

Interreg
Ελλάδα-Κύπρος

Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης



T4H



ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΝΩΣΗ



Τίτλος Πράξης: Επιτόπια Διαχείριση Νοσοκομειακών Υγρών Αποβλήτων με Στόχο τη Βελτίωση της Απόδοσης των Εγκαταστάσεων Επεξεργασίας Λυμάτων και της Αξιοποίησης των Εκροών (Treatment for Hospitals)

Ακρώνυμο: T4H

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ – ΔΙΕΘΝΕΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ
ΝΕΡΟΥ ΝΗΡΕΑΣ: Λειτουργία των πιλοτικών μονάδων – 4.4.1**

25/10/2023





ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ ΕΥΡΩΠΑΙΚΗ ΕΝΩΣΗ ΚΥΠΡΙΑΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ



Interreg
Ελλάδα-Κύπρος
Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης
T4H

Η Πράξη συγχρηματοδοτείται από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ε.Τ.Π.Α.) και από εθνικούς πόρους της Ελλάδας και της Κύπρου στο πλαίσιο του Προγράμματος Συνεργασίας INTERREG V-A Ελλάδα-Κύπρος 2014-2020



Πανεπιστήμιο Κύπρου
Τμήμα Πολιτικών Μηχανικών
και Μηχανικών Περιβάλλοντος



NIWEAS
International Water Research Center

Δικαιούχος 4:
Πανεπιστήμιο Κύπρου –
Διεθνές Ερευνητικό Κέντρο Νερού
Νηρέας

Το Διεθνές Ερευνητικό Κέντρο Νερού Νηρέας ανέλαβε όλες τις απαιτούμενες δειγματοληψίες και αναλύσεις στην πιλοτική μονάδα που εγκαταστάθηκε στο Γενικό Νοσοκομείο της Λάρνακας. Οι αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν αφορούσαν ρύπους αναδυόμενου ενδιαφέροντος (Contaminants of Emerging Concern – CECs) με έμφαση στις φαρμακευτικές ενώσεις καθώς και βακτήρια και γονίδια που φέρουν ανθεκτικότητα στις αντιβιοτικές ενώσεις (Antibiotic Resistance Bacteria & Antibiotic Resistance Genes – ARBs & ARGs). Επιπλέον, επιλεγμένα δείγματα στάλθηκαν σε εξωτερικούς εμπειρογνώμονες για πιο εξειδικευμένες αναλύσεις. Συγκεκριμένα, με χρήση υγρής χρωματογραφίας-φασματογράφου μάζας LC/ESI-QTOF-MS (Liquid Chromatography and Electrospray Ionization Quadrupole Time-Of-Flight Mass Spectrometry) και εφαρμογή τεχνικών στοχευμένης ανάλυσης (target screening) μελετήθηκε η παρουσία περισσότερων από 2000 μικρορύπων δίνοντας έμφαση στις φαρμακευτικές ουσίες. Όσον αφορά τους μικροβιολογικούς παράγοντες πραγματοποιήθηκε ολική αλληλούχηση γονιδίων (Sequencing) και στη συνέχεια έγινε επεξεργασία των ευρημάτων και αναλύθηκαν περαιτέρω μέσω βιοπληροφορικής (Bioinformatics).

Πανεπιστήμιο Κύπρου

25/10/2023

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

1	Εισαγωγή.....	1
1.1	Στόχος.....	1
1.2	Αρμοδιότητες.....	1
1.3	Πιλοτική μονάδα.....	2
1.4	Χρονικό Πλαίσιο.....	4
1.5	Δυσκολίες – Προβλήματα.....	4
2	Μέθοδοι.....	5
2.1	Διεθνές Ερευνητικό Κέντρο Νερού Νηρέας.....	5
2.1.1	Φυσικοχημικές Αναλύσεις.....	5
2.1.2	Μικροβιολογικές Αναλύσεις.....	6
2.1.3	Αναλύσεις Φαρμακευτικών ουσιών.....	8
2.1.4	Πείραμα <i>Lemna minor</i>	9
2.2	Εξειδικευμένες αναλύσεις.....	10
2.2.1	Ανάλυση μικρορύπων με χρήση LC/ESI-QTOF-MS.....	11
2.2.2	Αλληλούχηση προϊόντων PCR του γονιδίου 16S rRNA (Sequencing) και ανάλυση αποτελεσμάτων μέσω βιοπληροφορικής (Bioinformatics).....	11
3	Αποτελέσματα.....	13
3.1	Διεθνές Ερευνητικό Κέντρο Νερού Νηρέας.....	14
3.1.1	Φυσικοχημικές αναλύσεις.....	14
3.1.2	Μικροβιολογικές αναλύσεις.....	20
3.1.3	Αναλύσεις Φαρμακευτικών ουσιών.....	23
3.1.4	Πείραμα <i>Lemna minor</i>	27
3.2	Εξειδικευμένες αναλύσεις.....	29
3.2.1	Ανάλυση μικρορύπων με χρήση LC/ESI-QTOF-MS.....	29
3.2.2	Ανάλυση αποτελεσμάτων αλληλούχησης προϊόντων PCR του γονιδίου 16S rRNA (Sequencing) μέσω βιοπληροφορικής (Bioinformatics).....	34
4	Συμπεράσματα.....	49
5	Παραρτήματα.....	54

5.1	Παράρτημα Α.....	54
5.2	Παράρτημα Β.....	55
5.3	Παράρτημα Γ.....	61
6	Βιβλιογραφία.....	65

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 3-1:	Διακύμανση ολικών αιρούμενων στερεών στις επιμέρους τεχνολογίες της πιλοτικής μονάδας στα δείγματα που λήφθηκαν κατά τις 23 δειγματοληψίες.....	16
Διάγραμμα 3-2:	Μέσες λογαριθμικές συγκεντρώσεις των βακτηρίων ESKAPE που ποσοτικοποιήθηκαν από σύνολο 7 δειγματοληψιών στις επιμέρους τεχνολογίες της πιλοτικής μονάδας (απόλυτη αφθονία)	20
Διάγραμμα 3-3:	Ποσοστό των νεκρών βακτηρίων ESKAPE που ποσοτικοποιήθηκαν από σύνολο 7 δειγματοληψιών στις επιμέρους τεχνολογίες της πιλοτικής μονάδας.....	21
Διάγραμμα 3-4:	Μέσες λογαριθμικές τιμές συγκεντρώσεων των γονιδίων που ποσοτικοποιήθηκαν από σύνολο 7 δειγματοληψιών στις επιμέρους τεχνολογίες της πιλοτικής μονάδας (απόλυτη αφθονία)	22
Διάγραμμα 3-5:	Λόγος μέσης συγκέντρωσης γονιδίων ως προς τη μέση συγκέντρωση του γονιδίου 16S rRNA ανά σημείο δειγματοληψίας	23
Διάγραμμα 3-6:	Απεικόνιση των 7 διαφορετικών σημείων δειγματοληψίας (Barplots) σε συνδυασμό με στατιστική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε σε αυτά (ANOVA ακολουθούμενα από το HSD του Tukey (ή τις μη παραμετρικές εναλλακτικές Kruskal Wallis και Wilcoxon) για τους τέσσερεις αντιπροσωπευτικούς δείκτες α-ποικιλότητας (από αριστερά προς τα δεξιά: Shannon, Inverse Simpson, Fisher's α και Observed Richeaness). Τα δείγματα είναι ομαδοποιημένα ανάλογα με την ημέρα δειγματοληψίας και εμφανίζονται και τα δείγματα τα οποία επεξεργάστηκαν με PMA (κατάληξη PY ονόματος) ή όχι (κατάληξη PN ονόματος) ...	36
Διάγραμμα 3-7:	Απεικόνιση των δειγμάτων της νοσοκομειακής ροής κατά την διάρκεια της λειτουργίας της πιλοτικής μονάδας (9 μήνες), δείγματα εισόδου και εξόδου από τον πλήρους κλίμακας σταθμό επεξεργασίας αστικών λυμάτων της Λαρνακας (Barplots) σε συνδυασμό με στατιστική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε σε αυτά (ANOVA ακολουθούμενα από το HSD του Tukey (ή τις μη παραμετρικές εναλλακτικές Kruskal Wallis και Wilcoxon) για τους τέσσερεις αντιπροσωπευτικούς δείκτες α-ποικιλότητας (από αριστερά προς τα δεξιά: Shannon, Inverse Simpson, Fisher's α και observed richness). Τα δείγματα επεξεργάστηκαν με και χωρίς μεταχείριση με PMA	37

Διάγραμμα 3-8: Διαφορές σύνθεσης μεταξύ σημείων δειγματοληψίας και ημέρες δειγματοληψίας δειγμάτων που δεν λαμβάνουν PMA σε διάγραμμα διασποράς μη μετρικής πολυδιάστατης κλιμακοποίησης (NMDS)	39
Διάγραμμα 3-9: Διαφορές σύνθεσης μεταξύ δειγματοληπτικών εκστρατειών μέσω των διαφόρων σημείων δειγματοληψίας, για δείγματα που δεν λαμβάνουν PMA: ανάλυση κύριων καμπυλών απόκρισης (PRC) ανά σημείο δειγματοληψίας μεταξύ εκστρατειών που δείχνουν τα 30 γένη που είναι κυρίως υπεύθυνα για τις παρατηρούμενες διαφορές και τη διακύμανση που εξηγείται από το μοντέλο (R^2) και σημασία p-value (A), στοιβαγμένο ραβδόγραμμα των δειγμάτων που δείχνει μόνο τα ποσοστά των 30 γενών με ακραίες βαθμολογίες PRC (B), ανάλυση PRC μόνο για γένη που σχετίζονται με παθογόνα (Γ) και στοιβαγμένο ραβδόγραμμα των δειγμάτων που δείχνει τα ποσοστά όλα τα γένη που συνδέονται με παθογόνα είδη (Δ). Το συμπέρασμα γενών που συνδέονται με παθογόνο βασίστηκε στην μεθοδολογία της μελέτης από τους Bartlett et al, (2022)	41
Διάγραμμα 3-10: Διαφορές σύστασης κοινοτήτων μεταξύ δειγμάτων που έλαβαν μεταχείριση PMA (προϊόντα PCR που προέρχονται από άθικτα κύτταρα) έναντι αυτών που δεν έλαβαν (ολικό DNA): ανάλυση PRC ανά σημείο δειγματοληψίας κατά την 1η εκστρατεία δειγματοληψίας για τα 30 πλέον υπεύθυνα γένη για τις παρατηρούμενες διαφορές μαζί με τον συντελεστή προσδιορισμού (R^2) και τις τιμές σημαντικότητας p (A), διαστρωματωμένα ραβδογράμματα των δειγμάτων των 30 γενών με τις πλέον ακραίες τιμές PRC (B), αποτελέσματα της PRC της 2ης εκστρατείας (Γ) και το αντίστοιχο ραβδόγραμμα (Δ).....	44
Διάγραμμα 3-11: Διαφορές σύστασης κοινοτήτων μεταξύ δειγμάτων που έλαβαν μεταχείριση PMA (προϊόντα PCR που προέρχονται από άθικτα κύτταρα) έναντι αυτών που δεν έλαβαν (ολικό DNA) μόνο για την περίπτωση των μικροοργανισμών που σχετίζονται με παθογόνους: ανάλυση PRC ανά σημείο δειγματοληψίας κατά την 1 ^η εκστρατεία δειγματοληψίας για τα 30 πλέον υπεύθυνα γένη για τις παρατηρούμενες διαφορές μαζί με τον συντελεστή προσδιορισμού (R^2) και τις τιμές σημαντικότητας p (A), διαστρωματωμένα ραβδογράμματα των δειγμάτων των 30 γενών με τις πλέον ακραίες τιμές PRC (B), αποτελέσματα της PRC της 2 ^{ης} εκστρατείας (Γ) και το αντίστοιχο ραβδόγραμμα (Δ).....	46
Διάγραμμα 3-12: Διαφορές σύστασης κοινοτήτων του SP1 μεταξύ της αρχικής ημερομηνίας (25/11/2022) και των υπολοίπων: ανάλυση PRC του συνόλου των προκαρυωτών δείχνοντας τα 30 πλέον υπεύθυνα γένη για τις παρατηρούμενες διαφορές μαζί με τον συντελεστή προσδιορισμού (R^2) και τις τιμές σημαντικότητας p (A), διαστρωματωμένα ραβδογράμματα των δειγμάτων των 30 γενών με τις πλέον ακραίες τιμές PRC (B), αποτελέσματα της PRC για σχετιζόμενα με παθογόνα γένη (Γ) και το αντίστοιχο ραβδόγραμμα (Δ)	48
Διάγραμμα 5-1: Διάγραμμα ροής του συστήματος της πιλοτικής μονάδας που εγκαταστάθηκε στο Γενικό Νοσοκομείο Λάρνακας.....	54

Διάγραμμα 5-2: Διακύμανση ενεργής οξύτητας ανά δειγματοληψία ανά επιμέρους τεχνολογίας της πιλοτικής μονάδας	55
Διάγραμμα 5-3: Διακύμανση αγωγιμότητας ανά δειγματοληψία ανά επιμέρους τεχνολογίας της πιλοτικής μονάδας	55
Διάγραμμα 5-4: Διακύμανση τιμών ολικών συγκεντρώσεων του Χημικά Απαιτούμενου Οξυγόνου στις επιμέρους τεχνολογίες ανά δειγματοληψία	56
Διάγραμμα 5-5: Διακύμανση τιμών διαλυτών συγκεντρώσεων του Χημικά Απαιτούμενου Οξυγόνου στις επιμέρους τεχνολογίες ανά δειγματοληψία	56
Διάγραμμα 5-6: Διακύμανση τιμών ολικών συγκεντρώσεων του Ολικού Φωσφόρου στις επιμέρους τεχνολογίες ανά δειγματοληψία	57
Διάγραμμα 5-7: Διακύμανση τιμών διαλυτών συγκεντρώσεων του Ολικού Φωσφόρου στις επιμέρους τεχνολογίες ανά δειγματοληψία	57
Διάγραμμα 5-8: Διακύμανση τιμών ολικών συγκεντρώσεων του Ολικού Αζώτου στις επιμέρους τεχνολογίες ανά δειγματοληψία	58
Διάγραμμα 5-9: Διακύμανση τιμών διαλυτών συγκεντρώσεων του Ολικού Αζώτου στις επιμέρους τεχνολογίες ανά δειγματοληψία	58
Διάγραμμα 5-10: Διακύμανση τιμών ολικών συγκεντρώσεων του Αμμωνίου στις επιμέρους τεχνολογίες ανά δειγματοληψία	59
Διάγραμμα 5-11: Διακύμανση τιμών διαλυτών συγκεντρώσεων του Αμμωνίου στις επιμέρους τεχνολογίες ανά δειγματοληψία	59
Διάγραμμα 5-12: Διακύμανση των συγκεντρώσεων του Ολικού Οργανικού Άνθρακα στις επιμέρους τεχνολογίες ανά δειγματοληψία	60

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1-1: (α) Προσχέδια πιλοτικής μονάδας με τα 7 σημεία δειγματοληψίας (β) Φωτογραφία εγκατεστημένης της πιλοτικής μονάδας.....	3
Εικόνα 2-1: Γραφική απεικόνιση της επεξεργασίας του ΡΜΑ.....	6
Εικόνα 2-2: Όργανο ανάλυσης αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης – qPCR (Bio-Rad CFX96 Touch).....	7
Εικόνα 3-1: Δεξαμενή καθίζησης μετά την αερόβια επεξεργασία κατά τη 2 ^η δειγματοληψία στις 5 Σεπτεμβρίου 2023.....	27

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 2-1: Όγκος δείγματος που διηθήθηκε ανά μεμβράνη διήθησης ανά στάδιο επεξεργασίας	7
--	---

Πίνακας 3-1: Σύνολο δειγματοληψιών που πραγματοποιήθηκαν κατά την 9μηνη λειτουργία της πιλοτικής μονάδας με τις ακριβείς ημερομηνίες και τον κωδικό αναφοράς τους.....	13
Πίνακας 3-2: Ανώτατα όρια των υπό εξέταση φυσικοχημικών παραγόντων που απαιτείται να τηρούνται στους Σταθμούς Επεξεργασίας Αστικών Λυμάτων της Κύπρου σύμφωνα με τις άδειες απόρριψης /επαναχρησιμοποίησης του επεξεργασμένου αποβλήτου	14
Πίνακας 3-3: Μέσες τιμές συγκεντρώσεων pH και αγωγιμότητας στις επιμέρους τεχνολογίες της πιλοτικής μονάδας που προέκυψαν από τις 23 δειγματοληψίες	14
Πίνακας 3-4: Μέσες τιμές συγκεντρώσεων ολικών στερεών και ολικών αιωρούμενων στερεών στις επιμέρους τεχνολογίες της πιλοτικής μονάδας που προέκυψαν από τις 23 δειγματοληψίες	15
Πίνακας 3-5: Είδος μέτρησης των φυσικοχημικών παραμέτρων 5–8 ανά δειγματοληψία που πραγματοποιήθηκε	16
Πίνακας 3-6: Μέσες τιμές συγκεντρώσεων του Χημικά Απαιτούμενου Οξυγόνου στις επιμέρους τεχνολογίες της πιλοτικής μονάδας για ολικές και διαλυτές συγκεντρώσεις από 16 και 10 δειγματοληψίες αντίστοιχα	17
Πίνακας 3-7: Μέσες τιμές συγκεντρώσεων Ολικού Φωσφόρου στις επιμέρους τεχνολογίες της πιλοτικής μονάδας για ολικές και διαλυτές συγκεντρώσεις από 16 και 10 δειγματοληψίες αντίστοιχα	18
Πίνακας 3-8: Μέσες τιμές συγκεντρώσεων Ολικού Αζώτου στις επιμέρους τεχνολογίες της πιλοτικής μονάδας για ολικές και διαλυτές συγκεντρώσεις από 16 και 10 δειγματοληψίες αντίστοιχα	19
Πίνακας 3-9: Μέσες τιμές συγκεντρώσεων Αμμωνίου στις επιμέρους τεχνολογίες της πιλοτικής μονάδας για ολικές και διαλυτές συγκεντρώσεις από 16 και 10 δειγματοληψίες αντίστοιχα .	19
Πίνακας 3-10: Μέσες τιμές συγκεντρώσεων Διαλυτού Οργανικού Άνθρακα στις επιμέρους τεχνολογίες της πιλοτικής μονάδας από 8 δειγματοληψίες (Δ16-Δ23)	20
Πίνακας 3-11: Μέση συγκέντρωση ανιχνεύσιμων ουσιών στις επιμέρους τεχνολογίες της πιλοτικής μονάδας και η μέση ολική απομάκρυνση που προκύπτει από τις τρεις διαδοχικές δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν	24
Πίνακας 3-12: Ακραίες και διάμεσες συγκεντρώσεις φυσικοχημικών χαρακτηριστικών στα 6 ποτήρια ζέσεως (ΠΖ) την 0 ^η και 7 ^η ημέρα ανά κύκλο δειγματοληψίας. Η απομάκρυνση υπολογίστηκε με βάση τη διαφορά των διάμεσων τιμών ως μεταξύ 0 ^{ης} και 7 ^{ης} ημέρας ανά κύκλο δειγματοληψίας.	28
Πίνακας 3-13: Συγκεντρώσεις μικρορύπων στα επιμέρους τεχνολογικά στάδια της πιλοτικής μονάδας και η ολική απομάκρυνση που επιτεύχθηκε	29
Πίνακας 5-1: Δεδομένα ανάγνωσης αλληλουχιών που πέρασαν το στάδιο ελέγχου ποιότητας ανάγνωσης και προεπεξεργασίας,	61

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΑΚΡΩΝΥΜΩΝ

AnMBR – Anaerobic Membrane BioReactor

ARBs & ARGs – Antibiotic Resistance Bacteria & Antibiotic Resistance Genes

CECs – Contaminants of Emerging Concern

COD – Chemical Oxygen Demand

Cond. – Αγωγιμότητα

DNA – Γενετικό υλικό

DOC – Dissolved Organic Carbon

IN – Ροή εισόδου στο κεντρικό σταθμό επεξεργασίας αποβλήτων της Λάρνακας

LC/ESI-QTOF-MS – Liquid Chromatography and Electrospray Ionization Quadrupole Time-Of-Flight Mass Spectrometry

NH₄⁺ – Ammonium

OUT – Ροή εξόδου από το κεντρικό σταθμό επεξεργασίας αποβλήτων την Λάρνακας

pH – Ενεργός οξύτητα

PMA – Propidium Monoazide

PRB – Principal Response Curves

PS – Ροή στο αντλιοστάσιο όπου καταλήγουν τα υγρά απόβλητα του Γενικού Νοσοκομείου Λάρνακας

qPCR – Quantitative Polymerase Chain Reaction

SPE – Solid Phase Extraction

TN – Total Nitrogen

TO – Ταξινομική(ές) ομάδα(ες)

TP – Total Phosphorus

TS – Ολικά Στερεά

TSS – Ολικά Αιωρούμενα Στερεά

UPLC-MS/MS – Ultra-Performance Liquid Chromatography - mass spectrometry

MBBR – Moving Bed BioReactor

ΠΖ1 – Νερό βρύσης με *Lemna minor*

ΠΖ2 – Απόβλητο από τον αερόβιο αντιδραστήρα με *Lemna minor*

ΠΖ3 – Απόβλητο από τον αερόβιο αντιδραστήρα χωρίς *Lemna minor*

ΠΖ4 – Απόβλητο από την δεξαμενή καθίζησης μετά τον αερόβιο αντιδραστήρα με *Lemna minor*

ΠΖ5 – Απόβλητο από την δεξαμενή καθίζησης μετά τον αερόβιο αντιδραστήρα χωρίς *Lemna minor*

ΠΖ6 – Απόβλητο από την δεξαμενή καθίζησης μετά τον αερόβιο αντιδραστήρα χωρίς Lemna minor υπό συνθήκες σκότους

ΣΔ1 (SP1) – Σημείο Δειγματοληψίας 1 (Είσοδος πιλοτικής μονάδας)

ΣΔ4 (SP4) – Σημείο Δειγματοληψίας 4 (Μετά την αναερόβια επεξεργασία)

ΣΔ5 (SP5) – Σημείο Δειγματοληψίας 5 (Μετά τον αερόβιο αντιδραστήρα)

ΣΔ6 – Σημείο Δειγματοληψίας 6 (Μετά τα φυτά Lemna minor)

ΣΔ7 (SP6) – Σημείο Δειγματοληψίας 7 (Μετά την απολύμανση με υπεριώδη ακτινοβολία και υπεροξείδιο του υδρογόνου – Έξοδος πιλοτικής μονάδας)

1 Εισαγωγή

1.1 Στόχος

Στο παρόν παραδοτέο παρουσιάζεται ο έλεγχος της λειτουργίας της πιλοτικής μονάδας μέσω πραγματοποίησης δειγματοληψιών και διαφόρων αναλύσεων. Οι αναλύσεις αφορούσαν τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά (π.χ. Χημικά Απαιτούμενο Οξυγόνο (Chemical Oxygen Demand – COD), Ολικό Φωσφόρο (Total Phosphorous – TP)), το μικροβιολογικό (βακτήρια και γονίδια) και χημικό (π.χ. φαρμακευτικές ενώσεις) φορτίο του υγρού αποβλήτου στην είσοδο και έξοδο της μονάδας καθώς και στην έξοδο των επιμέρους τεχνολογιών από τις οποίες αποτελείται η πιλοτική μονάδα.

1.2 Αρμοδιότητες

Το Διεθνές Ερευνητικό Κέντρο Νερού Νηρέας ανέλαβε όλες τις απαιτούμενες δειγματοληψίες και αναλύσεις στην πιλοτική μονάδα που εγκαταστάθηκε στο Γενικό Νοσοκομείο της Λάρνακας. Οι αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν αφορούσαν ρύπους αναδυόμενου ενδιαφέροντος (Contaminants of Emerging Concern – CECs) με έμφαση στις φαρμακευτικές ενώσεις καθώς και βακτήρια και γονίδια που φέρουν ανθεκτικότητα στις αντιβιοτικές ενώσεις (Antibiotic Resistance Bacteria & Antibiotic Resistance Genes – ARBs & ARGs).

Πιο αναλυτικά, 12 φαρμακευτικές ενώσεις προσδιορίστηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν με χρήση της υγρής χρωματογραφίας- φασματομετρίας μάζας. Η επιλογή των εν λόγω ενώσεων έγινε με βάση τις ενώσεις που περιλαμβάνονται στην EU Watch List 2018/840 εκ των οποίων οι 10 είναι αντιβιοτικές ενώσεις και επελέγησαν με βάση την κατανάλωσή τους εντός του Γενικού Νοσοκομείου Λάρνακας σύμφωνα με τα δεδομένα που μας παρείχε το εντός του νοσοκομείου φαρμακείο. Επιπλέον, μέσω εξωτερικού εμπειρογνώμονα, έγιναν πιο εξειδικευμένες αναλύσεις με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας-φασματογράφου μάζας LC/ESI-QTOF-MS (Liquid Chromatography and Electrospray Ionization Quadrupole Time-Of-Flight Mass Spectrometry) και εφαρμογή τεχνικών στοχευμένης ανάλυσης (target screening) παρέχοντας τη δυνατότητα μελέτης της παρουσίας περισσότερων από 2000 μικρορύπων.

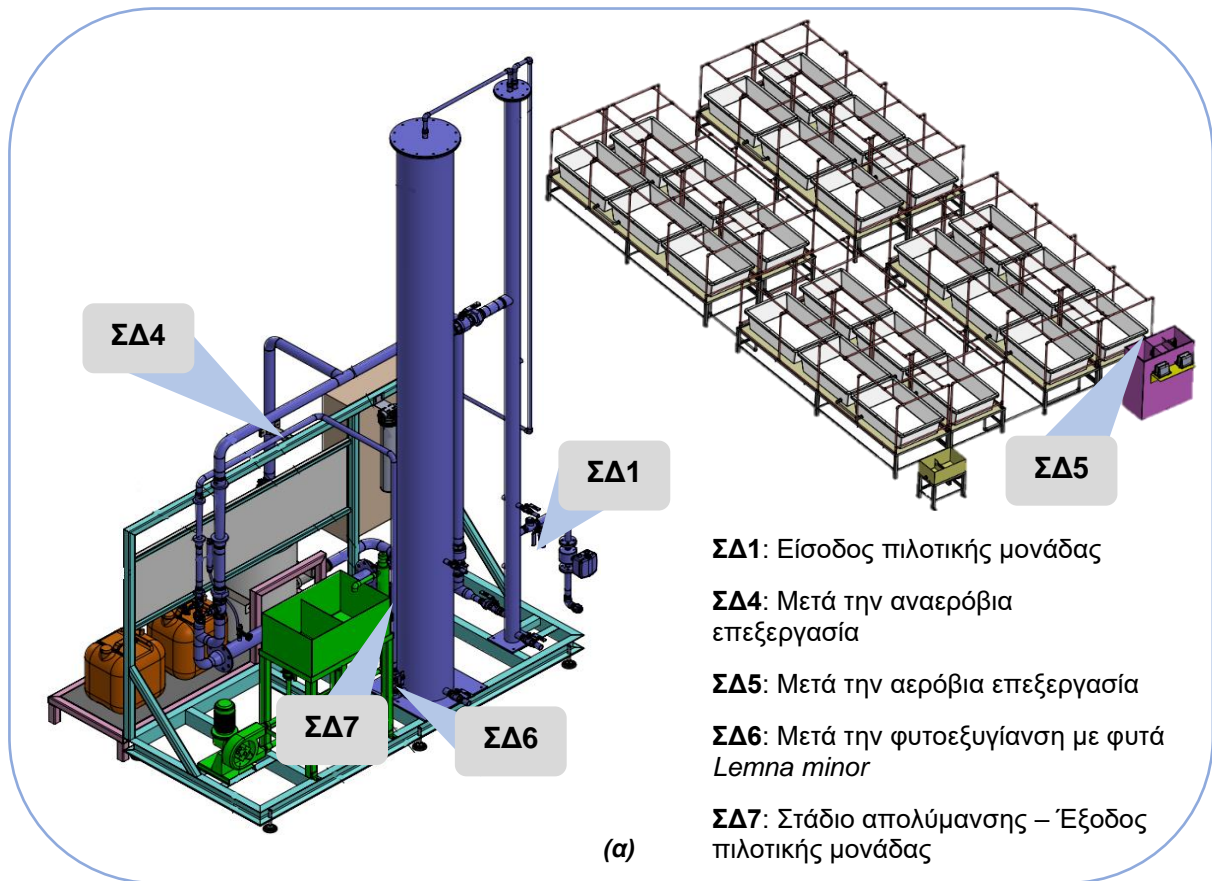
Αντίστοιχα, στη περίπτωση των μικροβιολογικών αναλύσεων εξετάστηκαν παθογόνα βακτήρια που ευθύνονται για την πλειονότητα των νοσοκομειακών λοιμώξεων, σύμφωνα με την κοινή αναφορά των European Center for Disease Prevention and Control (ECDC), Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), European Food Safety Authority (EFSA) και European Medicines Agency (EMA) του 2022, μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Quantitative Polymerase Chain Reaction – qPCR). Τα βακτήρια αυτά συγκαταλέγονται στην κατηγορία *ESKAPE* η οποία προκύπτει από τα αρχικά των 6 εν λόγω βακτηρίων που είναι *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella*

pneumoniae, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* και *Enterobacter species*. Επιπρόσθετα, επιλεγμένα δείγματα στάλθηκαν σε εξωτερικούς εμπειρογνώμονες για ολική αλληλούχηση γονιδίων (Sequencing) και στη συνέχεια ακολούθησε επεξεργασία των ευρημάτων και περαιτέρω ανάλυσή τους μέσω βιοπληροφορικής (Bioinformatics).

1.3 Πιλοτική μονάδα

Η πιλοτική μονάδα σχεδιάστηκε για δυνατότητα επεξεργασίας 1 m³ υγρού αποβλήτου και περιλαμβάνει σειρά από προχωρημένες φυσικοχημικές, βιοχημικές και χημικές τεχνολογίες. Συγκεκριμένα, αποτελείται από συνολικά 4 στάδια τεχνολογιών, την αναερόβια επεξεργασία μέσω του αντιδραστήρα MBR (Anaerobic Membrane BioReactor - AnMBR), την αερόβια μονάδα ρευστοποιημένης κλίνης (Moving Bed BioReactor - MBBR), το στάδιο φυτοεξυγίανσης με φυτά *Lemna minor* και το στάδιο απολύμανσης με προχωρημένη οξειδωση το οποίο επιτυγχάνεται με υπεριώδη ακτινοβολία σε συνδυασμό με υπεροξειδίο του υδρογόνου. Οι τεχνολογίες AnMBR, MBBR και *Lemna Minor* στοχεύουν στην απομάκρυνση οργανικού φορτίου (π.χ. COD, φαρμακευτικές ουσίες) και ανόργανου φορτίου (π.χ. άζωτο, νιτρικά) ενώ το στάδιο απολύμανσης απομακρύνει βακτήρια και γονίδια ανθεκτικά στις αντιβιοτικές ενώσεις και ενδεχόμενα φαρμακευτικές ουσίες. Ο σχεδιασμός της πιλοτικής μονάδας προέβλεψε την ύπαρξη 7 σημείων δειγματοληψίας όπως παρουσιάζονται στο διάγραμμα ροής στο Παράρτημα Α (Διάγραμμα 5-1). Η επιλογή των σημείων δειγματοληψίας έγινε ώστε να αντιπροσωπεύεται η κάθε επιμέρους τεχνολογία καταλήγοντας στα εξής 5 σημεία (Εικόνα 1-1):

- i. Είσοδος πιλοτικής μονάδας (Σημείο Δειγματοληψίας 1 – ΣΔ1)
- ii. Μετά την αναερόβια επεξεργασία (Σημείο Δειγματοληψίας 4 – ΣΔ4)
- iii. Μετά τον αερόβιο αντιδραστήρα (Σημείο Δειγματοληψίας 5 – ΣΔ5)
- iv. Μετά τα φυτά *Lemna minor* (Σημείο Δειγματοληψίας 6 – ΣΔ6)
- v. Μετά την απολύμανση με υπεριώδη ακτινοβολία και υπεροξειδίο του υδρογόνου – Έξοδος πιλοτικής μονάδας (Σημείο δειγματοληψίας 7 – ΣΔ7)



Εικόνα 1-1: (α) Προσχέδια πιλοτικής μονάδας με τα 7 σημεία δειγματοληψίας (β) Φωτογραφία εγκατεστημένης της πιλοτικής μονάδας

1.4 Χρονικό Πλαίσιο

Η εγκατάσταση της πιλοτικής μονάδας στο Γενικό Νοσοκομείο Λάρνακας πραγματοποιήθηκε στις 17 Δεκεμβρίου 2022 και παρέμεινε σε λειτουργία μέχρι τη λήξη του έργου στις 31 Οκτωβρίου 2023. Οι δειγματοληψίες στην πιλοτική μονάδα άρχισαν στις 25 Ιανουαρίου 2023 ώστε να δοθεί χρόνος στους μικροοργανισμούς (βιομάζα), στην αναερόβια και αερόβια τεχνολογία (AnMBR και MBBR), να αναπτυχθούν. Η επαρκής συγκέντρωση μικροοργανισμών είναι αναγκαία για τη σωστή λειτουργία των αντιδραστήρων και άρα τη σωστή επεξεργασία των υγρών αποβλήτων. Ποσότητες των φυτών *Lemna minor* προστέθηκαν στις λεκάνες στις 18 Ιανουαρίου 2023. Λόγω όμως των χαμηλών θερμοκρασιών δεν κατάφεραν να πολλαπλασιαστούν, ή και να επιβιώσουν. Επίσης, παρατηρήθηκε έντονη ανάπτυξη άλγης η οποία προκαλούσε προβλήματα φραγής στον εξοπλισμό αλλά και μεταφοράς στερεών στη δεξαμενή απολύμανσης επηρεάζοντας άμεσα την αποτελεσματικότητά της. Έτσι, στα μέσα Φεβρουαρίου αποφασίστηκε η κατάργηση των λεκανών *Lemna minor* και πραγματοποίηση πειράματος στο εργαστήριο με ελεγχόμενες συνθήκες οι οποίες θα προσομοίωναν στο μέγιστο δυνατό τις πραγματικές συνθήκες στην πιλοτική μονάδα (Ενότητα 2.1.4).

1.5 Δυσκολίες – Προβλήματα

Στο διάστημα λειτουργίας της μονάδας παρατηρήθηκαν αρκετά προβλήματα φραγής του εξοπλισμού, κυρίως λόγω στερεών, που είχαν ως αποτέλεσμα την αποσταθεροποίηση του συστήματος. Η ανάδοχος εταιρεία αναλάμβανε την απόφραξη του εξοπλισμού και επαναφορά της μονάδας στις ρυθμιζόμενες συνθήκες λειτουργίας της, ενώ κοντά στα τέλη Ιουλίου προχώρησε σε εγκατάσταση δύο επιπλέον δεξαμενών καθίζησης, μια πριν το σημείο ΣΔ1 και μια μετά το σημείο ΣΔ5, με σκοπό τη μείωση των στερεών.

Επιπλέον, υπήρξε δυσκολία στη διατήρηση της κατάλληλης θερμοκρασίας (35 – 40 °C) στον αναερόβιο αντιδραστήρα κατά τη διάρκεια λειτουργίας της μονάδας. Το πρόβλημα αυτό προέκυπτε λόγω ρύθμισης της λειτουργίας του θερμοστάτη εσωτερικά του αντιδραστήρα ο οποίος λειτουργούσε μόνο τις ώρες που προκαθορίστηκε να λειτουργεί και η μονάδα. Για το λόγο αυτό ζητήθηκε να τεθεί σε 24ωρη λειτουργία η μονάδα και όχι μόνο μεταξύ των ωρών 8:00 – 00:00 όπως ήταν αρχικά. Δυστυχώς, κατά τους καλοκαιρινούς μήνες, λόγω των υψηλών θερμοκρασιών και της έκθεσης της μονάδας στον ήλιο, η θερμοκρασία εντός του αντιδραστήρα ξεπερνούσε τους 40 °C κατά τις μεσημεριανές με απογευματινές ώρες. Οι διακυμάνσεις αυτές ενδέχεται να επηρέασαν την αποτελεσματικότητα της επεξεργασίας.

2 Μέθοδοι

2.1 Διεθνές Ερευνητικό Κέντρο Νερού Νηρέας

2.1.1 Φυσικοχημικές Αναλύσεις

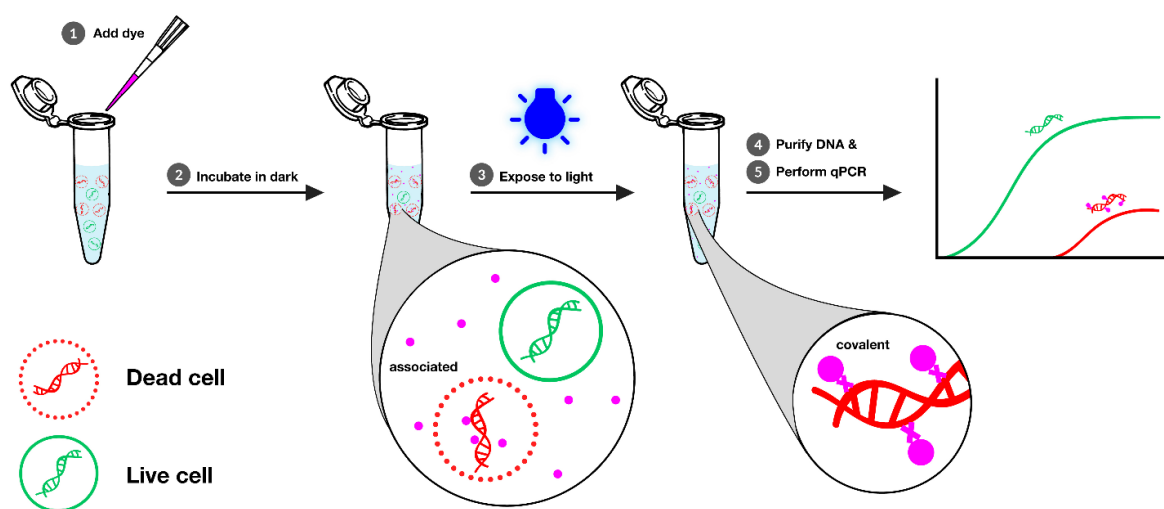
Η μέτρηση των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του αποβλήτου στα διάφορα στάδια επεξεργασίας της πιλοτικής μονάδας επιτρέπει την αξιολόγηση της λειτουργίας και της αποδοτικότητας της κάθε τεχνολογίας ξεχωριστά αλλά και όλης της μονάδας. Συγκεκριμένα τα δείγματα με την άφιξή τους στο εργαστήριο αναλύθηκαν ως προς τις ακόλουθες 9 φυσικοχημικές παραμέτρους.

1. Ενεργός οξύτητα (pH)
2. Αγωγιμότητα (Conductivity – Cond.)
3. Ολικά Στερεά (Total Solids – TS)
4. Ολικά Αιωρούμενα Στερεά (Total Suspended Solids – TSS)
5. Χημικά Απαιτούμενο Οξυγόνο (Chemical Oxygen Demand – COD)
6. Ολικός Φώσφορος (Total Phosphorous – TP)
7. Ολικό Άζωτο (Total Nitrogen – TN)
8. Αμμώνιο (Ammonium – NH_4^+)
9. Διαλυμένος Οργανικός Άνθρακας (Dissolved Organic Carbon – DOC)

Η βιωσιμότητα των μικροοργανισμών (βιομάζας), στην αναερόβια και αερόβια τεχνολογία, εξαρτάται από τη σύσταση και τα χαρακτηριστικά του υγρού αποβλήτου. Για το λόγο αυτό ο προσδιορισμός των εν λόγω παραμέτρων πέραν από την αξιολόγηση και απόδοση των τεχνολογιών είναι απαραίτητος και για τον έλεγχο των χαρακτηριστικών του υγρού αποβλήτου. Για παράδειγμα, η απόκλιση του pH από τα όρια 6.5 – 8.5 σοκάρει τη βιομάζα με αποτέλεσμα τη μη αποτελεσματική επεξεργασία του υγρού αποβλήτου. Ακόμη, ο πολλαπλασιασμός και η ευημερία της βιομάζας επηρεάζεται άμεσα από το οργανικό και θρεπτικό φορτίο που φέρει το υγρό απόβλητο και για αυτό προσδιορίζονται οι παράμετροι 5 - 9. Η μέτρηση των παραμέτρων 5 - 8 έγινε με πιστοποιημένα από διάφορα πρότυπα kits (π.χ. ISO, EPA, APHA) ενώ ο διαλυμένος οργανικός άνθρακας προσδιορίστηκε με τη χρήση του οργάνου OI Analytical Aurora-1030 TOC analyser συνδεδεμένου με OI Analytical Auto Sampler-1088. Τέλος, η μέτρηση των στερεών (παράμετροι 3 - 4) γίνεται για έλεγχο της απομάκρυνσης τους από τις εφαρμοζόμενες τεχνολογίες μιας και επηρεάζει αρνητικά το τελικό στάδιο της απολύμανσης προκαλώντας σκεδασμό/απορρόφηση της UV ακτινοβολίας.

2.1.2 Μικροβιολογικές Αναλύσεις

Οι μικροβιολογικές αναλύσεις αφορούσαν στην ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των παθογόνων βακτηρίων που περιλαμβάνονται στην κατηγορία *ESKAPE* (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* και *Enterobacter species*) και γονιδίων που φέρουν την ανθεκτικότητα στις αντιβιοτικές ενώσεις. Επιπρόσθετα, μέσω χρήσης ειδικής χρωστικής ουσίας (Propidium Monoazide - PMA), εξετάστηκε το ποσοστό των ζωντανών και νεκρών βακτηρίων/γονιδίων στα σημεία δειγματοληψίας ΣΔ1 και ΣΔ7 ώστε να διαφανεί η αποτελεσματικότητα του σταδίου απολύμανσης. Το PMA είναι μια χρωστική ουσία που διεισδύει επιλεκτικά σε κύτταρα με κατεστραμμένες κυτταρικές μεμβράνες και παρουσία φωτός 465-475 nm ενώνεται με το γενετικό υλικό του κυττάρου. Η ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης είναι μια παράμετρος που βοηθά στη διάκριση μεταξύ ζωντανών και νεκρών/κτυπημένων βακτηρίων. Η ένωση του PMA με το γενετικό υλικό αναστέλλει τον οποιοδήποτε πολλαπλασιασμό του κατά τη μέθοδο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (qPCR). Έτσι, σε ένα πληθυσμό ζωντανών και νεκρών/κτυπημένων βακτηρίων, μόνο τα νεκρά/κτυπημένα είναι επιρρεπή στο PMA. Στην Εικόνα 2-1 παρουσιάζεται γραφικά η πιο πάνω διαδικασία.



Εικόνα 2-1: Γραφική απεικόνιση της επεξεργασίας του PMA

Γενικά, σημαντικοί παράγοντες στις μικροβιολογικές αναλύσεις είναι η χρήση αποστειρωμένου εξοπλισμού και η σωστή συντήρηση των δειγμάτων ώστε να διασφαλιστεί στο μέγιστο η ακεραιότητα των αποτελεσμάτων. Η διαδικασία ποσοτικοποίησης των δειγμάτων χωρίζεται σε 3 κύρια στάδια, τη διήθηση (DNA filtration), την απομόνωση του γενετικού υλικού (DNA extraction) και τέλος την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των υπό εξέταση παραγόντων με τη μέθοδο qPCR.

Η διήθηση των δειγμάτων γίνεται σε αποστειρωμένες μεμβράνες πόρου 0.22 μm . Κάθε δείγμα διηθήθηκε εις διπλούν με εξαίρεση τα δείγματα των σημείων ΣΔ1 και ΣΔ7 τα οποία διηθήθηκαν εις τετραπλούν ώστε οι δύο μεμβράνες να αναλυθούν με τη χρωστική ουσία PMA. Οι διηθημένοι όγκοι ανά σημείο ανά μεμβράνη παρουσιάζονται στο Πίνακα 2-1.

Πίνακας 2-1: Όγκος δείγματος που διηθήθηκε ανά μεμβράνη διήθησης ανά στάδιο επεξεργασίας

Σημείο Δειγματοληψίας	Όγκος δείγματος
ΣΔ1	25 -35 mL
ΣΔ4	200 - 250 mL
ΣΔ5	40 - 50 mL
ΣΔ6	40 - 50 mL
ΣΔ7	40 - 50 mL

Ακολουθεί η απομόνωση του γενετικού υλικού μέσω ειδικών kits (DNeasy® PowerWater® Kit (QIAGEN, Αρ.: 14900-100-NF)) που συμφωνούν με τα ανάλογα πρότυπα ISO και περιέχουν όλα τα απαραίτητα αντιδραστήρια για την ολοκλήρωση της διαδικασίας. Συγκεκριμένα, η κάθε διηθημένη μεμβράνη εισάγεται σε ειδικό δοχείο του kit και στη συνέχεια ακολουθείται το πρωτόκολλο του κατασκευαστή όπου αναφέρονται λεπτομερώς τα στάδια που πρέπει να ακολουθηθούν. Στη περίπτωση των μεμβρανών που προορίζονταν για ανάλυση με τη χρωστική PMA προηγήθηκε η επαφή τους με αυτή για 10 λεπτά και μετά η έκθεσή τους σε μπλε φως με μήκος κύματος 465-475 nm για 15 λεπτά στη συσκευή PMA-Lite™ LED Photolysis Device (Biotium, Αρ.: E90002) πριν την εισαγωγή τους στο ειδικό δοχείο. Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας γίνεται η ποσοτικοποίηση του γενετικού υλικού με χρήση kit (Qubit™ dsDNA BR Assay (double-stranded DNA Broad-Range, Αρ.: Q32850)) και της συσκευής Qubit™ 4 Fluorometer (Αρ.: Q33238).

Τέλος, για την ανάλυση της qPCR μικρός όγκος από το απομονωμένο γενετικό υλικό για κάθε δείγμα μαζί με μείγμα αντιδραστηρίων (π.χ. στοχευμένες αλληλουχίες γενετικού υλικού (primers) για κάθε βακτήριο ή γονίδιο, αποστειρωμένο νερό, master mix) τοποθετούνται στις οπές ειδικής πλακέτας η οποία στη συνέχεια θα τοποθετηθεί στο όργανο Bio-Rad CFX96 Touch (Εικόνα 2-2) για επεξεργασία μέσω εναλλαγής θερμοκρασιών για διάφορους χρόνους και κύκλων επανάληψης.



Εικόνα 2-2: Όργανο ανάλυσης αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης – qPCR (Bio-Rad CFX96)

2.1.3 Αναλύσεις Φαρμακευτικών ουσιών

Η ανάλυση των φαρμακευτικών ουσιών πραγματοποιήθηκε μέσω υγρής χρωματογραφίας-φασματομετρία μάζας UPLC-MS/MS (Ultra-Performance Liquid Chromatography - mass spectrometry) η οποία επιτρέπει τον προσδιορισμό και την ποσοτικοποίηση διάφορων μικρορύπων (π.χ. φαρμακευτικές ουσίες) σε συγκεντρώσεις ng/L. Πριν τη μέτρηση στο εν λόγω όργανο απαιτείται η απομόνωση των ουσιών από το υγρό απόβλητο μέσω εκχύλισης στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction – SPE). Η αρχή της SPE βασίζεται στη διήθηση δείγματος από φυσίγγιο που περιέχει προσροφητικό υλικό (στέρεα φάση) στο οποίο προσροφούνται οι προς ανάλυση ουσίες. Ακολούθως, το προσροφητικό υλικό εκπλένεται με διαλύτη και το εκχύλισμα συλλέγεται και αφού συμπυκνωθεί κατάλληλα εισάγεται για ανάλυση στη UPLC-MS/MS. Οι οδηγίες για την πραγματοποίηση της SPE δόθηκαν από τον ανάδοχο που ανέλαβε τις αναλύσεις και ακολουθήθηκαν αναλόγως (Dasenaki et al. 2015).

Τα δείγματα μετά τη δειγματοληψία οξινίστηκαν με υδροχλωρικό οξύ (Hydrochloric acid – HCl), στο pH=2.5 και αποθηκεύτηκαν στους -20°C. Με την ολοκλήρωση της δειγματοληπτικής καμπάνιας ακολούθησε η διαδοχική διήθηση των δειγμάτων από φίλτρα πόρου 2.7 μm, 1 μm και 0.45 μm για την απομάκρυνση των μεγάλων στερεών και αποφυγή φραγής του προσροφητικού υλικού κατά την SPE. Ακολούθως, 100 mL από κάθε δείγμα μεταφέρθηκαν σε κεχριμπαρένια γυάλινα δοχεία στα οποία προστέθηκε 1 mL διαλύματος 5% (w/v) EDTA. Στη συνέχεια, στα δείγματα προστέθηκε συγκεκριμένη ποσότητα εσωτερικών προτύπων (100 μL) ενώ σε κάποια από τα δείγματα προστέθηκε επίσης ποσότητα μείγματος ρύπων για έλεγχο το ποσοτικού προσδιορισμού των ουσιών.

Τα δείγματα που αναλύθηκαν ως προς τις φαρμακευτικές ουσίες αφορούσαν 3 διαδοχικές δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν στις 9, 10 και 11 Αυγούστου 2023 στα επιμέρους τεχνολογικά στάδια της πιλοτικής μονάδας (ΣΔ1, ΣΔ4, ΣΔ5 και ΣΔ7).

2.1.4 Πείραμα *Lemna minor*

Σκοπός του πειράματος ήταν η εξέταση της επιρροής των φυτών *Lemna minor* στη μεταβολή των συγκεντρώσεων των φυσικοχημικών παραμέτρων COD, TP, TN και NH_4^+ προσομοιώνοντας τις συνθήκες πειράματος όσο το δυνατόν πιο κοντά στις πραγματικές. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε ελεγχόμενο χώρο του εργαστηρίου ΓΑΙΑ μέσα σε ποτήρια ζέσεως με όγκο δείγματος τα 500 mL κάτω από λάμπα ορατού φωτός δυναμικότητας 6000 lux. Το απόβλητο συλλεγόταν μετά την αερόβια επεξεργασία η οποία προηγείτο της επεξεργασίας με φυτά *Lemna minor* σύμφωνα με τον αρχικό σχεδιασμό. Λόγω της μεταγενέστερης προσθήκης δεξαμενής καθίζησης μετά την αερόβια επεξεργασία απόβλητο συλλέχθηκε τόσο από τον αερόβιο αντιδραστήρα καθώς και μετά από την δεξαμενή καθίζησης. Η διάταξη του πειράματος περιλάμβανε τα εξής 6 ποτήρια ζέσεως.

1. Νερό βρύσης με *Lemna minor* – ΠΖ1
2. Απόβλητο από τον αερόβιο αντιδραστήρα με *Lemna minor* – ΠΖ2
3. Απόβλητο από τον αερόβιο αντιδραστήρα χωρίς *Lemna minor* – ΠΖ3
4. Απόβλητο από την δεξαμενή καθίζησης μετά τον αερόβιο αντιδραστήρα με *Lemna minor* – ΠΖ4
5. Απόβλητο από την δεξαμενή καθίζησης μετά τον αερόβιο αντιδραστήρα χωρίς *Lemna minor* – ΠΖ5
6. Απόβλητο από την δεξαμενή καθίζησης μετά τον αερόβιο αντιδραστήρα χωρίς *Lemna minor* υπό συνθήκες σκότους – ΠΖ6

Λαμβάνοντας υπόψη την έντονη παραγωγή άλγης που παρατηρήθηκε κατά τη διάρκεια λειτουργία της επεξεργασίας με φυτά *Lemna minor* αποφασίστηκε η προσθήκη ποτηριών ζέσεως (ΠΖ3 και ΠΖ5) που δεν θα περιείχαν φυτά ώστε να διαφανεί η τυχόν επιρροή της άλγης στη συγκέντρωση των υπό εξέταση παραμέτρων του υγρού αποβλήτου. Επιπλέον, για την εξέταση της συνεισφοράς του φωτός στην παραγωγή της άλγης αλλά και στη μεταβολή των συγκεντρώσεων των φυσικοχημικών παραμέτρων προστέθηκε το ΠΖ6 όπου παρέμεινε εξολοκλήρου στο σκοτάδι χωρίς κάποια παρέμβαση.

Το κάθε ποτήρι ζέσεως περιείχε 500 mL υγρού αποβλήτου (νερό βρύσης για ΠΖ1) και 3 g (ww) *Lemna minor* στα ανάλογα ποτήρια ζέσεως. Κάθε 7^η ημέρα το 80% του όγκου ανανεωνόταν σε κάθε ποτήρι ζέσεως με νέο ανάλογο δείγμα από τη πιλοτική μονάδα (νερό βρύσης για ΠΖ1) ενώ η μάζα των φυτών ζυγιζόταν. Στη συνολική διάρκεια του πειράματος (36 ημέρες, 29 Αυγούστου 2023 – 3 Οκτωβρίου 2023) πραγματοποιήθηκαν 5 συνεχόμενες δειγματοληψίες. Πριν και μετά την ανανέωση όγκου συλλέγονταν δείγματα από κάθε ποτήρι ζέσεως για ανάλυσή τους προς τις εξεταζόμενες παραμέτρους ενώ παράλληλα ζυγιζόταν η μάζα των φυτών. Η συχνότητα των 7 ημερών επιλέχθηκε ώστε να αντιπροσωπεύεται ο χρόνος

παραμονής που ίσχυε για τις λεκάνες στη πιλοτική μονάδα. Τα ποτήρια ζέσεως ΠΖ1 – ΠΖ5 εκτίθεντο για 16 ώρες σε φωτισμό και 8 ώρες σε σκοτάδι για προσομοίωση της μέρας και νύχτας ενώ ανακινούνταν 2 φορές τη μέρα.

2.2 Εξειδικευμένες αναλύσεις

Δείγματα που προέκυψαν από 3 διαδοχικές δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν στις 9, 10 και 11 Αυγούστου 2023 στάλθηκαν σε εξωτερικούς εμπειρογνώμονες με σκοπό υλοποίησης εξειδικευμένων αναλύσεων. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις ως προς την παρουσία μικρορύπων με χρήση LC/ESI-QTOF-MS αλλά και την ολική αλληλούχηση του γονιδίου *16S rRNA* (Sequencing) όπου ακολούθησε επεξεργασία των ευρημάτων και περαιτέρω ανάλυσή τους μέσω βιοπληροφορικής (Bioinformatics). Δείγματα συλλέχθηκαν από τις επιμέρους τεχνολογίες της πιλοτικής μονάδας, την είσοδο και έξοδο του Κεντρικού Σταθμού Επεξεργασίας Λυμάτων της Λάρνακας και από αντλιοστάσιο που προηγείται του σταθμού επεξεργασίας και συμπεριλαμβάνει τα υγρά απόβλητα του Γενικού Νοσοκομείου Λάρνακας. Στην περίπτωση της ολικής αλληλούχησης στάλθηκαν επιπλέον δείγματα από την είσοδο της πιλοτικής μονάδας (ΣΔ1) από διαφορετικές χρονικές περιόδους κατά τη περίοδο λειτουργία της μονάδας με σκοπό την εύρεση τυχόν εποχιακών διακυμάνσεων στη μικροβιακή κοινότητα. Οι αναφορές στα δείγματα ακολουθούν:

- i. Είσοδος πιλοτικής μονάδας (Σημείο Δειγματοληψίας 1 – ΣΔ1) → SP1
- ii. Μετά την αναερόβια επεξεργασία (Σημείο Δειγματοληψίας 4 – ΣΔ4) → SP4
- iii. Μετά τον αερόβιο αντιδραστήρα (Σημείο Δειγματοληψίας 5 – ΣΔ5) → SP5
- iv. Μετά την απολύμανση με υπεριώδη ακτινοβολία και υπεροξείδιο του υδρογόνου – Έξοδος πιλοτικής μονάδας (Σημείο δειγματοληψίας 7 – ΣΔ7) → SP6
- v. Ροή στο αντλιοστάσιο όπου καταλήγουν τα υγρά απόβλητα του Γενικού Νοσοκομείου Λάρνακας → PS
- vi. Ροή εισόδου στο κεντρικό σταθμό επεξεργασίας αποβλήτων της Λάρνακας → IN
- vii. Ροή εξόδου από το κεντρικό σταθμό επεξεργασίας αποβλήτων την Λάρνακας → OUT

2.2.1 Ανάλυση μικρορύπων με χρήση LC/ESI-QTOF-MS

Η ανάλυση μέσω υγρής χρωματογραφίας-φασματογράφου μάζας LC/ESI-QTOF-MS επιτρέπει τον προσδιορισμό και την ποσοτικοποίηση πέραν των 2000 οργανικών ρύπων, συμπεριλαμβανομένων 915 φαρμακευτικών ουσιών και μεταβολιτών/προϊόντων μετασχηματισμού. Πριν τη μέτρηση στο εν λόγω όργανο απαιτείται η απομόνωση των ουσιών από το υγρό απόβλητο μέσω εκχύλισης στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction – SPE). Οι οδηγίες για τη πραγματοποίηση της SPE δόθηκαν από τον ανάδοχο που ανέλαβε τις αναλύσεις και ακολουθήθηκαν πιστά στο εργαστήριο ΓΑΙΑ (Dasenaki et al. 2015). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται στην Ενότητα 2.1.3.

Για την ανάλυση των μικρορύπων αποφασίστηκε η ανάμιξη ίσης ποσότητας δείγματος από τις 3 διαδοχικές δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν στις 9, 10 και 11 Αυγούστου 2023 για κάθε επιμέρους τεχνολογία της πιλοτικής μονάδας (ΣΔ1, ΣΔ4, ΣΔ5 και ΣΔ7) με σκοπό τη δημιουργία 4 σύνθετων δειγμάτων τα οποία και αναλύθηκαν.

2.2.2 Αλληλούχηση προϊόντων PCR του γονιδίου 16S rRNA (Sequencing) και ανάλυση αποτελεσμάτων μέσω βιοπληροφορικής (Bioinformatics)

Για αλληλούχηση των προϊόντων PCR του γονιδίου 16S rRNA ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράφεται στην Ενότητα 2.1.2 για τις μικροβιολογικές αναλύσεις χωρίς όμως το στάδιο της qPCR. Σε αποστειρωμένους σωλήνες των 2 mL μεταφέρθηκαν 25 μ L από τον ολικό όγκο των 100 μ L του εκχυλισμένου DNA των δειγμάτων. Στη συνέχεια τα δείγματα DNA στάλθηκαν στην ανάδοχο εξειδικευμένη εταιρία αλληλούχησης Admera Health (South Plainfield, NJ) με έδρα τις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής για περαιτέρω ανάλυση. Πιο συγκεκριμένα, τα εκχυλίσματα DNA υποβλήθηκαν σε ενίσχυση με συγκεκριμένους εκκινητές (515F/806R) που σχεδιάστηκαν κατά προηγούμενες μελέτες του Parada et al. (2016) και Apprill et al. (2015) αντίστοιχα, για την ενίσχυση του γονιδίου 16S rRNA. Τα προϊόντα αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) αλληλουχήθηκαν με το όργανο MiSeq (Illumina, San Diego, CA USA) χρησιμοποιώντας τα αντιδραστήρια V3 της Illumina προς παραγωγή ζευγών αναγνωσμάτων μεγέθους 250 βάσεων. Ακολούθως, τα δεδομένα αλληλούχησης που προέκυψαν στάλθηκαν για επιπλέον επεξεργασία από μια σειρά δοκιμών βιοπληροφορικής και στατιστικής ανάλυσης στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας με επιστημονικό υπεύθυνο τον Δρ. Σωτήριο Βασιλειάδη.

Ορισμένα από τα δείγματα των σημείων δειγματοληψίας υποβλήθηκαν σε εκχύλιση και επεξεργασία των κυττάρων τους με τη χρωστική ουσία PMA πριν από την εκχύλιση DNA και την ενίσχυση PCR, για τη διάκριση του DNA των άθικτων κυττάρων έναντι του περιβαλλοντικού DNA ή του DNA από τα διαταραγμένα/σπασμένα/νεκρά κύτταρα (με πρόσβαση από PMA, το οποίο αναστέλλει ενίσχυση PCR). Η επιλογή των δειγμάτων έγινε

ώστε να αξιολογηθούν οι πιθανές διακυμάνσεις ως προς τη μικροβιακή ποικιλότητα τόσο μεταξύ των διαφόρων σταδίων επεξεργασίας εντός της πιλοτικής μονάδας αλλά και στην είσοδο και έξοδο του Κεντρικού Σταθμού Επεξεργασίας Λυμάτων της Λάρνακας. Επιπλέον, τα δείγματα από την εισροή στη πιλοτική μονάδα από διάφορες χρονικές περιόδους αποσκοπούν στην αποτίμηση πιθανόν μεταβολών στη μικροβιακή κοινότητα κατά το πέρασμα του χρόνου.

Η ανάλυση δεδομένων αλληλούχησης περιελάβανε τη βιοπληροφορική επεξεργασία (δηλ. τον ποιοτικό έλεγχο των αναγνωσμάτων του DNA ως προς συστηματικά λάθη των διαδικασιών αλληλούχησης και της εργαστηριακής διεργασίας, αλλά και την προετοιμασία του πίνακα της σύστασης των μικροβιακών κοινοτήτων) και τη στατιστική ανάλυση για το σύνολο των προκαρυωτών, αλλά και των ταξινομικών κατηγοριών που κρίθηκαν ως παθογόνα σύμφωνα με τη βιβλιογραφία. Η συγκεκριμένη ανάλυση προσπαθεί να δώσει απαντήσεις στα ερωτήματα τα οποία αναφέρθηκαν πιο πάνω και περιγράφονται με περισσότερη λεπτομέρεια στην Ενότητα 3.2.

3 Αποτελέσματα

Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 23 δειγματοληψίες μεταξύ Ιανουαρίου και Αυγούστου 2023 στα σημεία ΣΔ1, ΣΔ4, ΣΔ5 και ΣΔ7. Από τον Απρίλη οι δειγματοληψίες καθιερώθηκαν στη μια φορά την εβδομάδα κάτι που τηρήθηκε στο μέγιστο δυνατό μιας και τα προβλήματα φραγής κάποιες φορές εμπόδιζαν την ομαλή διεξαγωγή και τήρηση της συχνότητας των δειγματοληψιών. Οι ακριβείς ημερομηνίες επιτυχών δειγματοληψιών παρουσιάζονται στον Πίνακα 3-1.

Πίνακας 3-1: Σύνολο δειγματοληψιών που πραγματοποιήθηκαν κατά την 9μηνη λειτουργία της πιλοτικής μονάδας με τις ακριβείς ημερομηνίες και τον κωδικό αναφοράς τους

Κωδικός Δειγματοληψίας	Ημερομηνία	Σχόλια
Δ1	25/01/2023	
Δ2	27/01/2023	
Δ3	01/02/2023	
Δ4	03/02/2023	
Δ5	07/02/2023	
Δ6	09/03/2023	
Δ7	21/03/2023	Μετά την αλλαγή βιομάζας
Δ8	28/03/2023	
Δ9	04/04/2023	
Δ10	11/04/2023	
Δ11	25/04/2023	
Δ12	02/05/2023	
Δ13	18/05/2023	
Δ14	23/05/2023	Μετά την αλλαγή όγκου επεξεργασίας στο 0,5 m ³
Δ15	30/05/2023	
Δ16	05/06/2023	
Δ17	04/07/2023	
Δ18	11/07/2023	
Δ19	27/07/2023	
Δ20	01/08/2023	
Δ21	09/08/2023	
Δ22	10/08/2023	
Δ23	11/08/2023	

3.1 Διεθνές Ερευνητικό Κέντρο Νερού Νηρέας

3.1.1 Φυσικοχημικές αναλύσεις

Τα όρια όλων των φυσικοχημικών παραμέτρων, εξαιρουμένου του DOC, που απαιτείται να τηρούν τα επεξεργασμένα αστικά λύματα ορίζονται στην Ευρωπαϊκή Οδηγία 91/271/ΕΟΚ. Στην περίπτωση της Κύπρου, λόγω της επαναχρησιμοποίησης των αστικών λυμάτων για σκοπούς άρδευσης, τα όρια αυτά υπόκεινται σε αυστηρότερους περιορισμούς όπως αυτοί ορίζονται από τις αρμόδιες αρχές. Στον Πίνακα 3-2 αναγράφονται τα ανώτατα όρια φυσικοχημικών παραμέτρων με βάση την Άδεια Απόρριψης των Σταθμών Επεξεργασίας Αστικών Λυμάτων στη Κύπρο. Με βάση τα εν λόγω όρια θα γίνει και ο σχολιασμός της αποτελεσματικότητας της μονάδας.

Πίνακας 3-2: Ανώτατα όρια των υπό εξέταση φυσικοχημικών παραγόντων που απαιτείται να τηρούνται στους Σταθμούς Επεξεργασίας Αστικών Λυμάτων της Κύπρου σύμφωνα με τις άδειες απόρριψης /επαναχρησιμοποίησης του επεξεργασμένου αποβλήτου

Παράμετροι Επεξεργασμένων Λυμάτων	Ανώτατα Όρια
Ενεργός Οξύτητα (pH)	6,5 – 8,5
Αγωγιμότητα (mS/cm)	2,20
TSS (mg/L)	10
COD (mg O ₂ /L)	70
TP (mg/L)	2
TN (mg/L)	15

3.1.1.1 Ενεργός οξύτητα και αγωγιμότητα (pH και Conductivity)

Οι τιμές του pH και της αγωγιμότητας παρέμειναν σχεδόν σταθερές στις επιμέρους τεχνολογίες της πιλοτικής μονάδας ενώ κυμαίνονταν κοντά στα επιτρεπτά όρια. Συγκεκριμένα, οι τιμές pH παρέμειναν μεταξύ 6,5 – 8,15 ενώ οι τιμές αγωγιμότητας κυμαίνονταν μεταξύ 1,7 – 2,0 mS/cm. Στον Πίνακα 3-3 παρουσιάζονται οι μέσες τιμές των μετρήσεων για pH και αγωγιμότητα που προέκυψαν από τις δειγματοληψίες από τα τέσσερα δειγματοληπτικά σημεία ενώ στο Παράρτημα Β παρουσιάζονται αναλυτικά όλα τα αποτελέσματα γραφικά (Διάγραμμα 5-2 και 5-3).

Πίνακας 3-3: Μέσες τιμές συγκεντρώσεων pH και αγωγιμότητας στις επιμέρους τεχνολογίες της πιλοτικής μονάδας που προέκυψαν από τις 23 δειγματοληψίες

	Σημεία Δειγματοληψίας	Μέση τιμή
pH	ΣΔ1	7,46
	ΣΔ4	7,53
	ΣΔ5	7,61
	ΣΔ7	7,66
Cond. (mS/cm)	ΣΔ1	1,80

	ΣΔ4	1,95
	ΣΔ5	1,72
	ΣΔ7	1,68

3.1.1.2 Ολικά στερεά και ολικά αιωρούμενα στερεά (Total Solids – TS και Total Suspended Solids – TSS)

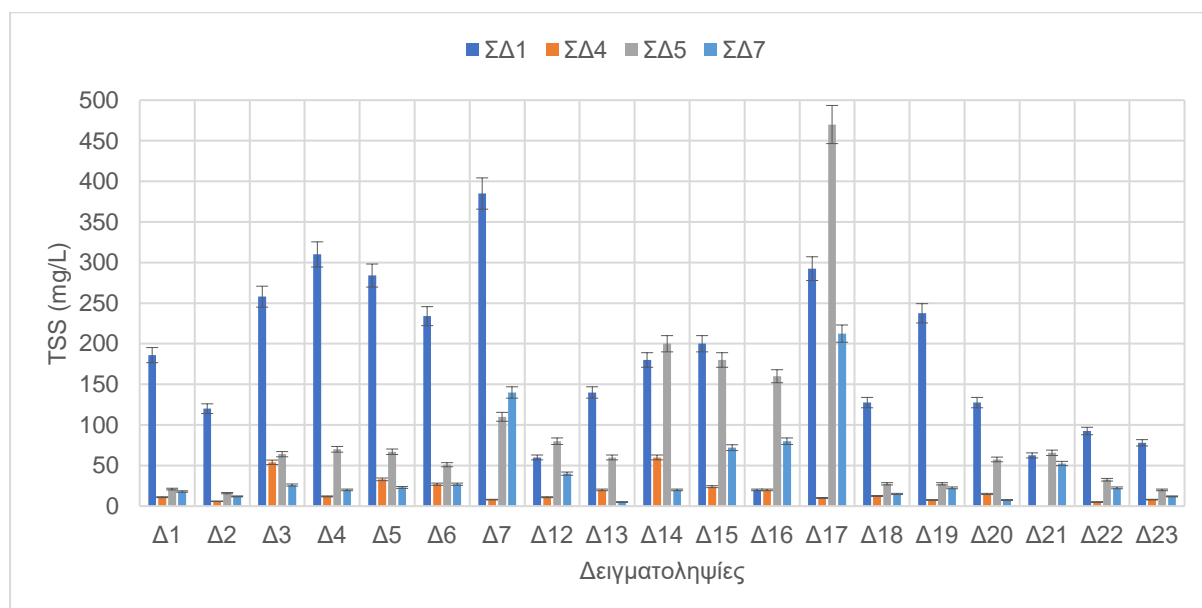
Τα αποτελέσματα των στερεών δείχνουν την επιβάρυνση που προκαλούσαν τόσο στον εξοπλισμό της πιλοτικής μονάδας όσο και στην αποτελεσματικότητα των τεχνολογιών. Οι μέσες τιμές των ολικών στερεών και ολικών αιωρούμενων στερεών παρουσιάζονται στον Πίνακα 3-4.

Πίνακας 3-4: Μέσες τιμές συγκεντρώσεων ολικών στερεών και ολικών αιωρούμενων στερεών στις επιμέρους τεχνολογίες της πιλοτικής μονάδας που προέκυψαν από τις 23 δειγματοληψίες

	Σημεία Δειγματοληψίας	Μέση τιμή
TS (mg/L)	ΣΔ1	1316,84
	ΣΔ4	979,47
	ΣΔ5	1032,11
	ΣΔ7	900,53
TSS (mg/L)	ΣΔ1	178,68
	ΣΔ4	18,11
	ΣΔ5	93,67
	ΣΔ7	43,55

Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις στερεών, όπως είναι λογικό, καταγράφηκαν στο ΣΔ1 της πιλοτικής μονάδας. Τη μεγαλύτερη συνεισφορά στη μείωση των ολικών αιωρούμενων στερεών είχε η αναερόβια επεξεργασία λόγω της μεμβράνης υπερδιήθησης (ΣΔ4). Αντιθέτως, στην αερόβια επεξεργασία, που ακολουθεί της μεμβράνης υπερδιήθησης, παρατηρήθηκε αύξηση στη συγκέντρωση των στερεών κυρίως στα ολικά αιωρούμενα στερεά, σύμφωνα και με το Διάγραμμα 3-1. Η αύξηση αυτή παρατηρήθηκε καθ' όλη τη διάρκεια της δειγματοληπτικής περιόδου όμως γίνεται εντονότερη καθώς αυτή εξελισσόταν κυρίως στη Δ17. Το πρόβλημα λύθηκε μετά από επέμβαση της ανάδοχης εταιρείας με επιδιόρθωση βλάβης στον αερόβιο αντιδραστήρα και με προσθήκη δεξαμενής καθίζησης μετά την επεξεργασία κάτι που φαίνεται ξεκάθαρα από τα αποτελέσματα της Δ18 και μετά. Δυστυχώς, μέρος των στερεών από την αερόβια επεξεργασία μεταφέρθηκαν στο στάδιο της απολύμανσης, όπως δείχνουν τα αποτελέσματα του Πίνακα 3-4 και του Διαγράμματος 3-1, επηρεάζοντας αρνητικά την αποτελεσματικότητά της αφού τα στερεά προκαλούν το φαινόμενο σκέδασης του φωτός επιτρέποντας στα βακτήρια να ξεφεύγουν της δράσης της υπεριώδους ακτινοβολίας. Γενικά, κοιτάζοντας τη μονάδα ως σύνολο, παρατηρήθηκε μείωση τόσο των ολικών στερεών όσο και των ολικών αιωρούμενων στερεών ύψους 31,6% και 75,6%, αντίστοιχα. Παρόλη τη σημαντική μείωση των ολικών αιωρούμενων στερεών η μέση

συγκέντρωση στο επεξεργασμένο απόβλητο της μονάδας (ΣΔ7) ήταν τετραπλάσια από το ανώτατο επιτρεπτό όριο των 10 mg/L που ισχύει στους Σταθμούς Επεξεργασίας Αστικών Λυμάτων (Πίνακας 3-2).



Διάγραμμα 3-1: Διακύμανση ολικών αιρούμενων στερεών στις επιμέρους τεχνολογίες της πιλοτικής μονάδας στα δείγματα που λήφθηκαν κατά τις 23 δειγματοληψίες

Οι φυσικοχημικές παράμετροι 5-8 μετρήθηκαν αρχικά ως προς τις ολικές τους συγκεντρώσεις. Όμως, λόγω των στερεών που παρατηρούνταν στα δείγματα σε συνδυασμό με τις αυξημένες συγκεντρώσεις των παραμέτρων που καταγράφονταν αποφασίστηκε η εξέταση της διαλυτής τους συγκέντρωσης αντί της ολικής ώστε να διαφανεί αν η ύπαρξη στερεών αποκρύπτει την πραγματική συνεισφορά των τεχνολογιών. Αυτό προαπαιτούσε το φιλτράρισμα των δειγμάτων, πριν τη μέτρηση των παραμέτρων, με φίλτρα πόρου 0,45 μm ώστε να απομακρύνονται τα στερεά. Στον Πίνακα 3-5 παρουσιάζονται οι δειγματοληψίες και αναφορά στην ολική ή διαλυτή συγκέντρωση των παραμέτρων που μετρήθηκαν. Η συζήτηση των αποτελεσμάτων που ακολουθεί βασίστηκε στις διαλυτές συγκεντρώσεις ενώ οι ολικές συγκεντρώσεις παρουσιάζονται για ενδεικτικούς σκοπούς.

Πίνακας 3-5: Είδος μέτρησης των φυσικοχημικών παραμέτρων 5–8 ανά δειγματοληψία που πραγματοποιήθηκε

Κωδικός Δειγματοληψίας	Συγκέντρωση παραμέτρων
Δ1	Ολική
Δ2	Ολική
Δ3	Ολική
Δ4	Ολική
Δ5	Ολική
Δ6	Ολική
Δ7	Ολική

Δ8	Ολική
Δ9	Ολική
Δ10	Ολική
Δ11	Ολική
Δ12	Ολική
Δ13	Ολική
Δ14	Ολική και Διαλυτή
Δ15	Ολική και Διαλυτή
Δ16	Ολική και Διαλυτή
Δ17	Διαλυτή
Δ18	Διαλυτή
Δ19	Διαλυτή
Δ20	Διαλυτή
Δ21	Διαλυτή
Δ22	Διαλυτή
Δ23	Διαλυτή

3.1.1.3 Χημικά Απαιτούμενο Οξυγόνο (Chemical Oxygen Demand – COD)

Οι μέσες συγκεντρώσεις του COD ανά στάδιο επεξεργασίας της πιλοτικής μονάδας παρουσιάζονται στον Πίνακα 3-6. Η μείωση του COD αναμενόταν να επιτευχθεί κυρίως στον αναερόβιο αντιδραστήρα (ΣΔ4) και μια περαιτέρω μείωση στον αερόβιο αντιδραστήρα (ΣΔ5). Αντιθέτως, τα δεδομένα του Πίνακα 3-6 δείχνουν πως η μέγιστη συνεισφορά στην απομάκρυνση του COD πραγματοποιείται στον αερόβιο αντιδραστήρα (ΣΔ5) με ποσοστό απομάκρυνσης 48% ενώ ακολουθεί το στάδιο απολύμανσης (ΣΔ7) με 13% και τέλος ο αναερόβιος αντιδραστήρας (ΣΔ4) με 6% δίνοντας συνολική απομάκρυνση 57%. Η μειωμένη συνεισφορά του αναερόβιου αντιδραστήρα ενδεχομένως να οφείλεται στις διακυμάνσεις των θερμοκρασιών που υπήρχαν οι οποίες αποσταθεροποιούσαν τη λειτουργία της βιομάζας. Η μείωση στο στάδιο απολύμανσης προκύπτει πιθανόν λόγω περαιτέρω οξειδωσης οργανικών ενώσεων από το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Σε γενικές γραμμές η πιλοτική μονάδα ως σύνολο επέφερε μείωση στο COD περί το 68% αλλά το επεξεργασμένο απόβλητο (ΣΔ7) ξεπερνούσε το ανώτατο όριο των 70 mg/L COD που απαιτείται σύμφωνα με τις άδειες απόρριψης (Πίνακας 3-2). Αναλυτικά οι διακυμάνσεις του COD στο Διάγραμμα 5-4 και 5-5 του Παραρτήματος Β.

Πίνακας 3-6: Μέσες τιμές συγκεντρώσεων του Χημικά Απαιτούμενου Οξυγόνου στις επιμέρους τεχνολογίες της πιλοτικής μονάδας για ολικές και διαλυτές συγκεντρώσεις από 16 και 10 δειγματοληψίες αντίστοιχα

COD (mg O ₂ /L)	Ολική συγκέντρωση	Διαλυτή συγκέντρωση
	Μέση τιμή	Μέση τιμή
ΣΔ1	1144,75	360,10
ΣΔ4	437,00	337,80
ΣΔ5	312,60	176,90
ΣΔ7	306,60	154,30

3.1.1.4 Ολικός Φώσφορος (Total Phosphorus – TP)

Οι μέσες συγκεντρώσεις του ολικού φωσφόρου ανά στάδιο επεξεργασίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 3-7. Ο ολικός φώσφορος συμπεριλαμβάνεται στα θρεπτικά συστατικά που χρειάζονται οι μικροοργανισμοί ως τροφή για τη λειτουργία τους. Έτσι, αναμένεται ότι η μείωση των θρεπτικών συστατικών θα πραγματοποιηθεί στην αερόβια και αναερόβια επεξεργασία. Όμως, η αναερόβια επεξεργασία επιφέρει αύξηση στη συγκέντρωση των θρεπτικών συστατικών, κάτι που αποτελεί ένα από τα βασικότερά της μειονεκτήματα, οδηγώντας στην ανάγκη για συνδυασμό της με άλλες τεχνολογίες που να στοχεύουν στη μείωση ή ανάκτηση των θρεπτικών συστατικών (Campos et al. 2019). Τα αποτελέσματα του Πίνακα 3-7 επιβεβαιώνουν τη θεωρία λόγω του ότι η μέγιστη συνεισφορά στη μείωση της συγκέντρωσης του ολικού φωσφόρου επιτυγχάνεται στην αερόβια επεξεργασία (ΣΔ5) με ποσοστιαία μείωση που φτάνει το 12%, ενώ αντίθετα η αναερόβια επεξεργασία (ΣΔ4) αυξάνει τη συγκέντρωση του ολικού φωσφόρου κατά 10%. Η επιρροή του σταδίου απολύμανσης στη μείωση του ολικού φωσφόρου είναι μηδαμινή. Στην πιλοτική μονάδα ως σύνολο, η μείωση του ολικού φωσφόρου στις διαλυτές συγκεντρώσεις είναι αμελητέα και μπορεί να θεωρηθεί ότι δεν επιτυγχάνεται απομάκρυνση. Και πάλι η συγκέντρωση του ολικού φωσφόρου στο τελικό επεξεργασμένο απόβλητο (ΣΔ7) δεν εμπίπτει στα όρια (Πίνακας 3-2) ξεπερνώντας τα κατά 4 φορές. Αναλυτικά οι διακυμάνσεις του ολικού φωσφόρου στο Διάγραμμα 5-9 και 5-7 του Παραρτήματος Β.

Πίνακας 3-7: Μέσες τιμές συγκεντρώσεων Ολικού Φωσφόρου στις επιμέρους τεχνολογίες της πιλοτικής μονάδας για ολικές και διαλυτές συγκεντρώσεις από 16 και 10 δειγματοληψίες αντίστοιχα

TP (mg PO ₄ -P/L)	Ολική συγκέντρωση	Διαλυτή συγκέντρωση
	Μέση τιμή	Μέση τιμή
ΣΔ1	11,65	8,20
ΣΔ4	8,91	8,99
ΣΔ5	9,61	7,94
ΣΔ7	7,77	8,06

3.1.1.5 Ολικό Άζωτο (Total Nitrogen – TN)

Τα αποτελέσματα του ολικού αζώτου είναι παρόμοια με αυτά του ολικού φωσφόρου. Λαμβάνοντας υπόψη την αρνητική συνεισφορά της αναερόβιας επεξεργασίας (ΣΔ4) στη μείωση των συγκεντρώσεων των θρεπτικών συστατικών τα αποτελέσματα του Πίνακα 3-8 είναι αναμενόμενα. Η αναερόβια επεξεργασία προσφέρει μια αύξηση κατά 6% στη συγκέντρωση του ολικού αζώτου ενώ η αερόβια τεχνολογία (ΣΔ5) επιφέρει τη μεγαλύτερη μείωση με 11%. Αντίστοιχα, το στάδιο απολύμανσης (ΣΔ7) έχει μηδαμινή επιρροή στην συγκέντρωση του ολικού αζώτου. Η συνολική απομάκρυνση της πιλοτικής μονάδας φτάνει μόλις στο 4% ένα ποσοστό που θεωρείται αμελητέο και που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η

πιλοτική μονάδα ως σύνολο δεν προσφέρει μείωση του ολικού αζώτου. Αναλυτικά οι διακυμάνσεις του ολικού αζώτου στο Διάγραμμα 5-8 και 5-9 του Παραρτήματος Β.

Πίνακας 3-8: Μέσες τιμές συγκεντρώσεων Ολικού Αζώτου στις επιμέρους τεχνολογίες της πιλοτικής μονάδας για ολικές και διαλυτές συγκεντρώσεις από 16 και 10 δειγματοληψίες αντίστοιχα

TN (mg N/L)	Ολική συγκέντρωση	Διαλυτή συγκέντρωση
	Μέση τιμή	Μέση τιμή
ΣΔ1	112,44	76,60
ΣΔ4	100,13	81,50
ΣΔ5	92,00	72,30
ΣΔ7	77,73	73,40

3.1.1.6 Αμμώνιο (Ammonium – NH₄⁺)

Στο Πίνακα 3-9 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για το αμμώνιο. Η αναερόβια επεξεργασία συνεισφέρει αρνητικά στη συγκέντρωση του αμμωνίου με αύξηση κατά 10% καθώς η αερόβια επεξεργασία συνεισφέρει σημαντικά με ποσοστό μείωσης του αμμωνίου κατά 55%. Τέλος, το στάδιο απολύμανσης χαρακτηρίζεται από μηδαμινή συνεισφορά. Στην περίπτωση του αμμωνίου η πιλοτική μονάδα παρουσιάζει σημαντικά ποσοστά απομάκρυνσης που αγγίζουν το 51%. Αναλυτικά οι διακυμάνσεις του αμμωνίου στο Διάγραμμα 5-10 και 5-11 του Παραρτήματος Β.

Πίνακας 3-9: Μέσες τιμές συγκεντρώσεων Αμμωνίου στις επιμέρους τεχνολογίες της πιλοτικής μονάδας για ολικές και διαλυτές συγκεντρώσεις από 16 και 10 δειγματοληψίες αντίστοιχα

NH ₄ ⁺ (mg NH ₄ ⁺ -N/L)	Ολική συγκέντρωση	Διαλυτή συγκέντρωση
	Μέση τιμή	Μέση τιμή
ΣΔ1	70,02	66,88
ΣΔ4	85,10	73,32
ΣΔ5	43,22	33,34
ΣΔ7	37,75	32,65

3.1.1.7 Διαλυτός Οργανικός Άνθρακας (Dissolved Organic Carbon – DOC)

Οι μετρήσεις του διαλυτού οργανικού άνθρακα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 3-10 έγιναν σε δείγματα διηθημένα από φίλτρα πόρου 0,2 μm όπως προϋποθέτουν οι οδηγίες χρήσης του οργάνου. Η μέγιστη συνεισφορά στη μείωση του διαλυτού οργανικού άνθρακα προήλθε από την αερόβια επεξεργασία της οποίας το ποσοστό απομάκρυνσης ισοδυναμεί με το μέσο συνολικό ποσοστό απομάκρυνσης του συνόλου της πιλοτικής μονάδας που ανέρχεται στο 80%. Στο στάδιο απολύμανσης παρατηρήθηκε μικρή αύξηση στη συγκέντρωση του διαλυτού οργανικού άνθρακα κάτι που πιθανόν να οφείλεται στην οξειδωση αιωρούμενων στερεών από το υπεροξείδιο υδρογόνου με αποτέλεσμα τη δημιουργία ευδιάλυτων οργανικών ενώσεων. Η

αναλυτική διακύμανση των συγκεντρώσεων DOC παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 5-12 του Παραρτήματος Β.

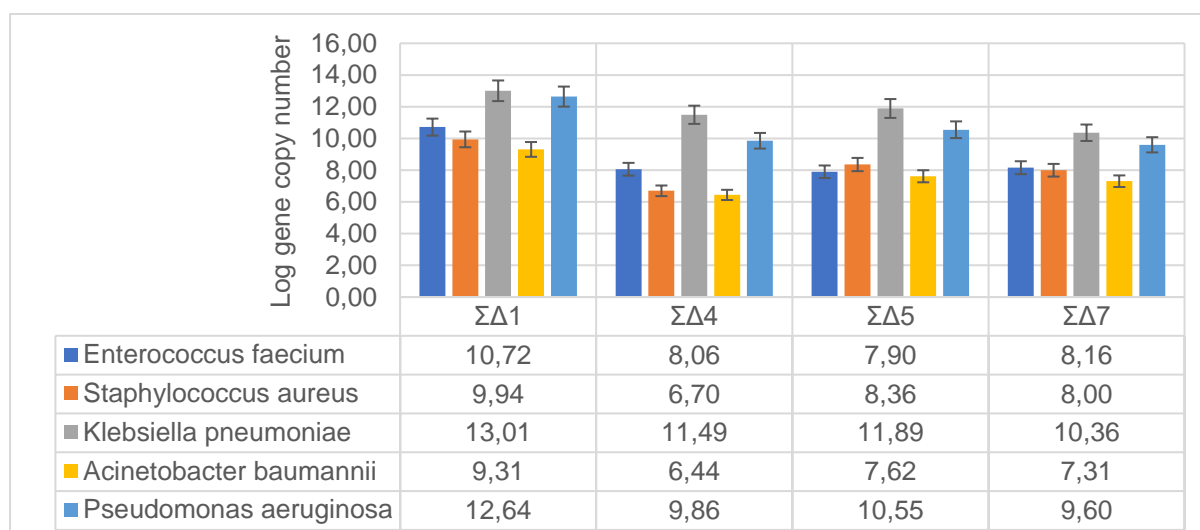
Πίνακας 3-10: Μέσες τιμές συγκεντρώσεων Διαλυτού Οργανικού Άνθρακα στις επιμέρους τεχνολογίες της πιλοτικής μονάδας από 8 δειγματοληψίες (Δ16-Δ23)

DOC (ppm C)	Μέση τιμή
ΣΔ1	195,26
ΣΔ4	155,62
ΣΔ5	30,75
ΣΔ7	38,48

3.1.2 Μικροβιολογικές αναλύσεις

3.1.2.1 Βακτήρια *ESKAPE*

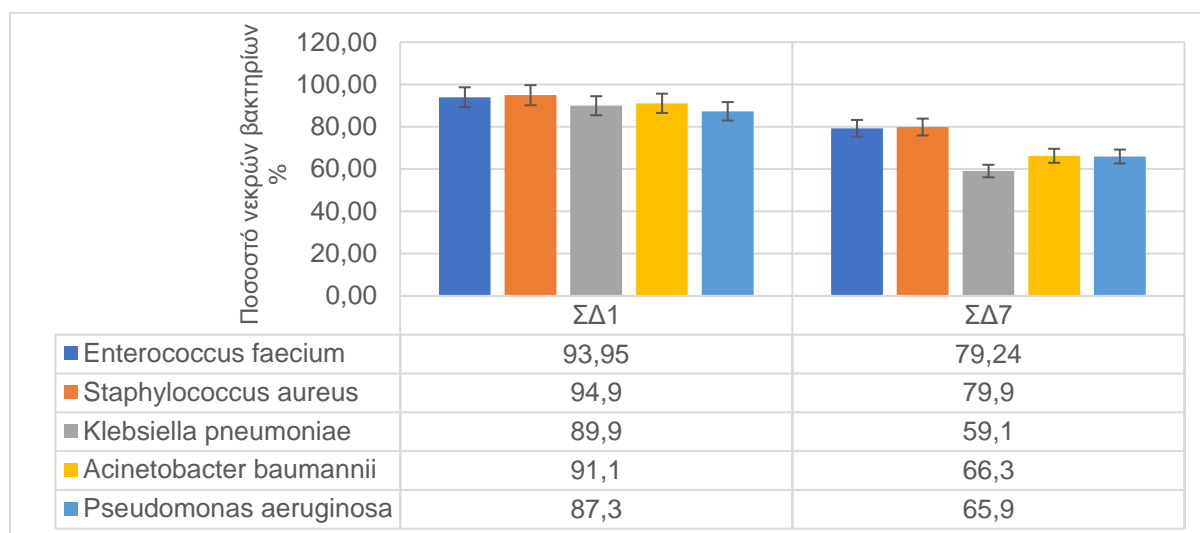
Από τα βακτήρια της κατηγορίας *ESKAPE* αναλύθηκαν τα *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* σε δείγματα από τα σημεία ΣΔ1, ΣΔ4, ΣΔ5 και ΣΔ7 της πιλοτικής μονάδας για 7 δειγματοληψίες. Οι μέσες λογαριθμικές συγκεντρώσεις που προέκυψαν ανά σημείο δειγματοληψίας (απόλυτη αφθονία) καθώς και οι μέσες τιμές του ποσοστού ζωντανών και νεκρών βακτηρίων στα σημεία ΣΔ1 και ΣΔ7 παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 3-2 και 3-3, αντίστοιχα.



Διάγραμμα 3-2: Μέσες λογαριθμικές συγκεντρώσεις των βακτηρίων *ESKAPE* που ποσοτικοποιήθηκαν από σύνολο 7 δειγματοληψιών στις επιμέρους τεχνολογίες της πιλοτικής μονάδας (απόλυτη αφθονία)

Σύμφωνα με το Διάγραμμα 3-2 η μεγαλύτερη μείωση στη συγκέντρωση των βακτηρίων *S. aureus*, *A. baumannii* και *E. faecium* σημειώθηκε μετά την αναερόβια επεξεργασία ενώ στα βακτήρια *K. pneumoniae* και *P. aeruginosa* στο στάδιο της απολύμανσης. Συγκεκριμένα

παρατηρείται μείωση περίπου 3 log σε κάθε περίπτωση όταν συγκριθούν με τη λογαριθμική συγκέντρωση στην είσοδο της μονάδας. Η μείωση μετά την αναερόβια επεξεργασία είναι αναμενόμενη λόγω της μεμβράνης υπερδιήθησης. Όμως, το γεγονός ότι το απόβλητο στη συνέχεια εισέρχεται στον αερόβιο αντιδραστήρα τα υπό εξέταση βακτήρια πολλαπλασιάζονται μιας και οι συνθήκες εντός του αντιδραστήρα είναι ιδανικές για ανάπτυξη. Στη περίπτωση του *S. aureus* η αύξηση ισοδυναμούσε με σχεδόν 2 log ενώ στα υπόλοιπα βακτήρια η αύξηση ήταν μεταξύ 0,5 – 1 log με εξαίρεση το *E. faecium* όπου η συγκέντρωση παρέμεινε σταθερή. Τέλος, οι συγκεντρώσεις στο στάδιο της απολύμανσης θεωρείτε πως παρέμειναν σταθερές για τα βακτήρια *E. faecium*, *S. aureus* και *A. baumannii* ενώ παρατηρήθηκε μείωση κοντά στο 1 log για *K. pneumoniae* και *P. aeruginosa*. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται ότι η ύπαρξη στερέων στο απόβλητο κατά το στάδιο της απολύμανσης πιθανόν να εμπόδιζε την πλήρη απόδοση του σταδίου.

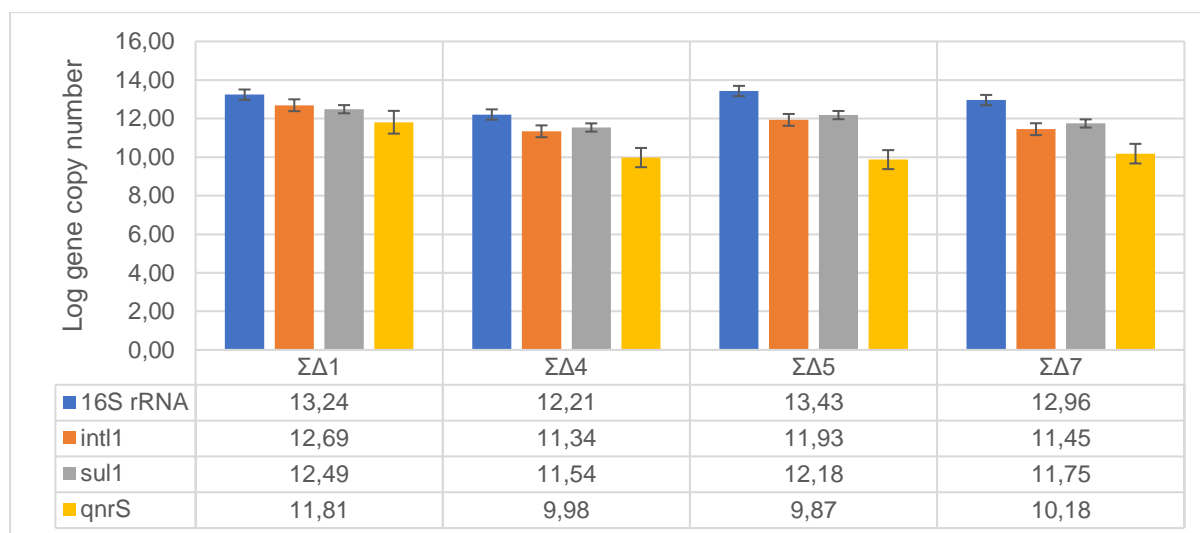


Διάγραμμα 3-3: Ποσοστό των νεκρών βακτηρίων ESKAPE που ποσοτικοποιήθηκαν από σύνολο 7 δειγματοληψιών στις επιμέρους τεχνολογίες της πιλοτικής μονάδας

Στην περίπτωση του ποσοστού των νεκρών βακτηρίων στα σημεία εισόδου και εξόδου της πιλοτικής μονάδας παρατηρείται μια μείωση (Διάγραμμα 3-3). Το ποσοστό των νεκρών βακτηρίων στο εισερχόμενο στη μονάδα απόβλητο, ανεξαρτήτως βακτηρίου, ήταν γύρω στο 90% ενώ στο επεξεργασμένο απόβλητο το ποσοστό μειώθηκε στο 80% για *S. aureus* και *E. Faecium* ενώ για τα υπόλοιπα βακτήρια ήταν γύρω στο 60%. Η μείωση αυτή πιθανόν να εξηγείται από την ύπαρξη άνω των επιτρεπτών ορίων στερέων εντός της δεξαμενής απολύμανσης με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της τεχνολογίας στο να επιτύχει τη μέγιστή της απόδοση.

3.1.2.2 Γονίδια που φέρουν την ανθεκτικότητα

Η εξέταση ως προς τα γονίδια που φέρουν ανθεκτικότητα έγινε στα γονίδια, *16S rRNA*, *intl1*, *sul1* και *qnrS* σε δείγματα από τα σημεία ΣΔ1, ΣΔ4, ΣΔ5 και ΣΔ7 της πιλοτικής μονάδας για 7 δειγματοληψίες. Οι μέσες λογαριθμικές συγκεντρώσεις που προέκυψαν ανά σημείο (απόλυτη αφθονία) παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 3-4.

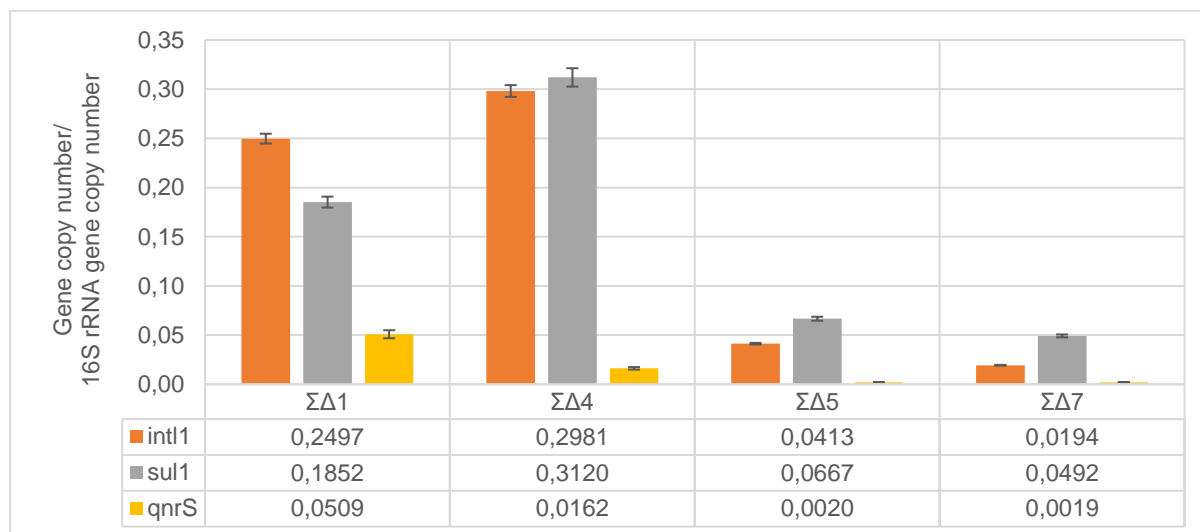


Διάγραμμα 3-4: Μέσες λογαριθμικές τιμές συγκεντρώσεων των γονιδίων που ποσοτικοποιήθηκαν από σύνολο 7 δειγματοληψιών στις επιμέρους τεχνολογίες της πιλοτικής μονάδας (απόλυτη αφθονία)

Σύμφωνα με το Διάγραμμα 3-4 η μέγιστη μείωση στη συγκέντρωση των γονιδίων πλησίασε τα 3 log για το γονίδιο *qnrS* και το 1 log στα υπόλοιπα γονίδια και παρατηρείτο μετά την αναερόβια επεξεργασία σε όλα τα υπό εξέταση γονίδια. Ομοίως με τα βακτήρια, η εισαγωγή του αποβλήτου στον αερόβιο αντιδραστήρα οδηγεί σε αύξηση της συγκέντρωσης των γονιδίων κατά περίπου 1 log αναιρώντας την συνεισφορά της μεμβράνης υπερδιήθησης από την αναερόβια επεξεργασία. Συγκρίνοντας τις λογαριθμικές συγκεντρώσεις των γονιδίων σε εισερχόμενο και επεξεργασμένο υγρό απόβλητο φαίνεται ότι δεν επιτυγχάνεται σημαντική μείωση αφού στη περίπτωση του *16S rRNA* η συγκέντρωση θεωρείται πως παραμένει σταθερή ενώ για *intl1*, *sul1* και *qnrS* υπάρχει μείωση μόλις 1,2, 0,7 και 1,6 log αντίστοιχα.

Παρόλα αυτά, τα αποτελέσματα στο Διάγραμμα 3-4 για την απόλυτη αφθονία των γονιδίων μπορούν επίσης να εκφραστούν σε σχετική αφθονία συγκριτικά με το γονίδιο *16S rRNA* το οποίο χαρακτηρίζεται ως “housekeeping gene” αφού εντοπίζεται σχεδόν σε όλα τα βακτηριακά είδη και αντιπροσωπεύει το βακτηριακό φορτίο. Πιο αναλυτικά, υπολογίζεται ο λόγος της συγκέντρωσης των υπολοίπων εξεταζόμενων γονιδίων ως προς την αντίστοιχη συγκέντρωση του γονιδίου *16S rRNA* στα σημεία δειγματοληψίας. Η σχετική αφθονία επιτρέπει την οπτικοποίηση της πιθανής απομάκρυνσης του βακτηριακού φορτίου που φέρει το υπό εξέταση γονίδιο και όχι απλά τη συνολική συγκέντρωση του βακτηριακού φορτίου με το υπό

εξέταση γονίδιο (απόλυτη αφθονία). Τα αποτελέσματα σχετικής αφθονίας παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 3-5.



Διάγραμμα 3-5: Λόγος μέσης συγκέντρωσης γονιδίων ως προς τη μέση συγκέντρωση του γονιδίου 16S rRNA ανά σημείο δειγματοληψίας

Με βάση το Διάγραμμα 3-5 στην αναερόβια επεξεργασία παρατηρείται μια αύξηση στην περίπτωση των γονιδίων *int11* και *sul1* η οποία ενδέχεται να οφείλεται στην παρουσία αναερόβιων μικροοργανισμών που περιέχουν το εν λόγω γενετικό υλικό. Η αερόβια επεξεργασία μπορεί να χαρακτηριστεί ως η διεργασία με τη σημαντικότερη συνεισφορά στη μείωση της συγκέντρωσης των υπό εξέταση γονιδίων, με τους λόγους των *int11* και *sul1* να μειώνονται από περίπου 0,3 στο 0,05 και για *qnrS* από 0,01 στο 0,002. Αυτό ενδεχομένως να εξηγείται στην περίπτωση όπου εντός του αντιδραστήρα επικρατούσαν συνθήκες ανταγωνισμού με τους αερόβιους μικροοργανισμούς να οδηγούνται στην κατανάλωση άλλων μικροοργανισμών. Επιπρόσθετα, η καθίζηση μετά την αερόβια επεξεργασία ενδέχεται να βοήθησε στην απομάκρυνση μικροοργανισμών. Στο στάδιο απολύμανσης παρατηρείται μια επιπλέον μείωση στο λόγο των γονιδίων *int11* και *sul1* κοντά στο 0,025, η οποία μπορεί να θεωρηθεί αμελητέα, ενώ για το *qnrS* ο λόγος παραμένει σταθερός. Συμπερασματικά, το Διάγραμμα 3-5 δείχνει ξανά την επιρροή των στερεών στην απόδοση της απολύμανσης αλλά ταυτόχρονα την σημαντική συνεισφορά της αερόβιας επεξεργασίας.

3.1.3 Αναλύσεις Φαρμακευτικών ουσιών

Η ανάλυση των φαρμακευτικών ενώσεων στα πλαίσια του παραδοτέου 4.4.1 έγινε με την χρήση οργάνου υγρής χρωματογραφίας-φασματομετρία μάζας UPLC-MS/MS που επιτρέπει την ποσοτικοποίηση ~90 φαρμακευτικών ουσιών. Συγκεκριμένα, αναλύθηκαν δείγματα από τα 4 σημεία δειγματοληψίας της πιλοτικής μονάδας (ΣΔ1, ΣΔ4, ΣΔ5 και ΣΔ7) και

ποσοτικοποιήθηκαν 33 από τις 90 ουσίες με τις πλείστες από αυτές να είναι αντιβιοτικές ενώσεις ενώ οι υπόλοιπες αποτελούνταν από αναλγητικά, αντι-υπερτασικά και αντιφλεγμονώδη φάρμακα. Στον Πίνακα 3-11 φαίνονται αναλυτικά οι μέσες συγκεντρώσεις της κάθε ουσίας ανά σημείο δειγματοληψίας καθώς και η μέση ολική απομάκρυνση που επιτυγχάνεται ανά ουσία όπως από τις τρεις διαδοχικές δειγματοληψίες που έγιναν. Από τις 33 ανιχνεύσιμες φαρμακευτικές ουσίες παρατηρείται μια αυξομείωση των συγκεντρώσεων τους μέσα στα υπό εξέταση δείγματα και μεταξύ των διαφορετικών σταδίων επεξεργασίας. Συγκεκριμένα, με βάση τον Πίνακα 3-11 παρατηρήθηκε μείωση στη συγκέντρωση ουσιών σε 25 περιπτώσεις εκ των οποίων οι δεκατέσσερις ενώσεις με ποσοστό απομάκρυνσης 70-100% ενώ για άλλες έντεκα το ποσοστό απομάκρυνσης κυμαίνεται από 8 έως 58%. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συμπίπτουν με παρόμοια αποτελέσματα από την διεθνή βιβλιογραφία. Γενικά πολλές μελέτες παρουσιάζουν ότι η απομάκρυνση των φαρμακευτικών ενώσεων από τα επεξεργασμένα υγρά απόβλητα επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό τόσο από τις φυσικοχημικές παραμέτρους και ιδιότητες της κάθε ουσίας αλλά και από τα στάδια επεξεργασίας στα οποία υπόκεινται τα απόβλητα που εμπεριέχουν τις φαρμακευτικές ενώσεις (Besha et al., 2017; Kim et al., 2018; Krzeminski et al., 2018; Iakovides, 2022).

Πίνακας 3-11: Μέση συγκέντρωση ανιχνεύσιμων ουσιών στις επιμέρους τεχνολογίες της πιλοτικής μονάδας και η μέση ολική απομάκρυνση που προκύπτει από τις τρεις διαδοχικές δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν

Ανιχνευθίσες ουσίες	Είδος ουσίας	Μέση συγκέντρωση (ng/L)				Μέση ολική απομάκρυνση (%)
		ΣΔ1	ΣΔ4	ΣΔ5	ΣΔ7	
Atenolol	Αντι-υπερτασικό	303	670	78	188	38
Atorvastatin	Στατίνη	352	377	1,73	27,5	92
Caffeine	Καφεΐνη	25213	31594	119	120	100
Carbamazepine	Αντιεπιληπτικό	9317	4579	2404	4659	50
Cefaclor	Αντιβιοτικό	1927	1799	<LOD	<LOD	100
Ciprofloxacin	Αντιβιοτικό	26072	15531	8590	16197	38
Cloxacillin	Αντιβιοτικό	947	1283	<LOD	691,5	27
Cortisone	Κορτιζόνη	712	410	<LOD	<LOD	100
Diclofenac	Αντιφλεγμονώδη	372	630	1653	2632	-608
Difloxacin	Αντιβιοτικό	14,6	<LOD	0,670	3,79	74
Ibuprofen	Αναλγητικό	2140	3489	390	252,5	88
Lincomycin	Αντιβιοτικό	100,7	151	4,45	85	16
Mefenamic acid	Αναλγητικό	<LOD	6,27	52,6	46,4	-3243
Metoprolol	Αντι-υπερτασικό	1059	1251	837	1604	-51
Metronidazole	Αντιβιοτικό	2771	1283	1263	2539	8

Niflumic acid	Αντιφλεγμονώδη	<LOD	3,0	2,72	4,79	-54128
Norfloxacin	Αντιβιοτικό	88	35,3	12,0	66,3	24
Ofloxacin	Αντιβιοτικό	806	663	444,0	968	-20
Paracetamol	Αναλγητικό	50097	42298	<LOD	<LOD	100
Propranolol	Αντι-υπερτασικό	258	633	245,1	365	-41
Sulfachloropyridazine	Αντιβιοτικό	<LOD	49,1	<LOD	<LOD	100
Sulfadiazine	Αντιβιοτικό	132	185	<LOD	<LOD	100
Sulfadimethoxine	Αντιβιοτικό	14,3	5,08	<LOD	6,05	58
Sulfadoxine	Αντιβιοτικό	7,8	1,88	1,88	10,22	-31
Sulfamethoxazole	Αντιβιοτικό	7068	4915	115,5	185	97
Sulfapyridine	Αντιβιοτικό	131,8	191	93,49	109,1	17
Sulfaquinoxaline	Αντιβιοτικό	7,86	<LOD	7,7	5,4	32
Sulfathiazole	Αντιβιοτικό	17,6	17,9	<LOD	<LOD	100
Theophylline	Βρογχοδιασταλτικό	8166	8214	79,3	121	99
Tiamulin	Αντιβιοτικό	8,9	14,0	<LOD	<LOD	100
Tramadol	Οπιοειδές	4409	4817	4621	7932	-80
Tylosin	Αντιβιοτικό	<LOD	168	<LOD	<LOD	100
Valsartan	Αντι-υπερτασικό	2876	4661	1200	2002	30

Σημείωση: Το LOD (Limit of Detection) αναφέρεται σε συγκέντρωση μικρότερη από το όριο ανίχνευσης, άρα όπου εμφανίζεται σημαίνει πως δεν ανιχνεύθηκε η συγκεκριμένη ουσία.

Κατά τη διάρκεια των διαφορετικών σταδίων επεξεργασίας σε μια πιλοτική μονάδα ή ένα σταθμό διαχείρισης υγρών αποβλήτων, λαμβάνουν χώρα διάφοροι μηχανισμοί που καθιστούν δυνατή την αποικοδόμηση/απομάκρυνση των διαφόρων φαρμακευτικών ουσιών. Αυτοί οι μηχανισμοί περιλαμβάνουν βιολογικές διεργασίες (π.χ. βιοαποικοδόμηση) και φυσικοχημικές διεργασίες (π.χ. προσρόφηση, αποδόμηση). Με βάση τις μελέτες που υπάρχουν στην διεθνή βιβλιογραφία αναφέρονται η βιοαποικοδόμηση και προσρόφηση ως οι κύριοι μηχανισμοί που λαμβάνουν χώρα σε βιοαντιδραστήρες (Radjenovic et al., 2007; Göbel et al., 2007; Verlicchi et al., 2012; Guerra et al., 2014; Luo et al., 2014; Li et al., 2015) όπως συμβαίνει και στην παρούσα πιλοτική μονάδα αφού περιλαμβάνει αερόβια και αναερόβια επεξεργασία.

Στις βιολογικές διεργασίες έχει αποδειχθεί πως ο μηχανισμός της βιοαποικοδόμησης είναι η πιο σημαντική διαδικασία που οδηγεί σε αλλαγές στη δομή των διαφόρων χημικών ουσιών όπως είναι οι φαρμακευτικές ενώσεις. Η βιοαποικοδόμηση είναι μια φυσική διεργασία διάσπασης υλικών ή ενώσεων από μικροοργανισμούς (π.χ. βακτήρια) και ποικίλλει από μερική μετατροπή έως πλήρη ανοργανοποίηση και διαφέρει μεταξύ των ενώσεων. Ο Joss et al. (2006) απέδειξε ότι ένας μεγάλος αριθμός ενώσεων που υποβάλλονται σε αερόβια επεξεργασία, παρουσίασαν κινητική ψευδο-πρώτης αποδόμησης (κινητικός συντελεστής k_{biol}), που σημαίνει ότι καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση βιομάζας μέσα στον αντιδραστήρα,

αυξάνεται και η βιοαποικοδόμηση των μικρορύπων. Ανάλογα με τη φύση και τη συγκέντρωση των μικρορύπων, μπορεί να συμβεί μια συν-μεταβολική διαδικασία όπου ένα αντιβιοτικό δρα ως δευτερεύον υπόστρωμα σε συνδυασμό με ένα άλλο οργανικό πρωτεύον υπόστρωμα (κινητική δεύτερης τάξης). Επιπλέον, σύμφωνα με αυτές τις σταθερές βιολογικής αποδόμησης, ο Joss et al. (2006) κατηγοριοποίησε τις οργανικές ενώσεις σε τρεις κύριες κατηγορίες (α) ελάχιστα βιοαποικοδομήσιμες με $k_{\text{biol}} < 0,1 \text{ L g}^{-1} \text{ SS d}^{-1}$. (β) εξαιρετικά βιοαποικοδομήσιμες, με $k_{\text{biol}} > 10 \text{ L g}^{-1} \text{ SS d}^{-1}$ και (γ) μέτρια βιοαποικοδομήσιμες με $0,1 < k_{\text{biol}} < 10 \text{ L g}^{-1} \text{ SS d}^{-1}$. Ανάλογα με τον τύπο της βιολογικής επεξεργασίας, η k_{biol} μιας ένωσης μπορεί να ποικίλλει ελαφρώς, ανάλογα με τις συνθήκες λειτουργίας του αντιδραστήρα, δηλαδή την πυκνότητα των μικροοργανισμών, τον τύπο των μικροοργανισμών και το εάν είναι κατάλληλοι για βιοαποικοδόμηση των ενώσεων που υπάρχουν στα υγρά απόβλητα. Για παράδειγμα, για τη βιοαποικοδόμηση του αντιβιοτικού ofloxacin, σύμφωνα με το Liu et al., (2023), είναι σημαντική η ύπαρξη των βακτηρίων φύλου *Proteobacteria* ενώ οι απονιτροποιητές γένους *Microbacterium*, *Geobacter* και *Ignavibacterium* μπορούν επίσης να ενισχύσουν τη διαδικασία σε περίπτωση αναερόβιας επεξεργασίας.

Οι φυσικοχημικές παράμετροι των ουσιών όπως για παράδειγμα η διαλυτότητα, η υδροφοβικότητα, η κατάσταση ιονισμού, το μοριακό βάρος, η χημική δομή, η σταθερότητα, η πτητικότητα, η βιοαποικοδομησιμότητα, η απορροφητικότητα και η αντιδραστικότητα επηρεάζουν άμεσα και τη βιοαποικοδόμησή τους. Οι εξαιρετικά διαλυτές ενώσεις είναι πιθανότερο να παραμείνουν στο υγρό απόβλητο και η αφαίρεσή τους να γίνει μέσω διαδικασιών διάλυσης και αραίωσης ενώ σε περίπτωση υδροφοβικών ουσιών παρατηρείται προσκόλλησή τους σε οργανική ύλη ή στερεά που υπάρχουν στο υγρό απόβλητο με αποτέλεσμα τη δυσκολότερη απομάκρυνσή τους. Επιπρόσθετα, οι παράμετροι λειτουργίας των διεργασιών επεξεργασίας ενδέχεται επίσης να επηρεάσουν την βιοαποικοδόμηση των ουσιών όπως το pH, η θερμοκρασία, ο χρόνος παραμονής καθώς και το είδος μιας διεργασίας. Η συγκέντρωση των φαρμακευτικών ουσιών, η παρουσία άλλων χημικών, η μικροβιακή κοινότητα και τα αιωρούμενα στερεά αποτελούν επιπλέον παράγοντες επιρροής. Πιο συγκεκριμένα, οι υψηλές συγκεντρώσεις φαρμακευτικών ουσιών μπορεί να επιβαρύνουν μια διεργασία με αποτέλεσμα τη μη αποτελεσματική απομάκρυνση των ουσιών ενώ η αύξηση του χρόνου παραμονής οδηγεί σε μεγαλύτερες πιθανότητες απομάκρυνσης ή αποικοδόμησης των φαρμακευτικών ουσιών. Για παράδειγμα στην περίπτωση της ένωσης diclofenac, συστήνεται αύξηση του χρόνου παραμονής (> 2-3 ημερών) κατά τις βιολογικές διεργασίες ώστε να επιτυγχάνεται σημαντική απομάκρυνση του από τα υγρά απόβλητα (Vieno et al., 2014). Γενικά, η κατανόηση αυτών των παραμέτρων είναι απαραίτητη για το σχεδιασμό και τη βελτιστοποίηση των διαδικασιών επεξεργασίας υγρών αποβλήτων ώστε να επιτευχθεί

αποτελεσματική απομάκρυνση ή αποικοδόμηση φαρμακευτικών ουσιών, ελαχιστοποιώντας τις πιθανές περιβαλλοντικές επιπτώσεις.

Στις οκτώ από τις 33 ανιχνεύσιμες ουσίες παρατηρήθηκε αύξηση στη συγκέντρωση μεταξύ ΣΔ1 και ΣΔ7 κάτι το οποίο εξηγείται με βάση τις ιδιότητες τις οποίες έχει η κάθε ουσία από αυτές που αναφέρθηκαν πιο πάνω. Επιπλέον, για τις ενώσεις mefenamic acid, niflumic acid, sulfachloropyridazine και tylosin παρατηρείται ότι στο ΣΔ1 οι συγκεντρώσεις τους είναι μη ανιχνεύσιμες (χαμηλότερες από το όριο ανίχνευσης) ενώ ανιχνεύονται στο ΣΔ4. Το γεγονός αυτό πιθανόν να οφείλεται στη διάσπαση γλυκουρονιδίων της φαρμακευτικής ένωσης κατά την αναερόβια επεξεργασία με αποτέλεσμα να μπορεί να ανιχνευθεί και να ποσοτικοποιηθεί. Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα από την υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας UPLC-MS/MS δείχνουν ότι η πιλοτική μονάδα κατάφερε να απομακρύνει σε σημαντικό ποσοστό τις πλείστες φαρμακευτικές ουσίες που ελέγχθηκαν.

3.1.4 Πείραμα *Lemna minor*

Στον Πίνακα 3-12 αναγράφονται οι χαμηλότερες, οι μεγαλύτερες καθώς και οι διάμεσες τιμές των φυσικοχημικών παραμέτρων που προέκυψαν από τις 5 διαδοχικές δειγματοληψίες, καθώς και η απομάκρυνση που επιτεύχθηκε μεταξύ 1^{ης} και 7^{ης} ημέρας ανά κύκλο δειγματοληψίας με βάση τις διάμεσες τιμές. Γενικά παρατηρήθηκαν από σημαντικές έως μηδαμινές μειώσεις στις συγκεντρώσεις των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών με εξαίρεση το COD όπου υπήρξε αύξηση. Η αύξηση του COD στα ποτήρια ζέσεως ΠΖ2 – ΠΖ4 ήταν περίπου 15% ενώ στο ΠΖ5 η αύξηση έφτασε το 40%. Η αύξηση αυτή οφείλεται στην ανάπτυξη άλγης όπου με την πάροδο του χρόνου γινόταν εντονότερη κυρίως στα δείγματα που πάρθηκαν από τη δεξαμενή καθίζησης (ΠΖ4 και ΠΖ5) καθώς εντός της δεξαμενής είχε αναπτυχθεί στρώμα άλγης (Εικόνα 3-1).



Εικόνα 3-1: Δεξαμενή καθίζησης μετά την αερόβια επεξεργασία κατά τη 2^η δειγματοληψία στις 5 Σεπτεμβρίου 2023

Η άλγη, μέσω της φωτοσύνθεσης, παράγει γλυκόζη που είναι οργανική ένωση οδηγώντας έτσι στην αύξηση του COD. Αυτό επιβεβαιώνεται με τα αποτελέσματα του ΠΖ6 όπου η μόνη διαφορά με το ΠΖ5 ήταν η απουσία φωτός που δεν επέτρεψε την ανάπτυξη της άλγης και έτσι προκύπτει μείωση στο COD. Η μεγαλύτερη αύξηση στο COD παρατηρήθηκε στο νερό της βρύσης λόγω της αποσύνθεσης των φυτών *Lemna minor* που προήλθε από το θάνατο μερικής ποσότητάς τους πιθανόν λόγω της έλλειψης θρεπτικών συστατικών και οργανικού φορτίου.

Στην περίπτωση του ολικού αζώτου και αμμωνίου η απομάκρυνση ήταν σημαντική ενώ για τον ολικό φώσφορο η απομάκρυνση ήταν αμελητέα. Για το ολικό άζωτο η απομάκρυνση κυμαινόταν γύρω στο 30% στα ΠΖ2-ΠΖ6 καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι η ύπαρξη ή η απουσία των φυτών δεν επηρεάζει, και αυτό προκύπτει επίσης από τα αποτελέσματα του ολικού φωσφόρου. Η μεγαλύτερη συνεισφορά των φυτών *Lemna minor* παρατηρείται στις απομακρύνσεις του αμμωνίου που κυμαίνονταν κοντά στο 15% στα δείγματα με απουσία φυτών ενώ η απομάκρυνση ξεπερνούσε το 25% παρουσία το φυτών. Γενικά, φαίνεται ότι τα φυτά *Lemna minor* δεν βοήθησαν στην απομάκρυνση των φυσικοχημικών παραγόντων που εξετάστηκαν παραμόνο στην περίπτωση του αμμωνίου.

Πίνακας 3-12: Ακραίες και διάμεσες συγκεντρώσεις φυσικοχημικών χαρακτηριστικών στα 6 ποτήρια ζέσεως (ΠΖ) την 0^η και 7^η ημέρα ανά κύκλο δειγματοληψίας. Η απομάκρυνση υπολογίστηκε με βάση τη διαφορά των διάμεσων τιμών ως μεταξύ 0^{ης} και 7^{ης} ημέρας ανά κύκλο δειγματοληψίας.

Παράμετροι	ΠΖ	Ελάχιστη τιμή		Διάμεσος		Μέγιστη τιμή		Απομάκρυνση (%)
		Ημ. 0	Ημ. 7	Ημ. 0	Ημ. 7	Ημ. 0	Ημ. 7	
COD (mg O ₂ /L)	ΠΖ1	24	57	26	111	51	128	-85
	ΠΖ2	54	58	73	89	87	157	-16
	ΠΖ3	53	58	78	90	128	150	-12
	ΠΖ4	50	57	68	85	100	95	-17
	ΠΖ5	63	57	70	109	89	163	-39
	ΠΖ6	81	64	85	71	89	75	14
TP (mg PO ₄ -P/L)	ΠΖ1	0,03	0,06	0,06	0,08	0,12	0,13	-0,02
	ΠΖ2	5,5	4,2	6,3	5,8	7,7	7,2	0,50
	ΠΖ3	5,7	5,1	6,9	6,5	7,9	7,3	0,40
	ΠΖ4	5,8	4	7,8	6,6	7,9	7,6	1,20
	ΠΖ5	5,7	5,3	8	6,2	8,1	7,5	1,80
	ΠΖ6	8,3	6,4	8,3	6,8	8,3	6,7	1,50
TN (mg N/L)	ΠΖ1	0	0	1	0	3	2	1
	ΠΖ2	56	18	64	23	74	52	41
	ΠΖ3	53	18	64	33	76	51	31
	ΠΖ4	53	23	57	33	69	50	33
	ΠΖ5	52	21	57	30	70	34	27
	ΠΖ6	54	18	60,5	35	67	49	25,5
NH ₄ ⁺ (mg NH ₄ ⁺ -N/L)	ΠΖ1	0	0	0,2	0	0,2	0,43	0,20
	ΠΖ2	28,6	4,8	41,4	11,7	50,3	22,2	29,7
	ΠΖ3	28,6	6,7	30,9	17,3	53,2	24,1	13,6
	ΠΖ4	28,7	10,8	43,5	18	59,4	27,1	25,5
	ΠΖ5	28,8	10,9	41	21	57,9	28,8	20
	ΠΖ6	28,1	7,5	41,1	28,1	54,1	33,1	13

3.2 Εξειδικευμένες αναλύσεις

3.2.1 Ανάλυση μικρορύπων με χρήση LC/ESI-QTOF-MS

Στην εν λόγω ανάλυση ανιχνεύθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν 116 από τους 2350 μικρορύπους που ελέγχθηκαν στις επιμέρους τεχνολογίες της πιλοτικής μονάδας. Οι ανιχνεύσιμοι μικρορύποι χωρίστηκαν σε 8 κύριες κατηγορίες φαρμακευτικές ουσίες και μεταβολίτες τους (Pharmaceuticals & TPs), βιομηχανικά χημικά (Industrial Chemicals), γλυκαντικές ουσίες (Sweeteners), φυτοφάρμακα και προϊόντα μετασχηματισμού τους (Plant Protection Products & TPs), παράνομες ουσίες, μεταβολίτες και προϊόντα μετασχηματισμού τους (Illicit Drugs & TPs), ρύποι σχετικοί με τον καπνό (Tobacco Related CECs), προϊόντα προσωπικής φροντίδας και προϊόντα μετασχηματισμού τους (Personal Care Products & TPs) και ρύποι σχετικοί με το καφέ (Coffee related CECs). Οι πλείστοι μικρορύποι αφορούσαν φαρμακευτικές ουσίες και μεταβολίτες τους με συνολικά 89 περιπτώσεις. Στον Πίνακα 3-13 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των μικρορύπων ανά σημείο δειγματοληψίας καθώς και η ολική απομάκρυνση που επιτυγχάνεται.

Πίνακας 3-13: Συγκεντρώσεις μικρορύπων στα επιμέρους τεχνολογικά στάδια της πιλοτικής μονάδας και η ολική απομάκρυνση που επιτεύχθηκε

Ανιχνευθείσες ουσίες	Κατηγορία ουσίας	Συγκέντρωση (μg/L)				Ολική απομάκρυνση (%)
		ΣΔ1	ΣΔ4	ΣΔ5	ΣΔ7	
1-(3-carboxypropyl)-3,7-dimethylxanthine	Pharmaceuticals & TPs	10,8	13,8	11,4	15,9	-47,3
1,2-Benzisothiazolinone	Industrial Chemicals	10,5	8,8	<LOD	<LOD	100,0
10,11-dihydro-10,11-dihydroxy-Carbamazepine	Pharmaceuticals & TPs	1,07	1,41	0,50	0,52	51,4
10-Hydroxy-Carbamazepine	Pharmaceuticals & TPs	5,16	6,85	4,43	5,33	-3,3
1-Hydroxy-Midazolam	Pharmaceuticals & TPs	0,35	0,93	1,03	0,95	-169,4
2-Hydroxy-Ibuprofen	Pharmaceuticals & TPs	19,6	29,0	1,38	1,32	93,3
3,3-pentamethylene-4-butyrolactam	Pharmaceuticals & TPs	0,06	0,06	0,52	0,42	-555,8
4-Acetamido-Antipyrine	Pharmaceuticals & TPs	3,00	3,96	10,6	10,7	-255,7
4-Formylamino-Antipyrine	Pharmaceuticals & TPs	<LOD	<LOD	1,28	1,53	-5081,6
5-Chlorobenzotriazole	Industrial Chemicals	0,303	0,35,	0,40	0,52	-73,6
Acesulfame	Sweeteners	23,7	2,28	9,05	8,88	62,6

Acetamiprid	Plant Protection Products & TPs	<LOD	<LOD	0,100	0,127	-470,7
Amitriptyline	Pharmaceuticals & TPs	6,40	10,2	0,749	0,33	94,9
Atenolol acid (Metoprolol acid)	Pharmaceuticals & TPs	43,2	47,6	18,4	19,2	55,6
Atropine	Pharmaceuticals & TPs	<LOD	<LOD	1,25	1,25	-50,0
Benzododecinium (Benzyl-dimethyl-dodecylammonium)	Industrial Chemicals	19,1	5,08	0,185	<LOD	100,0
Benzotriazole (BTR)	Industrial Chemicals	5,99	6,77	5,61	5,85	2,3
Benzoyllecgonine	Illicit Drugs & TPs	<LOD	<LOD	0,856	1,01	-484,1
Bezafibrate	Pharmaceuticals & TPs	22,1	28,2	25,7	31,5	-42,7
Bisoprolol	Pharmaceuticals & TPs	0,196	0,255	0,239	0,324	-65,8
Citalopram	Pharmaceuticals & TPs	3,62	5,97	3,75	3,89	-7,5
Citalopram-N-oxide	Pharmaceuticals & TPs	<LOD	<LOD	0,09	0,09	-50,0
Climbazole	Pharmaceuticals & TPs	0,444	2,16	1,47	1,07	-141,7
Clindamycin	Pharmaceuticals & TPs	12,6	26,8	<LOD	1,55	87,8
Clopidogrel	Pharmaceuticals & TPs	0,546	0,959	0,419	0,535	1,9
Clopidogrel Carbon acid	Pharmaceuticals & TPs	1,90	1,73	1,07	1,67	12,4
Codeine	Pharmaceuticals & TPs	0,947	0,910	1,85	1,67	-76,9
Cortisol F (4-Pregnene-11b,17a,21-triol-3,20-dione)	Pharmaceuticals & TPs	1,48	2,02	<LOD	<LOD	100,0
Cotinine	Tobacco Related CECs	1,43	1,39	0,793	0,981	31,3
Cyclamic acid	Sweeteners	10,4	2,30	<LOD	<LOD	100,0
D L-N N-Didesmethyl-Venlafaxine	Pharmaceuticals & TPs	<LOD	<LOD	0,11	0,11	-50,0
D L-N O-Didesmethyl-Venlafaxine	Pharmaceuticals & TPs	1,03	1,23	1,83	2,27	-121,0
D617 (met, of verapamil)	Pharmaceuticals & TPs	0,146	0,204	0,068	0,144	1,7
Dapiprazole	Pharmaceuticals & TPs	0,126	0,0676	0,270	0,353	-181,0
Desvenlafaxine (O-Desmethyl-Venlafaxine)	Pharmaceuticals & TPs	4,90	7,68	5,34	7,44	-51,9
Didecyldimethylammonium (DADMAC (C10:C10))	Industrial Chemicals	2,81	0,230	0,295	<LOD	100,0
Diethyltoluamide (DEET)	Plant Protection Products & TPs	<LOD	<LOD	0,05	0,05	-50,0

Dihydro-Codeine	Pharmaceuticals & TPs	<LOD	<LOD	1,25	1,25	-50,0
Dimetridazole	Pharmaceuticals & TPs	13,5	28,4	67,8	60,4	-348,7
Dinoterb	Plant Protection Products & TPs	<LOD	<LOD	0,287	0,196	-3374,4
Diphenhydramine	Pharmaceuticals & TPs	0,04	0,168	0,0907	0,129	-223,5
Diphenylphosphate	Industrial Chemicals	9,07	11,4	15,0	15,0	-65,8
Disopyramide	Pharmaceuticals & TPs	4,20	5,64	2,86	3,36	20,1
Donepezil	Pharmaceuticals & TPs	<LOD	0,153	0,05	0,05	-50,0
Emtricitabine	Pharmaceuticals & TPs	41,1	36,5	47,6	41,6	-1,2
Ephedrine	Pharmaceuticals & TPs	1,69	3,57	0,895	0,802	52,4
Esmolol	Pharmaceuticals & TPs	0,24	0,225	<LOD	<LOD	100,0
Ethylparaben	Personal Care Products & TPs	0,53	0,504	<LOD	<LOD	100,0
Famotidine	Pharmaceuticals & TPs	0,33	0,33	<LOD	<LOD	33,3
Fenofibric acid	Pharmaceuticals & TPs	0,16	0,543	0,27	0,25	-57,4
Flecainide	Pharmaceuticals & TPs	1,41	1,72	1,43	1,64	-16,3
Fluconazole	Pharmaceuticals & TPs	10,1	11,0	14,0	16,0	-58,8
Fluoxetine	Pharmaceuticals & TPs	0,498	0,742	<LOD	<LOD	100,0
Furosemide Related Comp B (2-amino-4-chloro-5-sulfamoylbenzoic acid)	Pharmaceuticals & TPs	0,882	0,67	<LOD	<LOD	100,0
Furosemide	Pharmaceuticals & TPs	3,92	4,88	0,67	1,24	68,5
Gabapentin	Pharmaceuticals & TPs	4,76	13,6	18,9	19,5	-310,2
Galaxolide	Personal Care Products & TPs	0,33	0,322	0,15	0,15	55,3
Gemfibrozil	Pharmaceuticals & TPs	3,59	3,76	2,65	1,96	45,6
Genistein	Pharmaceuticals & TPs	0,69	0,69	<LOD	<LOD	100,0
Homatropine	Pharmaceuticals & TPs	<LOD	<LOD	0,21	0,21	-50,0
Hydroxy-Chloroquine	Pharmaceuticals & TPs	5,63	4,01	4,51	0,75	86,7
Hydroxy-Cotinine	Tobacco Related CECs	<LOD	<LOD	0,43	0,53	-5016,1
Hydroxy-Quetiapine	Pharmaceuticals & TPs	0,18	0,29	0,19	0,19	-7,3
Ibuprofen-Carboxy	Pharmaceuticals & TPs	16,6	26,2	<LOD	<LOD	100,0
Iohexol	Pharmaceuticals & TPs	62,1	81,3	104	81,0	-30,4

Ipratropium	Pharmaceuticals & TPs	<LOD	<LOD	0,329	0,325	-832,9
Ketamine	Pharmaceuticals & TPs	0,28	0,57	0,704	0,834	-203,2
Labetalol	Pharmaceuticals & TPs	11,6	12,8	69,5	60,2	-420,7
Lamotrigine	Pharmaceuticals & TPs	0,451	0,777	1,03	1,50	-233,8
Levetiracetam	Pharmaceuticals & TPs	15,6	15,5	1,74	1,61	89,7
Lidocaine	Pharmaceuticals & TPs	4,91	6,26	3,99	4,91	-0,1
Linezolid	Pharmaceuticals & TPs	11,8	13,4	10,5	3,12	73,4
Losartan	Pharmaceuticals & TPs	<LOD	<LOD	1,97	2,56	-5537,9
Meclofenamic Acid	Pharmaceuticals & TPs	<LOD	<LOD	1,16	1,19	-318,3
Memantine	Pharmaceuticals & TPs	1,09	1,83	1,49	1,65	-51,3
Metenolone acetate	Pharmaceuticals & TPs	<LOD	<LOD	2,24	13,4	-796,8
Metformin	Pharmaceuticals & TPs	<LOD	0,933	0,290	0,940	-5861,9
Methylparaben	Personal Care Products & TPs	0,779	0,583	0,220	0,153	80,3
Methyl-Prednisolone	Pharmaceuticals & TPs	0,868	1,60	<LOD	<LOD	100,0
Metoclopramide	Pharmaceuticals & TPs	3,34	3,70	<LOD	<LOD	100,0
Midazolam	Pharmaceuticals & TPs	0,241	0,611	0,416	0,402	-67,0
Morphine (MOR)	Illicit Drugs & TPs	1,89	3,59	1,35	1,03	45,7
Mycophenolic acid	Pharmaceuticals & TPs	7,87	9,40	<LOD	<LOD	100,0
N4-Acetyl-Sulfamethoxazole (Impurity A)	Pharmaceuticals & TPs	0,75	0,75	2,16	1,48	-97,8
Naproxen	Pharmaceuticals & TPs	11,7	14,3	6,62	9,80	16,2
Nor-Citalopram	Pharmaceuticals & TPs	0,469	0,734	0,823	0,851	-81,4
Nor-Fentanyl	Pharmaceuticals & TPs	0,428	0,567	0,390	0,518	-21,0
Nor-Lidocaine	Pharmaceuticals & TPs	0,496	0,587	0,493	0,615	-24,1
Nor-Tramadol (N-desmethyl-Tramadol)	Pharmaceuticals & TPs	5,25	6,44	13,8	13,0	-148,4
Norvenlafaxine (N-Desmethyl-Venlafaxine)	Pharmaceuticals & TPs	0,536	1,04	1,57	1,95	-264,8
O-Desmethylnor-Tramadol	Pharmaceuticals & TPs	2,27	2,94	7,22	6,85	-201,7
O-Desmethyl-Tramadol	Pharmaceuticals & TPs	5,07	6,12	18,3	18,3	-261,7
Oxcarbazepine	Pharmaceuticals & TPs	5,94	10,7	<LOD	<LOD	100,0

Oxycodone	Illicit Drugs & TPs	<LOD	<LOD	1,24	1,04	-559,4
Pentoxifylline	Pharmaceuticals & TPs	0,952	1,25	4,90	5,22	-448,6
Pethidine (Meperidine)	Pharmaceuticals & TPs	2,56	3,33	5,05	4,95	-93,3
Phentermine	Pharmaceuticals & TPs	0,88	1,17	2,39	2,99	-241,4
Phosphate-triethyl	Industrial Chemicals	1,53	0,963	1,00	1,41	7,8
Pregabalin	Pharmaceuticals & TPs	6,82	17,5	19,7	17,2	-152,0
Propafenone	Pharmaceuticals & TPs	<LOD	<LOD	0,0421	0,02	-50,0
Propylparaben	Personal Care Products & TPs	0,631	0,819	0,164	<LOD	100,0
Quetiapine	Pharmaceuticals & TPs	2,06	3,37	1,13	0,90	56,2
Rimantadin	Pharmaceuticals & TPs	0,56	0,95	0,76	0,85	-51,3
Saccharine	Sweeteners	27,5	39,6	1,09	1,55	94,4
Salicylic acid	Pharmaceuticals & TPs	49,6	71,4	<LOD	<LOD	100,0
Sitagliptin	Pharmaceuticals & TPs	16,9	17,8	<LOD	<LOD	100,0
Sotalol	Pharmaceuticals & TPs	2,36	5,00	3,4	3,6	-54,3
Sucralose	Sweeteners	41,5	52,9	28,0	29,2	29,6
Telmisartan	Pharmaceuticals & TPs	1,68	2,68	2,04	0,601	64,1
Theobromine	Coffee related CECs	31,2	30,6	<LOD	<LOD	100,0
Tolytriazole (sum of 4-Me- and 5-Me-Benzotriazole)	Industrial Chemicals	<LOD	<LOD	0,27	0,27	-50,0
Triethylcitrate	Industrial Chemicals	53,5	87,2	12,6	13,6	74,6
Trimethoprim	Pharmaceuticals & TPs	28,0	32,5	71,4	75,9	-170,8
Trimethyloctylamm onium	Industrial Chemicals	6,55	11,2	<LOD	<LOD	100,0
Venlafaxine	Pharmaceuticals & TPs	2,57	4,32	7,38	8,19	-218,7
Vildagliptin	Pharmaceuticals & TPs	1,30	2,56	6,4	6,3	-383,0

Σημείωση: Το LOD (Limit of Detection) αναφέρεται σε συγκέντρωση μικρότερη από το όριο ανίχνευσης, άρα όπου εμφανίζεται σημαίνει πως δεν ανιχνεύτηκε η συγκεκριμένη ουσία. Οι τιμές σε γκριζα κουτιά χαρακτηρίζονται ως τιμές χαμηλότερες του ορίου ποσοτικοποίησης (Below Quantification Limit – BQL) και ισούνται με το μισό του ορίου ποσοτικοποίησης. Οι τιμές αυτές είναι μεγαλύτερες του ορίου ανίχνευσης και χαμηλότερες του ορίου ποσοτικοποίησης.

Συγκρίνοντας τις συγκεντρώσεις των μικρορύπων στα σημεία ΣΔ1 και ΣΔ7 προκύπτουν οι ολικές απομακρύνσεις στη τελευταία στήλη του Πίνακα 3-13. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μείωση στη συγκέντρωση ουσιών σε 49 περιπτώσεις εκ των οποίων οι 37 ουσίες με ποσοστό

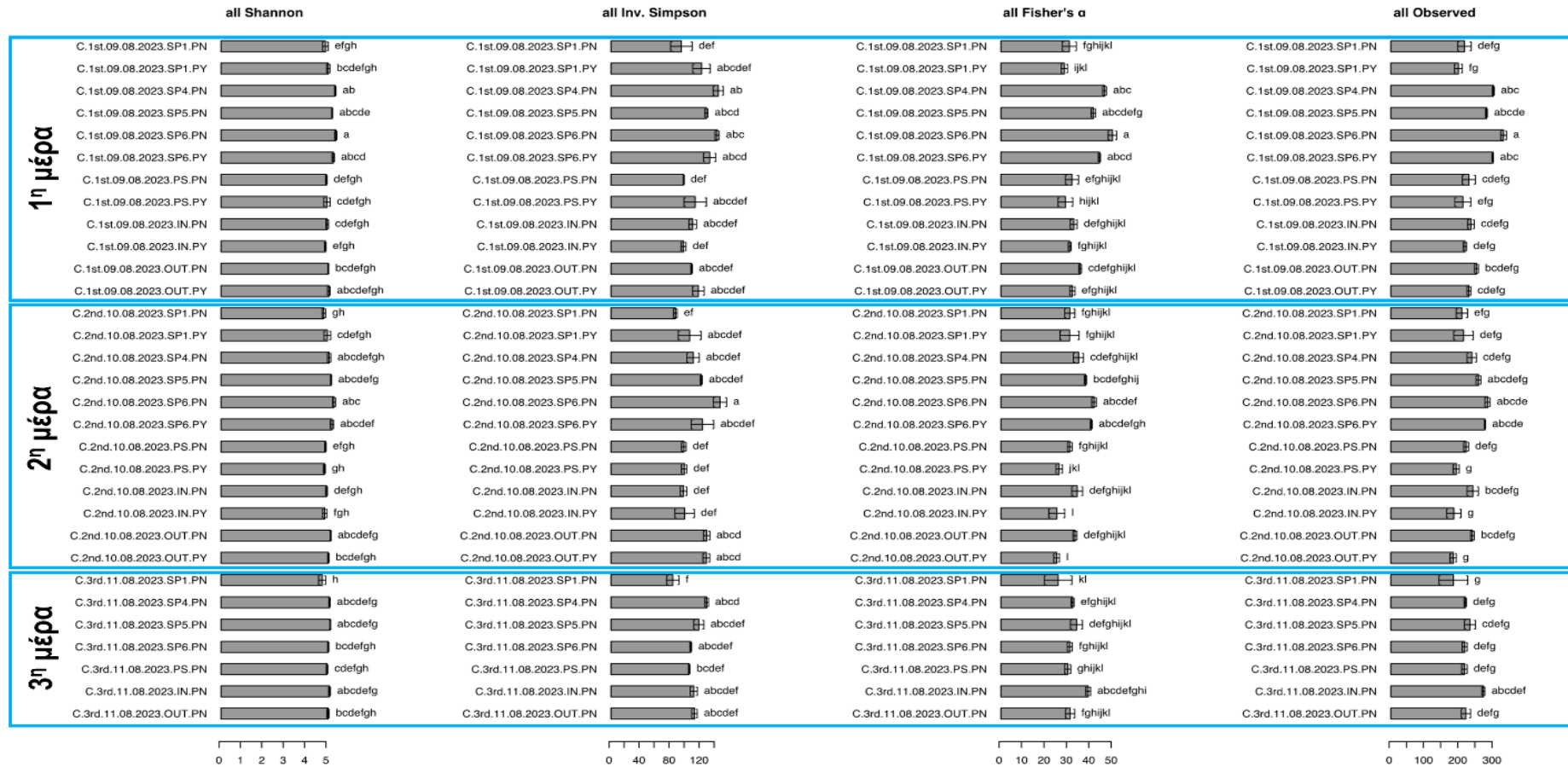
απομάκρυνσης 50-100% ενώ για άλλες 12 το ποσοστό απομάκρυνσης κυμαίνεται από 1,7 έως 45,7%. Αντιθέτως, σε 67 ουσίες παρατηρήθηκε αύξηση στις συγκεντρώσεις των ουσιών μεταξύ των σημείων ΣΔ1 και ΣΔ7 οι οποίες ενδεχομένως να οφείλονται σε φυσικοχημικούς παράγοντες και ιδιότητες τόνων των ουσιών όσο και των τεχνολογιών όπως εξηγήθηκε και στην Ενότητα 3.1.3. Χαρακτηριστικές περιπτώσεις αποτελούν οι αντιβιοτικές ενώσεις clindamycin, linezolid και trimethoprim οι οποίες συγκαταλέγονται στις χορηγημένες ενώσεις του Γενικού Νοσοκομείου Λάρνακας. Για clindamycin και linezolid καταγράφηκαν ολικές απομακρύνσεις με ποσοστά 87,8% και 73,4% αντίστοιχα, ενώ για trimethoprim παρατηρήθηκε αύξηση με τη συγκέντρωση να φτάνει στα 75,9 µg/L στο ΣΔ7 σε σύγκριση με 28,0 µg/L στο ΣΔ1. Επιπλέον, για κάποιες ενώσεις οι συγκεντρώσεις τους είναι μη ανιχνεύσιμες (χαμηλότερες από το όριο ανίχνευσης) στο ΣΔ1 ενώ ανιχνεύονται στα επόμενα στάδια. Το γεγονός αυτό πιθανόν να οφείλεται στη διάσπαση γλυκουρονιδίων ή άλλων συμπλόκων της φαρμακευτικής ένωσης με αποτέλεσμα να μπορεί να ανιχνεύεται η ένωση σε μεταγενέστερα στάδια. Ανάλογο παράδειγμα είναι ο μεταβολίτης της αντιβιοτικής ένωσης sulfamethoxazole (n4-acetyl-sulfamethoxazole (impurity A)) του οποίου στα σημεία ΣΔ1 και ΣΔ4 οι συγκεντρώσεις του ήταν χαμηλότερες από το όριο ποσοτικοποίησης (Below Quantification Limit – BQL) ενώ ανιχνεύεται στα σημεία ΣΔ5 και ΣΔ7. Συμπερασματικά, η πιλοτική μονάδα επέτρεψε σημαντική απομάκρυνση σε αρκετούς μικρορύπους. Αξίζει να σημειωθεί ότι συγκρίνοντας τις συγκεντρώσεις των 116 ανιχνεύσιμων ουσιών στις επιμέρους τεχνολογίες της πιλοτικής μονάδας φαίνεται πως στις πλείστες ουσίες η αερόβια επεξεργασία παρουσιάζει τη μέγιστη συνεισφορά στη μείωση των συγκεντρώσεών τους (ΣΔ5 – 66 περιπτώσεις) και ακολουθείται από το στάδιο της οξειδωσης (ΣΔ7 – 38 περιπτώσεις) και τέλος την αναερόβια επεξεργασία (ΣΔ4 – 19 περιπτώσεις).

3.2.2 Ανάλυση αποτελεσμάτων αλληλούχησης προϊόντων PCR του γονιδίου 16S rRNA (Sequencing) μέσω βιοοληροφορικής (Bioinformatics)

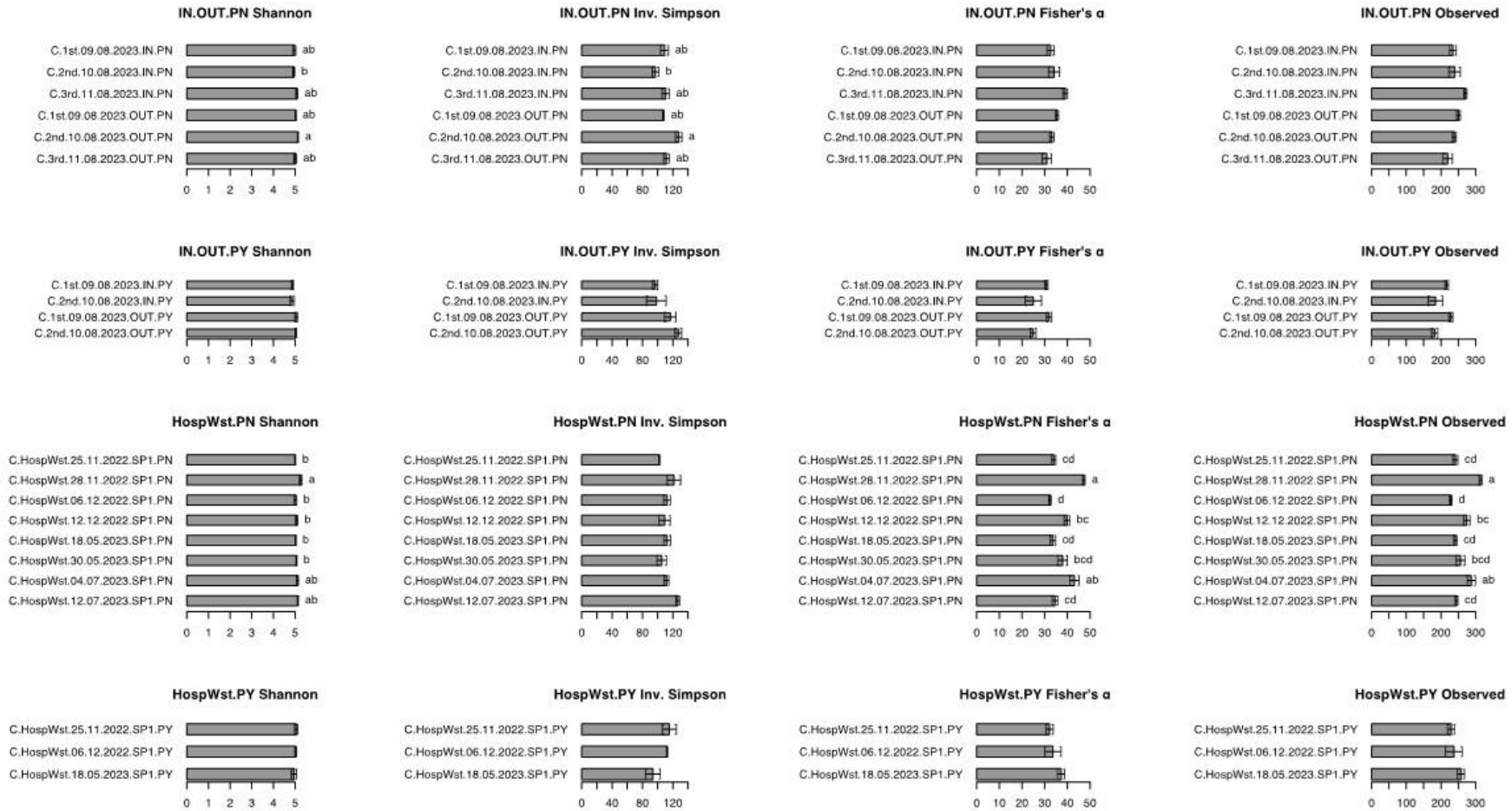
Στην ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 3101837 αλληλουχίες υψηλής ποιότητας από τα αρχικά 7489011 ζεύγη ανάγνωσης, με μέσο όρο ανά δείγμα 36927 που αντιστοιχούν στο 41,4 % των αρχικών ζευγών ανάγνωσης. Το πρώτο επίπεδο ανάλυσης που πραγματοποιήθηκε ήταν ως προς την α-ποικιλότητα. Συγκεκριμένα, υπολογίστηκαν αρκετοί δείκτες α-ποικιλότητας που ήταν αντιπροσωπευτικοί διαφορετικών επιπέδων κυριαρχίας των αναλυόμενων δεικτών: i) παρατηρούμενος πλούτος *Observed Richness* (αντιπροσωπευτικός όλων των ταξινομικών ομάδων - TO), *Shannon* (αντιπροσωπευτικός των TO χαμηλής σχετικής αφθονίας), *Inverse-Simpson* (αντιπροσωπευτικός των σχετικά κυρίαρχων TO), και *Fisher's α* (αντιπροσωπευτικός των άκρως κυρίαρχων TO). Τα διαφορετικά επίπεδα ανάλυσης έδωσαν διαφορετικά μοτίβα συμπεριφοράς της μικροβιολογικής κοινότητας και

αυτά παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 3-6 και 3-7. Ειδικότερα, οι δείκτες α-ποικιλότητας σχετικά με τα δείγματα που αφορούν την απόδοση της πιλοτική μονάδας παρουσίασαν διαφορές μεταξύ των σταδίων επεξεργασίας. Στο Διάγραμμα 3-6 φαίνονται τα δείγματα από τα διάφορα σημεία δειγματοληψίας των σταδίων επεξεργασίας μέσα στην πιλοτική μονάδα αλλά και τα σημεία δειγματοληψίας μετά την πιλοτική μονάδα. Με βάση το Διάγραμμα 3-6 αυτό το οποίο παρατηρείται είναι ότι τα δείγματα εισόδου (SP1) και εξόδου (SP6) από την πιλοτική μονάδα έχουν διαφορές μεταξύ τους, ειδικότερα τα δείγματα τα οποία δεν έτυχαν επεξεργασίας με PMA. Συγκεκριμένα, αυτό το οποίο γίνεται εύκολα αντιληπτό όσον αφορά τον δείκτη του *observed richness* είναι ότι παρουσιάζονται σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων εισόδου και εξόδου της πιλοτικής μονάδας και για τις τρεις μέρες δειγματοληψίας πράγμα το οποίο ήταν αναμενόμενο λόγω του ότι η ροή των νοσοκομειακών λυμάτων διέρχεται από τα διάφορα στάδια επεξεργασίας.

Στο Διάγραμμα 3-7 παρουσιάζονται τα δείγματα εκροής του νοσοκομείου και αυτό το οποίο παρατηρείται είναι ότι η νοσοκομειακή εκροή δεν παραμένει σταθερή με το πέρασμα του χρόνου αλλά αλλάζει. Αυτό είναι αναμενόμενο με βάση το γεγονός ότι οι βακτηριακές λοιμώξεις και οι ιοί διαφοροποιούνται μέσα στον χρόνο και αυτό αποτυπώνεται και στα δείγματα που εξετάστηκαν. Συγκεκριμένα οι δείκτες *Fisher's a* και *observed richness* είναι οι δείκτες που δείχνουν αυτή τη διαφοροποίηση. Εδώ πρέπει να αναφερθεί ότι τα δείγματα τα οποία επεξεργάστηκαν με το PMA για να διαχωριστεί το ζωντανό και ενεργό κομμάτι της μικροβιακή κοινότητας δεν παρουσιάζουν καμία διαφοροποίηση. Αυτό δείχνει ότι το ενεργό κομμάτι της μικροβιακής κοινότητας των δειγμάτων δεν αλλάζει και παραμένει σταθερό με το πέρασμα του χρόνου. Επιπρόσθετα στο Διάγραμμα 3-7 παρουσιάζονται και οι συγκρίσεις μεταξύ των δειγμάτων εισόδου και εξόδου στον σταθμό επεξεργασίας αστικών λυμάτων πλήρους κλίμακας στη Λάρνακα. Τα αποτελέσματα όπως ήταν αναμενόμενο διαφοροποιούνται μιας και τα λύματα υπόκεινται σε πρωτοβάθμια, δευτεροβάθμια, και τριτοβάθμια επεξεργασία και οδηγούνται σε απόρριψη στο περιβάλλον και για επαναχρησιμοποίηση για αρδευτικούς σκοπούς.

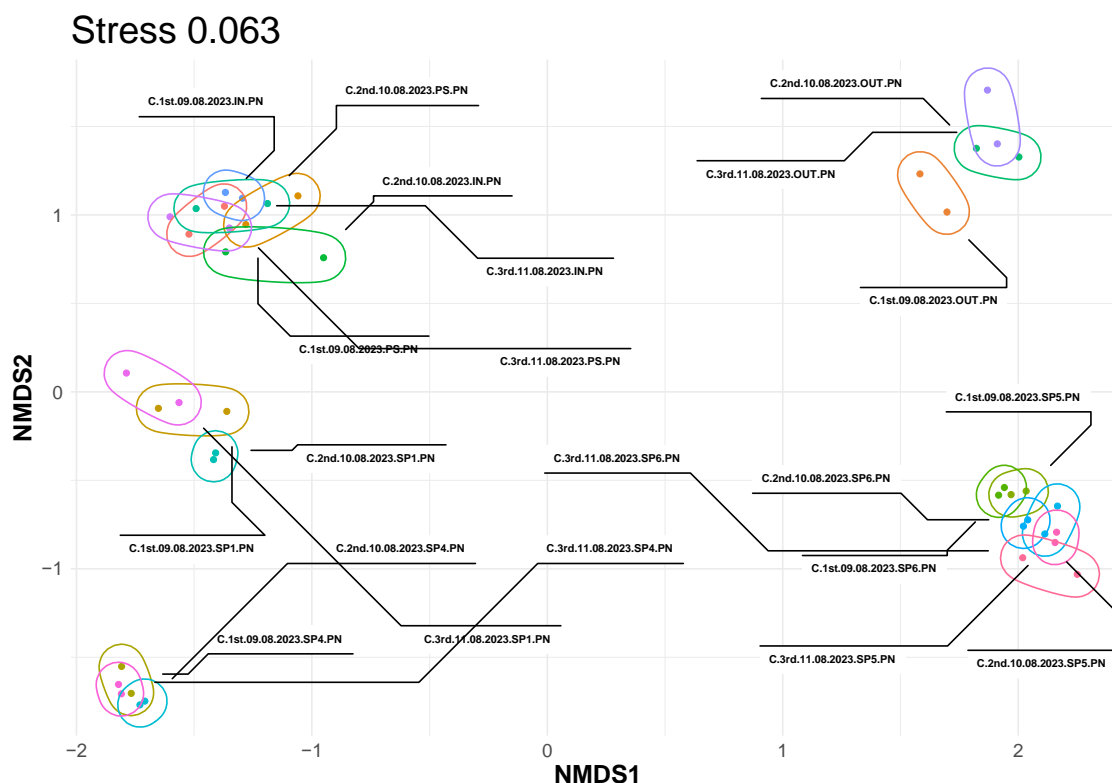


Διάγραμμα 3-6: Απεικόνιση των 7 διαφορετικών σημείων δειγματοληψίας (Barplots) σε συνδυασμό με στατιστική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε σε αυτά (ANOVA ακολουθούμενα από το HSD του Tukey (ή τις μη παραμετρικές εναλλακτικές Kruskal Wallis και Wilcoxon) για τους τέσσερις αντιπροσωπευτικούς δείκτες α-ποικιλότητας (από αριστερά προς τα δεξιά: Shannon, Inverse Simpson, Fisher's alpha και Observed Richeaness). Τα δείγματα είναι ομαδοποιημένα ανάλογα με την ημέρα δειγματοληψίας και εμφανίζονται και τα δείγματα τα οποία επεξεργάστηκαν με PMA (κατάληξη PY ονόματος) ή όχι (κατάληξη PN ονόματος)



Διάγραμμα 3-7: Απεικόνιση των δειγμάτων της νοσοκομειακής ροής κατά την διάρκεια της λειτουργίας της πιλοτικής μονάδας (9 μήνες), δείγματα εισόδου και εξόδου από τον πλήρους κλίμακας σταθμό επεξεργασίας αστικών λυμάτων της Λαρνακας (Barplots) σε συνδυασμό με στατιστική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε σε αυτά (ANOVA ακολουθούμενα από το HSD του Tukey (ή τις μη παραμετρικές εναλλακτικές Kruskal Wallis και Wilcoxon) για τους τέσσερις αντιπροσωπευτικούς δείκτες α-ποικιλότητας (από αριστερά προς τα δεξιά: Shannon, Inverse Simpson, Fisher's alpha και observed richness). Τα δείγματα επεξεργάστηκαν με και χωρίς μεταχείριση με PMA

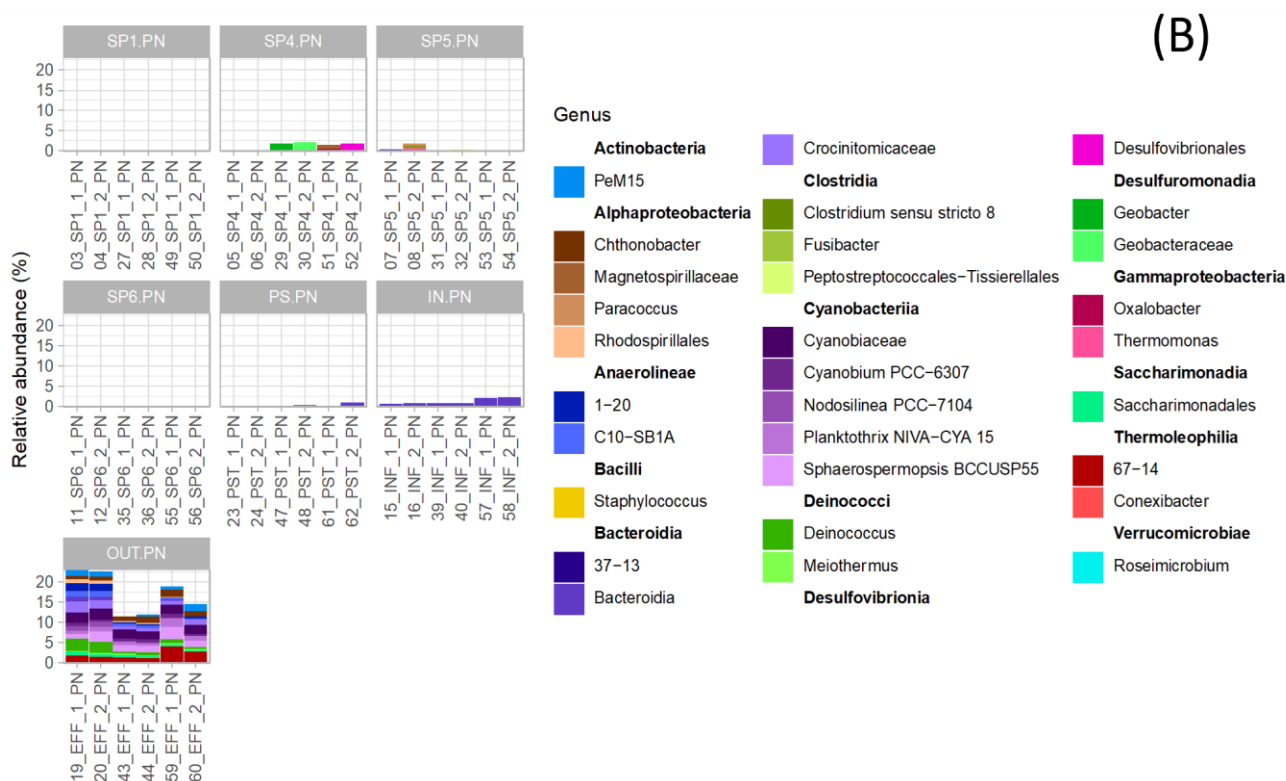
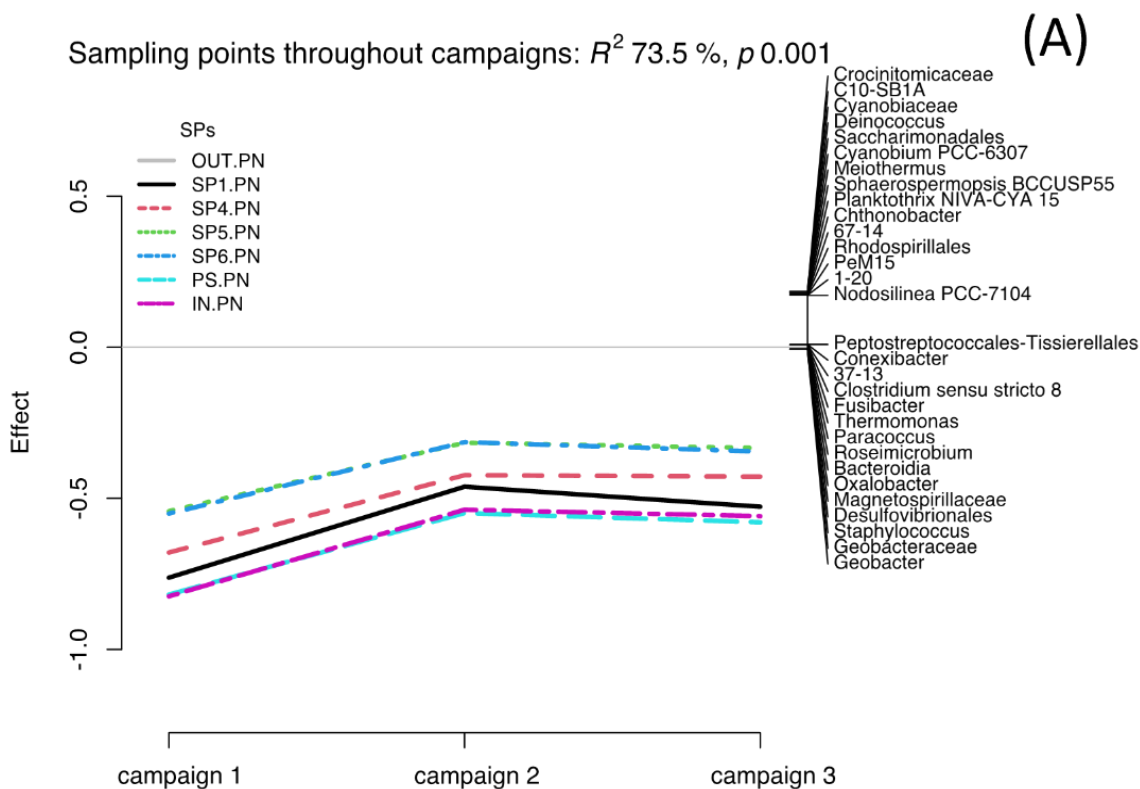
Τα δείγματα αναλύθηκαν και ως προς β-ποικιλότητα και τη διαφορική αφθονία της μικροβιακής κοινότητας των υπό εξέταση δειγμάτων. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε ανάλυση β-ποικιλότητας της βακτηριακής κοινότητας ως προς τα βακτήρια σε επίπεδο γένους, όπως επίσης και τα γένη που περιλάμβαναν καθιερωμένα (≥ 3 αναφερόμενες περιπτώσεις) και υποτιθέμενα παθογόνα (< 3 αναφερόμενες περιπτώσεις) σύμφωνα με την μελέτη του Bartlett et al, (2022). Επιπλέον, τα γνωστά παθογόνα προκαρυωτικά γένη κατηγοριοποιήθηκαν σε «κρίσιμη», «υψηλή», και «μέτρια» επικινδυνότητα με βάση την αντοχή τους στα αντιβιοτικά σύμφωνα με τα ενημερωτικά δελτία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας. Πιο συγκεκριμένα έγινε ανάλυση ως προς το σύνολο των βακτηρίων για τα δείγματα που δεν επεξεργάστηκαν με ΡΜΑ. Το Διάγραμμα 3-8 παρουσιάζει την σύγκριση της σύστασης των δειγμάτων μεταξύ των διαφορετικών σημείων και από τις τρεις μέρες δειγματοληψίας. Τα αποτελέσματα δείχνουν συνέπεια ως προς την σύσταση της μικροβιακής κοινότητας και τις τρεις μέρες για τα ίδια σημεία δειγματοληψίας. Παρατηρούνται κάποιες μικρές διαφοροποιήσεις μεταξύ των δειγμάτων χωρίς όμως να υπάρχει κάποια μεγάλη διαφορά στη σύσταση της μικροβιακής κοινότητας. Αυτά τα αποτελέσματα ήταν αναμενόμενα μιας και οι τεχνολογίες που εφαρμόζονται στα διάφορα στάδια επεξεργασίας της πιλοτική μονάδας περιλαμβάνουν αερόβιες και αναερόβιες διεργασίες, τεχνολογίες που στηρίζονται στα διαφορετικά χαρακτηριστικά της μικροβιακή κοινότητας. Για αυτό το λόγο παρατηρούνται οι διαφοροποιήσεις των δειγμάτων ως προς τη σύσταση τους. Οι διαφορές στη σύσταση της μικροβιακής κοινότητας μεταξύ των δειγμάτων αποτυπώνεται και στο Διάγραμμα 3-9 που παρουσιάζονται οι κυρίαρχες καμπύλες απόκρισης (principal response curves - PRC). Πιο συγκεκριμένα, στο Διάγραμμα 3-9 (Α) φαίνεται η διαφοροποίηση κατά τις PRC των μικροβιακών κοινοτήτων των δειγμάτων εξόδου από το σταθμό, συγκριτικά με τα δείγματα από το αντλιοστάσιο (PS) και τα εισερχόμενα στο σταθμό λύματα, πράγμα αναμενόμενο μιας και τα δείγματα περνούν από τα διάφορα στάδια επεξεργασίας (πρωτοβάθμια, δευτεροβάθμια, τριτοβάθμια και απολύμανση).



Διάγραμμα 3-8: Διαφορές σύνθεσης μεταξύ σημείων δειγματοληψίας και ημέρες δειγματοληψίας δειγμάτων που δεν λαμβάνουν PMA σε διάγραμμα διασποράς μη μετρικής πολυδιάστατης κλιμακοποίησης (NMDS)

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι συγκρίσεις με τα δείγματα της πιλοτικής μονάδας και συγκεκριμένα τα δείγματα από τα σημεία SP5 και SP6, που φαίνεται να είναι πολύ κοντά με αυτό της εκροής του σταθμού. Αυτό δείχνει ότι η πιλοτική μονάδα λειτουργεί αρκετά καλά και τα στάδια επεξεργασίας που εφαρμόζονται σε αυτή είναι αρκετά αποτελεσματικά δίνοντας αποτελέσματα πανομοιότυπα με αυτά των τεχνολογιών που εφαρμόζονται στο σταθμό μεγάλης κλίμακας στη Λάρνακα.

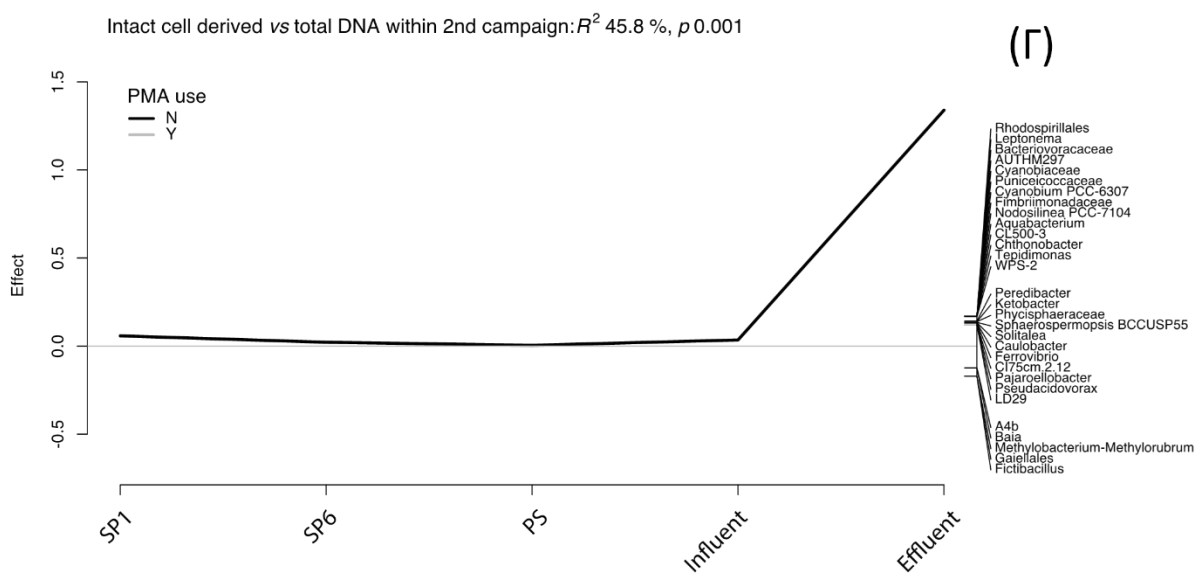
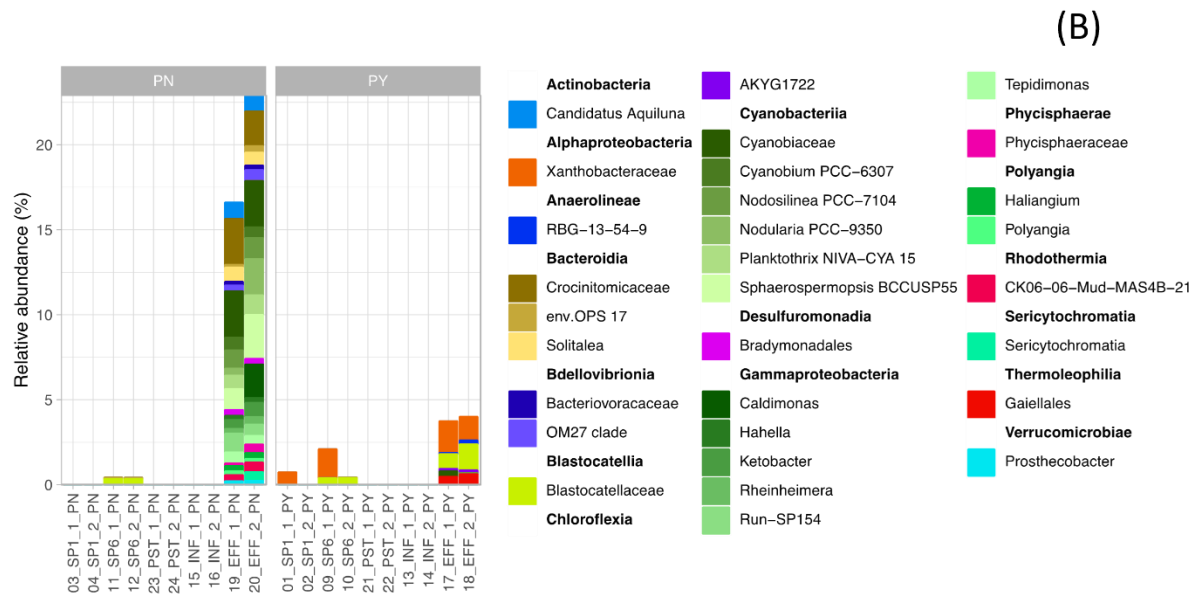
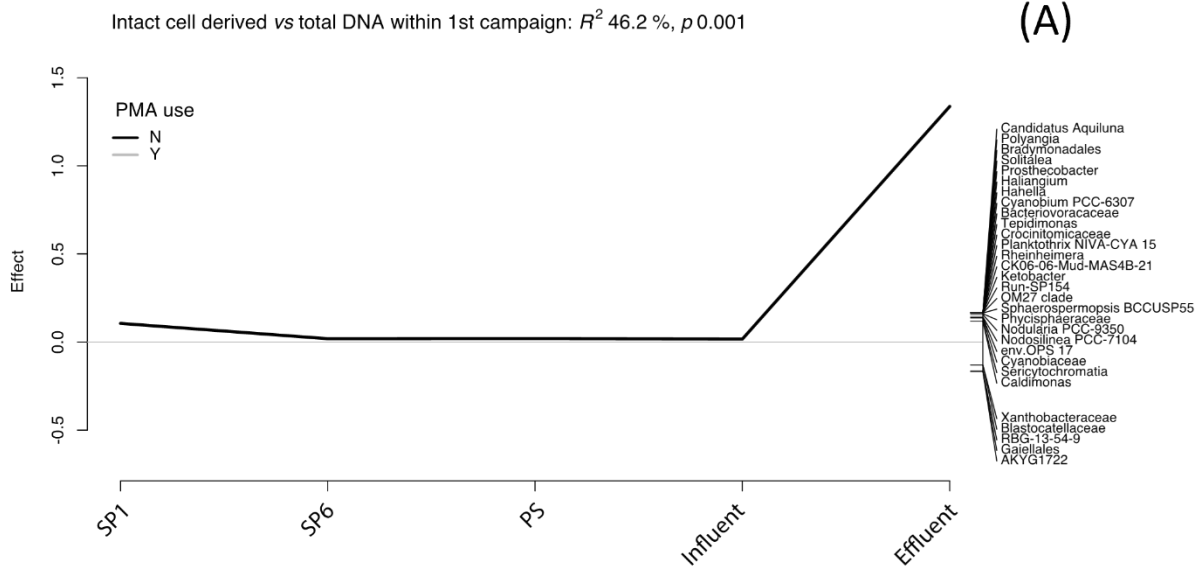
Το Διάγραμμα 3-9 (B) παρουσιάζει σε μορφή barplots μια πιο λεπτομερή ανάλυση των 30 κορυφαίων ΤΟ που συνδέονται με διαφορές που παρατηρούνται στις μικροβιακές κοινότητες μεταξύ των δειγμάτων. Μερικά από τα γένη βακτηρίων που παρουσιάζονται στα δείγματα περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων τα *Actinobacteria*, *Clostridia*, *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Bacilli* και άλλα. Οι ομάδες αυτές εντοπίζονται και σε άλλες μελέτες, όπως αυτή του Osunmakinde et al., (2019), όπου μελέτησε και εντόπισε τα *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, και *Firmicutes* ως κυρίαρχα φύλα σε τρεις μονάδες επεξεργασίας λυμάτων, ενώ τα *Alphaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacilli* και *Clostridia* ήταν τα κυρίαρχα γένη. Αυτά τα αποτελέσματα συμφωνούν και με αυτά τα οποία εντοπίζονται και σε δείγματα που αναλύθηκαν στα πλαίσια της παρούσας μελέτης.

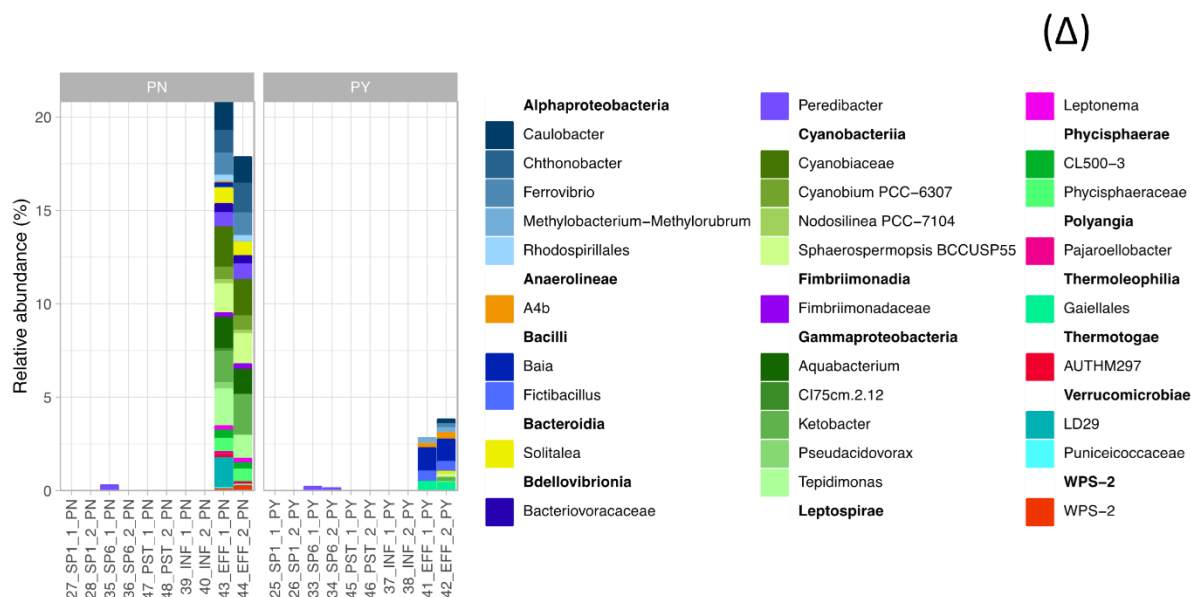


Επιπρόσθετα, χρησιμοποιώντας τη σχετική αφθονία των βακτηρίων που προέκυψε για τις συνολικές μικροβιακές κοινότητες των δειγμάτων, αναλύθηκαν εκ νέου ως προς τα δυνητικά παθογόνα βακτήρια και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 3-9 (Γ) και (Δ). Τα διαγράμματα αυτά δείχνουν ότι τα δείγματα εξόδου από την πιλοτική μονάδα μαζί με τα δείγματα εξόδου από το σταθμό μεγάλης κλίμακας στη Λάρνακα περιέχουν ίδια γένη βακτηρίων, ενώ διαφέρουν από τα δείγματα εισόδου. Η διαφορά στη σύσταση των δειγμάτων ως προς τη σχετική αφθονία των παθογόνων βακτηρίων στην κοινότητα αποτυπώνεται πιο ξεκάθαρα στο Διάγραμμα 3-9 (Δ). Συγκεκριμένα, με βάση το διάγραμμα αυτό, οι επιμέρους τεχνολογίες αλλά και το στάδιο απολύμανσης της πιλοτικής μονάδας μειώνουν κατά περισσότερο από 30% τη σχετική αφθονία διαφόρων παθογόνων βακτηρίων των υπό εξέταση δειγμάτων. Αυτό δείχνει την αποτελεσματικότητα της πιλοτικής μονάδας ως προς τη μείωση της σχετικής αφθονίας των παθογόνων μικροοργανισμών από τα νοσοκομειακά λύματα, που ήταν και ένας από τους στόχους του προγράμματος. Στο Διάγραμμα 3-9 (Δ) παρουσιάζεται και η μείωση που προκαλεί ο σταθμός επεξεργασίας πλήρους κλίμακας της Λάρνακας. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι υπάρχουν τα ίδια γένη στα δείγματα εκροής του σταθμού με αυτά της εκροής της πιλοτικής μονάδας και φτάνουν σε μειώσεις της σχετικής αφθονίας των υπό εξέταση βακτηριακών γενών μέχρι και ~30%.

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν και τα αποτελέσματα που αφορούν τα ολικά προκαρυωτικά βακτήρια για τα δείγματα τα οποία έχουν υποστεί μεταχείριση μαζί με PMA σε σχέση με αυτά τα οποία δεν υποστεί διαχείριση μαζί με PMA. Όπως έχει αναφερθεί και πιο πάνω η διαχείριση των δειγμάτων μαζί με PMA στόχο έχει να διαχωρίσει τα «κατεστραμμένα» με τα άθικτα κύτταρα του DNA στο εκάστοτε δείγματα. Στο Διάγραμμα 3-10 παρουσιάζονται οι διαφορές της σύστασης των βακτηριακών κοινοτήτων (τα 30 πλέον υπεύθυνα γένη για τις παρατηρούμενες διαφορές) μεταξύ δειγμάτων που έλαβαν μεταχείριση PMA (προϊόντα PCR που προέρχονται από άθικτα κύτταρα) έναντι αυτών που δεν έλαβαν (ολικό DNA), για τις 2 συνεχόμενες μέρες δειγματοληψίας στα υπό εξέταση δείγματα.

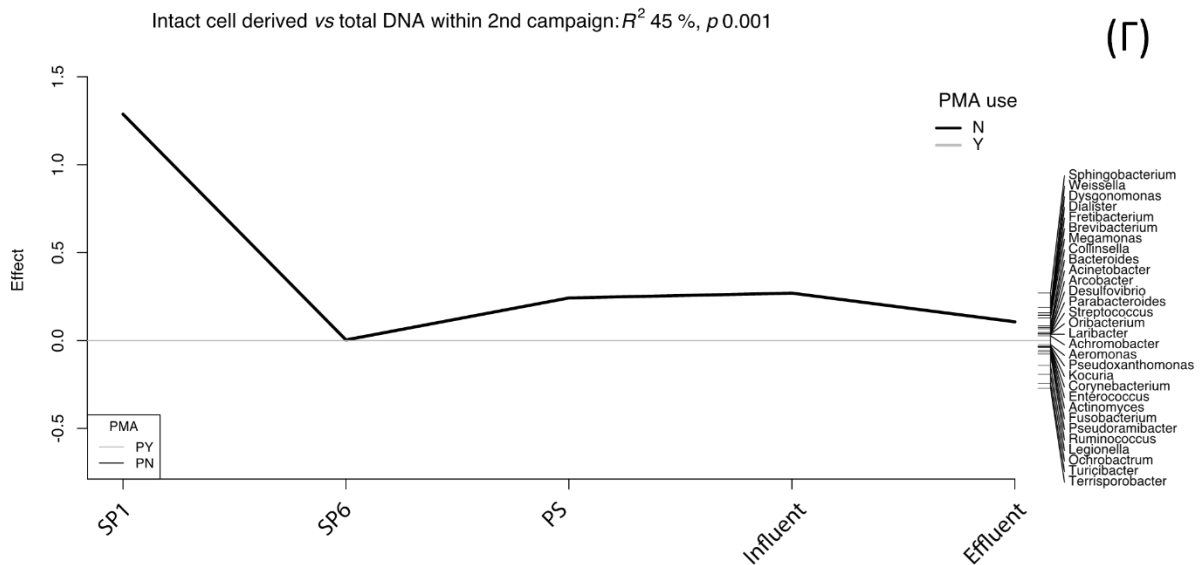
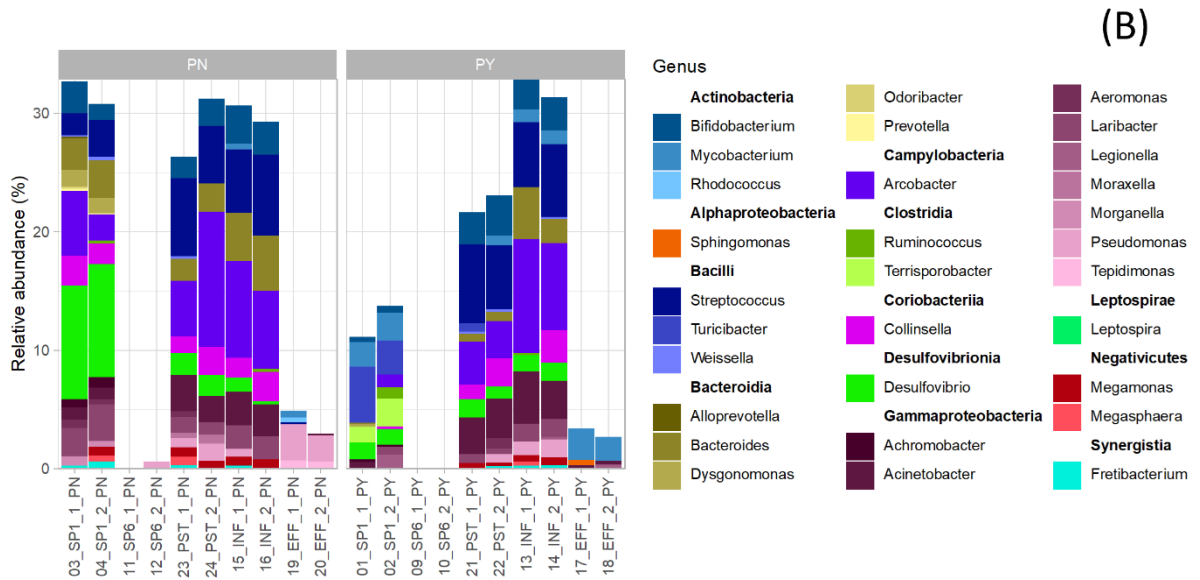
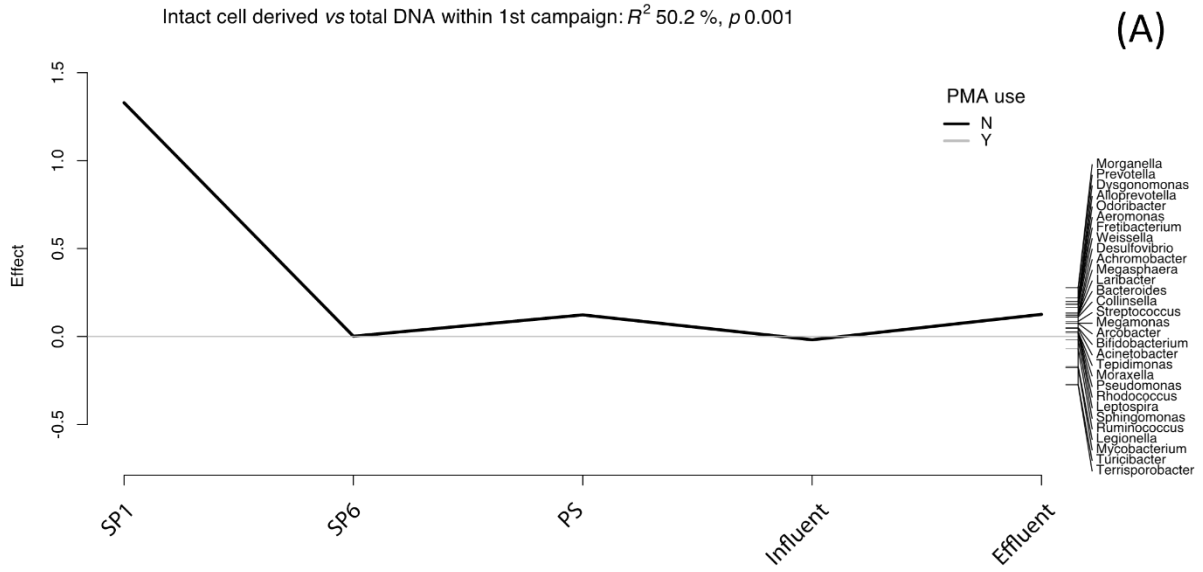
Οι κυρίαρχες καμπύλες απόκρισης (principal response curves - PRC) για τις δύο μέρες δειγματοληψίας δείχνουν παρόμοια προφίλ (Διάγραμμα 3-10 (Γ)). Σχετικά με τις εισροές και εκροές από το ρεύμα ανεπεξέργαστου και επεξεργασμένου αποβλήτου στην πιλοτική μονάδα δεν παρατηρήθηκαν ιδιαίτερες μεταβολές. Διαφορές παρατηρήθηκαν κυρίως στις εκροές μεταξύ των μεταχειρισμένων με PMA (αντιπροσωπευτικών των άθικτων κυττάρων) και των μη μεταχειρισμένων δειγμάτων στις εκροές του σταθμού πλήρους κλίμακας στην Λάρνακα Διάγραμμα 3-10 (B) και (Δ)) πράγμα που μπορεί να αποδοθεί στη διαφορετικότητα των τεχνολογιών που εφαρμόζονται στον τρόπο διαχείρισης των αποβλήτων στον σταθμό επεξεργασία με αποτέλεσμα να διαφοροποιείται και η μικροβιακή σύσταση του αποβλήτου της τελικής εκροής.



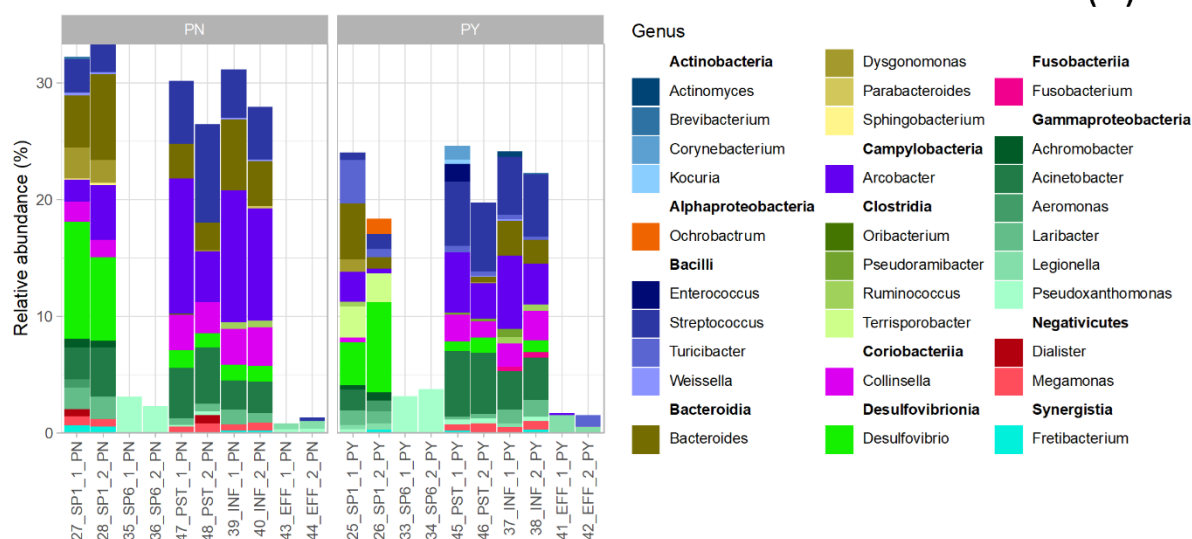


Διάγραμμα 3-10: Διαφορές σύστασης κοινοτήτων μεταξύ δειγμάτων που έλαβαν μεταχείριση PMA (προϊόντα PCR που προέρχονται από άθικτα κύτταρα) έναντι αυτών που δεν έλαβαν (ολικό DNA): ανάλυση PRC ανά σημείο δειγματοληψίας κατά την 1η εκστρατεία δειγματοληψίας για τα 30 πλέον υπεύθυνα γένη για τις παρατηρούμενες διαφορές μαζί με τον συντελεστή προσδιορισμού (R^2) και τις τιμές σημαντικότητας p (A), διαστρωματωμένα ραβδογράμματα των δειγμάτων των 30 γενών με τις πλέον ακραίες τιμές PRC (B), αποτελέσματα της PRC της 2ης εκστρατείας (Γ) και το αντίστοιχο ραβδόγραμμα (Δ)

Η αντίστοιχη ανάλυση μεταξύ των δειγμάτων που έχουν υποστεί διαχείριση με και χωρίς PMA για τις ταξινομικές ομάδες που σχετίζονται με παθογόνους μικροοργανισμούς έδειξε κυρίαρχες διαφορές μεταξύ των δειγμάτων. Στο Διάγραμμα 3-11 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα σχετικά με τη διαφορά στη σύσταση των βακτηριακών κοινοτήτων μεταξύ των δειγμάτων που έλαβαν μεταχείριση PMA (προϊόντα PCR που προέρχονται από άθικτα κύτταρα) έναντι αυτών που δεν έλαβαν (DNA χωρίς PMA) μόνο για την περίπτωση των μικροοργανισμών που σχετίζονται με παθογόνους για τις δύο μέρες δειγματοληψίας. Με βάση τα αποτελέσματα, τα γένη των παθογόνων βακτηρίων που εντοπίζονται και στις δύο μέρες δειγματοληψίας είναι μεταξύ άλλων τα *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Bacilli*, *Clostridia*, *Gamma proteobacteria* και άλλα. Συγκεκριμένα, στο Διάγραμμα 3-11 ((A) και (Γ)) φαίνεται ότι τα δείγματα εισόδου στην πιλοτική μονάδα είναι αυτά τα οποία διαφοροποιούνται σε μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με τα υπόλοιπα βακτήρια πράγμα το οποίο μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι πρόκειται για νοσοκομειακή μονάδα και οι συγκεντρώσεις των παθογόνων βακτηρίων αναμένεται να είναι μεγαλύτερη σε σχέση με τα υπόλοιπα σημεία.



(Δ)

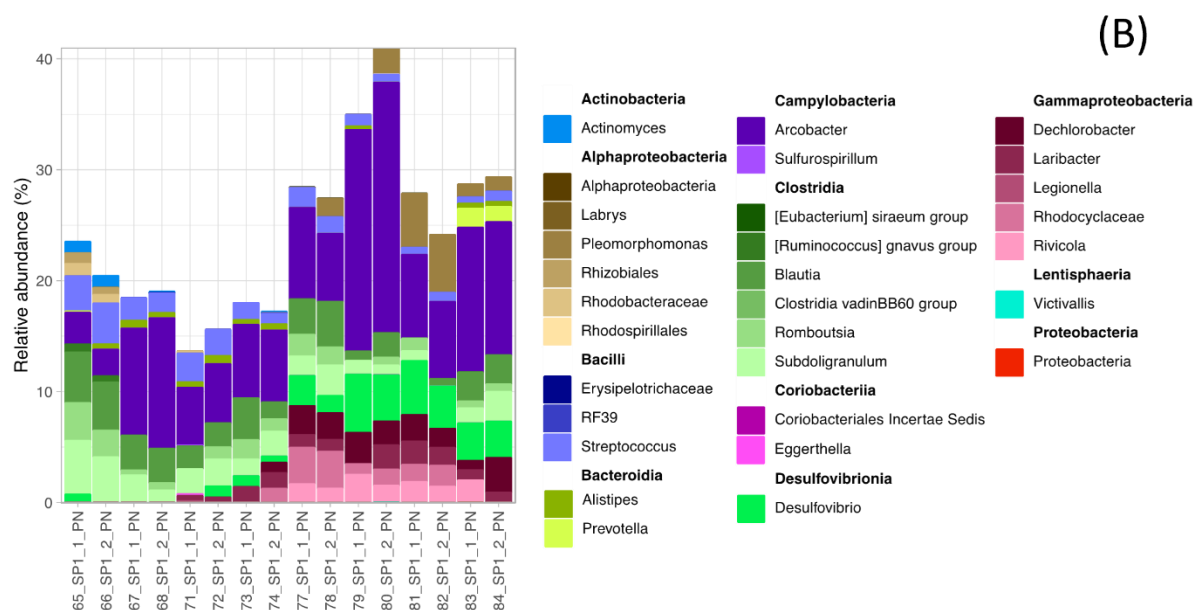
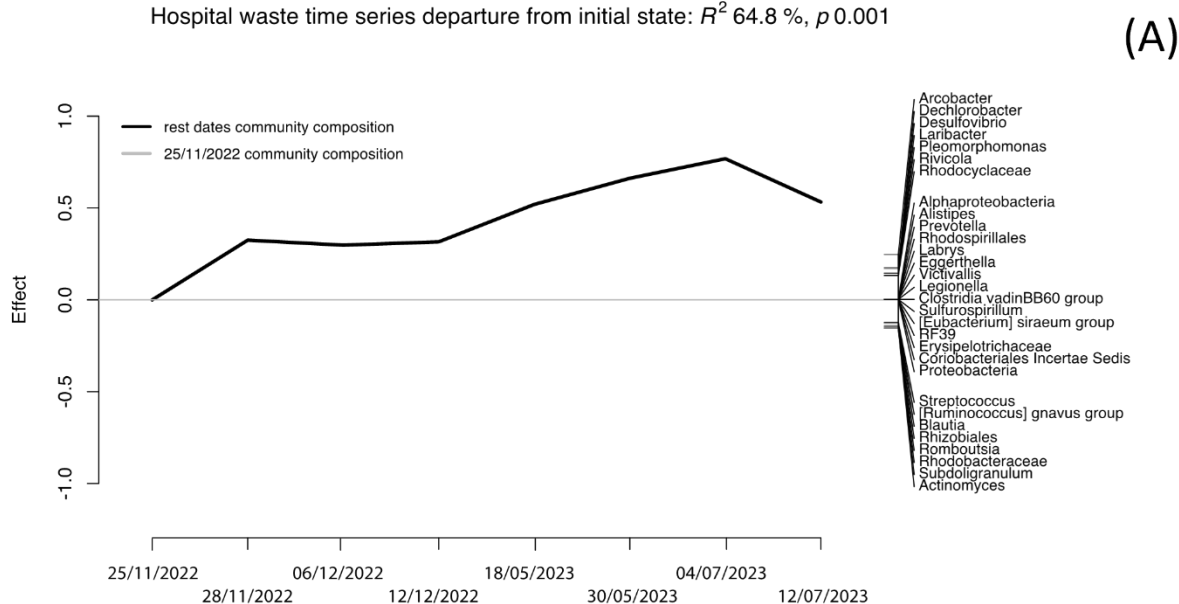


Διάγραμμα 3-11: Διαφορές σύστασης κοινοτήτων μεταξύ δειγμάτων που έλαβαν μεταχείριση PMA (προϊόντα PCR που προέρχονται από άθικτα κύτταρα) έναντι αυτών που δεν έλαβαν (ολικό DNA) μόνο για την περίπτωση των μικροοργανισμών που σχετίζονται με παθογόνους: ανάλυση PRC ανά σημείο δειγματοληψίας κατά την 1^η εκστρατεία δειγματοληψίας για τα 30 πλέον υπεύθυνα γένη για τις παρατηρούμενες διαφορές μαζί με τον συντελεστή προσδιορισμού (R^2) και τις τιμές σημαντικότητας p (A), διαστρωματωμένα ραβδογράμματα των δειγμάτων των 30 γενών με τις πλέον ακραίες τιμές PRC (B), αποτελέσματα της PRC της 2^{ης} εκστρατείας (Γ) και το αντίστοιχο ραβδόγραμμα (Δ)

Τέλος, ενδιαφέρον παρουσιάζουν και οι αναλύσεις σχετικά με τη διαφοροποίηση της μικροβιακής κοινότητας σε σχέση με τον χρόνο στην εκροή των αποβλήτων του Γενικού Νοσοκομείου Λάρνακας. Συγκεκριμένα, 8 δείγματα εκροής του Νοσοκομείου λήφθηκαν στο διάστημα των 9 μηνών λειτουργίας της πιλοτικής μονάδας ώστε να εξεταστεί κατά πόσο μεταβάλλεται η μικροβιακή κοινότητα με το πέρασμα του χρόνου. Τα αποτελέσματα έδειξαν κάποιες διαφοροποιήσεις σε σχέση με την αρχική κατάσταση της εκροής. Συγκεκριμένα στο Διάγραμμα 3-12 παρουσιάζονται οι διαφορές στη σύσταση της μικροβιακής κοινότητας για τα δείγματα εκροής του νοσοκομείου από τον Νοέμβριο του 2022 μέχρι και τον Ιούλιο του 2023. Συγκεκριμένα το Διάγραμμα 3-12 παρουσιάζει τα 30 γένη τα οποία είναι υπεύθυνα για τις διαφορές που παρουσιάζονται στα δείγματα (Διάγραμμα 3-12 (A) και (B)), και τα 30 γένη που σχετίζονται με παθογόνα βακτήρια και είναι υπεύθυνα για τις διαφορές των δειγμάτων (Διάγραμμα 3-12 (Γ) και (Δ)). Οι αλλαγές στη μικροβιακή κοινότητα που παρατηρούνται στα δείγματα εκροών του νοσοκομείου σε σχέση με το πρώτο δείγμα (25/11/2022) (Διάγραμμα 3-12 (A) και (Γ)), οφείλονται κυρίως στην ελάττωση των *Actinomycetes*, *Streptococcus*, *Rhodobacteraceae* και άλλων, ή της αύξησης των *Arcobacter*, *Desulfovibrio*, *Rhodocyclaceae*, *Legionella* και άλλων (Διάγραμμα 3-12 (B) και (Δ)). Οι διακυμάνσεις αυτές και οι διαφοροποιήσεις που παρατηρούνται μέσα στα νοσοκομειακά λύματα μπορούν να

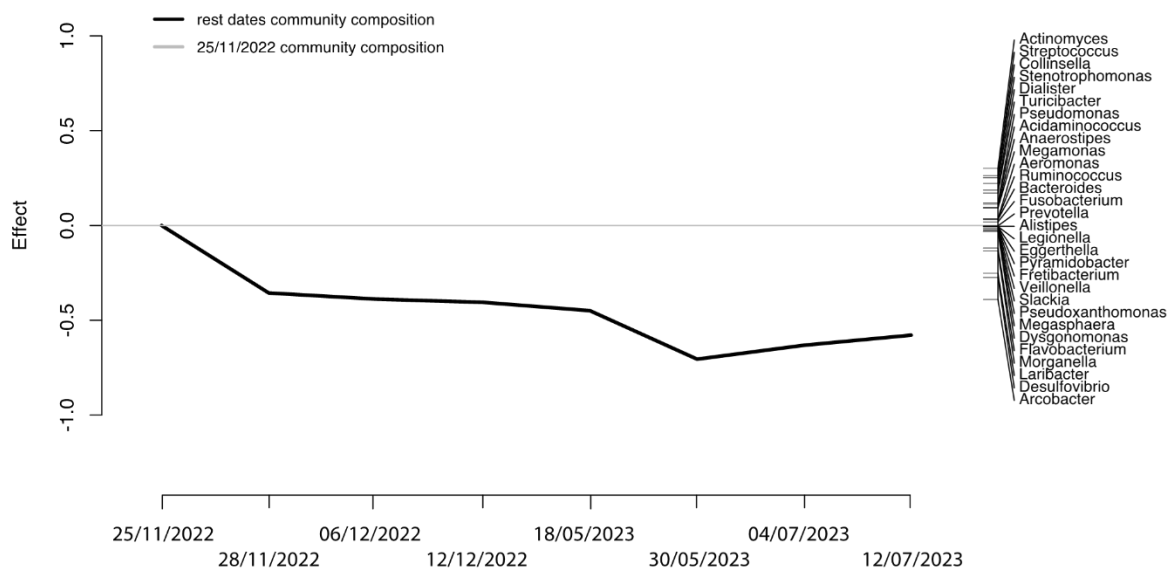
εξηγηθούν με βάση την εποχιακή αλλαγή και με βάση τις ασθένειες τις οποίες παρουσιάζουν οι ασθενείς που νοσηλεύονται στο Νοσοκομείο της Λάρνακας. Για παράδειγμα στο Διάγραμμα 3-12 (Δ) το γένος των *Campylobacteria* αυξάνεται με το πέρασμα του χρόνου. Αυτό είναι κάτι το οποίο αναφέρει και στην μελέτη του ο Friedrich et al., (2016) που ανέφερε ότι παρόμοια εποχικά μοτίβα από λοιμώξεις από *Campylobacter* στους ανθρώπους έχουν εντοπιστεί σε πολλές χώρες με θερμό κλίμα όπως και η Κύπρος. Συγκεκριμένα αναφέρει ότι πέρα από τη δική του μελέτη αλλά και άλλες μελέτες που εξέτασαν τα ποσοστά επίπτωσης εντόπισαν μια σταθερή αιχμή το καλοκαίρι, ενώ ορισμένες χώρες παρουσίασαν επίσης κορύφωση στις αρχές της άνοιξης πράγμα το οποίο παρατηρείται και στην παρούσα περίπτωση.

Hospital waste time series departure from initial state: R^2 64.8 %, p 0.001

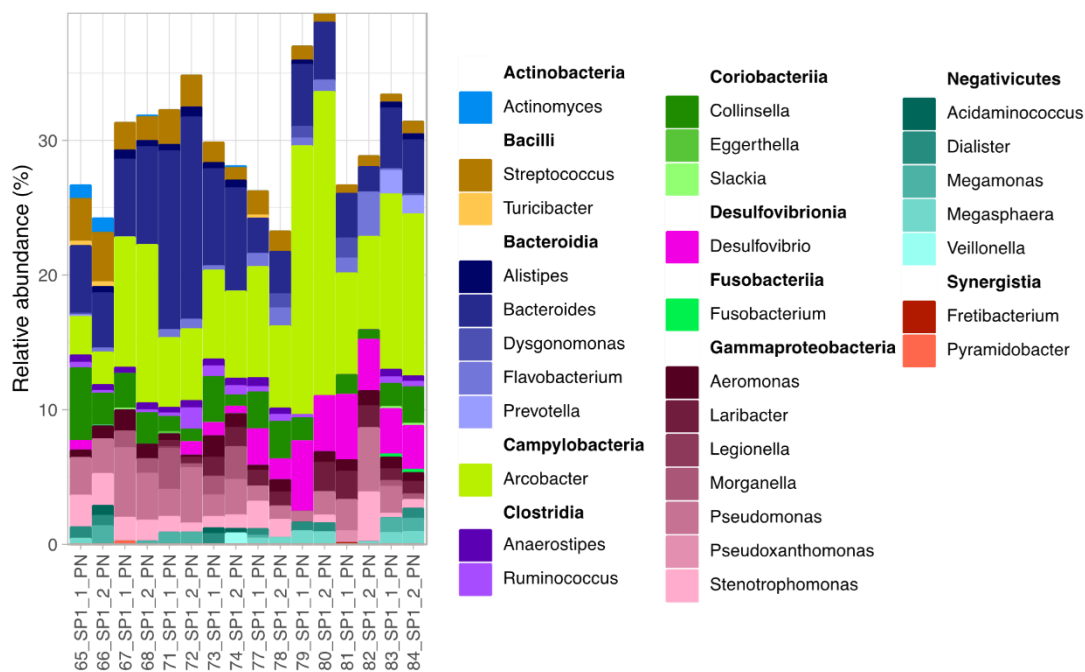


Hospital waste time series departure from initial state: R^2 63.7 %, p 0.001

(Γ)



(Δ)



Διάγραμμα 3-12: Διαφορές σύστασης κοινοτήτων του SP1 μεταξύ της αρχικής ημερομηνίας (25/11/2022) και των υπολοίπων: ανάλυση PRC του συνόλου των προκαρυωτών δείχνοντας τα 30 πλέον υπεύθυνα γένη για τις παρατηρούμενες διαφορές μαζί με τον συντελεστή προσδιορισμού (R^2) και τις τιμές σημαντικότητας p (A), διαστρωματωμένα ραβδογράμματα των δειγμάτων των 30 γενών με τις πλέον ακραίες τιμές PRC (B), αποτελέσματα της PRC για σχετιζόμενα με παθογόνα γένη (Γ) και το αντίστοιχο ραβδόγραμμα (Δ)

4 Συμπεράσματα

Η πιλοτική μονάδα που εγκαταστάθηκε στο Γενικό Νοσοκομείο Λάρνακας αντιμετώπισε τεχνικά προβλήματα κυρίως από περιστατικά φραγής λόγω υψηλής συγκέντρωσης στερεών σωματιδίων στο εισερχόμενο απόβλητο και στερεών που μεταφέρονται και συσσωρεύονται στις επιμέρους τεχνολογίες κατά την επεξεργασία. Τα προβλήματα αυτά προκάλούσαν αποσταθεροποίηση του συστήματος αποτρέποντας τις τεχνολογίες να φτάσουν στις μέγιστες δυνατότητες επεξεργασίας. Παρόλα τα προβλήματα που παρουσιάστηκαν στο διάστημα των 9 μηνών λειτουργίας της πιλοτικής μονάδας, τα αποτελέσματα που προέκυψαν ήταν ενθαρρυντικά δείχνοντας την επιρροή που είχε η μονάδα στην επεξεργασία των νοσοκομειακών υγρών αποβλήτων. Στην περίπτωση των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών, η ύπαρξη των στερεών οδήγησε τελικά στην απόφαση μέτρησης και των διαλυτών συγκεντρώσεων, σε συνδυασμό με τις ολικές συγκεντρώσεις, ώστε να γίνει αντιληπτή η πραγματική συνεισφορά των τεχνολογιών στη μείωση των υπό εξέταση παραμέτρων. Έτσι, λαμβάνοντας υπόψη τις διαλυτές συγκεντρώσεις φαίνεται ότι τα μεγαλύτερα ποσοστά απομάκρυνσης των φυσικοχημικών παραμέτρων επιτυγχάνονταν μετά την αερόβια επεξεργασία (MBBR – ΣΔ5). Συγκεκριμένα τα ποσοστά απομάκρυνσης του συνόλου της πιλοτικής μονάδας συγκρίνοντας τις συγκεντρώσεις των φυσικοχημικών παραμέτρων σε είσοδο και έξοδο της πιλοτικής μονάδας ανέρχονταν στο 57% για το χημικά απαιτούμενο οξυγόνο, στο 2% για τον ολικό φώσφορο, στο 4% για το ολικό άζωτο, στο 51% για το αμμώνιο και στο 80% για τον ολικό διαλυτό οργανικό άνθρακα. Κυριότερη συνεισφορά στις απομακρύνσεις είχε η αερόβια επεξεργασία ενώ η αναερόβια επεξεργασία είχε αρνητική συνεισφορά στα θρεπτικά συστατικά (ολικό άζωτο και ολικό φώσφορο). Η συμπεριφορά της αναερόβιας επεξεργασίας ως προς τα θρεπτικά συστατικά αναγνωρίζεται και από άλλες μελέτες στη βιβλιογραφία και αποτελεί ένα από τα εμπόδια της αυτόνομης εφαρμογής της τονίζοντας την ανάγκη για συνδυασμό της με διεργασίες που στοχεύουν την απομάκρυνση των εν λόγω παραμέτρων.

Στο πείραμα με τα φυτά *Lemna minor* αν και παρατηρήθηκαν απομακρύνσεις (είτε αμελητέες είτε σημαντικές) στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά, με εξαίρεση το χημικά απαιτούμενο οξυγόνο όπου προέκυψε αύξηση, φάνηκε πως δεν οφείλονταν στην παρουσία των φυτών. Πιο συγκεκριμένα, οι απομακρύνσεις στον ολικό φώσφορο θεωρήθηκαν αμελητέες ενώ στο ολικό άζωτο παρατηρήθηκε μείωση κοντά στο 30% ανεξαρτήτως ύπαρξης ή απουσίας των φυτών. Η συνεισφορά των φυτών εντοπίστηκε κυρίως στο αμμώνιο όπου η απομάκρυνση με απουσία φυτών ήταν κοντά στο 15% ενώ στην παρουσία των φυτών η απομάκρυνση έφτανε το 30%. Τέλος, στην περίπτωση του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου οι αυξήσεις στις τιμές των συγκεντρώσεων οφείλονταν κυρίως στην έντονη παραγωγή άλγης η οποία κατά τη φωτοσύνθεση παρήγαγε γλυκόζη (οργανική ένωση) αυξάνοντας το οργανικό φορτίο. Οπότεν

η συνεισφορά των φυτών *Lemna minor* μπορεί να θεωρηθεί αμελητέα στη μείωση των συγκεντρώσεων των φυσικοχημικών παραγόντων.

Μέσω των μικροβιολογικών αναλύσεων παρατηρήθηκαν μειώσεις μεταξύ εισερχόμενου και επεξεργασμένου αποβλήτου στην πιλοτική μονάδα ύψους 2-3 log στην περίπτωση των βακτηρίων και μείωση περί το 1 log για τα γονίδια που εξετάστηκαν. Τόσο η αναερόβια όσο και η αερόβια τεχνολογία έδειξαν σημαντικές συνεισφορές στις απομακρύνσεις μέσω των μικροβιολογικών αναλύσεων. Συγκεκριμένα, τα δεδομένα αναλύθηκαν ως προς την απόλυτη και σχετική αφθονία. Οι τιμές απόλυτης αφθονίας καταδεικνύουν ότι οι μεγαλύτερες μειώσεις των υπό εξέταση παραγόντων πραγματοποιήθηκαν στην αναερόβια επεξεργασία λόγω της μεμβράνης υπερδιήθησης η οποία κατακρατεί μέρος του βακτηριακού φορτίου ενώ οι τιμές της σχετικής αφθονίας δείχνουν ότι η αερόβια επεξεργασία οδήγησε σε σημαντική μείωση του λόγου συγκέντρωσης γονιδίων ως προς τη συγκέντρωση του γονιδίου *16S rRNA*. Το στάδιο απολύμανσης είχε χαμηλότερη συνεισφορά στην απομάκρυνση των εξεταζόμενων παραμέτρων, τόσο στην απόλυτη όσο και στη σχετική αφθονία, λόγω ύπαρξης στερεών στο υγρό απόβλητο, τα οποία προκαλούν σκεδασμό της υπεριώδους ακτινοβολίας αποτρέποντας την επαφή της με τους παθογόνους μικροοργανισμούς και άρα την απενεργοποίησή τους καθώς επίσης και λόγω πιθανών φαινομένων *shielding*. Το γεγονός αυτό δεν επέτρεψε στη διεργασία να επιτύχει υψηλές απομακρύνσεις.

Στην ανάλυση αλληλούχησης και ανάλυσης μέσω βιοπληροφορικής χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 3101837 αλληλουχίες υψηλής ποιότητας από τα αρχικά 7489011 ζεύγη ανάγνωσης, με μέσο όρο ανά δείγμα 36927 και αυτά αντιστοιχούν στο 41,4 % των αρχικών ζευγών ανάγνωσης. Το πρώτο επίπεδο ανάλυσης που πραγματοποιήθηκε ήταν ως προς την α-ποικιλότητα. Συγκεκριμένα, υπολογίστηκαν δείκτες α-ποικιλότητας που ήταν αντιπροσωπευτικοί διαφορετικών επιπέδων κυριαρχίας των αναλυόμενων δεικτών: i) παρατηρούμενος πλούτος *Observed Richness* (αντιπροσωπευτικός όλων των ταξινομικών ομάδων), *Shannon* (αντιπροσωπευτικός των χαμηλής σχετικής αφθονίας), *Inverse-Simpson* (αντιπροσωπευτικός των σχετικά κυρίαρχων), και *Fisher's α* (αντιπροσωπευτικός των άκρως κυρίαρχων). Τα διαφορετικά επίπεδα ανάλυσης έδωσαν διαφορετικά μοτίβα συμπεριφοράς της μικροβιολογικής κοινότητας και συγκεκριμένα έδειξαν ότι ο δείκτης του *observed richness* παρουσιάζει σημαντικές διαφορές (ειδικότερα τα δείγματα που δεν έτυχαν επεξεργασία με PMA) μεταξύ των δειγμάτων εισόδου και εξόδου της πιλοτικής μονάδας και για τις τρεις μέρες δειγματοληψίας λόγω των σταδίων επεξεργασίας. Οι δείκτες *Fisher's α* και *observed richness* έδειξαν τη διαφοροποίηση της νοσοκομειακής εκροής με το πέρασμα του χρόνου κάτι που αναμενόταν λαμβάνοντας υπόψη ότι οι βακτηριακές λοιμώξεις διαφοροποιούνται χρονικά. Στο ίδιο επίπεδο αναλύθηκαν τα δείγματα που επεξεργάστηκαν με το PMA και δεν παρουσίασαν καμία διαφοροποίηση οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι το ενεργό κομμάτι της μικροβιακής

κοινότητας των δειγμάτων παραμένει σταθερό με το πέρασμα του χρόνου. Τα δείγματα αναλύθηκαν και ως προς β-ποικιλότητα και τη διαφορική αφθονία της μικροβιακής κοινότητας των υπό εξέταση δειγμάτων. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε ανάλυση β-ποικιλότητας της βακτηριακής κοινότητας ως προς τα βακτήρια σε επίπεδο γένους, όπως επίσης και τα γένη που περιλάμβαναν καθιερωμένα (≥ 3 αναφερόμενες περιπτώσεις) και υποτιθέμενα παθογόνα (< 3 αναφερόμενες περιπτώσεις). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η σύσταση της μικροβιακής κοινότητας διατηρεί μια συνέπεια μεταξύ των σημείων δειγματοληψίας στις διάφορες μέρες δειγματοληψίας, ενώ διαφοροποιήσεις παρατηρήθηκαν μεταξύ των διαφορετικών σημείων δειγματοληψίας. Αυτή η διαφοροποίηση ήταν αναμενόμενη λόγω του ότι οι τεχνολογίες που εφαρμόζονται στα διάφορα στάδια επεξεργασίας της πιλοτικής μονάδας περιλαμβάνουν αερόβιες και αναερόβιες διεργασίες που στηρίζονται στα διαφορετικά χαρακτηριστικά της μικροβιακής κοινότητας, πράγμα το οποίο αποτυπώνεται και στα υπό εξέταση δείγματα. Επιπλέον, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δείγματα από την εκροή της πιλοτικής μονάδας είχαν πολλές ομοιότητες με τη βακτηριακή κοινότητα των δειγμάτων εκροής του σταθμού επεξεργασίας μεγάλης κλίμακας στην πόλη της Λάρνακας. Αυτά τα αποτελέσματα επισημάνουν την αποτελεσματικότητα των σταδίων επεξεργασίας που εφαρμόζονται στην πιλοτική μονάδα δίνοντας αποτελέσματα πανομοιότυπα με αυτά των τεχνολογιών που εφαρμόζονται στο κεντρικό σταθμό επεξεργασίας στη Λάρνακα. Η σχετική αφθονία των βακτηρίων που προέκυψε για τις συνολικές μικροβιακές κοινότητες των δειγμάτων, αναλύθηκε εκ νέου ως προς τα δυνητικά παθογόνα βακτήρια. Τα δείγματα εξόδου της πιλοτικής μονάδας και εξόδου του κεντρικού σταθμού επεξεργασίας παρουσίασαν ομοιότητες ως προς τα γένη βακτηρίων που είχαν στη σύστασή τους, ενώ σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν στα δείγματα εισόδου. Συγκεκριμένα, οι επιμέρους τεχνολογίες της πιλοτικής μονάδας μειώνουν κατά περισσότερο από 30% τη σχετική αφθονία διαφόρων παθογόνων βακτηρίων δείχνοντας την αποτελεσματικότητά της, ως προς τη μείωση της σχετικής αφθονίας των παθογόνων μικροοργανισμών από τα νοσοκομειακά υγρά απόβλητα. Επιπλέον, έγινε σύγκριση μεταξύ δειγμάτων που επεξεργάστηκαν με PMA με αυτά που δεν έτυχαν επεξεργασίας PMA. Τα αποτελέσματα αυτής της σύγκρισης δείχνουν τη διαφορετική επίδραση των τεχνολογιών που εφαρμόζονται στον τρόπο διαχείρισης των υγρών αποβλήτων στον κεντρικό σταθμό επεξεργασίας με αποτέλεσμα να διαφοροποιείται και η μικροβιακή σύσταση του αποβλήτου της τελικής εκροής. Η αντίστοιχη ανάλυση για τις ταξινομικές ομάδες που σχετίζονται με παθογόνους μικροοργανισμούς έδειξε κυρίαρχες διαφορές μεταξύ των δειγμάτων. Με βάση τα αποτελέσματα, τα γένη των παθογόνων βακτηρίων που εντοπίζονται και στις δύο μέρες δειγματοληψίας είναι μεταξύ άλλων τα *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Bacilli*, *Clostridia*, *Gamma proteobacteria* και άλλα. Τα δείγματα εισόδου στην πιλοτική μονάδα είναι αυτά τα οποία διαφοροποιούνται σε μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με τα υπόλοιπα βακτήρια γεγονός το οποίο μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι πρόκειται για νοσοκομειακή μονάδα και οι

συγκεντρώσεις των παθογόνων βακτηρίων αναμένεται να είναι μεγαλύτερες σε σχέση με τα υπόλοιπα σημεία. Τέλος, η εποχική διαφοροποίηση στη μικροβιακή κοινότητα που παρατηρήθηκε σε δείγματα από την εκροή του Γενικού Νοσοκομείου Λάρνακας σε σχέση με το πρώτο δείγμα στις 25/11/2022 ήταν ανάλογη και με άλλες μελέτες στη διεθνή βιβλιογραφία. Οι αλλαγές που προέκυψαν στη μικροβιακή κοινότητα οφείλονταν κυρίως στην ελάττωση των *Actinomycetes*, *Streptococcus*, *Rhodobacteraceae* και άλλων, ή στην αύξηση των *Arcobacter*, *Desulfovibrio*, *Rhodocyclaceae*, *Legionella* και άλλων. Οι παρατηρήσεις αυτές είναι αναμενόμενες όταν ληφθούν υπόψη οι εποχικές διακυμάνσεις στις ασθένειες που παρουσιάζουν οι ασθενείς που νοσηλεύονται στο Γενικό Νοσοκομείο Λάρνακας. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκαν κορυφώσεις ασθενειών κατά τους καλοκαιρινούς μήνες και στις αρχές της άνοιξης.

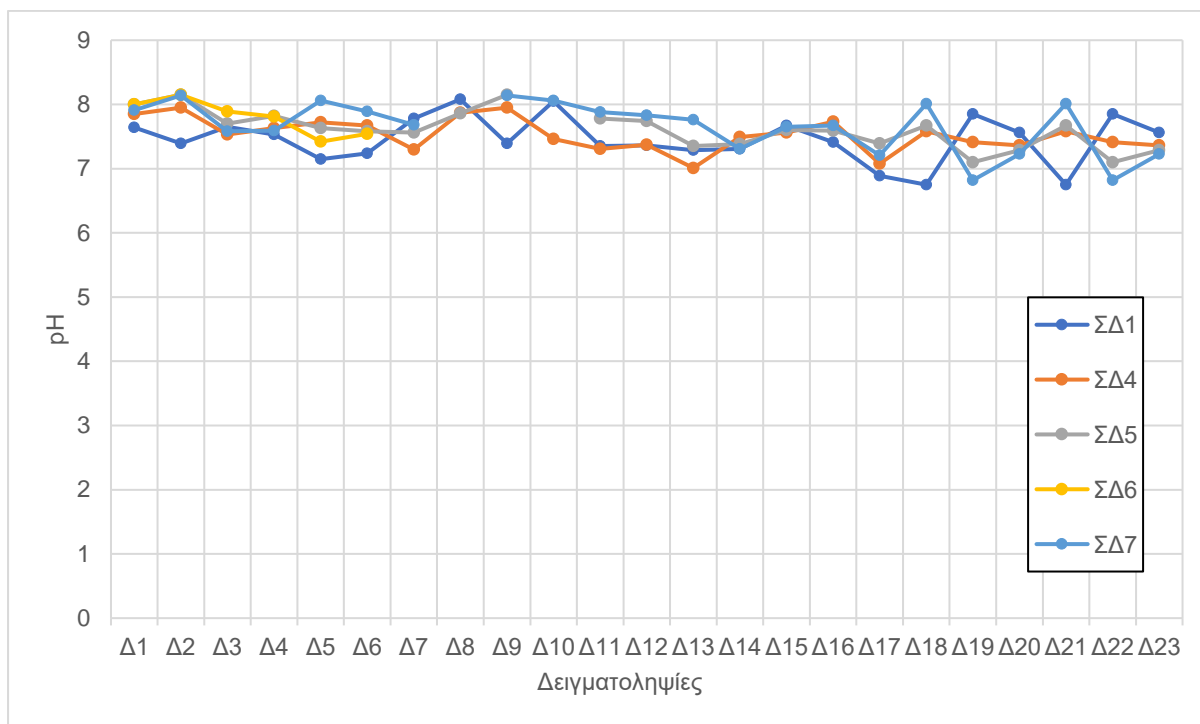
Οι αναλύσεις που διεξήχθησαν για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των φαρμακευτικών ενώσεων στις επιμέρους τεχνολογίες της πιλοτικής μονάδας έγιναν με τη χρήση οργάνων υγρής χρωματογραφίας-φασματομετρία μάζας UPLC-MS/MS και LC/ESI-QTOF-MS με δυνατότητα προσδιορισμού 90 φαρμακευτικών ουσιών και 2350 μικρορύπων, αντίστοιχα. Στη περίπτωση του UPLC-MS/MS, ποσοτικοποιήθηκαν 33 από τις 90 ουσίες στα 4 σημεία δειγματοληψίας της πιλοτικής μονάδας (ΣΔ1, ΣΔ4, ΣΔ5 και ΣΔ7) με τις πλείστες από αυτές να είναι αντιβιοτικές ενώσεις. Συγκεκριμένα, οι ουσίες ciprofloxacin (αντιβιοτικό), paracetamol (αναλγητικό) και η caffeine (διεγερτικό) είχαν τις τρεις πιο ψηλές συγκεντρώσεις των υπό εξέταση ενώσεων στην είσοδο της μονάδας επεξεργασίας. Με βάση τις συγκεντρώσεις που ποσοτικοποιήθηκαν στην εκροή της πιλοτικής μονάδας για τις τρεις αυτές ενώσεις η συνολική απομάκρυνση ανήλθε στο 38, 100, ~100% για την ciprofloxacin (αντιβιοτικό), paracetamol (αναλγητικό) και η caffeine (διεγερτικό), αντίστοιχα. Αναλυτικά, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στη συγκέντρωση δεκατεσσάρων ουσιών ενώ σε άλλες έντεκα παρατηρήθηκε μείωση <50%. Η μέθοδος στο όργανο LC/ESI-QTOF-MS επέτρεψε την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση 116 εκ των 2350 μικρορύπων στις επιμέρους τεχνολογίες της πιλοτικής μονάδας οι οποίοι χωρίστηκαν σε 8 κύριες κατηγορίες φαρμακευτικές ουσίες και μεταβολίτες τους (Pharmaceuticals & TPs), βιομηχανικά χημικά (Industrial Chemicals), γλυκαντικές ουσίες (Sweeteners), φυτοφάρμακα και προϊόντα μετασχηματισμού τους (Plant Protection Products & TPs), παράνομες ουσίες, μεταβολίτες και προϊόντα μετασχηματισμού τους (Illicit Drugs & TPs), ρύποι σχετικοί με τον καπνό (Tobacco Related CECs), προϊόντα προσωπικής φροντίδας και προϊόντα μετασχηματισμού τους (Personal Care Products & TPs) και ρύποι σχετικοί με το καφέ (Coffee related CECs). Οι πλείστοι ανιχνεύσιμοι μικρορύποι συμπεριλαμβάνονταν στην κατηγορία των φαρμακευτικών ουσιών, των μεταβολιτών τους αλλά και των προϊόντων μετασχηματισμού τους. Η πιλοτική μονάδα ως σύνολο πέτυχε την απομάκρυνση 49 ουσιών εκ των οποίων οι 37 είχαν ποσοστό απομάκρυνσης 50-100% ενώ

για άλλες 12 το ποσοστό απομάκρυνσης κυμαίνεται από 1,7 έως 45,7%. Ως αξιοσημείωτα παραδείγματα, οι αντιβιοτικές ενώσεις clindamycin, linezolid οι οποίες συγκαταλέγονται στις χορηγημένες ενώσεις του Γενικού Νοσοκομείου Λάρνακας και είχαν ολικές απομακρύνσεις με ποσοστά 87,8% και 73,4%, αντίστοιχα.

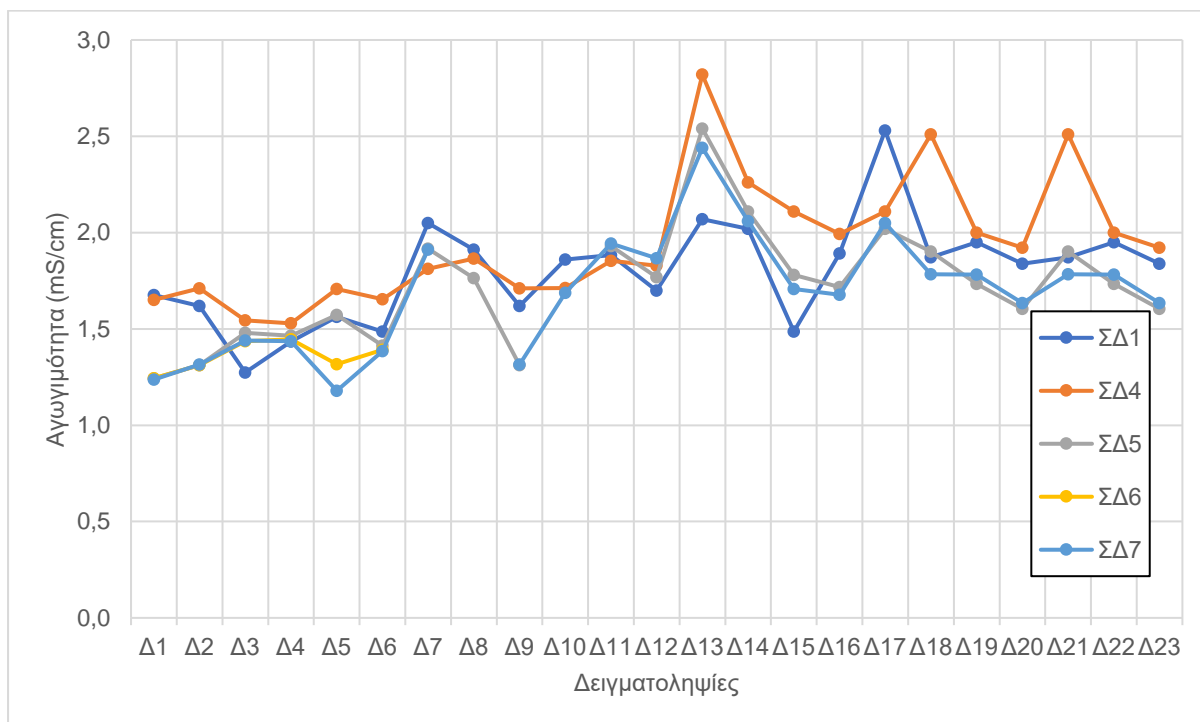
Σε κάποιες ουσίες, ανεξαρτήτως μεθόδου ποσοτικοποίησης, παρατηρήθηκε αύξηση στη συγκέντρωσή τους μεταξύ των σημείων ΣΔ1 και ΣΔ7 ενώ για άλλες οι συγκεντρώσεις τους ήταν μη ανιχνεύσιμες (χαμηλότερες από το όριο ανίχνευσης ή ποσοτικοποίησης) στο ΣΔ1 ενώ ανιχνεύτηκαν σε μεταγενέστερα στάδια επεξεργασίας. Οι παρατηρήσεις αυτές, εξηγούνται όταν ληφθεί υπόψη το γεγονός ότι η απομάκρυνση των φαρμακευτικών ενώσεων από τα επεξεργασμένα υγρά απόβλητα επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό τόσο από τις φυσικοχημικές παραμέτρους και ιδιότητες της κάθε ουσίας όσο και από τα στάδια επεξεργασίας τα οποία λειτουργούν με βάση διάφορους μηχανισμούς που καθιστούν δυνατή την αποικοδόμηση /απομάκρυνση των διαφόρων φαρμακευτικών ουσιών. Επιπλέον, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία η διάσπαση γλυκουρονιδίων φαρμακευτικών ενώσεων κατά την επεξεργασία των υγρών αποβλήτων οδηγεί στην τελική ανίχνευση τους παρόλο που δεν εντοπίζονται στο σημείο εισόδου ΣΔ1. Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα των φαρμακευτικών ουσιών και μικρορύπων με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας έδειξαν ότι η πιλοτική μονάδα είναι ικανή να απομακρύνει σε σημαντικό ποσοστό τις πλείστες φαρμακευτικές ουσίες και μικρορύπους που ελέγχθηκαν ενώ η τεχνολογία με τη σημαντικότερη συνεισφορά στη μείωση των συγκεντρώσεών τους ήταν η αερόβια επεξεργασία (ΣΔ5).

Εν κατακλείδι, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η πιλοτική μονάδα ως σύνολο έχει την ικανότητα να απομακρύνει ή να μειώνει τις εξεταζόμενες παραμέτρους. Συγκεκριμένα οι παράμετροι αφορούσαν τις αναλύσεις των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών, των μικροβιολογικών παραμέτρων και των ρύπων αναδυόμενου ενδιαφέροντος που περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων φαρμακευτικές ενώσεις, αποδεικνύοντας έτσι την αναγκαιότητα της επεξεργασίας των νοσοκομειακών υγρών αποβλήτων για μείωση του ρυπογόνου φορτίου στα κεντρικά συστήματα επεξεργασίας αστικών λυμάτων. Το γεγονός αυτό αποτελεί έναν από τους βασικούς στόχους του προγράμματος T4H που ήταν η κατάδειξη της συνεισφοράς των νοσοκομειακών μονάδων στο ρυπογόνο φορτίο των κεντρικών συστημάτων αλλά και η αποτελεσματική επιτόπια επεξεργασία των νοσοκομειακών υγρών αποβλήτων.

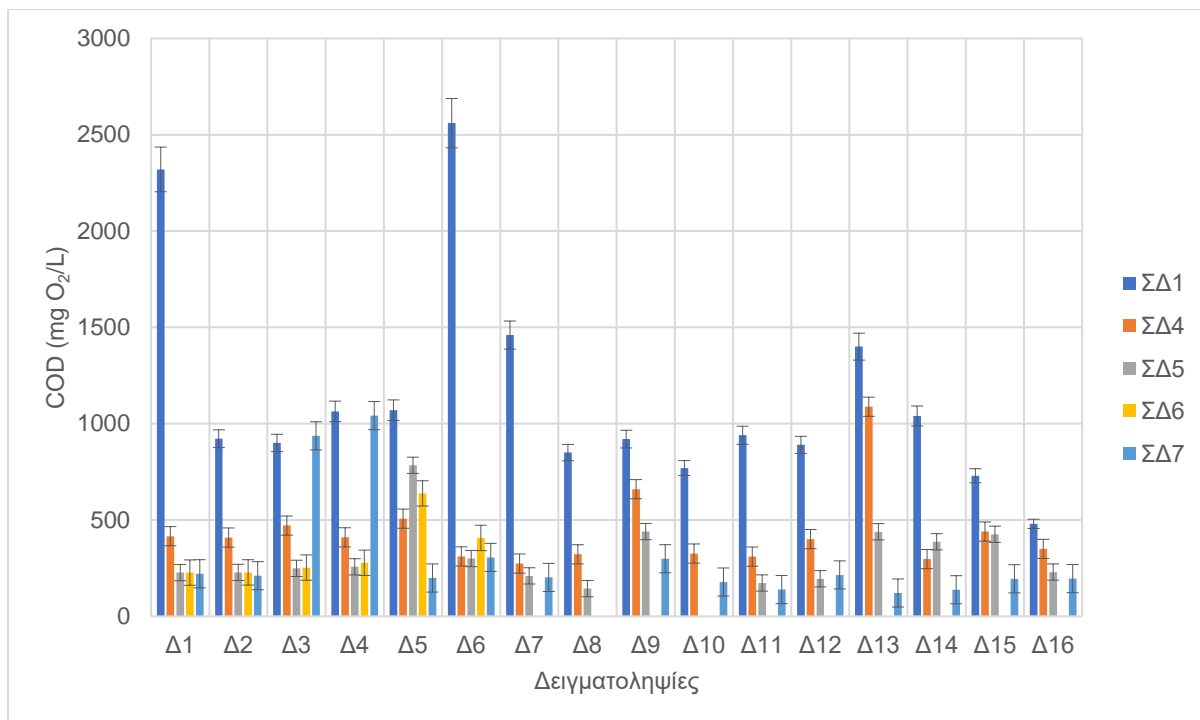
5.2 Παράρτημα Β



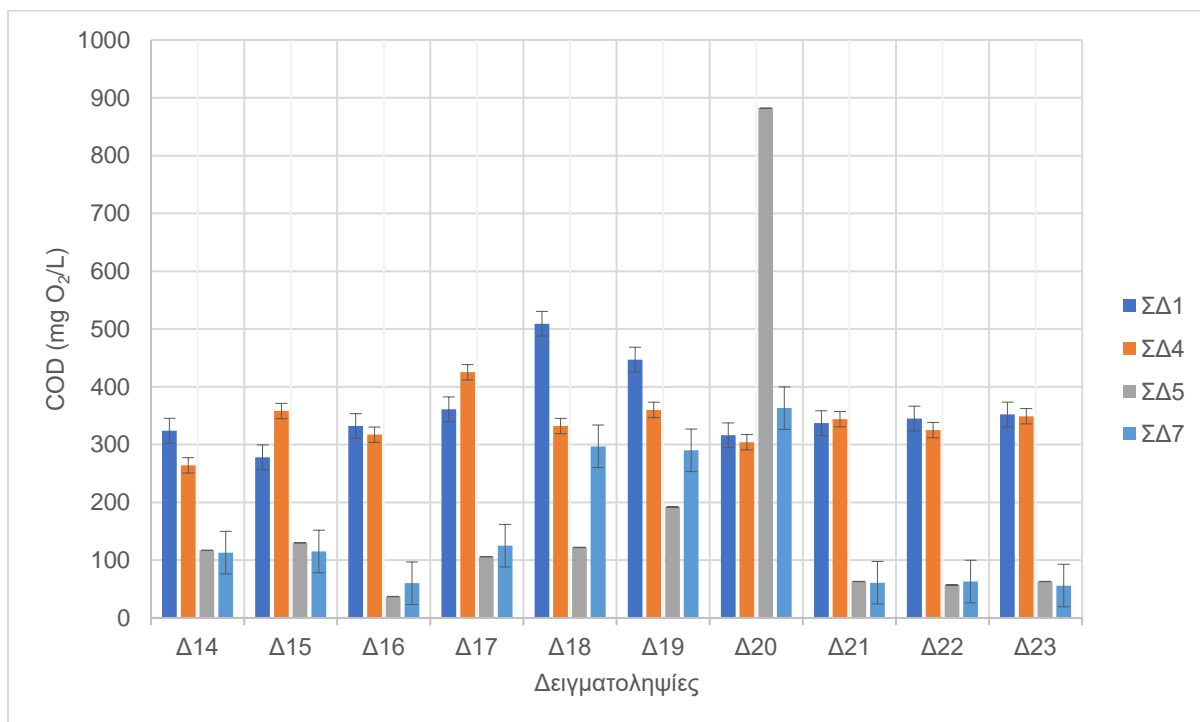
Διάγραμμα 5-2: Διακύμανση ενεργής οξύτητας ανά δειγματοληψία ανά επιμέρους τεχνολογίας της πιλοτικής μονάδας



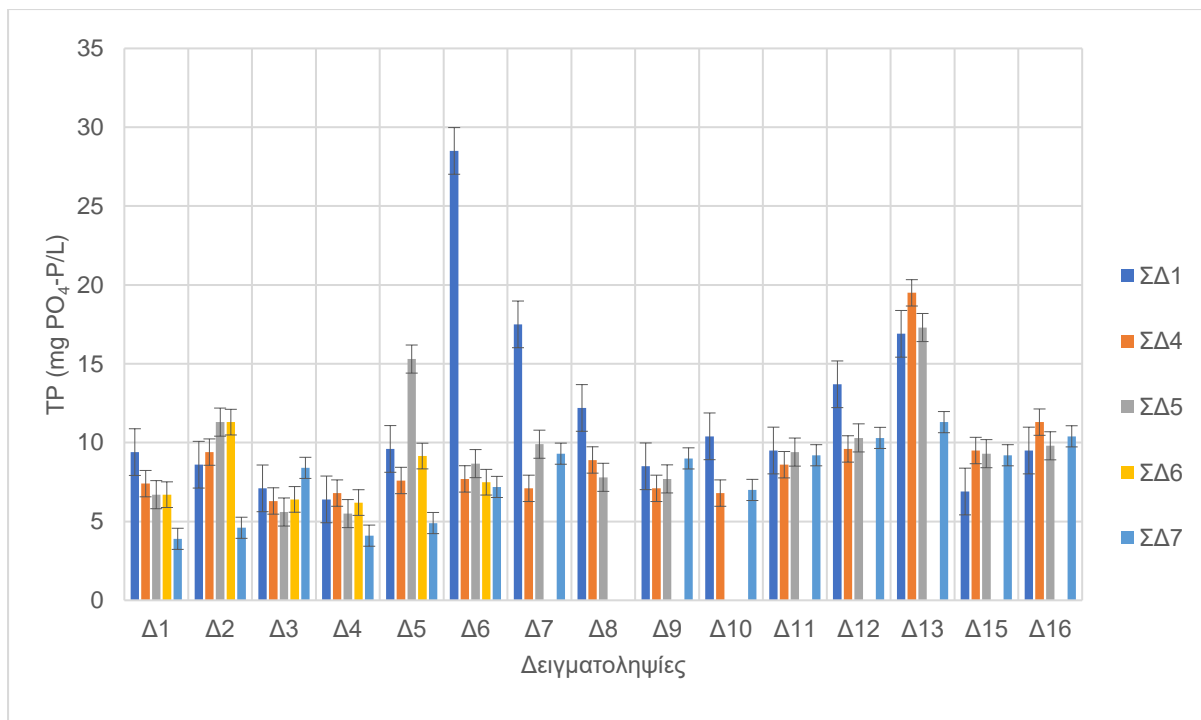
Διάγραμμα 5-3: Διακύμανση αγωγιμότητας ανά δειγματοληψία ανά επιμέρους τεχνολογίας της πιλοτικής μονάδας



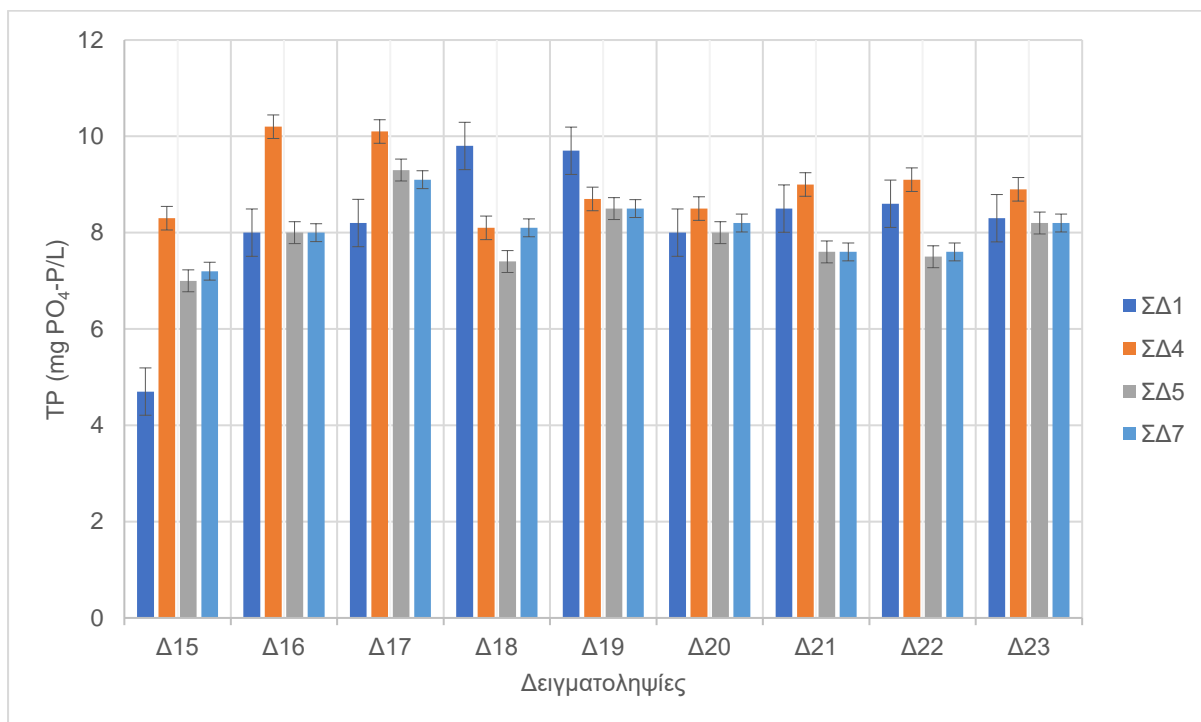
Διάγραμμα 5-4: Διακύμανση τιμών ολικών συγκεντρώσεων του Χημικά Απαιτούμενου Οξυγόνου στις επιμέρους τεχνολογίες ανά δειγματοληψία



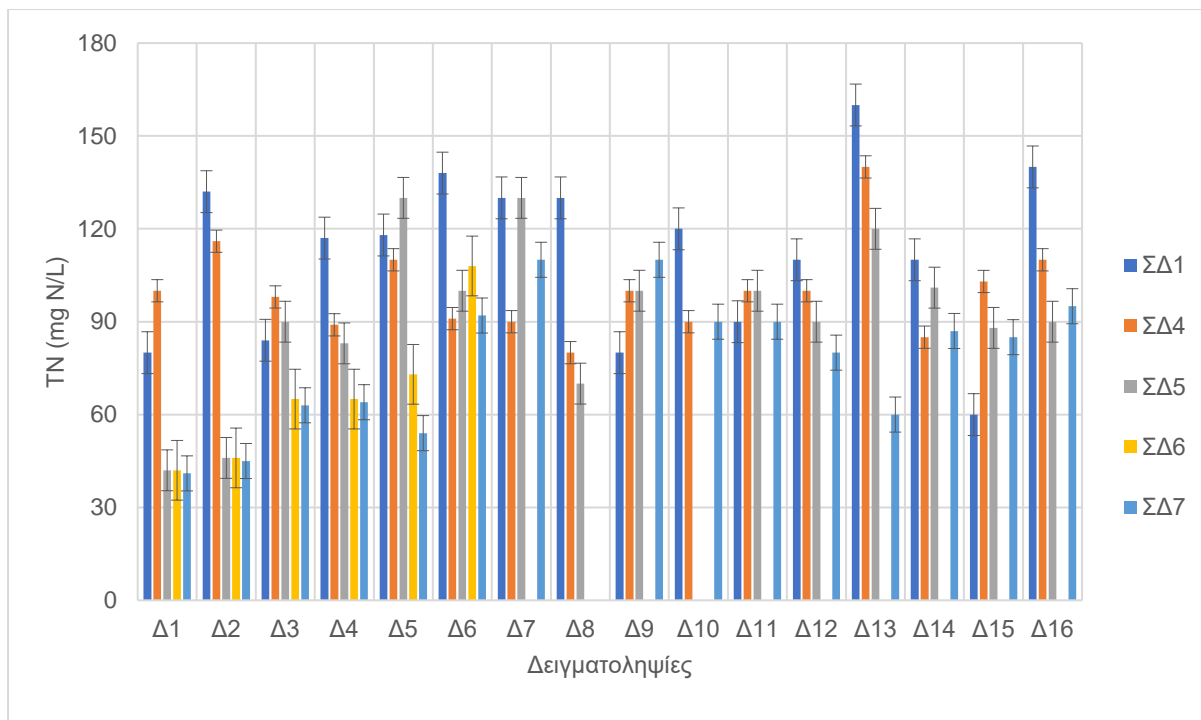
Διάγραμμα 5-5: Διακύμανση τιμών διαλυτών συγκεντρώσεων του Χημικά Απαιτούμενου Οξυγόνου στις επιμέρους τεχνολογίες ανά δειγματοληψία



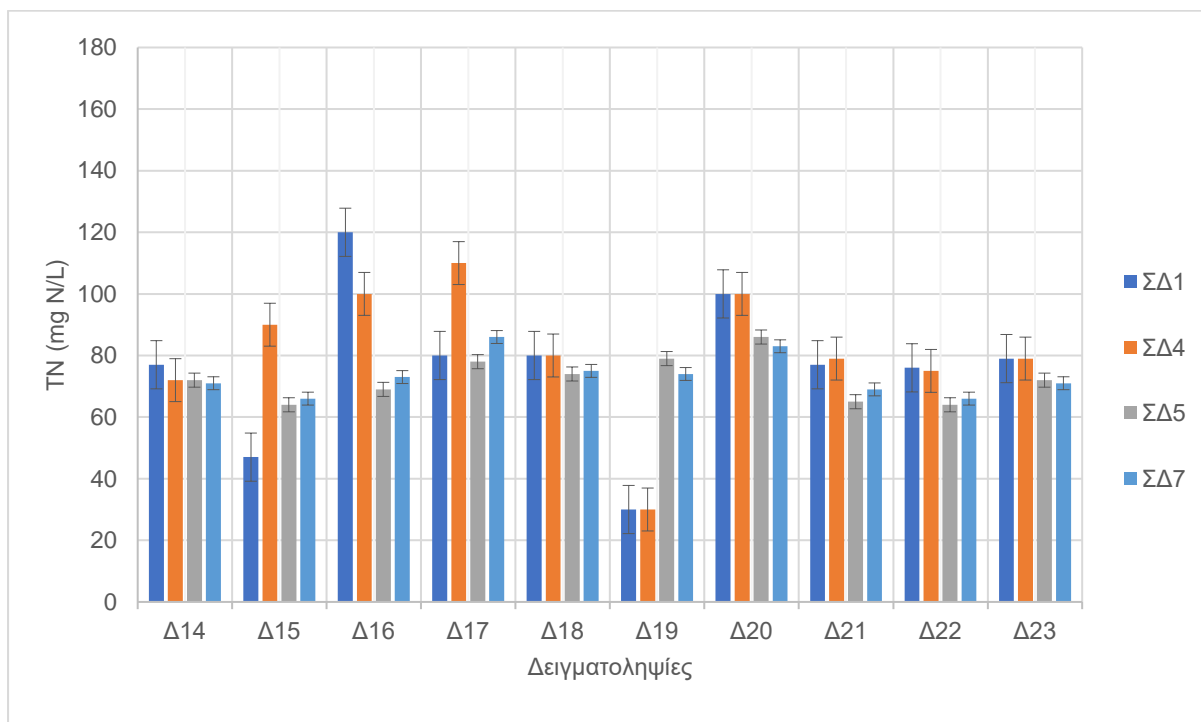
Διάγραμμα 5-6: Διακύμανση τιμών ολικών συγκεντρώσεων του Ολικού Φωσφόρου στις επιμέρους τεχνολογίες ανά δειγματοληψία



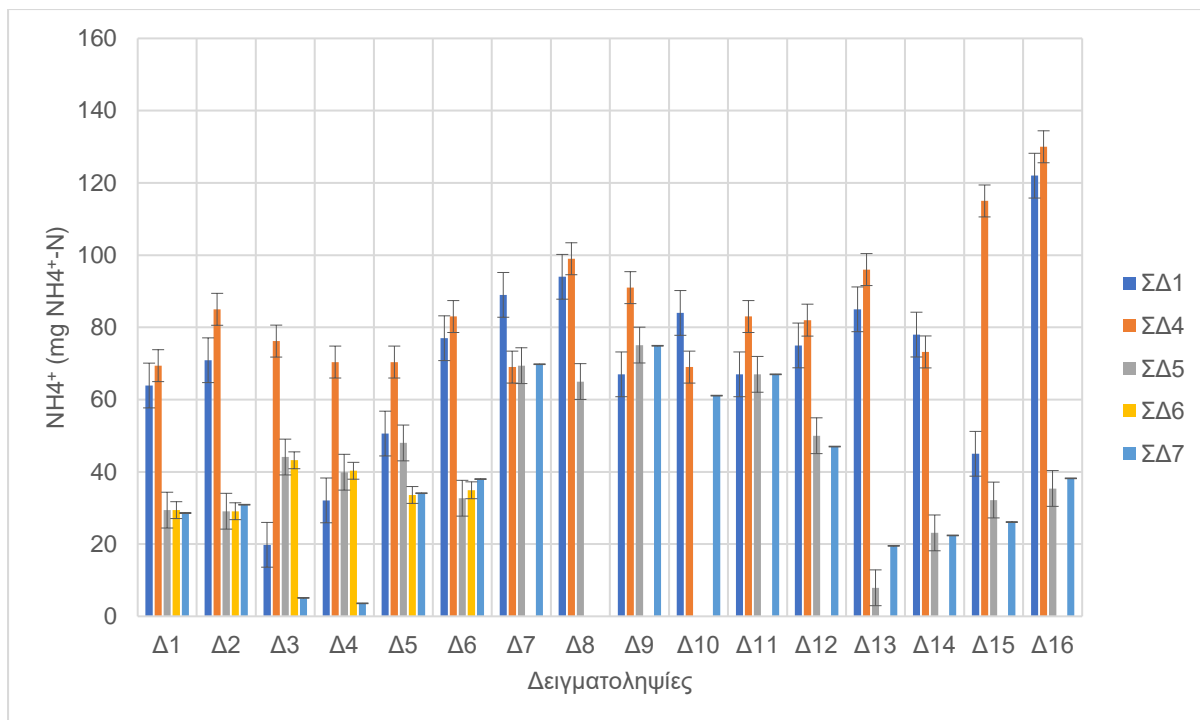
Διάγραμμα 5-7: Διακύμανση τιμών διαλυτών συγκεντρώσεων του Ολικού Φωσφόρου στις επιμέρους τεχνολογίες ανά δειγματοληψία



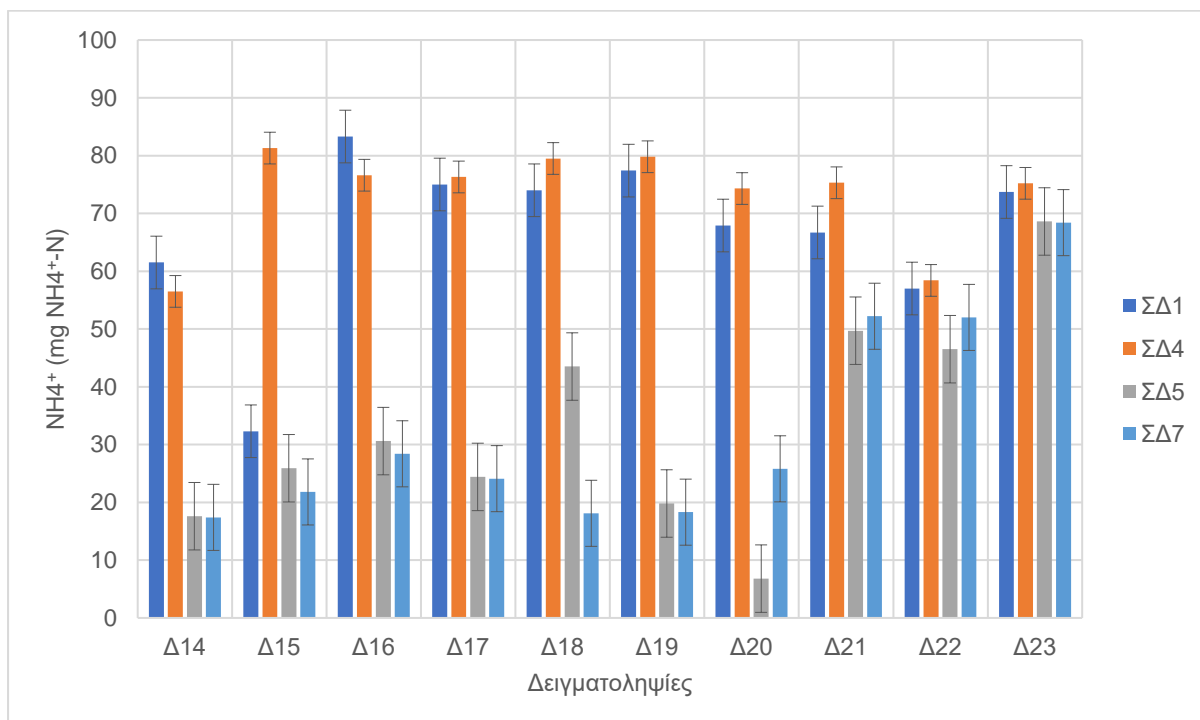
Διάγραμμα 5-8: Διακύμανση τιμών ολικών συγκεντρώσεων του Ολικού Αζώτου στις επιμέρους τεχνολογίες ανά δειγματοληψία



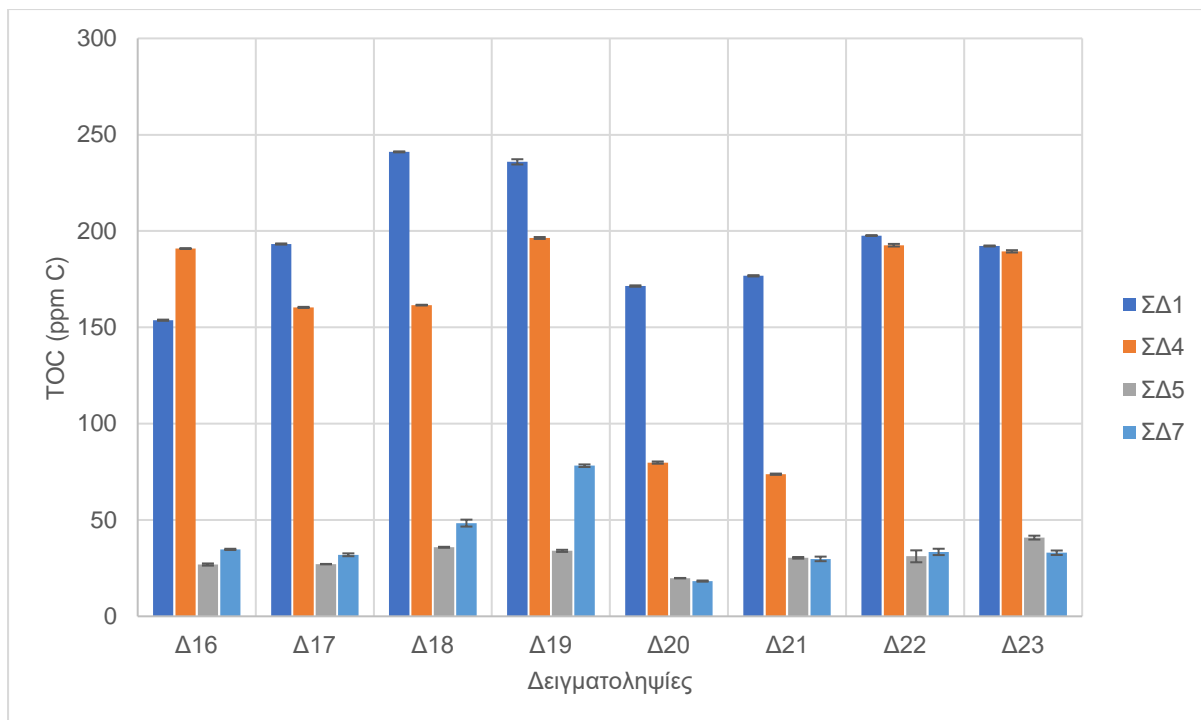
Διάγραμμα 5-9: Διακύμανση τιμών διαλυτών συγκεντρώσεων του Ολικού Αζώτου στις επιμέρους τεχνολογίες ανά δειγματοληψία



Διάγραμμα 5-10: Διακύμανση τιμών ολικών συγκεντρώσεων του Αμμωνίου στις επιμέρους τεχνολογίες ανά δειγματοληψία



Διάγραμμα 5-11: Διακύμανση τιμών διαλυτών συγκεντρώσεων του Αμμωνίου στις επιμέρους τεχνολογίες ανά δειγματοληψία



Διάγραμμα 5-12: Διακύμανση των συγκεντρώσεων του Ολικού Οργανικού Άνθρακα στις επιμέρους τεχνολογίες ανά δειγματοληψία

5.3 Παράρτημα Γ

Πίνακας 5-1: Δεδομένα ανάγνωσης αλληλουχιών που πέρασαν το στάδιο ελέγχου ποιότητας ανάγνωσης και προπεξεργασίας,

Seq, center ID	original sampleID 1	final sampleID	input	filtered	denoised F	denoised R	merged	nonchim	Euk, unchar	no Chloroplast	no Mitochondria
23187D-01-01	1_SP1_1_PMA	01_SP1_1_PY	89,781	82,169	79,107	79,937	73,512	27,584	27,584	27,584	27,584
23187D-01-02	2_SP1_2_PMA	02_SP1_2_PY	112,016	102,263	98,199	99,004	91,082	33,348	33,348	33,348	33,348
23187D-01-03	3_SP1_1	03_SP1_1_PN	87,984	76,766	72,995	72,681	62,688	33,414	33,414	33,414	33,414
23187D-01-04	4_SP1_2	04_SP1_2_PN	95,768	83,891	80,294	80,503	73,097	35,569	35,415	35,415	35,415
23187D-01-05	5_SP4_1	05_SP4_1_PN	89,134	80,917	80,129	79,921	78,232	28,320	28,233	28,233	28,233
23187D-01-06	6_SP4_2	06_SP4_2_PN	96,047	87,402	86,560	86,255	84,959	31,233	31,090	31,090	31,090
23187D-01-07	7_SP5_1	07_SP5_1_PN	89,153	77,728	75,918	75,680	68,219	40,001	40,001	38,852	38,817
23187D-01-08	8_SP5_2	08_SP5_2_PN	80,972	70,495	68,564	68,846	62,283	33,962	33,962	33,115	33,115
23187D-01-09	9_SP6_1_PMA	09_SP6_1_PY	91,920	79,693	77,940	78,121	71,025	39,466	39,466	39,132	39,088
23187D-01-10	10_SP6_2_PMA	10_SP6_2_PY	91,319	79,696	78,215	78,490	70,234	37,724	37,724	37,408	37,364
23187D-01-11	11_SP6_1	11_SP6_1_PN	104,361	91,370	89,664	89,476	79,268	36,672	36,386	35,549	35,524
23187D-01-12	12_SP6_2	12_SP6_2_PN	100,585	88,430	86,625	86,717	78,599	39,532	39,532	38,573	38,573
23187D-01-13	13_IN_1_PMA	13_INF_1_PY	79,594	70,600	64,379	65,899	52,488	33,129	33,129	33,129	33,129
23187D-01-14	14_IN_2_PMA	14_INF_2_PY	93,208	82,902	76,519	77,232	62,148	36,775	36,775	36,775	36,775
23187D-01-15	15_IN_1	15_INF_1_PN	90,584	79,989	74,331	74,708	63,701	43,216	43,216	43,216	43,216
23187D-01-16	16_IN_2	16_INF_2_PN	85,788	75,505	68,984	70,371	58,925	42,155	42,155	42,155	42,155
23187D-01-17	17_OUT_1_PMA	17_EFF_1_PY	87,744	79,342	72,192	73,159	60,830	39,427	38,864	38,818	38,735
23187D-01-18	18_OUT_2_PMA	18_EFF_2_PY	95,564	86,692	80,078	80,763	67,444	43,931	43,075	42,990	42,886
23187D-01-19	19_OUT_1	19_EFF_1_PN	90,995	81,310	73,300	73,164	61,782	44,064	43,431	43,328	43,328

Διεθνές Ερευνητικό Κέντρο Νερού Νηρέας | Παραδοτέο 4.4.1: Λειτουργία πιλοτικών μονάδων

23187D-01-20	20_OUT_2	20_EFF_2_PN	90,418	80,602	72,228	72,355	58,272	40,141	39,936	39,936	39,887
23187D-01-21	21_PS_1_PMA	21_PST_1_PY	89,029	79,547	73,970	74,672	60,779	38,584	38,584	38,584	38,584
23187D-01-22	22_PS_2_PMA	22_PST_2_PY	106,585	95,552	89,287	90,238	73,768	46,686	46,686	46,686	46,686
23187D-01-23	23_PS_1	23_PST_1_PN	94,984	84,694	79,480	79,878	69,124	42,759	42,759	42,759	42,759
23187D-01-24	24_PS_2	24_PST_2_PN	88,318	78,840	73,637	73,875	63,097	41,091	41,091	41,091	41,091
23187D-01-25	25_SP1_1_PMA	25_SP1_1_PY	86,968	78,094	74,781	74,979	69,571	29,266	29,212	28,904	28,135
23187D-01-26	26_SP1_2_PMA	26_SP1_2_PY	98,354	89,101	86,106	86,546	80,279	35,533	35,338	34,979	34,239
23187D-01-27	27_SP1_1	27_SP1_1_PN	85,511	76,183	73,934	73,781	68,943	29,335	28,980	28,923	28,837
23187D-01-28	28_SP1_2	28_SP1_2_PN	82,057	72,709	69,981	69,554	61,537	23,228	23,003	23,003	22,951
23187D-01-29	29_SP4_1	29_SP4_1_PN	91,833	82,126	81,254	81,083	79,799	32,916	31,739	31,739	31,739
23187D-01-30	30_SP4_2	30_SP4_2_PN	80,892	73,057	72,113	71,863	70,159	32,385	31,319	31,319	31,319
23187D-01-31	31_SP5_1	31_SP5_1_PN	87,676	77,839	75,864	76,029	70,838	37,222	37,182	36,541	36,541
23187D-01-32	32_SP5_2	32_SP5_2_PN	73,512	65,401	63,897	63,855	59,291	30,194	30,194	29,705	29,705
23187D-01-33	33_SP6_1_PMA	33_SP6_1_PY	89,741	78,137	76,597	76,559	72,176	36,853	36,853	36,853	36,853
23187D-01-34	34_SP6_2_PMA	34_SP6_2_PY	83,876	74,314	72,851	72,703	67,668	36,164	36,164	36,087	36,087
23187D-01-35	35_SP6_1	35_SP6_1_PN	86,503	76,712	74,898	75,143	68,935	36,337	36,295	35,666	35,666
23187D-01-36	36_SP6_2	36_SP6_2_PN	97,703	84,750	83,275	83,024	75,372	39,002	38,675	38,080	38,080
23187D-01-37	37_IN_1_PMA	37_INF_1_PY	83,742	74,427	68,005	69,798	55,794	37,311	37,032	37,032	37,032
23187D-01-38	38_IN_2_PMA	38_INF_2_PY	91,325	81,208	74,265	75,561	61,439	43,497	43,313	43,313	43,313
23187D-01-39	39_IN_1	39_INF_1_PN	83,454	73,860	68,240	68,416	58,054	36,187	36,091	36,091	36,091
23187D-01-40	40_IN_2	40_INF_2_PN	91,442	80,551	74,776	75,418	63,735	40,066	39,721	39,721	39,721
23187D-01-41	41_OUT_1_PMA	41_EFF_1_PY	87,241	79,624	74,701	75,480	66,378	35,894	35,748	35,607	35,530
23187D-01-42	42_OUT_2_PMA	42_EFF_2_PY	87,472	80,066	75,217	75,724	66,844	39,012	38,789	38,617	38,508

Διεθνές Ερευνητικό Κέντρο Νερού Νηρέας | Παραδοτέο 4.4.1: Λειτουργία πιλοτικών μονάδων

23187D-01-43	43_OUT_1	43_EFF_1_PN	99,274	89,449	82,941	83,108	72,250	45,253	44,820	44,739	44,687
23187D-01-44	44_OUT_2	44_EFF_2_PN	95,277	85,627	77,766	78,489	67,763	44,353	44,146	44,060	43,914
23187D-01-45	45_PS_1_PMA	45_PST_1_PY	84,124	74,936	69,550	70,291	57,743	39,204	39,204	39,204	39,204
23187D-01-46	46_PS_2_PMA	46_PST_2_PY	93,105	82,938	77,879	77,863	63,541	39,765	39,765	39,765	39,765
23187D-01-47	47_PS_1	47_PST_1_PN	82,066	73,016	68,589	68,647	59,597	38,536	38,521	38,521	38,521
23187D-01-48	48_PS_2	48_PST_2_PN	86,226	76,214	71,721	71,566	60,974	39,472	39,472	39,472	39,472
23187D-01-49	49_SP1_1	49_SP1_1_PN	96,594	84,855	81,064	81,757	71,245	38,014	38,012	37,898	37,705
23187D-01-50	50_SP1_2	50_SP1_2_PN	66,916	59,024	56,127	55,880	48,500	27,848	27,749	27,749	27,241
23187D-01-51	51_SP4_1	51_SP4_1_PN	76,152	70,285	69,632	69,503	68,519	28,188	28,078	28,078	28,078
23187D-01-52	52_SP4_2	52_SP4_2_PN	82,439	76,110	75,435	75,359	74,062	28,860	28,746	28,746	28,746
23187D-01-53	53_SP5_1	53_SP5_1_PN	85,144	73,061	71,394	71,385	64,891	31,808	31,791	31,263	31,263
23187D-01-54	54_SP5_2	54_SP5_2_PN	80,980	69,725	68,260	68,289	62,796	31,710	31,676	31,295	31,295
23187D-01-55	55_SP6_1	55_SP6_1_PN	78,913	68,730	67,514	67,462	62,533	33,222	33,189	32,876	32,876
23187D-01-56	56_SP6_2	56_SP6_2_PN	82,502	69,857	68,453	68,472	62,731	34,789	34,528	34,093	34,093
23187D-01-57	57_IN_1	57_INF_1_PN	92,527	81,521	75,123	75,972	65,023	41,671	41,554	41,554	41,554
23187D-01-58	58_IN_2	58_INF_2_PN	87,701	77,683	72,006	72,430	62,375	38,236	38,178	38,178	38,178
23187D-01-59	59_OUT_1	59_EFF_1_PN	88,709	80,077	73,879	74,295	62,860	38,353	38,110	38,110	38,004
23187D-01-60	60_OUT_2	60_EFF_2_PN	86,250	77,926	71,516	72,177	60,857	36,765	36,527	36,494	36,449
23187D-01-61	61_PS_1	61_PST_1_PN	84,137	74,884	69,444	70,049	60,201	40,191	40,191	40,191	40,191
23187D-01-62	62_PS_2	62_PST_2_PN	89,863	80,137	74,526	74,994	63,215	39,337	39,298	39,298	39,298
23187D-01-63	63_SP1_1_PMA	63_SP1_1_PY	90,883	80,203	76,799	77,071	67,538	41,295	41,295	41,295	41,295
23187D-01-64	64_SP1_2_PMA	64_SP1_2_PY	87,991	77,321	74,148	74,189	65,938	39,902	39,902	39,902	39,902
23187D-01-65	65_SP1_1	65_SP1_1_PN	88,912	76,301	72,936	73,304	61,413	39,578	39,578	39,578	39,578

Διεθνές Ερευνητικό Κέντρο Νερού Νηρέας | Παραδοτέο 4.4.1: Λειτουργία πιλοτικών μονάδων

23187D-01-66	66_SP1_2	66_SP1_2_PN	93,847	80,865	77,345	77,819	65,667	43,709	43,709	43,709	43,709
23187D-01-67	67_SP1_1	67_SP1_1_PN	99,306	84,675	81,414	81,598	72,195	35,575	35,573	35,573	35,573
23187D-01-68	68_SP1_2	68_SP1_2_PN	104,633	89,062	85,320	85,690	76,923	36,874	36,874	36,874	36,874
23187D-01-69	69_SP1_1_PMA	69_SP1_1_PY	92,146	79,961	76,231	76,889	64,554	41,076	41,076	41,076	41,076
23187D-01-70	70_SP1_2_PMA	70_SP1_2_PY	86,557	75,841	72,443	72,929	62,252	36,289	36,289	36,289	36,289
23187D-01-71	71_SP1_1	71_SP1_1_PN	87,129	75,591	72,375	72,732	63,876	38,303	38,303	38,303	38,303
23187D-01-72	72_SP1_2	72_SP1_2_PN	85,200	73,479	70,102	70,411	61,246	36,917	36,917	36,917	36,917
23187D-01-73	73_SP1_1	73_SP1_1_PN	90,549	75,638	71,766	72,714	63,141	37,262	37,262	37,262	37,262
23187D-01-74	74_SP1_2	74_SP1_2_PN	96,484	81,593	77,798	78,496	68,509	40,735	40,735	40,735	40,735
23187D-01-75	75_SP1_1_PMA	75_SP1_1_PY	81,445	72,951	69,613	70,404	57,902	36,599	36,599	36,599	36,599
23187D-01-76	76_SP1_2_PMA	76_SP1_2_PY	85,377	76,685	74,419	74,551	66,759	38,136	38,136	38,136	38,136
23187D-01-77	77_SP1_1	77_SP1_1_PN	88,471	76,775	73,594	73,569	61,858	40,483	40,483	40,483	40,483
23187D-01-78	78_SP1_2	78_SP1_2_PN	97,575	85,197	81,489	82,122	66,808	48,978	48,978	48,978	48,978
23187D-01-79	79_SP1_1	79_SP1_1_PN	83,670	72,526	68,687	69,733	60,810	33,164	33,164	33,164	33,164
23187D-01-80	80_SP1_2	80_SP1_2_PN	84,949	73,353	69,851	70,632	62,196	33,084	33,084	33,084	33,084
23187D-01-81	81_SP1_1	81_SP1_1_PN	86,384	74,224	71,005	71,170	61,879	33,528	33,528	33,528	33,528
23187D-01-82	82_SP1_2	82_SP1_2_PN	88,586	76,526	72,932	73,511	61,615	34,440	34,440	34,440	34,440
23187D-01-83	83_SP1_1	83_SP1_1_PN	93,106	82,411	78,505	78,676	68,853	46,389	46,389	46,349	46,349
23187D-01-84	84_SP1_2	84_SP1_2_PN	85,759	75,310	71,684	72,002	62,507	37,886	37,886	37,886	37,886
total			7,489,011	6,617,097	6,296,625	6,325,661	5,558,483	3,124,962	3,115,259	3,105,104	3,101,837
mean			89,155	78,775	74,960	75,305	66,172	37,202	37,086	36,966	36,927
stdev			7,112	6,454	6,276	6,273	7,030	4,842	4,853	4,877	4,905
total % of initial				88,4%	84,1%	84,5%	74,2%	41,7%	41,6%	41,5%	41,4%

6 Βιβλιογραφία

- rill, A, McNally, S, Parsons, R, Weber, L (2015), Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton, *Aquat Microb Ecol* 75, 129-137,
- Bartlett, A, Padfield, D, Lear, L, Bendall, R, Vos, M (2022), A comprehensive list of bacterial pathogens infecting humans, *Microbiology* 168 <https://doi.org/10.1099/mic/0,001269>
- Besha AT, Gebreyohannes AY, Tufa RA, Bekele DN, Curcio E, Giorno L, Removal of emerging micropollutants by activated sludge process and membrane bioreactors and the effects of micropollutants on membrane fouling: A review, *Journal of environmental chemical engineering*, 2017 Jun 1;5(3):2395-414,
- Callahan, B, Sankaran, K, Fukuyama, J, McMurdie, P, Holmes, S (2016a), Bioconductor Workflow for Microbiome Data Analysis: from raw reads to community analyses [version 2; peer review: 3 approved], *F1000Research* 510,12688/f1000research,8986,2
- Callahan, B J, McMurdie, P J, Rosen, M J, Han, A W, Johnson, A J A, Holmes, S P (2016b), DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data, *Nat Methods* 13, 581-583, 10,1038/nmeth,3869
- Campos JL, Crutchik D, Franchi Ó, Pavissich JP, Belmonte M, Pedrouso A, Mosquera-Corral A and Val del Río Á (2019) Nitrogen and Phosphorus Recovery From Anaerobically Pretreated Agro-Food Wastes: A Review, *Front, Sustain, Food Syst*, 2:91, 10,3389/fsufs,2018,00091
- Dasenaki, M, E., Thomaidis, N, S., (2015) Multianalyte method for the determination of pharmaceuticals in wastewater samples using solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Anal Bioanal Chem* 407, 4229–4245, 10,1007/s00216-015-8654-x
- de Mendiburu, F (2021), agricolae: Statistical procedures for agricultural research, R package version 1,3-5, 2021, from <https://CRAN.R-project.org/package=agricolae>
- Fisher, R A, Corbet, A S, Williams, C B (1943), The Relation Between the Number of Species and the Number of Individuals in a Random Sample of an Animal Population, *J Anim Ecol* 12, 42-58, 10,2307/1411
- Friedrich, a., marshall, j., biggs, p., midwinter, a., & french, n., (2016), Seasonality of *Campylobacter jejuni* isolates associated with human campylobacteriosis in the Manawatu region, New Zealand, *Epidemiology & Infection*, 144(4), 820-828, doi:10,1017/S0950268815002009
- Göbel, A., McArdell, C, S., Joss, A., Siegrist, H., Giger, W., (2007) Fate of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in different wastewater treatment technologies, *Sci, Total Environ.*, 372, (2–3), 361-371, 10,1016/j,scitotenv,2006,07,039
- Good, I J (1953), The population frequencies of species and the estimation of population parameters, *Biometrika* 40, 237-264, 10,1093/biomet/40,3-4,237
- Guerra P, Kim M, Shah A, Alae M, Smyth SA, (2014) Occurrence and fate of antibiotic, analgesic/anti-inflammatory, and antifungal compounds in five wastewater treatment processes, *Sci Total Environ*, 473-474:235-43, 10,1016/j,scitotenv,2013,12,008
- Iakovides, I, C., (2022) Fate of antibiotic resistance determinants during conventional and advanced wastewater treatment and in the wastewater-soil-plant continuum during irrigation with reclaimed water
- Joss, A., Zabczynski, S., Göbel, A., Hoffmann, B., Löffler, D., McArdell, C, S., Ternes, T, A., Thomsen, A., Siegrist, H., (2006) Biological degradation of pharmaceuticals in municipal wastewater treatment: proposing a classification scheme, *Water Res*, 40(8):1686-96, 10,1016/j,watres,2006,02,014
- Kolde, R (2019), pheatmap: Pretty Heatmaps, 2019, from <https://CRAN.R-project.org/package=pheatmap>

- Kursa, M B, Rudnicki, W R (2010), Feature Selection with the Boruta Package, *Journal of Statistical Software* 36, 1 - 13, 10.18637/jss.v036.i11
- Kim S, Chu KH, Al-Hamadani YA, Park CM, Jang M, Kim DH, Yu M, Heo J, Yoon Y, Removal of contaminants of emerging concern by membranes in water and wastewater: A review, *Chemical Engineering Journal*, 2018 Mar 1;335:896-914,
- Krzeminski P, Tomei MC, Karaolia P, Langenhoff A, Almeida CM, Felis E, Gritten F, Andersen HR, Fernandes T, Manaia CM, Rizzo L, Performance of secondary wastewater treatment methods for the removal of contaminants of emerging concern implicated in crop uptake and antibiotic resistance spread: A review, *Science of the Total Environment*, 2019 Jan 15;648:1052-81,
- Li, C., Cabassud, C., Guigui, C., (2015) Evaluation of membrane bioreactor on removal of pharmaceutical micropollutants: a review, *Desalination and Water Treatment*, 55:4, 845-858, 10.1080/19443994.2014.926839
- Liu, D., Zhang, Y., Yang, Q., Li, Y., Li, J., Liao, X., (2023) Fate of ofloxacin in rural wastewater treatment facility: Removal performance, pathways and microbial characteristics, *Bioresource Technology*, 371,128611, 10.1016/j.biortech.2023.128611
- Luo Y, Guo W, Ngo HH, Nghiem LD, Hai FI, Zhang J, Liang S, Wang XC, (2014) A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment, *Sci Total Environ*, 473-474:619-41, 10.1016/j.scitotenv.2013.12.065
- Marcon, E, Hérault, B (2015), entropart: An R package to measure and partition diversity, *Journal of Statistical Software*, 67 <http://EconPapers.repec.org/RePEc:jss:jstsof:v:067:i08>
- McMurdie, P J, Holmes, S (2013), phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data, *PLOS ONE* 8, e61217, 10.1371/journal.pone.0061217
- Oksanen, J, Blanchet, G F, Friendly, M, Kindt, R, Legendre, P, McGilinn, D, Minchin, P R, O'Hara, R B, Simpson, G L, Solymos, P, Henry, M, Stevens, R, Szoecs, E, Wagner, H (2020), *Vegan: community ecology package*, R package version 2.6-4, 2020, from <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Parada, A E, Needham, D M, Fuhrman, J A (2016), Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples, *Environ Microbiol* 18, 1403-1414, 10.1111/1462-2920.13023
- Radjenovic J, Petrovic M, Barceló D, Analysis of pharmaceuticals in wastewater and removal using a membrane bioreactor, (2007) *Anal Bioanal Chem*, 387(4):1365-77, 10.1007/s00216-006-0883-6,
- R Core Team (2023), *R: A language and environment for statistical computing*, reference index version 4.1.3, R Foundation for Statistical Computing
- Shannon, C E (1948), A mathematical theory of communication, *Bell System Technical Journal* 27, 379–423 and 623–656,
- Simpson, E H (1949), Measurement of diversity, *Nature* 163, 688-688, 10.1038/163688a0
- Yilmaz, P, Parfrey, L W, Yarza, P, Gerken, J, Priesse, E, Quast, C, Schweer, T, Peplies, J, Ludwig, W, Glöckner, F O (2014), The SILVA and “All-species Living Tree Project (LTP)” taxonomic frameworks, *Nucleic Acids Res* 42, D643-D648, 10.1093/nar/gkt1209
- Vieno, N., Sillanpää, M., (2014) Fate of diclofenac in municipal wastewater treatment plant — A review, *Environmental International*, 69, 28-39, 10.1016/j.envint.2014.03.021
- Verlicchi P, Al Aukidy M, Zambello E, (2012) Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment--a review, *Sci Total Environ*, 429:123-55, 10.1016/j.scitotenv.2012.04.028