



**ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

---

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

---

«Απομάκρυνση μικροοργανισμών και γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά κατά την επεξεργασία αστικών αποβλήτων σε πιλοτικές μονάδες τεχνητών υγροβιότοπων»

Σταυρουλάκης Κωνσταντίνος

A.M.: 2015050086

Εξεταστική Επιτροπή

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια - Βενιέρη Δανάη (Επιβλέπουσα)

Επίκουρος Καθηγητής - Στεφανάκης Αλέξανδρος

Αναπληρωτής Καθηγητής - Παρανυχιανάκης Νικόλαος

Χανιά, 2023

"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 το 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

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου κ. Βενιέρη Δανάη, για την βοήθεια, την καθοδήγηση και τον χρόνο που αφιέρωσε για αυτή την διπλωματική εργασία. Νιώθω υπερήφανος που μου έδωσε την ευκαιρία να συνεχίσω μία ακαδημαϊκή έρευνα διάρκειας ενός χρόνου, που ξεκίνησε από την συνάδελφο Αρετάκη Μαρία Αντωνία και ολοκληρώνεται με την συνεισφορά μου. Έπειτα, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην κ. Γουνάκη Ιωσηφίνα (Ε.ΔΙ.Π.) που με καλωσόρισε στο εργαστήριο της Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας, και με αρκετή υπομονή μου έδειξε το σωστό μονοπάτι για την διεξαγωγή των πειραμάτων μου, και με έκανε να αγαπήσω το εργαστήριο. Ήταν τιμή μου που υπήρξα μέλος στην ομάδα τους.

Ακόμη, ευχαριστώ την συνάδελφο Αρετάκη Μαρία Αντωνία για τις συμβουλές της ως προκάτοχος της σκυτάλης, τον συνάδελφο Λοΐζο Πιπερίδη για την βοήθεια του στις δειγματοληψίες, αλλά και τα υπόλοιπα παιδιά για την συνεργασία που είχαμε στο εργαστήριο.

Ιδιαίτερα, τις ευχαριστίες μου έχουν ο κ. Στεφανάκης Αλέξανδρος και ο κ. Παρανυχιανάκης Νικόλαος, οι οποίοι ήταν μέλη στην εξεταστική επιτροπή μου. Εκτιμώ το χρόνο που αφιέρωσαν για την αξιολόγηση της διπλωματικής μου.

Τελειώνοντας, οφείλω να πω ότι δεν θα ήταν δυνατό να φτάσω ως εδώ χωρίς την υποστήριξη της οικογένειάς μου και των φίλων μου.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία μελετήθηκαν τρεις πιλοτικές μονάδες τεχνητών υγροβιότοπων όσον αφορά στη βιολογική επεξεργασία αστικών λυμάτων και την απομάκρυνση του μικροβιακού φορτίου και των γονιδίων ανθεκτικότητας. Οι μονάδες αυτές βρίσκονται στο Πολυτεχνείο Κρήτης και τα αστικά λύματα που τις τροφοδοτούν προέρχονται από την έξοδο της πρωτοβάθμιας επεξεργασίας του Βιολογικού Καθαρισμού Χανίων.

Οι τρεις τεχνητοί υγροβιότοποι έχουν τις ονομασίες Control (CW-C) με πληρωτικό υλικό HDPE, Plastic (CW-P) με πληρωτικό υλικό HDPE και βλάστηση καλαμιών *Phragmites australis* και Gravel (CW-G) με πληρωτικό υλικό ασβεστολιθικό χαλίκι και βλάστηση καλαμιών *Phragmites australis*. Οι δειγματοληψίες έγιναν την περίοδο Νοέμβριος 2021 – Μάιος 2022, όπου κάθε μήνα λαμβάνονταν ποσότητες λυμάτων από τις εκροές των μονάδων.

Αρχικά μελετήθηκε η απόδοση των τεχνητών υγροβιότοπων, ως προς την απομάκρυνση των βακτηριακών δεικτών *Escherichia coli*, *Enterococcus* sp. και *Staphylococcus aureus*. Πραγματοποιήθηκε λήψη δειγμάτων από την εισροή και εκροή των υγροβιότοπων και ακολούθησε η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των εν λόγω βακτηριακών δεικτών. Κατά μέσο όρο, οι απομακρύνσεις των βακτηρίων στους τεχνητούς υγροβιότοπους CW-C, CW-P, CW-G για *E. coli* ήταν 90.52%, 99.47% και 70.12%, αντίστοιχα. Η απομάκρυνση του *Enterococcus* sp. ήταν 95.80%, 99.37%, 90.14%, αντίστοιχα, ενώ όσον αφορά στον *Staphylococcus aureus* δεν παρατηρήθηκε απομάκρυνση σε καμία μονάδα. Τα εντεροβακτήρια απομακρύνθηκαν πολύ ικανοποιητικά σε αντίθεση με τους σταφυλοκόκκους. Ο συνδυασμός πολυαιθυλενίου υψηλής πυκνότητας και βλάστησης καλαμιών του τεχνητού υγροβιότοπου CW-P τον καθιστά ως τον πιο αποδοτικό, καθώς εκεί παρατηρήθηκαν πολύ υψηλές τιμές απομάκρυνσης.

Κατόπιν, έγινε και μελέτη στη διαφοροποίηση του προφίλ ανθεκτικότητας των βακτηρίων μετά την επεξεργασία, στα αντιβιοτικά Amoxicillin, Ciprofloxacin και Sulfamethoxazole. Με την βοήθεια της μεθόδου MIC, προσδιορίστηκαν οι ελάχιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις πριν και μετά την επεξεργασία. Σε γενικές γραμμές, η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωσή τους στα αντιβιοτικά αυξήθηκε και ιδιαίτερα του βακτηρίου *E. coli* στο αντιβιοτικό Amoxicillin και των εντεροκόκκων στο αντιβιοτικό Ciprofloxacin. Αντίθετα, οι σταφυλόκοκκοι κατάφεραν να διατηρήσουν την ανθεκτικότητά τους σχεδόν σταθερή και στα τρία αντιβιοτικά.

Επίσης, πραγματοποιήθηκε ανίχνευση και ποσοτικοποίηση γονιδίων ανθεκτικότητας και συγκεκριμένα των *qnrA*, *ampC* και *sul II* στα λύματα εισροής και εκροής. Το γονίδιο *qnrA* δεν ανιχνεύθηκε σχεδόν καθόλου στις εκροές των τεχνητών υγροβιότοπων, το γονίδιο *ampC* αυξομειώθηκε και το γονίδιο *sul II* βρέθηκε παντού αυξημένο.

Τέλος, μελετήθηκε η απόδοση των υγροβιότοπων ως προς την απομάκρυνση αδενοϊών κατά την επεξεργασία των λυμάτων. Οι αδενοϊοί μειώθηκαν πολύ ικανοποιητικά μετά την επεξεργασία, με την απομάκρυνση τους να φτάνει έως και 99% σε ορισμένες περιπτώσεις. Οι αποτελεσματικότερες μονάδες ήταν η CW-C και η CW-P.

Συμπερασματικά, οι τεχνητοί υδροβιότοποι, όντας μια φιλική προς το περιβάλλον τεχνολογία και με ελάχιστο κόστος λειτουργίας και συντήρησης έναντι των συμβατικών μονάδων επεξεργασίας, κρίθηκαν πολύ αποτελεσματικοί για την βιολογική επεξεργασία αστικών λυμάτων. Βέβαια, υπάρχουν πολλά περιθώρια βελτίωσης ακόμα, καθώς δεν απέδωσαν σε όλα τα σημεία στα οποία μελετήθηκαν με ευνοϊκό τρόπο.

## ABSTRACT

The present Diploma Thesis deals with the investigation of performance efficiency of three pilot scale constructed wetlands, regarding their ability to treat urban wastewater and to remove pathogenic microorganisms and antibiotic resistance genes. These units are located at the Technical University of Crete and the influent urban wastewater is derived from the output of the primary treatment of the Waste Water Treatment Plant of Chania.

The three constructed wetlands are named Control (CW-C) with HDPE filler, Plastic (CW-P) with HDPE filler and *Phragmites australis* reed vegetation and Gravel (CW-G) with limestone gravel filler and *Phragmites australis* reed vegetation. Sampling took place within the period November 2021 – May 2022, during which, wastewater samples were taken monthly from the inlet and outlet of the units.

Initially, the performance of the constructed wetlands was studied, in terms of the removal of the bacterial indicators *Escherichia coli*, *Enterococcus* sp. and *Staphylococcus aureus*. Generally, the bacterial removals in constructed wetlands CW-C, CW-P, CW-G for *Escherichia coli* were 90.52%, 99.47% and 70.12%, respectively and for *Enterococcus* sp. were 95.80%, 99.37% and 90.14% respectively. On the contrary, no substantial removal was recorded for *Staphylococcus aureus* in any unit. Enterobacteriaceae were removed very satisfactorily in contrast to staphylococci. The combination of high-density polyethylene and reed vegetation of the CW-P constructed wetland makes it the most efficient wetland, as very high removal values of microbial load were observed.

Furthermore, within the framework of this thesis, antibiotic resistance profile of the isolated bacteria was studied. Resistance profile was recorded prior to and post treatment within the CWs. The antibiotics tested were Amoxicillin, Ciprofloxacin and Sulfamethoxazole and the applied method was MIC (minimum inhibitory concentration). Generally, the MIC of the tested antibiotics increased after treatment, especially, regarding the bacterium *Escherichia coli* and the antibiotic Amoxicillin and enterococci and the antibiotic Ciprofloxacin. On the contrary, staphylococci managed to keep their resistance almost stable after treatment, concerning their response to all the three antibiotics.

Also, the removal rates of target antibiotic resistance genes (ARGs) were investigated, namely, qnrA, ampC and sul II. The qnrA gene was almost undetectable in the effluents of all CWs, the presence of ampC gene in the effluents varied significantly and sul II gene was detected in high concentrations in all effluent samples.

Finally, CWs were studied in terms of their efficiency to remove adenoviruses from wastewater after treatment, Adenoviruses were reduced after treatment, with the removal rate reaching a value up to 99% in some cases. The most effective units were CW-C and CW-P.

In conclusion, constructed wetlands are considered as an environmentally friendly technology for the efficient treatment of wastewater, concerning the inactivation of microorganisms and the removal of ARGs and adenoviruses. However, further investigation is required and more studies should be performed, regarding the role of CWs on the effective wastewater treatment and the protection of public health.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ .....	2
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	3
ABSTRACT .....	5
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ .....	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	8
1.1 Μέθοδοι επεξεργασίας αστικών λυμάτων .....	8
1.1.1 Εγκαταστάσεις επεξεργασίας αστικών λυμάτων .....	8
1.1.2 Τεχνητοί υδροβιότοποι .....	9
1.2 Μικροοργανισμοί .....	10
1.2.1 Βακτήρια .....	10
1.2.2 Μικροοργανισμοί δείκτες.....	12
1.2.3 <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterococcus</i> sp., <i>Staphylococcus aureus</i> .....	14
1.2.4 Ιοί.....	17
1.2.5 Ιοί εντερικής προέλευσης.....	17
1.2.6 Αδενοϊοί .....	18
1.3 Αντιβιοτικά και ανθεκτικότητα .....	19
1.3.1 Αντιβιοτικά.....	19
1.3.2 Ομάδες αντιβιοτικών.....	20
1.3.3 Ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά .....	23
1.3.4 Το φαινόμενο ανθεκτικότητας στην Ελλάδα .....	24
1.3.5 Ρύπανση από αντιβιοτικά .....	25
1.3.6 Γονίδια ανθεκτικότητας .....	27
1.4 Σκοπός εργασίας .....	28
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	29
2.1 Διάταξη πιλοτικών μονάδων τεχνητών υδροβιότοπων .....	29
2.2 Δειγματοληψίες .....	30
2.3 Υλικά .....	32

2.4 Απομόνωση βακτηρίων .....	33
2.4.1 Μεθοδολογία .....	33
2.5 Έλεγχος ανθεκτικότητας βακτηρίων .....	34
2.5.1 Θεωρητικό υπόβαθρο .....	34
2.5.2 Μεθοδολογία .....	34
2.6 Έλεγχος απομάκρυνσης γονιδίων ανθεκτικότητας και αδenoϊών .....	36
2.6.1 Θεωρητικό υπόβαθρο .....	36
2.6.2 Μεθοδολογία .....	37
 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	38
3.1 Απομάκρυνση βακτηρίων μετά από επεξεργασία αστικών λυμάτων στους τεχνητούς υδροβιότοπους .....	38
3.2 Έλεγχος ανθεκτικότητας βακτηρίων σε αντιβιοτικά με τη μέθοδο ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης .....	51
3.2.1 Μεταβολή του προφίλ ανθεκτικότητας μετά την επεξεργασία .....	51
3.2.2 Κατηγοριοποίηση βακτηριακών στελεχών σε κλίμακα ευαισθησίας .....	60
3.3 Απομάκρυνση γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά μετά από επεξεργασία αστικών λυμάτων στους τεχνητούς υδροβιότοπους .....	67
3.4 Απομάκρυνση αδenoϊών μετά από επεξεργασία αστικών λυμάτων στους τεχνητούς υδροβιότοπους .....	77
 4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ & ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ .....	81
4.1 Συμπεράσματα .....	81
4.2 Προτάσεις .....	82
 5. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ .....	84
 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	90



## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σχεδόν έναν αιώνα μετά τη σύνθεση του πρώτου αντιβιοτικού, ο κλάδος της ιατρικής παρουσίασε ραγδαία εξέλιξη. Θεραπεύτηκαν πολλές ασθένειες και μειώθηκαν δραματικά οι θάνατοι από λοιμώδεις νόσους, και κατά συνέπεια, επεκτάθηκε το μέσο προσδόκιμο ζωής του ανθρώπου κατά 23 έτη. Ωστόσο, η υπερβολική χρήση των αντιβιοτικών συνετέλεσε στην ανάδειξη ενός νέου προβλήματος, αυτού της μικροβιακής ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά. Έτσι, με την παγκόσμια εξάπλωση της ανθεκτικότητας, οργανισμοί υγείας έχουν σημάνει συναγερμό χαρακτηρίζοντάς την σημαντική απειλή δημόσιας υγείας (Hutchings et al., 2019).

Αρκετές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην κατανόηση του τρόπου διασποράς της ανθεκτικότητας στο περιβάλλον, και πιο συγκεκριμένα, της διασποράς των ανθεκτικών βακτηρίων (Antibiotic Resistant Bacteria - ARBs) και των γονιδίων ανθεκτικότητας (Antibiotic Resistance Genes - ARGs). Από τα διάφορα περιβάλλοντα που έχουν ερευνηθεί, παρατηρείται ότι το υδάτινο περιβάλλον είναι αυτό το οποίο ευνοεί περισσότερο την εξάπλωση τους. Σε διόδους όπως τα αστικά λύματα, εντοπίζονται ποσότητες αντιβιοτικών, ARBs και ARGs που καταλήγουν στις μονάδες επεξεργασίας αστικών λυμάτων (Wastewater Treatment Plants - WWTPs). Όμως, οι τρέχουσες μονάδες δεν είναι ικανές να ανταποκριθούν σε τέτοιου είδους ρύπους, με συνέπεια τη συσσώρευση τους στους υδάτινους αποδέκτες (Almakki et al., 2019).

Έτσι, όσο επιτακτική κρίνεται η ανακάλυψη νέων αντιβιοτικών, ώστε να μπορούν να δρουν στα ανθεκτικά βακτήρια, ακόμα περισσότερο είναι η εύρεση νέων τρόπων και τεχνολογιών που να περιορίζουν την εξάπλωση της ανθεκτικότητας στο περιβάλλον. Τα τελευταία χρόνια μια νέα πράσινη τεχνολογία που δοκιμάζεται στην βιολογική επεξεργασία αστικών λυμάτων και απομάκρυνση του μικροβιακού φορτίου και των γονιδίων ανθεκτικότητας είναι οι τεχνητοί υδροβιότοποι (Constructed Wetlands - CWs). Όσο υποσχόμενα και αν δείχνουν τα δεδομένα, βρισκόμαστε ακόμα στα πρώιμα στάδια και υπάρχουν πολλές πτυχές αυτής της νέας τεχνολογίας που δεν έχουν μελετηθεί (García et al., 2020). Για τον λόγο αυτό, η παρούσα έρευνα σκοπεύει να ρίξει λίγο ακόμη φως σε αυτό το ιδιαίτερο ζήτημα.

### 1.1 Μέθοδοι επεξεργασίας αστικών λυμάτων

#### 1.1.1 Εγκαταστάσεις επεξεργασίας αστικών λυμάτων

Η επεξεργασία αστικών λυμάτων είναι η διαδικασία με την οποία γίνεται αποκατάσταση της ποιότητας του νερού, το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί από τον άνθρωπο και έχει ρυπανθεί ή και μολυνθεί. Η επεξεργασία, κατά κύριο λόγο, πραγματοποιείται σε

εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων (WWTPs) και χωρίζεται σε επιμέρους στάδια (πρωτοβάθμια, δευτεροβάθμια, τριτοβάθμια επεξεργασία) με φυσικές, χημικές και βιολογικές διεργασίες να λαμβάνουν χώρα. Η απολύμανση γίνεται είτε με χλωρίωση, είτε με υπεριώδη ακτινοβολία, είτε με οζόνωση. Αρκετές μονάδες είναι εξοπλισμένες και με τεχνολογίες παραγωγής ενέργειας σε μορφή βιοαερίου και παραγωγής εδαφοβελτιωτικού κομπόστ. Η τελική ποιότητα του νερού καθορίζεται από την χρήση για την οποία προορίζεται (υδάτινος αποδέκτης, άρδευση, πόσιμο νερό), με το κόστος να αυξάνεται αναλογικά με το ποσοστό καθαρότητας (Englande et al., 2015).

Οι μονάδες επεξεργασίας αστικών λυμάτων δέχονται εισροές από μια ποικιλία περιβαλλόντων όπως νοσοκομεία, βιομηχανίες, γεωργικούς και κτηνοτροφικούς χώρους. Αυτό τις καθιστά έντονα ρυπασμένα και μολυσμένα περιβάλλοντα στις οποίες μπορούν να ανιχνευθούν χημικές ενώσεις αντιβιοτικών, παθογόνοι μικροοργανισμοί όπως ανθεκτικά βακτήρια, αλλά και γονίδια ανθεκτικότητας. Όμως, οι τεχνολογίες επεξεργασίας που διαθέτουν οι τρέχουσες μονάδες δεν είναι σχεδιασμένες να απομακρύνουν τέτοιου είδους μικρορύπους, με αποτέλεσμα να απελευθερώνονται στο περιβάλλον μέσω των εκροών (Sabri et al., 2020).

### 1.1.2 Τεχνητοί υδροβιότοποι

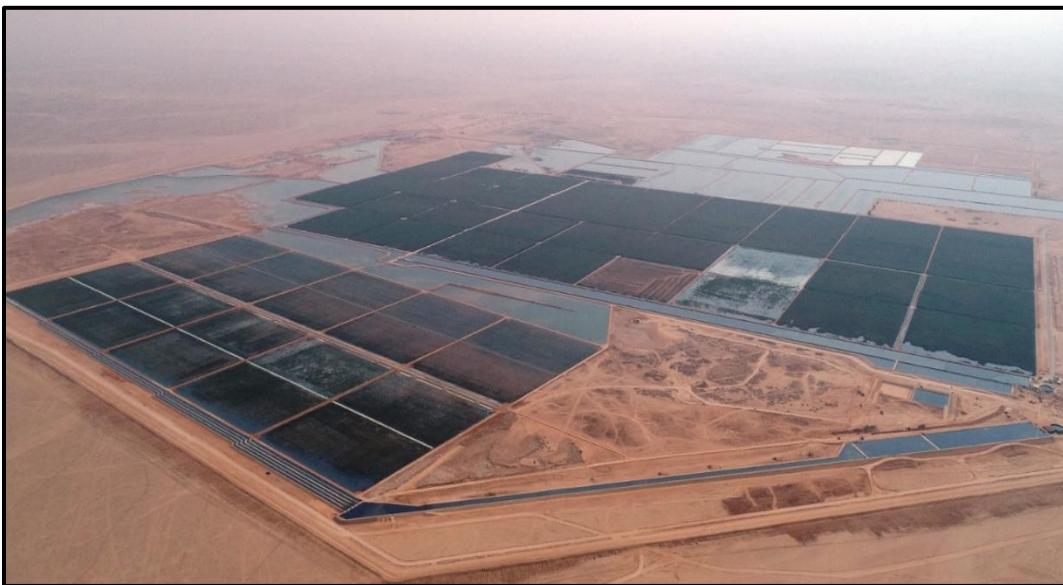
Τα τελευταία χρόνια, μια εναλλακτική μορφή επεξεργασίας αστικών και βιομηχανικών λυμάτων, που γίνεται ολοένα και πιο δημοφιλής, είναι οι τεχνητοί υδροβιότοποι (CWs). Οι τεχνητοί υδροβιότοποι έχουν σχεδιαστεί για να εκμεταλλεύονται πολλές από τις διαδικασίες που συμβαίνουν σε φυσικούς υδροβιότοπους, αλλά σε ένα πιο ελεγχόμενο περιβάλλον. Η επεξεργασία των λυμάτων γίνεται με διάφορους τρόπους όπως διήθηση, προσρόφηση, καθίζηση, ανταλλαγή ιόντων, πρόσληψη φυτών και μικροβιακή αποικοδόμηση. Οι δύο κυριότερες κατηγορίες κατασκευασμένων υδροβιότοπων είναι:

- i. Υδροβιότοποι με ελεύθερη επιφάνεια νερού, παρόμοιοι με φυσικούς υδροβιότοπους που έχουν πυθμένα εδάφους και αναδυόμενη βλάστηση, με την επιφάνεια του νερού εκτεθειμένη στην ατμόσφαιρα
- ii. Υδροβιότοποι υποεπιφανειακής οριζόντιας ή κάθετης ροής, γεμάτοι με πορώδη υλικά, με την στάθμη του νερού κάτω από την επιφάνεια

Οι τεχνητοί υδροβιότοποι μπορούν επίσης να ταξινομηθούν με βάση τους τύπους φυτών που αναπτύσσονται μέσα σε αυτούς όπως αναδυόμενα, επιπλέοντα και βυθισμένα φυτά. Λόγω του χαμηλού κόστους επένδυσης, λειτουργίας και συντήρησης, έχουν διαδοθεί σε μεγάλο βαθμό παγκοσμίως (Stanbury et al., 2017).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχουν οι τεχνητοί υδροβιότοποι και στην απολύμανση των λυμάτων. Αυτή επιτυγχάνεται με διαδικασίες όπως η καθίζηση των μικροοργανισμών, η μηχανική φίλτρωση τους από τα διάφορα πληρωτικά υλικά, η απορρόφηση τους από τη βλάστηση του υδροβιότοπου, η αναστολή τους εξαιτίας χημικών συνθηκών αλλά και ο φυσικός θάνατος (Wu et al., 2016).

Σχετικά με την απομάκρυνση των ανθεκτικών βακτηρίων και των γονιδίων ανθεκτικότητας, παρατηρείται μια θετική συμπεριφορά σε πρόσφατες έρευνες. Βέβαια, υπάρχουν πολλές παράμετροι που καθορίζουν την αποτελεσματικότητα των τεχνητών υδροβιότοπων σε αυτόν το τομέα. Για παράδειγμα, ο τύπος ροής, το πληρωτικό υλικό, η ύπαρξη βλάστησης, ο αερισμός, το pH, η θερμοκρασία και ο χρόνος παραμονής είναι μερικά από τα χαρακτηριστικά των τεχνητών υδροβιότοπων που επηρεάζουν την απόδοση απομάκρυνσης των ARBs και ARGs. Το μόνο σίγουρο είναι ότι δεν υπάρχει ένας ιδανικός τύπος τεχνητού υδροβιότοπου που να δρα σε ευρύ φάσμα ARBs και ARGs, καθώς παράμετροι που βοηθούν στην απομάκρυνση ενός στόχου, μπορεί να ευνοούν την ανάδειξη ενός άλλου (Hazra & Durso, 2022).



**Εικόνα 1.** Αεροφωτογραφία του Nimr Water Treatment Plant στο Ομάν. Η μεγαλύτερη εγκατάσταση υδροβιότοπων στον κόσμο (5.1 εκατ. m<sup>2</sup>) για την επεξεργασία νερού ρυπασμένου με πετρέλαιο (Stefanakis, 2020).

## 1.2 Μικροοργανισμοί

### 1.2.1 Βακτήρια

Όπως είναι γνωστό, τα βακτήρια είναι μικροσκοπικοί, μονοκύτταροι, προκαρυωτικοί μικροοργανισμοί που βρίσκονται σε κάθε είδος οικοσυστήματος του πλανήτη μας, σε μεγάλους πληθυσμιακά αριθμούς. Η αναπαραγωγή τους γίνεται με τη διαδικασία της δυαδικής σχάσης, όπου ένα μονό κύτταρο χωρίζεται στα δύο. Αυτά, μπορούν να

διακριθούν με βάση τα μορφολογικά και γενετικά τους χαρακτηριστικά. Για παράδειγμα, σχηματικά μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις βασικές κατηγορίες:

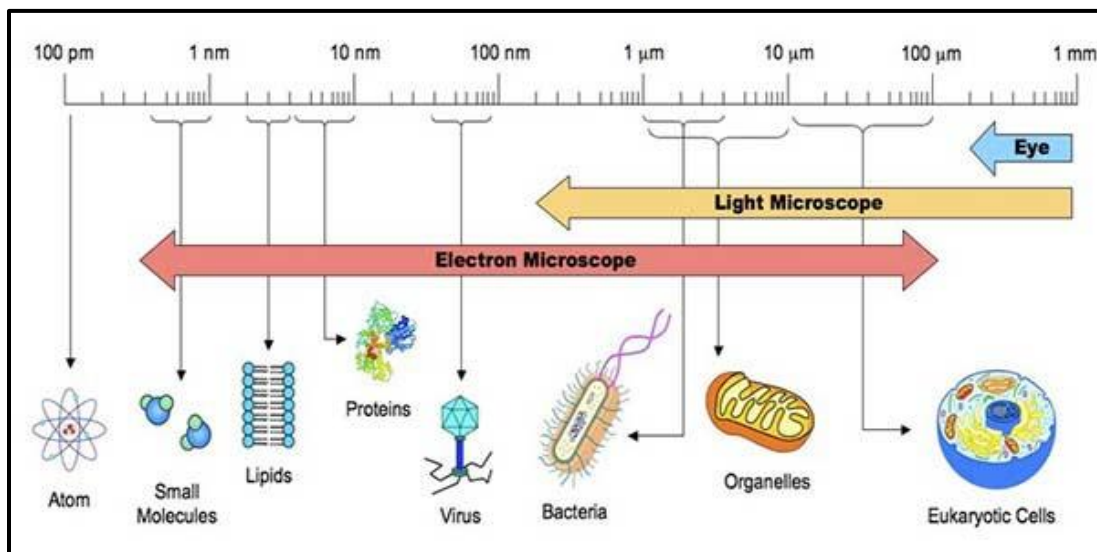
- i. Σφαιρικά-Κόκκοι
- ii. Ραβδοειδές-Βάκιλοι
- iii. Καμπύλα-Σπειρίλια

Από την άλλη, με βάση τη δομή του κυτταρικού τους τοιχώματος και την αντίδραση τους στη χρώση Gram, τα βακτήρια μπορούν να ομαδοποιηθούν σε:

- i. Θετικά κατά Gram (μπλε-ιώδες χρώμα)
- ii. Αρνητικά κατά Gram (ερυθρό-ροζ χρώμα)

Το περίβλημα των βακτηριακών κυττάρων είναι μια πολύπλοκη πολυστρωματική δομή που χρησιμεύει για την προστασία αυτών των οργανισμών. Τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια περιβάλλονται από ένα λεπτό κυτταρικό τοίχωμα πεπτιδογλυκάνης, το οποίο περιβάλλεται από μια εξωτερική μεμβράνη που περιέχει λιποπολυσακχαρίτη. Τα θετικά κατά Gram βακτήρια περιβάλλονται από ένα κυτταρικό τοίχωμα με παχύτερα στρώματα πεπτιδογλυκάνης σε σχέση με των αρνητικών κατά Gram, αλλά στερούνται εξωτερικής μεμβράνης.

Ορισμένα βακτήρια μπορούν να προκαλέσουν ασθένειες όταν εισβάλουν σε άλλους ζωντανούς οργανισμούς, χαρακτηρίζοντας τα παθογόνα. Όμως, υπάρχουν και αυτά που είναι αβλαβή και συμβιώνουν σε πολλούς ζώντες οργανισμούς (φυτά, ζώα, ανθρώπους) προσφέροντας ακόμη και ευεργετικές ιδιότητες στον ξενιστή τους, όπως τη μικροχλωρίδα του ανθρώπινου εντέρου (Parker, 2001).



**Εικόνα 2.** Τα σχετικά μεγέθη διαφόρων μικροσκοπικών και μη αντικειμένων (Aryal et al., 2022).

### 1.2.2 Μικροοργανισμοί δείκτες

Για τον έλεγχο της μικροβιολογικής ποιότητας ενός υδάτινου δείγματος, χρησιμοποιούνται κάποιοι μικροοργανισμοί-δείκτες. Η ανίχνευση τους στο υπό μελέτη δείγμα, οδηγεί στην αξιολόγηση της ποιότητάς του. Οι μικροοργανισμοί-δείκτες πρέπει να πληρούν κάποια κριτήρια, ορισμένα από τα οποία είναι τα εξής:

- Οι μικροοργανισμοί θα πρέπει να είναι κατάλληλοι για όλους τους τύπους υδάτων
- Οι μικροοργανισμοί θα πρέπει να είναι παρόντες όποτε υπάρχουν εντερικά παθογόνα
- Οι μικροοργανισμοί θα πρέπει να έχουν μεγαλύτερο χρόνο επιβίωσης από τα πιο ανθεκτικά εντερικά παθογόνα
- Η ανάπτυξη τους στο νερό να είναι ελάχιστη έως μηδενική
- Η ανίχνευση τους να μπορεί να γίνει με απλές μεθόδους
- Η πυκνότητα του μικροοργανισμού-δείκτη θα πρέπει να σχετίζεται άμεσα με το βαθμό της κοπρανώδους μόλυνσης
- Να είναι παρόντες στα κόπρανα θερμόαιμων ζώων

Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω, οι συνηθέστεροι δείκτες που επιλέγονται είναι κάποιες ομάδες βακτηρίων όπως τα ολικά κολοβακτηριοειδή, τα κοπρανώδη κολοβακτηριοειδή και οι κοπρανώδεις στρεπτόκοκκοι (Venieri, 2017).

#### **Ολικά κολοβακτηριοειδή (Total coliforms)**

Τα ολικά κολοβακτηριοειδή, είναι ευρέως διαδεδομένα σε όλο το περιβάλλον και χρησιμοποιούνται ως μικροοργανισμοί-δείκτες στη μικροβιολογία του νερού. Χαρακτηρίζονται ως ραβδόμορφα, αρνητικά κατά Gram, μη σπορογόνα βακτήρια που μπορούν να ζυμώσουν τη λακτόζη όταν επωάζονται στους 35–37 °C. Επιπλέον, απαρτίζονται από τα γένη *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* και *Klebsiella* (Halkman & Halkman, 2014). Η ανίχνευση κολοβακτηριδίων στο νερό δε σημαίνει αποκλειστικά μόλυνση κοπρανώδους προέλευσης, επειδή στελέχη αυτής της ομάδας ζουν φυσικά και εκτός της εντερικής χλωρίδας θερμόαιμων ζώων, σε φυτά και στο έδαφος. Ωστόσο, η παρουσία τους σε νερό μετά από επεξεργασία και απολύμανση, δηλώνει είτε ελλείψεις στη διαδικασία επεξεργασίας είτε κάποια μορφή μετέπειτα μόλυνσης (Brandt et al., 2017).

#### **Κοπρανώδη κολοβακτηριοειδή (Fecal coliforms)**

Μερικά κολοβακτηριοειδή μπορούν να αναπτυχθούν σε ακόμη υψηλότερες θερμοκρασίες (44.5 °C) και χαρακτηρίζονται ως «θερμοανθεκτικά». Αυτά αποτελούν υποομάδα των ολικών κολοβακτηριοειδών και ονομάζονται κοπρανώδη κολοβακτηριοειδή. Χρησιμοποιούνται συχνότερα ως δείκτες κοπρανώδους μόλυνσης επειδή η συμπεριφορά

τους μοιάζει με παθογόνων μικροοργανισμών και βρίσκονται σε αφθονία στα κόπρανα θερμόαιμων ζώων και ανθρώπων. Έμφαση πρέπει να δοθεί στο βακτήριο *Escherichia coli*, που ανήκει σε αυτή την ομάδα, και έχει καθοριστικό ρόλο σε μελέτες και πρότυπα που αφορούν την ποιότητα του νερού (Cisneros, 2011).

### **Κοπρανώδεις στρεπτόκοκκοι (Fecal streptococci)**

Οι κοπρανώδεις στρεπτόκοκκοι είναι θετικά κατά Gram βακτήρια που περιλαμβάνουν τα γένη *Enterococcus* και *Streptococcus*. Μερικά είδη που συμπεριλαμβάνονται σε αυτά τα γένη είναι *E. avium*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. faeculis*, *E. gallinarum* και *S. bovis*, *S. equinus* αντίστοιχα. Με ικανότητες ανάπτυξης σε δυσμενείς συνθήκες όπως NaCl 6.5%, pH 9.6 και 45 °C, παρουσιάζουν μερικά πλεονεκτήματα ως δείκτες, σε σχέση με τα ολικά και τα κοπρανώδη κολοβακτηριοειδή. Αναφορικά, πολλαπλασιάζονται σπάνια στο νερό, είναι πιο ανθεκτικά στη χλωρίωση και επιμένουν περισσότερο στο περιβάλλον. Η ανίχνευσή τους σε νερά υποδηλώνει μόλυνση από κόπρανα θερμόαιμων ζώων. Ιδιαίτερη σημασία έχουν τα *E. faecalis* και *E. faecium* τα οποία συναντώνται σε κόπρανα ανθρώπινης προέλευσης (Brusseau et al., 2019).

**Πίνακας 1.** Υδατογενείς λοιμώξεις και τα παθογόνα βακτήρια που τις προκαλούν (McKee & Cruz, 2021).

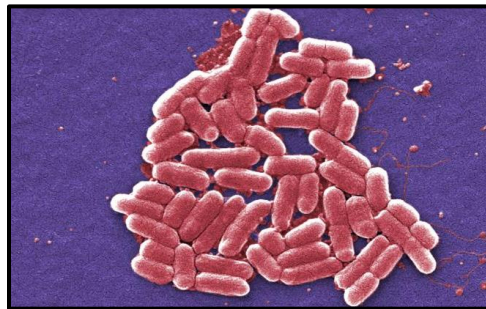
Παθογόνα βακτήρια	Σχετιζόμενες λοιμώξεις
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Μελιοειδωση
<i>Campylobacter jejuni</i>	Γαστρεντερίτιδα
<i>Campylobacter coli</i>	Γαστρεντερίτιδα
<i>Escherichia coli</i>	Γαστρεντερίτιδα
<i>Legionella</i> sp.	Νόσος των Λεγεωνάριων
<i>Nontuberculous mycobacteria</i>	Πνευμονική νόσος, λοίμωξη δέρματος
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Πνευμονική νόσος, λοίμωξη δέρματος
<i>Salmonella typhi</i>	Τυφοειδής πυρετός
<i>Salmonella enterica</i>	Σαλμονέλωση
<i>Shigella</i> sp.	Σιγκέλλωση
<i>Staphylococcus aureus</i>	Γαστρεντερίτιδα, λοίμωξη δέρματος
<i>Vibrio cholerae</i>	Χολέρα
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Γαστρεντερίτιδα



### 1.2.3 *Escherichia coli*, *Enterococcus* sp., *Staphylococcus aureus*

#### *Escherichia coli*

Το *Escherichia coli* (*E. coli*) ανακαλύφθηκε το 1884 από τον Γερμανό παιδίατρο και μικροβιολόγο Theodor Escherich σε μία μελέτη του για τα μικρόβια του εντέρου των βρεφών και είναι ίσως το πιο μελετημένο βακτήριο στην επιστήμη της μικροβιολογίας. Τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά αυτού του βακτηρίου όπως η ουδέτερη παθογένεια, η ευελιξία στην απομόνωση και η ανάπτυξη σε διαφορετικά θρεπτικά υλικά, γρήγορα το μετέτρεψαν σε μοντέλο στο κλάδο της βακτηριολογίας (Blount, 2015).



**Εικόνα 3.** *Escherichia coli* σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (CDC, 2006).

Το *E. coli* ανήκει στο γένος *Escherichia* και είναι αρνητικό κατά Gram, προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο. Έχει ραβδοειδές σχήμα και τα κύτταρα του έχουν πλάτος 1.1-1.5 μm και μήκος 2-6 μm, με ικανότητα κίνησης και εμφάνισης πλευρικών μαστιγίων (Desmarchelier & Fegan, 2011).

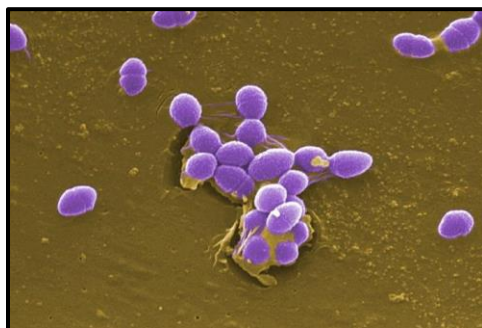
Η φυσική κατοικία του βακτηρίου είναι στο γαστρεντερικό σωλήνα ανθρώπων και ζώων και είναι μέλος του εντερικού μικροβιώματος. Οι δράσεις του συμβάλλουν στην κατανάλωση του οξυγόνου, στην παραγωγή βιταμίνης K και στην προστασία από παθογόνα, καθιστώντας το «σύμμαχο» των ανώτερων μορφών ζωής (Martinson & Walk, 2020). Παρ' όλα αυτά, υπάρχουν και παθογόνα στελέχη του εν λόγω βακτηρίου, που μπορούν να προκαλέσουν μια σειρά από ασθένειες. Ονομάζοντας μερικά από αυτά:

- Enterotoxigenic (ETEC)
- Enteroinvasive (EIEC)
- Enteropathogenic (EPEC)
- Verocytotoxigenic (VTEC)

Ιδιαίτερη σημασία αποδίδεται στο βακτήριο *E. coli* και από τη σκοπιά της δημόσιας υγείας, καθώς είναι δείκτης κοπρανώδους μόλυνσης και ανήκει στα κοπρανώδη κολοβακτηριοειδή (Percival & Williams, 2014).

### **Enterococcus sp.**

Οι εντερόκοκκοι ανακαλύφθηκαν το 1899 στην ανθρώπινη χλωρίδα των κοπράνων. Με τα τεχνολογικά εργαλεία της τότε εποχής, κατατάχθηκαν υπό το γένος *Streptococcus*. Όμως, με την πάροδο των χρόνων και την εξέλιξη της τεχνολογίας, η ανάλυση γονιδιωματικού DNA έδειξε ότι ήταν κατάλληλο να προσδιοριστεί ένα ξεχωριστό γένος, το γένος *Enterococcus*. Έτσι, μετά το 1984, πολλά είδη στρεπτόκοκκων μεταφέρθηκαν στο γένος *Enterococcus*, και έως σήμερα υπολογίζονται τουλάχιστον 58 διαφορετικά είδη εντερόκοκκων (Zhou et al., 2020).



**Εικόνα 4.** *Enterococcus faecalis* σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (CDC, 2006).

Οι εντερόκοκκοι (ή *Enterococcus* sp.) είναι θετικά κατά Gram και προαιρετικά αναερόβια βακτήρια. Μπορούν να εμφανιστούν ως απλοί κόκκοι, ζεύγη ή αλυσίδες. Οι διαστάσεις τους κυμαίνονται 0.6-2.0 μm πλάτος και 0.6-2.5 μm μήκος και μερικές φορές μπορούν να κινηθούν από λιγοστά μαστίγια (Calatrava, 2022).

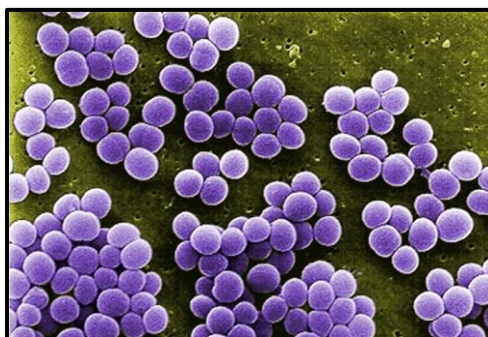
Σε μεγάλο αριθμό θηλαστικών, οι εντερόκοκκοι αποτελούν μέρος της φυσιολογικής εντερικής χλωρίδας. Συγκεκριμένα, στον άνθρωπο τα πιο κοινά είδη είναι τα *Enterococcus faecalis* και *Enterococcus faecium*. Ωστόσο, λόγω της ικανότητάς τους να επιβιώνουν στο περιβάλλον και της εγγενούς αντοχής τους στα αντιβιοτικά, κατατάσσονται μεταξύ των πιο διαδεδομένων νοσοκομειακών παθογόνων παγκοσμίως. Το 85-90% των λοιμώξεων από εντερόκοκκους προκαλούνται από *Enterococcus faecalis*, ενώ 5-10% προκαλούνται από *Enterococcus faecium*. Οι λοιμώξεις αυτές συμπεριλαμβάνουν ενδοκαρδίτιδες, σήψεις, λοιμώξεις χειρουργικών τραυμάτων και λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος (Van Tyne et al., 2013).

Από την σκοπιά της δημόσιας υγείας, τα βακτήρια αυτά είναι ιδιαίτερα σημαντικά, καθώς ανήκουν στην ομάδα των κοπρανωδών στρεπτόκοκκων και είναι δείκτες κοπρανώδους μόλυνσης νερών (Krawczyk et al., 2021).



### **Staphylococcus aureus**

Το 1880, ο Σκωτσέζος χειρουργός Alexander Ogston περιέγραψε για πρώτη φορά τους σταφυλόκοκκους σε χειρουργικό απόστημα σε μια άρθρωση του γόνατος. Δύο χρόνια αργότερα, το 1884, ο Γερμανός γιατρός Friedrich Julius Rosenbach διαφοροποίησε το είδος των βακτηρίων αυτών με βάση το χρυσό χρώμα των αποικιών τους, και τους προσέδωσε το όνομα *S. aureus* (Licitra, 2013).



**Εικόνα 5.** *Staphylococcus aureus* σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (CDC, 2001).

Το βακτήριο *S. aureus* ανήκει στο γένος *Staphylococcus*, είναι θετικό κατά Gram, προαιρετικά αναερόβιο, το οποίο σχηματίζει συστάδες κυττάρων που φαίνονται σαν «τσαμπιά σταφυλιών». Η διάμετρος ενός κόκκου-κυττάρου κυμαίνεται 0.5-1.5  $\mu\text{m}$  (Hudson, 2014). Ακόμη, θεωρείται μη-κινητικό, αλλά πρόσφατες έρευνες δείχνουν ότι μπορεί να κινηθεί με έμμεσο τρόπο, εξαπλώνοντας από μία κεντρική αποικία, προς τα έξω (Pollitt et al., 2015).

Το *S. aureus* εντοπίζεται τόσο στο περιβάλλον όσο και στους ανθρώπους. Στην περίπτωση των ανθρώπων, βρίσκεται κυρίως στο δέρμα και συνήθως ζει συμβιωτικά στη φυσιολογική χλωρίδα του δέρματος. Εάν όμως βρει ευκαιρία να εισχωρήσει στο εσωτερικού του ανθρώπινου οργανισμού, τότε μπορεί να μετατραπεί σε απειλητικό παθογόνο προκαλώντας μια σειρά από ασθένειες, από απλές τοπικές έως πολύ σοβαρές. Αναφορικά, δερματίτιδες, λοιμώξεις ουροποιητικού, τροφικές δηλητηριάσεις, πνευμονίες, ενδοκαρδίτιδες, οστεομυελίτιδες, σηψαιμίες κ.ά.. Επίσης, λόγω της εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών του βακτηρίου *S. aureus* (π.χ. Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA)) σε ποικιλία αντιβιοτικών, το βακτήριο αυτό συμπεριλαμβάνεται στη λίστα των νοσοκομειακών παθογόνων (Varadaraj, 2010).

Στη δημόσια υγεία, τα βακτήρια *S. aureus* έχουν και ρόλο δεικτών στην ποιότητα τροφίμων, καθώς η ανίχνευση εντεροτοξινών τους σε αυτά σημαίνει μικροβιακή μόλυνση των τροφίμων (Kadariya et al., 2014).

#### 1.2.4 Ιοί

Οι ιοί είναι ο πολυπληθέστερος βιολογικός παράγοντας που υπάρχει και αποτελούν υποχρεωτικά ενδοκυτταρικά παράσιτα. Δομούνται από νουκλεϊκό οξύ (DNA ή RNA) το οποίο περιβάλλεται από ένα προστατευτικό κάλυμμα πρωτεΐνης, το καψίδιο. Η αναπαραγωγή τους εξαρτάται αποκλειστικά από τα κύτταρα που θα εισβάλουν, λαμβάνοντας ενέργεια και υλικά απαραίτητα για να πολλαπλασιαστούν. Όλοι οι ζωντανοί οργανισμοί μπορούν να γίνουν ξενιστές των ιών (βακτήρια, μύκητες, φυτά, ζώα, άνθρωποι) και η μόλυνση μπορεί να διαρκέσει από λίγες ημέρες έως και όλη τη ζωή του οργανισμού ξενιστή. Αν και σχετικά απλοί, η ταξινόμηση τους γίνεται σύμφωνα με το μέγεθος, την οργάνωση του γονιδιώματος και την αρχιτεκτονική των καψιδίων, καθώς παρουσιάζουν σημαντική ποικιλομορφία σε αυτά (Payne, 2017).

#### 1.2.5 Ιοί εντερικής προέλευσης

Οι τρέχουσες μέθοδοι αξιολόγησης της ποιότητας του νερού βασίζονται κυρίως σε βακτηριακούς δείκτες, κάτι που δεν είναι τόσο αποτελεσματικό για την εύρεση μόλυνσης από παθογόνους ιούς. Το κενό αυτό συμπληρώνουν οι ιοί εντερικής προέλευσης, που μπορούν να επιβιώσουν σε δυσμενέστερες περιβαλλοντικές συνθήκες από τους βακτηριακούς δείκτες, και να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες μόλυνσης για νερά με ιικό φορτίο (Jiang et al., 2001).

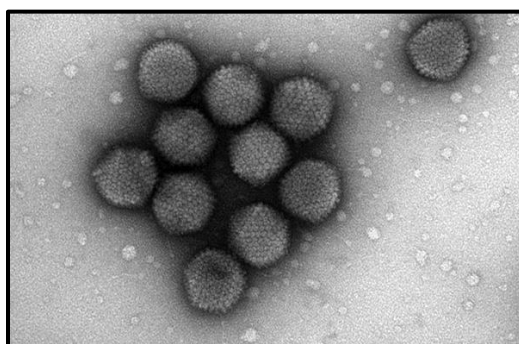
Οι ιοί εντερικής προέλευσης από τη φύση τους μπορούν να είναι παρόντες σε υδάτινα περιβάλλοντα, αλλά το πιο σύνηθες είναι η εισαγωγή τους σε αυτά μέσω ανθρώπινων δραστηριοτήτων. Τέτοιες δραστηριότητες μπορεί να είναι διαρροή λυμάτων, αστική απορροή, γεωργική απορροή και απόρριψη λυμάτων σκαφών. Η μόλυνση, η αναπαραγωγή και η μετάδοση τους γίνεται, κυρίως, δια μέσου του γαστρεντερικού συστήματος. Σε μολυσμένους ξενιστές (ζώα, ανθρώπους) οι ιοί αυτοί βρίσκονται στα κόπρανα σε εξαιρετικά μεγάλους αριθμούς και προκαλούν ανησυχία λόγω της χαμηλής μολυσματικής τους δόσης. Οι λοιμώξεις που προκαλούνται από αυτούς τους ιούς κυμαίνονται από ήπιες έως και πολύ σοβαρές, αγγίζοντας υψηλά ποσοστά θνησιμότητας αν δεν αντιμετωπιστούν εγκαίρως (Fong & Lipp, 2005).

**Πίνακας 2.** Υδατογενείς λοιμώξεις και οι ιοί που τις προκαλούν (McKee & Cruz, 2021).

Ιοί	Σχετιζόμενες λοιμώξεις
Adenoviruses	Γαστρεντερίτιδα, λοίμωξη αναπνευστικού
Astroviruses	Γαστρεντερίτιδα
Enteroviruses	Γαστρεντερίτιδα
Hepatitis virus A	Ηπατίτιδα
Hepatitis virus E	Ηπατίτιδα
Noroviruses	Γαστρεντερίτιδα
Rotaviruses	Γαστρεντερίτιδα
Sapoviruses	Γαστρεντερίτιδα

### 1.2.6 Αδενοϊοί

Οι αδενοϊοί ανιχνεύθηκαν για πρώτη φορά το 1953 από τους Αμερικάνους ιολόγους Wallace Rowe και Robert Huebner όταν απομονώθηκαν από καλλιέργεια σε αδενοειδούς ιστούς.



**Εικόνα 6.** Σωματίδια αδενοϊού σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (Sonntag et al., 2009).

Η οικογένεια των αδενοϊών, γνωστή ως *Adenoviridae*, περιλαμβάνει τα γένη *Mastadenovirus*, *Aviadenovirus* και *Atadenovirus* που αφορούν τα θηλαστικά, τα πτηνά και τα ερπετά αντίστοιχα. Σχηματικά, οι αδενοϊοί είναι εικοσαεδρικοί χωρίς περίβλημα με διάμετρο περίπου 80 nm, και γενετικά, το γονιδίωμα τους αποτελείται από δίκλωνο DNA (Bishop & Kirkwood, 2008).

Οι αδενοϊοί μπορούν να μεταδοθούν μέσω διαφόρων οδών συμπεριλαμβανομένων των ανθρώπων (σταγονίδια, κόπρανα), του νερού (λύματα) και του εξοπλισμού (μολυσμένα αντικείμενα). Από τα είδη αδενοϊών που στοχεύουν τους ανθρώπους, οι ορότυποι 18, 31, 40, 41 και 52 μπορούν να προκαλέσουν γαστρεντερίτιδα. Έμφαση πρέπει να δοθεί στους

αδενοϊούς 40 και 41 οι οποίοι είναι εντερικής προέλευσης, μεταδίδονται μέσω κοπράνων και συμβάλλουν στο 5-20% των νοσηλειών για διάρροια στις ανεπτυγμένες χώρες. Επίσης, αυτοί οι ιοί μπορούν να προκαλέσουν και άλλες ασθένειες όπως οξεία αναπνευστική νόσο, αιμορραγική κυστίτιδα και επιπεφυκίτιδα (Gerba, 2015).

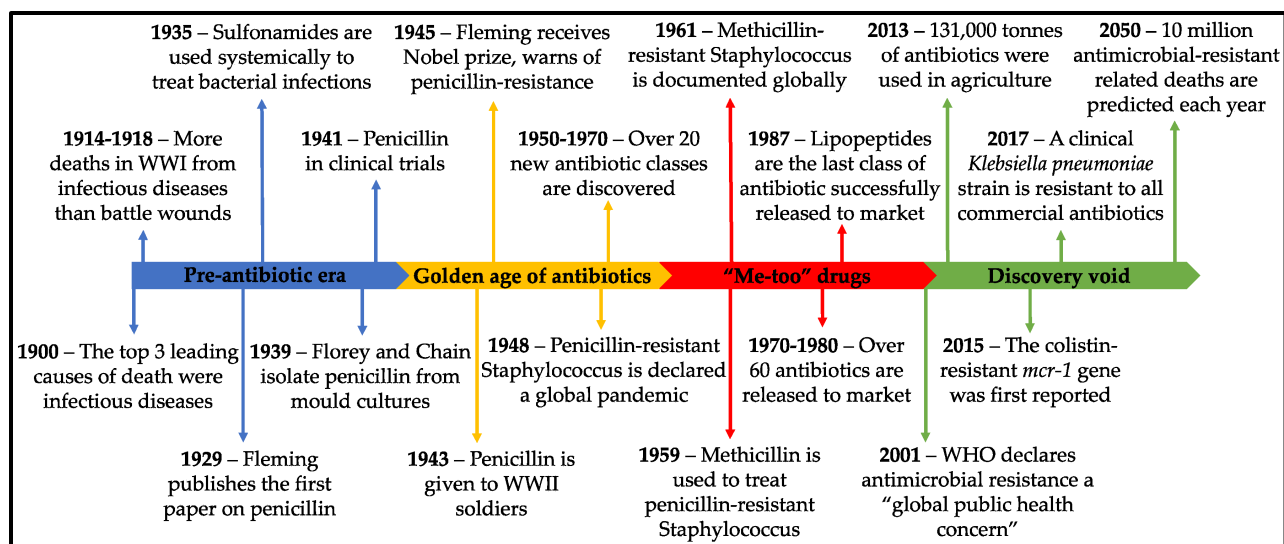
Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι οι αδενοϊοί επιβιώνουν στο νερό μεγαλύτερα διαστήματα (έως και 160 ημέρες σε όλα τα είδη νερών με μέση θερμοκρασία 10 °C) από άλλους ιούς εντερικής προέλευσης, κάτι που πιθανόν οφείλεται στο δομή του δίκλωνου DNA τους (Rigotto et al., 2011).

### 1.3 Αντιβιοτικά και ανθεκτικότητα

#### 1.3.1 Αντιβιοτικά

Τα αντιβιοτικά είναι φυσικές ουσίες που χρησιμοποιούνται για να αντιμετωπίσουν βακτήρια (σε ελάχιστες περιπτώσεις μύκητες και πρωτόζωα) καταστρέφοντας τα ολοκληρωτικά ή αναστέλλοντας την ανάπτυξη τους (Zimdahl, 2015).

Από την αρχαιότητα, υπάρχουν αναφορές (όπως ο πάπυρος «Ebers») που δηλώνουν ότι οι άνθρωποι εκμεταλλεύονταν τις ιδιότητες της μούχλας και τοποθετούσαν μουχλιασμένο ψωμί σε ανοιχτές πληγές. Χιλιάδες χρόνια αργότερα, το 1910, ο Γερμανός γιατρός Paul Ehrlich ανέπτυξε την πρώτη συνθετική αντιμικροβιακή ουσία, το Arsphenamine (ή Salvarsan) για την θεραπεία της σύφιλης από το βακτήριο *Treponema pallidum*. Μερικά χρόνια αργότερα, το 1928, ο Σκωτσέζος βιολόγος Alexander Fleming, παρατηρώντας ένα επιμολυσμένο τρυβλίο Petri, διαπίστωσε ότι η μούχλα *Penicillium* παρήγαγε μια ουσία που ανέστελλε τη δραστηριότητα βακτηρίων. Η ουσία αυτή ονομάστηκε Penicillin (Πενικιλίνη) και αφού μελετήθηκε, ξεκίνησε η μαζική βιομηχανική παραγωγή του πρώτου αντιβιοτικού Πενικιλίνης κλινικής χρήσης, κατά τη διάρκεια του Β΄ Παγκοσμίου Πολέμου. Ύστερα, ακολούθησε η χρυσή εποχή στην ανακάλυψη αντιβιοτικών από φυσικά προϊόντα όπου κορυφώθηκε στα τέλη της δεκαετίας 1950. Έκτοτε, παρατηρείται μια σταδιακή μείωση στην ανακάλυψη αντιβιοτικών και συγχρόνως μία συνεχής εξέλιξη της ανθεκτικότητας πολλών βακτηρίων στα αντιβιοτικά, καταλήγοντας στο σημερινό πρόβλημα αντιμικροβιακής αντοχής (Hutchings et al., 2019).



Εικόνα 7. Σημαντικά γεγονότα στην ιστορία των αντιβιοτικών (Browne et al., 2020).

### 1.3.2 Ομάδες αντιβιοτικών

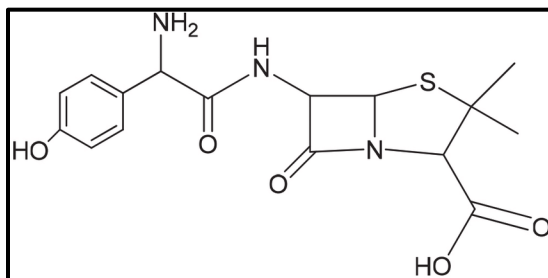
#### β-λακτάμες

Μετά την ανακάλυψη και μελέτη της δομής της Πενικιλίνης, δημιουργήθηκε μια ευρεία ομάδα αντιβιοτικών που περιέχουν έναν δακτύλιο β-λακτάμης στη χημική τους δομή. Τα αντιβιοτικά αυτά, δρουν στα ένζυμα (penicillin-binding proteins) των βακτηρίων που είναι υπεύθυνα για την οικοδόμηση του κυτταρικού τους τοιχώματος. Ως εκ τούτου, δρουν έναντι μόνο σε ταχέως πολλαπλασιαζόμενους οργανισμούς. Εκεί, η δέσμευση της πενικιλίνης στο κυτταρικό τοίχωμα παρεμβαίνει στην παραγωγή πεπτιδογλυκανών του κυτταρικού τοιχώματος και έχει ως αποτέλεσμα τη λύση των κυττάρων. Τα θετικά κατά Gram βακτήρια είναι συνήθως πιο ευαίσθητα στις β-λακτάμες λόγω έλλειψης του επιπλέον στρώματος λιποπολυσακχαρίτη που διαθέτουν τα αρνητικά (Davis, 2018).

#### ➤ Αμοξικιλίνη

Η Αμοξικιλίνη (AMX) είναι ένα ημισυνθετικό παράγωγο της Πενικιλίνης που δημιουργήθηκε το 1958 και βγήκε στην αγορά το 1972. Ανήκει στην ομάδα των β-λακταμών και είναι αποτελεσματικό έναντι σε θετικά κατά Gram βακτήρια κόκκων όπως στρεπτόκοκκων, σταφυλόκοκκων και εντερόκοκκων. Η Αμοξικιλίνη χρησιμοποιείται για τη θεραπεία λοιμώξεων του ανώτερου και κατώτερου αναπνευστικού, λοιμώξεων του

δέρματος, λοιμώξεων του ουροποιητικού συστήματος και λοιμώξεων ωτίτιδας (Castle, 2007).



**Εικόνα 8.** Η χημική ένωση της Αμοξικιλίνης (Qarah et al., 2019).

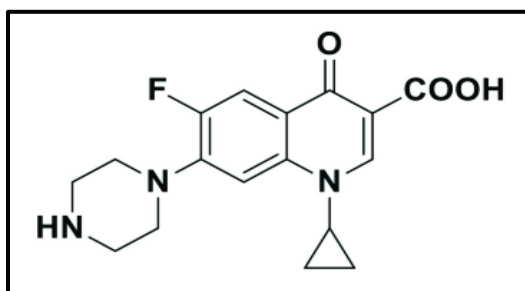
### **Κινολόνες**

Οι Κινολόνες, μια οικογένεια αντιβιοτικών που περιέχουν μια δικυκλική δομή πυρήνα που σχετίζεται με την ένωση 4-κινολόνη, ανακαλύφθηκαν στις αρχές της δεκαετίας 1960. Η δράση αυτών των αντιβιοτικών κατά των βακτηρίων γίνεται με την αναστολή της σύνθεσης του DNA των βακτηρίων. Συγκεκριμένα, κατά την σύνθεση του DNA, το δίκλωνο DNA χωρίζεται σε δύο μονόκλωνες δομές για να χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο. Οι Κινολόνες στοχεύουν τα ένζυμα (topoisomerase II, topoisomerase IV, gyrase) των βακτηρίων που είναι υπεύθυνα για την προαναφερόμενη διαδικασία, σταματώντας έτσι τη διαδικασία σύνθεσης. Το φάσμα εφαρμογής των Κινολονών συμπεριλαμβάνει τόσο τα θετικά κατά Gram βακτήρια, όσο και τα αρνητικά, αλλά και τα μυκοβακτήρια (Pham et al., 2019).

#### **➤ Σιπροφλοξασίνη**

Η Σιπροφλοξασίνη (CIP) είναι ένα συνθετικό αντιβιοτικό που ανήκει στην ομάδα των Φθοριοκινολονών (Κινολόνες που περιέχουν φθόριο στη χημική δομή τους), το οποίο βγήκε στο εμπόριο στα τέλη της δεκαετίας 1980. Χρησιμοποιείται κυρίως για την αντιμετώπιση λοιμώξεων που προκαλούνται από αρνητικά κατά Gram βακτήρια. Τέτοιες

λοιμώξεις μπορεί να είναι ουρολοιμώξεις, οστεομυελίτιδες, γονοκοκκικές λοιμώξεις και ωτορινολαρυγγολογικές λοιμώξεις (Emmerson, 2003).



**Εικόνα 9.** Η χημική ένωση της Σiproφλοξασίνης (Al-Harthy et al., 2020).

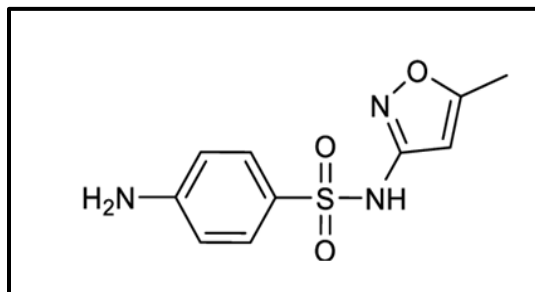
### **Σουλφοναμίδες**

Οι Σουλφοναμίδες είναι η πρώτη ομάδα αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκε συστηματικά για την αντιμετώπιση ποικίλων βακτηριακών λοιμώξεων. Η ανακάλυψη τους χρονολογείται στην δεκαετία 1930. Κοινό χαρακτηριστικό τους είναι η παρουσία ομάδας σουλφοναμιδίου στη χημική τους ένωση. Ο μηχανισμός δράσης τους, τους επιτρέπει να αντικαθιστούν το π-αμινοβενζοϊκό οξύ κατά τη σύνθεση του φολικού οξέος, που είναι απαραίτητο για την παραγωγή DNA στα βακτήρια. Συνεπώς, αναστέλλεται η παραγωγή σημαντικών ενζύμων (dihydrofolate, tetrahydrofolate) και σταματά η περαιτέρω διαίρεση των βακτηριακών κυττάρων. Τα αντιβιοτικά αυτά είναι πολύ αποτελεσματικά έναντι των θετικών κατά Gram και ορισμένων αρνητικών κατά Gram βακτηρίων (Ovung & Bhattacharyya, 2021).

#### **➤ Σουλφαμεθοξαζόλη**

Η Σουλφαμεθοξαζόλη (SMX) είναι ένα συνθετικό αντιβιοτικό που πρωτοεμφανίστηκε το 1961. Είναι μέλος των αντιβιοτικών Σουλφοναμιδών και χρησιμοποιείται κατά θετικών κατά Gram και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων. Τα τελευταία χρόνια αναμιγνύεται με την Τριμεθοπρίμη (TMP) για μεγαλύτερη αποδοτικότητα. Ιδιαίτερα, αυτό το αντιβιοτικό είναι αποτελεσματικό στη θεραπεία λοιμώξεων που προκαλούνται από στρεπτόκοκκους, γονόκοκκους, πνευμονόκοκκους, και σταφυλόκοκκους. Οι λοιμώξεις μπορεί να

συμπεριλαμβάνουν βρογχίτιδες, εντεροκολίτιδες, ωτίτιδες, πνευμονίες και ουρολοιμώξεις (Michelow & McCracken, 2009).



**Εικόνα 10.** Η χημική ένωση της Σουλφαμεθοξαζόλης (Nesměrák et al., 2020).

### 1.3.3 Ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά

Αναντίρρητα, τα αντιβιοτικά έχουν εξελίξει τον κλάδο της ιατρικής, προσφέροντας θεραπεία σε πολλές ασθένειες που προκαλούνται από παθογόνους μικροοργανισμούς και σώζοντας εκατομμύρια ζωές. Οι μικροοργανισμοί στόχοι των αντιβιοτικών όμως, εμφάνισαν μία αυξανόμενη αντίσταση στις ουσίες αυτές με την πάροδο του χρόνου, καθώς έβρισκαν τρόπους να προσαρμόζονται στις αντίξοες συνθήκες και να εξελίσσονται ανθεκτικότεροι. Έτσι, αναδείχθηκε το πρόβλημα της μικροβιακής αντοχής στα αντιβιοτικά, απειλώντας την δημόσια υγεία, το οποίο έχει λάβει παγκόσμιες διαστάσεις με μεγάλους οργανισμούς υγείας (WHO, CDC) να επισημαίνουν τη σοβαρότητα του (Prestinaci et al., 2015).

Οι παράγοντες που συνετέλεσαν στην ταχύτερη εξάπλωση του προβλήματος ποικίλουν, με την αλόγιστη χρήση (ή κατάχρηση) να βρίσκεται στην πρώτη θέση. Από την εποχή της Πενικιλίνης ακόμη, ο Alexander Fleming προειδοποίησε για τις συνέπειες της αλόγιστης χρήσης των αντιβιοτικών. Μέσα στα επόμενα χρόνια, τα λόγια του επαληθεύτηκαν με την εμφάνιση ανθεκτικών, στην Πενικιλίνη, στελεχών *S. aureus* σε ασθενείς νοσοκομείων. Ύστερα, άλλες αιτίες που οδήγησαν στη σημερινή κρίση της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά ήταν η εύκολη πρόσβαση στα αντιβιοτικά μέσω αγοράς, εκτεταμένη χρήση σε νοσοκομειακά περιβάλλοντα, εκτεταμένη χρήση στο κλάδο της γεωργίας και κτηνοτροφίας (εκτιμάται ότι το 70% των αντιβιοτικών που πωλούνται, προορίζονται για την γεωργία και τα ζώα παραγωγής τροφίμων), όπως επίσης και η διαθεσιμότητα λίγων νέων αντιβιοτικών (Wall, 2019).

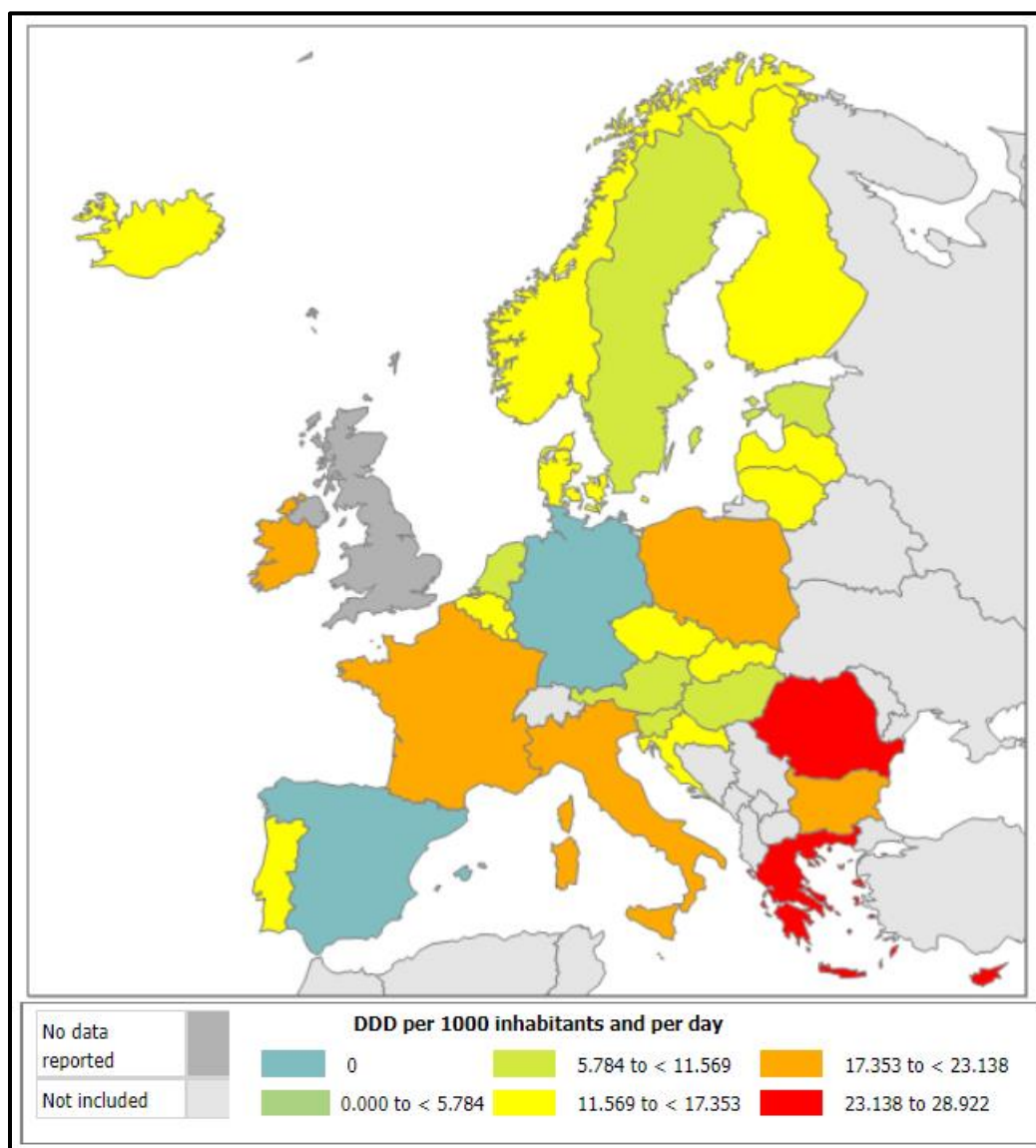


**Πίνακας 3.** Κατάλογος παθογόνων βακτηρίων ομαδοποιημένων σε τρεις κατηγορίες προτεραιότητας ανάλογα με την αντοχή τους στα αντιβιοτικά για την ενθάρρυνση της έρευνας και ανάπτυξης νέων αντιβιοτικών (WHO, 2017).

<b>Κρίσιμη Προτεραιότητα</b>	<i>Acinetobacter baumannii</i> , carbapenem-resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, carbapenem-resistant & third-generation cephalosporin-resistant
<b>Υψηλή Προτεραιότητα</b>	<i>Enterococcus faecium</i> , vancomycin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> , methicillin-resistant, vancomycin intermediate and resistant <i>Helicobacter pylori</i> , clarithromycin-resistant <i>Campylobacter</i> , fluoroquinolone-resistant <i>Salmonella</i> spp., fluoroquinolone-resistant <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , third-generation cephalosporin-resistant, fluoroquinolone-resistant
<b>Μέτρια Προτεραιότητα</b>	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , penicillin-non-susceptible <i>Haemophilus influenzae</i> , ampicillin-resistant <i>Shigella</i> spp., fluoroquinolone-resistant

#### 1.3.4 Το φαινόμενο ανθεκτικότητας στην Ελλάδα

Το πρόβλημα της μικροβιακής ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά είναι ιδιαίτερα κρίσιμο στον Ελλαδικό χώρο. Σύμφωνα με το Ευρωπαϊκό Κέντρο Πρόληψης και Ελέγχου Νόσων (ECDC), η κατανάλωση αντιβιοτικών στην Ελλάδα κατατάσσεται μεταξύ των υψηλότερων στην Ευρώπη, τόσο στα νοσοκομεία όσο και στην κοινότητα. Παρ' όλα αυτά, η προσπάθεια αντιμετώπισης του προβλήματος αυτού από το σύστημα υγείας της χώρας δεν είναι ικανοποιητική, καθώς δεν παρατηρείται συλλογική δράση αλλά δράση από μεμονωμένους φορείς και άτομα. Η κατάλληλη εκπαίδευση και ενημέρωση για την μικροβιακή ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά κρίνεται απαραίτητη για την επίσπευση του περιορισμού αυτής της κρίσης.

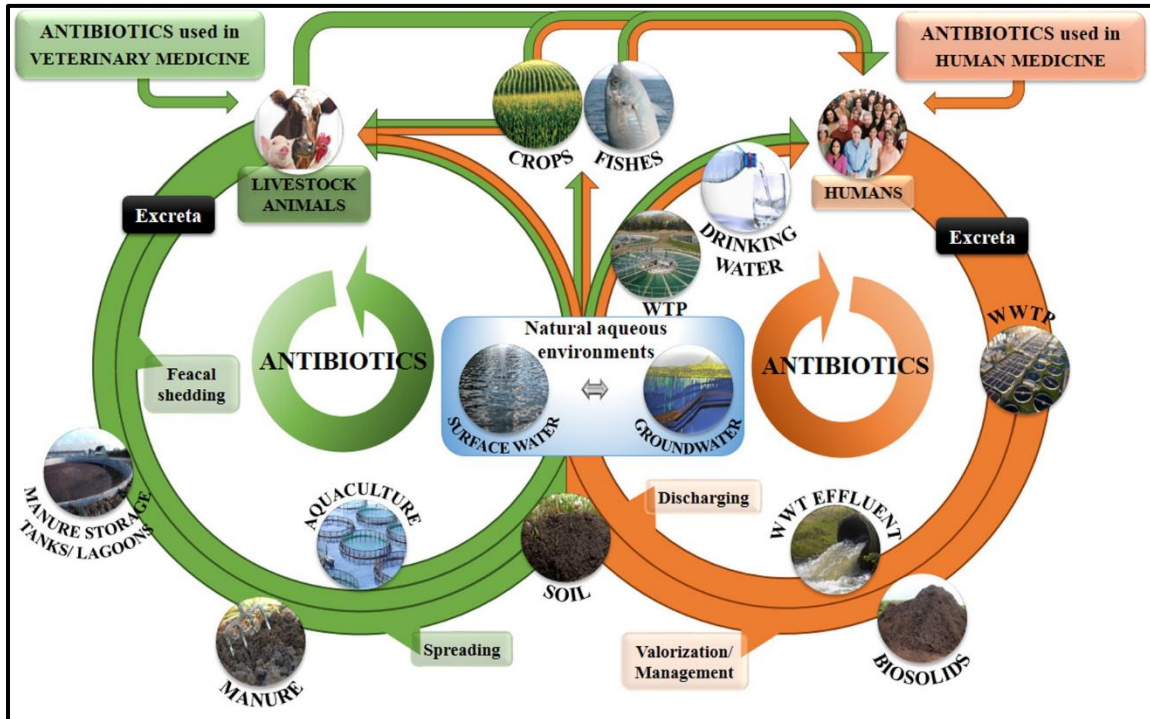


**Εικόνα 11.** Γεωγραφική κατανομή της κατανάλωσης αντιβιοτικών για συστηματική χρήση (DDD: Defined Daily Dose) στον κοινοτικό και νοσοκομειακό τομέα στην Ευρώπη το έτος 2020 (ECDC, 2022).

### 1.3.5 Ρύπανση από αντιβιοτικά

Πέρα από την εξάπλωση της ανθεκτικότητας στο περιβάλλον, η υπερβολική χρήση των αντιβιοτικών εγκυμονεί και άλλα προβλήματα. Η ανίχνευση σημαντικών συγκεντρώσεων αντιβιοτικών σε γλυκά νερά είναι γεγονός το οποίο υποδηλώνει την ρύπανση τους από αυτές τις ουσίες. Ενδεικτικά, σε μελέτες ανά τον κόσμο, οι συγκεντρώσεις αντιβιοτικών

που έχουν μετρηθεί σε γλυκά νερά είναι έως και 15 µg/L στην Αμερική, πάνω από 10 µg/L και 50 µg/L σε ευρωπαϊκές και αφρικανικές χώρες αντίστοιχα, και πάνω από 450 µg/L στις χώρες της Ασίας-Ειρηνικού. Αν και οι συγκεντρώσεις αυτές μπορεί να μην θεωρηθούν άμεσα επιβλαβείς για τον άνθρωπο, η αλληλεπίδραση τους με άλλους «στρεσογόνους» παράγοντες δημιουργεί ένα τοξικό περιβάλλον για τους μικροοργανισμούς. Αυτό προκαλεί μια αλυσιδωτή αντίδραση με συνέπειες στην τροφική αλυσίδα, διαταράσσοντας την ισορροπία των οικοσυστημάτων (Danner et al., 2019).



**Εικόνα 12.** Δίοδοι μετάδοσης αντιβιοτικών στο περιβάλλον (Carvalho & Santos, 2016).

### 1.3.6 Γονίδια ανθεκτικότητας

Τα βακτήρια, από εξελικτική σκοπιά, χρησιμοποιούν δύο κύριους γενετικούς μηχανισμούς για να επιβιώσουν στην «επίθεση» των αντιβιοτικών:

- i. Μεταλλάσσουν γονίδια που σχετίζονται με τον μηχανισμό δράσης κατά του αντιβιοτικού
- ii. Αποκτούν ξένο DNA μέσω οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς, που κωδικοποιεί καθοριστικούς παράγοντες αντοχής

#### **Μεταλλάξεις γονιδίων**

Βακτηριακά κύτταρα ενός ευαίσθητου πληθυσμού αναπτύσσουν μεταλλάξεις σε γονίδια που επηρεάζουν τη δράση του αντιβιοτικού, με έναν από τους εξής τρόπους:

- Τροποποιήσεις του αντιμικροβιακού στόχου
- Μείωση της πρόσληψης του φαρμάκου
- Ενεργοποίηση μηχανισμών εκροής για την εξώθηση του επιβλαβούς μορίου

Κατά συνέπεια, το αντιβιοτικό εξαλείφει τον ευαίσθητο πληθυσμό και τα ανθεκτικά βακτήρια (Antibiotic Resistant Bacteria – ARBs) κυριαρχούν και πολλαπλασιάζονται.

#### **Οριζόντια γονιδιακή μεταφορά**

Τα βακτήρια αποκτούν ξένο γενετικό υλικό μέσω οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς με τους εξής τρόπους:

- Μετασχηματισμός (ενσωμάτωση γυμνού DNA από το εξωτερικό περιβάλλον)
- Μεταγωγή (μεσολάβηση βακτηριοφάγου ιού)
- Σύζευξη (προσωρινή ή μόνιμη σύνδεση στελεχών ίδιου είδους)

Έτσι, τα ήδη-ανθεκτικά βακτήρια μπορούν να διασπείρουν τα γονίδια ανθεκτικότητας (Antibiotic Resistant Genes – ARGs) τους στα μη-ανθεκτικά, συμβάλλοντας στην εξάπλωση της ανθεκτικότητας στο περιβάλλον (Munita & Arias, 2016).

## 1.4 Σκοπός εργασίας

Ο σκοπός αυτής της διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη τριών πιλοτικών μονάδων τεχνητών υδροβιότοπων, με διαφορετικά πληρωτικά υλικά, ως προς την βιολογική επεξεργασία αστικών λυμάτων και απομάκρυνση του μικροβιακού φορτίου και των γονιδίων ανθεκτικότητας. Οι τεχνητοί υδροβιότοποι βρίσκονται στο Πολυτεχνείο Κρήτης και τα αστικά λύματα που τροφοδοτούνται σε αυτούς προέρχονται από την έξοδο της πρωτοβάθμιας επεξεργασίας του Βιολογικού Χανίων. Στο πλαίσιο αυτό εξετάστηκαν τα κάτωθι:

- Απομάκρυνση των βακτηρίων *E. coli*, *Enterococcus* sp. και *S. aureus*.
- Έλεγχος ανθεκτικότητας των βακτηρίων αυτών που απομονώνονται κατόπιν της επεξεργασίας στα αντιβιοτικά Amoxicillin, Ciprofloxacin και Sulfamethoxazole με τη μέθοδο ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC), αλλά και της μεταβολής του προφίλ ανθεκτικότητας.
- Έλεγχος απομάκρυνσης γονιδίων ανθεκτικότητας από τα λύματα κατά την επεξεργασία τους στους τεχνητούς υδροβιότοπους.
- Έλεγχος απομάκρυνσης αδενοϊών από τα λύματα κατά την επεξεργασία τους στους τεχνητούς υδροβιότοπους.

## 2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 2.1 Διάταξη πιλοτικών μονάδων τεχνητών υγροβιότοπων

Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν τρεις πιλοτικές μονάδες τεχνητών υγροβιότοπων που βρίσκονται στο Πολυτεχνείο Κρήτης και ανήκουν στο Εργαστήριο Τεχνολογίας και Διαχείρισης Περιβάλλοντος. Αναλυτικότερα, οι τεχνητοί υγροβιότοποι έχουν τις ονομασίες Control (CW-C), Plastic (CW-P) και Gravel (CW-G) και αποτελούνται από βαρέλια με ύψος 50 cm, διάμετρο 37 cm και ύψος στάθμης 25 cm.

#### **CW-C**

Το πληρωτικό υλικό στη μονάδα αυτή είναι πολυαιθυλένιο υψηλής πυκνότητας HDPE τύπου HX38 Biocarrier ( $\ell=38\text{mm}$ ,  $\varnothing=38\text{mm}$ , ε.ε.= $188\text{m}^2/\text{m}^3$ , πορώδες=95%) και τύπου HX25KLL Biocarrier ( $\ell=25\text{mm}$ ,  $\varnothing=25\text{mm}$ , ε.ε.= $360\text{m}^2/\text{m}^3$ , πορώδες=95%) από την εταιρία Christian Stöhr GmbH & Co. KG.

#### **CW-P**

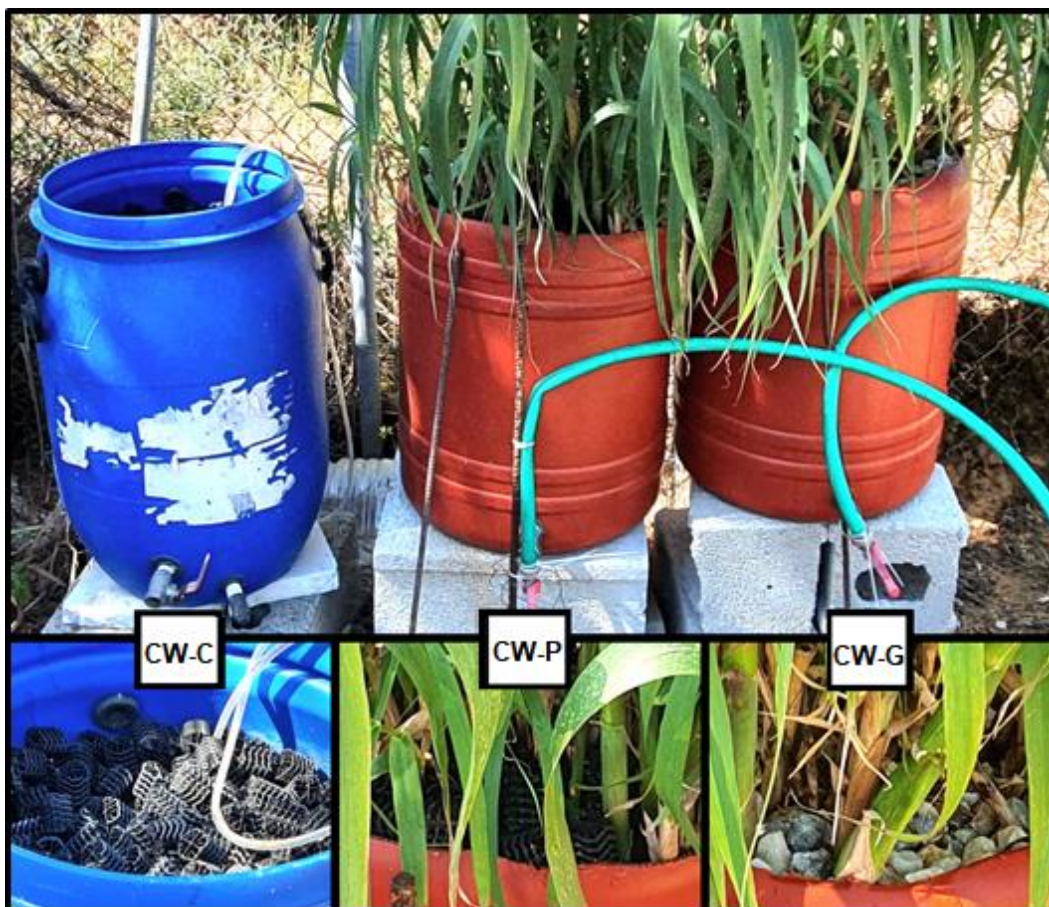
Το πληρωτικό υλικό στη μονάδα αυτή είναι, επίσης, πολυαιθυλένιο υψηλής πυκνότητας HDPE όμοιο με αυτό της μονάδας CW-C, και επιπλέον έχει γίνει φύτευση καλαμιών είδους *Phragmites australis*.

#### **CW-G**

Το πληρωτικό υλικό στη μονάδα αυτή είναι ασβεστολιθικό χαλίκι ( $\varnothing=1.7\text{-}2\text{cm}$ , πορώδες=38%) και επιπλέον έχει γίνει φύτευση καλαμιών είδους *Phragmites australis*.

Η ροή των τεχνητών υγροβιότοπων είναι υποεπιφανειακή και κάθετη. Η τροφοδοσία των μονάδων γινόταν με αστικά λύματα που έχουν υποστεί πρωτοβάθμια επεξεργασία στο Βιολογικό Χανίων, με την φόρτιση να γίνεται ανά 3 d, με 2 d ανάπαυσης μεταξύ φορτίσεων (Aretaki, 2022).





**Εικόνα 13.** Πιλοτικές μονάδες τεχνητών υγροβιότοπων Πολυτεχνείου Κρήτης. Από αριστερά προς δεξιά: μονάδα Control (CW-C) με πληρωτικό υλικό HDPE, μονάδα Plastic (CW-P) με πληρωτικό υλικό HDPE και βλάστηση καλαμιών *Phragmites australis*, μονάδα Gravel (CW-G) με πληρωτικό υλικό ασβεστολιθικό χαλίκι και βλάστηση καλαμιών *Phragmites australis*.

## 2.2 Δειγματοληψίες

Οι δειγματοληψίες έγιναν την περίοδο Νοέμβριος 2021 – Μάιος 2022. Τα δείγματα ήταν ποσότητες λυμάτων από τέσσερις διαφορετικές εκροές, για κάθε μήνα της περιόδου. Η μία εκροή ήταν η έξοδος πρωτοβάθμιας επεξεργασίας του Βιολογικού Χανίων, όπου εκεί έγινε συλλογή λύματος το οποίο μεταφέρθηκε στο Πολυτεχνείο Κρήτης. Το λύμα αυτό ονομάστηκε IN και τροφοδοτήθηκε στους τεχνητούς υγροβιότοπους CW-C, CW-P, CW-G. Οι υπόλοιπες τρεις εκροές ήταν αυτές των τεχνητών υγροβιότοπων CW-C, CW-P, CW-G.

G, όπου έγινε η συλλογή των λυμάτων C, P, G αντίστοιχα. Υπεύθυνο για την διαδικασία της δειγματοληψίας ήταν το συνεργαζόμενο εργαστήριο, Εργαστήριο Τεχνολογίας και Διαχείρισης Περιβάλλοντος, στο οποίο ανήκει η πειραματική διάταξη των τεχνητών υγροβιότοπων.

**Πίνακας 4.** Ημερομηνίες δειγματοληψιών.

Έτος	2021		2022				
Μήνας	Νοέμβριος	Δεκέμβριος	Ιανουάριος	Φεβρουάριος	Μάρτιος	Απρίλιος	Μάιος
Ημέρα	25	-	22	7	17	7	14
Δειγματοληψία	1	-	2	3	4	5	6

**Πίνακας 5.** Καιρικές συνθήκες στα Χανιά την περίοδο δειγματοληψιών (Meteo, 2022).

		Μέση θερμοκρασία (°C)	Μέση βροχόπτωση (mm)	Μέση ταχύτητα ανέμου (km/h)
2021	Νοέμβριος	18.0	16.6	5.6
	Δεκέμβριος	13.7	173.4	6.5
2022	Ιανουάριος	11.1	91.6	6.6
	Φεβρουάριος	12.9	68.0	7.0
	Μάρτιος	11.4	196.8	7.2
	Απρίλιος	17.4	2.4	6.3
	Μάιος	20.1	2.0	5.5

**Πίνακας 6.** Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των τεσσάρων λυμάτων τον Φεβρουάριο, στο μέσον της περιόδου δειγματοληψιών (Εργαστήριο Τεχνολογίας και Διαχείρισης Περιβάλλοντος).

	IN	C	P	G
pH	7.3	7.6	7.5	6.8
BOD (mg/L)	250	110	88	35
COD (mg/L)	66	28	62	374
TN (mg/L)	61	55	33	47
TP (mg/L)	3.988	1.853	2.123	1.618
TOC (mg/L)	33.4	11.2	6.8	4.2
PO <sub>4</sub> (mg/L)	1.915	1.802	1.917	1.334
NH <sub>4</sub> (mg/L)	42.5	26.2	23.7	8.3
Conductivity (μS/cm)	938	1279	1148	1199



## 2.3 Υλικά

### Εργαστηριακά υλικά

- Τρυβλία Petri διαμέτρου 6 cm
- Τρυβλία Petri διαμέτρου 9 cm
- Φιάλες διήθησης (Whatman)
- Φίλτρα μεμβράνης νιτροκυτταρίνης διαμέτρου πόρων 0.45 µm (Whatman)
- Αυτόματες πιπέτες (Eppendorf)
- Αυτόματες πολυκάναλες πιπέτες (Eppendorf)
- Πλάκες μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων (SARSTEDT)
- Κιτ απομόνωσης γενετικού υλικού (MACHEREY-NAGEL)
- MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plates (Applied Biosystems)
- SYBR Green qPCR Master Mix (KAPA BIOSYSTEMS)

### Συσκευές & όργανα

- Κλίβανος υγρής αποστείρωσης (RAYPA)
- Συσκευή διήθησης υπό κενό (PALL)
- Θάλαμος επώασης (Thermo SCIENTIFIC)
- Ζυγός ακριβείας (OHAUS)
- Φασματοφωτόμετρο (SHIMADZU)
- Microplate Reader EZ Read 400 (Biochrom)
- Φυγόκεντρος 4-16K (SIGMA)
- Φυγόκεντρος 5418R (Eppendorf)
- Φωτόμετρο BioPhotometer (Eppendorf)
- Real-Time PCR System StepOnePlus (Applied Biosystems)

### Θρεπτικά υλικά

- HiCrome E.coli Agar (HIMEDIA)
- Slanetz and Bartley Medium (NEOGEN)
- Bile Esculin Agar (HIMEDIA)
- Mannitol Salt Agar (NEOGEN)
- Nutrient Agar (NEOGEN)
- Nutrient Broth (NEOGEN)

### Αντιβιοτικά

- Amoxicillin (Sigma-Aldrich)
- Ciprofloxacin (Thermo SCIENTIFIC)
- Sulfamethoxazole-Trimethoprim (19:1) (Sigma-Aldrich)

## 2.4 Απομόνωση βακτηρίων

### 2.4.1 Μεθοδολογία

Στόχος ήταν ο έλεγχος των λυμάτων ΙΝ, C, Ρ, G όλων των μηνών ως προς την παρουσία και συγκέντρωση των βακτηρίων *E. coli*, *Enterococcus* sp. και *S. aureus*. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η διήθηση των υγρών δειγμάτων μέσω φίλτρων υπό συνθήκες κενού, ώστε να γίνει συγκράτηση βακτηρίων στα φίλτρα. Πριν από την διήθηση είχε προηγηθεί αραίωση των δειγμάτων. Ύστερα, τα φίλτρα τοποθετήθηκαν σε τρυβλία με εκλεκτικό θρεπτικό υλικό για το κάθε βακτήριο και ακολούθησε επώαση σε συγκεκριμένες συνθήκες για το κάθε βακτήριο. Τέλος, ακολούθησε η ποσοτικοποίηση, με καταμέτρηση των αποικιών των επωασμένων βακτηρίων.

#### *E. coli*

1. Διήθηση 100 mL δειγμάτων ΙΝ, C, Ρ, G μέσω φίλτρων πόρων 0.45  $\mu\text{m}$  υπό συνθήκες κενού
2. Μεταφορά φίλτρων σε θρεπτικό υπόστρωμα HiCrome E.coli Agar
3. Επώαση στους 37 °C για 24  $\pm$  4 h
4. Καταμέτρηση αποικιών μπλε-πράσινου χρώματος

#### *Enterococcus* sp.

1. Διήθηση 100 mL δειγμάτων ΙΝ, C, Ρ, G μέσω φίλτρων πόρων 0.45  $\mu\text{m}$  υπό συνθήκες κενού
2. Μεταφορά φίλτρων σε θρεπτικό υπόστρωμα Slanetz and Bartley Medium
3. Επώαση στους 37 °C για 48  $\pm$  4 h
4. Μεταφορά φίλτρων σε θρεπτικό υπόστρωμα Bile Esculin Agar για διαφοροποίηση εντερόκοκκων από στρεπτόκοκκους
5. Επώαση στους 44 °C για 2 h
6. Καταμέτρηση αποικιών καφέ-μαύρου χρώματος

#### *S. aureus*

1. Διήθηση 100 mL δειγμάτων ΙΝ, C, Ρ, G μέσω φίλτρων πόρων 0.45  $\mu\text{m}$  υπό συνθήκες κενού
2. Μεταφορά φίλτρων σε θρεπτικό υπόστρωμα Mannitol Salt Agar
3. Επώαση στους 37 °C για 48  $\pm$  4 h
4. Καταμέτρηση αποικιών κίτρινου-χρυσού χρώματος

Οι αποικίες μετρήθηκαν σε μονάδες Colony Forming Units ανά 100 mL διηθούμενου δείγματος, CFUs/100mL. Στο τέλος της διαδικασίας, έγιναν ανακαλλιέργειες των ανεπτυγμένων αποικιών σε μη εκλεκτικό θρεπτικό υλικό Nutrient Agar προκειμένου να χρησιμοποιηθούν στο πείραμα ελέγχου ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά.

## 2.5 Έλεγχος ανθεκτικότητας βακτηρίων

### 2.5.1 Θεωρητικό υπόβαθρο

Η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (Minimum Inhibitory Concentration – MIC) είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση ενός αντιβακτηριακού παράγοντα σε  $\mu\text{g/mL}$  ή  $\text{mg/L}$  που υπό αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες εμποδίζει πλήρως την ορατή ανάπτυξη του στελέχους δοκιμής ενός οργανισμού (Kowalska-Krochmal & Dudek-Wicher, 2021).

### 2.5.2 Μεθοδολογία

Στόχος ήταν ο έλεγχος ανθεκτικότητας των βακτηρίων *E. coli*, *Enterococcus* sp. και *S. aureus*, που απομονώθηκαν από τα λύματα IN, C, P, G (για τους μήνες: Νοέμβριο, Φεβρουάριο και Μάιο) στο προηγούμενο μέρος του πειράματος, στα αντιβιοτικά Amoxicillin, Ciprofloxacin και Sulfamethoxazole, με τη μέθοδο MIC. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε λέγεται Broth Microdilution, κατά την οποία εξετάζεται η ανάπτυξη του βακτηρίου σε θρεπτικό ζωμό με διάφορες συγκεντρώσεις αντιβιοτικού, εντός πλάκας μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων, μετά από επώαση σε ιδανικές συνθήκες.

#### Προετοιμασία αντιβιοτικού

Για την παρασκευή των απαιτούμενων συγκεντρώσεων αντιβιοτικών, ζυγίστηκε ποσότητα ξηρού αντιβιοτικού (σκόνη) και έπειτα διαλύθηκε σε ανάλογη ποσότητα αποστειρωμένου νερού, υπό συνθήκες ανάδευσης. Σημειώνεται ότι το εύρος συγκεντρώσεων που εξετάζονται επιλέχτηκαν σύμφωνα με τα όρια του EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) και τροποποιήθηκαν ανάλογα με τις απαιτήσεις του πειράματος.

**Πίνακας 7.** Συγκεντρώσεις αντιβιοτικών που εξετάστηκαν σε κάθε βακτήριο.

	Amoxicillin (mg/L)	Ciprofloxacin (mg/L)	Sulfamethoxazole (mg/L)
<i>E. coli</i>	32 - 0.25	8 - 0.0625	8 - 0.0625
<i>Enterococcus</i> sp.	16 - 0.125	8 - 0.0625	4 - 0.03125
<i>S. aureus</i>	8 - 0.0625	4 - 0.03125	4 - 0.03125

### **Προετοιμασία εναιωρήματος**

Από τα βακτήρια που απομονώθηκαν στο προηγούμενο μέρος του πειράματος, δημιουργήθηκαν φρέσκες ανακαλλιέργειες σε μη εκλεκτικό θρεπτικό υλικό Nutrient Agar. Έπειτα, παρασκευάστηκαν εναιωρήματα των βακτηρίων σε μη εκλεκτικό θρεπτικό ζωμό Nutrient Broth και φωτομετρήθηκαν σε μήκος κύματος 600 nm επιδιώκοντας οπτική απορρόφηση ίση με 0.1, η οποία αντιστοιχεί σε  $10^8$  CFUs/mL. Τέλος, έγιναν δεκαδικές αραιώσεις σε αυτά τα εναιωρήματα ώστε, μετά από λήψη 5  $\mu$ L και προσθήκη αυτών στα πηγάδια της πλάκας μικροτιτλοποίησης, να έχουμε συγκέντρωση  $10^5$  CFUs/mL.

### **Προετοιμασία πλάκας μικροτιτλοποίησης**

Με χρήση πολυκάναλης πιπέτας εφαρμόστηκαν 100  $\mu$ L θρεπτικού ζωμού Nutrient Broth σε όλα τα πηγάδια της πλάκας. Ακολούθησε η χορήγηση 100  $\mu$ L εκάστοτε αντιβιοτικού σε κάθε πηγάδι της σειράς A έως τη στήλη 9, σε συγκέντρωση διπλάσια της μέγιστης εξεταζόμενης συγκέντρωσης. Στη συνέχεια, μετά από ανάδευση του μίγματος ζωμού-αντιβιοτικού, λήφθηκαν 100  $\mu$ L από κάθε πηγάδι της σειράς A έως τη στήλη 9 και μεταφέρθηκαν στα αντίστοιχα πηγάδια της παρακάτω σειράς. Η διαδικασία ανάδευσης-μεταφοράς επαναλήφθηκε για όλες τις σειρές, με φθίνουσα κατεύθυνση, απορρίπτοντας την ποσότητα που λήφθηκε από την τελευταία σειρά για να διατηρηθεί το ισοζύγιο των 100  $\mu$ L σταθερό και να επιτευχθεί αραιώση  $\frac{1}{2}$  κάθε φορά. Αμέσως μετά, εισήχθησαν 5  $\mu$ L εναιωρήματος του εκάστοτε βακτηρίου σε όλα τα πηγάδια των στηλών 1-8, αλλά και στις στήλες 10-11, στα πρώτα τρία και τελευταία τρία πηγάδια, έτσι ώστε να έχουμε αρχικό  $10^5$  CFUs/100 $\mu$ L. Κάθε φορά εξετάστηκαν 4 στελέχη του ίδιου βακτηρίου και κατανεμήθηκαν σε 2 στήλες από τις στήλες 1-8, και σε μία τριπλέτα από τις στήλες 10-11, το κάθε ένα από αυτά. Ακολούθησε επώαση στους 37 °C για 24 h και, τέλος, ανάγνωση της πλάκας σε κατάλληλη συσκευή και μήκος κύματος 600nm.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1
B	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	3	1
C	3	3	3	3	3	3	3	3	1	1	3	1
D	4	4	4	4	4	4	4	4	1			1
E	5	5	5	5	5	5	5	5	1			1
F	6	6	6	6	6	6	6	6	1	2	4	1
G	7	7	7	7	7	7	7	7	1	2	4	1
H	8	8	8	8	8	8	8	8	1	2	4	1

**Εικόνα 14.** Διάταξη πλάκας μικροπιλοποίησης. Στήλες 1-8: Broth+Drug+Bacteria (έλεγχος ανασταλτικής συγκέντρωσης). Στήλη 9: Broth+Drug (έλεγχος αντιβιοτικού). Στήλες 10-11: Broth+Bacteria (έλεγχος ανάπτυξης στελεχών). Στήλη 12: Broth (έλεγχος επιμολύνσεων).

## 2.6 Έλεγχος απομάκρυνσης γονιδίων ανθεκτικότητας και αδενοϊών

### 2.6.1 Θεωρητικό υπόβαθρο

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μια βασική μοριακή τεχνική που χρησιμοποιείται για τον πολλαπλασιασμό αλληλουχιών στόχων από ένα πρότυπο DNA. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση θερμικού κύκλου, μια διαδικασία κατά την οποία ένα διάλυμα που περιλαμβάνει DNA θερμαίνεται και ψύχεται επανειλημμένα προκειμένου να διαχωριστεί το δίκλωνο DNA. Έπειτα, τμήματα DNA που ονομάζονται εκκινητές συνδέονται στη στοχευμένη αλληλουχία DNA και προκαλούν την ενζυμική αντιγραφή της, χρησιμοποιώντας πολυμεράσες DNA που εξαρτώνται από τη θερμοκρασία (Caetano-Anollés, 2013).

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real-time PCR ή qPCR) εισάγει την έννοια της παρακολούθησης του πολλαπλασιασμού του DNA στόχου, σε πραγματικό χρόνο. Σε αυτή την περίπτωση, αυτό επιτυγχάνεται μέσω της παρακολούθησης του φθορισμού, ο οποίος μετράται μετά από κάθε κύκλο, και η ένταση του σήματος φθορισμού αντανακλά τη στιγμιαία ποσότητα αντιγράφων DNA στο δείγμα τη συγκεκριμένη χρονική στιγμή (Kralik & Ricchi, 2017).

## 2.6.2 Μεθοδολογία

Στόχος ήταν η απομόνωση γενετικού υλικού από τα λύματα IN, C, P, G όλων των μηνών και στη συνέχεια ο έλεγχος απομάκρυνσης γονιδίων ανθεκτικότητας και αδενοϊών κατόπιν της επεξεργασίας των λυμάτων. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιλαμβάνει την απομόνωση γενετικού υλικού με χρήση kit «Genomic DNA from soil» της εταιρίας «MACHEREY-NAGEL» και την πραγματοποίησης real-time PCR.

### Απομόνωση γενετικού υλικού

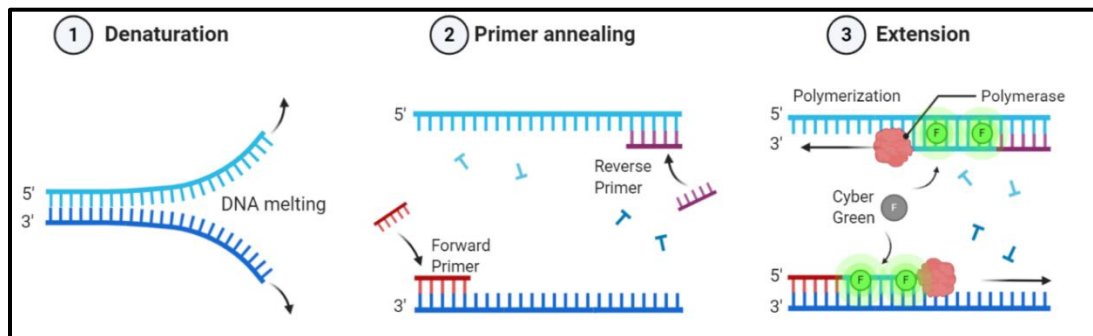
Αρχικά, από όλα τα δείγματα, μεταφέρθηκε ποσότητα 40 mL σε σωλήνες falcon, οι οποίοι τοποθετήθηκαν για φυγοκέντρωση σε συνθήκες 10,000 g, 30 min, 23 °C. Έπειτα, έγινε αφαίρεση του υπερκείμενου από κάθε falcon και με το ίζημα που είχε απομείνει, ακολουθήθηκαν τα βήματα από το πρωτόκολλο απομόνωσης γενετικού υλικού «Genomic DNA from soil» της εταιρίας «MACHEREY-NAGEL». Μετά το πέρας της διαδικασίας απομόνωσης, καταλήξαμε σε ποσότητα 50 µL γενετικού υλικού από κάθε δείγμα. Τέλος, έγινε φωτομέτρηση σε δύο μήκη κύματος, 260nm και 280nm, ώστε να διαπιστωθεί η καθαρότητα των γενετικών υλικών (ιδανική τιμή  $A_{260}/A_{280} = 1.8-1.9$ ).

### real-time PCR

Χρησιμοποιώντας την τυποποιημένη μέθοδο SYBR Green, αναζητήθηκαν τα εξής:

- qnrA - γονίδιο ανθεκτικότητας σε Κινολόνες
- ampC - γονίδιο ανθεκτικότητας σε β-λακτάμες
- sul II - γονίδιο ανθεκτικότητας σε Σουλφοναμίδες
- 16S rRNA - συνολικό ριβωσομικό βακτηριακό γενετικό υλικό
- NHEX - γονίδιο αδενοϊού

Στα βακτήρια το γονίδιο που έχει αποδειχθεί ότι είναι το πιο κατατοπιστικό για τη διερεύνηση της εξελικτικής συνάφειας είναι το 16S rRNA. Το γονίδιο αυτό υπάρχει σε όλα τα βακτήρια και είναι το κεντρικό δομικό συστατικό της βακτηριακής και της αρχαϊκής ριβωσωμικής υπομονάδας 30S (Jay & Inskeep, 2015).



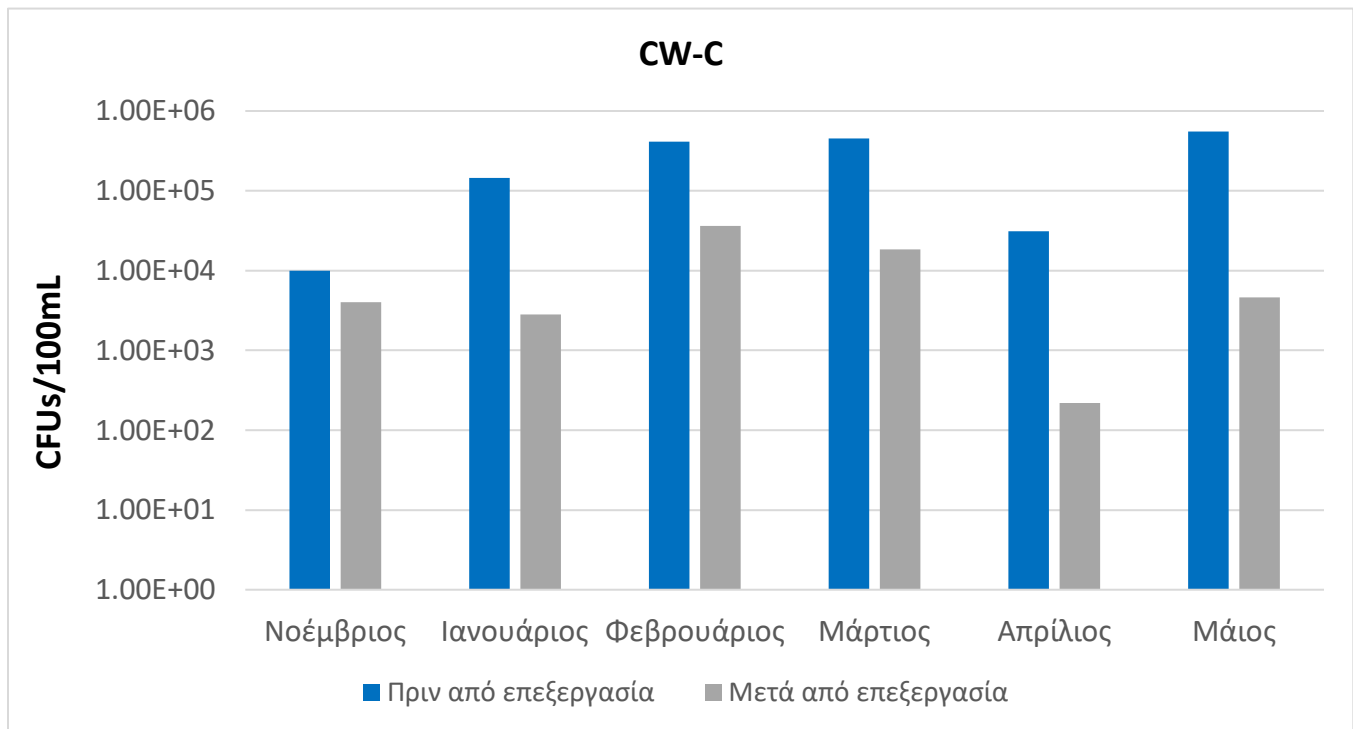
**Εικόνα 15.** Τα τρία στάδια που πραγματοποιούνται κατά τη διάρκεια ενός θερμικού κύκλου στην real-time PCR (Stratech, 2022).

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ

#### 3.1 Απομάκρυνση βακτηρίων μετά από επεξεργασία αστικών λυμάτων στους τεχνητούς υδροβιότοπους

Οι πιλοτικές μονάδες τεχνητών υδροβιότοπων εξετάζονται ως προς την απόδοση τους στην βιολογική επεξεργασία αστικών λυμάτων και απομάκρυνση του μικροβιακού φορτίου. Στις παρακάτω ενότητες παρουσιάζονται αναλυτικά γραφήματα με τις αρχικές συγκεντρώσεις (πριν από την επεξεργασία) και τις τελικές συγκεντρώσεις (μετά από την επεξεργασία) του εκάστοτε εξεταζόμενου παράγοντα.

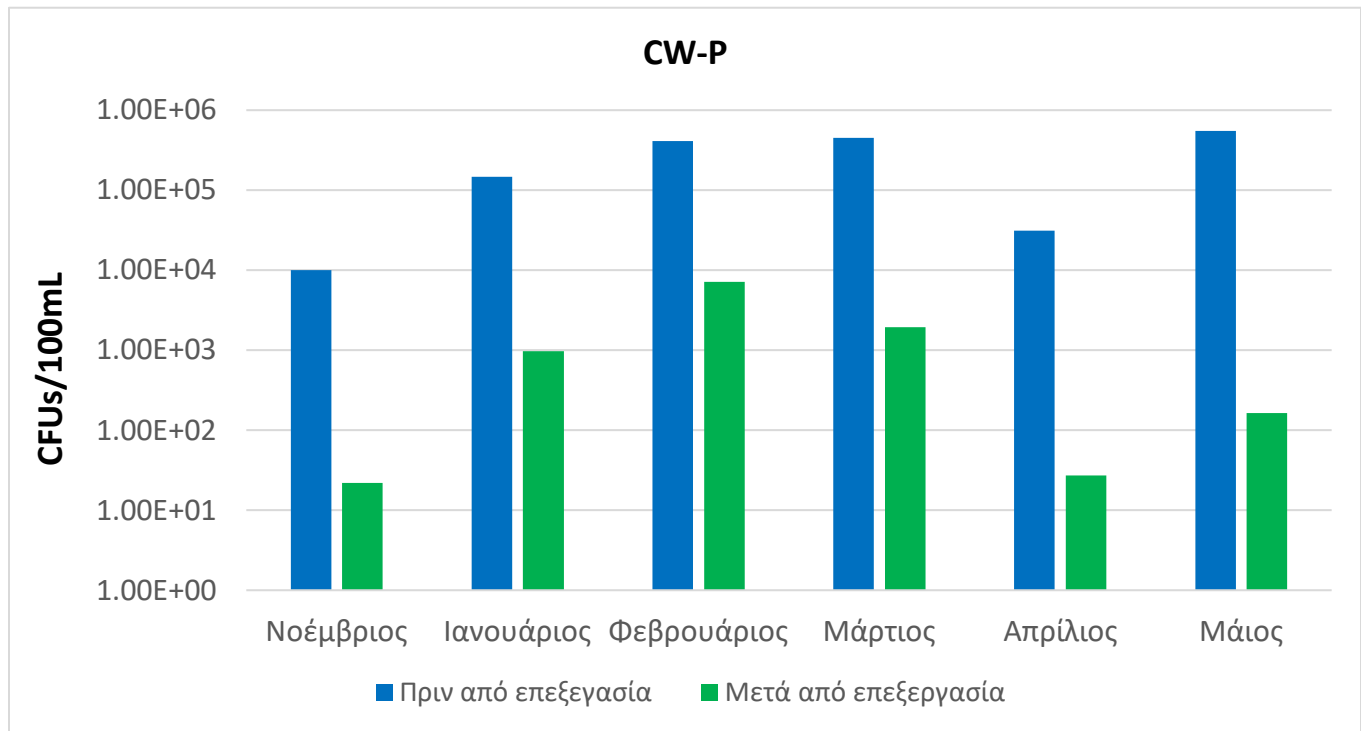
##### *E. coli*



**Γράφημα 1.** Συγκεντρώσεις *E. coli* (CFUs/100mL) στα λύματα, πριν και μετά από επεξεργασία στον τεχνητό υδροβιότοπο CW-C την περίοδο δειγματοληψιών.

Στο παραπάνω γράφημα, οι συγκεντρώσεις *E. coli* παρουσιάζουν μείωση μετά την επεξεργασία και αυτό αφορά σε όλους τους μήνες της περιόδου. Ιδιαίτερα, οι μήνες Απρίλιος, Μάιος και Ιανουάριος έχουν τις μεγαλύτερες απομακρύνσεις του βακτηρίου με 2.15 Logs (99.29%), 2.08 Logs (99.16%) και 1.71 Logs (98.07%), αντίστοιχα. Αξίζει,

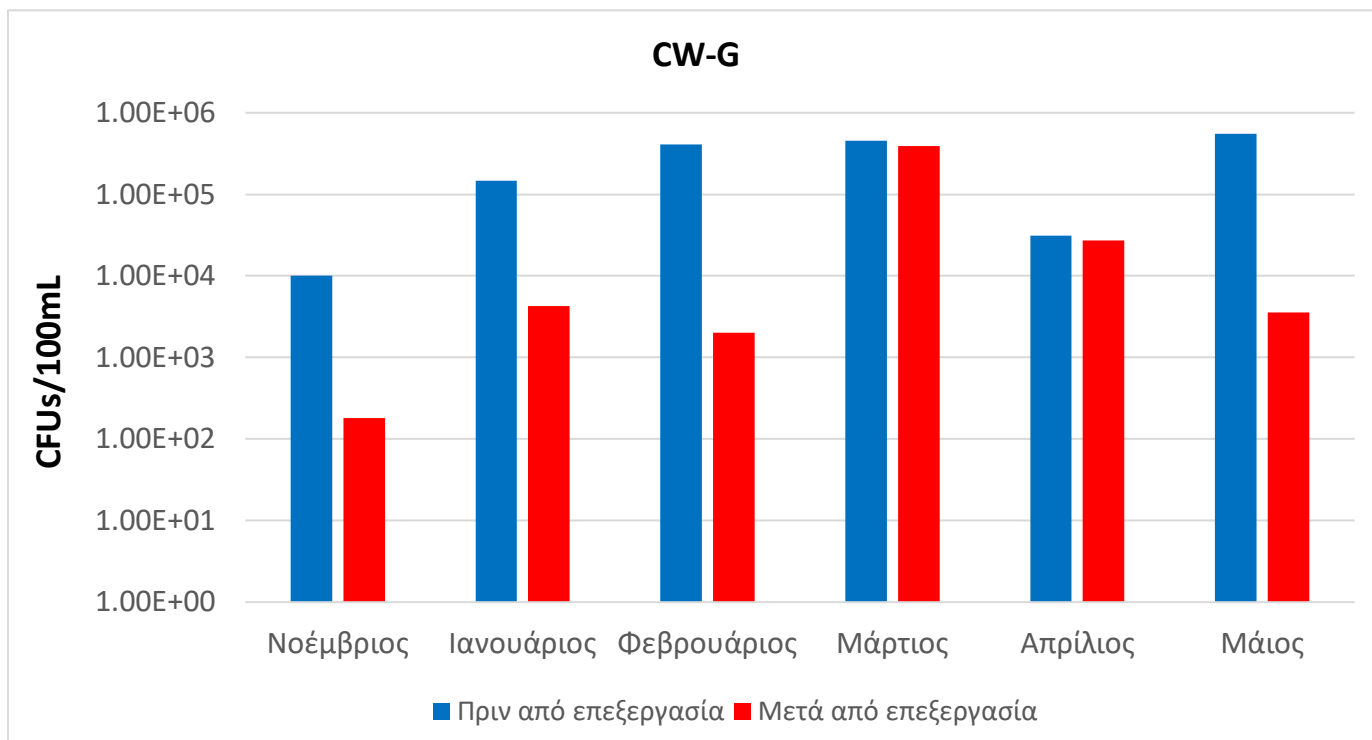
επίσης, να σημειωθεί το γεγονός ότι με την πάροδο των μηνών η συγκέντρωση του βακτηρίου αυξάνεται στα λύματα εισόδου προς επεξεργασία.



**Γράφημα 2.** Συγκεντρώσεις *E. coli* (CFUs/100mL) στα λύματα, πριν και μετά από επεξεργασία στον τεχνητό υγροβιότοπο CW-P την περίοδο δειγματοληψιών.

Στον τεχνητό υγροβιότοπο του γραφήματος 2, επιτυγχάνονται αρκετά καλές απομακρύνσεις *E. coli* καθώς, όπως φαίνεται, οι συγκεντρώσεις του βακτηρίου μετά την επεξεργασία μειώνονται σε μεγάλο βαθμό. Τον Μάιο η απομάκρυνση φτάνει έως 3.52 Logs (99.97%), τον Απρίλιο είναι εξίσου υψηλή με 3.06 Logs (99.91%) και ακολουθεί ο Νοέμβριος με 2.66 Logs (99.78%). Σε γενικές γραμμές, ο τεχνητός υγροβιότοπος CW-P έχει ποσοστά απομάκρυνσης του βακτηρίου ίσα με 99% για σχεδόν όλους τους μήνες.





**Γράφημα 3.** Συγκεντρώσεις *E. coli* (CFUs/100mL) στα λύματα, πριν και μετά από επεξεργασία στον τεχνητό υγροβιότοπο CW-G την περίοδο δειγματοληψιών.

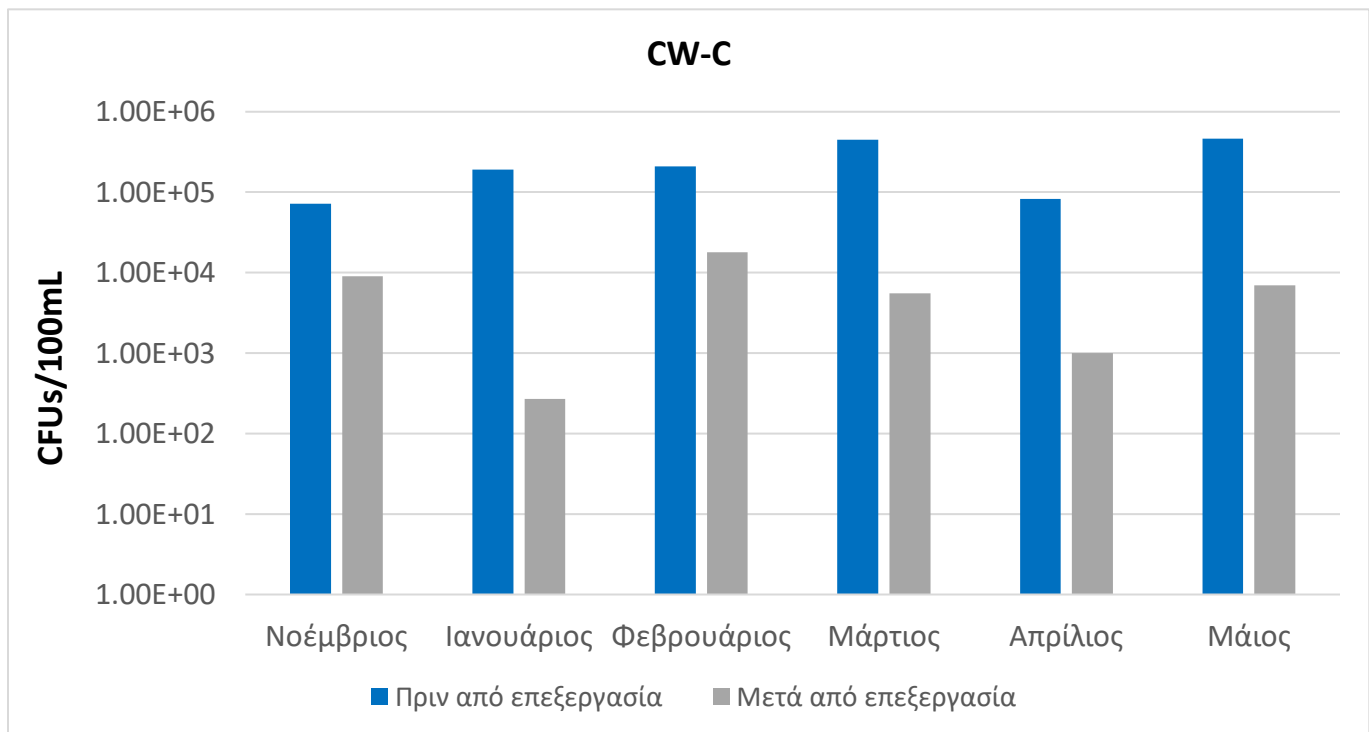
Στο γράφημα 3, τα αποτελέσματα των μετρήσεων για τον τεχνητό υγροβιότοπο CW-G δείχνουν την συγκέντρωση *E. coli* να μειώνεται σε καλό βαθμό, μετά την επεξεργασία των λυμάτων, εκτός από τον Μάρτιο και τον Απρίλιο. Σε αυτούς τους δύο μήνες, η μείωση που παρατηρείται είναι τόσο μικρή που μπορεί να θεωρηθεί και αμελητέα. Αντίθετα, η μέγιστη απομάκρυνση του βακτηρίου εμφανίζεται τον Φεβρουάριο με 2.31 Logs (99.51%). Έπειτα, πολύ καλές απομακρύνσεις έχουν και οι μήνες Μάιος και Νοέμβριος με 2.19 Logs (99.35%) και 1.74 Logs (98.20%) αντίστοιχα.

Συγκεντρωτικά, οι τρεις πιλοτικές μονάδες τεχνητών υγροβιότοπων που εξετάστηκαν ήταν οι CW-C, CW-P, CW-G, ως προς την απομάκρυνση του βακτηρίου *E. coli* μετά από επεξεργασία αστικών λυμάτων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα γίνεται κατάταξη των τεχνητών υγροβιότοπων ως προς την απόδοσή τους. Στην πρώτη θέση βρίσκεται ο τεχνητός υγροβιότοπος CW-P, με μέσο όρο απομάκρυνσης 2.59 Logs (99.47%). Έπειτα, την δεύτερη θέση κατέχει ο τεχνητός υγροβιότοπος CW-C με μέσο όρο απομάκρυνσης 1.46 Logs (90.52%) και στην τελευταία θέση βρίσκεται ο CW-G με μέσο όρο απομάκρυνσης 1.32 Logs (70.12%).

Κοινό χαρακτηριστικό των τεχνητών υγροβιότοπων που βρίσκονται στην πρώτη και δεύτερη θέση, είναι το πολυαιθυλένιο υψηλής πυκνότητας HDPE, το οποίο έχει μεγαλύτερο πορώδες από το χαλίκι που περιέχει ο υγροβιότοπος της τελευταίας θέσης,

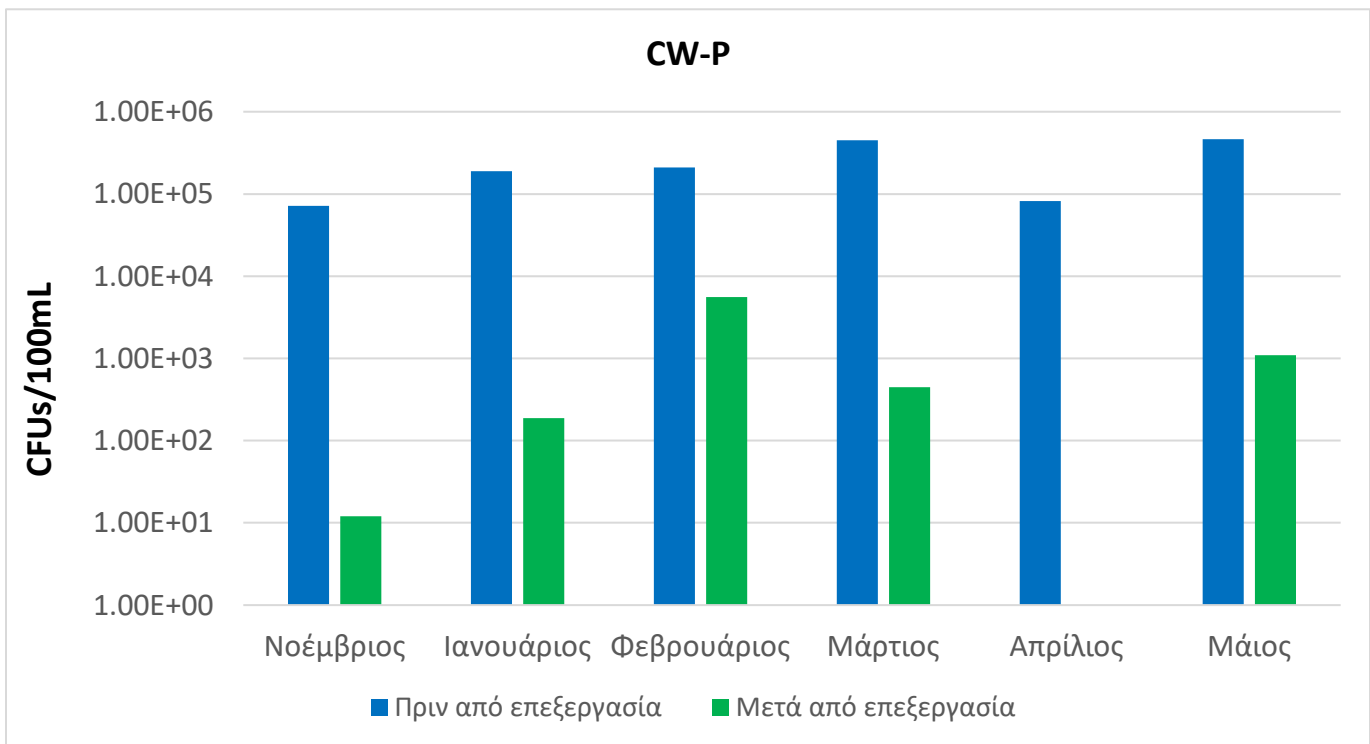
CW-G. Το χαρακτηριστικό που κάνει την διαφορά όμως, και σε συνδυασμό με το πολυαιθυλένιο υψηλής πυκνότητας HDPE, δίνει την πρωτιά στον τεχνητό υγροβιότοπο CW-P, είναι η βλάστηση καλαμιών *P. australis*. Αυτό επιβεβαιώνεται από την έρευνα των Hensch et al. (2003), που αναφέρεται ότι τα κοπρανώδη κολοβακτηριοειδή, όπως *E. coli* στην περίπτωση μας, παρουσιάζουν μεγαλύτερη απομάκρυνση σε τεχνητούς υγροβιότοπους με βλάστηση, μέχρι και 3.7 Logs, σε σχέση με συστήματα χωρίς καθόλου βλάστηση. Επιπλέον, τόσο η ύπαρξη φυτών σε τεχνητούς υγροβιότοπους, όσο και ο τύπος ροής, φαίνεται να είναι παράγοντες που συνδέονται με την μεγαλύτερη απομάκρυνση *E. coli*. Αυτό υποστηρίζεται και από την έρευνα των García et al. (2013), στην οποία η απομάκρυνση *E. coli* σε τεχνητό υγροβιότοπο κάθετης ροής με βλάστηση φτάνει τα 2 Logs. Στον αντίποδα βρίσκεται η έρευνα των Headley et al. (2013), στην οποία καλύτερες αποδόσεις στην απομάκρυνση *E. coli* έδωσαν οι τεχνητοί υγροβιότοποι οριζόντιας ροής με συνθήκες αερισμού, η επίδραση της βλάστησης ήταν ουδέτερη, και το χαλίκι ήταν το λιγότερο ευνοϊκό πληρωτικό υλικό. Ακόμα, αξίζει να σημειωθεί ότι, ανεξαρτήτως τύπου τεχνητού υγροβιότοπου, όταν ο χρόνος παραμονής είναι 1-2 d, η μείωση των βακτηριακών δεικτών στα λύματα φτάνει μέχρι και 99% (Quiñónez-Díaz et al., 2001).

#### **Enterococcus sp.**



**Γράφημα 4.** Συγκεντρώσεις *Enterococcus* sp. (CFUs/100mL) στα λύματα, πριν και μετά από επεξεργασία στον τεχνητό υγροβιότοπο CW-C την περίοδο δειγματοληψιών.

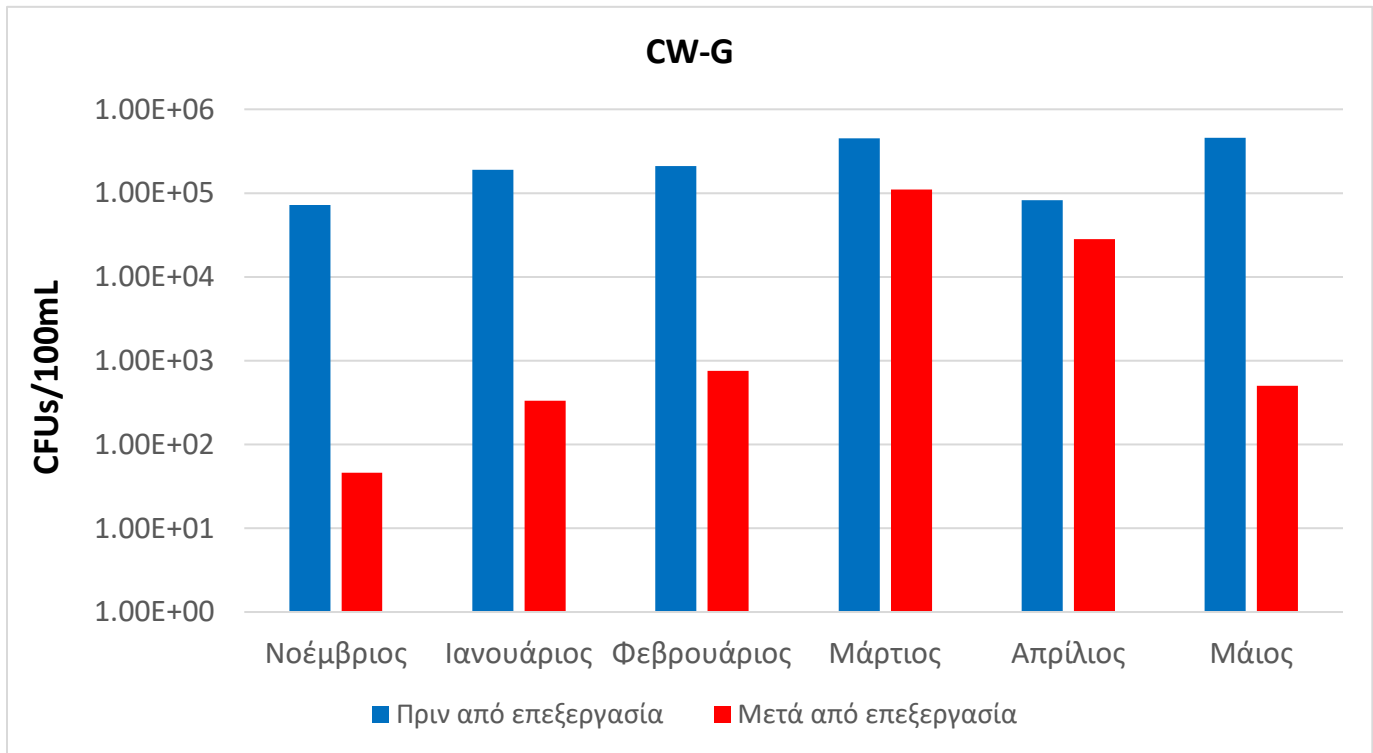
Όπως φαίνεται στο γράφημα 4, οι συγκεντρώσεις των εντερόκοκκων μειώνονται μετά την επεξεργασία των λυμάτων στο τεχνητό υγροβιότοπο με πολυαιθυλένιο υψηλής πυκνότητας. Οι μήνες στους οποίους παρατηρούνται οι μεγαλύτερες απομακρύνσεις των βακτηρίων είναι ο Ιανουάριος με 2.85 Logs (99.86%), την επόμενη θέση μοιράζονται ο Μάρτιος και ο Απρίλιος με 1.91 Logs (98.78%), και τέλος ο Μάιος με 1.82 Logs (98.48%). Επίσης, σημειώνεται πως οι συγκεντρώσεις των βακτηρίων αυτών στα ανεπεξέργαστα λύματα ακολουθούν ανοδική πορεία όσο πλησιάζουμε το τέλος της εξεταζόμενης περιόδου.



**Γράφημα 5.** Συγκεντρώσεις *Enterococcus* sp. (CFUs/100mL) στα λύματα, πριν και μετά από επεξεργασία στον τεχνητό υγροβιότοπο CW-P την περίοδο δειγματοληψιών.

Στο γράφημα 5, ο τεχνητός υγροβιότοπος CW-P λειτουργεί πολύ αποτελεσματικά στην μείωση της συγκέντρωσης των εντερόκοκκων μετά την επεξεργασία. Αυτό φαίνεται ξεκάθαρα από τον πρώτο κιόλας μήνα της περιόδου, στον οποίο έχουμε την μεγαλύτερη απομάκρυνση, ίση με 3.78 Logs (99.98%). Συνεχίζοντας, εξίσου καλές απομακρύνσεις βλέπουμε τον Ιανουάριο με 3.01 Logs (99.90%) και τον Μάρτιο με 3.00 Logs (99.90%). Είναι ανάγκη να αναφερθεί ότι τον Απρίλιο έχουμε απομάκρυνση 100%. Αν και κάτι τέτοιο δεν αποκλείεται να συμβεί, πρέπει να ληφθεί υπόψιν και η πιθανότητα της μεσολάβησης κάποιου σφάλματος πειραματικού ή ανθρώπινου, κατά την διαδικασία. Σημειώνεται ότι η

διαδικασία της απομόνωσης και ποσοτικοποίησης των εντερόκοκκων από το επεξεργασμένο λύμα, επαναλήφθηκε δίνοντας το ίδιο αποτέλεσμα.



**Γράφημα 6.** Συγκεντρώσεις *Enterococcus* sp. (CFUs/100mL) στα λύματα, πριν και μετά από επεξεργασία στον τεχνητό υγροβιότοπο CW-G την περίοδο δειγματοληψιών.

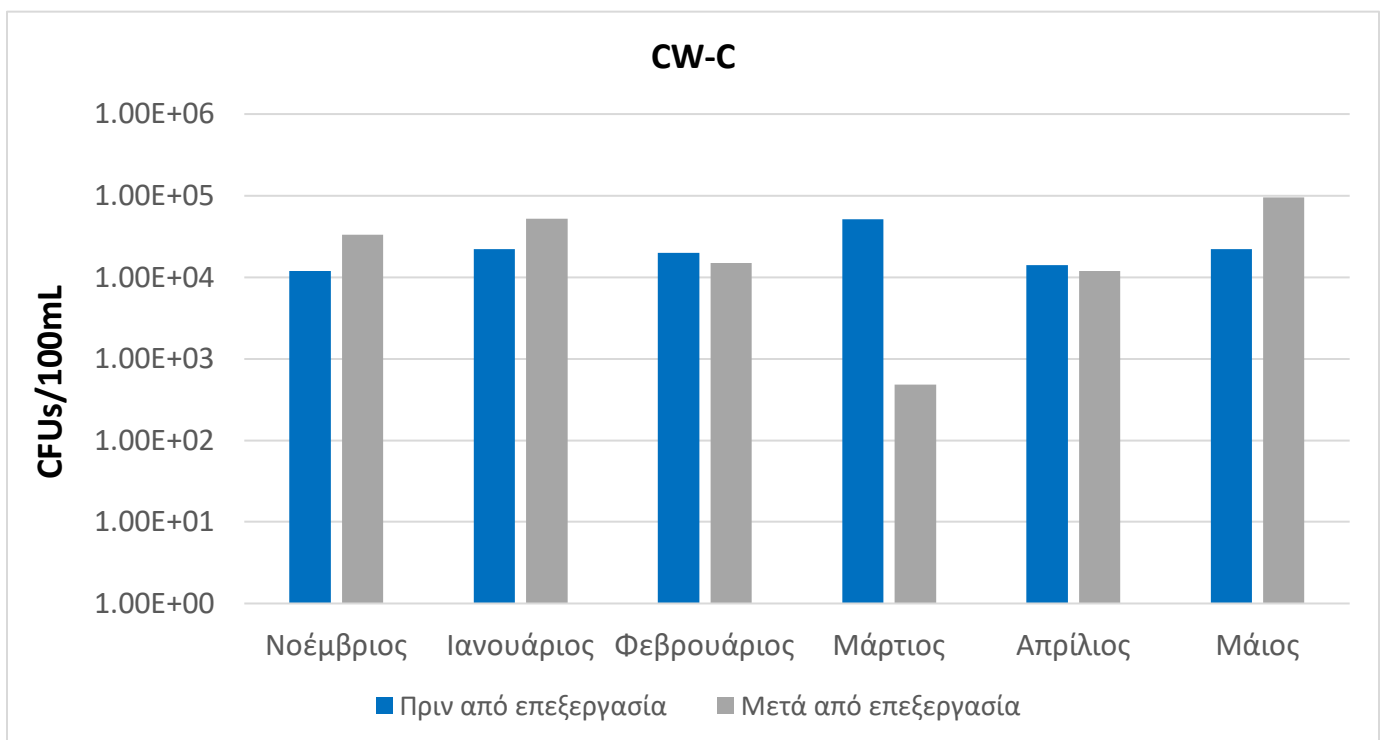
Ο τεχνητός υγροβιότοπος του παραπάνω γραφήματος απομακρύνει σε ικανοποιητικό βαθμό τους εντερόκοκκους από τα λύματα με εξαίρεση τους μήνες Μάρτιο και Απρίλιο, όπου η συκέντρωση των βακτηρίων αυτών μειώνεται ελάχιστα. Παρά ταύτα, η απομάκρυνση τον Νοέμβριο φτάνει ως 3.19 Logs (99.94%), τον Μάιο ως 2.96 Logs (99.89%) και τον Ιανουάριο ως 2.76 Logs (99.82%). Επομένως, αυτός ο τεχνητός υγροβιότοπος είναι αρκετά αποδοτικός αλλά όχι όσο ο CW-P, ο οποίος περιέχει επίσης βλάστηση αλλά αντί για χαλίκι έχει HDPE.

Αν δούμε την συνολική εικόνα, οι τρεις πιλοτικές μονάδες τεχνητών υγροβιότοπων που εξετάστηκαν ήταν οι CW-C, CW-P, CW-G, ως προς την απομάκρυνση των βακτηρίων *Enterococcus* sp. μετά από επεξεργασία αστικών λυμάτων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα προκύπτει εύκολα το συμπέρασμα ότι ο τεχνητός υγροβιότοπος CW-P με πληρωτικό υλικό HDPE και βλάστηση καλαμιών είναι ο αποδοτικότερος, με μέσο όρο

απομάκρυνσης 99.37%. Επίσης, πολύ καλές απομακρύνσεις είχαν και οι άλλοι δύο τεχνητοί υδροβιότοποι CW-C και CW-G, με μέσο όρο απομάκρυνσης 95.80% και 90.14% αντίστοιχα.

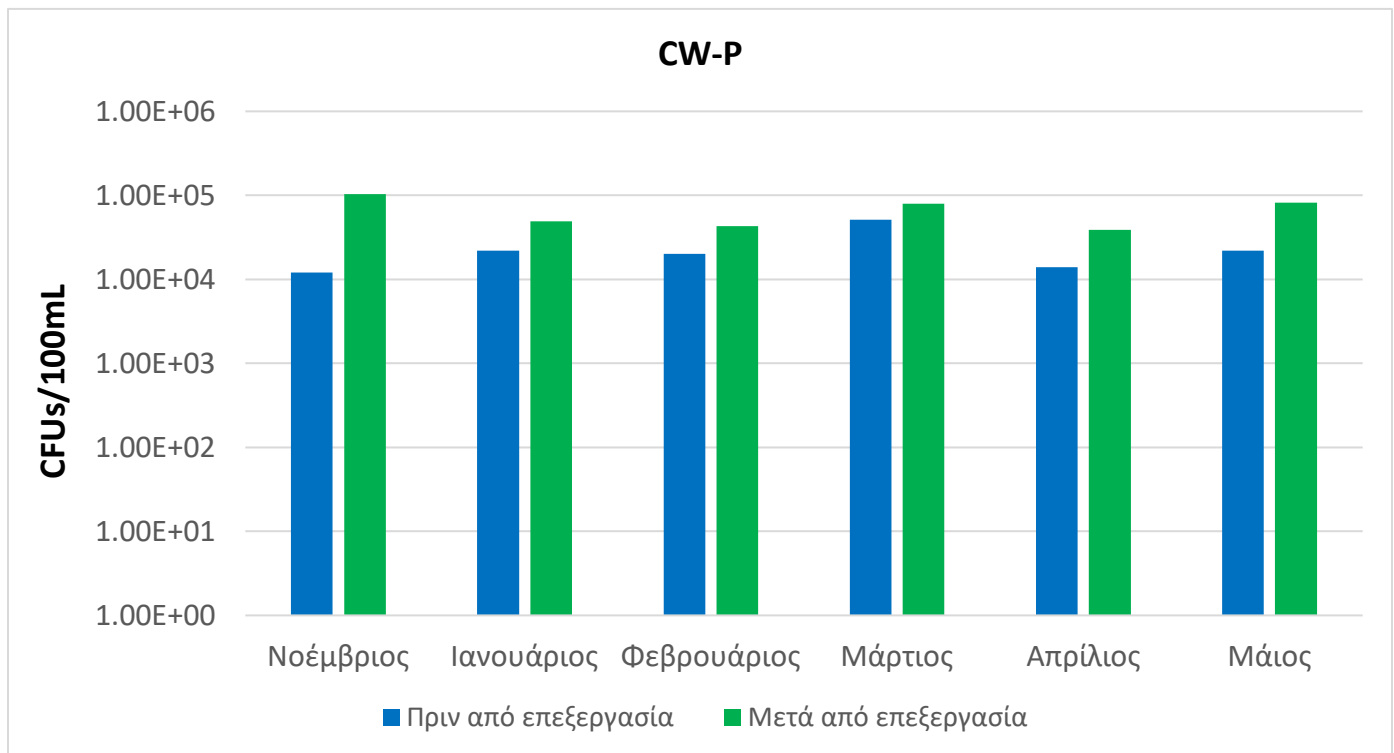
Γενικά διαπιστώνεται ότι οι εντερόκοκκοι μειώνονται σε ποσοστό άνω του 90%, γεγονός που συμβαδίζει με την έρευνα του Vymazal (2005), στην οποία οι κοπρανώδεις στρεπτόκοκκοι μειώνονται σε ποσοστά 80-95% σε τεχνητούς υδροβιότοπους με αναδυόμενη βλάστηση. Επίσης, σε τεχνητούς υδροβιότοπους και σε λύματα ζωικής προέλευσης, η απομάκρυνση δεικτών κοπρανώδους μόλυνσης και συγκεκριμένα εντερόκοκκων υπολογίζεται >95% (Bôto et al., 2023). Στην έρευνα των Stefanakis et al. (2019) σε πιλοτική μονάδα τεχνητού υδροβιότοπου κάθετης ροής με αερισμό που λειτουργούσε σαν τριτοβάθμια επεξεργασία αστικών λυμάτων, οι βακτηριακοί δείκτες απομακρύνθηκαν έως και 3.7 Logs. Στην ίδια έρευνα βρέθηκαν ακόμη και συσχετίσεις μεταξύ της ύπαρξης βακτηριοφάγων ιών στα λύματα και της μείωσης των βακτηριακών δεικτών. Επιπλέον, σε άλλη μελέτη με τεχνητούς υδροβιότοπους που δέχονταν γεωργικές απορροές βρέθηκε ότι απομακρυνόταν το 88-97% της συγκέντρωσης των εντερόκοκκων, με τον υδραυλικό χρόνο παραμονής να παίζει καθοριστικό ρόλο. Συγκεκριμένα, σε υδραυλικό χρόνο παραμονής μίας ημέρας, επιτυγχάνεται μέχρι και 70% μείωση της συγκέντρωσης των δεικτών (Díaz et al., 2010). Συνεπώς, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης επιβεβαιώνονται από το σύνολο των ερευνών που αναφέρθηκαν.

### **S. aureus**



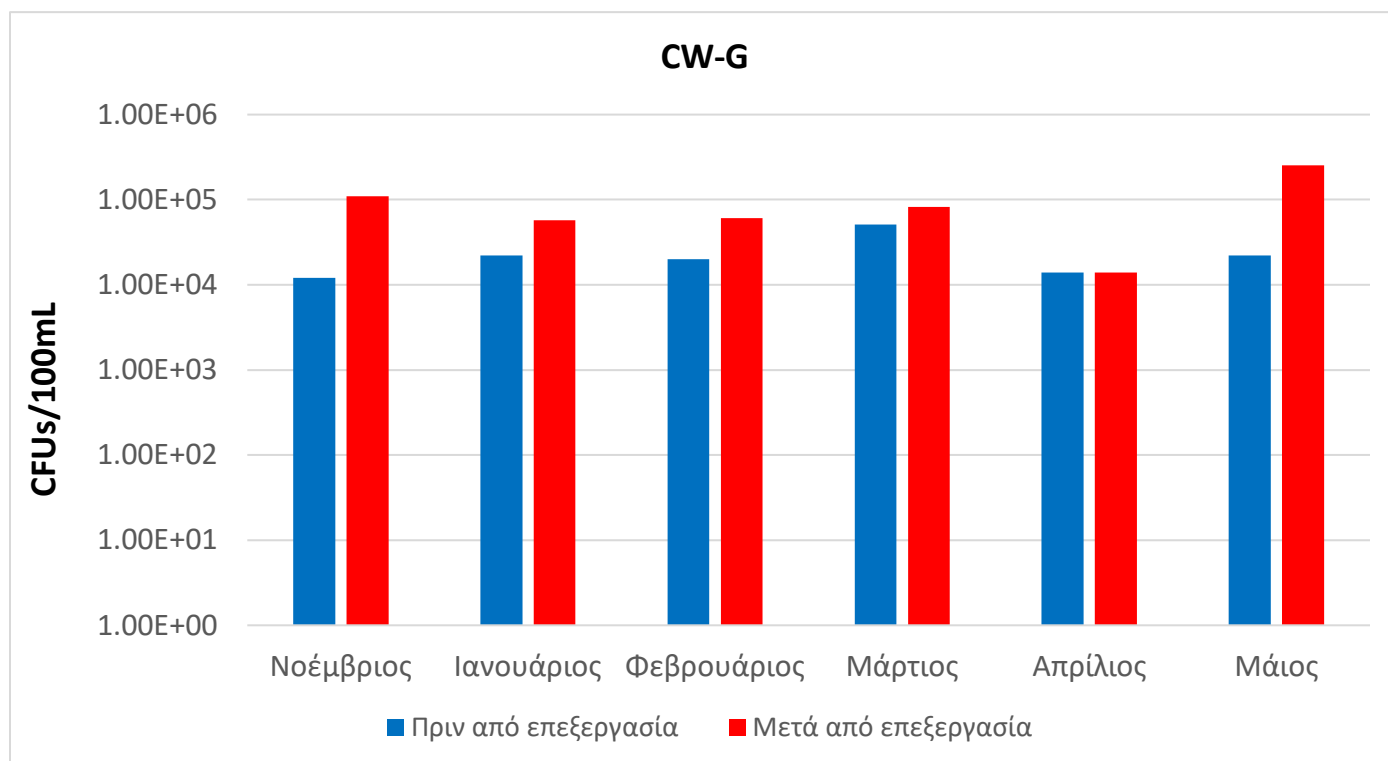
**Γράφημα 7.** Συγκεντρώσεις *S. aureus* (CFUs/100mL) στα λύματα, πριν και μετά από επεξεργασία στον τεχνητό υγροβιότοπο CW-C την περίοδο δειγματοληψιών.

Στο παραπάνω γράφημα, φαίνεται ότι ο τεχνητός υγροβιότοπος αδυνατεί να μειώσει τη συγκέντρωση *S. aureus* μετά την επεξεργασία, σε τρεις από τους έξι μήνες. Συγκεκριμένα, παρατηρείται αύξηση τον Νοέμβριο, τον Ιανουάριο και τον Μάιο. Αντίθετα, πολύ καλή απομάκρυνση των βακτηρίων έχουμε τον Μάρτιο με 2.03 Logs (99.06%). Για τον Φεβρουάριο και τον Απρίλιο, οι απομακρύνσεις είναι αρκετά μικρές με 0.12 Logs (25.00%) και 0.07 Logs (14.29%) αντίστοιχα.



**Γράφημα 8.** Συγκεντρώσεις *S. aureus* (CFUs/100mL) στα λύματα, πριν και μετά από επεξεργασία στον τεχνητό υγροβιότοπο CW-P την περίοδο δειγματοληψιών.

Οι αρνητικές απομακρύνσεις *S. aureus* συνεχίζονται και στον τεχνητό υγροβιότοπο CW-P, του γραφήματος 8. Σε αυτή την περίπτωση όμως, ο τεχνητός υγροβιότοπος κρίνεται εντελώς μη-αποδοτικός, καθώς οι συγκεντρώσεις των βακτηρίων στα λύματα μετά την επεξεργασία αυξάνονται σε όλους τους μήνες της περιόδου.



**Γράφημα 9.** Συγκεντρώσεις *S. aureus* (CFUs/100mL) στα λύματα, πριν και μετά από επεξεργασία στον τεχνητό υγροβιότοπο CW-G την περίοδο δειγματοληψιών.

Τα αποτελέσματα στο γράφημα 9 μας επιβεβαιώνουν ότι και ο υγροβιότοπος CW-G δεν μπορεί να απομακρύνει το βακτήριο *S. aureus* από τα λύματα. Όπως φαίνεται, οι συγκεντρώσεις του βακτηρίου αυξάνονται μετά την επεξεργασία σε κάθε μήνα της περιόδου εκτός του Απριλίου, που παραμένουν σταθερές και ίσες με τις αρχικές.

Από όλα τα παραπάνω γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι οι τρεις πιλοτικές μονάδες τεχνητών υγροβιότοπων CW-C, CW-P, CW-G, που εξετάστηκαν ως προς την απομάκρυνση του βακτηρίου *S. aureus* από τα λύματα, δεν ήταν αποτελεσματικές. Η μοναδική περίπτωση που παρατηρήθηκε μείωση της συγκέντρωσης των βακτηρίων αυτών μετά την επεξεργασία, ήταν στην μονάδα CW-C, όπου έφτασε τα 2.03 Logs (99.06%).

Σε παρόμοια έρευνα, μελετήθηκε μεταξύ άλλων η απομάκρυνση του βακτηρίου *S. aureus* κατά την επεξεργασία λυμάτων σε τεχνητούς υγροβιότοπους. Αποδείχθηκε και εκεί ότι οι τεχνητοί υγροβιότοποι δεν ήταν αποτελεσματικοί στην μείωση της συγκέντρωσης του βακτηρίου, με τις αρνητικές απομακρύνσεις να κυριαρχούν έναντι των θετικών (Aretaki, 2022). Στην έρευνα των Wu et al. (2016), υποστηρίζεται ότι ένα σύστημα με πολλούς τεχνητούς υγροβιότοπους είναι ιδανικότερο αντί μία ενιαίας μονάδας, σε περιπτώσεις που

η απομάκρυνση βακτηριακών δεικτών στα λύματα δεν είναι αρκετή ώστε να τηρούνται τα νομοθετικά όρια. Βέβαια, πρέπει να σημειωθεί ότι η έλλειψη βιβλιογραφικών αναφορών, σχετικών με την απομάκρυνση σταφυλοκόκκων από λύματα, των οποίων η επεξεργασία γίνεται σε τεχνητούς υγροβιότοπους, περιορίζει το πεδίο σύγκρισης των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης.

Λαμβάνοντας υπόψιν όσα αναφέρθηκαν, μπορούμε να κατατάξουμε τους βακτηριακούς παράγοντες που μελετήθηκαν, ανάλογα με την μέση απομάκρυνση τους σε κάθε τεχνητό υγροβιότοπο (Πίνακες 8, 9, 10), ως εξής:

CW-C: *Enterococcus* sp. > *E. coli* > *S. aureus*

CW-P: *Enterococcus* sp. > *E. coli* > *S. aureus*

CW-G: *Enterococcus* sp. > *E. coli* > *S. aureus*

Σε όλους τους τεχνητούς υγροβιότοπους, μεγαλύτερη μέση απομάκρυνση είχαν τα βακτήρια εντερικής προέλευσης, δηλαδή, οι εντερόκοκκοι ακολουθούμενοι από *E. coli*. Οι σταφυλόκοκκοι σε πολύ λίγες περιπτώσεις μειώθηκαν μετά την επεξεργασία των λυμάτων και εκεί η μείωση τους ήταν πολύ μικρή. Κατά την έρευνα των Díaz et al. (2010), παρατηρήθηκε και εκεί μεγαλύτερη απομάκρυνση των εντερόκοκκων έναντι των *E. coli*. Παράλληλα, στην έρευνα τους οι Wu et al. (2016), αναφέρουν ότι κατά την διαδικασία της μηχανικής φίλτρανσης εντός των τεχνητών υγροβιότοπων, τα κολοβακτηρίδια και οι κοπρανώδεις στρεπτόκοκκοι παρουσίασαν καλύτερες απομακρύνσεις λόγω της μεγαλύτερης ταχύτητας καθίζησης τους.

Με βάση τη δομή του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων και την αντίδραση τους στη χρώση Gram, τα βακτήρια ομαδοποιούνται σε θετικά και αρνητικά κατά Gram. Ωστόσο, δεν είναι εύκολο να κατανοηθεί η συσχέτιση μεταξύ θετικών και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων και απομάκρυνσής τους κατά την επεξεργασία του λύματος. Στην παρούσα μελέτη οι εντερόκοκκοι και οι σταφυλόκοκκοι, ενώ είναι και οι δύο Gram (+), παρουσίασαν διαφορετική συμπεριφορά με τους πρώτους να μειώνονται σημαντικά και τους δεύτερους να αυξάνονται μετά την επεξεργασία.

Όσον αφορά στα πληρωτικά υλικά, ο συνδυασμός πολυαιθυλενίου υψηλής πυκνότητας και βλάστησης καλαμιών του τεχνητού υγροβιότοπου CW-P, τον καθιστά ως τον πιο αποδοτικό, καθώς εκεί παρατηρήθηκαν πολύ υψηλές τιμές απομάκρυνσης. Οι βιβλιογραφικές αναφορές για το πολυαιθυλένιο υψηλής πυκνότητας είναι περιορισμένες, όμως διαπιστώνεται ότι το μεγάλο πορώδες που κατέχει συνεισφέρει στην απομάκρυνση και είναι αποτελεσματικότερο από το χαλίκι που έχει μικρότερο πορώδες. Επίσης, ο ρόλος της βλάστησης και ιδιαίτερα των καλαμιών έδειξε να λειτουργεί υπέρ της απομάκρυνσης, κάτι που επιβεβαιώνεται από πολλές έρευνες αλλά και από τους García et al. (2020), για ανθεκτικά βακτήρια.

Αξίζει να γίνει αναφορά και στην έρευνα των Hdidou et al. (2021), κατά την οποία μεγαλύτερη απομάκρυνση βακτηριακών δεικτών σημειώθηκε σε θερμότερες περιόδους έναντι ψυχρότερων. Εν μέρει, αυτό επιβεβαιώνεται και στην παρούσα έρευνα, όπου οι απομακρύνσεις βακτηρίων ήταν υψηλότερες στην αρχή και στο τέλος της εξεταζόμενης περιόδου.



Γενικά, οι μηχανισμοί με τους οποίους μπορούν να απομακρυνθούν οι παθογόνοι μικροοργανισμοί εντός τεχνητών υδροβιότοπων είναι φυσικοί, χημικοί και βιολογικοί. Στους χημικούς μηχανισμούς ανήκουν διεργασίες όπως η καθίζηση και η διήθηση. Χημικοί μηχανισμοί είναι διεργασίες όπως η οξειδωση, η υπεριώδης ηλιακή ακτινοβολία και η προσρόφηση σε οργανική ύλη. Όσο για τους βιολογικούς μηχανισμούς, ορισμένοι από αυτούς είναι ο ανταγωνισμός για τροφή μεταξύ μικροοργανισμών, η έκθεση στις εκκρίσεις των ριζών των φυτών, η συγκράτηση σε βιοφίλμ και ο φυσικός θάνατος (Stefanakis & Akratos, 2016).

**Πίνακας 8.** Συγκεντρώσεις *E. coli* στις εισροές και εκροές των μονάδων με τις αντίστοιχες τιμές απομάκρυνσης.

CW-C							
	Νοέμβριος	Ιανουάριος	Φεβρουάριος	Μάρτιος	Απρίλιος	Μάιος	
Είσοδος (CFUs/100mL)	1.00E+04	1.46E+05	4.10E+05	4.52E+05	3.10E+04	5.50E+05	
Έξοδος (CFUs/100mL)	4.04E+03	2.82E+03	3.65E+04	1.84E+04	2.20E+02	4.62E+03	
Απομάκρυνση (Logs)	0.39	1.71	1.05	1.39	2.15	2.08	M.O. = 1.46
Απομάκρυνση (%)	59.60	98.07	91.10	95.93	99.29	99.16	M.O. = 90.52
CW-P							
	Νοέμβριος	Ιανουάριος	Φεβρουάριος	Μάρτιος	Απρίλιος	Μάιος	
Είσοδος (CFUs/100mL)	1.00E+04	1.46E+05	4.10E+05	4.52E+05	3.10E+04	5.50E+05	
Έξοδος (CFUs/100mL)	2.20E+01	9.70E+02	7.20E+03	1.95E+03	2.70E+01	1.65E+02	
Απομάκρυνση (Logs)	2.66	2.18	1.76	2.37	3.06	3.52	M.O. = 2.59
Απομάκρυνση (%)	99.78	99.34	98.24	99.57	99.91	99.97	M.O. = 99.47
CW-G							
	Νοέμβριος	Ιανουάριος	Φεβρουάριος	Μάρτιος	Απρίλιος	Μάιος	
Είσοδος (CFUs/100mL)	1.00E+04	1.46E+05	4.10E+05	4.52E+05	3.10E+04	5.50E+05	
Έξοδος (CFUs/100mL)	1.80E+02	4.30E+03	2.02E+03	3.90E+05	2.70E+04	3.57E+03	
Απομάκρυνση (Logs)	1.74	1.53	2.31	0.06	0.06	2.19	M.O. = 1.32
Απομάκρυνση (%)	98.20	97.05	99.51	13.72	12.90	99.35	M.O. = 70.12

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

CW-C							
	Νοέμβριος	Ιανουάριος	Φεβρουάριος	Μάρτιος	Απρίλιος	Μάιος	
Είσοδος (CFUs/100mL)	7.20E+04	1.90E+05	2.10E+05	4.52E+05	8.20E+04	4.60E+05	
Έξοδος (CFUs/100mL)	9.00E+03	2.71E+02	1.80E+04	5.50E+03	1.00E+03	7.00E+03	
Απομάκρυνση (Logs)	0.90	2.85	1.07	1.91	1.91	1.82	M.O. = 1.74
Απομάκρυνση (%)	87.50	99.86	91.43	98.78	98.78	98.48	M.O. = 95.80
CW-P							
	Νοέμβριος	Ιανουάριος	Φεβρουάριος	Μάρτιος	Απρίλιος	Μάιος	
Είσοδος (CFUs/100mL)	7.20E+04	1.90E+05	2.10E+05	4.52E+05	8.20E+04	4.60E+05	
Έξοδος (CFUs/100mL)	1.20E+01	1.87E+02	5.60E+03	4.50E+02	0.00E+00	1.10E+03	
Απομάκρυνση (Logs)	3.78	3.01	1.57	3.00	-	2.62	M.O. = 2.80
Απομάκρυνση (%)	99.98	99.90	97.33	99.90	100.00	99.76	M.O. = 99.37
CW-G							
	Νοέμβριος	Ιανουάριος	Φεβρουάριος	Μάρτιος	Απρίλιος	Μάιος	
Είσοδος (CFUs/100mL)	7.20E+04	1.90E+05	2.10E+05	4.52E+05	8.20E+04	4.60E+05	
Έξοδος (CFUs/100mL)	4.60E+01	3.33E+02	7.50E+02	1.10E+05	2.80E+04	5.00E+02	
Απομάκρυνση (Logs)	3.19	2.76	2.45	0.61	0.47	2.96	M.O. = 2.07
Απομάκρυνση (%)	99.94	99.82	99.64	75.66	65.85	99.89	M.O. = 90.14

**Πίνακας 10.** Συγκεντρώσεις *S. aureus* στις εισροές και εκροές των μονάδων με τις αντίστοιχες τιμές απομάκρυνσης.

CW-C							
	Νοέμβριος	Ιανουάριος	Φεβρουάριος	Μάρτιος	Απρίλιος	Μάιος	
Είσοδος (CFUs/100mL)	1.20E+04	2.20E+04	2.00E+04	5.10E+04	1.40E+04	2.20E+04	
Έξοδος (CFUs/100mL)	3.30E+04	5.20E+04	1.50E+04	4.80E+02	1.20E+04	9.50E+04	
Απομάκρυνση (Logs)	-0.44	-0.37	0.12	2.03	0.07	-0.64	M.O. = 0.13
Απομάκρυνση (%)	-175.00	-136.36	25.00	99.06	14.29	-331.82	M.O. = -84.14
CW-P							
	Νοέμβριος	Ιανουάριος	Φεβρουάριος	Μάρτιος	Απρίλιος	Μάιος	
Είσοδος (CFUs/100mL)	1.20E+04	2.20E+04	2.00E+04	5.10E+04	1.40E+04	2.20E+04	
Έξοδος (CFUs/100mL)	1.03E+05	4.90E+04	4.30E+04	7.90E+04	3.90E+04	8.20E+04	
Απομάκρυνση (Logs)	-0.93	-0.35	-0.33	-0.19	-0.44	-0.57	M.O. = -0.47
Απομάκρυνση (%)	-758.33	-122.73	-115.00	-54.90	-178.57	-272.73	M.O. = -250.38
CW-G							
	Νοέμβριος	Ιανουάριος	Φεβρουάριος	Μάρτιος	Απρίλιος	Μάιος	
Είσοδος (CFUs/100mL)	1.20E+04	2.20E+04	2.00E+04	5.10E+04	1.40E+04	2.20E+04	
Έξοδος (CFUs/100mL)	1.10E+05	5.70E+04	6.10E+04	8.20E+04	1.40E+04	2.55E+05	
Απομάκρυνση (Logs)	-0.96	-0.41	-0.48	-0.21	0.00	-1.06	M.O. = -0.52
Απομάκρυνση (%)	-816.67	-159.09	-205.00	-60.78	0.00	-1059.09	M.O. = -383.44

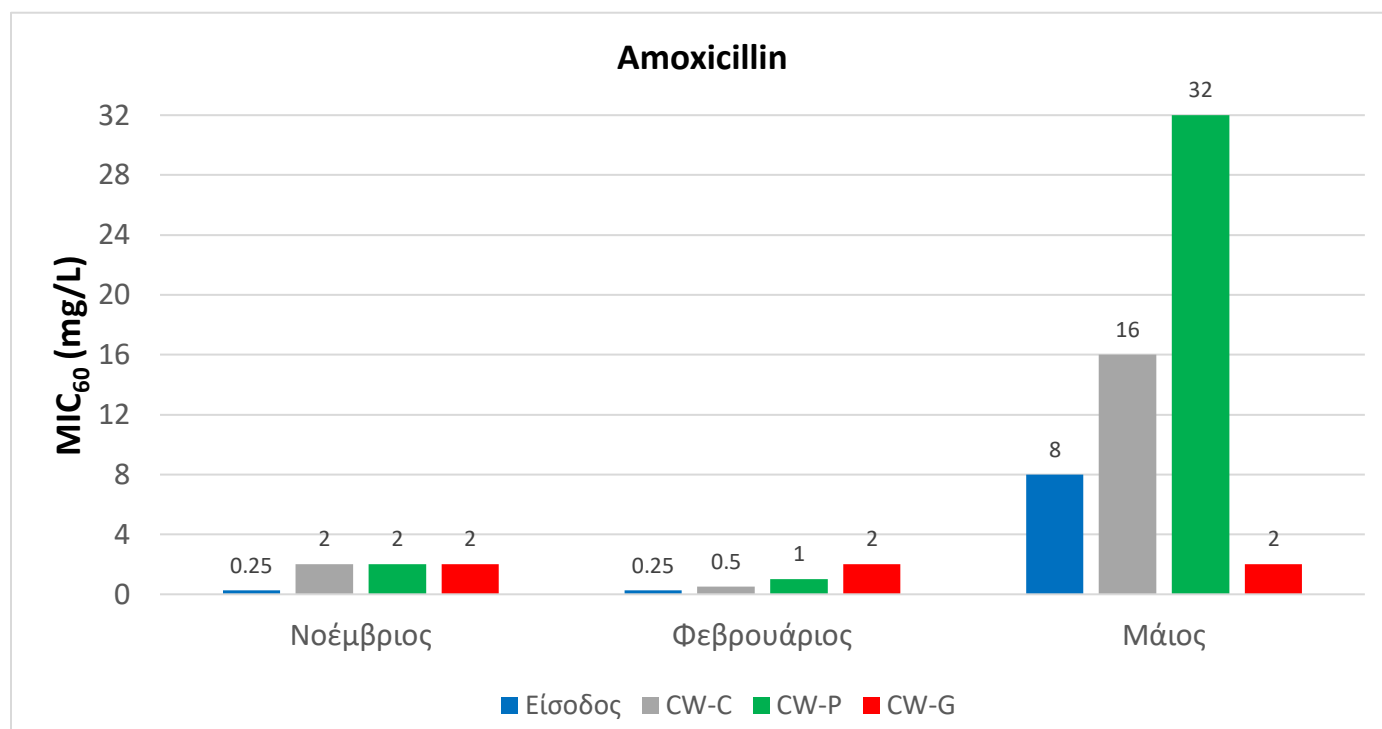
### 3.2 Έλεγχος ανθεκτικότητας βακτηρίων σε αντιβιοτικά με τη μέθοδο ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης

Για τον έλεγχο της ανθεκτικότητας των βακτηρίων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC). Ακολουθώντας τα πρότυπα του EUCAST, ως ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση ορίζεται η χαμηλότερη συγκέντρωση ενός αντιβακτηριακού παράγοντα που επιτυγχάνει 60% μείωση του βακτηριακού πληθυσμού (MIC<sub>60</sub>).

#### 3.2.1 Μεταβολή του προφίλ ανθεκτικότητας μετά την επεξεργασία

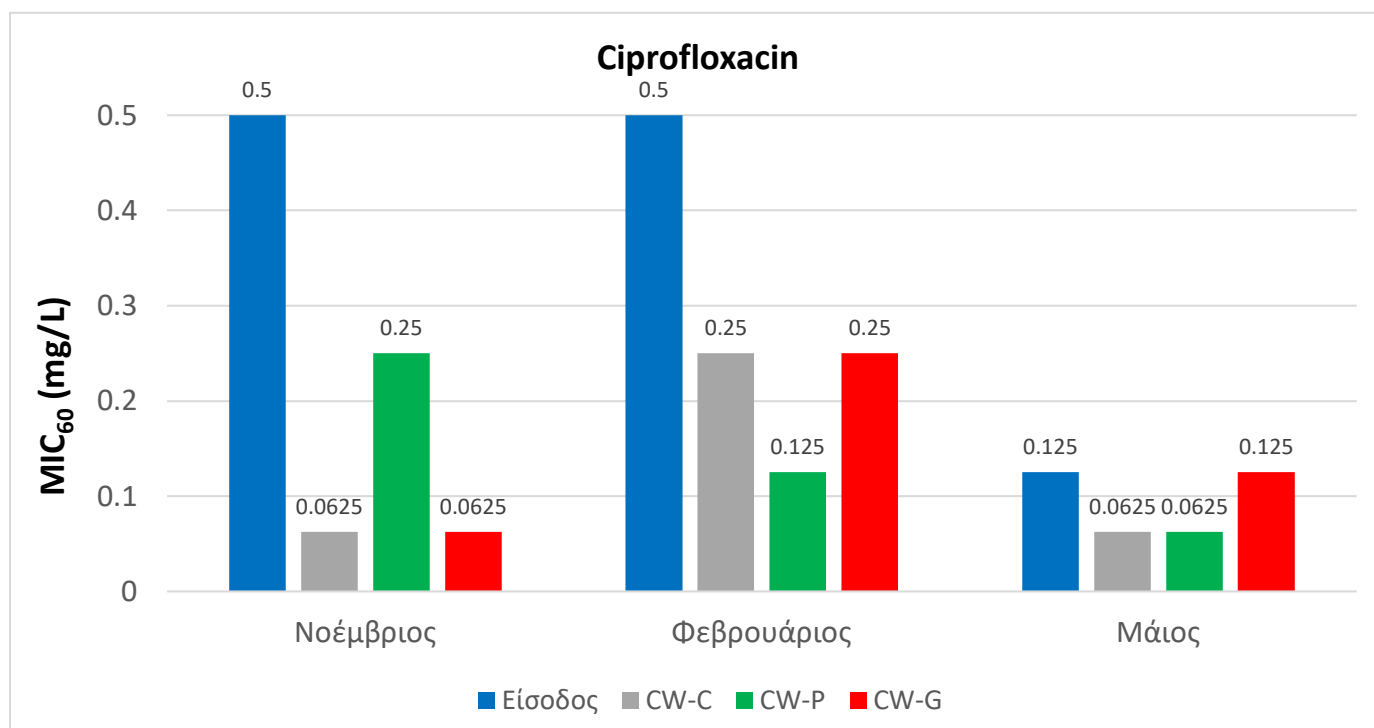
Από τα δείγματα λυμάτων που λήφθηκαν πριν και μετά την επεξεργασία στους τεχνητούς υδροβιότοπους, απομονώθηκαν τα βακτήρια *E. coli*, *Enterococcus* sp. και *S. aureus*. Η εξεταζόμενη περίοδος χωρίστηκε σε τρεις φάσεις, Νοέμβριος, Φεβρουάριος, Μάιος, και για κάθε ένα από τα παραπάνω βακτήρια, εξετάστηκαν 24 στελέχη συνολικά, 8 στελέχη για κάθε φάση. Τα αντιβιοτικά στα οποία υποβλήθηκαν είναι τα Amoxicillin, Ciprofloxacin και Sulfamethoxazole. Παρακάτω, παρουσιάζονται αναλυτικά γραφήματα στα οποία φαίνεται η διαφοροποίηση του προφίλ ανθεκτικότητας των βακτηριακών στελεχών στο εκάστοτε αντιβιοτικό, πριν και μετά την επεξεργασία.

#### *E. coli*



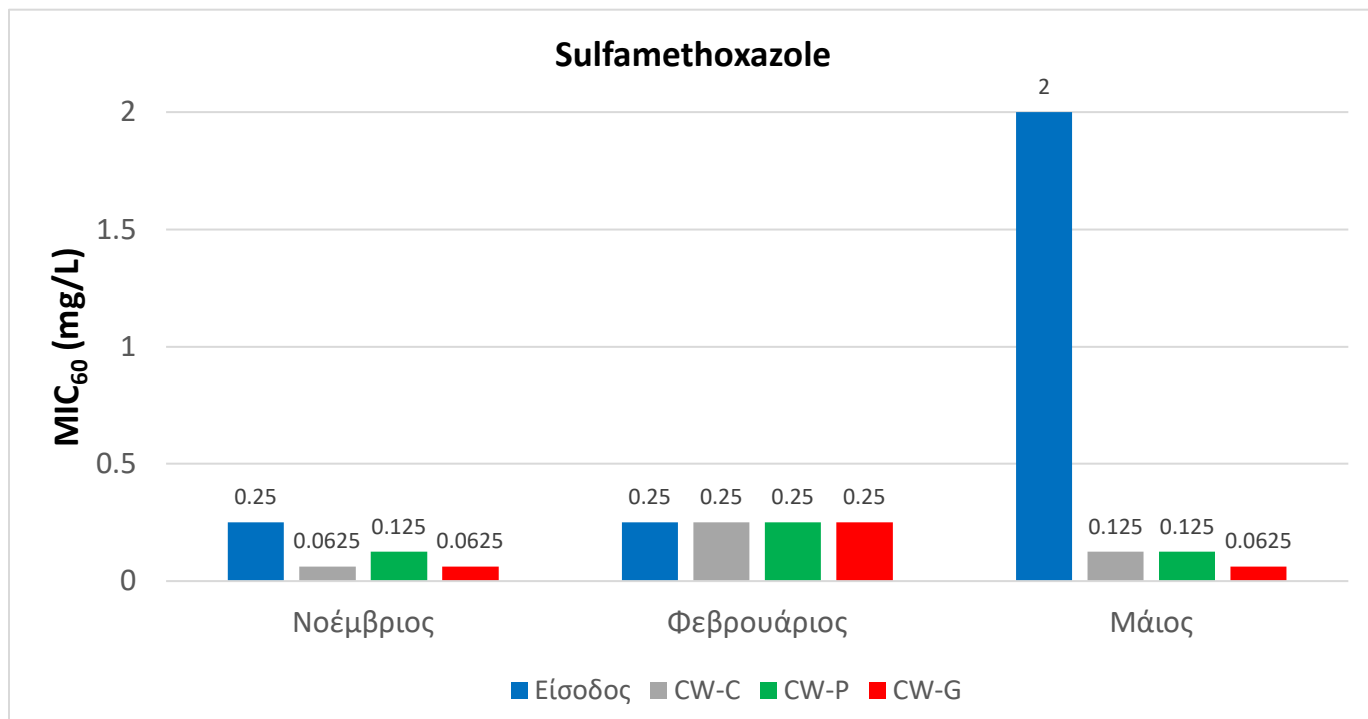
**Γράφημα 10.** Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση Amoxicillin ( $MIC_{60}$  - mg/L), για *E. coli*, πριν και μετά από επεξεργασία στους τεχνητούς υγροβιότοπους για τις τρεις περιόδους.

Στο παραπάνω γράφημα, παρατηρείται ότι τον Νοέμβριο, το βακτήριο γίνεται λίγο ανθεκτικότερο μετά την επεξεργασία, καθώς για να επιτευχθεί  $MIC_{60}$ , η συγκέντρωση του αντιβιοτικού αυξήθηκε από 0.25 mg/L σε 2 mg/L για όλες τις μονάδες. Τον Φεβρουάριο, οι ελάχιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις είναι, ξανά, υψηλότερες σε σχέση με την είσοδο. Ιδιαίτερότητα παρουσιάζει η μονάδα CW-P τον Μάιο, όπου  $MIC_{60}$  επιτυγχάνεται στην μέγιστη χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση Amoxicillin.



**Γράφημα 11.** Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση Ciprofloxacin ( $MIC_{60}$  - mg/L), για *E. coli*, πριν και μετά από επεξεργασία στους τεχνητούς υγροβιότοπους για τις τρεις περιόδους.

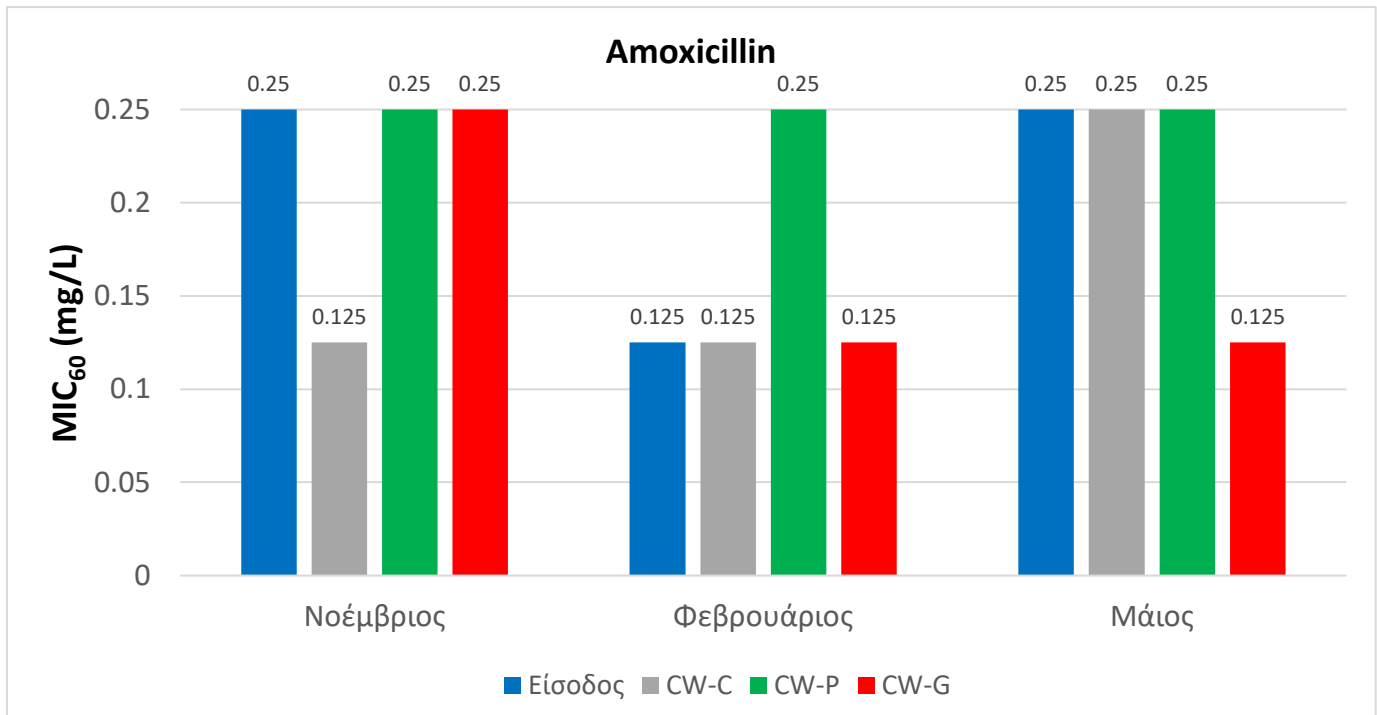
Στο γράφημα 11, το βακτήριο *E. coli* γίνεται πιο ευαίσθητο στο αντιβιοτικό Ciprofloxacin μετά την επεξεργασία, και αυτό φαίνεται από τις ελάχιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις. Αυτές είναι μικρότερες από τις αρχικές και αυτό ισχύει για όλες τις μονάδες και όλους τους μήνες, εκτός από τον τεχνητό υγροβιότοπο CW-G τον Μάιο, όπου το  $MIC_{60}$  δεν διαφοροποιείται.



**Γράφημα 12.** Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση Sulfamethoxazole ( $MIC_{60}$  - mg/L), για *E. coli*, πριν και μετά από επεξεργασία στους τεχνητούς υδροβιότοπους για τις τρεις περιόδους.

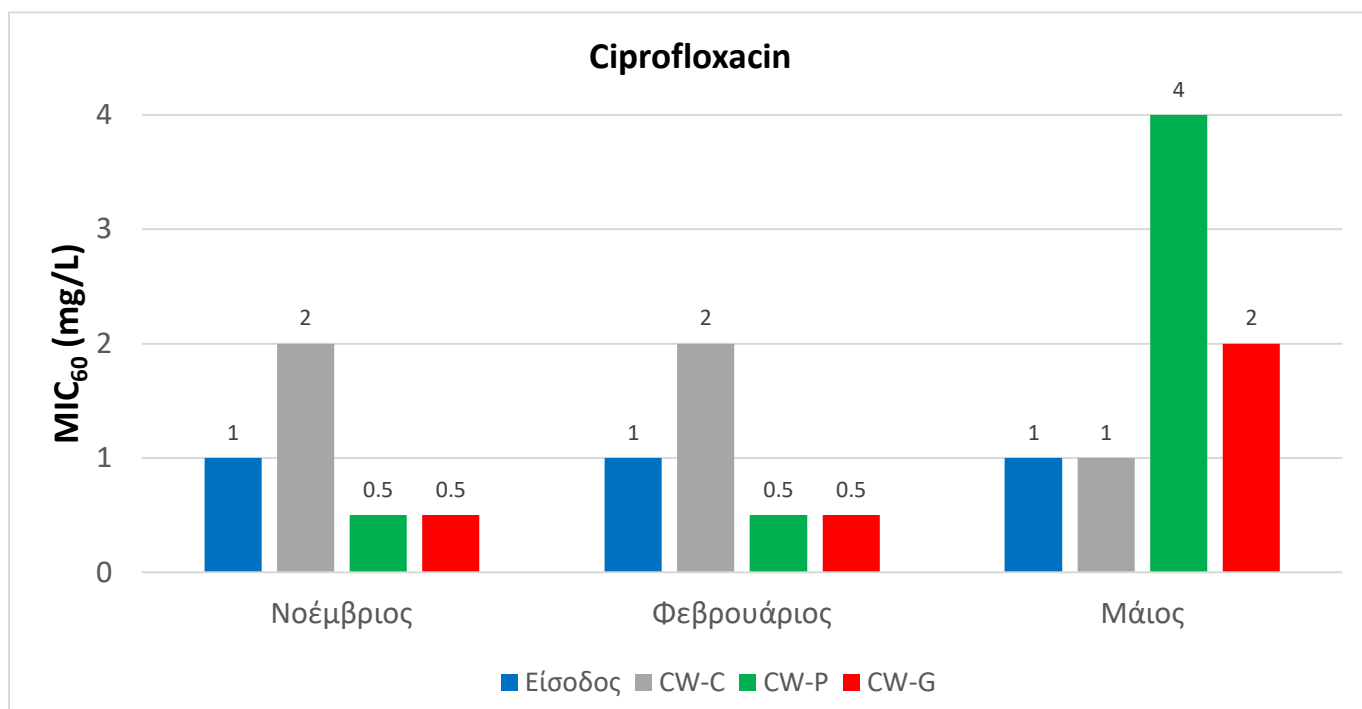
Από τα αποτελέσματα που φαίνονται στο γράφημα 12, γίνεται κατανοητό ότι τον Νοέμβριο το βακτήριο έγινε λίγο πιο ευαίσθητο, καθώς η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση μετά την επεξεργασία μειώθηκε για όλες τις μονάδες. Το ίδιο, όμως, δεν ισχύει για τον Φεβρουάριο, στον οποίο το  $MIC_{60}$  παραμένει σταθερό, πριν και μετά την επεξεργασία σε όλες τις μονάδες. Τον Μάιο, για τις μονάδες CW-C και CW-P, η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση καταγράφηκε 4 φορές υποδιπλασιασμένη της αρχικής, και 5 φορές για την μονάδα CW-G.

**Enterococcus sp.**



**Γράφημα 13.** Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση Amoxicillin ( $MIC_{60}$  - mg/L), για *Enterococcus sp.*, πριν και μετά από επεξεργασία στους τεχνητούς υδροβιότοπους για τις τρεις περιόδους.

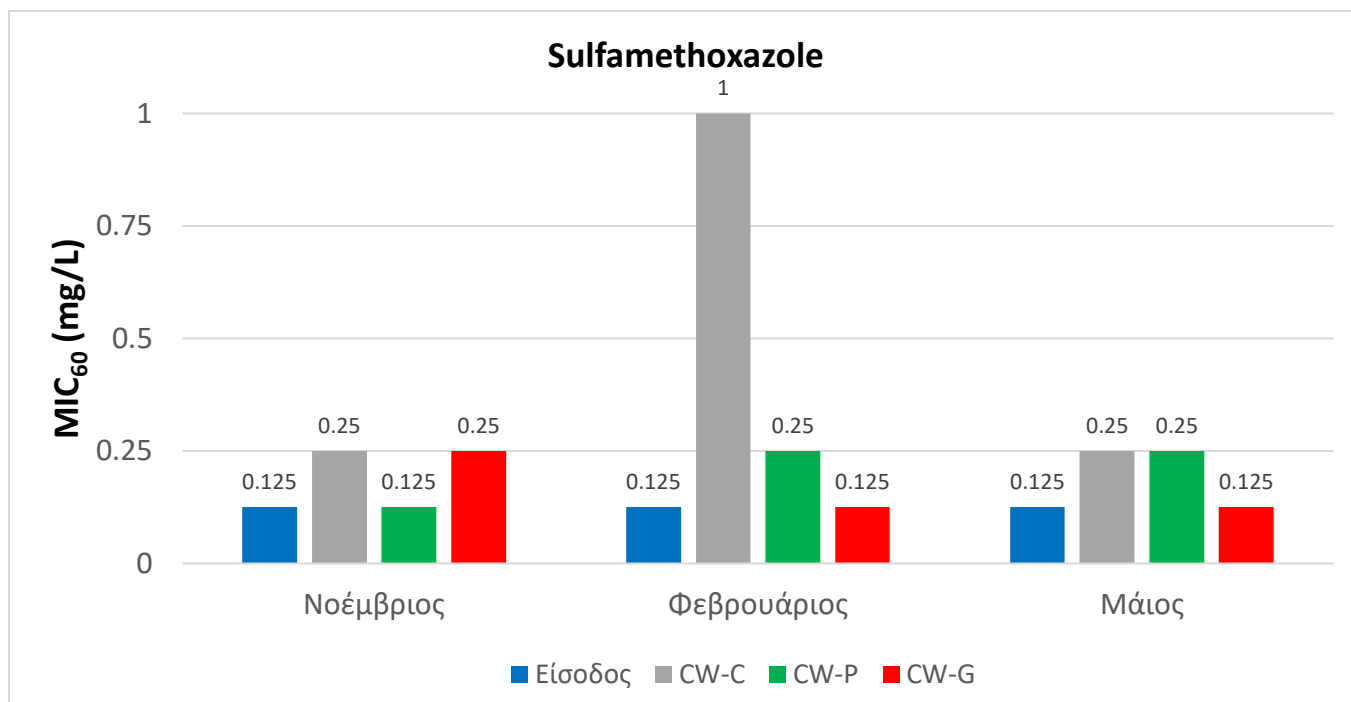
Βλέποντας τα αποτελέσματα του παραπάνω γραφήματος, γίνεται αντιληπτό ότι το προφίλ ανθεκτικότητας των εντεροκόκκων δεν αλλάζει ιδιαίτερα μετά την επεξεργασία των λυμάτων στους τεχνητούς υδροβιότοπους. Αυτό φαίνεται από το γεγονός ότι η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση του αντιβιοτικού παραμένει ίδια, με ορισμένες εξαιρέσεις. Συγκεκριμένα, τον Νοέμβριο στην μονάδα CW-C τα βακτήρια έγιναν πιο ευαίσθητα, τον Φεβρουάριο στην μονάδα CW-P έγιναν λίγο ανθεκτικότερα και τον Μάιο στην μονάδα CW-G, επίσης πιο ευαίσθητα.



**Γράφημα 14.** Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση Ciprofloxacin ( $MIC_{60}$  - mg/L), για *Enterococcus* sp., πριν και μετά από επεξεργασία στους τεχνητούς υγροβιότοπους για τις τρεις περιόδους.

Στο γράφημα 14, ακριβώς την ίδια συμπεριφορά είχαν οι εντερόκοκκοι τους μήνες Νοέμβριο και Φεβρουάριο. Αρχικά, απαιτείται μεγαλύτερη συγκέντρωση αντιβιοτικού για να επιτευχθεί  $MIC_{60}$  στην εκροή της μονάδας CW-C, ενώ στη συνέχεια, η απαιτούμενη συγκέντρωση μειώνεται για τις μονάδες CW-P και CW-G, που έχουν βλάστηση. Τον Μάιο, η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση δεν μεταβάλλεται στον τεχνητό υγροβιότοπο CW-C, τετραπλασιάζεται στον CW-P και διπλασιάζεται στον CW-G.

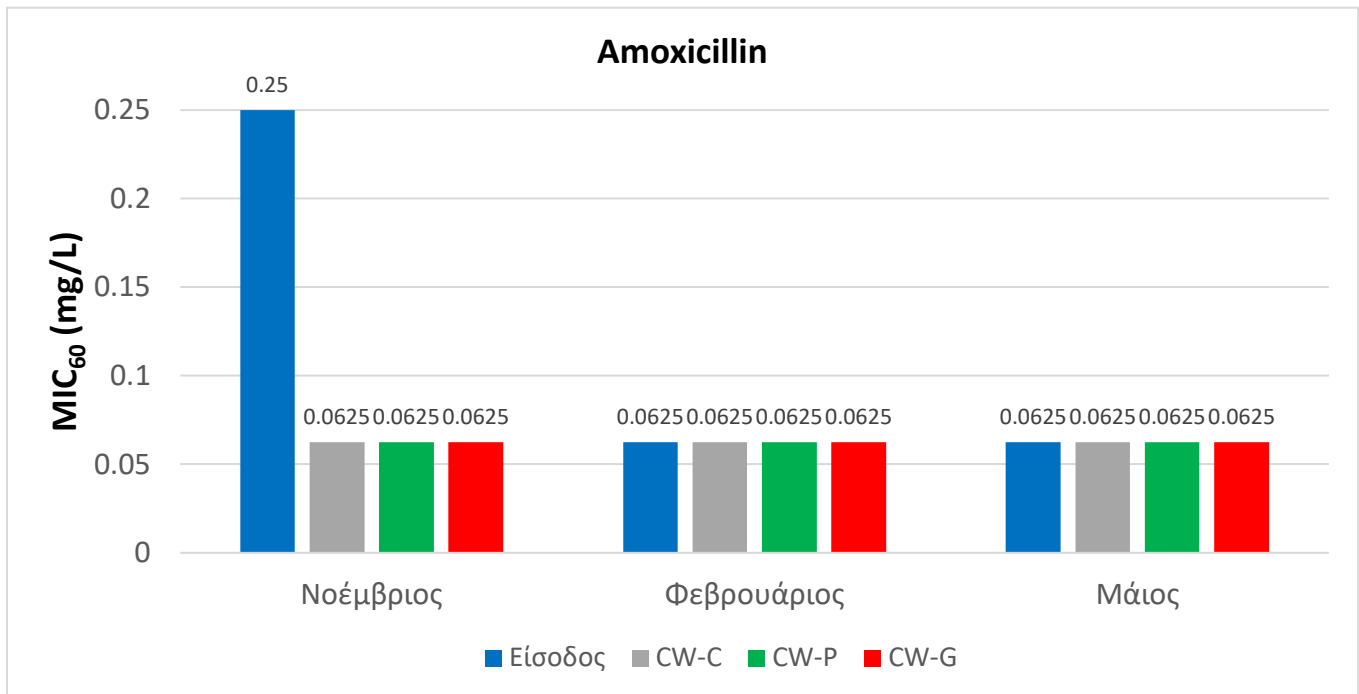




**Γράφημα 15.** Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση Sulfamethoxazole ( $MIC_{60}$  - mg/L), για *Enterococcus* sp., πριν και μετά από επεξεργασία στους τεχνητούς υγροβιότοπους για τις τρεις περιόδους.

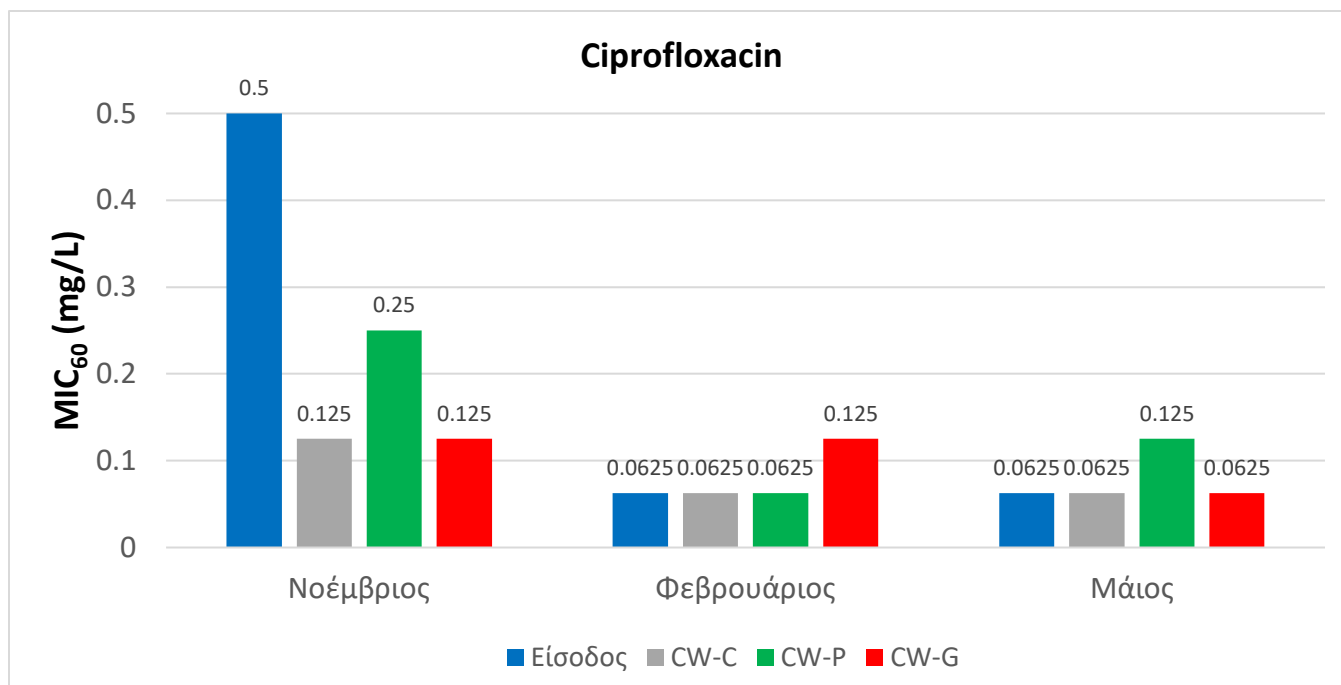
Διακυμάνσεις παρατηρούνται στο γράφημα 15, σχετικά με τα προφίλ ανθεκτικότητας. Σε όλες τις περιόδους, δύο από τους τρεις τεχνητούς υγροβιότοπους, συντελούν στην αύξηση της ανθεκτικότητας των εντερόκοκκων στο αντιβιοτικό. Αξίζει να σημειωθεί η περίπτωση της μονάδας CW-C τον Φεβρουάριο, όπου το  $MIC_{60}$  αυξήθηκε από 0.125 mg/L σε 1 mg/L.

**S. aureus**



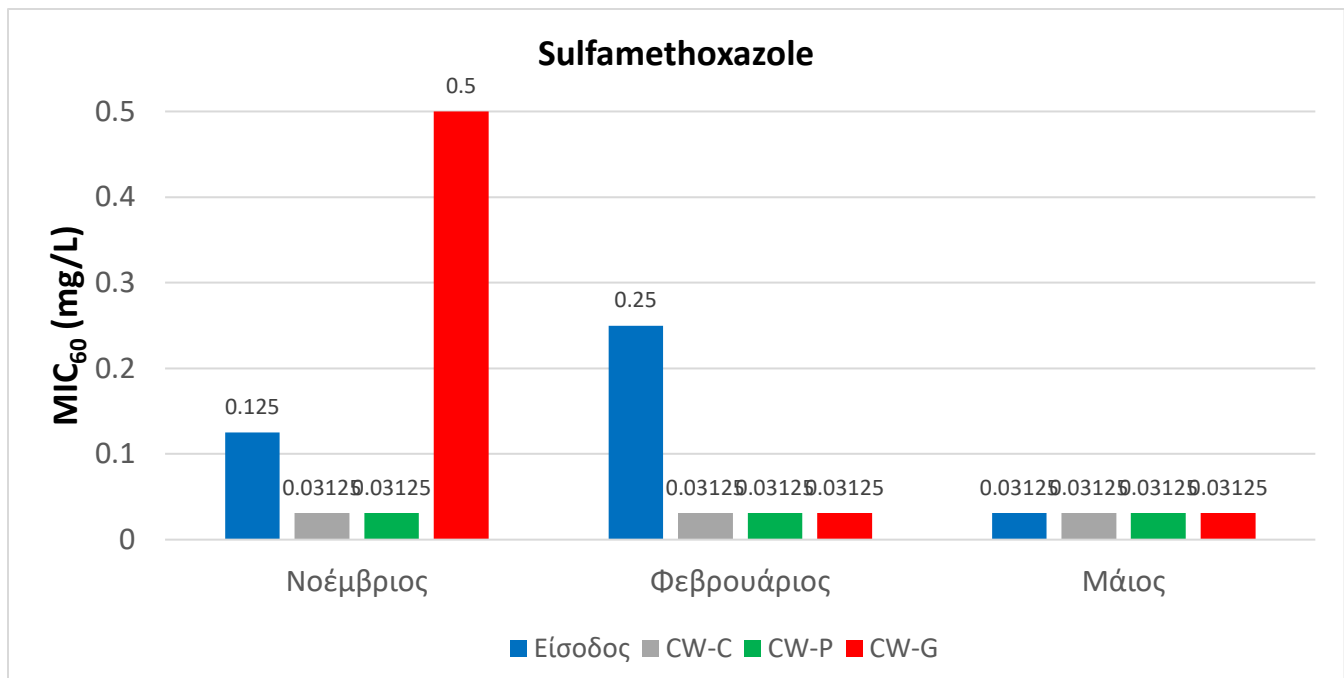
**Γράφημα 16.** Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση Amoxicillin ( $MIC_{60}$  - mg/L), για *S. aureus*, πριν και μετά από επεξεργασία στους τεχνητούς υγροβιότοπους για τις τρεις περιόδους.

Μελετώντας τα αποτελέσματα του γραφήματος 16, προκύπτει το συμπέρασμα ότι τον Νοέμβριο οι σταφυλόκοκκοι απέκτησαν ευαισθησία στο αντιβιοτικό, μετά την επεξεργασία στους τεχνητούς υγροβιότοπους. Ύστερα, τον Φεβρουάριο και τον Μάιο, δεν παρατηρείται κάποια μεταβολή στο προφίλ ανθεκτικότητας.



**Γράφημα 17.** Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση Ciprofloxacin ( $MIC_{60}$  - mg/L), για *S. aureus*, πριν και μετά από επεξεργασία στους τεχνητούς υγροβιότοπους για τις τρεις περιόδους.

Στο παραπάνω γράφημα, παρατηρείται ότι τον Νοέμβριο, όλες οι μονάδες μετέτρεψαν τους σταφυλόκοκκους σε πιο ευαίσθητους στο αντιβιοτικό, μετά την επεξεργασία. Τον Φεβρουάριο, η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση διατηρείται 0.0625 mg/L για τις μονάδες CW-C και CW-P, ενώ για την μονάδα CW-G αυξάνεται σε 0.125 mg/L. Τέλος, κάτι παρόμοιο συμβαίνει και τον Μάιο, όπου η μονάδα CW-P είναι αυτή της οποίας αυξάνεται το  $MIC_{60}$ .



**Γράφημα 18.** Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση Sulfamethoxazole ( $MIC_{60}$  - mg/L), για *S. aureus*, πριν και μετά από επεξεργασία στους τεχνητούς υδροβιότοπους για τις τρεις περιόδους.

Στο γράφημα 18, κατά την μελέτη των αποτελεσμάτων, φαίνεται ότι στην πρώτη περίοδο η ανθεκτικότητα των βακτηρίων μειώθηκε με εξαίρεση την μονάδα CW-G που έχει χαλί και βλάστηση. Στους μήνες Φεβρουάριο και Μάιο, η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση μειώθηκε και παρέμεινε σταθερή μετά την επεξεργασία, αντίστοιχα.

Εξετάζοντας συνολικά τα αποτελέσματα για την διαφοροποίηση του προφίλ ανθεκτικότητας των βακτηρίων στα αντιβιοτικά, πριν και μετά την επεξεργασία των αστικών λυμάτων σε τεχνητούς υδροβιότοπους, παρατηρήθηκαν τα εξής:

- Για *E. coli* καταγράφηκαν συνολικά 8 περιπτώσεις αύξησης του  $MIC_{60}$  μετά την επεξεργασία στους τεχνητούς υδροβιότοπους για τις τρεις περιόδους, και αφορούν κυρίως στις μονάδες CW-C και CW-P. Μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σημειώθηκε στο αντιβιοτικό Amoxicillin, ενώ στα αντιβιοτικά Ciprofloxacin και Sulfamethoxazole παρουσιάστηκε ευαισθησία.
- Για *Enterococcus* sp. καταγράφηκαν συνολικά 11 περιπτώσεις αύξησης του  $MIC_{60}$  μετά την επεξεργασία στους τεχνητούς υδροβιότοπους για τις τρεις περιόδους, και αφορούν κυρίως στις μονάδες CW-C και CW-P. Μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σημειώθηκε στα αντιβιοτικά Ciprofloxacin και Sulfamethoxazole, ενώ στο αντιβιοτικό Amoxicillin δεν φάνηκε κάποια ιδιαίτερη αλλαγή στην ανθεκτικότητα σε σχέση με τα στελέχη στην είσοδο πριν την επεξεργασία.

- Για *S. aureus* καταγράφηκαν συνολικά 3 περιπτώσεις αύξησης του MIC<sub>60</sub> μετά την επεξεργασία στους τεχνητούς υγροβιότοπους για τις τρεις περιόδους, και αφορούν κυρίως στις μονάδες CW-P και CW-G. Η ανθεκτικότητα, μετά την επεξεργασία, κατά μέσο όρο παρέμεινε σταθερή ή μειώθηκε και για τα τρία αντιβιοτικά, εκτός από κάποιες μικροαυξήσεις στα αντιβιοτικά Ciprofloxacin και Sulfamethoxazole.

Από την έρευνα της Aretaki (2022), στην οποία μελετήθηκαν τα ίδια στελέχη, όμως με την διαφορά ότι αφορούσαν θερινή περίοδο, το βακτήριο *E. coli* επίσης έγινε πιο ανθεκτικό στο αντιβιοτικό Amoxicillin. Οι εντερόκοκκοι παρουσίασαν αυξημένη αντίσταση κυρίως στο αντιβιοτικό Amoxicillin και οι σταφυλόκοκκοι στα αντιβιοτικά Amoxicillin και Sulfamethoxazole. Σε άλλη έρευνα που έχει γίνει από τους Helt et al. (2012), για την διαφοροποίηση του προφίλ ανθεκτικότητας σε βακτήρια εντερικής προέλευσης, από αντιβιοτικά σε τεχνητούς υγροβιότοπους, διαπιστώθηκε ότι η εισαγωγή ενός αντιβιοτικού στο σύστημα είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της ανθεκτικότητας. Ακόμα, παρατηρήθηκε ότι η ανθεκτικότητα των βακτηρίων αυξήθηκε, όχι μόνο στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό που εισήχθη (Ciprofloxacin), αλλά και σε πλήθος αντιβιοτικών από διαφορετικές ομάδες (Tetracyclines, Sulfonamides). Οι Sidrach-Cardona & Bécarea (2013), μελετώντας την ανθεκτικότητα βακτηριακών δεικτών σε αντιβιοτικά σε πειραματικές μονάδες τεχνητών υγροβιότοπων, διαπίστωσαν ότι το βακτήριο *E. coli* ήταν ανθεκτικότερο στο αντιβιοτικό Amoxicillin, απ' ότι οι εντερόκοκκοι, το οποίο επιβεβαιώνεται και στην παρούσα έρευνα. Συγχρόνως, παρατηρήθηκε ότι σε όλες τις εκροές των CWs, η ανθεκτικότητα αυξανόταν. Ο τύπος τεχνητού υγροβιότοπου, όπου το φαινόμενο αυτό ήταν εντονότερο, ήταν οριζόντιας υποεπιφανειακής ροής με χαλίκι και βλάστηση καλαμιών *P. australis*. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην σταθερότητα που προσφέρει το βιοφίλμ, ως προς την διαδικασία της σύζευξης.

Ένας μηχανισμός που πιθανόν οφείλεται στην ανάδειξη ανθεκτικότερων βακτηρίων *E. coli* μετά την επεξεργασία, είναι η ικανότητα τους να παράγουν ορισμένα ένζυμα για την αναστολή της δράσης των αντιβιοτικών. Έτσι, με την έκθεση τους σε μικροσυγκεντρώσεις αντιβιοτικών που υπάρχουν στα αστικά λύματα, παράγουν τα ένζυμα β-λακταμάσες, οι οποίες στοχεύουν β-λακταμικά αντιβιοτικά όπως το αντιβιοτικό Amoxicillin (Bajaj et al., 2016).

### 3.2.2 Κατηγοριοποίηση βακτηριακών στελεχών σε κλίμακα ευαισθησίας

Για την κατηγοριοποίηση των βακτηριακών στελεχών σε μία κλίμακα ευαισθησίας, χρησιμοποιήθηκαν τα πιο πρόσφατα πρωτόκολλα του EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Σύμφωνα με αυτά, ένα στέλεχος ορίζεται ως:

- **Ευαίσθητο (Susceptible)** σε ένα αντιβιοτικό, αν η χορήγηση του αντιβιοτικού αυτού ακολουθείται από πολύ μεγάλη πιθανότητα επιτυχούς θεραπείας.

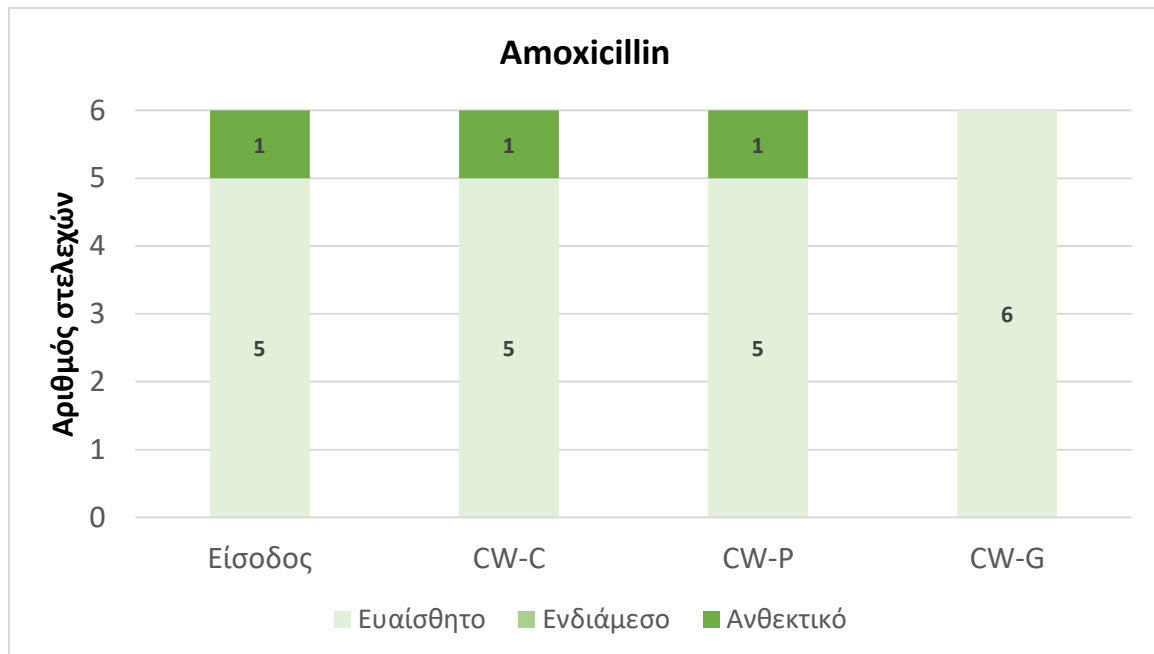
- **Ενδιάμεσης ευαισθησίας (Intermediate)** σε ένα αντιβιοτικό, αν με την χορήγηση αυτού αναμένεται αβέβαιο θεραπευτικό αποτέλεσμα, ή αν μπορεί να υπάρχει θεραπευτικό αποτέλεσμα είτε με μεγάλες δόσεις του αντιβιοτικού, είτε με υψηλές συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού στην εστία της λοίμωξης λόγω φαρμακοκινητικής. Η κατηγορία αυτή υποδεικνύει μια γκρίζα ζώνη, χρήσιμη για την ελαχιστοποίηση τεχνικών σφαλμάτων.
- **Ανθεκτικό (Resistant)** σε ένα αντιβιοτικό, αν η χορήγηση του αντιβιοτικού αυτού ακολουθείται από πολύ μεγάλη πιθανότητα αποτυχίας της θεραπείας.

**Πίνακας 11.** Εύρος ανασταλτικής συγκέντρωσης (mg/L) για την κατάταξη σε κλίμακα ευαισθησίας, των βακτηρίων *E. coli*, *Enterococcus* sp., *S. aureus* στα αντιβιοτικά Amoxicillin, Ciprofloxacin, Sulfamethoxazole (EUCAST, 2023).

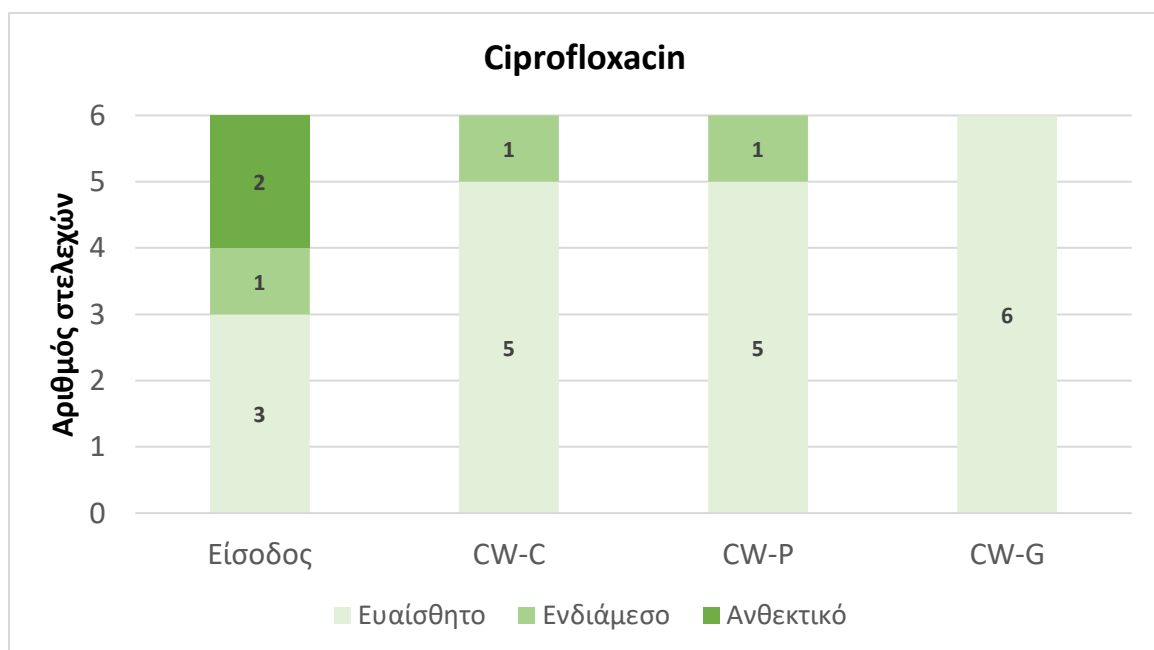
	Ευαίσθητο	Ενδιάμεσης ευαισθησίας	Ανθεκτικό
<b><i>E. coli</i></b>			
<b>Amoxicillin</b>	$MIC_{60} \leq 8$	-	$MIC_{60} > 8$
<b>Ciprofloxacin</b>	$MIC_{60} \leq 0.25$	$0.25 < MIC_{60} \leq 0.5$	$MIC_{60} > 0.5$
<b>Sulfamethoxazole</b>	$MIC_{60} \leq 2$	$2 < MIC_{60} \leq 4$	$MIC_{60} > 4$
<b><i>Enterococcus</i> sp.</b>			
<b>Amoxicillin</b>	$MIC_{60} \leq 4$	$4 < MIC_{60} \leq 8$	$MIC_{60} > 8$
<b>Ciprofloxacin</b>	$MIC_{60} \leq 4$	-	$MIC_{60} > 4$
<b>Sulfamethoxazole</b>	-	-	-
<b><i>S. aureus</i></b>			
<b>Amoxicillin</b>	-	-	-
<b>Ciprofloxacin</b>	$MIC_{60} \leq 0.001$	$0.001 < MIC_{60} \leq 1$	$MIC_{60} > 1$
<b>Sulfamethoxazole</b>	$MIC_{60} \leq 2$	$2 < MIC_{60} \leq 4$	$MIC_{60} > 4$

Στα παρακάτω γραφήματα γίνεται ταξινόμηση στην κλίμακα ευαισθησίας του EUCAST, των 24 στελεχών του κάθε βακτηρίου (*E. coli*, *Enterococcus* sp., *S. aureus*) μετά την υποβολή τους σε έλεγχο ανθεκτικότητας  $MIC_{60}$  στα αντιβιοτικά Amoxicillin, Ciprofloxacin και Sulfamethoxazole.

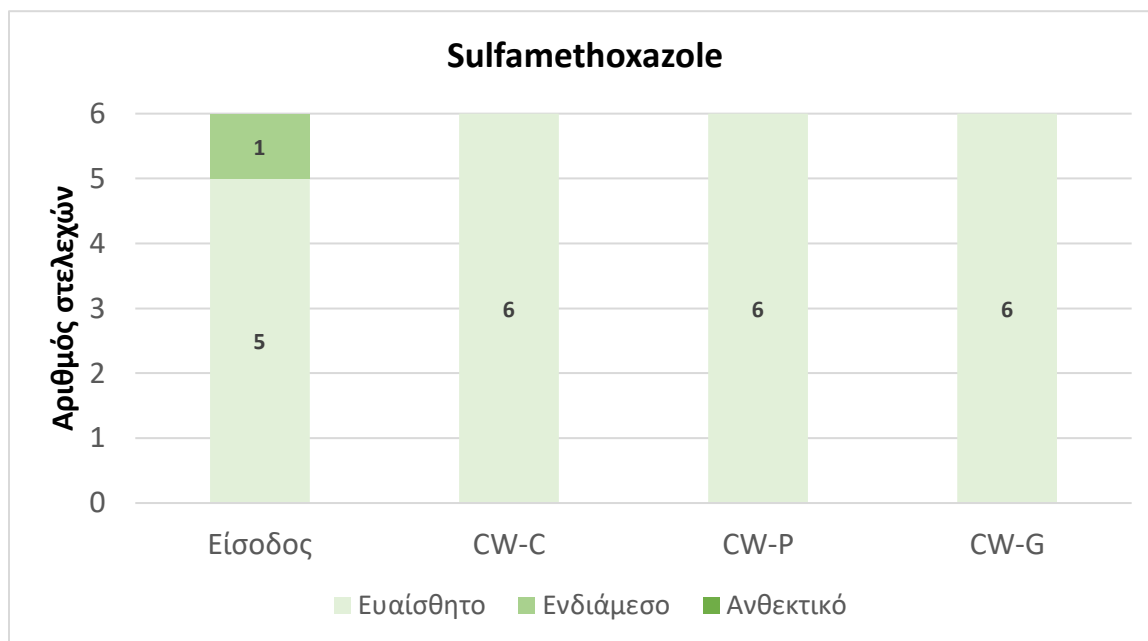
### *E. coli*



**Γράφημα 19.** Κατηγοριοποίηση των 24 στελεχών *E. coli* που εξετάστηκαν για την ανθεκτικότητά τους στο αντιβιοτικό Amoxicillin, πριν και μετά από επεξεργασία στους τεχνητούς υγροβιότοπους για τις τρεις περιόδους.



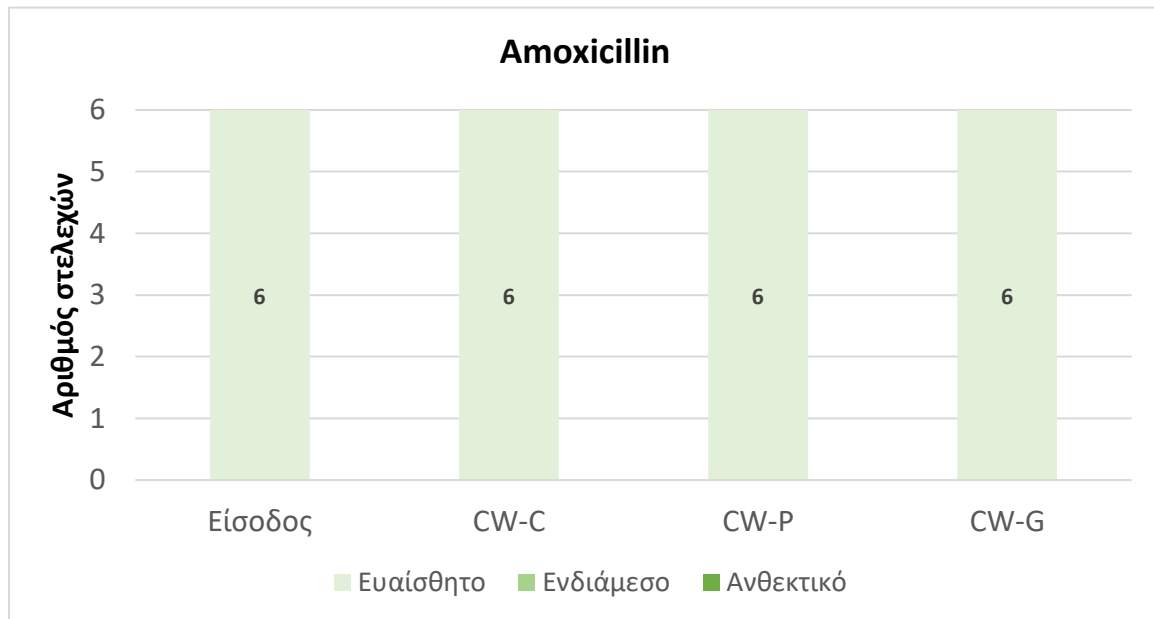
**Γράφημα 20.** Κατηγοριοποίηση των 24 στελεχών *E. coli* που εξετάστηκαν για την ανθεκτικότητα τους στο αντιβιοτικό Ciprofloxacin, πριν και μετά από επεξεργασία στους τεχνητούς υγροβιότοπους για τις τρεις περιόδους.



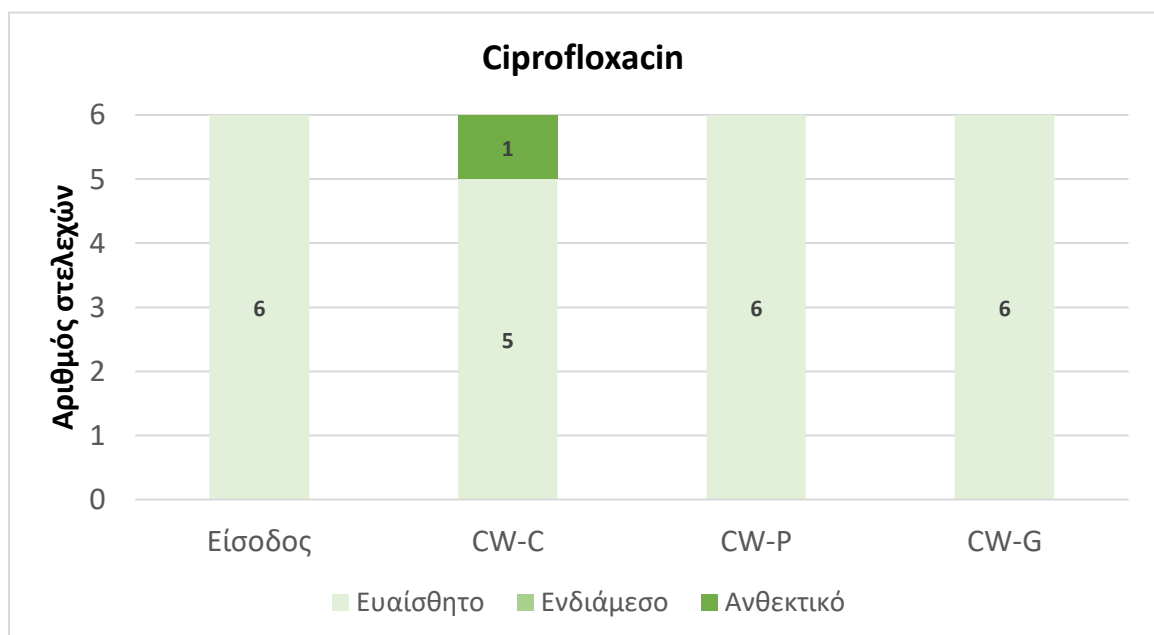
**Γράφημα 21.** Κατηγοριοποίηση των 24 στελεχών *E. coli* που εξετάστηκαν για την ανθεκτικότητα τους στο αντιβιοτικό Sulfamethoxazole, πριν και μετά από επεξεργασία στους τεχνητούς υγροβιότοπους για τις τρεις περιόδους.



**Enterococcus sp.**

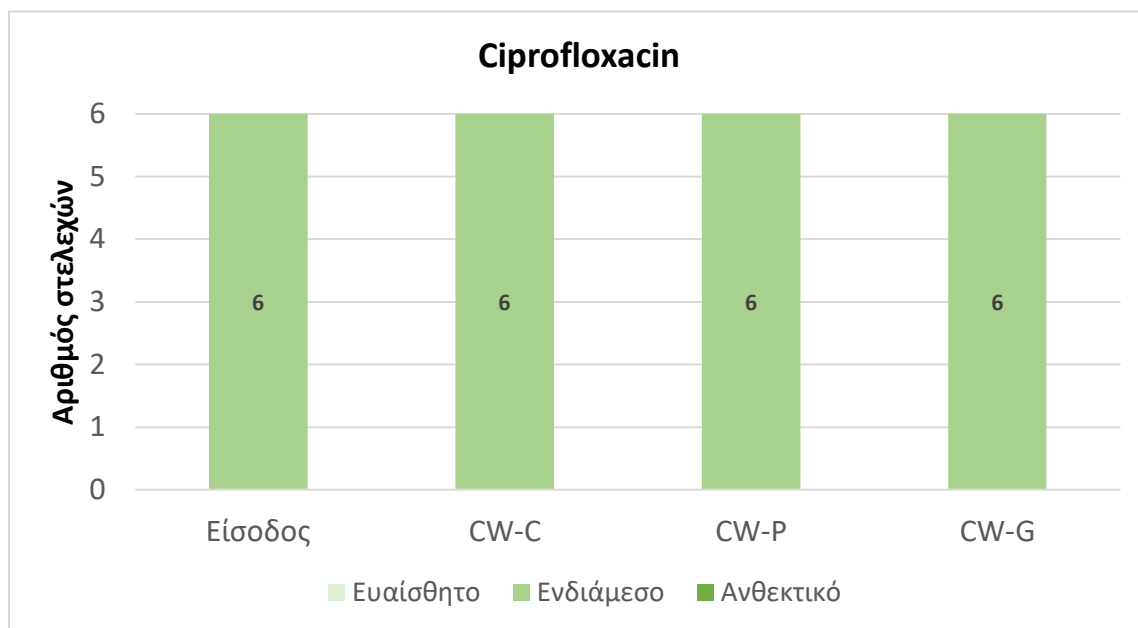


**Γράφημα 22.** Κατηγοριοποίηση των 24 στελεχών *Enterococcus* sp. που εξετάστηκαν για την ανθεκτικότητά τους στο αντιβιοτικό Αμοξικιλίνη, πριν και μετά από επεξεργασία στους τεχνητούς υγροβιότοπους για τις τρεις περιόδους.

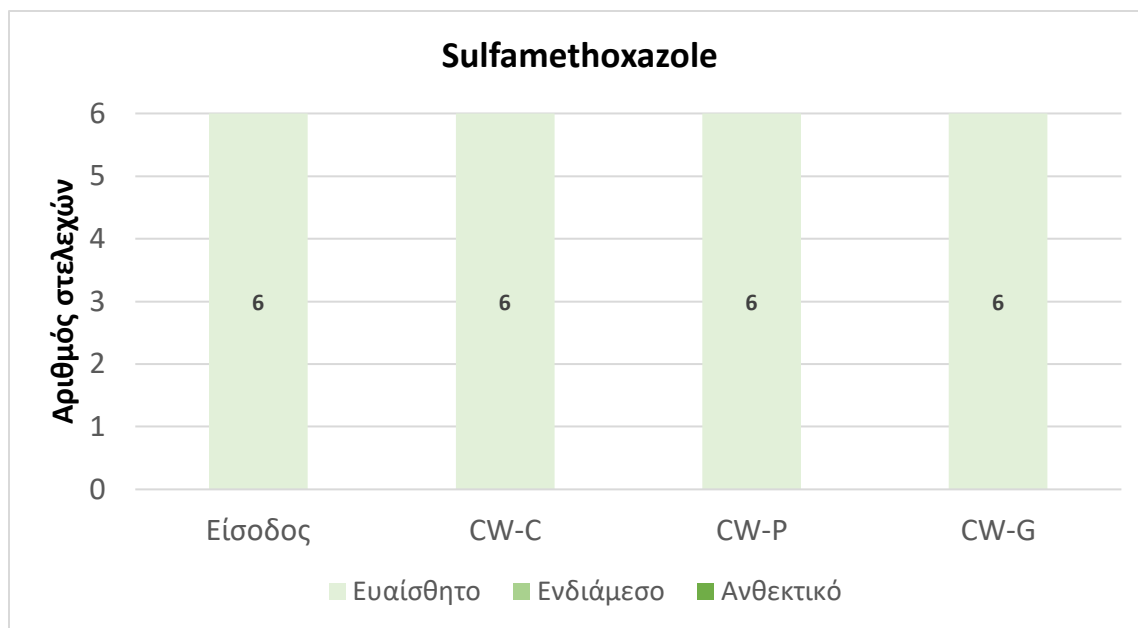


**Γράφημα 23.** Κατηγοριοποίηση των 24 στελεχών *Enterococcus* sp. που εξετάστηκαν για την ανθεκτικότητα τους στο αντιβιοτικό Ciprofloxacin, πριν και μετά από επεξεργασία στους τεχνητούς υγροβιότοπους για τις τρεις περιόδους.

**S. aureus**



**Γράφημα 24.** Κατηγοριοποίηση των 24 στελεχών *S. aureus* που εξετάστηκαν για την ανθεκτικότητα τους στο αντιβιοτικό Ciprofloxacin, πριν και μετά από επεξεργασία στους τεχνητούς υγροβιότοπους για τις τρεις περιόδους.



**Γράφημα 25.** Κατηγοριοποίηση των 24 στελεχών *S. aureus* που εξετάστηκαν για την ανθεκτικότητα τους στο αντιβιοτικό Sulfamethoxazole, πριν και μετά από επεξεργασία στους τεχνητούς υγροβιότοπους για τις τρεις περιόδους.

Σε αυτό το σημείο αναφέρεται ότι λόγω μη οριστικοποιημένων ορίων στην κλίμακα ευαισθησίας του EUCAST, που αφορούν *Enterococcus* sp. στο αντιβιοτικό Sulfamethoxazole και *S. aureus* στο αντιβιοτικό Amoxicillin, δεν ήταν δυνατή η διεξαγωγή των αντίστοιχων γραφημάτων.

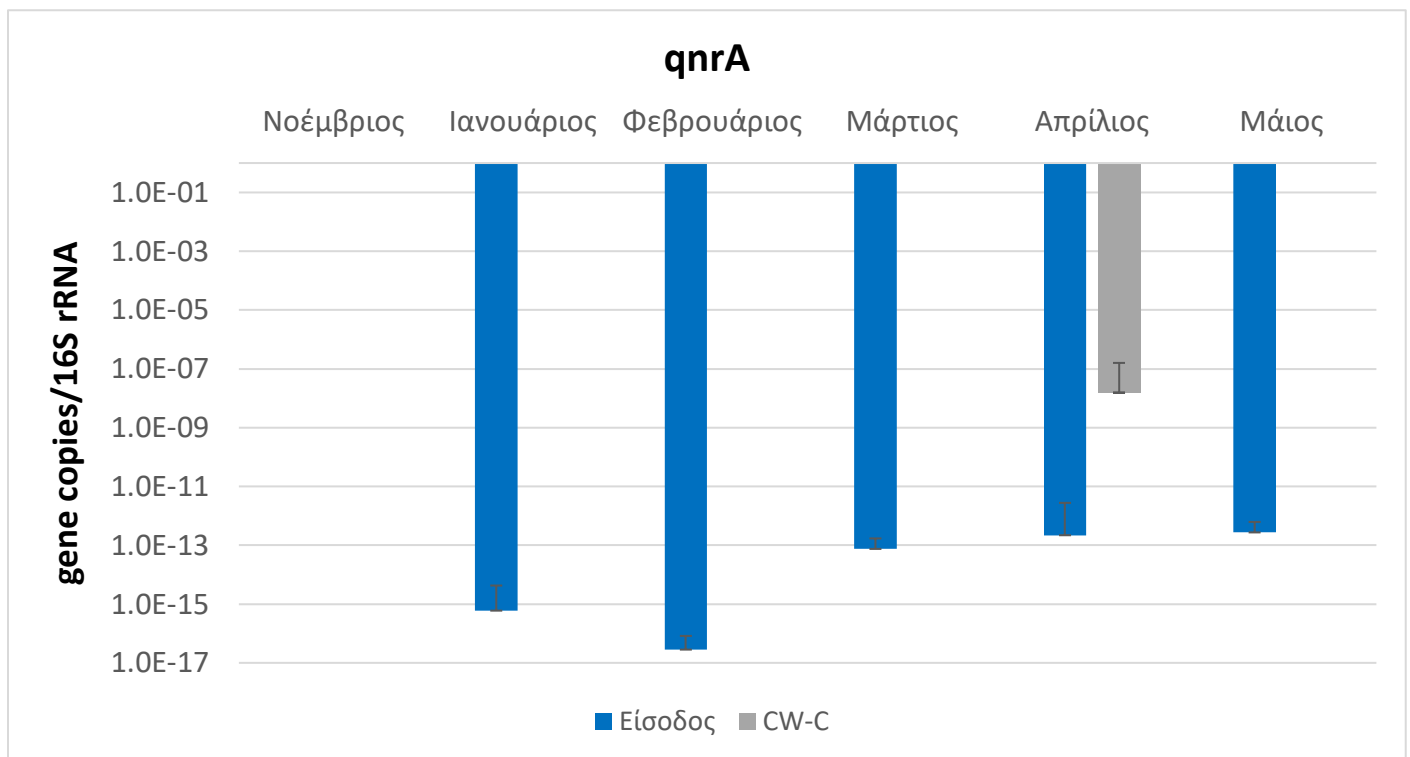
### 3.3 Απομάκρυνση γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά μετά από επεξεργασία αστικών λυμάτων στους τεχνητούς υγροβιότοπους

Οι πιλοτικές μονάδες τεχνητών υγροβιότοπων εξετάζονται ως προς την απόδοσή τους στην βιολογική επεξεργασία αστικών λυμάτων και απομάκρυνση συγκεκριμένων γονιδίων ανθεκτικότητας. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται τα 24 δείγματα που εξετάστηκαν με τη μέθοδο real-time PCR για την ύπαρξη γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά. Τα γονίδια αυτά είναι τα qnrA (γονίδιο ανθεκτικότητας σε Κινολόνες), ampC (γονίδιο ανθεκτικότητας σε β-λακτάμες), sul II (γονίδιο ανθεκτικότητας σε Σουλφοναμίδες) αλλά και το 16S rRNA (συνολικό ριβοσωμικό βακτηριακό γενετικό υλικό).

**Πίνακας 12.** Κωδικοποίηση δειγμάτων που εξετάστηκαν στη μέθοδο real-time PCR.

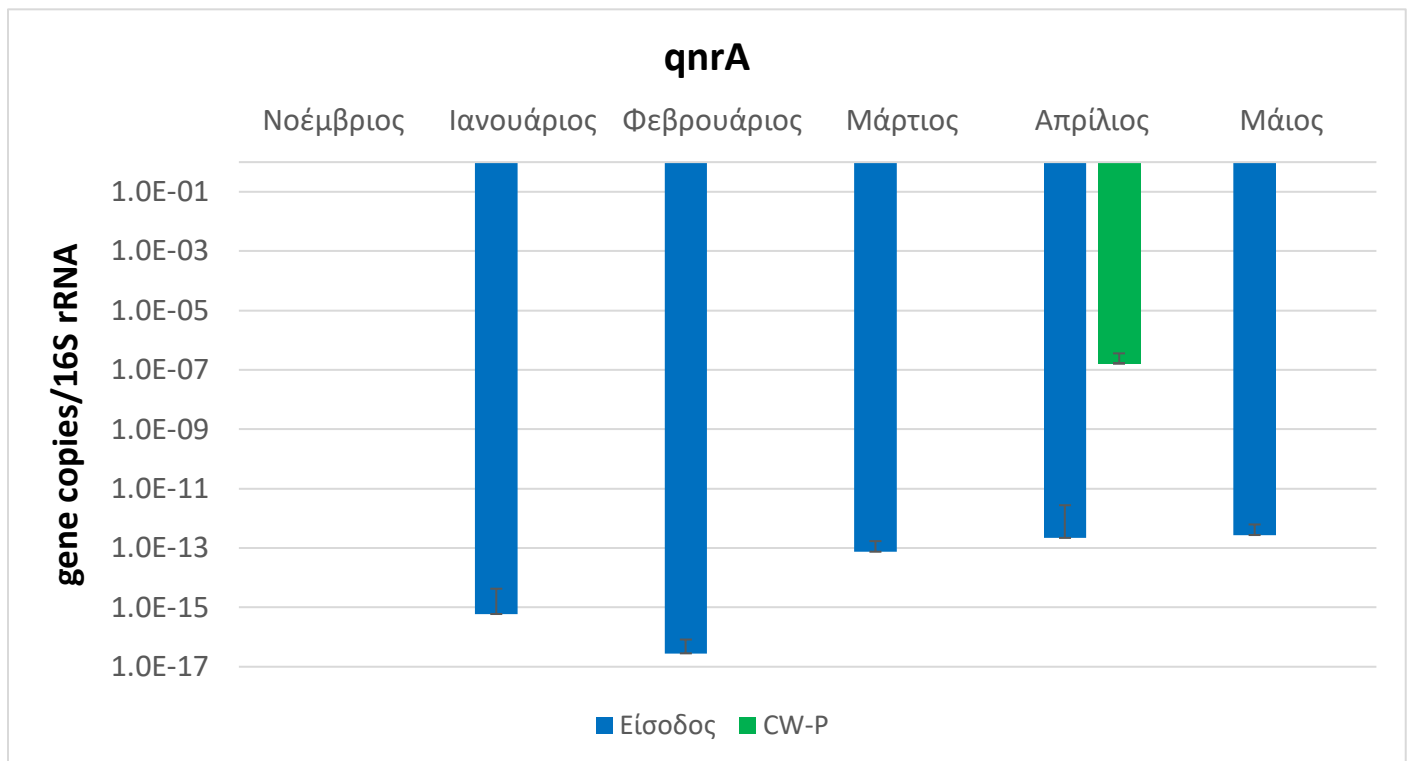
	Είσοδος	CW-G	CW-P	CW-C
<b>Νοέμβριος</b>	Δείγμα 1	Δείγμα 2	Δείγμα 3	Δείγμα 4
<b>Ιανουάριος</b>	Δείγμα 5	Δείγμα 6	Δείγμα 7	Δείγμα 8
<b>Φεβρουάριος</b>	Δείγμα 9	Δείγμα 10	Δείγμα 11	Δείγμα 12
<b>Μάρτιος</b>	Δείγμα 13	Δείγμα 14	Δείγμα 15	Δείγμα 16
<b>Απρίλιος</b>	Δείγμα 17	Δείγμα 18	Δείγμα 19	Δείγμα 20
<b>Μάιος</b>	Δείγμα 21	Δείγμα 22	Δείγμα 23	Δείγμα 24

#### qnrA



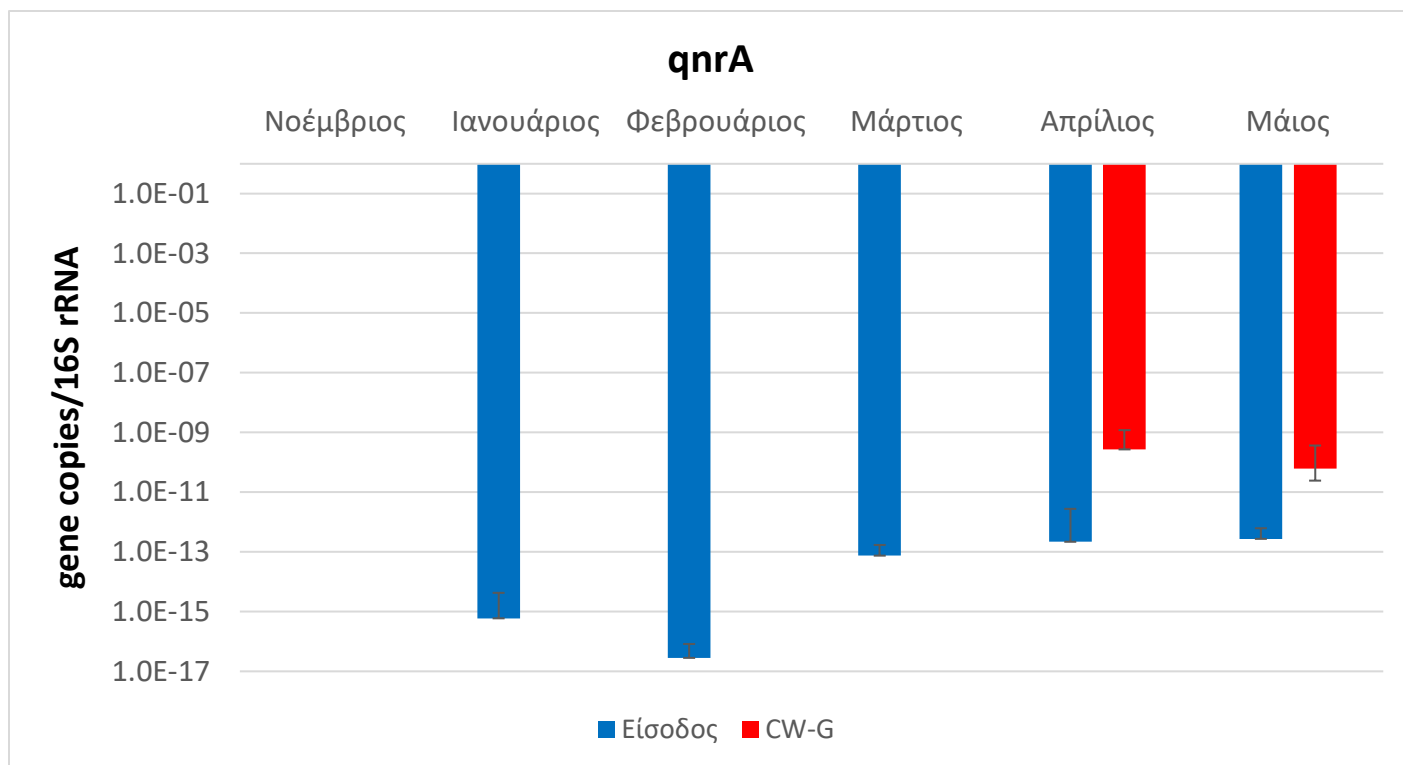
**Γράφημα 26.** Συγκεντρώσεις του γονιδίου qnrA (gene copies/16S rRNA) στα λύματα, πριν και μετά από επεξεργασία στον τεχνητό υγροβιότοπο CW-C την περίοδο δειγματοληψιών.

Στο παραπάνω γράφημα που αφορά στον τεχνητό υγροβιότοπο CW-C, όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα το γονίδιο qnrA δεν ανιχνεύεται μετά την επεξεργασία, σε πέντε από τους έξι μήνες της περιόδου. Μονάχα τον Απρίλιο, δηλώνει παρόν, και αυτό με μία αύξηση σχεδόν 5 Logs σε σχέση με την συγκέντρωση στην είσοδο.



**Γράφημα 27.** Συγκεντρώσεις του γονιδίου qnrA (gene copies/16S rRNA) στα λύματα, πριν και μετά από επεξεργασία στον τεχνητό υγροβιότοπο CW-P την περίοδο δειγματοληψιών.

Κατ' όμοιο τρόπο λειτουργεί και ο τεχνητός υγροβιότοπος CW-P του γραφήματος 27. Συγκεκριμένα, όπως φαίνεται από τα παραπάνω αποτελέσματα, η μονάδα CW-P ακολουθεί το μοτίβο της μονάδας CW-C, με την μόνη διαφορά ότι το γονίδιο qnrA μετά την επεξεργασία τον Απρίλιο, αυξάνει σχεδόν 6 Logs.

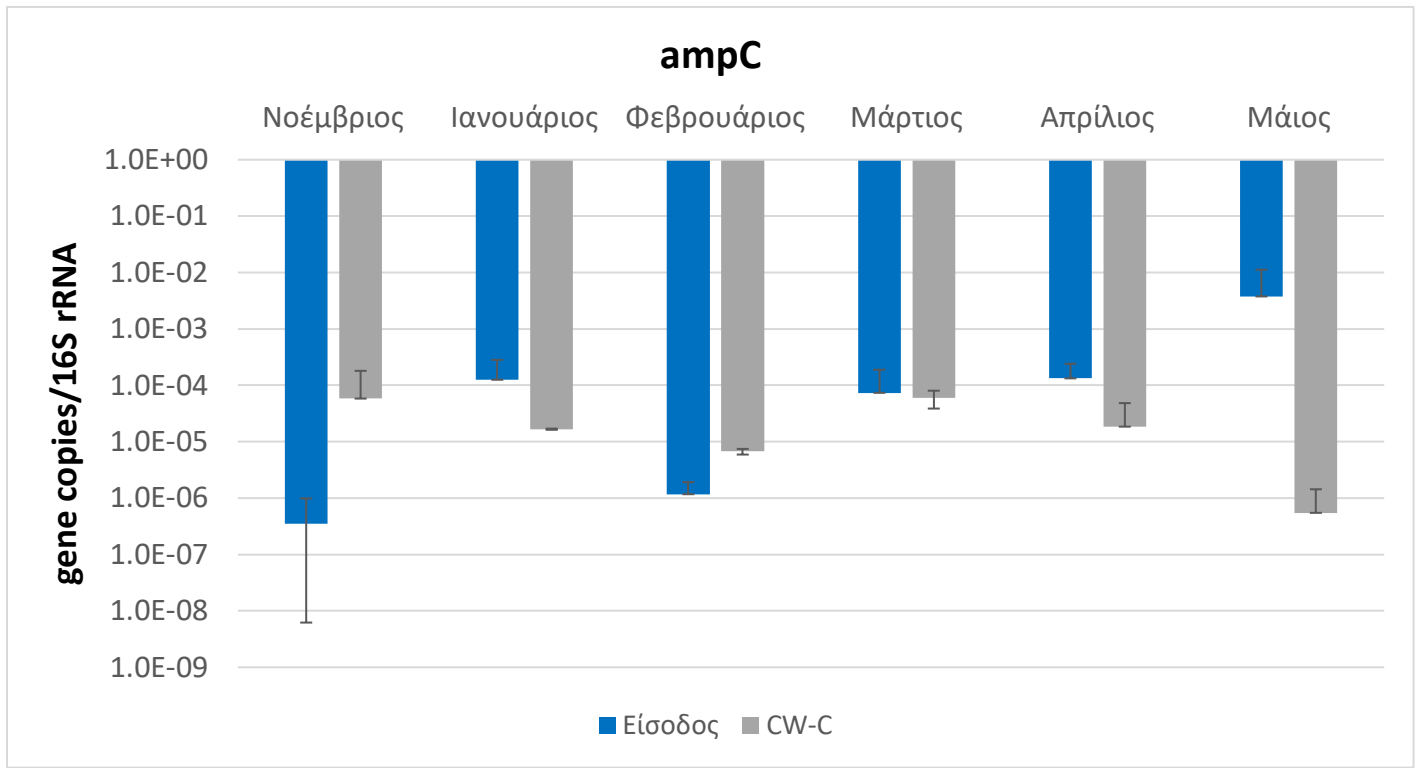


**Γράφημα 28.** Συγκεντρώσεις του γονιδίου qnrA (gene copies/16S rRNA) στα λύματα, πριν και μετά από επεξεργασία στον τεχνητό υγροβιότοπο CW-G την περίοδο δειγματοληψιών.

Στο γράφημα 28, μπορούμε να μελετήσουμε την συμπεριφορά του τεχνητού υγροβιότοπου CW-G, όσον αφορά στην απομάκρυνση του γονιδίου qnrA. Παρατηρείται ότι τέσσερις από τους έξι μήνες της περιόδου, το γονίδιο δεν ανιχνεύεται μετά την επεξεργασία των λυμάτων. Τους άλλους δύο μήνες, Απρίλιο και Μάιο, η συκέντρωση του γονιδίου στην έξοδο της μονάδας υπολογίζεται μεγαλύτερη από την αρχική κατά 3.10 Logs και 2.36 Logs αντίστοιχα.

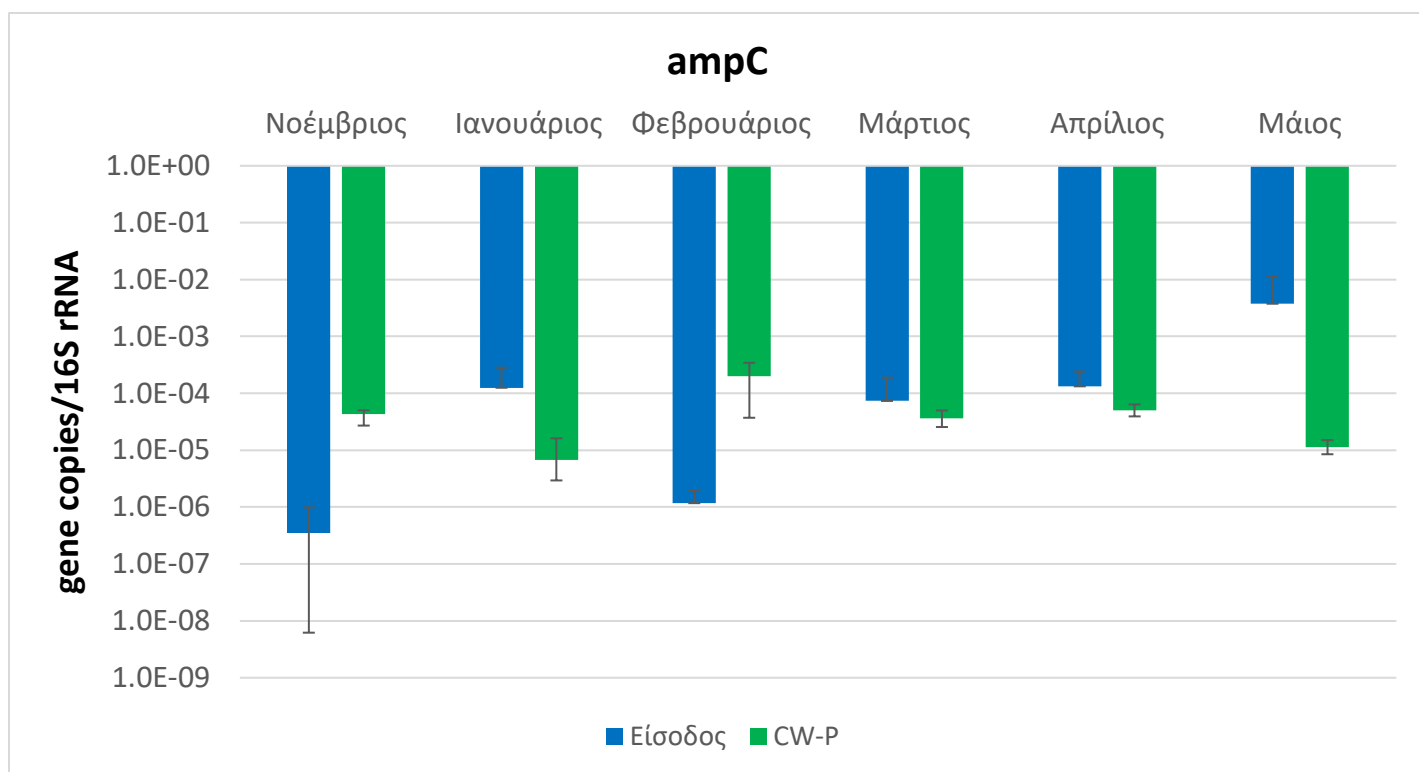
Από τις τρεις πιλοτικές μονάδες τεχνητών υγροβιότοπων CW-C, CW-P, CW-G, που εξετάστηκαν ως προς την απομάκρυνση του γονιδίου qnrA από τα λύματα, γίνεται εύκολα αντιληπτό από τα αποτελέσματα ότι όλες οι μονάδες υπήρξαν πολύ αποτελεσματικές. Αυτό φαίνεται από την αδυναμία ανίχνευσης του γονιδίου μετά την επεξεργασία τους πλείστους μήνες της περιόδου. Παρ' όλα αυτά, πρέπει να αναφερθεί ότι υπήρχαν και περιπτώσεις όπου το γονίδιο ανιχνεύθηκε σε συγκεντρώσεις αρκετά μεγαλύτερες από τις αρχικές, και αφορούν στους μήνες Απρίλιο και Μάιο.

### ampC



**Γράφημα 29.** Συγκεντρώσεις του γονιδίου ampC (gene copies/16S rRNA) στα λύματα, πριν και μετά από επεξεργασία στον τεχνητό υγροβιότοπο CW-C την περίοδο δειγματοληψιών.

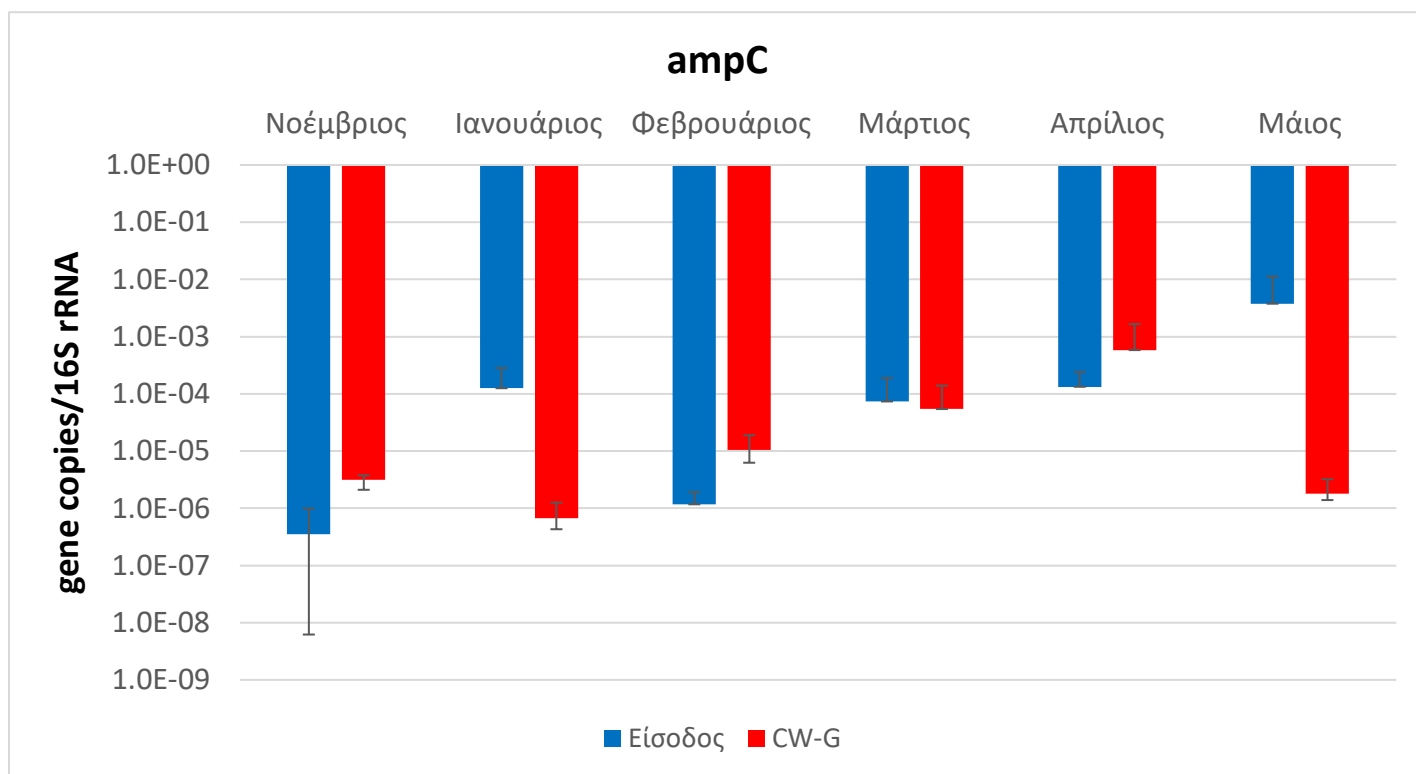
Στο γράφημα που παρατίθεται ανωτέρω, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που αφορούν στις συγκεντρώσεις του γονιδίου ampC στον τεχνητό υγροβιότοπο CW-C. Όπως φαίνεται, η μονάδα αυτή που περιέχει πολυαιθυλένιο υψηλής πυκνότητας ελαττώνει τη συκέντρωση του γονιδίου τους τέσσερις από τους έξι μήνες. Ο Μάιος είναι στην πρώτη θέση με 3.84 Logs απομάκρυνση, ακολουθούμενος από τον Ιανουάριο και τον Απρίλιο, με σχεδόν 0.90 Logs απομάκρυνση και για τους δύο αυτούς μήνες. Αρνητικές απομακρύνσεις σημειώνονται τον Νοέμβριο και τον Φεβρουάριο.



**Γράφημα 30.** Συγκεντρώσεις του γονιδίου ampC (gene copies/16S rRNA) στα λύματα, πριν και μετά από επεξεργασία στον τεχνητό υγροβιότοπο CW-P την περίοδο δειγματοληψιών.

Ο τεχνητός υγροβιότοπος CW-P του γραφήματος 30, που πέρα από το πολυαιθυλένιο υψηλής πυκνότητας έχει και βλάστηση καλαμιών, φαίνεται να λειτουργεί με αντίστοιχο τρόπο όπως η μονάδα CW-C του γραφήματος 29. Η μόνη διαφορά είναι ότι η απόδοσή του είναι μικρότερη ως προς την απομάκρυνση του γονιδίου ampC.



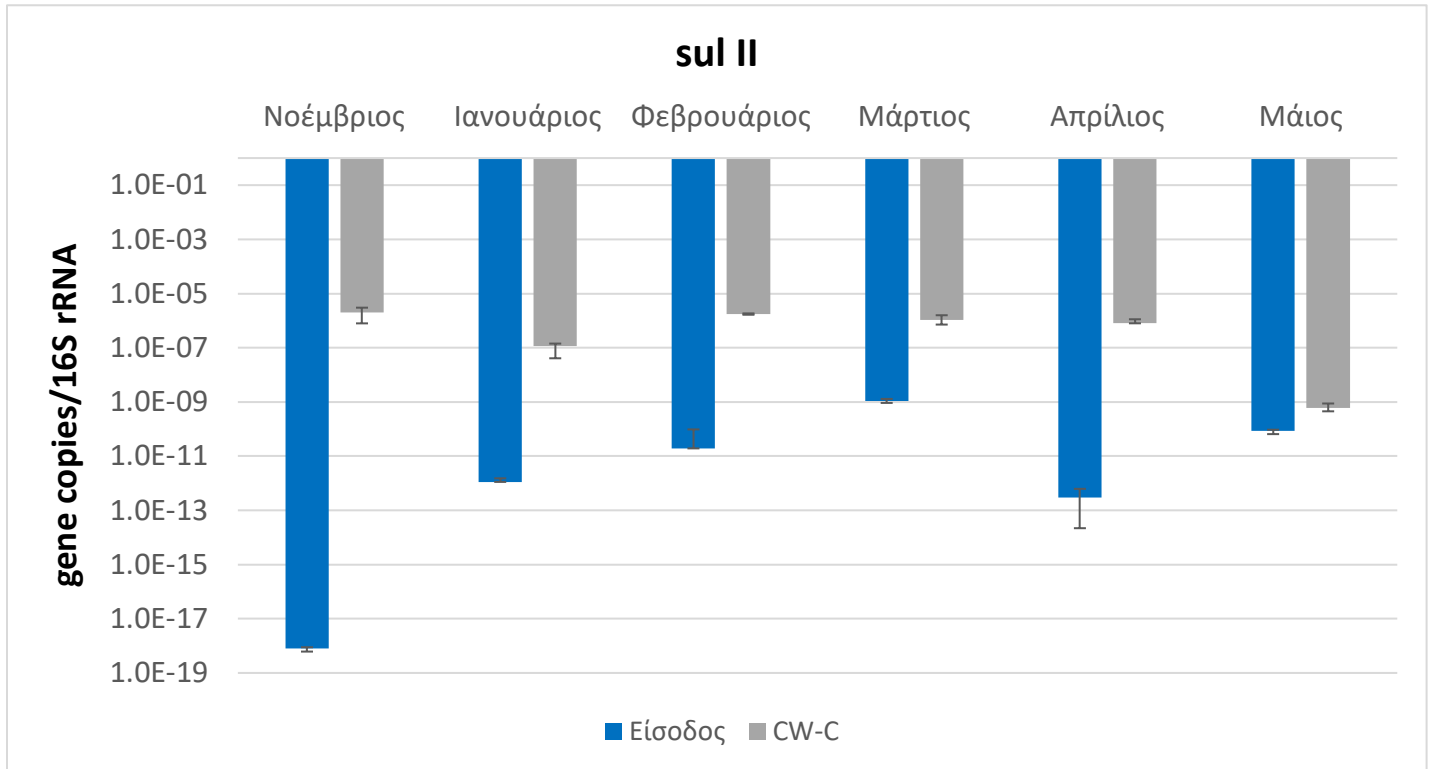


**Γράφημα 31.** Συγκεντρώσεις του γονιδίου ampC (gene copies/16S rRNA) στα λύματα, πριν και μετά από επεξεργασία στον τεχνητό υγροβιότοπο CW-G, για την περίοδο δειγματοληψιών.

Στο γράφημα 31, ο τεχνητός υγροβιότοπος CW-G, παρουσιάζει διακυμάνσεις στις συγκεντρώσεις του γονιδίου ampC πριν και μετά την επεξεργασία κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας. Πιο συγκεκριμένα, υψηλές απομακρύνσεις παρατηρούνται τον Μάιο με 3.32 Logs, και τον Ιανουάριο με 2.27 Logs. Αντιθέτως, συσσωρεύσεις του γονιδίου κατά σχεδόν 1 Log, μετά την επεξεργασία, σημειώνονται τον Νοέμβριο, τον Φεβρουάριο και τον Απρίλιο.

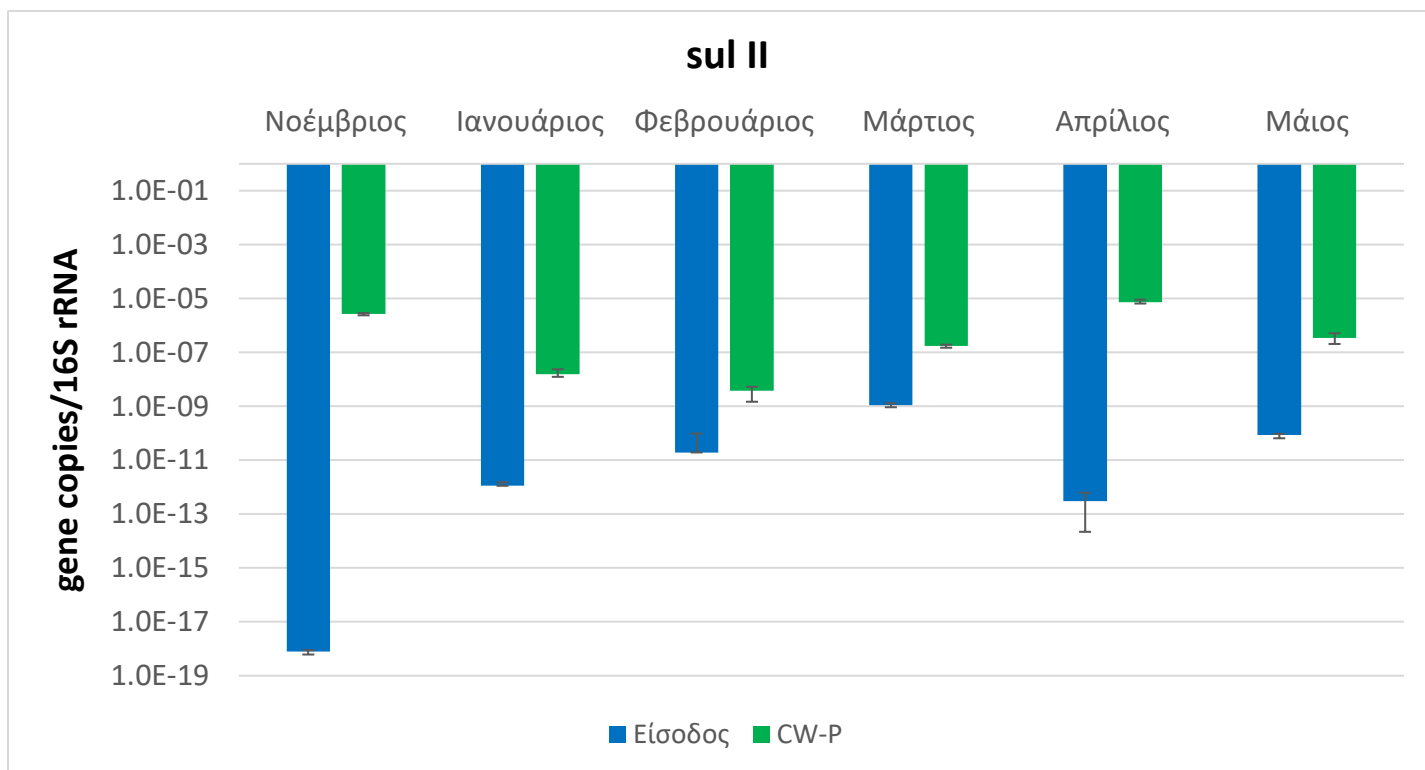
Ανασκοπώντας τα παραπάνω, οι τρεις πιλοτικές μονάδες τεχνητών υγροβιότοπων CW-C, CW-P, CW-G εξετάστηκαν ως προς την απομάκρυνση του γονιδίου ampC από τα λύματα. Και οι τρεις αυτές μονάδες καταφέρνουν να ελαττώσουν τις συγκεντρώσεις του γονιδίου μετά την επεξεργασία, για περισσότερους από τους μισούς μήνες της εξεταζόμενης περιόδου. Καλές αποδόσεις είχαν όλες οι μονάδες, αλλά κατά μέσο όρο, η πιο αποτελεσματική θεωρείται η μονάδα CW-G, με χαλίκι και βλάστηση καλαμιών. Ωστόσο, δεν παύουν να υπάρχουν και οι μήνες που παρατηρούνται αρνητικές απομακρύνσεις και στους τρεις τεχνητούς υγροβιότοπους.

## sul II



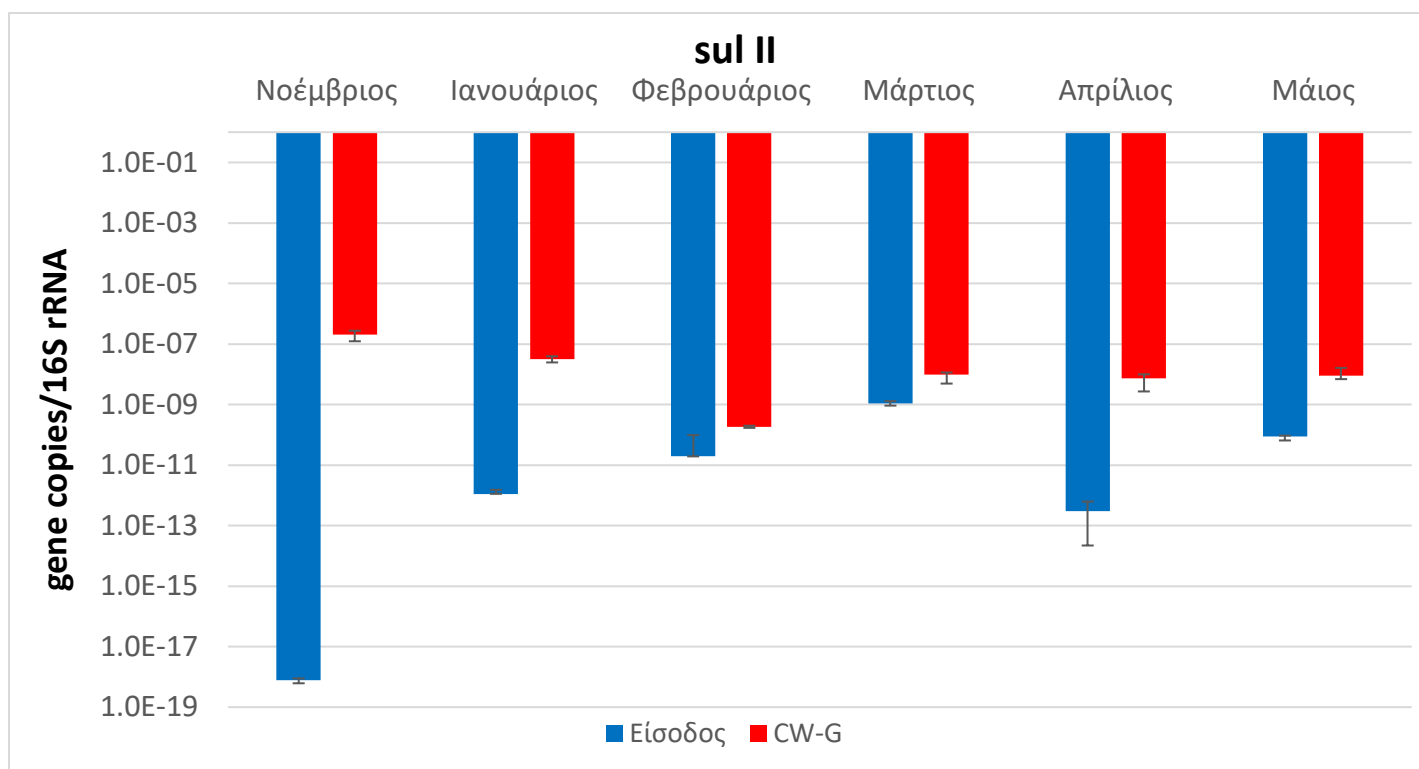
**Γράφημα 32.** Συγκεντρώσεις του γονιδίου *sul II* (gene copies/16S rRNA) στα λύματα, πριν και μετά από επεξεργασία στον τεχνητό υγροβιότοπο CW-C την περίοδο δειγματοληψιών.

Όπως φαίνεται στο γράφημα 32, ο τεχνητός υγροβιότοπος CW-C δεν μπορεί να μειώσει την συγκέντρωση του γονιδίου *sul II* μετά την επεξεργασία, σε κανέναν από τους μήνες. Η αύξηση της συγκέντρωσης κυμαίνεται από 0.85 Logs τον Μάιο, ως και 12.41 Logs τον Νοέμβριο.



**Γράφημα 33.** Συγκεντρώσεις του γονιδίου sul II (gene copies/16S rRNA) στα λύματα, πριν και μετά από επεξεργασία στον τεχνητό υγροβιότοπο CW-P την περίοδο δειγματοληψιών.

Σημαντικά μεγάλες συγκεντρώσεις του γονιδίου sul II, υπολογίζονται και στις εκροές του τεχνητού υγροβιότοπου CW-P, όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα του γραφήματος 33. Η μέγιστη αρνητική απομάκρυνση σημειώνεται τον Νοέμβριο και αγγίζει σχεδόν τα 13 Logs.



**Γράφημα 34.** Συγκεντρώσεις του γονιδίου *sul II* (gene copies/16S rRNA) στα λύματα, πριν και μετά από επεξεργασία στον τεχνητό υγροβιότοπο CW-G την περίοδο δειγματοληψιών.

Εξετάζοντας τα αποτελέσματα του γραφήματος 34, γίνεται αντιληπτό ότι και στη μονάδα CW-G το γονίδιο *sul II* βρίσκει τρόπο να συσσωρεύεται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις μετά την επεξεργασία. Βέβαια, τον Φεβρουάριο και τον Μάρτιο η αρνητική απομάκρυνση δεν είναι τόσο σημαντική, δεδομένου ότι είναι της τάξης του 1 Log.

Γενικά, οι τρεις πιλοτικές μονάδες τεχνητών υγροβιότοπων CW-C, CW-P, CW-G δεν αποδείχθηκαν αποτελεσματικές ως προς την απομάκρυνση του γονιδίου *sul II*. Σε όλες τις μονάδες και για όλους τους μήνες της εξεταζόμενης περιόδου το γονίδιο ανιχνεύεται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στις εκροές από ότι στις εισροές. Οι αρνητικές απομακρύνσεις ξεκινούν από μόλις 1 Log και κυμαίνονται έως σχεδόν 13 Logs.

Λαμβάνοντας υπόψιν όσα αναφέρθηκαν, μπορούμε να κατατάξουμε τα γονίδια ανθεκτικότητας που μελετήθηκαν, ανάλογα με την μέση απομάκρυνση τους σε κάθε τεχνητό υγροβιότοπο, ως εξής:

CW-C: *qnrA* > *ampC* > *sul II*

CW-P: *qnrA* > *ampC* > *sul II*

#### CW-G: qnrA > ampC > sul II

Σε όλες τις μονάδες, το γονίδιο qnrA απομακρύνθηκε αποτελεσματικότερα και το γονίδιο ampC βρίσκεται στη δεύτερη θέση. Ωστόσο, οι μονάδες δεν κατάφεραν να απομακρύνουν το γονίδιο sul II, ενώ παράλληλα, η τελική του συγκέντρωση ήταν πολύ μεγαλύτερη της αρχικής στις πλείστες των περιπτώσεων. Έρευνες όπως των Chen & Zhang (2013), έδειξαν ότι σε ένα σύστημα τεχνητών υδροβιότοπων με βλάστηση, που έχει το ρόλο προχωρημένης επεξεργασίας αστικών λυμάτων στην Κίνα, το γονίδιο sul I βρέθηκε μειωμένο στις εκροές ενώ το γονίδιο sul II βρέθηκε αυξημένο. Περεταίρω, οι Christofilopoulos et al. (2019), στην έρευνα τους απέδειξαν ότι σε τεχνητό υδροβιότοπο με χαλίκι και μακρόφυτα, τα γονίδια ανθεκτικότητας που αντιστοιχούν σε βακτήρια κοπρανώδους προέλευσης, ήταν αυξημένα στα λύματα των εκροών. Αυτό συμφωνεί με την παρούσα έρευνα για το γονίδιο sul II και, εν μέρη, για το γονίδιο ampC. Σε άλλη έρευνα που διεξήχθη από τους Sabri et al. (2021), εξετάστηκαν δύο μονάδες CWs ως προς την απομάκρυνση αντιβιοτικών και γονιδίων ανθεκτικότητας από αστικά λύματα. Ο χρόνος παραμονής ήταν μία και τρεις d, αντίστοιχα και οι μονάδες περιείχαν βλάστηση από *P. australis* με οριζόντια υποεπιφανειακή ροή. Το πόρισμα ήταν ότι η απομάκρυνση των ARGs κυμάνθηκε από 1-3 Logs, με τον χρόνο παραμονής και την εποχή (καλοκαίρι ή χειμώνας) να μην έχουν ιδιαίτερη επιρροή. Αξιοσημείωτη ήταν η συσχέτιση που βρέθηκε μεταξύ συγκεντρώσεων αντιβιοτικών, COD και TP στα λύματα, και γονιδίων ανθεκτικότητας.

Όσον αφορά στα διάφορα πληρωτικά που είναι διαθέσιμα, έρευνες δείχνουν ότι καλύτερη απομάκρυνση των ARGs έχει ο ζεόλιθος αντί ηφαιστειακών πετρωμάτων σε τεχνητούς υδροβιότοπους υποεπιφανειακής κάθετης ροής. Επίσης, ο ζεόλιθος αποδείχθηκε καλύτερος και συγκριτικά με κέλυφος στρειδιών και άλλων κεραμικών μέσων, σε CWs με οριζόντια υποεπιφανειακή ροή. Επιπλέον, άλλες ευνοϊκές παράμετροι θεωρούνται η υψηλή ειδική επιφάνεια του πληρωτικού υλικού, οι μικροπόροι και οι χημικές δομές που βοηθούν στην προσρόφηση (García et al., 2020). Ο ρόλος των φυτών είναι αμφιλεγόμενος, με έρευνες όπως των Hazra & Durso (2022), να υποστηρίζουν ότι αυτά έχουν έμμεση επιρροή στην απομάκρυνση των ARGs, παρέχοντας οξυγόνο στους μικροοργανισμούς και επιφάνεια για ανάπτυξη βιοφίλμ. Επίσης, υποστηρίζεται ότι από τα διάφορα φυτά που μπορούν να χρησιμοποιηθούν, τα καλάμια *P. australis* έχουν τα πιο υποσχόμενα επίπεδα απομάκρυνσης ARGs. Αντίθετα, οι Cardinal et al. (2014), απέδειξαν ότι για την απομάκρυνση αντιβιοτικών και γονιδίων ανθεκτικότητας από λύματα σε τεχνητούς υδροβιότοπους, η προσθήκη φυτών δεν είχε κάποιο ιδιαίτερο αντίκτυπο, κάτι το οποίο επαληθεύεται και στην παρούσα έρευνα.

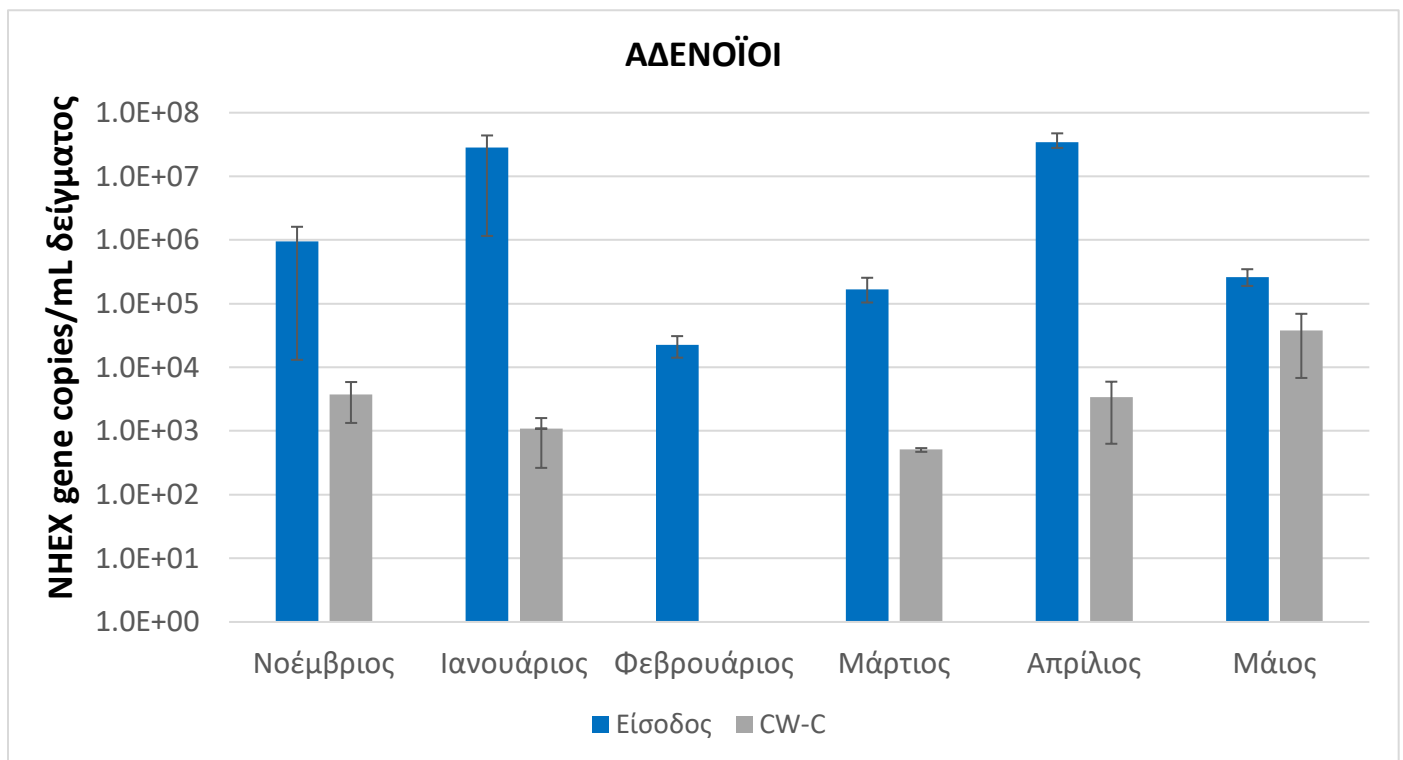
Ως ανερχόμενοι βιολογικοί ρύποι, τα γονίδια ανθεκτικότητας παρουσιάζουν διαφορετική συμπεριφορά και τύχη, σε διάφορα περιβαλλοντικά μέσα. Αυτό γίνεται αφού η μάζα και η σύνθεσή τους μπορεί να αλλάξει με τις βιολογικές δραστηριότητες εντός τεχνητού υδροβιότοπου. Συνεπώς, οι βιολογικές διεργασίες καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό την διαδικασία με την οποία αυξομειώνονται τα ARGs, καθώς όσο εύκολα μπορούν να τα υποβαθμίσουν, τόσο είναι δυνατή η μετάδοση και ο πολλαπλασιασμός τους (Chen et al., 2016).

### 3.4 Απομάκρυνση αδενοϊών μετά από επεξεργασία αστικών λυμάτων στους τεχνητούς υγροβιότοπους

Οι πιλοτικές μονάδες τεχνητών υγροβιότοπων εξετάζονται ως προς την απόδοσή τους στην βιολογική επεξεργασία αστικών λυμάτων και απομάκρυνση των αδενοϊών, ως δεικτών ιικής μόλυνσης στα λύματα. Ο έλεγχος απομάκρυνσης των αδενοϊών πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο real-time PCR, ποσοτικοποιώντας συγκεκριμένο γονίδιο ταυτοποίησης για τους εν λόγω ιούς. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται τα 24 δείγματα που εξετάστηκαν για την ύπαρξη αδενοϊών.

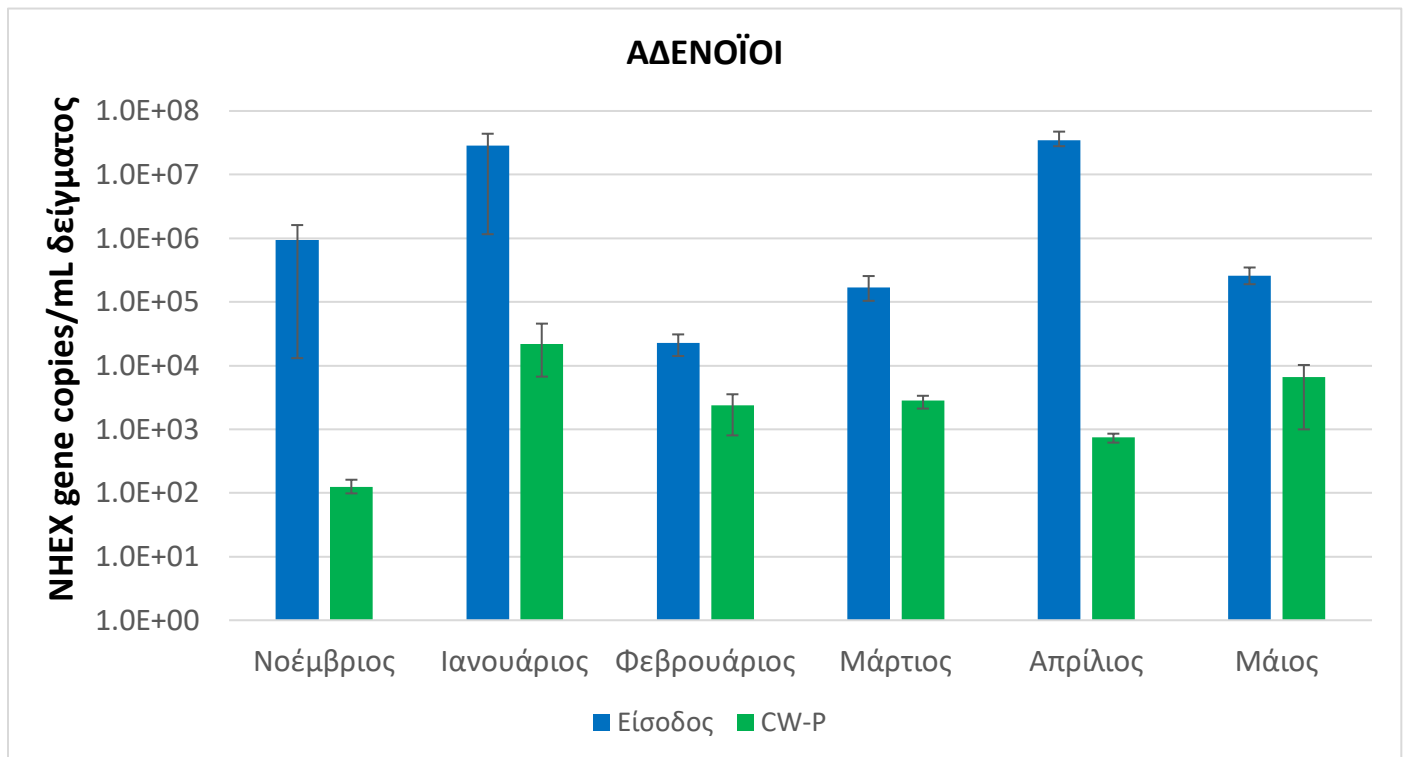
**Πίνακας 13.** Κωδικοποίηση δειγμάτων που εξετάστηκαν στη μέθοδο real-time PCR.

	Είσοδος	CW-G	CW-P	CW-C
<b>Νοέμβριος</b>	Δείγμα 1	Δείγμα 2	Δείγμα 3	Δείγμα 4
<b>Ιανουάριος</b>	Δείγμα 5	Δείγμα 6	Δείγμα 7	Δείγμα 8
<b>Φεβρουάριος</b>	Δείγμα 9	Δείγμα 10	Δείγμα 11	Δείγμα 12
<b>Μάρτιος</b>	Δείγμα 13	Δείγμα 14	Δείγμα 15	Δείγμα 16
<b>Απρίλιος</b>	Δείγμα 17	Δείγμα 18	Δείγμα 19	Δείγμα 20
<b>Μάιος</b>	Δείγμα 21	Δείγμα 22	Δείγμα 23	Δείγμα 24



**Γράφημα 35.** Ανίχνευση αδενοϊών στα λύματα πριν και μετά από επεξεργασία στον τεχνητό υγροβιότοπο CW-C την περίοδο δειγματοληψιών (ποσοτικοποίηση του γονιδίου ταυτοποίησης NHEX του αδενοϊού).

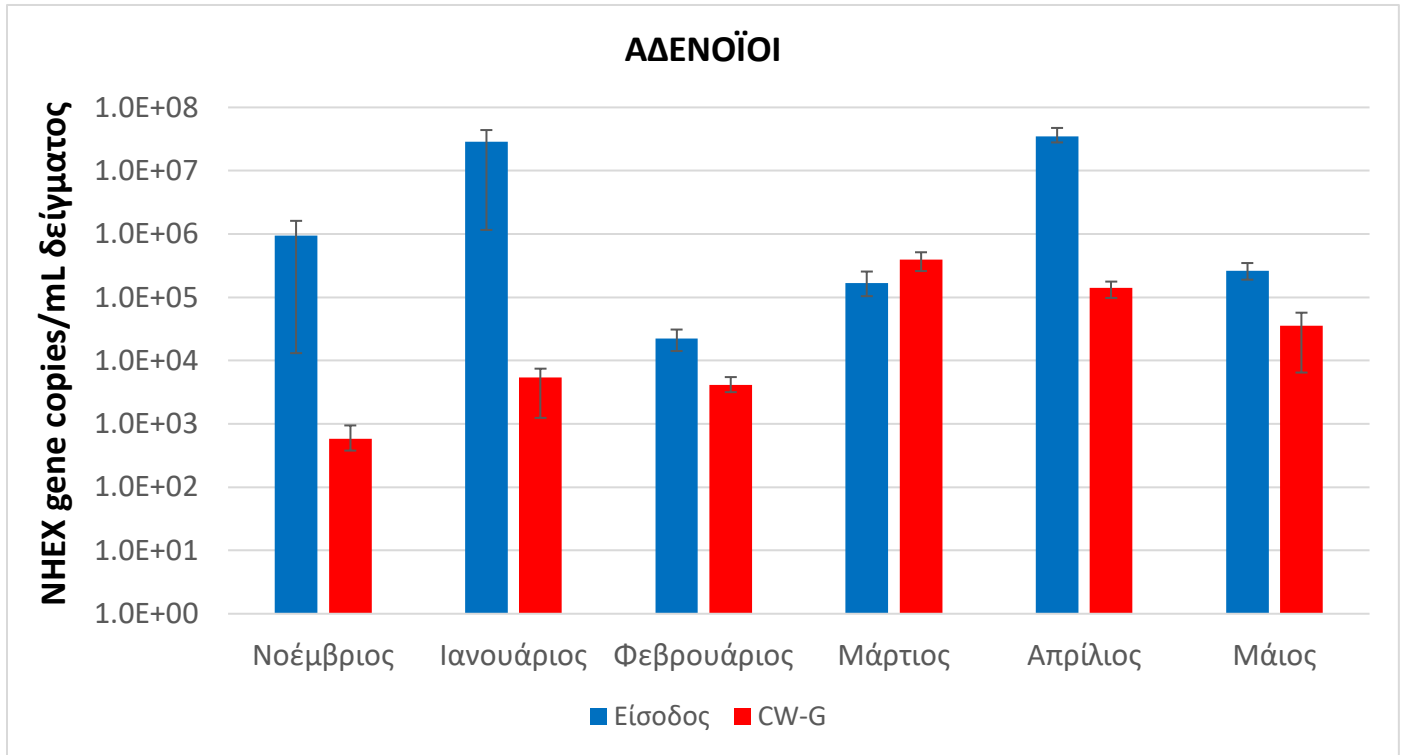
Στο γράφημα 35, που αφορά στον τεχνητό υγροβιότοπο CW-C με πληρωτικό υλικό πολυαιθυλένιο υψηλής πυκνότητας, παρατηρείται μια αρκετά θετική απόδοση στην απομάκρυνση των αδενοϊών. Συγκεκριμένα, στο δείγμα του Φεβρουαρίου, μετά την επεξεργασία δεν ανιχνεύεται καθόλου ο ιός αγγίζοντας, έτσι, απομάκρυνση 100%. Επίσης, απομακρύνσεις 4.41 Logs (99.99%) και 4.01 Logs (99.99%) επιτυγχάνονται τον Ιανουάριο και τον Απρίλιο αντίστοιχα.



**Γράφημα 36.** Ανίχνευση αδενοϊών στα λύματα πριν και μετά από επεξεργασία στον τεχνητό υγροβιότοπο CW-P την περίοδο δειγματοληψιών (ποσοτικοποίηση του γονιδίου ταυτοποίησης NHEX του αδενοϊού).

Στο παραπάνω γράφημα, φαίνονται τα αποτελέσματα των συγκεντρώσεων των αδενοϊών πριν και μετά την επεξεργασία στον τεχνητό υγροβιότοπο CW-P. Η μονάδα αυτή, η οποία περιέχει πολυαιθυλένιο υψηλής πυκνότητας και βλάστηση καλαμιών, παρουσιάζει πολύ καλές απομακρύνσεις, με την υψηλότερη να σημειώνεται τον Απρίλιο με 4.67 Logs

(99.99%). Στη συνέχεια, ακολουθούν οι μήνες Νοέμβριος και Ιανουάριος με 3.88 Logs (99.99%) και 3.11 Logs (99.92%) αντίστοιχα.



**Γράφημα 37.** Ανίχνευση αδενοϊών στα λύματα πριν και μετά από επεξεργασία στον τεχνητό υγροβιότοπο CW-G την περίοδο δειγματοληψιών (ποσοτικοποίηση του γονιδίου ταυτοποίησης NHEx του αδενοϊού).

Ο τεχνητός υγροβιότοπος CW-G του γραφήματος 37, με πληρωτικό υλικό χαλίκι και βλάστηση καλαμιών, φαίνεται να επιτυγχάνει μεγάλες απομακρύνσεις των αδενοϊών αρχικά, όμως στη συνέχεια φαίνεται να αδυνατεί να το διατηρήσει αυτό. Ιδιαίτερα, ο Ιανουάριος, ο Νοέμβριος και ο Απρίλιος, είναι οι μήνες με τις υψηλότερες απομακρύνσεις με 3.72 Logs (99.98%), 3.21 Logs (99.93%) και 2.39 Logs (99.59%), αντίστοιχως. Αντίθετα, τον Φεβρουάριο και τον Μάιο οι συγκεντρώσεις μειώθηκαν σχεδόν κατά μία τάξη μεγέθους, και τον Μάρτιο σημειώθηκε αύξηση της συγκέντρωσης των αδενοϊών μετά την επεξεργασία.

Βλέποντας την γενική εικόνα, οι τρεις πιλοτικές μονάδες τεχνητών υγροβιότοπων που εξετάστηκαν ήταν οι CW-C, CW-P, CW-G, ως προς την απομάκρυνση των αδενοϊών μετά από επεξεργασία αστικών λυμάτων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, προκύπτει το συμπέρασμα ότι ο τεχνητός υγροβιότοπος CW-C με πληρωτικό υλικό HDPE είναι ο



αποδοτικότερος, με μέσο όρο απομάκρυνσης 2.83 Logs. Εξίσου καλές απομακρύνσεις είχε και η μονάδα CW-P με μέσο όρο απομάκρυνσης 2.67 Logs. Ο τεχνητός υδροβιότοπος CW-G τους πρώτους μήνες της περιόδου έδωσε αρκετά καλές αποδόσεις αλλά, στη συνέχεια, δεν ανταποκρίθηκε με τον ίδιο τρόπο, έχοντας έναν μέσο όρο απομάκρυνσης 1.76 Logs.

Κατά την έρευνα των Kaliakatsos et al. (2019), παρατηρήθηκε ότι σε ένα σύστημα τεχνητών υδροβιότοπων για την επεξεργασία αστικών λυμάτων, η απομάκρυνση των αδενοϊών κυμάνθηκε από 3.35 Logs έως 4.27 Logs. Επίσης, το είδος ροής έδειξε να παίζει σημαντικό ρόλο, με την υποεπιφανειακή να θεωρείται η αποτελεσματικότερη. Η ύπαρξη βλάστησης και η απορρόφηση που συμβαίνει στις ρίζες, ήταν ακόμα δύο χαρακτηριστικά που ευνόησαν την απομάκρυνσή τους, γεγονός που ισχύει και στην παρούσα έρευνα. Επίσης, σε έρευνα που διεξήχθη από τους Rachmadi et al. (2016), διαπιστώθηκε ότι οι αδενοϊοί ήταν σε μεγαλύτερη αφθονία σε σύγκριση με άλλους ιούς εντερικής προέλευσης που ανιχνεύθηκαν σε ανεπεξέργαστα αστικά λύματα. Ωστόσο, η μετέπειτα επεξεργασία των λυμάτων σε τεχνητούς υδροβιότοπους έδειξε μείωση της συγκέντρωσης των ιών κατά μέσο όρο 2.5 Logs, με την θερμοκρασία και τον χρόνο παραμονής να είναι σημαντικές παράμετροι. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας, ο τεχνητός υδροβιότοπος χωρίς βλάστηση υπερτερεί στην απομάκρυνση των αδενοϊών έναντι των άλλων δύο, όπου υπάρχει βλάστηση καλαμιών. Αυτό έρχεται σε συμφωνία με την έρευνα της Aretaki (2022), για τις ίδιες μονάδες της παρούσας μελέτης, οι οποίες εξετάστηκαν σε προηγούμενη χρονική περίοδο. Σε άλλη μελέτη (Quiñónez-Díaz et al. 2001) παρατηρήθηκε απομάκρυνση μεγαλύτερη κατά 2 Logs σε μονάδες που υπήρχε κάποιο είδος βλάστησης.

Οι ιοί, λόγω των μικροσκοπικών τους διαστάσεων, έχουν πολύ μικρές ταχύτητες καθίζησης και η συγκράτησή τους από τα μέσα φιλτραρίσματος καθίσταται δύσκολη. Για αυτό, η πιο αποτελεσματική μέθοδος απομάκρυνσης θεωρείται η προσρόφηση. Η προσρόφηση των ιών σε πορώδη μέσα σχετίζεται με τα χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών στο εξωτερικό καψίδιο του ιού και οι ηλεκτροστατικές απωθητικές δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ ιού και πορώδους μέσου εξαρτώνται από το pH και την ιοντική ισχύ. Αυτό σημαίνει ότι σε αυξημένο pH, η ηλεκτροστατική απώθηση θα αυξηθεί, όντας και τα δύο σώματα, ιοί και πορώδη μέσα, αρνητικά φορτισμένα. Από την άλλη, με την αύξηση της ιοντικής ισχύος οι ενεργειακοί φραγμοί ελαττώνονται, προωθώντας την προσκόλληση σε επιφάνειες και κατ' επέκταση την προσρόφηση. Μία άλλη συνθήκη που επηρεάζει τον ρυθμό μείωσης της συγκέντρωσης των παθογόνων σε ένα σύστημα τεχνητού υδροβιότοπου είναι η υπεριώδης ηλιακή ακτινοβολία. Βέβαια, αυτό αφορά μονάδες με ελεύθερη επιφάνεια νερού, εκτεθειμένες στην ατμόσφαιρα και χωρίς φυτά που δημιουργούν σκίαση και όχι υποεπιφανειακής ροής, όπως αυτής της μελέτης (Wang et al., 2021).

## 4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ & ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

### 4.1 Συμπεράσματα

#### Απομάκρυνση βακτηρίων

Οι τεχνητοί υγροβιότοποι αυτής της μελέτης κατάφεραν να απομακρύνουν με μεγάλη επιτυχία τους βακτηριακούς δείκτες εντερικής προέλευσης. Συγκεκριμένα, οι κοπρανώδεις στρεπτόκοκκοι όπως *Enterococcus* sp. και τα κοπρανώδη κολοβακτηριοειδή όπως *E. coli*, μειώθηκαν σημαντικά μετά την επεξεργασία των αστικών λυμάτων στους τεχνητούς υγροβιότοπους, και αρκετές φορές η απομάκρυνση έφτασε το 99%. Από τις τρεις μονάδες CW-C, CW-P, CW-G, η πιο αποτελεσματική ήταν η CW-P με πληρωτικό υλικό πολυαιθυλένιο υψηλής πυκνότητας HDPE και βλάστηση καλαμιών *P. australis*. Το μεγάλο πορώδες του HDPE (95%) και η δράση των φυτών και των εκκρίσεων των ριζών τους, ήταν συνδυασμός ο οποίος συνετέλεσε στην ανάδειξη αυτής της μονάδας ως την καλύτερη από τις τρεις. Η δεύτερη καλύτερη επίδοση σημειώθηκε στη μονάδα CW-C, η οποία έχει επίσης πληρωτικό υλικό πολυαιθυλένιο υψηλής πυκνότητας HDPE, αλλά όχι βλάστηση. Όσον αφορά στην απομάκρυνση των βακτηρίων, η λιγότερο αποδοτική μονάδα ήταν η CW-G με πληρωτικό υλικό ασβεστολιθικό χαλίκι (πορώδες=38%) και βλάστηση καλαμιών *P. australis*. Ακόμη, όπως φάνηκε από τα αποτελέσματα των απομακρύνσεων, καμία από τις τρεις αυτές μονάδες δεν κατάφερε να απομακρύνει το βακτήριο *S. aureus* από τα λύματα. Συνεπώς, οι συγκεκριμένες μονάδες συνιστώνται ως μια εναλλακτική μέθοδος απολύμανσης αστικών λυμάτων, με υψηλή επιτυχία σε βακτήρια εντερικής προέλευσης.

#### Μεταβολή του προφίλ ανθεκτικότητας

Από τα βακτήρια κοπρανώδους προέλευσης που εξετάστηκαν, διαπιστώθηκε ότι τα εναπομείναντα κατόπιν της επεξεργασίας - *E. coli*, *Enterococcus* sp. - έγιναν πιο ανθεκτικά. Η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωσή τους στα αντιβιοτικά αυξήθηκε, και ιδιαίτερα του βακτηρίου *E. coli* στο αντιβιοτικό Amoxicillin και των εντεροκόκκων στο αντιβιοτικό Ciprofloxacin. Άλλες έρευνες πάνω στο ίδιο αντικείμενο επεσήμαναν πως οι τεχνητοί υγροβιότοποι τείνουν να παράγουν ανθεκτικότερα βακτήρια, κάτι που όπως φαίνεται ισχύει και στην παρούσα έρευνα. Αντιθέτως, το βακτήριο *S. aureus* που δεν μπόρεσε να μειωθεί από τους τεχνητούς υγροβιότοπους, αλλά συγχρόνως η συγκέντρωσή ήταν αυξημένη στις εκροές, κατάφερε να διατηρήσει την ανθεκτικότητά του σχεδόν σταθερή και στα τρία αντιβιοτικά.

#### Απομάκρυνση γονιδίων ανθεκτικότητας

Η διασπορά της ανθεκτικότητας στο περιβάλλον είναι ένα σοβαρό ζήτημα που αποτελεί αντικείμενο πολλών ερευνών. Αν και οι μηχανισμοί με τους οποίους τα βακτήρια γίνονται πιο ανθεκτικά στα αντιβιοτικά έχουν μελετηθεί, υπάρχουν ελάχιστοι τρόποι με τους οποίους μπορεί να περιοριστεί η εξάπλωση της ανθεκτικότητας. Οι τεχνητοί υγροβιότοποι

του πειράματος φαίνεται να μην έχουν μια ξεκάθαρη συμπεριφορά απέναντι στην απομάκρυνση γονιδίων ανθεκτικότητας από τα λύματα ύστερα από την επεξεργασία. Αυτό φαίνεται από το γεγονός ότι το γονίδιο qnrA σχεδόν δεν ανιχνεύθηκε στις εκροές των τεχνητών υδροβιότοπων, το γονίδιο ampC αυξομειώθηκε και το γονίδιο sul II βρέθηκε παντού αυξημένο. Επίσης, δεν μπορεί να οριστεί κάποια από τις τρεις μονάδες ως αποτελεσματικότερη, καθώς για το γονίδιο qnrA η μονάδα CW-P (HDPE + *P. australis*) ήταν αυτή με τις καλύτερες απομακρύνσεις, ενώ για το γονίδιο ampC η μονάδα CW-G (χαλίκι + *P. australis*) σημείωσε μεγαλύτερες απομακρύνσεις. Οι δύο αυτές μονάδες περιέχουν βλάστηση και έτσι συμφωνούν με πολλές έρευνες που υποστηρίζουν ότι η βλάστηση προσφέρει καλύτερη απομάκρυνση ARGs. Παρ' όλα αυτά, για την βαθύτερη κατανόηση της συμπεριφοράς και τύχης των ARGs στο υδάτινο περιβάλλον και κατά το στάδιο επεξεργασίας λυμάτων απαιτείται περεταίρω έρευνα.

### **Απομάκρυνση αδενοϊών**

Κατά την μελέτη των αποτελεσμάτων όσον αφορά στην απομάκρυνση των αδενοϊών, υπήρξαν περιπτώσεις που η απομάκρυνση έφτασε έως και 99%. Σε γενικές γραμμές, παρατηρήθηκε μια μείωση της συγκέντρωσης τους μετά την επεξεργασία των λυμάτων. Από τις τρεις μονάδες, η CW-C με την CW-P συναγωνίστηκαν για το προβάδισμα, με την CW-C να είναι ελάχιστα πιο αποτελεσματική. Οι δύο αυτές μονάδες περιέχουν, για πληρωτικό υλικό, πολυαιθυλένιο υψηλής πυκνότητας HDPE, με την διαφορά ότι η CW-P έχει και βλάστηση καλαμιών *P. australis*. Βέβαια, όπως φάνηκε, η βλάστηση δεν ευνόησε την απομάκρυνση των ιών, πράγμα αμφιλεγόμενο, καθώς πολλές έρευνες υποστηρίζουν ότι τα φυτά σε τεχνητούς υδροβιότοπους σχετίζονται με υψηλότερες απομακρύνσεις. Συμπερασματικά, οι αδενοϊοί, λόγω των μικροσκοπικών τους διαστάσεων, έχουν πολύ μικρές ταχύτητες καθίζησης και η συγκράτησή τους από τα μέσα φιλτραρίσματος καθίσταται δύσκολη. Για αυτό, η πιο αποτελεσματική μέθοδος απομάκρυνσης τους θεωρείται η προσρόφηση, όπως φάνηκε και από τις μονάδες που είχαν πληρωτικά υλικά με μεγάλο πορώδες.

## **4.2 Προτάσεις**

Παρακάτω παρατίθενται ορισμένες προτάσεις που θα μπορούσαν να αποτελέσουν αντικείμενο μελλοντικής έρευνας και ίσως να βελτιώσουν την λειτουργία και την απόδοση των τεχνητών υδροβιότοπων.

- Αλλαγή ορισμένων συνθηκών, όπως αύξηση του χρόνου παραμονής του λύματος και προσθήκη αερισμού
- Χρήση διαφορετικών πληρωτικών υλικών, όπως ο ζεόλιθος και η ενεργός ιλύς

- Δοκιμή άλλης βλάστησης, όπως *Typha* και *Scirpus*, ή ακόμα και κάτι πιο τοπικό, όπως *Nasturtium officinale* (νεροκάρδαμο) και *Coriandrum sativum* (κόλιανδρος)
- Εξέταση περισσότερων παθογόνων μικροοργανισμών και γονιδίων ανθεκτικότητας, για περαιτέρω κατανόηση των μηχανισμών απομάκρυνσης
- Συνδυασμός διαφορετικών τύπων τεχνητών υγροβιότοπων, με διαφορετικά πληρωτικά υλικά, με σκοπό τη δημιουργία ενός πιο πολύπλοκου συστήματος

## 5. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

**Πίνακας 14.** Κωδικοποίηση δειγμάτων και αποτελέσματα απομόνωσης και καθαρότητας DNA.

	<b>IN</b>		<b>G</b>		<b>P</b>		<b>C</b>	
<b>Νοέμβριος</b>	<b>Δείγμα 1</b>		<b>Δείγμα 2</b>		<b>Δείγμα 3</b>		<b>Δείγμα 4</b>	
	DNA=21.9 ng/μL	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> = 1.87	DNA=13 ng/μL	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> = 1.84	DNA=6.8 ng/μL	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> = 1.98	DNA=17 ng/μL	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> = 1.87
<b>Ιανουάριος</b>	<b>Δείγμα 5</b>		<b>Δείγμα 6</b>		<b>Δείγμα 7</b>		<b>Δείγμα 8</b>	
	DNA=114.9 ng/μL	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> = 1.78	DNA=21.3 ng/μL	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> = 1.86	DNA=40.4 ng/μL	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> = 1.86	DNA=48.3 ng/μL	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> = 2.06
<b>Φεβρουάριος</b>	<b>Δείγμα 9</b>		<b>Δείγμα 10</b>		<b>Δείγμα 11</b>		<b>Δείγμα 12</b>	
	DNA=18.4 ng/μL	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> = 1.97	DNA=24.8 ng/μL	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> = 1.91	DNA=14.8 ng/μL	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> = 1.95	DNA=60.9 ng/μL	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> = 1.45
<b>Μάρτιος</b>	<b>Δείγμα 13</b>		<b>Δείγμα 14</b>		<b>Δείγμα 15</b>		<b>Δείγμα 16</b>	
	DNA=24.3 ng/μL	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> = 1.50	DNA=11.7 ng/μL	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> = 1.62	DNA=93.4 ng/μL	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> = 1.52	DNA=3.4 ng/μL	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> = 1.60
<b>Απρίλιος</b>	<b>Δείγμα 17</b>		<b>Δείγμα 18</b>		<b>Δείγμα 19</b>		<b>Δείγμα 20</b>	
	DNA=178.7 ng/μL	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> = 1.59	DNA=28.7 ng/μL	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> = 1.71	DNA=3.4 ng/μL	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> = 1.21	DNA=18.1 ng/μL	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> = 1.69
<b>Μάιος</b>	<b>Δείγμα 21</b>		<b>Δείγμα 22</b>		<b>Δείγμα 23</b>		<b>Δείγμα 24</b>	
	DNA=27.1 ng/μL	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> = 2.02	DNA=73.4 ng/μL	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> = 2.92	DNA=13.9 ng/μL	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> = 1.42	DNA=38.6 ng/μL	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> = 1.32

**Πίνακας 15.** Συνθήκες αντίδρασης real-time PCR για την ανίχνευση γονιδίων ανθεκτικότητας.

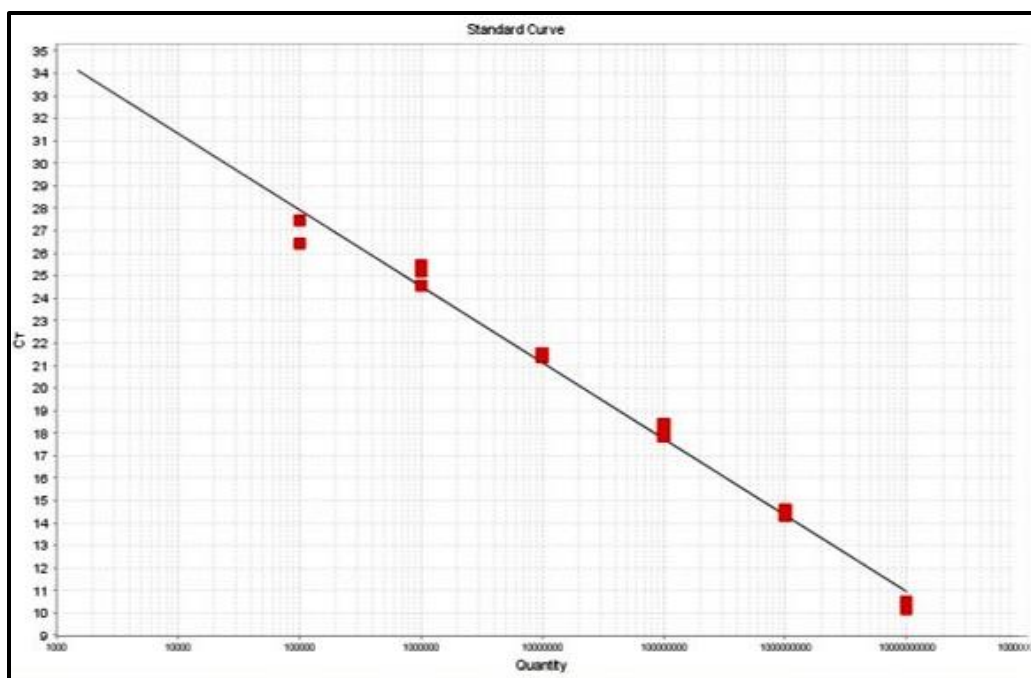
ARGs	Εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή 5'-3'	Προϊόν PCR (bp)	Συνθήκες αντίδρασης PCR	Μίγμα αντίδρασης, 20 $\mu$ L	Βιβλιογραφικές αναφορές
qnrA	qnrA-F	GATAAAGTTTTT CAGCAAGAGG	543	95 °C for 5min  < 94 °C for 1.5min 64 °C for 30s 72 °C for 1min > 35 cycles  95 °C for 15s 64 °C for 1min 95 °C for 15s	Master mix 1X Primer F 0.4 $\mu$ M Primer R 0.4 $\mu$ M DNA 2 $\mu$ L	Rodríguez-Martínez et al., 2003, Cummings et al., 2011
	qnrA-R	ATCCAGATCGG CAAAGGTTA				
ampC	ampC-F	TTCTATCAAMA CTGGCARCC	550	95 °C for 5min  < 94 °C for 30s 49 °C for 30s 72 °C for 1min > 35 cycles  95 °C for 15s 60 °C for 1min 95 °C for 15s	Master mix 1X Primer F 0.2 $\mu$ M Primer R 0.2 $\mu$ M DNA 2 $\mu$ L	Schwartz et al., 2003
	ampC-R	CCYTTTTATGTA CCCAYGA				
sul II	sul2-F	GCGCTCAAGG CAGATGGCATT	293	94 °C for 5min  < 94 °C for 15s 69 °C for 30s 72 °C for 1min > 35 cycles  95 °C for 15s 69 °C for 30s 95 °C for 15s	Master mix 1X Primer F 0.2 $\mu$ M Primer R 0.2 $\mu$ M DNA 2 $\mu$ L	Kern, 2002
	sul2-R	GCGTTTGATAC CGGCACCCGT				

**Πίνακας 16.** Συνθήκες αντίδρασης real-time PCR για την ανίχνευση του γονιδίου 16S rRNA - συνολικό ριβοσωμικό βακτηριακό γενετικό υλικό.

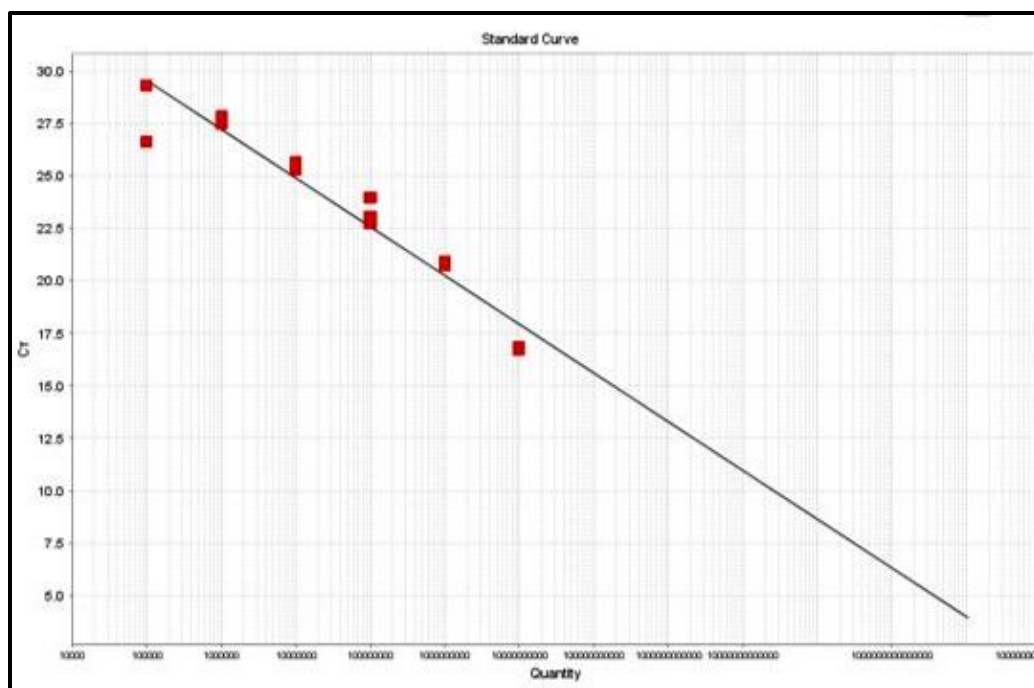
Εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή 5'-3'	Προϊόν PCR (bp)	Συνθήκες αντίδρασης PCR	Μίγμα αντίδρασης, 20 µL	Βιβλιογραφική αναφορά
8F	AGAGTTTGATCCTGGC TCAG	1500	95 °C for 4min < 95 °C for 1min 55 °C for 30s 72 °C for 30s > 30 cycles	Master mix 1X Primer F 0.5 µM Primer R 0.5 µM DNA 2µL	Dupont et al., 2014
1492R	GGTTACCTTGTTACGA CTT		95 °C for 15s 60 °C for 1min 95 °C for 15sec		

**Πίνακας 17.** Συνθήκες αντίδρασης real-time PCR για την ανίχνευση αδενοϊών μέσω του γονιδίου ταυτοποίησης NHEX.

Εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή 5'-3'	Προϊόν PCR (bp)	Συνθήκες αντίδρασης PCR	Μίγμα αντίδρασης, 20 µL	Βιβλιογραφικές αναφορές
NHEXA	GCCACCGAGACGTA CTTCAGCCT G	143	95 °C for 10min < 95 °C for 30s 55 °C for 1min 72 °C for 1min > 35 cycles	Master mix 1X Primer F 0.2 µM Primer R 0.2 µM DNA 2µl	Pina et al., 1998
NHEXB	TTGTACGAGTACGCGGTATCCTC GCGGTC		95 °C for 15s 55 °C for 30s 95 °C for 15s		

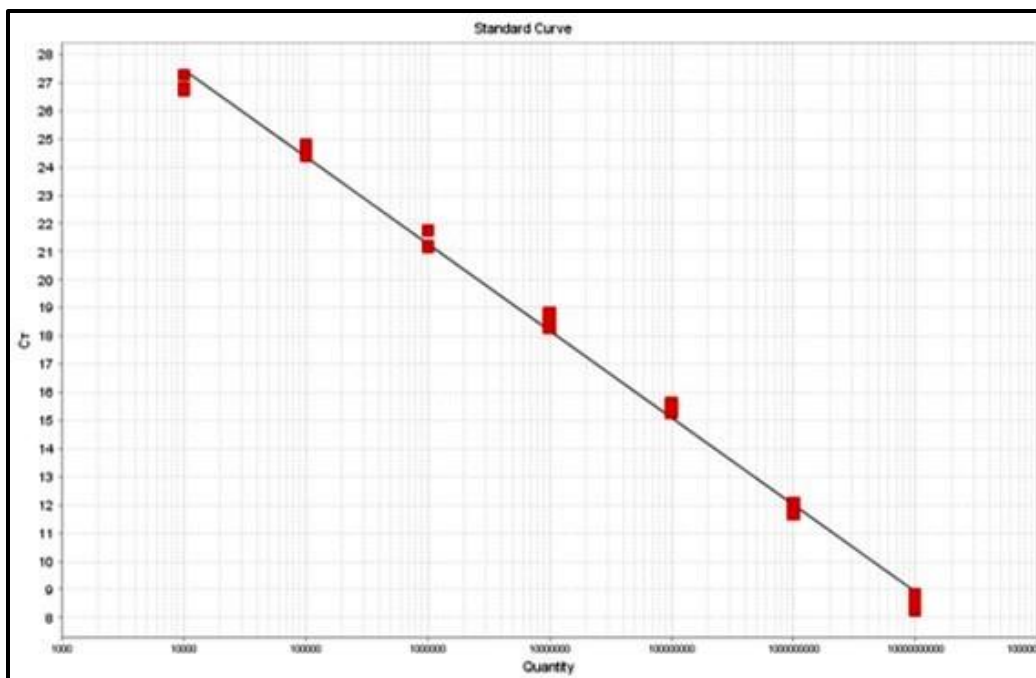


**Εικόνα 16.** Πρότυπη καμπύλη για το γονίδιο qnrA, με Slope: -3.392 και  $R^2$ : 0.99.

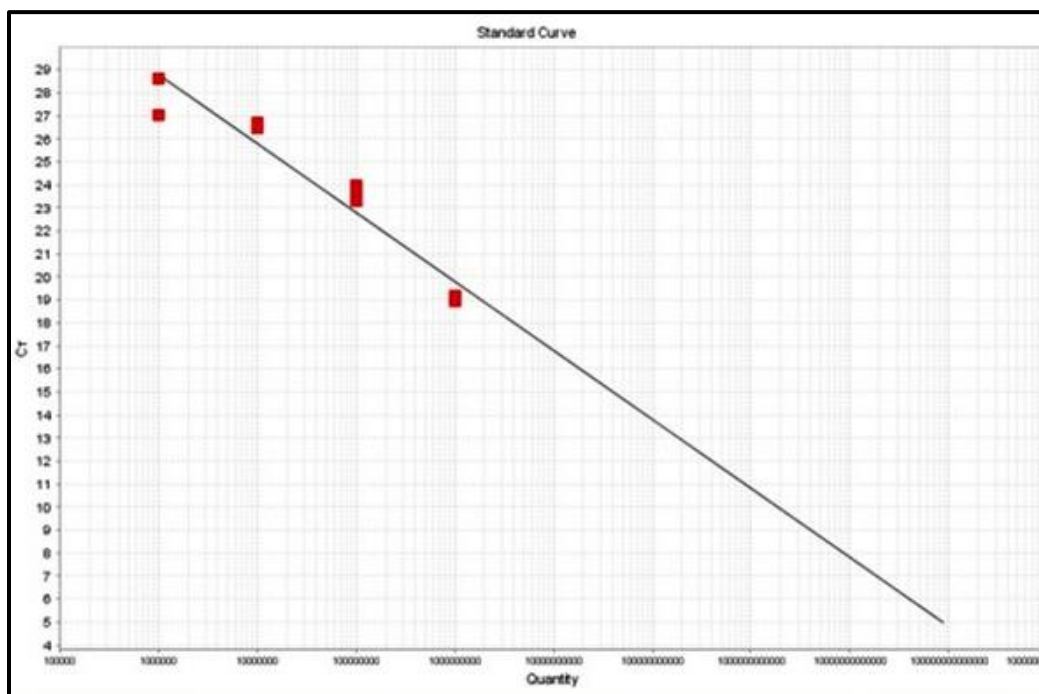


**Εικόνα 17.** Πρότυπη καμπύλη για το γονίδιο ampC, με Slope: -2.322 και  $R^2$ : 0.941.

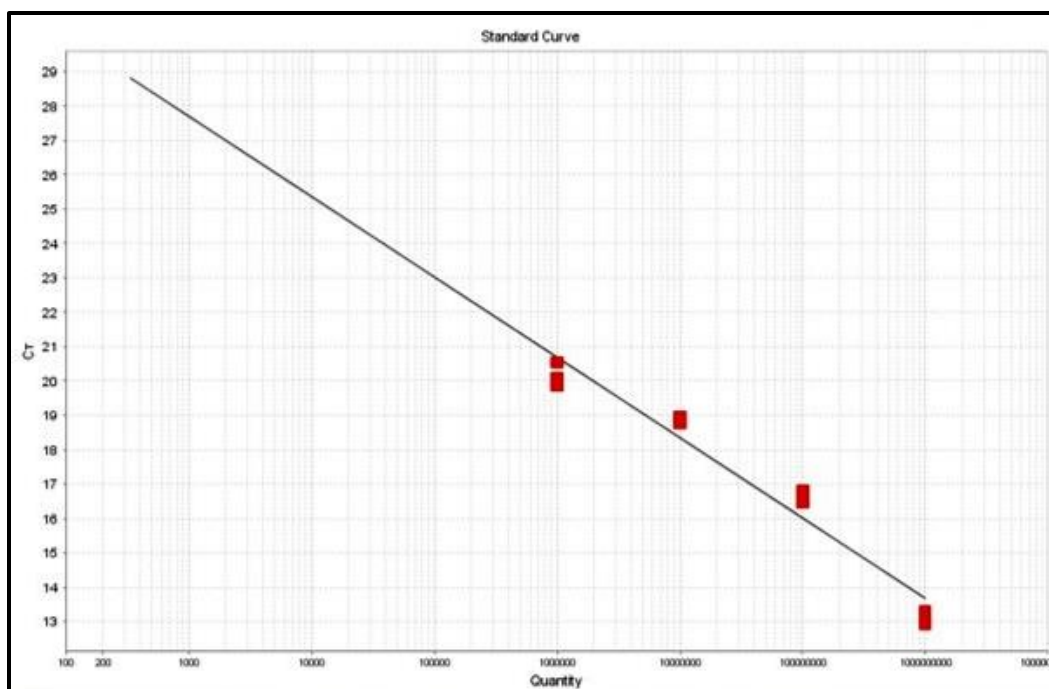




**Εικόνα 18.** Πρότυπη καμπύλη για το γονίδιο sul II, με Slope: -3.086 και  $R^2$ : 0.996.



**Εικόνα 19.** Πρότυπη καμπύλη για το γονίδιο 16S rRNA, με Slope: -2.993 και  $R^2$ : 0.93.



**Εικόνα 20.** Πρότυπη καμπύλη για το γονίδιο NHEX, με Slope: -2.332 και  $R^2$ : 0.956.

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### Επιστημονικά άρθρα

- Al-Harthy, T., Zoghaib, W., & Abdel-Jalil, R. (2020). Importance of Fluorine in Benzazole Compounds [Online image]. *Molecules*, 25(20), 4677. <https://doi.org/10.3390/molecules25204677>
- Almakki, A., Jumas-Bilak, E., Marchandin, H., & Licznar-Fajardo, P. (2019). Antibiotic resistance in urban runoff. *Science of the Total Environment*, 667, 64–76. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.183>
- Bajaj, P., Singh, N. S., & Virdi, J. S. (2016). Escherichia coli  $\beta$ -lactamases: What really matters. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00417>
- Bishop, R., & Kirkwood, C. (2008). Enteric Viruses. *Encyclopedia of Virology*, 116-123. <https://doi.org/10.1016/b978-012374410-4.00386-1>
- Blount, Z. (2015). The unexhausted potential of *E. coli*. *Elife*, 4. <https://doi.org/10.7554/elife.05826>
- Bôto, M. L., Dias, S. M., Crespo, R. D., Mucha, A. P., & Almeida, C. M. (2023). Removing chemical and biological pollutants from swine wastewater through constructed wetlands aiming reclaimed water reuse. *Journal of Environmental Management*, 326, 116642. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.116642>
- Brandt, M., Johnson, K., Elphinston, A., & Ratnayaka, D. (2017). Chemistry, Microbiology and Biology of Water. *Twort's Water Supply*, 235-321. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100025-0.00007-7>
- Browne, K., Chakraborty, S., Chen, R., Willcox, M., Black, D., Walsh, W., & Kumar, N. (2020). A New Era of Antibiotics: The Clinical Potential of Antimicrobial Peptides [Online image]. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(19), 7047. <https://doi.org/10.3390/ijms21197047>
- Brusseu, M., Pepper, I., & Gerba, C. (2019). *Environmental and Pollution Science* (3rd ed., pp. 191-217). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814719-1.00013-6>
- Caetano-Anollés, D. (2013). Polymerase chain reaction. *Brenner's Encyclopedia of Genetics*, 392–395. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-374984-0.01186-4>
- Calatrava, E. (2022). Other *Streptococcus* Species and *Enterococcus*. *Encyclopedia Of Infection And Immunity*, 529-541. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818731-9.00159-2>
- Cardinal, P., Anderson, J. C., Carlson, J. C., Low, J. E., Challis, J. K., Beattie, S. A., Bartel, C. N., Elliott, A. D., Montero, O. F., Lokesh, S., Favreau, A., Kozlova, T. A., Knapp, C. W., Hanson, M. L., & Wong, C. S. (2014). Macrophytes may not contribute significantly to removal of nutrients, pharmaceuticals, and antibiotic

- resistance in model surface constructed wetlands. *Science of the Total Environment*, 482-483, 294–304. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.02.095>
- Carvalho, I. T., & Santos, L. (2016). Antibiotics in the aquatic environments: A review of the European scenario [Online image]. *Environment International*, 94, 736–757. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.06.025>
- Castle, S. (2007). Amoxicillin. *Xpharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, 1-6. <https://doi.org/10.1016/b978-008055232-3.61222-x>
- Chen, H., & Zhang, M. (2013). Effects of advanced treatment systems on the removal of antibiotic resistance genes in wastewater treatment plants from Hangzhou, China. *Environmental Science & Technology*, 130711162357003. <https://doi.org/10.1021/es401091y>
- Chen, J., Ying, G.-G., Wei, X.-D., Liu, Y.-S., Liu, S.-S., Hu, L.-X., He, L.-Y., Chen, Z.-F., Chen, F.-R., & Yang, Y.-Q. (2016). Removal of antibiotics and antibiotic resistance genes from domestic sewage by constructed wetlands: Effect of flow configuration and plant species. *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, 94–103. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.05.006>
- Cisneros, B. (2011). Safe Sanitation in Low Economic Development Areas. *Treatise on Water Science*, 147-200. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-53199-5.00082-8>
- Cummings, D.E., Archer, K.F., Arriola, D.J., Baker, P.A., Faucett, K.G., Laroya, J.B., Pfeil, K.L., Ryan, C.R., Ryan, K.R.U., Zuill, D.E., 2011. Broad dissemination of plasmid-mediated quinolone resistance genes in sediments of two urban coastal wetlands. *Environ. Sci. Technol.* 45, 447–454. <https://doi.org/10.1021/es1029206>
- Danner, M.-C., Robertson, A., Behrends, V., & Reiss, J. (2019). Antibiotic pollution in surface fresh waters: Occurrence and effects. *Science of the Total Environment*, 664, 793–804. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.406>
- Davis, J. (2018). Pharmacologic Principles. *Equine Internal Medicine*, 79-137. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-44329-6.00002-4>
- Desmarchelier, P., & Fegan, N. (2011). Pathogens in Milk: *Escherichia coli*. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 60-66. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.00989-6>
- Díaz, F. J., O'Geen, A. T., & Dahlgren, R. A. (2010). Efficacy of constructed wetlands for removal of bacterial contamination from agricultural return flows. *Agricultural Water Management*, 97(11), 1813–1821. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2010.06.015>

- Dupont, S., Carré-Mlouka, A., Descarrega, F., Ereskovsky, A., Longeon, A., Mouray, E., Florent, I., & Bourguet-Kondracki, M. L. (2014). Diversity and biological activities of the bacterial community associated with the Marine Sponge *Phorbas Tenacior* (Porifera, Demospongiae). *Letters in Applied Microbiology*, 58(1), 42–52. <https://doi.org/10.1111/lam.12154>
- Emmerson, A. (2003). The quinolones: decades of development and use. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(90001), 13-20. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg208>
- Englande, A., Krenkel, P., & Shamas, J. (2015). Wastewater Treatment & Water Reclamation. *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-409548-9.09508-7>
- Fong, T., & Lipp, E. (2005). Enteric Viruses of Humans and Animals in Aquatic Environments: Health Risks, Detection, and Potential Water Quality Assessment Tools. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69(2), 357-371. <https://doi.org/10.1128/mmbr.69.2.357-371.2005>
- García, J. A., Paredes, D., & Cubillos, J. A. (2013). 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, 123228. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123228>
- 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, 123228. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123228>
- Gerba, C. (2015). Environmentally Transmitted Pathogens. *Environmental Microbiology*, 509-550. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-394626-3.00022-3>
- Halkman, H., & Halkman, A. (2014). Indicator Organisms. *Encyclopedia of Food Microbiology*, 358-363. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-384730-0.00396-7>
- Hazra, M., & Durso, L. M. (2022). Performance efficiency of conventional treatment plants and constructed wetlands towards reduction of antibiotic resistance. *Antibiotics*, 11(1), 114. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11010114>
- Hdidou, M., Necibi, M. C., Labille, J., El Hajjaji, S., Dhiba, D., Chehbouni, A., & Roche, N. (2021). Potential use of constructed wetland systems for rural sanitation and

- wastewater reuse in agriculture in the Moroccan context. *Energies*, 15(1), 156. <https://doi.org/10.3390/en15010156>
- Headley, T., Nivala, J., Kassa, K., Olsson, L., Wallace, S., Brix, H., van Afferden, M., & Müller, R. (2013). Escherichia coli removal and internal dynamics in subsurface f low ecotechnologies: Effects of design and plants. *Ecological Engineering*, 61, 564–574. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2013.07.062>
- Helt, C. D., Weber, K. P., Legge, R. L., & Slawson, R. M. (2012). Antibiotic resistance profiles of representative wetland bacteria and faecal indicators following ciprofloxacin exposure in lab-scale constructed mesocosms. *Ecological Engineering*, 39, 113–122. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2011.11.007>
- Hench, K. R., Bissonnette, G. K., Sexstone, A. J., Coleman, J. G., Garbutt, K., & Skousen, J. G. (2003). Fate of physical, chemical, and microbial contaminants in domestic wastewater following treatment by small constructed wetlands. *Water Research*, 37(4), 921–927. [https://doi.org/10.1016/s0043-1354\(02\)00377-9](https://doi.org/10.1016/s0043-1354(02)00377-9)
- Hudson, J. (2014). MICROBIOLOGICAL SAFETY OF MEAT | *Staphylococcus aureus*. *Encyclopedia of Meat Sciences*, 376-381. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-384731-7.00041-6>
- Hutchings, M., Truman, A., & Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*, 51, 72-80. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>
- Jay, Z. J., & Inskeep, W. P. (2015). The distribution, diversity, and importance of 16S rrna gene introns in the order thermoproteales. *Biology Direct*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s13062-015-0065-6>
- Jiang, S., Noble, R., & Chu, W. (2001). Human Adenoviruses and Coliphages in Urban Runoff-Impacted Coastal Waters of Southern California. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(1), 179-184. <https://doi.org/10.1128/aem.67.1.179-184.2001>
- Kadariya, J., Smith, T., & Thapaliya, D. (2014). *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Food- Borne Disease: An Ongoing Challenge in Public Health. *Biomed Research International*, 2014, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2014/827965>
- 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 & Biotechnology*. <https://doi.org/10.1002/jctb.6001>
- Kern, M. B. (2002). Susceptibility of Danish Escherichia coli strains isolated from urinary tract infections and bacteraemia, and distribution of sul genes conferring sulphonamide resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50(4), 513–516. <https://doi.org/10.1093/jac/dkf164>

- Kowalska-Krochmal, B., & Dudek-Wicher, R. (2021). The minimum inhibitory concentration of antibiotics: Methods, interpretation, clinical relevance. *Pathogens*, 10(2), 165. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020165>
- Kralik, P., & Ricchi, M. (2017). A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: Definitions, parameters, and everything. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00108>
- Krawczyk, B., Wityk, P., Gałęcka, M., & Michalik, M. (2021). The many faces of enterococcus spp.—commensal, probiotic and opportunistic pathogen. *Microorganisms*, 9(9), 1900. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091900>
- Licitra, G. (2013). Etymologia: *Staphylococcus*. *Emerging Infectious Diseases*, 19(9). <https://doi.org/10.3201/eid1909.et1909>
- Martinson, J., & Walk, S. (2020). *Escherichia coli* Residency in the Gut of Healthy Human Adults. *Ecosal Plus*, 9(1). <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.esp-0003-2020>
- McKee, A., & Cruz, M. (2021). Microbial and Viral Indicators of Pathogens and Human Health Risks from Recreational Exposure to Waters Impaired by Fecal Contamination. *Journal of Sustainable Water in the Built Environment*, 7(2). <https://doi.org/10.1061/jswbay.0000936>
- Michelow, I., & McCracken, G. (2009). ANTIBACTERIAL THERAPEUTIC AGENTS. *Feigin and Cherry's Textbook of Pediatric Infectious Diseases*, 3178-3227. <https://doi.org/10.1016/b978-1-4160-4044-6.50253-3>
- Munita, J., & Arias, C. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*, 4(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.vmbf-0016-2015>
- Nesměrák, K., Kroiherová, A., Baptistová, A., & Hraníček, J. (2020). Spectrometric determination of trimethoprim and sulfamethoxazole in tablets by automated sequential injection technique [Online image]. *Monatshefte Für Chemie - Chemical Monthly*, 151(8), 1311-1316. <https://doi.org/10.1007/s00706-020-02631-4>
- Ovung, A., & Bhattacharyya, J. (2021). Sulfonamide drugs: structure, antibacterial property, toxicity, and biophysical interactions. *Biophysical Reviews*, 13(2), 259-272. <https://doi.org/10.1007/s12551-021-00795-9>
- Parker, J. (2001). Bacteria. *Encyclopedia of Genetics*, 146-151. <https://doi.org/10.1006/rwgn.2001.0102>
- Payne, S. (2017). *Viruses: From Understanding to Investigation*, 1-21. <https://doi.org/10.1016/c2014-0-03894-4>
- Percival, S., & Williams, D. (2014). *Escherichia coli*. *Microbiology of Waterborne Diseases*, 89-117. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-415846-7.00006-8>

- Pham, T., Ziora, Z., & Blaskovich, M. (2019). Quinolone antibiotics. *Medchemcomm*, 10(10), 1719-1739. <https://doi.org/10.1039/c9md00120d>
- Pina, S., Puig, M., Lucena, F., Jofre, J., Girones, R., 1998. Viral pollution in the environment and in shellfish: Human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3376–3382. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.9.3376-3382.1998>
- Pollitt, E., Crusz, S., & Diggle, S. (2015). *Staphylococcus aureus* forms spreading dendrites that have characteristics of active motility. *Scientific Reports*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/srep17698>
- Prestinaci, F., Pezzotti, P., & Pantosti, A. (2015). Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathogens and Global Health*, 109(7), 309-318. <https://doi.org/10.1179/2047773215y.0000000030>
- Qarah, N., Abdulrahman, S., Algethami, F., Basavaiah, K., & El-Maaidenen, E. (2019). NEW APPLICATIONS FOR AMOXICILLIN DETERMINATION IN PURE FORM AND PHARMACEUTICALS BASED ON IODATE-IODIDE MIXTURE: TITRIMETRY AND SPECTROSCOPY STUDIES [Online image]. *Química Nova*. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170455>
- Quiñónez-Díaz, M. de, 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*, 36(7), 1311–1320. <https://doi.org/10.1081/ese-100104880>
- Rachmadi, A. T., Kitajima, M., Pepper, I. L., & Gerba, C. P. (2016). Enteric and indicator virus removal by surface flow wetlands. *Science of the Total Environment*, 542, 976–982. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.11.001>
- Rigotto, C., Hanley, K., Rochelle, P., De Leon, R., Barardi, C., & Yates, M. (2011). Survival of Adenovirus Types 2 and 41 in Surface and Ground Waters Measured by a Plaque Assay. *Environmental Science & Amp; Technology*, 45(9), 4145-4150. <https://doi.org/10.1021/es103922r>
- Rodríguez-Martínez, J.M., Pascual, A., García, I., Martínez-Martínez, L., 2003. Detection of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant qnr among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing AmpC-type  $\beta$ -lactamase. *J. Antimicrob. Chemother.* 52, 703–706. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg388>
- Sabri, N. A., Schmitt, H., van der Zaan, B. M., Gerritsen, H. W., Rijnaarts, H. H. M., & Langenhoff, A. A. M. (2021). Performance of full scale constructed wetlands in removing antibiotics and antibiotic resistance genes. *Science of the Total Environment*, 786, 147368. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147368>
- Sabri, N. A., Schmitt, H., Van der Zaan, B., Gerritsen, H. W., Zuidema, T., Rijnaarts, H. H. M., & Langenhoff, A. A. M. (2020). Prevalence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a wastewater effluent-receiving river in the Netherlands.



*Journal of Environmental Chemical Engineering*, 8(1), 102245.  
<https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.03.004>

- Schwartz, T., Kohnen, W., Jansen, B., & Obst, U. (2003). Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. *Microbiology Ecology*, 43(February), 325–335.  
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2003.tb01073.x>
- Sidrach-Cardona, R., & Bécares, E. (2013). Fecal indicator bacteria resistance to antibiotics in experimental constructed wetlands. *Ecological Engineering*, 50, 107–111. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2012.01.001>
- Sonntag, M., Mühldorfer, K., Speck, S., Wibbelt, G., & Kurth, A. (2009). New Adenovirus in Bats, Germany [Online image]. *Emerging Infectious Diseases*, 15(12), 2052–2055. <https://doi.org/10.3201/eid1512.090646>
- Stanbury, P., Whitaker, A., & Hall, S. (2017). Effluent treatment. *Principles of Fermentation Technology*, 687–723. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-099953-1.00011-9>
- Stefanakis, A. (2020). Constructed Wetlands for Sustainable Wastewater Treatment in Hot and Arid Climates: Opportunities, Challenges and Case Studies in the Middle East [Online image]. *Water*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/w12061665>
- Stefanakis, A. I., & Akratos, C. S. (2016). Removal of pathogenic bacteria in constructed wetlands: Mechanisms and efficiency. *Phytoremediation*, 327–346.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-319-41811-7\\_17](https://doi.org/10.1007/978-3-319-41811-7_17)
- Stefanakis, A. I., Bardiau, M., Trajano, D., Couceiro, F., Williams, J. B., & Taylor, H. (2019). Presence of bacteria and bacteriophages in full-scale trickling filters and an aerated constructed wetland. *Science of the Total Environment*, 659, 1135–1145. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.415>
- Van Tyne, D., Martin, M., & Gilmore, M. (2013). Structure, Function, and Biology of the *Enterococcus faecalis* Cytolysin. *Toxins*, 5(5), 895–911.  
<https://doi.org/10.3390/toxins5050895>
- Varadaraj, M. (2010). Capacity Building. *Ensuring Global Food Safety*, 151–176.  
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-374845-4.00009-6>
- Vymazal, J. (2005). Removal of enteric bacteria in constructed treatment wetlands with emergent macrophytes: A Review. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 40(6-7), 1355–1367. <https://doi.org/10.1081/ese-200055851>
- Wall, S. (2019). Prevention of antibiotic resistance – an epidemiological scoping review to identify research categories and knowledge gaps. *Global Health Action*, 12(sup1), 1756191. <https://doi.org/10.1080/16549716.2020.1756191>
- Wang, M., Zhu, J., & Mao, X. (2021). Removal of pathogens in onsite wastewater treatment systems: A review of design considerations and influencing factors. *Water*, 13(9), 1190. <https://doi.org/10.3390/w13091190>

- 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>
- Zhou, X., Willems, R., Friedrich, A., Rossen, J., & Bathoorn, E. (2020). *Enterococcus faecium*: from microbiological insights to practical recommendations for infection control and diagnostics. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 9(1).  
<https://doi.org/10.1186/s13756-020-00770-1>
- Zimdahl, R. (2015). Antibiotics. *Six Chemicals That Changed Agriculture*, 165-182.  
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-800561-3.00009-2>

### Διαδικτυακές πηγές

- Aryal, S., Butler, V., Kerr, A., Akter, s., Gilbert, C., & Aryal, S. et al. (2022). Size of Bacterial Cell [Online image]. Microbiology Info.com.  
[https://microbiologyinfo.com/different-size-shape-and-arrangement-of-bacterial-cells/#:~:text=The%20three%20basic%20bacterial%20shapes,What%20is%20this%3F&text=Cocci%20\(or%20coccus%20for%20a,are%20adjacent%20to%20one%20another](https://microbiologyinfo.com/different-size-shape-and-arrangement-of-bacterial-cells/#:~:text=The%20three%20basic%20bacterial%20shapes,What%20is%20this%3F&text=Cocci%20(or%20coccus%20for%20a,are%20adjacent%20to%20one%20another)
- CDC SEM image depicted a growing cluster of Gram-negative, rod-shaped, *Escherichia coli* bacteria [Online image]. (2006). Centers for Disease Control and Prevention.  
<https://phil.cdc.gov/details.aspx?pid=10068>
- CDC SEM image depicts a small group of Gram-positive, *Enterococcus faecalis* bacteria [Online image]. (2006). Centers for Disease Control and Prevention.  
<https://phil.cdc.gov/details.aspx?pid=12803>
- CDC SEM image shows a strain of *Staphylococcus aureus* bacteria [Online image]. (2001). Centers for Disease Control and Prevention.  
<https://phil.cdc.gov/details.aspx?pid=12803>
- ECDC geographical distribution of antimicrobial consumption [Online image]. (2022). European Centre for Disease Prevention and Control.  
<https://www.ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-consumption/database/geographical-distribution>
- EUCAST clinical breakpoints and dosing of antibiotics (2023). European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. [https://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/)
- Meteo meteorological data of Chania for the years 2021 and 2022 (2022). Meteosearch.  
<https://meteosearch.meteo.gr/data/list-station-files.cfm>

Stratech the three-step amplification procedure – denaturation, annealing, extension, during a qPCR cycle [Online image]. (2022). Stratech Scientific Limited.  
<https://www.stratech.co.uk/aat-bioquest/real-time-pcr-qpcr/>

WHO list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. (2017). World Health Organization. <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

### **Πανεπιστημιακές σημειώσεις**

Venieri, D. (2017). "Environmental Microbiology" University course notes, School of Chemical and Environmental Engineering, Technical University of Crete.  
<https://www.eclass.tuc.gr/modules/document/index.php?course=MHPER122&openDir=/55590fffS79W>

### **Διπλωματικές εργασίες**

Aretaki, M. A. (2022). «Municipal wastewater treatment by means of pilot scale constructed wetlands: study of the removal of microbial indicators and antibiotic resistance genes» Diploma thesis, School of Chemical and Environmental Engineering, Technical University of Crete.  
<https://dias.library.tuc.gr/view/93291?locale=en>