



**ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΚΡΗΤΗΣ**

ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΚΑΙ
ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ & ΥΓΕΙΟΝΟΜΙΚΗ
ΜΗΧΑΝΙΚΗ»

Διδακτορική διατριβή

*Αδρανοποίηση παθογόνων μικροοργανισμών και
ιών και απομάκρυνση γονιδίων ανθεκτικότητας στα
αντιβιοτικά από λύματα τεχνητών υδροβιοτόπων*

Ανδρέας Καλιακάτσος

Χανιά 2021

αυτή η διατριβή είναι αφιερωμένη

στην οικογένεια μου

Εξεταστική Επιτροπή

Δανάη Βενιέρη (Αναπληρώτρια Καθηγήτρια) - Επιβλέπουσα
Σχολή Χημικών Μηχανικών και Μηχανικών Περιβάλλοντος – Πολυτεχνείο Κρήτης

Νικόλαος Καλογεράκης (Καθηγητής) - Συμβουλευτική Επιτροπή
Σχολή Χημικών Μηχανικών και Μηχανικών Περιβάλλοντος – Πολυτεχνείο Κρήτης

Θρασύβουλος Μανιός (Καθηγητής) - Συμβουλευτική Επιτροπή
Ελληνικό Μεσογειακό Πανεπιστήμιο

Ελευθερία Ψυλλάκη (Καθηγήτρια) - Εξεταστική Επιτροπή
Σχολή Χημικών Μηχανικών και Μηχανικών Περιβάλλοντος – Πολυτεχνείο Κρήτης

Πέτρος Γκίκας (Καθηγητής) - Εξεταστική Επιτροπή
Σχολή Χημικών Μηχανικών και Μηχανικών Περιβάλλοντος – Πολυτεχνείο Κρήτης

Νικόλαος Ξεκουκουλωτάκης (Επίκουρος Καθηγητής) - Εξεταστική Επιτροπή
Σχολή Χημικών Μηχανικών και Μηχανικών Περιβάλλοντος – Πολυτεχνείο Κρήτης

Διονύσιος Μαντζαβίνος (Καθηγητής) - Εξεταστική Επιτροπή
Τμήμα Χημικών Μηχανικών - Πανεπιστήμιο Πατρών

Ευχαριστίες

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή κ. Νικόλαο Καλογεράκη για την ευκαιρία που μου έδωσε να ξεκινήσω την διδακτορική διατριβή και για τους απαιτούμενους οικονομικούς πόρους τους οποίους εξασφάλισε για την ολοκλήρωση του προγράμματος. Ήταν μεγάλη μου τιμή που συνεργάστηκα μαζί του.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω και να σημειώσω τη μεγάλη εκτίμηση μου στην επιβλέπουσα καθηγήτρια κα. Δανάη Βενιέρη για την άψογη συνεργασία μας, τις πολύ σημαντικές συμβουλές και την καθοδήγηση της καθόλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής, όπως επίσης και για την υπομονή της.

Θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Θρασύβουλο Μανιό και το εργαστήριο Αξιοποίησης Φυσικών Πόρων και Γεωργικής Μηχανικής του Μεσογειακού Πανεπιστημίου Ηρακλείου για τη παροχή των συστημάτων επεξεργασίας και τη φιλοξενία στο εργαστήριο για όσο διάστημα χρειάστηκε.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής:

Ελευθερία Ψυλλάκη (Καθηγήτρια), Σχολή Χημικών Μηχανικών & Μηχανικών Περιβάλλοντος – Πολυτεχνείο Κρήτης

Πέτρο Γκίκα (Καθηγητής), Σχολή Χημικών Μηχανικών & Μηχανικών Περιβάλλοντος – Πολυτεχνείο Κρήτης

Νικόλαο Ξεκουκουλωτάκη (Επίκουρος Καθηγητής), Σχολή Χημικών Μηχανικών & Μηχανικών Περιβάλλοντος – Πολυτεχνείο Κρήτης

Διονύσιο Μαντζαβίνο (Καθηγητής), Τμήμα Χημικών Μηχανικών - Πανεπιστήμιο Πατρών

για την συμφωνία τους να συμμετάσχουν στην εξεταστική επιτροπή και για το χρόνο τους.

Ξεχωριστά θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Ιωσηφίνα Γουνάκη για την όμορφη συνεργασία μας, την πολύτιμη βοήθεια της, τις συμβουλές της και τις εμπειρικές εργαστηριακές γνώσεις που μου μετέδωσε.

Οφείλω να ευχαριστήσω το Εργαστήριο Βιοχημικής Μηχανικής και Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας του Πολυτεχνείου Κρήτης και την κα. Παντίδου για τη βοήθεια της όπου χρειάστηκε. Επίσης τον κ. Φουντουλάκη Μιχάλη για τη συνεργασία μας και τη

βοήθεια του στο χώρο των υδροβιοτόπων. Επίσης, τον κ. Μπίνα Βασίλη από το Ινστιτούτο Ηλεκτρονικής Δομής και Λείζερ (IESL) και την κα. Αθανασία Πεταλά από το Εργαστήριο Ετερογενούς Φωτοκατάλυσης στο Τμήμα Χημικών Μηχανικών του Πανεπιστημίου Πατρών για την παροχή των καταλυτών.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω των Σταύρο Χριστοφιλόπουλο για τη συμβολή του στο στήσιμο των πειραμάτων και τη συνεργασία μας στη συγγραφή άρθρων, και την Κασσάνδρα Κουμάκη για τη συνεργασία μας σε μέρος των πειραμάτων και τη συγγραφή άρθρων.

Ευχαριστώ τους δικούς μου για τη στήριξη τους.



Special Acknowledgments:

Funding by the European Union FP-7 project **WATER4CROPS**, (grant agreement No. 311933) is highly appreciated.

Περιεχόμενα

.....	1
Συνοπτομογραφίες	i
Abstract	ii
Περίληψη	iv
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑΣ	1
1.1 Εισαγωγή	1
1.2 Σκοπός και καινοτομία	3
2 ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ	6
2.1 Μικροβιολογικοί δείκτες ποιότητας νερού	6
2.2 Βακτηριακοί δείκτες	6
2.3 Νομοθεσία	7
2.4 Βακτηριοφάγοι	8
2.5 Ιοί	12
2.5.1 Ιοί εντερικής προέλευσης	12
2.5.2 Εντεροϊοί	15
2.5.3 Αδενοϊοί	16
2.6 Ανθεκτικά βακτήρια σε αντιβιοτικά και γονίδια ανθεκτικότητας	17
2.7 Μονάδες επεξεργασίας λυμάτων	20
2.7.1 Παρουσία ιών στις μονάδες επεξεργασίας	21
2.7.2 ARB και ARGs στις μονάδες επεξεργασίας	22
3 ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α. ΤΕΧΝΗΤΟΙ ΥΔΡΟΒΙΟΤΟΠΟΙ	26
3.1 Εισαγωγή	26
3.2 Σχεδιασμός	29
3.3 Απομάκρυνση παθογόνων μικροοργανισμών	30
3.4 Πειραματικός σχεδιασμός	32
3.4.1 Υδροβιότοποι Ηράκλειου	32
3.4.2 Υδροβιότοπος Χανίων	35
3.4.3 Δειγματοληψίες	36
3.4.4 Αναλύσεις	36
3.5 Αποτελέσματα – Υδροβιότοποι (FWS – HSSF 1 – HSSF 2) ως συστήματα δευτεροβάθμιας επεξεργασίας για την απομάκρυνση μικροοργανισμών	43
3.5.1 Απομάκρυνση βακτηριακών δεικτών κοπρανώδους μόλυνσης	43

3.5.2	Απομάκρυνση βακτηριοφάγων MS2	46
3.5.3	Αδρανοποίηση ιών	48
3.6	Ανάλυση αποτελεσμάτων με χρήση στοχαστικών μοντέλων	54
3.6.1	Αποτελέσματα.....	55
3.7	Ανάλυση παλινδρόμησης με συμπερασματολογία Bayes για εκτίμηση και σύγκριση της αποτελεσματικότητας των συστημάτων ως προς τη μείωση των ιών. 56	
3.7.1	Το πρόβλημα.....	56
3.7.2	Μπεϋζιανή Θεωρία (Bayes Theorem)	58
3.7.3	Μπεϋζιανή γραμμική παλινδρόμηση (Bayesian Linear Regression)	60
3.7.4	Μεθοδολογία – Μοντέλο	61
3.7.5	Αποτελέσματα.....	66
3.8	Συζήτηση αποτελεσμάτων - Αξιολόγηση υδροβιοτόπων ως συστημάτων δευτεροβάθμιας επεξεργασίας για την απομάκρυνση μικροοργανισμών.....	83
3.9	Αποτελέσματα – Έλεγχος ανθεκτικότητας των απομονωμένων βακτηριακών δεικτών σε αντιβιοτικά και έλεγχος ARGs	92
3.9.1	Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση αντιβιοτικών (Minimum Inhibitory Concentration – MIC)	92
3.9.2	Γονίδια ανθεκτικότητας στα απομονωμένα στελέχη βακτηρίων	98
3.10	Ανάλυση πολλαπλής παλινδρόμησης.....	101
3.10.1	Αποτελέσματα.....	102
3.11	ARGs στο ολικό βακτηριακό DNA του λύματος.....	128
3.11.1	Ποσοτικοποίηση γονιδίων σε διαφορετικού τύπου γενετικό υλικό	129
3.12	Συζήτηση αποτελεσμάτων – Αξιολόγηση των υδροβιοτόπου ως προς την απομάκρυνση ARB και ARGs.....	130
3.13	Αποτελέσματα – Υδροβιοτόποι (Control – HSSF HRT1D- HSSF2D) ως συστήματα τριτοβάθμιας επεξεργασίας για την απομάκρυνση παθογόνων.....	135
3.13.1	Απομάκρυνση βακτηριακών δεικτών κοπρανώδους μόλυνσης Βακτηριακή ανάλυση.....	135
3.13.2	Βακτηριοφάγοι.....	136
3.13.3	Αδρανοποίηση Ιών.....	138
3.14	Συζήτηση αποτελεσμάτων - Αξιολόγηση υδροβιοτόπου ως συστήματος τριτοβάθμιας επεξεργασίας για την απομάκρυνση μικροοργανισμών	139
3.15	Αποτελέσματα - Έλεγχος ανθεκτικότητας των απομονωμένων βακτηριακών δεικτών σε αντιβιοτικά και έλεγχος ARGs	140

3.15.1	Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (Minimum Inhibitory Concentration – MIC)	140
3.15.2	Γονίδια ανθεκτικότητας στα απομονωμένα στελέχη βακτηρίων	146
3.16	Αποτελέσματα - Ανάλυση παλινδρόμησης	150
3.16.1	Ανάλυση παλινδρόμηση - Στελέχη <i>E. coli</i>	150
3.16.2	Ανάλυση κυρίων συνιστωσών PCA – <i>E. coli</i>	162
3.16.3	Ανάλυση παλινδρόμησης - Στελέχη εντεροκόκκων	166
3.16.4	Ανάλυση κυρίων συνιστωσών PCA - Enterococci	177
3.16.5	Ποσοτικοποίηση γονιδίων σε διαφορετικού τύπου γενετικό υλικό	181
3.17	Συζήτηση αποτελεσμάτων - Αποτελεσματικότητα υδροβιοτόπου ως προς την απομάκρυνση ARB και ARGs	183
3.18	Συνολικά συμπεράσματα	188
4	ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β. ΦΩΤΟΚΑΤΑΛΥΣΗ	191
4.1	Εισαγωγή	191
4.2	Αδρανοποίηση μικροοργανισμών με ηλιακή ακτινοβολία	191
4.2.1	Επανενεργοποίηση των παθογόνων μικροοργανισμών	193
4.3	Προηγμένες Οξειδωτικές Μέθοδοι Αντιρρύπανσης	194
	Φωτοκατάλυση	195
4.4	Αδρανοποίηση μικροοργανισμών	198
4.5	Παράγοντες που επηρεάζουν τη φωτοκατάλυση και τη μικροβιακή αδρανοποίηση	199
4.5.1	Τύπος καταλύτη και επιφάνεια καταλύτη	199
4.5.2	Ένταση ακτινοβολίας	200
4.5.3	Συγκέντρωση καταλύτη	200
4.5.4	Διαλυμένες ουσίες και φυσικοχημικές ιδιότητες της υδατικής μήτρας	201
4.5.5	Ανόργανα ιόντα	202
4.5.6	Οργανικές ενώσεις	202
4.5.7	Φωτοκατάλυση σε πραγματικό λύμα	203
4.5.8	Φυσικός πληθυσμός μικροοργανισμών	203
4.5.9	TiO ₂	204
4.5.10	Ενίσχυση φωτοκαταλύτη/doping	205
4.5.11	CuO _x /BiVO ₄	207
4.5.12	Συστήματα ηλιακής φωτοκατάλυσης και απολύμανσης	209

4.5.13	Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα σε επίπεδο εφαρμογής.....	210
4.6	Πειραματικός σχεδιασμός	212
4.6.1	Λύμα	212
4.6.2	Φωτοκαταλύτες.....	212
4.6.2.1	Ενισχυμένο	213
4.6.3	Φωτοκατάλυση εργαστηριακής κλίμακας	219
4.6.4	Φωτοκατάλυση πιλοτικής κλίμακας	221
4.6.5	Μικροβιολογική ανάλυση.....	222
4.6.6	Μέτρηση της έντασης της ακτινοβολίας	223
4.6.7	Μέτρηση της δόσης ακτινοβολίας	224
4.6.8	Κινητική της απολύμανσης.....	224
4.7	Αποτελέσματα - Συζήτηση.....	225
4.7.1	Εργαστηριακές δοκιμές.....	225
4.7.2	Δοκιμές πιλοτικής κλίμακας (CPC).....	233
4.7.3	Απομάκρυνση ιών	245
4.7.4	Ποσοτικοποίηση γονιδίων σε διαφορετικού τύπου γενετικό υλικό	251
4.8	Σύγκριση εργαστηριακής- πιλοτικής κλίμακας	254
4.9	Συμπεράσματα	255
5	Σύγκριση συστημάτων.....	258
6	ΚΕΦΑΛΑΙΟ Γ. Εκτίμηση Επικινδυνότητας	261
6.1	Σενάρια εκτίμησης κινδύνου	265
6.2	Αποτελέσματα	268
6.2.1	Στατική προσέγγιση	268
6.2.2	Στοχαστική προσέγγιση	270
6.2.3	Συμπεράσματα	283
7	Επίλογος – Τελικά συμπεράσματα	285
	Βιβλιογραφικές αναφορές.....	287
	Παράρτημα.....	302

Πίνακες

Πίνακας 1. Οικογένειες και είδη ιών. Παρουσιάζεται το γενετικό υλικό τους και οι ασθένειες που μπορούν να προκαλέσουν.	13
Πίνακας 2. Χαρακτηρισμός λύματος εισροής συστημάτων Ηρακλείου (Christofilopoulos, 2017).	35
Πίνακας 3. Τιμές ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης για τις οποίες τα βακτήρια χαρακτηρίζονται ως ανθεκτικά. Οι τιμές είναι σε $\mu\text{g mL}^{-1}$	41
Πίνακας 4. Συγκεντρώσεις βακτηριακών δεικτών στις εισροές και εκροές των συστημάτων με τις αντίστοιχες τιμές απομάκρυνσης και απόδοσης.	46
Πίνακας 5. Ποσοστό συνολικών θετικών δειγμάτων αδενοϊών (AdV) και εντεροϊών (EV) στα σημεία δειγματοληψίας. WTPP: πρωτοβάθμιο λύμα, HSSF: εκροή υδροβιότοπου υποεπιφανειακής ροής, FWS: εκροή υδροβιότοπου ελεύθερης επιφάνειας.	48
Πίνακας 6. Ποσοστημόρια και δείκτης σχετικής διακύμανσης (CV) των κατανομών β από τα συστήματα 1 και 2 για τους αδενοϊούς.	73
Πίνακας 7. Ποσοστημόρια και δείκτης σχετικής διακύμανσης (CV) των κατανομών β από τα συστήματα 1 και 2 για τους εντεροϊούς.	81
Πίνακας 8. Παρουσία και μείωση ιών στην εκροή διαφορετικών μεθόδων επεξεργασίας. .	90
Πίνακας 9. Μέσες τιμές για την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση MIC_{60} ανά βακτήριο και αντιβιοτικό στα σημεία δειγματοληψίας: PW: πρωτοβάθμιο λύμα, HSSF: εκροή υδροβιότοπου υποεπιφανειακής ροής, SF: αμμόφιλτρο. S: ευαίσθητο στο αντιβιοτικό, R: ανθεκτικό στο αντιβιοτικό.	97
Πίνακας 10. Συσχετίσεις παραμέτρων στο μοντέλο για το αντιβιοτικό sulfomethoxazole. Estimate: η διαφορά της απομάκρυνσης του πληθυσμού από τη μέση τιμή, p - value: η τιμή σημαντικότητας.	103
Πίνακας 11. Συσχετίσεις παραμέτρων στο μοντέλο για το αντιβιοτικό ciprofloxacin. Estimate: η διαφορά της απομάκρυνσης του πληθυσμού από τη μέση τιμή, p value: η τιμή σημαντικότητας.	105
Πίνακας 12. Συσχετίσεις παραμέτρων στο μοντέλο για το αντιβιοτικό amoxicillin. Estimate: η διαφορά της απομάκρυνσης του πληθυσμού από τη μέση τιμή, p. value: η τιμή σημαντικότητας.	107
Πίνακας 13. Συσχετίσεις παραμέτρων στο μοντέλο για το αντιβιοτικό tetracycline. Estimate: η διαφορά της απομάκρυνσης του πληθυσμού από τη μέση τιμή, p. value: η τιμή σημαντικότητας.	109
Πίνακας 14. Συσχετίσεις παραμέτρων στο μοντέλο για το αντιβιοτικό sulfomethoxazole. Estimate: η διαφορά της απομάκρυνσης του πληθυσμού από τη μέση τιμή, p. value: η τιμή σημαντικότητας.	116
Πίνακας 15. Συσχετίσεις παραμέτρων στο μοντέλο για το αντιβιοτικό ciprofloxacin. Estimate: η διαφορά της απομάκρυνσης του πληθυσμού από τη μέση τιμή, p. value: η τιμή σημαντικότητας.	119
Πίνακας 16. Συσχετίσεις παραμέτρων στο μοντέλο για το αντιβιοτικό amoxicillin. Estimate: η διαφορά της απομάκρυνσης του πληθυσμού από τη μέση τιμή, p. value: η τιμή σημαντικότητας.	121

Πίνακας 17. Συσχετίσεις παραμέτρων στο μοντέλο για το αντιβιοτικό tetracycline. Estimate: η διαφορά της απομάκρυνσης του πληθυσμού από τη μέση τιμή, p. value: η τιμή σημαντικότητας.....	123
Πίνακας 18. Μέσες τιμές για την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση MIC ₆₀ ανά βακτήριο και αντιβιοτικό. Η τιμές είναι σε (mg mL ⁻¹) S: ευαίσθητο στο αντιβιοτικό, R: ανθεκτικό στο αντιβιοτικό	145
Πίνακας 19. Συσχετίσεις παραμέτρων στο μοντέλο για το αντιβιοτικό sulfomethoxazole. Estimate: η διαφορά της απομάκρυνσης του πληθυσμού από τη μέση τιμή, p. value: η τιμή σημαντικότητας.....	151
Πίνακας 20. Συσχετίσεις παραμέτρων στο μοντέλο για το αντιβιοτικό ciprofloxacin. Estimate: η διαφορά της απομάκρυνσης του πληθυσμού από τη μέση τιμή, p. value: η τιμή σημαντικότητας.....	153
Πίνακας 21. Συσχετίσεις παραμέτρων στο μοντέλο για το αντιβιοτικό amoxicillin. Estimate: η διαφορά της απομάκρυνσης του πληθυσμού από τη μέση τιμή, p. value: η τιμή σημαντικότητας.....	155
Πίνακας 22. Συσχετίσεις παραμέτρων στο μοντέλο για το αντιβιοτικό tetracycline. Estimate: η διαφορά της απομάκρυνσης του πληθυσμού από τη μέση τιμή, p. value: η τιμή σημαντικότητας.....	158
Πίνακας 23. Συσχετίσεις παραμέτρων στο μοντέλο για το αντιβιοτικό cefaclor. Estimate: η διαφορά της απομάκρυνσης του πληθυσμού από τη μέση τιμή, p. value: η τιμή σημαντικότητας.....	160
Πίνακας 24. Συσχετίσεις παραμέτρων στο μοντέλο για το αντιβιοτικό sulfomethoxazole. Estimate: η διαφορά της απομάκρυνσης του πληθυσμού από τη μέση τιμή, p. value: η τιμή σημαντικότητας.....	167
Πίνακας 25. Συσχετίσεις παραμέτρων στο μοντέλο για το αντιβιοτικό ciprofloxacin. Estimate: η διαφορά της απομάκρυνσης του πληθυσμού από τη μέση τιμή, p. value: η τιμή σημαντικότητας.....	169
Πίνακας 26. Συσχετίσεις παραμέτρων στο μοντέλο για το αντιβιοτικό amoxicillin. Estimate: η διαφορά της απομάκρυνσης του πληθυσμού από τη μέση τιμή, p. value: η τιμή σημαντικότητας.....	171
Πίνακας 27. Συσχετίσεις παραμέτρων στο μοντέλο για το αντιβιοτικό tetracycline. Estimate: η διαφορά της απομάκρυνσης του πληθυσμού από τη μέση τιμή, p. value: η τιμή σημαντικότητας.....	173
Πίνακας 28. Συσχετίσεις παραμέτρων στο μοντέλο για το αντιβιοτικό cefaclor. Estimate: η διαφορά της απομάκρυνσης του πληθυσμού από τη μέση τιμή, p. value: η τιμή σημαντικότητας.....	175
Πίνακας 29. Οι διαφορετικοί συνδυασμοί των ημιαγωγών που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε δοκιμασία (Ε.Κ.: εργαστηριακή κλίμακα, CPC: πιλοτική κλίμακα)	212
Πίνακας 30. Ενεργειακά χάσματα για το TiO ₂ ενισχυμένο με μέταλλα.....	217
Πίνακας 31. Εργαστηριακή κλίμακα: κινητικές σταθερές αδρανοποίησης <i>E. coli</i> και <i>E. faecalis</i> με τον καταλύτη CuOx/BiVO ₄	225
Πίνακας 32. Εργαστηριακή κλίμακα: κινητικές σταθερές αδρανοποίησης <i>E. coli</i> και <i>E. faecalis</i> με τον καταλύτη In/Fe (0,05:0,05), In/Fe (0,02:0,02), In/Fe (0,1:0,1), In/Fe (0,5:0,5), Mn/Co (0,04:0,04), Mn/Co (0,1:0,1), Al/Fe (0,02:0,02), Al/Fe (0,1:0,1), Al/Mn (0,1:0,1) και P25	229

Πίνακας 33. Κινητικές σταθερές του $\text{CuO}_x/\text{BiVO}_4$ (0,75, 1,5, 3 wt%) και P25 στον CPC με ροή 10 h^{-1}	234
Πίνακας 34. Κινητικές σταθερές του $\text{CuO}_x/\text{BiVO}_4$ (0,75, 1,5, 3 wt%) και P25 στον CPC με ροή 20 L h^{-1}	236
Πίνακας 35. Κινητικές σταθερές για την αδρανοποίηση του <i>E. coli</i> και <i>Enterococcus</i> sp. σε πιλοτική κλίμακα σε απουσία καταλύτη (SODIS) και με την χρήση P25 και διμερώς ενισχυμένου TiO_2 με διάφορους συνδυασμούς μετάλλων, με συγκέντρωση 0,1:0,1 wt%. Ροή λύματος: 10 L h^{-1}	239
Πίνακας 36. Κινητικές σταθερές για την αδρανοποίηση του <i>E. coli</i> και <i>Enterococcus</i> sp. σε πιλοτική κλίμακα σε απουσία καταλύτη (SODIS) και με την χρήση P25 και διμερώς ενισχυμένου TiO_2 με διάφορους συνδυασμούς μετάλλων, με συγκέντρωση 0,1:0,1 wt%. Ροή λύματος: 20 L h^{-1}	241
Πίνακας 37. Ποσοστό αδρανοποίησης % των <i>E. coli</i> και <i>Enterococcus</i> sp, σε πιλοτική κλίμακα, με ροή 10 και 20 L h^{-1} , για $t_{30W}=50-60 \text{ min}$	243
Πίνακας 38. Σύγκριση τριτογενών συστημάτων επεξεργασίας ως προς την δυνατότητα απομάκρυνσης μικροοργανισμών και γονιδίων ανθεκτικότητας. HSSF: υδροβιότοπος υποεπιφανειακής ροής με υδραυλικό χρόνο παραμονής 2 ημέρες, CPC: αντιδραστήρας με ανακλαστές αλουμινίου, ARGs: γονίδια ανθεκτικότητας, eDNA: εξωκυτταρικό γενετικό υλικό.....	258
Πίνακας 39. Σύγκριση των μονάδων ως ολοκληρωμένων συστημάτων επεξεργασίας. Οι τιμές αναφέρονται στις συγκεντρώσεις που παρατηρήθηκαν στις τελικές εκροές των συστημάτων ανά λίτρο. HSSF: υδροβιότοπος υποεπιφανειακής ροής, IU: μονάδα αδρανοποίησης, CPC: αντιδραστήρας με ανακλαστές αλουμινίου, ARGs: γονίδια ανθεκτικότητας, eDNA: εξωκυτταρικό γενετικό υλικό.	260
Πίνακας 40. Βήματα κα σκοπός κάθε βήματος στη αξιολόγηση μικροβιακού κινδύνου. ...	261
Πίνακας 41. Παράμετροι μικροοργανισμών για την εκτίμηση κινδύνου.....	263
Πίνακας 42. Στοιχεία καταναλώσεων όγκου νερού ανά περίπτωση για την εκτίμηση κινδύνου.....	267

Γραφήματα

Γράφημα 1. Συγκεντρώσεις βακτηριακών δεικτών στις εκροές του Σύστηματος 1. Οι τιμές είναι σε μέσους όρους με το στατιστικό σφάλμα. Με * σημειώνονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$).....	44
Γράφημα 2. Συγκεντρώσεις βακτηριακών δεικτών στις εκροές του Σύστηματος 2. Οι τιμές είναι σε μέσους όρους με το στατιστικό σφάλμα. Με * σημειώνονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$).....	44
Γράφημα 3. Συγκεντρώσεις MS2 φάγων στις εκροές του Σύστηματος 2. Οι τιμές είναι σε μέσους όρους με το στατιστικό σφάλμα. Με * σημειώνονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$).	47
Γράφημα 4. Συγκεντρώσεις ιών στις εκροές των συστημάτων S1 και S2. Παρουσιάζονται οι μέσες τιμές με τα στατιστικά σφάλματα. Με * σημειώνονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$).	49

Γράφημα 5. Συγκεντρώσεις αδενοϊών και τιμές θερμοκρασίας ανά δειγματοληψία. Η διακεκομμένη γραμμή αναφέρεται στην αλλαγή του συστήματος.	50
Γράφημα 6. Συγκεντρώσεις εντεροϊών και τιμές θερμοκρασίας ανά δειγματοληψία. Η διακεκομμένη γραμμή αναφέρεται στην αλλαγή του συστήματος.	51
Γράφημα 7. Συγκεντρώσεις ιών και MS2 φάγων. Οι τιμές είναι σε μέσους όρους με το στατιστικό σφάλμα.	52
Γράφημα 8. Μεμονωμένες συγκεντρώσεις ιών και MS2 φάγων στην εκροή του HSSF του Συστήματος 2.	53
Γράφημα 9. Γραφήματα συσχετίσεων. Στο α) παρουσιάζονται οι συσχετίσεις και στο β) οι στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις με $p\text{-value} < 0.05$	53
Γράφημα 10. Ιστογράμματα της απόδοσης απομάκρυνσης των βακτηρίων <i>E. coli</i> και <i>Enterococci</i> των συστημάτων 1 και 2 των μονάδων Ηρακλείου. α. Απομάκρυνση <i>E. coli</i> συστήματος 1, β. Απομάκρυνση <i>enterococci</i> συστήματος 1, γ. Απομάκρυνση <i>E. coli</i> συστήματος 2, δ. Απομάκρυνση <i>enterococci</i> συστήματος 2. Στους πίνακες παρουσιάζονται τα ποσοστιαία σημεία.	55
Γράφημα 11. Scatter plots α) συγκέντρωσης εισόδου – συγκέντρωσης εξόδου, β) συγκέντρωσης εισόδου – απόδοσης γ) συγκέντρωσης εισόδου - συγκέντρωσης μείωσης για τους αδενοϊούς του Συστήματος 1.	62
Γράφημα 12. Scatter plots α) συγκέντρωσης εισόδου – συγκέντρωσης εξόδου, β) συγκέντρωσης εισόδου – απόδοσης γ) συγκέντρωσης εισόδου - συγκέντρωσης μείωσης για τους αδενοϊούς του Συστήματος 2.	62
Γράφημα 13. Scatter plots α) συγκέντρωσης εισόδου – συγκέντρωσης εξόδου, β) συγκέντρωσης εισόδου – απόδοσης γ) συγκέντρωσης εισόδου - συγκέντρωσης μείωσης για τους εντεροϊούς του Συστήματος 1.	63
Γράφημα 14. Scatter plots α) συγκέντρωσης εισόδου – συγκέντρωσης εξόδου, β) συγκέντρωσης εισόδου – απόδοσης γ) συγκέντρωσης εισόδου - συγκέντρωσης μείωσης για τους εντεροϊούς του Συστήματος 2.	63
Γράφημα 15. Κατανομή prior και posterior για την απόδοση τους συστήματος 1 ως προς του αδενοϊούς.	67
Γράφημα 16. Κατανομή prior και posterior για την απόδοση τους συστήματος 1 ως προς του αδενοϊούς.	67
Γράφημα 17. Καμπύλες πυκνοτήτων της κατανομής β με κόκκινο και σ με μπλε για την απόδοση των συστημάτων 1 και 2 ως προς την απομάκρυνση αδενοϊών. Η μπλε κάθετη γραμμή δείχνει την επικρατούσα τιμή.	68
Γράφημα 18. Απεικόνιση επικάλυψης κατανομών β του συστήματος 1 με μπλε γραμμή και 2 με μαύρη και κατανομή β συστήματος 2 με κόκκινη γραμμή και 1 με μαύρη γραμμή.	69
Γράφημα 19. Αξιόπιστο διάστημα 89% για την απόδοση του συστήματος 1 για τους αδενοϊούς.	70
Γράφημα 20. Αξιόπιστο διάστημα 89% για την απόδοση του συστήματος 2 για τους αδενοϊούς.	71
Γράφημα 21. Box Plots α) συστήματος 1 και β) συστήματος 2 για τους αδενοϊούς.	72
Γράφημα 22. Εκτιμώμενες και αναμενόμενες τιμές μείωσης αδενοϊών για το σύστημα 1... ..	74
Γράφημα 23. Εκτιμώμενες και αναμενόμενες τιμές μείωσης αδενοϊών για το σύστημα 2... ..	74
Γράφημα 24. Κατανομή prior και posterior για την απόδοση τους συστήματος 1 ως προς του εντεροϊούς.	76

Γράφημα 25. Κατανομή prior και posterior για την απόδοση τους συστήματος 2 ως προς του εντεροϊούς.....	76
Γράφημα 26. Καμπύλες πυκνοτήτων της κατανομής β με κόκκινο και σ με μπλε για την απόδοση των συστημάτων 1 και 2 ως προς την απομάκρυνση εντεροϊών. Η μπλε κάθετη γραμμή δείχνει την επικρατούσα τιμή.	77
Γράφημα 27. Απεικόνιση επικάλυψης κατανομών β του συστήματος 1 με μπλε γραμμή και 2 με μαύρη και κατανομή β συστήματος 2 με κόκκινη γραμμή και 1 με μαύρη γραμμή.....	78
Γράφημα 28. Αξιόπιστο διάστημα 89% για την απόδοση του συστήματος 1 και 2 για τους εντεροϊούς.....	79
Γράφημα 29. Box Plots συστήματος 1 και συστήματος 2 για τους εντεροϊούς.	80
Γράφημα 30. Εκτιμώμενες και αναμενόμενες τιμές μείωσης εντεροϊών για το σύστημα 1.	82
Γράφημα 31. Εκτιμώμενες και αναμενόμενες τιμές μείωσης εντεροϊών για το σύστημα 2.	82
Γράφημα 32. Density plots της μείωσης % του πληθυσμού <i>E. coli</i> μετά την έκθεση σε αντιβιοτικά ανά μονάδα επεξεργασίας. Η διακεκομμένη γραμμή δείχνει το σημείο που η μείωση του πληθυσμού είναι 60%.	93
Γράφημα 33. Μέσες τιμές της μείωσης % του πληθυσμού των στελεχών <i>E.coli</i> από τις εκροές των μονάδων επεξεργασίας για κάθε συγκέντρωση αντιβιοτικού. Η διακεκομμένη γραμμή δείχνει το σημείο μείωσης 60% του βακτηριακού πληθυσμού και η γαλάζια σκιαγραφημένη περιοχή τις τιμές όπου η συγκέντρωση χαρακτηρίζει το βακτήριο ως ευαίσθητο.....	94
Γράφημα 34. Density plots της μείωσης % του πληθυσμού των στελεχών enterococci μετά την έκθεση σε αντιβιοτικά ανά μονάδα επεξεργασίας. Η διακεκομμένη γραμμή δείχνει το σημείο που η μείωση του πληθυσμού είναι 60%.....	95
Γράφημα 35. Μέσες τιμές της μείωσης % του πληθυσμού των στελεχών εντερόκοκκων από την εκροές των μονάδων επεξεργασίας για κάθε συγκέντρωση αντιβιοτικού. Η διακεκομμένη γραμμή δείχνει το σημείο μείωσης 60% και η γαλάζια περιοχή τις τιμές όπου η συγκέντρωση χαρακτηρίζει το βακτήριο ως ευαίσθητο.....	96
Γράφημα 36. Συγκεντρώσεις γονιδίων ανθεκτικότητας από τα απομονωμένα στελέχη <i>E. coli</i>	99
Γράφημα 37. Συγκεντρώσεις γονιδίων ανθεκτικότητας από τα απομονωμένα στελέχη εντερόκοκκων.....	100
Γράφημα 38. QQ-plot και παράμετροι για την προσαρμογή του μοντέλου SMX.....	103
Γράφημα 39. Γράφημα πρόβλεψης για το SMX. Οι τελείες δείχνουν τις τιμές πρόβλεψης και οι γραμμές ενώνουν τις μέσες τιμές πρόβλεψης για κάθε μέθοδο επεξεργασίας.	104
Γράφημα 40. QQ-plot και παράμετροι για την προσαρμογή του μοντέλου CIP.	105
Γράφημα 41. Γράφημα πρόβλεψης για το CIP. Οι τελείες δείχνουν τις τιμές πρόβλεψης και οι γραμμές ενώνουν τις μέσες τιμές πρόβλεψης για κάθε μέθοδο επεξεργασίας.	106
Γράφημα 42. QQ-plot και παράμετροι για την προσαρμογή του μοντέλου AMOX.....	107
Γράφημα 43. Γράφημα πρόβλεψης για το AMOX. Οι τελείες δείχνουν τις τιμές πρόβλεψης και οι γραμμές ενώνουν τις μέσες τιμές πρόβλεψης για κάθε μέθοδο επεξεργασίας.	108
Γράφημα 44. QQ-plot και παράμετροι για την προσαρμογή του μοντέλου TET.	109
Γράφημα 45. Γράφημα πρόβλεψης για το TET. Οι τελείες δείχνουν τις τιμές πρόβλεψης και οι γραμμές ενώνουν τις μέσες τιμές πρόβλεψης για κάθε μέθοδο επεξεργασίας.	110
Γράφημα 46. Ανάλυση PCA του πληθυσμού <i>E.coli</i> σχετικά με τον έλεγχο ανθεκτικότητας στο SMX. για την επεξεργασία με το αντιβιοτικό SMX.	112

Γράφημα 47. Ανάλυση PCA του πληθυσμού <i>E.coli</i> σχετικά με τον έλεγχο ανθεκτικότητας στο CIP.....	113
Γράφημα 48. Ανάλυση PCA του πληθυσμού <i>E.coli</i> σχετικά με τον έλεγχο ανθεκτικότητας στο AMOX.	114
Γράφημα 49. Ανάλυση PCA του πληθυσμού <i>E. coli</i> σχετικά με τον έλεγχο ανθεκτικότητας στο TET.....	115
Γράφημα 50. QQ-plot και παράμετροι για την προσαρμογή του μοντέλου SMX.....	116
Γράφημα 51. Γράφημα πρόβλεψης για το SMX. Οι τελείες δείχνουν τις τιμές πρόβλεψης και οι γραμμές ενώνουν τις μέσες τιμές πρόβλεψης για κάθε μέθοδο επεξεργασίας.....	117
Γράφημα 52. QQ-plot και παράμετροι για την προσαρμογή του μοντέλου CIP.....	118
Γράφημα 53. Γράφημα πρόβλεψης για το CIP. Οι τελείες δείχνουν τις τιμές πρόβλεψης και οι γραμμές ενώνουν τις μέσες τιμές πρόβλεψης για κάθε μέθοδο επεξεργασίας.....	120
Γράφημα 54. QQ-plot και παράμετροι για την προσαρμογή του μοντέλου AMOX.....	120
Γράφημα 55. Γράφημα πρόβλεψης για το AMOX. Οι τελείες δείχνουν τις τιμές πρόβλεψης και οι γραμμές ενώνουν τις μέσες τιμές πρόβλεψης για κάθε μέθοδο επεξεργασίας.....	122
Γράφημα 56. QQ-plot και παράμετροι για την προσαρμογή του μοντέλου TET.	123
Γράφημα 57. Γράφημα πρόβλεψης για το CIP. Οι τελείες δείχνουν τις τιμές πρόβλεψης και οι γραμμές ενώνουν τις μέσες τιμές πρόβλεψης για κάθε μέθοδο επεξεργασίας.....	124
Γράφημα 58. Ανάλυση PCA του πληθυσμού των εντερόκοκκων για την επεξεργασία με το αντιβιοτικό SMX.	125
Γράφημα 59. Ανάλυση PCA του πληθυσμού των εντερόκοκκων για την επεξεργασία με το αντιβιοτικό CIP.	126
Γράφημα 60. Ανάλυση PCA του πληθυσμού των εντερόκοκκων για την επεξεργασία με το αντιβιοτικό AMOX.....	127
Γράφημα 61. Ανάλυση PCA του πληθυσμού των εντερόκοκκων για την επεξεργασία με το αντιβιοτικό TET.....	128
Γράφημα 62. Συγκεντρώσεις γονιδίων ανθεκτικότητας στο ολικό βακτηριακό DNA πριν και μετά την επεξεργασία από το υδροβιότοπο υποεπιφανειακής ροής HSSF.	129
Γράφημα 63. Συγκεντρώσεις γονιδίων ανθεκτικότητας σε ελεύθερο γενετικό υλικό, σε γενετικό υλικό φάγων και ολικό βακτηριακό γενετικό υλικό.....	130
Γράφημα 64. Συγκεντρώσεις βακτηριακών δεικτών στις εκροές των επεξεργασιών. Οι τιμές είναι σε μέσους όρους με το στατιστικό σφάλμα. Με * παρουσιάζονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$).....	136
Γράφημα 65. Συγκέντρωση MS2 βακτηριοφάγων στις εκροές των επεξεργασιών. Οι τιμές είναι σε μέσους όρους με το στατιστικό σφάλμα. Με * παρουσιάζονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$).....	137
Γράφημα 66. Συγκεντρώσεις ιών και φάγων στα σημεία δειγματοληψίας. Οι τιμές παρουσιάζονται σε μέσους όρους με το στατιστικό σφάλμα.	138
Γράφημα 67. Density plots της μείωσης % του πληθυσμού <i>E. coli</i> μετά την έκθεση σε αντιβιοτικά ανά μονάδα επεξεργασίας. Η διακεκομμένη γραμμή δείχνει το σημείο που η μείωση του πληθυσμού είναι 60%.	141
Γράφημα 68. Μέσες τιμές της μείωσης % του πληθυσμού των στελεχών <i>E.coli</i> από τις εκροές των μονάδων επεξεργασίας για κάθε συγκέντρωση αντιβιοτικού. Η διακεκομμένη γραμμή δείχνει το σημείο μείωσης 60% του βακτηριακού πληθυσμού και η γαλάζια	

σκιαγραφημένη περιοχή τις τιμές όπου η συγκέντρωση χαρακτηρίζει το βακτήριο ως ευαίσθητο.....	142
Γράφημα 69. Density plot της μείωσης του πληθυσμού εντερόκοκκων μετά από έκθεση στα αντιβιοτικά και ανά μονάδα επεξεργασίας. Η διακεκομμένη γραμμή δείχνει το σημείο που η μείωση του πληθυσμού είναι 60%.	143
Γράφημα 70. Μέσες τιμές της μείωσης του πληθυσμού των στελεχών εντεροκόκκων από την εκροές των μονάδων επεξεργασίας για κάθε συγκέντρωση αντιβιοτικού. Η διακεκομμένη γραμμή δείχνει το σημείο μείωσης 60% και η γαλάζια περιοχή τις τιμές όπου η συγκέντρωση χαρακτηρίζει το βακτήριο ως ευαίσθητο.....	144
Γράφημα 71. Συγκεντρώσεις γονιδίων ανθεκτικότητας από τα απομονωμένα στελέχη <i>E. coli</i> . Οι τιμές είναι σε μέσους όρους με το στατιστικό σφάλμα.....	148
Γράφημα 72. Συγκεντρώσεις γονιδίων ανθεκτικότητας από τα απομονωμένα στελέχη εντερόκοκκων. Οι τιμές είναι σε μέσους όρους με το στατιστικό σφάλμα.	150
Γράφημα 73. QQ-plot και παράμετροι για την προσαρμογή του μοντέλου SMX.....	151
Γράφημα 74. Γράφημα πρόβλεψης για το SMX. Οι τελείες δείχνουν τις τιμές πρόβλεψης και οι γραμμές ενώνουν τις μέσες τιμές πρόβλεψης για κάθε μέθοδο επεξεργασίας.....	152
Γράφημα 75. QQ-plot και παράμετροι για την προσαρμογή του μοντέλου CIP.....	153
Γράφημα 76. Γράφημα πρόβλεψης για το CIP. Οι τελείες δείχνουν τις τιμές πρόβλεψης και οι γραμμές ενώνουν τις μέσες τιμές πρόβλεψης για κάθε μέθοδο επεξεργασίας.....	154
Γράφημα 77. QQ-plot και παράμετροι για την προσαρμογή του μοντέλου AMOX.....	155
Γράφημα 78. Γράφημα πρόβλεψης για το AMOX. Οι τελείες δείχνουν τις τιμές πρόβλεψης και οι γραμμές ενώνουν τις μέσες τιμές πρόβλεψης για κάθε μέθοδο επεξεργασίας.....	157
Γράφημα 79. QQ-plot και παράμετροι για την προσαρμογή του μοντέλου TET.	157
Γράφημα 80. Γράφημα πρόβλεψης για το TET. Οι τελείες δείχνουν τις τιμές πρόβλεψης και οι γραμμές ενώνουν τις μέσες τιμές πρόβλεψης για κάθε μέθοδο επεξεργασίας.....	159
Γράφημα 81. QQ-plot και παράμετροι για την προσαρμογή του μοντέλου CEF.	159
Γράφημα 82. Γράφημα πρόβλεψης για το CEF. Οι τελείες δείχνουν τις τιμές πρόβλεψης και οι γραμμές ενώνουν τις μέσες τιμές πρόβλεψης για κάθε μέθοδο επεξεργασίας.....	161
Γράφημα 83. Ανάλυση PCA του πληθυσμού των εντερόκοκκων για την επεξεργασία με το αντιβιοτικό SMX.	162
Γράφημα 84. Ανάλυση PCA του πληθυσμού των εντερόκοκκων για την επεξεργασία με το αντιβιοτικό CIP.	163
Γράφημα 85. Ανάλυση PCA του πληθυσμού των εντερόκοκκων για την επεξεργασία με το αντιβιοτικό AMOX.....	164
Γράφημα 86. Ανάλυση PCA του πληθυσμού των εντερόκοκκων για την επεξεργασία με το αντιβιοτικό TET.....	165
Γράφημα 87. Ανάλυση PCA του πληθυσμού των εντερόκοκκων για την επεξεργασία με το αντιβιοτικό CEF.....	166
Γράφημα 88. QQ-plot και παράμετροι για την προσαρμογή του μοντέλου SMX.....	167
Γράφημα 89. Γράφημα πρόβλεψης για το SMX. Οι τελείες δείχνουν τις τιμές πρόβλεψης και οι γραμμές ενώνουν τις μέσες τιμές πρόβλεψης για κάθε μέθοδο επεξεργασίας.....	168
Γράφημα 90. QQ-plot και παράμετροι για την προσαρμογή του μοντέλου CIP.....	169
Γράφημα 91. Γράφημα πρόβλεψης για το CIP. Οι τελείες δείχνουν τις τιμές πρόβλεψης και οι γραμμές ενώνουν τις μέσες τιμές πρόβλεψης για κάθε μέθοδο επεξεργασίας.....	170
Γράφημα 92. QQ-plot και παράμετροι για την προσαρμογή του μοντέλου AMOX.....	170

Γράφημα 93. Γράφημα πρόβλεψης για το AMOX. Οι τελείες δείχνουν τις τιμές πρόβλεψης και οι γραμμές ενώνουν τις μέσες τιμές πρόβλεψης για κάθε μέθοδο επεξεργασίας.	172
Γράφημα 94. QQ-plot και παράμετροι για την προσαρμογή του μοντέλου TET.	173
Γράφημα 95. Γράφημα πρόβλεψης για το TET. Οι τελείες δείχνουν τις τιμές πρόβλεψης και οι γραμμές ενώνουν τις μέσες τιμές πρόβλεψης για κάθε μέθοδο επεξεργασίας.	174
Γράφημα 96. QQ-plot και παράμετροι για την προσαρμογή του μοντέλου CEF.	175
Γράφημα 97. Γράφημα πρόβλεψης για το TET. Οι τελείες δείχνουν τις τιμές πρόβλεψης και οι γραμμές ενώνουν τις μέσες τιμές πρόβλεψης για κάθε μέθοδο επεξεργασίας.	176
Γράφημα 98. Ανάλυση PCA του πληθυσμού των εντερόκοκκων για την επεξεργασία με το αντιβιοτικό SMX.	177
Γράφημα 99. Ανάλυση PCA του πληθυσμού των εντερόκοκκων για την επεξεργασία με το αντιβιοτικό CIP.	178
Γράφημα 100. Ανάλυση PCA του πληθυσμού των εντερόκοκκων για την επεξεργασία με το αντιβιοτικό AMOX.	179
Γράφημα 101. Ανάλυση PCA του πληθυσμού των εντερόκοκκων για την επεξεργασία με το αντιβιοτικό TET.	180
Γράφημα 102. Ανάλυση PCA του πληθυσμού των εντερόκοκκων για την επεξεργασία με το αντιβιοτικό CEF.	181
Γράφημα 103. Συγκεντρώσεις γονιδίων ανθεκτικότητας σε διαφορετικού τύπο γενετικό υλικό στις εκροές των επεξεργασιών. Οι τιμές παρουσιάζονται σε μέσους όρους με το στατιστικό σφάλμα.	182
Γράφημα 104. Αδρανοποίηση <i>E. coli</i> σε εργαστηριακή κλίμακα με CuO _x /BiVO ₄ (0,75/ 1,5 και 3 wt%).	226
Γράφημα 105. Αδρανοποίηση <i>E. faecalis</i> σε εργαστηριακή κλίμακα με CuO _x /BiVO ₄ (0,75, 1,5 και 3 wt%).	226
Γράφημα 106. Αδρανοποίηση <i>E. coli</i> σε εργαστηριακή κλίμακα με την χρήση P25 και διμερώς ενισχυμένου TiO ₂ με In/Fe σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.	230
Γράφημα 107. Αδρανοποίηση <i>E. coli</i> σε εργαστηριακή κλίμακα με την χρήση P25 και διμερώς ενισχυμένου TiO ₂ με διάφορους συνδυασμούς μετάλλων, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.	231
Γράφημα 108. Αδρανοποίηση <i>E. faecalis</i> σε εργαστηριακή κλίμακα με την χρήση P25 και διμερώς ενισχυμένου TiO ₂ με διάφορους συνδυασμούς μετάλλων, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.	231
Γράφημα 109. Αδρανοποίηση <i>E. coli</i> με CuO _x /BiVO ₄ (0,75, 1,5, 3 wt%) και P25 στον CPC με ροή 10L h ⁻¹	235
Γράφημα 110. Αδρανοποίηση <i>Enterococcus</i> sp. με CuO _x /BiVO ₄ (0,75, 1,5, 3 wt%) και P25 στον CPC με ροή 10L h ⁻¹	236
Γράφημα 111. Αδρανοποίηση <i>E. coli</i> με CuO _x /BiVO ₄ (0,75, 1,5, 3 wt%) και P25 στον CPC με ροή 20L h ⁻¹ (CFU/100mL).	237
Γράφημα 112. Αδρανοποίηση <i>Enterococcus</i> sp. με CuO _x /BiVO ₄ (0,75, 1,5, 3 wt%) και P25 στον CPC με ροή 20L h ⁻¹	238
Γράφημα 113. Αδρανοποίηση του <i>E. coli</i> σε πιλοτική κλίμακα σε απουσία καταλύτη (SODIS) και με την χρήση P25 και διμερώς ενισχυμένου TiO ₂ με διάφορους συνδυασμούς μετάλλων, με συγκέντρωση 0,1:0,1 wt%. Ροή λύματος: 10L h ⁻¹	240

Γράφημα 114. Αδρανοποίηση του <i>Enterococcus</i> <i>sp</i> σε πιλοτική κλίμακα σε απουσία καταλύτη (SODIS) και με την χρήση P25 και διμερώς ενισχυμένου TiO ₂ με διάφορους συνδυασμούς μετάλλων, με συγκέντρωση 0,1:0,1 wt%. Ροή λύματος: 10L h ⁻¹	241
Γράφημα 115. Αδρανοποίηση του <i>E. coli</i> σε πιλοτική κλίμακα σε απουσία καταλύτη (SODIS) και με την χρήση P25 και διμερώς ενισχυμένου TiO ₂ με διάφορους συνδυασμούς μετάλλων, με συγκέντρωση 0,1:0,1 wt%. Ροή λύματος: 20L h ⁻¹	242
Γράφημα 116. Αδρανοποίηση του <i>Enterococcus</i> <i>sp</i> σε πιλοτική κλίμακα σε απουσία καταλύτη (SODIS) και με την χρήση P25 και διμερώς ενισχυμένου TiO ₂ με διάφορους συνδυασμούς μετάλλων, με συγκέντρωση 0,1:0,1 wt%. Ροή λύματος: 20L h ⁻¹	242
Γράφημα 117. Συγκέντρωση αδενοϊών και εντεροϊών πριν και μετά την επεξεργασία με τη μονάδα CPC και τους καταλύτες Al/Mn, In/Fe και Mn/Co.	246
Γράφημα 118. Συγκεντρώσεις γονιδίων ανθεκτικότητας σε εξωκυτταρικό γενετικό υλικό (eDNA) και γενετικό υλικό φάγων πριν και μετά την επεξεργασία με τη μονάδα CPC.	252
Γράφημα 119. Αναπηροσταθμισμένο έτος ζωής για το σενάριο 1. Η κόκκινη διακεκομμένη γραμμή δείχνει το αποδεκτό όριο σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας.	268
Γράφημα 120. Αναπηροσταθμισμένο έτος ζωής για το σενάριο 1 Χανίων. Η κόκκινη διακεκομμένη γραμμή δείχνει το αποδεκτό όριο σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας.	269
Γράφημα 121. Αναπηροσταθμισμένο έτος ζωής για το σενάριο 2 Χανίων. Η κόκκινη διακεκομμένη γραμμή δείχνει το αποδεκτό όριο σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας.	270
Γράφημα 122. Τυχαίες τιμές συγκέντρωσης παθογόνων στην είσοδο του συστήματος βάσει των δεδομένων των πειραμάτων.....	271
Γράφημα 123. Καμπύλη κατανομής της δόσης κατάποσης νερού.	272
Γράφημα 124. Καμπύλες πιθανότητες μόλυνσης ανάλογα με τη δόση βάσει του μοντέλου έκθεσης που ακολουθεί το κάθε παθογόνο.	273
Γράφημα 125. Τιμές πιθανότητας μόλυνσης από το κάθε παθογόνο για κάθε μέθοδο επεξεργασίας. Η διακεκομμένη γραμμή δείχνει το αποδεκτό όριο.....	274
Γράφημα 126. Τιμές πιθανότητας ασθένειας από το κάθε παθογόνο για κάθε μέθοδο επεξεργασίας. Η διακεκομμένη γραμμή δείχνει το αποδεκτό όριο.....	275
Γράφημα 127. Συνολικά DALYs που προκύπτουν από κάθε παθογόνο μετά την κάθε επεξεργασία. Με διακεκομμένη γραμμή είναι το αποδεκτό όριο.	276
Γράφημα 128. Τυχαίες τιμές συγκέντρωσης παθογόνων στην είσοδο του συστήματος βάσει των δεδομένων των πειραμάτων.....	277
Γράφημα 129. Καμπύλη κατανομής της δόσης κατάποσης νερού.	278
Γράφημα 130. Καμπύλες πιθανότητες μόλυνσης ανάλογα με τη δόση βάσει του μοντέλου έκθεσης που ακολουθεί το κάθε παθογόνο.	279
Γράφημα 131. Τιμές πιθανότητας μόλυνσης από το κάθε παθογόνο για κάθε μέθοδο επεξεργασίας. Η διακεκομμένη γραμμή δείχνει το αποδεκτό όριο.....	280
Γράφημα 132. Τιμές πιθανότητας ασθένειας από το κάθε παθογόνο για κάθε μέθοδο επεξεργασίας. Η διακεκομμένη γραμμή δείχνει το αποδεκτό όριο.....	281
Γράφημα 133. Συνολικά DALYs που προκύπτουν από κάθε παθογόνο μετά την κάθε επεξεργασία. Με διακεκομμένη γραμμή είναι το αποδεκτό όριο.	282

Εικόνες

Εικόνα 1. Τυπική δομή βακτηριοφάγων	9
Εικόνα 2. Κατηγοριοποίηση φάγων σε οικογένειες βάσει του γενετικού υλικού και χαρακτηριστικότερα παραδείγματα για κάθε κατηγορία (Ackermann, 2009).	10
Εικόνα 3. Ροή ιών από τις ανθρώπινες δραστηριότητες στο περιβάλλον και ροές επαναεισαγωγή τους στον άνθρωπο.	15
Εικόνα 4. Τυποί αδενοϊών και ασθένειες που μπορούν να προκαλέσουν. Τροποποίηση από Jiang et al. (Jiang, 2006).....	17
Εικόνα 5. Τρόποι μεταφοράς γονιδίων στα βακτήρια.....	19
Εικόνα 6. Ροές αντιβιοτικών και γονιδίων ανθεκτικότητας στο περιβάλλον (Kumar et al., 2020).....	20
Εικόνα 7. Απομάκρυνση ARGs σε κάθε στάδιο επεξεργασίας (Pei et al., 2019)	23
Εικόνα 8. Βασικοί τύποι υδροβιότοπων: α) υδροβιότοπος επιφανειακής ροής, β) υδροβιότοπος οριζόντιας υποεπιφανειακής ροής. Μετατροπή από Tilley et al., 2008	28
Εικόνα 9. Σχηματική αναπαράσταση των δύο εξεταζόμενων συστημάτων, S1 και S2. Οι κόκκινες κουκκίδες δείχνουν τα σημεία δειγματοληψίας.....	33
Εικόνα 10. Τεχνητοί υδροβιότοποι συστήματος: α) υδροβιότοπος ελεύθερης επιφάνειας (FWS), β) υδροβιότοπος υποεπιφανειακής ροής (HSSF), γ) υδροβιότοποι FWS και HSSF, δ) αμμόφιλτρο (SF) μαζί με τη μονάδα αδρανοποίηση (IU), ε) κανάλι μονάδας IU.	34
Εικόνα 11. Τεχνητοί υδροβιότοποι Χανίων: α) Υδροβιότοπος χωρίς βλάστηση (Control), β) Υδροβιότοπος με βλάστηση (HSSF).	36
Εικόνα 12. Πιθανοτική απεικόνιση απλού μοντέλου γραμμικής παλινδρόμησης.....	61
Εικόνα 13. Κανόνας Bayes με αντιστοιχία κατανομών και δεδομένων.....	65
Εικόνα 14. Ροή μοντέλου και συναρτήσεις κώδικα R.....	66
Εικόνα 15. Προηγμένες Οξειδωτικές Μέθοδοι Αντιρρύπανσης, ΠΟΜΑ, τροποποίηση από Amor et al., 2019	194
Εικόνα 16. Μηχανισμός ετερογενούς φωτοκατάλυσης (Ζουμπούλης και συν. 2015).....	197
Εικόνα 17. XRD για το $\text{TiO}_2\text{-In/Fe}$ για συγκέντρωση In/Fe : 0,5:0,5/ 0,1:0,1/ 0,05:0,05/ 0,02:0,02 wt% και το TiO_2 (P25)	214
Εικόνα 18. XRD για το $\text{TiO}_2\text{-Al/Fe}$ για συγκέντρωση Al/Fe : 0,1:0,1/ 0,02:0,02 wt% και το TiO_2 (P25)	214
Εικόνα 19. XRD για το $\text{TiO}_2\text{-Al/Mn}$ 0,1:0,1 wt% και το TiO_2 (P25)	215
Εικόνα 20. XRD για το $\text{TiO}_2\text{-Mn/Co}$ για συγκέντρωση Mn/Co : 0,1:0,1/0,04:0,04 wt%	215
Εικόνα 21. UV-vis απορρόφηση του P25 και του Al:Fe/TiO_2 (0,1:0,1 και 0,02:0,02 wt%) ...	216
Εικόνα 22. UV-vis απορρόφηση του P25 και του Al:Mn/TiO_2 (0,1:0,1 wt%)	217
Εικόνα 23. UV-vis απορρόφηση του P25 και του Mn:Co/TiO_2 (0,1:0,1 και 0,04:0,04wt%) ..	217
Εικόνα 24. XRD για το P25 και το CuOx/BiVO_4 με συγκέντρωση Cu : 0,75/1,5 και 3 wt%. ...	218
Εικόνα 25. Ταυ plots και UV-vis απορρόφηση του CuOx/BiVO_4 με συγκέντρωση Cu : 0,75/1,5 και 3 wt%	218
Εικόνα 26. Εικόνες SEM για τους καταλύτες (Α) 0.75Cu/BVO και (Β) 3.0Cu/BVO.....	219
Εικόνα 27. Εικόνες SEM για τους καταλύτες α) (In-Fe) (0.5:0.5)/ TiO_2 , b) (Al-Fe) (0.02:0.02)/ TiO_2 , c) (Al-Mn) (0.1:0.1)/ TiO_2 and d) (Co-Mn) (0.1:0.1)/ TiO_2	219
Εικόνα 28. Αντιδραστήρας CPC: διάταξη του πειράματος	221

Εικόνα 29. Ο αντιδραστήρας CPC. Φαίνονται οι 2 είσοδοι και έξοδοι και οι 2 ξεχωριστές διατάξεις.....	222
Εικόνα 30. Σχηματική απεικόνιση αναπηροσταθμισμένου έτους ζωής, DALY. Τροποποίηση από Public Health England (2015)	264

Συντομογραφίες

Μονάδες επεξεργασίας λυμάτων, ΜΕΛ - Wastewater Treatment Plants, WTPP
Ολικά κολοβακτηριοειδή - Total Coliforms, TC
Κοπρανώδη κολοβακτηριοειδή - Fecal Coliforms, FC
Escherichia coli (*E.coli*)
Μονόκλωνο DNA - Single-stranded DNA, ssDNA
Δίκλωνο DNA - Double-stranded DNA, dsDNA
Αντίγραφα γονιδίου - Gene copies, gc
Εντεροϊοί Enteroviruses EV,
Αδενοϊοί Adenoviruses, AdV
Human Adenovirus, HAdV
Βακτήρια ανθεκτικά σε αντιβιοτικά - Antibiotic Resistant Bacteria, ARB
Γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά - Antibiotic Resistance Genes, ARGs
Οριζόντια γονιδιακή μεταφορά - Horizontal Gene Transfer, HGT
Εξωκυτταρικό DNA - Extracellular DNA, eDNA
Τεχνητοί υδροβιότοποι - Constructed Wetlands, CW
Τεχνητοί υδροβιότοποι ελεύθερης επιφάνειας - Free Water Surface, FWS
Τεχνητοί υδροβιότοποι υποεπιφανειακής ροής - Sub Surface Flow, SSF
Τεχνητοί υδροβιότοποι οριζόντιας υποεπιφανειακής ροής - Horizontal Subsurface, HSSF
Τεχνητοί υδροβιότοποι κάθετης ροής - Vertical Flow, VF
Σουλφαμεθοξαζόλη sulfamethoxazole, SMX
Σιπροφλοξασίνη, ciprofloxacin, CIP
Αμοξισιλίνη, Amoxicilin, AMOX
Τετρακυκλίνη, Tetracycline, TET
Κεφακλόρη, Cefaclor, CEF
Αποικίες βακτηρίων - Colony Forming Units, CFUs
Πλάκες βακτηριοφάγων - Plaque Forming Units, PFUs
Προηγμένες Οξειδωτικές Μέθοδοι Αντιρρύπανσης, ΠΟΜΑ - Advance Oxidation Processes, AOPs
Δδραστικές ρίζες οξυγόνου - Reactive Oxygen Species, ROS
Υπεριώδης ακτινοβολία – Ultraviolet, UV
Ποσοτική αξιολόγηση μικροβιακού κινδύνου - Qualitative Microbial Risk Assessment, QMRA

Abstract

The need for efficient and integrated wastewater treatment is now becoming imperative for the protection of public health, while the increasing consumption requirements make water reuse crucial. As many areas still do not have access to clean water, reuse is of particular importance. The presence of pathogenic microorganisms in the effluents of wastewater treatment plants is of great concern, since they pose considerable risk to public health, especially if the effluent is intended for reuse. In addition to pathogenic microorganisms, in recent years an emerging problem from the spread of resistant bacteria and resistance genes is arising. The wastewater treatment plants and the conventional processes, such as the activate sludge, are not able to remove efficiently persistent pathogens like viruses or antibiotic resistance genes. Moreover, the construction, maintenance cost and the generation of harmful byproducts are limiting factors for their installation.

The aim of the study was to examine the capability of economic and eco-friendly treatments to encounter the challenge to offer water safety. In this perspective and within the framework of the present study, pilot scale constructed wetlands and heterogeneous photo-catalytic processes using semiconductor oxides processes were developed as alternative wastewater treatment systems with the view to evaluate their disinfection efficiency, in terms of their potential to remove fecal bacterial indicators (*E. coli*, Enterococci) and bacteriophages (MS2), and the elimination of enteric viruses, namely adenoviruses and enteroviruses. In order to compare the different systems an alternative statistic approach using the Bayesian model was applied.

In addition, the concertation of the antibiotic resistance genes in different types of genetic material was estimated and the alterations of antibiotic resistance profile of bacteria were examined. A multi linear regression model was developed in an effort to estimate the role of the resistance genes to population's reduction after the exposure to the selected antibiotics.

Results showed the ability of the horizontal subsurface constructed wetlands to eliminate substantially bacterial indicators and also to achieve reduction of the viruses' concentration. Regarding the resistance genes, they continue to be present in the system's effluent, while no clear pattern in terms of bacterial resistance profile was

observed. Moreover, it was not clear which of the resistance genes are involved in the bacterial antibiotic resistance.

As far as the process of photocatalysis is concerned, there was a significant removal of fecal bacterial indicators and the use of doped photocatalysts contributed in the overall acceleration of the inactivation under solar irradiation. Also, photocatalytic processes achieved satisfactory inactivation of the tested viruses. However, significant concentration of resistance genes was observed in the effluents after the aforementioned processes.

Compared to conventional treatment methods, the examined treatments provided promising results taking into account their advantages. However, as shown by the quantitative microbial risk assessment, public health risks still remain, especially if the water is intended for reuse. The hazards arise mainly due to the presence of viruses in the final effluents of the systems. Particular attention should be paid on the presence of resistant bacteria and resistance genes as it is still difficult to assess the future risks that they may cause. The failure of bacterial indicators to predict the presence and risks that viruses may cause makes imperative to select carefully the water quality indicators that will be used to indicate the presence of viruses. In this trend, factors such as the kind of the treatment and the type and composition of the wastewater should always be taken into account.

Περίληψη

Η ανάγκη για αποτελεσματική και ολοκληρωμένη επεξεργασία λυμάτων καθίσταται πλέον επιτακτική για την προάσπιση της δημόσιας υγείας, ενώ οι συνεχώς αυξανόμενες απαιτήσεις κατανάλωσης κάνουν την επαναχρησιμοποίηση του νερού μονόδρομο. Δεδομένου ότι πολλές περιοχές εξακολουθούν να μην έχουν πρόσβαση σε νερό κάνουν την επαναχρησιμοποίηση ιδιαίτερης σημασίας. Η παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών, όπως οι ιοί, στους είτε στους υδάτινους αποδέκτες είτε στο νερό που προορίζεται για επαναχρησιμοποίηση εγκυμονούν κίνδυνο πανδημιών. Εκτός από τους παθογόνους μικροοργανισμούς, έχει αρχίσει να αναδεικνύεται τα τελευταία χρόνια το σημαντικό πρόβλημα το οποίο ανέρχεται από την εξάπλωση των ανθεκτικών βακτηρίων αλλά και των γονιδίων ανθεκτικότητας.

Οι μονάδες επεξεργασίας λυμάτων με μεθόδους επεξεργασίας όπως η ενεργός ιλύς αδυνατούν να αντιμετωπίσουν τους ιούς και τα γονίδια ανθεκτικότητας, ενώ αδυναμίες ως προς την απομάκρυνση τους παρουσιάζουν και οι συμβατικές μέθοδοι απολύμανσης. Επιπλέον, το κόστος κατασκευής, συντήρησης αλλά και η δημιουργία παραπροϊόντων είναι ανασταλτικοί παράγοντες για την εγκατάσταση τέτοιων μονάδων.

Στην παρούσα διατριβή εξετάστηκε η ικανότητα εναλλακτικών, οικονομικών και φιλικών προς το περιβάλλον συστημάτων να αντιμετωπίσουν την πρόκληση της απόδοσης αφελέστερου νερού. Στο πλαίσιο αυτό εξετάστηκαν συστήματα τεχνητών υδροβιοτόπων ελεύθερης επιφάνειας και οριζόντιας υποεπιφανειακής ροής δεχόμενα πρωτοβάθμιο και δευτεροβάθμιο λύμα. Επιπλέον, εξετάστηκαν και διεργασίες ετερογενούς φωτοκατάλυσης, σε εργαστηριακό και πιλοτικό επίπεδο, κάνοντας χρήση διαφορετικών ντοπαρισμένων καταλυτών. Στο πλαίσιο αυτό ποσοτικοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις για τα κοπρανώδη βακτηρία (*E. coli*, Enterococci) και των ιών εντερικής προέλευσης (αδενοϊοί, εντεροϊοί) των βακτηριοφάγων (MS2) όπως και των γονιδίων ανθεκτικότητας στις εκροές των συστημάτων και εξετάστηκαν οι μεταξύ τους συσχετίσεις. Επίσης, η σύγκριση των συστημάτων πραγματοποιείται με τη χρήση της μπεϋζιανής στατιστικής χρησιμοποιώντας τα πλεονεκτήματα τα οποία προσφέρει.

Ακόμα, ποσοτικοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις γονιδίων ανθεκτικότητας σε διαφορετικού τύπου γενετικό υλικό και εξετάστηκαν οι αλλαγές στο προφίλ ανθεκτικότητας των βακτηρίων πριν και μετά την επεξεργασία. Αναπτύσσοντας ένα

μοντέλο πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης έγινε μια προσπάθεια να εκτιμηθεί ο ρόλος των γονιδίων στην μείωση του βακτηριακού πληθυσμού μετά την έκθεση σε αντιβιοτικά

Τα αποτελέσματα της διατριβής αρχικά σημειώνουν την ικανότητα των τεχνητών υδροβιοτόπων οριζόντιας υποεπιφανειακής ροής να απομακρύνουν τους βακτηριακούς δείκτες αλλά και να επιτύχουν σημαντική μείωση των ιών εντερικής προέλευσης. Όσον αφορά στα γονίδια ανθεκτικότητας εξακολουθούν να βρίσκονται στις εκροές των συστημάτων, ενώ δεν παρατηρήθηκε ξεκάθαρο μοτίβο ως προς το προφίλ ανθεκτικότητας των βακτηρίων. Επίσης, παραμένει ασαφές το ποια γονίδια συμβάλλουν στην ανθεκτικότητα κατά την επεξεργασία με τα αντιβιοτικά.

Όσον αφορά στις διεργασίες φωτοκατάλυσης, παρουσιάζουν εξίσου σημαντική μείωση των κοπρανωδών βακτηρίων ενώ η χρήση των ενισχυμένων φωτοκαταλυτών έδειξε ότι επιταχύνει την αδρανοποίησή τους. Οι φωτοκαταλυτικές διεργασίες έδειξαν να επιτυγχάνουν ικανοποιητική αδρανοποίηση των εξεταζόμενων ιών. Ωστόσο, στις εκροές και αυτών των διεργασιών παρατηρήθηκαν σημαντικές συγκεντρώσεις γονιδίων ανθεκτικότητας.

Συγκριτικά με τις συμβατικές μεθόδους, οι εξεταζόμενες επεξεργασίες δίνουν υποσχόμενα αποτελέσματα δεδομένου των πλεονεκτημάτων τους. Ωστόσο, όπως παρουσιάζεται από την ποσοτική αξιολόγηση μικροβιακού κινδύνου, οι κίνδυνοι για τη δημόσια υγεία εξακολουθούν να υφίστανται, ειδικά στην περίπτωση που το νερό προορίζεται για επαναχρησιμοποίηση. Οι κίνδυνοι προκύπτουν κυρίως λόγω της παρουσίας των ιών στις τελικές εκροές των συστημάτων. Ιδιαίτερη σημασία θα πρέπει να δίνεται και στην παρουσία ανθεκτικών βακτηρίων και γονιδίων ανθεκτικότητας καθώς παραμένει δύσκολο να εκτιμηθούν τα μελλοντικά προβλήματα που δύνανται να προκαλέσουν. Η αποτυχία των βακτηριακών δεικτών να προβλέψουν την παρουσία και τον κίνδυνο που ενδέχεται να προκαλέσουν οι ιοί, κάνει επιτακτική την ανάγκη να επιλεγθούν με προσοχή οι δείκτες ποιότητας νερού που θα χρησιμοποιούνται για την ένδειξη της παρουσίας των ιών, ενώ θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη και παράγοντες όπως το ποια είναι η εκάστοτε επεξεργασία αλλά και οι επιδράσεις που θα μπορούσε να έχει ο τύπος και η σύσταση του λύματος.

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑΣ

1.1 Εισαγωγή

Η συνεχής αύξηση της κατανάλωσης νερού λόγω της μεγέθυνσης των αναγκών του πληθυσμού καθιστά όλο και πιο αναγκαία την επαναχρησιμοποίηση του για χρήσεις στη βιομηχανία, στη γεωργία και την ενίσχυση των υδροφόρων οριζόντων. Το πρόβλημα των αποθεμάτων του νερού είναι πιο έντονο σε περιοχές με λίγες βροχοπτώσεις και ξηρό ή ημίξηρο κλίμα. Παράλληλα εξακολουθεί μεγάλος μέρος του παγκόσμιου πληθυσμού να μην έχει πρόσβαση σε ασφαλές νερό. Για το λόγο αυτό η επαναχρησιμοποίηση του νερού θα έχει σημαντικό ρόλο και θα γίνεται όλο και πιο επιτακτική ιδιαίτερα σε αυτές τις περιοχές στα επόμενα χρόνια. Ωστόσο, εξίσου σημαντική θα είναι και η ποιότητα του νερού. Η παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών στα νερά που προορίζονται για επαναχρησιμοποίηση δύναται να προκαλέσουν κινδύνους για τη δημόσια υγεία. Εκτός από τα παθογόνα βακτήρια έντονη είναι και η παρουσία των ιών στα λύματα. Οι ιοί δεν απομακρύνονται επαρκώς κατά τις συμβατικές μεθόδους επεξεργασίας κι έχει καταγραφεί τόσο η έντονη παρουσία διαφορετικών τύπων ιών όσο και οι υψηλές συγκεντρώσεις τους στις εκροές των συστημάτων επεξεργασίας υγρών αποβλήτων (Kitajima et al., 2014). Η επαφή του πληθυσμού είτε με νερό είτε με υδάτινους αποδέκτες στους όποιους συναντώνται συγκεντρώσεις ιών μπορεί να οδηγήσει σε ξεσπάσματα επιδημιών.

Εκτός από παθογόνους μικροοργανισμούς στο νερό ενδέχεται να βρίσκονται και άλλοι ρύποι όπως αντιβιοτικά, παραπροϊόντα προσωπικής φροντίδας, βαρέα μέταλλα κ.α. Μεταξύ αυτών η σημαντική παρουσία συγκεντρώσεων ποικίλων αντιβιοτικών αποκτά όλο και περισσότερο ενδιαφέρον, ενώ παράλληλα εγείρει ανησυχία για τη δημόσια υγεία. Ένας από τους λόγους είναι η σύνδεσή τους με την παρουσία των γονιδίων ανθεκτικότητας σε μικροβιακούς πληθυσμούς. Η υπερβολική χρήση και κατάχρηση αντιβιοτικών τις τελευταίες δεκαετίες σε συνδυασμό με την αδυναμία των συμβατικών μονάδων επεξεργασίας αποβλήτων να εξαλείψουν τα γονίδια ανθεκτικότητας (Antibiotic Resistance Genes, ARGs) ευνοούν την ευρεία εξάπλωσή τους στο περιβάλλον. Ο κίνδυνος γίνεται ακόμη μεγαλύτερος εάν το νερό προορίζεται για επαναχρησιμοποίηση. Το ανακτημένο νερό έχει δείξει μεγάλο αριθμό γονιδίων ανθεκτικότητας (Fahrenfeld et al., 2013), ενώ τα ARGs έχουν ανιχνευθεί σε λαχανικά

για την άρδευση των οποίων έχει γίνει χρήση επαναχρησιμοποιημένου νερού. Ως αποτέλεσμα, μέσω της τροφικής αλυσίδας δημιουργείται ένα μονοπάτι για την (επανα)εισαγωγή των ARGs στον ανθρώπινο πληθυσμό, δημιουργώντας ένα πολύ ανησυχητικό κύκλο για τη δημόσια υγεία, καθώς ευνοεί τη δημιουργία και διασπορά ανθεκτικών βακτηρίων στα αντιβιοτικά (He et al., 2016). Το γεγονός αυτό κατατάσσει τα ARGs στους αναδυόμενους ρύπους όπως και τα αντιβιοτικά.

Παρόλο που οι μονάδες επεξεργασίας λυμάτων (ΜΕΛ) είναι ό,τι πιο αξιόπιστο υπάρχει αυτή τη στιγμή στην επεξεργασία των αποβλήτων, στη βάση τους δεν έχουν σχεδιαστεί για να αντιμετωπίζουν μικροοργανισμούς όπως οι ιοί και ρύπους όπως τα ARGs. Επιπλέον, ένα σημαντικό μειονέκτημα των ΜΕΛ έγκειται στο ότι είναι αδύνατη η εγκατάστασή τους σε μικρούς και απομακρυσμένους οικισμούς αλλά και σε φτωχότερες περιοχές λόγω του υψηλού κόστους κατασκευής και λειτουργίας. Γι' αυτό το λόγο έχουν προταθεί εναλλακτικές μέθοδοι επεξεργασίας αποβλήτων όπως οι τεχνητοί υδροβιότοποι οι οποίοι αποτελούν οικονομικές μεθόδους επεξεργασίας ιδιαίτερα για τις αναπτυσσόμενες χώρες. Τα συστήματα αυτά έχουν δείξει ότι μπορούν να έχουν σημαντικές αποδόσεις απέναντι σε παθογόνους μικροοργανισμούς και σε ιούς.

Ωστόσο, η επιλογή μεμονωμένων παθογόνων για το χαρακτηρισμό της ποιότητας του νερού μπορεί να είναι παραπλανητική, αφού κάθε μικροοργανισμός μπορεί να παρουσιάζει διαφορετικό επίπεδο αντοχής στις εκάστοτε περιβαλλοντικές συνθήκες. Επιπλέον, η απομάκρυνση ενός δείκτη δε συνεπάγεται απαραίτητα και την απουσία άλλων παθογόνων μικροοργανισμών, όπως οι ιοί, ενώ θα πρέπει πλέον να δίνεται περισσότερη σημασία και στη διαφορετικότητα αυτών των μικροοργανισμών. Παρόλο που τις προηγούμενες δεκαετίες είχε αναφερθεί ότι οι τεχνητοί υδροβιότοποι μπορούν να απομακρύνουν επιτυχώς τους ιούς, πρέπει να επισημανθεί ότι οι συγκεκριμένες μελέτες βασίζονταν κυρίως σε δεδομένα, τα οποία προέρχονταν από βακτηριοφάγους και όχι από ιούς εντερικής προέλευσης, οι οποίοι ενέχουν σοβαρούς κινδύνους για τη δημόσια υγεία. Η εξέλιξη μοριακών μεθόδων εντοπισμού όπως είναι η Real – Time PCR έδειξε ότι η εικόνα του μικροβιακού και ιικού φορτίου στις εκροές τέτοιων συστημάτων ενδέχεται να είναι πολύ διαφορετική. Επίσης παρόλο που έχει αναφερθεί ότι τεχνητοί υδροβιότοποι μπορούν να απομακρύνουν αντιβιοτικά, το τοπίο παραμένει σχετικά ασαφές, όσον αφορά στην απομάκρυνση των γονιδίων

ανθεκτικότητας. Επιπλέον, μεγάλο μειονέκτημα των τεχνητών υδροβιοτόπων είναι οι μεγάλες εκτάσεις που απαιτούνται για την εγκατάστασή τους.

Στο πλαίσιο αυτό έχουν γίνει προσπάθειες να αναπτυχθούν άλλες μέθοδοι επεξεργασίας οι οποίες θα μπορέσουν, ίσως συμπληρωματικά, να αντιμετωπίσουν τις παραπάνω προκλήσεις. Εκτός από τους τεχνητούς υδροβιοτόπους, τα τελευταία 20 χρόνια, η διερεύνηση των δυνατοτήτων της ετερογενούς φωτοκατάλυσης βρίσκεται στο επίκεντρο του επιστημονικού ενδιαφέροντος. Στον τομέα της απολύμανσης υπάρχει πλούσια βιβλιογραφία σχετικά με την αδρανοποίηση μεγάλης ποικιλίας παθογόνων μικροοργανισμών όπως βακτήρια, φάγοι και μύκητες με την χρήση απλού και τροποποιημένου, με διάφορες μεθόδους, TiO_2 και άλλων ημιαγώγιμων υλικών (Laxma et al., 2017; Liga et al., 2010; Venieri et al., 2015; Wang et al., 2015). Ωστόσο, οι δοκιμές σε αστικά απόβλητα είναι ακόμη περιορισμένες. Προς το παρόν, δεν υπάρχει βιβλιογραφία που να αναφέρεται σε απολύμανση πραγματικού λύματος, σε πιλοτική κλίμακα και με ενισχυμένους φωτοκαταλύτες, παρά μόνο με απλό TiO_2 .

1.2 Σκοπός και καινοτομία

Με γνώμονα τα παραπάνω, στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής αναπτύχθηκαν μονάδες επεξεργασίας τεχνητών υδροβιοτόπων και πιλοτικού συστήματος φωτοκατάλυσης με σκοπό να εκτιμηθεί η ικανότητα των εναλλακτικών «πράσινων» συστημάτων επεξεργασίας και της φωτοκατάλυσης να απομακρύνουν παθογόνους μικροοργανισμούς και να εξεταστεί η συμπεριφορά των ανθεκτικών βακτηρίων και των γονιδίων ανθεκτικότητας. Ειδικότερα στους στόχους της διατριβής περιλαμβάνονται:

- Η διερεύνηση της ικανότητας των τεχνητών υδροβιοτόπων να απομακρύνουν τους βακτηριακούς δείκτες, τους βακτηριοφάγους και κυρίως τους ιούς εντερικής προέλευσης αδενοϊούς και εντεροϊούς.
- Ο έλεγχος ενδεχόμενων συσχετίσεων μεταξύ των υπό μελέτη μικροοργανισμών, ώστε να εκτιμηθεί αν μπορούν οι βακτηριακοί δείκτες ή οι βακτηριοφάγοι να προβλέψουν τις συγκεντρώσεις των ιών.
- Η σύγκριση δύο διαφορετικών συστημάτων υδροβιοτόπων ως προς την ικανότητα τους να απομακρύνουν ιούς κάνοντας χρήση των πλεονεκτημάτων που δίνει η μπεϋζιανή στατιστική θεωρία έναντι των κλασικών στατιστικών μεθόδων.

- Η εξέταση της συμπεριφοράς των τεχνητών υδροβιοτόπων ως προς την αντιμετώπιση ανθεκτικών βακτηρίων και γονιδίων ανθεκτικότητας και η εκτίμηση για το κατά πόσο μεταβάλλεται το προφίλ ανθεκτικότητας στην εκροή της επεξεργασίας.
- Ο έλεγχος για το αν διαφέρουν οι συγκεντρώσεις των γονιδίων ανθεκτικότητας μεταξύ των κυττάρων τα οποία απομονώθηκαν από τις εκροές των επεξεργασιών
- Η διερεύνηση της επιρροής των συστημάτων επεξεργασίας αλλά και της επιρροή των γονιδίων ανθεκτικότητας στη μείωση του βακτηριακού πληθυσμού κατά την έκθεσή του σε αντιβιοτικά με τη χρήση μοντέλου πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης, με τελικό στόχο να προβλεφθεί ποια μέθοδος αναμένεται να δώσει καλύτερο αποτέλεσμα.
- Η ποσοτικοποίηση των γονιδίων ανθεκτικότητας σε διαφορετικού τύπου γενετικό υλικό από τις εκροές των συστημάτων, με στόχο να εκτιμηθεί αν οι τεχνητοί υδροβιότοποι μπορούν να απομακρύνουν τους συγκεκριμένους ρύπους.
- Η ποσοτικοποίηση των γονιδίων ανθεκτικότητας στο γενετικών υλικό των βακτηριοφάγων και η εκτίμηση του ρόλου των τελευταίων στη διάδοση των γονιδίων ανθεκτικότητας.

Τα παραπάνω εξετάζονται σε διαφορετικά συστήματα τεχνητών υδροβιοτόπων, οι οποίοι λειτουργούν ως συστήματα δευτεροβάθμιας και τριτοβάθμιας επεξεργασίας.

Εκτός από τους τεχνητούς υδροβιοτόπους εξετάζεται και η ικανότητα της ηλιακής φωτοκατάλυσης να απομακρύνει τους παθογόνους μικροοργανισμούς από τα υγρά απόβλητα. Στόχοι σε αυτή τη περίπτωση είναι:

- Ο έλεγχος απόδοσης διαφορετικών φωτοκαταλυτών να απομακρύνουν τους βακτηριακούς δείκτες κοπρανώδους μόλυνσης τόσο σε πειραματικό όσο και σε πιλοτικό επίπεδο με τη χρήση πραγματικού λύματος.
- Η αξιολόγηση της ικανότητας πιλοτικού αντιδραστήρα με ανακλαστήρες αλουμινίου με χρήση των καταλυτών να απομακρύνει το ιικό φορτίο σε δείγματα από πραγματικό λύμα εξόδου δευτεροβάθμιας επεξεργασίας.
- Η ποσοτικοποίηση των γονιδίων ανθεκτικότητάς σε ελεύθερο γενετικό υλικό και γενετικό υλικό βακτηριοφάγων στην εκροή της παραπάνω

μονάδας και η εκτίμηση απόδοσης της μονάδας ως προς την απομάκρυνση τους.

Τέλος, στόχος είναι να γίνει εκτίμηση του κινδύνου που θα μπορούσε να προκύψει για τη δημόσια υγεία βάσει του μικροβιακού φορτίου που συναντάται στις εκροές των συστημάτων επεξεργασίας.

2 ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

2.1 Μικροβιολογικοί δείκτες ποιότητας νερού

Οι μονάδες επεξεργασίας λυμάτων (ΜΕΛ) καλούνται να επεξεργαστούν το μεγάλο φορτίο παθογόνων μικροοργανισμών που δέχονται με σκοπό την απόθεση ασφαλέστερου νερού στους αποδέκτες. Είναι λοιπόν σημαντικός ο έλεγχος των εκροών των μονάδων ώστε να προσδιορίζεται η ποιότητα του νερού πριν την απόθεσή του στο περιβάλλον, ενώ ο έλεγχος γίνεται ακόμα πιο επιτακτικός εάν το νερό προορίζεται για επαναχρησιμοποίηση. Η πληθώρα των παθογόνων μικροοργανισμών καθιστά αδύνατη την εξέταση του κάθε μικροβίου ξεχωριστά γι' αυτό και ο έλεγχος πραγματοποιείται με την χρήση αντιπροσωπευτικών δεικτών. Ένας δείκτης ποιότητας νερού θα πρέπει να πληροί ορισμένα χαρακτηριστικά: να υπάρχει πάντα τόσο στα ανθρώπινα κόπρανα όσο και σε αυτά των θηλαστικών ζώων σε μεγάλους πληθυσμούς, να είναι εύκολο να ανιχνευτεί με απλές μεθόδους, να μην αναπτύσσετε στα φυσικά νερά ή γενικά στο περιβάλλον και να είναι ανθεκτικός στις περιβαλλοντικές συνθήκες.

2.2 Βακτηριακοί δείκτες

Οι πιο κοινοί δείκτες κοπρανώδους μόλυνσης είναι τα ολικά κολοβακτηριοειδή (Total Coliforms, TC) και τα κοπρανώδη κολοβακτηριοειδή (Fecal Coliforms, FC) που περιλαμβάνουν τα γένη *Klebsiella*, *Escherichia*, *Citrobacter* και *Enterobacter*.

Τα κολοβακτηριοειδή (coliforms) συνήθως δεν είναι παθογόνα και η παρουσία τους στο νερό υποδηλώνει μόλυνση από λύματα που πιθανόν συνοδεύονται από παθογόνους μικροοργανισμούς. Τα ολικά κολοβακτηρίδια (Total Coliforms, TC) και τα κοπρανώδη είναι ομάδα Gram αρνητικών βακτηρίων, μη σπορώδη, σε σχήμα ράβδου που έχουν ως κοινό γνώρισμα να μεταβολίζουν τη λακτόζη σε θρεπτικό υλικό στους 35°C. Τα βακτήρια αυτά υπάρχουν τόσο στο έδαφος όσο και στο υγρό περιβάλλον και η παρουσία τους υποδεικνύει περιβαλλοντική μόλυνση και ενδεχόμενη παρουσία παθογόνων βακτηρίων. Η παρουσία των TC στο νερό υποδηλώνει πιθανή βλάβη στο σύστημα επεξεργασίας γι' αυτό και αναγνωρίζεται ακόμα σε κάποιες περιπτώσεις ως δείκτης στις διαδικασίες επεξεργασίας και απολύμανσης (WHO 2003). Τα FC αποτελούν υποομάδα των TC, εμφανίζονται σε μεγάλους αριθμούς στα κόπρανα των ανθρώπων και των θερμόαιμων ζώων και διαχωρίζονται από τα TC από την ικανότητά τους να μεταβολίζουν τη λακτόζη στους 44,5°C εντός 24 ωρών. Η παρουσία τους στα

δείγματα δηλώνει πρόσφατη μόλυνση από κολοβακτηρίδια. Τα FC χρησιμοποιούνται ως δείκτες κυρίως για νερό που προορίζεται για πόση ή επαναχρησιμοποίηση.

Το *Escherichia coli* (*E.coli*) αποτελεί gram αρνητικό (-) βακτήριο το οποίο ανήκει στην ομάδα των κοπρανώδων και είναι το βακτήριο που εντοπίζεται σε μεγαλύτερους αριθμούς στα κόπρανα των ανθρώπων και των ζώων. Η πλειονότητα των στελεχών *E. coli* είναι συμβιωτικά βακτηρία του γαστρεντερικού συστήματος των θερμόαιμων ζώων. Τα περισσότερα από τα στελέχη είναι αβλαβή υπάρχουν όμως και επικίνδυνα στελέχη όπως το *E. coli* O157:H7. Το *E. coli* αποτελεί τον καλύτερο βακτηριακό δείκτη κοπρανώδους μόλυνσης στο νερό.

Οι κοπρανώδεις στρεπτόκοκκοι (fecal streptococci) είναι ομάδα gram (+) θετικών βακτηρίων, τα οποία ανήκουν στα γένη *Enterococcus* και *Streptococcus*. Το γένος *Enterococcus* περιλαμβάνει όλους τους στρεπτόκοκκους που έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται σε χλωριούχο νάτριο 6,5%, pH 9.6 στους 45°C και περιλαμβάνουν τα *E. avium*, *E. gallinarum*, *E. durans*, *E. faecium* και *E. Faecalis*, με τα δύο τελευταία να προέρχονται από το ανθρώπινο έντερο. Ως δείκτες ποιότητας νερού έχουν πλεονεκτήματα σε σχέση με τα TC και το *E. coli*, καθώς συνήθως δεν αναπτύσσονται στο υδάτινο περιβάλλον, είναι πιο ανθεκτικοί στις περιβαλλοντικές πιέσεις και στην απολύμανση με χλωρίωση, σπάνια πολλαπλασιάζονται σε μολυσμένο νερό και παρόλο που είναι πολύ λιγότεροι σε αριθμό από τα FC και τα *E. coli* στα κόπρανα, είναι αρκετοί για να εντοπιστούν ακόμα και μετά από σημαντική αραίωση. Τέλος, είναι αρκετά ανθεκτικοί στην ξηρασία γι' αυτό μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον αρχικό έλεγχο νέων δικτύων ή τον έλεγχο μόλυνσης μετά από απορροές ομβρίων υδάτων, ενώ οι μέθοδοι εντοπισμού τους είναι εύκολες και γρήγορες. Οι εντερόκοκκοι έχουν προταθεί ως χρήσιμοι δείκτες κινδύνου γαστρεντερίτιδας στα νερά αναψυχής και ως δείκτες της παρουσίας εντερικών ιών (Gerba, 2009).

2.3 Νομοθεσία

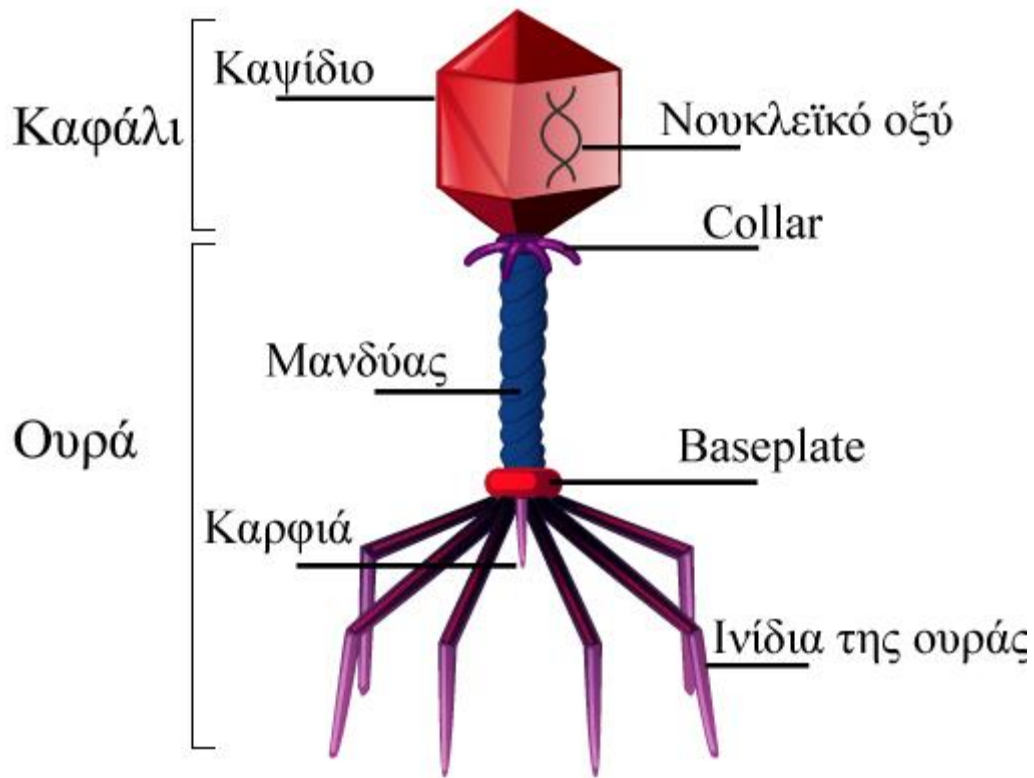
Αυτή τη στιγμή η νομοθεσία στην Ελλάδα ορίζει διαφορετικά όρια ανάλογα με την τελική απόθεση του νερού. Σύμφωνα με την Οδηγία πλαίσιο για τα απόβλητα 2008/98/EK του Ελληνικού υπουργείου περιβάλλοντος ενέργειας και κλιματικής αλλαγής (Υ.Π.Ε.Κ.Α.) και της Ευρωπαϊκής Κοινότητας, οι εφαρμογές επαναχρησιμοποίησης χαρακτηρίζονται ως περιορισμένες ή απεριόριστες, ανάλογα με τον βαθμό επικινδυνότητας για την ανθρώπινη υγεία. Η περιορισμένη άρδευση

αναφέρεται σε καλλιέργειες προϊόντων, τα οποία καταναλώνονται μετά από επεξεργασία (π.χ. θερμική), ή δεν είναι ανθρώπινης κατανάλωσης ή οι καρποί τους δεν έρχονται σε επαφή με το έδαφος. Σε αυτές τις καλλιέργειες απαγορεύεται το πότισμα μέσω καταιονισμού και η πρόσβαση του κοινού. Παραδείγματα περιορισμένης άρδευσης είναι η βιομηχανική ντομάτα, η ξυλεία χαρτοβιομηχανίας κ.α. Σε αυτήν την κατηγορία περιλαμβάνονται και βιομηχανικές εφαρμογές όπως το νερό ψύξης μίας χρήσης. Η μέγιστη συγκέντρωση *E. coli* στο νερό περιορισμένης άρδευσης είναι 200 CFU/100mL. Η απεριόριστη χρήση αναφέρεται σε καλλιέργειες όλων των τύπων, χωρίς περιορισμό στον τύπο άρδευσης και με ελεύθερη πρόσβαση του κοινού. Επίσης, περιλαμβάνει χώρους πρασίνου ανοιχτής πρόσβασης και διάφορες βιομηχανικές χρήσεις. Τα όρια για το *E. coli* σε αυτήν την περίπτωση είναι $\leq 5 \text{ CFU mL}^{-1}$ για το 80% των δειγμάτων και έως 50 CFU/mL για το 95% των δειγμάτων. Όσον αφορά στα θαλάσσια ύδατα η υπουργική απόφαση 46399/1352/ΦΕΚ438/86 ορίζει υποχρεωτικά όρια σύμφωνα με τα οποία το 95% των δειγμάτων που εξετάστηκαν σε μια περιοχή δεν πρέπει να υπερβαίνει: για τα TC/100 ml: 10.000, για τα FC/100ml: 500 και για τη Σαλμονέλλα /L: απουσία

Οι παραπάνω δείκτες δεν καλύπτουν πλέον τις ανάγκες για ασφαλές νερό. Το βασικό πρόβλημα με τους βακτηριακούς δείκτες είναι ότι δεν «λένε όλη την αλήθεια» σχετικά με την παρουσία άλλων μικροοργανισμών όπως για παράδειγμα των ιών. Έτσι, υπάρχουν περιπτώσεις όπου ενώ τα δείγματα δείχνουν τους βακτηριακούς δείκτες να είναι εντός των ορίων, οι ιοί εντοπίζονται σε επικίνδυνα υψηλές συγκεντρώσεις. Αυτό συμβαίνει διότι οι ιοί παρουσιάζουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα από τους βακτηριακούς δείκτες κατά την επεξεργασία τους. Υπό αυτό το πρίσμα έχουν προταθεί άλλοι μικροοργανισμοί ως δείκτες ποιότητας νερού, όπως οι ιοί εντερικής προέλευσης και οι βακτηριοφάγοι, (Eifan, 2013).

2.4 Βακτηριοφάγοι

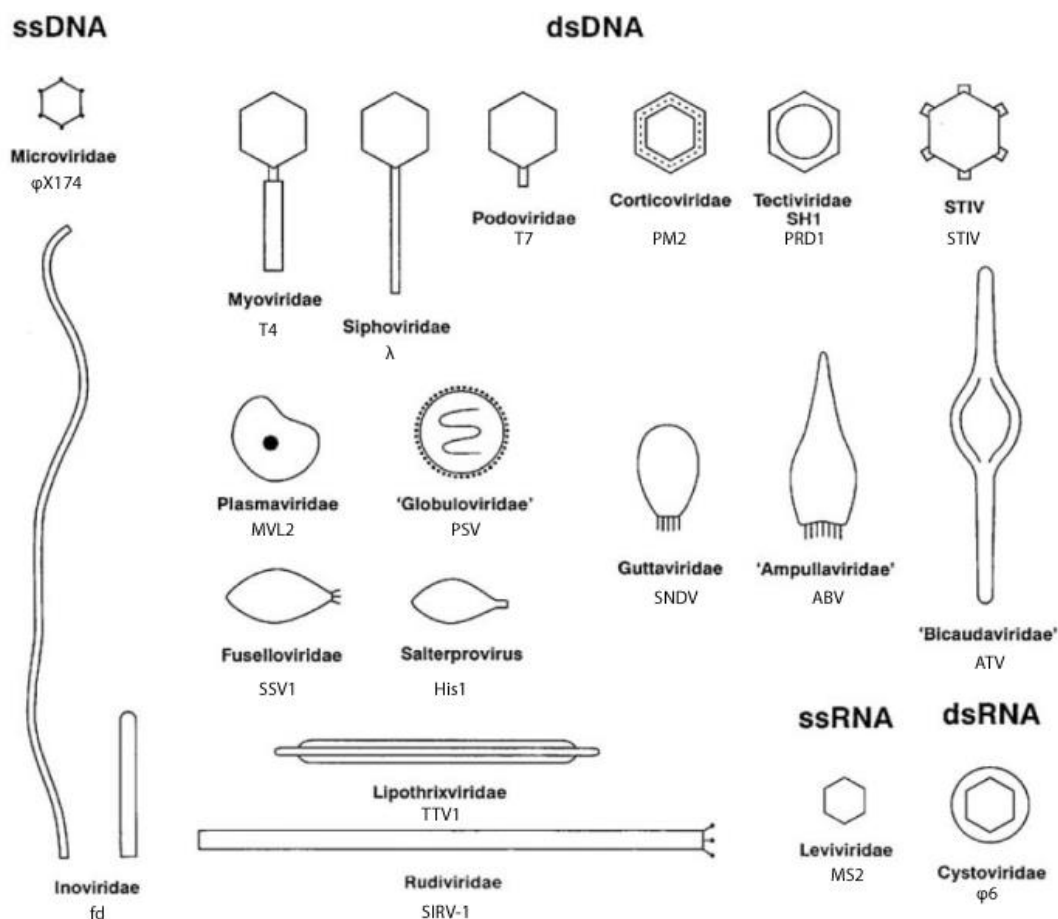
Οι βακτηριοφάγοι (bacteriophages) ή φάγοι είναι μη παθογόνοι ιοί που προσβάλλουν βακτήρια με σκοπό την αναπαραγωγή τους ενώ αποτελούν την πολυπληθέστερη, γνωστή μέχρι σήμερα, μορφή ζωής στον πλανήτη. Οι φάγοι ταξινομούνται σε 13 διαφορετικές οικογένειες με βάση το μέγεθος, το γενετικό υλικό και τη μορφολογία τους,



Εικόνα 1. Τυπική δομή βακτηριοφάγων

Σε γενικές γραμμές, η μορφολογία των φάγων περιλαμβάνει την κεφαλή, το κολλάρο, το σωλήνα ουράς, τη θήκη ουράς, μια εξαγωνική βάση, τις εξοχές της βάσης και τα ινίδια, όπου χρησιμοποιούνται για την προσκόλληση των φάγων στα βακτήρια, τα οποία κάποια είδη φάγων μπορεί να φέρουν και άλλα όχι.

Το γενετικό υλικό των φάγων βρίσκεται στην κεφαλή και μπορεί να είναι μονόκλωνο DNA (single-stranded DNA, ssDNA), δίκλωνο DNA (double-stranded DNA, dsDNA), μονόκλωνο RNA (ssRNA) και δίκλωνο RNA (dsRNA). Το μέγεθος των φάγων κυμαίνεται από 25 έως 100nm.



Εικόνα 2. Κατηγοριοποίηση φάγων σε οικογένειες βάσει του γενετικού υλικού και χαρακτηριστικότερα παραδείγματα για κάθε κατηγορία (Ackermann, 2009).

Η αναπαραγωγή των φάγων πραγματοποιείται με δύο μηχανισμούς, το λυτικό και το λυσιγονικό κύκλο. Κατά το λυτικό κύκλο επιτελείται καταστροφή του κυττάρου – ξενιστή ενώ κατά τον λυσιγονικό οι φάγοι δεν καταστρέφουν τον ξενιστή τους και συνεχίζουν να μεταφέρουν το γενετικό τους υλικό με τη μορφή προφάγου κατά τη διαίρεση του κυττάρου του ξενιστή.

Οι βακτηριοφάγοι που χρησιμοποιούν ως ξενιστές κοπρανώδη βακτηρίδια όπως τα *E. coli*, *Bacteroides* sp. και enterococci είναι γνωστοί ως κολιφάγοι (coliphages). Οι κολιφάγοι που χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση των υδάτων χωρίζονται σε δύο κύριες κατηγορίες: τους σωματικούς κολιφάγους, (somatic coliphages) και τους F-specific φάγους που με τη σειρά τους χωρίζονται σε F-specific DNA (F-DNA) και F specific RNA (F-RNA). Οι F-RNA υποδιαιρούνται σε τέσσερις ξεχωριστές ομάδες (genogroup) και σε δύο γένη (GI και GII του γένους *Levivirus*, GII και GIV του γένους *Allolevivirus*) που ανήκουν στην οικογένεια *Leviviridae*, με χαρακτηριστικότερα παραδείγματα τους MS2, GA, QB, και SP.

Οι σωματικοί κολιφάγοι προσβάλλουν το *E. coli* μέσω του κυτταρικού τοιχώματος ενώ οι F φάγοι μέσω των τριχιδίων (pili). Οι F φάγοι αποτελούνται από ένα καψίδιο με κυβική συμμετρία, έχουν διάμετρο 21-30nm και περιέχουν μονόκλωνο RNA ως γενετικό υλικό. Στους F ανήκουν και οι MS2 φάγοι. Έχει παρατηρηθεί ότι οι F φάγοι είναι πιθανό να πολλαπλασιαστούν και εκτός του εντερικού συστήματος των θηλαστικών.

Οι σωματικοί και οι F- specific κολιφάγοι συναντώνται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα απόβλητα (10^6 - 10^7 και 10^5 - 10^6 PFUs 100mL^{-1} αντίστοιχα) και στα ύδατα στα οποία υπάρχει κοπρανώδης μόλυνση. Η δειγματοληψία όπως και ο εντοπισμός τους αποτελούν γρήγορες και οικονομικές διαδικασίες ενώ η δυνατότητα της αποθήκευσης τους για μεγάλα διαστήματα χωρίς να μεταβάλλεται η συγκέντρωσή τους αποτελεί ένα ακόμα πλεονέκτημα. Επιπλέον χαρακτηριστικά των φάγων είναι η ανθεκτικότητά τους στις περιβαλλοντικές πιέσεις και η μη επανανεργοποίηση τους μετά από τις επεξεργασίες, ενώ δε φαίνεται να παρουσιάζουν και εποχιακές μεταβολές. Τέλος, οι φάγοι έχουν αρκετές ομοιότητες με τους ιούς όσον αφορά στα μορφολογικά και δομικά τους χαρακτηριστικά. Όλα τα παραπάνω καθιστούν τους φάγους ελκυστικούς ως υποψήφιους δείκτες ποιότητας νερού.

Παρόλο που δεν αναφέρεται ξεκάθαρη συσχέτιση μεταξύ των φάγων και των ιών, υπάρχουν αποδείξεις ότι οι φάγοι συνδέονται στενότερα με τους παθογόνους ιούς παρά με τους βακτηριακούς δείκτες. Πιθανές εξηγήσεις για τη μη ξεκάθαρη συσχέτιση ίσως είναι ότι οι φάγοι δεν υπάρχουν από μόνοι τους το περιβάλλον ενώ οι ιοί υπάρχουν γι' αυτό και κάποια είδη των F φάγων δίνουν καλύτερα αποτελέσματα. Η άλλη εξήγηση σχετίζεται με τις διαφορετικές μεθόδους που ακολουθούνται για τον εντοπισμό των φάγων και των ιών.

Όσον αφορά στην ανθεκτικότητά τους, αυτή εξαρτάται από την επεξεργασία η οποία εφαρμόζεται κάθε φορά. Έτσι, ενώ οι F - specific φάγοι παρουσιάζουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στην επεξεργασία της χλωρίωσης και στην επεξεργασία με υπεριώδη ακτινοβολία που χρησιμοποιούνται ως τριτοβάθμιες επεξεργασίες, οι σωματικοί κολιφάγοι είναι πιο ανθεκτικοί στις θερμικές επεξεργασίες που εφαρμόζονται στην ενεργό υλή (Jofre et al., 2016). Το γεγονός ότι οι F-RNA φάγοι παρουσιάζονται σε συγκεντρώσεις τουλάχιστον 100 φορές μεγαλύτερες σε σχέση με τους ιούς, και το γεγονός ότι αναφέρονται ως πιο ανθεκτικοί από τους ιούς ενισχύει

την άποψη ότι η μη παρουσία φάγων συνεπάγεται και την μη παρουσία ιών (Lin and Ganesh, 2013).

2.5 Ιοί

Οι ιοί αποτελούν υποχρεωτικά ενδοκυττάρια παράσιτα εφόσον δεν διαθέτουν τους απαραίτητους μηχανισμούς, όπως τα ένζυμα, για την αναπαραγωγή τους και εξαρτώνται αποκλειστικά από τους ξενιστές τους. Το γενετικό τους υλικό μπορεί να είναι είτε DNA είτε RNA μονόκλωνο ή δίκλωνο και συνήθως προστατεύεται από το καψίδιο, το οποίο αποτελείται από πρωτεΐνες. Το μέγεθος των ιών μπορεί να κυμαίνεται από 20 έως 1000nm. Οι ιοί ταξινομούνται με βάση τη μορφολογία τους, τη χημική τους σύνθεση και τον τρόπο αντιγραφής. Οι ιοί που προσβάλλουν τους ανθρώπους σήμερα ομαδοποιούνται σε 21 οικογένειες, αντανακλώντας μόνο ένα μικρό μέρος του φάσματος του πλήθους διαφορετικών ιών, των οποίων ο ξενιστής κυμαίνεται από σπονδυλωτά έως πρωτόζωα και από φυτά και μύκητες έως βακτήρια (βακτηριοφάγοι) (Whalley et al., 2018).

2.5.1 Ιοί εντερικής προέλευσης

Ο όρος ιοί εντερικής προέλευσης περιλαμβάνει τους ιούς που βρίσκονται στο γαστρεντερικό σύστημα των ανθρώπων και των ζώων και μπορούν να προκαλέσουν ασθένειες ενώ μπορεί τα μολυσμένα άτομα να είναι ασυμπτωματικά (Alidjinou et al., 2019; Wyn-Jones and Sellwood, 2001). Οι ιοί εντερικής προέλευσης μπορεί να υπάρχουν στο φυσικό περιβάλλον αλλά συνήθως η παρουσία υποδηλώνει ότι εισήλθαν σε αυτό μέσω αποβλήτων. Οι παθογόνοι ιοί, οι οποίοι εντοπίζονται στα απόβλητα προέρχονται από ανθρώπους και ζώα και εισάγονται στο περιβάλλον μέσω ανθρώπινων δραστηριοτήτων όπως οι κτηνοτροφικές μονάδες (De Oliveira et al., 2012), η γεωργία, οι εκροές των μονάδων επεξεργασίας λυμάτων και οι εδαφικές απορροές. Στον άνθρωπο συνήθως μεταφέρονται μέσω της κοπρανοστοματικής οδού, του φαγητού και του νερού. Οι ιοί εντερικής προέλευσης αποβάλλονται από τα κόπρανα των μολυσμένων ατόμων σε πολύ μεγάλους αριθμούς της τάξης των 10^5 με 10^{11} σωματιδίων ιού (gene copies, gc) ανά γραμμάριο κοπράνων. Οι ασθένειες οι οποίες προκαλούνται από τους εντερικούς ιούς σχετίζονται κυρίως με διάρροια και γαστρεντερίτιδες, μπορούν όμως να προκαλέσουν και αναπνευστικά προβλήματα, επιπεφυκίτιδα, ηπατίτιδα και ακόμα πιο επικίνδυνες ασθένειες με υψηλή θνησιμότητα όπως εγκεφαλίτιδα, ασηπτική μηνιγγίτιδα και μυοκαρδίτιδα (Theng-Theng Fong and

Erin K. Lipp, 2005). Δεδομένου ότι η παρουσία έστω και μερικών ικών σωματιδίων είναι αρκετή για να προκαλέσει μόλυνση, για παράδειγμα 10 - 100 βιρόνια Νοροϊών είναι ικανά να προκαλέσουν μόλυνση στον άνθρωπο (Lisa Lindesmith, 2003) κι ενδεχομένως πανδημία, η ανίχνευση τους ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις σε περιβαλλοντικά δείγματα ή σε τρόφιμα είναι σημαντική (Lin and Ganesh, 2013). Παράλληλα, η ικανότητα των ιών να παραμένουν ενεργοί στο περιβάλλον για μεγάλο χρονικό διάστημα τους καθιστά ακόμα πιο επικίνδυνους για τη δημόσια υγεία.

Ιστορικά έχουν καταγραφεί πολλές επιδημίες που έχουν προκληθεί λόγω της παρουσίας ιών στο νερό. Το 1988 προκλήθηκε μαζική έξαρση λόγω της κατανάλωσης μολυσμένων από απόβλητα οστρακοειδών στη Σαγκάη η οποία προκάλεσε 300.000 περιπτώσεις ηπατίτιδας Α και 25.000 περιπτώσεις γαστρεντερίτιδας. Το 1991 καταγράφηκαν 79.000 περιπτώσεις ηπατίτιδας Ε στην Κανπούρ (Ινδία) από την κατανάλωση μολυσμένου πόσιμου νερού. Το 2008 στο Μοντενέγκρο 10-15.000 άτομα επηρεάστηκαν από μολυσμένο πόσιμο νερό και ιοί που ανιχνεύτηκαν ήταν οι νοροϊοί, οι ροταϊοί και οι αδενοϊοί (Ewess, 2010).

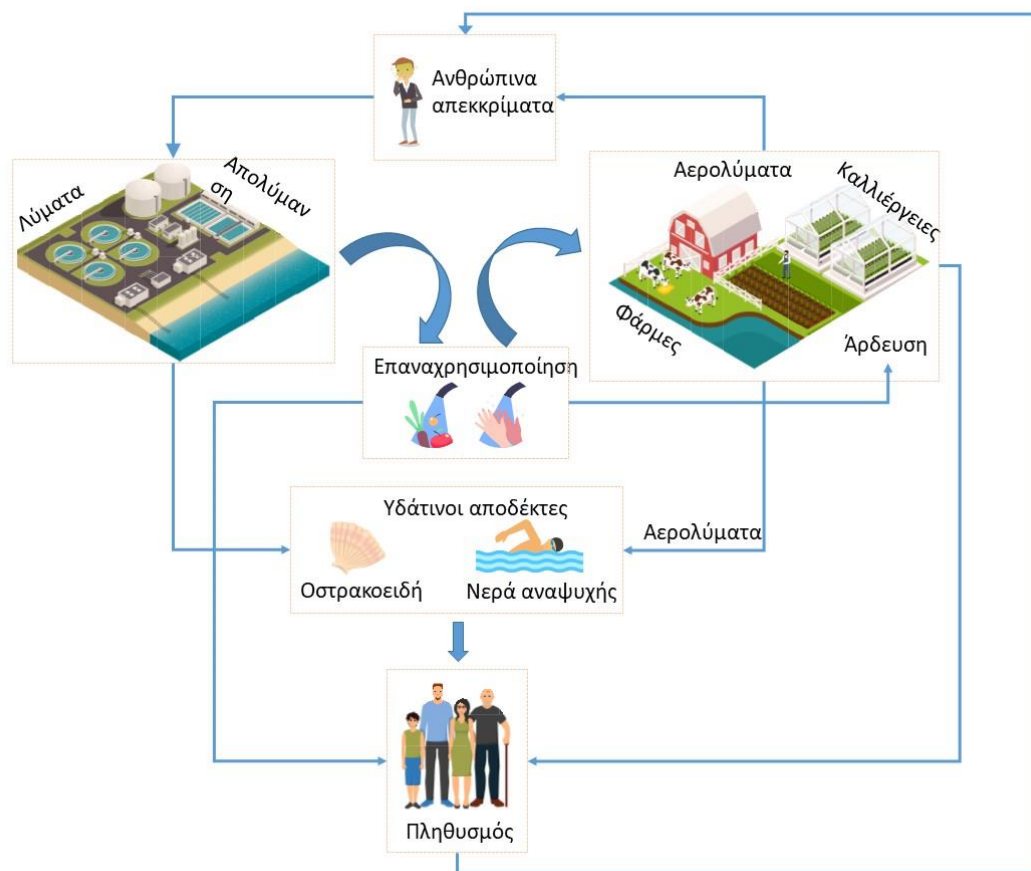
Πίνακας 1. Οικογένειες και είδη ιών. Παρουσιάζεται το γενετικό υλικό τους και οι ασθένειες που μπορούν να προκαλέσουν.

Οικογένεια	Γένος	Παράδειγμα	Ασθένειες	Γονιδίωμα	Φάκελος
Picornaviridae	Enterovirus Hepatovirus, Hepevirus, Sapovirus	Poliovirus, Echovirus, Coxsackievirus A, B Hepatitis A, E Sapporo-like virus	Μηνιγγίτιδα, Παράλυση, Μυοκαρδίτιδα, αναπνευστικά Λοιμώξεις, Γαστρεντερίτιδα Λοιμώδης ηπατίτιδα	ssRNA nonsegment	Όχι
Reoviridae	Rotaviridae	Human rotavirus	Γαστρεντερίτιδα	dsRNA segment	Όχι
Adenoviridae	Mastadenovirus	Human Adenovirus	Επιπεφυκίτιδα Γαστρεντερίτιδα Αναπνευστικές ασθένειες	dsDNA linear	Όχι
Caliciviridae	Calicivirus	Human calicivirus Norwalk virus	Προοδευτική πολυεστιακή Λευκοεγκεφαλοπάθεια,	ssRNA nonsegment	Όχι

			Ασθένειες του ουροποιητικού συστήματος		
Astroviridae	Mamastrovirus Parovirus	Human astrovirus Human parvovirus	Γαστρεντερίτιδα	ssRNA nonsegment	Όχι
Coronaviridae	Coronavirus Torovirus	Human Torovirus	Γαστρεντερίτιδα Αναπνευστικές ασθένειες	ssRNA nonsegment	Ναι
Circoviridae	Circovirus	Circovirus	Μείωση των λεμφοειδών και ανοσοκαταστολή	ssDNA circular	Όχι
Parvoviridae		Parvoviruses	Γαστρεντερίτιδα	ssDNA linear	Όχι
Picobirnaviridae	Picobirnavirus	Picobirnavirus	Γαστρεντερίτιδα	dsRNA segment	Όχι
Polyomaviridae	Polyomavirus	Polyomavirus (dsDNA) JC virus BK virus Simian virus 40	Λευκοεγκεφαλοπάθεια Αιμορραγική κυστίτιδα	dsDNA circular	Όχι
Anelloviridae	Alphatorquevirus	Torgue tenovirus	Όχι συγκεκριμένες ασθένειες	ingle-stranded, circular DNA	Όχι

Στο περιβάλλον, οι εντερικοί ιοί μπορούν να επιβιώνουν κάτω από ένα ευρύ φάσμα pH (από 3 έως 10), για παρατεταμένες χρονικές περιόδους και σε χαμηλές θερμοκρασίες. Οι ιοί έχουν αναφερθεί ότι επιβιώνουν και παραμένουν μολυσματικοί για 130 ημέρες στο θαλασσινό νερό, και για 120 ημέρες σε γλυκό νερό και λύματα, και για 100 ημέρες στο έδαφος στους 20 με 30°C (Theng-Theng Fong, 2005).

Η ανθεκτικότητα τους αλλά και η αδυναμία των βακτηριακών δεικτών να προβλέψουν την παρουσία των ιών έχει οδηγήσει στην πρόταση να χρησιμοποιηθούν οι ιοί ως δείκτες. Οι εντερικοί ιοί που έχουν προταθεί ως δείκτες μόλυνσης από τα απόβλητα στο περιβάλλον περιλαμβάνουν τους Εντεροϊούς (Enteroviruses, EV), τους Αδενοϊούς (Adenoviruses, AdV), τον Hepatitis A virus, τους ροταϊούς και τους Polyomaviruses (Eifan, 2013; Lin and Ganesh, 2013).



Εικόνα 3. Ροή ιών από τις ανθρώπινες δραστηριότητες στο περιβάλλον και ροές επανεισαγωγή τους στον άνθρωπο.

2.5.2 Εντεροϊοί

Οι εντεροϊοί ανήκουν στην οικογένεια των Picornaviridae. Η ομάδα των εντεροϊών περιλαμβάνει τους polioviruses, τους coxsackieviruses, τους echoviruses, και άλλους enteroviruses. Το μέγεθος τους κυμαίνεται από 22 έως 30 nm, το γενετικό τους υλικό αποτελείται από ssRNA και περιβάλλεται από εικοσαεδρικό καψίδιο. Μεταδίδονται μέσω της κοπρανοστοματικής οδού και προκαλούν διαφορετικές ασθένειες. Για παράδειγμα οι polio – ιοί προκαλούν πολιομυελίτιδα, οι coxsackie – ιοί σχετίζονται με αναπνευστικά προβλήματα, μυοκαρδίτιδα και περικαρδίτιδα, οι Echo – ιοί σχετίζονται με το κοινό κρυολόγημα και οι αριθμημένοι εντεροϊοί έχουν συσχετιστεί με βρογχίτιδα, μηνιγγίτιδα κ.α. (Theng-Theng Fong and Erin K. Lipp, 2005). Οι εντεροϊοί γενικά παρουσιάζονται σταθεροί σε pH μεταξύ 3 – 10 και είναι ευαίσθητοί στην χλωρίωση και στην ακτινοβολία UV (Wyn-Jones and Sellwood, 2001). Οι EV μπορεί να παρουσιάσουν εποχιακές διακυμάνσεις, συνήθως παρουσιάζουν αύξηση κατά τους

καλοκαιρινούς μήνες η οποία οφείλεται στην αυξημένη επαφή με τα νερά αναψυχής και αυτό αποτελεί ένα μειονέκτημα ως προς τη χρήση τους ως δείκτες (Lin and Ganesh, 2013).

2.5.3 Αδενοϊοί

Οι αδενοϊοί ανήκουν στην οικογένεια Mastadenovirus έχουν μέγεθος από 90 έως 100 nm και το γενετικό τους υλικό αποτελείται από dsDNA. Οι ανθρώπινοι αδενοϊοί (Human Adenovirus, HAdV), είναι υπεύθυνοι κυρίως για τις γαστρεντερίτιδες στα παιδιά (ειδικά οι τύποι 40 και 41) ενώ μπορεί να προκαλέσουν και άλλες ασθένειες όπως πνευμονία, επιπεφυκίτιδα, μηνιγγοεγκεφαλίτιδα κ.α. Μεταδίδονται κυρίως μέσω της κοπρανοστοματικής οδού, με εισπνοή αερολυμάτων, με κατανάλωση μολυσμένου νερού ή φαγητού και μπορούν να εξάγονται με τα κόπρανα για μεγάλο χρονικό διάστημα από τα μολυσμένα άτομα (Staggemeier, 2017; Theng-Theng Fong, 2005) Οι αδενοϊοί εμφανίζονται με μεγαλύτερη συχνότητα στα απόβλητα από ότι οι άλλοι εντερικοί ιοί και εξάγονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από τους μολυσμένους ασθενείς (Eifan, 2013). Λόγω της δομής του γενετικού τους υλικού παρουσιάζουν έως και 60 φορές μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στην UV ακτινοβολία από ότι οι ιοί με γενετικό υλικό RNA όπως οι εντεροϊοί και ο ιός της ηπατίτιδας Α. Επειδή το γενετικό τους υλικό είναι δίκλωνο, ένας άθικτος κλώνος DNA στους αδενοϊούς μπορεί να χρησιμεύσει ως πρότυπο για την επισκευή τους χρησιμοποιώντας τα ένζυμα του ξενιστή. Επιπλέον, αυτοί οι ιοί έχουν υψηλό μοριακό βάρος που μπορεί επίσης να επηρεάσει την αυξημένη αντοχή τους στην υπεριώδη ακτινοβολία (Theng-Theng Fong, 2005).

Είδη	Ορότυποι	Σημεία μόλυνσης
A	12, 18, 13	γαστρεντερικό σύστημα
B	3, 7, 16, 21, 50 (B1), 11, 14, 34,35	πνεύμονες, ουροποιητικό σύστημα
C	1, 2, 5, 6	ανώτερο αναπνευστικό σύστημα
D	8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 22, 23, 24, 26, 27, 30, 32, 33, 36, 37, 38, 39, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 51	μάτια, γαστρεντερικό σύστημα
E	4	αναπνευστικό σύστημα
F	40, 41	ουροποιητικό σύστημα

Εικόνα 4. Τυποι αδενοϊών και ασθένειες που μπορούν να προκαλέσουν. Τροποποίηση από Jiang et al. (Jiang, 2006).

Τόσο οι αδενοϊοί όσο και οι εντεροϊοί έχουν εντοπιστεί σε υψηλές συγκεντρώσεις σε περιβάλλοντα που σχετίζονται με ανθρώπινες δραστηριότητες με αποτέλεσμα να εγκυμονεί σοβαρός κίνδυνος για τη δημόσια υγεία. Για παράδειγμα μελέτες έχουν δείξει μεγάλες συγκεντρώσεις ιών στο θαλασσινό νερό αλλά και στην άμμο (Gularte et al., 2019). Άλλη μελέτη αναφέρει ότι κατά τη διάρκεια των Ολυμπιακών Αγώνων του Ρίο εντοπίστηκαν HAdV, human enterovirus, group A rotavirus σε συγκεντρώσεις που έφταναν τα 10^9 gc L⁻¹ στο νερό και τα 10^6 gc gr⁻¹ στα δείγματα άμμου, προκαλώντας κίνδυνο για την υγεία των αθλητών και των τουριστών (Staggemeier et al., 2017).

2.6 Ανθεκτικά βακτήρια σε αντιβιοτικά και γονίδια ανθεκτικότητας

Εκτός από τα προβλήματα που μπορεί να προκαλέσει στη δημόσια υγεία η επαφή με νερό που περιέχει παθογόνους μικροοργανισμούς, το πρόβλημα ενδέχεται να είναι ακόμα σοβαρότερο στην περίπτωση που αυτοί οι μικροοργανισμοί ανήκουν στα ανθεκτικά βακτήρια σε ποικιλία αντιβιοτικών.

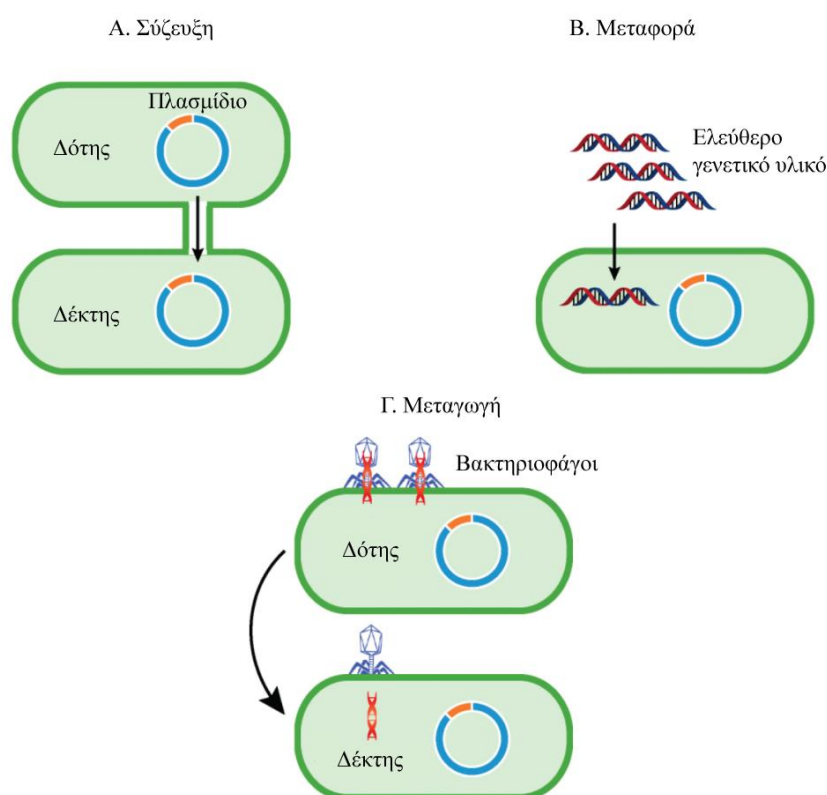
Η συνεχής αύξηση των ανθεκτικών βακτηρίων στα αντιβιοτικά (Antibiotic Resistant Bacteria, ARB) και η δυσκολία στην αντιμετώπισή τους θα αποτελέσει ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα που θα κληθεί να αντιμετωπίσει η ανθρωπότητα τα

επόμενα χρόνια σύμφωνα με τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας (WHO, 2014). Η υπόθεση ότι τα βακτήρια έχουν την ικανότητα να αποκτούν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά είναι γνωστή από το 1930 όταν και παρατηρήθηκε η ανθεκτικότητα του βακτηρίου *Staphylococcus aureus* στο αντιβιοτικό πενικιλίνη. Τα τελευταία χρόνια έγινε γνωστό ότι τα βακτήρια έχουν και επίκτητους μηχανισμούς ανθεκτικότητας, καθώς εντοπίστηκαν γονίδια ανθεκτικότητας, κυρίως αυτά που αντιστοιχούν στις β-λακτάμες, τις τετρακυκλίνες τετράκλινες και στη βανκομυκίνη σε βακτήρια που απομονώθηκαν από παγωμένο υπέδαφος ηλικίας 30.000 ετών. Σε άλλη έρευνα, σε δείγματα από ανθρώπινα κόκκαλα εντοπίστηκαν βακτήρια ανθεκτικά σε περισσότερα από ένα αντιβιοτικά (Olaitan and Rolain, 2016). Μια πιθανή και μάλλον λογική εξήγηση για την ανθεκτικότητα των παλαιότερων βακτηρίων είναι ότι τα βακτήρια που παράγουν αντιβιοτικά θα πρέπει να διαθέτουν και τους ανάλογους μηχανισμούς αυτοπροστασίας (Finley et al., 2013).

Η απόκτηση της ανθεκτικότητας από τα βακτήρια οφείλεται στα γονίδια ανθεκτικότητας (Antibiotic Resistance Genes, ARGs) και πραγματοποιείται με διαφορετικούς μηχανισμούς, οι οποίοι περιλαμβάνουν τις μεταλλάξεις, τα efflux pumps και την οριζόντια μεταφορά γονιδίων (Horizontal Gene Transfer, HGT) με την τελευταία να αποτελεί τον πιο συνήθη μηχανισμό μεταφοράς γονιδίων. Όταν σε ένα περιβάλλον υπάρχουν ευνοϊκές συνθήκες για αποικισμό βακτηρίων, ανάμιξη και έντονη δραστηριότητα, η HGT μπορεί να εμφανιστεί σε υψηλή συχνότητα (Sanderson et al., 2016). Η HGT περιλαμβάνει τη σύζευξη (conjugation), τη μεταφορά (transformation) και την μεταγωγή (transduction). Η σύζευξη αναφέρεται στην ανταλλαγή γενετικού υλικού μεταξύ των βακτηρίων, η μεταφορά αναφέρεται στην απόκτηση από το βακτήριο ελεύθερου έξωκυτταρικού γενετικού υλικού (extracellular DNA, eDNA) και τέλος η μεταγωγή αναφέρεται στη μεταφορά γενετικού υλικού μέσω των βακτηριοφάγων (Sun, 2018).

Λόγω των χαρακτηριστικών τους τα ARGs συμπεριλαμβάνονται στους αναδυόμενους ρύπους (emerging contaminants). Παρόλη την ομοιότητα με τους κοινούς ρύπους τα ARGs έχουν ορισμένα χαρακτηριστικά που θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την μελέτη και το σχεδιασμό για την αντιμετώπιση τους. Το πιο ιδιαίτερο χαρακτηριστικό είναι ότι είναι «βιολογικά» που σημαίνει ότι έχουν τη δυνατότητα να μεταφέρονται μέσω των γενετικών διαδικασιών σε διαφορετικών τύπων οργανισμούς και για μεγάλες αποστάσεις. Επίσης, άλλο χαρακτηριστικό τους είναι ότι δεν υπάρχει μια πηγή μόλυνσης, δεδομένου ότι η εξάπλωση και ο πολλαπλασιασμός

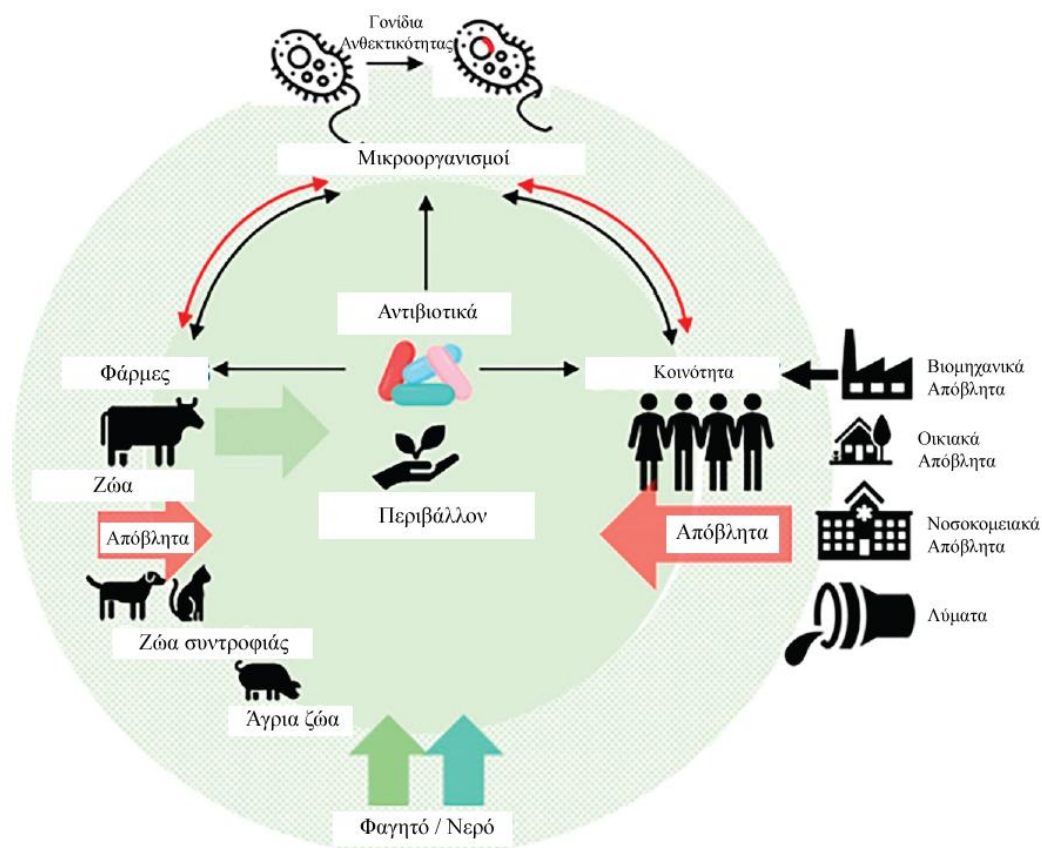
των γονιδίων μπορεί να είναι παραπροϊόντα διαφορετικών ανθρώπινων δραστηριοτήτων.



Εικόνα 5. Τρόποι μεταφοράς γονιδίων στα βακτήρια.

Τα τελευταία χρόνια πραγματοποιείται εκτεταμένη χρήση αντιβιοτικών έτσι ώστε να μπορέσουν να καλυφθούν οι διάφορες ανθρώπινες ανάγκες. Τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται σε δραστηριότητες όπως η γεωργία και η κτηνοτροφία τόσο για την προστασία των ζώων όσο και ως αυξητικοί παράγοντες. Παράλληλα, σε πολλές χώρες παρατηρείται και η ανεξέλεγκτη χρήση των αντιβιοτικών για λόγους υγείας, η οποία αυξήθηκε ιδιαίτερα την περίοδο της κρίσης, καθώς πολλοί ασθενείς προμηθεύονται και χρησιμοποιούν αντιβιοτικά χωρίς ιατρική γνωμάτευση λόγω οικονομικών προβλημάτων.

Τα παραπάνω οδηγούν σε αυξημένες συγκεντρώσεις αντιβιοτικών στα υγρά απόβλητα καθώς οι οργανισμοί είναι ικανοί να απορροφούν μόνο ένα μικρό ποσοστό των αντιβιοτικών που λαμβάνουν (Zhang et al., 2015). Η κατάσταση αυτή ευνοεί τη δημιουργία ARB καθώς τα αντιβιοτικά δημιουργούν επιλεκτικές πιέσεις στα βακτήρια, ενώ επικρατούν οι κατάλληλες συνθήκες για τον πολλαπλασιασμό και την δημιουργία ανθεκτικών βακτηρίων μέσω των μηχανισμών μεταφοράς.



Εικόνα 6. Ροές αντιβιοτικών και γονιδίων ανθεκτικότητας στο περιβάλλον (Kumar et al., 2020).

2.7 Μονάδες επεξεργασίας λυμάτων

Οι μονάδες επεξεργασίας λυμάτων (ΜΕΛ) κατασκευάζονται και χρησιμοποιούνται με σκοπό την επεξεργασία των αποβλήτων και την απόθεση ασφαλούς νερού στην περίπτωση της επαναχρησιμοποίησης. Οι ΜΕΛ μπορεί να δέχονται διαφορετικού τύπου λύματα, όπως αστικά λύματα, όμβρια ύδατα, βιομηχανικά απόβλητα, απόβλητα από κτηνοτροφικές μονάδες και νοσοκομειακά απόβλητα. Ανάλογα με τον τύπου του αποβλήτου που δέχονται αναπτύσσονται και αντίστοιχες μέθοδοι επεξεργασίας.

Οι περισσότερες ΜΕΛ αποτελούνται από τρία στάδια επεξεργασίας, την πρωτοβάθμια, τη δευτεροβάθμια και την τριτοβάθμια επεξεργασία. Κατά την προ επεξεργασία απομακρύνονται οι ανόργανες φερτές ύλες και η άμμος (εσχάρωση, αμμοσυλέκτες), τα λίπη και τα έλαια. Ακολουθεί η πρωτοβάθμια επεξεργασία όπου πραγματοποιείται διαχωρισμός μέσω φυσικών διεργασιών όπως η βαρύτητα και η επίπλευση. Κατά την πρωτοβάθμια επεξεργασία επιτυγχάνεται μείωση του οργανικού φορτίου BOD₅ 25-30% ενώ η μείωση των αιωρούμενων σωματιδίων (TSS) είναι στο

40-50%. Στην δευτεροβάθμια επεξεργασία λαμβάνουν χώρα βιολογικές και φυσικοχημικές διεργασίες με στόχο την απομάκρυνση κολλοειδών και οργανικών ουσιών. Κατά τη βιολογική διεργασία οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν ένα μέρος της τροφής (του υποστρώματος) για τις διεργασίες της αποσύνθεσης, εξασφαλίζοντας την απαιτούμενη για τις λειτουργικές τους ανάγκες ενέργεια, ενώ παράλληλα χρησιμοποιούν ένα άλλο μέρος του υποστρώματος για τη σύνθεση της κυτταρικής τους δομής. Ανάλογα με το είδος των μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται (αερόβιοι – αναερόβιοι) έχουν αναπτυχθεί και αντίστοιχες μέθοδοι. Παραδείγματα αερόβιας επεξεργασίας είναι η ενεργός ιλύς, οι αεριζόμενες λίμνες, τα βιολογικά φίλτρα κ.α. ενώ αναερόβιας τα αναερόβια φίλτρα, ο αναερόβιος χωνευτήρας και η αναερόβια μονάδα ενεργού ιλύος.

Η τριτοβάθμια επεξεργασία έπεται της δευτεροβάθμιας με στόχο την περαιτέρω απομάκρυνση των οργανικών ρύπων, της θολερότητας, του φωσφόρου, του αζώτου των μετάλλων. Τέλος, ακολουθεί η απολύμανση για την αδρανοποίηση και απομάκρυνση των παθογόνων μικροοργανισμών. Οι πιο συνήθεις μέθοδοι απολύμανσης περιλαμβάνουν τη χλωρίωση, την οζόνωση και την απολύμανση με UV ακτινοβολία. Παρόλο που η απόδοση της οζόνωσης και της UV είναι ικανοποιητική ως προς την απομάκρυνση των βακτηριακών δεικτών, δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε όλα τις μονάδες επεξεργασίας λυμάτων εξαιτίας του υψηλού κόστους του εξοπλισμού και της συντήρησης ενώ απαιτείται και εξειδικευμένο προσωπικό. Ακόμα, κατά τη χρήση μεθόδων όπως η χλωρίωση παράγονται παραπροϊόντα, τα οποία είναι βλαβερά για την ανθρώπινη υγεία, ενώ πιο φιλικές μέθοδοι όπως η απολύμανση με ηλιακή ακτινοβολία δεν είναι αποδοτικές απέναντι σε αρκετούς παθογόνους μικροοργανισμούς. Επιπλέον, τα τελευταία χρόνια μελέτες δείχνουν ότι οι μέθοδοι αυτές δεν είναι τόσο αποτελεσματικές ως προς την απομάκρυνση των ιών.

2.7.1 Παρουσία ιών στις μονάδες επεξεργασίας

Παρά το γεγονός ότι οι ΜΕΛ είναι ό,τι πιο αξιόπιστο αυτή τη στιγμή για την επεξεργασία των αποβλήτων καθώς επιτυγχάνουν την απομάκρυνση των βιοχημικών παραμέτρων και των βακτηριακών δεικτών, δεν συμβαίνει το ίδιο και με τους ιούς. Οι ΜΕΛ δεν έχουν σχεδιαστεί για την απομάκρυνση των ιών και στις εξόδους τους εξακολουθούν να εντοπίζονται ιοί σε σημαντικές συγκεντρώσεις.

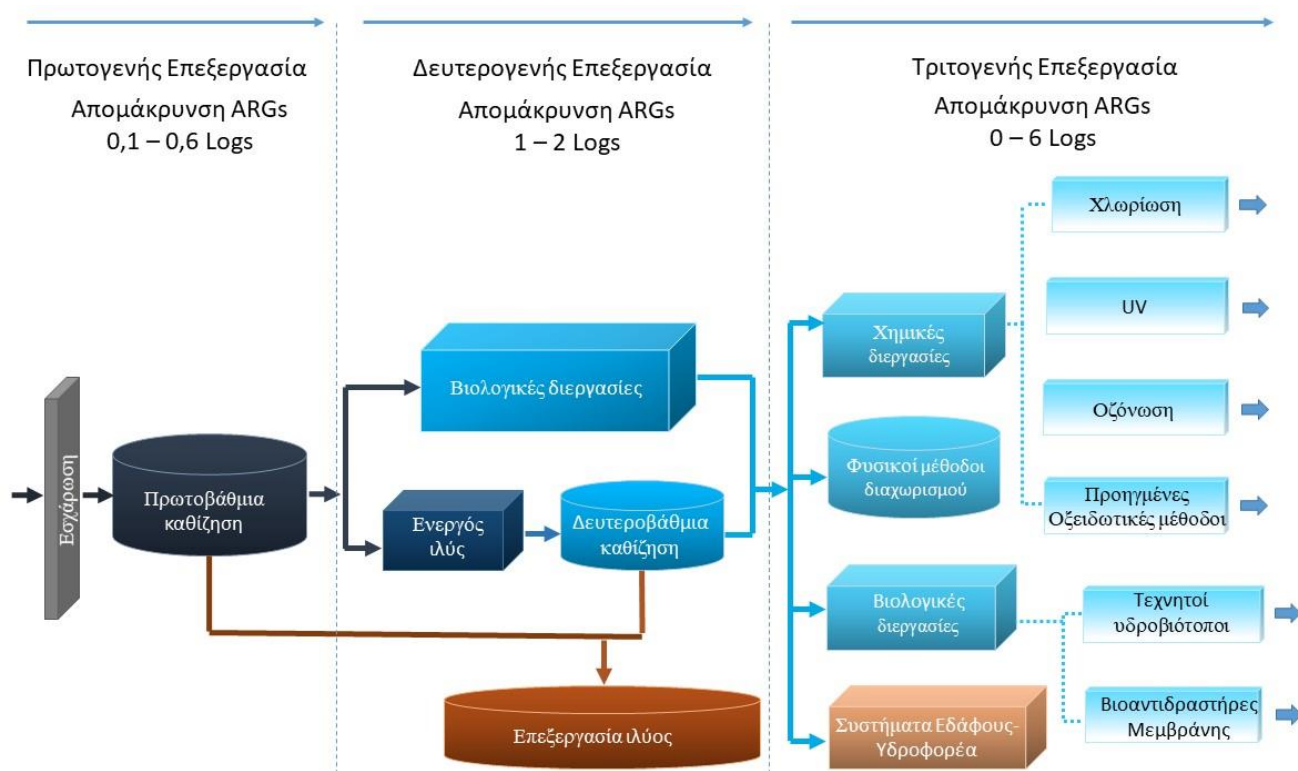
Πιο συγκεκριμένα οι ιοί παρουσιάζονται στις εισροές των ΜΕΛ σε μεγάλες συγκεντρώσεις της τάξης των 10^7 gc L⁻¹ για τους αδενοϊούς και 10^6 gc L⁻¹ για τους εντεροϊούς ενώ οι συγκεντρώσεις παρουσιάζονται υψηλές και στις εκροές. Για παράδειγμα μελέτη αναφέρει ότι σε δύο ΜΕΛ στην Αμερική, οι οποίες χρησιμοποιούσαν ως μεθόδους επεξεργασίας η μία ενεργό ιλύ σε συνδυασμό με χλωρίωση και η άλλη φίλτρο σε συνδυασμό με χλωρίωση, εντοπίστηκαν μεταξύ άλλων ιών, EV σε συγκέντρωση 10^4 gc L⁻¹ και AdV σε συγκέντρωση 10^5 gc L⁻¹ (Kitajima et al., 2014). Σε άλλη μελέτη σε έξοδο ΜΕΛ στην Ιαπωνία, με ενεργό ιλύ και χλωρίωση οι EV εντοπίστηκαν σε συγκεντρώσεις της τάξης 10^3 και οι AdV σε 10^4 gc L⁻¹ (Hata et al., 2013). Οι συγκεντρώσεις αυτές μπορεί να παρουσιάζουν διακυμάνσεις ανάλογα με την εποχή, τη σύσταση του πληθυσμού και την πιθανή μόλυνση των ατόμων του πληθυσμού.

2.7.2 ARB και ARGs στις μονάδες επεξεργασίας

Όπως και με τους ιούς, οι συμβατικές μονάδες επεξεργασίας δεν έχουν σχεδιαστεί για την απομάκρυνση των γονιδίων ανθεκτικότητας με αποτέλεσμα να εντοπίζονται ARB και ARGs στις εκροές τους. Σε γενικές γραμμές οι ΜΕΛ καταφέρνουν μείωση στα ποσοστά των ανθεκτικών βακτηρίων στις τελικές εξόδους όμως αυτή η τάση μπορεί να διαφέρει ανάλογα με το εξεταζόμενο βακτήριο και το εξεταζόμενο αντιβιοτικό. Όσον αφορά στα γονίδια ανθεκτικότητας αναφέρεται μικρή αύξηση στην ενεργό ιλύ και ιδιαίτερα κατά το στάδιο της αερόβιας χώνευσης. Αυτό φαίνεται να οφείλεται κυρίως στη σύσταση της βακτηριακής κοινότητας και στην παρουσία των αυτόχθονων βακτηρίων (Zhang et al., 2015). Τα γονίδια μπορεί να μεταφέρονται από τα αλλόχθονα βακτήρια, όπως τα FC στα αυτόχθονα (Calero-Cáceres et al., 2014). Στην εξάπλωση της ανθεκτικότητας συμβάλλει και η αφθονία των θρεπτικών που είναι απαραίτητα για τη σωστή λειτουργία της ενεργού ιλύος (Raftaf et al., 2016). Τόσο στις αερόβιες όσο και στις αναερόβιες δεξαμενές επεξεργασίας, η συνύπαρξη καταλοίπων αντιβιοτικών και ανθεκτικών βακτηρίων δημιουργεί το βέλτιστο περιβάλλον για την τόνωση της οριζόντιας μεταφοράς ARGs μεταξύ των αυτόχθονων βακτηρίων. Χαρακτηριστικό είναι ότι η συγκέντρωση των γονιδίων στη λάσπη μπορεί να ξεπεράσει τα 10^{10} gc gr⁻¹ τα οποία με την επανακυκλοφορία επαναεισέρχονται στο σύστημα (Chen and Zhang, 2013). Η ανεπαρκής απόδοση της ενεργού ιλύος απέναντι στα ARGs εντείνει το πρόβλημα καθώς μπορεί να οδηγήσει στην αυξημένη παρουσία των γονιδίων στο έδαφος. Μέσω των βακτηρίων τα γονίδια μεταφέρονται στα

βιοστερεά και από εκεί μεταφέρονται στο έδαφος στην περίπτωση που η λάσπη προορίζεται για χρήση ως εδαφοβελτιωτικό, προκαλώντας έμμεσα κινδύνους για τη δημόσια υγεία (Calero-Cáceres et al., 2014).

Έτσι κρίνεται απαραίτητη η τριτογενής επεξεργασία καθώς και η ανάπτυξη αποδοτικών μεθόδων απολύμανσης με σκοπό την περαιτέρω απομάκρυνση των ARB και ARGs. Όμως ενώ τα συμβατικά συστήματα τριτοβάθμιας επεξεργασίας είναι αποδοτικά ως προς την απομάκρυνση των βακτηρίων και κατά συνέπεια των ARB, έχουν παρατηρηθεί σημαντικές συγκεντρώσεις ARGs στις εκροές των συστημάτων αυτών ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις αναφέρεται ότι ευνοείται ακόμα και η ανάπτυξη νέων ARB και γενικά υπάρχει σύγχυση στα συμπεράσματα μεταξύ των μελετών.



Εικόνα 7. Απομάκρυνση ARGs σε κάθε στάδιο επεξεργασίας (Pei et al., 2019)

Για παράδειγμα μελέτη αναφέρει ότι η χλωρίωση αποτελεί μια αξιόπιστη μέθοδο απολύμανσης για την αντιμετώπιση των ARB και των ARGs στο πόσιμο νερό καθώς χαμηλές δόσεις χλωρίου $0,3 - 0,5 \text{ mg L}^{-1}$ είναι ικανές να περιορίσουν τη συχνότητα μεταφοράς των γονιδίων μεταξύ των βακτηρίων (Lin et al., 2016). Όμως άλλη μελέτη αναφέρει ότι η χλωρίωση του πόσιμου νερού ευνοεί την παρουσία γονιδίων ανθεκτικότητας τόσο στο εξωκυτταρικό όσο και στο ενδοκυτταρικό γενετικό υλικό (Shi et al., 2013) και ευνοεί την εξάπλωση των ARGs (Liu et al., 2018). Τα γονίδια

ανθεκτικότητας της τετρακυκλίνης και ειδικά το *tetQ* παραμένουν σε πληθώρα μετά την επεξεργασία με συγκέντρωση χλωρίου 4mg L^{-1} και το ίδιο συμβαίνει και για τα ανθεκτικά στην τετρακυκλίνη βακτήρια (Zheng et al., 2017). Άλλοι ερευνητές εντόπισαν το γονίδιο *vanA* στην εκροή της μονάδας χλωρίωσης ενώ υπήρξε απουσία των ARB (Furukawa et al., 2017). Οι Huang et al. παρατήρησαν αύξηση του ποσοστού των ARB μετά από έκθεση σε $10\text{ mg Cl}_2\text{ L}^{-1}$ για 10 min. Επίσης παρατήρησαν την αναγέννηση και επανανεργοποίηση των ARB, και ιδιαίτερα των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά chloramphenicol, ampicillin και penicillin, μετά την επεξεργασία με χαμηλή δόση υποχλωριώδους νατρίου Cl_2 $2,0\text{ mg L}^{-1}$ (Huang et al., 2011). Οι Oh et al. αναφέρουν ότι η επεξεργασία με χλωρίωση θα απαιτούσε συγκέντρωση 30 mg L^{-1} ώστε να επιτευχθεί 90% απομάκρυνση των ARB και των ARGs, η συγκέντρωση αυτή όμως είναι πρακτικά αδύνατη στην επεξεργασία των αποβλήτων (Oh et al., 2014). Ο συνδυασμός της χλωρίωσης με UV με δόση πάνω από $1\text{mg Cl}_2\text{ L}^{-1}$ και χρόνο επαφής 10 min αυξάνει την ανθεκτικότητα των στελεχών *E. coli* στην τετρακυκλίνη (Huang et al., 2013). Ακόμα, η χλωρίωση όταν εφαρμόζεται στην επεξεργασία των υγρών αποβλήτων παρουσία αμμωνίας ευνοεί το σχηματισμό χλωραμινών οι οποίες προκαλούν λύση των κυττάρων, συμβάλλοντας στη μεταφορά των γονιδίων μεταξύ των βακτηρίων (Guo et al., 2015). Τέλος, τα παραπροϊόντα της χλωρίωσης θα μπορούσαν να προκαλέσουν αύξηση της ανθεκτικότητας καθώς αυξάνουν τις μεταλλαξιγόνες δραστηριότητες των βακτηρίων (Lv et al., 2014).

Η απολύμανση με UV παρουσιάζει καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με την χλωρίωση όσον αφορά στη μεταφορά των γονιδίων. Η διαφορά τους σχετίζεται με το γεγονός ότι κατά την επεξεργασία αυτή πραγματοποιείται καταστροφή των πλασμιδίων που μεταφέρουν τα γονίδια ανθεκτικότητας (Guo et al., 2015). Παρόλα αυτά η μέθοδος αυτή παρουσιάζει δυσκολίες στην απομάκρυνση των ARGs. Παρόλο που έχει το πλεονέκτημα ότι δε δημιουργεί παραπροϊόντα έχει το μειονέκτημα ότι δε προσφέρει συνεχή απολύμανση με αποτελέσματα να ευνοείται η φωτοεπανανεργοποίηση. Για να επιτευχθούν τα επιθυμητά αποτελέσματα απαιτούνται μεγάλες δόσεις ακτινοβολίας (Pei et al., 2019).

Όσον αφορά στην οζόνωση, αναφέρεται ότι η μέθοδος είναι αποδοτική στην απομάκρυνση των ARB. Όμως φαίνεται ότι δεν μπορεί να αντιμετωπίσει τα ARGs και ευνοεί την ανάπτυξη τους (Zheng et al., 2017). Μελέτη αναφέρει ότι παρατηρήθηκε αύξηση των γονιδίων ανθεκτικότητας στην βανκομυκίνη (*vanA*) και στην ιμιπενέμη

(bla_{VIM}) εντός του πληθυσμού που επιβίωσε από την επεξεργασία ενώ άλλα γονίδια μειώθηκαν (Alexander et al., 2016). Επίσης και στην οζόνωση παρατηρούνται φαινόμενα επανανεργοποίησης και απαιτούνται μεγαλύτερες δόσεις για την απομάκρυνση των ARGs (Pei et al., 2019).

Σε γενικές γραμμές οι ΜΕΛ θεωρείται ότι αποτελούν τόσο hotspot όσο και δεξαμενές ARGs. Το βιοφίλμ που σχετίζεται με τις επιφάνειες των δεξαμενών και των σωληνώσεων περιέχει ένα περιβάλλον που ευνοεί τις μακροχρόνιες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των βακτηριακών κυττάρων και των εξωκυτταρικών πολυμερικών ουσιών (EPS). Τα ARGs μπορεί να γίνουν μέρος του βιοφίλμ είτε σαν μέρος ανθεκτικών βακτηρίων είτε ως εξωκυτταρικό DNA. Επίσης, τόσο οι συνθήκες λειτουργίας όσο και ο σχεδιασμός μπορούν να επηρεάσουν τη μοίρα των ARB και ARGs στην βιολογική επεξεργασία. Οι Kim et al. (2007) αξιολόγησαν την τύχη των ανθεκτικών στην τετρακυκλίνη βακτηρίων σε βιολογικές επεξεργασίες και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι μια αύξηση τόσο στην οργανική φόρτιση όσο και στον ρυθμό ανάπτυξης είχε ως αποτέλεσμα την ενίσχυση της αντοχής των βακτηρίων στην τετρακυκλίνη.

Τέλος τα αντιβιοτικά που εισάγονται στις ΜΕΛ δεν απομακρύνονται πλήρως από τις βιολογικές επεξεργασίες ή τις διεργασίες απολύμανσης. Οι Miao et al. (2004) ανίχνευσαν πολλαπλά αντιβιοτικά που ανήκουν στις τάξεις μακρολιδίου, κινολόνης, σουλφοναμίδης και τετρακυκλίνης στα λύματα από οκτώ ΜΕΛ στον Καναδά, ενώ οι συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών ήταν έως $0,09 \mu\text{g L}^{-1}$ στα επιφανειακά ύδατα κοντά σε αυτά τις μονάδες. Αυτές οι συγκεντρώσεις δεν είναι πιθανό ότι θα προκαλέσουν οξεία τοξικότητα σε υδρόβια ζώα, αλλά μπορούν να βλάψουν τα υδρόβια φυτά και τους μικροοργανισμούς, καθώς και να συμβάλουν στην ανάπτυξη του ARGs στο νερό και στα ιζήματα. Η παρουσία αντιβιοτικών στους υδάτινους αποδέκτες δημιουργεί πιέσεις στα βακτήρια ευνοώντας την ανταλλαγή ARGs. Ως αποτέλεσμα των παραπάνω, συγκεντρώσεις ARGs και ARB απελευθερώνονται στο περιβάλλον αλλάζοντας το υπόβαθρο της ανθεκτικότητας καθώς πραγματοποιείτε ανταλλαγή γονιδίων με τα βακτήρια που υπάρχουν στο περιβάλλον.

Οι ΜΕΛ δεν μπορούν να εγκατασταθούν εύκολα σε κάθε περιοχή, λόγω του κόστους ανάπτυξης και συντήρησης. Επίσης, οι συμβατικές τριτογενείς επεξεργασίες έχουν υψηλό κόστος και συνοδεύονται από παραπροϊόντα επιβλαβή για την ανθρώπινη υγεία αλλά και παρουσιάζουν χαμηλή απόδοση σε ορισμένα παθογόνα και ρύπους. Τα παραπάνω οδηγούν στη διερεύνηση εναλλακτικών συστημάτων επεξεργασίας με

στόχο την εφαρμογή οικονομικότερων και αποδοτικότερων συστημάτων αλλά και την πιθανή εφαρμογή τους ακόμα και σε αναπτυσσόμενες χώρες.

3 ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α. ΤΕΧΝΗΤΟΙ ΥΔΡΟΒΙΟΤΟΠΟΙ

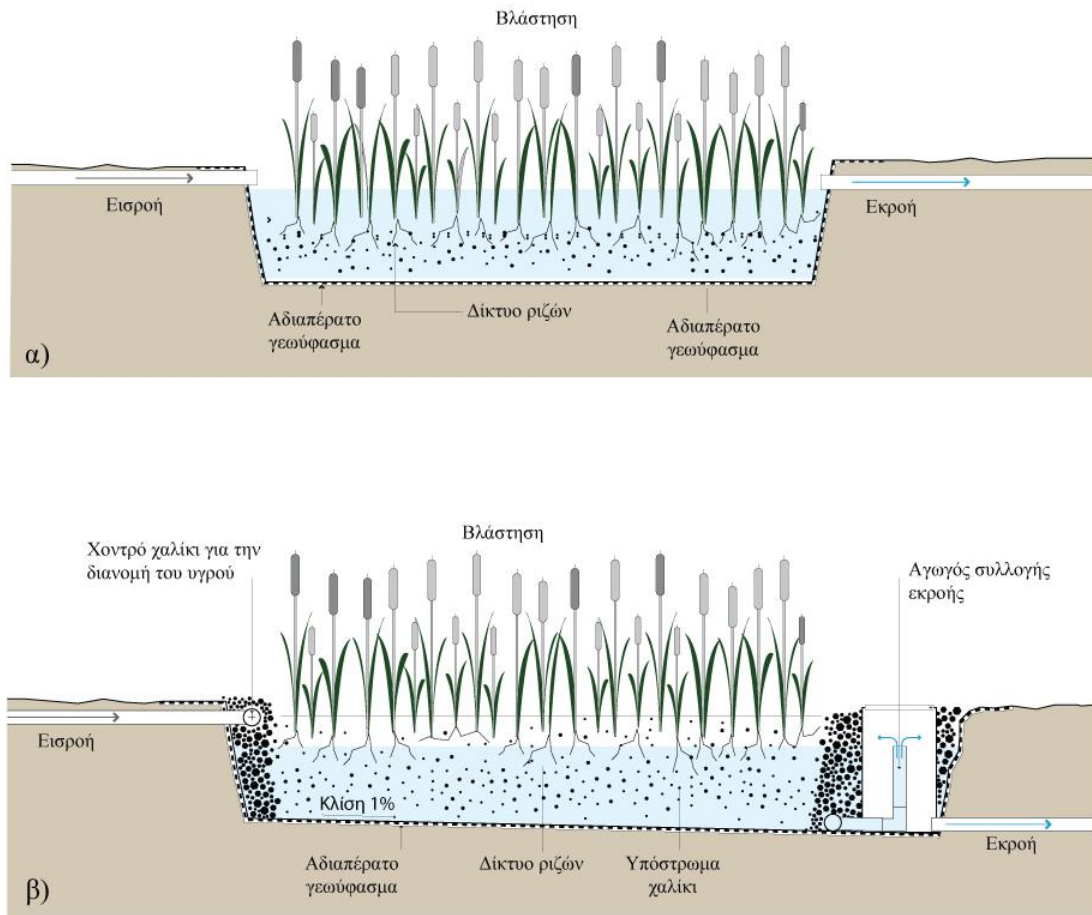
3.1 Εισαγωγή

Οι τεχνητοί υδροβιότοποι (Constructed Wetlands, CW) αποτελούν «πράσινη» τεχνολογία επεξεργασίας και ορίζονται ως μηχανικές κατασκευές, οι οποίες στην ουσία αντιγράφουν και αξιοποιούν τους φυσικούς, χημικούς και βιολογικούς μηχανισμούς των φυσικών υδροβιοτόπων με σκοπό την επεξεργασία διαφόρων τύπων υγρών αποβλήτων. Βασικό πλεονέκτημα των συστημάτων αυτών έναντι των συμβατικών μεθόδων αποτελεί το χαμηλό κόστος εγκατάστασης, λειτουργίας και συντήρησης. Ακόμα σημαντικό πλεονέκτημα τους είναι η εναρμόνιση τους με το φυσικό τοπίο και η αίσθηση ότι δημιουργούν χώρους πρασίνου που τους καθιστά πιο εύκολα αποδεκτούς από τις τοπικές κοινότητες. Το βασικό μειονέκτημα των CW είναι η σχετικά μεγάλη έκταση που απαιτείται για την εγκατάστασή τους. Λόγω των καλών αποδόσεων που μπορούν να επιτύχουν και του χαμηλού κόστους οι CW έχουν κερδίσει το ενδιαφέρον και αυτή τη στιγμή λειτουργούν πάνω από 50.000 CW στην Ευρώπη (Wu et al., 2015).

Οι CW χρησιμοποιούνται είτε ως συμπληρωματικό στάδιο κατά την τυπική και συνήθη επεξεργασία αποβλήτων (π.χ. ως τριτογενής επεξεργασία), είτε ως κύρια επεξεργασία. Έρευνες καταδεικνύουν ότι οι τεχνητοί υδροβιότοποι χαρακτηρίζονται ιδιαίτερα αποδοτικοί, δεδομένου ότι έχουν τη δυνατότητα να απομακρύνουν από αστικά και αγροτικά απόβλητα τα διάφορα θρεπτικά, όπως είναι το άζωτο και ο φωσφόρος, τα αιωρούμενα στερεά, ενώ παράλληλα μειώνουν αποτελεσματικά το βιοχημικώς απαιτούμενο οξυγόνο (Biochemical Oxygen Demand – BOD) και το χημικώς απαιτούμενο οξυγόνο (Chemical Oxygen Demand – COD) και τα ολικά αιωρούμενα στερεά (Total Suspended Solids – TSS) (Karathanasis et al., 2003; Upadhyay et al., 2016). Επίσης, δύνανται να αδρανοποιήσουν ποικιλία μικροοργανισμών που βρίσκονται στα απόβλητα, ανάλογα με τις εκάστοτε συνθήκες λειτουργίας (Wu et al., 2015). Ακόμη, έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στην επεξεργασία βιομηχανικών αποβλήτων, στραγγισμάτων χώρων υγειονομικής ταφής, αποβλήτων οινοποιιών, αποβλήτων κτηνοτροφικών μονάδων ακόμα και νοσοκομειακών αποβλήτων (Vymazal, 2014, 2009).

Σε γενικές γραμμές ένας τεχνητός υδροβιότοπος αποτελείται την λεκάνη, το υπόστρωμα και τη βλάστηση. Η λεκάνη έχει μικρή κλίση ενώ τα πρανή και ο πυθμένας καλύπτονται από αδιαπέραστο υλικό όπως γεώφασμα, σκυρόδεμα ή χαμηλής διαπερατότητας έδαφος όπως άργιλος. Το υπόστρωμα περιλαμβάνει το υλικό με το οποίο θα γεμίσει η λεκάνη, όπου συνήθως είναι κάποιο είδος χαλικιού. Η βλάστηση περιλαμβάνει την επιλογή των κατάλληλων φυτών που θα χρησιμοποιηθούν στον υδροβιότοπο.

Οι CW ταξινομούνται σύμφωνα με την υδρολογία στους υδροβιότοπους ελεύθερης επιφάνειας νερού (Free Water Surface, FWS) και τους υδροβιότοπους υποεπιφανειακής ροής (Sub Surface Flow, SSF). Τα συστήματα FWS είναι παρόμοια με τους φυσικούς υγροτόπους, με ρηχή ροή λυμάτων πάνω από ένα υπόστρωμα. Στα συστήματα SSF, τα λύματα ρέουν οριζόντια ή κάθετα μέσω του υποστρώματος που υποστηρίζει την ανάπτυξη των εγκαταστάσεων. Με βάση την κατεύθυνση της ροής, οι SSF CW θα μπορούσαν περαιτέρω να χωριστούν σε CW κάθετης ροής (Vertical Flow, VF) και οριζόντιας ροής (Horizontal Flow, HF). Ο συνδυασμός διαφορετικών τύπων υγροτόπων, είναι γνωστός ως υβριδικοί CW. Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί και άλλοι τύποι υδροβιότοπων όπως artificial aerated CWs, baffled flow CWs, hybrid towery CWs, step feeding CWs και circular flow corridor CWs για να βελτιώσουν την απόδοσή τους (Wu et al., 2015).



Εικόνα 8. Βασικοί τύποι υδροβιοτόπων: α) υδροβιότοπος επιφανειακής ροής, β) υδροβιότοπος οριζόντιας υποεπιφανειακής ροής. Μετατροπή από Tilley et al., 2008

Είναι σημαντικό το γεγονός ότι οι υδροβιότοποι οριζόντιας ροής μπορούν να επεξεργαστούν με επιτυχία απόβλητα με χαμηλές συγκεντρώσεις οργανικών, ενώ οι παραδοσιακές μέθοδοι επεξεργασίας όπως η ενεργός ιλύς, συνήθως αδυνατούν να επεξεργαστούν απόβλητα με συγκεντρώσεις χαμηλότερες από $58 - 80 \text{ mg L}^{-1}$ (Vymazal, 2009). Είναι γνωστό ότι οι τεχνητοί υδροβιότοποι λειτουργώντας ως τριτοβάθμια επεξεργασία επιτυγχάνουν σημαντικές απομακρύνσεις στο BOD_5 και στα SS. Αντίθετα, η απομάκρυνση των θρεπτικών είναι περισσότερο προβληματική. Καθώς ο αερισμός είναι περιορισμένος, ειδικά στη περίπτωση των SSF οριζόντιας ροής, η νιτροποίηση επιτυγχάνεται σε χαμηλό βαθμό. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις φωσφόρου το ποσοστό απομάκρυνσης μπορεί να φτάσει το 60 - 90 %. Οι υδροβιότοποι που χρησιμοποιούνται ως μονάδες τριτοβάθμιας επεξεργασίας μπορούν να απομακρύνουν αποτελεσματικά παθογόνους μικροοργανισμούς. Ταυτόχρονα, τελευταίες μελέτες δηλώνουν ότι το μέγεθος του πορώδους μέσου και ο υδραυλικός

χρόνος παραμονής (HRT) επηρεάζουν την απομάκρυνση των παθογόνων. Λεπτότερο χαλίκι και μεγαλύτερος χρόνος παραμονής βελτιώνουν την απόδοση της επεξεργασίας. Τέλος οι τεχνητοί υδροβιότοποι μπορούν να απομακρύνουν αποτελεσματικά χαμηλής συγκέντρωσης συνθετικά όπως φαρμακευτικά είδη, προϊόντα προσωπικής φροντίδας και βαρέα μέταλλα (Vymazal, 2009).

3.2 Σχεδιασμός

Οι παράμετροι που έχουν τους πιο σημαντικούς ρόλους στην επεξεργασία των ρύπων και κατά συνέπεια θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη στο σχεδιασμό των τεχνητών υδροβιοτόπων είναι η βλάστηση, το υπόστρωμα, ο υδραυλικός χρόνος παραμονής (HRT) και το βάθος του νερού.

Η βλάστηση έχει ουσιώδη ρόλο στη λειτουργία των υδροβιοτόπων, συμβάλλοντας με διαφορετικές λειτουργίες στην απόδοση των συστημάτων. Η παρουσία των φυτών συμβάλλει στην προσφορά οξυγόνου στα χαμηλότερα σημεία μέσω του ριζικού συστήματος ενώ ταυτόχρονα αυξάνει την προσφερόμενη επιφάνεια για την προσρόφηση των ουσιών και των βακτηρίων. Τα τελευταία χρόνια εξετάζεται η ικανότητα των φυτών να απορροφούν μέσω των ριζών τους διάφορους ρύπους όπως τα αντιβιοτικά (plant uptake) (Shelef et al., 2013). Επίσης οι ρίζες συμβάλλουν στη μείωση των βακτηρίων μέσω των εκκρίσεων βακτηριοκτόνων ουσιών. Τα φυτά που θα επιλεγθούν να τοποθετηθούν σε ένα CW θα πρέπει να έχουν αντοχή σε ανοξικές και υπερ-ευτροφικές συνθήκες γι' αυτό κατά την επιλογή των φυτών είναι σημαντικό να λαμβάνεται υπόψιν ο τύπος και η σύσταση του λύματος που θα εισέρχεται στο CW. Σε συνθήκες ευτροφισμού ή σε υψηλές συγκεντρώσεις αμμωνίας είναι πιθανή η καταστροφή των φυτών. Για παράδειγμα μελέτες έχουν δείξει ότι το *Typha latifolia* στρεσάρετε όταν υπάρχουν υψηλές συγκεντρώσεις αμμωνίας $160 - 170 \text{ mg L}^{-1}$ ενώ το *Scirpus validus* αντίθετα παρουσιάζει αντοχή. Άλλη μελέτη έχει δείξει ότι συγκεντρώσεις $\text{COD} \geq 200 \text{ mg L}^{-1}$ επηρεάζουν το μεταβολισμό του *Phragmites australis*, το οποίο αντίθετα είναι ανθεκτικό και μπορεί να επεξεργαστεί τις συγκεντρώσεις αντιβιοτικών που βρίσκονται στα απόβλητα. Αλλά φυτά όπως το *Arundo donax* και το *Sarcocornia fruticosa* παρουσιάζουν ανοχή στην αλατότητα ενώ το *Typha angustata* μπορεί να επιβιώσει σε υψηλές συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων ($\text{Cr VI } 30 \text{ mg L}^{-1}$). Επίσης θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη και η αντοχή των φυτών στις κλιματολογικές συνθήκες της εκάστοτε περιοχής (Wu et al., 2015). Συνήθως τα

μακρόφυτα χρησιμοποιούνται στους CW με τα είδη των αναδυόμενων *Phragmites sp.* (Poaceae), *Typha sp.* (Typhaceae), *Scirpus sp.* (Cyperaceae), *Iris sp.* (Iridaceae), *Juncus sp.* (Juncaceae) και *Eleocharis sp.* (Spikerush) να εμφανίζονται συχνότερα.

Η επιλογή του υποστρώματος διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη λειτουργία των CW καθώς καθορίζει τόσο την υδραυλική διαπερατότητα όσο και την απορρόφηση των ρύπων. Η ανεπαρκής υδραυλική αγωγιμότητα οδηγεί σε φράξιμο (clogging) του συστήματος και στη μείωση της αποδοτικότητάς του. Διαφορετικά υποστρώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την απορρόφηση διαφορετικών ρύπων. Ανάλογα με το υπόστρωμα μπορεί να επιτυγχάνονται διαφορετικά αποτελέσματα στην απομάκρυνση φωσφόρου και αμμωνίας ενώ ο τύπος του υποστρώματος επηρεάζει και την προσκόλληση των βακτηρίων (Wu et al., 2015).

Το βάθος του νερού αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για τον προσδιορισμό των τύπων των φυτών, τα οποία θα εγκατασταθούν και θα επηρεάσει επίσης τις βιοχημικές αντιδράσεις οι οποίες είναι υπεύθυνες για την απομάκρυνση των ρύπων, επηρεάζοντας την οξειδοαναγωγή και το επίπεδο του διαλυμένου οξυγόνου (Wu et al., 2015).

3.3 Απομάκρυνση παθογόνων μικροοργανισμών

Εστιάζοντας στους παθογόνους μικροοργανισμούς, οι μηχανισμοί που συμβάλλουν στην απομάκρυνση τους θα μπορούσαν να χωριστούν σε φυσικούς, χημικούς και βιολογικούς.

Στους φυσικούς μηχανισμούς περιλαμβάνονται το φιλτράρισμα και η καθίζηση και στους χημικούς περιλαμβάνονται η οξείδωση και η προσρόφηση. Οι βιολογικοί περιλαμβάνουν μηχανισμούς που βασίζονται στις αλληλεπιδράσεις των μικροοργανισμών με το βιοφίλμ και τη ριζόσφαιρα. Επίσης περιλαμβάνουν τη θήρευση από τα νηματώδη και τα πρώτιστα, την επίθεση από λυτικά βακτήρια και ιούς, τον ανταγωνισμό για θρεπτικά και το φυσικό θάνατο. Κάθε μηχανισμός μπορεί να έχει μεγαλύτερη ή μικρότερη συμβολή ανάλογα με το είδος του υδροβιοτόπου καθώς και να έχει διαφορετική αποτελεσματικότητα απέναντι στα διαφορετικά είδη μικροοργανισμών (Morató et al., 2014a).

Ο μηχανισμός της καθίζησης λαμβάνει χώρα κυρίως στους FWS CW όπου τα μεγαλύτερα σε μέγεθος παθογόνα όπως τα πρωτόζωα και οι ωοκύστες καθιζάνουν στο πυθμένα λόγω της βαρύτητας. Γι' αυτόν τον λόγο έχει παρατηρηθεί μεγάλος αριθμός

κοπρανωδών βακτηρίων (fecal coliforms) στα ιζήματα των τεχνητών υδροβιοτόπων και αυτό συνεπάγεται ότι τα κατώτερα στρώματα μπορούν να αποτελέσουν δεξαμενή παθογόνων μικροοργανισμών.

Η προσρόφηση πραγματοποιείται στη ριζόσφαιρα και στο υπόστρωμα όπου τα μικρόβια προσκολλώνται στις ρίζες των φυτών και στο πορώδες μέσο. Η προσκόλληση πραγματοποιείται λόγω των διαφορετικών φορτίων που αναπτύσσονται μεταξύ των βακτηρίων και των επιφανειών. Σημαντικό ρόλο σε αυτό έχει η ανάπτυξη του βιοφίλμ, του οποίου η δημιουργία ευνοείται με την παρουσία των φυτών.

Η αποτελεσματικότητα των CW απέναντι στους μικροοργανισμούς έχει αναφερθεί σε πολλές μελέτες και είναι γνωστή εδώ και αρκετά χρόνια. Οι τεχνητοί υδροβιότοποι έχουν δείξει ότι μπορεί να πετύχουν σημαντική μείωση των μικροοργανισμών μέσω των παραπάνω μηχανισμών. Στη μελέτη των Thurston et al. όπου εξετάζεται CW υποεπιφανειακής ροής δεχόμενος λύμα από την εκροή δευτεροβάθμιας επεξεργασίας, οι βακτηριακοί δείκτες FC και TC έδειξαν μείωση πάνω από 98% και οι κολιφάγοι 95%. Τα πρωτόζωα *Giardia* και *Cryptosporidium* απομακρύνθηκαν αποτελεσματικά από τους τεχνητούς υδροβιότοπους όμως σε χαμηλότερα ποσοστά 87% και 64% αντίστοιχα. Οι κύστες της *Giardia* απομακρύνθηκαν πιο αποτελεσματικά εξαιτίας του μεγαλύτερου μεγέθους (Thurston et al., 2001). Παρόμοιες αποδόσεις έδωσε υβριδικό σύστημα υδροβιοτόπων αποτελούμενο από λίμνη, υδροβιότοπο ελεύθερης επιφάνειας και υδροβιότοπο υποεπιφανειακής ροής τα οποίοι επεξεργάστηκαν αστικά λύματα. Οι βακτηριακοί δείκτες απομακρύνθηκαν σε ποσοστό 99% ενώ οι κολιφάγοι παρουσίασαν απομάκρυνση 78% (Reinoso et al., 2008).

Το υπόστρωμα αποτελεί παράγοντα κλειδί για την απομάκρυνση μικροβίων. Σε γενικές γραμμές το μικρότερο πορώδες μέσο βελτιώνει την απόδοση του CW κατά 1 με 2 λογαριθμικές μονάδες και για τα κολοβακτηρίδια και για τους σωματικούς κολιφάγους. Επίσης, το πορώδες μέσο επηρεάζει τη δημιουργία του βιοφίλμ. Έχει αναφερθεί ότι η ανάπτυξη EPS είναι υψηλότερη σε χαλίκι 5 mm σε σύγκριση με χαλίκι 20 mm.

Οι Garcia et al. εξετάζουν στη μελέτη τους και αξιολογούν το ρόλο του υδραυλικού χρόνου παραμονής στην απομάκρυνση των κοπρανωδών βακτηρίων και των σωματικών κολοβακτηριοφάγων σε τριτοβάθμια συστήματα CW. Στα αποτελέσματα της έρευνας τους αναφέρουν ότι χρησιμοποιώντας υδραυλικό χρόνο παραμονής 3

ημερών το σύστημα είχε καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με HRT λιγότερων ημερών (García et al., 2010, 2003). Σε συμφωνία είναι και η μελέτη των Solano et al., οι οποίοι αναφέρουν ότι χρησιμοποιώντας χαμηλότερο υδραυλικό χρόνο φόρτισης είχαν καλύτερα αποτελέσματα στην απομάκρυνση των βακτηριακών δεικτών TC, FC και FS (Solano et al., 2004).

Οι πληροφορίες για τη σχέση του βάθους των υδροβιοτόπων με την απομάκρυνση είναι ελλιπείς. Παρόλα αυτά αναφέρεται ότι σε μικρότερο βάθος (0.27m) η απομάκρυνση των ολικών κολοβακτηριδίων και της *E.coli* είναι μεγαλύτερη από ότι σε μεγαλύτερο βάθος (0.5m) (Wu et al., 2015).

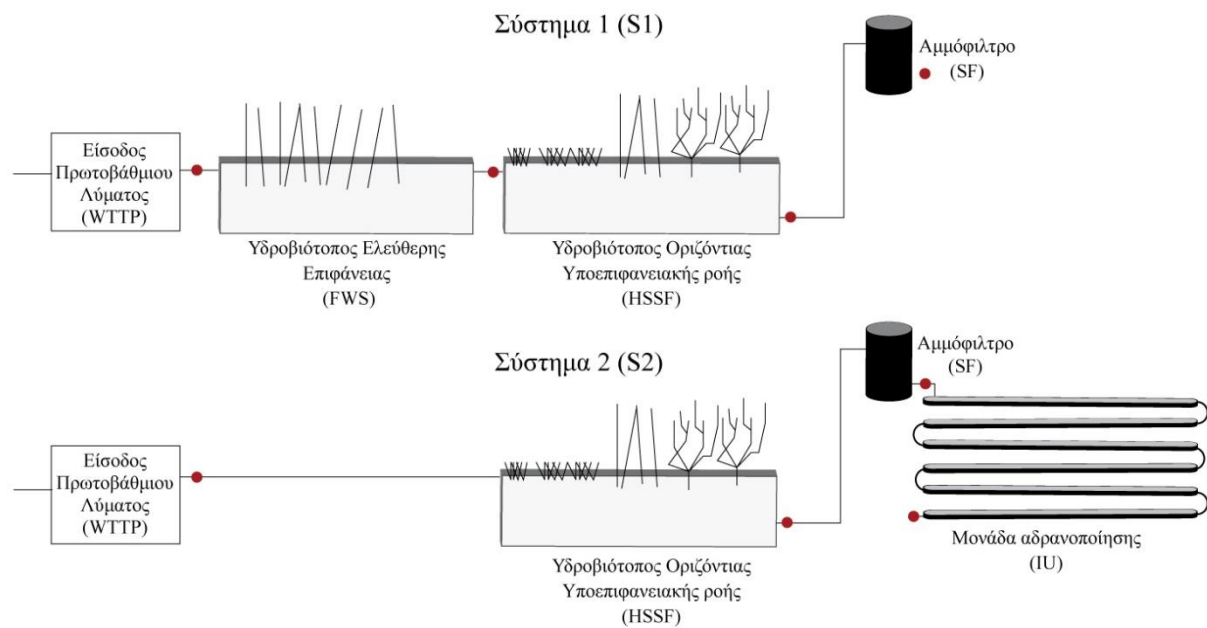
Στο πλαίσιο της διατριβής στόχος ήταν να εκτιμηθεί η ικανότητα δύο συστημάτων CW να απομακρύνουν τους βακτηριακούς δείκτες και τους ιούς εντερικής προέλευσης ποσοτικοποιώντας τις συγκεντρώσεις στις εκροές τους. Επιπλέον, εξετάστηκε η συμπεριφορά των βακτηριακών δεικτών ως προς την ανθεκτικότητα τους σε αντιβιοτικά μετά την επεξεργασία από CW. Τέλος, στόχος είναι να εξεταστεί η εκροή του CW ως προς τις συγκεντρώσεις ARGs σε διαφορετικού τύπου γενετικό υλικό.

3.4 Πειραματικός σχεδιασμός

3.4.1 Υδροβιότοποι Ηράκλειου

Ένας υδροβιότοπος ελεύθερης επιφάνειας και ένας υποεπιφανειακής ροής αναπτύχθηκαν από το εργαστήριο Αξιοποίησης Φυσικών Πόρων και Γεωργικής Μηχανικής του Μεσογειακού Πανεπιστημίου Ηρακλείου. Οι υδροβιότοποι αυτοί χρησιμοποιήθηκαν στα συστήματα επεξεργασίας S1 και S1, όπως φαίνεται στην εικόνα 9. Ο υδροβιότοπος ελεύθερης επιφάνειας (FWS) είχε μήκος 12,4 m. και πλάτος 3,4 m. ενώ τοποθετήθηκαν μικτές καλλιέργειες δύο ειδών καλαμιού, τα *P. australis* και το *Arundo donax*. Οι διαστάσεις του υγροτόπου οριζόντιας υποεπιφανειακής ροής (HSSF) ήταν μήκους 8,4 m και πλάτους 5,4 m και περιείχε χονδρόκοκκο χαλίκι (60-100 mm).

Στον HSSF τοποθετήθηκαν τέσσερα είδη αλόφυτων, τα *Tamarix parviflora*, *Limoniastrum monopetalum*, *Juncus sp.* και *Sarcocornia perennis*. Το αμμόφιλτρο (SF) είχε επιφάνεια 0,38 m² και περιείχε χαλίκι μέχρι τα 0,5 cm και άμμο μέχρι τα 50 cm. Η μονάδα αδρανοποίησης (Inactivation Unit, IU) κατασκευάστηκε από κανάλια χαμηλού βάθους που περιείχαν ως υπόστρωμα πορώδεις πήλινες μπάλες επικαλυμμένες με νανοσωματίδια Ag (Ag NP) και βαμμένες με TiO₂.



Εικόνα 9. Σχηματική αναπαράσταση των δύο εξεταζόμενων συστημάτων, S1 και S2. Οι κόκκινες κουκκίδες δείχνουν τα σημεία δειγματοληψίας.



Εικόνα 10. Τεχνητοί υδροβιότοποι συστήματος: α) υδροβιότοπος ελεύθερης επιφάνειας (FWS), β) υδροβιότοπος υποεπιφανειακής ροής (HSSF), γ) υδροβιότοποι FWS και HSSF, δ) αμμόφιλτρο (SF) μαζί με τη μονάδα αδρανοποίηση (IU), ε) κανάλι μονάδας IU.

Αρχικά, οι δύο υδροβιότοποι λειτούργησαν σε σειρά (Σύστημα 1, S1) ενώ στη συνέχεια αφαιρέθηκε ο υδροβιότοπος ελεύθερης επιφάνειας και προστέθηκε η μονάδα αδρανοποίησης (Σύστημα 2, S2). Στην εικόνα 9 παρουσιάζεται η διάταξη των υδροβιοτόπων. Και τα δύο συστήματα δέχονταν αστικά λύματα από την έξοδο της πρωτοβάθμιας επεξεργασίας της μονάδας επεξεργασίας λυμάτων του Ηρακλείου, η οποία εξυπηρετεί 175.000 κατοίκους. Τα συστήματα τροφοδοτούνταν με λύμα με ηλεκτρικές βάνες και χρονοδιακόπτη ώστε να προσομοιωθεί ο χρόνος φόρτισης όπως συμβαίνει σε μια ΜΕΛ. Η συνολική φόρτιση του συστήματος ήταν $1,4 \text{ m}^3 \text{ d}^{-1}$ και ο υδραυλικός χρόνος παραμονής 4 d.

Τα φυσικοχημικά συστατικά του λύματος στην είσοδο και την έξοδο των συστημάτων παρουσιάζονται στον Πίνακα. Οι αυξημένες τιμές οφείλονται στη αλλαγή του συστήματος και στην απομάκρυνση του FWS

Πίνακας 2. Χαρακτηρισμός λύματος εισροής συστημάτων Ηρακλείου (Christofilopoulos, 2017)

Παράμετροι	Είσοδος	Έξοδος	
BPA	0.03 – 1.61	ND – 0.08	mg L ⁻¹
pH	6.8 – 8.1	7.1 – 8.6	
EC	1.0 – 2.5	1.1 – 2.6	mS cm ⁻¹
BOD	45-195	30-70	mg L ⁻¹
COD	98.5 – 428.0	79.7 – 162.0	mg L ⁻¹
Total Nitrogen	41.9 – 156.0	35.3 – 111.0	mg L ⁻¹
Ammonium-N	10.9 – 86.5	10.1 – 61.1	mg L ⁻¹
Nitrate-N	0.2 – 22.8	0.2 – 10.7	mg L ⁻¹
Total Phosphorus	3.3 – 87.3	1.1 – 85.5	mg L ⁻¹
Boron	0.2 – 0.6	0.01 – 0.4	mg L ⁻¹

3.4.2 Υδροβιότοπος Χανίων

Στο χώρο που βρίσκεται η μονάδα επεξεργασίας λυμάτων των Χανίων αναπτύχθηκε υδροβιότοπος μικρότερου μεγέθους με σκοπό την αξιολόγηση του ως μονάδας τριτοβάθμιας επεξεργασίας. Ο υδροβιότοπος που αναπτύχθηκε ήταν υποεπιφανειακής ροής με διαστάσεις (2 m x 0,5 m x 0,5 m), ενώ ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε χαλίκι μεγέθους 0,8-1,25 cm. Ο υδροβιότοπος τροφοδοτείτο με λύμα από την έξοδο της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας και πραγματοποιήθηκαν πειράματα με υδραυλικό χρόνο παραμονής 1 και 2 d. Κατά τη διάρκεια του πειράματος υπήρξαν διαστήματα κατά τα οποία ο υδροβιότοπος επιφορτίστηκε τεχνητά με ποσότητες των αντιβιοτικών σουλφαμεθοξαζόλη (sulfamethoxazole, SMX) και σιπροφλοξασίνη (ciprofloxacin, CIP).



Εικόνα 11. Τεχνητοί υδροβιότοποι Χανίων: α) Υδροβιότοπος χωρίς βλάστηση (Control), β) Υδροβιότοπος με βλάστηση (HSSF).

3.4.3 Δειγματοληψίες

Τα δείγματα για τους βακτηριακούς δείκτες TC, *E. coli*, Enterococci και για τους βακτηριοφάγους MS2 συλλέχθηκαν χρησιμοποιώντας αποστειρωμένα μπουκάλια των 500 mL. Για την δειγματοληψία των ιών από την είσοδο τους συστήματος και από την έξοδο του FWS χρησιμοποιήθηκαν αποστειρωμένες πλαστικές φιάλες του 1,5 L, ενώ για τα δείγματα από τον HSSF και τη IU του Ηρακλείου και του HSSF των Χανίων, η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την μέθοδο EPA 1615 (USEPA, 2012) χρησιμοποιώντας το ηλεκτροθετικό φίλτρο Nanoceram® (Argonide, Sanford, FL). Για τους βακτηριοφάγους συλλέχθηκαν 50 mL από την εκροή του κάθε εξεταζόμενου συστήματος. Συνολικά, διηθήθηκαν από το φίλτρο 120 L επεξεργασμένων λυμάτων και όλα τα συλλεχθέντα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε πάγο για την μεταφορά τους στο εργαστήριο. Δειγματοληψίες δεν πραγματοποιήθηκαν τις ημέρες που είχε προηγηθεί έντονη βροχόπτωση, έτσι ώστε να αποφευχθεί η αραίωση των δειγμάτων.

3.4.4 Αναλύσεις

3.4.4.1 Ανίχνευση και καταμέτρηση βακτηριακών δεικτών κοπρανώδους μόλυνσης

Η ποσοτικοποίηση των αποικιών των βακτηριακών δεικτών πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της διήθησης χρησιμοποιώντας φίλτρο εστέρα κυτταρίνης μεγέθους πόρων 0,45 μm (Whatman®) ενώ μετά την διήθηση το φίλτρο επώαστηκε σε εκλεκτικά μέσα mEndo Agar LES (HIMEDIA), HiCrome *E. Coli* Agar (HIMEDIA) και Slanetz & Bartley Medium (HIMEDIA) προκειμένου να επιτευχθούν διακριτές αποικίες TC, *E.*

coli και Enterococci, αντίστοιχα. Η συγκέντρωση των σχηματιζόμενων αποικιών (Colony Forming Units, CFUs) εκτιμήθηκε μετά από επώαση στους 37°C για 24 h για TC και *E. coli* και μετά από 48 h για τα Enterococci. Οι τελευταίες επιβεβαιώθηκαν με μεταφορά των μεμβρανών σε Agar Bile Aesculin (HIMEDIA) που ακολουθείται από επώαση στους 44°C για δύο h. Οι εντερόκοκκοι υδρολύουν την αβεσουλίνη σε αυτό το μέσο εντός 2 h.

3.4.4.2 Ανίχνευση και καταμέτρηση βακτηριοφάγου MS2

Οι MS2 κολιφάγοι (ATCC 15597-B1) και ο βακτηριακός ξενιστής *E. coli* (ATCC 15597) ελήφθησαν από την American Type Culture Collection (Manassas, VA 20108 USA). Οι βακτηριοφάγοι πολλαπλασιάστηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν με τη μέθοδο ανάλυσης πλάκας (διπλό στρώμα μαλακού άγαρ), η οποία επικυρώνεται με το ISO 10705-1. Ο ξενιστής αναπτύχθηκε σε εκχύλισμα τρυπτόνης-ζύμης-γλυκόζης (TYGB) και χρησιμοποιήθηκε στην εκθετική έως και πρόωρη στατική του φάση. 1 mL του δείγματος χρησιμοποιήθηκε εις διπλούν και επώασθηκε στους 37° C για 18-24 h. Οι πλάκες που σχηματίστηκαν (Plaque Forming Units, PFUs) στα τρυβλία μετρήθηκαν την επόμενη ημέρα.

3.4.4.3 Ιολογική Ανάλυση

Η ιολογική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε σε αυτή τη διατριβή περιελάμβανε την επικύρωση των υφιστάμενων πρωτοκόλλων και τροποποιήσεων αυτών με σκοπό την αξιόπιστη και ακριβή αναγνώριση των επιλεγμένων ιών. Η πορεία για όλα τα στάδια της ιολογικής ανάλυσης εμφανίζονται στην εικόνα Π1 του Παραρτήματος

Η έκλουση και η επανασυγκέντρωση των ιών από το φίλτρο που χρησιμοποιήθηκε στην εκροή του HSSF και της IU εκτελέστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο EPA 1615 με βάση τη μέθοδο προσρόφησης / έκλουσης ιού (VIRADEL)(Cashdollar and Wymer, 2013). Για την έκλουση, 1 L διαλύματος Beef Extract διέρχεται μέσω του φίλτρου με περισταλτική αντλία. Στη συνέχεια ακολουθεί διαδικασία οργανικής κροκίδωσης και επανασυγκέντρωσης. Τέλος, πραγματοποιήθηκε τριτογενής συγκέντρωση με υπέρ - φυγοκέντριση χρησιμοποιώντας τα υπερφίλτρα Vivaspin 20 (Sartorius). Από τα συμπυκνώματα έγινε εξαγωγή ιικού νουκλεϊκού οξέος χρησιμοποιώντας το QiAamp DNA Mini και το QiAamp ιικό RNA kit (Qiagen) για τους αδενοϊούς και τους εντεροϊούς, αντίστοιχα, ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Αλυσιδωτή αντίδρασης πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR) & Real Time PCR

Για την ανίχνευση των αδενοϊών και των εντεροϊών διεξήχθησαν NESTED-PCR και RT-NESTED PCR αντίστοιχα. Η σύνθεση του συμπληρωματικού DNA (complementary DNA, cDNA) διεξήχθη χρησιμοποιώντας 5 μL από το νουκλεϊκό οξύ που απομονώθηκε προσθέτοντας 2.5 mM MgCl_2 (Biotools), 1x PCR buffer II (Biotools) που περιέχει 10 mM Tris-HCl (pH 8.3 στους 25°C), 50 mM KCl, 200 μM από κάθε τριφωσφορικό δεοξυνουκλεοτίδιο (dNTPs) και τον εκκινητή (primer) για τον εντεροϊό (2,5 μM Ent2) σε συνολικό όγκο 10 μL . Το μίγμα της αντίδρασης επωάζεται στους 95 °C για 5 min και στη συνέχεια τοποθετείται σε πάγο, πριν από την προσθήκη 1 μL αναστολέα RNase (Biolabs inc), 0,5 μL DTT και 1 μL αντίστροφης μεταγραφάσης M-MuLV (Biolabs inc). Η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 42°C για 30 min και στους 90 °C για 5 min (Puig et al., 1994)

Για την τυπική αντίδραση PCR, χρησιμοποιούνται 10 μL από το δείγμα ιικού DNA για τους αδενοϊούς και 10 μL cDNA για τους εντεροϊούς. Η ενίσχυση διεξάγεται σε διάλυμα αντίδρασης 50 μL που περιέχει 1,5 mM MgCl_2 , 1xPCR Buffer II (Perkin-Elmer Roche, Inc.) που περιέχει 10 mM Tris-HCl (pH 8,3 στους 25 °C), 50 mM KCl, 200 μM τριφωσφορικό δεσοξυνουκλεοτίδιο, εκκινητή αδενοϊού (HEXA) 0.08 μM ή εκκινητή εντεροϊού (Ent2) 0,15 μM και 2U DNA πολυμεράσης One Taq (Biolabs inc). Για όλες τις αντιδράσεις PCR, η αρχική αποδιάταξη διεξάγεται για 4 min στους 94 °C. Οι συνθήκες για την αντίδραση ενίσχυσης ήταν: αποδιάταξη (denaturation) στους 92 °C για 90 s, υβριδισμός εκκινητών (annealing) στους 55 °C για 90 s και επιμήκυνση (extension) στους 72 °C για 120 s.

Ένα μL από την παραπάνω αντίδραση χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα DNA στη NESTED-PCR. Το νέο διάλυμα είχε τελικό όγκο 40 μL που περιέχει κάθε ζεύγος εκκινητών σε 0,16 μM για την ανίχνευση αδενοϊού και 0,20 μM για την ανίχνευση εντεροϊού και η ενίσχυση έγινε για 30 κύκλους (Pina κ.ά., 1998). Όλοι οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την έρευνα καθώς και οι αλληλουχίες νουκλεοτιδίων τους φαίνονται στον Πίνακα Π 1 του Παραρτήματος. Το προϊόν των PCR επιβεβαιώθηκε με ηλεκτροφόρηση πηκτής (1,5% αγαρόζη). Για τα αρνητικά δείγματα χρησιμοποιήθηκε υπερκάθαρο νερό (MilliQ) ενώ για τον θετικό έλεγχο χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη

Adenovirus serotype 40 και Coxsackie B5, για αδενοϊούς και εντεροϊούς αντίστοιχα, τα οποία είχαν απομονωθεί από ασθενείς σε νοσοκομείο.

Η ποσοτικοποίηση των εντερικών ιών πραγματοποιήθηκε με Real-Time PCR. Τα πρότυπα (standards) των AdV και EVs παρασκευάστηκαν από τα δείγματα θετικά κοντρόλ της NESTED - PCR. Μετά την ηλεκτροφόρηση τα θετικά δείγματα κόπηκαν από το gel αγαρόζης και καθαρίστηκαν χρησιμοποιώντας το κιτ NucleoSpin® Gel και PCR Clean Up (MACHEREY-NAGEL, Germany). Μετά τον καθαρισμό, το προϊόν PCR κλωνοποιήθηκε σε φορέα TOPA-TA πλάσματος (pCR II – TOPO vector, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA) σύμφωνα με τις οδηγίες και το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Στη συνέχεια τα κλωνοποιημένα πλασμίδια μετασχηματίστηκαν σε competent cells *E. coli* DH5™-T1^R και τα μετασχηματισμένα βακτηρία επώαση σε άγαρ LB που περιείχε αμπικιλίνη. Μετά από μια ολονύκτια επώαση σε υγρή κυτταρική καλλιέργεια, το πλασμιδιακό DNA εξήχθη χρησιμοποιώντας το Invisorb® Plasmid Midi Kit (Stratec, Germany). Το καθαρισμένο ανασυνδυασμένο πλασμιδιακό DNA ποσοτικοποιήθηκε με φασματοφωτόμετρο UV (BioPhotometer, D300, Eppendorf, Hamburg, Germany) και στη συνέχεια αραιώθηκε σειριακά σε υπερκάθαρο αποστειρωμένο νερό (Milli-Q®).

Η Real-Time PCR πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα αντίδρασης 20 µL αποτελούμενο από 2,0 X SYBR Green Master Mix (KapaBiosystems, USA), 200 nmol L⁻¹ των primers, NHEXA / NHEXB ή NEnt1 / NEnt2 για AdV και EVs αντίστοιχα, και 2 µL του προτύπου DNA / cDNA. Τα δείγματα ενισχύθηκαν και ανιχνεύθηκαν χρησιμοποιώντας το PCR AB StepOnePlus™ Real-Time (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Το θερμικό προφίλ ήταν: 95 °C για 10 min στο στάδιο παραμονής (holding stage) και οι κύκλοι ήταν 95 °C για 30 s, 55 °C για 1 min, 72 °C για 1 min για 35 κύκλους, ενώ το στάδιο της καμπύλης τήξης ήταν 95 °C για 15 s, 55 °C για 30 s και 95 °C για 15 s.

Για την αλληλούχιση των προϊόντων της PCR και τη δημιουργία των φυλογενετικών δέντρων ώστε να απαντηθεί με ποιους τύπους ιών έχουν ομοιότητες οι αλληλουχίες, τα προϊόντα στάλθηκαν για ανάλυση στη StarSEQ (Germany) σύμφωνα με τις οδηγίες που παρέχονται στην ιστοσελίδα τους. Οι αναλυμένες αλληλουχίες συγκρίθηκαν με αλληλουχίες από τη βάση δεδομένων NCBI χρησιμοποιώντας το λογισμικό Blast. Για

τη στοίχιση των επιλεγμένων αλληλουχιών (sequence alignment) και τη δημιουργία των φυλογενετικών δέντρων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό MEGA X.

3.4.4.4 Έλεγχος ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά των απομονωμένων βακτηριακών δεικτών

Επιλεγμένες αποικίες *E. coli* και εντεροκόκκων ελέγχθηκαν ως προς την ανθεκτικότητά τους στα αντιβιοτικά εκτιμώντας την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (minimum inhibitory concentration - MIC) των επιλεγμένων αντιβιοτικών: σιπροφλοξασίνη (ciprofloxacin, CIP), σουλφαμεθοξαζόλη (sulfamethoxazole, SMX), τετρακυκλίνη (TET), αμοξικιλίνη (amoxicillin, AMOX), και κεφακλόρη (cefaclor, CEF). Η επιλογή των αντιβιοτικών έγινε με στόχο να αντιπροσωπεύονται οι διαφορετικές κλάσεις αντιβιοτικών. Η CIP ανήκει στις κινολόνες, η SMX στις σουλφοναμίδες, η TET στις τετρακυκλίνες, η AMOX στις πενικιλίνες και η CEF στις κεφαλοσπορίνες. Τα δύο τελευταία αντιβιοτικά ανήκουν στην ομάδα των βήτα λακταμών (β -lactams) η οποία αποτελεί την ευρύτερη ομάδα αντιβιοτικών. Η τιμή MIC υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας τη μικρομέθοδο αραιώσεων σε ζωμό (Broth Microdilution Method), βάσει πρωτοκόλλου CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Το MIC₆₀ αναφέρεται στην ελάχιστη συγκέντρωση ενός αντιμικροβιακού παράγοντα, που επαρκεί για 60% μείωση ενός βακτηριακού πληθυσμού. Στη συνέχεια στα πηγαδάκια δίσκων μικροτιτλοδότησης (microplates, 96 well) τοποθετήθηκαν οι κατάλληλες συγκεντρώσεις κάθε αντιβιοτικού οι οποίες ήταν: 20-0,08 mg L⁻¹ για τη CIP και την AMOX και 128-0,5 mg L⁻¹ για SMX και TET. Το εύρος συγκεντρώσεων επιλέχθηκε σύμφωνα με την EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Standards). Κάθε πηγαδάκι εμβολιάστηκε με το βακτηριακό στέλεχος του οποίου η τελική συγκέντρωση ήταν 10⁵ CFUs mL⁻¹. Οι δίσκοι μικροτιτλοδότησης επώστηκαν στους 37 °C για 18-24 h και ακολούθησε μέτρηση οπτικής πυκνότητας στα 630 nm, χρησιμοποιώντας το φωτόμετρο ανάγνωσης μικροπιακών (Labtech LT-4000 Plate Reader) και το λογισμικό Manta LML (England). Τα σημεία ευαισθησίας / αντοχής προσδιορίστηκαν σύμφωνα με τα κριτήρια που προτείνει το EUCAST (Eucast, 2019), ενώ για το CEF προσδιορίστηκαν από το Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2013). Στον Πίνακα 3 φαίνονται οι τιμές MIC₆₀ για το *E. coli* και τους εντεροκόκκους στα επιλεγμένα αντιβιοτικά.

Πίνακας 3. Τιμές ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης για τις οποίες τα βακτήρια χαρακτηρίζονται ως ανθεκτικά. Οι τιμές είναι σε $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Αντιβιοτικά	<i>E. coli</i>	Enterococci
SMX	≥ 4	>1
CIP	$\geq 0,5$	≥ 4
AMOX	≥ 8	≥ 8
TET	12	4
CEF	32	4

3.4.4.5 Ανίχνευση γονιδίων ανθεκτικότητας ARGs

Η απομόνωση του γενετικού υλικού από τα βιώσιμα κύτταρα των *E. coli* και των εντεροκόκκων έγινε με χημική λύση και εκχύλιση φαινόλης / χλωροφορμίου / ισοαμυλικής αλκοόλης (25: 24: 1) (Venieri et al., 2017). Η χημική λύση έγινε με πρωτεΐνάση K (20 mg mL^{-1}) (Sigma-Aldrich) και λυσοζύμη (10 mg mL^{-1}) (AppliChem, Germany).

Για το βακτηριακό γενετικό υλικό, 50 mL δείγματος διηθήθηκαν με μεμβράνες νάιλον $0.22 \mu\text{m}$ (Rephile, Greece) και το φίλτρο ξεπλύθηκε με PBS για να περιοριστούν οι πιθανότητες ύπαρξης μη κυτταρικού DNA ή φάγων στα φίλτρα. Το φίλτρο τεμαχίστηκε σε μικρά κομμάτια και το kit απομόνωσης DNA PowerSoil (MB BIO, Γερμανία) χρησιμοποιήθηκε για την εξαγωγή του βακτηριακού DNA από τις μεμβράνες (Zhang et al., 2018). Τα δείγματα των φίλτρων αποθηκεύτηκαν στους -20°C πριν από την ανάλυση.

Το διηθημένο υγρό από την παραπάνω διαδικασία χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση ARGs στους φάγους και στο eDNA. Για τη συγκέντρωση φάγων, τοποθετήθηκαν 15 mL καθαρισμένου δείγματος σε στήλες Amicon Ultra 100-kDA (Merch-Millipore, Germany) και φυγοκεντρήθηκαν στα $4000 \times g$ μέχρι ο όγκος να μειωθεί στα 0,5 mL. Στη συνέχεια, τα συμπυκνώματα βακτηριοφάγων επεξεργάστηκαν με DNase ($100 \text{ units mL}^{-1}$) έτσι ώστε να εξαλειφθεί το ελεύθερο γενετικό υλικό

(Imamovic et al., 2010). Η εκχύλιση των φάγων διεξήχθη σύμφωνα με τη μέθοδο των Sambrook et. al για τους λ βακτηριοφάγους (Sambrook J, 2006).

Για το eDNA αρχικά πραγματοποιήθηκε μια τυπική καθίζηση προσθέτοντας 1/10 του όγκου δείγματος 3M sodium acetate pH 5,5 και 2/3 95-100% αιθανόλη. Στη συνέχεια το διάλυμα αναμιγνύεται και αποθηκεύεται στους -20 °C για όλη τη νύχτα. Τα ιζήματα ανακτήθηκαν με φυγοκέντρωση στα 10.000 x g για 10 min στους 4 °C αφού απορρίφθηκε το υπερκείμενο υγρό (Ficetola et al., 2008). Το σφαιρίδιο επαναδιαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα TE και η εξαγωγή DNA πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο με την πρωτεΐνάση K όπως περιγράφεται παραπάνω. Η ποσότητα και η καθαρότητα του εξαγόμενου γενετικού υλικού προσδιορίστηκε με μέτρηση απορρόφησης στα 260 και 280 nm με φασματοφωτόμετρο (Eppendorf BioPhotometer® D30).

Τα ARGs τα οποία ποσοτικοποιήθηκαν με τη Real – Time PCR ήταν για τις σουλφοναμίδες (sul1 και sul2), τις κινολόνες (qnrA και aac (6)), τις β-λακτάμες (ampC και blaTEM) και για τις τετρακυκλίνες (tetA και tetM). Οι αλληλουχίες των εκκινητών και οι συνθήκες PCR σε πραγματικό χρόνο παρουσιάζονται στον Πίνακα Π2 του παραρτήματος. Η συγκέντρωση των ARGs εκτιμήθηκε εφαρμόζοντας τη μέθοδο SYBR Green και χρησιμοποιώντας το σύστημα StepOne Plus (Applied Biosystems). Όλες οι αντιδράσεις PCR εκτελέστηκαν εις τριπλούν σε SYBR Green Master Mix (KAPA Biosystems) σε τελικό όγκο 20 µL. Το μίγμα της αντίδρασης συνίστατο από 1,0 X Master Mix, 200 nM εκάστου εκκινητή για sul1, sul2, tetA, tetM, ampC και 400 nM εκάστου εκκινητή για τα qnrA, blaTEM και aac (6) -lb-cr και 2 µL δείγματος DNA. Οι συνθήκες για κάθε PCR παρουσιάζονται στον Πίνακα Π2 του παραρτήματος. Η αποτελεσματικότητα και η κλίση κάθε ενίσχυσης παρουσιάζονται στους Πίνακες Π3 και Π4 του παραρτήματος. Οι πρότυπες καμπύλες κατασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας ARGs από βακτηριακά στελέχη αναφοράς τα *E. coli* DSM 498 (Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) για qnrA, aac (6) -lb-cr, sul2, tetA, tetM, blaTEM και *Klebsiella pneumoniae* NCTC 5056 (Public Health England Culture Collections) για το γονίδιο sul1.

3.4.4.6 Στατιστική επεξεργασία

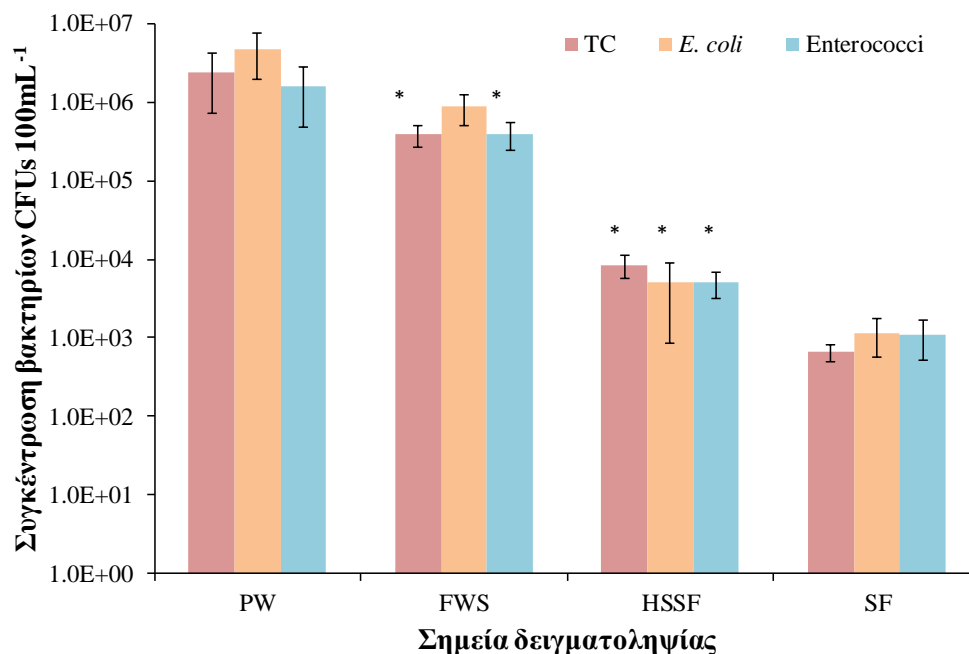
Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το IBM SPSS Statistics 20 και το Microsoft Excel 2016. Αρχικά σε όλα τα δεδομένα

πραγματοποιήθηκε έλεγχος κανονικότητας (Test Normality). Για να εξεταστεί αν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, στις παραμετρικές μεταβλητές χρησιμοποιήθηκε το paired sample T-test ενώ για τις μη παραμετρικές χρησιμοποιήθηκε το τεστ Wilcoxon. Για τον έλεγχο των συσχετίσεων μεταξύ των μεταβλητών εξετάστηκαν οι δείκτες Pearson και Spearman. Για τον έλεγχο της γραμμικής συσχέτισης μεταξύ εξαρτημένης και σταθερής μεταβλητής (είσοδος – έξοδος) χρησιμοποιήθηκε η γραμμική παλινδρόμηση (Linear Regression). Για όλες τις περιπτώσεις η σημαντικότητα ορίστηκε όταν η τιμή p δεν ξεπέρασε το επίπεδο άλφα 0,05 ($p < 0,05$).

3.5 Αποτελέσματα – Υδροβιότοποι (FWS – HSSF 1 – HSSF 2) ως συστήματα δευτεροβάθμιας επεξεργασίας για την απομάκρυνση μικροοργανισμών

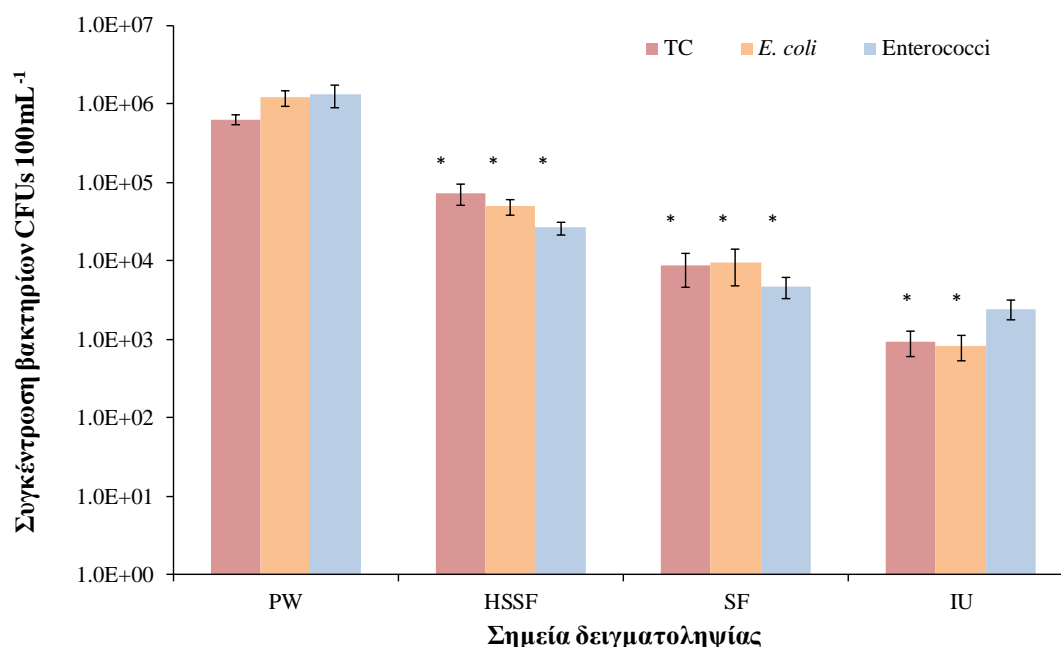
3.5.1 Απομάκρυνση βακτηριακών δεικτών κοπρανόδους μόλυνσης

Αρχικά τα συστήματα των υδροβιότοπων ελέγχθηκαν ως προς τη δυνατότητα απομάκρυνσης βακτηριακών δεικτών κοπρανόδους μόλυνσης από τα υγρά απόβλητα υπό τις δεδομένες συνθήκες λειτουργίας και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα γραφήματα 1 και 2. Εξετάζοντας τα αποτελέσματα τα οποία προκύπτουν από τη βακτηριακή ανάλυση (Γράφημα 1), το υβριδικό σύστημα των δύο υδροβιοτόπων σε σειρά μαζί με το αμμόφιλτρο (Σύστημα 1) επιτυγχάνει συνολική μείωση 3,6 Logs στα TC (99,97%), 3,6 Logs στο *E. coli* (99,98%) και 3,2 Logs στους εντερόκοκκους (99,93%).



Γράφημα 1. Συγκεντρώσεις βακτηριακών δεικτών στις εκροές του Συστήματος 1. Οι τιμές είναι σε μέσους όρους με το στατιστικό σφάλμα. Με * σημειώνονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$).

Το σύστημα 2 (Γράφημα 2) στο τέλος της επεξεργασίας, δηλαδή στην έξοδο της μονάδας αδρανοποίησης (IU) σημειώνει μείωση 2,8 Logs (99,85%), 3,2 (99,93%) Logs και 2,3 Logs (99,81%) για τα TC, *E. coli* και enterococci αντίστοιχα.



Γράφημα 2. Συγκεντρώσεις βακτηριακών δεικτών στις εκροές του Συστήματος 2. Οι τιμές είναι σε μέσους όρους με το στατιστικό σφάλμα. Με * σημειώνονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$).

Εστιάζοντας στους τεχνητούς υδροβιότοπους και συγκρίνοντας τον υδροβιότοπο επιφανειακής ροής του Συστήματος 1 (FWS, Γράφημα 1) με τον υδροβιότοπο υποεπιφανειακής ροής του Συστήματος 2 (HSSF, Γράφημα 2) παρατηρήθηκε ότι ο δεύτερος είχε καλύτερη απόδοση ως προς την απομάκρυνση των τριών βακτηριακών δεικτών. Συγκεκριμένα ο FWS επιτυγχάνει απομάκρυνση 0,8 Logs (84,24%), 0,7 Logs (81,70%) και 0,6 Logs (75,78%) Logs για TC, *E.coli* και εντεροκόκκους αντίστοιχα, ενώ η διαφορά είναι στατιστικά σημαντική για τα TC και τους εντερόκοκκους. Ο HSSF επιτυγχάνει 0,95 Logs (88,77%), 1,4 Logs (95,90%) και 1,7 Logs (97,98%) για TC, *E. coli* και εντερόκοκκους αντίστοιχα, με τη διαφορά στις συγκεντρώσεις να είναι στατιστικά σημαντική και για τους τρεις δείκτες.

Συνολικά, οι δύο υδροβιότοποι σε σειρά του Συστήματος 1 αποδίδουν καλύτερα απ' ότι μόνος του ο υδροβιότοπος του συστήματος 2. Συγκεκριμένα οι υδροβιότοποι σε σειρά επιτυγχάνουν μείωση 2,5 Log units, (99,66%), 3 Log units (99,89%) και 2,5 Log units (99,69%) για TC, *E. coli* και enterococci αντίστοιχα.

Το αμμόφιλτρο (SF) συνεισφέρει περαιτέρω στην μείωση του βακτηριακού φορτίου με τις διαφορές όμως να μην είναι στατιστικά σημαντικές για το Σύστημα 1 ενώ για το Σύστημα 2 είναι για τα TC και *E. coli*. Όσον αφορά στη μονάδα αδρανοποίησης (IU) του Συστήματος 2, επιτυγχάνει στατιστικά σημαντική μείωση στην περίπτωση των TC και *E. coli*, της τάξης των 0,96 Logs και 1,1 Logs αντίστοιχα ενώ η μείωση για τους εντερόκοκκους ήταν 0,3 Logs και όχι στατιστικά σημαντική.

Στον Πίνακα 4 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα ως προς την απομάκρυνση των βακτηριακών δεικτών και τις τελικές συγκεντρώσεις στην εκροή του κάθε συστήματος.

Πίνακας 4. Συγκεντρώσεις βακτηριακών δεικτών στις εισροές και εκροές των συστημάτων με τις αντίστοιχες τιμές απομάκρυνσης και απόδοσης.

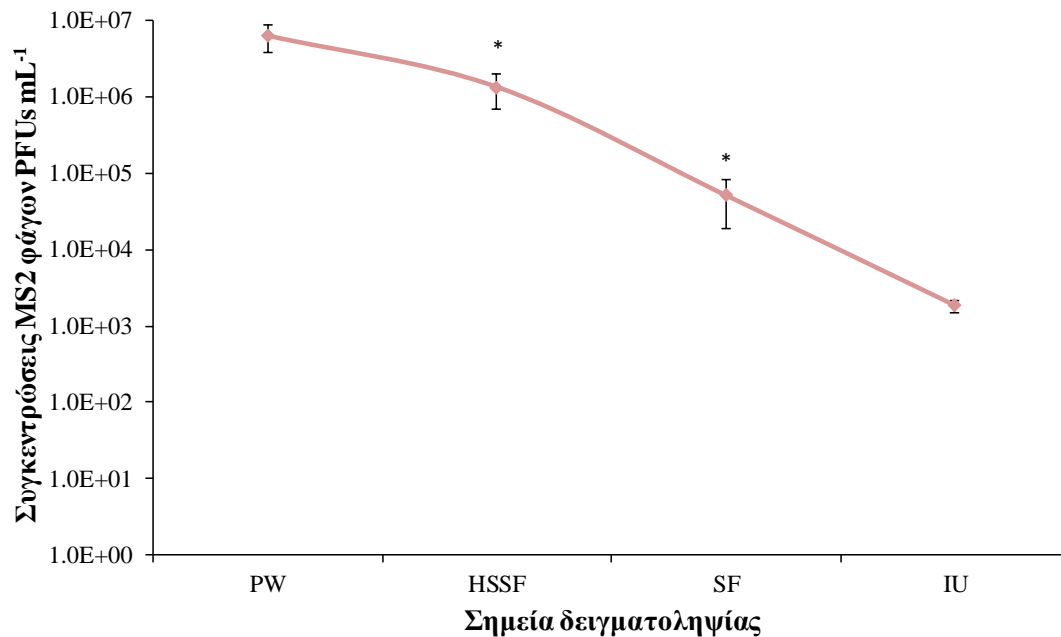
Επεξεργασία	Εισροή (CFUs mL ⁻¹)	Εκροή (CFUs mL ⁻¹)	Απομάκρυνση (Logs)	Απόδοση (%)
TC				
FWS	2,44 x 10 ⁶	3,84 x 10 ⁵	0,80	84,2
FWS + HSSF	2,44 x 10 ⁶	8,39 x 10 ³	2,46	99,7
FWS + HSSF +SF	2,44 x 10 ⁶	6,57 x 10 ²	3,56	99,97
HSSF	6,45 x 10 ⁵	7,24 x 10 ⁴	0,94	88
HSSF + SF +IU	6,45 x 10 ⁵	9, 39 x 10 ²	2,83	99,85
E.coli				
FWS	4,78 x 10 ⁶	8,75 x 10 ⁵	0,73	81,7
FWS + HSSF	4,78 x 10 ⁶	4,98 x 10 ³	2,98	99,9
FWS + HSSF +SF	4,78 x 10 ⁶	1,16 x 10 ³	3,6	99,98
HSSF	1,22 x 10 ⁶	4,99 x 10 ⁴	1,38	95,9
HSSF +SF +IU	1,22 x 10 ⁶	8,32 x 10 ²	3,1	99,93
Enterococci				
FWS	1,62 x 10 ⁶	3,91 x 10 ⁵	0,61	75,8
FWS + HSSF	1,62 x 10 ⁶	4,99 x 10 ³	2,5	99,7
FWS + HSSF +SF	1,62 x 10 ⁶	1,09 x 10 ³	3.1	99.93
HSSF	1,31 x 10 ⁶	2,65 x 10 ⁴	1.69	98
HSSF + IU	1,31 x 10 ⁶	2,46 x 10 ³	2.72	99.81

Τέλος, ο έλεγχος συσχετίσεων χρησιμοποιώντας τη γραμμική παλινδρόμηση δεν έδειξε γραμμική σχέση μεταξύ των συγκεντρώσεων εισροής και εκροής για κανέναν από τους βακτηριακούς δείκτες. Αυτό συνεπάγεται ότι η συγκέντρωση των βακτηριακών δεικτών στην είσοδο δεν επηρεάζει την συγκέντρωσή τους στην έξοδο.

3.5.2 Απομάκρυνση βακτηριοφάγων MS2

Οι βακτηριοφάγοι εξετάστηκαν μόνο κατά τη λειτουργία του Συστήματος 2. Οι MS2 βακτηριοφάγοι ανιχνεύθηκαν σε όλα τα σημεία δειγματοληψίας που εξετάστηκαν, επισημαίνοντας την αντοχή των βακτηριοφάγων κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας

των λυμάτων από τον υδροβιότοπο. Η συγκέντρωση των φάγων στην είσοδο του συστήματος ήταν $6,3 \times 10^6$ PFUs L⁻¹, στην έξοδο του HSSF $1,34 \times 10^6$ PFUs L⁻¹ (μείωση 0,67 Logs), στην έξοδο του SF $5,0 \times 10^4$ PFUs L⁻¹ (μείωση 2,0 Logs) ενώ στην έξοδο της IU $1,83 \times 10^3$ PFUs L⁻¹ (μείωση 1,44 Logs). Η μείωση ήταν στατιστικά σημαντική για το HSSF και το SF.



Γράφημα 3. Συγκεντρώσεις MS2 φάγων στις εκροές του Συστήματος 2. Οι τιμές είναι σε μέσους όρους με το στατιστικό σφάλμα. Με * σημειώνονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$).

Η μείωση που παρουσιάζεται στην εκροή του υδροβιότοπου έρχεται σε αντίθεση με μελέτη που αναφέρει ότι η μείωση των φάγων από τους υδροβιοτόπους μπορεί είναι πάνω από 90% (Gersberg et al., 1987).

Το αμμόφιλτρο κατάφερε σημαντική μείωση στη συγκέντρωση των φάγων, και το γεγονός αυτό καταδεικνύει ότι η απομάκρυνση των φάγων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον τύπο του υποστρώματος. Ένα μικρού διαμέτρου υπόστρωμα όπως η άμμος είναι πιο αποτελεσματικό στην απομάκρυνση των βακτηριοφάγων από ένα υπόστρωμα μεγαλύτερης διαμέτρου (Mcminn et al., 2018).

3.5.3 Αδρανοποίηση ιών

Οι δύο εξεταζόμενοι τύποι ιών ανιχνευθήκαν σε μεγάλα ποσοστά στα σημεία δειγματοληψίας. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 5, συνολικά οι AdV ανιχνεύθηκαν σε ποσοστό 89% στο πρωτοβάθμιο λύμα, σε ποσοστό 84% στην εκροή του ενώ οι EV ανιχνεύθηκαν σε ποσοστό 58% στην εκροή του υδροβιότοπου HSSF.

Πίνακας 5. Ποσοστό συνολικών θετικών δειγμάτων αδενοϊών (AdV) και εντεροϊών (EV) στα σημεία δειγματοληψίας. WTTP: πρωτοβάθμιο λύμα, HSSF: εκροή υδροβιότοπου υποεπιφανειακής ροής, FWS: εκροή υδροβιότοπου ελεύθερης επιφάνειας.

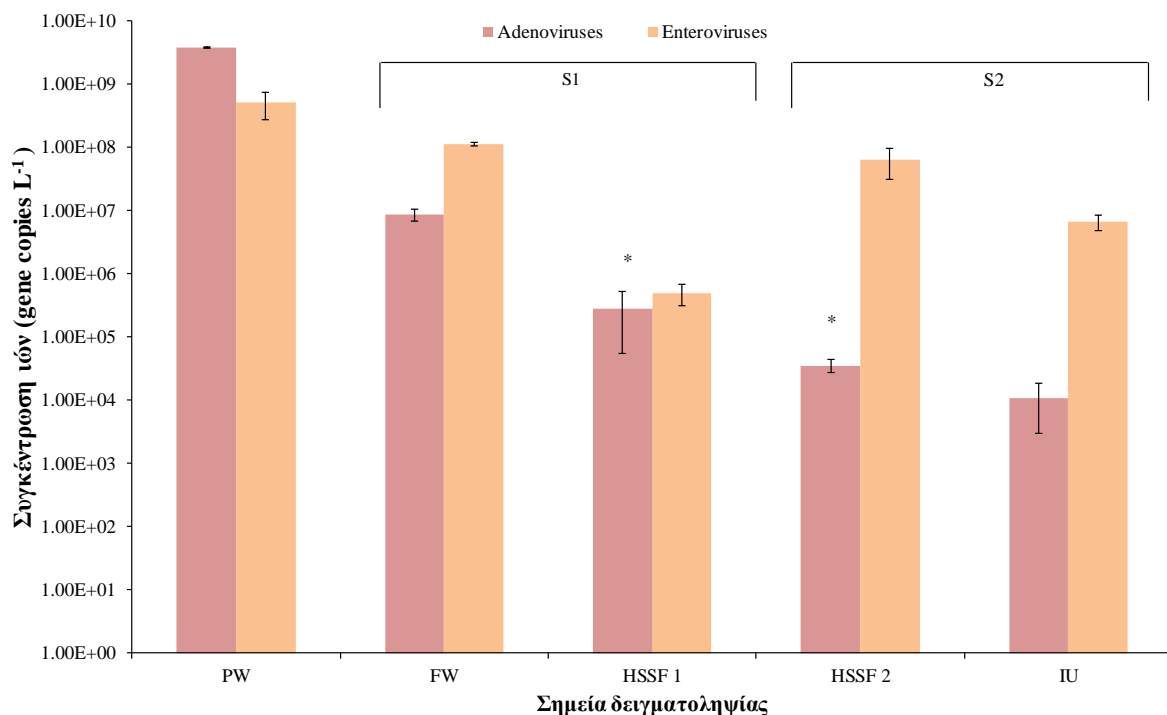
	Αδενοϊοί (AdV)	Εντεροϊοί (EV)
PW	89%	56%
HSSF	84%	58%
FWS	100%	50%

Στη συνέχεια για να μελετηθούν καλύτερα τα συστήματα ως προς την ικανότητα τους να απομακρύνουν το ιικό φορτίο, ποσοτικοποιήθηκαν τα γονιδιώματα στα δείγματα χρησιμοποιώντας Real – Time PCR (qPCR).

Δεδομένης της δυσκολίας να παρακολουθήσουμε ακριβώς την πορεία των ιών κατά την επεξεργασία και τον χρόνο που απαιτείται για να φτάσουν στην έξοδο χρησιμοποιήθηκαν οι μέσοι όροι σε κάθε περίπτωση. Τα αποτελέσματα στο Γράφημα 4 έδειξαν την έντονη παρουσία των ιών στα πρωτογενή λύματα στην είσοδο των συστημάτων αφού οι συγκεντρώσεις τους ήταν της τάξης των 10^9 και 10^8 gene copies

L^{-1} για τους AdV και EV αντίστοιχα. Ο FW (Σύστημα 1) επιτυγχάνει μείωση 2,64 και 0,65 Logs για τους AdV και τους EV αντίστοιχα. Στη συνέχεια ο HSSF επιτυγχάνει μείωση 1,48 Logs για AdV και 0,24 Logs για EV. Στην εκροή του HSSF του Συστήματος 1, δηλαδή στην τελική έξοδο του υβριδικού συστήματος των δύο υδροβιοτόπων, η συγκέντρωση των ιών ποσοτικοποιήθηκε στα $2,86 \times 10^5$ gene copies L^{-1} (μείωση 4,13 Logs) και σε $5,01 \times 10^5$ gene copies L^{-1} (μείωση 3,00 Logs) για AdV και EV αντίστοιχα με τη διαφορά να είναι στατιστικά σημαντική μόνο για τους AdV.

Τα αποτελέσματα για το σύστημα 2 έδειξαν ότι η μείωση που πέτυχε ο HSSF 2



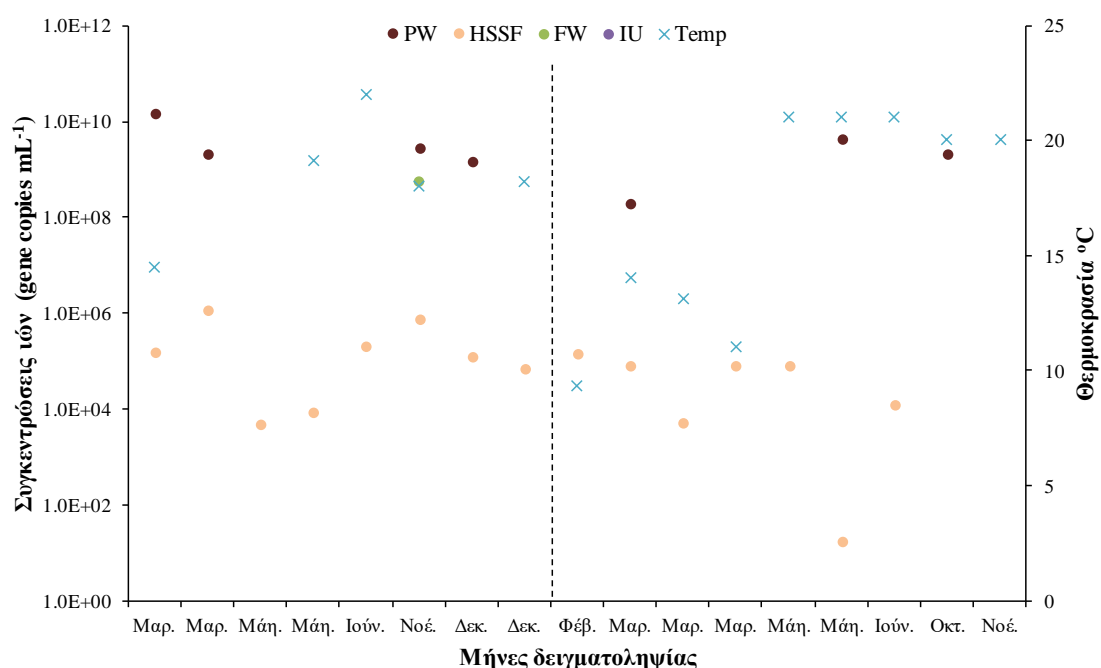
Γράφημα 4. Συγκεντρώσεις ιών στις εκροές των συστημάτων S1 και S2. Παρουσιάζονται οι μέσες τιμές με τα στατιστικά σφάλματα. Με * σημειώνονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$).

ήταν 4,55 και 0,89 Logs για AdV και EV αντίστοιχα με την διαφορά να είναι στατιστικά σημαντική μόνο στην περίπτωση των αδενοϊών. Στη συνέχεια η μονάδα αδρανοποίησης σημείωσε μείωση 0,7 και 1,9 Logs για AdV και EV αντίστοιχα. Στην τελική εκροή του S2 δηλαδή στην έξοδο της μονάδας IU οι συγκεντρώσεις των ιών ήταν $1,06 \times 10^4$ (μείωση 5,03 Logs) και $6,76 \times 10^6$ (μείωση 1,8 Logs) για τους AdV και EV αντίστοιχα.

Τα παραπάνω δείχνουν μια γενική εικόνα της παρουσίας των ιών και της μείωσης που επιφέρουν τα εξεταζόμενα συστήματα επεξεργασίας. Όμως, εξετάζοντας μεμονωμένα τις μετρήσεις παρατηρήθηκε ότι είναι πιθανό να υπάρξουν σημαντικές

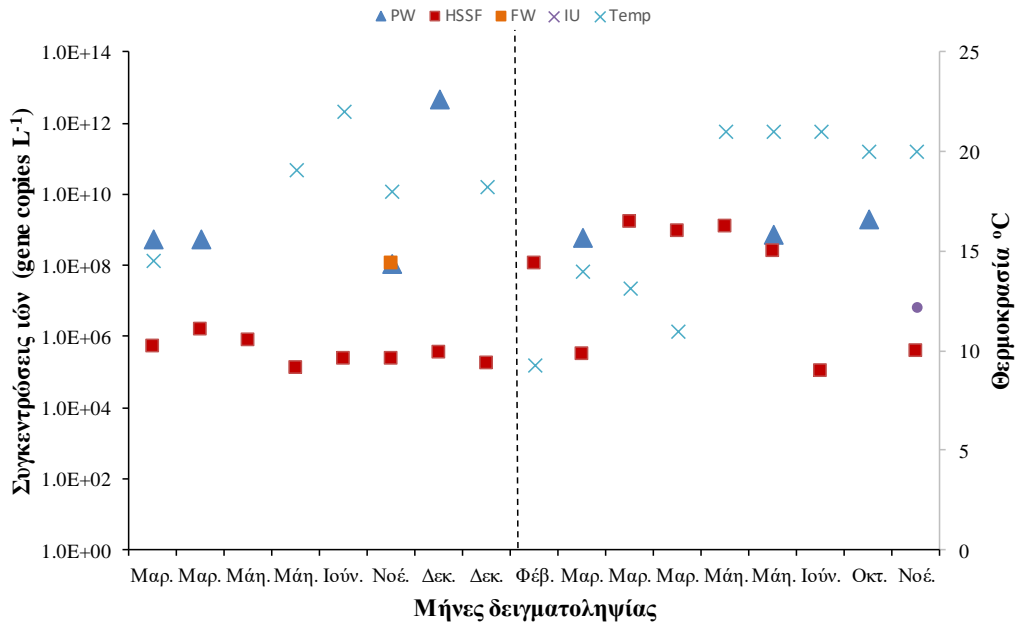
αποκλίσεις από τις μέσες τιμές. Τα Γραφήματα 5 και 6 παρουσιάζουν τις μεμονωμένες τιμές και η διακεκομμένη γραμμή σημειώνει την αλλαγή του συστήματος, δηλαδή την αφαίρεση του υδροβιότοπου ελεύθερης επιφάνειας (FWS).

Παρατηρώντας τις μετρήσεις των αδενοϊών (Γράφημα 5), φαίνεται ότι δεν υπήρχαν μεγάλες διακυμάνσεις στις συγκεντρώσεις της εισόδου. Μετά την αλλαγή του συστήματος, δηλαδή την αφαίρεση του υδροβιότοπου ελεύθερης επιφάνειας, δε φαίνεται να επηρεάστηκε η απόδοση του συστήματος ως προς την ικανότητα του να απομακρύνει τους αδενοϊούς.



Γράφημα 5. Συγκεντρώσεις αδενοϊών και τιμές θερμοκρασίας ανά δειγματοληψία. Η διακεκομμένη γραμμή αναφέρεται στην αλλαγή του συστήματος.

Από το Γράφημα 6 προκύπτει ότι αν και γενικά η συγκέντρωση των εντεροϊών ήταν σε σταθερές συγκεντρώσεις στα πρωτογενή λύματα, είναι πιθανόν να υπάρξουν περιπτώσεις με μεγάλη απόκλιση. Αυτό ενδεχομένως να οφείλεται σε αυξημένη συχνότητα/διασπορά των εντεροϊών στην κοινότητα τη συγκεκριμένη χρονική περίοδο (Δεκέμβριος). Αντίθετα με την περίπτωση των AdV, η αφαίρεση του FWS φαίνεται ότι επηρεάζει τη συνολική απόδοση του συστήματος οδηγώντας σε μειωμένη απομάκρυνση, αν και όπως παρουσιάστηκε προηγουμένως είναι μικρή η συνεισφορά του FWS στην απομάκρυνση των εντεροϊών. Παρόλα αυτά φαίνεται ότι μετά το πέρας ενός διαστήματος το σύστημα επανέρχεται στην αρχική του απόδοση.



Γράφημα 6. Συγκεντρώσεις εντεροϊών και τιμές θερμοκρασίας ανά δειγματοληψία. Η διακεκομμένη γραμμή αναφέρεται στην αλλαγή του συστήματος.

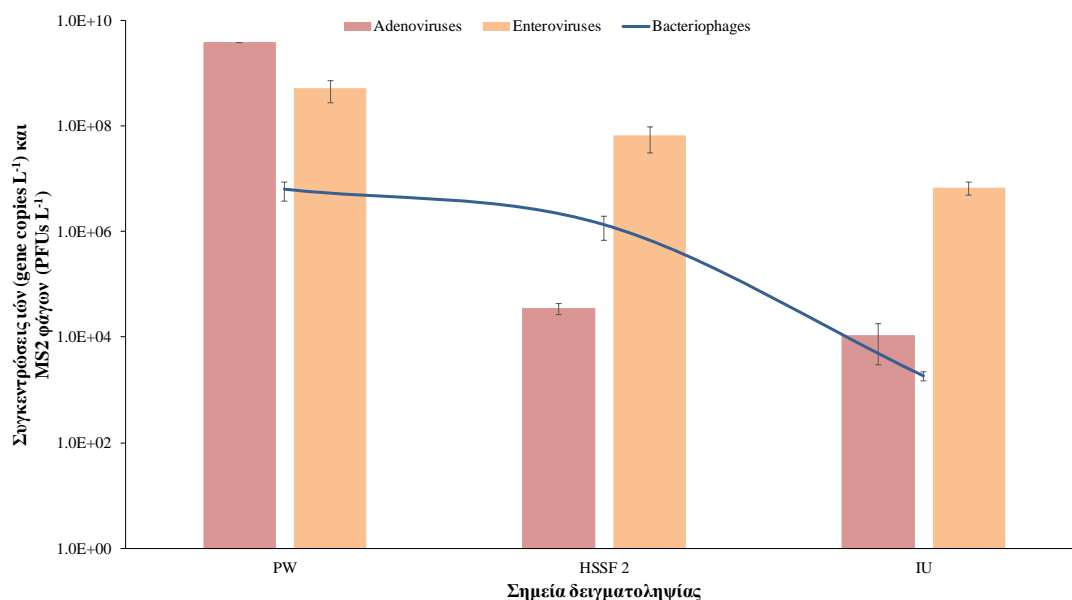
Όπως αναφέρεται παραπάνω, οι διαφορές ανάμεσα στις συγκεντρώσεις εισόδου και εξόδου παρουσιάστηκαν στατιστικά σημαντικές μόνο για τις περιπτώσεις των ιών AdV. Παρόλα αυτά όπως προαναφέρθηκε η συγκέντρωση των ιών στην είσοδο εξαρτάται από τη διασπορά τους στην κοινότητα και μπορεί να μεταβάλλεται λόγω έξαρσης δίνοντας αρκετά μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Έτσι, τροποποιώντας τα δεδομένα και αφαιρώντας αυτές τις ακραίες περιπτώσεις η διαφορά εισόδου εξόδου γίνεται στατιστικά σημαντική.

Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων κάνοντας χρήση της γραμμικής παλινδρόμησης έδειξε ότι δεν υπήρξε κάποια γραμμική συσχέτιση μεταξύ των συγκεντρώσεων εισόδου και εξόδου και για τους δύο τύπων ιών, δηλαδή η συγκέντρωση των ιών στην είσοδο των συστημάτων δεν επηρεάζει τη συγκέντρωση των ιών στην εκροή και αυτό συνεπάγεται τη σταθερή απόδοση τους συστήματος.

Επίσης δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της τιμής της θερμοκρασίας και της συγκέντρωσης των ιών. Ωστόσο, θα πρέπει να σημειωθεί ότι δεν υπήρξαν μεγάλες διακυμάνσεις της θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια της περιόδου δειγματοληψίας (ελάχιστο: 14°C, μέγιστο: 23°C).

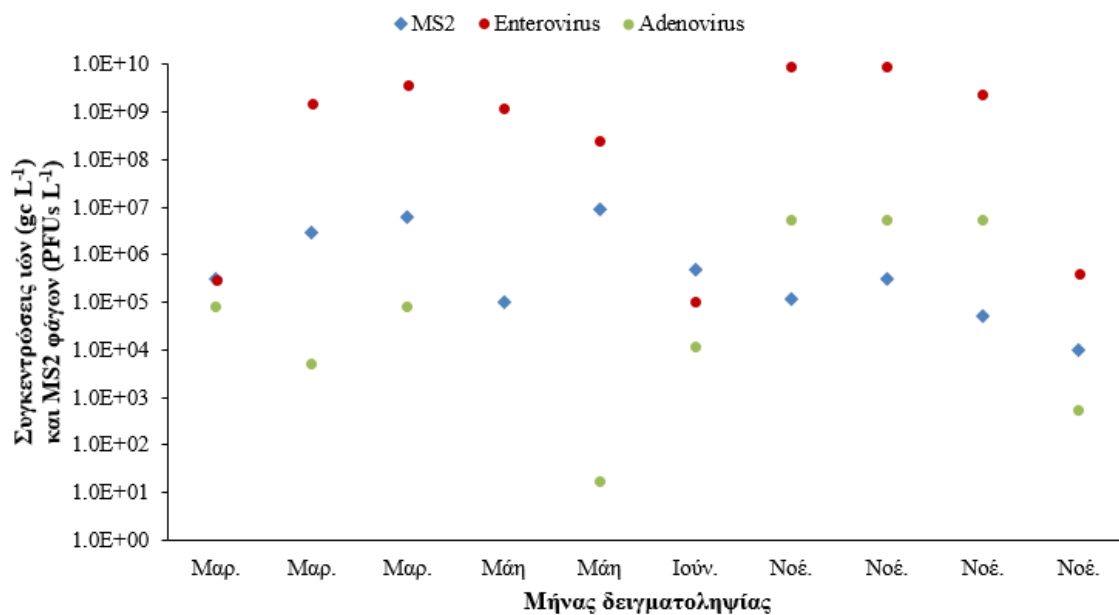
Κατόπιν, συνδυάζοντας τα αποτελέσματα των φάγων μαζί με αυτά των ιών (Γράφημα 7), παρατηρήθηκε ότι οι MS2 φάγοι ακολουθούν τη μείωση των ιών.

Αναφερόμενοι σε μέσους όρους παρατηρήθηκε ότι η μείωση των φάγων είναι μικρότερη από την μείωση και των δύο ιών. Επίσης, ενώ η συγκέντρωση των βακτηριοφάγων ήταν χαμηλότερη από τις συγκεντρώσεις και των δύο ιών στην είσοδο του συστήματος, ήταν υψηλότερη μόνο από τη συγκέντρωση των αδενοϊών στην έξοδο του υδροβιοτόπου και ήταν οριακά χαμηλότερη από αυτή των AdV στη έξοδο της ΙΥ.



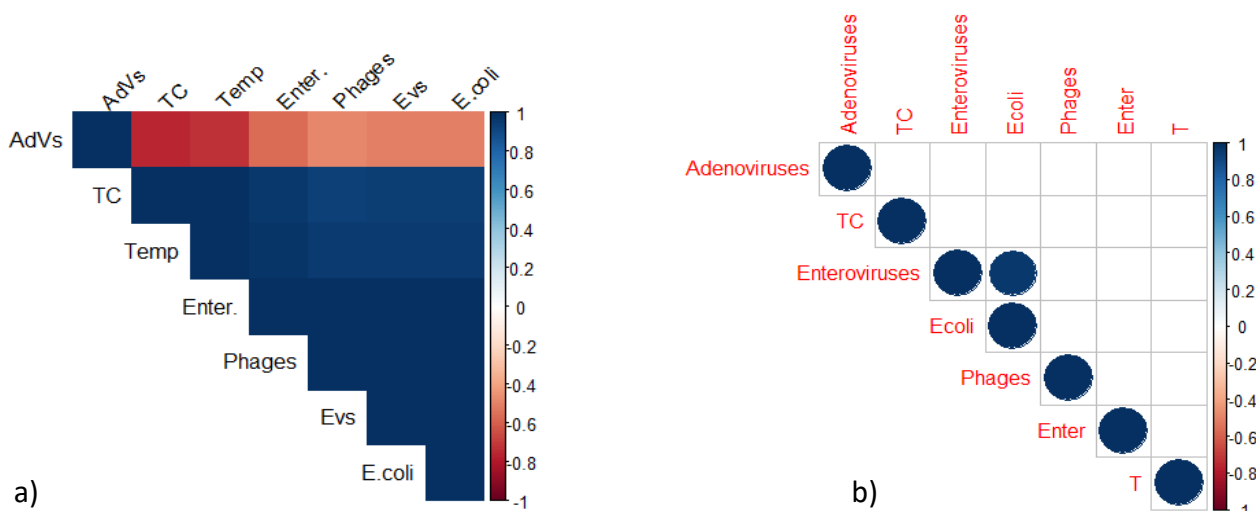
Γράφημα 7. Συγκεντρώσεις ιών και MS2 φάγων. Οι τιμές είναι σε μέσους όρους με το στατιστικό σφάλμα.

Και πάλι όμως πρέπει να σημειωθεί ότι εξετάζοντας μεμονωμένα τις περιπτώσεις (Γράφημα 8) παρατηρήθηκε ότι υπήρξαν μετρήσεις κατά τις οποίες η συγκέντρωση των AdV στην εκροή του HSSF ήταν μεγαλύτερη από αυτή των φάγων.



Γράφημα 8. Μεμονωμένες συγκεντρώσεις ιών και MS2 φάγων στην εκροή του HSSF του Συστήματος 2.

Τέλος, στο Γράφημα 9 εξετάζονται οι πιθανές συσχετίσεις μεταξύ όλων των παραμέτρων δηλαδή των βακτηριακών δεικτών, των βακτηριοφάγων, των ιών και της θερμοκρασίας. Όπως φαίνεται από το b) μέρος του γραφήματος η μόνη στατιστικά ισχυρή συσχέτιση που παρατηρήθηκε είναι μεταξύ των συγκεντρώσεων του βακτηρίου *E. coli* με τους EV. Δεν υπήρξε δηλαδή σημαντική συσχέτιση μεταξύ των συγκεντρώσεων των MS2 φάγων και των ιών ούτε και των AdV με κάποιον από τους βακτηριακούς δείκτες.



Γράφημα 9. Γραφήματα συσχετίσεων. Στο a) παρουσιάζονται οι συσχετίσεις και στο b) οι στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις με $p\text{-value} < 0.05$.

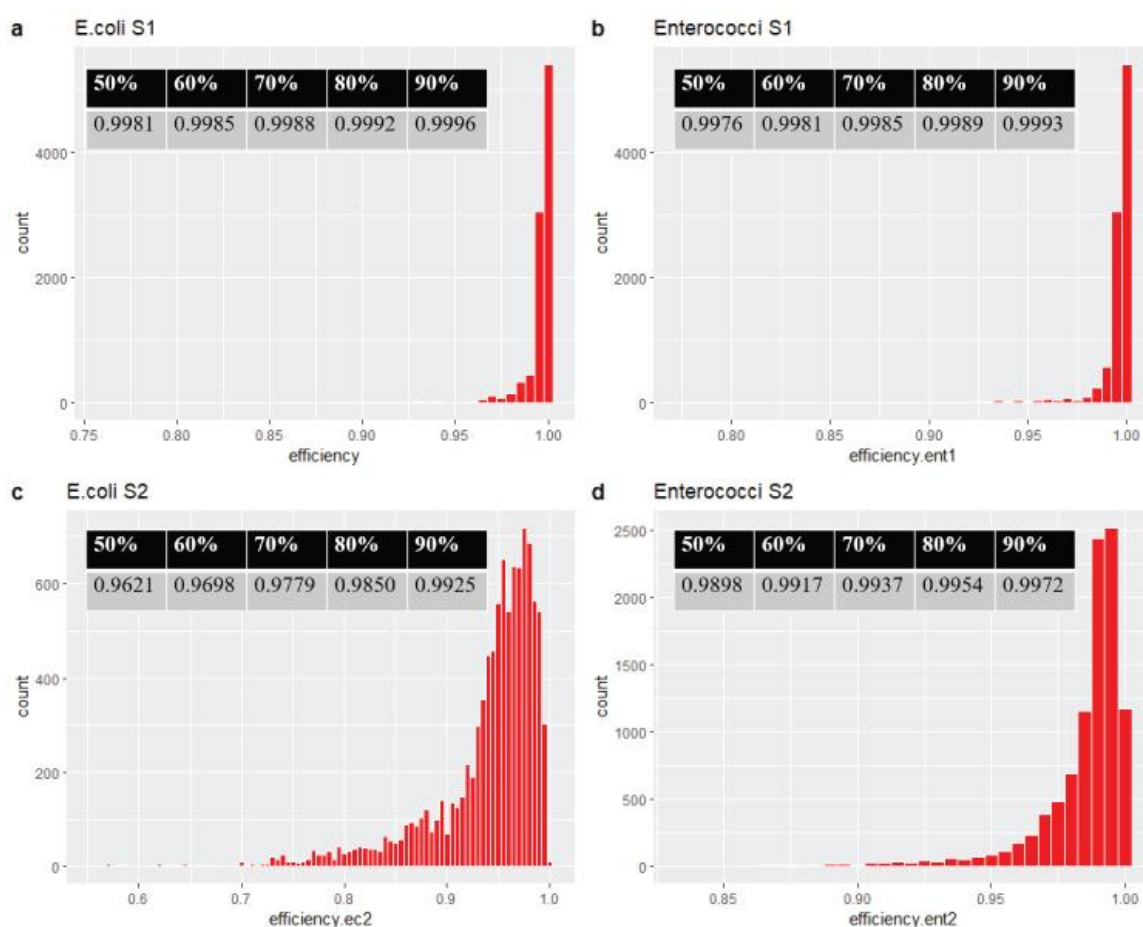
3.6 Ανάλυση αποτελεσμάτων με χρήση στοχαστικών μοντέλων

Παρακάτω γίνεται ο υπολογισμός της απόδοσης για το κάθε σύστημα όσον αφορά την απομάκρυνση του βακτηριακού φορτίου και σύγκριση της απόδοσης των συστημάτων με την μέθοδο της δημιουργία τυχαίων αριθμών από μια κατανομή (random variate). Κατά τη διαδικασία αυτή γίνεται προσομοίωση τυχαίων αριθμών, οι τιμές των οποίων κατανέμονται μέσα σε ένα διάστημα ακολουθώντας κάποια κατανομή, ενώ δεν υπάρχει καμιά συσχέτιση μεταξύ των αριθμών.

Στη συγκεκριμένη περίπτωση επιλέχθηκε η σειρά των τυχαίων αριθμών να ακολουθήσει μια ομοιόμορφη (uniform) κατανομή. Για την δημιουργία των κατανομών εισόδου και εξόδου χρησιμοποιήθηκαν οι μέγιστες και οι ελάχιστες τιμές του κάθε πειράματος. Για κάθε κατανομή δημιουργήθηκαν 100 τυχαίοι αριθμοί μεταξύ του ελάχιστου και του μέγιστου. Χρησιμοποιώντας τις ελάχιστες και μέγιστες τιμές και πραγματοποιώντας 100 επαναλήψεις δημιουργήθηκαν οι κατανομές εισόδου και εξόδου. Στη συνέχεια, από την κάθε κατανομή επιλέχθηκαν 1000 δείγματα. Από τα δείγματα εισόδου και εξόδου δημιουργήθηκε το ιστόγραμμα το οποίο δίνει τις τιμές της απόδοσης των συστημάτων (η τιμή 1.00 αντιστοιχεί σε απόδοση 100%). Από το ιστόγραμμα της απόδοσης υπολογίστηκαν τα ποσοστιαία σημεία (quantiles) τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τα σύγκριση των συστημάτων. Ολόκληρη η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της γλώσσας R και τμήμα του κώδικα παρουσιάζεται στον Κώδικα 1 του Παραρτήματος.

3.6.1 Αποτελέσματα

Στο Γράφημα 10 παρουσιάζονται τα ιστογράμματα της απόδοσης για τα βακτήρια *E. coli* και enterococci για τα συστήματα 1 και 2 των υδροβιοτόπων του Ηρακλείου. Από τα διαγράμματα φαίνεται ότι η απόδοση του συστήματος 1 είναι καλύτερη από την απόδοση του συστήματος 2, καθώς το ιστόγραμμα για το σύστημα S1 δείχνει ότι συγκεντρώνονται περισσότερες τιμές κοντά στην απόδοση 1,00. Παράλληλα, από τα ιστογράμματα φαίνεται και η μεγαλύτερη διακύμανση που παρουσιάζουν οι τιμές του συστήματος 2.



Γράφημα 10. Ιστογράμματα της απόδοσης απομάκρυνσης των βακτηρίων *E. coli* και Enterococci των συστημάτων 1 και 2 των μονάδων Ηρακλείου. α. Απομάκρυνση *E. coli* συστήματος 1, β. Απομάκρυνση enterococci συστήματος 1, γ. Απομάκρυνση *E. coli* συστήματος 2, δ. Απομάκρυνση enterococci συστήματος 2. Στους πίνακες παρουσιάζονται τα ποσοστιαία σημεία.

Στη συνέχεια στους πίνακες εντός των ιστογραμμάτων του Γραφήματος 10, παρουσιάζονται τα ποσοστιαία σημεία για κάθε σύστημα. Η χρήση των ποσοστιαίων σημείων βοηθάει στην ασφαλέστερη ερμηνεία των αποτελεσμάτων καθώς δίνουν

ακριβή νούμερα. Οι τιμές επιβεβαιώνουν την πολύ καλή απόδοση των συστημάτων και την καλύτερη απόδοση του Συστήματος 1 ως προς την απομάκρυνση των βακτηριακών δεικτών. Συγκεκριμένα, και όσον αφορά στο βακτήριο *E. coli*, για το σύστημα 1 η απόδοση 0.998 είναι μεγαλύτερη ή ίση με το 50% των παρατηρήσεων, ενώ για το σύστημα 2 απόδοση για το ίδιο διάστημα η απόδοση είναι 0,962. Για τους εντερόκοκκους για το 50% των παρατηρήσεων η απόδοση για το σύστημα 1 ήταν 0,998 ενώ για το σύστημα 2 ήταν 0.990.

3.7 Ανάλυση παλινδρόμησης με συμπερασματολογία Bayes για εκτίμηση και σύγκριση της αποτελεσματικότητας των συστημάτων ως προς τη μείωση των ιών.

3.7.1 Το πρόβλημα

Το πρόβλημα το οποίο προέκυψε στην συγκεκριμένη μελέτη κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων για τους ιούς είναι ότι υπήρξαν ελλιπείς τιμές. Η συλλογή και η ανάλυση δεδομένων για τους ιούς είναι μια δυσκολότερη διαδικασία συγκρινόμενη με τη συλλογή και επεξεργασία δειγμάτων για τους βακτηριακούς δείκτες. Πολλές φορές δεν είναι εύκολο να πραγματοποιούνται συχνές δειγματοληψίες και να λαμβάνονται δείγματα από όλα τα σημεία δειγματοληψίας ταυτόχρονα (σφάλματα μη εισαγωγής) (Ito et al., 2016). Η ιολογική ανάλυση πρέπει να πραγματοποιείται σε σύντομο χρονικό διάστημα από τη στιγμή της δειγματοληψίας ενώ σημαντικός ανασταλτικός παράγοντας μπορεί να είναι και το κόστος δειγματοληψίας και ανάλυσης για τους ιούς. Έτσι, το να εξάγονται συμπεράσματα από περιορισμένες πληροφορίες θα μπορούσε να οδηγήσει σε λανθασμένες αποφάσεις.

Επιπροσθέτως, μια προσέγγιση η οποία θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως «μη ζευγαρωμένη» (un-paired) θα μπορούσε να έχει νόημα όταν αναφερόμαστε σε δειγματοληψίες λυμάτων. Στην πραγματικότητα, τα δείγματα εισόδου και εξόδου αναφέρονται σε διαφορετικές ημέρες και όχι την ίδια ημέρα αφού απαιτείται κάποιο χρονικό διάστημα μέχρι να φτάσει το λύμα στο σημείο δειγματοληψίας της εξόδου. Ταυτόχρονα, ο πραγματικός χρόνος παραμονής ιών σε μια μονάδα, και ιδιαίτερα σε μια μονάδα όπως οι CW στην ουσία δεν είναι γνωστός με ακρίβεια, καθώς παράγοντες όπως η εξατμισοδιαπνοή μπορεί να επηρεάσουν σημαντικά τον υδραυλικό χρόνο παραμονής. Επομένως, δεν είναι δυνατό να προσδιοριστεί το κατάλληλο χρονικό διάστημα μεταξύ της δειγματοληψίας της εισροής και της εκροής (Rachmadi et al.,

2016). Αυτό συνεπάγεται ότι στην πραγματικότητα οι τιμές εισόδου και εξόδου είναι ανεξάρτητες.

Τα παραπάνω προβλήματα αντιμετωπίστηκαν και στην συγκεκριμένη μελέτη. Οι δειγματοληψίες στην έξοδο ήταν περισσότερες από την είσοδο, υπήρχαν περιπτώσεις σφαλμάτων στις δειγματοληψίες, ενώ δεν ήταν εύκολο να γίνει ανάλυση ιών από διαφορετικά σημεία την ίδια ημέρα.

Επίσης, σημαντικό είναι το πρόβλημα που προκύπτει όταν χρειαστεί να γίνει σύγκριση της αποτελεσματικότητας δύο συστημάτων. Το ερώτημα «ποιο σύστημα είναι πιο αποτελεσματικό» δεν μπορεί να απαντηθεί με παραδοσιακές στατιστικές αναλύσεις, όπως για παράδειγμα η ανάλυση διακύμανσης (Analysis of variance, ANOVA) αν λείπουν δεδομένα ή αν ο αριθμός των δεδομένων είναι μικρός.

Μια λύση για τα παραπάνω προβλήματα θα μπορούσε να είναι μια προσέγγιση με χρήση της μπεϋζιανής στατιστικής. Η χρήση της μπεϋζιανής στατιστικής μπορεί να δώσει ορισμένα πλεονεκτήματα σε σχέση με την κλασική στατιστική. Αρχικά χρησιμοποιώντας τη μπεϋζιανή στατιστική υπάρχει η δυνατότητα να συμπληρωθούν τα ελλιπή δεδομένα. Επίσης, δίνει τη δυνατότητα να αναλυθούν ξεχωριστά τα δεδομένα, να γίνουν προβλέψεις, και στη συνέχεια να πραγματοποιηθεί σύγκριση των συστημάτων.

Η έννοιά της πρωτοεμφανίστηκε το 1763 από το μαθηματικό Thomas Bayes ο οποίος ανέπτυξε μια φόρμουλα για να υπολογίσει τη δεσμευμένη πιθανότητα (πιθανότητα ενός ενδεχομένου A ξέροντας ότι ήδη έχει συμβεί ένα άλλο ενδεχόμενο B , $P(A|B)$). Το θεώρημα παρέχει έναν τρόπο αναθεώρησης των υπαρχουσών προβλέψεων δίνοντας νέα ή πρόσθετα αποτελέσματα. Η ανάπτυξη υπολογιστών, λογισμικών και η εμφάνιση μεθόδων προσομοίωσης, όπως οι μέθοδοι προσομοίωσης Monte Carlo με την χρήση Μαρκοβιανών αλυσίδων (Monte Carlo Chain Markov, MCMC), έκανε δυνατή και ευκολότερη την εφαρμογή της Μπεϋζιανής θεωρίας. Αυτό επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι κάθε χρόνο όλο και περισσότερες μελέτες επιλέγουν τη συμπερασματολογία Bayes για την επεξεργασία των δεδομένων τους (Hackenberger, 2019).

Η βασική διαφορά μεταξύ Μπεϋζιανής και κλασικής στατιστικής αφορά στη φύση της άγνωστης παραμέτρου. Στη κλασική στατιστική μια παράμετρος ενδιαφέροντος

θεωρείται άγνωστη, αλλά σταθερή. Για παράδειγμα, ένας πραγματικός μέσος. Αντίθετα στην μπεϋζιανή στατιστική όλες οι άγνωστες παράμετροι αντιμετωπίζονται ως αβέβαιες και ως εκ τούτου πρέπει να περιγράφονται από κατανομές πιθανότητας.

Συνοπτικά, στα πλεονεκτήματα της στατιστικής κατά Bayes εντάσσεται η ευκολότερη ερμηνεία των αποτελεσμάτων, το γεγονός ότι αποφεύγονται οι δυσκολίες που υπάρχουν στην κλασική στατιστική λόγω της μηδενικής υπόθεσης (null hypothesis), το γεγονός ότι το πλαίσιο της στατιστικής κατά Bayes προσφέρει μια πιο άμεση έκφραση της αβεβαιότητας, συμπεριλαμβανμένης και της πλήρης άγνοιας, και η δυνατότητα της αναβάθμισης της γνώσης αντί να δημιουργούνται συνεχώς καινούργιες μηδενικές υποθέσεις (Hackenberger, 2019). Στα πιο πρακτικά πλεονεκτήματα περιλαμβάνονται ο περιορισμός της ανησυχίας για τον μικρό αριθμό δειγμάτων και η δυσκολία που τον συνοδεύει στο να επιτευχθούν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα και η ευκολότερη μεταχείριση των παραμέτρων που δεν ακολουθούν κανονική κατανομή επιστρέφοντας ακριβέστερα αποτελέσματα (Van de Schoot et al., 2014).

3.7.2 Μπεϋζιανή Θεωρία (Bayes Theorem)

Η μπεϋζιανή θεωρία ή κανόνας του Bayes βασίζεται στο γεγονός ότι χρησιμοποιείται η προγενέστερη γνώση, η εμπειρία ή η πεποίθηση που υπάρχει για μια παράμετρο. Ο κανόνας του Bayes θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως μια «μηχανή» η οποία μετατρέπει την αρχική πεποίθηση σε μια μεταγενέστερη πεποίθηση. Στη συνέχεια αναβαθμίζει την αρχική και ο κύκλος αυτός επαναλαμβάνεται τροφοδοτώντας συνεχώς τη «μηχανή» με νέα δεδομένα (Gronewold and Vallero, 2010). Στην ουσία το σύστημα μαθαίνει από τα δεδομένα και μπορεί να κάνει προβλέψεις, δηλαδή η διαδικασία αυτή μπορεί να χαρακτηριστεί ως ένα είδος μηχανικής μάθησης (machine learning).

Στην βασική του μορφή το θεώρημα του Bayes είναι απλό και περιγράφεται από την εξίσωση 1:

Αν Y και X είναι δύο ενδεχόμενα με $P(X) > 0$, τότε

$$P(Y|X) = \frac{P(X|Y)P(Y)}{P(X)} \quad (1)$$

Όπου:

$P(Y|X)$ – είναι η δεσμευμένη πιθανότητα του Y δεδομένου του X

$P(B|A)$ – είναι η δεσμευμένη πιθανότητα του Y δεδομένου του X

$P(A)$ – είναι η “a-priori” πιθανότητα.

$P(X)$ – η πιθανότητα να συμβεί το X

Η συμπερασματολογία Bayes βασίζεται στον συνδυασμό της “a-priori” γνώσης με τα δεδομένα που εξάγονται από ένα πείραμα. Η συμπερασματολογία κατά Bayes οδηγεί στον τρόπο σύνδεσης της “a-priori” γνώσης με τα δεδομένα ώστε να γίνει εξαγωγή συμπερασμάτων για ολόκληρο τον πληθυσμό ή για τη λήψη αποφάσεων. Η προγενέστερη γνώση (a-priori) περιγράφεται από μια κατανομή την κατανομή prior.

Στην περίπτωση των συνεχών μεταβλητών ο κανόνας μπορεί να γραφεί ως:

$$P(Y|X) = \frac{P(X|Y) * P(Y)}{\int P(X|Y) * P(Y)dY} \quad (2)$$

Ο παρονομαστής εξαρτάται μόνο από το X , δηλαδή τις παρατηρήσεις του πειράματος, είναι σταθερά και ονομάζεται σταθερά κανονικοποίησης (marginalization). Το θεώρημα του Bayes συνηθίζεται να γράφεται σε διαφορετική μορφή ως εξής:

$$P(Y|X) \propto P(X|Y) * P(Y) \quad (3)$$

Δηλαδή η “a-posteriori” κατανομή είναι ανάλογη του γινομένου της “a-priori” κατανομής με την κατανομή πιθανοφάνειας (likelihood). Η κατανομή prior περιγράφει τη γνώση που τυχόν υπάρχει για ένα πείραμα πριν όμως αποκτηθούν δεδομένα για το πείραμα αυτό και η κατανομή πιθανοφάνειας (likelihood), προέρχεται από τα δεδομένα του πειράματος.

Έτσι ο παραπάνω κανόνας αυτός μπορεί να γραφεί χρησιμοποιώντας κατανομές. Σε αυτή την περίπτωση έχουμε:

$$Posterior = \frac{likelihood * prior}{marginalization} \quad (4)$$

Λόγω της δυνατότητας των προβλέψεων, η μπεϋζιανή στατιστική βρίσκει εφαρμογές σε πολλούς τομείς όπως τα οικονομικά, η ιατρική, η επιδημιολογία (Dunson, 2001) και οι εκλογικές διαδικασίες (Rivest and Shen, 2012), και μπορεί να εφαρμοστεί σε διαφορετικά είδη δεδομένων, δηλαδή τόσο σε περιγραφικά δεδομένα

όσο και σε συνεχείς τιμές. Όσον αφορά στις περιβαλλοντικές επιστήμες η στατιστική κατά Bayes έχει βρει εφαρμογή στην οικολογία (Hui, 2016; Shen and Sun, 2012), σε μοντέλα εξατμησοδιαπνοής (Khoshravesht et al., 2017) και σε μοντέλα εκτίμησης κινδύνου (Paulo et al., 2005).

Σε αυτή τη διατριβή, η μπεϋζιανή στατιστική θα εφαρμοστεί σε ένα μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης με κύριο στόχο να εκτιμηθεί ποιο από τα δύο συστήματα υδροβιοτόπων παρουσιάζει καλύτερη απόδοση αλλά και να γίνει πρόβλεψη της συγκέντρωσης των ιών στην εκροή των συστημάτων.

3.7.3 Μπεϋζιανή γραμμική παλινδρόμηση (Bayesian Linear Regression)

Η τυπική γραμμική παλινδρόμηση μπορεί να περιγραφεί από την εξίσωση 5:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_i + \varepsilon \quad (5)$$

Όπου, το Y είναι η εξαρτημένη τιμή, το β_0 είναι η τεταγμένη (intercept), β_1 η κλίση, X_i οι ανεξάρτητες τιμές και ε ο όρος σφάλματος (error term). Έτσι, όταν έχουμε μια τιμή για το X , το μοντέλο επιστρέφει μια τιμή για το Y .

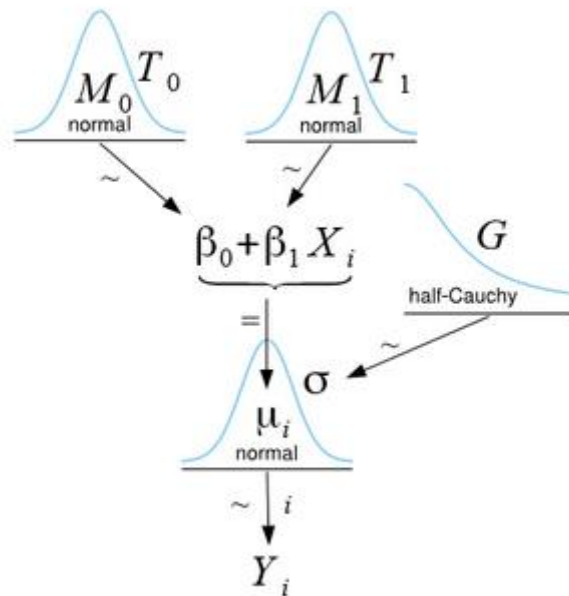
Αντίθετα, η Bayesian Linear Regression επιστρέφει μια κατανομή. Συνήθως, χρησιμοποιούνται κοινές κατανομές πιθανότητας για τον καθορισμό της κατανομής της αξιοπιστίας έναντι πιθανών τιμών παραμέτρων. Το πλεονέκτημα της χρήσης των κατανομών είναι ότι παρέχουν έναν φυσικό τρόπο για να αντικατοπτρίζουν την αβεβαιότητα των εκτιμήσεων. Η εφαρμογή της εκτίμησης Bayes απαιτεί μια πιθανή αναδιατύπωση της γραμμικής παλινδρόμησης.

Στην περίπτωση της γραμμικής παλινδρόμησης το Y_i διαμορφώνεται ως μια κανονική κατανομή με μέση τιμή $\mu_i = \beta_0 + \beta_1 X$ και τυπική απόκλιση σ , ως μια αντίστροφη κατανομή γάμα. Έτσι η εξίσωση μπορεί να διαμορφωθεί ως εξής:

$$Y_i \sim N(\mu_i, \sigma) \quad (6)$$

Όπου $\mu_i = \beta_0 + \beta_1 X_i$, $\beta_0 \sim N(M_0, T_0)$, $\beta_1 \sim N(M_1, T_1)$ and $\sigma \sim |\text{Cauchy}(G)|$

Στην Εικόνα 12 περιγράφεται το μοντέλο με όρους κατανομών.

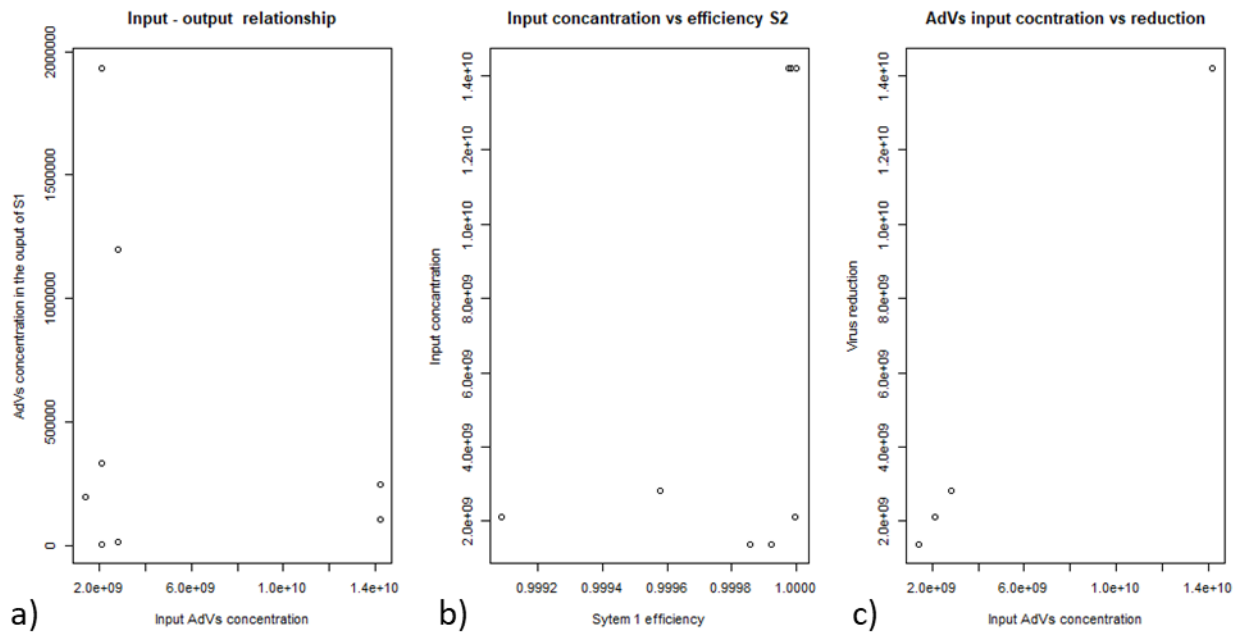


Εικόνα 12. Πιθανοτική απεικόνιση απλού μοντέλου γραμμικής παλινδρόμησης.

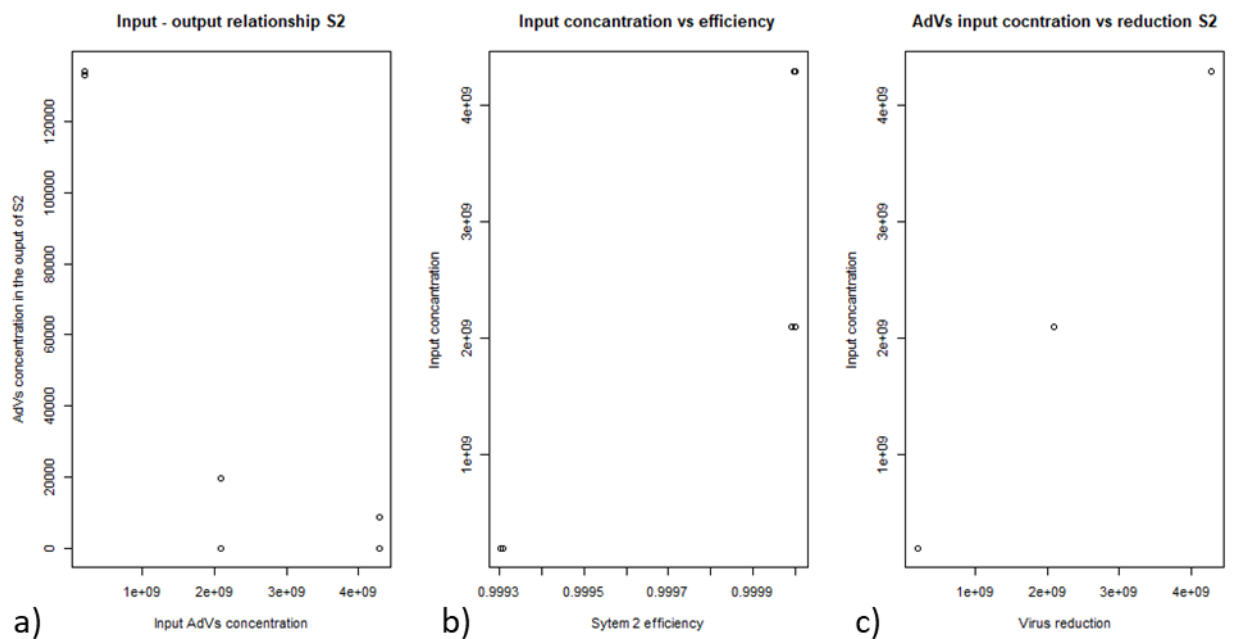
Η γραμμική παλινδρόμηση δημιουργεί έναν αρκετά φυσικό μηχανισμό που μπορεί να βοηθήσει στην ανάλυση ανεπαρκών ή όχι καλά κατανεμημένων δεδομένων. Όταν υπάρχουν «αδύναμες» prior κατανομές, ακόμα και μια μικρή ποσότητα δεδομένων θα ανατρέψει εύκολα την prior κατανομή και η likelihood θα έχει πολύ μεγαλύτερη επιρροή στο αποτέλεσμα των posterior κατανομών.

3.7.4 Μεθοδολογία – Μοντέλο

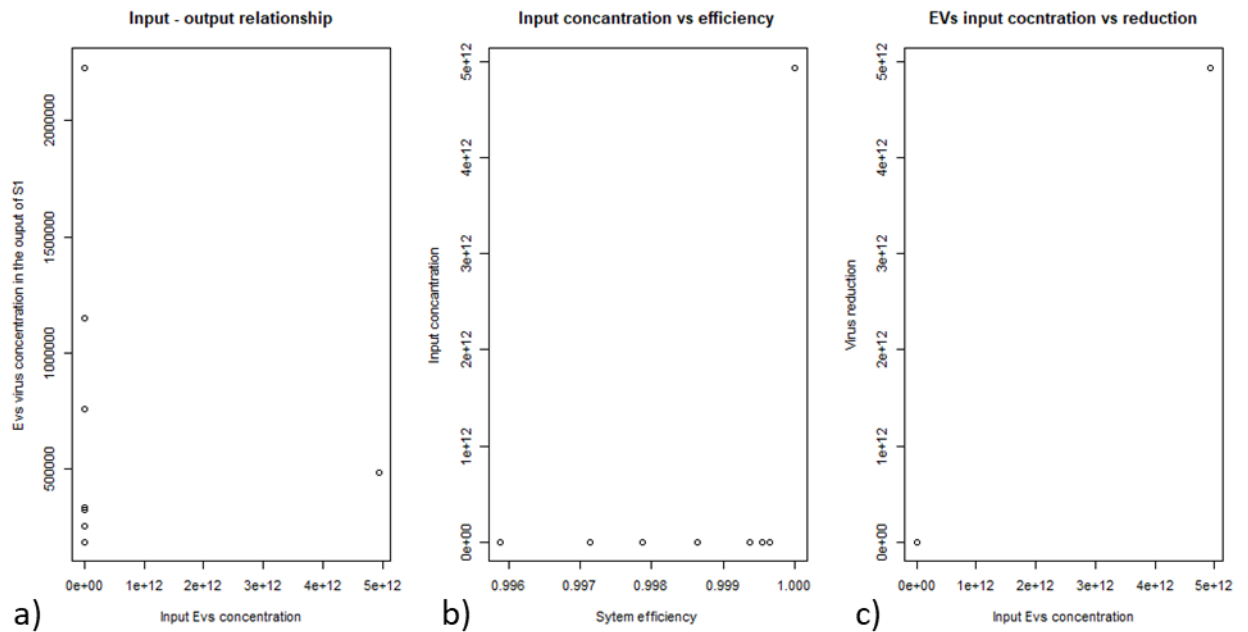
Το πρώτο βήμα ήταν να εξεταστεί αν υπάρχει κάποια γραμμική σχέση μεταξύ των μεταβλητών. Τα διασπορογράμματα (scatter plots) στα γραφήματα 11, 12, 13 και 14 παρουσιάζουν τον έλεγχο για γραμμική σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης εισόδου και εξόδου, της συγκέντρωσης εισόδου και απόδοσης και μεταξύ της αρχικής συγκέντρωσης και της μείωσης για τους αδενοϊούς και τους εντεροϊούς στα συστήματα 1 και 2 του Ηρακλείου.



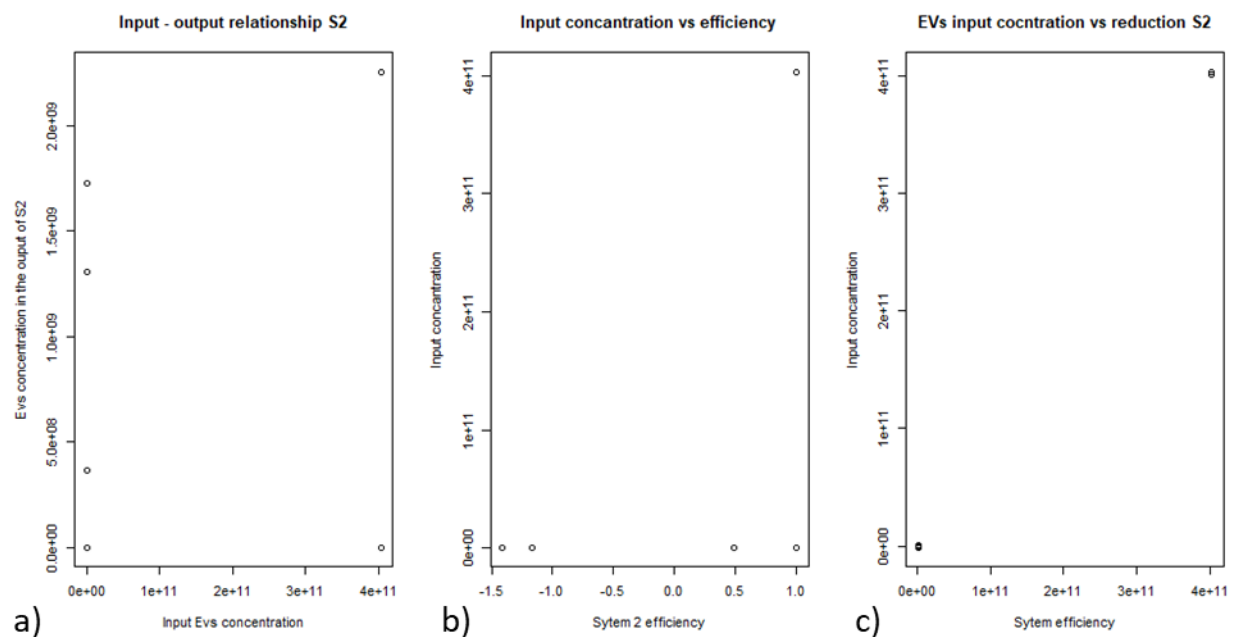
Γράφημα 11. Scatter plots a) συγκέντρωσης εισόδου – συγκέντρωσης εξόδου, b) συγκέντρωσης εισόδου – απόδοσης c) συγκέντρωσης εισόδου - συγκέντρωσης μείωσης για τους αδενοϊούς του Συστήματος 1.



Γράφημα 12. Scatter plots a) συγκέντρωσης εισόδου – συγκέντρωσης εξόδου, b) συγκέντρωσης εισόδου – απόδοσης c) συγκέντρωσης εισόδου - συγκέντρωσης μείωσης για τους αδενοϊούς του Συστήματος 2.



Γράφημα 13. Scatter plots a) συγκέντρωσης εισόδου – συγκέντρωσης εξόδου, b) συγκέντρωσης εισόδου – απόδοσης c) συγκέντρωσης εισόδου - συγκέντρωσης μείωσης για τους εντεροϊούς του Συστήματος 1.



Γράφημα 14. Scatter plots a) συγκέντρωσης εισόδου – συγκέντρωσης εξόδου, b) συγκέντρωσης εισόδου – απόδοσης c) συγκέντρωσης εισόδου - συγκέντρωσης μείωσης για τους εντεροϊούς του Συστήματος 2.

Αρχικά, από το πρώτο μέρος (a) των γραφημάτων 11, 12, 13 και 14 παρατηρήθηκε ότι δεν υπάρχει γραμμική σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης εισόδου και εξόδου. Αυτό σημαίνει ότι η τιμή εισόδου δεν επηρεάζει την τιμή εξόδου, για παράδειγμα

μεγαλύτερη συγκέντρωση ιών στην είσοδο δε συνεπάγεται μεγαλύτερη συγκέντρωση ιών στην έξοδο. Η ίδια τάση εμφανίζεται για τη συγκέντρωση εισόδου και την απόδοση του συστήματος. Η συγκέντρωση εισόδου δεν επηρεάζει την απόδοση του συστήματος, όπως φαίνεται από το δεύτερο μέρος των γραφημάτων (b). Το τρίτο μέρος (c) των γραφημάτων έδειξε ότι υπάρχει γραμμική σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης εισόδου και της μείωσης των ιν. Το παραπάνω ισχύει και για τα δύο συστήματα και για τους δύο τύπους ιών.

3.7.4.1 Μοντέλο παλινδρόμησης

Με βάση τα παραπάνω, η σχέση συγκέντρωσης εισόδου και μείωσης ιών μπορεί να περιγραφεί με ένα γραμμικό μοντέλο. Το μοντέλο μπορεί να έχει την έκφραση της εξίσωσης 5 όπου Y είναι η μείωση της συγκέντρωσης του ιού, X_i η συγκέντρωση εισόδου του ιού (γνωστή σταθερά), β_0 είναι το intercept, το β_1 δείχνει πώς η συγκέντρωση σχετίζεται με τη μείωση (κλίση) και το ε είναι το error term. Σε αυτήν την περίπτωση, γνωρίζοντας τις τιμές των β_1 , β_2 και X μπορούμε να έχουμε μια τιμή για το σημείο Y .

Στην περίπτωση αυτής της μελέτης έχουμε:

$$\beta_1 (\text{απόδοση συστήματος}) = \frac{Y}{X_i} \quad (8)$$

Χρησιμοποιώντας τη joint κατανομή των β_0 και β_1 , το μοντέλο δίνει την εκτίμηση (expectation) για το Y και μπορούμε να θεωρήσουμε ότι το error term είναι 0.

$$E(Y_i) = \beta_0 + \beta_1 X_i \quad (9)$$

3.7.4.2 Bayesian Regression Model

Για τη μπεϋζιανή ανάλυση θα πρέπει να καθοριστεί η prior κατανομή για τις άγνωστες παραμέτρους β και τη διακύμανση σ^2 .

Η γραμμική παλινδρόμηση προϋποθέτει κανονική κατανομή. Για τη δημιουργία μια κανονικής κατανομής χρειάζεται η τυπική απόκλιση (σ), όπου έχει κατανομή inverse gamma, και οι τιμές των μέσων των β . Η διακύμανση των β δίνεται από τον πίνακα της συνδιακύμανσης.

Οι κατανομές των β δίνονται από το μοντέλο. Κατόπιν τυχαίες τιμές λαμβάνονται από τις κατανομές. Οι τιμές για τα δείγματα συλλέγονται από την likelihood κατανομή χρησιμοποιώντας αλγόριθμους MCMC.

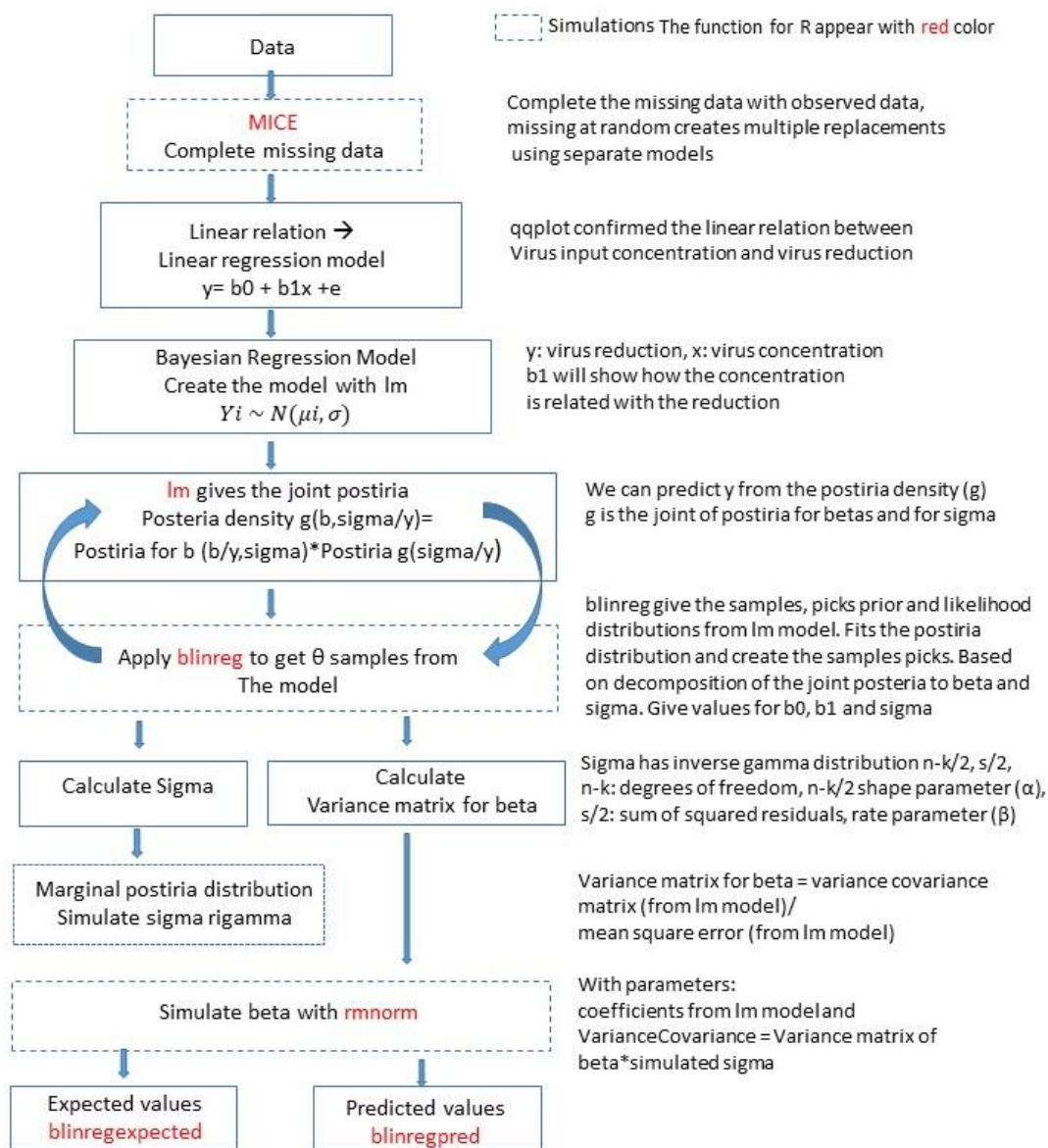
$$\begin{array}{c}
 \text{Posterior} \qquad \qquad \text{Likelihood} \qquad \text{Prior} \\
 \hline
 P(\text{Model}|\text{New Data}) = \frac{P(\text{New Data}|\text{Model})P(\text{Model})}{\underbrace{P(\text{New Data})}_{\text{Evidence}}}
 \end{array}$$

3.7.4.3 Δημιουργία μοντέλου στη γλώσσα R

Εικόνα 13. Κανόνας Bayes με αντιστοιχία κατανομών και δεδομένων

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η «συμπλήρωση» τιμών με την χρήση της βιβλιοθήκης MICE (Multivariate Imputation by Chained Equations). Το πακέτο εφαρμόζει την μπεϋζιανή μεθοδολογία δημιουργώντας πολλαπλές πιθανές αντικαταστάσεις και στη συνέχεια διαλέγει την καλύτερη επιλογή. Το πακέτο βασίζεται στο Fully Conditional Specification, όπου κάθε ατελής μεταβλητή υπολογίζεται από ένα ξεχωριστό μοντέλο. Διατηρεί όλες τις περιπτώσεις δημιουργώντας εκτιμώμενες τιμές βάσει των ήδη διαθέσιμων πληροφοριών. Το πακέτο χρησιμοποιεί διαφορετική μέθοδο για να τοποθετήσει την κάθε τιμή που λείπει (παλινδρόμηση, μέθοδος μέγιστης πιθανότητας κ.α)

Αφού έχουν συμπληρωθεί οι τιμές, δημιουργείται το μοντέλο όπως φαίνεται στην Εικόνα 14. Όλες οι παραπάνω διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν με την γλώσσα R και τμήμα του κώδικα παρουσιάζεται στον Κώδικα 2 του Παραρτήματος.

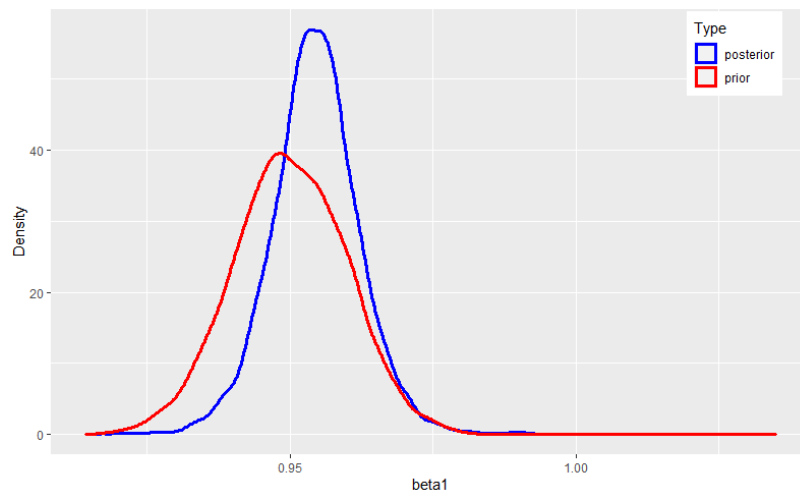


Εικόνα 14. Ροή μοντέλου και συναρτήσεις κώδικα R

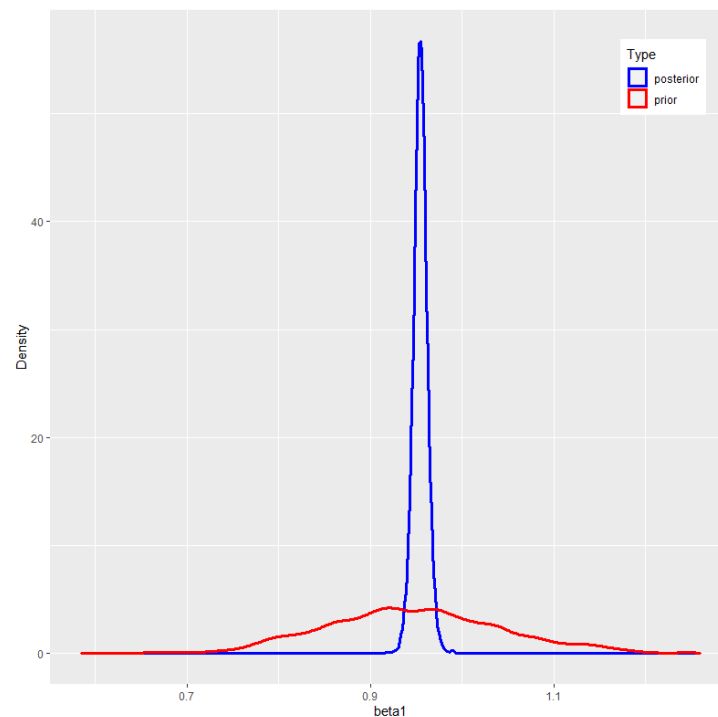
3.7.5 Αποτελέσματα

3.7.5.1 Αδενοϊοί

Για τη λειτουργία του μοντέλου και τον ορισμό της κατανομής prior χρησιμοποιήθηκε η πεποίθηση ότι και τα δύο συστήματα έχουν απόδοση 95%. Στα Γραφήματα 15 και 16 φαίνεται η κατανομή prior και το πως αλλάζει σε posterior με μετά την εισαγωγή των πειραματικών δεδομένων και την προσομοίωση.



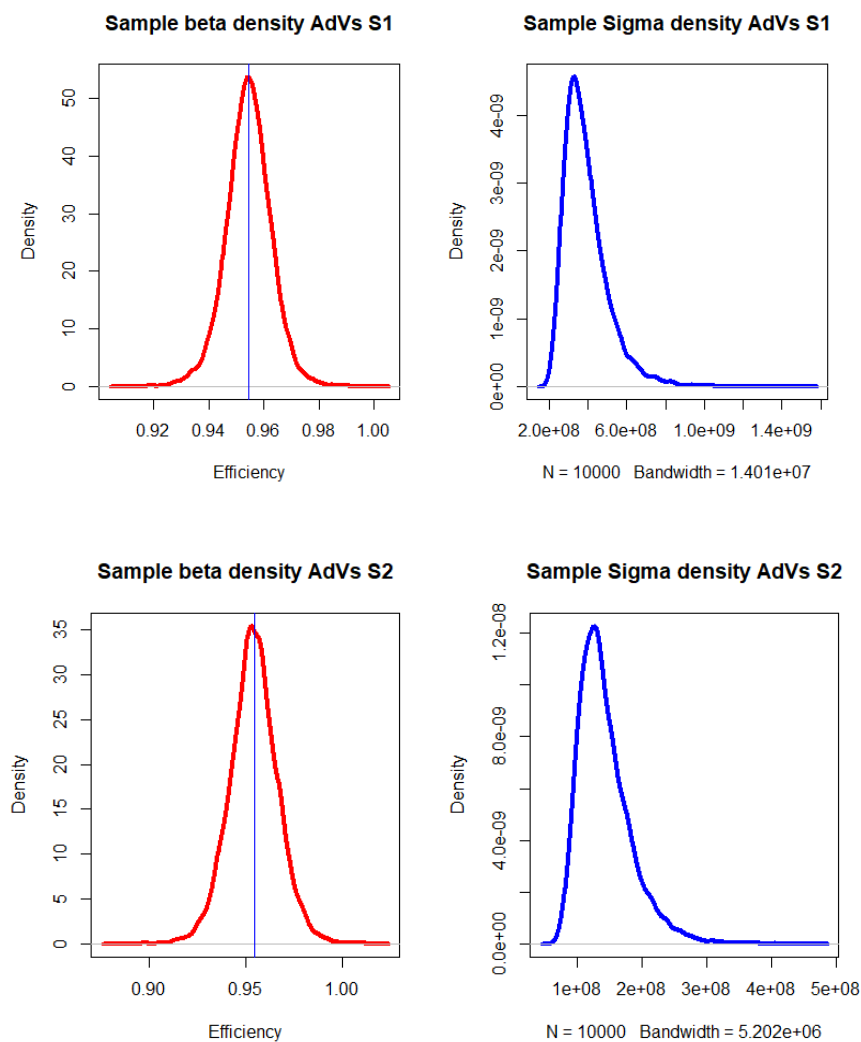
Γράφημα 15. Κατανομή prior και posterior για την απόδοση τους συστήματος 1 ως προς του αδενοϊούς.



Γράφημα 16. Κατανομή prior και posterior για την απόδοση τους συστήματος 1 ως προς του αδενοϊούς.

Στο Γράφημα 17 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του μοντέλου για τους αδενοϊούς για τα συστήματα 1 και 2. Κάνοντας χρήση των παρακάτω γραφημάτων πυκνοτήτων θα γίνει η σύγκριση της απόδοσης μεταξύ των 2 συστημάτων. Αρχικά, παρατηρώντας τα γραφήματα της κατανομής β (κόκκινη καμπύλη) του μοντέλου και για τα 2 συστήματα φαίνεται ότι είναι πολύ κοντά οι τιμές της απόδοσης για τα δύο συστήματα. Η μπλε κάθετη γραμμή σημειώνει τη μέγιστη εκτίμηση Posteriori

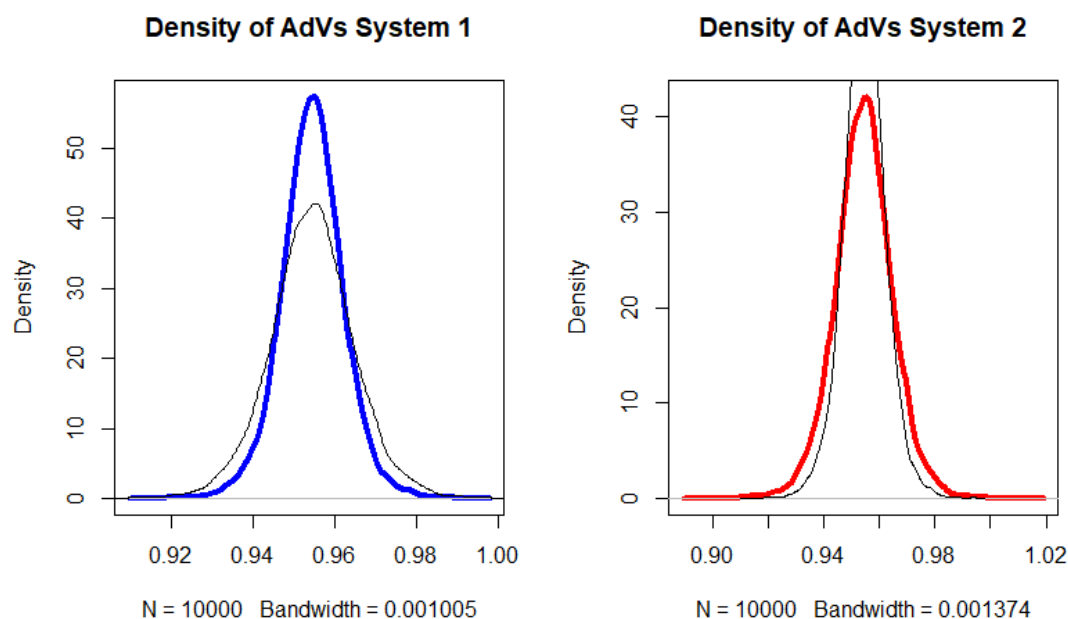
(Maximum A Posteriori, MAP) και είναι η τιμή που σχετίζεται με την υψηλότερη πυκνότητα πιθανότητας (η «κορυφή» της posterior κατανομής). Με άλλα λόγια, είναι μια εκτίμηση της επικρατούσας τιμής για συνεχείς παραμέτρους. Στη συγκεκριμένη περίπτωση η τιμή MAP ήταν ίδια για τα δύο συστήματα. Αυτό που μπορεί να παρατηρηθεί πιο εύκολα είναι ότι το σύστημα 1 έχει υψηλότερες τιμές στο αριστερό άκρο της κατανομής που συνεπάγεται ότι το χαμηλό όριο αντιστοιχεί σε υψηλότερες αποδόσεις.



Γράφημα 17. Καμπύλες πυκνοτήτων της κατανομής β με κόκκινο και σ με μπλε για την απόδοση των συστημάτων 1 και 2 ως προς την απομάκρυνση αδενοϊών. Η μπλε κάθετη γραμμή δείχνει την επικρατούσα τιμή.

Ακόμα ένας τρόπος για να συγκριθούν και οπτικά τα δύο συστήματα είναι να τοποθετηθούν στο ίδιο γράφημα οι κατανομές των δύο συστημάτων. Στο Γράφημα 18 παρουσιάζονται μαζί οι κατανομές της απόδοσης των δύο συστημάτων. Όπως φαίνεται

η διασπορά του συστήματος 1 είναι μικρότερη αφού παρουσιάζει στενότερη καμπύλη και μικρότερες ουρές στα άκρα.

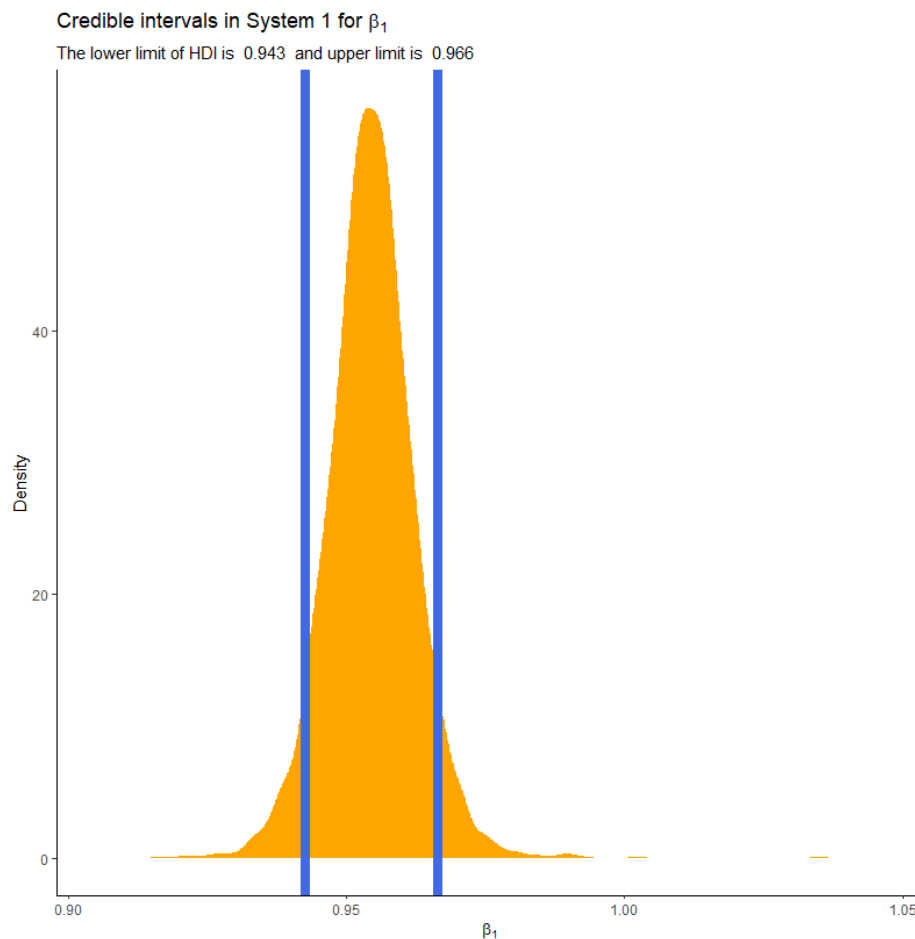


Γράφημα 18. Απεικόνιση επικάλυψης κατανομών β του συστήματος 1 με μπλε γραμμή και 2 με μαύρη και κατανομή β συστήματος 2 με κόκκινη γραμμή και 1 με μαύρη γραμμή.

Για την εξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων υπολογίστηκαν τα αξιόπιστα διαστήματα (Credible Intervals, CI) για τα δύο συστήματα. Ο όρος credible intervals χρησιμοποιείται στην μπεϋζιανή στατιστική και ερμηνεύεται ως το εύρος που περιέχει ένα συγκεκριμένο ποσοστό πιθανών τιμών. Ο βασικός σκοπός του είναι να περιγράψει και να συνοψίσει την αβεβαιότητα που σχετίζεται με τις παραμέτρους. Από αυτήν την άποψη, φαίνεται να είναι αρκετά παρόμοιο με τα διαστήματα εμπιστοσύνης της κλασικής στατιστικής. Ωστόσο, ενώ ο στόχος τους είναι παρόμοιος, ο στατιστικός ορισμός και η σημασία τους είναι πολύ διαφορετικά. Για παράδειγμα λέγοντας 95% CI εννοείται απλά το κεντρικό τμήμα της posterior κατανομής που περιέχει το 95% των τιμών. Αυτό βελτιώνει σημαντικά την ευκολία στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Δηλαδή μπορεί να ειπωθεί ότι: έχοντας τα πειραματικά δεδομένα, η απόδοση έχει 95% πιθανότητα να είναι μεταξύ κάποιων τιμών. Το ίδιο αποτέλεσμα χρησιμοποιώντας την παραδοσιακή στατιστική και τα διαστήματα εμπιστοσύνης θα ήταν: υπάρχει 95% πιθανότητα ότι όταν υπολογίζουμε δεδομένα αυτού του είδους το διάστημα εμπιστοσύνης θα βρίσκεται σε αυτό το εύρος τιμών. Στη μπεϋζιανή στατιστική είναι σύνηθες να χρησιμοποιείται το 89% ως CI ελλείψει σταθερότητας ειδικά στις

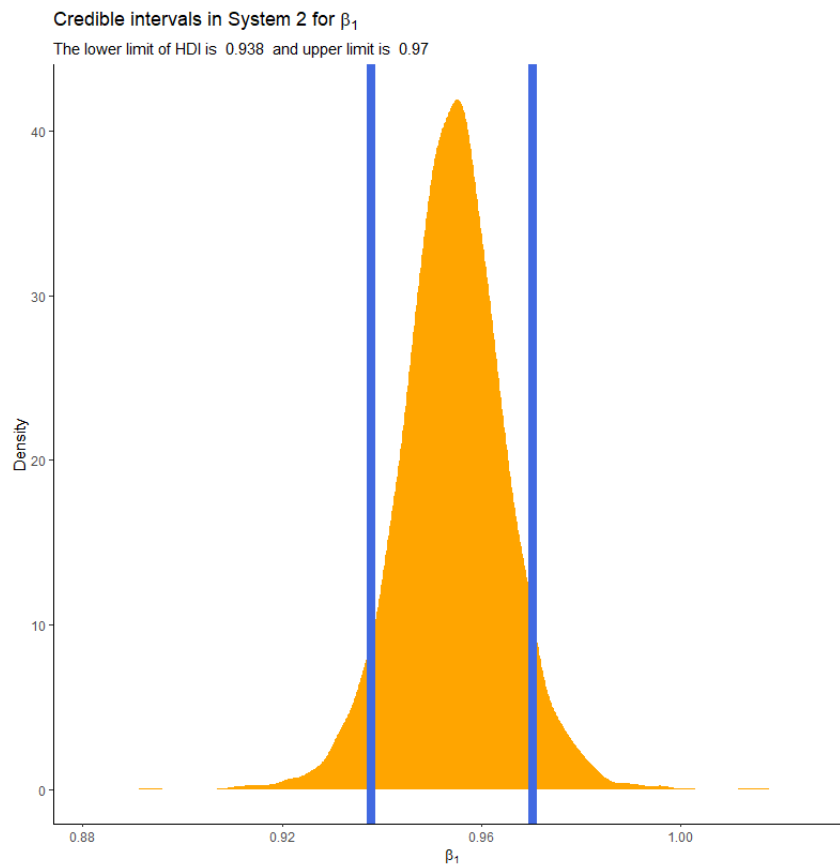
περιπτώσεις όπου δεν υπάρχουν πολλά δεδομένα. Σε αυτή τη μελέτη για τον υπολογισμό των credible intervals χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Highest Density Interval (HDI) κατά την οποία υποδεικνύονται ποια σημεία της κατανομής είναι πιο αξιόπιστα και ποια καλύπτουν το μεγαλύτερο μέρος της κατανομής. Έτσι, το HDI καθορίζει στην ουσία ένα διάστημα που καλύπτει το μεγαλύτερο μέρος της κατανομής (89%), έτσι ώστε κάθε σημείο μέσα στο διάστημα να έχει μεγαλύτερη αξιοπιστία από οποιοδήποτε σημείο εκτός του διαστήματος.

Στα γραφήματα 19 και 20 φαίνονται τα CI για τα συστήματα 1 και 2 αντίστοιχα. Σύμφωνα με το γράφημα 19 για το σύστημα 1, υπάρχει 89% πιθανότητα η απόδοση του συστήματος να είναι μεταξύ των τιμών 0,943 και 0,966.



Γράφημα 19. Αξιόπιστο διάστημα 89% για την απόδοση του συστήματος 1 για τους αδενοϊούς.

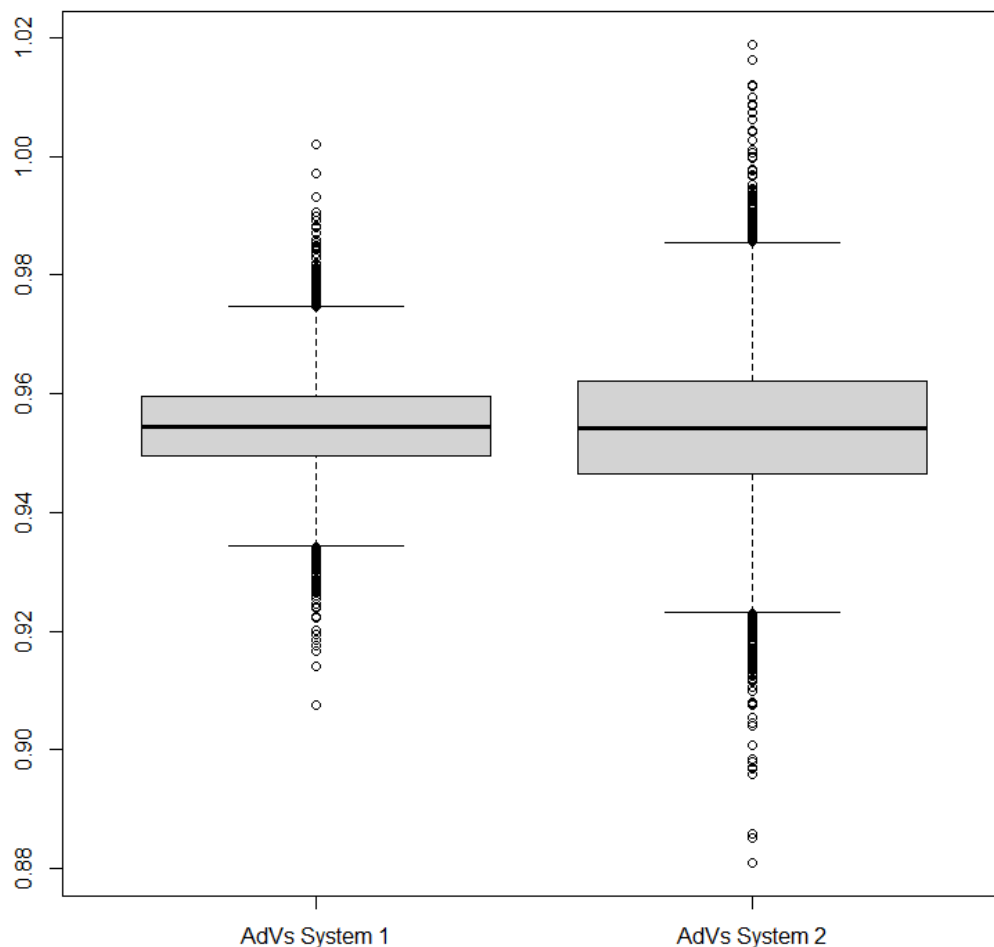
Για το σύστημα 2 αντίστοιχα, υπάρχει 89% πιθανότητα η απόδοση του συστήματος να είναι μεταξύ των τιμών 0,938 και 0,97.



Γράφημα 20. Αξιοπίστο διάστημα 89% για την απόδοση του συστήματος 2 για τους αδενοϊούς.

Όπως φαίνεται τα credible intervals των συστημάτων είναι σχεδόν όμοια. Αυτό που θα μπορούσε να σημειωθεί είναι ότι η τιμή της απόδοσης για το χαμηλό όριο (αριστερό άκρο) του συστήματος 1 είναι μεγαλύτερη από αυτή του συστήματος 2 ενώ στο υψηλό όριο (δεξιό όριο) είναι μεγαλύτερη για το σύστημα 2.

Οι διαφορές στην απόδοση των συστημάτων μπορούν να αποτυπωθούν και με τα θηκογράμματα (Box Plots). Στο Γράφημα 21 παρουσιάζονται τα Box Plots των δύο συστημάτων. Από τα Box Plots φαίνεται ότι η τιμή της διάμεσου για τα δύο συστήματα είναι σχεδόν ίδια.



Γράφημα 21. Box Plots a) συστήματος 1 και b) συστήματος 2 για τους αδενοϊούς.

Αυτό το οποίο φαίνεται ξεκάθαρα από τα Box Plots είναι ότι το σύστημα 2 έχει μεγαλύτερη διακύμανση και οι ακραίες τιμές (outliers) στο χαμηλό άκρο του αντιστοιχούν σε χαμηλότερες απόδοσης σε σύγκριση με αυτές του συστήματος 1.

Τα αποτελέσματα μπορούν να αποτυπωθούν χρησιμοποιώντας τις απόλυτες τιμές των ποσοστιαίων σημείων (percentiles) όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 6. Παρατηρώντας τις τιμές για τα χαμηλά percentiles δηλαδή για το 2,5% και το 25% φαίνεται ότι η απόδοση του συστήματος 1 είναι μεγαλύτερη. Επίσης στον πίνακα παρουσιάζεται και ο δείκτης μεταβλητότητας (Coefficient of Variation, CV) ο οποίος δείχνει την σχετική διακύμανση της κατανομής πιθανότητας.

Όπως φαίνεται η τιμή του δείκτη είναι μικρότερη για το σύστημα 1 κάτι που συνεπάγεται μικρότερη διασπορά αλλά και ότι η εκτίμηση είναι πιο ακριβής.

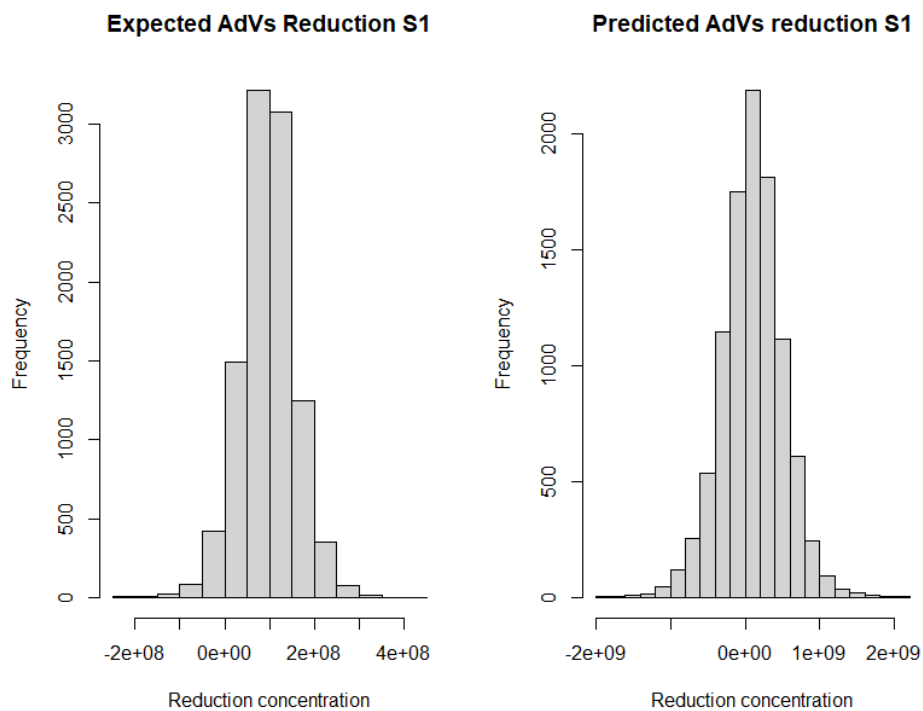
Πίνακας 6. Ποσοστημόρια και δείκτης σχετικής διακύμανσης (CV) των κατανομών β από τα συστήματα 1 και 2 για τους αδενοϊούς.

S1					
Percentiles	2,5%	25%	50%	75%	97,5%
β_1	0.9377593	0.9494168	0.9544976	0.9595370	0.9705437
CV	0.008685833				
S2					
Percentiles	2,5%	25%	50%	75%	97,5%
β_1	0.9289932	0.9464578	0.9542148	0.9620912	0.9794405
CV	0.01326986				

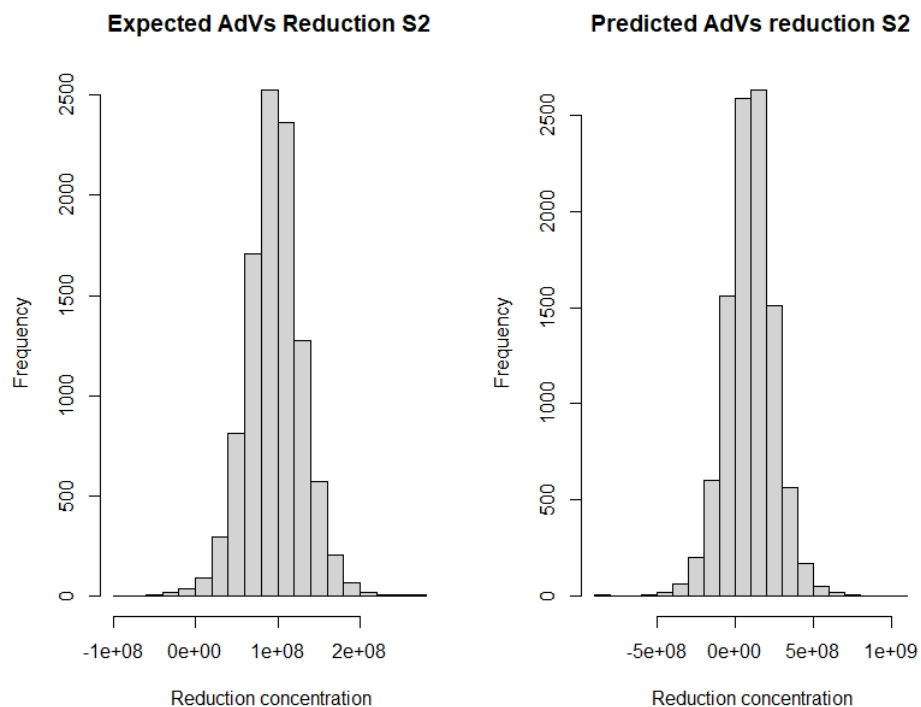
Προβλεπόμενες τιμές

Στα Γραφήματα 22 και 23 παρουσιάζονται οι προβλεπόμενες (predicted) και οι αναμενόμενες (exprected) πιθανότητες για τα δύο συστήματα. Η αναμενόμενη τιμή βασίζεται στη μέση τιμή από τα δεδομένα τα οποία προκύπτουν από την προσομοίωση του μοντέλου. Πλέον, έχοντας δημιουργήσει το γραμμικό μοντέλο μπορεί να γίνει η πρόβλεψη της απόδοσης, και αυτό θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ακόμα και για οποιοδήποτε παρόμοιο σύστημα. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η τιμή της πρόβλεψης περιέχει μεγαλύτερη αβεβαιότητα.

Έχοντας πλέον δημιουργήσει το μοντέλο θα μπορούσε να γίνει πρόβλεψη για την απόδοση των συστημάτων. Θεωρώντας λοιπόν τη συγκέντρωση των ιών στην είσοδο των συστημάτων στα 10^8 gc/L δημιουργούνται τα γραφήματα 22 και 23 για τα συστήματα 1 και 2 αντίστοιχα. Η προβλεπόμενη τιμή είναι η τιμή που προκύπτει για το Y για την συγκεκριμένη τιμή της συγκέντρωσης. Η αναμενόμενη τιμή είναι ο σταθμισμένος μέσος όρος των τιμών που μπορεί να πάρει η τυχαία μεταβλητή.



Γράφημα 22. Εκτιμώμενες και αναμενόμενες τιμές μείωσης αδενοϊών για το σύστημα 1.



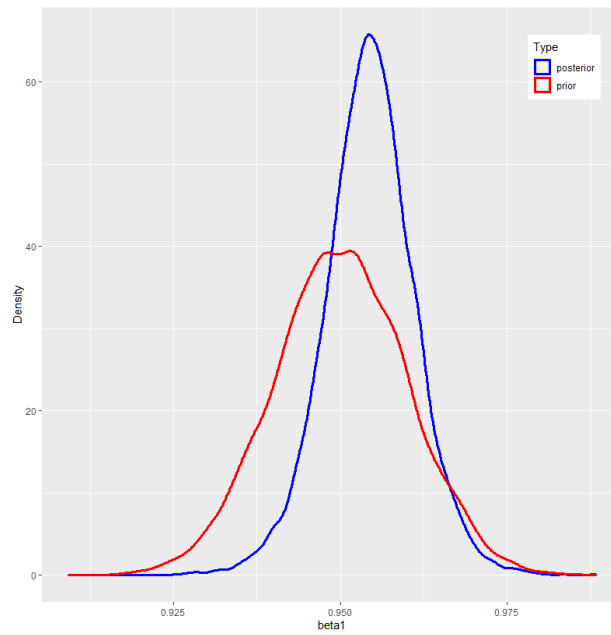
Γράφημα 23. Εκτιμώμενες και αναμενόμενες τιμές μείωσης αδενοϊών για το σύστημα 2.

Έτσι από το μοντέλο προκύπτει ότι η αναμενόμενη απόδοση για το σύστημα 1 είναι 0.963 και η προβλεπόμενη 0.993. Για το σύστημα 2 προκύπτει ότι η αναμενόμενη απόδοση είναι 0.960 και η προβλεπόμενη 0.971.

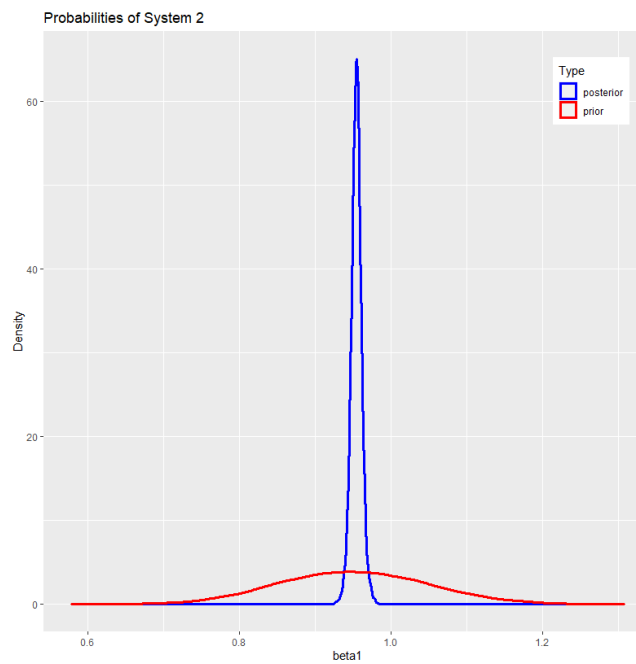
Συγκρίνοντας τα δύο γραφήματα για τις αναμενόμενες τιμές, επιβεβαιώνεται ότι από το σύστημα 1 αναμένεται καλύτερη απόδοση. Αυτό επιβεβαιώνεται και από όλα τα παραπάνω γραφήματα από τα οποία παρατηρείται έστω και το μικρό πλεονέκτημα του συστήματος 1. Σημαντικό πλεονέκτημα για το σύστημα 1 είναι και η μικρότερη διακύμανση στις τιμές. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι συγκρίνοντας τα δύο συστήματα χρησιμοποιώντας απλώς τους μέσους όρους συστημάτων για τους αδενοϊούς, όπως παρουσιάζεται στην προηγούμενη ενότητα, υπάρχει το αντίθετο αποτέλεσμα έστω και οριακά. Δηλαδή το σύστημα 2 παρουσιάζεται να έχει καλύτερη απόδοση ως προς την απομάκρυνση των αδενοϊών.

3.7.5.2 Εντεροϊοί

Παρόμοια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τους εντεροϊούς. Και σε αυτή την περίπτωση ως αρχική πεποίθηση θεωρήθηκε ότι τα συστήματα επιτυγχάνουν απομάκρυνση των εντεροϊών κατά 95%. Οι καμπύλες των prior και posterior κατανομών παρουσιάζονται στα Γραφήματα 24 και 25 για το σύστημα 1 και 2 αντίστοιχα.

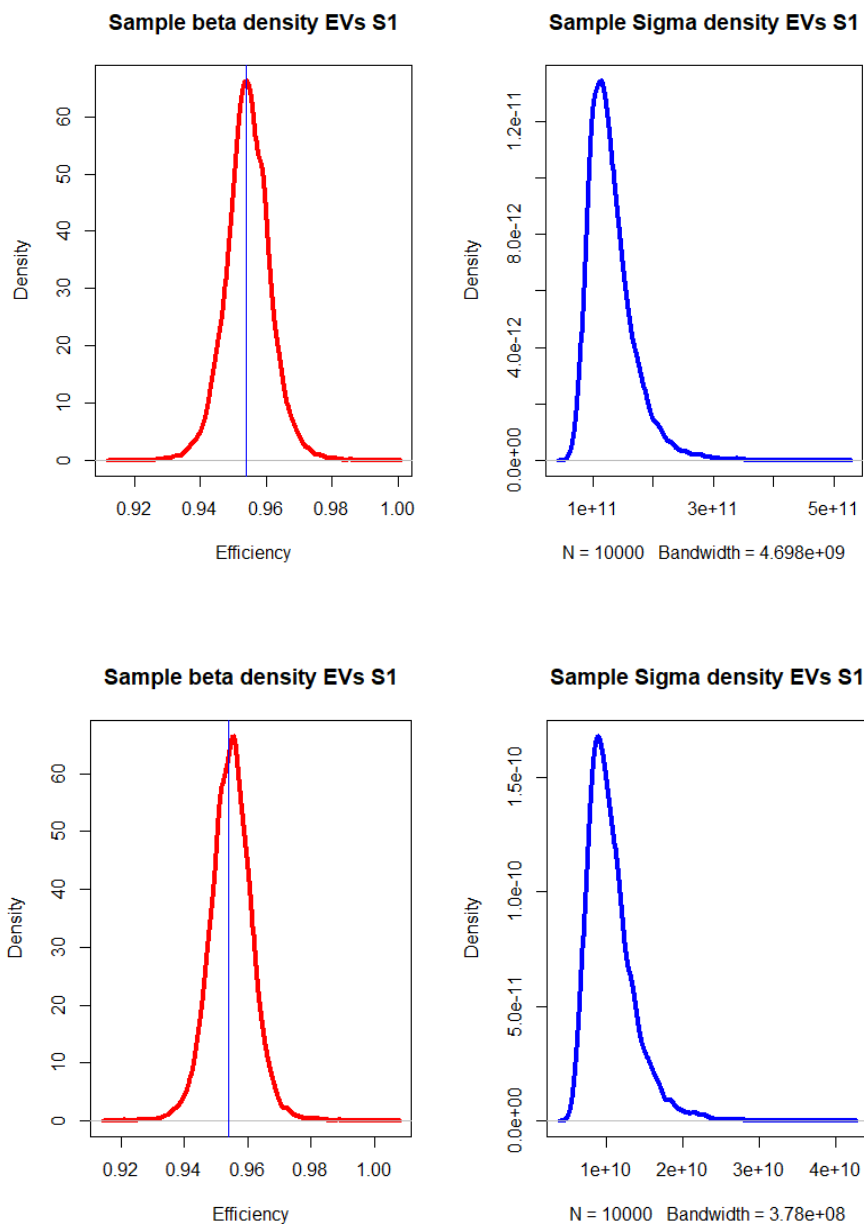


Γράφημα 24. Κατανομή prior και posterior για την απόδοση τους συστήματος 1 ως προς του εντεροϊούς.



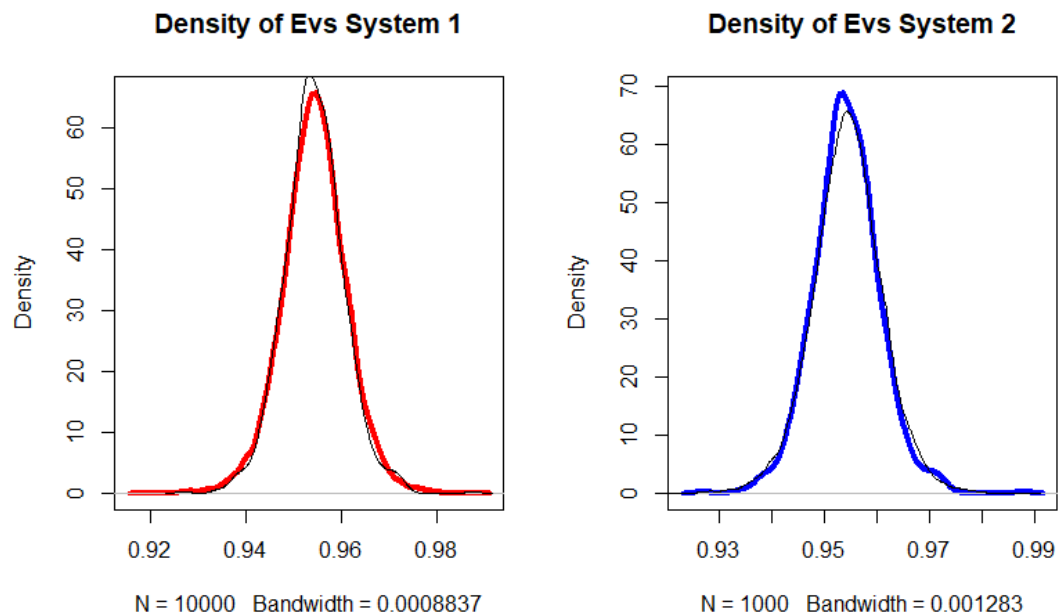
Γράφημα 25. Κατανομή prior και posterior για την απόδοση τους συστήματος 2 ως προς του εντεροϊούς.

Στο Γράφημα 26 παρουσιάζονται οι καμπύλες πυκνοτήτων και αυτό που παρατηρείται είναι ότι οι καμπύλες για τα δύο συστήματα είναι σχεδόν όμοιες, όπως και το ότι οι επικρατούσες τιμές για την απόδοση είναι ίδιες.



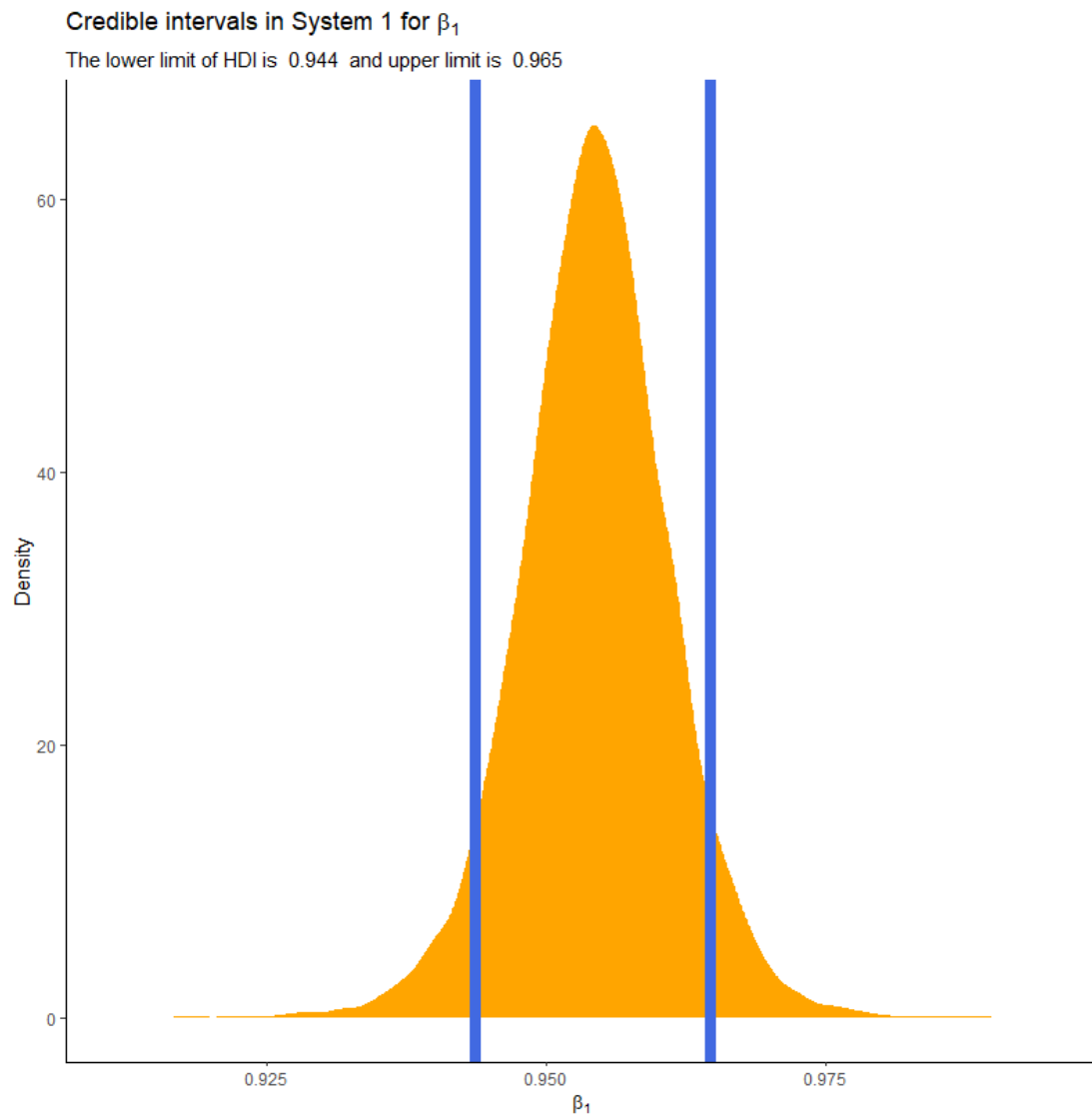
Γράφημα 26. Καμπύλες πυκνοτήτων της κατανομής β με κόκκινο και σ με μπλε για την απόδοση των συστημάτων 1 και 2 ως προς την απομάκρυνση εντεροϊών. Η μπλε κάθετη γραμμή δείχνει την επικρατούσα τιμή.

Η ομοιότητα επιβεβαιώνεται και από το γράφημα 27 στο οποίο τοποθετούνται μαζί οι καμπύλες των δύο συστημάτων.



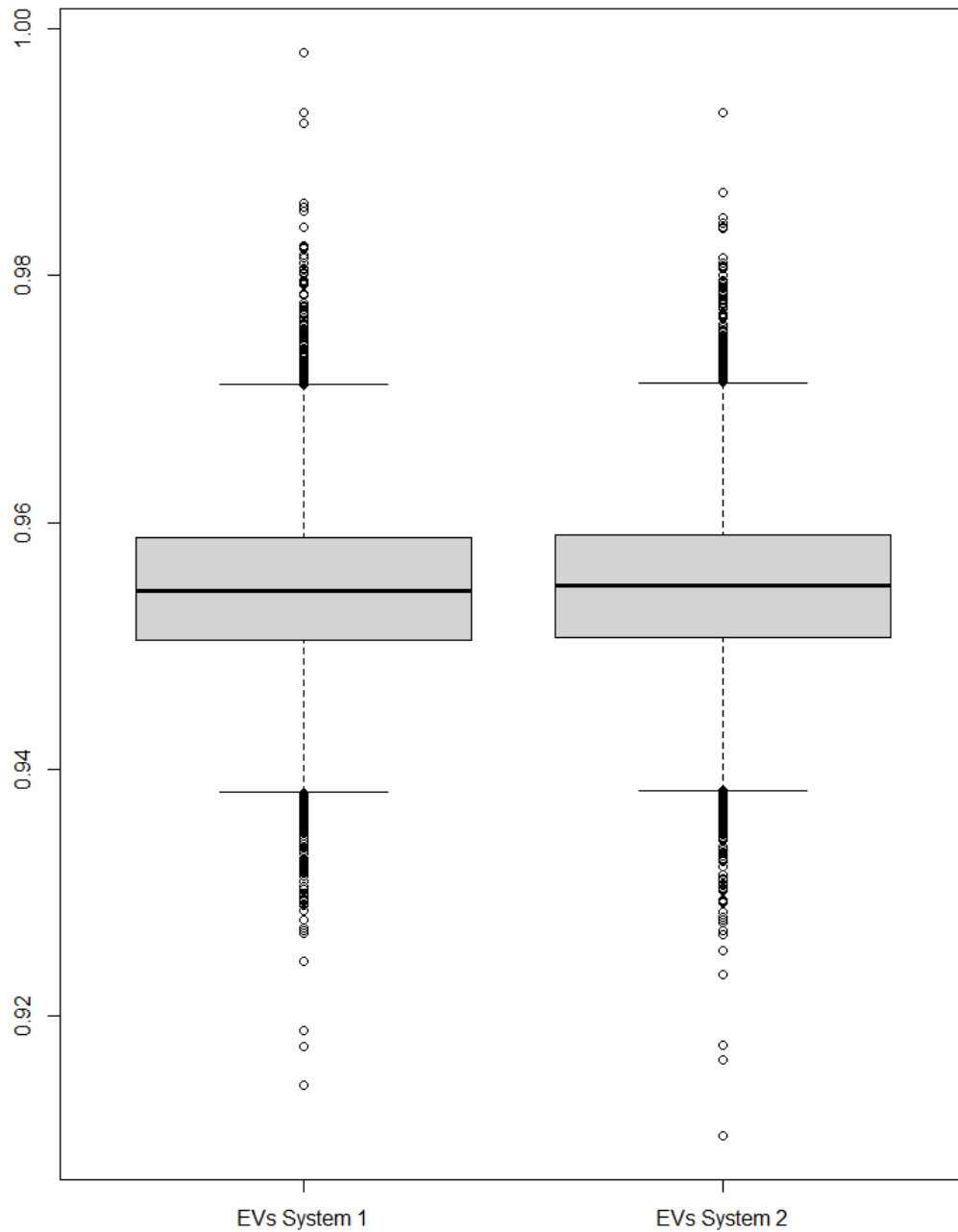
Γράφημα 27. Απεικόνιση επικάλυψης κατανομών β του συστήματος 1 με μπλε γραμμή και 2 με μαύρη και κατανομή β συστήματος 2 με κόκκινη γραμμή και 1 με μαύρη γραμμή.

Ακολουθεί το Γράφημα 28 όπου παρουσιάζεται το αξιόπιστο διάστημα 89% και αναφέρεται και στα δύο συστήματα αφού παρουσίασαν ακριβώς το ίδιο αποτέλεσμα. Όπως φαίνεται το κατώτερο όριο αντιστοιχεί στην τιμή 0,944 και το ανώτερο στην τιμή 0,965.



Γράφημα 28. Αξιόπιστο διάστημα 89% για την απόδοση του συστήματος 1 και 2 για τους εντεροϊούς.

Και από το γράφημα των box plots (Γράφημα 29) για τους εντεροϊούς επιβεβαιώνεται η μεγάλη ομοιότητα των δύο συστημάτων. Η μόνη διαφορά που φαίνεται είναι ότι σύστημα 1 έχει outliers στο άνω μέρος που αντιστοιχεί σε μεγαλύτερη απόδοση ενώ για το σύστημα 2 στο κάτω μέρος όπου αντιστοιχούν σε χαμηλότερη απόδοση.



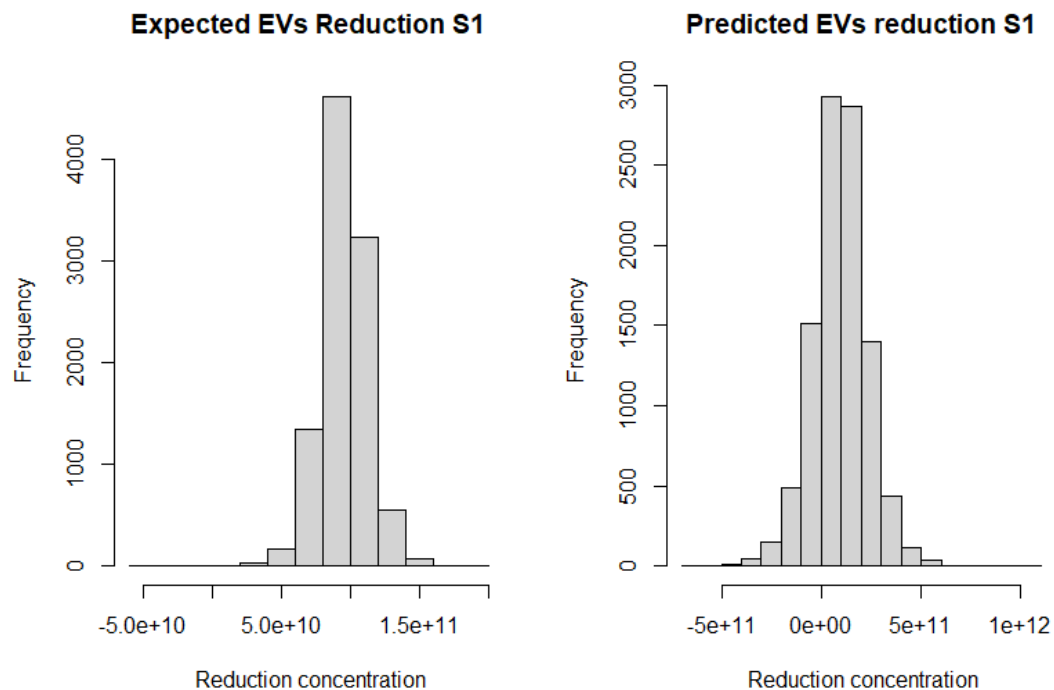
Γράφημα 29. Box Plots συστήματος 1 και συστήματος 2 για τους εντεροϊούς.

Στον παρακάτω πίνακα, παρουσιάζονται οι τιμές που δίνουν τα διαφορετικά ποσοστημόρια και ο δείκτης σχετικής διακύμανσης για τα δύο συστήματα. Όπως φαίνεται οι τιμές που προκύπτουν από τα ποσοστημόρια είναι σχεδόν ίδιες για τα 2 συστήματα ενώ παρατηρείται μια διαφορά στο δείκτη σχετικής διακύμανσης.

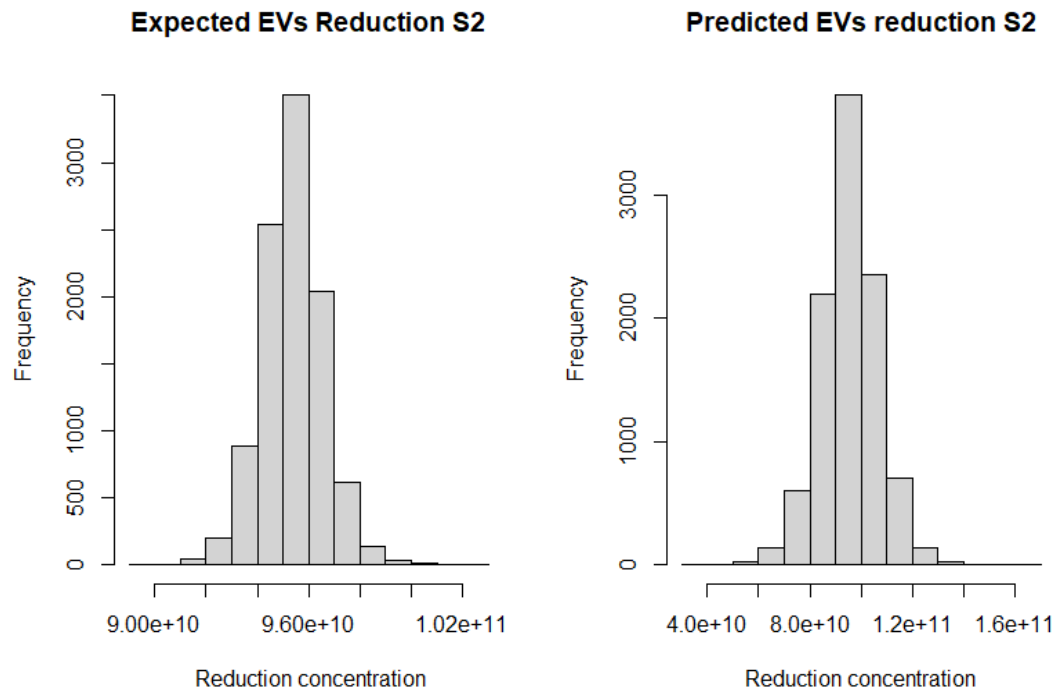
Πίνακας 7. Ποσοστημόρια και δείκτης σχετικής διακύμανσης (CV) των κατανομών β από τα συστήματα 1 και 2 για τους εντεροϊούς.

S1					
Percentiles	2,5%	25%	50%	75%	97,5%
β1	0.9420229	0.9508565	0.9546146	0.9584851	0.9672464
CV	0.006590189				
S1					
Percentiles	2,5%	25%	50%	75%	97,5%
β1	0.9385014	0.9495373	0.9545908	0.9594761	0.9705853
CV	0.008430203				

Τέλος, όπως και για τους αδενοϊούς υπολογίσθηκαν οι εκτιμώμενες και οι προβλεπόμενες τιμές για το δύο συστήματα και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα Γραφήματα 30 και 31. Σε αυτήν την περίπτωση θεωρήθηκε ότι η συγκέντρωση των εντεροϊών στην είσοδο των συστημάτων ήταν 10^{11} gc/L. Για το σύστημα 1 η αναμενόμενη τιμή για την απόδοση ήταν 0,962 και η προβλεπόμενη τιμή 0,943. Για το σύστημα 2 η αναμενόμενη και η προβλεπόμενη τιμή ήταν 0,953. Δηλαδή η προβλεπόμενη τιμή ήταν λίγο καλύτερη για το σύστημα 2.



Γράφημα 30. Εκτιμώμενες και αναμενόμενες τιμές μείωσης εντεροϊών για το σύστημα 1.



Γράφημα 31. Εκτιμώμενες και αναμενόμενες τιμές μείωσης εντεροϊών για το σύστημα 2.

Ο λόγος για τον οποίο επιλέχθηκαν διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις αδενοϊών και εντεροϊών για τον υπολογισμό των αναμενόμενων και προβλεπόμενων τιμών είναι ότι εξαιτίας των λίγων δεδομένων και των μικρών διαφοροποιήσεων των τιμών στα δεδομένα, το μοντέλο δεν «εκπαιδεύτηκε» για να μπορεί να κάνει πρόβλεψη σε όλα τα εύρη τιμών. Όπως αναφέρθηκε και στην αρχή της ενότητας κατά την μεϋζιανή προσέγγιση το μοντέλο βελτιώνεται συνεχώς με την εισαγωγή νέων δεδομένων.

3.8 Συζήτηση αποτελεσμάτων - Αξιολόγηση υδροβιοτόπων ως συστημάτων δευτεροβάθμιας επεξεργασίας για την απομάκρυνση μικροοργανισμών

Τα αποτελέσματα ανέδειξαν την ικανότητα των τεχνητών υδροβιοτόπων να απομακρύνουν το φορτίο των βακτηριακών δεικτών (TC, *E. coli*, enterococci) σε μεγάλο ποσοστό, κάτι το οποίο είναι σύμφωνο με προηγούμενες μελέτες, οι οποίες αναφέρουν ότι η αδρανοποίηση για τα κοπρανώδη κολοβακτηριοειδή σε γενικές γραμμές κυμαίνεται μεταξύ 1,25 και 2,5 Logs (Morató et al., 2014b). Πιο συγκεκριμένα, αναφέρεται ότι η απομάκρυνση για το *E. coli* είναι μεταξύ 96,6 και 98,9% και για τους κοπρανώδεις στρεπτόκοκκους 99% (Donde and Xiao, 2017).

Τα αποτελέσματα είναι σε συμφωνία με μελέτες που αναφέρουν ότι ένα υβριδικό σύστημα υδροβιοτόπων μπορεί να αποδώσει καλύτερα απ' ότι ένας μεμονωμένος υδροβιότοπος. Όσον αφορά τα κολοβακτηριοειδή αναφέρονται ποσοστά απομάκρυνσης 91,5%, 85,6% και 99,4% για υδροβιότοπο υποεπιφανειακής ροής, υδροβιότοπο ελεύθερης επιφάνειας και υβριδικό σύστημα αντίστοιχα. Για τους κοπρανώδεις στρεπτόκοκκους τα αντίστοιχα ποσοστά απομάκρυνσης είναι 92,6%, 84,0% και 97,7% ενώ για τα ολικά κολοβακτηριοειδή είναι 88,1%, 65,1% και 99,1 % (Vymazal, 2005). Η καλύτερη απόδοση των υβριδικών συστημάτων συνδέεται κυρίως με το πόσο χρονικό διάστημα βρίσκεται το λύμα εντός ενός τέτοιου συστήματος. Όσο μεγαλύτερη είναι η απόσταση από την εισροή του συστήματος τόσο μεγαλύτερη είναι απομάκρυνση που αναμένεται να επιτευχθεί από το σύστημα. (Vymazal, 2005). Σε ένα σύστημα υβριδικών υδροβιοτόπων τα βακτήρια θα παραμένουν μεγαλύτερο χρονικό διάστημα εντός της μονάδας και θα διανύσουν μεγαλύτερη απόσταση σε σχέση με ένα μεμονωμένο υδροβιότοπο. Ακόμα ο μεγαλύτερος χρόνος παραμονής που παρέχεται από ένα υβριδικό σύστημα δίνει περισσότερο χρόνο στα βακτήρια να καθιζήσουν, να προσκολληθούν στο υπόστρωμα και να αλληλοεπιδράσουν με τους φυσικοχημικούς

και βιολογικούς παράγοντες που συμβάλουν στην αδρανοποίηση τους (Alufasi et al., 2017a; Wu et al., 2016).

Η απόδοση που επιτυγχάνεται από τα υβριδικά συστήματα υδροβιότοπων είναι συγκρίσιμη με την απόδοση της ενεργού ιλύς η οποία επιτυγχάνει μείωση 90-99% (Vymazal, 2005). Τα υψηλά ποσοστά απομάκρυνσης των βακτηριακών δεικτών που πέτυχαν οι εξεταζόμενοι CW δεχόμενοι πρωτοβάθμιο λύμα, τονίζουν τη δυνατότητα τους να χρησιμοποιηθούν ως εναλλακτικά συστήματα δευτεροβάθμιας επεξεργασίας.

Συγκρίνοντας τους δύο διαφορετικούς υδροβιότοπους, παρατηρήθηκε ότι ο υδροβιότοπος υποεπιφανειακής ροής (HSSF) ήταν αποτελεσματικότερος από αυτόν της επιφανειακής ροής (FWS) όσον αφορά στην απομάκρυνση τόσο των βακτηριακών δεικτών όσο και των ιών. Η μελέτη των Kadlec et al. συγκεντρώνει δεδομένα από μεγάλο αριθμό μελετών και αναφέρει ότι δεν υπάρχει ουσιαστική διαφορά στην απόδοση ως προς την απομάκρυνση των παθογόνων μεταξύ FWS (μείωση 2,00 Logs) και HSSF (μείωση 2,09 Logs) (Kadlec, 2009). Παρόλα αυτά, η καλύτερη απόδοση των CW υποεπιφανειακής ροής ως προς την απομάκρυνση των βακτηριακών δεικτών έχει επίσης αναφερθεί και οφείλεται στις διαφορετικές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα στο κάθε σύστημα (Vymazal, 2005; Wu et al., 2016). Στους FWS οι παράγοντες που συμβάλλουν στην απομάκρυνση παθογόνων είναι η ηλιακή ακτινοβολία, η καθίζηση, ο φυσικός θάνατος, η φίλτρωση και η θήρευση. Στους HSSF σημαντικότεροι παράγοντες είναι η φίλτρωση και η απορρόφηση στο υπόστρωμα. Λόγω της πολυπλοκότητας των συστημάτων αυτών δεν είναι ευδιάκριτος ο βαθμός συμβολής του κάθε παράγοντα. Η ηλιακή ακτινοβολία έχει υπολογιστεί ότι μπορεί να προσφέρει 72,6% απομάκρυνση (Mayo, 2004) ενώ για τους HSSF η φίλτρωση προσφέρει μείωση 1,9- 3,2 Logs (Tanner et al., 2012) και η προσρόφηση στο υπόστρωμα έως 5 Logs (Shingare et al., 2019). Η καθίζηση παρουσιάζεται ως ο βασικότερος μηχανισμός απομάκρυνσης στους υδροβιότοπους ελεύθερης επιφάνειας ενώ η φίλτρωση στο υπόστρωμα στους υποεπιφανειακής ροής. Η συμβολή των μηχανισμών της φίλτρωσης και της απορρόφησης ίσως εξηγούν την καλύτερη απόδοση των HSSF.

Η ηλιακή ακτινοβολία η οποία είναι συνήθως ο κυρίαρχος μηχανισμός της βακτηριακής αδρανοποίησης στους υδροβιότοπους ελεύθερης επιφάνειας (Wu et al., 2016), δε θα μπορούσε να έχει δράση στη συγκεκριμένη μελέτη αφού τα πρωτογενή απόβλητα με τα οποία τροφοδοτούνταν το σύστημα χαρακτηρίζονται από υψηλή

θολερότητα και κατά συνέπεια το φυσικό ηλιακό φως δεν μπορούσε να εισέλθει στο νερό περιορίζοντας έτσι τη δράση της ακτινοβολίας στους παθογόνους μικροοργανισμούς. Η UV A ακτινοβολία μπορεί να καταστρέψει άμεσα το γονιδίωμα των παθογόνων (photo – biological damage) και επίσης η UV και το ορατό φάσμα μπορεί να αντιδράσει με φωτοευαισθητοποιητές όπως η οργανική ύλη και φωτοευαισθητοποιητές εντός των βακτηρίων όπως τα NADH/NADPH παράγοντας ελεύθερες ρίζες που άμεσα καταστρέφουν τους παθογόνους μικροοργανισμούς. Ο μηχανισμός αυτός δεν έχει την ίδια εφαρμογή για όλα τα παθογόνα και παρουσιάζονται διαφοροποιήσεις μεταξύ των Gram (+) και Gram (-) βακτηρίων. Ενώ οι εξωγενείς φωτοευαισθητοποιητές έχουν ρόλο στην αδρανοποίηση του *E. faecalis* (Gram (+)) δεν έδειξαν σημαντική δράση στα ίδια πειράματα για το *E. coli* (Gram (-)) (Kadir and Nelson, 2014).

Παράλληλα η καλύτερη απόδοση του εξεταζόμενου υδροβιότοπου υπό επιφανειακής ροής ενισχύει την άποψη ότι από τους μηχανισμούς που εμπλέκονται στην απομάκρυνση των βακτηριακών δεικτών, η μηχανική φίλτρανση διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην απομάκρυνση των παθογόνων. Ο μηχανισμός της φίλτρανσης περιλαμβάνει τη στράγγιση και την προσρόφηση οι οποίες επηρεάζονται από το υλικό και το μέγεθος των πόρων του υποστρώματος. Όπως αναφέρεται υπόστρωμα μικρότερης κοκκομετρίας ευνοεί τη διαδικασία αφού παρέχει μεγαλύτερη επιφάνεια για την προσρόφηση βακτηρίων (Alufasi et al., 2017a). Τα βακτήρια που κατά κύριο λόγο είναι αρνητικά φορτισμένα έλκονται από ένα θετικά φορτισμένο υπόστρωμα και προσροφώνται σε αυτό. Η έλξη μεταξύ ενός αρνητικά φορτισμένου βακτηρίου και μιας θετικά φορτισμένης επιφάνειας μπορεί να είναι αρκετά μεγάλη ώστε να τοποθετήσει το κύτταρο στο ελάχιστο της πρωτογενούς ενέργειας, και κατά συνέπεια στην μη αναστρέψιμη προσρόφηση. Όταν οι δυνάμεις δεν είναι ισχυρές υπάρχει η πιθανότητα τα βακτήρια να αποκολληθούν από το πορώδες μέσο και αυτό εξαρτάται κυρίως από τη χημική σύσταση και την ιονική ισχύ του λύματος. (Choi et al., 2017; Stevik et al., 2004). Και σε αυτό το σημείο φαίνεται πως υπάρχει διαφοροποίηση μεταξύ Gram θετικών και Gram αρνητικών βακτηρίων. Το τοίχωμα των βακτηριακών κυττάρων έχει αρνητικό φορτίο. Στα Gram θετικά βακτήρια ο λόγος αυτού του αρνητικού φορτίου είναι η παρουσία τειχοϊκών οξέων που συνδέονται είτε με την πεπτιδογλυκάνη είτε με την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Αυτά τα τειχοϊκά οξέα φορτίζονται αρνητικά λόγω της παρουσίας φωσφορικών στη δομή τους. Τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια έχουν

μια εξωτερική επικάλυψη φωσφολιπιδίων και λιποπολυσακχαριτών. Οι λιποπολυσακχαρίτες προσδίδουν ένα έντονα αρνητικό φορτίο στην επιφάνεια των Gram αρνητικών βακτηριακών κυττάρων (Sonohara et al., 1995). Κατά συνέπεια, η μόνιμη προσρόφηση των Gram αρνητικών βακτηρίων είναι πιθανότερο να συμβεί. Διαφοροποίηση όσον αφορά στην προσρόφηση των βακτηρίων υπάρχει και μεταξύ των βακτηρίων τα οποία διαθέτουν τριχίδια (pili) όπου είναι κυρίως τα Gram αρνητικά βακτήρια και παρουσιάζουν καλύτερες ιδιότητες προσρόφησης (Stevik et al., 2004).

Διαφοροποίηση μεταξύ των μικροοργανισμών υπάρχει και στον μηχανισμό της καθίζησης. Η καθίζηση είναι πιο αποτελεσματική για βακτήρια όπως οι κοπρανώδεις στρεπτόκοκκοι λόγω της υψηλής ταχύτητας καθίζησης ($\sim 0,1$ mm/s) ενώ αντίθετα για άλλους μικροοργανισμούς όπως τα πρωτόζωα, οι ωοκύστες και τα βακτήρια, όπως το *E.coli*, η καθίζηση είναι αναποτελεσματική λόγω των χαμηλών ταχυτήτων καθίζησης ($< 0,001$ mm/s) (Wu et al., 2016). Αυτός ίσως είναι ένας ακόμα παράγοντας εκτός από τη δυσλειτουργία της ηλιακής ακτινοβολίας που εξηγεί το μικρό ποσοστό απομάκρυνσης του *E.coli* από το FWS υδροβιότοπο.

Αναφερόμενοι στην απομάκρυνση των ιών, ο CW υπό επιφανειακής ροής λειτούργησε καλύτερα από τον CW ελεύθερης επιφάνειας στην περίπτωση των αδενοϊών. Δε παρατηρήθηκε όμως το ίδιο για τους εντεροϊούς καθώς οι συγκεντρώσεις ποσοτικοποιήθηκαν στα ίδια επίπεδα για τους δύο υδροβιοτόπους.

Η διαφοροποίηση η οποία παρατηρείται στην απόδοση του συστήματος μετά την αφαίρεση του FWS ως προς τους εντεροϊούς θα μπορούσε να αποδοθεί σε μια σειρά παραγόντων. Σε γενικές γραμμές η παρουσία οργανικής ύλης μειώνει την απόδοση των συστημάτων απέναντι στους ιούς (Pinon and Vialette, 2019). Οι ιοί έχουν τη ικανότητα να προσκολλώνται στα αιωρούμενα στερεά και να δημιουργούν συσσωματώματα. Η συσσωμάτωση των ιών σε μεγαλύτερα σωματίδια είναι ο μοναδικός τρόπος για να βρει εφαρμογή ο μηχανισμός της καθίζησης στους ιούς στους υδροβιότοπους ελεύθερης επιφάνειας. Παρόλα αυτά κάτι τέτοιο θα απαιτούσε περισσότερο χρόνο παραμονής στον υδροβιότοπο ελεύθερης επιφάνειας και φαίνεται ότι ο μηχανισμός αυτός δεν έχει ρόλο στην συγκεκριμένη περίπτωση. Εκτός όμως από τα αιωρούμενα στερεά οι ιοί είναι πιθανό να προσκολληθούν και σε κολλοειδή (Donde and Xiao, 2017; Kadlec and Wallace, 2008). Το μικρό μέγεθος των κολλοειδών καθιστά αδύνατη την καθίζηση

τους, ενώ η ικανότητα τους να ανταλλάσσουν ιόντα τα καθιστούν ισχυρά προσροφητικά (Templeton et al., 2008).

Σύμφωνα με τα φυσικοχημικά δεδομένα και τα αποτελέσματα τα οποία παρουσιάζονται στη μελέτη των Fountoulakis et. al η οποία αναφέρεται στον ίδιο υδροβιότοπο και στο ίδιο λύμα, μετά την απομάκρυνση του FWS η είσοδος του HSSF φορτίζεται με περισσότερη οργανική ύλη (Fountoulakis et al., 2017). Οι ιοί είναι πιθανό να ανταγωνίζονται με την οργανική ύλη για την προσρόφηση στις επιφάνειες. Οπότε είναι πιθανό η περισσότερη οργανική ύλη να παίρνει τις θέσεις των ιών στα προσφερόμενα για προσρόφηση σημεία (Pinon and Vialette, 2019). Οι περισσότεροι ιοί έχουν αρνητικό φορτίο, όπως και η οργανική ύλη γι' αυτό και προσκολλώνται στις επιφάνειες όπου συνήθως είναι θετικά φορτισμένες. Ακόμα, η προσκόλληση των ιών στα σωματίδια που βρίσκουν στους FWS τους προσφέρουν φυσική προστασία από αντιυικούς παράγοντες (Pinon and Vialette, 2019).

Παρόλο που φαίνεται ότι η απόδοση του υδροβιότοπου ελεύθερης επιφάνειας δεν συνεισφέρει άμεσα στην μείωση του ιικού φορτίου, φαίνεται ότι υπάρχει κάποιος έμμεσος ρόλος. Η παρουσία του FWS ενδεχομένως να ευνοεί τη δημιουργία συσσωμάτων τα οποία μπορούν και φιλτράρονται ευκολότερα στον υδροβιότοπο υποεπιφανειακής ροής. Επίσης έχει αναφερθεί ότι η προσκόλληση των ιών σε στερεά ευνοεί τη θήρευση τους (Jasper et al., 2013). Ακόμα, έχει αναφερθεί ότι οι εντεροϊοί δημιουργούν πιο εύκολα συσσωματώματα σε σχέση με τους αδενοϊούς (Gerba and Betancourt, 2017). Αυτό θα μπορούσε να κάνει πιο εύκολη την θήρευση τους στον HSSF επηρεάζοντας τις συγκεντρώσεις των EV.

Επίσης η θήρευση έχει αναφερθεί ότι συνδέεται με τις τιμές της θερμοκρασίας. Τα αυτόχθονα βακτήρια (Pinon and Vialette, 2019) και τα πρωτίστα έχουν επίδραση στην μείωση των ιών και η επίδραση αυτή επηρεάζεται από την αύξηση της θερμοκρασίας (Olive et al., 2020). Οι συνθήκες οι οποίες επικρατούν στους τεχνητούς υδροβιοτόπους ευνοούν την συμβίωση πολλών διαφορετικών βακτηρίων και πρωτίστων που ενδεχομένως συμβάλλουν στη μείωσή του ιικού φορτίου. Απαιτείται περισσότερη έρευνα καθώς παραμένει άγνωστη η σύνθεση των αυτόχθονων βακτηρίων εντός των υδροβιοτόπων. Επίσης φαίνεται ότι διαφορετικά είδη βακτηρίων θηρεύουν διαφορετικού τύπου ιών.

Η επαναφορά της απόδοσης του συστήματος 2 μετά από ένα χρονικό διάστημα θα μπορούσε να οφείλεται στον περισσότερο χρόνο λειτουργίας του συστήματος. Αυτό συνεπάγεται την καλύτερη ανάπτυξη των φυτών και του ριζικού συστήματος προσφέροντας μεγαλύτερη διαθέσιμη επιφάνεια για την προσκόλληση των ιών. Επίσης ευνοείται ο μηχανισμός της φίλτρανσης ενώ ο περισσότερος χρόνος λειτουργίας ενός συστήματος CW ευνοεί και τη δημιουργία του βιοφίλμ. Η ανάπτυξη του βιοφίλμ είχε βρεθεί ότι συμβάλλει στην προσκόλληση των σωματιδίων (Wu et al., 2016).

Οι υψηλές συγκεντρώσεις των EVs που προέκυψαν στη συγκεκριμένη μελέτη έχουν επίσης αναφερθεί σε περιβαλλοντικά δείγματα και σε άλλες μελέτες., αν και σύμφωνα με τη βιβλιογραφία οι AdV συνήθως συναντώνται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (Katayama et al., 2008; Kitajima et al., 2014). Μια πιθανή εξήγηση περιλαμβάνει την παρουσία και την παραγωγή αναστολέων των ενζύμων αντιγραφής στα λύματα, τα οποία μπορεί να μην έχουν αφαιρεθεί πλήρως κατά τη διαδικασία εξαγωγής του RNA, οδηγώντας έτσι σε υπερεκτίμηση των συγκεντρώσεων των ιικών σωματιδίων. Αυτό θα μπορούσε να είναι και ένα πλεονέκτημα των AdV έναντι των EV ως πιθανών δεικτών, εφόσον η ανίχνευση των πρώτων δεν απαιτεί το στάδιο της αντίστροφης μεταγραφής, το οποίο είναι ευαίσθητο σε αναστολές (Hamza et al., 2009). Ακόμα μια εξήγηση για την διαφορά στις συγκεντρώσεις είναι αυτή των Rames et al. οι οποίοι αναφέρουν ότι οι EV θα μπορούσαν να ανακτηθούν πιο αποτελεσματικά από ότι οι AdV χρησιμοποιώντας τη μέθοδο φίλτρων. Οι μακριές προεξέχουσες ίνες των AdV έχουν συσχετιστεί με τη φυσική παγίδευση του ιού σε διαφορετικούς τύπους φίλτρων που χρησιμοποιούνται για τη συγκέντρωσή τους, με συνέπεια την αναποτελεσματική έκλουση και ανάκτηση τους. Αντίθετα, οι νοροϊοί και οι εντεροϊοί, που στερούνται των μακρών ινών έχουν ανακτηθεί αποτελεσματικότερα χρησιμοποιώντας τις υπάρχουσες μεθόδους φίλτρου για τη διαδικασία της συγκέντρωσης (Rames et al., 2016).

Παράλληλα, στην παρούσα διατριβή εξετάστηκαν οι MS2 φάγοι ως πιθανοί δείκτες παρουσίας ιών. Παρόλο που δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των συγκεντρώσεων των ιών και των MS2 φάγων, η μεγαλύτερη συγκέντρωση των MS2 από αυτή των AdV θεωρείται αξιοσημείωτη και υποστηρίζει τη χρήση τους ως δείκτες ιικής μόλυνσης. Ωστόσο, παραμένει ασαφές ποιος τύπος βακτηριοφάγων μπορεί να συσχετιστεί με κάποιον από τους τύπους ιών εντερικής προέλευσης, κυρίως επειδή οι διαφορετικές μέθοδοι επεξεργασίας βασίζονται σε διαφορετικούς μηχανισμούς για την απομάκρυνση των φάγων. Για παράδειγμα, οι βακτηριοφάγοι MS2 δεν είναι

κατάλληλοι ως δείκτες για τους AdV στην περίπτωση της επεξεργασίας με κροκίδωση αφού οι MS2 απομακρύνονται γρηγορότερα από τους AdV (Shirasaki et al., 2016). Αντίθετα, οι συμβατικές μέθοδοι επεξεργασίας επιτυγχάνουν χαμηλότερη απομάκρυνση των φάγων MS2, έτσι σε αυτή την περίπτωση θα μπορούσαν να αποτελούν κατάλληλους ικούς δείκτες (Hata et al., 2013). Το ίδιο συμβαίνει και με τους βιοαντιδραστήρες με μεμβράνες (MBR) (Amarasiri et al., 2017).

Εκτός από τη μέθοδο επεξεργασίας, εξίσου σημαντικά είναι ο τύπος των υπό εξέταση υδάτων, (Haramoto et al., 2015) καθώς και οι μέθοδοι ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης που χρησιμοποιούνται. Για παράδειγμα, η Real – Time PCR μπορεί να ανιχνεύσει όλα τα γονιδιώματα ιών, συμπεριλαμβανομένων και των μη ενεργά μολυσματικών και αυτό θα μπορούσε ενδεχομένως να οδηγήσει σε υπερεκτίμηση της συγκέντρωσής τους. Αντίθετα, οι μέθοδοι ανάλυσης με πλάκες αναφέρονται μόνο σε «ζωντανούς» φάγους (Vergara et al., 2015). Οι διαφορετικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται θα μπορούσαν να εξηγήσουν και τη μη στατιστική συσχέτιση μεταξύ των συγκεντρώσεων των ιών και των φάγων (Amarasiri et al., 2017). Στη συγκεκριμένη μελέτη η μόνη στατιστικά σημαντική συσχέτιση ήταν μεταξύ των συγκεντρώσεων των EV με τα *E. coli*. Όμως τα *E. coli* δε θα μπορούσαν να είναι ο ενδεδειγμένος δείκτης για παρουσία EV, αφού οι συγκεντρώσεις των *E. coli* είναι χαμηλότερες στις εκροές των συστημάτων σε σχέση με τις συγκεντρώσεις των EV οι οποίες είναι πολύ υψηλότερες. Εντούτοις, η ανίχνευση των *E.coli* υποδηλώνει έως ένα βαθμό και την παρουσία EV.

Μια σημαντική παράμετρος η οποία έχει εξεταστεί από πολλές μελέτες είναι η εποχικότητα της παρουσίας των ιών και η επίδραση της θερμοκρασίας. Στην συγκεκριμένη μελέτη δε φαίνεται η παρουσία των ιών να επηρεάζεται από τις εποχιακές μεταβολές, καθώς ανιχνεύθηκαν σε όλες τις περιόδους δειγματοληψίας και ανεξάρτητα από τις κλιματικές συνθήκες. Η συχνότερη παρουσία των αδενοϊών καθ' όλη τη διάρκεια του χρόνου τους προσδίδει ακόμα ένα πλεονέκτημα για τη χρήση τους ως δείκτες (Fong et al., 2010; Katayama et al., 2008; Silva et al., 2011).

Συνολικά, οι τεχνητοί υδροβιότοποι του συστήματος παρουσιάστηκαν πιο αποτελεσματικοί, τουλάχιστον στην απομάκρυνση των AdV, συγκρινόμενοι με άλλα συστήματα επεξεργασίας (Πίνακας 8). Για παράδειγμα, μελέτες έχουν αναφέρει ότι η ενεργός ιλύς επιτυγχάνει 1,88 Logs μείωση των AdV, ενώ σύστημα ενεργού ιλύος

ακολουθούμενο από χλωρίωση πέτυχε μείωση 0,9 Logs στην εκροή της ενεργού ιλύος και μείωση 3,0 Logs στην εκροή της χλωρίωσης. Στις ίδιες μελέτες, η ενεργός ιλύς ακολουθούμενη από απολύμανση με υπεριώδη ακτινοβολία πέτυχε μείωση 2,0 Logs, ενώ βιολογικό φίλτρο ακολουθούμενο από μονάδα χλωρίωσης κατάφερε μείωση 1,1 Logs. Από την άλλη μεριά, βιοαντιδραστήρας μεμβράνης με μονάδα απολύμανσης υπεριωδών ακτινών κατάφερε μείωση 5,2 Logs, το οποίο αποτελεί καλύτερη απόδοση από αυτή των CW της συγκεκριμένης μελέτης.

Πίνακας 8. Παρουσία και μείωση ιών στην εκροή διαφορετικών μεθόδων επεξεργασίας.

Ιοί	Επεξεργασία	Συγκέντρωση στην εκροή (Logs viruses L ⁻¹)	Μείωση (Logs)	Βιβλιογραφία
AdV	Ενεργός ιλύς + χλωρίωση	4	0,9	(Kitajima et al., 2014)
	Βιόφιλτρα + χλωρίωση	4	1,1	
EV	Ενεργός ιλύς + χλωρίωση	3	1,5	(Kitajima et al., 2014)
	Βιόφιλτρα + χλωρίωση	3,1	2,1	
AdV	Ενεργός ιλύς	4,4	1,88	(Hata et al., 2013)
EV	Ενεργός ιλύς	2,7	2,29	(Hata et al., 2013)
AdV	Ενεργός ιλύς + χλωρίωση	3,1	3,0	(Simmons and Xagorarakis, 2011)
EV	Ενεργός ιλύς + χλωρίωση	2,9	2,0	(Simmons and Xagorarakis, 2011)
HAdV	Ενεργός ιλύς + UV	3	2	(Simmons and Xagorarakis, 2011)
EV	Ενεργός ιλύς + UV	1	4,1	(Simmons and Xagorarakis, 2011)
HAdV	MBR + UV	3	5,2	(Simmons and Xagorarakis, 2011)
EV	MBR + UV	1	4,9	(Simmons and Xagorarakis, 2011)

Από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι ένα υβριδικό σύστημα υδροβιοτόπων θα μπορούσε να πετύχει αντίστοιχα αποτελέσματα με ένα σύστημα ενεργού ιλύος (Hata et al., 2013). Παρόλη τη μεγάλη μείωση όμως, οι συγκεντρώσεις των ιών στις εξόδους παραμένουν σε υψηλά επίπεδα. Αυτό αποτελεί σημαντικό

κίνδυνο για την δημόσια υγεία καθώς λίγα μόνο ιικά σωματίδια αρκούν για την πρόκληση επιδημιών.

Επίσης είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η ταυτοποίηση των αλληλουχιών (το δένδrogramma παρουσιάζεται στην Εικόνα Π2 του παραρτήματος) έδειξε ότι οι αδενοϊοί που εντοπίστηκαν στην τελική εκροή του συστήματος έχουν μεγαλύτερη ομοιότητα με τους τύπους 40 και 41, οι οποίοι αποτελούν τους πλέον επικίνδυνους τύπους αδενοϊών και συνδέονται με την ιογενή γαστρεντερίτιδα. Το αποτέλεσμα αυτό είναι σε συμφωνία με μελέτες οι οποίες αναφέρουν ότι οι τύποι 40 και 41 και γενικότερα ο τύπος F των αδενοϊών κυριαρχεί μεταξύ των αδενοϊών στις εκροές των συστημάτων επεξεργασίας (Fong et al., 2010; Osuolale and Okoh, 2015). Η μελέτη των Haraot et al. αναφέρει ότι οι τύποι 40 και 41 εντοπίστηκαν σε μεγάλο ποσοστό (61,4%) και σε συγκέντρωση 10^5 gene copies L^{-1} σε δείγματα τα οποία συλλέχθηκαν από ύδατα ποταμού (Haramoto et al., 2010). Οι τύποι 40 και 41 εντοπίζονται και σε θαλασσινό νερό και παρουσιάζονται σταθερότεροι σε σχέση με τους ιούς polio 1 και τον ιό της ηπατίτιδας (HAV). Το γεγονός αυτό σημειώνει και την μεγαλύτερη ανθεκτικότητας τους στις περιβαλλοντικές πιέσεις για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (Enriquez et al., 1995; Fong et al., 2010). Αντίθετα, μελέτη σε διαφορετικά περιοχή αναφέρει ότι κυρίαρχο είδος μεταξύ των αδενοϊών είναι το είδος B, το οποίο εντοπίζεται σε ποσοστό 86% ενώ το είδος F μόλις σε 6,7% επί των θετικών δειγμάτων (Adefisoye et al., 2016). Η παρουσία συγκεκριμένων τύπων τόσο αδενοϊών όσο και εντεροϊών σε νερά που επαναχρησιμοποιούνται για άρδευση, στο πόσιμο νερό αλλά και στα όστρακα αντικατοπτρίζουν την ανακυκλοφορία των ιών στον πληθυσμό (Amdioune et al., 2012). Οι συχνοί ανασυνδυασμοί και μεταλλάξεις στους εντεροϊούς έχουν αναγνωριστεί ως οι κύριοι μηχανισμοί για τον παρατηρούμενο υψηλό ρυθμό εξέλιξης, επιτρέποντάς τους έτσι να ανταποκρίνονται γρήγορα και να προσαρμόζονται σε νέες περιβαλλοντικές προκλήσεις (Gerba et al., 2017).

Σε αυτή την ενότητα παρουσιάστηκε ένας διαφορετικός τρόπος στατιστικής επεξεργασίας των αποτελεσμάτων, ο οποίος μπορεί να αντιμετωπίσει τις δυσκολίες που ενδέχεται να παρουσιαστούν. Το πρόβλημα των ελλιπών δεδομένων σημειώνεται και σε άλλες μελέτες και θα μπορούσε να οδηγήσει σε λανθασμένα συμπεράσματα σχετικά με την απόδοση ενός συστήματος. Τα δεδομένα που δίνουν τιμές με μεγάλες διαφοροποιήσεις συνήθως θεωρούνται outliers και αφαιρούνται από την επεξεργασία. Αυτά θα μπορούσαν να οφείλονται σε σφάλματα δειγματοληψίας και ανάλυσης, καθώς

και σε εξάψεις των ιών στο πληθυσμό, οπότε η αφαίρεσή τους πιθανώς να οδηγήσει σε εσφαλμένα συμπεράσματα. Δεδομένα τα οποία προκύπτουν ειδικά από τέτοιου τύπου συστήματα πιλοτικής κλίμακας, τα οποία μπορεί να περιλαμβάνουν αρκετούς αστάθμητους παράγοντες όπως πιθανές βλάβες ή παράγοντες όπως η εξατμισοδιαπνοή ίσως και να μην είναι σωστή η αντιμετώπιση τους με χρήση μέσων όρων. Η χρήση της μπεϋζιανής στατιστικής και η δημιουργία ενός μοντέλου, το οποίο θα «εκπαιδευτεί» με αρκετά δεδομένα θα μπορούσε να προσφέρει ακόμα και εκτιμήσεις για την συγκέντρωση των ιών στην εκροή ενός συστήματος που δέχεται λύματα ενός συγκεκριμένου πληθυσμού, βάσει της συγκέντρωσης στην εισροή.

3.9 Αποτελέσματα – Έλεγχος ανθεκτικότητας των απομονωμένων βακτηριακών δεικτών σε αντιβιοτικά και έλεγχος ARGs

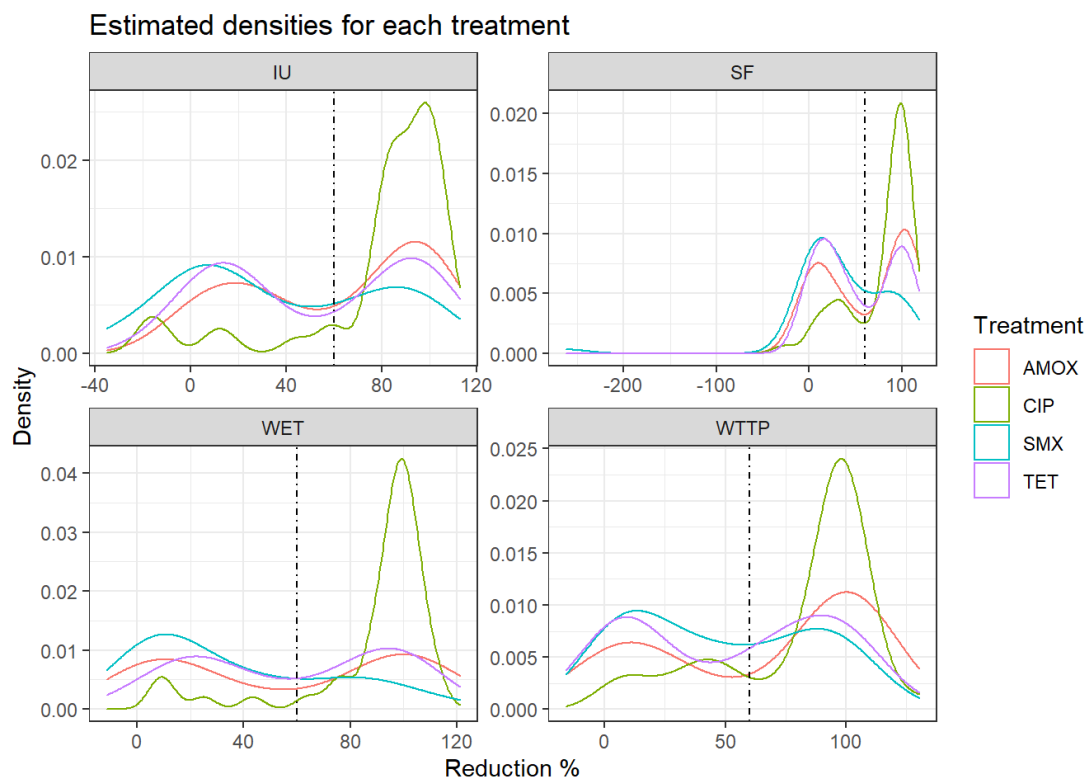
3.9.1 Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση αντιβιοτικών (Minimum Inhibitory Concentration – MIC)

Η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση επιλεγμένων αντιβιοτικών μετρήθηκε για τα απομονωμένα βακτήρια στα διαφορετικά σημεία δειγματοληψίας, με σκοπό να εξεταστούν οι πιθανές αλλαγές στο προφίλ ανθεκτικότητας των βακτηρίων μετά την κάθε επεξεργασία. Αν και είναι αδύνατον να εξεταστούν τα ίδια στελέχη στην είσοδο και την έξοδο, γίνεται μια προσπάθεια να σκιαγραφηθεί η γενική τάση χρησιμοποιώντας διαγράμματα πυκνοτήτων και μέσες τιμές. Στη συγκεκριμένη διατριβή ως ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση ορίστηκε η συγκέντρωση του αντιβιοτικού στην οποία επιτυγχάνεται 60% μείωση του βακτηριακού πληθυσμού (MIC_{60}).

Αρχικά δημιουργήθηκαν τα διαγράμματα πυκνοτήτων (density plots) που προέκυψαν από τη μείωση του εξεταζόμενου πληθυσμού μετά την έκθεση του στο κάθε αντιβιοτικό και ανά μέθοδο επεξεργασίας, ώστε να παρουσιαστεί μια γενικότερη εικόνα για την συμπεριφορά των μεταβλητών και να γίνει μια πρώτη σύγκριση μεταξύ των εξεταζόμενων αντιβιοτικών ανά επεξεργασία. Ένα διάγραμμα πυκνότητας είναι μια εκτίμηση της πυκνότητας πιθανότητας μιας αριθμητικής μεταβλητής, αποτελεί μια ομαλή εκδοχή του ιστογράμματος και δημιουργείται από τις συναρτήσεις πυρήνα (Kernel functions). Σε ένα διάγραμμα πυκνοτήτων ο άξονας y δείχνει την πιθανότητα της συνάρτησης πυκνότητας και όχι άμεσα την τιμή της πιθανότητας. Έτσι τα

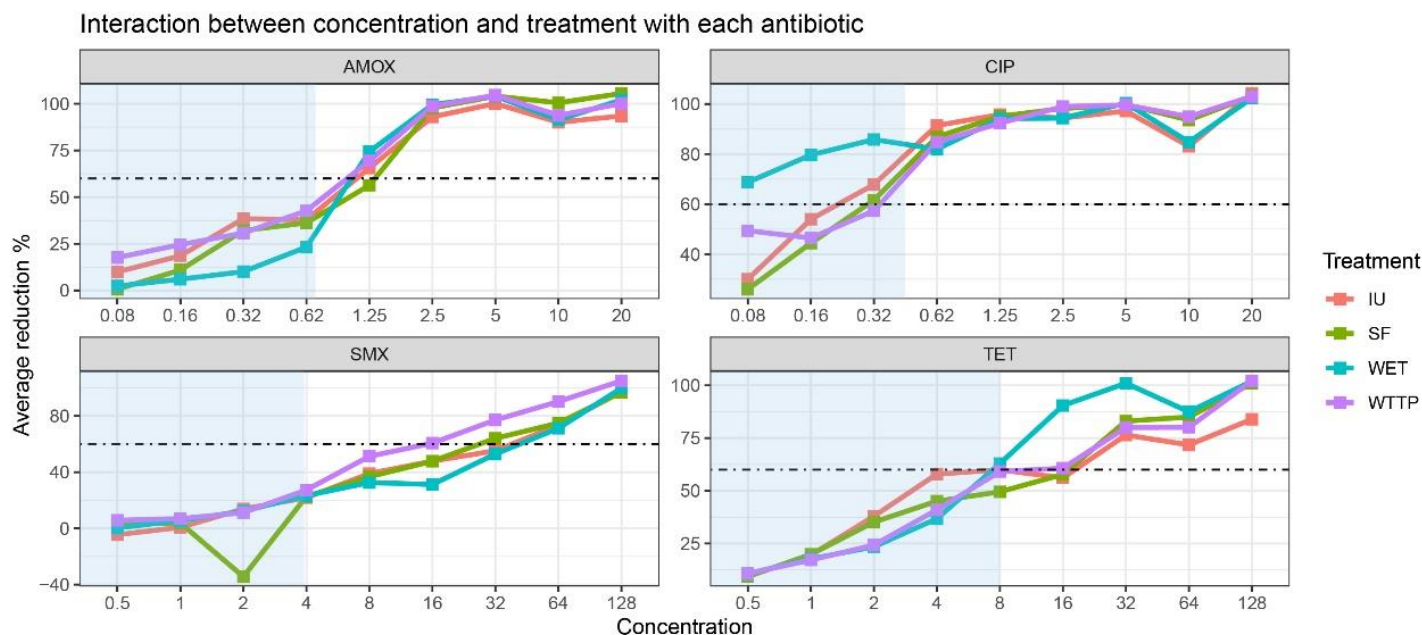
διαγράμματα αυτά χρησιμοποιούνται για τη σχετική σύγκριση μεταξύ των διαφορετικών μεταβλητών. Εκτός από την γενική εικόνα στη συγκεκριμένη περίπτωση το ενδιαφέρον εστιάζεται στο σημείο όπου οι καμπύλες τέμνουν τη διακεκομμένη γραμμή η οποία σηματοδοτεί τη μείωση του πληθυσμού κατά 60%. Τα διαγράμματα πυκνοτήτων δημιουργήθηκαν με χρήση της γλώσσας R.

Αρχικά αυτό που παρατηρείται είναι ότι οι καμπύλες κατανομών παρουσιάζουν παρόμοια μορφή για κάθε αντιβιοτικό σε κάθε μέθοδο επεξεργασίας με εξαίρεση το αντιβιοτικό CIP.



Γράφημα 32. Density plots της μείωσης % του πληθυσμού *E. coli* μετά την έκθεση σε αντιβιοτικά ανά μονάδα επεξεργασίας. Η διακεκομμένη γραμμή δείχνει το σημείο που η μείωση του πληθυσμού είναι 60%.

Όμως, συγκρίνοντας τις μεθόδους επεξεργασίας παρατηρείται διαφοροποίηση στις καμπύλες. Παρατηρώντας τις τιμές των πυκνοτήτων και το σημείο που τέμνει η διακεκομμένη γραμμή τις καμπύλες φαίνεται ότι για τον υδροβιότοπο (WET) και τη μονάδα αδρανοποίηση οι καμπύλες αντιστοιχούν σε υψηλότερες τιμές εκτίμησης πυκνότητας.

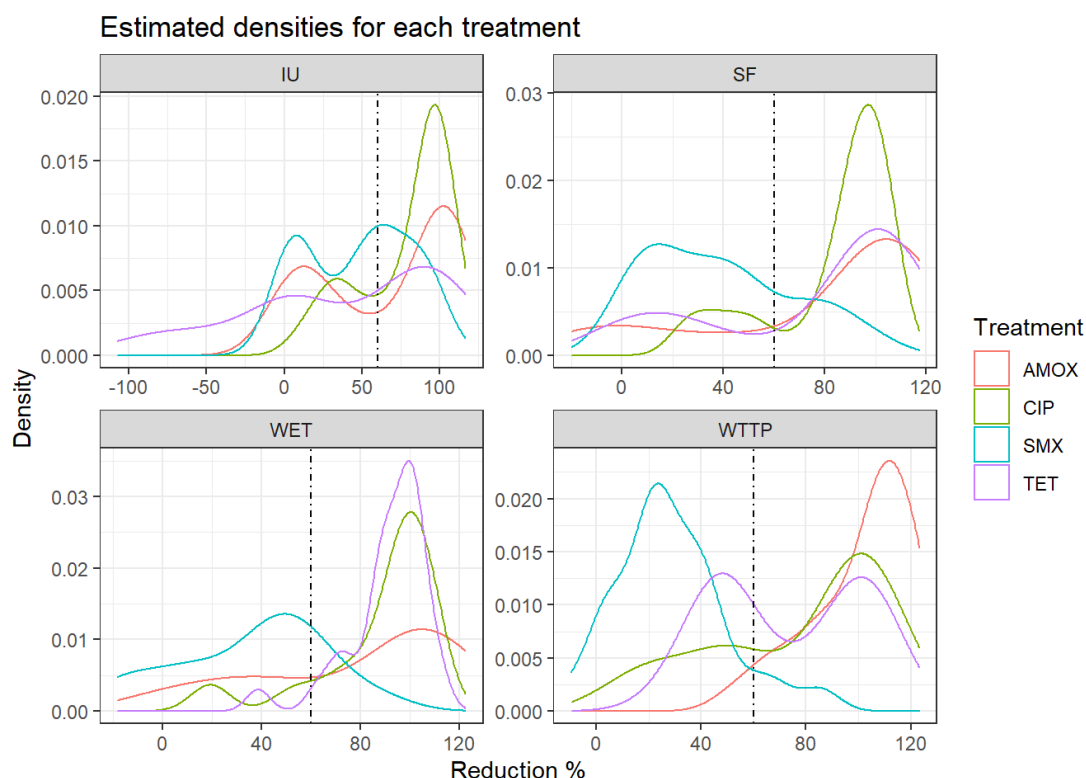


Γράφημα 33. Μέσες τιμές της μείωσης % του πληθυσμού των στελεχών *E.coli* από τις εκροές των μονάδων επεξεργασίας για κάθε συγκέντρωση αντιβιοτικού. Η διακεκομμένη γραμμή δείχνει το σημείο μείωσης 60% του βακτηριακού πληθυσμού και η γαλάζια σκιαγραφημένη περιοχή τις τιμές όπου η συγκέντρωση χαρακτηρίζει το βακτήριο ως ευαίσθητο.

Στο Γράφημα 33 παρουσιάζεται η μέση μείωση του πληθυσμού για κάθε συγκέντρωση αντιβιοτικού ανά αντιβιοτικό και ανά μονάδα επεξεργασίας. Με διακεκομμένη γραμμή σημειώνεται το 60% της μείωσης του πληθυσμού, δηλαδή την τιμή MIC₆₀, και με γαλάζιο χρώμα σημειώνονται οι συγκεντρώσεις, για τις οποίες το βακτήριο θεωρείται ευαίσθητο στο αντιβιοτικό. Όπως φαίνεται οι μέθοδοι επεξεργασίας παρουσιάζουν την ίδια συμπεριφορά με μόνη διαφοροποίηση στην περίπτωση του αντιβιοτικού CIP όπου ο υδροβιότοπος (WET) δείχνει καλύτερο αποτέλεσμα σε σχέση με τις άλλες επεξεργασίες, καθώς η αντίστοιχη καμπύλη βρίσκεται πάνω από τη διακεκομμένη γραμμή και εντός των ορίων ευαισθησίας νωρίτερα από τις υπόλοιπες. Το αποτέλεσμα αυτό ίσως δείχνει και μια συμβολή του υδροβιότοπου στην αντιμετώπιση των ανθεκτικών βακτηρίων.

Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι τα στελέχη του *E. coli* παρουσιάζονται ανθεκτικά με βάση την τιμή MIC₆₀, στα αντιβιοτικά AMOX και SMX, οριακά ευαίσθητα στο CIP (εκτός του WET), ενώ οι τιμές είναι οριακές και για το αντιβιοτικό TET, εκτός από την επεξεργασία με το αμμόφιλτρο (SF) που δείχνει τιμές εκτός των ορίων ανθεκτικότητας, σημειώνοντας ίσως την συμβολή της επεξεργασίας στην ανάπτυξη της ανθεκτικότητας.

Στο Γράφημα 34 παρουσιάζεται το αντίστοιχο διάγραμμα εκτίμησης πυκνοτήτων για τους εντερόκοκκους. Εδώ παρατηρείται ότι οι καμπύλες για το κάθε αντιβιοτικό δεν παρουσιάζουν τη ίδια ομοιομορφία όπως προηγουμένως για το *E.coli*, ενώ και σε αυτή την περίπτωση οι καμπύλες κατανομών δείχνουν διαφοροποίηση μεταξύ των μονάδων επεξεργασίας.

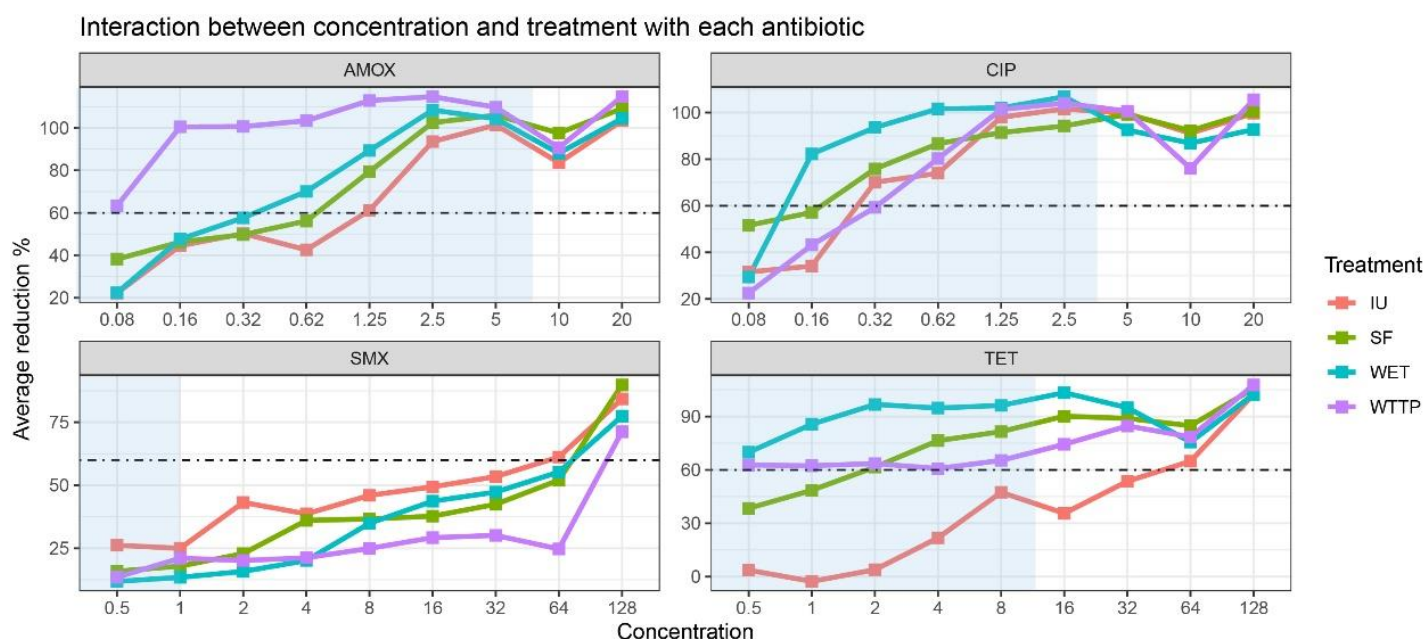


Γράφημα 34. Density plots της μείωσης % του πληθυσμού των στελεχών enterococci μετά την έκθεση σε αντιβιοτικά ανά μονάδα επεξεργασίας. Η διακεκομμένη γραμμή δείχνει το σημείο που η μείωση του πληθυσμού είναι 60%.

Η καμπύλη για το αντιβιοτικό SMX δείχνει υψηλότερη εκτίμηση πυκνότητας για τις επεξεργασίες IU, SF και WET, ενώ για το WTTP την υψηλότερη τιμή την δίνει το αντιβιοτικό TET.

Όπως φαίνεται από το Γράφημα 35 το οποίο παρουσιάζει τις μέσες τιμές της μείωσης των πληθυσμών ανά τιμή συγκέντρωσης, παρουσιάζεται διαφοροποίηση μεταξύ των καμπυλών των επεξεργασιών για κάθε περίπτωση αντιβιοτικού, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις παρουσιάζεται και διαφοροποίηση των καμπυλών των επεξεργασιών για το ίδιο αντιβιοτικό. Συγκεκριμένα, η καμπύλη της μονάδας WTTP παρουσιάζει μεγαλύτερα ποσοστά απομάκρυνσης του πληθυσμού για το αντιβιοτικό AMOX και είναι εξαρχής πάνω από τη διακεκομμένη γραμμή που συνεπάγεται ότι τα

απομονωμένα στελέχη είναι είδη ανθεκτικά κατά την είσοδο τους στις μονάδες επεξεργασίας. Στο γράφημα για το αντιβιοτικό CIP η καμπύλη για την επεξεργασία WET φτάνει σε υψηλότερα ποσοστά απομάκρυνσης του πληθυσμού σε μικρότερη συγκέντρωση αντιβιοτικού, ενώ για το αντιβιοτικό TET η τα στελέχη το οποία προήλθαν από την επεξεργασία με το WET δείχνουν εξ αρχής μείωση του πληθυσμού πάνω από 60%. Οι δύο τελευταίες περιπτώσεις δείχνουν ίσως μια συμβολή του υδροβιότοπου ως προς την αντιμετώπιση ανθεκτικών βακτηρίων τουλάχιστον για τα αντιβιοτικά CIP και TET. Στο γράφημα για το αντιβιοτικό TET η καμπύλη της επεξεργασίας IU δεν τέμνει τη διακεκομμένη γραμμή εντός της σκιαγραφημένης μπλε περιοχής, δηλαδή εντός των ορίων ανθεκτικότητας σε αντίθεση με τις άλλες καμπύλες και αυτό ενδεχομένως να δείχνει και μια συμβολή της επεξεργασίας στην ενίσχυση της ανθεκτικότητας των βακτηρίων. Τέλος, στο γράφημα για το αντιβιοτικό SMX, καμία από τις καμπύλες δεν τέμνει τη διακεκομμένη γραμμή εντός της μπλε ζώνες που δείχνει την ευαισθησία του πληθυσμού στο αντιβιοτικό δείχνοντας ότι οι επεξεργασίες δεν επηρεάζουν την είδη ισχυρή ανθεκτικότητα.



Γράφημα 35. Μέσες τιμές της μείωσης % του πληθυσμού των στελεχών εντερόκοκκων από την εκροές των μονάδων επεξεργασίας για κάθε συγκέντρωση αντιβιοτικού. Η διακεκομμένη γραμμή δείχνει το σημείο μείωσης 60% και η γαλάζια περιοχή τις τιμές όπου η συγκέντρωση χαρακτηρίζει το βακτήριο ως ευαίσθητο.

Στον Πίνακα 9 παρουσιάζονται οι μέσες τιμές MIC₆₀ για τα δύο βακτήρια μετά την έκθεσή τους στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά. Όπως φαίνεται από τις τιμές υπάρχουν

διαφορετικές συμπεριφορές μεταξύ των δύο διαφορετικών τύπων βακτηρίων. Τα βακτήρια τα οποία απομονώθηκαν από την είσοδο του συστήματος παρουσιάζουν ήδη ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά SMX και TET. Οι μέσες τιμές για την MIC₆₀ έδειξαν ανθεκτικότητας και των δύο βακτηρίων στην SMX σε όλα τα σημεία δειγματοληψίας.

Τα στελέχη των βακτηρίων που απομονώθηκαν από την έξοδο του HSSF είχαν τιμή MIC₆₀ που τα χαρακτηρίζει ως ευαίσθητα στα υπόλοιπα αντιβιοτικά που εξετάστηκαν. Πιο συγκεκριμένα, η τιμή της MIC₆₀ για τα απομονωμένα στελέχη *E. coli* μειώθηκε στην περίπτωση της CIP και παρέμεινε στα ίδια επίπεδα για την AMOX. Για τους εντερόκοκκους καταγράφηκε η ίδια τάση με τη διαφορά ότι η τιμή για την AMOX αυξήθηκε παραμένοντας όμως στα όρια του ευαίσθητου. Για την TET το προφίλ ανθεκτικότητας των βακτηρίων άλλαξε από ανθεκτικό σε ευαίσθητο και για τους δύο τύπους βακτηρίων. Μελετώντας μεμονωμένα τα στελέχη, τα *E. coli* που απομονώθηκαν από την εκροή του HSSF έδειξαν όλα ανθεκτικότητα στην SMX, το 40% από αυτά εμφανίστηκαν ανθεκτικά στη CIP και το 50% στην TET, ενώ όλα τα δείγματα έδειξαν ευαισθησία στην AMOX. Τέλος, τα απομονωμένα στελέχη από την έξοδο του SF έδειξαν αύξηση στη τιμή MIC₆₀ σε όλα τα αντιβιοτικά αλλά μόνο για την TET ο χαρακτηρισμός άλλαξε από ευαίσθητο σε ανθεκτικό.

Πίνακας 9. Μέσες τιμές για την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση MIC₆₀ ανά βακτήριο και αντιβιοτικό στα σημεία δειγματοληψίας: PW: πρωτοβάθμιο λύμα, HSSF: εκροή υδροβιότοπου υποεπιφανειακής ροής, SF: αμμόφιλτρο. S: ευαίσθητο στο αντιβιοτικό, R: ανθεκτικό στο αντιβιοτικό.

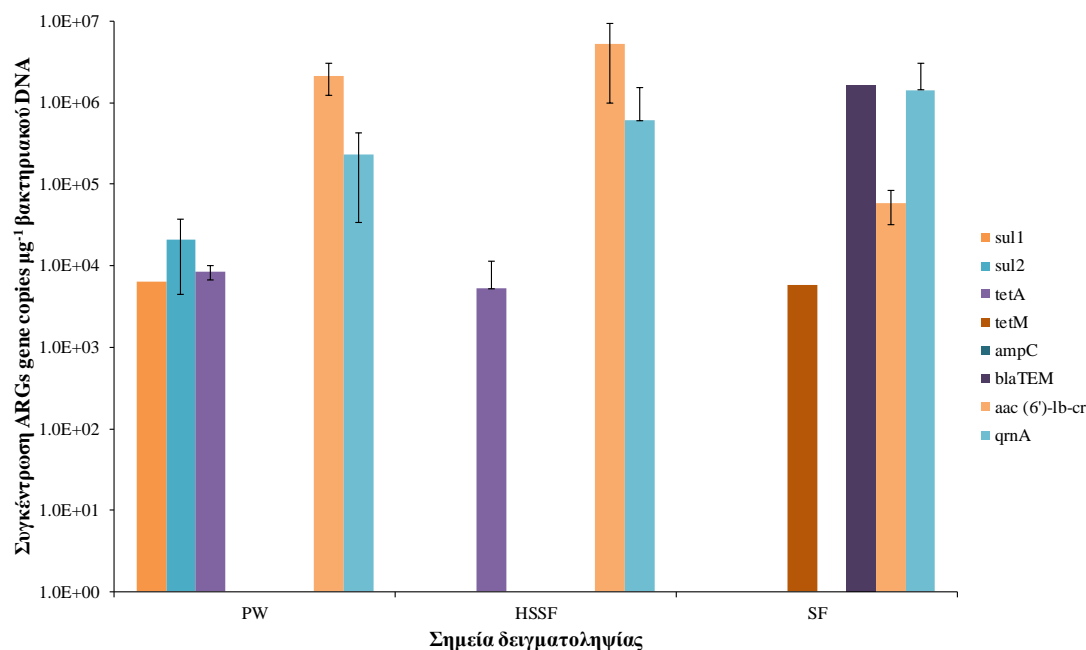
Βακτήρια	Αντιβιοτικά	PW (mg mL ⁻¹)	HSSF (mg mL ⁻¹)	SF (mg mL ⁻¹)
<i>E. coli</i>	SMX	16 ^R	32 ^R	32 ^R
	CIP	0.32 ^S	0.07 ^S	0.32 ^S
	AMOX	0.62 ^S	0.62 ^S	1.25 ^S
	TET	16 ^R	8 ^S	16 ^R
Enterococci	SMX	64 ^R	64 ^R	64 ^R
	CIP	0.32 ^S	0.08 ^S	0.16 ^S
	AMOX	0.08 ^S	0.32 ^S	1.25 ^S
	TET	8 ^S	-	64 ^R

3.9.2 Γονίδια ανθεκτικότητας στα απομονωμένα στελέχη βακτηρίων

Στα ίδια στελέχη για το οποία ερευνήθηκε η ανθεκτικότητά τους στα επιλεγμένα αντιβιοτικά, πραγματοποιήθηκε και ποσοτικοποίηση των γονιδίων ανθεκτικότητας τα οποία προσφέρουν ανθεκτικότητα σε αυτά τα αντιβιοτικά. Δηλαδή ποσοτικοποιήθηκαν τα *sul1* και *sul2* που αντιστοιχούν στο *sulfomethoxazole*, τα *tetA* και *tetM* όπου αντιστοιχούν στο *tetracycline*, τα *ampC* και *bla_{TEM}* που αντιστοιχούν στα β – lactams και τα *aac(6')-Ib-cr* και *qnrA*, τα οποία αντιστοιχούν στο *ciprofloxacin*.

Τα αποτελέσματα από την Real – Time PCR έδειξαν ότι υπάρχουν διαφορές στην παρουσία και στην ποσότητα των 8 εξεταζόμενων γονιδίων ανθεκτικότητας ανάμεσα στα δύο διαφορετικά είδη βακτηρίων. Η μέση συγκέντρωση του βακτηριακού DNA των *E. coli* και εντερόκοκκων παρουσιάζονται στα Γραφήματα 36 και 37 αντίστοιχα.

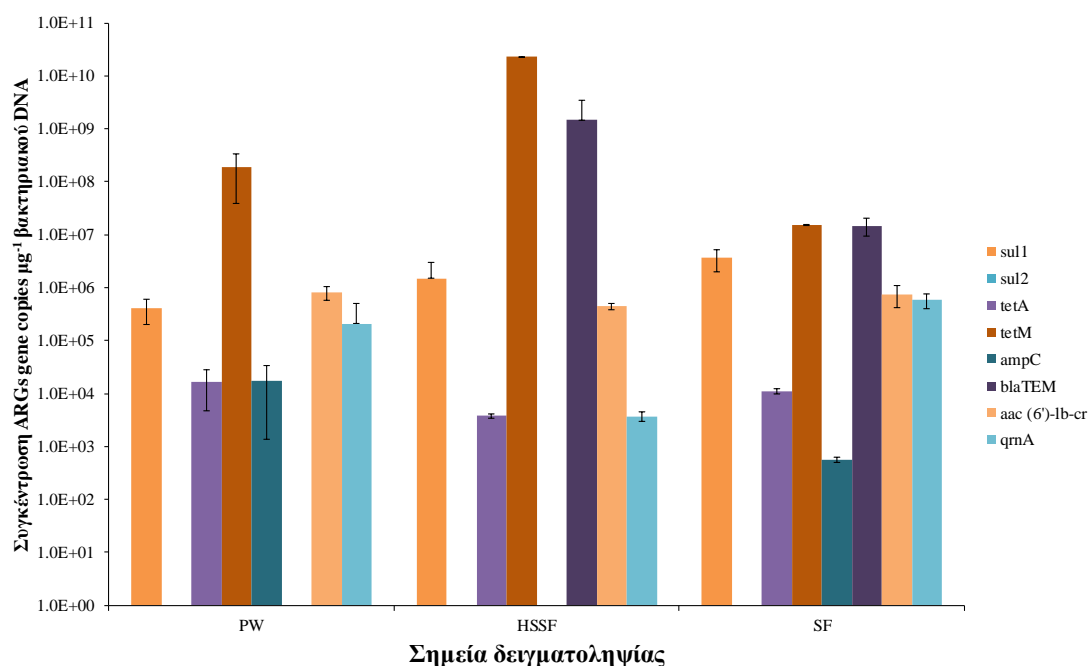
Πέντε από τα γονίδια ανθεκτικότητας, τα *sul1*, *sul2*, *aac(6')-Ib-cr*, *qnrA* και *tetA* εντοπίστηκαν στα στελέχη *E. coli* που απομονώθηκαν από την είσοδο του συστήματος (WWTP), ενώ μόνο τρία από αυτά, τα *tetA*, *aac(6')-Ib-cr* και *qnrA*, εντοπίστηκαν στα στελέχη από απομονώθηκαν από την έξοδο του υδροβιοτόπου (HSSF). Στην έξοδο του αμμόφιλτρου (SF) εντοπίστηκαν τέσσερα από τα γονίδια ανθεκτικότητας τα *aac(6')-Ib-cr*, *qnrA*, *bla_{TEM}* και *tetM*. Η ποσοτικοποίηση των γονιδίων έδειξε ότι τα γονίδια που προσδίδουν ανθεκτικότητα στις φλουοροκινολόνες (*aac(6')-Ib-cr* και *qnrA*) ήταν στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ακολουθούμενα από το γονίδιο *sul2* που προσδίδει ανθεκτικότητα στις σουλφοναμίδες.



Γράφημα 36. Συγκεντρώσεις γονιδίων ανθεκτικότητας από τα απομονωμένα στελέχη *E. coli*.

Μετά την επεξεργασία από τον HSSF παρατηρήθηκε μικρή αύξηση της τάξης των 0,4 Logs στις συγκεντρώσεις των γονιδίων aac (6) -Ib-cr και qnrA. Αντίθετα, το γονίδιο tetA παραμένει σχεδόν στις ίδιες συγκεντρώσεις. Η ποσοτικοποίηση των γονιδίων από τα στελέχη από την εκροή του SF έδειξε αύξηση 0,4 Logs για το γονίδιο qnrA και μείωση 2 Logs για το aac(6)-Ib-cr ενώ το bla_{TEM} ποσοτικοποιήθηκε στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, στα 6,2 Logs gc μg⁻¹.

Αναλύοντας τα αποτελέσματα από τα απομονωμένα στελέχη των εντεροκόκκων (Γράφημα 37), παρατηρήθηκε ότι τα εξεταζόμενα ARGs ήταν σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις και πιο συχνά ανιχνεύσιμα από ότι στα στελέχη *E. coli*. 6 από τα 8 ARGs ανιχνεύτηκαν στην εισροή του συστήματος (PW) και στην εκροή του HSSF ενώ στο SF 7 από τα 8. Συγκεκριμένα, το γονίδιο sul1 ανιχνεύθηκε σε στελέχη από όλα τα σημεία δειγματοληψίας σε αντίθεση με το sul2 που δεν ανιχνεύθηκε καθόλου. Τα γονίδια τα οποία προσδίδουν ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη, tetA και tetM, ανιχνεύθηκαν σε όλα τα σημεία δειγματοληψίας και το ίδιο παρατηρήθηκε για τα γονίδια aac(6)-Ib-cr και qnrA που προσδίδουν ανθεκτικότητα φλουοροκινολόνες. Από τα γονίδια που αναφέρονται στις β-λακτάμες, το ampC εμφανίστηκε στα στελέχη από το PW και το SF, ενώ το bla_{TEM} ανιχνεύτηκε σε δείγματα που απομονώθηκαν από τις εκροές του HSSF και του SF.



Γράφημα 37. Συγκεντρώσεις γονιδίων ανθεκτικότητας από τα απομονωμένα στελέχη εντερόκοκκων.

Αναφερόμενοι στις συγκεντρώσεις, το tetM εμφανίστηκε ως το πιο άφθονο στα στελέχη από όλα τα σημεία δειγματοληψίας, το sul1 το δεύτερο σε συγκέντρωση στο PW ενώ το bla_{TEM} στο HSSF και στο SF. Εστιάζοντας στις ποσότητες μετά την επεξεργασία με το HSSF, τα sul1 και tetM παρουσιάζουν αύξηση της τάξης των 0,5 και 2 Logs αντίστοιχα, το tetA μείωση 0,6 Logs, το aac (6')-Ib-cr μείωση 0,3 ενώ το qnrA τη μεγαλύτερη μείωση 1,7 Logs.

Για το SF, παρατηρήθηκε μικρή αύξηση της συγκέντρωσης του qnrA και μείωση 2 Logs για το γονίδιο aac(6)-Ib-cr στα δείγματα *E. coli*. Στα δείγματα από τους εντερόκοκκους για τα tetA και aac(6)-Ib-cr παρατηρήθηκε μικρή αύξηση ενώ το qnrA αυξήθηκε κατά 2,5 Logs. Αντιθέτως, τα γονίδια tetM και bla_{TEM} παρουσίασαν μείωση 3 και 2 Logs αντίστοιχα.

3.10 Ανάλυση πολλαπλής παλινδρόμησης

Σε αυτήν την ενότητα παρουσιάζεται μια προσπάθεια ανάλυσης των δεδομένων με χρήση της παλινδρόμησης. Χρησιμοποιώντας την παλινδρόμηση αναμένεται να φανεί ποιες μέθοδοι επεξεργασίας δίνουν καλύτερο αποτέλεσμα ως προς την αντιμετώπιση των εξεταζόμενων στελεχών βακτηρίων μετά από έκθεση στο κάθε αντιβιοτικό. Επίσης, μπορεί να εκτιμηθεί κατά πόσο επηρεάζει η παρουσία γονιδίων στην απομάκρυνση των βακτηρίων με τη χρήση αντιβιοτικού.

Για τις ανάγκες της ανάλυσης χρησιμοποιήθηκε η γραμμική πολλαπλή παλινδρόμηση (Multiple Linear Regression) κατά την οποία μελετάται η απόκριση μίας εξαρτημένης μεταβλητής ως γραμμικό αποτέλεσμα της δράσης πολλών ανεξάρτητων μεταβλητών και έχει την παρακάτω μορφή:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_{i1} + \beta_2 X_{i2} + \dots + \beta_p X_{ip} + \varepsilon \quad (10)$$

Όπου Y_i η εξαρτημένη μεταβλητή, X_i η ανεξάρτητες μεταβλητές, β οι μερικοί συντελεστές παλινδρόμησης και ε ο όρος σφάλματος. Στη συγκεκριμένη περίπτωση Y είναι η μείωση του εξεταζόμενου βακτηριακού πληθυσμού, και β οι παράμετροι όπως η μέθοδος επεξεργασίας, η συγκέντρωση του αντιβιοτικού και η παρουσία ή όχι των γονιδίων.

Αρχικά δημιουργείται ο πίνακας των συντελεστών παλινδρόμησης (coefficient) και αφαιρούνται οι τιμές οι οποίες δεν είναι στατιστικά σημαντικές έτσι ώστε να γίνει βελτίωση του μοντέλου. Τελικά, σε κάθε περίπτωση αντιβιοτικού χρησιμοποιήθηκαν μόνο οι μεταβλητές που ήταν στατιστικά σημαντικές ($p\text{-value} < 0.05$). Για τις ανάγκες βελτίωσης του μοντέλου λογαριθμίστηκαν οι συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών. Επιπλέον, αφαιρέθηκε και η μεταβλητή intercept αφού δεν ήταν στατιστικά σημαντική και η αφαίρεση της έδειξε ότι βελτιώνει περισσότερο το μοντέλο. Αφού έγινε ο έλεγχος για την κανονικότητα του κάθε μοντέλου με την βοήθεια των QQ-plots στη συνέχεια δημιουργήθηκαν οι τιμές πρόβλεψης. Η ανάλυση της πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της γλώσσας R και τμήμα του κώδικα φαίνεται στο κώδικα 3 του παραρτήματος.

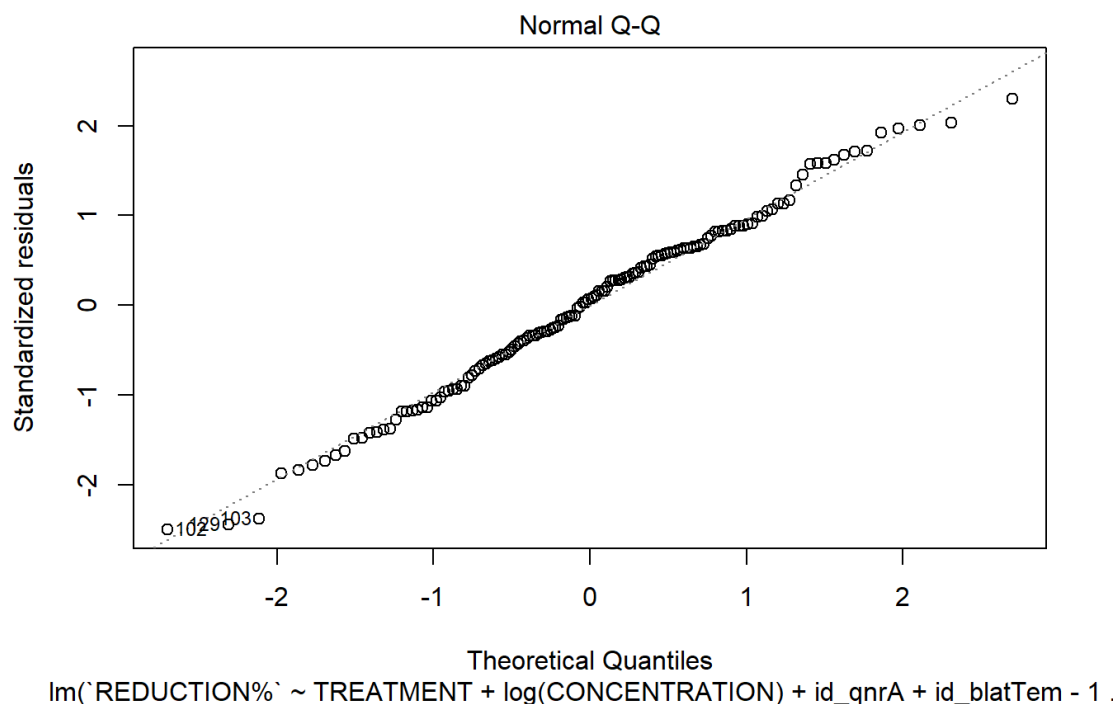
3.10.1 Αποτελέσματα

3.10.1.1 Ανάλυση παλινδρόμησης - Στελέχη *E.coli*

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα τα οποία προκύπτουν από το μοντέλο της γραμμικής πολλαπλής παλινδρόμησης. Η χρήση του μοντέλου μπορεί να δώσει λύση σε ένα πολύπλοκο ερώτημα, το οποίο είναι αν οι μέθοδοι επεξεργασίας επηρεάζουν την ανθεκτικότητα των βακτηρίων σε κάποιο αντιβιοτικό και το πώς τα ARGs που εντοπίζονται στα βακτήρια επηρεάζουν το αποτέλεσμα της επεξεργασίας.

Για κάθε περίπτωση πρώτα παρουσιάζονται τα QQ – plots, τα οποία δείχνουν το κατά πόσο τα δεδομένα ακολουθούν κανονική κατανομή. Το QQ - plot δίνει πληροφορίες σχετικά με το πόσο καλή είναι η προσαρμογή του μοντέλου. Όσο πιο κοντά είναι τα σημεία στη γραμμή τόσο καλύτερη προσαρμογή δείχνει το μοντέλο. Στη συνέχεια οι πίνακες συσχετίσεων δείχνουν τις συσχετίσεις μεταξύ των παραμέτρων και παρουσιάζεται ξεχωριστά η επίδραση της κάθε παραμέτρου στο μοντέλο. Η τιμή Estimate δείχνει την διαφορά επί τις εκατό από τη μέση μείωση του πληθυσμού για κάθε παράμετρο. Οι τιμές id_gene δείχνουν τη διαφορά επί τις εκατό από τη μέση τιμή του πληθυσμού όταν υπάρχει παρουσία κάποιου γονιδίου. Μια παράμετρος δείχνει επίδραση και συμπεριλαμβάνεται στο μοντέλο όταν η σημαντικότητα έχει $p - value < 0.05$. Στη συνέχεια στα γραφήματα παρουσιάζονται οι τιμές πρόβλεψης οι οποίες προκύπτουν από το μοντέλο και η γραμμή πρόβλεψης η οποία δείχνει τη μέση τιμή των προβλέψεων και κατά συνέπεια ποια επεξεργασία αποδίδει καλύτερα με τις δεδομένες συνθήκες.

Στο γράφημα 38 παρουσιάζεται το διάγραμμα QQ - plot για την προσαρμογή του μοντέλου για το αντιβιοτικό sulfomethoxazole καθώς και οι παράμετροι που συμμετείχαν στο συγκεκριμένο μοντέλο.



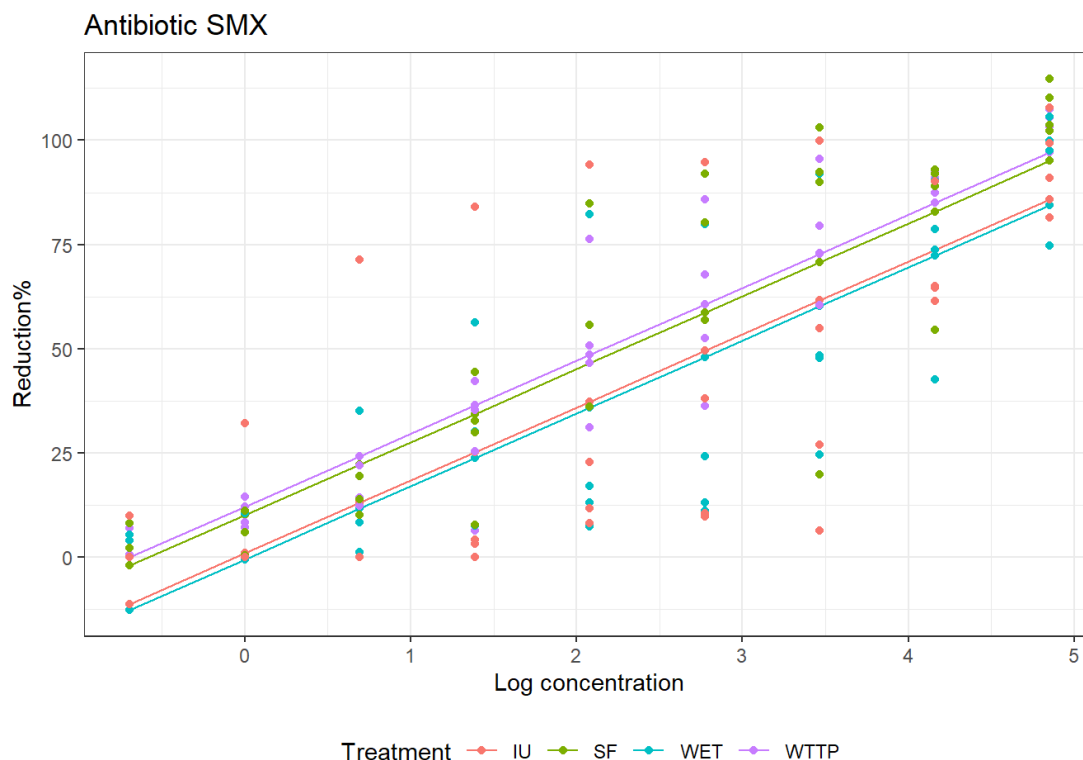
Γράφημα 38. QQ-plot και παράμετροι για την προσαρμογή του μοντέλου SMX.

Στον Πίνακα 10 φαίνονται οι παράμετροι οι οποίες συμμετείχαν στο μοντέλο για το SMX. Όπως φαίνεται από τον πίνακα, η μονάδα IU παρουσιάζει 19,9% μεγαλύτερη μείωση στο πληθυσμού από την μέση μείωση, το SF 9%, το WTTP 31,1% ενώ ο υδροβιότοπος έδειξε σχεδόν μηδενική συμβολή. Η παρουσία του γονιδίου qnrA έδειξε ότι σχετίζεται με μείωση κατά 25,6% ενώ η παρουσία του γονιδίου bla_{TEM} δείχνει αύξηση κατά 29,6% σε σχέση με τη μέση μείωση.

Πίνακας 10. Συσχετίσεις παραμέτρων στο μοντέλο για το αντιβιοτικό sulfomethoxazole. Estimate: η διαφορά της απομάκρυνσης του πληθυσμού από τη μέση τιμή, p - value: η τιμή σημαντικότητας.

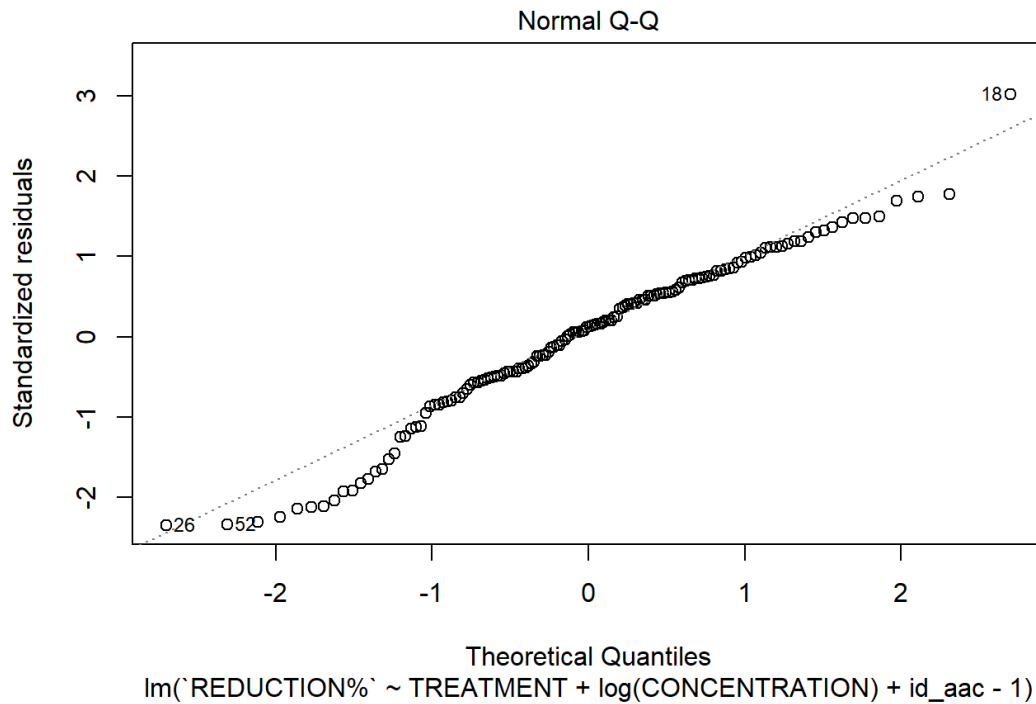
	Estimate (%)	Std. Error	t value	p - value
TREATMENT IU	19.9611	5.7206	3.489	0.000652***
TREATMENT SF	9.0454	4.3897	2.061	0.041234*
TREATMENT WET	-0.4820	3.9275	-0.123	0.902498
TREATMENT WTTP	31.1618	5.7206	5.447	2.30e-07***
log(CONCENTRATION)	17.5099	0.9488	18.455	< 2e-16 ***
id_qnrA	-25.3925	5.5457	-4.579	1.04e-05***
id_blatTem	29.6495	9.6054	3.087	0.002450**

Στο Γράφημα 39 παρουσιάζονται οι γραμμές πρόβλεψης για την μείωση του εξεταζόμενου πληθυσμού για κάθε μονάδα επεξεργασίας, όπως φαίνεται για το αντιβιοτικό SMX το μοντέλο δείχνει ότι καλύτερη απόδοση αναμένεται να έχει το WTTP, μετά το SF, μετά το IU και τέλος το WET.



Γράφημα 39. Γράφημα πρόβλεψης για το SMX. Οι τελείες δείχνουν τις τιμές πρόβλεψης και οι γραμμές ενώνουν τις μέσες τιμές πρόβλεψης για κάθε μέθοδο επεξεργασίας.

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα αντίστοιχα αποτελέσματα για το μοντέλο το οποίο αντιστοιχεί στο αντιβιοτικό ciprofloxacin. Όπως φαίνεται σε αυτή την περίπτωση μόνο η παράμετρος του γονιδίου aac έδειξε σημαντικότητα και επομένως συμπεριλήφθηκε στο μοντέλο.

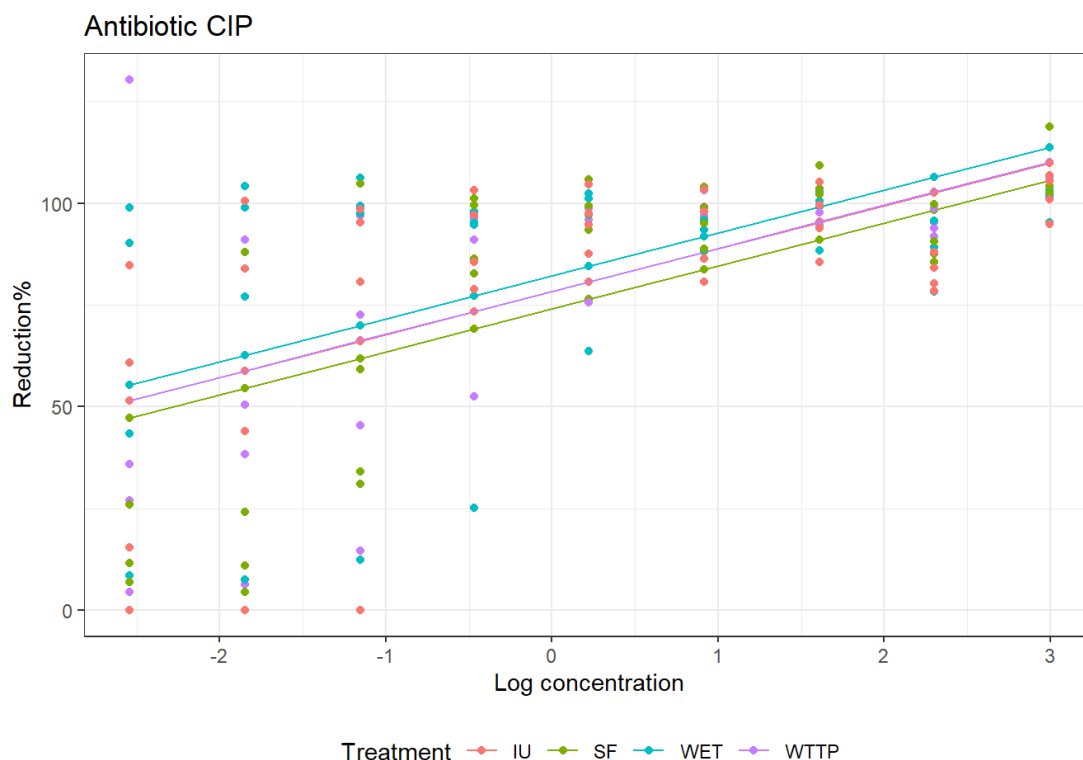


Γράφημα 40. QQ-plot και παράμετροι για την προσαρμογή του μοντέλου CIP.

Από τον Πίνακα 11 φαίνεται ότι όσον αφορά στις επεξεργασίες η παράμετρος που συμβάλλει περισσότερο στη μείωση του πληθυσμού είναι το WET, ενώ η παρουσία του γονιδίου acc δεν επηρεάζει αρνητικά τη μείωση του πληθυσμού.

Πίνακας 11. Συσχετίσεις παραμέτρων στο μοντέλο για το αντιβιοτικό ciprofloxacin. Estimate: η διαφορά της απομάκρυνσης του πληθυσμού από τη μέση τιμή, p value: η τιμή σημαντικότητας.

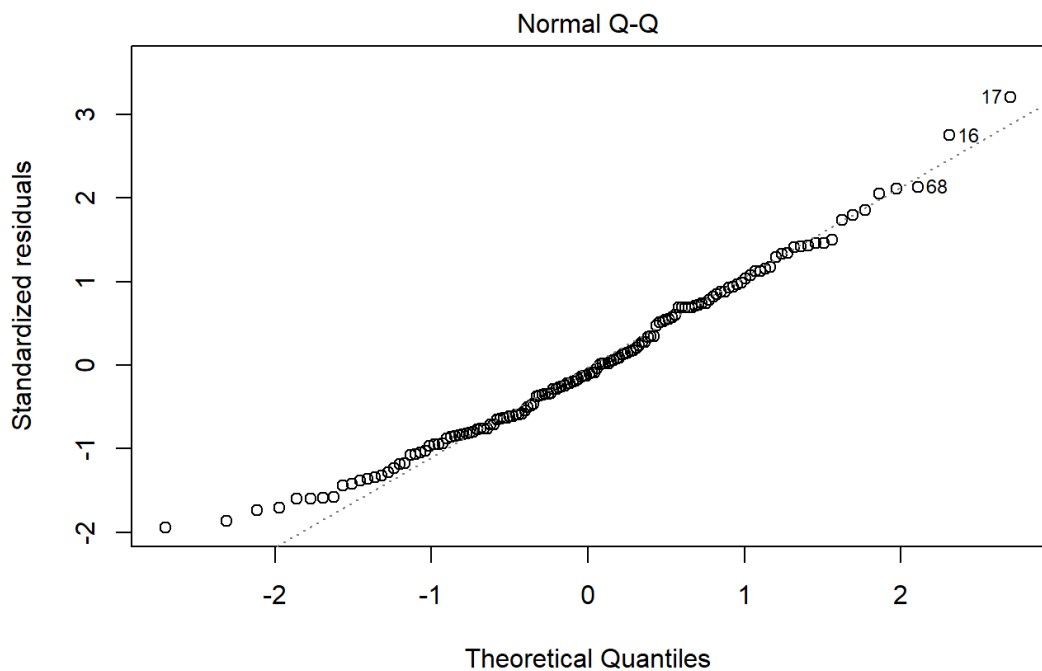
	Estimate	Std. Error	t. value	p. value
TREATMENT IU	63.276	6.615	9.565	< 2e-16***
TREATMENT SF	53.967	8.009	6.738	4.00e-10***
TREATMENT WET	82.114	4.189	19.603	< 2e-16***
TREATMENT WTTP	63.375	6.615	9.580	< 2e-16***
log(CONCENTRATION)	10.564	1.170	9.030	1.35e-15***
id_aac	20.015	6.827	2.932	0.00395**



Γράφημα 41. Γράφημα πρόβλεψης για το CIP. Οι τελείες δείχνουν τις τιμές πρόβλεψης και οι γραμμές ενώνουν τις μέσες τιμές πρόβλεψης για κάθε μέθοδο επεξεργασίας.

Όπως φαίνεται από το γράφημα 41, οι μέσες τιμές πρόβλεψης δείχνουν ότι σε αυτή την περίπτωση ο εξεταζόμενος πληθυσμός από την εκροή του υδροβιότοπου αναμένεται να παρουσιάσει τη μεγαλύτερη μείωση μετά την έκθεση του στο αντιβιοτικό CIP.

Ακολουθούν τα αποτελέσματα του μοντέλου για το αντιβιοτικό amoxicillin. Στο Γράφημα 42 φαίνεται η προσαρμογή του μοντέλου ενώ σε αυτή την περίπτωση συμπεριλαμβάνονται στο μοντέλο ως παράμετροι τα γονίδια ανθεκτικότητας aac και tetA.



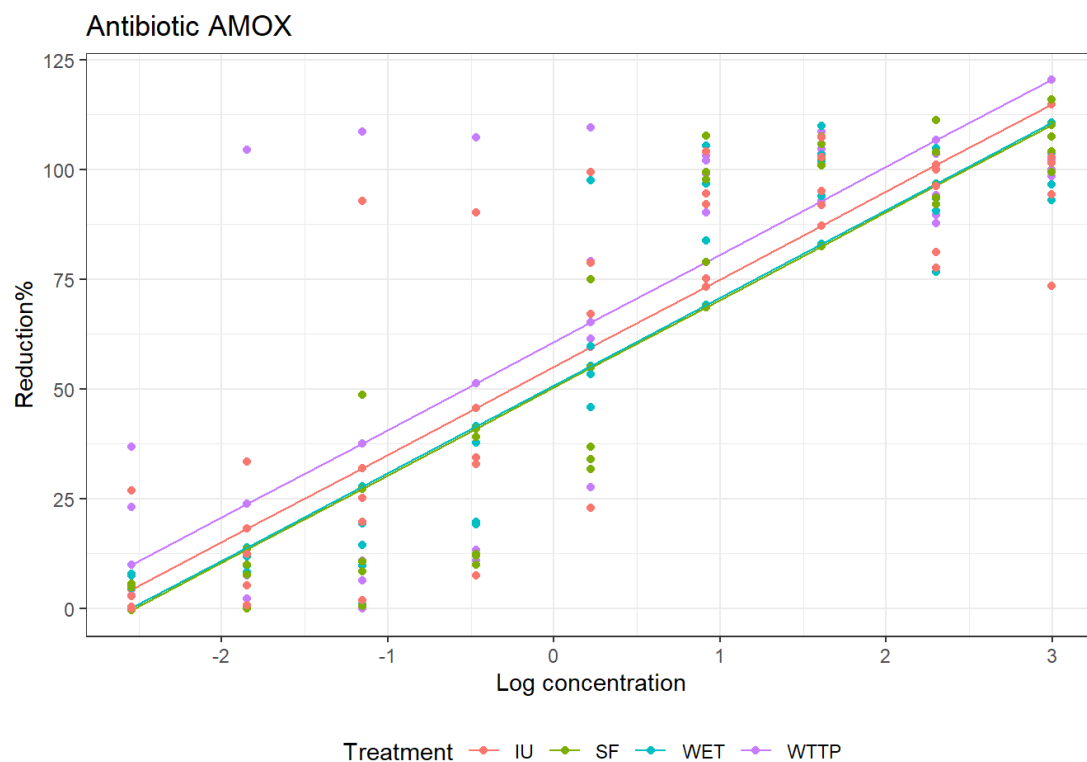
lm(`REDUCTION%` ~ TREATMENT + log(CONCENTRATION) + id_aac + id_tetA - 1)
Γράφημα 42. QQ-plot και παράμετροι για την προσαρμογή του μοντέλου AMOX

Από τον Πίνακα 12 φαίνεται ότι οι μέθοδοι επεξεργασίας έχουν θετική συμβολή στη μείωση του εξεταζόμενου πληθυσμού με το WET να έχει την υψηλότερη τιμή μείωσης του πληθυσμού σε σύγκριση με τη μέση μείωση. Τα γονίδια aac και tetA δε δείχνουν να συμβάλλουν αρνητικά στη μείωση του πληθυσμού κατά την έκθεση στο αντιβιοτικό amoxicillin.

Πίνακας 12. Συσχετίσεις παραμέτρων στο μοντέλο για το αντιβιοτικό amoxicillin. Estimate: η διαφορά της απομάκρυνσης του πληθυσμού από τη μέση τιμή, p. value: η τιμή σημαντικότητας.

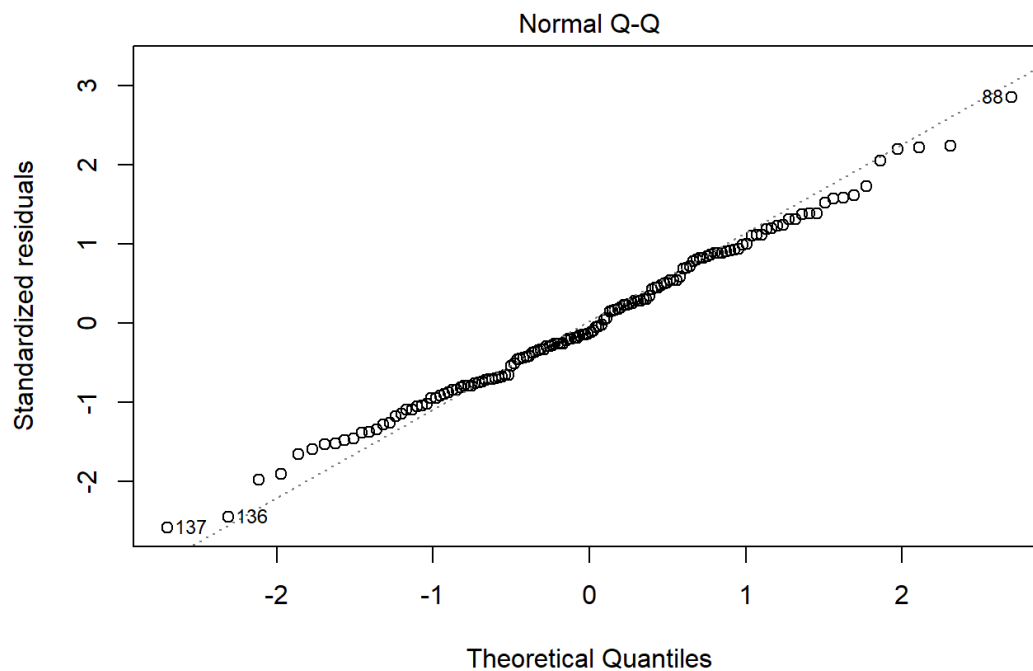
	Estimate	Std. Error	t value	p. value
TREATMENT IU	38.473	6.052	6.357	2.84e-09***
TREATMENT SF	33.514	7.057	4.749	5.09e-06***
TREATMENT WET	46.948	3.849	12.196	< 2e-16***
TREATMENT WWTP	40.187	6.487	6.195	6.38e-09***
log(CONCENTRATION)	19.965	1.025	19.487	< 2e-16***
id_aac	16.878	6.029	2.800	0.00585**
id_tetA	15.698	4.670	3.362	0.00100**

Οι γραμμές πρόβλεψης από το Γράφημα 43 δείχνουν καλύτερη απόδοση ως προς την αναμενόμενη μείωση του εξεταζόμενου πληθυσμού για το WWTP μετά για τη μονάδα IU και μετά για το SF και τέλος για το WET.



Γράφημα 43. Γράφημα πρόβλεψης για το AMOX. Οι τελείες δείχνουν τις τιμές πρόβλεψης και οι γραμμές ενώνουν τις μέσες τιμές πρόβλεψης για κάθε μέθοδο επεξεργασίας.

Τέλος, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για την περίπτωση του αντιβιοτικού tetracycline. Σε αυτή την περίπτωση οι παράμετροι των γονιδίων *sul*, *aac* και *tetM* συμπεριελήφθησαν στο μοντέλο.



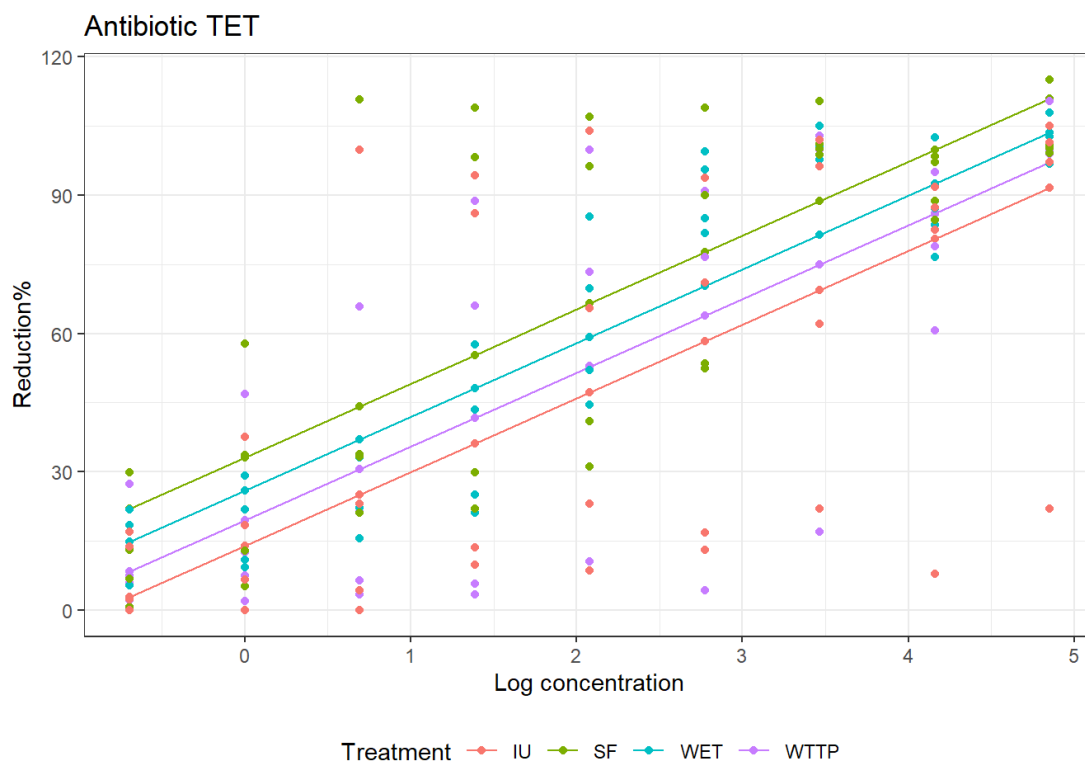
lm('REDUCTION%' ~ TREATMENT + log(CONCENTRATION) + id_Sul1 + id_aac + id_te .
Γράφημα 44. QQ-plot και παράμετροι για την προσαρμογή του μοντέλου TET.

Από τον Πίνακα 13 φαίνεται ότι το SF έχει τη μεγαλύτερη αύξηση στην απομάκρυνση του πληθυσμού σε σχέση με τη μέση τιμή και ακολουθεί η μονάδα IU. Από τα γονίδια ανθεκτικότητας φαίνεται ότι αρνητική επίδραση στη μείωση του πληθυσμού έχουν τα γονίδια aac και tetM ενώ το sul1 δε φαίνεται να επηρεάζει αρνητικά την απόδοση.

Πίνακας 13. Συσχετίσεις παραμέτρων στο μοντέλο για το αντιβιοτικό tetracycline. Estimate: η διαφορά της απομάκρυνσης του πληθυσμού από τη μέση τιμή, p. value: η τιμή σημαντικότητας.

	Estimate	Std. Error	t value	p. value
TREATMENT IU	70.0454	8.0304	8.723	8.51e-15***
TREATMENT SF	88.1939	7.7034	11.449	< 2e-16***
TREATMENT WET	25.9128	4.1267	6.279	4.27e-09***
TREATMENT WWTP	49.5729	6.1430	8.070	3.30e-13***
log(CONCENTRATION)	16.0278	0.9969	16.078	< 2e-16***
id_Sul1	24.9473	8.4866	2.940	0.00386**
id_aac	-48.4374	6.0861	-7.959	6.09e-13***
id_tetM	-26.4666	5.9146	-4.475	1.60e-05***

Από το γράφημα 45 και τις γραμμές πρόβλεψης φαίνεται ότι για την έκθεση στο αντιβιοτικό TET την καλύτερη απόδοση ως προς τη μείωση του πληθυσμού αναμένεται να έχει το αμμόφιλτρο και ο υδροβιότοπος, ακολουθεί το IU και τέλος το WWTP.



Γράφημα 45. Γράφημα πρόβλεψης για το TET. Οι τελείες δείχνουν τις τιμές πρόβλεψης και οι γραμμές ενώνουν τις μέσες τιμές πρόβλεψης για κάθε μέθοδο επεξεργασίας.

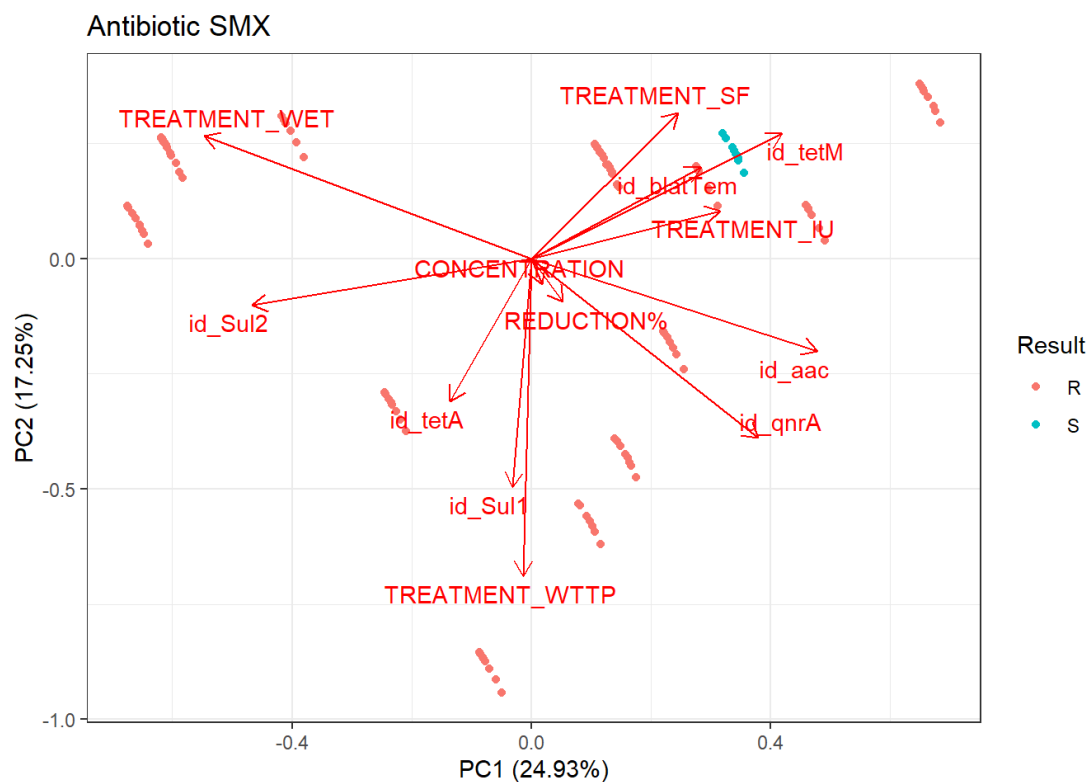
3.10.1.2 Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA) – *E.coli*

Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ανάλυσης κυρίων συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA) με στόχο να οπτικοποιηθούν οι πιθανές συσχετίσεις μεταξύ των παραμέτρων. Η PCA μπορεί να βοηθήσει στην ερμηνεία

μεγάλων συνόλων δεδομένων ταυτόχρονα ελαχιστοποιώντας την απώλεια πληροφοριών. Μια ανάλυση PCA μπορεί να δείξει πως σχετίζονται οι μεταβλητές αλλά και το πως ομαδοποιούνται τα δεδομένα. Εδώ η PCA χρησιμοποιήθηκε με στόχο να παρουσιαστούν ποιοί παράγοντες σχετίζονται με τα ανθεκτικά ή τα ευαίσθητα στα αντιβιοτικά βακτήρια. Οι παράγοντες όπως οι μέθοδοι επεξεργασίας και η παρουσία γονιδίων αντιπροσωπεύονται με ένα διάνυσμα, του οποίου η κατεύθυνση δείχνει αν σχετίζεται με το προφίλ ανθεκτικότητας ή όχι. Επίσης, η γωνία που σχηματίζουν μεταξύ τα διανύσματα δείχνουν αν υπάρχει μεταξύ τους συσχέτιση.

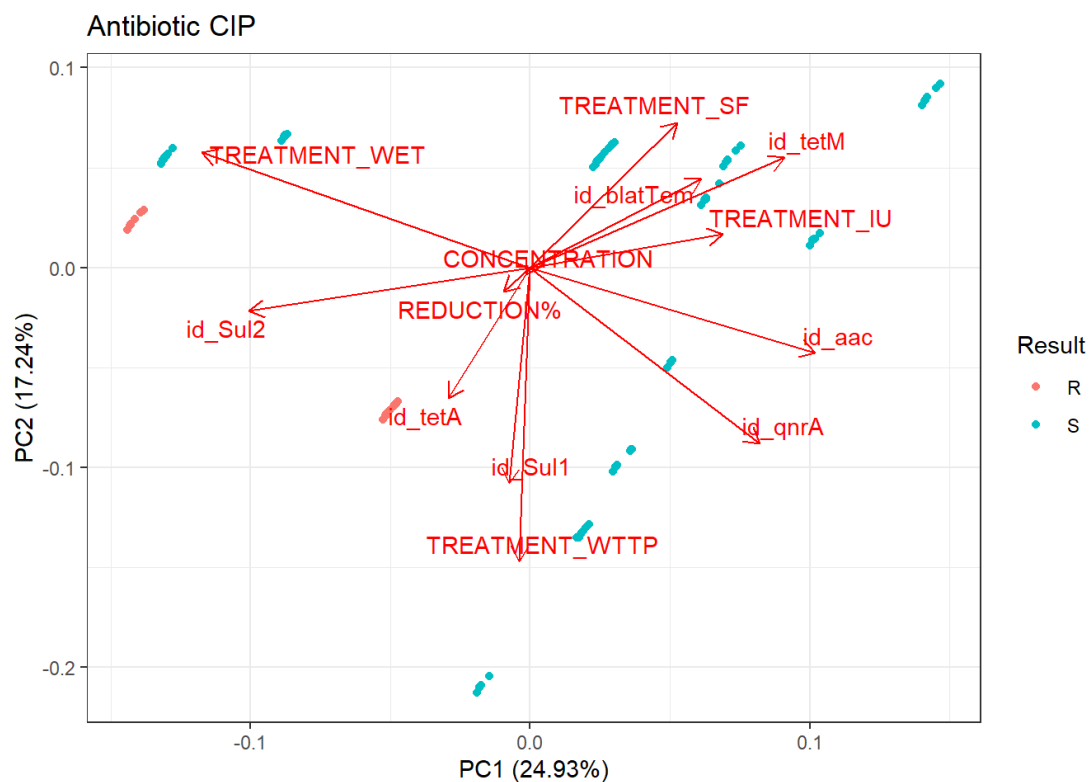
Στο Γράφημα 46 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για το αντιβιοτικό SMX. Όπως φαίνεται η ευαισθησία στο αντιβιοτικό SMX ίσως να σχετίζεται με την παρουσία του γονιδίου tetM. Η ανθεκτικότητα φαίνεται να σχετίζεται με το γονίδιο tetA και bla_{TEM}, ενώ φαίνεται να σχετίζεται εξίσου και με τις επεξεργασίες WET και WTTP.

Ακόμα μια παρατήρηση για την περίπτωση του αντιβιοτικού SMX είναι ότι φαίνεται πως η επεξεργασία WET σχετίζεται αρνητικά με την μείωση του εξεταζόμενου πληθυσμού.



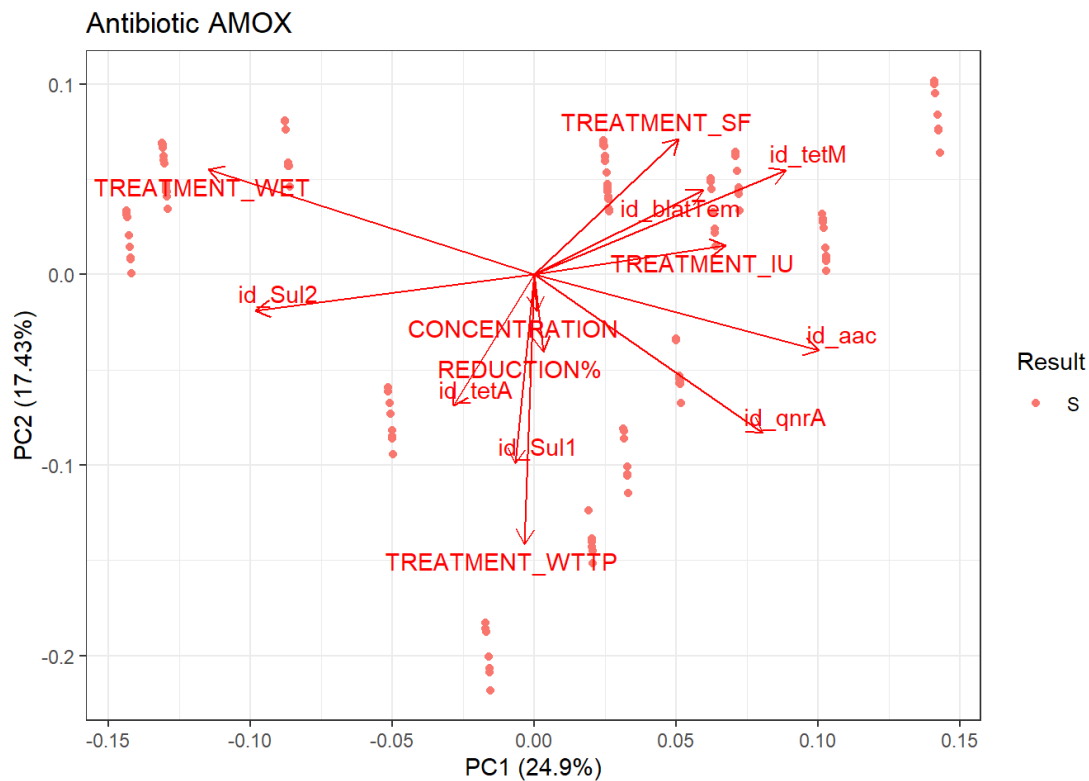
Γράφημα 46. Ανάλυση PCA του πληθυσμού *E.coli* σχετικά με τον έλεγχο ανθεκτικότητας στο SMX. για την επεξεργασία με το αντιβιοτικό SMX.

Για το αντιβιοτικό CIP (Γράφημα 47), η ευαισθησία φαίνεται να σχετίζεται με τα γονίδια ανθεκτικότητας *tetM* και *bla_{TEM}* ενώ όσον αφορά στις μεθόδους επεξεργασίας φαίνεται να σχετίζεται με το WET, το WTTP και με το IU. Στην περίπτωση του CIP η μείωση του εξεταζόμενου πληθυσμού φαίνεται να σχετίζεται αρνητικά με τις επεξεργασίες SF και IU.



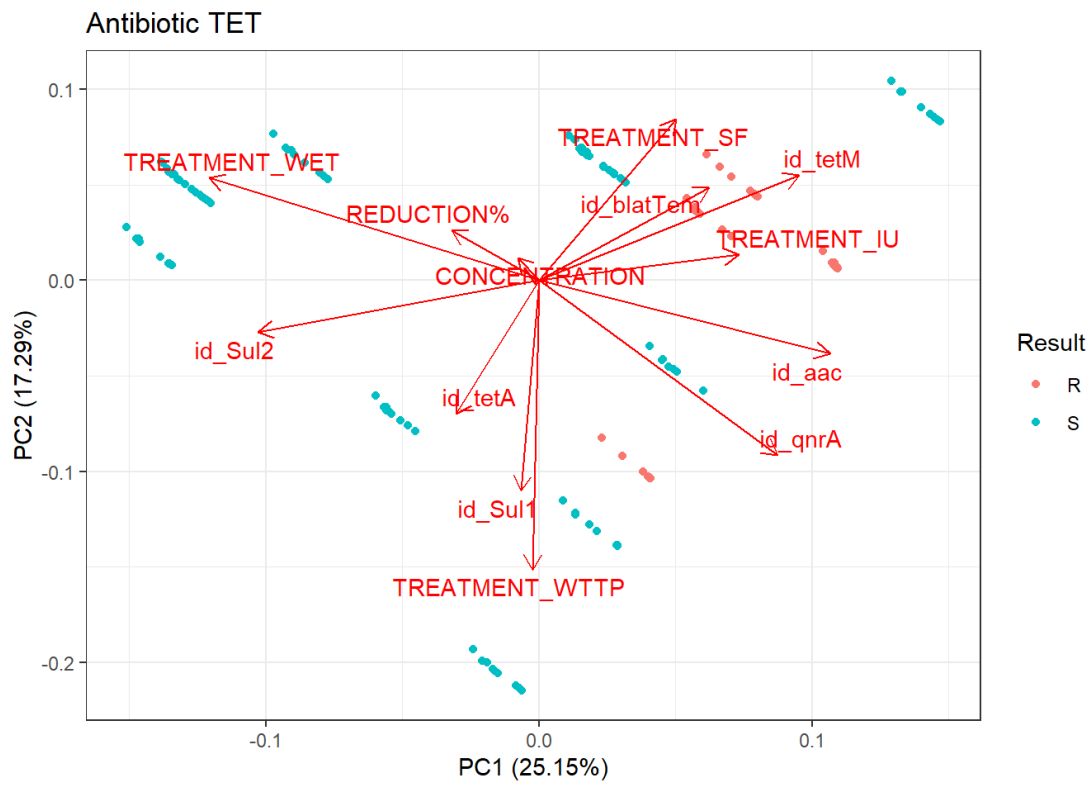
Γράφημα 47. Ανάλυση PCA του πληθυσμού *E.coli* σχετικά με τον έλεγχο ανθεκτικότητας στο CIP.

Για το αντιβιοτικό AMOX (Γράφημα 48) όλα τα στελέχη που εξετάστηκαν έδειξαν ευαισθησία και φαίνεται να σχετίζεται περισσότερο με τα γονίδια blaTEM, tetM και λιγότερο με τα tetA και sul1. Όσον αφορά τις μεθόδους επεξεργασίας με την ευαισθησία φαίνεται να σχετίζονται το WET, το WWTP και το IU. Σε αυτή την περίπτωση φαίνεται ότι το ποσοστό της μείωσης σχετίζεται αρνητικά με τις μεθόδους SF και IU.



Γράφημα 48. Ανάλυση PCA του πληθυσμού *E.coli* σχετικά με τον έλεγχο ανθεκτικότητας στο AMOX.

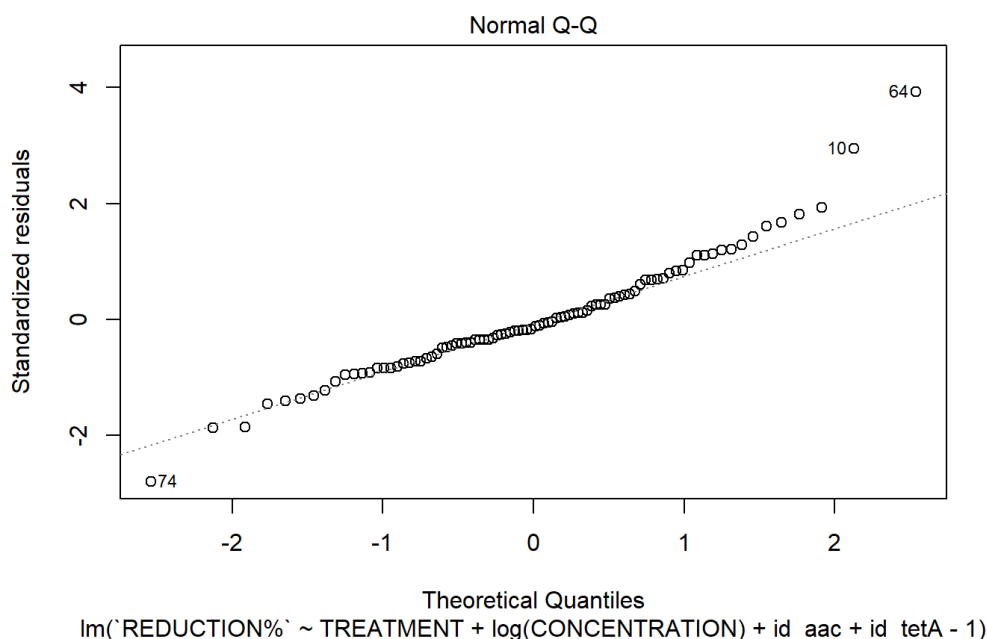
Τέλος, από το Γράφημα 49 για το αντιβιοτικό TET η ευαισθησία φαίνεται να σχετίζεται με τα γονίδια tetA και tetM ενώ η ανθεκτικότητα με το blaTEM. Όσον αφορά στις επεξεργασίες η ευαισθησία σχετίζεται με το WET και το WTTP ενώ ανθεκτικότητα με το IU. Σε αυτή την περίπτωση το ποσοστό της μείωσης του εξεταζόμενου πληθυσμού σχετίζεται αρνητικά με το IU ενώ θετικά με το WET.



Γράφημα 49. Ανάλυση PCA του πληθυσμού *E. coli* σχετικά με τον έλεγχο ανθεκτικότητας στο TET.

3.10.1.3 Ανάλυση παλινδρόμησης - Στελέχη εντεροκόκκων

Ομοίως ακολουθούν τα αποτελέσματα για τους εντερόκοκκους. Στο Γράφημα 50 παρουσιάζεται η προσαρμογή του μοντέλου για το αντιβιοτικό sulfomethoxazole ενώ τα γονίδια ανθεκτικότητας τα οποία είχαν συμμετοχή ως παράμετροι στο μοντέλο ήταν τα aac και tetA.



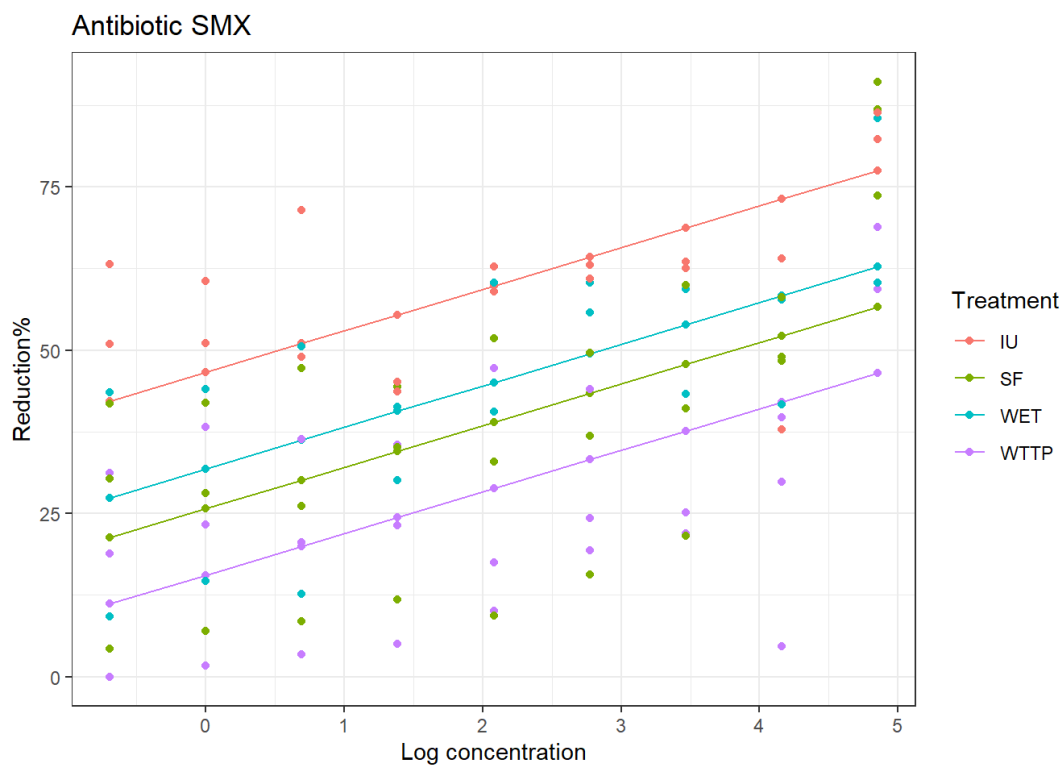
Γράφημα 50. QQ-plot και παράμετροι για την προσαρμογή του μοντέλου SMX

Ο Πίνακας 14 δείχνει ότι η μονάδα IU παρουσιάζει αύξηση σε σχέση με τη μέση μείωση του πληθυσμού κατά 46,5%. Η ύπαρξη των γονιδίων aac και tetA αυξάνει το ποσοστό της μείωσης του πληθυσμού κατά 13,4 και 15,8% αντίστοιχα.

Πίνακας 14. Συσχετίσεις παραμέτρων στο μοντέλο για το αντιβιοτικό sulfomethoxazole. Estimate: η διαφορά της απομάκρυνσης του πληθυσμού από τη μέση τιμή, p. value: η τιμή σημαντικότητας

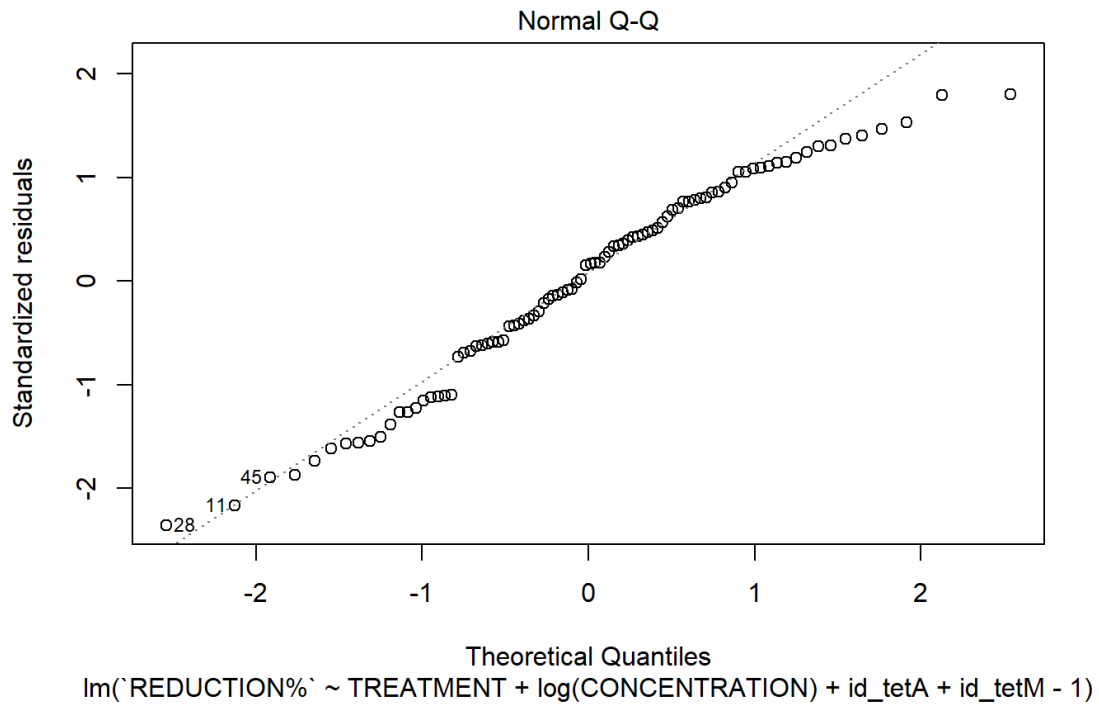
	Estimate	Std. Error	t value	p. value
TREATMENT IU	46.5926	3.4756	13.406	< 2e-16***
TREATMENT SF	11.3833	3.9052	2.915	0.004572**
TREATMENT WET	2.3143	5.5770	0.415	0.679240
TREATMENT WTP	1.2228	3.9052	0.313	0.754975
log(CONCENTRATION)	6.3798	0.7707	8.278	1.81e-12***
id_aac	13.4920	4.3616	3.093	0.002696**
id_tetA	15.9890	4.3616	3.666	0.000434***

Στο γράφημα 51 φαίνεται ότι η μονάδα IU δίνει τις καλύτερες τιμές πρόβλεψης και μετά το WET, ενώ ακολουθούν το SF και το WTTP.



Γράφημα 51. Γράφημα πρόβλεψης για το SMX. Οι τελείες δείχνουν τις τιμές πρόβλεψης και οι γραμμές ενώνουν τις μέσες τιμές πρόβλεψης για κάθε μέθοδο επεξεργασίας.

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για το αντιβιοτικό CIP, όπως φαίνεται από το Γράφημα 52 σε αυτή την περίπτωση συμπεριλαμβάνονται τα γονίδια tetA και tetM.



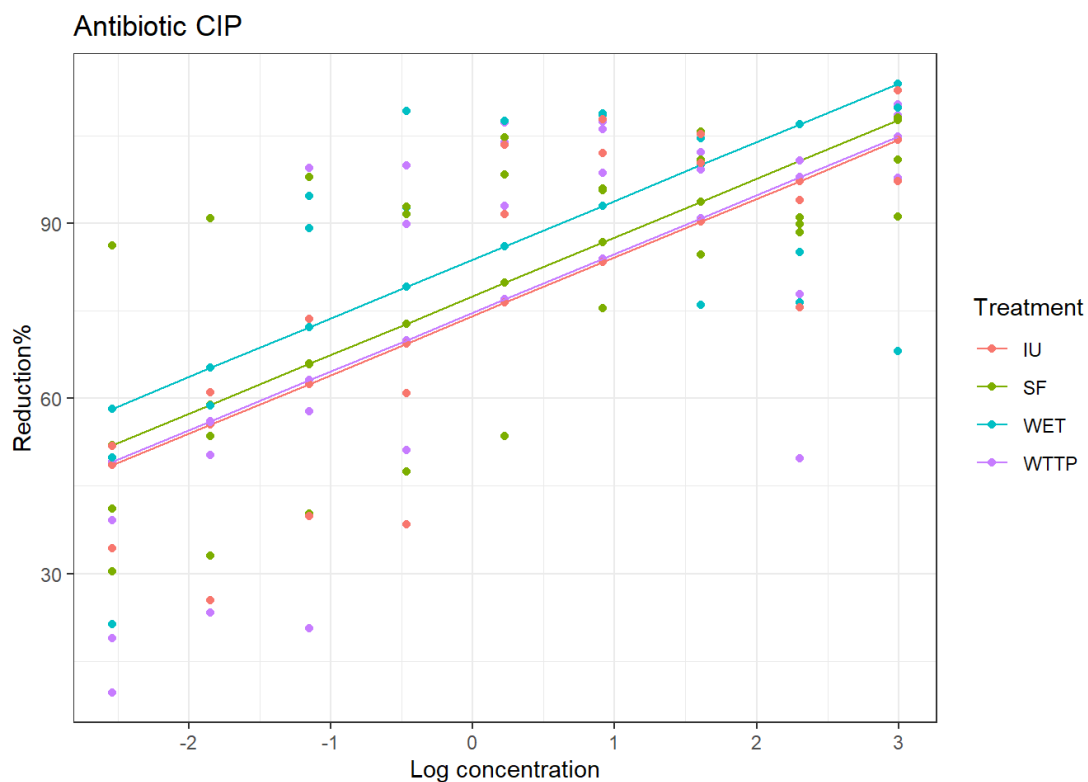
Γράφημα 52. QQ-plot και παράμετροι για την προσαρμογή του μοντέλου CIP

Από τον πίνακα 15 παρατηρείται ότι από τις μεθόδους επεξεργασίας το WWTP και το WET δείχνουν το μεγαλύτερο ποσοστό αύξησης στη μείωση του πληθυσμού σε σχέση με τη μέση μείωση. Το γονίδιο tetA δεν επηρεάζει τη μείωση του πληθυσμού με τη χρήση του αντιβιοτικού CIP σε αντίθεση με το tetM που δείχνει ποσοστό μείωσης 26,1 % από τη μέση μείωση του πληθυσμού.

Πίνακας 15. Συσχετίσεις παραμέτρων στο μοντέλο για το αντιβιοτικό ciprofloxacin. Estimate: η διαφορά της απομάκρυνσης του πληθυσμού από τη μέση τιμή, p. value: η τιμή σημαντικότητας

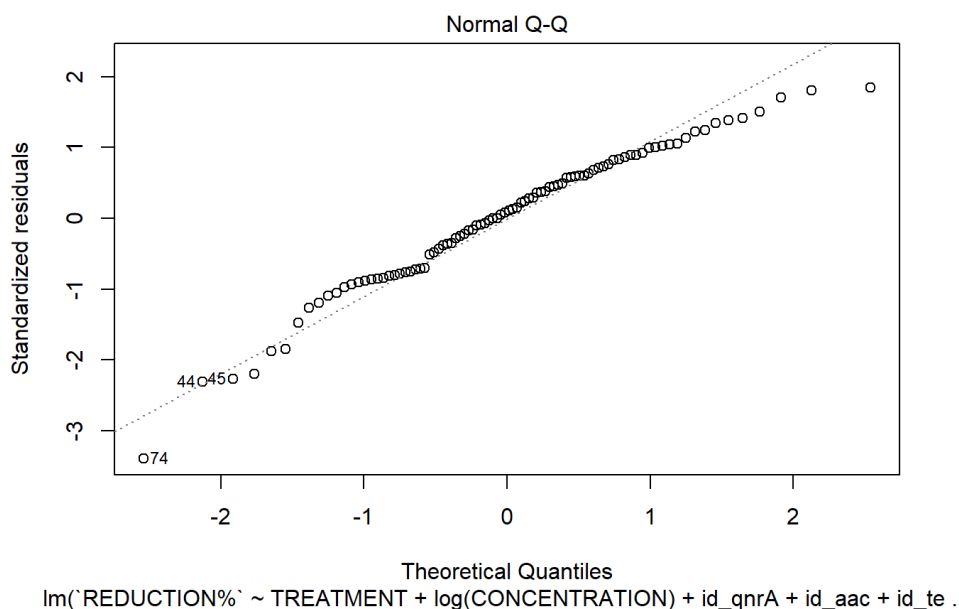
	Estimate	Std. Error	t value	p. value
TREATMENT IU	74.130	4.800	15.442	< 2e-16***
TREATMENT SF	89.380	6.783	13.176	< 2e-16***
TREATMENT WET	93.187	10.090	9.236	2.20e-14***
TREATMENT WTTP	95.253	9.241	10.308	< 2e-16***
log(CONCENTRATION)	10.058	1.200	8.384	1.12e-12***
id_tetA	16.748	6.275	2.669	0.00915**
id_tetM	-26.109	8.874	-2.942	0.00423**

Το γράφημα 53 παρουσιάζει τις γραμμές πρόβλεψης, και φαίνεται ότι το WET δίνει την καλύτερη απόδοση ακολουθούμενο από τα SF, WTTP και IU.



Γράφημα 53. Γράφημα πρόβλεψης για το CIP. Οι τελείες δείχνουν τις τιμές πρόβλεψης και οι γραμμές ενώνουν τις μέσες τιμές πρόβλεψης για κάθε μέθοδο επεξεργασίας.

Στο Γράφημα 54 παρουσιάζεται η προσαρμογή του μοντέλου για το αντιβιοτικό AMOX και ως παράμετροι συμμετείχαν τα γονίδια qnrA, aac και tetM.



Γράφημα 54. QQ-plot και παράμετροι για την προσαρμογή του μοντέλου AMOX.

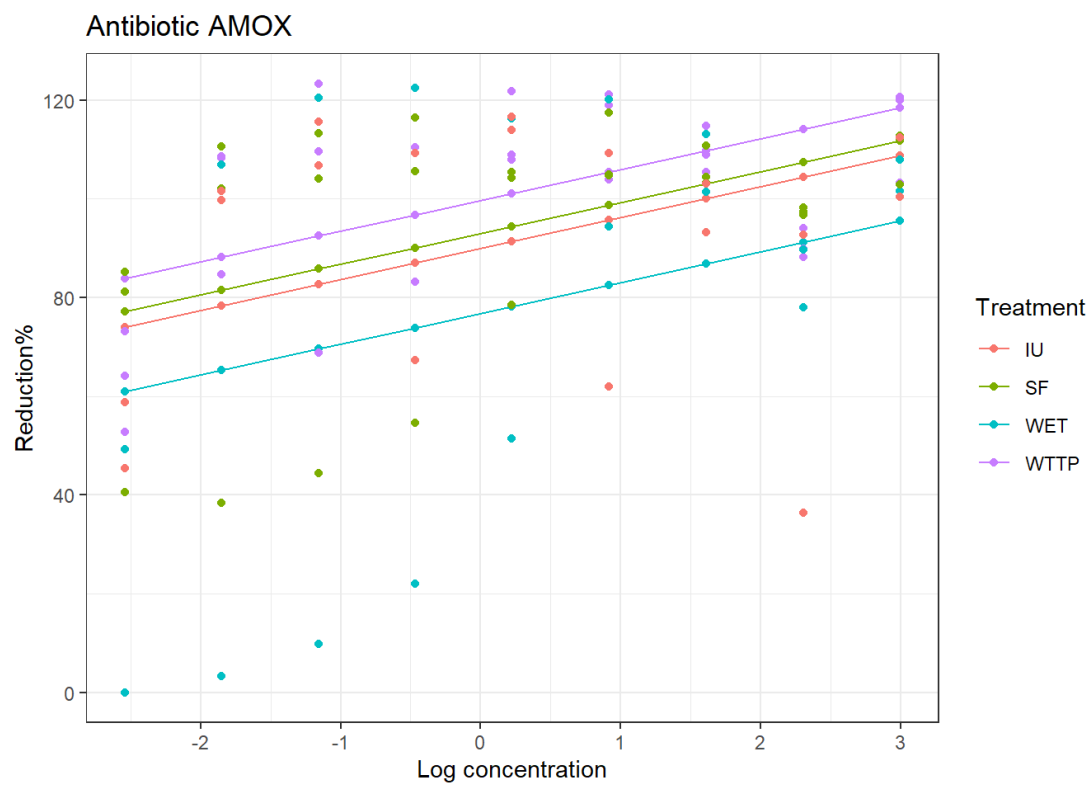
Από τον Πίνακα 16 φαίνεται ότι το IU δείχνει το μεγαλύτερο ποσοστό αύξησης στη μείωση του πληθυσμού σε σχέση με τη μέση τιμή. Όσον αφορά στα γονίδια, το tetM

έδειξε ότι επηρεάζει θετικά τη μείωση του πληθυσμού όπως και το qnrA, ενώ αντίθετα το γονίδιο aac έδειξε μείωση στο ποσοστό μείωσης κατά 29,4% σε σχέση με τη μέση μείωση του εξεταζόμενου πληθυσμού.

Πίνακας 16. Συσχετίσεις παραμέτρων στο μοντέλο για το αντιβιοτικό amoxicillin. Estimate: η διαφορά της απομάκρυνσης του πληθυσμού από τη μέση τιμή, p. value: η τιμή σημαντικότητας

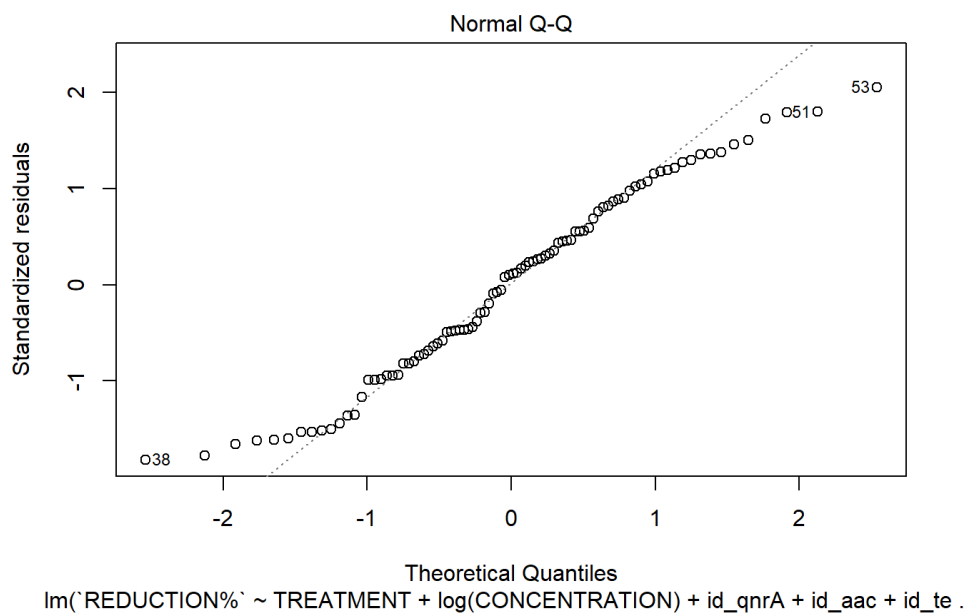
	Estimate	Std. Error	t value	p. value
TREATMENT IU	80.480	6.938	11.600	< 2e-16***
TREATMENT SF	54.736	11.322	4.834	6.15e-06***
TREATMENT WET	38.238	12.008	3.184	0.002052**
TREATMENT WWTP	48.180	13.865	3.475	0.000819***
log(CONCENTRATION)	6.262	1.416	4.421	2.99e-05***
id_qnrA	18.881	8.003	2.359	0.020686*
id_aac	-29.496	12.653	-2.331	0.022206*
id_tetM	58.621	16.005	3.663	0.000441***

Οι μέσες τιμές πρόβλεψης για το αντιβιοτικό AMOX (Γράφημα 55) έδειξαν ότι καλύτερη απόδοση είχε το WWTP και τη χαμηλότερη το WET.



Γράφημα 55. Γράφημα πρόβλεψης για το AMOX. Οι τελείες δείχνουν τις τιμές πρόβλεψης και οι γραμμές ενώνουν τις μέσες τιμές πρόβλεψης για κάθε μέθοδο επεξεργασίας.

Το Γράφημα 56 δείχνει την προσαρμογή του μοντέλου για το αντιβιοτικό TET στο οποίο συμμετείχαν τα γονίδια qnrA, aac και tetM.



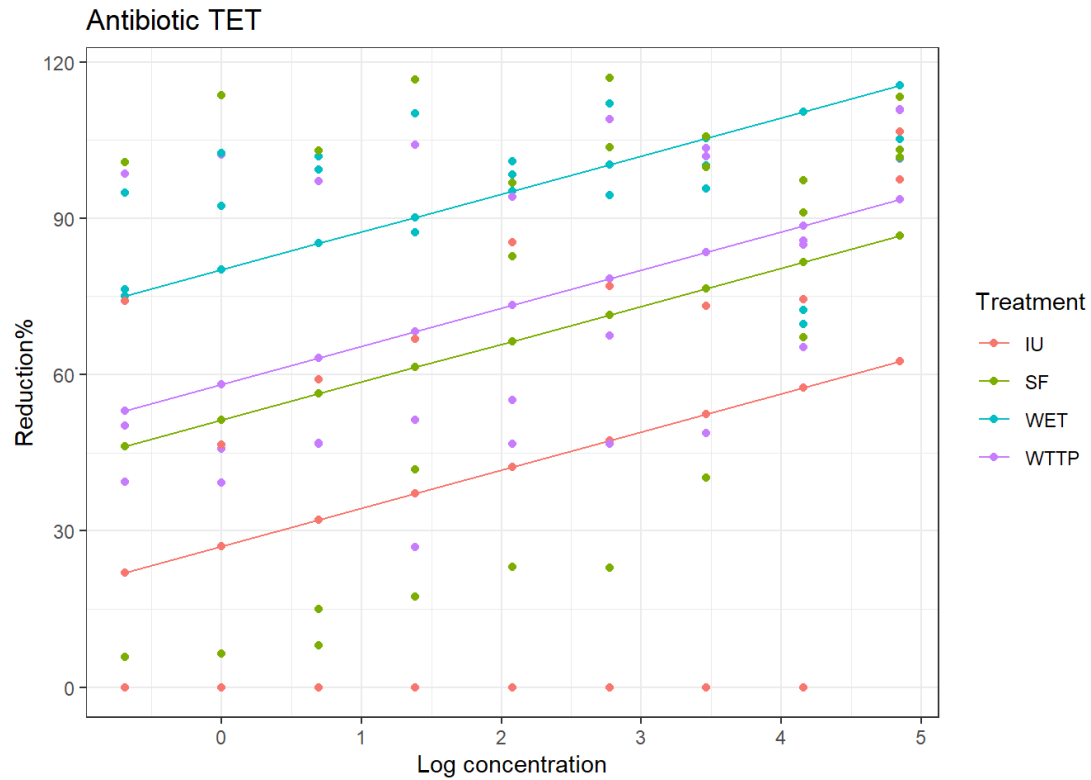
Γράφημα 56. QQ-plot και παράμετροι για την προσαρμογή του μοντέλου TET.

Στον Πίνακα 17 φαίνεται ότι η μέθοδοι επεξεργασίας WWTP και WET δίνουν το μεγαλύτερο ποσοστό αύξησης από τη μέση μείωση του πληθυσμού. Παρατηρώντας τα γονίδια φαίνεται ότι τα qnrA και tetM παρουσιάζουν μείωση κατά 27,5 και 49,9% αντίστοιχα από τη μέση μείωση του πληθυσμού.

Πίνακας 17. Συσχετίσεις παραμέτρων στο μοντέλο για το αντιβιοτικό tetracycline. Estimate: η διαφορά της απομάκρυνσης του πληθυσμού από τη μέση τιμή, p. value: η τιμή σημαντικότητας

	Estimate	Std. Error	t value	p. value
TREATMENT IU	40.838	9.394	4.347	3.93e-05***
TREATMENT SF	72.684	14.591	4.981	3.45e-06***
TREATMENT WET	84.683	15.422	5.491	4.37e-07***
TREATMENT WTP	87.078	17.681	4.925	4.31e-06***
log(CONCENTRATION)	7.303	1.764	4.139	8.41e-05***
id_qnrA	-27.561	9.986	-2.760	0.007128**
id_aac	59.162	15.789	3.747	0.000332***
id_tetM	-49.989	19.972	-2.503	0.014300*

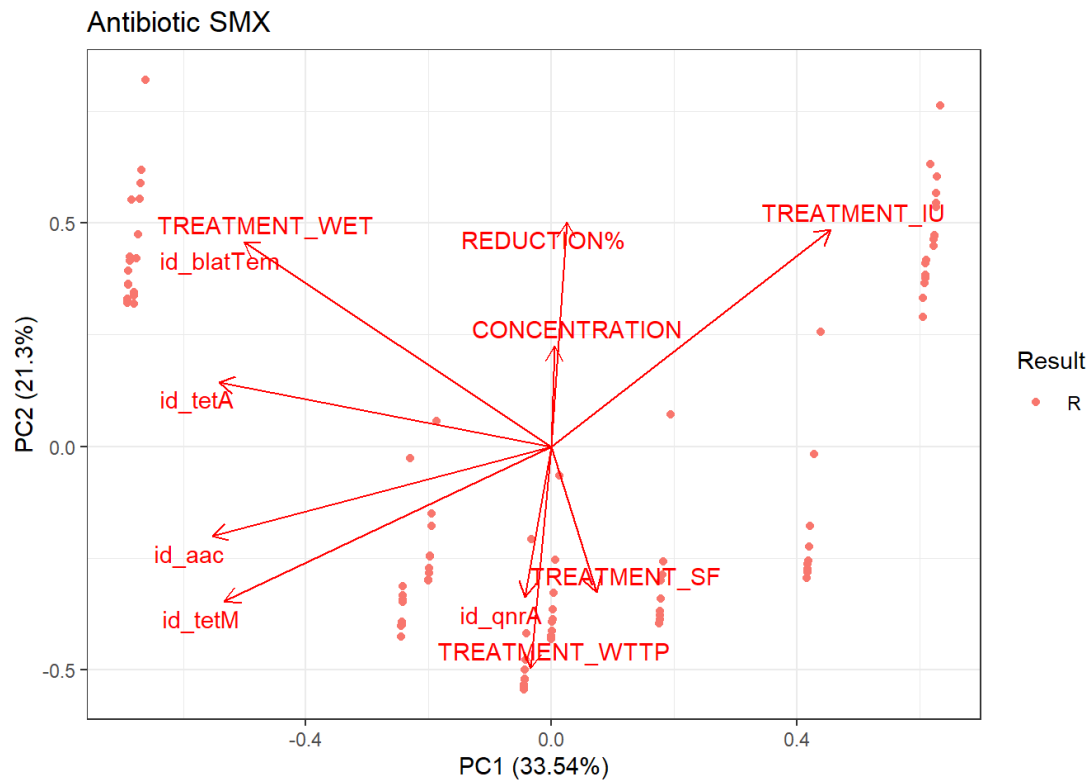
Οι γραμμές πρόβλεψης για το αντιβιοτικό TET (Γράφημα 57) έδειξαν ότι το WET δίνει το καλύτερο αποτέλεσμα στη συνέχεια το WWTP μετά το SF και τελευταίο το IU.



Γράφημα 57. Γράφημα πρόβλεψης για το CIP. Οι τελείες δείχνουν τις τιμές πρόβλεψης και οι γραμμές ενώνουν τις μέσες τιμές πρόβλεψης για κάθε μέθοδο επεξεργασίας.

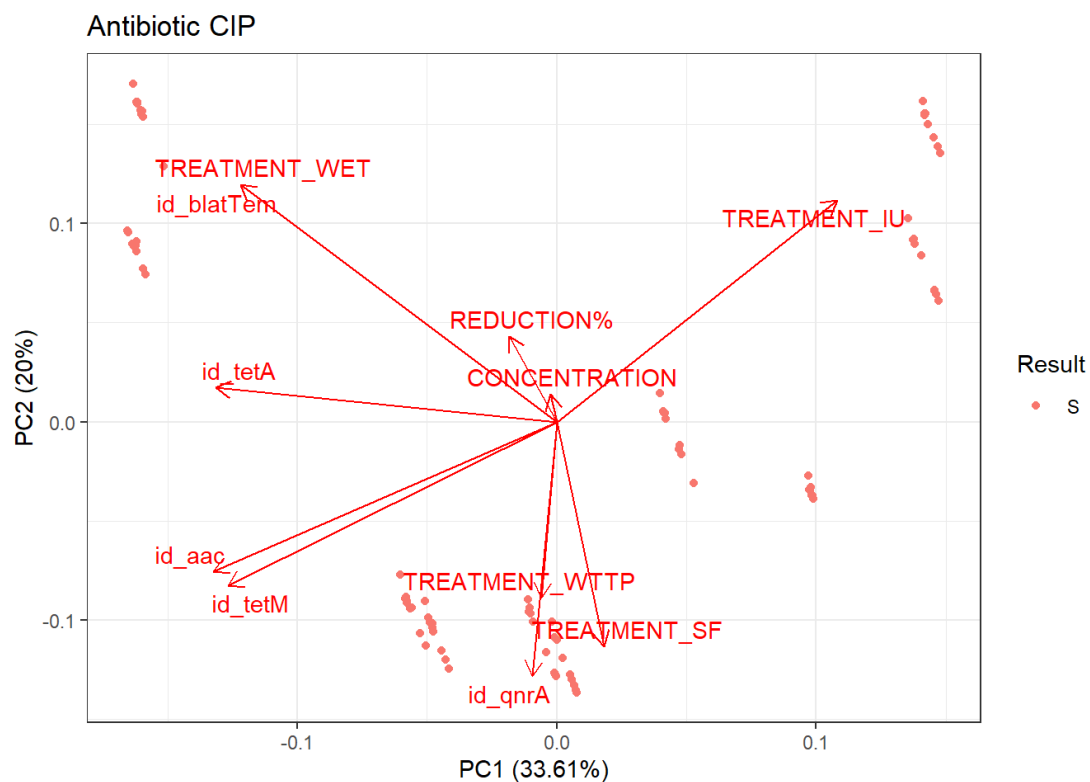
3.10.1.4 Ανάλυση κυρίων συνιστωσών (PCA) - Enterococci

Για το αντιβιοτικό SMX (Γράφημα 58) όλα τα εξεταζόμενα στελέχη χαρακτηρίστηκαν ως ανθεκτικά. Η ανθεκτικότητα φαίνεται να συνδέεται με τα γονίδια *bla*_{TEM} και *qnrA* καθώς και με τις επεξεργασίες WWTP, WET και IU.



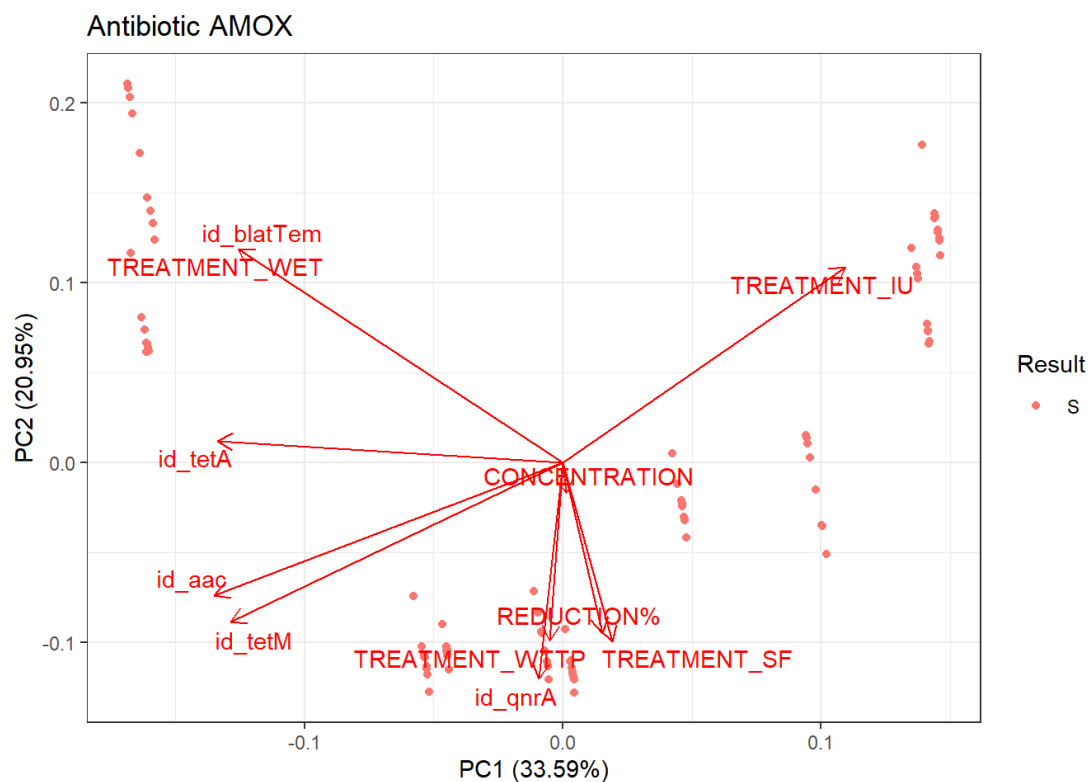
Γράφημα 58. Ανάλυση PCA του πληθυσμού των εντερόκοκκων για την επεξεργασία με το αντιβιοτικό SMX.

Για το αντιβιοτικό CIP (Γράφημα 59) όλα τα εξεταζόμενα στελέχη παρουσιάστηκαν ευαίσθητα. Σε αυτή την περίπτωση φαίνεται ότι το γονίδιο *bla*_{TEM} και οι επεξεργασίες WET και IU σχετίζονται με την ευαισθησία. Αρνητικά σε σχέση με το ποσοστό μείωσης του πληθυσμού φαίνεται να σχετίζονται οι επεξεργασίες WWTP και SF.



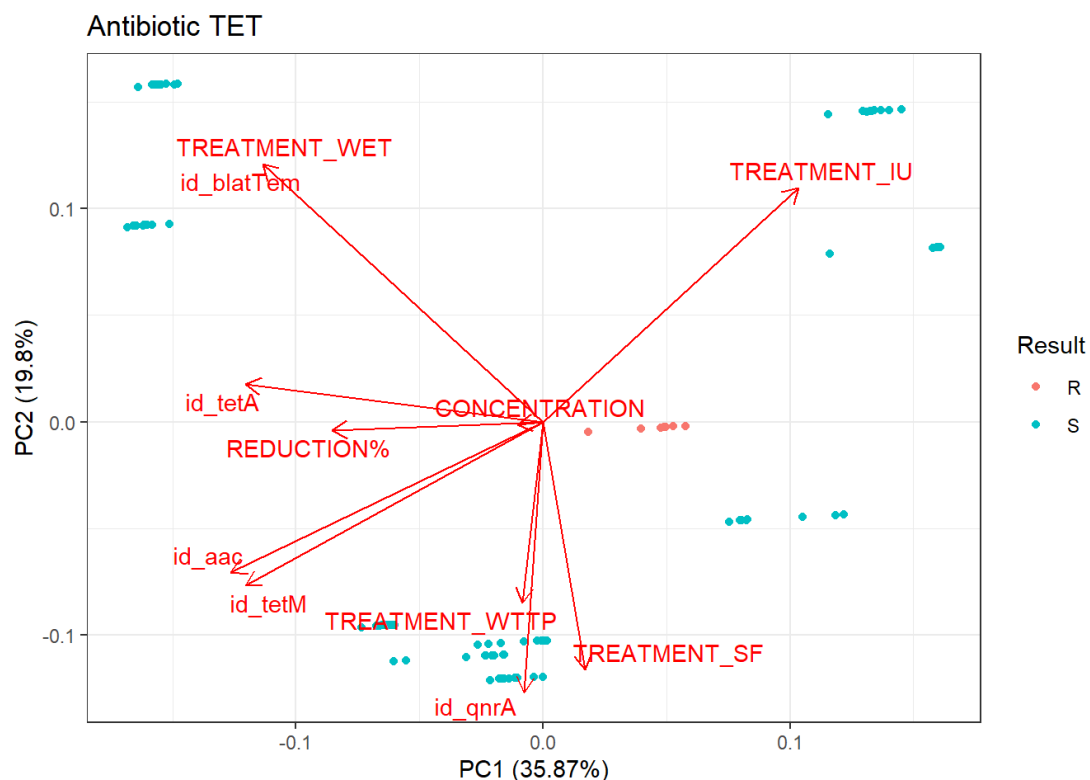
Γράφημα 59. Ανάλυση PCA του πληθυσμού των εντερόκοκκων για την επεξεργασία με το αντιβιοτικό CIP.

Ευαίσθητα παρουσιάστηκαν όλα τα εξεταζόμενα στελέχη και για το αντιβιοτικό AMOX. Όπως φαίνεται από το Γράφημα 60, τα γονίδια *bla_{TEM}* και *qnrA* δείχνουν ότι σχετίζονται με τη ευαισθησία. Θετικά με την ευαισθησία σχετίζονται οι επεξεργασίες WET και IU.



Γράφημα 60. Ανάλυση PCA του πληθυσμού των εντερόκοκκων για την επεξεργασία με το αντιβιοτικό AMOX.

Τέλος για το αντιβιοτικό TET (Γράφημα 61), τα ευαίσθητα στελέχη φαίνονται να σχετίζονται με τα γονίδια qnrA και με όλες τις επεξεργασίες εκτός από το SF, ενώ η μείωση του ποσοστού του εξεταζόμενου πληθυσμού σχετίζεται με την επεξεργασία WET.



Γράφημα 61. Ανάλυση PCA του πληθυσμού των εντερόκοκκων για την επεξεργασία με το αντιβιοτικό TET.

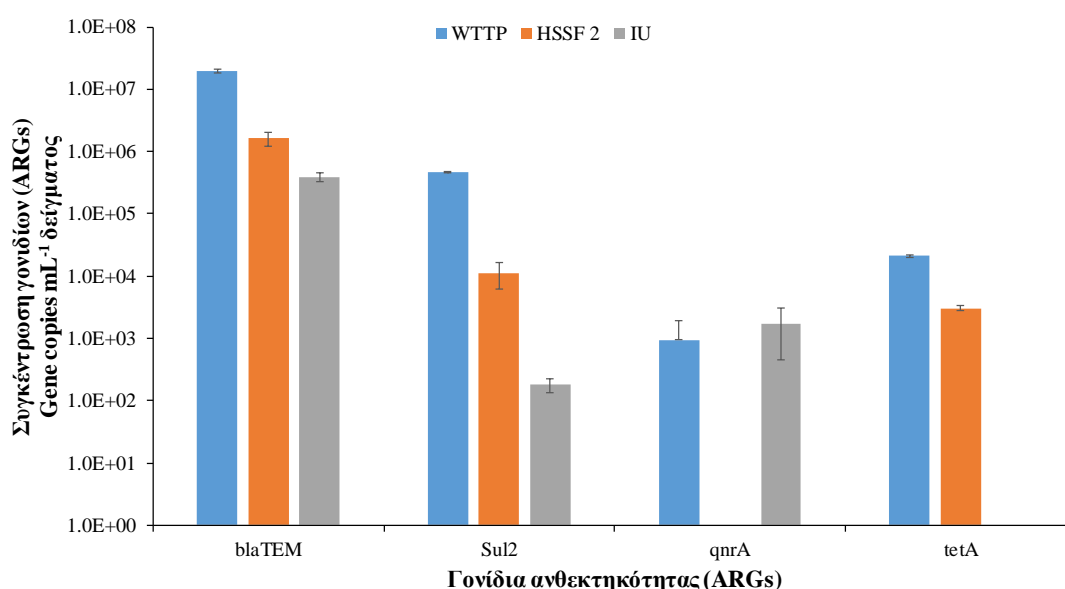
3.11 ARGs στο ολικό βακτηριακό DNA του λύματος

Στη συνέχεια, τέσσερα αντιπροσωπευτικά ARGs (*bla*_{TEM}, *sul2*, *qnrA* και *tetM*) ποσοτικοποιήθηκαν στο ολικό βακτηριακό DNA του λύματος πριν και μετά τη επεξεργασία με το υδροβιότοπο υποεπιφανειακής ροής (HSSF). Σύμφωνα με το Γράφημα 62 τα γονίδια που δεν είχαν ανιχνευθεί στα στελέχη των *E. coli* και των εντεροκόκκων ανιχνεύθηκαν στο ολικό DNA των βακτηρίων του λύματος. Συγκεκριμένα, το γονίδιο *bla*_{TEM} που δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα από τα είδη βακτηρίων στο πρωτοβάθμιο λύμα (WWTP), ανιχνεύθηκε στο ολικό βακτηριακό DNA του λύματος.

Τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης από τη Real - Time PCR (Γράφημα 62) έδειξαν ότι υπήρξε αξιοσημείωτη μείωση των συγκεντρώσεων στα δείγματα μεταξύ εισροής και εκροής για όλα τα εξεταζόμενα γονίδια. Τα ποσοστά απομάκρυνσης ήταν 91%, 77% και 86% για *bla*_{TEM}, *sul2* και *tetA* αντίστοιχα. Οι ρυθμοί απομάκρυνσης είναι συγκρίσιμοι με παρόμοια συστήματα υγροτόπων τα οποία δέχονται λύματα και επιτυγχάνουν ποσοστά απομάκρυνσης 60% για το *sul2* και περίπου 90% για τα γονίδια

ανθεκτικότητας που προσφέρουν ανθεκτικότητα στις τετρακυκλίνες (Chen et al., 2016b).

Το bla_{TEM} ποσοτικοποιήθηκε σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από τα άλλα 3 γονίδια στην εκροή του HSSF το οποίο είναι γενικά σύμφωνο με άλλες μελέτες οι οποίες ποσοτικοποίησαν αυτό το γονίδιο σε μεγάλες συγκεντρώσεις στο DNA που σχετίζεται με κυτταρικό γενετικό υλικό και αυτές οι υψηλές συγκεντρώσεις συνδέονται με την εκτεταμένη χρήση των β-λακταμών. Παρά το γεγονός ότι το sul2 δεν ποσοτικοποιήθηκε ούτε στα απομονωμένα στελέχη *E. coli* ούτε των εντεροκόκκων, ποσοτικοποιήθηκε στο ολικό βακτήριο DNA σε υψηλές συγκεντρώσεις. Αυτό είναι σύμφωνο με μελέτη η οποία εντόπισε το γονίδιο sul2 σε υψηλές συγκεντρώσεις σε συστήματα τεχνητών υδροβιοτόπων (Chen κ.ά., 2016b).

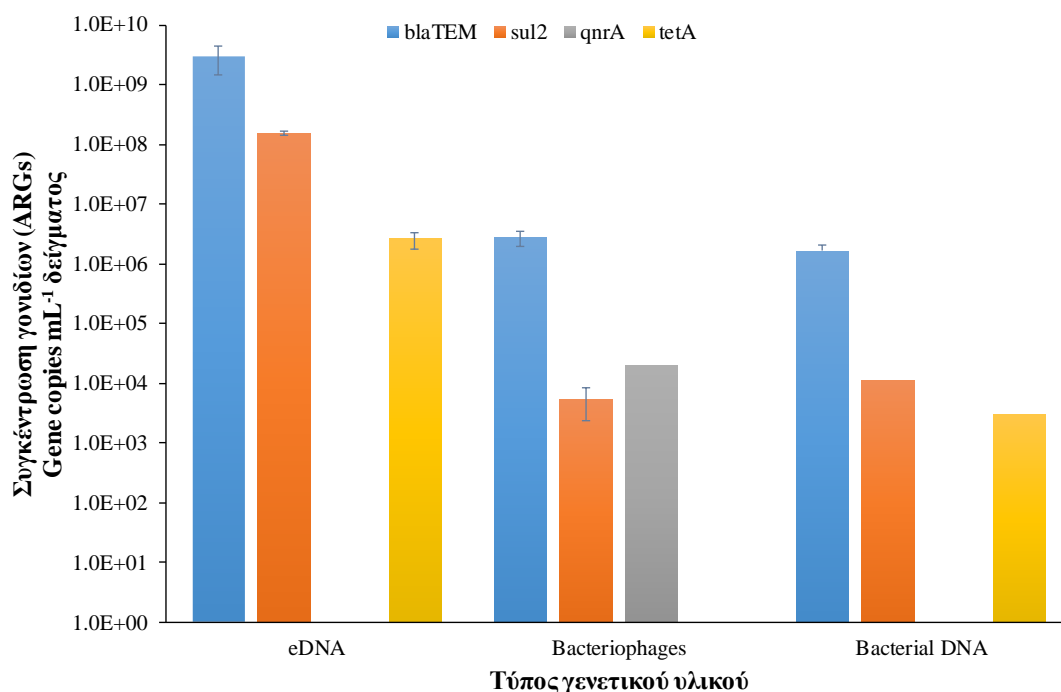


Γράφημα 62. Συγκεντρώσεις γονιδίων ανθεκτικότητας στο ολικό βακτηριακό DNA πριν και μετά την επεξεργασία από το υδροβιότοπο υποεπιφανειακής ροής HSSF.

3.11.1 Ποσοτικοποίηση γονιδίων σε διαφορετικού τύπου γενετικό υλικό

Στη συνέχεια εκτός από το ολικό βακτηριακό γενετικό υλικό, στο πλαίσιο της έρευνας έγινε μια προσπάθεια να ποσοτικοποιηθούν οι συγκεντρώσεις των τεσσάρων ARGs (bla_{TEM}, sul2, qnrA, tetA) και σε άλλου τύπου γενετικό υλικό. Συγκεκριμένα τα ARGs ποσοτικοποιήθηκαν σε ελεύθερο γενετικό υλικό (eDNA) και σε γενετικό

υλικό φάγων. Τα αποτελέσματα από το Γράφημα 63 δείχνουν ότι το γονίδιο qnrA δεν ανιχνεύθηκε ως eDNA και το tetA δεν ανιχνεύθηκε στα κλάσματα φάγων. Συγκρίνοντας τις συγκεντρώσεις, τα γονίδια εμφανίζονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ως eDNA από ότι στους φάγους ή στο DNA που σχετίζεται με βακτήρια. Για το eDNA οι μέσες τιμές για τα bla_{TEM}, sul2 και tetA ήταν 3×10^9 , $1,5 \times 10^8$ και $2,5 \times 10^6$ gc mL⁻¹ αντίστοιχα. Οι συγκεντρώσεις των ARGs από το βακτηριακό DNA ήταν χαμηλότερες κατά 3 Logs για το bla_{TEM}, 4 Logs για το sul2 και 3 Logs για το qnrA σε σχέση με το eDNA. Στο γενετικό υλικό των βακτηριοφάγων, τα bla_{TEM} sul2 και qnrA ποσοτικοποιήθηκαν στα $2,7 \times 10^6$, $5,3 \times 10^3$ και 2×10^4 gc mL⁻¹ αντίστοιχα.



Γράφημα 63. Συγκεντρώσεις γονιδίων ανθεκτικότητας σε ελεύθερο γενετικό υλικό, σε γενετικό υλικό φάγων και ολικό βακτηριακό γενετικό υλικό.

3.12 Συζήτηση αποτελεσμάτων – Αξιολόγηση των υδροβιοτόπου ως προς την απομάκρυνση ARB και ARGs

Βάσει των αποτελεσμάτων φαίνεται ότι η τύχη των ανθεκτικών βακτηρίων και γονιδίων ανθεκτικότητας είναι δύσκολο να εκτιμηθεί καθώς δεν παρουσιάζονται ξεκάθαρα μοτίβα. Η μέση τιμή MIC₆₀ των εξεταζόμενων πληθυσμών μπορεί να αλλάξει τον χαρακτηρισμό των βακτηρίων, από ανθεκτικά σε ευαίσθητα ή αντίστροφα,

καθώς προχωράει η ροή της επεξεργασίας. Επιπλέον, ακόμα και όταν δεν παρατηρήθηκε αλλαγή στο χαρακτηρισμό των βακτηρίων, παρατηρήθηκε μεταβολή στη τιμή της MIC₆₀ είτε προς χαμηλότερες συγκεντρώσεις αντιβιοτικών είτε προς υψηλότερες.

Εστιάζοντας στο υδροβιότοπο υποεπιφανειακής ροής και στη λειτουργία του ως μονάδας δευτεροβάθμιας επεξεργασίας, παρατηρήθηκε μεταβολή της τιμής MIC στους εξεταζόμενους πληθυσμούς από την εκροή του συστήματος. Στις περισσότερες περιπτώσεις οι απομονωμένοι πληθυσμοί τόσο των *E. coli* όσο και των εντεροκόκκων παρουσιάζουν μείωση στην τιμή MIC₆₀. Όμως υπάρχει και περίπτωση όπου ο εξεταζόμενος πληθυσμός από την εκροή του υδροβιότοπου παρουσιάζει αύξηση στην τιμή MIC₆₀ και συγκεκριμένα για τους εντεροκόκκους και το αντιβιοτικό AMOX. Η διακύμανση αυτή στις τιμές MIC μεταξύ εισόδου και εκροής συστήματος υδροβιοτόπων έχει επίσης αναφερθεί στη μελέτη των Russo et al., οι οποίοι αναφέρουν αύξηση στη τιμή MIC των εντεροκόκκων στα αντιβιοτικά rifampicin και sulfomethoxazole και μείωση για το tetracycline (Russo et al., 2019).

Παρόλη την θετική επίδραση του υδροβιότοπου όσον αφορά στην τιμή MIC, τα αποτελέσματα από τη Real - Time PCR για τα γονίδια που εξήχθησαν από τα στελέχη των *E. coli* και των enterococci, έδειξαν ότι υπάρχουν περιπτώσεις όπου οι συγκεντρώσεις των ARGs να παραμένουν σε υψηλές τιμές στην εκροή του υδροβιοτόπου παρουσιάζοντας ακόμα και αύξηση σε ορισμένες περιπτώσεις. Σε γενικές γραμμές τα εξεταζόμενα γονίδια εμφανίζονται πιο συχνά και σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στα στελέχη των εντερόκοκκων. Διαφοροποίηση μεταξύ των δύο τύπων βακτηρίων υπάρχει και στην παρουσία ARGs. Το *sul2* εμφανίστηκε μόνο στο *E. coli* ενώ το *ampC* μόνο στους εντερόκοκκούς. Επιπλέον διαφορές παρατηρήθηκαν και μεταξύ των συγκεντρώσεων στους δύο τύπους βακτηρίων καθώς τα γονίδια που προσφέρουν ανθεκτικότητα στις φλουοροκινολόνες (*qnrA* και *aac6*) εντοπίστηκαν σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στα *E. coli* ενώ το γονίδιο *tetM*, το οποίο σχετίζεται με την ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη, στους εντεροκόκκους.

Οι συγκεντρώσεις των ARGs που παρουσιάζονται στους πληθυσμούς των *E. coli* και εντεροκόκκων δεν μπορούν να συγκριθούν με άλλες μελέτες καθώς δεν υπάρχουν αντίστοιχα πειράματα τουλάχιστον όσον αφορά την ποσοτικοποίηση των ARGs. Οι υψηλές συγκεντρώσεις των *qnrA* και *aac6* που εντοπίστηκαν στο *E. coli* είναι ένα

ανησυχητικό αποτέλεσμα καθώς οι φλουροροκινολόνες αποτελούν νεότερες κλάσεις αντιβιοτικών (Nölvak et al., 2013). Επιπλέον οι ποσότητες των ARGs στους εντεροκόκκους αποτελούν σοβαρό πρόβλημα εξαιτίας της μεγαλύτερης ανθεκτικότητας τους στο περιβάλλον που ευνοεί την παρουσία και ακολούθως την εξάπλωση των ανθεκτικών εντερόκοκκων (Helt et al., 2012).

Συνδυάζονται τα αποτελέσματα από τις τιμές MIC₆₀ και τις ποσότητες γονιδίων στα βακτήρια προκύπτει ότι οι αλλαγές στην τιμή MIC₆₀ για το εκάστοτε αντιβιοτικό δεν συνδέεται απαραίτητα με τις συγκεντρώσεις των αντίστοιχων εξεταζόμενων γονιδίων. Συγκεκριμένα, ενώ τα απομονωμένα στελέχη *E. coli* από τον HSSF και το SF χαρακτηρίζονται ως ανθεκτικά στο SMX, τα γονίδια *sul1* και *sul2* τα οποία προσφέρουν ανθεκτικότητα στις σουλφοναμίδες δεν εντοπίστηκαν, ενώ στα στελέχη από το WWTP όπου η τιμές MIC₆₀ ήταν χαμηλότερη από αυτή στο HSSF εντοπίστηκαν και τα 2 γονίδια. Αντιθέτως ενώ τα γονίδια στις φλουροροκινολόνες είναι τα πιο άφθονα στα στελέχη από τον HSSF, οι τιμές MIC₆₀ παρουσιάζουν μείωση.

Όσον αφορά στους εντεροκόκκους, το *sul1* εντοπίστηκε στα στελέχη από όλα τα σημεία δειγματοληψίας και η τιμή της MIC₆₀ για την SMX παραμένει στα ίδια επίπεδα που τη χαρακτηρίζουν ως ανθεκτικά. Τα γονίδια τα οποία προσφέρουν ανθεκτικότητα στις φλουροροκινολόνες φαίνεται να ακολουθούν τις μεταβολές της τιμής MIC₆₀ για τη CIP. Η ίδια τάση υπάρχει και για τα γονίδια στις β-λακτάμες και παρόλο που η συγκέντρωση για το bla_{TEM} μειώνεται στο αμμόφιλτρο, η αύξηση της τιμής της MIC₆₀ μπορεί να οφείλεται στο γονίδιο *ampC*. Τελικά, η αύξηση της συγκέντρωσης του tetM μετά την επεξεργασία με το HSSF φαίνεται ότι δεν επηρεάζει την τιμή της MIC₆₀ για την τετρακυκλίνη. Ωστόσο πρέπει να σημειωθεί ότι εκτός από τα εξεταζόμενα ARGs υπάρχουν και άλλα γονίδια τα οποία προσφέρουν ανθεκτικότητα στο κάθε εξεταζόμενο αντιβιοτικό.

Λόγω της περίπλοκης αυτής συμπεριφοράς έγινε μια προσπάθεια μοντελοποίησης χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης ώστε να προβλεφθεί ποιά από τις επεξεργασίες θα μπορούσε να αποδώσει καλύτερα ως προς την απομάκρυνση του βακτηριακού πληθυσμού μετά την έκθεση σε αντιβιοτικό, συμπεριλαμβανομένης της επίδρασης της παρουσίας γονιδίων στα βακτήρια. Οι διαφορετικές συμπεριφορές επιβεβαιώνονται και από τα αποτελέσματα των μοντέλων όπου ο υδροβιότοπος υποεπιφανειακής ροής (HSSF) παρουσιάζει τη καλύτερη

πρόβλεψη σχετικά με τη μείωση του εξεταζόμενου πληθυσμού *E. coli* για το αντιβιοτικό CIP ενώ για το TET έδειξε τη δεύτερη καλύτερη πρόβλεψη ταυτόχρονα όμως και την μικρότερη για τα αντιβιοτικά SMX και AMOX. Για τους εντερόκοκκους ο υδροβιότοπος φαίνεται να ανταποκρίνεται καλύτερα δίνοντας καλύτερες τιμές πρόβλεψης για δύο (TET και CIP) από τα τέσσερα αντιβιοτικά. Σε κάθε περίπτωση και για τους δύο τύπου βακτηρίων δε φαίνεται η μείωση του εξεταζόμενου πληθυσμού να σχετίζεται με τη ροή των επεξεργασιών και κατά συνέπεια με τη σύσταση του λύματος. Ακόμα, σημαντικό είναι το γεγονός ότι τα ARGs δεν ακολουθούν κάποιο μοτίβο. Δηλαδή, γονίδια το οποία συνδέονται με την ανθεκτικότητα σε κάποιο αντιβιοτικό, η παρουσία τους δε συνεισφέρει απαραίτητα στην ανθεκτικότητα ως προς αυτό το αντιβιοτικό. Την ίδια στιγμή ARGs τα οποία δε σχετίζονται με το αντιβιοτικό φαίνεται να συνεισφέρουν στην ανθεκτικότητα των βακτηρίων. Τέλος παρατηρήθηκαν περιπτώσεις όπου η παρουσία γονιδίου φαίνεται συμβάλει στη μείωση του πληθυσμού παρουσία αντιβιοτικού.

Η παρουσία των γονιδίων ανθεκτικότητας ως eDNA σε μεγάλες συγκεντρώσεις είναι ένα αξιοσημείωτο αποτέλεσμα και θα μπορούσε να οδηγήσει στον ισχυρισμό ότι ο μηχανισμός της μεταλλαγής ευνοείται στους CW. Αυτό είναι μια αντίθετη τάση σε σχέση με την ενεργό ιλύ όπου τα γονίδια ανθεκτικότητας βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στο βακτηριακό DNA (Zhang et al., 2018). Οι υψηλές συγκεντρώσεις eDNA θα μπορούσαν να προκύψουν από τη λύση των βακτηρίων, από τα νεκρά βακτηριακά κύτταρα (debris) και από τη θήρευση που λαμβάνουν χώρα στους υδροβιότοπους. Ωστόσο, ο μηχανισμός της μεταλλαγής (transformation) είναι μια διαδικασία που απαιτεί ορισμένες προϋποθέσεις για να εφαρμοστεί και δεν είναι όλα τα βακτήρια ικανά να την πραγματοποιήσουν. Για παράδειγμα το *E. coli* θεωρείται ότι δεν είναι ικανό να λαμβάνει eDNA υπό κανονικές συνθήκες στα φυσικά περιβάλλοντα. Παρόλα αυτά όταν υπάρχουν οι κατάλληλες συνθήκες είναι πιθανόν να λάβουν eDNA. Αυτές οι συνθήκες περιλαμβάνουν την παρουσία πλασμιδίων, Ca^{2+} Mg^{2+} και ευαισθησία στην DNase (Hasegawa et al., 2018). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης μια γενίκευση θα μπορούσε να ήταν ότι ο μηχανισμός της μεταλλαγής δεν βρήκε εφαρμογή στο *E. coli* για το bla_{TEM} και το sul2 καθώς παρόλο που αυτά τα γονίδια ήταν σε αφθονία ως eDNA δεν ποσοτικοποιήθηκαν στα στελέχη των *E. coli* από την εκροή του HSSF.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα από τον τεχνητό υδροβιότοπο υποεπιφανειακής ροής με ένα τυπικό σύστημα ενεργού ιλύος φαίνεται ότι ο υδροβιότοπος, λειτουργώντας ως σύστημα δευτεροβάθμιας επεξεργασίας θα μπορούσε να δώσει αξιόλογα αποτελέσματα. Για παράδειγμα η μελέτη των Colaro – Cáceres et al. έδειξε συγκέντρωση 6 Logs για το bla_{TEM} και 5 Logs για το qnrA στο ολικό βακτηριακό DNA του λύματος στην έξοδο της αερόβιας ενεργού ιλύς σημειώνοντας μάλιστα αύξηση σε σχέση με το προηγούμενο στάδιο και για τα 2 αυτά γονίδια. Στην ίδια μελέτη οι συγκεντρώσεις των γονιδίων bla_{TEM} και qnrA στο γενετικό υλικό των φάγων ήταν στα ίδια επίπεδα με αυτά του υδροβιότοπου (Calero-Cáceres et al., 2014). Αυτό υποστηρίζεται και από τους Zhang et al. οι οποίοι αναφέρουν αύξηση των ARGs κατά την επεξεργασία με ενεργό ιλύ αναφέροντας επίσης ότι η αύξηση είναι μεγαλύτερη κατά τις αερόβιες διαδικασίες (Zhang et al., 2015).

Η παρουσία συγκεντρώσεων eDNA στις εκροές οι οποίες καταλήγουν σε υδάτινους αποδέκτες θα μπορούσαν να δημιουργήσουν μελλοντικούς κινδύνους. Το eDNA έχει βρεθεί σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στα ιζήματα της λεκάνης ποταμών από ότι το ενδοκυτταρικό DNA. Έτσι μαζί με την ικανότητα των βακτηρίων να αφομοιώσουν το eDNA αυξάνεται ο κίνδυνος δημιουργίας νέων ανθεκτικών βακτηρίων (Mao et al., 2014). Σε αυτό συμβάλλουν και οι συνθήκες που επικρατούν σε τέτοιου είδους περιβάλλοντα. Ο μετασχηματισμός μπορεί να υποβοηθείται από τη σταθεροποίηση του ελεύθερου eDNA μέσω προσρόφησης σε σωματίδια άμμου ή αργίλου, βελτιώνοντας την ανθεκτικότητα του στην DNase και επιτρέποντας στο DNA να παραμείνει ικανό ως προς μετασχηματισμό για εβδομάδες έως μήνες (Sanderson et al., 2016).

Τέλος, η ποσοτικοποίηση των ARGs στο γενετικό υλικό των φάγων που απομονώθηκαν από το λύμα έδειξε ότι μεταξύ των εξεταζόμενων γονιδίων το bla_{TEM} μετρήθηκε στη μεγαλύτερη συγκέντρωση σε σχέση με τα sul2 και qnrA. Το γονίδιο bla_{TEM} και γενικότερα τα γονίδια που προσφέρουν ανθεκτικότητα στις β – λακτάμες (bla_{SHV}, bla_{ndm}, bla_{OXA-2}) έχουν ποσοτικοποιηθεί σε γενετικό υλικό φάγων είτε σε δείγματα λυμάτων είτε σε δείγματα από υδάτινους αποδέκτες (Anand et al., 2016; Lekunberri et al., 2017; Marti et al., 2014). Η απουσία tetA στο γενετικό υλικό φάγων είναι σε αντίθεση με άλλη μελέτη, στην οποία εντοπίστηκε το συγκεκριμένο γονίδιο ενώ δεν εντοπίστηκαν άλλα γονίδια που προσφέρουν ανθεκτικότητα στις τετρακυκλίνες όπως τα tetO, tetB, tetG και tetM (Anand et al., 2016; Colomer-Iluch et al., 2014). Όσο αφορά στο γονίδιο qnrA, έχει επίσης αναφερθεί η έντονη παρουσία

του στο γενετικό υλικό των φάγων σε δείγματα λυμάτων όπως και του γονιδίου *qnrS*, το οποίο επίσης προσφέρει ανθεκτικότητα στις κινολόνες (Colomer-Iluch et al., 2014)(Lekunberri et al., 2017). Εδώ αξίζει να σημειωθεί το γεγονός ότι το γονίδιο ανθεκτικότητας *qnrA*, το οποίο ανιχνεύθηκε στα στελέχη *E. coli* και εντεροκόκκων εντοπίστηκε μόνο στο γενετικό υλικό των φάγων και όχι στα άλλα είδη γενετικού υλικού (eDNA και ολικό βακτηριακό DNA). Αυτό θα μπορούσε να δείχνει μια σύνδεση των φάγων και της μεταφοράς του γονιδίου *qnrA* στα βακτήρια. Οι φάγοι θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ως τα σωματίδια μεταγωγής των *qnr* γονιδίων στα βακτήρια, όντας υπεύθυνοι για την αύξηση της διασποράς των ARGs και τη δημιουργία νέων ανθεκτικών βακτηρίων (Colomer-Iluch et al., 2014).

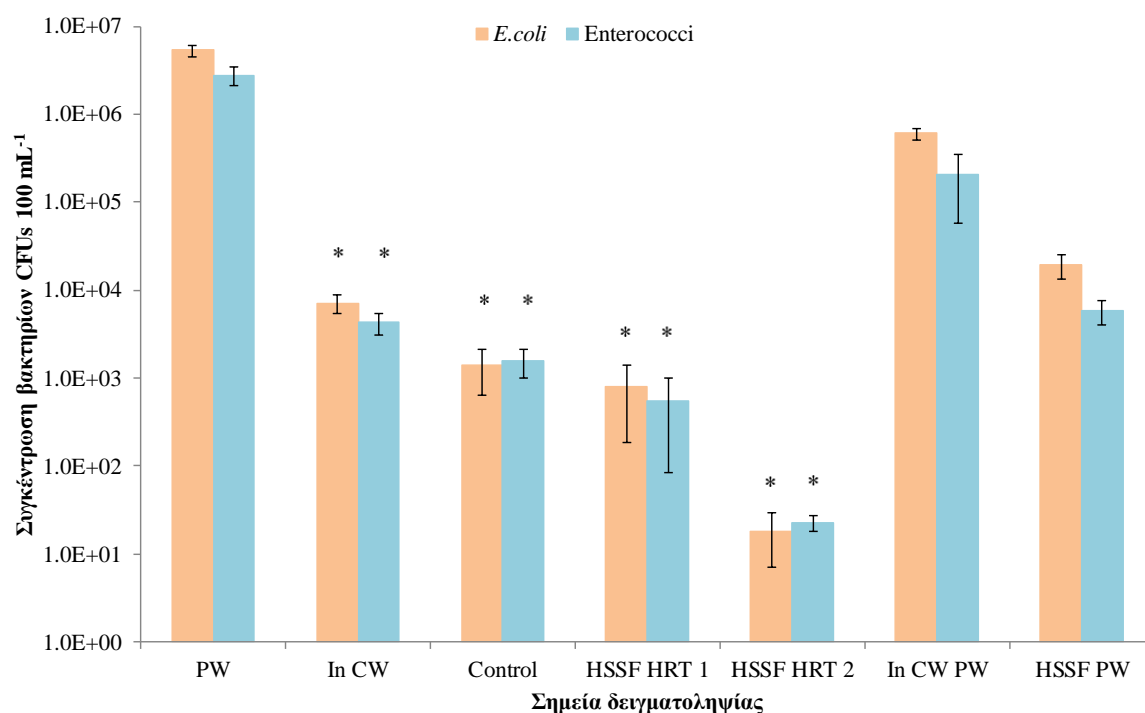
3.13 Αποτελέσματα – Υδροβιότοποι (Control – HSSF HRT1D- HSSF2D) ως συστήματα τριτοβάθμιας επεξεργασίας για την απομάκρυνση παθογόνων

3.13.1 Απομάκρυνση βακτηριακών δεικτών κοπρανώδους μόλυνσης Βακτηριακή ανάλυση

Αρχικά οι υδροβιότοποι εξετάστηκαν ως προς την ικανότητα του να απομακρύνει τους δύο βακτηριακούς δείκτες (*E. coli*, εντερόκοκκοι) λειτουργώντας ως σύστημα τριτοβάθμιας επεξεργασίας. Σε πρώτη φάση εξετάστηκαν οι εκροές του υδροβιότοπου με υδραυλικό χρόνο παραμονής 1 ημέρα (HSSF HRT 1) και του υδροβιότοπου χωρίς βλάστηση (Control). Τα αποτελέσματα από το Γράφημα 64 έδειξαν ότι ο υδροβιότοπος επιτυγχάνει μείωση 0,95 και 0,89 Logs για *E. coli* και εντερόκοκκους αντίστοιχα και οι συγκεντρώσεις στις εκροές ήταν $7,91 \times 10^2$ CFUs 100 mL⁻¹ για τα *E. coli* και $5,49 \times 10^2$ CFUs 100mL⁻¹ για τους εντερόκοκκους. Ο Control υδροβιότοπος επιτυγχάνει μικρότερη μείωση της τάξης των 0,7 και 0,43 Logs για *E. coli* και εντερόκοκκους αντίστοιχα.

Στη συνέχεια άλλαξε ο υδραυλικός χρόνος παραμονής του υδροβιότοπου και ρυθμίστηκε στις 2 ημέρες (HSSF HRT 2). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο υδροβιότοπος κατά τη λειτουργία του με HRT 2 επιτυγχάνει μείωση 2,58 και 2,27 Logs unit για *E. coli* και εντερόκοκκους αντίστοιχα και οι τελικές συγκεντρώσεις στην εκροή ήταν $1,83 \times 10$ CFUs 100mL⁻¹ για το *E. coli* και $2,28 \times 10$ CFUs 100mL⁻¹ για τους

εντερόκοκκους. Η στατιστική ανάλυση έδειξε οι διαφορές εισόδου και εξόδου ήταν στατιστικά σημαντικές σε κάθε περίπτωση και για τους δύο βακτηριακούς δείκτες.



Γράφημα 64. Συγκεντρώσεις βακτηριακών δεικτών στις εκροές των επεξεργασιών. Οι τιμές είναι σε μέσους όρους με το στατιστικό σφάλμα. Με * παρουσιάζονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$).

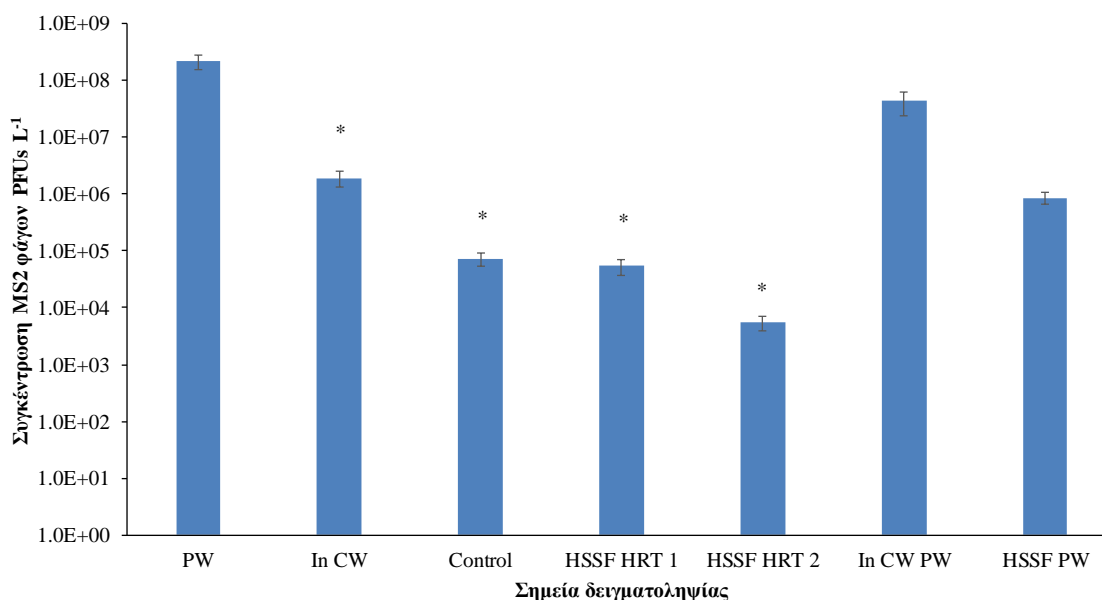
Τέλος μια σειρά πειραμάτων περιελάμβανε την τροφοδοσία του υδροβιότοπου με λύμα από την εκροή της πρωτοβάθμιας επεξεργασίας (HSSF PW). Σε αυτή την περίπτωση ο υδροβιότοπος παρουσίασε μείωση 1,49 και 1,54 Logs για τα *E.coli* και τους εντερόκοκκους αντίστοιχα.

3.13.2 Βακτηριοφάγοι

Ακολούθως, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των αναλύσεων για τους βακτηριοφάγους MS2. Τα αποτελέσματα από το Γράφημα 65 δείχνουν ότι οι φάγοι εντοπίστηκαν στις εκροές όλων των επεξεργασιών.

Στο πρωτοβάθμιο λύμα η συγκέντρωση των φάγων ήταν 10^8 PFUs L^{-1} και μετά τη δευτερογενή επεξεργασία (In CW) οι MS2 φάγοι μειώθηκαν κατά 2 Logs. Στην συνέχεια ο υδροβιότοπος χωρίς βλάστηση (Control) επιτυγχάνει μείωση 1,42 Logs ενώ ο υδροβιότοπος με βλάστηση και HRT 1 αποδίδει ελαφρώς καλύτερα επιτυγχάνοντας μείωση 1,54 Logs. Ο υδροβιότοπος με HRT 2d πετυχαίνει ακόμα μεγαλύτερη μείωση 2,45 Logs. Σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι οι διαφορές είναι στατιστικά σημαντικές. Η μείωση η οποία πετυχαίνει ο υδροβιότοπος είναι σε συμφωνία με τη μελέτη των Gonzales-Gustavson et al που αναφέρει ότι τα συστήματα τεχνητών υδροβιοτόπων μπορούν να πετυχαίνουν μείωση 2 Logs στους MS2 κολιφάγους (Gonzales-Gustavson et al., 2019). Τέλος ο υδροβιότοπος δεχόμενος πρωτοβάθμιο λύμα (HSSF PW) πέτυχε μείωση 1,7 Logs η οποία είναι πολύ κοντά στην απόδοση της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας.

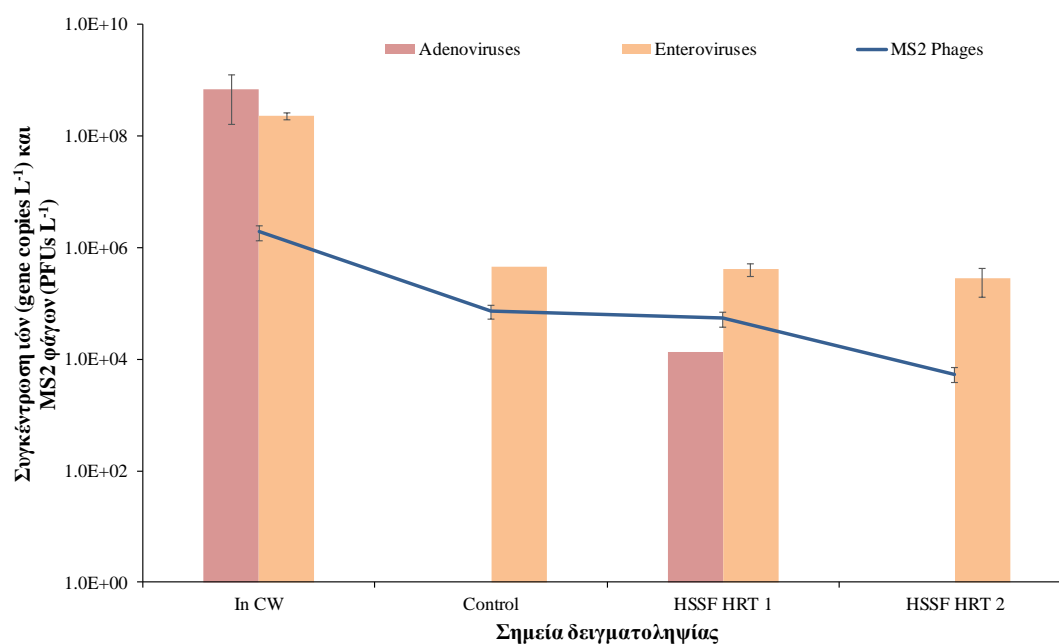
Τέλος, από την στατιστική ανάλυση δεν προέκυψε γραμμική συσχέτιση μεταξύ των συγκεντρώσεων εισόδου και εξόδου σε καμία από τις επεξεργασίες. Αυτό συνεπάγεται ότι μεγαλύτερη συγκέντρωση στην εισροή δε σημαίνει μεγαλύτερη συγκέντρωση στην εκροή του συστήματος.



Γράφημα 65. Συγκέντρωση MS2 βακτηριοφάγων στις εκροές των επεξεργασιών. Οι τιμές είναι σε μέσους όρους με το στατιστικό σφάλμα. Με * παρουσιάζονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$).

3.13.3 Αδρανοποίηση Ιών

Όσον αφορά στους ιούς (Γράφημα 66) μια πρώτη παρατήρηση είναι ότι και οι δύο τύποι ιών (αδενοϊοί και εντεροϊοί) παρουσιάζονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στο δευτεροβάθμιο λύμα (In CW), με τους αδενοϊούς να παρουσιάζονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από τους εντεροϊούς. Η μείωση που επιτυγχάνεται από τον υδροβιότοπο χωρίς βλάστηση (Control) είναι 2,7 Logs για τους EV ενώ οι AdV δεν εντοπίστηκαν. Την ίδια στιγμή ο υδροβιότοπος με βλάστηση πετυχαίνει μείωση 4,72 Logs για τους AdV και 2,75 Logs για τους EV. Στη συνέχεια κατά τη λειτουργία του υδροβιοτόπου με HRT 2 d η απομάκρυνση ήταν λίγο μεγαλύτερη από αυτή του HRT 1 d επιτυγχάνοντας μείωση 2,91 Logs ενώ οι αδενοϊοί δεν εντοπίστηκαν. Γενικά οι EVs είχαν σταθερότερη παρουσία αφού εντοπίστηκαν σε όλα τα δείγματα ενώ αντίθετα οι AdV εντοπίστηκαν μόλις στο 25% των δειγμάτων. Συγκρίνοντας τις συγκεντρώσεις των MS2 φάγων μαζί με τις συγκεντρώσεις των ιών παρατηρήθηκε ότι, η συγκέντρωση των βακτηριοφάγων στην έξοδο του υδροβιότοπου HRT1 ήταν μεγαλύτερη μόνο από αυτήν των αδενοϊών.



Γράφημα 66. Συγκέντρώσεις ιών και φάγων στα σημεία δειγματοληψίας. Οι τιμές παρουσιάζονται σε μέσους όρους με το στατιστικό σφάλμα.

3.14 Συζήτηση αποτελεσμάτων - Αξιολόγηση υδροβιοτόπου ως συστήματος τριτοβάθμιας επεξεργασίας για την απομάκρυνση μικροοργανισμών

Από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι οι τεχνητοί υδροβιότοποι θα μπορούσαν να προσφέρουν μια αξιόπιστη λύση στην τριτογενή επεξεργασία των αποβλήτων. Ο υδροβιότοπος πετυχαίνει απομάκρυνση των βακτηριακών δεικτών σε ποσοστό μεγαλύτερο του 99%. Το παραπάνω αποτέλεσμα επιτυγχάνεται κατά τη λειτουργία του CW με HRT 2 ημέρες κάτι το οποίο επιβεβαιώνει ότι ο υδραυλικός χρόνος παραμονής αποτελεί σημαντικό παράγοντά στην λειτουργία των τεχνητών υδροβιοτόπων. Όπως συζητείται και στην προηγούμενη ενότητα, ο μεγαλύτερος χρόνος παραμονής δίνει περισσότερο χρόνο στους μικροοργανισμούς ακόμα και σε αυτούς με μικρές ταχύτητες καθίζησης να προσκολληθούν στο υπόστρωμα ή στις ρίζες των φυτών. Επίσης δίνει περισσότερο χρόνο στις διάφορες φυσικές, χημικές και βιολογικές επεξεργασίες που λαμβάνουν χώρα στους υδροβιοτόπους ως μηχανισμοί απομάκρυνσης (Alufasi et al., 2017b).

Ακόμα φαίνεται ότι ο η βλάστηση δεν έχει σημαντικό ρόλο στην απομάκρυνση των βακτηριακών δεικτών όταν συνδυάζεται με μικρό υδραυλικό χρόνο παραμονής καθώς οι διαφορές μεταξύ του υδροβιότοπου με βλάστηση και του control είναι μικρές.

Τα αποτελέσματα για τους ιούς αρχικά επιβεβαιώνουν ότι τόσο οι AdV όσο και οι EV συναντώνται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στην εκροή της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας (In CW) όπως περιγράφεται και στην παραπάνω ενότητα. Ο υδροβιότοπος λειτουργώντας ως σύστημα τριτοβάθμιας επεξεργασίας δείχνει να είναι αποδοτικός και απέναντι στους ιούς καθώς καταφέρει μεγάλη απομάκρυνση και για τους δύο τύπους ιών. Συγκεκριμένα ο CW παρουσιάστηκε αποδοτικότερος απέναντι στους αδενοϊούς με τον υδραυλικό χρόνο παραμονής να φαίνεται να έχει και πάλι το σημαντικότερο ρόλο.

Συγκρινόμενος με τα συμβατικά συστήματα τριτοβάθμιας επεξεργασίας αποβλήτων όπως η χλωρίωση και απολύμανση με UV ακτινοβολία, ο υδροβιότοπος ως σύστημα τριτοβάθμιας επεξεργασίας έδωσε αξιολόγα αποτελέσματα. Για παράδειγμα σύστημα χλωρίωσης επιτυγχάνει απομάκρυνση 0.11 Logs και 0.12 Logs για αδενοϊούς και εντεροϊούς αντίστοιχα (Hata et al., 2013). Τα παραπάνω οδηγούν στο συμπέρασμα ότι

το σύστημα θα μπορούσε να συνεισφέρει στην απομάκρυνση ιών αποφεύγοντας τις επιβλαβείς επιπτώσεις της χλωρίωσης.

Η απομάκρυνση των MS2 φάγων είναι επίσης μεγαλύτερη στην εκροή του υδροβιότοπου με HRT 2 d ενώ η απόδοση του CW με βλάστηση και του control δεν έχουν μεγάλες διαφορές. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε αντίθεση με μελέτη η οποία αναφέρει ότι η απομάκρυνση των MS2 στους υδροβιότοπους εξαρτάται κυρίως από την βλάστηση αναφέροντας μεγάλη διαφορά μεταξύ υδροβιότοπων με βλάστηση και χωρίς βλάστηση (Nokes et al., 2003). Επίσης άλλη μελέτη αναφέρει ότι το φιλτράρισμα και οι προσρόφηση των φάγων στις ρίζες των φυτών έχουν σημαντικό ρόλο στην απομάκρυνση των φάγων (Amarasiri et al., 2017; Weber and Legge, 2008). Οι μείωση των φάγων από τον CW με HRT 2 είναι σε συμφωνία με μελέτες που αναφέρουν ότι οι τεχνητοί υδροβιότοποι με HRT 3-10 ημέρες μπορούν να επιτύχουν μείωση πάνω από 90% (Rachmadi et al., 2016). Από τα παραπάνω προκύπτει ότι ο υδραυλικός χρόνος παραμονής φαίνεται να έχει μεγαλύτερο ρόλο στην απομάκρυνση των MS2 φάγων από ότι η βλάστηση

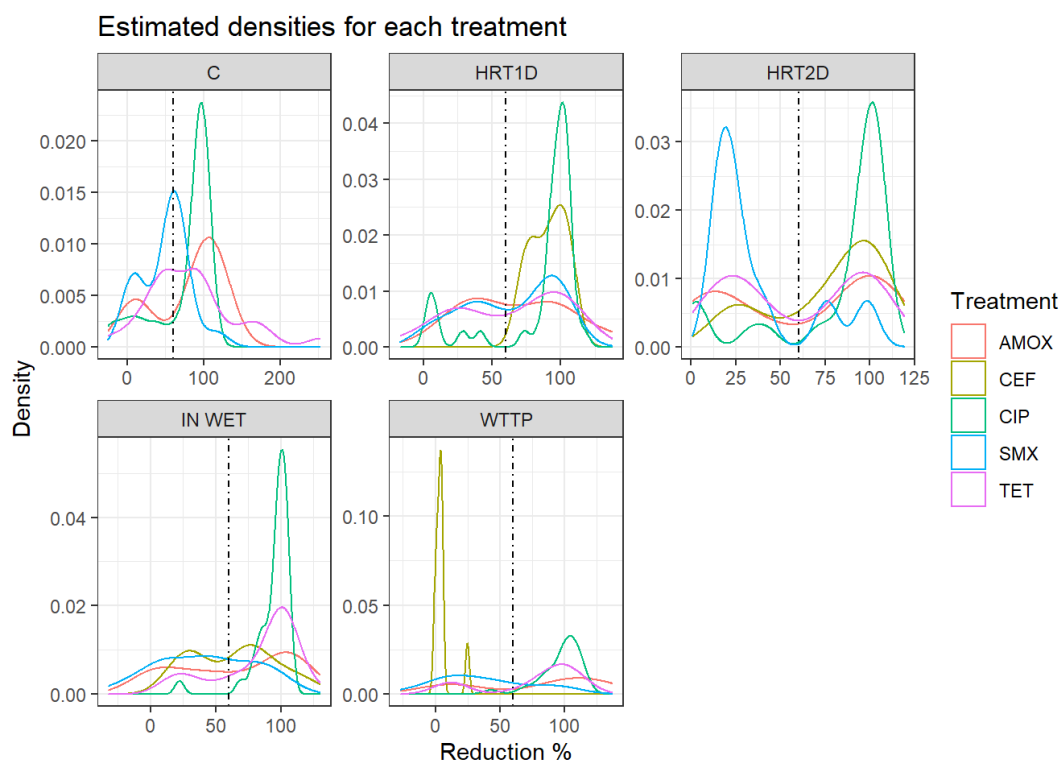
Εξετάζοντας την ικανότητα των MS2 φάγων να προβλέψουν την παρουσία των ιών, αυτό θα μπορούσε και πάλι να έχει ισχύ για την περίπτωση των αδενοϊών όπως φάνηκε και στην παραπάνω ενότητα. Η μείωση των MS2 φάγων ήταν μικρότερη από τη μείωση των AdV και η συγκέντρωση των φάγων στην εκροή του CW ήταν μεγαλύτερη από αυτή των ιών.

3.15 Αποτελέσματα - Έλεγχος ανθεκτικότητας των απομονωμένων βακτηριακών δεικτών σε αντιβιοτικά και έλεγχος ARGs

3.15.1 Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (Minimum Inhibitory Concentration – MIC)

Ομοίως με το προηγούμενο κεφάλαιο, αρχικά δημιουργήθηκαν τα διαγράμματα πυκνοτήτων ώστε να είναι εφικτή μια πρώτη σύγκριση των αποτελεσμάτων. Στο Γράφημα 67 παρουσιάζονται τα διαγράμματα πυκνοτήτων με τις καμπύλες των αντιβιοτικών ανά μονάδα επεξεργασίας για το βακτήριο *E.coli*. Όπως φαίνεται υπάρχουν περιπτώσεις, όπου οι καμπύλες διαφοροποιούνται μεταξύ τους όπως στις περιπτώσεις C και HRT 1D, ενώ στις περιπτώσεις HRT 2D, In Wet και WTTP

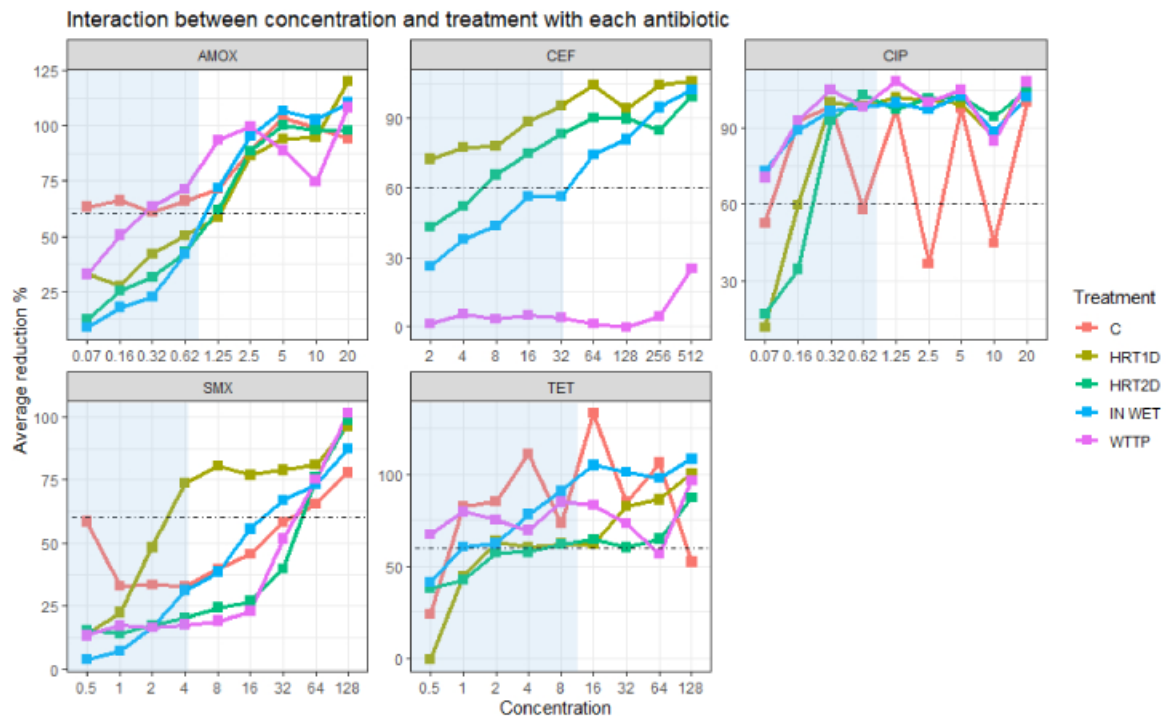
παρουσιάζεται ομοιομορφία. Επικεντρώνοντας στο σημείο όπου τέμνουν οι καμπύλες των αντιβιοτικών τη διακεκομμένη γραμμή φαίνεται ότι στο σημείο αυτό 3 από τις 5 καμπύλες του HRT 1d αντιστοιχούν σε υψηλότερες τιμές πυκνοτήτων σε σχέση με τις άλλες επεξεργασίες. Συγκριτικά υψηλές τιμές πυκνοτήτων δίνουν και οι καμπύλες, οι οποίες αντιστοιχούν στο In Wet.



Γράφημα 67. Density plots της μείωσης % του πληθυσμού *E. coli* μετά την έκθεση σε αντιβιοτικά ανά μονάδα επεξεργασίας. Η διακεκομμένη γραμμή δείχνει το σημείο που η μείωση του πληθυσμού είναι 60%.

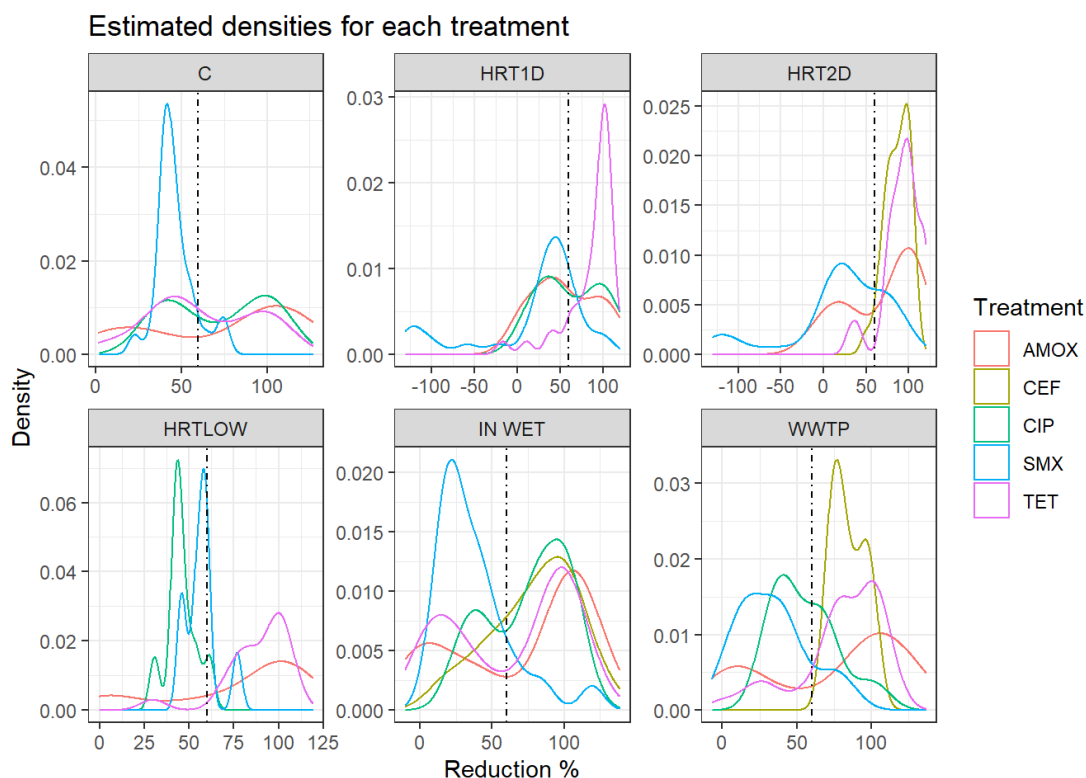
Στο Γράφημα 68 φαίνονται οι μέσες τιμές μείωσης % του πληθυσμού των *E. coli* για κάθε συγκέντρωση αντιβιοτικού. Στο πρώτο γράφημα για το AMOX φαίνεται ότι οι γραμμές που αντιστοιχούν στους υδροβιότοπους είναι εκτός των ορίων ευαισθησίας. Αντίθετα για το Cefaclor οι γραμμές που αντιστοιχούν στους υδροβιότοπους αλλά και στο In Wet είναι εντός των ορίων. Για το CIP όλες οι γραμμές είναι εντός ορίων ευαισθησίας, ενώ η μορφή της γραμμής για το C οφείλεται σε σφάλμα της μεθόδου. Για το SMX μόνο η γραμμή που αντιστοιχεί στον υδροβιότοπο με HRT 1d είναι εντός

των ορίων ευαισθησίας, ενώ για το TET όλες οι γραμμές είναι εντός με το αποτέλεσμα για του υδροβιοτόπους να είναι οριακό.



Γράφημα 68. Μέσες τιμές της μείωσης % του πληθυσμού των στελεχών *E. coli* από τις εκροές των μονάδων επεξεργασίας για κάθε συγκέντρωση αντιβιοτικού. Η διακεκομμένη γραμμή δείχνει το σημείο μείωσης 60% του βακτηριακού πληθυσμού και η γαλάζια σκιαγραφημένη περιοχή τις τιμές όπου η συγκέντρωση χαρακτηρίζει το βακτήριο ως ευαίσθητο.

Στο Γράφημα 69 ακολουθούν τα αντίστοιχα διαγράμματα πυκνοτήτων για τους εντεροκόκκους. Και σε αυτή την περίπτωση παρατηρούνται ανομοιομορφίες μεταξύ των καμπυλών των αντιβιοτικών για την ίδια μέθοδο επεξεργασίας, ενώ διαφορετικός είναι και ο σχηματισμός των καμπυλών μεταξύ των μεθόδων επεξεργασίας. Εστιάζοντας στο σημείο ενδιαφέροντος, όπου παρατηρείται μείωση του πληθυσμού κατά 60% (διακεκομμένη γραμμή), φαίνεται ότι ο υδροβιότοπος με HRT 1 d



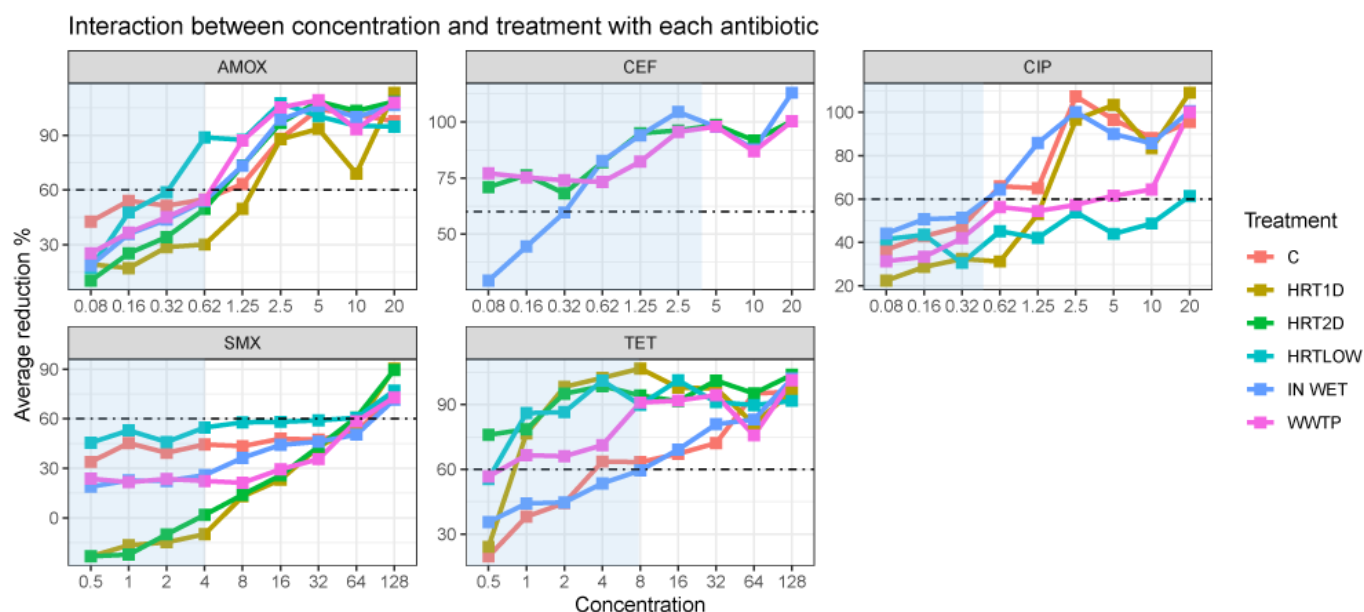
Γράφημα 69. Density plot της μείωσης του πληθυσμού εντερόκοκκων μετά από έκθεση στα αντιβιοτικά και ανά μονάδα επεξεργασίας. Η διακεκομμένη γραμμή δείχνει το σημείο που η μείωση του πληθυσμού είναι 60%.

συγκεντρώνει τις περισσότερες καμπύλες (4 από τις 5) σε καλύτερες τιμές πυκνότητας σε σχέση με τις άλλες επεξεργασίες.

Στο Γράφημα 70 παρουσιάζονται οι μέσες τιμές μείωσης του πληθυσμού για κάθε συγκέντρωση αντιβιοτικού για κάθε μέθοδο επεξεργασίας. Όπως φαίνεται από την ανάλυση υπάρχουν περιπτώσεις στις οποίες οι καμπύλες ακολουθούν ένα μοτίβο αλλά με διαφοροποίηση στο τελικό αποτελέσματα όσον αφορά στην ανθεκτικότητα. Στην περίπτωση του αντιβιοτικού AMOX οι καμπύλες φαίνεται να έχουν σχεδόν την ίδια μορφή όμως μόνο για τις επεξεργασίες C και ο WWTP να βρίσκονται εντός των ορίων ευαισθησίας. Για το CEF και πάλι υπάρχει ένα παρόμοιο σχήμα, εκτός από το και όλες οι καμπύλες βρίσκονται στα όρια της ευαισθησίας. Για το CIP παρατηρείται μια διαφοροποίηση μεταξύ των γραμμών με όλες όμως να είναι εκτός των ορίων ευαισθησίας. Για το SMX όλες οι γραμμές είναι εκτός των ορίων ευαισθησίας. Τέλος, για το TET οι γραμμές για τις επεξεργασίες HRT1D, HRT2D και WWTP βρίσκονται

εντός των ορίων ευαισθησίας ενώ τα C και In Wet βρίσκονται στο όριο να χαρακτηριστούν ως ανθεκτικά.

Στη συνέχεια στον Πίνακα 18 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα σχετικά τις απόλυτες τιμές της ελάχιστης ανασταλτική συγκέντρωσης (MIC_{60}) για τα βακτήρια *E. coli* και enterococci στα διαφορετικά αντιβιοτικά. Οι μέσες τιμές MIC_{60} έδειξαν ανθεκτικότητα στο SMX και για τους δύο τύπους βακτηρίων στην έξοδο της πρωτοβάθμιας επεξεργασίας. Η ανθεκτικότητα στην SMX θα μπορούσε να αποδοθεί στην αποκτηθείσα ανθεκτικότητα όσο τα βακτήρια βρίσκονται ακόμα μέσα στον οργανισμό. Γενικά, τα βακτήρια ενδέχεται να αναπτύξουν ανθεκτικότητα στην πορεία προς το WWTP. Στη συνέχεια παρατηρήθηκε ότι και οι δύο τύποι βακτηρίων παρουσίασαν αύξηση της τιμής MIC_{60} σε 2 από τα αντιβιοτικά στα δείγματα από την εκροή της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας. Για τα *E. coli* παρουσιάστηκε αύξηση στα AMOX και TET ενώ για τους εντερόκοκκους στα TET και CEF.



Γράφημα 70. Μέσες τιμές της μείωσης του πληθυσμού των στελεχών εντεροκόκκων από την εκροές των μονάδων επεξεργασίας για κάθε συγκέντρωση αντιβιοτικού. Η διακεκομμένη γραμμή δείχνει το σημείο μείωσης 60% και η γαλάζια περιοχή τις τιμές όπου η συγκέντρωση χαρακτηρίζει το βακτήριο ως ευαίσθητο.

Εστιάζοντας στους CW, οι μέσες τιμές MIC_{60} που αναφέρονται στα στελέχη *E. coli* από την εκροή του υδροβιότοπου με βλάστηση και HRT1 ήταν εντός των καθορισμένων ορίων ανθεκτικότητας. Συγκεκριμένα, κατά την επεξεργασία μειώθηκε η τιμή MIC_{60} για το SMX αλλάζοντας τον χαρακτηρισμό από ανθεκτικό σε ευαίσθητο, για την CIP αυξήθηκε η MIC_{60} χωρίς όμως να αλλάξει ο χαρακτηρισμός ενώ το ίδιο παρατηρήθηκε και για την AMOX. Για τους εντερόκοκκους οι τιμές έδειξαν αύξηση

στην τιμή MIC₆₀ για την CIP και AMOX και μείωση για το TET χωρίς όμως να αλλάξει ο χαρακτηρισμός σε κάποια από τις περιπτώσεις. Ο υδροβιότοπος χωρίς βλάστηση (Control) έδειξε για τα στελέχη *E. coli* αύξηση της τιμής MIC₆₀ στο SMX και στο CIP και μείωση στο TET. Για τους εντερόκοκκους παρατηρήθηκε μείωση της τιμής στην περίπτωση του TET ενώ οι υπόλοιπες τιμές παρέμειναν ίδιες.

Πίνακας 18. Μέσες τιμές για την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση MIC₆₀ ανά βακτήριο και αντιβιοτικό. Η τιμές είναι σε (mg mL⁻¹) S: ευαίσθητο στο αντιβιοτικό, R: ανθεκτικό στο αντιβιοτικό

Βακτήρια	Αντιβιοτικό	In WWTP	In WET	Control out	HSSF hrt1	HSSF-Low Conc. hrt 2	HSSF High Con HRT 1	HSSF HRT2
<i>E. coli</i>	SMX	32 ^R	16 ^R	32 ^R	2 ^S	2 ^S	0.5 ^S	32 ^R
	CIP	0.08 ^S	0.04 ^S	0.08 ^S	0.08 ^S	0.08 ^S	0.04 ^S	0.15 ^S
	AMOX	0.16 ^S	0.63 ^S	0.63 ^S	1.25 ^S	0.315 ^S	0.08 ^S	1.25 ^S
	TET		1 ^S	0.5 ^S	1 ^S	0.5 ^S	0.5 ^S	16 ^R
	CEF	512 ^R	32 ^R					4 ^S
Enterococci	SMX	64 ^R	64 ^R	64 ^R	64 ^R	64 ^R	64 ^R	64 ^R
	CIP	2.5 ^S	0.32 ^S	0.32 ^S	1.25 ^S	10 ^R	0.08 ^S	0.63 ^S
	Amox	0.625 ^S	0.625 ^S	0.625 ^S	1.25 ^S	0.078 ^S	0.078 ^S	0.625 ^S
	TET	0.5 ^S	8 ^R	2 ^S	0.5 ^S	0.5 ^S		Low c
	CEF	Low c	8 ^R					Low c

Κατά τη λειτουργία του ο CW με υδραυλικό χρόνο παραμονής 1 ημέρα και προσθήκη υψηλών συγκεντρώσεων των αντιβιοτικών SMX και CIP έδειξε μείωση της τιμής MIC₆₀ για όλες τις περιπτώσεις εκτός από την SMX στους εντερόκοκκους.

Εξετάζοντας τον CW με HRT 2 παρατηρήθηκε αύξηση της τιμής MIC₆₀ για όλα τα αντιβιοτικά εκτός από το CEF για τα στελέχη των *E. Coli*. Για τους εντερόκοκκους παρατηρήθηκε αύξηση της MIC₆₀ για την CIP και μείωση για τα TET και CEF.

Το διάστημα το οποίο ο υδροβιότοπος λειτούργησε με HRT2 και έγινε προσθήκη των αντιβιοτικών (CIP και SMX) παρατηρήθηκε μείωση της τιμής MIC₆₀ για την SMX,

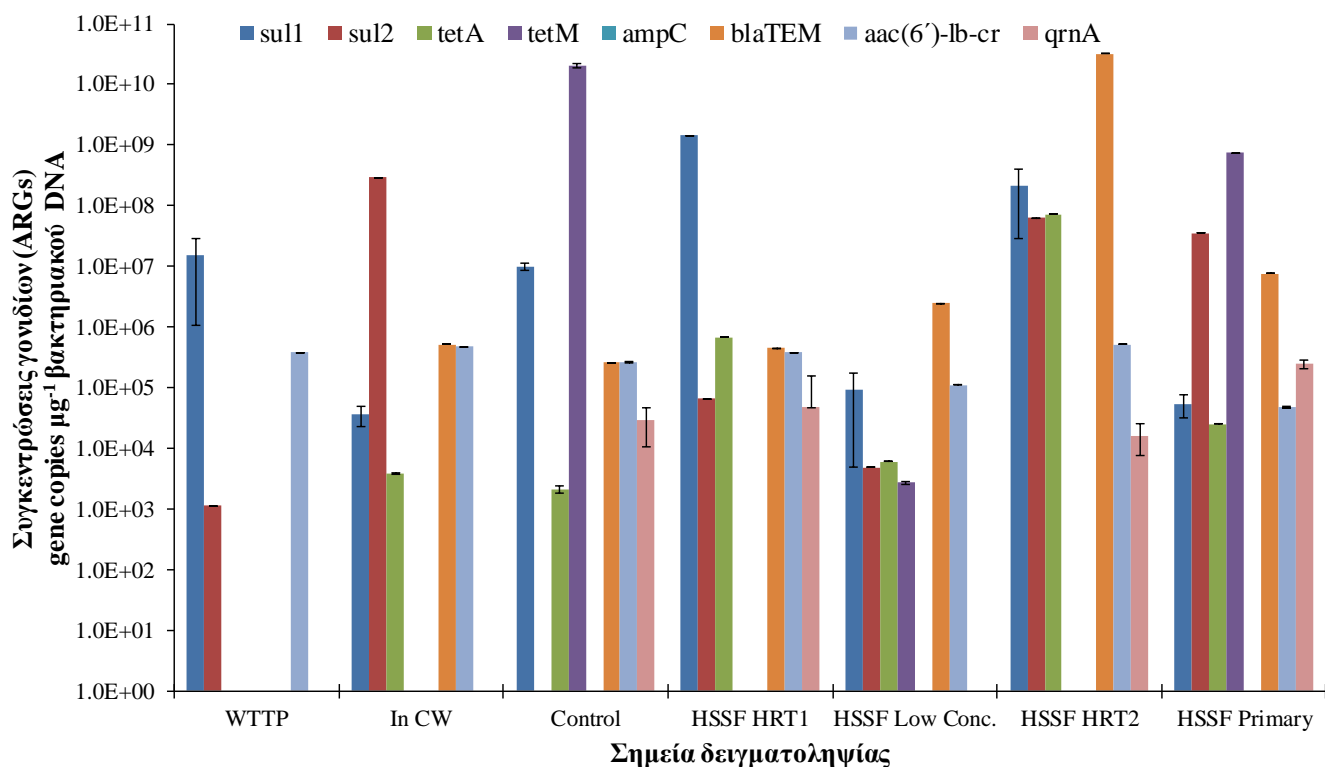
αλλάζοντας το χαρακτηρισμό από ανθεκτικό σε ευαίσθητο, μείωση για τα AMOX και TET χωρίς να αλλάξει ο χαρακτηρισμός, ενώ αυξήθηκε η τιμή για τη CIP για τα στελέχη *E. coli*. Στην περίπτωση των εντερόκοκκων υπήρξε αύξηση στην τιμή MIC₆₀ για την CIP αλλάζοντας το χαρακτηρισμό από ευαίσθητο σε ανθεκτικό ενώ για τα υπόλοιπες περιπτώσεις υπήρξε μείωση εκτός από αυτή για το SMX που έμεινε σταθερή.

3.15.2 Γονίδια ανθεκτικότητας στα απομονωμένα στελέχη βακτηρίων

Κατόπιν, τα ίδια απομονωμένα στελέχη τα οποία αναλύθηκαν για την τιμή MIC₆₀ εξετάστηκαν και για την παρουσία και την ποσότητα των ARGs. Παρατηρώντας τα αποτελέσματα του Γραφήματος 71 για το *E. coli* και σε όρους παρουσίας – απουσίας φαίνεται ότι τα γονίδια ανθεκτικότητας είχαν εντονότερη παρουσία στα στελέχη τα οποία απομονώθηκαν από την έξοδο της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας σε σύγκριση με τα στελέχη που απομονώθηκαν από την έξοδο της πρωτοβάθμιας, ενώ ακόμα περισσότερα γονίδια παρουσιάστηκαν από τα στελέχη που απομονώθηκαν από τις εξόδους των υδροβιότοπων. Συγκεκριμένα 3 από τα εξεταζόμενα γονίδια (*sul1*, *sul2*, *aac(6')-Ib-cr*) εντοπίστηκαν στα στελέχη από την έξοδο της πρωτοβάθμιας επεξεργασίας, 5 (*sul1*, *sul2*, *tetA*, *bla_{TEM}*, *aac(6')-Ib-cr*) στα στελέχη από την έξοδο της δευτεροβάθμιας, 6 στα στελέχη από την έξοδο του Control (*sul1*, *tetA*, *tetM*, *bla_{TEM}*, *aac(6')-Ib-cr*, *qnrA*), 6 στα στελέχη από τον υδροβιότοπο HRT1 (*sul1*, *sul2*, *tetA*, *bla_{TEM}*, *aac(6')-Ib-cr*, *qnrA*), 6 στα στελέχη που απομονώθηκαν από την έξοδο του HRT2 (*sul1*, *sul2*, *tetA*, *bla_{TEM}*, *aac(6')-Ib-cr*, *qnrA*), 6 στα στελέχη από την έξοδο του HRT Low (*sul1*, *sul2*, *tetA*, *tetM*, *bla_{TEM}*, *aac(6')-Ib-cr*,) και 7 στην περίπτωση όπου ο υδροβιότοπος τροφοδοτούνταν με πρωτοβάθμιο λύμα (*sul1*, *sul2*, *tetA*, *tetM*, *bla_{TEM}*, *aac(6')-Ib-cr*, *qnrA*). Τα γονίδια *sul1*, *tetA*, *bla_{TEM}* και *aac(6')-Ib-cr* παρουσιάστηκαν σε όλες τις περιπτώσεις των υδροβιοτόπων ενώ αντίθετα το *ampC* σε καμία.

Εξετάζοντας τις μεταβολές των συγκεντρώσεων των γονιδίων σε κάθε στάδιο παρατηρήθηκαν διαφορετικές συμπεριφορές για κάθε γονίδιο. Η έξοδος της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας έδειξε αυξημένες συγκεντρώσεις για το *sul2* σε σχέση με το προηγούμενο στάδιο, δηλαδή την έξοδο της πρωτοβάθμιας, και μειωμένες για το *sul1* ενώ το *aac(6')-Ib-cr* παρέμεινε στα ίδια επίπεδα. Η έξοδος του Control υδροβιότοπου έδειξε αυξημένη συγκέντρωση για το γονίδιο *sul2* σε σχέση με τη συγκέντρωση που ποσοτικοποιήθηκε στην έξοδο του In CW. Τα υπόλοιπα γονίδια που ποσοτικοποιήθηκαν παρέμειναν στα ίδια επίπεδα. Μετά την επεξεργασία από τον

υδροβιότοπο με βλάστηση και υδραυλικό χρόνο παραμονής 1 ημέρα (HRT1), το *sul1* και το *tetA* παρουσίασαν αύξηση σε σύγκριση με τις συγκεντρώσεις από το In CW ενώ το *sul2* παρουσίασε μείωση. Κατά τη λειτουργία του υδροβιοτόπου με υδραυλικό χρόνο 2 ημέρες, οι συγκεντρώσεις των βακτηρίων εμφανίστηκαν αυξημένες. Το *sul1*, *sul2*, *tetA* και το *bla_{TEM}* εμφανίστηκαν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις σε σύγκριση με την το In CW. Συγκρίνοντας τον υδροβιότοπο χωρίς βλάστηση (Control) με τον υδροβιότοπο με βλάστηση (HSSF HRT1) το *sul1* και το *tetA* ποσοτικοποιήθηκαν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στον CW με τη βλάστηση ενώ τα υπόλοιπα γονίδια παρέμειναν στα ίδια επίπεδα. Συγκρίνοντας τους υδροβιοτόπους με διαφορετικούς χρόνους παραμονής δηλαδή HRT 1 και HRT 2, όλα τα γονίδια παρουσιάστηκαν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στον υδροβιότοπο με υδραυλικό χρόνο παραμονής 2 ημέρες εκτός από τα *sul1* και *qnrA*. Κατά την επιμόλυνση του υδροβιοτόπου με χαμηλές συγκεντρώσεις αντιβιοτικών τα γονίδια παρουσιάστηκαν σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με το In CW εκτός του *bla_{TEM}* το οποία παρουσιάστηκε σε ελαφρώς αυξημένες συγκεντρώσεις. Σε σύγκριση με τη λειτουργία του υδροβιότοπου χωρίς επιμόλυνση, και πάλι τα γονίδια εμφανίστηκαν σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Τέλος συγκρίνοντας τις συγκεντρώσεις μεταξύ της εξόδου της δευτεροβάθμιας και της λειτουργίας του υδροβιοτόπου με πρωτοβάθμιο λύμα παρατηρήθηκε ότι στην εκροή του υδροβιότοπου όλα τα γονίδια ήταν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις.



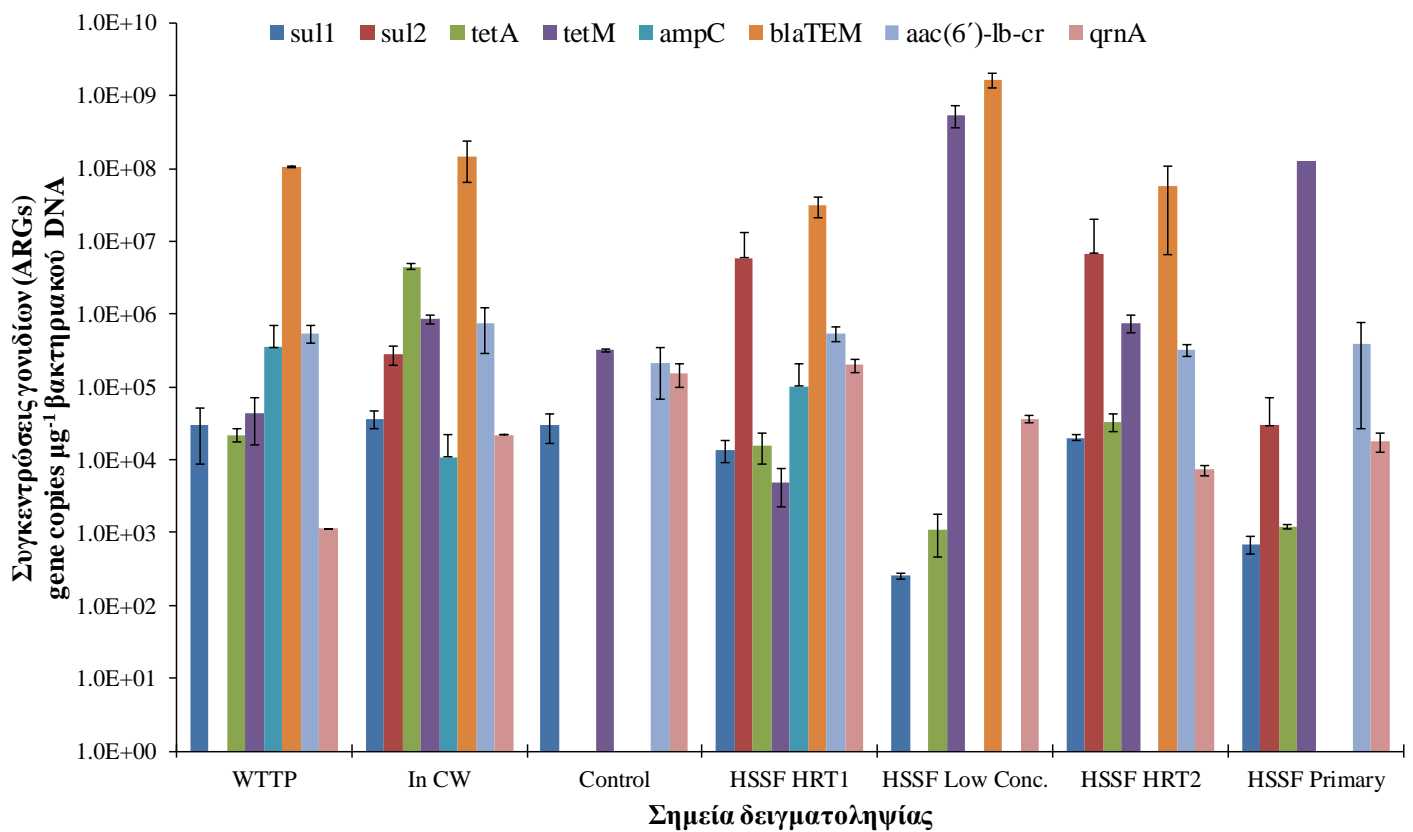
Γράφημα 71. Συγκεντρώσεις γονιδίων ανθεκτικότητας από τα απομονωμένα στελέχη *E. coli*. Οι τιμές είναι σε μέσους όρους με το στατιστικό σφάλμα.

Στο Γράφημα 72 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των γονιδίων ανθεκτικότητας από τα απομονωμένα στελέχη των εντερόκοκκων. Αρχικά και σε όρους παρουσίας - απουσίας, στην έξοδο της πρωτοβάθμιας παρουσιάστηκαν 7 από τα 8 γονίδια (δεν εμφανίστηκε το *sul2*), στην έξοδο της δευτεροβάθμιας εμφανίστηκαν και τα 8 γονίδια, στην έξοδο του υδροβιότοπου χωρίς βλάστηση 4 από τα 8 (*sul1*, *tetM*, *ampC* και *qnrA*), στην έξοδο τους υδροβιότοπου με βλάστηση 8/8 γονίδια, στον υδροβιότοπο με επιμόλυνση 5/8 (δεν παρουσιάστηκαν το *sul2*, *ampC* και *aac(6')-Ib-cr*), κατά την λειτουργία με υδραυλικό χρόνο 2 μέρες 7/8 (δεν εμφανίστηκε το *ampC*) και κατά τη λειτουργία με πρωτοβάθμιο λύμα 6/8 (δεν εμφανίστηκαν τα *ampC* και *blaTEM*). Το *sul1* και το *tetM* εμφανίστηκαν σε όλες τις περιπτώσεις υδροβιοτόπων.

Στη συνέχεια συγκρίνοντας τις συγκεντρώσεις που προέκυψαν από τα στελέχη της εκροής της πρωτοβάθμιας και της εκροής της δευτεροβάθμιας παρατηρήθηκε ότι τα γονίδια *tetA*, *tetM* και *qnrA* εμφανίστηκαν αυξημένα ενώ το *ampC* παρουσίασε μείωση.

Ο υδροβιότοπος χωρίς βλάστηση παρουσίασε το γονίδιο *qnrA* σε αυξημένη συγκέντρωση σε σχέση με το In CW. Η εκροή του υδροβιότοπου με HRT1 έδειξε

αύξηση της συγκέντρωσης των γονιδίων *sul2*, *ampC* και *qnrA*, ενώ μείωση παρουσίασαν τα γονίδια της τετρακυκλίνης *tetA*, *tetM*. Ο CW κατά τη λειτουργία του με HRT2 έδειξε αυξημένη συγκέντρωση μόνο για το *sul2* ενώ τα άλλα γονίδια παρέμειναν στα ίδια επίπεδα σε σύγκριση με το In CW. Παρατηρώντας τα αποτελέσματα μεταξύ του CW με βλάστηση και χωρίς, ο HRT1 παρουσιάζει μείωση για τα γονίδια *sul1* και *tetM* και αύξηση για τα *aac (6')-Ib-cr* και *qnrA*. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα μεταξύ HRT1 και HRT2 παρατηρήθηκε μεγαλύτερη συγκέντρωση του *tetM* στον HRT2 και μικρότερες ή ίσες συγκεντρώσεις για τα υπόλοιπα γονίδια. Τα αποτελέσματα μεταξύ HRT1 και της λειτουργίας με επιμόλυνση έδειξαν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις για τα *tetM* και *bla_{TEM}* στον υδροβιότοπο με επιμόλυνση ενώ τα *sul1*, *tetA* και *qnrA* παρουσιάστηκαν σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Τέλος, συγκρίνοντας τα αποτελέσματα μεταξύ In CW και της λειτουργίας του CW όταν δεχόταν πρωτοβάθμιο λύμα, παρατηρήθηκε ότι ο CW έδειξε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις μόνο για το *tetM*.

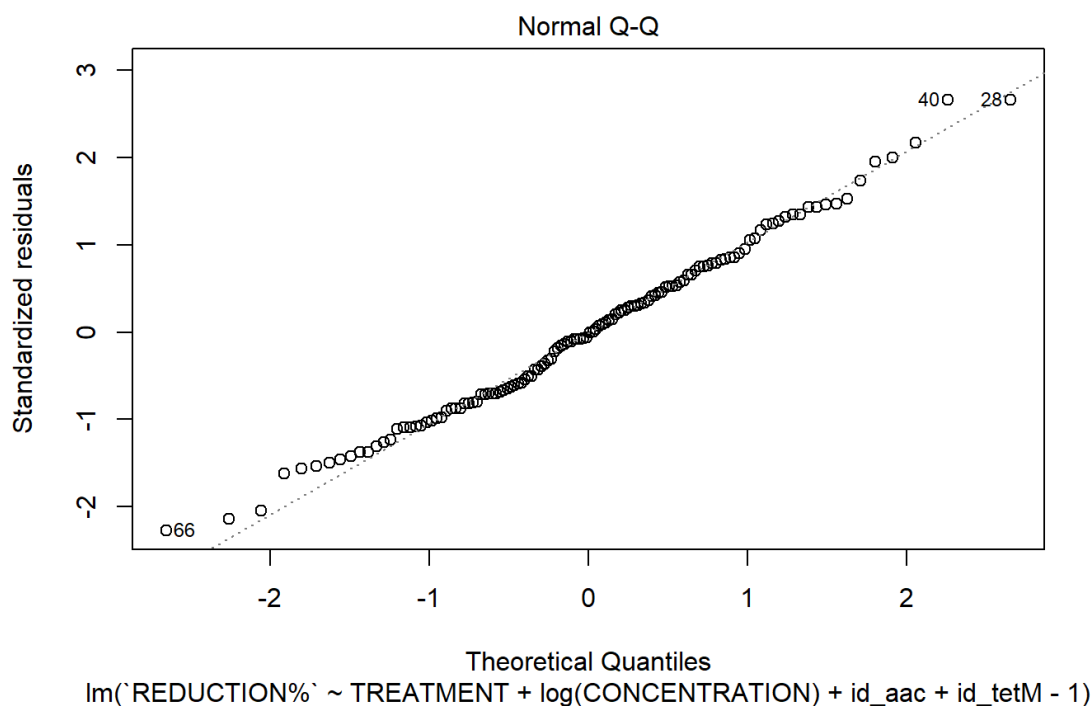


Γράφημα 72. Συγκεντρώσεις γονιδίων ανθεκτικότητας από τα απομονωμένα στελέχη εντερόκοκκων. Οι τιμές είναι σε μέσους όρους με το στατιστικό σφάλμα.

3.16 Αποτελέσματα - Ανάλυση παλινδρόμησης

3.16.1 Ανάλυση παλινδρόμηση - Στελέχη *E. coli*

Όπως και για τα συστήματα των υδροβιοτόπων Ηράκλειου, έτσι και για τα συστήματα των Χανίων πραγματοποιήθηκε ανάλυση πολλαπλής παλινδρόμησης. Ξεκινώντας με το αντιβιοτικό SMX, στο γράφημα 73 φαίνεται η προσαρμογή του μοντέλου και οι παράμετροι που συμμετείχαν στο μοντέλο που ήταν τα γονίδια aac και tetM.



Γράφημα 73. QQ-plot και παράμετροι για την προσαρμογή του μοντέλου SMX.

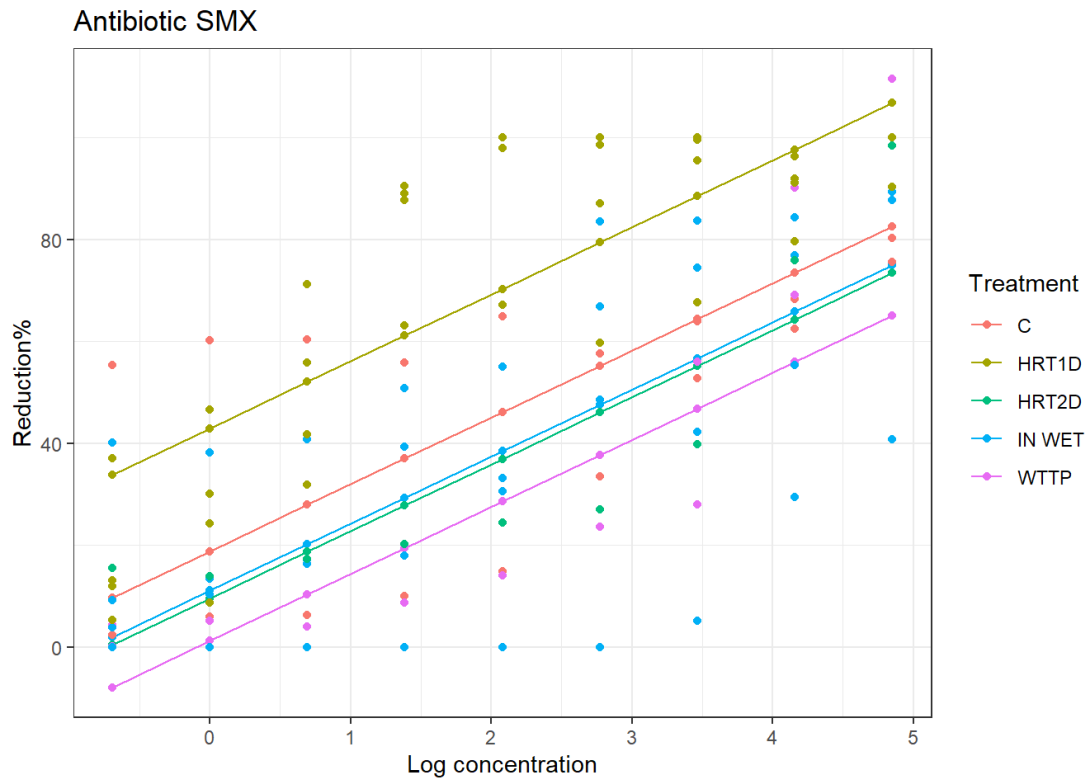
Από τα στοιχεία του πίνακα 16 φαίνεται ότι ο υδροβιότοπος με HRT μια ημέρα δείχνει τη μεγαλύτερη μείωση σε σχέση με τη μέση μείωση του πληθυσμού κατά 48,5%. Όσον αφορά στα γονίδια, η παρουσία του aac δείχνει μείωση σε σχέση με τη μέση τιμή μείωσης του πληθυσμού κατά 22% ενώ αντίθετα η παρουσία του tetM αύξηση κατά 32.6%.

Πίνακας 19. Συσχετίσεις παραμέτρων στο μοντέλο για το αντιβιοτικό sulfomethoxazole. Estimate: η διαφορά της απομάκρυνσης του πληθυσμού από τη μέση τιμή, p. value: η τιμή σημαντικότητας

	Estimate	Std. Error	t value	p. value
TREATMENT C	2.4977	6.3296	0.395	0.693847
TREATMENT HRT1D	48.5829	3.7368	13.001	< 2e-16***
TREATMENT HRT2D	9.6139	4.6684	2.059	0.041658*
TREATMENTIN WET	22.3945	4.2283	5.296	5.55e-07***
TREATMENT WTP	1.2508	4.6684	0.268	0.789222
log(CONCENTRATION)	13.1489	0.9027	14.566	< 2e-16***
id_aac	-22.5622	4.5695	-4.938	2.63e-06***
id_tetM	32.6024	8.5487	3.814	0.000219***

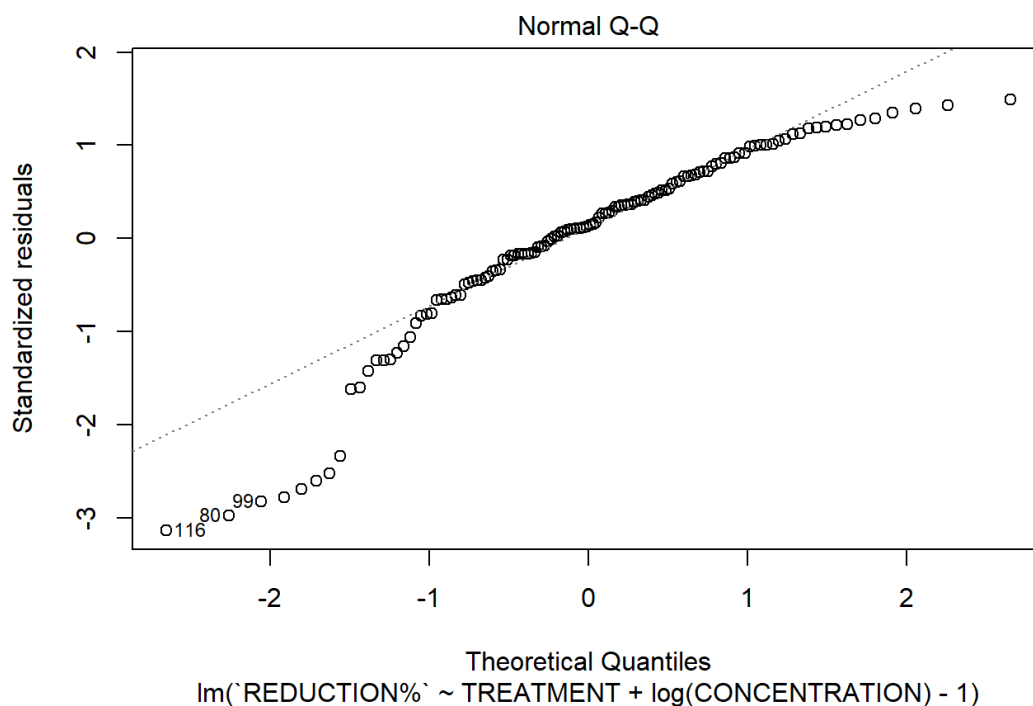
Από το Γράφημα 74 και τις γραμμές πρόβλεψης φαίνεται ότι ο υδροβιότοπος με HRT 1 ημέρα (HRT1D) δίνει την καλύτερη τιμή πρόβλεψης όσον αφορά στην μείωση του

εξεταζόμενου πληθυσμού, ενώ ακολουθούν κατά σειρά C, IN WET, HRT2D και WTTP.



Γράφημα 74. Γράφημα πρόβλεψης για το SMX. Οι τελείες δείχνουν τις τιμές πρόβλεψης και οι γραμμές ενώνουν τις μέσες τιμές πρόβλεψης για κάθε μέθοδο επεξεργασίας.

Στο Γράφημα 75 παρουσιάζεται η προσαρμογή του μοντέλου για το αντιβιοτικό CIP και όπως φαίνεται κανένα από τα γονίδια ανθεκτικότητας δε συμμετείχε ως παράμετρος.



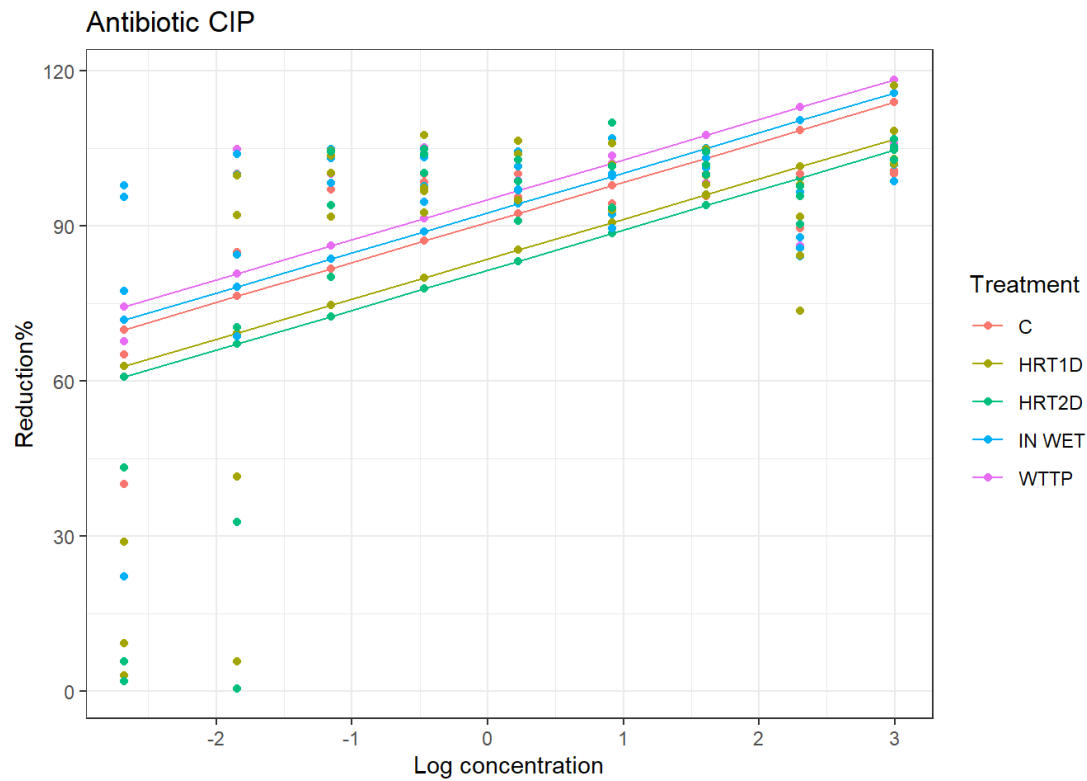
Γράφημα 75. QQ-plot και παράμετροι για την προσαρμογή του μοντέλου CIP

Για την περίπτωση του αντιβιοτικού CIP (Πίνακας 20) δεν υπήρξαν μεγάλες διαφορές όσον αφορά στην απόδοση των διαφορετικών μεθόδων επεξεργασίας.

Πίνακας 20. Συσχετίσεις παραμέτρων στο μοντέλο για το αντιβιοτικό ciprofloxacin. Estimate: η διαφορά της απομάκρυνσης του πληθυσμού από τη μέση τιμή, p. value: η τιμή σημαντικότητας

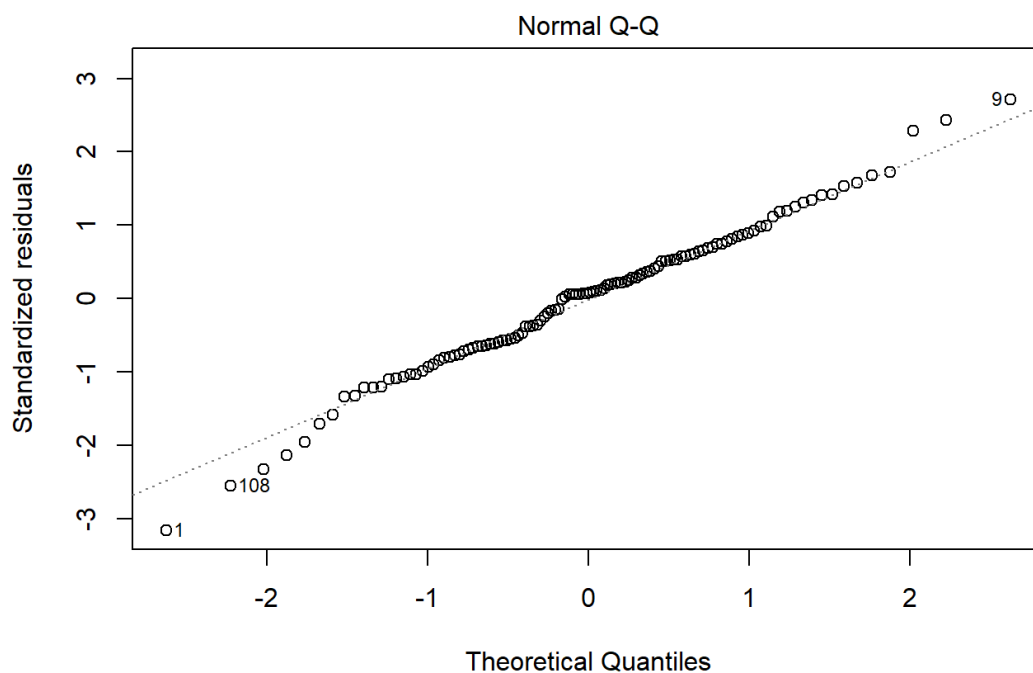
	Estimate	Std. Error	t value	p. value
TREATMENT C	90.628	5.135	17.650	< 2e-16***
TREATMENT HRT1D	83.531	3.634	22.983	< 2e-16***
TREATMENT HRT2D	81.399	4.195	19.405	< 2e-16***
TREATMENTIN WET	92.472	3.634	25.443	< 2e-16***
TREATMENT WTTP	95.027	7.258	13.092	< 2e-16***
log(CONCENTRATION)	7.746	1.071	7.233	4.84e-11***

Οι γραμμές πρόβλεψης (Γράφημα 76) έδειξαν ότι καλύτερο αποτέλεσμα όσον αφορά στη μείωση του εξεταζόμενου πληθυσμού αναμένεται από το WTTP και ακολουθούν κατά σειρά το IN WET, το C, το HRT1D και το HRT2D.



Γράφημα 76. Γράφημα πρόβλεψης για το CIP. Οι τελείες δείχνουν τις τιμές πρόβλεψης και οι γραμμές ενώνουν τις μέσες τιμές πρόβλεψης για κάθε μέθοδο επεξεργασίας.

Στο Γράφημα 77 παρουσιάζεται η προσαρμογή του μοντέλου για το αντιβιοτικό AMOX και σε αυτή την περίπτωση συμμετείχαν ως παράμετροι τα γονίδια *sul2*, *aac* και *tetM*.



Theoretical Quantiles

$\text{lm}(\text{'REDUCTION\%'} \sim \text{TREATMENT} + \log(\text{CONCENTRATION}) + \text{id_Sul2} + \text{id_aac} + \text{id_te})$

Γράφημα 77. QQ-plot και παράμετροι για την προσαρμογή του μοντέλου AMOX

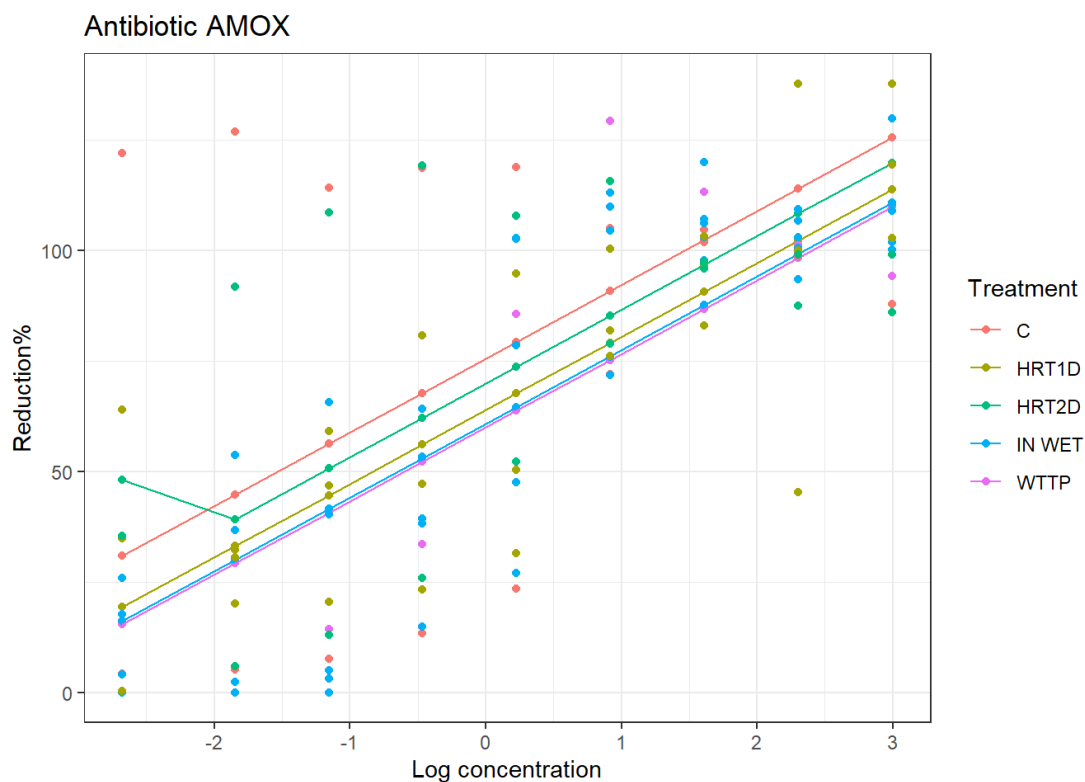
Από τον Πίνακα 21 φαίνεται ότι δεν υπήρξαν μεγάλες διαφοροποιήσεις μεταξύ των μονάδων επεξεργασίας, με το HRT1D και το WTTP να δίνουν τη μεγαλύτερη αύξηση στη μείωση του πληθυσμού σε σχέση με τη μέση μείωση. Εξετάζοντας τα γονίδια, φαίνεται ότι τα sul2, tetA και tetM, έχουν θετική επίδραση στη μείωση του πληθυσμού ενώ αντίθετα το aac δίνει μείωση 57% στη μέση μείωση του πληθυσμού.

Πίνακας 21. Συσχετίσεις παραμέτρων στο μοντέλο για το αντιβιοτικό amoxicillin. Estimate: η διαφορά της απομάκρυνσης του πληθυσμού από τη μέση τιμή, p. value: η τιμή σημαντικότητας

	Estimate	Std. Error	t value	p. value
TREATMENT C	43.979	7.846	5.605	1.66e-07***
TREATMENT HRT1D	59.643	5.980	9.974	< 2e-16***
TREATMENT HRT2D	47.104	7.411	6.356	5.32e-09***
TREATMENTIN WET	58.861	4.085	14.411	< 2e-16***
TREATMENT WTTP	59.986	7.846	7.646	9.92e-12***
log(CONCENTRATION)	16.681	1.216	13.718	< 2e-16***
id_Sul2	24.236	8.194	2.958	0.00382**

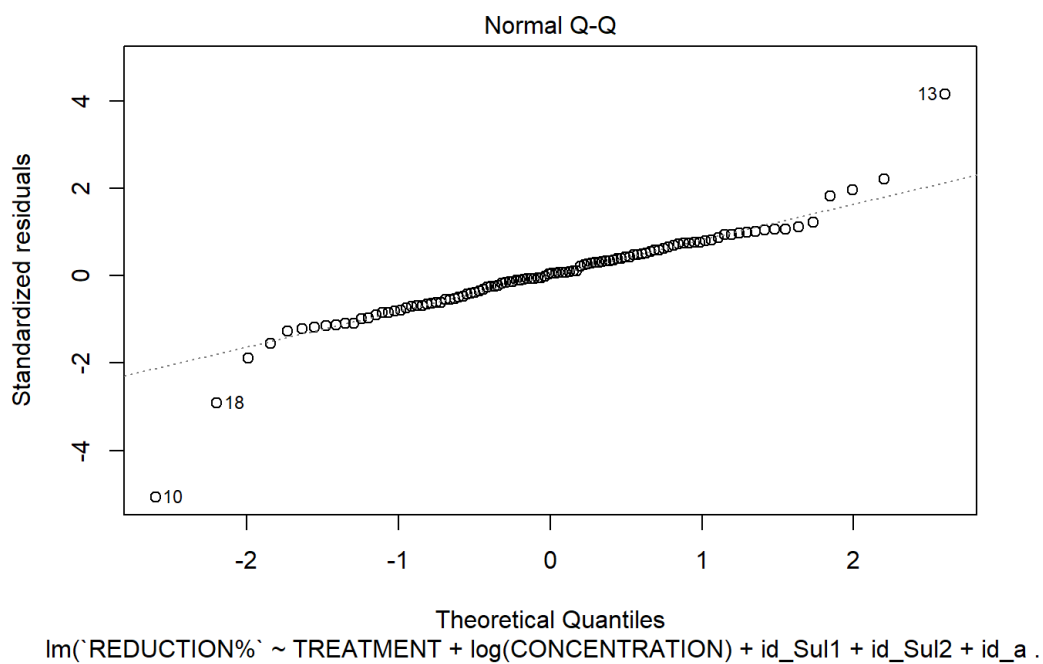
id_aac	-57.083	9.704	-5.883	4.77e-08***
id_tetA	21.431	7.571	2.831	0.00556**
id_tetM	63.302	11.090	5.708	1.05e-07***

Από το Γράφημα 78 και τις γραμμές πρόβλεψης φαίνεται ότι την καλύτερη απόδοση αναμένεται να την έχει το C και ακολουθούν κατά σειρά HRT2D, HRT1D, IN WET και WTTP.



Γράφημα 78. Γράφημα πρόβλεψης για το AMOX. Οι τελείες δείχνουν τις τιμές πρόβλεψης και οι γραμμές ενώνουν τις μέσες τιμές πρόβλεψης για κάθε μέθοδο επεξεργασίας.

Ακολουθούν τα αποτελέσματα για το αντιβιοτικό TET και όπως φαίνεται από το Γράφημα 79 σε αυτή την περίπτωση συμμετέχουν στο μοντέλο τα γονίδια *sul1*, *sul2* και *aac*.



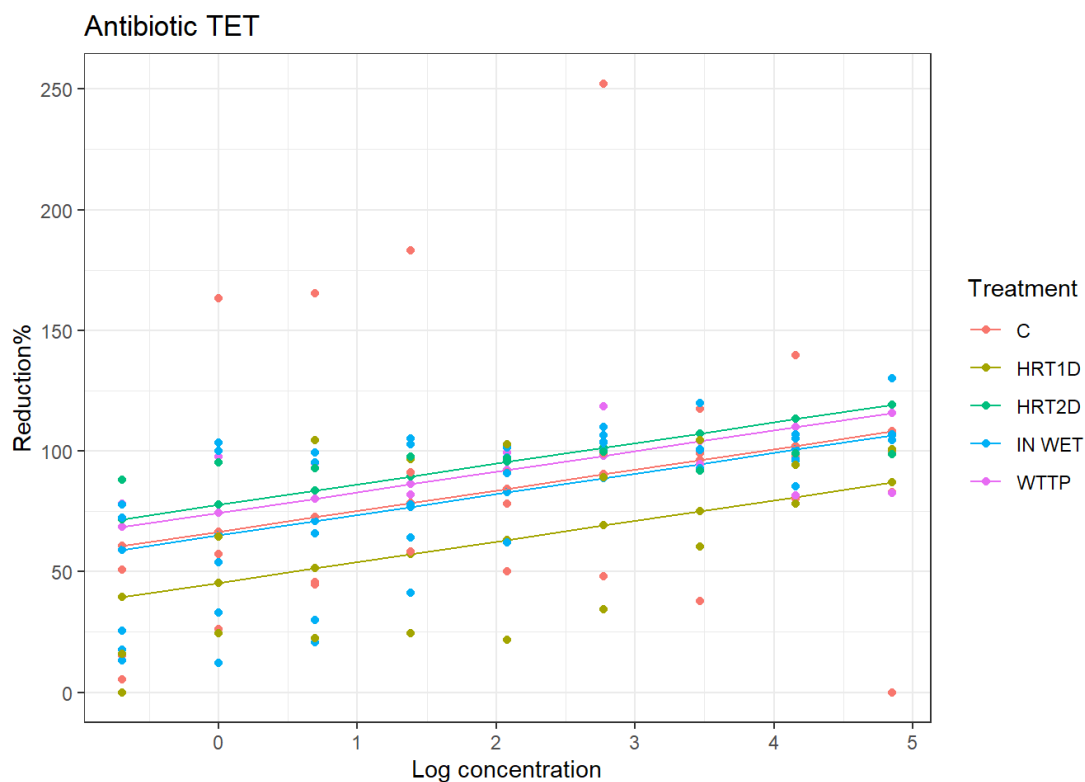
Γράφημα 79. QQ-plot και παράμετροι για την προσαρμογή του μοντέλου TET.

Τα αποτελέσματα του Πίνακα 22 δείχνουν ότι το HRT2D δείχνει τη μεγαλύτερη αύξηση στη μείωση του πληθυσμού σε σχέση με τη μέση μείωση. Παρατηρώντας τα γονίδια, το aac δείχνει αύξηση κατά 59,1% στη μείωση του πληθυσμού σε σχέση με τη μέση μείωση, ενώ αντίθετα τα γονίδια sul1 και sul2 δείχνουν μείωση 24% και 67% αντίστοιχα σε σχέση με τη μέση μείωση του πληθυσμού.

Πίνακας 22. Συσχετίσεις παραμέτρων στο μοντέλο για το αντιβιοτικό tetracycline. Estimate: η διαφορά της απομάκρυνσης του πληθυσμού από τη μέση τιμή, p. value: η τιμή σημαντικότητας

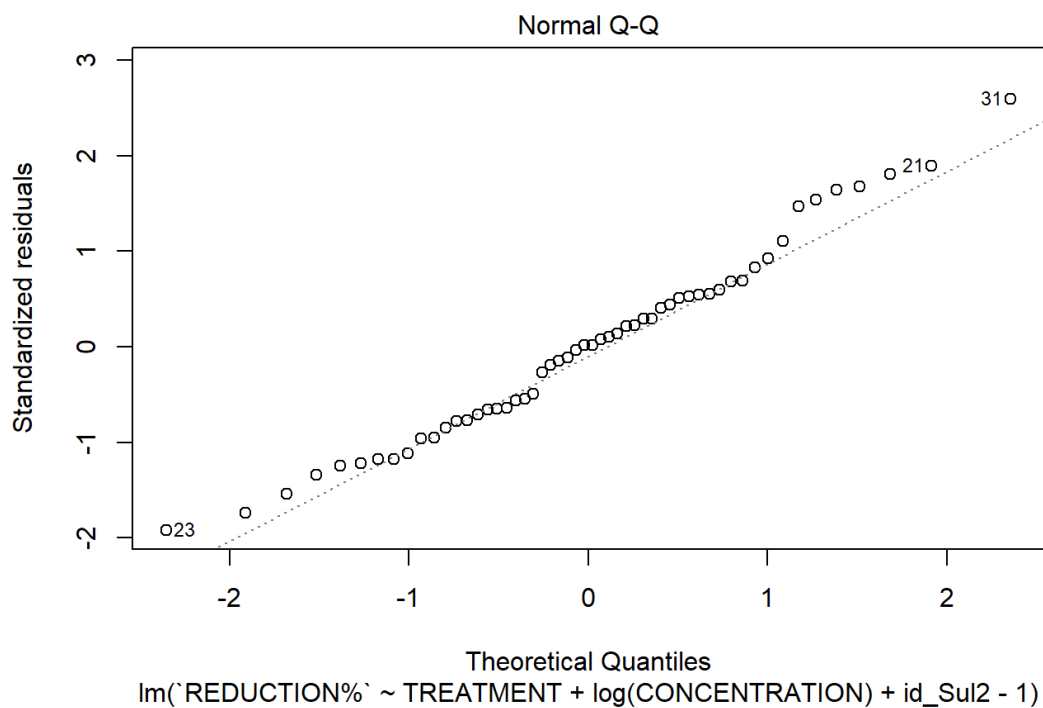
	Estimate	Std. Error	t value	p. value
TREATMENT C	71.663	12.944	5.536	2.54e-07***
TREATMENT HRT1D	61.939	9.481	6.533	2.81e-09***
TREATMENT HRT2D	102.483	14.897	6.880	5.49e-10***
TREATMENT IN WET	81.483	7.670	10.624	< 2e-16***
TREATMENT WTTP	99.090	14.897	6.652	1.61e-09***
log(CONCENTRATION)	8.553	1.682	5.085	1.74e-06***
id_Sul1	-24.749	10.048	-2.463	0.015498*
id_Sul2	-67.385	17.179	-3.923	0.000162***
id_aac	59.172	12.770	4.634	1.10e-05***

Οι γραμμές πρόβλεψης για το αντιβιοτικό TET (Γράφημα 80) έδειξαν ότι οι καλύτερες τιμές δίνονται από το HRT2D και ακολουθούν κατά σειρά το WTTP, το C, το IN WET και το HRT2D.



Γράφημα 80. Γράφημα πρόβλεψης για το TET. Οι τελείες δείχνουν τις τιμές πρόβλεψης και οι γραμμές ενώνουν τις μέσες τιμές πρόβλεψης για κάθε μέθοδο επεξεργασίας.

Το μοντέλο για το αντιβιοτικό CEF παρουσιάζεται στο Γράφημα 81 και περιλαμβάνει τη συμμετοχή του γονιδίου ανθεκτικότητας *sul2*.



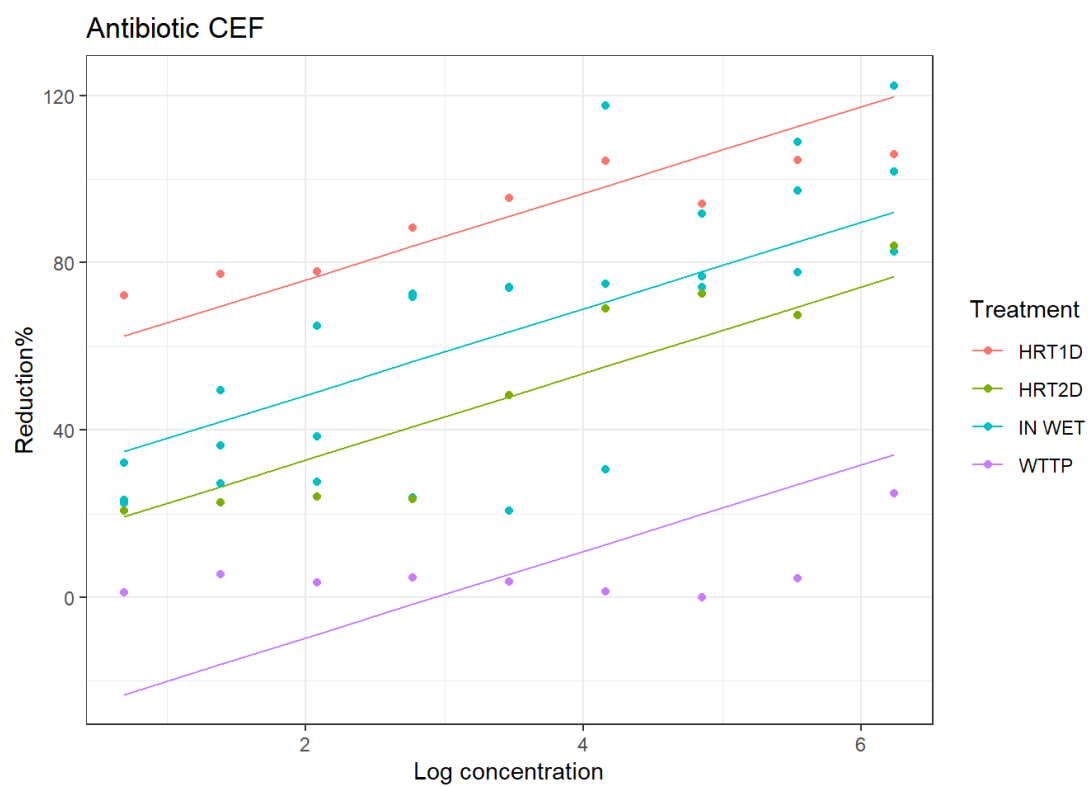
Γράφημα 81. QQ-plot και παράμετροι για την προσαρμογή του μοντέλου CEF.

Από τον πίνακα 23 φαίνεται ότι ο υδροβιότοπος με HRT 1 d (HRT1D) δείχνει μεγάλη αύξηση, 76,6% στη μείωση του πληθυσμού σε σχέση με τη μέση μείωση και ακολουθεί το IN WET. Όσον αφορά στο sul2 δείχνει να επηρεάζει αρνητικά τη μείωση του πληθυσμού κατά 21,4% σε σχέση με τη μέση μείωση.

Πίνακας 23. Συσχετίσεις παραμέτρων στο μοντέλο για το αντιβιοτικό cefaclor. Estimate: η διαφορά της απομάκρυνσης του πληθυσμού από τη μέση τιμή, p. value: η τιμή σημαντικότητας

	Estimate	Std. Error	t value	p. value
TREATMENT HRT1D	76.684	9.296	8.250	9.27e-11***
TREATMENT HRT2D	12.135	6.703	1.810	0.07652 .
TREATMENTIN WET	34.799	5.577	6.239	1.08e-07***
TREATMENT WTTP	-30.378	6.703	-4.532	3.89e-05***
log(CONCENTRATION)	10.349	1.199	8.628	2.52e-11***
id_Sul2	-21.430	6.440	-3.328	0.00169**

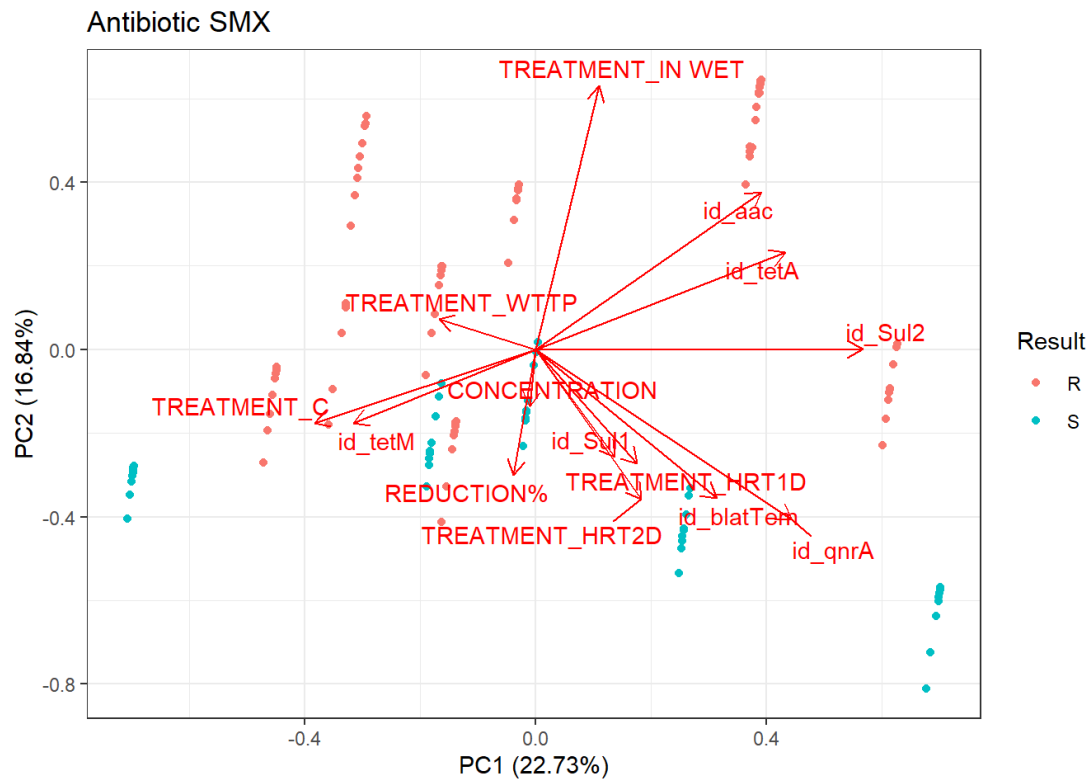
Από τις γραμμές πρόβλεψης του Γραφήματος 82 φαίνεται ότι τις καλύτερες τιμές πρόβλεψης τις παρουσιάζει το HRT1D και ακολουθούν το IN WET, το HRT2D και το WWTP.



Γράφημα 82. Γράφημα πρόβλεψης για το CEF. Οι τελείες δείχνουν τις τιμές πρόβλεψης και οι γραμμές ενώνουν τις μέσες τιμές πρόβλεψης για κάθε μέθοδο επεξεργασίας.

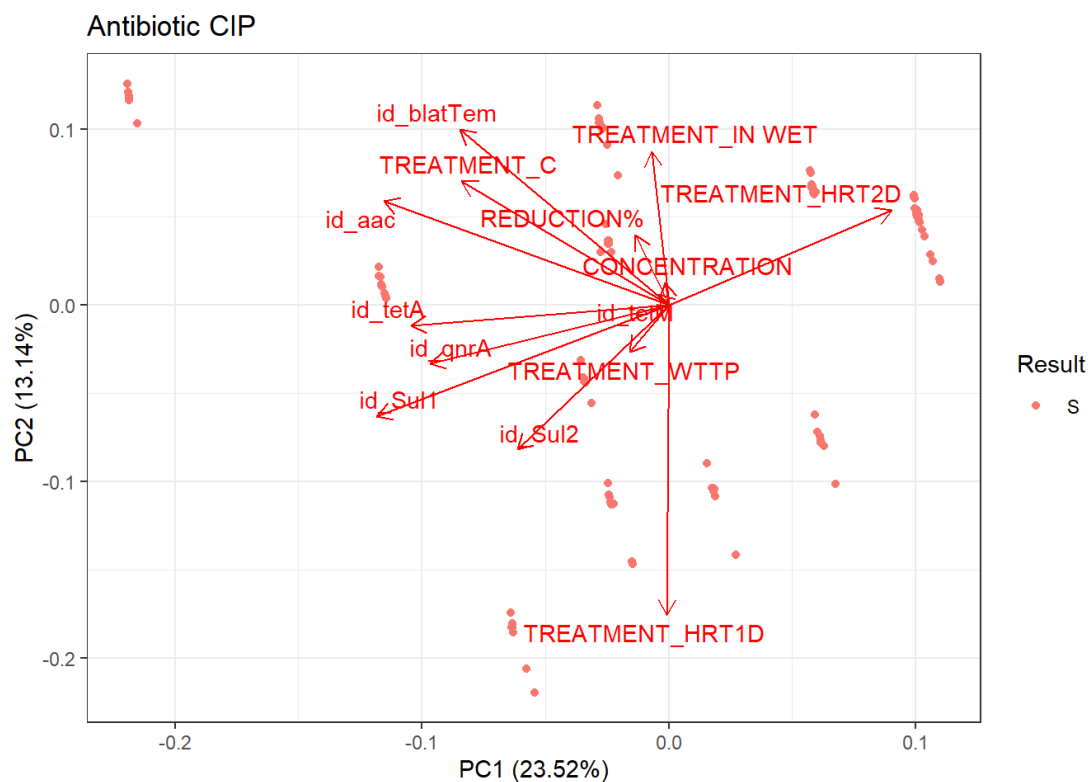
3.16.2 Ανάλυση κυρίων συνιστωσών PCA – *E. coli*

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την ανάλυση PCA. Ξεκινώντας από το αντιβιοτικό SMX (Γράφημα 83), η ευαισθησία φαίνεται να συνδέεται με το γονίδιο *qnrA* και με την επεξεργασία HRT 1D. Η ανθεκτικότητα φαίνεται να συνδέεται με τα γονίδια *sul2*, *aac* και *tetM* όπως και με τις επεξεργασίες WTTP και C.



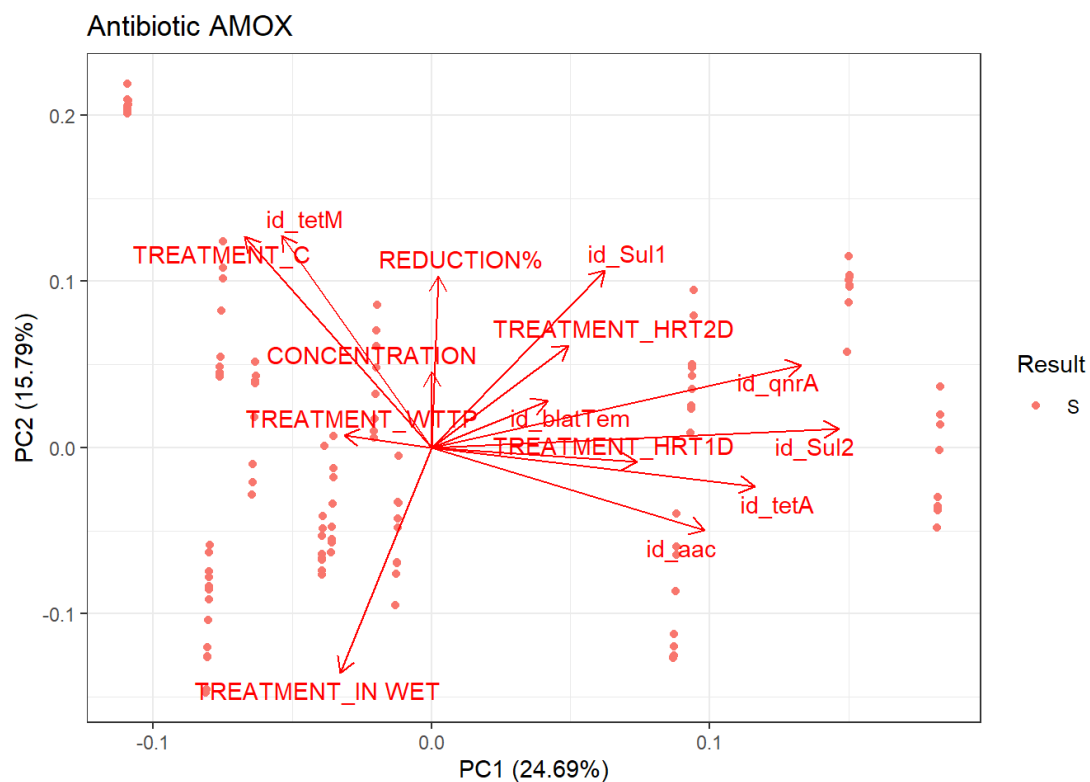
Γράφημα 83. Ανάλυση PCA του πληθυσμού των εντερόκοκκων για την επεξεργασία με το αντιβιοτικό SMX.

Στη συνέχεια και για το αντιβιοτικό CIP (Γράφημα 84) όλα τα εξεταζόμενα στελέχη έδειξαν ευαισθησία και φαίνεται να υπάρχει σύνδεση μόνο με την επεξεργασία HRT 2D.



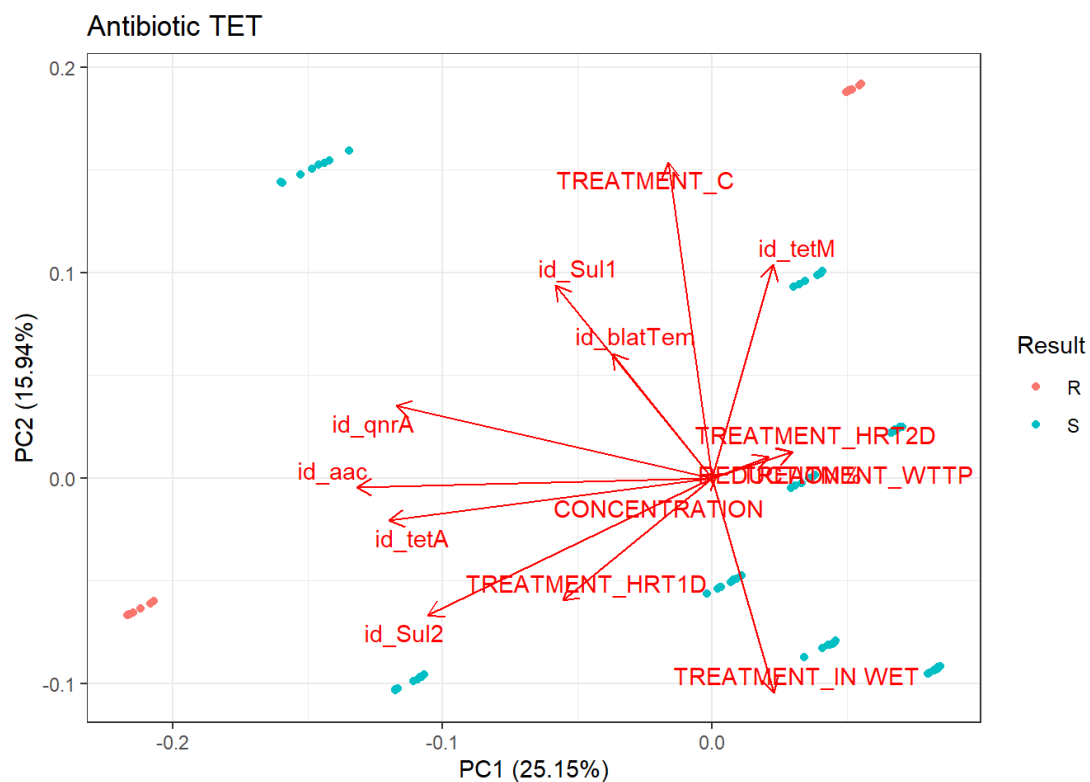
Γράφημα 84. Ανάλυση PCA του πληθυσμού των εντερόκοκκων για την επεξεργασία με το αντιβιοτικό CIP.

Ομοίως για το αντιβιοτικό AMOX (Γράφημα 85), όλες οι περιπτώσεις των εξεταζόμενων στελεχών έδειξαν ευαισθησία η οποία φαίνεται να συνδέεται με τα γονίδια *sul2* και *tetA*. Η επεξεργασία HRT 2D φαίνεται να συνδέεται θετικά με τη μείωση του πληθυσμού των εξεταζόμενων στελεχών.



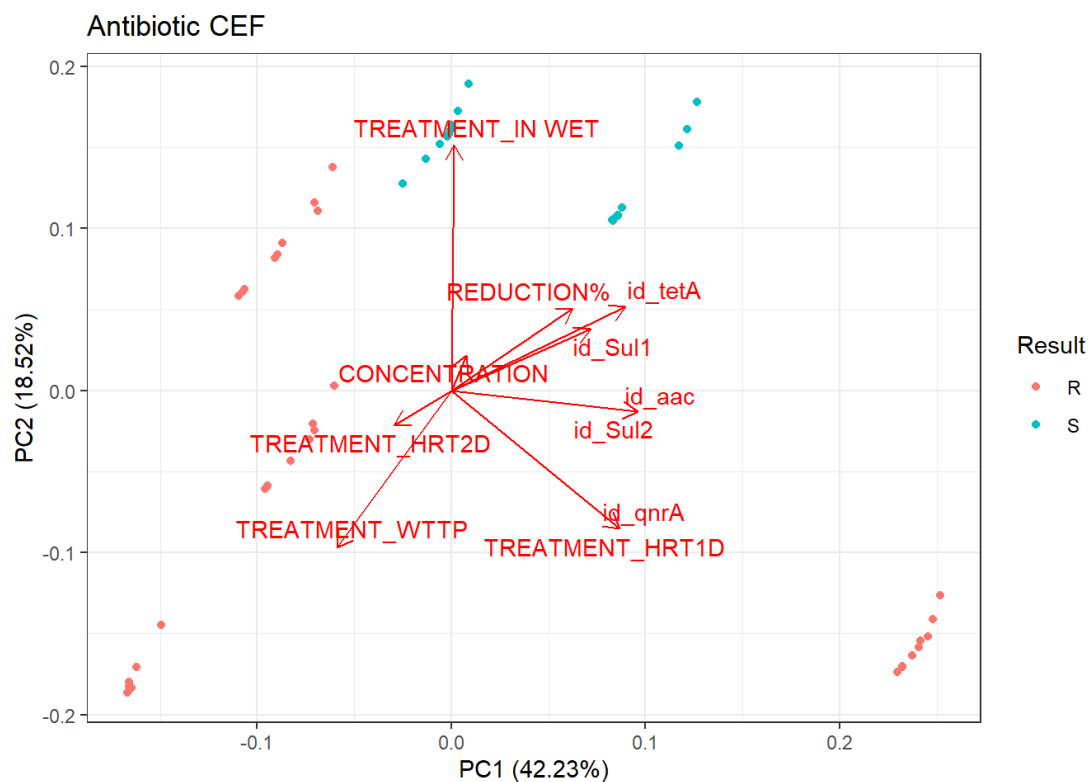
Γράφημα 85. Ανάλυση PCA του πληθυσμού των εντερόκοκκων για την επεξεργασία με το αντιβιοτικό AMOX.

Η ανάλυση για το αντιβιοτικό TET (Γράφημα 86) δεν έδειξε κάποια ξεκάθαρη σχέση μεταξύ ευαισθησία ή ανθεκτικότητας και γονιδίων. Η επεξεργασία HRT 2D φαίνεται να συνδέεται με την ευαισθησία και με τη μείωση το πληθυσμού.



Γράφημα 86. Ανάλυση PCA του πληθυσμού των εντερόκοκκων για την επεξεργασία με το αντιβιοτικό TET.

Τέλος για το αντιβιοτικό CEF (Γράφημα 87) η μόνη σχέση που αποτυπώνεται είναι μεταξύ των ευαίσθητων στελεχών και της επεξεργασίας WET.

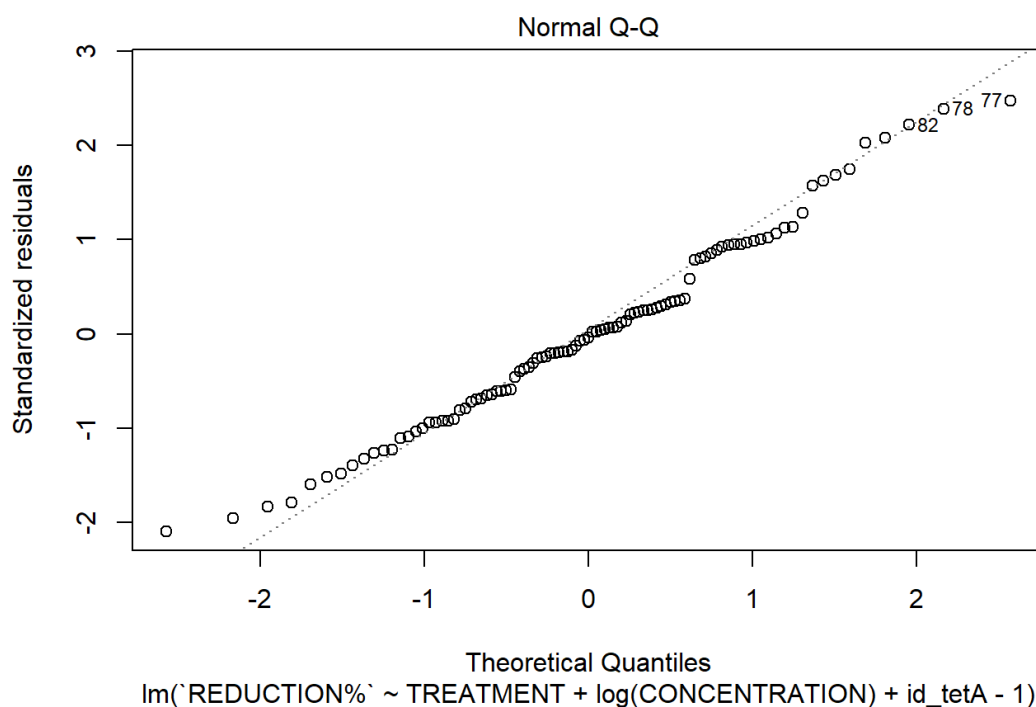


Γράφημα 87. Ανάλυση PCA του πληθυσμού των εντερόκοκκων για την επεξεργασία με το αντιβιοτικό CEF.

3.16.3 Ανάλυση παλινδρόμησης - Στελέχη εντεροκόκκων

Ακολουθούν τα αποτελέσματα της γραμμικής πολλαπλής παλινδρόμησης για τους εντερόκοκκους για τις διαφορετικές επεξεργασίες και αντιβιοτικά.

Στο Γράφημα 88 παρουσιάζεται η προσαρμογή του μοντελου για το αντιβιοτικό SMX στο μοντέλο περιλαμβάνεται η συμμετοχή του γονιδίου tetA.



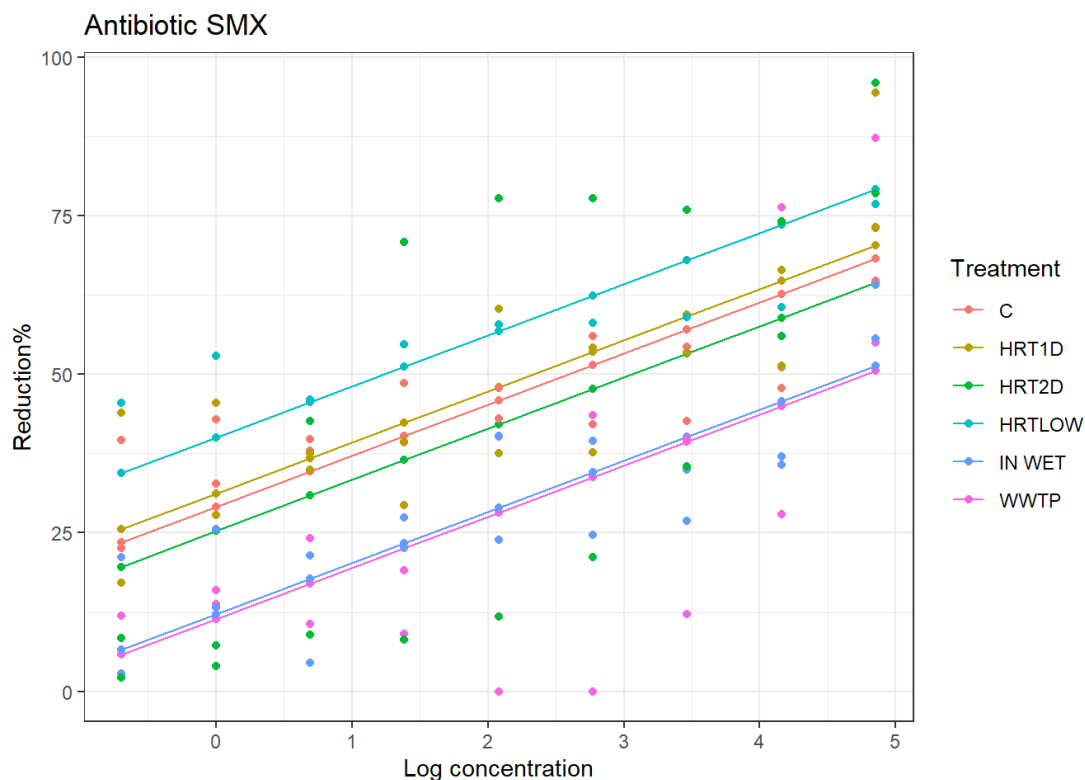
Γράφημα 88. QQ-plot και παράμετροι για την προσαρμογή του μοντέλου SMX.

Από τον Πίνακα 24 φαίνεται ότι ο πληθυσμός ο οποίος προήλθε από το HRT LOW δείχνει τη μεγαλύτερη αύξηση σε σχέση με τη μέση μείωση του πληθυσμού, ενώ το γονίδιο tetA δε φαίνεται να επηρεάζει αρνητικά τη μείωση του πληθυσμού μετά την έκθεση στο αντιβιοτικό.

Πίνακας 24. Συσχετίσεις παραμέτρων στο μοντέλο για το αντιβιοτικό sulfomethoxazole. Estimate: η διαφορά της απομάκρυνσης του πληθυσμού από τη μέση τιμή, p. value: η τιμή σημαντικότητας

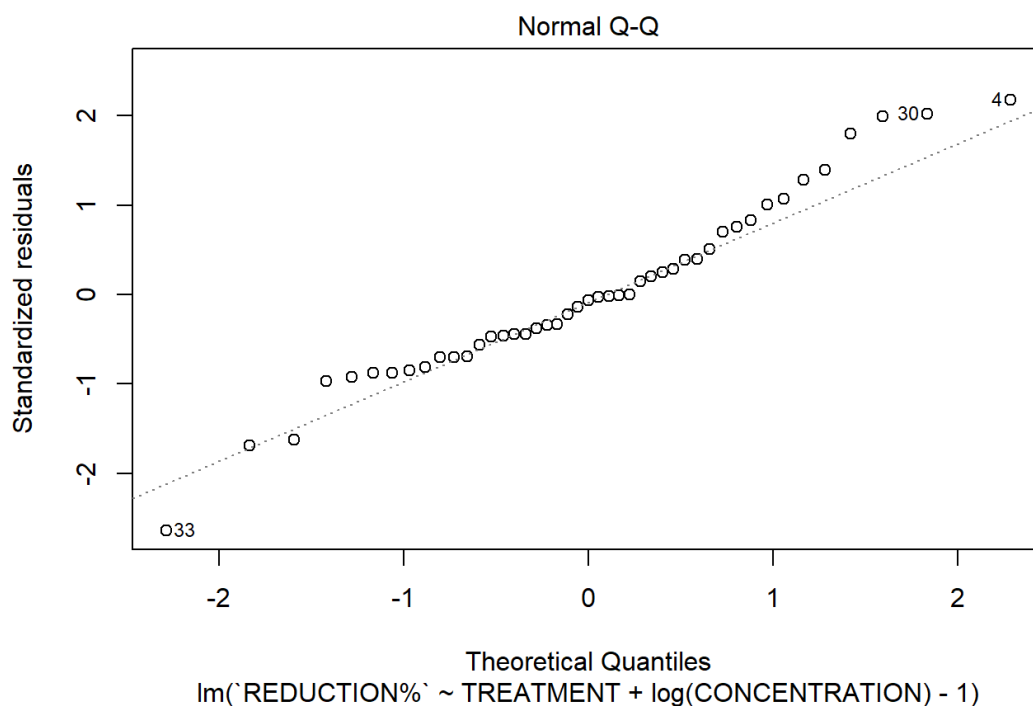
	Estimate	Std. Error	t value	p. value
TREATMENT C	29.1046	3.9115	7.441	5.42e-11***
TREATMENT HRT1D	31.1845	3.9115	7.973	4.37e-12***
TREATMENT HRT2D	7.8191	8.0273	0.974	0.33261
TREATMENT HRT LOW	40.0398	5.2521	7.624	2.29e-11***
TREATMENT IN WET	12.1726	3.9115	3.112	0.00248**
TREATMENT WWTP	2.6920	5.2521	0.513	0.60950
log(CONCENTRATION)	8.0810	0.8351	9.677	1.21e-15***
id_tetA	17.4419	7.0099	2.488	0.01466*

Οι γραμμές πρόβλεψης για το SMX (Γράφημα 89) δείχνουν ότι το HRTLOW έχει την καλύτερη απόδοση και ακολουθούν το HRT1D, C, HRT2D, IN WET και WWTP.



Γράφημα 89. Γράφημα πρόβλεψης για το SMX. Οι τελείες δείχνουν τις τιμές πρόβλεψης και οι γραμμές ενώνουν τις μέσες τιμές πρόβλεψης για κάθε μέθοδο επεξεργασίας.

Στο γράφημα 90 παρουσιάζεται το μοντέλο για το αντιβιοτικό CIP και όπως φαίνεται δε συμμετείχε κάποιο από τα εξεταζόμενα γονίδια ανθεκτικότητας.



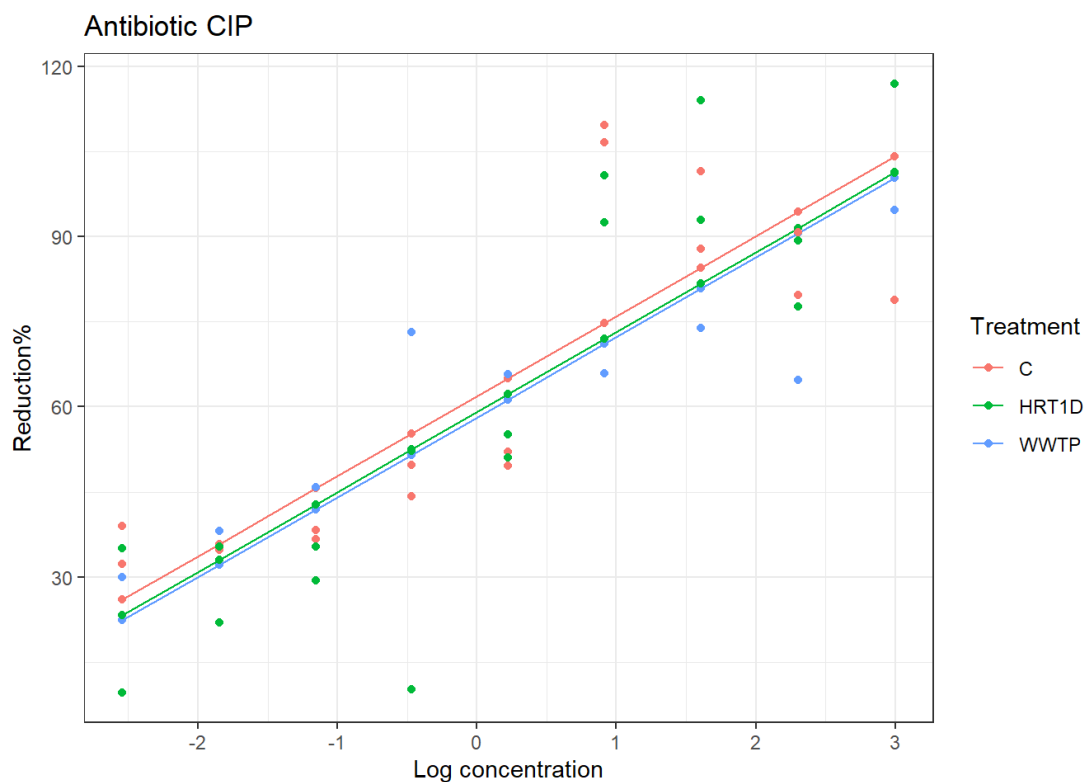
Γράφημα 90. QQ-plot και παράμετροι για την προσαρμογή του μοντέλου CIP.

Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 25 δεν υπάρχει κάποια ιδιαίτερη διαφοροποίηση μεταξύ των μεθόδων επεξεργασίας.

Πίνακας 25. Συσχετίσεις παραμέτρων στο μοντέλο για το αντιβιοτικό ciprofloxacin. Estimate: η διαφορά της απομάκρυνσης του πληθυσμού από τη μέση τιμή, p. value: η τιμή σημαντικότητας

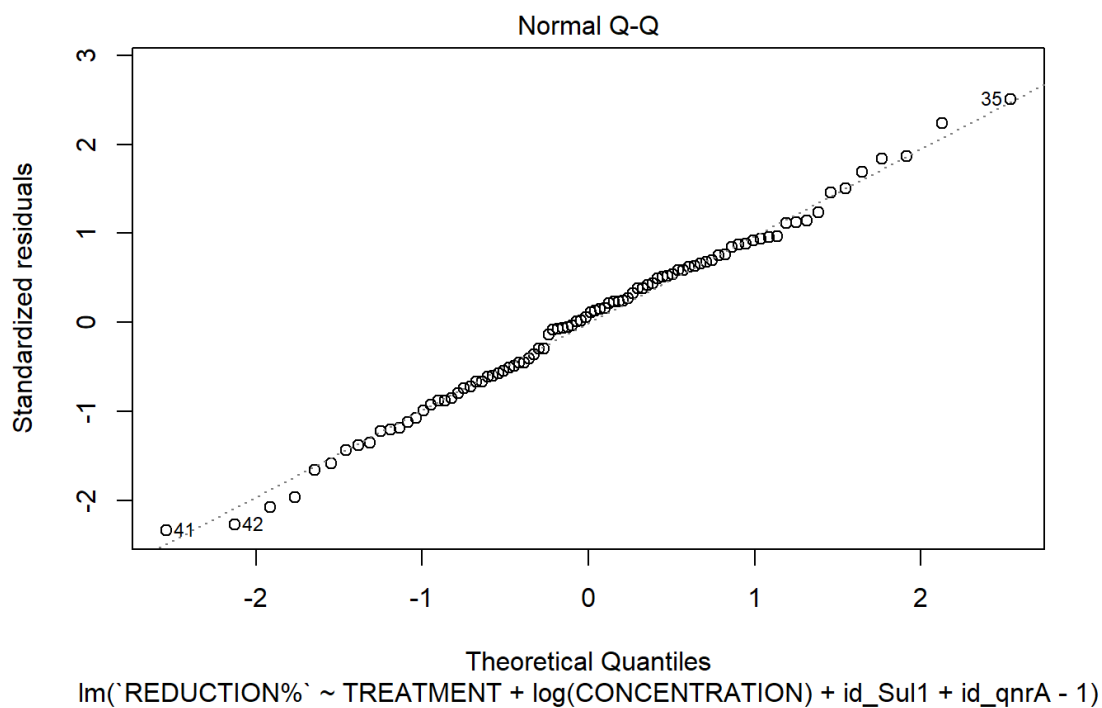
	Estimate	Std. Error	t value	p. value
TREATMENTC	61.861	3.902	15.85	< 2e-16***
TREATMENT HRT1D	59.064	3.902	15.13	< 2e-16***
TREATMENT WWTP	58.128	5.510	10.55	2.98e-13***
log(CONCENTRATION)	14.086	1.377	10.23	7.52e-13***

Η μη διαφοροποίηση στα αποτελέσματα που δίνουν οι επεξεργασίες αποτυπώνεται και στο Γράφημα 91 όπου οι γραμμές πρόβλεψης είναι κοντά μεταξύ τους.



Γράφημα 91. Γράφημα πρόβλεψης για το CIP. Οι τελείες δείχνουν τις τιμές πρόβλεψης και οι γραμμές ενώνουν τις μέσες τιμές πρόβλεψης για κάθε μέθοδο επεξεργασίας.

Στο Γράφημα 92 φαίνεται η προσαρμογή του μοντέλου για το αντιβιοτικό AMOX και στο μοντέλο περιλαμβάνονται τα γονίδια *sul1* και *qnrA*.



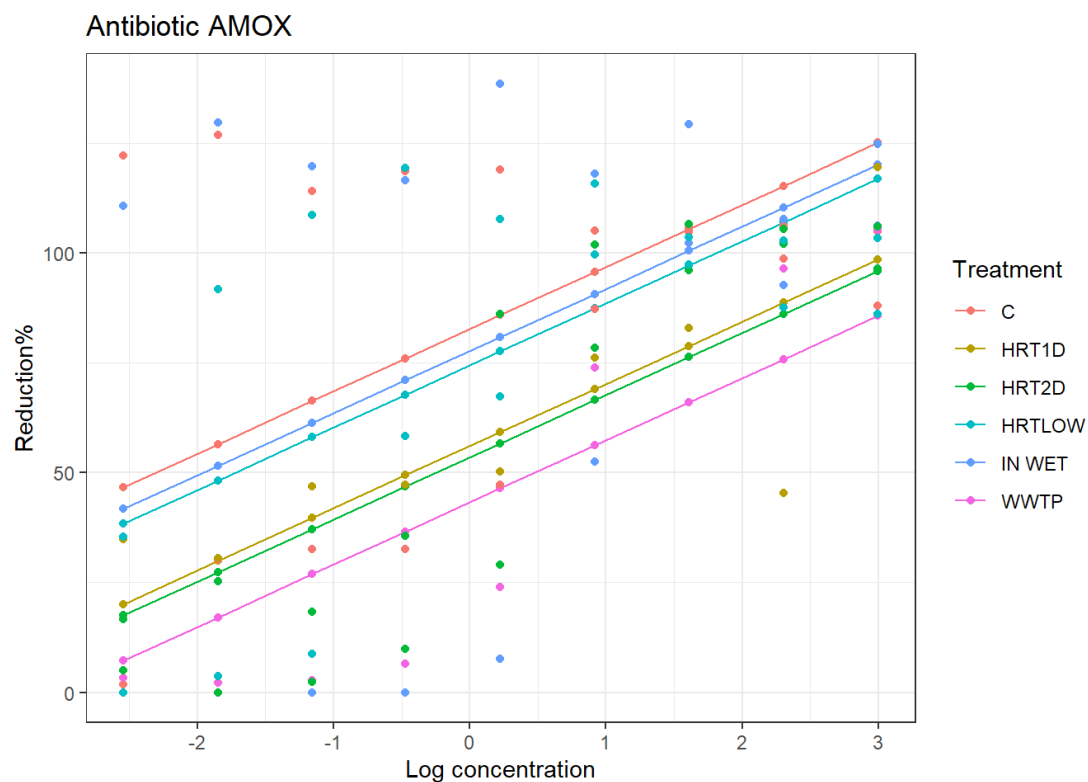
Γράφημα 92. QQ-plot και παράμετροι για την προσαρμογή του μοντέλου AMOX.

Όπως φαίνεται από το πίνακα 23 οι εκτιμώμενες τιμές είναι κοντά μεταξύ των επεξεργασιών εκτός από το HRT1D το οποίο δείχνει χαμηλότερη τιμή. Όσον αφορά στα γονίδια το *sul1* δείχνει να σχετίζεται με μείωση του ποσοστού της μείωσης του πληθυσμού ενώ δε συμβαίνει το ίδιο με το *qnrA*.

Πίνακας 26. Συσχετίσεις παραμέτρων στο μοντέλο για το αντιβιοτικό amoxicillin. Estimate: η διαφορά της απομάκρυνσης του πληθυσμού από τη μέση τιμή, p. value: η τιμή σημαντικότητας

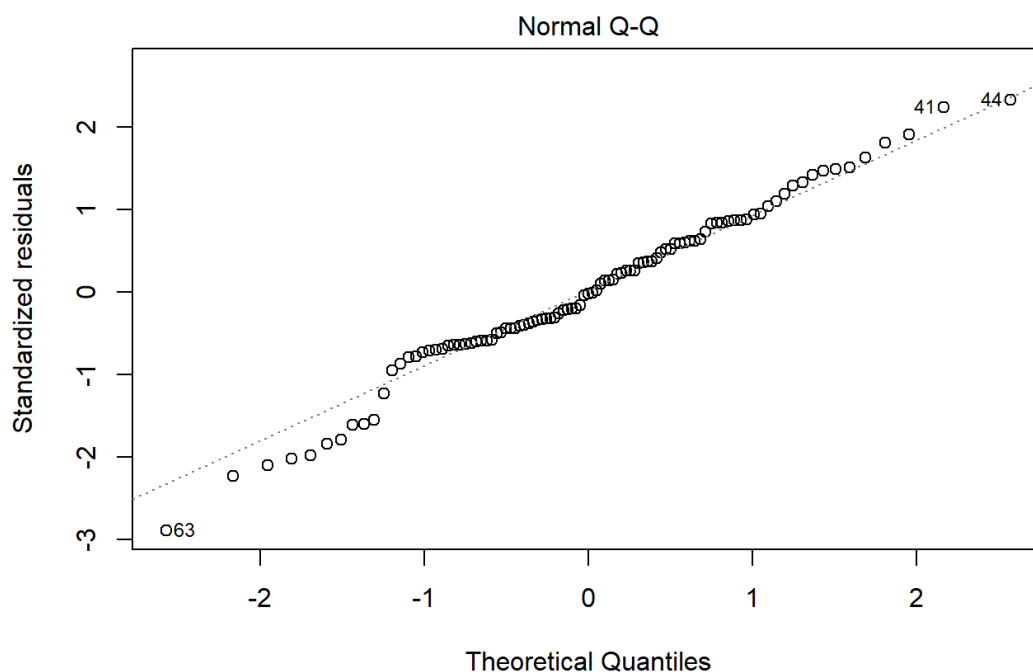
	Estimate	Std. Error	t value	p. value
TREATMENTC	91.394	18.624	4.907	4.70e-06***
TREATMENT HRT1D	39.899	24.041	1.660	0.10085
TREATMENT HRT2D	87.121	17.002	5.124	1.99e-06***
TREATMENTHRT LOW	91.230	10.758	8.480	8.48e-13***
TREATMENTIN WET	111.324	17.002	6.548	4.96e-09***
TREATMENT WWTP	76.826	18.624	4.125	8.92e-05***
log(CONCENTRATION)	14.169	1.903	7.447	9.14e-11***
id_Sul1	-33.577	15.202	-2.209	0.03002*
id_qnrA	49.779	15.202	3.274	0.00156**

Οι γραμμές πρόβλεψης (Γράφημα 93) δείχνουν ότι την καλύτερη απόδοση αναμένεται να έχει το C και ακολουθούν κατά σειρά IN WET, HRTLOW, HRT1D, HRT2D και WTTP.



Γράφημα 93. Γράφημα πρόβλεψης για το AMOX. Οι τελείες δείχνουν τις τιμές πρόβλεψης και οι γραμμές ενώνουν τις μέσες τιμές πρόβλεψης για κάθε μέθοδο επεξεργασίας.

Στο Γράφημα 94 παρουσιάζεται το μοντέλο για το αντιβιοτικό TET και σε αυτή την περίπτωση δεν περιλαμβάνεται κάποιο από τα γονίδια ως παράμετρος.



$$\text{lm}(\text{'REDUCTION\%'} \sim \text{TREATMENT} + \log(\text{CONCENTRATION}) - 1)$$

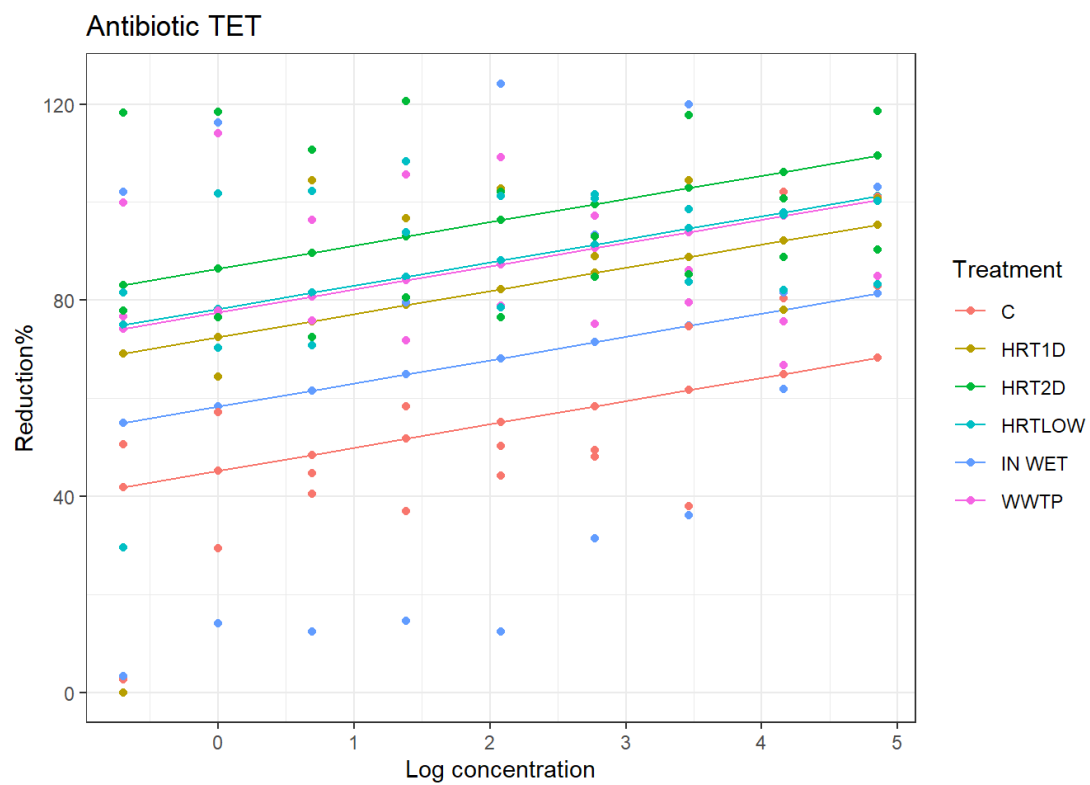
Γράφημα 94. QQ-plot και παράμετροι για την προσαρμογή του μοντέλου TET.

Από τον Πίνακα 27 φαίνεται ότι μεταξύ των επεξεργασιών τη χαμηλότερη αύξηση % στη μέση μείωση του πληθυσμού δόθηκε από το C.

Πίνακας 27. Συσχετίσεις παραμέτρων στο μοντέλο για το αντιβιοτικό tetracycline. Estimate: η διαφορά της απομάκρυνσης του πληθυσμού από τη μέση τιμή, p. value: η τιμή σημαντικότητας

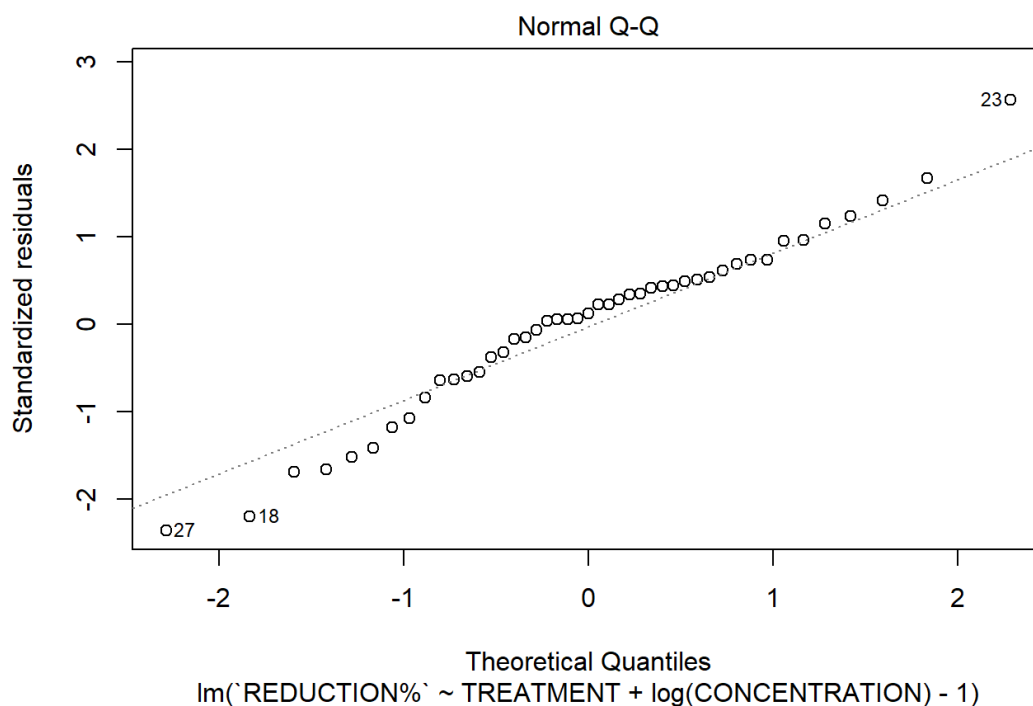
	Estimate	Std. Error	t value	p. value
TREATMENT C	45.177	6.770	6.673	1.85e-09***
TREATMENT HRT1D	72.393	9.090	7.964	4.28e-12***
TREATMENT HRT2D	86.416	6.770	12.765	< 2e-16***
TREATMENT HRT LOW	78.219	6.770	11.554	< 2e-16***
TREATMENT IN WET	58.292	6.770	8.611	1.91e-13***
TREATMENT WWTP	77.451	6.770	11.441	< 2e-16***
log(CONCENTRATION)	4.746	1.445	3.284	0.00145**

Αυτό φαίνεται και από το Γράφημα 95 όπου οι γραμμές της μέσης πρόβλεψης δίνουν κατά σειρά HRT2D, HRTLOW, HRT1D, IN WET και C.



Γράφημα 95. Γράφημα πρόβλεψης για το TET. Οι τελείες δείχνουν τις τιμές πρόβλεψης και οι γραμμές ενώνουν τις μέσες τιμές πρόβλεψης για κάθε μέθοδο επεξεργασίας.

Στο Γράφημα 96 παρουσιάζεται η προσαρμογή του μοντέλου για το αντιβιοτικό CEF και όπως φαίνεται δεν υπήρξε η συμμετοχή κάποιου γονιδίου στο μοντέλο.



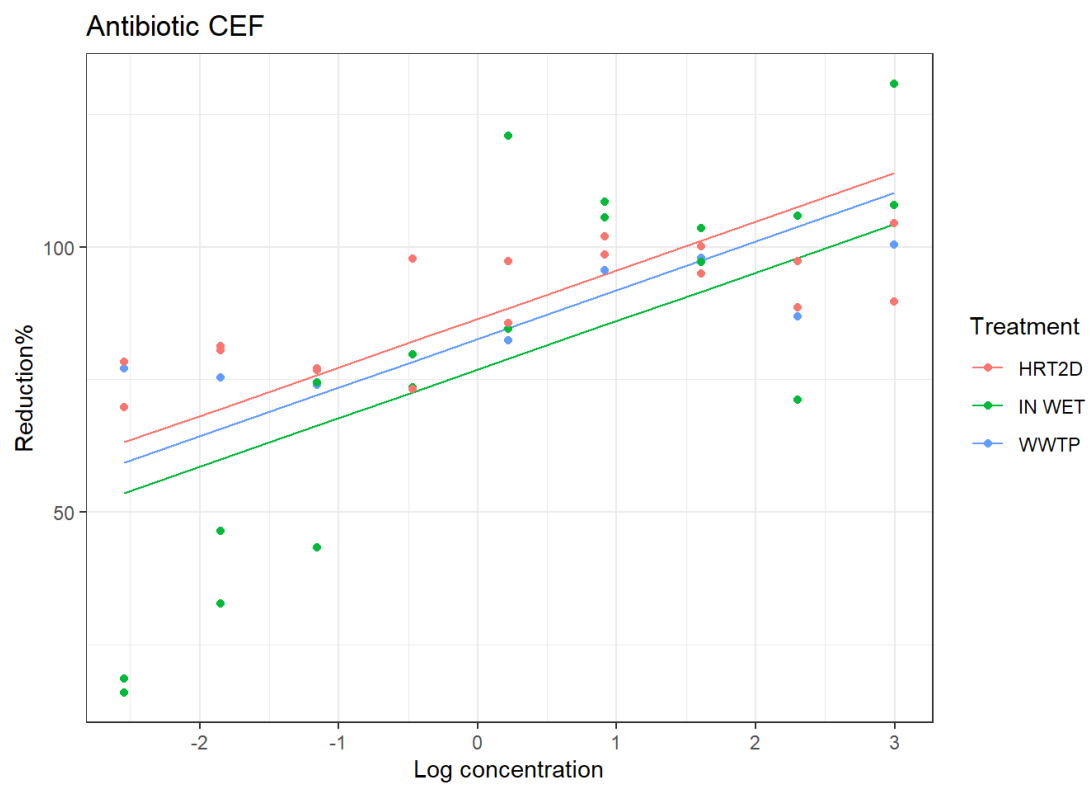
Γράφημα 96. QQ-plot και παράμετροι για την προσαρμογή του μοντέλου CEF.

Από τον Πίνακα 28 φαίνεται ότι οι τιμές της αύξησης της μείωσης του πληθυσμού ήταν παρόμοιες για τις εξεταζόμενες επεξεργασίες.

Πίνακας 28. Συσχετίσεις παραμέτρων στο μοντέλο για το αντιβιοτικό cefaclor. Estimate: η διαφορά της απομάκρυνσης του πληθυσμού από τη μέση τιμή, p. value: η τιμή σημαντικότητας

	Estimate	Std. Error	t value	p. value
TREATMENT HRT2D	86.455	3.985	21.693	< 2e-16***
TREATMENTIN WET	76.866	3.985	19.287	< 2e-16***
TREATMENT WWTP	82.692	5.627	14.695	< 2e-16***
log(CONCENTRATION)	9.159	1.406	6.513	8.08e-08***

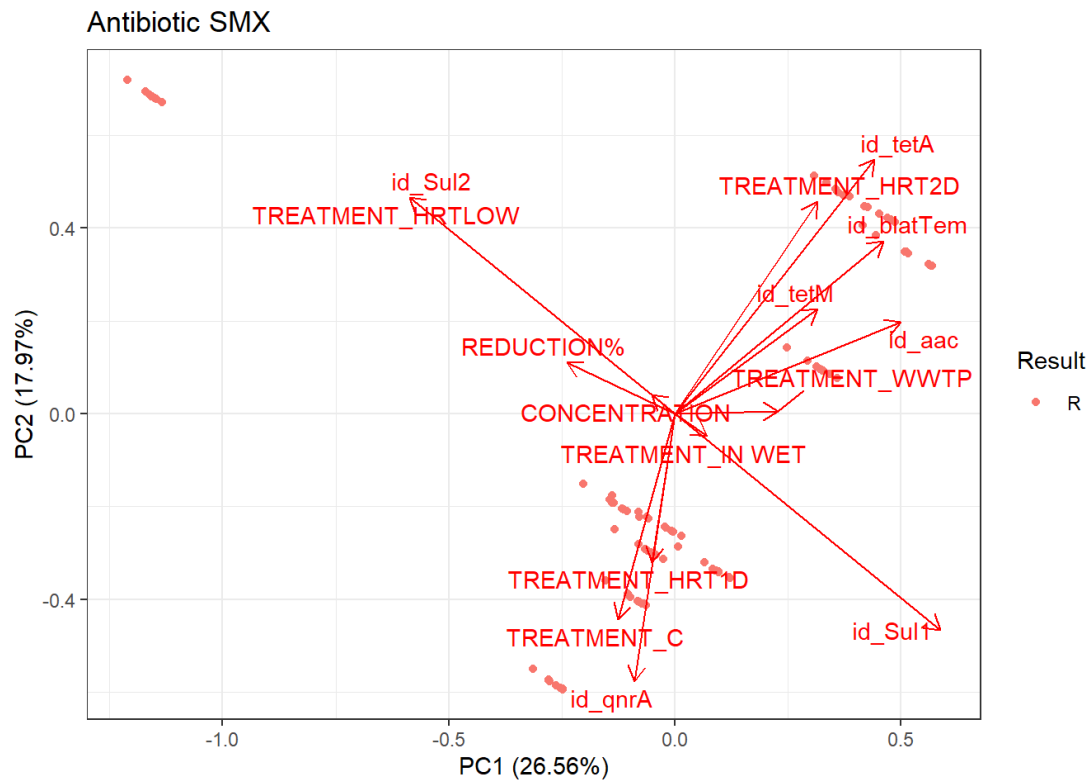
Στο Γράφημα 97 παρουσιάζονται οι μέσες τιμές πρόβλεψης για τις εξεταζόμενες επεξεργασίες και όπως φαίνεται την καλύτερη απόδοση αναμένεται να την έχει το HRT2D ενώ ακολουθούν WTTP και IN WET.



Γράφημα 97. Γράφημα πρόβλεψης για το TET. Οι τελείες δείχνουν τις τιμές πρόβλεψης και οι γραμμές ενώνουν τις μέσες τιμές πρόβλεψης για κάθε μέθοδο επεξεργασίας.

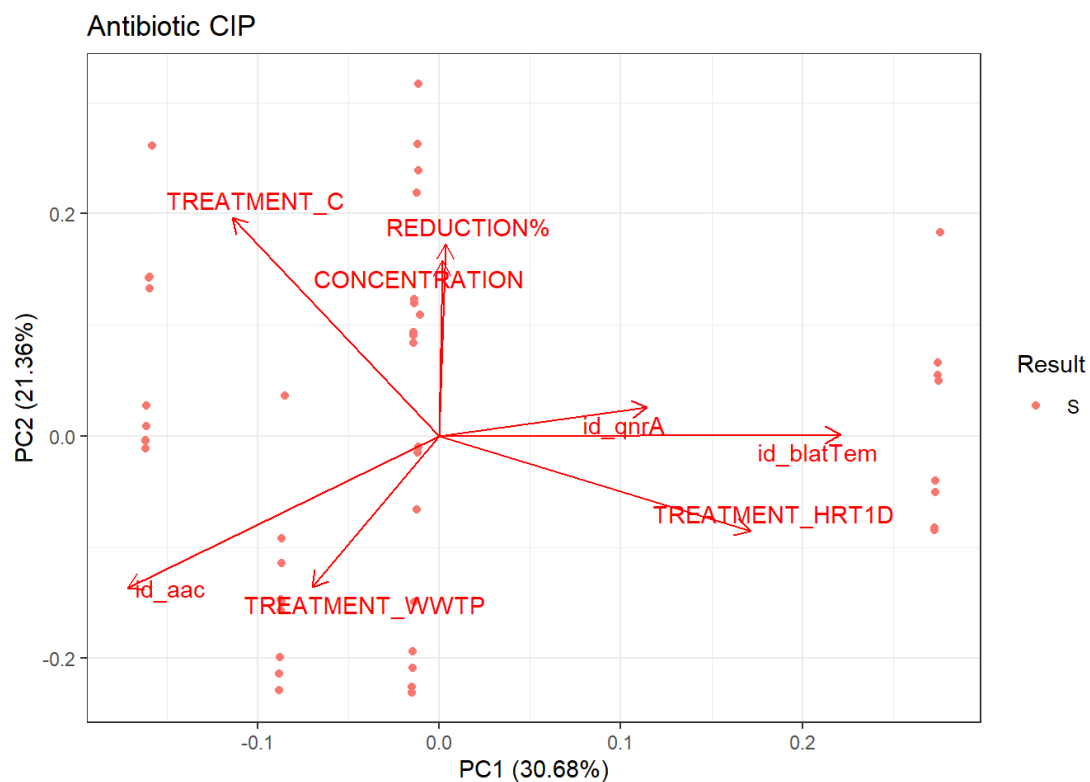
3.16.4 Ανάλυση κυρίων συνιστωσών PCA - Enterococci

Ακολουθεί η ανάλυση PCA για τους εντερόκοκκους. Για το αντιβιοτικό SMX (Γράφημα 98) όλα τα στελέχη παρουσιάστηκαν ανθεκτικά και φαίνεται να υπάρχει σύνδεση με το γονίδιο bla_{TEM} και την επεξεργασία HRT2D.



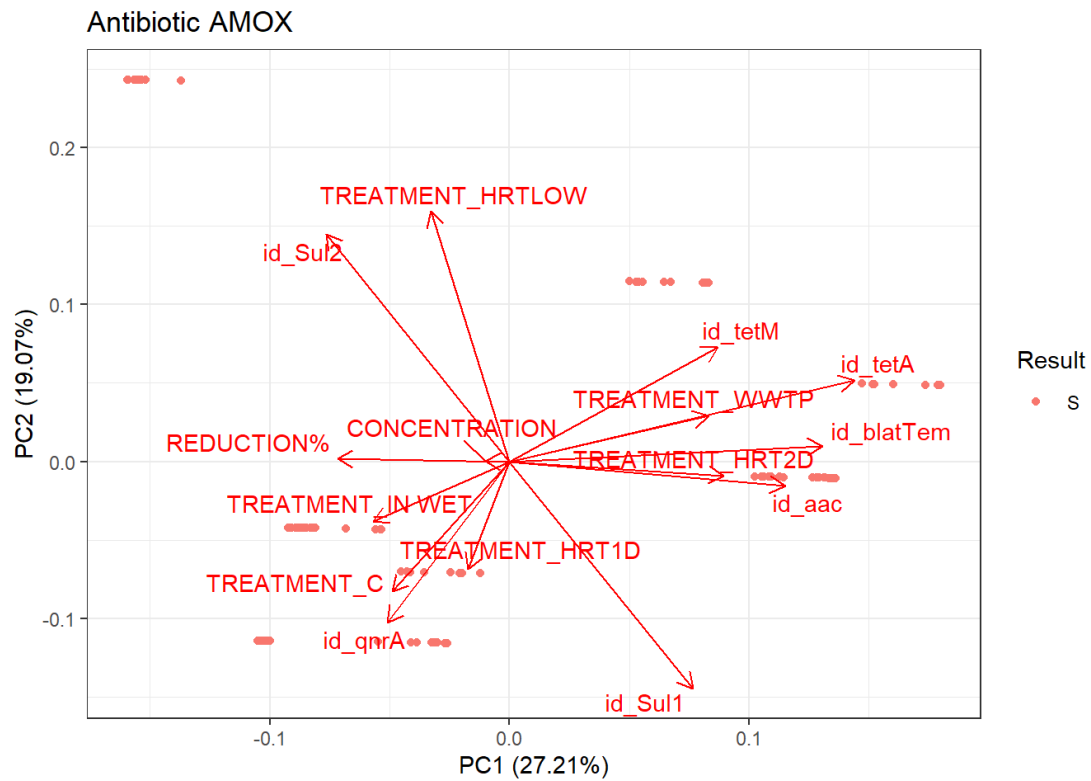
Γράφημα 98. Ανάλυση PCA του πληθυσμού των εντερόκοκκων για την επεξεργασία με το αντιβιοτικό SMX.

Για το αντιβιοτικό CIP όλα τα στελέχη παρουσιάστηκαν ευαίσθητα ενώ δεν παρουσιάστηκαν ξεκάθαρες συσχετίσεις μεταξύ των παραμέτρων.



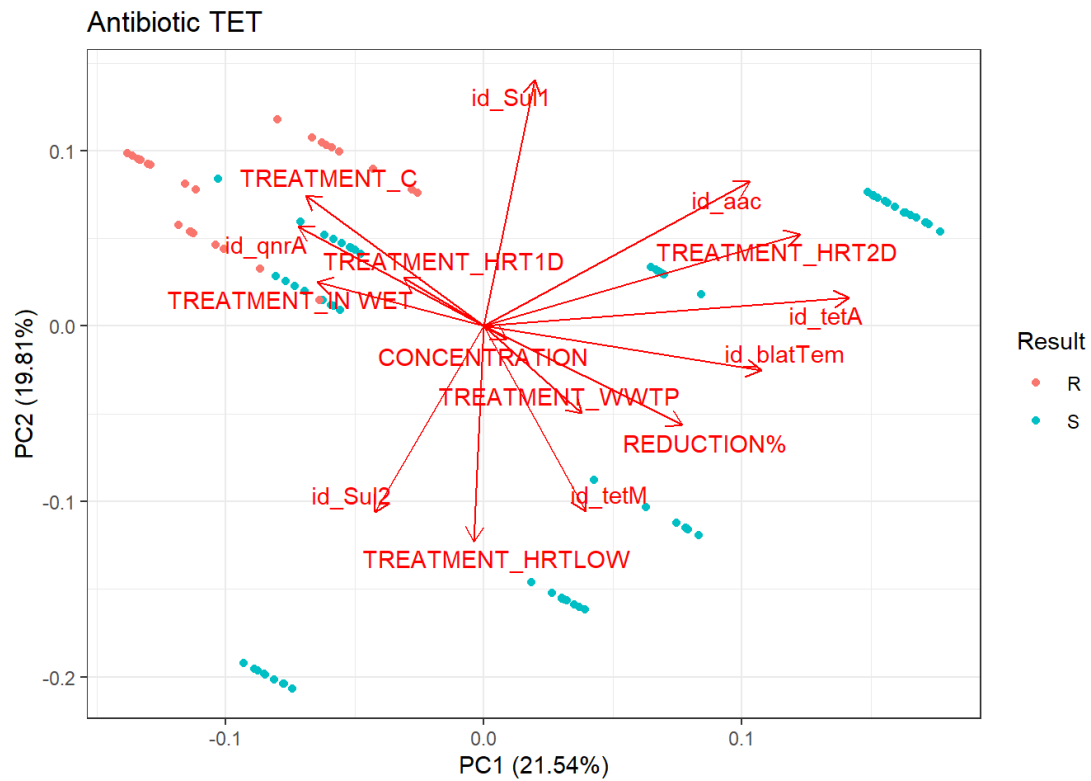
Γράφημα 99. Ανάλυση PCA του πληθυσμού των εντερόκοκκων για την επεξεργασία με το αντιβιοτικό CIP.

Και στην περίπτωση του αντιβιοτικού AMOX (Γράφημα 100) όλα τα εξεταζόμενα στελέχη χαρακτηρίστηκαν ευαίσθητα και φαίνεται συσχέτιση με τα γονίδια tetA, qnrA και aac όπως και με τις επεξεργασίες HRT 1D, HRT 2D και IN WET.



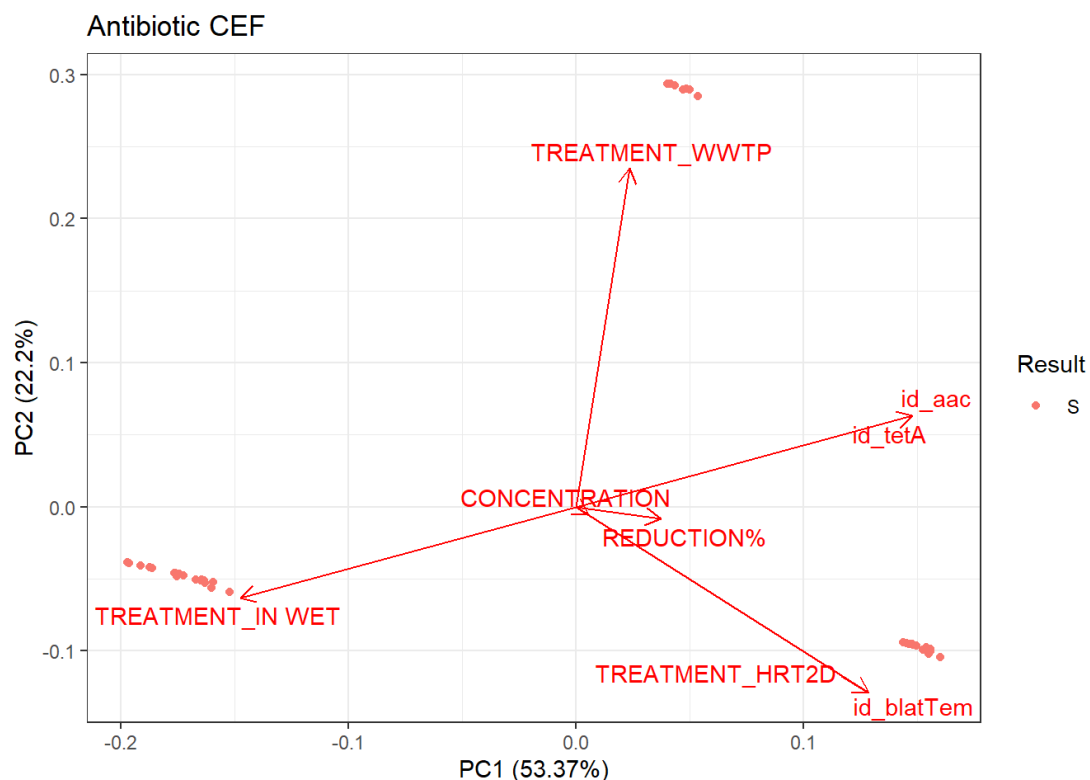
Γράφημα 100. Ανάλυση PCA του πληθυσμού των εντερόκοκκων για την επεξεργασία με το αντιβιοτικό AMOX.

Στην περίπτωση του αντιβιοτικού TET (Γράφημα 101) εντοπίστηκαν και ευαίσθητα και ανθεκτικά στελέχη. Όσον αφορά στην ανθεκτικότητα δεν παρατηρήθηκε κάποια ξεκάθαρη συσχέτιση, ενώ η ευαισθησία φαίνεται να συνδέεται με την επεξεργασία HRT2D.



Γράφημα 101. Ανάλυση PCA του πληθυσμού των εντερόκοκκων για την επεξεργασία με το αντιβιοτικό TET.

Στην τελευταία περίπτωση, αυτή για το αντιβιοτικό CEF (Γράφημα 102), όλα τα στελέχη παρουσιάστηκαν ευαίσθητα και φαίνεται να υπάρχει σύνδεση με τις επεξεργασίες WWTP και IN WET.



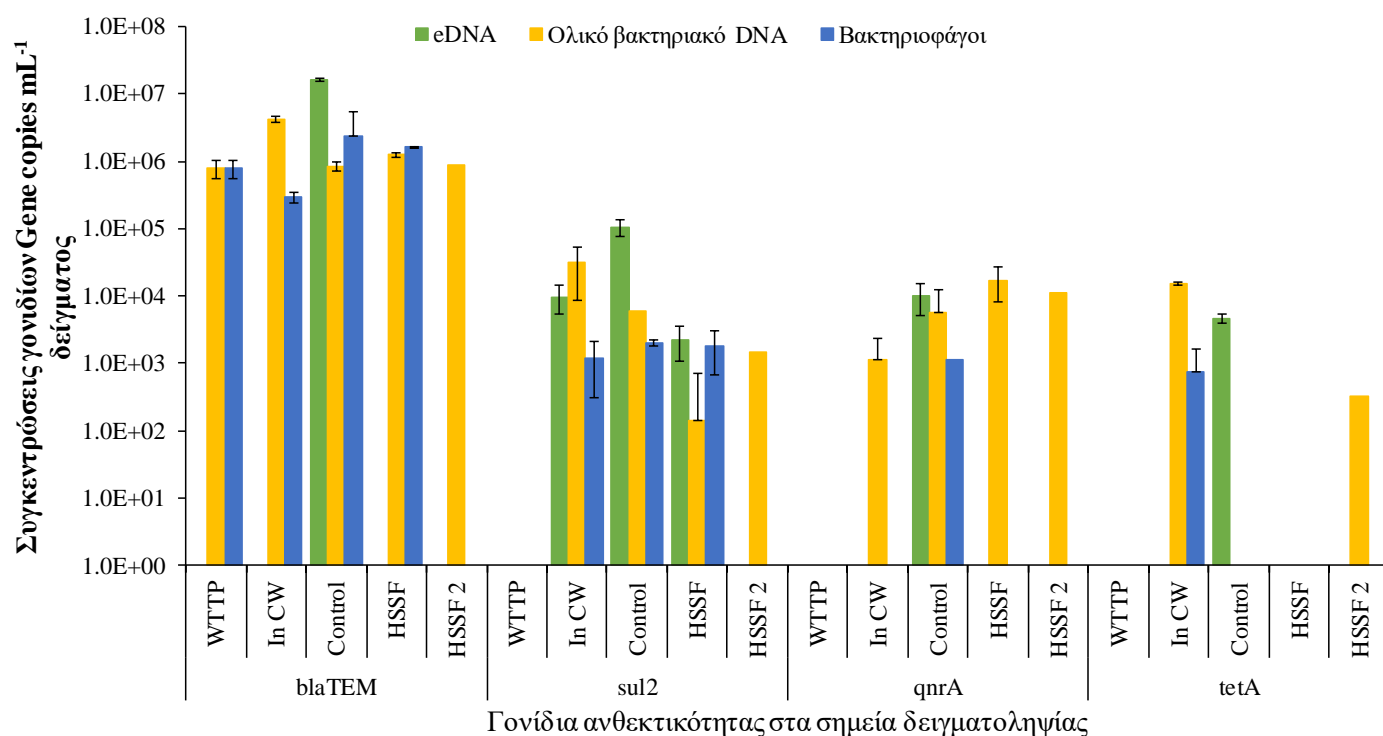
Γράφημα 102. Ανάλυση PCA του πληθυσμού των εντερόκοκκων για την επεξεργασία με το αντιβιοτικό CEF.

3.16.5 Ποσοτικοποίηση γονιδίων σε διαφορετικού τύπου γενετικό υλικό

Στο Γράφημα 103 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις 4 επιλεγμένων γονιδίων (*bla*TEM, *sul*2, *qnr*A, *tet*A) τα οποία προήλθαν από γενετικό υλικό διαφορετικού τύπου δηλαδή από ελεύθερο γενετικό υλικό (eDNA), βακτηριακό γενετικό υλικό και γενετικό υλικό βακτηριοφάγων.

Αρχικά συγκρίνοντας τα αποτελέσματα από την έξοδο της πρωτοβάθμιας και την έξοδο της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας, παρατηρήθηκε ότι το *bla*TEM στο βακτηριακό γενετικό υλικό παρουσίασε αύξηση της συγκέντρωσης στην έξοδο της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας. Τα υπόλοιπα γονίδια εντοπίστηκαν στην εκροή της δευτεροβάθμιας ενώ δεν εντοπίστηκαν στην εκροή της πρωτοβάθμιας. Το γενετικό υλικό το οποίο προέρχεται από τους βακτηριοφάγους έδειξε μικρή μείωση για το *bla*TEM και το *qnr*A δεν εντοπίστηκε. Τα *sul*2 και *tet*A εντοπίστηκαν στην έξοδο της δευτεροβάθμιας ενώ δεν εντοπίστηκαν στην εκροή της πρωτοβάθμιας. Όσον αφορά στο eDNA, μόνο το *sul*2 ποσοτικοποιήθηκε στην έξοδο της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας.

Κατόπιν, τα αποτελέσματα από την εκροή του υδροβιοτόπου με λειτουργία HRT1 έδειξαν για το bla_{TEM} μικρή μείωση της συγκέντρωσης στο βακτηριακό γενετικό υλικό και μικρή αύξηση στο γενετικό υλικό των φάγων. Για το sul2 παρατηρήθηκε μείωση στο eDNA και στο βακτηριακό γενετικό υλικό, ενώ η συγκέντρωση του στο γενετικό υλικό των φάγων παρέμεινε στα ίδια επίπεδα. Για το qnrA παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης στην έξοδο του υδροβιοτόπου στο βακτηριακό γενετικό υλικό. Το tetA δεν εντοπίστηκε σε κανέναν από τους τρεις τύπου γενετικού υλικού.



Γράφημα 103. Συγκεντρώσεις γονιδίων ανθεκτικότητας σε διαφορετικού τύπου γενετικό υλικό στις εκροές των επεξεργασιών. Οι τιμές παρουσιάζονται σε μέσους όρους με το στατιστικό σφάλμα.

Για τον υδροβιοτόπο με λειτουργία HRT 2 ημέρες τα αποτελέσματα έδειξαν για το bla_{TEM}, το sul2 και το tetA μικρή μείωση της συγκέντρωσης στο βακτηριακό γενετικό υλικό ενώ δεν εντοπίστηκαν στους άλλους τύπους. Στην περίπτωση του qnrA παρατηρήθηκε μικρή αύξηση της συγκέντρωσης.

Τέλος η περίπτωση του υδροβιοτόπου χωρίς βλάστηση έδειξε για το bla_{TEM} παρουσία του γονιδιού στο eDNA, μείωση της συγκέντρωσης στο βακτηριακό DNA και αύξηση στο γενετικό υλικό των φάγων σε σύγκριση με το προηγούμενο στάδιο επεξεργασίας. Για το sul2 παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης του γονιδιού στο eDNA και μικρή αύξηση στο γενετικό υλικό των φάγων ενώ σημειώθηκε μείωση στο

βακτηριακό DNA σε σχέση με το προηγούμενο στάδιο επεξεργασίας. Τέλος το tetA ποσοτικοποιήθηκε στο eDNA ενώ δεν είχε παρουσιαστεί στο προηγούμενο στάδιο και δεν ποσοτικοποιήθηκε στο βακτηριακό DNA και στο υλικό των φάγων όπου είχε εμφανιστεί προηγουμένως.

3.17 Συζήτηση αποτελεσμάτων - Αποτελεσματικότητα υδροβιότοπου ως προς την απομάκρυνση ARB και ARGs

Αρχικά σημειώνεται ότι και οι δύο τύποι βακτηρίων παρουσιάζουν αύξηση της τιμής MIC₆₀ σε μόλις 2 από τα αντιβιοτικά στα δείγματα από την εκροή της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας. Όμως τα γονίδια τα οποία ποσοτικοποιήθηκαν στα απομονωμένα στελέχη από την εκροή της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας έδειξαν εντονότερη παρουσία και μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από τα στελέχη που απομονώθηκαν από την έξοδο της πρωτοβάθμιας. Επίσης τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στην έξοδο της δευτεροβάθμιας οι συγκεντρώσεις των εξεταζόμενων γονιδίων ήταν μεγαλύτερες από την είσοδο και στα τρία κλάσματα γενετικού υλικού. Το αποτέλεσμα αυτό θα μπορούσε να επιβεβαιώσει το γεγονός ότι ευνοείται η ανταλλαγή και η μεταφορά των γονιδίων κατά το στάδιο της αερόβιας επεξεργασίας.

Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώνουν την άποψη ότι κατά την δευτερογενή επεξεργασία των λυμάτων ευνοείται η ανάπτυξη των ανθεκτικών βακτηρίων. Από τη μελέτη αυτή και από την εξέταση της MIC₆₀ προκύπτει ότι τα βακτήρια είναι πιθανό να αποκτήσουν ανθεκτικότητα σε ορισμένα από τα αντιβιοτικά κατά το στάδιο αυτό. Αυτό ενισχύεται ακόμα περισσότερο από τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης των ARGs στα στελέχη, όπου έδειξαν εντονότερη παρουσία των γονιδίων ανθεκτικότητας και στους δύο τύπους βακτηρίων. Το ίδιο επιβεβαιώνεται και από τα αποτελέσματα για τους διαφορετικού τύπου γενετικό υλικό όπου έδειξαν ότι οι συγκεντρώσεις των γονιδίων μπορεί να είναι αυξημένες. Οι αυξημένες συγκεντρώσεις στο βακτηριακό γενετικό υλικό θα μπορούσε εν μέρει να οφείλεται στην ποικιλομορφία των αυτόχthonων βακτηριακών πληθυσμών αφού είναι γνωστό ότι το φορτίο των βακτηριακών δεικτών μειώνεται κατά την δευτερογενή επεξεργασία. Τα παραπάνω είναι συμφωνία με άλλες μελέτες οι οποίες έχουν δείξει ότι τα WWTP ευνοούν την γενετική ανταλλαγή και ότι η εκροή της ενεργού ιλύος παρουσιάζει υψηλότερες συγκεντρώσεις από την εισροή ενώ σημειώνεται ότι ο πολλαπλασιασμός των ARGs λαμβάνει χώρα κυρίως στη δεξαμενή αερισμού όπου υπάρχει βιοδιάσπαση και

ανάπτυξη βακτηρίων. Οι αυξημένες συγκεντρώσεις του *sul2* στα απομονωμένα στελέχη από την έξοδο της δευτεροβάθμιας είναι σε συμφωνία με την μελέτη των Mao et al που αναφέρουν ότι τα γονίδια *sul* είναι κυρίαρχα στην ενεργό υλή (Mao et al., 2015).

Κάνοντας μια σύγκρισή των αποτελεσμάτων από τα ARGs στο βακτηριακό DNA από την εκροή της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας με τα αποτελέσματα του υδροβιότοπου από το προηγούμενο κεφάλαιο παρατηρούμε ότι ο υδροβιότοπος παρουσιάζει μείωση σε όλες τις περιπτώσεις γονιδίων ενώ η εκροή της δευτεροβάθμιας όχι.

Βάσει των αποτελεσμάτων αυτής της μελέτης και σύμφωνα με τις μέσες τιμές MIC₆₀ μπορεί να αναφερθεί ότι ο CW ως σύστημα τριτοβάθμιας επεξεργασίας θα μπορούσε να συνεισφέρει στον περιορισμό των ARB. Αυτό στηρίζεται στο γεγονός ότι τα οι μέσες τιμές MIC₆₀ από τα απομονωμένα στελέχη τα οποία προέρχονται από την εκροή του HSSF δείχνουν ευαισθησία στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά και οι μέσες τιμές της MIC₆₀ μειώθηκαν κατά την επεξεργασία από τον υδροβιότοπο για τις περισσότερες περιπτώσεις αντιβιοτικών. Όμως αυτό αποτελεί μια εκτίμηση και δεν είναι πανάκεια ότι οι CW έχουν την ικανότητα να εξαλείφουν πλήρως τα ARB καθώς παρατηρώντας μεμονωμένα τα στελέχη υπήρξαν περιπτώσεις που χαρακτηρίζονται ως ανθεκτικές. Μάλιστα υπήρξαν στελέχη που χαρακτήρισαν ανθεκτικά σε 3 από τα 4 εξεταζόμενα αντιβιοτικά κατατάσσοντας τα στα πολυανθεκτικά βακτήρια.

Επίσης τα ίδια τα βακτήρια μπορεί να έχουν διαφορετικές συμπεριφορές κατά την επεξεργασία τους με διαφορετικές μεθόδους. Αυτό είναι σύμφωνο με μελέτη πάνω στους CW η οποία σημειώνει ότι το *E. faecium* δείχνει διαφορετική συμπεριφορά σε διαφορετικά αντιβιοτικά (Russo et al., 2019).

Αναφερόμενοι στην ικανότητα των CW να απομακρύνουν τα ARGs παρατηρείται μια πολύπλοκη συμπεριφορά. Οι παράμετροι οι οποίες καθορίζουν τη λειτουργία και την απόδοση των CW όπως ο HRT, ο HRL, το υπόστρωμα, το pH και η βλάστηση μπορούν να βελτιώσουν την απόδοση τους ως προς την απομάκρυνση των ARGs και των ARB αλλά ταυτόχρονα μπορεί να δημιουργήσουν ευνοϊκές συνθήκες για την εξάπλωση τους. Έτσι, οι μηχανισμοί της απορρόφησης και της βιοαποδόμησης οι οποίοι αναφέρεται ότι μπορούν να συμβάλλουν στη μείωση των ARGs, μπορούν ταυτόχρονα να έχουν ρόλο και στον πολλαπλασιασμό τους (Chen et al., 2016).

Η πλούσια βακτηριακή ποικιλομορφία που υπάρχει στους CW και συμμετέχει στη βιοαποδόμηση ταυτόχρονα ευνοεί την μετάδοση των ARGs μεταξύ των βακτηρίων. Επίσης, οι δομές του βιοφίλμ που αναπτύσσονται ειδικά στους CW υποεπιφανειακής ροής λόγω του υποστρώματος (Fang et al., 2017) δημιουργούν δεξαμενές ARGs καθώς τα γονίδια που είναι σε μορφή eDNA παγιδεύονται στο βιοφίλμ (Sidrach-Cardona and Bécaries, 2013). Ακόμη, στα υποστρώματα προσροφώνται και ρυπαντές όπως αντιβιοτικά και βαρέα μέταλλα τα οποία δημιουργούν επιλεκτική πίεση στα βακτήρια (Fang et al., 2017).

Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έδειξαν ότι η απόδοση του συστήματος επηρεάζεται από τον υδραυλικό χρόνο παραμονής χωρίς όμως να είναι ξεκάθαρο αν η επιρροή αυτή είναι αρνητική ή θετική. Οι τιμές MIC₆₀ παρουσιάστηκαν αυξημένες όσο και οι συγκεντρώσεις των ARGs στα στελέχη των βακτηρίων τα οποία απομονώθηκαν από την εκροή του HSSF HRT2. Ο HRT επηρεάζει εμμέσως την απομάκρυνση των ARGs και των ARB καθώς μεγαλύτερος χρόνος παραμονής οδηγεί σε μεγαλύτερη απομάκρυνση των παθογόνων και συνεπώς λιγότερα ανθεκτικά βακτήρια στην εκροή. Όμως την ίδια στιγμή ο μεγαλύτερος HRT αυξάνει το χρονικό διάστημα που συνυπάρχουν τα βακτήρια ευνοώντας τη γενετική ανταλλαγή. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να εξηγήσει το αποτέλεσμα ότι ο CW με HRT2 παρουσιάζει μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ARGs από ότι ο HRT1.

Παρόμοια είναι τα αποτελέσματα και όσον αφορά στο ρόλο της βλάστησης. Τα φυτά εμπλέκονται έμμεσα στον περιορισμό των ARB αυξάνοντας τη διαθέσιμη επιφάνεια για την προσρόφηση των μικροοργανισμών. Όπως αναφέρεται και παραπάνω οι CW με βλάστηση είναι πιο αποδοτικοί από αυτούς χωρίς στην απομάκρυνση των βακτηρίων και λογικά απελευθερώνουν λιγότερα ARB στην εκροή τους. Αντιστρόφως, οι ίδιες συνθήκες που προσφέρονται από τα φυτά μπορεί να συμβάλουν στην εξάπλωση των ARB και των ARGs. Η μεταφορά οξυγόνου από τις ρίζες των φυτών στα υποστρώματα ευνοεί την ανάπτυξη και τη δραστηριότητα των βακτηρίων άρα και τις γενετικές μεταλλαγές. Σε αυτό πιθανόν να οφείλεται και η εντονότερη παρουσία των ARGs στα στελέχη τα οποία προήλθαν από την εκροή του υδροβιότοπο με βλάστηση σε σχέση με τον Control.

Κάτι ακόμα που ενδεχομένως συμβάλλει σε αυτή την περίπλοκη συμπεριφορά είναι η παρουσία αντιβιοτικών σε υποανασταλτικές συγκεντρώσεις. Ως υποανασταλτικές

συγκεντρώσεις ορίζονται οι συγκεντρώσεις αντιβιοτικών, οι οποίες επιτρέπουν στα ευαίσθητα βακτήρια να αναπτυχθούν αλλά με μειωμένους ρυθμούς. Οι υδροβιότοποι έχουν την δυνατότητα να απομακρύνουν αντιβιοτικά μέσω μηχανισμών όπως η προσρόφηση στο υπόστρωμα, η βιοαποδόμηση και η αναρρόφηση από τα φυτά (plant uptake). Το ίδιο σύστημα σε άλλη μελέτη έδειξε ότι μπορεί να απομακρύνει τις συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών SMX και CIP, με τις τελικές συγκεντρώσεις στην εκροή να είναι υποανασταλτικές τουλάχιστον για τα εξεταζόμενα βακτήρια (Christofilopoulos et al., 2019). Οι υποανασταλτικές συγκεντρώσεις έχει αναφερθεί ότι ευνοούν την εξάπλωση της ανθεκτικότητας (Gullberg et al., 2011). Τα υπολείμματα των αντιβιοτικών εντείνουν την οριζόντια μεταφορά των γονιδίων με την μελέτη των Mao et al να αναφέρει ότι υπάρχει συσχέτιση των συγκεντρώσεων των αντιβιοτικών και της παρουσίας των ARGs (Mao et al., 2015). Οι υποανασταλτικές συγκεντρώσεις αυξάνουν το ρυθμό και τη συχνότητα των διάφορων γενετικών διαδικασιών συμπεριλαμβανομένων της HGT, του ανασυνδυασμού και της μεταλλαξιγένεσης. Η αύξηση του ρυθμού της HGT προκαλείται από την απόκριση SOS. Η απόκριση SOS (SOS response) είναι μια καθολική απόκριση των βακτηρίων σε αλλοιώσεις του DNA τους, η οποία περιλαμβάνει την εισαγωγή γονιδιακών προϊόντων που εμποδίζουν την κυτταρική διαίρεση και προάγουν τη μετάλλαξη, τον ανασυνδυασμό και την επιδιόρθωση του DNA με τις βασικές πρωτεΐνες που εμπλέκονται να είναι οι RecA και LexA. Για παράδειγμα η επεξεργασία του στελέχους *E. coli* O157:H7 με φλουοροκινολόνες ενεργοποιεί τον μηχανισμό SOS με αποτέλεσμα την εισαγωγή του γονιδίου της τοξίνης shiga (Andersson and Hughes, 2014). Επίσης έχει αναφερθεί ότι η τετρακυκλίνη επιταχύνει έως και 1000 φορές την HGT γενετικών στοιχείων σε αρκετά παθογόνα βακτήρια όπως το *Staphylococcus aureus*, το *E. faecalis*, το *Listeria monocytogenes*, το *Vibrio cholerae* και το *E. coli* (Hughes and Andersson, 2012). Άλλη μελέτη αναφέρει ότι η αποδόμηση των σουλφοναμίδων μπορεί να ευνοεί την εξάπλωση των γονιδίων ανθεκτικότητας (Vila-Costa et al., 2017). Έτσι, ενώ θα περιμέναμε να μειωθεί η επιλεκτική πίεση στα βακτήρια λόγω της μείωσης της συγκέντρωσης των αντιβιοτικών (Pei et al., 2019) εμφανίζεται το αντίθετο αποτέλεσμα, δηλαδή η αύξηση των ARGs στον υδροβιότοπο χωρίς επιμόλυνση σε σχέση με αυτόν που δεχόταν επιμόλυνση. Σε γενικές γραμμές σε υποανασταλτικές συνθήκες ευνοούνται τα βακτήρια που αναπτύσσουν μεταλλάξεις οι οποίες έχουν χαμηλό κόστος προσαρμογής (fitness cost) για το βακτήριο. Αυτό έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, δεδομένου ότι ο περιορισμός της χρήσης των αντιβιοτικών θεωρείται μέθοδος περιορισμού των ARB,

καθώς η εφαρμογή ενός τέτοιου μέτρου δε θα έχει αποτέλεσμα σε καταστάσεις στις οποίες η ανθεκτικότητα έχει δημιουργηθεί σε υποανασταλτικές συγκεντρώσεις (Andersson and Hughes, 2014).

Ακόμα ένας παράγοντας που επηρεάζει την απόδοση των CW είναι ο τύπος και τα χαρακτηριστικά των αποβλήτων. Ρύποι όπως τα αντιβιοτικά οι τοξίνες και τα βαρέα μέταλλα ωθούν τα βακτήρια στο να ενεργοποιήσουν τους αμυντικούς τους μηχανισμούς όπως τα efflux pumps, με σκοπό να αντισταθούν στις περιβαλλοντικές πιέσεις. Ως αποτέλεσμα γονίδια όπως τα tet που συνδέονται με αυτούς τους μηχανισμούς εμφανίζονται σε αφθονία (Fang et al., 2017). Άλλες μελέτες αναφέρουν ότι η παρουσία ενός αντιβιοτικού μπορεί να προκαλέσει ανθεκτικότητα σε διαφορετικές κλάσεις αντιβιοτικών. Για παράδειγμα η εισαγωγή της CIP σε ένα υδάτινο περιβάλλον μπορεί να προκαλέσει ανθεκτικότητα, όχι μόνο στη CIP αλλά και σε άλλες κλάσεις αντιβιοτικών (Helt et al., 2012). Επίσης αναφέρεται ότι τα γονίδια sul δε σχετίζονται με τις σουλφοναμίδες αλλά περισσότερο με τα βαρέα μέταλλα και τα ιντρεγκρόνια int1 (Lu et al., 2015).

Τέλος θα πρέπει να σημειωθεί ότι δείγματα από διαφορετικά σημεία του CW όπως η υδατική φάση ή το υπόστρωμα, μπορεί να δώσουν διαφορετικά αποτελέσματα για την συγκέντρωση των ARGs. Για παράδειγμα το sul1 είναι σε μεγαλύτερη αφθονία κοντά στο υπόστρωμα (Fang et al., 2017) ενώ άλλα γονίδια στην υδατική φάση ή κοντά στις ρίζες των φυτών.

Τα παραπάνω θα μπορούσαν να εξηγήσουν γιατί υπάρχουν μελέτες οι οποίες υποστηρίζουν την αντίθετη άποψη, δηλαδή ότι οι CW δεν συμβάλλουν στον περιορισμό των ARGs (Anderson et al., 2013; Berglund et al., 2014).

Όσον αφορά στους βακτηριοφάγους, το blaTEM εντοπίστηκε σε υψηλές συγκεντρώσεις το οποίο είναι σε συμφωνία με άλλες μελέτες οι οποίες ποσοτικοποίησαν αυτό το γονίδιο σε μεγάλες συγκεντρώσεις στο γενετικό υλικό των φάγων από διαφορετικές πηγές (Brown-jaque et al., 2018; Subirats et al., 2016). Αυτό πιθανόν να συνδέεται με το γεγονός ότι οι β - λακτάμες είναι τα πιο κοινά στη χρήση αντιβιοτικά παγκοσμίως (Gunathilaka et al., 2017). Η σημασία και ο ρόλος των βακτηριοφάγων στην εξάπλωση των ARGs πρέπει να σημειωθεί. Οι φάγοι μπορεί να μεταδώσουν τα γονίδια στα βακτήρια δημιουργώντας νέα ARB. Επιπροσθέτως έχουν ρόλο στο μηχανισμό της μεταφοράς καθώς πραγματοποιούν λύση των βακτηρίων

απελευθερώνοντας γενετικό υλικό (Balcázar, 2018). Οι βακτηριοφάγοι απαντώνται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από τα βακτήρια ενώ λόγω της δομής τους έχουν καλύτερα ποσοστά επιβίωσης σε διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως θερμοκρασία και pH (Colomer-Iluch et al., 2011). Επιπλέον, είναι ήδη γνωστό ότι οι φάγοι είναι πιο ανθεκτικοί στις επεξεργασίες απολύμανσης σε σχέση με τα βακτήρια (Calero-Cáceres and Muniesa, 2016). Αυτό συνεπάγεται ότι μπορούν να επιβιώσουν και να μεταφέρουν τα γονίδια ανθεκτικότητας στο περιβάλλον και να συμμετέχουν στη μεταφορά γονιδίων ανθεκτικότητας. Ωστόσο, οι φάγοι έχουν υποτιμημένο ρόλο στη μεταφορά και επιτάχυνση της εξάπλωσης των ARGs (Lekunberri et al., 2017; Subirats et al., 2016) και θα πρέπει να δοθεί περισσότερη προσοχή.

3.18 Συνολικά συμπεράσματα

Σε γενικές γραμμές, οι CW μπορούν να εξαλείψουν με επιτυχία το βακτηριακό φορτίο λειτουργώντας είτε ως σύστημα δευτεροβάθμιας είτε ως σύστημα τριτοβάθμιας επεξεργασίας. Παρ' όλα αυτά, το εναπομένον βακτηριακό φορτίο στα λύματα απαιτεί την περαιτέρω απολύμανσή του, ειδικά εάν το νερό προορίζεται για επαναχρησιμοποίηση.

- Τα CW αποτελούνται από μια αξιόπιστη και χαμηλού κόστους λύση για την επεξεργασία λυμάτων, καθώς μπορούν να είναι αποτελεσματικά έναντι των παθογόνων όπως οι ιοί συγκρινόμενοι με τα συμβατικά συστήματα επεξεργασίας.
- Οι AdV παρουσιάστηκαν ελαφρώς πιο ευαίσθητοι στην επεξεργασία με CW από τους EV. Ωστόσο, σημαντικές συγκεντρώσεις και των δύο ιών παραμένουν στα απόβλητα, εγκυμονώντας κινδύνους για τη δημόσια υγεία στην περίπτωση επαναχρησιμοποίησης των λυμάτων.
- Οι μοριακές μέθοδοι είναι πιθανό να υποεκτιμήσουν τις συγκεντρώσεις των ιών με τις πραγματικές να είναι 1-3 τάξης μεγέθους μεγαλύτερες.
- Οι βακτηριακοί δείκτες αποτυγχάνουν να προβλέψουν την παρουσία των ιών
- Η επιλογή των βακτηριοφάγων ως υποκατάστατων για τη μόλυνση των ιών πρέπει να εξεταστεί με προσοχή επειδή η συσχέτιση μεταξύ φάγων και εντερικών ιών εξαρτάται έντονα από τον τύπο της επεξεργασίας και τον τύπο του ιού και τον σχετιζόμενο τύπου φάγου.

- Θα πρέπει να καθοριστούν κοινοί μέθοδοι δειγματοληψίας και εξέταση των ιών.

Η ανάγκη εξάλειψης της χρήσης αντιβιοτικών είναι καθοριστικής σημασίας, καθώς επιλέγουν την αντοχή στα αντιβιοτικά όχι μόνο στα WWTP αλλά και στο περιβάλλον.

Οι CW μπορούν να αποτελέσουν μια αξιόπιστη εναλλακτική λύση ειδικά για τις αναπτυσσόμενες χώρες και τις μικρές κοινότητες, καθώς μπορούν να περιορίσουν τις συγκεντρώσεις των ARGs και των ARB (Dires et al., 2018). Αλλά αυτό δεν είναι πανάκεια καθώς η απόδοσή τους εξαρτάται από πολλούς παράγοντες και χρειάζονται περισσότερες μελέτες ώστε να εξεταστούν οι διαφορετικοί μηχανισμοί που συμβάλουν στην απομάκρυνση αλλά και στην εξάπλωση.

- Τα βακτήρια έχουν διαφορετικές συμπεριφορές σε διαφορετικές επεξεργασίες και σε διαφορετικές πιέσεις αντιβιοτικών.
- Ο υδραυλικός χρόνος παραμονής που φαίνεται να είναι ο σημαντικότερος παράγοντας στην απομάκρυνση των παθογόνων μικροοργανισμών φαίνεται ότι ευνοεί τα ARGs.
- Ο ρόλος των φάγων ως μέσο για τη διάδοση των ARG είναι υποτιμημένος.
- Η προσθήκη μεθόδων απολύμανσης είναι απαραίτητη για περαιτέρω μείωση των πληθυσμών των ARB και των φάγων που απελευθερώνονται στο υδάτινο περιβάλλον.
- Μελέτη η οποία κάνει εκτίμηση κινδύνου αναφέρει ότι η μείωση θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 5,1 log units ώστε να μην υπάρξει κίνδυνος για την δημόσια σε περίπτωση που το νερό πρόκειται να χρησιμοποιηθεί για πότισμα λαχανικών (Gonzales-Gustavson et al., 2019).

Στην πραγματικότητα, έως τώρα, οι περισσότερες μελέτες συσχετίζουν την ικανότητα των CW να αφαιρούν ARGs με την ικανότητά τους να απομακρύνουν το βακτηριακό φορτίο (Sidrach-Cardona and Bécáres, 2013) (Ibekwe et al., 2016) (Fang et al., 2017) που απελευθερώνεται από τα λύματα και κατά συνέπεια μειώνει τις πιθανότητες σύζευξης μεταξύ των πληθυσμών των βακτηρίων στο περιβάλλον. Απαιτείται περισσότερη έρευνα για την κατανόηση των μηχανισμών που συμβάλλουν στην εξάλειψη της ανθεκτικότητας και για τον προσδιορισμό των παραμέτρων που θα

μπορούσαν να βελτιώσουν την απόδοση αυτών των συστημάτων και για να εξετάσουν το ρόλο και άλλων παραγόντων όπως οι φάγοι που εμπλέκονται στη διάδοση της ανθεκτικότητας.

Βάσει των παραπάνω ίσως γεννάται και το ερώτημα αν είναι σημαντικότερη στην εκροή ενός τέτοιου συστήματος η ύπαρξη λιγότερων βακτηρίων ή η ύπαρξη περισσότερων βακτηρίων αλλά λιγότερο ανθεκτικών.

4 ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β. ΦΩΤΟΚΑΤΑΛΥΣΗ

4.1 Εισαγωγή

Ως φωτόλυση, ορίζεται η διάσπαση μιας χημικής ουσίας που προκαλείται από φωτεινή ενέργεια. Φωτόλυση μπορούν να προκαλέσουν τα φωτόνια του ορατού φάσματος, αλλά κυρίως του υπεριώδους καθώς περιέχουν περισσότερη ενέργεια (Goslan et al., 2006). Οι οργανικές ενώσεις που είναι διαλυμένες στα επιφανειακά νερά (Natural Organic Matter- NOM) αλλά και στα υγρά απόβλητα (Effluent Organic Matter- EfOM), όταν εκτεθούν επαρκώς στο ηλιακό φως, φωτολύονται και σχηματίζουν ενεργές μορφές οξυγόνου, όπως $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{O}_2$, H_2O_2 , οι οποίες προκαλούν περαιτέρω οξειδώσεις και διάσπαση οργανικών και ανόργανων ενώσεων (Gomes et al., 2009).

4.2 Αδρανοποίηση μικροοργανισμών με ηλιακή ακτινοβολία

Το φάσμα της ηλιακής ακτινοβολίας που μπορεί να έχει μικροβιοκτόνα δράση είναι το ερυθρό, το υπέρυθρο και το UV-A (Goslan et al., 2006; Oates et al., 2003). Οι κύριοι μηχανισμοί μικροβιακής αδρανοποίησης είναι οι εξής:

- Η απορρόφηση της UV-A ακτινοβολίας από το DNA, μπορεί να προκαλέσει την ένωση παρακείμενων πυριμιδινών (θυμίνη και κυτοσίνη) προς σχηματισμό διμερών πυριμιδινών, παρεμποδίζοντας έτσι την ένωση των δακτυλίων θυμίνης και κυτοσίνης με τις συμπληρωματικές τους βάσεις. Η αλλαγή αυτή στην δομή του DNA εμποδίζει τα ένζυμα πολυμεράσες, που είναι υπεύθυνα για την αντιγραφή του, να συνεχίσουν την κίνηση τους κατά μήκος του μορίου, με αποτέλεσμα να τερματίζουν πρόωρα την αντιγραφή στην περιοχή του διμερούς, να υπερπηδούν το προβληματικό σημείο, ή να εναποθέτουν τυχαίες βάσεις κατά την αντιγραφή και την μεταγραφή. Η αποσταθεροποίηση της διπλής έλικας του DNA και οι μεταλλάξεις, εάν δεν διορθωθούν μπορεί να προκαλέσουν κυτταρικό θάνατο (Venieri and Mantzavinos, 2017a).
- Η διέγερση των ενδοκυττάρων φωτοευαίσθητοποιών, όπως πορφυρίνες, φλαβόνες, κινίνες, NADH/NADPH, από την υπεριώδη ακτινοβολία, φαίνεται πως οδηγεί στον σχηματισμό ενεργών μορφών οξυγόνου, εντός του κυττάρου. Οι ενεργές μορφές οξυγόνου και κυρίως το $\cdot\text{OH}$, είναι ιδιαίτερα αντιδραστικές και είναι γνωστό πως προκαλούν φθορά στο DNA, οξειδώνουν τα δομικά

αμινοξέα των πρωτεϊνών και τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα των λιπιδίων. Το RNA, ως πιο ασταθές μόριο, είναι ακόμη πιο ευάλωτο στην οξειδωτική πίεση των ROS και υπόκειται σε περισσότερες βλάβες. Έτσι, ακόμη και μικρότερη δόση UV-A, που δεν επαρκεί για να βλάψει άμεσα το DNA, μπορεί έμμεσα να προκαλέσει κυτταρικό θάνατο, μέσω των ROS (McGuigan et al., 2012; Misstear et al., 2013).

- Στο εξωτερικό των μικροβιακών κυττάρων, οι οργανικές φωτοευαίσθητες ενώσεις που βρίσκονται διαλυμένες στο νερό (είτε πρόκειται για επιφανειακό νερό, είτε για λύμα) όπως οι χρωστικές και οι χουμικές ενώσεις, απορροφούν υπεριώδη ακτινοβολία και πραγματοποιούν φωτοχημικές αντιδράσεις που έχουν ως προϊόντα ενεργές μορφές οξυγόνου. Οι τελευταίες βλάπτουν τους μικροοργανισμούς οξειδώνοντας ενώσεις της κυτταρικής τους μεμβράνης (Oates et al., 2003).
- Η φωτοχημική οξείδωση του συνενζύμου A (ακετυλο-CoA), διαταράσσει τον κύκλο του Krebs και οδηγεί σε αδυναμία κυτταρικής αναπνοής (Benabbou et al., 2007).
- Το νερό, καθώς απορροφά έντονα τις ερυθρές και υπέρυθρες ακτινοβολίες θερμαίνεται. Αν η θερμοκρασία φτάσει επίπεδα μεγαλύτερα των ορίων αντοχής πολλών μικροοργανισμών (συνήθως 45°C), προκαλεί μετουσίωση των πρωτεϊνών τους και πιθανόν το θάνατο. Έχει παρατηρηθεί έντονα συνεργιστική δράση θερμότητας και ακτινοβολίας στην αδρανοποίηση παθογόνων μικροοργανισμών. Αναφορικά, για την αδρανοποίηση της *E. coli* στους 50°C, απαιτείται το ένα τρίτο της ροής UV-A σε σχέση με χαμηλότερες θερμοκρασίες (Oates et al., 2003).

Ειδικότερα για το *E. coli*, η αδρανοποίηση οφείλεται στην διατάραξη μιας σειράς κυτταρικών λειτουργιών. Μετά από σύντομη έκθεση, διακόπτεται η σύνθεση ATP και δυσχεραίνεται η εκροή μεταβολικών αποβλήτων. Στη συνέχεια, μειώνεται το δυναμικό της μεμβράνης και η πρόσληψη γλυκόζης. Ήδη σε αυτό το στάδιο τα κύτταρα δεν είναι καλλιεργήσιμα. Τέλος, η μεμβράνη χάνει την ημιπερατή της ιδιότητα και ακολουθεί λύση του κυττάρου (McGuigan et al., 2012).

Η αδρανοποίηση του *E. coli*, αλλά και το αν αυτή οφείλεται στη καταστροφή του DNA ή της κυτταρικής μεμβράνης, εξαρτάται από το μήκος κύματος, τη συγκέντρωση

διαλυμένου οξυγόνου, την αλατότητα και τις συνθήκες επώασης μετά την ακτινοβολήση. Στο είδος περιλαμβάνονται στελέχη με διαφορετική ευαισθησία στην ηλιακή ακτινοβολία, με αποτέλεσμα ο ελάχιστος χρόνος επεξεργασίας να ποικίλλει (McGuigan et al., 2012).

4.2.1 Επανενεργοποίηση των παθογόνων μικροοργανισμών

Μολαταύτα, τα κύτταρα διαθέτουν ποικίλους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του γενετικού υλικού που μπορούν να προστατεύσουν ή και να επανενεργοποιήσουν τους μικροοργανισμούς. Στα βακτήρια έχουν εντοπιστεί μηχανισμοί επιδιόρθωσης της επίδρασης της ακτινοβολίας και περιλαμβάνουν διεργασίες, οι οποίες λαμβάνουν χώρα είτε στο φως είτε στο σκοτάδι. Στην φωτοενεργοποίηση, τα ένζυμα φωτολυάσες χρησιμοποιούν φωτεινή ενέργεια (300-500 nm) για να διαχωρίσουν τα διμερή πυριμιδινών και τυχόν άλλες προβληματικές αλληλουχίες στο DNA. Οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης στο σκοτάδι, ενεργοποιούνται με διακοπή της ακτινοβολήσης και περιλαμβάνουν επιδιορθώσεις στο γενετικό υλικό με εκτομή προβληματικών περιοχών, ανασυνδυασμό και την αντίδραση SOS (McGuigan et al. 2012). Παρόμοιοι μηχανισμοί, έχουν παρατηρηθεί και σε άλλες μικροβιακές ομάδες όπως τα πρωτόζωα.

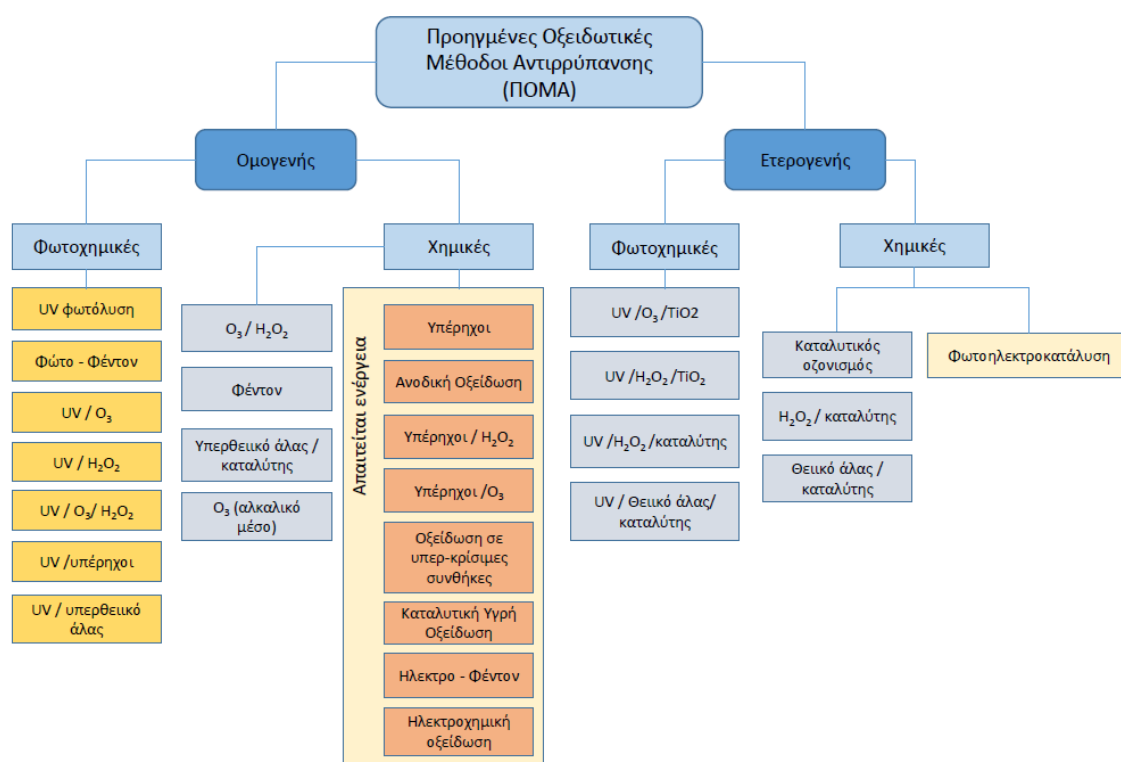
Η ικανότητα επανενεργοποίησης, εξαρτάται έντονα από το είδος του μικροοργανισμού και από τις συνθήκες της επεξεργασίας και αποτελεί σοβαρό μειονέκτημα της μεθόδου, δεδομένου ότι στην ηλιακή απολύμανση δεν υπάρχει υπολειμματική δράση. Ως αποτέλεσμα, ο πληθυσμός των παθογόνων σε ένα δείγμα νερού, μπορεί να επανέλθει σε μη αποδεκτά επίπεδα μετά την επεξεργασία του με ηλιακή ακτινοβολία. Ο κίνδυνος είναι μεγαλύτερος όταν υπάρχει ανάγκη αποθήκευσης του δείγματος πριν την χρήση ή απόρριψη του.

Η μη αναστρέψιμη αδρανοποίηση των παθογόνων είναι εφικτή, μετά από εντονότερη μεταχείριση. Ανάλογα με την ανθεκτικότητα του μικροοργανισμού, υπάρχει μια οριακή δόση UV-A την οποία μπορεί να διαχειριστεί και πέραν της οποίας, οι βλάβες που προκαλούνται είναι μόνιμες. Το ίδιο ισχύει και για υψηλότερη συγκέντρωση ROS. Ωστόσο, το ηλιακό φως που προσπίπτει στην επιφάνεια της γης περιέχει ένα μικρό ποσοστό υπεριώδους ακτινοβολίας (3-5%) που στις περισσότερες περιπτώσεις δεν βλάπτει μόνιμα το DNA των παθογόνων που συναντώνται στο μολυσμένο νερό και οι ενεργές μορφές οξυγόνου έχουν περιορισμένη συγκέντρωση και μικρή διάρκεια ζωής. Προκειμένου να θεωρηθεί ασφαλής για την δημόσια υγεία

και να έχει πρακτική εφαρμογή, έχουν διερευνηθεί διάφορες τεχνικές ενίσχυσης της ηλιακής απολύμανσης (Malato et al., 2007). Για την αξιολόγηση τους χρειάζεται επαναληπτικός έλεγχος της συγκέντρωσης των παθογόνων μετά από επώαση του δείγματος για αρκετές ώρες στο σκοτάδι (McGuigan et al., 2012).

4.3 Προηγμένες Οξειδωτικές Μέθοδοι Αντιρρύπανσης

Οι Προηγμένες Οξειδωτικές Μέθοδοι Αντιρρύπανσης – ΠΟΜΑ (Advance Oxidation Processes, AOPs) αποτελούν μια εναλλακτική ομάδα μεθόδων με υψηλό δυναμικό οξείδωσης και περιλαμβάνουν διαφορετικές διεργασίες όπως, $O_3/UV-C$, Photo-Fenton (Fenton + UV –A, B), Solar detoxification, TiO_2/UV και μη φωτοχημικές όπως η Οζονόλυση με ή χωρίς H_2O_2 , η Υγρή οξείδωση, η ηλεκτροχημική οξείδωση, η Ραδιόλυση και η Οξείδωση σε υπερκρίσιμες συνθήκες (Εικόνα 14).



Εικόνα 15. Προηγμένες Οξειδωτικές Μέθοδοι Αντιρρύπανσης, ΠΟΜΑ, τροποποίηση από Amor et al., 2019

Οι ΠΟΜΑ κεντρίζουν το ενδιαφέρον ως μέθοδοι επεξεργασίας των αποβλήτων καθώς είναι ικανές να οξειδώσουν τόσο τους οργανικούς ρύπους όσο και παθογόνους μικροοργανισμούς. Επιπλέον η χρήση της ηλιακής ακτινοβολίας σε πολλές από τις

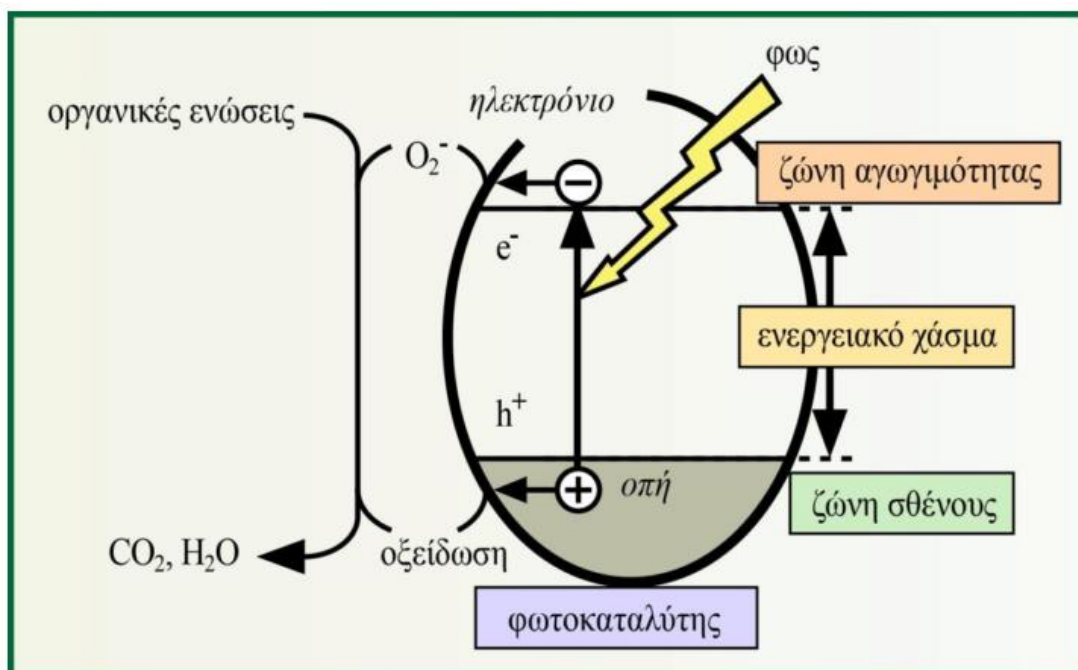
μεθόδους αυτές τις κατατάσει στις φιλικές προς το περιβάλλον επεξεργασίες (M. Agulló-Barceló, M.I. Polo-López, F. Lucena, J. Jofre, 2013). Η δυναμική τους βασίζεται κυρίως στην επιτόπου παραγωγή εξαιρετικά αντιδραστικών παροδικών ειδών, όπως οι ρίζες υδροξυλίου. Σε γενικές γραμμές και όσον αφορά στους μικροοργανισμούς, προκαλούν οξειδωτικό στρες στους και οδηγούν στην τελική τους αδρανοποίηση (Venieri and Mantzavinos, 2017b). Βασικό μειονεκτημα ορισμένων από τις ΠΟΜΑ, κυρίως των διεργασιών που απαιτούν ακτινοβολήση από UV λαμπτήρες και των διεργασιών που απαιτούν όζων είναι το υψηλό κόστος λειτουργίας. Για το λόγο αυτό κερδίζουν ακόμα μεγαλύτερο ενδιαφέρον οι διεργασίες οι οποίες βασίζονται στη φωτοκατάλυση (Malato et al., 2007).

Φωτοκατάλυση

Ως φωτοκατάλυση ορίζεται η προαγωγή μιας φωτοαντίδρασης παρουσία ενός καταλύτη και η έννοιά της χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Plotnikow το 1910. Η φωτοκατάλυση, όπως και γενικότερα η κατάλυση, διακρίνεται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, με βάση τη φάση στην οποία βρίσκονται τα αντιδρώντα και ο καταλύτης στο διάλυμα, την ετερογενή και την ομογενή. Στην ομογενή φωτοκατάλυση τα αντιδρώντα και ο καταλύτης βρίσκονται στην υγρή φάση. Οι οργανικοί ρύποι που είναι τα αντιδρώντα της αντίδρασης έρχονται σε επαφή με το αντιδραστήριο, το οποίο αποτελεί τον καταλύτη της αντίδρασης. Στην ετερογενή φωτοκατάλυση η φάση των αντιδρώντων και του καταλύτη είναι διαφορετική. Τα λύματα βρίσκονται σε υγρή φάση, ενώ ο καταλύτης σε στερεή.

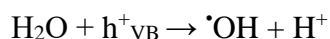
Η ετερογενής φωτοκατάλυση αναφέρεται σε καταλυτικές αντιδράσεις και διεργασίες που λαμβάνουν χώρα σε αιωρήματα ημιαγώγιμων κόνεων όπως TiO_2 , ZnO , WO_3 , CdS κ.α., παρουσία τεχνητού ή φυσικού φωτισμού, οι οποίες επιφέρουν την πλήρη οξείδωση διαφόρων οργανικών και ανόργανων ρύπων, καθώς και την αδρανοποίηση των παθογόνων μικροοργανισμών η οποία οφείλεται στη δημιουργία δραστικών ριζών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και στο υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2). Οι βασικότερες από αυτές τις δραστικές ρίζες, τουλάχιστον όσον αφορά στην αδρανοποίηση των μικροοργανισμών, είναι η ρίζα υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$), ακολουθούμενη από τη ρίζα ανιόντος οξυγόνου ($\text{O}_2^{\bullet-}$) και τη ρίζα υδροϋπεροξειδίου (HO_2^{\bullet}). Κατά την ετερογενή φωτοκατάλυση, ένας ημιαγώγιμος καταλύτης (π.χ. TiO_2) διαλύεται στο νερό και δρα ως μια μικρο - φωτοηλεκτροχημική κυψέλη στην οποία

συνυπάρχουν η άνοδος και η κάθοδος (Ζουμπούλης και συν. 2015). Σύμφωνα με το μοντέλο των μοριακών τροχιακών για τα ημιαγώγιμα υλικά, υπάρχουν δύο κύριες ενεργειακές στάθμες. Η υψηλότερη, είναι πλήρης ηλεκτρονίων και ονομάζεται ζώνη σθένους (valence gap) και η χαμηλότερη, η ζώνη αγωγιμότητας (conduction gap) είναι ελεύθερη ηλεκτρονίων. Το μεταξύ τους ενεργειακό χάσμα (E_{bg} , Energy band gap) καθορίζει το φορτίο που απαιτείται για την ενεργοποίηση των φωτοκαταλυτικών ιδιοτήτων του ημιαγωγού. Όταν στο μόριο προσπίπτουν φωτόνια με ενέργεια μεγαλύτερη του ενεργειακού χάσματος, το ηλεκτρόνιο της ζώνης σθένους διεγείρεται και μεταπηδά στην ζώνη αγωγιμότητας. Έτσι, κατά την διέγερση, σχηματίζονται οπές στην ζώνη σθένους ($h\nu_B^+$) και ηλεκτρόνια στην ζώνη αγωγιμότητας (e_{CB}^-). Οι οπές είναι ιδιαίτερα οξειδωτικά σωματίδια και τα ηλεκτρόνια ιδιαίτερα αναγωγικά και κατά την κίνηση τους στην επιφάνεια του καταλύτη, αντιδρούν με στοιχεία, ιόντα και ενώσεις που έχουν απορροφηθεί. Οι φωτοδημιουργούμενες οπές αντιδρούν με τα ιόντα OH^- ή με τα μόρια του H_2O που είναι προσροφημένα στην επιφάνεια του ημιαγωγού και τα οξειδώνουν προς ρίζες υδροξυλίου ($\cdot OH$) (Εικόνα 16). Τα ηλεκτρόνια, αντιδρούν με το μοριακό οξυγόνο και το μετατρέπουν σε ρίζες ανιόντων σουπεροξειδίου ($\cdot O_2^-$) και υπεροξειδίου ($\cdot O_2^{2-}$) (Fagan et al., 2016; Venieri and Mantzavinos, 2017a). Οι ρίζες αυτές αποτελούν το κύριο οξειδωτικό μέσο, το οποίο προσβάλλει τα οργανικά μόρια που βρίσκονται στο διάλυμα και τα αποδομεί προς CO_2 και ανόργανα άλατα. Λόγω του υψηλού δυναμικού αναγωγής των ριζών αυτών, είναι δυνατή η προσβολή πρακτικά όλων των οργανικών ρύπων που συναντώνται στην υγρή και στην αέρια φάση (Ζουμπούλης και συν. 2015).



Εικόνα 16. Μηχανισμός ετερογενούς φωτοκατάλυσης (Ζουμπούλης και συν. 2015)

Οι αντιδράσεις που μπορούν να λάβουν χώρα στην ετερογενή φωτοκατάλυση είναι πολύπλοκες και περιλαμβάνουν το νερό, το διαλυμένο οξυγόνο και την επιφάνεια του καταλύτη. Μπορούν να συνοψιστούν στους παρακάτω τύπους:



Πολλές φορές, οι οπές και τα ηλεκτρόνια δεν αντιδρούν με στοιχεία του περιβάλλοντος αλλά επανασυνδέονται προς παραγωγή θερμότητας. Η ταχύτητα ανασυνδυασμού εξαρτάται από τις ιδιότητες του καταλύτη και επηρεάζει καθοριστικά την απόδοση του.

Εκτός από τη δυνατότητα καταστροφής των τοξικών ουσιών οργανικής προελεύσεως με τη συγκεκριμένη μέθοδο, είναι δυνατή η οξείδωση και ανόργανων ιόντων (π.χ. NO_2^- , CN^- , S^{2-} , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ κ.α.) (Fernández et al., 2005).

Το φωτοηλεκτροχημικό φαινόμενο βρίσκει πολλές εφαρμογές όπως στην παραγωγή καύσιμου H_2 από το νερό, στην αδρανοποίηση τοξικών ρύπων σε νερό αλλά και στον αέρα, για κατασκευή αυτοκαθαριζόμενων επιφανειών, στην απόσμιση, την αποστείρωση κ.α. (Wang and Lewis, 2006).

4.4 Αδρανοποίηση μικροοργανισμών

Η αδρανοποίηση ξεκινάει με την επαφή του μικροοργανισμού με τον καταλύτη και το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει το οξειδωτικό στρες που προκαλείται στην εξωτερική μεμβράνη του κυττάρου. Το βιοκτόνο αποτέλεσμα επεκτείνεται προς την κυτταροπλασματική μεμβράνη, αυξάνοντας τη διαπερατότητα των κυττάρων και επιτρέποντας την έξοδο ενδοκυτταρικών συστατικών, η οποία τελικά προκαλεί απώλεια της ζωτικότητας. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι ο κυτταρικός θάνατος επιτυγχάνεται με τη φωτοοξειδωση του συνενζύμου A (CoA), το οποίο αναστέλλει τη διαδικασία της αναπνοής. Ο βαθμός στον οποίο πραγματοποιείται η διαπερατότητα των κυττάρων ποικίλλει μεταξύ των βακτηριακών ομάδων και επηρεάζεται από το πάχος του κυτταρικού τοιχώματος. Τα θετικά κατά Gram είδη έχουν ένα παχύ κυτταρικό τοίχωμα που περιέχει πολλά στρώματα πεπτιδογλυκάνης και τειοϊκών οξέων, παρέχοντάς τους τη δυνατότητα να διατηρήσουν τη βιωσιμότητά τους κατά τη διάρκεια της φωτοκαταλυτικής διαδικασίας, πιθανώς λόγω παρεμπόδισης της διείσδυσης των ελεύθερων ριζών. Παρόλα αυτά υπάρχουν και περιπτώσεις που καταδεικνύουν ότι τα βακτήρια που είναι αρνητικά κατά Gram απαιτούν μεγαλύτερη συγκέντρωση καταλύτη, λόγω της επιπλέον εξωτερικής μεμβράνης που διαθέτουν. Εκτός από την κυτταρική μεμβράνη ρόλο παίζει και η κυτταρική δομή. Τα ενδοσπόρια (σπόρια) που μπορεί να παράγονται από ορισμένα παθογόνα βακτηριακά είδη μπορεί να αντέχουν στις δυσμενείς συνθήκες φωτοκατάλυσης. Η παχιά επικάλυψη πρωτεϊνών που διαθέτουν παρέχει αντοχή και απαιτεί παρατεταμένη επεξεργασία. Συγκεκριμένα, η επικάλυψη των σπόρων *Bacillus* μπορεί να υποστεί βλάβη από τη UV-A ακτινοβολία μόνο στην περίπτωση που προκληθούν θανατηφόρες μεταλλάξεις.

Εκτός από την μεγαλύτερη παραγωγή ROS, ένα ακόμη μεγάλο πλεονέκτημα της φωτοκατάλυσης ως προς την φωτόλυση, είναι ότι στην πρώτη φαίνεται να υπάρχει κάποιου τύπου υπολειμματική δράση, που στην περίπτωση της απολύμανσης, σημαίνει ότι η βακτηριακή αδρανοποίηση συνεχίζεται και αφού διακοπεί η έκθεση σε ακτινοβολία. Αντίθετα, ελλείψει φωτοκαταλύτη, οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης των βακτηρίων, ενεργοποιούνται με το που θα βρεθούν υπό σκιά, επιτυγχάνοντας σε πολλές περιπτώσεις μεγάλο ποσοστό επανενεργοποίησης. Ωστόσο, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, για κάθε βακτήριο, υπάρχει ένα όριο στη δόση ακτινοβολίας, το οποίο όταν ξεπεραστεί, προκαλεί μη αναστρέψιμες βλάβες και κυτταρικό θάνατο. Η ύπαρξη

καταλύτη στην υδατική μήτρα, μειώνει την ελάχιστη απαιτούμενη ακτινοβολία για οριστική αδρανοποίηση των μικροοργανισμών (Misstear et al., 2013).

Η υπολειμματική δράση της φωτοκατάλυσης, πιθανόν οφείλεται στην αδρανοποίηση ή και καταστροφή των ενζύμων και άλλων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης, στην αύξηση της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης που επιτρέπει την είσοδο οξειδωτικών ριζών στο εσωτερικό του κυττάρου και οδηγεί σε περισσότερες οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις με μόρια του κυττάρου και στην συνέχιση αλυσιδωτών αντιδράσεων που πυροδοτήθηκαν από την UVA και σχετίζονται με την υπεροξείδωση λιπιδίων (Misstear et al., 2013).

4.5 Παράγοντες που επηρεάζουν τη φωτοκατάλυση και τη μικροβιακή αδρανοποίηση

4.5.1 Τύπος καταλύτη και επιφάνεια καταλύτη

Ο ρόλος του ημιαγωγού στη φωτοκαταλυτική οξείδωση των ρύπων είναι κρίσιμος. Τόσο οι φυσικές όσο και οι χημικές του ιδιότητες, αποτελούν παραμέτρους οι οποίες επιδρούν αποφασιστικά στη λειτουργικότητα του συστήματος. Οι ημιαγώγιμες ουσίες, που ως επί το πλείστον έχουν χρησιμοποιηθεί για φωτοκαταλυτικές εφαρμογές τόσο στον περιβαλλοντικό όσο και ενεργειακό τομέα, είναι οι TiO_2 , ZnO , SrTiO_3 , WO_3 , Fe_2O_3 , ZnS και CdS .

Η ενεργότητα των καταλυτών αυξάνεται με την αύξηση της επιφάνειας τους, συνεπώς η μορφή τους παίζει σημαντικό ρόλο στην απόδοση της απολύμανσης. Καταλύτες σε μορφή κόνεως που αιωρούνται στο υδατικό δείγμα πραγματοποιούν μικροβιακή αδρανοποίηση σε λιγότερο χρόνο από την ίδια συγκέντρωση καταλύτη δεσμευμένη σε στερεή επιφάνεια. Ωστόσο, όταν για την επανάκτηση και ανακύκλωση του καταλύτη χρειάζονται επιπρόσθετες διεργασίες, αυξάνεται το κόστος και η πολυπλοκότητα της εφαρμογής. Αυτό μπορεί να αποφευχθεί με την ενσωμάτωση του καταλύτη σε σταθερές επιφάνειες, με χαμηλότερη όμως απόδοση, αφού μειώνεται η επιφάνεια του καταλύτη που μπορεί να αντιδράσει με μικροοργανισμούς και οργανικούς ρύπους (McGuigan et al., 2012; Venieri and Mantzavinos, 2017a).

4.5.2 Ένταση ακτινοβολίας

Η μεγαλύτερη ένταση ακτινοβολίας, επιτυγχάνει την ταχύτερη η ενεργοποίηση του καταλύτη και συνεπώς την ταχύτερη αδρανοποίηση των παθογόνων (Benabbou et al., 2007). Στην περίπτωση ενός συστήματος που βασίζεται στον φυσικό φωτισμό, η ένταση της UV-A, της συνολικής ακτινοβολίας αλλά και η διάρκεια ακτινοβολήσης είναι ευμετάβλητοι παράγοντες και εξαρτώνται από την γεωγραφική θέση. Γενικά, έχει εκτιμηθεί ότι για να εξασφαλιστεί επαρκής μικροβιακή αδρανοποίηση στο νερό, χρειάζονται 3-5 h έκθεσης σε ηλιακή ακτινοβολία με ένταση μεγαλύτερη των 500 W/m^2 (απουσία καταλύτη). Οι περιοχές που βρίσκονται στην τροπική, υποτροπική και μερικώς στην εύκρατη ζώνη, σε χαμηλό υψόμετρο, καλύπτουν αυτές τις συνθήκες. Στην περίπτωση των εύκρατων περιοχών, πρέπει να ληφθεί υπόψη η εποχικότητα. Τοπικά καιρικά φαινόμενα, όπως η συγκέντρωση νεφών, επηρεάζουν την μικροβιακή αδρανοποίηση (Oates et al., 2003).

4.5.3 Συγκέντρωση καταλύτη

Η ταχύτητα παραγωγής των ROS έχει θετική εξάρτηση από την συγκέντρωση του καταλύτη. Η βέλτιστη συγκέντρωση TiO_2 για το πόσιμο νερό, που προτείνεται από τους περισσότερους ερευνητές είναι στο εύρος $0,25\text{-}1 \text{ g L}^{-1}$, σε συνθήκες εργαστηρίου. Με μικρότερες συγκεντρώσεις δεν γίνεται απορρόφηση όλων των διαθέσιμων φωτονίων.

Ωστόσο, έχουν παρατηρηθεί αρνητικές επιδράσεις της μεγαλύτερης συγκέντρωσης καταλύτη. Τα νανοσωματίδια του TiO_2 , περικυκλώνουν τα πολυμερή και τα κύτταρα που βρίσκονται στο διάλυμα και μέσω των οπών/ηλεκτρονίων αντιδρούν με τα μόρια τους. Η περίσσεια νανοσωματιδίων σχηματίζει συσσωματώματα και πολλαπλές στοιβάδες γύρω από το κυτταρικό τοίχωμα των βακτηρίων εμποδίζοντας την άμεση επαφή των τελευταίων με την ακτινοβολία αλλά και τη φωτο-ενεργοποίηση των νανοσωματιδίων που βρίσκονται προσκολλημένα σε αυτά. Τα εξωτερικά μόρια TiO_2 που ενεργοποιούνται, αν δεν έρθουν σε επαφή με κάποιο υπόστρωμα, ανασυνδυάζονται.

Η οξείδωση οργανικών μορίων απαιτεί υψηλότερες συγκεντρώσεις καταλύτη απ' ό,τι η αδρανοποίηση μικροοργανισμών. Αυτό πιθανόν συμβαίνει λόγω του μικρού μεγέθους των οργανικών μορίων που τους επιτρέπει να διαχέονται ανάμεσα από τα νανοσωματίδια του φωτοκαταλύτη. Επίσης, για την ίδια συγκέντρωση % κ.β., η

επιφάνεια των οργανικών μορίων είναι πολύ μεγαλύτερη από αυτή των μικροοργανισμών. Ακόμη, η αδρανοποίηση των διάφορων παθογόνων γίνεται μετά από λύση της κυτταρικής τους μεμβράνης ή την καταστροφή κάποιων εκ των ζωτικών τους οργανιδίων, χωρίς φυσικά να είναι απαραίτητη η οξείδωση όλων των οργανικών μορίων που το αποτελούν. Είναι λοιπόν προφανές ότι η βέλτιστη συγκέντρωση καταλύτη εξαρτάται από το στόχο της διεργασίας (Benabbou et al., 2007; McCullagh et al., 2007; Rincón and Pulgarin, 2003).

4.5.4 Διαλυμένες ουσίες και φυσικοχημικές ιδιότητες της υδατικής μήτρας

Εκτός από τις φυσικοχημικές ιδιότητες του καταλύτη, άλλοι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν τη φωτοκαταλυτική οξείδωση είναι η παρουσία οξειδωτικών ουσιών στην υδατική μήτρα, όπως H_2O_2 , $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, KJO_4 , KBrO_3 , κλπ., η συγκέντρωση οργανικών και ανόργανων διαλυμένων ενώσεων και αιωρούμενων στερεών, η θερμοκρασία και το pH, τα οποία ανάλογα με τις συνθήκες μπορεί να επιταχύνουν ή να επιβραδύνουν την αποικοδόμηση.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η συνεργιστική δράση του TiO_2 με διάφορα οξειδωτικά, όπως το H_2O_2 και το $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$. Η ύπαρξη αυτών των ουσιών στο υπό επεξεργασία διάλυμα αυξάνει την απόδοση της φωτοαποδόμησης, γιατί διευκολύνει τη δέσμευση των φωτοπαραγόμενων ηλεκτρονίων στον καταλύτη ενώ ταυτόχρονα δημιουργούνται και επιπλέον ελεύθερες ρίζες που ενισχύουν τη διαδικασία καθαρισμού (Ζουμπούλης και συν. 2015).

Το ισοηλεκτρικό σημείο για το TiO_2 (point of zero charge, PZC), δηλαδή η τιμή του pH στην οποία ο ημιαγωγός έχει μηδενικό φορτίο, είναι συνήθως 6,5, κυμαίνεται όμως από 4,5 έως 7,5 ανάλογα με την διαδικασία παραγωγής του. Σε πιο αλκαλικό περιβάλλον η επιφάνεια του φορτίζεται αρνητικά και σε πιο όξινο θετικά. Όταν η αρχική τιμή pH του διαλύματος είναι αρκετά όξινη (-4) ή αρκετά βασική (-9) η μικροβιακή αδρανοποίηση ξεκινάει ταχύτερα από ότι σε ένα ουδέτερο διάλυμα, χωρίς όμως να φαίνονται σημαντικές διαφορές στην συνολική απόδοση, πιθανόν γιατί η τιμή του pH μεταβάλλεται κατά την διάρκεια της φωτοκατάλυσης λόγω των ανιόντων που απελευθερώνονται (Benabbou et al., 2007; Rincón and Pulgarin, 2004).

4.5.5 Ανόργανα ιόντα

Τα ανόργανα ιόντα συνήθως επιβραδύνουν την οξείδωση των ενώσεων-στόχων, έχει όμως αναφερθεί η περίπτωση θετικής επίδρασης των χλωριδίων στην απολύμανση. Παρόλο που και τα ίδια καταναλώνουν ρίζες οξυγόνου, μέσω της φωτοκατάλυσης ενώνονται με οργανικές ενώσεις και σχηματίζουν οργανοχλωριωμένες ενώσεις οι οποίες είναι τοξικές και άρα ενισχύουν την απολυμαντική δράση (Marugán et al., 2008). Οι ίδιοι ερευνητές όμως, διαπίστωσαν πως όταν ο στόχος της φωτοκατάλυσης δεν είναι η απολύμανση αλλά η οξείδωση μιας χρωστικής, όλες οι διαλυμένες ενώσεις που περιέχονται στα αστικά λύματα, συμπεριλαμβανομένων των χλωριδίων, είχαν επιβραδυντική επίπτωση. Άλλο παράδειγμα, είναι η περίπτωση των καρβοξυλικών ριζών που παράγονται από την οξείδωση των ανθρακικών αλάτων και είναι μεν λιγότερο δραστικές από τις ρίζες οξυγόνου είναι όμως περισσότερο εκλεκτικές, οπότε αναλόγως του στόχου της διεργασίας, μπορεί να αυξήσουν ή να μειώσουν την απόδοση της αντίδρασης (Venieri and Mantzavinos, 2017a). Επίσης, η προσθήκη ιόντων σιδήρου, αλλά και η απελευθέρωση τους από άλλες ενώσεις κατά την φωτοκατάλυση, οδηγεί στην σύνθεση $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$ που με φωτοδιέγερση απελευθερώνει $\cdot\text{OH}$ και $(\text{FeO})^{2+}$ όταν το pH είναι περίπου 7. Τα ιόντα σιδήρου και οι ρίζες που απελευθερώνονται από τα οξειδία σιδήρου επιταχύνουν την φωτοκαταλυτική οξείδωση (Benabbou et al., 2007; Fisher et al., 2008; Rincón and Pulgarin, 2004).

4.5.6 Οργανικές ενώσεις

Όσον αφορά τις οργανικές ενώσεις, τα χουμικά και φουλβικά οξέα που βρίσκονται στα επιφανειακά νερά και τα αστικά απόβλητα, οξειδώνονται προς CO_2 καταναλώνοντας ROS και άρα μειώνουν την συγκέντρωσή τους. Συνήθως όμως και αναλόγως με τον καταλύτη, οι οργανικές ενώσεις μπορούν να δράσουν ως φωτοευαισθητοποιητές του καταλύτη και να αυξήσουν την απόδοσή του, αλλά και να αντιδράσουν οι ίδιες προς παραγωγή ROS (Miranda-García et al., 2011; Venieri and Mantzavinos, 2017a). Επίσης, τα EfOM, λειτουργούν ως θρεπτικά για τους διάφορους μικροοργανισμούς και διασφαλίζουν τις ευνοϊκές συνθήκες για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό τους ακόμη και μετά το τέλος της διεργασίας.

4.5.7 Φωτοκατάλυση σε πραγματικό λύμα

Η σύσταση των υγρών αστικών αποβλήτων διαφέρει σημαντικά από τα επιφανειακά και υπόγεια νερά. Τα ειδικά χαρακτηριστικά τους χρειάζεται να ληφθούν υπόψη κατά τις πειραματικές δοκιμές ώστε να υπάρξει αξιόπιστη εκτίμηση του δυναμικού απολύμανσης της φωτοκατάλυσης.

Η έρευνα στις απολυμαντικές τεχνικές πραγματοποιείται σε διάφορα υδατικά υλικά, όπως αποστειρωμένο, υπερκάθαρο ή απιονισμένο νερό για πειραματικούς λόγους, επιφανειακό και υπόγειο νερό, με σκοπό την παραγωγή πόσιμου νερού αλλά και αστικά απόβλητα τα οποία έχουν υποστεί δευτεροβάθμιο βιολογικό καθαρισμό. Η σύνθεση του νερού επηρεάζει τις κινητικές των αντιδράσεων και τους μηχανισμούς της φωτοκαταλυτικής διαδικασίας λόγω της παρουσίας ή απουσίας οργανικών και ανόργανων διαλυμένων ενώσεων (Venieri and Mantzavinos, 2017a).

Στα αστικά απόβλητα, υπάρχει υψηλή συγκέντρωση ανόργανων ιόντων, όπως νιτρικά, θειώδη, ανθρακικά άλατα κ.α., οργανικές ενώσεις (EfOM) και διαλυμένα στερεά. Γενικά, η αυξημένη συγκέντρωση διαλυμένων ουσιών, μειώνει την απόδοση της φωτοκατάλυσης, επειδή τα ROS είναι μη επιλεκτικά αντιδραστήρια και καθώς οξειδώνουν διάφορες ενώσεις, μειώνεται η διαθεσιμότητα τους για αντίδραση με τις ενώσεις-στόχους. Ωστόσο, λόγω της μεγάλης ποικιλίας των πιθανών αντιδράσεων που μπορούν να συμβούν σε ένα σύνθετο διάλυμα, η επίδραση των διαλυμένων ιόντων εξαρτάται από τις ειδικές συνθήκες κάθε πειράματος (Venieri and Mantzavinos, 2017a). Οι οργανικές και ανόργανες ενώσεις μαζί, αυξάνουν την θολερότητα του νερού και άρα εμποδίζουν την διέλευση της ακτινοβολίας και την ενεργοποίηση του φωτοκαταλύτη.

4.5.8 Φυσικός πληθυσμός μικροοργανισμών

Συνήθως στα εργαστηριακά πειράματα, χρησιμοποιούνται απομονωμένα στελέχη μικροοργανισμών που έχουν καλλιεργηθεί σε θρεπτικά υλικά και επαναιωρούνται στο νερό προκειμένου να επιτευχθούν οι επιθυμητές συγκεντρώσεις για την διεξαγωγή των πειραμάτων. Έτσι, οι εργαστηριακά καλλιεργημένες αποικίες συνήθως βρίσκονται ακόμη στην λανθάνουσα φάση όταν ξεκινούν οι πειραματικές δοκιμές, γεγονός που τις καθιστά πιο ευαίσθητες σε διαδικασίες απολύμανσης, αφού η ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών εξαρτάται και από την φάση του κυτταρικού κύκλου στην οποία βρίσκονται. Επίσης, η απουσία άλλων μικροοργανισμών από το διάλυμα, πιθανόν

επηρεάζει το πρότυπο αντίδρασης στην μέθοδο απολύμανσης. Αντίθετα, σε ένα πραγματικό δείγμα υγρού αποβλήτου, υπάρχει ποικιλία στελεχών του ίδιου είδους, που έχουν ήδη προσαρμοστεί στις συνθήκες του περιβάλλοντος τους αλλά και μεγάλη ποικιλία διαφορετικών ειδών, μεταξύ των οποίων υπάρχουν ανταγωνιστικές και συμβιωτικές σχέσεις. Μέχρι τώρα, υπάρχουν λίγες πληροφορίες σχετικά με την δράση της φωτοκατάλυσης σε φυσικούς πληθυσμούς κολοβακτηριοειδών, σε πραγματικό λύμα (Agulló-Barceló et al., 2013). Γενικά, μπορούμε να εκτιμήσουμε ότι ένας μικροβιακός πληθυσμός που προέρχεται από ένα μοναδικό στέλεχος που έχει καλλιεργηθεί σε ιδανικές συνθήκες χωρίς ανταγωνισμό και θηρευτές και που πιθανόν έχει φυλαχτεί στο ψυγείο πριν την επαναιώρηση του και την έναρξη της διαδικασίας απολύμανσης, θα είναι λιγότερο ανθεκτικός από το σύνολο των ατόμων του ίδιου είδους που βρίσκονται σε πραγματικό λύμα, έχουν υποστεί προηγούμενα στάδια επεξεργασίας, έχουν προσαρμοστεί και βρίσκονται σε φάση πολλαπλασιασμού (McGuigan et al., 2012).

Συνοψίζοντας, η επίδραση της σύνθεσης του νερού εξαρτάται από τον στόχο της διεργασίας (απολύμανση/αποδόμηση), τις ιδιότητες του στόχου (χημική ένωση/ μικροοργανισμός), τον φωτοκαταλύτη αλλά και τις γενικότερες πειραματικές συνθήκες.

4.5.9 TiO_2

Ο πιο διαδεδομένος φωτοκαταλύτης είναι το TiO_2 ή τιτάνια, καθώς συγκεντρώνει τα περισσότερα θετικά χαρακτηριστικά. Εκδηλώνει χημική σταθερότητα, εξαιρετική λειτουργικότητα σε συνθήκες περιβάλλοντος, δεν είναι τοξικός και είναι σχετικά οικονομικός (Venieri and Mantzavinos, 2017a; Wang and Lewis, 2006). Επίσης, εκτός από τη μεγάλη φωτοκαταλυτική δραστηριότητα συγκριτικά με τους υπόλοιπους ημιαγωγούς, παρουσιάζει και τη μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στη διάβρωση και φωτοδιάβρωση με αποτέλεσμα τη δυνατότητα ανακύκλωσής του (Ζουμπούλης και συν. 2015). Οι τρεις κρυσταλλικές δομές που μπορεί να σχηματίσει ονομάζονται ανατάση (anatase), ρουτίλιο (rutile) και μπρουκίτης (brookite), με πιο σταθερή και φωτοκαταλυτικά ενεργή την ανατάση. Έχει διαπιστωθεί καλύτερη απόδοση με συνδυασμό των μορφών ανατάση-ρουτιλίου (Luo et al., 2015).

Στον τομέα της απολύμανσης, ήδη από την δεκαετία του 1990, ο συνδυασμός TiO_2 /ηλιακή UVA έχει δοκιμαστεί από αρκετές επιστημονικές ομάδες ενάντια σε

κοινούς παθογόνους μικροοργανισμούς όπως τα βακτήρια *E. coli*, *E. faecalis*, TC, ιούς, πρωτόζωα και σπόρια διάφορων παθογόνων μυκήτων (Agulló-Barceló et al., 2013; Misstear et al., 2013).

Το μεγάλο μειονέκτημα του TiO_2 είναι ότι λόγω του μεγάλου ενεργειακού χάσματος (3,2 eV) ενεργοποιείται από φωτόνια με μήκος κύματος 390 nm (UV-A) ή λιγότερο, δηλαδή μόνο με το υπεριώδες φάσμα, το οποίο αποτελεί ένα μικρό ποσοστό της ηλιακής ακτινοβολίας (McGuigan et al., 2012; Wang and Lewis, 2006). Μία ακόμη αρνητική ιδιότητα είναι ο ταχύς ανασυνδυασμός μεταξύ οπών και ηλεκτρονίων (Venieri and Mantzavinos, 2017a).

Έχουν μελετηθεί διάφορες τεχνικές για την βελτιστοποίηση των φωτοκαταλυτικών ιδιοτήτων του TiO_2 , όπως:

- Θερμική κατεργασία υπό κενό ή υπό ατμόσφαιρα H_2 .
- Απόθεση μεταλλικών νησίδων από Pt, Au, Pd, Ag στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων του TiO_2 .
- Δημιουργία μικτών οξειδίων από $\text{TiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$, $\text{TiO}_2/\text{SiO}_2$, TiO_2/WO_3 .
- Η φωτοευαισθητοποίηση του καταλύτη με τη βοήθεια χρωστικών ουσιών που προσροφώνται στην επιφάνεια του κόκκου. Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατή η εκμετάλλευση ενός σημαντικού τμήματος του ορατού φάσματος της ηλιακής ακτινοβολίας. Το μειονέκτημα σ' αυτή την περίπτωση βρίσκεται στην ταυτόχρονη καταστροφή τόσο της τοξικής όσο και της χρωστικής ουσίας.
- Ενίσχυση (doping) με διάφορα μεταλλικά ιόντα, όπως Cr, V, Mo, W, Fe, κ.α., με απώτερο στόχο την αύξηση των φωτοκαταλυτικών ιδιοτήτων του TiO_2 , καθώς και τη μετατόπιση του φάσματος απορρόφησης προς το ορατό (Ζουμπούλης και συν. 2015).

4.5.10 Ενίσχυση φωτοκαταλύτη/doping

Μία από τις πιο ενδιαφέρουσες τεχνικές για την αύξηση της απόδοσης στους φωτοκαταλύτες είναι η ενσωμάτωση άλλων στοιχείων τα οποία έχουν στο p ατομικό τροχιακό τους υψηλότερη ενέργεια από ότι το $2p$ τροχιακό του οξυγόνου, ούτως ώστε να μετατοπίσουν σε υψηλότερη ενέργεια τη μέγιστη ζώνη σθένους και να ελαττώσουν το ενεργειακό χάσμα (Valence-band Maximum-VBM) (Yin et al., 2011). Όταν τα ιόντα ενσωματώνονται στο πλέγμα του καταλύτη, σχηματίζονται ενεργειακά χάσματα

διαφορετικών φορτίων. Η επίδραση της ενίσχυσης εξαρτάται από τις ιδιότητες των ιόντων που χρησιμοποιούνται. Για παράδειγμα, ιόντα σιδήρου (Fe), μαγγανίου (Mn) και χαλκού (Cu) έχουν την ιδιότητα να παγιδεύουν οπές και ηλεκτρόνια, ενώ τα ιόντα κοβαλτίου (Co) μπορούν να παγιδεύουν μόνο έναν τύπο φορτίου. Συνήθως ο συνδυασμός δύο ιόντων επιφέρει καλύτερα αποτελέσματα (Malato et al., 2009).

Εντούτοις, έχουν παρατηρηθεί αρνητικές επιπτώσεις στις ιδιότητες του καταλύτη από την προσθήκη μετάλλων, όπως μειωμένη ανθεκτικότητα στο φως που οδηγεί σε ταχύτερη ανάλωση του καταλύτη και αύξηση των κέντρων επανασύνδεσης οπών/ηλεκτρονίων (Venieri et al., 2014). Σε πολλές περιπτώσεις πρόσμειξης με κατιόντα μετάλλων, η φωτοκαταλυτική δράση του TiO_2 μειώθηκε ακόμη και στο φάσμα UV. Αυτό οφείλεται στο ότι μειώθηκε η θερμική σταθερότητα ή στην αύξηση των κέντρων επανασύνδεσης οπών/ηλεκτρονίων στην επιφάνεια του (Wang and Lewis, 2006). Όταν η ποσότητα μεταλλικών ιόντων υπερβεί μία τιμή, η επίδραση της αύξησης των κέντρων επανασύνδεσης είναι εντονότερη των ευεργετικών αλλαγών που προκαλούν, οπότε τελικά η απόδοση του καταλύτη μειώνεται (Miranda-García et al., 2011). Επίσης, η περίσσεια ιόντων σχηματίζει συσσωματώματα στην επιφάνεια του πλέγματος που εμποδίζουν την διέλευση των φωτονίων για ενεργοποίηση του καταλύτη αλλά και την επαφή αντιδρώντων για παραγωγή ROS (Li et al., 2014).

Η προσθήκη ενός ιόντος στο οξυγόνο (monodoping) αλλά και η διμερής προσθήκη ηλεκτρονιοδότη-δέκτη στο Ti και το O (codoping) έχουν δοκιμαστεί με σκοπό την μείωση του ενεργειακού χάσματος. Γενικά, θεωρούνταν ότι δυο ηλεκτρονιο-αποδέκτες ή δύο ηλεκτρονιοδότες απωθούν ο ένας τον άλλον, όμως έχουν αναφερθεί θετικά αποτελέσματα και σε αυτήν την περίπτωση. Για παράδειγμα, η διπλή ενσωμάτωση ανιόντων N στο TiO_2 φαίνεται να προκαλεί μεγαλύτερη μείωση στο ενεργειακό χάσμα από ότι η μονομερής ενσωμάτωση C ή S, παρόλο που τα C και S έχουν μεγαλύτερη ενέργεια στο p τροχιακό τους από ότι το άζωτο. Επίσης, η διμερής ενίσχυση με C και S είχε καλύτερα αποτελέσματα από ότι το κάθε ιόν ξεχωριστά (Yin et al., 2011). Σύμφωνα με τους ίδιους ερευνητές, όταν τα σύμπλοκα των ιόντων-ενισχυτών σχηματίζουν δύο οπές σε γειτονικά κέντρα του οξυγόνου, δημιουργούνται υψηλές αλληλεπιδράσεις που αυξάνουν την κινητικότητα των φορτίων στο πλέγμα και οδηγούν σε μεγαλύτερη μείωση του ενεργειακού χάσματος. Με άλλα λόγια, η διμερής

ενίσχυση στο μόριο του οξυγόνου, με ομώνυμα ιόντα (binary doping) είναι πιο αποτελεσματική από την μονομερή ή την διμερή με δότη-αποδέκτη.

4.5.11 $\text{CuO}_x/\text{BiVO}_4$

Ένας επίσης αρκετά μελετημένος φωτοκαταλύτης είναι το βαναδικό βισμούθιο (BiVO_4), ένας ημιαγωγός με χημική σταθερότητα σε υδατικά διαλύματα. Σχηματίζει τρεις κρυσταλλικές δομές, το τετραγωνικό ζirkόνιο (tetragonal zircon), το τετραγωνικό σκελίτη (tetragonal scheelite) και το μονόκλωνο σκελίτη (monoclinic scheelite, m- BiVO_4). Το m- BiVO_4 φαίνεται πως έχει υψηλότερη φωτοκαταλυτική δραστηριότητα σε σχέση με τις άλλες δύο μορφές και μικρό ενεργειακό χάσμα (2,3-2,4 eV) (Yoosefi Booshehri et al., 2014). Σύμφωνα με την εξίσωση της ενέργειας των φωτονίων: $E=h \cdot c \cdot \lambda^{-1}$ (E: ενέργεια, h: σταθερά του Plank, c: ταχύτητα του φωτός, λ: μήκος κύματος), το m- BiVO_4 μπορεί να ενεργοποιηθεί από φωτόνια με μήκος κύματος μικρότερο ή ίσο των 539 nm, που αντιστοιχεί στο πράσινο φως. Τα στοιχεία που τον αποτελούν υπάρχουν άφθονα στη γη, με αρκετά χαμηλό κόστος και τοξικότητα (Sharma et al., 2016; Yuan et al., 2014). Ωστόσο, η απόδοση του δεν είναι ιδιαίτερα υψηλή, λόγω της αργής κίνησης των φορτίων και των ισχνών απορροφητικών ιδιοτήτων της επιφάνειας του (Min et al., 2014).

Μεγάλη αύξηση της αποδοτικότητας του m- BiVO_4 επιτυγχάνεται όταν συνδυάζεται με μέταλλα ή μεταλλικά οξείδια. Για παράδειγμα, όταν προστίθεται άργυρος (Ag/BiVO_4), τα μόρια του αργύρου παγιδεύουν ηλεκτρόνια και ενισχύουν τον διαχωρισμό των φορτίων στην επιφάνεια του καταλύτη, με αποτέλεσμα την μεγαλύτερη παραγωγή ROS (Xu et al., 2008; Yoosefi Booshehri et al., 2014).

Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε BiVO_4 ενισχυμένο με οξείδια χαλκού (CuO_x), τα οποία αναμένεται να αυξήσουν την φωτοκαταλυτική απόδοση, καθώς ως ημιαγώγιμο υλικό έχουν ενεργειακό χάσμα 2,1 eV και άρα διευρύνουν το φάσμα απορρόφησης του BiVO_4 προς μεγαλύτερα μήκη κύματος (Li et al., 2014).

Ο χαλκός (Cu, Cuprum) είναι ένα μέταλλο με βιοστατικές ιδιότητες. Σε αντίθεση με τον άργυρο (Ag), ο οποίος επίσης έχει απολυμαντικές ιδιότητες, ο χαλκός αποτελεί ένα απαραίτητο ιχνοστοιχείο για τα φυτά και τα ζώα. Ωστόσο, σε μεγάλες ποσότητες είναι τοξικός. Σύμφωνα με τον WHO, το ανώτατο όριο στο πόσιμο νερό είναι 2 mg/L ενώ

κατά την Ευρωπαϊκή Επιτροπή είναι 3 mg/L. Επίσης, ο χαλκός είναι φθηνότερος από τον άργυρο, οπότε από οικονομική και περιβαλλοντική άποψη, φαίνεται να είναι μια κατάλληλη επιλογή για την επεξεργασία του νερού (Yoosefi Booshehri et al., 2015).

Οι αντιβακτηριακές ιδιότητες του χαλκού φαίνεται ότι οφείλονται στα ιόντα Cu^{2+} που εξαιτίας του μικρού τους μεγέθους έχουν την ικανότητα να διαταράσσουν και να διαπερνούν το κυτταρικό τοίχωμα και την κυτταρική μεμβράνη. Αφού εισέλθουν στο κύτταρο, παρεμβαίνουν σε ενζυμικές λειτουργίες, μεταλλάσσουν τη δομή πρωτεϊνών και του DNA και έτσι εμποδίζουν την έκφραση του γενετικού υλικού και προκαλούν κυτταρικό θάνατο. Συνεπώς, κάθε υλικό που μπορεί να απελευθερώσει ιόντα χαλκού, έχει αντιμικροβιακές ιδιότητες και η αποδοτικότητα του εξαρτάται από τον ρυθμό απελευθέρωσης των ιόντων (Hassan et al., 2013; Yoosefi Booshehri et al., 2015). Έρευνες έχουν δείξει ότι τα οξείδια χαλκού είναι πιο αποτελεσματικά στην αδρανοποίηση *E. coli* από ότι μόρια χαλκού και αυτό πιθανόν οφείλεται στο ότι στα οξείδια ο χαλκός βρίσκεται ήδη στην πιο οξειδωμένη κατάσταση και τα ιόντα απελευθερώνονται απευθείας ενώ στην περίπτωση των μορίων απαιτείται να προηγηθεί οξείδωση (Hassan et al., 2013).

Τα οξείδια χαλκού (CuO), απελευθερώνουν Cu^{2+} , παρουσία νερού και οξυγόνου. Έχουν χαμηλή διαλυτότητα στο νερό οπότε ο ρυθμός απελευθέρωσης ιόντων είναι αρκετά αργός ώστε να επιτευχθεί μια σταθερή συγκέντρωση Cu^{2+} για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (Hassan et al., 2013; Yoosefi Booshehri et al., 2015). Άλλες χρήσιμες ιδιότητες είναι η σταθερότητα, η ανθεκτικότητά και η δυνατότητα να σχηματίζουν δομές με μεγάλη επιφάνεια (Hassan et al., 2013).

Οι κρύσταλλοι των CuO , μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως ενισχυτές της δράσης άλλων φωτοκαταλυτών, χάρη στο στενό ενεργειακό τους χάσμα. Η ευεργετική τους επίδραση είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των οξειδίων χαλκού μέχρι μία βέλτιστη τιμή, πέραν της οποίας προκαλείται μείωση στην ενεργότητα του καταλύτη. Αυτό πιθανόν οφείλεται στο ότι η περίσσεια των οξειδίων που δεν μπορεί να ενσωματωθεί στην επιφάνεια του καταλύτη, σχηματίζει συσσωματώματα που καλύπτουν τα ενεργά του κέντρα. Επίσης, μπορεί να λειτουργήσουν ως κέντρα ανασυνδυασμού (Aguilera-Ruiz et al., 2015).

Στην περίπτωση της φωτοκαταλυτικής απολύμανσης, η προσθήκη CuO_x ως ενισχυτή άλλων ημιαγωγών, αυξάνει την απόδοση και λόγω των βιοστατικών

ιδιοτήτων του χαλκού. Σύμφωνα με αρκετές μελέτες, η απολυμαντική δράση της τιτάνιας ενισχυμένη με CuO_x είναι υψηλότερη του απλού TiO_2 κι αυτό οφείλεται όχι μόνο στην διεύρυνση του φάσματος απορρόφησης αλλά και στην τοξικότητα των ιόντων χαλκού που διαρρέουν από τα οξείδια (Hassan et al., 2013; Pham and Lee, 2015; Yoosefi Booshehri et al., 2015).

Το $\text{CuO}_x/\text{BiVO}_4$ είναι ένας υποσχόμενος φωτοκαταλύτης με δυνατότητες εφαρμογής στην επεξεργασία του νερού, όμως μέχρι τώρα η διαθέσιμη βιβλιογραφία αναφέρεται μόνο στην αποδόμηση χρωστικών και άλλων μορίων ανιχνευτών, και όχι σε πραγματικούς ρύπους ή παθογόνους μικροοργανισμούς, με εξαίρεση μία μελέτη στην δισφαινόλη-A (Kanigaridou et al., 2017a).

4.5.12 Συστήματα ηλιακής φωτοκατάλυσης και απολύμανσης

Η πιο απλή και οικονομική εφαρμογή για την απολύμανση επιφανειακού νερού που προορίζεται για πόση είναι η πλήρωση κοινών πλαστικών μπουκαλιών PET με νερό, και η ολιγόωρη έκθεση τους στον ήλιο. Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου έχει αποδειχθεί εργαστηριακά και έχουν γίνει προσπάθειες εφαρμογής σε κοινότητες της Αφρικής που αντιμετωπίζουν έλλειψη καθαρού νερού. Το μεγάλο πλεονέκτημα είναι το μηδαμινό κόστος, όμως υπάρχουν σημαντικά μειονεκτήματα, όπως η δυσκολία στην αποθήκευση λόγω του κινδύνου επανενεργοποίηση των παθογόνων και η πιθανότητα απελευθέρωσης τοξικών ενώσεων από τις φιάλες PET. Άλλο σημαντικό εμπόδιο στην αποδοχή της μεθόδου είναι η δυσπιστία των τοπικών κοινωνιών ως προς την αποτελεσματικότητα μιας τόσο απλής διαδικασίας και η έλλειψη σαφούς ένδειξης ολοκλήρωσης της απολύμανσης (Polo-López et al., 2011). Σύμφωνα με κοινή έρευνα των WHO/UNICEF του 2011, μόνο το 1% του αναπτυσσόμενου κόσμου χρησιμοποιεί την φωτόλυση ως μέθοδο απολύμανσης στις οικιακές μονάδες απολύμανσης και αποθήκευσης νερού, παρόλο που το κόστος της είναι σαφώς μικρότερο άλλων μεθόδων, όπως τα κεραμικά φίλτρα ή φίλτρα αργής άμμου (McGuigan et al., 2012).

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η αύξηση της θερμοκρασίας δρα συνεργιστικά με την ακτινοβολία στη μικροβιακή αδρανοποίηση. Με στόχο την αύξηση της θερμοκρασίας, γίνονται προσαρμογές στα συστήματα ηλιακής απολύμανσης. Για παράδειγμα, συνηθίζεται τμήμα του δοχείου να βάφεται μαύρο ή η ροή του νερού να γίνεται σε διαφανείς σωλήνες, οι οποίοι είναι τοποθετημένοι σε μαύρη επιφάνεια. Άλλη

μέθοδος είναι η χρήση δοχείων με διπλά γυάλινα τοιχώματα, τα οποία εγκλωβίζουν την θερμότητα με τρόπο παρόμοιο των θερμοκηπίων (McGuigan et al., 2012).

Πιο διαδεδομένη, είναι η χρήση αντιδραστήρων με ανακλαστικές αλουμινίου, γνωστοί ως CPC (Compound Parabolic Collectors). Οι καθρέφτες αλουμινίου έχουν την ιδιότητα να ανακλούν την UVA ακτινοβολία και έτσι να πολλαπλασιάζουν την ποσότητα που προσπίπτει στους διαφανείς περιέκτες (Malato et al., 2004). Επίσης, συμβάλλουν και στην αύξηση της θερμοκρασίας, αν και σε μικρότερο βαθμό από ότι οι μαύρες επιφάνειες. Ωστόσο, τα συστήματα με ανακλαστικές έχουν το πλεονέκτημα ότι μπορούν να επιτύχουν φωτεινή αδρανοποίηση ακόμη και σε νεφελώδεις ημέρες που η θερμοκρασία δεν είναι αρκετά υψηλή για να προκαλέσει βακτηριακό θάνατο (Agulló-Barceló et al., 2013). Εργαστηριακές δοκιμές έχουν αναδείξει τους αντιδραστήρες CPC ως τους πιο αποτελεσματικούς και χρησιμοποιούνται ήδη σε εφαρμογές μεγάλης κλίμακας όπως το SOLWATER στην Αργεντινή, που λειτουργεί από το 2005 και το AQUACAT στην βόρειο Αφρική από το 2003 με σκοπό την απολύμανση πόσιμου νερού (Missstear et al., 2013).

Προκειμένου να υπάρξει μια σαφής ένδειξη για την επιτυχία της απολύμανσης, έχουν σχεδιαστεί αυτοματοποιημένα συστήματα μέτρησης της ληφθείσας UV ακτινοβολίας. Η ελάχιστη θανατηφόρα δόση ακτινοβολίας εξαρτάται από την σύσταση και τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του νερού, την ανθεκτικότητα του οργανισμού και τη θερμοκρασία. Στην περίπτωση της φωτοκατάλυσης, η αποτελεσματικότητα του καταλύτη διαμορφώνει την ελάχιστη δόση ακτινοβολίας. Συνεπώς, για να καθοριστεί η απαραίτητη δόση χρειάζεται καλή γνώση όλων των παραπάνω παραμέτρων (Polo-López et al., 2011).

4.5.13 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα σε επίπεδο εφαρμογής

Από τεχνικής απόψεως, το βασικό χαρακτηριστικό ενός συστήματος επεξεργασίας νερού με ηλιακή φωτοκατάλυση είναι η χρήση του ήλιου ως πηγής ενέργειας. Στην περίπτωση των ηλιόλουστων περιοχών, όπου οι κλιματικές συνθήκες επιτρέπουν μια τέτοια εφαρμογή, μπορεί να επιτευχθεί μεγάλη εξοικονόμηση κόστους και φυσικών πόρων. Η εκμετάλλευση της ηλιακής ακτινοβολίας αντί της χρήσης τεχνητού φωτισμού ελαττώνει το αρχικό κεφάλαιο του εξοπλισμού και της εγκατάστασης του αλλά και το λειτουργικό κόστος. Μεγάλης σημασίας είναι και η μείωση του περιβαλλοντικού αντίκτυπου, μέσω της χρήσης μιας ανανεώσιμης πηγής ενέργειας.

Όσον αφορά στον εξοπλισμό, είναι απαραίτητη η κατασκευή ενός αυτοματοποιημένου συστήματος, που να απαιτεί μικρή ανθρώπινη παρέμβαση και να έχει τη δυνατότητα να επεξεργαστεί μεγάλες ποσότητες λύματος σε όσο δυνατόν μικρότερο χρονικό διάστημα. Με την αύξηση της πολυπλοκότητας των αντιδραστήρων αυξάνεται και το κόστος, ωστόσο, παραμένει μια οικονομικότερη λύση σε σχέση με τις περισσότερες συμβατικές. Η απόδοση όμως των συστημάτων που έχουν σχεδιαστεί μέχρι τώρα, μειονεκτούν ως προς την απαίτηση χώρου. Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, για την απολύμανση των αστικών λυμάτων μιας κοινότητας με τη χρήση ηλιακής φωτοκατάλυσης, όταν η ημερήσια παροχή είναι αρκετά m^3 , απαιτούνται αντιδραστήρες CPC που να καλύπτουν εκατοντάδες m^2 . Η ελάχιστη διάρκεια για την επιτυχία της διεργασίας είναι από λίγα λεπτά έως αρκετές ώρες, ανάλογα με το είδος του παθογόνου, την επιθυμητή μείωση στην συγκέντρωσή του και την ένταση της ακτινοβολίας. Προκειμένου να είναι εφαρμόσιμο ένα τέτοιο σύστημα σε κοινοτικές μονάδες επεξεργασίας λυμάτων, χρειάζεται να μειωθεί ο χρόνος επαφής. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με βελτίωση στον σχεδιασμό των αντιδραστήρων, π.χ. αύξηση της συγκεντρωτικής ικανότητας των ανακλαστήρων (Agulló-Barceló et al., 2013).

Δυνατότητα εξέλιξης υπάρχει και στο πρότυπο έκθεσης στην ακτινοβολία. Οι μαιανδρικοί σωλήνες είναι η πιο δημοφιλής διάταξη, καθώς επιτρέπει την εξάπλωση του υγρού σε μεγάλη επιφάνεια με ταυτόχρονη συνεχή ροή. Η μηχανική καταπόνηση των μικροοργανισμών μέσω της κίνησης της υδατικής μήτρας μπορεί να επιταχύνει την αδρανοποίησή τους. Επίσης, αξίζει να μελετηθεί η βέλτιστη εναλλαγή έκθεσης στο φως και τη σκιά, η οποία μπορεί να εξαντλήσει τους μικροοργανισμούς και τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης τους.

Φυσικά, οι καταλύτες είναι καθοριστικοί για την αξιολόγηση της μεθόδου και η αύξηση της αποδοτικότητάς τους μειώνει τον ελάχιστο χρόνο επαφής. Οι βελτιωμένοι καταλύτες είναι ακριβότεροι από την εμπορική τιτάνια, ωστόσο η διαφορά αυτή μπορεί να καλυφθεί όταν λόγω της υψηλής απόδοσης μειώνεται η απαιτούμενη συγκέντρωση.

Η ηλιακή φωτοκατάλυση μπορεί να εφαρμοστεί στην επεξεργασία πόσιμου νερού και υγρών αποβλήτων με σκοπό την απολύμανση αλλά και την εξουδετέρωση αναδυόμενων μικρορύπων. Σε ορισμένες περιπτώσεις, πιθανόν μπορεί να αντικαταστήσει την χλωρίωση και πρωτότερα στάδια του βιολογικού καθαρισμού. Το οργανικό και ανόργανο φορτίο των αστικών λυμάτων στο στάδιο της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας είναι συνήθως της τάξης των μερικών εκατοντάδων $mg\ L^{-1}$, που είναι διαχειρίσιμο από φωτοκαταλυτικές διεργασίες.

Η απολύμανση μέσω φωτοκατάλυσης έχει μελετηθεί εκτενώς σε εργαστηριακές συνθήκες με αρκετή επιτυχία, όμως οι πιλοτικές δοκιμές και οι εφαρμογές μεγάλης κλίμακας είναι ακόμη λίγες. Προς το παρόν, δεν υπάρχει διαθέσιμη βιβλιογραφία που να αναφέρεται σε απολύμανση πραγματικού λύματος με φυσικό φωτισμό και ενισχυμένους φωτοκαταλύτες.

4.6 Πειραματικός σχεδιασμός

4.6.1 Λύμα

Το υγρό απόβλητο που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα υδροβιοτόπου και φωτοκατάλυσης προέρχεται από την Εγκατάσταση Επεξεργασίας Λυμάτων Χανίων και συγκεκριμένα από το κανάλι που συνδέει την εκροή της δεξαμενής δευτεροβάθμιας καθίζησης με την δεξαμενή χλωρίωσης. Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του αποβλήτου ήταν: pH 6,97, pH(mv) -22,4, αλατότητα/TDS (‰) 0,45, αγωγιμότητα (μS/cm)888

4.6.2 Φωτοκαταλύτες

Οι φωτοκαταλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ο εμπορικός καταλύτης TiO₂ (P25) της εταιρίας Degussa AG, TiO₂ διμερώς ενισχυμένος (binary doping) με In/Fe, Mn/Co, Al/Mn, Al/Fe σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και CuO_x/BiVO₄ με συγκέντρωση Cu: 0,75%, 1,5% και 3% wt% όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 29.

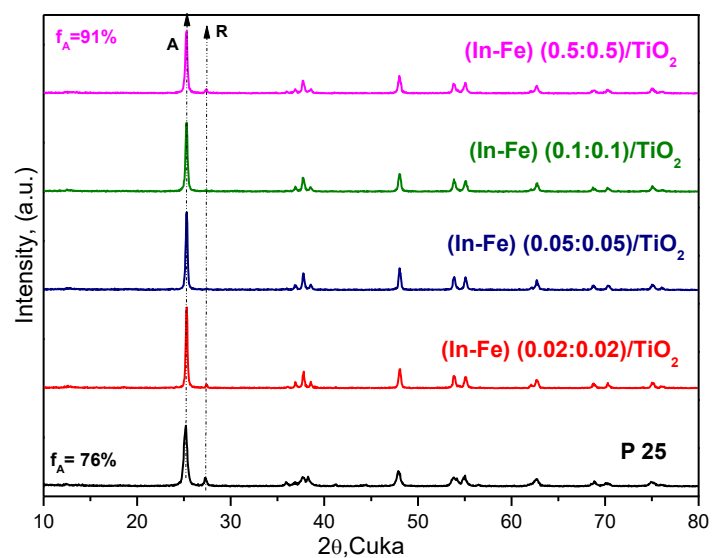
Πίνακας 29. Οι διαφορετικοί συνδυασμοί των ημιαγωγών που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε δοκιμασία (Ε.Κ.: εργαστηριακή κλίμακα, CPC: πιλοτική κλίμακα)

ΚΑΤΑΛΥΤΗΣ	ΕΝΙΣΧΥΤΗΣ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΜΕΤΑΛΛΟΥ-ΕΝΙΣΧΥΤΗ (wt%)		
		CPC	Ε.Κ. <i>E. coli</i>	Ε.Κ. <i>E. faecalis</i>
		0,75	0,75%	0,75%
BiVO₄	CuO_x (Cu)	1,50	1,50%	1,50%
		3	3%	3%
			0,1:0,1	0,1:0,1
TiO₂	In/Fe	0,1:0,1	0,5:0,5	
			0,02:0,02	0,02:0,02
			0,05:0,05	
TiO₂	Mn/Co	0,1:0,1	0,1:0,1	0,1:0,1

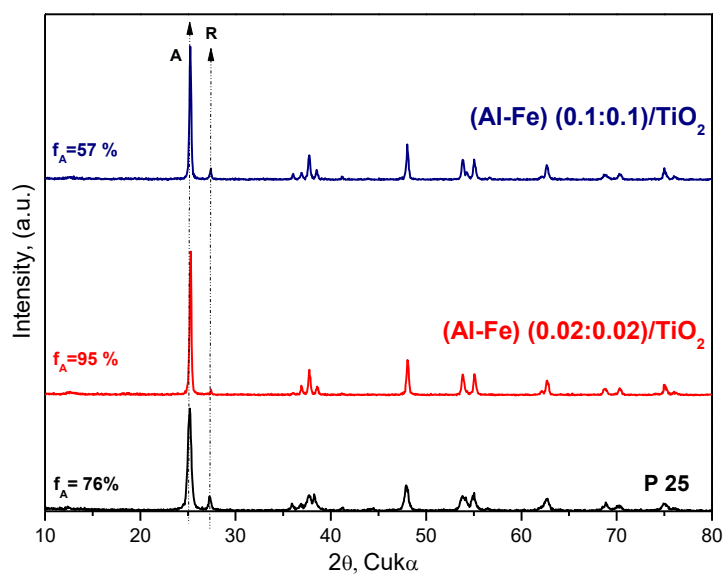
			0,04:0,04	
TiO₂	Al/Fe	0,1:0,1	0,1:0,1	0,1:0,1
			0,02:0,02	0,02:0,02
TiO₂	Al/Mn	0,1:0,1	0,1:0,1	0,1:0,1

4.6.2.1 Ενισχυμένο TiO₂

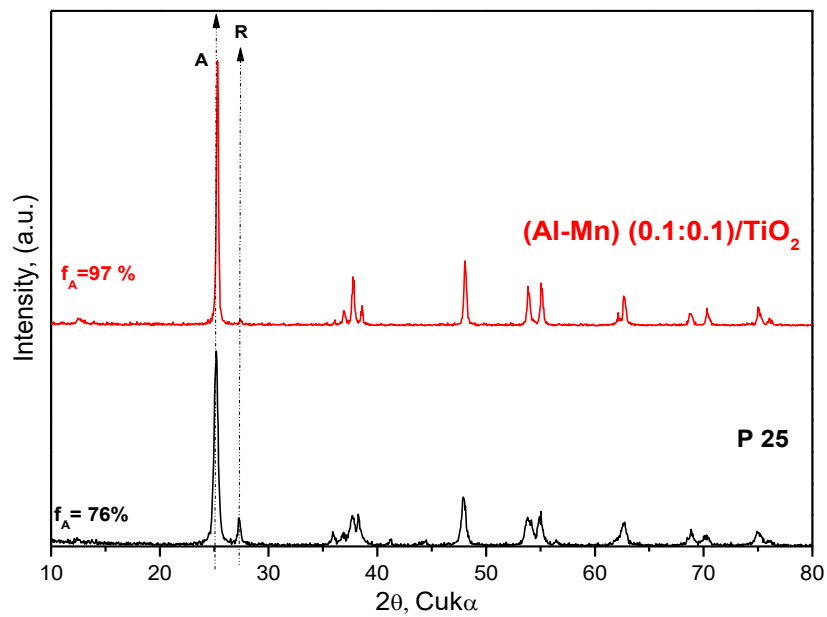
Οι καταλύτες TiO₂ ενισχυμένοι με μέταλλα κατασκευάστηκαν στο Ινστιτούτο Ηλεκτρονικής Δομής και Λέιζερ (IESL) στο ΙΤΕ, Ηράκλειο Κρήτης, σε συνεργασία με το τμήμα Φυσικής του Πανεπιστημίου Κρήτης. Το φάσμα περίθλασης ακτινών-χ (XRD) φαίνεται στις Εικόνες 17, 18, 19 και 20.



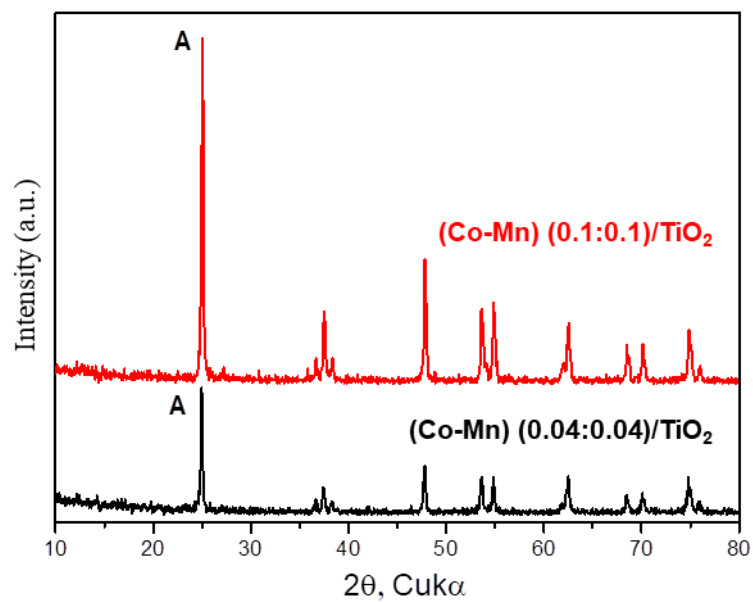
Εικόνα 17. XRD για το TiO_2 -In/Fe για συγκέντρωση In/Fe: 0,5:0,5/ 0,1:0,1/ 0,05:0,05/ 0,02:0,02 wt% και το TiO_2 (P25)



Εικόνα 18. XRD για το TiO_2 -Al/Fe για συγκέντρωση Al/Fe: 0,1:0,1/ 0,02:0,02 wt% και το TiO_2 (P25)

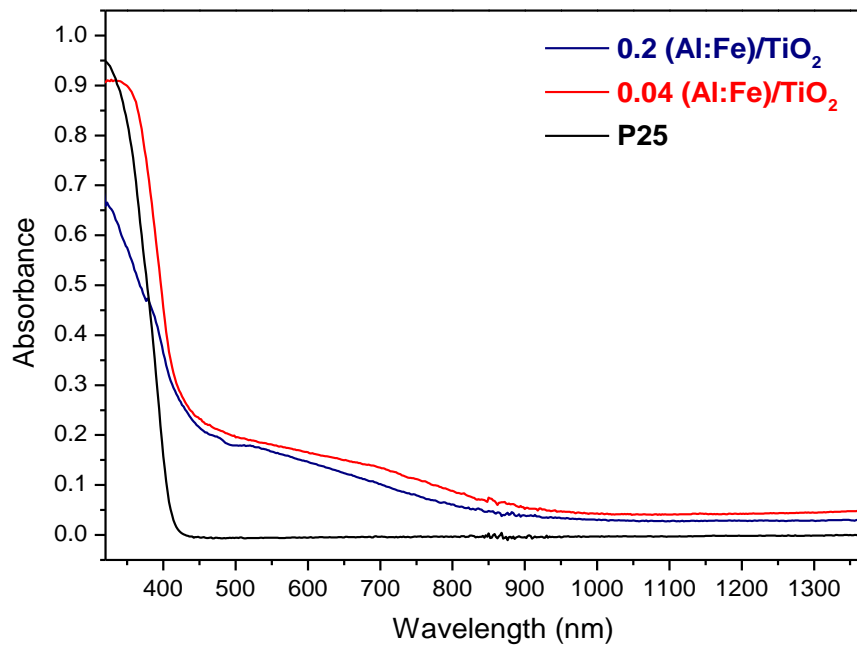


Εικόνα 19. XRD για το TiO₂-Al/Mn 0,1:0,1 wt% και το TiO₂ (P25)

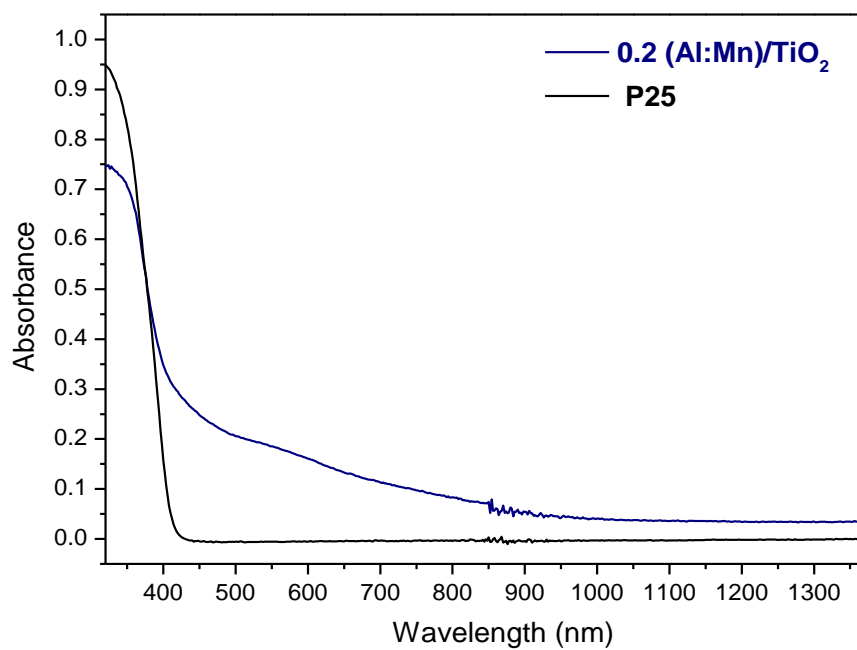


Εικόνα 20. XRD για το TiO₂-Mn/Co για συγκέντρωση Mn/Co: 0,1:0,1/0,04:0,04 wt%

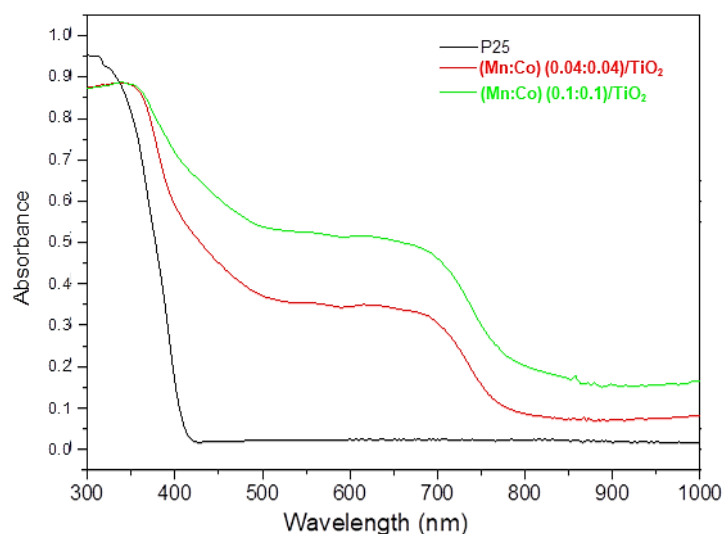
Στα παρακάτω Εικόνες (21, 22 και 23) φαίνεται η απορρόφηση στο υπεριώδες και το ορατό φάσμα και στον Πίνακα 30 παρουσιάζονται τα ενεργειακά χάσματα.



Εικόνα 21. UV-vis απορρόφηση του P25 και του Al:Fe/TiO₂ (0,1:0,1 και 0,02:0,02 wt%)



Εικόνα 22. UV-vis απορρόφηση του P25 και του Al:Mn/TiO₂ (0,1:0,1 wt%)



Εικόνα 23. UV-vis απορρόφηση του P25 και του Mn:Co/TiO₂ (0,1:0,1 και 0,04:0,04wt%)

Πίνακας 30. Ενεργειακά χάσματα για το TiO₂ ενισχυμένο με μέταλλα.

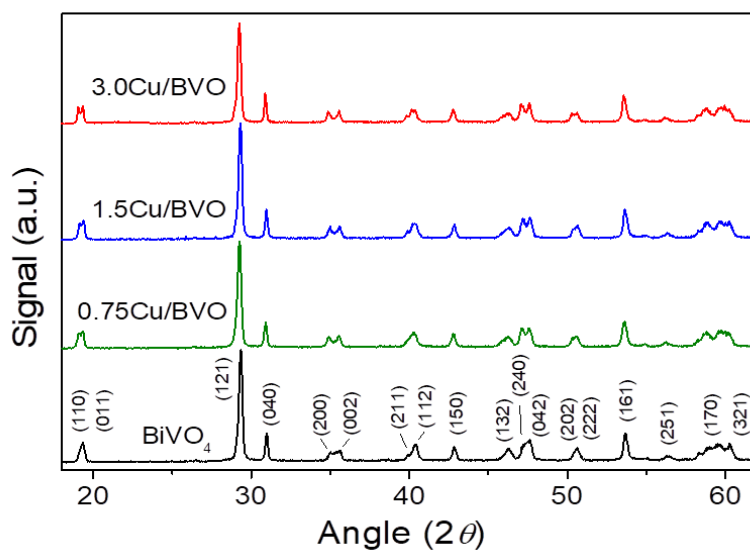
Συγκέντρωση ενισχυτή (wt%)	Ενεργειακό χάσμα (eV)			
	In/Fe	Mn/Co	Al/Fe	Al/Mn
0,02:0,02	3,1		3	
0,04:0,04		3		
0,05:0,05	3			
0,1:0,1	3	2,7	2,7	3
0,5:0,5	2,5			

CuOx/BiVO₄

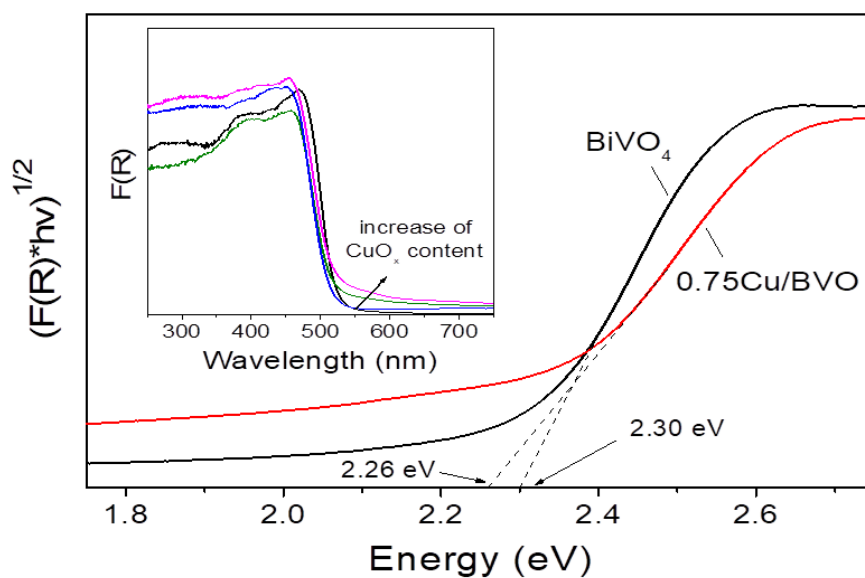
Οι καταλύτες βαναδικού βισμούθιου με οξείδια χαλκού κατασκευάστηκαν στο τμήμα Χημικών Μηχανικών του Πανεπιστημίου Πατρών και περιέχουν συγκέντρωση Cu: 0,75, 1,5 και 3 wt%. Στην Εικόνα 24 φαίνεται το φάσμα XRD.

Η απορρόφηση μετρήθηκε με την τεχνική ανακλαστικότητας με σκέδαση (DRS) στο φάσμα 200-800nm. Το ενεργειακό χάσμα παρουσιάζεται με την μέθοδο Tauc και

φαίνεται πως δεν μετατοπίστηκε ιδιαίτερα μετά την προσθήκη των οξειδίων χαλκού, αλλά παρέμεινε 2,25-2,3eV και για τις τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις (Εικόνα 25).

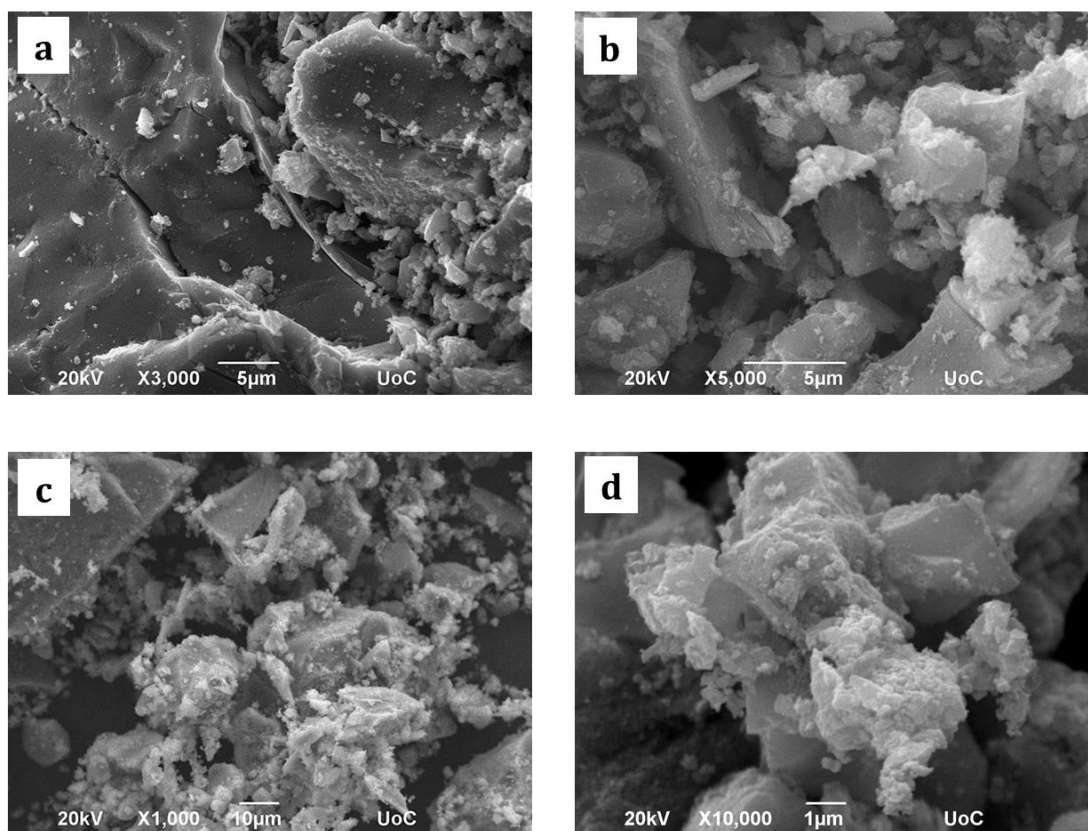


Εικόνα 24. XRD για το P25 και το CuOx/BiVO₄ με συγκέντρωση Cu: 0,75/1,5 και 3 wt%.

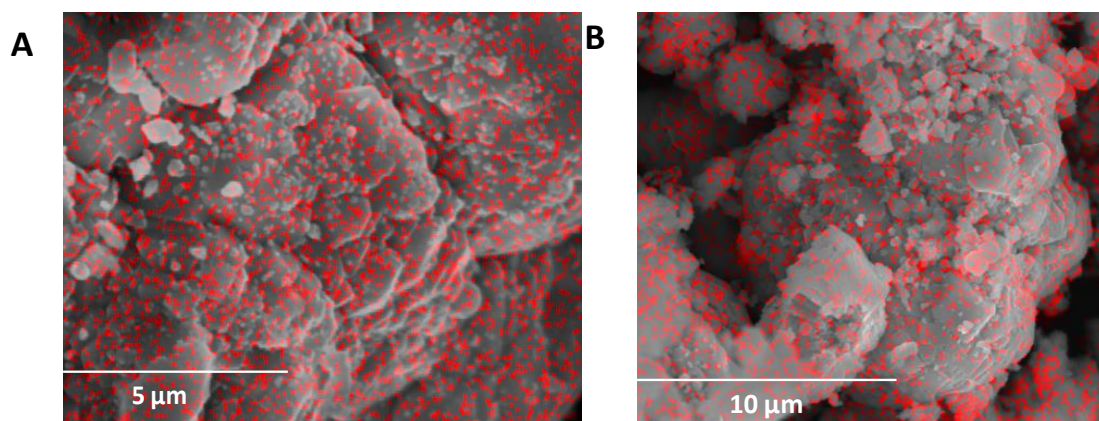


Εικόνα 25. Tauc plots και UV-vis απορρόφηση του το CuOx/BiVO₄ με συγκέντρωση Cu: 0,75/1,5 και 3 wt%

Στη συνέχεια παρουσιάζονται οι εικόνες SEM (Εικόνες 26 και 27) οι οποίες δείχνουν τη μορφολογία και τα χαρακτηριστικά των καταλυτών.



Εικόνα 27. Εικόνες SEM για τους καταλύτες a) (In-Fe) (0.5:0.5)/TiO₂, b) (Al-Fe) (0.02:0.02)/TiO₂, c) (Al-Mn) (0.1:0.1)/TiO₂ and d) (Co-Mn) (0.1:0.1)/TiO₂



Εικόνα 26. Εικόνες SEM για τους καταλύτες (A) 0.75Cu/BVO και (B) 3.0Cu/BVO.

4.6.3 Φωτοκατάλυση εργαστηριακής κλίμακας

Πριν την έναρξη της πειραματικής δοκιμασίας, το υγρό απόβλητο αποστειρώνεται σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης (αυτόκαυστο) για 30min, σε θερμοκρασία 121°C και πίεση 2atm. Αφού επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου, 270 mL αναδεύονται για

περίπου 30min, σε μαγνητικό αναδευτήρα με 6mg καταλύτη, σε δοχείο ζέσεως χωρητικότητας 500mL, το οποίο έχει καλυφθεί περιμετρικά με αλουμινόχαρτο για παρεμπόδιση της διάχυτης ακτινοβολίας.

Αποικίες του *E. coli* ή του *E. faecalis* ενυδατώνονται σε διάλυμα NaCl 0,7 w/v %, μέχρι να επιτευχθεί οπτική απορρόφηση 0,1 στα 600 nm, στην οποία εκτιμάται ότι η συγκέντρωση του μικροοργανισμού είναι περίπου 10^8 CFU mL⁻¹. Μετά από μία δεκαδική αραιώση, 30 mL του εναιωρήματος με συγκέντρωση κυττάρων 10^7 CFU mL⁻¹ προστίθενται στο λύμα, με τελικό αποτέλεσμα 300 mL λύματος με συγκέντρωση καταλύτη 20 mg L⁻¹ και κυττάρων 10^6 CFU mL⁻¹.

Αμέσως μετά, ξεκινά η έκθεση στον λαμπτήρα προσομοιωμένης ηλιακής ακτινοβολίας, με συνεχή ανάδευση. Δείγματα όγκου 1 mL, λαμβάνονται στις χρονικές στιγμές 0, 3, 6, 10, 15, 30, 45, 60 και 90 min και φυλάσσονται στον πάγο μέχρι την ολοκλήρωση της διαδικασίας. Κατόπιν, γίνονται οι κατάλληλες δεκαδικές αραιώσεις των δειγμάτων σε NaCl 0,7 w/v % και η επίστρωση 300 μ L σε Nutrient agar με κρίκο εμβολιασμού (streaking). Μετά από επώαση στους 37°C για 24 h, γίνεται καταμέτρηση των αποικιών και υπολογισμός της συγκέντρωσης των βακτηριακών δεικτών.

Για να διαπιστωθεί η δυνατότητα επανενεργοποίησης των βακτηρίων, μετά το τέλος κάθε πειράματος, τα διαλύματα παρέμειναν στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου, για 24 h και κατόπιν έγινε καταμέτρηση των ζώντων κυττάρων, σύμφωνα με τον ίδιο τρόπο που περιγράφεται παραπάνω. Για κάθε συνδυασμό καταλύτη/μικροοργανισμού έγιναν 2 ή 3 πειραματικές δοκιμές στις ίδιες συνθήκες.

Στα εργαστηριακά πειράματα χρησιμοποιήθηκε σύστημα προσομοίωσης του ηλιακού φωτός της εταιρείας Newport, μοντέλο 96000. Το σύστημα περιλαμβάνει λάμπα ξένου, χωρίς όζον, ισχύος 150W και προσομοιάζει την ακτινοβολία του ηλίου που προσπίπτει στην επιφάνεια της γης με μέγιστη γωνία 48,2°. Σύμφωνα με τον κατασκευαστή, η UV-A ακτινοβολία αποτελεί το 5% της συνολικής εκπεμπόμενης και η UV-B το 0,1%. Η ακτινοβολία με μήκος κύματος μικρότερο των 280nm, ανακόπτεται από το ειδικό φίλτρο Air Mass 1.5 Global Filter (Newport, μοντέλο 81094). Το δείγμα σε γυάλινο δοχείο, τοποθετείται σε μαγνητικό αναδευτήρα που βρίσκεται στην βάση της λάμπας, με τέτοιο τρόπο ώστε να δέχεται το μέγιστο της ακτινοβολίας.

4.6.4 Φωτοκατάλυση πιλοτικής κλίμακας

Τα πιλοτικά πειράματα στον CPC αντιδραστήρα (Εικόνα 28) έγιναν με ασυνεχή λειτουργία (ανά παρτίδες, batch mode). Για την εκτέλεση κάθε πειράματος, συλλέγονται 10 L λύματος δευτεροβάθμιας επεξεργασίας και αναδεύονται για 30 min, στο σκοτάδι, με 20 mg L⁻¹ καταλύτη. Έπειτα, το λύμα εισέρχεται στους σωλήνες με απόχυση. Η στιγμή της πλήρωσης των σωλήνων θεωρείται η χρονική στιγμή 0. Το υγρό απόβλητο κυλάει μέχρι το τέλος της διάταξης και εξέρχεται μέσω ενός αδιαφανούς πλαστικού σωλήνα που καταλήγει στην δεξαμενή συλλογής και ανακυκλοφορίας. Από εκεί, επιστρέφει στην είσοδο του αντιδραστήρα μέσω ηλεκτρικής αντλίας.



Εικόνα 28. Αντιδραστήρας CPC: διάταξη του πειράματος

Η ροή του λύματος καθορίστηκε από την υδραυλική παροχή της αντλίας και έγιναν δοκιμές με 10 L h⁻¹ και 20 L h⁻¹. Η συνολική διάρκεια του πειράματος ήταν 2,5 h και οι δειγματοληψίες έγιναν ανά 30min, από την δεξαμενή ανακυκλοφορίας. Ο όγκος του λύματος που ήταν εκτεθειμένος κάθε στιγμή στον ήλιο (V_i) υπολογίστηκε στα 8 L ενώ τα υπόλοιπα 2 L κινούνταν μέσα στον σωλήνα εξόδου ή εισόδου και στην δεξαμενή. Πειράματα ελέγχου πραγματοποιήθηκαν με την χρήση απλής τιτάνιας (P25) και απουσία καταλύτη (solar disinfection - SODIS).

Τα πιλοτικά πειράματα ηλιακής φωτοκατάλυσης πραγματοποιήθηκαν σε έναν αντιδραστήρα με ανακλαστήρες αλουμινίου (CPC), τοποθετημένο στις εγκαταστάσεις του Πολυτεχνείου Κρήτης στα Χανιά, με ακριβείς συντεταγμένες: 35°31' βόρειο

παράλληλο και 24°04' ανατολικό μεσημβρινό. Ο αντιδραστήρας αποτελείται από 20 σωλήνες βοροπυριτικού γυαλιού, διαστάσεων 55mm x 1,5m, με πάχος τοιχώματος 1,8mm, συνδεδεμένους μεταξύ τους ανά δυνάδες, σε μαιανδρική διάταξη. Με την είσοδο στο υψηλότερο σημείο και την έξοδο στο χαμηλότερο, το λύμα κατά την ροή του, διέρχεται από όλους τους σωλήνες. Για τις ανάγκες της μελέτης, η διάταξη χωρίστηκε σε δύο ανεξάρτητα τμήματα, ώστε να πραγματοποιούνται ταυτόχρονα δύο πειράματα. Κάθε τμήμα περιλαμβάνει 8 σωλήνες και συνολική, εκτεθειμένη στον ήλιο επιφάνεια 1,76m² (Εικόνα 29).



Εικόνα 29. Ο αντιδραστήρας CPC. Φαίνονται οι 2 είσοδοι και έξοδοι και οι 2 ξεχωριστές διατάξεις

4.6.5 Μικροβιολογική ανάλυση

Οι μικροβιολογικές αναλύσεις, αφορούν στην απομόνωση και μέτρηση *E. coli* και *Enterococcus* sp. και έγιναν με διήθηση και καλλιέργεια σε εκλεκτικά θρεπτικά υλικά, με τον ίδιο τρόπο που περιγράφεται στο κεφάλαιο του υδροβιότοπου.

Η αρχική συγκέντρωση των μικροβιακών κυττάρων στα εναιωρήματα που χρησιμοποιήθηκαν στην φωτοκατάλυση με τεχνητό φωτισμό εκτιμούνταν με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας του διαλύματος στα 600nm σε φασματοφωτόμετρο (Shimadzu UV 1240 spectrophotometer).

Η δειγματοληψία των ιών και η ιολογική ανάλυση πραγματοποιήθηκαν όπως περιγράφονται στην ενότητα 3.4.4.3 του προηγούμενου κεφαλαίου. Επίσης η

ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των γονιδίων ανθεκτικότητας πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πειραματικό μέρος της ενότητας 3.4.4.5.

4.6.6 Μέτρηση της έντασης της ακτινοβολίας

Η μέτρηση της έντασης της ηλιακής ακτινοβολίας έγινε με τον αισθητήρα VantagePro2 της Davis Instruments που είναι εγκατεστημένος στο Πολυτεχνείο Κρήτης, στα Χανιά. Γνωρίζοντας ότι η ένταση της ηλιακής ακτινοβολίας μεταβάλλεται κατά την διάρκεια της ημέρας και του χρόνου και εξαρτάται από το τοπικό κλίμα και τις μεταβολές στην υγρασία της ατμόσφαιρας, προκειμένου τα πειράματα να είναι συγκρίσιμα μεταξύ τους αλλά και με άλλων ερευνητών, εφαρμόστηκε κανονικοποίηση του χρόνου σύμφωνα με την Εξίσωση (11) (Vidal et al., 2003):

$$t_{30W,n} = t_{30W,n-1} + \Delta t_n \frac{I_{UV} V_i}{30 V_t}; \quad \Delta t_n = t_n - t_{n-1} \quad (11)$$

όπου t_n είναι η χρονική στιγμή της μέτρησης της ακτινοβολίας, Δt_n το χρονικό διάστημα ανάμεσα σε δύο μετρήσεις, I_{UV} η ένταση της ακτινοβολίας σε W/m^2 την χρονική στιγμή t_n , V_i ο ακτινοβολούμενος όγκος του λύματος, V_t ο συνολικός όγκος και t_{30W} μία τιμή «κανονικοποιημένου» χρόνου, που αντιστοιχεί στον χρόνο ακτινοβολήσης με σταθερή ένταση UV ακτινοβολίας ίση με $30W/m^2$. Η τιμή αυτή επιλέγεται διότι αντιστοιχεί στην ένταση της UV ακτινοβολίας που προσπίπτει στην γη μία τελείως ανέφελη ημέρα κατά το μεσημέρι.

Ωστόσο, ο μετεωρολογικός εξοπλισμός του Πολυτεχνείου δεν έχει την δυνατότητα μέτρησης της έντασης της UV ακτινοβολίας, παρά μόνο της συνολικής ηλιακής, οπότε έγινε η παραδοχή ότι η ένταση της UV αντιστοιχεί σταθερά στο 3% της συνολικής. Αριθμητικά, αυτό ισοδυναμεί με τον λόγο της συνολική ηλιακής ακτινοβολίας προς $1000W/m^2$ (αντί 30). Όπου $1000W/m^2$, θεωρείται η ένταση της ηλιακής ακτινοβολίας που προσπίπτει στην γη μία τελείως ανέφελη ημέρα κατά το μεσημέρι. Με δεδομένο ότι οι ενισχυμένοι φωτοκαταλύτες που χρησιμοποιήθηκαν απορροφούν όχι μόνο την UV, αλλά και τμήμα του ορατού φωτεινού φάσματος, είναι πιθανόν η μεταποιημένη μορφή του τύπου να ανταποκρίνεται με μεγαλύτερη ακρίβεια στην κινητική των συγκεκριμένων πειραμάτων.

4.6.7 Μέτρηση της δόσης ακτινοβολίας

Η ποσότητα της ενέργειας που λήφθηκε από το σύστημα υπολογίστηκε σύμφωνα με την Εξίσωση 12:

$$Q_{UVn} = \frac{t_n I_{UVn} A}{V_t} \quad (12)$$

Όπου Q_{UVn} η ενέργεια της UV ακτινοβολίας που έχει ληφθεί από τον συνολικό όγκο του λύματος (V_t) μέχρι την χρονική στιγμή t_n σε kJoule/L, όπου I_{UVn} η ένταση της UV ακτινοβολίας κατά το διάστημα n σε W/m² και όπου A η συνολική εκτεθειμένη στον ήλιο επιφάνεια.

Με την χρήση του κανονικοποιημένου χρόνου, η δόση ενέργειας της συνολικής ακτινοβολίας μπορεί να υπολογιστεί με την χρήση του τύπου ως εξής:

$$Q_{UVn} = \frac{t_{30W} 1000A}{V_t} \quad (13)$$

και η δόση ενέργειας της UV ακτινοβολίας:

$$Q_{UVn} = \frac{t_{30W} 30A}{V_t} \quad (14)$$

4.6.8 Κινητική της απολύμανσης

Ο ρυθμός της απολύμανσης έγινε με την χρήση του μοντέλου Chick, σύμφωνα με το οποίο η απολύμανση θεωρείται αντίδραση 1^{ης} τάξης.

$$\log\left(\frac{N}{N_o}\right) = -k \cdot t \quad (15)$$

όπου N_o ο αρχικός βακτηριακός πληθυσμός, N ο βακτηριακός πληθυσμός την χρονική στιγμή t ή t_{30W} και k η κινητική σταθερά της αντίδρασης.

4.7 Αποτελέσματα - Συζήτηση

4.7.1 Εργαστηριακές δοκιμές

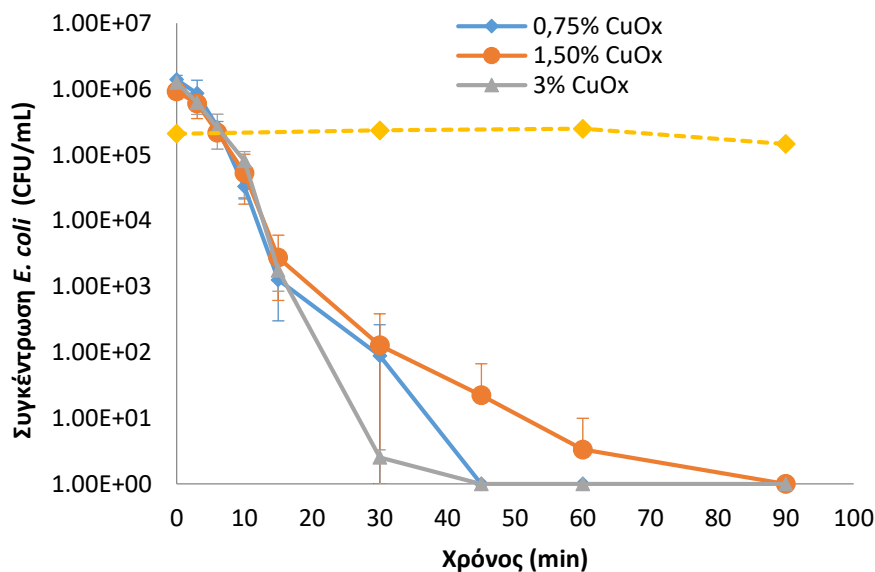
4.7.1.1 CuO_x/BiVO₄

Αρχικά εξετάστηκε η απόδοση των καταλυτών σε εργαστηριακή κλίμακα. Στον Πίνακα 31 παρουσιάζονται οι κινητικές σταθερές της απολύμανσης (k) για τους δύο βακτηριακούς δείκτες, με την χρήση του CuO_x/BiVO₄ με συγκεντρώσεις Cu: 0,75, 1,5 και 3 wt%, και του P25. Για το *E.coli* η συνολική διάρκεια του πειράματος ήταν 90 min ενώ για *E. faecalis* 60 λεπτά. Στην περίπτωση του *E. faecalis* υπολογιστήκαν δύο διαφορετικές σταθερές, μια για το διάστημα 0-30 min και μια για το διάστημα 45 -60 min έτσι ώστε να εξεταστεί καλύτερα η ταχύτητα της αντίδρασης στα πρώτα στάδια του πειράματος. Σε πρώτη ανάλυση υπάρχουν μικρές διαφορές στις τιμές της k και φαίνεται ότι η συγκέντρωση του καταλύτη δεν επηρεάζει την ταχύτητα της αντίδρασης και για τα δύο βακτήρια. Οι μικρές διαφορές ήταν αναμενόμενες αφού δεν υπάρχει διαφοροποίηση στο ενεργειακό χάσμα ανάμεσα των τριών συγκεντρώσεων.

Πίνακας 31. Εργαστηριακή κλίμακα: κινητικές σταθερές αδρανοποίησης *E. coli* και *E. faecalis* με τον καταλύτη CuO_x/BiVO₄

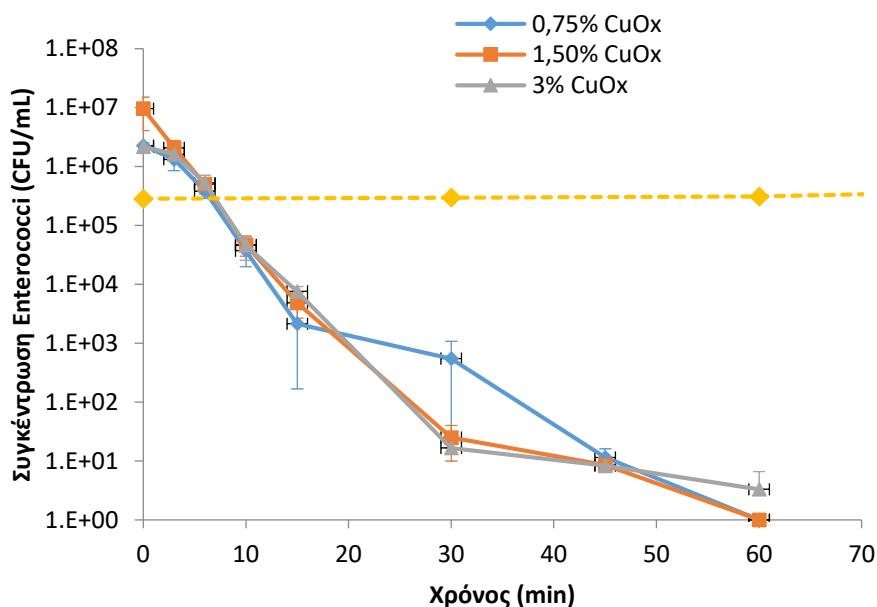
ΚΑΤΑΛΥΤΗΣ	<i>E. coli</i>		<i>E. faecalis</i> (45-60min)		<i>E. faecalis</i> (30min)	
	k (min ⁻¹)	R^2	k (min ⁻¹)	R^2	k (min ⁻¹)	R^2
CuO_x 0,75%	0,415	0,947	0,33	0,8825		
CuO_x 1,5%	0,361	0,959	0,361	0,895	0,4495	0,9825
CuO_x 3%	0,424	0,969	0,292	0,899	0,384	0,981
P25	0,121	0,965	0,051	0,983		

Όπως φαίνεται στο Γράφημα 104, μετά από 45 min ακτινοβολήσης, ο πληθυσμός του *E. coli*, και για τις τρεις συγκεντρώσεις χαλκού, είχε μείωση μεγαλύτερη του 99,99%.



Γράφημα 104. Αδρανοποίηση *E. coli* σε εργαστηριακή κλίμακα με CuOx/BiVO₄ (0,75/ 1,5 και 3 wt%)

Για τους εντερόκοκκους και σύμφωνα με το Γράφημα 105 παρατηρήθηκε ότι μετά από 60 min ακτινοβόλησης ο πληθυσμός του *E. faecalis*, και για τις τρεις συγκεντρώσεις χαλκού, είχε μείωση μεγαλύτερη του 99,99 % και στο 67% των δοκιμασιών υπήρξε πλήρης εξόντωση του.



Γράφημα 105. Αδρανοποίηση *E. faecalis* σε εργαστηριακή κλίμακα με CuOx/BiVO₄ (0,75, 1,5 και 3 wt%)

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα για τα δύο διαφορετικά βακτήρια παρατηρήθηκε ότι το *E. coli* απαιτήθηκε λιγότερος χρόνος για να επιτευχθεί η αδρανοποίηση 99.99%.

Η έντονη φωτοκαταλυτική και απολυμαντική δράση, φαίνεται πως οφείλεται στην προσθήκη οξειδίων χαλκού στο σχετικά αδρανές m-BiVO₄. Από τη στιγμή που το ενεργειακό χάσμα δεν έχει μεταβληθεί σημαντικά, η ενεργότητα του συμπλόκου μπορεί να αποδοθεί στον αποτελεσματικό διαχωρισμό των φωτογενεμένων (photogenerated) φορέων φόρτισης στην ετεροδιέγερση (heterojunction) p-n που αναπτύχθηκε μεταξύ των ημιαγωγών n- BiVO₄ και p- CuO (Kanigaridou et al., 2017b). Σε γενικές γραμμές η χρήση δύο ημιαγωγών σε επαφή με διαφορετικά επίπεδα ενέργειων οξειδοαναγωγής, της ζώνης αγωγιμότητας και της ζώνης σθένους, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να βελτιώσει τον διαχωρισμό των φωτοδημιουργημένων φορέων και να ενισχύσει την αποτελεσματικότητα της μεταφοράς φορτίου. Το BiVO₄ είναι ημιαγωγός n τύπου ενώ το Cu₂ είναι p με τις ενέργειες τους να είναι για το BiVO₄ (EVB = 2.73 eV, ECB = 0.33 eV). Μελέτες που εξέτασαν την απόδοση του BiVO₄, αναφέρουν τη χαμηλή φωτοκαταλυτική του δραστηριότητα, τουλάχιστον όσον αφορά στην αδρανοποίηση των βακτηρίων. Σε πείραμα των Sharma et al. (2016), η αδρανοποίηση του *E. coli* σε υγρό θρεπτικό μέσο με 20 mg L⁻¹ m-BiVO₄, ήταν της τάξης του 80% μετά από έκθεση 2 h σε προσομοιωτή ηλιακού φωτός. Σε άλλη εργασία αναφέρεται πως σε διάλυμα με m-BiVO₄ (2 mg mL⁻¹) και *E. coli* 10⁷ CFUs mL⁻¹, μετά από ακτινοβολία με ορατό φως (>420 nm) για 6 h, η συγκέντρωση των βακτηρίων είχε μειωθεί μόλις στα 4,5x10⁵ CFUs mL⁻¹. Με προσθήκη νανοσωματιδίων Ag (19,7 wt%) στον καταλύτη, επιτεύχθηκε ολική αδρανοποίηση σε 3h, που οφείλεται στην αύξηση της φωτοκαταλυτικής δραστηριότητας μέσω της παγίδευσης ηλεκτρονίων από τον άργυρο και όχι στην τοξικότητα του μετάλλου. Με τον ίδιο καταλύτη (Ag/BiVO₄ 19,7 wt %) και υπό φυσικό φωτισμό, η αδρανοποίηση πραγματοποιήθηκε σε 90 min, χάρη στην UV ακτινοβολία (Booshehri et al. 2014).

Μελέτη που έγινε μόνο με τη χρήση οξειδίου του χαλκού, έδειξε ότι ο χαλκός από μόνος του μπορεί να έχει απολυμαντική δράση απέναντι στα Gram θετικά και αρνητικά βακτήρια (Yoosefi Booshehri et al., 2015).

Επίσης παρατηρείται ότι ενώ για το *E. coli* φαίνεται ότι η αύξηση της συγκέντρωσης του χαλκού στον καταλύτη βελτιώνει την απόδοση για το *E. coli* δηλαδή 0,75<1,5<3 δε συμβαίνει το ίδιο και τον εντερόκοκκο. Ενώ η αύξηση από 0,75 σε 1,5 βελτιώνει

την απόδοση, η αλλαγή από 1,5 σε 3 μειώνει την απόδοση. Αυτή η συμπεριφορά μπορεί να οφείλεται στο ότι χρησιμοποιώντας μεγαλύτερη συγκέντρωσή μετάλλου, το υπερβολικό μεταλλικό οξείδιο μπορεί να σχηματίσει μεγάλα σωματίδια και / ή επικαλυπτόμενα συσσωματώματα που καλύπτουν τις ενεργές θέσεις στην επιφάνεια του BiVO_4 και δρουν ως κέντρα ανασυνδυασμού, μειώνοντας έτσι τη φωτοκαταλυτική απόδοση. Έτσι παρόλο που χρειάζονται μεγαλύτερες συγκεντρώσεις μετάλλου για να είναι δυνατή η απορρόφηση σε μεγαλύτερα μήκη κύματος αυτό τελικά δεν βελτιώνει την απόδοση του συγκεκριμένου καταλύτη (Kanigaridou et al., 2017b).

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα από τις σκοτεινές συνθήκες, τα αποτελέσματα έδειξαν αρκετά έντονη επανανεργοποίηση μετά από επώαση 24 h, με τις τελικές συγκεντρώσεις να είναι 763 CFU mL^{-1} και 563 CFU mL^{-1} για το CuOx/BiVO_4 0,75 wt% και CuOx/BiVO_4 1,5 wt% αντίστοιχα. Με συγκέντρωση χαλκού 3 wt% στο CuOx/BiVO_4 η επανανεργοποίηση ήταν μικρότερη κι ο πληθυσμός που μετρήθηκε ήταν κατά μέσο όρο 23 CFU mL^{-1} . Από την μελέτη της ταχύτητας της φωτοκαταλυτικής αντίδρασης, δεν φαίνεται να υπάρχει υπεροχή του καταλύτη ανάλογη της υψηλότερης συγκέντρωσης χαλκού, οπότε η πιο πιθανή εξήγηση για την «υπολειμματική» δράση του CuOx/BiVO_4 3 wt% είναι ότι οφείλεται στην απελευθέρωση μεγαλύτερης συγκέντρωσης Cu^{2+} . Λόγω της σχετικά χαμηλής διαλυτότητας των οξειδίων χαλκού, είναι πιθανόν να συνέχισαν να απελευθερώνονται και κατά τη διάρκεια της σκοτεινής επώασης. Ωστόσο, υπάρχουν σαφείς ενδείξεις ότι η μικροβιακή αδρανοποίηση κατά την διάρκεια της έκθεσης στην ακτινοβολία, οφείλεται σε φωτοκαταλυτικές αντιδράσεις και όχι στην τοξικότητα του καταλύτη. Η συγκέντρωση του χαλκού στο εναίωρημα ($0,15\text{-}0,6 \text{ mg L}^{-1}$) είναι πολύ μικρή για να επιτύχει την ολική αδρανοποίηση βακτηρίων με συγκέντρωση 10^6 CFU mL^{-1} . Επίσης, οι διαφορετικές συγκεντρώσεις χαλκού δεν είχαν ανάλογη επίδραση στην ταχύτητα της απολύμανσης. Με την χρήση τεχνητού φωτισμού, η αδρανοποίηση ξεκίνησε ταυτόχρονα με την έναρξη της ακτινοβολίας και υπήρξε 50% μείωση στην συγκέντρωση των βακτηρίων στα 3 πρώτα λεπτά της διεργασίας, γεγονός που δεν μπορεί να οφείλεται στην τοξικότητα των Cu^{2+} λόγω του χαμηλού ρυθμού απελευθέρωσης τους από τα CuOx . Τέλος, στα πειράματα με φυσικό φωτισμό παρατηρήθηκε ότι η απολυμαντική ικανότητα είναι ανάλογη της έντασης της ακτινοβολίας, επιβεβαιώνοντας ότι οφείλεται κυρίως στην φωτοκαταλυτική δραστηριότητα του CuOx/BiVO_4 .

4.7.1.2 Ενισχυμένο TiO₂

Φωτοκαταλύτες TiO₂ διμερώς ενισχυμένοι με 4 διαφορετικούς συνδυασμούς μετάλλων (In/Fe, Mn/Co, Al/Fe, Al/Mn) αξιολογήθηκαν σε εργαστηριακή και πιλοτική κλίμακα με βάση την ικανότητα αδρανοποίησης του *E. coli*, *E. faecalis* και το σύνολο των *Enterococcus* sp.

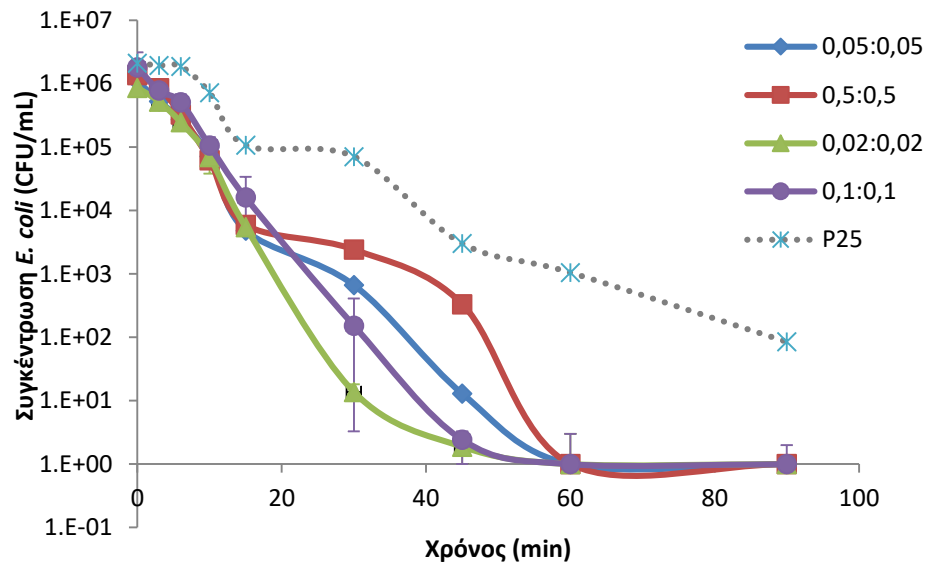
Στα πειράματα εργαστηρίου, ο κάθε συνδυασμός μετάλλων-ενισχυτών δοκιμάστηκε σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (wt%), όπως φαίνεται στον Πίνακα 32, ενώ στην πιλοτική κλίμακα, οι καταλύτες είχαν συγκέντρωση μετάλλων 0,2 wt% (0,1 wt% για κάθε μέταλλο).

Πίνακας 32. Εργαστηριακή κλίμακα: κινητικές σταθερές αδρανοποίησης *E. coli* και *E. faecalis* με τον καταλύτη In/Fe (0,05:0,05), In/Fe (0,02:0,02), In/Fe (0,1:0,1), In/Fe (0,5:0,5), Mn/Co (0,04:0,04), Mn/Co (0,1:0,1), Al/Fe (0,02:0,02), Al/Fe (0,1:0,1), Al/Mn (0,1:0,1) και P25 .

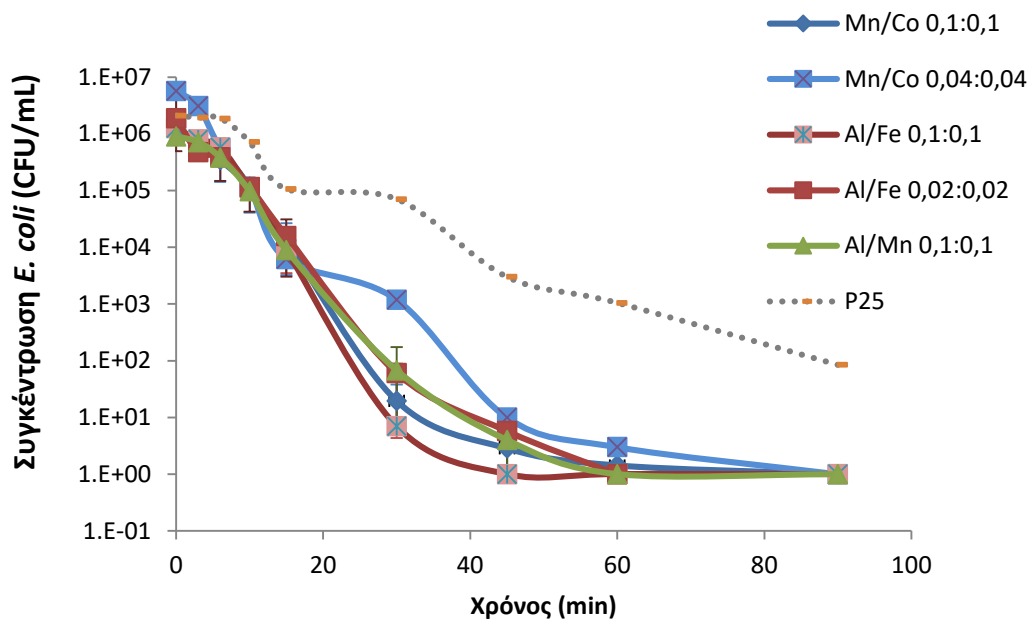
	<i>E. coli</i>		<i>E. faecalis</i>	
Καταλυτής	k (min ⁻¹)	R ²	k (min ⁻¹)	R ²
In/Fe (0,05:0,05)	0,25	0,98		
In/Fe (0,02:0,02)	0,31	0,97	0,31	0,96
In/Fe (0,1:0,1)	0,31	0,96	0,11	0,88
In/Fe (0,5:0,5)	0,22	0,94		
Mn/Co (0,04:0,04)	0,27	0,93		
Mn/Co (0,1:0,1)	0,36	0,94	0,14	0,96
Al/Fe (0,02:0,02)	0,30	0,97	0,13	0,88
Al/Fe (0,1:0,1)	0,36	0,95	0,12	0,89
Al/Mn (0,1:0,1)	0,29	0,97	0,11	0,89
P25	0,12	0,97	0,05	0,98

Η διαφορά στη συγκέντρωση των μετάλλων-ενισχυτών In/Fe και Al/Fe (0,02:0,02 και 0,1:0,1 wt%) δεν φάνηκε να επηρεάζει την απόδοση του καταλύτη και δε βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις κινητικές σταθερές της αδρανοποίησης του *E. coli*. Επίσης δεν σημειώθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ούτε μεταξύ του συνόλου των καταλυτών, παρά μόνο σε σχέση με το απλό TiO₂ που επιβεβαιώνει την

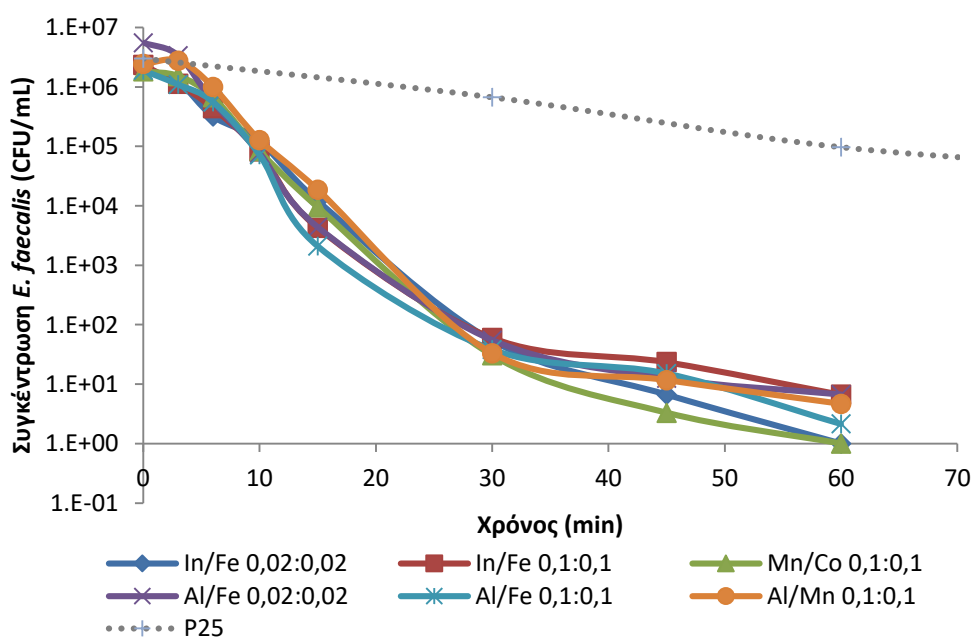
αύξηση της φωτοκαταλυτικής απόδοσης χάρη στην ενίσχυση με μέταλλα. Όλοι οι ενισχυμένοι καταλύτες προκάλεσαν μείωση 6 Logs στο *E. coli* και στο *E. faecalis* μετά από 60 min, ενώ με το P25 η αντίστοιχη μείωση ήταν 4 Logs, όπως φαίνεται και στα Γραφήματα 106, 107 και 108.



Γράφημα 106. Αδρανοποίηση *E. coli* σε εργαστηριακή κλίμακα με την χρήση P25 και διμερώς ενισχυμένου TiO_2 με In/Fe σε διαφορετικές συγκεντρώσεις



Γράφημα 107. Αδρανοποίηση *E. coli* σε εργαστηριακή κλίμακα με την χρήση P25 και διμερώς ενισχυμένου TiO_2 με διάφορους συνδυασμούς μετάλλων, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.



Γράφημα 108. Αδρανοποίηση *E. faecalis* σε εργαστηριακή κλίμακα με την χρήση P25 και διμερώς ενισχυμένου TiO_2 με διάφορους συνδυασμούς μετάλλων, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

Η συγκέντρωση του *E. coli* μηδενίστηκε ή μειώθηκε στις $<5 \text{ CFU mL}^{-1}$ (μείωση μεγαλύτερη του 99,99%), μετά από 60 min έκθεσης στο φως, με όλους τους καταλύτες.

Το *E. faecalis*, φάνηκε πως είναι πιο ανθεκτικό και μηδενίστηκε μόνο με τη χρήση του In/Fe 0,02:0,02 και του Mn/Co 0,1:0,1, ενώ με τους υπόλοιπους καταλύτες μειώθηκε σε συγκεντρώσεις 5-15 CFU mL⁻¹ (μείωση μεγαλύτερη του 99,99% του αρχικού βακτηριακού πληθυσμού). Η αντίστοιχη μείωση βακτηριακής συγκέντρωσης των *E. coli* και *E. faecalis* για την απλή τιτάνια, ήταν 99,95% και 96,77%, αντίστοιχα. Η μεγάλη βελτίωση στην απόδοση του καταλύτη μέσω της ενίσχυσης με binary doping φαίνεται και από τις κινητικές σταθερές και τα διαγράμματα λογαριθμικής μείωσης της συγκέντρωσης των βακτηρίων.

Μετά από επώαση για 24 h σε σκοτεινές συνθήκες, οι αποικίες του *E. coli* που μετρήθηκαν ήταν κατά μέσο όρο 21 CFU mL⁻¹, με ένα αρκετά μεγάλο εύρος τιμών, από 3 έως 193 CFU mL⁻¹, χωρίς να υπάρχουν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στους διάφορους καταλύτες. Η επανανεργοποίηση του *E. faecalis* ήταν πολύ έντονη και η συγκέντρωση του έφτασε μέχρι και τις 2x10⁴ CFU mL⁻¹, με μέσο όρο 5x10³ CFU mL⁻¹, χωρίς πάλι να υπάρχουν στατιστικές διαφορές ανάμεσα στις ομάδες.

Η μεγαλύτερη ενεργοποίηση του *E. faecalis* σε σχέση με το *E. coli*, επιβεβαιώνει την αναγκαιότητα επιλογής δεικτών από διαφορετικές μικροβιολογικές ομάδες για την ασφαλή αξιολόγηση της απολύμανσης. Παρόλο που και τα δύο βακτήρια αδρανοποιήθηκαν με παρόμοιο ρυθμό, το Gram θετικό *E. faecalis* φάνηκε πως διαθέτει ισχυρούς μηχανισμούς επιδιόρθωσης και είναι ικανό να ανταπεξέλθει στο οξειδωτικό στρες της φωτοκατάλυσης. Η σημασία του επαναληπτικού ελέγχου μετά από επώαση μερικών ωρών τονίζεται από τις παρατηρήσεις και των δύο οργανισμών, αφού οι συγκεντρώσεις τους στο επεξεργασμένο λύμα, μετά από 24 h, ήταν απαγορευτικές για αρδευτική χρήση. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι οι καταλύτες CuOx/BiVO₄ είχαν μικρότερα επίπεδα επανανεργοποίησης σε σχέση με τα ενισχυμένα TiO₂. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, αυτό πιθανόν οφείλεται στην διαρροή Cu²⁺, που είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των CuOx. Η υπόθεση για την υπολειμματική τους δράση επαληθεύεται από την μεγαλύτερη επανανεργοποίηση των μικροοργανισμών όταν επεξεργάστηκαν με καταλύτες που δεν περιείχαν οξείδια χαλκού. Η απολυμαντική δράση των οξειδίων χαλκού έχει αποδειχτεί και σε πειράματα που δεν περιλάμβαναν φωτοκαταλυτική οξείδωση. Οι Yoosefi Booshehri et al. (2015), ανακίνησαν χαρτί κυτταρίνης εμποτισμένο με CuOx και κατόπιν έλεγξαν την απολυμαντική ικανότητα του εναιωρήματος (αφού αφαίρεσαν το χαρτί) στο *E. coli* και το Gram θετικό *Staphylococcus aureus*, με αρχική συγκέντρωση 10⁷ CFU mL⁻¹. Παρατηρήθηκε ολική

αδρανοποίηση μετά από 180 min για το *E. coli* και 150 min για το *S. aureus*. Η συγκέντρωση του χαλκού στο διάλυμα ήταν 0,98–1,28 mg L⁻¹.

Συγκρίνοντας την απόδοση όλων των καταλυτών που δοκιμάστηκαν, φαίνεται πως το CuOx/BiVO₄ 3 wt% είναι πιο αποτελεσματικό στην αδρανοποίηση του *E. coli*, από ότι οι καταλύτες ενισχυμένου TiO₂ (paired t-test με διάστημα εμπιστοσύνης 95%). Στην αδρανοποίηση του *E. faecalis*, η υψηλότερη τιμή *k* μετρήθηκε με την χρήση του CuOx/BiVO₄ 1,5 wt%, χωρίς όμως στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τους υπόλοιπους.

Η επανανεργοποίηση των παθογόνων μικροοργανισμών, πιθανόν παρουσιάζεται διογκωμένη στην συγκεκριμένη μελέτη, δεδομένου ότι οι δοκιμές έγιναν σε λύμα και όχι σε νερό ή άλλη ολιγοτροφική υδατική μήτρα. Τα αστικά λύματα αφθονούν σε οργανικές ενώσεις που εξυπηρετούν ως θρεπτικά στοιχεία για τους μικροοργανισμούς και ευνοούν τον πολλαπλασιασμό τους. Συνεπώς η αυξημένη συγκέντρωση των βακτηρίων οφείλεται εν μέρει στην επανανεργοποίηση ορισμένων ατόμων αλλά και στον πολλαπλασιασμό τους κατά τη διάρκεια της εικοσιτετράωρης επώασης.

Σε μελέτη που έγινε με σκοπό την εκτίμηση του κινδύνου επανανεργοποίηση του *E. coli* σε λύμα που χρησιμοποιήθηκε σε άρδευση μαρουλιών, μετά από την επεξεργασία του με φυσικό φως (χωρίς καταλύτη), δεν ανιχνεύθηκαν βακτήρια, στην πλειοψηφία των δειγμάτων, ενώ όλα τα δείγματα που ποτίστηκαν με λύμα που δεν είχε υποστεί φωτόλυση ήταν θετικά στο *E. coli*. Επίσης, στο επεξεργασμένο απόβλητο που επώαστηκε στο σκοτάδι για 48h βρέθηκε συγκέντρωση *E. coli* της τάξης 10² CFU mL⁻¹ (Bichai et al. 2012). Η αποθήκευση του επεξεργασμένου λύματος πριν την χρήση σε άρδευση πρέπει να αποφεύγεται σε κάθε περίπτωση, αφού ακόμη και μία μικρή αρχική συγκέντρωση μπορεί να αυξηθεί σε απαγορευτικές τιμές εντός ολίγων ωρών. Ωστόσο, φαίνεται πως όταν η επαναχρησιμοποίηση γίνει άμεσα, οι χαμηλές συγκεντρώσεις παθογόνων δεν αποτελούν κίνδυνο, αφού καταπολεμούνται από τα φυτά και την ηλιακή ακτινοβολία.

4.7.2 Δοκιμές πιλοτικής κλίμακας (CPC)

Στην πιλοτική κλίμακα, οι δύο βακτηριακοί δείκτες εξετάστηκαν ταυτόχρονα. Οι αρχικές συγκεντρώσεις είναι αρκετές λογαριθμικές τάξεις χαμηλότερες από ότι στα εργαστηριακά πειράματα, καθώς πρόκειται για τους φυσικούς πληθυσμούς που εντοπίζονται στο λύμα. Οι κινητικές σταθερές και τα διαγράμματα μεταβολής του

βακτηριακού πληθυσμού έγιναν με βάση τον κανονικοποιημένο χρόνο ακτινοβολήσης t_{30W} . Όλοι οι καταλύτες δοκιμάστηκαν με ροή λύματος 10 L h^{-1} και 20 L h^{-1} .

Μετά την κανονικοποίηση του χρόνου δεν ήταν δυνατόν να υπάρξει σύμπτωση των χρονικών σημείων των δειγματοληψιών. Η συνολική διάρκεια των πειραμάτων αντιστοιχεί σε 48 έως 104 min διορθωμένου χρόνου (t_{30W}), γεγονός που δυσχεραίνει την σύγκριση μεταξύ της απόδοσης των καταλυτών στα τελευταία στάδια της διεργασίας.

4.7.2.1 $\text{CuO}_x/\text{BiVO}_4$

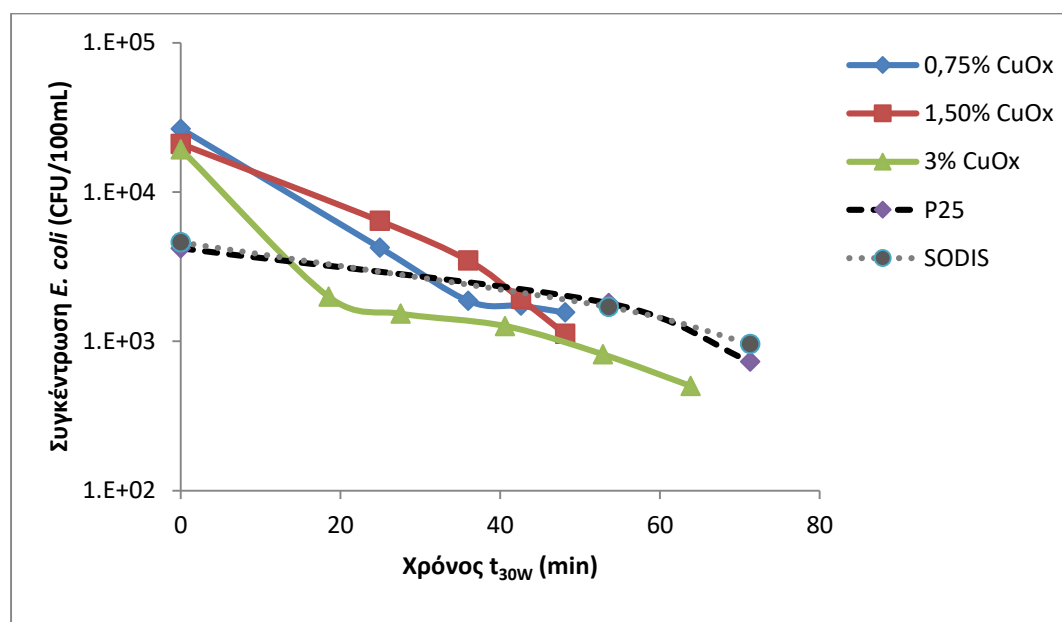
Στον Πίνακα 33 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των πιλοτικών δοκιμών με ροή 10 L h^{-1} με την χρήση του καταλύτη $\text{CuO}_x/\text{BiVO}_4$ (0,75/1,5 και 3 wt%).

Πίνακας 33. Κινητικές σταθερές του $\text{CuO}_x/\text{BiVO}_4$ (0,75, 1,5, 3 wt%) και P25 στον CPC με ροή 10 h^{-1}

Καταλύτης	<i>E. coli</i>		Enterococci		T (°C)
	k (min^{-1})	R ²	k (min^{-1})	R ²	
CuOx 0,75%	0,07	0,96	0,07	0,95	22,5
CuOx 1,5%	0,06	0,97	0,07	0,93	22,5
CuOx 3%	0,06	0,74	0,05	0,73	19,9
P25	0,02	0,95	0,02	0,92	18,1
SODIS	0,04	0,97	0,03	0,98	22

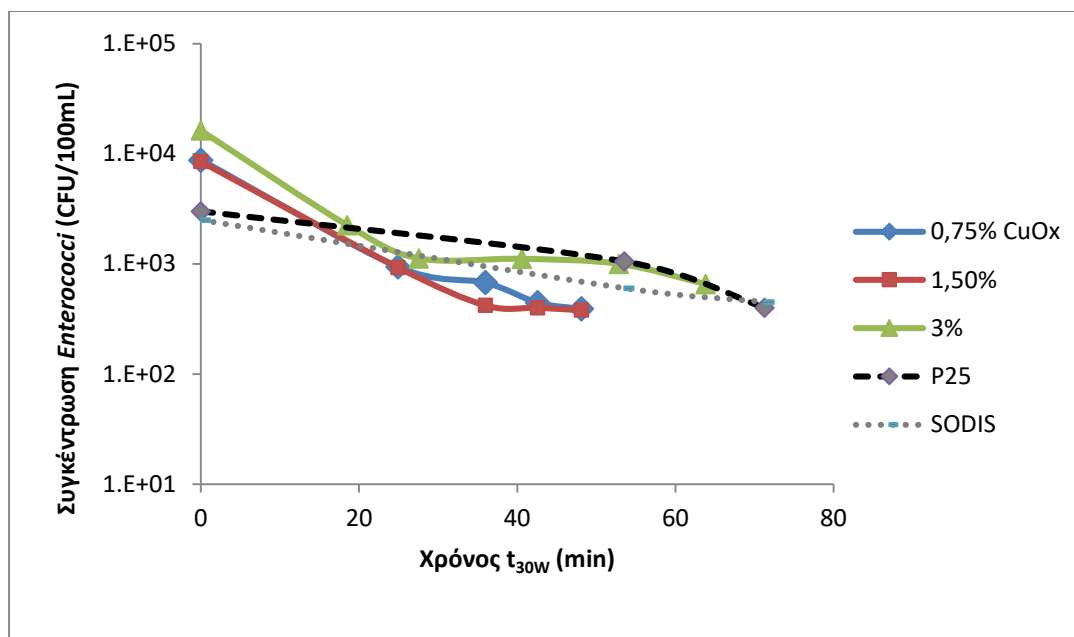
Η διαφορά στη συγκέντρωση του καταλύτη CuO_x (0,02:0,02 και 0,1:0,1 wt%) δεν φάνηκε να επηρεάζει την αδρανοποίηση του *E. coli*. Για τους εντεροκόκκους παρατηρήθηκε διαφορά στη σταθερά κινητικής με την περίπτωση της συγκέντρωσης καταλύτη 3% να παρουσιάζει μειωμένη την κινητική σταθερά. Σε κάθε περίπτωση συγκέντρωσης καταλύτη τα αποτελέσματα ήταν καλύτερα από αυτά της P25 και για τα δύο βακτήρια.

Στο Γράφημα 109 φαίνεται ότι η επεξεργασία του *E. coli* με τον καταλύτη $\text{CuO}_x/\text{BiVO}_4$ με συγκέντρωση χαλκού 3% επιτυγχάνει αδρανοποίηση 2 Logs ενώ οι διεργασίες P25 και SODIS παρουσιάζουν αδρανοποίηση περίπου 0,5 Logs.



Γράφημα 109. Αδρανοποίηση *E. coli* με $\text{CuO}_x/\text{BiVO}_4$ (0,75, 1,5, 3 wt%) και P25 στον CPC με ροή 10L h^{-1} .

Όσον αφορά στην περίπτωση των εντεροκόκκων (Γράφημα 110) ο καταλύτης με συγκέντρωση χαλκού 3% επιτυγχάνει αδρανοποίηση 1,3 Logs ενώ οι διεργασίες με μικρότερη συγκέντρωση χαλκού έδειξαν αδρανοποίηση 1,5 Logs. Οι διεργασίες P25 και SODIS πέτυχαν αδρανοποίηση 0,7 Logs.



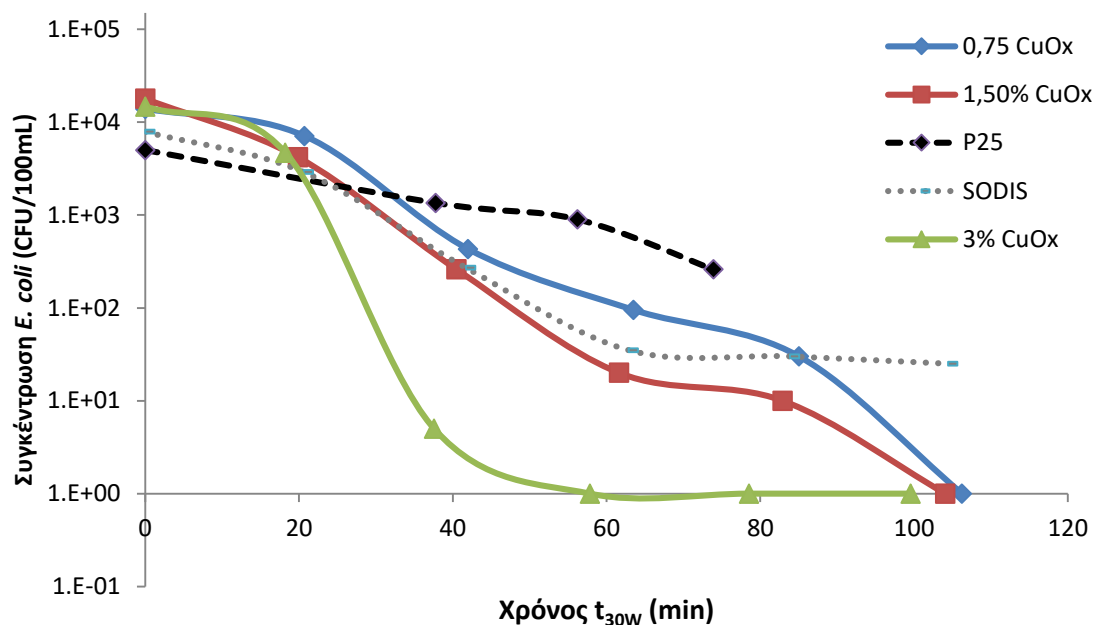
Γράφημα 110. Αδρανοποίηση *Enterococcus* sp. με $\text{CuO}_x/\text{BiVO}_4$ (0,75, 1,5, 3 wt%) και P25 στον CPC με ροή 10L h^{-1}

Στον Πίνακα 31 παρουσιάζονται οι κινητικές σταθερές όπως προέκυψαν από το πείραμα με διπλάσια ροή και όπως φαίνεται δεν προκύπτουν σημαντικές διαφορές στις κινητικές σταθερές μεταξύ των καταλυτών με διαφορετικές συγκεντρώσεις χαλκού και για τα δύο βακτήρια. Όλες οι περιπτώσεις παρουσιάζουν μεγαλύτερες κινητικές σταθερές από τη P25.

Πίνακας 34. Κινητικές σταθερές του $\text{CuO}_x/\text{BiVO}_4$ (0,75, 1,5, 3 wt%) και P25 στον CPC με ροή 20L h^{-1}

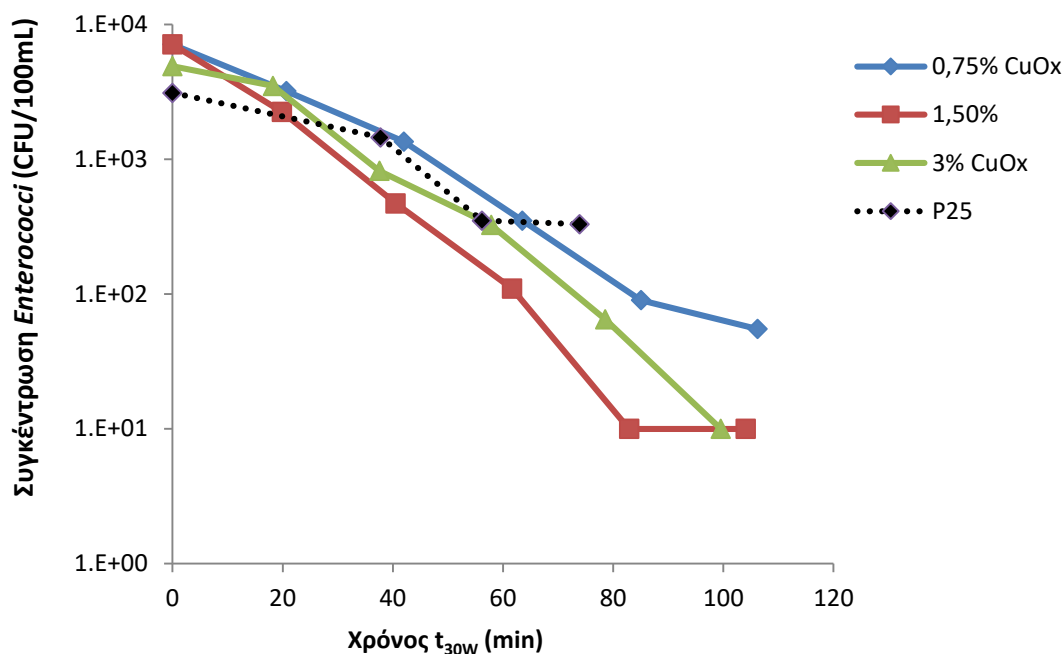
	<i>E. coli</i>		Enterococci		
ΚΑΤΑΛΥΤΗΣ	k (min ⁻¹)	R ²	k (min ⁻¹)	R ²	T (°C)
CuOx 0,75%	0,09	0,93	0,05	0,99	24,3
CuOx 1,5%	0,10	0,98	0,07	0,97	23,4
CuOx 3%	0,17	0,90	0,06	0,96	23,4
P25	0,04	0,96	0,03	0,90	18,2

Στο Γράφημα 111 φαίνεται ότι οι καταλυτικές διεργασίες με CuO_x/BiVO₄ επιτυγχάνουν αδρανοποίηση περίπου 4 Logs ενώ η SODIS 2,2 Logs. Επιπλέον φαίνεται και η καλύτερη απόδοση του καταλύτη με συγκέντρωση χαλκού 3%.



Γράφημα 111. Αδρανοποίηση *E. coli* με CuO_x/BiVO₄ (0,75, 1,5, 3 wt%) και P25 στον CPC με ροή 20L h⁻¹ (CFU/100mL)

Η αδρανοποίηση των εντεροκόκκων (Γράφημα 112) η οποία επιτυγχάνεται από τις καταλυτικές διεργασίες με CuO_x/BiVO₄ και συγκέντρωση χαλκού 1,5 και 3% είναι περίπου 3 Logs ενώ με την P25 η αδρανοποίηση ήταν μόλις 1 Log unit.



Γράφημα 112. Αδρανοποίηση *Enterococcus* sp. με $\text{CuO}_x/\text{BiVO}_4$ (0,75, 1,5, 3 wt%) και P25 στον CPC με ροή 20L h^{-1}

Όπως και στα εργαστηριακά πειράματα, η απόδοση των καταλυτών ήταν παρόμοια, παρά τη διαφορετική συγκέντρωση χαλκού, με εξαίρεση την αδρανοποίηση του *E. coli*, με ροή 20L h^{-1} , η οποία με την χρήση του $\text{CuO}_x/\text{BiVO}_4$ 3wt% έγινε σχεδόν δύο φορές ταχύτερα (1,8-1,95) σε σχέση με τους άλλους δύο καταλύτες. Ο μικρός αριθμός επαναλήψεων των πειραμάτων δεν αποκλείει την πιθανότητα τυχαίας διακύμανσης. Σε σχέση με το P25, η απόδοση του $\text{CuO}_x/\text{BiVO}_4$ ήταν αυξημένη κατά 2,4-4,7 φορές για το *E. coli* και 1,5-3,4 φορές για το *Enterococcus* sp.

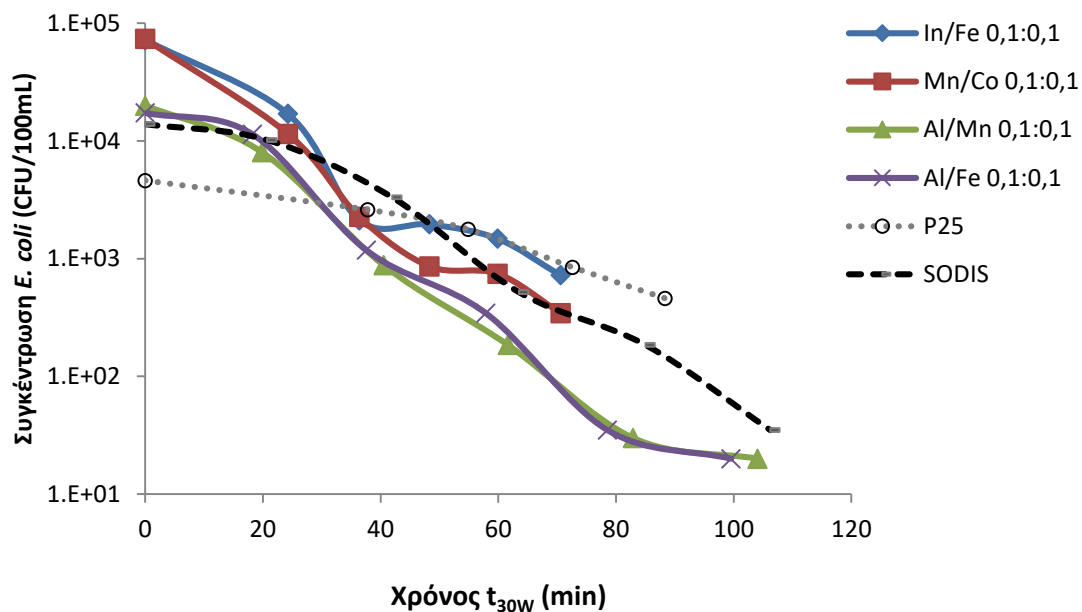
4.7.2.2 Ενισχυμένο TiO_2

Στον Πίνακα 35 και στα Γραφήματα 113 και 114 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των πιλοτικών δοκιμών με την χρήση TiO_2 διμερώς ενισχυμένου με Al/Fe, In/Fe, Mn/Co, Al/Mn (0,1:0,1 wt%). Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 35, η απόδοση όλων των καταλυτών ήταν παρόμοια, με μέσο όρο $k = 0,07\text{min}^{-1}$ ($\pm 0,011$) για το *E. coli* και $k = 0,06\text{min}^{-1}$ ($\pm 0,007$) για το *Enterococcus* sp.

Πίνακας 35. Κινητικές σταθερές για την αδρανοποίηση του *E. coli* και *Enterococcus* sp. σε πιλοτική κλίμακα σε απουσία καταλύτη (SODIS) και με την χρήση P25 και διμερώς ενισχυμένου TiO₂ με διάφορους συνδυασμούς μετάλλων, με συγκέντρωση 0,1:0,1 wt%. Ροή λύματος: 10L h⁻¹.

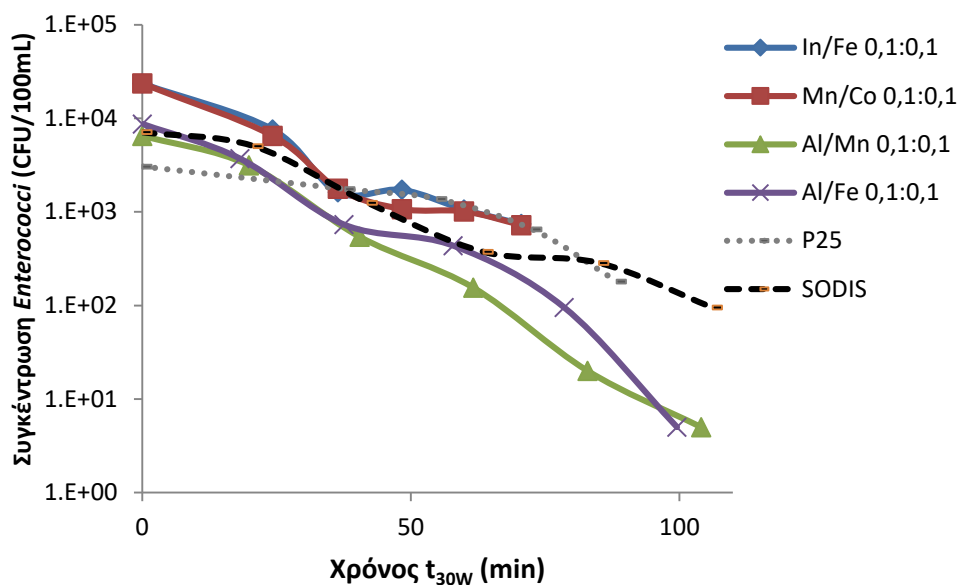
	<i>E. coli</i>		Enterococci		
Καταλύτης	k (min ⁻¹)	R ²	k (min ⁻¹)	R ²	T (°C)
In/Fe (0,1:0,1)	0,07	0,92	0,05	0,92	30,4
Mn/Co (0,1:0,1)	0,08	0,96	0,06	0,92	30,4
Al/Fe (0,1:0,1)	0,07	0,97	0,07	0,94	23,4
Al/Mn (0,1:0,1)	0,07	0,98	0,07	0,98	23,4
P25	0,02	0,95	0,02	0,92	18,1
SODIS	0,04	0,97	0,03	0,98	22

Τα αποτελέσματα από Γράφημα 113 δείχνουν ότι οι επεξεργασίες με τους καταλύτες Al/Mn και Al/Fe μπορούν να πετύχουν αδρανοποίηση 4,5 Logs για το *E. coli*.



Γράφημα 113. Αδρανοποίηση του *E. coli* σε πιλοτική κλίμακα σε απουσία καταλύτη (SODIS) και με την χρήση P25 και διμερώς ενισχυμένου TiO_2 με διάφορους συνδυασμούς μετάλλων, με συγκέντρωση 0,1:0,1 wt%. Ροή λύματος: 10 L h^{-1} .

Ομοίως, στο Γράφημα 114 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τους εντεροκόκκους όπως και πάλι σημειώνεται η πολύ καλή απόδοση των καταλυτών οι οποίοι επιτυγχάνουν αδρανοποίηση 3,5 Logs.

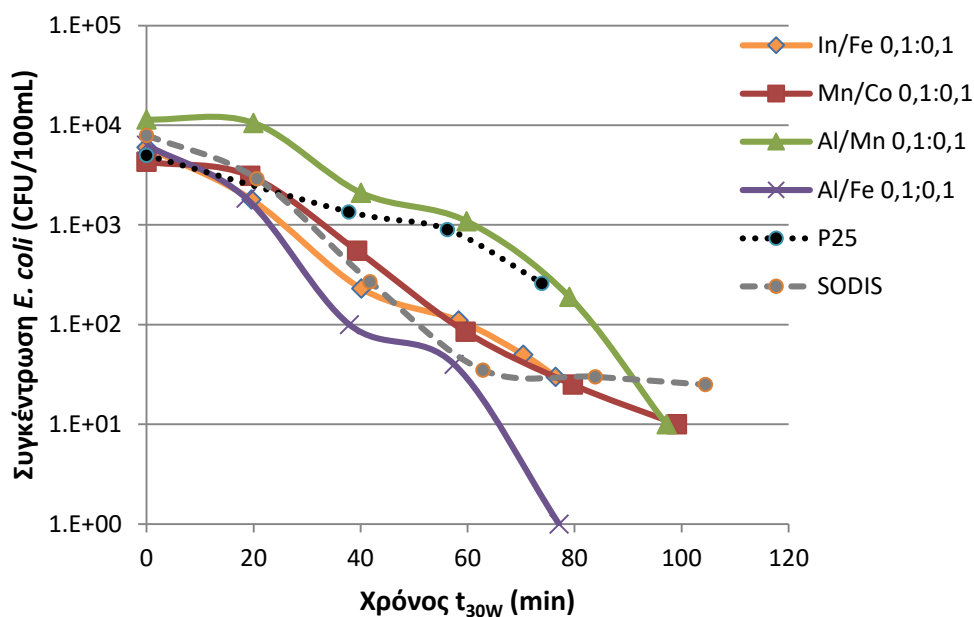


Γράφημα 114. Αδρανοποίηση του *Enterococcus* *sp* σε πιλοτική κλίμακα σε απουσία καταλύτη (SODIS) και με την χρήση P25 και διμερώς ενισχυμένου TiO_2 με διάφορους συνδυασμούς μετάλλων, με συγκέντρωση 0,1:0,1 wt%. Ροή λύματος: 10L h^{-1}

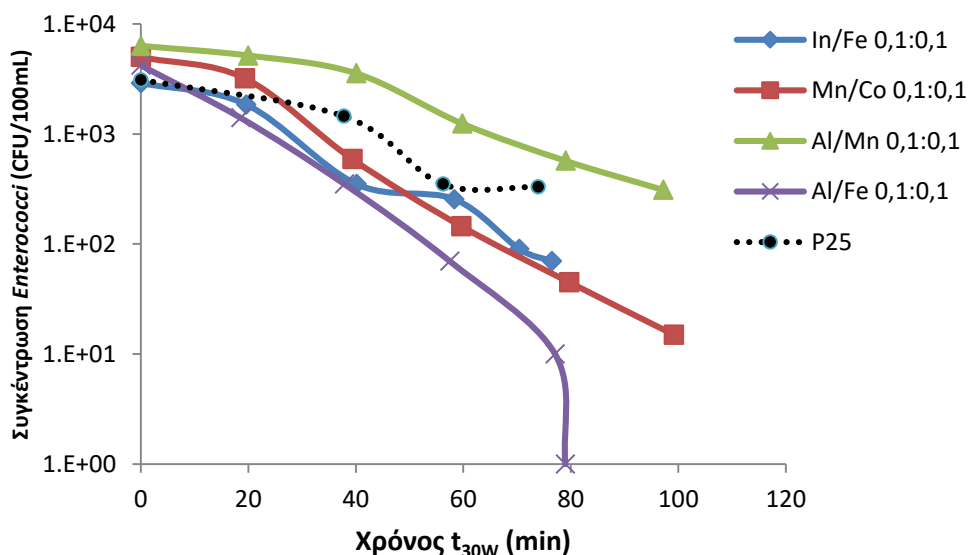
Παρακάτω στον Πίνακα 36 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των πειραμάτων με ροή λύματος 20L/h .

Πίνακας 36. Κινητικές σταθερές για την αδρανοποίηση του *E. coli* και *Enterococcus* *sp.* σε πιλοτική κλίμακα σε απουσία καταλύτη (SODIS) και με την χρήση P25 και διμερώς ενισχυμένου TiO_2 με διάφορους συνδυασμούς μετάλλων, με συγκέντρωση 0,1:0,1 wt%. Ροή λύματος: 20L h^{-1}

	<i>E. coli</i>		Enterococci		
Καταλύτης	k (min^{-1})	R ²	k (min^{-1})	R ²	T(°C)
In/Fe (0,1:0,1)	0,07	0,99	0,05	0,96	22
Mn/Co (0,1:0,1)	0,06	0,97	0,06	0,98	22,1
Al/Fe (0,1:0,1)	0,10	0,96	0,07	0,99	21,4
Al/Mn (0,1:0,1)	0,06	0,86	0,03	0,93	20
P25	0,04	0,96	0,03	0,9	18,2



Γράφημα 115. Αδρανοποίηση του *E. coli* σε πιλοτική κλίμακα σε απουσία καταλύτη (SODIS) και με την χρήση P25 και διμερώς ενισχυμένου TiO_2 με διάφορους συνδυασμούς μετάλλων, με συγκέντρωση 0,1:0,1 wt%. Ροή λύματος: 20 L h^{-1}



Γράφημα 116. Αδρανοποίηση του *Enterococcus* sp σε πιλοτική κλίμακα σε απουσία καταλύτη (SODIS) και με την χρήση P25 και διμερώς ενισχυμένου TiO_2 με διάφορους συνδυασμούς μετάλλων, με συγκέντρωση 0,1:0,1 wt%. Ροή λύματος: 20 L h^{-1}

Με ροή 20 L h^{-1} , το TiO_2 Al/Fe 0,1:0,1 wt% ήταν πιο δραστικό και για τους δύο βακτηριακούς δείκτες με $k=0,103\text{ min}^{-1}$ για το *E. coli* και $k=0,073\text{ min}^{-1}$ για το *Enterococcus* sp. Οι υπόλοιποι καταλύτες είχαν παρόμοια απόδοση για το *E. coli* με

μέσο όρο $k=0,06 \text{ min}^{-1}$ ($\pm 0,006$). Η απόδοση του Al/Mn 0,1:0,1 wt% για το *Enterococcus* sp ήταν αρκετά χαμηλή $k=0,028 \text{ min}^{-1}$, ενώ η αντίστοιχη τιμή για το P25 ήταν $k=0,031 \text{ min}^{-1}$. Σε όλες τις άλλες μετρήσεις των πιλοτικών πειραμάτων, η απόδοση των ενισχυμένων καταλυτών αυξήθηκε σε σχέση με το P25 2,5-3,7 φορές για το *E. coli* και 1,5-2,8 φορές για το *Enterococcus* sp. Μετά από 150min έκθεσης στο ηλιακό φως, σε όλα τα πειράματα, παρατηρήθηκε μείωση στους μικροβιακούς δείκτες από 94,11 έως 99,99%.

Για να γίνει ευκολότερη σύγκριση μεταξύ των αποτελεσμάτων, στον Πίνακα 37 παρουσιάζεται η μείωση στη συγκέντρωση των παθογόνων σε ποσοστά, μετά από ακτινοβόληση διάρκειας $t_{30W}=50-60 \text{ min}$, που αντιστοιχεί σε πραγματικό χρόνο σε 90-120 min.

Πίνακας 37. Ποσοστό αδρανοποίησης % των *E. coli* και *Enterococcus* sp, σε πιλοτική κλίμακα, με ροή 10 και 20 L h⁻¹, για $t_{30W}=50-60 \text{ min}$

	ΚΑΤΑΛΥΤΗΣ	CuOx/BiVO ₄			In/Fe	Mn/Co	Al/Mn	Al/Fe	P25	SODIS
	c ενισχυτή (wt%)	0,75	1,5	3	0,1/0,1	0,1/0,1	0,1/0,1	0,1/0,1		
ΠΑΡΟΧΗ	ΒΑΚΤΗΡΙΟ	ΠΟΣΟΣΤΟ ΜΕΙΩΣΗΣ								
10L/h	<i>E. coli</i>	94,11	94,67	95,76	97,94	98,99	99,07	98,01	81,30	63,04
	<i>Enterococcus</i> sp	95,54	95,53	91,57	95,49	95,70	97,62	95,00	78,69	76,00
20L/h	<i>E. coli</i>	99,32	99,89	99,99	98,17	98,02	90,44	99,37	94,80	98,07
	<i>Enterococcus</i> sp	95,07	98,45	93,37	91,21	97,10	80,32	98,33	89,35	94,14

Η αδρανοποίηση του *E. coli* έγινε γρηγορότερα όταν η ροή ήταν 20 L h⁻¹, εκτός από τους καταλύτες TiO₂-Al/Mn και TiO₂-Mn/Co. Η επίδραση της ροής στην αδρανοποίηση του *Enterococcus* sp, δεν ήταν τόσο ξεκάθαρη, όμως στην πλειοψηφία των περιπτώσεων ήταν θετική, με εξαίρεση τους CuOx/BiVO₄ 0,75 και 1,5 wt%, TiO₂-Al/Mn και TiO₂-In/Fe. Σε όλες τις δοκιμές, η αδρανοποίηση ήταν μεγαλύτερη του 90% (εκτός από το TiO₂-Al/Mn, 20 L h⁻¹ για το *Enterococcus* sp). Κατά μέσο όρο, η αδρανοποίηση του *E. coli* και του *Enterococcus* sp. ήταν μεγαλύτερη με την αυξημένη ροή. Ωστόσο, δεν φάνηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην απόδοση μεταξύ των δύο συνθηκών, σύμφωνα με το τεστ Mann-Whitney Rank Sum (βαθμός σημαντικότητας: P=0,097 για το *E. coli* και P=0,902 για το *Enterococcus* sp).

Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, η ροή είναι ένας παράγοντας που επηρεάζει σημαντικά την απόδοση της φωτοκατάλυσης στους CPC αντιδραστήρες, λόγω της διαμόρφωσης του χρόνου έκθεσης στο φως αλλά και της μηχανικής εξασθένησης των κυττάρων (McGuigan et al., 2012). Σε συστήματα με ανακυκλοφορία, η αυξημένη ροή μπορεί να έχει θετική ή αρνητική επίδραση στην μικροβιακή αδρανοποίηση, όταν η συνολική ποσότητα ακτινοβολίας που λαμβάνεται ανά επιφάνεια λύματος είναι σταθερή. Κατά την ανακυκλοφορία, το λύμα εξερχόμενο από τους μαιανδρικούς σωλήνες, παραμένει για κάποιο διάστημα σε σκιά μέχρις ότου περάσει από τον σωλήνα εξόδου και την δεξαμενή ανακυκλοφορίας. Η διακοπτόμενη ακτινοβολία, σύμφωνα με ορισμένες μελέτες, επιτρέπει στους μικροοργανισμούς να ενεργοποιήσουν τους σκοτεινούς μηχανισμούς επιδιόρθωσης και να προσαρμοστούν στην ακτινοβολία και τις ενεργές μορφές οξυγόνου. Ιδιαίτερα όταν η διακοπή είναι κατά τα πρώτα λεπτά της δοκιμασίας, οι περισσότερες βλάβες είναι ακόμη αναστρέψιμες και οι μηχανισμοί που ενεργοποιούνται ενισχύουν την άμυνα τους. Γίνεται ταχεία σύνθεση του ενζύμου δισμουτάση του υπεροξειδίου η οποία καταλύει τις ρίζες υδροξυλίου και υπεροξειδίου σε υπεροξείδιο του υδρογόνου και οξυγόνου, τα οποία είναι λιγότερο δραστικά (Rincón and Pulgarin, 2003). Άλλες μελέτες υποστηρίζουν πως η ταχύτητα απολύμανσης μπορεί να ενισχυθεί εφαρμόζοντας διακοπτόμενη ακτινοβολία, καθώς όταν τα βακτήρια παραμένουν εκτεθειμένα στον ήλιο για παρατεταμένο χρονικό διάστημα και αν η ένταση της ακτινοβολίας που λαμβάνουν δεν είναι αρκετά ισχυρή για να προκαλέσει άμεσα αδρανοποίηση, τότε πιθανόν ενεργοποιούνται οι μηχανισμοί φωτοενεργοποίησης με αποτέλεσμα πάλι, την προσαρμογή στην επίδραση της UV ακτινοβολίας (Fernández et al., 2005). Επίσης έχει παρατηρηθεί διαφορετική απόκριση μεταξύ διαφορετικών ειδών. Για παράδειγμα, το βακτήριο *Bacillus pumilis* και ο βακτηριοφάγος MS2, φάνηκαν να είναι πιο ευαίσθητοι σε διακοπτόμενη έκθεση, διάφορα είδη *Enterococcus* δεν έδειξαν να επηρεάζονται από την συνέχεια ή μη της ακτινοβολίας, ενώ δοκιμές σε *E. coli* και *Bacteriodes fragilis* επιβεβαίωσαν πως η διακοπή της ακτινοβολίας εμποδίζει την αδρανοποίηση τους. Για κάποια είδη, η συχνότητα εναλλαγής φωτός-σκότους καθορίζει το εάν τελικά θα ενισχυθούν ή θα αποδυναμωθούν οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης τους (Mistear et al., 2013).

Άλλη πιθανή εξήγηση της ενίσχυσης της απολύμανσης με αυξημένη ροή, είναι πως λόγω της καλύτερης ανάδευσης του λύματος, υπάρχει μικρότερη καθίζηση του καταλύτη στην δεξαμενή ανακυκλοφορίας και άρα μεγαλύτερη συγκέντρωση

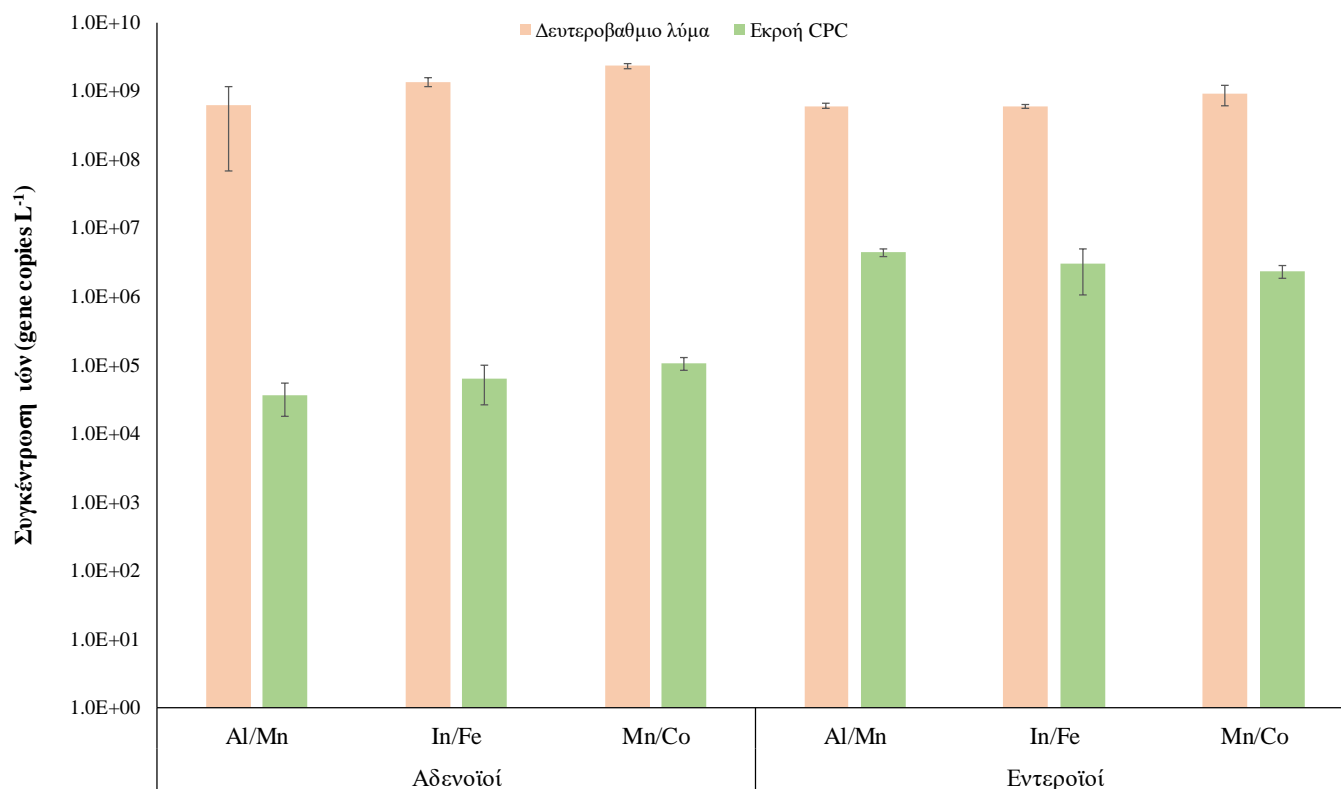
καταλύτη στους σωλήνες που εκτίθενται στην ηλιακή ακτινοβολία. Τα μέταλλα και τα μεταλλικά οξείδια που χρησιμοποιούνται ως φωτοκαταλύτες έχουν χαμηλή διαλυτότητα στο νερό και μεγάλο μοριακό βάρος, συνεπώς χρειάζεται συνεχής ανάδευση ώστε να αποφευχθεί η καθίζηση τους και προσεκτικός σχεδιασμός της κυκλοφορίας του λύματος.

Επίσης, σε συστήματα που περιλαμβάνουν συνεχή ροή του λύματος, το μηχανικό στρες κατά την διάρκεια της διαδικασίας επηρεάζει την απόδοση της διαδικασίας. Πειράματα ελέγχου που έχουν διεξαχθεί σε αντιδραστήρες CPC, σε σκοτεινές συνθήκες και απουσία καταλύτη, απέδειξαν ότι ένα μεγάλο ποσοστό των βακτηρίων θανατώνονται λόγω μηχανικής εξασθένησης κατά την κίνηση του νερού στο μαιανδρικό σύστημα (Misstear et al., 2013). Σε άλλο πείραμα με σκοπό την απολύμανση πραγματικού αστικού δευτεροβάθμιου απόβλητου, με φωτόλυση (απουσία καταλύτη), σε στατικό αντιδραστήρα CPC, δηλαδή χωρίς σύστημα ροής του λύματος, με φυσικό φωτισμό, παρατηρήθηκε μείωση του *E. coli* κατά 2 Log units με δόση UV ακτινοβολίας 300-350 kJ/m² (Bichai et al., 2012). Στην παρούσα μελέτη, αντίστοιχη μείωση στο *E. coli*, χωρίς καταλύτη, στον αντιδραστήρα CPC, επιτεύχθηκε με δόση UV 150-200 kJ/m². Η ταχύτερη αδρανοποίηση πιθανόν οφείλεται στην μηχανική εξασθένηση των μικροοργανισμών λόγω της συνεχούς κίνησης του λύματος μέσα στον αντιδραστήρα και της εναλλαγής φωτός-σκότους.

4.7.3 Απομάκρυνση ιών

Η μονάδα CPC εξετάστηκε και ως προς την ικανότητα της να απομακρύνει τους αδενοϊούς και τους εντεροϊούς. Για το σκοπό αυτό η μονάδα τροφοδοτήθηκε με 120 L λύματος προερχόμενο από την εκροή της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας της μονάδας επεξεργασίας λυμάτων των Χανίων. Λόγω της μεθόδου της δειγματοληψίας, δειγματοληψία με φίλτρο, λήφθηκε μόνο ένα δείγμα από την έξοδο του συστήματος μετά από 3 ώρες επεξεργασίας.

Όσον αφορά στην απομάκρυνση των ιών χρησιμοποιήθηκαν οι καταλύτες Al/Mn 0,1:0,1, In/Fe 0,5:0,5 και Mn/Co 0,1:0,1. Όπως φαίνεται στο Γράφημα 117, οι τρεις επιλεγμένοι καταλύτες παρουσίασαν παρόμοια απόδοση στην απομάκρυνση τόσο των αδενοϊών όσο και των εντεροϊών. Παρατηρώντας τα αποτελέσματα μεταξύ των δύο τύπων ιών, φαίνεται ότι οι καταλύτες είχαν καλύτερη απόδοση απέναντι στους αδενοϊούς. Συγκεκριμένα για τους AdV η μείωση ήταν 4,2 Logs με τον καταλύτη Al/Mn και 4,3 Logs για τους In/Fe και Mn/Co. Για τους EV η μείωση ήταν 2,1, 2,3 και 2,6 Logs με τους καταλύτες που περιείχαν Al/Mn, In/Fe και Mn/Co, αντίστοιχα. Οι τελικές συγκεντρώσεις των ιών μετά το πέρας της επεξεργασίας ήταν της τάξης των 10^4 gc L⁻¹ και 10^6 gc L⁻¹ για AdV και EV, αντίστοιχα.



Γράφημα 117. Συγκέντρωση αδενοϊών και εντεροϊών πριν και μετά την επεξεργασία με τη μονάδα CPC και τους καταλύτες Al/Mn, In/Fe και Mn/Co.

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η φωτοκατάλυση ως μέθοδος αδρανοποίησης/απομάκρυνσης των ιών μπορεί να πετύχει αξιόλογα αποτελέσματα. Η πλειονότητα των μελετών σχετικά με την ετερογενή φωτοκατάλυση και την απόδοσή της απέναντι στους ιούς αναφέρεται σε πειράματα τα οποία έχουν γίνει με

βακτηριοφάγους και κυρίως με MS2 φάγους, οι οποίοι αποτελούν δείκτες ιικής μόλυνσης τους υδάτινου περιβάλλοντος. Παρόλο που στο συγκεκριμένο μέρος της διατριβής δεν εξετάστηκαν οι βακτηριοφάγοι, αντίστοιχη μελέτη που διενεργήθηκε σε λύμα με την ίδια σύσταση και τον ίδιο καταλύτη Mn/Co TiO₂ υπό φυσική ηλιακή ακτινοβολία, έδειξε απομάκρυνση των φάγων της τάξης των 3,8 Logs (Venieri et al., 2015). Η απομάκρυνση αυτή είναι μικρότερη από αυτή που επιτυγχάνει ο ίδιος καταλύτης για τους AdV, δίνοντας ένα πλεονέκτημα στους MS2 φάγους σε ενδεχόμενο επιλογής τους ως δεικτών παρουσίας των αδενοϊών. Στη μελέτη των Love et al. αναφέρεται ότι οι MS2 φάγοι παρουσίασαν παρόμοιους ρυθμούς απομάκρυνσης με τον αδενοϊό τύπου 2 σε πειράματα σε καθαρό νερό και με χρήση μόνο της ηλιακής ακτινοβολίας (Love et al., 2010). Όμως, όπως έδειξε αυτή η διατριβή, δεν ισχύει το ίδιο και για τους εντεροϊούς, οι οποίοι έδειξαν μικρότερη μείωση σε σχέση με τους MS2 φάγους.

Γενικότερα στη βιβλιογραφία αναφέρεται η αποτελεσματική δράση των καταλυτικών και φωτοκαταλυτικών διεργασιών ως προς την αδρανοποίηση των ιών και η πλειονότητα αυτών βασίζονται συμπεράσματά τους σε πειράματα με βακτηριοφάγους. Για παράδειγμα, αναφέρεται ότι φωτοκαταλυτικός αντιδραστήρας μεμβράνης με εναιώρημα TiO₂ κατάφερε απομάκρυνση 5 Logs στους f2 φάγους (φάγοι με παρόμοια χαρακτηριστικά με τους MS2) (Zheng et al., 2015). Επίσης, η παρουσία ημιαγωγικών και ντοπαρισμένων καταλυτών φαίνεται ότι συμβάλλει θετικά στην αδρανοποίηση των ιών, εδώ πρέπει να σημειωθεί ότι στην πλειονότητα των μελετών έχουν χρησιμοποιηθεί οι φάγοι ως δείκτες ιικής μόλυνσης. Η μελέτη των Horovitz et al αναφέρει επίσης την πολύ καλή απόδοση στην αδρανοποίηση των MS2 φάγων σε πειράματα με φωτοκαταλυτικό αντιδραστήρα με μεμβράνη με τη χρήση ντοπαρισμένου καταλύτη με επικάλυψη TiO₂ (N-doped TiO₂), χρησιμοποιώντας φυσικά επιφανειακά ύδατα (Horovitz et al., 2018). Η σύζευξη του TiO₂ για σχηματισμό σύνθετων υλικών με άλλα οξείδια έχει επίσης δείξει μεγάλη αποτελεσματικότητα. Για παράδειγμα, τα σύνθετα νανοϋλικά SiO₂-TiO₂ έχει αναφερθεί ότι εμφανίζουν έως και 270% υψηλότερα ποσοστά φωτοκαταλυτικής αδρανοποίησης για το βακτηριοφάγο MS2 από το μη τροποποιημένο TiO₂ (Liga et al., 2013). Η ενίσχυση του TiO₂ με Ag έδειξε βελτιωμένη αποτελεσματικότητα έναντι των ιών. Για παράδειγμα, εξετάστηκαν TiP2 NPs με άργυρο (nAg / TiO₂) για να εκτιμηθεί η επίδραση στους MS2. Ο ρυθμός αδρανοποίησης των MS2 αναφέρθηκε ότι ήταν 5 φορές υψηλότερος σε σύγκριση με

μόνο το TiO_2 . Παρατηρήθηκε επίσης ότι η έκταση της αδρανοποίησης αυξήθηκε με την αύξηση της περιεκτικότητας σε πρόσμιξη (Laxma et al., 2017)

Παρόλα αυτά, είναι λίγες οι μελέτες που έχουν εξετάσει την απόδοση των φωτοκαλυτικών διεργασιών απέναντι σε άλλα είδη ιών, κυρίως λόγω των δυσκολιών στην ανάπτυξη, στην επεξεργασία και στην ποσοτικοποίησή τους, ενώ είναι ακόμα μικρός ο αριθμός των μελετών οι οποίες εξετάζουν την αδρανοποίηση των ιών σε συνθήκες πραγματικού λύματος. Ωστόσο, ακόμα και σε αυτό το μικρό αριθμό των μελετών εντοπίζεται η υποσχόμενη απόδοση των διεργασιών. Μελέτη η οποία περιγράφει την επεξεργασία των αδενοϊών σε εργαστηριακό επίπεδο με φωτοκαταλυτικό αντιδραστήρα παρουσία TiO_2 σε δείγμα από επιφανειακό νερό λίμνης (pH 7,0 – 7,8) αναφέρει μείωση περίπου 3 Logs (Guo et al., 2018). Άλλη μελέτη σημειώνει ότι διεργασία φωτοκατάλυσης, σε πειραματικό επίπεδο, με TiO_2 επιστρωμένο σε γυάλινη επιφάνεια και UVA ακτινοβολία επιτυγχάνει ικανοποιητική μείωση (4 Logs) του ιού της γρίπης (human influenza A virus) (Nakano et al., 2012). Επιπλέον, πειράματα εργαστηριακής κλίμακας έδειξαν ότι φωτο - ενεργοποιούμενο TiO_2 μπορεί να αδρανοποιήσει ιούς με διαφορετικές δομές, γενετικό υλικό RNA ιών ((H1N1-Flu, zika virus) και DNA ιούς (ιός ηπατίτιδας C) χρησιμοποιώντας ηλιακή ακτινοβολία. Η ίδια μελέτη αναφέρει και την επιτυχή αδρανοποίηση του κορωνοϊού SARS-CoV-2 (Tong et al., 2021). Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα αυτής της διατριβής με τα παραπάνω θα μπορούσε να ευσταθεί ο ισχυρισμός ότι οι καταλύτες Al/Mn, In/Fe και Mn/Co μπορούν να συμβάλουν ικανοποιητικά στην αδρανοποίηση των ιών δεδομένου ότι πέτυχαν απομάκρυνση της τάξης των 4 Logs σε συνθήκες πραγματικού λύματος και πιλοτικής κλίμακας.

Η διαφορά στην αποτελεσματικότητα των ROS μεταξύ ιών και βακτηρίων έγκειται στην διαφορά της δομής. Η δομή των ιών και η έλλειψη ενζύμων τους καθιστά ανθεκτικότερους από τα βακτήρια. Μιλώντας συγκεκριμένα για τους αδενοϊούς, αναγνωρίζονται ως οι πλέον ανθεκτικοί ιοί στην UV ακτινοβολία καθώς για την αντιμετώπιση τους απαιτείται μεγαλύτερη δόση UV_{254} . Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το γενετικό υλικό τους αποτελείται από DNA διπλής έλικας και έτσι η κάθε έλικα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο για την επιδιόρθωσή του ιού στην περίπτωση καταστροφής (Guo et al., 2018) Αντίθετα, η πιο πολύπλοκη δομή του *E. coli* το καθιστά πιο ευαίσθητο αφού μια και μόνο μικρή βλάβη στην επιφάνεια του κύτταρου μπορεί να καταστρέψει τα μεταβολικά συστήματα (Misstear and Gill, 2012).

Όσον αφορά στις διαφορές στους μηχανισμούς απομάκρυνσης, στην περίπτωση του βακτηριακού δείκτη *E. coli* ένα μέρος της απομάκρυνσης επιτυγχάνεται από O^{2-} και H_2O_2 στην περίπτωση που διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη. Από την άλλη πλευρά, η αδρανοποίηση των ιών προκαλείται από την αποικοδόμηση της πρωτεΐνης του καψιδίου, της οποίας η δομή είναι απλή και άκαμπτη και συνεπώς απαιτεί περισσότερη οξειδωτική ισχύ και επηρεάζεται από την ένταση της ακτινοβολίας (Nakano et al., 2012). Η παρεμπόδιση της ενδοκυτταρικής ανάπτυξης που προηγείται των κωδικοποιήσεων του φάγου είναι ο πραγματικός βιολογικός μηχανισμός που αντιπροσωπεύει το μεγαλύτερο μέρος της αδρανοποίησης (Misstear and Gill, 2012). Επίσης, ο μηχανισμός απομάκρυνσης των φάγων σχετίζεται κυρίως με τις ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου (Misstear and Gill, 2012). Σε αντίθεση με τα παραπάνω και τις μελέτες που αναφέρουν ότι βασικό ρόλο στην αδρανοποίηση των ιών έχει η ακτινοβολία, η πρόσφατη μελέτη των Tong et al. περιγράφει ότι οι ρίζες OH που παράγονται από τη φωτοενεργοποίηση του TiO_2 επιτίθενται στο RNA γονιδίωμα του ιού και έτσι καταστρέφεται η ικανότητα του ιού να προκαλέσει νέο μολυσματικό κύκλο (Tong et al., 2021).

Για την αδρανοποίηση των ιών σημαντικότερο ρόλο έχουν οι ρίζες OH που δημιουργούνται σε αιωρούμενη μορφή και όχι στην επιφάνεια του καταλύτη. Αυτό συμβαίνει διότι αναπτύσσονται δυνάμεις απόθησης μεταξύ των φάγων και της επιφάνειας του καταλύτη TiO_2 που είναι αρνητικά φορτισμένοι σε pH κοντά στο 7 (Cho et al., 2005). Μελέτη με πειράματα σε αντιδραστήρα φωτοκαταλυτικής μεμβράνης και με χρήση ντοπαρισμένου καταλύτη με Al_2O_3 έδειξε ότι το αλκαλικό pH του νερού αναστέλλει τη φωτοκαταλυτική απολύμανση μέσω κακής αλληλεπίδρασης των MS2 φάγων με τον καταλύτη που προκαλείται λόγω της ηλεκτροστατικής απόθησης. Από τα αρνητικά φορτισμένα είδη που δοκιμάστηκαν (Cl^- , Bicarbonate- $CaCO_3$), η οργανική ύλη έδειξε να έχει την πιο σημαντική επίδραση στην αδράνεια της φωτοκαταλυτικής διαδικασίας. Είναι σημαντικό λοιπόν να εξετάζεται η ποιότητα του νερού πριν εφαρμοστούν αυτές οι τεχνολογίες (Horovitz et al., 2018). Η σημασία της σύστασης του λύματος σημειώνεται και από τους Guo et al., οι οποίοι τονίζουν ότι η σύσταση του λύματος επηρεάζει την απόδοση των φωτοκαλυτικών διεργασιών απέναντι στους αδενοϊούς. Τα χαμηλότερα επίπεδα διαλυμένου οργανικού άνθρακα και η διαφορετική χημική σύσταση με μικρότερα οργανικά μόρια συμβάλλουν στο να αποτελέσουν οι ιοί τους στόχους των ROS. Επίσης, μεγαλύτερα οργανικά μόρια μπορεί

να δημιουργήσουν μια «ασπίδα» για τους ιούς απέναντι στην ακτινοβολία (Guo et al., 2018).

Από τα αποτελέσματα είναι φανερό ότι μόνο ο έλεγχος την βακτηριακών δεικτών δεν αρκεί για την έλεγχο της ποιότητας και της ασφάλειας του νερού, καθώς οι μεγάλες συγκεντρώσεις των ιών στην εκροή της επεξεργασίας θα μπορούσαν να εγείρουν κινδύνους. Γενικότερα οι διαφοροποιήσεις που περιγράφονται μεταξύ των μικροοργανισμών απέναντι στις διαφορετικές διεργασίες χρήζουν ιδιαίτερης προσοχής. Υπάρχει η περίπτωση να παρατηρείται διαφορά στα πειράματα μεταξύ φυσικού και τεχνητού φωτός. Για παράδειγμα σε συνθήκες τεχνητού φωτός η αδρανοποίηση διαφορετικών φάγων έδειξε τη σειρά ανθεκτικότητας PR772 > UX174 > MS2. Αντίθετα, σε συνθήκες φυσικού φωτός οι PR772 παρουσιάστηκαν πιο ευαίσθητοι. Ακόμα και το ίδιο είδος μικροοργανισμού μπορεί να επηρεαστεί από τις διακυμάνσεις στις συνθήκες του πειράματος, για παράδειγμα την ηλιοφάνεια (Misstear and Gill, 2012) (Agulló-Barceló et al., 2013).

Σημαντικό είναι επίσης να σημειωθεί ότι παρατηρούνται διαφορές μεταξύ των διαφορετικών φωτοκαταλυτικών διεργασιών ως προς την ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών. Η διεργασία H_2O_2 /ηλιακή ακτινοβολία έδειξε ρυθμό αδρανοποίησης *E. coli* > F-RNA φάγοι > σωματικοί κολιφάγοι > ωοκύστες, ενώ ετερογενής φωτοκατάλυση με καταλύτη TiO_2 έδειξε F-RNA φάγοι > σωματικοί κολιφάγοι \geq *E. coli* > ωοκύστες. Διαφορές ενδέχεται να παρουσιαστούν και μεταξύ των πειραμάτων εργαστηριακής και πιλοτικής κλίμακας. Σε αντίθεση με τα παραπάνω, μελέτη σε μονάδα CPC με χρήση καταλύτη TiO_2 αναφέρει τη μεγαλύτερη ευαισθησία των MS2 φάγων σε σχέση με το *E. coli* σε λύμα εκροής δευτεροβάθμιας επεξεργασίας (Agulló-Barceló et al., 2013). Θα πρέπει λοιπόν να εξετάζεται η σύσταση του λύματος και το είδος των μικροοργανισμών που θα καλείται να αντιμετωπίσει η εκάστοτε επεξεργασία, καθώς και το ποιοι καταλύτες θα είναι η καλύτερη επιλογή.

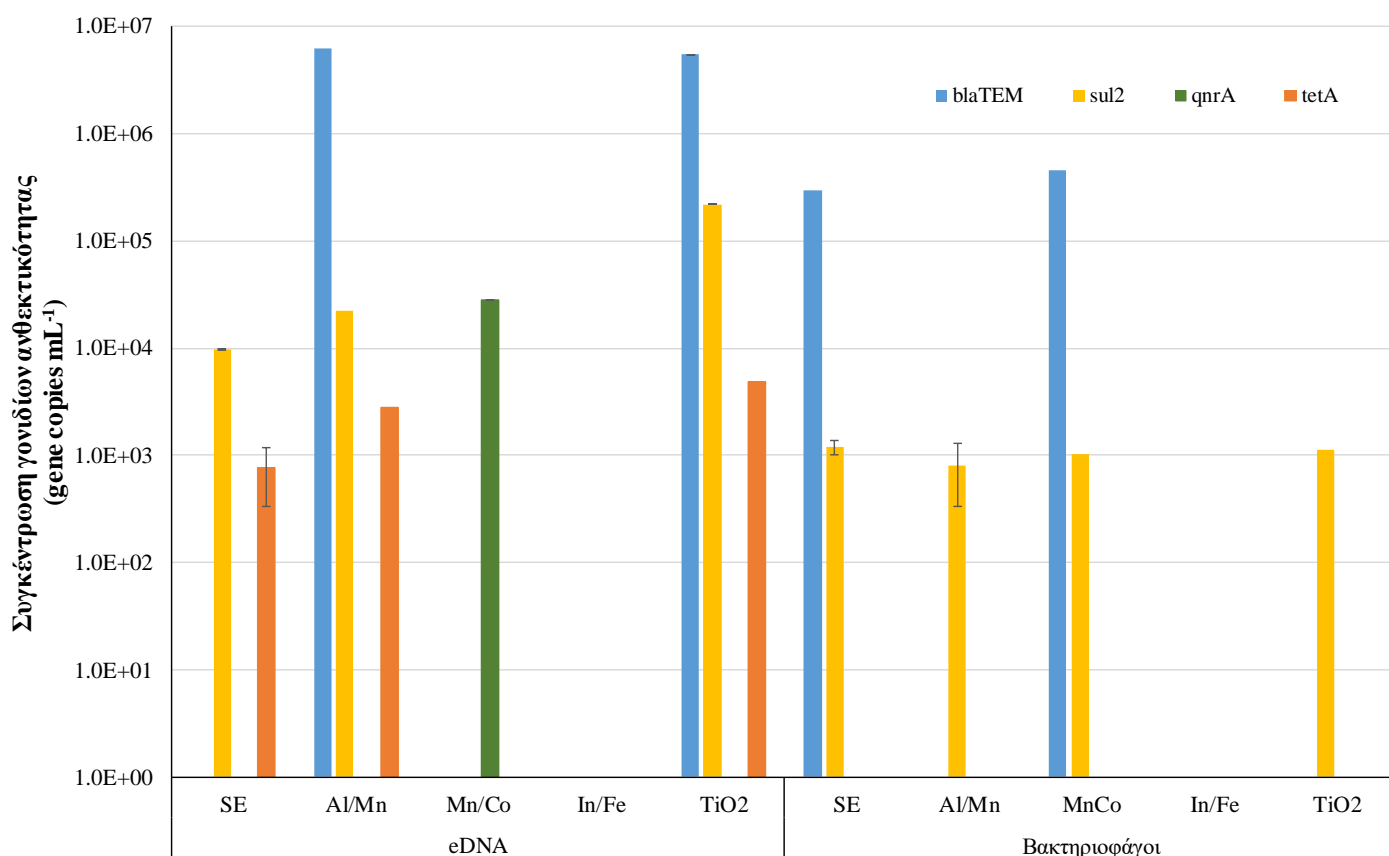
Το αποτέλεσμα αυτό σε σύγκριση με την παρούσα μελέτη και δεδομένου ότι το λύμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν πραγματικό και όχι συνθετικό, τονίζει την αποδοτικότητα των καταλυτών που χρησιμοποιήθηκαν. Αντιθέτως, η μικρή μείωση των εντεροϊών δεν επιβεβαιώνεται συχνά στη βιβλιογραφία, καθώς γενικά αναφέρονται ως πιο ευαίσθητοι στη UVA ακτινοβολία. Μια πιθανή εξήγηση θα

μπορούσε να είναι η ικανότητα των εντεροϊών να δημιουργούν συσσωματώματα, όπως αναφέρεται και στο Κεφάλαιο 3, με αποτέλεσμα να μειώνεται η δράση των ROS (Gerba and Betancourt, 2017)

4.7.4 Ποσοτικοποίηση γονιδίων σε διαφορετικού τύπου γενετικό υλικό

Στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης εξετάστηκε η δυνατότητα της πιλοτικής μονάδας, υπό τις δεδομένες συνθήκες λειτουργίας, να απομακρύνει γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά. Συγκεκριμένα, εξετάστηκαν γονίδια ανθεκτικότητας (ARGs) στο εξωκυτταρικό γενετικό υλικό και στο γενετικό υλικό των φάγων κι ελέγχθηκε η παρουσία τους και η συγκέντρωσή τους στην εκροή της μονάδας.

Παρατηρώντας το Γράφημα 118 φαίνεται ότι τα εξεταζόμενα γονίδια ανθεκτικότητας δεν παρουσίασαν μείωση στις συγκεντρώσεις τους μετά την επεξεργασία με τους καταλύτες. Μάλιστα φαίνεται ότι σε ορισμένες περιπτώσεις η επεξεργασία ευνοεί την αύξηση των ARGs. Στο eDNA παρατηρήθηκε μικρή αύξηση στη συγκέντρωση του *sul2* και του *tetA* για τον καταλύτη Al/Mn, ενώ η αύξηση αυτή ήταν μεγαλύτερη για τη P25. Το *bla_{TEM}* εμφανίστηκε στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (10^3 gc L⁻¹) για τους δύο προηγούμενους καταλύτες, ενώ δεν ποσοτικοποιήθηκε στο λύμα εισόδου. Το *qnrA* ποσοτικοποιήθηκε μόνο μετά την επεξεργασία με τον καταλύτη Mn/Co, ενώ μετά την επεξεργασία με το Al/Fe δεν ποσοτικοποιήθηκε κανένα από τα εξεταζόμενα γονίδια.



Γράφημα 118. Συγκεντρώσεις γονιδίων ανθεκτικότητας σε εξωκυτταρικό γενετικό υλικό (eDNA) και γενετικό υλικό φάγων πριν και μετά την επεξεργασία με τη μονάδα CPC.

Εξετάζοντας το γενετικό υλικό το οποίο απομονώθηκε από τους φαγούς, οι συγκεντρώσεις δε φάνηκαν να επηρεάζονται από την επεξεργασία με τους καταλύτες. Το *sul2* ποσοτικοποιήθηκε μετά την επεξεργασία με τους τρεις καταλύτες Al/Mn, Mn/Co και TiO₂ στην ίδια συγκέντρωση (10³ gc L⁻¹) και το *bla*_{TEM} μόνο στο Mn/Co σε συγκέντρωση (10⁶ gc L⁻¹). Τα υπόλοιπα γονίδια δεν εντοπίστηκαν μετά τις επεξεργασίες ενώ όταν χρησιμοποιήθηκε ο καταλύτης με In/Fe και πάλι δεν εμφανίστηκε κανένα γονίδιο όπως και στην περίπτωση του eDNA.

Δεδομένης της υψηλής απόδοσης της φωτοκατάλυσης απέναντι στα βακτήρια, και με δεδομένο ότι ορισμένα από αυτά θα φέρουν και γονίδια ανθεκτικότητας θα περίμενε κανείς ότι η επεξεργασία θα ήταν αποτελεσματική και απέναντι στα γονίδια ανθεκτικότητας. Ωστόσο, στην εκροή του συστήματος παρατηρήθηκαν σημαντικές συγκεντρώσεις γονιδίων ανθεκτικότητας στο εξωκυτταρικό DNA, οι οποίες μάλιστα φαίνεται ότι έμειναν και ανεπηρέαστες μετά την επεξεργασία. Το φαινόμενο αυτό έχει

επίσης παρατηρηθεί από τους Karaolia et al., οι οποίοι αναφέρουν ότι οι συγκεντρώσεις των ARGs στο εξωκυτταρικό γενετικό υλικό από λύμα εκροής μονάδας βιοαντιδραστήρα μεμβρανών παρουσιάζουν περίπλοκες συμπεριφορές μετά την επεξεργασία τους με φωτοκαταλύτες TiO_2 με βάση το γραφένιο και παρουσία ηλιακής ακτινοβολίας. Συγκεκριμένα, οι αρχικές συγκεντρώσεις των γονιδίων *sul1* και *ermB* παρέμειναν ανεπηρέαστες ενώ το *ampC* δεν εντοπίστηκε μετά την επεξεργασία με τους καταλύτες (Karaolia et al., 2018). Αν και στη συγκεκριμένη διατριβή όλα τα εξεταζόμενα γονίδια από τα δείγματα eDNA παρουσίασαν αύξηση μετά την επεξεργασία, σε άλλη μελέτη τα αντίστοιχα ARGs μειώθηκαν κατά 4,7–5,8 Logs μετά την επεξεργασία με TiO_2 επιστρωμένο σε κρύσταλλο quartz. Η συγκεκριμένη μείωση αφορούσε στα γονίδια *mecA* και *ampC*, τα οποία προσδίδουν ανθεκτικότητα στις πενικιλίνες και στις λακτάμες. Παρόλη την τελική μείωση και σε αυτή την περίπτωση παρατηρήθηκε περίπλοκη συμπεριφορά αφού σε στάδιο της επεξεργασίας παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης. Όπως αναφέρεται οι συγκεντρώσεις των γονιδίων ανθεκτικότητας είναι πιθανό να επηρεάζονται από την καταστροφή των βακτηριακών κυττάρων, η οποία οδηγεί σε απελευθέρωση ARGs. Εντούτοις, επισημαίνεται ότι η όλη ανάλυση έλαβε χώρα σε συνθήκες εργαστηρίου (εργαστηριακή κλίμακα και όχι πιλοτική) και με υδατική μήτρα που αφορούσε σε φυσικό νερό (Guo et al., 2017).

Μολονότι που σε αυτή τη διατριβή δεν εξετάστηκαν οι συγκεντρώσεις των ARGs στο ολικό βακτηριακό DNA του λύματος, θα πρέπει να αναφερθεί ότι και σε αυτή την περίπτωση παρουσιάζονται διαφορετικές συμπεριφορές στις συγκεντρώσεις των γονιδίων. Συγκεκριμένα, μελέτη αναφέρει ότι παρόλο που το βακτήριο *E. coli* απομακρύνεται επιτυχώς μετά την επεξεργασία με $\text{UV}/\text{H}_2\text{O}_2$, τα ARGs εξακολουθούν να υφίστανται, με το *bla_{TEM}* να μην επηρεάζεται, το *qnrS* να παρουσιάζει μικρή μείωση ενώ το *tetW* παρουσιάζει σημαντική μείωση (Ferro et al., 2016).

Από την άλλη μεριά μελέτες τονίζουν την ξεκάθαρη αποτελεσματικότητα των οξειδωτικών διεργασιών τόσο απέναντι στα ανθεκτικά βακτήρια όσο και στα γονίδια ανθεκτικότητας στο νερό ή στα λύματα, σημειώνοντας τη συμβολή των διεργασιών στον περιορισμό της εξάπλωσης των ARGs. Ενδεικτικά αναφέρεται μείωση 2,58 - 3,79 Logs στα ARGs (*sul1*, *tetX*, *tetG*, *intl1*) στο ολικό βακτηριακό γενετικό υλικό σε λύμα από την εκροή δευτεροβάθμιας επεξεργασίας μετά την επεξεργασία με φέντον και μείωση 2,63 – 3,48 μετά την επεξεργασία με $\text{UV}/\text{H}_2\text{O}_2$ (Zhang et al., 2016). Επίσης, η

μελέτη των Giannakis et al αναφέρει ότι η διεργασία φώτο – φέντον με τεχνητό φως μπορεί να μειώσει σημαντικά το γονίδιο bla_{CTX-M-9} στα βακτήρια *E. coli* (Giannakis et al., 2018).

Ακόμα θα πρέπει να σχολιαστεί ότι ενδεχομένως οι καταλυτικές διεργασίες επηρεάζουν το προφίλ ανθεκτικότητας των βακτηρίων. Οι Fiorentino et al. αναφέρουν ότι τα ανθεκτικά στελέχη *E. coli*, τα οποία απομόνωσαν από πρωτοβάθμιο λύμα, δεν έχασαν την ανθεκτικότητά τους μετά την επεξεργασία τους με H₂O₂/ηλιακή ακτινοβολία, TiO₂/ηλιακή ακτινοβολία, H₂O₂/TiO₂/ακτινοβολία και φώτο-Fenton (Fiorentino et al., 2015). Άλλη μελέτη παρατήρησε μεταβολές στην ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση του βακτηρίου *Klebsiella pneumoniae* στα αντιβιοτικά ampicillin, cefaclor και tetracycline μετά την επεξεργασία με διαφορετικούς καταλύτες (Mn-, Co- and Mn/Co, binary-doped TiO₂), ενώ οι μεταβολές φαίνεται να επηρεάζονται από τη διεργασία (Venieri et al., 2017).

Επιπλέον αναφέρεται ότι δεν υπάρχουν διαφορές στην απόδοση των διεργασιών μεταξύ ανθεκτικών και ευαίσθητων βακτηρίων (Giannakis et al., 2018)

4.8 Σύγκριση εργαστηριακής- πιλοτικής κλίμακας

Η βακτηριακή αδρανοποίηση στα πειράματα εργαστηριακής κλίμακας ήταν πολύ ταχύτερη απ’ ότι σε αυτά της πιλοτικής, όπως φαίνεται και από τις κινητικές σταθερές που ήταν μέχρι και 5 φορές μεγαλύτερες. Οι κινητικές σταθερές στα πιλοτικά πειράματα με φυσικό φωτισμό υπολογίστηκαν με βάση τον κανονικοποιημένο χρόνο, δηλαδή περιγράφουν την ταχύτητα της απολύμανσης εάν η ηλιακή ακτινοβολία ήταν σταθερά 1000 W/m², όσο είναι και η ένταση του προσομοιωτή ηλιακού φωτός. Ωστόσο, το ποσοστό της UVA στη λάμπα είναι σταθερά 5%. Στο φυσικό φως δεν ήταν δυνατό να εξακριβώσουμε το ακριβές ποσοστό της UV όμως, με βάση την τοποθεσία και την εποχή στην οποία έλαβαν χώρα τα πειράματα, υπολογίζεται ότι κατά μέσο όρο είναι λιγότερο από 5%. Το χαμηλότερο ποσοστό της UVA στα πιλοτικά πειράματα είναι πιθανόν να επιβράδυναν την δράση των καταλυτών. Επίσης, με την κανονικοποίηση του χρόνου επιτυγχάνεται η ομαλοποίηση των τιμών της έντασης ακτινοβολίας για ένα χρονικό διάστημα Δt. Οι ακραίες όμως τιμές που μπορεί να υπάρχουν σε αυτό το διάστημα επηρεάζουν την έκβαση της διεργασίας, ανάλογα με την ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών και την συγκέντρωση του καταλύτη. Δηλαδή, με την ένταση της ακτινοβολίας της λάμπας, που αντιστοιχεί στο μέγιστο μιας

ηλιόλουστης καλοκαιρινής ημέρας, ενεργοποιείται ταυτόχρονα μεγαλύτερο ποσοστό του καταλύτη, παράγεται αυξημένη συγκέντρωση ROS και προκαλείται εντονότερο στρες στα κύτταρα. Επιπλέον, το επίπεδο ανθεκτικότητας στην υψηλή ακτινοβολία διαφέρει ανάμεσα στους μικροοργανισμούς (Rincón and Pulgarin, 2003). Ακόμη, στα εργαστηριακά πειράματα, το σύνολο του δείγματος βρισκόταν υπό συνεχή έκθεση στην ακτινοβολία, ενώ στον αντιδραστήρα CPC η έκθεση ήταν διακοπτόμενη, λόγω της ροής του λύματος στον σωλήνα εξόδου και τη δεξαμενή ανακυκλοφορίας. Η μαγνητική ανάδευση στο δοχείο ζέσεως που χρησιμοποιήθηκε στο εργαστήριο εξασφάλισε την συνεχή κίνηση των κυττάρων και των νανοσωματιδίων του καταλύτη αυξάνοντας την πιθανότητα για μεταξύ τους επαφή. Στην πιλοτική μονάδα, η ροή του λύματος ήταν αρκετά πιο αργή. Επίσης, όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, ο φυσικός μικροβιακός πληθυσμός του λύματος αναμένεται να είναι πιο ανθεκτικός από τα εργαστηριακά στελέχη. Η παρουσία και άλλων ζωντανών μικροοργανισμών πιθανόν να επηρέασε την ταχύτητα της αντίδρασης. Τέλος, η αρχική συγκέντρωση των κυττάρων στο εργαστηριακό πείραμα ήταν αρκετά μεγαλύτερη του πιλοτικού, επιτρέποντας μεγαλύτερη λογαριθμική μείωση και επηρεάζοντας τελικά και τις κινητικές σταθερές. Συμπερασματικά, η εκτίμηση του απολυμαντικού δυναμικού ενός φωτοκαταλύτη δεν μπορεί να είναι ολοκληρωμένη αν δεν ελεγχθεί και σε πιλοτική κλίμακα.

4.9 Συμπεράσματα

Η χρήση ενός οικονομικού καταλύτη, ο οποίος είναι χημικά και βιολογικά αδρανής, σε συνδυασμό με τη δυνατότητα ενεργοποίησής του με την ηλιακή ακτινοβολία μπορεί να προσφέρει, ειδικά σε περιοχές μεγάλης ηλιοφάνειας όπως η Ελλάδα, πολύ αποτελεσματικές και οικονομικές λύσεις αδρανοποίησης τοξικών ρύπων και παθογόνων μικροοργανισμών.

- Η εμπορική τιτάνια δεν είναι αρκετά δραστική στο ηλιακό φως ώστε να επιτευχθεί ασφαλής απολύμανση σε λύμα, σε χρονικό διάστημα τόσο σύντομο ώστε να είναι δυνατή η εφαρμογή σε μεγαλύτερη κλίμακα.
- Η έρευνα για την απολυμαντική ικανότητα των φωτοκαταλυτών σε αστικά απόβλητα, με φυσικό φως περιλαμβάνει πολλές πειραματικές μεταβλητές που χρειάζεται να εξεταστούν ξεχωριστά όπως η σύσταση της υδατικής μήτρας σε κάθε περίπτωση, η προσθήκη οξειδωτικών ή άλλων ουσιών, οι συνθήκες του περιβάλλοντος (θερμοκρασία, ένταση ακτινοβολίας) (Fisher et al., 2008;

Giannakis et al., 2015; Rincón and Pulgarin, 2004). Οι περισσότερες έρευνες συμφωνούν στο ότι η θολερότητα και η υψηλή συγκέντρωση οργανικών ενώσεων στα αστικά απόβλητα επιβραδύνουν την απολύμανση με φωτοκατάλυση, όμως με την χρήση ισχυρών φωτοκαταλυτών έχουν επιτευχθεί ενθαρρυντικά αποτελέσματα

- Η πιλοτική μονάδα καταφέρνει να απομακρύνει επιτυχώς τους βακτηριακούς δείκτες σημειώνοντας απομάκρυνση πάνω από 99% του αρχικού πληθυσμού.
- Η μονάδα CPC επιτυγχάνει αξιόλογα αποτελέσματα όσον αφορά στην απομάκρυνση των εξεταζόμενων ιών, όμως οι τελικές συγκεντρώσεις παραμένουν σε υψηλά επίπεδα.
- Η δυνατότητα φωτοενεργοποίησης των παθογόνων αποτελεί ίσως το μεγαλύτερο μειονέκτημα της μεθόδου. Η παρουσία φωτοκαταλύτη φαίνεται πως μειώνει αυτόν τον κίνδυνο, σε σχέση με τα πειράματα απλής φωτόλυσης (Bichai et al., 2012; McCullagh et al., 2007; Rincón and Pulgarin, 2007). Επίσης, με μεγαλύτερη δόση ακτινοβολίας, που εξαρτάται από την ανθεκτικότητα του μικροβιακού είδους, επιτυγχάνεται μη αναστρέψιμη αδρανοποίηση (Rincón and Pulgarin, 2003).
- Οι συγκεντρώσεις των ARGs στο eDNA δε φαίνεται να επηρεάζονται από την διαδικασία της φωτοκατάλυσης ή κατά την επεξεργασία προκύπτουν νέα ARGs λόγω της λύσης των βακτηρίων.
- Σημαντική είναι και η παρουσία των ARGs στο γενετικό υλικό των φάγων όπου φαίνεται ότι μένει ανεπηρέαστη από την επεξεργασία με ορισμένους από τους καταλύτες.

Η φυσική μορφή του καταλύτη είναι ένα ακόμη θέμα που απασχολεί τους ερευνητές. Η μεγαλύτερη επιφάνεια των κόνεων σε σχέση με τους σταθεροποιημένους καταλύτες, αυξάνει την επαφή τους με τα φωτόνια αλλά και τα οργανικά περιεχόμενα του διαλύματος κι έτσι επιτυγχάνουν υψηλότερο ρυθμό οξειδωτικής δραστηριότητας. Από την άλλη, η διαδικασία ανάκτησης του καταλύτη όταν είναι σε μορφή κόνεως, απαιτεί ένα ακόμη εξειδικευμένο στάδιο στην επεξεργασία των υγρών αποβλήτων που αυξάνει τόσο το κόστος όσο και την πολυπλοκότητα της επεξεργασίας (Venieri and Mantzavinos, 2017a). Η απόρριψη του καταλύτη μαζί με το λύμα μπορεί σε βάθος χρόνου να έχει επιβαρυντικές επιπτώσεις στο περιβάλλον. Οι καταλύτες που είναι δεσμευμένοι σε σταθερές επιφάνειες, εντός του αντιδραστήρα, έχουν χαμηλότερη

φωτοκαταλυτική δραστηριότητα, ιδίως όταν πρόκειται για απολύμανση λύματος, διότι οι οργανικές ενώσεις ανταγωνίζονται τους μικροοργανισμούς για τις ενεργές θέσεις του καταλύτη και περιορίζουν τα φωτόνια που διαπερνούν το σώμα του νερού και φτάνουν στην επιφάνεια του. Για την μείωση του *E. coli* κατά 4 Log units σε λύμα, απαιτείται ο διπλάσιος χρόνος για ένα σύστημα με σταθερό καταλύτη από ότι με την ίδια συγκέντρωση σε σκόνη. Παρόλα αυτά, μπορεί να επιτευχθεί ολική αδρανοποίηση με πιο αργό, όμως σταθερό ρυθμό, χωρίς να μειώνεται η απόδοση ακόμη και μετά από αρκετούς πειραματικούς κύκλους (van Grieken et al., 2009). Η μελέτη της απολύμανσης με φωτοκαταλύτες σε μορφή σκόνης, μπορεί να θεωρηθεί το πρώτο βήμα για την κατανόηση και αξιολόγηση της διεργασίας

5 Σύγκριση συστημάτων

Βάσει των παραπάνω αποτελεσμάτων προκύπτει ότι τόσο τα ενναλακτικά «πράσινα» συστήματα των τεχνητών υδροβιοτόπων όσο και τα συστήματα τα οποία βασίζονται στις φωτοκαταλυτικές διεργασίες μπορούν να είναι αποδοτικά απέναντι στους παθογόνους μικροοργανισμούς.

Πίνακας 38. Σύγκριση τριτογενών συστημάτων επεξεργασίας ως προς την δυνατότητα απομάκρυνσης μικροοργανισμών και γονιδίων ανθεκτικότητας. HSSF: υδροβιότοπος υποεπιφανειακής ροής με υδραυλικό χρόνο παραμονής 2 ημέρες, CPC: αντιδραστήρας με ανακλαστήρες αλουμινίου, ARGs: γονίδια ανθεκτικότητας, eDNA: εξωκυτταρικό γενετικό υλικό.

Μικροοργανισμός/ARGs	Σύστημα επεξεργασίας – Απομάκρυνση μικροοργανισμών/ARGs (Logs)	
	HSSF	CPC
<i>E. coli</i>	2,58	6
Enterococci	2,27	7,4
MS2 φάγοι	2,45	3,8 (Venieri et al)
Αδενοϊοί	4,72	4
Εντεροϊοί	2,75	2
ARGs (βακτηριακό DNA)	0-1	-
ARGs (eDNA)	Δεν ανιχνεύτηκε	Καμία μεταβολή
ARGs (DNA φάγοι)	Δεν ανιχνεύτηκε	Καμία μεταβολή

Συγκρίνοντας τον τεχνητό υδροβιότοπο των Χανίων και την πιλοτική μονάδα CPC τα οποία λειτούργησαν ως μονάδες τριτοβάθμιας επεξεργασίας δεχόμενα λύμα ίδιας σύστασης από την έξοδο της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας προκύπτει ότι η μονάδα CPC ήταν αποδοτικότερη όσον αφορά στην απομάκρυνση και των δύο βακτηριακών δεικτών (*E. coli* και Enterococci). Η διαφορά στην απομάκρυνση μεταξύ των δύο συστημάτων ήταν σχεδόν διπλάσια με την μονάδα CPC ουσιαστικά να μηδενίζει το βακτηριακό φορτίο, τουλάχιστον των δεικτών, μετά από 2 ώρες επεξεργασίας. Η μονάδα CPC θα μπορούσε να θεωρηθεί αποδοτικότερη και στην απομάκρυνση των MS2 φάγων αν και τα δεδομένα προέρχονται από άλλη μελέτη και όχι με τις ίδιες ακριβώς συνθήκες. Παρόλες τις μεγάλες διαφορές στην απόδοση για την απομάκρυνση

των δεικτών, η τάση αλλάζει όσον αφορά στους ιούς. Ο τεχνητός υδροβιότοπος παρουσιάζεται πιο αποδοτικός στην απομάκρυνση του ιικού φορτίου, αν και οι διαφορές δεν είναι μεγάλες. Αναφερόμενοι στα γονίδια ανθεκτικότητας, αυτά δεν εντοπίστηκαν στο ελεύθερο γενετικό υλικό και στο γενετικό υλικό των φάγων στα δείγματα από την εκροή του υδροβιότοπου ενώ αντίθετα παρέμειναν στις ίδιες συγκεντρώσεις στην εκροή της μονάδας CPC. Το βακτηριακό γενετικό υλικό μειώθηκε περίπου 1 Log unit κατά την επεξεργασία με τον υδροβιότοπο. Ενώ δεν πραγματοποιήθηκαν πειράματα για το βακτηριακό γενετικό υλικό στην εκροή της μονάδας CPC θα μπορούσε να ευσταθεί ο ισχυρισμός ότι η μείωση θα ήταν μεγαλύτερη λόγω της πολύ μεγαλύτερης μείωσης των βακτηριακών δεικτών.

Τέλος, γίνεται μια προσπάθεια σύγκρισης των τελικών συγκεντρώσεων των μικροοργανισμών και των γονιδίων ανθεκτικότητας στις εκροές, θεωρώντας τα συστήματα επεξεργασίας ως ολοκληρωμένα. Δηλαδή ο τεχνητός υδροβιότοπος με το αμμόφιλτρο και την μονάδα αδρανοποίησης θεωρείται ένα ολοκληρωμένο σύστημα με τον CW να αποτελεί τη δευτεροβάθμια επεξεργασία. Το άλλο σύστημα περιλαμβάνει τη ΜΕΛ των Χανίων με τριτοβάθμια επεξεργασία τη μονάδα CPC.

Πίνακας 39. Σύγκριση των μονάδων ως ολοκληρωμένων συστημάτων επεξεργασίας. Οι τιμές αναφέρονται στις συγκεντρώσεις που παρατηρήθηκαν στις τελικές εκροές των συστημάτων ανά λίτρο. HSSF: υδροβιότοπος υποεπιφανειακής ροής, IU: μονάδα αδρανοποίησης, CPC: αντιδραστήρας με ανακλαστήρες αλουμινίου, ARGs: γονίδια ανθεκτικότητας, eDNA: εξωκυτταρικό γενετικό υλικό.

Μικροοργανισμός/ARGs	Συστήματα επεξεργασίας – Συγκεντρώσεις μικροοργανισμών / ARGs	
	HSSF +IU	CPC
<i>E. coli</i> (CFUs)	10 ³	~ 0
Enterococci (CFUs)	10 ⁴	~ 0
MS2 φάγοι (PFUs)	10 ³	
Αδενοϊοί (gene copies)	10 ⁴	10 ⁴
Εντεροϊοί (gene copies)	10 ⁷	10 ⁶
ARGs σε Βακτηριακό DNA (gene copies)	10 ⁵	
ARGs σε eDNA (gene copies)		
bla _{TEM}	10 ⁹	10 ⁶
sul2	10 ⁸	10 ⁴
qnrA		10 ⁴
tetA	10 ⁶	10 ³
ARGs σε DNA φάγων (gene copies)		
bla _{TEM}	10 ⁶	10 ⁵
sul2	10 ⁴	10 ³
qnrA	10 ⁴	
tetA		

Από τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα του Πίνακα 35 παρατηρείται ότι οι συγκεντρώσεις στην εκροή της μονάδας CPC είναι χαμηλότερες για όλους σχεδόν τους μικροοργανισμούς και τα γονίδια ανθεκτικότητας.

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω κάθε σύστημα μπορεί να προσφέρει διαφορετικές αποδόσεις απέναντι σε διαφορετικούς ρύπους. Η επιλογή του καταλληλότερου συστήματος για εφαρμογή θα πρέπει να γίνεται βάσει των χαρακτηριστικών του λύματος αλλά και του επιθυμητού αποτελέσματος. Σε κάθε περίπτωση θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν και οι αδυναμίες των συστημάτων, δηλαδή οι μεγάλες εκτάσεις και το πρόβλημα του clogging για τους CW και η απαίτηση για πιο εξειδικευμένο προσωπικό, ηλιοφάνειας και ανάκτηση καταλυτών για την μονάδα CPC.

6 ΚΕΦΑΛΑΙΟ Γ. Εκτίμηση Επικινδυνότητας

Οι συγκεντρώσεις των παθογόνων μικροοργανισμών στις εκροές των παραπάνω συστημάτων είναι πιθανό να εγκυμονούν κινδύνους για την δημόσια υγεία. Η εκτίμηση κινδύνου (Risk Assessment) είναι μια διαδικασία η οποία μπορεί να συμβάλει στο να εκτιμηθούν αυτοί οι κίνδυνοι. Πιο συγκεκριμένα, η ποσοτική αξιολόγηση μικροβιακού κινδύνου (Qualitative Microbial Risk Assessment, QMRA) είναι μια διαδικασία που αξιολογεί την πιθανότητα των αρνητικών επιπτώσεων για την ανθρώπινη υγεία από την έκθεση σε ένα μέσο στο οποίο υπάρχουν παθογόνοι μικροοργανισμοί. Η εκτίμηση του κινδύνου μπορεί να επιτευχθεί είτε χρησιμοποιώντας επιδημιολογικά δεδομένα είτε χρησιμοποιώντας μοντέλα. Η διαδικασία περιλαμβάνει τέσσερα βήματα: την αναγνώριση κινδύνου, την αξιολόγηση έκθεσης, την αξιολόγηση δόσης-απόκρισης και το χαρακτηρισμό του κινδύνου.

Πίνακας 40. Βήματα και σκοπός κάθε βήματος στη αξιολόγηση μικροβιακού κινδύνου.

Βήμα	Σκοπός
1. Επισήμανση του προβλήματος και εντοπισμός των κινδύνων	Περιγραφή του συνολικού περιβάλλοντος και συσχέτιση παθογόνων που μπορούν να προκαλέσουν οξεία ή χρόνια επίπτωση στην ανθρώπινη υγεία
2. Ανάλυση δόσης - απόκρισης	Κατάλληλη συσχέτιση μεταξύ της έκθεσης στο παθογόνο και τη λοίμωξη ή ασθένεια (από επιδημιολογικές μελέτες)
3. Αξιολόγηση της έκθεσης	Καθορισμός μεγέθους και φύσης των πληθυσμών που εκτίθενται σε κάθε προσδιορισμένο παθογόνο από τη διαδρομή, το ποσό και τη διάρκεια της έκθεσης
4. Χαρακτηρισμός της επικινδυνότητας	Ενσωμάτωση πληροφοριών από την έκθεση και την ανάλυση δόσης – απόκρισης, ώστε να παρουσιαστούν τα αποτελέσματα στους αρμόδιους φορείς, λαμβάνοντας υπόψη τη μεταβλητότητα και την αβεβαιότητα των εκτιμήσεων.

Κατά την QMRA τα δεδομένα δόσης-απόκρισης εντάσσονται σε μαθηματικά μοντέλα που συσχετίζουν την πιθανότητα μόλυνσης με το μέσο όρο κατάποση – δόσης για συγκεκριμένα παθογόνα, διαδρομές μετάδοσης και ξενιστές. Το εκθετικό μοντέλο και το μοντέλο beta-Poisson είναι τα κυρίαρχα μοντέλα, τα οποία χρησιμοποιούνται ανάλογα τον μικροοργανισμό.

Στη διατριβή αυτή χρησιμοποιήθηκαν δύο τρόποι για την εκτίμηση του μικροβιακού κινδύνου. Αρχικά υλοποιήθηκε ο στατικός τρόπος κατά τον οποίο τα δεδομένα των εκροών τοποθετήθηκαν σε εξισώσεις. Ο δεύτερος τρόπος ήταν στοχαστικός, χρησιμοποιώντας «βιβλιοθήκη» η οποία βασίζει τη λειτουργία της στη γλώσσα R.

Δόση

Η δόση (dose) των παθογόνων, η οποία λαμβάνεται από τις διαφορετικές χρήσεις του νερού μπορεί να υπολογιστεί από την εξίσωση:

$$dose = C \times V \times T \quad (16)$$

Όπου C η τελική συγκέντρωση των παθογόνων, V ο όγκος έκθεσης και T ο χρόνος έκθεσης. Ανάλογα την περίπτωση η εξίσωση μπορεί να τροποποιηθεί. Για την δόση νερού που αφορά στη συγκέντρωση των παθογόνων χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση (16) ενώ για τους ιούς η χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση (17) (Chigor et al., 2014)

$$dose = C \times \frac{1}{R} \times I \times 10^{-DR} \times V \quad (17)$$

όπου R η απόδοση της ανάκτησης των ιών βάσει της μεθόδου, I η μολυσματικότητα του ιού και DR η αποτελεσματικότητα της μονάδας επεξεργασίας.

Μοντέλα δόσης – απόκρισης

Η ημερήσια πιθανότητα μόλυνσης δίνεται από τα μοντέλα δόσης – απόκρισης (dose-response). Οι εντερόκοκκοι, όπως και οι 2 τύποι ιών ακολουθούν το εκθετικό μοντέλο όπως παρουσιάζεται στην εξίσωση (18) ενώ το βακτήριο *E. coli* το μοντέλο beta-Poisson όπως φαίνεται στην εξίσωση (19) ή (20):

$$P_{infection/day} = e^{(-kd)} \quad (18)$$

$$P_{infection/day} = 1 - \left[1 + \frac{d}{\beta} \right]^{-a} \quad (19)$$

$$P_{infection/day} = 1 - \left[1 + \frac{d}{N_{50} \left(2^{\frac{1}{a}} - 1 \right)} \right]^{-a} \quad (20)$$

Στη συνέχεια, η ετήσια πιθανότητα μόλυνσης δίνεται από την εξίσωση (21):

$$P_{infection/year} = 1 - \left(1 - P_{\frac{Infectio}{day}}\right)^n \quad (21)$$

Όπου n οι συνολικές μέρες έκθεσης στο γεγονός κατά τη διάρκεια του έτους. Οι παράμετροι για τον κάθε μικροοργανισμό παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 41. Παράμετροι μικροοργανισμών για την εκτίμηση κινδύνου.

Παράμετροι	Περιγραφή	Μικροοργανισμός			
		<i>E. coli</i>	Enterococci	AdV	EV
R	Απόδοση ανάκτησης ιών (%)			50%	60%
I	Μολυσματικότητα			1/2	1/100
k	Σενάριο 1		0.1	0.607	0.00374
	Σενάριο 2		0.1	0.41	0.0145
a		0.155			
N₅₀		2110000			
Decay constant (day ⁻¹)		0.45	0.53	0.056	0.08
P_{ill/inf}		0.25	0.09	2.47 Ingestion 0.007	0.45

Ακολουθώντας, με βάση τις πιθανότητες μόλυνσης υπολογίστηκε η πιθανότητα ασθένειας σύμφωνα με την εξίσωση (22) για τους αδενοϊούς και την εξίσωση (23) για τα υπόλοιπα παθογόνα.

$$P_{ill} = 1 - \left(1 + \frac{dose}{\eta}\right)^{-r} \quad (22)$$

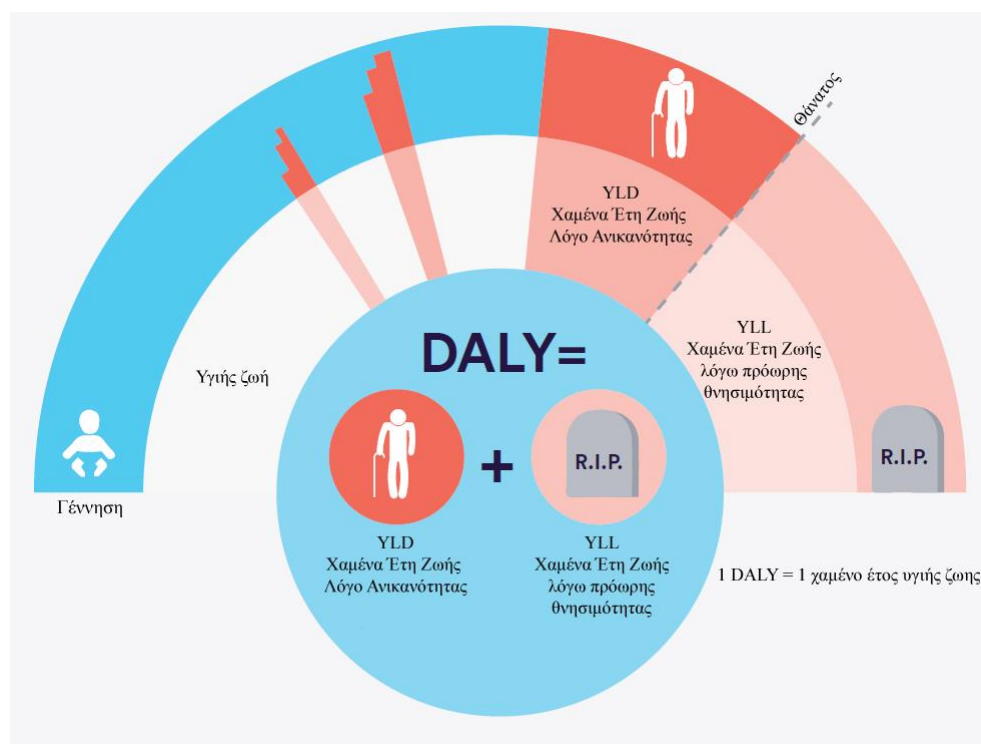
$$P_{ill} = P_{inf/year} \times P_{ill/inf} \quad (23)$$

Το P_{ill/inf} είναι διαφορετικό για κάθε παθογόνο και δηλώνει την πιθανότητα να μετατραπεί η μόλυνση σε ασθένεια.

Σε όλα τα σενάρια θεωρήθηκε ότι από τη συνολική συγκέντρωση του βακτηρίου *E. coli* το 17% περιλαμβάνει τους ορότυπους *E. coli* O157:H7 και O26:H11, οι οποίοι είναι παθογόνοι και μπορούν να προκαλέσουν ασθένεια (Masciopinto et al., 2020).

Αναπηροσταθμισμένο έτος ζωής

Ο όρος αναπηροσταθμισμένα έτη ζωής (Disability-Adjusted Life Years, DALYs), περιλαμβάνει τα έτη ζωής που χάνονται λόγω ασθένειας ή θανάτου κατά τη διάρκεια της ζωής ενός ανθρώπου (Εικόνα 30).



Εικόνα 30. Σχηματική απεικόνιση αναπηροσταθμισμένου έτους ζωής, DALY. Τροποποίηση από Public Health England (2015)

Τα DALYs μπορούν να υπολογιστούν χρησιμοποιώντας την εξίσωση:

$$DALY = \frac{DALY}{illness} \times P_{year/ill} \quad (24)$$

Όπου το DALY/illness αποτελεί συγκεκριμένο αριθμό, ο οποίος αντιστοιχεί στα διαφορετικά παθογόνα. Ο παγκόσμιος οργανισμός υγείας θέτει σαν αποδεκτό όριο DALYs τις 10^{-6} ημέρες.

Στην περίπτωση υπολογισμού των DALYs, για τους εντεροϊούς χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα που παρέχονται από τους Νοροϊούς καθώς έχουν τα ίδια μορφολογικά χαρακτηριστικά.

6.1 Σενάρια εκτίμησης κινδύνου

Στατική προσέγγιση

Σενάριο 1

Στο πρώτο σενάριο εξετάζεται ο κίνδυνος που μπορεί να προκύψει για τους κολυμβητές αν κολυμπούν σε κοντινή απόσταση από την εκροή της μονάδας επεξεργασίας. Στο σενάριο αυτό θεωρήθηκε ότι ένας κολυμβητής μπορεί να λαμβάνει 18.5 mL νερού ανά ημέρα κολύμβησης στα 30min κολύμβησης.

Στο σενάριο αυτό θεωρήθηκε ότι η αρχική συγκέντρωση των μικροοργανισμών αλλάζει μέχρι το σημείο κολύμβησης σύμφωνα με την εξίσωση (25) καθώς υπάρχει θανάτωση των μικροοργανισμών με το πέρασμα των ημερών (Sunger et al., 2019).

$$C_t = \frac{C_0 \exp(-kt)}{(1 + d)} \quad (25)$$

Όπου C_0 η αρχική συγκέντρωση των παθογόνων στην έξοδο της μονάδας επεξεργασίας, k η σταθερά θανάτωσης ενός οργανισμού με την πάροδο του χρόνου, t ο χρόνος που περνάει μέχρι να φτάσει ένας μικροοργανισμός στο σημείο ενδιαφέροντος και d ο συντελεστής αραίωσης.

Σενάριο 2

Στο σενάριο 2 εκτιμήθηκε ο κίνδυνος από την κατανάλωση λαχανικών τα οποία έχουν ποτιστεί με επαναχρησιμοποιούμενο νερό καθώς και ο κίνδυνος για τους αγρότες που πιθανώς να έρθουν σε επαφή με το νερό κατά τη διάρκεια των εργασιών. Ως λαχανικά θεωρούνται τα φυλλώδη όπως τα μαρούλια, όπου τα παθογόνα μπορεί να παραμείνουν στα φύλλα. Στο σενάριο αυτό θεωρήθηκε ότι υπάρχει μείωση 2 Logs στις συγκεντρώσεις των μικροοργανισμών μέχρι να φτάσει το νερό στα λαχανικά. Σύμφωνα με τον WHO θεωρητικά καταναλώνονται 10 mL επαναχρησιμοποιούμενου νερού ανά 100g φρέσκων λαχανικών. Η ημερήσια κατανάλωση λαχανικών θεωρείται στα 38,9 g ανά άτομο ανά ημέρα. Η κατανάλωση τέτοιων λαχανικών θεωρείται ότι είναι 90 ημέρες το χρόνο. Η ακούσια επαφή των αγροτών με το νερό κατά το πότισμα θεωρείται ότι

είναι 1mL νερού ανά άτομο ανά ημέρα από τους τρόπους ποτίσματος. Θεωρείται ότι οι αγρότες βρίσκονται στο χώρο εργασίας 300 ημέρες τον χρόνο.

Στοχαστική προσέγγιση

Στη δεύτερη περίπτωση η εκτίμηση κίνδυνου πραγματοποιήθηκε με στοχαστικό τρόπο και χρησιμοποιήθηκε το πακέτο `kwb.qmra` βασιζόμενο στη γλώσσα R. Το πακέτο χρησιμοποιεί την προσομοίωση Monte Carlo για να χαρακτηρίσει την αβεβαιότητα ή τη μεταβλητότητα των παραμέτρων της συγκέντρωσης των παθογόνων και του όγκου έκθεσης. Η απόκριση δόσης για κάθε παθογόνο υπολογίζεται χρησιμοποιώντας τις παραμέτρους μέγιστης πιθανότητας του εκθετικού μοντέλου ή του μοντέλου beta - Poisson. Στο μοντέλο εισήχθησαν τα δεδομένα από το πειραματικό μέρος για τους μικροοργανισμούς καθώς και ο τύπος των κατανομών που ακολουθούν όπως προέκυψαν από τη στατιστική ανάλυση. Επίσης, καθορίστηκε και ο όγκος έκθεσης ανά γεγονός καθώς και η κατανομή του, όπως περιγράφεται από την βιβλιογραφία.

Στην περίπτωση του στοχαστικού μοντέλου εξετάστηκε ένα σενάριο για τους υδροβιοτόπους του Ηρακλείου και ένα για τα συστήματα επεξεργασίας των Χανίων.

Σενάριο 1 – Κολύμβηση κοντά στο σύστημα Ηρακλείου

Στο σενάριο αυτό εκτιμήθηκε ο κίνδυνος για τους κολυμβητές σε περίπτωση δραστηριότητας σε νερά κοντά στις εκροές των συστημάτων. Σε αυτή την περίπτωση θεωρήθηκε ότι η έκθεση (νερό που λαμβάνεται κατά το κολύμπι) ακολουθεί τριγωνική κατανομή (triangular distribution) με μέγιστο, ελάχιστο και επικρατούσα τιμή 20, 50 και 35mL αντίστοιχα (Federigi et al., 2020).

Σενάριο 2 – Επαναχρησιμοποίηση νερού από σύστημα Χανίων

Στο δεύτερο σενάριο εκτιμήθηκε ο κίνδυνος στην περίπτωση κατά την οποία το νερό από τις εκροές των συστημάτων προορίζονταν για επαναχρησιμοποίηση. Αυτή η περίπτωση περιλαμβάνει χρήση νερού στις καλλιέργειες λαχανικών και χρήση νερού για μπάνιο. Τα δεδομένα των καταναλώσεων παρουσιάζονται στον Πίνακα 42.

Πίνακας 42. Στοιχεία καταναλώσεων όγκου νερού ανά περίπτωση για την εκτίμηση κινδύνου.

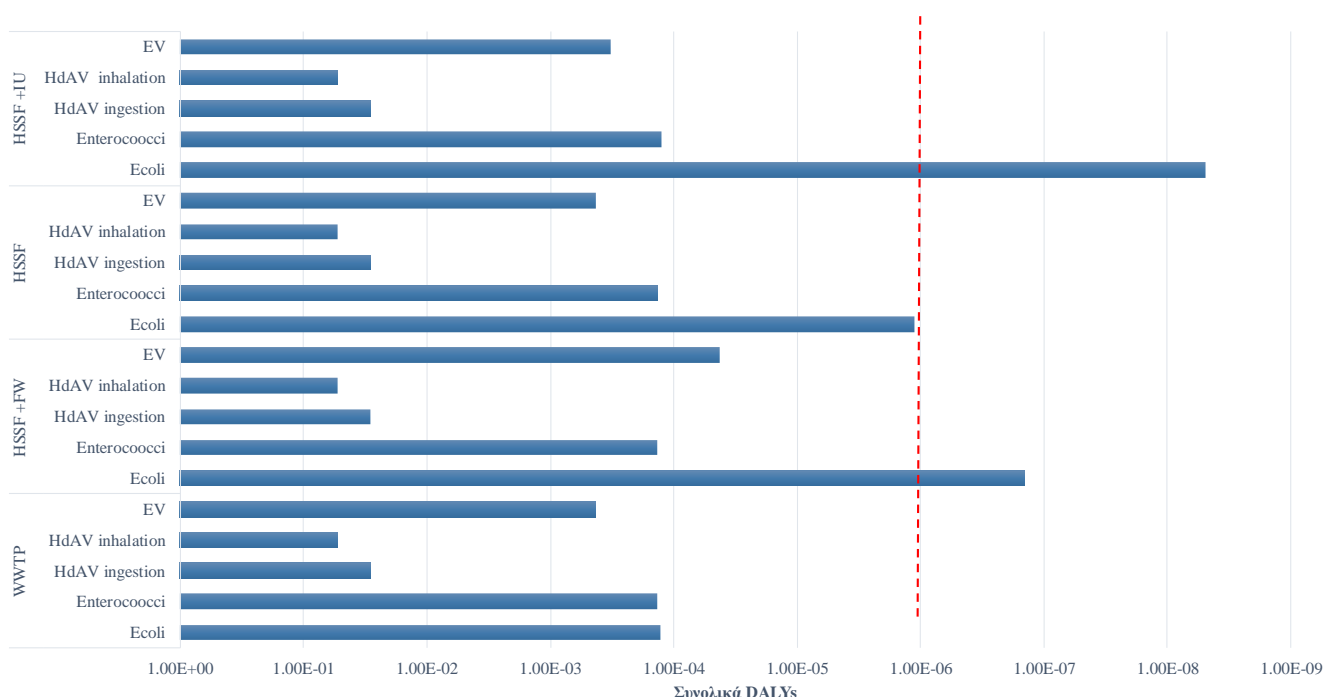
Χρήση	Κατανομή και ποσότητα
Κατάποση νερού κατά το πότισμα mL/day	Κατανομή Uniform Min: 10 Max:15 (Kouamé et al., 2017)
Όγκος νερού που καταναλώνεται από τα πράσινα φυλλώδη λαχανικά mL/g	Κατανομή Uniform Min: 0.089 Max: 0.127 (Kouamé et al., 2017)
Κατάποση νερού κατά το μπάνιο mL/γεγονός	Κατανομή Uniform Min: 0.058 Max: 1.6 (Jamal et al., 2020)
Κατάποση κατά το βούρτσισμα δοντιών mL/γεγονός	Κατανομή Uniform Min: 1 Max: 5 (Jamal et al., 2020)

6.2 Αποτελέσματα

6.2.1 Στατική προσέγγιση

Σενάριο 1 Ηράκλειο

Όπως φαίνεται από το Γράφημα 119 για το Σενάριο 1 των υδροβιότοπων του Ηρακλείου μόνο για το βακτήριο *E. coli* οι τιμές ξεπερνούν το αποδεκτό όριο των DALYs, ενώ για το σύστημα με τον ένα υδροβιότοπο (HSSF) το αποτέλεσμα είναι οριακό.



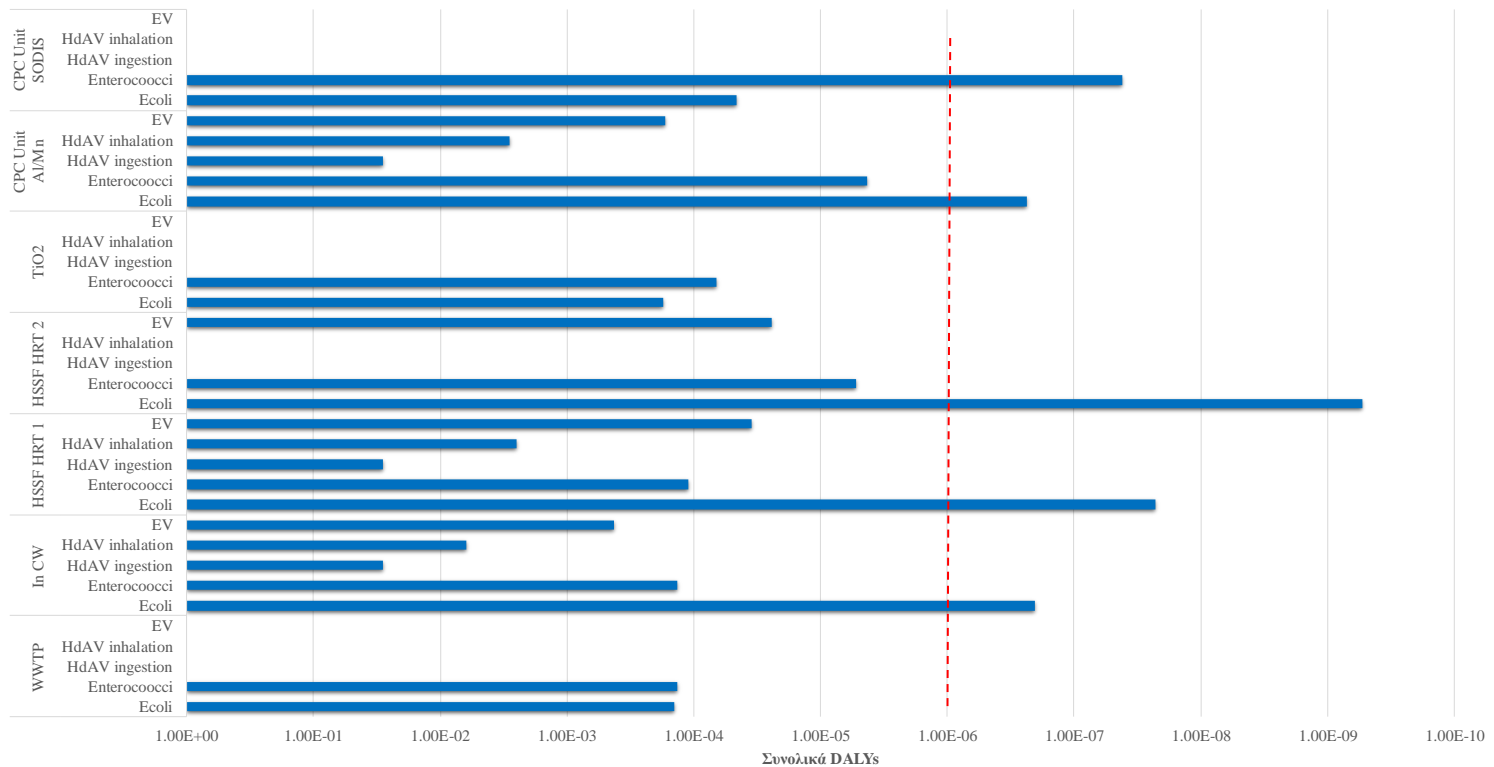
Γράφημα 119. Αναπροσταθμισμένο έτος ζωής για το σενάριο 1. Η κόκκινη διακεκομμένη γραμμή δείχνει το αποδεκτό όριο σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας.

Σενάριο 1 Χανιά

Τα αποτελέσματα για το σενάριο της κολύμβησης σε νερά που βρίσκονται κοντά στην εκρόη της μονάδας επεξεργασίας των Χανίων έχοντας ως τριτογενή επεξεργασία είτε υδροβιότοπο είτε μονάδα φωτοκατάλυσης παρουσιάζονται στο Γράφημα 120.

Αρχικά αυτό που παρατηρείται είναι ότι για όλα τα συστήματα, εκτός από την εκρόη της πρωτοβάθμιας επεξεργασίας (WWTP) και την επεξεργασία με TiO_2 οι τιμές DALYs για το βακτήριο *E. coli* βρίσκονται στα αποδεκτά όρια. Επίσης, κανένα από τα συστήματα δεν έδωσε αποτέλεσμα εντός των ορίων για τους εντερόκοκκους. Σημαντική παρατήρηση είναι ότι κανένα από τα συστήματα δεν έδωσε τιμές εντός των

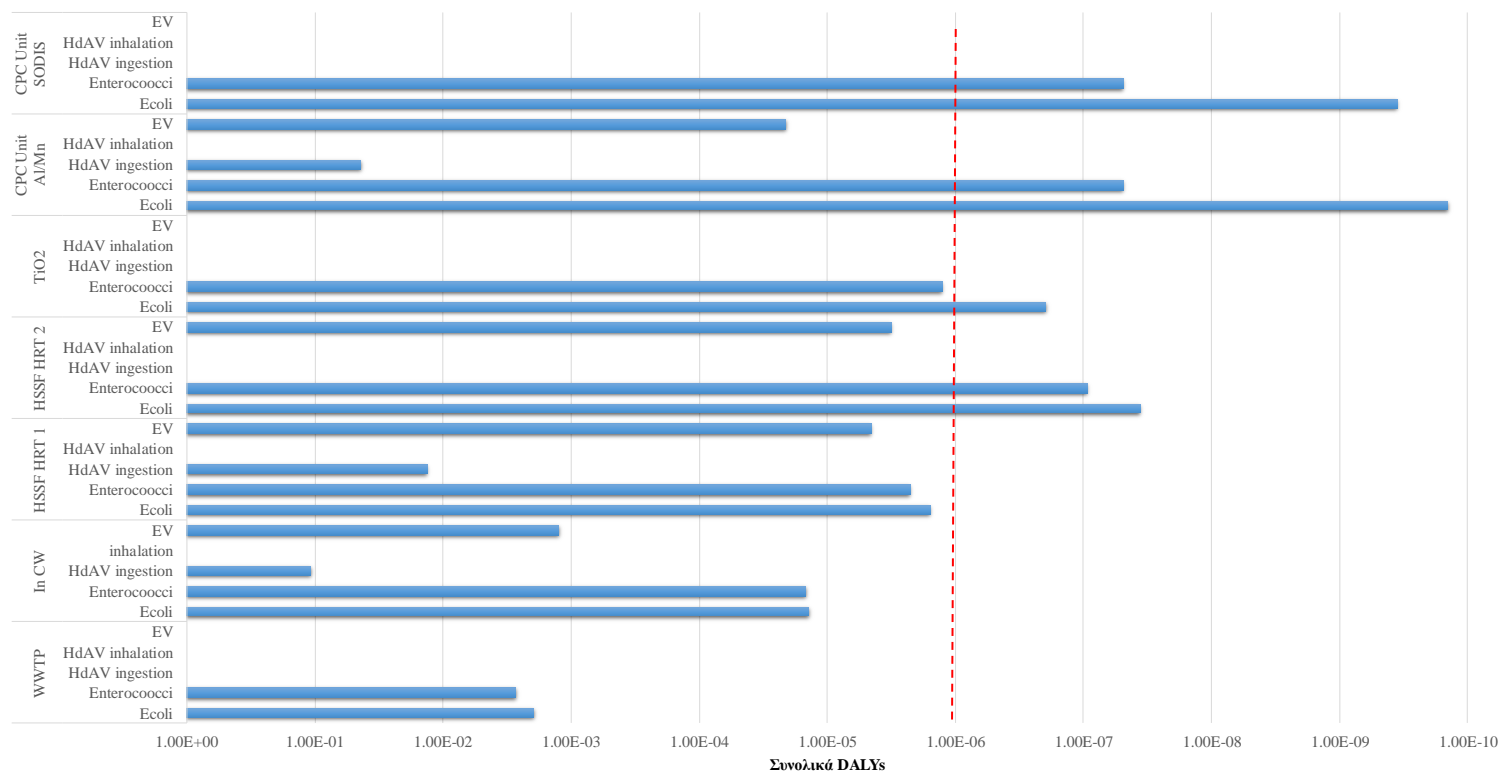
ορίων και για τους ιούς, εκτός από την περίπτωση του HSSF HRT2 όπου δεν εντοπίστηκαν στην έξοδο του συστήματος.



Γράφημα 120. Αναπηροσταθμισμένο έτος ζωής για το σενάριο 1 Χανίων. Η κόκκινη διακεκομμένη γραμμή δείχνει το αποδεκτό όριο σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας.

Σενάριο 2 Χανιά

Στο Γράφημα 121 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για το σενάριο της επαναχρησιμοποίησης νερού. Και σε αυτή την περίπτωση φαίνεται ότι όλες οι τιμές για το σύνολο των μικροοργανισμών είναι εκτός των προτεινόμενων ορίων με εξαίρεση το βακτήριο *E.coli*.

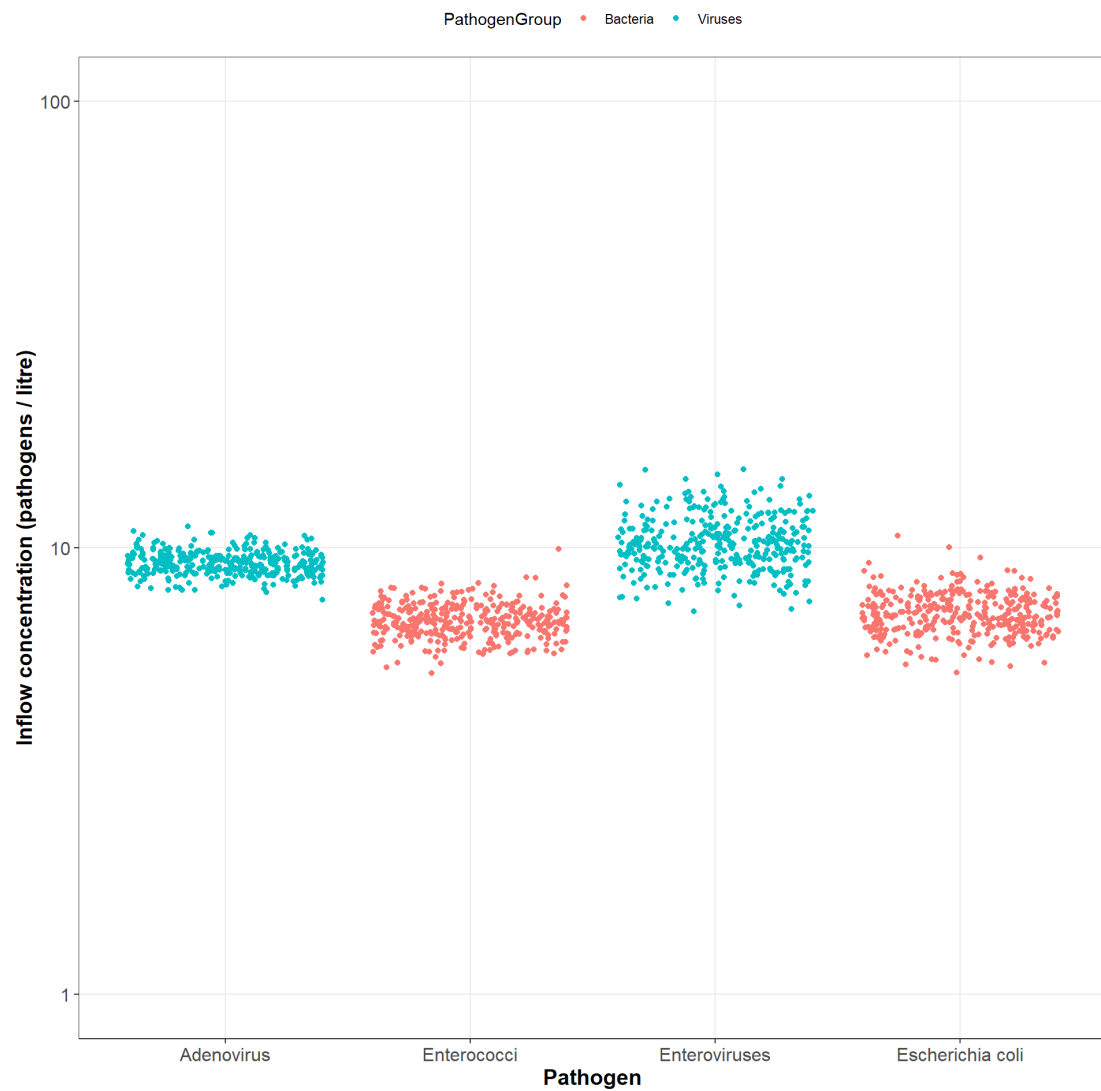


Γράφημα 121. Αναπηροσταθμισμένο έτος ζωής για το σενάριο 2 Χανίων. Η κόκκινη διακεκομμένη γραμμή δείχνει το αποδεκτό όριο σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας.

6.2.2 Στοχαστική προσέγγιση

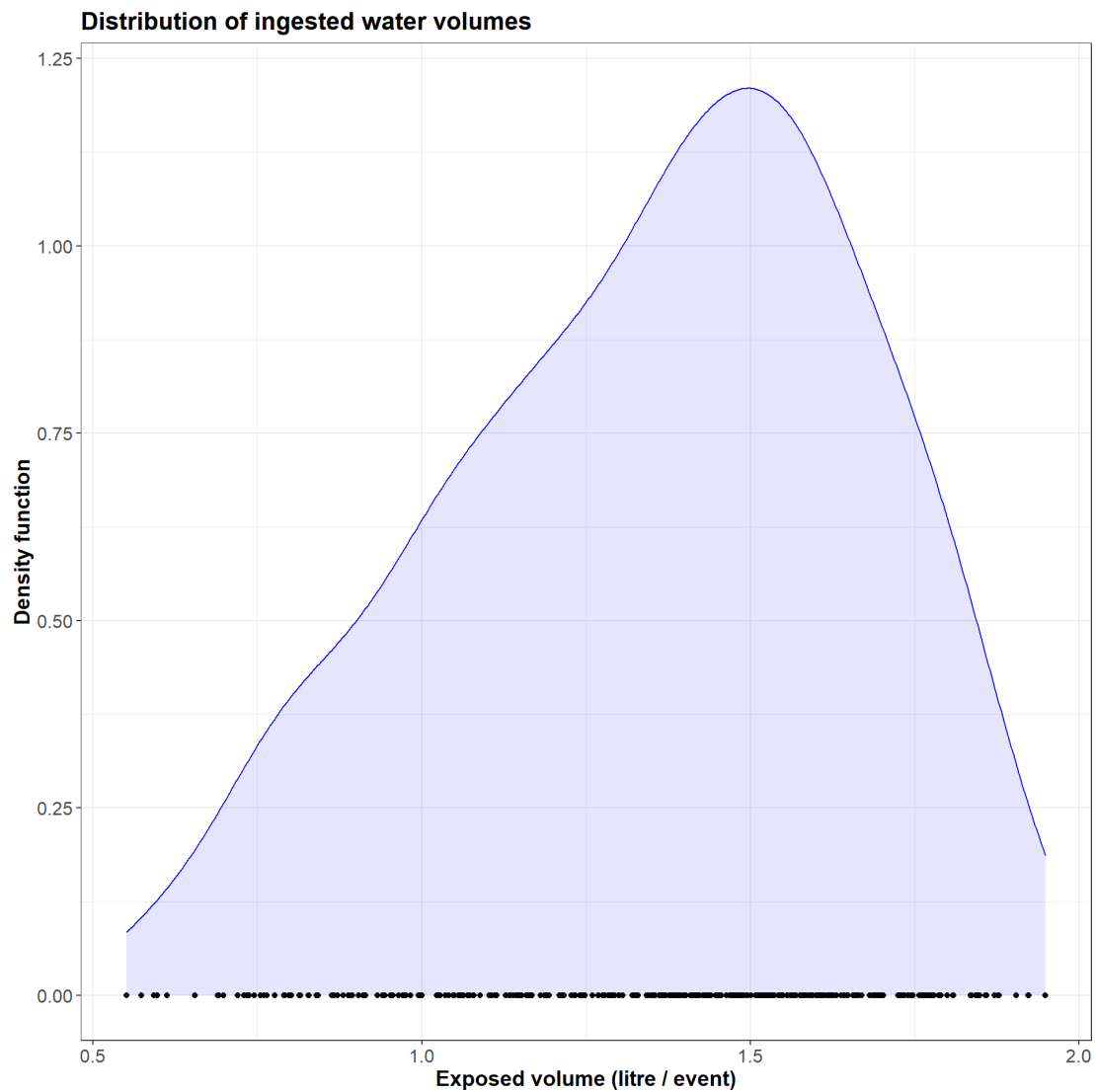
Σενάριο 1 – Κολύμβηση κοντά στο σύστημα Ηρακλείου

Στη συνέχεια ακολουθούν τα γραφήματα όπως εξάγονται από το στοχαστικό μοντέλο. Αρχικά παρουσιάζεται ο τρόπος που κατανέμεται η συγκέντρωση των βακτηρίων και των ιών στη είσοδο του συστήματος επεξεργασίας βάσει των δεδομένων από τα πειράματα και των κατανομών που ακολουθούν (Γράφημα 122).



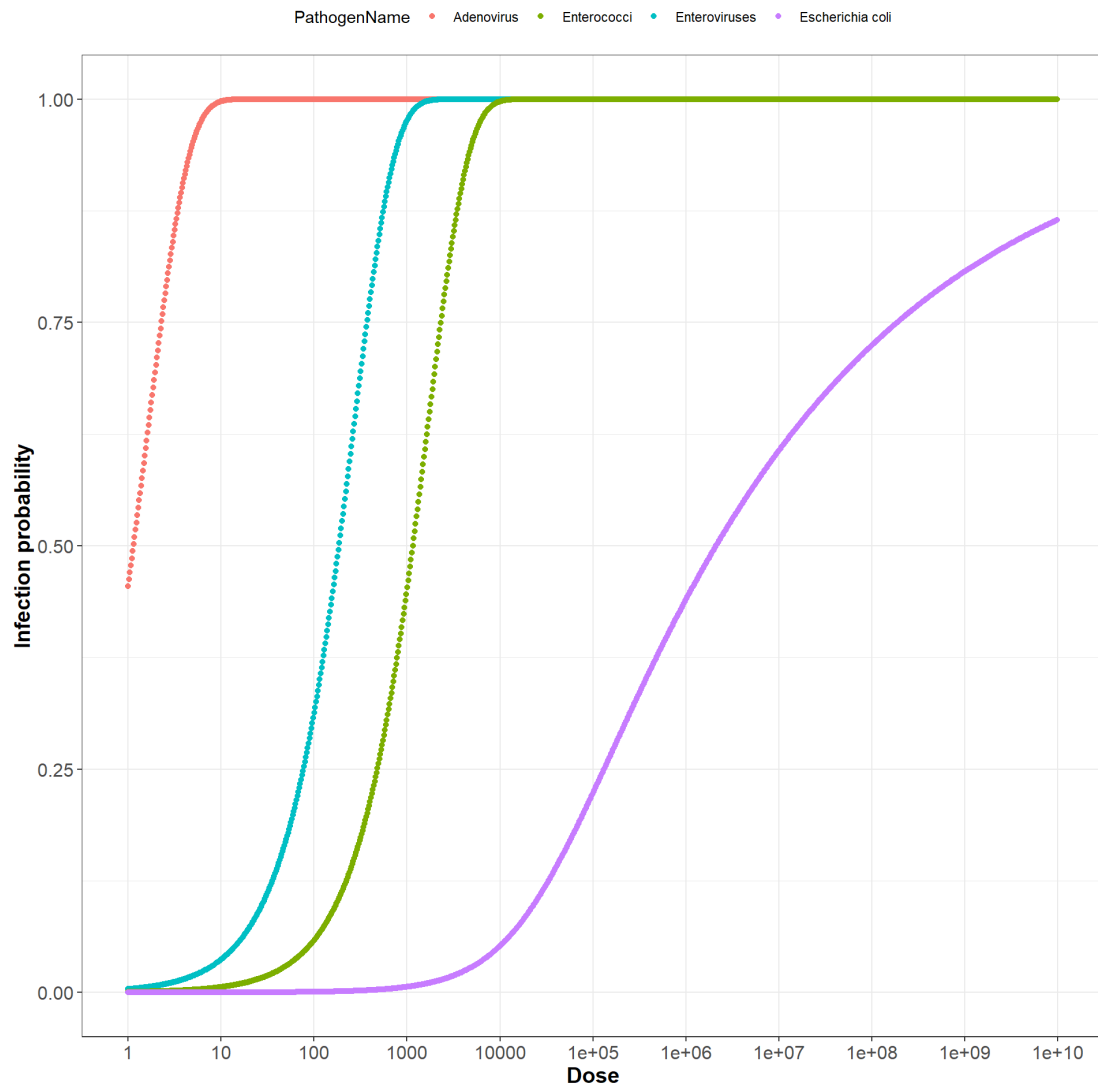
Γράφημα 122. Τυχαίες τιμές συγκέντρωσης παθογόνων στην είσοδο του συστήματος βάσει των δεδομένων των πειραμάτων.

Στο Γράφημα 123 παρουσιάζεται η κατανομή του όγκου νερού από την οποία επιλέγονται τυχαία οι τιμές κατάποσης ανά γεγονός.



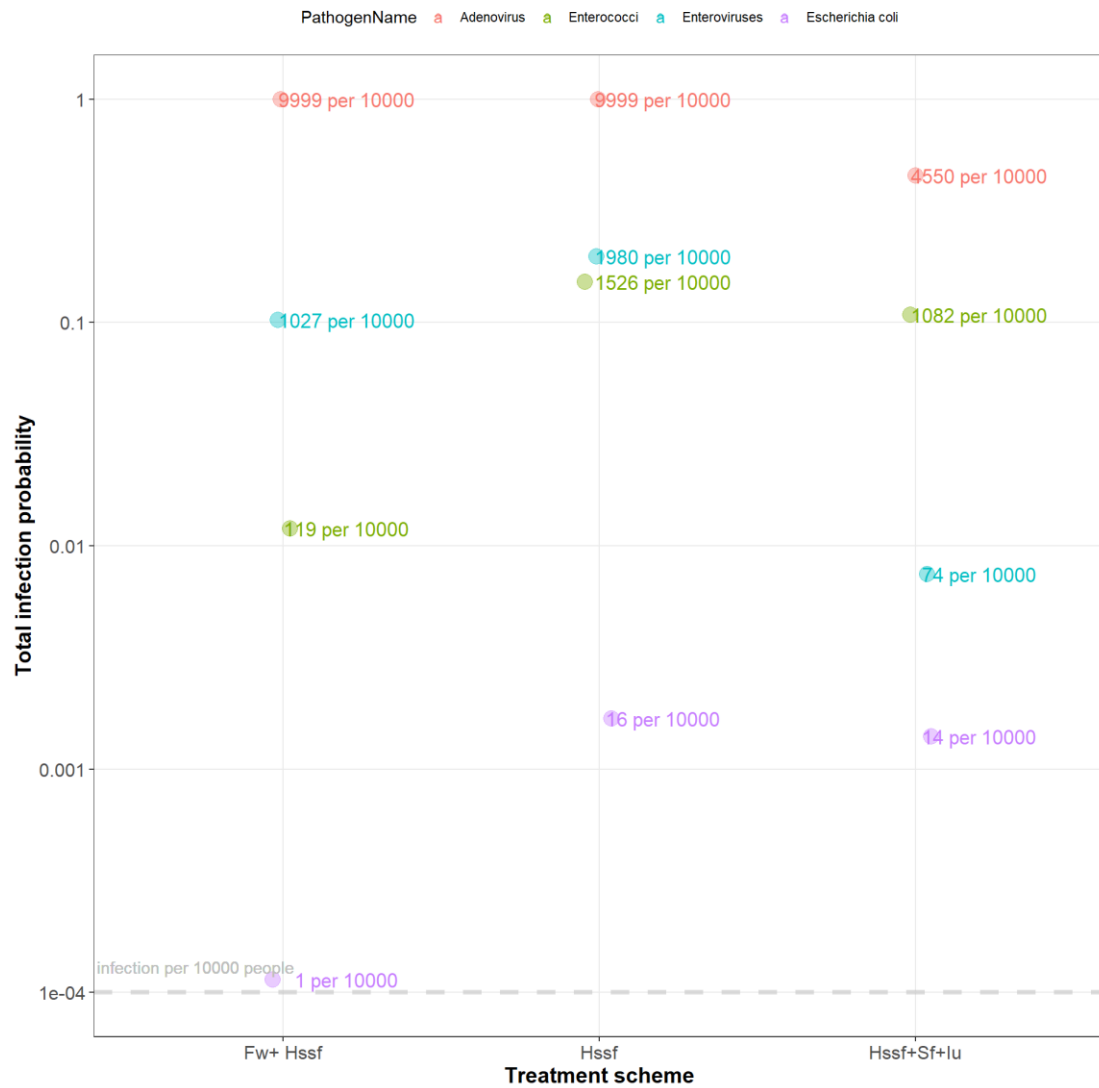
Γράφημα 123. Καμπύλη κατανομής της δόσης κατάποσης νερού.

Στο Γράφημα 124 παρουσιάζονται οι καμπύλες που δείχνουν την πιθανότητα μόλυνσης σε σχέση με τη λαμβανόμενη δόση, ανάλογα με το μοντέλο έκθεσης που ακολουθεί το κάθε παθογόνο (εκθετικό ή beta-poison).



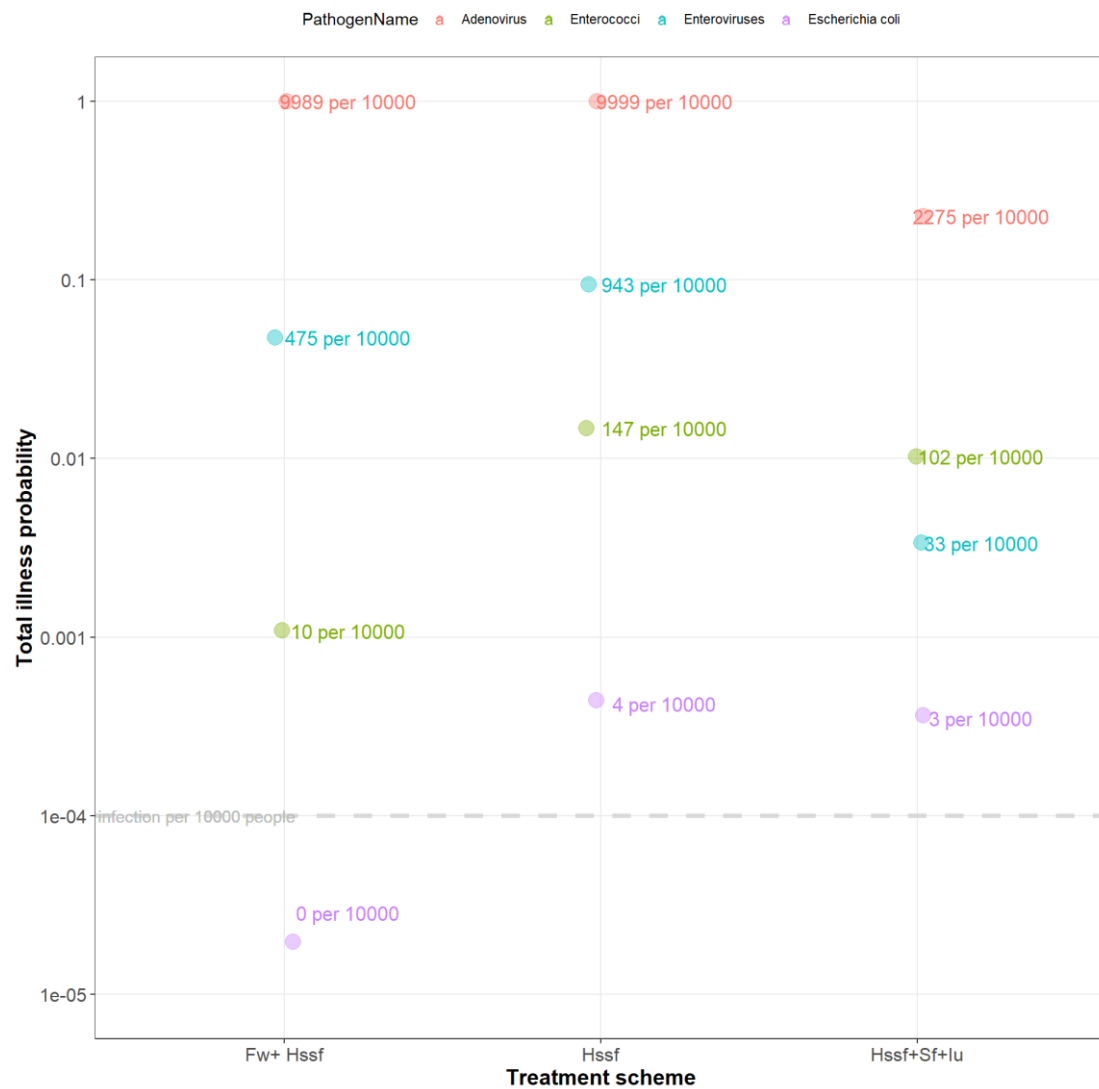
Γράφημα 124. Καμπύλες πιθανότητες μόλυνσης ανάλογα με τη δόση βάσει του μοντέλου έκθεσης που ακολουθεί το κάθε παθογόνο.

Το γράφημα 125 δείχνει τη συνολική πιθανότητα μόλυνσης από κάθε παθογόνο για κάθε σύστημα επεξεργασίας.



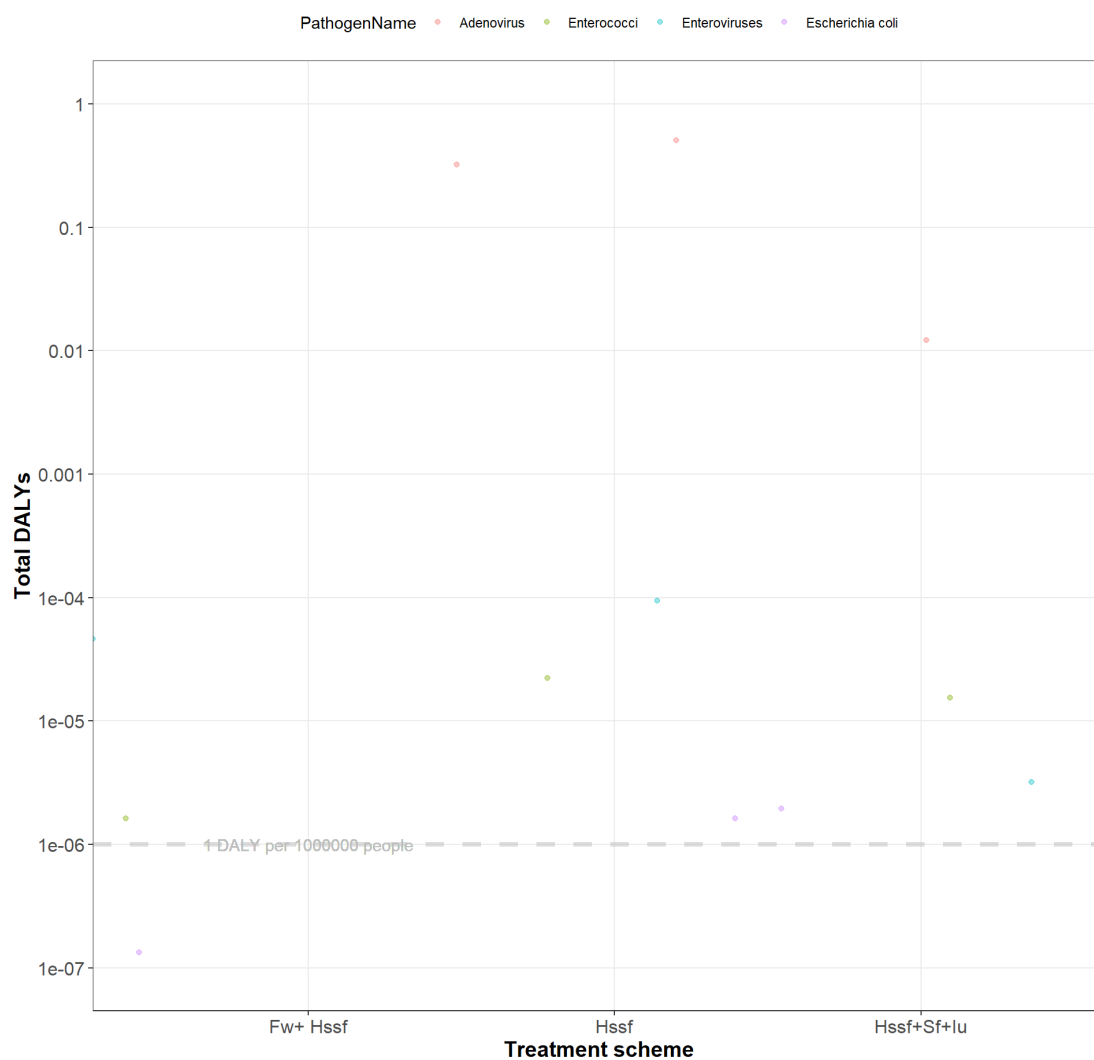
Γράφημα 125. Τιμές πιθανότητας μόλυνσης από το κάθε παθογόνο για κάθε μέθοδο επεξεργασίας. Η διακεκομμένη γραμμή δείχνει το αποδεκτό όριο.

Στη συνέχεια στο Γράφημα 126 παρουσιάζονται οι συνολικές πιθανότητες ασθένειας για κάθε παθογόνο από την εκροή του κάθε συστήματος



Γράφημα 126. Τιμές πιθανότητας ασθένειας από το κάθε παθογόνο για κάθε μέθοδο επεξεργασίας. Η διακεκομμένη γραμμή δείχνει το αποδεκτό όριο.

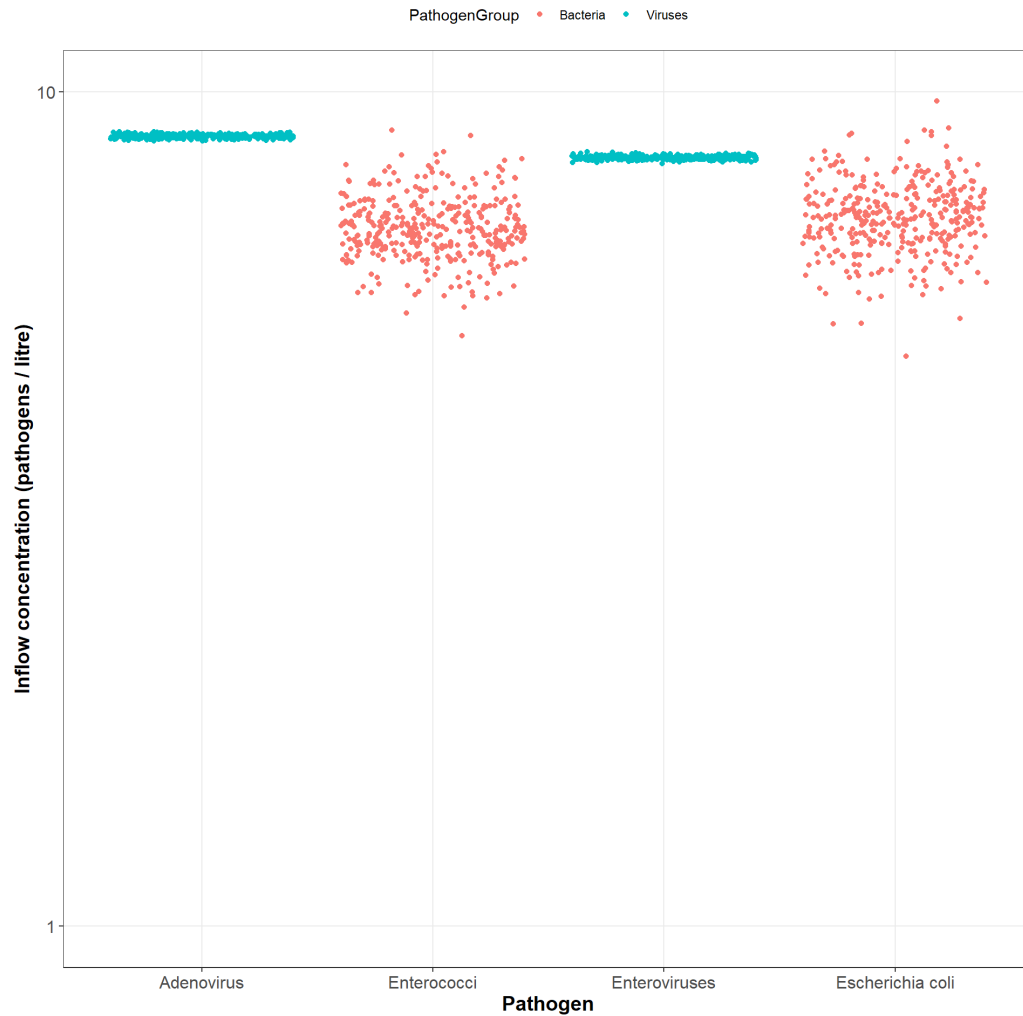
Τέλος, στο Γράφημα 127 παρουσιάζονται τα DALYs από το κάθε παθογόνο στις διαφορετικές μεθόδους επεξεργασίας.



Γράφημα 127. Συνολικά DALYs που προκύπτουν από κάθε παθογόνο μετά την κάθε επεξεργασία. Με διακεκομμένη γραμμή είναι το αποδεκτό όριο.

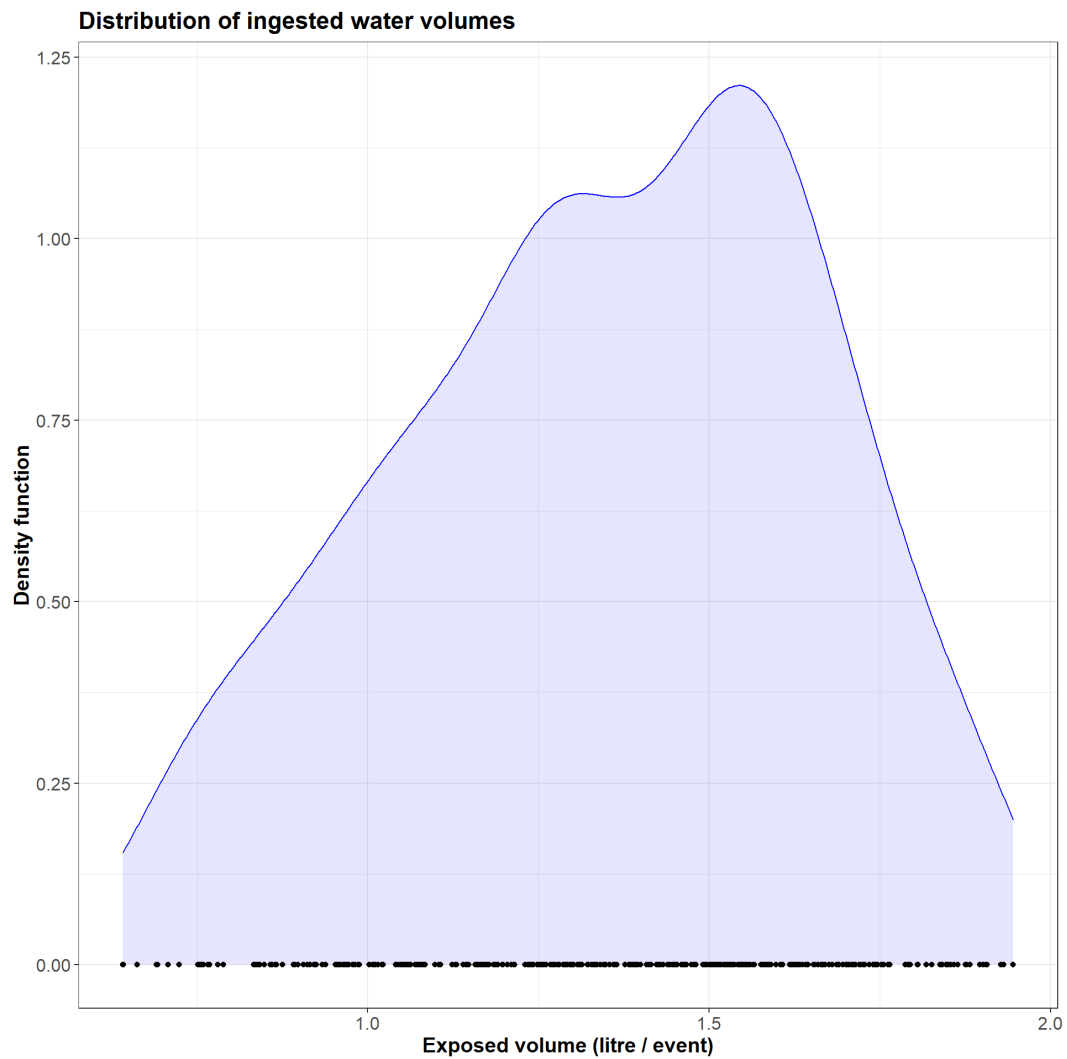
Σενάριο 2 – Επαναχρησιμοποίηση νερού από σύστημα Χανίων

Ομοίως με παραπάνω παρουσιάζονται οι τιμές συγκέντρωσης στην είσοδο του συστημάτων βάσει της κατανομής των δεδομένων (Γράφημα 128). Σε αυτή την περίπτωση λόγω των λίγων δεδομένων χρησιμοποιείται uniform κατανομή για τους ιούς και log normal κατανομή για τα βακτήρια.



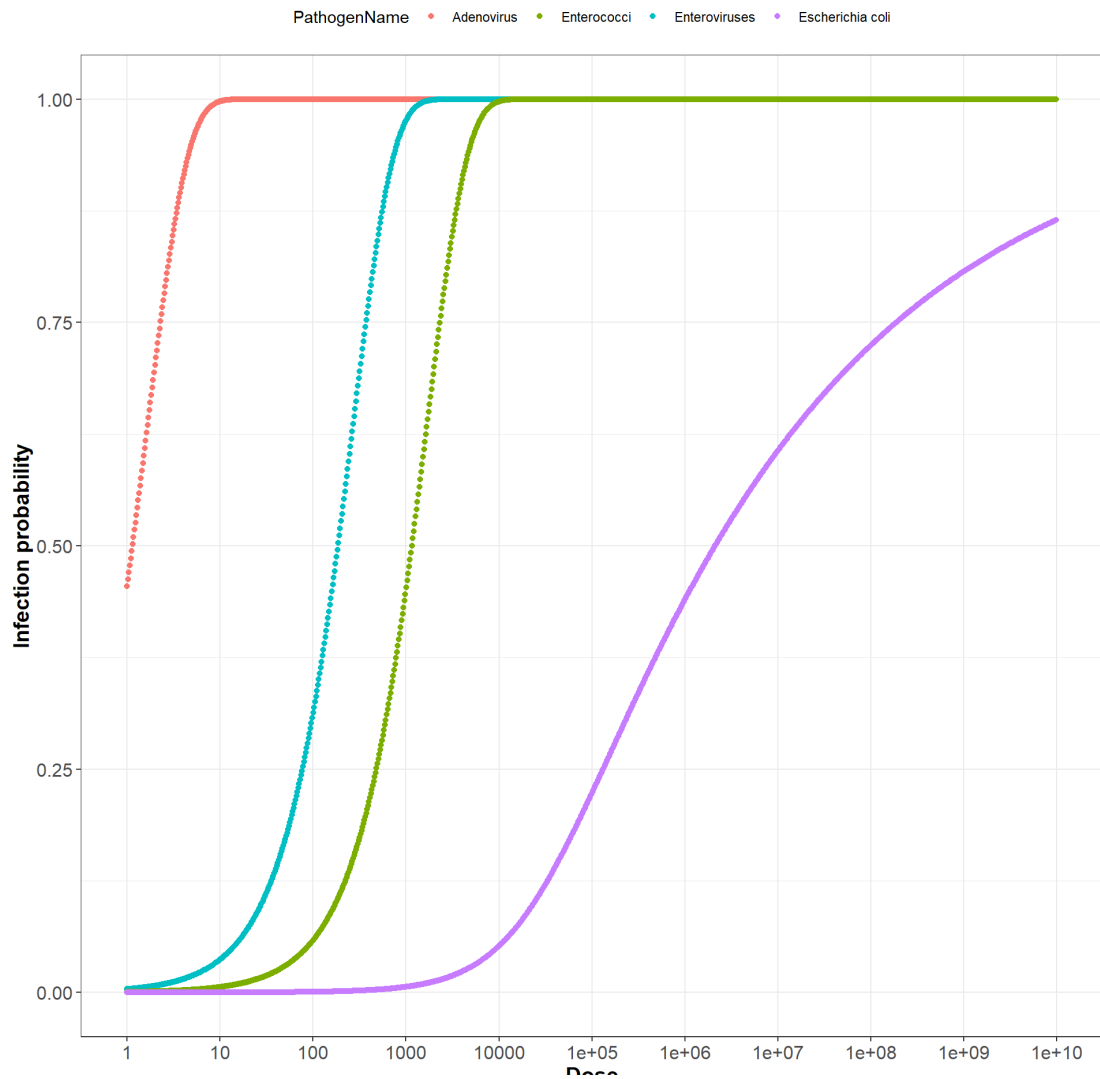
Γράφημα 128. Τυχαίες τιμές συγκέντρωσης παθογόνων στην είσοδο του συστήματος βάσει των δεδομένων των πειραμάτων.

Στο γράφημα 129 φαίνεται οι κατανομή της καμπύλης από όπου επιλέγονται οι τυχαίες τιμές της δόσης κατάποσης.



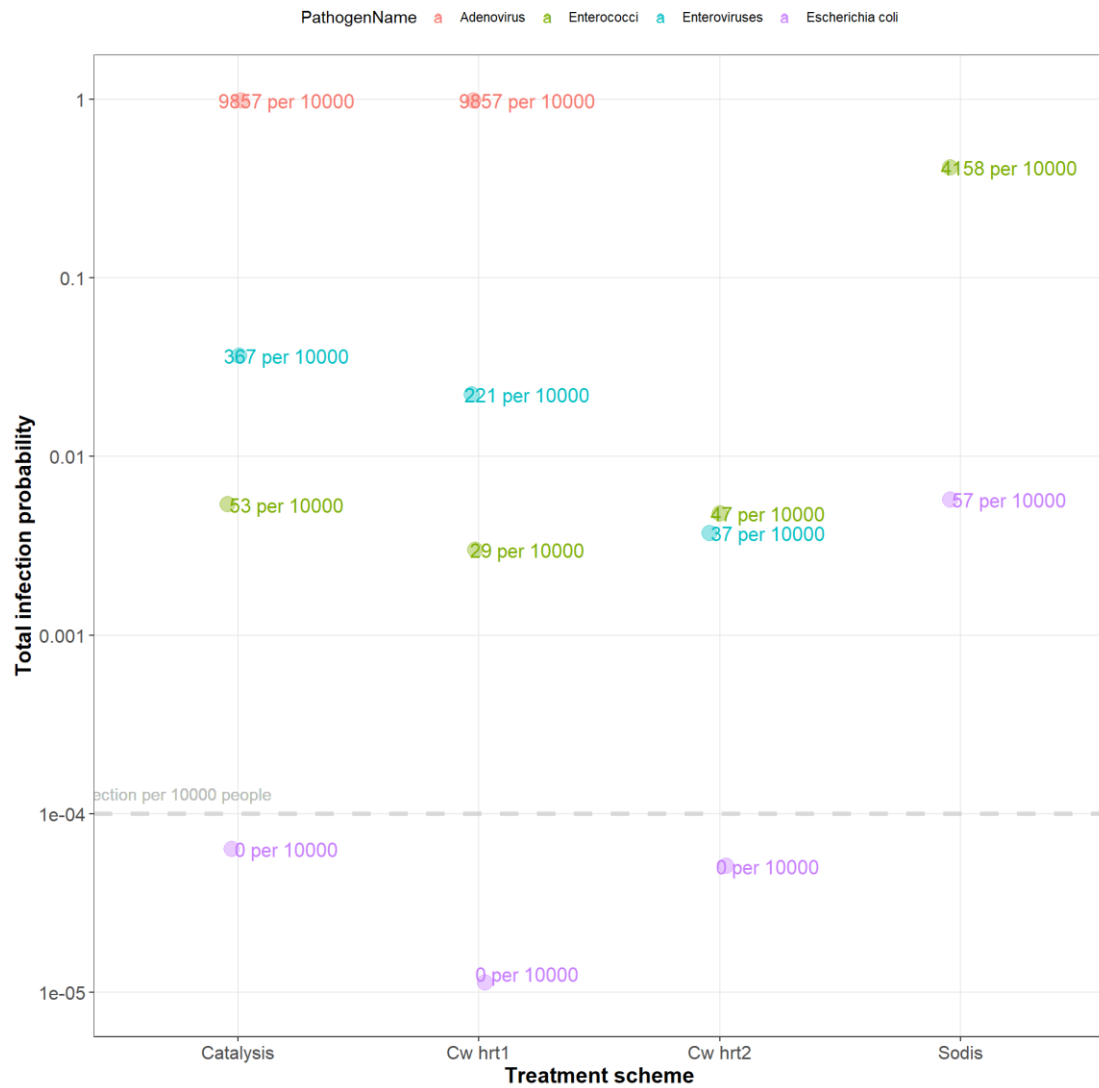
Γράφημα 129. Καμπύλη κατανομής της δόσης κατάποσης νερού.

Στο γράφημα 130 παρουσιάζονται οι καμπύλες που δείχνουν την πιθανότητα μόλυνσης σε σχέση με τη λαμβανόμενη δόση, ανάλογα με το μοντέλο έκθεσης που ακολουθεί το κάθε παθογόνο (εκθετικό, beta-poisson).



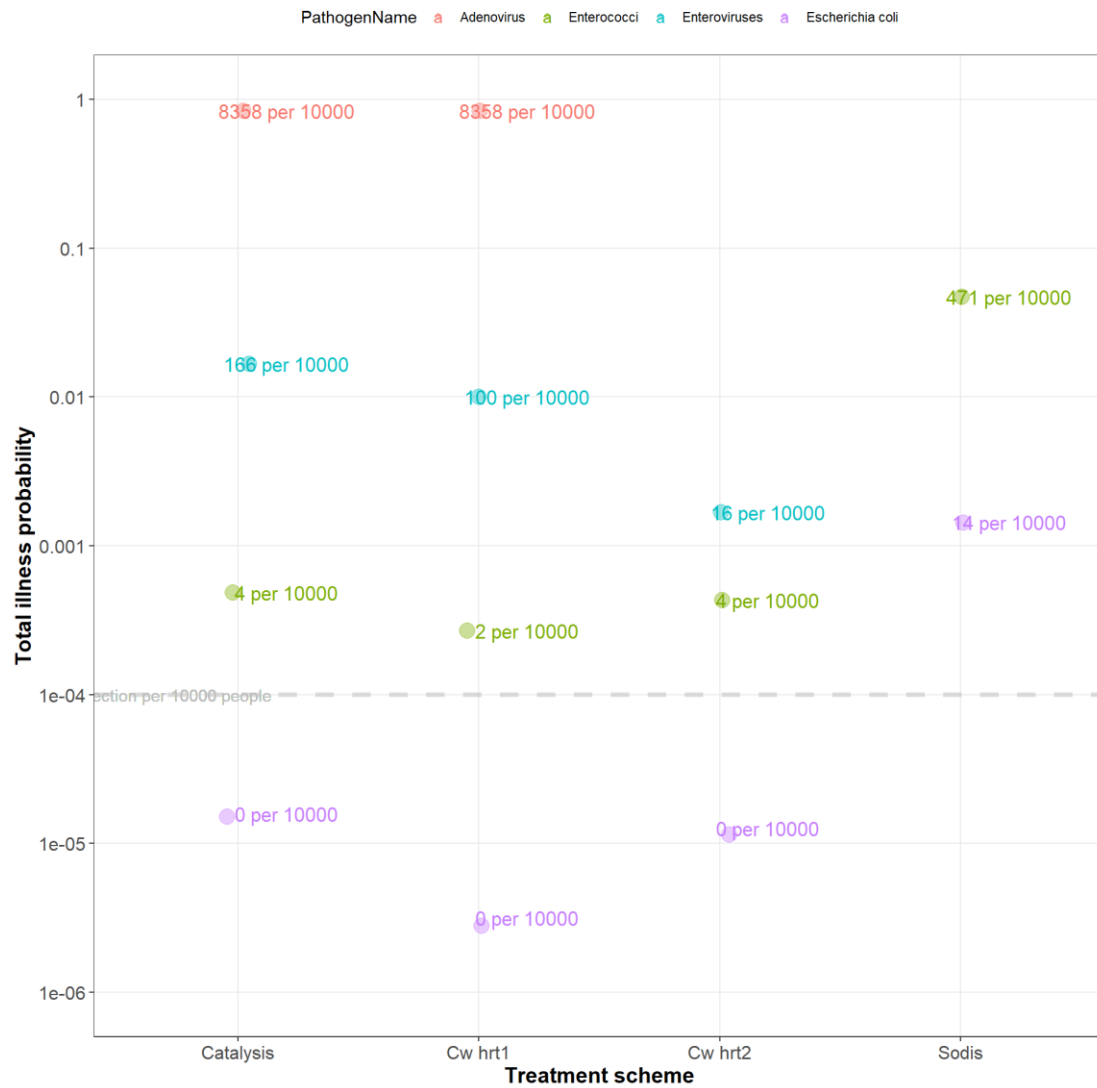
Γράφημα 130. Καμπύλες πιθανότητες μόλυνσης ανάλογα με τη δόση βάσει του μοντέλου έκθεσης που ακολουθεί το κάθε παθογόνο.

Ακολουθεί το Γράφημα 131 το οποίο παρουσιάζει τις συνολικές πιθανότητες μόλυνσης από κάθε παθογόνο για κάθε μέθοδο επεξεργασίας.



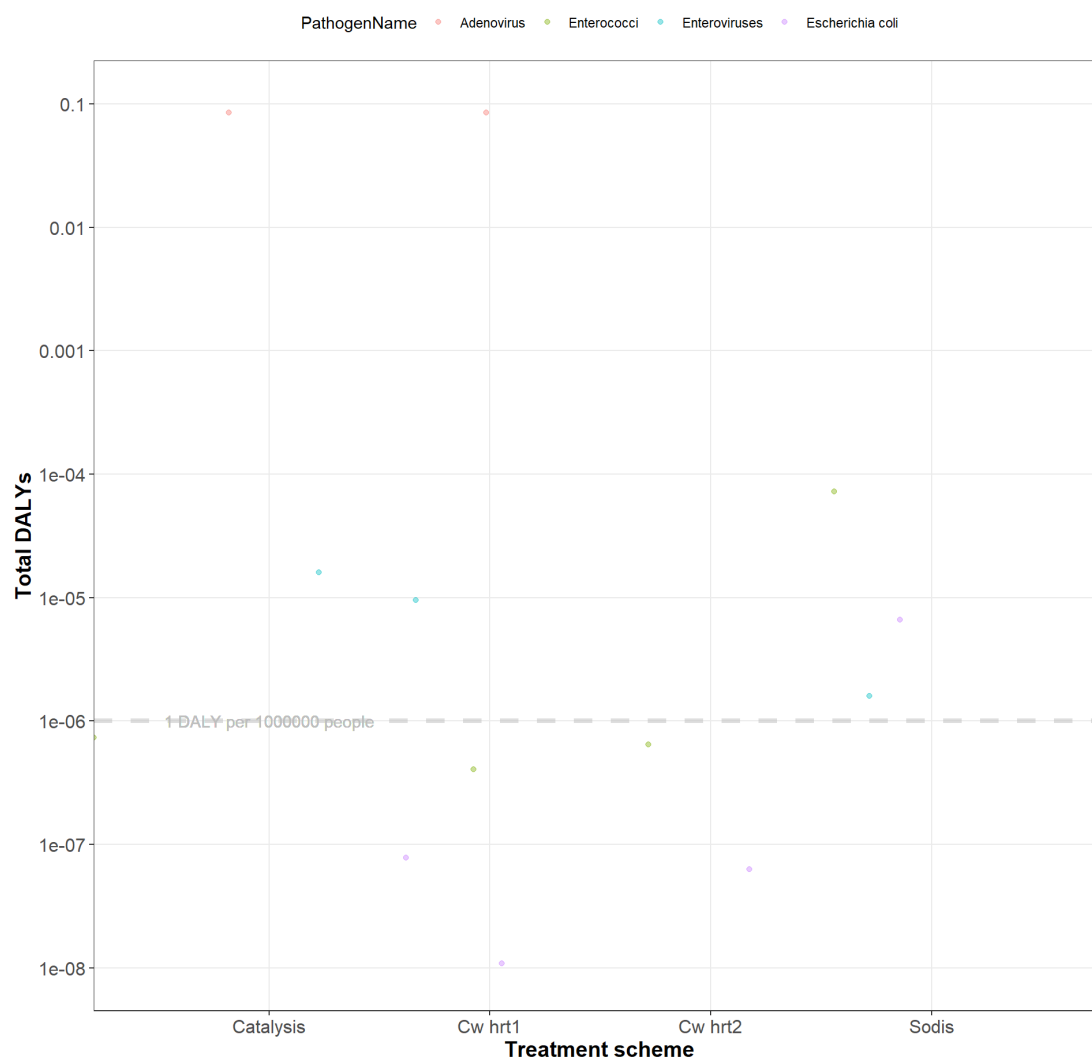
Γράφημα 131. Τιμές πιθανότητας μόλυνσης από το κάθε παθογόνο για κάθε μέθοδο επεξεργασίας. Η διακεκομμένη γραμμή δείχνει το αποδεκτό όριο.

Στο παρακάτω γράφημα παρουσιάζονται οι συνολικές πιθανότητες ασθένειας από το κάθε παθογόνο για κάθε μέθοδο επεξεργασίας.



Γράφημα 132. Τιμές πιθανότητας ασθένειας από το κάθε παθογόνο για κάθε μέθοδο επεξεργασίας. Η διακεκομμένη γραμμή δείχνει το αποδεκτό όριο.

Τέλος, στο Γράφημα 133 παρουσιάζονται τα συνολικά DALYs για κάθε παθογόνο από κάθε μέθοδο επεξεργασίας.



Γράφημα 133. Συνολικά DALYs που προκύπτουν από κάθε παθογόνο μετά την κάθε επεξεργασία. Με διακεκομμένη γραμμή είναι το αποδεκτό όριο.

6.2.3 Συμπεράσματα

Χρησιμοποιώντας την εκτίμηση κινδύνου μπορεί να γίνει μια καλύτερη ανάγνωση των αποτελεσμάτων. Για τα συστήματα του Ηρακλείου, όπου εξετάστηκε το σενάριο της κολύμβησης, μόνο οι τιμές που σχετίζονται με το βακτήριο *E. coli* από την εκροή του συστήματος των δύο υδροβιοτόπων είναι εντός των ορίων τόσο για την πιθανότητα ασθένειας όσο και για τις τιμές DALYs. Όσον αφορά στα συστήματα των Χανίων, για τα οποία εξετάστηκε το σενάριο επαναχρησιμοποίησης, οι τιμές για την πιθανότητα μόλυνσης και ασθένειας για το βακτήριο *E. coli* είναι εντός ορίων για όλα τα συστήματα εκτός από το SODIS. Για τα DALYs εκτός από το *E.coli* εντός των ορίων είναι και οι τιμές για τους εντερόκοκκους.

Στις υποθετικές περιπτώσεις όπου εξετάζονται από τα σενάρια, αν κάποιος θα ερχόταν σε επαφή με το προερχόμενο από τις επεξεργασίες νερό, πιθανότητα θα προεκύπταν σημαντικοί κίνδυνοι για την υγεία του. Παρόλο που η απόδοση των συστημάτων φαίνεται να είναι υψηλή, το φορτίο που τελικά υφίσταται στις εκροές είναι ικανό να προκαλέσει κινδύνους για τη δημόσια υγεία. Ο κίνδυνος αυτός προέρχεται ξεκάθαρα από το υκó φορτίο. Όπως παρουσιάζεται από τα αποτελέσματα του μοντέλου οι αδενοϊοί είναι σχεδόν σίγουρο ότι θα μολύνουν και θα προκαλέσουν ασθένεια. Παρόλο όλο που οι εντεροϊοί εντοπίστηκαν σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ή σε ίδιες συγκεντρώσεις με τους αδενοϊούς, η μεγαλύτερη μολυσματική ικανότητα των αδενοϊών τους δίνει πολύ μεγαλύτερες πιθανότητες να προκαλέσουν κίνδυνο. Αυτό επιβεβαιώνεται και στη μελέτη των Gonzales-Gustavson et al., οι οποίοι καταγράφουν τον κίνδυνο από την κατανάλωση μαρουλιών ποτισμένα με επαναχρησιμοποιούμενου νερό προερχόμενο από τριτογενείς επεξεργασίες όπως τεχνητοί υδροβιότοποι, UV και χλωρίωση. Καμία από τις επεξεργασίες δε περνάει το προτεινόμενο όριο παρόλο των 10^{-6} DALYs λόγω της παρουσίας των νοροϊών και των αδενοϊών παρόλο που μείωση ήταν 3,9 και 2,8 Logs αντίστοιχα. Οπότε γίνεται επιτακτική η περαιτέρω μείωση των παθογόνων στις εκροές ακόμα και των τριτογενών συστημάτων επεξεργασίας, ώστε να επιτευχθούν τα επιτρεπτά όρια (Gonzales-Gustavson et al., 2019).

Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής αναδεικνύουν την ανάγκη χρήσης και άλλων μικροοργανισμών ως δεικτών ποιότητας του νερού εκτός των κλασικών βακτηριακών δεικτών που ορίζει η νομοθεσία, ώστε να διασφαλιστεί η καλή ποιότητα του νερού και κατ' επέκταση η δημόσια υγεία.

Παρόλο που εκ πρώτης όψεως και όπως φαίνεται από την ανάλυση κινδύνου τα βακτήρια δεν αποτελούν πρόβλημα για τη δημόσια υγεία λόγω της επαρκούς απομάκρυνσής τους και της μικρότερης μολυσματικότητας σε σχέση με τους ιούς, υπάρχει ένας σημαντικός παράγοντας ο οποίος δε λαμβάνεται υπόψη στην εκτίμηση κινδύνου. Αυτός σχετίζεται με την ανθεκτικότητα των βακτηρίων στα αντιβιοτικά αλλά και την ικανότητά τους να μεταδίδουν αυτήν την ανθεκτικότητά. Για παράδειγμα ένα ανθεκτικό βακτήριο σίγουρα θα προκαλέσει πολύ περισσότερες ημέρες ασθένειας ή ακόμα και θάνατο από ένα βακτήριο το οποίο μπορεί να αντιμετωπιστεί επιτυχώς με κάποιο αντιβιοτικό. Αυτή η παράμετρος δεν εισάγεται στα μοντέλα μικροβιακής εκτίμησης κινδύνου δημιουργώντας κενό ασφαλείας για τη δημόσια υγεία. Επιπλέον, δεν έχουν αναπτυχθεί μοντέλα, τα οποία να εκτιμούν τον κίνδυνο από τις συγκεντρώσεις των γονιδίων ανθεκτικότητας ενώ υπάρχουν δυσκολίες στην ανάπτυξη μοντέλων τα οποία θα εκτιμούν τον κίνδυνο που μπορεί να προκύψει από την ανθεκτικότητα στο σύνολό της. Αυτό συμβαίνει γιατί θα πρέπει να συμπεριληφθούν αρκετοί παράγοντες όπως η παρουσία των κινητών γενετικών στοιχείων, τα οποία μπορούν να μεταφέρουν τα γονίδια, η ικανότητα των βακτηρίων να αναπτύσσουν ανθεκτικότητα σε καινούργιες κλάσεις αντιβιοτικών και η σύσταση της εκροής, η οποία μπορεί να ευνοήσει την οριζόντια μεταφορά γονιδίων μέσω ρύπων, όπως είναι τα αντιβιοτικά και τα βαρέα μέταλλα (Martínez et al., 2015). Το γεγονός ότι δεν έχουν ακόμα κατανοηθεί πλήρως οι μηχανισμοί απόκτησης ανθεκτικότητας αλλά και το γεγονός ότι τα ενδιαφερόμενα μέρη δεν είναι ακόμα εξοικειωμένα με την έννοια της ανθεκτικότητας δυσχεραίνουν περισσότερο την κατάσταση (Hong et al., 2018). Έτσι, η δημιουργία πληρέστερων μοντέλων εκτίμησης κινδύνου αποτελεί μια πρόκληση για μελλοντικές έρευνες.

7 Επίλογος – Τελικά συμπεράσματα

Οι ανάγκες για ασφαλέστερο νερό οδηγεί στην διερεύνηση λύσεων που θα μπορούσαν να προσφέρουν σε αυτή την κατεύθυνση. Τα αποτελέσματα αυτής της διατριβής έδειξαν ότι οικονομικές και φιλικές προς το περιβάλλον διεργασίες μπορούν να παρουσιάσουν ικανοποιητικά αποτελέσματα.

Συμπερασματικά, λειτουργώντας ως συστήματα δευτεροβάθμιας επεξεργασίας οι τεχνητοί υδροβιότοποι μπορούν να προσφέρουν ικανοποιητικές αποδόσεις σε σύγκριση με τις συμβατικές μεθόδους επεξεργασίας. Εξετάζοντας τους τεχνητούς υδροβιότοπους και τη μονάδα CPC ως συστήματα τριτοβάθμιας επεξεργασίας, οι τεχνητοί υδροβιότοποι απομακρύνουν τους παθογόνους μικροοργανισμούς με σειρά Αδενοϊοί > Εντεροϊοί > *E. coli* > βακτηριοφάγοι > Εντεροκόκκοι ενώ η αντίστοιχη σειρά αδρανοποίησης μετά τη φωτοκαταλυτική διεργασία ήταν Εντεροκόκκοι > *E. coli* > Αδενοϊοί > βακτηριοφάγοι > Εντεροϊοί. Όμως, είναι μεγάλης σημασίας να γίνεται ανάγνωση και της αρχική συγκέντρωσης των μικροοργανισμών και όχι μόνο η απόδοση. Ακόμα και μια απόδοση 99% η οποία συνδυάζεται με μεγάλη αρχική συγκέντρωση μπορεί να δημιουργήσει πρόβλημα για τη δημόσια υγεία. Επιπλέον χρειάζεται προσοχή στην επιλογή των βακτηριακών δεικτών και στο κατά πόσο οι δείκτες μπορούν να εκτιμήσουν με ασφάλεια την ποιότητα του νερού σε όρους παρουσίας ιών, καθώς οι διαφορετικές διεργασίες προσφέρουν διαφορετικούς μηχανισμούς απομάκρυνσης των μικροοργανισμών.

Η αντιμετώπιση των ανθεκτικών βακτηρίων είναι ένα από τα προβλήματα που θα πρέπει να αντιμετωπιστούν τα επόμενα χρόνια. Παρά το γεγονός ότι τα συστήματα παρουσιάζουν ξεκάθαρη μείωση του μικροβιακού φορτίου, τα αποτελέσματα είναι συγκεχυμένα όσον αφορά στα γονίδια ανθεκτικότητας και στο πως μπορεί να μεταβάλλεται το προφίλ ανθεκτικότητας των βακτηρίων κατά την επεξεργασία τους. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ένας παράγοντας που μπορεί να απενεργοποιεί τους μικροοργανισμούς ή τα γονίδια, μπορεί ταυτόχρονα να συμβάλει στην εξάπλωση γονιδίων.

Οι εκροές παρουσιάζουν υψηλές συγκεντρώσεις γονιδίων σε διαφορετικού τύπου γενετικό υλικό και τα εναπομείναντα γονίδια σε συνδυασμό και την απόκριση SOS των βακτηρίων μπορεί να οδηγήσει στη εξάπλωση των ανθεκτικών βακτηρίων. Έτσι

παρατηρείται αδυναμία στο να εκτιμηθούν οι επιπτώσεις και οι κίνδυνοι από την εξάπλωση αυτή λόγω των πολύπλοκων μηχανισμών που λαμβάνουν χώρα.

Διαφορετικές διεργασίες μπορούν να προσφέρουν καλύτερα αποτελέσματα απέναντι σε διαφορετικούς μικροοργανισμούς και ίσως ένας συνδυασμός αυτών να μπορεί να προσφέρει ολοκληρωμένες λύσεις σε απομακρυσμένες περιοχές οι σε ασθενέστερα οικονομικά χώρες.

Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Περισσότερη έρευνα θα μπορούσε να συμβάλει στο να αντιμετωπιστούν καλύτερα οι παραπάνω προκλήσεις:

Περισσότερη διερεύνηση στα συστήματα τεχνητών υδροβιοτόπων ώστε να κατανοηθούν καλύτερα ποιοι είναι οι μηχανισμών οι οποίοι συμβάλουν στην απομάκρυνση των εκάστοτε παθογόνων

Εξέταση περισσότερων παθογόνων και διερεύνηση των συσχετίσεων μεταξύ αυτών ώστε να επιλεγούν κατάλληλοι δείκτες

Πειράματα πιλοτικής κλίμακας με χρήση πραγματικού λύματος ώστε να διερευνηθεί η τύχη των ίων μετά την επεξεργασία με φωτοκαταλυτικές διεργασίες σε πιλοτική κλίμακα σε πραγματικές συνθήκες

Ανάπτυξη μοντέλων εκτίμησης κινδύνου τα οποία θα λαμβάνουν υπόψη τους τον κίνδυνο της μεταφοράς των γονιδίων ανεκτικότητας.

Βιβλιογραφικές αναφορές

- Ackermann, H.W., 2009. Phage classification and characterization. *Methods Mol. Biol.* 501, 127–140. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_13
- Adefisoye, M.A., Nwodo, U.U., Green, E., Okoh, A.I., 2016. Quantitative PCR Detection and Characterisation of Human Adenovirus, Rotavirus and Hepatitis A Virus in Discharged Effluents of Two Wastewater Treatment Facilities in the Eastern Cape, South Africa. *Food Environ. Virol.* <https://doi.org/10.1007/s12560-016-9246-4>
- Aguilera-Ruiz, E., García-Pérez, U.M., De La Garza-Galván, M., Zambrano-Robledo, P., Bermúdez-Reyes, B., Peral, J., 2015. Efficiency of Cu₂O/BiVO₄ particles prepared with a new soft procedure on the degradation of dyes under visible-light irradiation. *Appl. Surf. Sci.* 328, 361–367. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.12.059>
- Agulló-Barceló, M., Polo-López, M.I., Lucena, F., Jofre, J., Fernández-Ibáñez, P., 2013. Solar Advanced Oxidation Processes as disinfection tertiary treatments for real wastewater: Implications for water reclamation. *Appl. Catal. B Environ.* 136–137, 341–350. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2013.01.069>
- Alexander, J., Knopp, G., Dötsch, A., Wieland, A., Schwartz, T., 2016. Ozone treatment of conditioned wastewater selects antibiotic resistance genes, opportunistic bacteria, and induce strong population shifts. *Sci. Total Environ.* 559, 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.03.154>
- Alidjinou, E.K., Sane, F., Firquet, S., Lobert, P.E., Hober, D., 2019. Resistance of Enteric Viruses on Fomites. *Intervirology* 61, 205–213. <https://doi.org/10.1159/000448807>
- Alufasi, R., Gere, J., Chakauya, E., Lebea, P., Parawira, W., Chingwaru, W., 2017a. Mechanisms of pathogen removal by macrophytes in constructed wetlands. *Environ. Technol. Rev.* 6, 135–144. <https://doi.org/10.1080/21622515.2017.1325940>
- Alufasi, R., Gere, J., Chakauya, E., Lebea, P., Parawira, W., Chingwaru, W., 2017b. Mechanisms of pathogen removal by macrophytes in constructed wetlands. *Environ. Technol. Rev.* 6, 135–144. <https://doi.org/10.1080/21622515.2017.1325940>
- Amarasiri, M., Kitajima, M., Nguyen, T.H., Okabe, S., 2017. Bacteriophage removal efficiency as a validation and operational monitoring tool for virus reduction in wastewater reclamation: Review. *Water Res.* 121, 258–269. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.05.035>
- Amdiouini, H., Faouzi, A., Fariat, N., Hassar, M., Soukri, A., Nourlil, J., 2012. Detection and molecular identification of human adenoviruses and enteroviruses in wastewater from Morocco. *Lett. Appl. Microbiol.* 54, 359–366. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2012.03220.x>
- Amor, C., Marchão, L., Lucas, M.S., Peres, J.A., 2019. Application of advanced oxidation processes for the treatment of recalcitrant agro-industrial wastewater: A review. *Water (Switzerland)* 11. <https://doi.org/10.3390/w11020205>
- Anand, T., Bera, B.C., Vaid, R.K., Barua, S., Riyesh, T., Virmani, N., Hussain, M., Singh, R.K., Tripathi, B.N., 2016. Abundance of antibiotic resistance genes in environmental bacteriophages 3458–3466. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000639>
- Anderson, J.C., Carlson, J.C., Low, J.E., Challis, J.K., Wong, C.S., Knapp, C.W., Hanson, M.L., 2013. Performance of a constructed wetland in Grand Marais , Manitoba , Canada : Removal of nutrients , pharmaceuticals , and antibiotic resistance genes from municipal wastewater. *Chem. Cent. J.* 7, 1. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-7-54>
- Andersson, D.I., Hughes, D., 2014. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 465–478. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3270>
- Balcázar, J.L., 2018. How do bacteriophages promote antibiotic resistance in the environment? *Clin.*

- Microbiol. Infect. 24, 447–449. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.10.010>
- Benabbou, A.K., Derriche, Z., Felix, C., Lejeune, P., Guillard, C., 2007. Photocatalytic inactivation of *Escherichia coli*. Effect of concentration of TiO₂ and microorganism, nature, and intensity of UV irradiation. *Appl. Catal. B Environ.* 76, 257–263. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2007.05.026>
- Berglund, B., Ali, G., Weisner, S.E.B., Magnus, P., Fick, J., Lindgren, P., 2014. Efficient removal of antibiotics in surface- flow constructed wetlands , with no observed impact on antibiotic resistance genes. *Sci. Total Environ.* 476–477, 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.12.128>
- Bichai, F., Polo-López, M.I., Fernández Ibañez, P., 2012. Solar disinfection of wastewater to reduce contamination of lettuce crops by *Escherichia coli* in reclaimed water irrigation. *Water Res.* 46, 6040–6050. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.08.024>
- Brown-jaque, M., Calero-cáceres, W., Espinal, P., Rodríguez-navarro, J., Miró, E., González-lópez, J.J., Cornejo, T., 2018. International Journal of Antimicrobial Agents Antibiotic resistance genes in phage particles isolated from human faeces and induced from clinical bacterial isolates. *Int. J. Antimicrob. Agents* 51, 434–442. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.11.014>
- Calero-Cáceres, W., Melgarejo, A., Colomer-Lluch, M., Stoll, C., Lucena, F., Jofre, J., Muniesa, M., 2014. Sludge as a potential important source of antibiotic resistance genes in both the bacterial and bacteriophage fractions. *Environ. Sci. Technol.* 48, 7602–7611. <https://doi.org/10.1021/es501851s>
- Calero-Cáceres, W., Muniesa, M., 2016. Persistence of naturally occurring antibiotic resistance genes in the bacteria and bacteriophage fractions of wastewater. *Water Res.* 95, 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.03.006>
- Cashdollar, J.L., Wymer, L., 2013. Methods for primary concentration of viruses from water samples: A review and meta-analysis of recent studies. *J. Appl. Microbiol.* 115, 1–11. <https://doi.org/10.1111/jam.12143>
- Chen, H., Zhang, M., 2013. Effects of advanced treatment systems on the removal of antibiotic resistance genes in wastewater treatment plants from Hangzhou, China. *Environ. Sci. Technol.* 47, 8157–8163. <https://doi.org/10.1021/es401091y>
- Chen, J., Ying, G.G., Wei, X.D., Liu, Y.S., Liu, S.S., Hu, L.X., He, L.Y., Chen, Z.F., Chen, F.R., Yang, Y.Q., 2016. Removal of antibiotics and antibiotic resistance genes from domestic sewage by constructed wetlands: Effect of flow configuration and plant species. *Sci. Total Environ.* 571, 974–982. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.07.085>
- Chigor, V.N., Sibanda, T., Okoh, A.I., 2014. Assessment of the Risks for Human Health of Adenoviruses, Hepatitis A Virus, Rotaviruses and Enteroviruses in the Buffalo River and Three Source Water Dams in the Eastern Cape. *Food Environ. Virol.* 6, 87–98. <https://doi.org/10.1007/s12560-014-9138-4>
- Cho, M., Chung, H., Choi, W., Yoon, J., 2005. Different Inactivation Behaviors of MS2 Phage and. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 270–275. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.1.270>
- Choi, N.C., Choi, J.W., Kwon, K.S., Lee, S.G., Lee, S., 2017. Quantifying bacterial attachment and detachment using leaching solutions of various ionic strengths after bacterial pulse. *AMB Express* 7. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0340-2>
- Christofilopoulos, S., 2017. Removal of bisphenol A from wastewater and groundwater with helophytes. Technical University of Crete.
- Christofilopoulos, S., Kaliakatsos, A., Triantafyllou, K., Gounaki, I., Venieri, D., Kalogerakis, N., 2019. Evaluation of a constructed wetland for wastewater treatment: Addressing emerging organic contaminants and antibiotic resistant bacteria. *N. Biotechnol.* 52, 94–103. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.05.006>

- CLSI, 2013. M100-S23 Performance Standards for Antimicrobial.
- Colomer-lluch, M., Imamovic, L., Jofre, J., Muniesa, M., 2011. Bacteriophages Carrying Antibiotic Resistance Genes in Fecal Waste from Cattle , Pigs , and Poultry □ 55, 4908–4911. <https://doi.org/10.1128/AAC.00535-11>
- Colomer-lluch, M., Jofre, J., Muniesa, M., 2014. Quinolone resistance genes (qnrA and qnrS) in bacteriophage particles from wastewater samples and the effect of inducing agents on packaged antibiotic resistance genes 1265–1274. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt528>
- Cummings, D.E., Archer, K.F., Arriola, D.J., Baker, P.A., Faucett, K.G., Laroya, J.B., Pfeil, K.L., Ryan, C.R., Ryan, K.R.U., Zuill, D.E., 2011. Broad dissemination of plasmid-mediated quinolone resistance genes in sediments of two urban coastal wetlands. *Environ. Sci. Technol.* 45, 447–454. <https://doi.org/10.1021/es1029206>
- De Oliveira, L.K., Fleck, J.D., Comerlato, J., Kluge, M., Bergamaschi, B., Fabres, R.B., Da Luz, R.B., Da Silva, J.V. dos S., Rodrigues, M.T., Genro, J.L., Staggemeier, R., Baldasso, N., Spilki, F.R., 2012. Enteric viruses in water samples from Brazilian dairy farms. *Agric. Water Manag.* 111, 34–39. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2012.05.001>
- Donde, O.O., Xiao, B., 2017. Understanding wastewater treatment mechanisms: A review on detection, removal, and purification efficiencies of faecal bacteria indicators across constructed wetlands. *Environ. Rev.* 25, 444–451. <https://doi.org/10.1139/er-2017-0017>
- Dunson, D.B., 2001. Commentary: Practical advantages of Bayesian analysis of epidemiologic data. *Am. J. Epidemiol.* 153, 1222–1226. <https://doi.org/10.1093/aje/153.12.1222>
- Eifan, S.A., 2013. Enteric Viruses And Aquatic Environment. *Internet J. Microbiol.* 12, 1–7.
- Enriquez, C.E., Hurst, C.J., Gerba, C.P., 1995. Survival of the enteric adenoviruses 40 and 41 in tap, sea, and waste water. *Water Res.* 29, 2548–2553. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(95\)00070-2](https://doi.org/10.1016/0043-1354(95)00070-2)
- Eucast, 2019. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0, 2019. <http://www.eucast.org>. 0–99.
- Ewess, H., 2010. Molecular Quantification of Viruses in Surface Water : Development of Indicator of Viral Molekulare Quantifizierung von Viren in Oberflächenwasser : Entwicklung eines Indikators zur Bestimmung der viralen Kontamination in Wasser Dissertation zur Erlangung 104.
- Fagan, R., McCormack, D.E., Dionysiou, D.D., Pillai, S.C., 2016. Materials Science in Semiconductor Processing A review of solar and visible light active TiO₂ photocatalysis for treating bacteria , cyanotoxins and contaminants of emerging concern. *Mater. Sci. Semicond. Process.* 42, 2–14. <https://doi.org/10.1016/j.mssp.2015.07.052>
- Fahrenfeld, N., Ma, Y., O'Brien, M., Pruden, A., 2013. Reclaimed water as a reservoir of antibiotic resistance genes: Distribution system and irrigation implications. *Front. Microbiol.* 4, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00130>
- Fang, H., Zhang, Q., Nie, X., Chen, B., Xiao, Y., Zhou, Q., Liao, W., Liang, X., 2017. Occurrence and elimination of antibiotic resistance genes in a long-term operation integrated surface flow constructed wetland. *Chemosphere* 173, 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.01.027>
- Federigi, I., Bonadonna, L., Bonanno Ferraro, G., Briancesco, R., Cioni, L., Coccia, A.M., Della Libera, S., Ferretti, E., Gramaccioni, L., Iaconelli, M., La Rosa, G., Lucentini, L., Mancini, P., Suffredini, E., Vicenza, T., Veneri, C., Verani, M., Carducci, A., 2020. Quantitative Microbial Risk Assessment as support for bathing waters profiling. *Mar. Pollut. Bull.* 157. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111318>
- Fernández, P., Blanco, J., Sichel, C., Malato, S., 2005. Water disinfection by solar photocatalysis using compound parabolic collectors. *Catal. Today* 101, 345–352. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2005.03.062>

- Ferro, G., Guarino, F., Castiglione, S., Rizzo, L., 2016. Antibiotic resistance spread potential in urban wastewater effluents disinfected by UV/H₂O₂ process. *Sci. Total Environ.* 560–561, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.04.047>
- Ficetola, G.F., Miaud, C., Pompanon, F., Taberlet, P., 2008. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biol. Lett.* 4, 423–425. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2008.0118>
- Finley, R.L., Collignon, P., Larsson, D.G.J., Mcewen, S.A., Li, X.Z., Gaze, W.H., Reid-Smith, R., Timinouni, M., Graham, D.W., Topp, E., 2013. The scourge of antibiotic resistance: The important role of the environment. *Clin. Infect. Dis.* 57, 704–710. <https://doi.org/10.1093/cid/cit355>
- Fiorentino, A., Ferro, G., Alferez, M.C., Polo-López, M.I., Fernández-Ibañez, P., Rizzo, L., 2015. Inactivation and regrowth of multidrug resistant bacteria in urban wastewater after disinfection by solar-driven and chlorination processes. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 148, 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.03.029>
- Fisher, M.B., Keenan, C.R., Nelson, K.L., Voelker, B.M., 2008. Speeding up solar disinfection (SODIS): Effects of hydrogen peroxide, temperature, pH, and copper plus ascorbate on the photoinactivation of *E. coli*. *J. Water Health* 6, 35–51. <https://doi.org/10.2166/wh.2007.005>
- Fong, T.T., Phanikumar, M.S., Xagoraki, I., Rose, J.B., 2010. Quantitative detection of human adenoviruses in wastewater and combined sewer overflows influencing a Michigan river. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 715–723. <https://doi.org/10.1128/AEM.01316-09>
- Fountoulakis, M.S., Daskalakis, G., Papadaki, A., Kalogerakis, N., Manios, T., 2017. Use of halophytes in pilot-scale horizontal flow constructed wetland treating domestic wastewater. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 16682–16689. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9295-8>
- Furukawa, T., Jikumaru, A., Ueno, T., Sei, K., 2017. Inactivation effect of antibiotic-resistant gene using chlorine disinfection. *Water (Switzerland)* 9, 1–9. <https://doi.org/10.3390/w9070547>
- García, J., Rousseau, D.P.L., Morató, J., Lesage, E., Matamoros, V., Bayona, J.M., 2010. Contaminant Removal Processes in Subsurface-Flow Constructed Wetlands: A Review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 40, 561–661. <https://doi.org/10.1080/10643380802471076>
- García, J., Vivar, J., Aromir, M., Mujeriego, R., 2003. Role of hydraulic retention time and granular medium in microbial removal in tertiary treatment reed beds. *Water Res.* 37, 2645–2653. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00066-6](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00066-6)
- Gerba, C.P., 2009. Indicator Microorganisms, Second Edi. ed, Environmental Microbiology. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370519-8.00023-7>
- Gerba, C.P., Betancourt, W.Q., 2017. Viral Aggregation: Impact on Virus Behavior in the Environment. *Environ. Sci. Technol.* 51, 7318–7325. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b05835>
- Gerba, C.P., Betancourt, W.Q., Kitajima, M., 2017. How much reduction of virus is needed for recycled water: A continuous changing need for assessment? *Water Res.* 108, 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.11.020>
- Gersberg, R.M., Lyon, S.R., Brenner, R., Elkins, B. V., 1987. Fate of viruses in artificial wetlands. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 731–736.
- Giannakis, S., Darakas, E., Escalas-Cañellas, A., Pulgarin, C., 2015. Solar disinfection modeling and post-irradiation response of *Escherichia coli* in wastewater. *Chem. Eng. J.* 281, 588–598. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.06.077>
- Giannakis, S., Le, T.T.M., Entenza, J.M., Pulgarin, C., 2018. Solar photo-Fenton disinfection of 11 antibiotic-resistant bacteria (ARB) and elimination of representative AR genes. Evidence that antibiotic resistance does not imply resistance to oxidative treatment. *Water Res.* 143, 334–345. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.06.062>

- Gomes, A.I., Vilar, V.J.P., Boaventura, R.A.R., 2009. Synthetic and natural waters disinfection using natural solar radiation in a pilot plant with CPCs. *Catal. Today* 144, 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2008.12.023>
- Gonzales-Gustavson, E., Rusiñol, M., Medema, G., Calvo, M., Girones, R., 2019. Quantitative risk assessment of norovirus and adenovirus for the use of reclaimed water to irrigate lettuce in Catalonia. *Water Res.* 153, 91–99. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.12.070>
- Goslan, E.H., Gurses, F., Banks, J., Parsons, S.A., 2006. An investigation into reservoir NOM reduction by UV photolysis and advanced oxidation processes. *Chemosphere* 65, 1113–1119. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.04.041>
- Gronewold, A.D., Vallero, D.A., 2010. Applications of Bayes' theorem for predicting environmental damage. <https://doi.org/10.1036/1097-8542.YB100249>
- Gularte, J.S., Girardi, V., Demoliner, M., de Souza, F.G., Filippi, M., Eisen, A.K.A., Mena, K.D., de Quevedo, D.M., Rigotto, C., de Barros, M.P., Spilki, F.R., 2019. Human mastadenovirus in water, sediment, sea surface microlayer, and bivalve mollusk from southern Brazilian beaches. *Mar. Pollut. Bull.* 142, 335–349. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.12.046>
- Gullberg, E., Cao, S., Berg, O.G., Ilbäck, C., Sandegren, L., Hughes, D., Andersson, D.I., 2011. Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLoS Pathog.* 7, 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002158>
- Gunathilaka, G.U., Tahlan, V., Mafiz, A.I., Polur, M., Zhang, Y., 2017. International Journal of Antimicrobial Agents Phages in urban wastewater have the potential to disseminate antibiotic resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents* 50, 678–683. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.08.013>
- Guo, B., Snow, S.D., Starr, B.J., Xagorarakis, I., Tarabara, V. V., 2018. Photocatalytic inactivation of human adenovirus 40: Effect of dissolved organic matter and prefiltration. *Sep. Purif. Technol.* 193, 193–201. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.11.012>
- Guo, C., Wang, K., Hou, S., Wan, L., Lv, J., Zhang, Y., Qu, X., Chen, S., Xu, J., 2017. H₂O₂ and/or TiO₂ photocatalysis under UV irradiation for the removal of antibiotic resistant bacteria and their antibiotic resistance genes. *J. Hazard. Mater.* 323, 710–718. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.10.041>
- Guo, M.T., Yuan, Q. Bin, Yang, J., 2015. Distinguishing effects of ultraviolet exposure and chlorination on the horizontal transfer of antibiotic resistance genes in municipal wastewater. *Environ. Sci. Technol.* 49, 5771–5778. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b00644>
- Hackenberger, B.K., 2019. Bayes or not bayes, is this the question? *Croat. Med. J.* 60, 50–52. <https://doi.org/10.3325/cmj.2019.60.50>
- Hamza, I.A., Jurzik, L., Stang, A., Sure, K., Berla, K., Wilhelm, M., 2009. Detection of human viruses in rivers of a densely-populated area in Germany using a virus adsorption elution method optimized for PCR analyses. *Water Res.* 43, 2657–2668. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.03.020>
- Haramoto, E., Fujino, S., Otagiri, M., 2015. Science of the Total Environment Distinct behaviors of infectious F-specific RNA coliphage genogroups at a wastewater treatment plant. *Sci. Total Environ.* 520, 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.03.034>
- Haramoto, E., Kitajima, M., Katayama, H., Ohgaki, S., 2010. Real-time PCR detection of adenoviruses, polyomaviruses, and torque teno viruses in river water in Japan. *Water Res.* 44, 1747–1752. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.11.043>
- Hasegawa, H., Suzuki, E., Maeda, S., 2018. Horizontal Plasmid Transfer by Transformation in *Escherichia coli* : Environmental Factors and Possible Mechanisms 9, 1–6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02365>

- Hassan, M.S., Amna, T., Kim, H.Y., Khil, M.S., 2013. Enhanced bactericidal effect of novel CuO/TiO₂ composite nanorods and a mechanism thereof. *Compos. Part B Eng.* 45, 904–910. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2012.09.009>
- Hata, A., Kitajima, M., Katayama, H., 2013. Occurrence and reduction of human viruses, F-specific RNA coliphage genogroups and microbial indicators at a full-scale wastewater treatment plant in Japan. *J. Appl. Microbiol.* 114, 545–554. <https://doi.org/10.1111/jam.12051>
- He, L.Y., Ying, G.G., Liu, Y.S., Su, H.C., Chen, J., Liu, S.S., Zhao, J.L., 2016. Discharge of swine wastes risks water quality and food safety: Antibiotics and antibiotic resistance genes from swine sources to the receiving environments. *Environ. Int.* 92–93, 210–219. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.03.023>
- Helt, C.D., Weber, K.P., Legge, R.L., Slawson, R.M., 2012. Antibiotic resistance profiles of representative wetland bacteria and faecal indicators following ciprofloxacin exposure in lab-scale constructed mesocosms. *Ecol. Eng.* 39, 113–122. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2011.11.007>
- Hong, P.Y., Julian, T.R., Pyper, M.L., Jiang, S.C., Nelson, K.L., Graham, D., Pruden, A., Manaia, C.M., 2018. Reusing treated wastewater: Consideration of the safety aspects associated with antibiotic-resistant bacteria and antibiotic resistance genes. *Water (Switzerland)* 10. <https://doi.org/10.3390/w10030244>
- Horovitz, I., Avisar, D., Luster, E., Lozzi, L., Luxbacher, T., Mamane, H., 2018. MS2 bacteriophage inactivation using a N-doped TiO₂-coated photocatalytic membrane reactor: Influence of water-quality parameters. *Chem. Eng. J.* 354, 995–1006. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.08.083>
- Huang, J.J., Hu, H.Y., Tang, F., Li, Y., Lu, S.Q., Lu, Y., 2011. Inactivation and reactivation of antibiotic-resistant bacteria by chlorination in secondary effluents of a municipal wastewater treatment plant. *Water Res.* 45, 2775–2781. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.02.026>
- Huang, J.J., Hu, H.Y., Wu, Y.H., Wei, B., Lu, Y., 2013. Effect of chlorination and ultraviolet disinfection on tetA-mediated tetracycline resistance of *Escherichia coli*. *Chemosphere* 90, 2247–2253. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.10.008>
- Hughes, D., Andersson, D.I., 2012. Selection of resistance at lethal and non-lethal antibiotic concentrations. *Curr. Opin. Microbiol.* 15, 555–560. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2012.07.005>
- Hui, F.K.C., 2016. boral – Bayesian Ordination and Regression Analysis of Multivariate Abundance Data in R. *Methods Ecol. Evol.* 7, 744–750. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12514>
- Ibekwe, A.M., Murinda, S.E., Debroy, C., Reddy, G.B., 2016. Potential pathogens, antimicrobial patterns and genotypic diversity of *Escherichia coli* isolates in constructed wetlands treating swine wastewater 1–14. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw006>
- Imamovic, L., Ballesté, E., Jofre, J., Muniesa, M., 2010. Quantification of Shiga toxin-converting bacteriophages in wastewater and in fecal samples by real-time quantitative PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 5693–5701. <https://doi.org/10.1128/AEM.00107-10>
- Ito, T., Kato, T., Hasegawa, M., Katayama, H., Ishii, S., Okabe, S., Sano, D., 2016. Evaluation of virus reduction efficiency in wastewater treatment unit processes as a credit value in the multiple barrier system for wastewater reclamation and reuse. *J. Water Health* 14, 879–889. <https://doi.org/10.2166/wh.2016.096>
- Jacobs, L., Chenia, H.Y., 2007. Characterization of integrons and tetracycline resistance determinants in *Aeromonas* spp. isolated from South African aquaculture systems. *Int. J. Food Microbiol.* 114, 295–306. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.09.030>
- Jamal, R., Mubarak, S., Sahulka, S.Q., Kori, J.A., Tajammul, A., Ahmed, J., Mahar, R.B., Olsen, M.S., Goel, R., Weidhaas, J., 2020. Informing water distribution line rehabilitation through quantitative microbial risk assessment. *Sci. Total Environ.* 739. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140021>

- Jasper, J.T., Sedlak, D.L., Sharp, J.O., Luthy, R.G., Horne, A.J., Nelson, K.L., Al, J.E.T., 2013. Unit Process Wetlands for Removal of Trace Organic Contaminants and Pathogens from Municipal Wastewater Effluent 30. <https://doi.org/10.1089/ees.2012.0239>
- Jiang, S.C., 2006. Human adenoviruses in water: Occurrence and health implications: A critical review. *Environ. Sci. Technol.* 40, 7132–7140. <https://doi.org/10.1021/es060892o>
- Jofre, J., Lucena, F., Blanch, A.R., Muniesa, M., 2016. Coliphages as model organisms in the characterization and management of water resources. *Water (Switzerland)* 8, 1–21. <https://doi.org/10.3390/w8050199>
- Kadir, K., Nelson, K.L., 2014. Sunlight mediated inactivation mechanisms of *Enterococcus faecalis* and *Escherichia coli* in clear water versus waste stabilization pond water. *Water Res.* 50, 307–317. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.10.046>
- Kadlec, R.H., 2009. Comparison of free water and horizontal subsurface treatment wetlands. *Ecol. Eng.* 35, 159–174. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2008.04.008>
- Kadlec, R.H., Wallace, S., 2008. Treatment Wetlands, Treatment Wetlands. <https://doi.org/10.1201/9781420012514>
- Kanigariidou, Y., Petala, A., Frontistis, Z., Antonopoulou, M., Solakidou, M., Konstantinou, I., Deligiannakis, Y., Mantzavinos, D., Kondarides, D.I., 2017a. Solar photocatalytic degradation of bisphenol A with CuOx/BiVO4: Insights into the unexpectedly favorable effect of bicarbonates. *Chem. Eng. J.* 318, 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.04.145>
- Kanigariidou, Y., Petala, A., Frontistis, Z., Antonopoulou, M., Solakidou, M., Konstantinou, I., Deligiannakis, Y., Mantzavinos, D., Kondarides, D.I., 2017b. Solar photocatalytic degradation of bisphenol A with CuOx/BiVO4: Insights into the unexpectedly favorable effect of bicarbonates. *Chem. Eng. J.* 318, 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.04.145>
- Karaolia, P., Michael-Kordatou, I., Hapeshi, E., Drosou, C., Bertakis, Y., Christofilos, D., Armatas, G.S., Sygellou, L., Schwartz, T., Xekoukoulotakis, N.P., Fatta-Kassinos, D., 2018. Removal of antibiotics, antibiotic-resistant bacteria and their associated genes by graphene-based TiO2 composite photocatalysts under solar radiation in urban wastewaters. *Appl. Catal. B Environ.* <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2017.11.020>
- Karathanasis, A.D., Potter, C.L., Coyne, M.S., 2003. Vegetation effects on fecal bacteria, BOD, and suspended solid removal in constructed wetlands treating domestic wastewater. *Ecol. Eng.* 20, 157–169. [https://doi.org/10.1016/S0925-8574\(03\)00011-9](https://doi.org/10.1016/S0925-8574(03)00011-9)
- Katayama, H., Haramoto, E., Oguma, K., Yamashita, H., Tajima, A., Nakajima, H., Ohgaki, S., 2008. One-year monthly quantitative survey of noroviruses, enteroviruses, and adenoviruses in wastewater collected from six plants in Japan. *Water Res.* 42, 1441–1448. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.10.029>
- Kern, M.B., 2002. Susceptibility of Danish *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections and bacteraemia, and distribution of sul genes conferring sulphonamide resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 50, 513–516. <https://doi.org/10.1093/jac/dkf164>
- Khoshravesh, M., Sefidkouhi, M.A.G., Valipour, M., 2017. Estimation of reference evapotranspiration using multivariate fractional polynomial, Bayesian regression, and robust regression models in three arid environments. *Appl. Water Sci.* 7, 1911–1922. <https://doi.org/10.1007/s13201-015-0368-x>
- Kitajima, M., Iker, B.C., Pepper, I.L., Gerba, C.P., 2014. Relative abundance and treatment reduction of viruses during wastewater treatment processes - Identification of potential viral indicators. *Sci. Total Environ.* 488–489, 290–296. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.04.087>
- Kouamé, P.K., Nguyen-Viet, H., Dongo, K., Zurbrugg, C., Biémi, J., Bonfoh, B., 2017. Microbiological risk infection assessment using QMRA in agriculture systems in Côte d’Ivoire, West Africa. *Environ. Monit. Assess.* 189. <https://doi.org/10.1007/s10661-017-6279-6>

- Kumar, S.B., Arnipalli, S.R., Ziouzenkova, O., 2020. Antibiotics in food chain: The consequences for antibiotic resistance. *Antibiotics* 9, 1–26. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9100688>
- Laxma, P.V., Kavitha, B., Anil, P., Reddy, K., Kim, K., 2017. TiO₂ -based photocatalytic disinfection of microbes in aqueous media : A review 154, 296–303. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.01.018>
- Lekunberri, I., Villagrasa, M., Balcázar, J.L., Borrego, C.M., 2017. Contribution of bacteriophage and plasmid DNA to the mobilization of antibiotic resistance genes in a river receiving treated wastewater discharges. *Sci. Total Environ.* 601–602, 206–209. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.174>
- Li, H., Hong, W., Cui, Y., Hu, X., Fan, S., Zhu, L., 2014. Enhancement of the visible light photocatalytic activity of Cu₂O/BiVO₄ catalysts synthesized by ultrasonic dispersion method at room temperature. *Mater. Sci. Eng. B Solid-State Mater. Adv. Technol.* 181, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.mseb.2013.11.001>
- Liga, M. V, Bryant, E.L., Colvin, V.L., Li, Q., 2010. Virus inactivation by silver doped titanium dioxide nanoparticles for drinking water treatment. *Water Res.* 45, 535–544. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.09.012>
- Lin, J., Ganesh, A., 2013. Water quality indicators: bacteria, coliphages, enteric viruses. *Int. J. Environ. Health Res.* 23, 484–506. <https://doi.org/10.1080/09603123.2013.769201>
- Lin, W., Zhang, M., Zhang, S., Yu, X., 2016. Can chlorination co-select antibiotic-resistance genes? *Chemosphere* 156, 412–419. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.04.139>
- Lisa Lindesmith, Christine Moe, Severine Marionneau Ruvoen, Nathalie, Xi Jiang , Lauren Lindblad, Paul Stewart, Jacques Lependu Baric, & R., 2003. Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nat Med* 9, 548–553. <https://doi.org/10.1038/nm>
- Liu, S.S., Qu, H.M., Yang, D., Hu, H., Liu, W.L., Qiu, Z.G., Hou, A.M., Guo, J., Li, J.W., Shen, Z.Q., Jin, M., 2018. Chlorine disinfection increases both intracellular and extracellular antibiotic resistance genes in a full-scale wastewater treatment plant. *Water Res.* 136, 131–136. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.02.036>
- Love, D.C., Silverman, A., Nelson, K.L., 2010. Human virus and bacteriophage inactivation in clear water by simulated sunlight compared to bacteriophage inactivation at a Southern California beach. *Environ. Sci. Technol.* 44, 6965–6970. <https://doi.org/10.1021/es1001924>
- Lu, Z., Na, G., Gao, H., Wang, L., Bao, C., Yao, Z., 2015. Fate of sulfonamide resistance genes in estuary environment and effect of anthropogenic activities. *Sci. Total Environ.* 527–528, 429–438. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.04.101>
- Luo, Z., Poyraz, A.S., Kuo, C., Miao, R., Meng, Y., Chen, S., Jiang, T., Wenos, C., Suib, S.L., 2015. Crystalline Mixed Phase (Anatase / Rutile) Mesoporous Titanium Dioxides for Visible Light Photocatalytic Activity. *Chem. Mater.* 27, 6–17. <https://doi.org/10.1051/0004-6361>
- Lv, L., Jiang, T., Zhang, S., Yu, X., 2014. Exposure to mutagenic disinfection byproducts leads to increase of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Sci. Technol.* 48, 8188–8195. <https://doi.org/10.1021/es501646n>
- M. Agulló-Barceló, M.I. Polo-López, F. Lucenab, J. Jofreb, P.F.-I., 2013. Applied Catalysis B : Environmental Solar Advanced Oxidation Processes as disinfection tertiary treatments for real wastewater : Implications for water reclamation 137, 341–350. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2013.01.069>
- Malato, R., Gálvez, J.B., Rubio, M.I.M., Ibáñez, P.F., Padilla, D.A., Pereira, M.C., Mendes, J.F., De Oliveira, J.C., 2004. Engineering of solar photocatalytic collectors. *Sol. Energy* 77, 513–524. <https://doi.org/10.1016/j.solener.2004.03.020>
- Malato, S., Blanco, J., Alarcón, D.C., Maldonado, M.I., Fernández-Ibáñez, P., Gernjak, W., 2007.

- Photocatalytic decontamination and disinfection of water with solar collectors. *Catal. Today* 122, 137–149. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2007.01.034>
- Malato, S., Fernández-Ibañez, P., Maldonado, M.I., Blanco, J., Gernjak, W., 2009. Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: Recent overview and trends. *Catal. Today* 147, 1–59. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2009.06.018>
- Mao, D., Luo, Y., Mathieu, J., Wang, Q., Feng, L., Mu, Q., Feng, C., Alvarez, P.J.J., 2014. Persistence of extracellular DNA in river sediment facilitates antibiotic resistance gene propagation. *Environ. Sci. Technol.* 48, 71–78. <https://doi.org/10.1021/es404280v>
- Mao, D., Yu, S., Rysz, M., Luo, Y., Yang, F., Li, F., Hou, J., Mu, Q., Alvarez, P.J.J., 2015. Prevalence and proliferation of antibiotic resistance genes in two municipal wastewater treatment plants. *Water Res.* 85, 458–466. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.09.010>
- Marti, E., Variatza, E., Balcázar, J.L., 2014. Bacteriophages as a reservoir of extended-spectrum β -lactamase and fluoroquinolone resistance genes in the environment. *Clin. Microbiol. Infect.* 20. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12446>
- Martínez, J.L., Coque, T.M., Baquero, F., 2015. What is a resistance gene? Ranking risk in resistomes. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 116–123. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3399>
- Marugán, J., van Grieken, R., Sordo, C., Cruz, C., 2008. Kinetics of the photocatalytic disinfection of *Escherichia coli* suspensions. *Appl. Catal. B Environ.* 82, 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2008.01.002>
- Masciopinto, C., Vurro, M., Lorusso, N., Santoro, D., Haas, C.N., 2020. Application of QMRA to MAR operations for safe agricultural water reuses in coastal areas. *Water Res. X* 8. <https://doi.org/10.1016/j.wroa.2020.100062>
- Mayo, A.W., 2004. Kinetics of bacterial mortality in granular bed wetlands. *Phys. Chem. Earth* 29, 1259–1264. <https://doi.org/10.1016/j.pce.2004.09.030>
- McCullagh, C., Robertson, J.M.C., Bahnemann, D.W., Robertson, P.K.J., 2007. The application of TiO₂ photocatalysis for disinfection of water contaminated with pathogenic micro-organisms: a review. *Res. Chem. Intermed.* 33, 359–375. <https://doi.org/10.1163/156856707779238775>
- McGuigan, K.G., Conroy, R.M., Mosler, H.J., du Preez, M., Ubomba-Jaswa, E., Fernandez-Ibañez, P., 2012. Solar water disinfection (SODIS): A review from bench-top to roof-top. *J. Hazard. Mater.* 235–236, 29–46. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.07.053>
- Mcminn, B.R., Ashbolt, N.J., Korajkic, A., States, U., Agency, E.P., 2018. Bacteriophages as indicators of fecal pollution and enteric virus removal. <https://doi.org/10.1111/lam.12736>. Submit
- Min, S., Wang, F., Jin, Z., Xu, J., 2014. Cu₂O nanoparticles decorated BiVO₄ as an effective visible-light-driven p-n heterojunction photocatalyst for methylene blue degradation. *Superlattices Microstruct.* 74, 294–307. <https://doi.org/10.1016/j.spmi.2014.07.003>
- Miranda-García, N., Suárez, S., Sánchez, B., Coronado, J.M., Malato, S., Maldonado, M.I., 2011. Photocatalytic degradation of emerging contaminants in municipal wastewater treatment plant effluents using immobilized TiO₂ in a solar pilot plant. *Appl. Catal. B Environ.* 103, 294–301. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2011.01.030>
- Misstear, D.B., Gill, L.W., 2012. Journal of Photochemistry and Photobiology B : Biology The inactivation of phages MS2 , U X174 and PR772 using UV and solar photocatalysis. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 107, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2011.10.012>
- Misstear, D.B., Murtagh, J.P., Gill, L.W., 2013. The Effect of Dark Periods on the UV Photolytic and Photocatalytic Disinfection of *Escherichia coli* in a Continuous Flow Reactor. *J. Sol. Energy Eng.* 135, 021012. <https://doi.org/10.1115/1.4023179>
- Morató, J., Codony, F., Sánchez, O., Pérez, L.M., García, J., Mas, J., 2014a. Key design factors

- affecting microbial community composition and pathogenic organism removal in horizontal subsurface flow constructed wetlands. *Sci. Total Environ.* 481, 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.01.068>
- Morató, J., Codony, F., Sánchez, O., Pérez, L.M., García, J., Mas, J., 2014b. Key design factors affecting microbial community composition and pathogenic organism removal in horizontal subsurface flow constructed wetlands. *Sci. Total Environ.* 481, 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.01.068>
- Nakano, R., Ishiguro, H., Yao, Y., Kajioka, J., Fujishima, A., Sunada, K., Minoshima, M., Hashimoto, K., Kubota, Y., 2012. Photocatalytic inactivation of influenza virus by titanium dioxide thin film. *Photochem. Photobiol. Sci.* 11, 1293–1298. <https://doi.org/10.1039/c2pp05414k>
- Nokes, R.L., Gerba, C.P., Karpiscak, M.M., 2003. Microbial water quality improvement by small scale on-site subsurface wetland treatment. *J. Environ. Sci. Heal. - Part A Toxic/Hazardous Subst. Environ. Eng.* 38, 1849–1855. <https://doi.org/10.1081/ESE-120022883>
- Nölvak, H., Truu, M., Tiirik, K., Oopkaup, K., Sildvee, T., Kaasik, A., Mander, Ü., Truu, J., 2013. Dynamics of antibiotic resistance genes and their relationships with system treatment efficiency in a horizontal subsurface flow constructed wetland. *Sci. Total Environ.* 461–462, 636–644. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.05.052>
- Oates, P.M., Shanahan, P., Polz, M.F., 2003. Solar disinfection (SODIS): Simulation of solar radiation for global assessment and application for point-of-use water treatment in Haiti. *Water Res.* 37, 47–54. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00241-5](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00241-5)
- Oh, J., Salcedo, D.E., Medriano, C.A., Kim, S., 2014. Comparison of different disinfection processes in the effective removal of antibiotic-resistant bacteria and genes. *J. Environ. Sci. (China)* 26, 1238–1242. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(13\)60594-X](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(13)60594-X)
- Olaitan, A.O., Rolain, J.-M., 2016. Ancient Resistome. *Microbiol. Spectr.* 1–6. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.PoH>
- Olive, M., Gan, C., Carratalà, A., Kohn, T., 2020. Control of waterborne human viruses by indigenous bacteria and protists is influenced by temperature, virus type, and microbial species. *Appl. Environ. Microbiol.* 86, 1–12. <https://doi.org/10.1128/AEM.01992-19>
- Osuolale, O., Okoh, A., 2015. Incidence of human adenoviruses and Hepatitis A virus in the final effluent of selected wastewater treatment plants in Eastern Cape Province, South Africa. *Virol. J.* 12, 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12985-015-0327-z>
- Park, C.H., Robicsek, A., Jacoby, G.A., Sahm, D., Hooper, D.C., 2006. Prevalence in the United States of *aac(6)-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 3953–3955. <https://doi.org/10.1128/AAC.00915-06>
- Paulo, M.J., Van Der Voet, H., Jansen, M.J.W., Ter Braak, C.J.F., Van Klaveren, J.D., 2005. Risk assessment of dietary exposure to pesticides using a Bayesian method. *Pest Manag. Sci.* 61, 759–766. <https://doi.org/10.1002/ps.1060>
- Pei, M., Zhang, B., He, Y., Su, J., Gin, K., Lev, O., Shen, G., Hu, S., 2019. State of the art of tertiary treatment technologies for controlling antibiotic resistance in wastewater treatment plants. *Environ. Int.* 131, 105026. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105026>
- Pham, T.D., Lee, B.K., 2015. Disinfection of *Staphylococcus aureus* in indoor aerosols using Cu-TiO₂ deposited on glass fiber under visible light irradiation. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 307–308, 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2015.04.002>
- 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, 3376–3382.
- Pinon, A., Vialette, M., 2019. Survival of viruses in water. *Intervirology* 61, 214–222.

<https://doi.org/10.1159/000484899>

- Polo-López, M.I., Fernández-Ibáñez, P., Ubomba-Jaswa, E., Navntoft, C., García-Fernández, I., Dunlop, P.S.M., Schmid, M., Byrne, J.A., McGuigan, K.G., 2011. Elimination of water pathogens with solar radiation using an automated sequential batch CPC reactor. *J. Hazard. Mater.* 196, 16–21. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.08.052>
- Puig, M., Jofre, J., Lucena, F., Allard, A., Wadell, G., Gironés, R., 1994. Detection of adenovirus and enterovirus in polluted waters by nested PCR amplification. *Appl. Environ. Microbiology* 60, 2963–2970. [https://doi.org/10.1016/0273-1223\(95\)00291-T](https://doi.org/10.1016/0273-1223(95)00291-T)
- Rachmadi, A.T., Kitajima, M., Pepper, I.L., Gerba, C.P., 2016. Enteric and indicator virus removal by surface flow wetlands. *Sci. Total Environ.* 542, 976–982. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.11.001>
- Rafrat, I.D., Lekunberri, I., Sánchez-Melsió, A., Aouni, M., Borrego, C.M., Balcázar, J.L., 2016. Abundance of antibiotic resistance genes in five municipal wastewater treatment plants in the Monastir Governorate, Tunisia. *Environ. Pollut.* 219, 353–358. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.10.062>
- Rames, E., Roiko, A., Stratton, H., Macdonald, J., 2016. Technical aspects of using human adenovirus as a viral water quality indicator. *Water Res.* 96, 308–326. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.03.042>
- Reinoso, R., Torres, L.A., Bécares, E., 2008. Efficiency of natural systems for removal of bacteria and pathogenic parasites from wastewater. *Sci. Total Environ.* 395, 80–86. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.02.039>
- Rincón, A.G., Pulgarin, C., 2007. Absence of *E. coli* regrowth after Fe³⁺ and TiO₂ solar photoassisted disinfection of water in CPC solar photoreactor. *Catal. Today* 124, 204–214. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2007.03.039>
- Rincón, A.G., Pulgarin, C., 2004. Effect of pH, inorganic ions, organic matter and H₂O₂ on *E. coli* K12 photocatalytic inactivation by TiO₂: Implications in solar water disinfection. *Appl. Catal. B Environ.* 51, 283–302. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2004.03.007>
- Rincón, A.G., Pulgarin, C., 2003. Photocatalytic inactivation of *E. coli*: Effect of (continuous-intermittent) light intensity and of (suspended-fixed) TiO₂ concentration. *Appl. Catal. B Environ.* 44, 263–284. [https://doi.org/10.1016/S0926-3373\(03\)00076-6](https://doi.org/10.1016/S0926-3373(03)00076-6)
- Rivest, R.L., Shen, E., 2012. A Bayesian method for auditing elections. 2012 Electron. Voting Technol. Work. Trust. Elections, EVT/WOTE 2012.
- Rodríguez-Martínez, J.M., Pascual, A., García, I., Martínez-Martínez, L., 2003. Detection of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant qnr among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing AmpC-type β -lactamase. *J. Antimicrob. Chemother.* 52, 703–706. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg388>
- Russo, N., Pino, A., Toscano, A., Cirelli, G.L., Caggia, C., Arioli, S., Randazzo, C.L., 2019. Bioresource Technology Occurrence , diversity , and persistence of antibiotic resistant enterococci in full-scale constructed wetlands treating urban wastewater in Sicily. *Bioresour. Technol.* 274, 468–478. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.017>
- Sambrook J, R.D., 2006. Standard Ethanol Precipitation of DNA in Microcentrifuge Tubes.
- Sanderson, H., Fricker, C., Brown, R.S., Majury, A., Liss, S.N., 2016. Antibiotic resistance genes as an emerging environmental contaminant. *Environ. Rev.* 24, 205–218. <https://doi.org/10.1139/er-2015-0069>
- Schwartz, T., Kohnen, W., Jansen, B., Obst, U., 2003. Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in. *Microbiol. Ecol.* 43, 325–335.

- Sharma, R., Uma, Singh, S., Verma, A., Khanuja, M., 2016. Visible light induced bactericidal and photocatalytic activity of hydrothermally synthesized BiVO₄ nano-octahedrals. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 162, 266–272. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.06.035>
- Shelef, O., Gross, A., Rachmilevitch, S., 2013. Role of plants in a constructed Wetland: Current and new perspectives. *Water (Switzerland)* 5, 405–419. <https://doi.org/10.3390/w5020405>
- Shen, X., Sun, T., 2012. Applications of Bayesian modeling to simulate ecosystem metabolism in response to hydrologic alteration and climate change in the Yellow River Estuary, China. *Procedia Environ. Sci.* 13, 790–796. <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2012.01.072>
- Shi, P., Jia, S., Zhang, X.X., Zhang, T., Cheng, S., Li, A., 2013. Metagenomic insights into chlorination effects on microbial antibiotic resistance in drinking water. *Water Res.* 47, 111–120. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.09.046>
- Shingare, R.P., Thawale, P.R., Raghunathan, K., Mishra, A., Kumar, S., 2019. Constructed wetland for wastewater reuse: Role and efficiency in removing enteric pathogens. *J. Environ. Manage.* 246, 444–461. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.05.157>
- Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Marubayashi, T., Murai, K., 2016. Science of the Total Environment Investigation of enteric adenovirus and poliovirus removal by coagulation processes and suitability of bacteriophages MS2 and φ X174 as surrogates for those viruses. *Sci. Total Environ.* 563–564, 29–39. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.04.090>
- Sidrach-Cardona, R., Bécares, E., 2013. Fecal indicator bacteria resistance to antibiotics in experimental constructed wetlands. *Ecol. Eng.* 50, 107–111. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2012.01.001>
- Silva, H.D., Garc??a-Zapata, M.T.A., Anuncia??o, C.E., 2011. Why the Use of Adenoviruses as Water Quality Virologic Marker? *Food Environ. Virol.* 3, 138–140. <https://doi.org/10.1007/s12560-011-9069-2>
- Simmons, F.J., Xagoraki, I., 2011. Release of infectious human enteric viruses by full-scale wastewater utilities. *Water Res.* 45, 3590–3598. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.04.001>
- Solano, M.L., Soriano, P., Ciria, M.P., 2004. Constructed Wetlands as a Sustainable Solution for Wastewater Treatment in Small Villages. *Biosyst. Eng.* 87, 109–118. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2003.10.005>
- Sonohara, R., Muramatsu, N., Ohshima, H., Kondo, T., 1995. Difference in surface properties between *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* as revealed by electrophoretic mobility measurements. *Biophys. Chem.* 55, 273–277. [https://doi.org/10.1016/0301-4622\(95\)00004-H](https://doi.org/10.1016/0301-4622(95)00004-H)
- Speldooren, R.I.E., Heym, B., Labia, R., 1998. Discriminatory Detection of Inhibitor-Resistant β -Lactamases in *Escherichia coli* by Single-Strand Conformation Polymorphism-PCR 42, 879–884.
- Staggemeier, R., Heck, T.M.S., Demoliner, M., Ritzel, R.G.F., Röhnelt, N.M.S., Girardi, V., Venker, C.A., Spilki, F.R., 2017. Enteric viruses and adenovirus diversity in waters from 2016 Olympic venues. *Sci. Total Environ.* 586, 304–312. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.223>
- Stevik, T.K., Aa, K., Ausland, G., Hanssen, J.F., 2004. Retention and removal of pathogenic bacteria in wastewater percolating through porous media: A review. *Water Res.* 38, 1355–1367. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2003.12.024>
- Subirats, J., Sánchez-Melsió, A., Borrego, C.M., Balcázar, J.L., Simonet, P., 2016. Metagenomic analysis reveals that bacteriophages are reservoirs of antibiotic resistance genes. *Int. J. Antimicrob. Agents* 48, 163–167. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.04.028>
- Sun, D., 2018. Pull in and Push Out : Mechanisms of Horizontal Gene Transfer in Bacteria 9, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02154>
- Sunger, N., Hamilton, K.A., Morgan, P.M., Haas, C.N., 2019. Comparison of pathogen-derived ‘total

- risk' with indicator-based correlations for recreational (swimming) exposure. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 26, 30614–30624. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1881-x>
- Tanner, C.C., Sukias, J.P.S., Headley, T.R., Yates, C.R., Stott, R., 2012. Constructed wetlands and denitrifying bioreactors for on-site and decentralised wastewater treatment: Comparison of five alternative configurations. *Ecol. Eng.* 42, 112–123. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2012.01.022>
- Templeton, M.R., Andrews, R.C., Hofmann, R., 2008. Particle-associated viruses in water: Impacts on disinfection processes. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 38, 137–164. <https://doi.org/10.1080/10643380601174764>
- Tennstedt, T., Szczepanowski, R., Krahn, I., Pühler, A., Schlüter, A., 2005. Sequence of the 68,869 bp IncP-1 α plasmid pTB11 from a waste-water treatment plant reveals a highly conserved backbone, a Tn402-like integron and other transposable elements. *Plasmid* 53, 218–238. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2004.09.004>
- Theng-Theng Fong and Erin K. Lipp, 2005. Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: Health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69, 357–371. <https://doi.org/10.1128/MMBR.69.2.357>
- Thurston, J.A., Gerba, C.P., Foster, K.E., Karpiscak, M.M., 2001. Fate of indicator microorganisms, giardia and cryptosporidium in subsurface flow constructed wetlands. *Water Res.* 35, 1547–1551. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00414-0](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00414-0)
- Tilley, E., Lüthi, C., Morel, A., Zurbrügg, C., Schertenleib, R., 2008. Compendium of Sanitation Systems and Technologies. Development 158.
- Tong, Y., Shi, G., Hu, G., Hu, X., Han, L., Xie, X., Xu, Y., Zhang, R., Sun, J., Zhong, J., 2021. Photo-catalyzed TiO₂ inactivates pathogenic viruses by attacking viral genome. *Chem. Eng. J.* 414, 128788. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.128788>
- Upadhyay, A.K., Bankoti, N.S., Rai, U.N., 2016. Studies on sustainability of simulated constructed wetland system for treatment of urban waste: Design and operation. *J. Environ. Manage.* 169, 285–292. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.01.004>
- USEPA, 2012. Method 1615: Measurement of Enterovirus and Norovirus occurrence in water by culture and RT-qPCR.
- Van de Schoot, R., Kaplan, D., Denissen, J., Asendorpf, J.B., Neyer, F.J., van Aken, M.A.G., 2014. A Gentle Introduction to Bayesian Analysis: Applications to Developmental Research. *Child Dev.* 85, 842–860. <https://doi.org/10.1111/cdev.12169>
- van Grieken, R., Marugán, J., Sordo, C., Pablos, C., 2009. Comparison of the photocatalytic disinfection of *E. coli* suspensions in slurry, wall and fixed-bed reactors. *Catal. Today* 144, 48–54. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2008.11.017>
- Venieri, D., Fraggadaki, A., Kostadima, M., Chatzisyneon, E., Binas, V., Zachopoulos, A., Kiriakidis, G., Mantzavinos, D., 2014. Solar light and metal-doped TiO₂ to eliminate water-transmitted bacterial pathogens: Photocatalyst characterization and disinfection performance. *Appl. Catal. B Environ.* 154–155, 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2014.02.007>
- Venieri, D., Gounaki, I., Bikouvaraki, M., Binas, V., Zachopoulos, A., Kiriakidis, G., Mantzavinos, D., 2017. Solar photocatalysis as disinfection technique: Inactivation of *Klebsiella pneumoniae* in sewage and investigation of changes in antibiotic resistance profile. *J. Environ. Manage.* 195. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.06.009>
- Venieri, D., Gounaki, I., Binas, V., Zachopoulos, A., Kiriakidis, G., Mantzavinos, D., 2015. Inactivation of MS2 coliphage in sewage by solar photocatalysis using metal-doped TiO₂. *Appl. Catal. B Environ.* 178, 54–64. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2014.10.052>
- Venieri, D., Mantzavinos, D., 2017a. Disinfection of Waters/Wastewaters by Solar Photocatalysis, in: *Advances in Photocatalytic Disinfection*. pp. 177–198. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-53496-6>

- Venieri, D., Mantzavinos, D., 2017b. Disinfection of Waters / Wastewaters by Solar Photocatalysis. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-53496-0>
- Vergara, G.G.R. V, Goh, S.G., Rezaeinejad, S., Chang, S.Y., Sobsey, M.D., Gin, K.Y.H., 2015. Evaluation of FRNA coliphages as indicators of human enteric viruses in a tropical urban freshwater catchment. *Water Res.* 79, 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.04.022>
- Vidal, A., Alarc, D., Malato, S., Maldonado, M.I., Julia, C., Gernjak, W., 2003. Applied studies in solar photocatalytic detoxification : an overview 75, 329–336. <https://doi.org/10.1016/j.solener.2003.07.017>
- Vila-Costa, M., Gioia, R., Aceña, J., Pérez, S., Casamayor, E.O., Dachs, J., 2017. Degradation of sulfonamides as a microbial resistance mechanism. *Water Res.* 115, 309–317. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.03.007>
- Vymazal, J., 2014. Constructed wetlands for treatment of industrial wastewaters: A review. *Ecol. Eng.* 73, 724–751. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2014.09.034>
- Vymazal, J., 2009. The use constructed wetlands with horizontal sub-surface flow for various types of wastewater. *Ecol. Eng.* 35, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2008.08.016>
- Vymazal, J., 2005. Removal of enteric bacteria in constructed treatment wetlands with emergent macrophytes: A review. *J. Environ. Sci. Heal. - Part A Toxic/Hazardous Subst. Environ. Eng.* 40, 1355–1367. <https://doi.org/10.1081/ESE-200055851>
- Wang, H., Lewis, J.P., 2006. Second-generation photocatalytic materials: anion-doped TiO₂. *J. Phys. Condens. Matter* 18, 421–434. <https://doi.org/10.1088/0953-8984/18/2/006>
- Wang, W., Huang, G., Yu, J.C., Wong, P.K., 2015. Advances in photocatalytic disinfection of bacteria : Development of photocatalysts and mechanisms ScienceDirect Invited article Development of photocatalysts and mechanisms. *JES* 34, 232–247. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2015.05.003>
- Weber, K.P., Legge, R.L., 2008. Pathogen Removal in Constructed Wetlands, *Wetlands: Ecology, Conservation & Restoration*. https://doi.org/doi.org/10.1007/978-3-319-41811-7_17
- Whalley, N.A., Walters, S., Hammond, K., 2018. Molecular Cell Biology. *Mol. Med. Clin.* 37–49. <https://doi.org/10.18772/22008014655.9>
- WHO, 2014. Antimicrobial resistance.
- Wu, H., Zhang, J., Ngo, H.H., Guo, W., Hu, Z., Liang, S., Fan, J., Liu, H., 2015. A review on the sustainability of constructed wetlands for wastewater treatment: Design and operation. *Bioresour. Technol.* 175, 594–601. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.068>
- Wu, S., Carvalho, P.N., M??ller, J.A., Manoj, V.R., Dong, R., 2016. Sanitation in constructed wetlands: A review on the removal of human pathogens and fecal indicators. *Sci. Total Environ.* 541, 8–22. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.047>
- Wyn-Jones, A.P., Sellwood, J., 2001. A review: Enteric viruses in the aquatic environment. *J. Appl. Microbiol.* 91, 945–962. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01470.x>
- Xu, H., Li, H., Wu, C., Chu, J., Yan, Y., Shu, H., Gu, Z., 2008. Preparation, characterization and photocatalytic properties of Cu-loaded BiVO₄. *J. Hazard. Mater.* 153, 877–884. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.09.039>
- Yin, W., Wei, S., Al-jassim, M.M., Yan, Y., 2011. Double-Hole-Mediated Coupling of Dopants and Its Impact on Band Gap Engineering in TiO₂ 066801, 9–12. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.106.066801>
- Yoosefi Booshehri, A., Simon Chun-Kiat Goh, A., Hong, J., Jiang, R., Xu, R., 2014. Effect of

- depositing silver nanoparticles on BiVO₄ in enhancing visible light photocatalytic inactivation of bacteria in water. *J. Mater. Chem. A Mater. energy Sustain.* 2, 6209–6217. <https://doi.org/10.1039/c3ta15392d>
- Yoosefi Booshehri, A., Wang, R., Xu, R., 2015. Simple method of deposition of CuO nanoparticles on a cellulose paper and its antibacterial activity. *Chem. Eng. J.* 262, 999–1008. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.09.096>
- Yuan, Q., Chen, L., Xiong, M., He, J., Luo, S.L., Au, C.T., Yin, S.F., 2014. Cu₂O/BiVO₄ heterostructures: Synthesis and application in simultaneous photocatalytic oxidation of organic dyes and reduction of Cr(VI) under visible light. *Chem. Eng. J.* 255, 394–402. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.06.031>
- Zhang, S., Han, B., Gu, J., Wang, C., Wang, P., Ma, Y., Cao, J., He, Z., 2015. Fate of antibiotic resistant cultivable heterotrophic bacteria and antibiotic resistance genes in wastewater treatment processes. *Chemosphere* 135, 138–145. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.04.001>
- Zhang, Y., Li, A., Dai, T., Li, F., Xie, H., Chen, L., Wen, D., 2018. Cell-free DNA: A Neglected Source for Antibiotic Resistance Genes Spreading from WWTPs. *Environ. Sci. Technol.* 52, 248–257. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b04283>
- Zhang, Y., Zhuang, Y., Geng, J., Ren, H., Xu, K., Ding, L., 2016. Reduction of antibiotic resistance genes in municipal wastewater effluent by advanced oxidation processes. *Sci. Total Environ.* 550, 184–191. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.078>
- Zheng, J., Su, C., Zhou, J., Xu, L., Qian, Y., Chen, H., 2017. Effects and mechanisms of ultraviolet, chlorination, and ozone disinfection on antibiotic resistance genes in secondary effluents of municipal wastewater treatment plants. *Chem. Eng. J.* 317, 309–316. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.02.076>
- Zheng, X., Wang, Q., Chen, L., Wang, J., Cheng, R., 2015. Photocatalytic membrane reactor (PMR) for virus removal in water: Performance and mechanisms. *Chem. Eng. J.* 277, 124–129. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.04.117>
- Ζουμπούλης, Α., Πελέκα, Ε., Τριανταφυλλίδης, Κ., 2015. Κεφάλαιο 7 - Η Κατάλυση ως βασική «Αρχή» της Πράσινης Χημείας, in: Πράσινη Χημεία Και Τεχνολογία Στη Βιώσιμη Ανάπτυξη. Εκδόσεις Κάλλιπος, pp. 222–239.

Παράρτημα

Πίνακας Π1. Εκκινητές, αλληλουχίες, μέγεθος προϊόντος PCR και συνθήκες PCR και Nested – PCR για αδενοϊούς και εντεροϊούς. Στις συνθήκες με έντονα γράμματα σημειώνεται η θερμοκρασία υβριδισμού.

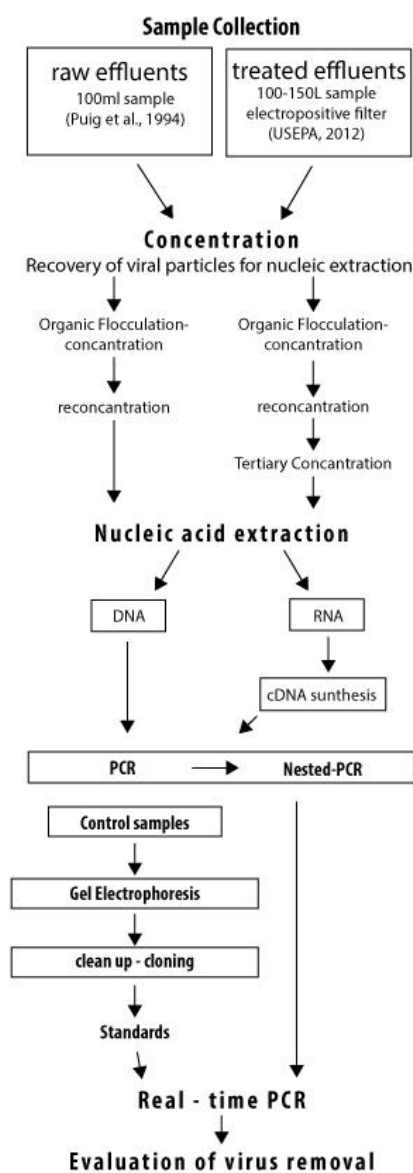
Ιός	Εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή 5' to 3'	Μέγεθος προϊόντος	Συνθήκες	Συγκέντρωση εκκινητή	Αναφορά
AdVs	HEXA	GCCGCAGTGGTCT TACATGCACATC	301 bp	95 °C for 10 min 35 κύκλοι 95 °C for 30 s, 55 °C for 1min, 72 °C for 1min	200nM	(Pina et al., 1998)
	HEXB	CAGCACGCCGCGG ATGTCAAAGT			200nM	
AdVs, Nested - PCR	NHEXA	GCCACCGAGACGT ACTTCAGCCTG	143 bp	95 °C for 10 min 35 κύκλοι 95 °C for 30 s, 55 °C for 1min, 72 °C for 1min	200nM	(Pina et al., 1998)
	NHEXB	TTGTACGAGTACG CGGTATCCTCGCG GTC			200nM	
EVs	Ent1	CGGTACCTTTGTA CGCCTGT	540 bp	95 °C for 10 min 35 κύκλοι 95 °C for 30 s, 55 °C for 1min, 72 °C for 1min	200nM	(Pina et al., 1998)
	Ent2	ATTGTCACCATAA GCAGCCA			200nM	
EVs, Nested - PCR	NEnt1	TCCGGCCCCTGAA TGCGGCTA	123bp	95 °C for 10 min 35 κύκλοι 95 °C for 30 s, 55 °C for 1min, 72 °C for 1min	200nM	(Pina et al., 1998)
	NEnt2	GAAACACGGACAC CCAAAGTA			200nM	
	R	GTCCGACAAGTTG CATGAT			200nM	

Πίνακας Π2. Αλληλουχίες και συνθήκες της εφαρμογής PCR για τα γονίδια ανθεκτικότητας. Στις συνθήκες με έντονα γράμματα σημειώνεται η θερμοκρασία υβριδισμού

Γονίδια	Αλληλουχία εκκινήτη 5' to 3'	Μέγεθος προϊόντος	Συνθήκες	Αναφορά
sul1 – F	GCAAGGCGGAAACCCGCGCC	417bp	95°C for 5 min 35 κύκλοι 94°C for 30sec, 55°C for 10 min 72 for 2 min	(Venieri et al., 2017), (Jacobs and Chenia, 2007)
sul1 – R	CTTCGATGAGAGCCGCGCGC			
sul2 – F	GCGCTCAAGGCAGATGGCATT	293bp	94°C for 5 min 35 κύκλοι 94°C for 15sec, 69°C for 30 sec 72 for 1 min	(Kern, 2002)
sul2 - R	GCGTTTGATACCGGCACCCGT			
qnrA – F	GATAAAGTTTTTCAGCAAGAG	543bp	95°C for 5 min 35 κύκλοι 94°C for 1,5 min, 64°C for 30 sec 72 for 1 min	(Rodríguez-Martínez et al., 2003), (Cummings et al., 2011)
qnrA – R	ATCCAGATCGGCAAAGGTTA			
aac(6')-lb-cr - F	TCCGGCCCCCTGAATGCGGCTA	482bp	95°C for 10min 35 κύκλοι 95°C for 45 sec, 55°C for 45 sec 72 for 45 sec	(Park et al., 2006)
aac(6')-lb-cr - R	CTCGAATGCCTGGCGTGTTC			
blaTEM – F	AAAGATGCTGAAGATCA	425bp	95°C for 10min 35 κύκλοι 94°C for 5 min, 42°C for 30 sec 72 for 6 sec	(Speldooren et al., 1998)
blaTEM - R	TTTGGTATGGCTTCATTC			
ampC – F	TTCTATCAAMACTGGCARCC	550bp	94°C for 5 min 35 κύκλοι 94°C for 30sec, 49°C for 30 sec 72 for 1 min	(Schwartz et al., 2003)
ampC - R	CCYTTTTATGTACCCAYGA			
tetA – F	CGATATCACTGATGGCGATG	318bp	94°C for 5min 35 κύκλοι 94°C for 1 min, 55°C for 1 sec 72 for 5min	(Tennstedt et al., 2005)
tetA - R	GTCCGACAAGTTGCATGAT			
tetM – F	GTTAAATAGTGTTCTTGGAG	656bp	94°C for 5min 35 κύκλοι 94°C for 1 min, 55°C for 1 sec 72 for 5min	(Tennstedt et al., 2005)
tetM - R	CTAAGATATGGCTCTAACAA			

METHODOLOGY PLAN

Detection and quantification of viruses applying molecular biology techniques



Εικόνα Π 1. Σχεδιάγραμμα μεθοδολογίας για την ανάλυση των ιών.

Πίνακας Π 3. Αποδόσεις της Real - Time PCR στην ποσοτικοποίηση αδενοϊών και εντεροϊών.

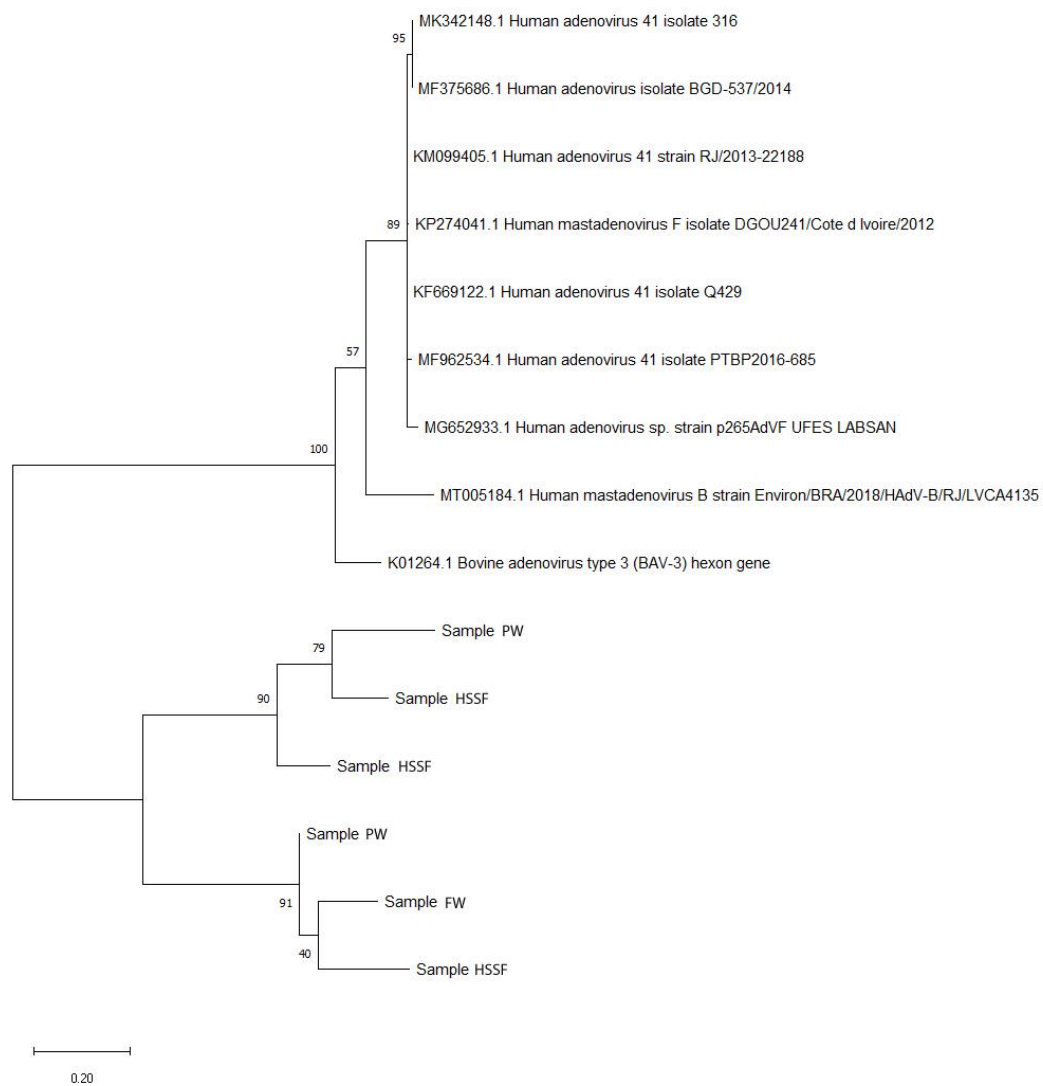
Αδενοϊοί	Κλίση: -3.296, R ² : 0.887, Απόδοση: 101.072
Εντεροϊοί	Κλίση: -3.176, R ² : 0.989, Απόδοση: 106.486

Πίνακας Π 4. Αποδόσεις της Real –Time PCR στην ποσοτικοποίηση των γονιδίων στα απομονωμένα στελέχη *E.coli* και enterococci.

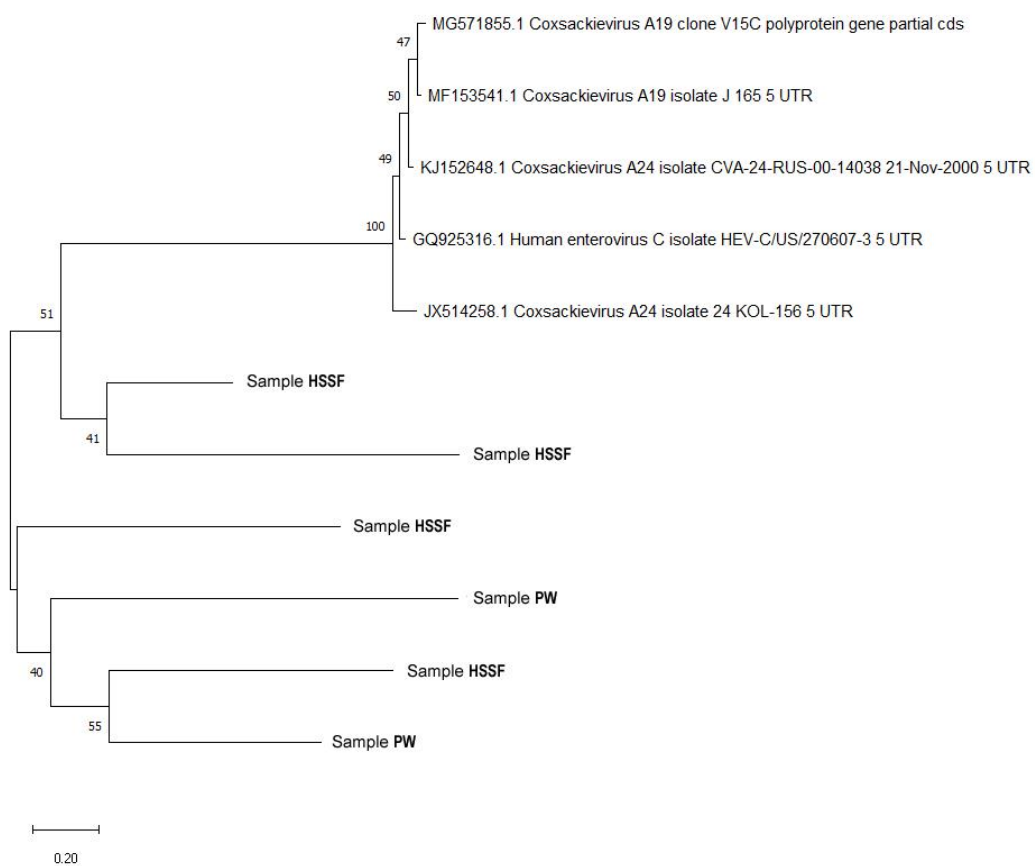
	<i>E. coli</i>	Enterococci
Sul1	Κλίση: -2.668 R ² : 0.927 Απόδοση: 137.073	Κλίση: -2.959 R ² : 0.979 Απόδοση: 117.753
Sul2	Κλίση: -3.363 R ² : 0.999 Απόδοση: 98.314	Κλίση: -3.293 R ² : 0.9998 Απόδοση: 101.23
qnrA	Κλίση: -3.162 R ² : 0.987 Απόδοση: 107.122	Κλίση: -3.369 R ² : 0.992 Απόδοση: 98.088
aac-(6')-lb-cr	Κλίση: -3.22 R ² : 0.995 Απόδοση: 104.45	Κλίση: -3.22 R ² : 0.995 Απόδοση: 104.45
bla _{TEM}	Κλίση: -3.606 R ² : 0.955 Απόδοση: 141.993	Κλίση: -2.06 R ² : 0.955 Απόδοση: 141.993
ampC	Κλίση: -3.729 R ² : 0.916 Απόδοση: 132.492	Κλίση: -2.996 R ² : 0.977 Απόδοση: 117.336
tetA	Κλίση: -3.785 R ² : 0.998 Απόδοση: 83.74	Κλίση: -3.785 R ² : 0.998 Απόδοση: 83.74
tetM	Κλίση: -3.218 R ² : 0.955 Απόδοση: 104.532	Κλίση: -3.218 R ² : 0.955 Απόδοση: 104.532

Πίνακας Π5. Αποδόσεις Real-Time PCR για τα γονίδια ανθεκτικότητας στο ολικό βακτηριακό DNA, στο eDNA και στο γενετικό υλικό φάγων.

sul2	Κλίση: -3.229, R ² : 0.99, Απόδοση: 104.0.39
qnrA	Κλίση: -3.441, R ² : 0.992, Απόδοση: 95.26
bla _{TEM}	Κλίση: -2.572, R ² : 0.968, Απόδοση: 144.829
tetA	Κλίση: -3.515, R ² : 0.998, Απόδοση: 92.518



Εικόνα Π 2. Δενδρόγραμμα αδενοϊών



Εικόνα Π 3. Δενδρόγραμμα εντεροϊών

```

trials <- 10000
min_input<-min(sys1.ecoli[,1],na.rm=T)
min_input
max_input<-max(sys1.ecoli[,1],na.rm=T)
max_input
min_output<-min(sys1.ecoli[,2],na.rm=T)
min_output
max_output<-max(sys1.ecoli[,2],na.rm=T)
max_output

uniform_input <- runif(100,min=min_input,max=max_input)
uniform_input
hist(uniform_input)
density(uniform_input)
plot(density(uniform_input))
uniform_output <- runif(100,min=min_output,max=max_output)
input <- sample(uniform_input, size = trials, replace = TRUE, prob = NULL)
hist(input)
output <- sample(uniform_output, size = trials, replace = TRUE, prob = NULL)
hist(output)
efficiency <- (input - output)/input
efficiency

#we plot the histogram (ggplot2 package should be installed)
ec1<-ggplot(data=NULL, aes(x=efficiency)) + geom_histogram(binwidth=0.005,
color="white",fill='red')+ ggtitle ("E.coli S1")
#we get the mean, max, mean, median and sd
summary(efficiency)
sd(efficiency)

```

Κώδικας 1. Τμήμα κώδικα R για τη δημιουργία των uniform κατανομών με τυχαίες τιμές για τη σύγκριση των συστημάτων ως προς την απομάκρυνση των βακτηριακών δεικτών.

```

b <- eti(betal1$betal)
ci_eti<- ci(betal1$betal,method = "ETI")

betal1$betal %>%
  estimate_density(extend = TRUE) %>%
  ggplot(aes(x = x, y = y)) +
  geom_area(fill = "orange") +
  theme_classic() +
  # HDI in blue
  geom_vline(xintercept = ci_eti$CI_low, color = "royalblue", size = 3) +
  geom_vline(xintercept = ci_eti$CI_high, color = "royalblue", size = 3) +
  labs(title = expression(paste("Credible intervals in System 1 for ", beta[1])),
        subtitle = paste("The lower limit of HDI is ",round(ci_eti$CI_low,3)," and upper limit is ",round(ci_eti$CI_high,3)),
        x = expression(beta[1]),
        y = "Density")

```

```

1 # we load the data as indicated using read.csv function
2 viruses<- read.csv("C:\\Users\\Andreas\\Desktop\\Statistics with R\\Bayes Statistics\\Analysis\\Data viruses f
3 library(LearnBayes)
4 view(viruses)
5 library(mice)
6 library(ggplot2)
7 library(tidyverse)
8
9 library(bayestestR)
10 library(see)
11
12
13 ad.sy1 <- viruses[,c(1,2)]
14 ad.sy1.c <- mice(ad.sy1,m=5,maxit = 5,printFlag = F)
15 ad.sy1.c$imp
16 ad.sy1 <- complete(ad.sy1.c,1)
17 ad.sy1
18 #aim effeciency of waste water
19 #ad virus for system 1
20
21 plot(ad.sy1[,1],ad.sy1[,2],xlab = "Input Advs concentration",
22      ylab="Advs concentration in the ouput of S1")
23 title("Input - output relationship")
24
25 ad.vi.re.sy1 <- ad.sy1[,1] - ad.sy1[,2]
26 ad.vi.re.sy1
27 ad.inp.c<- ad.sy1[,1]
28 system.effeciency<- ad.vi.re.sy1/ad.inp.c
29 system.effeciency
30
31 ad.vi.re.sy12 <- cbind(ad.inp.c,ad.vi.re.sy1,system.effeciency)
32 ad.vi.re.sy12
33
34 plot(ad.inp.c,ad.vi.re.sy1, xlab = "Input Advs concentration", ylab = "Virus reduction") #slope ch.y/ch.x= sys
35 title("Advs input cocntration vs reduction")
36 plot(system.effeciency,ad.inp.c, xlab = "Sytem 1 efficiency", ylab = "Input concantration")
37 title("Input concantration vs efficiency S1")
38
39 par(mfrow=c(1,3))
40 m.a.1<- lm(ad.vi.re.sy1~ad.inp.c,x=T,y=T)#(X'X)^-1X'Y
41 summary(m.a.1)
42 m.a.1
43 plot(m.a.1)
44
45 prior1 = list(b0=c(0,0.95),c0=0.1)
46
47 theta.sample <- blinreg(m.a.1$y,m.a.1$x,10000,prior=prior1)
48
49 plot(theta.sample$beta)
50
51 betal1 <- NULL
52
53 s= data.frame(beta0=theta.sample$beta[,1],betal=theta.sample$beta[,2])
54
55 prior_beta <- rnorm(10000,0.95,0.01)
56 betal1 <- data.frame(betal=s$betal,beta_p=prior_beta)
57
58 ggplot(betal1) +
59   geom_density(size=1.2,aes(betal,colour='posterior'))+
60   geom_density(size=1.2,aes(beta_p,colour='prior'))+
61   labs(colour="Type",
62        y="Density") +
63   scale_colour_manual(values=c("blue", "red")) +
64   theme(legend.position=c(0.9, 0.9))
65
66
67 a <- hdi(betal1$betal)
68
69 ci_hdi<- ci(betal1$betal,method = "HDI")
70 ci_eti<- ci(betal1$betal,method = "ETI")
71
72 betal1$betal %>%
73   estimate_density(extend = TRUE) %>%
74   ggplot(aes(x = x, y = y)) +
75   geom_area(fill = "orange") +
76   theme_classic() +
77   # HDI in blue
78   geom_vline(xintercept = ci_hdi$CI_low, color = "royalblue", size = 3) +
79   geom_vline(xintercept = ci_hdi$CI_high, color = "royalblue", size = 3) +
80   labs(title = expression(paste("Credible intervals in System 1 for ", beta[1])),
81        subtitle = paste("The lower limit of HDI is ",round(ci_hdi$CI_low,3)," and upper limit is ",round(ci_hdi$CI_high,3)),
82        x = expression(beta[1]),
83        y = "Density")

```

Κώδικας 2. Τμήμα κώδικας R για τη ην σύγκριση της απόδοσης των συστημάτων ως προς την απομάκρυνση των ιών με συμπερασματολογία Bayes.

```
# This code is used to verify if the gene is present (level 1) or not (level 0) at each set of
treatment and antibiotic
dados$id_sul1 <- ifelse(dados$sul1==0,0,1)
dados$id_sul2 <- ifelse(dados$sul2==0,0,1)
dados$id_qnrA <- ifelse(dados$qnrA==0,0,1)
dados$id_aac <- ifelse(dados$aac==0,0,1)
dados$id_tetA <- ifelse(dados$tetA==0,0,1)
dados$id_tetM <- ifelse(dados$tetM==0,0,1)
dados$id_blattem <- ifelse(dados$blattEM==0,0,1)
dados$id_ampC <- ifelse(dados$ampC==0,0,1)
'''
'''{r,warning=F,fig.pos="h",fig.width=10}
dados %>% mutate(trat=as.factor(TREATMENT),con=factor(round(CONCENTRATION,2),ordered = T)) %>%
group_by(ANTIBIOTIC,trat,con) %>% summarise(val=mean(`REDUCTION%`)) %>%
ggplot(aes(x=con,y=val))+
geom_line(size = 1.2, aes(group = trat, color = trat)) +
geom_point(size = 2.6, aes(color = trat), shape = 15)+
labs(
  title = "Interaction between concentration and treatment with each antibiotic",
  x = "Concentration",
  y = "Average reduction %",
  colour="Treatment"
)+
facet_wrap(~ANTIBIOTIC,scales = "free")+
geom_hline(yintercept = 60, linetype="dotted")
'''|

'''{r}
#SMX
ajuste_SMX <- lm(`REDUCTION%`~TREATMENT+log(CONCENTRATION)+RESISTANCE+id_sul1+id_sul2+id_qnrA+id_
ac-1,data=dados %>% filter(ANTIBIOTIC=="SMX"))

#Coefficients table
outcoef <- round(summary(ajuste_SMX)$coef,4)
outcoef <- data.frame(cbind(VariableName=rownames(outcoef), outcoef))
rownames(outcoef) <- NULL
names(outcoef)[5]<- "p.value"
outcoef$VariableName[c(1:5,7)]<- c(paste0("TREATMENT: ",str_sub(outcoef$VariableName[1:5],start =
10)),paste0("Resistance: ",str_sub(outcoef$VariableName[7],start = 11)))

kable(outcoef,"latex",booktabs=T,caption="Regression coefficients for the SMX antibiotic") %>%
kable_styling(font_size = 12,latex_options = "HOLD_position")
'''
```

Κώδικας 3. Τμήμα κώδικα R για τη δημιουργία μοντέλου γραμμικής πολλαπλής παλινδρόμησης.

```
pca_SMX-prcomp(dados %>% filter(ANTIBIOTIC=="SMX") %>% select(eval(names(dados)[24:28]),CONCENTRATION,id_sul1
,id_sul2,id_qnrA,id_aac,`REDUCTION%`,sul1,sul2,qnrA),center = T,scale. = T)

autoplot(pca_SMX,data=dados %>% filter(ANTIBIOTIC=="SMX"),colour="RESISTANCE",loadings=T,loadings.label=T,scale=0.5,loadings
.label.repel=T)+
labs(
  title = "Antibiotic SMX",
  colour="Result"
)
```

Κώδικας 4. Τμήμα κώδικα R για την ανάλυση πολλαπλών συνιστωσών PCA.