



ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΚΑΙ
ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Επεξεργασία αστικών αποβλήτων σε πιλοτικές μονάδες τεχνητών υδροβιότοπων: διερεύνηση απομάκρυνσης μικροβιακών δεικτών και γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά»

ΜΑΡΙΑ ΑΝΤΩΝΙΑ ΑΡΕΤΑΚΗ

Χανιά, 2022



ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΚΑΙ
ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Επεξεργασία αστικών αποβλήτων σε πιλοτικές μονάδες τεχνητών υγροβιότοπων: διερεύνηση απομάκρυνσης μικροβιακών δεικτών και γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά»

«Municipal wastewater treatment by means of pilot scale constructed wetlands: study of the removal of microbial indicators and antibiotic resistance genes»

ΜΑΡΙΑ ΑΝΤΩΝΙΑ ΑΡΕΤΑΚΗ
ΑΜ:2016050005

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Αναπληρώτρια καθηγήτρια : Δανάη Βενιέρη (Επιβλέπουσα)

Επίκουρος καθηγητής : Αλέξανδρος Στεφανάκης

Καθηγήτρια : Ελευθερία Ψυλλάκη

«Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για μη κερδοσκοπικό σκοπό, εκπαιδευτικού ή ερευνητικού χαρακτήρα, με την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης. Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση της εργασίας για άλλη χρήση θα πρέπει να απευθύνονται προς τη συγγραφέα. Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σε αυτό το έγγραφο εκφράζουν τον συγγραφέα και δεν πρέπει να ερμηνευθεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις του Πολυτεχνείου Κρήτης.»

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου κα. Δανάη Βενιέρη για την πολύτιμη καθοδήγηση και στήριξή της, σε μια χρονιά που ήταν ιδιαίτερα δύσκολη. Την ευχαριστώ θερμά για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε. Θα ήθελα επιπλέον να ευχαριστήσω την κα. Ιωσηφίνα Γουνάκη, ΕΔΙΠ του εργαστηρίου Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας, για την βοήθειά της, τις εργαστηριακές γνώσεις που μου μετέδωσε και την υπομονή της στις πολλές, όμορφες μέρες που περάσαμε μαζί στο εργαστήριο. Ήταν μεγάλη μου χαρά και τιμή που συνεργάστηκα μαζί τους.

Θερμές ευχαριστίες απευθύνω στην συμφοιτήτρια και φίλη μου Δανάη Μεσχίνη για την άψογη συνεργασία μας στο εργαστήριο και την βοήθεια που παρείχαμε η μια στην άλλη κατά τη διάρκεια της χρονιάς.

Επιπλέον, ευχαριστώ ιδιαίτερα τον κύριο Αλέξανδρο Στεφανάκη και την κυρία Ελευθερία Ψυλλάκη για την συμμετοχή τους στην εξεταστική επιτροπή και το χρόνο τους.

Τέλος, θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω από καρδιάς την οικογένειά μου και τους φίλους μου για την ουσιαστική στήριξη που μου παρείχαν αυτά τα χρόνια, η οποία ήταν καταλυτικής σημασίας για την πορεία μου στο Πολυτεχνείο Κρήτης. Ξεχωριστά θέλω να ευχαριστήσω την μητέρα μου Μαρία και τον παππού μου Ιάσονα που πάντα πιστεύουν σε εμένα και μου το δείχνουν με κάθε δυνατό τρόπο.

Μαρία Αντωνία Αρετάκη

Χανιά, 2022

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	4
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ-ABBREVIATIONS	7
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	8
ABSTRACT.....	10
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ^ο – ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	12
1.1 ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΝΕΡΟΥ.....	9
1.2 ΑΔΕΝΟΙΟΙ.....	14
2. ANTIBIOTIKA.....	15
2.1 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΕ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ.....	18
2.2 ΔΙΑΔΟΣΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΩΣ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟ ΠΡΟΒΛΗΜΑ.....	18
2.3 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΑ ANTIBIOTIKA.....	20
3. ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΟΣ ΔΙΑΔΟΣΗΣ ΤΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ANTIBIOTIKA.....	22
3.1 ΧΡΗΣΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ.....	22
3.2 ΧΡΗΣΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ-ΤΕΧΝΗΤΟΙ ΥΓΡΟΒΙΟΤΟΠΟΙ.....	23
3.2.1 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΕΧΝΗΤΩΝ ΥΓΡΟΒΙΟΤΟΠΩΝ.....	26
3.2.2 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗΣ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ.....	28
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ^ο – ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	30
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ^ο – ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	31
3.1 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΔΙΑΤΑΞΗΣ ΤΕΧΝΗΤΩΝ ΥΓΡΟΒΙΟΤΟΠΩΝ.....	31
3.2 ΥΛΙΚΑ.....	32
3.3 ΜΕΘΟΔΟΙ.....	33
3.3.1 ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ.....	33
3.3.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ.....	34
3.3.3 ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ.....	36
3.3.4 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΔΕΝΟΙΩΝ ΣΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ.....	38

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ^ο – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	40
4.1 ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΣΤΟΥΣ ΤΕΧΝΗΤΟΥΣ ΥΓΡΟΒΙΟΤΟΠΟΥΣ.....	40
4.1.1 ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΚΟΠΡΑΝΩΔΟΥΣ ΜΟΛΥΝΣΗΣ.....	40
4.1.2 ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΑΔΕΝΟΙΩΝ.....	53
4.2 ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ MIC(MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION).....	58
4.2.1 ΣΥΝΟΠΤΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΜΕΝΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ.....	60
4.2.2 ΕΛΕΓΧΟΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ.....	61
4.2.3 ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΣΕ ΑΝΘΕΚΤΙΚΑ-ΜΕΤΡΙΩΣ ΕΥΑΙΣΘΗΤΑ ΕΥΑΙΣΘΗΤΑ.....	69
4.3 ΓΟΝΙΔΙΑ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΑ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ.....	74
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ^ο – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ.....	84
5.1 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	84
5.2 ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ	85
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	86
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	105

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ-ABBREVIATIONS

Εγκατάσταση επεξεργασίας λυμάτων – ΕΕΛ

Ολικά κολοβακτηριοειδή- Total Coliforms, TC

Κοπρανώδη κολοβακτηριοειδή- Fecal Coliforms, FC

Escherichia coli (*E. coli*)

Αδενοϊοί – Adenoviruses, AdVs

Βακτήρια ανθεκτικά σε αντιβιοτικά- Antibiotic Resistant Bacteria ,ARB

Γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά- Antibiotic Resistance Genes, ARGs

Τεχνητοί υγροβιότοποι – Constructed Wetlands, CWs

Τεχνητοί υγροβιότοποι ελεύθερης επιφάνειας- Free Water Surface, FWS

Τεχνητοί υγροβιότοποι υπο-επιφανειακής ροής – Sub Surface Flow, SSW

Τεχνητοί υγροβιότοποι κάθετης ροής- Vertical Flow Constructed Wetlands- VFCWs

Τεχνητοί υγροβιότοποι οριζόντιας ροής- Horizontal Flow Constructed Wetlands- HFCWs

Τεχνητός υγροβιότοπος control (χωρίς βλάστηση και HDPE)- Constructed Wetland Control, CWC

Τεχνητός υγροβιότοπος με χαλίκι και βλάστηση -Constructed Wetland with gravel, CWG

Τεχνητός υγροβιότοπος με HDPE και βλάστηση- Constructed Wetland with plastic , CWP

Σιπροφλοξασίνη , Ciprofloxacin-CIP

Αμοξικιλίνη, Amoxicillin- AMOX

Σουλφαμεθοξαζόλη , Sulfamethoxazole- SMX

Αποικίες βακτηρίων- Colony Forming Units, CFUS

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στο πλαίσιο της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας, μελετήθηκε η απόδοση τριών πιλοτικών μονάδων τεχνητών υδροβιότοπων (Constructed Wetlands) για την επεξεργασία αστικών λυμάτων από την ΕΕΛ Χανίων. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν δείγματα από την εκροή τους ως προς την απομάκρυνση βακτηριακών δεικτών κοπρανώδους μόλυνσης, αδενοϊών, γονιδίων ανθεκτικότητας (ARGs) καθώς επίσης διερευνήθηκε η τυχόν διαφοροποίηση του προφίλ ανθεκτικότητας των βακτηριακών στελεχών σε διαφορετικά αντιβιοτικά.

Το πείραμα αφορά τρεις μονάδες τεχνητών υδροβιότοπων κάθετης υπο-επιφανειακής ροής που τοποθετήθηκαν στον υπαίθριο χώρο του θερμοκηπίου του Πολυτεχνείου Κρήτης και μελετήθηκαν για διάστημα λειτουργίας τεσσάρων μηνών (Ιούλιος-Οκτώβριος). Οι δύο πιλοτικές μονάδες ήταν φυτεμένες με το κοινό καλάμι *Phragmites Australis* και είχαν ως πληρωτικό υλικό η μία χαλίκι και η άλλη ανακυκλωμένο πλαστικό HDPE ενώ η τρίτη μονάδα ήταν το control , χωρίς βλάστηση και με πληρωτικό υλικό επίσης HDPE. Οι τρεις τεχνητοί υδροβιότοποι χαρακτηρίζονται ως CWG (Gravel) , CWP (Plastic) και CWC (Control).

Όσον αφορά τα αποτελέσματα για την απομάκρυνση του βακτηριακού φορτίου, μελετήθηκαν συγκεκριμένα τρία βακτήρια: *Escherichia coli* , *Staphylococcus sp.* και *Enterococcus sp.* Τα αποτελέσματα των μέσων αποδόσεων απομάκρυνσης των παραπάνω βακτηρίων για τις μονάδες είναι τα εξής : Στον CWC υπήρξε μείωση 78,70% της *E.coli* , 31,19% του *Staphylococcus sp.* και 84,43% του *Enterococcus sp.* Στον CWG για την *E.coli* σημειώθηκε απομάκρυνση 93,43%, για τον *Staphylococcus sp.* 40,48% και για τον *Enterococcus sp.* 99,69%. Τέλος, σχετικά με την απόδοση του CWP, η *E.coli* μειώθηκε κατά 94,12%, ο *Staphylococcus sp.* 32,20% και ο *Enterococcus sp.* 85,18%. Συνολικά ο *Enterococcus sp.* παρουσίασε καλύτερες τιμές απομακρύνσεων συνολικά λόγω των υψηλών ταχυτήτων καθίζησης σε σχέση με την *E.coli* ενώ επίσης θεωρείται ότι γενικά βασικός μηχανισμός απομάκρυνσης των μικροοργανισμών στους τεχνητούς υδροβιότοπους είναι η φίλτρωση του λύματος στο υπόστρωμα. Σχετικά με την απομάκρυνση των αδενοϊών (AdVs) , τις καλύτερες τιμές απομάκρυνσης φαίνεται να εμφάνισε ο CWC καθώς υπήρχαν δείγματα εκροής στα οποία δεν ανιχνεύθηκε καθόλου συγκέντρωση γονιδίων αδενοϊού. Οι CWG και CWP παρουσίασαν επίσης αξιοσημείωτη μείωση που έφτασε έως και παραπάνω από 2Logs.

Το HDPE ως πληρωτικό υλικό παρότι δεν εμφανίζεται τόσο συχνά σε βιβλιογραφικές αναφορές είναι ένα ελαφρύ υλικό και μια αξιόπιστη εναλλακτική λύση που παρέχει αρκετά ικανοποιητικά αποτελέσματα και εμφανίζει πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλα υλικά υποστρώματος (χαλίκι ή άμμος) όπως φάνηκε στη συγκεκριμένη εργασία.

Η τυχόν διαφοροποίηση του προφίλ ανθεκτικότητας των τριών βακτηρίων που προαναφέρθηκαν, εξετάστηκε για τρία αντιβιοτικά : την Σιπροφλοξασίνη (CIP), την Αμοξικιλίνη (AMOX) και την Σουλφαμεθοξαζόλη (SMX). Ο έλεγχος αυτός έγινε με βάση την μέθοδο της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης MIC₆₀ και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα βακτηριακά στελέχη από την εκροή του CWC παρουσίασαν την μεγαλύτερη αύξηση της τιμής αυτής σχεδόν σε όλα τα αντιβιοτικά. Στους άλλους δύο υγροβιότοπους με βλάστηση CWG και CWP, συμπεραίνεται η ίσως έμμεση συμβολή των φυτών στην μείωση της ανθεκτικότητας . Παρ'όλα αυτά δεν υπάρχει κάποιο ξεκάθαρο μοτίβο για τον τρόπο που αλλάζει το προφίλ ανθεκτικότητας των βακτηρίων.

Τα γονίδια ανθεκτικότητας που μελετήθηκαν είναι τα *sul II*, *ampC*, *qnrA* τα οποία σχετίζονται με τα υπό μελέτη αντιβιοτικά που αναφέρθηκαν και το ριβωσομικό βακτηριακό γενετικό υλικό 16s rRNA. Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν διαπιστώνεται η σημαντική αύξηση των γονιδίων ανθεκτικότητας και η διάδοσή τους στην εκροή και των τριών υγροβιότοπων. Ωστόσο παρουσιάζεται και μείωση αυτών σε ορισμένες περιπτώσεις συγκρίνοντας τις συγκεντρώσεις τους με αυτές στο αρχικό λύμα εισροής.

Συνοψίζοντας, οι τεχνητοί υγροβιότοποι , μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εναλλακτικές τεχνολογίες, φιλικές προς το περιβάλλον για την επεξεργασία λυμάτων καθώς δύνανται να επιτύχουν καλές αποδόσεις απομακρύνσεων του μικροβιακού φορτίου αλλά και των ARGs τα οποία θεωρούνται απειλή τόσο για το περιβάλλον όσο και για την ανθρώπινη υγεία.

ABSTRACT

In the context of this specific thesis, the performance of three pilot scale constructed wetlands was studied for the treatment of municipal wastewater from the wastewater treatment plant of Chania. In particular, samples from their outflow were examined in terms of the removal of bacterial indicators of fecal contamination, adenoviruses (AdVs), resistance genes (ARGs), as well as the possible differentiation of the resistance profile of the bacterial strains to different antibiotics was investigated.

The experiment concerns three vertical sub-surface flow constructed wetlands which were placed in the outdoor area of the greenhouse of the Technical University of Crete and were studied for an operational period of four months (July-October). The two pilot scale units were planted with the common reed *Phragmites Australis* and had as filling material gravel and the other recycled plastic HDPE while the third unit was the control, without vegetation and also with HDPE as filling material. The three constructed wetlands are labeled as CWG (Gravel), CWP (Plastic) and CWC (Control).

Regarding the results of the removal of the bacterial load, three bacteria were specifically examined: *Escherichia coli*, *Staphylococcus sp.* and *Enterococcus sp.* The results of the average removal efficiency of the above bacteria for the units are as follows: In CWC there was a reduction of 78.70% of *E. coli*, 31.19% of *Staphylococcus sp.* and 84.43% of *Enterococcus sp.* In the CWG for *E. coli* there was a removal of 93.43%, for *Staphylococcus sp.* 40.48% and for *Enterococcus sp.* 99.69%. Finally, regarding the CWP performance, *E. coli* was reduced by 94.12%, *Staphylococcus sp.* 32.20% and *Enterococcus sp.* 85.18%. Overall, *Enterococcus sp.* showed better removal rates due to the high sedimentation speeds compared to *E. coli*, while it is also considered that, in general, the basic mechanism for the removal of microorganisms in constructed wetlands is the filtration of the sewage on the substrate. Regarding the removal of adenoviruses (AdVs), the best removal values seem to have been shown by CWC as there were effluent samples in which no concentration of adenovirus genes was detected. CWG and CWP also showed a noticeable decrease reaching up to more than 2Logs.

HDPE as a filling material, although it does not appear so often in literature references, is a light material and a reliable alternative that provides quite satisfactory results and has advantages over other substrate materials (gravel or sand) as shown in this specific study.

The potential differentiation of the resistance profile of the three bacteria mentioned above was examined for three antibiotics: Ciprofloxacin (CIP), Amoxicillin (AMOX) and Sulfamethoxazole (SMX). This test was based on the Minimum Inhibitory Concentration method, MIC₆₀ and the results showed that the

bacterial strains from the CWC effluent had the greatest increase in this value for almost all antibiotics. In the other two wetlands CWG and CWP with vegetation, the results showed that perhaps there is an indirect contribution of plants to the reduction of antibiotic resistance. However, there is no clear pattern on how the resistance profile of bacteria changes.

The resistance genes that were studied are *sul II*, *ampC*, *qnrA* which are associated with the antibiotics under study and the 16s rRNA ribosomal bacterial genetic material. From the results obtained, the significant increase of resistance genes and their distribution in the outflow of the three wetlands can be concluded. However, there is also a reduction of the genes in some cases comparing their concentrations with the inflow sewage.

To sum up, constructed wetlands can be used as alternative, environmentally friendly technologies for wastewater treatment as they can achieve good removal rates for the microbial load and also for ARGs, which are considered to be a threat to the environment and to the human health as well.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η μεγάλη πρόοδος που έχει σημειωθεί ήδη από τα μέσα του 20ού αιώνα στην ιατρική, την τεχνολογία και γενικότερα στις επιστήμες, έχει συμβάλει στην άνοδο του βιοτικού επιπέδου και της ποιότητας ζωής για τον άνθρωπο. Ωστόσο, ακόμη και σήμερα αντιμετωπίζουμε προκλήσεις όσον αφορά την εξασφάλιση της ποιότητας του νερού. Έχει διαπιστωθεί ότι στις χώρες χαμηλής και μεσαίας ανάπτυξης πολλές φορές η απορροή λυμάτων χωρίς επεξεργασία εμφανίζεται έως 92% και 70% αντίστοιχα, των συνολικών παραγόμενων αποβλήτων και αυτή η απορροή τελικά διατίθεται κυρίως σε επιφανειακά υδάτινα σώματα δημιουργώντας τεράστια περιβαλλοντικά προβλήματα (Sandoval et al., 2019).

Στα πλαίσια αυτά, συμβατικές μονάδες επεξεργασίας αστικών λυμάτων (ΕΕΛ) έχουν σχεδιαστεί ώστε να πραγματοποιείται η απομάκρυνση συμβατικών ρύπων συμπεριλαμβανομένων των αιωρούμενων στερεών, των θρεπτικών ουσιών (άζωτο και φώσφορος), της οργανικής ύλης, μικρορυπαντών (όπως τα φαρμακευτικά προϊόντα, και τα προϊόντα προσωπικής φροντίδας) και έχει αποδειχτεί ότι σε συγκεκριμένες συνθήκες λειτουργίας έχουν καλές αποδόσεις ως προς την απομάκρυνση παθογόνων μικροοργανισμών και ιών, προτού γίνει επαναχρησιμοποίηση του νερού με κάποιο τρόπο ή τα επεξεργασμένα λύματα διατεθούν σε υδάτινο αποδέκτη (Stange et al., 2019). Το τελευταίο ωστόσο είναι ένα αμφιλεγόμενο ζήτημα καθώς συχνά καταγράφονται στην εκροή συμβατικών συστημάτων επεξεργασίας λυμάτων, υψηλές συγκεντρώσεις ιών, γεγονός το οποίο εγκυμονεί υγειονομικούς κινδύνους.

Από την άλλη πλευρά, επιστημονικές μελέτες έχουν δείξει ότι στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων δημιουργούνται οι κατάλληλες συνθήκες για τον πολλαπλασιασμό βακτηρίων ανθεκτικών σε αντιβιοτικά καθώς η ανεπαρκής απομάκρυνση των αντιβιοτικών από αυτά τα συστήματα έχει ως αποτέλεσμα την εκτεταμένη έκθεσή τους σε πολλά διαφορετικά αντιβιοτικά ταυτόχρονα. Το γεγονός αυτό τελικά οδηγεί σε ένα τεράστιο περιβαλλοντικό πρόβλημα των τελευταίων χρόνων που είναι η διάδοση γονιδίων ανθεκτικών στα αντιβιοτικά (ARGs) στο περιβάλλον (Christofilopoulos et al., 2019; X. Liu et al., 2019).

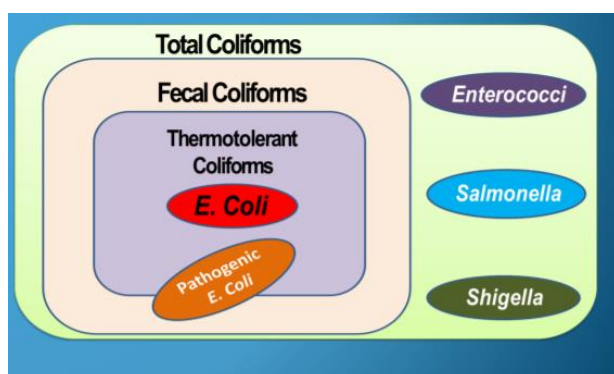
Παρότι μέχρι σήμερα δεν έχει βρεθεί κάποια ιδανική μέθοδος επεξεργασίας για την πλήρη απομάκρυνση των παθογόνων μικροοργανισμών και των γονιδίων ανθεκτικότητας, εξετάζεται η αποδοτικότητα νέων τεχνολογιών όπως είναι οι Τεχνητοί Υγροβιότοποι (Constructed Wetlands- CWs), ή όπως αποκαλούνται από την επιστημονική κοινότητα «Πράσινη Τεχνολογία» (Dong et al., 2016; *Green Technology to Wastewater Treatment*, n.d.)

1.1 ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΝΕΡΟΥ

Οι εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων (ΕΕΛ), αποσκοπούν στην όσο δυνατό καλύτερη επεξεργασία των λυμάτων και την απομάκρυνση παθογόνων μικροοργανισμών ώστε να διοχετευτούν σε ένα υδάτινο αποδέκτη με ασφάλεια και χωρίς να εγκυμονεί ο κίνδυνος για μόλυνση των υδάτων ή το ξέσπασμα κάποιας πανδημίας (Kaliakatsos et al., 2019). Συγκεκριμένα, οι παθογόνοι μικροοργανισμοί είναι παθογόνα στελέχη συγκεκριμένων μικροοργανισμών που δύνανται να προκαλέσουν κάποια λοίμωξη στον ξενιστή τους. Υπάρχουν πέντε κύριες κατηγορίες παθογόνων που είναι άμεσα συνυφασμένες με τις υδατογενείς ασθένειες : τα εντερικά βακτήρια, τα πρωτόζωα, οι μύκητες, οι ιοί και οι έλμινθες (Alexandros & Akratos, 2016). Για το λόγο αυτό, υψίστης σημασίας είναι ο συνεχής έλεγχος των εκροών των εγκαταστάσεων αυτών.

Στο πλαίσιο λοιπόν του ελέγχου της ποιότητας των υδάτων, η επιστημονική κοινότητα εισήγαγε την έννοια των μικροβιακών δεικτών κοπρανώδους μόλυνσης και σύμφωνα με τη νομοθεσία ο κάθε μικροβιακός δείκτης έχει μέγιστο όριο συγκέντρωσης ώστε να επιτραπεί η διοχέτευση του επεξεργασμένου λύματος σε υδάτινο αποδέκτη ή η επαναχρησιμοποίησή του. Οι μικροβιακοί δείκτες αξιολογούν την απομάκρυνση των παθογόνων μικροοργανισμών και την απόδοση των ΕΕΛ κατά τις διεργασίες απολύμανσης (Wu et al., 2016).

Για να θεωρηθούν ως δείκτες πρέπει να έχουν ορισμένα χαρακτηριστικά όπως να έχουν μεγαλύτερη συγκέντρωση από τους παθογόνους μικροοργανισμούς, να αντέχουν σε αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες, να υπάρχουν στην εντερική μικροχλωρίδα των θερμόαιμων ζώων, να είναι εύκολο να ανιχνευτούν με απλές μεθόδους και τέλος να μην αναπτύσσονται στο περιβάλλον ή στα φυσικά ύδατα (Luis Lugo et al., 2021). Οι βιολογικοί αυτοί δείκτες αποτελούνται από τα ολικά κολοβακτηριοειδή (Total Coliforms), τα κοπρανώδη κολοβακτηριοειδή (Fecal Coliforms) που είναι υποομάδα τους και τους κοπρανώδεις στρεπτόκοκκους. Οι πιο συνήθεις βιολογικοί δείκτες που χρησιμοποιούνται για τον εντοπισμό κοπρανώδους μόλυνσης είναι η *Escherichia coli* που ανήκει στα κοπρανώδη κολοβακτηριοειδή, ο κοπρανώδης Στρεπτόκοκκος (FS) και ορισμένες φορές ο *Staphylococcus* (Wu et al., 2016).



Εικόνα 1. Οικογένεια Κολοβακτηριοειδών (Total Coliforms)

Η *E. coli* είναι ένα gram αρνητικό βακτήριο και σύμφωνα με έρευνες αποτελεί το 20-30% των συνολικών ολικών κολοβακτηριοειδών που εντοπίζονται στα λύματα (Hussain, 2019). Τα περισσότερα στελέχη της *E. coli* βρίσκονται στο γαστρεντερικό σύστημα των θερμόαιμων ζώων και είναι συμβιωτικά βακτήρια. Ωστόσο υπάρχουν και παθογόνα στελέχη.

Στα γένη *Enterococcus* και *Streptococcus* ανήκουν οι κοπρανώδεις στρεπτόκοκκοι. Οι Εντερόκοκκοι (*Enterococcus sp.*) είναι μια μεγάλη ομάδα gram θετικών κόκκων στους οποίους ανήκουν και οι εντερόκοκκοι κοπρανώδους προέλευσης (*E. faecalis*) που εντοπίζονται στα κόπρανα θερμόαιμων ζώων σε μικρότερο αριθμό από ότι η *E. coli* (Alexandros & Akratos, 2016). Ωστόσο, ως δείκτες ποιότητας νερού πλεονεκτούν έναντι της *E. coli* καθώς δεν συνηθίζεται ο πολλαπλασιασμός τους στα φυσικά ύδατα αλλά ούτε και στο μολυσμένο νερό και έχουν μεγαλύτερη αντοχή κατά την χλωρίωση και στις διάφορες περιβαλλοντικές πιέσεις. Τέλος, σύμφωνα με τους Hussain et al, είναι ένας καλός δείκτης για την πρόβλεψη της παρουσίας εντερικών ιών (Hussain, 2019).

Παρότι η κοπρανώδης μόλυνση μπορεί να εντοπιστεί εύκολα, γρήγορα και με οικονομικές μεθόδους σύμφωνα με αυτά που προαναφέρθηκαν, στην πραγματικότητα καμία από τις κατηγορίες των βιολογικών δεικτών δεν μπορεί να χαρακτηριστεί ως ο απόλυτος δείκτης, εφόσον αρκετές φορές αποτυγχάνουν στην πρόβλεψη της παρουσίας παθογόνων όπως είναι οι ιοί (Alexandros & Akratos, 2016).

1.2 ΑΔΕΝΟΪΟΙ

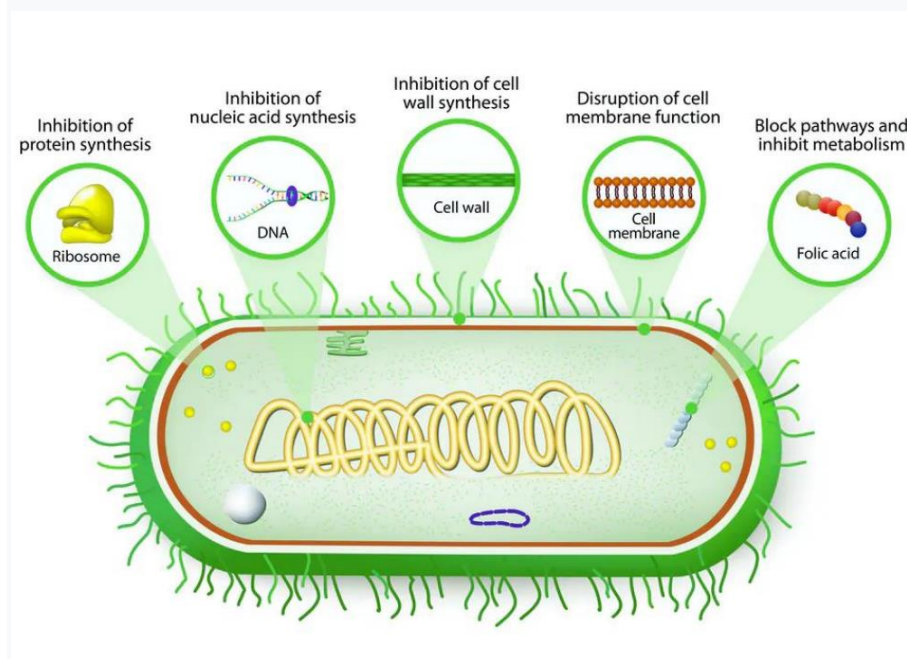
Πολλές έρευνες έχουν ασχοληθεί με τους ανθρώπινους παθογόνους ιούς, καθώς αποτελούν σοβαρό κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία. Οι αδενοϊοί είναι DNA ιοί οι οποίοι μπορούν εύκολα να μεταδοθούν μέσω της κοπρανοστοματικής οδού και με την εισπνοή αερολυμάτων. Ο πολλαπλασιασμός τους γίνεται στο γαστρεντερικό σωλήνα και μπορούν να απεκκριθούν σε υψηλές συγκεντρώσεις (10⁸-10¹¹ σωματίδια/g κοπράνων). Οι ιοί αυτοί έχουν μεγάλη αντοχή σε περιβαλλοντικές πιέσεις όπως την UV ακτινοβολία, την χλωρίωση και σε διακυμάνσεις στο pH. Με λίγα λόγια στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων δεν είναι εφικτή η πλήρης απομάκρυνσή τους και για αυτό εντοπίζονται στις εκροές τους σε αρκετά μεγάλες συγκεντρώσεις (Elmahdy et al., 2018; Kaliakatsos et al., 2019). Δεν μπορούν να αναπαραχθούν στο υδάτινο περιβάλλον αλλά μπορούν να παραμείνουν σταθεροί για μεγάλες περιόδους ειδικά όταν προσροφούνται σε οργανικά υλικά.

Σύμφωνα με τους Greaves et al, αλλά και άλλους ερευνητές, κάποιοι ιοί όπως οι AdVs, έχουν προταθεί ως δείκτες για τον εντοπισμό ικής μόλυνσης από άλλους παθογόνους ιούς (Greaves et al., 2020). Σύμφωνα με όσα αναφέρθηκαν προηγουμένως, αυτό συμβαίνει διότι οι ιοί θα μπορούσαν να είναι άφθονοι στα λύματα ακόμη και αν αυτά συμμορφώνονται με τα βακτηριακά όρια που επιβάλλονται από την ισχύουσα νομοθεσία καθώς οι ιοί είναι πιο ανθεκτικοί από τα

βακτήρια στα απολυμαντικά μέσα. Επίσης η συχνότερη παρουσία των αδενοϊών καθ' όλη τη διάρκεια του χρόνου τους προσδίδει ακόμα ένα πλεονέκτημα για τη χρήση τους ως δείκτες.

2. ANTIBIOTIKA

Τα αντιβιοτικά είναι είτε φυσικές είτε τεχνητές ουσίες από τον άνθρωπο που έχουν τη δυνατότητα να καταστρέψουν ή να καταστείλουν την ανάπτυξη των βακτηρίων δρώντας με πολλούς μηχανισμούς εναντίον τους. Η ευρεία χρήση τους έχει ως στόχο κυρίως την αποφυγή και τη θεραπεία διάφορων μολυσματικών ασθενειών από παθογόνους μικροοργανισμούς.



Εικόνα 2. Μηχανισμοί δράσης αντιβιοτικών : αναστολή σύνθεσης νουκλεϊκών οξέων, αναστολή πρωτεϊνικής σύνθεσης, αναστολή σύνθεσης κυτταρικού τοιχώματος κλπ (Baaloudj et al., 2021).

Λόγω της χημικής τους σύστασης τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται πιο συχνά κατηγοριοποιούνται σε 6 κατηγορίες :

1. β-λακτάμες (ανήκουν οι Πενικιλίνες και οι Κεφαλοσπορίνες)
2. Αμινογλυκοσίδες
3. Σουλφοναμίδες
4. Μακρολίδια
5. Κινολόνες
6. Τετρακυκλίνες

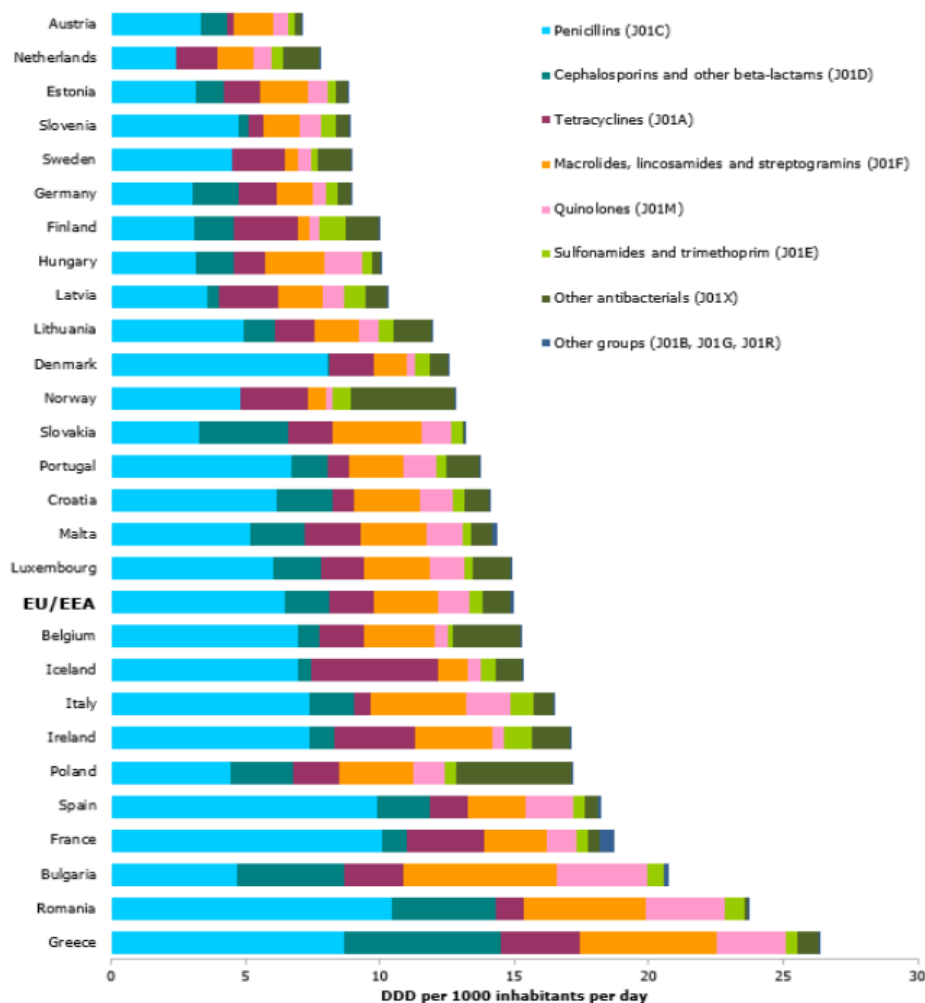
Μετά την πρώτη χρήση των αντιβιοτικών τη δεκαετία του 1940, μειώθηκαν δραματικά οι ασθένειες και οι θάνατοι από λοιμώδεις νόσους. Ωστόσο, η απομάκρυνσή των αντιβιοτικών από το υδάτινο περιβάλλον στο οποίο και

καταλήγουν τελικά, είναι ιδιαίτερα δύσκολη λόγω των φυσικών και χημικών ιδιοτήτων τους. Πιο συγκεκριμένα, η εκτεταμένη χρήση των αντιβιοτικών τόσο στους ανθρώπους όσο και στα ζώα, έχει οδηγήσει στην εξάπλωση ιχμών από αυτές τις εξαιρετικά σταθερές ενώσεις στα φυσικά υδατικά ενδιαιτήματα σε παγκόσμιο επίπεδο, συμπεριλαμβανομένων των ποταμών, των λιμνών, των υπόγειων νερών και των θαλασσών. Λόγω της συνεχούς απόρριψης λυμάτων από μονάδες επεξεργασίας λυμάτων, αντιβιοτικά συνήθως εμφανίζονται στο επιφανειακό νερό ως μείγματα σε διάφορες συγκεντρώσεις από ng/L έως και μg/L (Baaloudj et al., 2021).

Τα αντιβιοτικά καιρό τώρα απασχολούν την επιστημονική κοινότητα καθώς από το σύνολο των φαρμακευτικών προϊόντων, είναι αυτά που χρησιμοποιούνται εκτενώς. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO-World Health Organization), η εκτεταμένη τους χρήση αποτελεί πρωταρχικό προβληματισμό λόγω αφενός των αρνητικών επιπτώσεών τους σε χρήσιμους και μη παθογόνους μικροοργανισμούς του βιολογικού συστήματος του ανθρώπου και αφετέρου γιατί θέτουν επιλεκτική πίεση στους βακτηριακούς πληθυσμούς γεγονός που τελικά οδηγεί στην διάδοση της ανθεκτικότητας μέσω διαφόρων μηχανισμών που θα αναφερθούν στη συνέχεια.

Ενώ προλαμβάνουν εκατομμύρια θανάτους κάθε χρόνο και αποτελούν την κύρια θεραπεία για δυνητικά θανατηφόρες βακτηριακές λοιμώξεις, η κατάχρησή τους εξαιτίας της εύκολης πρόσβασης των ανθρώπων σε αυτά με την έλλειψη νομοθετικού πλαισίου και των ακατάλληλων συνταγογραφήσεων από γιατρούς, οδηγούν στην δημιουργία μιας παγκόσμιας μάστιγας που είναι η αύξηση της ανθεκτικότητας των βακτηρίων σε αυτά αλλά και η διάδοση γονιδίων ανθεκτικότητας. (Chen et al., 2019; Dires et al., 2018). Έτσι, τα γονίδια ανθεκτικότητας έχουν χαρακτηριστεί από την επιστημονική κοινότητα ως αναδυόμενοι περιβαλλοντικοί ρύποι (Fang et al., 2017).

Μελέτες έχουν δείξει ότι κάθε χρόνο το πρόβλημα της ανθεκτικότητας των μικροοργανισμών στα αντιβιοτικά συνεπάγεται κόστος άνω του 1,5 δισ. ευρώ για δαπάνες υγειονομικής περίθαλψης, ενώ 25.000 άτομα ετησίως χάνουν τη ζωή τους από ασθένειες που πλέον είναι δυσκολότερο να αντιμετωπιστούν. Η παρακολούθηση της κατανάλωσης αντιμικροβιακών παραγόντων είναι συστηματική ήδη από το 1997 στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης (ΕΕ) μέσω του Ευρωπαϊκού Δικτύου Επιτήρησης Αντιμικροβιακής Κατανάλωσης (ESAC-Net). Πλέον, το Ευρωπαϊκό Κέντρο Πρόληψης και Ελέγχου Νοσημάτων (ECDC) συντονίζει αυτήν την εργασία. Με δεδομένα που συλλέχθηκαν για το 2020, παρατηρήθηκε ότι περιβάλλοντα που έχουν υψηλή κατανάλωση αντιβιοτικών όπως τα νοσοκομεία, έχουν και μεγάλη αντιμικροβιακή αντοχή γεγονός που συσχετίζει άμεσα την ανάπτυξη της ανθεκτικότητας με την χρήση αντιβιοτικών.

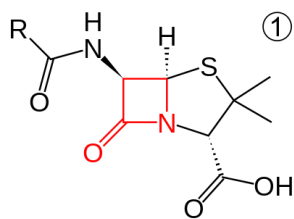


*DDD = Defined daily dose/1000 inhabitants per day

Εικόνα 3. Εξωνοσοκομειακή κατανάλωση αντιβιοτικών σε ευρωπαϊκές χώρες το 2020 εκφρασμένη σε ημερήσια δόση ανά 1000 κατοίκους ανά μέρα- ECDC Surveillance of antimicrobial consumption in Europe.

Συγκεκριμένα, η Ευρωπαϊκή Επιτροπή έχει αναφέρει ότι η ρύπανση υδάτων και εδαφών με φαρμακευτικά προϊόντα και αντιβιοτικά είναι ένα αναδυόμενο περιβαλλοντικό ζήτημα .Ωστόσο δεν υπάρχουν πρότυπα και κανονισμοί που να ρυθμίζουν εκκρίσεις αντιβιοτικών στο περιβάλλον από διαφορετικές πηγές . Τα αντιβιοτικά αμοξικιλίνη και σιπροφλοξασίνη σχετικά με την ΕΕ είναι οι πιο συνηθισμένες ουσίες που καταλήγουν στο περιβάλλον(Polianciuc et al., 2020).

Τα λακταμικά αντιβιοτικά , δηλαδή αυτά που περιέχεται στο μόριό τους ο β - λακταμικός δακτύλιος όπως η πενικιλίνη, η κεφαλοσπορίνη και ως ένα βαθμό οι καρβαπενέμες, έχει αναφερθεί από έρευνες ότι είναι τα πιο συχνά καταναλισκόμενα αντιβιοτικά στις Ευρωπαϊκές χώρες. (Rampuria et al., 2021)



Εικόνα 4. Δομή μόριο Πενικιλίνης (Με κόκκινο ο β-λακταμικός δακτύλιος)

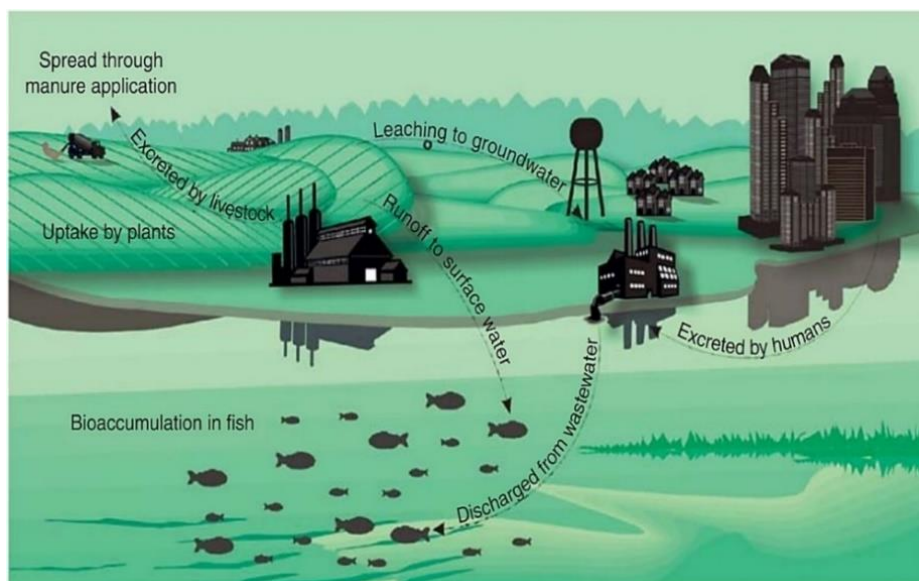
2.1 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΕ ANTIBIOTIKA

Η αντιμικροβιακή αντοχή εμφανίζεται και φυσικά στο περιβάλλον ως απάντηση των μικροοργανισμών για τον έλεγχο της μικροβιακής ανάπτυξης παθογόνων στελεχών. Το φαινόμενο αυτό άρχισε να γίνεται αντιληπτό με την ανακάλυψη του πρώτου αντιβιοτικού, της πενικιλίνης, από τον Alexander Fleming, το 1928. Τότε, τα πρώτα ανθεκτικά βακτήρια προέκυψαν από έναν μηχανισμό εξέλιξης ώστε να προσαρμοστούν στην παρουσία αυτού του αντιβιοτικού. Κατά την δεκαετία του 1960, αναφέρθηκαν τα πρώτα βακτηριακά στελέχη ανθεκτικά στα αντιβιοτικά. Έτσι έγινε στην περίπτωση του *Staphylococcus aureus* που βρέθηκε ανθεκτικό στην μετακυκλίνη, δέκα χρόνια αργότερα στην αμπικιλίνη, και ακόμα δέκα χρόνια μετά στην βανκομυκίνη (Bairán et al., 2020).

Η ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά είναι ένα συνεχώς αυξανόμενο φαινόμενο στην Ελλάδα σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, καθώς η Ελλάδα συγκαταλέγεται στις χώρες που αντιμετωπίζουν τον μεγαλύτερο κίνδυνο από την αντοχή παθογόνων μικροοργανισμών σε αντιβιοτικά, λόγω κατάχρησης αυτών. Ανησυχητικό είναι επίσης το γεγονός ότι κατέχει τα πρωτεία στην κατανάλωση αντιβιοτικών στην Ευρώπη.

2.2 ΔΙΑΔΟΣΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΩΣ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟ ΠΡΟΒΛΗΜΑ

Το πρόβλημα της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά από τους μικροοργανισμούς καθώς και η εύκολη διάδοση της ανθεκτικότητας, έχει διπλή όψη καθώς εκτός από τους υγειονομικούς κινδύνους αποτελεί και ένα τεράστιο περιβαλλοντικό πρόβλημα.



Εικόνα 5. Ανθρωπογενείς δραστηριότητες που οδηγούν στην μεταφορά των αντιβιοτικών στο περιβάλλον. (Baaloudj et al., 2021)

Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 5, τα αντιβιοτικά καταλήγουν στο περιβάλλον και ειδικότερα στο υδάτινο με διάφορους τρόπους. Οι κύριοι τρόποι μεταφοράς αντιβιοτικών ουσιών αλλά και ανθεκτικών βακτηρίων στο υδάτινο περιβάλλον αφορούν την απόρριψη :

- κτηνοτροφικών και γεωργικών αποβλήτων και κυρίως κοπριάς που χρησιμοποιείται σαν εναλλακτικό τρόπο λίπανσης
- νοσοκομειακών αποβλήτων
- αποβλήτων από υδατοκαλλιέργειες
- επεξεργασμένων και ανεπεξεργαστων λυμάτων ανθρώπινης προέλευσης

Από τα παραπάνω, οι εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων (ΕΕΛ), θεωρούνται ως οι σημαντικότεροι φορείς της διάδοσης ανθεκτικότητας στο περιβάλλον. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τους García et al, η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά αυξάνεται σημαντικά στα επεξεργασμένα λύματα σε σχέση με τα μη επεξεργασμένα, γεγονός που δηλώνει ότι τα βακτήρια αποκτούν γονίδια ανθεκτικότητας κατά τις διεργασίες επεξεργασίας (J. García et al., 2020). Τόσο στις αερόβιες όσο και στις αναερόβιες δεξαμενές επεξεργασίας, η συνύπαρξη καταλοίπων αντιβιοτικών και ανθεκτικών βακτηρίων δίνουν το έναυσμα για την μεταφορά γονιδίων ανθεκτικότητας . Ωστόσο, τα γονίδια ανθεκτικότητας εκτός από τα λύματα γενικά εντοπίζονται σε διάφορα περιβάλλοντα όπως τα επιφανειακά και υπόγεια νερά, σε ιζήματα, σε φυσικούς υδροβιότοπους, υποδεικνύοντας με αυτό τον τρόπο την παρουσία τους σε τελείως διαφορετικές συνθήκες (Venieri et al., 2017).

Μεγάλες ποσότητες αντιβιοτικών απορρίπτονται ετησίως στο περιβάλλον επειδή περίπου το 30-90% των καταναλισκόμενων αντιβιοτικών αποβάλλονται χωρίς να έχουν μεταβολιστεί εντελώς από τον ανθρώπινο οργανισμό και έτσι εισέρχονται

στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων (Liu et al., 2019). Στις μονάδες βιολογικού καθαρισμού όπου και καταλήγουν , συμβαίνει μερική διάσπασή τους με φυσική και χημική επεξεργασία , με αποτέλεσμα τα υπολείμματα αντιβιοτικών (80-90% του συνόλου των αντιβιοτικών) να καταλήγουν από την επεξεργασμένη εκροή στο περιβάλλον και πιο συγκεκριμένα στο υδάτινο (Baaloudj et al., 2021). Για παράδειγμα σε έρευνα των Hu et al. , διεξήχθη το συμπέρασμα ότι δεν γίνεται καλή προσρόφηση των Σουλφοναμίδων στην ενεργό ιλύ κατά την επεξεργασία των λυμάτων (Hu et al., 2018). Ωστόσο, οι αντιβιοτικοί παράγοντες μπορούν να υποβαθμιστούν σημαντικά κατά την είσοδό τους στο υδάτινο περιβάλλον με βιοαποικοδόμηση από βακτήρια και μύκητες, με προσρόφηση, υδρόλυση, φωτόλυση , οξειδωση και αναγωγή. Συγκεκριμένα, οι β-λακτάμες υπόκεινται εύκολα σε υδρόλυση ενώ οι τετρακυκλίνες σε φωτοαποδόμηση.

Από την άλλη μεριά όμως, τα γονίδια ανθεκτικότητας έχει αποδειχθεί ότι έχουν την ικανότητα να επιβιώνουν ακόμα και σε ιδιαίτερες περιβαλλοντικές συνθήκες καθώς επίσης να γίνεται η διασπορά τους ακόμα και υπό την απουσία των ξενιστών τους γεγονός που καθιστά τον περιορισμό της διάδοσής τους δύσκολο εγχείρημα. Επιπλέον, τα γονίδια ανθεκτικότητας υπάρχουν σε ιζήματα και στην ενεργό ιλύ στις μονάδες επεξεργασίας λυμάτων και συχνά απελευθερώνονται από τα σχηματιζόμενα βιοφίλμ στο υπερκείμενο λύμα. Ταυτόχρονα, προκαλείται επιλεκτική πίεση στον βακτηριακό πληθυσμό λόγω της ύπαρξης αντιβιοτικών , βαρέων μετάλλων και άλλων χημικών στα λύματα (Abou-Kandil et al., 2021). Σύμφωνα με τα παραπάνω λοιπόν ,τα γονίδια ανθεκτικότητας πρέπει να εξετάζονται όχι μόνο στα επεξεργασμένα λύματα (εκροή) της ΕΕΛ αλλά και στα εναπομείναντα βακτηριακά κύτταρα καθώς θεωρούνται φορείς λοιμωδών ασθενειών που μεταδίδονται μέσω του νερού (Christofilopoulos et al., 2019).

2.3 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

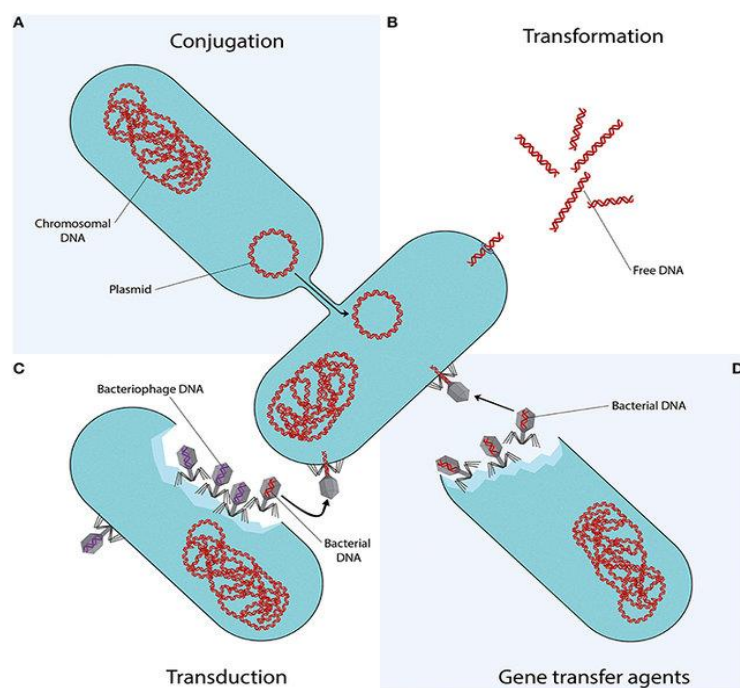
Η ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά εμφανίζεται σε όλα τα βακτήρια , παθογόνα και μη και μπορεί να διακριθεί σε δύο κατηγορίες : ενδογενής ανθεκτικότητα και επίκτητη.

- Η ενδογενής ανθεκτικότητα εξαρτάται από το είδος των βακτηρίων και καθορίζεται γενετικά. Συγκεκριμένα, κάποια βακτηριακά είδη λόγω εγγενών δομικών ή λειτουργικών χαρακτηριστικών έχουν αντοχή σε συγκεκριμένους αντιμικροβιακούς παράγοντες. Για παράδειγμα, βακτήρια που στερούνται κυτταρικού τοιχώματος ,παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά που κύρια δράση τους είναι η αναστολή σύνθεσης κυτταρικού τοιχώματος.
- Η επίκτητη ανθεκτικότητα αναπτύσσεται σε αρχικά ευαίσθητους μικροοργανισμούς με διάφορους μηχανισμούς. Οφείλεται στα γονίδια ανθεκτικότητας και πραγματοποιείται με : αλλαγές στη δομή του χρωμοσωμικού DNA ή/και στην απόκτηση γενετικού υλικού από άλλα βακτήρια.

Οι μεταλλάξεις στο χρωμοσωμικό DNA συνήθως αποτελούν σπάνιο και τυχαίο γεγονός και γίνονται υπό την έκθεση των βακτηριακών πληθυσμών σε αντιμικροβιακούς παράγοντες. Λόγω της εκθετικής ανάπτυξης των βακτηρίων, εξαπλώνονται ταχύτατα καθώς μεταφέρονται στους απογόνους μέσω της κάθετης μεταφοράς γονιδίων. Από την άλλη πλευρά, η απόκτηση γενετικού υλικού από άλλα βακτήρια είναι ένα εξαιρετικά συνηθισμένο γεγονός που ευνοείται κάτω από ορισμένες περιβαλλοντικές συνθήκες, και καθίσταται η κύρια αιτία της εύκολης και γρήγορης διάδοσης ανθεκτικότητας στο περιβάλλον. Συγκεκριμένα, με διάφορες ακολουθίες DNA που ονομάζονται μεταθετά στοιχεία (jumping genes), όπως είναι τα πλασμίδια, τα τρανσποζόνια και τα ιντεγκρόνια, επιτυγχάνεται η οριζόντια μεταφορά γονιδίων (Horizontal Gene Transfer-HGT). Η μεταβίβαση των γονιδίων ανθεκτικότητας μπορεί να γίνει με:

- Σύζευξη (conjugation)
- Μεταγωγή (transduction)
- Μετασχηματισμός (transformation)

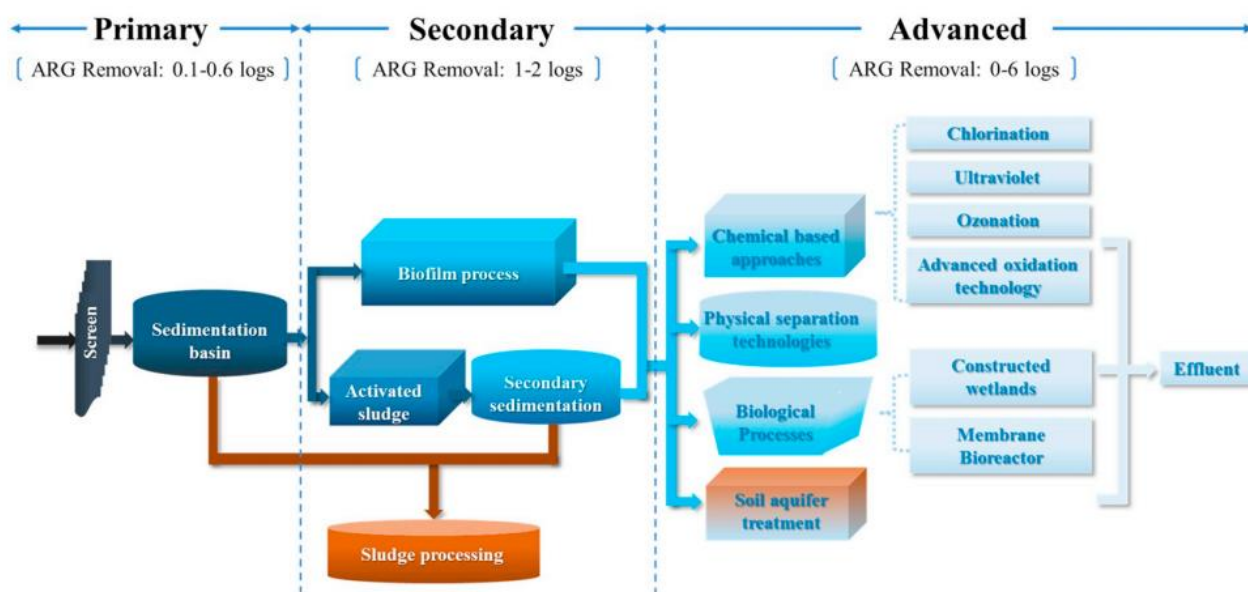
Η βακτηριακή σύζευξη είναι το πιο συνηθισμένο είδος οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων και ανακαλύφθηκε πρώτη φορά στο βακτήριο *Escherichia coli* το 1946 (Sun, 2018).



Εικόνα 6. HRT, (A) Σύζευξη: μονόδρομη μεταφορά DNA με επαφή ενός βακτηριακού κυττάρου δότη με ένα βακτηριακό κύτταρο δέκτη μέσω συζευκτικών-αυτομεταβιβάσιμων πλασμιδίων (B) Μετασχηματισμός: πρόσληψη ελεύθερου τμήματος DNA από βακτήρια που έχουν υποστεί λύση (C) Μεταγωγή: Μεταφορά DNA από βακτηριακό κύτταρο δότη σε βακτηριακό κύτταρο δέκτη με την διαμεσολάβηση βακτηριοφάγου. (Wintersdorff et al., 2016)

3. ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΟΣ ΔΙΑΔΟΣΗΣ ΤΩΝ ARB & ΤΩΝ ARGs

Όπως προαναφέρθηκε , οι μονάδες επεξεργασίας υγρών αποβλήτων, παρότι έχουν μεγάλη απόδοση στην επεξεργασία λυμάτων , έχουν ευρέως αναγνωριστεί ως “hot spots” ή αλλιώς δεξαμενές ARBs και ARGs (Yi et al., 2017) . Ωστόσο, έρευνες έχουν αναφέρει ότι στα διάφορα στάδια επεξεργασίας σε μία τέτοια μονάδα υπάρχει κάποια απομάκρυνση γονιδίων ανθεκτικότητας που απεικονίζεται και στο παρακάτω σχήμα.



Εικόνα 7. Απομάκρυνση ARGs στα επιμέρους στάδια επεξεργασίας υγρών αποβλήτων (Pei et al., 2019)

3.1 ΧΡΗΣΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

Συμβατικές μέθοδοι τριτοβάθμιας επεξεργασίας όπως η χλωρίωση ή η UV ακτινοβολία έχουν αποδειχθεί αρκετά αποτελεσματικές στην αδρανοποίηση διαφόρων μικροοργανισμών αλλά όσον αφορά τον ρόλο τους στην διαφοροποίηση του προφίλ ανθεκτικότητας στα εναπομείναντα κύτταρα μετά την επεξεργασία δεν υπάρχουν πολλές πληροφορίες. (Venieri et al., 2017) . Συγκεκριμένα η χλωρίωση είναι μια αμφιλεγόμενη μέθοδος για την απομάκρυνση των γονιδίων ανθεκτικότητας καθώς υπάρχουν αμφίσημα συμπεράσματα σε έρευνες. Σύμφωνα με τους Lin et al., , 282 τύποι ανιχνευμένων ARG και 13 τύποι κινητών γενετικών στοιχείων μειώθηκαν σημαντικά μετά επεξεργασία με 4 mg Cl₂/L ελεύθερου χλωρίου για 30 λεπτά (Lin et al., 2016). Αντίθετα , οι Liu et al, αναφέρουν ότι η χλωρίωση μπορεί ενισχύσει την ύπαρξη ARGs καθώς ενδέχεται να δημιουργηθούν χλωραμίνες με την παρουσία

αμμωνίας, το οποίο τελικά οδηγεί στη λύση των κυττάρων και συμπερασματικά στην διάδοση των γονιδίων μεταξύ των βακτηρίων (Liu et al., 2018). Επιπλέον, δεν πρέπει να παραβλέπεται το γεγονός ότι η χλωρίωση δημιουργεί παραπροϊόντα όπως είναι το τριχλωρομεθάνιο, όταν υπάρχει στα λύματα μεγάλη συγκέντρωση οργανικής ύλης.

Η UV ακτινοβολία είναι επίσης μια συνηθισμένη μέθοδος απολύμανσης και αποστείρωσης με μικρό σχηματισμό παραπροϊόντων και σε συγκεκριμένα μήκη κύματος (240-280nm) προκαλεί την αποδιάταξη της δομής των βακτηρίων και προκαλεί θάνατο σε αυτά. Ωστόσο, ενώ πλεονεκτεί σε πολλά πράγματα έναντι της χλωρίωσης, έχει διαπιστωθεί ότι λόγω του φαινομένου της φωτοεπανενεργοποίησης δεν είναι τόσο αποτελεσματική και απαιτούνται μεγάλες δόσεις ακτινοβολίας για το επιθυμητό αποτέλεσμα.

Η επεξεργασία με όζον , το οποίο είναι ένα ισχυρό οξειδωτικό μέσο, έχει αναφερθεί σε έρευνα των Wang & Chen ότι μπορεί να οδηγήσει σε περισσότερο από 99% απομάκρυνση ARGs σε ακόμα και μία πολύ μικρή ποσότητα των 1mg/L (Wang & Chen, 2020). Παρ' όλα αυτά η οζόνωση δύναται να δημιουργήσει παραπροϊόντα, όπως είναι τα βρωμικά ιόντα που θεωρούνται καρκινογόνα, αν στα λύματα υπάρχουν βρωμιούχες ενώσεις. Επιπλέον, έχουν αναπτυχθεί οι λεγόμενες προηγμένες διεργασίες οξείδωσης (Advanced oxidation processes -AOP), οι οποίες είναι στην πλειοψηφία τους φιλικές προς το περιβάλλον(Bairán et al., 2020).Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η αντίδραση Fenton, η ηλεκτροχημική και φωτοκαταλυτική οξείδωση οι οποίες έχουν εφαρμοστεί με επιτυχία όχι μόνο για την επεξεργασία συμβατικών χημικών ρύπων αλλά και για την εξάλειψη βακτηρίων , ιών και αναδυόμενων ρύπων όπως τα αντιβιοτικά που βρίσκονται στα λύματα. Για τη δράση τους ως προς τη μείωση των γονιδίων ανθεκτικότητας δεν είναι γνωστά πολλά στοιχεία καθώς υπάρχουν λίγες μόνο μελέτες που ακόμα βρίσκονται σε εργαστηριακή κλίμακα. Ωστόσο, τα στοιχεία που υπάρχουν υποδηλώνουν ότι θα μπορούσε να είναι μια δυνητικά αποτελεσματική επιλογή για την καταπολέμηση του προβλήματος των γονιδίων ανθεκτικότητας (Pei et al., 2019).

3.2 ΧΡΗΣΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ -ΤΕΧΝΗΤΟΙ ΥΓΡΟΒΙΟΤΟΠΟΙ

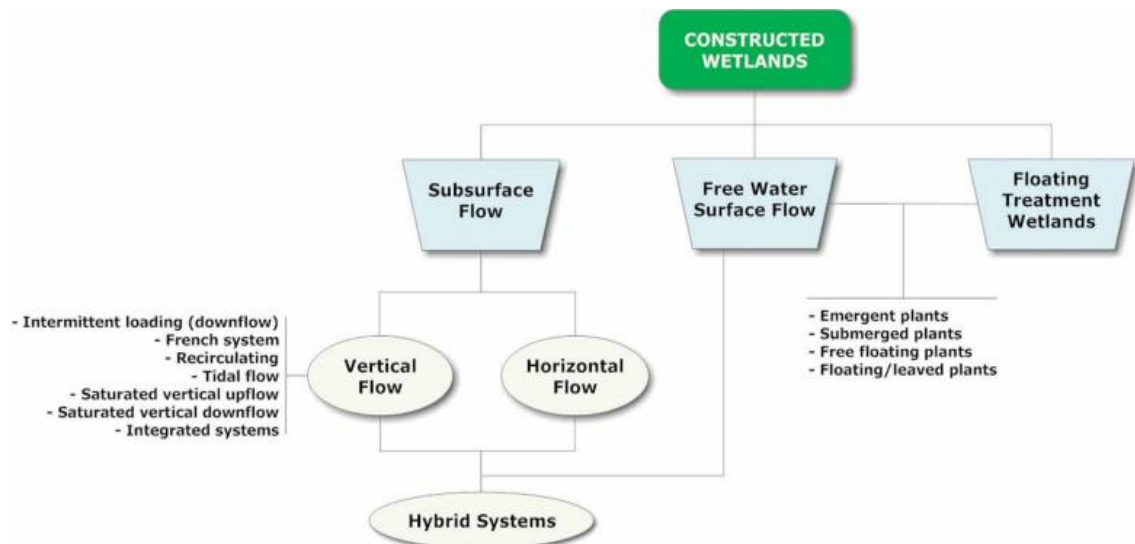
Η τεχνολογία των τεχνητών υγροβιότοπων (CWs), θεωρείται σήμερα ως μια από τις πιο ελκυστικές εναλλακτικές τεχνολογίες επεξεργασία λυμάτων η οποία δεν απαιτεί τη χρήση χημικών ούτε εξωτερικής ενέργειας και έχει λάβει μεγάλο επιστημονικό ενδιαφέρον κυρίως τα τελευταία 20 χρόνια. Ο πρώτος πλήρους κλίμακας τεχνητός υγροβιότοπος σχεδιάστηκε στα τέλη του 1960 και σήμερα υπάρχουν περισσότεροι από 50.000 στην Ευρώπη σε λειτουργία(Wu et al., 2015). Αναφέρονται ως «πράσινη» τεχνολογία και μιμούνται τους διάφορους φυσικούς, χημικούς και βιολογικούς μηχανισμούς των φυσικών υγροβιότοπων για την επεξεργασία ρύπων, την απομάκρυνση θρεπτικών ουσιών και παθογόνων , μέσω

αλληλεπιδράσεων του υποστρώματος των υδροβιότοπων , της βλάστησης και των μικροοργανισμών με ένα τρόπο ιδιαίτερα φιλικό προς το περιβάλλον.

Αυτά τα συστήματα επεξεργασίας παρέχουν πολλαπλά οικονομικά, περιβαλλοντικά, και κοινωνικά οφέλη σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους επεξεργασίας όπως αυτή της ενεργού ιλύος και συνήθως χρησιμοποιούνται ως συμπληρωματικό στάδιο στην τυπική επεξεργασία αποβλήτων (π.χ ως τριτογενής επεξεργασία) , ή ως κύρια. Είναι μια βιώσιμη τεχνολογία που σε πολλές έρευνες έχει διαπιστωθεί ότι έχει καλύτερη απόδοση στην απομάκρυνση διαφόρων μικρορύπων συμπεριλαμβανομένων των αντιβιοτικών και των γονιδίων ανθεκτικότητας. (Rampuria et al., 2021; A. I. Stefanakis, 2015). Επιπλέον το μόνο προϊόν που μπορεί να θεωρηθεί ως υποπροϊόν στις μονάδες τεχνητών υδροβιότοπων είναι η φυτική βιομάζα. Συνήθως η φυτική βιομάζα συλλέγεται και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω εκμετάλλευση ως βιοκαύσιμο για ενέργεια ή για παραγωγή κομπόστ (Alexandros & Akratos, 2016).

Ειδικότερα, χρησιμοποιούνται για την επεξεργασία όχι μόνο αστικών λυμάτων αλλά και γεωργικών, στραγγισμάτων από χώρους υγειονομικής ταφής, πετροχημικών προϊόντων ,καθώς και βιομηχανικών λυμάτων. (Dires et al., 2018; Parde et al., 2021). Οι τεχνητοί υδροβιότοποι έχουν την ικανότητα να αποκτούν υψηλούς ρυθμούς απομάκρυνσης BOD , COD , ολικών αιωρούμενων στερεών (TSS) και ολικού φωσφόρου (TP), ενώ είναι λιγότερο αποτελεσματικοί στην αφαίρεση αζώτου και νιτρικών. Επιπλέον σε πολλές μελέτες αναφέρετε η επιτυχημένη δράση τους ως προς την αδρανοποίηση των βακτηρίων δεικτών ενώ παράλληλα τα τελευταία χρόνια έρευνες εστιάζουν στην απομάκρυνση των γονιδίων ανθεκτικότητας (Kaliakatsos et al., 2019). Όσον αφορά τα γονίδια ανθεκτικότητας, οι Pei et al αναφέρουν ότι οι περισσότεροι τεχνητοί υδροβιότοποι μπορούν να επιτύχουν καλύτερα ποσοστά απομάκρυνσης από ότι οι συμβατικές μονάδες επεξεργασίας λυμάτων (Pei et al., 2019)

Οι τεχνητοί υδροβιότοποι ανάλογα την υδρολογία τους, δηλαδή τον τρόπο ροής μέσα σε αυτούς κατηγοριοποιούνται στους ελεύθερης επιφάνειας ή επιφανειακής ροής (Free water surface systems – FWS CWs) και στους υπο-επιφανειακής ροής (Subsurface flow constructed wetlands -SF CWs). Σε αντίθεση με τους FWS CWs, στους υπο-επιφανειακής ροής τεχνητούς υδροβιότοπους δεν υπάρχει επιφάνεια νερού εκτεθειμένη στην ατμόσφαιρα, η στάθμη του νερού διατηρείται 5-10 cm κάτω από την επιφάνεια του στρώματος χαλικιού και το νερό ρέει μέσα από τους πόρους του υποστρώματος και έρχεται σε επαφή με τις ρίζες των φυτών και το προσκολλημένο βιοφίλμ (A. I. Stefanakis, 2015). Περαιτέρω ταξινόμηση στους τεχνητούς υδροβιότοπους γίνεται με βάση την κατεύθυνση της ροής καθώς χωρίζονται σε οριζόντιας ροής (Horizontal Flow-HF) και σε κάθετης ροής (Vertical Flow-VF) .

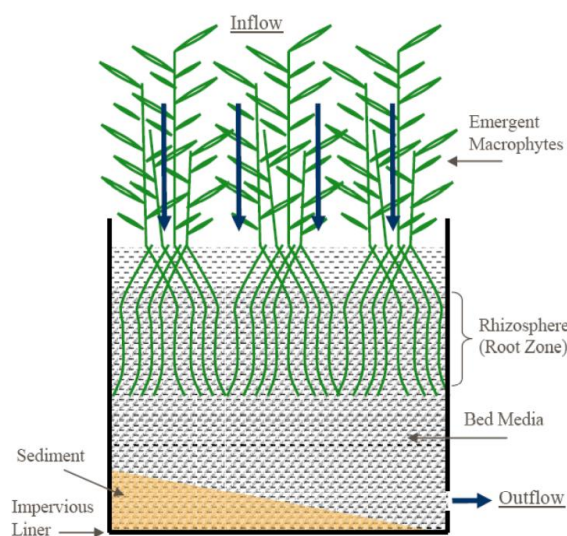


Εικόνα 8. Ταξινόμηση ειδών τεχνητών υγροβιότοπων (Α. Ι. Stefanakis, 2015)

Λόγω του υψηλότερου κόστους στην κατασκευή και στη λειτουργία τους, οι κάθετης ροής τεχνητοί υγροβιότοποι (VFCW) ήταν λιγότερο αναπτυγμένοι και εφαρμοσμένοι σε σχέση με τους ελεύθερης ροής (FWF CW) και οριζόντιας ροής (HSF CW) που ήταν οι κυρίαρχοι τύποι μέχρι πρόσφατα. Ωστόσο, η τελευταία γενιά τεχνητών υγροβιότοπων εμφανίζονται ως συστήματα κάθετης ροής για τους εξής λόγους :

- Μειώνουν τους περιβαλλοντικούς κινδύνους όπως η απελευθέρωση οσμών και αερίων και τον πολλαπλασιασμό εντόμων.
- Έχουν πολύ μεγαλύτερη ικανότητα μεταφοράς οξυγόνου με αποτέλεσμα καλή απόδοση νιτροποίησης
- Μπορούν να απομακρύνουν αποτελεσματικά το BOD₅ ,το COD και τα παθογόνα. (Α. Ι. Stefanakis, 2015; Tempra et al., 2007)

Έτσι, τα τελευταία 15 χρόνια η έρευνα για τα συστήματα VFCW εντατικοποιήθηκε σημαντικά και σήμερα, υπάρχουν διάφορες τροποποιήσεις των συστημάτων VF που είτε έχουν ήδη εφαρμοστεί είτε βρίσκονται υπό διερεύνηση. Τα λύματα τροφοδοτούνται από την κορυφή του συστήματος και στη συνέχεια λόγω βαρύτητας διοχετεύονται σταδιακά προς το κάτω μέρος της κλίνης όπου γίνεται συλλογή της εκροής. Αυτός ο τρόπος τροφοδότησης παρέχει υψηλά επίπεδα μεταφοράς οξυγόνου εντός του υποστρώματος και κατ' επέκταση τα καθιστά αποτελεσματικά στην επεξεργασία λυμάτων. Η πιο κοινή εγκατάσταση είναι μια λεκάνη που περιέχει πολλά στρώματα χαλικιών και άμμου με αυξανόμενη διαβάθμιση από πάνω προς τα κάτω ενώ τα φυτά είναι τοποθετημένα στο πάνω στρώμα του υποστρώματος. Το βάθος της κλίνης κυμαίνεται συνήθως από 0,45m έως 1,20m και το κάτω μέρος της έχει συνήθως μια κίση 1-2% έτσω ώστε να επιτρέπεται η συλλογή του επεξεργασμένου νερού. (Α. Ι. Stefanakis, 2015; Α. Ι. Stefanakis & Tsihrintzis, 2012).



Εικόνα 9. Τυπική μονάδα τεχνητού υγροβιότοπου κάθετης ροής (VF CW) (R. E. Russo, 2008).

3.2.1 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΕΧΝΗΤΩΝ ΥΓΡΟΒΙΟΤΟΠΩΝ

Η απόδοση των τεχνητών υγροβιότοπων σύμφωνα με στοιχεία που έχουν δημοσιοποιηθεί από πολλές μελέτες εξαρτάται κυρίως από τα εξής : το είδος του τεχνητού υγροβιότοπου, το πληρωτικό υλικό και το μέγεθος του πορώδους του , την βλάστηση, τον υδραυλικό χρόνο παραμονής (HRT) και το βάθος του νερού.

Το είδος του τεχνητού υγροβιότοπου παίζει καθοριστικό ρόλο στην απομάκρυνση ρύπων. Οι τεχνητοί υγροβιότοποι υπο-επιφανειακής ροής παρουσιάζουν περισσότερα πλεονεκτήματα ως προς την αδρανοποίηση και την εξάλειψη των γονιδίων ανθεκτικότητας (ARGs) σε σχέση με τους επιφανειακής ροής. Το γεγονός αυτό μπορεί να πηγάζει από το ότι στους πρώτους υπάρχει περισσότερος διαθέσιμος χώρος για την απορρόφησή τους και οι βιολογικές διεργασίες που συμβαίνουν στο υπόστρωμα υπόγειας ροής είναι πιο πολύπλοκες (Pei et al., 2019).

Το πληρωτικό υλικό στους τεχνητούς υγροβιότοπους είναι μεγάλης σημασίας καθώς στους τεχνητούς υγροβιότοπους υπόγειας ροής λειτουργούν ως φίλτρα και αποτελούν το 50% του όγκου του συστήματος. Επιπλέον, αποτελούν μέσα υποστήριξης της βλάστησης και επιτρέπουν βιολογικές και φυσικοχημικές αλληλεπιδράσεις. Ταυτόχρονα είναι τα κύρια μέσα στα οποία αναπτύσσονται τα βιοφίλμ. Τα πιο χρησιμοποιούμενα υποστρώματα σε CW είναι τα συμβατικά υποστρώματα, όπως η άμμος και το χαλίκι ενώ μελέτες έχουν επικεντρωθεί τα τελευταία χρόνια στην επιλογή νέων υποστρωμάτων και η επαναχρησιμοποίηση άλλου υλικού όπως είναι τα υποστρώματα από ανακυκλωμένο τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο (PET) (Pei et al., 2019).

Τα μικρού μεγέθους σωματίδια ευνοούν τα υψηλά ποσοστά αρχικής απομάκρυνσης αλλά ταυτόχρονα και την ταχεία απόφραξη (clogging) και δυνητική μακροχρόνια αστοχία των τεχνητών υδροβιότοπων. Η απόφραξη στους τεχνητούς υδροβιότοπους υπο-επιφανειακής ροής είναι ένα γνωστό πρόβλημα που μειώνει τη διάρκεια ζωής των συστημάτων. Ωστόσο στην ίδια έρευνα αναφέρεται ότι συγκρίνοντας κλίνες άμμου (0,3-0,9mm διάμετρος) με κλίνες χαλικιού (2-12mm διάμετρος), προκύπτει ότι τα πρώτα έχουν καλύτερη απόδοση στην απομάκρυνση μικροοργανισμών. Από την άλλη πλευρά οι Parde et al, συμπεραίνουν ότι τα χαλίκια μπορούν να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά ως μέσο για την αφαίρεση οργανικής ύλης, φωσφόρου, θεικού και αρσενικού (Parde et al., 2021). Επομένως, η επιλογή του μεγέθους των σωματιδίων του υποστρώματος πρέπει να γίνεται με τέτοιο τρόπο ώστε να εξασφαλίζεται τόσο η αποτελεσματική επεξεργασία όσο και η πρόληψη απόφραξης ενώ ταυτόχρονα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ότι διαφορετικά υποστρώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την απορρόφηση διαφορετικών ρύπων. Έρευνες έχουν δείξει ότι το πλαστικό (PET), σε σχέση με το χαλίκι, μπορεί να επεκτείνει τη ωφέλιμη ζωή της μονάδας καθώς είναι ελαφρύτερο, σε περίπτωση φαινομένου απόφραξης (clogging) είναι εύκολος ο καθαρισμός του και τέλος, ελαχιστοποιεί την απαιτούμενη επιφάνεια κατασκευής των τεχνητών υδροβιότοπων (Luis et al., 2021).

Όσον αφορά στην βλάστηση στους τεχνητούς υδροβιότοπους αρχικά θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η αντοχή των φυτών στις εκάστοτε κλιματολογικές συνθήκες της περιοχής όπου λειτουργούν τα συστήματα αυτά (Wu et al., 2015). Η επιλογή βλάστησης στον τεχνητό υδροβιότοπο οφείλει να συμβαδίζει με τη βλάστηση τοπικών υδροβιότοπων για καλύτερο αποτέλεσμα και να είναι ανθεκτική σε παράσιτα, ασθένειες αλλά και στη μεγάλη ποικιλία ρύπων που συναντώνται στα λύματα (οργανική ύλη, βαρέα μέταλλα κλπ) (Stefanakis et al., 2014). Παρότι δεν υπάρχουν σαφείς οδηγίες ως προς την επιλογή βλάστησης στους τεχνητούς υδροβιότοπους έχει διαπιστωθεί ότι τα καλάμια *Phragmites australis* και τα cattails (*Typha latifolia*) έχουν καλύτερες καταγεγραμμένες αποδόσεις στην επεξεργασία των λυμάτων. Τα *Phragmites australis* είναι τα πιο συνηθισμένα χρησιμοποιούμενα φυτά σε παγκόσμιο επίπεδο λόγω της άριστης απόδοσής τους, της ικανότητάς τους να αναπτύσσουν βαθιές ρίζες και να αντιστέκονται στα “επιθετικά” λύματα και σε αρρώστιες. Γενικά υπάρχει κάποια ασυμφωνία στις απόψεις σχετικά με την σημασία των φυτών στην απομάκρυνση των κολοβακτηριδίων και των ανθεκτικών εντερικών βακτηρίων στα αντιβιοτικά στους τεχνητούς υδροβιότοπους (Dires et al., 2018). Ωστόσο στις περισσότερες μελέτες αναφέρεται ότι η βλάστηση είναι εξαιρετικά μεγάλης σημασίας καθώς συμβάλουν στην παροχή οξυγόνου στο σύστημα σε ποσοστό 90% του συνολικού οξυγόνου που υπάρχει στο υπόστρωμα. Με αυτό τον τρόπο, δημιουργούν ένα περιορισμένο αερόβιο μικροπεριβάλλον στην υπόγεια περιοχή των συστημάτων. Επιπλέον μελέτες δείχνουν ότι καθώς τα φυτά συμμετέχουν στην αφομοίωση θρεπτικών ουσιών, στην παροχή επιφάνειας για ανάπτυξη βιοφίλμ, στη συγκράτηση αιωρούμενων σωματιδίων, ευνοούν τον υδραυλικό χρόνο παραμονής και ως εκ τούτου, οι διαδικασίες απομάκρυνσης ρύπων

συμβάλλουν άμεσα στη μικροβιακή απομάκρυνση μέσω της εκπομπής τοξικών ουσιών από τις ρίζες ,ενώ τέλος ελέγχουν την ανάπτυξη των αλγών (Langergraber et al., 2019.; Torrents Armengol, 2016.).

Τέλος, σύμφωνα με τους Wu et al, το βάθος του νερού είναι σημαντικός παράγοντας καθώς καθορίζει τον τύπο φυτών που θα χρησιμοποιηθούν στον τεχνητό υδροβιότοπο και θα επηρεάσει επίσης τις αντιδράσεις οξειδοαναγωγής και το επίπεδο του διαλυμένου οξυγόνου (Wu et al., 2016). Με λίγα λόγια , επηρεάζοντας τις βιοχημικές αντιδράσεις που μπορούν να συμβούν, τελικά επηρεάζει και την απομάκρυνση των ρύπων.

3.2.2 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗΣ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

Σε αντίθεση με άλλες συμβατικές μεθόδους που εστιάζουν σε ένα μόνο μηχανισμό επεξεργασίας ή έναν μόνο τύπο ρύπων , οι τεχνητοί υδροβιότοποι χρησιμοποιούν πολλές συνεργικές διεργασίες για να μετασχηματίσουν και/ή αφαιρέσουν τους ρύπους. Συγκεκριμένα, οι μηχανισμοί απομάκρυνσης παθογόνων στους τεχνητούς υδροβιότοπους αποτελούν μια συνδυασμένη δράση διάφορων φυσικών, χημικών και βιολογικών διεργασιών. Συνοπτικά αναφέρονται οι παρακάτω:

Η φυσική διεργασία περιλαμβάνει την καθίζηση των αιωρούμενων σωματιδίων που υπάρχουν στα λύματα, καθώς και το φιλτράρισμα στο οποίο υπόκεινται καθώς περνάνε διαμέσου του υποστρώματος. Η διαδικασία καθίζησης όχι μόνο μειώνει την οργανική ύλη αλλά και εξαλείφει τα κολοβακτηρίδια (Parde et al., 2021).Στις χημικές διεργασίες συμπεριλαμβάνεται η οξείδωση και η προσρόφηση ενώ στους βιολογικούς μηχανισμούς εντάσσονται οι αλληλεπιδράσεις μικροοργανισμών με το βιοφίλμ και ουσίες που εκκρίνονται από ριζόσφαιρα, ο ανταγωνισμός για τα θρεπτικά, ο φυσικός θάνατος, η θήρευση από τα νηματώδη και τα πρώτιστα και τέλος η επίθεση από ιούς και λυτικά βακτήρια (Rampuria et al., 2021).

Οι μηχανισμοί απομάκρυνσης βακτηρίων και κοπρανωδών παθογόνων στους τεχνητούς υδροβιότοπους ποικίλουν ανάλογα με τον συγκεκριμένο τύπο σχεδιασμού της μονάδας, το υδραυλικό καθεστώς που επικρατεί , τα χαρακτηριστικά των λυμάτων ακόμα και το τοπικό κλίμα.

Το στρώμα βιοφίλμ που σχηματίζεται κατά μήκος των ριζών των φυτών αλλά και στους κόκκους του μέσου του υποστρώματος μπορεί να διευκολύνει την απομάκρυνση παθογόνων μέσω της προσκόλλησής τους σε αυτό και ο φυσικός θάνατος (natural die-off) θεωρείται επίσης ως ένας σημαντικός μηχανισμός εξάλειψης των παθογόνων (Alexandros & Akratos, 2016).

Διάφορες έρευνες έχουν ασχοληθεί τα τελευταία χρόνια με την απομάκρυνση γονιδίων ανθεκτικότητας (ARGs) στους τεχνητούς υδροβιότοπους και σύμφωνα με

στοιχεία από την έρευνα των Zhang et al, οι τεχνητοί υγροβιότοποι αποδεικνύονται πιο αποτελεσματικοί στην απομάκρυνσή τους σε σχέση με τα συμβατικά συστήματα επεξεργασίας λυμάτων (Zhang et al., 2020). Η υψηλή αυτή αποτελεσματικότητα αποδίδεται στην πολύ καλή απόδοση διήθησης των μικροοργανισμών που κουβαλάνε τα ARGs στο υπόστρωμα του συστήματος. Συγκεκριμένα βρήκαν ότι γονίδια tet (αντοχής στην τετρακυκλίνη) από λύματα χοίρων μειώθηκαν κατά 50% τεχνητούς υγροβιότοπους. Επίσης, οι Rampuria et al, διαπίστωσαν καλύτερη αποτελεσματικότητα απομάκρυνσης γονιδίων sul1 σε σχέση με συμβατικές τεχνολογίες (Rampuria et al., 2021).

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι μόλις την τελευταία δεκαετία, έχει ξεκινήσει η αξιολόγηση των τεχνητών υγροβιότοπων ως προς την ικανότητά τους να απομακρύνουν παθογόνα βακτήρια από τα λύματα. Έτσι, οι γνώσεις μας σχετικά με την τύχη τόσο των παθογόνων μικροοργανισμών όσο και των γονιδίων ανθεκτικότητας σε αυτούς είναι γενικά περιορισμένες (Manaia, 2017).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη της επεξεργασίας αστικών αποβλήτων από την Εγκατάσταση Επεξεργασίας Λυμάτων Χανίων, σε τρεις ,διαφορετικές μεταξύ τους, πιλοτικές μονάδες τεχνητών υγροβιότοπων.

Στην εκροή αυτών των υγροβιότοπων έγινε :

- Διερεύνηση απομάκρυνσης μικροβιακών δεικτών (συγκεκριμένα *Escherichia coli* , *Staphylococcus sp.* , *Enterococcus sp.*).
- Έλεγχος της ανθεκτικότητάς τους σε ποικιλία αντιβιοτικών (Σιπροφλοξασίνη, Αμοξικιλίνη και Σουλφαμεθοξαζόλη) με την εύρεση της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (με τη μέθοδο MIC - Minimum Inhibitory Concentration) για καθένα από τα υπό μελέτη αντιβιοτικά.
- Έλεγχος μεταβολής του προφίλ ανθεκτικότητας των βακτηρίων που παρέμειναν μετά την επεξεργασία από τον εκάστοτε υγροβιότοπο.
- Απομόνωση γενετικού υλικού από δείγματα αρχικού λύματος και εκροής των υγροβιότοπων και έλεγχος ύπαρξης συγκεκριμένων γονιδίων ανθεκτικότητας.
- Έλεγχος απομάκρυνσης Αδενοϊού (AdV) από τα επεξεργασμένα λύματα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΔΙΑΤΑΞΗΣ ΤΕΧΝΗΤΩΝ ΥΓΡΟΒΙΟΤΟΠΩΝ



Εικόνα 10. Πιλοτικές μονάδες τεχνητών υγροβιότοπων στο Πολυτεχνείο Κρήτης. Στα αριστερά ο υγροβιότοπος Control (CWC) με HDPE ως πληρωτικό υλικό, στη μέση ο CWP με βλάστηση και HDPE και τέλος στα δεξιά ο CWG με βλάστηση και χαλίκι.

Οι τεχνητοί υγροβιότοποι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν κατακόρυφης ροής και αποτελούνταν από βαρέλια διαμέτρου 37cm, ύψους 50 cm και ύψους στάθμης νερού 25 cm. Στους δύο τεχνητούς υγροβιότοπους είχε γίνει φύτευση ενός μακρόφυτου (κοινό καλάμι) *Phragmites Australis*. Το πληρωτικό υλικό του ενός ήταν ασβεστολιθικό χαλίκι (Gravel - CW_G) ενώ του άλλου ανακυκλωμένο πλαστικό HDPE (Plastic- CWP). Ο τρίτος υγροβιότοπος ήταν το Control (CWC), δηλαδή δεν είχε γίνει φύτευση και σαν πληρωτικό υλικό είχε επίσης HDPE.

Όσον αφορά στο σχεδιασμό τους, πιο συγκεκριμένα, για τη μονάδα CW_G το πληρωτικό υλικό ήταν χαλίκι διαμέτρου 1,7-2 cm με πορώδες που ανέρχεται κοντά στο 38% και στην μονάδα CW_P είχαν τοποθετηθεί δύο μεγέθη ανακυκλωμένου πλαστικού : εμπορικές ετικέτες HX38 Biocarrier και HX25KLL Biocarrier που παρέχονται από την Εταιρία Christian Stöhr GmbH & Co. KG. Χαρακτηριστικά για HX38: ειδική επιφάνεια 188 m² /m³ , μήκος 38mm και διάμετρος 38mm. Χαρακτηριστικά για HX25KLL: ειδική επιφάνεια 360 m² /m³ , μήκος 25mm και διάμετρος 25mm. Το πορώδες και των δύο τύπων πλαστικού ανέρχεται στο 95%.

Η φόρτιση των υδροβιότοπων γινόταν ανά 3 ημέρες (1 μέρα και ακολουθούσαν 2 μέρες ανάπαυσης) και το απόβλητο με το οποίο γινόταν η φόρτισή τους, προερχόταν από την Εγκατάσταση Επεξεργασίας Λυμάτων Χανίων, μετά την πρωτοβάθμια καθίζηση. Στον πυθμένα των μονάδων, υπήρχε ένας εύκαμπτος σωλήνας οδηγώντας το επεξεργασμένο λύμα εντός ενός δοχείου συλλογής.

Η διεξαγωγή του πειράματος διήρκησε τους μήνες Ιούνιο με Οκτώβρη και σύμφωνα με το <http://meteosearch.meteo.gr/> παρουσιάζονται οι τιμές μέσης και μέγιστης θερμοκρασίας, βροχόπτωσης, μέσης και μέγιστης ταχύτητας ανέμου, καθώς και επικρατούσας διεύθυνσης ανέμου για τους μήνες αυτούς.

Πίνακας 1. Μέση και μέγιστη θερμοκρασία, μέση βροχόπτωση, μέση και μέγιστη ταχύτητα ανέμου, επικρατούσα διεύθυνση

Μήνες	Μέση Θερμοκρασία (°C)	Μέγιστη Θερμοκρασία (°C)	Μέση βροχόπτωση (mm)	Μέση Ταχύτητα ανέμου (km/h)	Μέγιστη Ταχύτητα ανέμου (km/h)	Επικρατούσα διεύθυνση ανέμου
Ιούλιος	27,7	40,1	0	7,3	54,7	SW
Αύγουστος	30,1	42,7	0,06	7,2	54,7	SW
Σεπτέμβρης	24,2	37,2	9	5,5	38,6	NE
Οκτώβρης	19,4	27,2	12,3	5,4	43,5	SW

3.2 ΥΛΙΚΑ

ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ

- ✚ Συσκευή διήθησης υπό κενό (PALL Gelman Laboratory)
- ✚ Θάλαμος επώασης (Thermo Scientific Heraeus)
- ✚ Κλίβανος υγρής αποστείρωσης (TRADE Raypa)
- ✚ Ζυγός ακριβείας (Adventurer OHAUS Balance)
- ✚ Φασματοφωτόμετρο (Shimadzu)
- ✚ Φυγόκεντρος - Centrifuge 5418R (Eppendorf)
- ✚ Microplate reader (LT-4000)
- ✚ Φυγόκεντρος – SIGMA 4-16K
- ✚ StepOnePlus -Real Time PCR System (Applied Biosystems)

StEPΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΥΛΙΚΑ

- ✚ Φιάλες διήθησης (Whatman)
- ✚ Φίλτρα μεμβράνης νιτροκυτταρίνης, διαμέτρου 47mm και μέγεθος πόρων 0,45μm
- ✚ Αποστειρωμένα τρυβλία Petri διαμέτρου 9cm και 6cm
- ✚ Πλάκες μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων (microplate)

ANTIBIOTIKA (Sigma-Aldrich)

- Amoxicillin (64mL/L, 16mL/L)
- Ciprofloxacin (16mL/L, 16mL/L)
- Sulfamethoxazole (16mL/L, 8mL/L)

ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

- Nutrient Agar
- Slanetz
- Bile Esculin Agar
- Nutrient Broth
- HiCrom Agar
- Mannitol Salt Agar

ΥΛΙΚΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ DNA ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΥ PCR

- NucleoSpin Soil DNA extraction Kit (Macherey-Nagel)
- MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plates (Applied Biosystems)
- SYBR Green qPCR Master Mix (KAPA BIOSYSTEMS)

3.3 ΜΕΘΟΔΟΙ

3.3.1 ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

Για την διεξαγωγή του πειράματος, πραγματοποιήθηκε μια σειρά από δειγματοληψίες χωρισμένες σε τρεις περιόδους: Ιούλιος – 1^η περίοδος, Αύγουστος 2^η περίοδος, Σεπτέμβρης-Οκτώβρης – 3^η περίοδος. Τα δείγματα συμπεριλαμβάνουν τις εκροές των τριών υδροβιότοπων (CW_G , CW_P , CW_C) και την είσοδο σε αυτούς η οποία αποτελείται από αστικά λύματα της μονάδας επεξεργασίας αστικών λυμάτων Χανίων. Η λήψη των δειγμάτων γίνονταν σε πλαστικά μπουκάλια (500ml). Η επεξεργασία τους γινόταν όσο το δυνατόν πιο άμεσα μετά τη λήψη τους (μέχρι 6 μέρες συνήθως μετά την λήψη) ώστε να αποφευχθεί η αλλοίωσή τους και τα δείγματα συντηρούνταν στο ψυγείο. Ακολουθεί ένας συγκεντρωτικός πίνακας των δειγματοληψιών για αυτή την περίοδο:

Πίνακας 2. Δειγματοληψίες

Δειγματοληψία	Ημερομηνία
1	15/07/2021
2	20/07/2021
3	03/08/2021
4	12/08/2021
5	20/08/2021
6	27/08/2021
7	05/09/2021
8	14/09/2021
9	05/10/2021

3.3.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Στα δείγματα που συλλέχθηκαν έγινε έλεγχος για την παρουσία βακτηρίων που ανήκουν στα γένη *Escherichia coli*, *Enterococcus sp.* και *Staphylococcus sp.* Για την απομόνωσή τους, αρχικά έγινε διήθηση των δειγμάτων μέσω φίλτρων και στη συνέχεια τα φίλτρα τοποθετήθηκαν σε εκλεκτικά θρεπτικά υλικά ώστε να γίνει η καλλιέργεια των επιθυμητών βακτηριακών στελεχών. Η διήθηση έλαβε χώρα σε συσκευή διήθησης υπό κενό μετά από αποστείρωσή της, χρησιμοποιώντας κάθε φορά 100 mL δείγματος. Επειδή τα δείγματα προέρχονταν από βιολογικό καθαρισμό και είχαν μεγάλη συγκέντρωση κοπρανώδους υλικού ήταν απαραίτητη η διεξαγωγή αραιώσεων με χρήση αποστειρωμένου νερού, προτού γίνει η διήθησή τους. Οι αραιώσεις έγιναν με τη μέθοδο διαδοχικών αραιώσεων.

Στη συνέχεια αναφέρεται αναλυτικά η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την απομόνωση κάθε βακτηρίου με βάση το πρωτόκολλο του κάθε δείκτη:

E. coli

1. Μετά τη διήθηση του υγρού δείγματος μεταφορά του φίλτρου σε εκλεκτικό θρεπτικό υλικό HiCrom Agar.
2. Επώαση στους 37° C για 24±4 h.
3. Καταμέτρηση των αποικιών (CFU) που δημιουργούνται με μπλε χρώμα.

Enterococcus sp.

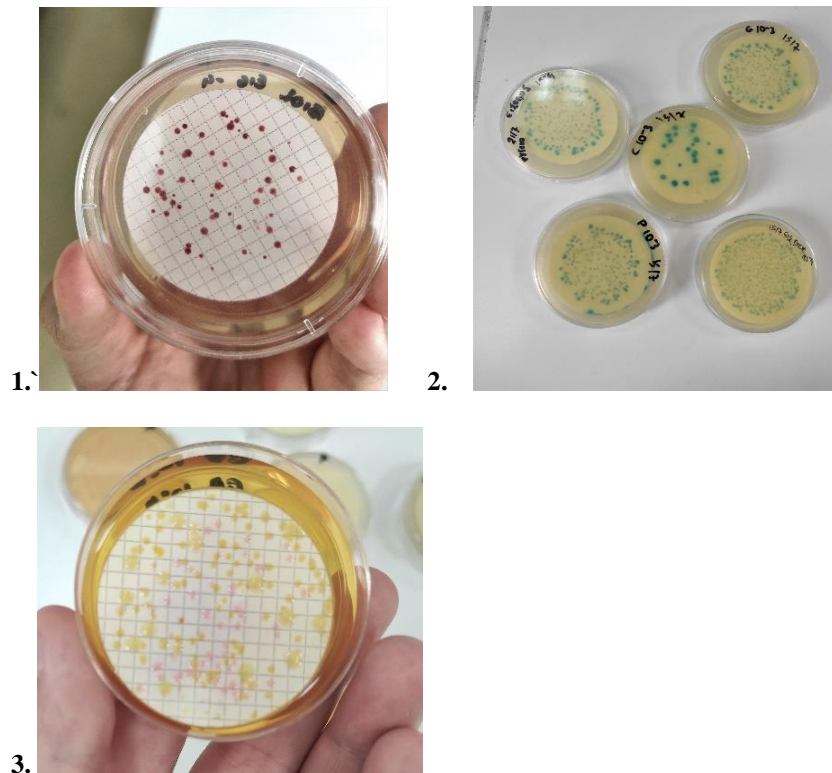
1. Μετά τη διήθηση του υγρού δείγματος μεταφορά του φίλτρου σε εκλεκτικό θρεπτικό υλικό Slanetz & Bartley Medium.
2. Επώαση στους 37° C για 48±4 h.

3. Καταμέτρηση των αποικιών (CFU) που δημιουργούνται με καφέ-κόκκινου χρώματος .
4. Μεταφορά του φίλτρου σε άλλο τρυβλίο με υπόστρωμα Bile-Aesculin για την επιβεβαίωση των *Enterococcus sp.*
5. Καταμέτρηση σκούρων κόκκινων αποικιών με ελαφριά σκιά μετά από επώαση στους 44° C για 20min.

Staphylococcus sp.

1. Μετά τη διήθηση του υγρού δείγματος μεταφορά του φίλτρου σε εκλεκτικό θρεπτικό υλικό Mannitol Salt Agar
2. Επώαση στους 37° C για 24±4 h.
3. Καταμέτρηση των αποικιών (CFU) που δημιουργούνται με κίτρινο χρώμα.

Τα αποτελέσματα από την παραπάνω πειραματική διαδικασία καταγράφηκαν σε CFU/100 mL και τα τρυβλία στη συνέχεια συσκευάστηκαν και τοποθετήθηκαν στο ψυγείο ώστε να διατηρηθούν.



Εικόνα 11. Καλλιέργειες 1. *Enterococcus sp.*, 2. *E. coli*, 3. *Staphylococcus sp.*

3.3.3 ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

Για τον έλεγχο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά, ενδεδειγμένη μέθοδος θεωρείται η μέθοδος Ελάχιστης Ανασταλτικής Συγκέντρωσης (Minimum Inhibitory Concentration-MIC). Σύμφωνα με αυτή προσδιορίζεται η ελάχιστη συγκέντρωση αντιβιοτικών που αναστέλλει την ανάπτυξη μικροοργανισμών μετά από επώαση για 24h. Έγινε έλεγχος σε επιλεγμένες αποικίες *E.coli*, *Enterococcus sp.* και *Staphylococcus sp.* ως προς την ανθεκτικότητά τους σε συγκεκριμένα αντιβιοτικά : Αμοξικιλίνη (AMOX), Σιπροφλοξασίνη (CIP) και Σουλφαμεθοξαζόλη (SMX). Η επιλογή αντιβιοτικών έγινε ώστε να υπάρχουν αντιβιοτικά από διαφορετικές κλάσεις αντιβιοτικών.

Αρχικά, παρασκευάστηκαν τα διαλύματα αντιβιοτικών προς χρήση. Οι συγκεντρώσεις αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε ένα από τα βακτήρια παρατίθενται στον πίνακα που ακολουθεί και επιλέχθηκαν με βάση τα όρια ευαισθησίας/αντοχής που αναφέρει το EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) .

Πίνακας 3.Συγκεντρώσεις Amoxicillin (mg/L)

Βακτήρια	Συγκεντρώσεις Amoxicillin (mg/L)							
<i>E. coli</i>	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25
<i>Enterococcus sp.</i>	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625
<i>Staphylococcus sp.</i>	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125

Πίνακας 4. Συγκεντρώσεις Ciprofloxacin (mg/L)

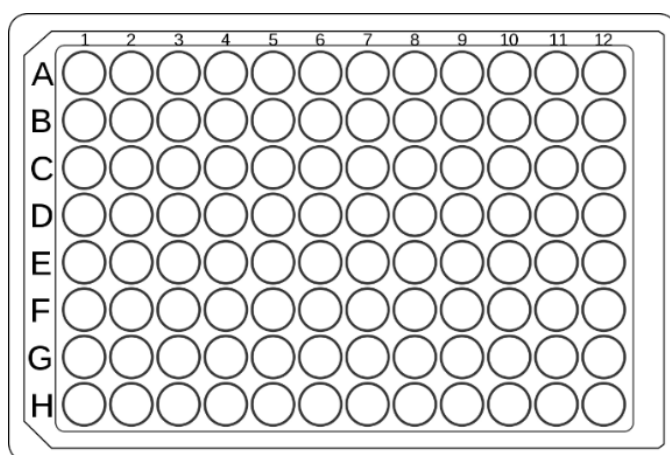
Βακτήρια	Συγκεντρώσεις Ciprofloxacin (mg/L)							
<i>E. coli</i>	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625
<i>Enterococcus sp.</i>	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625
<i>Staphylococcus sp.</i>	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125

Πίνακας 5. Συγκεντρώσεις Sulfamethoxazole (mg/L)

Βακτήρια	Συγκεντρώσεις Sulfamethoxazole (mg/L)							
<i>E. coli</i>	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625
<i>Enterococcus sp.</i>	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125
<i>Staphylococcus sp.</i>	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125

Για την εφαρμογή της μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν πλάκες μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων (πηγαδάκια), στις οποίες αρχικά τοποθετήθηκαν 100μL από Nutrient Broth (πηγαδάκια από στήλες 1-12 και σειρές A-H). Στη συνέχεια, στη σειρά A τοποθετήθηκαν 100 μL από το εκάστοτε αντιβιοτικό μέχρι όμως τη στήλη 9. Αφού έγινε καλή ανάδευση με πολυκάναλη πιπέτα, έγιναν διαδοχικές αραιώσεις μέχρι την τελευταία σειρά του plate και κάθε φορά μεταφέρονταν 100 μL από τη μία γραμμή στην επόμενη. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται αραιώση η $1 \div 2$. Έτσι λοιπόν ξεκινώντας από μια συγκέντρωση αντιβιοτικού στην πρώτη σειρά 32mg/L καταλήγει στην τελευταία σειρά να είναι 0,25mg/L. Από την τελευταία σειρά ωστόσο, πάντα αφαιρούνται 100 μL.

Παράλληλα είχε προηγηθεί η δημιουργία εναιωρημάτων των μικροοργανισμών (Nutrient Broth+μικροοργανισμός) των οποίων είχε ελεγχθεί η οπτική απορρόφηση σε φωτόμετρο στα 600nm ώστε να μην ξεπερνάει το 0,113 καθώς σε αυτή την οπτική απορρόφηση είναι γνωστό ότι υπάρχουν 10^8 CFU/100 ml. Στη συνέχεια, γινόταν αραιώση ώστε το τελικό εναιώρημα με το οποίο θα εμβολιαζόταν το microplate να ήταν συγκέντρωσης 10^6 CFU/100ml. Σε κάθε microplate τοποθετούνταν 4 στελέχη από ένα συγκεκριμένο βακτήριο (πχ *E.coli*) καθένα από τα οποία είχε απομονωθεί από την έξοδο ενός τεχνητού υγροβιότοπου (CWc, CWG, CWP) και από την είσοδο (Influent) για μια συγκεκριμένη ημερομηνία. Από τη στήλη 1 έως την 8 το εναιώρημα κάθε βακτηριακού στελέχους τοποθετούνταν σε 2 στήλες για να υπάρχει επαναληψιμότητα. Στη συνέχεια στις στήλες 10 και 11 που δεν υπήρχε αντιβιοτικό, εμβολιαζόταν το plate με το κάθε εναιώρημα με τρεις επαναλήψεις για ώστε να ελεγχθεί η ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Στη στήλη 9 υπήρχε μόνο αντιβιοτικό, ενώ στη στήλη 12 υπήρχε μόνο Broth, το οποίο χρησιμοποιήθηκε σαν control για να εντοπιστεί τυχόν επιμόλυνση κατά την διαδικασία.



Εικόνα 12.Ενδεικτικά οι θέσεις στο microplate

Μετά την προετοιμασία του microplate, πραγματοποιήθηκε 24h επώαση και στη συνέχεια έγινε μέτρηση οπτικής πυκνότητας χρησιμοποιώντας το φωτόμετρο

ανάγνωσης μικροπλακών Microplate reader (LT-4000) και το λογισμικό Manta LML (England).

Η μέθοδος MIC εφαρμόστηκε σε 6 στελέχη του βακτηρίου *E.coli* για κάθε μια από τις τρεις μονάδες ξεχωριστά και την είσοδο, δηλαδή συνολικά σε 24 στελέχη ομοίως σε 24 στελέχη *Enterococcus sp.* και ομοίως σε 24 στελέχη *Staphylococcus sp.* και για 3 αντιβιοτικά σε κάθε βακτήριο. Συνολικά έγιναν 54 plate για να ελεγχθεί η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση αντιβιοτικού.

3.3.4 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΔΕΝΟΙΟΥ ΣΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR), είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος που αποσκοπεί στον πολλαπλασιασμό *in vitro* συγκεκριμένων αλληλουχιών του DNA. Με την PCR μια συγκεκριμένη περιοχή του DNA (πχ ένα γονίδιο), μπορεί να πολλαπλασιαστεί μέχρι και δισεκατομμύρια φορές αρκεί να είναι γνωστές οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες στα δύο άκρα της περιοχής ενδιαφέροντος. Έτσι, μπορούμε να απομονώσουμε και να πολλαπλασιάσουμε γονίδια που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά. Η PCR βασίζεται σε διαδοχικούς κύκλους αντιγραφής που ξεκινούν από καθορισμένες θέσεις μιας μήτρας DNA και κάθε κύκλος αποτελείται από τρία στάδια:

- Αποδιάταξη του DNA
- Υβριδισμός εκκινητών, δηλαδή πρόσδεσή τους στις συμπληρωματικές προς αυτούς αλληλουχίες
- Επιμήκυνση των εκκινητών για σύνθεση DNA με κατεύθυνση 5'→3'

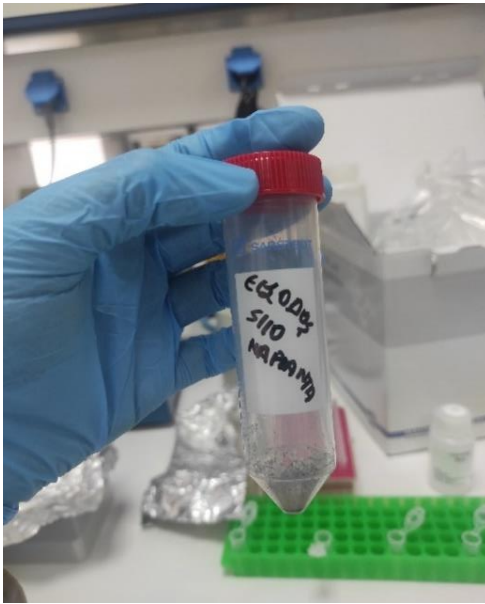
Αναλυτικά τα γονίδια που εξετάστηκαν στην συγκεκριμένη εργασία φαίνονται στον πίνακα ενώ οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR σε κάθε γονίδιο, οι αλληλουχίες των εκκινητών και οι κύκλοι PCR που εφαρμόστηκαν, φαίνονται στο παράρτημα.

Πίνακας 6. Γενετικό υλικό που ανιχνεύθηκε με τη μέθοδο της PCR

sul II	Γονίδια ανθεκτικότητας
qnrA	
ampC	
16S rRNA (Universal)	Συνολικό ριβωσομικό γενετικό υλικό στα δείγματα

Επιπλέον, εξετάστηκε η ύπαρξη ή μη Αδενοϊού (Adv) στα δείγματα πριν την επεξεργασία (Influent) και μετά την επεξεργασία στους τρεις υδροβιότοπους, προκειμένου να διαπιστωθεί αν επιτυγχάνεται η απομάκρυνσή του.

Για την απομόνωση του γενετικού υλικού, αρχικά χρησιμοποιήθηκε το NucleoSpin Soil DNA extraction Kit , με το οποίο από κάθε δείγμα προέκυψαν 50μL. Στη συνέχεια χρησιμοποιώντας τη μέθοδο SYBR Green , έγιναν οι qPCR. Οι πρότυπες καμπύλες που προέκυψαν παραθέτονται στο παράρτημα. Συνολικά έγιναν 5 Real-time PCR : μία για κάθε γονίδιο, για το 16S rRNA και για τον Αδενοϊό.



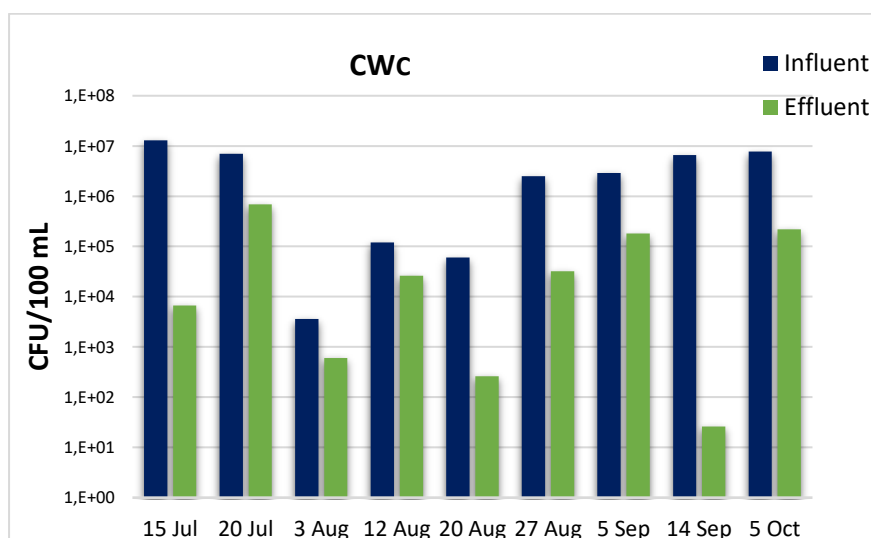
Εικόνα 13. Απομόνωση γενετικού υλικού

4.1 ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΣΤΟΥΣ ΤΕΧΝΗΤΟΥΣ ΥΓΡΟΒΙΟΤΟΠΟΥΣ

4.1.1 ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΚΟΠΡΑΝΩΔΟΥΣ ΜΟΛΥΝΣΗΣ

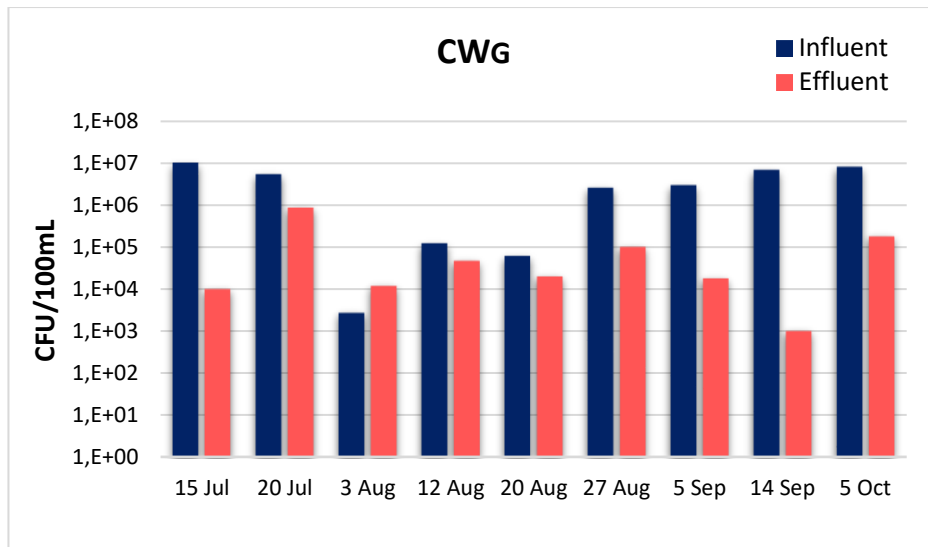
Αρχικά τα συστήματα των τεχνητών υγροβιότοπων ελέγχθηκαν ως προς τη δυνατότητα απομάκρυνσης βακτηριακών δεικτών κοπρανώδους μόλυνσης από τα υγρά απόβλητα υπό τις δεδομένες συνθήκες λειτουργίας και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα γραφήματα που ακολουθούν.

➤ *Escherichia coli*



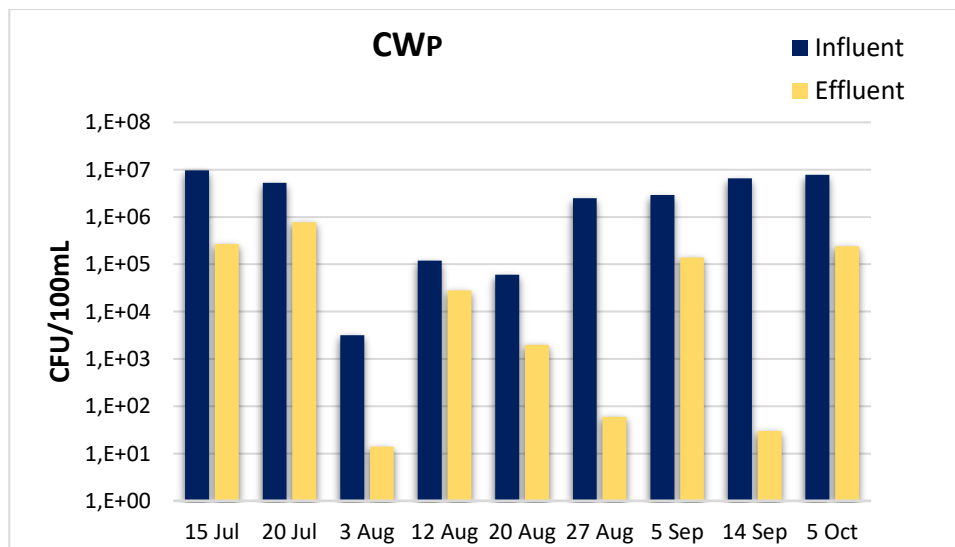
Γράφημα 1. Συγκέντρωση *E.coli* (CFU/100mL) πριν και μετά την επεξεργασία από τον CWC ανά ημερομηνίες δειγματοληψίας.

Στο Γράφημα 1. η απομάκρυνση της *E.coli* ,παρουσιάζει διακυμάνσεις. Υψηλότερη απομάκρυνση παρουσιάζεται στην 8^η δειγματοληψία στις 14 Σεπτεμβρίου , όπου επιτυγχάνεται απομάκρυνση 5,40 Logs της *E.coli* . Ωστόσο, από την αρχή , κατά την πρώτη κιόλας δειγματοληψία επιτυγχάνεται σε μεγάλο βαθμό η απομάκρυνση της *E.coli* στην έξοδο του υγροβιότοπου καθώς τα ποσοστά απομάκρυνσης κυμαίνονται από 78,33% έως και 99,99%.



Γράφημα 2 Συγκέντρωση *E.coli* (CFU/100mL) πριν και μετά την επεξεργασία από τον CWG ανά ημερομηνίες δειγματοληψίας.

Όσον αφορά την απομάκρυνση της *E.coli* στον CWG, αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι υπάρχουν και αρνητικές απομακρύνσεις δηλαδή μετά την επεξεργασία από τον υδροβιότοπο, η συγκέντρωση της *E.coli* είναι υψηλότερη σε σχέση με την είσοδο. Αυτό, όπως φαίνεται από το διάγραμμα, συμβαίνει στην τρίτη δειγματοληψία στις 3 Αυγούστου, ενώ μεγαλύτερη απομάκρυνση εμφανίζεται στις 14 Σεπτεμβρίου 3,83 Logs (99,98%).



Γράφημα 3. Συγκέντρωση *E.coli* (CFU/100mL) πριν και μετά την επεξεργασία από τον CWP ανά ημερομηνίες δειγματοληψίας.

Στο Γράφημα 3. Φαίνεται πως η *E.coli*. παρουσιάζει ιδιαίτερα καλή απομάκρυνση κατά το μήνα Αύγουστο, με την απομάκρυνση να είναι στις 3 Αυγούστου 2,36Logs (99,56%) ενώ στις 27 Αυγούστου 4,62 Logs. (99,90%). Συνολικά όμως διαπιστώνεται τα αποτελέσματα είναι πολύ θετικά ως προς την απομάκρυνσή της μετά την επεξεργασία από τον CWP.

Εξετάζοντας λοιπόν συνολικά τα παραπάνω αποτελέσματα , ο τεχνητός υγροβιότοπος χωρίς φύτευση και HDPE σαν πληρωτικό υλικό , CWC επιτυγχάνει κατά μέσο όρο μείωση 2,02 Logs στην *E.coli* (93,43%) , ο τεχνητός υγροβιότοπος με φύτευση και πληρωτικό υλικό χαλίκι,CWG μείωση 1,49 Logs (78,70%), ενώ τέλος ο τεχνητός υγροβιότοπος με φύτευση και πληρωτικό υλικό HDPE , CWP μείωση 2,18 Logs (94,12%). Αποτελέσματα από άλλες έρευνες αναφέρουν ότι η απομάκρυνση για τα κοπρανώδη κολοβακτηριοειδή υπερβαίνει το 90% γεγονός το οποίο στα αποτελέσματα στη συγκεκριμένη εργασία δεν ισχύει για όλους τους υγροβιότοπους. Πιο συγκεκριμένα αναφέρεται ότι η απομάκρυνση για το βακτήριο *E. coli* είναι μεταξύ 96,6 και 98,9%.(Donde and Xiao 2017). Ωστόσο τα αποτελέσματα των άλλων ερευνών έχουν διεξαχθεί μετά από μεγαλύτερο διάστημα λειτουργίας των τεχνητών υγροβιότοπων .Επιπλέον το φαινόμενο της αρνητικής απομάκρυνσης , έχει αναφερθεί και σε έρευνα των Rampuria et. al καθώς έχει παρατηρηθεί η ικανότητα της *E. coli* να επιβιώνει και αναπτύσσεται εκ νέου στα ιζήματα στο υδάτινο περιβάλλον (Rampuria et al., 2021).

Συγκρίνοντας λοιπόν τους τρεις διαφορετικούς τεχνητούς υγροβιότοπους, παρατηρήθηκε ότι ο τεχνητός υγροβιότοπος , CWP είναι αποτελεσματικότερος στην απομάκρυνση της *E.coli* σε σχέση με τους άλλους δύο. Αυτό είναι σύμφωνο με άλλες έρευνες που αναφέρουν ότι οι υγροβιότοποι με φύτευση έχουν υψηλότερες αποδόσεις απομάκρυνσης της *E.coli* σε σχέση αυτούς χωρίς φύτευση (J. A. García et al., 2013a). Οι Shingare et al, αναφέρουν ότι τα μακρόφυτα στους τεχνητούς υγροβιότοπους αυξάνουν σημαντικά την θανάτωση της *E. coli* (die-off) αλλά και άλλων βακτηρίων εντός της μονάδας. Η παρουσία των φυτών ενισχύει την αερόβια μικροβιακή δραστηριότητα ιδιαίτερα στην επιφάνεια της ρίζας, λόγω απελευθέρωσης οξυγόνου. Μικρόβια είναι επίσης παρόντα ως προσκολλημένο βιοφίλμ στις ρίζες των φυτών και συμβάλουν στην αποικοδόμηση και μείωση των εντερικών βακτηρίων. (Shingare et al., 2019). Επιπλέον, είναι γνωστό ότι τα μακρόφυτα παράγουν εκκρίσεις στη ριζόσφαιρα που μπορεί να επηρεάσουν δυσμενώς τα παθογόνα. Οι García et al, συγκεκριμένα αναφέρουν ότι τα μακρόφυτα *P.australis* παράγουν βακτηριοκτόνες ενώσεις που συνέβαλαν στην αδρανοποίηση των παθογόνων βακτηρίων. (J. A. García et al., 2013a).

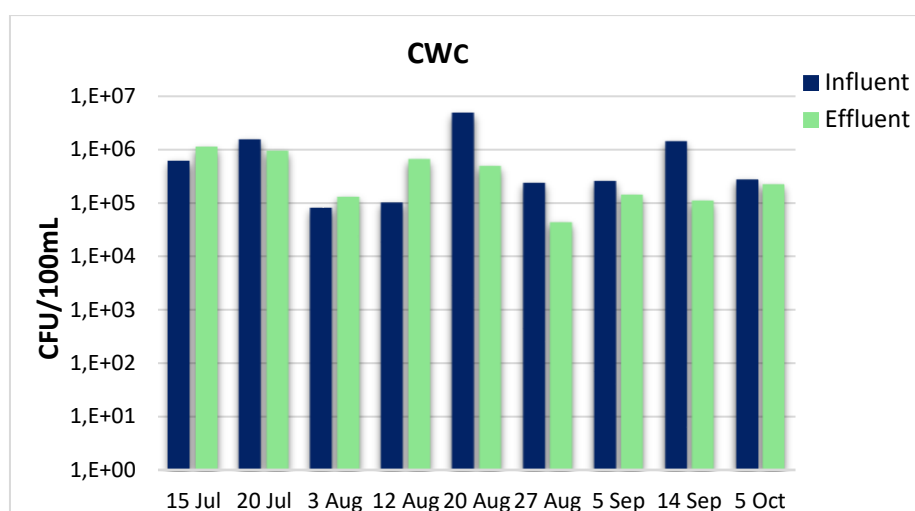
Στους τεχνητούς υγροβιότοπους κάθετης ροής , έχει αναφερθεί ότι κύριος μηχανισμός απομάκρυνσης μικροοργανισμών δεικτών όπως η *E.coli* είναι η μηχανική φίλτρωση του λύματος μέσα από το υπόστρωμα (Alexandros & Akratos, 2016). Για αυτό το λόγο η σημασία του πληρωτικού υλικού στους τεχνητούς υγροβιότοπους είναι τεράστια για την αποτελεσματικότητα της απομάκρυνσης των παθογόνων. Συγκεκριμένα, όπως προαναφέρθηκε μεγαλύτερη απομάκρυνση στην *E.coli* εμφάνισε ο CWP που σαν πληρωτικό υλικό είχε HDPE, ακολουθεί ο CWC που επίσης σαν πληρωτικό υλικό είχε HDPE και τελευταίος είναι ο CWG με πληρωτικό υλικό χαλίκι. Τα αποτελέσματα αυτά δεν είναι σύμφωνα με τις περισσότερες έρευνες οι οποίες αναφέρουν ότι υποστρώματα μικρότερου μεγέθους όπως είναι το χαλίκι , ευνοούν περισσότερο τη διαδικασία της φίλτρωσης. Για παράδειγμα σε έρευνα των Wu et al,

και Chen et al , αναφέρεται μεγαλύτερο ποσοστό απομάκρυνσης της *E.coli* σε μια μονάδα κατακόρυφης ροής που περιείχε άμμο σε σύγκριση με μια άλλη που περιείχε χοντρό χαλίκι (H. Wu et al., 2015; Chen et al., 2019). Στη συγκεκριμένη εργασία ωστόσο που χρησιμοποιήθηκαν χαλίκι και πλαστικό ως υπόστρωμα, είναι λογικό το HDPE να εμφανίζει καλύτερα ποσοστά απομακρύνσεων καθώς έχει πορώδες 95% ενώ το χαλίκι περίπου 38%. Έτσι, ευνοείται η δημιουργία βιοφίλμ στο πρώτο και η δυνατότητα προσρόφησης σε αυτό.

Πίνακας 7. Συγκεντρώσεις *E.coli* στις εισροές και εκροές των μονάδων με τις αντίστοιχες τιμές απομάκρυνσης και απόδοσης.

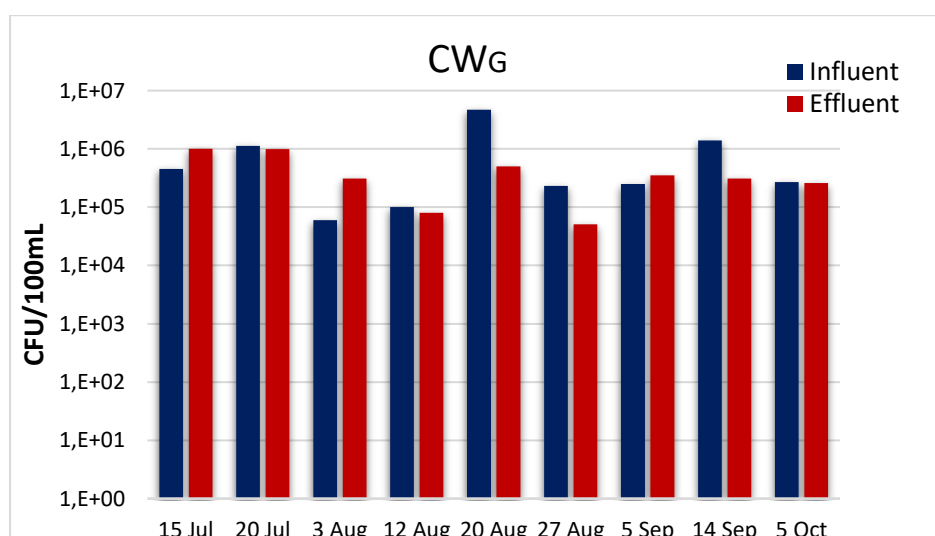
ΜΟΝΑΔΑ	Δείγμα	Είσοδος (CFU/100mL)	Έξοδος (CFU/100mL)	Απομάκρυνση (Logs)	Απόδοση %
CWG	15 Jul	1,3E+07	1,0E+04	3,11	99,92
	20 Jul	7,0E+06	8,5E+05	0,92	87,86
	3 Aug	3,6E+03	1,2E+04	-0,52	0,00
	12 Aug	1,2E+05	4,7E+04	0,41	60,83
	20 Aug	6,0E+04	2,0E+04	0,48	66,67
	27Aug	2,5E+06	1,0E+05	1,40	96,00
	5 Sep	2,9E+06	1,8E+04	2,21	99,38
	14 Sep	6,6E+06	1,0E+03	3,82	99,98
	5 Oct	7,8E+06	1,8E+05	1,64	97,69
	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ:			1,55	78,70
	Δείγμα	Είσοδος (CFU/100mL)	Έξοδος (CFU/100mL)	Απομάκρυνση (Logs)	Απόδοση %
CWC	15 Jul	1,3E+07	6,7E+03	3,29	99,95
	20 Jul	7,0E+06	6,9E+05	1,01	90,14
	3 Aug	3,6E+03	6,0E+02	0,78	83,33
	12 Aug	1,2E+05	2,6E+04	0,66	78,33
	20 Aug	6,0E+04	2,6E+02	2,36	99,57
	27Aug	2,5E+06	3,2E+04	1,89	98,72
	5 Sep	2,9E+06	1,8E+05	1,21	93,79
	14 Sep	6,6E+06	2,6E+01	5,40	99,99
	5 Oct	7,8E+06	2,2E+05	1,55	97,18
	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ :			2,02	93,45
	Δείγμα	Είσοδος (CFU/100mL)	Έξοδος (CFU/100mL)	Απομάκρυνση (Logs)	Απόδοση %
CWP	15 Jul	9,8E+06	2,7E+05	1,56	97,23
	20 Jul	5,3E+06	7,8E+05	0,83	85,14
	3 Aug	3,2E+03	1,4E+01	2,36	99,56
	12 Aug	1,2E+05	2,8E+04	0,63	76,67
	20 Aug	6,0E+04	2,0E+03	1,48	96,67
	27Aug	2,5E+06	6,0E+01	4,62	99,90
	5 Sep	2,9E+06	1,4E+05	1,32	95,17
	14 Sep	6,6E+06	3,0E+01	5,34	99,80
	5 Oct	7,8E+06	2,4E+05	1,51	96,92
	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ:			2,18	94,12

➤ **Staphylococcus sp.**



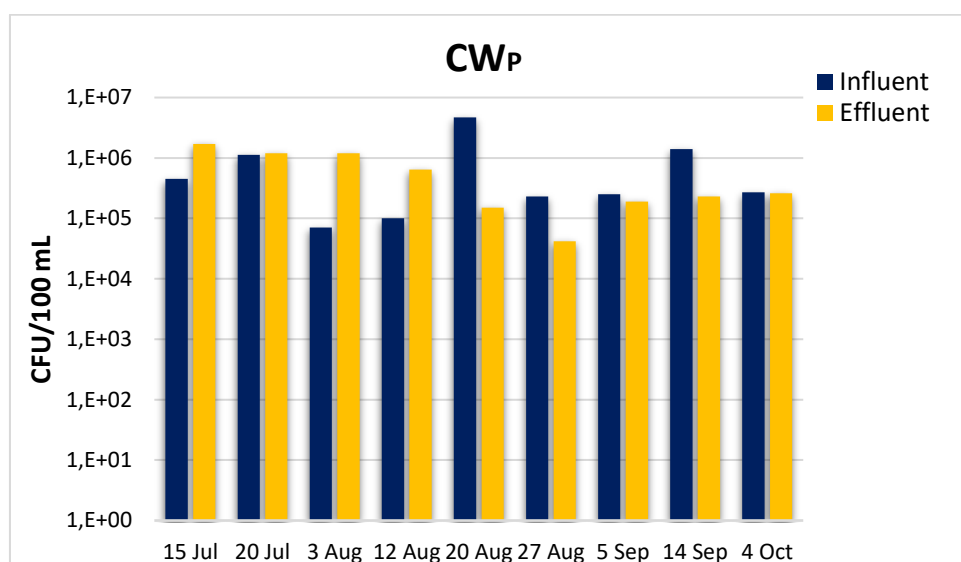
Γράφημα 4 Συγκέντρωση *Staphylococcus sp.* (CFU/100mL) πριν και μετά την επεξεργασία από τον CWC ανά ημερομηνίες δειγματοληψίας.

Στον τεχνητό υγροβιότοπο control , δηλαδή χωρίς φύτευση, όπως παρουσιάζεται στο Γράφημα 4. τα αποτελέσματα ως προς την απομάκρυνσή του δεν είναι ιδιαίτερα θετικά. Σε τρεις από τις ημερομηνίες που έγινε η δειγματοληψία εμφανίζει αρνητική απομάκρυνση δηλαδή η συγκέντρωσή του αυξάνεται στην έξοδο του υγροβιότοπου. Επιπλέον , ακόμα και στις υπόλοιπες ημερομηνίες που υπάρχει ένα ποσοστό μείωσής του μετά την επεξεργασία του λύματος, η μείωση αυτή είναι αρκετά μικρή. Η μεγαλύτερη απομάκρυνση επιτυγχάνεται στις 14 Σεπτεμβρίου και είναι 1,10 Logs (92,14%). Ωστόσο αυτή η μεμονωμένη ημερομηνία στην οποία υπήρχε αυξημένη απόδοση απομάκρυνσης, δεν αρκεί ώστε να θεωρηθεί το σύστημα αποτελεσματικό.



Γράφημα 5 Συγκέντρωση *Staphylococcus sp.* (CFU/100mL) πριν και μετά την επεξεργασία από τον CWG ανά ημερομηνίες δειγματοληψίας.

Στο Γράφημα 5. παρουσιάζονται τα αποτελέσματα απομάκρυνσης του *Staphylococcus sp.* από τον τεχνητό υγροβιότοπο CWG με χαλίκι και βλάστηση. Παρατηρείται ότι το υψηλότερο ποσοστό απομάκρυνσής του εμφανίζεται να είναι 0,97Logs(89,36%) στις 20 Αυγούστου και 0,65Logs(77,86%) στις 5 Σεπτεμβρίου, ενώ σε όλες τις άλλες ημερομηνίες δειγματοληψίας παρουσιάζει είτε αρνητική απομάκρυνση , είτε πάρα πολύ μικρή έως και αμελητέα.



Γράφημα 6. Συγκέντρωση *Staphylococcus sp.* (CFU/100mL) πριν και μετά την επεξεργασία από τον CWP ανά ημερομηνίες δειγματοληψίας.

Σχετικά με την απόδοση του CWP , που σαν πληρωτικό υλικό είχε πλαστικό HDPE, φαίνεται πως όλο σχεδόν τον πρώτο μήνα δειγματοληψίας (15 Ιουλίου -12 Αυγούστου) παρουσιάζει αρνητικές απομακρύνσεις, δηλαδή η συγκέντρωση του αυξάνεται στην έξοδο του υγροβιότοπου. Από εκεί και πέρα παρουσιάζεται ένα υψηλό ποσοστό απομάκρυνσης 1,50 Logs (96,81%) , χωρίς όμως αυτό να συνεχίζει καθώς η μείωση του βακτηρίου μετά την επεξεργασία από τον υγροβιότοπο εμφανίζει διακυμάνσεις . Για το λόγο αυτό δεν μπορεί να θεωρηθεί ως αρκετά αποτελεσματικός ο CWP στην απομάκρυνση του *Staphylococcus sp.*

Όσον αφορά συνολικά τα αποτελέσματα για τη μείωση του *Staphylococcus sp.* από κάθε υγροβιότοπο, ο CWC επιτυγχάνει κατά μέσο όρο μείωση 0,23 Logs (40,42%) , ο CWG μείωση 0,15 (31,19%), ενώ τέλος ο CWP επιτυγχάνει μείωση 0,06Logs (32,20%). Δεν υπάρχουν πολλές βιβλιογραφικές αναφορές από άλλες έρευνες που να έχουν εξετάσει την απομάκρυνση του *Staphylococcus sp.* όπως συμβαίνει με την *E.coli* και τον *Enterococcus sp.* . Ωστόσο οι Dires et al, αναφέρουν ότι στους βακτηριακούς δείκτες και τον *Staphylococcus sp.* δεν υπάρχει ιδιαίτερη διαφοροποίηση στα ποσοστά μείωσής του σε υγροβιότοπους με βλάστηση και σε άλλους χωρίς καθώς συνήθως επιτυγχάνονται απομακρύνσεις έως και 99,3% και στους δύο τύπους. Τα ποσοστά απομάκρυνσης που βρέθηκαν στη συγκεκριμένη εργασία είναι πολύ μικρά και στους τρεις υγροβιότοπους σε σχέση με την τιμή που

αναφέρεται στην άλλη έρευνα. Παρ' όλα αυτά είναι σύμφωνα στο γεγονός ότι δεν υπάρχει ιδιαίτερη διαφορά στην απόδοση του υγροβιότοπου χωρίς βλάστηση σε σχέση με τους άλλους δύο που είχαν .

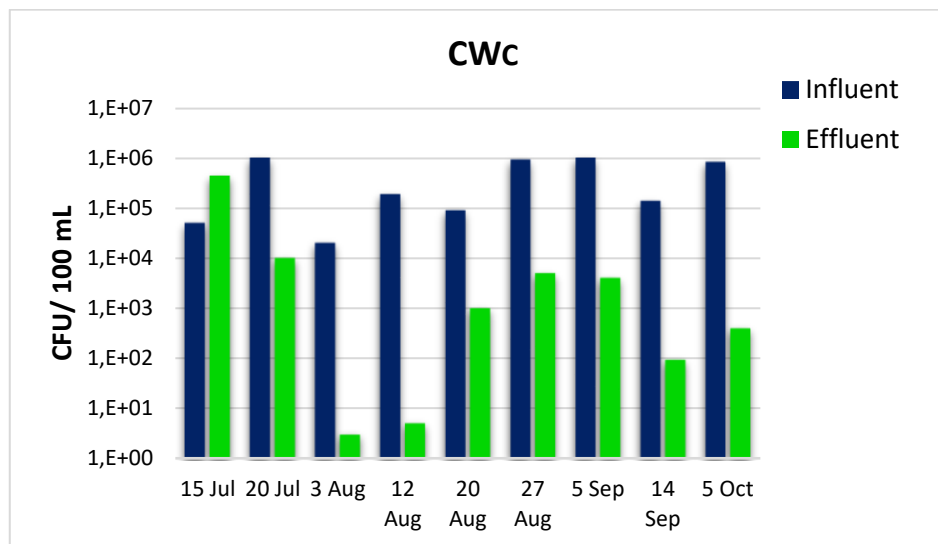
Σε γενικές γραμμές ωστόσο τα αποτελέσματα απομάκρυνσης του *Staphylococcus sp.* σε όλες τις μονάδες τεχνητών υγροβιότοπων ήταν ιδιαίτερα χαμηλά. Σε έρευνες έχει αναφερθεί ότι ορισμένα βακτήρια μπορεί να αναπτυχθούν εντός των τεχνητών υγροβιότοπων. Επομένως μπορεί να εμφανιστεί εκ νέου ανάπτυξη παθογόνων αλλά η δυναμική μιας τέτοιας επανεμφάνισης είναι πολύπλοκη και σε μεγάλο βαθμό εξαρτάται από παράγοντες όπως η θερμοκρασία και το σχηματιζόμενο βιοφίλμ εντός της μονάδας. Συγκεκριμένα, ο ρυθμός αναγέννησης διαφόρων παθογόνων σε διαφορετικούς τύπους τεχνητών υγροβιότοπων εξακολουθεί να είναι ελάχιστα κατανοητός και χρήζει περαιτέρω διερεύνησης (Wu et al., 2016). Τέλος, στην ίδια έρευνα αναφέρεται ότι σε υγροβιότοπους με χαλίκι και βλάστηση τα ποσοστά θανάτωσης (die-off) του *Staphylococcus sp.* δεν είχαν μεγάλη διαφορά με τα αντίστοιχα σε υγροβιότοπο με χαλίκι χωρίς βλάστηση.

Πίνακας 8. Συγκεντρώσεις *Staphylococcus sp.* στις εισροές και εκροές των μονάδων με τις αντίστοιχες τιμές απομάκρυνσης και απόδοσης.

Μονάδα Επεξεργασίας	Δείγμα	Είσοδος (CFU/100mL)	Έξοδος (CFU/100mL)	Απομάκρυνση (Logs)	Απόδοση %
CWG	15 Jul	4,5E+05	1,0E+06	-0,35	0,00
	20 Jul	1,1E+06	9,9E+05	0,06	12,00
	3 Aug	7,1E+04	3,1E+05	-0,64	0,00
	12 Aug	1,0E+05	8,0E+04	0,10	20,00
	20 Aug	4,7E+06	5,0E+05	0,97	89,36
	27Aug	2,3E+05	5,1E+04	0,65	77,83
	5 Sep	2,5E+05	3,5E+05	-0,15	0,00
	14 Sep	1,4E+06	3,1E+05	0,65	77,86
	5 Oct	2,7E+05	2,6E+05	0,02	3,70
	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ:			0,15	31,19
Μονάδα Επεξεργασίας	Δείγμα	Είσοδος (CFU/100mL)	Έξοδος (CFU/100mL)	Απομάκρυνση (Logs)	Απόδοση %
CWC	15 Jul	6,0E+05	1,1E+06	-0,26	0,00
	20 Jul	1,5E+06	9,3E+05	0,21	38,00
	3 Aug	8,0E+04	1,3E+05	-0,21	0,00
	12 Aug	1,0E+05	6,5E+05	-0,81	0,00
	20 Aug	4,7E+06	4,8E+05	0,99	89,79
	27Aug	2,3E+05	4,3E+04	0,73	81,30
	5 Sep	2,5E+05	1,4E+05	0,25	44,00
	14 Sep	1,4E+06	1,1E+05	1,10	92,14
	5 Oct	2,7E+05	2,2E+05	0,09	18,52
	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ:			0,23	40,42
Μονάδα Επεξεργασίας	Δείγμα	Είσοδος (CFU/100mL)	Έξοδος (CFU/100mL)	Απομάκρυνση (Logs)	Απόδοση %
CWP	15 Jul	4,5E+05	1,7E+06	-0,58	0,00
	20 Jul	1,1E+06	1,2E+06	-0,03	0,00
	3 Aug	7,1E+04	1,2E+06	-1,23	0,00
	12 Aug	1,0E+05	6,4E+05	-0,81	0,00

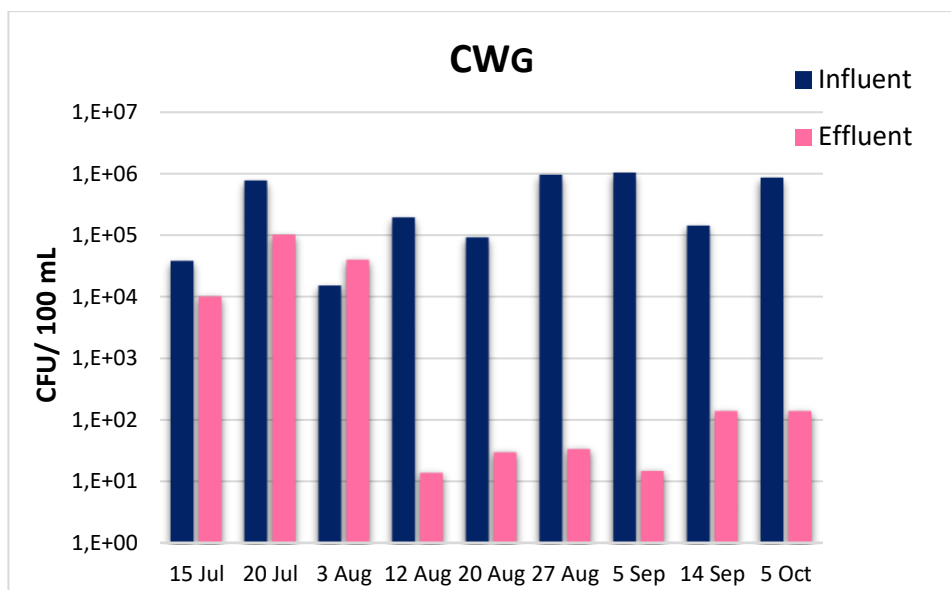
20 Aug	4,7E+06	1,5E+05	1,50	96,81
27Aug	2,3E+05	4,2E+04	0,74	81,74
5 Sep	2,5E+05	1,9E+05	0,12	24,00
14 Sep	1,4E+06	2,3E+05	0,78	83,57
5 Oct	2,7E+05	2,6E+05	0,02	3,70
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ:			0,06	32,20

➤ **Enterococcus sp.**



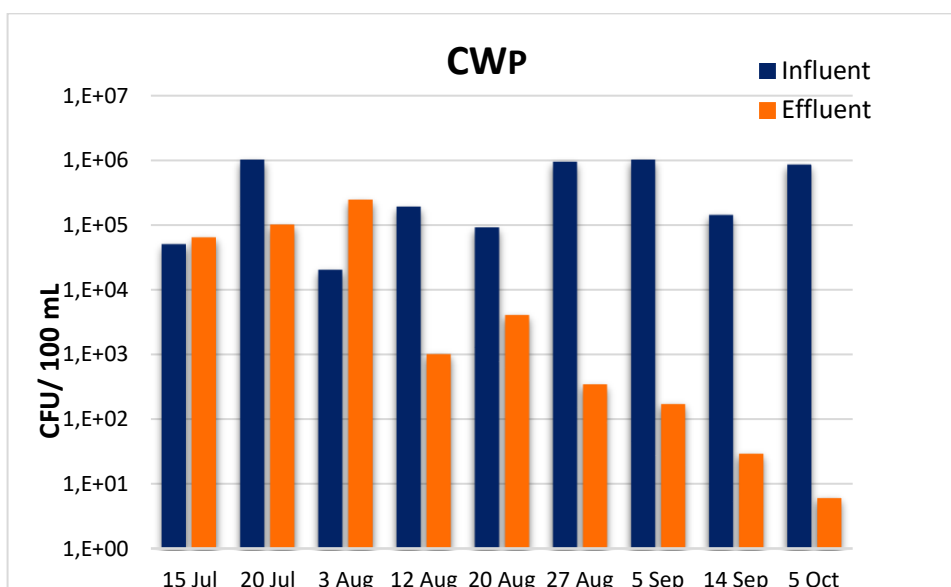
Γράφημα 7. Συγκέντρωση (CFU/100mL) πριν και μετά την επεξεργασία από τον CWC ανά ημερομηνίες δειγματοληψίας.

Στο Γράφημα 7. παρουσιάζεται η απομάκρυνση του *Enterococcus sp.* μετά από επεξεργασία από τον υδροβιότοπο control, δηλαδή χωρίς βλάστηση και με HDPE σαν πληρωτικό υλικό. Όπως φαίνεται στο γράφημα μόνο κατά την πρώτη δειγματοληψία υπήρχε αρνητική απομάκρυνσή του. Όλες τις υπόλοιπες ημερομηνίες τα ποσοστά απομάκρυνσής του μετά την επεξεργασία είναι μεγάλα και ορισμένα αγγίζουν σχεδόν το 100% αποδεικνύοντας με αυτό τον τρόπο την υψηλή αποδοτικότητα του CWC.



Γράφημα 8. Συγκέντρωση *Enterococcus sp.* (CFU/100mL) πριν και μετά την επεξεργασία από τον CWG ανά ημερομηνίες δειγματοληψίας.

Στον υγροβιότοπο CWG παρατηρείται ότι από τις 12 Αυγούστου η απομάκρυνση του είναι πολύ υψηλή και κάποια ποσοστά απομάκρυνσης είναι σχεδόν 100%. Στις 20 και 27 Αυγούστου για παράδειγμα έχουμε τις μεγαλύτερες απομακρύνσεις 4,44Logs και 4,92Logs αντίστοιχα. Επομένως μπορεί να διεξαχθεί το συμπέρασμα ότι ο CWG είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικός στην απομάκρυνση του *Enterococcus sp.* από το λύμα.



Γράφημα 9. Συγκέντρωση *Enterococcus sp.* (CFU/100mL) πριν και μετά την επεξεργασία από τον D

Στο Γράφημα 9. μπορούμε να διαπιστώσουμε ότι η απομάκρυνση του *Enterococcus sp.* μετά από επεξεργασία του λύματος στον CWr παρουσιάζει διακυμάνσεις. Αρχικά εμφανίζει αρνητική απομάκρυνση, στη συνέχεια μικρή αλλά από τις 12 Αυγούστου και μέχρι την τελευταία ημερομηνία δειγματοληψίας το ποσοστό μείωσης αυξάνεται σημαντικά και φτάνει μέχρι 5,15 Logs (99,99%). Έτσι, διαπιστώνεται ότι ο CWr έχει υψηλή αποδοτικότητα στην απομάκρυνση του *Enterococcus sp.*

Εξετάζοντας συνολικά τα αποτελέσματα για την απομάκρυνση του *Enterococcus sp.* μετά την επεξεργασία του λύματος από κάθε υδροβιότοπο ξεχωριστά, διαπιστώνεται ο CWC επιτυγχάνει κατά μέσο όρο μείωση 2,94 Logs (99,60%), ο CWG μείωση 2,62 Logs (84,43%), ενώ τέλος ο CWr επιτυγχάνει μείωση 2,79 Logs (85,18%). Έρευνες αναφέρουν ότι για τους βακτηριακούς δείκτες κοπρανόδους προέλευσης υπάρχει απομάκρυνση μετά από εξεργασία σε τεχνητούς υδροβιότοπους μεγαλύτερη από 90% (A. Stefanakis et al., 2014). Πιο συγκεκριμένα οι Donde et al, αναφέρουν μείωση κοπρανόδους στρεπτόκοκκου μεγαλύτερη από 0,9Logs (Donde & Bangding, 2017.). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν σε αυτή την εργασία είναι σύμφωνα με την παραπάνω διαπίστωση από άλλη έρευνα καθώς εμφανίζουν πολύ καλά ποσοστά απομάκρυνσης.

Άλλες έρευνες αναφέρουν ότι η ύπαρξη μακρόφυτων στους τεχνητούς υδροβιότοπους έχει σημαντικό ρόλο καθώς σε μονάδες χωρίς βλάστηση το ποσοστό μείωσης του *Enterococcus sp.* ήταν σημαντικά μικρότερο σε σχέση με άλλες μονάδες που είχαν βλάστηση (Sleytr et al., 2007; Sandoval-Herazo et al., 2018). Το γεγονός αυτό δεν επιβεβαιώνεται σε αυτή την εργασία καθώς όπως φαίνεται ο υδροβιότοπος CWC χωρίς βλάστηση παρουσιάζει σημαντικά μεγαλύτερο ποσοστό απομάκρυνσης του *Enterococcus sp.* σε σχέση με τους CWG και CWr.

Στους τεχνητούς υδροβιότοπους κάθετης ροής έχει αναφερθεί από έρευνες ότι κύριος μηχανισμός απομάκρυνσης μικροοργανισμών κοπρανόδους προέλευσης όπως είναι και οι fecal streptococci είναι η μηχανική φίλτραση του λύματος μέσα από το υπόστρωμα (Alexandros & Akratos, 2016 ; S. Wu et al., 2016) . Για αυτό το λόγο η επιλογή κατάλληλου υποστρώματος είναι καταλυτικής σημασίας για την αποδοτικότερη λειτουργία των υδροβιότοπων. Δεν βρέθηκαν πολλές έρευνες που να αναφέρουν ότι χρησιμοποιήθηκε HDPE ως πληρωτικό υλικό όπως στη συγκεκριμένη εργασία, καθώς το χαλίκι και η άμμος είναι πολύ πιο συνηθισμένα. Ωστόσο, οι Sandoval et al, αναφέρουν ότι το PET(τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο) σαν πληρωτικό υλικό συμβάλει σημαντικά στην απομάκρυνση των ρύπων και στην καλύτερη ανάπτυξη της βλάστησης στους υδροβιότοπους. Κατά συνέπεια, εφόσον η ύπαρξη βλάστησης έχει παρατηρηθεί ότι ευνοεί την απομάκρυνση του *Enterococcus sp.* είναι αναμενόμενο το πλαστικό σαν πληρωτικό υλικό να θεωρηθεί αποτελεσματικότερο σε σχέση με το χαλίκι. Τα ποσοστά απομάκρυνσης στην εργασία αυτή υποδηλώνουν ότι ο υδροβιότοπος με πλαστικό CWC επιτυγχάνει τη μεγαλύτερη απομάκρυνση, ακολουθεί ο υδροβιότοπος που επίσης έχει πλαστικό ως πληρωτικό υλικό CWr και τέλος είναι ο CWG με πληρωτικό υλικό χαλίκι. Επομένως, τα παραπάνω

αποτελέσματα συμφωνούν εν μέρη με τα συμπεράσματα που έχουν διεξαχθεί από τις άλλες έρευνες καθώς ο CWC λειτουργεί χωρίς βλάβιση.

Επιπλέον οι Norton et al, αναφέρουν ότι η προσρόφηση στο υπόστρωμα είναι ένας από τους βασικούς μηχανισμούς απομάκρυνσης παθογόνων. Συγκεκριμένα ότι το μέγεθος του υλικού του υποστρώματος είναι ένας καθοριστικός παράγοντας αποτελεσματικότητα, καθώς ένα μικρότερο μέγεθος κόκκου έχει μεγαλύτερη ειδική επιφάνεια για αλληλεπιδράσεις (Norton 2007). Ωστόσο το πορώδες του υλικού έχει εξίσου σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό βιοφίλμ των βακτηρίων, το οποίο είναι τρόπος απομάκρυνσής τους από τα λύματα. Στη συγκεκριμένη εργασία λοιπόν που χρησιμοποιήθηκαν χαλίκι και πλαστικό ως υπόστρωμα, είναι λογικό το HDPE να εμφανίζει καλύτερα ποσοστά απομακρύνσεων καθώς το συγκεκριμένο πλαστικό έχει πορώδες 95% ενώ το χαλίκι περίπου 38%.

Πίνακας 9. Συγκεντρώσεις *Enterococcus sp.* στις εισροές και εκροές των μονάδων με τις αντίστοιχες τιμές απομάκρυνσης και απόδοσης.

Μονάδα Επεξεργασίας	Δειγματοληψία	Είσοδος (CFU/100mL)	Έξοδος (CFU/100mL)	Απομάκρυνση (Logs)	Απόδοση %
CWG	15 Jul	3,8E+04	1,0E+04	0,57	73,33
	20 Jul	7,5E+05	1,0E+05	0,88	86,67
	3 Aug	1,8E+04	4,0E+04	-0,36	0,00
	12 Aug	1,9E+05	1,4E+01	4,13	99,99
	20 Aug	9,0E+04	3,0E+01	3,48	99,97
	27Aug	9,3E+05	3,4E+01	4,44	100,00
	5 Sep	1,0E+06	1,5E+01	4,82	100,00
	14 Sep	1,4E+05	1,4E+02	3,00	99,90
	5 Oct	8,4E+05	1,4E+02	3,78	99,98
			ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ:	2,62	84,43
Μονάδα Επεξεργασίας	Δειγματοληψία	Είσοδος (CFU/100mL)	Έξοδος (CFU/100mL)	Απομάκρυνση (Logs)	Απόδοση %
CWC	15 Jul	5,0E+04	4,4E+05	-0,94	0,00
	20 Jul	1,0E+06	1,0E+04	2,00	99,00
	3 Aug	2,0E+04	3,0E+00	3,82	99,99
	12 Aug	1,9E+05	5,0E+00	4,58	99,99
	20 Aug	9,0E+04	1,0E+03	1,95	98,89
	27Aug	9,3E+05	5,0E+03	2,27	99,46
	5 Sep	1,0E+06	4,0E+03	2,40	99,60
	14 Sep	1,4E+05	9,3E+01	3,18	99,93
	5 Oct	8,4E+05	4,0E+02	3,32	99,95
			ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ:	2,94	99,60
Μονάδα Επεξεργασίας	Δειγματοληψία	Είσοδος (CFU/100mL)	Έξοδος (CFU/100mL)	Απομάκρυνση (Logs)	Απόδοση %
CWP	15 Jul	3,8E+04	6,3E+04	-0,23	0,00
	20 Jul	7,5E+05	1,0E+05	0,88	86,67
	3 Aug	1,8E+04	2,4E+05	-1,13	0,00
	12 Aug	1,9E+05	1,0E+03	2,28	99,47
	20 Aug	9,0E+04	4,0E+03	1,35	95,56
	27Aug	9,3E+05	3,4E+02	3,44	99,96
	5 Sep	1,0E+06	1,7E+02	3,77	99,98

14 Sep	1,4E+05	2,9E+02	2,68	99,79
5 Oct	8,4E+05	6,0E+00	5,15	99,99
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ :			2,79	85,18

Εξετάζοντας συνολικά όλα τα παραπάνω αποτελέσματα παρατηρείται η εξής κατάταξη στην απομάκρυνση των διαφορετικών βακτηρίων μετά από επεξεργασία του λύματος στους τρεις υδροβιότοπους :

CWC: *Enterococcus sp.* > *E. coli* > *Staphylococcus sp.*

CWG: *Enterococcus sp.* > *E. coli.* > *Staphylococcus sp.*

CWP: *E. coli* > *Enterococcus sp.* *Staphylococcus sp.*

Σε έρευνά τους οι Lamori et al, έχουν επισημάνει ότι οι τεχνητοί υδροβιότοποι έχουν καλύτερη απόδοση στην απομάκρυνση Εντερόκοκκων σε σχέση με την *E.coli* (Lamori et al., 2019). Η καθίζηση των μικροοργανισμών στο υπόστρωμα των τεχνητών υδροβιότοπων είναι επίσης ένας σημαντικός μηχανισμός απομάκρυνσής τους και έχει διαπιστωθεί ότι είναι αποτελεσματική σε ποσοστά έως και 99% στην απομάκρυνση ορισμένων βακτηρίων μεταξύ των οποίων οι κοπρανώδεις στρεπτόκοκκοι καθώς έχουν υψηλές ταχύτητες καθίζησης (Chen et al., 2019). Πιο συγκεκριμένα οι κοπρανώδεις στρεπτόκοκκοι έχουν υψηλή ταχύτητα καθίζησης (~ 0,1 mm/s) ενώ αντίθετα άλλοι μικροοργανισμοί όπως τα πρωτόζωα, οι ωοκύστες και τα βακτήρια, όπως το *E.coli*, έχουν χαμηλή ταχύτητα καθίζησης (< 0,001 mm/s) και η καθίζηση είναι αναποτελεσματική (Wu et al., 2016). Όλα τα παραπάνω μπορούν να ερμηνεύσουν ως ένα βαθμό τα αποτελέσματα που προέκυψαν στην συγκεκριμένη εργασία καθώς τα ποσοστά απομάκρυνσης του *Enterococcus sp.* ήταν στην πλειοψηφία υψηλότερα σε σχέση με τα άλλα δυο βακτήρια.

Οι Alufasi et al, αναφέρουν πως , η μηχανική φίλτρανση είναι βασικός μηχανισμός 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 (Alufasi et al., 2017). Στην αποτελεσματικότητα της προσρόφησης ωστόσο σημασία έχει η έλξη που υπάρχει μεταξύ βακτηρίου και υποστρώματος, δηλαδή τα βακτήρια που είναι αρνητικά φορτισμένα έλκονται από ένα θετικά φορτισμένο υπόστρωμα. Στην περίπτωση που η έλξη είναι αρκετά μεγάλη, τοποθετεί το κύτταρο στο ελάχιστο της πρωτογενούς ενέργειας και συμπερασματικά σε μη αναστρέψιμη προσρόφηση. Αντιθέτως, αν δεν είναι ισχυρές οι δυνάμεις τα βακτήρια δύνανται να αποκολληθούν από το υπόστρωμα (Sonohara et al 1995). Γενικά το τοίχωμα των βακτηριακών κυττάρων είναι αρνητικά φορτισμένο. Ωστόσο, υπάρχει σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ Gram θετικών και Gram αρνητικών βακτηρίων. Στα Gram + βακτήρια το αρνητικό φορτίο προσδίδεται κυρίως από τα τειχοϊκά οξέα τα οποία έχουν φωσφορικά στη δομή τους

και έτσι φορτίζονται αρνητικά. Ταυτόχρονα, τα Gram - βακτήρια έχουν μια εξωτερική επικάλυψη φωσφολιπιδίων και λιποσακχαριτών , και το αρνητικό φορτίο στην επιφάνειά τους προσδίδεται από τους λιποσακχαρίτες. Επομένως, η μόνιμη προσρόφηση των Gram αρνητικών βακτηρίων στο υπόστρωμα των τεχνητών υγροβιότοπων είναι πιθανότερο να συμβεί. Όπως προαναφέρθηκε η *E.coli* είναι ένα Gram αρνητικό βακτήριο ενώ ο *Enterococcus sp.*, και ο *Staphylococcus sp.* Gram θετικά. Η *E.coli* είχε υψηλότερα ποσοστά απομάκρυνσης από ότι ο *Staphylococcus sp.* γεγονός το οποίο μπορεί να οφείλεται στον παραπάνω παράγοντα.

Σε πολλές έρευνες αναφέρεται επίσης η σημασία της θερμοκρασίας στην απόδοση των υγροβιότοπων. Οι Carballeira et al, παρατήρησαν ότι υπήρχαν υψηλότερα ποσοστά απομάκρυνσης σε υψηλές θερμοκρασίες σε σχέση με χαμηλές. (Carballeira et al.,2021) . Στη μελέτη των Sandoval-Herazo et al που συγκεντρώνουν αποτελέσματα από άλλες έρευνες , αναφέρεται ότι σε χαμηλές θερμοκρασίες , η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου στη ριζόσφαιρα των φυτών μειώνεται λόγω φυσικής θανάτωσης των μακρόφυτων(Sandoval-Herazo et al., 2018). Ωστόσο, δεν υπάρχουν ξεκάθαρα αποτελέσματα σχετικά με τις επιπτώσεις των εποχιακών διακυμάνσεων στην απομάκρυνση των παθογόνων. Το πειραματικό μέρος της συγκεκριμένης εργασίας διεξήχθη σε καλοκαιρινούς μήνες μέχρι και Οκτώβρη όπου οι θερμοκρασίες ήταν ιδιαίτερα υψηλές (Πίνακας 1) για αυτό το λόγο δεν μπορούμε να διεξάγουμε συμπεράσματα ως προς αυτό τον παράγοντα. Παρόλα αυτά πολλά από τα αποτελέσματα απομακρύνσεων όπως φαίνονται στα παραπάνω γραφήματα είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικά ως προς την απομάκρυνση των βακτηρίων και την απόδοση των υγροβιότοπων.

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι τα αποτελέσματα στην συγκεκριμένη εργασία αναφέρονται στους πρώτους τέσσερις μήνες λειτουργίας των μονάδων το οποίο σε πολλές έρευνες αναφέρεται σαν startup stage. (1-4 μήνες). Τα αποτελέσματα λοιπόν αυτά στη συνέχεια όταν οι υγροβιότοποι εισέλθουν στο στάδιο ωρίμανσης, ίσως αλλάξουν δραστικά προς το καλύτερο καθώς οι μηχανισμοί απομάκρυνσης των παθογόνων μικροοργανισμών θα λειτουργούν στο μέγιστο δυνατό(Abou-Kandil et al., 2021). Ωστόσο, μελέτες έχουν δείξει ότι μια ‘καθαρή ‘ απομάκρυνση κολοβακτηριδίων μέσω προσρόφησης μπορεί να συμβεί μόνο κατά το αρχικό στάδιο λειτουργίας των τεχνητών υγροβιότοπων καθώς είναι πιθανό να συμβεί κορεσμός τόσο στα σωματίδια του υποστρώματος όσο και στις ρίζες των φυτών(Wu et al., 2015).

Έτσι, η απομάκρυνση των παθογόνων σε υγροτόπους που κατασκευάζονται με υπόγεια ροή που χρησιμοποιούνται για την επεξεργασία των λυμάτων φαίνεται να είναι μια πολύ περίπλοκη αλλά και αποτελεσματική διαδικασία και μπορεί τα αποτελέσματα που διεξάγονται να διαφέρουν από έρευνα σε έρευνα και να εξαρτώνται από πολλούς παράγοντες. Παρ’ όλο που υπάρχουν πιθανοί μηχανισμοί απομάκρυνσης παθογόνων οι οποίοι έχουν αναφερθεί σε πολλές έρευνες, πρέπει να γίνει περαιτέρω μελέτη για να γίνουν πλήρως κατανοητοί.

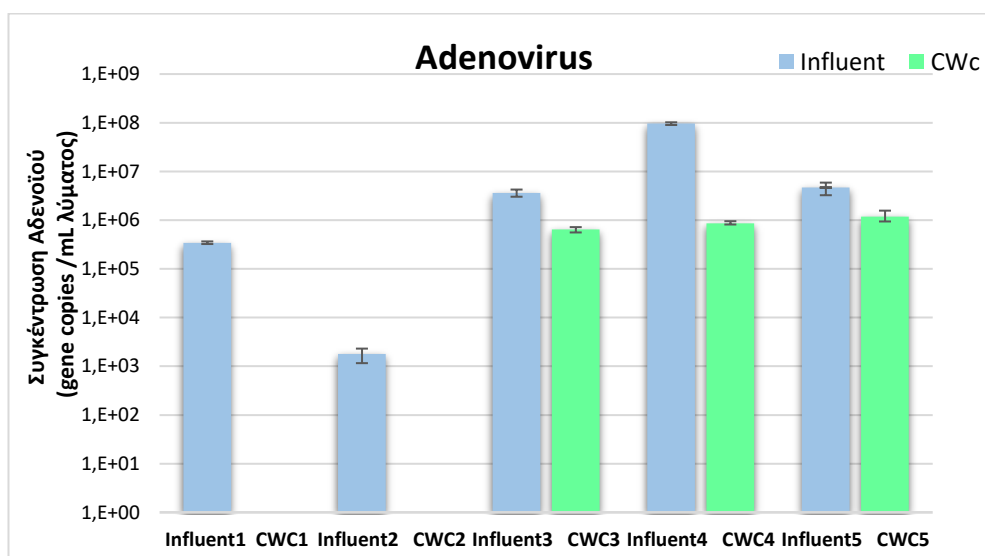
4.1.2 ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΑΔΕΝΟΙΩΝ

Για να μελετηθούν τα συστήματα τεχνητών υδροβιότοπων ως προς την ικανότητα τους να απομακρύνουν ιικό φορτίο, και συγκεκριμένα αδενοϊούς, ποσοτικοποιήθηκαν τα γονιδιώματα στα δείγματα χρησιμοποιώντας Real-Time PCR (qPCR). Τα δείγματα ήταν στο σύνολο 20 και παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα ανά ημερομηνία:

Πίνακας 10. Ονομασία δειγμάτων στην qPCR ανά ημερομηνία

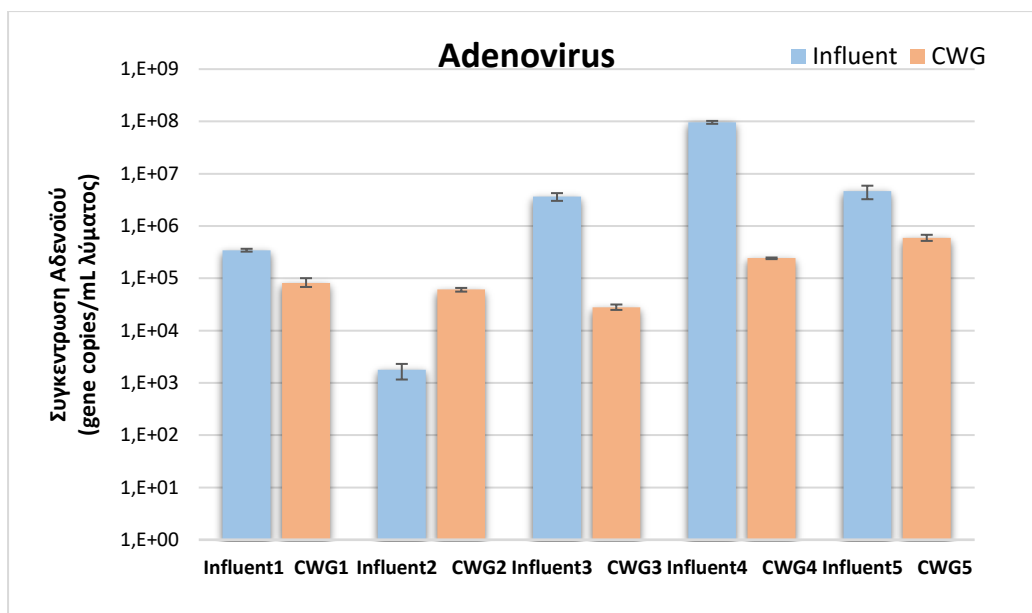
Δείγματα	Influent	MONADA		
		CWc	CWp	CWG
15.7.2021	Influent 1	CWc 1	CWp 1	CWG 1
12.8.2021	Influent 2	CWc 2	CWp 2	CWG 2
05.09.2021	Influent 3	CWc 3	CWp 3	CWG 3
14.09.2021	Influent 4	CWc 4	CWp 4	CWG 4
05.10.2021	Influent 5	CWc 5	CWp 5	CWG 5

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν παρουσιάζονται στα γραφήματα που ακολουθούν:



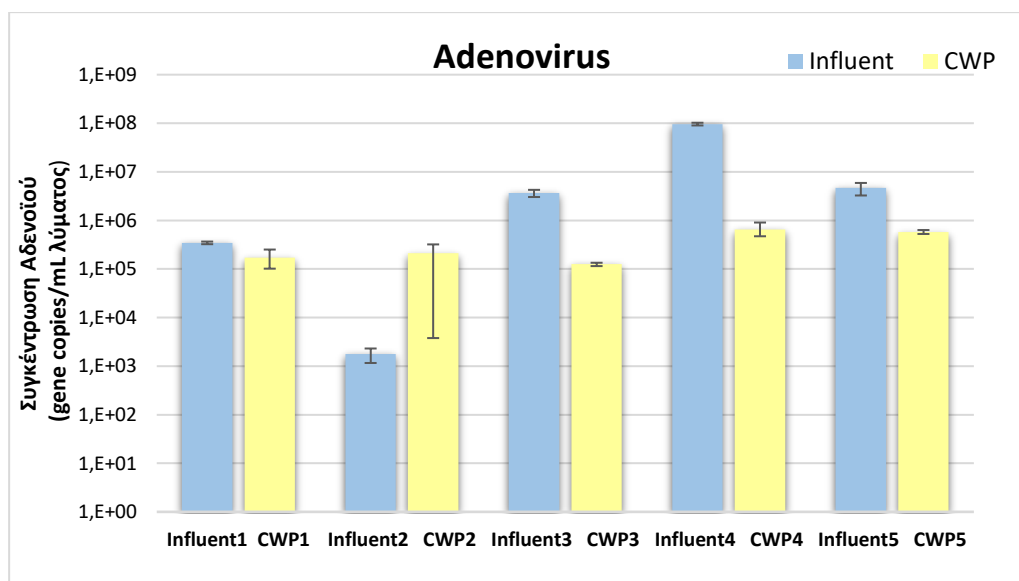
Γράφημα 10. Συγκέντρωση αδενοϊού στο αρχικό λύμα (Influent) και στην εκροή του CWC.

Όσον αφορά την απόδοση του CWC, υδροβιότοπου χωρίς βλάστηση και με πλαστικό ως πληρωτικό υλικό, στο Γράφημα 10 φαίνεται πως είναι αρκετά αποτελεσματικός στην απομάκρυνση των αδενοϊών. Στα πρώτα δύο δείγματα φαίνεται πως στην εκροή του υδροβιότοπου δεν εμφανίζεται καθόλου ενώ στο Influent υπήρχε αρχικά σε συγκεντρώσεις $3,44 \times 10^5$ gene copies/mL και $1,78 \times 10^3$ gene copies/mL. Στη συνέχεια παρότι εμφανίζεται στην εκροή του υδροβιότοπου, συγκρίνοντας τη συγκέντρωση του AdV με την είσοδο, κάθε φορά παρατηρείται ότι μειώνεται έως και 2 Logs (CWC4).



Γράφημα 11. Συγκέντρωση αδενοϊού στο αρχικό λύμα (Influent) και στην εκροή του CWG.

Στην εκροή του CWG, υδροβιότοπου με χαλίκι και βλάστηση, μια πρώτη παρατήρηση είναι ότι επιτυγχάνονται καλά ποσοστά απομακρύνσεων του αδενοϊού. Οι απομακρύνσεις αυτές κυμαίνονται από περίπου 0,6 Logs και φτάνουν σε ορισμένα δείγματα πάνω από 2 Logs (CWG3, CWG4). Ωστόσο παρουσιάζεται και μια αρνητική απομάκρυνση στο δείγμα CWG2 καθώς η συγκέντρωση αδενοϊού στην εκροή είναι αρκετά μεγαλύτερη($6,10 \times 10^4$ gene copies/mL) σε σχέση με το Influent ($1,78 \times 10^3$ gene copies/mL).



Γράφημα 12. Συγκέντρωση αδενοϊού στο αρχικό λύμα (Influent) και στην εκροή του CWP.

Στον CWP, υγροβιότοπο με βλάστηση και πλαστικό ως υπόστρωμα, όπως παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την qPCR στο Γράφημα 12, διαπιστώνεται ότι η συγκέντρωση του αδενοϊού στην εκροή είναι μειωμένη σε σχέση με τη συγκέντρωση στο αρχικό λύμα. Η απομάκρυνση που εμφανίζεται συνολικά κυμαίνεται από τιμές μικρές 0,3 Logs στην πρώτη φορά δειγματοληψίας και τελικά φτάνει έως και 2 Logs (CWP4). Ωστόσο στο δεύτερο δείγμα , CWP2 εμφανίζεται μεγαλύτερη συγκέντρωση αδενοϊού στη εκροή του υγροβιότοπου σε σχέση με το Influent2.

Εξετάζοντας συνολικά τα παραπάνω αποτελέσματα, μπορεί να γίνει η γενική παρατήρηση ότι και οι τρεις τεχνητοί υγροβιότοποι παρουσιάζουν ιδιαίτερα θετικά αποτελέσματα απομάκρυνσης της συγκέντρωσης των αδενοϊών. Και στους τρεις υγροβιότοπους οι τιμές απομάκρυνσης των αδενοϊών κυμαίνονται από 0,5 Logs και φτάνουν έως και λίγο περισσότερο από 2 Logs.

Ωστόσο, ο CWC χωρίς φύτευση , όπως φαίνεται στο Γράφημα 10, εμφανίζει κάποιο πλεονέκτημα σε σχέση με τους άλλους δύο καθώς στα δύο πρώτα δείγματα εκροής από τον υγροβιότοπο δεν παρουσιάζει καθόλου συγκέντρωση αδενοϊών συγκρινόμενα με τα αντίστοιχα δείγματα του αρχικού λύματος. Έρευνες έχουν αναφέρει ότι ο ρόλος των μακρόφυτων είναι καταλυτικής σημασίας για την απομάκρυνση του ιικού φορτίου.. Συγκεκριμένα έχει αναφερθεί ότι η βλάστηση παρέχει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στην απομάκρυνση του ιού (Coliphage, Adenoviruses) από τη μη φυτική, πιθανώς λόγω της παρουσίας ρίζας φυτού (Shingare et al., 2019). Η υψηλότερη αποτελεσματικότητα αφαίρεσης ιικών κυττάρων σε υπο-επιφανειακής ροής τεχνητούς υγροβιότοπους αποδόθηκε κυρίως στην προσκόλληση των κυττάρων σε ένα στρώμα βιοφίλμ πάνω στο ρίζωμα των φυτών καθώς επίσης σημαντικό ρόλο παίζουν και τα σύμπλοκα ρίζας-υποστρώματος στην διήθηση και προσρόφηση ιών (Alufasi et al., 2017; Quiñónez-Díaz et al., 2001). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν στην συγκεκριμένη εργασία δεν είναι σύμφωνα με τα παραπάνω καθώς δεν παρατηρήθηκε μεγάλη διαφοροποίηση (θετική ή αρνητική) στην απομάκρυνση της συγκέντρωσης των αδενοϊών στην εκροή κάποιου συγκεκριμένου τύπου τεχνητού υγροβιότοπου. Ωστόσο, το μόνο αξιοσημείωτο γεγονός εντοπίζεται στον τεχνητό υγροβιότοπο χωρίς βλάστηση όπως προαναφέρθηκε, στα δύο πρώτα δείγματα που δεν υπάρχει καθόλου συγκέντρωση αδενοϊού στην εκροή, γεγονός που επίσης δεν είναι σύμφωνο με όλα τα παραπάνω.

Παρ' όλα αυτά, δεν μπορεί να διεξαχθεί ένα σαφές αποτέλεσμα για το ρόλο των φυτών καθώς οι υγροβιότοποι εξετάστηκαν μόνο για τους πρώτους 4 μήνες λειτουργίας τους. Η απόδοση του συστήματος CWG και CWP με βλάστηση , θα μπορούσε να αυξηθεί μετά από ένα χρονικό διάστημα .Ο περισσότερος χρόνος λειτουργίας του συστήματος θα μπορούσε να συνεπάγεται την καλύτερη ανάπτυξη των φυτών και του ριζικού συστήματος προσφέροντας μεγαλύτερη διαθέσιμη επιφάνεια για την προσκόλληση των ιών. Επίσης εννοείται ο μηχανισμός της φίλτρανσης ενώ ταυτόχρονα ο περισσότερος χρόνος λειτουργίας ενός συστήματος CW ενοεί και τη δημιουργία του βιοφίλμ (Wu et al., 2016)

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 δεν είναι εφικτό η παρουσία των ιών να εξεταστεί σε σχέση με την εποχικότητα καθώς το πειραματικό μέρος διεξάχθηκε καλοκαιρινούς μήνες μέχρι και Οκτώβρη που οι θερμοκρασίες ήταν ιδιαίτερα υψηλές. Επιπλέον, οι Quinonez et al, σε μελέτη τους έχουν αναφέρει και την τεράστια σημασία της ηλιακής ακτινοβολίας στην απομάκρυνση των ιών, μια παράμετρος που επίσης δεν μπορεί να εξεταστεί καθώς μελετάμε υδροβιότοπους υπο-επιφανειακής ροής όπου το λύμα δεν εκτίθεται στην ατμόσφαιρα (Quiñónez-Díaz et al., 2001). Σχετικά με όσα αναφέρθηκαν παραπάνω λοιπόν, από τα γραφήματα 11 και 12 αξιοσημείωτη παρατήρηση είναι η εξής : στα δείγματα CWG2 και CWP2 που είναι δείγματα από ίδια ημερομηνία (12 Αυγούστου), παρουσιάζεται αρνητική απομάκρυνση. Δηλαδή η συγκέντρωση του αδενοϊού στην εκροή και των δύο μονάδων είναι υψηλότερη από ότι στο αρχικό λύμα. Στον Πίνακα 1. που παρουσιάζονται οι θερμοκρασίες κατά τους μήνες δειγματοληψίας, φαίνεται πως ο Αύγουστος παρουσίασε τις υψηλότερες θερμοκρασίες σε σχέση με τους άλλους 3 μήνες. Έρευνες έχουν αναφέρει ότι η θερμοκρασία παίζει σημαντικό ρόλο στην απομάκρυνση παθογόνων μικροοργανισμών και κυρίως ιών. Συγκεκριμένα οι Greaves et al, που παραθέτουν βιβλιογραφικές αναφορές από άλλες έρευνες, αναφέρουν ότι έχει βρεθεί μείωση πάνω από 1 Log της συγκέντρωσης των ιών στην εκροή υδροβιότοπων υπό-επιφανειακής ροής ,η οποία απομάκρυνση αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας (Greaves et al., 2020). Η διαπίστωση αυτή δεν συνάδει με τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης εργασίας , καθώς παρουσιάζεται αύξηση του ιικού φορτίου μόνο κατά τον μήνα Αύγουστο που έχει τις υψηλότερες θερμοκρασίες.

Ακόμα ένας μηχανισμός απομάκρυνσης των ιών που έχει αναφερθεί σε πολλές μελέτες, είναι η θήρευση. Οι Olive et al, αναφέρουν ότι τα αυτόχθονα βακτήρια και τα πρώτιστα έχουν επίδραση στην μείωση των ιών και η επίδραση αυτή επηρεάζεται από την αυξημένη θερμοκρασία(Olive et al., 2020). Οι συνθήκες οι οποίες επικρατούν στους τεχνητούς υδροβιότοπους ευνοούν ιδιαίτερα την συμβίωση πολλών διαφορετικών μικροοργανισμών . Ωστόσο απαιτείται περισσότερη έρευνα καθώς παραμένει άγνωστη η σύνθεση των αυτόχθονων βακτηρίων εντός των υδροβιότοπων. Επίσης φαίνεται ότι διαφορετικά είδη βακτηρίων θηρεύουν διαφορετικούς τύπους ιών.

Ωστόσο, η παρουσία οργανικής ύλης έχει αναφερθεί σε έρευνες ότι μειώνει την απόδοση των συστημάτων απέναντι στην αντιμετώπιση των ιών. Τα λύματα από την μονάδα επεξεργασίας αστικών λυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν ως Influent, πιθανόν να είχαν μεγάλο οργανικό φορτίο και οι ιοί να ανταγωνίζονταν με την οργανική ύλη για την προσρόφιση στις επιφάνειες εντός των υδροβιότοπων. Επιπλέον οι ιοί είναι πιθανό να προσκολληθούν σε κολλοειδή , το μέγεθος των οποίων είναι μικρό και καθιστά αδύνατη την καθίζηση (Norton 2007).

Συμπερασματικά οι τεχνητοί υδροβιότοποι στην συγκεκριμένη εργασία εμφανίζονται ιδιαίτερα αποτελεσματικοί στην απομάκρυνση των AdV σχέση και με

άλλα συστήματα που έχουν αναφερθεί σε διαφορετικές μελέτες καθώς καταφέρνουν μείωση έως και 2 Logs. Για παράδειγμα μελέτες έχουν αναφέρει ότι το σύστημα ενεργού ιλύος επιτυγχάνει 1,88 Logs μείωση των AdV, ενώ η ενεργός ιλύς ακολουθούμενη από απολύμανση με υπεριώδη ακτινοβολία πέτυχε μείωση 2,0 Logs (.Kaliakatsos et al., 2019).

4.2 ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΕ ANTIBIOTIKA ME ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ MIC (MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION).

Η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση των επιλεγμένων αντιβιοτικών μετρήθηκε για τα απομονωμένα βακτήρια από τους τρεις υγροβιότοπους και την αντίστοιχη είσοδό τους , με σκοπό να εξεταστούν οι πιθανές αλλαγές στο προφίλ ανθεκτικότητας των βακτηρίων μετά την κάθε επεξεργασία. Στη συγκεκριμένη εργασία ως ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση ορίστηκε η συγκέντρωση του αντιβιοτικού στην οποία επιτυγχάνεται 60% μείωση του βακτηριακού πληθυσμού (MIC₆₀) σύμφωνα με τον EUCAST.

Η μέθοδος MIC όπως προαναφέρθηκε , εφαρμόστηκε συνολικά σε 24 στελέχη από το βακτήριο *E.coli*, 24 στελέχη *Enterococcus sp.* και 24 στελέχη *Staphylococcus sp.* και για 3 αντιβιοτικά σε κάθε βακτήριο. Ωστόσο, παρουσιάζονται τα συνολικά διαγράμματα όπως φαίνεται παρακάτω, ενώ για όλα τα στελέχη ξεχωριστά ,τα διαγράμματα υπάρχουν στο Παράρτημα.

4.2.1 ΣΥΝΟΠΤΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΜΕΝΑ ANTIBIOTIKA

Σε αυτή τη διπλωματική εργασία έγινε έλεγχος της ανθεκτικότητας των βακτηρίων στα αντιβιοτικά αμοξικιλίνη(AMOX), σιπροφλοξασίνη (CIP) και σουλφαμεθοξαζόλη (SMX). Επιλέχθηκαν τα συγκεκριμένα αντιβιοτικά καθώς εκτός ότι αντιπροσωπεύουν 3 κατηγορίες αντιβιοτικών (β-λακτάμες, κινολόνες, σουλφοναμίδες αντίστοιχα) είναι και ευρέως διαδεδομένα στο περιβάλλον λόγω συγκεκριμένων ιδιοτήτων που έχουν :

- Οι περισσότερες από τις κινολόνες έχουν υψηλή χημική σταθερότητα και δεν αποικοδομούνται εύκολα με αυξημένη θερμοκρασία ή με υδρόλυση. Ως εκ τούτου, μεταφέρονται γρήγορα από το νερό στο έδαφος και τα ιζήματα. Λόγω της επιμονής που έχουν στο περιβάλλον, παρατηρήθηκε ότι το υψηλό επίπεδο σιπροφλοξασίνης (25 µg/L) μπορεί να τροποποιήσει ορισμένα βακτηριακά στελέχη .
- Οι πενικιλίνες , στις οποίες ανήκει και η αμοξικιλίνη , είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες στην υδρόλυση, η οποία θα μπορούσε να συμβεί μέσα σε κάποιες

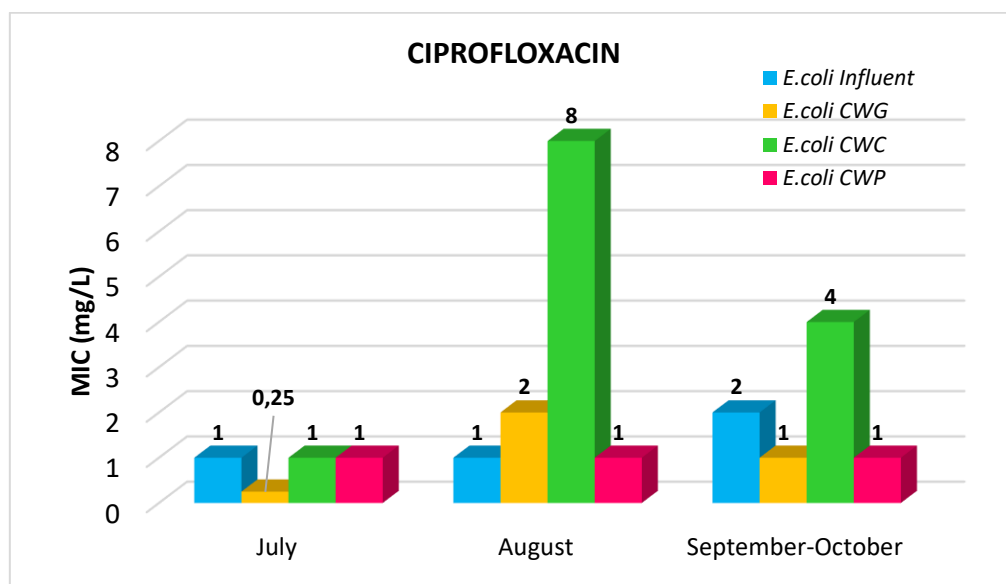
εβδομάδες στα περισσότερα επιφανειακά ύδατα. Επίσης, έχουν μειωμένη τάση προσρόφησης στο έδαφος, αλλά μπορούν να σχηματίσουν σύμπλοκα με κατιόντα και να συσσωρεύονται στη λυματολάσπη. Αυτό μπορεί να εξηγήσει τη βακτηριακή αντίσταση στις πενικιλίνες που παρατηρείται στις μονάδες επεξεργασίας λυμάτων. (Polianciuc et al., 2020)

- Τέλος, όσον αφορά τις σουλφοναμίδες, έχουν κεντρίσει το επιστημονικό ενδιαφέρον λόγω της ευρείας εφαρμογής τους, της εύκολης συσσώρευσής τους και της δύσκολη αποικοδόμησής τους στο φυσικό περιβάλλον. Μελέτες έδειξαν ότι συγκεκριμένα η σουλφαμεθοξαζόλη ανιχνεύεται συχνά σε υδάτινα και εδαφικά περιβάλλοντα, λόγω της πολικότητας και της αντοχής του.

4.2.2 ΕΛΕΓΧΟΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση επιλεγμένων αντιβιοτικών μετρήθηκε για τα απομονωμένα βακτήρια τόσο στο αρχικό λύμα χωρίς επεξεργασία, όσο και στην έξοδο σε κάθε ένα από τους τρεις υδροβιότοπους ώστε να εξεταστούν οι πιθανές αλλαγές στο προφίλ ανθεκτικότητας των βακτηρίων. Η διαφοροποίηση του προφίλ ανθεκτικότητας εξετάστηκε σε 3 περιόδους λειτουργίας των υδροβιότοπων όπως φαίνεται στα διαγράμματα που ακολουθούν: Ιούλιος – 1^η περίοδος, Αύγουστος 2^η περίοδος, Σεπτέμβρης-Οκτώβρης – 3^η περίοδος.

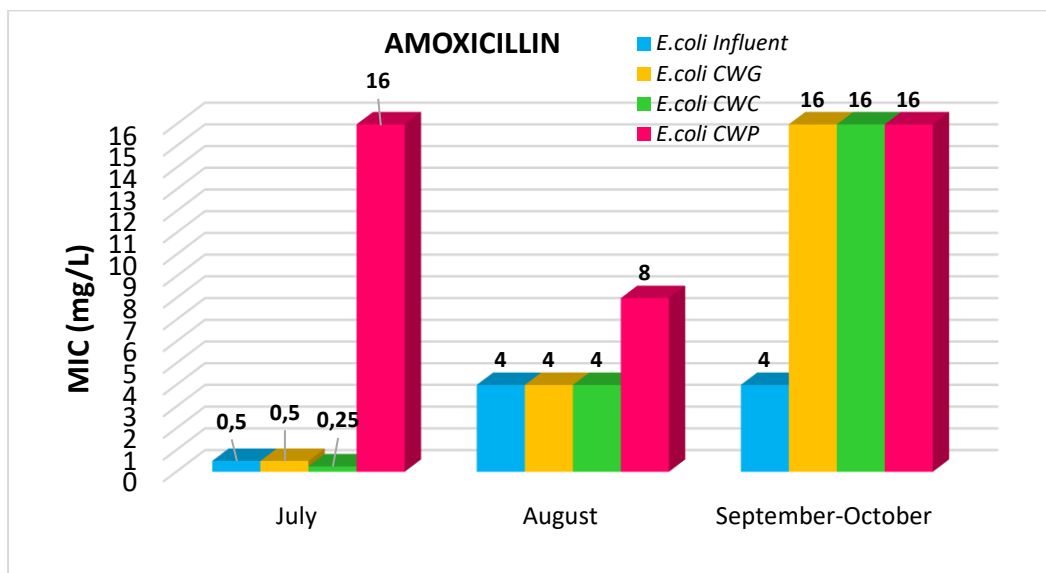
➔ *Escherichia coli*



Γράφημα 13. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση σιπροφλοξασίνης MIC₆₀ για την *E. coli* στις 3 περιόδους.

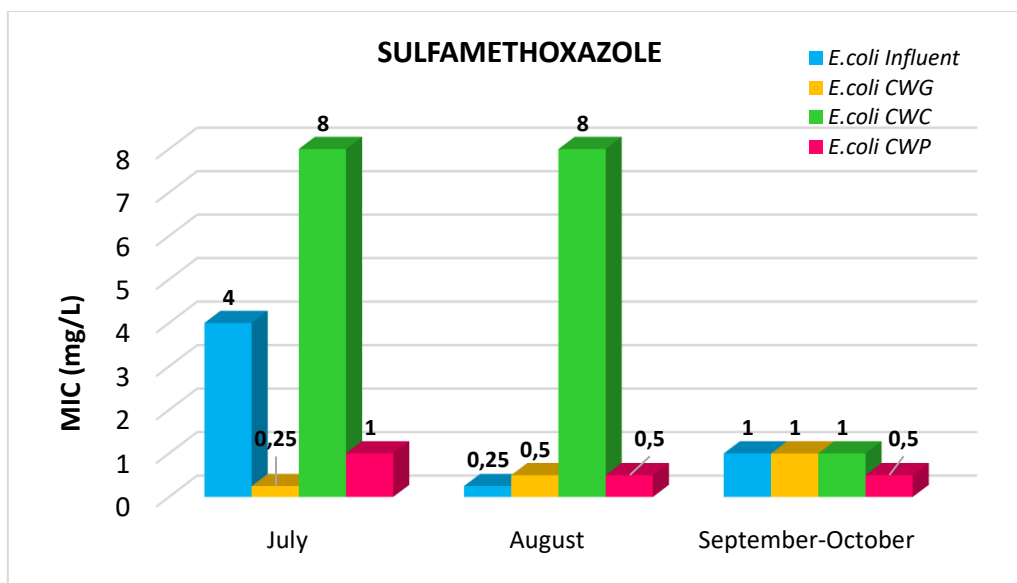
Όπως φαίνεται στο παραπάνω Γράφημα, η τιμή του MIC₆₀ για το αντιβιοτικό Σιπροφλοξασίνη στην *E. coli* παρουσιάζει διακυμάνσεις. Αξιοσημείωτο είναι το

γεγονός ότι το MIC₆₀ αλλάζει σημαντικά μετά από επεξεργασία στον CWC καθώς αρχικά δεν διαφοροποιείται από την τιμή MIC₆₀ των στελεχών εισόδου αλλά στη συνέχεια διπλασιάζεται (4mg/L CIP). Με λίγα λόγια η *E.coli* γίνεται περισσότερο ανθεκτική στο αντιβιοτικό καθώς για να επιτευχθεί 60% μείωση του πληθυσμού της, απαιτείται μεγαλύτερη συγκέντρωση αντιβιοτικού σε σχέση με πριν.



Γράφημα 14. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση αμοξικιλίνης MIC₆₀ για την *E.coli* στις 3 περιόδους.

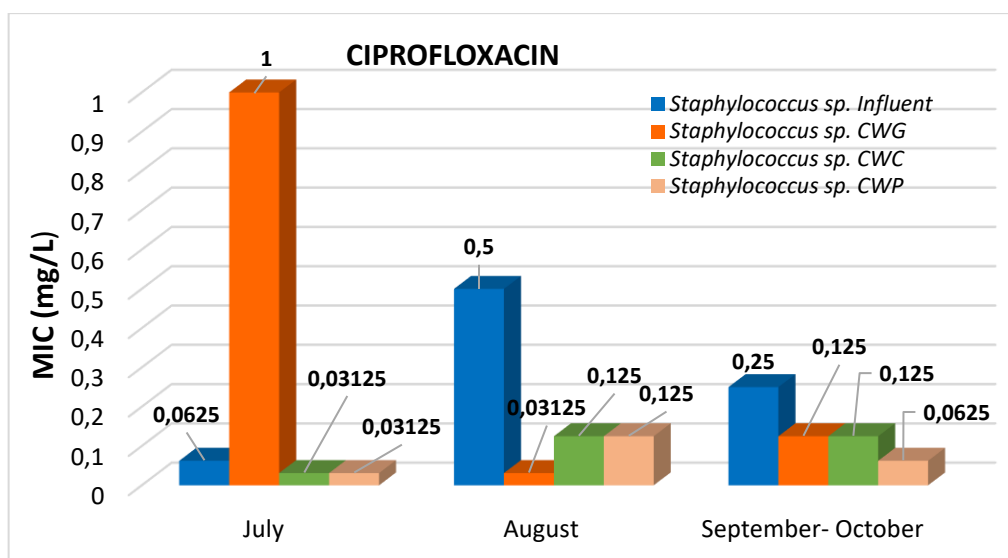
Όσον αφορά το αντιβιοτικό Αμοξικιλίνη, τα στελέχη της *E.coli* ενώ αρχικά στον πρώτο μήνα λειτουργίας των υδροβιότοπων CWG και CWC παρουσιάζουν μικρές τιμές MIC₆₀ που όμως δεν εμφανίζουν κάποια αλλαγή σε σχέση με τα στελέχη εισόδου, κατά την 3^η περίοδο η τιμή αυτή αυξάνεται πολύ στα 16mg/L AMOX ενώ η τιμή στα στελέχη από το Influent είναι μικρότερη.. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η *E.coli* γίνεται περισσότερο ανθεκτική στο αντιβιοτικό αμοξικιλίνη μετά από την τετράμηνη λειτουργία των υδροβιότοπων που εξετάζεται στη συγκεκριμένη εργασία.



Γράφημα 15. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση σουλφαμεθοξαζόλης MIC₆₀ για την *E. coli* στις 3 περιόδους.

Η τιμή MIC₆₀ για τα στελέχη της *E. coli* για το αντιβιοτικό σουλφαμεθοξαζόλη όπως φαίνεται στο γράφημα παρουσιάζει διακυμάνσεις. Αυξάνεται ιδιαίτερα μετά την επεξεργασία από τον CWC κατά τις δύο πρώτες περιόδους λειτουργίας των υδροβιότοπων, δηλαδή τα στελέχη γίνονται πιο ανθεκτικά στο αντιβιοτικό. Επιπλέον μετά την επεξεργασία από τον CWP κατά την 3^η περίοδο, μειώνεται η τιμή MIC₆₀ από 1mg/L στο 0,5mg/L SMX.

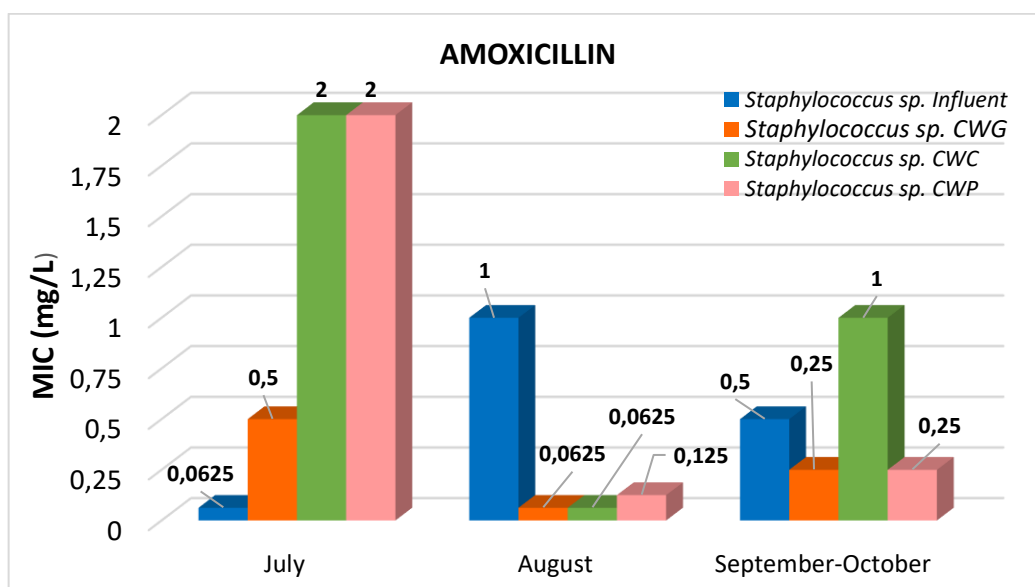
→ *Staphylococcus sp.*



Γράφημα 16. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση σιπροφλοξασίνης MIC₆₀ για τον *Staphylococcus sp.* στις 3 περιόδους.

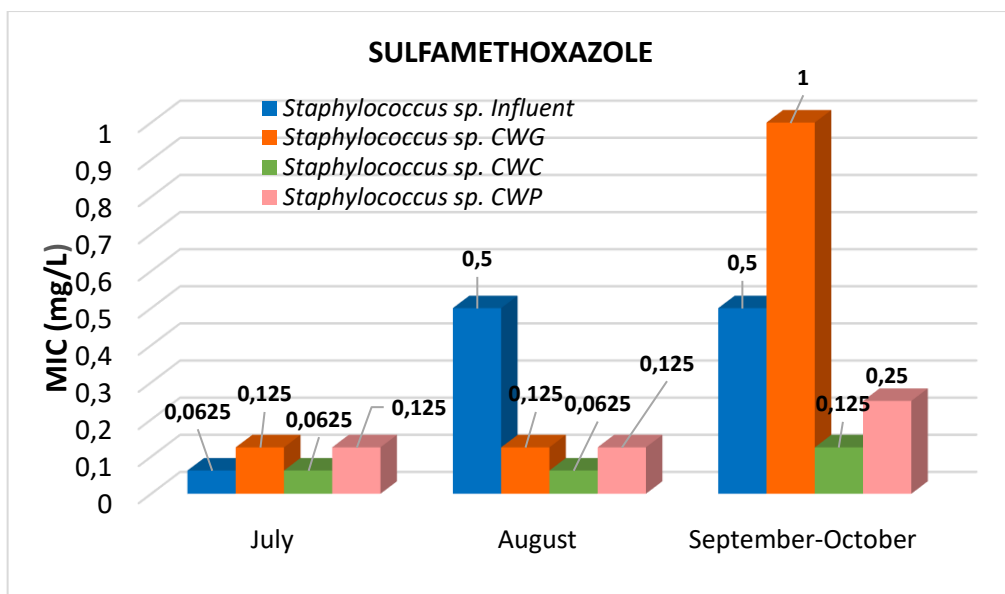
Στο παραπάνω γράφημα παρουσιάζονται οι διαφοροποιήσεις της τιμής MIC₆₀ στο αντιβιοτικό σιπροφλοξασίνη στα στελέχη του *Staphylococcus sp.*

Όπως φαίνεται , την 1^η περίοδο (Ιούλιος) ενώ τα στελέχη στην εκροή του CWC παρουσιάζουν πολύ μεγαλύτερη τιμή MIC₆₀ (1mg/L SMX) σε σχέση με τα αντίστοιχα στελέχη στο αρχικό λύμα (0,0625mg/L) , στις δύο επόμενες περιόδους που ακολουθούν υπάρχει μείωση σε αυτή την τιμή καθιστώντας έτσι τα στελέχη πιο ευαίσθητα στο αντιβιοτικό. Γενικά μπορεί να γίνει η παρατήρηση ότι κατά την 3^η περίοδο λειτουργίας του υγροβιότοπου συγκρίνοντας την τιμή MIC₆₀ των στελεχών *Staphylococcus sp.* στο αρχικό λύμα (Influent) σε σχέση με τις εκροές των υγροβιότοπων , διαπιστώνεται ότι μειώνονται. Επομένως τα στελέχη γίνονται συνολικά πιο ευαίσθητα στο αντιβιοτικό .



Γράφημα 17. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση αμοξικιλίνης MIC₆₀ για τον *Staphylococcus sp.* στις 3 περιόδους

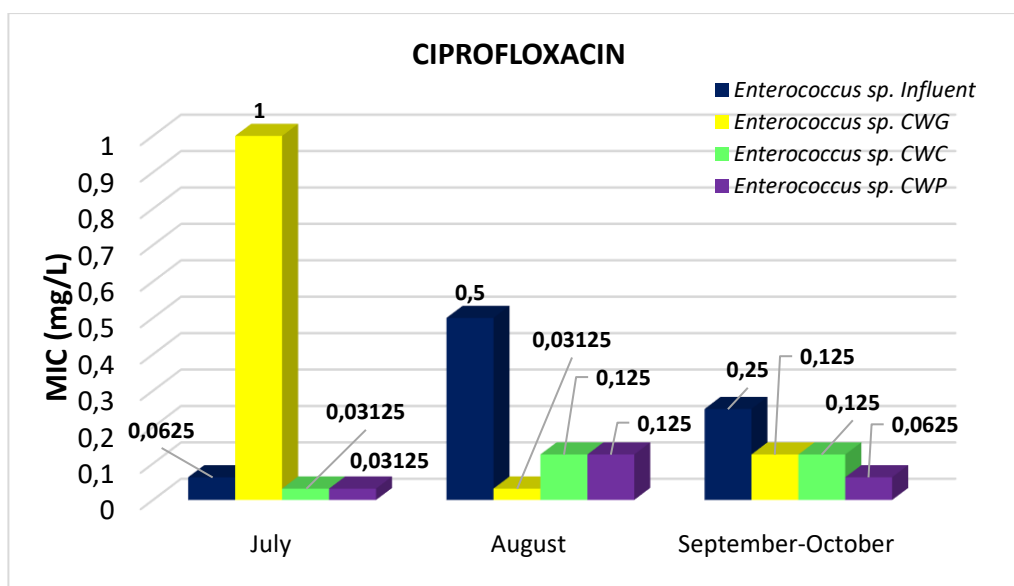
Σχετικά με το MIC₆₀ στην αμοξικιλίνη παρουσιάζεται διακύμανση στην τιμή στις τρεις περιόδους λειτουργίας των υγροβιότοπων όπως παρουσιάζεται στο γράφημα. Στην αρχή, τα στελέχη από τις εκροές είναι πιο ανθεκτικά στο αντιβιοτικό από τα στελέχη του αρχικού λύματος. Ωστόσο, γενικά φαίνεται ότι η επεξεργασία στους υγροβιότοπους CWG και CWP, συμβάλει στη μείωση της ανθεκτικότητας τελικά καθώς η τιμή MIC₆₀ μειώνεται και τα στελέχη γίνονται πιο ευαίσθητα στο αντιβιοτικό. Αντίθετα, η επεξεργασία στον CWC ίσως συμβάλει στην αύξηση της ανθεκτικότητας.



Γράφημα 18. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση σουλφαμεθοξαζόλης MIC₆₀ για τον *Staphylococcus sp.* στις 3 περιόδους.

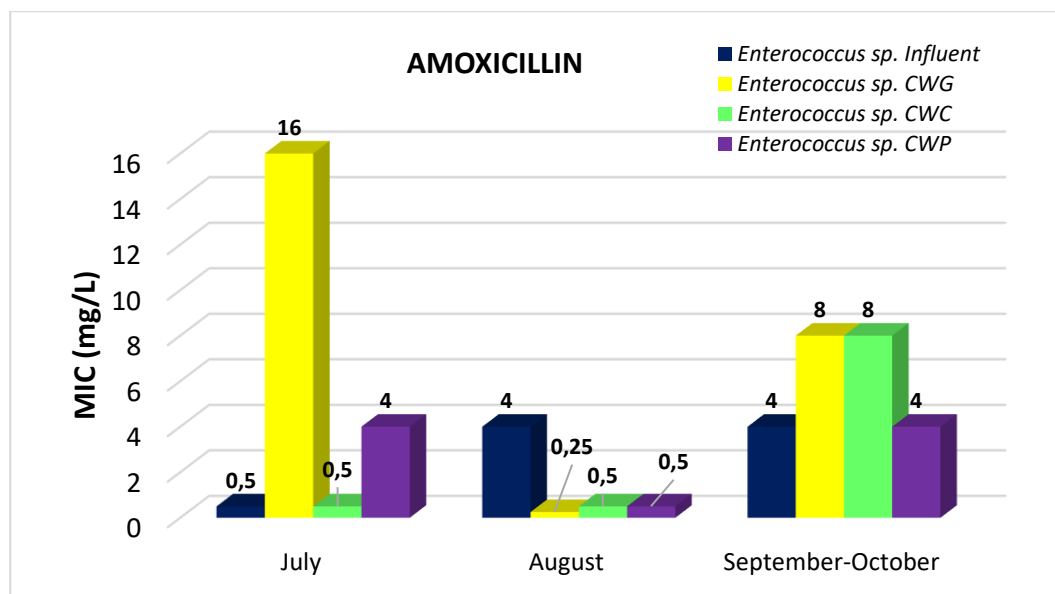
Σε γενικές γραμμές όσον αφορά τη σουλφαμεθοξαζόλη, φαίνεται πως τα στελέχη από τη 2^η περίοδο (Αύγουστος) και μετά, γίνονται πιο ευαίσθητα στο αντιβιοτικό γιατί για να επιτευχθεί 60% μείωση του πληθυσμού της, απαιτείται μικρότερη συγκέντρωση αντιβιοτικού σε σχέση με πριν την επεξεργασία από τις μονάδες υδροβιότοπων. Ωστόσο, κατά την 3^η περίοδο επεξεργασίας, τα στελέχη από την εκροή CWe φαίνεται πως αποκτούν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό σε σχέση με τα στελέχη από το Influent. Η τιμή του MIC₆₀ διπλασιάζεται.

→ Enterococcus sp.



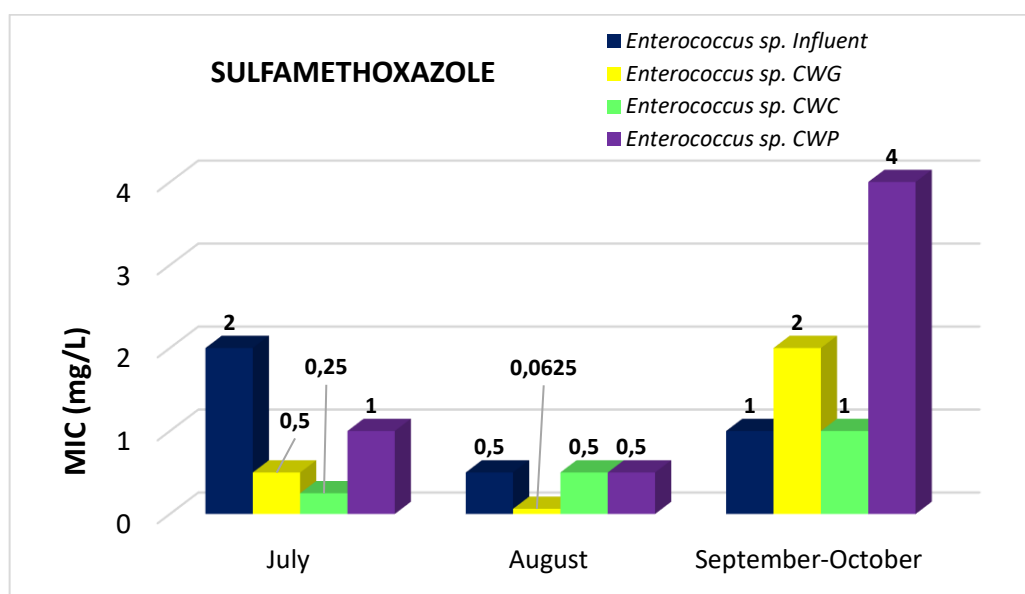
Γράφημα 19. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση σιπροφλοξασίνης MIC₆₀ για τον *Enterococcus sp.* στις 3 περιόδους.

Μια γενική παρατήρηση για τα αποτελέσματα του παραπάνω γραφήματος είναι ότι τα στελέχη *Enterococcus sp.* γίνονται πιο ευαίσθητα τελικά στο αντιβιοτικό σιπροφλοξασίνη καθώς οι τιμές MIC₆₀ μειώνονται μετά την επεξεργασία από τους υγροβιότοπους. Αυτή η μείωση φαίνεται ιδιαίτερα στην 2^η και 3^η περίοδο λειτουργίας των υγροβιότοπων καθώς αρχικά τα στελέχη από την μονάδα CWG παρουσιάζονται ιδιαίτερα πιο ανθεκτικά στο αντιβιοτικό σε σχέση με τα στελέχη στο αρχικό λύμα.



Γράφημα 20. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση αμοξικιλίνης MIC₆₀ για τον *Enterococcus sp.* στις 3 περιόδους.

Για το αντιβιοτικό αμοξικιλίνη δεν υπάρχει ξεκάθαρο μοτίβο για το πως διαφοροποιείται το προφίλ ανθεκτικότητας των στελεχών *Enterococcus sp.* πριν και μετά την επεξεργασία από τους τεχνητούς υδροβιότοπους. Κατά την 2^η περίοδο (Αύγουστος) φαίνεται ότι υπάρχει σημαντική μείωση στην τιμή MIC₆₀ στα στελέχη από τις εκροές και των τριών υδροβιότοπων η οποία όμως τιμή αυξάνεται ξανά στη συνέχεια.



Γράφημα 21. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση σουλφαμεθοξαζόλης MIC₆₀ για τον *Enterococcus sp.* στις 3 περιόδους.

Σχετικά με το αντιβιοτικό σουλφαμεθοξαζόλη, ενώ την πρώτη περίοδο λειτουργίας των υδροβιότοπων φαίνεται μείωση στην τιμή MIC₆₀ στα στελέχη *Enterococcus sp.*, μετά από την επεξεργασία στους υδροβιότοπους, στη συνέχεια η τιμή αυτή είτε δεν παρουσιάζει αλλαγή σε σχέση με τα στελέχη στο αρχικό λύμα (Influent) είτε τελικά αυξάνεται, καθιστώντας έτσι τα βακτήρια πιο ανθεκτικά στο αντιβιοτικό.

Εστιάζοντας συνολικά στα αποτελέσματα και συγκρίνοντας τις τιμές MIC₆₀ των στελεχών από την είσοδο και την εκροή των τριών υδροβιότοπων δεν διαπιστώθηκε ξεκάθαρο μοτίβο ως προς την αύξηση ή μείωση της τιμής αυτής στα τρία αντιβιοτικά και μεταξύ των τριών βακτηρίων. Ωστόσο παρατηρήθηκαν ορισμένες τάσεις και για αυτό μπορούν να γίνουν οι εξής παρατηρήσεις όσον αφορά τις αλλαγές στην τιμή MIC₆₀ σε κάθε αντιβιοτικό και κάθε βακτήριο :

- Όσον αφορά την σιπροφλοξασίνη , η *E.coli* μετά από επεξεργασία του λύματος στον CWC παρουσιάζει αύξηση στην τιμή MIC₆₀ δηλαδή γίνεται πιο ανθεκτική στο αντιβιοτικό, ενώ αντίθετα τα βακτήρια *Staphylococcus sp.* και *Enterococcus sp.* μεταβάλλονται σε πιο ευαίσθητα στο αντιβιοτικό μετά από επεξεργασία στους CWG και CWP.

- Για το αντιβιοτικό αμοξικιλίνη, η *E.coli* παρουσίασε μεγάλη διαφοροποίηση στο προφίλ ανθεκτικότητάς της καθώς τα στελέχη από τις εκροές και των τριών υδροβιότοπων ήταν πιο ανθεκτικά στο αντιβιοτικό σε σχέση με αυτά της εισόδου. Στο βακτήριο *Staphylococcus sp.* αξιοσημείωτη είναι επίσης η αύξηση της τιμής MIC₆₀ μετά από επεξεργασία του λύματος στον CWC δηλαδή η αύξηση της ανθεκτικότητας των στελεχών. Τέλος όσον αφορά το βακτήριο *Enterococcus sp.* δεν υπάρχει ξεκάθαρο μοτίβο στη διαφοροποίηση του προφίλ ανθεκτικότητας και υπάρχουν διακυμάνσεις ανάλογα την εξεταζόμενη περίοδο λειτουργίας των υδροβιότοπων.
- Τέλος, για το βακτήριο *E.coli* συμπερασματικά ως προς το προφίλ ανθεκτικότητάς του για τη σουλφामεθοξαζόλη μπορεί να αναφερθεί ότι στην 3^η περίοδο λειτουργίας των υδροβιότοπων εμφανίζει μείωση στην τιμή MIC₆₀ και στους τρεις υδροβιότοπους σε σχέση με τις πρώτες δύο. Τα στελέχη του *Staphylococcus sp.* και *Enterococcus sp.* γίνονται περισσότερο ανθεκτικά στη σουλφामεθοξαζόλη μετά από επεξεργασία του λύματος από τον CWC.

Οι τιμές των MIC₆₀ δεν μπορούν να συγκριθούν όλες με άλλες μελέτες καθώς δεν βρέθηκαν αντίστοιχες που να ασχολήθηκαν με τον έλεγχο του προφίλ ανθεκτικότητας των συγκεκριμένων βακτηρίων στα υπό εξέταση αντιβιοτικά μετά από επεξεργασία σε παρόμοιους τεχνητούς υδροβιότοπους. Οι περισσότερες έρευνες ωστόσο αναφέρονται σε μείωση ή αύξηση γονιδίων ανθεκτικότητας μετά από την επεξεργασία του λύματος σε τεχνητούς υδροβιότοπους, το οποίο δεν συνδέεται πάντα με αλλαγές στην τιμή MIC₆₀ για τα διαφορετικά αντιβιοτικά όπως θα αναφερθεί σε ενότητα στη συνέχεια.

Παρ' όλα αυτά, άλλες έρευνες έχουν αναφέρει στα αποτελέσματά τους ότι οι μέσες τιμές MIC₆₀ ήταν υψηλότερες σε δείγματα από εκροές τεχνητών υδροβιότοπων που δεν είχαν βλάστηση (Christofilopoulos et al., 2019). Οι Pei et al, αναφέρουν επίσης ότι τα φυτά συμβάλουν ελάχιστα στην μείωση της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά με άμεσο τρόπο αλλά υποβοηθούν με άλλους. Όπως προαναφέρθηκε η επιφάνεια που παρέχουν τα φυτά για τη δημιουργία βιοφίλμ τελικά οδηγεί στην απομάκρυνση των μικροοργανισμών και έχει σαν έμμεσο αποτέλεσμα τον περιορισμό των ανθεκτικών βακτηρίων ενώ ταυτόχρονα μπορούν να μειώσουν την ποσότητα αντιβιοτικών που υπάρχουν διαλυμένα στα λύματα. (Pei et al., 2019) Αν μειωθεί η συγκέντρωση των διαλυμένων αντιβιοτικών στα λύματα αυτό συνεπάγεται τον περιορισμό της έκθεσης των βακτηριακών πληθυσμών σε αυτά επομένως και τη μείωση της επιλεκτική πίεσης που ασκείται σε αυτά.

Τα αποτελέσματα στη συγκεκριμένη εργασία είναι σύμφωνα με την παραπάνω διαπίστωση από άλλες έρευνες καθώς βακτηριακά στελέχη από την εκροή του υδροβιότοπου CWC, που ήταν το control χωρίς βλάστηση, εμφανίζουν την μεγαλύτερη αύξηση της τιμής MIC₆₀ σχεδόν σε όλα τα αντιβιοτικά. Συνεπώς αυξάνεται η ανθεκτικότητά τους στα αντιβιοτικά.

Επιπλέον, διακύμανση στις τιμές MIC₆₀ μεταξύ εισόδου και εκροής συστήματος υδροβιοτόπων έχει διαπιστωθεί στη μελέτη των Russo et al., οι οποίοι αναφέρουν αύξηση στην τιμή αυτή στους εντεροκόκκους στα αντιβιοτικά σιπροφλοξασίνη και σουλφαμεθοξαζόλη (N. Russo et al., 2019). Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης εργασίας παραπάνω υποδεικνύουν ότι τα στελέχη *Enterococcus* *sp.* γίνονται πιο ανθεκτικά στη σουλφαμεθοξαζόλη μετά από επεξεργασία στον υγροβιότοπο CWC ενώ γίνονται πιο ευαίσθητα στην σιπροφλοξασίνη καθώς η τιμή MIC₆₀ μειώνεται σημαντικά μετά από επεξεργασία στους CWG και CWP.

Τέλος οι Rampuria et al, σε μελέτη τους έχουν αναφέρει ότι η ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά εξαρτάται και από άλλο ένα παράγοντα που είναι το αν το βακτήριο είναι Gram αρνητικό ή Gram θετικό . Συγκεκριμένα τα Gram αρνητικά βακτήρια όπως είναι η *E.coli* έχουν την δυνατότητα να παράγουν ένζυμα τις β-λακταμάσες οι οποίες αδρανοποιούν τα β-λακταμικά αντιβιοτικά (Rampuria et al., 2021). Το παραπάνω είναι σύμφωνο με τα αποτελέσματα που διεξήχθησαν καθώς τα στελέχη της *E.coli* φαίνονται να είναι τα πιο ανθεκτικά στο αντιβιοτικό αμοξικιλίνη που ανήκει στα β-λακταμικά αντιβιοτικά. Το προφίλ ανθεκτικότητάς των στελεχών του βακτηρίου *E.coli* στην αμοξικιλίνη αλλάζει σημαντικά καθώς η τιμή MIC₆₀ αυξάνεται στα βακτηριακά στελέχη στις εκροές και στους τρεις υγροβιότοπους.

4.2.3 ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΣΕ ΑΝΘΕΚΤΙΚΑ- ΜΕΤΡΙΩΣ ΕΥΑΙΣΘΗΤΑ- ΕΥΑΙΣΘΗΤΑ

Ο προσδιορισμός των ορίων για την κατηγοριοποίηση των βακτηρίων έγινε βάση δεδομένων από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή για τον Αντιμικροβιακό Έλεγχο Ευαισθησίας EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing).

Η ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών ορίζεται από το ISO 20776-2:2021 (212, ISO/TC, 2021), με βάση το οποίο οι μικροοργανισμοί κατηγοριοποιούνται ως :

- Ανθεκτικοί (Resistant): οι μικροοργανισμοί των οποίων η ανάπτυξη αναστέλλεται από μία συγκέντρωση αντιμικροβιακού παράγοντα, η οποία συνδέεται με υψηλή πιθανότητα θεραπευτικής αποτυχίας.
- Μετρίως ευαίσθητοι (Intermediate): οι μικροοργανισμοί των οποίων η ανάπτυξη αναστέλλεται από μία συγκέντρωση αντιμικροβιακού παράγοντα, η οποία συνδέεται με αμφίβολη θεραπευτική επιτυχία.
- Ευαίσθητοι (Susceptible): οι μικροοργανισμοί των οποίων η ανάπτυξη αναστέλλεται από μία συγκέντρωση αντιμικροβιακού παράγοντα, η οποία συνδέεται με υψηλή πιθανότητα θεραπευτικής επιτυχίας.

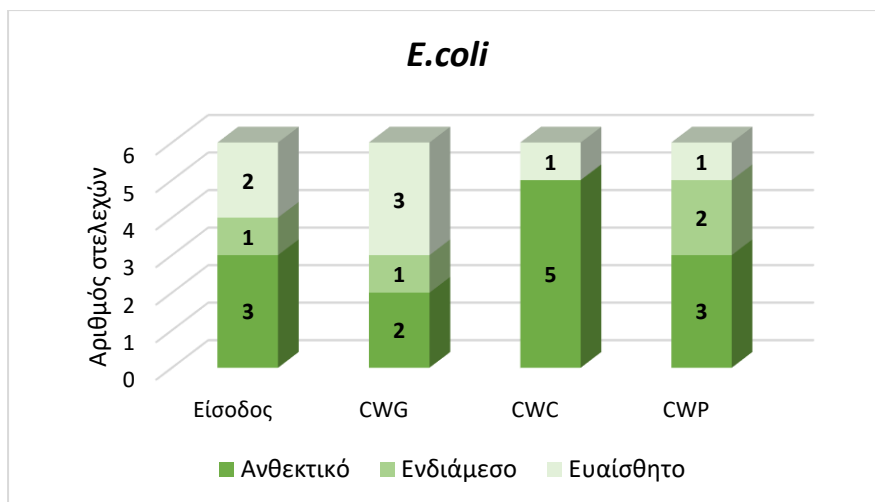
Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται αναλυτικά το εύρος της ανασταλτικής συγκέντρωσης MIC (μg/mL) της δράσης κάθε αντιβιοτικού που χρησιμοποιήθηκε για κάθε ένα βακτήριο :

Πίνακας 11. Εύρος ανασταλτικής συγκέντρωσης MIC μικροοργανισμών στα τρία αντιβιοτικά (μg/mL)

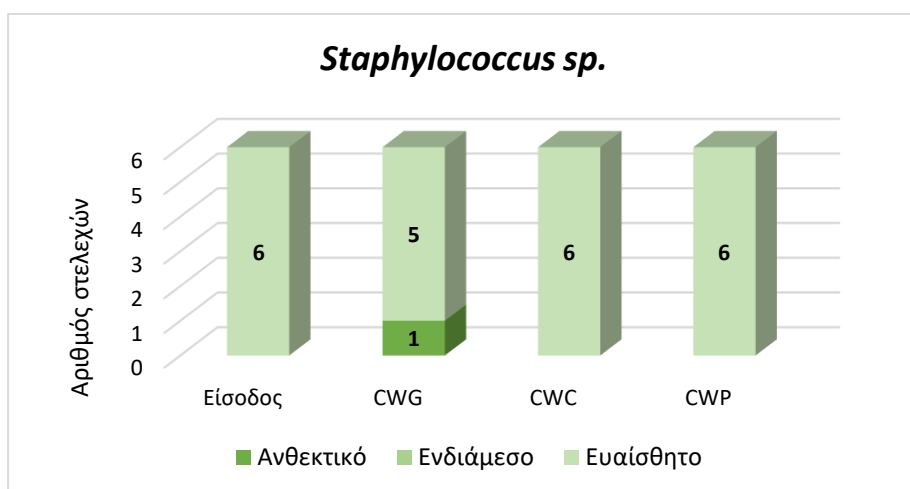
ΕΥΡΟΣ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ MIC (μg/mL)			
	Ευαίσθητος	Μετρίως Ευαίσθητος	Ανθεκτικός
CIPROFLOXACIN			
<i>Escherichia coli</i>	MIC ≤ 0,25	0,25 < MIC ≤ 0,5	MIC > 0,5
<i>Enterococcus sp.</i>	MIC ≤ 4	-	MIC > 4
<i>Staphylococcus sp.</i>	MIC ≤ 1	-	MIC > 1
AMOXICILLIN			
<i>Escherichia coli</i>	MIC ≤ 8	-	MIC > 8
<i>Enterococcus sp.</i>	MIC ≤ 4	4 < MIC ≤ 8	MIC > 8
<i>Staphylococcus sp.</i>	-	-	-
SULFAMETHOXAZOLE			
<i>Escherichia coli</i>	MIC ≤ 2	2 < MIC ≤ 4	MIC > 4
<i>Enterococcus sp.</i>	-	-	-
<i>Staphylococcus sp.</i>	MIC ≤ 2	2 < MIC ≤ 4	MIC > 4

Ακολουθούν αναλυτικά τα διαγράμματα που κατηγοριοποιούν σε ανθεκτικά-μετρίως ευαίσθητα και ευαίσθητα , τα έξι διαφορετικά στελέχη από κάθε βακτήριο και από κάθε εξεταζόμενη μονάδα :

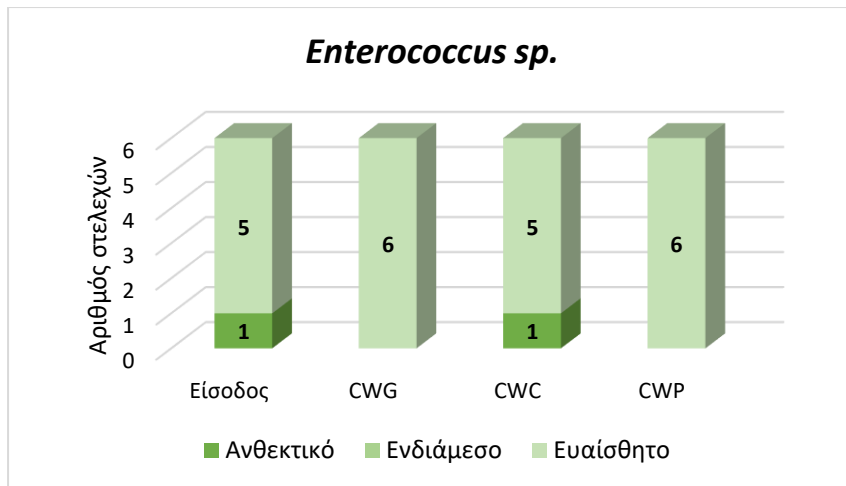
➤ CIPROFLOXACIN



Γράφημα 22. Κατηγοριοποίηση των στελεχών *E.coli* σε κάθε υγροβιότοπο σε σχέση με το βαθμό ανθεκτικότητας στη σιπροφλοξασίνη.

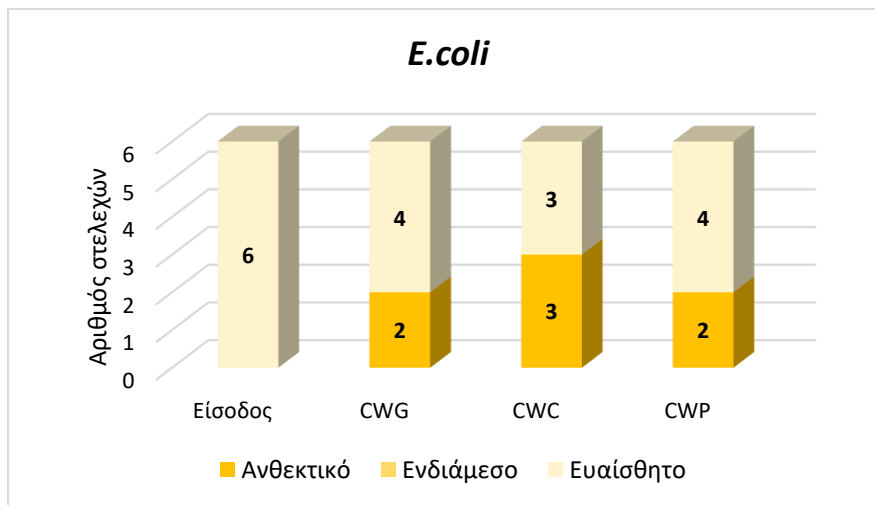


Γράφημα 23. Κατηγοριοποίηση των στελεχών *Staphylococcus sp.* σε κάθε υγροβιότοπο σε σχέση με το βαθμό ανθεκτικότητας στη σιπροφλοξασίνη.

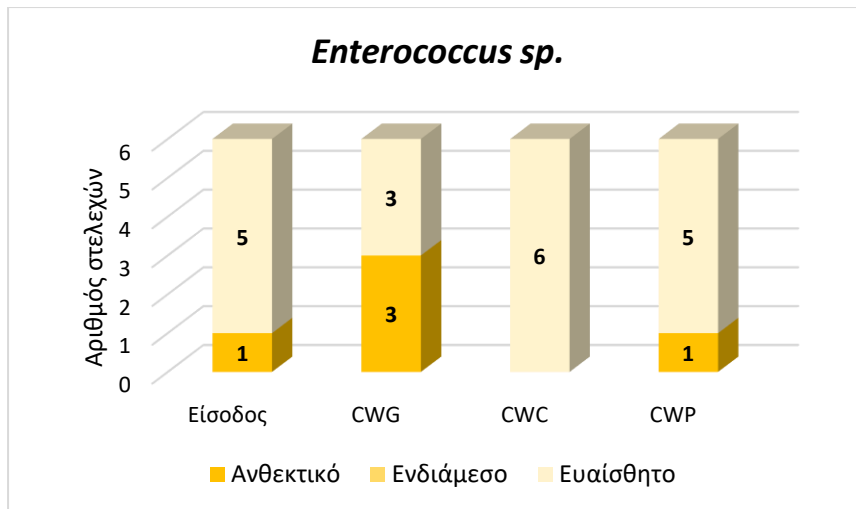


Γράφημα 24. Κατηγοριοποίηση των στελεχών *Enterococcus sp.* σε κάθε υγροβιότοπο σε σχέση με το βαθμό ανθεκτικότητας στη σιπροφλοξασίνη.

➤ AMOXICILLIN

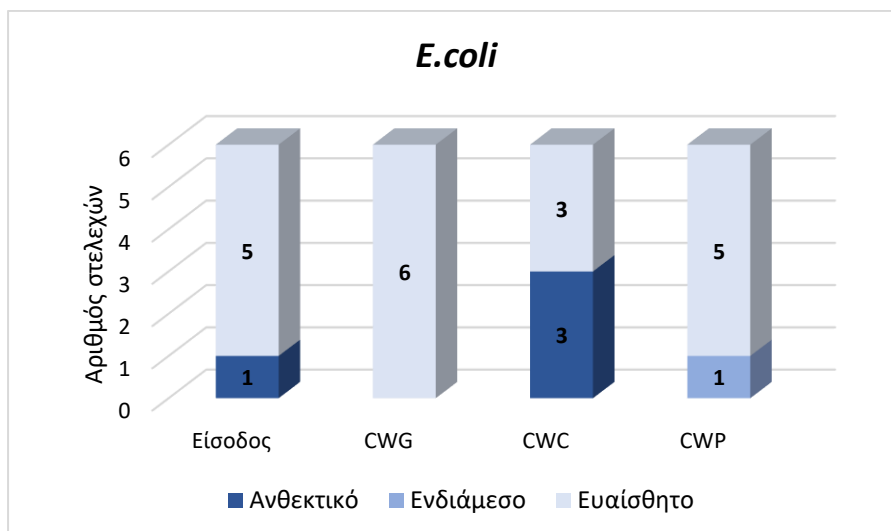


Γράφημα 25. Κατηγοριοποίηση των στελεχών *E.coli* σε κάθε υγροβιότοπο σε σχέση με το βαθμό ανθεκτικότητας στην αμοξικιλίνη.

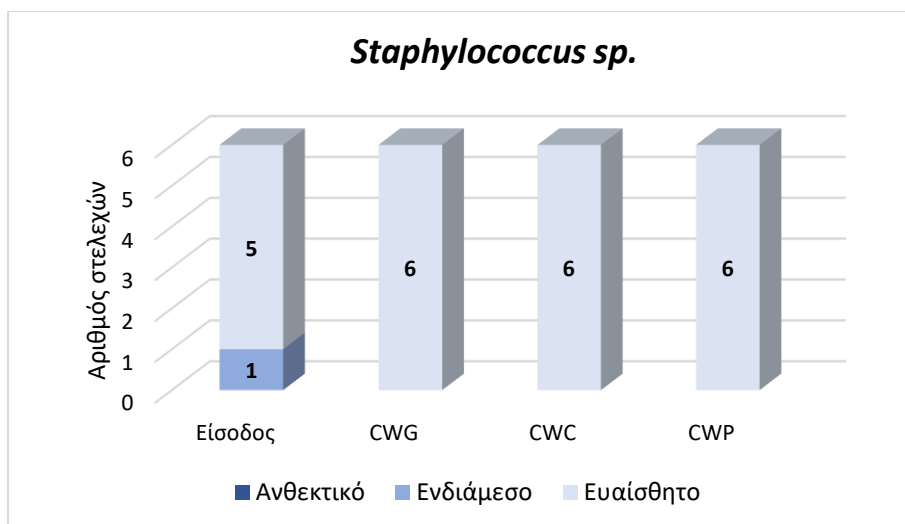


Γράφημα 26. Κατηγοριοποίηση των στελεχών *Enterococcus sp.* σε κάθε υγροβιότοπο σε σχέση με το βαθμό ανθεκτικότητας στην αμοξικιλίνη

➤ **SULFAMETHOXAZOLE**



Γράφημα 27. Κατηγοριοποίηση των στελεχών *E.coli* σε κάθε υγροβιότοπο σε σχέση με το βαθμό ανθεκτικότητας στη σουλφαμεθοξαζόλη.



Γράφημα 28. Κατηγοριοποίηση των στελεχών *Staphylococcus sp.* σε κάθε υγροβιότοπο σε σχέση με το βαθμό ανθεκτικότητας στη σουλφαμεθοξαζόλη.

Η μέση τιμή MIC₆₀ των εξεταζόμενων πληθυσμών μετά από την επεξεργασία του λύματος στους διαφορετικούς τεχνητούς υγροβιότοπους μπορεί να μεταβληθεί και επομένως να αλλάξει και τον χαρακτηρισμό των βακτηρίων, από ανθεκτικά σε ευαίσθητα ή/και αντίστροφα. Ωστόσο, ακόμα και όταν δεν παρατηρήθηκε ιδιαίτερη αλλαγή στο χαρακτηρισμό των βακτηρίων μετά από επεξεργασία στους υγροβιότοπους όπως φαίνεται στα παραπάνω γραφήματα, παρατηρήθηκε μεταβολή στη τιμή της MIC₆₀ είτε προς χαμηλότερες συγκεντρώσεις αντιβιοτικών είτε προς υψηλότερες όπως διαπιστώθηκε στην προηγούμενη ενότητα που εξετάστηκε η διαφοροποίηση του προφίλ ανθεκτικότητας των βακτηρίων.

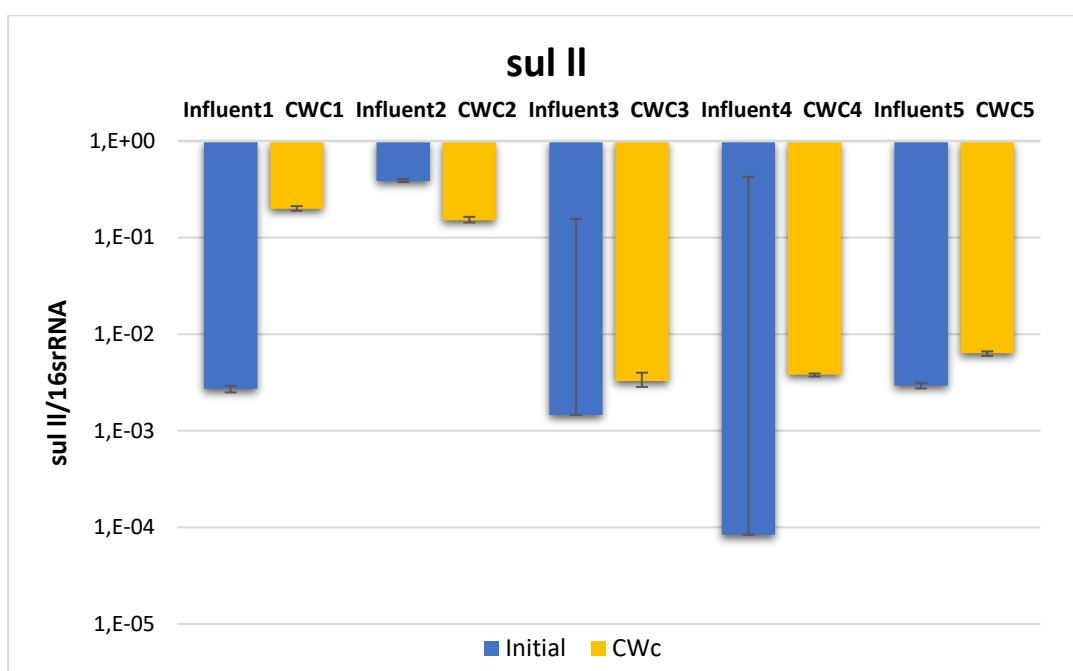
4.3 ΓΟΝΙΔΙΑ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΑ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

Σε δείγματα από εκροές των τριών υγροβιότοπων μετά από απομόνωση γενετικού υλικού πραγματοποιήθηκε και ποσοτικοποίηση των γονιδίων ανθεκτικότητας (ARGs), τα οποία προσφέρουν ανθεκτικότητα σε αυτά τα αντιβιοτικά που μελετήθηκαν παραπάνω. Δηλαδή ποσοτικοποιήθηκαν το *sul II* που αντιστοιχεί στο Sulfamethoxazole, το *qnrA*, που αντιστοιχεί στο Ciprofloxacin, το *ampC* που αντιστοιχεί στα β-λακταμικά αντιβιοτικά δηλαδή στο Amoxicillin και το 16s rRNA που αντιστοιχεί στο συνολικό ριβωσομικό βακτηριακό γενετικό υλικό. Στη συνέχεια τα αποτελέσματα από την Real - Time PCR έδειξαν ότι υπάρχουν διαφορές στην παρουσία και στην ποσότητα των εξεταζόμενων γονιδίων ανθεκτικότητας στην εκροή των τριών διαφορετικών τεχνητών υγροβιότοπων. Τα διαγράμματα παρουσιάζονται με το λόγο του εκάστοτε γονιδίου ως προς το συνολικό βακτηριακό γενετικό υλικό που υπάρχει στα δείγματα.

Πίνακας 12. Ονομασία δειγμάτων στην qPCR ανά ημερομηνία

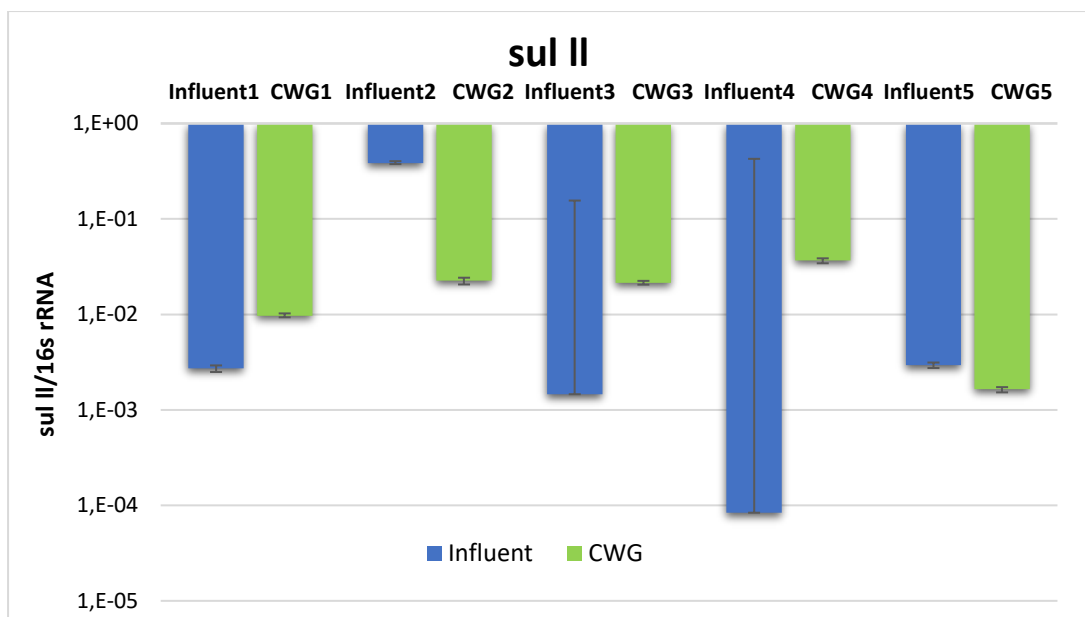
Δείγματα	Influent	MONAΔΑ		
		CWc	CWp	CWG
15.7.2021	Influent 1	CWc 1	CWp 1	CWG 1
12.8.2021	Influent 2	CWc 2	CWp 2	CWG 2
05.09.2021	Influent 3	CWc 3	CWp 3	CWG 3
14.09.2021	Influent 4	CWc 4	CWp 4	CWG 4
05.10.2021	Influent 5	CWc 5	CWp 5	CWG 5

➤ Γονίδιο sul II



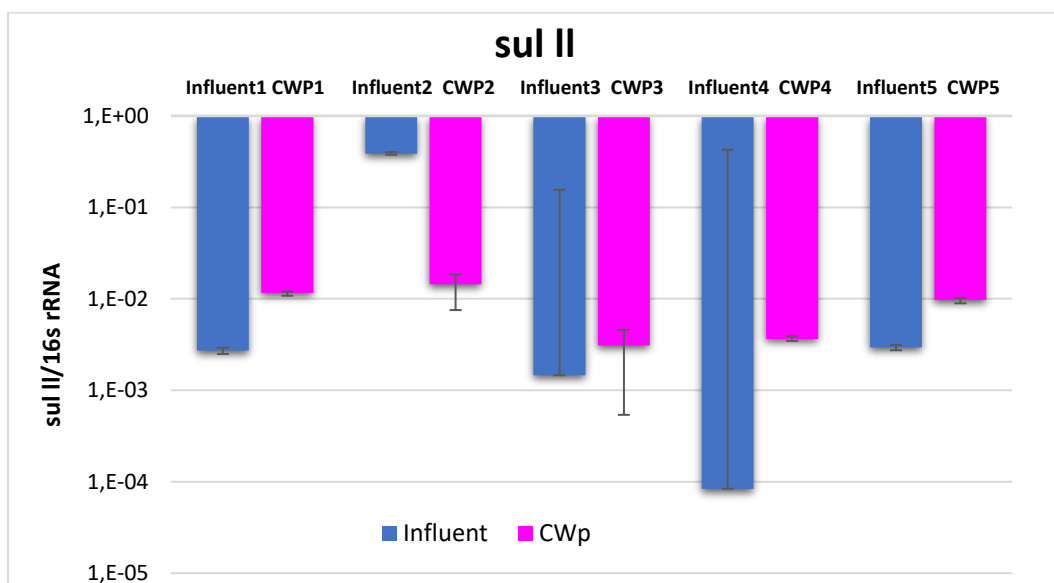
Γράφημα 29. Συγκεντρώσεις γονιδίου sul II (gene copies/16S rRNA) στο Influent και στην εκροή του CWC.

Στο παραπάνω γράφημα, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν για το γονίδιο sul II σε διαφορετικές δειγματοληψίες τόσο στο αρχικό λύμα όσο και στην εκροή του υδροβιότοπου control, χωρίς βλάστηση και πλαστικό HDPE, για να διαπιστωθεί αν υπάρχει μείωση. Εκτός από το CWC2 όπου η συγκέντρωση γονιδίων στην εκροή του υδροβιότοπου είναι μικρότερη από ότι στην είσοδο παρατηρείται γενικά αύξηση του γονιδίου, που κυμαίνεται από 0,33 Logs (CWC5) έως και 2 Logs (CWC1). Δηλαδή υπάρχει αρνητική απομάκρυνση του sul II στον υδροβιότοπο CWC.



Γράφημα 30. . Συγκεντρώσεις γονιδίου sul II (gene copies/16s rRNA) στο Influent και στην εκροή του CWG.

Ο υγροβιότοπος με βλάστηση και χαλίκι, CWG, όπως φαίνεται στο Γράφημα 30. παρουσιάζει αύξηση του γονιδίου sul II που σε ορισμένες περιπτώσεις φτάνει έως και 2,5 Logs (CWG4). Ωστόσο παρατηρούνται και καλά αποτελέσματα απομακρύνσεων σε δύο δειγματοληψίες (CWG2, CWG5).

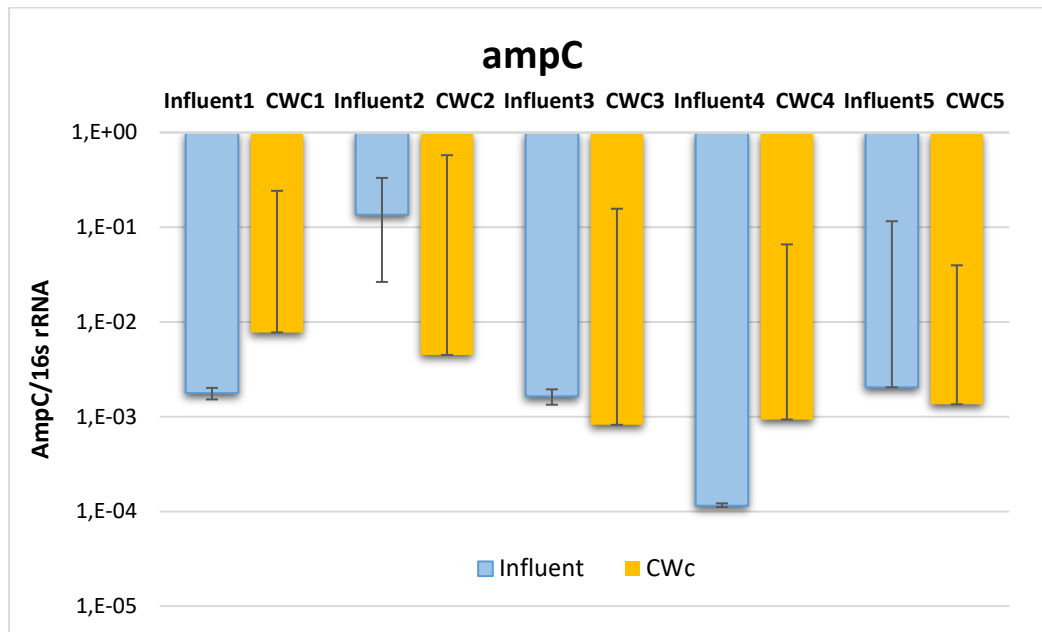


Γράφημα 31 . Συγκεντρώσεις γονιδίου sul II (gene copies/16s rRNA) στο Influent και στην εκροή του CWp.

Όσον αφορά την μείωση του γονιδίου sul II στην εκροή του τεχνητού υγροβιότοπου με βλάστηση και πλαστικό HDPE ως υπόστρωμα, CWP, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι έχει αρκετές αρνητικές απομακρύνσεις που φτάνουν έως και 1,60 Logs αύξηση του γονιδίου (CWP4). Ωστόσο υπάρχει και μια θετική

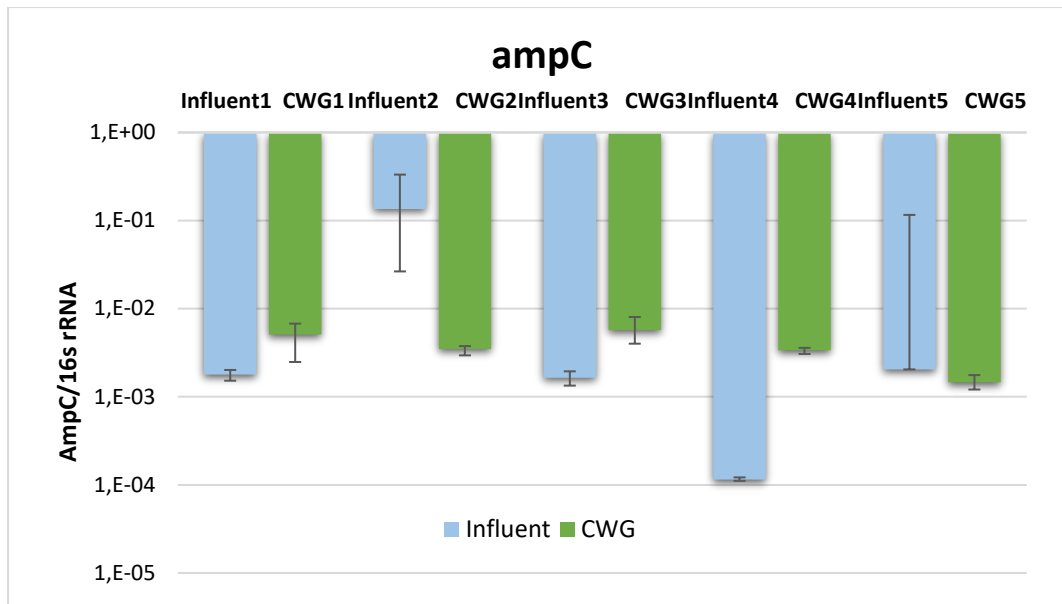
απομάκρυνση στο δείγμα CWP2 καθώς η συγκέντρωση του γονιδίου εμφανίζεται μικρότερη στην εκροή σε σχέση με το Influent.

➤ Γονίδιο ampC



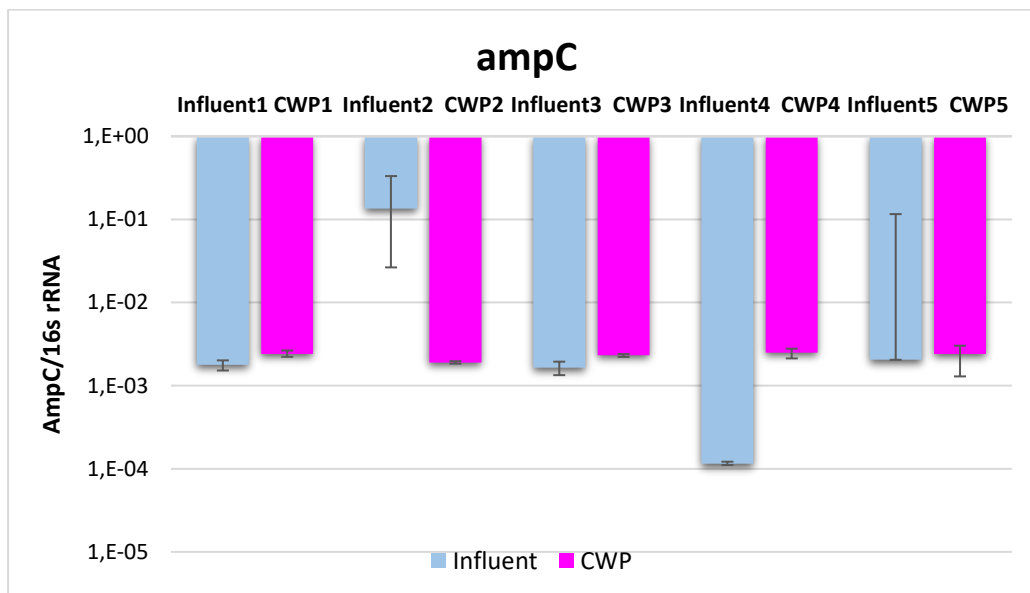
Γράφημα 32. . Συγκεντρώσεις γονιδίου ampC (gene copies/16S rRNA) στο Influent και στην εκροή του CWC.

Όσον αφορά το γονίδιο ανθεκτικότητας ampC, διαπιστώνεται αύξηση του γονιδίου έως και 1 Log (CWC4), για τον υγροβιότοπο CWC. Παρ' όλα αυτά, συνολικά διαπιστώνεται ότι υπάρχει κυρίως μείωση της συγκέντρωσης του γονιδίου στην εκροή του υγροβιότοπου σε σχέση με το αρχικό λύμα.



Γράφημα 33. . Συγκεντρώσεις γονιδίου ampC (gene copies/16s rRNA) στο Influent και στην εκροή του CWG.

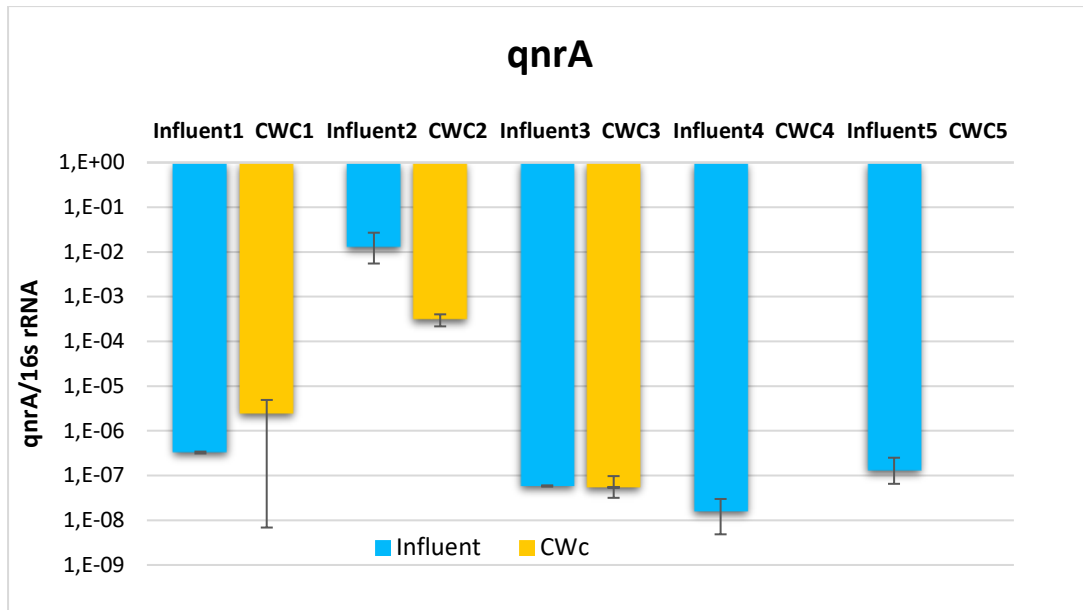
Στον υδροβιότοπο CWG, υπάρχει αύξηση του γονιδίου ampC που κυμαίνεται από 0,40 Logs (CWG1) έως και 1,47 Logs (CWG4). Παρατηρούνται επίσης καλές τιμές απομακρύνσεων σε δύο περιπτώσεις όπως φαίνεται στο Γράφημα 33.



Γράφημα 34. . Συγκεντρώσεις γονιδίου ampC (gene copies/16s rRNA) στο Influent και στην εκροή του CWP.

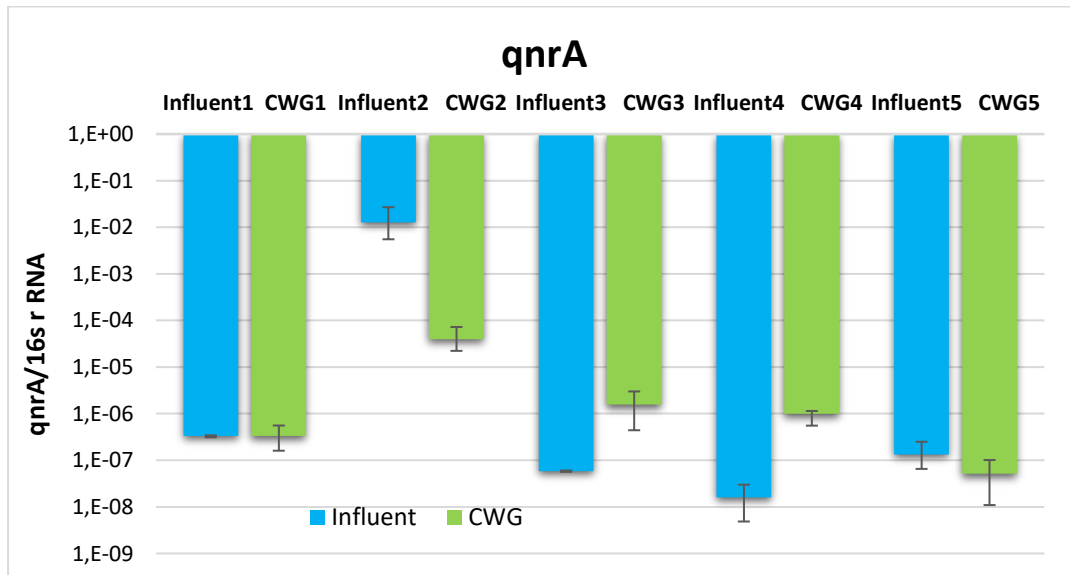
Στο Γράφημα 34. παρουσιάζεται γενικά μια μικρή αύξηση του ampC στην εκροή του CWP, της τάξης του 0,07Logs δηλαδή σχεδόν ανεπαίσθητη εκτός από το 4^ο δείγμα εκροής (CWP4), που εμφανίζει 1,34 Logs αύξηση στην εκροή. Στο 2^ο δείγμα (CWP2) ωστόσο, παρουσιάζεται σημαντική μείωσή του στην εκροή 1,86Logs.

➤ Γονίδιο *qnrA*



Γράφημα 35. Συγκεντρώσεις γονιδίου *qnrA* (gene copies/16S rRNA) στο Influent και στην εκροή του CWC.

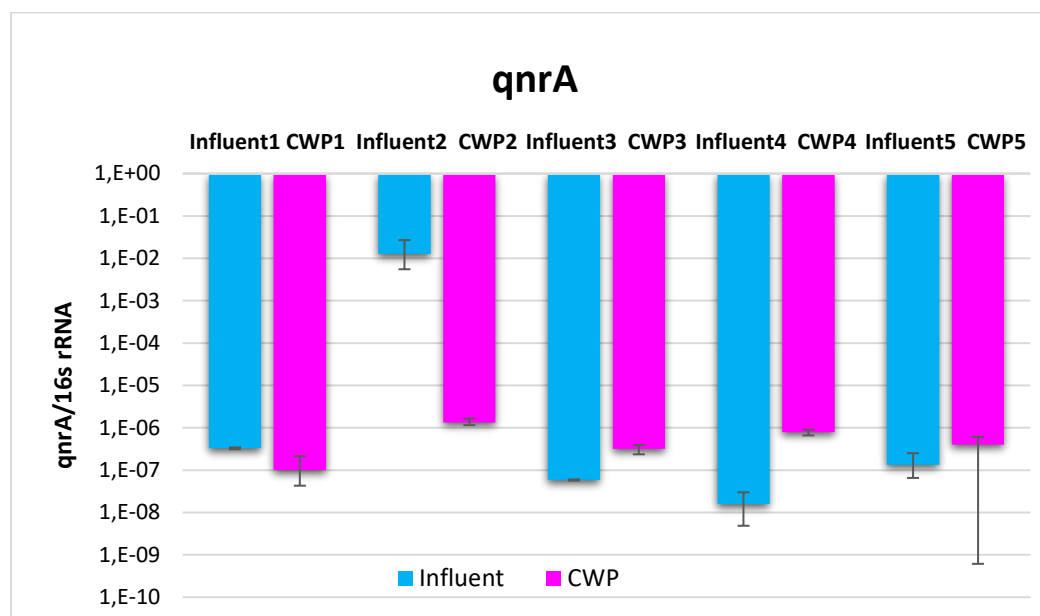
Το γονίδιο ανθεκτικότητας *qnrA* παρουσιάζει διακυμάνσεις ως προς την απομάκρυνσή του στην εκροή του CWC. Αρχικά παρουσιάζει αύξηση κατά σχεδόν 1Log (CWC1), στη συνέχεια θετικά αποτελέσματα απομακρύνσεων καθώς η συγκέντρωσή του μειώνεται, ενώ στα δύο τελευταία δείγματα εκροής δεν ανιχνεύθηκε καθόλου.



Γράφημα 36. Συγκεντρώσεις γονιδίου *qnrA* (gene copies/16S rRNA) στο Influent και στην εκροή του CWG.

Στην εκροή του υδροβιότοπου CWG, στα δείγματα CWP3 και CWP4 οι απομακρύνσεις του *qnrA* είναι αρνητικές καθώς αυξάνεται κατά 1,43 Logs και

1,80Logs αντίστοιχα. Ωστόσο, στα υπόλοιπα 3 δείγματα εκροής, η συγκέντρωση του γονιδίου εμφανίζεται μειωμένη σε σχέση με το Influent.



Γράφημα 37. Συγκεντρώσεις γονιδίου qnrA (gene copies/16s rRNA) στο Influent και στην εκροή του CWP.

Στο Γράφημα 37. φαίνεται πως στα πρώτα δύο δείγματα εκροής (CWP1, CWP2) η συγκέντρωση του γονιδίου qnrA μειώνεται σημαντικά σε σχέση την συγκέντρωση που έχει στο αρχικό λύμα. Στη συνέχεια όμως, παρουσιάζει σημαντική αύξηση που κυμαίνεται από 0,49 Logs έως και 1,70 Logs (CWP4).

Εξετάζοντας συνολικά τα αποτελέσματα που προέκυψαν ως προς τη μείωση της συγκέντρωσης των τριών γονιδίων στις εκροές των τεχνητών υδροβιότοπων μπορούν να σημειωθούν τα εξής :

- Όσον αφορά το γονίδιο ανθεκτικότητας sul II, ο CWC, παρουσιάζει κυρίως αρνητικές τιμές απομακρύνσεων που φτάνουν έως και τα 2 Logs. Ο CWG παρουσιάζει τις καλύτερες απομακρύνσεις σε σχέση με τους άλλους δύο ενώ τέλος ο CWP παρουσιάζει μεγάλη αύξηση του γονιδίου στην εκροή του έως και 1,64 Logs .
- Ο υδροβιότοπος CWC παρουσιάζει τα καλύτερα αποτελέσματα απομακρύνσεων του γονιδίου ampC σε σχέση με τους άλλους δύο. Αντίθετα οι CWG και CWP εμφανίζουν αύξηση του γονιδίου έως και 1,47 Logs και 1,34 Logs αντίστοιχα.
- Τέλος, σχετικά με το γονίδιο ανθεκτικότητας qnrA, αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι μόνο στον CWC υπήρξαν δείγματα που δεν ανιχνεύθηκε καθόλου στην εκροή το qnrA, δηλαδή έγινε πλήρης απομάκρυνση. Οι υδροβιότοποι CWG και CWP παρουσίασαν

διακυμάνσεις όσον αφορά στην απομάκρυνση του γονιδίου και κυρίως αύξησή του της τάξης του 1,80Logs και 1,70Logs αντίστοιχα.

Σε διάφορες έρευνες έχει αναφερθεί ότι η θερμοκρασία είναι ένας καταλυτικής σημασίας παράγοντας που επηρεάζει ιδιαίτερα την απόδοση των CWs. Οι ζεστές εποχές και οι υψηλές θερμοκρασίες βοηθούν την επέκταση της μικροβιακής κοινότητας και οι μικροοργανισμοί με ARGs, έχουν μεγαλύτερα ποσοστά επιβίωσης. Αντίθετα, οι Pei et al, αναφέρουν σε μελέτη τους ότι η αύξηση της θερμοκρασίας, μείωσε κατά περίπου 1-2 τάξεις μεγέθους τα ARGs στην εκροή τεχνητών υδροβιότοπων (Pei et al., 2019). Τα αποτελέσματα που διεξάχθηκαν στην συγκεκριμένη εργασία είναι σύμφωνα με την παρατήρηση των Pei et al, καθώς αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι υπήρξε μείωση της συγκεντρώσεως των γονιδίων κατά 1-2 τάξεις μεγέθους, στην εκροή όλων των υδροβιότοπων και για όλα τα γονίδια ανθεκτικότητας σε δείγματα μιας συγκεκριμένης ημερομηνίας όπως φαίνεται στα γραφήματα 29-37. Τα δείγματα αυτά (CWC2, CWG2, CWP2) είναι από τις εκροές υδροβιότοπων, και είχαν ληφθεί όπως φαίνεται στον Πίνακα 15 τον Αύγουστο. Ωστόσο στον Πίνακα 1 που παρουσιάζονται οι μέσες τιμές θερμοκρασίες κατά τους μήνες δειγματοληψίας από τους υδροβιότοπους, φαίνεται ότι ο Αύγουστος είχε τις υψηλότερες τιμές. Πιθανόν λοιπόν η αυξημένη αυτή θερμοκρασία να ενίσχυσε την μείωση των ARGs.

Επιπλέον, όπως έχει προαναφερθεί σε προηγούμενη ενότητα, στους τεχνητούς υδροβιότοπους υπάρχει πλούσια βακτηριακή ποικιλομορφία. Ο διαφορετικός βακτηριακός πληθυσμός που υπάρχει συμβάλει στη βιοαποδόμηση ρύπων ή και στην θήρευση ιών αλλά ταυτόχρονα ευνοεί την μετάδοση των ARGs μεταξύ των βακτηρίων. Επίσης, οι δομές του βιοφίλμ που αναπτύσσονται ειδικά στους CW υπο-επιφανειακής ροής όπως αυτοί που εξετάζονται στην συγκεκριμένη εργασία, λόγω του υποστρώματος δημιουργούν δεξαμενές ARGs καθώς τα γονίδια πιθανόν να παγιδεύονται στο βιοφίλμ. Ακόμη, στα υποστρώματα προσροφώνται και ρυπαντές όπως αντιβιοτικά και βαρέα μέταλλα τα οποία δημιουργούν επιλεκτική πίεση στα βακτήρια (Fang et al., 2017). Όλα τα παραπάνω μπορούν επίσης να εξηγήσουν τους λόγους που αρκετά δείγματα εκροών από τους τεχνητούς υδροβιότοπους CWC, CWG και CWP, παρουσίαζαν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των γονιδίων σε σχέση με το αρχικό λύμα από την μονάδα επεξεργασίας αστικών λυμάτων.

Από την άλλη πλευρά, όσον αφορά την απομάκρυνση γονιδίων ανθεκτικότητας από τεχνητούς υδροβιότοπους έρευνες έχουν αναφέρει ότι το είδος του τεχνητού υδροβιότοπου και το είδος του υποστρώματος μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά την απομάκρυνση τους. Συγκεκριμένα οι Zhang et al, σε μελέτη τους έχουν αναφέρει μείωση ARGs σε τεχνητούς υδροβιότοπους υπο-επιφανειακής ροής που κυμαίνεται από 0,26 Logs έως και 3.3 Logs (Zhang et al., 2020). Οι Pei et al, αναφέρουν ότι η προσρόφηση σε ένα μέσο όπως το χαλίκι είναι στους μηχανισμούς απομάκρυνσης των ARG (Pei et al., 2019). Αυτή η διαπίστωση επαληθεύεται στη συγκεκριμένη εργασία καθώς ο CWG με υπόστρωμα χαλίκι παρουσιάζει τις καλύτερες απομακρύνσεις όσον αφορά το γονίδιο sul II σε σχέση με τους άλλους δυο

υγροβιότοπους. Επιπλέον οι Monsalves et al διαπίστωσαν ότι τα συστήματα VSSF (κάθετα συστήματα υπο-επιφανειακής ροής) πέτυχαν απομακρύνσεις ARG πάνω από 62%. Οι συγγραφείς πρότειναν ότι αυτές οι αποδόσεις μείωσης στα συστήματα αυτά σχετίζονταν με την ικανότητα φιλτραρίσματος στο μέσο υποστήριξης (Monsalves et al., 2022).

Σε έρευνά τους οι Liu et al, έχουν επισημάνει ότι η βλάστηση στους τεχνητούς υγροβιότοπους είναι μια παράμετρος που επίσης μπορεί να επηρεάσει την απομάκρυνση των ARGs (L. Liu et al., 2020). Η βλάστηση δεν αφαιρεί άμεσα τα ARGs, αλλά παρέχει οξυγόνο στους μικροοργανισμούς, επιφάνεια για την ανάπτυξη βιοφίλμ και φιλτράρει τα στερεά σωματίδια. Ένας CW με βλάστηση έδειξε απομάκρυνση του ARB έως και 81-93% σε σύγκριση με μη φυτεμένους (42-74%) (Hazra & Durso, 2022). Επειδή οι τεχνητοί υγροβιότοποι στη συγκεκριμένη εργασία εξετάστηκαν στους πρώτους τέσσερις μήνες λειτουργίας τους, η απόδοση των συστημάτων CWG και CWP με βλάστηση, θα μπορούσε να αυξηθεί μετά από ένα χρονικό διάστημα και να δίνει καλύτερες τιμές απομακρύνσεων. Δηλαδή, ο περισσότερος χρόνος λειτουργίας του συστήματος θα μπορούσε να συνεπάγεται την καλύτερη ανάπτυξη των φυτών και του ριζικού συστήματος προσφέροντας μεγαλύτερη διαθέσιμη επιφάνεια για την προσκόλληση των ARB και των ARGs. Επίσης η μείωση της συγκέντρωσης των ARG στην εκροή των υγροβιότοπων σε σχέση με το Influent συμβαίνει λόγω του σχηματισμού βιοφίλμ μεταξύ του πληρωτικού υλικού και των ριζών του φυτού. Συγκεκριμένα αναφέρθηκε ότι συγκεντρώσεις ARG μπορεί να είναι 0,22 γονίδια/16S rRNA υψηλότερες στο υπόστρωμα σε σύγκριση με αυτές στη στήλη νερού (Monsalves et al., 2022). Το κοινό καλάμι (*Phragmites australis*) που χρησιμοποιήθηκε και στους υγροβιότοπους CWG και CWP, χρησιμοποιείται ευρέως σε συστήματα CW και η παρουσία του έχει αποδειχθεί αρκετά αποτελεσματική στη μείωση των επιπέδων ARG και 16sRNA σε σύγκριση με άλλα φυτά (García et al., 2013b).

Από όλα τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι η ικανότητα των CW να απομακρύνουν τα ARGs παρουσιάζει διακυμάνσεις και παρατηρείται μια πολύπλοκη συμπεριφορά. Με λίγα λόγια, ενώ κάποιοι μηχανισμοί συμβάλουν στην απομάκρυνση των ARGs αλλά και των ARB που έχουν τα γονίδια ανθεκτικότητας, ταυτόχρονα μπορεί να δημιουργούνται ευνοϊκές συνθήκες για την εξάπλωσή τους. Ενδεικτικό παράδειγμα είναι ο μηχανισμός της απορρόφησης και βιοαποδόμησης που αναφέρθηκαν παραπάνω ότι συμβάλουν στη μείωση των ARGs, ενώ μπορούν ταυτόχρονα να παίζουν σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό τους (Chen et al., 2016). Επιπλέον, σημασία έχει από ποιο σημείο γίνεται η δειγματοληψία στους τεχνητούς υγροβιότοπους ώστε να διαπιστωθεί η απομάκρυνση των γονιδίων ανθεκτικότητας. Για παράδειγμα οι Fang et al. αναφέρουν ότι το *sul II* είναι σε μεγαλύτερη αφθονία κοντά στο υπόστρωμα ενώ άλλα γονίδια στην υδατική φάση ή κοντά στο ριζικό σύστημα (Fang et al., 2017). Έτσι εξηγείται γιατί υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι οι τεχνητοί υγροβιότοποι δεν συμβάλλουν καθόλου στον περιορισμό των γονιδίων ανθεκτικότητας.

Τέλος, μια γενική παρατήρηση συνδυάζοντας τα αποτελέσματα στην ενότητα 4.2.2 που εξετάστηκε το προφίλ ανθεκτικότητας των βακτηρίων *E.coli*, *Staphylococcus sp.* και *Enterococcus sp.* σε ποικιλία αντιβιοτικών μπορούμε να διαπιστώσουμε ότι η τιμή MIC₆₀ για κάθε αντιβιοτικό δεν συνδέεται απαραίτητα με τις συγκεντρώσεις που ανιχνεύθηκαν των αντίστοιχων εξεταζόμενων γονιδίων. Δηλαδή τα ARGs δεν ακολουθούν κάποιο μοτίβο και η παρουσία συγκεκριμένων που είναι σχετικά με την ανθεκτικότητα ως προς ένα αντιβιοτικό δεν συνεισφέρει απαραίτητα στην ανθεκτικότητα ως προς το συγκεκριμένο αντιβιοτικό. Για παράδειγμα τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης εργασίας έδειξαν μεταβολές στο προφίλ ανθεκτικότητας των τριών βακτηρίων στο αντιβιοτικό Σιπροφλοξασίνη και σε ορισμένες περιπτώσεις αύξηση της τιμής MIC₆₀ μετά από επεξεργασία του λύματος στον CWC. Ωστόσο, όπως φαίνεται στο γράφημα 35 το γονίδιο *qnrA* που συνδέεται με την ανθεκτικότητα στις κινολόνες δεν ανιχνεύεται καθόλου στα δείγματα εκροών του CWC τους μήνες Σεπτέμβριο και Οκτώβρη που τότε εμφανίζει αύξηση η τιμή MIC₆₀ στη Σιπροφλοξασίνη. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι υπάρχουν και άλλα γονίδια ανθεκτικότητας που δεν εξετάστηκαν όμως στην παρούσα εργασία και σχετίζονται με την ανθεκτικότητα των βακτηρίων στα συγκεκριμένα αντιβιοτικά.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ- ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

5.1 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Παρά την ευρεία χρήση της τεχνολογίας των τεχνητών υγροβιότοπων σε όλο τον κόσμο, ο αριθμός των δημοσιευμένων μελετών εξακολουθεί να είναι σχετικά μικρός σε τροπικά κλίματα, όπου βρίσκονται επίσης και οι περισσότερες από τις αναπτυσσόμενες χώρες που χρησιμοποιούνται αυτά τα συστήματα. Παρ' όλα αυτά έχει διαπιστωθεί ότι το θερμό κλίμα έχει θετική επίδραση στον σχεδιασμό και την απόδοση των μονάδων καθώς οι βιολογικές διεργασίες ευνοούνται και ενισχύονται σε υψηλότερες θερμοκρασίες. Με αυτό τον τρόπο, οι τεχνητοί υγροβιότοποι αποτελούν μια βιώσιμη και οικονομικά αποδοτική τεχνολογία και προσφέρουν πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλες τεχνολογίες επεξεργασίας λυμάτων. Ωστόσο οι τεχνητοί υγροβιότοποι κατακόρυφης ροής όπως είναι οι μονάδες στην συγκεκριμένη εργασία δεν έχουν διερευνηθεί διεξοδικά μέχρι σήμερα ώστε να υπάρχει μια πολύ ξεκάθαρη εικόνα των αποδόσεών τους.

Όσον αφορά τα διαφορετικά πληρωτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν στις πιλοτικές μονάδες τεχνητών υγροβιότοπων, το χαλίκι είναι πιο σύνηθες και η χρήση του αναφέρεται στις περισσότερες μελέτες. Παρ' όλα αυτά η χρήση ανακυκλωμένου πλαστικού HDPE ως υλικό υποστρώματος αποδείχθηκε μια αξιόπιστη εναλλακτική λύση που παρέχει αρκετά ικανοποιητικά αποτελέσματα απομακρύνσεων κυρίως στους μικροοργανισμούς αλλά και στα ARGs. Επίσης παρέχει το πλεονέκτημα ότι με τη χρήση αυτού του μέσου αποφεύγεται το φαινόμενο "bed clogging" δηλαδή ο κορεσμός του υποστρώματος καθώς μπορεί εύκολα να καθαριστεί και να επανατοποθετηθεί.

Επιπλέον, οι περισσότερες μελέτες συσχετίζουν την ικανότητα των CW να αφαιρούν ARGs με την ικανότητά τους να απομακρύνουν το βακτηριακό φορτίο (Fang et al., 2017). Ωστόσο τα αποτελέσματα που προέκυψαν σε αυτή την εργασία αποδεικνύουν ότι η μείωση των βακτηριακών δεικτών και στους τρεις τεχνητούς υγροβιότοπους, CWC, CWG και CWP, παρότι εμφανίζουν καλές αποδόσεις απομάκρυνσης οι οποίες δυνητικά με τον περισσότερο χρόνο λειτουργίας των μονάδων μπορούν να γίνουν καλύτερες, ταυτόχρονα η συγκέντρωση των γονιδίων ανθεκτικότητας στην εκροή τους είναι αρκετά μεγάλη. Το γεγονός αυτό είναι πολύ σημαντικό καθώς η εύκολη διάδοση ανθεκτικότητας μέσω των ARGs εγκυμονεί τεράστιους περιβαλλοντικούς κινδύνους αλλά και αποτελεί απειλή για την ανθρώπινη υγεία. Με βάσει λοιπόν όλων των παραπάνω γεννάται το ερώτημα αν τελικά είναι πιο σημαντικό στις εκροές αυτών των συστημάτων να υπάρχουν λιγότερα βακτήρια ή περισσότερα αλλά λιγότερο ανθεκτικά σε ποικιλία αντιβιοτικών. Επίσης, σχετικά με την απομάκρυνση ιών και συγκεκριμένα των αδενοϊών που εξετάστηκαν σε αυτή την εργασία, αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι οι μονάδες τεχνητών υγροβιότοπων μπορούν να επιτύχουν σημαντική μείωση. Ωστόσο παρά τη

μεγάλη μείωση , οι συγκεντρώσεις των ιών στις εξόδους παραμένουν σε υψηλά επίπεδα, το οποίο αποτελεί επίσης κίνδυνο για τη δημόσια υγεία καθώς για την πρόκληση επιδημιών αρκούν μόνο λίγα ιικά σωματίδια.

Συνοψίζοντας, μπορεί διεξαχθεί το συμπέρασμα ότι η τεχνολογία των τεχνητών υδροβιότοπων αποτελεί μια «πράσινη» τεχνολογία όπως συχνά αναφέρονται οι τεχνητοί υδροβιότοποι στη βιβλιογραφία. Με λίγα λόγια , είναι ένα φιλικό προς το περιβάλλον σύστημα επεξεργασίας υγρών αποβλήτων. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν στην συγκεκριμένη εργασία αποδεικνύουν ότι μπορεί να έχουν αξιολογες αποδόσεις τόσο στην απομάκρυνση μικροοργανισμών όσο και γονιδίων ανθεκτικότητας (ARGs) σε ποικιλία αντιβιοτικών, ενώ το προφίλ ανθεκτικότητας των βακτηρίων στα αντιβιοτικά μπορεί να διαφοροποιείται χωρίς όμως να εμφανίζει ξεκάθαρο μοτίβο. Επειδή οι φυσικοχημικοί μηχανισμοί που συμβάλλουν στην απομάκρυνση των παραπάνω είναι ιδιαίτερα πολύπλοκοι και δεν υπάρχει πλήρης κατανόηση της συνδυασμένης δράσης τους, απαιτείται περισσότερη έρευνα ώστε να βελτιστοποιηθούν ορισμένες παράμετροι στους τεχνητούς υδροβιότοπους και συνεπώς να αυξηθεί η απόδοσή τους. Επί του παρόντος ωστόσο, είναι γεγονός ότι δεν υπάρχει πανάκεια μέθοδος επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων κυρίως ως προς την απομάκρυνση γονιδίων ανθεκτικότητας (ARGs).

5.2 ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

Όπως προαναφέρθηκε παραπάνω δεδομένου ότι υπάρχει περιθώριο για περαιτέρω βελτίωση των μονάδων τεχνητών υδροβιότοπων , κάποιες μελλοντικές προτάσεις είναι οι εξής :

- Λειτουργία πολλαπλών τεχνητών υδροβιότοπων, δηλαδή δημιουργία ενός υβριδικού συστήματος αφού με αυτό τον τρόπο τα μειονεκτήματα του ενός συστήματος θα μπορούν να καλύπτονται από τα πλεονεκτήματα του άλλου για βελτιστοποίηση των αποδόσεων. Επίσης σε αυτή την περίπτωση είναι πιο πιθανό να γίνεται επίτευξη των ορίων της νομοθεσίας στις εκροές για τις διάφορες μικροβιακές παραμέτρους έτσι ώστε να είναι εφικτή η επαναχρησιμοποίηση των επεξεργασμένων λυμάτων.
- Περισσότερη διερεύνηση στους μηχανισμούς απομάκρυνσης των μικροοργανισμών και των γονιδίων ανθεκτικότητας στις μονάδες τεχνητών υδροβιότοπων ώστε να γίνει προσπάθεια για βελτίωση των σχεδιαστικών παραμέτρων που επηρεάζουν τους μηχανισμούς αυτούς.
- Δημιουργία συστήματος τεχνητού υδροβιότοπου με ποικιλία φυτών ως βλάστηση, για έλεγχο της συνδυασμένης δράσης τους καθώς έχει γίνει αναφορά σε διάφορες μελέτες ,καλών αποδόσεων σε απομάκρυνση ρύπων , από διαφορετικά είδη μακρόφυτων.
- Περισσότερη διερεύνηση όσον αφορά την αποτελεσματικότητα του ανακυκλωμένου πλαστικού (PET) ως υπόστρωμα καθώς η ευρεία χρήση του εκτός από οικονομικό όφελος σε σχέση με άλλου τύπου μέσα, έχει και τεράστιο περιβαλλοντικό όφελος.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

- ΕΛΕΓΧΟΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΓΙΑ ΟΛΑ ΤΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

Πίνακας 13. Ονομασία στελεχών *Staphylococcus* sp. ανά περίοδο

Ιούλιος 2021			
Μονάδες			
INFLUENT	CWG	CWc	CWP
<i>Staphylococcus</i> sp. Influent_1	<i>Staphylococcus</i> sp. CWG_2	<i>Staphylococcus</i> sp. CWC_3	<i>Staphylococcus</i> sp. CWP_4
<i>Staphylococcus</i> sp. Influent_1A	<i>Staphylococcus</i> sp. CWG_2A	<i>Staphylococcus</i> sp. CWC_3A	<i>Staphylococcus</i> sp. CWP_4A
2 ^η περίοδος			
Αύγουστος 2021			
Μονάδες			
INITIAL	CWG	CWc	CWP
<i>Staphylococcus</i> sp. Influent_5	<i>Staphylococcus</i> sp. CWG_6	<i>Staphylococcus</i> sp. CWC_7	<i>Staphylococcus</i> sp. CWP_8
<i>Staphylococcus</i> sp. Influent_5A	<i>Staphylococcus</i> sp. CWG_6A	<i>Staphylococcus</i> sp. CWC_7A	<i>Staphylococcus</i> sp. CWP_8A
3 ^η περίοδος			
Σεπτέμβριος-Οκτώβριος 2021			
Μονάδες			
INITIAL	CWG	CWc	CWP
<i>Staphylococcus</i> sp. Influent_9	<i>Staphylococcus</i> sp. CWG_10	<i>Staphylococcus</i> sp. CWC_11	<i>Staphylococcus</i> sp. CWP_12
<i>Staphylococcus</i> sp. Influent_9A	<i>Staphylococcus</i> sp. CWG_10A	<i>Staphylococcus</i> sp. CWC_11A	<i>Staphylococcus</i> sp. CWP_12A

Πίνακας 14.. Ονομασία στελεχών *E. coli* ανά περίοδο

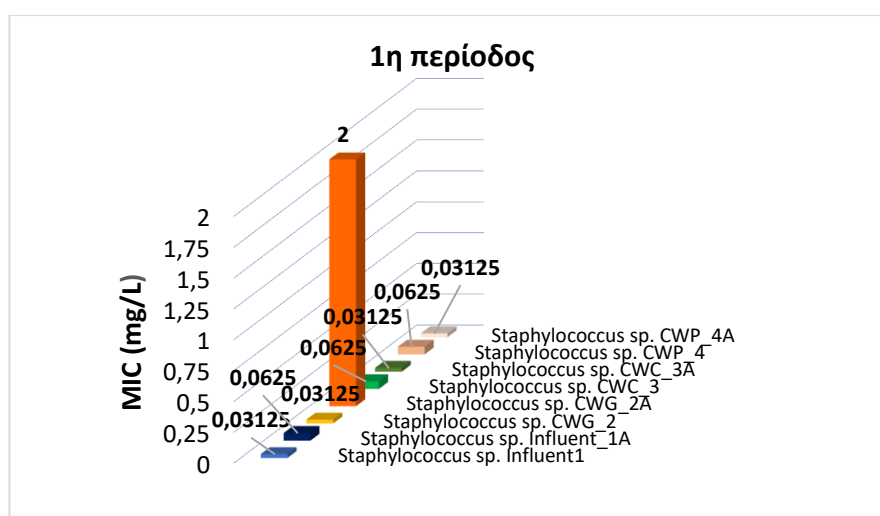
Ιούλιος 2021			
Μονάδες			
INFLUENT	CWG	CWc	CWP
<i>E. coli</i> Influent_1	<i>E. coli</i> CWG_2	<i>E. coli</i> CWC_3	<i>E. coli</i> CWP_4
<i>E. coli</i> Influent_1A	<i>E. coli</i> CWG_2A	<i>E. coli</i> CWC_3A	<i>E. coli</i> CWP_4A
2 ^η περίοδος			
Αύγουστος 2021			
Μονάδες			
INITIAL	CWG	CWc	CWP
<i>E. coli</i> Influent_5	<i>E. coli</i> CWG_6	<i>E. coli</i> CWC_7	<i>E. coli</i> CWP_8
<i>E. coli</i> Influent_5A	<i>E. coli</i> CWC_6A	<i>E. coli</i> CWC_7A	<i>E. coli</i> CWP_8A
3 ^η περίοδος			
Σεπτέμβριος-Οκτώβριος 2021			
Μονάδες			
INITIAL	CWG	CWc	CWP
<i>E. coli</i> Influent_9	<i>E. coli</i> CWG_10	<i>E. coli</i> CWC_11	<i>E. coli</i> CWP_12
<i>E. coli</i> Influent_9A	<i>E. coli</i> CWG_10A	<i>E. coli</i> CWC_11A	<i>E. coli</i> CWP_12A

Πίνακας 15.. Ονομασία στελεχών *Enterococcus* sp. ανά περίοδο

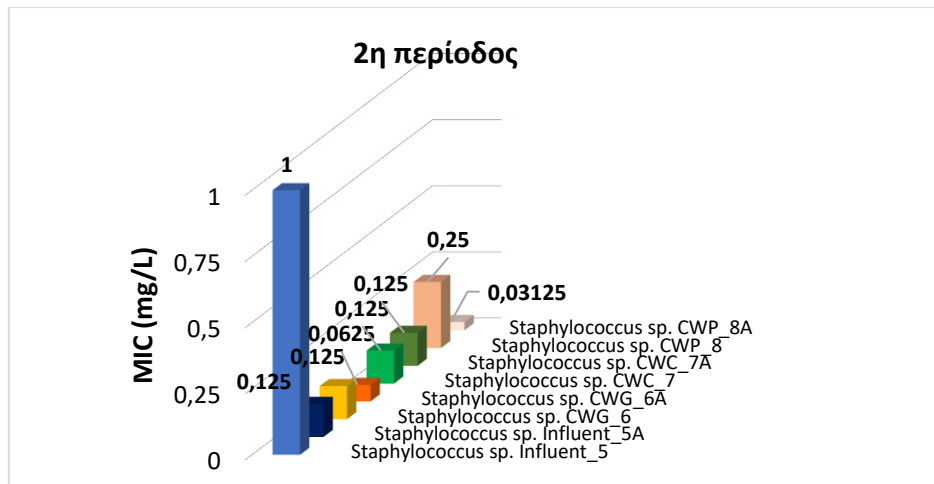
1 ^η περίοδος			
Ιούλιος 2021			
Μονάδες			
INFLUENT	CWG	CWc	CWP
<i>Enterococcus</i> sp. Influent_1	<i>Enterococcus</i> sp. CWG_2	<i>Enterococcus</i> sp. CWC_3	<i>Enterococcus</i> sp. CWP_4
<i>Enterococcus</i> sp. Influent_1A	<i>Enterococcus</i> sp. CWG_2A	<i>Enterococcus</i> sp. CWC_3A	<i>Enterococcus</i> sp. CWP_4A
2 ^η περίοδος			
Αύγουστος 2021			
Μονάδες			
INITIAL	CWG	CWc	CWP
<i>Enterococcus</i> sp. Influent_5	<i>Enterococcus</i> sp. CWG_6	<i>Enterococcus</i> sp. CWC_7	<i>Enterococcus</i> sp. CWP_8
<i>Enterococcus</i> sp. Influent_5A	<i>Enterococcus</i> sp. CWG_6A	<i>Enterococcus</i> sp. CWC_7A	<i>Enterococcus</i> sp. CWP_8A
3 ^η περίοδος			
Σεπτέμβριος-Οκτώβριος 2021			
Μονάδες			
INITIAL	CWG	CWc	CWP
<i>Enterococcus</i> sp. Influent_9	<i>Enterococcus</i> sp. CWG_10	<i>Enterococcus</i> sp. CWC_11	<i>Enterococcus</i> sp. CWP_12
<i>Enterococcus</i> sp. Influent_9A	<i>Enterococcus</i> sp. CWG_10A	<i>Enterococcus</i> sp. CWC_11A	<i>Enterococcus</i> sp. CWP_12A

→ *Staphylococcus* sp.

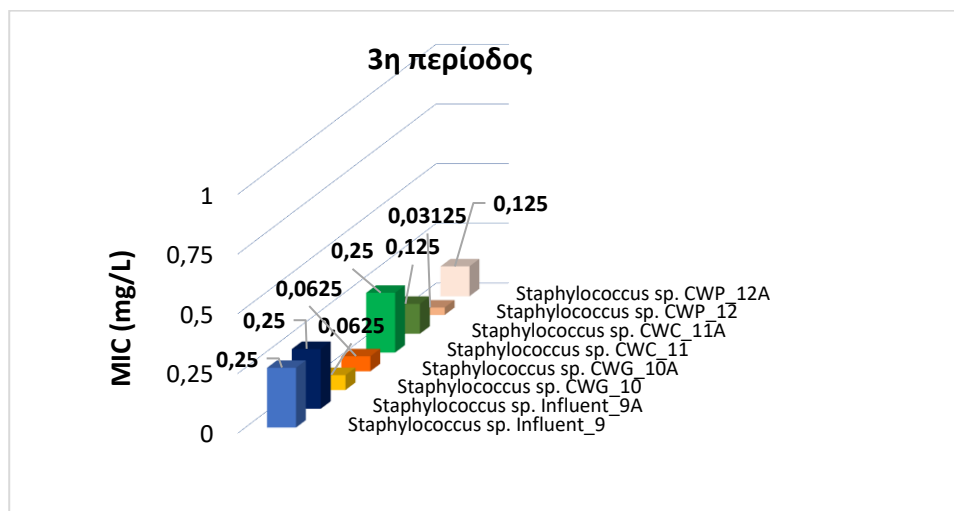
CIPROFLOXACIN



Γράφημα 38. Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση σιπροφλοξασίνης για τον *Staphylococcus* sp. κατά την 1^η περίοδο.

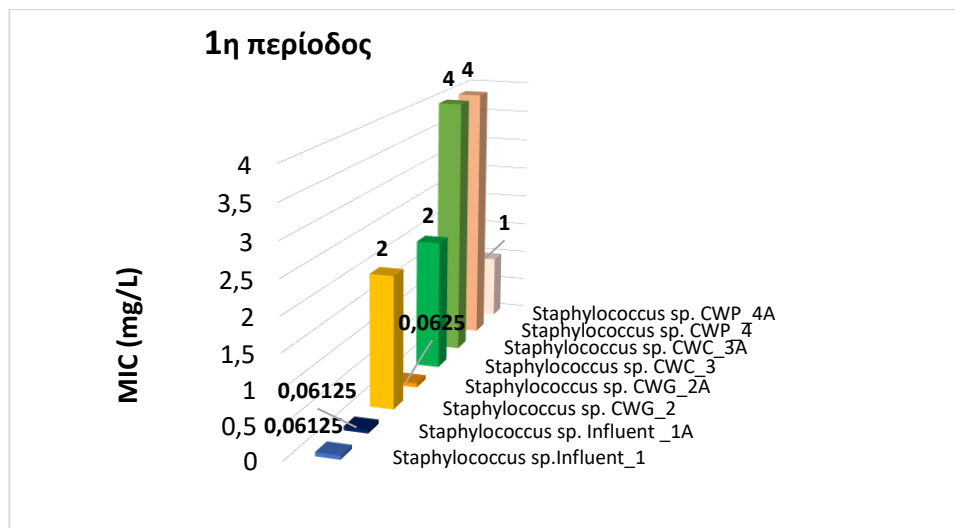


Γράφημα 39. Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση σιπροφλοξασίνης για τον *Staphylococcus sp.* κατά την 2^η περίοδο.

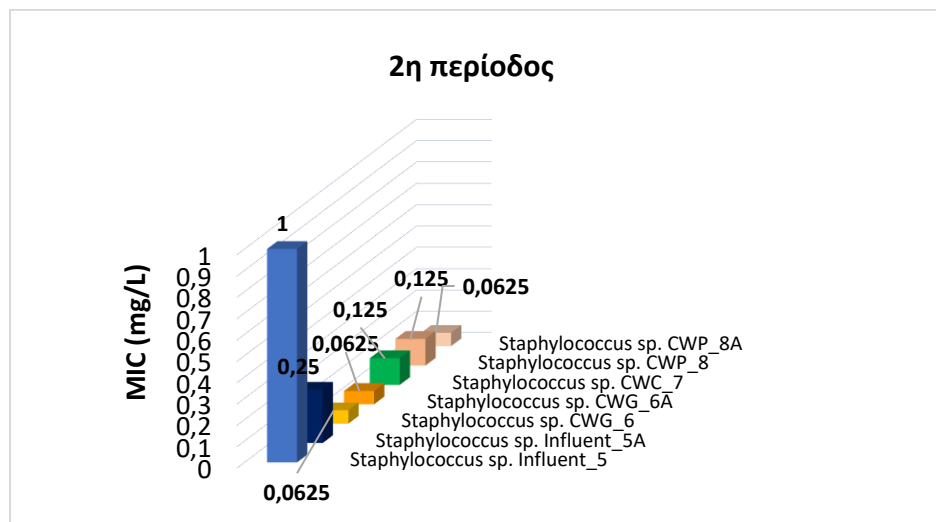


Γράφημα 40. Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση σιπροφλοξασίνης για τον *Staphylococcus sp.* κατά την 3^η περίοδο.

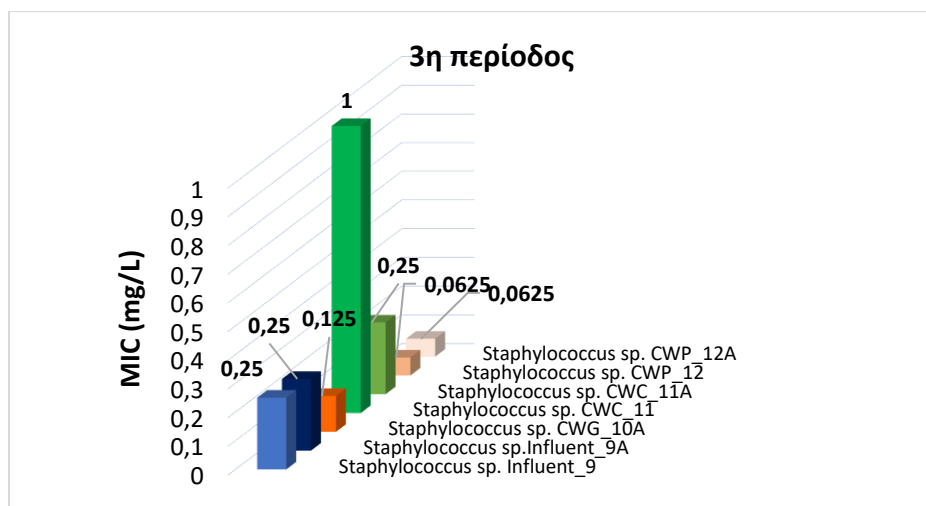
AMOXICILLIN



Γράφημα 41. Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση αμοξικιλίνης για τον *Staphylococcus sp.* κατά την 1^η περίοδο.

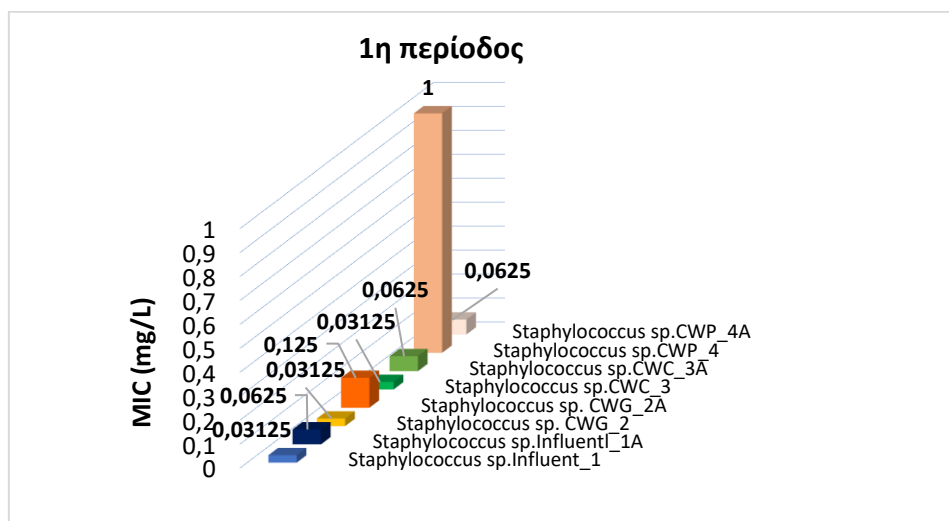


Γράφημα 42. Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση αμοξικιλίνης για τον *Staphylococcus sp.* κατά την 2^η περίοδο.

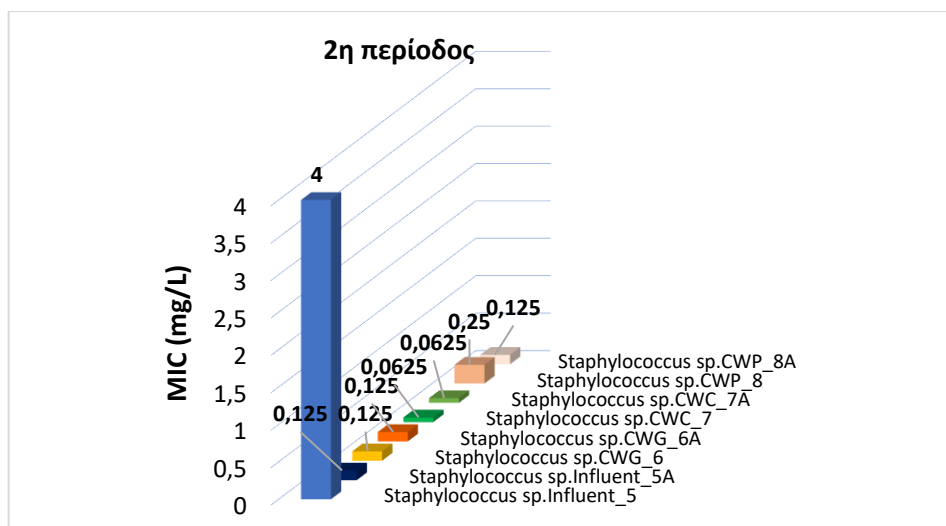


Γράφημα 43. Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση αμοξικιλίνης για τον *Staphylococcus sp.* κατά την 3^η περίοδο.

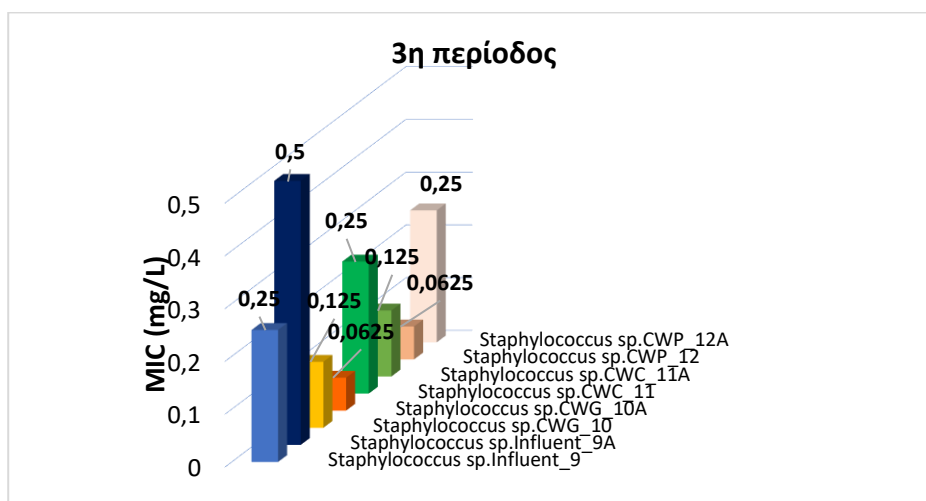
SULFAMETHOXAZOLE



Γράφημα 44. Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση σουλφαμεθοξαζόλης για τον *Staphylococcus sp.* κατά την 1^η περίοδο.



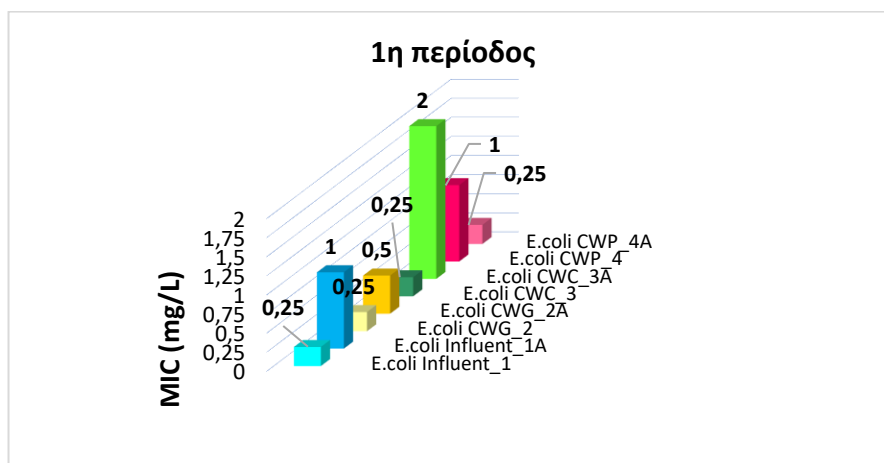
Γράφημα 45. Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση σουλφαμεθοξαζόλης για τον *Staphylococcus sp.* κατά την 2^η περίοδο.



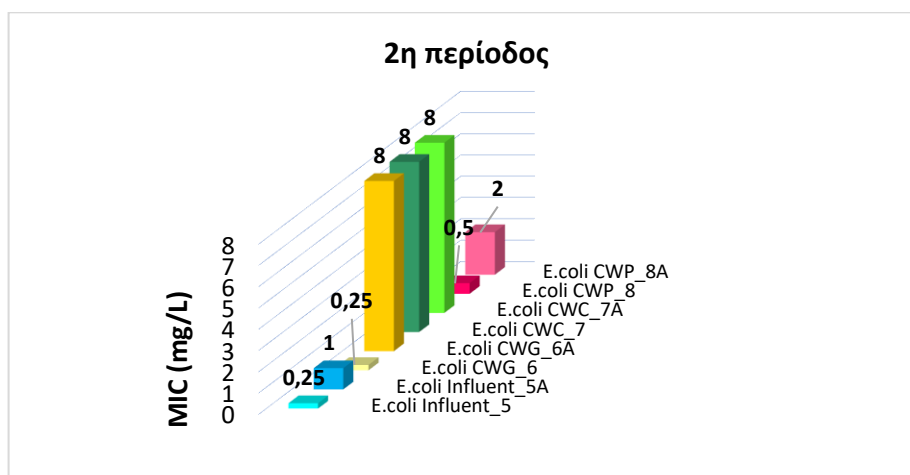
Γράφημα 46. Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση σουλφαμεθοξαζόλης για τον *Staphylococcus sp.* κατά την 3^η περίοδο.

→ *Escherichia coli*

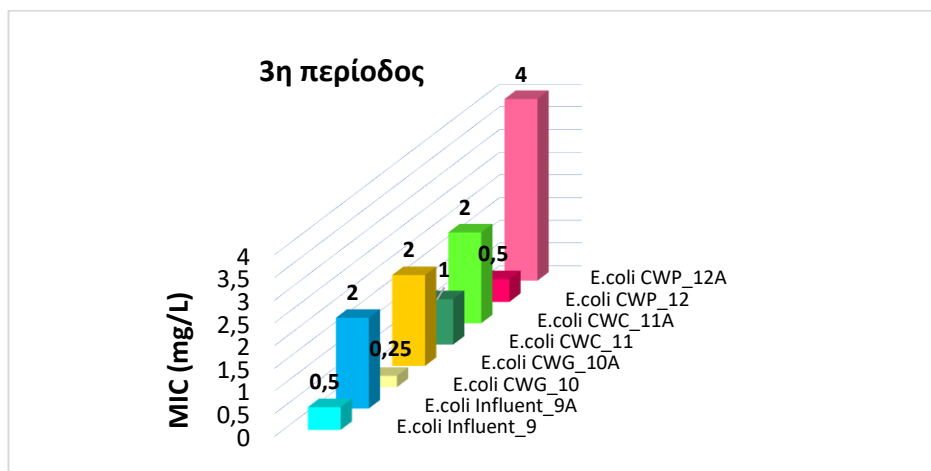
CIPROFLOXACIN



Γράφημα 47. Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση σιπροφλοξασίνης για την *E.coli* κατά την 1^η περίοδο

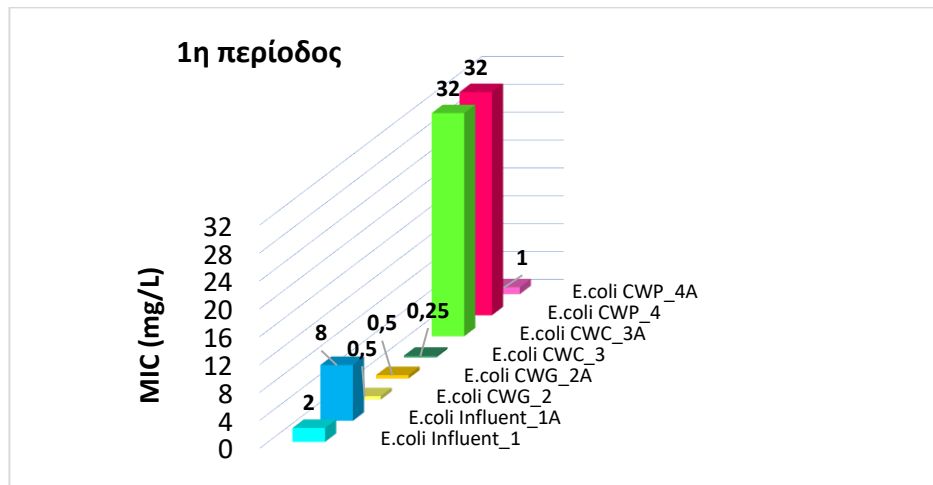


Γράφημα 48. Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση σιπροφλοξασίνης για την *E.coli* κατά την 2^η περίοδο.

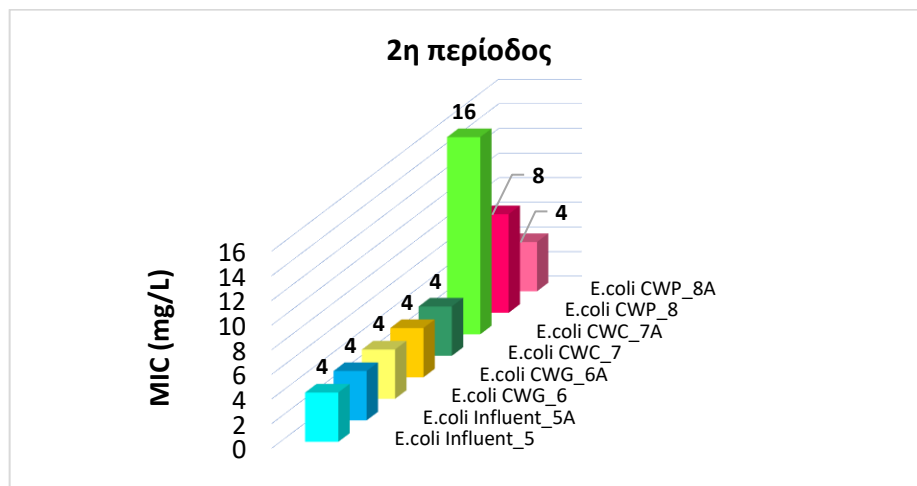


Γράφημα 49. Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση σιπροφλοξασίνης για την *E.coli* κατά την 3^η περίοδο.

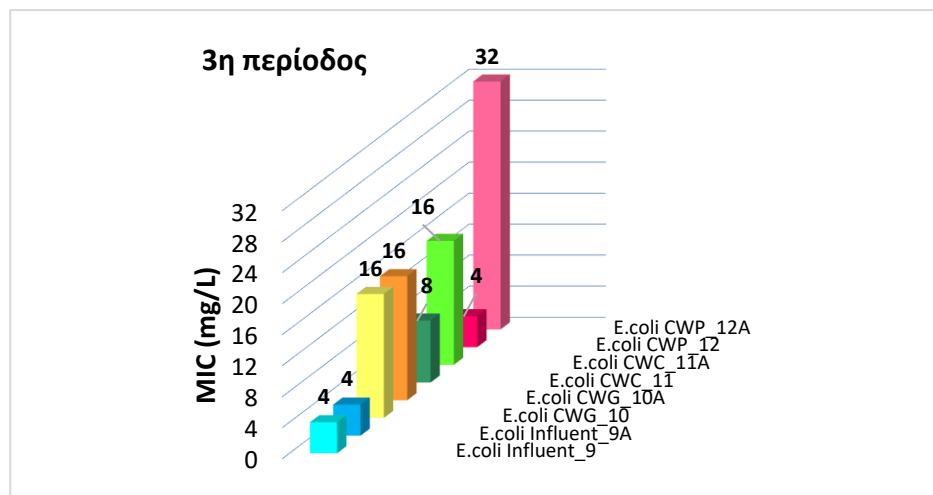
AMOXICILLIN



Γράφημα 50. Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση αμοξικιλίνης για την *E.coli* κατά την 1^η περίοδο.

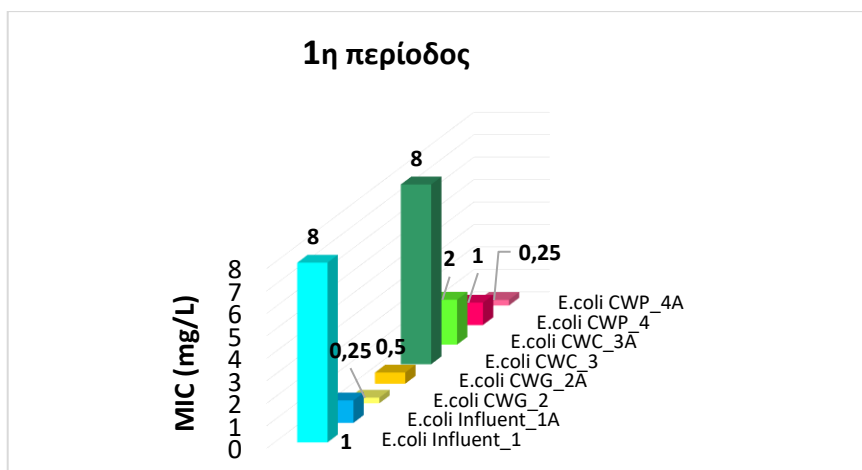


Γράφημα 51. Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση αμοξικιλίνης για την *E.coli* κατά την 2^η περίοδο.

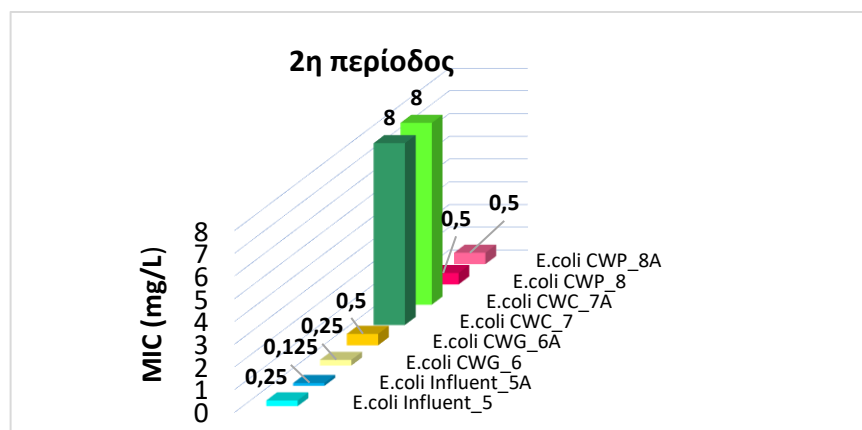


Γράφημα 52. Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση αμοξικιλίνης για την *E.coli* κατά την 3^η περίοδο.

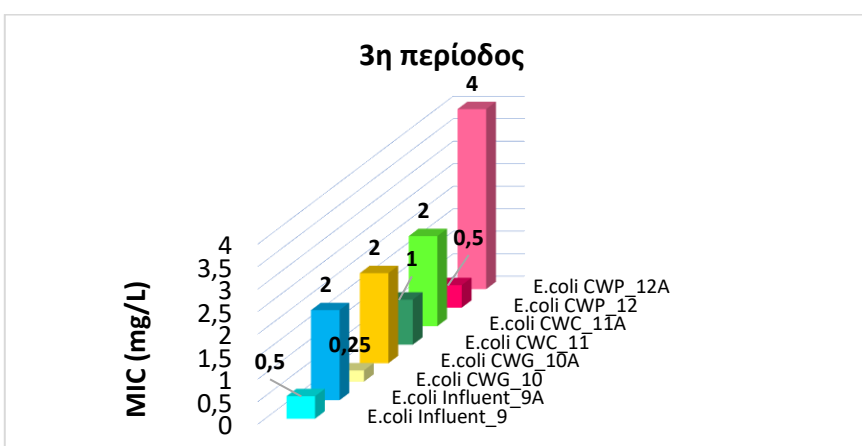
SULFAMETHOXAZOLE



Γράφημα 53. Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση σουλφαμεθοξαζόλης για την *E.coli* κατά την 1^η περίοδο.



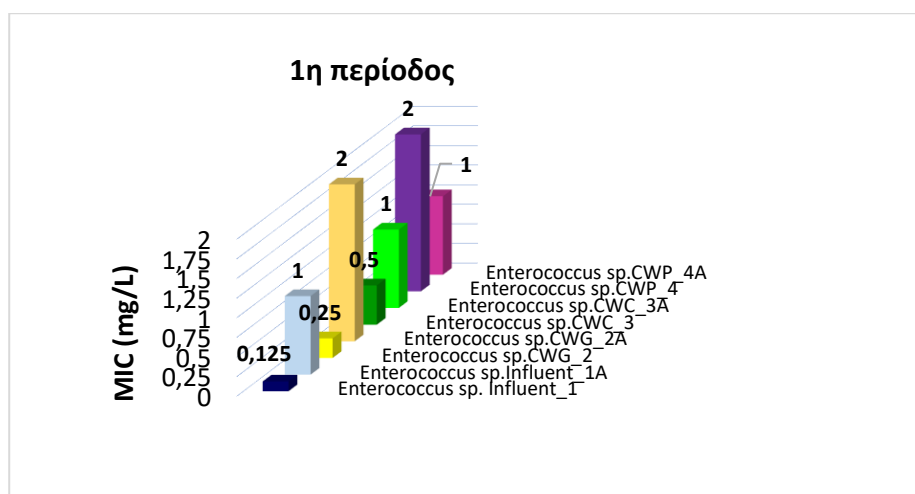
Γράφημα 54. Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση σουλφαμεθοξαζόλης για την *E.coli* κατά την 2^η περίοδο.



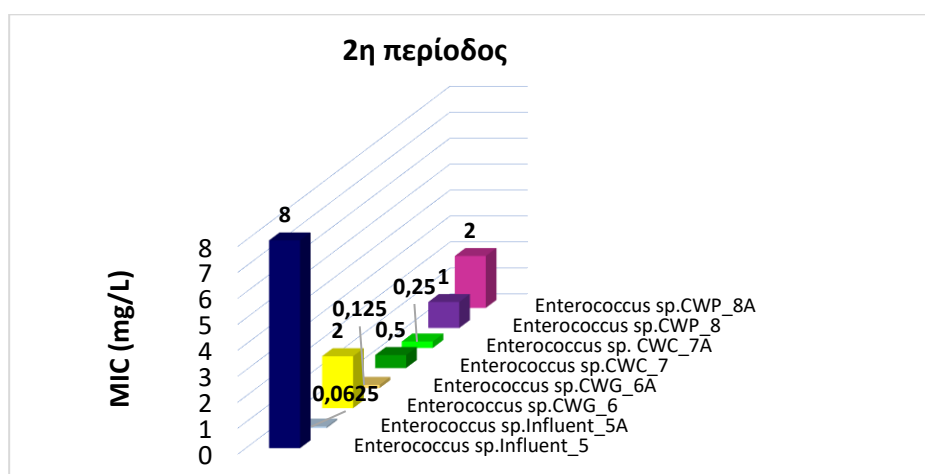
Γράφημα 55. Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση σουλφαμεθοξαζόλης για την *E.coli* κατά την 3^η περίοδο.

→ **Enterococcus sp.**

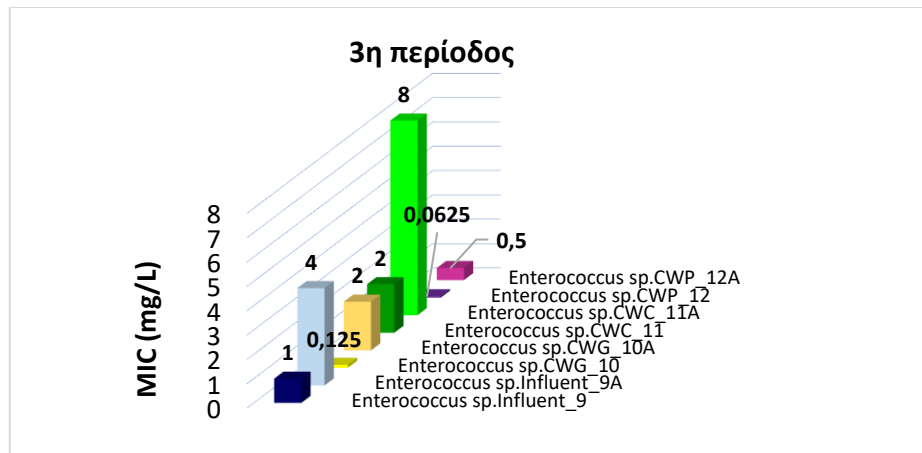
CIPROFLOXACIN



Γράφημα 56. Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση σιπροφλοξασίνης για τον *Enterococcus sp.* κατά την 1^η περίοδο.

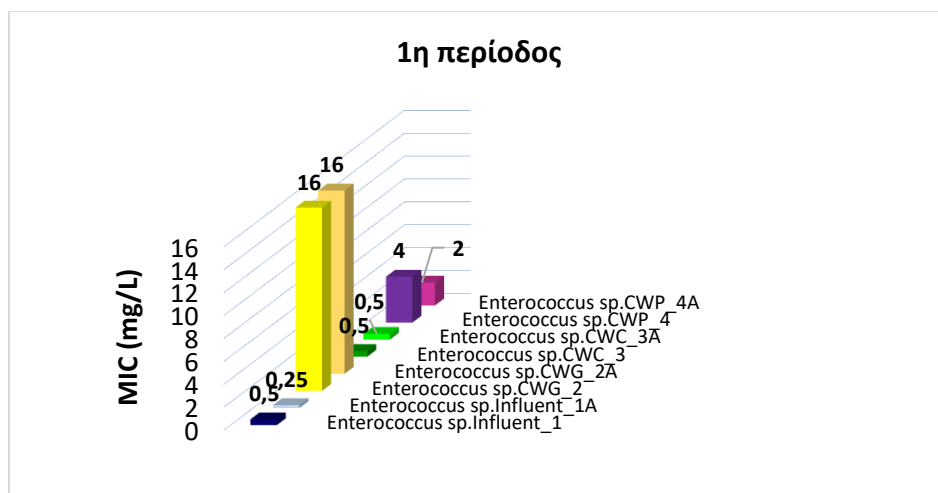


Γράφημα 57. Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση σιπροφλοξασίνης για τον *Enterococcus sp.* κατά την 2^η περίοδο.

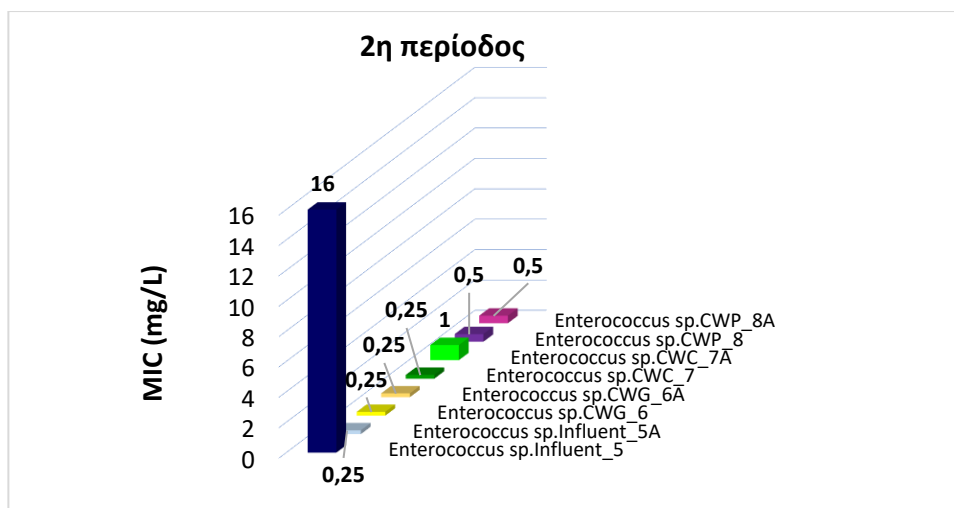


Γράφημα 58. Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση σιπροφλοξασίνης για τον *Enterococcus* sp. κατά την 3^η περίοδο.

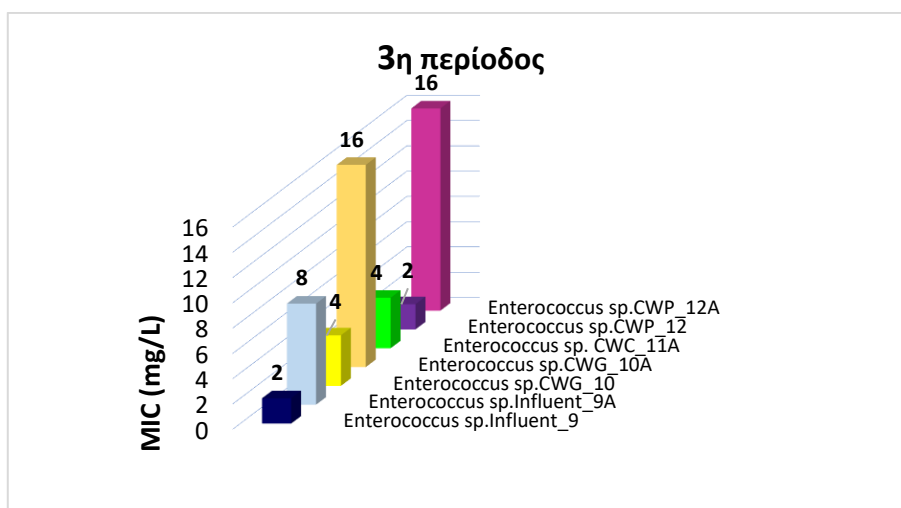
AMOXICILLIN



Γράφημα 59. Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση αμοξικιλίνης για τον *Enterococcus sp.* κατά την 1^η περίοδο.



Γράφημα 60. Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση αμοξικιλίνης για τον *Enterococcus sp.* κατά την 2^η περίοδο.

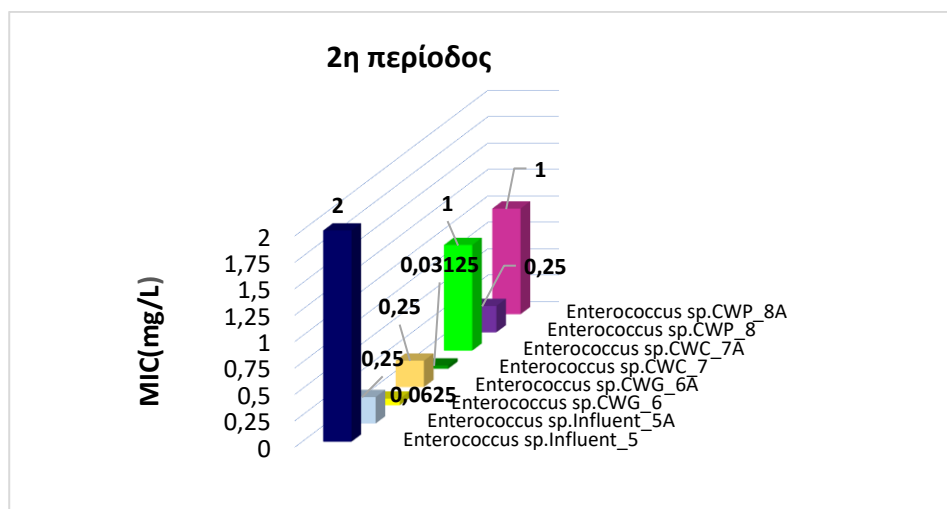


Γράφημα 61. Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση αμοξικιλίνης για τον *Enterococcus sp.* κατά την 3^η περίοδο.

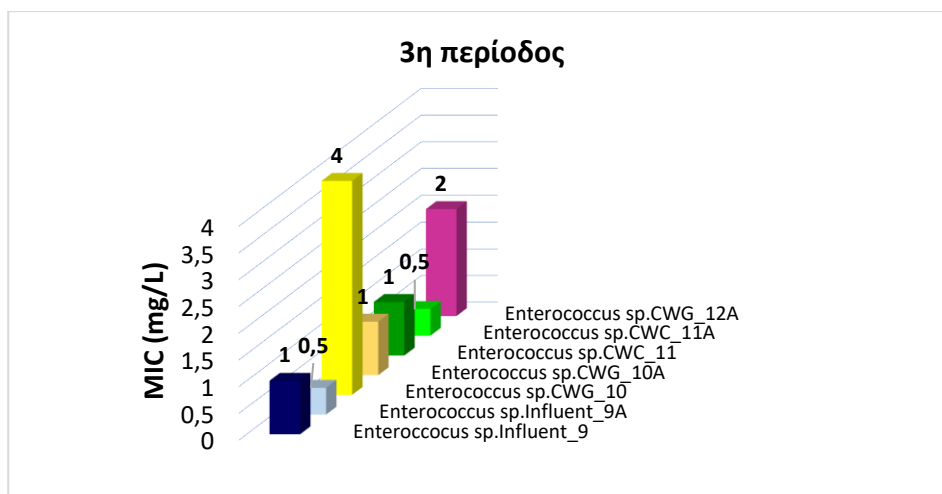
SULFAMETHOXAZOLE



Γράφημα 62. Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση σουλφαμεθοξαζόλης για τον *Enterococcus sp.* κατά την 1^η περίοδο.



Γράφημα 63. Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση σουλφαμεθοξαζόλης για τον *Enterococcus sp.* κατά την 2^η περίοδο.



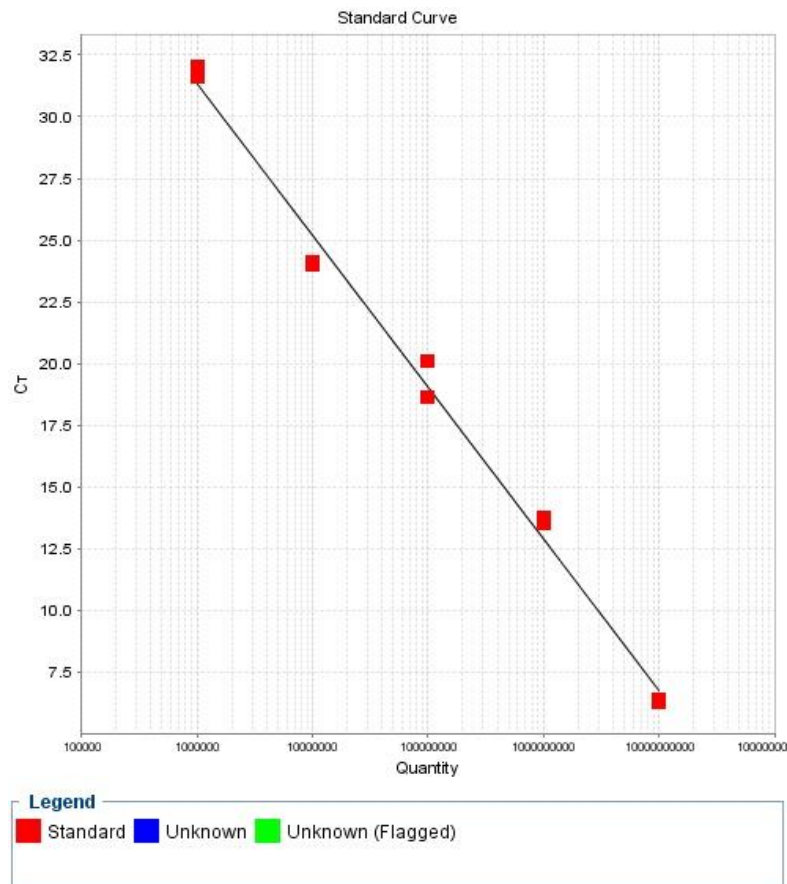
Γράφημα 64.Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση σουλφαμεθοξαζόλης για τον *Enterococcus sp.* κατά την 3^η περίοδο.

• ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ- PCR

sul II

Πίνακας 19. Περιεχόμενα αντίδρασης qPCR για την αναζήτηση του γονιδίου sul II, κύκλοι αντίδρασης και αλληλουχίες εκκινήτων.

Primer name	Primer sequence 5'-3'	PCR product (bp)	PCR conditions	Reaction mix, 20 μL
Sul2 F	GCGCTCAAGGCAGATGGCATT	293	94°C for 5 min	Master mix 1X
Sul2 R	GCGTTTGATACCGGCACCCGT		<94°C for 15sec, 69°C for 30 sec 72°C for 1min > 35 cycles 95 °C for 15 sec 69 °C for 30 sec 95 °C for 15 sec	Primer F 200 nM Primer R 200nM DNA 2μl



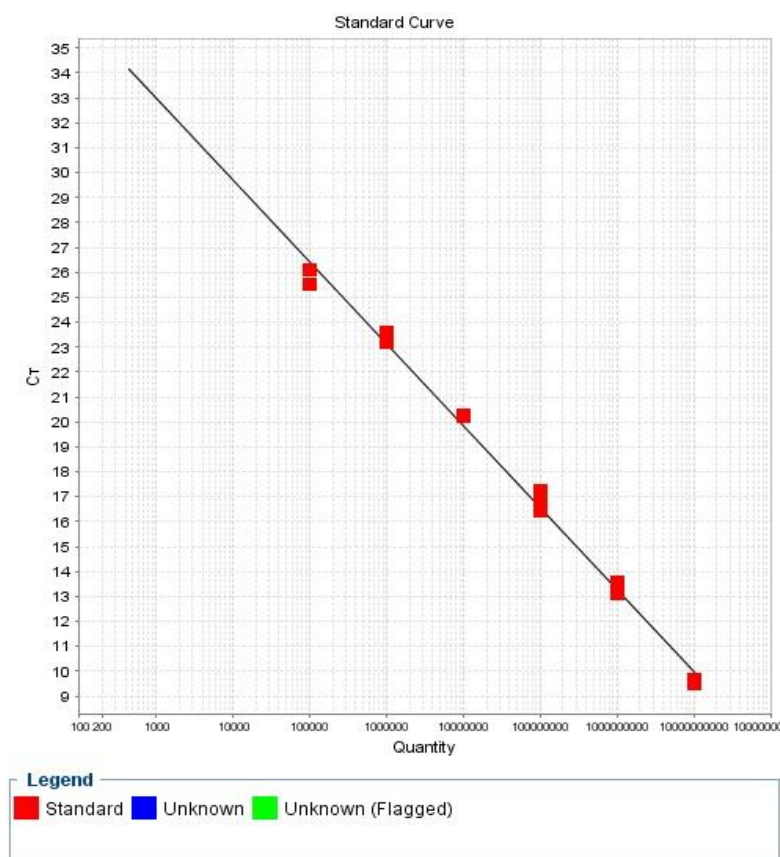
Εικόνα 14. Πρότυπη καμπύλη για το γονίδιο sul II

qnrA

Πίνακας 20. Περιεχόμενα αντίδρασης qPCR για την αναζήτηση του γονιδίου qnrA, κύκλοι αντίδρασης και αλληλουχίες εκκινητών.

<i>Primer name</i>	<i>Primer sequence 5'-3'</i>	<i>PCR product (bp)</i>	<i>PCR conditions</i>	<i>Reaction mix, 20 µL</i>
qnrA-F	GAT AAA GTT TTT CAG CAA GAGG	543	95 °C for 5 min	Master mix 1X Primer F 0.4 µM Primer R 0.4 µM DNA 2µl
qnrA-R	ATC CAG ATCGGC AAA GGT TA		< 94 °C for 1.5min 64 °C for 30 sec 72 °C for 1 min > 35 cycles 95 °C for 15sec	

			64 °C for 1min	
			95 °C for 15sec	



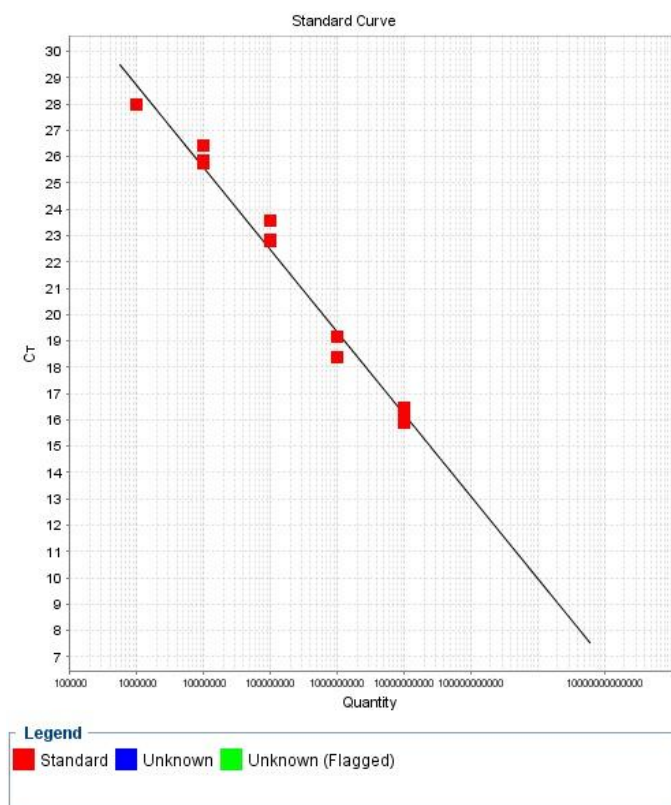
Εικόνα 15. Πρότυπη καμπύλη για το γονίδιο qnrA

ampC

Πίνακας 21. Περιεχόμενα αντίδρασης PCR για την αναζήτηση του γονιδίου ampC, κύκλοι αντίδρασης και αλληλουχίες εκκινήτων.

Primer name	Primer sequence 5'-3'	PCR product (bp)	PCR conditions	Reaction mix, 20 μ L
ampC-For	TTCTATCAAMACTGGCARCC	550	95 °C for 5 min < 94 °C for 30sec 49 °C for 30 sec 72 °C for 1 min > 35 cycles	Master mix 1X Primer F 0.2 μ M Primer R 0.2 μ M DNA 2 μ l
ampC-Rev	CCYTTTTATGTACCCAYGA			

			95 °C for 15sec 60 °C for 1min 95 °C for 15sec	
--	--	--	--	--



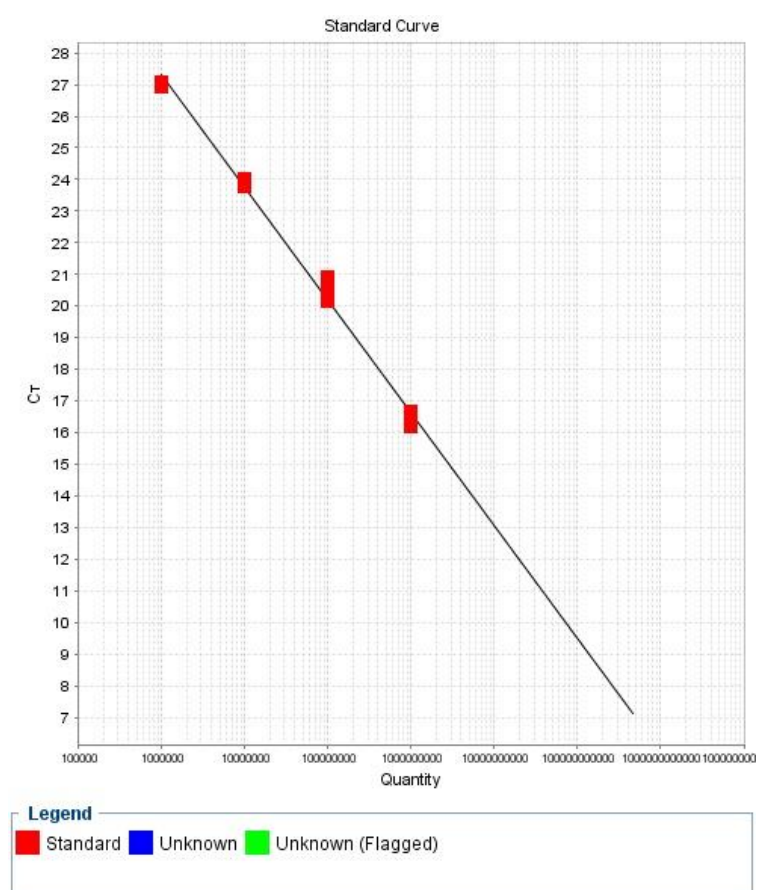
Εικόνα 16. Πρότυπη καμπύλη για το γονίδιο ampC

Universal

Πίνακας 22. Περιεχόμενα αντίδρασης PCR για την αναζήτηση του γονιδίου 16s rRNA, κύκλοι αντίδρασης και αλληλουχίες εκκινήτων.

<i>Primer name</i>	<i>Primer sequence 5'-3'</i>	<i>PCR product (bp)</i>	<i>PCR conditions</i>	<i>Reaction mix, 20 µL</i>
8F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	>1000	95°C for 4 min	Master mix 1X
1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT		< 95°C for 1 min, 55°C for 30 sec, 72°C for 30sec >	Primer F 500 nM Primer R 500nM DNA 2µl

			30 cycles 95 °C for 15 sec 60 °C for 1 min 95 °C for 15 sec	
--	--	--	--	--

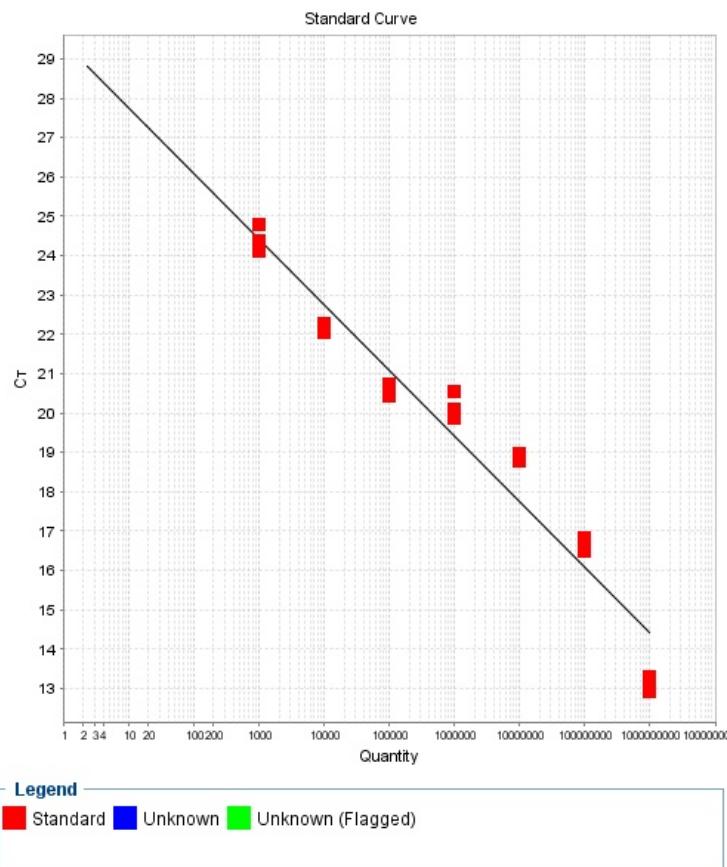


Εικόνα 17. Πρότυπη καμπύλη για το 16srRNA

Αδενοϊός

Πίνακας 23. Περιεχόμενα αντίδρασης PCR για την αναζήτηση του NHEX ,κύκλοι αντίδρασης και αλληλουχίες εκκινήτων.

	<i>Target</i>	<i>Primer name</i>	<i>Primer sequence 5'-3'</i>	<i>PCR conditions</i>	<i>Reaction mix, 20 μL</i>
Adenovirus	NHEX	NHEXA	GCCACCGAGACGTACTTCAGCCTG	95 °C for 10 min < 95 °C for 30sec 55 °C for 1 min 72 °C for 1 min > 35 cycles 95 °C for 15sec 55 °C for 30 sec 95 °C for 15sec	Master mix 1X Primer F 0.2 μM Primer R 0.2 μM DNA 2μl



Εικόνα 18. Πρότυπη καμπύλη για τον ADv

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΕΛΛΗΝΙΚΗ

- Ανδρέας Καλιακάτσος «Αδρανοποίηση παθογόνων μικροοργανισμών και ιών και απομάκρυνση γονιδίων ανθεκτικότητας από λύματα τεχνητών υδροβιοτόπων» Διδακτορική Διατριβή, Πολυτεχνείο Κρήτης 2021
- Ευαγγελία Παπαδοπούλου, Σημειώσεις Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας, «Πλασμίδια και οριζόντια γονιδιακή μεταφορά», Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 2019
- Ευαγγελία Λεμπέση, «Μηχανισμοί Αντοχής των Gram-θετικών και Gram-αρνητικών βακτηρίων στα β-λακταμικά αντιβιοτικά», Πρόγραμμα Μετεκπαιδευτικών Μαθημάτων Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας 2012-2013.

ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ

- Abou-Kandil, A., Shibli, A., Azaizeh, H., Wolff, D., Wick, A., & Jadoun, J. (2021). Fate and removal of bacteria and antibiotic resistance genes in horizontal subsurface constructed wetlands: Effect of mixed vegetation and substrate type. *Science of the Total Environment*, 759, 144193. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144193>
- Alexandros, S. I., & Akrotos, C. S. (2016). Removal of pathogenic bacteria in constructed wetlands: Mechanisms and efficiency. In *Phytoremediation: Management of Environmental Contaminants, Volume 4* (pp. 327–346). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-41811-7_17
- Alufasi, R., Gere, J., Chakauya, E., Lebea, P., Parawira, W., & Chingwaru, W. (2017). Mechanisms of pathogen removal by macrophytes in constructed wetlands. In *Environmental Technology Reviews* (Vol. 6, Issue 1, pp. 135–144). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/21622515.2017.1325940>
- Baaloudj, O., Assadi, I., Nasrallah, N., el Jery, A., Khezami, L., & Assadi, A. A. (2021). Simultaneous removal of antibiotics and inactivation of antibiotic-resistant bacteria by photocatalysis: A review. In *Journal of Water Process Engineering* (Vol. 42). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2021.102089>
- Bairán, G., Rebollar-Pérez, G., Chávez-Bravo, E., & Torres, E. (2020). Treatment processes for microbial resistance mitigation: The technological contribution to tackle the problem of antibiotic resistance. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(23), 1–20. <https://doi.org/10.3390/ijerph17238866>

- Carballeira, T., Ruiz, I., & Soto, M. (2021). *Improving the performance of vertical flow constructed wetlands by modifying the filtering media structure*. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14389-1/Published>
- Chen, J., Deng, W. J., Liu, Y. S., Hu, L. X., He, L. Y., Zhao, J. L., Wang, T. T., & Ying, G. G. (2019). Fate and removal of antibiotics and antibiotic resistance genes in hybrid constructed wetlands. *Environmental Pollution*, 249, 894–903. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.03.111>
- 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. *Science of the Total Environment*, 571, 974–982. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.07.085>
- 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. *New Biotechnology*, 52(May), 94–103. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.05.006>
- Dires, S., Birhanu, T., Ambelu, A., & Sahilu, G. (2018). Antibiotic resistant bacteria removal of subsurface flow constructed wetlands from hospital wastewater. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6(4), 4265–4272. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.06.034>
- Donde, O. O., & Bangding, X. (2017). *Understanding wastewater treatment mechanisms: A review on detection, removal and 1 purification efficiencies of faecal bacteria indicators across constructed wetlands 2*. www.nrcresearchpress.com
- Dong, H., Yuan, X., Wang, W., & Qiang, Z. (2016). Occurrence and removal of antibiotics in ecological and conventional wastewater treatment processes: A field study. *Journal of Environmental Management*, 178, 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.04.037>
- Elmahdy, M. E. I., Magri, M. E., Garcia, L. A., Fongaro, G., & Barardi, C. R. M. (2018). Microcosm environment models for studying the stability of adenovirus and murine norovirus in water and sediment. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 221(4), 734–741. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2018.04.002>
- 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>
- García, J. A., Paredes, D., & Cubillos, J. A. (2013a). Effect of plants and the combination of wetland treatment type systems on pathogen removal in tropical climate conditions. *Ecological Engineering*, 58, 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2013.06.010>

- García, J. A., Paredes, D., & Cubillos, J. A. (2013b). Effect of plants and the combination of wetland treatment type systems on pathogen removal in tropical climate conditions. *Ecological Engineering*, 58, 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2013.06.010>
- García, J., García-Galán, M. J., Day, J. W., Boopathy, R., White, J. R., Wallace, S., & Hunter, R. G. (2020). A review of emerging organic contaminants (EOCs), antibiotic resistant bacteria (ARB), and antibiotic resistance genes (ARGs) in the environment: Increasing removal with wetlands and reducing environmental impacts. *Bioresource Technology*, 307(February), 123228. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123228>
- Greaves, J., Stone, D., Wu, Z., & Bibby, K. (2020). Persistence of emerging viral fecal indicators in large-scale freshwater mesocosms. *Water Research X*, 9. <https://doi.org/10.1016/j.wroa.2020.100067>
- *green technology to wastewater treatment*. (n.d.).
- Hazra, M., & Durso, L. M. (2022). Performance Efficiency of Conventional Treatment Plants and Constructed Wetlands towards Reduction of Antibiotic Resistance. In *Antibiotics* (Vol. 11, Issue 1). MDPI. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11010114>
- Hu, J., Zhou, J., Zhou, S., Wu, P., & Tsang, Y. F. (2018). Occurrence and fate of antibiotics in a wastewater treatment plant and their biological effects on receiving waters in Guizhou. *Process Safety and Environmental Protection*, 113, 483–490. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2017.12.003>
- Hussain, Q. A. (2019). Bacteria: The natural indicator of environmental pollution. In *Freshwater Microbiology: Perspectives of Bacterial Dynamics in Lake Ecosystems* (pp. 393–220). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817495-1.00010-4>
- Kaliakatsos, A., Kalogerakis, N., Manios, T., & Venieri, D. (2019). Efficiency of two constructed wetland systems for wastewater treatment: removal of bacterial indicators and enteric viruses. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 94(7), 2123–2130. <https://doi.org/10.1002/jctb.6001>
- Lamori, J. G., Xue, J., Rachmadi, A. T., Lopez, G. U., Kitajima, M., Gerba, C. P., Pepper, I. L., Brooks, J. P., & Sherchan, S. (2019). Removal of fecal indicator bacteria and antibiotic resistant genes in constructed wetlands. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(10), 10188–10197. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04468->
- Langergraber, G. (Günter), Dotro, G., Nivala, J., Rizzo, A., & Stein, O. R. (2019). *Wetland technology: practical information on the design and application of treatment wetlands*.
- 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>
- Liu, L., Xin, Y., Huang, X., & Liu, C. (2020). Response of antibiotic resistance genes in constructed wetlands during treatment of livestock

wastewater with different exogenous inducers: Antibiotic and antibiotic-resistant bacteria. *Bioresource Technology*, 314(May), 123779. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123779>

- 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 Research*, 136, 131–136. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.02.036>
- Liu, X., Guo, X., Liu, Y., Lu, S., Xi, B., Zhang, J., Wang, Z., & Bi, B. (2019). A review on removing antibiotics and antibiotic resistance genes from wastewater by constructed wetlands: Performance and microbial response. *Environmental Pollution*, 254, 112996. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.112996>
- Luis, A., Ana Lorena, E. G., Amaya, L., & Iñaki, T. (2021). Unplanted wetland-type filter for co-treatment of landfill leachate and septic tank wastewater: Analysing gravel replacement by plastic and passive (filling-emptied) aeration effects at pilot scale. *Journal of Environmental Management*, 294. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112940>
- Luis Lugo, J., Rafael Lugo, E., & de La Puente, M. (2021). A systematic review of microorganisms as indicators of recreational water quality in natural and drinking water systems. In *Journal of Water and Health* (Vol. 19, Issue 1, pp. 20–28). IWA Publishing. <https://doi.org/10.2166/WH.2020.179>
- Manaia, C. M. (2017). Assessing the Risk of Antibiotic Resistance Transmission from the Environment to Humans: Non-Direct Proportionality between Abundance and Risk. In *Trends in Microbiology* (Vol. 25, Issue 3, pp. 173–181). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.11.014>
- Monsalves, N., Leiva, A. M., Gómez, G., & Vidal, G. (2022). Antibiotic-Resistant Gene Behavior in Constructed Wetlands Treating Sewage: A Critical Review. *Sustainability*, 14(14), 8524. <https://doi.org/10.3390/su14148524>
- Norton, S. (n.d.). *Removal Mechanisms in Constructed Wastewater Wetlands*.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(3). <https://doi.org/10.1128/AEM.01992-19>
- Parde, D., Patwa, A., Shukla, A., Vijay, R., Killedar, D. J., & Kumar, R. (2021). A review of constructed wetland on type, treatment and technology of wastewater. In *Environmental Technology and Innovation* (Vol. 21). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101261>
- 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. In *Environment International* (Vol. 131). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105026>

- Polianciuc, S. I., Gurzău, A. E., Kiss, B., Georgia Ștefan, M., & Loghin, F. (2020). Antibiotics in the environment: causes and consequences. *Medicine and Pharmacy Reports*, 93(3), 231–240. <https://doi.org/10.15386/mpr-1742>
- Quiñónez-Díaz, M. D. J., Karpiscak, M. M., Ellman, E. D., & Gerba, C. P. (2001). Removal of pathogenic and indicator microorganisms by a constructed wetland receiving untreated domestic wastewater. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 36(7), 1311–1320. <https://doi.org/10.1081/ESE-100104880>
- Rampuria, A., Gupta, A. B., Kulshreshtha, N. M., & Brighu, U. (2021). Microbiological Analysis of Two Deep Constructed Wetlands with Special Emphasis on the Removal of Pathogens and Antibiotic-Resistant Bacteria. *Water, Air, and Soil Pollution*, 232(5). <https://doi.org/10.1007/s11270-021-05121-3>
- Russo, N., Pino, A., Toscano, A., Cirelli, G. L., Caggia, C., Arioli, S., & Randazzo, C. L. (2019). Occurrence, diversity, and persistence of antibiotic resistant enterococci in full-scale constructed wetlands treating urban wastewater in Sicily. *Bioresource Technology*, 274, 468–478. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.017>
- Russo, R. E. (2008). *Wetlands: ecology, conservation and restoration*. Nova Science Publishers.
- Sandoval, L., Marín-Muñiz, J. L., Zamora-Castro, S. A., Sandoval-Salas, F., & Alvarado-Lassman, A. (2019). Evaluation of wastewater treatment by microcosms of vertical subsurface wetlands in partially saturated conditions planted with ornamental plants and filled with mineral and plastic substrates. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(2). <https://doi.org/10.3390/ijerph16020167>
- 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. In *Journal of Environmental Management* (Vol. 246, pp. 444–461). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.05.157>
- Sleytr, K., Tietz, A., Langergraber, G., & Haberl, R. (2007). Investigation of bacterial removal during the filtration process in constructed wetlands. *Science of the Total Environment*, 380(1–3), 173–180. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.03.001>
- Stange, C., Sidhu, J. P. S., Toze, S., & Tiehm, A. (2019). Comparative removal of antibiotic resistance genes during chlorination, ozonation, and UV treatment. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 222(3), 541–548. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2019.02.002>
- Stefanakis, A., Akratos, C. S., & Tsihrintzis, V. A. (2014). *Vertical Flow Constructed Wetlands: Eco-engineering Systems for Wastewater and Sludge Treatment*.

- Stefanakis, A. I. (2015). Constructed wetlands: Description and benefits of an eco-tech water treatment system. In *Impact of Water Pollution on Human Health and Environmental Sustainability* (pp. 281–303). IGI Global. <https://doi.org/10.4018/978-1-4666-9559-7.ch012>
- Stefanakis, A. I., & Tsihrintzis, V. A. (2012). Effects of loading, resting period, temperature, porous media, vegetation and aeration on performance of pilot-scale vertical flow constructed wetlands. *Chemical Engineering Journal*, 181–182, 416–430. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.11.108>
- Sun, D. (2018). Pull in and push out: Mechanisms of horizontal gene transfer in bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 9(SEP). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02154>
- Tempra, Ombretta., Somalia Urban Development Programme., & United Nations Human Settlements Programme. (2007). *First steps towards strategic urban planning*. United Nations Human Settlements Programme.
- Torrens Armengol, A. (2016.). *Subsurface flow constructed wetlands for the treatment of wastewater from different sources. Design and operation*. www.tdx.cat
- 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. *Journal of Environmental Management*, 195, 140–147. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.06.009>
- Von Wintersdorff, C. J. H., Penders, J., van Niekerk, J. M., Mills, N. D., Majumder, S., van Alphen, L. B., Savelkoul, P. H. M., & Wolffs, P. F. G. (2016). Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 7, Issue FEB). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00173>
- Wang, J., & Chen, X. (2020). Removal of antibiotic resistance genes (ARGs) in various wastewater treatment processes: An overview. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. <https://doi.org/10.1080/10643389.2020.1835124>
- 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. In *Bioresource Technology* (Vol. 175, pp. 594–601). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.068>
- Wu, S., Carvalho, P. N., Müller, J. A., Manoj, V. R., & Dong, R. (2016). Sanitation in constructed wetlands: A review on the removal of human pathogens and fecal indicators. *Science of the Total Environment*, 541, 8–22. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.047>
- Yi, X., Tran, N. H., Yin, T., He, Y., & Gin, K. Y. H. (2017). Removal of selected PPCPs, EDCs, and antibiotic resistance genes in landfill leachate by a full-scale constructed wetlands system. *Water Research*, 121, 46–60. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.05.008>

- Zhang, S., Lu, Y. X., Zhang, J. J., Liu, S., Song, H. L., & Yang, X. L. (2020). Constructed wetland revealed efficient sulfamethoxazole removal but enhanced the spread of antibiotic resistance genes. *Molecules*, 25(4). <https://doi.org/10.3390/molecules25040834>