



ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Έλεγχος απομάκρυνσης μικροβιακών δεικτών και γονιδίων ανθεκτικότητας σε
αντιβιοτικά κατά την επεξεργασία διασταλαγμάτων ΧΥΤΑ σε πιλοτικές μονάδες
τεχνητών υγροβιότοπων»

«Elimination of microbial indicators and antibiotic resistance genes during treatment
of landfill leachates with pilot scale constructed wetlands»

ΔΑΝΑΗ ΜΕΣΧΙΝΗ

AM: 2015050027

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δανάη Βενιέρη (Επιβλέπουσα)

Αλέξανδρος Στεφανάκης

Ελευθερία Ψυλλάκη

XANIA 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 τη συγγραφέα. Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σε αυτό το έγγραφο εκφράζουν τον συγγραφέα και δεν πρέπει να ερμηνευθεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις του Πολυτεχνείου Κρήτης»

Ευχαριστίες

Με το πέρας της παρούσας διπλωματικής εργασίας θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου κ. Δανάη Βενιέρη, γιατί χάρη στη σοβαρή ακαδημαϊκή της παρουσία και την ικανότητα της να εμπνέει, στράφηκα σε ένα είδος εργασίας χρονοβόρο και απαιτητικό, που καλλιέργησε τις δεξιότητες, την επιμονή και την υπομονή μου. Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Ιωσηφίνα Γουνάκη, ΕΔΙΠ του εργαστηρίου Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας, που με την επίβλεψη, την ενθάρρυνση και την υποστήριξη της, κατάφερα να ολοκληρώσω αυτή την εκπαιδευτική εκδρομή.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τη συμφοιτήτρια μου και φίλη μου Μαριάντα Αρετάκη, που στάθηκε στο πλευρό μου για κάθε είδους βοήθεια.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Αλέξανδρο Στεφανάκη καθώς και τη κ. Έλια Ψυλλάκη, για τη συμμετοχή τους και το χρόνο τους στη τελική διαμόρφωση της εργασίας μου.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	3
Συνοτομογραφίες.....	6
Περίληψη.....	7
Abstract	9
1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	11
1.1 Αστικά Στερεά Απόβλητα ΑΣΑ.....	11
1.2 ΧΩΡΟΙ ΥΓΕΙΟΝΟΜΙΚΗΣ ΤΑΦΗΣ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ (ΧΥΤΑ)	14
1.2.1. ΔΙΑΣΤΑΛΑΓΜΑΤΑ	17
1.3 ΤΕΧΝΗΤΟΙ ΥΓΡΟΒΙΟΤΟΠΟΙ.....	18
1.3.1. ΠΛΗΡΩΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ ΥΓΡΟΒΙΟΤΟΠΩΝ	21
1.3.2 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΒΛΑΣΤΗΣΗΣ.....	23
1.4 ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ.....	24
1.5. ΑΔΕΝΟΪΟΙ.....	26
1.6 ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ.....	27
1.6.1 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΣΕ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ	28
2. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	31
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	32
3.1 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΚΑΙ ΧΩΡΟΘΕΤΗΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΔΙΑΤΑΞΗΣ	32
3.2 ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ.....	34
3.3 ΥΛΙΚΑ	34
3.4 ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ	36
3.4.1 ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ.....	36
3.4.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ	37
3.4.3 ΈΛΕΓΧΟΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ.....	39
3.4.4 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΔΕΝΟΪΟΥ ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ	41
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	43
4.1 ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΑΠΟ ΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΚΡΩΝ ΤΩΝ ΤΕΧΝΗΤΩΝ ΥΓΡΟΒΙΟΤΟΠΩΝ	43
4.2 ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΑΔΕΝΟΪΟΥ.....	55
4.3 ΕΛΕΓΧΟΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΟΦΙΛ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΣΕ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ	60
4.4 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ARGs ΤΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ	74
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ / ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ.....	85

5.1 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	85
5.2 ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ	88
Βιβλιογραφία	89
Παράρτημα.....	103

Συντομογραφίες

Αστικά Στερεά Απόβλητα, ΑΣΑ

Χώροι Υγειονομικής Ταφής, ΧΥΤΑ

Βιοαντιδραστήρες μεμβρανών - Membrane Biological Reactor, MBR

Τεχνητοί Υγροβιότοποι – Constructed Wetlands, CWs

Προηγμένες Διαδικασίες Οξειδωσης - Advanced Oxidation Process, AOP

Υγροβιότοποι Ελεύθερης Επιφάνειας – Free Water Surface, FWS

Υγροβιότοποι υποεπιφανειακής οριζόντιας ροής - Horizontal subsurface Flow Constructed Wetlands, HF CWs

Υγροβιότοποι υποεπιφανειακής κάθετης ροής - Vertical subsurface Flow Constructed Wetlands, VF CWs

Βιοχημικά Απαιτούμενο Οξυγόνο - Biochemical Oxygen Demand, BOD

Χημικά Απαιτούμενο Οξυγόνο – Chemical Oxygen Demand, COD

Ολικά Αιωρούμενα Στερεά - Total Suspended Solids, TSS

Escherichia coli, *E. coli*

Staphylococcus aureus, *S. aureus*

Αδενοϊός - Adenovirus, AdV

Αμοξικιλίνη – Amoxicillin, AMX

Σουλφαμεθοξαζόλη - Sulfamethoxazole, SMX

Σιπροφλοξασίνη – Ciprofloxacin, CIP

Βακτήρια Ανθεκτικά σε Αντιβιοτικά - Antibiotic Resistant Bacteria, ARB

Γονίδια Ανεκτικότητας σε Αντιβιοτικά – Antibiotic Resistance Genes, ARGs

Βακτηριακές Αποικίες - Colony Forming Units, CFUs

μέθοδος Ελάχιστης Ανασταλτικής Συγκέντρωσης – method Minimum Inhibitory Concentration, MIC

Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης - Polymerase Chain Reaction, PCR

Περίληψη

Αντικείμενο έρευνας της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι ο έλεγχος απομάκρυνσης μικροβιακών δεικτών και γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά κατά την επεξεργασία διασταλαγμάτων που προέρχονταν από χώρο υγειονομικής ταφής σε πιλοτικές μονάδες τεχνητών υδροβιότοπων. Τα διασταλάγματα προέρχονταν από τον Χώρο Υγειονομική Ταφής Αποβλήτων Χανίων (ΧΥΤΑ) και η επεξεργασία τους έγινε σε τέσσερις διαφορετικές πιλοτικές μονάδες τεχνητών υδροβιότοπων, οριζόντιας υποεπιφανειακής ροής (HF CWs). Συγκεκριμένα μελετήθηκε η απόδοση των πιλοτικών μονάδων των τεχνητών υδροβιότοπων με βλάστηση *Phragmites australis*, που βρίσκονται στον εξωτερικό χώρο του θερμοκηπίου του Πολυτεχνείου Κρήτης, στα Χανιά, ως προς την επίδραση των διαφορετικών πληρωτικών υλικών στις διεργασίες απομάκρυνσης των μικροβιακών δεικτών, του αδενοϊού και των γονιδίων ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά.

Η πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε αποτελείται από τέσσερις πιλοτικούς τεχνητούς υδροβιότοπους οριζόντιας υποεπιφανειακής ροής. Στην πρώτη μονάδα (P = Plastic) τοποθετήθηκε ως πληρωτικό υλικό πολυαιθυλένιο υψηλής πυκνότητας (HDPE). Στη δεύτερη (PB = Plastic & Biochar) τοποθετήθηκε HDPE μαζί με 10% w/v βιοεξανθράκωμα. Στην τρίτη (G = Gravel) τοποθετήθηκε χαλίκι, ενώ στη τέταρτη (GB = Gravel & Biochar) τοποθετήθηκε χαλίκι μαζί με 10% w/v βιοεξανθράκωμα. Κάθε πιλοτική μονάδα αποτελείται από σιδερένιες ορθογώνιες κλίνες, που έχουν επενδυθεί εσωτερικά με πλαστικό υλικό HDPE.

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε την περίοδο από 28 Μαΐου έως 21 Ιουλίου του 2021.

Στο πλαίσιο εκτέλεσης του πειράματος έγιναν διαδοχικές δειγματοληψίες, στη διάρκεια τριών περιόδων, του Μαΐου, (1^η χρονική περίοδος), του Ιουνίου (2^η χρονική περίοδος), και του Ιουλίου (3^η χρονική περίοδος). Τα δείγματα εισροής προέρχονταν από αραιωμένα διασταλάγματα του Χ.Υ.Τ. Χανίων, ενώ τα δείγματα εκροής προέρχονταν από τις εκροές των τεσσάρων τεχνητών υδροβιότοπων (P, PB, G, GB).

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν ότι, ανεξάρτητα από το πληρωτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα στους HF CWs, δεν σημειώθηκε ουσιαστική απομάκρυνση των μικροβιακών δεικτών *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* και *Enterococcus sp.* Αντίθετα, παρατηρήθηκε απομάκρυνση των αδενοϊών έως ένα βαθμό. Πιο συγκεκριμένα, μεγαλύτερη απόδοση έδειξαν οι εκροές των υδροβιότοπων P και PB, με μείωση του ιικού φορτίου μέχρι 2 Logs. Όσον αφορά στα γονίδια ανθεκτικότητας (ARGs) που μελετήθηκαν, δηλαδή τα *sul II*, *ampC* και *qnrA*, τα αποτελέσματα ήταν τα εξής:

Τα γονίδια *sul II* και *ampC* δεν απομακρύνθηκαν κατά την επεξεργασία των διασταλαγμάτων, καθώς ανιχνεύθηκαν σε μεγάλες συγκεντρώσεις στις εκροές των υγροβιότοπων. Όσον αφορά στο *qnrA*, δεν σημειώθηκε απομάκρυνση στην εκροή του υγροβιότοπου PB, ενώ σε όλες τις άλλες εκροές υπήρξε σημαντική μείωση της συγκέντρωσής του σε σύγκριση με την εισροή. Η μεγαλύτερη μείωση εμφανίζεται στην εκροή του υγροβιότοπου GB και είναι της τάξης των 2 Logs. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι υπάρχει συσχέτιση της απομάκρυνσης των βακτηριακών δεικτών με την απομάκρυνση των ARGs. Συγκεκριμένα, όταν η απομάκρυνση των βακτηριακών δεικτών είναι αρνητική, αρνητική είναι και η απομάκρυνση των ARGs.

Τέλος, ως προς τη διαφοροποίηση των τιμών της MIC_{60} δεν υπάρχει ξεκάθαρο μοτίβο των προφίλ ανθεκτικότητας των στελεχών των μικροβιακών δεικτών κατόπιν της επεξεργασίας ως προς όλα τα αντιβιοτικά και συγκεκριμένα τη σιπροφλοξασίνη (CIP), αμοξικιλίνη (AMOX) και σουλφαμεθοξαζόλη (SMX).

Συμπερασματικά, τα πειράματα δείχνουν ότι οι υγροβιότοποι δεν ήταν αποτελεσματικοί στην απομάκρυνση των μικροβιακών δεικτών και των γονιδίων ARGs, ήταν όμως θετικοί στην απομάκρυνση των αδενοϊών.

Οι περίπλοκοι φυσικοχημικοί και βιολογικοί μηχανισμοί που λαμβάνουν χώρα στους υγροβιότοπους επιδρούν στις διεργασίες απομάκρυνσης βακτηρίων και ιών και η εκάστοτε μεταβολή τους επιδρά άμεσα στην παρουσία παθογόνων στην εκροή.

Abstract

The objective of the present diploma thesis is the study of the elimination of microbial indicators, adenoviruses, and antibiotic resistance genes during treatment of landfill leachates with pilot scale constructed wetlands. The leachates derived from Chania waste landfill and were treated in four pilot scale units of horizontal subsurface flow constructed wetlands (CWs). Specifically, the performance efficiency of the units was studied in relation to the different filling materials and operating conditions. The CWs were planted with *Phragmites australis* and are located in the campus of Technical University of Crete (greenhouse).

The first unit (P = Plastic) contained high-density polyethylene (HDPE) as filling material. The second CW (PB = Plastic & Biochar) had HDPE combined with 10% w/v biochar. The filling materials of the third (G = Gravel) and the fourth unit (GB = Gravel & Biochar) were gravel and combined with 10% w/v biochar. Each pilot unit consisted of rectangular iron beds lined internally with HDPE plastic.

The experiment was conducted from 28 May to 21 July 2021. During the experiment, consecutive sampling was performed during three periods: May (1st period), June (2nd period), and July (3rd period). Inflow samples were collected from diluted leachates from the landfill site, while outflow samples were collected from the effluents of the four constructed wetlands (P, PB, G, GB).

The results of the experiments indicated that regardless of the substrate material used, there was no substantial removal of microbial indicators *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Enterococcus sp.* However, adenoviruses were eliminated to a certain extent. Specifically, higher performance occurred during treatment with the wetlands P and PB, as a 2 Log of viral reduction was recorded.

Regarding the antibiotic resistance genes (ARGs) studied, namely *sul II*, *ampC*, and *qnrA*, the results were the following:

The *sul II* and *ampC* genes were not removed during the treatment of the leachates, as they were detected in high concentrations in all effluents. Regarding *qnrA*, there was no removal in

the PB wetland, while in all other effluents there was a significant decrease of its concentration compared to that in the influent. The highest removal occurred during treatment with the GB wetland and was 2 Logs. The results show that there is a correlation between the removal of bacterial indicators and the removal of ARGs.

Finally, there is no clear pattern post treatment regarding its effect on the antibiotic resistance profile of the bacteria and the MIC₆₀ values of certain antibiotics, namely ciprofloxacin (CIP), amoxicillin (AMOX) and sulfamethoxazole (SMX).

In conclusion, the experiments show that wetlands were not effective in removing microbial markers and ARGs genes but were quite capable of removing adenoviruses.

The complex physicochemical and biological mechanisms that take place in wetlands affect the processes of removal of bacteria and viruses and subsequently, their presence in the effluents.

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Αστικά Στερεά Απόβλητα ΑΣΑ

Τα αστικά στερεά απόβλητα (ΑΣΑ) αντιπροσωπεύουν μια ποικιλία υλικών που εμφανίζονται σε στερεή φυσική κατάσταση και ο ιδιοκτήτης τους επιθυμεί ή υποχρεούται να απαλλαγεί από αυτά και υπάγονται στον κατάλογο του EWC (European Waste Catalogue). Υπάρχουν όμως ορισμένα είδη αποβλήτων που δεν εμπίπτουν σε αυτόν τον κατάλογο. Αυτό ισχύει ιδιαίτερα για ειδικές κατηγορίες αποβλήτων που μπορεί να είναι πιο σύνθετες (Στούπας Χ., 2020).

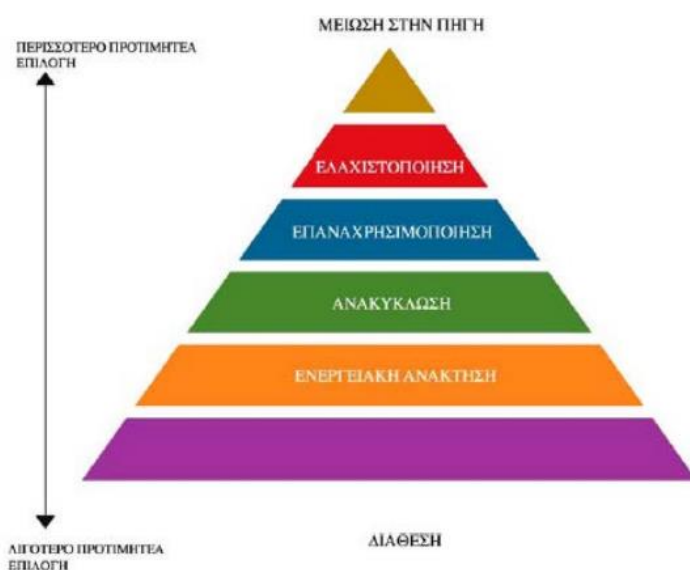
Η ταξινόμηση των αστικών στερεών αποβλήτων πραγματοποιείται με σκοπό να προσδιοριστούν βασικές κατηγορίες υλικών που περιέχουν, προκειμένου να καταρτιστούν σχέδια διαχείρισης, επεξεργασίας και αξιοποίησής τους, όπως ανακύκλωση, ανάκτηση ενέργειας κ.λπ. Ο διαχωρισμός των ΑΣΑ σε κατηγορίες υλικών γίνεται με βάση δείγματα και αναλύσεις και περιλαμβάνει τα εξής κλάσματα:

- ❖ Ζυμώσιμα
- ❖ Χαρτί
- ❖ Μέταλλα
- ❖ Γυαλί
- ❖ Πλαστικό
- ❖ Δέρμα - Ξύλο - Ύφασμα - Λάστιχο (ΔΞΥΛ)
- ❖ Αδρανή
- ❖ Λοιπά

Η επιλογή των τεχνολογιών διαχείρισης των ΑΣΑ εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως οι οικονομικές συνθήκες, η υποδομή, η πολιτική βούληση και οι περιβαλλοντικές προτεραιότητες της κάθε χώρας. Οι ανεπτυγμένες χώρες με υψηλό κατά κεφαλήν εισόδημα τείνουν να επικεντρώνονται στην ανακύκλωση και την καύση για τη διαχείριση των ΑΣΑ, ενώ οι αναπτυσσόμενες χώρες μπορεί να εξαρτώνται περισσότερο από την εναπόθεση σε χώρους υγειονομικής ταφής (Γιδαράκος Ε., 2015).

Η ανακύκλωση είναι μία από τις πιο δημοφιλείς και αποτελεσματικές μεθόδους διαχείρισης των ΑΣΑ. Η διαδικασία της ανακύκλωσης βασίζεται στην ανακύκλωση υλικών από τα απόβλητα, ώστε να χρησιμοποιηθούν ξανά και να παραχθούν νέα προϊόντα. Ενισχύει την οικονομία κυκλικής διαχείρισης, μειώνει την κατανάλωση πρώτων υλών και μειώνει την ποσότητα των απορριμμάτων, που καταλήγουν στους χώρους υγειονομικής ταφής (ΧΥΤΑ). Συνήθως συνδυάζεται με τη Διαλογή στην Πηγή, η οποία αποτελεί τη διαδικασία όπου οι πολίτες διαχωρίζουν τα απορρίμματα στην πηγή, δηλαδή στον χώρο παραγωγής, προκειμένου

να διαχωριστούν τα ανακυκλώσιμα υλικά από τα υπόλοιπα απόβλητα. Και οι δύο αυτές μέθοδοι βασίζονται στην ιεραρχία, η οποία φαίνεται στην εικόνα 1(Στούπας Χ., 2020).



Εικόνα 1 : Διάγραμμα ιεραρχίας επιλογών διαχείρισης ΑΣΑ(Γιδαράκος Ε., 2015)

Η θερμική επεξεργασία των ΑΣΑ περιλαμβάνει τρεις κύριες τεχνολογίες: την καύση, την πυρόλυση και την αεριοποίηση. Ο κύριος σκοπός αυτών των τεχνολογιών είναι η αποσύνθεση και η καταστροφή του οργανικού κλάσματος των ΑΣΑ και ορισμένων, πιθανώς, επικίνδυνων ουσιών, ανεξάρτητα από την παρουσία ή την απουσία οξυγόνου. Μέσω αυτών των διαδικασιών, επιτυγχάνεται η ελαχιστοποίηση των υπολειμμάτων προς εναπόθεση σε χώρους υγειονομικής ταφής και η εκμετάλλευση της παραγόμενης θερμότητας για θέρμανση ή παραγωγή ενέργειας(Στούπας Χ., 2020).



Εικόνα 2 : Σχηματική απεικόνιση θερμικής επεξεργασίας ΑΣΑ(Στούπας Χ., 2020).

Καύση (Incineration):Είναι μια θερμική διαδικασία που πραγματοποιείται σε ειδικά σχεδιασμένες μονάδες, γνωστές ως καυστήρες. Στη διαδικασία αυτή, τα ΑΣΑ εκτίθενται σε

υψηλές θερμοκρασίες (συνήθως άνω των 850°C) υπό ελεγχόμενες συνθήκες. Κατά τη διάρκεια της καύσης, τα οργανικά υλικά υπόκεινται σε ένα σύνολο χημικών αντιδράσεων, όπου προκαλείται η αποσύνθεσή τους. Τα οργανικά υλικά μετατρέπονται σε διοξείδιο του άνθρακα (CO₂) και νερό (H₂O), ενώ τα ενδιάμεσα προϊόντα μπορεί να περιέχουν διάφορες χημικές ενώσεις, όπως τα όξινα αέρια (π.χ. οξείδιο του αζώτου – NO_x) και βαρέα μέταλλα(Γιδαράκος Ε., 2015).

Πυρόλυση (Pyrolysis): Είναι μια θερμική διαδικασία όπου λαμβάνει χώρα, απουσία οξυγόνου ή υπό περιορισμένη προσφορά οξυγόνου. Κατά την πυρόλυση, τα ΑΣΑ θερμαίνονται σε υψηλές θερμοκρασίες (γύρω στους 500°C - 800°C) χωρίς να καίγονται πλήρως. Κατά τη διάρκεια της διεργασίας τα ΑΣΑ υπόκεινται σε διαδικασίες θερμικής αποσύνθεσης, κατά τις οποίες παράγονται υγρά ή αέρια προϊόντα και ένα αναλογικά μικρό ποσοστό στερεών προϊόντων (ψυχρή στερεοποίηση)(Στούπας Χ., 2020).

Αεριοποίηση (Gasification): Η αεριοποίηση είναι μια διαδικασία υψηλής θερμοκρασίας, όπου τα ΑΣΑ εκτίθενται σε ένα αναερόβιο περιβάλλον με ανεπαρκή ποσότητα οξυγόνου για πλήρη καύση. Κατά την αεριοποίηση τα ΑΣΑ υποβάλλονται σε ένα πολύπλοκο χημικό και θερμικό σύστημα αντιδράσεων. Τα ΑΣΑ μετατρέπονται σε έναν ποικίλο συνδυασμό αερίων, περιλαμβάνοντας υδρογόνο, μεθάνιο, οξείδιο του άνθρακα και προϊόντα υγροποίησης(Στούπας Χ., 2020).

Οι θερμικές διεργασίες παρέχουν το πλεονέκτημα της ενεργειακής αξιοποίησης των αποβλήτων, με αποτέλεσμα τη μείωση του όγκου των υλικών που απορρίπτονται σε χώρους εναπόθεσης και την παραγωγή ενέργειας. Ωστόσο, οι διεργασίες αυτές απαιτούν προηγμένη τεχνολογία και οικονομικά μέσα και είναι σημαντικό να λαμβάνονται υπόψη οι περιβαλλοντικές επιπτώσεις και το κόστος υλοποίησής τους(Γιδαράκος Ε., 2015).

Άλλη μια μέθοδος διαχείρισης των ΑΣΑ αποτελεί η κομποστοποίηση. Είναι μία αερόβια διαδικασία αποσύνθεσης του οργανικού κλάσματος των αστικών στερεών αποβλήτων (ΑΣΑ) υπό ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας, υγρασίας και pH, παρουσία οξυγόνου. Αυτή η διαδικασία οδηγεί στη δημιουργία σταθεροποιημένης βιομάζας, γνωστής ως "κόμποστ", η οποία είναι πλούσια σε θρεπτικά συστατικά και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εδαφοβελτιωτικό. Πρόκειται για μια οικονομική μέθοδο, η οποία συμβάλλει στη μείωση του οργανικού υλικού που καταλήγει σε απόθεση σε χώρους υγειονομικής ταφής αποβλήτων (ΧΥΤΑ), πράγμα που επιμηκύνει τον χρόνο ζωής τους. Επιπλέον, η κομποστοποίηση μειώνει

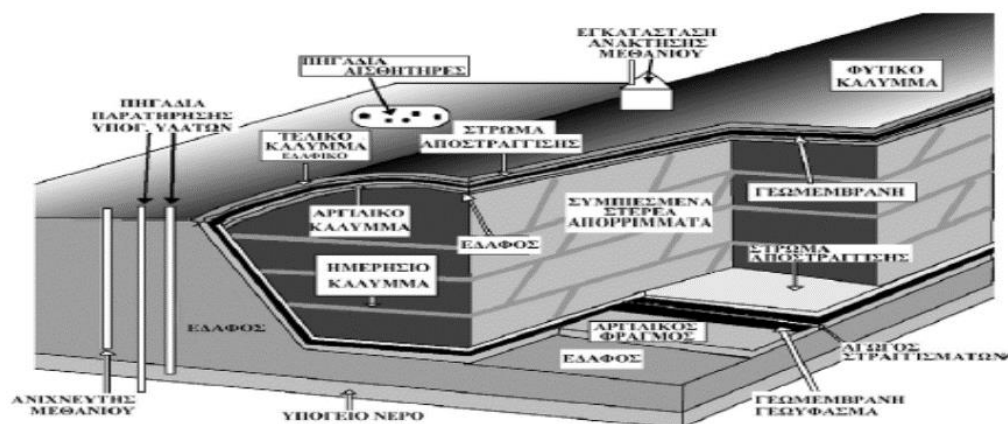
την παραγόμενη ποσότητα διασταλαγμάτων, βελτιώνοντας το περιβάλλον και ελαχιστοποιώντας την ανάγκη για χώρους διάθεσης(Στούπας Χ., 2020).

Στη σύγχρονη εποχή, η Υγειονομική Ταφή Αστικών Στερεών Αποβλήτων (ΑΣΑ) αντιμετωπίζεται ως μία διαχειριστική τεχνολογία που δεν είναι επιθυμητή, λόγω των αυξανόμενων προσπάθειών προώθησης πρακτικών ελαχιστοποίησης, επαναχρησιμοποίησης και ανακύκλωσης αποβλήτων, όπως προβλέπεται από το νομοθετικό πλαίσιο. Ωστόσο, οι Χώροι Υγειονομικής Ταφής ΑΣΑ αποτελούν μία από τις πιο συνηθισμένες μεθόδους διάθεσης του υπολοίπου αυτού, διότι παρέχουν μια ασφαλή λύση για την μόνιμη αποθήκευση των αποβλήτων που δεν μπορούν να ανακυκλωθούν ή να τα επεξεργαστούμε περαιτέρω(Γιδαράκος Ε., 2015).

1.2 ΧΩΡΟΙ ΥΓΕΙΟΝΟΜΙΚΗΣ ΤΑΦΗΣ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ (ΧΥΤΑ)

Παρότι οι χώροι ταφής απορριμμάτων (ΧΥΤΑ) αντιπροσωπεύουν εγκαταστάσεις υψηλής μηχανικής, που πληρούν αυστηρές κατασκευαστικές και λειτουργικές προδιαγραφές, το νομοθετικό πλαίσιο και η σχεδιάσή τους έχουν προορισμό να αποτρέψουν οποιουσδήποτε κινδύνους που απειλούν τη δημόσια υγεία και ασφάλεια (Στούπας Χ., 2020). Παράλληλα, οι σύγχρονοι ΧΥΤΑ έχουν σχεδιαστεί και δομηθεί έτσι ώστε να μειώνουν ή ακόμα και να αποτρέπουν τις αρνητικές επιπτώσεις των απορριμμάτων στο περιβάλλον, όπως αναφέρουν οι Wiszniowski et al. (2006).

Η λειτουργία του χώρου διάθεσης εξαρτάται κυρίως από τη φύση και την ποσότητα των αποβλήτων που φτάνουν στο χώρο ταφής, καθώς είναι κρίσιμοι παράγοντες που επηρεάζουν τη διαχείρισή του. Τα διαφορετικά είδη αποβλήτων απαιτούν διαφορετικές μεθόδους μεταχείρισης και τοποθέτησης, ενώ η ποσότητα των απορριμμάτων καθορίζει το ρυθμό με τον οποίο τροφοδοτούνται στους χώρους υγειονομικής ταφής. Παράλληλα το υλικό κάλυψης παίζει έναν σημαντικό ρόλο στην πρόληψη των οσμών, της μόλυνσης και της διάσπασης των αποβλήτων.



Εικόνα 3 : Απεικόνιση χώρου υγειονομικής ταφής απορριμμάτων (Tchobanoglous, 1993)

Το βασικό χαρακτηριστικό και δομικό στοιχείο ενός ΧΥΤΑ είναι το "κύτταρο" (cell), το οποίο αποτελείται από τα απορρίμματα, συνήθως μιας ημέρας, που πρώτα συμπιέζονται και στη συνέχεια καλύπτονται με στρώση εδαφικού υλικού. Η στρώση του εδαφικού υλικού αποτελείται από χώμα ή άλλα εναλλακτικά υλικά, όπως για παράδειγμα το "compost" (φυτοχώματα), και έχει σημαντικό ρόλο. Ο σκοπός της είναι να παρεμποδίζει την είσοδο υδάτων στον χώρο των ΑΣΑ, ώστε να μειώνεται η υγρασία και να αποτρέπεται η διάβρωση των αποβλήτων. Επιπλέον, αυτή η στρώση εδαφικού υλικού συμβάλλει στον περιορισμό του διασκορπισμού των απορριμμάτων από τον χώρο του ΧΥΤΑ προς τον περιβάλλοντα χώρο, διαμέσου του ανέμου, των υδάτων και των ζώων. Έτσι, εξασφαλίζεται η προστασία του περιβάλλοντος και αποτρέπεται η μόλυνση του εδάφους και των υδάτων από τα απόβλητα.



Εικόνα 4 : Δομή και χαρακτηριστικά ενός ΧΥΤΑ (Tchobanoglous, 1993)

Τα απορρίμματα που μεταφέρονται στον ΧΥΤΑ από τα απορριμματοφόρα υπόκεινται σε ένα συγκεκριμένο και καλά δομημένο σύστημα διάθεσης. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα: Τα απορρίμματα ζυγίζονται και τοποθετούνται σε προκαθορισμένο σημείο

που ονομάζεται "τυμπάνι" ή "στρώση" (lift). Η στρώση είναι μια πλήρης, οριζόντια σειρά από κύτταρα του ίδιου ύψους, και οι στρώσεις τοποθετούνται μια πάνω στην άλλη. Χρησιμοποιούνται ζώνες για να διατηρήσουν τη σταθερότητα των πρανών και για την τοποθέτηση τάφρων ή αγωγών για την επιφανειακή απορροή. Επίσης, το κύτταρο καλύπτεται με τελικό κάλυμμα που αποτελείται συνήθως από πολλαπλές στρώσεις χώματος ή/και γεωμεμβράνες. Αυτό το κάλυμμα αποτρέπει την κατείσδυση ομβρίων υδάτων στα ενταφιασμένα απόβλητα, προλαμβάνει την εξάπλωση ασθενειών και ελαχιστοποιεί την εκπομπή οσμών. (Γιδαράκος Ε., 2015). Στη συνέχεια τα απόβλητα συμπιέζονται για να δημιουργηθεί μεγαλύτερη πυκνότητα, αυξάνοντας την παραγωγή αερίου ανά μονάδα όγκου. Η συμπίεση βοηθά στη μείωση του όγκου των αποβλήτων και επομένως στην αποτελεσματικότερη χρήση του χώρου του ΧΥΤΑ. Η περίπλοκη αυτή διαδικασία επαναλαμβάνεται για αρκετά στρώματα ανάλογα με την παροχή απορριμμάτων και τις προδιαγραφές του ΧΥΤΑ. Η σταδιακή συσσώρευση των αποβλήτων και η κατάλληλη τοποθέτησή τους προσφέρουν τη δυνατότητα αποτελεσματικής διαχείρισης των απορριμμάτων στον ΧΥΤΑ.

Η διαδικασία αποσύνθεσης των βιοαποικοδομήσιμων υλικών στα απόβλητα ενός ΧΥΤΑ ακολουθεί τέσσερα στάδια, όπως περιγράφεται από τις μελέτες των (Kjeldsen et al., 2002; Ren & Yuan, 2015) :

Στάδιο 1^ο : Αερόβιο στάδιο: Σε αυτό το στάδιο, το οξυγόνο που υπάρχει στα πρόσφατα εναποτιθέμενα απόβλητα, καταναλώνεται από τους μικροοργανισμούς άμεσα. Κατά τη διαδικασία αυτή, οι οργανικές ενώσεις αποσυντίθενται με τη βοήθεια του οξυγόνου.

Στάδιο 2^ο : Ζύμωση - οξεογένεση: Αφού εξαντληθεί το οξυγόνο, παράγονται υψηλές ποσότητες καρβοξυλικών οξέων.

Στάδιο 3^ο : Μεθανογένεση: Σε αυτό το στάδιο, τα καρβοξυλικά οξέα μετατρέπονται σε μεθάνιο (CH_4) και διοξείδιο του άνθρακα (CO_2). Το μεθάνιο είναι το βασικό συστατικό του βιοαερίου.

Στάδιο 4^ο : Ωρίμανση - σταθεροποίηση: Σε αυτό το στάδιο, η μικροβιακή δραστηριότητα, όπως και η παραγωγή μεθανίου, είναι επίσης χαμηλή. Επομένως και η παραγωγή του βιοαερίου είναι μικρότερη.

Το βιοαέριο που παράγεται από την αναερόβια χώνευση του οργανικού κλάσματος των απορριμμάτων αποτελείται κυρίως από μονοξείδιο του άνθρακα (CO) και μεθάνιο (CH_4) σε ποσοστό περίπου 90%. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πηγή ενέργειας για διάφορες εφαρμογές. Ωστόσο, η παραγωγή μεθανίου μπορεί να έχει περιβαλλοντικές επιπτώσεις,

καθώς το μεθάνιο είναι ένα ισχυρό αέριο του θερμοκηπίου, που συμβάλλει στην αύξηση της παγκόσμιας θερμοκρασίας.

Άλλο ένα προϊόν που παράγεται κατά την αναερόβια χώνευση είναι τα διασταλάγματα.

1.2.1. ΔΙΑΣΤΑΛΑΓΜΑΤΑ

Η οδηγία 1999/31/ΕΚ της Ευρωπαϊκής Ένωσης με τίτλο «Περί υγειονομικής ταφής των αποβλήτων» ορίζει τα διασταλάγματα ως : "οποιοδήποτε υγρό που ρέει μέσω των απορριμμάτων που έχουν αποθηκευτεί σε έναν χώρο ταφής ή περιέχεται μέσα σε αυτά ". Τα διασταλάγματα μπορεί να προέρχονται από διάφορες πηγές, όπως υδρολογικές συνθήκες, βροχή ή την απορρόφηση υγρών από τα ίδια τα απόβλητα.

Η παραγωγή των διασταλαγμάτων επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, όπως οι κλιματολογικές συνθήκες, η μορφολογία της περιοχής και ο τρόπος λειτουργίας του χώρου διάθεσης των αστικών αποβλήτων. Τα διασταλάγματα περιέχουν πολύ μεγάλα φορτία ρύπων από τα ανεπεξέργαστα λύματα και αποτελούν σημαντική πηγή ρύπανσης για τα υπόγεια και τα επιφανειακά ύδατα (Στούπας Χ., 2020).

Οι οργανικές ουσίες που περιέχονται στα διασταλάγματα επιβαρύνουν σημαντικά την ποιότητά τους και αποτελούν το κυριότερο κριτήριο για την εκτίμησή τους (Γιδαράκος Ε., 2015), εξαρτώνται από παράγοντες όπως η ηλικία της εγκατάστασης, το είδος της εφαρμοζόμενης συμπίεσης και η σύσταση των αποβλήτων.

Το πρόβλημα της επεξεργασίας των αποβλήτων αποτελεί σημαντική πρόκληση σε παγκόσμιο επίπεδο και πολλές χώρες, συμπεριλαμβανομένων των χωρών της Ευρωπαϊκής Ένωσης, αντιμετωπίζουν δυσκολίες στην αποτελεσματική διαχείριση των αποβλήτων, ειδικά των διασταλαγμάτων. Οι τεχνολογίες που προορίζονται για την επεξεργασία των διασταλαγμάτων μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τρεις γενικές κατηγορίες: Αερόβιες, αναερόβιες βιολογικές μέθοδοι επεξεργασίας και φυσικοχημικές μέθοδοι επεξεργασίας (Wiszniewski et al., 2006).

Οι βιολογικές μέθοδοι θεωρούνται απλές, αξιόπιστες και οικονομικά αποδοτικές τεχνολογίες επεξεργασίας διασταλαγμάτων. Χρησιμοποιούνται κυρίως για την επεξεργασία διασταλαγμάτων που έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε οργανικές ουσίες, καθώς η βιοαποικοδόμηση εξασφαλίζει την αποτελεσματική απομάκρυνση οργανικών και αζωτούχων ουσιών με υψηλή αναλογία BOD/COD. Ανάλογα με την παρουσία ή απουσία οξυγόνου, οι βιολογικές διεργασίες χωρίζονται σε αερόβιες και αναερόβιες. Οι αερόβιες βιολογικές

διεργασίες περιλαμβάνουν : Αεριζόμενες λίμνες, συστήματα ενεργούς ιλύος , αντιδραστήρες εναλλασσόμενου έργου, περιστρεφόμενους βιοδίσκους, χαλικοδιυλιστήρια, βιοαντιδραστήρες μεμβρανών και τεχνητούς υγροβιότοπους. Οι αναερόβιες βιολογικές μέθοδοι περιλαμβάνουν : Αναερόβια χώνευση, αντιδραστήρα με αναερόβιο φίλτρο, αντιδραστήρα ανοδικής ροής με κουβέρτα ιλύος, Annamox(Kurniawan et al., 2010).

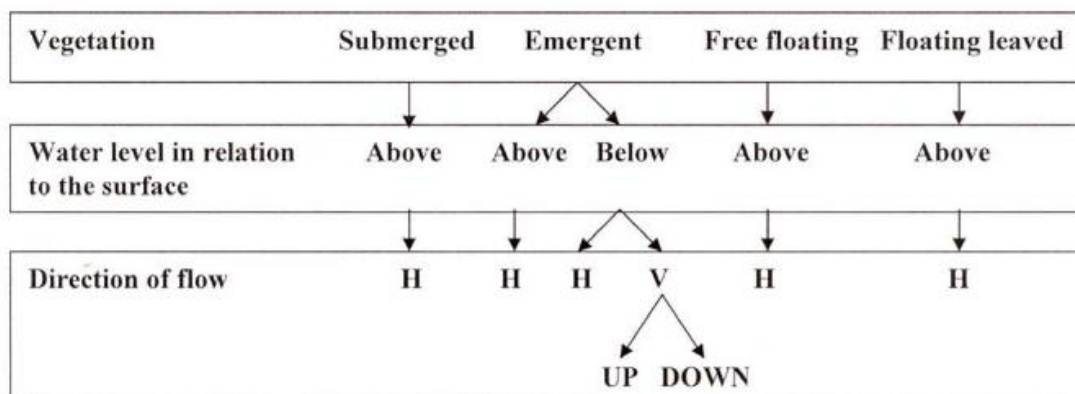
Οι φυσικοχημικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται συνήθως για την επεξεργασία διασταλαγμάτων με μικρό οργανικό φορτίο, τα οποία μπορεί να περιέχουν ανόργανες ουσίες, δυσδιάλυτες οργανικές ουσίες, βαρέα μέταλλα και στοιχεία ρύπανσης που είναι δύσκολο να απομακρυνθούν με τις βιολογικές μεθόδους. Συνήθως χρησιμοποιούνται είτε για την επεξεργασία διασταλαγμάτων μεγάλης ηλικίας από χώρους υγειονομικής ταφής, που βρίσκονται στη φάση σταθεροποίησης, είτε ως συμπληρωματικά στάδια επεξεργασίας μετά τη βιολογική μέθοδο(Kurniawan et al., 2006). Οι κυριότερες φυσικοχημικές διεργασίες που χρησιμοποιούνται είναι : η κροκίδωση, ο διαχωρισμός με μεμβράνες, η προσρόφηση με ενεργό άνθρακα, η χημική κατακρήμνιση, η ιοντοανταλλαγή, η χημική οξείδωση/ προηγμένες διεργασίες οξείδωσης (AOP) και η ηλεκτροχημική επεξεργασία(Ozturk et al., 2003).

1.3 ΤΕΧΝΗΤΟΙ ΥΓΡΟΒΙΟΤΟΠΟΙ

Οι τεχνητοί υγροβιότοποι (Constructed Wetlands ,CWs) είναι τεχνολογικά συστήματα που έχουν σχεδιαστεί και κατασκευαστεί για να αποτυπώνουν τις φυσικές διεργασίες που περιλαμβάνουν τη βλάστηση των υγροβιότοπων , τα εδάφη και τις συναφείς μικροβιακές διεργασίες που βοηθούν στην επεξεργασία των λυμάτων. Επιτυγχάνουν τις διεργασίες απομάκρυνσης, μιμούμενοι τις διαδικασίες που συμβαίνουν σε φυσικούς υγροβιότοπους , αλλά το περιβάλλον , στο οποίο δραστηριοποιούνται, είναι πιο ελεγχόμενο (Vymazal, 2010). Στα πλεονεκτήματα αυτών το συστημάτων συγκαταλέγονται οι χαμηλές απαιτήσεις σε ενέργεια, το χαμηλό κόστος καθώς και η απλότητα στη λειτουργία και τη συντήρησή τους και για αυτό το λόγο πλέον θεωρούνται ευρέως ως μια πράσινη τεχνολογία που χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση της περιβαλλοντικής ρύπανσης(Corbella & Puigagut, 2018).

Οι CWs μπορούν να ταξινομηθούν λαμβάνοντας υπόψη κριτήρια όπως η υδρολογία (επιφανειακή ή υποεπιφανειακή ροή), ο τύπος μακροφυτικής βλάστησης (αναδυόμενη, βυθισμένη και ελευθέρα επιπλέουσα)(Vymazal, 2011a). Ανάλογα με το αν η ροή είναι οριζόντια ή κάθετη μπορούμε να διακρίνουμε τα συστήματα υποεπιφανειακής ροής σε περισσότερες κατηγορίες (οριζόντια ή κάθετη), (Vymazal Jan, 2008). Διαφορετικοί τύποι που έχουν ερευνηθεί και αναπτυχθεί είναι: α) υγροβιότοποι ελεύθερης επιφάνειας (Free Water Surface, FWS), β) υγροβιότοποι υποεπιφανειακής οριζόντιας ροής (Horizontal Subsurface

Systems, HF CWs), γ) υγροβιότοποι υποεπιφανειακής κάθετης ροής (Vertical Flow Systems, VF CWs), δ) υβριδικά ή συνδυασμένα συστήματα, τα οποία αποτελούν συνδυασμό διαφορετικών τύπων συστημάτων.



Εικόνα 5 : Βασικές κατηγορίες και χαρακτηριστικά των διαφόρων τύπων τεχνητών υγροβιότοπων για την επεξεργασία λυμάτων με H= horizontal και V= vertical(Vymazal, 2010).

Η Γερμανίδα Käthe Seidel είχε πραγματοποιήσει από το 1950 στο ίδρυμα Max Planck τα πρώτα πειράματα για την επεξεργασία λυμάτων από υγροβιότοπους(Seidel, 1956). Τα πειράματά της έγιναν ως επί το πλείστον σε τεχνητούς υγροβιότοπους με οριζόντια (HF CWs) ή κάθετη (VF CWs) υποεπιφανειακή ροή. Πάντως, ο πρώτος πλήρως κατασκευασμένος τεχνητός υγροβιότοπος λειτούργησε στην Ολλανδία το 1967 με σύστημα ελεύθερης επιφάνειας (FWS) (Vymazal, 2010). Ύστερα από 50 χρόνια έρευνας και εφαρμογής, οι τεχνητοί υγροβιότοποι αναγνωρίστηκαν ως αξιόπιστη τεχνολογία επεξεργασίας λυμάτων και, μέχρι σήμερα, έχουν αναδειχθεί ως κατάλληλη λύση για την επεξεργασία πολλών τύπων λυμάτων (Vymazal, 2011a).

Οι διαφορές στα κύρια χαρακτηριστικά σχεδιασμού αλλά και στις διεργασίες για την απομάκρυνση των ρύπων δίνουν τους διαφορετικούς τύπους τεχνητών υγροβιότοπων.

Τεχνητοί υγροβιότοποι ελεύθερης επιφάνειας (FWS CWs)

Οι τεχνητοί υγροβιότοποι επιφανειακής ροής, γνωστοί και ως συστήματα ελεύθερης επιφάνειας (FWS CWs), αποτελούνται συνήθως από κανάλια, τάφρους ή παράλληλες λεκάνες με αδιαπέρατους πυθμένες και πλωτά, βυθισμένα και αναδυόμενα φυτά (Robert H. Kadlec, 2008).

Το προεπεξεργασμένο λύμα, καθώς ρέει με μικρή ταχύτητα δια μέσω των στελεχών και των ριζών της υφιστάμενης βλάστησης, υποβάλλεται σε φυσικές διεργασίες (καθίζηση, διήθηση,

έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία), χημικές (καθίζηση, προσρόφηση, εξάτμιση) και βιολογικές (μικροβιακή αποικοδόμηση, μικροβιακές μετατροπές θρεπτικών ουσιών, πρόσληψη από τη στήλη ύδατος και τη ριζική ζώνη, διεργασίες μικροβιακού ανταγωνισμού και φυσικής φθοράς των βακτηρίων) (Merz, 2000). Σε αυτά τα συστήματα η κύρια πηγή του οξυγόνου είναι το οξυγόνο της ατμόσφαιρας, που διαχέεται από την ελεύθερη επιφάνεια του υγρού. Η πιο κοινή εφαρμογή τέτοιων συστημάτων είναι για τριτοβάθμια επεξεργασία αστικών λυμάτων και επίσης για απορροή όμβριων και υδάτων αποστράγγισης ορυχείων (Kadlec & Knight, Treatment Wetlands, 1996) (Robert H. Kadlec, 2008)(Vymazal Jan, 2008).

Τεχνητοί υδροβιότοποι οριζόντιας υποεπιφανειακής ροής (HF CWs) ή (HSSF)

Στους τεχνητούς υδροβιότοπους υποεπιφανειακής οριζόντιας ροής (HF CWs), οι οποίοι αναπτύσσονται μέσα σε κανάλια ή τάφρους με σχετικά στεγανούς πυθμένες, τα λύματα τροφοδοτούνται στην είσοδο και ρέουν αργά μέσω του πορώδους μέσου κάτω από την επιφάνεια του στρώματος, που έχει φυτευτεί με αναδυόμενη βλάστηση, προς την έξοδο όπου συλλέγονται. Η επεξεργασία των λυμάτων συχνά περιλαμβάνει ένα δίκτυο ζωνών με διάφορες επεξεργασίες για τη βελτίωση της ποιότητας της εκροής πριν από την εκχύλιση της και περιλαμβάνει αερόβιες, ανοξικές και αναερόβιες ζώνες. Μέσα σε αυτό το δίκτυο πραγματοποιείται η επεξεργασία των λυμάτων, μέσω της μικροβιακής αποικοδόμησης, καθώς και άλλων φυσικοχημικών διεργασιών. Στους HF CWs, επειδή δεν υπάρχει ανταλλαγή αέρα με την ατμόσφαιρα, το στρώμα του υδροβιότοπου παραμένει κυρίως αναερόβιο. Ωστόσο, γύρω από τις ρίζες και τα ριζώματα των φυτών που υπάρχουν στο σύστημα, υπάρχει πρόσβαση σε οξυγόνο. Τα φυτά διανέμουν οξυγόνο στο υπόστρωμα, καθιστώντας αυτές τις περιοχές αερόβιες. Αυτός ο περιορισμένος αερόβιος χώρος εξυπηρετεί την απομάκρυνση οργανικής ύλης μέσω της μικροβιακής δραστηριότητας (Brix, 1987).

Οι τεχνητοί υδροβιότοποι υποεπιφανειακής οριζόντιας ροής (HF CWs) αρχικά αναπτύχθηκαν για την επεξεργασία οικιακών και αστικών λυμάτων. Ωστόσο, με την πάροδο του χρόνου και την εξέλιξη της τεχνολογίας, έχουν διαπιστωθεί πλεονεκτήματα και σε άλλους τύπους λυμάτων.

Υδροβιότοποι κατακόρυφης υποεπιφανειακής ροής (VF ή VSSF)

Οι υδροβιότοποι κατακόρυφης ροής (VF CWs) αποτελούνται από ένα επίπεδο στρωματοποιημένου χαλικιού με άμμο, που έχει φυτευτεί με μακρόφυτα. Η τροφοδοσία γίνεται περιοδικά με μεγάλες παροχές, κατακλύζοντας έτσι την επιφάνεια. Κατά τη διάρκεια

αυτής της φόρτισης , τα λύματα απορροφώνται από το θρεπτικό μέσο που υπάρχει στα στρώματα του υδροβιότοπου. Στο κάτω μέρος του υδροβιότοπου υπάρχει ένα δίκτυο αποχέτευσης που συλλέγει τα λύματα που περνούν μέσα από το θρεπτικό μέσο και στη συνέχεια απομακρύνονται. Το στρώμα αποστραγγίζεται τελείως έτσι ώστε να επιτρέπει στον αέρα να ξαναγεμίσει το στρώμα. Τα λύματα τροφοδοτούνται εκ νέου μόνο αφού διεισδύσει όλο το λύμα και το στρώμα είναι απαλλαγμένο από αυτό (Alexandros Stefanakis, 2014). Η επεξεργασία λυμάτων, οικιακών ή προερχόμενων από μικρές κοινότητες, γίνεται συνήθως με τη χρήση VF CWs. Χρησιμοποιούνται όμως και σε άλλες περιπτώσεις, για παράδειγμα στα βιομηχανικά λύματα και στην απορροή όμβριων υδάτων.

Υβριδικά συστήματα τεχνητών υδροβιότοπων

Μπορούν να συνδυαστούν διάφοροι τύποι τεχνητών υδροβιότοπων για την επίτευξη υψηλότερης αποτελεσματικότητας απομάκρυνσης ρυπαντών , ειδικότερα για το άζωτο. Η Seidel, με το πρωτότυπο υβριδικό σύστημα που αναπτύχθηκε στο Ινστιτούτο Max Planck στο Krefeld της Γερμανίας το 1956, συνέδραμε στη δημιουργία πολλών από τα συνδυασμένα συστήματα υδροβιότοπων που βλέπουμε σήμερα (Seidel, 1956). Τα συστήματα υβριδικών υδροβιότοπων VF-HF και HF-VF ανήκουν στις πιο κοινές διαμορφώσεις υβριδικών συστημάτων. Ωστόσο, γενικά, η συνδυασμένη χρήση διαφορετικών ειδών τεχνητών υδροβιότοπων μπορεί να οδηγήσει σε ακόμα υψηλότερη απόδοση επεξεργασίας (Vymazal Jan, 2008).

1.3.1. ΠΛΗΡΩΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ ΥΓΡΟΒΙΟΤΟΠΩΝ

Τα πληρωτικά υλικά που εμπεριέχονται στα υποστρώματα των υδροβιότοπων, είναι μια από τις βασικές παραμέτρους σχεδιασμού διότι έχει αποδειχθεί πως έχουν σημαντική επίδραση στους CWs. (Sa'at et al., 2021) Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η αφαίρεση πολλών ρύπων στα CWs επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τους τύπους υποστρωμάτων καθώς μπορεί να παρέχουν το μέσο για την ανάπτυξη των φυτών και τη διαδρομή για τη ροή των λυμάτων (Ge et al., 2020; Hijosa-Valsero et al., 2016; Huang et al., 2017).

Η ταξινόμηση των υποστρωμάτων διαμορφώνεται με γνώμονα τα χαρακτηριστικά και την πηγή των υλικών, και η κατηγοριοποίηση γίνεται σε παραδοσιακά ορυκτά υλικά, χημικά προϊόντα, υλικά βιομάζας, βιομηχανικά απόβλητα, τροποποιημένα λειτουργικά υλικά και νέα υλικά.

Τα φυσικά ορυκτά υλικά (π.χ. χώμα, άμμος, χαλίκι, ασβεστόλιθος, φυσικός ζεόλιθος κ.λπ.) είναι τα πιο ευρέως εφαρμοζόμενα υποστρώματα στα CWs. Το έδαφος και η άμμος και το

χαλίκι παρέχουν καλές φυτικές συνθήκες για την ανάπτυξη των φυτών στους CWs. Η ρίζα των φυτών μπορεί να διεισδύσει σε αυτά τα υλικά, επιτρέποντας την απορρόφηση των θρεπτικών ουσιών και την προώθηση της βιολογικής διαδικασίας (Gill et al., 2017). Το χαλίκι αποτελεί το πιο κοινό πληρωτικό υλικό σε CWs και γίνεται εκτεταμένη χρήση του σε τεχνητούς υδροβιότοπους πιλοτικής κλίμακας (Gikas et al., 2018; Hernández-Crespo et al., 2017). Ωστόσο, λόγω του μικρότερου ειδικού χώρου και των λιγότερο ενεργών συστατικών, δεν υπάρχει υψηλή αποτελεσματικότητα στην επεξεργασία φυσικών υλικών όταν πρόκειται για ρύπους υψηλής συγκέντρωσης. (Ji et al., 2022)

Τα τελευταία χρόνια μελετάται η επιλογή νέων υποστρωμάτων και η επαναχρησιμοποίηση άλλου υλικού όπως είναι τα υποστρώματα από ανακυκλωμένο πλαστικό (HDPE). Η χρήση ανακυκλωμένου πλαστικού στα υποστρώματα των τεχνητών υδροβιότοπων έχει το δυναμικό να προσφέρει οικολογικά οφέλη, όπως μείωση της χρήσης πρωτογενών πρώτων υλών, μείωση της παραγωγής απορριμμάτων και προώθηση της κυκλικής οικονομίας. Ωστόσο, η χρήση ανακυκλωμένου υλικού σε τέτοιου είδους εφαρμογές πρέπει να εξετάζεται διεξοδικά, καθώς δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία.

Το βιοεξανθράκωμα (biochar) είναι ένα πληρωτικό υλικό, του οποίου οι πηγές θα μπορούσαν να χωριστούν σε τέσσερις κατηγορίες, π.χ. γεωργικά απόβλητα και ξύλο, απόβλητα τροφίμων, αποθέματα θαλάσσιων ζωοτροφών και λάσπη λυμάτων, και εφαρμόστηκε σε πολλά συστήματα επεξεργασίας λυμάτων αυτή τη δεκαετία (Ashoori et al., 2019; Qin et al., 2020) λόγω της μεγάλης επιφάνειας, της πυκνότητας φωτός, της μεγάλης ικανότητας προσρόφησης (Gayathri et al., 2021) και της δυνατότητας μείωσης των εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου. (Guo et al., 2020) Παρασκευάζεται κατά κανόνα με πυρόλυση, όταν χρησιμοποιείται σε τεχνητούς υδροβιότοπους. Αναμιγνύεται συνήθως με άλλο πληρωτικό υποστρώματος σε συγκεκριμένη αναλογία, όταν εφαρμόζεται σε CWs. Το biochar έχει μεγάλη επιφάνεια, η οποία συμβάλλει στην απορρόφηση διαφόρων ρύπων. (Chahinez et al., 2020; Khurshid et al., 2021) Εν τω μεταξύ, το βιοεξανθράκωμα θα μπορούσε επίσης να ενισχύσει την απομάκρυνση των ρύπων έμμεσα, επηρεάζοντας τα χαρακτηριστικά του υποστρώματος, των μικροβίων και της ανάπτυξης των φυτών στα CWs. (Zhuang et al., 2022).

Επιπλέον, η συνένωση των πληρωτικών υλικών των υποστρωμάτων μπορεί επίσης να σχηματίσει θερμικούς μονωτές και να διατηρήσει τη βιολογική δραστηριότητα στα CWs, γεγονός που ενισχύει την αποτελεσματικότητα της απομάκρυνσης των ρύπων το χειμώνα.

1.3.2 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΒΛΑΣΤΗΣΗΣ

Η παρουσία της βλάστησης στους τεχνητούς υδροβιότοπους έχει ουσιαστικό ρόλο στην πρόσληψη θρεπτικών στοιχείων, στην παροχή οξυγόνου, στη ρύθμιση της ροής και στην επιβράδυνση του νερού, συμβάλλοντας έτσι στην αποτελεσματική απομάκρυνση ρύπων και στη βελτίωση της ποιότητας του νερού που επεξεργάζονται οι υδροβιότοποι (Α.Ν. Αγγελάκης et al., 2017). Οι διαδικασίες που συμβαίνουν στη ριζόσφαιρα και η δυνατότητα των φυτών να μεταφέρουν O_2 στις ρίζες επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της επεξεργασίας των ρύπων στους τεχνητούς υδροβιότοπους. (Α.Ν. Αγγελάκης et al., 2017)

Οι τεχνητοί υδροβιότοποι που σχεδιάζονται για την επεξεργασία υγρών αποβλήτων χρησιμοποιούν μεγάλο αριθμό φυτών με ειδικά χαρακτηριστικά που τους καθιστούν κατάλληλους για αυτήν τη χρήση. Τα φυτά αυτά παρέχουν επιφάνειες στις ρίζες τους που επιτρέπουν την προσκόλληση των μικροοργανισμών και παρέχουν οξυγόνο και οργανικές ενώσεις για τον μεταβολισμό. Εκτελούν διάφορες λειτουργίες που συμβάλλουν στην αποδοτική επεξεργασία των ρύπων. Ο ρόλος των φυτών εξαρτάται από τον τεχνικό και λειτουργικό σχεδιασμό του συστήματος. Σε συστήματα με οριζόντια υποεπιφανειακή ροή ο βασικός τους ρόλος είναι να δημιουργούν ένα περιβάλλον που προάγει την ανάπτυξη των βακτηρίων και των μικροοργανισμών που συμμετέχουν στις διαδικασίες επεξεργασίας (Kataki et al., 2021; Shelef et al., 2013; Vymazal, 2011b).

Μερικά από τα πλέον συνηθισμένα φυτά που χρησιμοποιούνται είναι το *Phragmites* sp. (κοινό καλάμι), το οποίο αποτελεί το κυρίαρχο είδος σε τεχνητούς υδροβιότοπους στην υπόλοιπη Ευρώπη και στη χώρα μας. Τα κλαδιά του ριζώματος, τα οποία διασυνδέονται, σχηματίζουν δίκτυο εσωτερικού αερισμού τροφοδοτώντας με οξυγόνο και τα ριζώματα και τις προσκολλημένες ρίζες (Dickopp et al., 2011). Έχουν επίσης το πλεονέκτημα ότι μπορούν να ζήσουν αρκετά χρόνια (Čížková et al., 1996). Επιπλέον, η απελευθέρωση οξυγόνου από τα κωνικά τμήματα των ριζών και των ριζωμάτων στη ριζόσφαιρα (J. Armstrong & Armstrong, 1988; W. Armstrong et al., 1990), κρατά σημαντικό ρόλο στη δημιουργία αερόβιων περιβαλλόντων, όπου μπορούν να λειτουργούν αερόβιοι μικροοργανισμοί συμμετέχοντες στην οξείδωση των αναερόβιων ουσιών. Η παραγόμενη υπέργεια βιομάζα (Vymazal & Kropfelová, 2005) είναι απαραίτητη για την απελευθέρωση οργανικής ύλης στη ριζόσφαιρα υπό τη μορφή των εξιδρωμάτων ριζών, βλεννογόνων, νεκρών κυττάρων ριζών και ριζωμάτων. Επίσης, η παρουσία υψηλότερης πυκνότητας μικροοργανισμών στις ρίζες σε σύγκριση με τα γύρω ριχώδη σωματίδια του χαλικιού (Moulisová et al., 2023), αναδεικνύει τη ρίζα ως μια ενεργή και πολυπληθή μικροβιακή περιοχή (Faußer et al., 2013). Η έλλειψη πληροφοριών για

τις λειτουργίες των υπογείων τμημάτων των φυτών, καθώς και για την αλληλεπίδρασή τους με τους μικροοργανισμούς, μπορεί να αποτελεί πρόκληση στην κατανόηση του πλήρους φάσματος των λειτουργιών των τεχνητών υδροβιότοπων. Ενδέχεται οι αρνητικές επιπτώσεις τοξικών προϊόντων μικροβιακού μεταβολισμού στα υπόγεια τμήματα των φυτών να επηρεάσουν την απόδοση και την αποτελεσματικότητα των τεχνητών υδροβιότοπων στην επεξεργασία των ρύπων.

1.4 ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

Τα λύματα μπορεί να περιέχουν πολλά διαφορετικά παθογόνα οφειλόμενα σε ασθένειες που μεταδίδονται μεταξύ ανθρώπων και ζώων. Κύρια πηγή παθογόνων στο υδάτινο περιβάλλον είναι η απόρριψη ακατέργαστων ή ανεπαρκώς επεξεργασμένων λυμάτων. Βακτήρια, ιοί, πρωτόζωα και έλμινθες είναι οι τέσσερις ομάδες στις οποίες διακρίνονται τα παθογόνα (Suzuki et al., 2012). Η άμεση ανίχνευσή τους και η απαρίθμηση απαιτούν χρόνο, κόστος αλλά και ειδικές τεχνικές και εγκαταστάσεις. Για αυτούς τους λόγους, οι βακτηριολόγοι ανέπτυξαν την ιδέα της χρήσης μικροβιακών δεικτών για την ένδειξη της μόλυνσης (Ng et al., 1993).

Η παρακολούθηση των βακτηρίων κοπρανώδους υλικού, καθώς και η μέτρησή τους μπορεί να αποτελέσει έναν δείκτη για την ασφάλεια των υδάτων και την αξιολόγηση της ενδεχόμενης μόλυνσης από παθογόνους μικροοργανισμούς (Suzuki et al., 2012).

Η επιλογή των ενδεικτικών βακτηρίων για τον προσδιορισμό της παρουσίας παθογόνων οργανισμών σε ύδατα πρέπει να γίνεται, λαμβάνοντας υπόψη τα ακόλουθα: i) πρέπει να μπορούν να προσδιορίζονται με εύκολο, γρήγορο και ακριβή τρόπο, χρησιμοποιώντας διαδεδομένες μεθόδους ανάλυσης, ii) πρέπει να είναι είδη που δεν πολλαπλασιάζονται εύκολα υπό φυσικές συνθήκες στο περιβάλλον, ώστε οι μεταβολές στην παρουσία τους να αντανakλούν πραγματικές αλλαγές στην ποιότητα του νερού, iii) πρέπει να έχουν σημαντική συσχέτιση με τον αριθμό των παθογόνων οργανισμών. Αυτό σημαίνει ότι η παρουσία των επιλεγμένων βακτηρίων πρέπει να αντικατοπτρίζει αυξημένο κίνδυνο για την υγεία του ανθρώπινου πληθυσμού, iv) πρέπει να έχουν καλά χαρακτηρισμένους ξενιστές, δηλαδή να βρίσκονται συχνά σε συγκεκριμένες πηγές μόλυνσης (όπως κοπρανώδες υλικό) και να μην είναι παθογόνοι για τον άνθρωπο (Scott et al., 2002). Η *Escherichia coli* (*E. coli*) είναι ένα βακτήριο που συνήθως βρίσκεται στο παχύ έντερο των ζώων ζεστού αίματος, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπινου εντέρου. Αποτελεί μια σημαντική συνιστώσα της φυσιολογικής χλωρίδας του εντέρου, όπου συμβάλλει σε βιοχημικές διεργασίες και διατηρεί την ισορροπία του εντερικού περιβάλλοντος. Η παρουσία της σε δείγματα περιβάλλοντος, μπορεί να υποδεικνύει πρόσφατη μόλυνση από κοπρανώδες υλικό. Αυτό μπορεί να συμβαίνει

λόγω ανεπαρκούς επεξεργασίας λυμάτων. Η παρουσία της *E. coli* σε περιβαλλοντικά δείγματα δεν υποδεικνύει απευθείας την παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών, παρόλα αυτά μπορεί να αποτελεί έναν προειδοποιητικό δείκτη για τον πιθανό κίνδυνο παρουσίας παθογόνων οργανισμών που μεταδίδονται μέσω ανθρώπινων αποβλήτων (Brüssow et al., 2004). Η *E. coli* χρησιμοποιείται ευρέως ως μικροβιακός δείκτης για την αναγνώριση ποιοτικών και ποσοτικών παραμέτρων στο νερό και στα λύματα με μη αποδεκτά επίπεδα μόλυνσης (Atlas J, 1993). Η *E. coli* είναι ένα βακτήριο που ανήκει στην ομάδα των Gram αρνητικών βακτηρίων. Είναι προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο, μη σπορογόνο και η βέλτιστη θερμοκρασία για την ανάπτυξη είναι γύρω στους 37°C. Ωστόσο, ορισμένα στελέχη μπορούν να αναπτυχθούν σε υψηλότερες θερμοκρασίες, έως και 49°C (Fotadar et al., 2005).

Ο *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) είναι γνωστός για την ανθεκτικότητά του σε διάφορες συνθήκες και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Πρόκειται για ένα μη σπορογόνο βακτήριο και έχει την ικανότητα να επιβιώνει σε ακραίες συνθήκες. Μερικές από αυτές τις συνθήκες περιλαμβάνουν υψηλές θερμοκρασίες, ξήρανση, υψηλή αλατότητα, ακραίο pH, καθώς και παρουσία αντιβιοτικών που συνήθως χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο των βακτηριακών λοιμώξεων. Επιπλέον, είναι ανθεκτικό βακτήριο σε διάφορες μεθόδους απολύμανσης (Torici et al., 2021). Ο ανθρώπινος οργανισμός αποτελεί συχνά φορέα του *S. aureus* (Kloos & Bannerman, 1994). Τις περισσότερες φορές, αυτά τα βακτήρια δεν προκαλούν προβλήματα ή οδηγούν σε σχετικά μικρές λοιμώξεις του δέρματος, αλλά περιστασιακά οι λοιμώξεις μπορεί να γίνουν θανατηφόρες και να προκαλέσουν σοβαρά προβλήματα υγείας. Γι' αυτό το λόγο ο *S. aureus* μελετήθηκε ως μικροβιακός δείκτης μόλυνσης τα τελευταία χρόνια. Η ανίχνευσή του ευνοείται από την υψηλή του ικανότητα επιβίωσης σε θαλάσσια περιβάλλοντα, καθώς είναι πιο ανθεκτικό στο χλωροαιθάνιο από ότι είναι τα κολοβακτηρίδια και επίσης είναι πιο ανθεκτικό στο αλάτι (World Health Organization (WHO), 1995).

Οι εντερόκοκκοι είναι βακτήρια θετικά κατά Gram, που συνήθως ανιχνεύονται στο γαστρεντερικό σύστημα του ανθρώπου και των ζώων και θεωρούνται κατάλληλοι δείκτες κοπρανώδους μόλυνσης. Ο λόγος που χρησιμοποιούνται είναι διότι έχουν την ικανότητα να επιβιώνουν σε αυτό το περιβάλλον για μεγάλο χρονικό διάστημα και να αντέχουν τις αντιξοότητες του. Επίσης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό και τον χαρακτηρισμό των δεικτών παθογόνων σε υδάτινα περιβάλλοντα. Αυτό συμβαίνει γιατί η παρουσία και η συμπεριφορά των εντερόκοκκων μπορεί να δώσει στους ερευνητές ένα ενδεικτικό σημάδι για το επίπεδο μόλυνσης και την πιθανή παρουσία παθογόνων οργανισμών που προέρχονται από κόπρανα (Byarpanahalli et al., 2012).

1.5. ΑΔΕΝΟΪΟΙ

Οι αδενοϊοί που εντάσσονται στους ιούς εντερικής προέλευσης αποτελούν δείκτες ιικής μόλυνσης του υδάτινου περιβάλλοντος (Rames et al., 2016).

Οι ανθρώπινοι αδενοϊοί (HAdV) ανήκουν στην οικογένεια Adenoviridae και στο γένος Mastadenovirus. Είναι μεσαίου μεγέθους, χωρίς περίβλημα, εικοσαεδρικοί ιοί με διάμετρο 70 έως 90 nm, ενώ παράλληλα το γενετικό τους υλικό είναι δίκλωνο DNA. Οι αδενοϊοί είναι εξαιρετικά ανθεκτικοί σε φυσικούς και χημικούς παράγοντες (Echavarria, 2008). Η χρησιμότητα του HAdV ως δείκτη ιικής μόλυνσης αποδίδεται στα παρακάτω:

1) Ο HAdV είναι σταθερός και ανθεκτικός στο περιβάλλον των λυμάτων. Αυτό το χαρακτηριστικό καθιστά δυνατή την παραμονή και επιβίωση του ιού στα λύματα και την ευρεία διασπορά του (Bofill-Mas et al., 2006; Dong et al., 2010; Haramoto et al., 2007; Katayama et al., 2008; Pina et al., 1998a).

2) Ο HAdV συνήθως ανιχνεύεται συνεχώς στα λύματα, χωρίς μεγάλες εποχικές διακυμάνσεις. Αυτό καθιστά δυνατή την παρακολούθηση της παρουσίας του ιού στα λύματα χωρίς την επιρροή εποχικών παραγόντων (Carducci & Verani, 2013; T. T. Fong et al., 2010; Haramoto et al., 2007; Hewitt et al., 2011; Pina et al., 1998a; Poma et al., 2012).

3) Ο HAdV είναι ανθεκτικός στην απολύμανση με υπεριώδη ακτινοβολία UV, που είναι μια συνήθης μέθοδος απολύμανσης των λυμάτων (Linden et al., 2007; Nwachuku et al., 2005; Thurston-Enriquez et al., 2003).

4) Ο HAdV είναι άφθονος σε σχέση με άλλους εντερικούς ιούς, κάτι που διευκολύνει την ανίχνευσή του (Katayama et al., 2008; Poma et al., 2012; Rosa et al., 2010; Simmons & Xagoraki, 2011).

5) Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι ανίχνευσης του ιού HAdV, συμπεριλαμβανομένων των μοριακών τεχνικών, που διευκολύνουν την ανίχνευση του ιού στα λύματα (APHA, 1999; Jiang, 2006; Ogorzaly et al., 2013; H. D. Silva et al., 2011).

6) Ο HAdV σχετίζεται κυρίως με τον ανθρώπινο ξενιστή και ειδικά με τη μόλυνση από ανθρώπινα κόπρανα. Αυτό το χαρακτηριστικό τον καθιστά ιδιαίτερα σημαντικό για την παρακολούθηση της ανθρώπινης κοινότητας σε σχέση με τη μόλυνση (T.-T. Fong & Lipp, 2005; Wong et al., 2012).

Λόγω αυτών των χαρακτηριστικών δικαιολογείται η ένδειξή του ως δείκτη για την ποιότητα των λυμάτων. (H. D. Silva et al., 2011)

1.6 ANTIBIOTIKA

Τα αντιβιοτικά είναι είτε φυσικά απαντώμενες είτε ανθρωπογενείς ενώσεις, οι οποίες χρησιμοποιούνται ευρέως για τη βελτίωση της υγείας των ανθρώπων, των ζώων και των φυτών και για την πρόληψη και τη θεραπεία λοιμώξεων που προκαλούνται από παθογόνα βακτήρια. Τα αντιβιοτικά εξελίχθηκαν από φυσικές πηγές, όπως μικροοργανισμούς και φυτά, σε χημικά, συνθετικά προϊόντα που παράγονται βιομηχανικά. Η εξέλιξη αυτή έχει οδηγήσει στη δημιουργία διαφόρων κατηγοριών αντιβιοτικών, με διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης και εφαρμογές. Ορισμένες από τις βασικές κατηγορίες αντιβιοτικών είναι οι β-λακτάμες, οι κινολόνες, οι τετρακυλίνες, τα μακρολίδια, τα σουλφοαμίδια, οι αμινογλυκοσίδες και οι καρβαπενέμες. Τα αντιβιοτικά έχουν συχνά λησμονηθεί ως πιθανοί ρύποι στο περιβάλλον, παρά τον άμεσο αντίκτυπο που μπορούν να έχουν στους μικροοργανισμούς του περιβάλλοντος και τις εκπομπές λόγω της μεγάλης χρήσης τους (Sidrach-Cardona & Bécarea, 2013).

Η αμοξικιλίνη (amoxicillin, AMX) ανήκει στην ομάδα των βήτα-λακταμικών αντιβιοτικών. Είναι ένα ημισυνθετικό αντιβιοτικό που προέρχεται από την βάση της αμινοπενικιλίνης. Η αμοξικιλίνη είναι ένα αντιβιοτικό που ευρέως χρησιμοποιείται στην ιατρική για τη θεραπεία ποικίλων λοιμώξεων (Litskas et al., 2018). Ο τρόπος δράσης της βασίζεται στην αναστολή του σχηματισμού του κυτταρικού τοίχου των βακτηρίων, προκαλώντας την καταστροφή τους. Είναι αποτελεσματική κατά πολλών βακτηριακών ειδών, συμπεριλαμβανομένων θετικών και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων. Η αμοξικιλίνη είναι γνωστή για την αστάθειά της και την υποβολή σε υδρόλυση και αποικοδόμηση σε διάφορα προϊόντα αποδόμησης (Gozlan et al., 2013). Αυτό οφείλεται στη δομή της, που περιλαμβάνει έναν βήτα-λακταμικό δακτύλιο. Ο βήτα-λακταμικός δακτύλιος είναι ευαίσθητος σε διάφορες βιοτικές (όπως ένζυμα) και αβιοτικές (όπως η θερμότητα και η έκθεση στο φως) διεργασίες, που μπορούν να προκαλέσουν τη διάσπαση της αμοξικιλίνης σε πιο απλά συστατικά. Λόγω της ευρέως διαδεδομένης χρήσης της έχει προκύψει το πρόβλημα αντοχής των βακτηρίων στο αντιβιοτικό αυτό (Sodhi et al., 2021).

Η σουλφαμεθοξαζόλη (sulfamethoxazole, SMX) είναι ένας θεμελιώδης εκπρόσωπος των σουλφοαμίδων με μεσαία δράση και αποτελεί το χρησιμότερο μέλος της συγκεκριμένης κατηγορίας αντιμικροβιακών παραγόντων (Huoninen, 2001). Η σουλφαμεθοξαζόλη έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για τη θεραπεία βακτηριακών λοιμώξεων, όπως λοιμώξεις των ουροποιητικών οδών, βρογχίτιδα και προστατίτιδα στον άνθρωπο. Η SMX είναι ένα σουλφανιλαμίδιο που δρα ως αναστολέας της διυδροπτεροϊκής σύνθεσης στα βακτήρια. Αυτό συμβαίνει επειδή η σουλφαμεθοξαζόλη είναι δομικά ανάλογη του παραμινοβενζοϊκού οξέος

(PABA), που είναι μια προκαταρκτική ουσία για τη σύνθεση του διυδροπτεροϊκού οξέος, το οποίο απαιτείται για την παραγωγή τετραϋδροφολικού οξέος. Το τετραϋδροφολικό οξύ είναι σημαντικός παράγοντας για τη βιοσύνθεση των νουκλεοτιδίων, τα οποία απαιτούνται για την αναπαραγωγή του DNA και του RNA των βακτηρίων. Με την αναστολή της διυδροπτεροϊκής σύνθεσης, η σουλφαμεθοξαζόλη αποτρέπει την ανάπτυξη των βακτηρίων (Bhattacharjee, 2016). Η SMX καταπολεμά αποτελεσματικά βακτήρια θετικά και αρνητικά κατά Gram. Η ευρεία αντιμικροβιακή δράση της SMX την καθιστά χρήσιμη σε διάφορες εφαρμογές, συμπεριλαμβανομένης της κτηνοτροφίας και της υδατοκαλλιέργειας (J. Wang & Wang, 2018).

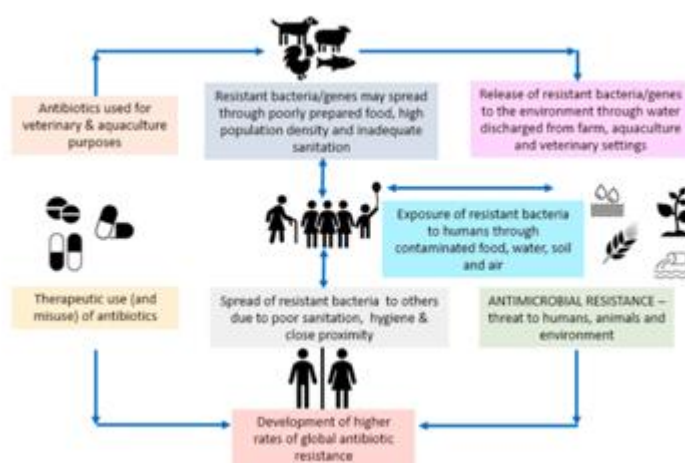
Η σιπροφλοξασίνη (ciprofloxacin, CIP) είναι μία από τις φθοροκινολόνες που λειτουργεί σε εύρος φάσματος κατά των περισσότερων αρνητικών βακτηρίων Gram, διότι στοχεύει τις βακτηριακές τοποϊσομεράσες τύπου II, τη γύραση και τη τοποϊσομεράση IV και προκαλεί μη αναστρέψιμη βλάβη στο βακτηριακό DNA (Aldred et al., 2014). Η σιπροφλοξασίνη έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για τη θεραπεία ανθρώπινων λοιμώξεων καθώς και λοιμώξεων που προέρχονται από βιομηχανίες ζωοτροφών. Η αλόγιστη χρήση της έχει οδηγήσει πολλά βακτηριακά στελέχη να αποκτούν αντοχή σε αυτήν. Η σιπροφλοξασίνη μεταβολίζεται και εκκρίνεται μόνο εν μέρει μέσω των ούρων και των κοπράνων ως η μητρική ένωση ή με τη μορφή μεταβολιτών με αντιβακτηριακή δράση, με αποτέλεσμα την απορρόφησή της από το έδαφος, επηρεάζοντας τους μικροοργανισμούς του εδάφους και την πανίδα (Pu et al., 2020).

1.6.1 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΣΕ ANTIBIOTIKA

Η απλή ανίχνευση της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά είναι ένα σημαντικό παγκόσμιο πρόβλημα που αφορά τη δημόσια υγεία και το περιβάλλον. Η Επιτροπή Περιβάλλοντος των Ηνωμένων Εθνών κατατάσσει την αντοχή στα αντιβιοτικά ως ένα από τα έξι αναδυόμενα ζητήματα περιβαλλοντικής ανησυχίας. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας αναφέρει την εμφάνιση των διάφορων παθογόνων που είναι ανθεκτικοί στα αντιβιοτικά ως ένα δυνητικό κίνδυνο για τη δημόσια υγεία (Moushumi Hazra, 2022). Αυτή η ανθεκτικότητα κατάγεται από φυσιολογικές εξελίξεις στη φύση, αλλά έχει ενταθεί από την ευρεία και συχνή χρήση αντιβιοτικών στην ανθρώπινη ιατρική, την κτηνιατρική και τη γεωργία (Pazda et al., 2019). Τα ανθεκτικά στα αντιβιοτικά βακτήρια (Antibiotic-Resistant Bacteria - ARB) είναι βακτήρια που έχουν αναπτύξει μηχανισμούς ανθεκτικότητας έναντι ενός ή περισσότερων αντιβιοτικών. Τα γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά (Antibiotic-Resistance Genes - ARGs) είναι γονίδια που περιέχουν τις πληροφορίες για τη δημιουργία αυτών των ανθεκτικών μηχανισμών. Αυτά τα γονίδια μπορούν να μεταφερθούν από έναν μικροοργανισμό σε άλλους, είτε μέσω

βακτηριακών διαδικασιών είτε μέσω άλλων μηχανισμών, όπως η μεταφορά γονιδίων μεταξύ βακτηρίων.

Τα υψηλά επίπεδα μικροβιακής βιομάζας στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων παρέχουν μεγάλη ποσότητα βακτηρίων στο περιβάλλον και αυτό δίνει τη δυνατότητα σε ανθεκτικά βακτήρια να αναπτυχθούν και να εξαπλωθούν ευκολότερα. Επιπλέον, η παρουσία θρεπτικών ουσιών, όπως νιτροφωσφορικά άλατα, στα λύματα, μπορεί να ενισχύσει την ανάπτυξη των βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένων ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων (Guardabassi et al., 2002). Σε ένα εύρος 30% έως 90% των καταναλωθέντων αντιβιοτικών πραγματοποιείται απέκκριση με τη μορφή μεταβολιτών ή συνδυασμών του (Sabri, Schmitt, et al., 2020; Sabri, van Holst, et al., 2020), γεγονός που καθιστά τα λύματα μια βασική οδό για την περιβαλλοντική έκθεσή τους στα αντιβιοτικά (Bueno et al., 2020; Lamba & Ahammad, 2017). Η μεταφορά και η επεξεργασία των λυμάτων μπορούν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στην επιδείνωση του προβλήματος της αντοχής στα αντιβιοτικά. Κατά τη διάρκεια της μεταφοράς και της επεξεργασίας των λυμάτων, οι μικροοργανισμοί εκτίθενται σε αντιβιοτικά και σε περιβαλλοντικές συνθήκες που μπορούν να προωθήσουν την ανάπτυξη της αντοχής τους (Hubeny et al., 2021). Η παρουσία πολυάριθμων ARGs με ανθεκτικότητα σε κύριες ομάδες αντιβιοτικών, όπως τετρακυλίνη, αμινογλυκοσίδες, μακρολίδες, σουλφοναμίδες και β-λακτάμες, έχει καταγραφεί τόσο στην ενεργή ιλύ όσο και στα λύματα από μονάδες επεξεργασίας (X. X. Zhang et al., 2009). Τα υπολείμματα αντιβιοτικών ανιχνεύονται τόσο σε υδάτινο περιβάλλον όσο και σε δείγματα ιζημάτων, συνήθως σε εύρη ng/L και η συγκέντρωση ποικίλλει ανάλογα με την ανθρωπογενή επίδραση.



Εικόνα 6 : Απεικόνιση πιθανών οδών και απειλών λόγω της αντοχής στα αντιβιοτικά για την ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον, ιδίως για το νερό και το έδαφος, λόγω υπερβολικής χρήσης αντιβιοτικών, σε συνδυασμό με τη κακή υγιεινή και την απελευθέρωση στο περιβάλλον (Moushumi Hazra, 2022).

Τα ARBs λειτουργούν ως κινητήριος δύναμη για τη μεταφορά και τον πολλαπλασιασμό των γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά (ARGs) στο περιβάλλον. Η παρουσία αυτών των ανθεκτικών βακτηρίων αυξάνει την αφθονία και την ποικιλία των ARGs, προσθέτοντας στον γενικότερο "βακτηριακό πολλαπλασιασμό" των γονιδίων ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά. Είναι επίσης σημαντικό να σημειωθεί ότι τα ARBs μπορούν να εισβάλουν στο ανθρώπινο σώμα και να λειτουργήσουν ως φορείς των ARGs. Επιπλέον, η μετάδοση της ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά από το περιβαλλοντικό τμήμα στον άνθρωπο εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την κοινότητα των βακτηρίων. Η συνεργασία, η ανταγωνιστικότητα και ο αντίκτυπος που έχουν οι διάφοροι βακτηριακοί πληθυσμοί στην εξάπλωση των ARGs είναι πολύπλοκοι παράγοντες που επηρεάζουν τη δυνατότητα μετάδοσης ανθεκτικότητας στον άνθρωπο (Moushumi Hazra, 2022).

2. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι ο έλεγχος απομάκρυνσης μικροβιακών δεικτών και γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά κατά την επεξεργασία διασταλαγμάτων ΧΥΤΑ σε πιλοτικές μονάδες τεχνητών υγροβιότοπων. Τα διασταλάγματα προέρχονταν από τον ΧΥΤΑ Χανίων και η επεξεργασία τους πραγματοποιήθηκε σε τέσσερις διαφορετικές πιλοτικές μονάδες τεχνητών υγροβιότοπων, οριζόντιας υποεπιφανειακής ροής.

Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν τα εξής:

- ❖ Η απομάκρυνση των βακτηριακών δεικτών *Escherichia coli* , *Staphylococcus aureus*, και *Enterococcus sp* κατά την επεξεργασία των διασταλαγμάτων στις πιλοτικές μονάδες των τεχνητών υγροβιότοπων.
- ❖ Η μεταβολή του προφίλ της ανθεκτικότητας των βακτηρίων που παρέμεναν στην εκροή των τεσσάρων υγροβιότοπων σε σύγκριση με τα αντίστοιχα της εισροής.
- ❖ Η ανίχνευση και ο έλεγχος απομάκρυνσης συγκεκριμένων γονιδίων ανθεκτικότητας (ARGs) μετά την επεξεργασία στους υγροβιότοπους.
- ❖ Η απομάκρυνση αδενοϊού (AdV) κατόπιν της επεξεργασίας στους υγροβιότοπους.

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΚΑΙ ΧΩΡΟΘΕΤΗΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΔΙΑΤΑΞΗΣ

Η πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε αποτελείται από τέσσερις πιλοτικούς τεχνητούς υγροβιότοπους οριζόντιας υποεπιφανειακής ροής, οι οποίοι διαμορφώθηκαν στο εργαστήριο του κ.Στεφανάκη (εικόνα 10). Κάθε πιλοτική μονάδα αποτελείται από σιδερένιες ορθογώνιες κλίνες, που έχουν επενδυθεί εσωτερικά με πλαστικό υλικό HDPE με μήκος 93cm, πλάτος 45cm και ύψος 45cm. Η επένδυση με πλαστικό έχει ως σκοπό την στεγανοποίηση της μονάδας.

Οι πιλοτικές μονάδες τοποθετήθηκαν σε σειρά στον εξωτερικό χώρο του θερμοκηπίου της Σχολής ΧΗ.Μη.ΠΕΡ. Από αριστερά προς τα δεξιά, στην πρώτη μονάδα (P = Plastic) τοποθετήθηκε ως πληρωτικό υλικό πολυαιθυλένιο υψηλής πυκνότητας (HDPE). Στη δεύτερη (PB = Plastic & Biochar) τοποθετήθηκε HDPE μαζί με 10% w/v βιοεξανθράκωμα. Στην τρίτη (G= Gravel) τοποθετήθηκε χαλίκι, ενώ στη τέταρτη (GB = Gravel & Biochar) τοποθετήθηκε χαλίκι μαζί με 10% w/v βιοεξανθράκωμα.



Εικόνα 7 :Πιλοτικές μονάδες τεχνητών υγροβιότοπων Πολυτεχνείου Κρήτης. Ξεκινώντας από αριστερά, ο υγροβιότοπος P, PB,G, GB

Το HDPE είναι ένα θερμοπλαστικό πολυμερές προϊόν πετρελαίου. Στην πειραματική διάταξη χρησιμοποιήθηκαν δύο τύποι ανακυκλωμένου πλαστικού της εταιρείας Christian Stöhr GmbH & Co. KG. Το HX38 Biocarrier έχει ειδική επιφάνεια 188 m²/m³, μήκος 38mm και διάμετρο

38mm, ενώ το HX25KLL Biocarrier έχει ειδική επιφάνεια 360 m²/m³, μήκος 25mm και διάμετρο 25mm. Και οι δύο τύποι πλαστικού έχουν πορώδες που φθάνει το 95%.

Το βιοεξανθράκωμα που χρησιμοποιήθηκε προέρχεται από κλαδιά ελιάς μετά από επεξεργασία και θέρμανση στους 800oC σε φούρνο ξήρανσης.

Τα χαλίκια που χρησιμοποιήθηκαν ως πληρωτικό υλικό στις δύο τελευταίες πιλοτικές μονάδες έχουν μέση διάμετρο 4-10mm και πορώδες 30%. Τα χαλίκια προέρχονται από λατομείο, αποτελώντας ένα σημαντικό δομικό υλικό.

Σε όλες τις μονάδες έχει επιλεγεί σαν τύπος φυτικής βλάστησης το κοινό καλάμι (*Phragmites australis*).

Σε κάθε μια από τις τέσσερις πιλοτικές μονάδες ως εισροή χρησιμοποιείται αραιωμένο λύμα που προέρχεται από διασταλάγματα του Χ.Υ.Τ.Α. Χανίων. Ο όγκος διασταλάγματος που χρησιμοποιήθηκε στην πειραματική διαδικασία, προήλθε από τις εγκαταστάσεις του ΧΥΤΑ Χανίων και πιο συγκεκριμένα, έπειτα από το στάδιο της κροκίδωσης και πριν από το στάδιο της χημικής οξείδωσης. Το λύμα εφαρμόζεται ομοιόμορφα στην ανάντη πλευρά κάθε μονάδας. Το επεξεργασμένο λύμα εισέρχεται στο δοχείο συλλογής, μέσω ενός εύκαμπτου σωλήνα ο οποίος βρίσκεται στο εσωτερικό του πυθμένα, με την αρχή του στο κάτω μέρος της μονάδας και την έξοδό του στο άνω μέρος του τοιχώματος της. Προκειμένου να επιτευχθεί φυσική ροή, η κάθε μονάδα βρίσκεται σε κλίση της τάξης του 1 %.

Η εφαρμογή της εισροής και η συλλογή των εκροών γίνεται χειρωνακτικά. Η φόρτιση των υγροβιότοπων γινόταν σε καθημερινή βάση. Η αραιώση του διασταλάγματος ήταν ¼ (1 L διαστάλαγμα : 3 L νερό) σε όλη τη διάρκεια του πειράματος. Η μέση ημερήσια παροχή ήταν 3.3L/day. Επίσης στο διαστάλαγμα υπήρχε μεθανόλη κατά την περίοδο των μετρήσεων του Ιουλίου.

3.2 ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε την περίοδο από 28 Μαΐου έως 21 Ιουλίου του 2021. Ακολούθως εμφανίζονται οι τιμές μέσης καθώς και μέγιστης θερμοκρασίας, η μέση καθώς και η μέγιστη ταχύτητα ανέμου, η μέση βροχόπτωση καθώς και η επικρατούσα διεύθυνση του ανέμου που αντιστοιχούν στους άνωθεν μήνες. Τα μετεωρολογικά στοιχεία συλλέχθηκαν από <https://meteosearch.meteo.gr/>.

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

Μήνες	Μέση θερμοκρασία (°C)	Μέγιστη θερμοκρασία (°C)	Μέση ταχύτητα ανέμου (km/h)	Μέγιστη ταχύτητα ανέμου (km/h)	Μέση βροχόπτωση (mm)	Επικρατούσα διεύθυνση ανέμου
Μάιος	21,7	37,4	8,9	53,1	0,206	W
Ιούνιος	24,5	38,8	6,4	33,8	0,087	SW
Ιούλιος	27,7	43,2	7,3	54,7	0	SW

3.3 ΥΛΙΚΑ

Συσκευές και Όργανα :

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

Εργαστηριακά υλικά :

- * Πιπέτες σταθερού όγκου χωρητικότητας 100 μ L, 200 μ L, 1000 μ L
- * Αποστειρωμένα τρυβλία Petri με διάμετρο 6 cm και 9 cm
- * Αποστειρωμένες γυάλινες κωνικές φιάλες
- * Φίλτρα διήθησης (μεμβράνες νιτροκυτταρίνης με διάμετρο 47mm και μέγεθος πόρων 0,45 μ m)
- * Πλάκες μικροτιτλοποίησης με χωρητικότητα 96 θέσεων (microplate)

Αντιβιοτικά:

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

Υλικά απομόνωσης γενετικού υλικού και μεθόδου PCR:

- * DNeasy PowerSoil extraction Kit (50) (Qiagen)
- * MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plates (Applied Biosystems)
- * SYBR Green qPCR Master Mix (KAPA BIOSYSTEMS)

3.4 ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

3.4.1 ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

Στο πλαίσιο εκτέλεσης του πειράματος έγιναν διαδοχικές δειγματοληψίες στη διάρκεια τριών περιόδων, του Μαΐου που αποτελεί την 1^η χρονική περίοδο, του Ιουνίου που αποτελεί τη 2^η , και του Ιουλίου που αποτελεί την 3^η .

Τα δείγματα εισροής προέρχονται από αραιωμένα διασταλάγματα των Χ.Υ.Τ.Α. Χανίων, ενώ τα δείγματα εκροής προέρχονται από τις εκροές των τεσσάρων τεχνητών υδροβιότοπων (P , PB, G, GB). Αφού πραγματοποιούταν η συλλογή των δειγμάτων της εισροής και των τεσσάρων εκροών στη συνέχεια λάμβανε χώρα η άμεση επεξεργασία τους, σε μέγιστο χρονικό διάστημα 6 ημερών από τη λήψη τους, προκειμένου να μην αλλοιωθεί το περιεχόμενό τους.

Παρακάτω αναγράφονται σε πίνακα οι συνολικές δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν στις τρεις χρονικές περιόδους:

Πίνακας 2: Συνοπτικός πίνακας δειγματοληψιών

<i>Ημερομηνία δειγματοληψίας</i>	<i>Δειγματοληψία</i>
28 May 2021	1
3 June 2021	2
10 June 2021	3
16 June 2021	4
23 June 2021	5
24 June 2021	6
29 June 2021	7
6 July 2021	8
14 July 2021	9
21 July 2021	10

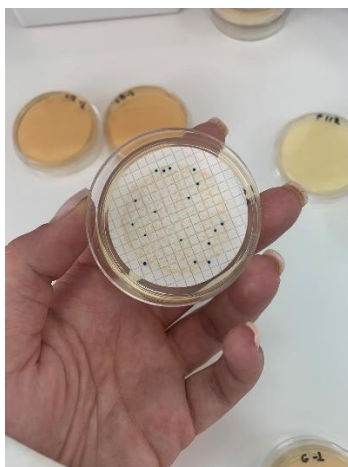
3.4.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Η ανίχνευση και απομόνωση των βακτηριακών δεικτών πραγματοποιήθηκε μέσω διήθησης των δειγμάτων. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν αρχικά σε συσκευή διήθησης υπό κενό, η οποία προηγουμένως είχε αποστειρωθεί. Στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε διήθηση μέσω φίλτρων, χρησιμοποιώντας κάθε φορά 100 mL δείγματος. Με το πέρας της διήθησης, τα φίλτρα μεταφέρθηκαν σε εκλεκτικά θρεπτικά υλικά με σκοπό να πραγματοποιηθεί η καλλιέργεια των τριών βακτηρίων.

Αναλυτικά, με γνώμονα το πρωτόκολλο για την απομόνωση του κάθε βακτηριακού στελέχους επιλέχθηκε η εξής διαδικασία :

Escherichia coli:

- Μεταφορά φίλτρου σε τρυβλίο με εκλεκτικό θρεπτικό υλικό HiCrom Agar.
- Επώαση του τρυβλίου σε θάλαμο στους 37 °C για 24 ± 4 h.
- Καταμέτρηση των αποικιών (CFUs) μπλε χρώματος.



Εικόνα 8: Καλλιέργεια *Escherichia coli*

Staphylococcus aureus:

- Μεταφορά φίλτρου σε τρυβλίο με εκλεκτικό θρεπτικό υλικό Mannitol Salt Agar.
- Επώαση του τρυβλίου σε θάλαμο στους 37 °C για 24 ± 4 h.
- Καταμέτρηση των αποικιών (CFUs) κίτρινου χρώματος.



Εικόνα 9 : Καλλιέργεια *Staphylococcus aureus*

Enterococcus sp.:

- Μεταφορά φίλτρου σε τρυβλίο με εκλεκτικό θρεπτικό υλικό Slanetz and Bartely Medium.
- Επώαση του τρυβλίου σε θάλαμο στους 37 °C για 48 ± 4 h.
- Καταμέτρηση των αποικιών (CFUs) καφέ - κόκκινου χρώματος.
- Μεταφορά φίλτρου σε νέο τρυβλίο με θρεπτικό υλικό Bile Esculin Agar, για επιβεβαίωση ύπαρξης *Enterococcus sp.*
- Επώαση στους 44 °C για 20 min.
- Καταμέτρηση των μαύρων αποικιών (CFUs).



Εικόνα 10: Καλλιέργεια *Enterococcus sp*

Στη συνέχεια έγινε καταγραφή των αποτελεσμάτων σε CFUs / 100 mL.

3.4.3 ΈΛΕΓΧΟΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Το πρώτο βήμα για τον έλεγχο ανθεκτικότητας των βακτηριακών στελεχών σε αντιβιοτικά ήταν η παρασκευή εναιωρημάτων τους. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν ανακαλλιέργειες των επιλεγμένων βακτηρίων (*Escherichia coli*, *Staphylococcus sp.* και *Enterococcus sp.*), σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό Nutrient Agar, τα οποία επώστηκαν για 24 h στον σε θερμοκρασία 37 °C. Κατόπιν, δημιουργήθηκε εναιώρημα των βακτηρίων σε Nutrient Broth και ρυθμίστηκε η συγκέντρωσή τους στα 10⁸ CFUs/mL μέσω μέτρησης της οπτικής απορρόφησης στα 600nm.

Το δεύτερο βήμα ήταν η παρασκευή των διαλυμάτων αντιβιοτικών που ήταν αναγκαία για την εκτέλεση του πειράματος (Amoxicillin, Sulfamethoxazole και Ciprofloxacin). Τα συγκεκριμένα αντιβιοτικά επιλέχθηκαν έτσι ώστε να προέρχονται από διαφορετικές κλάσεις. Οι συγκεντρώσεις τους προσδιορίστηκαν με κριτήριο τα όρια ευαισθησίας/αντοχής που αναφέρει το European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) και οι τιμές τους δίνονται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 3 : Χρησιμοποιούμενες αρχικές συγκεντρώσεις των 3 αντιβιοτικών για κάθε βακτηριακό στέλεχος ξεχωριστά

Αρχική συγκέντρωση αντιβιοτικών (mg/L)	Βακτηριακά στελέχη		
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Enterococcus sp.</i>
Amoxicillin	64	64	16
Sulfamethoxazole	8	8	8
Ciprofloxacin	8	8	8

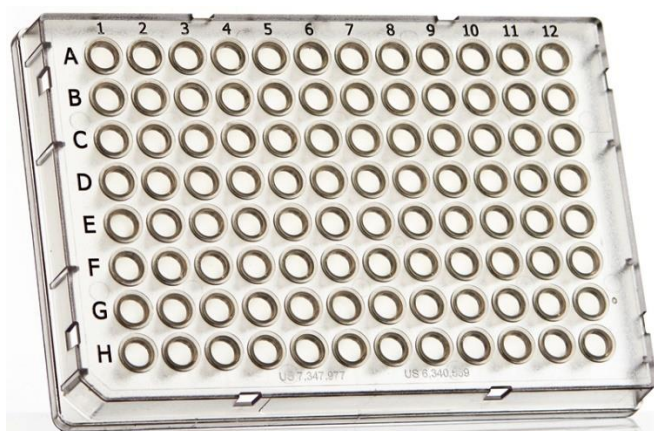
Το τρίτο βήμα ήταν ο έλεγχος ανθεκτικότητας των επιλεγμένων βακτηριακών στελεχών στα παραπάνω αντιβιοτικά. Ο έλεγχος αυτός έγινε με τη μέθοδο της Ελάχιστης Ανασταλτικής Συγκέντρωσης (MIC). Σκοπός αυτής της μεθόδου είναι ο προσδιορισμός της ελάχιστης συγκέντρωσης αντιβιοτικών που απαιτείται για την αναστολή της ανάπτυξης μικροοργανισμών μετά από επώαση των βακτηρίων για τουλάχιστον 24 h σε θερμοκρασία 37 °C.

Για την εφαρμογή της μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν πλάκες μικροτιτλοποίησης (microplates) με χωρητικότητα 96 θέσεων (πηγαδάκια). Αρχικά με χρήση ειδικής πολυκάναλης αυτόματης πιπέτας προστέθηκαν 100μL Nutrient Broth σε κάθε πηγαδάκι στις στήλες 1 έως 12 και στις σειρές Α έως Η (εικόνα 14). Σε κάθε διαφορετικό micro plate τοποθετήθηκε, μέχρι τη στήλη 9, 100μL από ένα από τα προαναφερθέντα αντιβιοτικά. Μετά από καλή ανάδευση με χρήση της πιπέτας πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις μέχρι τη σειρά Η του plate, μεταφέροντας κάθε φορά 100μL από τη μία σειρά στην επόμενη, προκειμένου να επιτευχθεί αραιώση 1 προς 2, με ταυτόχρονη αφαίρεση 100μL από την τελευταία σειρά.

Σε κάθε microplate τοποθετήθηκαν τέσσερα στελέχη από ένα συγκεκριμένο βακτήριο από αυτά που είχαν απομονωθεί από την εισροή και τις εκροές των υδροβιότοπων σε επιλεγμένες ημερομηνίες. Τα στελέχη αυτά τοποθετήθηκαν στις στήλες 1 έως 8, ανά δύο για κάθε εναιώρημα βακτηριακού στελέχους ώστε να υπάρχει επαναληψιμότητα στις μετρήσεις. Στην στήλη 9 δεν τοποθετήθηκαν στελέχη, οπότε υπήρχε μόνο αντιβιοτικό. Στις στήλες 10 και 11 τοποθετήθηκε εναιώρημα καθενός από τα τέσσερα βακτηριακά στελέχη ανά τρία πηγαδάκια και συγκεκριμένα στα A, B, C και F, G, H. Στη στήλη 12 και στα κενά πηγαδάκια των στηλών 10 και 11 τοποθετήθηκε μόνο Nutrient Broth.

Τα εναιωρήματα βακτηριακών στελεχών στις στήλες 10 και 11 χρησιμοποιήθηκαν με σκοπό τον έλεγχο της ανάπτυξης των μικροοργανισμών, χωρίς τον ανασταλτικό παράγοντα του αντιβιοτικού και το μεμονωμένο Broth που υπήρχε στα πηγαδάκια D, E, F των στηλών 10 και 11 και σε όλη τη στήλη 12 χρησιμοποιήθηκε ως control για τυχόν επιμόλυνση του plate.

Μετά από αυτήν την προετοιμασία, τα microplates επωάστηκαν για 24 τουλάχιστον h στον θάλαμο επώασης στους 37°C. Κατόπιν μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα με χρήση φωτόμετρου ανάγνωσης microplates, Microplate reader (LT – 4000) και λογισμικού manta LML (England).



Εικόνα 11 :Ενδεικτική απεικόνιση microplate

3.4.4 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΔΕΝΟΪΟΥ ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

Η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των αδενοϊών και των γονιδίων ανθεκτικότητας πραγματοποιήθηκαν με real-time PCR (qPCR).

Αρχικά απομονώθηκε DNA από τα δείγματα με χρήση του DNeasy PowerSoil extraction Kit (50) (Qiagen). Τα δείγματα επιλέχθηκαν σε κάθε μια από τις ακόλουθες ημερομηνίες :

28/05/2021: 1 δείγμα εισροής (Influent) και 4 δείγματα εκροής των τεσσάρων υδροβιότοπων (P, PB, G, GB) .

16/06/2021: 1 δείγμα εισροής (Influent) και 4 δείγματα εκροής των τεσσάρων υδροβιότοπων (P, PB, G, GB) .

14/07/2021: 1 δείγμα εισροής (Influent) και 4 δείγματα εκροής των τεσσάρων υδροβιότοπων (P, PB, G, GB) .

Μετά το πέρας της διαδικασίας απομόνωσης του DNA, σύμφωνα με τις οδηγίες που αναγράφονταν στο Kit, προέκυψαν 50 µL γενετικού υλικού από κάθε δείγμα.

Τα υπό εξέταση γονίδια ανθεκτικότητας ήταν τα *sul II* (ανθεκτικότητα στη σουλφαμεθοξαζόλη), *qnrA* (ανθεκτικότητα στις κινολόνες – ciprofloxacin) και *ampC* (ανθεκτικότητα στις β-λακτάμες – amoxicillin), ενώ παράλληλα ανιχνεύθηκε και ποσοτικοποιήθηκε στα δείγματα το 16S rRNA (Universal) (βακτηριακό ριβοσωμικό υλικό). Στο παράρτημα αναλύονται λεπτομερώς τα πρωτόκολλα ποσοτικοποίησης των γονιδίων και παρατίθενται οι αλληλουχίες των εκκινητών σε κάθε περίπτωση.

Η διαδικασία ανίχνευσης αδενοϊού στα δείγματα πραγματοποιήθηκε με Nested PCR. Η "nested PCR" είναι μια μοριακή τεχνική αναπαραγωγής DNA που χρησιμοποιείται για την ευαισθητοποίηση και την αύξηση της ειδικότητας του PCR (Polymerase Chain Reaction). Ουσιαστικά, η nested PCR είναι μια μέθοδος που εφαρμόζει δύο σειρές αντιδράσεων PCR αντί για μία. Στην αρχική αντίδραση PCR, το DNA στόχος ενισχύεται χρησιμοποιώντας προσανατολισμένους προς τα εμπρός (forward) και προσανατολισμένους προς τα πίσω (reverse) primers. Στην nested PCR, το προϊόν της πρώτης αντίδρασης PCR λειτουργεί ως το DNA στόχος για μια δεύτερη αντίδραση PCR, χρησιμοποιώντας διαφορετικούς primers. Αυτό το διπλό βήμα επιτρέπει την αύξηση της ειδικότητας της ανίχνευσης, καθώς και την αύξηση της ευαισθησίας στην ανίχνευση σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις του DNA στόχου. Η nested

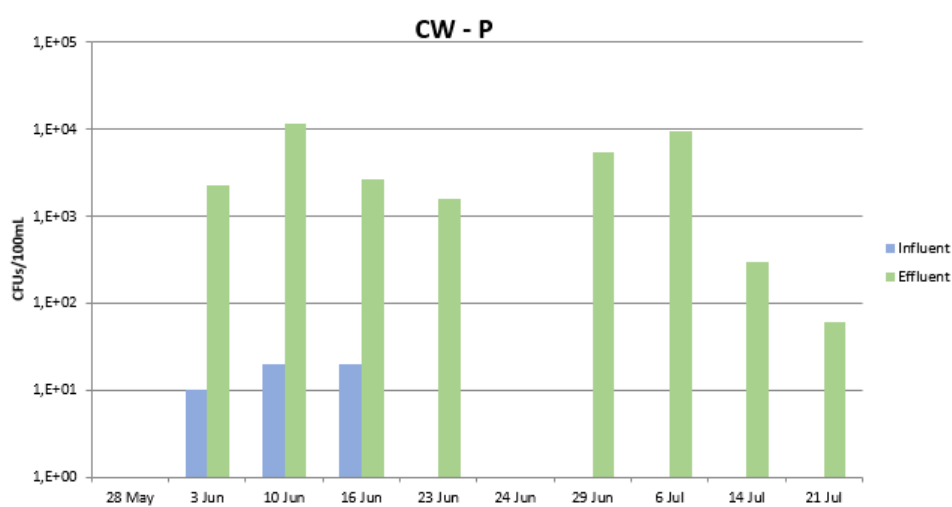
PCR είναι ιδιαίτερα χρήσιμη όταν πρέπει να ανιχνευθεί ένα πολύ μικρό ποσό DNA σε περιβάλλοντα με υψηλή αρχική παρουσία άλλου DNA. Επίσης, βοηθά στη μείωση του ψευδώς θετικού αποτελέσματος λόγω ενδεχόμενης μόλυνσης και ενδιάμεσων προϊόντων στη μέθοδο PCR.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΑΠΟ ΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΚΡΟΩΝ ΤΩΝ ΤΕΧΝΗΤΩΝ ΥΓΡΟΒΙΟΤΟΠΩΝ

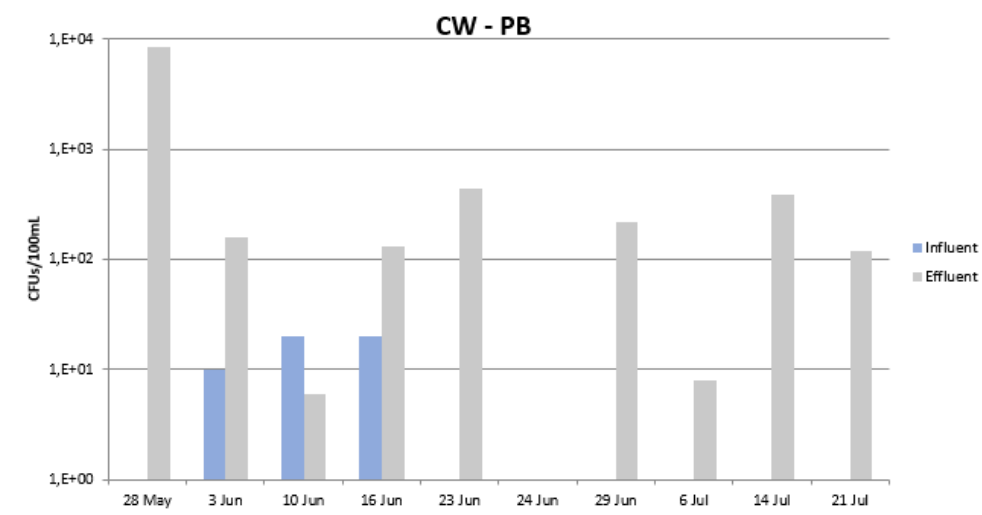
Αρχικά οι πιλοτικές μονάδες των CWs υποβλήθηκαν σε έλεγχο ως προς την δυνατότητα απομάκρυνσης των μικροβιακών δεικτών από τα υγρά λύματα. Τα ευρήματα παρουσιάζονται με τη μορφή διαγραμμάτων.

❖ *Escherichia Coli*



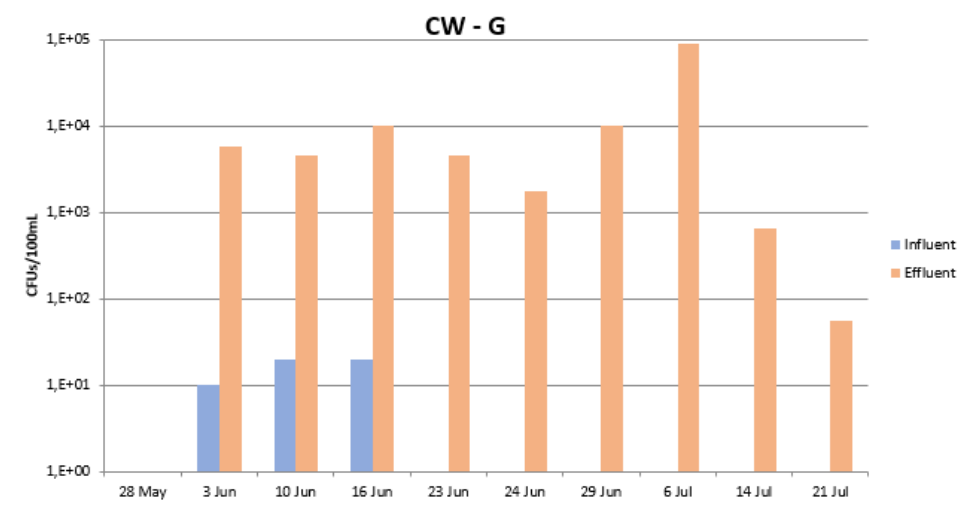
Γράφημα 1 : Συγκεντρώσεις βακτηριακού δείκτη *Escherichia Coli* (CFUs/ 100 ml) από την εισροή και την εκροή του CW P κατά τη χρονική περίοδο των δειγματοληψιών.

Όπως γίνεται εμφανές από το γράφημα 1 δεν επιτυγχάνεται απομάκρυνση της *E. coli* από την εκροή του υγροβιότοπου, που έχει ως πληρωτικό υλικό το πλαστικό (HDPE). Όπως φαίνεται από το γράφημα καταγράφονται αρνητικές τιμές απομάκρυνσης οι οποίες υποδηλώνουν ανάπτυξη του βακτηριακού στελέχους μετά από την επεξεργασία που πραγματοποιείται εντός του CW. Είναι αναγκαίο να σημειωθεί πως ενώ στις εισροές που προέρχονται από το ΧΥΤΑ στις περισσότερες δειγματοληψίες δεν ανιχνεύεται ο βακτηριακός δείκτης στη συνέχεια αναπτύσσεται μέσα στη πιλοτική μονάδα.



Γράφημα 2 : Συγκεντρώσεις βακτηριακού δείκτη *Escherichia Coli* (CFUs/ 100 ml) από την εισροή και την εκροή του CW PB κατά τη χρονική περίοδο των δειγματοληψιών.

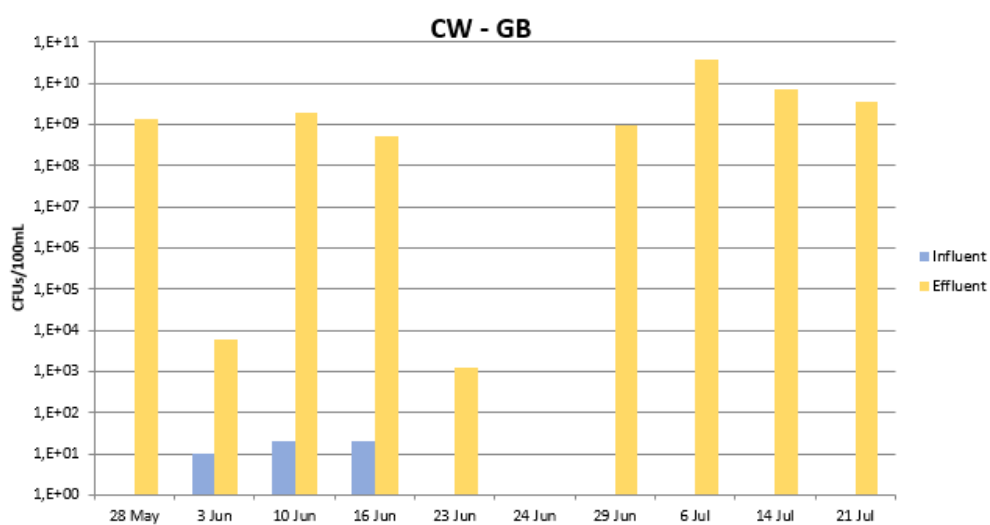
Η απομάκρυνση της *Escherichia coli* στον υδροβιότοπο PB, που έχει ως πληρωτικό υλικό πλαστικό μαζί με biochar, δεν επιτυγχάνεται με τον επιθυμητό τρόπο (γράφημα 2). Παρατηρούμε πως η μέγιστη απομάκρυνση με μείωση κατά 0,53 Logs, με ποσοστό 70 %, παρατηρείται στη δειγματοληψία που πραγματοποιήθηκε στις 10 Ιουνίου του 2021. Όπως γίνεται εμφανές από το γράφημα 2 υπάρχει ισχυρή ανάπτυξη του μικροβιακού δείκτη εντός της μονάδας επεξεργασίας του υδροβιότοπου PB. Πρέπει να σημειωθεί ότι στη δειγματοληψία που έλαβε χώρα στις 24 Ιουνίου 2021, δεν ανιχνεύθηκε καθόλου η *E. coli*.



Γράφημα 3 : Συγκεντρώσεις βακτηριακού δείκτη *Escherichia Coli* (CFUs/ 100 ml) από την εισροή και την εκροή του CW G κατά τη χρονική περίοδο των δειγματοληψιών.

Και στην περίπτωση του υδροβιότοπου CW-G δεν επιτυγχάνεται απομάκρυνση της *E. coli* από την εκροή του υδροβιότοπου, που έχει ως πληρωτικό υλικό το χαλίκι. Όπως φαίνεται από το γράφημα 3 καταγράφονται αρνητικές τιμές απομάκρυνσης οι οποίες υποδηλώνουν ανάπτυξη

του βακτηριακού στελέχους μετά την επεξεργασία που πραγματοποιείται εντός του CW. Μάλιστα, στην πλειοψηφία των δειγματοληψιών δεν ανιχνεύθηκε το βακτηριακό στέλεχος στις εισροές.



Γράφημα 4 : Συγκεντρώσεις βακτηριακού δείκτη *Escherichia coli* (CFUs/ 100 ml) από την εισροή και την εκροή του CW GB κατά τη χρονική περίοδο των δειγματοληψιών.

Με βάση το γράφημα 4, δεν επιτυγχάνεται απομάκρυνση της *E. coli* από την εκροή του υδροβιότοπου, που έχει ως πληρωτικό υλικό το χαλίκι μαζί με biochar. Εδώ παρατηρείται σημαντική διαφορά μεταξύ εισροής και εκροής ως προς την ανάπτυξη του βακτηριακού στελέχους. Στο γράφημα καταγράφονται αρνητικές τιμές απομάκρυνσης οι οποίες υποδηλώνουν ανάπτυξη του βακτηριακού στελέχους μετά την επεξεργασία που πραγματοποιείται εντός του CW.

Συνολικά, όπως γίνεται εμφανές από τα γραφήματα, δεν επιτυγχάνεται απομάκρυνση της *E. coli*, με εξαίρεση την απομάκρυνση που πραγματοποιείται την 10η Ιουνίου του 2021, η οποία αγγίζει το 70%, μετά την επεξεργασία στον υδροβιότοπο PB, όπου χρησιμοποιείται ως πληρωτικό υλικό το HDPE μαζί με biochar. Γενικά, σύμφωνα με τα γραφήματα, παρατηρείται μεγάλη ανάπτυξη, με μεγάλες διακυμάνσεις, της *E. coli*, ύστερα από την επεξεργασία της από τα συστήματα των CWs. Αντιθέτως δεν ανιχνεύεται στις εισροές μεγάλη ανάπτυξη του βακτηριακού δείκτη. Άρα συμπεραίνεται πως η μεγάλη ανάπτυξη οφείλεται σε παράγοντες που δρουν εντός των CWs.

Σύμφωνα με έρευνες, η αύξηση της θερμοκρασίας αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα στην ανάπτυξη των βακτηριακών στελεχών. Ειδικότερα, η *E. coli* κατά την επώασή της σε θερμοκρασίες 5 °C, 10 °C, 20 °C και 37 °C, έδειξε την καλύτερη επιβίωση στους 5 °C (Sjogren, 1994). Παρόλο που το πείραμα διεξήχθη καλοκαιρινούς μήνες δεν παρατηρείται η αντίστοιχη

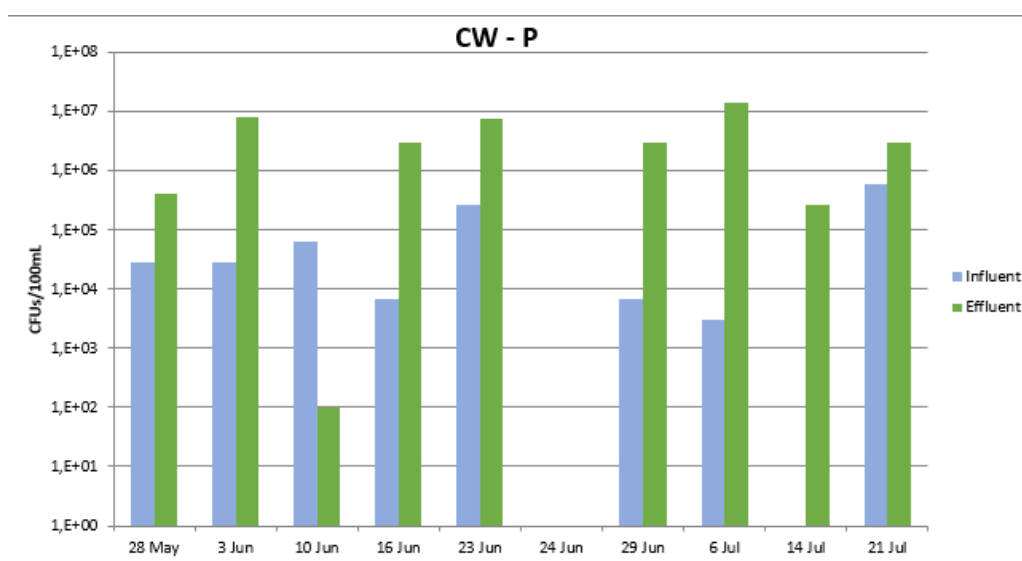
απομάκρυνση στις εκροές των τεχνητών υδροβιότοπων. Τα αποτελέσματα όμως από τις προαναφερόμενες έρευνες έχουν προκύψει ύστερα από μεγάλο διάστημα λειτουργίας των CWs. Δεν συνέβη το ίδιο στο δικό μας πείραμα, διότι οι πιλοτικές μονάδες δεν λειτουργούσαν ούτε ένα χρόνο και αυτό το γεγονός μπορεί να επηρέασε τα αποτελέσματα που προέκυψαν.

Άλλος ένας ανασταλτικός παράγοντας για την επίτευξη της απομάκρυνσης ενδέχεται να είναι οι οργανικές ενώσεις που εμπεριέχονται στα λύματα της εισροής. Αποτελέσματα ερευνών έχουν δείξει πως οι οργανικές ενώσεις μπορεί να ανταγωνιστούν τα βακτηριακά στελέχη για τις θέσεις προσρόφησης στα πορώδη μέσα και να μειώσουν την επιφανειακή προσρόφηση, μειώνοντας έτσι και την απόδοση απομάκρυνσης. Επιπλέον, η υψηλή συγκέντρωση διαλυμένης οργανικής ύλης ενδέχεται να μειώσει την απόδοση απομάκρυνσης καθώς μειώνει τους ρυθμούς αδρανοποίησης (Brown & Jaffé, 2001; Stevik et al., 2004).

Άλλη μια παράμετρος που ενδέχεται να επηρεάζει την απομάκρυνση είναι το pH. Το εύρος ανάπτυξης pH της *E. coli* σε υψηλή υδατική δραστηριότητα κυμαίνεται από 4,4 έως 9 (Suehr et al., 2020). Συνδυαστικά με το γεγονός ότι στα δείγματα εισροής, που προέρχονταν από διασταλλάγματα ΧΥΤΑ, το pH τους ήταν 6,3 προκύπτει η δημιουργία ενός ευνοϊκού περιβάλλοντος ανάπτυξης του βακτηριακού στελέχους.

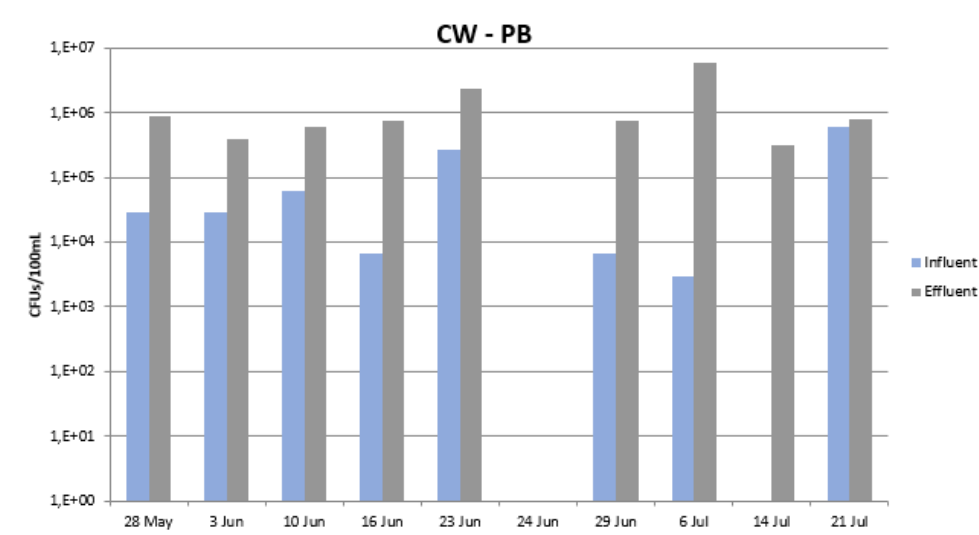
Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα από τους 4 CWs, παρατηρείται πως σε κανένα δεν επιτυγχάνεται πλήρης απομάκρυνση της *E. coli*. Παρόλα αυτά, από τους 4 πιο αποδοτικούς εμφανίζεται ο υδροβιότοπος PB, γεγονός που είναι λογικό καθώς το HDPE έχει πορώδες περίπου 95% σε αντίθεση με το χαλίκι που έχει πορώδες περίπου 30%.

❖ *Staphylococcus aureus*



Γράφημα 5 : Συγκεντρώσεις βακτηριακού δείκτη *Staphylococcus aureus* (CFUs/ 100 ml) από την εισροή και την εκροή του CW P κατά τη χρονική περίοδο των δειγματοληψιών.

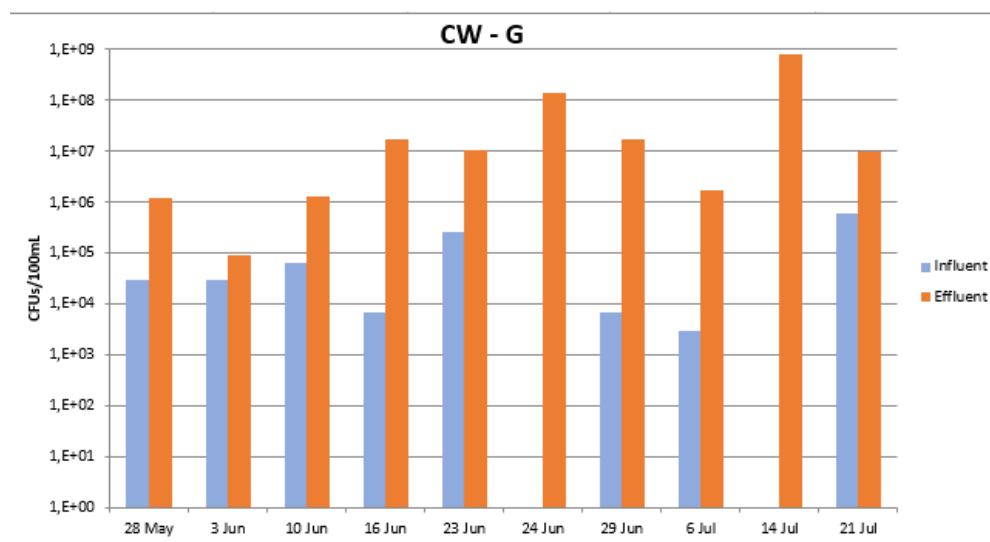
Στο γράφημα 5 παρουσιάζεται μεικτή εικόνα. Ο *S. aureus* ανιχνεύεται σε μεγάλη συγκέντρωση στην εισροή του CW-P στις περισσότερες δειγματοληψίες, ενώ παράλληλα, σημειώνεται μικρότερη ανάπτυξη του βακτηριακού στελέχους στην εκροή σε σχέση με την *E. coli*. Η μοναδική εξαίρεση αφορούσε στο δείγμα της 10^{ης} Ιουνίου του 2021, όπου επιτεύχθηκε απομάκρυνση κατά 99,83%.



Γράφημα 6 : Συγκεντρώσεις βακτηριακού δείκτη *Staphylococcus aureus* (CFUs/ 100 ml) από την εισροή και την εκροή του CW PB κατά τη χρονική περίοδο των δειγματοληψιών.

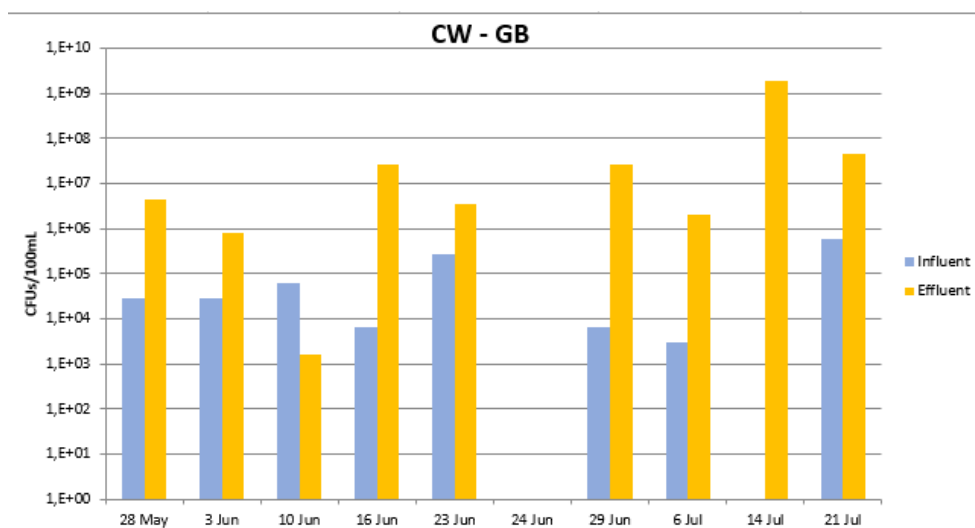
Η εικόνα που δίνεται στο γράφημα 6 δείχνει πως δεν επιτεύχθηκε απομάκρυνση του μικροβιακού δείκτη σε κανένα δείγμα του υδροβιότοπου CW-PB. Επιπλέον, στο δείγμα της

24ης Ιουνίου του 2021 δεν ανιχνεύθηκε *S. aureus* ούτε στην εισροή, ούτε στην εκροή. Παράλληλα, στο δείγμα της 14^{ης} Ιουλίου του 2021, ενώ δεν ανιχνεύθηκε ο μικροβιακός δείκτης στην εισροή, υπήρξε μεγάλη ανάπτυξή του μετά την επεξεργασία στον υγροβιότοπο.



Γράφημα 7 : Συγκεντρώσεις βακτηριακού δείκτη *Staphylococcus aureus* (CFUs/ 100 ml) από την εισροή και την εκροή του CW G κατά τη χρονική περίοδο των δειγματοληψιών.

Στο γράφημα 7 παρουσιάζεται εικόνα ανάλογη αυτής του γραφήματος 6. Πράγματι, δεν επιτεύχθηκε απομάκρυνση του μικροβιακού δείκτη σε κανένα δείγμα του υγροβιότοπου CW-G. Επιπλέον, στο δείγμα της 24ης Ιουνίου και 14^{ης} Ιουλίου του 2021 δεν ανιχνεύθηκε *S. aureus* στην εισροή, ενώ υπήρξε αλματώδης ανάπτυξη στην εκροή.



Γράφημα 8 : Συγκεντρώσεις βακτηριακού δείκτη *Staphylococcus aureus* (CFUs/ 100 ml) από την εισροή και την εκροή του CW GB κατά τη χρονική περίοδο των δειγματοληψιών.

Στο γράφημα 8 και κατά την επεξεργασία στον υγροβιότοπο CW-GB παρατηρείται απομάκρυνση του *S. aureus* στο δείγμα της 10^{ης} Ιουνίου του 2021 με μείωση περίπου 2,8 Logs (ποσοστό μεγαλύτερο του 99%). Επίσης, στο δείγμα της 24ης Ιουνίου του 2021 δεν ανιχνεύθηκε *S. aureus* ούτε στην εισροή, ούτε στην εκροή. Τέλος, στο δείγμα της 14^{ης} Ιουλίου του 2021, ενώ δεν ανιχνεύθηκε ο μικροβιακός δείκτης στην εισροή, υπήρξε μεγάλη ανάπτυξη του μικροβιακού δείκτη μετά από την επεξεργασία στον υγροβιότοπο.

Συμπερασματικά, ύστερα από την παρατήρηση των γραφημάτων προκύπτει πως δεν επιτυγχάνεται απομάκρυνση του *S. aureus* μετά την επεξεργασία των διασταλαγμάτων στους 4 τεχνητούς υγροβιότοπους, με εξαίρεση το δείγμα της 10^{ης} Ιουνίου του 2021 από την εκροή του υγροβιότοπου P, με πληρωτικό υλικό HDPE, όπου υπάρχει μείωση περίπου 2,80 Logs (απομάκρυνση κατά 99,84%). Ομοίως, επιτυγχάνεται απομάκρυνση και στο δείγμα της ίδιας ημερομηνίας αλλά από την εκροή του υγροβιότοπου GB, με μεικτό πληρωτικό υλικό χαλικιού με biochar, στο οποίο υπάρχει μείωση 1,57 Logs (απομάκρυνση κατά 97,34%).

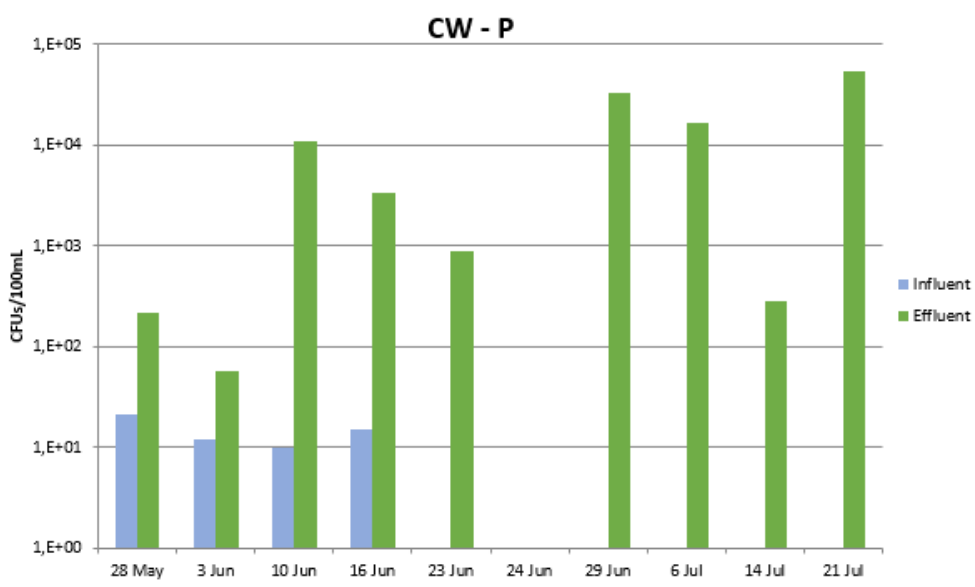
Γενικά, δεν υπάρχουν αρκετές έρευνες που μελετούν τα χαρακτηριστικά και τις ιδιότητες του *S. aureus* σε συστήματα τεχνητών υγροβιότοπων. Ωστόσο κάποιες μελέτες έχουν δείξει πως αναπτύσσεται σε περιβάλλοντα με εύρος θερμοκρασιών από 6,7 °C έως 45,6° C, με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 37°C (Angelotti et al., 1961). Οι συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας που επικρατούσαν, καθώς το πείραμα διεξάχθηκε καλοκαιρινούς μήνες, ενδέχεται να επηρέασαν την ανάπτυξη του στελέχους εντός των υγροβιότοπων. Άλλος ένας παράγοντας που ενδέχεται να επηρεάζει την απομάκρυνση του *S. aureus* είναι το pH. Το εύρος ανάπτυξης pH, που ευνοεί την ανάπτυξη των στελεχών, κυμαίνεται από 4 έως 10 με βέλτιστη τιμή

ανάμεσα στο 6 και στο 7 (Buchanan & Pitt, 1996). Όπως έχει προαναφερθεί, το pH της εισροής από τον ΧΥΤΑ Χανίων είναι περίπου 6,3 γεγονός που δημιουργεί ευνοϊκές συνθήκες για την ανάπτυξη των βακτηριακών στελεχών εντός των υγροβιότοπων. Αυτά τα χαρακτηριστικά επιτρέπουν στο *S. aureus* να αναπτυχθεί και να επιβιώσει σε ένα ευρύ φάσμα περιβαλλοντικών συνθηκών καθώς και να παραμείνει σε περιβάλλοντα με δυσμενείς συνθήκες για μεγάλες περιόδους.

Έρευνες έχουν δείξει πως κάποιοι μικροοργανισμοί μπορούν να αναπτυχθούν εκ νέου μέσα σε μονάδες τεχνητών υγροβιότοπων, λόγω του σχηματιζόμενου βιοφίλμ που αναπτύσσεται εντός της πιλοτικής μονάδας. Τα θρεπτικά συστατικά είναι κύριοι περιοριστικοί παράγοντες για την ανάπτυξη βιοφίλμ, η οποία προκαλεί μείωση του κενού χώρου του πορώδους μέσου και αύξηση της διασποράς (Hill & Sleep, 2002; Vandevivere & Baveye, 1992). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της απόδοσης της απομάκρυνσης των βακτηριακών στελεχών, καθώς μειώνονται οι διεργασίες που συμβάλλουν σε αυτή.

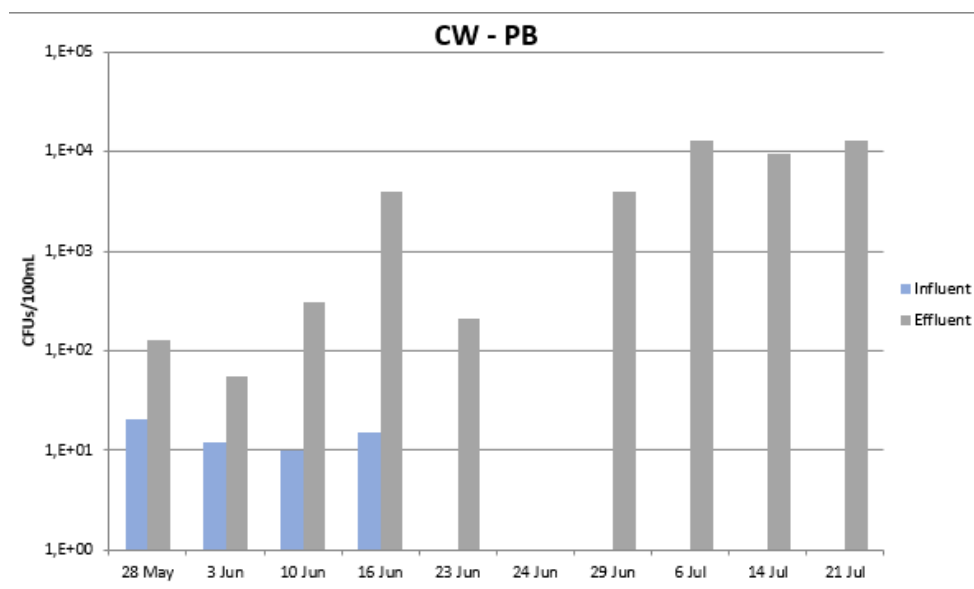
Συγκρίνοντας τα γραφήματα των 4 CWs , παρατηρείται πως σε όλα επικρατούν αρνητικές απομακρύνσεις του *S. aureus*. Ωστόσο, ο πιο αποδοτικό εκ των τεσσάρων εμφανίζεται ο υγροβιότοπος P και επακολούθως ο υγροβιότοπος GB, γεγονός που είναι λογικό καθώς το HDPE έχει πορώδες περίπου 95%. Το χαλίκι έχει πορώδες περίπου 30% ωστόσο η προσθήκη biochar στον υγροβιότοπο αυξάνει την απόδοση της απομάκρυνσης

❖ *Enterococcus sp.*



Γράφημα 9 : Συγκεντρώσεις βακτηριακού δείκτη *Enterococcus sp.* (CFUs/ 100 ml) από την εισροή και την εκροή του CW P κατά τη χρονική περίοδο των δειγματοληψιών.

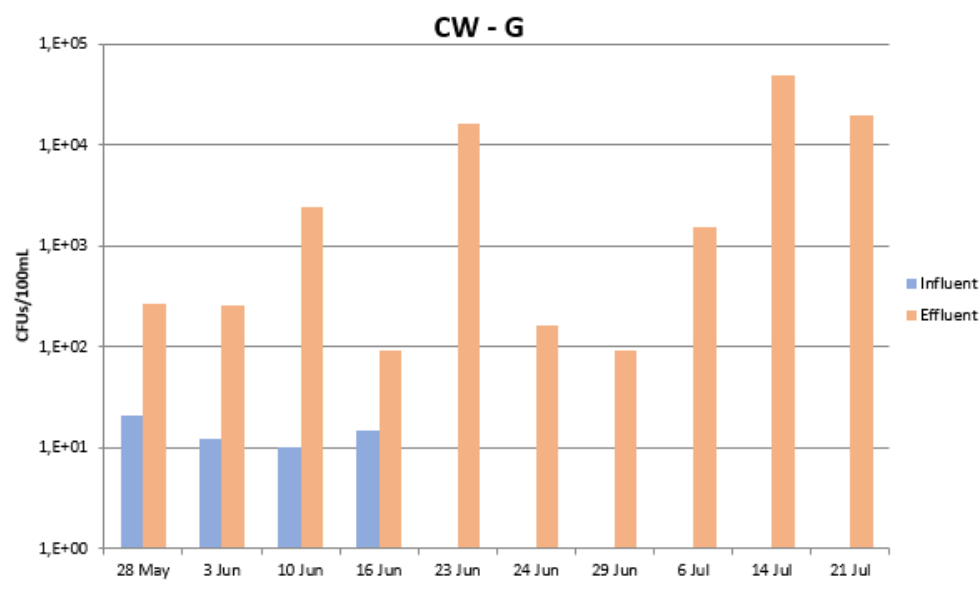
Από το γράφημα 9 προκύπτει ότι μετά από την δειγματοληψία της 16^{ης} Ιουνίου δεν ανιχνεύθηκε ο εντερόκοκκος σε καμία από τις εισροές και παρατηρείται υπερβολικά μεγάλη ανάπτυξη των στελεχών μετά την επεξεργασία στον υδροβιότοπο CW-P.



Γράφημα 10 : Συγκεντρώσεις βακτηριακού δείκτη *Enterococcus sp.* (CFUs/ 100 ml) από την εισροή και την εκροή του CW PB κατά τη χρονική περίοδο των δειγματοληψιών.

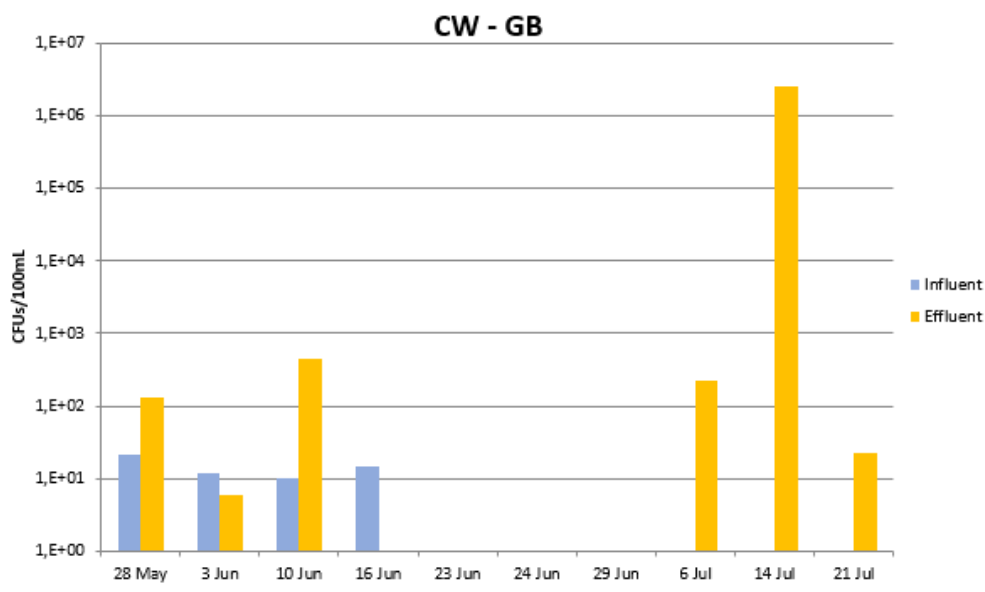
Η ίδια εικόνα παρατηρείται και στον CW-PB (γράφημα 10), καθώς δεν επιτυγχάνεται απομάκρυνση του εντερόκοκκου. Επιπροσθέτως, αξίζει να σημειωθεί ότι ύστερα από την

δειγματοληψία της 16^{ης} Ιουνίου δεν ανιχνεύθηκε ο εντερόκοκκος σε καμία από τις εισροές και παρατηρείται υπερβολικά μεγάλη ανάπτυξη των στελεχών μετά την επεξεργασία στον υγροβιότοπο.



Γράφημα 11 : Συγκεντρώσεις βακτηριακού δείκτη *Enterococcus sp.* (CFUs/ 100 ml) από την εισροή και την εκροή του CW G κατά τη χρονική περίοδο των δειγματοληψιών.

Ανάλογη εικόνα με το προηγούμενο γράφημα παρουσιάζεται και στον υγροβιότοπο CW-G (γράφημα 11). Δεν επιτυγχάνεται απομάκρυνση του εντερόκοκκου με αξιοσημείωτες αρνητικές απομακρύνσεις σε όλες τις ημερομηνίες δειγματοληψίας. Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί ότι ύστερα από την δειγματοληψία της 16^{ης} Ιουνίου δεν ανιχνεύθηκε ο εντερόκοκκος σε καμία από τις εισροές και παρατηρείται υπερβολικά μεγάλη ανάπτυξη των στελεχών μετά την επεξεργασία στον υγροβιότοπο.



Γράφημα 12 : Συγκεντρώσεις βακτηριακού δείκτη *Enterococcus sp.* (CFUs/ 100 ml) από την εισροή και την εκροή του CW GB κατά τη χρονική περίοδο των δειγματοληψιών.

Η εικόνα στον CW-GB (γράφημα 12) είναι διαφορετική σε σχέση με όλα τα προηγούμενα. Αρχικά στα 4 πρώτα δείγματα δεν εμφανίζεται μεγάλη ανάπτυξη του εντερόκοκκου. Μάλιστα, στο δείγμα της 3^{ης} Ιουνίου του 2021, επιτεύχθηκε απομάκρυνση σε ποσοστό 50%, δηλαδή μείωση κατά 0,3 Logs. Στις 16 Ιουνίου δεν ανιχνεύθηκε σχεδόν καθόλου το βακτηριακό στέλεχος στην εκροή του υδροβιότοπου, πράγμα που σημαίνει πως η απομάκρυνση ήταν 93,33%, δηλαδή υπήρχε μείωση κατά 1,18 Logs. Στις 3 επόμενες δειγματοληψίες που ακολούθησαν δεν ανιχνεύθηκε ο εντερόκοκκος ούτε στην εισροή, ούτε στην εκροή. Στις τρεις τελευταίες δειγματοληψίες σημειώθηκε ανάπτυξη του εντερόκοκκου μετά την επεξεργασία στον τεχνητό υδροβιότοπο, παρ' όλο που δεν είχε ανιχνευθεί στις εισροές.

Συνολικά, ύστερα από μελέτη των άνωθεν γραφημάτων προκύπτει πως οι μονάδες δεν είχαν αποτελεσματική απομάκρυνση του εντερόκοκκου, με εξαίρεση τις απομακρύνσεις που επιτυγχάνονται στον υδροβιότοπο GB, με πληρωτικό υλικό χαλικιού με μίξη biochar, στις ημερομηνίες της 3^{ης} Ιουνίου του 2021, κατά τις οποίες επιτυγχάνεται μείωση κατά 0,3 Logs (50%), καθώς και της 16^{ης} Ιουνίου του 2021, όπου επιτυγχάνεται μείωση κατά 1,18 Logs (93,33%).

Γενικά, τα στελέχη του εντερόκοκκου αναπτύσσουν υψηλό επίπεδο ενδογενούς αντοχής (Giraja, 2002), χαρακτηριστικό που τα καθιστά ικανά να αναπτύσσονται σε δυσμενή περιβάλλοντα. Κατά την αξιολόγηση της ανάπτυξης των ειδών *Enterococcus*, η πιο σημαντική μεταβλητή είναι το pH. Έρευνες έχουν δείξει πως οι εντερόκοκκοι έχουν εύρος ανάπτυξης pH 4,6 - 9,9 με βέλτιστο pH το 7,5 (Van Den Berghe et al., 2006). Η αντίσταση του *Enterococcus sp.*

σε ένα εύρος τιμών pH οφείλεται στην ανθεκτικότητα της μεμβράνης και την αδιαπερατότητά του σε οξέα και αλκάλια. Στην παρούσα διπλωματική το pH της εισροής ήταν 6,3, γεγονός που ευνοεί την ανάπτυξη των στελεχών εντός του υγροβιότοπου. Επιπλέον έρευνες έχουν δείξει πως τα είδη του εντερόκοκκου αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται από 5°C έως 50°C. Η βέλτιστη θερμοκρασία, σύμφωνα με το μοντέλο Rosso, είναι 42,7 °C. Συνδυαστικά όλες αυτές οι ιδιότητες δημιουργούν ένα αρμονικό περιβάλλον, το οποίο ενδέχεται να συντελεί στην ανάπτυξη του εντερόκοκκου εντός των πιλοτικών μονάδων των τεχνητών υγροβιότοπων.

Παρατηρώντας τα γραφήματα των 4 CWs προκύπτει το συμπέρασμα πως σχεδόν σε όλες τις εκροές επικρατούν αρνητικές απομακρύνσεις του εντερόκοκκου. Ωστόσο, ο πιο αποδοτικός υγροβιότοπος εμφανίζεται ο CW-GB. Το χαλίκι παρόλο που έχει πορώδες περίπου 30%, με την προσθήκη biochar στον υγροβιότοπο φαίνεται πως αυξάνει την απόδοση της απομάκρυνσης.

Αφού μελετήθηκαν όλα τα παραπάνω αποτελέσματα, εξήχθησαν τα ακόλουθα συμπεράσματα :

Όσον αφορά στον υγροβιότοπο P, δεν υπάρχει απομάκρυνση κανενός από τους 3 βακτηριακούς δείκτες που επιλέχθηκαν. Εξαίρεση αποτελεί η απομάκρυνση που επιτυγχάνεται στο στέλεχος του *S.aureus* κατά τη δειγματοληψία της 10^{ης} Ιουνίου του 2021, όπου επιτεύχθηκε απομάκρυνση κατά 99,83%.

Όσον αφορά στον υγροβιότοπο PB, η απομάκρυνση παρουσιάζει αρνητικές τιμές κα για τους τρεις μικροβιακούς δείκτες που μελετήθηκαν. Εξαίρεση αποτελεί η απομάκρυνση που επιτυγχάνεται στο στέλεχος της *E.coli* κατά τη δειγματοληψία της 10^{ης} Ιουνίου του 2021, όπου επιτεύχθηκε απομάκρυνση κατά 70 %.

Όσον αφορά στον υγροβιότοπο G οι απομακρύνσεις όλων των βακτηριακών στελεχών ήταν αρνητικές.

Στον υγροβιότοπο GB, δεν παρατηρείται καμία απομάκρυνση του στελέχους της *E.coli* σε καμία από τις ημερομηνίες δειγματοληψίας. Παρόλα αυτά, παρατηρείται απομάκρυνση του *S. aureus* στο δείγμα της 10^{ης} Ιουνίου του 2021 με ποσοστό μεγαλύτερο του 99%. Ο εντερόκοκκος παρατηρείται πως απομακρύνεται με ποσοστό 93,33% στο δείγμα της 16^{ης} Ιουνίου του 2021. Παράλληλα στο δείγμα της 3^{ης} Ιουνίου του 2021 επιτεύχθηκε απομάκρυνση σε ποσοστό 50%.

Ενδεικτικές μελέτες έχουν δείξει πως οι βακτηριακοί δείκτες στις εκροές ενός CW ενδέχεται να είναι σε θέση να επιβιώσουν ή ακόμη και να αναπτυχθούν, να αναπαραχθούν και να πολλαπλασιαστούν στον υγροβιότοπο, όταν παραμένουν για παρατεταμένο χρονικό διάστημα (Leclerc et al., 2002). Ενδέχεται να είναι μέλος της κοινότητας του αυτόχθονου υγροβιότοπου (Hazen C., 1978), ή μπορεί να είναι πανταχού παρόντες στη φύση, δηλαδή να υπάρχουν φυσικά σε υδάτινα σώματα (Podschun et al., 2001). Μελέτες έδειξαν πως περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, η οργανική ύλη και το άζωτο μπορούν να επηρεάσουν την απομάκρυνση των βακτηριακών δεικτών στα CWs (Khouja et al., 2020) .

Η παρουσία των βακτηριακών δεικτών υποδηλώνει το ενδεχόμενο ύπαρξης παθογόνων στο σύστημα. Επομένως, η απομάκρυνση των παθογόνων σε υγροβιότοπους υποεπιφανειακής ροής, που χρησιμοποιούνται για την επεξεργασία των λυμάτων, έχει σχέση με την απομάκρυνση των βακτηριακών δεικτών. Αυτό φαίνεται να είναι μια πολύ περίπλοκη διαδικασία και μπορεί να ποικίλλει χρονικά και χωρικά, ανάλογα με πολλούς παράγοντες. Αποτελέσματα ερευνών έχουν δείξει πως στην απομάκρυνση βακτηριακών δεικτών συμβάλλουν σημαντικά διάφοροι φυσικοχημικοί και βιολογικοί μηχανισμοί όπως η προσρόφηση, η καθίζηση, η παρουσία οξυγόνου, ο ανταγωνισμός και η θήρευση από άλλες μικροβιακές οντότητες (Boutilier et al., 2010; Garcia & Bécares, 1997; Ottová et al., 1997). Παρόλα αυτά, λόγω της πολυπλοκότητας μεταξύ των αβιοτικών και βιοτικών σχέσεων στα CWs είναι ελλιπής η κατανόηση των διαδικασιών αφαίρεσης βακτηριακών δεικτών σε αυτά τα συστήματα επεξεργασίας.

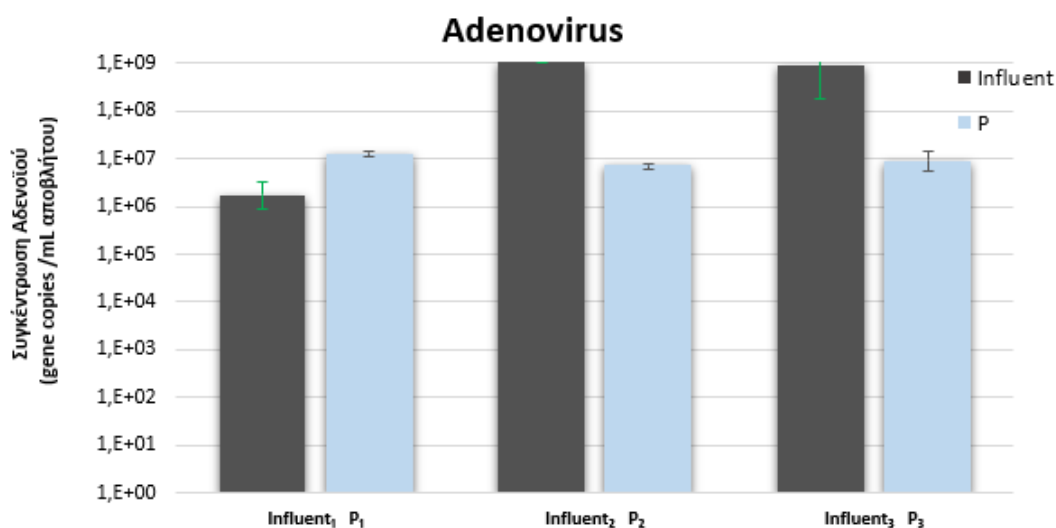
4.2 ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΑΔΕΝΟΪΟΥ

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της real Time PCR (qPCR) προκειμένου να ελεγχθεί η ικανότητα των πιλοτικών μονάδων υγροβιότοπων στην απομάκρυνση του ιικού φορτίου και ειδικότερα του αδενοϊού. Ο συνολικός αριθμός των δειγμάτων ήταν 15 και η ονομασία σε συνδυασμό με την ημερομηνία δειγματοληψίας τους αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 4: Ονομασία δειγμάτων στα οποία εφαρμόστηκε qPCR κατηγοριοποιημένα βάσει ημερομηνίας

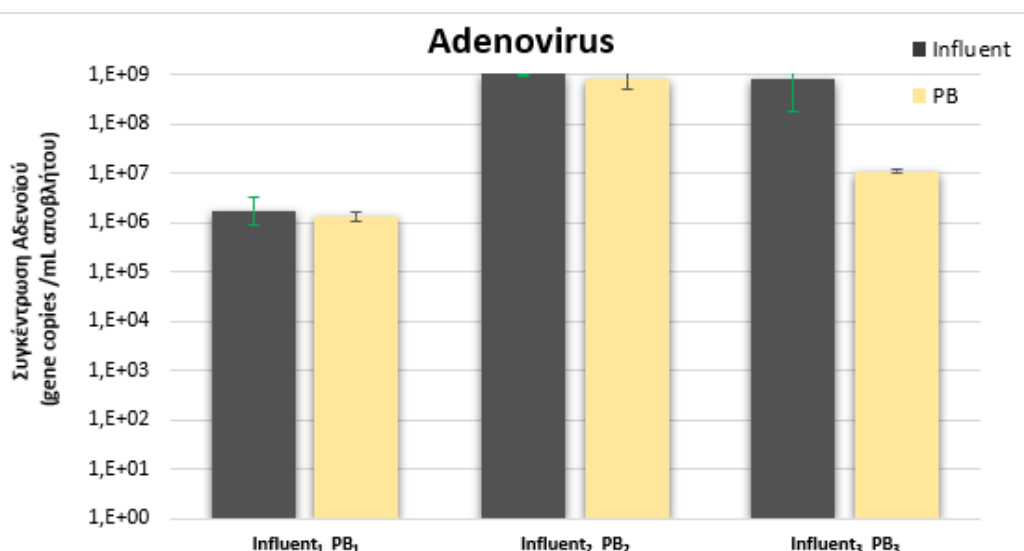
Ημερομηνίες δειγματοληψίας	<i>Influent</i>	<i>P</i>	<i>PB</i>	<i>G</i>	<i>GB</i>
28 May 2021	Influent ₁	P ₁	PB ₁	G ₁	GB ₁
16 June 2021	Influent ₂	P ₂	PB ₂	G ₂	GB ₂
14 July 2021	Influent ₃	P ₃	PB ₃	G ₃	GB ₃

Τα αποτελέσματα από την εφαρμογή της μεθόδου qPCR παρατίθενται στα παρακάτω γραφήματα:



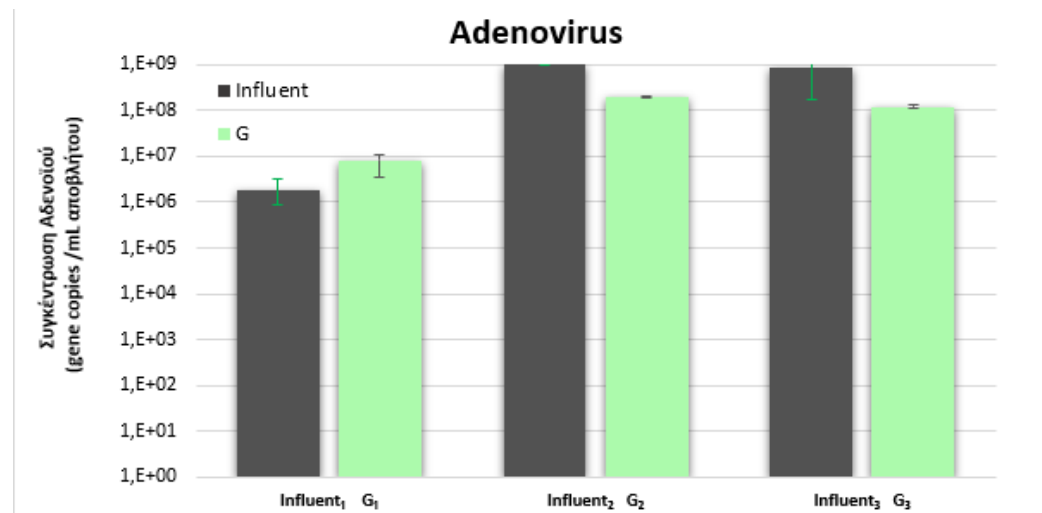
Γράφημα 13 : Συγκέντρωση αδενοϊού στην εισροή (Influent) καθώς και στην εκροή του υγροβιότοπου P στις επιλεγμένες ημερομηνίες

Σύμφωνα με το γράφημα 13 (υγροβιότοπος P με πληρωτικό υλικό plastic) προκύπτει ότι στη δειγματοληψία του Μαΐου δεν επιτυγχάνεται απομάκρυνση του αδενοϊού, καθώς η συγκέντρωση στην εισροή είναι σχεδόν ίδια με τη συγκέντρωση στην εκροή. Αντίθετα, στις δειγματοληψίες του Ιουνίου και του Ιουλίου, παρατηρείται ότι παρ' όλη την αύξηση της συγκέντρωσης των αδενοϊών στις εισροές, επιτυγχάνεται μείωση του ιικού φορτίου στις εκροές, πράγμα που υποδηλώνει αποδοτική λειτουργία του συστήματος.



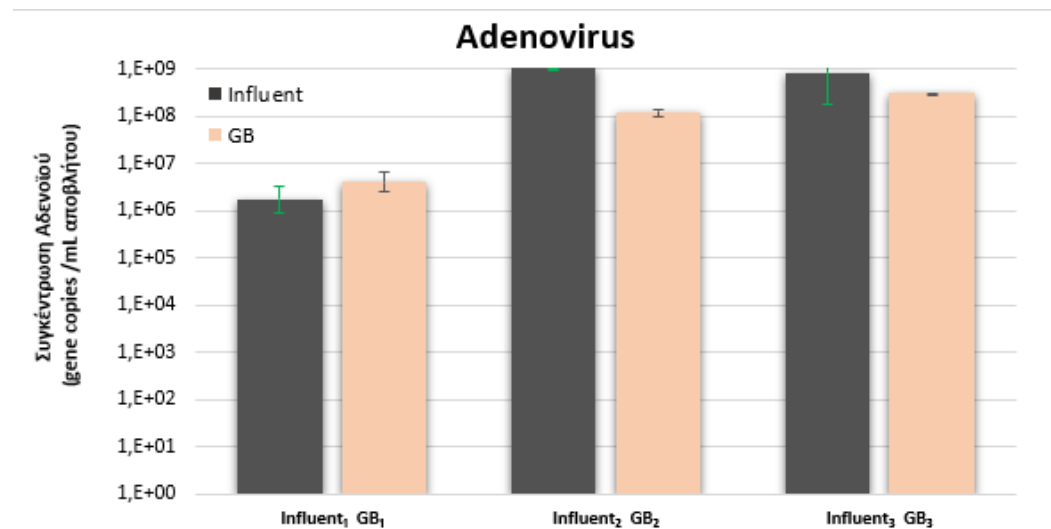
Γράφημα 14 : Συγκέντρωση αδενοϊού στην εισροή (Influent) καθώς και στην εκροή του υγροβιότοπου PB στις επιλεγμένες ημερομηνίες

Σύμφωνα με το γράφημα 14 (υγροβιότοπος PB με πληρωτικό υλικό plastic biochar) και στις τρεις δειγματοληψίες παρατηρείται μικρή μείωση του ιικού φορτίου μεταξύ της εισροής και της αντίστοιχης εκροής. Αναλυτικότερα, στις πρώτες δύο δειγματοληψίες η μείωση είναι πολύ μικρή, ενώ στην τρίτη δειγματοληψία του Ιουλίου η μείωση ήταν σημαντική, αν και η εισροή στις δειγματοληψίες του Ιουνίου και του Ιουλίου ήταν σημαντικά αυξημένη σε σχέση με αυτήν του Μαΐου.



Γράφημα 15 : Συγκέντρωση αδενοϊού στην εισροή (Influent) καθώς και στην εκροή του υγροβιότοπου G στις επιλεγμένες ημερομηνίες

Από το παραπάνω γράφημα (υγροβιότοπος G με πληρωτικό υλικό gravel) δεν παρατηρείται απομάκρυνση του αδενοϊού στη δειγματοληψία του Μαΐου. Εντούτοις, σημειώνεται απομάκρυνση του αδενοϊού στις δύο επόμενες δειγματοληψίες του Ιουνίου και του Ιουλίου, παρόλο που το ιικό φορτίο ήταν αυξημένο στην εισροή.



Γράφημα 16 : Συγκέντρωση αδενοϊού στην εισροή (Influent) καθώς και στην εκροή του υγροβιότοπου GB στις επιλεγμένες ημερομηνίες

Σύμφωνα με το γράφημα 16 (υγροβιότοπος GB με πληρωτικό υλικό gravel biochar) δεν προκύπτει απομάκρυνση στη δειγματοληψία του Μαΐου, ενώ στις δειγματοληψίες του Ιουνίου και του Ιουλίου σημειώνεται απομάκρυνση του αδενοϊού. Το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό αυτής της περίπτωσης είναι ότι η συγκέντρωση του αδενοϊού παρουσιάζει αυξητική τάση κατά τη διαδοχή των χρονικών περιόδων.

Συμπερασματικά, ύστερα από την εξέταση των γραφημάτων προκύπτει πως σε όλους τους υγροβιότοπους επιτυγχάνεται απομάκρυνση των αδενοϊών έως ένα βαθμό. Αναλυτικότερα, στον υγροβιότοπο P, εκτός από την δειγματοληψία του Μαΐου, στις επόμενες δυο δειγματοληψίες του Ιουνίου και του Ιουλίου επιτυγχάνεται μείωση των αδενοϊών που κυμαίνεται από 1,98 Logs έως 2,16 Logs. Στον υγροβιότοπο PB υπάρχει μείωση του ιικού φορτίου, που κυμαίνεται από 0,1 Logs έως 1,89 Logs. Όσον αφορά στον υγροβιότοπο G κατά τη δειγματοληψία του Μαΐου δεν παρατηρείται κάποια απομάκρυνση, ωστόσο, στις επόμενες δύο δειγματοληψίες επιτυγχάνεται μείωση κατά 0,73 Logs το μήνα Ιούνιο και κατά 0,86 Logs το μήνα Ιούλιο. Τέλος σχετικά με τον υγροβιότοπο GB, ενώ αρχικά δεν παρουσιάζεται απομάκρυνση στη συνέχεια υπάρχει μείωση του ιικού φορτίου η οποία κυμαίνεται από 0,45 Logs έως 0,92 Logs.

Σύμφωνα με ορισμένες έρευνες, έχει διαπιστωθεί πως οι τεχνητοί υγροβιότοποι υποεπιφανειακής οριζόντιας ροής είναι αποτελεσματικοί στην απομάκρυνση των εντερικών ιών και ειδικότερα του αδενοϊού. Η αυξημένη αποτελεσματικότητα αυτών των συστημάτων οφείλεται στην μεγαλύτερη έκθεση των εντερικών ιών σε θηρευτικούς μικροοργανισμούς. Επιπλέον, τα συστήματα HF CWs προσφέρουν μεγάλη επιφάνεια προσρόφησης και η απομάκρυνση των παθογόνων, συμπεριλαμβανομένων των αδενοϊών, πραγματοποιείται

κυρίως με διήθηση στράγγιση. Η αποτελεσματικότητα της απομάκρυνσης αγγίζει το 96,6 % μειώνοντας τη συγκέντρωσή τους έως και 1,5 Logs (Meneay, 2009). Άλλες έρευνες έχουν δείξει απομάκρυνση πάνω από 90% των εντερικών ιών που μελετήθηκαν συμπεριλαμβανομένου και του αδενοϊού (Azaizeh et al., 2013).

Μερικοί από τους κύριους παράγοντες που επηρεάζουν την επιβίωση των εντερικών ιών σε υγρά περιβάλλοντα είναι η θερμοκρασία, η ιοντική ισχύς, τα χημικά συστατικά, ο μικροβιακός ανταγωνισμός (Sánchez & Bosch, 2016). Αυτοί οι παράγοντες μπορούν να αδρανοποιήσουν τους ιούς με διαφορετικούς τρόπους, είτε προκαλώντας βλάβη στο γονιδίωμα του ιού, είτε προκαλώντας μετουσίωση ή βλάβη στις πρωτεΐνες καψιδίου (Elmahdy et al., 2018). Ειδικότερα, όσον αφορά στη θερμοκρασία, μεγάλος αριθμός ερευνών έχει ασχοληθεί με την επίδρασή της στην απομάκρυνση των εντερικών ιών από τις εκροές υδροβιότοπων υποεπιφανειακής ροής (Ahmed et al., 2014, 2019; Bae & Wuertz, 2015; Ballesté et al., 2019; Chendorain et al., 1998; Elmahdy et al., 2018; Ibrahim et al., 2019; Prevost et al., 2016). Σύμφωνα με αυτές τις έρευνες η αύξηση της θερμοκρασίας συνοδεύεται από αύξηση της απομάκρυνσης το ιικού φορτίου. Η διαπίστωση αυτή συνδέεται με τα αποτελέσματα που έχουν προκύψει στα γραφήματα. Στο Πίνακα 1 παρουσιάζονται οι θερμοκρασίες που επικρατούσαν από το Μάιο μέχρι τον Ιούλιο. Παρατηρείται πως με την αύξηση της θερμοκρασίας αυξάνεται και η απομάκρυνση των αδενοϊών.

Ένας από τους παράγοντες που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην μείωση της συγκέντρωσης των γονιδίων των εντερικών ιών αποτελούν τα μακρόφυτα. Μέσω αυτών παρέχεται οξυγόνο στις ρίζες καθορίζοντας τη δραστηριότητα καθώς και το τύπο του μεταβολισμού που εκτελείται από τους μικροοργανισμούς στη ριζική ζώνη (Stottmeister et al., 2003). Άλλος ένας λόγος που οδηγεί στην απομάκρυνση των ιικών φορτίων μέσω των μακρόφυτων είναι η προσρόφηση από βιοφίλμ στις ρίζες των φυτών (Stevik et al., 2004; Stott & Tanner, 2005). Επιπλέον τα μακρόφυτα συμβάλλουν στην απομάκρυνση των εντερικών ιών αποβάλλοντας τοξικές αντιμικροβιακές ουσίες από τις ρίζες τους (Stottmeister et al., 2003; Sundaravadivel & Vigneswaran, 2001). Η ανάπτυξη των ριζών των φυτών τόσο οριζοντίως όσο και καθέτως ευνοούν την απομάκρυνση ενισχύοντας την επεξεργασία στις υδραυλικές οδούς και αυξάνοντας τον χρόνο επαφής (Stottmeister et al., 2003; Vymazal, 2010). Στην παρούσα πειραματική διαδικασία πρέπει να επισημανθεί ότι η φύτευση του *Phragmites australis* πραγματοποιήθηκε τον Απρίλιο με αποτέλεσμα στα τέλη Μαΐου το φυτό να έχει φτάσει μόλις στο τελικό στάδιο ανάπτυξής του. Παρατηρώντας τα γραφήματα γίνεται εμφανές πως σε όλες τις εκροές των υδροβιότοπων, πλην της εκροής του PB, παρουσιάζεται αρνητική απομάκρυνση

των αδενοϊών για τη χρονική περίοδο του Μαΐου. Η αρνητική αυτή απομάκρυνση ενδέχεται να συνδέεται με την ανάπτυξη της φυτικής βλάστησης καθώς για στις επόμενες χρονικές περιόδους παρατηρείται απομάκρυνση των αδενοϊών σε όλες τις εκροές των υδροβιότοπων.

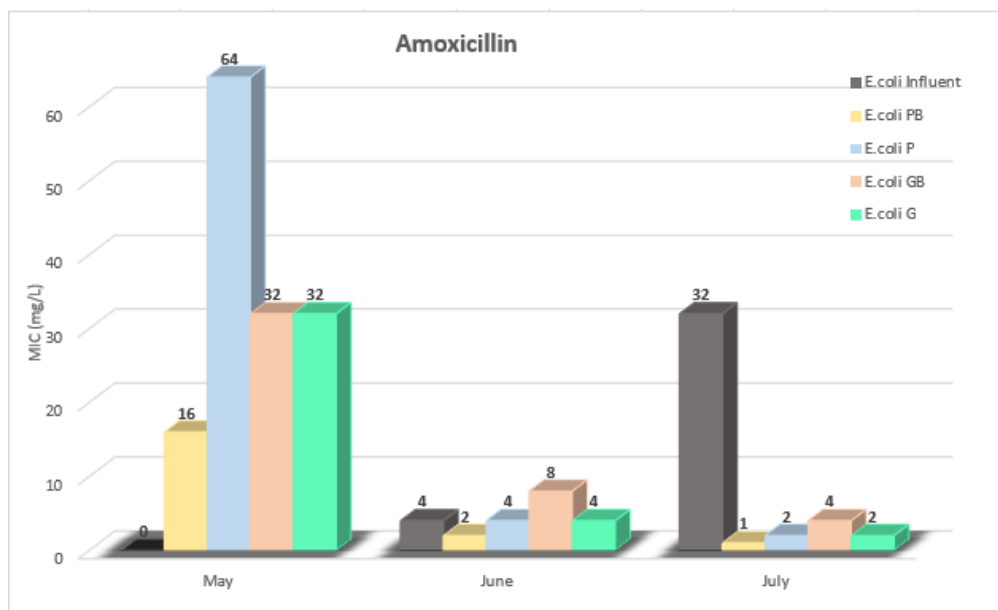
Σύμφωνα με τους Elmahdy et al., (2018) ένας σημαντικός παράγοντας στην αδρανοποίηση των αδενοϊών είναι η φυσική ηλιακή ακτινοβολία UV. Ένα τέτοιο συμπέρασμα δε μπορεί να εξαχθεί από τη παρούσα διπλωματική καθώς οι υδροβιότοποι ήταν υποεπιφανειακής ροής με αποτέλεσμα μετά την εισροή του λύματος στον υδροβιότοπο όλες οι διεργασίες απομάκρυνσης να πραγματοποιούνται υποεπιφανειακά.

Συνολικά, στην παρούσα διπλωματική επιτυγχάνεται απομάκρυνση του αδενοϊού από όλες τις εκροές των τεχνητών υδροβιότοπων. Από τους τέσσερις υδροβιότοπους πιο αποτελεσματικός εμφανίζεται ο PB. Ενδεχομένως αυτό να οφείλεται στη φυσική προσκόλληση των ιών πάνω στο biochar, είτε στην αλληλεπίδραση των ιών με τις επιφάνειές του.

4.3 ΕΛΕΓΧΟΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΟΦΙΛ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΣΕ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Προκειμένου να ελεγχθεί η διαφοροποίηση των προφίλ ανθεκτικότητας των βακτηριακών δεικτών που εξετάστηκαν στην πειραματική διαδικασία έγινε χρήση της μεθόδου MIC για να βρεθεί η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση τριών αντιβιοτικών και συγκεκριμένα των AMX, SMX, CIP. Στα ακόλουθα γραφήματα παρουσιάζεται η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση των αντιβιοτικών που χρησιμοποιείται για την αναστολή του 60% του πληθυσμού των απομονωμένων βακτηρίων στην εισροή, όπου δεν έχει γίνει επεξεργασία, και στις 4 εκροές ύστερα από επεξεργασία από τους τεχνητούς υδροβιότοπους, με σκοπό τον εντοπισμό αλλαγών στη συμπεριφορά των βακτηρίων. Η εξέταση του προφίλ της ανθεκτικότητας έγινε σε τρεις χρονικές περιόδους: 1^η χρονική περίοδος – Μάιος, 2^η χρονική περίοδος – Ιούνιος και 3^η χρονική περίοδος – Ιούλιος.

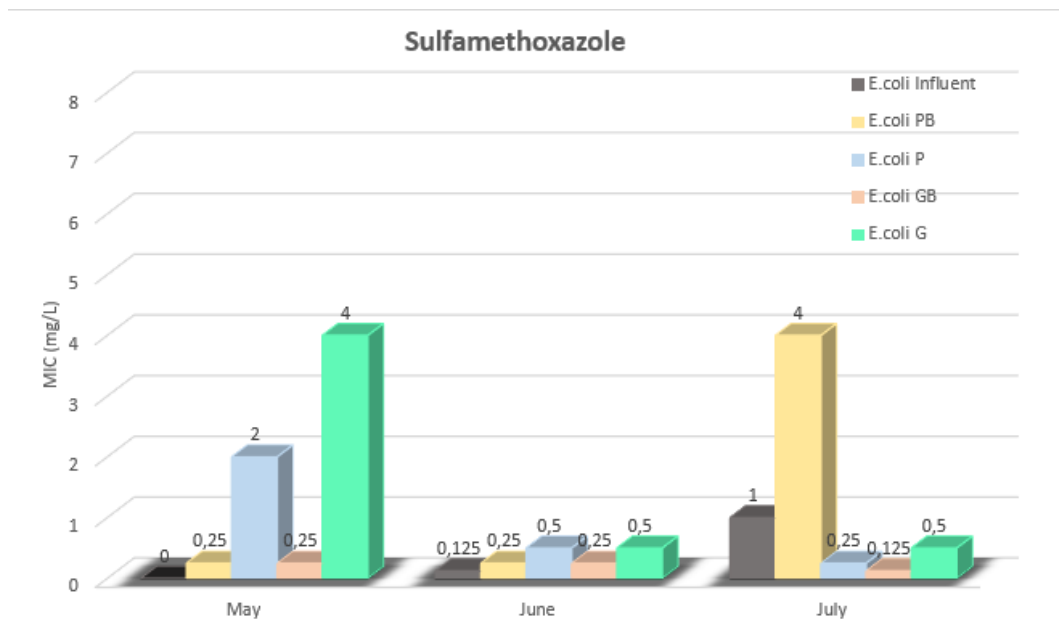
- *Escherichia coli*



Γράφημα

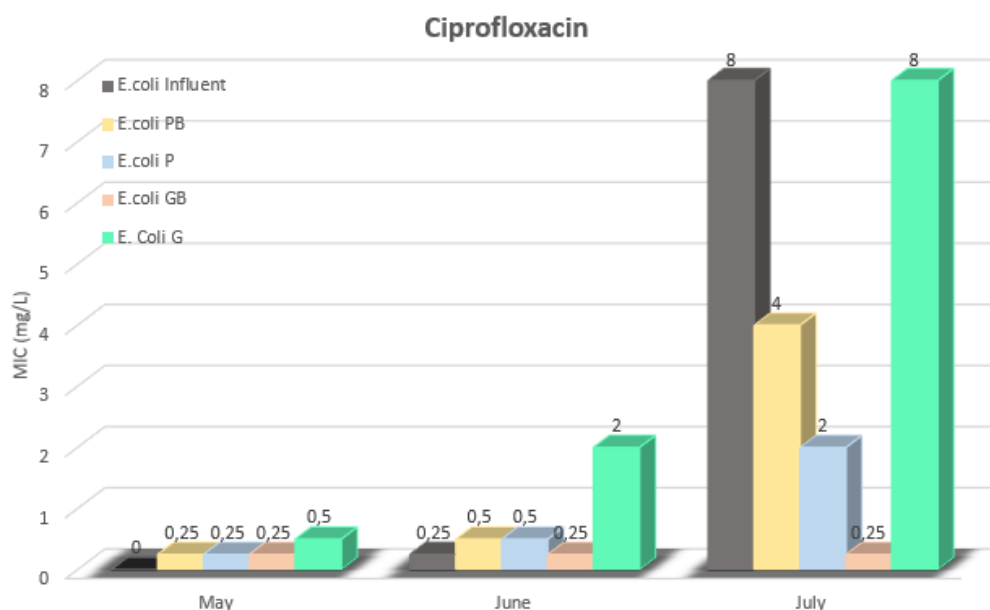
17 : Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση (MIC₆₀) αμοξικιλίνης για το βακτηριακό δείκτη *E. coli* κατά τη διάρκεια των 3 χρονικών περιόδων.

Όπως γίνεται εμφανές από το γράφημα 17, συγκρίνοντας τα στελέχη της *E. coli* που αφορούν την εισροή, η οποία δεν έχει υποστεί καμία επεξεργασία, με τα στελέχη των εκροών των υδροβιότοπων παρατηρείται πως για το μήνα Μάϊο σε όλες τις εκροές τα στελέχη της *E. coli* έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμοξικιλίνη. Στη συνέχεια για το μήνα Ιούνιο παρατηρείται διαφοροποίηση ανάμεσα στην εισροή και τις διαφορετικές εκροές. Οι εκροές των υδροβιότοπων P και G δεν παρουσιάζουν διαφοροποίηση ως προς την ανασταλτική συγκέντρωση της αμοξικιλίνης στην εισροή. Αντίθετα, στην εκροή του υδροβιότοπου PB, τα στελέχη της *E. coli* γίνονται πιο ευαίσθητα στο αντιβιοτικό συγκριτικά με την εισροή. Από την άλλη πλευρά, τα στελέχη της *E. coli* στην εκροή του υδροβιότοπου GB, γίνονται ανθεκτικότερα στην αμοξικιλίνη, καθώς η απαιτούμενη ανασταλτική συγκέντρωση της εισροής είναι 4 mg/L, ενώ της εκροής από το GB είναι 8 mg/L. Εν τέλει, όσον αφορά στο μήνα Ιούλιο τα στελέχη της *E. coli* και στις 4 εκροές των υδροβιότοπων έχουν γίνει πιο ευαίσθητα στην αμοξικιλίνη συγκριτικά με τα αντίστοιχα στελέχη της εισροής.



Γράφημα 18 : Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση (MIC₆₀) σουλφαμεθοξαζόλης για το βακτηριακό δείκτη *E. coli* κατά τη διάρκεια των 3 χρονικών περιόδων.

Όπως παρατηρείται από το γράφημα 18, συγκρίνοντας τα στελέχη της *E. coli* που αφορούν την εισροή, η οποία δεν έχει υποστεί καμία επεξεργασία, με τα στελέχη των εκροών των υδροβιότοπων, παρατηρείται πως για τον μήνα Μάιο σε όλες τις εκροές τα στελέχη της *E. coli* έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό σουλφαμεθοξαζόλη. Στη συνέχεια για το μήνα Ιούνιο γίνεται εμφανές πως τα στελέχη της *E. coli* σε όλες οι εκροές έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα στο εξεταζόμενο αντιβιοτικό. Εν τέλει, όσον αφορά στο μήνα Ιούλιο παρατηρείται διαφοροποίηση ανάμεσα στην εισροή και τις διαφορετικές εκροές. Τα στελέχη της *E. coli* που βρίσκονται στην εκροή του υδροβιότοπου PB έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό συγκριτικά με τα στελέχη της εισροής. Αντίθετα, σε όλες τις άλλες εκροές τα στελέχη της *E.coli* γίνονται πιο ευαίσθητα στην σουλφαμεθοξαζόλη συγκριτικά με τα στελέχη της εισροής.



Γράφημα 19 : Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση (MIC₆₀) σιπροφλοξασίνης για τον βακτηριακό δείκτη *E. coli* κατά τη διάρκεια των 3 χρονικών περιόδων.

Σύμφωνα με το γράφημα 19, συγκρίνοντας τα στελέχη της *E. coli* που αφορούν την εισροή, η οποία δεν έχει υποστεί καμία επεξεργασία, με τα στελέχη των εκροών των υδροβιότοπων, παρατηρείται πως για το μήνα Μάιο καθώς και για τον μήνα Ιούνιο, σε όλες τις εκροές τα στελέχη της *E. coli* έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό σιπροφλοξασίνη. Όσον αφορά στο μήνα Ιούλιο στα στελέχη της *E. coli* υπάρχουν διαφοροποιήσεις ανάμεσα στην εισροή και στις εκροές. Συγκεκριμένα, τα στελέχη της *E. coli* στην εκροή του υδροβιότοπου G δεν παρουσιάζουν διαφοροποίηση συγκριτικά με τα στελέχη της εισροής. Αντίθετα, τα στελέχη στις υπόλοιπες τρεις εκροές των υδροβιότοπων αποκτούν ευαισθησία στη σιπροφλοξασίνη συγκρίνοντας τα με τα στελέχη της εισροής.

Επομένως για τα στελέχη της *E. coli* της εισροής σε σχέση με τα αντίστοιχα στελέχη των τεσσάρων εκροών προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

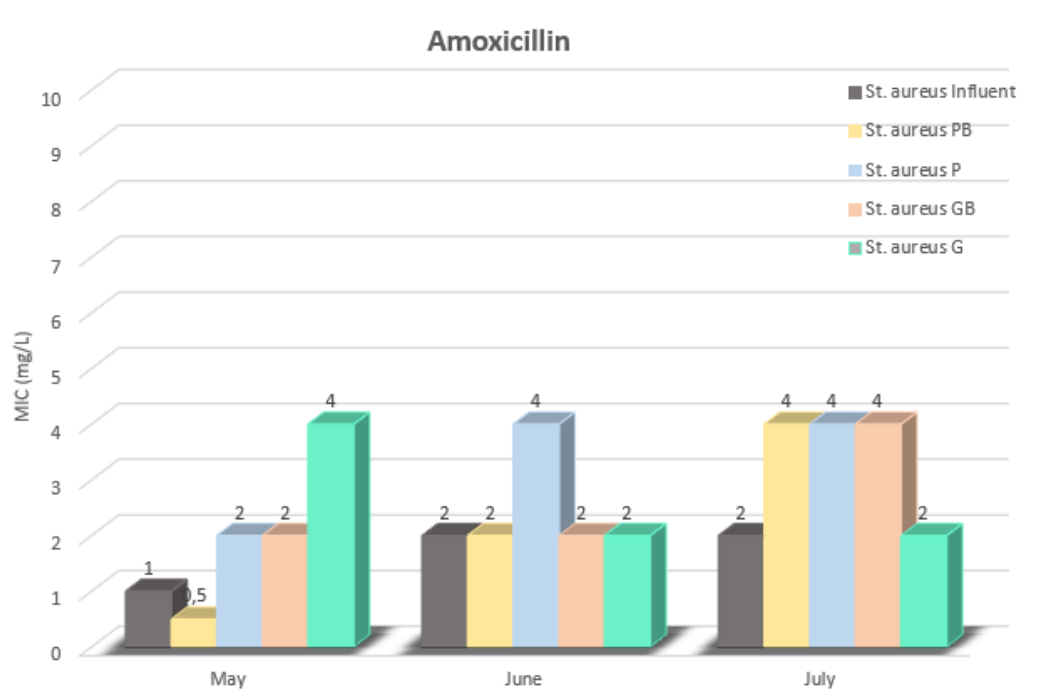
Όσον αφορά στην εκροή του υδροβιότοπου P, τα στελέχη της *E. coli* για το μήνα Μάιο αποκτούν ανθεκτικότητα σε όλα τα αντιβιοτικά, συγκριτικά με τα στελέχη της *E. coli* της εισροής. Στα δείγματα του Ιουνίου τα στελέχη της *E. coli* αποκτούν ανθεκτικότητα έναντι των αντίστοιχων της εισροής, όσον αφορά στα αντιβιοτικά sulfamethoxazole και ciprofloxacin. Αντίθετα, για το αντιβιοτικό amoxicillin δεν παρατηρείται κάποια διαφοροποίηση μεταξύ της απαιτούμενης ανασταλτικής συγκέντρωσης της εισροής με αυτή της εκροής. Για το μήνα Ιούλιο, τα στελέχη της *E. coli* αποκτούν ευαισθησία και στα τρία αντιβιοτικά συγκριτικά με τα αντίστοιχα στελέχη της εισροής.

Στην εκροή του υγροβιότοπου PB, τα στελέχη της *E. coli* της δειγματοληψίας του Μαΐου αποκτούν ανθεκτικότητα σε όλα τα αντιβιοτικά, συγκριτικά με τα στελέχη της *E. coli* της εισροής. Για τον μήνα Ιούνιο, τα στελέχη της *E. coli* αποκτούν ανθεκτικότητα έναντι των στελεχών της *E. coli* της εισροής, όσον αφορά στα αντιβιοτικά sulfamethoxazole και ciprofloxacin. Αντίθετα, για το αντιβιοτικό amoxicillin τα στελέχη της *E. coli* της εκροής αποκτούν ευαισθησία στο αντιβιοτικό έναντι των αντίστοιχων στελεχών της εισροής. Για τον μήνα Ιούλιο, τα στελέχη της *E. coli* αποκτούν ευαισθησία και στα αντιβιοτικά amoxicillin και ciprofloxacin συγκριτικά με τα αντίστοιχα στελέχη της εισροής. Αντιθέτως τα στελέχη της *E. coli* γίνονται πιο ανθεκτικά απέναντι στη sulfamethoxazole, συγκριτικά με τα αντίστοιχα στελέχη της εισροής.

Στην εκροή του υγροβιότοπου G, τα στελέχη της *E. coli* για τον μήνα Μάιο αποκτούν ανθεκτικότητα σε όλα τα αντιβιοτικά, συγκριτικά με τα στελέχη της *E. coli* της εισροής. Για τον μήνα Ιούνιο, τα στελέχη της *E. coli* αποκτούν ανθεκτικότητα έναντι των στελεχών της *E. coli* της εισροής, όσον αφορά στα αντιβιοτικά sulfamethoxazole και ciprofloxacin. Αντίθετα για το αντιβιοτικό amoxicillin δεν παρατηρείται κάποια διαφοροποίηση μεταξύ της απαιτούμενης ανασταλτικής συγκέντρωσης της εισροής με αυτή της εκροής. Για τον μήνα Ιούλιο, τα στελέχη της *E. coli* αποκτούν ευαισθησία και στα αντιβιοτικά amoxicillin και sulfamethoxazole συγκριτικά με τα αντίστοιχα στελέχη της εισροής. Αντιθέτως δεν παρατηρείται διαφοροποίηση μεταξύ της απαιτούμενης ανασταλτικής συγκέντρωσης του ciprofloxacin της εκροής με αυτή της εισροής.

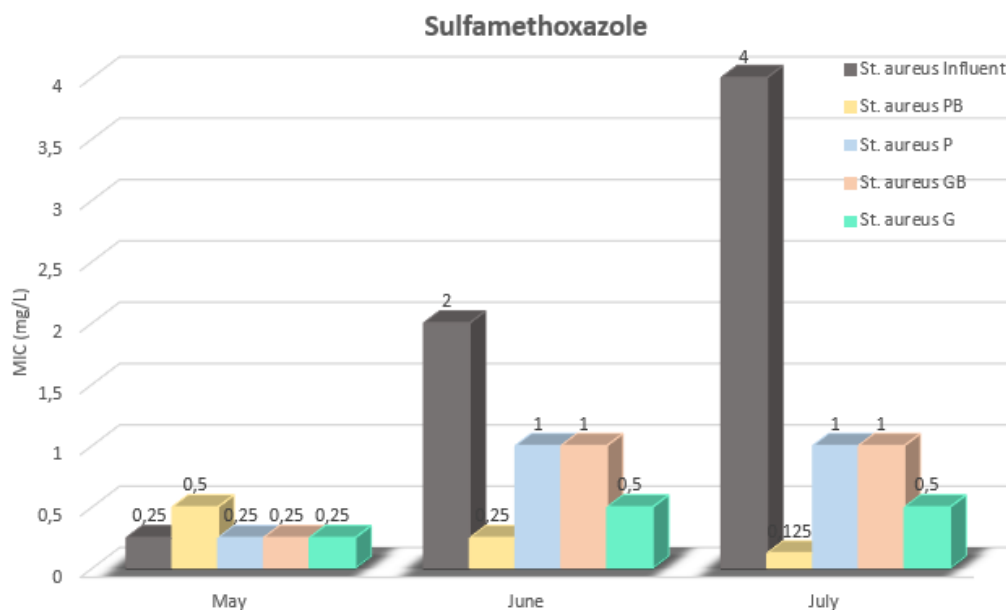
Στην εκροή του υγροβιότοπου GB, τα στελέχη της *E. coli* για τον μήνα Μάιο αποκτούν ανθεκτικότητα σε όλα τα αντιβιοτικά, συγκριτικά με τα στελέχη της *E. coli* της εισροής. Για τον μήνα Ιούνιο, τα στελέχη της *E. coli* αποκτούν ανθεκτικότητα έναντι των στελεχών της *E. coli* της εισροής, όσον αφορά στα αντιβιοτικά sulfamethoxazole και amoxicillin. Αντίθετα για το αντιβιοτικό ciprofloxacin δεν παρατηρείται κάποια διαφοροποίηση μεταξύ της απαιτούμενης ανασταλτικής συγκέντρωσης της εισροής με αυτή της εκροής. Για τον μήνα Ιούλιο, τα στελέχη της *E. coli* αποκτούν ευαισθησία και στα τρία αντιβιοτικά συγκριτικά με τα αντίστοιχα στελέχη της εισροής.

- ***Staphylococcus aureus***



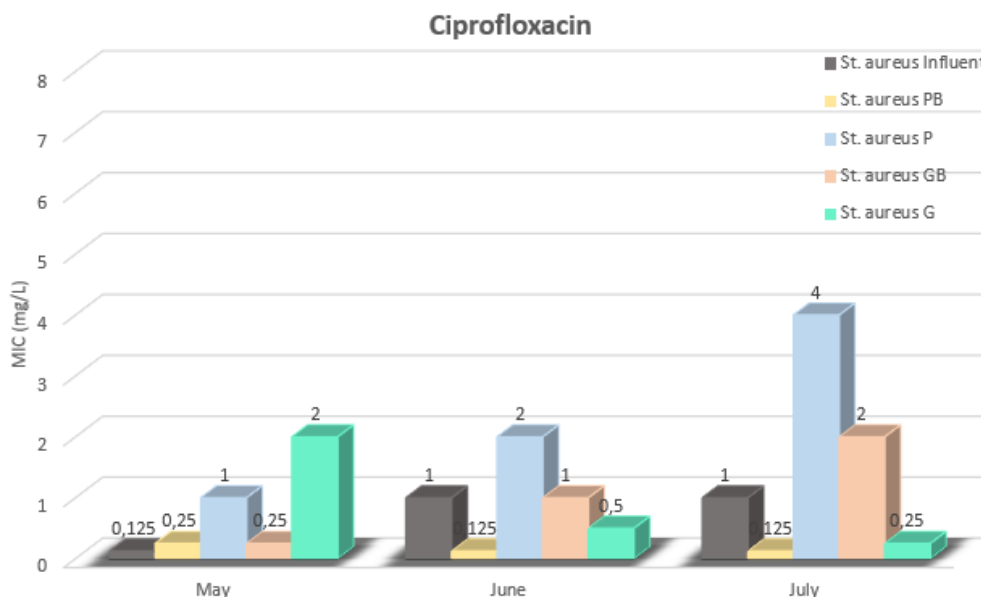
Γράφημα 20 : Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση (MIC₆₀) αμοξικιλίνης για τον βακτηριακό δείκτη *S. aureus* κατά τη διάρκεια των 3 χρονικών περιόδων.

Όπως γίνεται εμφανές από το γράφημα 20, συγκρίνοντας τα στελέχη του *S.aureus* που αφορούν την εισροή, η οποία δεν έχει υποστεί καμία επεξεργασία, με τα στελέχη των εκροών των υδροβιότοπων παρατηρείται πως για τον μήνα Μάιο σε όλες τις εκροές τα στελέχη του *S.aureus* έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμοξικιλίνη, με εξαίρεση τα στελέχη στην εκροή του υδροβιότοπου PB, τα οποία γίνονται πιο ευαίσθητα στην αμοξικιλίνη συγκριτικά με τα στελέχη της εισροής. Στη συνέχεια για τον μήνα Ιούνιο παρατηρείται διαφοροποίηση ανάμεσα στην εισροή και τις διαφορετικές εκροές. Οι εκροές των υδροβιότοπων PB, GB και G δεν παρουσιάζουν διαφοροποίηση από την απαιτούμενη ανασταλτική συγκέντρωση της αμοξικιλίνης στην εισροή. Από την άλλη πλευρά, τα στελέχη του *S.aureus* στην εκροή του υδροβιότοπου P, γίνονται ανθεκτικότερα στην αμοξικιλίνη, καθώς η απαιτούμενη ανασταλτική συγκέντρωση της εισροής είναι 2 mg/L, ενώ της εκροής από το P είναι 4 mg/L. Εν τέλει, για τον μήνα Ιούλιο τα στελέχη του *S.aureus* και στην εκροή του υδροβιότοπου GB, δεν παρουσιάζουν διαφοροποίηση από την απαιτούμενη ανασταλτική συγκέντρωση της αμοξικιλίνης στην εισροή. Αντίθετα τα στελέχη των εκροών των υπόλοιπων τριών εκροών έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό συγκριτικά με τα στελέχη της εισροής.



Γράφημα 21 : Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση (MIC₆₀) σουλφαμεθοξαζόλης για τον βακτηριακό δείκτη *S. aureus* κατά τη διάρκεια των 3 χρονικών περιόδων.

Όπως παρατηρείται από το παραπάνω γράφημα, συγκρίνοντας τα στελέχη του *S. aureus* που αφορούν την εισροή, η οποία δεν έχει υποστεί καμία επεξεργασία, με τα στελέχη των εκροών των υδροβιότοπων, για τον μήνα Μάιο τα στελέχη του *S. aureus* στην εκροή του υδροβιότοπου PB έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό σουλφαμεθοξαζόλη. Αντίθετα στις υπόλοιπες τρεις εκροές, δεν εμφανίζεται διαφοροποίηση της απαιτούμενης ανασταλτικής συγκέντρωσης της σουλφαμεθοξαζόλης, μεταξύ των στελεχών της εισροής και των στελεχών των τριών εκροών. Στη συνέχεια για τον μήνα Ιούνιο γίνεται εμφανές πως τα στελέχη του *S. aureus* σε όλες οι εκροές έχουν γίνει πιο ευαίσθητα στο εξεταζόμενο αντιβιοτικό, συγκριτικά με τα στελέχη της εισροής. Τέλος, τον μήνα Ιούλιο τα στελέχη του *S. aureus* και στις 4 εκροές των υδροβιότοπων έχουν γίνει πιο ευαίσθητα στην σουλφαμεθοξαζόλη συγκριτικά με τα στελέχη της εισροής.



Γράφημα 22 : Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση (MIC₆₀) σιπροφλοξασίνης για τον βακτηριακό δείκτη *S. aureus* κατά τη διάρκεια των 3 χρονικών περιόδων.

Όπως γίνεται εμφανές από το γράφημα 22, συγκρίνοντας τα στελέχη του *S. aureus* που αφορούν στην εισροή, η οποία δεν έχει υποστεί καμία επεξεργασία, με τα στελέχη των εκροών των υδροβιότοπων παρατηρείται πως για τον μήνα Μάιο σε όλες τις εκροές τα στελέχη του *S. aureus* έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό σιπροφλοξασίνη. Στη συνέχεια για τον μήνα Ιούνιο παρατηρείται διαφοροποίηση ανάμεσα στην εισροή και τις διαφορετικές εκροές. Η εκροή του υδροβιότοπου GB και δεν παρουσιάζει διαφοροποίηση από την απαιτούμενη ανασταλτική συγκέντρωση της σιπροφλοξασίνης στην εισροή. Από την άλλη πλευρά, τα στελέχη του *S. aureus* στην εκροή του υδροβιότοπου P, γίνονται ανθεκτικότερα στην σιπροφλοξασίνη καθώς η απαιτούμενη ανασταλτική συγκέντρωση της εισροής είναι 1 mg/L, ενώ της εκροής από το P είναι 2 mg/L. Τα στελέχη του *S. aureus* από τις εκροές των υδροβιότοπων PB και G, γίνονται πιο ευαίσθητα στο αντιβιοτικό συγκριτικά με τα αντίστοιχα στελέχη της εισροής. Τον Ιούλιο τα στελέχη του *S. aureus* και στην εκροή των υδροβιότοπων GB και P αναπτύσσουν ανθεκτικότητα στη σιπροφλοξασίνη έναντι των αντίστοιχων στελεχών της εισροής. Αντίθετα, τα στελέχη των εκροών των υδροβιότοπων PB και G αποκτούν ευαισθησία στη σιπροφλοξασίνη έναντι των αντίστοιχων στελεχών της εισροής.

Συμπερασματικά λοιπόν για τα στελέχη του *S. aureus* της εισροής σε σχέση με τα αντίστοιχα στελέχη των τεσσάρων εκροών προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

Στην εκροή του υδροβιότοπου P, τα στελέχη του *S. aureus* για τον μήνα Μάιο αποκτούν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά amoxicillin και ciprofloxacin, συγκριτικά με τα στελέχη του *S. aureus* της εισροής. Αντίθετα για το αντιβιοτικό sulfamethoxazole δεν παρατηρείται κάποια

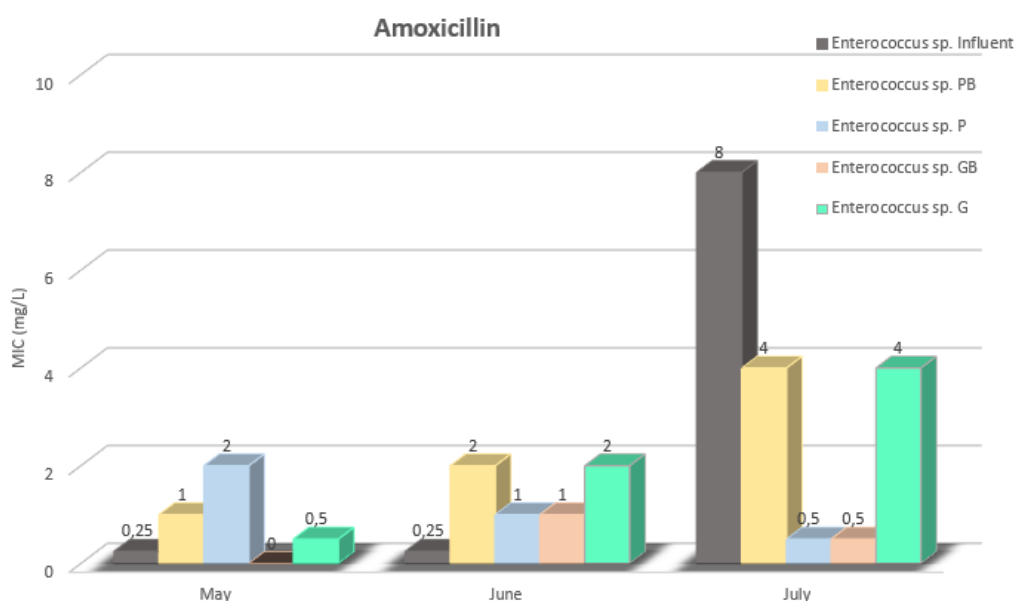
διαφοροποίηση μεταξύ της απαιτούμενης ανασταλτικής συγκέντρωσης της εισροής με αυτή της εκροής. Για τον μήνα Ιούνιο, τα στελέχη του *S. aureus* αποκτούν ανθεκτικότητα έναντι των στελεχών του *S. aureus* της εισροής, όσον αφορά στα αντιβιοτικά amoxicillin και ciprofloxacin. Αντίθετα, τα στελέχη του *S. aureus* παρουσιάζουν ευαισθησία έναντι των αντίστοιχων στελεχών της εισροής για το αντιβιοτικό sulfamethoxazole. Για τον μήνα Ιούλιο, τα στελέχη του *S. aureus* αποκτούν ευαισθησία στο αντιβιοτικό sulfamethoxazole συγκριτικά με τα αντίστοιχα στελέχη της εισροής. Αντιθέτως, τα στελέχη του *S. aureus* της εκροής αποκτούν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά amoxicillin και ciprofloxacin έναντι των αντίστοιχων στελεχών της εισροής.

Στην εκροή του υγροβιότοπου PB, τα στελέχη του *S. aureus* για τον μήνα Μάιο αποκτούν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά sulfamethoxazole και ciprofloxacin, συγκριτικά με τα στελέχη του *S. aureus* της εισροής. Αντίθετα, τα στελέχη του *S. aureus* της εκροής γίνονται πιο ευαίσθητα στο αντιβιοτικό amoxicillin, έναντι των αντίστοιχων στελεχών της εισροής. Για τον μήνα Ιούνιο, τα στελέχη του *S. aureus* αποκτούν ευαισθησία έναντι των στελεχών του *S. aureus* της εισροής, όσον αφορά στα αντιβιοτικά sulfamethoxazole και ciprofloxacin. Αντίθετα, δεν παρατηρείται κάποια διαφοροποίηση στην απαιτούμενη ανασταλτική συγκέντρωση του amoxicillin μεταξύ των στελεχών του *S. aureus* της εκροής και των αντίστοιχων στελεχών της εισροής. Για τον μήνα Ιούλιο, τα στελέχη του *S. aureus* αποκτούν ευαισθησία και στα αντιβιοτικά sulfamethoxazole και ciprofloxacin συγκριτικά με τα αντίστοιχα στελέχη της εισροής. Αντιθέτως, τα στελέχη του *S. aureus* γίνονται πιο ανθεκτικά απέναντι στη amoxicillin, συγκριτικά με τα αντίστοιχα στελέχη της εισροής.

Στην εκροή του υγροβιότοπου G, τα στελέχη του *S. aureus* για τον μήνα Μάιο αποκτούν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά amoxicillin και ciprofloxacin, συγκριτικά με τα στελέχη του *S. aureus* της εισροής. Ωστόσο, δεν παρατηρείται καμία διαφοροποίηση της απαιτούμενης ανασταλτικής συγκέντρωσης του sulfamethoxazole μεταξύ των στελεχών του *S. aureus* της εκροής με τα αντίστοιχα στελέχη της εισροής. Στη δειγματοληψία του Ιουνίου παρατηρείται ότι τα στελέχη του *S. aureus* αποκτούν ευαισθησία στα αντιβιοτικά sulfamethoxazole και ciprofloxacin έναντι των στελεχών του *S. aureus* της εισροής. Αντίθετα, για το αντιβιοτικό amoxicillin δεν παρατηρείται κάποια διαφοροποίηση μεταξύ της απαιτούμενης ανασταλτικής συγκέντρωσης της εισροής με αυτή της εκροής. Για τον μήνα Ιούλιο, τα στελέχη του *S. aureus* αποκτούν ευαισθησία και στα αντιβιοτικά sulfamethoxazole και ciprofloxacin συγκριτικά με τα αντίστοιχα στελέχη της εισροής. Αντιθέτως, δεν παρατηρείται διαφοροποίηση μεταξύ της απαιτούμενης ανασταλτικής συγκέντρωσης του amoxicillin της εκροής με αυτή της εισροής.

Στην εκροή του υγροβιότοπου GB, τα στελέχη του *S. aureus* για τον μήνα Μάιο αποκτούν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά amoxicillin και ciprofloxacin, συγκριτικά με τα στελέχη του *S. aureus* της εισροής. Ωστόσο, δεν παρατηρείται καμία διαφοροποίηση της απαιτούμενης ανασταλτικής συγκέντρωσης του sulfamethoxazole μεταξύ των στελεχών του *S. aureus* της εκροής με τα αντίστοιχα στελέχη της εισροής. Για τον μήνα Ιούνιο, τα στελέχη του *S. aureus* αποκτούν ανθεκτικότητα έναντι των στελεχών του *S. aureus* της εισροής, όσον αφορά το αντιβιοτικό sulfamethoxazole. Αντίθετα για τα αντιβιοτικά ciprofloxacin και amoxicillin δεν παρατηρείται κάποια διαφοροποίηση μεταξύ της απαιτούμενης ανασταλτικής συγκέντρωσης της εισροής με αυτή της εκροής. Για τον μήνα Ιούλιο, τα στελέχη του *S. aureus* αποκτούν ευαισθησία στο αντιβιοτικό sulfamethoxazole έναντι των αντίστοιχων στελεχών της εισροής. Όμως, τα στελέχη του *S. aureus* της εκροής αποκτούν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά amoxicillin και ciprofloxacin έναντι των αντίστοιχων στελεχών της εισροής.

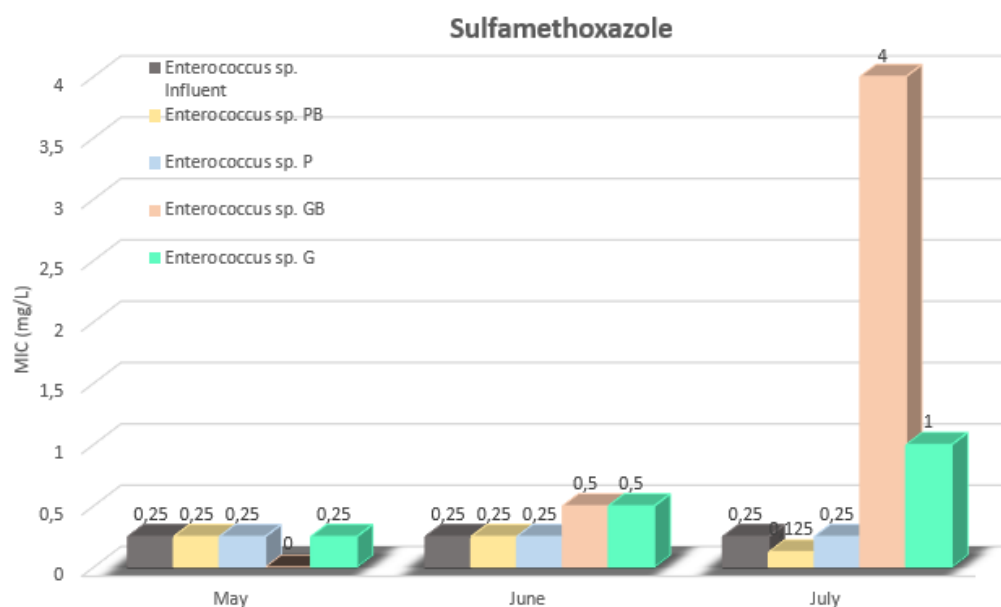
▪ ***Enterococcus sp.***



Γράφημα 23 : Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση (MIC₆₀) αμοξικιλίνης για τον βακτηριακό δείκτη *Enterococcus sp.* κατά τη διάρκεια των 3 χρονικών περιόδων.

Όπως γίνεται εμφανές από το παραπάνω γράφημα, συγκρίνοντας τα στελέχη του *Enterococcus sp.* που αφορούν την εισροή, η οποία δεν έχει υποστεί καμία επεξεργασία, με τα στελέχη των εκροών των υγροβιότοπων παρατηρείται πως για τον μήνα Μάιο σε όλες τις εκροές τα στελέχη του *Enterococcus sp.* έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμοξικιλίνη, με εξαίρεση τα στελέχη στην εκροή του υγροβιότοπου GB, τα οποία γίνονται πιο ευαίσθητα στην αμοξικιλίνη συγκριτικά με τα στελέχη της εισροής. Στη συνέχεια για τον μήνα

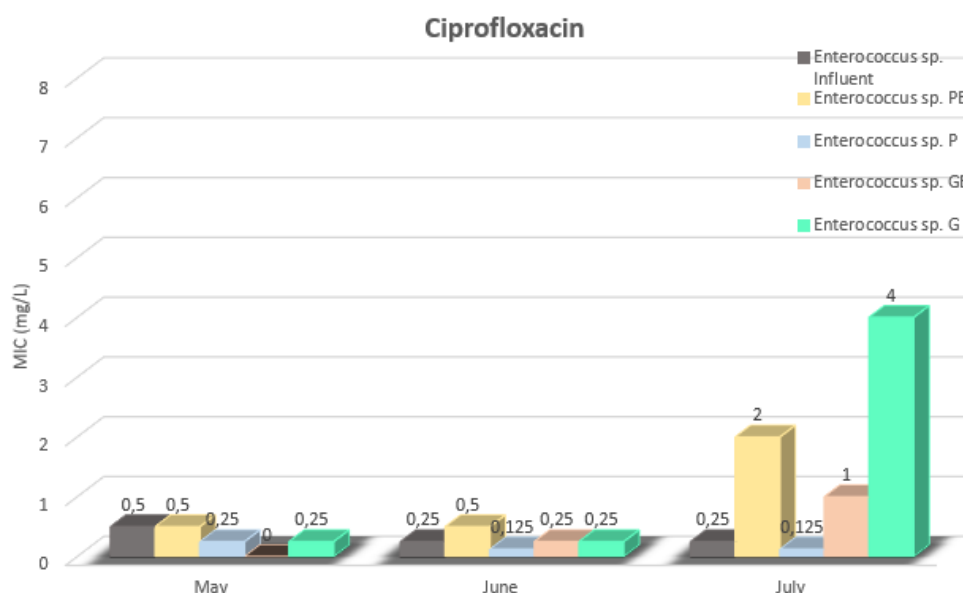
Ιούνιο παρατηρείται πως τα στελέχη του *Enterococcus sp.* όλων των εκροών έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα στην αμοξικιλίνη έναντι των αντίστοιχων στελεχών της εισροής. Στη δειγματοληψία του Ιουλίου τα στελέχη του *Enterococcus sp.* και στις τέσσερις εκροές παρουσιάζουν ευαισθησία στο αντιβιοτικό έναντι των στελεχών του *Enterococcus sp.* της εισροής.



Γράφημα 24 : Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση (MIC₆₀) σουλφαμεθοξαζόλης για τον βακτηριακό δείκτη *Enterococcus sp.* κατά τη διάρκεια των 3 χρονικών περιόδων.

Όπως παρατηρείται από το γράφημα 24, συγκρίνοντας τα στελέχη του *Enterococcus sp.* που αφορούν την εισροή, η οποία δεν έχει υποστεί καμία επεξεργασία, με τα στελέχη των εκροών των υδροβιότοπων παρατηρείται πως για τον μήνα Μάιο τα στελέχη του *Enterococcus sp.* στην εκροή του υδροβιότοπου PB έχουν αναπτύξει ευαισθησία στο αντιβιοτικό σουλφαμεθοξαζόλη. Αντίθετα, στις υπόλοιπες τρεις εκροές δεν εμφανίζεται διαφοροποίηση της απαιτούμενης ανασταλτικής συγκέντρωσης της σουλφαμεθοξαζόλης μεταξύ των στελεχών της εισροής και των στελεχών των τριών εκροών. Στη συνέχεια για τον μήνα Ιούνιο γίνεται εμφανές πως τα στελέχη του *Enterococcus sp.* στις εκροές των υδροβιότοπων G και GB έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα στη σουλφαμεθοξαζόλη συγκριτικά με τα αντίστοιχα στελέχη της εισροής. Ωστόσο, δεν εμφανίζεται διαφοροποίηση της απαιτούμενης ανασταλτικής συγκέντρωσης της σουλφαμεθοξαζόλης μεταξύ των στελεχών της εισροής και των στελεχών των υπόλοιπων δύο εκροών. Για τον μήνα Ιούλιο, τα στελέχη του *Enterococcus sp.* παρουσιάζουν διαφοροποιήσεις συγκρίνοντας την εισροή με τις τέσσερις εκροές. Συγκεκριμένα, δεν παρουσιάζεται διαφοροποίηση της απαιτούμενης ανασταλτικής συγκέντρωσης της σουλφαμεθοξαζόλης, μεταξύ των στελεχών της εισροής και των στελεχών

της εκροής από τον υδροβιότοπο P. Αντιθέτως, τα στελέχη του *Enterococcus sp.* στις εκροές των υδροβιότοπων G και GB έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα στη σουλφαμεθοξαζόλη συγκριτικά με τα αντίστοιχα στελέχη της εισροής. Τα στελέχη του *Enterococcus sp.* από την εκροή του υδροβιότοπου PB, παρουσιάζουν ευαισθησία στο υπό εξέταση αντιβιοτικό συγκριτικά με τα αντίστοιχα στελέχη της εισροής.



Γράφημα 25 : Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση (MIC₆₀) σιπροφλοξασίνης για τον βακτηριακό δείκτη *Enterococcus sp.* κατά τη διάρκεια των 3 χρονικών περιόδων.

Σύμφωνα με το γράφημα 25 και συγκρίνοντας τα στελέχη του *Enterococcus sp.* που αφορούν την εισροή με τα στελέχη των εκροών των υδροβιότοπων παρατηρείται πως για τον μήνα Μάιο υπάρχει διαφοροποίηση των στελεχών της εισροής και των τεσσάρων εκροών. Συγκεκριμένα, δεν παρουσιάζεται διαφοροποίηση στην απαιτούμενη ανασταλτική συγκέντρωση της σιπροφλοξασίνης στην εισροή με την αντίστοιχη συγκέντρωση στην εκροή του υδροβιότοπου PB. Τα στελέχη του *Enterococcus sp.* στις υπόλοιπες 3 εκροές παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στη σιπροφλοξασίνη, συγκρίνοντας τα με τα αντίστοιχα στελέχη της εισροής. Στη συνέχεια για τον μήνα Ιούνιο οι εκροές των υδροβιότοπων GB και G δεν παρουσιάζουν διαφοροποίηση από την απαιτούμενη ανασταλτική συγκέντρωση της σιπροφλοξασίνης στην εισροή. Από την άλλη πλευρά, τα στελέχη του *Enterococcus sp.* στην εκροή του υδροβιότοπου P γίνονται πιο ευαίσθητα στην σιπροφλοξασίνη, καθώς η απαιτούμενη ανασταλτική συγκέντρωση της εισροής είναι 0,25 mg/L, ενώ της εκροής από το P είναι 0,125 mg/L. Τα στελέχη του *Enterococcus sp.* στην εκροή του υδροβιότοπου PB αναπτύσσουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό συγκριτικά με τα αντίστοιχα στελέχη της εισροής. Στα δείγματα του Ιουλίου τα στελέχη του *Enterococcus sp.* στην εκροή των υδροβιότοπων GB, G και PB αναπτύσσουν ανθεκτικότητα στη σιπροφλοξασίνη έναντι των αντίστοιχων στελεχών της εισροής. Αντίθετα

τα στελέχη της εκροής του υγροβιότοπου P αποκτούν ευαισθησία στη σιπροφλοξασίνη έναντι των αντίστοιχων στελεχών της εισροής.

Συμπερασματικά λοιπόν για τα στελέχη του *Enterococcus sp.* της εισροής σε σχέση με τα αντίστοιχα στελέχη των τεσσάρων εκροών προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

Στην εκροή του υγροβιότοπου P, τα στελέχη του *Enterococcus sp.* για τον μήνα Μάιο αποκτούν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό amoxicillin, συγκριτικά με τα στελέχη του *Enterococcus sp.* της εισροής. Αντίθετα για το αντιβιοτικό sulfamethoxazole δεν παρατηρείται κάποια διαφοροποίηση μεταξύ της απαιτούμενης ανασταλτικής συγκέντρωσης της εισροής με αυτή της εκροής. Επιπλέον, τα στελέχη του *Enterococcus sp.* γίνονται πιο ευαίσθητα στο αντιβιοτικό ciprofloxacin συγκρίνοντας τα με τα αντίστοιχα στελέχη της εισροής. Για τον μήνα Ιούνιο, τα στελέχη του *Enterococcus sp.* αποκτούν ανθεκτικότητα έναντι των στελεχών του *Enterococcus sp.* της εισροής, όσον αφορά στο αντιβιοτικό amoxicillin. Αντίθετα, τα στελέχη του *Enterococcus sp.* παρουσιάζουν ευαισθησία έναντι των αντίστοιχων στελεχών της εισροής για το αντιβιοτικό ciprofloxacin. Στο αντιβιοτικό sulfamethoxazole δεν παρατηρείται κάποια διαφοροποίηση μεταξύ της απαιτούμενης ανασταλτικής συγκέντρωσης της εισροής και αυτής της εκροής. Για τον μήνα Ιούλιο, δεν παρατηρείται διακύμανση μεταξύ της απαιτούμενης ανασταλτικής συγκέντρωσης του sulfamethoxazole της εισροής και της αντίστοιχης συγκέντρωσης της εκροής. Αντιθέτως, τα στελέχη του *Enterococcus sp.* της εκροής αποκτούν ευαισθησία στα αντιβιοτικά amoxicillin και ciprofloxacin έναντι των αντίστοιχων στελεχών της εισροής.

Στην εκροή του υγροβιότοπου PB, τα στελέχη του *Enterococcus sp.* για τον μήνα Μάιο αποκτούν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό amoxicillin, συγκριτικά με τα στελέχη του *Enterococcus sp.* της εισροής. Ωστόσο, δεν παρατηρείται διαφοροποίηση στην απαιτούμενη ανασταλτική συγκέντρωση μεταξύ της εκροής και της αντίστοιχης συγκέντρωσης της εισροής, ως προς τα αντιβιοτικά sulfamethoxazole και ciprofloxacin. Για τον μήνα Ιούνιο, τα στελέχη του *Enterococcus sp.* αποκτούν ανθεκτικότητα έναντι των στελεχών του *Enterococcus sp.* της εισροής, ως προς τα αντιβιοτικά amoxicillin και ciprofloxacin. Αντίθετα δεν παρατηρείται κάποια διαφοροποίηση στην απαιτούμενη ανασταλτική συγκέντρωση του sulfamethoxazole μεταξύ των στελεχών του *Enterococcus sp.* της εκροής και των αντίστοιχων στελεχών της εισροής. Για τον μήνα Ιούλιο, τα στελέχη του *Enterococcus sp.* αποκτούν ευαισθησία και στα αντιβιοτικά sulfamethoxazole και amoxicillin συγκριτικά με τα αντίστοιχα στελέχη της εισροής. Αντιθέτως τα στελέχη του *Enterococcus sp.* γίνονται πιο ανθεκτικά απέναντι στη ciprofloxacin, συγκριτικά με τα αντίστοιχα στελέχη της εισροής.

Στην εκροή του υγροβιότοπου G, τα στελέχη του *Enterococcus sp.* για τον μήνα Μάιο αποκτούν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό amoxicillin, συγκριτικά με τα στελέχη του *Enterococcus sp.* της εισροής. Αντιθέτως, τα στελέχη του *Enterococcus sp.* αποκτούν ευαισθησία στο αντιβιοτικό ciprofloxacin, συγκριτικά με τα αντίστοιχα στελέχη της εισροής. Ωστόσο, δεν παρατηρείται καμία διαφοροποίηση της απαιτούμενης ανασταλτικής συγκέντρωσης του sulfamethoxazole μεταξύ των στελεχών του *Enterococcus sp.* της εκροής και των αντίστοιχων στελεχών της εισροής. Για τον μήνα Ιούνιο, τα στελέχη του *Enterococcus sp.* αποκτούν ανθεκτικότητα έναντι των στελεχών του *Enterococcus sp.* της εισροής, όσον αφορά στα αντιβιοτικά sulfamethoxazole και amoxicillin. Αντίθετα για το αντιβιοτικό ciprofloxacin, δεν παρατηρείται κάποια διαφοροποίηση μεταξύ της απαιτούμενης ανασταλτικής συγκέντρωσης της εισροής με αυτή της εκροής. Για τον μήνα Ιούλιο, τα στελέχη του *Enterococcus sp.* αποκτούν ευαισθησία και στο αντιβιοτικό amoxicillin συγκριτικά με τα αντίστοιχα στελέχη της εισροής. Αντιθέτως, τα στελέχη του *Enterococcus sp.* αποκτούν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά ciprofloxacin και sulfamethoxazole συγκριτικά με τα αντίστοιχα στελέχη της εισροής

Στην εκροή του υγροβιότοπου GB, τα στελέχη του *Enterococcus sp.* για τον μήνα Μάιο αποκτούν ευαισθησία σε όλα τα εξεταζόμενα αντιβιοτικά συγκριτικά με τα αντίστοιχα στελέχη της εισροής. Για τον μήνα Ιούνιο, τα στελέχη του *Enterococcus sp.* αποκτούν ανθεκτικότητα έναντι των στελεχών του *Enterococcus sp.* της εισροής, σε σχέση με τα αντιβιοτικά sulfamethoxazole και amoxicillin. Αντίθετα για το αντιβιοτικό ciprofloxacin δεν παρατηρείται κάποια διαφοροποίηση μεταξύ της απαιτούμενης ανασταλτικής συγκέντρωσης της εισροής και αυτής της εκροής. Για τον μήνα Ιούλιο, δεν παρατηρείται κάποια διαφοροποίηση μεταξύ της απαιτούμενης ανασταλτικής συγκέντρωσης του sulfamethoxazole της εισροής και αυτής της εκροής. Όμως, τα στελέχη του *Enterococcus sp.* της εκροής αποκτούν ευαισθησία απέναντι στα αντιβιοτικά amoxicillin και ciprofloxacin έναντι των αντίστοιχων στελεχών της εισροής.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία έχει προκύψει πως επιτυγχάνεται σημαντική μείωση ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά μέσω της βλάστησης, καθώς έχει διαπιστωθεί πως έχει βασικό ρόλο στο φιλτράρισμα των στερεών σωματιδίων. Επιπλέον τροφοδοτεί με οξυγόνο τις μικροβιακές κοινότητες επηρεάζοντας τη ποσότητα των ARGs (Anderson et al., 2013; H. Chen & Zhang, 2013; Fang et al., 2017). Ακόμα, η βλάστηση παρέχει μια επιφάνεια, η οποία ευνοεί τη δημιουργία βιοφίλμ, εντείνοντας έτσι την ικανότητα απομάκρυνσης των μικροβιακών κοινοτήτων, ενώ ταυτόχρονα η απομάκρυνση των ARGs εντείνεται με τη συγκομιδή της βλάστησης(X. Huang et al., 2015). Συγκεκριμένα, έρευνες έχουν δείξει πως το καλάμι, το οποίο

χρησιμοποιήθηκε ως τύπος βλάστησης και στην παρούσα πειραματική διάταξη, αποτελεί τη βέλτιστη επιλογή για τη μείωση της ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά συγκριτικά με άλλους τύπους βλάστησης και γι' αυτό έχει χρήση σε παγκόσμια κλίμακα (Fang et al., 2017; Yi et al., 2017).

Αν και η σύγκριση της ανθεκτικότητας των αντιβιοτικών σε περιβαλλοντικά δείγματα είναι δυσχερής, δεδομένης της απουσίας τυποποιημένων μεθόδων, θα μπορούσαν να περιγραφούν ορισμένες τάσεις, τουλάχιστον όσο αφορά στον πληθυσμό του *Enterococcus* sp. Αρκετοί ερευνητές, κάνοντας χρήση διαφορετικών μεθοδολογιών, υπέδειξαν υψηλά ποσοστά αντοχής που κυμαίνονται από 20% έως 44% για την για την τετρακυκλίνη, την ερυθρομυκίνη και τις κινολόνες και σημαντικά χαμηλότερη αντίσταση για τις αμινοπενικιλίνες και τα σουλφοναμίδια που κυμαίνονται από 1% έως 7%(M. F. Da Silva et al., 2006; Łuczkiwicz et al., 2010; Yi et al., 2017). Η παραπάνω διαπίστωση επιβεβαιώνεται από τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας, καθώς παρατηρείται πως για το αντιβιοτικό σιπροφλοξασίνη τα στελέχη του εντερόκοκκου έχουν υψηλό ποσοστό αντοχής απέναντι στο αντιβιοτικό, ενώ αντίθετα παρατηρείται σημαντικά χαμηλότερο ποσοστό αντοχής των στελεχών του εντερόκοκκου απέναντι στα αντιβιοτικά αμοξικιλίνη και σουλφαμεθοξαζόλη.

Ακόμα έρευνες έχουν μελετήσει το γεγονός ότι τα αντιβιοτικά που ανήκουν στην κατηγορία των β' λακταμών όπως η αμοξικιλίνη, αναφέρονται ως αντιβιοτικά με τη μεγαλύτερη κατανάλωση σε ευρωπαϊκές χώρες(Coenen et al., 2009; Kümmerer, 2009). Λόγω αυτού, αυξάνεται και η ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά, όπως η αμοξικιλίνη. Ο μηχανισμός ανθεκτικότητας στηρίζεται σε παραγωγή ενζύμου από Gram αρνητικά βακτήρια, που προκαλεί την αναστολή της δράσης των αντιβιοτικών αυτής της κατηγορίας. Αυτό συνάδει με τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τα γραφήματα του πειράματος, καθώς από τους τρεις βακτηριακούς δείκτες η *E. coli* εμφανίζεται η πιο ανθεκτική απέναντι στο αντιβιοτικό αμοξικιλίνη (WHO, 2017).

4.4 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ARGs ΤΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Προκειμένου να ποσοτικοποιηθούν τα γονίδια ανθεκτικότητας, ARGs, των αντιβιοτικών που ελέγχθηκαν στο παρόν πείραμα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της Real- Time PCR. Ειδικότερα, αφού απομονώθηκαν από τα δείγματα των εκρών των τεσσάρων υγροβιότοπων, ποσοτικοποιήθηκαν τα ARGs των αντιβιοτικών amoxicillin (γονίδιο ampC), sulfamethoxazole(γονίδιο sul II) και ciprofloxacin (γονίδιο qnrA), που περιέχονται σε αυτά. Το γονίδιο 16S rRNA αντιπροσωπεύει το συνολικό ριβωσομικό βακτηριακό γενετικό υλικό.

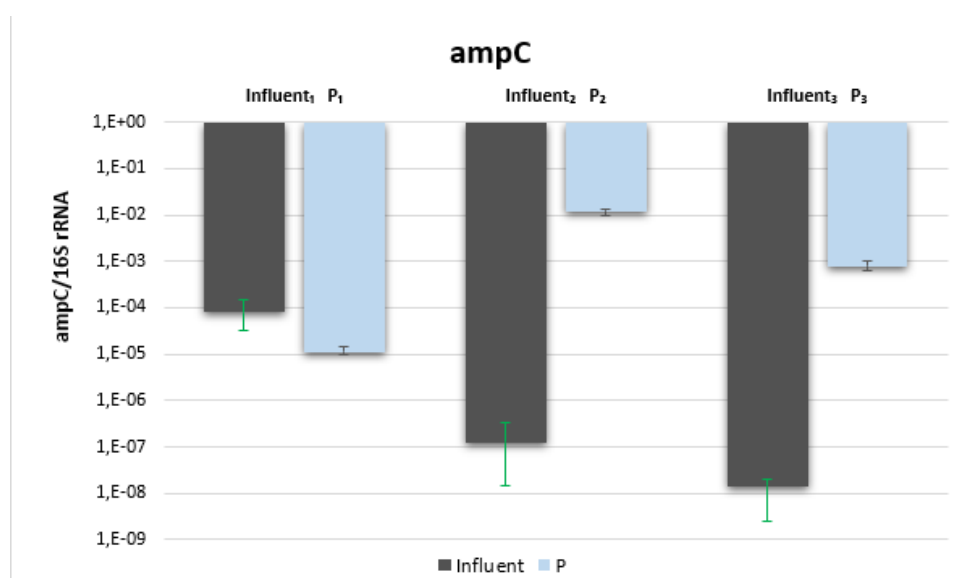
Παρακάτω ακολουθεί ένας πίνακας με την ονομασία των δειγμάτων της εισροής καθώς και των τεσσάρων εκροών από τους υδροβιότοπους που χρησιμοποιήθηκαν στην qPCR.

Πίνακας 5: Ονομασία δειγμάτων στα οποία εφαρμόστηκε qPCR κατηγοριοποιημένα βάση ημερομηνίας

Ημερομηνίες δειγματοληψιών	Influent	P	PB	G	GB
28 May 2021	Influent ₁	P ₁	PB ₁	G ₁	GB ₁
16 June 2021	Influent ₂	P ₂	PB ₂	G ₂	GB ₂
14 July 2021	Influent ₃	P ₃	PB ₃	G ₃	GB ₃

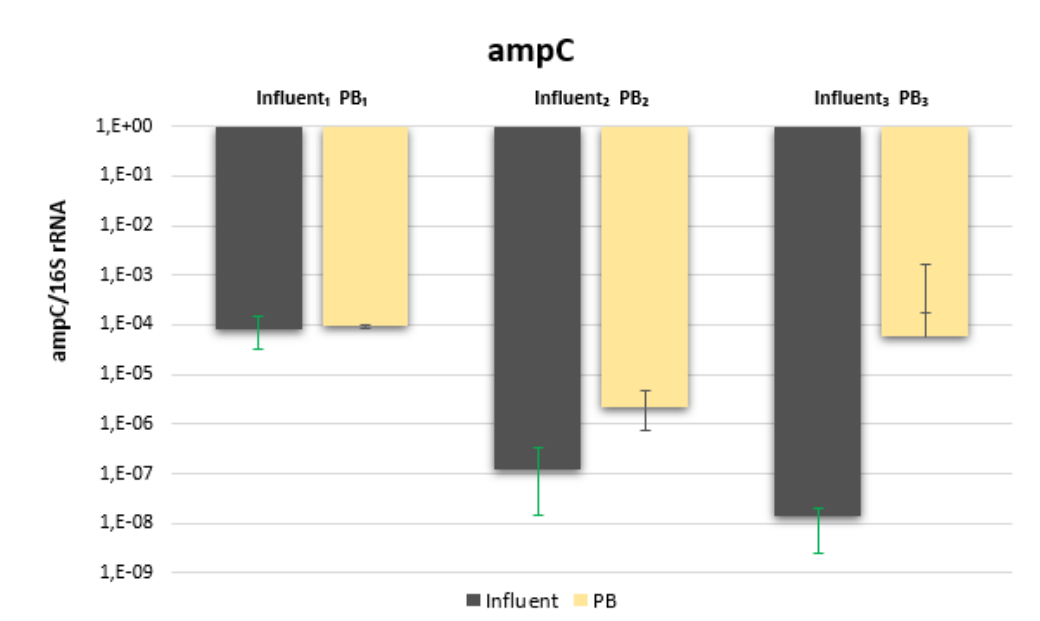
Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα επόμενα γραφήματα με μορφή λόγου της συγκέντρωσης του εκάστοτε εξεταζόμενου γονιδίου προς το 16S rRNA.

♦ **Γονίδιο ampC**



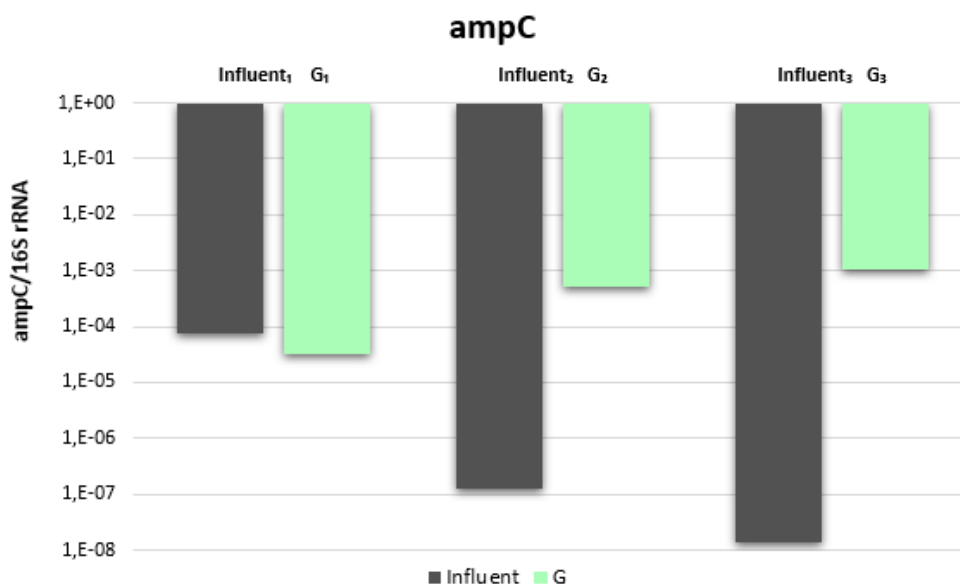
Γράφημα 26 : Αναλογία ampC gene copies / 16S rRNA στην εισροή και στην εκροή του υδροβιότοπου P, με πληρωτικό υλικό HDPE, κατά τη διάρκεια των τριών χρονικών περιόδων.

Στο γράφημα 26, κατά τη χρονική περίοδο του Μαΐου παρουσιάζεται μικρή απομάκρυνση του γονιδίου ampC, καθώς η συγκέντρωση της εκροής είναι μικρότερη από την αντίστοιχη συγκέντρωση της εισροής, που δεν έχει υποστεί κάποια επεξεργασία. Κατά τις επόμενες δύο χρονικές περιόδους του Ιουνίου και του Ιουλίου ωστόσο, παρατηρείται αύξηση του γονιδίου, η οποία κυμαίνεται από 4,74 έως 4,99 Logs. Επομένως, δεν υπάρχει ουσιαστικά απομάκρυνση του ampC στον υδροβιότοπο P.



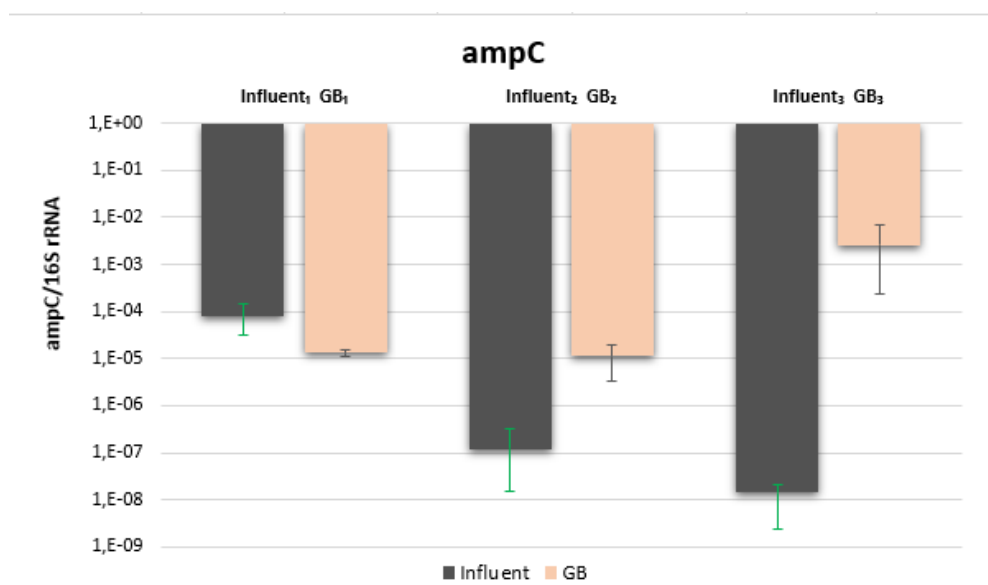
Γράφημα 27 : Αναλογία γονιδίου ampC gene copies / 16S rRNA στην εισροή όσο και στην εκροή του υγροβιότοπου PB, με πληρωτικό υλικό HDPE σε συνδυασμό με biochar, κατά τη διάρκεια των τριών χρονικών περιόδων.

Στο γράφημα 27, κατά τη χρονική περίοδο του Μαΐου παρουσιάζεται μια πολύ μικρή απομάκρυνση του γονιδίου ampC καθώς η συγκέντρωση της εκροής είναι ελαφρώς μικρότερη από την αντίστοιχη συγκέντρωση της εισροής, που δεν έχει υποστεί κάποια επεξεργασία. Κατά τις επόμενες δύο χρονικές περιόδους του Ιουνίου και του Ιουλίου ωστόσο, παρατηρείται αύξηση του γονιδίου, η οποία κυμαίνεται από 1,24 έως 3,62 Logs. Επομένως, γίνεται εμφανές ότι δεν υπάρχει απομάκρυνση του ampC στον υγροβιότοπο PB.



Γράφημα 28 : Αναλογία γονιδίου ampC gene copies / 16S rRNA στην εισροή και στην εκροή του υγροβιότοπου G, με πληρωτικό υλικό χαλίκι, κατά τη διάρκεια των τριών χρονικών περιόδων.

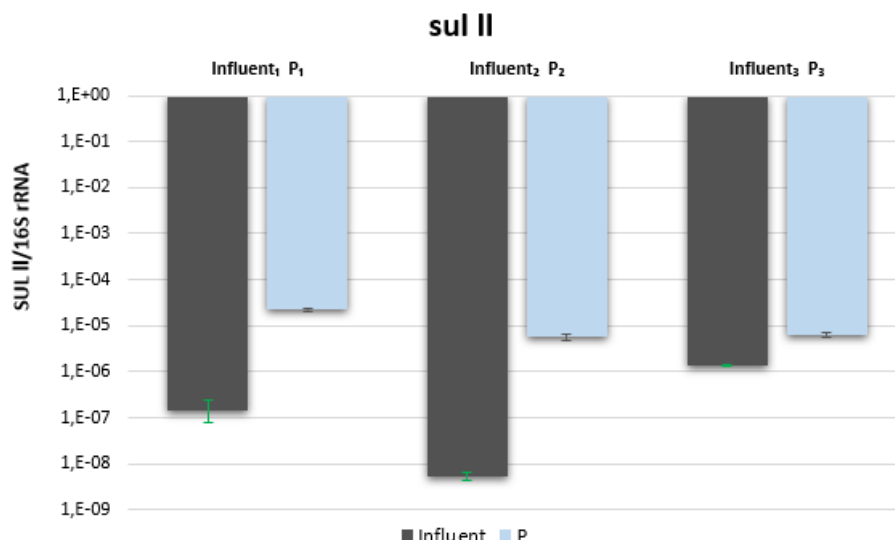
Σύμφωνα με το γράφημα 28 κατά τη χρονική περίοδο του Μαΐου παρουσιάζεται απομάκρυνση του γονιδίου *ampC*, καθώς η συγκέντρωση της εκροής είναι μικρότερη από την αντίστοιχη συγκέντρωση της εισροής, που δεν έχει υποστεί κάποια επεξεργασία. Κατά τις επόμενες δύο χρονικές περιόδους του Ιουνίου και του Ιουλίου ωστόσο, παρατηρείται αύξηση του γονιδίου, η οποία κυμαίνεται από 3,61 έως 4,88 Logs. Επομένως, συμπερασματικά, προκύπτει ότι δεν παρατηρείται απομάκρυνση του *ampC* στον υδροβιότοπο G.



Γράφημα 29 : Αναλογία γονιδίου *ampC* gene copies / 16S rRNA στην εισροή και στην εκροή του υδροβιότοπου GB, με πληρωτικό υλικό χαλίκι σε συνδυασμό με biochar, κατά τη διάρκεια των τριών χρονικών περιόδων.

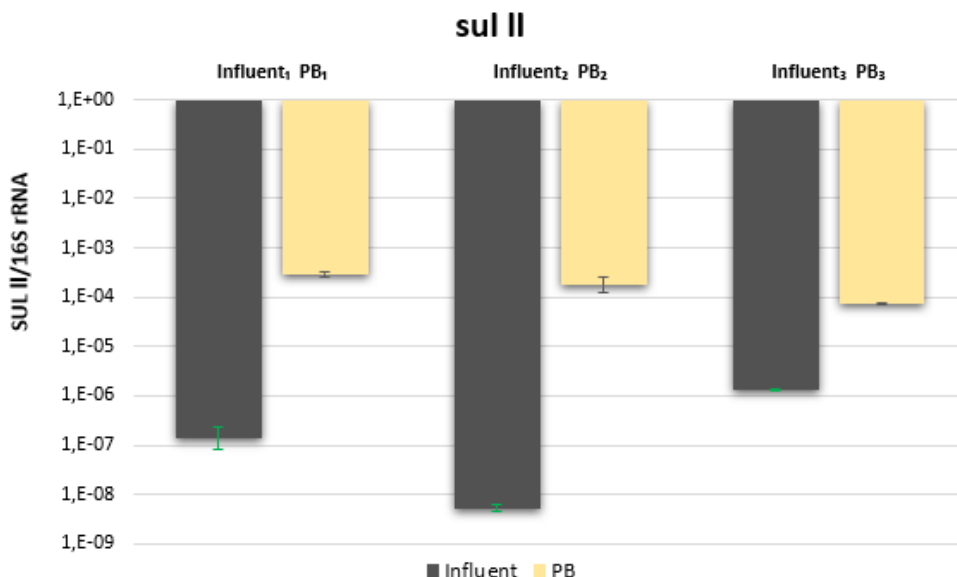
Στο γράφημα 29, κατά τη χρονική περίοδο του Μαΐου παρουσιάζεται απομάκρυνση του γονιδίου *ampC*, καθώς η συγκέντρωση της εκροής είναι μικρότερη από την αντίστοιχη συγκέντρωση της εισροής, που δεν έχει υποστεί κάποια επεξεργασία. Κατά τις επόμενες δύο χρονικές περιόδους του Ιουνίου και του Ιουλίου ωστόσο, παρατηρείται αύξηση του γονιδίου, η οποία κυμαίνεται από 1,97 έως 5,22 Logs. Επομένως, η συνολική εικόνα του γραφήματος οδηγεί στο συμπέρασμα ότι δεν παρατηρείται απομάκρυνση του *ampC* στον υδροβιότοπο GB.

♦ Γονίδιο *sul II*



Γράφημα 30 : Αναλογία γονιδίου sul II gene copies / 16S rRNA στην εισροή και στην εκροή του υδροβιότοπου P, με πληρωτικό υλικό HDPE, κατά τη διάρκεια των τριών χρονικών περιόδων.

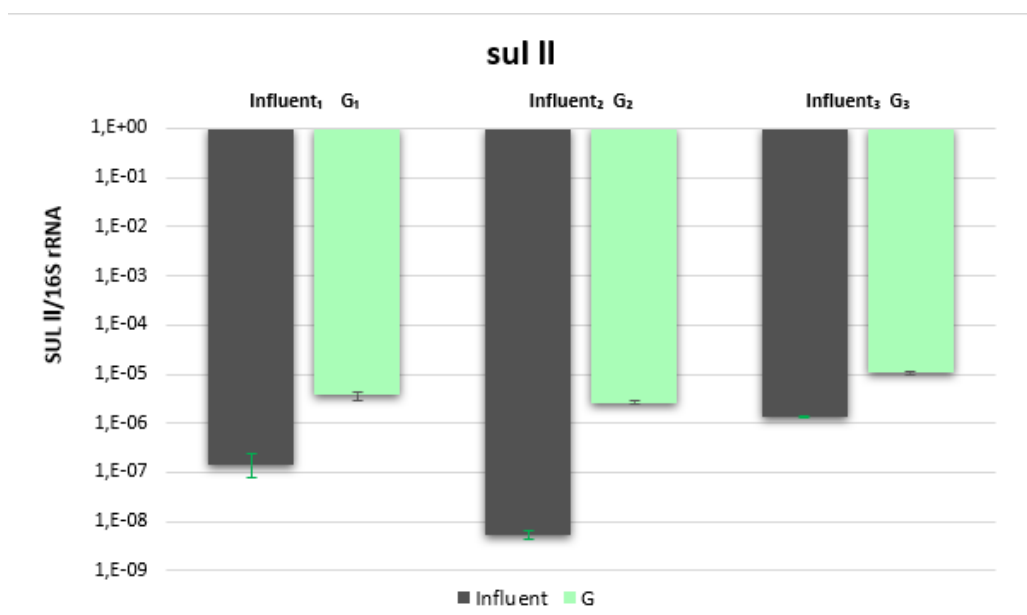
Στο γράφημα 30 γίνεται φανερό ότι το γονίδιο sul II, δεν παρουσιάζει απομάκρυνση. Οι αρνητικές τιμές κυμαίνονται από 0,65 έως 3,04 Logs και στις τρεις χρονικές περιόδους. Αυτό γίνεται αντιληπτό καθώς η συγκέντρωση της εκροής είναι καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος μεγαλύτερη συγκριτικά με την αντίστοιχη συγκέντρωση της εισροής.



Γράφημα 31 : Αναλογία γονιδίου sul II gene copies / 16S rRNA στην εισροή και στην εκροή του υδροβιότοπου PB, με πληρωτικό υλικό HDPE σε συνδυασμό με biochar, κατά τη διάρκεια των τριών χρονικών περιόδων.

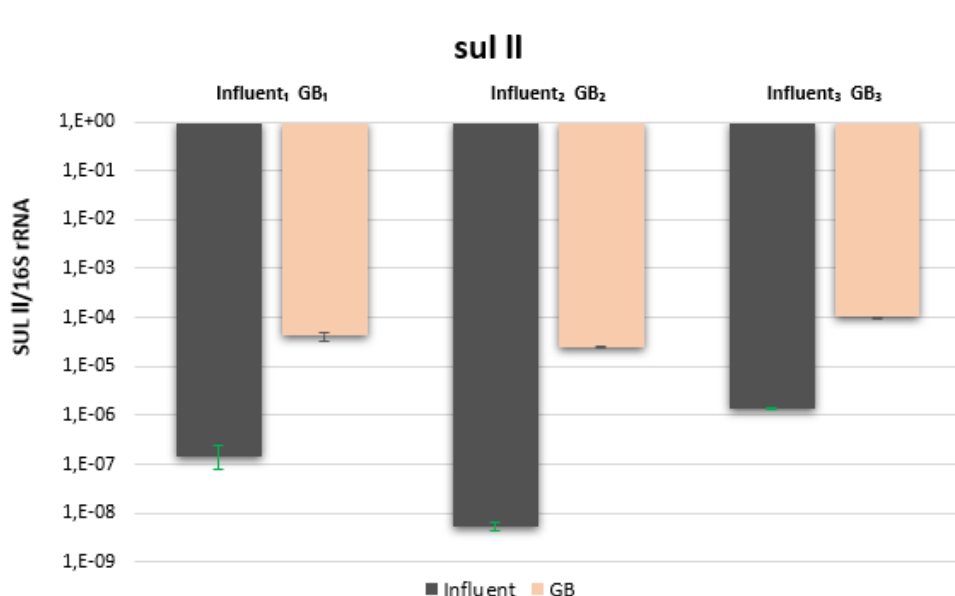
Παρατηρώντας το παραπάνω γράφημα γίνεται φανερό ότι το γονίδιο sul II, δεν παρουσιάζει απομάκρυνση. Οι αρνητικές τιμές κυμαίνονται από 1,73 έως 4,53 Logs κατά τη διάρκεια και των τριών χρονικών περιόδων. Αυτό γίνεται αντιληπτό καθώς η συγκέντρωση της εκροής είναι

καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος μεγαλύτερη συγκριτικά με την αντίστοιχη συγκέντρωση της εισροής.



Γράφημα 31 : Αναλογία γονιδίου sul II gene copies / 16S rRNA στην εισροή και στην εκροή του υδροβιότοπου G, με πληρωτικό υλικό χαλίκι, κατά τη διάρκεια των τριών χρονικών περιόδων.

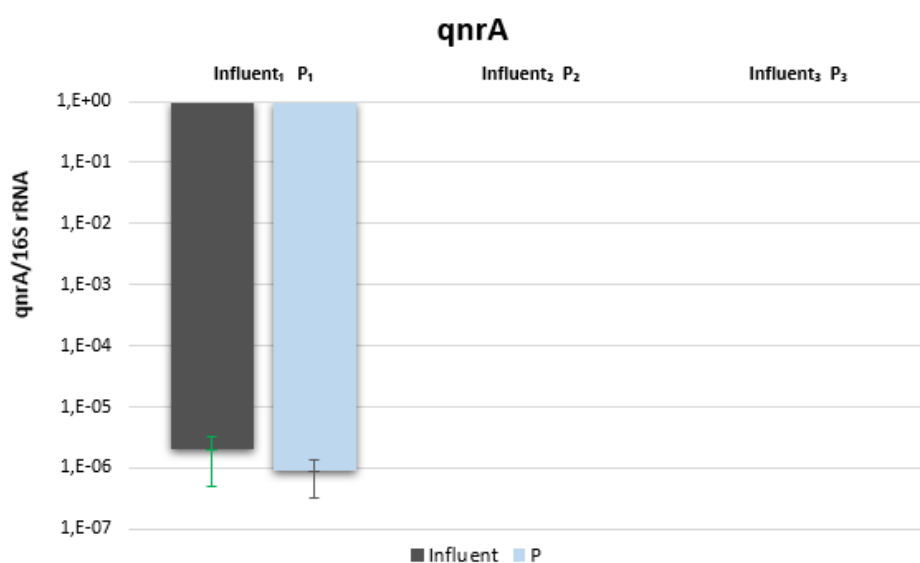
Παρατηρώντας το γράφημα 31 γίνεται φανερό ότι το γονίδιο sul II δεν παρουσιάζει απομάκρυνση. Οι αρνητικές τιμές κυμαίνονται από 0,90 έως 2,70 Logs καθ' όλη τη χρονική διάρκεια της πειραματικής διάταξης. Αυτό γίνεται αντιληπτό καθώς η συγκέντρωση της εκροής είναι καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος μεγαλύτερη συγκριτικά με την αντίστοιχη συγκέντρωση της εισροής.



Γράφημα 32 : Αναλογία γονιδίου sul II gene copies / 16S rRNA στην εισροή και στην εκροή του υδροβιότοπου GB, με πληρωτικό υλικό χαλίκι σε συνδυασμό με biochar, κατά τη διάρκεια των τριών χρονικών περιόδων.

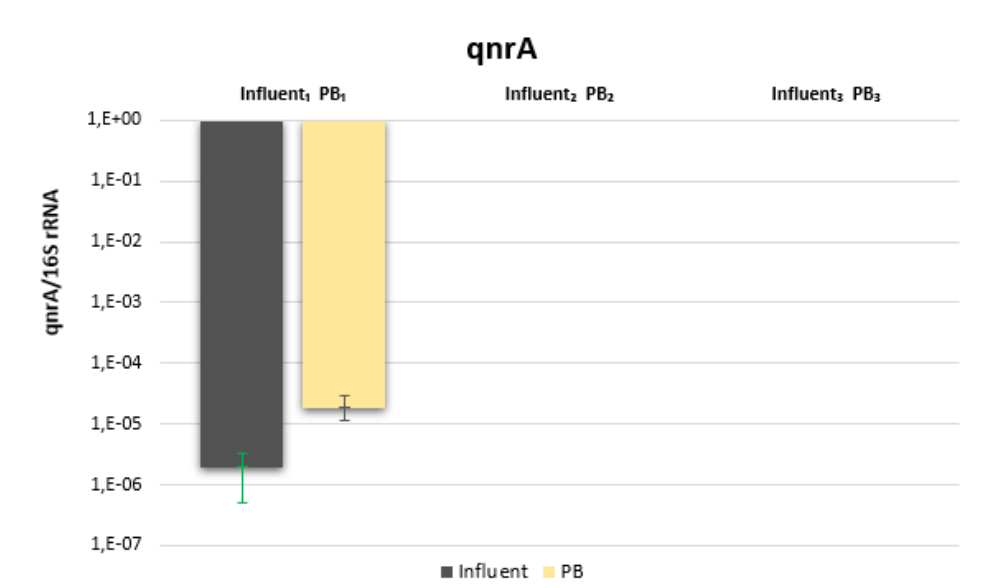
Παρατηρώντας το γράφημα 32 γίνεται φανερό ότι το γονίδιο *sul II* δεν παρουσιάζει απομάκρυνση. Οι αρνητικές τιμές κυμαίνονται από 1,87 έως 3,68 Logs κατά τη διάρκεια και των τριών χρονικών περιόδων. Αυτό γίνεται αντιληπτό καθώς η συγκέντρωση της εκροής είναι καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος μεγαλύτερη συγκριτικά με την αντίστοιχη συγκέντρωση της εισροής.

♦ **Γονίδιο *qnrA***



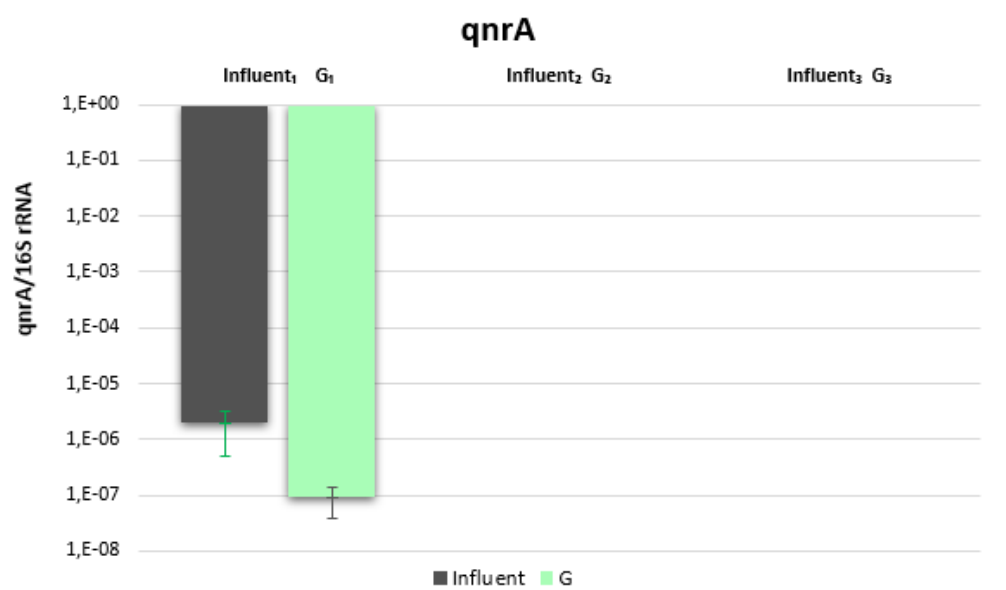
Γράφημα 33 : Αναλογία γονιδίου *qnrA* gene copies / 16S rRNA στην εισροή και στην εκροή του υδροβιότοπου P, με πληρωτικό υλικό HDPE, κατά τη διάρκεια των τριών χρονικών περιόδων.

Στο γράφημα 33 παρατηρείται πως υπάρχει απομάκρυνση του γονιδίου *qnrA*, κατά τη χρονική περίοδο του Μαΐου. Αυτό γίνεται εμφανές καθώς η συγκέντρωση στην εκροή είναι μικρότερη από την αντίστοιχη συγκέντρωση της εισροής. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι κατά τη διάρκεια των επόμενων δυο χρονικών περιόδου του Ιουνίου και του Ιουλίου δεν ανιχνεύεται το γονίδιο ούτε στην εισροή αλλά ούτε και στην εκροή του υδροβιότοπου. Άρα, συμπερασματικά, η απομάκρυνση είναι θετική.



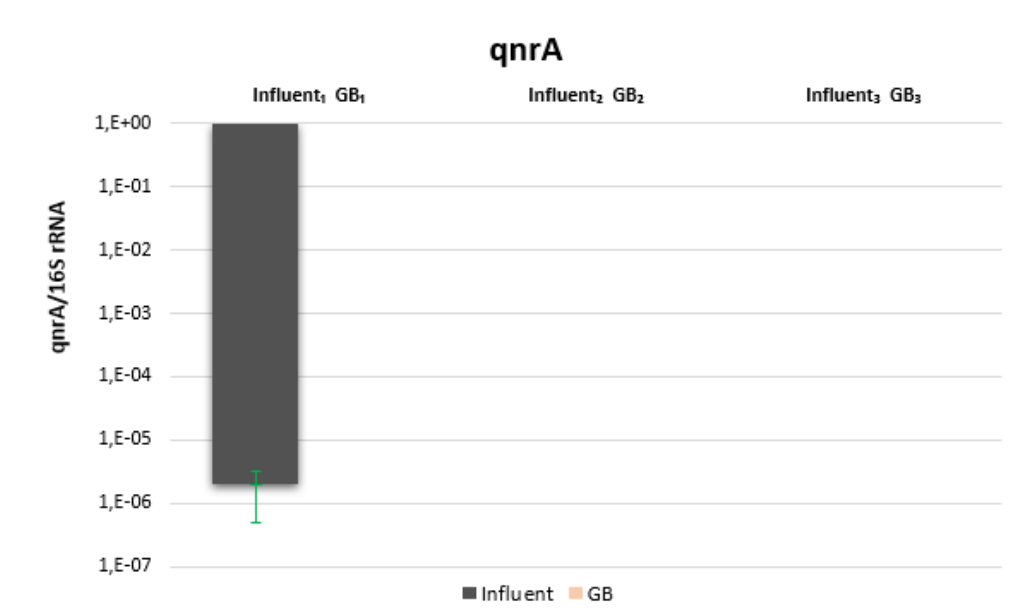
Γράφημα 34 : Αναλογία γονιδίου qnrA gene copies / 16S rRNA στην εισροή και στην εκροή του υδροβιότοπου PB, με πληρωτικό υλικό HDPE σε συνδυασμό με biochar, κατά τη διάρκεια των τριών χρονικών περιόδων.

Από το παραπάνω γράφημα (34) γίνεται εμφανές πως δεν υπάρχει απομάκρυνση του γονιδίου qnrA, κατά τη χρονική περίοδο του Μαΐου με αύξηση κατά 0,97 Logs. Αυτό γίνεται εμφανές καθώς η συγκέντρωση στην εκροή είναι μικρότερη από την αντίστοιχη συγκέντρωση στην εισροή. Αξιοσημείωτο, και σε αυτό το γράφημα, είναι το γεγονός ότι κατά τη διάρκεια των επόμενων δυο χρονικών περιόδων, του Ιουνίου και του Ιουλίου, δεν ανιχνεύεται το γονίδιο ούτε στην εισροή ούτε και στην εκροή του υδροβιότοπου. Άρα, συμπερασματικά, η απομάκρυνση είναι αρνητική.



Γράφημα 35 : Αναλογία γονιδίου qnrA gene copies / 16S rRNA στην εισροή και στην εκροή του υδροβιότοπου G, με πληρωτικό υλικό HDPE χαλίκι, κατά τη διάρκεια των τριών χρονικών περιόδων.

Από το άνωθεν γράφημα (35) γίνεται εμφανές πως υπάρχει απομάκρυνση του γονιδίου qnrA, κατά τη χρονική περίοδο του Μαΐου. Αυτό γίνεται εμφανές καθώς η συγκέντρωση στην εκροή είναι μικρότερη από την αντίστοιχη συγκέντρωση της εισροής. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι κατά τη διάρκεια των επόμενων δύο χρονικών περιόδων, του Ιουνίου και του Ιουλίου, δεν ανιχνεύεται το γονίδιο ούτε στην εισροή ούτε και στην εκροή του υγροβιότοπου. Άρα, συμπερασματικά, η απομάκρυνση είναι θετική.



Γράφημα 36 : Αναλογία γονιδίου qnrA gene copies / 16S rRNA στην εισροή και στην εκροή του υγροβιότοπου GB, με πληρωτικό υλικό HDPE χαλίκι σε συνδυασμό με biochar, κατά τη διάρκεια των τριών χρονικών περιόδων.

Στο παραπάνω γράφημα (36), παρατηρείται πως κατά τη χρονική περίοδο του Μαΐου ανιχνεύθηκε το γονίδιο qnrA μόνο στην εισροή. Αντιθέτως, στην εκροή δεν έχει ανιχνευθεί καθόλου, επομένως όλη η συγκέντρωση του γονιδίου έχει απομακρυνθεί. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι κατά τη διάρκεια των επόμενων δυο χρονικών περιόδου του Ιουνίου και του Ιουλίου δεν ανιχνεύεται το γονίδιο ούτε στην εισροή ούτε και στην εκροή του υγροβιότοπου.

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα των γραφημάτων για τα υπό εξέταση γονίδια ανθεκτικότητας που ερευνήθηκαν προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα για τις εκροές των υγροβιότοπων :

Στις εκροές του CW P, με πληρωτικό υλικό HDPE, όσο αφορά το γονίδιο ampC πάρα την αρχική απομάκρυνση που επιτυγχάνεται κατά τη 1^η χρονική περίοδο, στη συνέχεια κατά της δύο επόμενες χρονικές περιόδους παρατηρείται αύξηση του γονιδίου. Γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα πως υπάρχει αύξηση της συγκέντρωσης του γονιδίου εντός της πιλοτικής μονάδας του υγροβιότοπου. Επιπλέον, για το γονίδιο sull II, παρατηρείται αύξηση της

συγκέντρωσής του συγκριτικά με το ολικό βακτηριακό υλικό κατά τη διάρκεια και των τριών χρονικών περιόδων. Εν τέλει, για το γονίδιο qnrA, ενώ αρχικά επιτυγχάνεται απομάκρυνση στη συνέχεια για τις υπόλοιπες δύο χρονικές περιόδους δεν υπάρχει ανίχνευση του γονιδίου τόσο στην εισροή όσο και στην εκροή.

Στις εκροές του CW PB, με πληρωτικό υλικό HDPE σε συνδυασμό με biochar, όσο αφορά το γονίδιο ampC πάρα την αρχική απομάκρυνση που επιτυγχάνεται κατά τη 1^η χρονική περίοδο, στη συνέχεια κατά της δύο επόμενες χρονικές περιόδους παρατηρείται αύξηση του γονιδίου. Αυτό το γεγονός οδηγεί στο συμπέρασμα πως υπάρχει αύξηση της συγκέντρωσης του γονιδίου εντός της πιλοτικής μονάδας. Επιπλέον, για το γονίδιο sulI II, παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσής του συγκριτικά με το ολικό βακτηριακό υλικό κατά τη διάρκεια και των τριών χρονικών περιόδων. Εν τέλει, για το γονίδιο qnrA, αρχικά δεν επιτυγχάνεται απομάκρυνση στη συνέχεια για τις υπόλοιπες δύο χρονικές περιόδους δεν υπάρχει ανίχνευση του γονιδίου τόσο στην εισροή όσο και στην εκροή.

Όσον αφορά στις εκροές του CW G, με πληρωτικό υλικό χαλίκι, όσο αφορά το γονίδιο ampC πάρα την αρχική απομάκρυνση που επιτυγχάνεται κατά τη 1^η χρονική περίοδο, στη συνέχεια κατά της δύο επόμενες χρονικές περιόδους παρατηρείται αύξηση του γονιδίου. Επομένως, υπάρχει αύξηση της συγκέντρωσης του γονιδίου εντός της πιλοτικής μονάδας. Επιπλέον, για το γονίδιο sulI II, παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσής του συγκριτικά με το ολικό βακτηριακό υλικό κατά τη διάρκεια και των τριών χρονικών περιόδων. Εν τέλει, για το γονίδιο qnrA, ενώ αρχικά επιτυγχάνεται απομάκρυνση στη συνέχεια για τις υπόλοιπες δύο χρονικές περιόδους δεν υπάρχει ανίχνευση του γονιδίου τόσο στην εισροή όσο και στην εκροή.

Όσον αφορά στις εκροές του CW GB, με πληρωτικό υλικό χαλίκι σε συνδυασμό με biochar, όσο αφορά το γονίδιο ampC πάρα την αρχική απομάκρυνση που επιτυγχάνεται κατά τη 1^η χρονική περίοδο, στη συνέχεια κατά της δύο επόμενες χρονικές περιόδους παρατηρείται αύξηση του γονιδίου. Επομένως, υπάρχει αύξηση της συγκέντρωσης του γονιδίου εντός της πιλοτικής μονάδας. Επιπλέον, για το γονίδιο sulI II, παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσής του συγκριτικά με το ολικό βακτηριακό υλικό κατά τη διάρκεια και των τριών χρονικών περιόδων. Εν τέλει, για το γονίδιο qnrA, αρχικά επιτυγχάνεται πλήρης απομάκρυνση του γονιδίου καθώς ενώ υπάρχει συγκέντρωση στην εισροή ενώ στην αντίστοιχη εκροή δεν ανιχνεύθηκε το γονίδιο. Στη συνέχεια για τις υπόλοιπες δύο χρονικές περιόδους δεν υπάρχει ανίχνευση του γονιδίου τόσο στην εισροή όσο και στην εκροή.

Ένας σημαντικός παράγοντας, που συμβάλλει στην απομάκρυνση των ARGs από τους τεχνητούς υγροβιότοπους είναι η επιλογή του υποστρώματος, δηλαδή του πληρωτικού υλικού που επιλέγεται. Έρευνες έχουν δείξει πως η μη επιτυχής απομάκρυνση των ARGs μπορεί να αποδοθεί στον βιομετασχηματισμό των αντιβιοτικών καθώς και στην εκρόφησή τους από τη φάση του υποστρώματος στην υδατική φάση (J. Chen et al., 2015, 2019b; Hijosa-Valsero et al., 2011). Όταν χρησιμοποιείται το χαλίκι ως πληρωτικό υλικό, μελέτες έχουν αναφέρει πως η απόδοση της απομάκρυνσης δεν είναι υψηλή, αντίθετα σε κάποιες περιπτώσεις εμφανίζονται και αρνητικές τιμές στις απομακρύνσεις. Πιο αναλυτικά, αποτελέσματα που έχουν προκύψει από HF CWs, των οποίων ο χρόνος λειτουργείας είναι από 1 έως 2,5 έτη, δείχνουν πως απομακρύνεται το 94% της σιπροφλοξασίνης και το 27% -71% της σουλφαμεθοξαζόλης (Ávila et al., 2021; Hijosa-Valsero et al., 2011). Στην παρούσα διπλωματική η παραπάνω διαπίστωση δεν μπορεί να επιβεβαιωθεί, καθώς για τον G προκύπτουν σε όλες τις χρονικές περιόδους αρνητικές απομακρύνσεις του γονιδίου *sul II*. Ωστόσο, υπάρχει θετική απομάκρυνση του γονιδίου *qnrA*, κατά τη χρονική περίοδο του Μαΐου, αλλά στη συνέχεια δεν υπάρχει ανίχνευση του γονιδίου στις επόμενες δύο χρονικές περιόδους τόσο στην εισροή όσο και στην εκροή. Σχετικά με τα υπόλοιπα πληρωτικά υλικά, που χρησιμοποιήθηκαν σαν υποστρώματα στους CWs, δεν υπάρχουν έρευνες που αφορούν την απομάκρυνση των ARGs.

Όσον αφορά το γονίδιο ανθεκτικότητας *sul II*, που αντιστοιχεί στο αντιβιοτικό σουλφαμεθοξαζόλη, παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσης του συγκριτικά με το ολικό βακτηριακό υλικό, σε όλες τις εκροές των υγροβιότοπων κατά τη διάρκεια και των τριών χρονικών περιόδων που μελετήθηκαν. Αυτό οφείλεται στο ότι η σουλφαμεθοξαζόλη, σύμφωνα με μελέτες, έχει υψηλό K_d , το οποίο ευνοεί την απορρόφηση της στο υπόστρωμα (Song et al., 2018; S. Zhang et al., 2020). Η επιλεκτική πίεση, που προκαλείται από τη συσσώρευση της σουλφαμεθοξαζόλης και των ARGs στο βιοφίλμ του υποστρώματος, θα μπορούσε να είναι η πιθανή αιτία για την επιμονή των βακτηρίων που μεταφέρουν τα ARGs. Επιπλέον, μελέτες έδειξαν πως οι μεταβολίτες της σουλφαμεθοξαζόλης θα μπορούσαν να αναστείλουν τη δράση των βακτηρίων σε σαφώς μεγαλύτερο βαθμό από το ίδιο το αντιβιοτικό (Majewsky et al., 2014).

Άλλος ένας παράγοντας που επηρεάζει την απομάκρυνση των ARGs είναι η θερμοκρασία. Σε κάποιες μελέτες έχει διαπιστωθεί πως το καλοκαίρι, που οι θερμοκρασίες είναι υψηλότερες, ευνοείται η αύξηση των ARB, τα οποία μεταφέρουν τα γονίδια ανθεκτικότητας (Manoharan et al., 2022). Αντιθέτως, σύμφωνα με άλλες μελέτες κατά τους καλοκαιρινούς μήνες τα βακτήρια που αποσυνθέτουν πρωτεΐνες εμφάνισαν μεγαλύτερη ικανότητα απομάκρυνσης των ARGs.

Ακόμα, διαπιστώθηκε ότι το αερόβιο περιβάλλον γύρω από τις ρίζες των φυτών συμβάλλει στην προστασία της κοινότητας των μικροοργανισμών, την καλοκαιρινή περίοδο, ενισχύοντας τη μικροβιακή δραστηριότητα, αυξάνοντας έτσι την αποτελεσματικότητα απομάκρυνσης των ARGs (Truu et al., 2009). Αυτό διαπιστώνεται και με άλλες μελέτες, στις οποίες έχει διαπιστωθεί ότι οι υψηλότερες θερμοκρασίες προάγουν την επιβίωση των βακτηριακών κοινοτήτων στα ιζήματα (Y. Luo et al., 2010), με αποτέλεσμα η αφθονία των ARG στα ιζήματα να είναι υψηλότερη το καλοκαίρι από ό,τι το χειμώνα, καθώς αναπτύσσονται οι κατάλληλες συνθήκες που ευνοούν την ανταλλαγή ARGs, μέσω των βακτηριακών κοινοτήτων. Στην παρούσα διπλωματική, επιβεβαιώνεται η μελέτη των Manoharan et al. Και των Luo et al. καθώς παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσης όλων των γονιδίων, συγκριτικά με το ολικό βακτηριακό γενετικό υλικό, με την αύξηση της θερμοκρασίας.

Επιπλέον, μελέτες έχουν συσχετίσει την απομάκρυνση των βακτηριακών δεικτών με την απομάκρυνση των ARGs στα συστήματα των τεχνητών υδροβιότοπων (Fang et al., 2017). Η συγκεκριμένη διαπίστωση μπορεί να επιβεβαιωθεί από τη παρούσα εργασία, καθώς παρατηρείται αρνητική απομάκρυνση των μικροβιακών δεικτών και ταυτόχρονα αρνητική απόδοση των μηχανισμών απομάκρυνσης ARGs.

Γενικά, η μεγάλη αστάθεια της απομάκρυνσης των αντιβιοτικών και κατά συνέπεια των γονιδίων τους με αποτέλεσμα να μην επιτυγχάνεται απομάκρυνση, γεγονός που δείχνει πως οι μηχανισμοί απομάκρυνσης των ARGs είναι μια πολύπλοκη διαδικασία, που χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση. Τα περιορισμένα δεδομένα που υπάρχουν σχετικά με την επίδραση των αντιβιοτικών στη δομή και την εξέλιξη των μικροβιακών κοινοτήτων των CWs έχουν αποδυναμώσει τη κατανόηση του μηχανισμού κίνησης και εξέλιξης των μικροβιακών πληθυσμών υπό τη επιλεκτική πίεση των αντιβιοτικών. Πιθανές αιτίες της μεταβλητότητας της απομάκρυνσης ενδέχεται να είναι ότι πολλά αντιβιοτικά μεταβολίζονται ως συζευγμένοι μεταβολίτες που θα μπορούσαν να μετασχηματιστούν στις μητρικές τους ενώσεις. Αυτός ο μετασχηματισμός οφείλεται σε αλλαγές των περιβαλλοντικών συνθηκών ή της δευτερογενούς απελευθέρωσης των αντιβιοτικών που είχαν απορροφηθεί από το υπόστρωμα, με το πέρας μιας χρονικής περιόδου (X. Liu et al., 2019).

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ / ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

5.1 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι τεχνητοί υδροβιότοποι HF CWs είναι μία τεχνολογία που εφαρμόζεται όλο και περισσότερο τα τελευταία χρόνια. Στους HF CWs πραγματοποιείται η επεξεργασία των λυμάτων μέσω της μικροβιακής αποικοδόμησης καθώς και άλλων φυσικοχημικών διεργασιών. Οι

μικροοργανισμοί που δρουν μπορούν να αναπτύξουν διαφορετικές μεταβολικές διαδικασίες, που επιτρέπουν την απομάκρυνση των οργανικών ρύπων. Τα συστήματα τεχνητών υγροβιότοπων έχουν υψηλή απόδοση στην απομάκρυνση BOD₅ (βιοχημικής οξειδώσιμης οργανικής ύλης), ολικά αιωρούμενων στερεών (TSS), αζώτου και παθογόνων μικροοργανισμών. Κατά την τελευταία δεκαετία έχει δοθεί έμφαση στη μελέτη των μηχανισμών απομάκρυνσης που πραγματοποιούνται στα HF CWs. Παρ' όλ' αυτά επειδή οι μηχανισμοί αυτοί είναι πολύπλοκοι δεν έχουν διερευνηθεί διεξοδικά. Ως αποτέλεσμα, δεν υπάρχει ξεκάθαρη εικόνα της απόδοσής τους.

Στη συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκε η απόδοση των πιλοτικών μονάδων των τεχνητών υγροβιότοπων με βλάστηση *Phragmites australis*, που βρίσκονται στο Πολυτεχνείο Κρήτης, στα Χανιά, ως προς την επίδραση των διαφορετικών πληρωτικών υλικών στις διεργασίες απομάκρυνσης των μικροβιακών δεικτών, του αδενοϊού και των γονιδίων ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν ότι, ανεξάρτητα από το πληρωτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα στους HF CWs, δεν επιτεύχθηκε απομάκρυνση και των τριών μικροβιακών δεικτών, ενώ η απόδοση της απομάκρυνσης για τους αδενοϊούς ήταν θετική. Πιο αναλυτικά, μεγαλύτερη απομάκρυνση παρατηρήθηκε στις εκροές των υγροβιότοπων P και PB, με μείωση του ιικού φορτίου έως και 2 Logs. Όσον αφορά στα γονίδια ανθεκτικότητας ARGs που μελετήθηκαν, δηλαδή *sul II*, *ampC* και *qnrA*, τα αποτελέσματα ήταν τα εξής:

Οι απομακρύνσεις των γονιδίων *sul II* και *ampC* από τις εκροές των HF CWs ήταν παντού αρνητικές. Όσον αφορά στο *qnrA*, η απομάκρυνση στην εκροή του υγροβιότοπου PB ήταν αρνητική, ενώ σε όλες τις άλλες εκροές ήταν θετική.

Τέλος, ως προς την διαφοροποίηση των τιμών της MIC₆₀ δεν υπάρχει ξεκάθαρο μοτίβο των προφίλ ανθεκτικότητας των στελεχών των μικροβιακών δεικτών ως προς τα αντιβιοτικά που εξετάστηκαν. Ειδικότερα, για την εκροή του υγροβιότοπου P για την *E. coli* δεν υπάρχει ξεκάθαρο μοτίβο των προφίλ ανθεκτικότητας ως προς όλα τα αντιβιοτικά, καθώς μεταβάλλεται με τις χρονικές περιόδους. Για τον *S. aureus* παρατηρείται ανθεκτικότητα ως προς το αντιβιοτικό σιπροφλοξασίνη και αμοξικιλίνη, ενώ ευαισθησία παρατηρείται ως προς το αντιβιοτικό σουλφαμεθοξαζόλη. Τέλος για τον *Enterococcus sp.* παρατηρείται ότι αποκτά ευαισθησία ως προς το αντιβιοτικό σιπροφλοξασίνη, ενώ για την σουλφαμεθοξαζόλη δεν παρατηρείται διαφοροποίηση της τιμής MIC₆₀. Ως προς το αντιβιοτικό αμοξικιλίνη υπάρχει διακύμανση του προφίλ ανθεκτικότητας κατά τη διάρκεια των τριών χρονικών περιόδων. Για

την εκροή του υγροβιότοπου PB για την *E. coli* παρατηρείται ότι αποκτά ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό σουλφαμεθοξαζόλη. Ως προς τα άλλα δυο αντιβιοτικά δεν υπάρχει ξεκάθαρο μοτίβο, καθώς τα προφίλ ανθεκτικότητας μεταβάλλονται με τη χρονική περίοδο. Για τον *S. aureus* υπάρχει διακύμανση στα προφίλ ανθεκτικότητας και των τριών αντιβιοτικών κατά τη διάρκεια των χρονικών περιόδων. Τέλος, ομοίως, για τον *Enterococcus sp.* δεν υπάρχει ξεκάθαρο μοτίβο της τιμής MIC₆₀, για κανένα από τα τρία αντιβιοτικά. Για τις εκροές των υγροβιότοπων G και GB για όλους τους βακτηριακούς δείκτες υπάρχει διακύμανση των προφίλ ανθεκτικότητας των τριών αντιβιοτικών κατά τη διάρκεια των χρονικών περιόδων.

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι υπάρχει συσχέτιση της απομάκρυνσης των βακτηριακών δεικτών με την απομάκρυνση των ARGs.

Συμπερασματικά, τα πειράματα δείχνουν ότι οι υγροβιότοποι δεν ήταν αποτελεσματικοί στην απομάκρυνση των μικροβιακών δεικτών και των γονιδίων ARGs, ήταν όμως θετικοί στην απομάκρυνση των αδενοϊών. Τέλος, ως προς την εναλλαγή των προφίλ ανθεκτικότητας των στελεχών, που εξετάστηκαν σε σχέση με τα τρία προαναφερθέντα αντιβιοτικά, τα αποτελέσματα ήταν διφορούμενα.

Πρέπει να σημειωθεί όμως ότι λόγω των περίπλοκων φυσικοχημικών και βιολογικών μηχανισμών που επιδρούν στις διεργασίες απομάκρυνσης, που πραγματοποιούνται στους υγροβιότοπους, είναι πιθανόν η μεταβολή κάποιων παραμέτρων των πειραμάτων να δώσει διαφορετικά αποτελέσματα.

5.2 ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

Με βάση τα παραπάνω συμπεράσματα προκύπτει μία σειρά προτάσεων για τη μελλοντική διενέργεια παρόμοιων πειραμάτων σχετικά με την απόδοση των τεχνητών υγροβιότοπων.

Μία πρώτη πρόταση είναι ο σχεδιασμός υβριδικών συστημάτων τεχνητών υγροβιότοπων, οι οποίοι αποτελούν συνδυασμό υγροβιότοπων διαφορετικών τύπων, ώστε να βελτιώνεται η απόδοσή τους. Π.χ μία τέτοια διάταξη μπορεί να αποτελείται από έναν VF CWs ο οποίος στη συνέχεια ακολουθείται από έναν HF CWs ώστε τα πλεονεκτήματα του ενός να αντισταθμίζουν τα μειονεκτήματα του άλλου. Έτσι μπορεί να επιτυγχάνονται στις εκροές τα προβλεπόμενα νομοθετικά όρια ώστε να μπορεί να γίνει επαναχρησιμοποίηση των επεξεργασμένων λυμάτων. Μία δεύτερη πρόταση εστιάζει στην εξέταση της χρήσης διαφορετικών πληρωτικών υλικών, τα οποία θα μπορούσαν να βελτιώσουν την απόδοση των τεχνητών υγροβιότοπων. Εν κατακλείδι, ιδιαίτερα σημαντική είναι η περαιτέρω διερεύνηση των μηχανισμών που επιδρούν στην απομάκρυνση των μικροοργανισμών και των γονιδίων ανθεκτικότητας.

Βιβλιογραφία

- Ahmed, W., Gyawali, P., Sidhu, J. P. S., & Toze, S. (2014). Relative inactivation of faecal indicator bacteria and sewage markers in freshwater and seawater microcosms. *Letters in Applied Microbiology*, 59(3), 348–354. <https://doi.org/10.1111/lam.12285>
- Ahmed, W., Zhang, Q., Kozak, S., Beale, D., Gyawali, P., Sadowsky, M. J., & Simpson, S. (2019). Comparative decay of sewage-associated marker genes in beach water and sediment in a subtropical region. *Water Research*, 149, 511–521. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.10.088>
- Aldred, K. J., Kerns, R. J., & Osheroff, N. (2014). Mechanism of quinolone action and resistance. In *Biochemistry* (Vol. 53, Issue 10, pp. 1565–1574). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/bi5000564>
- Anderson, J. C., Carlson, J. C., Low, J. E., Challis, J. K., Wong, C. S., Knapp, C. W., & Hanson, M. L. (2013). Performance of a constructed wetland in Grand Marais, Manitoba, Canada: Removal of nutrients, pharmaceuticals, and antibiotic resistance genes from municipal wastewater. *Chemistry Central Journal*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/1752-153X-7-54>
- Angelotti, R., Foter, M. J., Lewis, K. H., Angelotti, R., Foter, M. J., & Lewis, K. H. (1961). *Time-Temperature Effects on Salmonellae and Staphylococci in Foods III. Thermal Death Time Studies*.
- APHA. (1999). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*.
- Armstrong, J., & Armstrong, W. (1988). Phragmites australis-A Preliminary Study of Soil-Oxidizing Sites and Internal Gas Transport Pathways. In *New Phytologist* (Vol. 108, Issue 4).
- Armstrong, W., Armstrong, J., & Beckett, P. M. (1990). MEASUREMENT AND MODELLING OF OXYGEN RELEASE FROM ROOTS OF PHRAGMITES AUSTRALIS. In *Constructed Wetlands in Water Pollution Control* (pp. 41–51). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-040784-5.50009-7>
- Ashoori, N., Teixido, M., Spahr, S., LeFevre, G. H., Sedlak, D. L., & Luthy, R. G. (2019). Evaluation of pilot-scale biochar-amended woodchip bioreactors to remove nitrate, metals, and trace organic contaminants from urban stormwater runoff. *Water Research*, 154, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.01.040>
- Ávila, C., García-Galán, M. J., Uggetti, E., Montemurro, N., García-Vara, M., Pérez, S., García, J., & Postigo, C. (2021). Boosting pharmaceutical removal through aeration in constructed wetlands. *Journal of Hazardous Materials*, 412. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125231>
- Azaizeh, H., Linden, K. G., Barstow, C., Kalbouneh, S., Tellawi, A., Albalawneh, A., & Gerchman, Y. (2013). Constructed wetlands combined with UV disinfection systems for removal of enteric pathogens and wastewater contaminants. *Water Science and Technology*, 67(3), 651–657. <https://doi.org/10.2166/wst.2012.615>

- Bae, S., & Wuertz, S. (2015). Decay of host-associated Bacteroidales cells and DNA in continuous-flow freshwater and seawater microcosms of identical experimental design and temperature as measured by PMA-qPCR and qPCR. *Water Research*, 70, 205–213. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.10.032>
- Ballesté, E., Pascual-Benito, M., Martín-Díaz, J., Blanch, A. R., Lucena, F., Muniesa, M., Jofre, J., & García-Aljaro, C. (2019). Dynamics of crAssphage as a human source tracking marker in potentially faecally polluted environments. *Water Research*, 155, 233–244. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.02.042>
- Bhattacharjee, M. K. (2016). Antimetabolites: Antibiotics That Inhibit Nucleotide Synthesis. In *Chemistry of Antibiotics and Related Drugs* (pp. 95–108). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-40746-3_4
- Bofill-Mas, S., Albinana-Gimenez, N., Clemente-Casares, P., Hundesa, A., Rodriguez-Manzano, J., Allard, A., Calvo, M., & Girones, R. (2006). Quantification and stability of human adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(12), 7894–7896. <https://doi.org/10.1128/AEM.00965-06>
- Boutilier, L., Jamieson, R., Gordon, R., Lake, C., & Hart, W. (2010). Performance of surface-flow domestic wastewater treatment wetlands. *Wetlands*, 30(4), 795–804. <https://doi.org/10.1007/s13157-010-0067-1>
- Brix, H. (1987). Treatment of wastewater in the rhizosphere of wetland plants - The root-zone method. *Water Science and Technology*, 19(1–2), 107–118. <https://doi.org/10.2166/wst.1987.0193>
- Brown, D. G., & Jaffé, P. R. (2001). Effects of nonionic surfactants on bacterial transport through porous media. *Environmental Science and Technology*, 35(19), 3877–3883. <https://doi.org/10.1021/es010577w>
- Brüssow, H., Canchaya, C., & Hardt, W.-D. (2004). Phages and the Evolution of Bacterial Pathogens: from Genomic Rearrangements to Lysogenic Conversion. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(3), 560–602. <https://doi.org/10.1128/mmbr.68.3.560-602.2004>
- Buchanan, R., & Pitt, J. I. (1996). *The International Commission on Microbiological Specification for Foods (ICMSF) Salmonella Survival in Dry Pet Food View project Quantifying the risk of human Toxoplasma gondii infection due to consumption of fresh pork in the United States View project*. <https://www.researchgate.net/publication/278922093>
- Bueno, I., Verdugo, C., Jimenez-Lopez, O., Alvarez, P. P., Gonzalez-Rocha, G., Lima, C. A., Travis, D. A., Wass, B., Zhang, Q., Ishii, S., & Singer, R. S. (2020). Role of wastewater treatment plants on environmental abundance of Antimicrobial Resistance Genes in Chilean rivers. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 223(1), 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2019.10.006>

- Carducci, A., & Verani, M. (2013). Effects of Bacterial, Chemical, Physical and Meteorological Variables on Virus Removal by a Wastewater Treatment Plant. *Food and Environmental Virology*, 5(1), 69–76. <https://doi.org/10.1007/s12560-013-9105-5>
- Chahinez, H. O., Abdelkader, O., Leila, Y., & Tran, H. N. (2020). One-stage preparation of palm petiole-derived biochar: Characterization and application for adsorption of crystal violet dye in water. *Environmental Technology and Innovation*, 19. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.100872>
- 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 and Technology*, 47(15), 8157–8163. <https://doi.org/10.1021/es401091y>
- Chen, J., Deng, W. J., Liu, Y. S., Hu, L. X., He, L. Y., Zhao, J. L., Wang, T. T., & Ying, G. G. (2019). Fate and removal of antibiotics and antibiotic resistance genes in hybrid constructed wetlands. *Environmental Pollution*, 249, 894–903. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.03.111>
- Chen, J., Liu, Y. S., Su, H. C., Ying, G. G., Liu, F., Liu, S. S., He, L. Y., Chen, Z. F., Yang, Y. Q., & Chen, F. R. (2015). Removal of antibiotics and antibiotic resistance genes in rural wastewater by an integrated constructed wetland. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(3), 1794–1803. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-2800-4>
- Chendorain, M., Yates, M., & Villegas, F. (1998). (1998) *Fate and Transport of Viruses through Surface Water Constructed Wetlands, The*.
- Čížková, H., Lukavská, J., Přibáň, K., Kopecký, J., & Brabcová, H. (1996). Carbohydrate levels in rhizomes of *Phragmites australis* at an oligotrophic and a eutrophic site: A preliminary study. *Folia Geobotanica*, 31(1), 111–118. <https://doi.org/10.1007/bf02804000>
- Coenen, S., Muller, A., Adriaenssens, N., Vankerckhoven, V., Hendrickx, E., Goossens, H., Mittermayer, H., Goossens, H., Markova, B., Andrašević, A., Kontemeniotis, A., Jiří, V., Frimodt-Møller, N., Rootslane, L., Huovinen, P., Cavalié, P., Kern, W., Giamarellou, H., Ternák, G., ... Davey, P. (2009). European surveillance of antimicrobial consumption (ESAC): Outpatient parenteral antibiotic treatment in Europe. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64(1), 200–205. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp135>
- Corbella, C., & Puigagut, J. (2018). Improving domestic wastewater treatment efficiency with constructed wetland microbial fuel cells: Influence of anode material and external resistance. *Science of the Total Environment*, 631–632, 1406–1414. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.084>
- 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. *Environmental Science & Technology*, 45(2), 447–454. <https://doi.org/10.1021/ES1029206>

- Da Silva, M. F., Tiago, I., Veríssimo, A., Boaventura, R. A., Nunes, O. C., & Manaia, C. M. (2006). Antibiotic resistance of enterococci and related bacteria in an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiology Ecology*, 55(2), 322–329. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2005.00032.x>
- Dickopp, J., Kazda, M., & Čížková, H. (2011). Differences in rhizome aeration of *Phragmites australis* in a constructed wetland. *Ecological Engineering*, 37(11), 1647–1653. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2011.06.030>
- Dong, Y., Kim, J., & Lewis, G. D. (2010). Evaluation of methodology for detection of human adenoviruses in wastewater, drinking water, stream water and recreational waters. *Journal of Applied Microbiology*, 108(3), 800–809. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04477.x>
- 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>
- Echavarría, M. (2008). Adenoviruses in immunocompromised hosts. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 21, Issue 4, pp. 704–715). <https://doi.org/10.1128/CMR.00052-07>
- Elmahdy, M. E. I., Magri, M. E., Garcia, L. A., Fongaro, G., & Barardi, C. R. M. (2018). Microcosm environment models for studying the stability of adenovirus and murine norovirus in water and sediment. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 221(4), 734–741. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2018.04.002>
- Fang, H., Zhang, Q., Nie, X., Chen, B., Xiao, Y., Zhou, Q., Liao, W., & Liang, X. (2017). Occurrence and elimination of antibiotic resistance genes in a long-term operation integrated surface flow constructed wetland. *Chemosphere*, 173, 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.01.027>
- Faußer, A., Dušek, J., Čížková, H., Hoppert, M., Walther, P., & Kazda, M. (2013). Internal oxygen dynamics in rhizomes of *Phragmites australis* and presence of methanotrophs in root biofilms in a constructed wetland for wastewater treatment. *Desalination and Water Treatment*, 51(13–15), 3026–3031. <https://doi.org/10.1080/19443994.2012.748452>
- Fong, T. T., Phanikumar, M. S., Xagorarakis, I., & Rose, J. B. (2010). Quantitative detection of human adenoviruses in wastewater and combined sewer overflows influencing a Michigan river. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(3), 715–723. <https://doi.org/10.1128/AEM.01316-09>
- Fong, T.-T., & Lipp, E. K. (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>

- Fotadar, U., Zaveloff, P., & Terracio, L. (2005). Growth of *Escherichia coli* at elevated temperatures. *Journal of Basic Microbiology*, 45(5), 403–404.
<https://doi.org/10.1002/jobm.200410542>
- Garcia, M., & Bécares, E. (1997). Bacterial removal in three pilot-scale wastewater treatment systems for rural areas. *Water Science and Technology*, 35(11–12), 197–200.
[https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(97\)00258-8](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(97)00258-8)
- Gayathri, R., Gopinath, K. P., & Kumar, P. S. (2021). Adsorptive separation of toxic metals from aquatic environment using agro waste biochar: Application in electroplating industrial wastewater. *Chemosphere*, 262. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128031>
- Ge, X., Cao, X., Song, X., Wang, Y., Si, Z., Zhao, Y., Wang, W., & Tesfahunegn, A. A. (2020). Bioenergy generation and simultaneous nitrate and phosphorus removal in a pyrite-based constructed wetland-microbial fuel cell. *Bioresource Technology*, 296.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122350>
- Gikas, G. D., Pérez-Villanueva, M., Tsioras, M., Alexoudis, C., Pérez-Rojas, G., Masís-Mora, M., Lizano-Fallas, V., Rodríguez-Rodríguez, C. E., Vryzas, Z., & Tsihrintzis, V. A. (2018). Low-cost approaches for the removal of terbuthylazine from agricultural wastewater: Constructed wetlands and biopurification system. *Chemical Engineering Journal*, 335, 647–656. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.11.031>
- Gill, L. W., Ring, P., Casey, B., Higgins, N. M. P., & Johnston, P. M. (2017). Long term heavy metal removal by a constructed wetland treating rainfall runoff from a motorway. *Science of the Total Environment*, 601–602, 32–44.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.182>
- Giraja, G. (2002). *Enterococci from foods*. www.fems-microbiology.org
- Gozlan, I., Rotstein, A., & Avisar, D. (2013). Amoxicillin-degradation products formed under controlled environmental conditions: Identification and determination in the aquatic environment. *Chemosphere*, 91(7), 985–992.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.095>
- Guardabassi, L., Lo, D. M. A., Wong, F., & Dalsgaard, A. (2002). The effects of tertiary wastewater treatment on the prevalence of antimicrobial resistant bacteria. In *Water Research* (Vol. 36).
- Guo, F., Zhang, J., Yang, X., He, Q., Ao, L., & Chen, Y. (2020). Impact of biochar on greenhouse gas emissions from constructed wetlands under various influent chemical oxygen demand to nitrogen ratios. *Bioresource Technology*, 303.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122908>
- Haramoto, E., Katayama, H., Oguma, K., & Ohgaki, S. (2007). Quantitative analysis of human enteric adenoviruses in aquatic environments. *Journal of Applied Microbiology*, 103(6), 2153–2159. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03453.x>

- Hazen C., F. B. , H. P. , E. W. (1978). *Prevalence and Distribution of Aeromonas hydrophila in the United States*.
- Hdidou, M., Necibi, M. C., Labille, J., Hajjaji, S. El, Dhiba, D., Chechbouni, A., & Roche, N. (2022). Potential use of constructed wetland systems for rural sanitation and wastewater reuse in agriculture in the moroccan context. In *Energies* (Vol. 15, Issue 1). MDPI. <https://doi.org/10.3390/en15010156>
- Hernández-Crespo, C., Gargallo, S., Benedito-Durá, V., Nácher-Rodríguez, B., Rodrigo-Alacreu, M. A., & Martín, M. (2017). Performance of surface and subsurface flow constructed wetlands treating eutrophic waters. *Science of the Total Environment*, 595, 584–593. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.278>
- Hewitt, J., Leonard, M., Greening, G. E., & Lewis, G. D. (2011). Influence of wastewater treatment process and the population size on human virus profiles in wastewater. *Water Research*, 45(18), 6267–6276. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.09.029>
- Hijosa-Valsero, M., Fink, G., Schlüsener, M. P., Sidrach-Cardona, R., Martín-Villacorta, J., Ternes, T., & Bécares, E. (2011). Removal of antibiotics from urban wastewater by constructed wetland optimization. *Chemosphere*, 83(5), 713–719. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.02.004>
- Hijosa-Valsero, M., Reyes-Contreras, C., Domínguez, C., Bécares, E., & Bayona, J. M. (2016). Behaviour of pharmaceuticals and personal care products in constructed wetland compartments: Influent, effluent, pore water, substrate and plant roots. *Chemosphere*, 145, 508–517. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.11.090>
- Hill, D. D., & Sleep, B. E. (2002). *Effects of biofilm growth on flow and transport through a glass parallel plate fracture*. www.elsevier.com/locate/jconhyd
- Huang, X., Liu, C., Li, K., Su, J., Zhu, G., & Liu, L. (2015). Performance of vertical up-flow constructed wetlands on swine wastewater containing tetracyclines and tet genes. *Water Research*, 70, 109–117. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.11.048>
- Huang, X., Zheng, J., Liu, C., Liu, L., Liu, Y., & Fan, H. (2017). Removal of antibiotics and resistance genes from swine wastewater using vertical flow constructed wetlands: Effect of hydraulic flow direction and substrate type. *Chemical Engineering Journal*, 308, 692–699. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.09.110>
- Hubeny, J., Harnisz, M., Korzeniewska, E., Buta, M., Zieliński, W., Rolbiecki, D., Giebułtowiec, J., Nałęcz-Jawecki, G., & Płaza, G. (2021). Industrialization as a source of heavy metals and antibiotics which can enhance the antibiotic resistance in wastewater, sewage sludge and river water. *PLoS ONE*, 16(6 June). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0252691>
- Huovinen, P. (2001). *Resistance to Trimethoprim-Sulfamethoxazole*. <https://academic.oup.com/cid/article/32/11/1608/464214>

- Hussain, S. A., & Prasher, S. O. (2011). Understanding the sorption of ionophoric pharmaceuticals in a treatment wetland. *Wetlands*, 31(3), 563–571. <https://doi.org/10.1007/s13157-011-0171-x>
- Ibrahim, E. M. M. E. M., El-Liethy, M. A., Abia, A. L. K., Hemdan, B. A., & Shaheen, M. N. (2019). Survival of *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, HAdV2 and MNV-1 in river water under dark conditions and varying storage temperatures. *Science of the Total Environment*, 648, 1297–1304. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.275>
- Ji, Z., Tang, W., & Pei, Y. (2022). Constructed wetland substrates: A review on development, function mechanisms, and application in contaminants removal. In *Chemosphere* (Vol. 286). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131564>
- Jia, H., Sun, Z., & Li, G. (2014). A four-stage constructed wetland system for treating polluted water from an urban river. *Ecological Engineering*, 71, 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2014.07.013>
- Jiang, S. C. (2006). Human adenoviruses in water: Occurrence and health implications: A critical review. In *Environmental Science and Technology* (Vol. 40, Issue 23, pp. 7132–7140). <https://doi.org/10.1021/es060892o>
- Kataki, S., Chatterjee, S., Vairale, M. G., Dwivedi, S. K., & Gupta, D. K. (2021). Constructed wetland, an eco-technology for wastewater treatment: A review on types of wastewater treated and components of the technology (macrophyte, biofilm and substrate). *Journal of Environmental Management*, 283. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.111986>
- Katayama, H., Haramoto, E., Oguma, K., Yamashita, H., Tajima, A., Nakajima, H., & Ohgaki, S. (2008). One-year monthly quantitative survey of noroviruses, enteroviruses, and adenoviruses in wastewater collected from six plants in Japan. *Water Research*, 42(6–7), 1441–1448. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.10.029>
- Kerrn, M. B., Klemmensen, T., Frimodt-Møller, N., & Espersen, F. (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>
- Khouja, I., M'Hiri, F., Ouzari, H. I., & Saidi, N. (2020). Removal processes of indicator organisms and opportunistic pathogens in an anaerobic digester-constructed wetland system. *Water and Environment Journal*, 34(S1), 342–354. <https://doi.org/10.1111/wej.12531>
- Khurshid, H., Mustafa, M. R. U., Rashid, U., Isa, M. H., Ho, Y. C., & Shah, M. M. (2021). Adsorptive removal of COD from produced water using tea waste biochar. *Environmental Technology and Innovation*, 23. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101563>
- Kjeldsen, P., Barlaz, M. A., Rooker, A. P., Baun, A., Ledin, A., & Christensen, T. H. (2002). Present and long-term composition of MSW landfill leachate: A review. In *Critical*

- Reviews in Environmental Science and Technology* (Vol. 32, Issue 4, pp. 297–336).
<https://doi.org/10.1080/10643380290813462>
- Kloos, W. E., & Bannerman, T. L. (1994). Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 7, Issue 1, pp. 117–140). American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/CMR.7.1.117>
- Kümmerer, K. (2009). Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part I. In *Chemosphere* (Vol. 75, Issue 4, pp. 417–434).
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.11.086>
- Kurniawan, T. A., Lo, W., Chan, G., & Sillanpää, M. E. T. (2010). Biological processes for treatment of landfill leachate. In *Journal of Environmental Monitoring* (Vol. 12, Issue 11, pp. 2032–2047). <https://doi.org/10.1039/c0em00076k>
- Kurniawan, T. A., Lo, W. H., & Chan, G. Y. S. (2006). Physico-chemical treatments for removal of recalcitrant contaminants from landfill leachate. *Journal of Hazardous Materials*, 129(1–3), 80–100. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2005.08.010>
- Lamba, M., & Ahammad, S. Z. (2017). Sewage treatment effluents in Delhi: A key contributor of B-lactam resistant bacteria and genes to the environment. *Chemosphere*, 188, 249–256. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.08.133>
- Leclerc, H., Schwartzbrod, L., & Dei-Cas, E. (2002). Microbial Agents Associated with Waterborne Diseases. In *Critical Reviews in Microbiology* (Vol. 28, Issue 4).
- Linden, K. G., Thurston, J., Schaefer, R., & Malley, J. P. (2007). Enhanced UV inactivation of adenoviruses under polychromatic UV lamps. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(23), 7571–7574. <https://doi.org/10.1128/AEM.01587-07>
- Litskas, V. D., Karamanlis, X. N., Prousalis, S. P., & Koveos, D. S. (2018). Effects of the Antibiotic Amoxicillin on Key Species of the Terrestrial Environment. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 100(4), 509–515. <https://doi.org/10.1007/s00128-018-2302-z>
- Liu, X., Guo, X., Liu, Y., Lu, S., Xi, B., Zhang, J., Wang, Z., & Bi, B. (2019). A review on removing antibiotics and antibiotic resistance genes from wastewater by constructed wetlands: Performance and microbial response. In *Environmental Pollution* (Vol. 254). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.112996>
- Liu, X., Liu, Y., Lu, S., Guo, W., & Xi, B. (2018). Performance and mechanism into TiO₂/Zeolite composites for sulfadiazine adsorption and photodegradation. *Chemical Engineering Journal*, 350, 131–147. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.05.141>
- Łuczkiwicz, A., Fudala-Książek, S., Jankowska, K., Quant, B., & Olańczuk-Neyman, K. (2010). Diversity of fecal coliforms and their antimicrobial resistance patterns in wastewater treatment model plant. *Water Science and Technology*, 61(6), 1383–1392. <https://doi.org/10.2166/wst.2010.015>

- Luo, Y., Mao, D., Rysz, M., Zhou, Q., Zhang, H., Xu, L., & Alvarez, P. J. J. (2010). Trends in antibiotic resistance genes occurrence in the Haihe River, China. *Environmental Science and Technology*, 44(19), 7220–7225. <https://doi.org/10.1021/es100233w>
- Majewsky, M., Wagner, D., Delay, M., Bräse, S., Yargeau, V., & Horn, H. (2014). Antibacterial activity of sulfamethoxazole transformation products (TPs): General relevance for sulfonamide TPs modified at the para position. *Chemical Research in Toxicology*, 27(10), 1821–1828. <https://doi.org/10.1021/tx500267x>
- Manoharan, R. K., Ishaque, F., & Ahn, Y. H. (2022). Fate of antibiotic resistant genes in wastewater environments and treatment strategies - A review. In *Chemosphere* (Vol. 298). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134671>
- Meney, Kathy. Pantelic. L. and Hardcastle. K. (2009). *PERFORMANCE EVALUATION OF A FULL-SCALE CONSTRUCTED WETLAND SYSTEM PROVIDING SECONDARY AND TERTIARY TREATMENT OF MUNICIPAL WASTEWATER – AN AUSTRALIAN CASE STUDY*.
- Moulisová, L., Čížková, H., Dušek, J., & Kazda, M. (2023). Root and rhizome traits of the common reed (*Phragmites australis*) in a constructed wetland for wastewater treatment. *Ecological Engineering*, 186. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2022.106832>
- Moushumi Hazra, H. J. , J. B. W. , J. E. M. W. (2022). *Antibiotics and antibiotic resistant bacteria/genes in urban wastewater: A comparison of their fate in conventional treatment systems and constructed wetlands*.
- Ng, W. J., Sim, T. S., Ong, S. L., Ng, K. Y., Ramasamy, M., & Tan, K. N. (1993). FATE OF COLWORMS AND COLIPHAGES IN THE SEQUENCING BATCH REACTOR (SBR). In *Bioresource Technology* (Vol. 46).
- Nwachuku, N., Gerba, C. P., Oswald, A., & Mashadi, F. D. (2005). Comparative inactivation of adenovirus serotypes by UV light disinfection. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 5633–5636. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5633-5636.2005>
- Ogorzaly, L., Cauchie, H. M., Penny, C., Perrin, A., Gantzer, C., & Bertrand, I. (2013). Two-day detection of infectious enteric and non-enteric adenoviruses by improved ICC-qPCR. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(9), 4159–4166. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4782-4>
- Ottová, V., Balcarová, J., & Vymazal, J. (1997). Microbial characteristics of constructed wetlands. *Water Science and Technology*, 35(5), 117–123. [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(97\)00060-7](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(97)00060-7)
- Ozturk, I., Altinbas, M., Koyuncu, I., Arikan, O., & Gomec-Yangin, C. (2003). Advanced physico-chemical treatment experiences on young municipal landfill leachates. *Waste Management*, 23(5), 441–446. [https://doi.org/10.1016/S0956-053X\(03\)00061-8](https://doi.org/10.1016/S0956-053X(03)00061-8)
- Pazda, M., Kumirska, J., Stepnowski, P., & Mulkiwicz, E. (2019). Antibiotic resistance genes identified in wastewater treatment plant systems – A review. In *Science of the Total Environment* (Vol. 697). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134023>

- Pina, S., Puig, M., Lucena, F., Jofre, J., & Girones, R. (1998a). Viral Pollution in the Environment and in Shellfish: Human Adenovirus Detection by PCR as an Index of Human Viruses. In *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* (Vol. 64, Issue 9).
- Pina, S., Puig, M., Lucena, F., Jofre, J., & Girones, R. (1998b). Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(9), 3376–3382. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.9.3376-3382.1998>
- Podschun, R., Pietsch, S., Höller, C., & Ullmann, U. (2001). Incidence of Klebsiella Species in Surface Waters and Their Expression of Virulence Factors. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), 3325–3327. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.7.3325-3327.2001>
- Poma, H. R., Gutiérrez Cacciabue, D., Garcé, B., Gonzo, E. E., & Rajal, V. B. (2012). Towards a rational strategy for monitoring of microbiological quality of ambient waters. *Science of the Total Environment*, 433, 98–109. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.06.019>
- Prevost, B., Goulet, M., Lucas, F. S., Joyeux, M., Moulin, L., & Wurtzer, S. (2016). Viral persistence in surface and drinking water: Suitability of PCR pre-treatment with intercalating dyes. *Water Research*, 91, 68–76. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.12.049>
- Pu, Q., Wang, H. T., Pan, T., Li, H., & Su, J. Q. (2020). Enhanced removal of ciprofloxacin and reduction of antibiotic resistance genes by earthworm *Metaphire vulgaris* in soil. *Science of the Total Environment*, 742. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140409>
- Qin, Y., Zhu, X., Su, Q., Anumah, A., Gao, B., Lyu, W., Zhou, X., Xing, Y., & Wang, B. (2020). Enhanced removal of ammonium from water by ball-milled biochar. *Environmental Geochemistry and Health*, 42(6), 1579–1587. <https://doi.org/10.1007/s10653-019-00474-5>
- Rames, E., Roiko, A., Stratton, H., & Macdonald, J. (2016). Technical aspects of using human adenovirus as a viral water quality indicator. In *Water Research* (Vol. 96, pp. 308–326). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.03.042>
- Ren, Y., & Yuan, Q. (2015). Fungi in Landfill Leachate Treatment Process. In *Biodegradation and Bioremediation of Polluted Systems - New Advances and Technologies*. InTech. <https://doi.org/10.5772/60863>
- Rodríguez-Martínez, J. M., Pascual, A., García, I., & Martínez-Martínez, L. (2003). Detection of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant qnr among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing AmpC-type β -lactamase. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(4), 703–706. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKG388>
- Rosa, G. La, Pourshaban, M., Iaconelli, M., & Muscillo, M. (2010). Quantitative real-time PCR of enteric viruses in influent and effluent samples from wastewater treatment plants in Italy. *Ann Ist Super Sanità*, 46(3), 266–273. https://doi.org/10.4415/Ann_10_03_07

- Sa'at, S. K. M., Yusoff, M. S., Zaman, N. Q., & Ismail, H. A. (2021). Effect of gravel-sand substrate on sub-surface flow constructed wetland for palm oil mill effluent treatment. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 765(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/765/1/012048>
- 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). <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.03.004>
- Sabri, N. A., van Holst, S., Schmitt, H., van der Zaan, B. M., Gerritsen, H. W., Rijnaarts, H. H. M., & Langenhoff, A. A. M. (2020). Fate of antibiotics and antibiotic resistance genes during conventional and additional treatment technologies in wastewater treatment plants. *Science of the Total Environment*, 741. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140199>
- Sánchez, G., & Bosch, A. (2016). Survival of Enteric Viruses in the Environment and Food. In *Viruses in Foods* (pp. 367–392). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-30723-7_13
- 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. *FEMS Microbiology Ecology*, 43(3), 325–335. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6941.2003.TB01073.X>
- Scott, T. M., Rose, J. B., Jenkins, T. M., Farrah, S. R., & Lukasik, J. (2002). Microbial source tracking: Current methodology and future directions. In *Applied and Environmental Microbiology* (Vol. 68, Issue 12, pp. 5796–5803). <https://doi.org/10.1128/AEM.68.12.5796-5803.2002>
- Seidel, K. (1956). *Die Flechtbinse, Scirpus lacustris L.; Ökologie, Morphologie und Entwicklung, ihre Stellung bei den Völkern und ihre wirtschaftliche Bedeutung*.
- Shelef, O., Gross, A., & Rachmilevitch, S. (2013). Role of plants in a constructed Wetland: Current and new perspectives. *Water (Switzerland)*, 5(2), 405–419. <https://doi.org/10.3390/w5020405>
- 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>
- Silva, H. D., García-Zapata, M. T. A., & Anunciação, C. E. (2011). Why the Use of Adenoviruses as Water Quality Virologic Marker? *Food and Environmental Virology*, 3(3–4), 138–140. <https://doi.org/10.1007/s12560-011-9069-2>
- Simmons, F. J., & Xagorarakis, I. (2011). Release of infectious human enteric viruses by full-scale wastewater utilities. *Water Research*, 45(12), 3590–3598. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.04.001>

- Sjogren, R. E. (1994). *PROLONGED SURVIVAL OF AN ENVIRONMENTAL ESCHERICHIA COLI IN LABORATORY SOIL MICROCOSMS*.
- Sodhi, K. K., Kumar, M., & Singh, D. K. (2021). Insight into the amoxicillin resistance, ecotoxicity, and remediation strategies. In *Journal of Water Process Engineering* (Vol. 39). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101858>
- Song, H. L., Zhang, S., Guo, J., Yang, Y. L., Zhang, L. M., Li, H., Yang, X. L., & Liu, X. (2018). Vertical up-flow constructed wetlands exhibited efficient antibiotic removal but induced antibiotic resistance genes in effluent. *Chemosphere*, 203, 434–441. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.04.006>
- Stevik, T. K., Aa, K., Ausland, G., & Hanssen, J. F. (2004). Retention and removal of pathogenic bacteria in wastewater percolating through porous media: A review. In *Water Research* (Vol. 38, Issue 6, pp. 1355–1367). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2003.12.024>
- Stott, R., & Tanner, C. C. (2005). *Influence of biofilm on removal of surrogate faecal microbes in a constructed wetland and maturation pond*. <https://iwaponline.com/wst/article-pdf/51/9/315/47962/315.pdf>
- Stottmeister, U., Wießner, A., Kusch, P., Kappelmeyer, U., Kästner, M., Bederski, O., Müller, R. A., & Moormann, H. (2003). Effects of plants and microorganisms in constructed wetlands for wastewater treatment. *Biotechnology Advances*, 22(1–2), 93–117. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2003.08.010>
- Suehr, Q. J., Chen, F., Anderson, N. M., & Keller, S. E. (2020). Effect of pH on survival of *Escherichia coli* O157, *Escherichia coli* O121, and *salmonella enterica* during desiccation and short-term storage. *Journal of Food Protection*, 83(2), 211–220. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-19-195>
- Sundaravadivel, M., & Vigneswaran, S. (2001). Constructed wetlands for wastewater treatment. In *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* (Vol. 31, Issue 4, pp. 351–409). CRC Press LLC. <https://doi.org/10.1080/20016491089253>
- Suzuki, Y., Kanda, N., & Furukawa, T. (2012). Abundance of *Enterococcus* species, *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*, essential indicators of fecal pollution, in river water. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 47(11), 1500–1505. <https://doi.org/10.1080/10934529.2012.680315>
- Thurston-Enriquez, J. A., Haas, C. N., Jacangelo, J., Riley, K., & Gerba, C. P. (2003). Inactivation of feline calicivirus and adenovirus type 40 by UV radiation. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(1), 577–582. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.1.577-582.2003>
- Topić, N., Cenov, A., Jozić, S., Glad, M., Mance, D., Lušić, D., Kapetanović, D., Mance, D., & Lušić, D. V. (2021). *Staphylococcus aureus*—an additional parameter of bathing water

- quality for crowded urban beaches. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(10). <https://doi.org/10.3390/ijerph18105234>
- Truu, M., Juhanson, J., & Truu, J. (2009). Microbial biomass, activity and community composition in constructed wetlands. *Science of the Total Environment*, 407(13), 3958–3971. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.11.036>
- Usui, M., Akiyoshi, M., Fukuda, A., Iwano, H., & Kato, T. (2023). 16S rRNA nanopore sequencing for rapid diagnosis of causative bacteria in bovine mastitis. *Research in Veterinary Science*, 161, 45–49. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2023.06.006>
- Van Den Berghe, E., De Winter, T., & De Vuyst, L. (2006). Enterocin A production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 406 is characterised by a temperature- and pH-dependent switch-off mechanism when growth is limited due to nutrient depletion. *International Journal of Food Microbiology*, 107(2), 159–170. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.08.027>
- Vandevivere, P., & Baveye, P. (1992). DIVISION S-I-SOIL PHYSICS Saturated Hydraulic Conductivity Reduction Caused by Aerobic Bacteria in Sand Columns. In *SOIL SCIENCE SOCIETY OF AMERICA JOURNAL* (Vol. 56, Issue 1).
- Vymazal, J. (2010). Constructed wetlands for wastewater treatment. In *Water (Switzerland)* (Vol. 2, Issue 3, pp. 530–549). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/w2030530>
- Vymazal, J. (2011a). Constructed wetlands for wastewater treatment: Five decades of experience. *Environmental Science and Technology*, 45(1), 61–69. <https://doi.org/10.1021/es101403q>
- Vymazal, J. (2011b). Plants used in constructed wetlands with horizontal subsurface flow: A review. In *Hydrobiologia* (Vol. 674, Issue 1, pp. 133–156). <https://doi.org/10.1007/s10750-011-0738-9>
- Vymazal, J., & Kropfelová, L. (2005). Growth of *Phragmites australis* and *Phalaris arundinacea* in constructed wetlands for wastewater treatment in the Czech Republic. *Ecological Engineering*, 25(5), 606–621. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2005.07.005>
- Vymazal Jan, K. L. (2008). *Wastewater Treatment in Constructed Wetlands with Horizontal Sub-Surface Flow*. www.springer.com/series/5929
- Wang, J., & Wang, S. (2018). Microbial degradation of sulfamethoxazole in the environment. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 102, Issue 8, pp. 3573–3582). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8845-4>
- Wisniewski, J., Robert, D., Surmacz-Gorska, J., Miksch, K., & Weber, J. V. (2006). Landfill leachate treatment methods: A review. In *Environmental Chemistry Letters* (Vol. 4, Issue 1, pp. 51–61). <https://doi.org/10.1007/s10311-005-0016-z>

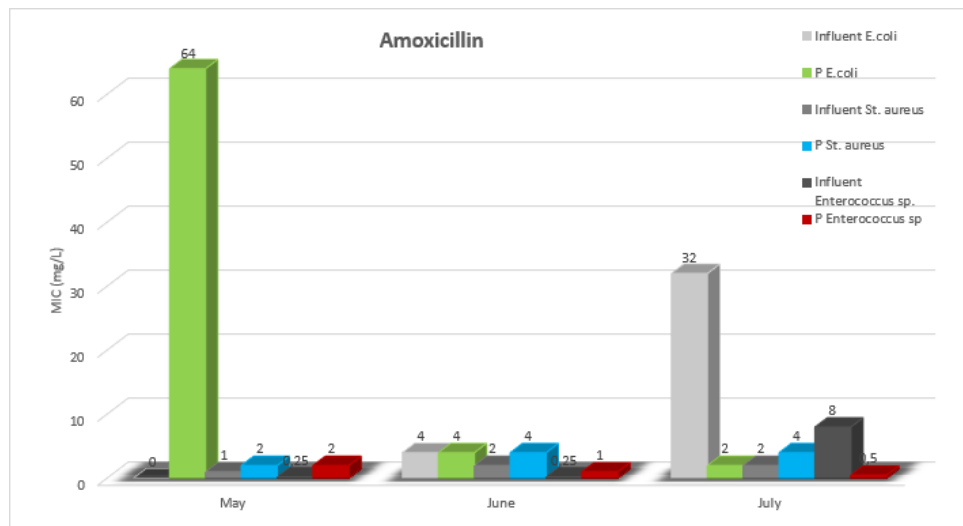
- Wong, K., Fong, T. T., Bibby, K., & Molina, M. (2012). Application of enteric viruses for fecal pollution source tracking in environmental waters. In *Environment International* (Vol. 45, Issue 1, pp. 151–164). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2012.02.009>
- World Health Organization (WHO). (1995). Determination of *Staphylococcus aureus* in sea water and sewage by the membrane filtration (MF) culture methode. *Refrence Methods for Marine Pollution Studies No. 28*.
- Yang, Y., Shi, W., Lu, S. Y., Liu, J., Liang, H., Yang, Y., Duan, G., Li, Y., Wang, H., & Zhang, A. (2018). Prevalence of antibiotic resistance genes in bacteriophage DNA fraction from Funan River water in Sichuan, China. *Science of the Total Environment*, 626, 835–841. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.148>
- Yi, X., Tran, N. H., Yin, T., He, Y., & Gin, K. Y. H. (2017). Removal of selected PPCPs, EDCs, and antibiotic resistance genes in landfill leachate by a full-scale constructed wetlands system. *Water Research*, 121, 46–60. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.05.008>
- Zhang, S., Lu, Y. X., Zhang, J. J., Liu, S., Song, H. L., & Yang, X. L. (2020). Constructed wetland revealed efficient sulfamethoxazole removal but enhanced the spread of antibiotic resistance genes. *Molecules*, 25(4). <https://doi.org/10.3390/molecules25040834>
- Zhang, X. X., Zhang, T., & Fang, H. H. P. (2009). Antibiotic resistance genes in water environment. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 82, Issue 3, pp. 397–414). <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1829-z>
- Zhuang, L. L., Li, M., Li, Y., Zhang, L., Xu, X., Wu, H., Liang, S., Su, C., & Zhang, J. (2022). The performance and mechanism of biochar-enhanced constructed wetland for wastewater treatment. In *Journal of Water Process Engineering* (Vol. 45). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2021.102522>
- A.N. Αγγελάκης, N.B. Παρανυχιανάκης, & Κ.Π. Τσαγκαράκης. (2017). *ΦΥΣΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΑΣΤΙΚΩΝ ΥΓΡΩΝ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ: ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ, ΑΡΧΕΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ*.
- Γιδαράκος Ευάγγελος. (2015). *ΣΤΕΡΕΑ ΑΠΟΒΛΗΤΑ: ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΚΑΙ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ*.
- Στούπας Χριστόφορος. (2020). *Επεξεργασία διασταλαγμάτων ΧΥΤΑ με βιολογικές και χημικές μεθόδους : Μελέτη περίπτωσης ΧΥΤΑ Μαυρομάχης*.

Παράρτημα

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ ΕΛΑΧΙΣΤΩΝ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ MIC

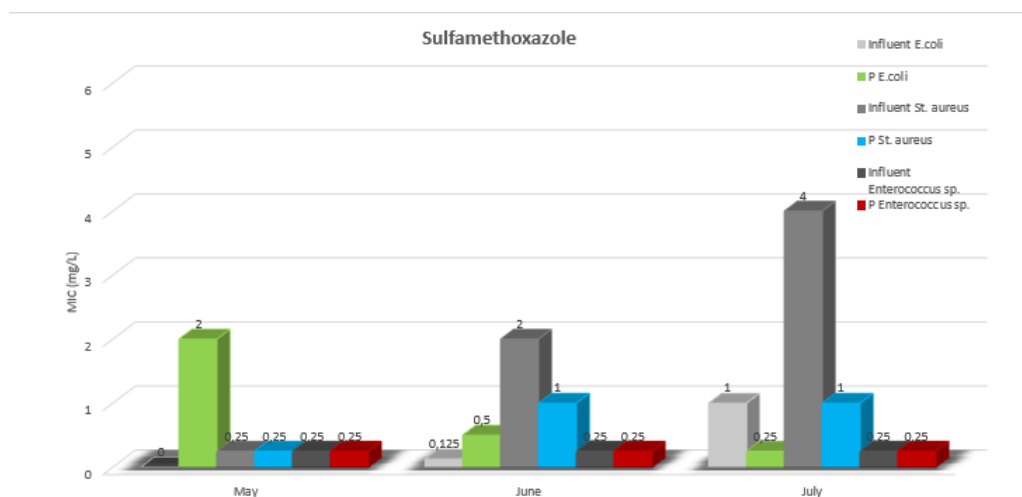
CW P (plastic)

Amoxicillin



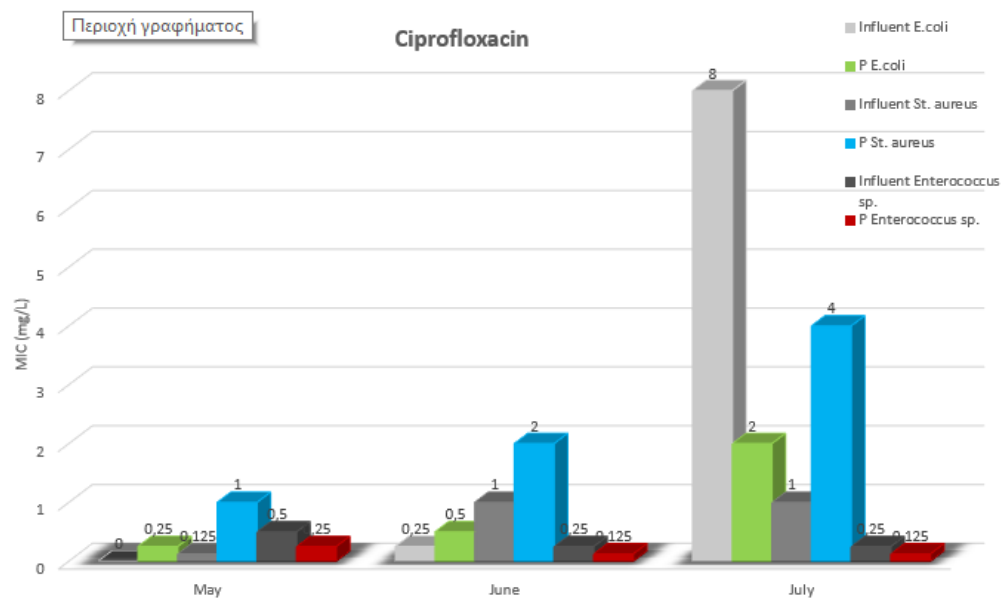
Γράφημα Π1: Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση amoxicillin για κάθε βακτηριακό στέλεχος της εκροής του υδροβιότοπου P κατά τις 3 χρονικές περιόδους.

Sulfamethoxazole



Γράφημα Π2: Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση sulfamethoxazole για κάθε βακτηριακό στέλεχος της εκροής του υδροβιότοπου P κατά τις 3 χρονικές περιόδους.

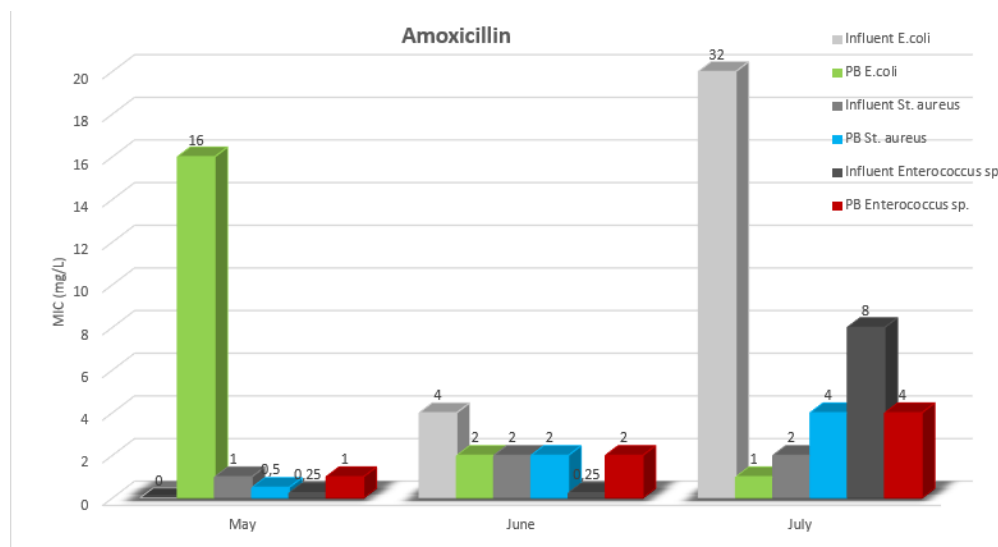
Ciprofloxacin



Γράφημα Π3: Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση ciprofloxacin για κάθε βακτηριακό στέλεχος της εκροής του υδροβιότοπου P κατά τις 3 χρονικές περιόδους.

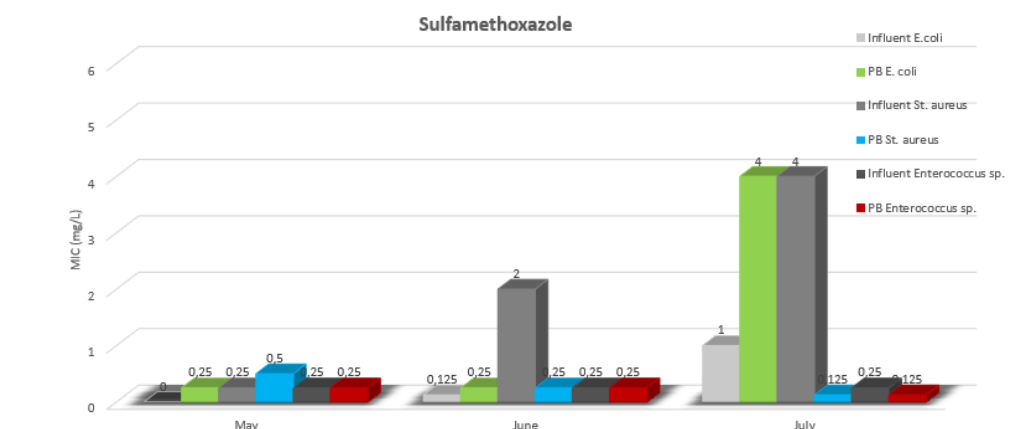
CW PB (plastic-biochar)

Amoxicillin



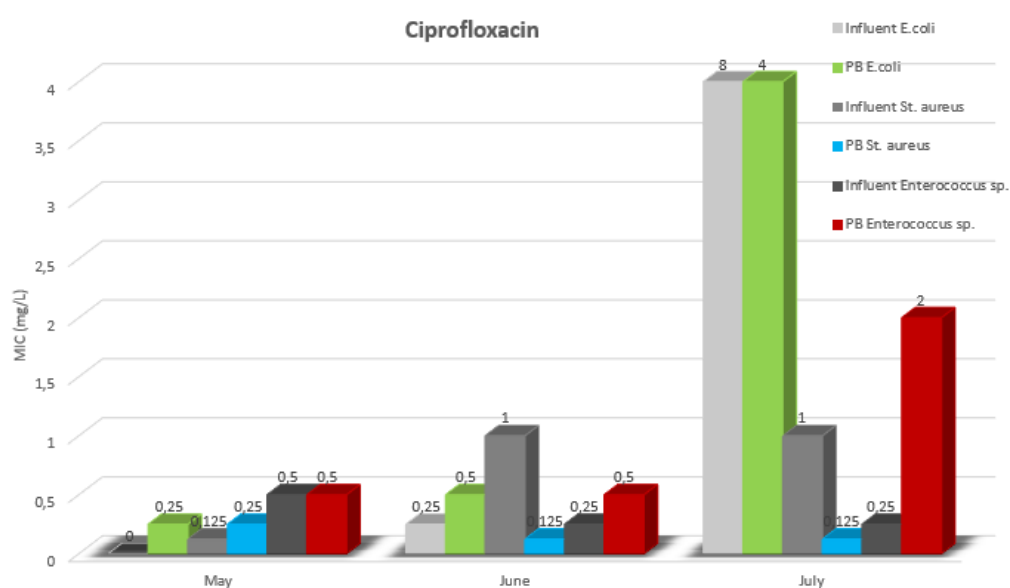
Γράφημα Π4: Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση amoxicillin για κάθε βακτηριακό στέλεχος της εκροής του υδροβιότοπου PB κατά τις 3 χρονικές περιόδους.

Sulfamethoxazole



Γράφημα Π5: Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση sulfamethoxazole για κάθε βακτηριακό στέλεχος της εκροής του υδροβιότοπου PB κατά τις 3 χρονικές περιόδους.

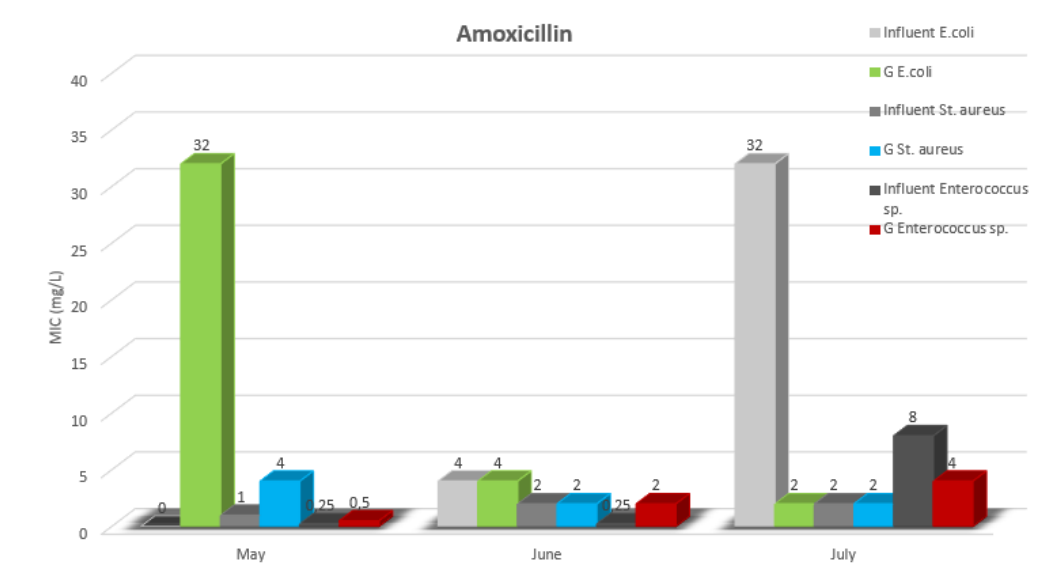
Ciprofloxacin



Γράφημα Π6: Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση ciprofloxacin για κάθε βακτηριακό στέλεχος της εκροής του υδροβιότοπου PB κατά τις 3 χρονικές περιόδους.

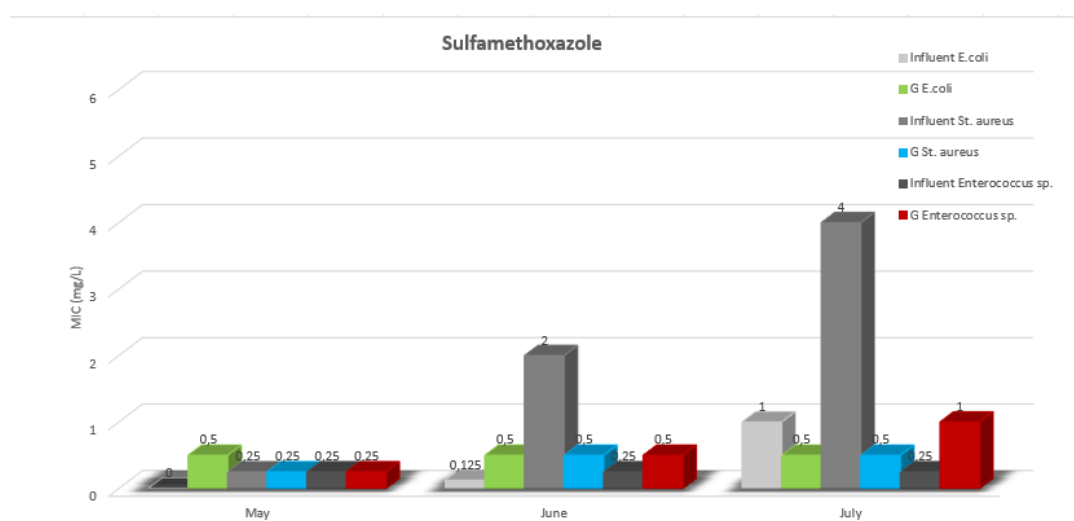
CW G (gravel)

Amoxicillin



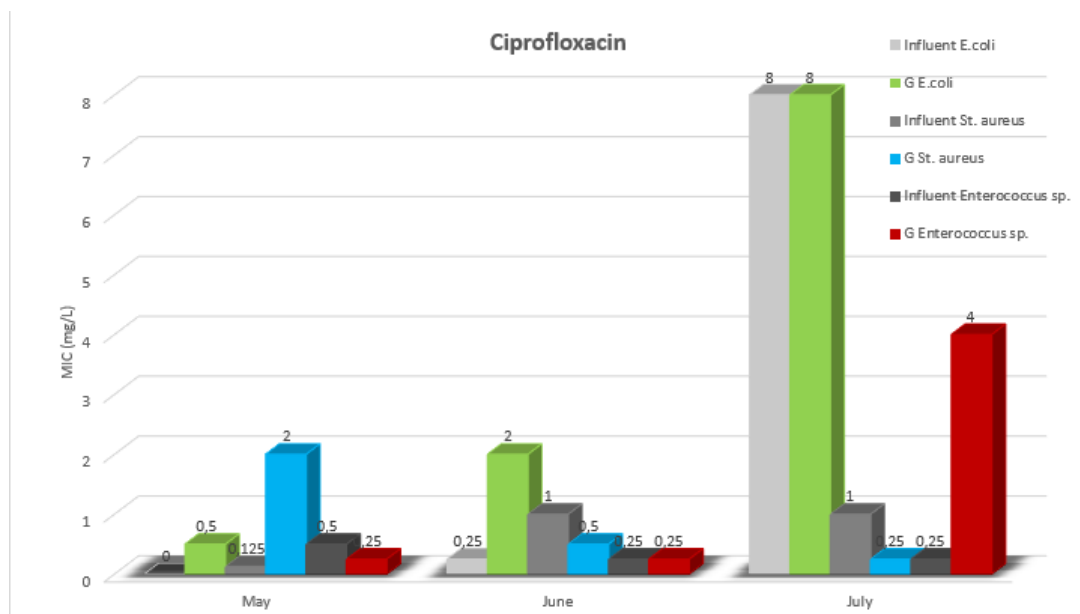
Γράφημα Π7: Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση amoxicillin για κάθε βακτηριακό στέλεχος της εκροής του υγροβιότοπου G κατά τις 3 χρονικές περιόδους.

Sulfamethoxazole



Γράφημα Π8: Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση sulfamethoxazole για κάθε βακτηριακό στέλεχος της εκροής του υγροβιότοπου G κατά τις 3 χρονικές περιόδους.

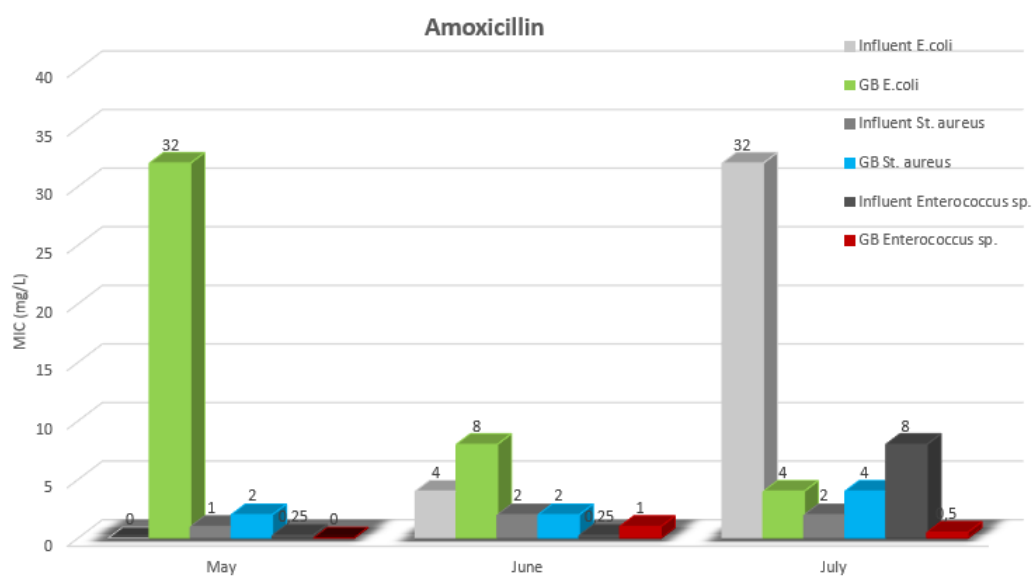
Ciprofloxacin



Γράφημα Π₉: Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση ciprofloxacin για κάθε βακτηριακό στέλεχος της εκροής του υγροβιότοπου G κατά τις 3 χρονικές περιόδους.

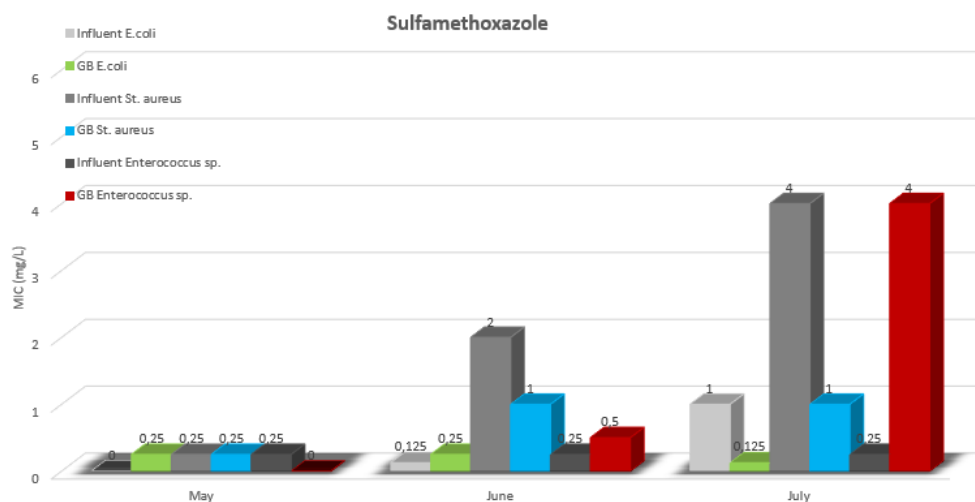
CW GB (gravel- biochar)

Amoxicillin



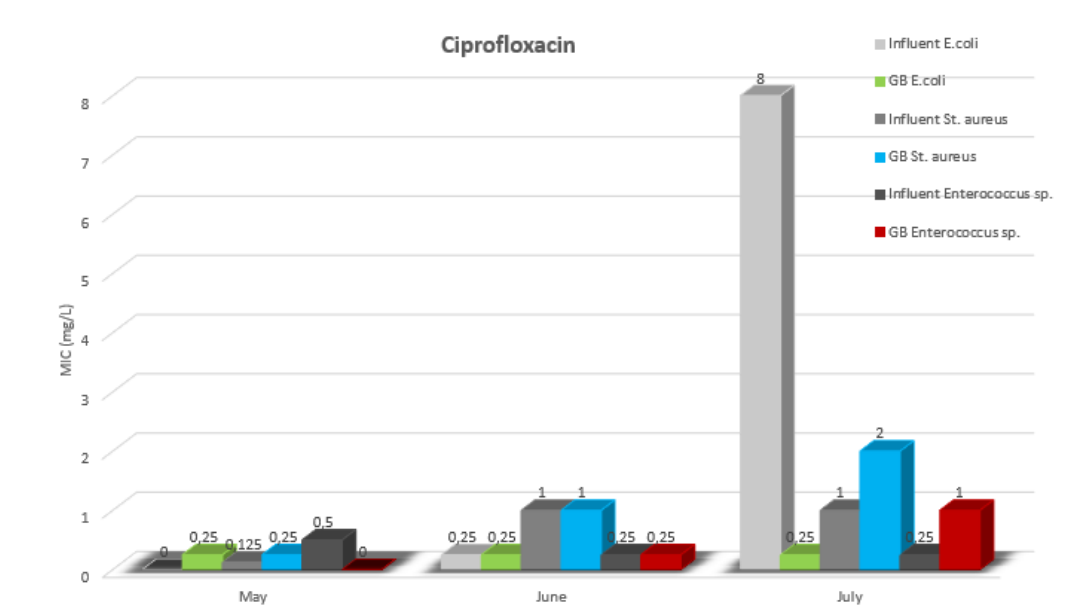
Γράφημα Π₁₀: Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση amoxicillin για κάθε βακτηριακό στέλεχος της εκροής του υγροβιότοπου GB κατά τις 3 χρονικές περιόδους.

Sulfamethoxazole



Γράφημα Π₁₁: Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση sulfamethoxazole για κάθε βακτηριακό στέλεχος της εκροής του υγροβιότοπου GB κατά τις 3 χρονικές περιόδους.

Ciprofloxacin



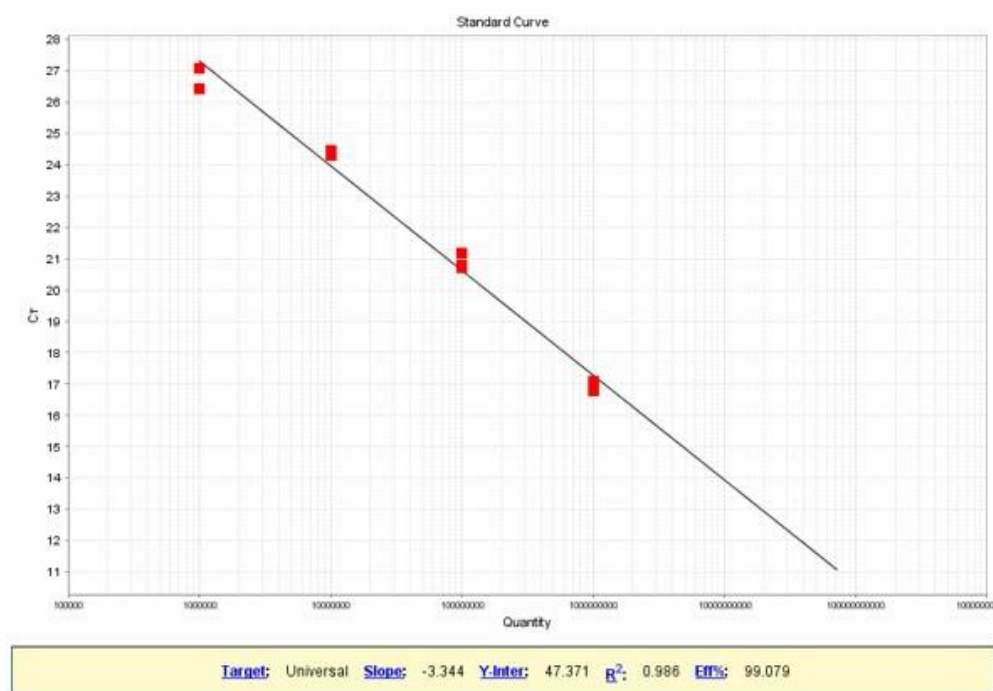
Γράφημα Π₁₂: Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση sulfamethoxazole για κάθε βακτηριακό στέλεχος της εκροής του υγροβιότοπου GB κατά τις 3 χρονικές περιόδους.



16S rRNA

Πίνακας Π13: Αλληλουχίες εκκινητών , κύκλοι αντίδρασης και περιεχόμενα αντίδρασης qPCR για την ανίχνευση του γονιδίου 16S rRNA (Dupont et al., 2014).

Primer Name	Primer sequence 5' —>3'	PCR product (bp)	PCR conditions	PCR cycles	Reaction mix 20 µL
8F (forward)	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	>1000	95 °C for 4 min		Master mix (2.0x)
			95 °C for 1 min	30 cycles	Primer F 500 nM
			55 °C for 30 sec		Primer R 500 nM
1492R (reverse)	GGTTACCTTGTTACGACTT		72 °C for 30 sec		
			95 °C for 15 sec		
			60 °C for 1 min		
			95 °C for 15 sec		

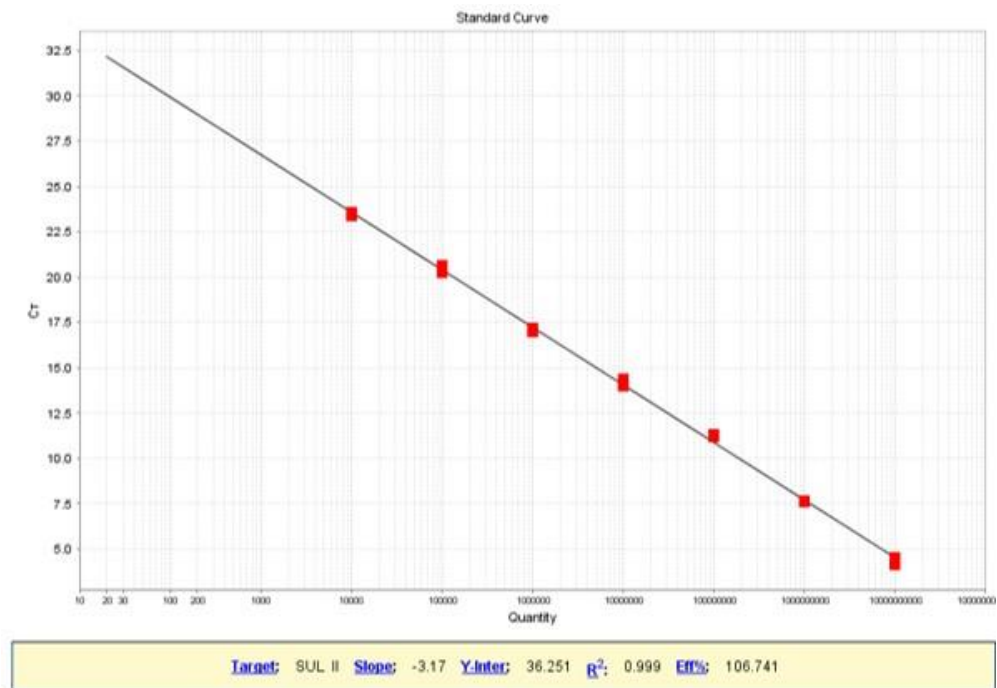


Εικόνα 12: Πρότυπη καμπύλη γονιδίου 16S rRNA

sul II

Πίνακας 10: Αλληλουχίες εκκινητών , κύκλοι αντίδρασης και περιεχόμενα αντίδρασης qPCR για την ανίχνευση του γονιδίου sul II (Kern et al., 2002).

Primer Name	Primer sequence 5' —>3'	PCR product (bp)	PCR conditions	PCR cycles	Reaction mix 20 µL
Sul2 F (forward)	GCGCTCAAGGCAGATGGCATT	293	94 °C for 5 min		Master mix (2.0x)
			94 °C for 15 sec	35 cycles	Primer F 200 nM
			69 °C for 30 sec		Primer R 200 nM
Sul2 R (reverse)	GCGTTTGATACCGGCACCCGT		72 °C for 1 min		
			95 °C for 15 sec		
			69 °C for 30 sec		
			95 °C for 15 sec		



Εικόνα 13: Πρότυπη καμπύλη γονιδίου sul II

ampC

Πίνακας 11: Αλληλουχίες εκκινητών , κύκλοι αντίδρασης και περιεχόμενα αντίδρασης qPCR για την ανίχνευση του γονιδίου ampC (Schwartz et al., 2003).

Primer Name	Primer sequence 5' —>3'	PCR product (bp)	PCR conditions	PCR cycles	Reaction mix 20 µL
ampC-F (forward)	TTCTATCAAMACTGGCARCC	550	94 °C for 5 min		Master mix (2.0x)
			94 °C for 30 sec	35 cycles	Primer F 200 nM
			49 °C for 30 sec		Primer R 200 nM
ampC-R (reverse)	CCYTTTATGTACCCAYGA		72 °C for 1 min		
			95 °C for 15 sec		
			60 °C for 1 min		
		95 °C for 15 sec			

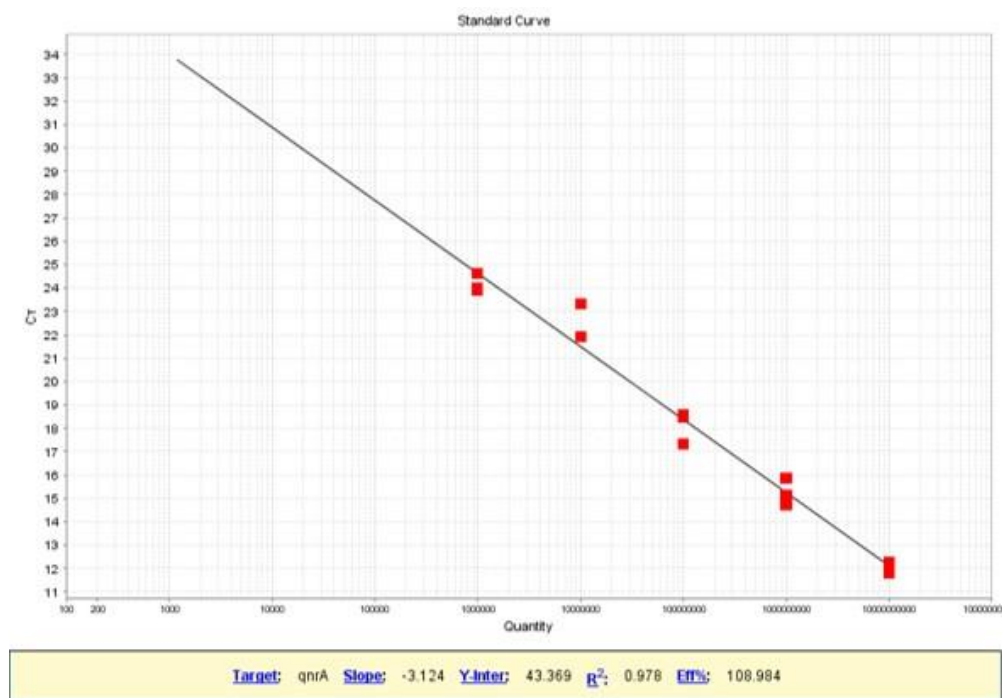


Εικόνα 14: Πρότυπη καμπύλη γονιδίου ampC

qnrA

Πίνακας 12: Αλληλουχίες εκκινήτων , κύκλοι αντίδρασης και περιεχόμενα αντίδρασης qPCR για την ανίχνευση του γονιδίου qnrA (Cummings et al., 2011, Rodríguez-Martínez et al., 2003).

Primer Name	Primer sequence 5' —>3'	PCR product (bp)	PCR conditions	PCR cycles	Reaction mix 20 µL
qnrA-F (forward)	GATAAAGTTTTTCAGCAAGAGG	543	95 °C for 5 min		Master mix (2.0x)
			94 °C for 1,5 min	35 cycles	Primer F 400 nM
			64 °C for 30 sec		Primer R 400 nM
qnrA-R (reverse)	ATC CAG ATCGGC AAA GGT TA		72 °C for 1 min		
95 °C for 15 sec					
64 °C for 1 min					
		95 °C for 15 sec			

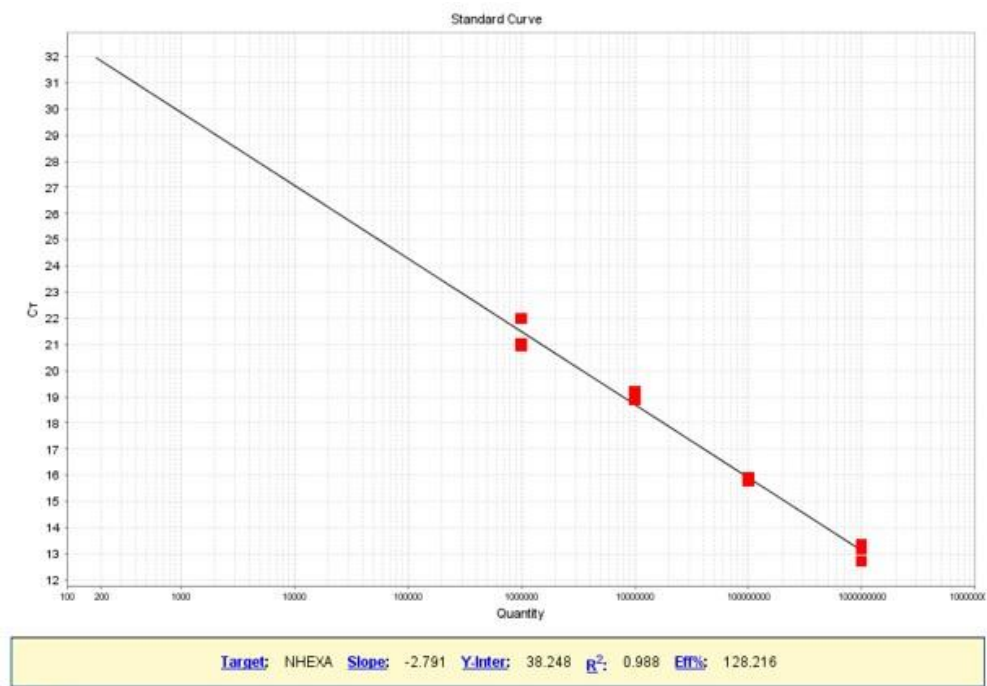


Εικόνα 15: Πρότυπη καμπύλη γονιδίου qnrA

Adenovirus

Πίνακας 13: Αλληλουχίες εκκινητών , κύκλοι αντίδρασης και περιεχόμενα αντίδρασης qPCR για την ανίχνευση του γονιδίου NHEX (Pina et al., 1998b).

Primer Name	Primer sequence 5' —>3'	PCR conditions	PCR cycles	Reaction mix 20 μ L
NHEXA	GCCACCGAGACGTACTTCAGCCTG	95 °C for 10 min	35 cycles	Master mix (2.0x)
		95 °C for 30 sec		Primer F 200 nM
		55 °C for 1 min		Primer R 200 nM
		72 °C for 1 min		DNA 2 μ L
		95 °C for 15 sec		
		55 °C for 30 sec		
		95 °C for 15 sec		



Εικόνα 20: Πρότυπη καμπύλη Adenovirus