



UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„NICOLAE TESTEMIȚANU” DIN REPUBLICA MOLDOVA

**METODE DE PRELEVARE
A PROBELOR DIN APELE REZIDUALE
ÎN ZONELE UMEDE CONSTRUITE:
ANALIZA CHIMICĂ, MOLECULARĂ
ȘI MICROBIOLOGICĂ**

Chișinău, 2023



UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„NICOLAE TESTEMIȚANU” DIN REPUBLICA MOLDOVA

**METODE DE PRELEVARE
A PROBELOR DIN APELE REZIDUALE
ÎN ZONELE UMEDE CONSTRUITE:
ANALIZA CHIMICĂ, MOLECULARĂ ȘI
MICROBIOLOGICĂ**



Chișinău, 2023

Aprobat la ședința *Consiliului de Management al Calității al USMF „Nicolae Testemițanu”*, proces-verbal nr. 2 din 29 noiembrie 2023

Aprobat la ședința *Comisiei științifico-medodice de profil Medicina comunitară*, proces-verbal nr. 1 din 27 octombrie 2023

Aprobat la ședința *Departamentului de Medicină Preventivă*, proces-verbal nr. 3 din 20 octombrie 2023

Autori:

Greta BĂLAN, dr. hab. șt. med., conf. univ., Disciplina de microbiologie și imunologie, Departamentul Medicină Preventivă
Carolina LOZAN-TÎRȘU, dr. șt. med., conf. univ., Disciplina de microbiologie și imunologie, Departamentul Medicină Preventivă

Vladimir BERNIC, dr. șt. med., conf. cercet., medic specialist în igienă, Agenția Națională pentru Sănătate Publică

Livia ȚAPU, doctorand, Catedra de medicină socială și management „Nicolae Testemițanu”, medic specialist în microbiologie, Agenția Națională pentru Sănătate Publică

Alina FERDOHLEB, dr. șt. med., conf. univ., Catedra de medicină socială și management „Nicolae Testemițanu”

Recenzenți:

Cătălina CROITORU, dr. șt. med., conf. univ., Disciplina de igienă, Departamentul Medicină Preventivă

Natalia FLOREA, dr. șt. med., conf. univ., Disciplina de microbiologie și imunologie, Departamentul Medicină Preventivă

Lilian GLOBA, dr. șt. med., Catedra de histologie, citologie și embriologie

Ghidul oferă medicilor specialiști din cadrul ANSP și rezidenți instrucțiuni pentru colectarea, manipularea, conservarea și transportarea probelor de ape reziduale din zonele umede construite pentru analize chimice, moleculare și microbiologice.

Ghidul a fost realizat cu suportul proiectului 22.80013.8007.1M „Phage treatment and wetland technology as intervention strategy to prevent dissemination of antibiotic resistance in surface waters (PhageLand)” din cadrul JPIAMR-ACTION 2021 (2022-2025), Coordonator național Alina Ferdohleb.

Servicii editorial-poligrafice: Tipografia „PRINT-CARO”.

CUPRINS

ABREVIERI	4
Capitolul 1. Riscurile condiționate	5
de poluarea apelor uzate.....	5
1.1. Poluanții din apele uzate și natura lor	5
1.2. Impactul apelor uzate asupra sănătății populației	7
1.3. Apele uzate – mediu favorabil pentru dezvoltarea rezistenței antimicrobiene.....	10
Capitolul 2. Epurarea apelor uzate	12
2.1 Sistemele convenționale de tratare.....	12
2.2. Sistemele naturale de epurare și zonele umede construite.....	13
2.3. Zonele umede construite din Republica Moldova	17
Capitolul 3. Analiza reziduurilor de antimicrobiene în apă	21
3.1. Generalități.....	21
3.2. Identificarea probei	21
3.3. Prelevarea și transportarea probelor	21
Capitolul 4. Analize moleculare	24
4.1. Generalități.....	24
4.2. Comunitățile țintă.....	24
4.3. Colectarea, prelucrarea și depozitarea probelor.....	24
4.4. Transportarea probelor	26
4.5. Extracția și secvențierea metagenomică a ADN-ului	26
4.6. Izolarea ADN-ului total din bacterii Gram-pozitive, Gram-negative și levuri.....	27
Capitolul 5. Caracteristici-cheie ale zonelor umede construite pentru eliminarea maximă a micropoluantilor	34
BIBLIOGRAFIE	38
Anexe	42

ABREVIERI

ADN	Acid dezoxiribonucleic
ANSP	Agenția Națională pentru Sănătate Publică
ARN	Acid ribonucleic
BRA	Bacterii rezistente la antimicrobiene
CCO	Consumul Chimic de Oxigen
CBO	Consumului Biochimic de Oxigen
CU	Curgere pe uscat
EGM	Elemente genetice mobile
FWS	Sisteme de curgere liberă a apelor de suprafață
GRA	Gene de rezistență la antimicrobiene
HF	Sisteme de curgere orizontală a apelor subterane
PCB	Bifenili policlorurați
RS	Rată scăzută
SNT	Sisteme naturale de tratare
STAU	Stație de tratare a apelor uzate
USMF	Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie
VF	Sisteme cu curgere verticală
ZUC	Zonă umedă construită

Capitolul 1. Riscurile condiționate de poluarea apelor uzate

1.1. Poluanții din apele uzate și natura lor

În ultimii ani, problema apelor uzate a devenit tot mai acută și relevantă în întreaga lume, inclusiv în Republica Moldova. Cauza rezidă în industrializarea extensivă, creșterea densității populației și urbanizarea excesivă a societăților. Apele uzate, generate din activitățile comunale și industriale, constituie sursele principale de poluare a mediului. Gestionarea apelor uzate prezintă o problemă gravă nu numai prin creșterea considerabilă a costurilor pentru epurare și tratare, dar și prin gama largă de poluanți chimici și de contaminanți microbieni care pătrund în sursele de apă și în sol, cu consecințe „devastatoare” atât pentru ecosistemele naturale, cât și pentru sănătatea populației.

Legea apelor din Republica Moldova definește drept uzate apele ce provin din activități casnice, sociale și economice, și ale căror caracteristici fizice, chimice și bacteriologice inițiale sunt alterate de poluanții sau de reziduurile conținute.

Principalele surse de poluare a apelor uzate sunt procesele industriale, agricole, activitățile umane și precipitațiile atmosferice. Astfel, apele uzate din procesele industriale pot conține produse petroliere, metale grele, compuși organici, acizi și materiale radioactive. În urma activităților agricole, apa poate fi poluată cu pesticide și cu îngrășăminte minerale. Apele uzate menajere pot conține detergenți, o gamă variată de bacterii, de virusuri, de levuri, de protozoare, de helminți și diverse medicamente. Ploaia sau zăpada topită spală resturile de combustibil, de lubrifianți și de reactivi de pe drumuri.

Poluanții din apele uzate, reieșind din natura lor, se clasifică în:

1. Poluanți de natura fizică (depunerile radioactive; ape folosite la centralele atomice; deșeuri radioactive; ape termale; lichide calde provenite de la răcirea instalațiilor industriale sau a centralelor termoelectrice și atomoelectrice);
2. Poluanți de natură chimică (acizi și alcalii, petrol și produse petroliere, săruri și fenoli, dioxizi și pesticide, metale grele, azotat de amoniu și nitrifiți, surfactanți sintetici etc.);

3. Poluanți de natură biologică (levuri, alge, bacterii, virusuri, paraziți) (Figura 1).



Figura 1. Sursele de poluare a apelor uzate

Apele uzate sunt compuse din ape reziduale menajere, formate din apă neagră (excremente, urină și nămol fecal) și apă gri (apa reziduală de la spălare și scăldat); apa din unități și din instituții comerciale, inclusiv din spitale; apa reziduală industrială, ape pluviale și alte scurgeri urbane; scurgeri agricole, horticoale și de acvacultură.

Apele uzate conțin 99,9 % apă și 0,1 c% substanțe solide, care includ substanțe organice și anorganice dizolvate și în suspensie. Frația organică constă din grăsimi, din carbohidrați, din proteine, din lignină și din produșii de descompunere ai acestora. Partea anorganică include mai mulți constituenți derivați din surse industriale, precum și din surse casnice, inclusiv unele metale grele: cadmiu, mercur, arsen, zinc și cupru.

Apa uzată este considerată un rezervor important de agenți patogeni precum coliformi fecali, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio cholerae*, ouă și chisturi parazitare, virusuri și levuri, nematozi intestinali cum ar fi speciile din genul *Ancylostoma* (*Ancylostoma duodenale*), ascaridele (*Ascaris lumbricoides*) și viermii-bici (*Trichuris* spp.).

Apele reziduale conțin și o cantitate mare de nutrienți, în special azot (N) și fosfor (P). Aproximativ, 16,6 milioane de tone metrice de azot și 3,0 milioane de tone metrice de fosfor sunt prezente în apele uzate produse anual în întreaga lume.

1.2. Impactul apelor uzate asupra sănătății populației

1.2.1. Impactul microflorei patogene din apele uzate asupra sănătății

Bolile diareice, cum ar fi infecția rotavirală, holera și febra tifoidă, reprezintă principala problemă de sănătate legată de poluarea apelor uzate care provoacă anual 1,6 mil. de decese. Experții OMS au constatat că aproximativ 80 % din toate bolile infecțioase din lume sunt asociate cu calitatea nesatisfăcătoare a apei potabile determinată de poluarea acesteia cu ape uzate.

Apele uzate fecaloid-menajere, apele reziduale de la spitale, de la laboratoare de microbiologie etc., conțin un număr foarte mare de bacterii, de virusuri și de helminții care pot contamina sursele de apă potabilă, prezentând un risc direct pentru sănătatea populației. Principalele maladii cauzate de microorganismele din apele uzate sunt prezentate în Tabelul 1.

Riscul major pentru sănătate este condiționat de bacteriile rezistente la antimicrobiene, care creează impedimente în tratare și favorizează apariția complicațiilor, soldate deseori cu deces. Principalele bacterii patogene din apele uzate care pot afecta sănătatea populației sunt: *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* 0157: H7, *Helicobacter pylori*, *Salmonella* Typhi, *Shigella* spp., *Vibrio cholerae* etc.

Tabelul 1. Boli cauzate de bacteriile patogene din apele uzate

Bacterii	Patologii
<i>Campylobacter jejuni</i>	Gastroenterită
<i>Escherichia coli</i>	Gastroenterită
<i>E. coli</i> 0157: H7	Colită hemoragică și sindromul hemolítico-uremic
<i>Helicobacter pylori</i>	Ulcer gastric și duodenal
<i>Salmonella</i> spp.	Salmoneloză, gastroenterită
<i>Salmonella</i> Typhi	Febră tifoidă
<i>Shigella</i> spp.	Dizenterie
<i>Vibrio cholerae</i>	Holeră

Numărul și diversitatea virusurilor patogene din apele uzate reflectă modelul de infecție în populația umană. Adenovirusul, rotavirusul, viru-

sul hepatitei A și alte virusuri enterice, cum ar fi norovirusurile, virusul Cocksackie, echovirusul, reovirusul și astrovirusul, sunt unele dintre principalele virusuri patogene umane transmisibile prin apă. Virusurile, cei mai importanți și mai periculoși poluanți din apele uzate, sunt rezistente la tratament, dificil de detectat și au un grad ridicat de infecțiozitate. Bolile virale, condiționate de apele uzate, sunt prezentate în Tabelul 2.

Tabelul 2. Boli cauzate de virusurile din apele uzate

Virusuri	Boli
Astrovirus	Gastroenterită
Calicivirus	
Coronavirus	
Enterovirus	
Parvovirus	
Norovirus	
Rotavirus	
Adenovirus	Infecții oculare, boli respiratorii
Virusul Cocksackie	Meningită aseptică, herpangină, respiratorii, boli cardiace și renale
Echovirus	Febră, boli respiratorii și cardiace, meningită aseptică, erupții cutanate
Poliovirus	Paralizie, meningită aseptică
Hepatita A și E	Hepatită infecțioasă

Un alt grup de agenți patogeni, care se regăsesc în apele uzate și pot provoca o gamă largă de afecțiuni, sunt paraziții. Potrivit OMS, în lume există peste 4,5 mld. de oameni care suferă de parazitoze ce provoacă anual circa 16 mil. de decese. Apele uzate prezintă mediul cel mai favorabil pentru răspândirea infecțiilor parazitare. Principalele boli, provocate de paraziții din apele uzate, sunt prezentate în Tabelul 3.

Tabelul 3. Boli cauzate de helminții din apele uzate

Helminți	Boli
<i>Ascaris lumbricoides</i>	Ascaridioză
<i>Ancylostoma duodenale</i>	Anchilostomiază

<i>Clonorchis sinensis</i>	Fascioloză
<i>Fasciola hepatica</i>	Fascioloză
<i>Opisthorchis viverrini</i>	Opistorhiază
<i>Schistosoma</i> spp.	Schistosomiază
<i>Trichuris</i> spp.	Trichocefaloză
<i>Taenia solium</i>	Cisticercoză

1.2.2. Impactul poluanților chimici din apele uzate

Apele uzate, fie rezultate din activități industriale, agricole sau rezidențiale, conțin o varietate de poluanți chimici. Expunerea la acești compuși, direct sau indirect, poate avea consecințe grave asupra sănătății umane.

Metale grele

Metalele grele, cum ar fi mercurul, plumbul, cadmiul și arseniul, provin, de obicei, din deșeuri industriale. Expunerea la aceste metale poate duce la intoxicații acute sau cronice, leziuni renale, neuropatii și carcenoame.

Pesticide

Reziduurile provenite din practicile agricole pot ajunge în apele de suprafață și subterane. Acestea pot cauza perturbări endocrine, neurogene și alte efecte adverse asupra sănătății.

Produse farmaceutice și hormoni

Medicamentele neutilizate sau excretate de asemenea pot ajunge în apele uzate provocând efecte endocrine sau pot interfera cu sistemele biologice ale organismelor acvatice și ale oamenilor.

Compuși organici volatili

Aceștia provin din deșeuri industriale și au potențial carcinogen, mutagen și toxic.

Expunerea la concentrații mari de poluanți, cum ar fi metalele grele, poate cauza simptome acute așa ca greață, vomă, diaree și probleme neurologice. De exemplu, plumbul și mercurul pot afecta sistemul nervos, conducând la diminuarea funcției cognitive, la probleme de comportament și la deteriorarea coordonării. Pesticidele și compuși farmaceutici pot interfera cu funcția hormonală normală a organismului, generând infertilitate, malformații congenitale și tulburări de dezvoltare. Substanțe precum PCB-urile și unele metale grele pot crește riscul de cancer prin afectarea ADN-ului sau prin facilitarea creșterii tumorilor.

1.3. Apele uzate – mediu favorabil pentru dezvoltarea rezistenței antimicrobiene

Rezistența antimicrobiană este un răspuns evolutiv al microorganismelor care poate avea consecințe vitale asupra oamenilor. Deși bacteriile pot dezvolta rezistență prin mutații spontane, acestea au și capacitatea de transfer direct de gene între specii (transfer orizontal), ceea ce facilitează, „colaborarea” dintre ele pentru dezvoltarea rapidă a mecanismelor de re-zistență. Descifrarea mecanismelor de dezvoltare a rezistenței la antimicrobiene a progresat semnificativ datorită tehnologiilor de analiză moleculară avansată. Cu ajutorul acestor tehnologii a fost elucidată interacțiunea dintre agenții patogeni, genele de rezistență și elementele genetice mobile, precum și interacțiunea cu mediul, cu oamenii și cu animalele. Accesibilitatea metodelor de secvențiere a întregului genom și analizele de meta-genomică permit elaborarea de strategii de sănătate publică, dezvoltarea de noi metode de diagnostic și de tratament al infecțiilor multirezistente și optimizarea vaccinurilor.

Ecosistemele acvatice reprezintă unul dintre punctele-cheie în care se dezvoltă rezistența la antimicrobiene. Din vremuri străvechi se practica eliberarea în mediu a apelor reziduale care conțineau diverse substanțe, inclusiv compuși chimici folosiți în medicina umană, veterinară sau în agricultură. Drept urmare, apele reziduale conțin antibiotice, dezinfectanți, metale și multe molecule toxice cu activitate antimicrobiană, care au favorizat dezvoltarea genelor de rezistență.

În prezent, numeroase tipuri de antibiotice au fost detectate în diverse zone, inclusiv în apele subterane, în apele de suprafață și în sol. Antibioticele ajungând în mediu nu afectează doar echilibrul ecologic al microorganismelor din mediu, dar și favorizează dezvoltarea de către acestea a rezistenței la antibiotice, contribuind la apariția genelor de rezistență la antibiotice (GRA). Aceste fenomene nu sunt doar o amenințare la adresa vieții și a sănătății umane și animale, ci și un risc ecologic. GRA induse de antibiotice migrează și se răspândesc rapid în mediu, inclusiv prin transferul lor orizontal, fiind distribuite pe scară largă în diverse habitate.

Tetraciclina, macrolidele, sulfonamida și genele de rezistență la fluorchinolone au fost detectate în stațiile de tratare a apelor uzate ceea ce confirmă severitatea contaminării mediului cu antibiotice. Chiar dacă uti-

lizarea antibioticelor va fi redusă în viitor, GRA persistă și continuă să se disperseze pe scară largă prin mecanisme de transfer orizontal de gene de către elemente genetice mobile care joacă un rol valoros în transmiterea acestora.

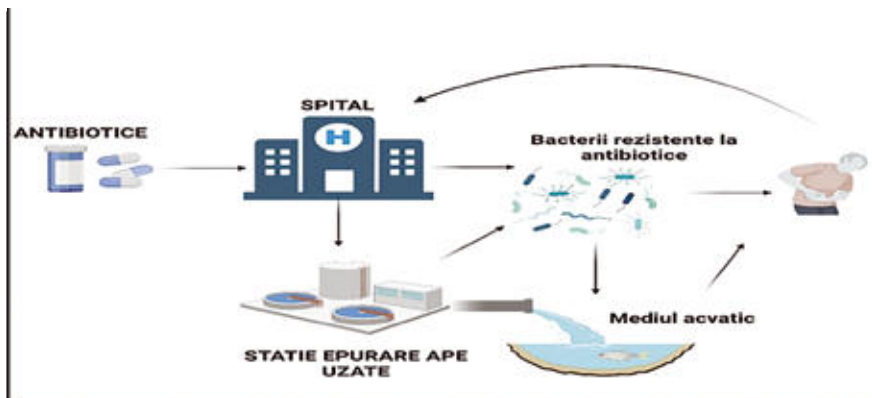


Figura 2. Traseul BRA și GRA în corelație cu dispersia antibioticelor în mediile acvatice

Răspândirea bacteriilor rezistente la antimicrobiene (BRA) și GRA prin contaminarea fecală are loc prin trei moduri diferite: (1) omul poate fi contaminat cu un agent patogen rezistent la antibiotice prin ingestia directă de apă potabilă, deși nu are loc transmiterea de la om la om; (2) transmiterea de la om la om are loc după o infecție directă prin consumul de apă contaminată; (3) transfer orizontal de GRA către agenții patogeni umani (Figura 2).

Bacteriile rezistente la antimicrobiene pot cauza infecții care nu mai răspund la tratamentele obișnuite, făcând aceste infecții mai greu de tratat, iar uneori letale. Tratarea infecțiilor cauzate de BRA necesită adesea spitalizare îndelungată și medicamente mai costisitoare. Prevalența crescută a BRA poate pune în pericol procedurile medicale de rutină, inclusiv intervențiile chirurgicale, transplanturile și tratamentele pentru cancer.

Capitolul 2. Epurarea apelor uzate

2.1 Sistemele convenționale de tratare

Înțelegerea naturii apelor uzate este fundamentală pentru proiectarea corespunzătoare a instalațiilor de epurare a apelor uzate și selectarea tehnologiilor eficiente de tratare. Contaminanții din apele uzate pot fi înlăturați prin metode biologice, fizice și chimice.

Pentru obținerea unui efluent acceptabil, procesul de epurare a apelor uzate se compune din trei sau din patru etape: preliminară, primară, secundară și terțiară sau avansată.

La etapa 1 (preliminară), unele caracteristici nefavorabile de bază sunt reduse și apele uzate sunt pregătite pentru continuarea tratării. Procesele de tratare preliminară constau în operațiuni fizice unitare, cum ar fi cernere, mărunțire, îndepărtarea nisipului, flotație, egalizarea fluxului, manipularea vidanjului și metode de control al mirosului. Această tratare reduce consumul biochimic de oxigen (CBO) din apele uzate de la 15 până la 30%.

Tratarea primară acționează ca un precursor pentru tratarea secundară și implică operații fizice (cernere, sedimentare) și preaerisire sau floculare mecanică cu aditivi chimici. Efluentul lichid din tratarea primară se caracterizează printr-o cantitate mare de materii organice în suspensie și un CBO mare (aproximativ 60% din CBO inițial).

La tratarea secundară, materia organică este îndepărtată prin procese biologice, fie în condiții aerobe, fie anaerobe. Unități biologice aerobe sunt:

- Filtre (filtre de nisip intermitente, filtre de scurgere)
- Bazine de aerare, de alimentare cu nămol activ recirculat
- Iazuri de oxidare și lagune aerate

Unități biologice anaerobe sunt:

- Lagune anaerobe
- Fose septice
- Rezervoare septice ecologice Inhoff etc.

Etapa finală este tratamentul terțiar pentru a îndepărta cantități semnificative de azot, de fosfor, de metale grele, de substanțe organice biodegradabile, de bacterii și de virusuri. În acest scop se folosesc coagularea chimică, flocularea și sedimentarea, urmate de filtrarea cu cărbune activ.

Pentru îndepărtarea unor ioni specifici sau pentru reducerea solidelor dizolvate sunt utilizate schimbul de ioni și osmoza inversă.

Nămolul de epurare constă din solidele organice și anorganice, prezente în deșeurile brute care au fost îndepărtate în decantorul primar, și solidele organice generate la tratarea secundară și eliminate în decantorul secundar sau într-un proces de îngroșare separat. Acesta are o compoziție complexă, conținând niveluri ridicate de materie organică și mai multe substanțe nutritive. Gestionarea nămolului este o activitate foarte complexă și costisitoare.

În prezent sunt dezvoltate noi tehnologii și tehnici de management al apelor uzate ca răspuns la limitările economice, sociale și de mediu în continuă creștere ale sistemelor convenționale de epurare a apelor uzate. Noile abordări includ procese naturale și sunt proiectate ținând cont de durabilitate, spre deosebire de sistemele convenționale care sunt mari consumatoare de energie și dependente de substanțe chimice utilizate.

2.2. Sistemele naturale de epurare și zonele umede construite

Pentru a evita contaminarea apei potabile, autoritățile locale au construit instalații mari, convenționale, de tratare a apelor uzate. Aceste facilități pot fi aplicate doar în zonele puternic urbanizate, nu și în zonele rurale, în comunitățile mici izolate și / sau periurbane, unde apele uzate se evacuează, de obicei, în fose septice. Din cauza lipsei unităților de tratare a apelor uzate, o practică comună este evacuarea ilegală a foselor septice în cursuri de apă adiacente sau în ape pluviale. O soluție ideală pentru soluționarea acestei probleme și pentru tratarea apelor uzate în aceste zone ar fi construirea de sisteme naturale de tratare (SNT) ce includ metode de tratare terestră.

2.2.1 Metode de tratare terestră

Aceste metode au la bază reacțiile fizice, chimice și biologice asupra și în matricea solului. După un tratament preliminar, apele uzate sunt deversate pe sol (cu sau fără vegetație). Aceste tehnologii au o rată scăzută, infiltrare rapidă și sisteme de curgere pe uscat, precum și combinații ale acestor tipuri. În metodele cu o rată scăzută (RS) și curgere pe uscat (CU), vegetația constituie o componentă de tratare semnificativă, iar în infiltrarea rapidă vegetația nu este necesară.

2.2.2. Iazuri de stabilizare a apelor uzate

Această metodă presupune prezența iazurilor deschise, a căror funcție de tratare depinde de lumina soarelui, de viața microbiană și de formele inferioare de plante și de animale. Materia organică se descompune în mod natural, de exemplu, biologic. Cu contribuția bacteriilor și algei, apele uzate sunt stabilizate, iar agenții patogeni sunt reduși. În general, conținutul organic al efluentului este transformat în forme mai stabile. Timpul de retenție variază între 30 și 120 de zile. Iazurile de stabilizare pot fi: lagune de canalizare, de oxidare, redox, de maturare, facultative, anaerobe, aerobe și iazuri aerate. Ele pot fi folosite în diferite condiții meteorologice independent, în serie cu diferite tipuri de iazuri (de exemplu, cu iazuri anaerobe, facultative și de maturare) sau în combinație cu alte sisteme.

2.2.3. Zonele umede construite

Zonele umede construite (ZUC) sunt ecosisteme naturale, unde apele reziduale sunt introduse pentru epurare biologică și fizică într-un filtru (nisip și pietriș) pe care crește vegetație. Tratarea apelor uzate este asigurată prin activitatea bacteriilor de pe biofilmul substratului și filtrului fizic, și prin efectele absorbante. Pentru accelerarea procesului, pe toată suprafața filtrului de nisip se cresc plante, de obicei trestie sau stuf. În comparație cu tehnologiile tradiționale de tratare, ZUC sunt sisteme pasive de tratare care oferă o soluție rentabilă și ecologică pentru remedierea apelor uzate de diferite origini (Figura 3).

În prezent sunt cunoscute trei tipuri de zone umede construite: sisteme de curgere liberă (FWS) a apelor de suprafață, sisteme de curgere orizontală a apelor subterane (HF) și sisteme cu curgere verticală (VF).

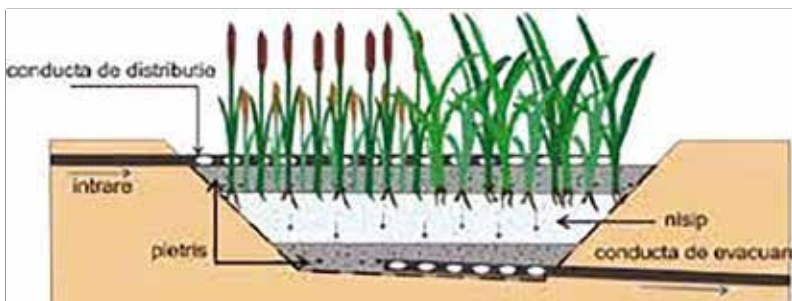


Figura 3. Schița unei ZUC cu flux vertical

ZUC cu sistem liber de curgere a apelor de suprafață constau din unul sau mai multe bazine sau canale impermeabile cu vegetație și de mică adâncime (40-60 cm adâncime), umplute cu pământ, cu vegetație nativă plantată (de exemplu, papură, stuf și / sau papură) și echipate cu structuri de intrare și de evacuare corespunzătoare. Apa uzată curge la adâncimi de la 10 până la 30 cm sau chiar 45 cm și este expusă atmosferei, vântului și luminii directe a soarelui.

O zonă anoxică/anaerobă predomină în partea de jos a zonei umede, în timp ce o zonă aerobă există aproape de suprafață, oxigenată din atmosferă prin reaerare, ca urmare a legănării plantelor în vânt. În timp ce apa uzată curge prin zona umedă, au loc simultan procese fizice, chimice și biologice care elimină poluanții. Deși stratul de sol sub apă este anaerob, rădăcinile plantelor eliberează oxigen în zonă, ducând la crearea unui mediu cu o activitate biologică și chimică complexă.

ZUC cu sisteme de curgere orizontală a apelor subterane (HF) sunt canale umplute cu pietriș grosier și cu nisip, și plantate cu vegetație acvatică. Fundul canalului, aflat la o adâncime de la 0,5 până la 1m (3-32 mm în diametru), este aliniat pe o căptușeală impermeabilă (argilă sau geomembrană impermeabilă) cu scopul de a preveni pierderile. Apele uzate trebuie să rămână sub suprafața mediului poros care curge prin pori în jurul rădăcinilor și a rizomilor plantelor. Fundul canalului ar trebui să fie de mare și de mică adâncime, astfel încât traseul de curgere a apei să fie maximizat, iar o zonă de intrare largă asigură o distribuire uniformă a fluxului. Panta fundului canalului este, în mod normal, de 1%. Vegetația zonelor umede construite se compune din orice plante cu rădăcini adânci, extinse, care pot crește în medii umede, bogate în nutrienți. Apele uzate sunt purificate în momentul în care intră în contact cu mediul de filtrare și cu rădăcinile plantelor.

ZUC cu curgere verticală (VF) sunt paturi de filtrare cultivate cu plante acvatice (Anexa 1). Apele uzate sunt introduse la suprafața acestor zone umede printr-o rețea de conducte perforate pentru a se obține o inundare uniformă. Apa coboară gravitațional prin matricea filtrului și ajunge la stratul de drenaj (de jos), care conține o rețea de tuburi de colectare și de aerare perforate. Patul conține diferite straturi cu diferite gradații. Primul strat constă din pietriș utilizat pentru drenaj (minim 20 cm grosime), urmat,

în partea de sus, de straturi de pietriș și de nisip (strat de suprafață cu grosimea de 10-30 cm). Stratul superior este plantat și vegetației îi este permis să dezvolte rădăcini adânci, extinse care să pătrundă în mediul de filtrare. Adâncimea totală variază de la 0,90 m până la 1,20 m. Pentru drenaj este nevoie de o pantă a patului de 1 %. ZUC cu flux vertical poate opera cu: flux intermitent, descendent nesaturat, saturat sau descendent și flux mareal. În aceste sisteme apar două faze: faza de inundare și faza de uscare. Diferența importantă dintre o ZUC cu flux vertical și una cu flux orizontal subteran este nu doar direcția căii de curgere, ci, mai degrabă, ciclurile de umplere și de uscare, și condițiile aerobe îmbunătățite în cazul ZUC cu flux vertical. Aceste deosebiri duc la cerințe reduse în această zonă umedă.

Zonele umede construite au un șir de avantaje: consum scăzut de energie, exploatare și întreținere ușoară, adaptabile la schimbările sezoniere, înlăturare eficientă a agenților patogeni și a nutrienților, încadrare armonioasă în peisaj, lipsa de poluare sonoră, posibilitate de epurare a apelor brute, gestionare minimă a nămolului. Sistemul ZUC are și un dezavantaj – necesită mult spațiu, iar dacă proiectul prevede o epurare prealabilă, este necesară evacuarea sistematică a nămolului și tăierea anuală a vegetației. Cu toate acestea, utilizarea vegetației tăiate din ZUC (producerea de brichete și de peleți) poate aduce și avantaje economice. ZUC permite eliminarea a peste 80 % din materiile corganice (CCO-Cr) și a 100% din agenții patogeni. Investițiile inițiale de asemenea sunt mai mici și se ridică la aproximativ 5,5 mil. de USD, comparativ cu 10 mil. de USD care ar fi necesare pentru o stație convențională de tratare a apelor uzate de capacitate similară.

Zonele umede construite sunt destinate epurării apelor menajere în două trepte și permit eliminarea compușilor organici (CBO, CCO), materialelor în suspensie, a nutrienților (N și P) și a microorganismelor patogene. Eficiența zonei umede construite, controlată prin analiza consumului chimic de oxigen (CCO-Cr) și al consumului biochimic de oxigen (CBO), este de 77-93% și, respectiv, 94-95%. Zonele umede construite, pe lângă îmbunătățirea calității apelor uzate prin înlăturarea compușilor azotului, metalelor grele, materiei organice etc., s-au dovedit a fi un procedeu mai puțin costisitor în exploatare și rezistent la temperaturi joase.

În zonele urbane, populația este principala sursă de reziduuri de antibiotice, de bacterii rezistente la antibiotice și de gene de rezistență la

antibiotice, excretate prin fecale și transportate la stațiile de tratare a apelor uzate. Deși aceste instalații reduc în mod eficient conținutul de nutrienți și încărcătura bacteriană din apele uzate la niveluri acceptabile înainte de evacuare, tratamentele convenționale sunt departe de a fi optime în îndepărtarea compușilor farmaceutici (inclusiv a antibioticelor).

2.3. Zonele umede construite din Republica Moldova

În Republica Moldova există o serie de zone umede proiectate și construite cu implicarea experților străini și cu finanțarea agențiilor internaționale (ApaSan, Elveția, SKAT, Austria, BERD etc.). Norme de proiectare aprobate oficial pentru ZUC nu există, iar evidența funcționării lor stabile și eficiența tehnologiilor trebuie studiate în continuare, pe baza experienței de funcționare în Republica Moldova.

Prima stație de epurare de zonă umedă construită a fost construită în apropierea mănăstirii Căpriana în 2006, proiectată ca un stadiu avansat de tratare a apelor uzate, în urma tratării biologice.

În perioada 2007-2012, mai multe stații de tratare a apelor uzate de acest tip au fost construite pentru obiecte izolate în satele Brătuleni, Iurceni, Cristești, Negrea, Sărata Galbenă, Drăgușenii Noi, Rusca. De regulă, doar o parte din aceste localități (de obicei, o școală, o grădiniță pentru copii, administrația locală și o parte din casele particulare legate de aprovizionarea centralizată și de canalizare) au fost conectate la stația de epurare. Schema convențională a acestor stații de tratare implică pomparea (dacă relieful permite - prin gravitație), filtrarea (un strat de pietriș), rezervoare de stabilizare, una până la patru secțiuni de facilități de bază și o gură de evacuare a apelor tratate. Stația de epurare de la Rusca implică o fosă septică (ca o primă etapă de tratare), construită în 2007, a doua etapă este o ZUC cu patru paturi orizontale de 300 m² fiecare, umplute cu pietriș, a căror suprafață este cultivată cu stuf. Capacitatea de tratare este de 40 m³/zi. Adăugător a fost construit un sistem de canalizare de 700 de m, ceea ce a permis conectarea la stația de epurare a 50 de case particulare din satul Rusca.

În septembrie 2013, în mun. Orhei a fost pusă în funcțiune cea mai mare stație de acest fel din Europa.

În prezent, doar 24% din populația Moldovei este conectată la instalații de epurare a apelor uzate.

2.3.1. Zona umedă construită din raionul Orhei, satul Seliște

ZUC Orhei este proiectată cu o capacitate suficientă pentru tratarea tuturor apelor uzate generate de orașul Orhei și la niveluri de eficiență conform cu cerințele UE. Se estimează că ea va genera economii de energie de 40% pe metru cub tratat și va reduce cantitatea de poluanți deversați în mediu datorită performanței ridicate de tratare. Construcția ZUC a fost finanțată din Grantul pentru Dezvoltare Regională și Protecție Socială (2,9 mil. de USD), Uniunea Europeană, Fondul Ecologic Național al Ministerului Mediului (2,2 mil. de USD) și Proiectul național de alimentare cu apă și canalizare (0,4 mil. de USD), Banca Mondială. Costul ZUC Orhei este de aproximativ 4,8 mil./de euro.

ZUC Orhei ocupă o suprafață de 5 ha și are conducta de intrare din oraș, cameră de recepție, deznisipator, șnec cu instalație de malaxare, stație de pompare, etapa 1, cu unitate de preaerare și egalizare - linia 1, linia 2, linia 3, linia 4, vane de control pentru alimentarea liniilor 1, 2, 3, 4; bloc administrativ, bloc de generatoare; stație de pompare, etapa 2 - linia 1, 2, 3, 4; sistem de evacuare a apelor reziduale epurate cu stație de dezinfectare bazată pe folosirea hipocloritului de sodiu.

Capacitatea de epurare biologică a apelor uzate la ZUC Orhei, datorită instalațiilor de preaerare din rezervoarele de egalizare, este de 4400 m³/zi, 2000 kgCBO5/zi.

Etapa de preaerare permite reducerea considerabilă a încărcăturilor organice. La tratarea prealabilă a încărcării industriale, conform Regulamentului de recepție a apelor uzate în sistemul de canalizare centralizat, ZUC poate obține limite de deversare de 6 000 m³/zi, prin adăugarea procesului de preaerare. ZUC poate funcționa eficient fără procesul de preaerare pentru influentul sumar, constituit din ape uzate menajere, și de producere cu capacitatea de 2700 m³/zi și încărcarea cu poluanți organici în valoare de 1200 kgCBO5/zi.

Componenta stației ZUC, care asigură cerințele de funcționare de la populația cu acces la sistemul centralizat de canalizare de 14652 locuitori, necanalizat - până la 6216 locuitori (volumul apelor uzate în influent - 2110 m³/zi, ape uzate industriale - 487 m³/zi), este următoarea:

- a) Instalație tehnologică primară: stație de epurare care recepționează apele uzate brute prin colectorul principal din mun. Orhei. Aceasta constă din două canale echipate cu grătare și cu utilaj de curățare a grătarului, de reținere a nisipului. Fiecare unitate include un sistem de

aerare cu hidroelevator pentru pomparea nisipului sedimentat spre camera de colectare a nisipului cu ulterioara lui evacuare într-un depozit de deșeuri. După deznisipator, apele uzate trec printr-un canal deschis echipat cu un baraj-deversor cu stavile. Instalația este dotată cu o conductă de preaplin și cu un canal de centură (by-pass).

- b) Rezervorul de egalizare și stația de pompare principală. Rezervorul este compus din două camere din beton armat cu o capacitate totală de 1400 m³ și este echipat cu patru jeturi de flux, patru mixere și opt pompe electrice submersibile pentru alimentarea zonei umede construite.
- c) Zona umedă construită este compusă din patru linii/trepte (suprafața totală de 4,5 ha). Fiecare linie funcționează consecutiv: etapa 1 - platforma de stof filtrantă pentru apele uzate brute (PSF), plantată pe toată suprafața cu plante hidrofile, este alcătuită din patru linii ce funcționează paralel: fiecare linie este divizată în trei sectoare alimentate alternativ de supape/vane dirijate automat; etapa a 2-a - platforma cu flux vertical (PFV), plantată pe toată suprafața cu plante hidrofile. Fluxul vertical este compus din patru linii ce funcționează paralel: fiecare linie este divizată în patru sectoare, alimentate alternativ prin intermediul a patru pompe centrifuge submersibile (stația de pompare de treapta a doua).
- d) Stație de dezinfectare, bazată pe tehnologia folosirii hipocloritului de sodiu, este situată în amonte de stația de pompare a apelor effluente.
- e) Stația de pompare a apei epurate în punctul de deversare: transportarea apelor uzate epurate în r. Răut se efectuează prin conducta sub presiune cu lungimea de 1,45 km.
- f) Instalații auxiliare: clădiri operaționale, inclusiv camere pentru ședințe, personal, camera pentru stație și camera de dozare. Stația este dotată și cu o substație de generare a curentului electric (Diesel (1x400 KVA)). Încăperile sunt asigurate cu sisteme de iluminare și de distribuire a energiei electrice de putere mică pentru asigurarea iluminatului exterior, parcare auto.

Nămolul din apele uzate brute se depozitează direct pe platformele de stof filtrant PSF (etapa 1). Creșterea nămolului depozitat este planificată în conformitate cu literatura de specialitate la 15-20 mm/an. Lucrările primare de evacuare a nămolului se desfășoară la atingerea grosimii pe PSF de 30 cm, după o perioadă de circa 12-15 ani. După 10-12 ani de funcționare

începe activitatea de monitorizare a procesului de sedimentare a nămolului: evaluarea grosimii și compoziției nămolului în scopul verificării dacă calitatea lui corespunde cerințelor de utilizare în agricultură. Apa separată de nămol se colectează în rezervorul de egalizare, la intrare în ZUC. Deșeurile solide captate pe grătare sunt transportate, după dezinfectarea preliminară cu hipoclorit de sodiu, la gunoștea autorizată a localității.

Apele reziduale, epurate și dezinfectate cu hipoclorit de sodiu, sunt deversate în r. Răut, cu asigurarea concentrației în ele a substanțelor în suspensie de - 35,0 mg/l, CCO - 125 mgO₂/l, CBO₅ – 25,0 mgO₂/l, *E. coli* - 5000 UFC/l, lipsa florei patogene și a ouălor de helminți.

Controlul calității apelor reziduale la parametri sanitaro-chimici și microbiologici se efectuează de laboratorul departamental al Regiei Apă Canal Orhei. Aprovizionarea cu apă potabilă în volum de 2,0 m³/zi se efectuează din sonda arteziană din adiacență, calitatea apei din sondă corespunde normelor sanitare în vigoare. Terenul de amplasare a stației de epurare este amenajat și îngrădit, iar zona de protecție sanitară corespunde cerințelor SNiP 2.04.03- 85 “Canalizarea. Rețele și instalații externe”.

Zona umedă construită Orhei (ORH-CW) deservește aproximativ 26 000 de locuitori și câteva agroindustrii, și este alcătuită din patru linii care funcționează în paralel, fiecare cu două trepte de curgere verticale în serie (Figura 4).

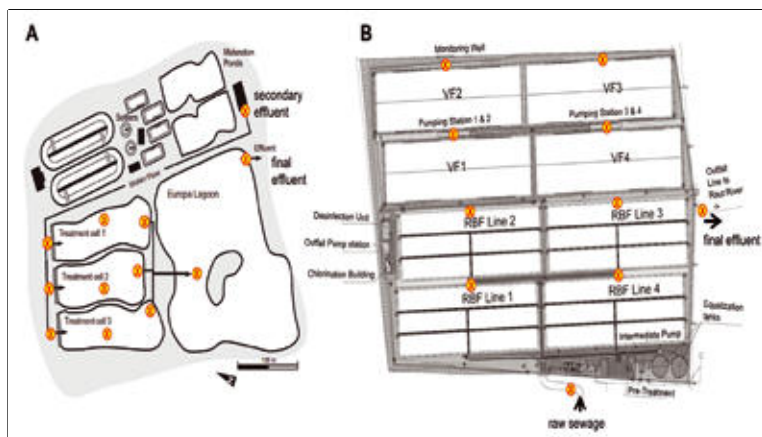


Figura 4. Desen schematic al stației de epurare CW de la Orhei (R. Moldova) RBF: sistem francez de stuf (etapa I); VF: Flux vertical (etapa a 2-a). În ambele cazuri, punctele galbene indică locația punctelor de prelevare planificate de-a lungul transectului influent-efluent

Capitolul 3. Analiza reziduurilor de antimicrobiene în apă

3.1. Generalități

Conform recomandărilor Organizației Internaționale de Standardizare (ISO 5667-1:2020), apa și sedimentul trebuie colectate și procesate înainte de a fi transportate la laborator pentru analiza chimică și moleculară.

3.2. Identificarea probei

Toate recipientele pentru colectarea probelor trebuie să fie marcate clar și fără ambiguitate, astfel încât rezultatele analitice ulterioare să poată fi interpretate corect. Pentru fiecare probă se completează un formular, în momentul recoltării probei, care se va lipi cu grijă pe recipient, acoperit cu bandă adezivă transparentă (pentru a nu pierde fișa în timpul congelării/refrigerării/expedierii).

3.3. Prelevarea și transportarea probelor

Recoltarea probelor de apă se realizează conform standardului ISO 5667-6 privind prelevarea de probe din râuri și pâraie.

3.3.1. Prelevarea probelor de apă pentru analiza reziduurilor de antimicrobiene

Probele de apă pentru analiza produselor farmaceutice trebuie colectate în sticle de polietilenă de culoare chihlimbar (Figura 5), în care se toarnă soluție de 10% de HNO



Figura 5. Sticle din polietilenă de culoare chihlimbar recomandate pentru recoltarea probelor de apă pentru analize chimice

pentru 24 de ore. Înainte de prelevarea probei, sticlele se clătesc cu apă ultrapurificată (MilliQ sau prin alt sistem disponibil).

Procedura

Eșantionare pe teren: la locul de prelevare, clățiți bine sticla cu apă pură (de trei ori). Luați 1 L de probă de apă și colectați apa scufundând sticla în direcția opusă fluxului de apă. Umpleți sticla maximum 70% din volumul capacității (≈ 700 ml), pentru a evita fisurarea acesteia la îngheț.

Dacă este posibil, se recomandă măsurarea la locul de prelevare a variabilelor fizico-chimice de bază, cum ar fi temperatura, pH-ul, conductibilitatea și oxigenul dizolvat.

Includeți o probă martor: o sticlă cu aceeași procedură de eșantionare, dar cu apă de la robinet.

Transportarea probelor: transportați probele la laborator la rece și la întuneric (-20°C , dacă este posibil, sau 4°C), cutie frigorifică portabilă și pachete de congelare.

Notați condițiile meteorologice din timpul zilei și orice caracteristică a probelor de apă pe care o observați (culoare, miros, prezența spumei etc.).

Prelucrare în laborator: păstrați probele la -20°C până la expediere.

3.3.2. Prelevarea sedimentului

Procedura. Din fiecare punct selectat se colectează, de la suprafață, aproximativ 1kg de sediment într-o găleată, folosind o lopată sterilă sau un dispozitiv similar, în funcție de tipul probei și de accesibilitatea la locul de colectare (Figura 6). Ulterior, circa 0,25 kg de sediment se transferă în recipiente de polietilenă de 1L care se păstrează la 4°C . Se recomandă de acoperit sedimentul cu un strat de apă colectată din același loc, pentru a evita uscarea în timpul depozitării și transportării.

Suplimentar, circa 1L de apă de râu (recipiente din polietilenă păstrate la 4°C) trebuie colectat la fiecare loc pentru metoda de cernere umedă. Această apă trebuie transmisă la laborator împreună cu probele de sediment.

Odată ajunse în laborator, atât probele de apă, cât și de sediment (inclusiv apa pentru cernerea umedă) trebuie imediat congelate la -20°C și depozitate până la expediere. oate etapele de prelevare și de conservare trebuie înregistrate în raportul de eșantionare.

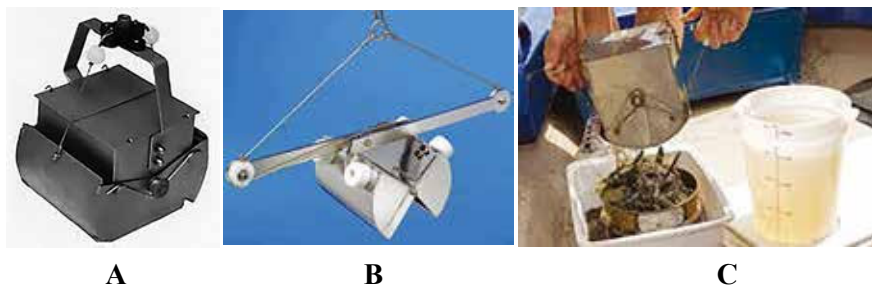


Figura 6. (A) Ekman grab, (B) Van Ven, (C) După colectare, sedimentul trebuie plasat într-un recipient adecvat (de exemplu, recipient din polipropilenă) cu un strat de apă deasupra, pentru a evita uscarea în timpul transportării

3.3.3. Transportarea probelor

Transportarea probelor la laborator trebuie făcută cât mai curând posibil (24-48 de ore), în recipiente adecvate umplute cu gheață carbonică. Unele antimicrobiene, cum ar fi fluorochinolonele, tetraciclonele și macrolidele, sunt extrem de labile chiar și după congelare. Dacă nu dispuneți de gheață carbonică, umpleți recipientele cu pungi de gheață pentru a menține probele cât mai reci posibil în timpul transportării.

Capitolul 4. Analize moleculare

4.1. Generalități

Scopul acestor investigații este caracterizarea detaliată a comunităților bacteriene și a resistomului, mobilomului și viromului probelor colectate folosind metagenomica. Toate investigațiile se bazează pe extracția corectă a ADN-ului de înaltă puritate și calitate din microbiota acvatică sau sedimentată. Procesarea și transportul probelor sunt menite să mențină integritatea celulelor bacteriene pentru a evita degradarea acizilor nucleici.

4.2. Comunitățile țintă

Proiectul se concentrează pe apă și pe substraturi de sedimente/pat colectate de-a lungul unui transect spațial în ambele CW.

- Comunități-țintă: apă/sedimente/organisme acvatice/substraturi (ZUC Orhei)
- Investigații-țintă: scopul este de a efectua o secvențiere metagenomică pentru a obține secvențe de gene care vor fi apoi supuse procesării bioinformatică pentru a identifica și a cuantifica diferite gene:
 - genele ARNr 16S pentru a caracteriza compoziția comunității bacteriene
 - grupul de gene de rezistență la antibiotice (GRA) din probă (resistomul)
 - grupul de elemente genetice mobile (EGM) din probă (mobilom)
 - grupul de gene virale, pentru a caracteriza compoziția și structura comunităților virale (viromul)

4.3. Colectarea, prelucrarea și depozitarea probelor

Probele trebuie colectate la fiecare loc selectat împreună cu probele destinate analizelor chimice (vezi secțiunile anterioare). Toate recipientele pentru eșantioane vor fi etichetate în mod clar, fără ambiguitate, astfel încât rezultatele analitice ulterioare să poată fi interpretate corect.

Probele pentru analiza moleculară trebuie procesate diferit, în funcție de tipul de eșantion (apă sau sediment), după cum este descris în continuare.

4.3.1. Probe de apă

Apa trebuie colectată la fiecare loc de prelevare, folosind vase sterile din polipropilenă sau din borosilicat cu o capacitate de 1–2 litri (Figura 7).

La punctul de prelevare, sticla se clătește bine cu apa care urmează să fie prelevată (de trei ori). Recipientele se umplu COMPLET (≈ 1.000 ml). Se colectează trei probe la fiecare punct de prelevare. Probele colectate se păstrează (până la expediere) și se transportă la laborator la rece și la întuneric (4°C).

În caz că apele reziduale sunt filtrate, odată ajunse în laborator, un volum cunoscut de apă (1 litru sau volume mai mari (2 litri) pentru a garanta suficient ADN pentru analizele în aval) trebuie filtrat prin membrane cu dimensiunea porilor de $0,2\ \mu\text{m}$ în diametru (ISOPORE $0,2\ \mu\text{m}$ GTTP 47 mm), Millipore, Ref. GTTP04700), folosind un dispozitiv de filtrare adecvat (Figura 8). Replicatele sunt obligatorii (două-trei filtre per probă).

Fiecare filtru trebuie apoi pliat cu grijă și introdus în tuburi Eppendorf sterile de 2 ml (etichetate corespunzător). Filtrele pot fi apoi depozitate la -20°C până la livrarea către laborator.

4.3.2. Probe de sediment

Probele pot fi colectate folosind o lopată sterilă, așa cum s-a recomandat anterior (vezi Secțiunea 3.3.2). Din fiecare probă, 5-10 g de sediment se plasează în flacoane sterile de 15 ml (etichetate corespunzător) care trebuie păstrate pe gheață (în cutie frigorifică portabilă) până la sosirea în laborator. Odată ajunse în laborator, probele pot fi păstrate la -20°C până la expedierea către laborator pentru efectuarea analizelor metagenomice.



Figura 7. Vase sterile din sticlă borosilicată (A) sau din polipropilenă (B).



Figura 8. Filtrarea apei prin membrane de policarbonat de 0,2 μm (ISOPORE), folosind dispozitive standard de filtrare și o pompă de vid

4.4. Transportarea probelor

4.4.1 Expedierea probelor integrale pentru investigații moleculare

Sticlele trebuie plasate într-un recipient adecvat (de exemplu, cutie de spumă, cutie de EPS) umplut cu pungi de gheață pentru a menține probele la rece în timpul transportării (4°C).

4.4.2 Expedierea probelor de ape reziduale filtrate pentru analize moleculare

Filtrele înghețate cu biomasa colectată (tuburi Eppendorf) și mostrele de sedimente înghețate (tuburi Falcon) trebuie expediate la laboratorul de efectuare a investigațiilor metagenomice în containere adecvate și cu gheață carbonică (livrare în 24 de ore pentru a evita decongelarea în timpul transportului). Aceste probe vor fi procesate în laborator pentru a extrage ADN genomic de înaltă puritate și calitate pentru analize metagenomice.

4.5. Extracția și secvențierea metagenomică a ADN-ului

ADN-ul total poate fi extras în trei exemplare din 500 mg de sediment, din 500 mg de intestine de dafnii sau de melci per probă, folosind un kit Fast DNA Spin for Feces (MP Biomedicals), conform instrucțiunilor producătorului. Extracția totală a ADN-ului din apă (filtru) poate fi efectuată conform protocolului pentru kitul DNeasy PowerSoil (Qiagen). Fiecare fil-

tru va fi plasat într-un tub steril de 5 ml, în care va fi transferat conținutul tubului PowerBead și se va adăuga soluție C1. Tuburile cu filtre vor fi apoi așezate pe un vortex sau un bead-beater (MP Biomedicals). Următorii pași de extracție a ADN-ului vor fi efectuați conform instrucțiunilor producătorului. Concentrația și puritatea extractelor de ADN vor fi analizate folosind metode fluorometrice (QUBIT®).

4.6. Izolarea ADN-ului total din bacterii Gram-pozitive, Gram-negative și levuri

Setul descris este conceput pentru izolarea rapidă a ADN-ului genomic pur din orice bacterie Gram-pozitivă, Gram-negativă și din levuri. Anumite specii bacteriene sunt rezistente la lizare, astfel încât pot fi necesare alte enzime suplimentare decât lizozimul. De exemplu, liza stafilococilor este mult mai eficientă la utilizarea lisostafinei. Pentru o liză eficientă a levurilor este necesară zimolaza sau liticaza.

Tabelul 4. Conținutul setului de izolare a ADN-ului

Conținut	50 de pregătiri	150 de pregătiri	Depozitare/ Stabilitate
Tampon BG	1,8 ml	5,4 ml	15-25°C
Lyse BG	33 ml	100 ml	15-25°C
BL *	3 ml	9 ml	- 20°C
RNază A (10 mg/ml)	0,12 ml	0,36 ml	2-8°C
Proteinaza K (20 mg/ml)	0,9 ml	2,7 ml	- 20°C
Soluție BG	21 ml	63 ml	15-25°C
Tampon de spălare BGX	55 ml	165 ml	15-25°C
Eluare	6 ml	18 ml	15-25°C
Coloane de legare ADN	50	3 x 50	15-25°C

* Conține lizozim (20 mg/ml).

4.6.1. Cantitatea maximă de probă

Capacitatea maximă de legare a coloanei pentru ADN este de 25 μg. Pentru a obține cea mai înaltă calitate a ADN-ului, este necesar de a folo-

și culturi bacteriene fie în fază staționară, fie în fază log. Ținând cont de diferențele în caracteristicile de creștere ale bacteriilor și ale speciilor de levuri, se recomandă efectuarea unui test preliminar pentru determinarea cantității optime de pornire. În general, greutatea peletului celular nu trebuie să depășească 50 mg pe o singură minicoloană, iar volumul de cultură nu trebuie să depășească 1,0 ml pe o singură minicoloană. Nu se utilizează mai mult de 1×10^9 celule de levuri per un singur preparat. În cazul obturării minicoloanelor din cauza vâscozității ridicate a lizatului, se reduce cantitatea inițială de bacterii sau de levuri utilizate pentru izolare.

4.6.2. Depozitarea compușilor

Odată despachetat, componentele kitului se păstrează la temperatura camerei, cu excepția tamponului BL (cu lizozim) și a proteinazei K, care trebuie păstrate la -20°C . RNaza A se păstrează la $2-8^{\circ}\text{C}$.

Toate soluțiile trebuie păstrate ermetic închise pentru a evita evaporarea și modificările rezultate ale concentrației componentelor tampon. Pentru a obține un ADN de înaltă calitate, este necesar de a respecta cu rigurozitate protocolul.

4.6.3. Echipamentele și reactivii necesari

Echipamentele necesare: microcentrifugă, mănuși de unică folosință, vârfuri de pipetă sterile, tuburi sterile de 1,5–2 ml, un bloc de încălzire pentru incubare la $30-55^{\circ}\text{C}$.

Reactivii necesari: pentru izolarea simultană a ADN-ului genomic și plasmidic din levuri - etanol [96–100% v/v]; pentru protocolul de levuri – β mercaptoetanol (14,3 M, β ME).

4.6.4. Protocol de cercetare

Partea I. Prepararea și liza celulelor

Bacterii:

1. Se amestecă într-un tub Eppendorf de 1,5 ml:
 - A. 100 μl cultură bacteriană de 24 de ore și 200 μl tampon Lyse BG.
 - Sau:
 - B. Se alege colonia bacteriană direct din placa de geloză și se suspendă în 300 μl tampon Lyse BG.

Sau:

- C. Se creează pelete bacteriene din 0,1–1,5ml de cultură peste noapte prin centrifugare și se descarcă supernatantul, asigurându-se că tot lichidul este îndepărtat complet. Se resuspendează peletele bacteriene în 300 μ l tampon Lyse BG.
 - Pentru a obține un randament maxim de ADN, este esențial să se resuspende complet peletele de celule bacteriene.
 - ADN-ul de cea mai înaltă calitate este obținut din culturi bacteriene, care se află fie în faza logaritmică, fie în faza staționară timpurie.
2. Se adaugă 50 μ l tampon BL și 2 μ l pIRNaza A la suspensia de celule (p. 1.). Se amestecă prin răsturnarea de mai multe ori, pipetare sau vortexare timp de 3 s.
 - Pentru liza eficientă a unor specii bacteriene, pot fi necesare alte enzime decât lizozimul.
3. Se incubează proba la 37°C timp de 15 minute.

Levuri:

1. Se peletează celulele de levuri dintr-un volum adecvat de cultură prin centrifugare (greutatea peletelui nu trebuie să depășească 50 mg). Se păstrează peletele și se aruncă supernatantul, asigurându-se că tot lichidul este îndepărtat complet.

Se resuspendează peletele de levuri în 300 μ l tampon Lyse BG.

- Pentru a obține un randament maxim de ADN, este esențial să fie resuspendate complet celulele de levuri.
 - Datorită caracteristicilor diferite de creștere ale speciilor de levuri, se recomandă efectuarea unui test preliminar pentru determinarea volumului optim de pornire. Greutatea peletelui nu trebuie să depășească 50 mg pe o minicoloană. Nu se utilizează mai mult de 1×10^9 celule de levuri pentru o singură preparare.
 - Se adaugă 1 μ l de β -mercaptoetanol (β -ME) per 1 ml Lyse BG înainte de utilizare. Lyse BG este stabilă timp de 1 lună după adăugarea β -ME.
2. Se centrifughează timp de 1 min la 11 000 xg, se aruncă supernatantul și se resuspendează din nou peletele de levuri în 250 μ l tampon Lyse BG. Se amestecă cât mai bine prin pipetare.

3. Se adaugă enzima adecvată (de exemplu, liticaza) și 2 μ l Rnaza A la peletele resuspendat. Se amestecă bine și se incubează la 30°C timp de 30 min.

- 50U liticăză/zimolază per 1 x 10⁷ celule. Volumul maxim de enzimă adăugat nu poate depăși 50 μ l.

Partea a II-a. Izolarea ADN-ului

1. Se adaugă 15 μ l proteinaza K la peletele celular resuspendat. Se amestecă prin răsturnare de mai multe ori sau prin vortexare timp de 3 s.

2. Se incubează proba la 55°C timp de 30 min.

- Pe durata incubației, proba se amestecă răsturnând ocazional tubul de mai multe ori.

3. Se adaugă 350 μ l tampon Sol. BG. Se amestecă prin răsturnare de mai multe ori sau prin vortexare timp de 3 s.

4. Se incubează proba la 55°C timp de 5 min.

5. Se vortexează proba timp de 15 s.

6. Se centrifughează lizatul timp de 2 min la 11 000 x g și se transferă cu atenție până la 600 μ l de supernatant limpede într-o coloană spin de legare a ADN-ului.

7. Se centrifughează timp de 1 min la 11 000 xg. Se scoate coloana de centrifugare, se aruncă fluxul și se lipește coloana de centrifugare înapoi pe tubul de colectare.

8. Se transferă amestecul rămas în aceeași coloană spin de legare a ADN-ului și se centrifughează la 11 000 x g timp de 1 min. Se scoate coloana de centrifugare, se toarnă supernatantul și se pune înapoi în tubul receptor.

9. Se adaugă 450 μ l de tampon de spălare BGX și se centrifughează la 11 000xg timp de 1 min.

10. Se scoate coloana de centrifugare, se aruncă fluxul și se lipește coloana de centrifugare înapoi pe tubul de colectare.

11. Se adaugă 450 μ l de tampon de spălare BGX și se centrifughează la 11 000 xg timp de 1 min.

12. Se scoate coloana de centrifugare, tamponul de spălare BGX și se centrifughează la 11 000 xg timp de 1 min.

13. Se rotește la 11 000 x g timp de 1 min pentru a elimina urmele soluției tampon de spălare BGX.

14. Se pune coloana de centrifugare în noul tub receptor (1,5–2 ml) și se adaugă 50–100 μ l de tampon de eluare pentru eluarea ADN-ului legat.

- Adăugarea tamponului de eluare direct pe centrul rășinii îmbunătățește randamentul ADN. Pentru a evita transferul de urme de ADN între coloanele de spin, nu se permite atingerea pereților coloanei de spin cu micropipeta.
- Pentru a îmbunătăți eficiența eluării ADN-ului genomic din membrană, tamponul de eluare poate fi încălzit la temperatura de 80°C.

15. Se incubează coloana spin de legare a ADN-ului/ansamblu tub de colectare timp de 2 min la temperatura camerei.

16. Se centrifughează timp de 1 min la 11 000 xg.

17. Se scoate coloana de rotire, se acoperă tubul receptor. ADN-ul genomic este pregătit pentru a fi investigat. Poate fi păstrat fie la 2–8°C (de preferință), fie la -20°C (a se evita congelarea și decongelarea multiplă a ADN-ului).

Protocolul de purificare a ADN-ului genomic și plasmidic al levurilor

Acest protocol este pentru izolarea simultană a ADN-ului genomic și plasmidic din levuri:

1. Se aplică 30 μ l de tampon de activare BG în coloana de centrifugare (a nu se centrifuga) și se păstrează la temperatura camerei până când se transferă lizatul în coloana de centrifugare (pentru cele mai bune rezultate cel puțin 15 min).

- Adăugarea de tampon BG în centrul rășinii permite umezirea completă a membranelor și legarea maximă a ADN-ului.
- Activarea membranei trebuie făcută înainte de a începe procedura de izolare.

2. Se prepară peletele din celule de levuri dintr-un volum adecvat de cultură (greutatea peletului nu trebuie să depășească 50 mg) prin centrifugare și se aruncă supernatantul, asigurându-se că tot lichidul este îndepărtat complet. Se resuspendează peletele de levuri în 300 μ l tampon Lyse BG.

- Pentru o izolare mai bună, este esențială resuspenderea completă a celulelor de levuri.

- Ținând cont de caracteristicile diferite de creștere ale speciilor de levuri, se recomandă efectuarea unui test preliminar pentru determinarea volumului optim de pornire. Greutatea peletului nu trebuie să depășească 50 mg pe o minicolană. A nu se utiliza mai mult de 1 x 10⁹ celule de levuri pentru o singură preparare.
- Se adaugă 1 μl de β-mercaptoetanol (β-ME) per 1 ml Lyse BG înainte de utilizare. Lyse BG este stabil timp de 1 lună după adăugarea β-ME.

3. Se centrifughează timp de 1 min la 11 000 x g, se aruncă supernatantul și se resuspendează din nou peletul de levuri în 225 μl tampon Lyse BG. Se amestecă cât mai bine prin pipetare.

4. Se adaugă enzima adecvată (de exemplu, liticaza) și 2 μl RNaza A la peletul resuspendat. Se amestecă bine și se incubează la 30°C timp de 30 min.

- 50U liticaza/zimolaza per 1 x 10⁷ celule. Volumul maxim de enzimă adăugată nu poate depăși 50 μl.

5. Se adaugă 15 μl proteinaza K la peletele celular resuspendat. Se amestecă prin răsturnarea de mai multe ori sau prin vortexare timp de 3 s.

6. Se incubează proba la 55 °C timp de 30 min.

7. Se adaugă 225 μl tampon Sol BG și se amestecă prin răsturnarea de mai multe ori sau prin vortexare timp de 3 s.

8. Se incubează proba la 55 °C timp de 5 min.

9. Se vortexează proba timp de 15 s.

10. Se centrifughează lizatul timp de 2 min la 11 000 x g și se transferă supernatantul într-un alt tub de 2 ml.

11. Se adaugă 250 μl etanol (96–100%) la probă și se amestecă bine prin agitare în vortex.

- Se poate forma un precipitat după adăugarea de etanol.

12. Se aplică până la 600 μl de probă, inclusiv orice precipitat, la coloana spin de legare a ADN-ului plasată într-un tub de colectare de 2 ml.

13. Se centrifughează timp de 1 min la 11 000 x g. Se scoate coloana de centrifugare, se aruncă fluxul și se lipește coloana de centrifugare înapoi pe tubul de colectare.

14. Se transferă amestecul rămas în aceeași coloană spin de legare a ADN-ului și se centrifughează la 11 000 x g timp de 1 min. Se scoate

coloana de centrifugare, se toarnă supernatantul și se pune înapoi în tubul receptor.

15. Se adaugă 450 μ l de tampon de spălare BGX și se centrifughează la 11 000 xg timp de 1 min. Se scoate coloana de centrifugare, se toarnă supernatantul și se pune înapoi în tubul receptor.

16. Se adaugă 450 μ l de tampon de spălare BGX și se centrifughează la 11 000 xg timp de 1 min. Se scoate coloana de centrifugare, se toarnă supernatantul și se pune înapoi în tubul receptor.

17. Se rotește la 11 000 xg timp de 1 min pentru a elimina urmele tamponului de spălare BGX.

18. Se pune coloana de centrifugare în noul tub receptor (1,5–2 ml) și se adaugă 50–100 μ l de tampon de eluare pentru eluarea ADN-ului legat.

- Adăugarea tamponului de eluare direct pe centrul rășinii îmbunătățește randamentul ADN. Pentru a evita transferul de urme de ADN între coloanele de spin, nu se permite atingerea pereților coloanei de spin cu micropipeta.
- Pentru a îmbunătăți eficiența eluării ADN-ului genomic din membrană, tamponul de eluare poate fi încălzit la o temperatură de 80°C.

19. Se incubează ansamblul coloană rotativă/tub receptor timp de 2 min la temperatura camerei.

20. Se centrifughează timp de 1 min la 11 000 x g.

21. Se scoate coloana de rotire, se acoperă tubul receptor. ADN-ul genomic este pregătit pentru investigații. Poate fi păstrat fie la 2–8°C (de preferință), fie la -20°C (a se evita înghețarea și decongelarea multiplă a ADN-ului).

Capitolul 5.

Caracteristici-cheie ale zonelor umede construite pentru eliminarea maximă a micropoluantilor

Îndepărtarea micropoluantilor din apele uzate de către ZUC a fost studiată și revizuită pe larg în ultimii ani. Cu toate acestea, majoritatea studiilor nu se concentrează pe eliminarea micropoluantilor din effluentul stațiilor de tratare a apelor uzate (STAU) convenționale, care încă mai conține micropoluanti, ci pe îndepărtarea micropoluantilor din apele uzate brute. Apa uzată brută are o compoziție semnificativ diferită față de effluentul STAU, care afectează pozitiv sau negativ mecanismele de îndepărtare a micropoluantilor.

Micropoluantii, cum ar fi produsele farmaceutice, pesticidele și substanțele chimice industriale, sunt omniprezenți în apele de suprafață din întreaga lume în concentrații variind de la pg/L- μ g/L. Prezența lor în mediu s-a dovedit a avea efecte adverse asupra sănătății ecosistemelor și a oamenilor. O sursă majoră de micropoluanti în apele de suprafață este evacuarea apelor uzate epurate municipale, deoarece conțin micropoluanti care nu sunt îndepărtați în timpul epurării convenționale a acestora. Tratarea convențională a apelor uzate municipale constă, în general, într-o combinație de epurare fizică și/sau chimică primară pentru separarea solidelor, tratare biologică secundară pentru îndepărtarea nutrienților și a materiei organice, și tratament terțiar fizic și/sau chimic pentru îndepărtarea suplimentară a nutrienților și a solidelor în suspensie. Uniunea Europeană recunoaște amenințarea pe care o reprezintă micropoluantii pentru mediu și a elaborat directiva de tratare a apelor uzate (Directiva Consiliului 91/271/CEE) ce conține mai mulți poluanți care trebuie controlați strict în apele de suprafață și subterane, inclusiv micropoluanti, cum ar fi pesticidele, produsele farmaceutice, antibioticele și PFAS. Drept urmare, mai multe țări au dezvoltat strategii pentru a preveni eliberarea de micropoluanti în mediu prin intermediul effluentilor din stația de tratare a apelor uzate, inclusiv noi tehnologii pentru tratarea cuaternară. Exemple de tehnologii de succes pentru eliminarea micropoluantilor din effluentii STAU sunt cele bazate pe adsorbție, pe oxidare și pe membrane.

Tehnologiile bazate pe adsorbție, cum ar fi cărbunele activat granular, au demonstrat o eficiență ridicată de îndepărtarea micropoluantilor din STAU efluent în experimentele pilot la scară mare. Tehnologiile bazate pe oxidare, cum ar fi ozonarea și combinația de lumină ultravioletă și H_2O_2 , de asemenea au manifestat o eficiență înaltă la îndepărtarea micropoluantilor din efluentul stației de epurare în timpul investigațiilor pilot la scară mică și mare. Combinația ambelor tehnologii a fost folosită pentru a depăși dezavantajele tehnologiilor luate în parte, cum ar fi formarea de produse toxice de transformare cu ozonare sau saturarea capacității de adsorbție cu cărbune activat.

Tehnologiile pentru îndepărtarea îmbunătățită a micropoluantilor pot fi, de asemenea, integrate în etapa secundară sau terțiară de tratare a apei uzate. De exemplu, prin adăugarea de cărbune activat granular la bioreactoarele cu membrană s-a constatat că implementarea tratamentului cuaternar sub formă de adsorbție cu cărbune activat sau ozonare, sau combinarea ambelor metode pentru toate stațiile de epurare din Europa cu o capacitate de 100 000 de echivalent personal sau mai mult ar avea ca rezultat scăderea debitului toxic cumulativ de micropoluantți aproximativ cu 40%. Dezvoltarea recentă a noilor materiale membranare a dus la aplicarea nanofiltrării pentru îndepărtarea micropoluantilor. Cu toate acestea, metoda de filtrare are unele dezavantaje tehnologice, cum ar fi necesitatea pretratării apei pentru a preveni murdărirea membranei și pentru a asigura o bună funcționare și producerea unui flux rezidual cu concentrații mari de micropoluantți care trebuie evacuați. Aceste metode (adsorbția, oxidarea și filtrarea) necesită pentru funcționare o cantitate considerabilă de energie și/sau materiale utilizate.

Dezvoltarea și utilizarea unor metode mai ecologice pentru a elimina micropoluantții din apele uzate tratate va reduce consumul de energie și a consumabilelor.

O soluție ecologică pentru tratarea apelor uzate este utilizarea ZUC în care procesele de îndepărtare și eliminare a poluanților cum ar fi biodegradarea, adsorbția, filtrarea, adsorbția de către plante și fotodegradarea, au loc simultan. CW elimină micropoluantții din apele uzate și multe studii recente s-au concentrat pe identificarea mecanismelor dominante de îndepărtare, a parametrilor de mediu, a caracteristicilor chimice ale micropoluant-

ților și a modelelor optime de ZUC legate de eliminarea micropoluantilor.

Majoritatea studiilor din literatura științifică disponibilă despre eliminarea micropoluantilor din ZUC se concentrează pe tratarea de către acestea a apelor uzate menajere netratate. Aceste ape, la fel ca și cele brute, au o compoziție semnificativ diferită față de apele uzate tratate, în ele fiind mai mare concentrația de substanțe organice, de azot, de fosfați și de micropoluanti. De obicei, apele uzate menajere netratate conțin aproximativ 140 mg/L TOC, 7 mg/LP și 40 mg/LN. Noua Directivă a UE privind tratarea apelor uzate urbane prescrie cerințe de calitate a apei pentru evacuarea efluentului tratat de 37 mg/L TOC, 0,5 mg/LP și 6 mg/LN. Matricele diferite de apă pot avea atât un impact pozitiv, cât și negativ asupra mecanismelor de îndepărtare a micropoluantilor dintr-o ZUC și a performanței hidraulice a sistemului, de exemplu, în ceea ce privește înfundarea substratului. Prin urmare, pentru o proiectare optimă a ZUC pentru eliminarea micropoluantilor din efluentul STAU, este important să se evalueze numai ZUC utilizate pentru îndepărtarea micropoluantilor din efluentul STAU.

Eficiența de îndepărtare a micropoluantilor este determinată pe baza unei selecții de micropoluanti care trebuie să îndeplinească următoarele criterii pentru a putea funcționa ca un micropoluant indicator adecvat:

- Micropoluantul este detectat în mod obișnuit în afluentul stațiilor de epurare.
- Micropoluantul este detectat frecvent în efluentul secundar STAU
- O stație de epurare convențională fără tratament terțiar are o eficiență de eliminare mai mică de 50% pentru micropoluant.
- Ozonarea sau adsorbția cu cărbune activat îndepărtează >70% din micropoluanti din efluentul STAU.

ZUC-urile pot îndepărta micropoluanti din efluentul STAU în 80-100%, în special la cele cu substraturi cu adsorbție îmbunătățite organic, comparabile cu cele ale tehnologiilor convenționale de posttratare; ozonare și adsorbție cu cărbune activat.

Pentru a determina designul optim al ZUC pentru posttratarea efluentului STAU în vederea eliminării suplimentare a micropoluantilor, a fost analizată eliminarea de către diferite tipuri de ZUC a 16 micropoluanti. Rezultatele obținute arată că sistemele de ZUC cu substraturi de adsorbție îmbunătățite organic ating cea mai mare eficiență de îndepărtare a micropo-

luanților ca urmare a adsorbției, dar longevitatea efectului nu este cunoscută. Biodegradarea aerobă și fotodegradarea sunt alte mecanisme relevante de îndepărtare a micropoluantilor studiați. La moment nu se cunoaște dacă aerarea activă pentru a stimula biodegradarea aerobă a micropoluantilor are ca rezultat o eliminare crescută a micropoluantilor din effluentul STAU.

Aplicarea mai largă a sistemelor de ZUC pentru îndepărtarea micropoluantilor din effluentul STAU și compararea echitabilă cu alte tehnologii de posttratare pentru îndepărtarea îmbunătățită a micropoluantilor este târăgănată din cauza neelucidării dilemei la ce se referă ozonarea și adsorbția cu cărbune activat: 1) saturația îmbunătățită a substratului de adsorbție; 2) analiza produselor de transformare și a efectelor biologice; 3) perspective asupra relației dintre compoziția comunității microbiene și biodegradarea micropoluantilor; 4) absorbția de către plante și degradarea micropoluantilor în plante; 5) stabilirea regulilor de proiectare pentru ratele de încărcare hidraulică adecvate și/sau timpii de retenție hidraulică pentru ZUC dedicate eliminării micropoluantilor din effluentul STAU și 6) amprenta energetică și de carbon a diferitor sisteme ZUC. Această analiză se încheie cu sugestii detaliate pentru direcțiile viitoare de cercetare care ar oferi răspunsuri la aceste lacune în cunoștințe.

Bibliografie:

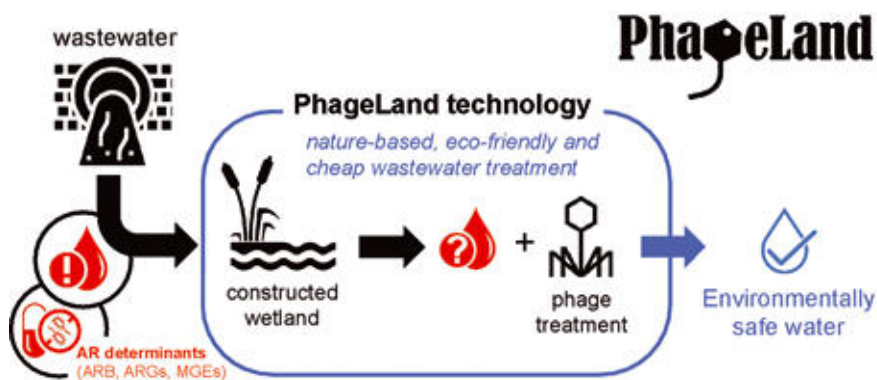
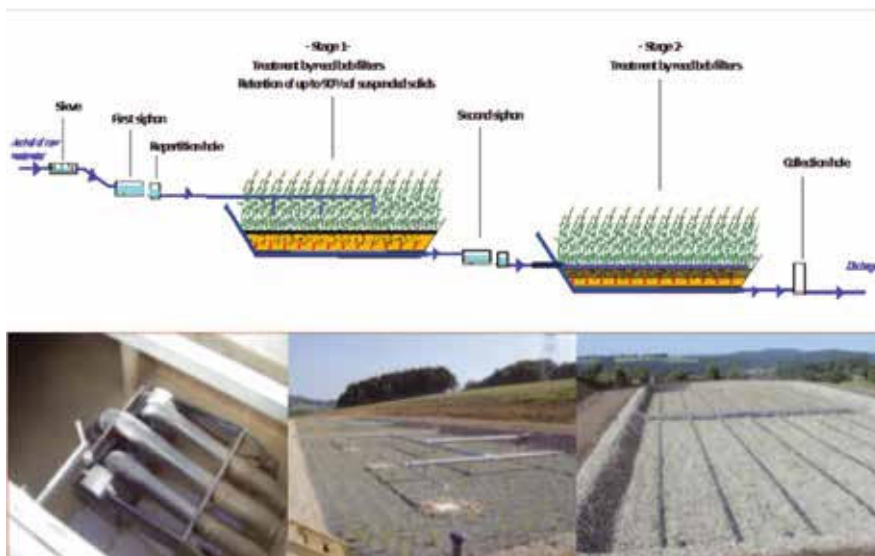
1. Avila, C., Garcia-Galan, M.J., Borrego, C.M., Rodriguez-Mozaz, S., Garcia, J., Barcelo, D. New insights on the combined removal of antibiotics and ARGs in urban wastewater through the use of two configurations of vertical subsurface flow constructed wetlands. *Sci. Total Environ.* 2021, 755, 142554.
2. Bălan G. Compuși noi cu acțiune asupra microorganismelor izolate din ulcere trofice: tz. de doct. hab. în medicină. Chișinău, 2022. 283p.
3. Burduniuc O. Produse inovatoare cu acțiune antifungică asupra unor agenți cauzali ai micozelor umane: tz. de doct. hab. în medicină. Chișinău, 2023. 383p.
4. Ciobanu E, Croitoru C, Balan G, Bernic V, Burduniuc O, Ferdohleb A. “Phage treatment and wetland technology as intervention strategy to prevent dissemination of antibiotic resistance in surface waters” - a project launch in Low-Middle Income countries of Eastern Europe. One Health & Risk Management. In: Abstract material National Scientific Conference with International participation „Water and health: achievements and challenges,” March 2022. Chisinau, 2022; 3 (issue 2-S), p. 28.
5. Ciobanu E, Croitoru C, Ferdohleb A. Fenomenul de rezistență la antibiotice în țările cu venituri mici și mijlocii: prin prisma instrumentului „Cunoștințe, Atitudini și Practici ale medicilor”. În: Conferința „Yesterday’s cultural heritage – contribution to the development of tomorrow’s sustainable society” edition-7, Chișinău, Moldova, 9-10 februarie 2023. Chișinău, 2023, p.190-191.
6. Conte, G., Bolognesi, A., Bragalli, C., Branchini, S., De Carli, A., Lenzi, C., Masi, F., Massarutto, A., Pollastri, M., Principi, I. Innovative Urban Water Management as a Climate Change Adaptation Strategy: Results from the Implementation of the Project. *Water Against Climate Change (WATACLIC)*. *Water*, 2012, 4(4), p.1025-1038.
7. Conte, G., Martinuzzi, N., Giovannelli, L., Pucci, B., Masi, F. Constructed wetlands for wastewater treatment in central Italy. *Water Science & Technology*. 2001, vol. 44, n. 11-12, p.339-343.

8. Croitoru C, Bălan G, Burduniuc O. Gram-negative microorganisms, infectious diseases, and the relationship to climate change. In: Studii și Cercetări de Antropologie. 2023; 8, p.30-30.
9. Croitoru C, Ciobanu E. Ghid de bune practici: Alimentație rațională, siguranța alimentelor și schimbarea comportamentului alimentar. Chișinău, 2019, 160 p.
10. Curteanu M, Ciobanu E. Bottled drinking water consumption in LMICs. In: Studii și Cercetări de Antropologie. 2023; 8, p.32.
11. Ferdohleb A, Croitoru C, Ciobanu E, Spinei L. Health-related quality of life and the impact of antimicrobial resistance. In: Studii și Cercetări de Antropologie. 2023; 8, p. 31.
12. Ferdohleb A, Iaconi OS, Galben L. The public health problem and resistant bacteria in low-and middle-income countries. In: One Health & Risk Management. 2023, Special Edition: November, p.18.
13. Ferdohleb A. Calitatea vieții populației din țările cu venituri mici și medii estimate cu instrumente standardizate. In: Sănătatea, medicina și bioetica în societatea contemporană: studii inter și pluridisciplinare: Materialele Conferinței Științifice Internaționale, ediția a VI-a, 6-7 octombrie 2023. Chișinău, 2023, p. 278-284.
14. Gajewska, M., Józwiakowski, K., Ghrabi, A., Masi, F. Impact of Influent Wastewater Quality on Nitrogen Removal Rates in Multistage Treatment Wetlands. Environmental Science and Pollution Research. 2015, p.12840-12848. doi:10.1007/s11356-014-3647-4.
15. Garf, M., Flores, L., Ferrer, I. Life cycle assessment of wastewater treatment systems for small communities: Activated sludge, constructed wetlands and high rate algal ponds. J. Clean. Prod. 2017, 161, p.211-219.
16. GeneMATRIX Bacterial & Yeast Genomic DNA Purification Kit. Universal kit for isolation of total DNA from bacteria Gram +, Gram - and yeast. Cat. no. E3580
17. Ghrabi, A., Bousselmi, L., Masi, F., Regelsberger, M. Constructed wetland as a low cost and sustainable solution for wastewater treatment adapted to rural settlements: the Chorfech wastewater treatment

- pilot plant. *Water Science & Technology*. 2011, 63(12), 3006-3012.
18. He, Y., Zhang, L., Jiang, L., Wagner, T., Sutton, N.B., Ji, R., Langenhoff, A.A.M. Improving removal of antibiotics in constructed wetland treatment systems based on key design and operational parameters: a review. *J. Hazard. Mater.* 2021, 407, 124386.
 19. ISO 5667-6:1990 Calitatea apei – Eșantionare, Partea 6: îndrumări privind prelevarea de probe pentru râuri și pâraie.
 20. Iunac D, Galben L, Ferdohleb A, Balan G. Mecanisme de rezistență la antimicrobiene a tulpinilor de *Staphylococcus aureus*: sinteză narativă. In: *Sănătate Publică, Economie și Management în Medicină*. 2023; 95(2), p. 38-43.
 21. Iunac D, Galben L, Ferdohleb A, Bălan G. Antimicrobial resistance phenotypes of *Staphylococcus aureus* strains in the Republic of Moldova. In: *Studii și Cercetări de Antropologie*. 2023; 8: 48-48.
 22. Lazăr C, Tagadiuc O, Ferdohleb A. Rolul strategiilor alternative de combatere a rezistenței la antimicrobiene. In: *One Health & Risk Management*. 2023, nr. 1(S), p. 56.
 23. Lazăr C, Tagadiuc O. The phage therapy against antibiotic-resistant bacteria. In: *Studii și Cercetări de Antropologie*. 2023; 8, p. 54.
 24. Liqueste, C., Udias, A., Conte, G., Grizzetti, B., Masi, F. Integrated valuation of a nature-based solution for water pollution control. Highlighting hidden benefits. *Ecosystem Services*. 2016, 22, p. 392-401.
 25. Llorca, M., Gros, M., Rodríguez-Mozaz, S., Barceló, D. Sample preservation for the analysis of antibiotics in water. *Journal of Chromatography A*. 2014, 1369, p. 43-51.
 26. Masi, F., Bresciani, R., Martinuzzi, N., Cigarini, G. and Rizzo, A. Large scale application of French reed beds: municipal wastewater treatment for a 20,000 inhabitants town in Moldova. *Water Science and Technology*. 2017, 76 (1), p. 68-78.
 27. Masi, F., Bresciani, R., Rizzo, A., Conte, G. Constructed wetlands for combined sewer overflow treatment: Ecosystem services at Gorla Maggiore, Italy. *Ecological Engineering*. 2017, Volume 98, p. 427-438.
 28. Meyer, D., Molle, P., Esser, D., Troesch, S., Masi, F., Dittmer, U. Con-

- structed Wetlands for Combined Sewer Overflow Treatment-Comparison of German, French and Italian Approaches. *Water*. 2013, 5(1), p. 1-12.
29. Pîsla M, Bahnarel I, Ferdohleb A. Experiența și bunele practici ale țărilor Uniunii Europene în domeniul fortificării serviciilor de sănătate ocupațională. In: *Sănătate Publică, Economie și Management în Medicină*. 2014; 54(3), p. 24-29.
 30. Raport tehnic - 2010 - 041 Strategia comună de implementare a directivei-cadru privind apa (2000/60/ec) document de orientare nr. 25 privind monitorizarea chimică a sedimentelor și a biotei în conformitate cu directiva-cadru privind apa.
 31. Sampling Protocols FOR CHEMICAL and MOLECULAR ANALYSES. JPIAMR Call on “One Health interventions to prevent or reduce the development and transmission of AMR” Project “PhageLand – Phage treatment and wetland technology as intervention strategy to prevent dissemination of antibiotic resistance in surface waters” (JPIAMR, PCI2021-122109-2A).
 32. Scheumann, R., Masi, F., El Hamouri, B., Kraume, M. Greywater treatment as an option for effective wastewater management in small communities. *Desalination and Water Treatment*. 2009, 4, p. 33-39.
 33. Sireșteanu, D., Ciubotaru, I., Vacarciuc, C., Aga, A., Anton, I. Zonele umede construite implementate în Republica Moldova o simplă soluție de epurare naturală a apelor uzate. *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale*, 2013, 5(41), p. 232-233.
 34. Spinei L, Ciobanu E, Balan G, Croitoru C, Tapu L, Ferdohleb A. Rolul strategiilor alternative de combatere a rezistenței la antimicrobiene. In: *One Health & Risk Management*. 2023, nr. 1(S), p. 43.
 35. STOWA 2021. The innovation program removal of micropollutants at wastewater treatment plants: The state of affairs autumn 2021. Disponibil <https://www.stowa.nl/sites/default/files/assets/pdf>
 36. Wu, S., Wallace, S., Brix, H., Kuschik, P., Kipkemoi Kirui, W., Masi, F., Dong, R. Treatment of industrial effluents in constructed wetlands: Challenges, operational strategies and overall performance. *Environmental Pollution*. 2015, 20, p. 107-120.

VF ZUC cu configurație cu sifon





**Catalan Institute for Water Research,
Department of Water Quality,
Spain Coordinator country**



**University of Warsaw,
Faculty of Microbiology,
Institute of Microbiology, Dept. of
Environmental Microbiology and
Biotechnology, Poland**



**Warsaw University of Life Sciences,
Department of Biochemistry
and Microbiology, Poland**



**KU Leuven, Laboratory of
Gene Technology,
Leuven, Belgium**

PARTNERS



**Delft University of Technology,
Department of Biotechnology,
the Netherlands**



**Quadram Institute Bioscience,
Norwich Research Park,
Rosalind Franklin Road, Norwich,
the United Kingdom**



**Nicolae Testemitanu State University
of Medicine and Pharmacy,
National Institute for Health
and Medical Research,
Republic of Moldova**

Descrierea CIP a Camerei Naționale a Cărții din Republica Moldova

Metode de prelevare a probelor din apele reziduale în zonele umede construite: analiza chimică, moleculară și microbiologică : / Greta Bălan, Carolina Lozan-Tirșu, Vladimir Bernic, Alina Ferdohleb; Universitatea de Stat de Medicina și Farmacie “Nicolae Testemițanu”. – Chișinău : [S. n.], 2023 (Print-Caro). – 44 p. : fig., tab.

Aut. indicați pe verso f. de tit. – Bibliogr.: p. 38-41 (36 tit.). – [200] ex.

ISBN 978-9975-175-72-2.

628.35:614.777

M 61

Tipografia Print Caro, mun. Chișinău, str. Columna, 170
email: printcaro@gmail.com



JPIAMR-ACTION Joint Transnational Call for Proposals 2021
One Health interventions to prevent or reduce the development
and transmission of antimicrobial resistance", 2022-2025.