



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΔΙΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ - ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΥΔΑΤΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ

**Ποιότητα Υδάτων &
Περιβαλλοντική
Τεχνολογία**

Πειραματική διερεύνηση του βαθμού εξουδετέρωσης
ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων κατά τη
χλωρίωση δευτεροβάθμια και τριτοβάθμια
επεξεργασμένων λυμάτων

Κόη Αγγελική - Μαρία

Αθήνα, 2024

**«ΕΠΙΣΤΗΜΗ &
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ
ΥΔΑΤΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ»**

Επιβλέπων Καθηγητής: Δ. Μαμάης

ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΔΙΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ – ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΥΔΑΤΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ»

*Πειραματική διερεύνηση του βαθμού εξουδετέρωσης ανθεκτικών στα
αντιβιοτικά βακτηρίων κατά τη χλωρίωση δευτεροβάθμια και τριτοβάθμια
επεξεργασμένων λυμάτων*

Κόη Αγγελική Μαρία

Αθήνα, 2024

Επιβλέπων Καθηγητής: Δ. Μαμάης

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

- 1. Μαμάης Δ., Καθηγητής, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο*
- 2. Νουτσόπουλος Κ., Καθηγητής, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο*
- 3. Χονδρός Μ., Επίκουρος Καθηγητής, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Καθηγητή του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, Δρ. Μαμάη Δανιήλ, Καθηγητή του Τμήματος Πολιτικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, για την επίβλεψη της παρούσας πτυχιακής εργασίας και για την ευκαιρία που μου έδωσε να την εκπονήσω στο Εργαστήριο Υγειονομικής Τεχνολογίας, Ε.Μ.Π.

Επίσης, ευχαριστώ ιδιαίτερα την υποψήφια Διδάκτορα Καλλή Μαρία, για την πολύτιμη καθοδήγηση, υπομονή και κατανόηση κατά τη διάρκεια των εργαστηριακών αναλύσεων καθώς επίσης, και για τη διαρκή υποστήριξη και καθοδήγηση κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας

Θερμές ευχαριστίες εκφράζονται επίσης, στους ερευνητές και εργαστηριακό προσωπικό, για την παραχώρηση των χώρων του εργαστηρίου Υγειονομικής Τεχνολογίας, Ε.Μ.Π., καθώς και για την καθοριστική συμβολή τους με τις πολύτιμες γνώσεις που προσέφεραν πάντα πρόθυμα όπως και για τη διαρκή καθοδήγηση κατά τη διεξαγωγή της έρευνας.

Ευχαριστίες επιπλέον, απευθύνω στους Υποψήφιους Διδάκτορες του Εργαστηρίου Υγειονομικής Τεχνολογίας, για την υπέροχη συνεργασία και καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης του εργαστηριακού σκέλους της παρούσας εργασίας.

Θερμές ευχαριστίες εκφράζονται επίσης στους Δρ. Νουτσόπουλο Κ. και Δρ. Χονδρό Μ. – Καθηγητές του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, μέλη της τριμελούς επιτροπής, για το χρόνο που αφιέρωσαν στην αξιολόγηση της εργασίας μου.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω θερμά την οικογένεια μου, για την ολόψυχη αγάπη και υποστήριξή τους καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου, καθώς και τους φίλους μου για τη συνεχή ηθική υποστήριξή τους.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μικροβιακή αντοχή (AMR) αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους κινδύνους που απειλούν την δημόσια υγεία τα τελευταία χρόνια. Η αδιάκριτη χρήση των αντιβιοτικών και η απελευθέρωσή τους στα υδάτινα συστήματα, προκαλεί την ανάπτυξη βακτηρίων ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά (ARB) και γονιδίων ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά (ARGs). Τα ARB και ARGs χαρακτηρίζονται ως αναδυόμενοι ρύποι και οδηγούν σε παγκόσμια προβλήματα υγείας. Οι συμβατικές εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων αποτελούν την κύρια πηγή ARB σε φυσικά υδάτινα σώματα. Οι εγκαταστάσεις βιολογικής επεξεργασίας αποτελούν μια δεξαμενή βακτηρίων που φιλοξενούν δυνητικά τα βακτήρια ανθεκτικότητας. Η χρήση των τεχνητών υγροβιότοπων (CWs) παρέχεται ως μια χαμηλού κόστους και βιώσιμη λύση για την επεξεργασία των λυμάτων, όσον αφορά την απομάκρυνση θρεπτικών ουσιών, παθογόνων και ARB, είτε ως αυτόνομη διαδικασία επεξεργασίας είτε όταν ενσωματώνεται με συμβατικά συστήματα επεξεργασίας. Επιπλέον, η χλωρίωση, μια ευρέως χρησιμοποιούμενη διαδικασία, ως μέθοδος απολύμανσης, διερευνάται εκτενώς ως προς την αποτελεσματικότητά της για την απομάκρυνση των ARB και ARG τα τελευταία χρόνια.

Στη παρούσα εργασία, συλλέχθηκαν δείγματα αστικών λυμάτων, κατά τη χειμερινή και την ανοιξιάτικη περίοδο, 2022-23, από 2 εγκαταστάσεις επεξεργασίας, με διαφορετικά στάδια επεξεργασίας. Στα δείγματα ανεπεξέργαστων, επεξεργασμένων και τελικών εκροών αναλύθηκαν, η παρουσία ανθεκτικών *E.coli* σε 5 αντιβιοτικά (αμοξικιλίνη, αμπικιλίνη, ερυθρομυκίνη, τετρακυκλίνη, σιπροφλοξασίνη) καθώς και η παρουσία ολικών κολοβακτηριδίων. Στα επεξεργασμένα δείγματα, πραγματοποιήθηκε πειραματική διερεύνηση του βαθμού εξουδετέρωσης των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων κατά τη χλωρίωση. Τα επεξεργασμένα λύματα, συγκρίθηκαν με πολλαπλές δόσεις χλωρίου και σταθερό χρόνο επαφής (30 λεπτά), για την απομάκρυνση των ARB στην αμπικιλίνη, τετρακυκλίνη, σιπροφλοξασίνη και ερυθρομυκίνη.

Η βιολογική δευτεροβάθμια επεξεργασία με ενεργό ιλύ επιτυγχάνει απομάκρυνση των πληθυσμών TC, *E.coli* και ARB με μείωση 2-3 log, και 98,97 – 100 % απομάκρυνση. Σημειώνεται ότι δεν παρατηρείται απομάκρυνση κατά την πρωτοβάθμια καθίζηση. Η εγκατάσταση UASB-CWs, απομακρύνει 0,8-1,3 log με το σύστημα UASB και με τον τεχνητό υγροβιότοπο 2,3-3,3 log. Στην εγκατάσταση UASB-CWs, μετρήθηκε συνολική απομάκρυνση 3 – 4.5 log με ποσοστιαία απομάκρυνση 99,89 – 100%. Σημειώνεται ότι σε ορισμένα δείγματα πραγματοποιήθηκε πλήρης απομάκρυνση (100%) των ARB σε αμπικιλίνη και τετρακυκλίνη.

Τα μεγαλύτερα ποσοστά ανθεκτικότητας σημείωσαν τα ARB στην ερυθρομυκίνη, στην αμπικιλίνη και στην αμοξικιλίνη που αποτελούσαν το 13%-50% των *E.coli* στα στάδια επεξεργασίας. Μικρότερα ποσοστά παρουσίας εμφάνισαν τα ARB στην

τετρακυκλίνη και την σιπροφλοξασίνη. Στα δείγματα της βιολογικής επεξεργασίας, τα ποσοστά μειώνονταν στην έξοδο της εγκατάστασης. Στα δείγματα της εγκατάστασης UASB – CWs, μόνο το ένα δείγμα ακολούθησε αυτή τη μείωση, καθώς στο δεύτερο δείγμα, ορισμένα βακτήρια παρουσίασαν αύξηση του ποσοστού ανθεκτικότητας (ερυθρομυκίνη από 13% σε 49% και αμοξυκιλλίνη από 10% σε 16%).

Για τα δείγματα από την εγκατάσταση της βιολογικής επεξεργασίας με ενεργό ιλύ τα εξεταζόμενα Ct ήταν 30, 35, 50 (mg Cl₂ min/L) και για τα δείγματα της εγκατάστασης UASB - CWs με Ct 15, 20 (mg Cl₂ min/L). Η απομάκρυνση για τους πληθυσμούς TC παρατηρήθηκε σε 1,4 - 3,3 log. Μέσω της αύξησης του Ct (mg Cl₂ min/L), προκαλείται αύξηση της απομάκρυνσης του πληθυσμού *E.coli* και ARB. Επιπλέον, το ποσοστό απομάκρυνσης στους πληθυσμούς *E.coli* και ARB που επιτεύχθηκε μέσω της διαδικασίας της χλωρίωσης αναλογούσε από 2-4 log με Ct 35 mg Cl₂ min/L έως 4 log με Ct 50 mg Cl₂ min/L. Για την εγκατάσταση UASB-CWs, παρατηρείται ότι με Ct 20 mg Cl₂ min/L επιτυγχάνεται πλήρης απομάκρυνση 3-4 log. Αντίστοιχα, για την εγκατάσταση της βιολογικής επεξεργασίας η απομάκρυνση είναι εμφανής στο Ct 50 mg Cl₂ min/L.

Στα δείγματα από την εγκατάσταση της βιολογικής επεξεργασίας, παρατηρήθηκε πλήρης απομάκρυνση για ARB στην τετρακυκλίνη στα Ct 50 και 35 mg Cl₂ min/L. Στα δείγματα από την εγκατάσταση UASB-CWs παρατηρείται πλήρης απομάκρυνση για όλα τα ARB στο πείραμα με Ct 20 mg Cl₂ min/L. Στο δείγμα με Ct 15 mg Cl₂ min/L, παρατηρείται πλήρης απομάκρυνση για ARB στην τετρακυκλίνη. Επιπλέον, για την κατανόηση της μεταφοράς και παρουσίας ανθεκτικότητας στο περιβάλλον, πραγματοποιήθηκε πείραμα ανακαλλιέργειας για τους πληθυσμούς των *E.coli* και των ARB στην αμικιλίνη. Σημειώνεται ότι παρατηρήθηκε αύξηση των πληθυσμών των ανθεκτικών βακτηρίων στα δείγματα από τις εξεταζόμενες εγκαταστάσεις (Ct/Ct >1).

Τέλος, σημειώνεται ότι οι τιμές των *E.coli* για τα εξεταζόμενα Ct (mg Cl₂ min/L), εμπίπτουν στα όρια της νομοθεσίας για περιορισμένη άρδευση, και οι τιμές στο πείραμα Ct 50 mg Cl₂ min/L, εμπίπτουν στα όρια της Ευρωπαϊκής νομοθεσίας (κατηγορία A). Η παρούσα εργασία, θέτει την ανάγκη καλύτερης κατανόησης της απόδοσης των τεχνολογιών επεξεργασίας (τόσο των συμβατικών συστημάτων όσο και των CW) και της χλωρίωσης, ως μέθοδος απολύμανσης, για τη μείωση των ARB από τα λύματα. Τα επεξεργασμένα λύματα διατίθενται στους υδάτινους αποδέκτες και άμεσα ή έμμεσα έρχονται σε επαφή με τον άνθρωπο και ως εκ τούτου, είναι σημαντικό να ερευνηθούν τα προβλήματα που σχετίζονται με την παρουσία AMR στα επεξεργασμένα λύματα και στις πιθανές στρατηγικές διαχείρισής τους.

Λέξεις Κλειδιά: ανθεκτικότητα βακτηρίων; αντιβιοτικά; απολύμανση λυμάτων; χλωρίωση

ABSTRACT

Antimicrobial resistance (AMR) is one of today's most important concerns of public health. Indiscriminate use of antibiotics and their release into the water bodies have been known to afflict the bacterial population of the ecosystem and cause the development of antibiotic resistance bacteria (ARB) and antibiotic resistance genes (ARGs). Antibiotic-resistant bacteria and genes are emerging contaminants leading to severe worldwide health problems. Conventional wastewater treatment plants provide a pathway for ARB to be released into natural water bodies. WWTPs based on activated sludge used in sewage treatment, constitute an important reservoir of enteric bacteria which harbor potentially transferable resistance bacteria. The use of constructed wetlands (CWs) has the potential to provide a low-cost solution for wastewater treatment, with respect to removal of nutrients, pathogens, ARB, either as a standalone treatment process or when integrated with conventional treatment systems. Additionally, chlorination, a widely used procedure, as a disinfection method, was extensively explored for its efficiency to remove ARB and ARGs, in recent years.

In this study, domestic wastewater samples were collected from 2 WWTPs, differing on the dimensions and bio-treatment processes. These samples were compared, in winter and spring seasons, during 2022-23. The occurrence of *E.coli* resistant to 5 antibiotics (amoxicillin, ampicillin, erythromycin, tetracycline, ciprofloxacin) as well as the presence of total coliforms were analyzed in untreated, treated, and final effluent wastewater samples. To enrich the analyses of chlorination, an experimental investigation was made, on the neutralization degree of antibiotic-resistant bacteria during chlorination, using secondary and tertiary treated wastewater. With multiple dosage of chlorine (1, 1.5, 2, 3 mg Cl₂/L) and constant contact time at 30 min, samples were compared for the loads of amoxicillin-, tetracycline, ciprofloxacin, and erythromycin -resistant bacteria in the treated effluents.

Secondary treatment with activated sludge, achieves removal of TC, *E.coli* and ARB with 2-3 log reduction, and 98.97 – 100 % removal. It is noted that no removal was observed during the primary sedimentation. In the UASB a removal of 0.8-1.3 log is observed, and a greater removal in the constructed wetland with 2.3-3.3 log. At UASB-CWs system, a removal of 3 – 4.5 log was observed with 99.89 – 100% removal. It is noted that a complete removal (100%) of the ampicillin and tetracycline ARBs was performed.

The highest rates of resistance marked ARBs in erythromycin, ampicillin and amoxicillin which constituted 13%-50% of *E.coli*. ARBs in tetracycline and ciprofloxacin showed lower percentages of presence. In the biological treatment, the rates decreased at the effluents. In samples from the UASB – CWs system, only one sample followed this

reduction, as in the second sample, some bacteria showed an increase in the rate of resistance (erythromycin from 13% to 49% and amoxicillin from 10% to 16%).

In the examined samples, the general parameters were analyzed without showing extreme values. For the biological treatment plant with activated sludge samples, tested Ct were 30, 35, 50 (mg Cl₂ min/L) and for the UASB - CWs system samples, tested Ct were 15, 20 (mg Cl₂ min/L). The removal, in the chlorinated samples, for the TC populations was observed at 1.4 - 3.3 log. By increasing Ct (mg Cl₂ min/L), an increase in the removal of *E.coli* and ARB population is caused. In addition, the removal of *E.coli* and ARB populations achieved through the chlorination process ranged from 2-4 log (Ct 35 mg Cl₂ min/L) 4 log (Ct 50 mg Cl₂ min/L). For the UASB-CWs system, it is observed that with Ct 20mg Cl₂ min/L, a complete removal is achieved (3-4 log). Accordingly, for the biological treatment plant, the removal is occurring with Ct 50 mg Cl₂ min/L.

In samples from the biological treatment plant, a complete removal was observed for ARBs in tetracycline at Ct 50 and 35 mg Cl₂ min/L. Samples from the UASB-CWs system showed complete removal for all ARBs with Ct 20 mg Cl₂ min/L. In the sample with Ct 15 mg Cl₂ min/L, complete removal is observed only for ARBs in tetracycline. In addition to understanding the transfer of resistance in the environment, a regrowth experiment was performed for *E.coli* and ARB populations in ampicillin. It is noted that an increase in ARB populations was observed in samples from both systems.

It is noted that the values for the examined Ct (mg Cl₂ min/L) fall within the limits of the legislation for limited irrigation, and the experiment Ct (50 mg Cl₂ min/L), fall within the limits of the European legislation (category A). The present study promotes a better understanding of the performance efficiency of treatment technologies (both conventional systems and CWs) and chlorination as a disinfection method, for the reduction of ARB from wastewater. The treated effluents from WWTPs are discharged into water bodies and can directly or indirectly affect the population of any region. Therefore, it is essential to focus on the problems associated with the AMR present in the treated effluent and their possible mitigation strategies.

Keywords: antibiotic-resistant bacteria; wastewater; disinfection; chlorination

Πίνακας περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	ii
ABSTRACT.....	iv
1. Εισαγωγή	1
2. Βιβλιογραφική ανασκόπηση	3
2.1. Αντιμικροβιακή αντοχή.....	4
2.2. Βακτήρια ανθεκτικά στα αντιβιοτικά	5
2.2.1. Αντιβιοτικά.....	6
Πηγές αντιβιοτικών στο περιβάλλον	8
Κατηγορίες αντιβιοτικών	10
Μηχανισμοί δράσης αντιβιοτικών και μηχανισμοί αντιβιοτικής αντίστασης	11
2.2.2. Μηχανισμοί μεταφοράς ανθεκτικότητας	13
2.2.3. Ουσίες που ενισχύουν τη μεταφορά ανθεκτικότητας	15
2.3. Παρουσία και μεταφορά ανθεκτικών βακτηρίων στο περιβάλλον	17
2.3.1. Παρουσία ανθεκτικών βακτηρίων στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων	18
2.3.2. Συστήματα βιολογικής επεξεργασίας λυμάτων	21
UASB.....	24
Τεχνητοί Υγροβιότοποι.....	24
Συστήματα τριτοβάθμιας επεξεργασίας.....	26
2.3.3. Μέθοδοι απολύμανσης.....	28
Χλωρίωση	28
2.4. Διάθεση και επαναχρησιμοποίηση λυμάτων.....	32
2.5. Νομοθετικό πλαίσιο.....	34
2.6. Στόχοι εργασίας	42
3. Μεθοδολογία	43
3.1. Συστήματα μελέτης	43
Εγκατάσταση επεξεργασίας λυμάτων Ψυτάλειας.....	45
Εγκατάσταση επεξεργασίας λυμάτων Άντισσας	47
3.2. Είδος μελέτης	51
<i>Escherichia coli</i>	52
3.3. Εξεταζόμενα αντιβιοτικά.....	54

3.4. Εργαστηριακή ανάλυση.....	58
3.4.1. Μετρήσεις γενικών παραμέτρων δειγμάτων	59
3.4.2. Προετοιμασία πειραμάτων.....	70
Εργαστηριακές προφυλάξεις	70
Προετοιμασία τρυβλίων.....	71
3.4.3. Πειράματα χλωρίωσης	75
Προετοιμασία απολυμαντικού μέσου	75
Προπείραμα.....	76
Χλωρίωση δειγμάτων	77
Αποχλωρίωση δειγμάτων.....	78
3.4.4. Μικροβιολογική ανάλυση	79
3.4.4.1 Πείραμα Regrowth.....	87
3.5. Υπολογισμός αποτελεσμάτων	88
4. Αποτελέσματα	91
4.1. Στάδια επεξεργασίας εγκαταστάσεων	91
4.2. Πείραμα βαθμού εξουδετέρωσης ανθεκτικών βακτηρίων με χλωρίωση	108
4.2.1. Μετρήσεις γενικών παραμέτρων δειγμάτων	108
4.2.2. Προπείραμα.....	110
4.2.3. Πείραμα χλωρίωσης δειγμάτων – Μικροβιολογικής ανάλυσης	118
4.2.4. Πείραμα Regrowth	132
5. Συμπεράσματα.....	136
6. Βιβλιογραφία.....	141
7. Παράρτημα	168

EYPETHPIO EIKONΩN

Εικόνα 2.1. Πηγές αντιβιοτικών στο περιβάλλον (Harbarth et al., 2015).	9
Εικόνα 2.2. Δράση των αντιβιοτικών και μηχανισμοί ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά (Wright, 2010).	12
Εικόνα 2.3. Μέθοδοι οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων (Mosaka et al., 2023).	14
Εικόνα 3.1.1. Εγκατάσταση Άντισσας (α), εγκατάσταση Ψυττάλειας (β) στο χάρτη.	44
Εικόνα 3.1.2. Κέντρο Επεξεργασίας Λυμάτων Ψυττάλειας (ΚΕΛΨ) (Ε.ΥΔ.ΑΠ. - eydap.gr)	48
Εικόνα 3.1.3. Εγκατάσταση επεξεργασίας Λυμάτων Άντισσας (α) και σχεδιάγραμμα κάτοψης εγκατάστασης (β) (HYDROUSA - hydrousa.org)	50
Εικόνα 3.1.4. Επεξεργασία λυμάτων σε μικρή κλίμακα και κυκλική οικονομία (Πηγή: Αποκεντρωμένη Διαχείριση Λυμάτων & Συστήματα, Επεξεργασίας Μικρής Κλίμακας, Κ. Νουτσόπουλος – Σ. Μαλαμής, Ακαδ. Έτος 2022-23).	51
Εικόνα 3.2.1. Κατηγοριοποίηση Total coliforms (maine.gov).	55
Εικόνα 3.4.1.1. Συσκευή μέτρησης pH.	61
Εικόνα 3.4.1.2. Συσκευή χώνευσης για μέτρηση COD (mg/l).	63
Εικόνα 3.4.1.3. Συσκευή μέτρησης διαλυμένου οξυγόνου DO (mg/L).	64
Εικόνα 3.4.1.4. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση του Fe ²⁺ .	68
Εικόνα 3.4.1.5. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση του NH ₄ ⁺ -N	69
Εικόνα 3.4.2.1. Συσκευή αποστείρωσης.	70
Εικόνα 3.4.2.2. Chromogenic Coliform Agar.	72
Εικόνα 3.4.2.3. Υδατόλουτρο.	72
Εικόνα 3.4.2.4. Tryptic Soy Agar.	74
Εικόνα 3.4.3.1. Συσκευή φασματοφωτομέτρου.	76

Εικόνα 3.4.3.2. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την εύρεση υπολειμματικού χλωρίου.	77
Εικόνα 3.4.4.1. Σχεδιάγραμμα μεθόδου φίλτρανσης μέσω μεμβρανών (biologyreader.com).	79
Εικόνα 3.4.4.2. Δοκιμαστικοί σωλήνες που χρησιμοποιούνταν σε αραιώσεις των δειγμάτων.	80
Εικόνα 3.4.4.3. Συσκευή μέτρησης αποικιών βακτηρίων.	85
Εικόνα. 3.4.4.4. <i>E.coli</i> και coliforms σε καλλιέργεια τρυβλίων Petri.	86
Εικόνα 3.4.4.5. Καλλιέργεια δειγμάτων σε τρυβλία Petri.	87

Γράφημα 3.1.1. Στάδια επεξεργασίας εγκαταστάσεων και δείγματα που λήφθηκαν στην εγκατάσταση της Ψυττάλειας (α) και στην εγκατάσταση της Άντισσας (β).	46
Γράφημα 3.3.2 Κατανάλωση αντιβιοτικών στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης (EU/EEA, 2019).	55
Γράφημα 4.1.1. Πληθυσμοί ολικών κολοβακτηρίων (CFU/100ml) στα στάδια της εγκατάστασης της Ψυττάλειας.	92
Γράφημα 4.1.2. Πληθυσμοί ολικών κολοβακτηρίων (CFU/100ml) στα στάδια της εγκατάστασης της Άντισσας.	92
Γράφημα 4.1.3. Απομάκρυνση ολικών κολοβακτηριδίων κατά τα στάδια επεξεργασίας εγκαταστάσεων Ψυττάλειας.	93
Γράφημα 4.1.4. Απομάκρυνση ολικών κολοβακτηριδίων κατά τα στάδια επεξεργασίας εγκαταστάσεων Άντισσας.	94
Γράφημα 4.1.5. Συνολική απομάκρυνση ολικών κολοβακτηριδίων στις εξεταζόμενες εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων (ΚΕΛΨ - Ψυττάλεια και CW - Άντισσα).	95
Γράφημα 4.1.6. Ποσοστό <i>E.coli</i> που περιείχαν τα ολικά κολοβακτηρίδια κατά τα στάδια επεξεργασίας των δύο εγκαταστάσεων.	96
Γράφημα 4.1.7. Πληθυσμοί <i>E.coli</i> και ανθεκτικών <i>E.coli</i> στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά, κατά τα στάδια επεξεργασίας, της εγκατάστασης στη Ψυττάλεια.	97
Γράφημα 4.1.8. Πληθυσμοί <i>E.coli</i> και ανθεκτικών <i>E.coli</i> στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά, κατά τα στάδια επεξεργασίας, της εγκατάστασης στην Άντισσα.	98
Γράφημα 4.1.9. Λογαριθμική μείωση πληθυσμών <i>E.coli</i> και ανθεκτικών <i>E.coli</i> στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά, κατά τα στάδια επεξεργασίας, της εγκατάστασης στη Ψυττάλεια.	99
Γράφημα 4.1.10. Λογαριθμική μείωση πληθυσμών <i>E.coli</i> και ανθεκτικών <i>E.coli</i> στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά, κατά τα στάδια επεξεργασίας, της εγκατάστασης στην Άντισσα.	100
Γράφημα 4.1.11. Λογαριθμική μείωση πληθυσμών <i>E.coli</i> και ανθεκτικών <i>E.coli</i> στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά, στις δύο εξεταζόμενες εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων.	100

Γράφημα 4.1.12. Ποσοστό απομάκρυνσης <i>E.coli</i> και ανθεκτικών <i>E.coli</i> στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά, στις δύο εξεταζόμενες εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων.	101
Γράφημα 4.1.13. Ποσοστό ανθεκτικότητας <i>E.coli</i> στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά κατά στάδια της εγκατάστασης επεξεργασίας λυμάτων Ψυττάλειας.	105
Γράφημα 4.1.14. Ποσοστό ανθεκτικότητας <i>E.coli</i> στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά κατά τα στάδια της εγκατάστασης επεξεργασίας λυμάτων Άντισσας.	106
Γράφημα 4.2.2.1. Πλήθος ολικών βακτηρίων πριν και μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης στα προπειράματα.	111
Γράφημα 4.2.2.2. Λογαριθμική απεικόνιση του πλήθους των <i>E.coli</i> και των ανθεκτικ <i>E.coli</i> (CFU/100ml) στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά, πριν και μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης στα προπειράματα, σύμφωνα με τα εξεταζόμενα Ct (mg Cl ₂ min/L) (α) 20 Ct (mg Cl ₂ min/L), (β) 35 Ct (mg Cl ₂ min/L).	112
Γράφημα 4.2.2.3. Ποσοστό ανθεκτικότητας των ανθεκτικών <i>E.coli</i> στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά, πριν και μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης στο προπείραμα με 20 Ct (mg Cl ₂ min/L).	113
Γράφημα 4.2.2.4. Ποσοστό ανθεκτικότητας των ανθεκτικών <i>E.coli</i> στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά, πριν και μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης στο προπείραμα με 20 Ct (mg Cl ₂ min/L).	114
Γράφημα 4.2.2.5. Λογαριθμική μείωση στα προπειράματα μετά την διαδικασία της χλωρίωσης για 20 Ct (mg Cl ₂ min/L) και 35 Ct (mg Cl ₂ min/L).	114
Γράφημα 4.2.2.6. Ποσοστό απομάκρυνσης στα προπειράματα μετά την διαδικασία της χλωρίωσης για 20 Ct (mg Cl ₂ min/L) και 35 Ct (mg Cl ₂ min/L).	115
Γράφημα 4.2.2.7. Πλήθος <i>E.coli</i> και ανθεκτικών <i>E.coli</i> στο αντιβιοτικό της αμπικιλίνης μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης και μετά το πείραμα της ανακαλλιέργειας για (α) Ct 20 mg Cl ₂ min/L και (β) για Ct 35 mg Cl ₂ min/L.	116
Γράφημα 4.2.2.8. Λόγος ανακαλλιέργειας Cr/Ct, που υπολογίστηκε στα εξεταζόμενα δείγματα των προπειραμάτων.	117
Γράφημα 4.2.3.1. Πλήθος ολικών βακτηρίων πριν και μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης στα εξεταζόμενα δείγματα.	119
Γράφημα 4.2.3.2. Λογαριθμική μείωση των ολικών κολοβακτηρίων στα εξεταζόμενα δείγματα.	120
Γράφημα 4.2.3.3. Ποσοστό <i>E.coli</i> που περιείχαν τα ολικά κολοβακτηρίδια στα εξεταζόμενα δείγματα πριν και μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης.	121

Γράφημα 4.2.3.4. Λογαριθμική απεικόνιση του πλήθους των <i>E.coli</i> και των ανθεκτικών <i>E.coli</i> (CFU/100ml) στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά, πριν και μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης, σύμφωνα με τα εξεταζόμενα Ct (mg Cl ₂ min/L) (α) 30 Ct (mg Cl ₂ min/L), (β)35 Ct (mg Cl ₂ min/L) και (γ) 50 Ct (mg Cl ₂ min/L).	122
Γράφημα 4.2.3.5. Ρυθμός μείωσης των των <i>E.coli</i> και των ανθεκτικών <i>E.coli</i> στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά με την αύξηση του Ct (mg Cl ₂ min/L για την εγκατάσταση Ψυττάλειας.	123
Γράφημα 4.2.3.6. Λογαριθμική απεικόνιση του πλήθους των <i>E.coli</i> και των ανθεκτικών <i>E.coli</i> (CFU/100ml) στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά, πριν και μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης, σύμφωνα με τα εξεταζόμενα Ct (mg Cl ₂ min/L) (α) 15 Ct (mg Cl ₂ min/L), (β) 20 Ct (mg Cl ₂ min/L).	125
Γράφημα 4.2.3.7. Ρυθμός μείωσης των των <i>E.coli</i> και των ανθεκτικών <i>E.coli</i> στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά με την αύξηση του Ct (mg Cl ₂ min/L) για την εγκατάσταση Άντισσας.	126
Γράφημα 4.2.3.8. Λογαριθμική μείωση των <i>E.coli</i> και των ανθεκτικών <i>E.coli</i> στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά στις δύο εγκαταστάσεις.	127
Γράφημα 4.2.3.9. Ποσοστό απομάκρυνσης των <i>E.coli</i> και των ανθεκτικών <i>E.coli</i> στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά στις δύο εγκαταστάσεις.	128
Γράφημα 4.2.3.10. Ποσοστό ανθεκτικότητας στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά (αμπικιλίνη τετρακυκλίνη ερυθρομυκίνη και σιπροφλοξασίνη), στην εγκατάσταση της Ψυττάλειας, πριν και μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης, σύμφωνα με τα εξεταζόμενα Ct (mg Cl ₂ min/L) (α) 30 Ct (mg Cl ₂ min/L), (β)35 Ct (mg Cl ₂ min/L) και (γ) 50 Ct (mg Cl ₂ min/L)..	130
Γράφημα 4.2.3.11. Ποσοστό ανθεκτικότητας στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά (αμπικιλίνη τετρακυκλίνη ερυθρομυκίνη και σιπροφλοξασίνη), στην εγκατάσταση της Άντισσας, πριν και μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης (α) 15 Ct (mg Cl ₂ min/L), (β) 20 Ct (mg Cl ₂ min/L)..	131
Γράφημα 4.2.4.1. Πλήθος <i>E.coli</i> και ανθεκτικών <i>E.coli</i> στο αντιβιοτικό της αμπικιλίνης μετά το πείραμα της ανακαλλιέργειας για τα εξεταζόμενα Ct (mg Cl ₂ min/L).	133
Γράφημα 4.2.4.2. Λόγος ανακαλλιέργειας Cr/Ct <i>E.coli</i> και ανθεκτικών στην αμπικιλίνη <i>E.coli</i> , που υπολογίστηκε στα εξεταζόμενα δείγματα.	134

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 2.1. Σύνοψη νομοθεσιών ορίων επαναχρησιμοποίησης.	36
Πίνακας 2.2. Κατηγορίες ποιότητας του ανακτημένου νερού και επιτρεπόμενη γεωργική χρήση και μέθοδος άρδευσης (EU) 2020/741).	37
Πίνακας 2.3. Παρακολούθηση για επικύρωση του ανακτημένου νερού για γεωργική άρδευση(EU) 2020/741).	38
Πίνακας 2.4. Απαιτήσεις ποιότητας του ανακτημένου νερού για γεωργική άρδευση (EU) 2020/741).	39
Πίνακας 3.1.1. Χαρακτηριστικά εξεταζόμενων εγκαταστάσεων.	45
Πίνακας 3.3.1. Minimal Inhibitory Concentration Interpretive Standards for Enterobacterales (C.L.S.I., 2020).	57
Πίνακας 3.3.2. Συγκεντρώσεις MIC breakpoints (mg/L), που λήφθηκαν στο πείραμα.	58
Πίνακας 3.4.1. Γενικά χαρακτηριστικά δειγματοληψιών στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν.	59
Πίνακας 3.4.2. 1. Τιμές διαλυμάτων stock αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση.	75
Πίνακας 3.4.4.1. Αραιώσεις δειγμάτων κατά τα στάδια επεξεργασίας Ψυττάλειας.	81
Πίνακας 3.4.4.2. Αραιώσεις χλωριωμένων δειγμάτων Ψυττάλειας.	81
Πίνακας 3.4.4.3. Αραιώσεις δειγμάτων για το πείραμα ανακαλλιέργειας της Ψυττάλειας.	82
Πίνακας 3.4.4.4. Αραιώσεις δειγμάτων για τα στάδια επεξεργασίας της Άντισσας	82
Πίνακας 3.4.4.5. Αραίωσης για τα χλωριωμένα δείγματα της Άντισσας.	83
Πίνακας 3.4.4.6. Αραιώσεις για το πείραμα ανακαλλιέργειας στην Άντισσα.	83
Πίνακας 4.2.1.1. Γενικές παράμετροι στα εξεταζόμενα δείγματα της εγκατάστασης Ψυττάλειας.	108
Πίνακας 4.2.1.2. Γενικές παράμετροι στα εξεταζόμενα δείγματα της εγκατάστασης Άντισσας.	109
Πίνακας 4.2.3.1. Δεδομένα πειραμάτων χλωρίωσης.	118
Πίνακας 4.2.3.2. Ρυθμός μείωσης των των <i>E.coli</i> και των ανθεκτικών <i>E.coli</i> στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά.	124

Πίνακας 7.1.1. Πλήθος ολικών κολοβακτηριδίων κατά τα στάδια επεξεργασίας των δύο εγκαταστάσεων.	167
Πίνακας 7.1.2. Ποσοστό απομάκρυνσης και λογαριθμική μείωση ολικών κολοβακτηριδίων κατά τα στάδια επεξεργασίας των δύο εγκαταστάσεων.	167
Πίνακας 7.1.3. Ποσοστό απομάκρυνσης και λογαριθμική μείωση ολικών κολοβακτηριδίων στις δύο εγκαταστάσεις.	168
Πίνακας 7.1.4. Ποσοστό <i>E.coli</i> που περιείχαν τα ολικά κολοβακτηρίδια κατά τα στάδια επεξεργασίας των δύο εγκαταστάσεων.	168
Πίνακας 7.1.5. Στάδια επεξεργασίας εγκαταστάσεων Ψυττάλειας 1 (Πλήθος <i>E.coli</i> και ανθεκτικών στα αντιβιοτικά <i>E.coli</i>)	168
Πίνακας 7.1.6. Στάδια επεξεργασίας εγκαταστάσεων Ψυττάλειας 2 (Πλήθος <i>E.coli</i> και ανθεκτικών στα αντιβιοτικά <i>E.coli</i>)	169
Πίνακας 7.1.7. Στάδια επεξεργασίας εγκαταστάσεων Άντισσας 1 (Πλήθος <i>E.coli</i> και ανθεκτικών στα αντιβιοτικά <i>E.coli</i>)	169
Πίνακας 7.1.8. Στάδια επεξεργασίας εγκαταστάσεων Άντισσας 2 (Πλήθος <i>E.coli</i> και ανθεκτικών στα αντιβιοτικά <i>E.coli</i>)	169
Πίνακας 7.1.9. Λογαριθμική μείωση <i>E.coli</i> στις δύο εξεταζόμενες εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων	170
Πίνακας 7.1.10. Ποσοστό απομάκρυνσης <i>E.coli</i> και ανθεκτικών στα αντιβιοτικά <i>E.coli</i> στις δύο εξεταζόμενες εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων.	170
Πίνακας 7.1.11. Ποσοστό ανθεκτικότητας <i>E.coli</i> στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά κατά τα στάδια της εγκατάστασης επεξεργασίας λυμάτων Ψυττάλειας.	170
Πίνακας 7.1.12. Ποσοστό ανθεκτικότητας <i>E.coli</i> στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά κατά τα στάδια της εγκατάστασης επεξεργασίας λυμάτων Άντισσας.	171
Πίνακας 7.2.1.1. Δεδομένα προπειραμάτων χλωρίωσης.	171
Πίνακας 7.2.1.2. Πλήθος ολικών κολοβακτηριδίων στα δύο εξεταζόμενα Ct (mg Cl ₂ min/L) των προπειραμάτων.	172
Πίνακας 7.2.1.3. Πλήθος, ποσοστό απομάκρυνσης, λογαριθμική μείωση του πλήθους των βακτηρίων <i>E.coli</i> λόγω της διαδικασίας της χλωρίωσης και ποσοστά ανθεκτικότητας στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά πριν και μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης για Ct 20 mg Cl ₂ min/L.	172
Πίνακας 7.2.1.4. Πλήθος, ποσοστό απομάκρυνσης, λογαριθμική μείωση του πλήθους των βακτηρίων <i>E.coli</i> λόγω της διαδικασίας της χλωρίωσης και ποσοστά	173

ανθεκτικότητας στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά πριν και μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης για Ct 35 mg Cl ₂ min/L.	
Πίνακας 7.2.1.5. Πλήθος <i>E.coli</i> και ανθεκτικών <i>E.coli</i> στην αμπικιλίνη (CFU/100 ml) κατά το πείραμα ανακαλλιέργειας για τα Ct (mg Cl ₂ min/L) των προπειραμάτων.	173
Πίνακας 7.2.1.6. Λόγος Ct/Ct των <i>E.coli</i> και των ανθεκτικών <i>E.coli</i> στην αμπικιλίνη (CFU/100 ml) κατά το πείραμα ανακαλλιέργειας για τα Ct (mg Cl ₂ min/L) των προπειραμάτων.	173
Πίνακας 7.2.2.1. Δεδομένα πειραμάτων χλωρίωσης.	174
Πίνακας 7.2.2.2. Πλήθος ολικών κολοβακτηριδίων στα δύο εξεταζόμενα Ct (mg Cl ₂ min/L) των πειραμάτων.	174
Πίνακας 7.2.2.3. Ποσοστό <i>E.coli</i> που περιείχαν τα ολικά κολοβακτηρίδια στα εξεταζόμενα δείγματα πριν και μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης.	175
Πίνακας 7.2.2.4. Πλήθος <i>E.coli</i> πριν τη διαδικασία της χλωρίωσης για τα εξεταζόμενα Ct (mg Cl ₂ min/L).	175
Πίνακας 7.2.2.5. Πλήθος <i>E.coli</i> μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης για τα εξεταζόμενα Ct (mg Cl ₂ min/L).	176
Πίνακας 7.2.2.6. Ποσοστό απομάκρυνσης <i>E.coli</i> μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης για τα εξεταζόμενα Ct (mg Cl ₂ min/L).	176
Πίνακας 7.2.2.7. Λογαριθμική μείωση, για τα εξεταζόμενα Ct (mg Cl ₂ min/L).	177
Πίνακας 7.2.2.8. Ρυθμός μείωσης K, για τα εξεταζόμενα Ct (mg Cl ₂ min/L).	177
Πίνακας 7.2.2.9. Ποσοστό ανθεκτικότητας <i>E.coli</i> στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά, πριν τη διαδικασία της χλωρίωσης για τα εξεταζόμενα Ct (mg Cl ₂ min/L).	177
Πίνακας 7.2.2.10. Ποσοστό ανθεκτικότητας <i>E.coli</i> στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά, μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης για τα εξεταζόμενα Ct (mg Cl ₂ min/L).	178
Πίνακας 7.2.3.1. Πλήθος <i>E.coli</i> και ανθεκτικών <i>E.coli</i> στην αμπικιλίνη (CFU/100 ml) κατά το πείραμα ανακαλλιέργειας για τα Ct (mg Cl ₂ min/L) των πειραμάτων.	179
Πίνακας 7.2.3.2. Λόγος Ct/Ct των <i>E.coli</i> και των ανθεκτικών <i>E.coli</i> στην αμπικιλίνη (CFU/100 ml) κατά το πείραμα ανακαλλιέργειας για τα Ct (mg Cl ₂ min/L) των πειραμάτων.	180

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ΕΕΛ (WWTP)	Εγκατάσταση Επεξεργασίας Λυμάτων (Wastewater treatment plant)
Ι.π. (IE)	Ισοδύναμος πληθυσμός (Inhabitant equivalents)
ΠΟΥ (WHO)	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας
AMP	Ampicillin (Αμπικιλίνη)
AMR	Antimicrobial resistance (Αντιμικροβιακή αντοχή)
AMX	Amoxicillin (Αμοξικιλίνη)
ARB	Antibiotic Resistant Bacteria (Βακτήρια ανθεκτικά σε αντιβιοτικό)
ARGs	Antibiotic Resistant Genes (Γονίδια ανθεκτικά στα αντιβιοτικά)
AOPs	Advanced Oxidation Processes
ATP	Adenosine triphosphate (Τριφωσφορική αδενοσίνη)
BOD	Biochemical oxygen demand (Βιοχημικά απαιτούμενο οξυγόνο)
CIP	Ciprofloxacin (Σιπροφλοξασίνη)
COD	Chemical oxygen demand (Χημικά απαιτούμενο οξυγόνο)
CW	Constructed wetland (Τεχνητός Υγροβιότοπος)
DO	Dissolved oxygen (Διαλυμένο οξυγόνο)
EC	<i>Escherichia coli</i>
E.C.D.C.	European Centre for Disease Prevention and Control (Ευρωπαϊκό Κέντρο Πρόληψης και Ελέγχου Νοσημάτων)
EOCs	Emerging Organic Contaminants (Αναδύμενοι Οργανικοί Ρύποι)
ERY	Erythromycin (Ερυθρομυκίνη)
FWS	Free Water Surface (constructed wetland)
HF	Horizontal flow (subsurface flow constructed wetland)
HGT	Horizontal gene transfer (Οριζόντια μεταφορά γονιδίων)
MF	Membrane filtration (Φίλτρα μεμβράνης)
MP	Micropollutant (Μικρορύποι)

MPs	Microplastics (Μικροπλαστικά)
MRB	Multiresistant Bacteria (Βακτήρια ανθεκτικά σε παραπάνω από ένα αντιβιοτικό)
NPs	Nanoplastics (Νανοπλαστικά)
PE	Polyethylene (Πολυαιθυλένιο)
PP	Polypropylene (Πολυπροπυλένιο)
PS	Polystyrene (Πολυστυρένιο)
SAT	Saturated (Κορεσμένος)
SF	Sand filtration (Φίλτρα άμμου)
SSF	Sub-surface flow (constructed wetland)
T	Temperature (Θερμοκρασία)
TC	Total coliform (Ολικά κολοβακτηρίδια)
TET	Tetracycline (Τετρακυκλίνη)
TOC	Total organic carbon (Συνολικός οργανικός άνθρακας)
TSS	Total Suspended Solids (Ολικά αιωρούμενα στερεά)
UASB	Upflow anaerobic sludge blanket (Αντιδραστήρας αναερόβιας χώνευσης)
UNSAT	Unsaturated (Ακόρεστος)
UV	Ultraviolet (Υπεριώδης)
VF	Vertical flow (subsurface flow constructed wetland)
VSSF	Vertical Sub-surface Flow (constructed wetland)

1. Εισαγωγή

Η πίεση των υδατικών πόρων, αυξάνεται συνεχώς σύμφωνα με παγκόσμιες έρευνες και προέρχεται κυρίως από ανθρωπογενείς πηγές. Η μόλυνση του υδροφόρου ορίζοντα, προέρχεται κυρίως από οικίες, βιομηχανίες, νοσοκομειακές μονάδες, αγροτικές, κτηνοτροφικές και άλλες δραστηριότητες, αποτελώντας ένα αρκετά σημαντικό ζήτημα προς έρευνα, με την επιστημονική κοινότητα να εξετάζει ενδελεχώς, ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια, τις επιπτώσεις που ενδέχεται να προκαλεί για το περιβάλλον και τη δημόσια υγεία.

Η ανθεκτικότητα των βακτηρίων στα αντιβιοτικά και η μεταφορά τους στο περιβάλλον μέσω των υδάτινων συστημάτων, αναδεικνύεται ως ένα κρίσιμο ζήτημα σε παγκόσμιο επίπεδο και έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας. Προκειμένου να αντιμετωπιστεί το ζήτημα αυτό, είναι σημαντικό να ληφθούν άμεσα μέτρα για την πρόληψη της εξάπλωσης των ανθεκτικών βακτηρίων και των ανθεκτικών γονιδίων στο φυσικό περιβάλλον.

Οι εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων, διαθέτουν ιδανικές συνθήκες ανάπτυξης βακτηρίων που είναι ανθεκτικά στα αντιβιοτικά ευνοώντας την παρουσία και τη μεταφορά τους. Τα βακτήρια δεν απομακρύνονται πλήρως από τις εγκαταστάσεις, καθώς τα στάδια επεξεργασίας δεν είναι σχεδιασμένα για την απόλυτη μείωση του πληθυσμού τους. Επιπλέον, ακόμα και σε εγκαταστάσεις που διαθέτουν συστήματα τριτοβάθμιας επεξεργασίας και απολύμανσης, τα ανθεκτικά γονίδια των βακτηρίων αυτών, είναι εφικτό να μην καταστραφούν πλήρως και να διοχετευτούν στο περιβάλλον. Επίσης, η αυξημένη παρουσία αντιβιοτικών στις εγκαταστάσεις, προάγει την οριζόντια μεταφορά των γονιδίων ανθεκτικότητας μεταξύ του πληθυσμού των βακτηρίων, ενισχύοντας την παρουσία τους.

Οι αποδέκτες των εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων είναι συνήθως θάλασσες, ποτάμια, λίμνες ή και υπόγεια ύδατα, οπότε και η επιβάρυνση του περιβάλλοντος των συστημάτων αυτών, με βακτήρια και γονίδια ανθεκτικά στα αντιβιοτικά, είναι άμεση. Επιπλέον, σε ορισμένες περιπτώσεις πραγματοποιείται επαναχρησιμοποίηση των λυμάτων για γεωργική χρήση (άρδευση), τροφοδότηση υπόγειων υδροφόρων, βιομηχανική, αστική και περιαστική χρήση. Άρα, με σκοπό την ασφαλή απόρριψη και επαναχρησιμοποίηση λυμάτων, καίριο ζήτημα αποτελεί η βελτιστοποίηση των συνθηκών απόδοσης των εγκαταστάσεων επεξεργασίας ώστε να αυξηθεί ο βαθμός εξουδετέρωσης των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων και γονιδίων στις τελικές εκροές των εγκαταστάσεων.

Στην παρούσα εργασία διερευνάται πειραματικά, ο βαθμός εξουδετέρωσης ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων κατά τη χλωρίωση δευτεροβάθμια και τριτοβάθμια επεξεργασμένων λυμάτων. Στο πλαίσιο της εργασίας λήφθηκαν δείγματα δευτεροβάθμιας επεξεργασίας λυμάτων από συμβατικά συστήματα ενεργού ιλύος και από συστήματα επεξεργασίας λυμάτων μέσω τεχνητού υγροβιότοπου, τα οποία υποβλήθηκαν σε απολύμανση με χλωρίωση στο εργαστήριο

Υγειονομικής Τεχνολογίας, Ε.Μ.Π.. Κατά την εργαστηριακή ανάλυση εξετάστηκε η παρουσία των ολικών κολοβακτηρίων και των ανθεκτικών βακτηρίων *Escherichia coli* σε αντιβιοτικά γενικής χρήσης (ερυθρομυκίνη, σιπροφλοξασίνη, τετρακυκλίνη, αμπικιλίνη, αμοξυκιλλίνη) στα στάδια επεξεργασίας των εγκαταστάσεων με σκοπό την κατανόηση της απομάκρυνσης που επιτυγχάνουν. Επισημαίνεται ότι ως μικροβιακός δείκτης κατά τη χλωρίωση των εκροών, χρησιμοποιήθηκε το φορτίο των βακτηρίων *Escherichia coli*, που εμφανίζει ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά γενικής χρήσης (ερυθρομυκίνη, σιπροφλοξασίνη, τετρακυκλίνη και αμπικιλίνη).

Αναλυτικότερα, η παρούσα εργασία αποτελείται από τα εξής ακόλουθα κεφάλαια:

- Κεφάλαιο 1ο: Εισαγωγή
- Κεφάλαιο 2ο: Βιβλιογραφική ανασκόπηση όπου παρουσιάζονται πληροφορίες για την ανθεκτικότητα των βακτηρίων στα αντιβιοτικά, καθώς και για την παρουσία τους στα στάδια επεξεργασίας των εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων
- Κεφάλαιο 3ο: Μεθοδολογία που ακολουθήθηκε κατά την πειραματική διαδικασία, καθώς και παρουσίαση των δύο εξεταζόμενων εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων που πραγματοποιήθηκαν οι δειγματοληψίες
- Κεφάλαιο 4ο: Ανάλυση των αποτελεσμάτων και σύγκριση με παγκόσμια βιβλιογραφία
- Κεφάλαιο 5ο: Συμπεράσματα έρευνας και προτάσεις για μελλοντική έρευνα
- Κεφάλαιο 6ο: Βιβλιογραφία

Τέλος, στο Παράρτημα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των πειραμάτων για όλες τις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο σε μορφή Πινάκων.

2. Βιβλιογραφική ανασκόπηση

Η παρουσία και μεταφορά των αντιβιοτικών στο περιβάλλον, χρήζει ιδιαίτερης μελέτης, λόγω της ανάπτυξης ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων (ARB) και ανθεκτικών στα αντιβιοτικά γονιδίων (ARGs). Η χρήση των αντιβιοτικών είναι εκτενής, σε ποικίλους τομείς (Sharma et al., 2016), καθώς τα αντιβιοτικά δρουν κατά των μικροβιακών λοιμώξεων. Σημειώνεται ότι, εκκρίνονται από τους οργανισμούς εντός λίγων ημερών από την κατανάλωσή τους (Calderón-Franco et al., 2021). Τα τελευταία χρόνια, υφίσταται μια αυξανόμενη ανησυχία για τις επιπτώσεις που προκαλεί στο περιβάλλον η απελευθέρωση οργανικών ενώσεων ανθρωπογενούς προέλευσης, γνωστές και ως αναδυόμενοι οργανικοί ρύποι (Emerging Organic Contaminants, EOCs) (Van et al. 2020; García et al., 2020; Hazra et al. 2022).

Οι αναδυόμενοι οργανικοί ρύποι περιλαμβάνουν μια ευρεία ποικιλία χημικών ενώσεων, όπως φαρμακευτικά προϊόντα και προϊόντα προσωπικής φροντίδας, φυτοφάρμακα, ορμόνες, επιβραδυντικά φλόγας, πλαστικοποιητές και βιομηχανικά πρόσθετα (García et al., 2020). Σύμφωνα με έρευνα των Farré et al., 2008, στις κατηγορίες αυτές, περιλαμβάνονται επίσης και οι μεταβολίτες, καθώς και τα ενδιάμεσα προϊόντα αποικοδόμησης των πρωτογενών αυτών ενώσεων. Η ευρεία παρουσία των αναδυόμενων οργανικών ρύπων στο περιβάλλον αποτελεί απειλή για πληθώρα ζωντανών οργανισμών, καθώς είναι εφικτό να παραμένουν βιολογικά ενεργοί για μεγάλες χρονικές περιόδους (Oberoi et al. 2019; García et al., 2020).

Παγκόσμιες έρευνες μελετούν την ιδιαίτερη επίδραση των εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων, στην παρουσία αναδυόμενων οργανικών ρύπων και στη μεταφορά τους στο περιβάλλον (Pallares-Vega et al., 2019; Wang and Chen 2022). Σημειώνεται ότι οι συμβατικές μονάδες επεξεργασίας λυμάτων δεν είναι αποτελεσματικές στην απομάκρυνση φαρμακευτικών προϊόντων και προϊόντων προσωπικής φροντίδας, συμπεριλαμβανομένων των αντιβιοτικών, των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων και ανθεκτικών στα αντιβιοτικά γονιδίων, που ρυπαίνουν και κατά συνέπεια μολύνουν τα οικοσυστήματα με βιοδραστικές ουσίες και υπολείμματα ανθεκτικότητας (Cacace et al., 2019, Corno et al., 2019, Manaia et al., 2018).

Με σκοπό την κατανόηση της ανθεκτικότητας των βακτηρίων στα αντιβιοτικά είναι απαραίτητη η διερεύνηση των παραγόντων που επηρεάζουν την αντιμικροβιακή αντοχή, τα αντιβιοτικά και τους μηχανισμούς δράσης τους. Επιπλέον, στα επόμενα υποκεφάλαια αναλύονται η παρουσία τους στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων, η αλληλεπίδρασή τους με άλλες ουσίες στο φυσικό περιβάλλον, καθώς και οι άμεσες επιπτώσεις που προκαλούν στα οικοσυστήματα και τον άνθρωπο.

2.1. Αντιμικροβιακή αντοχή

Οι αντιμικροβιακές φαρμακευτικές ουσίες αποτελούνται από ενεργές ουσίες, συνθετικής ή φυσικής προέλευσης, οι οποίες καταστρέφουν ή αναστέλλουν την ανάπτυξη μικροοργανισμών. Χρησιμοποιούνται ευρέως στην ιατρική, την κτηνιατρική, τη γεωργία, την κτηνοτροφία και την ιχθυοκαλλιέργεια καθώς, χαρακτηρίζονται ως ζωτικής σημασίας για την πρόληψη και θεραπεία λοιμώξεων στον άνθρωπο και στα ζώα (Zeon and Kibe, 2023). Στις αντιμικροβιακές φαρμακευτικές ουσίες περιλαμβάνονται τα αντιβιοτικά, τα αντιικά, τα αντιμυκητιακά και τα αντιπρωτοζωικά (Campusano et al., 2023).

Αντιμικροβιακή αντοχή παρατηρείται όταν μικροοργανισμοί όπως βακτήρια και μύκητες αναπτύσσουν τη δυνατότητα να αντιμετωπίζουν τις φαρμακευτικές ουσίες που έχουν σχεδιαστεί για να τους εξοντώνουν (Hazra et al. 2022; Zeon and Kibe, 2023; WHO, 2021). Αναλυτικότερα, ως αντιμικροβιακή αντοχή χαρακτηρίζεται η μη καταστροφή των μικροοργανισμών από τα αντιμικροβιακά και παρατηρείται τόσο σε κλινικό (in vivo) όσο και σε εργαστηριακό επίπεδο (in vitro). Σύμφωνα με δημοσίευση του WHO, 2021, σε κλινικό επίπεδο αποτελεί αποτυχία αντιμικροβιακής θεραπείας και σε εργαστηριακό επίπεδο χαρακτηρίζει την αντοχή των μικροοργανισμών στα αντιμικροβιακά, η οποία καθορίζεται σύμφωνα με συγκεκριμένα όρια ευαισθησίας (CLSI, EUCAST) που προέρχονται από την αντίστοιχη μεθοδολογία που ακολουθείται (Bobate et al., 2023). Άξιο σημείωσης, αποτελεί το γεγονός ότι οι μολύνσεις που παρουσιάζουν αντιμικροβιακή αντοχή μπορεί να είναι δύσκολα ιάσιμες και μερικές φορές αδύνατον να αντιμετωπιστούν (Wang and Schaffner, 2011).

Η αντοχή στα αντιμικροβιακά είναι ένα φυσικό φαινόμενο, ωστόσο, ο αυξημένος βαθμός αντοχής στα αντιμικροβιακά οφείλεται και σε μια συνδυασμένη δράση των μικροοργανισμών που έχουν έρθει σε επαφή με αντιβιοτικά, αντιικά, αντιμυκητιακά και αντιπρωτοζωικά φάρμακα, και στη διάδοση αυτών των μικροοργανισμών και των μηχανισμών αντοχής που διαθέτουν (Rayasam et al., 2023). Οι ανθεκτικοί μικροοργανισμοί, δεν καταστρέφονται από τα αντιμικροβιακά, με αποτέλεσμα την επιβίωσή τους, τον πολλαπλασιασμό τους και τη μεταφορά της αντοχής τους, στις επόμενες γενιές μικροοργανισμών. Έτσι με τον τρόπο αυτό, εμφανίζονται και αναπτύσσονται στις γλωρίδες ανθρώπων και ζώων (eody.gov.gr). Ωστόσο, η αντοχή στα αντιμικροβιακά έχει μόλις κεντρίσει την προσοχή της ερευνητικής κοινότητας, και περιορισμένες μελέτες έχουν εξετάσει την επίδραση τεχνικών απολύμανσης ως προς τον έλεγχο των ανθεκτικών μικροοργανισμών και γονιδίων σε αντιμικροβιακές φαρμακευτικές ουσίες (Yuan et al., 2015; Hazra et al. 2022). Επιπλέον παγκόσμιες έρευνες παρουσιάζουν ότι η αυξημένη χρήση απολυμαντικών κατά την περίοδο της πανδημίας COVID-19, είναι εφικτό να ενισχύσει την ανθεκτικότητα των βακτηρίων (Lu and Guo, 2021).

Για την κατανόηση του μεγέθους του προβλήματος της αντιμικροβιακής αντοχής, οι επιστήμονες και οι ειδικοί πρέπει να μελετήσουν ποικίλους τομείς όπως ιστορικούς, πληθυσμιακούς, υγειονομικούς και οικονομικούς αλλά και να αναλύουν τον αντίκτυπο στους

τομείς αυτούς. Επιπλέον, τα θεσμικά και τα διοικητικά μέσα, πρέπει να διαθέτουν το απαραίτητο κεφάλαιο και επαρκής πόρους, με σκοπό την έρευνα και τους κινδύνους που εμφανίζει η αντοχή στα αντιμικροβιακά (Sarmah et al., 2006; Kümmerer, 2009; Zhang et al., 2011; Zeon and Kibe, 2023). Η Παγκόσμια Τράπεζα αναφέρει ότι οι οικονομικές επιπτώσεις της αντιμικροβιακής αντοχής, θα μπορούσαν να ανέρχονται στο 3,8% του παγκόσμιου Α.Ε.Π. (Ακαθάριστο Εγχώριο Προϊόν) μέχρι το 2050 (Zeon and Kibe, 2023). Επιπλέον, σύμφωνα με το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (C.D.C.), η αντιμικροβιακή αντοχή προσθέτει 20 δις. δολαρίων σε άμεσο κόστος υγειονομικής περίθαλψης στις Ηνωμένες Πολιτείες, το οποίο υπολογίζεται περίπου σε 35 δις. δολάρια απώλειες παραγωγικότητας ετησίως (Dadgostar, 2019; Hazra et al. 2022).

Η αντιμικροβιακή αντοχή, αποτελεί μία από τις μεγαλύτερες απειλές για τον τομέα της ιατρικής καθώς σε παγκόσμιο επίπεδο και ετησίως, χάνουν την ζωή τους περίπου 700.000 άνθρωποι και ο αριθμός αυτός αναμένεται να φθάσει τα 10 εκατομμύρια ετησίως μέχρι το 2050 (Murray et al., 2022). Άξιο σημείωσης αποτελεί το γεγονός ότι οι παθογόνοι μικροοργανισμοί μπορούν να μεταδοθούν από άτομο σε άτομο, από ζώο σε άτομο και από επιφάνεια σε άτομο. Αυτή η εξάπλωση των παθογόνων μικροοργανισμών μεγιστοποιεί την επιβίωσή τους και συμβάλλει στη συνολική εμφάνιση αντίστασης στα αντιμικροβιακά (García et al., 2020; Zeon and Kibe, 2023). Για την κατανόηση του προβλήματος της αντιμικροβιακής αντοχής, κρίσιμη κρίνεται η ανάλυση της παρουσίας και μεταφοράς των βακτηρίων που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά, που εξετάζεται στα επόμενα υποκεφάλαια.

2.2. Βακτήρια ανθεκτικά στα αντιβιοτικά

Τα ανθεκτικά στα αντιβιοτικά βακτήρια είναι βακτήρια τα οποία αποκτούν αντοχή με τον χρόνο μέσω διαφόρων μηχανισμών και πλέον δεν ανταποκρίνονται στα αντιβιοτικά (Herraiz-Carboné et al., 2021; Armstrong, 1982). Η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά δεν αποτελεί ένα πρόσφατο φαινόμενο, αλλά η ραγδαία αύξηση και παρουσία των βακτηρίων και γονιδίων που είναι ανθεκτικά στα αντιβιοτικά στο περιβάλλον τα τελευταία χρόνια, οδήγησε στον χαρακτηρισμό τους και στην κατηγοριοποίησή τους, ως αναδυόμενοι ρύποι και αι αποτελούν σημαντικό κίνδυνο παγκοσμίως (Li et al., 2023). Τα ανθεκτικά στα αντιβιοτικά βακτήρια αποτελούν έναν από τους μεγαλύτερους δημόσιους υγειονομικούς κινδύνους της εποχής μας, καθώς προκαλούν χιλιάδες θανάτους ανθρώπων ετησίως (Muhammad et al., 2020; Laxminarayan et al., 2016). Η αντοχή στα αντιβιοτικά χαρακτηρίζεται ως ένα παγκόσμιο πρόβλημα που απαιτεί διεθνή συνεργασία και συντονισμένη δράση, καθώς δεδομένα παρουσιάζουν ότι υπάρχουν 25,000 θάνατοι ετησίως στην Ευρωπαϊκή Ένωση (O'neill, 2015).

Η αντιμικροβιακή αντοχή αντιπροσωπεύει σημαντικό ποσοστό της περιβαλλοντικής ρύπανσης. Η παρουσία στο περιβάλλον, των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά γονιδίων προκαλεί σταδιακά εκτενή ανησυχία λόγω των επιπτώσεων στο περιβάλλον και τους ανθρώπους (Zheng et al., 2017). Όπως παρουσιάστηκε και σε παραπάνω υποκεφάλαιο, η παρουσία των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων και γονιδίων, χαρακτηρίζονται ως ένας αναδυόμενος ρύπος λόγω της δυνητικής τους απειλής στη δημόσια υγεία αλλά και στο περιβάλλον (Pruden et al., 2006; Negreanu et al., 2012; Bouki et al., 2013). Πλέον, είναι σαφές ότι υφίσταται ανάγκη για μια παγκόσμια στρατηγική για την αντιμετώπιση των προκλήσεων της αντιμικροβιακής αντοχής (World Health Organization, 2000).

Πρόσφατες παγκόσμιες μελέτες παρουσιάζουν ασυμμετρίες στον ρυθμό εμφάνισης της αντοχής στα αντιβιοτικά, σύμφωνα με το κλίμα, τους κοινωνικοοικονομικούς παράγοντες και τη χρήση αντιβιοτικών ως πιθανούς παράγοντες της ασύμμετρης αυτής κατανομής (Vaz-Moreira, et al. 2022; Kümmerer, 2009). Στην Ευρώπη, όπου η κλινική αντοχή στα αντιβιοτικά παρακολουθείται εδώ και περισσότερα από 20 χρόνια, το Ευρωπαϊκό Κέντρο Πρόληψης και Ελέγχου Νοσημάτων (E.C.D.C.) περιγράφει συνεχώς μια αυξανόμενη τάση από το Βορρά προς το Νότο και από τη Δύση προς την Ανατολή (E.C.D.C., 2020). Πρόσφατη έρευνα των Vaz-Moreira, et al. 2022, στην Πολωνία παρατήρησε υψηλότερη κατανάλωση αντιβιοτικών και επικρατούσα συχνότητα αντοχής, κυρίως σε κοινοτικό επίπεδο, σε σύγκριση με την Πορτογαλία. Ο οικονομικός παγκόσμιος αντίκτυπος της αντιμικροβιακής αντοχής αναμένεται να υπερβεί το ποσό του 1 τρισ. δολαρίων ετησίως έως το 2030, ίσως ακόμη και 2 τρισ. δολαρίων ετησίως (Morel et al., 2020).

Η κατανόηση και η αντιμετώπιση των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων και στα βακτήρια που εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε παραπάνω από ένα αντιβιοτικά, απαιτούν διεπιστημονική προσέγγιση (Hazra et al. 2022). Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (Π.Ο.Υ.) επίσης έχει επιστήσει την προσοχή στο πρόβλημα της ανθεκτικότητας και έχει προωθήσει πρωτοβουλίες για την πρόληψή της και τη βελτίωση της χρήσης των αντιβιοτικών παγκοσμίως (Berendonk et al., 2013; WHO, 2015; WHO, 2017). Για την κατανόηση του προβλήματος της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά, κρίσιμη κρίνεται η ανάλυση της λειτουργίας των αντιβιοτικών που εξετάζεται στα επόμενα υποκεφάλαια.

2.2.1. Αντιβιοτικά

Τα αντιβιοτικά σχεδιάζονται με σκοπό την καταπολέμηση των παθογόνων βακτηρίων, στοχεύοντας σε συγκεκριμένα μέρη της δομής ή της κυτταρικής μηχανικής τους. Τα πρώτα αντιβιοτικά αναπτύχθηκαν στη δεκαετία του 1940 και το πρώτο αντιβιοτικό, η πενικιλίνη,

ανακαλύφθηκε το 1927 από τον Alexander Fleming. Μετά την πρώτη χρήση των αντιβιοτικών τη δεκαετία του 1940, οι ασθένειες και οι θάνατοι από λοιμώδεις νόσους παρουσίασαν μεγάλη μειωτική τάση (Du et al, 2017; Kohanski, 2010). Ως προς τον σχηματισμό τους, τα αντιβιοτικά, αποτελούνται από οργανικές ενώσεις, που παράγονται μέσω δευτερογενών προϊόντων του μεταβολισμού μικροοργανισμών, ή συντίθενται τεχνητά ή ημιτεχνητά και χρησιμοποιούνται είτε για εξάλειψη μικροοργανισμών είτε παρεμβαίνουν σε βασικές βιοχημικές διεργασίες του μεταβολισμού τους (Du et al, 2017).

Τα αντιβιοτικά αποτελούν μια από τις κυριότερες κατηγορίες φαρμάκων, που χρησιμοποιούνται σε ποικίλες εφαρμογές θεραπείας λοιμώξεων αλλά η αλόγιστη και άσκοπη συνταγογράφηση και χρήση τους είναι εφικτό να οδηγήσει στην εμφάνιση ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά αυτά (Pulcini et al., 2013; Yuan et al., 2015; Van et al. 2020; Alam et al., 2021). Συνοπτικά, οι κύριοι παράγοντες που ενισχύουν την ανθεκτικότητα είναι η υπερσυνταγογράφηση, η αλόγιστη χρήση, καθώς και το γεγονός ότι δεν λαμβάνονται ολοκληρωμένες οι θεραπείες (Fiorentino et al., 2022).

Τα τελευταία χρόνια, τα αντιβιοτικά έχουν θεωρηθεί ως μέρος μιας νέας αναδυόμενης κατηγορίας μικρορυπαντών, με δυνητικά επικίνδυνες επιδράσεις στο περιβάλλον, ειδικά σε υδάτινα οικοσυστήματα, όπως οι λίμνες και η θάλασσα (Fatta-Kassinos et al., 2010). Άξιο σημείωσης αποτελεί το γεγονός ότι τα αντιβιοτικά, συμπεριλαμβανομένων των τετρακυκλινών, των σουλφοναμιδίων και των κινολόνων, χρησιμοποιούνται ευρέως στην αλιεία (Pruden, 2018). Επιπλέον, τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται ευρέως σε γεωργικές εφαρμογές, στην κτηνιατρική και φυσικά στην ιατρική (Gonzalez - Ronquillo et al., 2017). Υπολογίζεται ότι από το έτος 2000, η κατανάλωση των αντιβιοτικών αυξήθηκε από 21,1 σε 34,8 δις. τόνους και εκτιμάται ότι θα αυξηθεί περαιτέρω κατά 67% στις πιο πυκνά κατοικημένες χώρες μέχρι και το έτος 2030 (Chen et al., 2016; He et al., 2018).

Αναλυτικότερα, στις αναπτυσσόμενες χώρες, η ανεξέλεγκτη χρήση αντιβιοτικών στην κτηνοτροφία και τη γεωργία μπορεί να οδηγήσει στην εισαγωγή αντιβιοτικών στο περιβάλλον μέσω των αποβλήτων κτηνοτροφικών, αλιευτικών και γεωργικών δραστηριοτήτων (Cycó et al. 2019). Επιπλέον, η με επαρκής διαχείριση των αντιβιοτικών και των φαρμάκων στα απόβλητα των αναπτυσσόμενων χωρών είναι εφικτό να οδηγήσει στην αυξημένη παρουσία αντιβιοτικών στο περιβάλλον (Gelband et al. 2015; Sun et al., 2019; Yu et al., 2020; Berges et al., 2021).

Αντίθετα, στις αναπτυγμένες χώρες, υφίστανται συστήματα αποτελεσματικότερης διαχείρισης των αποβλήτων. Επίσης, σημειώνεται ότι στις αναπτυγμένες κοινωνίες, ακολουθούνται αυστηρότεροι κανονισμοί για τη χρήση αντιβιοτικών στις δραστηριότητες του πρωτογενή τομέα (Gelband et al. 2015). Στις αναπτυγμένες χώρες, υπάρχει συνήθως καλύτερη πρόσβαση στην υγειονομική περίθαλψη και στα αντιβιοτικά. Η παραγωγή, η κατανάλωση και η διάθεση των φαρμάκων, στις αναπτυγμένες χώρες, είναι πιο εξειδικευμένες και πιο αυστηρά ελεγχόμενες, μειώνοντας τον κίνδυνο απελευθέρωσης αντιβιοτικών στο περιβάλλον. Ο ανθρώπινος πληθυσμός όμως, στις αναπτυσσόμενες χώρες να καταφεύγει με μεγαλύτερη ευκολία

στη χρήση αντιβιοτικών χωρίς ειδική συνταγογράφηση, με αποτέλεσμα και την ανεξέλεγκτη απόρριψη αυτών, συμβάλλοντας πρακτικά στην αύξηση της παρουσίας αντιβιοτικών στο περιβάλλον (Göbel et al. 2005; Andersson and Hughes, 2012; Russell and Yost, 2021; Xue et al., 2022).

Πηγές αντιβιοτικών στο περιβάλλον

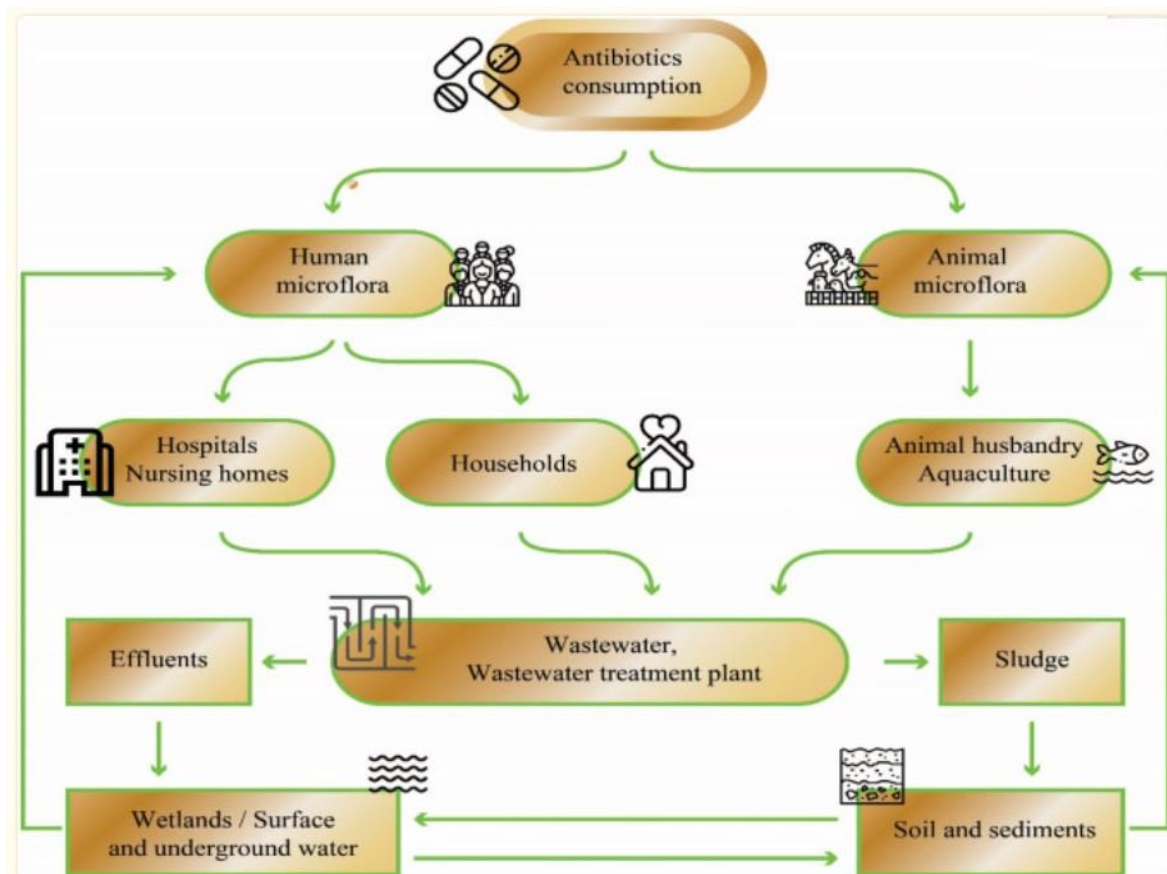
Τα αντιβιοτικά είναι εφικτό να ανιχνευτούν στο φυσικό περιβάλλον μέσω της αστικής απόρριψης, των νοσοκομειακών αποβλήτων, των αποβλήτων φαρμακευτικών βιομηχανιών και μέσω της απόρριψης κτηνοτροφικών-ιχθυοτροφικών προϊόντων, όπως παρουσιάζεται και στην ακόλουθη Εικόνα 2.1. (Kemper 2008; Harbarth et al., 2015). Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στις εκροές από εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων και στα απόβλητα από νοσοκομειακές και κτηνοτροφικές μονάδες, καθώς αποτελούν τις κύριες πηγές ρύπανσης στο περιβάλλον (Khan et al., 2021; Aydın et al., 2018), όπως παρουσιάζεται και στην ακόλουθη Εικόνα 2.1. (Harbarth et al., 2015). Σημειώνεται ότι μόλις τα αντιβιοτικά απορροφηθούν από ζώα ή ανθρώπους, μεταβολίζονται μόνο κατά περίπου 40%, ενώ το υπόλοιπο μέρος απελευθερώνεται στα λύματα και τελικά στο περιβάλλον καθώς, οι κύριοι αποδέκτες είναι τα εδάφη και τα υδάτινα σώματα ((Florindo et al., 2019; Singh et al., 2019; Cheng et al., 2018; Bueno et al., 2020; Lamba and Ahammad, 2017). Τα αντιβιοτικά συνήθως εξασθενούν με αβιοτικές δράσεις μέσω προσρόφησης, υδρόλυσης και φωτόλυσης ή με βιοτικές δράσεις. Οι περισσότεροι τύποι αντιβιοτικών, όμως, όπως για παράδειγμα οι σουλφοναμίδες δεν είναι ευαίσθητες στην αποικοδόμηση (Yu et al., 2019). Υπολογίζεται ότι περισσότερο από το 85% των αντιβιοτικών υπάρχουν στο περιβάλλον με τη μορφή αντιγόνων ή άλλων ενεργών μεταβολιτών, προκαλώντας ρύπανση εδαφών και υδάτων (Delgado et al., 2010; Zhang et al., 2022).

Έχει παρατηρηθεί ότι τα αντιβιοτικά, είναι εφικτό να παραμείνουν για μεγάλο χρονικό διάστημα στο περιβάλλον, ακόμη και αν απελευθερωθούν σε χαμηλές συγκεντρώσεις (Kolár et al., 2001). Επιπλέον, η παρουσία των αντιβιοτικών στο περιβάλλον σε οριακές συγκεντρώσεις ενεργοποίησης (sub-lethal), είναι εφικτό να προωθήσει την ανάπτυξη της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά. Οριακές συγκεντρώσεις ενεργοποίησης, θεωρούνται οι συγκεντρώσεις που βρίσκονται οριακά και χαμηλότερα από την ελάχιστη συγκέντρωση που χρειάζεται για να λειτουργήσει αποδοτικά ένα αντιβιοτικό (WHO, 2022; Fiorentino et al., 2022). Σημειώνεται ότι, παρά τις σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών στο φυσικό περιβάλλον, η μακροχρόνια έκθεση σε αντιβιοτικά δημιουργεί σημαντικούς κινδύνους για το περιβάλλον και την ανθρώπινη υγεία (Milh et al., 2021). Η παρατεταμένη έκθεση σε οριακές συγκεντρώσεις αντιβιοτικών μεταβάλλει τον μεταβολισμό των βακτηρίων και προάγει την παραγωγή

μεταβολιτών που συμβάλλουν στην ανθεκτικότητα των βακτηρίων στα αντιβιοτικά (Majumder et al., 2019).

Η μελέτη παρουσίας αντιβιοτικών στο περιβάλλον μπορεί να πραγματοποιηθεί και ως προς τη χωρική κατανομή, συγκριτικά με τους κοινωνικούς-οικονομικούς παράγοντες, στις αναπτυσσόμενες αλλά και στις αναπτυγμένες χώρες (Gelband et al. 2015). Αντίστοιχα, η εποχιακή κατανομή της παρουσίας αντιβιοτικών στο περιβάλλον εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της συχνότητας χρήσης των αντιβιοτικών, της εποχικής εμφάνισης λοιμώξεων και των περιβαλλοντικών συνθηκών (Wang et al. 2020).

Η μεταφορά στο περιβάλλον, εξαρτάται από τις φυσικές και χημικές ιδιότητες του περιβάλλοντος αλλά και των ίδιων των αντιβιοτικών. Αναλυτικότερα, τα αντιβιοτικά που απελευθερώνονται στο περιβάλλον, είναι εφικτό να επηρεάζονται από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, η υγρασία και η ένταση της ηλιακής ακτινοβολίας (Li et al., 2023). Αυτοί οι παράγοντες μπορούν να διαφοροποιήσουν την παρουσία και την περιβαλλοντική συμπεριφορά των αντιβιοτικών κατά τη διάρκεια του έτους.



Εικόνα 2.1. Πηγές αντιβιοτικών στο περιβάλλον (Harbarth et al., 2015).

Αναλυτικότερα, η εποχικότητα είναι εφικτό να επηρεάζει την παρουσία βακτηρίων ανθεκτικών στα αντιβιοτικά στο περιβάλλον (χειμώνα - καλοκαίρι) (Wang et al. 2020). Ουσιαστικά, η εποχιακή κατανομή της παρουσίας αντιβιοτικών στο περιβάλλον μπορεί να επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της χρήσης αντιβιοτικών και των εποχικών μεταβολών (Kümmerer et al., 2009). Αυτή η ανθεκτικότητα μπορεί να επιδράσει στον τρόπο με τον οποίο τα αντιβιοτικά δρουν αλλά και μεταφέρονται στο περιβάλλον (Brooks et al., 2007). Η χρήση αντιβιοτικών δεν εξαρτάται απαραίτητα από την εποχή καθώς η συνταγογράφηση αντιβιοτικών πραγματοποιείται όταν απαιτείται θεραπεία μιας λοίμωξης (Chee-Sanford et al., 2001). Ωστόσο, η εποχιακή ποικιλότητα των λοιμώξεων, όπως οι αναπνευστικές λοιμώξεις τους χειμερινούς μήνες και αντίστοιχα, οι λοιμώξεις που σχετίζονται με διατροφικά αίτια τους θερινούς, είναι εφικτό να επηρεάσει τον τύπο και την ποσότητα των αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται (Munir et al., 2011; Pei et al., 2006; Storteboom et al., 2010; Xi et al., 2009).

Η παρουσία και μεταφορά των αντιβιοτικών στο περιβάλλον, συμπεριλαμβανομένης της απορρόφησης και της αποδόμησης που υφίστανται στα υδάτινα περιβάλλοντα, αποτελούν καίριο ζήτημα με σκοπό την κατανόηση της διασποράς τους και της εξάπλωσης των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων και των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά γονιδίων (Gerolin et al., 2020).

Κατηγορίες αντιβιοτικών

Τα αντιβιοτικά ταξινομούνται συνήθως με βάση τον μηχανισμό δράσης τους, το φάσμα δραστηριότητάς τους ή τη χημική τους δομή (Wang et al., 2015; Nnadozie et al., 2017). Αναλυτικότερα, ως προς τον μηχανισμό δράσης τους χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, τα βακτηριοκτόνα και τα βακτηριοστατικά (Noor et al., 2021; Qi et al., 2022; Li et al., 2023). Ως βακτηριοκτόνα, χαρακτηρίζονται τα αντιβιοτικά που στοχεύουν στο κυτταρικό τοίχωμα ή στην κυτταρική μεμβράνη ή παρεμποδίζουν ζωτικής σημασίας βακτηριακά ένζυμα. Αντίστοιχα, βακτηριοστατικά χαρακτηρίζονται τα αντιβιοτικά που αναστέλλουν την πρωτεϊνική σύνθεση των βακτηρίων (Nnadozie et al., 2017; Wang et al., 2020; Noor et al., 2021; Li et al., 2023).

Ως προς το φάσμα δραστηριότητάς τους, ταξινομούνται με βάση την εξειδικευμένη δράση τους. Δηλαδή, αν είναι στενού ή ευρέως φάσματος (Li et al., 2023). Τα αντιβιοτικά στενού φάσματος στοχεύουν συγκεκριμένους τύπους βακτηρίων, όπως τα αρνητικά ή θετικά κατά Gram βακτήρια, ενώ τα ευρέως φάσματος στοχεύουν ένα διευρυμένο φάσμα ειδών βακτηρίων (Li et al., 2023; Qi et al., 2022).

Αντίστοιχα, τα αντιβιοτικά, είναι εφικτό να ταξινομηθούν ανάλογα με τη χημική δομή τους. Οι κυριότερες κατηγορίες αντιβιοτικών είναι οι Β-λακτάμες, μακρολίδες, τετρακυκλίνες, κινολόνες, αμινογλυκοσίδες, σουλφοναμίδια (Noor et al., 2021; Bérdy, 2012; Ben et al., 2019). Αναλυτικότερα, οι Β-λακτάμες περιλαμβάνουν αντιβιοτικά όπως οι πενικιλίνες και οι κεφαλοσπορίνες και δρουν στο βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα (Qi et al., 2022). Αντίστοιχα, οι μακρολίδες είναι αντιβιοτικά που επηρεάζουν την πρωτεϊνική σύνθεση στα βακτήρια, με παραδείγματα να περιλαμβάνουν την ερυθρομυκίνη και την αζιθρομυκίνη (Shearer et al., 2022). Επιπλέον, σημειώνεται ότι οι τετρακυκλίνες εμποδίζουν τη σύσταση των βακτηριακών ριβοσωμών, όπως η τετρακυκλίνη (Zhang et al., 2024). Οι κινολόνες επηρεάζουν το DNA των βακτηρίων, εμποδίζοντας την αναπαραγωγή, με παραδείγματα να περιλαμβάνουν τη λεβοφλοξασίνη και την κινολόνη (Hooper et al., 2015; Shariati et al., 2022). Οι αμινογλυκοσίδες, επηρεάζουν τη σύνθεση του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος, όπως η στρεπτομυκίνη και η νεομυκίνη όπου ανήκουν σε αυτήν την κατηγορία (Bérdy, 2012). Τέλος, τα σουλφοναμίδια είναι αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται κυρίως για τη θεραπεία της λοίμωξης από βακτήρια του εντέρου, όπως η σουλφαμεθοξαζόλη (Felis et al., 2024). Σημειώνεται ότι οι μηχανισμοί δράσης των αντιβιοτικών, αναλύονται στο επόμενο υποκεφάλαιο με σκοπό την βέλτιστη κατανόηση του προβλήματος της ανθεκτικότητας.

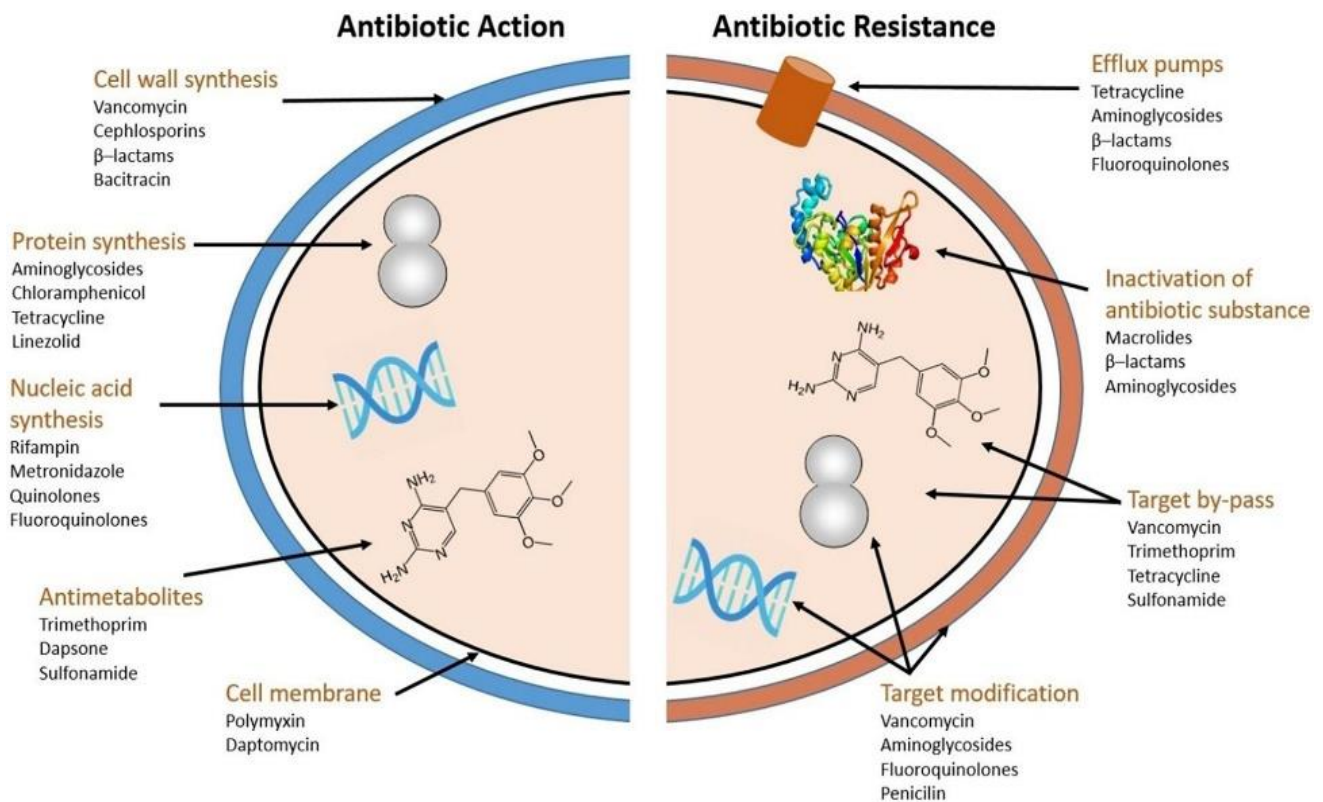
Η αυξανόμενη παρουσία ανθεκτικών βακτηρίων στα αντιβιοτικά, καθώς και η μεταφορά της ανθεκτικότητας, θέτουν απαραίτητη την έρευνα με σκοπό την κατανόηση των μηχανισμών που λειτουργούν τα αντιβιοτικά αλλά και την εξέταση και δοκιμή εναλλακτικών τρόπων αντιβακτηριδιακής θεραπείας (Kohanski et al., 2010).

Μηχανισμοί δράσης αντιβιοτικών και μηχανισμοί αντιβιοτικής αντίστασης

Τα αντιβιοτικά ταξινομούνται σε πέντε κύριες ομάδες, ανάλογα με τον μηχανισμό δράσης τους (Scaccia et al., 2021). Κύρια παραδείγματα αποτελούν η αναστολή της σύνθεσης και η διαταραχή της κυτταρικής μεμβράνης και του κυτταρικού τοιχώματος, η αναστολή της πρωτεϊνικής σύνθεσης, η αναστολή της σύνθεσης των νουκλεϊκών οξέων, η παρεμβολή σε μονοπάτια βιοσύνθεσης και η αναστολή του μεταβολισμού των μικροοργανισμών (Pak et al., 2016). Η παραπάνω κατηγοριοποίηση βασίζεται στον τρόπο με τον οποίο τα αντιβιοτικά επιδρούν στα βακτήρια και παρέχει κατευθυντήριες λύσεις στην επιλογή για την αντιμετώπιση διάφορων βακτηριακών λοιμώξεων ανάλογα με τον μηχανισμό που δρα το βακτήριο που προκαλεί τη λοίμωξη (Scaccia et al., 2021).

Αναλυτικότερα, τα αντιβιοτικά που εμποδίζουν τη σύνθεση του κυτταρικού τοίχου των βακτηρίων περιλαμβάνουν τη βανκομυκίνη, τις κεφαλοσπορίνες, τις β-λακτάμες και τη βακιτρακίνη (Tikhonova et al., 2002). Τα αντιβιοτικά που επηρεάζουν την πρωτεϊνική σύνθεση

στα βακτήρια, περιλαμβάνουν τις αμινογλυκοσίδες, τη χλωραμφενικόλη, την τετρακυκλίνη και τη λινεζολίδα. Τα αντιβιοτικά που εμποδίζουν τη σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων των βακτηρίων, περιλαμβάνουν τη ριφαμπικίνη, τη μετρονιδαζόλη, τις κινολόνες και τις φθοριοκινολόνες (Piotrowska-Seget, 2019). Οι αντιμεταβολίτες, επηρεάζουν τη μεταβολή των βακτηριακών βασικών ουσιών, με παραδείγματα να περιλαμβάνουν την τριμεθοπρίμη και τη δαψόνη. Τέλος, με διάσπαση της κυτταρικής μεμβράνης δρουν τα αντιβιοτικά που διαλύουν την κυτταρική μεμβράνη των βακτηρίων και περιλαμβάνουν την πολυμυξίνη και τη δαπτομυκίνη (Zgurskaya et al., 2002; Bondarczuk and Piotrowska-Seget, 2019).



Εικόνα 2.2. Δράση των αντιβιοτικών και μηχανισμοί ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά (Wright, 2010).

Όπως παρουσιάζεται και στην Εικόνα 2.2., τα βακτήρια έχουν αναπτύξει τέσσερις κύριους μηχανισμούς ανθεκτικότητας ενάντια στα αντιβιοτικά (Zhang et al., 2009; Wright, 2010). Οι βασικοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά είναι η άντληση αντιβιοτικού μέσω ειδικών αντλιών, η παρεμπόδιση εισόδου του αντιβιοτικού, η τροποποίηση δράσης αντιβιοτικού και η αδρανοποίηση του αντιβιοτικού.

Ορισμένα βακτήρια, λειτουργούν με τον μηχανισμό των αντλιών εκροής (Efflux pumps), οι οποίες, αποβάλλουν αποτελεσματικά τα αντιβιοτικά από το κύτταρο (Wright, 2011; Kohanski et al., 2010). Σημειώνεται ότι υφίστανται πέντε ομάδες πρωτεϊνών εκροής (efflux protein families), οι οποίες αποτελούνται από τις πρωτεΐνες που είναι συνδεδεμένες με την ATP (ATP-binding cassette (ABC)), τις πολυφαρμακευτικές και τοξικές ενώσεις εξώθησης (multidrug and toxic compound extrusion (MATE)), τους κύριους διαμεσολαβητές (major facilitators (MFs)), την ανθεκτικότητα στην κυτταρική διαίρεση (resistance nodulation cell division (RND)) και ανθεκτικότητα σε πολλαπλά αντιβιοτικά (small multidrug resistance (SMR)) (Nishino and Yamaguchi, 2001; Kohanski et al., 2010).

Αναλυτικότερα, είναι εφικτό να πραγματοποιείται αδρανοποίηση των αντιβιοτικών, η οποία συμβαίνει όταν η δραστηριότητα της ουσίας του αντιβιοτικού ανακόπτεται άμεσα μέσω της διαδικασίας της υδρόλυσης ή μέσω μετατροπής/μεταβολής των λειτουργικών ομάδων (conversion of functional groups) (Wright, 2005; Diaz et al., 2014). Οι στρατηγικές παράκαμψης του στόχου του αντιβιοτικού περιλαμβάνουν τη δημιουργία νέων διαδρόμων για να παρακάμψουν τη δράση των ενζύμων, την υπερπαραγωγή της στοχευμένης ένωσης (Munita and Arias, 2016), τις δομικές αλλαγές στο κυτταρικό τοίχωμα (Vila et al., 2007) και την αποτροπή σύνδεσης του αντιβιοτικού με τον στόχο του, μέσω γενετικών μεταλλάξεων (Wright, 2010). Τέλος, σημειώνεται ότι η τροποποίηση του στόχου πραγματοποιείται μέσω της τροποποίησης των ίδιων των στόχων των αντιβιοτικών (Wright, 2010). Ποικίλοι τύποι μηχανισμών αντοχής μπορούν να παρέχουν ταυτόχρονα αντίσταση ενάντια στην ίδια οικογένεια αντιβιοτικών (Oliveira et al., 2016). Άξιο σημείωσης αποτελεί το γεγονός ότι ένας τύπος μηχανισμού αντοχής μπορεί επίσης να παρέχει και αντίσταση ενάντια σε περισσότερους από έναν τύπους αντιβιοτικών, διαφορετικών οικογενειών (Kohanski et al., 2010).

2.2.2. Μηχανισμοί μεταφοράς ανθεκτικότητας

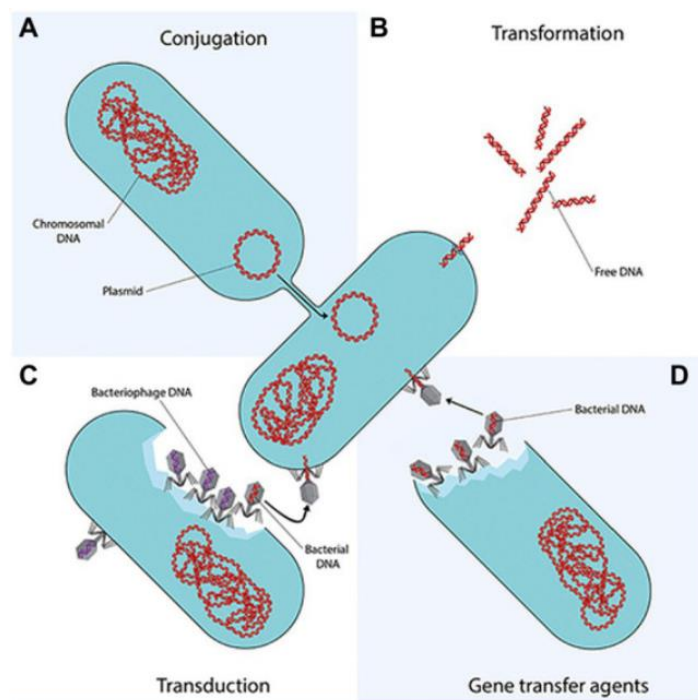
Ορισμένοι μηχανισμοί μεταφοράς ανθεκτικότητας των αντιβιοτικών στα βακτήρια, περιλαμβάνουν την κάθετη και οριζόντια μεταφορά, τη φυσική επιλογή, τις βιολογικές τροποποιήσεις και την ανταλλαγή DNA (Wang et al., 2023; Kohanski et al., 2010). Όπως παρουσιάστηκε σε παραπάνω υποκεφάλαιο, ορισμένα βακτήρια έχουν αναπτύξει λειτουργίες που μπορούν να αφαιρέσουν ένα αντιβιοτικό πριν φτάσει στον στόχο του, ενώ άλλα έχουν εξελιχθεί για να παράγουν ένζυμα που σταματούν τη δράση του αντιβιοτικού ((Vila et al., 2007).

Αναλυτικότερα, μέσω της κάθετης μεταφοράς (vertical inheritance), ορισμένα βακτήρια είναι ήδη ανθεκτικά σε κοινά αντιβιοτικά λόγω της μεταφοράς ανθεκτικών γονιδίων στις γενεές, οπότε και τα χαρακτηριστικά αυτά, μεταβιβάζονται από γενιά σε γενιά (Josephine et al., 2004;

Kahne et al., 2005). Η φυσική επιλογή (natural selection) δρα όταν τα βακτήρια εκτίθενται αρχικά σε ένα αντιβιοτικό. Τα βακτήρια που είναι ευαίσθητα στο αντιβιοτικό θα πεθάνουν γρήγορα, αφήνοντας τα επιζώντα βακτήρια να μεταβιβάσουν τα ανθεκτικά χαρακτηριστικά τους στις επόμενες γενιές (Li et al., 2020).

Οριζόντια μεταφορά γονιδίων

Εκτός από τη μεταφορά των γονιδίων που είναι ανθεκτικά στα αντιβιοτικά, ανάμεσα στις γενεές, είναι εφικτό να παρουσιαστεί ανθεκτικότητα και μέσω μετάλλαξης ή με οριζόντια μεταφορά γονιδίων ανθεκτικότητας (Jury et al., 2010). Αναλυτικότερα, η οριζόντια μεταφορά γονιδίων (horizontal gene transfer - HGT) περιλαμβάνει τη σύζευξη (conjugation), το μετασχηματισμό (transformation) και τη μεταγωγή (transduction), η οποία επιτυγχάνεται μέσω κινητών γενετικών στοιχείων (mobile genetic elements - MGE), όπως πλασμίδια, τρανσποζόνια και ιντεγκρόνια (plasmids, transposons, and integrons) (Dodd et al., 2012), όπως παρουσιάζεται και στην ακόλουθη Εικόνα 2.3. Σύμφωνα με τον μηχανισμό μετασχηματισμού, το εξωκυτταρικό DNA που απελευθερώνεται από ένα βακτηριακό κύτταρο με λύση/θάνατο μπορεί να μεταφερθεί σε ένα μη ανθεκτικό κύτταρο (Fiorentino et al., 2022).



Εικόνα 2.3. Μέθοδοι οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων (Mosaka et al., 2023).

Αναλυτικότερα, τα βακτήρια ανταλλάσσουν εύκολα DNA ανάμεσα στους πληθυσμούς τους και στα διάφορα είδη μεταξύ τους (Schwarz et al., 2016). Συνεπώς, τα γονίδια που παρέχουν ανθεκτικότητα σε έναν τύπο βακτηρίων είναι εφικτό να ενσωματωθούν και σε διαφορετικά είδη βακτηρίων (Baker et al., 2018). Το γεγονός αυτό δηλώνει, ότι η χρήση ενός συγκεκριμένου αντιβιοτικού μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε αυτό το συγκεκριμένο αντιβιοτικό ακόμα και από άλλα είδη βακτηρίων (Bayles et al., 2007). Τέλος, σημειώνεται ότι οι μηχανισμοί μεταφοράς της ανθεκτικότητας των αντιβιοτικών είναι εφικτό να λειτουργούν λόγω της ταχείας αναπαραγωγής, καθώς τα βακτήρια αναπαράγονται γρήγορα, μερικές φορές σε λιγότερο από 20 min (Li et al., 2020). Επομένως, δεν απαιτείται αρκετός χρόνος για να αποτελέσουν τα ανθεκτικά βακτήρια μεγάλο μέρος του συνολικού πληθυσμού βακτηρίων (Wang et al., 2023; Poole, 2002). Άρα, μέσω των γενετικών μεταλλάξεων και με οριζόντια μεταφορά γονιδίων ανθεκτικότητας, τα βακτήρια μπορούν να αναπτύξουν μηχανισμούς αντίστασης ενάντια στα αντιβιοτικά (Uehara et al., 2009).

2.2.3. Ουσίες που ενισχύουν τη μεταφορά ανθεκτικότητας

Οι αναδύομενοι ρύποι, όπως τα φάρμακα, τα προϊόντα απορρυπαντικών, τα μικροπλαστικά, και άλλα χημικά, είναι εφικτό να επηρεάσουν την παρουσία και τη διασπορά των ανθεκτικών βακτηρίων, στο περιβάλλον (García et al., 2020). Σε παγκόσμιες έρευνες έχει παρατηρηθεί ότι ποικίλες χημικές ουσίες, δρουν θετικά ως προς τα βακτήρια και προάγουν την επιβίωση και μεταφορά των ανθεκτικών βακτηρίων στο περιβάλλον (Koutsoumanis et al., 2021; Seiler and Berendonk, 2012; Yazdankhah et al., 2018).

Η επίδραση που υφίστανται τα βακτήρια και τα γονίδια που είναι ανθεκτικά στα αντιβιοτικά από βαρέα μέταλλα και από αναδύομενους ρύπους στο περιβάλλον, αποτελεί ένα ενδιαφέρον ερευνητικό ζήτημα που εξετάζεται τα τελευταία χρόνια (Yazdankhah et al., 2018). Παγκόσμιες μελέτες παρουσιάζουν την επίδραση των βαρέων μετάλλων, όπως ο μόλυβδος, το κάδμιο και ο υδράργυρος, αναλύοντας την επιρροή που θέτουν στην εξάπλωση των βακτηρίων και γονιδίων που είναι ανθεκτικά στα αντιβιοτικά, είτε μέσω της επιλογής των ανθεκτικών βακτηρίων, είτε μέσω της αύξησης της συγκέντρωσης πλήθους των ανθεκτικών βακτηρίων, στο περιβάλλον (Squadrone, 2020; Yazdankhah et al., 2018). Στο υδάτινο περιβάλλον, τα γονίδια ανθεκτικότητας στα βαρέα μέταλλα συνυπάρχουν συχνά στα ίδια γενετικά στοιχεία με τα γονίδια ανθεκτικότητας, ενισχύοντας τη παράλληλη ανθεκτικότητα (Gao et al., 2015). Επιπλέον, η έρευνα των Gao et al., 2015, παρουσιάζει την συσχέτιση και επίδραση που υφίστανται τα ανθεκτικά στην ερυθρομυκίνη γονίδια, όταν σε δείγματα αστικών λυμάτων, συνυπάρχουν υπολείμματα ανθεκτικότητας, αντιβιοτικά και βαρέα μέταλλα.

Ακόμα μια κατηγορία που επηρεάζουν άμεσα την ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά, αποτελούν τα βιοφίλμ των μικροπλαστικών καθώς παρέχουν ένα βιώσιμο περιβάλλον για ανταλλαγή γονιδίων ανθεκτικότητας. Σε παγκόσμιες έρευνες έχει παρουσιαστεί ότι τα μικροπλαστικά (MPs) διαθέτουν τη δυνατότητα να συσσωρεύουν και να ενισχύουν επιλεκτικά την παρουσία και μεταφορά αντιβιοτικών, ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων και ανθεκτικών στα αντιβιοτικά γονιδίων στο περιβάλλον (Cheng, et al. 2022; Zarei-Baygi et al., 2021; Zhang et al., 2022; Wang et al., 2021). Ακόμα, έρευνα των Cheng, et al. 2022, παρουσίασε την προσρόφηση ανθεκτικών γονιδίων στα αντιβιοτικά σε τέσσερις τύπους μικροπλαστικών (PE, PP, PS και ανακυκλωμένα PE). Τα μικροπλαστικά πολυπροπυλενίου, παρουσίασαν την υψηλότερη ικανότητα προσρόφησης για τα ανθεκτικά στα αντιβιοτικά γονίδια. Στην έρευνα των Cheng, et al. 2022, η προσρόφηση των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά γονιδίων, σε μικροπλαστικά παρεμποδίστηκε σημαντικά από το χουμικό οξύ και την τετρακυκλίνη. Σημειώνεται ότι ο εμπλουτισμός των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά γονιδίων μειώθηκε κατά 99,7% και 95,0% αντίστοιχα όταν προστέθηκε στο δείγμα χουμικό οξύ (50 mg/L) και τετρακυκλίνη (200 mg/L) (Cheng, et al. 2022).

Η παρουσία μικροπλαστικών στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων, επηρεάζει αρνητικά την επεξεργασία τους και την απολύμανση του νερού καθώς οι εγκαταστάσεις επεξεργασίας δεν έχουν σχεδιαστεί με σκοπό την επιτυχή απομάκρυνσή τους. Σημειώνεται ότι οι αφθονίες των μικροπλαστικών που έχουν μετρηθεί σε εκροές λυμάτων δευτεροβάθμιας επεξεργασίας εμφανίζουν 100πλάσιες τιμές (213 MPs m^{-3}) από αυτές των συστημάτων MBR (2.29 MPs m^{-3}) (Zeri et al., 2021). Επιπλέον, άξιο σημείωσης αποτελεί το γεγονός ότι οι τεχνητοί υγροβιότοποι έχουν αναγνωριστεί ως σημαντικές πηγές μικροπλαστικών, ναοπλαστικών αλλά και γονιδίων αντοχής στα αντιβιοτικά, για τα υδάτινα περιβάλλοντα (Bydalek et al., 2023). Επίσης, η ευρεία παρουσία μικροπλαστικών σε θαλάσσια και ποτάμια οικοσυστήματα, που αποτελούν τους αποδέκτες των εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων, ερευνάται τα τελευταία χρόνια με σκοπό την κατανόηση του ζητήματος και των επιπτώσεων του (Koutsikos et al., 2023; Zeri et al., 2021). Ωστόσο, λίγα δεδομένα είναι ακόμα γνωστά για την επίδραση της έκθεσης μικροπλαστικών και ναοπλαστικών στην οριζόντια μεταφορά γονιδίων των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά γονιδίων, στο περιβάλλον (Zhao et al., 2023).

Επιπλέον, αναγκαία κρίνεται και η μελέτη της επίδρασης των φυσικών και χημικών χαρακτηριστικών του περιβάλλοντος, όπως για παράδειγμα σε περιοχές που υπάρχει υψηλή οργανική φόρτιση, όπου είναι εφικτό να παρατηρηθούν αυξημένες συγκεντρώσεις βακτηρίων λόγω ύπαρξης πλούσιου υποστρώματος στο περιβάλλον που ζουν (Wang et al., 2023). Ως δείκτης του οργανικού φορτίου, το COD, θα μπορούσε να παρέχει επαρκή ενέργεια για την ανάπτυξη των ARB και την εξάπλωση των ARG στο περιβάλλον (Zieliński et al., 2021). Σε παγκόσμιες μελέτες, έχει αναφερθεί ότι τα ανθεκτικά στα αντιβιοτικά γονίδια, θα ήταν πιο ενεργά σε μια ευτροφική κατάσταση καθώς θα ενισχυόταν η οριζόντια μεταφορά γονιδίων μεταξύ των βακτηρίων (Yao et al., 2020). Από αυτή την άποψη, οι ανόργανοι ρύποι όπως το $\text{NH}_3\text{-N}$, που αποτελούν σημαντικούς δείκτες του ευτροφισμού του νερού και είναι εφικτό να σχετίζονται στενά με την οριζόντια μεταφορά των ARGs στα υδάτινα περιβάλλοντα (Wang et al., 2023).

2.3. Παρουσία και μεταφορά ανθεκτικών βακτηρίων στο περιβάλλον

Η αντιμικροβιακή αντοχή αποτελεί ανησυχία για τη σύγχρονη κοινωνία, όχι μόνο μεταξύ της δημόσιας υγείας και των ιατρικών κοινοτήτων, στο πλαίσιο των κλινικών περιβαλλόντων, αλλά και στα θέματα περιβαλλοντικής προστασίας, στο φυσικό περιβάλλον. (Raza et al., 2023). Η παρουσία και μεταφορά των αντιβιοτικών στο περιβάλλον, συνδέεται άμεσα με την εξάπλωση των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων και των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά γονιδίων. Παγκόσμιες μελέτες έχουν αναφέρει την παρουσία ανθεκτικών μικροοργανισμών σε δείγματα υδάτων, λυμάτων, επεξεργασμένου πόσιμου νερού, επιφανειακών υδάτων, εδάφους, ακόμα και σε δείγματα αέρα (Knapp et al., 2010; Huang et al., 2012; Korzeniewska et al., 2013; Middleton et al., 2013; Shi et al., 2013). Ωστόσο, τα υδάτινα οικοσυστήματα θεωρούνται οι κύριες αποθήκες για την ανάπτυξη των ανθεκτικών αυτών μικροοργανισμών (Echeverria-Palencia et al., 2017; Li et al., 2023; Jørgensen et al., 2017; Khan et al., 2018; Lai et al., 2021; Radisic et al., 2023).

Αναλυτικότερα, η συσσώρευση και η ανάπτυξη ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων και γονιδίων χαρακτηρίζεται ως ένας αναδυόμενος ρύπος ακόμα και του εδάφους, δημιουργώντας νέες προκλήσεις για την αποκατάσταση, την ανάκτηση και τη διατήρησή του. Η εφαρμογή οργανικών λιπασμάτων στη γεωργία είναι μία από τις πιο σημαντικές πηγές ρύπανσης του εδάφους με ανθεκτικά στα αντιβιοτικά βακτήρια και γονίδια. Για παράδειγμα, έρευνα των Knapp et al., 2010 στις Κάτω Χώρες παρουσίασαν ότι δείγματα εδάφους, περιέχουν έως και 15 φορές περισσότερα γονίδια που μεταφέρουν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά το 2008 σε σύγκριση με δείγματα εδάφους από το 1970. Επιπλέον, σημειώνεται ότι τα αντιβιοτικά μπορούν να επιβιώσουν για παρατεταμένες χρονικές περιόδους στο περιβάλλον και το ελεύθεροDNA που μεταφέρουν τα γονίδια ανθεκτικότητας μπορούν να επιβιώσουν έως και δύο χρόνια στο έδαφος (Knapp et al., 2010). Οι υπάρχουσες τεχνικές για την αποκατάσταση του εδάφους που ρυπαίνεται από ανθεκτικά βακτήρια και γονίδια, είναι πολύ περιορισμένες. Η βιοηλεκτροχημική αποκατάσταση (Bioelectrochemical remediation) χρησιμοποιώντας βιοηλεκτροχημικά συστήματα όπως μικροβιακά κύτταρα καυσίμων (microbial fuel cells) και μικροβιακά κύτταρα ηλεκτρολύσης (microbial electrolysis cells) είναι ορισμένες από τις τεχνολογίες που μπορούν να απομακρύνουν τα ανθεκτικά βακτήρια και γονίδια από το έδαφος (Li et al., 2023).

Οι υδάτινοι αποδέκτες, χρήζουν ιδιαίτερης προσοχής λόγω της ικανότητάς τους να μεταφέρουν σε σύντομο χρονικό διάστημα φαρμακευτικές ουσίες και ανθεκτικούς μικροοργανισμούς στα αντιμικροβιακά, ακόμα και σε απομακρυσμένες περιοχές (Yang et al., 2018). Ανάλογα τον τύπο του υδάτινου οικοσυστήματος, τα ανθεκτικά στα αντιβιοτικά βακτήρια, δρουν και μεταφέρονται με ποικίλους τρόπους, όπως για παράδειγμα στους ποταμούς και στις λίμνες, λόγω των διαφορετικών υδραυλικών τους ιδιοτήτων. Ειδικότερα, στους ποταμούς, η περιεκτικότητα των ρύπων στα ιζήματα μειώνεται διαρκώς στο κατάντι του ποταμού από την πηγή, λόγω των υδραυλικών χαρακτηριστικών τους (Gerolin et al., 2020).

Επιπλέον σημειώνεται ότι στις λίμνες, ο χρόνος παραμονής των ρυπαντικών ουσιών ενισχύεται λόγω της στασιμότητας των υδάτων. Για τον λόγο αυτό, οι λίμνες είναι πιο πιθανό να συσσωρεύουν και να αποθηκεύουν ανθεκτικά βακτήρια και γονίδια στα αντιβιοτικά σε αντίθεση με τα ποτάμια όπου και υπάρχει ροή (Chen et al., 2019). Οι λίμνες, αποτελούν βασικές πηγές φρέσκου νερού με σκοπό τη χρήση του για πόση, καθώς περιέχουν περίπου το 90% του υγρού επιφανειακού γλυκού νερού παγκοσμίως, σε σύγκριση με το 2% των ποταμών (McConnell et al., 2013) και άρα, αυξάνουν έτσι, τον κίνδυνο που σχετίζεται με τα βακτήρια και γονίδια που είναι ανθεκτικά στα αντιβιοτικά.

Παγκόσμιες μελέτες έχουν παρατηρήσει ότι οι εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων αποτελούν κέντρα διάδοσης της αντιμικροβιακής αντοχής στο περιβάλλον καθώς δείγματα από εκροές εγκαταστάσεων περιέχουν μεγάλο πλήθος βακτηρίων ανθεκτικότητας (Guo et al., 2017; Rizzo et al., 2013). Η αναποτελεσματικότητα που παρουσιάζουν οι συμβατικές μονάδες επεξεργασίας λυμάτων για την επιτυχή απομάκρυνση των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων, γονιδίων αλλά και αντιβιοτικών, οδηγεί στην εξάπλωση της ανθεκτικότητας στο περιβάλλον και στις φυσικές πηγές νερού (Miguel Herraiz-Carboné 2021), όπως αναλύεται και στο ακόλουθο υποκεφάλαιο.

2.3.1. Παρουσία ανθεκτικών βακτηρίων στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων

Στα λύματα, η επιβίωση των μικροοργανισμών, ποικίλλει ανάλογα με το είδος τους, αλλά και σύμφωνα με τους φυσικούς, χημικούς και βιολογικούς παράγοντες που υπάρχουν στο περιβάλλον (Delgadillo-Mirquez et al., 2016). Οι φυσικοί παράγοντες που επηρεάζουν την μεταφορά και επιβίωση των μικροοργανισμών που προέρχονται από λύματα, στο θαλάσσιο περιβάλλον είναι η διασπορά, η προσρόφηση σε σωματίδια, η ηλιακή ακτινοβολία και η θερμοκρασία των υδάτων. Αντίστοιχα οι χημικοί παράγοντες περιλαμβάνουν το pH, η αλατότητα και η παρουσία ή έλλειψη θρεπτικών ουσιών. Τέλος, οι βιολογικοί παράγοντες εξαρτώνται για παράδειγμα από τον ανταγωνισμό με την υφιστάμενη χλωρίδα και πανίδα του περιβάλλοντος (Yu et al., 2019; Delgadillo-Mirquez et al., 2016).

Όπως αναφέρθηκε και σε παραπάνω υποκεφάλαιο, ορισμένοι παράγοντες που επηρεάζουν την παρουσία ανθεκτικότητας στα βακτήρια, αποτελούν η παρουσία αντιβιοτικών, βαρέων μετάλλων και μικροπλαστικών (Sambaza et al., 2023). Συγχρόνως, οι παράγοντες που επηρεάζουν την μεταφορά αλλά και την αλληλεπίδραση μεταξύ άλλων ουσιών στο περιβάλλον, είναι ακόμη ασαφείς (Sambaza et al., 2023). Άμεσο ρόλο λαμβάνει η δομή της βακτηριακής κοινότητας, τα κινητά γενετικά στοιχεία (MGEs) και οι φυσικοχημικές ιδιότητες των λυμάτων

(συμπεριλαμβανομένων των COD, DO, NH₃-N, pH και θερμοκρασίας) όπου είναι εφικτό να επηρεάσουν την κατανομή και την μεταφορά της ανθεκτικότητας στα λύματα (Sambaza et al., 2023; Sabri et al., 2020; Guo et al., 2017; Guo et al., 2015).

Τα αστικά λύματα αποτελούν πρόσφορο υπόστρωμα για την ανάπτυξη βακτηρίων και θεωρούνται ευνοϊκά τόσο για την επιβίωση όσο και για τη μεταφορά της ανθεκτικότητας των βακτηρίων (Auerbach et al., 2007; Lindberg et al., 2004). Η ανθεκτικότητα των βακτηρίων στα λύματα παρουσιάζεται ότι είναι είτε φυσική είτε επίκτητη. Παγκόσμιες έρευνες παρουσιάζουν ότι τα αστικά λύματα αποτελούν ιδανικό υπόστρωμα για την επιβίωση και τη μεταφορά των ανθεκτικών βακτηρίων στα αντιβιοτικά, λόγω της αφθονίας ειδών βακτηρίων, της παρουσίας θρεπτικών ουσιών και αντιβιοτικών (Tiwari et al., 2024; Cheng et al., 2020; Wang et al., 2015). Επίσης, σημειώνεται ότι εκτός από τις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων, ακόμα και οι αγωγοί αποχέτευσης περιέχουν βιοφίλμ εσωτερικής επιφάνειας που ενισχύει εξίσου τη συσσώρευση και διασπορά της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά (Auguet et al., 2017).

Επιπλέον, σημειώνεται ότι οι εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων δεν είναι σχεδιασμένες ώστε να απομακρύνουν πλήρως τα αντιβιοτικά και ιδιαίτερα τα υδρόφιλα, ενισχύοντας με τον τρόπο αυτό, το φαινόμενο της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά μεταξύ των βακτηρίων (Xu et al., 2007; Zhang et al., 2017). Παγκόσμιες μελέτες παρουσιάζουν ότι, τα επίπεδα συγκέντρωσης των ανιχνευόμενων αντιβιοτικών στα αστικά λύματα κυμαίνονται σε τιμές από ng/L έως mg/L (Batt et al., 2007; Behera et al., 2011; Rodriguez-Mozaz et al., 2015;). Συγκεκριμένα, έρευνες παρουσιάζουν ότι η παρουσία αντιβιοτικών στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων που έχουν ως αποδέκτες φυσικά υδάτινα συστήματα, κυμαίνεται σε τιμές από 2 ng/L έως 25 mg/L (Oberoi et al., 2019). Ακόμα παγκόσμιες έρευνες των, σε εκροές εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων παρουσιάζουν ποικίλες τιμές συγκεντρώσεων αντιβιοτικών, όπως 8000 ng/L σιπροφλοξασίνης (Mutiyaar and Mittal, 2014), 2000 ng/L σουλφαμεθοξαζόλης (Joshua et al., 2020), 7000 ng/L of κλαριθρομυκίνης (Guerra et al., 2014), 991 ng/L οφλοξασίνης (Le-Minh et al., 2010) και 2469 ng/L τριμεθοπρίμης (Anjali and Shanthakumar, 2019). Έρευνα των Minh et al., 2009, παρουσίασε πως τα αντιβιοτικά και ειδικά οι β-λακτάμες, δεν ήταν εφικτό να απομακρυνθούν πλήρως σε μονάδες επεξεργασίας λυμάτων που διαχειρίζονταν αστικά λύματα. Οι β-λακτάμες παρέμειναν σε υψηλές συγκεντρώσεις και άρα, απαιτείται πρόσθετη επεξεργασία πριν τη διάθεσή τους στο περιβάλλον (Minh et al., 2009).

Ανθεκτικά στα αντιβιοτικά βακτήρια και γονίδια, έχουν εντοπιστεί σε διάφορα στάδια των εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων (Chen and Zhang, 2013; Zhai et al., 2016; Zhang and Zhang, 2011). Έρευνα στην Ιαπωνία, ανέδειξε ότι μια ευρεία ποικιλία σημαντικών βακτηρίων ανθεκτικών στα αντιβιοτικά, γονιδίων αντοχής στα αντιβιοτικά αλλά και αντιμικροβιακά υπολείμματα (residues) έχουν ισχυρή παρουσία στα ανθρώπινα λύματα (Baba, et al. 2022). Καθώς οι εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων αποτελούν δεξαμενή των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων, διευκολύνουν την ανταλλαγή ανθεκτικών στα αντιβιοτικά γονιδίων μέσω οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων μεταξύ των μη - ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων (Hultman et al., 2018, Jacquiod et al., 2017). Ορισμένα ανθεκτικά στα αντιβιοτικά γονίδια δεν απομακρύνονται

κατά τη διάρκεια των διεργασιών επεξεργασίας και ανιχνεύονται στα λύματα εκροής των εγκαταστάσεων (Raza et al., 2022), τα οποία μεταφέρονται στο φυσικό περιβάλλον (Berglund et al., 2015; Quintela-Baluja et al., 2019). Έρευνα των Saxena et al., 2021, παρουσίασαν την ευρεία παρουσία ανθεκτικών γονιδίων στην τετρακυκλίνη στην εκροή των εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων δευτεροβάθμιας επεξεργασίας με ενεργό ιλύ (Saxena et al., 2021). Με τον τρόπο αυτό, κατά τα στάδια επεξεργασίας των εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων, πολλά ανθεκτικά στα αντιβιοτικά βακτήρια και γονίδια όπου απομακρύνονται από τα λύματα, συγκεντρώνονται στην ιλύ (Munir et al., 2011). Μία ευρεία ποικιλία ανθεκτικών γονιδίων στα αντιβιοτικά, που μεταφέρουν την ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά όπως οι βήτα-λακτάμες, οι τετρακυκλίνες, οι σουλφοναμίδες, οι κινολόνες και οι αμινογλυκοσίδες, έχουν ανιχνευθεί σε διάφορα στάδια επεξεργασίας των εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων (Guo et al., 2017, Pazda et al., 2019; Raza et al., 2023).

Έρευνες παρουσιάζουν ότι οι εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων θα μπορούσαν να μειώσουν σημαντικά τους χημικούς ρύπους, αλλά οι δυνατότητες της απομάκρυνσης σε βιολογικούς ρύπους όπως τα ανθεκτικά στα αντιβιοτικά βακτήρια και γονίδια, είναι ακόμα ασαφείς (Sabri et al., 2020). Υπολογίζεται ότι, παγκοσμίως, πάνω από το 80% των λυμάτων απορρίπτεται χωρίς επεξεργασία παρέχοντας άμεση περιβαλλοντική έκθεση σε αντιβιοτικά, βακτήρια και γονίδια ανθεκτικότητας (Hazra et al., 2022). Ορισμένες μελέτες παρουσιάζουν ότι οι εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων μπορούν να μειώσουν αποτελεσματικά τα ανθεκτικά στα αντιβιοτικά βακτήρια και γονίδια (An et al., 2018; Chen and Zhang, 2013; Gulkowska et al., 2008), ενώ άλλες μελέτες ανέφεραν το αντίθετο (Pallares-Vega et al., 2019; Rafraf et al., 2016). Ωστόσο, τόσο τα ανθεκτικά βακτήρια όσο και τα γονίδια ανθεκτικότητας, ανιχνεύονται στα δείγματα από τις εκροές των εγκαταστάσεων ανεξάρτητα από την δυναμική μεταβολή τους, είτε μειώνονται κατά την επεξεργασία, είτε αυξάνονται (Wang et al., 2023).

Παγκόσμιες μελέτες παρουσιάζουν την απομάκρυνση των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων και γονιδίων στις διαδικασίες επεξεργασίας λυμάτων, με καίριο ζήτημα να αποτελεί η διερεύνηση της αποτελεσματικότητας των τεχνολογιών επεξεργασίας τριτοβάθμιας επεξεργασίας λυμάτων (όπως για παράδειγμα η διήθηση με μεμβράνη, ο ενεργός άνθρακας, τα αμμόφιλτρα κ.α.) στην απομάκρυνση ανθεκτικότητας από τις εγκαταστάσεις (Sambaza et al., 2023; Munir et al., 2011; Alexander et al., 2016). Επιπλέον, η επιτυχής απολύμανση των λυμάτων αποτελεί ένα από τα κύρια ζητήματα κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας και εφαρμόζεται ευρέως σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων (Yuan et al., 2015). Απαραίτητη κρίνεται η διερεύνηση από την επιστημονική κοινότητα της απόδοσης των συμβατικών μεθόδων απολύμανσης (χλωρίωση, οζόνωση, υπεριώδη ακτινοβολία). Έρευνα των Kalli et al., 2023 παρουσιάζει την εφαρμογή των προαναφερθέντων διεργασιών απολύμανσης αλλά και των ευρέως χρησιμοποιούμενων προηγμένων διεργασιών οξείδωσης (AOPs) για τον έλεγχο της αντιμικροβιακής αντοχής στα λύματα (Kalli et al., 2023). Ποικίλες τεχνολογίες είναι εφικτό να εφαρμοστούν κατά την επεξεργασία λυμάτων για την απομάκρυνση διαφορετικών τύπων ρύπων, όπως η φωτοκατάλυση με διάφορα υλικά (Li et al., 2022) ή η οζόνωση (Moreira et al., 2016). Για παράδειγμα, οι

προχωρημένες θεραπείες οξείδωσης που βασίζονται στο όζον έχουν αποδειχθεί ότι είναι κατάλληλες για την απομάκρυνση των παθογόνων, συγχρόνως με την απομάκρυνση των αναδυόμενων ρύπων όπως των αντιβιοτικών (Gorito et al., 2021). Ωστόσο, καθώς οι τεχνολογίες αυτές μπορεί να είναι δαπανηρές, άλλες φθηνότερες και πιο πράσινες τεχνολογίες, αποτελούν για παράδειγμα, οι τεχνητοί υγροβιότοποι (Gorito et al., 2017; Galve et al., 2021).

2.3.2. Συστήματα βιολογικής επεξεργασίας λυμάτων

Οι πληθυσμοί των ανθεκτικών βακτηρίων όπως αναφέρθηκε και σε παραπάνω κεφάλαιο, είναι εφικτό να επηρεάζονται άμεσα από την οργανική ουσία που υπάρχει στα λύματα καθώς και από τα θρεπτικά στοιχεία τους (Guo et al., 2018; Korzeniewska and Harnisz, 2018). Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω και με σκοπό την επιτυχή απομάκρυνση τους, τα στάδια των εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων, θα πρέπει να σχεδιάζονται σύμφωνα με τα χαρακτηριστικά των λυμάτων που τίθεται προς επεξεργασία, τους οικονομικούς παράγοντες και τις διαθέσιμες τεχνολογικές διαδικασίες (Li et al., 2022; Delgadillo-Mirquez et al., 2016). Σημειώνεται ότι τα συμβατικά συστήματα δευτεροβάθμιας επεξεργασίας με ενεργό ιλύ αποτελούν μια οικονομική και αποτελεσματική μέθοδο επεξεργασίας για τα αστικά λύματα και εμφανίζουν δυνατότητες απομάκρυνσης αντιβιοτικών, ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων και γονιδίων (Delgadillo-Mirquez et al., 2016).

Οι εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων, με συστήματα βιολογικής επεξεργασίας ενεργού ιλύος, συνήθως περιλαμβάνουν αρχικά στάδια προεπεξεργασίας του εισερχόμενου φορτίου, πρωτοβάθμια επεξεργασία και δευτεροβάθμια βιολογική επεξεργασία με δευτεροβάθμια δεξαμενή καθίζησης. Κατά την προεπεξεργασία, πραγματοποιούνται ποικίλες διεργασίες με σκοπό την απομάκρυνση διαφόρων ογκώδων αντικειμένων και υλικών, όπως ξύλα, πέτρες, πλαστικά, πανιά κ.λπ. Η απομάκρυνση αυτή, κρίνεται απαραίτητη για τη βελτίωση της απόδοσης και της εύρυθμης λειτουργίας των επόμενων σταδίων επεξεργασίας. Εκτός από τη διαδικασία της εσχάρωσης, υφίστανται άλεση ή πολτοποίηση, όπου τα υλικά της εσχάρωσης μετατρέπονται σε πολτό για περαιτέρω επεξεργασία (Κούγκολος, 2007). Αφού απομακρυνθούν τα ογκώδη υλικά ή πολτοποιηθούν, ακολουθεί η διαδικασία της εξάμμωσης των λυμάτων με σκοπό την αφαίρεση υλικών υψηλού ειδικού βάρους, όπως χαλίκια και άμμος. Βασική διεργασία αποτελεί και η απολίπανση όπου πραγματοποιείται απομάκρυνση των λιπαρών υλικών. Οι παραπάνω εκροές, μεταφέρονται σε ειδικές δεξαμενές για καθίζηση και περαιτέρω επεξεργασία. Μετά τη λιποσυλλογή, όπου απομακρύνονται έλαια και λίπη, ακολουθεί η διαδικασία της εξισορρόπησης παροχής όπου εξασφαλίζεται η ομοιόμορφη παροχή στα επόμενα στάδια της επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων (Tchobanogous, et al., 2002; FAO, 2011). Σημειώνεται ότι κατά το στάδιο της προεπεξεργασίας των λυμάτων, δεν πραγματοποιείται εστιασμένη διαχείριση του μολυσματικού

φορτίου και άρα των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων και γονιδίων. Για παράδειγμα με τις επί μέρους διεργασίες κατά την επεξεργασία των λυμάτων απομακρύνεται ένα μικρό ποσοστό αυτών των μικροοργανισμών, όπως στις σχάρες όπου επιτυγχάνεται ποσοστό απομάκρυνσης 10 – 20 % περίπου και στους αμμοσυλλέκτες 10– 25 % (Νταράκας, 2014)

Μετά την προεπεξεργασία, ακολουθεί η πρωτοβάθμια επεξεργασία, όπου πραγματοποιείται απομάκρυνση των οργανικών και ανόργανων στερεών μέσω της φυσικής διεργασίας της καθίζησης. Παράλληλα, πραγματοποιείται και απομάκρυνση των αιωρούμενων στερεών έως και 70%, αφαίρεση του οργανικού υλικού ως BOD₅ έως και 50% και των ελαίων και λιπών που περιέχονται στα λύματα έως και 65% (Κούγκολος, 2007). Σημειώνεται ότι τα διαλυμένα κολλοειδή δεν επηρεάζονται κατά το στάδιο της πρωτοβάθμιας επεξεργασίας. Κατά την πρωτοβάθμια καθίζηση, επίσης, απομακρύνεται ένα μέρος του οργανικού αζώτου, του οργανικού φωσφόρου, καθώς και των βαρέων μετάλλων που περιέχονται στα υγρά απόβλητα. Οι εκροές από τις δεξαμενές πρωτοβάθμιας καθίζησης χαρακτηρίζονται ως πρωτοβάθμια επεξεργασμένα λύματα (Amoatey και Bani, 2011). Σημειώνεται ότι η πρωτοβάθμια επεξεργασία είναι εφικτό να αφαιρέσει μόνο ένα μικρό ποσοστό των ανθεκτικών γονιδίων (Thakali et al., 2020, Yang et al., 2019). Η πρωτοβάθμια επεξεργασία, έχει εξεταστεί από τους Yang et al. (2019), και τα αποτελέσματα παρουσίασαν μείωση 0,17-0,5 log των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά γονιδίων, υποδεικνύοντας τη χαμηλή αποτελεσματικότητα στη μείωσή τους. της παρουσίας γονιδίων αντίστασης. Σημειώνεται ότι κατά την πρωτοβάθμια καθίζηση απομακρύνεται 25 –75 % του ρυπαντικού φορτίου, οργανικών και αιωρούμενων στερεών (Hazra et al. 2022).

Στη συνέχεια ακολουθεί η δευτεροβάθμια επεξεργασία των λυμάτων. Κατά τη δευτεροβάθμια επεξεργασία, τα λύματα υποβάλλονται σε επιπλέον επεξεργασία με σκοπό την απομάκρυνση κυρίως του οργανικού φορτίου. Τα διαλυμένα και κολλοειδή οργανικά στερεά απομακρύνονται μέσω βιολογικών διαδικασιών επεξεργασίας. Κατά τη βιολογική επεξεργασία και ανάλογα τις παραμέτρους που ισχύουν για τα διαμερίσματα του βιολογικού αντιδραστήρα (αερόβια, αναερόβια και ανοξική ζώνη) επιτυγχάνεται απομάκρυνση οργανικού άνθρακα, αζώτου, και φωσφόρου. Η επεξεργασία μπορεί να υλοποιηθεί μέσω φίλτρων μεμβρανών, μεθόδους ενεργού ιλύος, αναερόβια επεξεργασία, τάφρους οξείδωσης και δεξαμενές σταθεροποίησης (Amoatey and Bani, 2011). Η εκροή της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας που απομακρύνεται κατά τη δευτεροβάθμια καθίζηση ονομάζεται δευτεροβάθμια ιλύς και διαχειρίζεται σε συνδυασμό με την πρωτοβάθμια ιλύ για περαιτέρω επεξεργασία (FAO, 2021). Η εκροή λυμάτων, αντίστοιχα, αφορά δευτεροβάθμια επεξεργασμένα λύματα.

Στους βιολογικούς αντιδραστήρες καθώς υπάρχει αφθονία οργανικής τροφής και θρεπτικών συστατικών παρατηρείται αύξηση της εμφάνισης ανθεκτικότητας σε βακτήρια και γονίδια (Cacace et al., 2019; Rizzo et al., 2018). Επιπλέον σημειώνεται ότι σε παγκόσμιες πρόσφατες έρευνες, έχει ερευνηθεί ότι οι αδυναμίες στα συστήματα επεξεργασίας λυμάτων είναι εφικτό να επηρεάσουν τους πληθυσμούς των βακτηριακών κοινοτήτων, τις συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων, την παρουσία μικροπλαστικών και άλλων ουσιών, και κατά συνέπεια να αυξήσουν τα ποσοστά ανθεκτικότητας (Pallares-Vega et al., 2019; Quintela-Baluja et al., 2019).

Παγκόσμιες μελέτες εξέτασαν την παρουσία και τον πολλαπλασιασμό των ανθεκτικών γονιδίων στα αντιβιοτικά, σε πλήρους κλίμακας εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων, δευτεροβάθμιας επεξεργασίας ενεργού ιλύος και παρατήρησαν ότι τα ανθεκτικά γονίδια αυξήθηκαν σημαντικά στις δεξαμενές αερισμού λόγω της σημαντικής ανάπτυξης των βακτηρίων (Zhang et al., 2015; Mao et al., 2015). Έρευνες παρουσιάζουν ότι ο πληθυσμός των κολοβακτηρίων σε αστικά λύματα κυμαίνεται συνήθως σε 10^7 CFU / 100mL (Al-Jassim et al., 2015; Mokracka et al., 2012) και μέσω των διεργασιών κατά την δευτεροβάθμια επεξεργασία των λυμάτων απομακρύνεται μεγάλο ποσοστό αυτών των μικροοργανισμών. Συγκεκριμένα, έρευνα των Christgen et al., παρουσιάζει την επιτυχή απομάκρυνση που πραγματοποιείται σε αερόβιους αντιδραστήρες για τα ανθεκτικά στα αντιβιοτικά βακτήρια και γονίδια (Christgen et al., 2015).

Σε αντίθεση, ορισμένες μελέτες έχουν παρουσιάσει ότι η βιολογική επεξεργασία των λυμάτων, δεν είναι εφικτό να μειώσει σημαντικά τη σχετική αφθονία των γονιδίων ανθεκτικότητας (Thakali et al., 2020; Sabri et al., 2020). Συγκεκριμένα, έρευνα των Sabri et al., 2020, παρουσιάζει ότι η δευτεροβάθμια δεξαμενή καθίζησης αφαιρεί κλάσμα ανθεκτικών γονιδίων, έχοντας ως αποτέλεσμα την μεταφορά των ανθεκτικών γονιδίων στην φάση της ιλύος (Sabri et al., 2020). Μέσω της βιολογικής επεξεργασίας και πιο συγκεκριμένα με τη μέθοδο της ενεργού ιλύος επιτυγχάνεται απομάκρυνση 90 – 98 % των ανθεκτικών βακτηρίων, αλλά τα ποσοστά απομάκρυνσης των ανθεκτικών γονιδίων είναι πολύ μικρότερα (Al-Jassim et al., 2015; Mokracka et al., 2012).

Σημειώνεται ότι η παρουσία η μεταφορά των ανθεκτικών γονιδίων και βακτηρίων στα αντιβιοτικά, στα αστικά λύματα, ποικίλει ανάλογα με τα στάδια επεξεργασίας που υφίστανται τα λύματα και την ποσότητα που είναι εφικτό να επεξεργαστούν, ανάλογα με την εισερχόμενη παροχή τους (Novo et al., 2010). Σημειώνεται ότι μεγαλύτεροι χρόνοι παραμονής έως και 24 ώρες απομάκρυναν σε μεγαλύτερα ποσοστά τα δεκτικά στα αντιβιοτικά βακτήρια συγκριτικά με μικρότερους χρόνους παραμονής από 9 έως 12 ώρες (Novo et al., 2010).

Παρά την επιτυχή απομάκρυνση των ανθεκτικών βακτηρίων ακόμα και κατά 99% κατά τη δευτεροβάθμια επεξεργασία, ορισμένα ανθεκτικά βακτήρια ανιχνεύονται στις εκροές εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων με αποτέλεσμα την άμεση εισροή τους στα φυσικά υδάτινα οικοσυστήματα (Osińska et al., 2020). Το πρόβλημα που σχετίζεται με την ανθεκτικότητα των βακτηρίων που προέρχονται από εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων, στα φυσικά υδάτινα συστήματα, παρουσιάζει ιδιαίτερους κινδύνους για τη δημόσια υγεία και για τον λόγο αυτό θα πρέπει να ερευνηθούν περαιτέρω οι μέθοδοι απομάκρυνσής τους από τις εγκαταστάσεις (Khan et al., 2020).

UASB

Η αναερόβια επεξεργασία επιτυγχάνει υψηλά ποσοστά ανάκτησης ενέργειας, με ταυτόχρονη μείωση της παραγόμενης ιλύος και χαρακτηρίζεται ως ένα σύστημα με σταθερό πληθυσμό μικροοργανισμών που προτείνεται σε πολλές χώρες ως σύστημα επεξεργασίας λυμάτων (Tao et al., 2017). Κατά την αναερόβια επεξεργασία οι μικροοργανισμοί μετατρέπουν την οργανική ύλη σε μεθάνιο και βιομάζα υπό την απουσία οξυγόνου (Anukam et al., 2019). Παράγοντες που επηρεάζουν την αναερόβια διεργασία, είναι η διαθεσιμότητα θρεπτικών και ιχνοστοιχείων, η παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων ιόντων (νατρίου, καλίου, μαγνησίου), βαρέων μετάλλων, οξυγόνου O₂, αμμωνίας, σουλφιδίων, χλωριδίων, νιτρικών και θειϊκών, είναι εφικτό να αναχαιτίσουν την αναερόβια διεργασία.

Η αναερόβια επεξεργασία έχει παρουσιαστεί ότι μπορεί να απομακρύνει επιτυχώς τα ανθεκτικά στα αντιβιοτικά βακτήρια και γονίδια (Christgen et al., 2015). Επιπλέον παγκοσμίως έρευνες παρουσιάζουν την επιτυχή απομάκρυνση των αντιβιοτικών που μπορούν να παρουσιάσει η αναερόβια επεξεργασία (Golet et al., 2003). Συγκεκριμένα σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους Narumiya et al., παρουσιάστηκε ότι αναερόβια επεξεργασία είναι εφικτό να απομακρύνει αντιβιοτικά όπως η ερυθρομυκίνη >50% (Narumiya et al., 2013). Έχει παρατηρηθεί ότι βιοαποδόμηση των αντιβιοτικών εξαρτάται κυρίως από το στάδιο της μεθανογένεσης, ακολουθούμενη από το στάδιο της ακετογένεσης και της οξικογένεσης (Alvarino et al., 2014; Gonzalez-Gil et al., 2017; Gonzalez-Gil et al., 2018; Kennes-Veiga et al., 2022; Paranhos et al., 2022). Η συγκέντρωση των αντιβιοτικών στην ιλύ, παρουσιάζεται ότι επηρεάζει την αερόβια χώνευση, την αφθονία των μικροοργανισμών αλλά και την παρουσία των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά γονιδίων πιθανόν λόγω της επιλεκτικότητας που μπορεί να πραγματοποιηθεί στις συνθήκες αυτές (Wang et al., 2023).

Τεχνητοί Υγροβιότοποι

Οι τεχνητοί υγροβιότοποι, χρησιμοποιούνται για την επεξεργασία αστικών λυμάτων, βιομηχανικών υγρών αποβλήτων, αποβλήτων ορυχείων, επιφανειακή απορροή (γεωργικές εκτάσεις, αυτοκινητόδρομους) (Crites and Tchobanoglous, 1998). Σημειώνεται ότι στην κατηγορία των εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων μικρής κλίμακας περιλαμβάνονται και οι τεχνητοί υγροβιότοποι, μεταξύ άλλων. Τα πλεονεκτήματά τους περιλαμβάνουν το χαμηλό κόστος κατασκευής, το χαμηλό λειτουργικό κόστος, την αντοχή σε διακυμάνσεις υδραυλικού και ρυπαντικού φορτίου (πολύ μικρές παροχές – έως αρκετά μεγάλες), την επίτευξη υψηλής απομάκρυνσης ρυπαντικού φορτίου κατά την επεξεργασία, την προσαρμογή που εμφανίζουν στο

οικοσύστημα καθώς και το γεγονός ότι αποτελούν μέρος διαβίωσης πανίδας. Επιπλέον, προσφέρουν βελτίωση της αισθητικής, είναι εφικτό να επεξεργαστούν πλημμυρικές απορροές και αποτελούν μια πράσινη τεχνολογία μέσω φυσικών διεργασιών (Αγγελάκης and Tchobanoglous, 1995; Bernharthorton et al., 2023).

Οι τεχνητοί υδροβιότοποι χρησιμοποιούνται ευρέως ως μέθοδος επεξεργασίας λυμάτων λόγω του χαμηλού κόστους εγκατάστασης και συντήρησης, της εύκολης λειτουργίας και της αποτελεσματικότητας στην απομάκρυνση ρύπων (Christofilopoulos et al., 2019, He et al., 2018, Huang et al., 2017). Έρευνες παρουσιάζουν την υψηλή απόδοση στην απομάκρυνση των θρεπτικών συστατικών, των αντιβιοτικών και των βακτηρίων ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά από λύματα (Li et al., 2019, Liu et al., 2019, Santos et al., 2019). Πρόσφατες μελέτες παρουσίασαν την δυνατότητα των τεχνητών υδροβιότοπων στην αποτελεσματική απομάκρυνση μικρορυπαντών όπως φαρμακευτικά και προσωπικά προϊόντα φροντίδας από τα αστικά λύματα (Chen et al., 2016, Dvořáková březinova et al. 2018; Gorito et al., 2018).

Επιπλέον, σημειώνεται ότι οι τεχνητοί υδροβιότοποι είναι συστήματα που έχουν σχεδιαστεί για να προσομοιώνουν την ικανότητα που διαθέτουν οι φυσικοί υγρότοποι να επεξεργάζονται τα ρυπασμένα ύδατα (Bôto et al., 2023). Αυτά τα συστήματα συνδυάζουν την δράση της χλωρίδας, του εδάφους και των μικροοργανισμών που δρουν σε έναν φυσικό υδροβιότοπο, με σκοπό την απομάκρυνση των ρύπων μέσω ενός συνδυασμού φυσικών, χημικών και βιολογικών διεργασιών (Almeida et al., 2017). Τα μακρόφυτα διαδραματίζουν βασικό λειτουργικό ρόλο στα υδρόβια οικοσυστήματα (Prančl et al., 2014) και είναι εφικτό να επηρεάσουν τις οικολογικές διεργασίες όπως η μεταφορά θρεπτικών ουσιών και να διατηρήσουν την υγεία των υδρόβιων οικοσυστήματος απελευθερώνοντας οξυγόνο (Li et al., 2021). Μελέτη των Sakurai et al., 2021, παρουσιάζει ότι οι τεχνητοί υδροβιότοποι που συνδυάζουν την οριζόντια και κατακόρυφη ροή υπόγειας επιφάνειας εμφανίζουν υψηλή απόδοση στην απομάκρυνση των αντιβιοτικών, μειώνοντας την εξάπλωση της ανθεκτικότητας.

Οι κύριοι μηχανισμοί απομάκρυνσης στους τεχνητούς υδροβιότοπους περιλαμβάνουν τη βιοαποικοδόμηση, την προσρόφηση του εδάφους, την απορροή, την πρόσληψη ουσιών από τα φυτά, τη φωτόλυση και την υδρόλυση (García et al., 2003, Uggetti et al., 2016, Ávila et al., 2017). Αναλυτικότερα όσον αφορά τα αιωρούμενα στερεά ο κύριοι μηχανισμοί απομάκρυνσης τους είναι η καθίζηση, η διήθηση και η βιοαποδόμηση. Ο διαλυτός οργανικός άνθρακας είναι εφικτό να απομακρυνθεί μέσω της αερόβιας και της αναερόβιας βιοαποδόμησης. Η χημική σύσταση του αζώτου είναι εφικτό να μεταβληθεί μέσω των διεργασιών της αμμώνιοποίησης, της νιτροποίησης, της απονιτροποίησης, της προσρόφησης, της φυτοαπορρόφησης αλλά και της πτητικοποίησης. Όσον αφορά τις φωσφορικές ενώσεις οι μηχανισμοί που συμβάλλουν στην απομάκρυνση τους είναι η προσρόφηση, η καθίζηση και η φυτοαπορρόφηση. Τα μέταλλα είναι εφικτό να απομακρυνθούν μέσω της προσρόφησης της ιοντοανταλλαγής της κατακρήμνισης της φυτοαπορρόφησης και της βιοαποδόμησης. Τέλος οι παθογόνοι μικροοργανισμοί απομακρύνονται μέσω καθίζησης, διήθησης, UV-ακτινοβολίας αλλά και μέσω προσθήκης

χημικών μέσων που οδηγούν στην εξάλειψη των μικροοργανισμών (Álvarez et al., 2017, Pelissari et al., 2018).

Οι μικροοργανισμοί συντελούν ενεργά στην απομάκρυνση των μικρορυπαντών στους τεχνητούς υδροβιότοπους (Chen and Xie, 2018; He et al., 2018; Hijosa-Valsero et al., 2010; Petrie et al., 2018). Έρευνα των Dan et al., 2013, παρουσιάζει ότι η βιοαποικοδόμηση είναι ο σημαντικότερος μηχανισμός απομάκρυνσης για τις σουλφοναμίδες στους τεχνητούς υδροβιότοπους. Εκτός αυτού, η παρουσία αντιβιοτικών, είναι εφικτό να μεταβάλλει τη δομή και τη λειτουργία της μικροβιακής κοινότητας (Huang et al., 2017; Santos et al., 2019). Οι τεχνητοί υδροβιότοποι έχουν χαρακτηριστεί, τα τελευταία χρόνια, για την αποτελεσματική επεξεργασία των λυμάτων και την απομάκρυνση των ρύπων, όπως μέταλλα, αντιβιοτικά και θρεπτικά συστατικά, από τα λύματα αντιπροσωπεύοντας μια εναλλακτική λύση στην επεξεργασία λυμάτων (Bôto et al., 2016; Almeida et al., 2017; Liang et al., 2017; Wang et al., 2018; Flores et al., 2019; Santos et al., 2019; Galve et al., 2021).

Έρευνα των Harza et al., 2022, παρουσίασε, ότι στις χώρες χαμηλού εισοδήματος, μόνο το 8-28% των λυμάτων αντιμετωπίζεται μέσω συμβατικών διεργασιών επεξεργασίας, με αποτέλεσμα το περιβάλλον εκτίθεται σε υψηλά επίπεδα ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων και γονιδίων, αλλά και φαρμακευτικών προϊόντων. Η χρήση των τεχνητών υδροβιότοπων παρέχει τη δυνατότητα να αποτελεί λύση χαμηλού κόστους για επεξεργασία λυμάτων, είτε ως αυτόνομη διαδικασία επεξεργασίας είτε όταν ενσωματώνεται με συμβατικά συστήματα επεξεργασίας. Οι τεχνητοί υδροβιότοποι έχουν επίσης ερευνηθεί για τη μείωση των υπολειμμάτων αντιβιοτικών, των φαρμακευτικών προϊόντων και των αναδυόμενων ρύπων. Δεδομένων των πλεονεκτημάτων των τεχνητών υδροβιότοπων, αποτελούν μια οικονομική ιδανική λύση επεξεργασίας λυμάτων (Harza et al., 2022).

Συστήματα τριτοβάθμιας επεξεργασίας

Το στάδιο της τριτοβάθμιας επεξεργασίας αποβλήτων, εφαρμόζεται όταν απαιτείται η απομάκρυνση των υπολειμμάτων που πιθανώς διαφεύγουν από τη δευτεροβάθμια επεξεργασία (Amoatey and Bani, 2011). Η τριτοβάθμια επεξεργασία απομακρύνει σημαντικές ποσότητες αζώτου, φωσφόρου, βαρέων μετάλλων, οργανικών ρύπων και παθογόνων και επιτυγχάνει υψηλής ποιότητας εκροή με χαμηλή περιεκτικότητα σε παθογόνα και αιωρούμενα στερεά (Zagklis and Bampos, 2022). Οι μέθοδοι τριτοβάθμιας επεξεργασίας περιλαμβάνουν διήθηση με συστήματα μεμβρανών, διήθηση άμμου και διήθηση με ενεργό άνθρακα, όπου παρουσιάζουν υψηλή απομάκρυνση φορτίων (Κούγκολος, 2007). Μερικά φίλτρα έχουν βελτιωθεί με αποτέλεσμα τον συνδυασμό των δύο, δηλαδή και τα φίλτρα και οι μεμβράνες να έχουν την ικανότητα να αφαιρούν τα ελμίνθια, ένα είδος νηματωδών. Η πιο πρόσφατη μέθοδος που έχει χρησιμοποιηθεί είναι η

διήθηση δίσκου, η οποία χρησιμοποιεί μεγάλους δίσκους υφασμάτων που συνδέονται με περιστρεφόμενα τύμπανα για φιλτράρισμα (Amoatey and Bani, 2011; FAO, 2021).

Αναλυτικότερα, τα φίλτρα μεμβράνης εφαρμόζονται ευρέως για την επεξεργασία λυμάτων με σκοπό την επαναχρησιμοποίηση (Krzeminski et al., 2020; Acero et al., 2010). Ανάλογα με το μέγεθος των πόρων των μεμβρανών, πραγματοποιείται και η αντίστοιχη διεργασία μικροδιήθησης (MF), υπερδιήθησης (UF), νανοδιήθησης (NF) και αντίστροφης ώσμωσης (RO) (Brandhuber et al., 1998). Η βιοαντιδραστήρες MBR (Membrane Bioreactor) αποτελούν ένα συνδυασμό συστήματος μεμβρανών και βιολογικής επεξεργασίας για την απομάκρυνση οργανικής ύλης, μικρορυπαντών και βακτηρίων (Radjenovic et al., 2009). Παγκόσμιας έρευνας παρουσιάζουν την πλήρη απομάκρυνση των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων και την απομάκρυνση γονιδίων κατά 7.1 log, που είναι εφικτό να πραγματοποιήσουν οι αντιδραστήρες MBR (Le et al. 2018). Ακόμα σημειώνεται ότι σε έρευνα των Karaolia et al., παρατηρήθηκε ότι οι αντιδραστήρες MBR δεν ήταν εφικτό να απομακρύνουν επιτυχώς ανθεκτικά στα αντιβιοτικά γονίδια (Karaolia et al., 2022).

Όσον αφορά τα φίλτρα άμμου, χρησιμοποιούνται ως μια τρίτοβάθμια μέθοδος επεξεργασίας αστικών λυμάτων. Επιπλέον σημειώνεται, ότι τα φίλτρα άμμου μπορούν να συνδυαστούν με συμβατικές μεθόδους απολύμανσης προκειμένου να μειωθεί η δόση των απολυμαντικών μέσων και ο σχηματισμός τοξικών υποπροϊόντων απολύμανσης (Langenbach et al., 2010; Gómez et al., 2006). Παγκόσμιες μελέτες παρουσιάζουν την αποτελεσματική απομάκρυνση παθογόνων μικροοργανισμών από φίλτρα άμμου και μελετούν την αύξηση του βάθους της άμμου, ως προς την αύξηση της απομάκρυνσης των βακτηρίων, λόγω της αντίστοιχης αύξησης των ενεργών θέσεων προσρόφησης (Langenbach et al., 2009). Σε έρευνα των Qian et al., παρουσιάστηκε ότι οι πληθυσμοί *E. coli* απομακρύνθηκαν με χρήση βιολογικού φίλτρου άμμου κατά 96,1% (Qian et al. 2022). Ωστόσο, σε έρευνα των McConnell et al., παρουσιάστηκε ελαφρά μείωση (0,26 log) στα συνολικά ανθεκτικά στα αντιβιοτικά γονίδια που μετρήθηκαν με διήθηση άμμου (McConnell et al., 2018). Επιπλέον, οι Sabri et al., παρουσίασαν ότι η διήθηση άμμου μετά από αντιδραστήρα ενεργού ιλύος και δεξαμενή καθίζησης, μείωσαν περαιτέρω τα ανθεκτικά στα αντιβιοτικά γονίδια κατά 0,71–1,75 log (Sabri et al., 2020).

Ο ενεργός άνθρακας χρησιμοποιείται συχνά για την προσρόφηση ποικίλων ρύπων από τα λύματα, όπως είναι οι οργανικές ενώσεις, τα βαρέα μέταλλα και τα φαρμακευτικά προϊόντα (Bali et al., 2019; Kårelid et al., 2017). Ο ενεργός άνθρακας έχει ανιχνευθεί ότι είναι εφικτό να χρησιμοποιηθεί για την προσρόφηση αντιβιοτικών, ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτήρια και γονίδια, που βρίσκονται στα λύματα (Spit et al., 2022). Ωστόσο, η αφαίρεση ανθεκτικών βακτηρίων και γονιδίων, χρήζει περαιτέρω έρευνα από την επιστημονική κοινότητα, καθώς δεν υπάρχουν πολλές μελέτες που να διευκρινίζουν εάν ο ενεργός άνθρακας αυξάνει ή μειώνει τα ανθεκτικά στα αντιβιοτικά βακτήρια και γονίδια (Slipko et al. 2022). Έρευνα των Spit et al., παρατήρησαν σε πιλοτικό σύστημα οζονισμού και διήθησης ενεργού άνθρακα, ότι οι ανθεκτικοί στο αντιβιοτικό της βανκομυκίνης εντερόκοκκοι, αυξήθηκαν κατά 0,5 log μετά τη διήθηση με

ενεργό άνθρακα, παρουσιάζοντας ότι ο ενεργός άνθρακας αυξάνει την ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά (Spit et al. 2022).

Μετά την τριτοβάθμια επεξεργασία, πραγματοποιείται και η διαδικασία της απολύμανσης όπως παρουσιάζεται στο ακόλουθο υποκεφάλαιο, που αποτελεί το τελευταίο βήμα στην επεξεργασία των υγρών αποβλήτων πριν αυτά διατεθούν ελεύθερα στο υδάτινο οικοσύστημα. Η απολύμανση γίνεται με τη χρήση πολλών μεθόδων συμπεριλαμβανομένης της χρήσης χλωρίου, όζοντος και υπερϊώδους ακτινοβολίας. Πραγματοποιείται ούτως ώστε τα υγρά απόβλητα να πληρούν όλους τους διεθνείς κανόνες και πρότυπα για την αγροτική και αστική επαναχρησιμοποίησή τους (Amoatey and Bani, 2011).

2.3.3. Μέθοδοι απολύμανσης

Οι βασικοί μηχανισμοί δράσης της απολύμανσης που χρησιμοποιούνται για την απομάκρυνση των παθογόνων μικροοργανισμών από τα λύματα, είναι εφικτό να προκαλούν φθορά στο κυτταρικό τοίχωμα των μικροοργανισμών ή να ασκούν επίδραση στη διαπερατότητα του κυττάρου, ενώ παράλληλα μεταβάλλουν την κολλοειδή φύση του πρωτοπλάσματος (Macaulay et al., 2017). Επιπλέον, προβαίνουν σε μεταβολές στο DNA ή RNA των μικροοργανισμών, ενώ τέλος, παρεμποδίζουν την ενζυμική δράση. Οι παραπάνω μηχανισμοί αποτελούν βασικά εργαλεία για την αποτελεσματική απολύμανση των υγρών αποβλήτων, εξασφαλίζοντας την αντιμετώπιση και εξάλειψη μικροοργανισμών (Lin et al., 2016).

Χλωρίωση

Η μέθοδος της χλωρίωσης των λυμάτων αποτελεί την πιο διαδεδομένη μέθοδο επεξεργασίας απολύμανσης καθώς πρόκειται για μια οικονομική και εύκολη μέθοδο διαχείρισης των παθογόνων μικροοργανισμών (Lin et al., 2016; Fiorentino et al., 2015). Η κατανάλωση χλωρίου που παρουσιάζουν τα λύματα εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά τους.

Η πλέον ευρέως διαδεδομένη ένωση που χρησιμοποιείται κατά τη διαδικασία της χλωρίωσης είναι το υποχλωριώδες νάτριο (sodium hypochlorite, NaOCl). Πρόκειται για μια χημική ουσία που διατίθεται σε υδατικό διάλυμα (από 3 έως 12%, με συνηθέστερη περιεκτικότητα περίπου 5%) ως λευκαντικό, απολυμαντικό και αποσμητικό υγρό με τη γενική ονομασία χλωρίνη (Kesar and Bhatti, 2022). Το υποχλωριώδες νάτριο παρασκευάστηκε το 1789, στο Παρίσι από

τον χημικό Claude Louis Berthollet, όπου με σκοπό τη σύνθεσή του, χρησιμοποιήθηκε αέριο χλώριο που διαβιβάστηκε μέσω διαλύματος ανθρακικού νατρίου, με αποτέλεσμα την ακόλουθη αντίδραση.



Η διαδικασία της χλωρίωσης συνήθως εφαρμόζεται σε δεξαμενές που διαθέτουν μαιανδρική ροή, με τον χρόνο επαφής να ανέρχεται τουλάχιστον σε 20 λεπτά, ενώ μπορεί να κριθεί απαραίτητη η υπέρβαση αυτού του χρονικού διαστήματος. Η επιλογή δεξαμενών με μορφή μαιανδρικής ροής, εξασφαλίζει τη δημιουργία εμβολικής ροής και την επίτευξη του επιθυμητού χρόνου επαφής με το χλώριο και τα λύματα. Για την υλοποίηση αυτού, απαιτείται η κατασκευή μιας δεξαμενής μεγάλου μήκους, με τον λόγο μήκους προς πλάτος της ροής να κυμαίνεται σε περίπου 40:1. Πρακτική κρίνεται η προσθήκη χλωρίου σε περιοχές με έντονη ανάδευση, είτε αυτή δημιουργείται μηχανικά είτε με υδραυλικό τρόπο, ώστε να εξασφαλίζεται η επιτυχημένη απομάκρυνση των μικροοργανισμών (Νταρακάς, 2016).

Ποικίλες ανόργανες και οργανικές χημικές ενώσεις, αλληλοεπιδρούν με την απομάκρυνση των παθογόνων μικροοργανισμών κατά την απολύμανση, όπως για παράδειγμα αζωτούχες ενώσεις και υδρόθειο (Guo et al., 2015). Η παρουσία διαλυμένων οργανικών υλών οδηγεί σε μείωση της απόδοσης της καταστροφής των παθογόνων μικροοργανισμών. Στο ακατέργαστο νερό, η θολότητα αποτελείται από ανόργανα στοιχεία όπως λάσπη, άργιλος, οξείδια σιδήρου και από οργανική ύλη καθώς επίσης και από μικροβιακά κύτταρα. Η θολότητα αξιολογείται με την εκτίμηση της σκέδασης του φωτός από διασκορπισμένα υλικά που υπάρχουν στο νερό.

Η θολότητα αλληλοεπιδρά με την παρουσία των παθογόνων μικροοργανισμών στο νερό, αλλά μπορεί επίσης να μειώσει την απόδοση του χλωρίου και άλλων μεθόδων απολύμανσης. Η απομάκρυνση της θολότητας βασίζεται στο γεγονός ότι οι μικροοργανισμοί που συνδέονται με σωματίδια είναι πιο ανθεκτικοί από τους ελεύθερα αιωρούμενους μικροοργανισμούς. Σημειώνεται ότι ο συνολικός οργανικός άνθρακας (TOC), που σχετίζεται με τα κolloειδή στερεά, αλληλοεπιδρά με το χλώριο που παραμένει στο νερό. Τέλος, σε παγκόσμιες έρευνες παρουσιάζεται πως η μείωση της θολότητας σε <0,1 NTU, είναι εφικτό να αποτελέσει προληπτική δράση για την αποτροπή της παρεμπόδισης της απολύμανσης λόγω ύπαρξης στερεάς ύλης (Bitton, 2011; Gernaout, 2017).

Σημειώνεται ότι, μέγιστη απολύμανση επιτυγχάνεται για τιμές pH μεταξύ 5,5 και 7,5. Όσο υψηλότερη είναι η τιμή του pH και όσο χαμηλότερη είναι η θερμοκρασία τόσο περισσότερη ποσότητα χλωρίου απαιτείται για την επιτυχή απολύμανση. Το φως, η θερμοκρασία και ίχνη βαρέων μετάλλων δημιουργούν απώλειες ενεργού χλωρίου λόγω μετατροπής του σε χλωρικό και χλωριώδες νάτριο (Νταράκας, 2014)

Η δράση του χλωρίου στους μικροοργανισμούς αποτελεί μείζον θέμα έρευνας, καθώς έχει παρατηρηθεί ότι το χλώριο είναι εφικτό να αυξήσει την ανθεκτικότητα των βακτηρίων (Guo et al., 2015). Επιπλέον, σημειώνεται η δυνατότητα ορισμένων μικροοργανισμών να εμφανίσουν ανθεκτικότητα και στο χλώριο, επιδεινώνοντας με τον τρόπο αυτό το πρόβλημα διαχείρισής τους, όπως αναλύεται στη συνέχεια (Destiani et al., 2019).

Έρευνα των Grabow et al., 1976, αναφέρει ότι το ποσοστό των ανθεκτικών βακτηρίων στην αμικικιλίνη σε δείγματα λυμάτων μετά από τη διαδικασία της απολύμανσης με τη μέθοδο της χλωρίωσης, μεταβάλλεται ελαφρώς ή ακόμα και μειώνεται. Παρόμοια αποτελέσματα, παρουσίασαν και οι Iwane et al., 2001, καθώς στα δείγματα που ανέλυσαν η μέθοδος της χλωρίωσης δεν επηρέασε σημαντικά το ποσοστό ανθεκτικότητας στα *E. Coli* στα αντιβιοτικά (από 14,7 έως 14,0%). Αναλυτικότερα, το αντιβιοτικό της αμικικιλίνη παρουσίασε σταθερή τιμή στο 7,3% και η τετρακυκλίνη εμφάνισε τιμές από 8,0% στο 6,7% (Iwane et al., 2001). Ποικίλες έρευνες παρουσιάζουν την ασυνέπεια που εμφανίζει η χλωρίωση στην απομάκρυνση των ανθεκτικών βακτηρίων ακόμη και για το ίδιο είδος (Gao et al., 2012, Munir et al., 2011). Σε αντίθεση, άλλες παγκόσμιες έρευνες παρουσιάζουν την επιτυχή απομάκρυνση ανθεκτικών βακτηρίων με τη μέθοδο της χλωρίωσης των λυμάτων (Macauley et al.; 2006, Huang et al., 2011). Η έλλειψη δεδομένων καθιστά το πρόβλημα της ανθεκτικότητας ακόμα ασαφές και η αποτελεσματικότητα της χλωρίωσης στη μείωση της ανθεκτικότητας των βακτηρίων χρήζει περαιτέρω διερεύνηση.

Σημειώνεται ότι σε δείγματα λυμάτων, η αποτελεσματική απενεργοποίηση των ανθεκτικών βακτηρίων, είναι εφικτό να μην υποδηλώνει την εξάλειψη της αντοχής στα αντιβιοτικά. Η παρουσία και μεταφορά των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά γονιδίων πρέπει επίσης να ληφθεί υπόψη στη διερεύνηση του ζητήματος. Έρευνες παρουσιάζουν ότι τα ανθεκτικά στα αντιβιοτικά γονίδια που μεταφέρονται στο περιβάλλον, είναι εφικτό να παραμείνουν ενεργά για μεγάλο χρονικό διάστημα και στη συνέχεια να μεταφερθούν στους οργανισμούς (Pruden et al., 2006; Rizzo et al., 2013). Επομένως, η χλωρίωση αποτελεί μια από τις κύριες μεθόδους που πρέπει να αξιολογούνται σχετικά με την αποτελεσματικότητά της στη μείωση της ανθεκτικότητας (Rizzo et al., 2013).

Επιπλέον, σημειώνεται ότι, σε έρευνα των Kennedy et al., 2019 που πραγματοποιήθηκε σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων, βρέθηκε ότι κατά τη διαδικασία της απολύμανσης με χλωρίωση, το χρησιμοποιούμενο χλώριο αντιδρά με ποικίλες ουσίες και δημιουργεί ως προϊόντα νέες ενώσεις που έχουν παρόμοια δομή με άλλα είδη αντιβιοτικών, όπως οι χλωροτετρακυκλίνες που χρησιμοποιούνται ευρέως στον πρωτογενή τομέα της κτηνοτροφίας. Ορισμένοι οργανισμοί ανθεκτικοί στα αντιβιοτικά παρουσιάζονται ότι εμφανίζουν ανθεκτικότητα και στο χλώριο, αποδυναμώνοντας με τον τρόπο αυτό, την επίδραση της (Huang et al., 2011; Armstrong et al., 1982; Murray et al., 1984; Templeton et al., 2009). Παγκόσμιες έρευνες παρουσιάζουν την δυνατότητα των εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων απομακρύνουν ανθεκτικά στα αντιβιοτικά βακτήρια, χωρίς όμως να απομακρύνονται επιτυχώς και τα ανθεκτικά στα αντιβιοτικά γονίδια (Wallmann et al., 2021), και παρατηρείται ότι χρειάζονται μεγαλύτερες δόσεις χλωρίου

και χρόνο παραμονής ώστε να επιτευχθεί η πλήρη απομάκρυνση των γονιδίων ανθεκτικότητας (Zhang et al., 2019; Liu et al., 2018). Ωστόσο, εξακολουθούν να υπάρχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα σχετικά με την απομάκρυνση του ποσοστού ανθεκτικών βακτηρίων με χλωρίωση (Huang et al., 2011).

Παγκόσμιες έρευνες παρουσιάζουν ότι η εμφάνιση ανθεκτικότητας που δημιουργείται λόγω των απολυμαντικών μέσων, αποτελεί ένα από τα κυριότερα προβλήματα για την δημόσια υγεία στις μέρες μας, σε συνδυασμό με την πανδημία COVID-19 (O'Neill, 2016). Για παράδειγμα, τα αντισηπτικά περιέχουν ως συστατικά ενώσεις τεταρτοταγούς αμμωνίου (Tandukar et al., 2013) και αιθανόλης (Pidot et al., 2018). απολυμαντικά με βάση το χλώριο (Li et al., 2016); και υποπροϊόντα απολύμανσης (Lu et al., 2018) όπου είναι εφικτό να ενισχύσουν την εξάπλωση της ανθεκτικότητας στους μικροοργανισμούς μέσω μετάλλαξης ή οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων. Με τον τρόπο αυτό, οι τρέχουσες αυξήσεις στις πρακτικές απολύμανσης είναι εφικτό να θέτουν σε κίνδυνο το περιβάλλον και τη δημόσια υγεία επιταχύνοντας την εξάπλωση της ανθεκτικότητας (Ji et al., 2021). Επιπλέον, σημειώνεται ότι η χημική επεξεργασία των λυμάτων εμφανίζει μακροπρόθεσμες χημικές επιδράσεις στο περιβάλλον, μερικές από τις οποίες είναι αρνητικές (Hoyle and Svendsen, 2016). Οι οξειδωτικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται στις AOPs περιλαμβάνουν το όζον (O_3), UV και το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2). Χρησιμοποιούνται πολύ συχνά οι διεργασίες H_2O_2/O_3 , O_3 / UV και H_2O_2/UV . Άλλες πιο καινοτόμες, όπως η φωτοκατάλυση του διοξειδίου του τιτανίου (TiO_2) και η αντίδραση Fenton (Phattarapattamawong et al., 2021).

Σε αντίθεση, άλλες μέθοδοι απολύμανσης όπως με το όζον, δεν προκαλούνται αντίστοιχες επιπτώσεις. Το όζον επιδρά στο βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα. Αναλυτικότερα, το μοριακό όζον καταστρέφει την κυτταρική μεμβράνη, προκαλώντας την οξείδωση των κυτταρικών συστατικών, (Michael-Kordatou et al., 2018; Cullen et al., 2010). Η ικανότητα απολύμανσης του όζοντος ποικίλλει μεταξύ των διαφόρων ειδών βακτηρίων και εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες (Czekalski et al., 2016). Σε έρευνα των Alexander et al., παρατηρήθηκε ότι οι εντερόκοκκοι εμφάνισαν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στο όζον σε σύγκριση με το *Pseudomonas aeruginosa* (Alexander et al., 2016). Όσον αφορά, την ανθεκτικότητα των βακτηρίων, οι Slipko et al., παρατήρησαν ότι η απενεργοποίηση του ανθεκτικού στην αμικιλίνη *E. coli* απαιτούσε υψηλότερη δόση όζοντος από το ανθεκτικό στην τριμεθοπρίμη και στη σουλφαμεθοξαζόλη *E. coli* (Slipko et al., 2022). Το όζον, έχει παρατηρηθεί ότι δεν απομακρύνει αποτελεσματικά τα ανθεκτικά στα αντιβιοτικά γονίδια από τα δευτεροβάθμια επεξεργασμένα λύματα (Ben et al., 2017; Czekalski et al., 2016).

Σε παγκόσμιες μελέτες, όπου εξέτασαν τον συνδυασμό της υπεριώδους ακτινοβολίας UV με το H_2O_2 (UV/ H_2O_2), σημειώθηκε επιτυχής απομάκρυνση αντιβιοτικών και ανθεκτικών βακτηρίων και γονιδίων σε αντιβιοτικά (Afonso-Olivares et al., 2019, 2016; De la Cruz et al., 2012). Σε έρευνα των Anjali και Shanthakumar, το όζον προκάλεσε περισσότερο από το 98% της αποικοδόμησης των εξεταζόμενων αντιβιοτικών, ωστόσο, κύριο πρόβλημα της μεθόδου αποτελεί η παραγωγή τοξικών υποπροϊόντων (Anjali and Shanthakumar, 2019). Αρκετές άλλες μελέτες

έχουν επίσης αναφέρει τη δυνατότητα αποικοδόμησης των αντιβιοτικών χρησιμοποιώντας έναν συνδυασμό διαφορετικών προηγμένων διαδικασιών οξείδωσης (Hazra et al., 2022). Έρευνες παρουσιάζουν κατά την απολύμανση με χρήση UV ακτινοβολίας, οι πληθυσμοί των βακτηρίων που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά αυξάνονται συγκριτικά με τους πληθυσμούς πριν την απολύμανση (Krzeminski et al., 2020). Απαιτούνται περαιτέρω μελέτες σχετικά με την δυνατότητα απομάκρυνσης των AOPs, καθώς προσφέρουν μεγάλες δυνατότητες για την αφαίρεση των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων και γονιδίων, με χαμηλό σχηματισμό τοξικών παραπροϊόντων σε σύγκριση με τις συμβατικές μεθόδους απολύμανσης (Kalli et al., 2023).

2.4. Διάθεση και επαναχρησιμοποίηση λυμάτων

Η παραγωγή ανακτημένου νερού και η ανάκτηση πόρων από λύματα αποτελούν καίριο ζήτημα στην σύγχρονη τεχνολογία. Τα επεξεργασμένα λύματα και η επεξεργασμένη ιλύς από τις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων έχουν συνήθως ως αποδέκτες θαλάσσια και ποτάμια συστήματα ή ρέματα (Ofori et al., 2021; Rizzo et al., 2020; Hwangbo et al., 2019). Σε αρκετές περιπτώσεις πραγματοποιείται επαναχρησιμοποίησή τους για παράδειγμα σε γεωργικές εκτάσεις.

Η επαναχρησιμοποίηση του ανακτημένου νερού είναι σημαντική για την προστασία και τη διατήρηση των φυσικών υδάτινων πόρων (Brienza et al., 2022; Ofori et al., 2021). Εκτός αυτού, ορισμένα απόβλητα, όπως τα κτηνοτροφικά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως λίπασμα λόγω των υψηλών επιπέδων θρεπτικών ουσιών και της οργανικής ύλης που διαθέτουν. Ωστόσο, τα λύματα είναι εφικτό να περιέχουν επιβλαβείς ουσίες (τόσο χημικές όσο και βιολογικές μολυσματικές ουσίες) που πρέπει μέσω της επεξεργασίας να αφαιρούνται ή ακόμα και αν είναι εφικτό να εξαλείφονται ώστε να εξασφαλιστεί η ποιότητα του νερού, αποτρέποντας τις εισροές μολυσματικών ουσιών στο περιβάλλον και τελικά στην ανθρώπινη υγεία (Bôto et al., 2023).

Οι κατηγορίες επαναχρησιμοποίησης λυμάτων περιλαμβάνουν την άρδευση, την αστική και περιαστική χρήση, τον εμπλουτισμό των υπόγειων υδροφόρων, τη βιομηχανική χρήση, την αναψυχή ή τις περιβαλλοντικές χρήσεις και σε σπάνιες περιπτώσεις την άμεση ή έμμεση πόση (Brienza et al., 2022; Ανδρεαδάκης, 2017). Αναλυτικότερα, είναι εφικτό να πραγματοποιηθεί άρδευση με περιορισμένη χρήση σε καλλιέργειες ζωοτροφών, βιομηχανικές καλλιέργειες και λιβάδια αλλά και με απεριόριστη χρήση που περιλαμβάνει όλες τις καλλιέργειες των οποίων τα προϊόντα καταναλώνονται ωμά (Yalin et al., 2023; Hwangbo et al., 2019). Επιπλέον, χρησιμοποιούνται σε αστική και περιαστική χρήση όπως σε πάρκα, πρανή εθνικών δρόμων, νεκροταφεία, γήπεδα golf, αστικές ζώνες πρασίνου, για πυροπροστασία και άρδευση κήπων (Yalin et al., 2023; Radini et al., 2023). Άξιο σημείωσης αποτελεί ο εμπλουτισμός των υπόγειων υδροφόρων μέσω αναπλήρωσης των υπόγειων υδάτων και παρεμπόδισης της υφαλμύρυνσης.

Χρησιμοποιείται εξίσου για βιομηχανική χρήση, όπως για παράδειγμα σε τροφοδοσία για λέβητες και σε διεργασίες ψύξης. Σπάνια περίπτωση αποτελεί η άμεση ή έμμεση πόση. Τέλος, επαναχρησιμοποίηση μπορεί να πραγματοποιηθεί και για αναψυχή ή για περιβαλλοντικές χρήσεις όπως τεχνητές λίμνες και αποκατάσταση ελωδών περιοχών (Ofori et al., 2021; Rizzo et al., 2020; Hwangbo et al., 2019; Ανδρεαδάκης, 2017).

Οι Η.Π.Α. και ειδικότερα η Καλιφόρνια χρησιμοποιεί για άρδευση περισσότερο από 70% των επεξεργασμένων αστικών λυμάτων και το Ισραήλ αξιοποιεί στη γεωργία >80% των λυμάτων (Ανδρεαδάκης, 2017). Στην Κύπρο, περίπου 75% των επεξεργασμένων αστικών λυμάτων διατίθεται για άρδευση στη γεωργία και 13-14% για τον εμπλουτισμό του υπόγειου υδροφορέα (>12.000.000 m³ λυμάτων ανά έτος) (Ανδρεαδάκης, 2017). Στην Ισπανία επαναχρησιμοποιείται λιγότερο από το 10% των επεξεργασμένων λυμάτων και στην Ελλάδα χρησιμοποιείται λιγότερο από 1% των επεξεργασμένων λυμάτων (Ανδρεαδάκης, 2017). Οι ιδιαιτερότητες της Ελλάδας με τη σχετικά επαρκή αλλά άνιση κατανομή της βροχόπτωσης και τους εγγενείς περιορισμούς ως προς τη γεωργική επαναχρησιμοποίηση στα μεγάλα αστικά κέντρα και ιδίως στην Αθήνα, το δυναμικό για την επαναχρησιμοποίηση εκτιμάται ότι δεν ξεπερνά το 8-10% (Ανδρεαδάκης, 2017).

Σημειώνεται ότι αρκετές είναι οι δυνατότητες επαναχρησιμοποίησης μέσω εδαφικής διάθεσης στην Αττική για το αστικό πράσινο. Η συνολική έκταση αστικού πρασίνου για τους Δήμους του Λεκανοπεδίου Αθηνών ανέρχεται στα 27,000 περίπου στρέμματα (Ανδρεαδάκης, 2017). Η συνολική ετήσια κατανάλωση ανέρχεται στο ποσό των 8×10⁶ m³ περίπου και αποτελεί μέρος της δημοτικής – δημόσιας κατανάλωσης και εκτιμάται ότι σε συνθήκες διαθεσιμότητας νερού η ετήσια κατανάλωση για τις ίδιες περιοχές μπορεί να διπλασιαστεί και να φθάσει τα 16 - 17×10⁶ m³ (Ανδρεαδάκης, 2017).

Σημειώνεται ότι οι μολυσματικές ουσίες που περιέχουν τα λύματα είναι εφικτό να μεταφερθούν στο περιβάλλον μέσω της γεωργικής απορροής και να απειλήσουν με τη μετάδοσή τους την τροφική αλυσίδα (Hwangbo et al., 2019; Ανδρεαδάκης, 2017). Μελέτες παρουσιάζουν την παρουσία παθογόνων ειδών όπως *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella*, *Escherichia coli*, *Clostridium*, *Arcobacter*, *Salmonella* και *Circovirus Porcine Type 2* σε λύματα, ακόμα και κατά τη διεργασία της αναερόβιας χώνευσης (Xinjie et al., 2019; Hu et al., 2020). Ως εκ τούτου, απαιτείται προεπεξεργασία των λυμάτων πριν από την επαναχρησιμοποίηση για να αποφευχθεί η εξάπλωση των μολυσματικών ουσιών στο περιβάλλον και η εισαγωγή τους στην τροφική αλυσίδα, όπως για παράδειγμα, σε περιπτώσεις που χρησιμοποιείται ανακτημένο νερό στον τομέα της γεωργίας, όπου επηρεάζει άμεσα την ανθρώπινη υγεία (Bôto et al., 2023).

Επιπλέον είναι εφικτό να πραγματοποιηθεί διάθεση των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων μέσω της επεξεργασίας των λυμάτων, όπου μπορεί να παραχθούν και να μεταφερθούν γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά στο περιβάλλον, τα οποία μπορούν να ενισχύσουν την ανθεκτικότητα των βακτηρίων. Επίσης, τα βακτήρια που επιβιώνουν κατά την επεξεργασία των λυμάτων είναι πιθανό να είναι πιο ανθεκτικά στις συνθήκες του περιβάλλοντος, συμπεριλαμβανομένων των αντιβιοτικών (Bôto et al., 2023; Yalin et al., 2023; Radini et al., 2023).

Brienza et al., 2022; Ofori et al., 2021; Rizzo et al., 2020; Hwangbo et al., 2019). Σε ορισμένες περιπτώσεις, παρατηρείται παρουσία βακτηρίων στο περιβάλλον ακόμα και μετά από διεργασίες απολύμανσης (Regrowth) (Bôto et al., 2023; Yalin et al., 2023). Το φαινόμενο αυτό, θέτει ως καίριο ζήτημα διαχείρισης των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων και γονιδίων με την παρουσία τους στο περιβάλλον καθώς και την ανάγκη για αποτελεσματικές μεθόδους διαχείρισης των λυμάτων. Έρευνες παρουσιάζουν, ότι κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας λυμάτων στις εγκαταστάσεις είναι εφικτό να επιβιώσουν βακτήρια που έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά και να επιστρέψουν στους αποδέκτες μέσω της τελικής εκροής, αυξάνοντας την πληθυσμιακή συγκέντρωση των ανθεκτικών βακτηρίων στο περιβάλλον (Rizzo et al., 2020). Μέχρι στιγμής έχουν πραγματοποιηθεί περιορισμένες προσπάθειες σχετικά με την ανάλυση των χαρακτηριστικών των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά γονιδίων κατά την διεργασία της χλωρίωσης των λυμάτων με σκοπό την επαναχρησιμοποίησή τους (Hwangbo et al., 2019; Yuan et al., 2015).

2.5. Νομοθετικό πλαίσιο

Επαναχρησιμοποίηση λυμάτων

Η πρώτη Ευρωπαϊκή Πρωτοβουλία Πολιτών, «Right2Water» (2013), παρότρυνε τα θεσμικά όργανα και τα κράτη μέλη της ΕΕ να εξασφαλίσουν ότι όλοι οι πολίτες απολαύουν του δικαιώματος στην ύδρευση και την αποχέτευση, ότι η παροχή νερού και η διαχείριση των υδάτινων πόρων δεν υπόκεινται στους κανόνες εσωτερικής αγοράς και ότι οι υπηρεσίες ύδρευσης εξαιρούνται από μέτρα ελευθέρωσης. Υπογραμμίζοντας την απαραίτητη μετάβαση σε μια κυκλική οικονομία, το Κοινοβούλιο υποστήριξε σχέδια για την προώθηση της επαναχρησιμοποίησης του νερού για γεωργική άρδευση. Σε παρόμοιο πνεύμα, ενέκρινε σχέδια για τη βελτίωση της ποιότητας του νερού βρύσης, ώστε να μειωθεί η χρήση πλαστικών φιαλών.

Στην ανακοίνωση της Επιτροπής της 14ης Νοεμβρίου 2012 «Προσχέδιο για τη διαφύλαξη των υδατικών πόρων της Ευρώπης» επισημαίνεται η ανάγκη δημιουργίας ενός μέσου για τη ρύθμιση σε επίπεδο Ένωσης των προτύπων για την επαναχρησιμοποίηση των υδάτων, με στόχο την άρση των εμποδίων στην ευρεία χρήση μιας τέτοιας εναλλακτικής επιλογής υδροδότησης, δηλαδή ενός μέσου που να μπορεί να συμβάλλει στον περιορισμό της λειψυδρίας και στη μείωση της τρωτότητας των συστημάτων εφοδιασμού.

Οι κατηγορίες των κριτηρίων όπου μετρούνται για την αξιολόγηση της επαναχρησιμοποίησης λυμάτων ποικίλουν ανάλογα με την εκάστοτε νομοθεσία. Με σκοπό την επαναχρησιμοποίηση νερού και την αξιοποίηση προς όφελος των τοπικών κοινωνιών κατά την

παραγωγή λυμάτων, πραγματοποιούνται κυρίως μετρήσεις στα αιωρούμενα στερεά, στους παθογόνους μικροοργανισμούς, στα θρεπτικά συστατικά, στα βαρέα μέταλλα, στις οργανικές ουσίες και στις αγρονομικές παραμέτρους. Για παράδειγμα, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας ορίζει απαραίτητη τη μέτρηση των κολοβακτηρίων, των παρασίτων, των αγρονομικών παραμέτρων αλλά και των βαρέων μετάλλων. Αντίστοιχα, η νομοθεσία που καλύπτει την Καλιφόρνια και την Ευρώπη ορίζει απαραίτητη τη μέτρηση κολοβακτηριδίων, αγρονομικών παραμέτρων, βαρέων μετάλλων αλλά και μικροοργανικών. Τέλος όσον αφορά τη νομοθεσία της Ελλάδας ορίζεται να πραγματοποιούνται μετρήσεις των κολοβακτηριδίων, των αγρονομικών παραμέτρων, των βαρέων μετάλλων και των μικροοργανικών. Σύμφωνα με τα παραπάνω ορίζεται η απαιτούμενη επεξεργασία λυμάτων σύμφωνα με είδος της επαναχρησιμοποίησής τους αλλά και ο τρόπος διάθεσης του ανακτημένου νερού.

Αναλυτικότερα, τα αγρονομικά κριτήρια περιλαμβάνουν παραμέτρους που είναι εφικτό να προκαλέσουν πιθανό πρόβλημα κατά την άρδευση. Τα κριτήρια αυτά, ομαδοποιούνται σε τρεις κατηγορίες, σύμφωνα με τον βαθμό περιορισμού κατά την εφαρμογή (μηδαμινός, μικρός – μέτριος, σημαντικός). Για την ειδική τοξικότητα ιόντων πραγματοποιούνται μετρήσεις στις ποσότητες νατρίου και χλωριόντων, όσον αφορά την επιφανειακή άρδευση ή τον καταιονισμό. Επιπλέον για την ειδική τοξικότητα ιόντων, πραγματοποιούνται μετρήσεις και για την ποσότητες βορίου. Τέλος άλλες επιπτώσεις μετρούνται σύμφωνα με τις ποσότητες αζώτου $\text{NO}_3\text{-N}$ και HCO_3 . Καίρια παράμετρος μετρήσεων αποτελεί η μέτρηση pH σύμφωνα με το τυπικό διάγραμμα 6.5 – 8.0, αλλά και η μέτρηση για την εύρεση των ποσοτήτων υπολειμματικού χλωρίου. Για παράδειγμα, σύμφωνα με την οριοθέτηση του θεσμικού πλαισίου της Ιταλίας που ορίζεται από την EPA – FAO για τα μέταλλα, πραγματοποιούνται μετρήσεις σε αλουμίνιο, αρσενικό, βηρύλλιο, κάδμιο, κοβάλτιο, χρώμιο, χαλκό, φθόριο, σίδηρο, λίθιο, μαγνήσιο, μολυβδαίνιο, νικέλιο, μόλυβδο, σελήνιο, βανάδιο, ψευδάργυρο και υδράργυρο.

Η νομοθεσία ορίζει τα μικροβιολογικά κριτήρια καθώς και την επιλογή κατάλληλου δείκτη για τη παθογόνων μικροοργανισμών με σκοπό την επαναχρησιμοποίηση. Για παράδειγμα σε περιοχές όπως η Ελλάδα η Ιταλία και η Καλιφόρνια, χρησιμοποιείται ευρέως ο δείκτης ολικών κολοβακτηριδίων (TC). Επιπλέον σημειώνεται στην περίπτωση της Ελλάδας ευρεία είναι η χρήση του δείκτη EC. Τέλος ο δείκτης των FC χρησιμοποιείται από τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας WHO, την Κύπρο, ΕΠΑ. Σημειώνεται ότι $\text{FC/EC} \sim 1$ και $\text{TC/FC} \sim 5\text{-}10$.

Πίνακας 2.1. Σύνοψη νομοθεσιών ορίων επαναχρησιμοποίησης.

Κανονισμός	TC / 100 ml	FC / 100 ml	EC / 100 ml	% δειγμάτων	Επεξεργασία
ΠΟΥ		200-1000		50	Λίμνες οξείδωσης
Καλιφόρνια	2,2/23			50 / max	Δευτεροβάθμια βιολογική + διύλιση
Ιταλία 1977	2			50	
Ιταλία 2003			10 (50-100)	80	
ΕΡΑ		14		max	
Κύπρος απεριόριστη		5/15		80 (max)	Δευτεροβάθμια βιολογική + διύλιση
ΕΥΤ και Ελλάδα (2010) Απεριόριστη			5 (50)	80 (95)	Δευτεροβάθμια βιολογική + διύλιση + απολύμανση
Ελλάδα Περιορισμένη			200	50	Δευτεροβάθμια βιολογική + απολύμανση
Ελλάδα (2008) Αστική	2 (20)			80 (95)	Προχωρημένη + απολύμανση

Αναλυτικότερα, τα μικροβιολογικά κριτήρια σύμφωνα με ΗΠΑ και Ευρώπη, για περιορισμένη γεωργική χρήση, πρέπει να πραγματοποιηθεί βιολογική απολύμανση με απομάκρυνση βακτηρίων και τελική μέτρηση που ορίζεται στα 200 FC/100ml. Αντίστοιχα για απεριόριστη γεωργική χρήση ορίζεται FC/100ml - Μη Ανίχνευση. Τέλος, ειδικά για αστική και βιομηχανική χρήση, αλλά ακόμα και για εμπλουτισμό υπόγειου υδροφορέα FC/100ml – Μη Ανίχνευση.

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (Π.Ο.Υ.) θέτει ελαστικά προτεινόμενα μικροβιολογικά κριτήρια ποιότητας για επαναχρησιμοποίηση ανακτημένου νερού στη γεωργία. Τα όρια που δίνει ο ΠΟΥ, ορίζουν μεγαλύτερα όρια όπως για παράδειγμα για περιορισμένη γεωργική χρήση δεν απαιτείται επεξεργασία ή απαιτείται μόνο πρωτοβάθμια επεξεργασία λυμάτων. Αντίστοιχα για απεριόριστη γεωργική χρήση, ο μέγιστος αριθμός βακτηρίων ορίζεται στα 1000 FC/100ml. Τέλος για αστική χρήση ορίζεται στα 200 FC/100ml.

Ο κανονισμός Πολιτείας της Καλιφόρνια θέτει αυστηρά μικροβιολογικά όρια για επαναχρησιμοποίηση ανακτημένου νερού. Σε ορισμένες Ευρωπαϊκές χώρες (Ισπανία, Ιταλία, Γαλλία, Κύπρος) υπάρχει εθνική νομοθεσία για την επαναχρησιμοποίηση των λυμάτων. Στην Ελλάδα με τη θέσπιση της Κ.Υ.Α. για τον καθορισμό μέτρων, όρων και διαδικασιών για την

επαναχρησιμοποίηση επεξεργασμένων υγρών αποβλήτων, ΦΕΚ 354-8/3/11 υπάρχει πλέον το κατάλληλο θεσμικό πλαίσιο για την επαναχρησιμοποίηση των λυμάτων.

Πεδίο εφαρμογής Ευρωπαϊκής νομοθεσίας

Η Ευρωπαϊκή νομοθεσία ορίζει ανάλογα με το τύπο καλλιέργειας και τη μέθοδο άρδευσης, τις απαραίτητες παραμέτρους που μετρούνται, περιλαμβάνοντας, τους μικροοργανισμούς *E.coli* (cfu/100ml), το οργανικό φορτίο σε BOD₅ (mg/l), τα ολικά αιωρούμενα στερεά TSS (mg/l) και τη θολότητα (NTU).

Πίνακας 2.2. Κατηγορίες ποιότητας του ανακτημένου νερού και επιτρεπόμενη γεωργική χρήση και μέθοδος άρδευσης (EU) 2020/741).

Ελάχιστη κατηγορία ποιότητας του ανακτημένου νερού	Κατηγορία καλλιέργειας (*)	Μέθοδος άρδευσης
A	Όλες οι καλλιέργειες εδώδιμων φυτών που καταναλώνονται ωμά των οποίων το βρώσιμο τμήμα έρχεται σε άμεση επαφή με ανακτημένο νερό και τα ριζώδη φυτά που καταναλώνονται ωμά	Όλες οι μέθοδοι άρδευσης
B	Καλλιέργειες εδώδιμων φυτών που καταναλώνονται ωμά όταν το βρώσιμο μέρος παράγεται πάνω από το έδαφος και δεν βρίσκεται σε άμεση επαφή με ανακτημένο νερό, καλλιέργειες εδώδιμων φυτών που μεταποιούνται και καλλιέργειες μη εδώδιμων φυτών, συμπεριλαμβανομένων των καλλιεργειών που χρησιμοποιούνται για τη διατροφή γαλακτοπαραγωγικών ζώων ή ζώων που παράγουν κρέας	Όλες οι μέθοδοι άρδευσης
Γ	Καλλιέργειες εδώδιμων φυτών που καταναλώνονται ωμά όταν το βρώσιμο μέρος παράγεται πάνω από το έδαφος και δεν βρίσκεται σε άμεση επαφή με ανακτημένο νερό, καλλιέργειες εδώδιμων φυτών που μεταποιούνται και καλλιέργειες μη εδώδιμων φυτών, συμπεριλαμβανομένων των καλλιεργειών που χρησιμοποιούνται για τη διατροφή γαλακτοπαραγωγικών ζώων ή ζώων που παράγουν κρέας	Στάγδην άρδευση (**) ή άλλη μέθοδος άρδευσης που αποφεύγει την άμεση επαφή με το βρώσιμο μέρος της καλλιέργειας
Δ	Βιομηχανικές και ενεργειακές καλλιέργειες και καλλιέργειες σπόρων	Όλες οι μέθοδοι άρδευσης (***)

(*) Εάν ο ίδιος τύπος αρδευόμενης καλλιέργειας εμπίπτει σε πολλαπλές κατηγορίες του πίνακα 1, ισχύουν οι απαιτήσεις της αυστηρότερης κατηγορίας.

(**) Στάγδην άρδευση είναι ένα σύστημα μικροάρδευσης φυτών με σταγόνες ή μικρά ρυάκια νερού και συνίσταται στην παροχή νερού σε σταγόνες πάνω στο έδαφος ή απευθείας κάτω από την επιφάνειά του σε πολύ χαμηλές ροές (2-20 λίτρα/ώρα) μέσω ενός συστήματος πλαστικών σωλήνων μικρής διαμέτρου στο οποίο προσαρμόζονται εκροές που ονομάζονται σταλάκτες.

(***) Στις περιπτώσεις μεθόδων άρδευσης τεχνητής βροχής, θα πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στην προστασία της υγείας των εργαζομένων ή των παρευρισκομένων. Για τον σκοπό αυτό, εφαρμόζονται κατάλληλα προληπτικά μέτρα.

Αν και το ανακτημένο νερό έχει υψηλότερες απαιτήσεις ποιότητας από τα λύματα που απορρίπτονται σε υδάτινους δέκτες, το φαινόμενο της μικροβιακής αντοχής δεν λαμβάνεται καθόλου υπόψη. Όπως παρουσιάζεται και στους Πίνακες 2.2, 2.3 και 2.4., ο κανονισμός (ΕΕ) 2020/741 της Ευρωπαϊκής Ένωσης για την επαναχρησιμοποίηση των λυμάτων βασίζεται σε μικροβιακούς δείκτες και συγκεκριμένα, το μέγιστο φορτίο *Escherichia coli* σε επεξεργασμένα λύματα που προορίζονται για γεωργικές καλλιέργειες ορίζεται σε ανώτερη τιμή 10 CFU/100 mL. Ο κανονισμός δεν λαμβάνει υπόψη το φορτίο των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων και επομένως, η παρουσία τους δεν παρακολουθείται κατά την εφαρμογή επεξεργασμένων λυμάτων στο έδαφος και στις καλλιέργειες (Kalli et al., 2023).

Πίνακας 2.3. Παρακολούθηση για επικύρωση του ανακτημένου νερού για γεωργική άρδευση(EU) 2020/741).

Κατηγορία ποιότητας του νερού	Μικροοργανισμοί-δείκτες (*)	Στόχοι επιδόσεων της αλυσίδας επεξεργασίας (μείωση log ₁₀)
Α	<i>E. coli</i>	≥ 5,0
	Σύνολο κολιφάγων/ειδικών F κολιφάγων/σωματικών κολιφάγων/κολιφάγων (**)	≥ 6,0
	Σπόρια <i>Clostridium perfringens</i> /σποριογόνια, θεικομειωτικά βακτηρίδια (***)	≥ 4,0 (στην περίπτωση των σπορίων <i>Clostridium perfringens</i>) ≥ 5,0 (στην περίπτωση των σποριογόνων, θεικοαναγωγικών βακτηριδίων)

(*) Για την παρακολούθηση για επικύρωση μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν τα παθογόνα αναφοράς *Campylobacter*, ροταϊός και *Cryptosporidium*, αντί των προτεινόμενων μικροοργανισμών-δεικτών. Στην περίπτωση αυτή ισχύουν οι ακόλουθοι στόχοι επιδόσεων για τη μείωση log₁₀: *Campylobacter* (≥ 5,0), ροταϊός (≥ 6,0) και *Cryptosporidium* (≥ 5,0).

(**) Το σύνολο των κολιφάγων επιλέγεται ως ο καταλληλότερος ικός δείκτης. Ωστόσο, αν η ανάλυση των συνολικών κολιφάγων δεν είναι εφικτή, αναλύεται τουλάχιστον ένας εξ αυτών (ειδικοί F κολιφάγοι ή σωματικοί κολιφάγοι).

(***) Τα σπόρια *Clostridium perfringens* επιλέγονται ως ο καταλληλότερος δείκτης για τα πρωτόζωα. Ωστόσο, τα σποριογόνια, θεικοαναγωγικά βακτηρίδια είναι μια εναλλακτική λύση σε περίπτωση που η συγκέντρωση των σπορίων *Clostridium perfringens* δεν καθιστά δυνατή την επικύρωση της απαιτούμενης μείωσης log₁₀.

Σημειώνεται ότι το σύστημα επεξεργασίας της HYDROUSA, στην Άντισσα, σχεδιάστηκε με στόχο της εφαρμοζόμενης τεχνολογίας να εγγυηθεί απαιτήσεις «κατηγορίας Α» για επαναχρησιμοποίηση επεξεργασμένων λυμάτων στην άρδευση σε όρους TSS, BOD₅ και θολότητας, σύμφωνα με τον Κανονισμό της ΕΕ 2020/741 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του

Συμβουλίου της 25ης Μαΐου 2020. σχετικά με τις ελάχιστες απαιτήσεις για επαναχρησιμοποίηση νερού.

Πίνακας 2.4. Απαιτήσεις ποιότητας του ανακτημένου νερού για γεωργική άρδευση (EU) 2020/741).

Κατηγορία ποιότητας ανακτημένου νερού	Ενδεικτικός τεχνολογικός στόχος	Απαιτήσεις ποιότητας				
		E. coli (αριθμός/100 ml)	BOD ₅ (mg/l)	TSS (mg/l)	Θολότητα (NTU)	Άλλα
A	Δευτεροβάθμια επεξεργασία, διήθηση και απολύμανση	≤ 10	≤ 10	≤ 10	≤ 5	Legionella spp.: < 1.000 cfu/l, όταν υπάρχει κίνδυνος αερολύσης
B	Δευτεροβάθμια επεξεργασία και απολύμανση	≤ 100	Σύμφωνα με την οδηγία 91/271/ΕΟΚ (Παράρτημα Ι πίνακας 1)	Σύμφωνα με την οδηγία 91/271/ΕΟΚ (Παράρτημα Ι πίνακας 1)	-	Εντερικά νηματούδη (αβγά ελμίνθων): ≤ 1 αβγό/l για άρδευση βοσκοτόπων ή χορτονομής
Γ	Δευτεροβάθμια επεξεργασία και απολύμανση	≤ 1 000				
Δ	Δευτεροβάθμια επεξεργασία και απολύμανση	≤ 10 000				

Ο βαθμός επεξεργασίας λυμάτων σύμφωνα με τον αντίστοιχο χαρακτηρισμό προβλέπεται να είναι δευτεροβάθμιος σύμφωνα με τη νομοθεσία για τα λύματα (Οδηγία 91/271/ΕΟΚ), δευτεροβάθμιος ακολουθούμενος από διύλιση, ή προχωρημένος βασισμένος σε μεμβράνες. Ο βαθμός επεξεργασίας λυμάτων συνδέεται άμεσα με την τελική χρήση των ανακτημένων λυμάτων σύμφωνα με την αντίστοιχη Κ.Υ.Α.. Αναλυτικότερα, για περιορισμένη άρδευση εμπλουτισμό υδροφορέα μέσω διήθησης ή βιομηχανική χρήση με νερό ψύξης έως και μιας χρήσης ή κατ' ελάχιστη απαιτούμενη επεξεργασία είναι η δευτεροβάθμια βιολογική επεξεργασία με απολύμανση. Αντίστοιχα όταν η τελική χρήση αφορά απεριόριστη άρδευση ή βιομηχανική χρήση, τότε απαιτείται δευτεροβάθμια βιολογική επεξεργασία, διύλιση και απολύμανση. Τέλος για περιαστική χρήση οι εμπλουτισμό υδροφορέα μέσω γεώτρησης απαιτείται δευτεροβάθμια βιολογική επεξεργασία, προχωρημένη επεξεργασία μέσω μεμβρανών και απολύμανση.

Η Οδηγία 91/271/ΕΟΚ για την επεξεργασία των αστικών λυμάτων στοχεύει στην προστασία του περιβάλλοντος από τις αρνητικές επιδράσεις της απόρριψης αστικών και βιομηχανικών λυμάτων. Η Οδηγία ορίζει ελάχιστα πρότυπα και χρονοδιαγράμματα για τη συλλογή, την επεξεργασία και την απόρριψη αστικών λυμάτων, θεσπίζει μηχανισμούς ελέγχου για την απόρριψη λυματολάσπης και διατυπώνει την απαίτηση να παύσει σταδιακά η απόρριψη λυματολάσπης στη θάλασσα. Σύμφωνα με άλλες πολιτικές της Ευρωπαϊκής Πράσινης Συμφωνίας που αποσκοπούν στη μείωση της ρύπανσης σε μηδενικές καθαρές εκπομπές έως το 2050, η

Επιτροπή ενέκρινε την πρότασή της για αναθεωρημένη Οδηγία τον Οκτώβριο του 2022 (Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο - europa1).

Σημειώνεται ότι απαραίτητη κρίνεται η ενημέρωση των τοπικών κοινωνιών και των γεωργών σχετικά με τα οφέλη που προκύπτουν από τη χρήση ανακτημένου νερού και για το γεγονός ότι είναι ένας ασφαλής τρόπος εξοικονόμησης φρέσκου νερού. Επιπλέον, αναγκαία κρίνεται η αναβάθμιση ορθών γεωργικών πρακτικών ώστε να συμπεριλάβει και την άρδευση με ανακτημένο νερό στα πρότυπα του Κυπριακού κώδικα ορθής γεωργικής πρακτικής. Σύμφωνα με μετρήσεις από 15 εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων στην Ελλάδα, χωρίς απολύμανση, τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των δευτεροβάθμιων επεξεργασμένων λυμάτων είναι οργανικό φορτίο σε μορφή BOD₅ 10 - 25 mg/l, αιωρούμενα στερεά SS 10 - 35 mg/l, θολότητα 2 - 10 NTU, διαφάνεια μικρότερη του 70% και FC 10⁵ - 10⁶ / 100 ml (Ανδρεαδάκης, 2017).

Ιδιαίτερη σημασία, δίνεται στην έρευνα και στην υιοθέτηση μεθόδων προστασίας και απολύμανσης των υδάτινων πόρων. Προτεραιότητα αποτελεί η θέσπιση νομοθεσίας, σύμφωνα με την οποία τα υγρά βιομηχανικά απόβλητα υποχρεούνται να υποστούν επεξεργασία προτού διατεθούν στο περιβάλλον. Οι ρυθμίσεις αυτές, χαρακτηρίζονται εξαιρετικά αυστηρές στις ανεπτυγμένες χώρες, με τις Ευρωπαϊκές χώρες να υιοθετούν σχετική νομοθεσία από τα τέλη της δεκαετίας του 1970, με τη συνεχή ενίσχυσή τους. Ειδικότερα, η Ευρωπαϊκή Οδηγία 2000 παρέχει σημαντικές κατευθυντήριες γραμμές για την προστασία των επιφανειακών, υπογείων και παράκτιων υδάτων στις Ευρωπαϊκές χώρες (Ανδρεαδάκης, 2017)..

Με την υφιστάμενη Οδηγία ο έλεγχος των μικροοργανισμών και των τοξικών ουσιών περιορίζεται στον έλεγχο μέσω κανονισμών της εισόδου στο δίκτυο βιομηχανικών αποβλήτων, με κύριο στόχο την προστασία της εγκατάστασης. Η παρουσία μικροοργανισμών οικιακής και ευρύτερα αστικής προέλευσης θεωρείται ότι δεν εγκυμονεί σοβαρούς κινδύνους και δεν αντιμετωπίζεται

Το επόμενο βήμα αποτελεί η αναθεώρηση των κανονισμών δικτύων και στην κατά περίπτωση εφαρμογή τεταρτοβάθμιας επεξεργασίας, λόγω κυρίως νέων ρύπων, σε πρώτο στάδιο έμφαση στα φαρμακευτικά προϊόντα και τα καλλυντικά αλλά και λόγω των απαιτήσεων της κυκλικής οικονομίας (επαναχρησιμοποίηση λυμάτων και ιλύος) (Ανδρεαδάκης, 2017).

Πεδίο εφαρμογής ελληνικής νομοθεσίας

Το πεδίο εφαρμογής της Κ.Υ.Α. 145116/2011 (ΦΕΚ Β 354) για την επαναχρησιμοποίηση λυμάτων αναλυτικότερα, ορίζει την επαναχρησιμοποίηση επεξεργασμένων λυμάτων και υγρών αποβλήτων από συμβατικές βιομηχανικές δραστηριότητες για γεωργική χρήση (άρδευση),

τροφοδότηση υπόγειων υδροφορέων, αστική και περιαστική χρήση, βιομηχανική χρήση. Στην επαναχρησιμοποίηση επεξεργασμένων βιομηχανικών υγρών αποβλήτων που προέρχονται από μη συμβατικές βιομηχανικές δραστηριότητες, τα οποία έχουν καταστεί μη επικίνδυνα, παρέχονται μόνο για περιορισμένη άρδευση μέσω υπεδάφιου συστήματος άρδευσης, τροφοδότηση υπόγειων υδροφορέων και βιομηχανική χρήση. Αντίθετα, δεν υπάγονται στο πεδίο εφαρμογής της Κ.Υ.Α., η ανακύκλωση βιομηχανικών αποβλήτων, η άμεση ή έμμεση επαναχρησιμοποίηση για πόση (με εξαίρεση ορισμένες περιπτώσεις έμμεσης τέτοιας επαναχρησιμοποίησης), η επαναχρησιμοποίηση για χρήσεις κολύμβησης (πισίνες) και η επαναχρησιμοποίηση για οικιακές χρήσεις.

Αναλυτικότερα οι επιτρεπόμενοι τύποι επαναχρησιμοποίησης για τα αστικά λύματα και για τα βιομηχανικά απόβλητα με συμβατικούς ρύπους, περιλαμβάνουν την άρδευση υπό περιορισμούς, την άρδευση χωρίς περιορισμούς, τη βιομηχανική επαναχρησιμοποίηση, τον εμπλουτισμό υδροφορέων, τον εμπλουτισμό προστατευόμενων υδροφορέων, τις αστικές χρήσεις, αλλά και τη χρήση σε περιαστικό πράσινο ή αναψυχή. Αντίστοιχα σε άλλα βιομηχανικά απόβλητα, επιτρεπτή είναι η άρδευση υπό περιορισμούς, η βιομηχανική επαναχρησιμοποίηση αλλά και ο εμπλουτισμός υδροφορέων.

Όσον αφορά τα όρια για διάθεση λυμάτων με σκοπό την επαναχρησιμοποίηση (περιορισμένη, απεριόριστη χρήση) για *E.coli* υφίστανται όρια στις ποσότητες υπολειμματικού χλωρίου, χρόνου επαφής και πλήθος EC/100ml, Με βάση την ΚΥΑ 145116/2011 για απεριόριστη άρδευση, η εφαρμογή της χλωρίωσης θα εξασφαλίζεται συγκέντρωση υπολειμματικού χλωρίου ≥ 2 mg/l, και ελάχιστος χρόνος επαφής 60 min. Για απεριόριστη άρδευση η μέγιστη τιμή των *Escherichia Coli* είναι 5 για το 80% των δειγμάτων και 50 για το 95% των δειγμάτων. Η ελάχιστη προτεινόμενη επεξεργασία που απαιτείται για απεριόριστη άρδευση είναι δευτεροβάθμια βιολογική επεξεργασία, που ακολουθείται από τριτοβάθμια (κατ'ελάχιστο κροκίδωση, διύλιση) και στη συνέχεια απολύμανση, για την παραγωγή εκροής με συγκεντρώσεις BOD₅ και SS μικρότερες από 10 mg/l για το 80% των δειγμάτων και τιμές θολότητας μικρότερες από 2 NTU ως διάμεση τιμή. Η συγκέντρωση των περιττωματικών κολοβακτηριδίων θα πρέπει να διατηρείται μικρότερη από 5 FC/100 ml για το 80% των δειγμάτων.

Με βάση την ΚΥΑ 145116/2011, για περιορισμένη πρέπει να εξασφαλίζεται γινόμενο υπολειμματικού χλωρίου επί χρόνο επαφής (C·t) μεγαλύτερο ή ίσο από 30 mg·min/l και ελάχιστος χρόνος επαφής ίσο με 30 λεπτά. Για περιορισμένη άρδευση η μέγιστη διάμεση τιμή των *Escherichia Coli* είναι ίση με 200 EC/100 mL. Η ελάχιστη προτεινόμενη επεξεργασία λυμάτων για την περιορισμένη άρδευση είναι δευτεροβάθμια βιολογική επεξεργασία για την παραγωγή εκροής με συγκεντρώσεις BOD₅ και SS χαμηλότερες από 25 και 35 mg/l αντίστοιχα, για το 80% των δειγμάτων και συγκεντρώσεις περιττωματικών κολοβακτηριδίων χαμηλότερες από 200 FC/100 ml, ως διάμεση τιμή, μέσω κατάλληλης απολύμανσης των δευτεροβάθμιων εκροών.

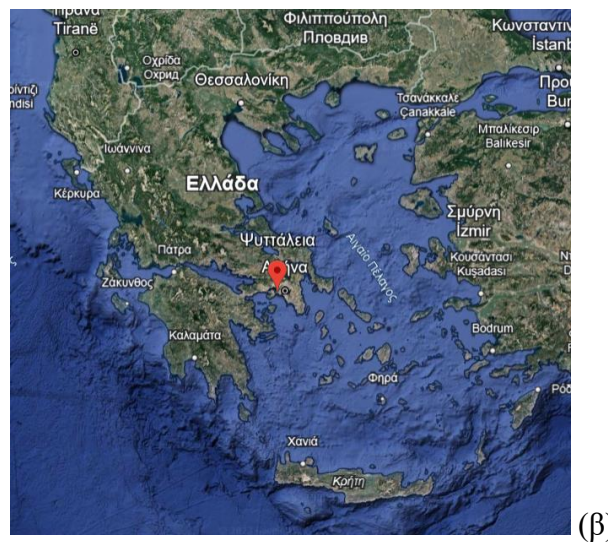
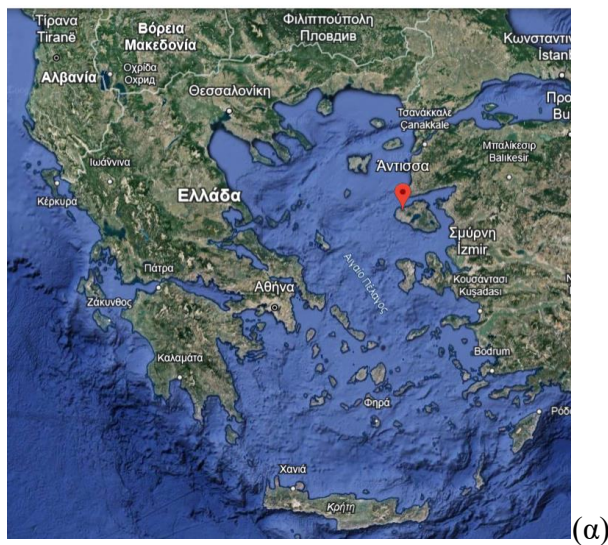
2.6. Στόχοι εργασίας

Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας λήφθηκαν επεξεργασμένα δείγματα λυμάτων από συμβατικά συστήματα ενεργού ιλύος και από συστήματα επεξεργασίας λυμάτων μέσω τεχνητού υγροβιότοπου. Σημειώνεται ότι ως μικροβιακός δείκτης στις εργαστηριακές αναλύσεις, χρησιμοποιήθηκαν τα φορτία των ολικών κολοβακτηρίων και των βακτηρίων *E.coli*. Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση του βαθμού εξουδετέρωσης των ανθεκτικών βακτηρίων σε αντιβιοτικά γενικής χρήσης (ερυθρομυκίνη, σιπροφλοξασίνη, τετρακυκλίνη, αμπικιλίνη) κατά τη χλωρίωση δευτεροβάθμια και τριτοβάθμια επεξεργασμένων λυμάτων. Επιπλέον, σημειώνεται ότι πραγματοποιήθηκε πείραμα ανακαλλιέργειας βακτηρίων (regrowth), για την κατανόηση της μεταφοράς και της αναγέννησής τους στο περιβάλλον. Τέλος, κατά την εργαστηριακή ανάλυση εξετάστηκε η παρουσία των ολικών κολοβακτηρίων και των ανθεκτικών βακτηρίων *E.coli* σε αντιβιοτικά γενικής χρήσης (ερυθρομυκίνη, σιπροφλοξασίνη, τετρακυκλίνη, αμπικιλίνη, αμοξικιλίνη) στα στάδια επεξεργασίας των εγκαταστάσεων με σκοπό την διερεύνηση του βαθμού απομάκρυνσης που επιτυγχάνουν τα εξεταζόμενα συστήματα επεξεργασίας λυμάτων.

3. Μεθοδολογία

3.1. Συστήματα μελέτης

Για την παρούσα εργασία ερευνήθηκαν δύο εγκαταστάσεις επεξεργασίας αστικών λυμάτων. Στην ακόλουθη Εικόνα 3.1.1., παρουσιάζονται οι δύο εξεταζόμενες εγκαταστάσεις στο χάρτη. Σημειώνεται ότι η εγκατάσταση της Ψυττάλειας αφορά ένα αστικό κέντρο, ενώ της Άντισσας, μια νησιωτική περιοχή.



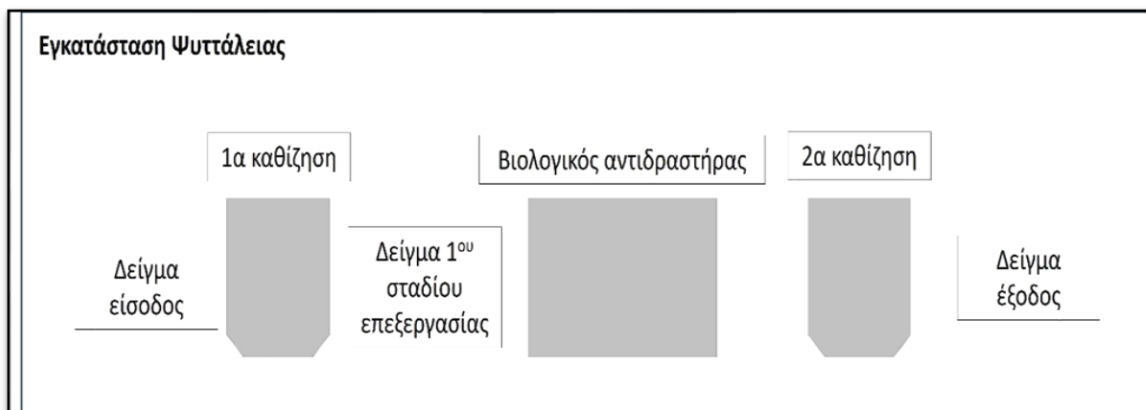
Εικόνα 3.1.1. Εγκατάσταση Άντισσας (α), εγκατάσταση Ψυττάλειας (β) στο χάρτη.

Στον ακόλουθο Πίνακα 3.1.1. παρουσιάζονται συνοπτικά οι δύο εξεταζόμενες εγκαταστάσεις που αναλύθηκαν στην παρούσα εργασία και αναγράφονται τα στάδιά τους. Συγκεκριμένα η εγκατάσταση επεξεργασίας λυμάτων της Ψυττάλειας περιλαμβάνει πρωτοβάθμια δεξαμενή καθίζησης και δευτεροβάθμια βιολογική επεξεργασία με καθίζηση. Αντίστοιχα, η επεξεργασία λυμάτων της Άντισσας περιλαμβάνει αναερόβια επεξεργασία και επεξεργασία μέσω τεχνητού υγροβιότοπου.

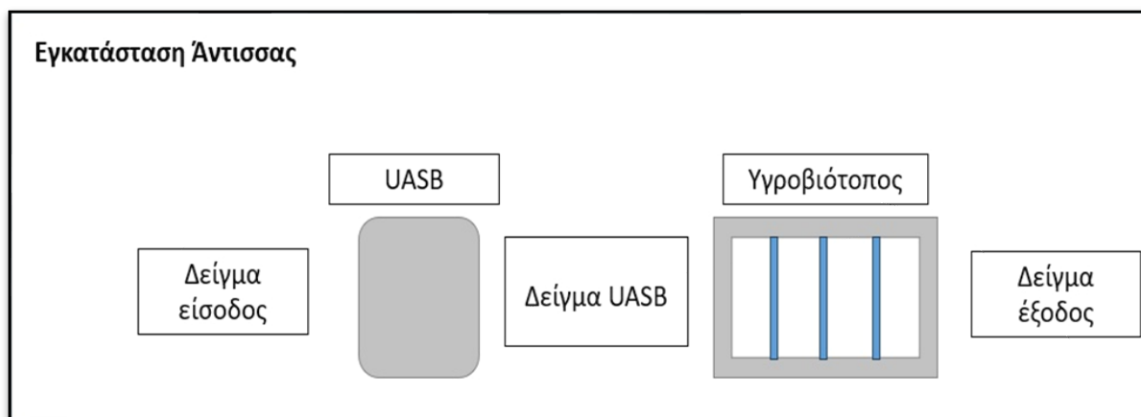
Πίνακας 3.1.1. Χαρακτηριστικά εξεταζόμενων εγκαταστάσεων.

Εγκατάσταση	Δείγμα	Στάδια επεξεργασίας
Ψυττάλεια	Αστικά Λύματα	1 ^α Δεξαμενή καθίζησης / Βιολογική 2 ^α επεξεργασία
Άντισσα	Αστικά Λύματα	UASB / Υγροβιότοπος

Στο ακόλουθο Γράφημα 3.1.1., παρουσιάζονται τα στάδια επεξεργασίας των δύο εγκαταστάσεων καθώς και τα σημεία από όπου λήφθηκαν τα δείγματα που αναλύθηκαν για τις ανάγκες της παρούσας εργασίας.



(α)



(β)

Γράφημα 3.1.1. Στάδια επεξεργασίας εγκαταστάσεων και δείγματα που λήφθηκαν στην εγκατάσταση της Ψυττάλειας (α) και στην εγκατάσταση της Άντισσας (β).

Όπως παρουσιάζεται και από το παραπάνω Γράφημα 3.1., η εγκατάσταση επεξεργασίας λυμάτων της Ψυττάλειας, περιλαμβάνει πρωτοβάθμια καθίζηση και δευτεροβάθμια βιολογική επεξεργασία με δευτεροβάθμια καθίζηση. Αντίστοιχα η εγκατάσταση στην Άντισσα, περιλαμβάνει αναερόβια χώνευση μέσω αντιδραστήρα UASB και επεξεργασία μέσω υγροβιότοπου.

Εγκατάσταση επεξεργασίας λυμάτων Ψυττάλειας

Το Κέντρο Επεξεργασίας Λυμάτων της Ψυττάλειας (Κ.Ε.Λ.Ψ.) βρίσκεται σε λειτουργία από το 1994 (Ε.ΥΔ.ΑΠ. - eydap.gr). Η επεξεργασία λυμάτων στο Κ.Ε.Λ.Ψ. περιλαμβάνει τα στάδια της προεπεξεργασίας, πρωτοβάθμιας επεξεργασίας και προχωρημένης δευτεροβάθμιας βιολογικής επεξεργασίας με απομάκρυνση αζώτου, επεξεργασία ιλύος και συμπαραγωγή ηλεκτρικής και θερμικής ενέργειας. Το Κ.Ε.Λ.Ψ. αποτελεί την κύρια μονάδα επεξεργασίας λυμάτων στην ευρύτερη περιοχή της Αθήνας, με μέση ημερήσια παροχή εισερχομένων λυμάτων 730.000 m³ (Ε.ΥΔ.ΑΠ. - eydap.gr). Το Κ.Ε.Λ.Ψ. είναι ένα από τα μεγαλύτερα Κέντρα Επεξεργασίας Λυμάτων στην Ευρώπη και διεθνώς, με δυναμικότητα ισοδύναμου πληθυσμού 5.600.000 κατοίκων (Ε.ΥΔ.ΑΠ. - eydap.gr).

Αναλυτικότερα, οι εγκαταστάσεις του Κ.Ε.Λ.Ψ., όπως παρουσιάζονται και στην Εικόνα 3.1.2., περιλαμβάνουν το στάδιο προεπεξεργασίας των λυμάτων στις εγκαταστάσεις του Ακροκεράμου, με απομάκρυνση των βαρέων στερεών, εσχάρωση, εξάμμωση και απόσμιση

καθώς και προεπεξεργασία των λυμάτων της Σαλαμίνας στην Κυνόσουρα Σαλαμίνας (Ε.ΥΔ.ΑΠ. - eydap.gr). Στη συνέχεια, τα προεπεξεργασμένα λύματα μεταφέρονται με υποθαλάσσιους αγωγούς στη νήσο Ψυττάλεια όπου και συνεχίζεται η επεξεργασία των λυμάτων στις δεξαμενές πρωτοβάθμια καθίζησης στις οποίες συλλέγεται η πρωτοβάθμια ιλύς. Η πρωτοβάθμια καθίζηση πραγματοποιείται σε έξι ορθογώνιες δεξαμενές, διαστάσεων 100 x 20 x 3 m η καθεμία, συνολικής παροχής 27,0 m³/sec. και συνολικού όγκου 36.000 m³(Ε.ΥΔ.ΑΠ. - eydap.gr).

Τα πρωτοβάθμια επεξεργασμένα λύματα υφίστανται προχωρημένη δευτεροβάθμια βιολογική επεξεργασία με το σύστημα της ενεργού ιλύος για την απομάκρυνση του οργανικού φορτίου και τη μείωση του φορτίου αζώτου. Η παρούσα επεξεργασία συντελείται στη βιολογική βαθμίδα, που αποτελείται από τους βιοαντιδραστήρες και τις δεξαμενές τελικής καθίζησης, στις οποίες καθιζάνει η βιολογική ιλύς. Συγκεκριμένα τα πρωτοβάθμια επεξεργασμένα λύματα μεταφέρονται μέσω του κεντρικού οχετού εξυπηρέτησης σε δύο οχετούς τροφοδοσίας, από τους οποίους και διανέμονται μέσω πλευρικών ανοιγμάτων σε δώδεκα βιοαντιδραστήρες, συνολικού όγκου 298.000 m³, διατεταγμένους σε παράλληλη διάταξη εκατέρωθεν του οχετού τροφοδοσίας σε δύο ομάδες των έξι (Ε.ΥΔ.ΑΠ. - eydap.gr). Ακόμα, σημειώνεται ότι έχουν κατασκευαστεί δύο επιπλέον βιοαντιδραστήρες με σκοπό τη μελλοντική αξιοποίηση. Οι βιοαντιδραστήρες είναι διαμορφωμένοι με την κατάλληλη διαμερισματοποίηση, διατηρώντας αναερόβια ζώνη επιλογής μικροοργανισμών, ανοξική ζώνη, επαμφοτερίζουσα ζώνη (ανοξική/αερόβια), αερόβιες ζώνες και ζώνη απαερίωσης. Σημειώνεται ότι η αναερόβια, η ανοξική, η επαμφοτερίζουσα και η ζώνη απαερίωσης είναι εξοπλισμένες με ειδικούς υποβρύχιους αναδευτήρες. Αντίστοιχα, οι αερόβιες ζώνες είναι εξοπλισμένες με ειδικό σύστημα υποβρύχιας διάχυσης του αέρα, διαθέτοντας ελαστικούς διαχυτήρες λεπτής φυσαλίδας. Ο διαχωρισμός της βιομάζας από τα επεξεργασμένα λύματα, πραγματοποιείται σε εξήντα τέσσερις ορθογώνιες δεξαμενές καθίζησης, συνολικής επιφάνειας 52.096 m² (Ε.ΥΔ.ΑΠ. - eydap.gr). Μέσω της επεξεργασίας που πραγματοποιεί η μονάδα, τα αιωρούμενα στερεά και το οργανικό φορτίο των λυμάτων μειώνονται κατά περίπου 93% και το ολικό άζωτο μειώνεται κατά περίπου 80% (Ε.ΥΔ.ΑΠ. - eydap.gr).

Άξιο σημείωσης αποτελεί το γεγονός ότι μέρος της τελικής εκροής υφίσταται διύλιση (με αμμόφιλτρα) και απολύμανση (με διατάξεις υπεριώδους ακτινοβολίας) με σκοπό την επαναχρησιμοποίησή της για ανάγκες άρδευσης στις εγκαταστάσεις της νήσου Ψυττάλειας. Η τελική εκροή της εγκατάστασης έχει αποδέκτη τον Σαρωνικό Κόλπο στον οποίο τα επεξεργασμένα λύματα διατίθενται μέσω υποθαλάσσιου συστήματος αγωγών βαθιάς διάχυσης (Ε.ΥΔ.ΑΠ. - eydap.gr). Σημειώνεται ότι μέσω της επεξεργασίας που υφίστανται τα λύματα, πραγματοποιείται μείωση των αιωρούμενων στερεών σωματιδίων και του οργανικού φορτίου των λυμάτων κατά 93% και το ολικό άζωτο μειώνεται κατά 80%, με αποτέλεσμα την αξιοσημείωτη βελτίωση και την επαναποίκηση των βενθικών οικοσυστημάτων της δυτικής πλευράς του Σαρωνικού κόλπου (WWF, 2017).



Εικόνα 3.1.2. Κέντρο Επεξεργασίας Λυμάτων Ψυττάλειας (ΚΕΛΨ) (Ε.ΥΔ.ΑΠ. - eydap.gr)

Στην παρούσα εργασία, πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία προεπεξεργασμένων λυμάτων από την είσοδο της εγκατάστασης, πρωτοβάθμια επεξεργασμένων λυμάτων από την έξοδο της πρωτοβάθμιας επεξεργασίας και τέλος, δευτεροβάθμια επεξεργασμένα δείγματα τελικής εκροής, κατά τη χειμερινή περίοδο Νοεμβρίου 2022 - Μαρτίου 2023. Η εγκατάσταση της Ψυττάλειας επιλέχθηκε καθώς αποτελεί μια από τις μεγαλύτερες εγκαταστάσεις επεξεργασίας υγρών αστικών αποβλήτων, με εκροή δευτεροβάθμιων επεξεργασμένων λυμάτων, διατηρώντας σύστημα βιολογικής επεξεργασίας, όπου είναι και το πιο κοινό σύστημα επεξεργασίας. Σημειώνεται ότι τα δείγματα αφού συλλέχθηκαν, τοποθετήθηκαν σε αεροστεγή γυάλινα σκεύη και αποθηκεύτηκαν μέσα σε καταψύκτες για την αποφυγή αλλοίωσης του δείγματος και ανάπτυξης μικροοργανισμών. Στη συνέχεια μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο Υγειονομικής Τεχνολογίας, Ε.Μ.Π., όπου και αναλύθηκαν.

Εγκατάσταση επεξεργασίας λυμάτων Άντισσας

Ο εξεταζόμενος υγροβιότοπος επεξεργασίας λυμάτων βρίσκεται σε λειτουργία από το 2017-8 στο χωριό Άντισσα της Λέσβου, με πληθυσμό 500 περίπου κατοίκων. Η πιλοτική εγκατάσταση Hydro 1 πραγματοποιεί επεξεργασία αστικών λυμάτων, περίπου 100 τόνους ανά ημέρα κατά τη θερινή περίοδο (HYDROUSA - hydrousa.org). Τα λύματα αρχικά προεπεξεργάζονται με εσχάρωση, εξάμωση και λιποσυλλογή και στην συνέχεια επεξεργάζονται μέσω αναερόβιας διεργασίας σε αντιδραστήρα UASB με παραγωγή βιοαερίου 10 MWh/έτος. Σημειώνεται ότι, κατά την αναερόβια επεξεργασία των λυμάτων λαμβάνεται βιομεθάνιο για ενεργειακή χρήση. Στη συνέχεια, τα λύματα επεξεργάζονται μέσω τεχνητών υγροβιοτόπων, όπου

φιλτράρονται από χαλίκι, καλάμια και άλλα φυτά, επιτυγχάνοντας απομάκρυνση μεγαλύτερη του 95% για τις παραμέτρους του COD και των TSS. Είναι σχεδιασμένος σε πολλαπλά στάδια, με τον κορεσμένο υδροβιότοπο - VF SAT (17.5 x14 m και 250 m²); και αντίστοιχα τον ακόρεστο υδροβιότοπο VF UNSAT (χωρισμένος σε 3 κλίνες τοπογραφικά με 4 γραμμές τροφοδοσίας, 18 x 8.5m και 600 m²) (HYDROUSA - hydrousa.org).

Επιπλέον, η εγκατάσταση διαθέτει σύστημα απολύμανσης μέσω χρήσης της μεθόδου UV-ακτινοβολίας για την εξόντωση των παθογόνων μικροοργανισμών. Μετά τη διαδικασία της απολύμανσης το ανακτημένο νερό αποθηκεύεται σε δεξαμενές ώστε να χρησιμοποιηθεί για άρδευση στη γεωργία, ως νερό κατηγορίας A για τις παραμέτρους TSS, BOD₅ και θολότητα, σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Οδηγία 2020/741 (HYDROUSA - hydrousa.org). Στην ακόλουθη Εικόνα 3.1.3., παρουσιάζεται η εγκατάσταση, καθώς και το σχεδιάγραμμα κάτοψης των επιμέρους σταδίων επεξεργασίας λυμάτων.



(α)

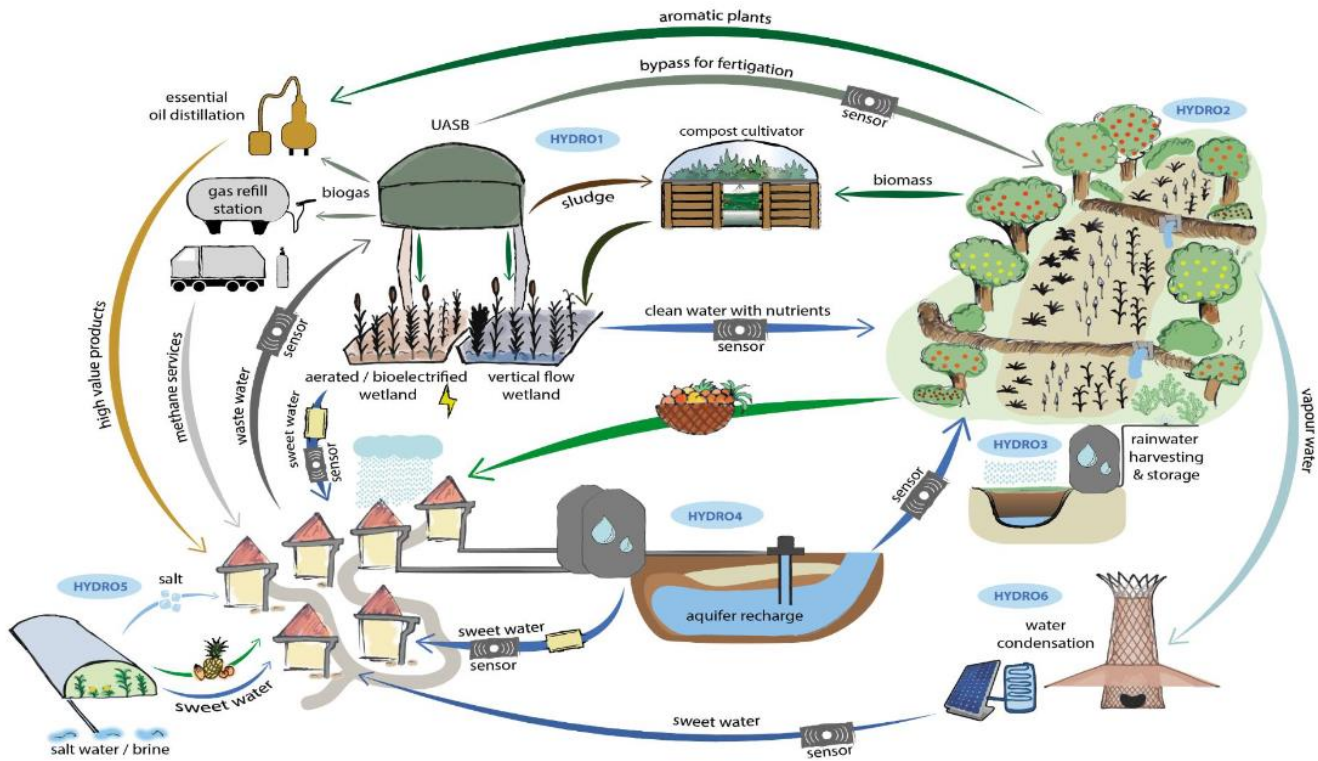


(β)

Εικόνα 3.1.3. Εγκατάσταση επεξεργασίας Λυμάτων Άντισσας (α) και σχεδιάγραμμα κάτοψης εγκατάστασης (β) (HYDROUSA - hydrousa.org)

Η παραγόμενη ιλύς που προκύπτει από την επεξεργασία, κομποστοποιείται, ενώ συγχρόνως δημιουργείται ανακτημένο νερό, με το οποίο αρδεύονται πολυποίκιλες καλλιέργειες σε έκταση 10 στρεμμάτων, με 10,000 m³/έτος (HYDROUSA - hydrousa.org). Σημειώνεται, ότι το σύστημα αυτό, παράγει εκροή πλούσια σε θρεπτικά στοιχεία (άζωτο και φώσφορο) η οποία είναι κατάλληλη για την άρδευση καλλιεργειών. Η άρδευση πραγματοποιείται με χρήση στάγδην άρδευσης συγκεκριμένων δέντρων, θάμνων και καλλιεργειών (ελιές, ροδιές, δάφνη) καθώς προϊόντων με υψηλή θρεπτική αξία (ιπποφάες) και βοτάνων (λεβάντα, φασκόμηλο, ρίγανη, θυμάρι) (HYDROUSA - hydrousa.org). Στόχος του έργου, είναι η διοχέτευση των προϊόντων σε αγροτικούς συνεταιρισμούς καθώς και η εξοικείωση των πολιτών και ιδιαίτερα των αγροτών με τη χρήση ανακτημένου νερού για άρδευση σε καλλιέργειες. Στην εγκατάσταση ουσιαστικά, έχει αναπτυχθεί σύστημα επεξεργασίας λυμάτων με φυσικό τρόπο, το οποίο είναι πλήρως ενταγμένο στο τοπικό περιβάλλον, επιτυγχάνοντας συγχρόνως μηδενική απόρριψη λυμάτων στη θάλασσα κατά την ξηρή περίοδο, ελαχιστοποίηση εξόδων παραγωγής ανακυκλωμένου νερού με κατανάλωση ενέργειας μικρότερη του 0,3 kWh/m³, αύξηση της παροχής υδάτων και ανακύκλωση θρεπτικών συστατικών (HYDROUSA - hydrousa.org).

Άξιο σημείωσης αποτελεί το γεγονός ότι το σύστημα επεξεργασίας λυμάτων της Άντισσας (HYDRO 1) αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα εφαρμογής κυκλικής οικονομίας στη διαχείριση λυμάτων σε μικρή κλίμακα όπως παρουσιάζεται και από την ακόλουθη Εικόνα 3.1.4..



Εικόνα 3.1.4. Επεξεργασία λυμάτων σε μικρή κλίμακα και κυκλική οικονομία (Πηγή: Αποκεντρωμένη Διαχείριση Λυμάτων & Συστήματα, Επεξεργασίας Μικρής Κλίμακας, Κ. Νουτσόπουλος – Σ. Μαλαμής, Ακαδ. Έτος 2022-23).

Στην παρούσα εργασία, πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία ανεπεξέργαστων λυμάτων από την είσοδο της εγκατάστασης, αναερόβιων επεξεργασμένων λυμάτων από την έξοδο του UASB αντιδραστήρα και τέλος, επεξεργασμένα δείγματα τελικής εκροής από τον υγροβιότοπο, κατά τη χειμερινή περίοδο Ιανουαρίου 2023 - Μαρτίου 2023. Η εγκατάσταση της Άντισσας επιλέχθηκε καθώς αποτελεί μια μικρής κλίμακας εγκατάσταση επεξεργασίας υγρών αστικών αποβλήτων, διατηρώντας συνδυασμό συστημάτων επεξεργασίας, μέσω αναερόβιας χώνευσης και τεχνητού υγροβιότοπου, που αποτελούν βασικές εναλλακτικές των κοινών συστημάτων, με υψηλά ποσοστά αποδόσεων. Τα δείγματα αφού συλλέχθηκαν, τοποθετήθηκαν σε αεροστεγή γυάλινα σκεύη και αποθηκεύτηκαν μέσα σε καταψύκτες για την αποφυγή αλλοίωσης του δείγματος και ανάπτυξης μικροοργανισμών. Στη συνέχεια, τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο Υγειονομικής Τεχνολογίας, Ε.Μ.Π., όπου και αναλύθηκαν.

3.2. Είδος μελέτης

Οι βιοδείκτες, βοηθούν στην εκτίμηση των συγκεντρώσεων χημικών ουσιών στα υδρόβια οικοσυστήματα. Η εκτίμηση αυτή, στοχεύει στην αξιολόγηση της έκθεσης των φυσικών πληθυσμών στους ρύπους (Moreira and Guilhermino, 2005). Πρακτικά, η μεθοδολογική προσέγγιση εκτίμησης οικολογικού κινδύνου, που χρησιμοποιεί βιοδείκτες, πραγματοποιεί απευθείας μέτρηση των τοξικών επιδράσεων που προκαλεί η εκάστοτε εξεταζόμενη χημική ουσία σε κάποιο οργανισμό (Vlahogianni et al., 2007). Ως βιοδείκτης ορίζεται κάποιο μετρήσιμο μέγεθος/δείκτης σε βιολογικό σύστημα ή δείγμα, που οφείλεται σε μεταβολές κυτταρικών ή βιοχημικών διεργασιών, δομών, λειτουργιών και συμπεριφορών των οργανισμών, που προκαλούνται από κάποιο ξеноβιοτικό παράγοντα (Paruch et al., 2012). Οι βιοδείκτες διακρίνονται στους βιοδείκτες έκθεσης, επίδρασης και δεκτικότητας/ευαισθησίας. Η επιλογή των κατάλληλων βιοδεικτών για την εκτίμηση του οικολογικού κινδύνου βασίζεται στο μηχανισμό απόκρισης του βιοδείκτη υπό την επίδραση κάποιας χημικής ουσίας (McCarty et al., 2002).

Ως βιοδείκτης ευαισθησίας (biomarker of susceptibility) ορίζεται μια τελικά προσδιοριζόμενη παράμετρος φυσιολογικής ή βιοχημικής κατάστασης, που έχει υποστεί κάποια μεταβολή και οδηγεί τον βιολογικό οργανισμό σε επιπτώσεις, εξαιτίας κάποιου χημικού, φυσικού ή μολυσματικού παράγοντα. Αυτοί οι βιοδείκτες δύνανται να χρησιμοποιηθούν για την πρόβλεψη ανθρώπινων ασθενειών με τη χρήση οργανισμών – βιολογικών δεικτών (Sanchez et al., 2009). Η αξία των βιοδεικτών έγκειται στην ικανότητα τους να ενσωματώνουν πολλαπλές εκθέσεις σε ποικιλία χημικών ρύπων σε μια περιοχή, συνθήκες που αντιπροσωπεύουν την κατάσταση που υπάρχει σε περιοχές διάθεσης αποβλήτων (Vlahogianni et al., 2007).

Στην παρούσα εργασία, με σκοπό την ανάλυση των δειγμάτων για την διερεύνηση του βαθμού ανθεκτικότητας των βακτηρίων, ως δείκτες, χρησιμοποιήθηκαν οι πληθυσμοί ολικών κολοβακτηριδίων που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα καθώς και οι πληθυσμοί *E. Coli*, όπως παρουσιάζεται και αναλυτικότερα στα επόμενα υποκεφάλαια.

Ολικά κολοβακτηριοειδή

Τα ολικά κολοβακτηριοειδή (Total coliforms) ανήκουν στην οικογένεια των εντεροβακτηριδίων (*Enterobacteriaceae*). Τα βακτήρια αυτά, είναι ραβδόμορφα, αρνητικά κατά Gram, μη σπορογόνα, αερόβια και δυνητικά αναερόβια, που αναπτύσσονται στο εντερικό σύστημα αλλά και στο φυσικό περιβάλλον (Chen et al., 2023). Ορισμένα παραδείγματα βακτηρίων της οικογένειας *Enterobacteriaceae*, αποτελούν τα είδη *Citrobacter freundii*,

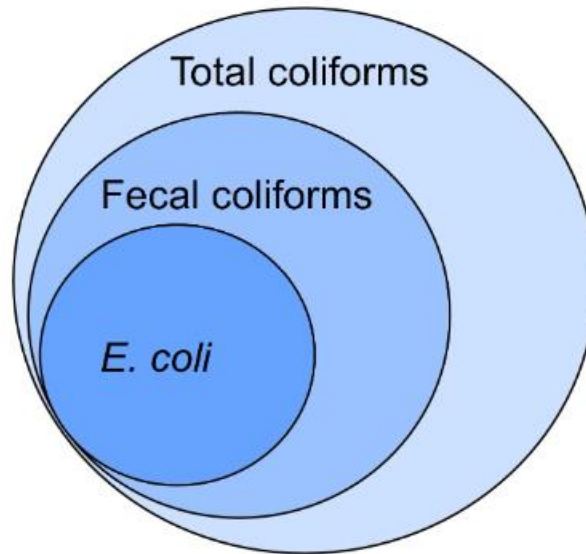
Enterobacter cloacae, *Enterobacter aerogenes*, *E. coli*, and *Klebsiella pneumoniae* (Halkman et al., 2014). Η παρουσία των κολοβακτηριοειδών στα φυσικά ύδατα δεν είναι απόλυτη ένδειξη ότι τα ύδατα αυτά, έχουν επιμολυνθεί με κοπρανώδες υλικό, καθώς πολλά είδη αυτών εντοπίζονται στο φυσικό περιβάλλον (έδαφος, φύλλα κλπ), χωρίς κάποια παρέμβαση ανθρώπινης δραστηριότητας. Καθιστά όμως το δείγμα δυνητικά μολυσμένο και επιβάλλει την περαιτέρω διερεύνησή του. Η παρουσία τους επομένως, παρέχει ενδείξεις για την ποιότητα των υδάτων (Halkman et al., 2014). Τα περιττωματικά κολοβακτηρίδια έχουν διαστάσεις περίπου 1,5-3,0μm και αναπτύσσονται σε θερμοκρασία 10-45°C με pH 5,5-8. Χρησιμοποιούνται ως δείκτης μόλυνσης και συχνά αποτελούν αιτία εντερικών λοιμώξεων (Tominaga et al., 2020).

Η παρουσία τους ανιχνεύεται στα αστικά λύματα, σε βιομηχανικά απόβλητα και σε απορροές από κατοικημένες περιοχές, χωρίς όμως να προκαλούν απαραίτητα ασθένειες. Συναντώνται σε περιττώματα ανθρώπων και θερμόαιμων ζώων (10% των εντεροβακτηριδίων), όπως και σε περιοχές βλάστησης, στο υδάτινο περιβάλλον αλλά και στο έδαφος (Halkman et al., 2014; Tominaga et al., 2020). Σημειώνεται ότι τα ολικά κολοβακτηρίδια χρησιμοποιούνται ως οργανισμοί δείκτες καθώς έχουν ευρεία παρουσία σε ποικίλα περιβάλλοντα (Halkman et al., 2014). Η παρουσία τους σε δείγματα υδάτων δεν εξασφαλίζει την ύπαρξη παθογόνων, αποτελεί όμως μια αξιόπιστη ένδειξη μόλυνσης των υδάτων και ανάγκη για περαιτέρω εξέταση παθογόνων. Ορισμένα βακτήρια είναι εφικτό να προκαλέσουν γαστρεντερικές παθήσεις και χαρακτηρίζονται επικίνδυνα για ειδικές ομάδες πληθυσμού. Αποτελούν χρήσιμο δείκτη για τον προσδιορισμό της ποιότητας υδάτων ποικίλων χρήσεων όπως πόσιμου νερού, ύδατα ιχθυοκαλλιεργειών, δραστηριότητες αναψυχής αλλά και για ανακτημένα λύματα προς επαναχρησιμοποίηση (Halkman et al., 2014; Tominaga et al., 2020).

Escherichia coli

Τα *E.coli* επιλέχθηκαν με βάση την ευρεία χρήση τους ως δείκτες μικροβιακής μόλυνσης στα ύδατα και στο επαναχρησιμοποιούμενο νερό. Ανήκει στο γένος των coliforms, της οικογένειας των εντεροβακτηριδίων, όπως παρουσιάζεται και στην Εικόνα 3.2.1.. Το είδος *E. Coli* συνήθως, επιλέγεται ως αντιπροσωπευτικός δείκτης της αντιμικροβιακής αντίστασης σε Gram-αρνητικά βακτήρια (Papaionánou et al., 2022). Η προσβολή από *E. Coli* είναι υπεύθυνη για λοιμώξεις σε ανθρώπους και ζώα (Payment et al., 2003; Simpson et al., 2002). Αυτό το Gram-αρνητικό, κολοβακτηρίδιο που έχει τη μορφή βακίλου, έχει μελετηθεί εκτενώς από την επιστημονική βιβλιογραφία για τα μολυσματικά και ανθεκτικά στα αντιβιοτικά στελέχη του (Cruz-López et al., 2020; Rangel et al., 2005; Troeger et al., 2017; Miguel Herraiz-Carboné, 2021). Παγκόσμιες έρευνες παρουσιάζουν ότι το είδος *E. Coli* μπορεί εύκολα να αποκτήσει αντοχή στις αντιμικροβιακές ουσίες που καταναλώνονται από ανθρώπους και ζώα (Handrova et al., 2019;

Drugdova et al., 2013). Η συνεχής παρουσία των *E.coli* στα λύματα και στο περιβάλλον, θέτουν το είδος ως έναν ιδανικό δείκτη για την διερεύνηση της ανθεκτικότητας σε περιβαλλοντικά δείγματα (Forster et al., 2002; Iakovides 2019; Karaolia et al., 2017; Wellington et al., 2013).

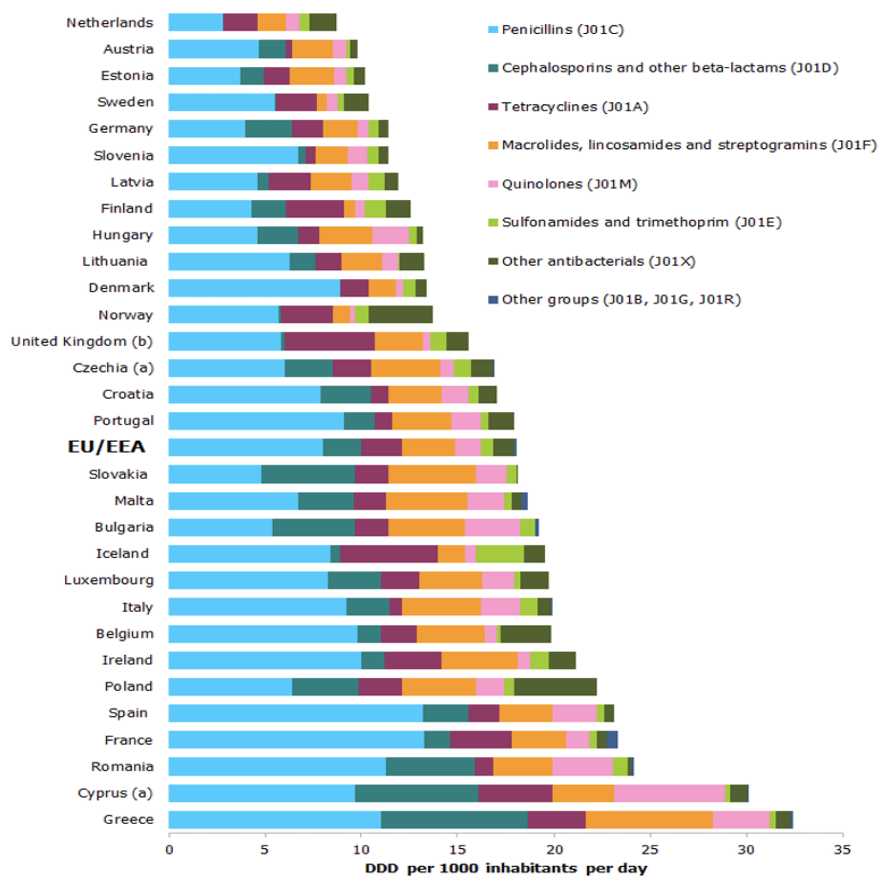


Εικόνα 3.2.1. Κατηγοριοποίηση Total coliforms (maine.gov).

Άξιο σημείωσης αποτελεί το γεγονός ότι οι πληθυσμοί *E. Coli* αποτελούν μια από τις πιο σημαντικές αιτίες μολυσματικών ασθενειών όσον αφορά τις γαστρεντερικές και ουροποιητικές οδούς (Bianculllo et al., 2019; Moreira et al., 2016; Hunter, 2003), προκαλώντας υψηλό ποσοστό θνησιμότητας. Το είδος *E. Coli* είναι ένα από τα κύρια εντερικά βακτήρια που προκαλεί γαστρεντερίτιδα ή νεογνική μηνιγγίτιδα (Tenaillon et al., 2010). Παγκόσμιες έρευνες παρουσιάζουν την αυξημένη θνησιμότητα που προκαλείται, ακόμα και σε επίπεδα > 800.000 άτομα ετησίως (Clarke, 2001; Omole et al., 2019). Επομένως, η ανθεκτικότητα των *E. Coli* στα αντιβιοτικά, προσελκύει μεγάλη προσοχή παγκοσμίως, καθώς παρουσιάζει σοβαρές προκλήσεις για την επιστημονική κοινότητα (Alhaj et al., 2007; Alizade, 2018; Uma et al., 2009; Evers et al., 2016; Hamilton and Haas, 2016; Strachan et al., 2006). Επιπλέον, σημειώνεται ότι η μέτρηση των παθογόνων μικροοργανισμών και ιδιαίτερα του είδους *E. Coli*, περιλαμβάνεται στην Πρόταση «Κανονισμού του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου», σχετικά με τις ελάχιστες απαιτήσεις για το νερό επαναχρησιμοποίηση (EE, 2019) (Iakovides, 2019).

3.3. Εξεταζόμενα αντιβιοτικά

Τα εξεταζόμενα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτέλεση των πειραμάτων ήταν η αμοξυκιλλίνη, η ερυθρομυκίνη, η σιπροφλοξασίνη, η τετρακυκλίνη και η αμπικιλίνη. Η επιλογή των αντιβιοτικών πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την εξεταζόμενη βιβλιογραφία καθώς, παρατηρήθηκε μεγαλύτερη χρήση τους και άρα πραγματοποιείται έρευνα για την ανθεκτικότητα των αντιβιοτικών αυτών και την επίδραση της χλωρίωσης στα ανθεκτικά βακτήρια (Iakovides et al., 2019; Ofrydoroulou et al., 2022). Στο ακόλουθο Γράφημα 3.3.2., παρουσιάζεται η κατανάλωση αντιβιοτικών στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης.



Γράφημα 3.3.2 Κατανάλωση αντιβιοτικών στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης (EU/EEA, 2019).

Οι τετρακυκλίνες (Tetracycline, $C_{22}H_{24}N_2O_8$) είναι αντιμικροβιακά ευρέος φάσματος εναντίον Gram⁺⁺ και Gram⁻ μικροοργανισμών (Daghrir and Drogui 2013). Δρουν

αναστέλλοντας την πρωτεϊνική σύνθεση των μικροβίων. Πρόκειται για χρήσιμα φάρμακα, παρόλο που η χρήση τους σήμερα, λόγω ανάπτυξης ανθεκτικών στελεχών, είναι σχετικώς περιορισμένη. Σε ορισμένες λοιμώξεις αποτελούν φάρμακα εκλογής. Όλες οι τετρακυκλίνες έχουν κατά κανόνα κοινό αντιμικροβιακό φάσμα (Azanu et al. 2018). Σημειώνεται ότι ο μηχανισμός δράσης τους αφορά την αναστολή της πρωτεϊνικής βακτηριακής σύνθεσης. Αναλυτικότερα, η τετρακυκλίνη αναστέλλει την κυτταρική ανάπτυξη, αναστέλλοντας τη μετάφραση. Συγκεκριμένα, προσδένεται στην υποομάδα 30S του ριβοσώματος, αποτρέποντας τη σύνδεση του tRNA στο σύμπλεγμα mRNA-ριβοσώματος. Οι τετρακυκλίνες είναι ένα ευρέως φάσματος αντιβιοτικό και στοχεύουν σε ένα διευρυμένο φάσμα βακτηρίων (Roberts, 2005; Grabert et al., 2018). Οι τετρακυκλίνες αν και δεν χρησιμοποιούνται συχνά στους ανθρώπινους οργανισμούς, ανιχνεύονται ευρέως σε δείγματα λυμάτων, δείγματα επιφανειακών υδάτων και πόσιμου νερού (Azanu et al. 2018; Hanna et al. 2018). Οι ανθρώπινοι οργανισμοί και τα ζώα αποβάλλουν περίπου το 70% της τετρακυκλίνης που περιέχουν τα αντιβιοτικά σε ενεργή μορφή (Daghrir and Drogui 2013). Τα αντιβιοτικά της τετρακυκλίνης στο περιβάλλον λόγω της υδρόφοβης μορφής του και της χαμηλής πτητικότητάς του εμφανίζει μεγάλη συχνότητα παρουσίας σε υδάτινα περιβάλλοντα (Daghrir and Drogui 2013).

Η σιπροφλοξασίνη (Ciprofloxacin, $C_{17}H_{18}FN_3O_3$) ανήκει στις κινολόνες, μια κατηγορία αντιβιοτικών που είναι κατάλληλη για τη θεραπεία λοιμώξεων ευρέως φάσματος. Η σιπροφλοξασίνη αναστέλλει τη DNA γυράση κατά τέτοιο τρόπο ώστε να σταματά τον βακτηριακό μεταβολισμό και την αναπαραγωγή (Shariati et al., 2022). Άλλα είδη που ανήκουν στην κατηγορία των κινολονών, όπως το πιπεμιδικό οξύ, το ναλιδιξικό οξύ, η μοξιφλοξασίνη και η γκατιφλοξασίνη έχουν ανιχνευτεί σε παραδώσουμε σε έρευνες σε δείγματα εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων (Zhang and Li 2011). Επιπλέον σε δείγματα από εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων στην Ευρώπη, τόσο στα ανεπεξέργαστα όσο και στα επεξεργασμένα λύματα έχουν ανιχνευθεί αντιβιοτικά της κατηγορίας των κινολονών σε ποικίλες συγκεντρώσεις (Santos et al. 2013). Η σιπροφλοξασίνη, για παράδειγμα έχει ανιχνευτεί σε εκροές από νοσοκομειακά λύματα στην Ισπανία, τη Σουηδία, την Πορτογαλία και την Ιταλία σε συγκεντρώσεις μερικών δεκάδων $\mu\text{g L}^{-1}$ (Lindberg et al. 2004; Gracia-Lor et al. 2012; Verlicchi et al. 2012; Gros et al. 2013; Santos et al. 2013).

Η ερυθρομυκίνη (Erythromycin, $C_{37}H_{67}NO_{13}$) είναι ένα αντιβιοτικό που ανήκει στις μακρολίδες. Σημειώνεται ότι ο μηχανισμός δράσης τους αφορά την αναστολή της πρωτεϊνικής βακτηριακής σύνθεσης. Δρώντας ανασταλτικά στην πρωτεϊνοσύνθεση, συνδέεται με την υπομονάδα 50S των ριβοσωμάτων των βακτηρίων. Οι μακρολίδες ανιχνεύονται ευρέως σε δείγματα επιφανειακών υδάτων, με μερικά παραδείγματα να αποτελούν την τυλοσίνη, τη ροξιθρομυκίνη, την αζιθρομυκίνη και την κλαριθρομυκίνη (Yang and Carlson 2004; Göbel et al. 2005; Petrovic et al. 2006). Επιπλέον σημειώνεται η παρουσία τους και σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων τόσο στα ανεπεξέργαστα όσο και στα επεξεργασμένα λύματα (Spongberg and Witter 2008; Lin et al. 2009; Watkinson et al. 2009). Σημειώνεται ότι η ερυθρομυκίνη επιλέχθηκε λόγω του ότι ανήκει στην λίστα παρακολούθησης των αναδυόμενων ρύπων (CECs) για την παρακολούθηση των επιφανειακών υδάτων από την Ευρωπαϊκή Ένωση με βάση την

Απόφαση 2015/495. Η συγκέντρωση της ερυθρομυκίνης που προστέθηκε στο υπόστρωμα επιλέχθηκε με βάση τη μελέτη των Iakovides et al., 2021.

Η αμπικιλίνη (Ampicillin, $C_{16}H_{18}N_3NaO_4S$) είναι ευρέος φάσματος ημισυνθετική πενικιλίνη (αντιβιοτικό βήτα-λακτάμης) που ασκεί βακτηριοκτόνο δράση εναντίον πολλών θετικών και αρνητικών κατά Gram μικροοργανισμών. Σημειώνεται ότι ο μηχανισμός δράσης της αφορά την αναστολή της σύνθεσης του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος. Η αμοξυκιλλίνη (amoxicillin) είναι μία ημισυνθετική πενικιλίνη (αντιβιοτικό βήτα-λακτάμης) η οποία αναστέλλει ένα ή περισσότερα ένζυμα (αναφέρονται συνήθως ως πενικιλινοδεσμευτικές πρωτεΐνες, PBP) στην οδό βιοσύνθεσης της βακτηριακής πεπτιδογλυκάνης, ενός βασικού δομικού συστατικού του τοιχώματος του βακτηριακού κυττάρου. Η αναστολή της πεπτιδογλυκάνης οδηγεί σε εξασθένηση του κυτταρικού τοιχώματος, της οποίας συνήθως έπεται η λύση και ο θάνατος του κυττάρου. Ο μηχανισμός δράσης της αφορά την αναστολή της σύνθεσης του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος. Σημειώνεται ότι οι β-λακτάμες, παρουσιάζονται συχνά σε δείγματα από εκροές νοσοκομειακών αποβλήτων αλλά και στα μη επεξεργασμένα αστικά λύματα (Michael et al. 2013; Harrabi et al. 2018).

Οι ελάχιστες συγκεντρώσεις αναστολής (Minimum Inhibitory Concentrations, MICs), παρουσιάζουν την χαμηλότερη συγκέντρωση ενός αντιμικροβιακού που αναστέλλει την ορατή ανάπτυξη ενός μικροοργανισμού. Αποτελούν πρότυπα για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας των βακτηρίων στα φάρμακα (Halling-Sorensen et al., 2002; Andrews, 2001). Αν και τα MIC δείχνουν την αναστολή της βακτηριακής ανάπτυξης, παρέχουν περιορισμένες πληροφορίες σχετικά με τους μηχανισμούς ανθεκτικότητας των βακτηρίων στα αντιβιοτικά (Li et al., 2016). Οι τιμές MIC χρησιμοποιούνται ευρέως από διαγνωστικά εργαστήρια, ως ερευνητικό εργαλείο για τον προσδιορισμό της *in vitro* δραστηριότητας νέων αντιβιοτικών. Αντίστοιχα, πληθώρα δεδομένων από τέτοιες μελέτες έχουν χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό ορίων των τιμών MIC. (Andrews, 2001). Στον ακόλουθο Πίνακα 3.3.1., παρουσιάζονται οι ελάχιστες τιμές που δίνονται για τα εντεροβακτήρια (C.L.S.I., 2020). Σημειώνεται ότι, οι μικροοργανισμοί είναι ευαίσθητοι (Susceptible, S) όταν αναστέλλονται από τις επιτεύξιμες συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού. Οι μικροοργανισμοί είναι ανθεκτικοί (Resistant, R) όταν δεν αναστέλλονται από τις επιτεύξιμες συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού και συνιστάται εναλλακτική θεραπεία (Iakovides 2019; Wayne, 2007; Andes and Craig, 2005).

Πίνακας 3.3.1. Minimal Inhibitory Concentration Interpretive Standards for Enterobacterales (C.L.S.I., 2020).

Antibiotic Compound	MIC breakpoints ($\mu\text{g/mL}$)	
	S \leq	R \geq
Ampicillin	8	32
Amoxicillin-clavulanate	8/4	32/16
Ciprofloxacin (2015)	1	4
Ciprofloxacin (2020)		1
Tetracycline	4	16

Ακολούθως στον Πίνακα 3.3.2., παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις που λήφθηκαν στο πείραμα που πραγματοποιήθηκε στην παρούσα εργασία. Αναλυτικότερα, τα πέντε αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν, υπολογίστηκαν για την τοποθέτησή τους στο υπόστρωμα που καλλιεργήθηκαν τα βακτήρια, σε δόσεις ως 32 mg/L για την αμπικιλίνη - AMP, 1 mg/L για τη σιπροφλοξασίνη - CIP, 16 mg/L για την τετρακυκλίνη – TET, 32 mg/L για την αμοξυκιλλίνη – AMX και 8 mg/L για την ερυθρομυκίνη – ERY (CLSI, 2020; Iakovides et al., 2021).

Πίνακας 3.3.2. Συγκεντρώσεις MIC breakpoints (mg/L), που λήφθηκαν στο πείραμα.

Antibiotic Compound	MIC breakpoints (mg/L)
	R>
Ampicillin	32
Ciprofloxacin	1
Tetracycline	16
Erythromycin	8
Amoxicillin	32

Οι συγκεντρώσεις αντιβιοτικών που προστέθηκαν υπολογίστηκαν ως η μέγιστη τιμή της ελάχιστης συγκέντρωσης αναστολής (MICs) των βακτηρίων *E.coli* που παρατίθενται στο CLSI. καθώς, αποτελεί κοινό είδος που σχετίζεται με την ανθρώπινη υγεία, στα λύματα (Guo et al., 2013; Yuan et al., 2015).

3.4. Εργαστηριακή ανάλυση

Δειγματοληψία και μεταφορά δειγμάτων

Τα δείγματα που συλλέχθηκαν τοποθετήθηκαν σε σφραγισμένα πλαστικά δοχεία πολυαιθυλενίου χωρητικότητας ενός λίτρου, με σκοπό την αποφυγή επιμόλυνσης. Κατά τη μεταφορά τους αποθηκεύτηκαν σε ειδικά κιβώτια από πολυστυρένιο, ώστε να διατηρηθεί η θερμοκρασία τους σε συνθήκες ψύξης στους 4°C, όπως παρουσιάζεται και σε παγκόσμιες έρευνες ((Liu et al., 2018; Kazmi et al., 2008). Η ψύξη των δειγμάτων κρίνεται απαραίτητη καθώς με τον τρόπο αυτό, δεν είναι εφικτός ο πολλαπλασιασμός των μεσόθερμων μικροοργανισμών *E.coli*, που αναλύθηκαν κατά τον εργαστηριακό έλεγχο. Οι εργαστηριακές αναλύσεις των δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν σε λιγότερο από 24 ώρες από τη στιγμή της δειγματοληψίας, όπως ορίζεται και από τη μεθοδολογία για δείγματα λυμάτων, με στόχο την ακριβέστερη ανάλυση των πραγματικών τιμών που υφίστανται στο κάθε δείγμα (Liu et al., 2018).

Πίνακας 3.4.1. Γενικά χαρακτηριστικά δειγματοληψιών στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν.

Αρ. δείγματος	TE (1)	TE (2)	TE (3)	R2 (1)	R2 (2)
Περιοχή δειγματοληψίας	Ψυττάλεια	Ψυττάλεια	Ψυττάλεια	Άντισσα	Άντισσα
Ημερομηνία δειγματοληψίας	5.12.22	13.12.22	6.12.22	24.1.23	31.1.23
Αρχική Δόση Χλωρίου (mg/L)	3	2	1.5	1.5	1
Υπολειμματικό ολικό χλώριο (mg/L)	1.7	1.2	0.95	0.65	0.5
Χρόνος επαφής - t (min)	30	30	30	30	30
Ct (mg Cl ₂ min/L)	50	35	30	20	15

Συνολικά πραγματοποιήθηκαν πέντε δειγματοληψίες με σκοπό την εύρεση βαθμού εξουδετέρωσης ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων μέσω χλωρίωσης, εκ των οποίων, οι τρεις προέρχονταν από την εγκατάσταση της Ψυττάλειας και δύο από την εγκατάσταση της Άντισσας.

Αναλυτικότερα, στον ακόλουθο Πίνακα 3.4.1., παρουσιάζονται οι αρχικές δόσεις χλωρίου που προστέθηκαν στο κάθε δείγμα, ο χρόνος ανάμιξης, το υπολειμματικό ολικό χλώριο που μετρήθηκε, καθώς και το τελικό υπολογιζόμενο Ct. Σημειώνεται ότι για τα δείγματα από την Ψυττάλεια πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις με Ct 30, 35, 50 (mg Cl₂ min/L) και για τα την Άντισσα με Ct 15, 20 (mg Cl₂ min/L).

Για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκε διπλή δειγματοληψία - duplicate και στους υπολογισμούς λήφθηκαν υπόψη οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις των μετρήσεων. Σκοπός των διπλών δειγμάτων είναι η αποφυγή σφάλματος κατά τη δειγματοληψία και την ανάλυση (Liu et al., 2018). Επιπλέον σημειώνεται ότι πραγματοποιήθηκαν προπειράματα με σκοπό την εύρεση της απαραίτητης δόσης και χρόνου επαφής για τη διεξαγωγή των πειραμάτων στα δείγματα των δύο εξεταζόμενων εγκαταστάσεων. Από τα προ πειράματα παρατηρήθηκε ότι η κατανάλωση του χλωρίου με αρχική δόση 9 ήταν παρόμοια, με την αρχική δόση 3, οπότε και επιλέχθηκε η μικρότερη (Παράρτημα). Κατά τα προπειράματα πραγματοποιήθηκε μέτρηση με χρόνο επαφής 15 λεπτά, ωστόσο στα πειράματα επιλέχθηκε ο χρόνος επαφής 30 λεπτών για την επίτευξη του επιθυμητού Ct σύμφωνα με τη νομοθεσία.

Σημειώνεται ότι ανιχνευθήκαν χαμηλές συγκεντρώσεις βακτηρίων στην είσοδο σε κατάσταση Ψυττάλειας, οπότε δείγματα τελικής εκροής Ψυττάλειας με Ct 50, 35, 30 (mg Cl₂ min/L) πραγματοποιήθηκε προσθήκη 10ml πρωτοβάθμιας εκροής ώστε να επιτευχθεί ικανοποιητική συγκέντρωση βακτηρίων. Τα Ct (mg Cl₂ min/L) που λήφθηκαν στα δείγματα της Άντισσας είναι μικρότερα από εκείνα της Ψυττάλειας καθώς κατά το προπείραμα που πραγματοποιήθηκε και παρουσιάζεται σε επόμενο υποκεφάλαιο, παρατηρήθηκε ότι με μεγαλύτερα Ct (mg Cl₂ min/L), διενεργούνταν πλήρης απολύμανση των δειγμάτων. Τέλος, σημειώνεται ότι πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες και στα στάδια των εγκαταστάσεων, με σκοπό την καλύτερη αποτύπωση και ανάλυση του βαθμού επεξεργασίας ως προς τους εξεταζόμενους ανθεκτικούς στα αντιβιοτικά μικροοργανισμούς των εγκαταστάσεων.

3.4.1. Μετρήσεις γενικών παραμέτρων δειγμάτων

Η ποιότητα των υδάτων αναφέρεται σε χημικά, φυσικά και βιολογικά χαρακτηριστικά. Στις εργαστηριακές μελέτες, οι προσδιοριζόμενες παράμετροι περιλαμβάνουν συνήθως, φυσικά χαρακτηριστικά (pH, θερμοκρασία, θολότητα) στερεά συστατικά (ολικά αιωρούμενα στερεά-TSS), οργανικό φορτίο (COD) και θρεπτικά συστατικά (αμμωνία) και παρουσία άλλων εξεταζόμενων ουσιών (πχ. βαρέα μέταλλα).

Στην παρούσα εργασία, πραγματοποιήθηκε μέτρηση για τις παραμέτρους COD (mg/l), TSS (mg/l), Fe²⁺ (mg/l), NH₄⁺-N (mg/l), θολότητα (NTU), T (°C), pH (πριν και μετά τη χλωρίωση),

DO(mg/l) (πριν και μετά τη χλωρίωση). Πριν από κάθε πείραμα, πραγματοποιούταν συλλογή 100 ml από το δείγμα της τελικής εκροής της εγκατάστασης της Ψυττάλειας και της εξόδου του τεχνητού υδροβιότοπου της Άντισσας, με σκοπό τη μέτρηση των γενικών παραμέτρων.

Οι παράμετροι αυτοί είναι εφικτό να χαρακτηρίσουν τα δευτεροβάθμια και τριτοβάθμια λύματα ή και να επηρεάζουν την ανάπτυξη οργανισμών μέσω για παράδειγμα του οργανικού φορτίου, του διαλυμένου οξυγόνου και του pH. Ένα από τα σημαντικότερα φυσικά χαρακτηριστικά είναι τα στερεά συστατικά που περιέχονται στα ύδατα. Η μέτρηση των στερεών χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της ποιότητάς τους ως προς την προστασία της δημόσιας υγείας και του περιβάλλοντος. Στην περίπτωση των υγρών αποβλήτων αποτελούν σημαντικές παραμέτρους καθώς επηρεάζουν τη δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης των λυμάτων και την ποιότητα των τελικών αποδεκτών (Νταράκας, 2016).

pH

Το pH των δειγμάτων εξετάστηκε πριν και μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης, για όλα τα εξεταζόμενα δείγματα. Στα δείγματα Ψυττάλειας η μέτρηση αφορά το δείγμα μετά από την προσθήκη 10 ml πρωτοβάθμια επεξεργασμένων λυμάτων. Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε με κατάλληλη συσκευή μέτρησης pH (φορητό πεχάμετρο τύπου 3110 της εταιρείας WTW, (Εικόνα 3.4.1.1.), εμφανίζοντας την τιμή στο όργανο. Σημειώνεται ότι το pH των λυμάτων συνήθως είναι σχεδόν ουδέτερο (περίπου 7.00) (Μαρκαντωνάτος, 1986).



Εικόνα 3.4.1.1. Συσκευή μέτρησης pH.

Το pH μελετάται καθώς επηρεάζει πληθώρα άλλων παραμέτρων, καθώς για παράδειγμα, στους ετεροτροφικούς μικροοργανισμούς, παρατηρείται μικρή επίδραση τόσο του pH όσο και του DO (Νταράκας, 2016). Η μορφή του αμμωνιακού αζώτου (NH_3 ή NH_4^+) εξαρτάται από το pH του συστήματος. Αναλυτικότερα, η ανύψωση του pH μετατρέπει τη NH_4 σε NH_3 και σε περιπτώσεις που χρησιμοποιείται ασβέστης για την ανύψωση του pH σε εγκαταστάσεις, τότε προσροφάται CO_2 από την ατμόσφαιρα και δημιουργείται ίζημα CaCO_3 , με συνέπεια την ανάγκη εντατικής επίβλεψης και συντήρησης των εγκαταστάσεων (Κούγκολος, 2007)

Θερμοκρασία (T)

Η θερμοκρασία των λυμάτων επηρεάζει άμεσα την παρουσία των μικροοργανισμών καθώς ανάλογα με το θερμοκρασιακό τους εύρος, πραγματοποιείται η ανάπτυξή τους (Κούγκολος, 2007). Η θερμοκρασία T ($^{\circ}\text{C}$) των δειγμάτων μετρήθηκε σε όλα τα πειράματα χλωρίωσης. Η μέτρηση κατά την διάρκεια των πειραματικών διαδικασιών πραγματοποιήθηκε με κατάλληλη συσκευή μέτρησης θερμοκρασίας (φορητό ψηφιακό θερμομέτρο), εμφανίζοντας την τιμή στο όργανο σε μονάδες $^{\circ}\text{C}$. Σημειώνεται ότι το φορητό πεγάμετρο που χρησιμοποιήθηκε για τις μετρήσεις pH, περιλαμβάνει και αισθητήρα μέτρησης θερμοκρασίας. Η θερμοκρασία των

λυμάτων, συνήθως παρουσιάζεται μερικούς βαθμούς μεγαλύτερη από εκείνη του περιβάλλοντος το χειμώνα και ελαφρώς κατώτερη το καλοκαίρι (Μαρκαντωνάτος, 1986).

Χημικά Απαιτούμενο Οξυγόνο (COD)

Η μέτρηση του οργανικού φορτίου, πραγματοποιήθηκε με την ανάλυση του COD (mg/l) των δειγμάτων που εξετάστηκαν. Σημειώνεται ότι η μέτρηση πραγματοποιήθηκε στο δείγμα πριν από την προσθήκη χλωρίου. Η μέτρηση του χημικώς απαιτούμενου οξυγόνου (COD) χρησιμοποιείται ευρύτατα για τη μέτρηση του οργανικού φορτίου που περιέχεται στα ύδατα. Στην περίπτωση των υγρών αποβλήτων, αποτελεί σημαντική παράμετρο καθώς επηρεάζει τη δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης των λυμάτων και την ποιότητα των τελικών αποδεκτών.

Πρακτικά, τα αιωρούμενα πτητικά στερεά προσμετρώνται στο συνολικό COD των λυμάτων και στον βαθμό που είναι βιοδιασπάσιμα, στο συνολικό BOD₅ (αποτελούν το λεγόμενο σωματιδιακό COD ή BOD₅). Οι περιβαλλοντικές υπηρεσίες ορίζουν όρια συγκέντρωσης COD τόσο στα προς διάθεση απόβλητα όσο και στα νερά των αποδεκτών, ανάλογα με την επιθυμητή τους χρήση. Η συστηματική παρακολούθηση των ποιοτικών χαρακτηριστικών των αποβλήτων αποσκοπεί στον έλεγχο απόδοσης μιας εγκατάστασης επεξεργασίας λυμάτων ή μιας δεδομένης διαδικασίας επεξεργασίας, στην υλοποίηση νέων προγραμμάτων επεξεργασίας και στην εφαρμογή ή συμμόρφωση προς τη σχετική νομοθεσία (Ανδρεαδάκης, 2015).

Η εκτέλεση της διαδικασίας προσδιορισμού του COD πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο 5220 D “Closed Reflux Colorimetric Method” του Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22nd Edition, 2012. Σύμφωνα με το πειραματικό πρωτόκολλο τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής πειραματικά σκεύη:

- Ογκομετρικά σκεύη (κύλινδροι, φιάλες, πιπέτες) για τις μετρήσεις των δειγμάτων
- Συσκευή χώνευσης φιαλιδίων
- Φασματοφωτόμετρο ορατού φωτός τύπου HACH DR2800
- Αντιδραστήρια σε φιαλίδια σύμφωνα με το εύρος μέτρησης, με φιαλίδια HACH LCK314 (15-150 mg/L)



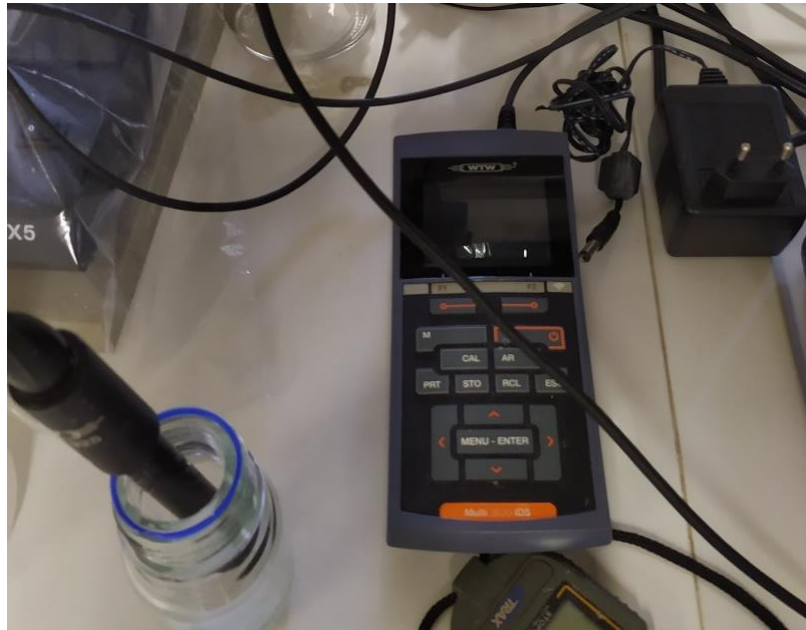
Εικόνα 3.4.1.2. Συσκευή χώνευσης για μέτρηση COD (mg/l).

Αναλυτικότερα, για τον προσδιορισμό του ολικού COD των δειγμάτων ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

- Προσθήκη 2 ml δείγματος με χρήση πιπέτας στα φιαλίδια που περιέχουν τα αντιδραστήρια.
- Κλείσιμο των φιαλιδίων με προσοχή λόγω εξώθερμης αντίδρασης .
- Τοποθέτηση των φιαλιδίων και ενός δείγματος απιονισμένου νερού για χώνευση για 2 hr (Εικόνα 3.4.1.2.).
- Τα δείγματα τοποθετούνται ώστε να κρυώσουν για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μέτρηση της συγκέντρωσης του COD κάθε δείγματος χρησιμοποιώντας το φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος ίσο με 400 ή 600 nm ανάλογα με την καμπύλη, αφού πρώτα μηδενιστεί το όργανο με το δείγμα του απιονισμένου νερού.

Διαλυμένο οξυγόνο (DO)

Το διαλυμένο οξυγόνο DO (mg/L) των δειγμάτων αναλύθηκε πριν και μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης σε όλα τα εξεταζόμενα Ct mg Cl₂ min/L. Σημειώνεται ότι στα δείγματα Ψυττάλειας η μέτρηση αφορά το δείγμα μετά από την προσθήκη 10 ml πρωτοβάθμια επεξεργασμένων λυμάτων.



Εικόνα 3.4.1.3. Συσκευή μέτρησης διαλυμένου οξυγόνου DO (mg/L).

Η μέτρηση του διαλυμένου οξυγόνου πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του φορητού οξυγονόμετρου Multi 3510 IDS της εταιρείας WTW το οποίο δίνει και την τιμή της θερμοκρασίας (Εικόνα 3.4.1.3.). Για τη σωστή μέτρηση του διαλυμένου οξυγόνου, έπρεπε το διάλυμα να βρίσκεται σε συνεχή ανάμειξη (Νταράκας, 2016). Η μέτρηση του DO, εμφανίζεται στο όργανο σε mg/L.

Ολικά αιωρούμενα στερεά (TSS)

Το σύνολο των στερεών που περιέχονται σε ένα δείγμα χαρακτηρίζεται ως ολικά αιωρούμενα στερεά (Total Suspended Solids, TS). Τα ολικά αιωρούμενα στερεά ενός υγρού αποβλήτου εργαστηριακά ορίζονται από το στερεό υπόλειμμα το οποίο παραμένει μετά από εξάτμιση προζυγισμένου δείγματος αποβλήτου και εκφράζεται σε mg/l ή σε % αναλογία (βάρος ανά όγκο). Η μέτρηση των ολικών αιωρούμενων στερεών παρέχει σημαντικές πληροφορίες σχετικά με το επίπεδο επιβάρυνσης που υπόκειται ο υδατικός αποδέκτης. Τα ολικά στερεά διακρίνονται σε υποκατηγορίες ανάλογα με το μέγεθος και τις ιδιότητές τους (αιωρούμενα-διαλυτά, κολλοειδή, καθιζήσιμα, οργανικά –σταθερά) (Ανδρεαδάκης, 2015).

Οι υψηλές τιμές των ολικών αιωρούμενων στερεών στα λύματα σχετίζονται συχνά με υπερβολική παραγωγή στερεών λόγω αύξησης της φόρτισης BOD₅ (Βιοχημική Ζήτηση Οξυγόνου) ή είναι πιθανό να υποδεικνύουν προβλήματα με τα βακτήρια όπως η ανεπάρκεια θρεπτικών συστατικών. Τέλος, οι υψηλές τιμές ολικών αιωρούμενων στερεών μπορούν επίσης να αποδοθούν σε υψηλές ροές ή σε ανεπαρκείς χρόνους καθίζησης λόγω της ηρεμίας των ζωνών που γεμίζουν με στερεά. Σε δεξαμενές αερισμού, τα υψηλά συνολικά αιωρούμενα στερεά μπορεί να υποδηλώνουν ακατάλληλο αερισμό εντός του συστήματος. Τα αιωρούμενα στερεά μπορούν να επηρεάσουν δυσμενώς την ανάπτυξη των υδρόβιων οργανισμών και να παρέχουν προστασία στους παθογόνους μικροοργανισμούς έναντι των διαδικασιών καταστροφής τους. Επιπλέον, τα αιωρούμενα στερεά επηρεάζουν τη μεταφορά συστατικών, όπως του οξυγόνου, μεταξύ ατμόσφαιρας και νερού (Ανδρεαδάκης, 2015).

Η εκτέλεση της διαδικασίας προσδιορισμού των στερεών πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο 2540 D του Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22nd Edition, 2012. Σύμφωνα με το πειραματικό πρωτόκολλο τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- Αναλυτικός ζυγός ακριβείας
- Φούρνος 103°C για μέτρηση ολικών στερεών
- Φίλτρα GF/C διαμέτρου 4,7 cm.
- Συσκευή διήθησης μονή – αντλία κενού
- Ξηραντήρας
- Ογκομετρικά σκεύη (κύλινδροι, φιάλες, πιπέτες) για τις μετρήσεις των δειγμάτων
- Εργαστηριακά εργαλεία (λαβίδα και σπάτουλα)

Για τον εργαστηριακό προσδιορισμό των ολικών αιωρούμενων στερεών στα λύματα ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

- Ζύγιση προξηραμένου φίλτρου GF/C (διαμέτρου 4,7 cm και μέγεθος πόρου 1,2 μm, Whatman, GE. Healthcare, U.K.)
- Ογκομέτρηση δείγματος προς διήθηση

- Ανάδευση του δείγματος
- Τοποθέτηση του φίλτρου στη μονάδα διήθησης και διαχωρισμός του δείγματος διαμέσου GF/C φίλτρου με χρήσης αντλίας κενού
- Αφαίρεση του φίλτρου με χρήση λαβίδας και τοποθέτηση του δείγματος σε φούρνο στους 103°C για 1 hr για την πλήρη εξάτμιση του υγρού
- Αφαίρεση του δείγματος από τον φούρνο και τοποθέτηση σε ξηραντήρα
- Τελική μέτρηση του βάρους του φίλτρου με χρήση αναλυτικού ζυγού ακριβείας

Σημειώνεται ότι στα TSS (mg/l) των δειγμάτων που αναλύθηκαν, η μέτρηση αφορά το δείγμα πριν από την προσθήκη χλωρίου, σε όλα τα εξεταζόμενα Ct (mg Cl₂ min/L). Για την παρουσίαση των αποτελεσμάτων υπολογίστηκαν για όλες τις αναλύσεις, η μάζα των στερεών συστατικών στα δείγματα (gr). Αναλυτικότερα, η μάζα (gr) των αιωρούμενων στερεών συστατικών (TSS) στα δείγματα υπολογίστηκε ως:

$$TSS \text{ (gr)} = \text{Βάρος φίλτρου μετά την εξάτμιση (103°C) (gr)} - \text{Καθαρό βάρος φίλτρου (gr)}$$

Στη συνέχεια προσδιορίστηκε η συγκέντρωση (mg/l) των στερεών ανάλογα με τον όγκο του δείγματος που αναλύθηκε με σκοπό την ομογενοποίηση, διαχείριση και παρουσίαση των δεδομένων και των αποτελεσμάτων.

$$gr \rightarrow mg \rightarrow mg / l = gr / m^3$$

Σύμφωνα με:

$$\text{Στερεά (mg / l)} = (A - B \text{ (mg)}) / V \text{ (ml)} * 1000$$

Όπου,

- ❖ A Βάρος φίλτρου μετά από εξάτμιση
- ❖ B Βάρος φίλτρου πριν από εξάτμιση
- ❖ V Όγκος δείγματος που αναλύθηκε

Θολότητα

Η παρουσία αιωρούμενων στερεών στα ύδατα οδηγεί στη δημιουργία θολότητας η οποία εκτρέπει ή απορροφά την ηλιακή ακτινοβολία. Ως συνέπεια του γεγονότος αυτού είναι πέρα από

την αισθητική υποβάθμιση του νερού, η παρεμπόδιση της διέλευσης του ηλιακού φωτός και ο περιορισμός των διαδικασιών φωτοσύνθεσης και παραγωγής του φυτοπλαγκτόν. Η θολότητα χρησιμοποιείται ως μέτρο της διαύγειας του νερού αλλά και ως μέτρο της ποιότητας των αποβλήτων που καταλήγουν σε φυσικούς αποδέκτες, κυρίως για τον περιορισμό κολλοειδών και υπολειμματικών αιωρούμενων σωματιδίων. Σε ανεπεξέργαστα απόβλητα δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της θολότητας και των αιωρούμενων σωματιδίων, ωστόσο, η συσχέτιση αυτή είναι μεγάλη όταν πρόκειται για απόβλητα που έχουν υποστεί δευτεροβάθμια επεξεργασία (Νταράκας, 2016).

Η θολότητα προσδιορίστηκε σύμφωνα με τη νεφελομετρική μέθοδο (χρήση θολόμετρου Hach Turbidity meter) σε Νεφελομετρικές Μονάδες Θολότητας (NTU). Κατά τη νεφελομετρική μέθοδο μετράται με τη βοήθεια φωτόμετρου, η ένταση του φωτός που διαθλάται καθώς μια δέσμη φωτός σταθερής έντασης περνά διαμέσου του δείγματος. Η θολότητα (NTU) των δειγμάτων που αναλύθηκε σε όλα τα εξεταζόμενα Ct mg Cl₂ min/L. Σημειώνεται ότι στα δείγματα Ψυττάλειας η μέτρηση αφορά το δείγμα μετά από την προσθήκη 10 ml πρωτοβάθμια επεξεργασμένων λυμάτων.

Δισθενής σίδηρος - Fe²⁺

Ο δισθενής σίδηρος Fe²⁺ (mg/l) των δειγμάτων αναλύθηκε σε όλα τα εξεταζόμενα Ct mg Cl₂ min/L. Στα δείγματα Ψυττάλειας η μέτρηση αφορά το δείγμα μετά από την προσθήκη 10 ml πρωτοβάθμια επεξεργασμένων λυμάτων. Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε με κατάλληλο αντιδραστήριο (LCK 320, Hach) μέτρησης σιδήρου. Στη συνέχεια το αντιδραστήριο – φιαλίδιο, τοποθετήθηκε στη συσκευή μέτρησης φάσματος, εμφανίζονται την τιμή στο όργανο σε mg/L.

Ο δισθενής σίδηρος μετρήθηκε στα εξεταζόμενα δείγματα έτσι ώστε να εξασφαλιστεί ότι δεν επηρέαζε την δράση της χλωρίωσης. Ο σίδηρος σε κατάσταση οξειδωσης +2 είναι ευαίσθητος στην οξείδωση. Εν παρουσία χλωρίου, ο Fe²⁺ μπορεί να οξειδωθεί σε Fe³⁺. Αυτή η αντίδραση οξειδοαναγωγής μπορεί να επηρεάσει τη συνολική διαδικασία χλωρίωσης. Επιπλέον, σε παρουσία Fe²⁺, μπορούν να καταλυθούν οι αντιδράσεις χλωρίωσης. Για παράδειγμα, ο Fe²⁺ μπορεί να επιταχύνει τη δυσαναλογία του χλωρίου, οδηγώντας στο σχηματισμό χλωριδίων και χλωρικών (Νταράκας, 2016).



Εικόνα 3.4.1.4. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση του Fe^{2+} .

Στη παραπάνω Εικόνα 3.4.1.4., παρουσιάζονται τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση του Fe^{2+} . Η μέτρηση των τιμών δινόταν με τη βοήθεια του φασματοφωτόμετρου, σύμφωνα με τις οδηγίες του αντιδραστηρίου.

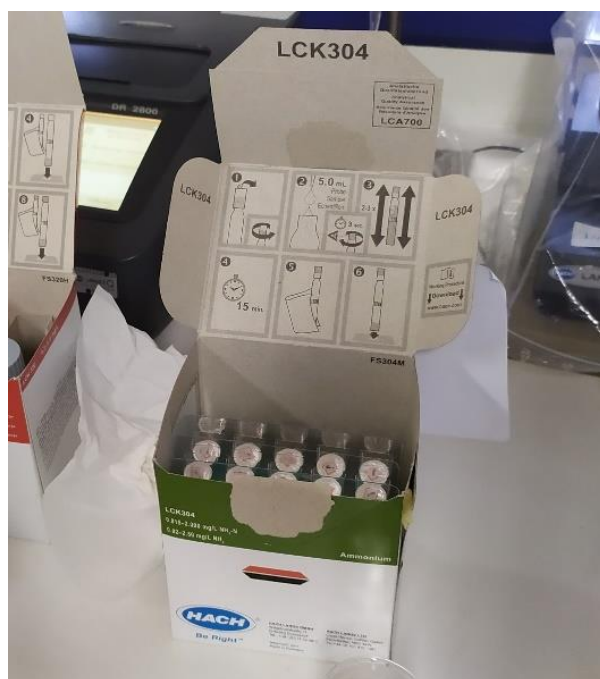
Αμμωνιακό άζωτο - NH_4^+-N

Το άζωτο σε μορφή αμμωνιακού αζώτου NH_4^+-N (mg/l) των δειγμάτων αναλύθηκε σε όλα τα εξεταζόμενα Ct mg Cl_2 min/L. Σημειώνεται ότι στα δείγματα Ψυττάλειας η μέτρηση αφορά το δείγμα μετά από την προσθήκη 10 ml πρωτοβάθμια επεξεργασμένων λυμάτων. Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε με κατάλληλο αντιδραστήριο (LCK 304, Hach) μέτρησης αμμωνιακού αζώτου. Στη συνέχεια το αντιδραστήριο – φιαλίδιο, τοποθετήθηκε στη συσκευή μέτρησης φάσματος, εμφανίζονται την τιμή στο όργανο σε mg/L.

Σε παρουσία χλωρίου, το NH_4^+ μπορεί να αντιδράσει για να σχηματίσει χλωραμίνες, όπως μονοχλωραμίνες (NH_2Cl), διχλωραμίνη ($NHCl_2$) και τριχλωραμίνες (NCl_3). Αυτές οι χλωραμίνες είναι υποπροϊόντα απολύμανσης και είναι λιγότερο αποτελεσματικά απολυμαντικά σε σύγκριση με το ελεύθερο χλώριο. Επίσης, το NH_4^+-N μπορεί να ανταγωνιστεί άλλες ουσίες για τη χλωρίωση.

Η παρουσία ιόντων αμμωνίου θα μπορούσε να επηρεάσει την αποτελεσματικότητα των αντιδράσεων χλωρίωσης συμμετέχοντας σε παράπλευρες αντιδράσεις ή αντιδρώντας με παραπροϊόντα της χλωρίωσης (Νταράκας, 2016).

Το αμμωνιακό άζωτο νιτροποιούμενο προκαλεί αποξυγόνωση ενώ η μη ιονισμένη συνιστώσα του (NH_3) είναι τοξική στους υδρόβιους οργανισμούς και το νιτρικό άζωτο (NO_3) αποτελεί τοξική συνιστώσα του πόσιμου νερού. Εξάλλου το άζωτο, (αμμωνιακό και νιτρικό), αλλά και ο φώσφορος με τη μορφή των φωσφορικών μπορούν να κινητοποιήσουν φαινόμενα ευτροφισμού ενώ και σε οργανική μορφή μπορούν επίσης να θεωρηθούν ως δυνητικοί παράγοντες ευτροφισμού, αφού οι οργανικές ύλες διασπώνται κατά το βιολογικό καθαρισμό και στους αποδέκτες των λυμάτων, αποδίδοντας το N και P σε ανόργανη μορφή (Ανδρεαδάκης, 2015).



Εικόνα 3.4.1.5. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση του NH_4^+-N

Στη παραπάνω Εικόνα 3.4.1.5., παρουσιάζονται τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση του NH_4^+-N . Η μέτρηση των τιμών δινόταν με τη βοήθεια του φασματοφωτόμετρου, σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσης του αντιδραστηρίου.

3.4.2. Προετοιμασία πειραμάτων

Εργαστηριακές προφυλάξεις

Η προστασία των δειγμάτων από επιμόλυνση, αποτελεί μείζων ζήτημα της ανάλυσης μικροβιολογικών παραμέτρων. Σε όλα τα στάδια των εργαστηριακών αναλύσεων, λαμβάνονταν τα απαραίτητα μέτρα προστασίας σε εργαστηριακούς χώρους, με χρήση εργαστηριακής ρόμπας και γαντιών αλλά, και σύμφωνα με τη μεθοδολογία πραγματοποιούνταν τα ακόλουθα βήματα για την αποφυγή επιμολύνσεων των δειγμάτων.

Αναλυτικότερα, πριν από κάθε εργαστηριακή ανάλυση πραγματοποιούνταν απολύμανση των σκευών και των εργαλείων που χρησιμοποιούνταν, σε ειδική συσκευή αποστείρωσης - autoclave (Εικόνα 3.4.2.1.) στους 121°C, για χρονικό διάστημα 30 min. Αναλυτικότερα, στη συσκευή απολύμανσης τοποθετούνταν, τα ατσάλινα εργαλεία (λαβίδες και εξαρτήματα συσκευής διήθησης) όπου καλύπτονταν με αλουμινόχαρτο, γυάλινα σκεύη που χρησιμοποιούνταν κατά τη διάρκεια του πειράματος όπως ογκομετρικοί κύλινδροι, δοχεία με πλαστικό πάμα και δοκιμαστικοί σωλήνες, πλαστικά ρύγγη πιπετών 1 ml και 5 ml αποθηκευμένα σε αλουμινόχαρτο, και τέλος απιονισμένο νερό για τις απαιτούμενες αραιώσεις των δειγμάτων, τα διαδικαστικά του πειράματος κατά τη διάρκεια της διήθησης αλλά και για τη δημιουργία υποστρώματος.



Εικόνα 3.4.2.1. Συσκευή αποστείρωσης.

Επιπλέον, σημειώνεται ότι όλες οι επιφάνειες που πραγματοποιούταν ο μικροβιολογικός εργαστηριακός έλεγχος, όπως η διήθηση των δειγμάτων και η μέτρηση των αποικιών στα τρυβλία, αποστειρώνονταν πριν και μετά από κάθε ανάλυση με χρήση καθαρής αλκοόλης 98%. Σημειώνεται ότι η διαδικασία της διήθησης πραγματοποιείται σε ειδικό απαγωγό αερίων και σε αποστειρωμένη επιφάνεια για την αποφυγή επιμόλυνσης των δειγμάτων.

Τα δείγματα κατά τη μεταφορά και αποθήκευση, έως την εργαστηριακή ανάλυση, και τα τρυβλία petri που περιείχαν τα υποστρώματα ανάπτυξης των μικροοργανισμών, αποθηκεύονταν σε ψυγεία στους 5-8°C για την αποφυγή επιμόλυνσης ή ανάπτυξης μικροοργανισμών, αλλά και αλλοίωσης των υποστρωμάτων. Όλες οι εργαστηριακές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C), σύμφωνα με τη μεθοδολογία αναλύσεων μικροβιολογικών παραμέτρων, εντός χώρου με ελεγχόμενη ρύθμιση θερμοκρασίας.

Προετοιμασία τρυβλίων

Με σκοπό την καλλιέργεια βακτηρίων *E.coli*, παρασκευάζεται υπόστρωμα Chromogenic Coliform Agar.

- Αρχικά, πραγματοποιείται ογκομέτρηση του αποστειρωμένου και απιονισμένου νερού σε δοχείο ζέσεως και τοποθετείται σε τράπεζα θέρμανσης.
- Στη συνέχεια προστίθεται η επιθυμητή ποσότητα αφυδατωμένου υποστρώματος όπως αναγράφεται στις οδηγίες παρασκευής του υποστρώματος. Αναλυτικότερα, σύμφωνα με τις οδηγίες που αναγράφονται στο Chromogenic Coliform Agar (Εικόνα 3.4.2.2.), που χρησιμοποιήθηκε στο παρόν πείραμα, σε ποσότητα ενός λίτρου αποστειρωμένου απιονισμένου νερού, προστίθονται 26,5 gr αφυδατωμένου υποστρώματος σε μορφή σκόνης



Εικόνα 3.4.2.2. Chromogenic Coliform Agar.

- Με τον τρόπο αυτό, το υπόστρωμα (agar) θερμαίνεται, για περίπου 35 min, έως ότου να διαλυθεί. Με τη βοήθεια απολυμασμένης γυάλινης ράβδου, με σκοπό την αποφυγή επιμόλυνσης του υποστρώματος, πραγματοποιείται συνεχής ανάδευση μέχρι να διαλυθεί ολικώς.
- Τέλος, τοποθετείται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 45°C για περίπου 30 min, με συχνή μικρή ανάδευση (Εικόνα 3.4.2.3.).



Εικόνα 3.4.2.3. Υδατόλουτρο.

- Το υπόστρωμα στη συνέχεια αναδεύεται ξανά ελαφρώς και είναι έτοιμο να τοποθετηθεί σε τρυβλία petri διαμέτρου 60 mm. Η ιδανική ποσότητα υποστρώματος που ορίζεται να διατηρούν τα τρυβλία, είναι τα 10 ml (περίπου 4 mm ύψος του τρυβλίου) ώστε να επιτευχθεί η ανάπτυξη αποικιών στο υπόστρωμα. Τα τρυβλία petri τοποθετούνται στον χώρο του απαγωγού για αποφυγή επιμόλυνσης και παραμένουν σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου να στερεοποιηθεί το υπόστρωμα.
- Τα τρυβλία petri αποθηκεύονται στους 5-8°C, σε συνθήκες ψύξης για τη διατήρησή τους.

Μόλις αφαιρούνταν από το υδατόλουτρο τα δείγματα και με σκοπό τη διεξαγωγή του πειράματος εύρεσης του βαθμού εξουδετέρωσης των ανθεκτικών βακτηρίων στα αντιβιοτικά, πραγματοποιούνταν προσθήκη του αντίστοιχα μετρούμενου αντιβιοτικού στο υπόστρωμα, με ελαφρά ανάδευση, και στη συνέχεια τοποθετούνταν στα τρυβλία petri.

Αναλυτικότερα πραγματοποιούνταν οι απαραίτητες αραιώσεις των αντιβιοτικών, με τους κατάλληλους διαλύτες, με σκοπό την επίτευξη της επιθυμητής συγκέντρωσης και στη συνέχεια με χρήση πιπέτας προστίθονταν στο υπόστρωμα (με αραιώση 1 ml αντιβιοτικού για την επιθυμητή συγκέντρωση, στο διάλυμα θρεπτικού άγαρ). Ειδικότερα, όπως αναφέρεται και ανωτέρω, οι συγκεντρώσεις που λήφθηκαν στο πείραμα ήταν 32 mg/L για την αμπικιλίνη (ampicillin), 1 mg/L για τη σιπροφλοξασίνη (ciprofloxacin), 16 mg/L για την τετρακυκλίνη (tetracycline) και 8 mg/L για την ερυθρομικίνη (erythromycin) όπως ορίζεται για το κάθε αντιβιοτικό.

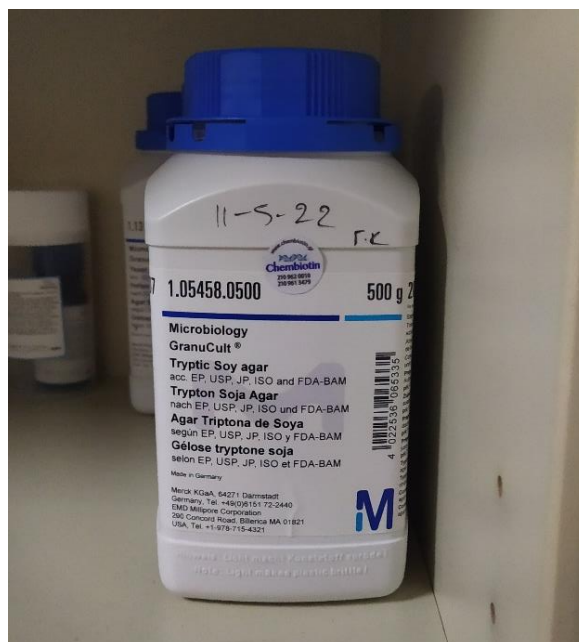
Πίνακας 3.4.2. 1. Τιμές διαλυμάτων stock αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση.

Αντιβιοτικό	Διαλύτης	Συγκέντρωση (mg/mL)
Αμπικιλίνη	Νερό	20
Αμοξικιλίνη	DMSO (Dimethyl sulfoxide)	20
Ερυθρομικίνη	Αιθανόλη	20
Τετρακυκλίνη	Νερό	4
Σιπροφλοξασίνη	Νερό	4

Για να επιτευχθεί η συγκέντρωση του κάθε αντιβιοτικού στο υπόστρωμα, πραγματοποιούνται προσθήκη με χρήση πιπέτας, ρύγχους 5 mL, σύμφωνα με τον τύπο $C_1V_1=C_2V_2$. Στον ανωτέρω Πίνακα 3.4.2.1., παρουσιάζονται οι τιμές των διαλυμάτων stock των αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργαστηριακή ανάλυση.

Αντίστοιχα, με σκοπό την ανακαλλιέργεια των ολικών κολοβακτηρίων Coliform, ώστε να υπολογιστεί ο πραγματικός αριθμός των Coliform βακτηρίων των δειγμάτων, παρασκευάζεται υπόστρωμα Tryptic Soy Agar.

- Αρχικά, πραγματοποιείται ογκομέτρηση του αποστειρωμένου και απιονισμένου νερού σε δοχείο ζέσεως και τοποθετείται σε τράπεζα θέρμανσης.
- Στη συνέχεια προστίθεται η επιθυμητή ποσότητα αφυδατωμένου υποστρώματος όπως αναγράφεται στις οδηγίες παρασκευής του υποστρώματος. Αναλυτικότερα, σύμφωνα με τις οδηγίες που αναγράφονται στο Tryptic Soy Agar (Εικόνα 3.4.2.4.) που χρησιμοποιήθηκε στο παρόν πείραμα, σε ποσότητα ενός λίτρου αποστειρωμένου απιονισμένου νερού, προστίθονται 40 gr αφυδατωμένου υποστρώματος σε μορφή σκόνης.



Εικόνα 3.4.2.4. Tryptic Soy Agar.

- Με τον τρόπο αυτό, το υπόστρωμα (agar) θερμαίνεται, έως ότου να διαλυθεί. Με τη βοήθεια απολυμασμένης γυάλινης ράβδου, με σκοπό την αποφυγή επιμόλυνσης του υποστρώματος, πραγματοποιείται συνεχής ανάδευση μέχρι να διαλυθεί ολικώς

- Στη συνέχεια, το υπόστρωμα αποστειρώνεται στους 121°C για 15 min, μέσω συσκευής αποστείρωσης - autoclave.
- Τέλος, τοποθετείται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 45°C για περίπου 30 min, με συχνή μικρή ανάδευση.
- Το υπόστρωμα στη συνέχεια αναδεύεται ξανά ελαφρώς και είναι έτοιμο να τοποθετηθεί σε τρυβλία petri διαμέτρου 90 mm. Η ιδανική ποσότητα υποστρώματος που ορίζεται να διατηρούν τα τρυβλία, είναι τα 20 ml (περίπου 4 mm ύψος του τρυβλίου) ώστε να επιτευχθεί η ανάπτυξη αποικιών στο υπόστρωμα. Τα τρυβλία petri τοποθετούνται στον χώρο του απαγωγού για αποφυγή επιμόλυνσης και παραμένουν σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου να στερεοποιηθεί το υπόστρωμα.
- Τα τρυβλία petri αποθηκεύονται στους 5-8°C, σε συνθήκες ψύξης για τη διατήρησή τους.

3.4.3. Πειράματα χλωρίωσης

Προετοιμασία απολυμαντικού μέσου

Η απολύμανση των δειγμάτων με τη μέθοδο της χλωρίωσης πραγματοποιήθηκε με προσθήκη υποχλωριώδες νατρίου (NaOCl), καθώς αποτελεί την επικρατέστερη και ευρέως χρησιμοποιούμενη ένωση που εφαρμόζεται στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων, όπως παρουσιάζεται και σε παγκόσμιες έρευνες (Kesar et al., 2022). Με σκοπό να επιτευχθεί η κατάλληλη περιεκτικότητα χλωρίου στο δείγμα, πραγματοποιούνταν η απαραίτητη αραίωση αρχικού διαλύματος υποχλωριώδες νατρίου NaOCl 50 g/L (50000 mg/L), για διάλυμα 1 g/L, σύμφωνα με το αντίστοιχο πρωτόκολλο για τη μεθοδολογία της χλωρίωσης δειγμάτων. Στη συνέχεια για τη μέτρηση της συγκέντρωσης του χλωρίου στο φασματοφωτόμετρο (Εικόνα 3.4.3.1.) πραγματοποιούνταν αραίωση 1:10000 καθώς η μέγιστη συγκέντρωση χλωρίου που είναι εφικτό να μετρήσει το όργανο ορίζεται στα 2mg/L.



Εικόνα 3.4.3.1. Συσκευή φασματοφωτομέτρου.

Οι αραιώσεις πραγματοποιούνταν σε ογκομετρικές φιάλες, με τη χρήση αυτόματης πιπέτας μεταβλητού όγκου, με πλαστικά ρύγχη 1-5 ml. Για να επιτευχθεί η επιθυμητή συγκέντρωση στο διάλυμα, πραγματοποιούνταν ο αντίστοιχος υπολογισμός, σύμφωνα με τον τύπο $C_1V_1=C_2V_2$.

Προπείραμα

Με σκοπό την εύρεση του ρυθμού κατανάλωσης χλωρίου των δειγμάτων από την κάθε εγκατάσταση, της ποσότητας προσθήκης χλωρίου στα δείγματα ώστε να επιτευχθεί το απαιτούμενο Ct (mg Cl₂ min/L), αλλά και των αραιώσεων των δειγμάτων, πραγματοποιήθηκε προπείραμα χλωρίωσης για τα δείγματα της Ψυττάλειας και της Αντισσας, αντίστοιχα.

Στο προπείραμα για την εύρεση βέλτιστης δόσης χλωρίου πραγματοποιούνταν μετρήσεις ολικού και ελεύθερου χλωρίου στους χρόνους t=0 min, t=15 min, t=30 min (DPD method). Αναλυτικότερα, λαμβάνονταν 10ml δείγμα και με τη χρήση αντιδραστηρίου (Εικόνα 3.4.3.2.), μετρούταν στο φασματοφωτόμετρο οι τιμές για ολικό και υπολειμματικό χλώριο, όπως περιγράφεται και σε παγκόσμιες έρευνες (Yuan et al., 2015; Pang et al., 2021). Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιεί σκόνη διαιθυλίου-P-φαινυλίου διαμίνης (DPD method), καθώς η DPD αντιδρά με

το υπολειμματικό χλώριο, μεταβάλλοντας το χρώμα του δείγματος σε ροζ (Yuan et al., 2015). Όσο περισσότερο χρωματιστεί το δείγμα, τόσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα του χλωρίου που περιέχει. Στη συνέχεια πραγματοποιείται η ανάλυσή του δείγματος με φασματοφωτόμετρο, δίνοντας την τελική τιμή χλωρίου σε mg/L (Yuan et al., 2015).



Εικόνα 3.4.3.2. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την εύρεση υπολειμματικού χλωρίου.

Το υπολειμματικό χλώριο στο τέλος του πειράματος, μετρούνταν με σκοπό την σύγκριση με την υφιστάμενη νομοθεσία καθώς, για περιορισμένη άρδευση, δίνονται τιμές $Ct \geq 30$ mg Cl_2 min/L, σε υπολειμματικό ≥ 1 mg/l με ελάχιστο χρόνο επαφής $t=30$ min και για απεριόριστη, δίνεται συγκέντρωση υπολειμματικού χλωρίου ≥ 2 mg/L, με ελάχιστο χρόνο επαφής 60 min.

Χλωρίωση δειγμάτων

Το δείγμα μετά από την απαραίτητη ογκομέτρηση σε πλαστικό ογκομετρικό κύλινδρο, τοποθετούνταν σε ποτήρι ζέσεως (600 mL), και πραγματοποιούνταν συνεχής ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα για 15 min σε 100 rpm, σε θερμοκρασία δωματίου (25°C), με σκοπό την

επίτευξη ομοιόμορφης ανάδευσης του δείγματος, όπως παρουσιάζεται και σε παγκόσμιες έρευνες (Kesar et al., 2022; Destiani and Templeton, 2019; Zhang et al., 2019; Stange et al., 2019). Στη συνέχεια, πραγματοποιούνταν η προσθήκη χλωρίου και λήψη πρώτης μέτρησης σε χρόνο $t=0$. Οι επόμενες μετρήσεις αφορούσαν τα $t=15$ min και $t=30$ min σύμφωνα με την μέθοδο DPD method, για μετρήσεις ολικού υπολειμματικού χλωρίου.

Η τιμή C_t (συγκέντρωση υπολειμματικού χλωρίου και χρόνου επαφής) υπολογίστηκε με σκοπό να εκφραστεί η δόση χλωρίωσης. Τα εξεταζόμενα C_t ήταν 15 και 20 $\text{mg Cl}_2 \text{ min/L}$ για τα επεξεργασμένα λύματα από την Άντισσα και 30, 35 και 50 $\text{mg Cl}_2 \text{ min/L}$ για τα επεξεργασμένα λύματα από την Ψυτάλεια. Σημειώνεται ότι η διαδικασία της απολύμανσης με τη μέθοδο της χλωρίωσης σε κάθε συγκέντρωση πραγματοποιήθηκε για 2 επαναλήψεις κάθε φορά και λήφθηκαν υπόψη οι τιμές των μέσων όρων.

Αποχλωρίωση δειγμάτων

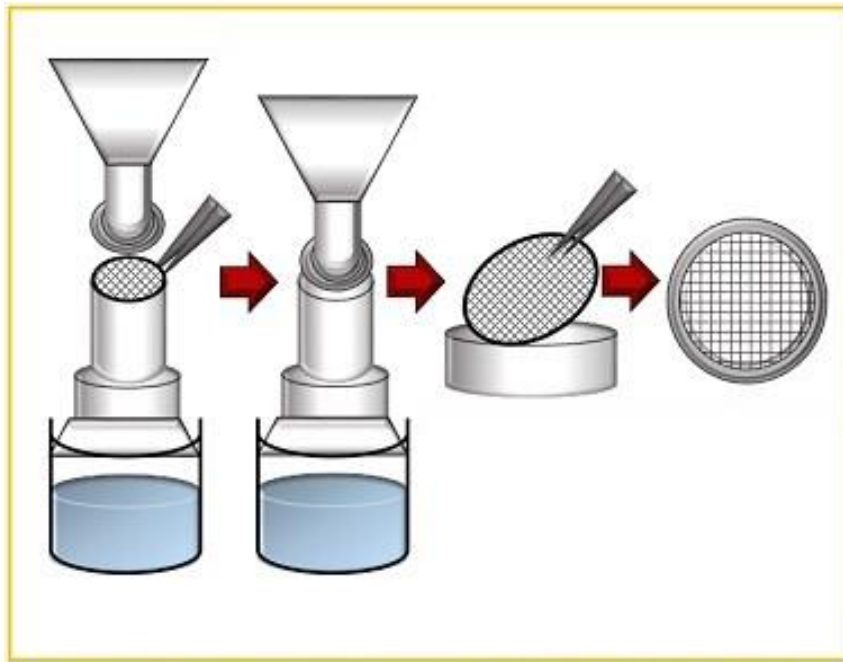
Σε δείγματα που πρόκειται να πραγματοποιηθεί εργαστηριακή ανάλυση και περιέχουν υπολειμματικό χλώριο, προστίθεται αναγωγικός παράγοντας, εκτός εάν το δοχείο περιέχει ήδη υπόστρωμα για απευθείας καλλιέργεια του δείγματος, όπως παρουσιάζεται και σε παγκόσμιες έρευνες (Jiang et al., 2023; Shi et al., 2022; Zhang et al., 2019; Destiani and Templeton, 2019). Το θειοθειικό νάτριο ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) αποτελεί ικανοποιητικό παράγοντα αποχλωρίωσης, ο οποίος εξουδετερώνει κάθε υπόλειμμα και παρεμποδίζει τη συνέχιση της βακτηριοκτόνου δράσης κατά τη μεταφορά των δειγμάτων. Έτσι ο έλεγχος πραγματοποιείται με μεγαλύτερη ακρίβεια για το πραγματικό μικροβιακό φορτίο των λυμάτων (Shi et al., 2022).

Αναλυτικότερα, για δειγματοληψία χλωριωμένων εκροών βιολογικών καθαρισμών προστίθεται επαρκής ποσότητα $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ σε καθαρό και αποστειρωμένο δοχείο, ώστε το δείγμα να έχει συγκέντρωση 100mg/L. Για παράδειγμα, ποσότητα 0,1 mL από 10% διάλυμα $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ σε δοχείο 120 mL επαρκεί για δείγμα με περιεκτικότητα 15 mg/L σε υπολειμματικό χλώριο. Αντίστοιχα, για δείγματα πόσιμου νερού, η συγκέντρωση αποχλωριωτικού παράγοντα μπορεί να μειωθεί ως 0,1 mL διαλύματος 3% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ σε δοχείο 120 mL όπου θα εξουδετερώσει έως και 5 mg/L υπολειμματικού χλωρίου (Zhang et al., 2019).

Στην παρούσα εργασία, πραγματοποιούνταν προσθήκη 1 ml $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, από διάλυμα συγκέντρωσης 10%, σε 600 ml δείγματος. Σημειώνεται ότι μετά την προσθήκη του αποχλωριωτικού παράγοντα, λαμβάνονταν δείγμα για μέτρηση ολικού και υπολειμματικού χλωρίου με σκοπό την επιβεβαίωση της διεργασίας της αποχλωρίωσης.

3.4.4. Μικροβιολογική ανάλυση

Με σκοπό τον προσδιορισμό της ανθεκτικότητας των βακτηρίων στους διαφορετικούς τύπους αντιβιοτικών μετά από τη διαδικασία της χλωρίωσης, τα δείγματα αναλύθηκαν στον χώρο του μικροβιολογικού εργαστηρίου. Στα δείγματα πραγματοποιήθηκαν οι απαραίτητες αραιώσεις και στη συνέχεια, αναδεύτηκαν σε ειδικό μηχάνημα ανάδευσης δοκιμαστικών σωλήνων. Ακολούθως, διηθήθηκαν σε ειδική συσκευή διήθησης, εντός του χώρου του απαγωγού. Τέλος η επώαση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε επωαστήρα με σκοπό την καλλιέργεια και την μέτρησή τους, ώστε να προσδιοριστεί ο αριθμός των ανθεκτικών σε αντιβιοτικά ετεροτροφικά βακτήρια. Σημειώνεται ότι τα τρυβλία που δεν περιείχαν αντιβιοτικά αναλύθηκαν επίσης για τον προσδιορισμό του συνολικού αριθμού βακτηρίων *E.coli*. Σε όλα τα δείγματα η ανάλυση διεξήχθη σύμφωνα με την μέθοδο των μεμβρανών (Membrane Filtration Method), όπου παρουσιάζεται στην ακόλουθη Εικόνα 3.4.4.1.. Στις επόμενες παραγράφους, αναλύονται τα στάδια που ακολουθήθηκαν αναλυτικότερα με σκοπό την πλήρη παρουσίαση των σταδίων της μεθοδολογίας εργαστηριακής.



Εικόνα 3.4.4.1. Σχεδιάγραμμα μεθόδου φίλτρανσης μέσω μεμβρανών (biologyreader.com).

Η μεθοδολογία της μέτρησης των βακτηρίων μέσω διήθησης των δειγμάτων όπου ακολουθήθηκε, παρουσιάζεται και σε παγκόσμιες άλλες έρευνες (Iakovides et al., 2019; Novo and Manaia, 2010; Michael et al., 2012) με χρήση φίλτρων μεμβράνης ISO.

Αραιώσεις δειγμάτων

Στα εξεταζόμενα δείγματα ήταν απαραίτητη η αραιώση ώστε να καταστεί εφικτή η μέτρησή των μικροοργανισμών. Αναλυτικότερα, όσο μεγαλύτερο το φορτίο των δειγμάτων, τόσο μεγαλύτερη και η αραιώση που απαιτούνταν. Η αραιώση των δειγμάτων πραγματοποιούνταν στους δοκιμαστικούς σωλήνες που παρουσιάζονται στην ακόλουθη Εικόνα 3.4.4.2..



Εικόνα 3.4.4.2. Δοκιμαστικοί σωλήνες που χρησιμοποιούνταν σε αραιώσεις των δειγμάτων.

Στον ακόλουθο Πίνακα 3.4.4.1., παρουσιάζονται οι αραιώσεις που απαιτούνταν για τα στάδια επεξεργασίας των δειγμάτων από την εγκατάσταση της Ψυττάλειας. Αναλυτικότερα,

παρουσιάζονται οι απαραίτητες αραιώσεις που πραγματοποιήθηκαν για τα λύματα από την είσοδο της εγκατάστασης της Ψυττάλειας, από την έξοδο της πρωτοβάθμιας επεξεργασίας και από την τελική έξοδο, για τους πληθυσμούς *E.coli* (control) που δεν περιείχαν αντιβιοτικό στο υπόστρωμά τους και για τους πληθυσμούς *E.coli* που μετρήθηκαν σε υπόστρωμα αντιβιοτικών.

Πίνακας 3.4.4.1. Αραιώσεις δειγμάτων κατά τα στάδια επεξεργασίας Ψυττάλειας.

	In	1α	TE
Control	0,001	0,01	1
	0,0001	0,001	0,1
	0,00001	0,0001	0,01
			0,001
Antibiotic	0,01	0,01	10
	0,001	0,001	1
	0,0001		0,1

Αντίστοιχα όσον αφορά τα χλωριωμένα δείγματα της Ψυττάλειας, στον ακόλουθο Πίνακα 3.4.4.2., παρουσιάζονται οι απαραίτητες αραιώσεις για τους πληθυσμούς *E.coli* χωρίς προσθήκη αντιβιοτικού στο υπόστρωμα (control) αλλά και για την ανάλυση των χλωριωμένων δειγμάτων που εξετάζονταν σε υπόστρωμα αντιβιοτικών.

Πίνακας 3.4.4.2. Αραιώσεις χλωριωμένων δειγμάτων Ψυττάλειας.

	TE Chlr
Control Chlr	100
	10
	0,1
	1
	0,1
	0,01
Antibiotic Chlr	100

Τέλος, στον ακόλουθο Πίνακα 3.4.4.3., παρουσιάζονται οι κατάλληλες αραιώσεις που απαιτούνταν για τα δείγματα της Ψυττάλειας του πειράματος ανακαλλιέργειας μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης (Regrowth), για τους πληθυσμούς *E.coli* χωρίς την προσθήκη αντιβιοτικών αλλά και για τον πληθυσμό *E.coli* που μετρήθηκε σε υπόστρωμα αντιβιοτικού αμικιλίνης.

Πίνακας 3.4.4.3. Αραιώσεις δειγμάτων για το πείραμα ανακαλλιέργειας της Ψυττάλειας.

TE Regrowth	
Control	100
	10
	1
Antibiotic	100
	10

Αντίστοιχα στον ακόλουθο Πίνακα 3.4.4.4., παρουσιάζονται οι απαραίτητες αραιώσεις που πραγματοποιήθηκαν για τα στάδια επεξεργασίας της εγκατάστασης, στα λύματα από την εγκατάσταση της Άντισσας.

Πίνακας 3.4.4.4. Αραιώσεις δειγμάτων για τα στάδια επεξεργασίας της Άντισσας

	In	UASB	CWs
Control	0,001	0,01	1
	0,0001	0,001	0,1
	0,00001	0,0001	0,01
		0,0001	
Antibiotic	0,01	0,01	10
	0,001	0,001	1

Όσον αφορά τα χλωριωμένα δείγματα, στον ακόλουθο Πίνακα 3.4.4.5., παρουσιάζονται οι απαραίτητες αραιώσεις που πραγματοποιήθηκαν μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης για τα λύματα της εξόδου της εγκατάστασης της Άντισσας που αναλύθηκαν.

Πίνακας 3.4.4.5. Αραίωσης για τα χλωριωμένα δείγματα της Άντισσας.

	CWs Chlr
Control Chlr	100
	10
	1
	0,1
	0,01
Antibiotic Chlr	100

Τέλος, ο ακόλουθος Πίνακας 3.4.4.6., παρουσιάζει την απαραίτητη αραίωση που πραγματοποιήθηκε για τα δείγματα της Άντισσας του πειράματος ανακαλλιέργειας μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης (Regrowth).

Πίνακας 3.4.4.6. Αραιώσεις για το πείραμα ανακαλλιέργειας στην Άντισσα.

	CWs Regrowth
Control	100
	10
	1
Antibiotic	100
	10

Οι παραπάνω αραιώσεις των δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν με σκοπό την εργαστηριακή ανάλυση και μέτρηση των αποικιών βακτηρίων, μέσω διήθησης ελάχιστου όγκο χλωριωμένου δείγματος στα 100 ml.

Διήθηση δειγμάτων

Στη συνέχεια με σκοπό τη μέτρηση των δειγμάτων για την ανθεκτικότητα των βακτηρίων στα αντιβιοτικά, πραγματοποιήθηκε διήθηση των δειγμάτων σε ειδική συσκευή διήθησης. Πριν τη διήθηση των δειγμάτων πραγματοποιούνταν ανάδευση, με σκοπό την ομογενοποίηση του υλικού και την αποφυγή οποιασδήποτε καθίζησης είχε προλάβει να πραγματοποιηθεί κατά την εργαστηριακή ανάλυση. Αναλυτικότερα, τα δείγματα διηθούνταν σε 0.45 μm pore size, Millipore μέσω αντλίας κενού αέρος σε ειδική συσκευή διήθησης. Τέλος, τα δείγματα μετά τη διαδικασία της διήθησης τοποθετούνταν σε τρυβλία με το αντίστοιχο εξεταζόμενο υπόστρωμα, με χρήση αποστειρωμένης λεπίδας.

Επώαση δειγμάτων

Κατόπιν της τοποθέτησης της μεμβράνης βιβλία με τα εξεταζόμενα υπόστρωμα, πραγματοποιούνταν επώαση με σκοπό την καλλιέργεια αποικιών και μέτρηση της ανθεκτικότητας των βακτηρίων. Αναλυτικότερα, τα τρυβλία τοποθετούνται ανάποδα στον επωαστήρα για 24 ώρες, σε σταθερή θερμοκρασία στους 37°C. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την αντίστοιχη μεθοδολογία για την μέτρηση βακτηριακών αποικιών (bacterial colony counting method) (Osińska et al., 2020; Kong et al., 2022).

Μέτρηση - Coliforms

Στα εξεταζόμενα δείγματα πραγματοποιούνταν μέτρηση των coliforms με σκοπό αποτύπωση της ποιοτικής κατάστασης των λυμάτων. Η μέτρηση των αποικιών coliforms περιλάμβανε τις ροζ αποικίες όπως παρουσιάζεται και στην Εικόνα 3.4.4.3. ακολούθως και πραγματοποιούνταν σε ειδική συσκευή counter. Στη συνέχεια με σκοπό την μέτρηση των coliforms ώστε να υπολογιστεί ο τελικός πληθυσμός τους κάθε δείγμα πραγματοποιούνταν, ανακαλλιέργεια των αποικιών με τυχαία δειγματοληπτική επιλογή 10 αποικιών από κάθε τρυβλίο.



Εικόνα 3.4.4.3. Συσκευή μέτρησης αποικιών βακτηρίων.

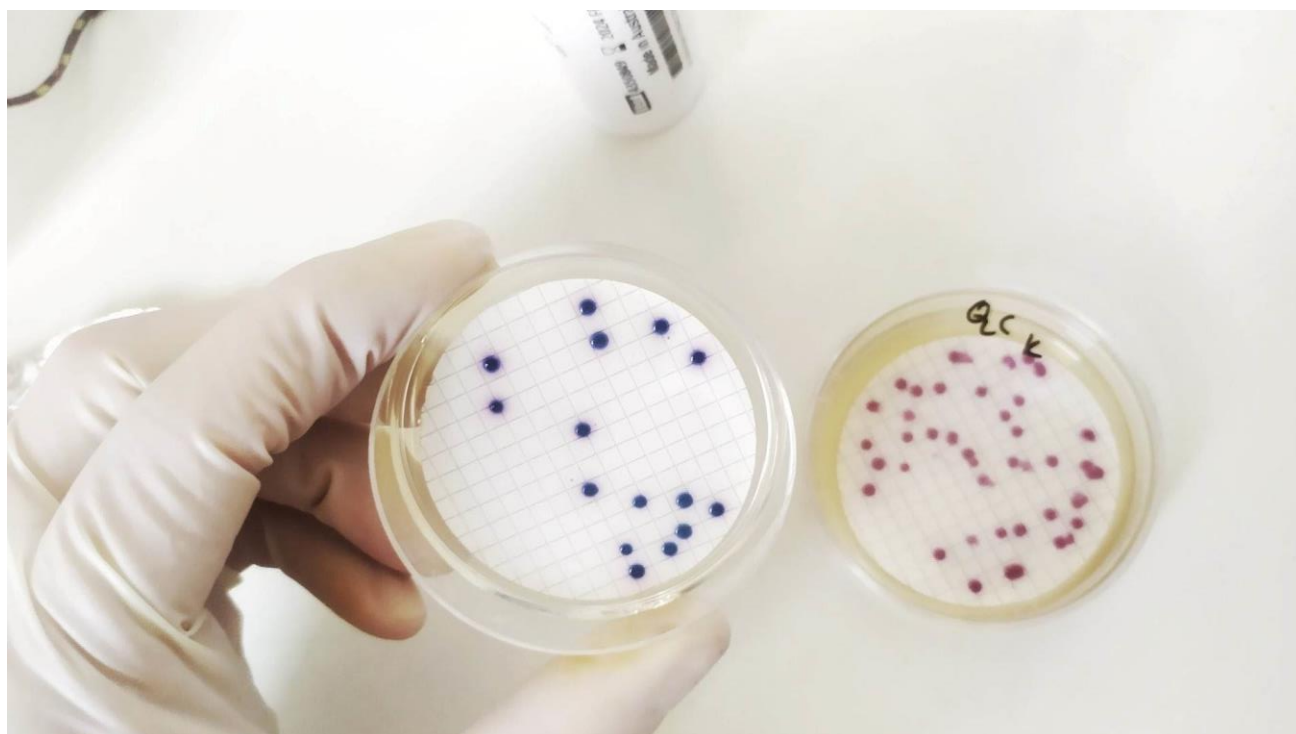
Αναλυτικότερα, πραγματοποιούνταν διαίρεση του τρυβλίου που θα υποστήριζε την ανακαλλιέργεια, σε δέκα αντίστοιχες περιοχές. Με τη χρήση αποστειρωμένων κρίκων πραγματοποιούνταν η επιλογή των αποικιών από όλες τις περιοχές του εξεταζόμενου τρυβλίου. Για επίτευξη μεθόδου τυχαίας δειγματοληψίας, γίνεται λήψη μεγάλων αλλά και μικρών αποικιών από όλες τις περιοχές. Στη συνέχεια οι αποικίες επωάζουν στους 36°C για 24 hr, σε ειδικό επωαστήριο.

Η ανακαλλιέργεια εξετάζονταν με τεστ οξειδάσης, Ο έλεγχος της οξειδάσης χρησιμοποιείται για την αναγνώριση των γενών *Neisseria*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Campylobacter*, *Pseudomonas* (θετική αντίδραση) και για αποκλεισμό όλων των ειδών των εντεροβακτηρίων που δίνουν αρνητική αντίδραση (Martin et al., 2008).

Αναλυτικότερα, πραγματοποιούνταν μεταφορά μικρής ποσότητας βακτηρίων από την αποικία που είχε αναπτυχθεί στο ειδικό strip οξειδάσης και παρατηρούνταν η αλλαγή χρώματος μετά από 30 sec. Σημειώνεται ότι όταν παραμένει το χρώμα στο strip ίδιο με το χρώμα της αποικίας, σημαίνει ότι είναι κολοβακτηρίδιο και όταν το χρώμα είναι μπλε σκούρο, τότε έχει αντιδράσει με την οξειδάση και δεν είναι κολοβακτηρίδιο. Με τον τρόπο αυτό πραγματοποιούνταν υπολογισμός αναγωγής των τιμών για τα βακτήρια που ανήκαν στην οικογένεια των κολοβακτηριδίων και είχαν ελεγχθεί από το τεστ οξειδάσης.

Μέτρηση - Δείκτη *E.coli*

Η μέτρηση των αποικιών *E.Coli* περιλάμβανε την μέτρηση των αποικιών με μπλέ χρώμα όπως παρουσιάζεται και στην Εικόνα 3.4.4.4. ακολούθως και πραγματοποιούνταν σε ειδική συσκευή counter. Σημειώνεται, ότι όλες οι μετρήσεις κατά τον εργαστηριακό έλεγχο, αποτυπώνονταν σε ειδικό έντυπο ανάλυσης ολικών κολοβακτηριδίων και *E.coli* σε νερά.



Εικόνα. 3.4.4.4. *E.coli* και coliforms σε καλλιέργεια τρυβλίων Petri.

Η παραπάνω μεθοδολογία που ακολουθήθηκε παρουσιάζεται και σε παγκόσμιας άλλες έρευνες καθώς η απομόνωση των βακτηρίων και η καλλιέργεια τους σε κατάλληλο υπόστρωμα χρησιμοποιείται ευρέως (Ma et al., 2022a). Με σκοπό την εύρεση των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων πραγματοποιήθηκε, καλλιέργεια με και χωρίς προσθήκη αντιβιοτικού στο υπόστρωμα (Thamlikitkul et al., 2019, Sib et al., 2020; CLSI, 2017; Chiemchaisri et al., 2023).

3.4.4.1 Πείραμα Regrowth

Με το πέρας της διαδικασίας της χλωρίωσης πραγματοποιούνταν λήψη χλωριωμένου δείγματος για το πείραμα ανακαλλιέργειας - Regrowth σε *E.coli*. Στη συνέχεια, πραγματοποιούνταν αποθήκευση του δείγματος για 48 ώρες εν απουσία φωτός, στους 25 ± 1 °C (Iakovides et al., 2019).



Εικόνα 3.4.4.5. Καλλιέργεια δειγμάτων σε τρυβλία Petri.

Τα δείγματα ανακαλλιέργειας – regrowth, ακολουθούσαν την ίδια μεθοδολογία ανάλυσης και μετρήθηκαν με σκοπό την σύγκριση των αποτελεσμάτων (Εικόνα 3.4.4.5.). Στο πείραμα ανακαλλιέργειας εξετάστηκαν ο πληθυσμός *E.coli* χωρίς υπόστρωμα αντιβιοτικού και ο πληθυσμός *E.coli* με υπόστρωμα που περιείχε το αντιβιοτικό αμικικιλίνη.

3.5. Υπολογισμός αποτελεσμάτων

Με σκοπό την παραγωγή αποτελεσμάτων για τις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν στην εργαστηριακή ανάλυση, πραγματοποιήθηκαν οι απαραίτητοι υπολογισμοί όπως παρουσιάζονται ακολούθως, για τους πληθυσμούς *E. Coli* και ολικών κολοβακτηρίων αντίστοιχα (Chiemchaisri et al., 2023; Yuan et al., 2015). Αναλυτικότερα για τους πληθυσμούς *E. Coli* πραγματοποιήθηκε ο ακόλουθος υπολογισμός:

$$CFU/100\text{ mL} = (\# \text{ of } E.coli \text{ colonies counted} \div \text{sample volume filtered in mL}) \times 100$$

Αντίστοιχα για τους πληθυσμούς των κολοβακτηρίων – Coliform, αρχικά πραγματοποιούταν η αναγωγή του πληθυσμού σύμφωνα με το τεστ οξειδάσης. Για παράδειγμα, αν από τις 10 αποικίες που επιλέχθηκαν για ανακαλλιέργεια, οι 8 ήταν αρνητικές στο test οξειδάσης και αρχικά είχαν μετρηθεί 100 αποικίες, τότε πραγματοποιείται αναγωγή για τις 100 αποικίες. Άρα ως αποτέλεσμα προκύπτει ότι 80 αποικίες είναι κολοβακτηρίδια και ακολουθείται ο τελικός υπολογισμός σύμφωνα με τον ακόλουθο τύπο (Yuan et al., 201):

$$CFU/100\text{ mL} = (\# \text{ of Coliform colonies counted} \div \text{sample volume filtered in mL}) \times 100$$

Ο υπολογισμός των ολικών κολοβακτηρίων προκύπτει από το άθροισμα των κολοβακτηρίων και των *E.coli* που μετρήθηκαν, σύμφωνα με τη μεθοδολογία που ακολουθήθηκε. Όπως παρουσιάζεται και στις Εικόνες 3.4.4.4. και 3.4.4.5., τα βακτήρια *E.coli* χρωματίζονταν με μπλε χρώμα και τα coliforms με ροζ χρώμα, αποτελώντας ως άθροισμα τα ολικά κολοβακτηρίδια. Επιπλέον, σημειώνεται ότι ο αριθμός των ολικών κολοβακτηριδίων, περιλαμβάνει και τα ανθεκτικά αλλά και τα μη ανθεκτικά βακτήρια. Αναλυτικότερα, ο υπολογισμός προκύπτει ως:

$$\text{Total Coliforms} = E.coli + \text{Coliform bacteria}$$

Η ανθεκτικότητα των βακτηρίων στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά υπολογίστηκε σύμφωνα με τον ακόλουθο τύπο (Ma et al., 2022a; Huang et al., 2012) ως:

$$Resistance (\%) = \frac{\text{Αριθμός αποικιών στο υπόστρωμα με αντιβιοτικό } (\frac{CFU}{100 \text{ ml}})}{\text{Αριθμός αποικιών στο υπόστρωμα χωρίς αντιβιοτικό } (\frac{CFU}{100 \text{ ml}})} * 100$$

Αντίστοιχα, η απομάκρυνση των σταδίων των εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων, καθώς και η απομάκρυνση κατά τη διαδικασία της χλωρίωσης, υπολογίστηκε από τον παρακάτω τύπο (Ma et al., 2022a; Huang et al., 2012):

$$Removal (\%) = \frac{\text{Αριθμός αποικιών στο υπόστρωμα μετά τη χλωρίωση } (\frac{CFU}{100 \text{ ml}})}{\text{Αριθμός αποικιών στο υπόστρωμα πριν τη χλωρίωση } (\frac{CFU}{100 \text{ ml}})} * 100$$

Η λογαριθμική μείωση των πληθυσμών των βακτηρίων υπολογίστηκε από την ακόλουθη σχέση, όπου, N_0 η συγκέντρωση των *E.coli* πριν την χλωρίωση (CFU/100 mL) και N , η συγκέντρωση των *E.coli* μετά την χλωρίωση (CFU/100 mL) (Ma et al., 2022a):

$$Log = - \log (N / N_0)$$

Ο ρυθμός μείωσης των βακτηρίων k , υπολογίστηκε σύμφωνα με την ακόλουθη σχέση κινητικής πρώτης τάξης, όπως και σε παγκόσμιες έρευνες (Ma et al., 2022a; Fiorentino et al., 2022; Phattarapattamawong et al., 2021):

$$\begin{aligned} \frac{dN}{dt} &= -k \times C_0 \times N \\ \int \frac{dN}{N} &= \int -k \times C t \\ \int_{N_0}^N \frac{1}{N} \times dt &= -k \times C \int_0^t dt \\ \ln [N] \Big|_{N_0}^N &= -k \times C t \\ \ln N - \ln N_0 &= -k \times C t \end{aligned}$$

$$\ln \frac{N}{N_0} = e^{-k \times Ct}$$

$$\frac{N}{N_0} = -e^{-k \times Ct}$$

$$N = N_0 \times e^{-k \times Ct}$$

Όπου, N_0 η συγκέντρωση των *E.coli* πριν την χλωρίωση (CFU/100 mL), N_t η συγκέντρωση των *E.coli* μετά την χλωρίωση (CFU/100 mL), Ct η δόση χλωρίου (mg min Cl₂/L) (όπου προκύπτει από το γινόμενο του υπολειμματικού χλωρίου με τον χρόνο επαφής) και K η σταθερά μείωσης των *E.coli* (1/min).

Τα δείγματα ανακαλλιέργειας – regrowth, των βακτηρίων σύμφωνα με τη μεθοδολογία ανάλυσης (Karaolia et al., 2015) υπολογίζεται, ως:

$$\text{Reactivation} = Cr / Ct \rightarrow$$

$$(\text{Regrowth } E.coli/100 \text{ ml}) / (\text{After Chlorination } E.coli/100 \text{ ml})$$

Σημειώνεται ότι, όταν ο λόγος υπολογίζεται μεγαλύτερος της μονάδας, θεωρήθηκε ως εκ νέου ανάπτυξη και πολλαπλασιασμός είτε των βακτηρίων που δεν εξουδετερώθηκαν κατά τη διαδικασία της χλωρίωσης, είτε των αδρανοποιημένων βακτηρίων, που προηγουμένως δεν μπορούσαν να αναπτυχθούν στο υπόστρωμα. Με τον τρόπο αυτό, οι πληθυσμοί των βακτηρίων όπου κατά τη δοκιμή αναγέννησης, υπερβαίνουν τον πληθυσμό των βακτηρίων που ανιχνεύονται κατά τη χλωρίωση, θεωρούνται ως ενεργοποιημένα βακτήρια (Karaolia et al., 2015).

Τέλος, σημειώνεται ότι όλοι οι απαραίτητοι υπολογισμοί, οι στατιστικές αναλύσεις καθώς, και η απεικόνιση των Πινάκων και Γραφημάτων, πραγματοποιήθηκαν με χρήση του προγράμματος Microsoft Excel.

4. Αποτελέσματα

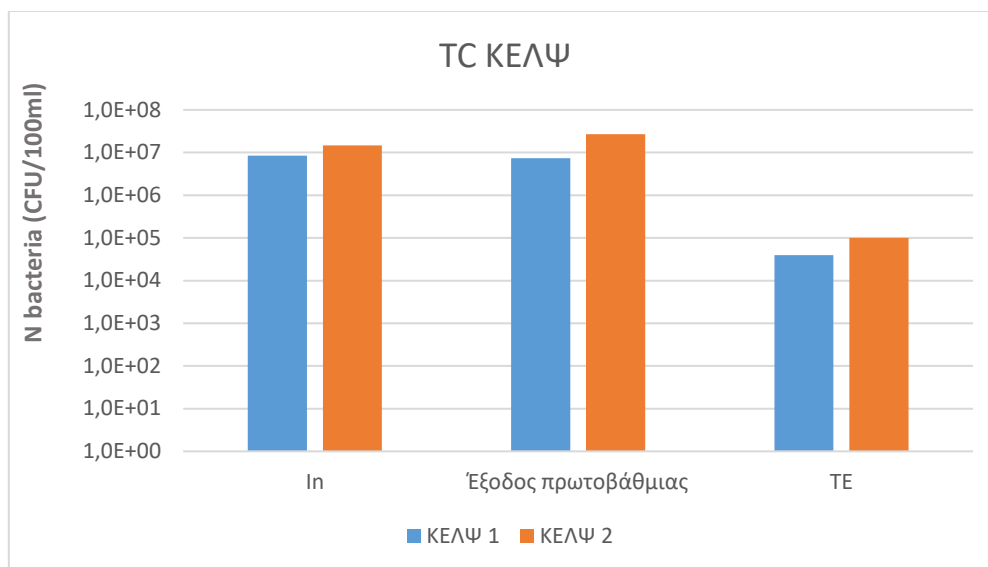
4.1. Στάδια επεξεργασίας εγκαταστάσεων

Με σκοπό την κατανόηση και την εύρεση αποτελεσμάτων όσον αφορά την απομάκρυνση ανθεκτικών βακτηρίων που πραγματοποιείται κατά τα στάδια επεξεργασίας λυμάτων των δύο εξεταζόμενων εγκαταστάσεων, πραγματοποιήθηκαν δύο δειγματοληψίες για την κάθε εγκατάσταση, σε κάθε στάδιο επεξεργασίας. Στις αναλύσεις μετρήθηκαν οι πληθυσμοί των ολικών κολοβακτηριδίων των *E.coli* και των *E.coli* που ήταν ανθεκτικά στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά. Στη συνέχεια υπολογίστηκε η λογαριθμική μείωση και το ποσοστό απομάκρυνσης των εξεταζόμενων εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων.

Ολικά κολοβακτηρίδια

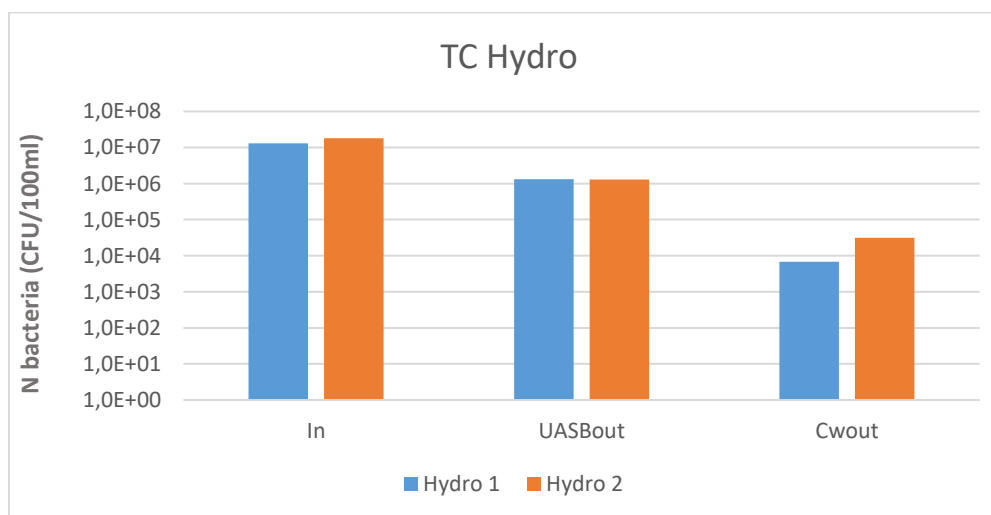
Αναλυτικότερα, σύμφωνα με τις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν, και όπως παρουσιάζεται στα ακόλουθα Γραφήματα 4.1.1. και 4.1.2. καθώς και στον Πίνακα 7.1.1. (Παράρτημα), το πλήθος των ολικών κολοβακτηριδίων στις εισόδους των δύο εγκαταστάσεων, ήταν σε παρόμοιες τιμές. Επιπλέον, παρατηρείται ότι το αναερόβιο σύστημα UASB στην εγκατάσταση της Άντισσας επιτυγχάνει απομάκρυνση, σε αντίθεση με την 1^α επεξεργασία καθίζησης της Ψυττάλειας, η οποία δεν απομακρύνει τα βακτήρια. Συγχρόνως, υφίσταται παρόμοια απομάκρυνση ανάμεσα στα στάδια μεταξύ των δύο συστημάτων όπου αφορούν την 2^α επεξεργασία της Ψυττάλειας και την επεξεργασία μέσω του υγροβιότοπου της Άντισσας. Σημειώνεται, ότι στην τελική εκροή της Ψυττάλειας, το πλήθος των ολικών κολοβακτηριδίων, μετρήθηκε σε υψηλότερη τιμή, συγκριτικά με αυτή της εκροής του υγροβιότοπου. Τέλος, παρατηρείται μεγαλύτερη απομάκρυνση στην εγκατάσταση της Άντισσας ως συνολικό σύστημα όπως παρουσιάζεται αναλυτικότερα και ακολούθως.

Στο παρακάτω Γράφημα 4.1.1., παρουσιάζεται ο πληθυσμός των ολικών κολοβακτηρίων στα στάδια της εγκατάστασης της Ψυττάλειας (CFU/100mL). Στην είσοδο της εγκατάστασης, τα ολικά κολοβακτηρίδια μετρήθηκαν, στα δύο εξεταζόμενα δείγματα με μέσο όρο $1 \times 10^7 \pm 3 \times 10^6$ CFU/100mL, στην πρωτοβάθμια επεξεργασία δεν παρουσίασαν μείωση και στην έξοδο της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας μειώθηκαν σε $7 \times 10^4 \pm 3 \times 10^4$ CFU/100mL.



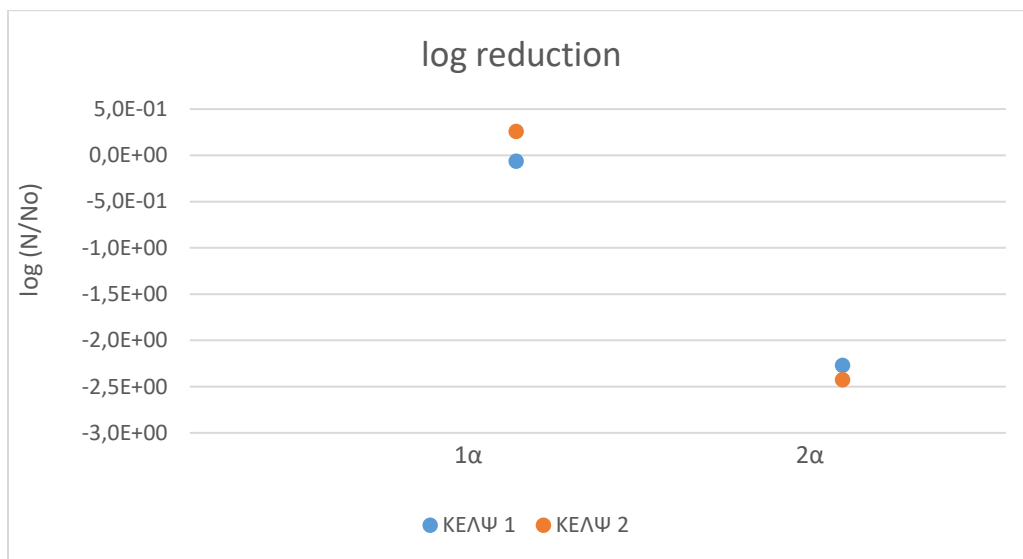
Γράφημα 4.1.1. Πληθυσμοί ολικών κολοβακτηρίων (CFU/100ml) στα στάδια της εγκατάστασης της Ψυττάλειας.

Αντίστοιχα, στο ακόλουθο Γράφημα 4.1.2. παρουσιάζονται οι πληθυσμοί των ολικών κολοβακτηρίων στα στάδια της εγκατάστασης της Άντισσας (CFU/100mL). Αναλυτικότερα, στην είσοδο της εγκατάστασης τα ολικά κολοβακτηρίδια μετρήθηκαν, με μέσο όρο των δειγμάτων $2 \times 10^7 \pm 3 \times 10^6$ CFU/100mL, ενώ στην έξοδο παρουσίασαν μείωση σε $2 \times 10^4 \pm 1 \times 10^4$ CFU/100mL.



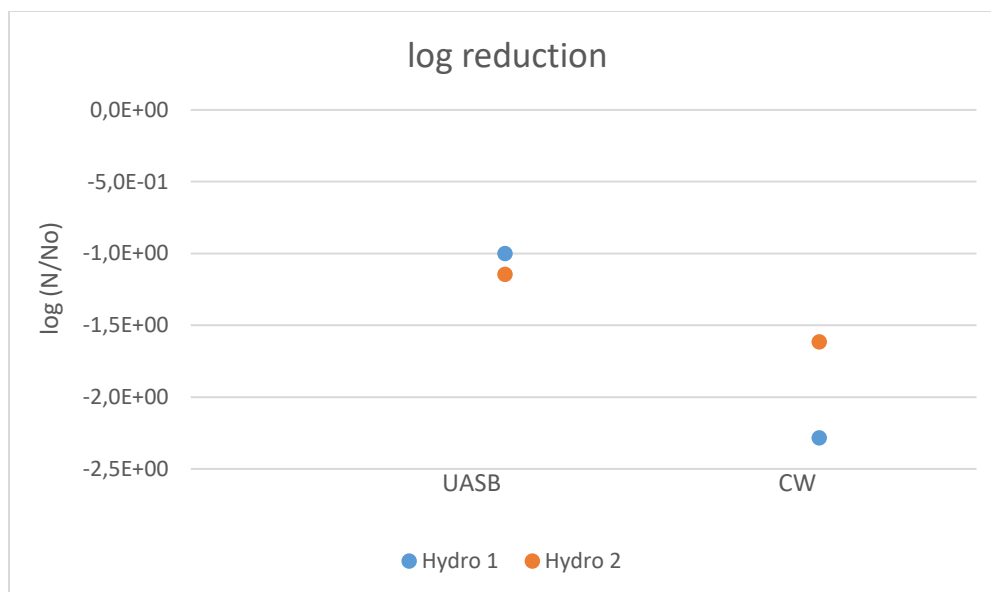
Γράφημα 4.1.2. Πληθυσμοί ολικών κολοβακτηρίων (CFU/100ml) στα στάδια της εγκατάστασης της Άντισσας.

Στα παρακάτω Γραφήματα 4.1.3. και 4.1.4., παρουσιάζεται η λογαριθμική μείωση ολικών κολοβακτηριδίων κατά τα στάδια επεξεργασίας των δύο εγκαταστάσεων καθώς και στον Πίνακα 7.1.2. (Παράρτημα) σε συνδυασμό με την ποσοστιαία απομάκρυνση των σταδίων των δύο εγκαταστάσεων. Αναλυτικότερα, η εγκατάσταση της Ψυτάλειας, απομακρύνει τα ολικά κολοβακτηρίδια, πραγματοποιώντας μείωση του πλήθους τους κατά 2,3-2,4 log κατά τη βιολογική δευτεροβάθμια επεξεργασία λυμάτων, ενώ σημειώνεται ότι κατά την πρωτοβάθμια επεξεργασία δεν παρατηρείται μείωση των ολικών κολοβακτηριδίων, όπως παρουσιάζεται και στο ακόλουθο Γράφημα 4.1.3..



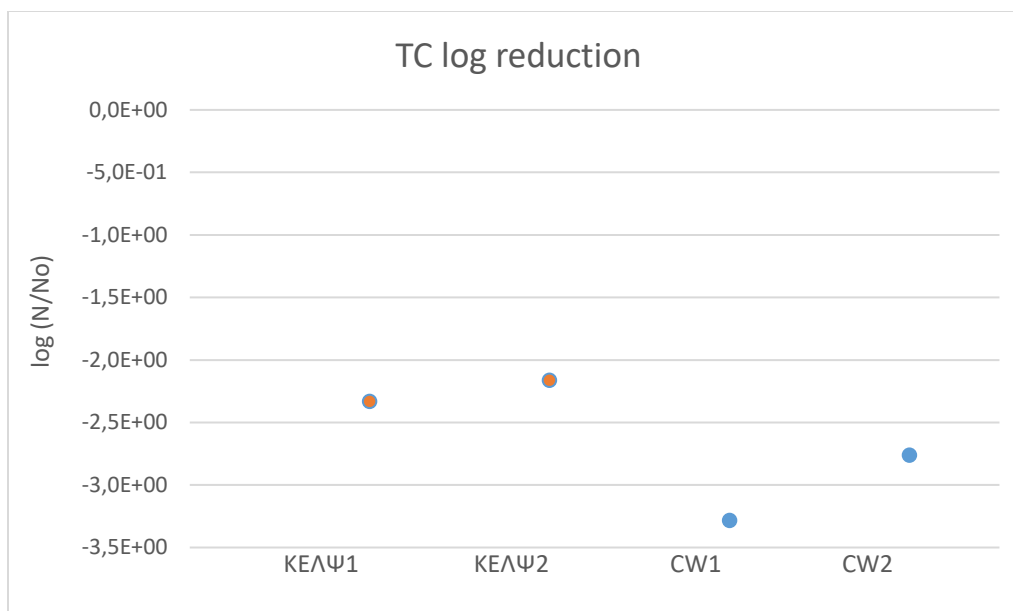
Γράφημα 4.1.3. Απομάκρυνση ολικών κολοβακτηριδίων κατά τα στάδια επεξεργασίας εγκαταστάσεων Ψυτάλειας.

Αντίστοιχα, στο ακόλουθο Γράφημα 4.1.4. παρουσιάζεται η λογαριθμική μείωση των ολικών κολοβακτηριδίων κατά τα στάδια επεξεργασίας της εγκατάστασης στην Άντισσα. Όπως παρατηρείται από τα δεδομένα των μετρήσεων, το αναερόβιο σύστημα UASB, απομακρύνει τα ολικά κολοβακτηρίδια, πραγματοποιώντας μείωση του πλήθους τους κατά 1-1,1 log και συγχρόνως ο υγροβιότοπος επιτυγχάνει μείωση κατά 1,6-2,3 log.



Γράφημα 4.1.4. Απομάκρυνση ολικών κολοβακτηριδίων κατά τα στάδια επεξεργασίας εγκαταστάσεων Άντισσας.

Από τα παραπάνω προκύπτει το ακόλουθο Γράφημα 4.1.5., όπου παρουσιάζεται η συνολική απομάκρυνση του πλήθους των ολικών κολοβακτηριδίων, σε λογαριθμική κλίμακα, που παρατηρείται στις δύο εγκαταστάσεις. Αναλυτικότερα για τα δείγματα της Ψυττάλειας, επιτυγχάνεται απομάκρυνση κατά 2,3 και 2,2 log (ΚΕΛΨ1 και ΚΕΛΨ2, αντίστοιχα) και για τα δείγματα της Άντισσας 3,3 και 2,8 log (Hydro1 και Hydro2 αντίστοιχα). Οι μέσοι όροι των λογαριθμικών απομακρύνσεων που μετρήθηκαν για τις δύο εξεταζόμενες εγκαταστάσεις (3,05 log απομάκρυνση η εγκατάσταση της Άντισσας και 2,25 log απομάκρυνση της Ψυττάλειας), παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.1.3. (Παράρτημα) σε συνδυασμό με την ποσοστιαία απομάκρυνση των εγκαταστάσεων. Αναλυτικότερα, τα δείγματα της εγκατάστασης της Ψυττάλειας, παρατηρείται 99,3% έως 99,5% συνολική απομάκρυνση των ολικών κολοβακτηριδίων μέσω της πρωτοβάθμιας και δευτεροβάθμιας επεξεργασίας. Αντίστοιχα για τα δείγματα της Άντισσας, παρατηρείται απομάκρυνση από 99,8% έως 99,9%, συνολικά από την εγκατάσταση μέσω των σταδίων της αναερόβιας επεξεργασίας και του υγροβιότοπου.



Γράφημα 4.1.5. Συνολική απομάκρυνση ολικών κολοβακτηριδίων στις εξεταζόμενες εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων (ΚΕΛΨ - Ψυτάλεια και CW - Αντίσσα).

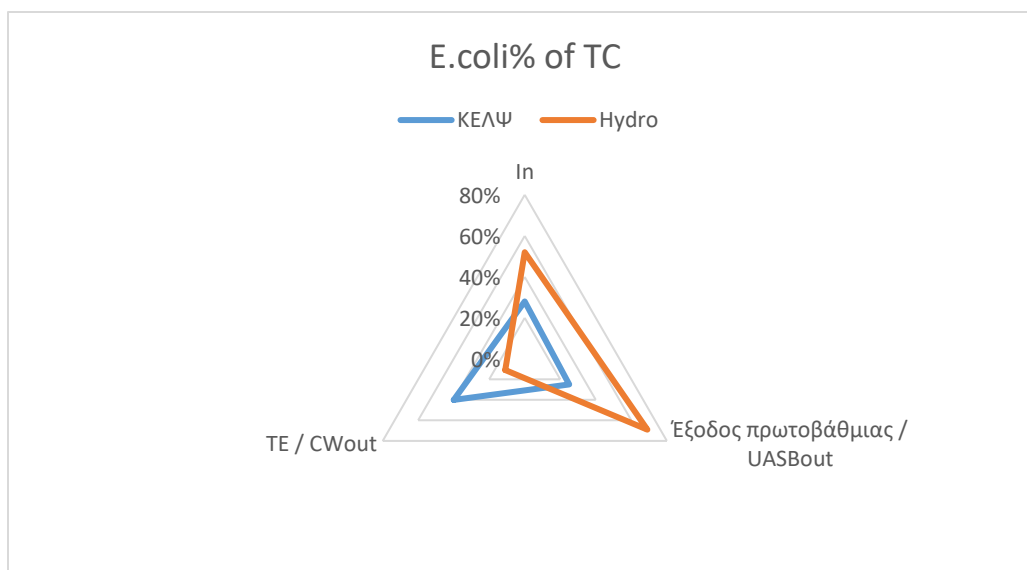
Τα αποτελέσματα αυτά, έρχονται σε συμφωνία με παγκόσμιες έρευνες, σε συστήματα ενεργού ιλύος με ποσοστά απομάκρυνσης >90% έως και 99% σε ορισμένες περιπτώσεις (Aghalari et al., 2020; Chukwu et al., 2018; Ukpong, 2013; Miranzadeh et al., 2013; Samie et al., 2009; Kazmi et al., 2008; Fars et al., 2005; Koivunen et al., 2003). Αναλυτικότερα, σε έρευνα των Kazmi et al., 2008., παρατηρήθηκε σημαντική μείωση 99.4% του πλήθους των ολικών κολοβακτηρίων κατά τη βιολογική επεξεργασία αστικών λυμάτων με ενεργό ιλύ (log 2.2). Παρόμοιες υψηλές τιμές απομάκρυνσης ολικών κολοβακτηρίων παρουσίασαν και οι Balogun et al., 2021 με 97% έως 99.98%. Επίσης, έρευνα των Miranzadeh et al., 2013, παρουσίασε την απομάκρυνση των ολικών κολοβακτηρίων με την μέθοδο της ενεργού ιλύος σε ποσοστό 92% (Miranzadeh et al., 2013). Σε συμφωνία επίσης έρχονται και οι τιμές της λογαριθμικής μείωσης που παρουσιάζεται, καθώς σε παγκόσμιες έρευνες, κυμαίνεται σε log 1.22 (Ayaz et al., 2008), log 1.54 (García et al., 2013), log 1.79 (Caselles-Osorio et al., 2011), και log 2.7 (García et al., 2008).

Όσον αφορά τους τεχνητούς υγροβιότοπους, παγκόσμιες έρευνες παρουσιάζουν ότι υψηλότερη απομάκρυνση ολικών κολοβακτηριδίων επιτυγχάνεται είτε με μεγαλύτερους χρόνους παραμονής (HRT), είτε με χρήση πολλαπλών συστημάτων τεχνητών υγροβιότοπων στη σειρά, απαιτώντας μεγαλύτερη έκταση για την εγκατάσταση (Biswas et al., 2023; Ayaz et al., 2008; Tanner et al., 1995). Έρευνα των Biswas et al., 2023, παρουσίασε την απομάκρυνση των ολικών κολοβακτηριδίων με log 2.93- 2.95, ενώ σημειώνεται ότι η εποχική διακύμανση της θερμοκρασίας επηρέασε σημαντικά την απόδοση απομάκρυνσης των ολικών κολοβακτηριδίων (Biswas et al., 2023). Σε έρευνα των Ayaz et al., 2008, ανιχνεύθηκε κατά μέσο όρο 94% αφαίρεση των ολικών

κολοβακτηριδίων (log 1,22) σε οριζόντιας ροής τεχνητό υγροβιότοπο με *Cyperus* και *Lemna*. Αντίστοιχα οι Tanner et al. (1995), σημείωσαν απομάκρυνση κολοβακτηριδίων 90–99% (με log 1.0 έως log 2.0) σε υποεπιφανειακής ροής τεχνητό υγροβιότοπο. Οι Decamp et al. (1999), ανέφεραν απομάκρυνση 99,75% (log 2,6) κολοβακτηριδίων σε υποεπιφανειακής ροής τεχνητό υγροβιότοπο με *Phragmites australis*. Τέλος, σημειώνεται ότι οι Quiñónez-Díaz et al. (2001), πέτυχαν αφαίρεση 99,99% ολικών κολοβακτηριδίων κατά την επεξεργασία ακατέργαστων οικιακών λυμάτων σε τεχνητό υγροβιότοπο οριζόντιας ροής με *Scirpus olneyi*.

E.coli

Σημειώνεται πως και στις δύο εγκαταστάσεις οι πληθυσμοί *E.coli* ήταν μικρότεροι, ως αναμενόμενο, από τους πληθυσμούς ολικών κολοβακτηριδίων. Ειδικότερα, για το σύστημα της Ψυττάλειας, στην είσοδο της εγκατάστασης το 24% - 31% των ολικών κολοβακτηριδίων, άνηκε στο είδος *E.coli*, ενώ στην έξοδο της εγκατάστασης αποτελούσε το 24% - 47% του πληθυσμού τους. Στα δείγματα της Άντισσας, οι αντίστοιχες μετρήσεις παρουσίασαν στην είσοδο της εγκατάστασης τιμές από 41% έως 60% και στην έξοδο από 9% έως 19%. Στο ακόλουθο Γράφημα 4.1.6., παρουσιάζονται οι μέσοι όροι του πλήθους *E.coli* που μετρήθηκαν (όπως παρουσιάζονται και στον Πίνακα 7.1.4., Παράρτημα).

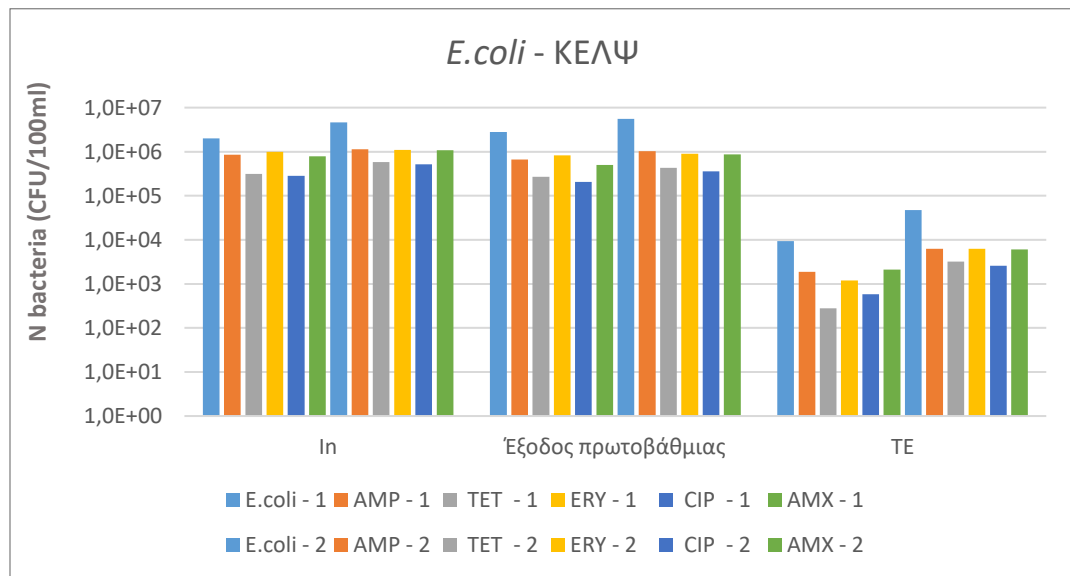


Γράφημα 4.1.6. Ποσοστό *E.coli* που περιείχαν τα ολικά κολοβακτηρίδια κατά τα στάδια επεξεργασίας των δύο εγκαταστάσεων.

Στα ακόλουθα Γραφήματα 4.1.7. και 4.1.8., καθώς και στους Πίνακες 7.1.5., 7.1.6., 7.1.7., 7.1.8., (Παράρτημα) παρουσιάζονται οι μετρήσεις του πλήθους των *E.coli* στα στάδια επεξεργασίας των δύο εξεταζόμενων εγκαταστάσεων. Στο σύνολό τους, παρατηρούνται παρόμοιες μετρήσεις των πληθυσμών *E.coli*, συγκριτικά με τις μετρήσεις των ολικών κολοβακτηριδίων, που παρουσιάστηκαν παραπάνω, στα στάδια των εγκαταστάσεων.

Αναλυτικότερα, στην είσοδο της εγκατάστασης της Ψυττάλειας τα βακτήρια *E.coli* υπολογίστηκαν, με μέσο όρο $3 \times 10^6 \pm 1 \times 10^6$ CFU /100mL, ενώ στην έξοδο παρουσίασαν μείωση σε $3 \times 10^4 \pm 2 \times 10^4$ CFU /100mL.

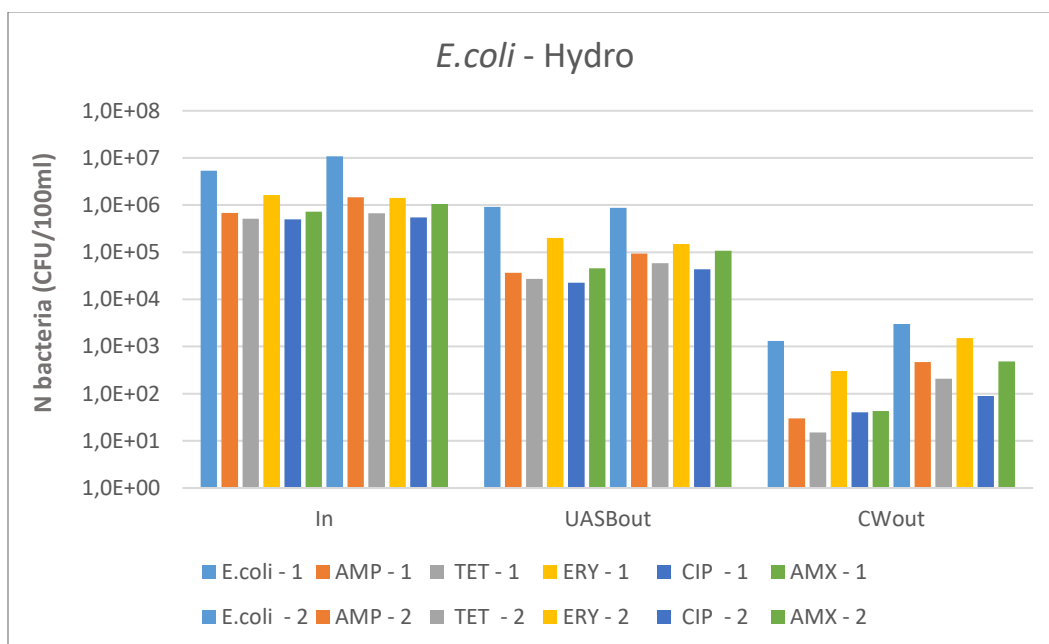
Όσον αφορά τα ανθεκτικά στα αντιβιοτικά βακτήρια, οι τιμές για την είσοδο κυμαίνονταν μεταξύ $4 \times 10^5 \pm 1 \times 10^5$ CFU /100mL (για TET και CIP) έως $1 \times 10^6 \pm 5 \times 10^4$ CFU /100mL (για ERY). Αντίστοιχα, στην έξοδο, τα ανθεκτικά στα αντιβιοτικά βακτήρια, παρουσίασαν τιμές που κυμαίνονταν μεταξύ $2 \times 10^3 \pm 1 \times 10^3$ CFU /100mL (για TET και CIP) έως $4 \times 10^3 \pm 2 \times 10^3$ CFU /100mL (για AMP, AMX και ERY). Στο ακόλουθο Γράφημα 4.1.7., παρουσιάζονται οι τιμές των πληθυσμών *E.coli* και των ανθεκτικών *E.coli* στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά, κατά τα στάδια επεξεργασίας, της εγκατάστασης στη Ψυττάλεια.



Γράφημα 4.1.7. Πληθυσμοί *E.coli* και ανθεκτικών *E.coli* στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά, κατά τα στάδια επεξεργασίας, της εγκατάστασης στη Ψυττάλεια.

Αντίστοιχα, στην είσοδο της εγκατάστασης της Άντισσας τα βακτήρια *E.coli* μετρήθηκαν, με μέσο όρο $8 \times 10^6 \pm 3 \times 10^6$ CFU /100mL, ενώ στην έξοδο παρουσίασαν μείωση σε $2 \times 10^3 \pm 8 \times$

10² CFU/100mL. Όσον αφορά τα ανθεκτικά στα αντιβιοτικά βακτήρια, οι τιμές για την είσοδο κυμαίνονταν μεταξύ $5 \times 10^5 \pm 3 \times 10^4$ CFU/100mL (για TET και CIP) έως $2 \times 10^6 \pm 1 \times 10^5$ CFU/100mL (για ERY). Αντίστοιχα, στην έξοδο, τα ανθεκτικά στα αντιβιοτικά βακτήρια, παρουσίασαν τιμές που κυμαίνονταν μεταξύ $7 \times 10^1 \pm 3 \times 10^1$ CFU/100mL (για CIP) έως $9 \times 10^2 \pm 6 \times 10^2$ CFU/100mL (για ERY). Στο ακόλουθο Γράφημα 4.1.8., παρουσιάζονται οι τιμές των πληθυσμών *E.coli* και των ανθεκτικών *E.coli* στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά, κατά τα στάδια επεξεργασίας, της εγκατάσταση στην Άντισσα.



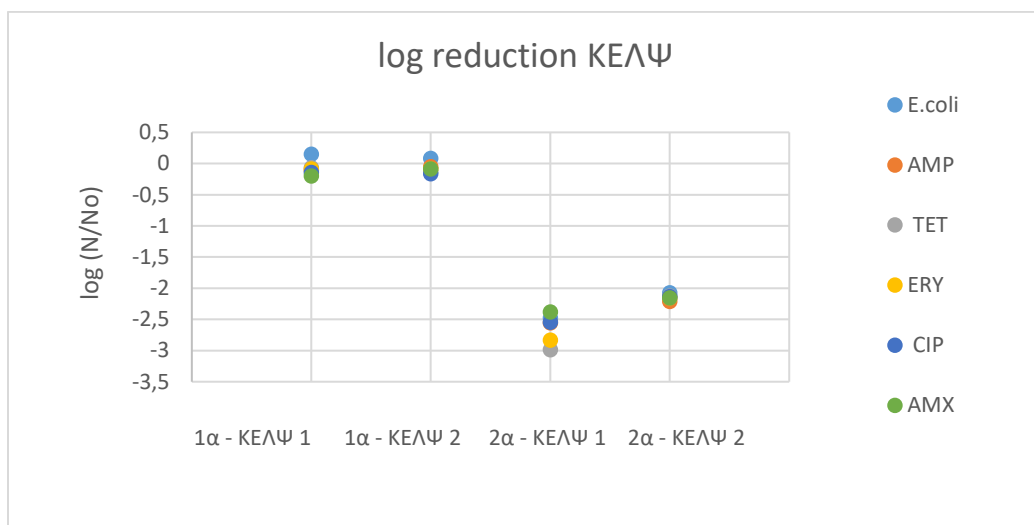
Γράφημα 4.1.8. Πληθυσμοί *E.coli* και ανθεκτικών *E.coli* στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά, κατά τα στάδια επεξεργασίας, της εγκατάσταση στην Άντισσα.

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι, πανομοιότυπες μετρήσεις παρατηρούνται μεταξύ των εισόδων των δύο εγκαταστάσεων, με ελάχιστα μεγαλύτερες τιμές να παρατηρούνται στην εγκατάσταση της Άντισσας. Επιπλέον, το αναερόβιο σύστημα UASB επιτυγχάνει μεγαλύτερη απομάκρυνση, συγκριτικά με την 1^α επεξεργασία. Παρόμοια και ελάχιστα μεγαλύτερη απομάκρυνση παρατηρείται στον υγροβιότοπο της Άντισσας, συγκριτικά με την 2^α επεξεργασία της Ψυττάλειας. Συνολικά, παρατηρείται μεγαλύτερη απομάκρυνση στο σύστημα της Άντισσας στους πληθυσμούς *E.coli*, όπως και στους πληθυσμούς ολικών κολοβακτηριδίων.

Όσον αφορά τους πληθυσμούς *E.coli* που εμφάνιζαν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά κατά τα στάδια επεξεργασίας των εγκαταστάσεων, παρουσίασαν παρόμοια αποτελέσματα με τις μετρήσεις των *E.coli* της ομάδας control. Παρατηρείται ότι οι πληθυσμοί των ανθεκτικών *E.coli* βακτηρίων

είναι εμφανώς μικρότεροι από τους πληθυσμούς *E.coli* που δεν είχαν αντιβιοτικό στο υπόστρωμά τους. Αναλυτικότερα, παρατηρείται μεγαλύτερη απομάκρυνση το UASB από την 1^α επεξεργασία, όπως και παρόμοια απομάκρυνση του υγροβιότοπου συγκριτικά με την 2^α επεξεργασία. Σημειώνεται πως στο σύνολο της εγκατάστασης, παρατηρείται μεγαλύτερη απομάκρυνση στο σύστημα της Άντισσας.

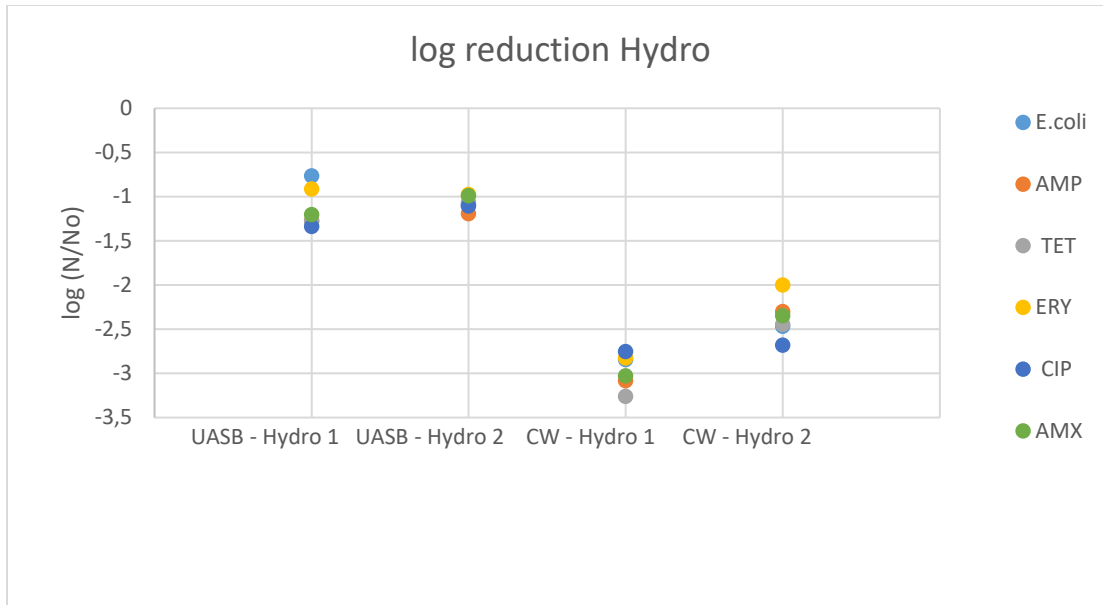
Στα ακόλουθα Γραφήματα 4.1.9. και 4.1.10. παρουσιάζεται η λογαριθμική μείωση των *E.coli* και των *E.coli* που είναι ανθεκτικά στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά, κατά τα στάδια επεξεργασίας των εγκαταστάσεων.



Γράφημα 4.1.9. Λογαριθμική μείωση πληθυσμών *E.coli* και ανθεκτικών *E.coli* στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά, κατά τα στάδια επεξεργασίας, της εγκατάστασης στη Ψυττάλειας.

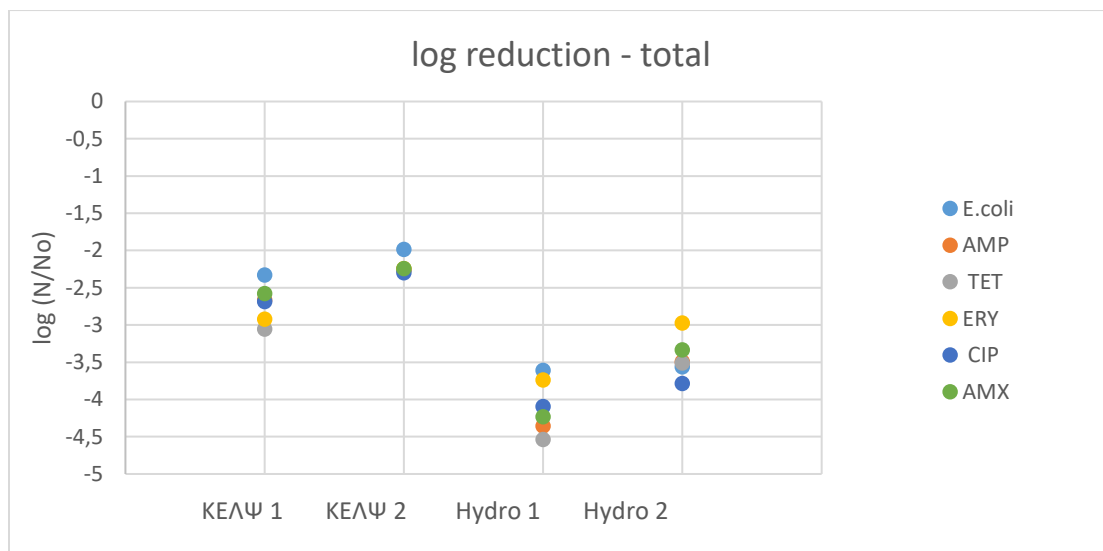
Όπως παρατηρείται από τα Γραφήματα 4.1.9. και 4.1.10., καθώς και από τον Πίνακα 7.1.9. (Παράρτημα), οι τιμές μεταξύ των *E.coli* που δεν είχαν υπόστρωμα με αντιβιοτικό αλλά και στα ανθεκτικά *E.coli* στα διαφορετικά αντιβιοτικά, δεν επηρεάζονται από τα στάδια επεξεργασίας και είναι πανομοιότυπες μεταξύ τους. Άξιο σημείωσης αποτελεί το γεγονός ότι κατά την ανάλυση μετρήθηκε για τα δείγματα ΚΕΛΨ1 και Hydro1, ότι πραγματοποιείται πλήρης απομάκρυνση των βακτηρίων που είναι ανθεκτικά στα αντιβιοτικά αμπικιλίνη και τετρακυκλίνη (100% απομάκρυνση).

Σημειώνεται ότι η απομάκρυνση που επιτυγχάνει η δευτεροβάθμια επεξεργασία της Ψυττάλειας, είναι της τάξεως 2-3 log, ενώ δεν παρατηρείται απομάκρυνση κατά την πρωτοβάθμια επεξεργασία. Όσον αφορά το σύστημα της Άντισσας, παρατηρείται απομάκρυνση 0,8-1,3 log, στο σύστημα UASB και μεγαλύτερη απομάκρυνση στον τεχνητό υγροβιότοπο με 2,3-3,3 log.



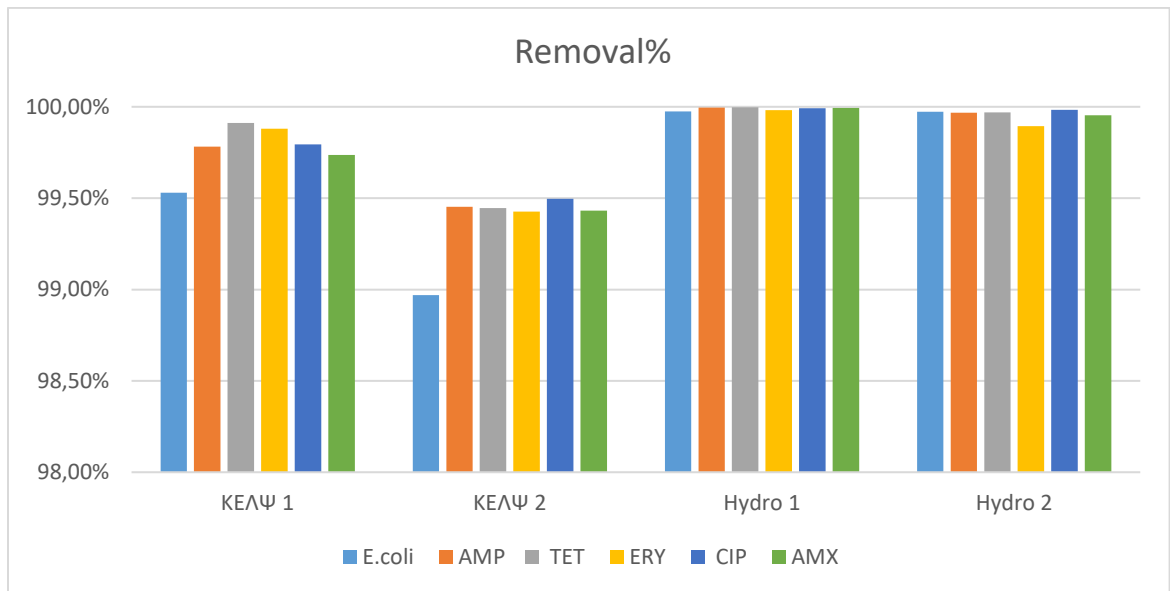
Γράφημα 4.1.10. Λογαριθμική μείωση πληθυσμών *E.coli* και ανθεκτικών *E.coli* στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά, κατά τα στάδια επεξεργασίας, της εγκατάσταση στη Άντισσας.

Στο ακόλουθο Γράφημα 4.1.11. παρουσιάζεται η λογαριθμική μείωση των *E.coli*, στα δείγματα των εξεταζόμενων εγκαταστάσεων, λαμβάνοντας υπόψη τη συνολική απομάκρυνση που πραγματοποιεί η κάθε εγκατάσταση.



Γράφημα 4.1.11. Λογαριθμική μείωση πληθυσμών *E.coli* και ανθεκτικών *E.coli* στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά, στις δύο εξεταζόμενες εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων.

Όπως είναι εμφανές και από το ακόλουθο Γράφημα 4.1.12. και από τον Πίνακα 7.1.10. (Παράρτημα) η εγκατάσταση της Ψυτάλειας απομακρύνει συνολικά 1,99 – 3,05 log, επιτυγχάνοντας απομάκρυνση 98,97 – 100 %. Αντίστοιχα στην εγκατάσταση της Αντισσας, μετρήθηκε απομάκρυνση 2,98 – 4,53 log με ποσοστιαία απομάκρυνση 99,89 – 100%.



Γράφημα 4.1.12. Ποσοστό απομάκρυνσης *E.coli* και ανθεκτικών *E.coli* στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά, στις δύο εξεταζόμενες εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων.

Οι συγκεντρώσεις στις εισόδους εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων, παρουσίασαν ομοιότητες με παγκόσμιες έρευνες, με τιμές *E. coli* $10^5 - 10^6$ CFU/100 mL (Osínska et al., 2020). Στην έρευνα των Barrios-Hernández et al., οι πληθυσμοί των *E. coli* εμφάνισαν μείωση $\log_{10} 1.7 \pm 0.7$ και τα ολικά κολοβακτηρίδια κατά $\log_{10} 1.1 \pm 0.7$ (Barrios-Hernández et al., 2020). Στα ανεπεξέργαστα λύματα, τα *E. coli* που εμφάνιζαν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό της αμπικιλίνης, παρουσίασαν τα μεγαλύτερα ποσοστά ανθεκτικότητας 18% - 20% (Osínska et al., 2020). Άλλες έρευνες από δείγματα λυμάτων στις εισόδους εγκαταστάσεων επεξεργασίας στην Ιταλία, παρουσίασαν μεγαλύτερα ποσοστά εμφάνισης *E.coli* που εμφάνισαν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό της αμπικιλίνης με ποσοστά 20–47% (Ma et al., 2022a). Οι πληθυσμοί των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων που μετρήθηκαν σε έρευνα των Osínska et al., παρουσίασαν τιμές $2.07 \times 10^4 - 8.39 \times 10^8$ CFU/100mL στα δείγματα που συλλέχθηκαν την χειμερινή περίοδο και $3.07 \times 10^4 - 3.47 \times 10^8$ CFU/100mL (συμπεριλαμβάνοντας 10^8 στα ανεπεξέργαστα λύματα έως 10^7 στα επεξεργασμένα λύματα) την φθινοπωρινή περίοδο, εμφανίζοντας μια εποχιακή διακύμανση στους πληθυσμούς (Osínska et al., 2020).

Η αποτελεσματικότητα απομάκρυνσης των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων, γονιδίων και των αντιβιοτικών σε μια συμβατική εγκατάσταση επεξεργασίας λυμάτων ποικίλλει ανάλογα με την τεχνολογία και τις συνθήκες, η οποία συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 2-3 λογαριθμικών κλιμάκων (Reinthaler et al., 2003; Pärnänen et al., 2018). Ποικίλες έρευνες παρουσιάζουν την επιτυχή απομάκρυνση των βακτηρίων, που πραγματοποιούν διάφορες φυσικές, βιολογικές και χημικές διεργασίες στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων (Reinthaler et al., 2003; Amarasiri et al., 2017; Sano et al., 2016). Έρευνα των Raboni et al., μελέτησε επτά εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων στην Ιταλία, και παρουσίασε την επιτυχή απομάκρυνση των *E.coli* κατά 91.8% ~ 96.5% μέσω ποικίλων μηχανικών και βιολογικών διεργασιών, πριν τη διαδικασία της χλωρίωσης (Raboni et al., 2016). Σε αντίθεση, αρκετές έρευνες παρουσιάζουν ότι οι εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων δεν είναι εφικτό να απομακρύνουν πλήρως τα ανθεκτικά στα αντιβιοτικά βακτήρια και γονίδια, καθώς σε πολλές εγκαταστάσεις παρατηρείται ακόμα και αύξηση του πληθυσμού των ανθεκτικών βακτηρίων και γονιδίων στις εκροές (Chu et al., 2018; Karkman et al., 2018; Rizzo et al., 2013; Jian Xu et al., 2015).

Σε παγκόσμιες έρευνες σημειώνεται η αδυναμία απομάκρυνσης των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων από την πρωτοβάθμια επεξεργασία καθίζησης με μείωση 0-1 log (Hazra et al., 2022; Pei et al., 2019; Borjesson et al., 2009). Συγκεκριμένα, σε έρευνα των Chen et al., , παρουσιάζεται ότι η έξοδος της πρωτοβάθμιας επεξεργασίας καθίζησης εμφάνισε μείωση των *E.coli* κατά 0.98 log (Chen et al., 2023). Σε συμφωνία των παραπάνω, έρευνα των Li et al., μελέτησε τη μείωση που επιτυγχάνει η πρωτοβάθμια επεξεργασία καθίζησης, μαζί με την απομάκρυνση των ολικών αιωρούμενων στερεών, απομακρύνοντας συγχρόνως την βιομάζα των βακτηρίων κατά 1 log (Li et al., 2016). Σημειώνεται ότι η πρωτοβάθμια καθίζηση είναι εφικτό να απομακρύνει ολικά αιωρούμενα στερεά κατά 60%, ενώ η απομάκρυνση που επιτυγχάνει για τα *E. Coli*, κυμαίνεται σε 30% (Raboni et al., 2016).

Σε έρευνες σημειώνεται ότι η δευτεροβάθμια επεξεργασία, παρουσιάζει μεγαλύτερη απομάκρυνση από την πρωτοβάθμια επεξεργασία, όσον αφορά τα *E.coli* με 2.62 log και τα ολικά κολοβακτηρίδια με 3.21 log (Hazra και Durso 2022; P.; Du et al., 2015; RodriguezMozaz et al., 2015; Gao et al., 2012; Munir et al., 2011). Σε συμφωνία με παγκόσμιες μελέτες έρχονται τα αποτελέσματα των απομακρύνσεων των συστημάτων καθώς, έρευνα των Christgen et al., 2015, παρουσίασε 83% απομάκρυνση ανθεκτικών στα αντιβιοτικά γονιδίων από αερόβιους βιοαντιδραστήρες σε σύγκριση με 62% απομάκρυνση αναερόβιων βιοαντιδραστήρων. Οι παραπάνω απομακρύνσεις είναι εφικτό να οφείλονται στη διαφορά θερμοκρασίας μεταξύ των δυο διεργασιών (Uluseker et al., 2021; Pei et al., 2007). Οι πληθυσμοί των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων, στην έξοδο εγκατάστασης δευτεροβάθμιας επεξεργασίας λυμάτων, εμφάνισαν τιμές $1.05 \times 10^3 - 3.09 \times 10^5$ CFU/100mL, σύμφωνα με τους Gao et al., 2012. Αντίστοιχα, οι πληθυσμοί που παρουσίασαν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά της αμπικιλίνης και της τετρακυκλίνης, σε δευτεροβάθμια επεξεργασμένα λύματα παρουσίασαν τιμές $1.2 \times 10^6 - 1.5 \times 10^7$, $840 - 6.1 \times 10^5$, CFU/100mL, αντίστοιχα, με την τετρακυκλίνη να εμφανίζει σε όλα τα δείγματα τις χαμηλότερες τιμές (Huang et al., 2012). Έρευνα των Ben et al., παρουσίασε τις τιμές

των πληθυσμών ανθεκτικών βακτηρίων να κυμαίνονται από 1.1×10^3 έως 8.9×10^5 CFU /100mL. (Ben et al., 2017).

Ποικίλες συμβατικές μέθοδοι επεξεργασίας όπου εξετάστηκαν σε παγκόσμιες έρευνες παρουσίασαν απομάκρυνση των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων κατά $2.37-4.56 \log_{10}$ ($p < .05$) (Munir, Wong and Xagorarakí, 2011; O’Flaherty and Cummins, 2017). Τα αποτελέσματα αυτά, παρουσιάζουν την δυνατότητα των βιολογικών συστημάτων με καθίζηση να απομακρύνουν ανθεκτικά βακτήρια τουλάχιστον κατά 1 log (Li et al., 2016). Επιπλέον, η έρευνα των Li et al., επισημαίνει την ικανότητα της βιολογικής διεργασίας να απομακρύνει επιτυχώς αντιβιοτικά και ανθεκτικά στα αντιβιοτικά γονίδια, ενώ η δευτεροβάθμια καθίζηση απομακρύνει τα ανθεκτικά στα αντιβιοτικά βακτήρια, καθώς σε δείγματα από τους βιολογικούς αντιδραστήρες, οι πληθυσμοί εμφανίζουν υψηλές τιμές (Li et al., 2016). Στο σύνολό της, η δευτεροβάθμια βιολογική επεξεργασία με καθίζηση είναι εφικτό να απομακρύνει 91.8–96.5%, ανάλογα με τις διεργασίες που πραγματοποιούνται (Raboni et al., 2016).

Έρευνα των Li et al., παρουσίασε ότι στην αναερόβια διεργασία της εξεταζόμενης εγκατάστασης επεξεργασίας λυμάτων, ο πληθυσμός των ανθεκτικών βακτηρίων παρουσίασε μεγαλύτερη μείωση (1 log), συγκριτικά με την αερόβια (Li et al., 2016). Σε παγκόσμιες έρευνες παρουσιάζεται ότι ο πληθυσμός των ανθεκτικών βακτηρίων εμφανίζει στατιστικά μικρότερες τιμές σε δείγματα εκροών αναερόβιων επεξεργασιών, συγκριτικά με εκροές αερόβιων συστημάτων καθώς στα αερόβια συστήματα πραγματοποιούνται περισσότερες βιολογικές διεργασίες (Wang et al., 2021; Burch et al., 2013).

Ακόμα έρευνες παρουσιάζουν την αποτελεσματικότητα απομάκρυνσης των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά γονιδίων μέσω τεχνητών υγροβιότοπων καθώς παρουσιάζεται να είναι υψηλότερη από εκείνη των συμβατικών εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων (Xu et al., 2015). Για παράδειγμα, σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε τεχνητούς υγροβιότοπους με διαχείριση νοσοκομειακών λυμάτων, τα βακτήρια που παρουσίασαν ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη, την ερυθρομυκίνη και την αμπικιλλίνη απομακρύνθηκαν κατά 80.8-93.2% (Dires et al., 2018). Όπως παρουσιάζουν παγκόσμιες έρευνες, οι τεχνητοί υγροβιότοποι παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα αποτελεσματικότητας στην μείωση των ανθεκτικών βακτηρίων στα αντιβιοτικά (59% έως περίπου 99%) (Chen et al., 2016). Η αποτελεσματικότητα της απομάκρυνσης ακόμα και των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά γονιδίων κυμαίνεται από 88% έως 99% (Chen et al., 2019). Επίσης, η επιτυχής απομάκρυνση των αντιβιοτικών από τους τεχνητούς υγροβιότοπους, οφείλεται κυρίως στη μικροβιακή αποικοδόμηση και οι κύριοι μηχανισμοί για την εξάλειψη των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά γονιδίων θα μπορούσαν να περιλαμβάνουν την ρόφηση των υποστρωμάτων και τις βιολογικές διεργασίες (Chen et al., 2019).

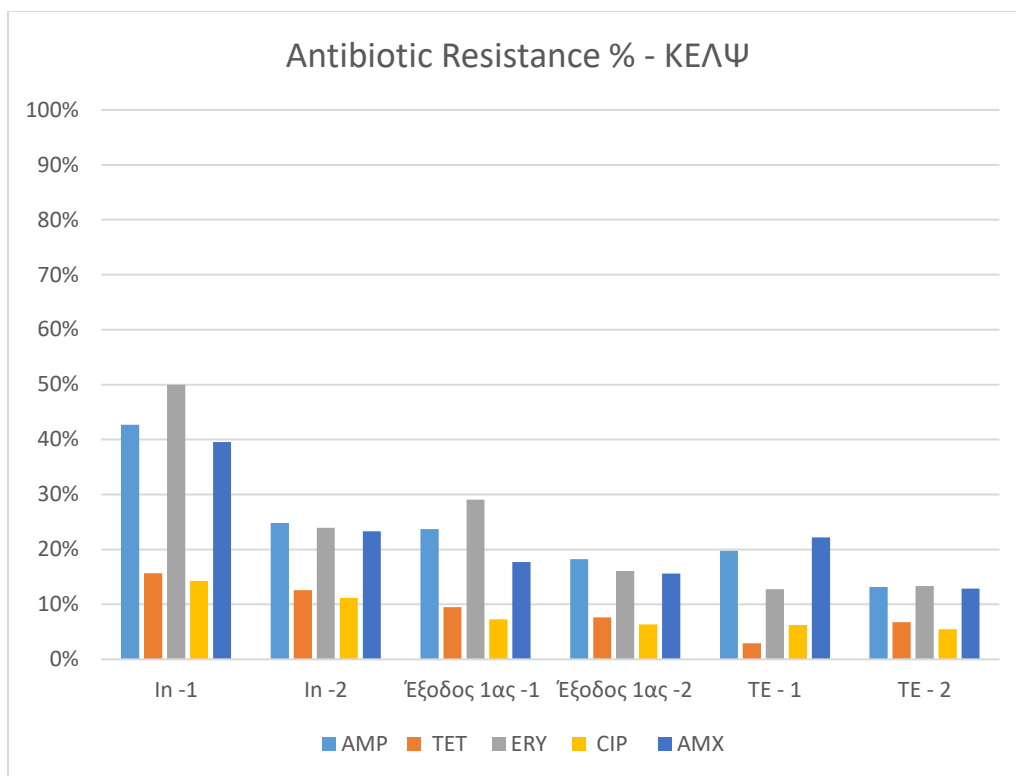
Σημειώνεται ότι ο ρυθμός υδραυλικής φόρτισης (HLR) και ο υδραυλικός χρόνος παραμονής (HRT) χαρακτηρίζονται ως βασικές παράμετροι στην αποτελεσματικότητα απομάκρυνσης των τεχνητών υγροβιότοπων για ανθεκτικά βακτήρια και γονίδια (Anderson et al., 2013, Maal-Bared et al., 2013, Miller et al., 2014). Η μεγαλύτερη διάρκεια HRT, είναι εφικτό να

οδηγήσει σε συσσώρευση ανθεκτικών γονιδίων, τα οποία τελικά και να απορριφθούν στο περιβάλλον (García et al., 2020). Στη μελέτη των Fang et al., οι αφθονίες των ανθεκτικών γονιδίων σε τεχνητούς υγροβιότοπους παρουσίασαν υψηλότερες τιμές κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού, συγκριτικά με τις τιμές του χειμώνα, κυρίως λόγω των θερμότερων θερμοκρασιών που προάγουν την επιβίωση των βακτηριακών κοινοτήτων (Fang et al., 2017). Αντίστοιχα με μεγαλύτερες τιμές HLR, στους τεχνητούς υγροβιότοπους, κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού είναι εφικτό να ενισχυθεί η διάχυση και η ανταλλαγή ανθεκτικών γονιδίων μεταξύ του εδάφους και του νερού, λόγω υψηλότερης μηχανικής δυναμικής της υδατικής φάσης (García et al., 2020).

Όσον αφορά την τριτοβάθμια επεξεργασία, έρευνα των Hazra και Durso, 2022 παρουσιάζει απομάκρυνση με μείωση κατά 2-3 log (Hazra και Durso 2022). Σε συμφωνία, έρευνα των Gao et al., παρουσίασε σημαντική συσχέτιση στους πληθυσμούς των ανθεκτικών βακτηρίων και γονιδίων κατά την μείωση 2-3 logs, $p < 0.05$, σε ανεπεξέργαστα και επεξεργασμένα λύματα (Gao et al., 2012). Τέλος, έρευνα των Chiemchaisri et al., παρουσιάζει την υψηλή απομάκρυνση των *E. Coli* και των ολικών κολοβακτηρίων κατά 6 – 7 log CFU/100 ml) σε αστικά λύματα (Chiemchaisri et al., 2023).

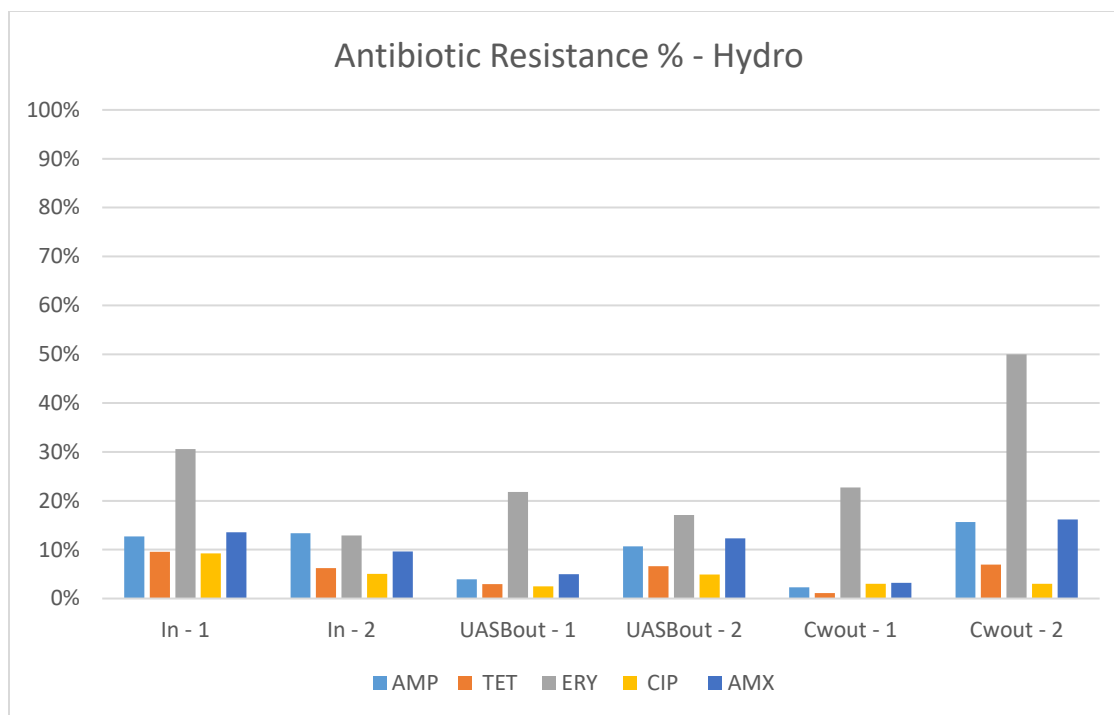
Δράση αντιβιοτικών

Με σκοπό την κατανόηση και την εύρεση του ποσοστού δράσης των εξεταζόμενων αντιβιοτικών κατά τα στάδια των εγκαταστάσεων, προκύπτει το ακόλουθο Γράφημα 4.1.13. καθώς και από τον Πίνακα 7.1.11. (Παράρτημα), για την εγκατάσταση της Ψυττάλειας. Όπως παρατηρείται, οι πληθυσμοί των εισόδων των εγκαταστάσεων κατά σειρά από τη μεγαλύτερη εμφάνιση ανθεκτικότητας, προς τη μικρότερη είναι για το πρώτο εξεταζόμενο δείγμα 1) Ery (Ποσοστό ανθεκτικότητας 50%), 2) Amp, 3) Amx, 4) Tet, 5) Cip (14,3%) και για το δεύτερο εξεταζόμενο δείγμα 1) Amp (25%), 2) Ery, 3) Amx, 4) Tet. 5) Cip (11%). Αντίστοιχα στην έξοδο της εγκατάστασης της Ψυττάλειας, στους πληθυσμούς που μετρήθηκαν, παρατηρείται κατά σειρά ανθεκτικότητας για το πρώτο δείγμα 1) Amx (22%), 2) Amp, 3) Ery, 4) Cip, 5) Tet (3%) και για το δεύτερο δείγμα 1) Ery (13%) (, 2) Amp, 3) Amx, 4) Tet. 5) Cip (3%).



Γράφημα 4.1.13. Ποσοστό ανθεκτικότητας *E.coli* στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά κατά τα στάδια της εγκατάστασης επεξεργασίας λυμάτων Ψοττάλειας.

Αντίστοιχα, όσον αφορά τα δείγματα από την εγκατάσταση της Άντισσας, από το ακόλουθο Γράφημα 4.1.14., καθώς και από τον Πίνακα 7.1.12 (Παράρτημα), στην είσοδο της εγκατάστασης μετρήθηκαν κατά σειρά ανθεκτικότητας για το πρώτο δείγμα 1) Ery (13%), 2) Amx, 3) Amp, 4) Tet, 5) Cip (3%) και για το δεύτερο δείγμα 1) Amp (13%), 2) Ery, 3) Amx, 4) Tet, 5) Cip (5%). Στην έξοδο της εγκατάστασης της Άντισσας μετρήθηκαν αντίστοιχα οι τιμές για το πρώτο δείγμα 1) Ery (23%), 2) Amx, 3) Cip, 4) Amp, 5) Tet (1%) και για το δεύτερο δείγμα 1) Ery (49%), 2) Amx, 3) Amp, 4) Tet, 5) Cip (3%).



Γράφημα 4.1.14. Ποσοστό ανθεκτικότητας *E.coli* στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά κατά τα στάδια της εγκατάστασης επεξεργασίας λυμάτων Άντισσας.

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι τα αντιβιοτικά με τη μεγαλύτερη εμφάνιση ανθεκτικότητας είναι η ερυθρομυκίνη, η αμπικιλίνη και η αμοξυκιλλίνη. Αντίθετα, τα αντιβιοτικά με τα μικρότερα ποσοστά ανθεκτικότητας είναι η τετρακυκλίνη και η σιπροφλοξασίνη. Σημειώνεται ότι τα αντιβιοτικά αμπικιλίνη και αμοξυκιλλίνη, ανήκουν στην ίδια κατηγορία αντιβιοτικών, αυτή των β-λακταμών, και παρουσιάζουν παρόμοιο προφίλ τιμών.

Στα δείγματα της Ψυττάλειας κατά τα στάδια επεξεργασίας τα ποσοστά ανθεκτικότητας μειώνονταν. Στα δείγματα της Άντισσας όμως, μόνο το ένα δείγμα ακολούθησε αυτή τη μείωση, καθώς άξιο σημείωσης αποτελεί το γεγονός ότι στο δεύτερο δείγμα, τα βακτήρια παρουσίασαν αύξηση του ποσοστού ανθεκτικότητας με χαρακτηριστικό παράδειγμα την ερυθρομυκίνη (από 13% στο 49%) και την αμοξυκιλλίνη (από 10% στο 16%), ενώ παρατηρούνται παρόμοιες τιμές για την τετρακυκλίνη, την αμπικιλίνη και τη σιπροφλοξασίνη. Τέλος, σημειώνεται ότι κατά την δεύτερη δειγματοληψία ο αριθμός των *E.coli* και των ανθεκτικών *E.coli* είναι μεγαλύτερος. Η διαφορά αυτή, πιθανόν να οφείλεται στην υψηλότερη θερμοκρασία κατά την χρονική περίοδο της δεύτερης δειγματοληψίας. Έρευνα των Osińska et al., 2020 παρουσιάζει την συσχέτιση μεταξύ θερμοκρασίας των λυμάτων σε σχέση με τους πληθυσμούς των εξεταζόμενων βακτηρίων *E. coli* και των *E. coli* που παρουσίασαν ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά των β-λακταμών (Osińska et al., 2020).

Έρευνες, παρουσιάζουν ότι στις εκροές των εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων με ενεργό ιλύ, εμφανίζονται υψηλά ποσοστά ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό της αμπικιλίνης από 4.7% - 17.5% (Bondarczuk and Piotrowska-Seget, 2019) έως και 42.34% (Fars et al., 2005). Επιπλέον η έρευνα των Fars et al., 2005, παρουσίασε υψηλά ποσοστά ανθεκτικότητας και στο αντιβιοτικό της αμοξυκιλλίνης έως 42.34%. Το ποσοστό εμφάνισης *E.coli* με ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη, σε δείγματα εκροών δευτεροβάθμιας βιολογικής επεξεργασίας, παρουσίασε τιμές έως και 47%, ενώ τα ανθεκτικά βακτήρια στην τετρακυκλίνη εμφάνισαν την μικρότερη παρουσία σε όλα τα δείγματα που εξετάστηκαν στην έρευνα των Huang et al. (2012). Αντίστοιχα, έρευνα των Pignato et al. (2009) σε εκροές εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων στην Ιταλία, ανίχνευσαν ανθεκτικά βακτήρια στην αμπικιλίνη σε ποσοστά 16–20% *E. coli*. Τέλος, ακόμα μια έρευνα παρουσίασε το υψηλό ποσοστό ανθεκτικότητας στην ομάδα αντιβιοτικών β-λακταμών, έως και 88% (Osińska et al., 2020). Τα παραπάνω, έρχονται σε συμφωνία και με έρευνες στην Κίνα, που παρουσίασαν ότι η κατηγορία αντιβιοτικών των β- λακταμών χρησιμοποιείται ευρέως σε ποσοστά > 45% των περιπτώσεων λοίμωξης των ανθρώπων, θέτοντας τα ως τα πιο διαδεδομένα αντιβιοτικά, με ισχυρή παρουσία στα λύματα (Li et al., 2008).

Σημειώνεται ότι σε έρευνες, δειγμάτων εκροών αστικών λυμάτων δευτεροβάθμιας βιολογικής επεξεργασίας, τα ποσοστά εμφάνισης ανθεκτικών βακτηρίων στο αντιβιοτικό της τετρακυκλίνης παρουσιάζουν τιμές >2.6% (Huang et al., 2012). Αντίστοιχα, έρευνα των Osińska et al., παρουσίασε την εμφάνιση ανθεκτικών βακτηρίων στο αντιβιοτικό της τετρακυκλίνης, να αποτελεί το 22% των συνολικών βακτηρίων στα δείγματα (Osińska et al., 2020). Τέλος, έρευνα των Pignato et al. (2009) σε δείγματα εκροών από εγκατάσταση επεξεργασίας στην Ιταλία, παρουσίασε ότι τα ανθεκτικά στην τετρακυκλίνη βακτήρια εμφάνισαν τιμές 13–17% (Pignato et al., 2009). Επιπλέον, έρευνα σε δύο εγκαταστάσεις επεξεργασία λυμάτων στη Νορβηγία, από τους Schwermer et al., παρουσίασε την επιτυχή απομάκρυνση των πληθυσμών *E.coli*, Συγχρόνως παρατηρήθηκε, ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό της αμπικιλίνης για τους πληθυσμούς *E.coli*. σε ποσοστά 6-27%, καθώς και της τετρακυκλίνης με ανθεκτικότητα 3-14% αλλά και της σιπροφλοξασίνης με 0-7%. Η έρευνα, παρουσίασε την δυνατότητα των φυσικών και χημικών διεργασιών να απομακρύνουν επιτυχώς τους πληθυσμούς των βακτηρίων, και σε εργαστηριακή κλίμακα εξετάστηκαν οι δυνατότητες φίλτρων μεμβάνης να απομακρύνουν ακόμα και 100% των βακτηρίων (Schwermer et al., 2018).

Πρόσφατες μελέτες σε τεχνητούς υγροβιότοπους παρουσίασαν την ικανοποιητική απομάκρυνση που επιτυγχάνουν για τα αντιβιοτικά και τα ανθεκτικά στα αντιβιοτικά βακτήρια και γονίδια σε ποσοστά (Liu et al., 2019). Οι Chen et al., παρουσίασαν την απομάκρυνση ανθεκτικών γονιδίων σε αντιβιοτικά τετρακυκλίνης, σουλφοναμιδίων και κινολόνης, σε ποσοστά 87.8% to 99.1% (Chen et al., 2019). Έρευνα των Dires et al., σημείωσε τιμές για τα *E.coli* που ανιχνευθήκαν να εμφανίζουν ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη κατά 81.8% και ανθεκτικά στην αμοξυκιλλίνη κατά 72.7%. Υψηλότερη απομάκρυνση σημειώθηκε στις εγκαταστάσεις τεχνητών υγροβιότοπων με ποσοστά 81% - 94% (Dires et al., 2018). Παγκόσμιες έρευνες παρουσιάζουν την μεγαλύτερη απομάκρυνση των ανθεκτικών βακτηρίων, που επιτυγχάνουν οι τεχνητοί

υγροβιότοποι, συγκριτικά με τα συμβατικά συστήματα επεξεργασίας (Garcia et al., 2008, Karathanasis et al., 2003, Molleda et al., 2008) Συγκεκριμένα, έρευνα των Sidrach-Cardona et al., παρουσίασε απομάκρυνση των ανθεκτικών βακτηρίων σε τεχνητούς υγροβιότοπους κατά 90 - 99% (Sidrach-Cardona et al., 2013).

4.2. Πείραμα βαθμού εξουδετέρωσης ανθεκτικών βακτηρίων με χλωρίωση

4.2.1. Μετρήσεις γενικών παραμέτρων δειγμάτων

Οι γενικές παράμετροι που εξετάστηκαν ήταν το οργανικό υλικό των δειγμάτων ως Χημικά απαιτούμενο οξυγόνο – COD (mg/l), τα ολικά αιωρούμενα στερεά – TSS (mg/l), ο σίδηρος υπο τη μορφή δισθενούς σιδήρου Fe^{2+} (mg/l), το άζωτο σε μορφή αμμωνιακού αζώτου NH_4^+-N (mg/l), η θολότητα (NTU), η θερμοκρασία - T ($^{\circ}C$), το pH πριν και μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης και το διαλυμένο οξυγόνο – DO (mg/l) πριν και μετά τη χλωρίωση.

Στον ακόλουθο Πίνακα 4.2.1.1. παρουσιάζονται ο μέσος όρος, το εύρος, η μέγιστη τιμή, η ελάχιστη τιμή η τυπική απόκλιση και η διακύμανση τιμών που προέκυψαν από τις μετρήσεις των γενικών παραμέτρων των δειγμάτων που προέρχονταν από την εγκατάσταση της Ψυττάλειας.

Πίνακας 4.2.1.1. Γενικές παράμετροι στα εξεταζόμενα δείγματα της εγκατάστασης Ψυττάλειας.

ΚΕΛΨ	Average	Min	Max
COD (mg/L)	32,07	30,90	32,90
TSS (mg/L)	4,68	2,30	7,45
Fe^{2+} (mg/L)	0,10	0,08	0,12
NH_4^+-N (mg/L)	1,01	0,54	1,65
Θολότητα (NTU)	3,52	1,82	5,57
T $^{\circ}C$	18,23	17,70	18,80
pH (πριν την χλωρίωση)	7,68	7,30	7,95
pH (μετά την χλωρίωση)	7,20	7,00	7,30
DO (πριν την χλωρίωση) (mg/L)	9,10	9,01	9,19
DO (μετά την χλωρίωση) (mg/L)	8,25	7,30	9,19

Αντίστοιχα, στον ακόλουθο Πίνακα 4.2.1.2. παρουσιάζονται ο μέσος όρος, το εύρος, η μέγιστη τιμή, η ελάχιστη τιμή η τυπική απόκλιση και η διακύμανση τιμών που προέκυψαν από τις μετρήσεις των γενικών παραμέτρων των δειγμάτων που προέρχονταν από την εγκατάσταση της Άντισσας.

Πίνακας 4.2.1.2. Γενικές παράμετροι στα εξεταζόμενα δείγματα της εγκατάστασης Άντισσας.

CW	Average	Min	Max
COD (mg/L)	28,98	26,85	31,10
TSS (mg/L)	2,80	2,20	3,40
Fe²⁺ (mg/L)	0,11	0,11	0,11
NH₄⁺-N (mg/L)	0,20	0,17	0,23
Θολότητα (NTU)	3,49	3,27	3,70
T ° C	17,95	17,70	18,20
pH (πριν την χλωρίωση)	6,67	6,42	6,92
pH (μετά την χλωρίωση)	6,65	6,42	6,89
DO (πριν την χλωρίωση) (mg/L)	9,16	9,15	9,17
DO (μετά την χλωρίωση) (mg/L)	9,28	9,17	9,38

Για τις παραμέτρους COD (mg/l), TSS (mg/l), Fe²⁺ (mg/l), NH₄⁺-N (mg/l), θολότητα (NTU), T (°C), pH (πριν και μετά τη χλωρίωση), DO (mg/l) (πριν και μετά τη χλωρίωση), οι μετρούμενες τιμές δεν εμφάνισαν ιδιαίτερες αυξομειώσεις. Επιπλέον, σημειώνεται ότι οι μετρήσεις των ουσιών που επηρεάζουν την ανάπτυξη οργανισμών (οργανικό φορτίο, διαλυμένο οξυγόνο, pH), καθώς και οι παράμετροι που επηρεάζουν την κατανάλωση χλωρίου, δεν παρουσίασαν ακραίες τιμές.

Η μέτρηση του οργανικού φορτίου, πραγματοποιήθηκε με την ανάλυση του COD (mg/l) των δειγμάτων που εξετάστηκαν. Παρατηρείται ότι τα δείγματα της εγκατάστασης της Ψυττάλειας παρουσιάζουν μεγαλύτερο μέσο όρο 32,4 mg/l, συγκριτικά με της Άντισσας 29 mg/l. Τα ολικά αιωρούμενα στερεά TSS (mg/l), που μετρήθηκαν ανάμεσα στις δύο εγκαταστάσεις παρουσίασαν παρόμοιες τιμές με μεγαλύτερο μέσο όρο 3,94 mg/l στα δείγματα της Ψυττάλειας και 2,8 mg/l στα δείγματα της Άντισσας). Οι τιμές του δισθενές σιδήρου Fe²⁺ (mg/L) ανάμεσα στις δύο εγκαταστάσεις παρουσίασαν παρόμοιες τιμές (μέσο όρο 0,09 mg/l στα δείγματα της Ψυττάλειας και 0,11 mg/l στα δείγματα της Άντισσας). Οι τιμές του αμμωνιακού αζώτου NH₄⁺-N (mg/l) ανάμεσα στις δύο εγκαταστάσεις παρουσίασαν μεγαλύτερο μέσο όρο στα δείγματα της Ψυττάλειας (0,74 mg/l στα δείγματα της Ψυττάλειας και 0.2 mg/l στα δείγματα της Άντισσας). Όσον αφορά τις μετρήσεις της θολότητας (NTU) των δειγμάτων ανάμεσα στις δύο εγκαταστάσεις, παρατηρείται μεγαλύτερο εύρος τιμών στα δείγματα από την εγκατάσταση της Ψυττάλειας και μεγαλύτερος μέσος όρος στα δείγματα της Άντισσας (2,7 NTU στα δείγματα της Ψυττάλειας και

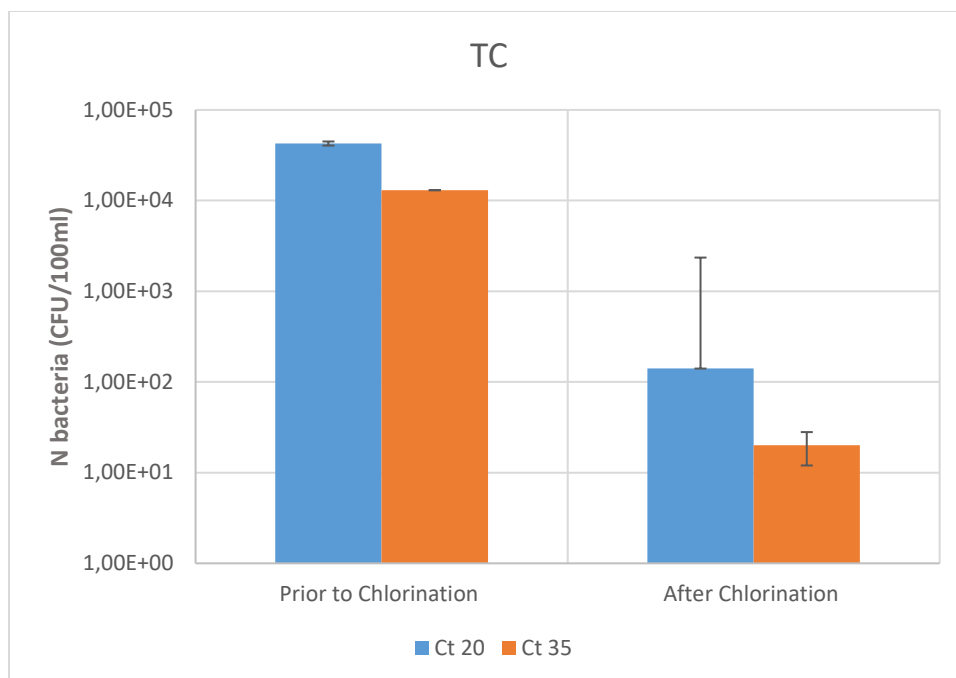
3,5 NTU στα δείγματα της Άντισσας). Οι τιμές θερμοκρασίας T (° C) ανάμεσα στα δείγματα από τις δύο εγκαταστάσεις, κυμαίνονταν στους 18-19 ° C. Παρόμοιες τιμές pH ανάμεσα στις δύο εγκαταστάσεις. Ελαφρώς μεγαλύτερος μέσος όρος τιμών παρατηρείται στα δείγματα από την εγκατάσταση της Ψυττάλειας (6,7 Ψυττάλεια και 7,4 Άντισσας). Πανομοιότυπες τιμές διαλυμένου οξυγόνου DO (mg/l) ανάμεσα στις δύο εγκαταστάσεις (μέσος όρος Ψυττάλεια 8,7 mg/l και Άντισσα 9,2 mg/l).

Άξιο σημείωσης αποτελεί το γεγονός ότι τα δείγματα από την εγκατάσταση επεξεργασίας της Ψυττάλειας, παρουσιάζουν τιμές COD (mg/l), TSS (mg/l), και θολότητας (NTU) που ικανοποιούν τις οριακές τιμές τριτοβάθμιων επεξεργασμένων λυμάτων. Εξίσου, χαρακτηρισμό τριτοβάθμιας επεξεργασίας λαμβάνουν και τα δείγματα από την εγκατάσταση της Άντισσας. Οι παραπάνω χαρακτηρισμοί βαθμών επεξεργασίας λυμάτων, προκύπτουν από την ισχύουσα νομοθεσία.

4.2.2. Προπείραμα

Με σκοπό την κατανόηση της δράσης της χλωρίωσης στα εξεταζόμενα δείγματα, πραγματοποιήθηκαν δύο προπείραμα, με λύματα από την εγκατάσταση της Ψυττάλειας. Στο πρώτο προπείραμα, ο χρόνος επαφής ήταν 30 min και πραγματοποιήθηκε προσθήκη αρχικής δόσης χλωρίου 9 mg/L, με υπολειμματικό χλώριο 1,2 mg/L, όπως παρουσιάζεται και στον Πίνακα 7.2.1.1. (Παράρτημα). Το δεύτερο προπείραμα, πραγματοποιήθηκε με μικρότερη αρχική δόση χλωρίου στα 3 mg/L, καθώς το υπολειμματικό χλώριο μετρήθηκε σε παρόμοιες τιμές (1,3 mg/L), και ο χρόνος επαφής ορίστηκε σε 15 min με σκοπό την επίτευξη Ct 20 mg Cl₂ min/L.

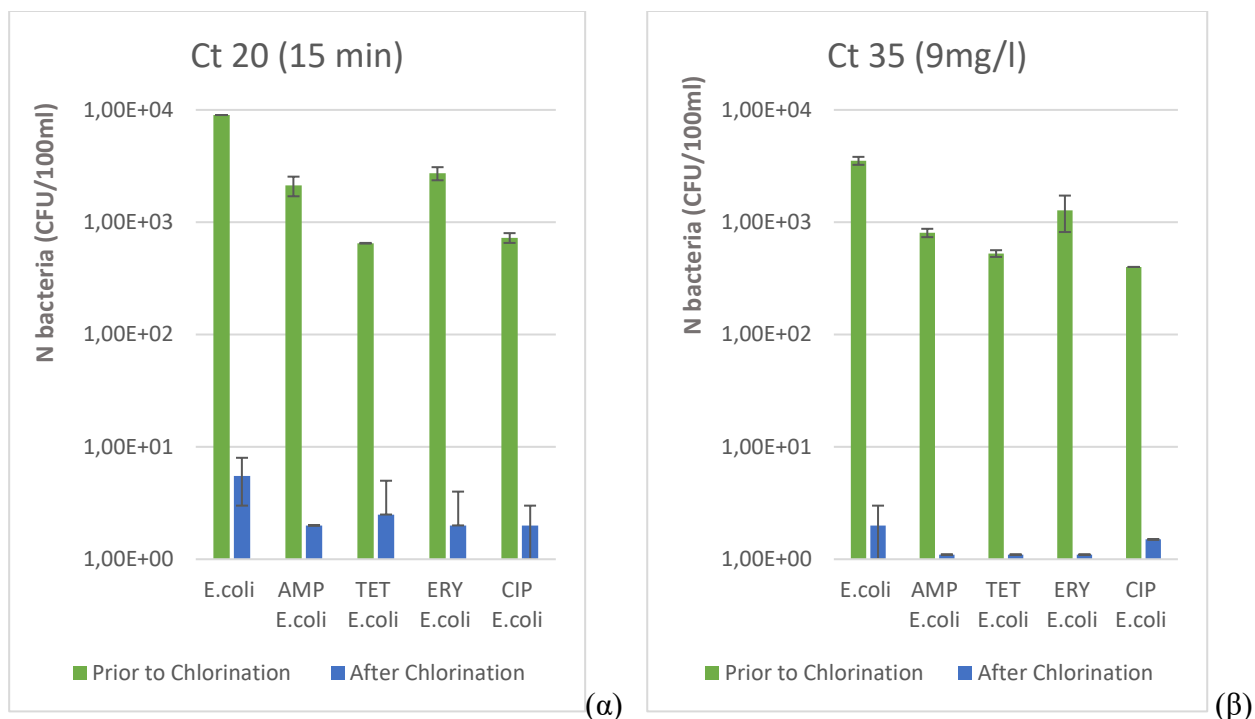
Αναλυτικότερα ο πληθυσμός των ολικών κολοβακτηριδίων πριν και μετά από τη διαδικασία της χλωρίωσης παρουσιάζεται στο ακόλουθο Γράφημα 4.2.2.1. καθώς και στον Πίνακα 7.2.1.2. (Παράρτημα) για τα δύο εξεταζόμενα Ct (mg Cl₂ min/L). Πριν από τη διαδικασία της χλωρίωσης ο πληθυσμός μετρήθηκε $4 \times 10^4 \pm 1 \times 10^4$ CFU/100mL και μετά τη χλωρίωση $1 \times 10^2 \pm 3 \times 10^1$ CFU/100mL, για 20 Ct (mg Cl₂ min/L). Αντίστοιχα για 35 Ct (mg Cl₂ min/L), πριν από τη διαδικασία ανιχνευθήκαν $1 \times 10^4 \pm 2 \times 10^3$ CFU/100mL και μετά τη χλωρίωση $2 \times 10^1 \pm 8$ CFU/100mL.



Γράφημα 4.2.2.1. Πλήθος ολικών βακτηρίων πριν και μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης στα προπειράματα.

Στον Πίνακα 7.2.1.2. (Παράρτημα) παρουσιάζονται ο βαθμός απομάκρυνσης μέσω της διαδικασίας της χλωρίωσης και η λογαριθμική μείωσή τους. Συγκεκριμένα, για 20 mg Cl₂ min/L, επιτεύχθηκε 99.7% απομάκρυνση με μείωση log 2, και για 35 mg Cl₂ min/L, επιτεύχθηκε 99.8% απομάκρυνση με μείωση log 3.

Στα ακόλουθα Γραφήματα 4.2.2.2., παρουσιάζονται οι πληθυσμοί των *E.coli* και των *E.coli* με υπόστρωμα αντιβιοτικών που εξετάστηκαν, για τα δύο Ct του προπειράματος (35 και 20 mg Cl₂ min/L, αντίστοιχα), πριν και μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης. Σημειώνεται ότι στις μετρήσεις παρατηρήθηκαν χαμηλές τιμές παρουσίας κολοβακτηρίων και *E.coli*, οπότε και στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε προσθήκη 10 ml πρωτοβάθμια επεξεργασμένων λυμάτων, με σκοπό την αύξηση του πληθυσμού τους.



Γράφημα 4.2.2.2. Λογαριθμική απεικόνιση του πλήθους των *E.coli* και των ανθεκτικών *E.coli* (CFU/100ml) στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά, πριν και μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης στα προπείράματα, σύμφωνα με τα εξεταζόμενα Ct (mg Cl₂ min/L) (α) 20 Ct (mg Cl₂ min/L), (β) 35 Ct (mg Cl₂ min/L).

Τα παραπάνω προκύπτουν από τους Πίνακες 7.2.1.3. και 7.2.1.4. (Παράρτημα), όπου παρουσιάζουν τις τιμές που υπολογίστηκαν για τις μετρήσεις των πληθυσμών *E.coli* και των *E.coli* με υπόστρωμα αντιβιοτικών, στο προπείραμα με Ct 20 mg Cl₂ min/L. και με Ct 35 mg Cl₂ min/L.

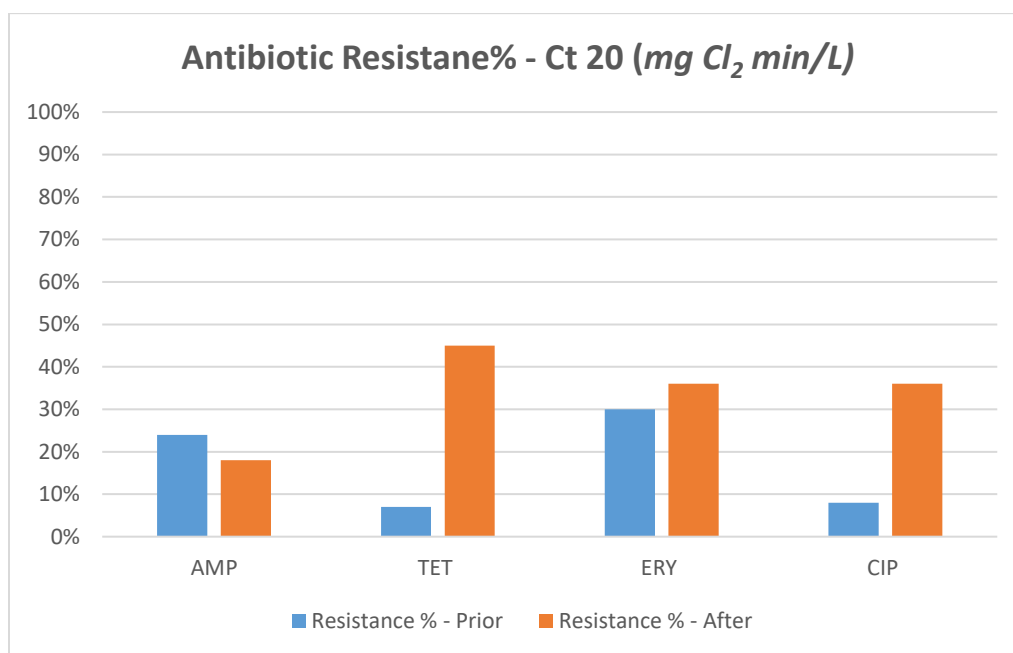
Οι πληθυσμοί των *E.coli* πριν τη διαδικασία της χλωρίωσης μετρήθηκαν $9 \times 10^3 \pm 5$ CFU/100mL και μετά τη χλωρίωση $6 \pm 2,5$ CFU/100mL. Οι τιμές των ανθεκτικών βακτηρίων πριν τη χλωρίωση παρουσίασαν τιμές από $6,5 \times 10^2 \pm 5$ CFU/100mL για το αντιβιοτικό της τετρακυκλίνης, έως $2, \times 10^3 \pm 4 \times 10^2$ CFU/100mL για την αμικιλίνη. Μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης αντίστοιχα, η μικρότερη τιμή ανιχνεύθηκε ως 1 CFU/100mL για την αμικιλίνη έως $3 \pm 2,5$ CFU/100mL για την τετρακυκλίνη.

Οι πληθυσμοί των *E.coli* πριν τη διαδικασία της χλωρίωσης μετρήθηκαν $3,5 \times 10^3 \pm 2,9 \times 10^2$ CFU/100mL και μετά τη χλωρίωση 2 ± 1 CFU/100mL. Οι τιμές των ανθεκτικών βακτηρίων πριν τη χλωρίωση παρουσίασαν τιμές από 4×10^2 CFU/100mL για το αντιβιοτικό της αμικιλίνης, έως $1,3 \times 10^3 \pm 4,6 \times 10^2$ CFU/100mL για το αντιβιοτικό της ερυθρομυκίνης. Μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης αντίστοιχα, απόλυτη απομάκρυνση πραγματοποιήθηκε για την τετρακυκλίνη και

την ερυθρομυκίνη. Σημειώνεται ότι τιμές παρουσιάστηκαν μόνο για τα αντιβιοτικά της αμπικιλλίνης και της σιπροφλοξασίνης.

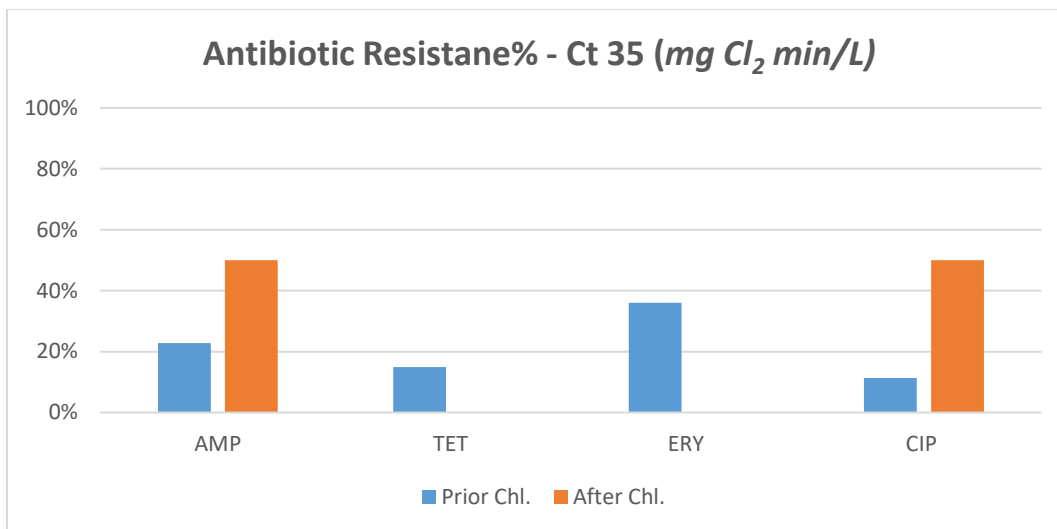
Στους Πίνακες 7.2.1.3. και 7.2.1.4. (Παράρτημα), σημειώνεται το ποσοστό απομάκρυνσης και η λογαριθμική μείωση του πλήθους των βακτηρίων λόγω της διαδικασίας της χλωρίωσης. Τέλος, παρουσιάζονται τα ποσοστά ανθεκτικότητας στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά πριν και μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης.

Άξιο σημείωσης αποτελεί το γεγονός ότι όπως παρατηρείται και από το ακόλουθο Γράφημα 4.2.2.3., για Ct 20 mg Cl₂ min/L, παρατηρείται, αύξηση του ποσοστού των ανθεκτικών βακτηρίων στα αντιβιοτικά τετρακυκλίνη - TET, ερυθρομυκίνη - ERY και σιπροφλοξασίνη - CIP, μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης.



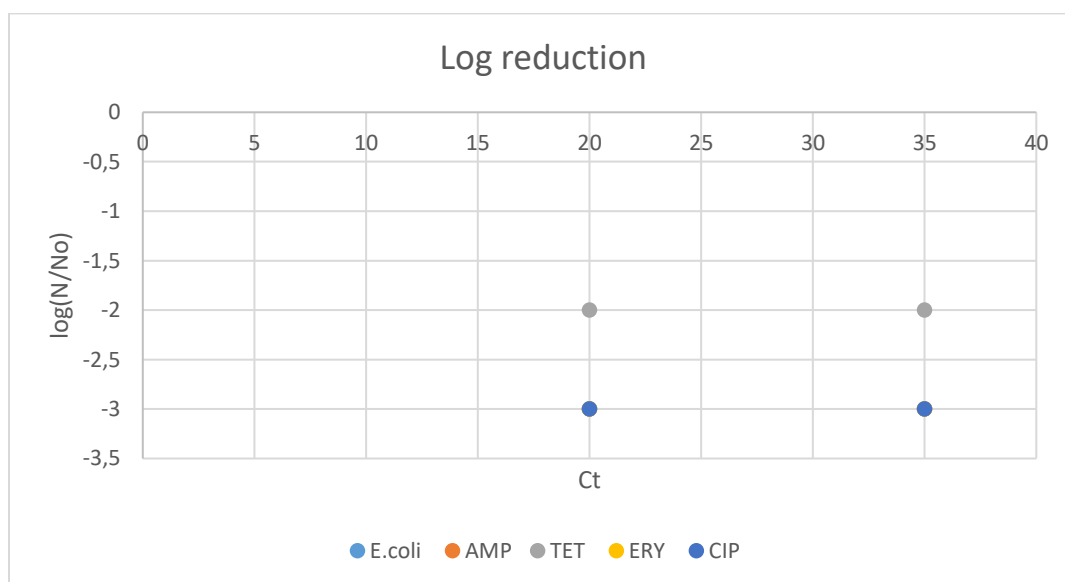
Γράφημα 4.2.2.3. Ποσοστό ανθεκτικότητας των ανθεκτικών *E.coli* στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά, πριν και μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης στο προπείραμα με 20 Ct (mg Cl₂ min/L).

Σημειώνεται ότι, όπως παρατηρείται και από το ακόλουθο Γράφημα 4.2.2.4., για Ct 35 mg Cl₂ min/L, παρατηρείται αύξηση του ποσοστού ανθεκτικότητας στα βακτήρια που περιείχαν στο υπόστρωμά τους αμπικιλλίνη – AMP και σιπροφλοξασίνη – CIP, μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης.



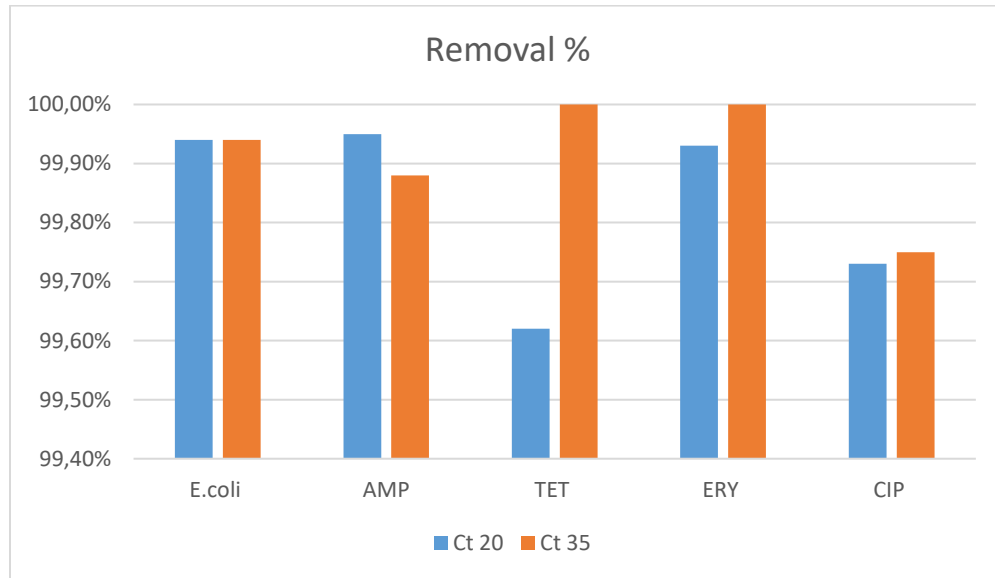
Γράφημα 4.2.2.4. Ποσοστό ανθεκτικότητας των ανθεκτικών *E.coli* στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά, πριν και μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης στο προπείραμα με 20 Ct (mg Cl₂ min/L).

Στο ακόλουθο Γράφημα 4.2.2.5., παρουσιάζεται η λογαριθμική μείωση που επιτεύχθηκε στα δύο προπειράματα μετά την διαδικασία της χλωρίωσης για 20 Ct (mg Cl₂ min/L) και 35 Ct (mg Cl₂ min/L).



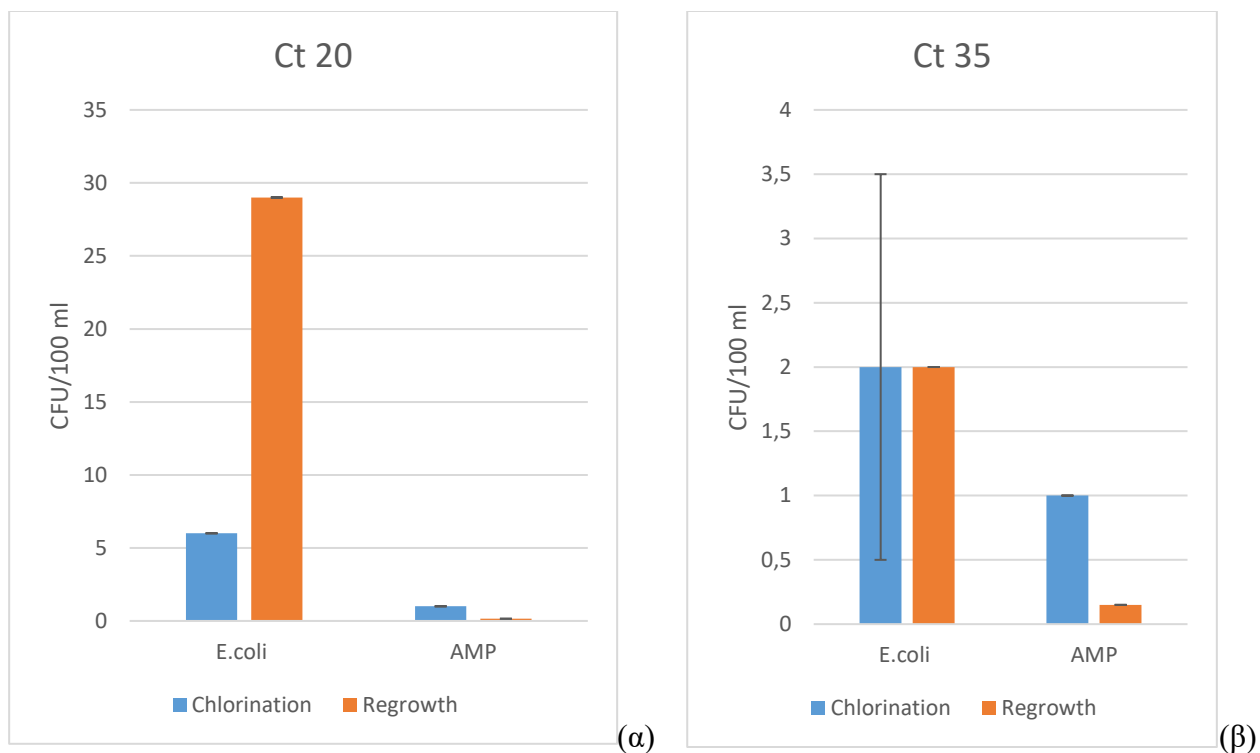
Γράφημα 4.2.2.5. Λογαριθμική μείωση στα προπειράματα μετά την διαδικασία της χλωρίωσης για 20 Ct (mg Cl₂ min/L) και 35 Ct (mg Cl₂ min/L).

Στο ακόλουθο Γράφημα 4.2.2.6., παρουσιάζεται το ποσοστό απομάκρυνσης που επιτεύχθηκε στα δύο προπειράματα μετά την διαδικασία της χλωρίωσης για 20 Ct (mg Cl₂ min/L) και 35 Ct (mg Cl₂ min/L).



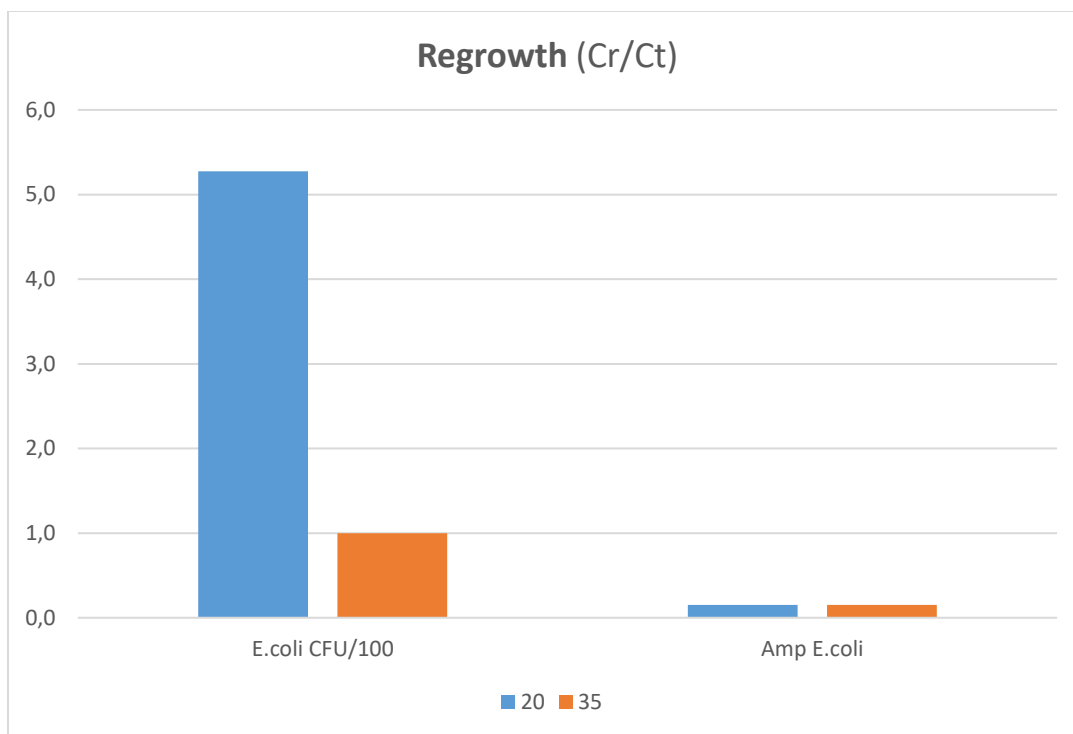
Γράφημα 4.2.2.6. Ποσοστό απομάκρυνσης στα προπειράματα μετά την διαδικασία της χλωρίωσης για 20 Ct (mg Cl₂ min/L) και 35 Ct (mg Cl₂ min/L).

Επιπλέον, όπως παρουσιάζεται και στα ακόλουθα Γραφήματα 4.2.2.7., καθώς και στον Πίνακα 7.2.1.5. (Παράρτημα), για τα εξεταζόμενα δείγματα πραγματοποιήθηκε πείραμα ανακαλλιέργειας για τα Ct του προπειράματος (35 και 20 mg Cl₂ min/L). Αναλυτικότερα, στο Γράφημα, παρουσιάζονται οι πληθυσμοί των *E.coli* και των *E.coli* που ήταν ανθεκτικά στο αντιβιοτικό της αμικικιλίνης. Στα 20 mg Cl₂ min/L, παρατηρείται ανακαλλιέργεια στον πληθυσμό των *E.coli* με 29 CFU/100 ml, ενώ δεν παρατηρείται ανακαλλιέργεια των βακτηρίων που είναι ανθεκτικά στην αμικικιλίνη. Αντίστοιχα, για το προπείραμα με 35 mg Cl₂ min/L, παρατηρείται ανακαλλιέργεια στον πληθυσμό των *E.coli* με 2±1,5 CFU/100 ml, ενώ για τον ανθεκτικό πληθυσμό στην αμικικιλίνη δεν παρατηρείται να ανακαλλιέργεια.



Γράφημα 4.2.2.7. Πλήθος *E.coli* και ανθεκτικών *E.coli* στο αντιβιοτικό της αμπικιλίνης μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης και μετά το πείραμα της ανακαλλιέργειας για (α) $Ct\ 20\ mg\ Cl_2\ min/L$ και (β) για $Ct\ 35\ mg\ Cl_2\ min/L$.

Στο ακόλουθο Γράφημα 4.2.2.8. καθώς και στον Πίνακα 7.2.1.6. (Παράρτημα), παρουσιάζεται ο λόγος Cr/Ct των εξεταζόμενων δειγμάτων. Για το δείγμα *E.coli*, παρατηρείται ανακαλλιέργεια των βακτηρίων με Cr/Ct ίσο με 5 για προπείραμα με $20\ mg\ Cl_2\ min/L$. Για το προπείραμα με $35\ mg\ Cl_2\ min/L$, παρατηρείται Cr/Ct ίσο με 1. Σημειώνεται ότι σε κανένα δείγμα δεν παρατηρήθηκε ανακαλλιέργεια στα ανθεκτικά βακτήρια στο αντιβιοτικό της αμπικιλίνης.



Γράφημα 4.2.2.8. Λόγος ανακαλλιέργειας Cr/Ct, που υπολογίστηκε στα εξεταζόμενα δείγματα των προπειραμάτων.

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι στην παρούσα εργασία, μέσω των προπειραμάτων, υπολογίστηκαν οι τελικές τιμές των παραμέτρων που χρησιμοποιήθηκαν στο κυρίως πείραμα χλωρίωσης με σκοπό την διερεύνηση του βαθμού εξουδετέρωσης ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων κατά τη χλωρίωση επεξεργασμένων λυμάτων, και παρουσιάζονται στο επόμενο υποκεφάλαιο.

Όπως παρουσιάζεται και σε έρευνα των Huang et al., σε μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν με σταθερό CT 50 mg Cl₂ min/L, οι πληθυσμοί των βακτηρίων παρουσίασαν ποικίλες τιμές καθώς οι μεταβλητές της αρχικής δόσης χλωρίου και του χρόνου επαφής, διαφοροποιούνταν σε κάθε πείραμα. Για παράδειγμα, η απομάκρυνση των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων, με αρχική δόση χλωρίου 25 mg Cl₂/L και χρόνο επαφής 2 min ήταν υψηλότερη από την απομάκρυνση που παρουσίασαν με αρχική δόση 2 mg Cl₂/L και χρόνο επαφής 25 min. Τα βακτήρια που εμφάνισαν ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη παρουσίασαν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα όταν εκθέτονταν σε χαμηλότερες δόσεις χλωρίου με μεγαλύτερο χρόνο επαφής. Τα παραπάνω παρουσιάζουν την ανάγκη για περαιτέρω έρευνα ως προς τις αρχικές δόσεις χλωρίου και τον χρόνο επαφής (Huang et al., 2011).

4.2.3. Πείραμα χλωρίωσης δειγμάτων – Μικροβιολογικής ανάλυσης

Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 5 δειγματοληψίες, εκ των οποίων οι 3 αφορούσαν δείγματα από την εγκατάσταση της Ψυττάλειας με εξεταζόμενα Ct 30, 35, 50 (mg Cl₂ min/L) και ακόμα 2 δείγματα από την εγκατάσταση της Άντισσας με εξεταζόμενα Ct 15, 20 (mg Cl₂ min/L). Στον ακόλουθο Πίνακα 4.2.3.1. παρουσιάζονται οι τιμές που προέκυψαν από τα πειράματα χλωρίωσης για κάθε εξεταζόμενο Ct (mg Cl₂ min/L). Σημειώνεται ότι όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με χρόνο επαφής 30 min.

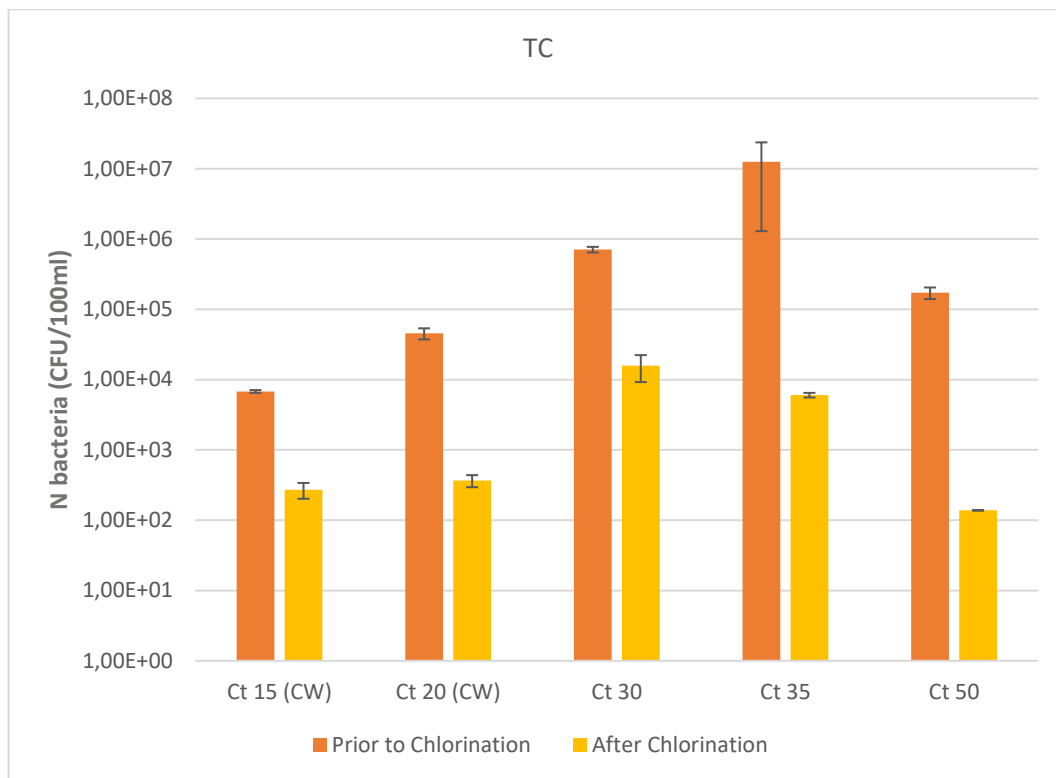
Πίνακας 4.2.3.1. Δεδομένα πειραμάτων χλωρίωσης.

Αρ. δείγματος	TE (1)	TE (2)	TE (3)	R2 (1)	R2 (2)
Περιοχή δειγματοληψίας	Ψυττάλεια	Ψυττάλεια	Ψυττάλεια	Άντισσα	Άντισσα
Αρχική Δόση Χλωρίου (mg/L)	3	2	1.5	1.5	1
Υπολειμματικό ολικό χλώριο - C (mg/L)	1.7	1.0	0.9	0.6	0.5
Ct (mg Cl ₂ min/L)	50	35	30	20	15

Κατά την ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις και στους πληθυσμούς των ολικών κολοβακτηριδίων. Ο Πίνακας 7.2.2.2. (Παράρτημα) παρουσιάζει τις μετρήσεις των πληθυσμών των ολικών κολοβακτηριδίων πριν και μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης, τη λογαριθμική μείωση του πληθυσμού και το ποσοστό του βαθμού απομάκρυνσης που πραγματοποιείται με τη διαδικασία της χλωρίωσης σύμφωνα με τα αντίστοιχα εξεταζόμενα Ct (mg Cl₂ min/L). Σημειώνεται ότι το πλήθος που μετρήθηκε στα δείγματα πριν από την διαδικασία της χλωρίωσης, ερχόταν σε συμφωνία με τις τιμές των δειγμάτων που εξετάστηκαν για την απομάκρυνση που πραγματοποιούν τα στάδια των εγκαταστάσεων.

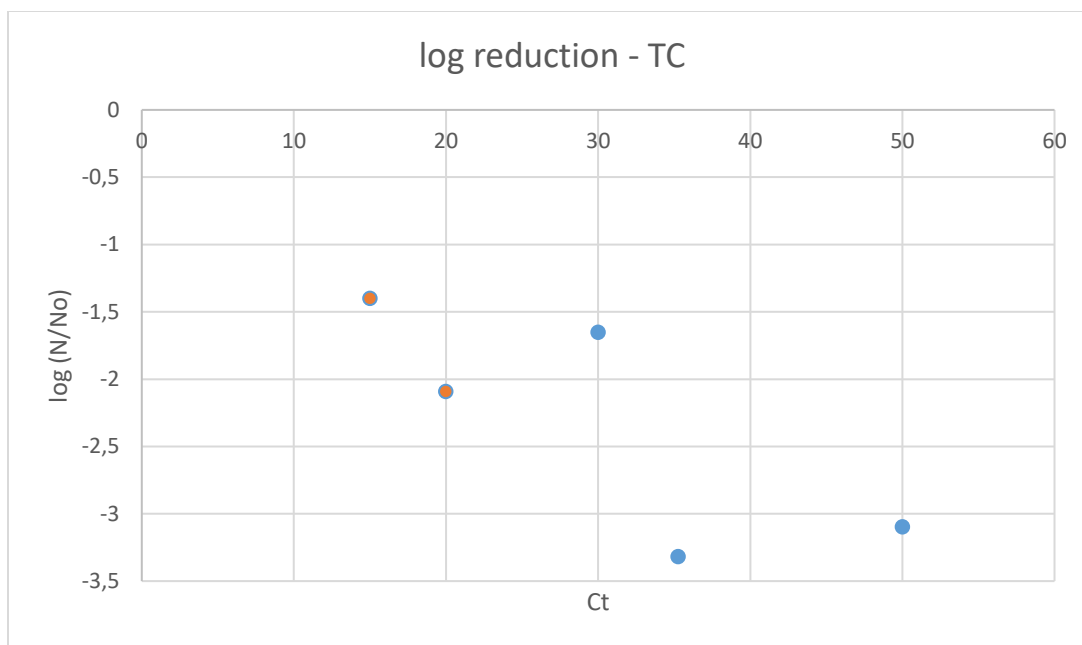
Στο ακόλουθο Γράφημα 4.2.3.1., παρουσιάζονται οι τιμές πλήθους των ολικών κολοβακτηρίων που μετρήθηκαν στα εξεταζόμενα δείγματα και από τις δύο εγκαταστάσεις, πριν και μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης. Παρατηρείται ότι τα ολικά κολοβακτηρίδια με τη διαδικασία της χλωρίωσης για την εγκατάσταση της Άντισσας, εμφάνισαν μικρότερες τιμές ($7 \times 10^3 \pm 3 \times 10^2$ και $5 \times 10^4 \pm 8 \times 10^3$) από αυτές της εγκατάστασης της Ψυττάλειας ($2 \times 10^5 \pm 3 \times 10^4$, $7 \times 10^5 \pm 7 \times 10^4$ και $1 \times 10^7 \pm 1 \times 10^7$). Αντίστοιχα μετά την επεξεργασία της χλωρίωσης ανιχνεύτηκαν για την εγκατάσταση της Άντισσας, $3 \times 10^2 \pm 7 \times 10^1$ και $4 \times 10^2 \pm 7 \times 10^1$ και για την εγκατάσταση

της Ψυττάλειας από $1 \times 10^2 \pm 3 \times 10^4$, $4 \times 10^3 \pm 5 \times 10^2$ έως και $2 \times 10^4 \pm 7 \times 10^3$ όπως παρουσιάζεται και στον Πίνακα 7.2.2.2. (Παράρτημα).



Γράφημα 4.2.3.1. Πλήθος ολικών βακτηρίων πριν και μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης στα εξεταζόμενα δείγματα.

Το ακόλουθο Γράφημα 4.2.3.2. παρουσιάζει τη λογαριθμική μείωση που παρατηρείται ανάμεσα στους πληθυσμούς των ολικών κολοβακτηριδίων λόγω της διαδικασίας της χλωρίωσης, στα εξεταζόμενα δείγματα. Όπως παρατηρείται οι τιμές ποικίλουν από 1,4 έως 3,3 log. Η συνολική εικόνα του Γραφήματος 4.2.3.2. παρουσιάζει σταδιακή μείωση του πλήθους των ολικών κολοβακτηρίων, με την αντίστοιχη μείωση του εξεταζόμενου Ct (mg Cl₂ min/L).



Γράφημα 4.2.3.2. Λογαριθμική μείωση των ολικών κολοβακτηρίων στα εξεταζόμενα δείγματα.

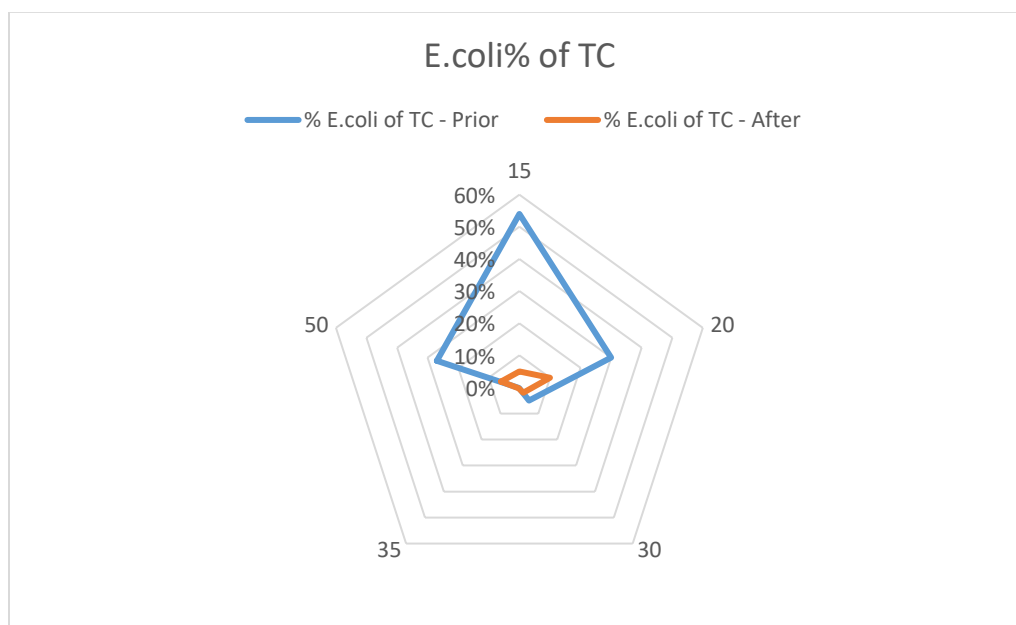
Σημειώνεται πως η απομάκρυνση που επιτυγχάνεται ποσοστιαία κυμαίνεται σε τιμές > 96%. Αναλυτικότερα, προκύπτει 96% απομάκρυνση με Ct 15 mg Cl₂ min/L και 99,9% απομάκρυνση με Ct 20 mg Cl₂ min/L για την εγκατάσταση της Άντισσας. Αντίστοιχα, οι τιμές των δειγμάτων από την εγκατάσταση της Ψυττάλειας, παρουσιάζουν 98% απομάκρυνση για Ct 30 mg Cl₂ min/L και >99.9% απομάκρυνση για Ct 35 και 50 mg Cl₂ min/L.

Έρευνα των Yuan et al., 2015, παρουσιάζει την απομάκρυνση που επιτυγχάνει η μέθοδος της χλωρίωσης ως μέθοδος απολύμανσης. Το όριο ανίχνευσης μικροοργανισμών υπολογίστηκε στα 15 mg Cl₂ min/L και η απομάκρυνση κυμαινόταν ποσοστιαία σε 80% για τα ολικά κολοβακτηρίδια (Yuan et al., 2015). Σημειώνεται ότι στον πληθυσμό των κολοβακτηρίων σε αστικά λύματα, επιτυγχάνεται μέσω της απολύμανσης αδρανοποίηση των μικροοργανισμών σε ποσοστό 98 – 99,9 % (Νταράκας, 2014).

E.coli και ανθεκτικότητα βακτηρίων E.coli

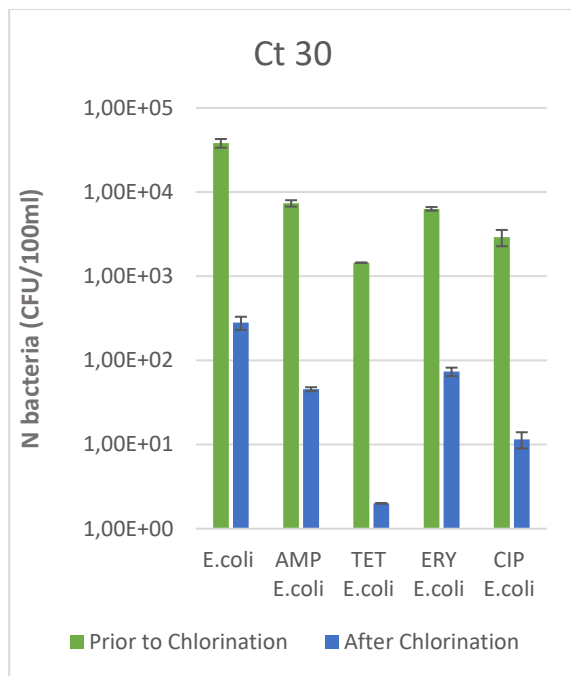
Αρχικά, σημειώνεται πως και στις δύο εγκαταστάσεις οι πληθυσμοί *E.coli* ήταν μικρότεροι, από τους πληθυσμούς ολικών κολοβακτηριδίων, σε συμφωνία με τα δεδομένα που αναλύθηκαν

από τα δείγματα των σταδίων των δύο εγκαταστάσεων, όπως παρουσιάζεται και στο ακόλουθο Γράφημα 4.2.3.3. Αναλυτικότερα, στο σύστημα της Άντισσας, ο πληθυσμός των *E.coli* στην είσοδο αποτελούσε το 30-54% των ολικών κολοβακτηριδίων. Στα δείγματα της Ψυττάλειας, οι αντίστοιχες μετρήσεις παρουσίασαν τιμές από 0,12% έως 27%. Επιπλέον, άξιο σημείωσης αποτελεί το γεγονός ότι μεγαλύτερα ποσοστά *E.coli* παρατηρήθηκαν στα δείγματα από τα στάδια της εγκατάστασης στην Άντισσα, συγκριτικά με τα δείγματα της Ψυττάλειας (όπως παρουσιάζονται και στον Πίνακα 7.2.2.3., Παράρτημα).

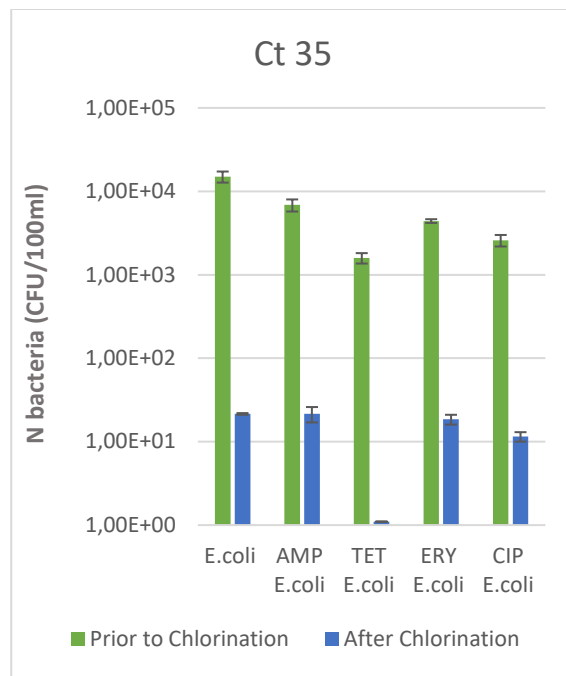


Γράφημα 4.2.3.3. Ποσοστό *E.coli* που περιείχαν τα ολικά κολοβακτηρίδια στα εξεταζόμενα δείγματα πριν και μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης.

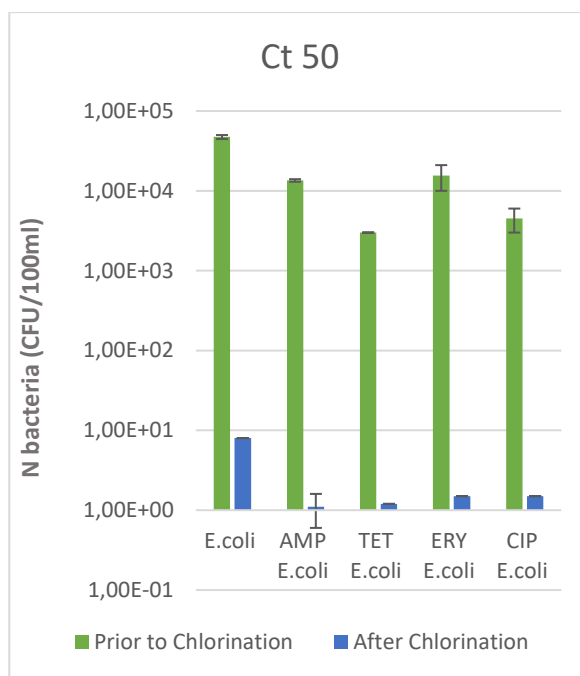
Όσον αφορά τα εξεταζόμενα *E.coli*, στα δείγματα που αναλύθηκαν, τα ακόλουθα Γραφήματα 4.2.3.4., παρουσιάζουν το πλήθος των *E.coli* (CFU/100ml) σύμφωνα με τα εξεταζόμενα Ct (mg Cl₂ min/L) πριν και μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης. Στο σύνολό τους, παρατηρούνται παρόμοιες μετρήσεις των πληθυσμών *E.coli*, συγκριτικά με τις μετρήσεις των ολικών κολοβακτηριδίων στα στάδια των εγκαταστάσεων στα εξεταζόμενα Ct (mg Cl₂ min/L). Επιπλέον σημειώνεται ότι σε όλα τα δείγματα, οι πληθυσμοί των *E.coli* που εμφάνισαν ανθεκτικότητα στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά ήταν μικρότεροι από τους πληθυσμούς που δεν περιείχαν αντιβιοτικό στο υπόστρωμά τους.



(α)



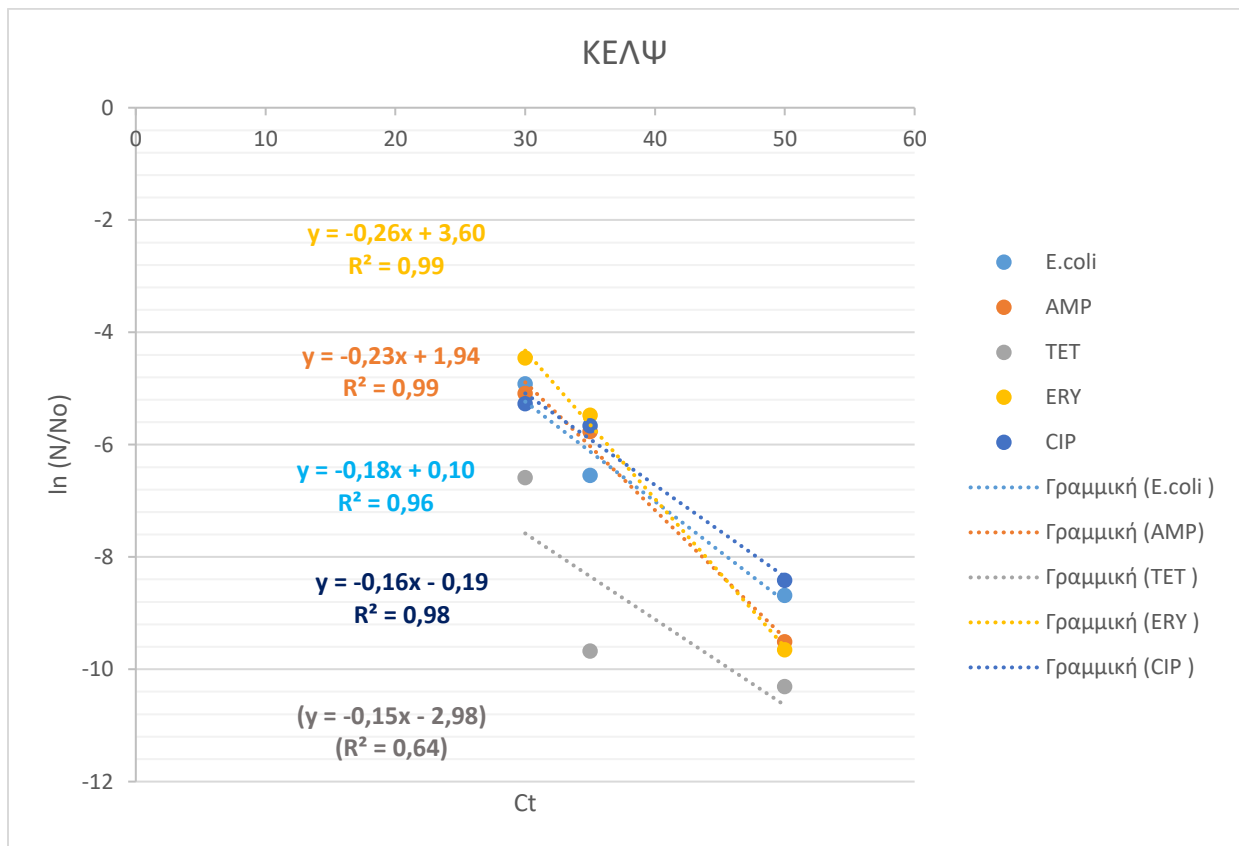
(β)



(γ)

Γράφημα 4.2.3.4. Λογαριθμική απεικόνιση του πλήθους των *E.coli* και των ανθεκτικών *E.coli* (CFU/100ml) στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά, πριν και μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης, σύμφωνα με τα εξεταζόμενα Ct (mg Cl₂ min/L) (α) 30 Ct (mg Cl₂ min/L), (β) 35 Ct (mg Cl₂ min/L) και (γ) 50 Ct (mg Cl₂ min/L).

Στους Πίνακες 7.2.2.4. και 7.2.2.5., του Παραρτήματος, παρουσιάζονται οι τιμές των πληθυσμών των *E.coli* βακτηρίων της ομάδας που δεν περιείχε αντιβιοτικό το υπόστρωμά του και των *E.coli* που εμφάνισαν ανθεκτικότητα στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά (AMP, TET, ERY, CIP) πριν και μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης. Σημειώνεται ότι το πλήθος που μετρήθηκε στα δείγματα πριν από την διαδικασία της χλωρίωσης, ερχόταν σε συμφωνία με τις τιμές των δειγμάτων όπου εξετάστηκαν για την απομάκρυνση που πραγματοποιούν τα στάδια των εγκαταστάσεων και παρουσιάστηκαν σε παραπάνω υποκεφάλαιο. Στο ακόλουθο Γράφημα 4.2.3.5. παρουσιάζεται ο ρυθμός μείωσης των *E.coli* και των ανθεκτικών *E.coli* στα εξεταζόμενα δείγματα της εγκατάστασης της Ψυττάλειας. Παρατηρείται ότι η αύξηση του Ct (mg Cl₂ min/L), προκαλεί αύξηση της απομάκρυνσης του πληθυσμού *E.coli*.



Γράφημα 4.2.3.5. Ρυθμός μείωσης των *E.coli* και των ανθεκτικών *E.coli* στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά με την αύξηση του Ct (mg Cl₂ min/L για την εγκατάσταση της Ψυττάλειας.

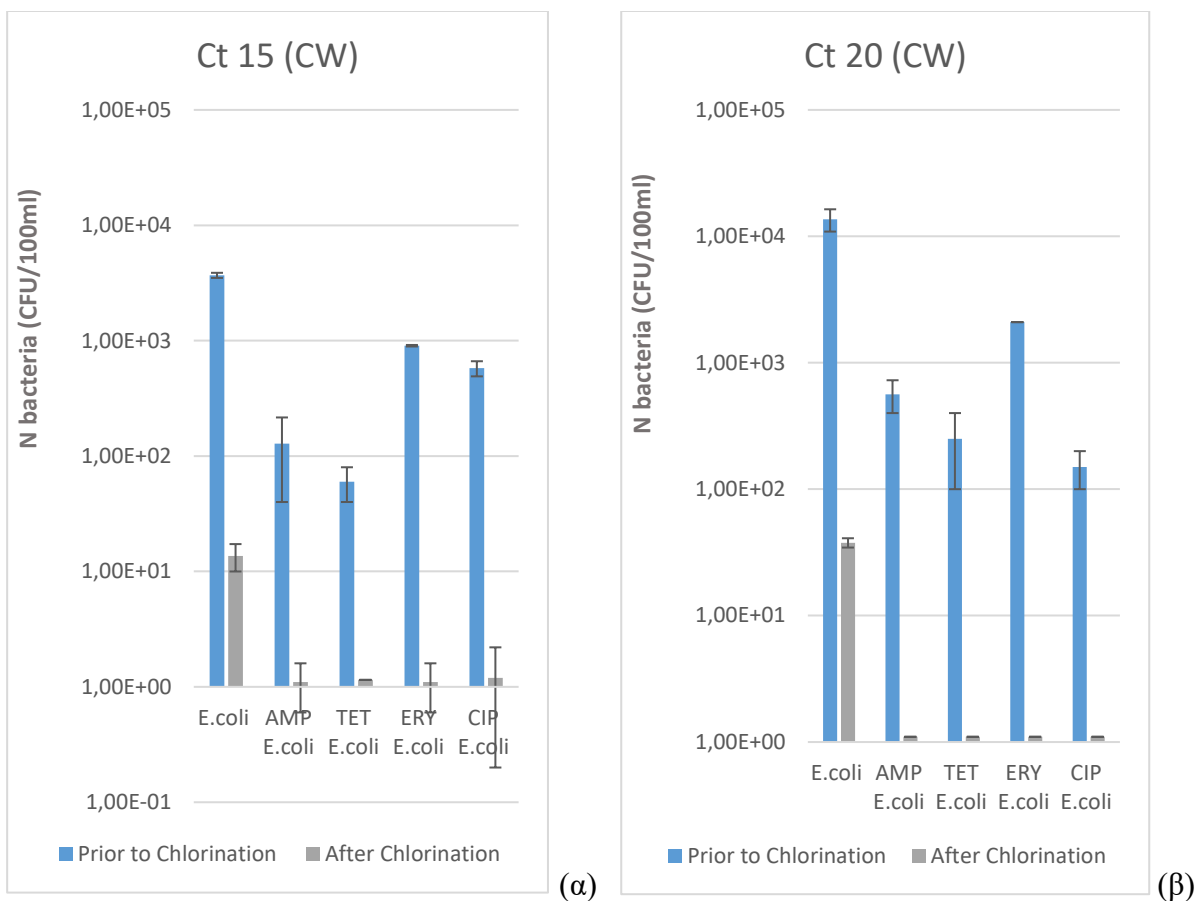
Αναλυτικότερα, από το παραπάνω Γράφημα, προκύπτει ο ακόλουθος Πίνακας εκθετικών εξισώσεων ρυθμού μείωσης των βακτηρίων με την αύξηση του Ct. Σημαντική συσχέτιση παρατηρείται στις τιμές της πλειοψηφίας των εξεταζόμενων δειγμάτων με $R^2 > 0.95$, $p < 0.05$.

Σημειώνεται ότι στον Πίνακα 4.2.3.2., δεν δίνεται εκθετική εξίσωση για το αντιβιοτικό της τετρακυκλίνης διότι παρουσίασε πλήρη απομάκρυνση ($R^2 < 0.95$). Όπως προκύπτει από τις εξισώσεις που παρουσιάζονται, στους ρυθμούς μείωσης K, παρατηρούνται μεγαλύτερες τιμές για τα *E.coli* που εμφάνισαν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό της ερυθρομυκίνης και τις αμπικιλλίνης, παρουσιάζοντας με τον τρόπο αυτό μεγαλύτερη απομάκρυνση κατά τη διαδικασία της χλωρίωσης. Ακολουθούν τα *E.coli* που δεν περιείχαν αντιβιοτικό στο υπόστρωμά τους και τα *E.coli* που εμφάνισαν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό της σιπροφλοξασίνης και της τετρακυκλίνης με την μικρότερη τιμή.

Πίνακας 4.2.3.2. Ρυθμός μείωσης των *E.coli* και των ανθεκτικών *E.coli* στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά.

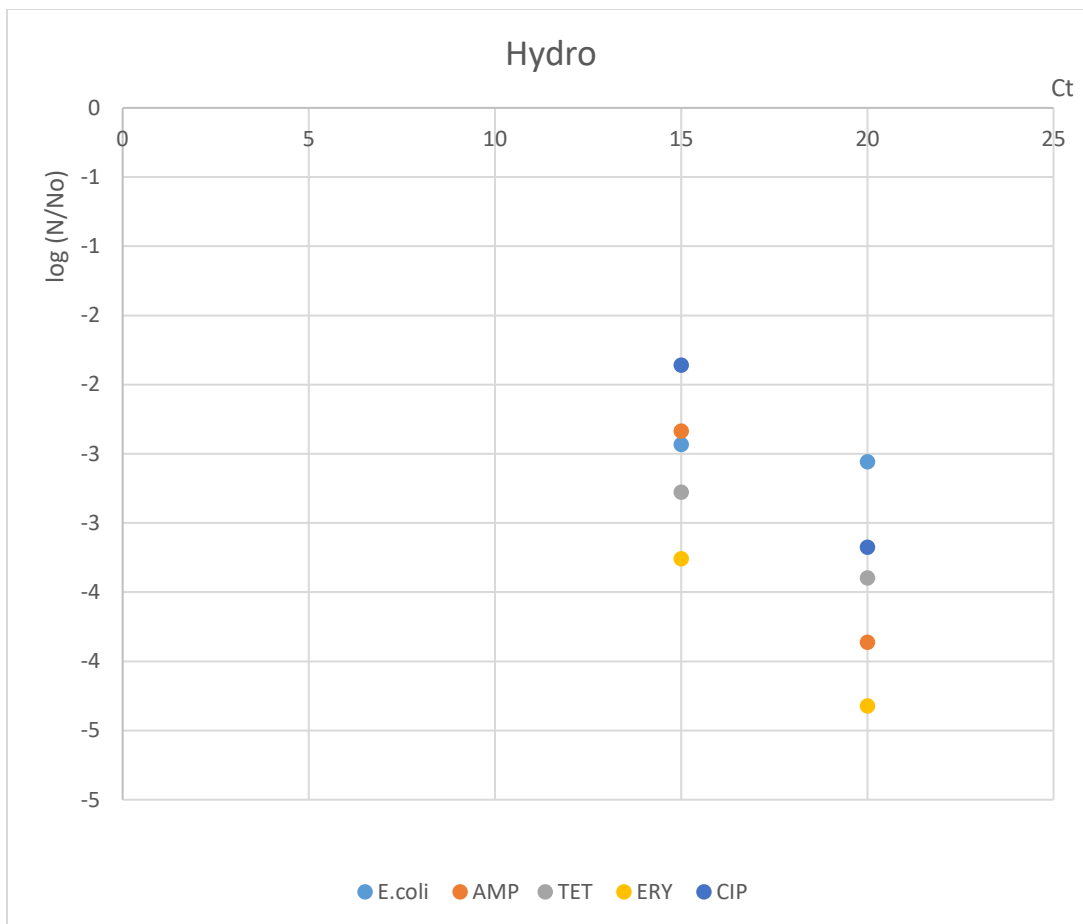
<i>E.coli</i>	$y = -0,18x + 0,10$ $R^2 = 0,96$
ERY	$y = -0,26x + 3,60$ $R^2 = 0,99$
AMP	$y = -0,23x + 1,94$ $R^2 = 0,99$
CIP	$y = -0,16x - 0,19$ $R^2 = 0,98$

Για την εγκατάσταση της Άντισσας, παρατηρείται ότι με Ct 20 mg Cl₂ min/L επιτυγχάνεται πλήρης απομάκρυνση και αντίστοιχα για την εγκατάσταση της Ψυττάλειας η απομάκρυνση είναι εμφανής στο Ct 50 mg Cl₂ min/L. Σημειώνεται ότι η αρχική δόση για το Ct 20 mg Cl₂ min/L στην εγκατάσταση της Άντισσας ήταν 1.5 mg/l με χρόνο παραμονής 30 min και αντίστοιχα για το Ct 50 mg Cl₂ min/L στην εγκατάσταση της Ψυττάλειας, η αρχική δόση ήταν 3 mg/l με χρόνο παραμονής 30 min. Το ακόλουθο Γράφημα 4.2.3.6., παρουσιάζει τη λογαριθμική απεικόνιση του πλήθους των *E.coli* (CFU/100ml) σύμφωνα με τα εξεταζόμενα Ct (mg Cl₂ min/L) πριν και μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης.



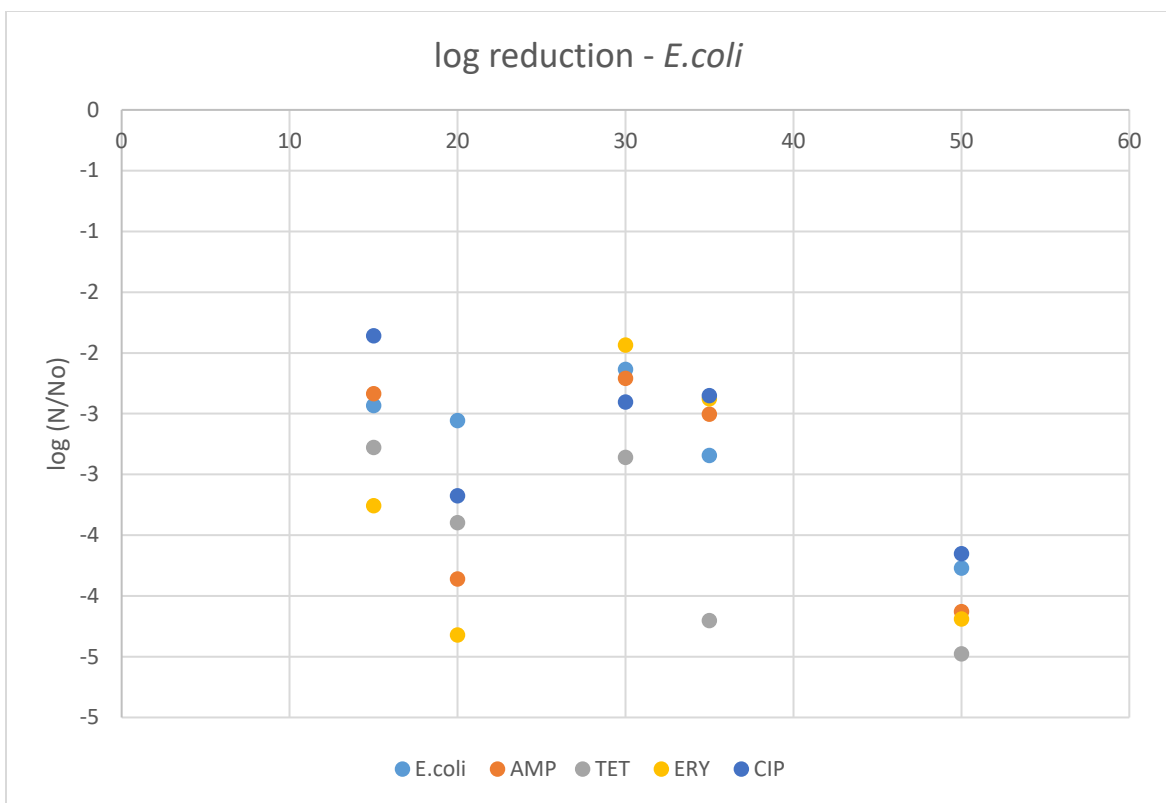
Γράφημα 4.2.3.6. Λογαριθμική απεικόνιση του πλήθους των *E.coli* και των ανθεκτικών *E.coli* (CFU/100ml) στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά, πριν και μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης, σύμφωνα με τα εξεταζόμενα Ct (mg Cl₂ min/L) (α) 15 Ct (mg Cl₂ min/L), (β) 20 Ct (mg Cl₂ min/L).

Στο ακόλουθο Γράφημα 4.2.3.7. παρουσιάζεται η λογαριθμική απομάκρυνση των *E.coli* και των ανθεκτικών *E.coli* στα εξεταζόμενα δείγματα της εγκατάστασης της Άντισσας. Παρατηρείται ότι η αύξηση του Ct (mg Cl₂ min/L), προκαλεί αύξηση της απομάκρυνσης του πληθυσμού *E.coli*.



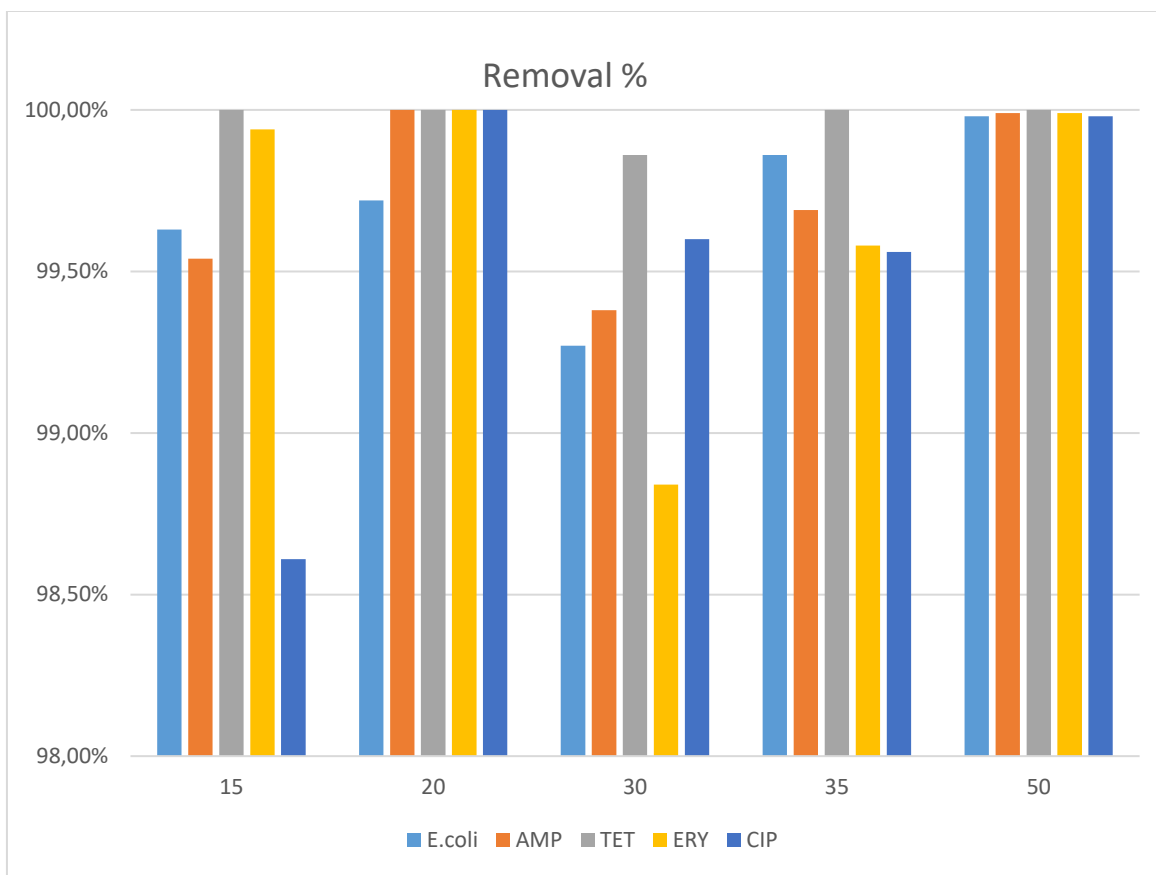
Γράφημα 4.2.3.7. Λογαριθμική απομάκρυνση των *E.coli* και των ανθεκτικών *E.coli* στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά με την αύξηση του Ct (mg Cl₂ min/L) για την εγκατάσταση της Άντισσας.

Στο ακόλουθο Γράφημα 4.2.3.8., όπως και στον Πίνακα 7.2.2.7 (Παράρτημα) παρουσιάζεται η λογαριθμική μείωση που παρουσίασαν τα δείγματα από τις δύο εξεταζόμενες εγκαταστάσεις επεξεργασίας. Επιπλέον, σημειώνεται ότι το ποσοστό απομάκρυνσης στους πληθυσμούς *E.coli* που επιτεύχθηκε μέσω της διαδικασίας της χλωρίωσης αναλογούσε από 99.3% (Ct 35 mg Cl₂ min/L) έως 100% (Ct 50 mg Cl₂ min/L).



Γράφημα 4.2.3.8. Λογαριθμική μείωση των *E.coli* και των ανθεκτικών *E.coli* στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά στις δύο εγκαταστάσεις.

Στο ακόλουθο Γράφημα 4.2.3.9. καθώς και στον Πίνακα 7.2.2.6. (Παράρτημα) παρουσιάζεται η ποσοστιαία απομάκρυνση που επιτεύχθηκε κατά τη διαδικασία της χλωρίωσης των δειγμάτων. Όπως παρατηρείται σε όλα τα δείγματα εμφανίζεται απομάκρυνση >98,6%. Στα δείγματα από την εγκατάσταση της Άντισσας παρατηρείται, πλήρης απομάκρυνση για τα ανθεκτικά στα αντιβιοτικά βακτήρια στο πείραμα με Ct 20 mg Cl₂ min/L και 99,7% για τα βακτήρια *E.coli* της ομάδας control που δεν περιείχαν αντιβιοτικό στο υπόστρωμά τους. Στο δείγμα με Ct 15 mg Cl₂ min/L, παρατηρείται πλήρης απομάκρυνση για το αντιβιοτικό τετρακυκλίνη καθώς και απομάκρυνση > 98,6% για τα υπόλοιπα εξεταζόμενα αντιβιοτικά. Όσον αφορά τα δείγματα από την εγκατάσταση της Ψυττάλειας, παρατηρήθηκε απομάκρυνση σε όλα τα εξεταζόμενα Ct, > 99,3%. Πλήρης απομάκρυνση παρατηρήθηκε για το αντιβιοτικό τετρακυκλίνη στα Ct 50 mg Cl₂ min/L, 35 mg Cl₂ min/L για τα δείγματα της Ψυττάλειας. Αντίστοιχα, στα δείγματα της Άντισσας παρατηρήθηκε πλήρης απομάκρυνση για τα βακτήρια που είναι ανθεκτικά στην τετρακυκλίνη και για τα δύο εξεταζόμενα Ct (20 και 15 mg Cl₂ min/L).



Γράφημα 4.2.3.9. Ποσοστό απομάκρυνσης των *E.coli* και των ανθεκτικών *E.coli* κατά την χλωρίωση στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά στις δύο εγκαταστάσεις.

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι για τα δείγματα από την εγκατάσταση της Άντισσας πραγματοποιήθηκε πλήρης απολύμανση (100%) στους πληθυσμούς που παρουσίασαν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης με Ct 20 mg Cl₂ min/L. Αντίστοιχα για την εγκατάσταση της Ψυττάλειας, πλήρης απολύμανση (100%) στους πληθυσμούς που παρουσίασαν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά, πραγματοποιήθηκε με Ct 50 mg Cl₂ min/L.

Τα παραπάνω αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία με παγκόσμιες έρευνες καθώς σε μελέτη των Raboni et al., παρατηρήθηκε επιτυχής απομάκρυνση των βακτηρίων *E.coli* μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης σε ποσοστά > 97 % σε δείγματα από επτά εγκαταστάσεις επεξεργασίας αστικών λυμάτων στην Ιταλία (Raboni et al., 2016). Ακόμα και παλαιότερες έρευνες όπως των Murray et al., παρουσιάζουν την σημαντική απομάκρυνση που επιτυγχάνει η μέθοδος της χλωρίωσης, καθώς παρατήρησαν πλήρη απομάκρυνση των βακτηρίων *E.coli* (με υπολειμματικό Cl₂ 0.8 – 0.9 mg/l και χρόνο επαφής 1 h) (Murray et al., 1984), ενώ η μείωση των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά *E.coli*, εμφάνιζε μικρότερα ποσοστά. Έρευνα των Ma et al., 2022, παρουσίασε ότι στην είσοδο των εξεταζόμενων εγκαταστάσεων, για τα βακτήρια *E.coli* που δεν περιείχαν

αντιβιοτικό στο υπόστρωμά τους, οι συγκεντρώσεις ανιχνεύθηκαν 10^6 CFU/100 mL. Στην έξοδο των εγκαταστάσεων και κατόπιν χλωρίωσης (~0.2-0.4 mg/L), αντίστοιχα παρουσίασαν τιμές 10^3 CFU/100 mL, με απομάκρυνση log 3 (Ma et al., 2022a).

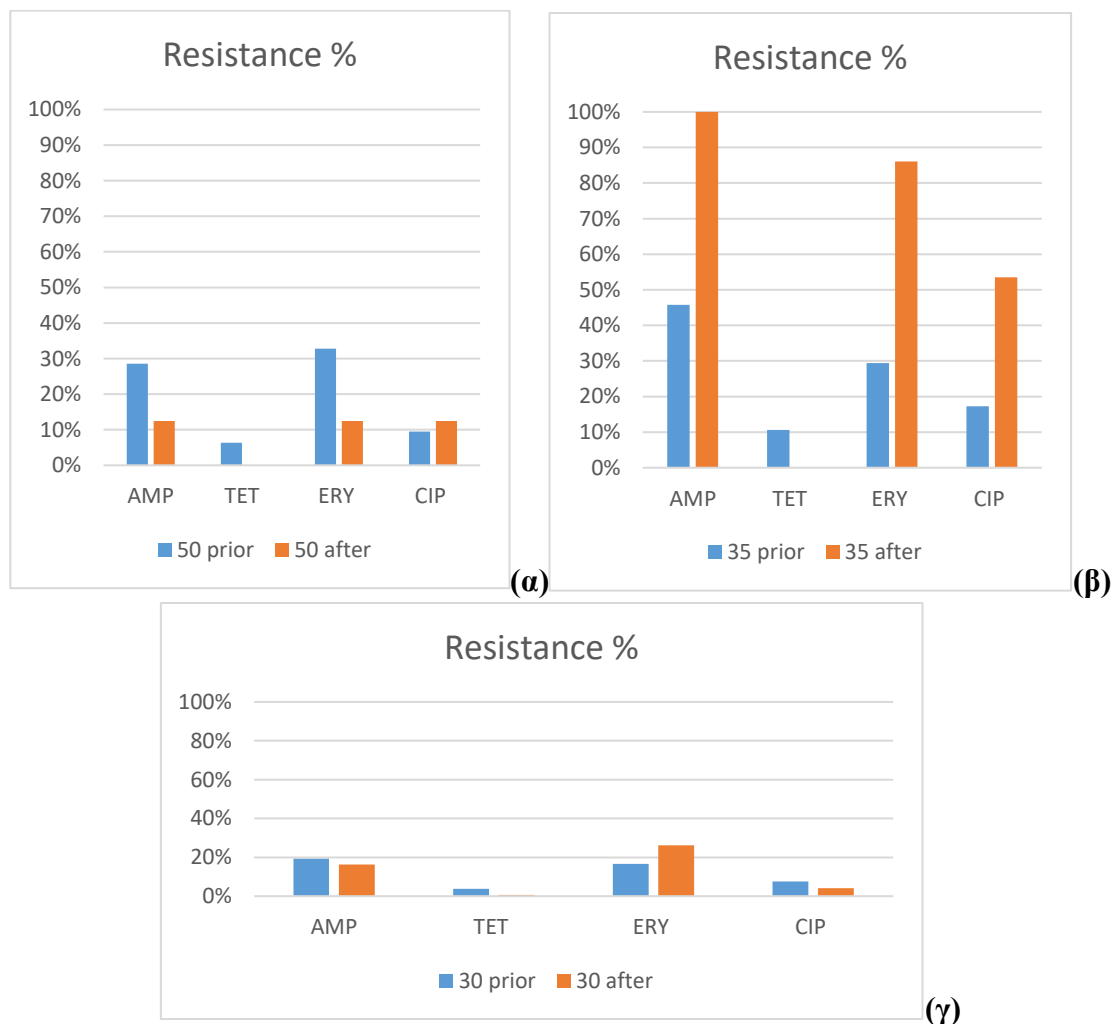
Επιπλέον στην έρευνα των Ma et al., σημειώθηκε μείωση κατά 2-3 log για τα *E. coli* που παρουσίασαν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά της αμπικιλίνης και της τετρακυκλίνης (Ma et al., 2022a). Βακτήρια που εμφάνισαν ανθεκτικότητα στην αμοξυκιλλίνη και την τετρακυκλίνη, παρουσίασαν μείωση κατά 3-4 log κατά την απολύμανση με χλωρίωση 0.5 mg Cl_2 /L και χρόνο επαφής 40 min, ενώ με απολύμανση 2.0 mg Cl_2 /L κατά 4-5 log (Phattarapattamawong et al., 2021). Σε έρευνα των Stange et al., η χλωρίωση ήταν επιτυχής (>99.89%) για την απομάκρυνση ανθεκτικών βακτηρίων κατά 3-4 logs σε 0.5 mg Cl_2 /L με χρόνο επαφής 30 min (Stange et al., 2019). Οι Yuan et al. (2015), παρουσίασαν την επιτυχή απομάκρυνση ανθεκτικών βακτηρίων κατά τη χλωρίωση, αλλά μικρή απομάκρυνση στα ανθεκτικά γονίδια. Αναλυτικότερα, η έρευνα των Yuan et al., παρουσιάζει την απομάκρυνση που επιτυγχάνει η μέθοδος της χλωρίωσης ως μέθοδος απολύμανσης για τα ανθεκτικά στα αντιβιοτικά βακτήρια και ειδικά στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά της ερυθρομυκίνης και τετρακυκλίνης, όπου εξετάστηκαν και στην παρούσα εργασία. Επιπλέον σημειώνεται ότι στην έρευνα των Yuan et al., το όριο ανίχνευσης των περισσότερων βακτηρίων υπολογίστηκε με Ct 15 mg Cl_2 min/L. Για τα βακτήρια που ήταν ανθεκτικά στην ερυθρομυκίνη, χρειαζόνταν μεγαλύτερες δόσεις έως και 60 mg Cl_2 min/L καθώς η ποσοστιαία απομάκρυνση υπολογίστηκε μόλις σε 40% (Yuan et al., 2015).

Άλλες έρευνες παρουσίασαν υψηλότερες αρχικές δόσεις χλωρίου με σκοπό την μείωση των ανθεκτικών βακτηρίων (Zheng et al., 2017; Guo et al., 2015). Έρευνα των Kong et al., παρουσίασε ότι η μείωση των ανθεκτικών βακτηρίων στην τετρακυκλίνη και την αμπικιλίνη, για δόσεις <50 mg Cl_2 min/L, κυμαινόταν σε τιμές 0.25-log. Η απομάκρυνση αυξάνονταν σε 6-log με αρχική δόση χλωρίου 150 mg Cl_2 min/L και τελικό πληθυσμό 10^4 CFU/100mL (Kong et al., 2022). Αντίστοιχα, οι Li et al., 2016 παρουσιάζουν την επιτυχή απομάκρυνση των ανθεκτικών βακτηρίων και γονιδίων μέσω της χλωρίωσης σε ποικίλες δόσεις χλωρίου και χρόνους επαφής (Li et al., 2016). Επιπλέον, οι Liu et al. (2018), με μελέτη τους σε εγκατάσταση επεξεργασίας αστικών λυμάτων στην Κίνα, παρουσίασαν ότι μέσω της χλωρίωσης, ο πληθυσμός των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά γονιδίων αυξήθηκε (8-9 mg Cl_2 /L και χρόνος επαφής 30 min) (Liu et al., 2018). Έρευνα των Templeton et al., παρουσιάζουν ότι ορισμένα βακτήρια ανθεκτικά στα αντιβιοτικά εμφανίζουν ανθεκτικότητα και στη χλωρίωση (Templeton et al., 2009). Σημειώνεται ότι βακτήρια που είναι ανθεκτικά σε παραπάνω από ένα αντιβιοτικά, όπως το είδος *A. Baumannii*, έχει παρατηρηθεί ότι εμφανίζουν και μεγάλη ανθεκτικότητα στη χλωρίωση (Yi Luo et al., 2014). Άλλες έρευνες παρουσιάζουν την πλήρη απομάκρυνση ανθεκτικών βακτηρίων που επιτυγχάνουν συνδυασμοί μεθόδων απολύμανσης όπως UV/χλωρίωση (8 mJ/cm², chlorine 2 mg/L) (Wang et al., 2020).

Ανθεκτικότητα βακτηρίων στα αντιβιοτικά

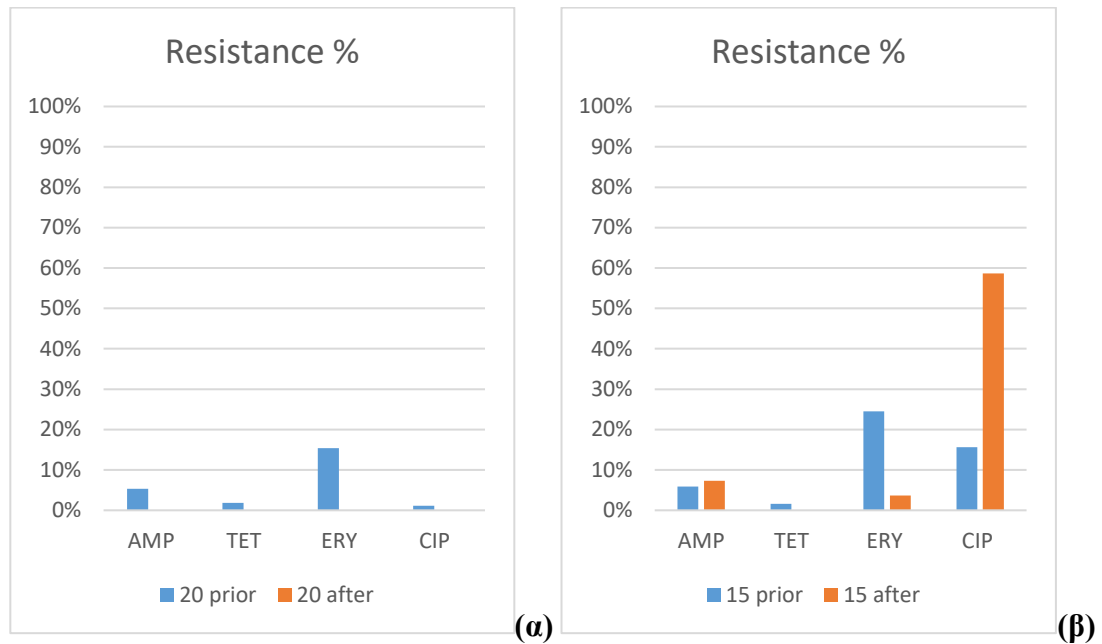
Με σκοπό την κατανόηση της ανθεκτικότητας των βακτηρίων στα αντιβιοτικά, υπολογίστηκε το ποσοστό ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά που εμφάνισαν τα βακτήρια *E.coli* πριν και μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης.

Στο ακόλουθο Γράφημα 4.2.3.10. παρουσιάζεται το ποσοστό ανθεκτικότητας στα 4 εξεταζόμενα αντιβιοτικά (αμπικιλίνη τετρακυκλίνη ερυθρομυκίνη και σιπροφλοξασίνη), στην εγκατάσταση της Ψυττάλειας, πριν και μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης.



Γράφημα 4.2.3.10. Ποσοστό ανθεκτικότητας στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά (αμπικιλίνη τετρακυκλίνη ερυθρομυκίνη και σιπροφλοξασίνη), στην εγκατάσταση της Ψυττάλειας, πριν και μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης, σύμφωνα με τα εξεταζόμενα Ct (mg Cl₂ min/L) (α) 30 Ct (mg Cl₂ min/L), (β) 35 Ct (mg Cl₂ min/L) και (γ) 50 Ct (mg Cl₂ min/L)..

Αντίστοιχα, στο ακόλουθο Γράφημα 4.2.3.11. παρουσιάζεται το ποσοστό ανθεκτικότητας στα 4 εξεταζόμενα αντιβιοτικά (αμπικιλίνη τετρακυκλίνη ερυθρομυκίνη και σιπροφλοξασίνη), στην εγκατάσταση της Άντισσας, πριν και μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης.



Γράφημα 4.2.3.11. Ποσοστό ανθεκτικότητας στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά (αμπικιλίνη τετρακυκλίνη ερυθρομυκίνη και σιπροφλοξασίνη), στην εγκατάσταση της Άντισσας, πριν και μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης (α) 15 Ct (mg Cl₂ min/L), (β) 20 Ct (mg Cl₂ min/L)..

Όπως παρουσιάζεται και στους Πίνακες 7.2.2.9. και 7.2.2.10. (Παράρτημα), όσον αφορά τα δείγματα της Ψυτάλειας παρατηρείται αύξηση του ποσοστού ανθεκτικότητας μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης για 35 mg Cl₂ min/L για το αντιβιοτικό της αμπικιλίνης, της ερυθρομυκίνης και της σιπροφλοξασίνης. Αντίστοιχα στα 50 mg Cl₂ min/L παρατηρείται αύξηση στο ποσοστό ανθεκτικότητας της σιπροφλοξασίνης. Για 30 mg Cl₂ min/L παρατηρείται αύξηση ανθεκτικότητας της ερυθρομυκίνης. Στο δείγμα από την Άντισσα, για 20 mg Cl₂ min/L δεν παρατηρήθηκε αύξηση του ποσοστού ανθεκτικότητας σε κανένα αντιβιοτικό, αφού υπήρξε πλήρης απομάκρυνση. Αντίθετα, στα 15 mg Cl₂ min/L παρατηρήθηκε μικρή αύξηση του ποσοστού της αμπικιλίνης και μεγαλύτερη αύξηση του ποσοστού της σιπροφλοξασίνης. Στα υπόλοιπα δείγματα το ποσοστό ανθεκτικότητας, μειώθηκε μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης.

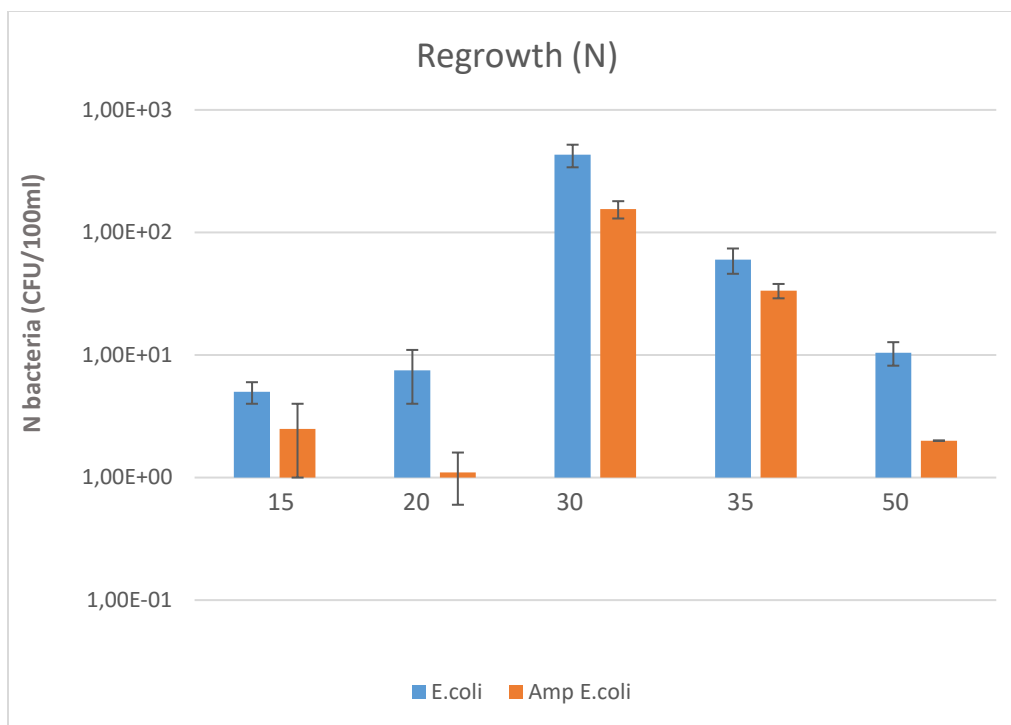
Έρευνα των Turolla et al., παρουσίασε τα υψηλά ποσοστά ανθεκτικότητας που εμφάνισαν οι πληθυσμοί *E. Coli* για το αντιβιοτικό της αμπικιλίνης από 20 έως 47%. Επιπλέον σημειώνεται

ότι δεν ανιχνεύθηκε ποσοστό ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη (Turolla et al., 2017). Σε παγκόσμιες έρευνες, έχει υπολογιστεί ότι η ανθεκτικότητα των βακτηρίων αυξάνεται μετά τη χλωρίωση (Liu et al., 2018; Xu et al., 2016; Lin et al., 2016) καθώς οι τιμές των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά γονιδίων που μετρούνται είναι μεγαλύτερες μετά την απολύμανση. Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε εγκατάσταση επεξεργασίας λυμάτων, βρέθηκε ότι μετά την διαδικασία της απολύμανσης με χλωρίωση, οι αφθονίες των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά γονιδίων αυξήθηκαν για τα αντιβιοτικά των κατηγοριών β-λακτάμης και τετρακυκλίνης (Wang et al., 2023). Ακόμα μια έρευνα από τις ΗΠΑ, παρουσίασαν ότι η αφθονία ανθεκτικών γονιδίων στα ανεπεξέργαστα λύματα εμφάνισε ίδιες τιμές με την αφθονία στα τριτοβάθμια επεξεργασμένα λύματα, για το αντιβιοτικό της τετρακυκλίνης (Auerbach et al., 2007; Dodd, 2012).

Σημειώνεται ότι σε έρευνα των Huang et al., τα ανθεκτικά βακτήρια αποτελούσαν το 100% του συνολικού πληθυσμού των βακτηρίων που ανιχνευθήκαν σε χλωριωμένα δείγματα (10 mg Cl₂/L με χρόνο επαφής 10min), σε αντίθεση με το 78% που αποτελούσαν πριν τη διαδικασία της χλωρίωσης. Από τα αποτελέσματα αυτά, θεωρείται ότι η χλωρίωση ενισχύει την επιλεκτικότητα των ανθεκτικών βακτηρίων, και ως αποτέλεσμα πραγματοποιήθηκε αύξηση των ανθεκτικών βακτηρίων στην αμπικιλίνη (με δόση 2.0 mg Cl₂/L και χρόνο επαφής 10 min) έως και 50% (Huang et al., 2011). Ακόμα και σε παλαιότερες έρευνες, έχει παρατηρηθεί η ανακαλλιέργεια των ανθεκτικών βακτηρίων μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης (Murray et al., 1984). Συγκεκριμένα το 88% των βακτηρίων που εξετάστηκαν, παρουσίασαν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά της αμπικιλίνης και της τετρακυκλίνης, και μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης (Murray et al., 1984). Τέλος, σημειώνεται ότι έρευνα των Al-Jassim et al., όπου μελέτησε τους κινδύνους που μπορεί να επιφέρει η επαναχρησιμοποίηση λυμάτων, παρουσίασε την αύξηση των ανθεκτικών σε 6 αντιβιοτικά βακτηρίων από 3.8% στα ανεπεξέργαστα λύματα, σε 6.9% στα χλωριωμένα επεξεργασμένα λύματα (Al-Jassim et al., 2015).

4.2.4. Πείραμα Regrowth

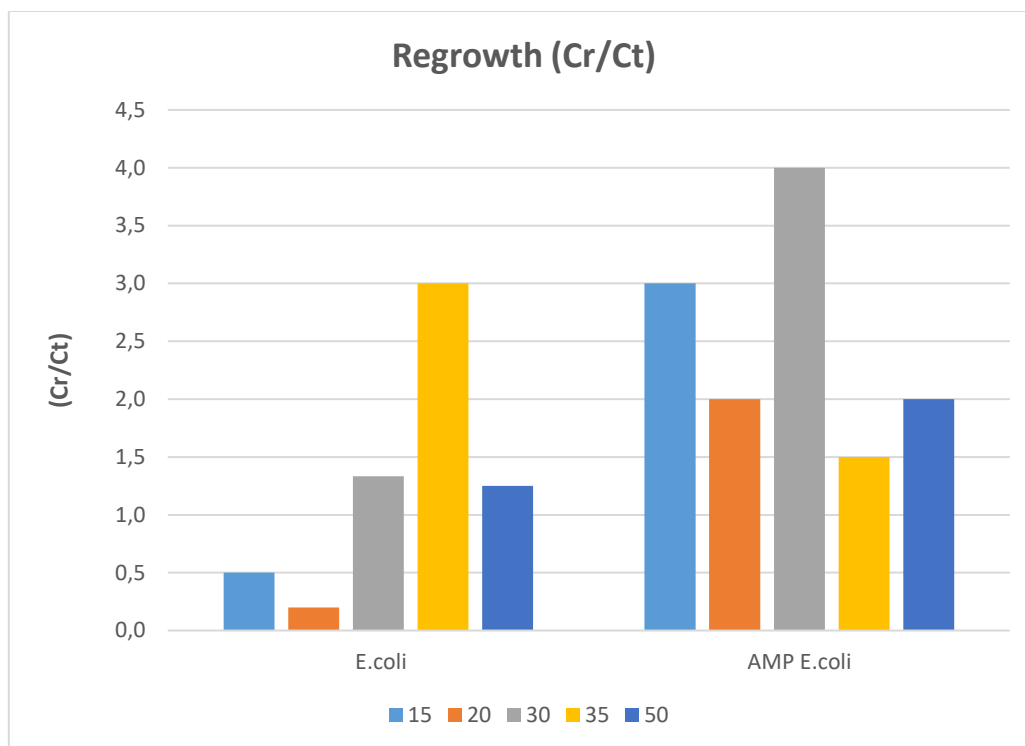
Για την κατανόηση της δράσης των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων, πραγματοποιήθηκε πείραμα Regrowth, και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο ακόλουθο Γράφημα. Αναλυτικότερα, παρουσιάζονται οι πληθυσμοί από την ανακαλλιέργεια που πραγματοποιήθηκε για δείγματα *E.coli* (control) και *E.coli* με υπόστρωμα αμπικιλίνης (AMP).



Γράφημα 4.2.4.1. Πλήθος *E.coli* και ανθεκτικών *E.coli* στο αντιβιοτικό της αμπικιλίνης μετά το πείραμα της ανακαλλιέργειας για τα εξεταζόμενα Ct (mg Cl₂ min/L).

Όπως παρουσιάζεται στο Γράφημα 4.2.4.1. και στον Πίνακα 7.2.3.1. (Παράρτημα), Οι μεγαλύτεροι πληθυσμοί των βακτηρίων ανιχνεύθηκαν στο δείγμα που εξετάστηκε με Ct 30 (mg/ L min). Αντίστοιχα οι μικρότεροι πληθυσμοί ανιχνεύθηκαν στα δείγματα που εξετάστηκαν με Ct 50 (mg/ L min) για την εγκατάσταση της Ψυττάλειας και Ct 15 (mg/ L min) για την εγκατάσταση της Άντισσας.

Στον Πίνακα 7.2.3.2. (Παράρτημα) παρουσιάζεται η ανακαλλιέργεια που πραγματοποιήθηκε στα δείγματα, σε όλα τα εξεταζόμενα Ct (mg/ L min). Σημειώνεται ότι ανακαλλιέργεια των βακτηρίων πραγματοποιείται, όταν ο λόγος Cr/Ct, είναι >1. Έτσι, από τα παραπάνω προκύπτει το ακόλουθο Γράφημα 4.2.4.2.



Γράφημα 4.2.4.2. Λόγος ανακαλλιέργειας Cr/Ct *E.coli* και ανθεκτικών στην αμπικιλίνη *E.coli*, που υπολογίστηκε στα εξεταζόμενα δείγματα.

Από το παραπάνω Γράφημα 4.2.4.2., προκύπτει ότι η μικρότερη ανακαλλιέργεια συγκριτικά με όλα τα δείγματα που εξετάστηκαν παρατηρείται στα *E.coli* χωρίς υπόστρωμα αντιβιοτικού στα δείγματα από την εγκατάσταση της Άντισσας. Αντίθετα, για τα ανθεκτικά βακτήρια στην αμπικιλίνη, παρατηρείται ανακαλλιέργεια των βακτηρίων >1 (3 για το Ct 15 (mg/ L min) και 2 για το για το Ct 20 (mg/ L min)). Σε αντίθεση, στα δείγματα από την εγκατάσταση της Ψυττάλειας παρατηρείται ανακαλλιέργεια, ακόμα και με μικρές τιμές σε όλα τα δείγματα που εξετάστηκαν. Σημειώνεται ότι η μεγαλύτερη τιμή ανιχνεύθηκε στο δείγμα από την εγκατάσταση της Ψυττάλειας με Ct 30 (mg/ L min) για τα βακτήρια που ήταν ανθεκτικά στην αμπικιλίνη. Μεταξύ των *E.coli* και των *E.coli* με υπόστρωμα αμπικιλίνης δεν εμφανίζονται μεγάλες αποκλίσεις στις τιμές, ανά τα εξεταζόμενα Ct (mg/ L min). Άξιο σημείωσης αποτελεί το γεγονός ότι και στις δύο εξεταζόμενες εγκαταστάσεις, η ανακαλλιέργεια των ανθεκτικών βακτηρίων στο αντιβιοτικό της αμπικιλίνης παρουσίασε μεγαλύτερες τιμές του λόγου ανακαλλιέργειας Cr/Ct, συγκριτικά με τα βακτήρια που δεν περιείχαν αντιβιοτικό στο υπόστρωμά τους.

Ειδικότερα, παγκόσμιες έρευνες παρουσιάζουν ότι η χλωρίωση δεν είναι εφικτό να καταστρέψει πλήρως τα ανθεκτικά στα αντιβιοτικά βακτήρια και γονίδια, καθώς σε εργαστηριακά πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί, παρατηρούνται μεγάλα ποσοστά ανακαλλιέργειας των ανθεκτικών βακτηρίων στα αντιβιοτικά (Pillay and Olanirano, 2016; Anthony et al., 2020). Ακόμα

και σε παλαιότερη έρευνα των Murray et al., είχε ανιχνευθεί ανακαλλιέργεια των ανθεκτικών *E.coli* στα αντιβιοτικά της αμπικιλίνης και της τετρακυκλίνης, με ποσοστά εμφάνισης ανακαλλιέργειας έως 88% (Murray et al., 1984). Συγκεκριμένα, έρευνα των Fiorentino et al., παρουσιάζει την απομάκρυνση που επιτυγχάνει η μέθοδος της χλωρίωσης αλλά τα μειονεκτήματά της όσον αφορά την ανακαλλιέργεια – regrowth που πραγματοποιείται με 0.2 mg/L υπολειμματικό χλώριο και χρόνο επαφής 15 min, άρα Ct 30 mg Cl₂ min/L (Fiorentino et al., 2015). Αντίστοιχα, έρευνα των Huang et al., ανέλυσε την απομάκρυνση που επιτυγχάνεται μέσω της χλωρίωσης αλλά την ανακαλλιέργεια που είναι εφικτό να πραγματοποιηθεί μετέπειτα καθώς, παρατήρησε ανακαλλιέργεια των βακτηρίων όταν η αρχική δόση χλωρίου ήταν μικρότερη από 2 mg Cl₂ L⁻¹ και ο χρόνος επαφής 10 min (Huang et al., 2013).

Επιπλέον, σημειώνεται ότι σε έρευνα των Shi et al., μετά από 48 h αποθήκευσης των χλωριωμένων δειγμάτων (με εξεταζόμενες δόσεις χλωρίου 5, 10, 20 και 50 mg/L), σημειώθηκε ανακαλλιέργεια των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων (Shi et al., 2022). Άλλες μέθοδοι απολύμανσης όπως η μέθοδος οξειδωσης Fenton εμφανίζουν μείωση της παρουσίας των ανθεκτικών βακτηρίων, θέτοντας, τις μεθόδους αυτές προς περαιτέρω διερεύνηση (Shi et al., 2022). Έρευνα των Iakovides et al., παρουσίασε ότι η ανακαλλιέργεια βακτηρίων παύει να πραγματοποιείται κατά την απολύμανση με όζον σε μεγάλες δόσεις (Iakovides et al., 2019). Συμπερασματικά, η ανακαλλιέργεια των ανθεκτικών βακτηρίων στα δευτεροβάθμια επεξεργασμένα λύματα, κατόπιν της διαδικασίας της χλωρίωσης, θα μπορούσε να επιφέρει κινδύνους στην δημόσια υγεία και το περιβάλλον μέσω της επαναχρησιμοποίησής τους (Huang et al., 2011).

Τέλος, σημειώνεται ότι σε παγκόσμιες έρευνες, παρατηρείται ανακαλλιέργεια των ανθεκτικών βακτηρίων στα αντιβιοτικά της κατηγορίας των β-λακταμών καθώς, τα αντιβιοτικά αυτά έχουν μεγαλύτερη χρονική παρουσία και άρα διευρυμένη χρήση (Osińska et al., 2020). Αντίστοιχα, τα ποσοστά για τα αντιβιοτικά της τετρακυκλίνης και της σιπροφλοξασίνης παρουσιάζουν μικρότερες τιμές ανακαλλιέργειας έως 3% (Yuan et al., 2015).

5. Συμπεράσματα

Η παρούσα εργασία παρουσιάζει την εμφάνιση ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων, σε δείγματα λυμάτων και ερευνά τις προσπάθειες για τη μείωση του μολυσματικού φορτίου μέσω της απολύμανσης σε δύο εξεταζόμενες εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων. Με σκοπό την κατανόηση της μεταφοράς των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων στις εγκαταστάσεις, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις κατά τα στάδια επεξεργασίας. Επιπλέον, για την αποτύπωση της τύχης των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων στο περιβάλλον, πραγματοποιήθηκε πείραμα Regrowth.

Αναλυτικότερα, όσον αφορά το πλήθος των ολικών κολοβακτηριδίων στην είσοδο των εγκαταστάσεων δεν εμφανίζονται διαφορές. Η επεξεργασία μέσω του αναερόβιου συστήματος UASB στην εγκατάσταση της Άντισσας παρουσιάζει απομάκρυνση, σε αντίθεση με την πρωτοβάθμια καθίζηση της Ψυττάλειας. Σημειώνεται ότι, παρατηρείται παρόμοια απομάκρυνση μεταξύ των σταδίων των δύο συστημάτων, ιδίως όσον αφορά τη δευτεροβάθμια επεξεργασία στην εγκατάσταση της Ψυττάλειας και τον τεχνητό υγροβιότοπο της Άντισσας. Επιπλέον, παρατηρείται υψηλότερη έξοδος της Ψυττάλειας σε πλήθος ολικών κολοβακτηριδίων, ενώ η εγκατάσταση της Άντισσας εμφανίζει καλύτερη απομάκρυνση ως συνολικό σύστημα. Για τα δείγματα της Ψυττάλειας, επιτυγχάνεται απομάκρυνση κατά 2,3 log και για τα δείγματα της Άντισσας 3,1 log. Αναλυτικότερα, για τα δείγματα της Ψυττάλειας παρατηρείται 99,4% συνολική απομάκρυνση ολικών κολοβακτηριδίων από την εγκατάσταση. Αντίστοιχα για τα δείγματα της Άντισσας, παρατηρείται απομάκρυνση 99,9%, συνολικά στα στάδια της εγκατάστασης, λόγω των δύο σταδίων που επιτυγχάνουν απομάκρυνση και την τριτοβάθμια επεξεργασία που επιτυγχάνεται με τα δύο στάδια των υγροβιοτόπων.

Σημειώνεται πως και στις δύο εγκαταστάσεις οι πληθυσμοί *E.coli* ήταν μικρότεροι, ως αναμενόμενο από τους πληθυσμούς ολικών κολοβακτηριδίων. Ειδικότερα, για το σύστημα της Άντισσας, στην είσοδο της εγκατάστασης το 52% των ολικών κολοβακτηριδίων, άνηκε στο είδος *E.coli*, ενώ στην έξοδο της εγκατάστασης αποτελούσε το 11% του πληθυσμού. Στην εγκατάσταση της Ψυττάλειας οι αντίστοιχες τιμές παρουσίασαν μικρότερη διακύμανση με την είσοδο να αποτελεί το 28% και την έξοδο το 40%. Αντίστοιχα, παρατηρούνται παρόμοιες μετρήσεις απομάκρυνσης πληθυσμών *E.coli*, συγκριτικά με τις μετρήσεις των ολικών κολοβακτηριδίων στα στάδια των εγκαταστάσεων. Εξίσου πανομοιότυπες μετρήσεις μεταξύ των εισόδων των δύο εγκαταστάσεων με ελάχιστα μεγαλύτερες τιμές να παρατηρούνται στην εγκατάσταση της Άντισσας. Επίσης άξιο σημείωσης αποτελεί, η μεγαλύτερη απομάκρυνση που επιτυγχάνει το αναερόβιο σύστημα UASB, συγκριτικά με την 1^η επεξεργασία. Επίσης, παρόμοια και ελάχιστα μεγαλύτερη απομάκρυνση παρατηρείται στον υγροβιότοπο, συγκριτικά με την 2^η επεξεργασία. Συνολικά παρατηρείται μεγαλύτερη απομάκρυνση στο σύστημα της Άντισσας καθώς διαθέτει δύο στάδια βιολογικής επεξεργασίας που επιτυγχάνουν απομάκρυνση, συγκριτικά με τη Ψυττάλεια που διαθέτει ένα σύστημα, αυτό της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας να επιτυγχάνει απομάκρυνση.

Όσον αφορά τους πληθυσμούς *E.coli* που εμφάνιζαν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά κατά τα στάδια επεξεργασίας των εγκαταστάσεων, παρουσίασαν παρόμοια αποτελέσματα με τις μετρήσεις των *E.coli* της ομάδας ελέγχου. Οι τιμές μεταξύ των ολικών *E.coli* αλλά και των ανθεκτικών *E.coli* στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά, κατά τα στάδια επεξεργασίας, δεν επηρεάζονται και είναι πανομοιότυπες. Παρατηρείται ότι οι πληθυσμοί των ανθεκτικών *E.coli* βακτηρίων είναι εμφανώς μικρότεροι από τους πληθυσμούς *E.coli* που δεν περιείχαν αντιβιοτικό στο υπόστρωμά τους. Αναλυτικότερα, παρατηρείται μεγαλύτερη απομάκρυνση στο UASB από την 1^α επεξεργασία, όπως και παρόμοια απομάκρυνση του υδροβιότοπου συγκριτικά με την 2^α επεξεργασία. Τέλος, παρατηρείται μεγαλύτερη απομάκρυνση στο σύστημα της Άντισσας. Η απομάκρυνση που επιτυγχάνει η δευτεροβάθμια επεξεργασία της Ψυττάλειας, είναι 2-3 log, ενώ δεν παρατηρείται απομάκρυνση κατά την πρωτοβάθμια επεξεργασία. Όσον αφορά το σύστημα της Άντισσας, παρατηρείται απομάκρυνση 0,8-1,3 log, στο σύστημα UASB και μεγαλύτερη απομάκρυνση στον τεχνητό υδροβιότοπο με 2,3-3,3 log. Όσον αφορά τη λογαριθμική μείωση των *E.coli*, στα δείγματα των εξεταζόμενων εγκαταστάσεων, λαμβάνοντας υπόψη τη συνολική απομάκρυνση που πραγματοποιεί η κάθε εγκατάσταση υπολογίστηκε ότι η εγκατάσταση της Ψυττάλειας απομακρύνει συνολικά 1,99 – 3,05 log, επιτυγχάνοντας απομάκρυνση 98,9 – 100 %. Αντίστοιχα στην εγκατάσταση της Άντισσας, μετρήθηκε απομάκρυνση 2,98 – 4,53 log με ποσοστιαία απομάκρυνση 99,8 – 100%, λόγω των δύο σταδίων που επιτυγχάνουν απομάκρυνση, συγκριτικά με το ένα στάδιο στην εγκατάσταση της Ψυττάλειας.

Όσον αφορά τα αντιβιοτικά και τη δράση τους και με σκοπό την κατανόηση και την εύρεση του ποσοστού δράσης των εξεταζόμενων αντιβιοτικών κατά τα στάδια των εγκαταστάσεων, προκύπτει ότι τα αντιβιοτικά με τη μεγαλύτερη εμφάνιση ανθεκτικότητας είναι η ερυθρομυκίνη, η αμπικιλίνη και η αμοξικιλίνη. Αντίθετα, τα αντιβιοτικά με τα μικρότερα ποσοστά ανθεκτικότητας είναι η τετρακυκλίνη και η σιπροφλοξασίνη. Στα δείγματα της Ψυττάλειας κατά τα στάδια επεξεργασίας τα ποσοστά μειώνονταν. Στα δείγματα της Άντισσας όμως, μόνο το ένα δείγμα ακολούθησε αυτή τη μείωση, καθώς άξιο σημείωσης αποτελεί το γεγονός ότι στο δεύτερο δείγμα, τα βακτήρια παρουσίασαν αύξηση του ποσοστού ανθεκτικότητας με χαρακτηριστικό παράδειγμα την ερυθρομυκίνη (από 13% στο 49%) και την αμοξικιλίνη (από 10% στο 16%), ενώ παρατηρούνται παρόμοιες τιμές για την τετρακυκλίνη, την αμπικιλίνη και τη σιπροφλοξασίνη, παρουσιάζοντας τις ποικίλες δυνατότητες εμφάνισης των ανθεκτικών βακτηρίων σε διαφορετικά εξεταζόμενα αντιβιοτικά.

Στα εξεταζόμενα δείγματα, αναλύθηκαν οι παράμετροι COD (mg/l), TSS (mg/l), Fe²⁺ (mg/l), NH₄⁺-N (mg/l), θολότητα (NTU), T (°C), pH (πριν και μετά τη χλωρίωση), DO(mg/l) (πριν και μετά τη χλωρίωση). Οι μετρούμενες τιμές δεν εμφάνισαν ιδιαίτερες αυξομειώσεις και επιπλέον, σημειώνεται ότι οι μετρήσεις των ουσιών που επηρεάζουν την ανάπτυξη οργανισμών, την κατανάλωση χλωρίου (οργανικό φορτίο, διαλυμένο οξυγόνο, pH), αλλά και οι ουσίες που επηρεάζουν τη μεταφορά ανθεκτικότητας (Fe), δεν παρουσίασαν ακραίες τιμές. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 7 δειγματοληψίες, εκ των οποίων οι 5 αφορούσαν δείγματα πειραμάτων και οι 2 προπειραμάτων από την εγκατάσταση της Ψυττάλειας. Συγκεκριμένα, στα πειράματα, για την

εγκατάσταση της Ψυττάλειας τα εξεταζόμενα Ct ήταν 30, 35, 50 (mg Cl₂ min/L) και ακόμα 2 δείγματα από την εγκατάσταση της Άντισσας με εξεταζόμενα Ct 15, 20 (mg Cl₂ min/L), με τις τιμές του χρόνου επαφής και του υπολειμματικού χλωρίου, να εμπίπτουν στα όρια των νομοθεσιών για επαναχρησιμοποίηση λυμάτων.

Όσον αφορά τη λογαριθμική μείωση που παρατηρείται ανάμεσα στους πληθυσμούς των ολικών κολοβακτηριδίων λόγω της διαδικασίας της χλωρίωσης, στα εξεταζόμενα δείγματα, παρατηρείται πως οι τιμές ποικίλουν από 1,4 έως 3,3 log. Η συνολική εικόνα του πλήθους των ολικών κολοβακτηριδίων, παρουσιάζει σταδιακή μείωση με την αντίστοιχη μείωση του εξεταζόμενου Ct (mg Cl₂ min/L). Όσον αφορά την ομάδα control *E.coli*, στα δείγματα που αναλύθηκαν, στη λογαριθμική απεικόνιση πριν τη διαδικασία της χλωρίωσης παρατηρούνται παρόμοιες μετρήσεις συγκριτικά με τις μετρήσεις των ολικών κολοβακτηριδίων στα στάδια των εγκαταστάσεων. Σημειώνεται ότι η αύξηση του Ct (mg Cl₂ min/L), προκαλεί αύξηση της απομάκρυνσης του πληθυσμού *E.coli*, καθώς η χλωρίωση αποτελεί κύρια μέθοδο απολύμανσης με σκοπό την καταστροφή των βακτηρίων.

Για την εγκατάσταση της Άντισσας, παρατηρείται ότι με Ct 20 mg Cl₂ min/L επιτυγχάνεται πλήρης απομάκρυνση των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων και αντίστοιχα για την εγκατάσταση της Ψυττάλειας η απομάκρυνση είναι εμφανής στο Ct 50 mg Cl₂ min/L, σε συμφωνία με παγκόσμιες έρευνες που παρουσιάζουν τη μείωση των ανθεκτικών βακτηρίων μέσω της διαδικασίας της χλωρίωσης. Σημειώνεται ότι η αρχική δόση για το Ct 20 mg Cl₂ min/L ήταν 1,5 mg/l με χρόνο παραμονής 30 min και αντίστοιχα για το Ct 50 mg Cl₂ min/L, η αρχική δόση ήταν 3 mg/l με χρόνο παραμονής 30 min. Στα δείγματα από την εγκατάσταση της Άντισσας παρατηρείται, πλήρης απομάκρυνση για τα ανθεκτικά στα αντιβιοτικά βακτήρια στο πείραμα με Ct 20 mg Cl₂ min/L και 3 log για τα βακτήρια *E.coli* της ομάδας control. Σημειώνεται, ότι στο δείγμα με Ct 15 mg Cl₂ min/L, παρατηρείται πλήρης απομάκρυνση για το αντιβιοτικό τετρακυκλίνη. Όσον αφορά τα δείγματα από την εγκατάσταση της Ψυττάλειας, παρατηρήθηκε πλήρης απομάκρυνση για τα ανθεκτικά βακτήρια αντιβιοτικό τετρακυκλίνη στα Ct 50 και 30 mg Cl₂ min/L. Επιπλέον, όπως προκύπτει από τις εξισώσεις που παρουσιάζονται στους ρυθμούς μείωσης K, παρατηρούνται μεγαλύτερες τιμές για τα *E.coli* που εμφάνισαν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό της ερυθρομυκίνης και τις αμπικιλλίνης, παρουσιάζοντας με τον τρόπο αυτό, μεγαλύτερη απομάκρυνση κατά τη διαδικασία της χλωρίωσης. Ακολουθούν τα *E.coli* που δεν περιείχαν αντιβιοτικό στο υπόστρωμά τους και τα *E.coli* που εμφάνισαν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό της σιπροφλοξασίνης με την μικρότερη τιμή, παρουσιάζοντας την ποικιλομορφία που εμφανίζουν τα ανθεκτικά βακτήρια σε διαφορετικά εξεταζόμενα αντιβιοτικά.

Με σκοπό την κατανόηση της ανθεκτικότητας των βακτηρίων στα αντιβιοτικά, υπολογίστηκε το ποσοστό ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά που εμφάνισαν τα βακτήρια *E.coli* πριν και μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης. Σημειώνεται ότι στο δείγμα με Ct 50 mg Cl₂ min/L, μετρήθηκε μεγαλύτερο ποσοστό ανθεκτικότητας των *E.coli* στο υπόστρωμα σιπροφλοξασίνης, μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης, σε συμφωνία με παγκόσμιες έρευνες που παρουσιάζουν ότι η απολύμανση μέσω χλωρίωσης δρα επιλεκτικά, επιτρέποντας στα ανθεκτικά βακτήρια την

επιβίωσή τους. Επιπλέον παρατηρείται ότι για το Ct 20 mg Cl₂ min/L, πραγματοποιήθηκε πλήρης απομάκρυνση των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων, χωρίς αύξηση της εμφάνισης ανθεκτικότητας. Για την κατανόηση της δράσης των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων, πραγματοποιήθηκε πείραμα Regrowth. Αναλυτικότερα, πραγματοποιήθηκε ανάλυση για δείγματα *E.coli* (control) και *E.coli* με υπόστρωμα αμπικιλλίνης (AMP). Από την ανάλυση παρατηρείται αναγέννηση των βακτηρίων σε δείγματα από την εγκατάσταση της Ψυττάλειας, σε αντίθεση με τα δείγματα από την εγκατάσταση της Άντισσας που δεν παρατηρείται αναγέννηση των *E.coli* χωρίς υπόστρωμα. Σημειώνεται ότι ανακαλλιέργεια παρατηρήθηκε σε όλα τα δείγματα των *E.coli* με υπόστρωμα αμπικιλλίνης και από τις δύο εξεταζόμενες εγκαταστάσεις, χωρίς να εμφανίζονται μεγάλες αποκλίσεις στις τιμές, ενισχύοντας με τον τρόπο αυτό την ανάγκη για περαιτέρω έρευνα της μεταφοράς τους στο περιβάλλον.

Συμπερασματικά, σημειώθηκε επιτυχής απομάκρυνση των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων στις δύο εξεταζόμενες εγκαταστάσεις, με την επεξεργασία της Άντισσας, να υπερσχύει, πραγματοποιώντας μεγαλύτερη απομάκρυνση, λόγω του διπλού βιολογικού συστήματος που διαθέτει (UASB και τεχνητό υγροβιότοπο) και την τριτοβάθμια επεξεργασία που επιτυγχάνεται με τα δύο στάδια των υγροβιοτόπων. Σε αντίθεση, η επεξεργασία μέσω φυσικών και βιολογικών διεργασιών της Ψυττάλειας (1^α δεξαμενή καθίζησης και σύστημα 2^α επεξεργασίας με βιολογικό αντιδραστήρα) παρουσίασε μικρότερη απομάκρυνση καθώς το στάδιο της 1^α επεξεργασίας με καθίζηση στερεών μέσω βαρύτητας, δεν εμφάνισε δυνατότητα απομάκρυνσης των βακτηρίων. Επιπλέον, στα δείγματα της Ψυττάλειας χρειάστηκε μεγαλύτερο Ct (50 mg Cl₂ min/L) για πλήρη εξουδετέρωση των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων, συγκριτικά με αυτό των επεξεργασμένων λυμάτων από την εγκατάσταση της Άντισσας (20 mg Cl₂ min/L). Το υπολειμματικό χλώριο που μετρήθηκε, εμπίπτει στα όρια της νομοθεσίας, όπως και οι τιμές του πλήθους των *E.coli*, οπότε κρίνεται εφικτή η χρήση για περιορισμένη άρδευση. Σημειώνεται ότι οι τιμές των πληθυσμών *E.coli* για το Ct (50 mg Cl₂ min/L), εμπίπτουν και στα όρια της Ευρωπαϊκής νομοθεσίας, όπως και οι τιμές των γενικών παραμέτρων των δειγμάτων. Τέλος, άξιο σημείωσης αποτελεί το γεγονός ότι και στις δύο εξεταζόμενες εγκαταστάσεις, παρατηρήθηκε ανακαλλιέργεια των ανθεκτικών βακτηρίων στο αντιβιοτικό της αμπικιλλίνης, σε συμφωνία με παγκόσμιες έρευνες όπου παρουσιάζουν ότι η χλωρίωση δεν είναι εφικτό να καταστρέψει πλήρως τα ανθεκτικά στα αντιβιοτικά βακτήρια και γονίδια.

Εν κατακλείδι, αναγκαία κρίνεται η διερεύνηση της καταστροφής των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων και των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά γονιδίων στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων, συμπληρωματικά της υφιστάμενης προσέγγισης που βασίζεται στους δείκτες παθογένειας. Ως εκ τούτου, η αντιμετώπιση της κρίσης που εμφανίζει η ανθεκτικότητα των βακτηρίων στο περιβάλλον και τον άνθρωπο, είναι μια πολύπλοκη διαδικασία, αλλά, είναι προφανές ότι η έρευνα για την αντιμετώπισή της ξεκινά από την ανίχνευση της παρουσίας και μεταφοράς των ανθεκτικών βακτηρίων και γονιδίων στο περιβάλλον, καθώς και από τη δυνατότητα αναγέννησής τους στο περιβάλλον. Σημειώνεται ότι υφίσταται ανάγκη για περαιτέρω έρευνα, στα εναλλακτικά συστήματα επεξεργασίας λυμάτων, όπως οι υγροβιότοποι, καθώς

αποτελούν αποτελεσματική και οικονομική λύση που προσομοιάζει φυσικά οικοσυστήματα, και μέσω της επαναχρησιμοποίησης συνεισφέρουν στην κυκλική οικονομία και τη βιώσιμη ανάπτυξη, ως πράσινα συστήματα επεξεργασίας. Επίσης, υφίσταται ανάγκη για μελλοντική έρευνα όσον αφορά i) τις μεθόδους αποτελεσματικής απομάκρυνσης των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων και γονιδίων από τις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων και ii) την ανάλυση επικινδυνότητας που ενέχει η παρουσία τους στα επεξεργασμένα λύματα.

6. Βιβλιογραφία

Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

- Acero, J.L.; Benitez, F.J.; Leal, A.I.; Real, F.J.; Teva, F. Membrane Filtration Technologies Applied to Municipal Secondary Effluents for Potential Reuse. *J. Hazard. Mater.* 2010, 177, 390–398
- Aghalari, Z., Dahms, H. U., Sillanpää, M., Sosa-Hernandez, J. E., & Parra-Saldívar, R. (2020). Effectiveness of wastewater treatment systems in removing microbial agents: a systematic review. *Globalization and health*, 16, 1-11.
- Al-Jassim, N., Ansari, M. I., Harb, M., & Hong, P.-Y. (2015). Removal of bacterial contaminants and antibiotic resistance genes by conventional wastewater treatment processes in Saudi Arabia: Is the treated wastewater safe to reuse for agricultural irrigation? *Water Research*, 73, 277–290. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.01.036>
- Alam MU, Ferdous S, Ercumen A, Lin A, Kamal A, Luies SK, Sharior F, Khan R, Rahman MZ, Parvez SM, Amin N, Tadesse BT, Moushomi NA, Hasan R, Taneja N, Islam MA, Rahman M. Effective Treatment Strategies for the Removal of Antibiotic-Resistant Bacteria, Antibiotic-Resistance Genes, and Antibiotic Residues in the Effluent From Wastewater Treatment Plants Receiving Municipal, Hospital, and Domestic Wastewater: Protocol for a Systematic Review. *JMIR Res Protoc.* 2021 Nov 26;10(11):e33365. doi: 10.2196/33365. PMID: 34842550; PMCID: PMC8665387.
- Alexander, J., Knopp, G., Dötsch, A., Wieland, A., & Schwartz, T. (2016). Ozone treatment of conditioned wastewater selects antibiotic resistance genes, opportunistic bacteria, and induce strong population shifts. *Science of the Total Environment*, 559, 103-112.
- Almeida, C. M., Santos, F., Ferreira, A. C., Gomes, C. R., Basto, M. C., & Mucha, A. P. (2017). Constructed wetlands for the removal of metals from livestock wastewater – can the presence of veterinary antibiotics affect removals? *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 137, 143–148. doi:10.1016/j.ecoenv.2016.11.021
- Andrews J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 48 Suppl 1, 5–16. https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl_1.5
- Armstrong JL, Calomiris JJ, Seidler RJ. Selection of antibiotic-resistant standard plate count bacteria during water treatment. *Appl Environ Microb.* 1982; 44: 308–316.

- Aydin, S., Aydin, M. E., Ulvi, A., & Kilic, H. (2018). Antibiotics in hospital effluents: Occurrence, contribution to urban wastewater, removal in a wastewater treatment plant, and environmental risk assessment. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(1), 544–558. doi:10.1007/s11356-018-3563-0
- Azanu D, Styrihave B, Darko G, Weisser JJ, Abaidoo RC. Occurrence and risk assessment of antibiotics in water and lettuce in Ghana. *Sci Total Environ*. 2018;622–623:293–305. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.11.287.
- Baba, H., Nishiyama, M., Watanabe, T., & Kanamori, H. (2022). Review of Antimicrobial Resistance in Wastewater in Japan: Current Challenges and Future Perspectives. *Antibiotics*, Volume 11(7). doi:10.3390/antibiotics11070849
- Baker, K.S., Dallman, T.J., Field, N. et al. Horizontal antimicrobial resistance transfer drives epidemics of multiple *Shigella* species. *Nat Commun* 9, 1462 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03949-8>
- Bali, M.; Tlili, H. Removal of Heavy Metals from Wastewater Using Infiltration-Percolation Process and Adsorption on Activated Carbon. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 2019, 16, 249–258.
- Balogun, S., & Ogwueleka, T. C. (2021). Coliforms removal efficiency of WUPA Wastewater Treatment Plant, Abuja, Nigeria. *Energy Nexus*, 4, 100024. <https://doi.org/10.1016/j.nexus.2021.100024>
- Barrios-Hernández, M. L., Pronk, M., Garcia, H., Boersma, A., Brdjanovic, D., van Loosdrecht, M. C. M., & Hooijmans, C. M. (2020). Removal of bacterial and viral indicator organisms in full-scale aerobic granular sludge and conventional activated sludge systems. *Water Research* X, 6, 100040. <https://doi.org/10.1016/j.wroa.2019.100040>
- Bayles KW. The biological role of death and lysis in biofilm development. *Nat Rev Microbiol*. 2007;5:721–6.
- Ben, Y., Fu, C., Hu, M., Liu, L., Wong, M. H., & Zheng, C. (2019). Human health risk assessment of antibiotic resistance associated with antibiotic residues in the environment: A Review. *Environmental Research*, 169, 483–493. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.11.040>
- Ben W, Wang J, Cao R, Yang M, Zhang Y, Qiang Z. Distribution of antibiotic resistance in the effluents of ten municipal wastewater treatment plants in China and the effect of treatment processes. *Chemosphere*. 2017 Apr;172:392-398. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.01.041. Epub 2017 Jan 6. PMID: 28088530.

- Bernharthorton, C., Willis, J., Raje, H., & Boopathy, R. (2023). Effect of a natural wetland on the removal of antibiotics and antibiotic resistant bacteria in a treated sewage treatment effluent. *Bioresource Technology Reports*, 23, 101558. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2023.101558>
- Biswas, A., & Chakraborty, S. (2023). Organics and coliform removal from low strength domestic wastewater using integrated constructed wetland – microbial fuel cell reactor with bioelectricity generation. *Journal of Cleaner Production*, 408, 137204. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2023.137204>
- Bobate, S., Mahalle, S., Dafale, N. A., & Bajaj, A. (2023). Emergence of environmental antibiotic resistance: Mechanism, monitoring and Management. *Environmental Advances*, 13, 100409. doi:10.1016/j.envadv.2023.100409
- Bondarczuk, K., & Piotrowska-Seget, Z. (2019). Microbial diversity and antibiotic resistance in a final effluent-receiving lake. *Science of The Total Environment*, 650, 2951-2961.
- Bôto, M. L., Dias, S. M., Crespo, R. D., Mucha, A. P., & Almeida, C. M. (2023). Removing chemical and biological pollutants from swine wastewater through constructed wetlands aiming reclaimed water reuse. *Journal of Environmental Management*, 326, 116642. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.116642>
- Bôto, M., Almeida, C., & Mucha, A. (2016). Potential of constructed wetlands for removal of antibiotics from saline aquaculture effluents. *Water*, 8(10), 465. doi:10.3390/w8100465
- Bouki C, Venieri D, Diamadopoulos E. Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: A review. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2013; 91: 1–9. 10.1016/j.ecoenv.2013.01.016
- Brienza, M., Sauvêtre, A., Ait-Mouheb, N., Bru-Adan, V., Coviello, D., Lequette, K., Patureau, D., Chiron, S., & Wéry, N. (2022). Reclaimed wastewater reuse in irrigation: Role of biofilms in the fate of antibiotics and spread of antimicrobial resistance. *Water Research*, 221, 118830. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.118830>
- Bydalek, F., Webster, G., Barden, R., Weightman, A. J., Kasprzyk-Hordern, B., & Wenk, J. (2023). Microplastic biofilm, associated pathogen and antimicrobial resistance dynamics through a wastewater treatment process incorporating a constructed wetland. *Water Research*, 235, 119936. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.119936>
- Campusano F., R. E., Abdelhady, R., Guirguis, D., Abdelmalak, S., Shaker, M., & Ray, S. D. (2023). Antimicrobial agents. *Reference Module in Biomedical Sciences*. doi:10.1016/b978-0-12-824315-2.00946-5

- Chen, S., Chen, J., Wang, X., Li, J., Dong, B., & Xu, Z. (2023). Footprints of total coliforms, faecal coliforms and *E. coli* in a wastewater treatment plant and the probabilistic assessment and reduction of *E. coli* infection risks. *Science of The Total Environment*, 900, 165845. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.165845>
- Chen, J., Tong, T., Jiang, X., & Xie, S. (2020). Biodegradation of sulfonamides in both oxic and anoxic zones of vertical flow constructed wetland and the potential degraders. *Environmental Pollution*, 265, 115040. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115040>
- Chen, Z., Min, H., Hu, D., Wang, H., Zhao, Y., Cui, Y., Zou, X., Wu, P., Ge, H., Luo, K., Zhang, L., & Liu, W. (2020). Performance of a novel multiple draft tubes airlift loop membrane bioreactor to treat ampicillin pharmaceutical wastewater under different temperatures. *Chemical Engineering Journal*, 380, 122521. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.122521>
- Chen H., L. Jing, Z. Yao, F. Meng, Y. Teng, Prevalence, source and risk of antibiotic resistance genes in the sediments of Lake Tai (China) deciphered by metagenomic assembly: a comparison with other global lakes. *Environ. Int.*, 127 (2019), pp. 267-275
- Chen, L., Zheng, W., Liu, R., Song, X., Wei, D., Qiu, S., & Zhao, Y. (2016). Treatment of digested piggyery wastewater with a membrane bioreactor. *Environmental Engineering and Management Journal*, 15(10), 2181–2188. <https://doi.org/10.30638/eemj.2016.236>
- Cheng, Y., Lu, J., Fu, S., Wang, S., Senehi, N., & Qingbin Yuan. (2022). Enhanced propagation of intracellular and extracellular antibiotic resistance genes in municipal wastewater by microplastics,. *Environmental Pollution*, Volume 292(Part A). doi:<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118284>.
- Cheng, D., Ngo, H. H., Guo, W., Liu, Y., Chang, S. W., Nguyen, D. D., Nghiem, L. D., Zhou, J., & Ni, B. (2018). Anaerobic membrane bioreactors for antibiotic wastewater treatment: Performance and membrane fouling issues. *Bioresource Technology*, 267, 714–724. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.07.133>
- Chiemchaisri, W., Chiemchaisri, C., Witthayaphirom, C., Mahavee, K., & Watanabe, T. (2023). Surveillance of antibiotic persistence adaptation of emerging antibiotic-resistant bacteria in wastewater treatment processes: Comparison between domestic and hospital wastewaters. *Environmental Technology & Innovation*, 31, 103161. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2023.103161>
- Chukwu, M. N., & Oranu, C. N. (2018). Performance Assessment of Biological Wastewater Treatment at WUPA Wastewater Treatment Plant, Abuja, Nigeria. *Nigerian Journal of Environmental Sciences and Technology (NIJEST)* Vol, 2(1), 46-55.
- CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 30th ed., ISBN 978-1-68440-067-6. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2020.

- Crites, Tchobanoglous (1998). Small and decentralized wastewater management systems, McGraw Hill, International Edition
- Cullen, P.J.; Valdramidis, V.P.; Tiwari, B.K.; Patil, S.; Bourke, P.; O'Donnell, C.P. Ozone Processing for Food Preservation: An Overview on Fruit Juice Treatments. *J. Int. Ozone Assoc.* 2010, 32, 166–179.
- Cycoń M, Mroziak A, Piotrowska-Seget Z. Antibiotics in the soil environment—degradation and their impact on microbial activity and diversity. *Front Microbiol.* 2019;10:338. doi: 10.3389/fmicb.2019.00338.
- Czekalski, N.; Imminger, S.; Salhi, E.; Veljkovic, M.; Kleffel, K.; Drissner, D.; Hammes, F.; Bürgmann, H.; Von Gunten, U. Inactivation of Antibiotic Resistant Bacteria and Resistance Genes by Ozone: From Laboratory Experiments to Full-Scale Wastewater Treatment. *Environ. Sci. Technol.* 2016, 50, 11862–11871.
- Dadgostar, P. (2019). Antimicrobial resistance: Implications and costs. *Infection and Drug Resistance, Volume 12*, 3903–3910. <https://doi.org/10.2147/idr.s234610>
- Daghrir R, Drogui P. Tetracycline antibiotics in the environment: a review. *Environ Chem Lett.* 2013;11:209–227. doi: 10.1007/s10311-013-0404-8. [
- Destiani, R., & Templeton, M. R. (2019). Chlorination and ultraviolet disinfection of antibiotic-resistant bacteria and antibiotic resistance genes in drinking water. *AIMS Environmental Science*, 6(3).
- Dires, S., Birhanu, T., Ambelu, A., & Sahilu, G. (2018). Antibiotic resistant bacteria removal of subsurface flow constructed wetlands from hospital wastewater. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6(4), 4265-4272.
- Dodd, M. C. (2012). Potential impacts of disinfection processes on elimination and deactivation of antibiotic resistance genes during water and wastewater treatment. *Journal of Environmental Monitoring*, 14(7), 1754. <https://doi.org/10.1039/c2em00006g>
- Drugdova Z., Kmet V. Prevalence of β -lactam and fluoroquinolone resistance, and virulence factors in *Escherichia coli* isolated from chickens in Slovakia. *Biologia.* 2013; 68:11–17. doi: 10.2478/s11756-012-0142-6.
- Echeverria-Palencia, C. M., Thulsiraj, V., Tran, N., Ericksen, C. A., Melendez, I., Sanchez, M. G., Jay, J. A. (2017). Disparate antibiotic resistance gene quantities revealed across 4 major cities in California: A survey in drinking water, air, and soil at 24 public parks. *ACS Omega*, 2(5), 2255–2263. doi:10.1021/acsomega.7b00118
- Fars, S., Oufdou, K., Nejmeddine, A., Hassani, L., Melloul, A. A., Bousselhaj, K., & Mezrioui, N. (2005). Antibiotic resistance and survival of faecal coliforms in activated

sludge system in a semi-arid region (Beni Mellal, Morocco). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21, 493-500.

Fatta-Kassinou, D., Meric, S., & Nikolaou, A. (2010). Pharmaceutical residues in environmental waters and wastewater: Current State of Knowledge and future research. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399(1), 251–275. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4300-9>

Felis, E., Sochacki, A., Bajkacz, S., Łuczkiwicz, A., Józwiakowski, K., García, J., & Vymazal, J. (2024). Removal of selected sulfonamides and sulfonamide resistance genes from wastewater in full-scale constructed wetlands. *Science of The Total Environment*, 912, 169195. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.169195>

Ferreira da Silva M, Tiago I, Veríssimo A, Boaventura RA, Nunes OC, Manaia CM. Antibiotic resistance of enterococci and related bacteria in an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiol Ecol*. 2006 Feb;55(2):322-9. doi: 10.1111/j.1574-6941.2005.00032.x. PMID: 16420639.

Fiorentino, A. *et al.* (2015) ‘Inactivation and regrowth of multidrug resistant bacteria in urban wastewater after disinfection by solar-driven and chlorination processes’, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 148, pp. 43–50. doi:10.1016/j.jphotobiol.2015.03.029.

Flores, L., García, J., Pena, R., & Garfí, M. (2019). Constructed wetlands for winery wastewater treatment: A comparative life cycle assessment. *Science of The Total Environment*, 659, 1567–1576. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.12.348

Fiorentino, A., Soriano-Molina, P., Abeledo-Lameiro, M. J., de la Odra, I., Proto, A., Polo-López, M. I., Pérez, J. A., & Rizzo, L. (2022). Neutral (Fe³⁺-NTA) and acidic (Fe²⁺) pH solar photo-fenton vs chlorination: Effective urban wastewater disinfection does not mean control of antibiotic resistance. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10(6), 108777. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.108777>

Florindo, C., Lima, F., Branco, L. C., & Marrucho, I. M. (2019). Hydrophobic deep eutectic solvents: A circular approach to purify water contaminated with ciprofloxacin. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 7(17), 14739–14746. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b02658>

Galve, J. C., Sundo, M. B., Camus, D. R., De Padua, V. M., & Morales, R. D. (2021). Series type vertical subsurface flow constructed wetlands for dairy farm wastewater treatment. *Civil Engineering Journal*, 7(2), 292–303. doi:10.28991/cej-2021-03091654

Gao, P., He, S., Huang, S., Li, K., Liu, Z., Xue, G., & Sun, W. (2015). Impacts of coexisting antibiotics, antibacterial residues, and heavy metals on the occurrence of erythromycin

resistance genes in urban wastewater. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(9), 3971–3980. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6404-9>

Gao P, Munir M, Xagorarakis I. Correlation of tetracycline and sulfonamide antibiotics with corresponding resistance genes and resistant bacteria in a conventional municipal wastewater treatment plant, *Sci Total Environ*. 2012; 421–422: 173–183.

García, J., García-Galán, M. J., Day, J. W., Boopathy, R., White, J. R., Wallace, S., & Hunter, R. G. (2020). A review of emerging organic contaminants (eocs), antibiotic resistant bacteria (ARB), and antibiotic resistance genes (args) in the environment: Increasing removal with wetlands and reducing environmental impacts. *Bioresource Technology*, 307, 123228. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123228>

Gelband H, Miller-Petrie M, Suraj P, Sumanth G, Levinson J, Barter D, White A, Laxminarayan R (2015) State of the world's antibiotics. Center for Disease Dynamics, Economics and Policy. CDDEP, Washington D.C.

Gerolin C.R., F.N. Pupim, A.O. Sawakuchi, C.H. Grohmann, G. Labuto, D. Semensatto Microplastics in sediments from Amazon rivers, *Brazil Sci. Total Environ.*, 749 (2020), Article 141604

Göbel A, Thomsen A, McArdell CS, Joss A, Giger W. Occurrence and sorption behavior of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in activated sludge treatment. *Environ Sci Technol*. 2005;39:3981–3989. doi: 10.1021/es048550a.

Gómez, M.; de la Rúa, A.; Garralón, G.; Plaza, F.; Hontoria, E.; Gómez, M.A. Urban Wastewater Disinfection by Filtration Technologies. *Desalination* 2006, 190, 16–28

Gonzalez Ronquillo, M., & Angeles Hernandez, J. C. (2017). Antibiotic and synthetic growth promoters in animal diets: Review of impact and analytical methods. *Food Control*, 72, 255–267. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.03.001>

Grabow WOK, van Zyl M, Prozesky OW. Behavior in conventional sewage purification processes of coliform bacteria with transferable or non-transferable drug-resistance. *Water Res*. 1976; 10: 717–723.

Gracia-Lor E, Sancho JV, Serrano R, Hernández F. Occurrence and removal of pharmaceuticals in wastewater treatment plants at the Spanish Mediterranean area of Valencia. *Chemosphere*. 2012;87:453–462. doi: 10.1016/j.chemosphere.2011.12.025.

Gros M, Rodríguez-Mozaz S, Barceló D. Rapid analysis of multiclass antibiotic residues and some of their metabolites in hospital, urban wastewater and river water by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2013;1292:173–188. doi: 10.1016/j.chroma.2012.12.072.

- Guo, M.-T.; Yuan, Q.-B.; Yang, J. Distinguishing Effects of Ultraviolet Exposure and Chlorination on the Horizontal Transfer of Antibiotic Resistance Genes in Municipal Wastewater. *Environ. Sci. Technol.* 2015, 49, 5771–5778.
- Handrova L., Kmet V. Antibiotic resistance and virulence factors of *Escherichia coli* from eagles and goshawks. *J. Environ. Sci. Health Part B.* 2019; 54:605–614. doi: 10.1080/03601234.2019.1608103.
- Hanna N, Sun P, Sun Q, Li X, Yang X, Ji X, Zou H, Ottoson J, Nilsson LE, Berglund B. Presence of antibiotic residues in various environmental compartments of Shandong province in eastern China: its potential for resistance development and ecological and human risk. *Environ Int.* 2018;114:131–142. doi: 10.1016/j.envint.2018.02.003.
- Halling-Sørensen B, Sengeløv G, Tjørnelund J. Toxicity of tetracyclines and tetracycline degradation products to environmentally relevant bacteria, including selected tetracycline-resistant bacteria. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2002 Apr;42(3):263-71. doi: 10.1007/s00244-001-0017-2. PMID: 11910453.
- Harbarth S, Balkhy HH, Goossens H, Jarlier V, Kluytmans J, Laxminarayan R, Saam M, Van Belkum A, Pittet D; for the World Healthcare-Associated Infections Resistance Forum participants. Antimicrobial resistance: one world, one fight! *Antimicrob Resist Infect Control.* 2015 Nov 18;4:49. doi: 10.1186/s13756-015-0091-2. PMCID: PMC4652432.
- Harrabi M, Della Giustina SV, Aloulou F, Rodriguez-Mozaz S, Barceló D, Elleuch B. Analysis of multiclass antibiotic residues in urban wastewater in Tunisia. *Environ Nanotechnol Monit.* 2018;10:163–170.
- Hazra, M., Joshi, H., Williams, J. B., & Watts, J. E. M. (2022). Antibiotics and antibiotic resistant bacteria/genes in urban wastewater: A comparison of their fate in conventional treatment systems and constructed wetlands. *Chemosphere*, 303, 135148. doi:10.1016/j.chemosphere.2022.135148
- He, Y., Nurul, S., Schmitt, H., Sutton, N. B., Murk, T. A. J., Blokland, M. H., Rijnaarts, H. H. M., & Langenhoff, A. A. M. (2018). Evaluation of attenuation of pharmaceuticals, toxic potency, and antibiotic resistance genes in constructed wetlands treating wastewater effluents. *Science of The Total Environment*, 631–632, 1572–1581. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.083>
- Hooper DC, Jacoby GA. Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. *Ann N Y Acad Sci.* (2015) 1354:12–31. 10.1111/nyas.12830
- Hoyle, G. W., & Svendsen, E. R. (2016). Persistent effects of chlorine inhalation on respiratory health. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1378(1), 33-40.

- Hu, H., Li, X., Wu, S., & Yang, C. (2020). Sustainable livestock wastewater treatment via phytoremediation: Current status and future perspectives. *Bioresource Technology*, 315, 123809. doi:10.1016/j.biortech.2020.123809
- Huang, J.-J., Hu, H.-Y., Wu, Y.-H., Wei, B., & Lu, Y. (2013). Effect of chlorination and ultraviolet disinfection on TETA-mediated tetracycline resistance of escherichia coli. *Chemosphere*, 90(8), 2247–2253. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.10.008>
- Huang, J. J., Hu, H. Y., Lu, S. Q., Li, Y., Tang, F., Lu, Y., & Wei, B. (2012). Monitoring and evaluation of antibiotic-resistant bacteria at a municipal wastewater treatment plant in China. *Environment international*, 42, 31-36.
- Huang JJ, Hu HY, Tang F, Li Y, Lu SQ. Inactivation and reactivation of antibiotic-resistant bacteria by chlorination in secondary effluents of a municipal wastewater treatment plant. *Water Res.* 2011; 45: 2775–2781. 10.1016/j.watres.2011.02.026
- Hwangbo, M., Claycomb, E. C., Liu, Y., Alivio, T. E. G., Banerjee, S., & Chu, K.-H. (2019). Effectiveness of zinc oxide-assisted photocatalysis for concerned constituents in reclaimed wastewater: 1,4-dioxane, trihalomethanes, antibiotics, antibiotic resistant bacteria (ARB), and antibiotic resistance genes (args). *Science of The Total Environment*, 649, 1189–1197. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.360>
- Iakovides, I. C., Michael-Kordatou, I., Moreira, N. F. F., Ribeiro, A. R., Fernandes, T., Pereira, M. F. R., Nunes, O. C., Manaia, C. M., Silva, A. M. T., & Fatta-Kassinos, D. (2019). Continuous ozonation of urban wastewater: Removal of antibiotics, antibiotic-resistant escherichia coli and antibiotic resistance genes and phytotoxicity. *Water Research*, 159, 333–347. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.05.025>
- Iwane T, Urase T, Yamamoto K. Possible impact of treated wastewater discharge on incidence of antibiotic resistant bacteria in river water. *Water Sci Technol.* 2001; 43: 91–99.
- Jay, J.M., Loessner, M.J. and Golden, D.A. (2005) *Modern Food Microbiology*. 7th Edition, Springer Science and Business Media, Inc., New York, 63-90, 101-125.
- Ji Lu, Jianhua Guo ,Disinfection spreads antimicrobial resistance.Science371,474-474(2021).DOI:10.1126/science.abg4380
- Jiang, Q., Li, H., Wan, K., Ye, C., & Yu, X. (2023). Quantification and antibiotic resistance risk assessment of chlorination-residual viable/VBNC escherichia coli and enterococcus in on-site hospital wastewater treatment system. *Science of The Total Environment*, 872, 162139. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162139>

- Josephine HR, Kumar I, Pratt RF. The perfect penicillin? Inhibition of a bacterial DD-peptidase by peptidoglycan-mimetic beta-lactams. *J Am Chem Soc.* 2004;126:8122–3.
- Kahne D, Leimkuhler C, Lu W, Walsh C. Glycopeptide and lipoglycopeptide antibiotics. *Chem Rev.* 2005;105:425–48.
- Kalli, M.; Noutsopoulos, C.; Mamais, D. The Fate and Occurrence of Antibiotic-Resistant Bacteria and Antibiotic Resistance Genes during Advanced Wastewater Treatment and Disinfection: A Review. *Water* 2023, 15, 2084. <https://doi.org/10.3390/w15112084>
- Karaolia, P.; Michael, C.; Schwartz, T.; Fatta-Kassinos, D. Membrane Bioreactor Followed by Solar Photo-Fenton Oxidation: Bacterial Community Structure Changes and Bacterial Reduction. *Sci. Total Environ.* 2022, 847, 157594
- Karaolia, P., Michael-Kordatou, I., Hapeshi, E., Drosou, C., Bertakis, Y., Christofilos, D., Armatas, G. S., Sygellou, L., Schwartz, T., Xekoukoulotakis, N. P., & Fatta-Kassinos, D. (2018). Removal of antibiotics, antibiotic-resistant bacteria and their associated genes by graphene-based TiO₂ composite photocatalysts under solar radiation in urban wastewaters. *Applied Catalysis B: Environmental*, 224, 810–824. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2017.11.020>
- Kårelid, V.; Larsson, G.; Björleinius, B. Pilot-Scale Removal of Pharmaceuticals in Municipal Wastewater: Comparison of Granular and Powdered Activated Carbon Treatment at Three Wastewater Treatment Plants. *J. Environ. Manag.* 2017, 193, 491–502.
- Kazmi, A. A., Tyagi, V. K., Trivedi, R. C., & Kumar, A. (2008). Coliforms removal in full-scale activated sludge plants in India. *Journal of Environmental Management*, 87(3), 415–419.
- Kennedy Neth, N. L., Carlin, C. M., & Keen, O. S. (2019). Emerging investigator series: Transformation of common antibiotics during water disinfection with chlorine and formation of antibacterially active products. *Environmental Science: Water Research & Technology*, 5(7), 1222–1233. <https://doi.org/10.1039/c9ew00182d>
- Kesar, S., & Bhatti, M. S. (2022). Chlorination of secondary treated wastewater with sodium hypochlorite (NaOCl): An effective single alternate to other disinfectants. *Heliyon*, 8(11). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11162>
- Khan, M. T., Shah, I. A., Ihsanullah, I., Naushad, Mu., Ali, S., Shah, S. H., & Mohammad, A. W. (2021). Hospital wastewater as a source of environmental contamination: An overview of management practices, environmental risks, and treatment processes. *Journal of Water Process Engineering*, 41, 101990. doi:10.1016/j.jwpe.2021.101990

- Kheiri, R., & Akhtari, L. (2016). Antimicrobial resistance and integron gene cassette arrays in commensal *Escherichia coli* from human and animal sources in Iran. *Gut Pathogens*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s13099-016-0123-3>
- Knapp CW, Dolting J, Ehlert PAI, Graham DW. Evidence of increasing antibiotic resistance gene abundances in archived soils since 1940. *Environ Sci Technol*. 2010; 44: 580–587. 10.1021/es901221x
- Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol*. 2010 Jun;8(6):423-35. doi: 10.1038/nrmicro2333. Epub 2010 May 4. PMID: 20440275; PMCID: PMC2896384.
- Kong C, He X, Guo M, Ma S, Xu B, Tang Y. (2022). The Impacts of Chlorine and Disinfection Byproducts on Antibiotic-Resistant Bacteria (ARB) and Their Conjugative Transfer. *Water*; 14(19):3009. <https://doi.org/10.3390/w14193009>
- Korzeniewska E, Korzeniewska A, Harnisz M. Antibiotic resistant *Escherichia coli* in hospital and municipal sewage and their emission to the environment. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2013; 91: 96–102. 10.1016/j.ecoenv.2013.01.014
- Koutsikos, N., Koi, A. M., Zeri, C., Tsangaris, C., Dimitriou, E., & Kalantzi, O.-I. (2023). Exploring microplastic pollution in a Mediterranean River: The role of introduced species as bioindicators. *Heliyon*, 9(4). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e15069>
- Krzeminski, P.; Feys, E.; Anglès d'Auriac, M.; Wennberg, A.C.; Umar, M.; Schwermer, C.U.; Uhl, W. Combined Membrane Filtration and 265 Nm UV Irradiation for Effective Removal of Cell Free Antibiotic Resistance Genes from Feed Water and Concentrate. *J. Membr. Sci*. 2020, 598, 117676
- Kümmerer, K. (2009) 'Antibiotics in the aquatic environment – a review – part II', *Chemosphere*, 75(4), pp. 435–441. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.12.006.
- Landoni, M. F., & Albarellos, G. (2015). The use of antimicrobial agents in Broiler Chickens. *The Veterinary Journal*, 205(1), 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.04.016>
- Langenbach, K.; Kusch, P.; Horn, H.; Kästner, M. Modeling of Slow Sand Filtration for Disinfection of Secondary Clarifier Effluent. *Water Res*. 2010, 44, 159–166. Le, T.H.; Ng, C.; Tran, N.H.; Chen, H.; Gin, K.Y.H. Removal of Antibiotic Residues, Antibiotic Resistant Bacteria and Antibiotic Resistance Genes in Municipal Wastewater by Membrane Bioreactor Systems. *Water Res*. 2018, 145, 498–508.
- Langenbach, K.; Kusch, P.; Horn, H.; Kästner, M. Slow Sand Filtration of Secondary Clarifier Effluent for Wastewater Reuse. *Environ. Sci. Technol*. 2009, 43, 5896–5901.

- Li, S., Ondon, B. S., Ho, S.-H., & Li, F. (2023a). Emerging soil contamination of antibiotics resistance bacteria (ARB) carrying genes (args): New challenges for soil remediation and conservation. *Environmental Research*, 219, 115132. doi:10.1016/j.envres.2022.115132
- Li, S., Ondon, B. S., Ho, S.-H., Zhou, Q., & Li, F. (2023b). Drinking water sources as hotspots of antibiotic-resistant bacteria (ARB) and antibiotic resistance genes (args): Occurrence, spread, and mitigation strategies. *Journal of Water Process Engineering*, 53, 103907. doi:10.1016/j.jwpe.2023.103907
- Li, T., Ouyang, W., Lin, C., Wang, J., Cui, X., Li, Y., Guo, Z., Zhu, W., & He, M. (2023c). Occurrence, distribution, and potential ecological risks of antibiotics in a seasonal freeze-thaw basin. *Journal of Hazardous Materials*, 459, 132301. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.132301>
- Li, J., Qin, Y., Zhao, C., Zhang, Z., & Zhou, Z. (2023d). Tetracycline antibiotics: Potential anticancer drugs. *European Journal of Pharmacology*, 956, 175949. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2023.175949>
- Li, W., Tapiainen, T., Brinkac, L., Lorenzi, H. A., Moncera, K., Tejesvi, M. V., Salo, J., & Nelson, K. E. (2020). Vertical transmission of gut microbiome and antimicrobial resistance genes in infants exposed to antibiotics at birth. *The Journal of Infectious Diseases*, 224(7), 1236–1246. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa155>
- Li, J., Cheng, W., Xu, L. et al. Occurrence and removal of antibiotics and the corresponding resistance genes in wastewater treatment plants: effluents' influence to downstream water environment. *Environ Sci Pollut Res* 23, 6826–6835 (2016). <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5916-2>
- Li, D., Zeng, S., He, M., & Gu, A. Z. (2016). Water disinfection byproducts induce antibiotic resistance-role of environmental pollutants in resistance phenomena. *Environmental science & technology*, 50(6), 3193-3201.
- Lin, W., Li, S., Zhang, S., & Yu, X. (2016). Reduction in horizontal transfer of conjugative plasmid by UV irradiation and low-level chlorination. *Water Research*, 91, 331–338. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.01.020>
- Lin AY, Yu TH, Lateef SK. Removal of pharmaceuticals in secondary wastewater treatment processes in Taiwan. *J Hazard Mater.* 2009;167:1163–1169. doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.01.108.
- Liang, Y., Zhu, H., Bañuelos, G., Yan, B., Zhou, Q., Yu, X., & Cheng, X. (2017). Constructed wetlands for saline wastewater treatment: A Review. *Ecological Engineering*, 98, 275–285. doi:10.1016/j.ecoleng.2016.11.005
- Lindberg R, Jarnheimer P-Å, Olsen B, Johansson M, Tysklind M. Determination of antibiotic substances in hospital sewage water using solid phase extraction and liquid

chromatography/mass spectrometry and group analogue internal standards. *Chemosphere*. 2004;57:1479–1488. doi: 10.1016/j.chemosphere.2004.09.015.

Lindberg R, Jarnheimer PA, Olsen B, Johansson M, Tysklind M. Determination of antibiotic substances in hospital sewage water using solid phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry and group analogue internal standards. *Chemosphere*. 2004; 57: 1479–1488.

Liu, S.-S., Qu, H.-M., Yang, D., Hu, H., Liu, W.-L., Qiu, Z.-G., Hou, A.-M., Guo, J., Li, J.-W., Shen, Z.-Q., & Jin, M. (2018). Chlorine disinfection increases both intracellular and extracellular antibiotic resistance genes in a full-scale wastewater treatment plant. *Water Research*, 136, 131–136. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.02.036>

Liu X, Guo X, Liu Y, Lu S, Xi B, Zhang J, Wang Z, Bi B. A review on removing antibiotics and antibiotic resistance genes from wastewater by constructed wetlands: Performance and microbial response. *Environ Pollut*. 2019 Nov;254(Pt A):112996. doi: 10.1016/j.envpol.2019.112996. Epub 2019 Aug 2. PMID: 31400665.

Lu, J., Jin, M., Nguyen, S. H., Mao, L., Li, J., Coin, L. J. & Guo, J. (2018). Non-antibiotic antimicrobial triclosan induces multiple antibiotic resistance through genetic mutation. *Environment international*, 118, 257-265.

Lu J, Guo J. (2021) Disinfection spreads antimicrobial resistance. *Science*. ;371(6528):474. doi: 10.1126/science.abg4380. PMID: 33510019.

Ma, C.-Y., Sugie, Y., Yu, Z., Okuno, Y., Tanaka, H., & Ihara, M. (2022a). Occurrence of *E. coli* and antibiotic-resistant *E. coli* in the southern watershed of Lake Biwa, including in wastewater treatment plant effluent and inflow rivers. *Chemosphere*, 301, 134372. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134372>

Ma, C.-Y., Ihara, M., Liu, S., Sugie, Y., & Tanaka, H. (2022b). Tracking the source of antibiotic-resistant *Escherichia coli* in the aquatic environment in Shiga, Japan, through whole-genome sequencing. *Environmental Advances*, 8, 100185. <https://doi.org/10.1016/j.envadv.2022.100185>

Macauley JJ, Qiang Z, Adams CD, Surampalli R, Mormile MR. Disinfection of swine wastewater using chlorine, ultraviolet light and ozone. *Water Res*. 2006 Jun;40(10):2017-26. doi: 10.1016/j.watres.2006.03.021. Epub 2006 May 5. PMID: 16678233.

Majumder, A., Gupta, B., & Gupta, A. K. (2019). Pharmaceutically active compounds in aqueous environment: A status, toxicity and insights of remediation. *Environmental Research*, 176, 108542. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108542>

Makowska, Nicoletta, Ryszard Koczura, και Joanna Mokracka. 2016. ‘Class 1 Integrase, Sulfonamide and Tetracycline Resistance Genes in Wastewater Treatment Plant and

Surface Water'. *Chemosphere* 144: 1665–73.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.10.044>.

Martin R. Adams and Maurice O. Moss (2008) *Food Microbiology*, 3rd Edition, RSC Publishing, London, UK.

McCarty LS, Power M, Munkittrick KR, Bioindicators versus biomarkers in ecological risk assessment, *Human and Ecological Risk Assessment*, 2002, 8:159164.

McConnell R.L., D.C. Abel, D.C. Abel, *Environmental Geology Today*. Jones & Bartlett Publishers (2013).

McConnell, M.M.; Truelstrup Hansen, L.; Jamieson, R.C.; Neudorf, K.D.; Yost, C.K.; Tong, A. Removal of Antibiotic Resistance Genes in Two Tertiary Level Municipal Wastewater Treatment Plants. *Sci. Total Environ.* 2018, 643, 292–300

Michael-Kordatou, I.; Karaolia, P.; Fatta-Kassinos, D. The Role of Operating Parameters and Oxidative Damage Mechanisms of Advanced Chemical Oxidation Processes in the Combat against Antibiotic-Resistant Bacteria and Resistance Genes Present in Urban Wastewater. *Water Res.* 2018, 129, 208–230.

Michael I, Rizzo L, McArdell C, Manaia C, Merlin C, Schwartz T, Dagot C, Fatta-Kassinos D. Urban wastewater treatment plants as hotspots for the release of antibiotics in the environment: a review. *Water Res.* 2013;47:957–995. doi: 10.1016/j.watres.2012.11.027.

Middleton JH, Salierno JD. Antibiotic resistance in triclosan tolerant fecal coliforms isolated from surface waters near wastewater treatment plant outflows (Morris County, NJ, USA). *Ecotoxicol Environ Saf.* 2013; 88: 79–88. 10.1016/j.ecoenv.2012.10.025

Miguel Herraiz-Carboné, S. C. (2021). Are we correctly targeting the research on disinfection of antibiotic-resistant bacteria (ARB)? *Journal of Cleaner Production*(Volume 320). doi:<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.128865>

Minh, T. B., Leung, H. W., Loi, I. H., Chan, W. H., So, M. K., Mao, J. Q., Choi, D., Lam, J. C. W., Zheng, G., Martin, M., Lee, J. H. W., Lam, P. K. S., & Richardson, B. J. (2009). Antibiotics in the Hong Kong metropolitan area: Ubiquitous distribution and fate in Victoria Harbour. *Marine Pollution Bulletin*, 58(7), 1052–1062. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.02.004>

Miranzadeh, M. B., Dehghani, R., Bigdeli, M., Mazaheri Tehrani, A., & Heidari, M. (2013). Coliforms removal by an integrated activated sludge-maturation pond system. *International Journal of Environmental Health Engineering (IJEHE)*, 2(June), 1-5.

- Moreira S.M., Guilhermino D.L. (2005). The use of mytilus galloprovincialis acetylcholinesterase and glutathione s-transferases activities as biomarkers of environmental contamination along the northwest portuguese coast. *Environmental Monitoring and Assessment*.105: 309–325
- Mosaka TBM, Unuofin JO, Daramola MO, Tizaoui C, Iwarere SA. Inactivation of antibiotic-resistant bacteria and antibiotic-resistance genes in wastewater streams: Current challenges and future perspectives. *Front Microbiol*. 2023 Jan 16;13:1100102. doi: 10.3389/fmicb.2022.1100102. PMID: 36733776; PMCID: PMC9888414.
- Munir M, Wong K, Xagorarakis I. Release of antibiotic resistant bacteria and genes in the effluent and biosolids of five wastewater utilities in Michigan. *Water Res*. 2011; 45: 681–693. 10.1016/j.watres.2010.08.033
- Murray GE, Tobin RS, Junkins B, Kushner DJ. Effect of chlorination on antibiotic resistance profiles of sewage-related bacteria. *Appl Environ Microb*. 1984; 48: 73–77.
- Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B. H., Kumaran, E. A., McManigal, B., Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(21)02724-0)
- Negreanu Y, Pasternak Z, Jurkevitch E, Cytryn E. Impact of treated wastewater irrigation on antibiotic resistance in agricultural soils. *Environ Sci Technol*. 2012; 46: 4800–4808. 10.1021/es204665b
- Nhung, N. T., Chansiripornchai, N., & Carrique-Mas, J. J. (2017). Antimicrobial resistance in Bacterial Poultry pathogens: A Review. *Frontiers in Veterinary Science*, 4. <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00126>
- Nnadozie C. F., Kumari S., Bux F. (2017). Status of pathogens, antibiotic resistance genes and antibiotic residues in wastewater treatment systems. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol*. 16, 491–515. doi: 10.1007/s11157-017-9438-x
- Noor Z. Z., Rabiou Z., Sani M. H. M., Samad A. F. A., Kamaroddin M. F. A., Perez M. F., et al. (2021). A review of bacterial antibiotic resistance genes and their removal strategies from wastewater. *Current Pollution Reports* 7, 494–509. doi: 10.1007/s40726-021-00198-0
- Novo A, Manaia CM. Factors influencing antibiotic resistance burden in municipal wastewater treatment plants. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010 Jul;87(3):1157-66. doi: 10.1007/s00253-010-2583-6. Epub 2010 Apr 16. PMID: 20396880.

- O'Neill, J. (2016). Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations.
- O'Neill, J. (2015). Antimicrobials in agriculture and the environment: reducing unnecessary use and waste. The review on antimicrobial resistance. Wellcome Trust.
- Ofori, S., Puškáčová, A., Růžičková, I., & Wanner, J. (2021). Treated wastewater reuse for irrigation: Pros and cons. *Science of The Total Environment*, 760, 144026. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144026>
- Ofrydopoulou, A., Nannou, C., Evgenidou, E., Christodoulou, A., & Lambropoulou, D. (2022). Assessment of a wide array of organic micropollutants of emerging concern in wastewater treatment plants in Greece: Occurrence, removals, mass loading and potential risks. *Science of The Total Environment*, 802, 149860. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149860>
- Osińska, Adriana, Ewa Korzeniewska, Monika Harnisz, Ewa Felis, Sylwia Bajkacz, Piotr Jachimowicz, Sebastian Niestępski, and Iwona Konopka. 2020. 'Small-scale wastewater treatment plants as a source of the dissemination of antibiotic resistance genes in the aquatic environment'. *Journal of Hazardous Materials* 381.121221. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121221>
- Page, S. W., & Gautier, P. (2012). Use of antimicrobial agents in Livestock. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*, 31(1), 145–188. <https://doi.org/10.20506/rst.31.1.2106>
- Pang, Z., Cai, Y., Xiong, W., Xiao, J., & Zou, J. (2021). A spectrophotometric method for measuring permanganate index (CODMn) by N,N-diethyl-P-phenylenediamine (DPD). *Chemosphere*, 266, 128936. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128936>
- Papajová, I., Šmigová, J., Gregová, G., Šoltys, J., Venglovský, J., Papaj, J., Szabóová, T., Dančová, N., Ihnacik, L., Schusterová, I., Sušinková, J., Raková, J., & Regecová, I. (2022). Effect of wastewater treatment on bacterial community, antibiotic-resistant bacteria and endoparasites. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(5), 2750. <https://doi.org/10.3390/ijerph19052750> Guo MT, Yuan QB, Yang J. Ultraviolet reduction of erythromycin and tetracycline resistant heterotrophic bacteria and their resistance genes in municipal wastewater. *Chemosphere*. 2013; 93: 2864–2868. [10.1016/j.chemosphere.2013.08.068](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.08.068)
- Paruch, A. M., & Mæhlum, T. (2012). Specific features of escherichia coli that distinguish it from coliform and thermotolerant coliform bacteria and define it as the most accurate indicator of faecal contamination in the environment. *Ecological Indicators*, 23, 140–142. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2012.03.026>

- Payment P., Waite M., Dufour A. Introducing parameters for the assessment of drinking water quality. *Assess. Microb. Saf. Drink. Water Improv. Approaches Methods*. 2003; 4:47–77.
- Petrovic M, Gros M, Barcelo D. Multi-residue analysis of pharmaceuticals in wastewater by ultra-performance liquid chromatography–quadrupole–time-of-flight mass spectrometry. *Chromatogr A*. 2006;1124:68–81. doi: 10.1016/j.chroma.2006.05.024.
- Pidot, Sacha J., Wei Gao, Andrew H. Bultjens, Ian R. Monk, Romain Guerillot, Glen P. Carter, Jean YH Lee (2018). "Increasing tolerance of hospital *Enterococcus faecium* to handwash alcohols." *Science translational medicine* 10, no. 452: eaar6115.
- Phattarapattamawong, S., Chareewan, N., & Polprasert, C. (2021). Comparative removal of two antibiotic resistant bacteria and genes by the simultaneous use of chlorine and UV irradiation (UV/chlorine): Influence of free radicals on gene degradation. *Science of the Total Environment*, 755, 142696.
- Poole, K. (2002). Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology*, 92. doi:10.1046/j.1365-2672.92.5s1.8.x
- Pruden, A. (2018). Antibiotics and Antibiotic Resistance: Closing the Loop Between Hospitals and the Environment. Elsevier, pp. 137-148. doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63857-1.00008-5
- Pruden A, Pei RT, Storteboom H, Carlson KH. Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: studies in Northern Colorado, *Environ Sci Technol*. 2006; 40: 7445–7450.
- Pulcini, C., & Gyssens, I. C. (2013). How to educate prescribers in antimicrobial stewardship practices. *Virulence*, 4(2), 192–202. doi:10.4161/viru.23706
- Qi, Z., Le, Z., Han, F., Qi, Y., & Liu, R. (2022). B-lactamase genes transmission influenced by tetracycline, sulfonamide and β -lactams antibiotics contamination in the on-site farm soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 241, 113753. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113753
- Qian, S.; Hou, R.; Yuan, R.; Zhou, B.; Chen, Z.; Chen, H. Removal of *Escherichia Coli* from Domestic Sewage Using Biological Sand Filters: Reduction Effect and Microbial Community Analysis. *Environ. Res*. 2022, 209, 112908
- Radini, S., González-Camejo, J., Andreola, C., Eusebi, A. L., & Fatone, F. (2023). Risk management and digitalisation to overcome barriers for safe reuse of urban wastewater for irrigation – a review based on European practice. *Journal of Water Process Engineering*, 53, 103690. https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2023.103690

- Radjenovic, J.; Petrovic, M.; Barceló, D. Fate and Distribution of Pharmaceuticals in Wastewater and Sewage Sludge of the Conventional Activated Sludge (CAS) and Advanced Membrane Bioreactor (MBR) Treatment. *Water Res.* 2009, 43, 831–841.
- Rayasam, K., Prakash, P. O., Akkina, R. C., & Peddireddy, V. (2023). Antimicrobial resistance—a serious Global Threat. *Bacterial Survival in the Hostile Environment*, 81–100. doi:10.1016/b978-0-323-91806-0.00016-3
- Raza, S., Kang, K. H., Shin, J., Shin, S. G., Chun, J., Cho, H. U., Shin, J., & Kim, Y. M. (2023). Variations in antibiotic resistance genes and microbial community in sludges passing through biological nutrient removal and anaerobic digestion processes in municipal wastewater treatment plants. *Chemosphere*, 313, 137362. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.137362>
- Reinthaler, F. F., Posch, J., Feierl, G., Wüst, G., Haas, D., Ruckebauer, G., Mascher, F., & Marth, E. (2003). Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge. *Water Research*, 37(8), 1685–1690. [https://doi.org/10.1016/s0043-1354\(02\)00569-9](https://doi.org/10.1016/s0043-1354(02)00569-9)
- Rizzo, L., Gernjak, W., Krzeminski, P., Malato, S., McArdell, C. S., Perez, J. A., Schaar, H., & Fatta-Kassinos, D. (2020). Best available technologies and treatment trains to address current challenges in urban wastewater reuse for irrigation of crops in EU countries. *Science of The Total Environment*, 710, 136312. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136312>
- Rizzo L, Manaia C, Merlin C, Schwartz T, Dagot C, et al. Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review. *Sci Total Environ.* 2013; 447: 345–360. 10.1016/j.scitotenv.2013.01.032
- Sabri, N.A.; van Holst, S.; Schmitt, H.; van der Zaan, B.M.; Gerritsen, H.W.; Rijnaarts, H.H.M.; Langenhoff, A.A.M. Fate of Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes during Conventional and Additional Treatment Technologies in Wastewater Treatment Plants. *Sci. Total Environ.* 2020, 741, 140199
- Sakurai, K. S., Pompei, C. M., Tomita, I. N., Santos-Neto, Á. J., & Silva, G. H. (2021). Hybrid constructed wetlands as post-treatment of Blackwater: An assessment of the removal of antibiotics. *Journal of Environmental Management*, 278, 111552. doi:10.1016/j.jenvman.2020.111552
- Samie, A., Obi, C. L., Igumbor, J. O., & Momba, M. N. B. (2009). Focus on 14 sewage treatment plants in the Mpumalanga Province, South Africa in order to gauge the efficiency of wastewater treatment. *African Journal of Biotechnology*, 8(14).

- Sanchez W, Porcher JM. Fish biomarkers for environmental monitoring within the Water Framework Directive of the European Union, *Trends in Analytical Chemistry*, 2009, 28(2): 150-15.
- Santos, F., Almeida, C. M., Ribeiro, I., Ferreira, A. C., & Mucha, A. P. (2019). Removal of veterinary antibiotics in constructed wetland microcosms – response of bacterial communities. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 169, 894–901. doi:10.1016/j.ecoenv.2018.11.078
- Santos LH, Gros M, Rodriguez-Mozaz S, Delerue-Matos C, Pena A, Barcelo D, Montenegro MC. Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: identification of ecologically relevant pharmaceuticals. *Sci Total Environ*. 2013;461–462:302–316. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.04.077.
- Sambaza SS, Naicker N. (2023). Contribution of wastewater to antimicrobial resistance: A review article. *J Glob Antimicrob Resist*. 34:23-29. doi: 10.1016/j.jgar.2023.05.010. Epub 2023 Jun 5. PMID: 37285914.
- Sarmah, A. K., Meyer, M. T., & Boxall, A. B. (2006). A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere*, 65(5), 725-759.
- Schwarz, S. & Johnson, A. P. (2016). Transferable resistance to colistin: a new but old threat. *J. Antimicrob. Chemother.* 71, 2066–2070.
- Schwermer CU, Krzeminski P, Wennberg AC, Vogelsang C, Uhl W. (2018). Removal of antibiotic resistant E. coli in two Norwegian wastewater treatment plants and by nano- and ultra-filtration processes. *Water Sci Technol.*;77(3-4):1115-1126. doi: 10.2166/wst.2017.642. PMID: 29488975.
- Shariati A, Arshadi M, Khosrojerdi MA, Abedinzadeh M, Ganjalishahi M, Maleki A, Heidary M, Khoshnood S. The resistance mechanisms of bacteria against ciprofloxacin and new approaches for enhancing the efficacy of this antibiotic. *Front Public Health*. (2022), 21;10:1025633. doi: 10.3389/fpubh.2022.1025633. PMID: 36620240; PMCID: PMC9815622.
- Shearer, L., Pap, S., & Gibb, S. W. (2022). Removal of pharmaceuticals from wastewater: A review of adsorptive approaches, modelling and mechanisms for metformin and macrolides. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10(4), 108106. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.108106>
- Shi, J. et al. (2022) ‘Distinguishing removal and regrowth potential of antibiotic resistance genes and antibiotic resistant bacteria on microplastics and in leachate after chlorination or Fenton oxidation’, *Journal of Hazardous Materials*, 430, p. 128432. doi:10.1016/j.jhazmat.2022.128432.

- Shi P, Jia S, Zhang XX, Zhang T, Cheng S, Li A. Metagenomic insights into chlorination effects on microbial antibiotic resistance in drinking water. *Water Res.* 2013; 47: 111–120. 10.1016/j.watres.2012.09.046
- Sidrach-Cardona, R., & Becares, E. (2013). Fecal indicator bacteria resistance to antibiotics in experimental constructed wetlands. *Ecological Engineering*, 50, 107-111.
- Simpson J.M., Santo Domingo J.W., Reasoner D.J. Microbial source tracking: State of the science. *Environ. Sci. Technol.* 2002; 36:5279–5298. doi: 10.1021/es026000b.
- Singh, R., Singh, A. P., Kumar, S., Giri, B. S., & Kim, K.-H. (2019). Antibiotic resistance in major rivers in the world: A systematic review on occurrence, emergence, and management strategies. *Journal of Cleaner Production*, 234, 1484–1505. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.06.243>
- Slipko, K.; Reif, D.; Schaar, H.; Saracevic, E.; Klinger, A.; Wallmann, L.; Krampe, J.; Woegerbauer, M.; Hufnagl, P.; Kreuzinger, N. Advanced Wastewater Treatment with Ozonation and Granular Activated Carbon Filtration: Inactivation of Antibiotic Resistance Targets in a Long-Term Pilot Study. *J. Hazard. Mater.* 2022, 438, 129396.
- Spit, T.; van der Hoek, J.P.; de Jong, C.; van Halem, D.; de Kreuk, M.; Perez, B.B. Removal of Antibiotic Resistance From Municipal Secondary Effluents by Ozone-Activated Carbon Filtration. *Front. Environ. Sci.* 2022, 10, 335
- Spongberg AL, Witter JD. Pharmaceutical compounds in the wastewater process stream in Northwest Ohio. *Sci Total Environ.* 2008;397:148–157. doi: 10.1016/j.scitotenv.2008.02.042.
- Stange, C., Sidhu, J. P. S., Toze, S., & Tiehm, A. (2019). Comparative removal of antibiotic resistance genes during chlorination, ozonation, and UV treatment. *International journal of hygiene and environmental health*, 222(3), 541-548.
- Tandukar, M., Oh, S., Tezel, U., Konstantinidis, K. T., & Pavlostathis, S. G. (2013). Long-term exposure to benzalkonium chloride disinfectants results in change of microbial community structure and increased antimicrobial resistance. *Environmental science & technology*, 47(17), 9730-9738.
- Templeton MR, Oddy F, Leung W, Rogers M. Chlorine and UV disinfection of ampicillin-resistant and trimethoprim-resistant *Escherichia coli*, *Can J Civil Eng.* 2009; 36: 889–894.
- Thakali, O.; Brooks, J.P.; Shahin, S.; Sherchan, S.P.; Haramoto, E. Removal of Antibiotic Resistance Genes at Two Conventional Wastewater Treatment Plants of Louisiana, USA. *Water* 2020, 12, 1729.

- Tikhonova EB, Wang Q, Zgurskaya HI. Chimeric analysis of the multicomponent multidrug efflux transporters from gram-negative bacteria. *J Bacteriol.* 2002 Dec;184(23):6499-507. doi: 10.1128/JB.184.23.6499-6507.2002. PMID: 12426337; PMCID: PMC135444.
- Tiwari, A., Krolicka, A., Tran, T. T., Räisänen, K., Ásmundsdóttir, Á. M., Wikmark, O.-G., Lood, R., & Pitkänen, T. (2024). Antibiotic resistance monitoring in wastewater in the Nordic Countries: A systematic review. *Environmental Research*, 246, 118052. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.118052>
- Tominaga, T., & Ishii, M. (2020). Detection of microorganisms with lateral flow test strips. *Methods in Microbiology*, 351–394. <https://doi.org/10.1016/bs.mim.2019.11.007>
- Turolla A, Cattaneo M, Marazzi F, Mezzanotte V, Antonelli M. (2017). Antibiotic resistant bacteria in urban sewage: Role of full-scale wastewater treatment plants on environmental spreading. *Chemosphere.* 2018 Jan;191:761-769. doi: 10.1016/j.chemosphere.10.099. Epub 2017 Nov 1. PMID: 29080537.
- Uehara T, Dinh T, Bernhardt TG. LytM-domain factors are required for daughter cell separation and rapid ampicillin-induced lysis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2009;191:5094–107.
- Ukpong, E. C. (2013). Performance evaluation of activated sludge wastewater treatment plant (ASWTP) At QIT, Ibeno local government area of Akwa Ibom state, Nigeria. *Int J Eng Sci*, 2(7), 1-13.
- Urbánek, K., & Látal, T. (2001). Antibiotic selective pressure and development of bacterial resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 17(5), 357–363. [https://doi.org/10.1016/s0924-8579\(01\)00317-x](https://doi.org/10.1016/s0924-8579(01)00317-x)
- Vaz-Moreira, I., Harnisz, M., Abreu-Silva, J., Rolbiecki, D., Korzeniewska, E., Luczkiewicz, A. Plaza, G. (2022). Antibiotic resistance in wastewater, does the context matter? Poland and Portugal as a case study. *Environmental Science and Technology*(52:23), pp. 4194-4216. doi:10.1080/10643389.2021.2000828
- Verlicchi P, Al Aukidy M, Galletti A, Petrovic M, Barcelo D. Hospital effluent: investigation of the concentrations and distribution of pharmaceuticals and environmental risk assessment. *Sci Total Environ.* 2012;430:109–118. doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.04.055.
- Vlahogianni T, Dasenakis M, Scoullou M, Valavanidis A. Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metal's pollution in coastal areas from Saronikos gulf of Greece. *Mar Pollut Bull*, 2007, 54: 1361-1371
- Wang, J., Xu, S., Zhao, K., Song, G., Zhao, S., & Liu, R. (2023). Risk control of antibiotics, antibiotic resistance genes (args) and antibiotic resistant bacteria (ARB) during sewage

sludge treatment and disposal: A Review. *Science of The Total Environment*, 877, 162772. doi:10.1016/j.scitotenv.2023.162772

Wang, Z., Fu, L., Gu, J.-D., Deng, S., Huang, C., & Luo, L. (2023). The factors controlling antibiotic resistance genes in different treatment processes of mainstream full-scale wastewater treatment plants. *Science of The Total Environment*, 900, 165815. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.165815>

Wang, Z., Gao, J., Dai, H., Zhao, Y., Li, D., Duan, W., & Guo, Y. (2021). Microplastics affect the ammonia oxidation performance of aerobic granular sludge and enrich the intracellular and extracellular antibiotic resistance genes. *Journal of Hazardous Materials*, 409, 124981. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124981>

Wang J., Chu L., Wojnarovits L., Takacs E. (2020). Occurrence and fate of antibiotics, antibiotic resistant genes (ARGs) and antibiotic resistant bacteria (ARB) in municipal wastewater treatment plant: an overview. *Sci. Total Environ.* 744:140997. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.140997

Wang, M., Zhang, W.-W., Li, N., Liu, Y.-Y., Zheng, X.-B., & Hao, G.-Y. (2017). Photosynthesis and growth responses of *Fraxinus mandshurica* RUPR. seedlings to a gradient of simulated nitrogen deposition. *Annals of Forest Science*, 75(1). doi:10.1007/s13595-017-0678-2

Wang, H.H. and Schaffner, D.W. (2011) ‘Antibiotic resistance: How much do we know and where do we go from here?’, *Applied and Environmental Microbiology*, 77(20), pp. 7093–7095. doi:10.1128/aem.06565-11.

Watkinson AJ, Murby EJ, Kolpin DW, Costanzo SD. The occurrence of antibiotics in an urban watershed: from wastewater to drinking water. *Sci Total Environ.* 2009;407:2711–2723. doi: 10.1016/j.scitotenv.2008.11.059.

Wen, L., Cui, Y., Huang, L., Wei, C., Wang, G., Zhang, J., Jiang, Y., Wei, Y., & Shen, P. (2023). Changes of composition and antibiotic resistance of fecal coliform bacteria in municipal wastewater treatment plant. *Journal of Environmental Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2023.09.012>

World Health Organization, The selection and use of essential medicines: report of the WHO Expert Committee, 2017 (including the 20th WHO model list of essential medicines and the 6th model list of essential medicines for children), World Health Organization, 2017. [⟨https://apps.who.int/iris/handle/10665/259481⟩](https://apps.who.int/iris/handle/10665/259481) (accessed February 11, 2022).

World Health Organization (WHO). WHO Annual Report on Infectious Disease: Overcoming Antimicrobial Resistance. World Health Organization: Geneva, Switzerland 2000. Available: <http://www.who.int/infectious-disease-report/2000>.

- Wright, G.D., 2010. Q&A: Antibiotic resistance: where does it come from and what can we do about it?. *BMC biology*, 8, pp.1-6.
- WWF, 2017. Ρύπανση στον Σαρωνικό Κόλπο, Υπόμνημα προς τις αρμόδιες αρχές σχετικά με τις περιβαλλοντικές επιπτώσεις από το ναυάγιο του δεξαμενόπλοιου «Αγία Ζώνη II»
- Xinjie, W., Xin, N., Qilu, C., Ligen, X., Yuhua, Z., & Qifa, Z. (2019). Vetiver and dictyosphaerium sp. co-culture for the removal of nutrients and ecological inactivation of pathogens in swine wastewater. *Journal of Advanced Research*, 20, 71–78. doi:10.1016/j.jare.2019.05.004
- Xu, L., Ouyang, W., Qian, Y., Su, C., Su, J., & Chen, H. (2016). High-throughput profiling of antibiotic resistance genes in drinking water treatment plants and distribution systems. *Environmental Pollution*, 213, 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.02.013>
- Xu J, Xu Y, Wang H, Guo C, Qiu H, He Y, Zhang Y, Li X, Meng W. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a sewage treatment plant and its effluent-receiving river. *Chemosphere*. 2015 Jan;119:1379-1385. doi: 10.1016/j.chemosphere.2014.02.040. Epub 2014 Mar 12. PMID: 24630248.
- Yalin, D., Craddock, H. A., Assouline, S., Ben Mordechay, E., Ben-Gal, A., Bernstein, N., Chaudhry, R. M., Chefetz, B., Fatta-Kassinos, D., Gawlik, B. M., Hamilton, K. A., Khalifa, L., Kisekka, I., Klapp, I., Korach-Rechtman, H., Kurtzman, D., Levy, G. J., Maffettone, R., Malato, S., Cytryn, E. (2023). Mitigating risks and maximizing sustainability of treated wastewater reuse for irrigation. *Water Research X*, 21, 100203. <https://doi.org/10.1016/j.wroa.2023.100203>
- Yang Y., W. Song, H. Lin, W. Wang, L. Du, W. Xing. Antibiotics and antibiotic resistance genes in global lakes: a review and meta-analysis. *Environ. Int.*, 116 (2018), pp. 60-73
- Yang, L.; Wen, Q.; Chen, Z.; Duan, R.; Yang, P. Impacts of Advanced Treatment Processes on Elimination of Antibiotic Resistance Genes in a Municipal Wastewater Treatment Plant. *Front. Environ. Sci. Eng.* (2019), 13, 32.
- Yang S, Carlson K. Solid-phase extraction–high-performance liquid chromatography–ion trap mass spectrometry for analysis of trace concentrations of macrolide antibiotics in natural and waste water matrices. *Chromatogr A*. (2004) ;1038:141–155. doi: 10.1016/j.chroma.2004.02.084.
- Yuan QB, Guo MT, Yang J. Fate of antibiotic resistant bacteria and genes during wastewater chlorination: implication for antibiotic resistance control. *PLoS One*. 2015 Mar 4;10(3):e0119403. doi: 10.1371/journal.pone.0119403. PMID: 25738838; PMCID: PMC4349789.

- Zagklis, D.P.; Bampos, G. Tertiary Wastewater Treatment Technologies: A Review of Technical, Economic, and Life Cycle Aspects. *Processes* 2022, 10, 2304.
- Zarei-Baygi, A., & Smith, A. L. (2021). Intracellular versus extracellular antibiotic resistance genes in the environment: Prevalence, horizontal transfer, and mitigation strategies. *Bioresource Technology*, 319, 124181. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124181>
- Zeri, C., Adamopoulou, A., Koi, A., Koutsikos, N., Lytras, E., & Dimitriou, E. (2021). Rivers and wastewater-treatment plants as microplastic pathways to Eastern Mediterranean Waters: First records for the Aegean Sea, Greece. *Sustainability*, 13(10), 5328. <https://doi.org/10.3390/su13105328>
- Zeon, O., & Kibe, L. W. (2023). Antimicrobial drug resistance and antimicrobial resistant threats. *Physician Assistant Clinics*, 8(3), 411–420. doi:10.1016/j.cpha.2023.03.001
- Zgurskaya HI. Molecular analysis of efflux pump-based antibiotic resistance. *Int J Med Microbiol.* 2002 Jul;292(2):95-105. doi: 10.1078/1438-4221-00195. PMID: 12195740.
- Zhang, X., Cai, T., Zhang, S., Hou, J., Cheng, L., Chen, W., & Zhang, Q. (2024). Contamination distribution and non-biological removal pathways of typical tetracycline antibiotics in the environment: A Review. *Journal of Hazardous Materials*, 463, 132862. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.132862>
- Zhang, S., Wang, H., Liu, M., Yu, H., Peng, J., Cao, X., Qu, J. (2022). Press perturbations of microplastics and antibiotics on freshwater micro-ecosystem: Case study for the ecological restoration of submerged plants. *Water Research*, 226, 119248. doi:10.1016/j.watres.2022.119248
- Zhang, S., Liu, X., Qiu, P., Chen, B., Xu, C., Dong, W., & Liu, T. (2022). Microplastics can selectively enrich intracellular and extracellular antibiotic resistant genes and shape different microbial communities in Aquatic Systems. *Science of The Total Environment*, 822, 153488. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153488>
- Zhang, T., Hu, Y., Jiang, L., Yao, S., Lin, K., Zhou, Y., & Cui, C. (2019). Removal of antibiotic resistance genes and control of horizontal transfer risk by UV, chlorination and UV/chlorination treatments of drinking water. *Chemical Engineering Journal*, 358, 589–597. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.09.218>
- Zhang, J., Li, W., Chen, J., Wang, F., Qi, W., & Li, Y. (2019). Impact of disinfectant on bacterial antibiotic resistance transfer between biofilm and tap water in a simulated distribution network. *Environmental pollution*, 246, 131-140.

- Zhang, Y.; Gu, A.Z.; He, M.; Li, D.; Chen, J. Subinhibitory Concentrations of Disinfectants Promote the Horizontal Transfer of Multidrug Resistance Genes within and across Genera. *Environ. Sci. Technol.* 2017, 51, 570–580.
- Zhang, Y., Zhuang, Y., Geng, J., Ren, H., Zhang, Y., Ding, L., & Xu, K. (2015). Inactivation of antibiotic resistance genes in municipal wastewater effluent by chlorination and sequential UV/chlorination disinfection. *Science of The Total Environment*, 512–513, 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.01.028>
- Zhang, Y.B., Li, Y. and Sun, X.L. (2011) ‘Antibiotic resistance of bacteria isolated from shrimp hatcheries and cultural ponds on Donghai Island, China’, *Marine Pollution Bulletin*, 62(11), pp. 2299–2307. doi:10.1016/j.marpolbul.2011.08.048.
- Zhang T, Li B. Occurrence, transformation, and fate of antibiotics in municipal wastewater treatment plants. *Crit Rev Environ Sci Technol.* 2011;41:951–998. doi: 10.1080/10643380903392692.
- Zhang, X.-X., Zhang, T., & Fang, H. H. (2009). Antibiotic resistance genes in water environment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(3), 397–414. doi:10.1007/s00253-008-1829-z
- Zhao, Y., Hu, Z., Xie, H., Wu, H., Wang, Y., Xu, H. Zhang, J. (2023). Size-dependent promotion of micro(nano)plastics on the horizontal gene transfer of antibiotic resistance genes in constructed wetlands. *Water Research*, 244, 120520. doi:10.1016/j.watres.2023.120520
- Zheng J, Zhou ZC, Chen F, Chen T, Wei YY, Han Y, Chen H. [Reducing Effect of Three Disinfection Technologies for Sulfonamides Resistance Genes]. *Huan Jing Ke Xue.* 2017 Apr 8;38(4):1497-1505. Chinese. doi: 10.13227/j.hjkx.201610059. PMID: 29965152.

Ελληνική βιβλιογραφία

- Αγγελάκης, Tchobanoglous (1995). Υγρά Απόβλητα: Φυσικά συστήματα επεξεργασίας και ανάκτησης, επαναχρησιμοποίησης και διάθεσης εκροών, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης
- Ανδρεαδάκης Ανδρέας, (2017) Δυνατότητες εξοικονόμησης και ορθολογικής διαχείρισης αστικού νερού,. mycourses.gr
- Ανδρεαδάκης Ανδρέας (2015). Επεξεργασία και Διαχείριση Λυμάτων και Ιλύος. Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο
- Κούγκολος, Α. (2007). «Εισαγωγή στην περιβαλλοντική μηχανική», Θεσσαλονίκη: Εκδ. Τζιόλα
- Μαρκαντωνάτος, Γρ., (1986), Επεξεργασία και Διάθεση υγρών αποβλήτων, 1η έκδοση, Εκδόσεις Παπασωτηρίου, Αθήνα
- Νταρακάς, Ε. (2016). «Τεχνική περιβάλλοντος-Διεργασίες επεξεργασίας νερού και υγρών αποβλήτων», Θεσσαλονίκη: Εκδ. Σοφία
- Νταράκας Ε. (2014), «Διεργασίες επεξεργασίας υγρών αποβλήτων», Τεχνική Περιβάλλοντος (Π.Σ. ΑΠΘ)

Ιστότοποι

- ΕΟΔΥ <https://eody.gov.gr/mikroviaki-antochi-kai-loimoxeis-poy-syndeontai-me-choroys-parochis-ygeias/>
- A European One Health Action Plan Against Antimicrobial Resistance (AMR) https://health.ec.europa.eu/system/files/2020-01/amr_2017_action-plan_0.pdf
- European law union <https://eur-lex.europa.eu/legal-content>
- Maine Center for Disease Control & Prevention, <https://www.maine.gov/dhhs/mecdc/environmental-health>

7. Παράρτημα

7.1. Στάδια επεξεργασίας εγκαταστάσεων

- *Ολικά κολοβακτηρίδια (TC)*

Πίνακας 7.1.1. Πλήθος ολικών κολοβακτηριδίων κατά τα στάδια επεξεργασίας των δύο εγκαταστάσεων.

CFU/100 ml	Ψυττάλεια 21.2	Ψυττάλεια 28.2	Hydro 1 / 13.3	Hydro 1 / 20.3
In ΚΕΛΨ/ In Άντισσας	8.5E+06	1.5E+07	1.3E+07	1.8E+07
Έξοδος πρωτοβάθμιας / UASBout	7.3E+06	2.7E+07	1.3E+06	1.3E+06
TE / CWout	3.9E+04	1.0E+05	6.8E+03	3.2E+04

Πίνακας 7.1.2. Ποσοστό απομάκρυνσης και λογαριθμική μείωση ολικών κολοβακτηριδίων κατά τα στάδια επεξεργασίας των δύο εγκαταστάσεων.

	ΚΕΛΨ 1		ΚΕΛΨ 2		Hydro 1		Hydro 2	
	Removal %	Log reduction	Removal %	Log reduction	Removal %	Log reduction	Removal %	Log reduction
Έξοδος πρωτοβάθμιας / UASBout	14%	-0,1	-82%	0,3	90,0%	-1,0	92,9%	-1,1
TE / CWout	99,5%	-2,3	99,6%	-2,4	99,5%	-2,3	97,6%	-1,6

Πίνακας 7.1.3. Ποσοστό απομάκρυνσης και λογαριθμική μείωση ολικών κολοβακτηριδίων στις δύο εγκαταστάσεις.

TC	Removal%	log reduction
ΚΕΛΨ 1	99,5%	-2
ΚΕΛΨ 2	99,3%	-2
Hydro 1	99,9%	-3
Hydro 2	99,8%	-3

Πίνακας 7.1.4. Ποσοστό *E.coli* που περιείχαν τα ολικά κολοβακτηρίδια κατά τα στάδια επεξεργασίας των δύο εγκαταστάσεων.

	% <i>E.coli</i> of TC - Mean ΚΕΛΨ (CFU/100ml)	% <i>E.coli</i> of TC - Mean Hydro (CFU/100ml)
In	28%	52%
Έξοδος πρωτοβάθμιας / UASBout	25%	69%
TE / Cwout	40%	11%

- Πλήθος *E.coli*

Πίνακας 7.1.5. Στάδια επεξεργασίας εγκαταστάσεων Ψυττάλειας 1 (Πλήθος *E.coli* και ανθεκτικών στα αντιβιοτικά *E.coli*)

(CFU/100ml)	<i>E.coli</i>	AMP	TET	ERY	CIP	AMX
In(1)	2.0E+06	8.5E+05	3.1E+05	1.0E+06	2.9E+05	7.9E+05
1α (1)	2.8E+06	6.7E+05	2.7E+05	8.2E+05	2.1E+05	5.0E+05
TE (1)	9.4E+03	1.9E+03	2.8E+02	1.2E+03	5.9E+02	2.1E+03

*Πίνακας 7.1.6. Στάδια επεξεργασίας εγκαταστάσεων Ψυτάλειας 2 (Πλήθος *E.coli* και ανθεκτικών στα αντιβιοτικά *E.coli*)*

(CFU/100ml)	<i>E.coli</i>	AMP	TET	ERY	CIP	AMX
In(2)	4.6E+06	1.1E+06	5.8E+05	1.1E+06	5.1E+05	1.1E+06
1α (2)	5.6E+06	1.0E+06	4.3E+05	9.0E+05	3.6E+05	8.7E+05
TE (2)	4.7E+04	6.2E+03	3.2E+03	6.3E+03	2.6E+03	6.1E+03

*Πίνακας 7.1.7. Στάδια επεξεργασίας εγκαταστάσεων Αντισσας 1 (Πλήθος *E.coli* και ανθεκτικών στα αντιβιοτικά *E.coli*)*

(CFU /100ml)	<i>E.coli</i>	AMP	TET	ERY	CIP	AMX
In	5.4E+06	6.8E+05	5.1E+05	1.6E+06	5.0E+05	7.3E+05
UASBout	9.2E+05	3.6E+04	2.7E+04	2.0E+05	2.3E+04	4.6E+04
Cwout	1.3E+03	3.0E+01	1.5E+01	3.0E+02	4.0E+01	4.3E+01

*Πίνακας 7.1.8. Στάδια επεξεργασίας εγκαταστάσεων Αντισσας 2 (Πλήθος *E.coli* και ανθεκτικών στα αντιβιοτικά *E.coli*)*

(CFU /100ml)	<i>E.coli</i>	AMP	TET	ERY	CIP	AMX
In	1.1E+07	1.5E+06	6.8E+05	1.4E+06	5.5E+05	1.1E+06
UASBout	8.8E+05	9.4E+04	5.8E+04	1.5E+05	4.3E+04	1.1E+05
Cwout	3.0E+03	4.7E+02	2.1E+02	1.5E+03	9.0E+01	4.9E+02

Πίνακας 7.1.9. Λογαριθμική μείωση E.coli στις δύο εξεταζόμενες εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων

Log reduction	<i>E.coli</i>	AMP	TET	ERY	CIP	AMX
ΚΕΛΨ 1	-2	-3	-3	-3	-3	-3
ΚΕΛΨ 2	-2	-2	-2	-2	-2	-2
Hydro 1	-4	-4	-5	-4	-4	-4
Hydro 2	-4	-3	-4	-3	-4	-3

Πίνακας 7.1.10. Ποσοστό απομάκρυνσης E.coli και ανθεκτικών στα αντιβιοτικά E.coli στις δύο εξεταζόμενες εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων.

Removal%	<i>E.coli</i>	AMP	TET	ERY	CIP	AMX
ΚΕΛΨ 1	99,53%	99,78%	99,91%	99,88%	99,79%	99,74%
ΚΕΛΨ 2	98,97%	99,45%	99,45%	99,43%	99,50%	99,43%
Hydro 1	99,98%	100,00%	100,00%	99,98%	99,99%	99,99%
Hydro 2	99,97%	99,97%	99,97%	99,89%	99,98%	99,95%

Πίνακας 7.1.11. Ποσοστό ανθεκτικότητας E.coli στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά κατά τα στάδια της εγκατάστασης επεξεργασίας λυμάτων Ψοττάλειας.

Antibiotic Resistance % - ΚΕΛΨ	AMP	TET	ERY	CIP	AMX
In -1	43%	16%	50%	14%	40%
In -2	25%	13%	24%	11%	23%
Έξοδος 1ας -1	24%	10%	29%	7%	18%
Έξοδος 1ας -2	18%	8%	16%	6%	16%
TE - 1	20%	3%	13%	6%	22%
TE - 2	13%	7%	13%	5%	13%

Πίνακας 7.1.12. Ποσοστό ανθεκτικότητας E.coli στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά κατά τα στάδια της εγκατάστασης επεξεργασίας λυμάτων Άντισσας.

Antibiotic Resistance % - Hydro	AMP	TET	ERY	CIP	AMX
In - 1	13%	10%	31%	9%	14%
In - 2	13%	6%	13%	5%	10%
UASBout - 1	4%	3%	22%	2%	5%
UASBout - 2	11%	7%	17%	5%	12%
Cwout - 1	2%	1%	23%	3%	3%
Cwout - 2	16%	7%	50%	3%	16%

7.2. Χλωρίωση δειγμάτων

7.2.1. Προπείραμα

Πίνακας 7.2.1.1. Δεδομένα προπειραμάτων χλωρίωσης.

Αρ. δείγματος	TE (1)	TE (2)
Περιοχή δειγματοληψίας	Ψυττάλεια	Ψυττάλεια
Αρχική Δόση Χλωρίου (mg/L)	9	3
Υπολειμματικό ολικό χλώριο - C (mg/L)	1.2	1.3
Χρόνος επαφής - t (min)	30	15
Ct (mg Cl₂ min/L)	35	20

Πίνακας 7.2.1.2. Πλήθος ολικών κολοβακτηριδίων στα δύο εξεταζόμενα Ct (mg Cl₂ min/L) των προπειραμάτων.

Ct (mg Cl ₂ min/L)	20	35
Prior to Chlorination - Mean TC (CFU/100ml)	4E+04±1E+04	1E+04±2E+03
After Chlorination - Mean TC (CFU/100ml)	1E+02±3E+01	2E+01±8E+00
Removal (%)	99,7	99,8
log reduction	2	3

Πίνακας 7.2.1.3. Πλήθος, ποσοστό απομάκρυνσης, λογαριθμική μείωση του πλήθους των βακτηρίων E.coli λόγω της διαδικασίας της χλωρίωσης και ποσοστά ανθεκτικότητας στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά πριν και μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης για Ct 20 mg Cl₂ min/L.

Ct 20 mg Cl ₂ min/L	E.coli	AMP	TET	ERY	CIP
Prior to Chlorination CFU/100 ml	9,00E+03 ±4,50E+00	2,12E+03 ±4,21E+02	6,50E+02 ±4,55E+00	2,73E+03 ±3,64E+02	7,27E+02 ±7,27E+01
After Chlorination CFU/100 ml	6 ±2,50E+00	1 ±0,00E+00	3 ±2,50E+00	2 ±2,00E+00	2 ±1,00E+00
Resistance % - Prior		24%	7%	30%	8%
Resistance % - After		18%	45%	36%	36%
Removal %	99,94%	99,95%	99,62%	99,93%	99,73%
Log reduction	3	3	2	3	3

Πίνακας 7.2.1.4. Πλήθος, ποσοστό απομάκρυνσης, λογαριθμική μείωση του πλήθους των βακτηρίων E.coli λόγω της διαδικασίας της χλωρίωσης και ποσοστά ανθεκτικότητας στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά πριν και μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης για Ct 35 mg Cl₂ min/L.

Ct 35 mg Cl ₂ min/L	<i>E.coli</i>	AMP	TET	ERY	CIP
Prior to Chlorination	3,53E+03	8,05E+02	5,27E+02	1,27E+03	4,00E+02
CFU/100 ml	±2,87E+02	±6,88E+01	±3,64E+01	±4,55E+02	±0,00E+00
After Chlorination	2	1	0	0	1
CFU/100 ml	±1,00E+00	±0,00E+00	±0,00E+00	±0,00E+00	±0,00E+00
Resistance % - In		23%	15%	36%	11%
Resistance % - Out		50%	0%	0%	50%
Removal %	99,94%	99,88%	100,00%	100,00%	99,75%
Log reduction	3	3	2	3	3

Πίνακας 7.2.1.5. Πλήθος E.coli και ανθεκτικών E.coli στην αμπικιλίνη (CFU/100 ml) κατά το πείραμα ανακαλλιέργειας για τα Ct (mg Cl₂ min/L) των προπειραμάτων.

CFU/100 ml	<i>E.coli</i>	AMP
Regrowth 20 mg Cl ₂ min/L	29	0
Regrowth 35 mg Cl ₂ min/L	2±1,5	0

Πίνακας 7.2.1.6. Λόγος Cr/Ct των E.coli και των ανθεκτικών E.coli στην αμπικιλίνη (CFU/100 ml) κατά το πείραμα ανακαλλιέργειας για τα Ct (mg Cl₂ min/L) των προπειραμάτων.

Cr/Ct	<i>E.coli</i>	Amp
Regrowth Ct 20 mg Cl ₂ min/L	5	0
Regrowth Ct 35 mg Cl ₂ min/L	1	0

7.2.2. Πείραμα

Πίνακας 7.2.2.1. Δεδομένα πειραμάτων χλωρίωσης.

Αρ. δείγματος	TE (1)	TE (2)	TE (3)	R2 (1)	R2 (2)
Περιοχή δειγματοληψίας	Ψυττάλεια	Ψυττάλεια	Ψυττάλεια	Άντισσα	Άντισσα
Αρχική Δόση Χλωρίου (mg/L)	3	2	1.5	1.5	1
Υπολειμματικό ολικό χλώριο - C (mg/L)	1.7	1.0	0.9	0.6	0.5
Ct (mg Cl ₂ min/L)	50	35	30	20	15

Πίνακας 7.2.2.2. Πλήθος ολικών κολοβακτηριδίων στα δύο εξεταζόμενα Ct (mg Cl₂ min/L) των πειραμάτων.

Ct (mg Cl ₂ min/L)	15	20	30	35	50
Prior to Chlorination - Mean TC (CFU/100ml)	7E+03± 3E+02	5E+04± 8E+03	7E+05± 7E+04	1E+07± 1E+07	2E+05± 3E+04
After Chlorination - Mean TC (CFU/100ml)	3E+02± 7E+01	4E+02± 7E+01	2E+04± 7E+03	6E+03± 5E+02	1E+02± 3E+04
Removal (%) log reduction	96,0 1	99,2 2	97,8 2	100 3	99,9 3

Πίνακας 7.2.2.3. Ποσοστό *E.coli* που περιείχαν τα ολικά κολοβακτηρίδια στα εξεταζόμενα δείγματα πριν και μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης.

Ct (mg Cl₂ min/L)	15	20	30	35	50
% <i>E.coli</i> of TC - Prior	54%	30%	5%	0,1%	27%
% <i>E.coli</i> of TC - After	5%	10%	2%	0,4%	6%

Πίνακας 7.2.2.4. Πλήθος *E.coli* πριν τη διαδικασίας της χλωρίωσης για τα εξεταζόμενα Ct (mg Cl₂ min/L).

Prior to Chlorination					
Ct	<i>E.coli</i>	AMP	TET	ERY	CIP
50	4.7E+04±	1.4E+04±	3.0E+03±	1.6E+04±	4.5E+03±
	2,7E+03	5,0E+02	0,0E+00	5,5E+03	1,5E+03
35	1.5E+04±	6.9E+03±	1.6E+03±	4.4E+03±	2.6E+03±
	2,3E+03	1,1E+03	2,3E+02	2,3E+02	4,1E+02
30	3.8E+04±	7.4E+03±	1.4E+03±	6.3E+03±	2.9E+03±
	4,5E+03	6,4E+02	1,4E+01	3,2E+02	6,4E+02
20 (CW)	1.4E+04±	7.3E+02±	2.5E+02±	2.1E+03±	1.5E+02±
	2,7E+03	1,6E+02	1,5E+02	4,5E+00	5,0E+01
15 (CW)	3.7E+03±	2.2E+02±	6.0E+01±	9.0E+02±	5.8E+02±
	1,9E+02	8,8E+01	2,0E+01	1,4E+01	8,6E+01

Πίνακας 7.2.2.5. Πλήθος *E.coli* μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης για τα εξεταζόμενα Ct (mg Cl₂ min/L).

After Chlorination					
Ct	<i>E.coli</i>	AMP	TET	ERY	CIP
50	8.0E+00±	1.0E+00±	0.0E+00±	1.0E+00±	1.0E+00±
	0,0E+00	5,0E-01	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
35	2.2E+01±	2.2E+01±	0.0E+00±	1.9E+01±	1.2E+01±
	5,0E-01	4,5E+00	0,0E+00	2,5E+00	1,5E+00
30	2.8E+02±	4.6E+01±	2.0E+00±	7.4E+01±	1.2E+01±
	5,0E+01	2,5E+00	0,0E+00	8,5E+00	2,5E+00
20 (CW)	3.8E+01±	0.0E+00±	0.0E+00±	0.0E+00±	0.0E+00±
	3,2E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
15 (CW)	1.4E+01±	1.0E+00±	0.0E+00±	5.0E-01±	8.0E+00±
	3,6E+00	5,0E-01	0,0E+00	5,0E-01	1,0E+00

Πίνακας 7.2.2.6. Ποσοστό απομάκρυνσης *E.coli* μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης για τα εξεταζόμενα Ct (mg Cl₂ min/L).

Removal %	<i>E.coli</i>	AMP	TET	ERY	CIP
50	99,98%	99,99%	100,00%	99,99%	99,98%
35	99,86%	99,69%	100,00%	99,58%	99,56%
30	99,27%	99,38%	99,86%	98,84%	99,60%
20	99,72%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
15	99,63%	99,54%	100,00%	99,94%	98,61%

Πίνακας 7.2.2.7. Λογαριθμική μείωση, για τα εξεταζόμενα Ct (mg Cl₂ min/L).

	<i>E.coli</i>	AMP	TET	ERY	CIP
50	-4	-4	-4	-4	-4

35	-3	-3	-4	-2	-2
30	-2	-2	-3	-2	-2
20	-3	-4	-3	-4	-3
15	-2	-2	-3	-3	-2

Πίνακας 7.2.2.8. Ρυθμός μείωσης K, για τα εξεταζόμενα Ct (mg Cl₂ min/L).

Log(No/N)=kt	E.coli	AMP	TET	ERY	CIP
50	-0,13	-0,14	-0,15	-0,14	-0,12
35	-0,09	-0,08	-0,14	-0,08	-0,08
30	-0,07	-0,07	-0,10	-0,06	-0,08
20	-0,09	-0,13	-0,11	-0,14	-0,11
15	-0,08	-0,08	-0,09	-0,11	-0,06

Πίνακας 7.2.2.9. Ποσοστό ανθεκτικότητας E.coli στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά, πριν τη διαδικασία της χλωρίωσης για τα εξεταζόμενα Ct (mg Cl₂ min/L).

Resistance % (Prior)	AMP	TET	ERY	CIP
15	6%	2%	25%	16%
20	5%	2%	15%	1%
30	19%	4%	17%	8%
35	46%	11%	29%	17%
50	29%	6%	33%	10%

Πίνακας 7.2.2.10. Ποσοστό ανθεκτικότητας E.coli στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά, μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης για τα εξεταζόμενα Ct (mg Cl₂ min/L).

Resistance % (After)	AMP	TET	ERY	CIP
15	7%	0%	4%	59%

20	0%	0%	0%	0%
30	16%	1%	26%	4%
35	100%	0%	86%	53%
50	13%	0%	13%	13%

7.2.3. Πείραμα Regrowth

Πίνακας 7.2.3.1. Πλήθος *E.coli* και ανθεκτικών *E.coli* στην αμπικιλίνη (CFU/100 ml) κατά το πείραμα ανακαλλιέργειας για τα Ct (mg Cl₂ min/L) των πειραμάτων.

	<i>E.coli</i>	Regrowth <i>E.coli</i>	AMP <i>E.coli</i>	Regrowth Amp <i>E.coli</i>
50	8.0E+00± 0,0E+00	1,00E+01± 2,27E+00	1.0E+00± 5,0E-01	2,00E+00± 0,00E+00
35	2.8E+02± 5,0E+01	6,00E+01± 1,40E+01	4.6E+01± 2,5E+00	3,00E+01± 4,50E+00
30	2.2E+01± 5,0E-01	4,00E+02± 9,00E+01	2.2E+01± 4,5E+00	2,00E+02± 2,50E+01
20	3.8E+01± 3,2E+00	8,00E+00± 3,50E+00	0.0E+00± 0,0E+00	1,00E+00± 5,00E-01
15	1.4E+01± 3,6E+00	5,00E+00± 1,00E+00	1.0E+00± 5,0E-01	3,00E+00± 1,50E+00

Πίνακας 7.2.3.2. Λόγος Ct/Ct των *E.coli* και των ανθεκτικών *E.coli* στην αμπικιλίνη (CFU/100 ml) κατά το πείραμα ανακαλλιέργειας για τα Ct (mg Cl₂ min/L) των πειραμάτων.

	Regrowth <i>E.coli</i>	AMP <i>E.coli</i>
50	1,3	2,0
35	3,0	1,5
30	1,3	4,0

20	0,2	2,0
15	0,5	3,0
