



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΔΗΜΟΣΙΑΣ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΠΟΛΙΤΙΚΩΝ ΔΗΜΟΣΙΑΣ ΥΓΕΙΑΣ

ΠΜΣ «ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΕΙΑ» 2020-2021

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Μικροβιολογικές αναλύσεις υδάτων κολυμβητικών
δεξαμενών με προτυποποιημένες (ISO) μεθόδους»**

Συγγραφέας:

Κουβέλη Ευαγγελία, Βιολόγος

A.M.: ΜΕΡΥ20013

Επιβλέπουσα:

Μανδηλαρά Γεωργία

Αθήνα, Μάρτιος 2022



UNIVERSITY OF WEST ATTICA
SCHOOL OF PUBLIC HEALTH
DEPARTMENT OF PUBLIC HEALTH POLICY
MSc “OCCUPATIONAL AND ENVIRONMENTAL HEALTH” 2020-2021

DIPLOMA THESIS

**“Microbiological testing of swimming pool waters applying
standardized (ISO) methods”**

Author:

Kouveli Evangelia, Biologist

R.N.: MEPY20013

Supervisor:

Mandilara Georgia

Athens, March 2022



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΔΗΜΟΣΙΑΣ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΠΟΛΙΤΙΚΩΝ ΔΗΜΟΣΙΑΣ ΥΓΕΙΑΣ

ΠΜΣ «ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΕΙΑ» 2020-2021

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Μικροβιολογικές αναλύσεις υδάτων κολυμβητικών
δεξαμενών με προτυποποιημένες (ISO) μεθόδους»**

Μέλη Εξεταστικής Επιτροπής συμπεριλαμβανομένου και του Εισηγητή

Η Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία εξετάστηκε επιτυχώς από την κάτωθι
Εξεταστική Επιτροπή:

Α/Α	ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ	ΒΑΘΜΙΔΑ/ΙΔΙΟΤΗΤΑ	ΨΗΦΙΑΚΗ ΥΠΟΓΡΑΦΗ
1	Μανδηλαρά Γεωργία	Επίκουρη Καθηγήτρια (Επιβλέπουσα)	
2	Βατόπουλος Αλκιβιάδης	Καθηγητής	
3	Δαμκούκα Ιωάννα	Επίκουρη Καθηγήτρια	

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Κουβέλη Ευαγγελία του Δημητρίου, με αριθμό μητρώου ΜΕΡΥ20013, φοιτήτρια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Επαγγελματική και Περιβαλλοντική Υγεία» του Τμήματος Πολιτικών Δημόσιας Υγείας της Σχολής Δημόσιας Υγείας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της, είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς, είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Η Δηλούσα



.....

Copyright © Κουβέλη Ευαγγελία, 2022

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο των απαιτήσεων του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών στην Επαγγελματική και Περιβαλλοντική Υγεία του Τμήματος Πολιτικών Δημόσιας Υγείας της Σχολής Δημόσιας Υγείας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής. Η έγκρισή της δεν υποδηλώνει απαραίτητα και την αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα εκ μέρους του Τμήματος Πολιτικών Δημόσιας Υγείας.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Το μεγάλο μου ενδιαφέρον για θέματα σχετικά με τη διαχείριση των υδάτινων πόρων, τον έλεγχο υδατογενών νοσημάτων μέσω της παρακολούθησης της μικροβιολογικής ποιότητας του νερού, με απώτερο σκοπό την προστασία της Δημόσιας Υγείας, αποτέλεσε το έναυσμα για την επιλογή του θέματος της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Στο σημείο αυτό, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όσους συνέβαλαν στη δημιουργία και ολοκλήρωσή της. Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα μου, την κυρία Μανδηλαρά Γεωργία, Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας Δημόσιας Υγείας-Μοριακής Μικροβιολογίας, η οποία με καλωσόρισε από την πρώτη μέρα στη Μονάδα Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας, με έκανε να νιώσω ευπρόσδεκτη και σίγουρη ότι θα αποκομίσω πολλές γνώσεις και εμπειρία από τη συνεργασία μας. Νιώθω πολύ τυχερή που η καθηγήτριά μου συμφώνησε να ασχοληθώ με ένα θέμα που είχε και πειραματικό μέρος, πέραν της βιβλιογραφικής αναζήτησης. Την ευχαριστώ θερμά για τη συνεχή καθοδήγηση, τις συμβουλές, την απεριόριστη καλοσύνη της, τη βοήθεια και το ενδιαφέρον της.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην κυρία Μιχαλοπούλου Διαμάντω, Τεχνολόγο Ιατρικών Εργαστηρίων και στην κυρία Παναγιωτίδου Έμιλυ, Υποψήφια Διδάκτωρ του ΕΚΠΑ, για την άψογη συνεργασία που είχαμε. Χωρίς τη βοήθειά τους, το αμέριστο ενδιαφέρον, τις γνώσεις τους και την ουσιώδη εκπαίδευση που μου παρείχαν ως προς τις τεχνικές και τις ορθές πρακτικές εργασίας στο χώρο του εργαστηρίου, η παρούσα διπλωματική εργασία δε θα μπορούσε να είχε ολοκληρωθεί.

Ειδικές ευχαριστίες στη Δρ. Παππά Όλγα για τις πολύτιμες συμβουλές και την επιστημονική καθοδήγηση κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων, αλλά και για την παραχώρηση του πρότυπου στελέχους *P. aeruginosa* με εγγενή αντοχή σε CTX, TIC, TCC.

Με αυτήν την εργασία, ολοκληρώνεται και ένας κύκλος της ζωής μου, που ξεκίνησε όταν έγινα αποδεκτή στο ΠΜΣ ΕΠΥ τον Οκτώβριο του 2020. Στο πλαίσιο αυτό, οφείλω να πω μέσα από την καρδιά μου ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου που πλέον είναι μεγαλύτερη, καθώς με στήριζε ανέκαθεν σε κάθε μεγάλη απόφαση που έπαιρνα στη ζωή μου. Τα τελευταία 2 χρόνια ήταν αρκετά

πρωτόγνωρα, και οι δικοί μου άνθρωποι ήταν πάντα στο πλευρό μου να με βοηθούν με κάθε τρόπο, για να μη σταματήσω να ελπίζω ότι κάποια μέρα τα όνειρά μου θα πραγματοποιηθούν. Και στα επόμενα όνειρα που έχουμε, πάντα μαζί!

Αφιερωμένο στον άνθρωπό μου, τον Dennis.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	v
ABSTRACT	vii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	ix
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	xi
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1. ΟΡΙΣΜΟΙ-ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΚΟΛΥΜΒΗΤΙΚΩΝ ΔΕΞΑΜΕΝΩΝ	1
2. ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ ΚΟΛΥΜΒΗΤΙΚΩΝ ΔΕΞΑΜΕΝΩΝ	3
3. ΒΑΣΙΚΕΣ ΕΝΝΟΙΕΣ ΣΤΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ	7
3.1. Ορισμοί	7
3.2. Κατηγορίες θρεπτικών υποστρωμάτων	8
3.2.1. Ως προς τη στερεότητα.....	8
3.2.2. Ως προς τη χημική σύσταση.....	9
3.2.3. Ως προς τα είδη μικροοργανισμών που αναπτύσσονται	9
3.3. Διάκριση βακτηρίων	9
3.3.1. Χρώση κατά Gram	9
3.3.2. Τεστ οξειδάσης.....	11
3.4. Μικροβιακή αντοχή στα αντιβιοτικά	12
4. ΠΑΘΟΓΟΝΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΚΟΛΥΜΒΗΤΙΚΩΝ ΔΕΞΑΜΕΝΩΝ ..	15
4.1. Ιοί	16
4.1.1. Αδενοϊοί	16
4.1.2. Νοροϊοί.....	17
4.1.3. Ιός Ηπατίτιδας Α	17
4.2. Παράσιτα.....	18
4.2.1. Κρυπτοσπορίδιο	19
4.2.2. <i>Giardia lamblia</i>	21

4.2.3. Αμοιβάδες του γένους <i>Naegleria</i> και <i>Acanthamoeba</i>	23
4.3. Βακτήρια	24
4.3.1. Κοπρανώδους προέλευσης - <i>Shigella spp.</i>	24
4.3.2. Μη κοπρανώδη παθογόνα βακτήρια - <i>Legionella spp.</i>	25
5. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΥΔΑΤΩΝ ΚΟΛΥΜΒΗΤΙΚΩΝ ΔΕΞΑΜΕΝΩΝ.....	30
5.1. Χαρακτηριστικά ιδανικών μικροβιακών δεικτών.....	32
5.2. Ομάδα Ολικών Κολοβακτηριοειδών (Total Coliforms-TC).....	33
5.2.1. Κοπρανώδη κολοβακτηριοειδή (Faecal Coliforms-FC)	35
5.2.2. Εντερόκοκκοι εντερικής προέλευσης.....	37
5.3. Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα	39
5.4. Μη κοπρανώδη παθογόνα μικρόβια	39
5.4.1. Πυοκυανική Ψευδομονάδα- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	39
5.4.2. Σταφυλόκοκκος Χρυσίζων - <i>Staphylococcus aureus</i>	44
6. ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΚΙΝΔΥΝΟΥ-ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗΣ.....	46
6.1. Χλωρίωση	49
6.2. Βρωμίωση	53
6.3. Ηλεκτρόλυση	54
6.4. Οζονισμός	55
6.5. UV	57
6.6. Ενεργό οξυγόνο.....	59
6.7. Ιονισμός.....	61
7. ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ ΚΟΛΥΜΒΗΤΙΚΩΝ ΔΕΞΑΜΕΝΩΝ	64
8. ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	67
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	68
1. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΧΗΜΙΚΑ - ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ	68

1.1. Εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα <i>Pseudomonas</i> CN Agar Base ISO (CAT.: 1153, Condalab).....	68
1.2. Γενικό θρεπτικό υπόστρωμα για ανακαλλιέργειες - Nutrient agar (LAB008, M0003, LABM, Neogen)	68
1.3. King's B Agar, USP Medium (KAB20500, Biolab).....	68
1.4. Acetamide Broth (N. 40101012, Biolife).....	68
1.5. Αντιδραστήριο Nessler (345148, SIGMA-ALDRICH).....	69
1.6. Ταινίες οξειδάσης (Oxidase Strips, MB0266A, Thermo Fisher Scientific/Oxoid).....	69
1.7. Θρεπτικό υπόστρωμα φύλαξης στελεχών στους -80°C, Brain Heart + 20% glycerol (CM1135, Oxoid).....	69
1.8. Θρεπτικό υπόστρωμα Mueller-Hinton Agar (CM0337, Oxoid).....	69
1.9. Tris-EDTA (TE) buffer για DNA extraction	69
1.10. 10x Tris-Borate EDTA Buffer (TBE) (Ref: GB12.0110, Grisp)	70
1.11. Gel αγαρόζης για ηλεκτροφόρηση.....	70
1.12. Αντιβιοτικά	70
2. ΣΤΕΛΕΧΗ ΑΝΑΦΟΡΑΣ.....	71
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ.....	71
4. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	73
4.1. Διήθηση των δειγμάτων και απομόνωση αποικιών	73
4.2. Φθορισμός των αποικιών <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	74
4.3. Βιοχημική Ταυτοποίηση	74
4.3.1. Ανακαλλιέργειες επιβεβαιωμένων και ύποπτων στελεχών.....	74
4.3.2. Παραγωγή οξειδάσης	75
4.3.3. Παραγωγή αμμωνίας.....	75
4.3.4. Παραγωγή φθορεσκεΐνης	76
4.4. Εκχύλιση DNA.....	77
4.5. Μοριακή Ταυτοποίηση	77

4.6. Φαινοτυπικές δοκιμασίες ελέγχου μικροβιακής ευαισθησίας των στελεχών	79
4.6.1. Έλεγχος μικροβιακής ευαισθησίας	79
4.6.2. Φαινοτυπικές διαγνωστικές δοκιμασίες συνέργειας	79
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Γ: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	81
1. Ταυτοποίηση στελεχών <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	81
2. Φαινοτυπικές δοκιμασίες ελέγχου μικροβιακής ευαισθησίας των στελεχών	84
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Δ: ΣΥΖΗΤΗΣΗ	88
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ε: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	103
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΣΤ: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	104
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	131

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Η μικροβιολογική ανάλυση δειγμάτων νερού αποτελεί μέρος της παρακολούθησης της ασφαλούς λειτουργίας των κολυμβητικών δεξαμενών. Η ανίχνευση λοιμογόνων παραγόντων στο νερό, συμβάλλει στην εφαρμογή κατάλληλων μέτρων διαχείρισης για τον έλεγχο υδατογενών νοσημάτων και την προστασία της Δημόσιας Υγείας. Στα πλαίσια μικροβιολογικού ελέγχου ρουτίνας των νερών αναψυχής, διεθνείς οργανισμοί και η Ελληνική Υγειονομική Διάταξη προτείνουν τη χρήση μικροοργανισμών δεικτών κοπρανώδους μόλυνσης. Επίσης, μη κοπρανώδεις ανθρώπινες εκκρίσεις συνιστούν πηγή ευκαιριακών παθογόνων, όπως η *Pseudomonas aeruginosa*, που εντοπίζεται σε κολυμβητικές δεξαμενές συνήθως με μορφή βιομεμβρανών, επιδεικνύοντας αντοχή στις απολυμαντικές τεχνικές.

Σκοπός: Σκοπό της παρούσας μελέτης συνιστά η εξοικείωση με κλασικές μικροβιολογικές τεχνικές ελέγχου υδάτων κολυμβητικών δεξαμενών για παρουσία κοπρανωδών δεικτών και *Pseudomonas aeruginosa* και για την ταυτοποίηση της *Pseudomonas aeruginosa* με μοριακές τεχνικές. Ακολούθως, ελέγχεται το προφίλ αντοχής των καλλιεργημάτων *Pseudomonas aeruginosa* σε επιλεγμένα αντιβιοτικά.

Μεθοδολογία: Το διάστημα Ιούνιος-Αύγουστος 2021, πραγματοποιήθηκε μικροβιολογικός έλεγχος 65 δειγμάτων νερού, 18 κολυμβητικών δεξαμενών (εσωτερικές, εξωτερικές, παιδικές, εκπαιδευτικές, υδροθεραπείας), 12 φορέων στην Αθήνα. Όλα τα δείγματα αναλύθηκαν για τους δείκτες κοπρανώδους μόλυνσης και για *Pseudomonas aeruginosa* με τις ανάλογες ISO μεθόδους. Στα καλλιεργήματα *Pseudomonas aeruginosa* που απομονώθηκαν, πραγματοποιήθηκε επιβεβαίωση ταυτοποίησης με PCR μέθοδο και έλεγχος μικροβιακής αντοχής με τη μέθοδο Kirby-Bauer Disk Diffusion Test.

Αποτελέσματα: Από τα 65 δείγματα νερού που διηθήθηκαν, αναπτύχθηκαν αποικίες στο 83% (n=54/65) των τρυβλίων. Τελικά, μόνο στο 12.3% των δειγμάτων (n=8/65), 30 πράσινες φθορίζουσες αποικίες επιβεβαιώθηκαν ως *Pseudomonas aeruginosa*, με την ISO και την PCR μέθοδο. Ο έλεγχος της ευαισθησίας σε αντιβιοτικά διεξήχθη σε 9 καλλιεργήματα. Όλα παρουσίασαν τον ίδιο φαινότυπο αντοχής με το πρότυπο στέλεχος. Το 100% των δειγμάτων ήταν ανθεκτικά στα CTX, AMC και FOX, 88.9% ήταν μετρίως ευαίσθητα στο PTZ και 77.8% μετρίως ευαίσθητα στο TIC. Τα

αποτελέσματα του DDST test για τα αντιβιοτικά CAZ-AMC-CTX ήταν αρνητικά. Επομένως, τα απομονωμένα στελέχη παρουσιάζουν φαινότυπο αντοχής AmpC β-λακταμάσες «κεφαλοσπορινάσες».

Συμπεράσματα: Κρίνεται απαραίτητη η βελτίωση των διαδικασιών απολύμανσης και καθαρισμού των κολυμβητικών δεξαμενών και η επαρκής εκπαίδευση του τεχνικού προσωπικού. Λαμβάνοντας υπόψη τις διαφορετικές χρήσεις κάθε κολυμβητικής δεξαμενής και το ημερήσιο αριθμό λουομένων, είναι απαραίτητο να αυξηθεί η γνώση και η ευαισθητοποίηση των χρηστών για τον κίνδυνο έκθεσης στο παθογόνο, σε συνδυασμό με συστηματική δειγματοληψία νερού για μικροβιολογική ανάλυση. Η μέθοδος PCR προσφέρει υψηλή ευαισθησία με μείωση του απαιτούμενου χρόνου για την ανάλυση, συγκριτικά με τη μέθοδο UNI EN ISO 16266:2009. Συμπερασματικά, τονίζεται η ανάγκη συμπερίληψης της *Pseudomonas aeruginosa* ως μικροβιολογικού δείκτη για την παρακολούθηση της ποιότητας των υδάτων κολυμβητικών δεξαμενών και η ανάγκη αναθεώρησης της Υγειονομικής Διάταξης.

Λέξεις-κλειδιά: *Pseudomonas aeruginosa*, βακτήρια, διήθηση διαμέσου μεμβρανών, PCR, ISO 16266:2009, κολυμβητική δεξαμενή, δεξαμενή υδροθεραπείας, ύδατα αναψυχής, ποιότητα νερού, νομοθεσία, μικροβιακή αντοχή, ευαισθησία, ampC.

ABSTRACT

Background: Microbiological analysis of water samples is part of the monitoring of the safe operation of swimming pools. The detection of infectious agents in water contributes to the implementation of appropriate management measures to control waterborne diseases and to protect Public Health. For routine microbiological monitoring of recreational water, regulatory agencies and The Greek Hygienic Regulation suggest the use of faecal indicator microorganisms. Also, non-faecal human shedding is a source of opportunistic pathogens, such as *Pseudomonas aeruginosa*, which can be found into the pool water usually in form of biofilm, showing resistance to disinfection methods. Moreover, the eradication of this pathogen is difficult, due to the capacity of its strains to resist antibiotics.

Objective: The aim of the current study is to familiarize oneself with classic microbiological techniques of recreational water monitoring, in order to determine the presence of faecal indicators and *Pseudomonas aeruginosa* and for the molecular identification of *Pseudomonas aeruginosa*. Next, the antibiotic resistance profile of the PA isolates in selected antibiotics is determined.

Methods: During the period of June-August 2021, the microbiological quality of 65 pool water samples from 18 pools (indoor, outdoor, baby, teaching, hydrotherapy) of 12 associated enterprises in Athens was tested. All samples were analysed according to ISO methods, for the detection of faecal indicators and *Pseudomonas aeruginosa*. In the isolated PA cultures, PCR identification was conducted and susceptibility tests were performed according to the Kirby-Bauer Disk Diffusion Test.

Results: From the 65 water samples filtered, initial colonies were developed in 83% (n=54/65) of the plates. Finally, only in 12.3% of the samples (n = 8/65), 30 green fluorescent colonies were confirmed as *Pseudomonas aeruginosa*, according to the ISO and PCR method. Antibiotic susceptibility testing was performed on 9 isolates. All exhibited the same resistance phenotype as the model strain. 100% of the samples were resistant to CTX, AMC and FOX, 88.9% were moderately sensitive to PTZ and 77.8% moderately sensitive to TIC. DDST test results for CAZ-AMC-CTX antibiotics were negative. Thus, the isolated strains exhibit the AmpC β -lactamase "cephalosporinase" resistance phenotype.

Conclusion: There is a need for improvement of the disinfection and cleaning procedures and sufficient training of the technical personnel. With consideration given to the different uses of each pool and the daily bather loads, it is necessary to increase users' knowledge and awareness of the risk of exposure to the pathogen, in combination with the systematic water sampling for microbiological analysis. PCR analysis offers high sensitivity with a reduction of the required time for the analysis, compared with the UNI EN ISO 16266:2009 method. In conclusion, our study highlights the need to include *Pseudomonas aeruginosa* as a microbiological indicator for monitoring the quality of swimming pool water and the need for revision of The Greek Hygienic Regulation.

Key-Words:

Pseudomonas aeruginosa, bacteria, membrane filtration, PCR, ISO 16266:2009, swimming pool, hydrotherapy pool, recreational water, water quality, legislation, antibiotic resistance, susceptibility, ampC.

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Κατανομή της νόσου στη χώρα μας κατά τα έτη 2014-2018 (Πηγή: ECDC, 2020).....	28
Πίνακας 2: Κύρια χαρακτηριστικά των μέσων απολύμανσης νερού.	47
Πίνακας 3: Κύρια απολυμαντικά μέσα για κολυμβητικές δεξαμενές και συναφή περιβάλλοντα (Πηγή: WHO, 2006).	48
Πίνακας 4: Δυναμικό οξειδοαναγωγής των κυριότερων οξειδωτικών που χρησιμοποιούνται κατά την απολύμανση του νερού (Πηγή: Pyas et al., 2018).....	56
Πίνακας 5: Οφέλη και μειονεκτήματα του οζονισμού του νερού (Πηγή: WHO, 2006; Pyas et al., 2018; Omarova et al., 2018).....	57
Πίνακας 6: Όρια των θεσπισμένων από την Ελληνική Νομοθεσία παραμετρικών τιμών για τους μικροβιολογικούς δείκτες που εξετάζονται υποχρεωτικά σε μικροβιολογικούς ελέγχους υδάτων κολυμβητικών δεξαμενών (Πηγή: ΚΕΕΛΠΝΟ, 2016).	66
Πίνακας 7: Λίστα αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν κατά τον έλεγχο της ευαισθησίας των εξεταζόμενων στελεχών.....	70
Πίνακας 8: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη μοριακή ταυτοποίηση των εξεταζόμενων στελεχών.....	78
Πίνακας 9: Σύνολο απομονωμένων αποικιών ψευδομονάδας τύπου A από τα εξεταζόμενα δείγματα νερού, για τις οποίες ακολούθησε μοριακή ταυτοποίηση.	82
Πίνακας 10: Μικροβιακές αποικίες των υποχρεωτικών δεικτών στα εξεταζόμενα δείγματα νερού στα οποία ανιχνεύθηκαν πράσινες αποικίες ψευδομονάδας. (TC = Ολικά κολοβακτηριοειδή, OMX = Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα).....	83
Πίνακας 11: Κριτήρια μικροβιακής ευαισθησίας και εύρη ζωνών αναστολής (breakpoints), σύμφωνα με το Clinical and Laboratory Standards Institute Guidelines, καθώς και προφίλ μικροβιακής αντοχής για 9 αντιπροσωπευτικά απομονωμένα	

στελέχη *P. aeruginosa* προερχόμενων από κολυμβητικές δεξαμενές συνεργαζόμενων φορέων.85

Πίνακας 12: Κριτήρια μικροβιακής ευαισθησίας και εύρη ζωνών αναστολής (breakpoints), σύμφωνα με το Clinical and Laboratory Standards Institute Guidelines, καθώς και προφίλ μικροβιακής αντοχής για 9 αντιπροσωπευτικά απομονωμένα στελέχη *P. aeruginosa* προερχόμενων από κολυμβητικές δεξαμενές συνεργαζόμενων φορέων με τους χαρακτηρισμούς: ευαίσθητο (S), μέτρια ευαίσθητο (I) και ανθεκτικό (R).86

Πίνακας 13: Σύνολο δειγμάτων νερού κολυμβητικών δεξαμενών που αναλύθηκαν με τη μέθοδο της διήθησης μεμβρανών, σύνολο προκαταρκτικά θετικών αποικιών τύπου A, B ή Γ και τα αποτελέσματα όλων των επιβεβαιωτικών σταδίων για τη βιοχημική τους ταυτοποίηση έως το στάδιο της τελικής φύλαξης των επιβεβαιωμένων αποικιών τύπου A (NT = Not Tested).131

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Διάγραμμα ενός τυπικού συστήματος επεξεργασίας νερού σε κολυμβητική δεξαμενή (Πηγή: Wyczarska-Kokot et al., 2020).....	3
Εικόνα 2: Δομή κυτταρικού τοιχώματος Gram (-) και Gram (+) βακτηρίων, αντίστοιχα (Πηγή: Gebel Berg, 2015).	10
Εικόνα 3: Διαγραμματική απεικόνιση της διαδικασίας χρώσης των βακτηρίων (προσήλωση, προσθήκη μπλε χρωστικής, προσθήκη διαλύματος ιωδίου, αποχρωματισμός, προσθήκη κόκκινης χρωστικής-σαφρανίνης (Πηγή: Tankeshwar, 2015).	11
Εικόνα 4: Ταξινόμηση παρασιτικών πρωτόζωων (Πηγή: Omarova et al., 2018).....	19
Εικόνα 5: Ο κύκλος ζωής της <i>Giardia</i> (Πηγή: Esch & Petersen, 2013, αναπροσαρμογή).....	21
Εικόνα 6: Κατανομή περιστατικών Λεγεωνέλλωσης ανά 100000 πληθυσμού στις Ευρωπαϊκές χώρες (Πηγή: ECDC, 2020).	28
Εικόνα 7: Πιθανοί μικροβιολογικοί και χημικοί παράγοντες κινδύνου σε κολυμβητικές δεξαμενές και παρόμοια περιβάλλοντα (Πηγή: Ekowati, 2019, αναπροσαρμογή από WHO, 2006)	31
Εικόνα 8: Ομάδα των Κολοβακτηριοειδών (Πηγή: Bioscience, 2021).	34
Εικόνα 9: Οζίδια ερυθρού χρώματος στα πέλματα ασθενή, έπειτα από τη δερματική επαφή με μολυσμένο από <i>Pseudomonas aeruginosa</i> νερό κοινοτικής κολυμβητικής δεξαμενής (Πηγή: Fiorillo et al., 2001).	42
Εικόνα 10: Ερυθρές βλατίδες στην περιοχή του θώρακα (Εικόνα Α) και ερυθρά οζίδια στις παλάμες (Εικόνα Β) (Πηγή: Yu et al., 2007).....	43

Εικόνα 11: Συντακτικός τύπος BCDMH	53
Εικόνα 12: Υπόδειγμα αρνητικού (αριστερά) και θετικού (δεξιά) αποτελέσματος, ως προς την παραγωγή αμμωνίας.	76
Εικόνα 13: Υπόδειγμα αρνητικού (δεξιά) και θετικού (αριστερά) αποτελέσματος, ως προς την παραγωγή φθορεσκεΐνης.....	77
Εικόνα 14: Υπόδειγμα DDST test για τον έλεγχο της παραγωγής ευρέος φάσματος β-λακταμασών (ESBL), με εμφανή τη ζώνη αναστολής γύρω από το δίσκο CAZ και CTX ως προς τον δίσκο του αναστολέα AMC. (Πηγή: Helmy & Wasfi, 2014).....	80
Εικόνα 15: Δείγμα 338-α (δεξιά) θετικό ως προς την παραγωγή αμμωνίας κατά την προσθήκη αντιδραστηρίου Nessler στο θρεπτικό υπόστρωμα Acetamide broth.	81
Εικόνα 16: Ηλεκτροφόρηση DNA επτά εξεταζόμενων καλλιεργημάτων με τη χρήση εκκινητών για το γονίδιο-στόχο <i>oprL</i> (504 bp). Lad.: δείκτης μοριακών βαρών (DNA Ladder), 1: δείγμα 250-1, 2: δείγμα 294-1s, 3: δείγμα 296-α', 4: δείγμα 335-1, 5: δείγμα 353-1, 6: δείγμα 372-1, 7: δείγμα 373-1, (+): θετικός μάρτυρας - πρότυπο στέλεχος <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , (-): αρνητικός μάρτυρας - διάλυμα χωρίς DNA.	84
Εικόνα 17: Φαινοτυπική δοκιμασία συνέργειας DDST test για το πρότυπο στέλεχος και το δείγμα 373-1 ως προς τα αντιβιοτικά CAZ-AMC-CTX με αρνητικό αποτέλεσμα.	87

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΟΡΙΣΜΟΙ-ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΚΟΛΥΜΒΗΤΙΚΩΝ ΔΕΞΑΜΕΝΩΝ

Στο Άρθρο 1 της Υγειονομικής Διάταξης Γ1/443/1973 (ΦΕΚ 87/Β/1973) «Περί κολυμβητικών δεξαμενών μετά οδηγιών κατασκευής και λειτουργίας αυτών», όπως αυτή τροποποιήθηκε με την υπ' αριθμ. Γ4/1150/76 (ΦΕΚ 937/ Β'/1976) Υγειονομική Διάταξη, παρατίθενται ορισμοί για τις κυριότερες κατηγορίες κολυμβητικών δεξαμενών. Πιο αναλυτικά:

- **Κολυμβητική δεξαμενή ή κολυμβητήριο** καλείται «κάθε μερικώς ή πλήρως τεχνητή δεξαμενή η οποία τροφοδοτείται από νερό κατάλληλης πηγής υδροληψίας που πληροί τα πρότυπα ποιότητας και η οποία χρησιμοποιείται για ομαδική κολύμβηση και αναψυχή».
- **Δημόσιας χρήσης κολυμβητική δεξαμενή** καλείται «η δεξαμενή η οποία χρησιμοποιείται από το κοινό ή από ομάδες πληθυσμού, όπως μέλη συλλόγων, εκπαιδευτικών ιδρυμάτων, ενοίκους ξενοδοχείων, ενοίκους πολυκατοικίας κλπ., ανεξαρτήτως ιδιοκτησίας».
- **Αθλητική κολυμβητική δεξαμενή** καλείται «η δεξαμενή η οποία χρησιμοποιείται αποκλειστικά ή κατά κύριο λόγο για τη διεξαγωγή αθλητικών αγωνισμάτων, προπονήσεων ή για εκπαίδευση των αθλητών».
- **Ιδιωτική κολυμβητική δεξαμενή** καλείται «η δεξαμενή που χρησιμοποιείται αποκλειστικά από τα μέλη μιας οικογένειας, συγγενείς ή/και φιλικά πρόσωπα».
- **Εσωτερική κολυμβητική δεξαμενή** καλείται «η δεξαμενή η οποία βρίσκεται εντός κλειστού στεγασμένου χώρου».
- **Εξωτερική κολυμβητική δεξαμενή** ή υπαίθρια καλείται «η δεξαμενή η οποία βρίσκεται σε ανοικτό υπαίθριο, περιφραγμένο χώρο».

Σύμφωνα με τα οριζόμενα του Άρθρου 46 «Ρυθμίσεις για κολυμβητικές δεξαμενές εντός τουριστικών καταλυμάτων», παράγραφος 1, του Ν. 4688/2020 (ΦΕΚ 101/Α/24-5-2020) «Ειδικές μορφές τουρισμού, διατάξεις για την τουριστική ανάπτυξη και άλλες διατάξεις», ως κολυμβητικές δεξαμενές νοούνται επιπροσθέτως «και τα συστήματα υδρομάλαξης ή και μηχανισμού παραγωγής κυμάτων που διαθέτουν συστήματα ανακυκλοφορίας, φίλτρανσης και χημικής επεξεργασίας (jacuzzi)». Ως **δεξαμενή υδρομάλαξης** (spa, whirlpool spas, jacuzzis) ορίζεται «η δεξαμενή η κατασκευή της οποίας εξασφαλίζει ότι οι χρήστες αυτής μπορούν να κάθονται και να

επιδρά επάνω τους νερό υπό πίεση και φυσαλίδες αέρα, παρά να κολυμπούν» (Μαυρίδου et al., 2014). Η χρήση της δεν αφορά κολύμβηση, αλλά κατάκλιση και παραμονή του χρήστη εντός αυτής, το σώμα του οποίου εμβαπτίζεται έως το λαιμό. Ο υδροθεραπευτικός της σκοπός οφείλεται στους εκτοξευτήρες νερού που διαθέτει (με ή χωρίς εμφύσηση αέρα). Το νερό έχει θερμοκρασία περίπου 30-40 °C. Η ανανέωση των υδάτων δεν πραγματοποιείται ύστερα από κάθε χρήση, αλλά μετά την πάροδο ορισμένου χρονικού διαστήματος ή μετά από ένα μεγάλο αριθμό χρήσεων, η δεξαμενή αδειάζει και πληρώνεται εκ νέου με καθαρό νερό (ΚΕΕΛΠΝΟ, 2016).

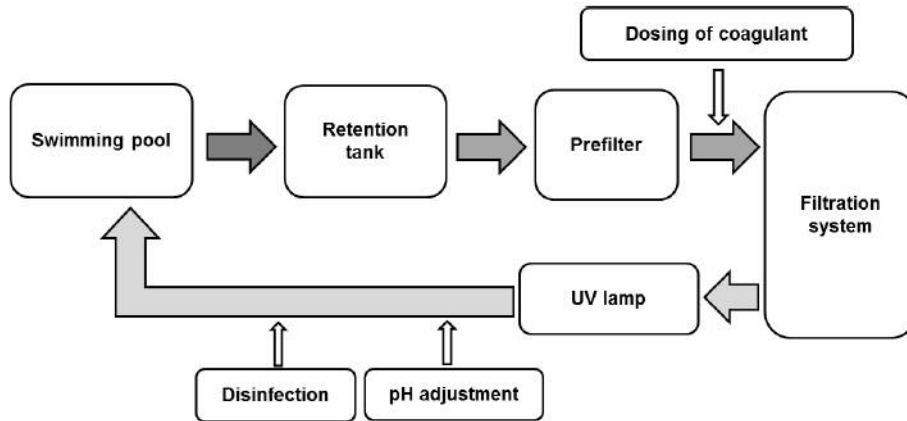
Με τον όρο **ανακυκλοφορία της κολυμβητικής δεξαμενής** νοείται «η συνεχής ροή καθ' όλη τη διάρκεια της λειτουργίας της δεξαμενής που οφείλεται στην ταυτόχρονη προσαγωγή και απαγωγή του νερού. Αυτή η ροή ενεργοποιεί διεργασίες ανάμιξης και μεταφοράς μέσω των οποίων διασφαλίζεται η ομοιόμορφη κατανομή των απολυμαντικών ουσιών στην υδάτινη μάζα και παράλληλα η απομάκρυνση των ρυπαντών». Το χρονικό διάστημα κατά το οποίο ο συνολικός όγκος νερού διέρχεται 1 φορά από το σύστημα ανακυκλοφορίας και διύλισης, ονομάζεται **περίοδος ανανέωσης** (turnover period) (ΣΕΕΠΥ, 2020).

Στον Κώδικα Πρακτικής του Συλλόγου Ελληνικών Επιχειρήσεων Πισίνας & Υδρομασάζ (ΣΕΕΠΥ, 2020) γίνεται εκτενής αναφορά σε κολυμβητικές δεξαμενές που στον EN 15288-1 αναφέρονται ως:

- **Κολυμβητικές Δεξαμενές Τύπου 1** - «δημόσιες κολυμβητικές δεξαμενές για τις οποίες η χρήση του υδάτινου στοιχείου αποτελεί την κύρια επαγγελματική δραστηριότητα του χώρου στον οποίο βρίσκονται (π.χ. δημόσια κολυμβητήρια, κολυμβητικές δεξαμενές πάρκων αναψυχής, κολυμβητικές δεξαμενές υδάτινων πάρκων κ.α.)».
- **Κολυμβητικές Δεξαμενές Τύπου 2** - «δημόσιες κολυμβητικές δεξαμενές για τις οποίες η χρήση του υδάτινου στοιχείου δεν αποτελεί την κύρια επαγγελματική δραστηριότητα του χώρου στον οποίο βρίσκονται, αλλά συμπληρωματική υπηρεσία (π.χ. κολυμβητικές δεξαμενές ξενοδοχείων, camping, club, κολυμβητικές δεξαμενές θεραπευτηρίων κ.α.)».

2. ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ ΚΟΛΥΜΒΗΤΙΚΩΝ ΔΕΞΑΜΕΝΩΝ

Η λειτουργία των σύγχρονων κολυμβητικών δεξαμενών βασίζεται σε ένα κλειστό σύστημα ανακυκλοφορίας και διύλισης του νερού, με ενεργή υπερχειλίση και επεξεργασία του με απολυμαντικές μεθόδους. Μια σχηματική απεικόνιση ενός τυπικού συστήματος παρουσιάζεται στην Εικόνα 1.



Εικόνα 1: Διάγραμμα ενός τυπικού συστήματος επεξεργασίας νερού σε κολυμβητική δεξαμενή (Πηγή: Wyczarska-Kokot et al., 2020).

Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα, μια τυπική εγκατάσταση απαρτίζεται από την κολυμβητική δεξαμενή, το σύστημα ανακυκλοφορίας του νερού με σωλήνες και αντλίες, φίλτρα για τη διύλιση του νερού, έναν πίνακα ελέγχου για τη ρύθμιση της δόσης του εφαρμοζόμενου χλωρίου, εξισορρόπηση του pH και θέρμανση του νερού.

Σύμφωνα με την Ελληνική Νομοθεσία σε δεξαμενές χωρητικότητας άνω των 750 m³ είναι υποχρεωτική η λειτουργία του συστήματος ανακυκλοφορίας του νερού 24 ώρες την ημέρα, με δυνατότητα μείωσης του ρυθμού ανανέωσης κατά το ήμισυ, όταν δεν πραγματοποιείται χρήση της δεξαμενής. Η πλήρης ανανέωση του νερού πρέπει να έχει ολοκληρωθεί εντός 4ώρου και εντός 6ώρου στις αθλητικές εγκαταστάσεις. Με το σύστημα ανακυκλοφορίας και διύλισης του νερού εξασφαλίζεται ο απαιτούμενος ρυθμός ανανέωσής του και η μείωση της θολότητας.

Η διαύγεια του νερού είναι ένας σημαντικός παράγοντας για την ασφάλεια των λουομένων και την αποφυγή ατυχήματος. Το στάδιο της διύλισης του νερού πραγματοποιείται στην κλίνη διύλισης, η οποία αποτελείται από το υλικό πλήρωσης του φίλτρου και στη μάζα της συγκρατούνται οι ρύποι που περιέχονται στο νερό. Το ανώτερο όριο θολότητας του νερού στις κολυμβητικές δεξαμενές είναι τα 0.5 NTU.

Το φίλτρο πρέπει να εξασφαλίζει την κατακράτηση κολλοειδών ουσιών, μικροοργανισμών και λεπτών αιωρούμενων σωματιδίων (ΣΕΕΠΥ, 2020).

Σύμφωνα με την Ελληνική νομοθεσία είναι εφικτή η χρήση ταχυδιωλιστηρίων βαρύτητας όταν το νερό είναι υψηλής σκληρότητας ή πίεσης ή κάποιο άλλο κατάλληλο σύστημα φίλτρανσης τα οποία πρέπει να εξασφαλίζουν ίδια παροχή με την αντλία ανακυκλοφορίας, την αύξηση της διαύγειας του νερού και την κατακράτηση σωματιδίων διαμέτρου $> 50 \mu\text{m}$. Συνήθως, χρησιμοποιούνται φίλτρα άμμου. Το υλικό διύλισης πρέπει να έχει ύψος 0,90 m και να αποτελείται από άμμο και χαλίκια. Οι κόκκοι της άμμου διαμέτρου 0,4 – 0,5 mm δεν πρέπει να περιέχουν ευδιάλυτα υλικά, άργιλο ή οργανικές ουσίες.

Σε κολυμβητικές δεξαμενές δημόσιας χρήσης υπάρχουν 2 κατηγορίες φίλτρων που χρησιμοποιούνται ευρέως: τα **φίλτρα σταθερής κλίνης** μονοστρωματικά ή πολυστρωματικά (ή φίλτρα κοκκώδους μέσου διύλισης) και τα **φίλτρα αναγεννώμενης κλίνης**. Η δεύτερη κατηγορία φίλτρων είναι γνωστή και με τον όρο «φίλτρα προεπικάλυσης» (pre coat filters). Αποτελούνται από ένα λεπτόκοκκο πορώδες υλικό που επικαλύπτει το φίλτρο και σχηματίζει κλίνη με μεγάλη επιφάνεια διύλισης. Κατά την αντίστροφη πλύση η κλίνη αναγεννάται, καθώς το υλικό προεπικάλυσης απομακρύνεται και καταλήγει στο δίκτυο αποχέτευσης (ΣΕΕΠΥ, 2020).

Ως κοκκώδη υλικά του φίλτρου (ανοιχτό ή κλειστό δοχείο πίεσεως) μπορούν να χρησιμοποιηθούν η χαλαζιακή άμμος, ζεόλιθος, θρυμματισμένη ύαλος ή ανθρακίτης. Το υλικό επικάλυψης των στοιχείων φίλτρων προεπικάλυσης μπορεί να είναι γη διατόμων, κελουλόζη ή περλίτης. Τέλος, τα φίλτρα σταθερής κλίνης διαφοροποιούνται ως προς την ταχύτητα διύλισης του νερού σε 3 κατηγορίες (ΣΕΕΠΥ, 2020):

- Χαμηλής ταχύτητας (low rate granular media filters): έως $10 \text{ m}^3/\text{h}/\text{m}^2$
- Μέσης ταχύτητας (medium rate granular media filters): από $11 - 30 \text{ m}^3/\text{h}/\text{m}^2$
- Υψηλής ταχύτητας (high rate granular media filters): από $31 - 50 \text{ m}^3/\text{h}/\text{m}^2$

Κατά το στάδιο της κροκίδωσης επιτυγχάνεται η συσσωμάτωση διαλυμένων, αιωρούμενων και κολλοειδών ουσιών με τη δημιουργία κροκίδων μεγάλου μεγέθους και εν συνεχεία η απομάκρυνσή τους με την κατακράτηση τους από το φίλτρο. Η κροκίδωση είναι εξαιρετικά σημαντικό στάδιο επεξεργασίας του νερού της πισίνας

καθώς εξασφαλίζει την κατακράτηση των κυστών *Cryptosporidium* και *Giardia*, των φωσφορικών και της οργανικής ύλης που προέρχεται από τις ανθρώπινες εκκρίσεις, μειώνοντας με αυτό τον τρόπο το σχηματισμό των ανεπιθύμητων τριαλογονομεθανίων (THMs).

Ως κροκιδωτικές ουσίες χρησιμοποιούνται συνήθως άλατα του αργιλίου ή του σιδήρου. Τα κροκιδωτικά είναι απαραίτητα να εισάγονται με συνεχή τρόπο και να αναμειγνύονται ταχέως με το νερό. Η απόδοση της κροκιδώσης καθορίζεται από το pH, το οποίο πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 6.5 και 7.4. Οι ελάχιστες δόσεις (για συνεχή δοσομέτρηση) είναι 0.1 mg/l ως σίδηρος για άλατα σιδήρου και 0.05 mg/l ως αργίλιο για ενώσεις αργιλίου (ΣΕΕΠΥ, 2020).

Πολύ σημαντική για την επίτευξη μιας καλής ποιότητας του νερού είναι η ανάμειξη του εντός της κολυμβητικής δεξαμενής με νερό το οποίο έχει υποστεί επεξεργασία με τη χρήση απολυμαντικών μεθόδων. Τα στόμια εισαγωγής πρέπει να εντοπίζονται σε συγκεκριμένες θέσεις εντός της πισίνας οι οποίες θα επιτρέπουν τη γρήγορη διασπορά (οριζόντια ή κατακόρυφη) απολυμασμένου νερού στο συνολικό όγκο της δεξαμενής. Στις νεότερες πισίνες συνιστάται, τα στόμια να τοποθετούνται στα τοιχώματα των πλευρών της δεξαμενής με το μεγαλύτερο μήκος. Ταυτόχρονα, το χρησιμοποιημένο νερό που οδηγείται προς επεξεργασία, πρέπει να απομακρύνεται μέσω της πιο σύντομης διαδρομής, χάρη στην ύπαρξη φρεατίων αναρρόφησης στην περιοχή του πυθμένα ή/και επιφανειακών αναρροφητήρων (skimmers) ή καναλιών υπερχειλίσης. Τα skimmers, εκτός της αναρρόφησης του νερού επιτρέπουν τη συγκράτηση ευμεγεθών στερεών, όπως φύλλα, προστατεύοντας το κατάντη κύκλωμα επεξεργασίας (Cloteaux et al., 2013).

Σύμφωνα με την ισχύουσα νομοθεσία, επιτρέπεται η χρήση skimmers σε δημόσιες κολυμβητικές δεξαμενές με επιφάνεια μικρότερη από 200 m² (ένα skimmer τουλάχιστον, ανά 50 m²), καθώς δεν ενδείκνυνται για κολυμβητικές δεξαμενές με μεγάλο φορτίο λουομένων, γιατί δεν επιτυγχάνουν το βέλτιστο καθαρισμό της επιφανειακής υδάτινης στιβάδας (ΣΕΕΠΥ, 2020).

Η υδραυλική εγκατάσταση της δεξαμενής δύναται να συνεισφέρει στα οφέλη της επεξεργασίας και της απολύμανσης του νερού μέσω της ορθής κυκλοφορίας του νερού εντός της δεξαμενής. Πιο αναλυτικά, η ροή του νερού είναι πιθανό να

συμβάλει στη δημιουργία ζωνών στο ύψος της υδάτινης στήλης, γνωστές και ως «νεκρές ζώνες», των οποίων ο όγκος νερού δεν οδηγείται προς ανακυκλοφορία και απολύμανση και τα νερά παραμένουν στάσιμα. Επομένως, ακόμα και αν έχει προηγηθεί απολύμανση του νερού, η αποτελεσματικότητα της ως προς την αδρανοποίηση μικροοργανισμών που μπορεί να επιβιώσουν και να αναπτυχθούν στο νερό, δεν είναι όμοια σε όλη την δεξαμενή, ακριβώς στα σημεία των νεκρών ζωνών (Guida et al., 2016).

Τα αποτελέσματα των ποιοτικών αναλύσεων δειγμάτων νερού των κολυμβητικών δεξαμενών διαφοροποιούνται ως προς το αρχικό σημείο δειγματοληψίας και συλλογής του νερού (Wyczarska-Kokot et al., 2020). Η ασυνέπεια της εκτιμώμενης ποιότητας νερού ως προς τα διαφορετικά σημεία της κολυμβητικής δεξαμενής, καθιστά ιδιαίτερα δύσκολη τη διαμόρφωση μια σαφούς, τελικής αξιολόγησης της ποιότητας του νερού της πισίνας. Εξίσου σημαντική είναι η διενέργεια επιτόπιων (in situ) αναλύσεων για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων του ελεύθερου και του συνδυασμένου υπολειμματικού χλωρίου σε διάφορα σημεία της δεξαμενής (Wyczarska-Kokot et al., 2020).

Σύμφωνα με τους Wyczarska-Kokot et al., (2020), εάν το νερό ικανοποιεί τα θεσπισμένα πρότυπα ποιότητας σε τμήματα της κολυμβητικής δεξαμενής που θεωρούνται τα πιο ευάλωτα ως προς την παρουσία υψηλότερων συγκεντρώσεων ρύπων, π.χ. νεκρές ζώνες, τότε σίγουρα θα πληροί τις απαιτήσεις της νομοθεσίας και στην υπόλοιπη δεξαμενή όπου το ρυπαντικό και μικροβιολογικό φορτίο είναι μικρότερο.

3. ΒΑΣΙΚΕΣ ΕΝΝΟΙΕΣ ΣΤΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ

3.1. Ορισμοί

Μικροβιολογικό θρεπτικό υπόστρωμα: «στερεό ή υγρό υπόστρωμα μικροβιακής ανάπτυξης».

Μικροβιακή αποικία: «πληθυσμός κυττάρων ενός μικροοργανισμού, απόγονοι ενός αρχικού κυττάρου στο αποστειρωμένο θρεπτικό υπόστρωμα».

Αξενική ή Καθαρή καλλιέργεια: «αναπαραγωγή κυττάρων ενός μικροοργανισμού, τα οποία προέρχονται από μονοκαλλιέργεια, δηλαδή από μια μεμονωμένη αποικία του συγκεκριμένου μικροοργανισμού».

Υγρή καλλιέργεια: «καθαρή καλλιέργεια μικροοργανισμού σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα».

Στερεή καλλιέργεια: «καθαρή καλλιέργεια μικροοργανισμού σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (υπόστρωμα που περιέχει άγαρ)».

Ασηπτική τεχνική ή υπό άσηπτες συνθήκες: «διατήρηση κατάλληλων συνθηκών ασηπτίας, κατά τις οποίες δεν είναι εφικτή η μικροβιακή μόλυνση». Η μεταφορά θρεπτικών υλικών στα τρυβλία πραγματοποιείται πάντα κοντά σε φλόγα λύχνου Bunsen.

Αποστείρωση: πραγματοποιείται καταστροφή όλων των ζωντανών κυττάρων, των ιών και των σπορίων. Η πλέον αποτελεσματική τεχνική αποστείρωσης είναι με θερμότητα σε ειδικούς αυτόκαυστους αποστειρωτικούς κλιβάνους (autoclave).

Επιμόλυνση: «μικροβιακή μόλυνση χώρου ή υλικού (θρεπτικό υλικό, επιφάνεια)».

Εμβόλιο: «μικρή ποσότητα κυττάρων ή σπορίων ενός ή περισσότερων μικροοργανισμών».

Εναιώρημα εμβολίου: «ποσότητα κυττάρων μικροοργανισμού αραιωμένη σε υδατικό διάλυμα ή σε συγκεκριμένη ποσότητα υγρού θρεπτικού υποστρώματος».

Εμβολιασμός: «μεταφορά εμβολίου σε καθαρό αποστειρωμένο θρεπτικό υπόστρωμα (υγρό ή στερεό) υπό άσηπτες συνθήκες».

Επώαση: «θερμοκρασία ανάπτυξης ενός μικροοργανισμού».

Διαμοιρασμός υποστρώματος: «μεταφορά υποστρώματος σε τρυβλία, φιάλες ή σωλήνες».

Επίστρωση (διανομή ή διασπορά): «διασπορά του εμβολίου που περιέχει το μικροοργανισμό στην επιφάνεια του θρεπτικού υποστρώματος καλλιέργειας».

Ενσωμάτωση εμβολίου στο υπόστρωμα καλλιέργειας: «αραίωση ποσότητας μικροβιακών κυττάρων στη μάζα στερεού θρεπτικού υποστρώματος, το οποίο αρχικά είναι σε υγρή κατάσταση. Τα κύτταρα ενσωματώνονται στο υπόστρωμα όταν αυτό στερεοποιηθεί».

Χρήσιμα εργαλεία για τη μεταφορά του εμβολίου: «σιφόνιο, αυτόματη πιπέτα (από υγρή καλλιέργεια) μικροβιολογικός κρίκος ή κρίκος εμβολιασμού (από στερεή ή υγρή καλλιέργεια), ανατομική βελόνα/ανατομική λαβίδα» (Madigan et al., 2003).

3.2. Κατηγορίες θρεπτικών υποστρωμάτων

Τα θρεπτικά υλικά είναι απαραίτητα για το διαχωρισμό συγκεκριμένων στελεχών από μεικτούς πληθυσμούς μικροβίων και την απομόνωση καθαρών καλλιιεργειών τους. Επιπλέον, η χρησιμότητα των θρεπτικών υποστρωμάτων επεκτείνεται και στη μελέτη των συγκεκριμένων στελεχών, έπειτα από καλλιιεργειά τους ή ανανέωση των ήδη υφιστάμενων καλλιιεργειών των στελεχών ενδιαφέροντος. Στα κύρια συστατικά ενός θρεπτικού υλικού περιλαμβάνονται μια πηγή άνθρακα με πιο συνήθη το μονοσακχαρίτη γλυκόζη, μια πηγή αζώτου για τη βιοσύνθεση υλικών των μικροβιακών κυττάρων, καθώς και απαραίτητα ιχνοστοιχεία, υδατοδιαλυτές βιταμίνες και άλατα.

3.2.1. Ως προς τη στερεότητα

Τα θρεπτικά υλικά μπορεί να βρίσκονται σε στερεή, υγρή ή ημι-στερεή κατάσταση. Η προσθήκη άγαρ (πολυσακχαρίτης από εκχύλισμα θαλάσσιων φυκών) οδηγεί σε στερεοποίηση του θρεπτικού υποστρώματος. Οι μικροοργανισμοί δε μεταβολίζουν το άγαρ. Ως προς τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του, το άγαρ τήκεται σε θερμοκρασία 100 °C, ενώ η θερμοκρασία στην οποία προκαλείται πήξη του θρεπτικού υλικού, είναι περίπου < 40 °C. Η προσθήκη του συγκεκριμένου πολυσακχαρίτη δεν προκαλεί μεταβολές στο pH του υποστρώματος.

3.2.2. Ως προς τη χημική σύσταση

i. Συνθετικά: παρασκευάζονται στο εργαστήριο ή στη βιομηχανία. Η χημική τους σύσταση είναι πλήρως καθορισμένη. Στα τυποποιημένα υποστρώματα γίνεται λεπτομερής αναφορά της ποιοτικής και ποσοτικής σύστασής τους. Μια άλλη κατηγορία, τα ημι-συνθετικά υποστρώματα, αφορά συνθετικά υλικά τα οποία περιέχουν σε μικρή ποσότητα και μια φυσική ουσία, ως αυξητικό παράγοντα.

ii. Σύνθετα ή Πολύπλοκα ή Φυσικά: δεν είναι πλήρως γνωστή ή καθορισμένη η σύστασή τους. Τα συγκεκριμένα υποστρώματα λαμβάνονται από τη φύση: εκχυλίσματα φρούτων, χαρουπάλευρο, μούστος, ελαιόπουλπα. Η μικροβιακή ανάπτυξη σε σύνθετα υποστρώματα ευνοείται από την ποικιλία θρεπτικών συστατικών που περιέχουν.

3.2.3. Ως προς τα είδη μικροοργανισμών που αναπτύσσονται

i. Τυπικά ή γενικής χρήσης: επιτρέπουν την ανάπτυξη μεγάλου αριθμού διαφορετικών ειδών μικροοργανισμών και η χρήση τους αφορά την απομόνωση αυτών των οργανισμών από το φυσικό τους περιβάλλον.

ii. Εκλεκτικά: υποστρώματα στα οποία αναπτύσσονται συγκεκριμένα μικροβιακά είδη. Η μετατροπή ενός υποστρώματος γενικής χρήσης σε εκλεκτικό πραγματοποιείται εύκολα με την προσθήκη κατάλληλης ουσίας, η οποία λειτουργεί είτε ενισχυτικά, είτε ανασταλτικά για την ανάπτυξη συγκεκριμένων μικροοργανισμών.

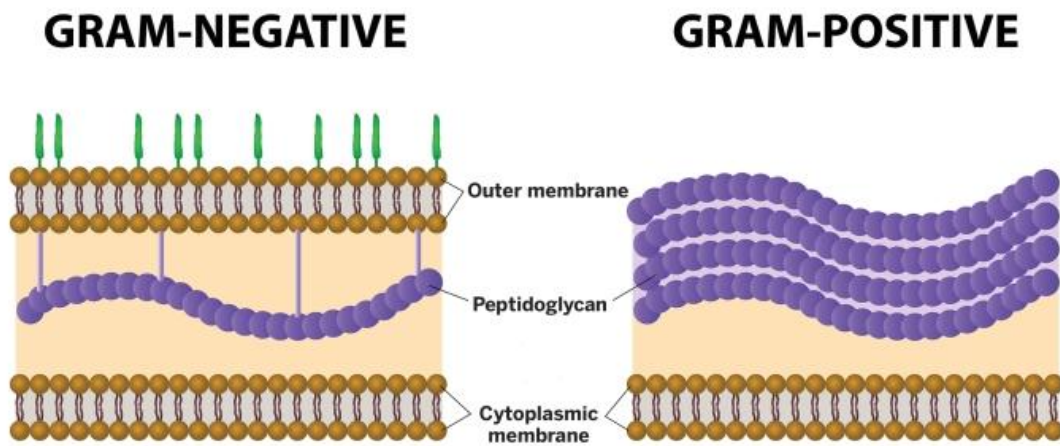
iii. Διαγνωστικά ή ειδικά: επιτρέπουν τη διαφοροποίηση ενός μικροβιακού είδους από άλλα, λόγω του συγκεκριμένου φαινοτύπου που αναπτύσσει στο υπόστρωμα.

3.3. Διάκριση βακτηρίων

3.3.1. Χρώση κατά Gram

Η χρώση κατά Gram αποτελεί μια ευρέως εφαρμοζόμενη τεχνική η οποία αναπτύχθηκε από το Δανό Μικροβιολόγο Hans Christian Gram το 1884 (Britannica, 2020). Η συγκεκριμένη τεχνική επιτρέπει το διαχωρισμό και την ταξινόμηση βακτηριακών ειδών (Tankeshwar, 2015). Με βάση τη δομή του κυτταρικού τους τοιχώματος, τα βακτήρια διακρίνονται σε Gram αρνητικά και Gram θετικά και διαχωρίζονται φαινοτυπικά ως προς το χρώμα που αποκτούν τα κύτταρά τους, το οποίο μπορεί να είναι κόκκινο ή βιολετί. Τα Gram θετικά διαθέτουν ένα ομογενές

παχύ κυτταρικό τοίχωμα που αποτελείται από πεπτιδογλυκάνες ή μουρεΐνη. Αντιθέτως, στο κυτταρικό τοίχωμα των Gram αρνητικών βακτηρίων, το οποίο είναι αρκετά πιο σύνθετο, εκτός από το πολύ λεπτό στρώμα πεπτιδογλυκάνης που περιβάλλει την κυτταροπλασματική μεμβράνη, απαντάται και ένα επιπρόσθετο εξωτερικό στρώμα, η εξωτερική μεμβράνη. Ο χώρος μεταξύ της εξωτερικής μεμβράνης και του κυτταρικού τοιχώματος από πεπτιδογλυκάνη, καλείται περιπλασματικός χώρος.



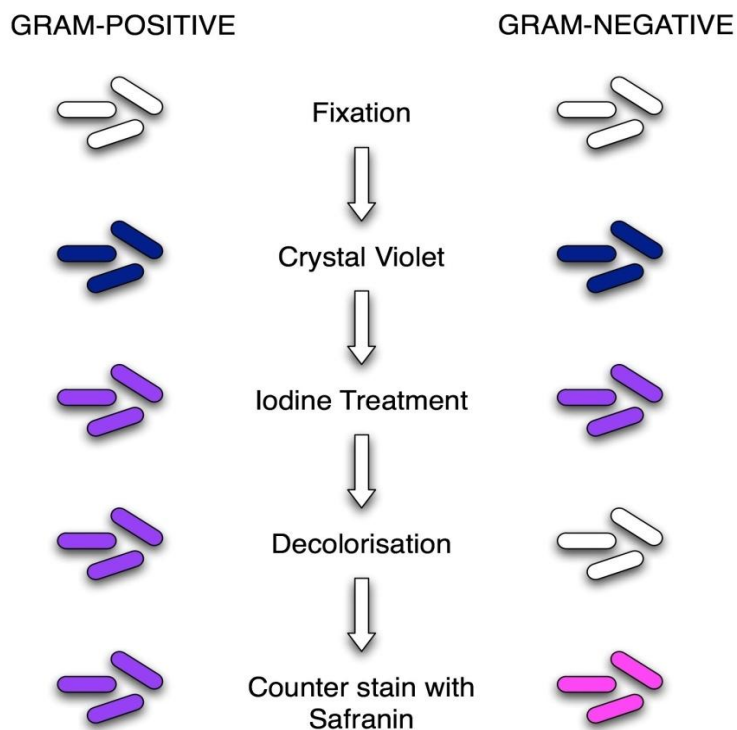
Εικόνα 2: Δομή κυτταρικού τοιχώματος Gram (-) και Gram (+) βακτηρίων, αντίστοιχα (Πηγή: Gebel Berg, 2015).

Τα βασικότερα στάδια της τεχνικής χρώσης κατά Gram περιλαμβάνουν τις εξής διαδικασίες (Tankeshwar, 2015; Britannica, 2020):

1. προσήλωση: μεταφορά βακτηριακών κυττάρων σε αντικειμενοφόρο πλάκα με απιονισμένο νερό.
2. προσθήκη αρχικού παράγοντα χρώσης, του διαλύματος crystal violet. Η χρωστική προσδίδει ένα κυανό ή μωβ χρώμα σε όλα τα βακτηριακά κύτταρα του δείγματος.
3. προσθήκη διαλύματος ιωδίου και ιωδιούχου καλίου για τη δημιουργία ενός αδιάλυτου συμπλέγματος μεταξύ του ιωδίου και της χρωστικής crystal violet (σύμπλεγμα CV-I). Στο στάδιο αυτό, όλα τα κύτταρα διατηρούν ένα έντονο κυανό χρώμα.
4. στάδιο αποχρωματισμού: προσθήκη κατάλληλου διαλύματος (π.χ. αιθυλική αλκοόλη, ακετόνη) οδηγεί σε αφυδάτωση και συρρίκνωση του στρώματος πεπτιδογλυκάνης, οπότε το σύμπλεγμα CV-I δεν μπορεί να διαφύγει από το

αδιαπέραστο πλέον κυτταρικό τοίχωμα πεπτιδογλυκάνης και εγκλωβίζεται στο εσωτερικό των Gram (+) βακτηρίων. Τα υπόλοιπα κύτταρα, τα Gram (-) είναι πλέον αποχρωματισμένα, καθώς λόγω της υποβάθμισης της εξωτερικής τους μεμβράνης από την προσθήκη του παράγοντα αποχρωματισμού, το πολύ λεπτό στρώμα πεπτιδογλυκάνης που διαθέτουν αδυνατεί να συγκρατήσει το σύμπλεγμα CV-I.

5. προσθήκη τελικού παράγοντα χρώσης, της σαφρανίνης, η οποία έχει μικρότερη πυκνότητα από τη χρωστική crystal violet. Η χρωστική προσδίδει ένα κόκκινο χρώμα στα αποχρωματισμένα Gram (-) βακτήρια, ενώ δεν ασκεί καμία επίδραση στα ήδη μπλε χρωματισμένα Gram (+) βακτήρια.



Εικόνα 3: Διαγραμματική απεικόνιση της διαδικασίας χρώσης των βακτηρίων (προσήλωση, προσθήκη μπλε χρωστικής, προσθήκη διαλύματος ιωδίου, αποχρωματισμός, προσθήκη κόκκινης χρωστικής-σαφρανίνης (Πηγή: Tankeshwar, 2015).

3.3.2. Τεστ οξειδάσης

Ένας εναλλακτικός τρόπος για την ταυτοποίηση βακτηρίων είναι η δοκιμή της οξειδάσης. Το ένζυμο οξειδάση κυτοχρώματος c, το οποίο ανιχνεύεται με τη συγκεκριμένη δοκιμή, κατά την αερόβια αναπνοή συντελεί στη μεταφορά ηλεκτρονίων από το κυτόχρωμα c στο οξυγόνο. Μόνο στα υποχρεωτικώς αερόβια

βακτήρια το τεστ οξειδάσης είναι θετικό και με αυτόν τον τρόπο διακρίνονται π.χ. το γένος *Pseudomonas* (θετικό) από το γένος *Enterobacteriaceae* (αρνητικό).

Το τεστ διεξάγεται συνήθως με έτοιμα χάρτινα ραβδία εμποτισμένα με τη χημική ένωση N,N,N,N-τετραμεθυλ-ρ-φαινυλενοδιαμίνη, η οποία προκαλεί την οξείδωση της οξειδάσης κυτοχρώματος c και μέσω της αντίδρασης θα αναπτυχθεί ένας μωβ χρωματισμός στα κύτταρα του υπό εξέταση βακτηρίου (Shields & Cathcart, 2010).

3.4. Μικροβιακή αντοχή στα αντιβιοτικά

Ως μικροβιακή αντοχή σε αντιβιοτικά νοείται η ικανότητα που έχουν οι μικροοργανισμοί να παρουσιάζουν όλο και περισσότερη αντοχή σε αντιβιοτικά στα οποία αρχικώς παρουσίαζαν ευαισθησία, καθιστώντας τελικά αναποτελεσματική τη δράση τους, είτε μέσω της τροποποίησης της διαπερατότητας στο φάρμακο ή στο στόχο του φαρμάκου, είτε μέσω απενεργοποίησης του φαρμάκου (Madigan et al., 2003). Η μετάδοση ανθεκτικών μικροβίων διευκολύνεται από ανθρωπογενείς παράγοντες, όπως η αλόγιστη χρήση αντιβιοτικών σε τομείς όπως η υγεία, η γεωργία, η κτηνοτροφία και οι ιχθυοκαλλιέργειες, οι κακές πρακτικές υγιεινής σε χώρους παροχής υπηρεσιών υγείας και η μη ορθή διαχείριση αποβλήτων υγειονομικών μονάδων, υγρών αποβλήτων, αποβλήτων βιομηχανικών εγκαταστάσεων παραγωγής αντιβιοτικών ή μονάδων υδατοκαλλιέργειας (Kummerer, 2009).

Συνολικά, υπάρχουν 3 τύποι μικροβιακής αντοχής, η φυσική (*intrinsic*), η επίκτητη (*acquired*) και η ανθεκτικότητα προσαρμογής (*adaptive*). Στη **φυσική** αντοχή, όσοι μικροοργανισμοί την παρουσιάζουν, διαθέτουν εκ φύσεως ορισμένα γονίδια τα οποία προσδίδουν αντοχή στα αντιβιοτικά. Αναφορικά με τη *Pseudomonas aeruginosa*, η φυσική αντοχή που αντιπροσωπεύει το φαινότυπο άγριου-τύπου (wild-type phenotype) εκδηλώνεται με: 1.) μειωμένη διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης λόγω της απώλειας των πορινών *oprD*, που εμπλέκονται στην πρόσδεση-πρόσληψη καρβαπενεμών από το κύτταρο (Li et al., 2012), 2.) έκφραση αντλιών εκροής (*efflux pumps*) που αποβάλλουν τα αντιβιοτικά εκτός κυττάρου, καθώς και 3.) με παραγωγή ενζύμων που αδρανοποιούν το αντιβιοτικό (Pang et al., 2019).

Στην **επίκτητη** αντοχή, η ανθεκτικότητα προσδίδεται στα βακτήρια μέσω μεταλλαγών στο γενετικό τους υλικό. Αυτές αφορούν τυχαίες χρωμοσωμικές μεταλλάξεις σε γονίδια που τροποποιούν την έκφραση μιας πρωτεΐνης ή την απόκτηση εξωγενούς DNA από άλλα βακτήρια με οριζόντια μεταφορά (Breidenstein

et al., 2011). Η **προσαρμοστική** αντοχή, αφορά το σχηματισμό βιομεμβρανών που λειτουργούν ως εμπόδιο στη διάχυση του αντιβιοτικού, όπως συμβαίνει με τη *Pseudomonas aeruginosa* που δημιουργεί biofilms στους πνεύμονες μολυσμένων ασθενών με κυστική ίνωση, αλλαγές στη ρύθμιση των αντλιών εκροής, την απενεργοποίηση των αντιβιοτικών μέσω ενζύμων και όλες τις περιβαλλοντικά οφειλόμενες αλλαγές στο γονιδίωμα των βακτηρίων (Drenkard, 2003).

Στους βιοχημικούς μηχανισμούς αντοχής περιλαμβάνονται η τροποποίηση του στόχου δράσης του αντιβιοτικού, η αδρανοποίησή του μέσω ενζύμων, η μειωμένη είσοδος του στο μικροοργανισμό λόγω απώλειας των πορινών (πρωτεΐνες-μικρά κανάλια των κυτταρικών τοιχωμάτων των Gram (-) βακτηρίων που διευκολύνουν την είσοδο του αντιβιοτικού) ή/και η ενεργητική αποβολή του αντιβιοτικού μέσω των αντλιών εκροής (*efflux pumps*). Για παράδειγμα, οι β-λακταμάσες είναι ένζυμα που αδρανοποιούν τις β-λακτάμες προκαλώντας διάσπαση του αμιδικού δεσμού του β-λακταμικού δακτυλίου των συγκεκριμένων αντιβιοτικών (Pang et al., 2019).

Για τη θεραπεία ασθενών με λοιμώξεις οφειλόμενες σε βακτήρια, χρησιμοποιείται εκτεταμένα μια κατηγορία αντιβιοτικών, οι β-λακτάμες, που θεωρούνται από τα αποτελεσματικότερα και πιο ασφαλή για χορήγηση. Ωστόσο, τα ένζυμα λακταμάσες που απαντώνται στα Gram (-) βακτήρια, έχουν την ικανότητα αποδόμησης των β-λακταμών με υδρόλυση.

Οι AmpC β-λακταμάσες είναι κεφαλοσπορινάσες, ένζυμα που κωδικοποιούνται από το DNA πολλών ειδών της οικογένειας *Enterobacteriaceae* και άλλων ειδών, παρέχοντας αντοχή έναντι της κεφαζολίνης, των περισσότερων πενικιλινών, αλλά και έναντι συνδυασμών αναστολέων της β-λακταμάσης με β-λακτάμες. Σε πολλά βακτήρια, η παραγωγή των AmpC ενζύμων επάγεται και εκφράζονται σε υψηλές συγκεντρώσεις μέσω μεταλλάξεων. Η υπερέκφραση των ενζύμων οδηγεί σε υψηλή ανθεκτικότητα των οργανισμών σε ευρέος φάσματος κεφαλοσπορίνες, συμπεριλαμβανομένης της κεφταζιδίμης και της κεφοταξίμης. Τα γονίδια της ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά, αν και πιο σπάνια, μπορούν να εντοπιστούν και σε εξωχρωμοσωμικά γενετικά στοιχεία, τα πλασμίδια (Jacoby, 2009).

Η ψευδομονάδα διαθέτει τη χρωμοσωμική κεφαλοσπορινάση AmpC, η έκφραση της οποίας επάγεται έπειτα από έκθεση σε ένα αντιβιοτικό β-λακτάμης (Driscoll et al., 2007; Lister et al., 2009).

Στα στελέχη άγριου φαινοτύπου, εντοπίζονται μικρές ποσότητες του ενζύμου AmpC, η παραγωγή του οποίου μπορεί να αυξηθεί παρουσία β-λακτάμης, προσφέροντας σταδιακά ανοχή στις αντιβακτηριακές β-λακτάμες. Ευρήματα ερευνών έως σήμερα, υποστηρίζουν ότι η κεφαλοσπορινάση AmpC από μόνη της δεν προκαλεί σημαντική μεταβολή στην ευαισθησία της ψευδομονάδας στις καρβαπενέμες. Από την άλλη, σε συνδυασμό με άλλους εγγενείς μηχανισμούς, όπως οι πορίνες και οι αντλίες εκροής, αλλά και οι επίκτητες β-λακτάμες, μπορεί να ενισχύσει την ανοχή στα αντιβιοτικά (Driscoll et al., 2007; Jacoby, 2009; Lister et al., 2009).

4. ΠΑΘΟΓΟΝΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΚΟΛΥΜΒΗΤΙΚΩΝ ΔΕΞΑΜΕΝΩΝ

Η χημική, φυσική, καθώς και η μικροβιολογική ποιότητα υδάτων κολυμβητικών δεξαμενών επηρεάζεται από ποικίλους παράγοντες με κυριότερους τα κατασκευαστικά χαρακτηριστικά της δεξαμενής, την πηγή υδροληψίας του νερού που χρησιμοποιείται, τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του, καθώς και ο τρόπος λειτουργίας της κολυμβητικής εγκατάστασης, αναφορικά με το σκοπό για τον οποίο χρησιμοποιείται και το είδος των χρηστών/λουόμενων (ΚΕΕΛΠΝΟ, 2016).

Υδατα κολύμβησης των οποίων τα ποιοτικά χαρακτηριστικά δεν ικανοποιούν τα θεσπισμένα πρότυπα ποιότητας, αποτελούν δυνητική εστία μετάδοσης ασθενειών υδρικής προέλευσης (Martins, 1995). Παράγοντες όπως ο συνολικός αριθμός ατόμων που χρησιμοποιούν την κολυμβητική δεξαμενή μια δεδομένη χρονική στιγμή, η διάρκεια σε ώρες κατά τις οποίες γίνεται χρήση της δεξαμενής ημερησίως, η περίοδος κολυμβητικής αιχμής, καθώς και η ηλικία των χρηστών η οποία επηρεάζει το βαθμό συμμόρφωσής τους στους ισχύοντες κανόνες υγιεινής, π.χ. βρέφη και μικρά παιδιά, δύνανται να υποβαθμίσουν σε σημαντικό βαθμό τη μικροβιολογική ποιότητα του νερού (ΚΕΕΛΠΝΟ, 2016).

Οι κυριότερες φυσικοχημικές παράμετροι που εξετάζονται κατά τους επιτόπιους ελέγχους είναι η μέτρηση του pH και η συγκέντρωση του ελεύθερου υπολειμματικού χλωρίου, καθώς η χλωρίωση συνιστά την επικρατέστερη εφαρμοζόμενη απολυμαντική τεχνική. Παρόλα αυτά, αρκετοί οργανισμοί δύνανται να προστατευτούν από τη δράση του απολυμαντικού μέσου χάρη στα κατασκευαστικά χαρακτηριστικά της δεξαμενής και το υλικό των χρησιμοποιούμενων φίλτρων (Martins, 1995). Η εκτίμηση του συνολικού αριθμού των χρηστών, είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς όσο περισσότεροι χρήστες βρίσκονται εντός της κολυμβητικής δεξαμενής, τόσο αυξάνει ο κίνδυνος επαφής με παθογόνα που μπορεί να έχουν απελευθερωθεί στο νερό. Σε αυτή την περίπτωση, οι επιπτώσεις στην υγεία των λουόμενων είναι ανάλογες με την περίπτωση της έκθεσης σε νερό υποβαθμισμένης ποιότητας, λόγω μόλυνσης από κόπρανα. Έχει διαπιστωθεί ισχυρή συσχέτιση ανάμεσα στο συνολικό αριθμό χρηστών και στις συγκεντρώσεις παθογόνων μικροοργανισμών στο νερό (Graczyk et al., 2007).

4.1. Ιοί

Οι λοιμώξεις που οφείλονται σε ιούς, έπειτα από την έκθεση σε μολυσμένο νερό κολυμβητικών δεξαμενών, είναι εξαιρετικά σπάνιες (WHO, 2006). Δεδομένου ότι οι ιοί απαιτούν έναν ξενιστή για να πολλαπλασιαστούν, ο πολλαπλασιασμός τους δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί στο νερό και η παρουσία τους σε αυτό είναι απόρροια μιας προηγηθείσας ρύπανσης. Οι συχνότερα αναφερόμενες λοιμώξεις ιογενούς αιτιολογίας αποδίδονται στους αδενοϊούς, τους νοροϊούς και τον ιό της ηπατίτιδας Α. Ιικοί παράγοντες που σχετίζονται με την πρόκληση ασθενειών υδρικής προέλευσης, είναι κατά σειρά οι αδενοϊοί, οι νοροϊοί και ο ιός της ηπατίτιδας Α (WHO, 2006; Sinclair et al., 2009; Lugo et al., 2021).

4.1.1. Αδενοϊοί

Συνολικά, 6 είδη (Α-Ζ) και 51 ορότυποι (Hunter, 1997) απαρτίζουν το γένος των αδενοϊών (Echavarría, 2004). Τα κύρια όργανα και συστήματα που προσβάλλουν είναι το ανώτερο και κατώτερο αναπνευστικό, το γαστρεντερικό σύστημα, καθώς εκκρίνονται στο εντερικό βλεννογόνο, καθώς και οι οφθαλμοί.

Η μετάδοση του ιού στις κολυμβητικές δεξαμενές πραγματοποιείται μέσω 3 οδών έκθεσης: κατάποση νερού, άμεση επαφή του βλεννογόνου του επιπεφυκότα με το νερό, άμεση επαφή του βλεννογόνου του ανώτερου αναπνευστικού με το νερό (D' Angelo et al., 1979). Από τη δεκαετία του 1950 υπάρχουν 11 δημοσιευμένες μελέτες για περιστατικά νοσηρότητας χρηστών κολυμβητικών δεξαμενών από αδενοϊούς (Sinclair et al., 2009), εκ των οποίων η μία είναι η έρευνα των Paparetropoulou & Vantarakis, (1998) η οποία αφορούσε μια επιδημία φαρυγγοεπιπεφυκίτιδας από την οποία νόσησαν 80 κολυμβητές. Στα κυριότερα συμπτώματα συγκαταλέγονται ο πονόλαιμος, η φαρυγγίτιδα, η οξεία γαστρεντερίτιδα, η επιπεφυκίτιδα και ο υψηλός πυρετός (Foy et al., 1968; CDC, 2019). Ωστόσο, έχουν αναφερθεί και περιπτώσεις ατόμων που νόσησαν και υπέφεραν από έντονες κεφαλαλγίες ή ακόμα και απώλεια όρεξης (Martone et al., 1980).

Ο πιο σημαντικός αιτιολογικός παράγοντας που συμβάλλει στην μετάδοση της ιικής μόλυνσης είναι η ανεπαρκής εφαρμογή χλωρίου και η αναποτελεσματική λειτουργία των φίλτρων της πισίνας (Foy et al., 1968; Caldwell et al., 1974; D' Angelo, 1979; Paparetropoulou & Vantarakis, 1998). Συγκέντρωση ελεύθερου υπολειμματικού χλωρίου άνω των 0.3 mg/L έχει αποδειχθεί ότι είναι αποτελεσματική στον περιορισμό της μετάδοσης των αδενοϊών (Caldwell et al., 1974), ενώ όταν το υπολειμματικό

χλώριο είναι σε συγκέντρωση μικρότερη από 0.2 mg/L, δεν επιφέρει καμία επίδραση (Papapetropoulou & Vantarakis, 1998).

4.1.2. Νοροϊοί

Οι νοροϊοί είναι η σημαντικότερη αιτία επιδημιών ιογενούς προέλευσης σε νερά αναψυχής (Sinclair et al., 2009). Κύριες οδοί έκθεσης είναι η άμεση επαφή με μολυσμένο άτομο, η εισπνοή αερολυμάτων, η κατανάλωση μολυσμένου φαγητού ή νερού και η δερματική επαφή με μολυσμένες επιφάνειες (ΚΕΕΛΠΝΟ, 2016; CDC, 2021a). Είναι άκρως μολυσματικοί (Sinclair et al., 2009), μεταδίδονται μέσω της εντεροστοματικής οδού και εντοπίζονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα εμέσματα και τα κόπρανα ασθενών (Podewils et al., 2006; Moresco et al., 2012). Ανιχνεύονται σε εξεταζόμενα δείγματα έως και 2 εβδομάδες αφού υποχωρήσουν τα συμπτώματα (ΚΕΕΛΠΝΟ, 2016). Τα συμπτώματα συνήθως περιορίζονται στο άτομο και έχουν διάρκεια 24-72 ώρες. Εκδηλώνονται περίπου το πρώτο 10ωρο μετά την έκθεση, παρόλο που η επώαση του ιού κυμαίνεται στις 24 έως 48 ώρες (Sinclair et al., 2009). Οι επιδημίες υδρικής προέλευσης από νοροϊούς σχετίζονται κυρίως με φυσικά ύδατα αναψυχής (π.χ. ποτάμια και λίμνες), στα οποία δεν εφαρμόζεται καμία απολυμαντική τεχνική (ΚΕΕΛΠΝΟ, 2016). Αντίθετα, οι βιβλιογραφικές αναφορές σχετικά με περιστατικά μόλυνσης από νοροϊό σε κολυμβητικές δεξαμενές, είναι αρκετά περιορισμένες, δεδομένου ότι η απολυμαντική τεχνική που εφαρμόζεται είναι αποτελεσματική (Sinclair et al., 2009; Lugo et al., 2021).

4.1.3. Ιός Ηπατίτιδας Α

Η ηπατίτιδα Α είναι μια οξεία, αυτοπεριοριζόμενη νόσος του ήπατος, η οποία προκαλείται από τον ιό της ηπατίτιδας Α (Hepatitis A Virus, HAV). Ο ιός HAV μεταδίδεται κυρίως μέσω της στοματικής οδού, λόγω της κατανάλωσης μολυσμένου νερού ή τροφίμων που έχουν έρθει σε άμεση επαφή με κόπρανα ατόμων που πάσχουν από τη συγκεκριμένη νόσο (Nelson et al., 2020). Τα συμπτώματα της νόσου είναι ιδιαίτερα οξυμένα στις ευπαθείς πληθυσμιακές ομάδες, όπως οι ηλικιωμένοι, ανοσοκατασταλμένοι ασθενείς, ασθενείς με χρόνιες ηπατικές νόσους ή άλλα υποκείμενα νοσήματα (Keemer & Miskovsky, 2000).

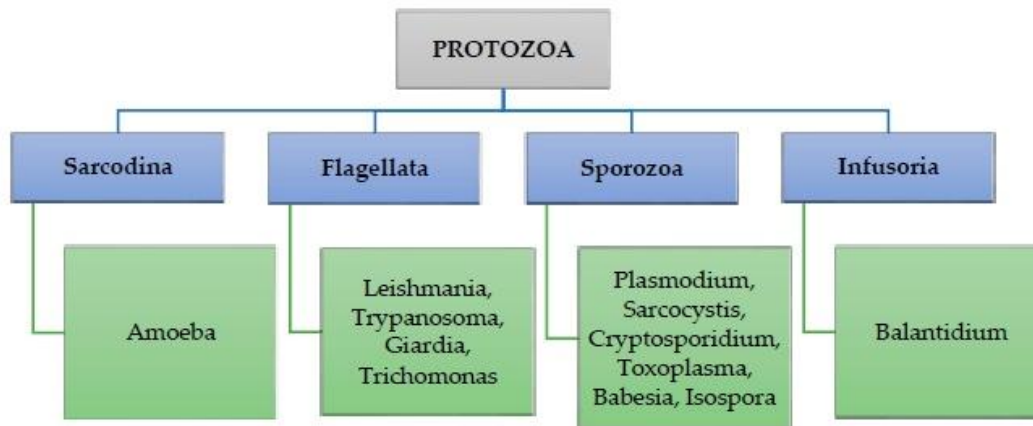
Αναφορικά με τη μετάδοση του ιού HAV μέσω δημόσιων συστημάτων ύδρευσης, υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές για κρούσματα ηπατίτιδας Α μεταξύ χρηστών ατομικών ή κοινοτικών πηγαδιών, γεώτρητων φρεάτων και κολυμβητικών δεξαμενών. Το νερό στα συγκεκριμένα συστήματα ήταν μολυσμένο από τις

δισεκδύσεις λυμάτων των σηπτικών συστημάτων αποχέτευσης της ευρύτερης περιοχής, όπου σημειώθηκαν τα κρούσματα (Barrett et al., 2019).

Η μετάδοση του ιού της ηπατίτιδας Α μέσω του νερού παρεμποδίζεται, όταν το νερό υφίσταται κατάλληλη επεξεργασία και διάλυση εντός των δημόσιων συστημάτων ύδρευσης (Fiore, 2004). Επομένως, εγκαταστάσεις υδάτων αναψυχής δεν αποτελούν κίνδυνο για την έξαρση κρουσμάτων ηπατίτιδας Α, όταν στις δεξαμενές τους (κολυμβητικές, υδρομάλαξης) εφαρμόζεται επαρκής δόση απολυμαντικού και περιορίζονται οι επιμολύνσεις από διεισδύσεις λυμάτων στο δίκτυο διανομής του νερού με το οποίο πληρώνεται η δεξαμενή και από ατυχήματα κοπρανόδους αιτιολογίας (π.χ. βρέφη και μικρά παιδιά εντός της δεξαμενής) (Fiore, 2004; Nelson et al., 2020). Ωστόσο, στη μελέτη των Mahoney et al. (1992) περιγράφεται η μετάδοση του ιού ΗΑV σε 20 άτομα ηλικίας 4 έως 36 ετών, έπειτα από την κολύμβηση στην ίδια δημόσια πισίνα. Από ηπατίτιδα Α νόσησαν κυρίως μικρά παιδιά ηλικίας 5 έως 9 ετών, ενώ όλοι οι χρήστες παρέμειναν στην πισίνα για περισσότερο από 1 ώρα και βύθισαν το κεφάλι τους κάτω από την επιφάνεια του νερού. Η μόλυνση αποδόθηκε στη διείσδυση λυμάτων από τον αγωγό αποχέτευσης στον αγωγό ύδρευσης του νερού τροφοδοσίας της δεξαμενής (Mahoney et al., 1992). Σε μια άλλη αντίστοιχη περίπτωση, αιτιολογικοί παράγοντες μετάδοσης της μόλυνσης ήταν ο αυξημένος αριθμός χρηστών εντός της κολυμβητικής δεξαμενής και η μη εφαρμογή χλωρίωσης για απολύμανση του νερού (Solt et al., 1994; WHO, 2006).

4.2. Παράσιτα

Στη Γη υπάρχουν περίπου 15000 είδη πρωτοζώων (Cox, 2002). Στις νόσους που σχετίζονται με τη χρήση κολυμβητικών δεξαμενών στο νερό των οποίων εντοπίζονται πρωτόζωα κοπρανόδους προέλευσης, περιλαμβάνονται εκείνες που οφείλονται κυρίως σε δύο παράσιτα: το Κρυπτοσπορίδιο (*Cryptosporidium*) και την *Giardia* (Omarova et al., 2018). Τα δύο αυτά παράσιτα είναι υπό τη μορφή ανθεκτικών κυστών ή ωοκυστών και είναι σημαντικοί φορείς διαρροϊκών νόσων (Karanis et al., 2007). Οι κύστες δεν επηρεάζονται από περιβαλλοντικές πιέσεις, ούτε από τα συνήθη απολυμαντικά μέσα (π.χ. χλώριο) (Hajdu et al., 2008). Είναι άκρως μολυσματικά ως παράσιτα και καταλήγουν σε υψηλές συγκεντρώσεις στο νερό από εκκρίσεις μολυσμένων ατόμων (WHO, 2006). Στην Εικόνα 4 παρουσιάζονται οι κλάσεις και τα γένη πρωτόζωων που είναι υψίστης σημασίας για τη Δημόσια Υγεία.



Εικόνα 4: Ταξινόμηση παρασιτικών πρωτόζωων (Πηγή: Omarova et al., 2018).

Οι κύστες της *Giardia* και οι οοκύστες του *Cryptosporidium* διεισδύουν στα συστήματα επεξεργασίας των υδάτων χάρη στο μικρό μέγεθός τους, που κυμαίνεται μεταξύ 1-17 μm. Επομένως, μπορεί να προκαλέσουν κρούσματα και επιδημίες Γιαρδίασης και Κρυπτοσποριδίωσης, αντίστοιχα, λόγω της κατάποσης νερού στο οποίο έχει εφαρμοστεί πρότερη επεξεργασία (Smith, 1998).

4.2.1. Κρυπτοσπορίδιο

Το κρυπτοσπορίδιο είναι ένα ενδοκυτταρικό παράσιτο αναγνωρισμένο ως ένα άκρως μολυσματικό παθογόνο και ως η πιο συνήθης αιτία εκδήλωσης διαρροϊκής νόσου σε παγκόσμιο επίπεδο (Guerrant, 1997). Προσβάλλει ανθρώπους και άλλους ζωικούς οργανισμούς (π.χ. πτηνά, ερπετά, ιχθύες, βοοειδή) (ΚΕΕΛΠΙΝΟ, 2016). Η λοίμωξη από το πρωτόζωο *Cryptosporidium parvum* χαρακτηρίζεται από πυρετό, ναυτίες, εμετούς, διάρροια, κράμπες και κοιλιακό άλγος (WHO, 2006; ΚΕΕΛΠΙΝΟ, 2016). Η διάρκεια εκδήλωσης των συμπτωμάτων κυμαίνεται από 1 έως 2 εβδομάδες (Guerrant, 1997).

Τις τελευταίες 3 δεκαετίες έχει καταγραφεί πληθώρα εξάρσεων κρυπτοσποριδίωσης σε χώρες της Ευρώπης και της Βόρειας Αμερικής (Karanis et al., 2007). Το μεγαλύτερο ποσοστό των κρουσμάτων κρυπτοσποριδίωσης σε ανθρώπους αποδίδεται σε 2 κύρια είδη από τα 22 συνολικά αναγνωρισμένα, το *Cryptosporidium parvum* και το *Cryptosporidium hominis* (Morgan-Ryan et al., 2002). Καταγεγραμμένα κρούσματα της νόσου που σχετίζονται με τη χρήση κολυμβητικών δεξαμενών, αποτελούν απόδειξη της ικανότητας του παρασίτου να προκαλεί λοιμώξεις, ακόμα και αν προσλαμβάνεται με την κατάποση εξαιρετικά μικρών ποσοτήτων πλήρως

χλωριωμένου νερού. Αυτό οφείλεται στον υψηλό βαθμό αντοχής του κρυπτοσποριδίου στη χλωρίωση και στη μερική απομάκρυνσή του από τα αμμόφιλτρα (McAnulty et al., 1994).

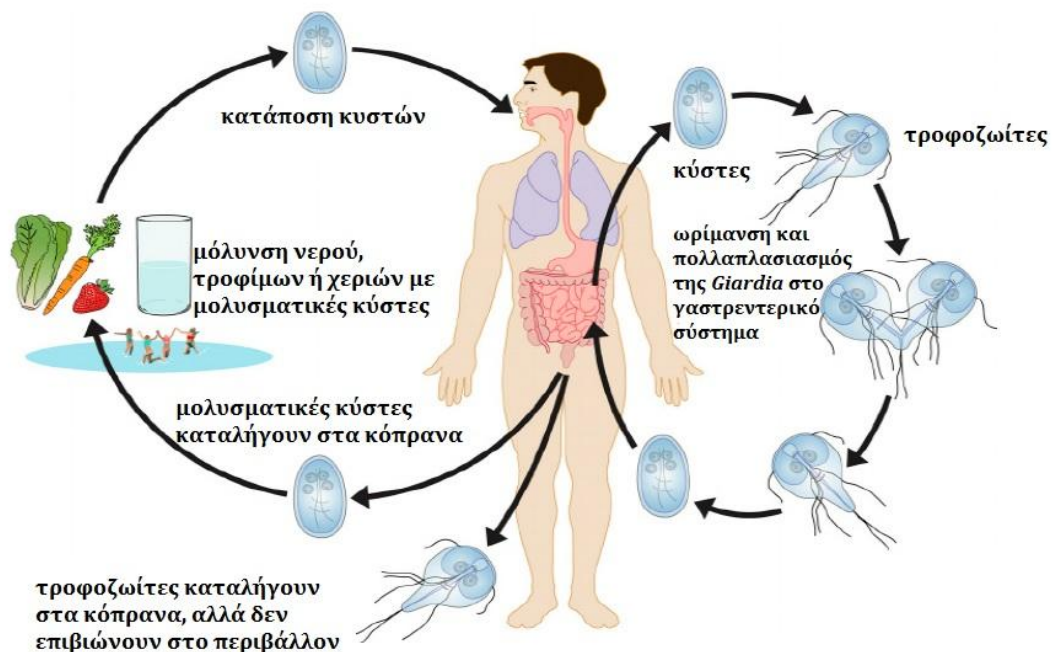
Στη μελέτη των Karanis et al. (2007) γίνεται μια εκτενής παρουσίαση όλων των καταγεγραμμένων και δημοσιευμένων κρουσμάτων ασθενειών υδρικής προέλευσης που οφείλονται σε παράσιτα. Σχετικά με τα κρούσματα κρυπτοσποριδίωσης και γιαρδίασης, το 50.3% (83) και το 13.6% (18) αυτών, αντίστοιχα, σχετιζόταν με μολυσμένα νερά αναψυχής. Η επιμόλυνση κολυμβητικών δεξαμενών από παράσιτα, οφείλεται κυρίως σε ατυχήματα απελευθέρωσης περιττωμάτων (σε φουσκωτές πισίνες και πισίνες για μικρά παιδιά). Επιπροσθέτως, πιθανές κατασκευαστικές αστοχίες και κακή συντήρηση των διατάξεων σωληνώσεων, δύνανται να συμβάλλουν στην εξάπλωση των συγκεκριμένων πρωτόζωων (Joce et al., 1991).

Στην Ελλάδα, έχουν ανιχνευτεί τα παράσιτα *Cryptosporidium* και *Giardia* στα επιφανειακά νερά τεχνητών ταμιευτήρων, κολυμβητικών δεξαμενών και σε δείγματα πόσιμου νερού (Karanis et al., 2002). Η λοιμογόνος δόση (Infective Dose, ID₅₀) που επηρεάζει το 50% του εκτιθέμενου πληθυσμού, για το κρυπτοσπορίδιο είναι περίπου 132 ωοκύστες (DuPont et al., 1995). Ωστόσο, έχει περιγραφεί εκδήλωση συμπτωμάτων κρυπτοσποριδίωσης, έπειτα από την κατάποση < 30 ωοκύστεων (Guerrant, 1997). Σε κάθε διαρροϊκό επεισόδιο σημειώνεται απελευθέρωση εκατομμυρίων κρυπτοσποριδίων (ΚΕΕΛΠΙΝΟ, 2016).

Στη μελέτη των Suppes et al. (2016), πραγματοποιήθηκε ποσοτική εκτίμηση διακινδύνευσης από μόλυνση με κρυπτοσπορίδιο στις ηλικιακές ομάδες των ενηλίκων (> 18 ετών) και των παιδιών (≤ 18 ετών). Ο μέσος εκτιμώμενος κίνδυνος για λοίμωξη από *Cryptosporidium* υπολογίστηκε στις $2,6 \times 10^{-4}$ λοιμώξεις/επίσκεψη σε κολυμβητική δεξαμενή. Η τιμή της μέσης διακινδύνευσης εξαρτάται από την κολυμβητική συμπεριφορά των χρηστών. Πιο αναλυτικά, ο μέσος εκτιμώμενος κίνδυνος για τους ενήλικες ήταν 2.2×10^{-2} λοιμώξεις/έτος και για τα παιδιά 2.9×10^{-2} λοιμώξεις/έτος (μέση τιμή: 2.5×10^{-2} λοιμώξεις/έτος, ανεξαρτήτως ηλικίας). Η υψηλότερη τιμή κινδύνου για την ηλικιακή ομάδα των ≤18 ετών αποδόθηκε στην αυξημένη διάρκεια παραμονής των νεαρών ατόμων στην πισίνα και στην κατάποση μεγαλύτερων ποσοτήτων νερού κατά την κολύμβηση.

4.2.2. *Giardia lamblia*

Η λοίμωξη από το εντερικό πρωτόζωο *Giardia lamblia*, γνωστή ως Γιαρδίαση (Giardiasis) χαρακτηρίζεται από εμετούς, έντονη διάρροια μεγάλης διαρκείας, απώλεια όρεξης, κόπωση, κράμπες και κόπρανα με δυσάρεστη οσμή (Harter et al., 1984; WHO, 2006). Στην Εικόνα 5 περιγράφεται σχηματικά ο κύκλος ζωής των πρωτοζώων του γένους *Giardia*. Το παράσιτο απαντάται σε 2 μορφές: ως τροφοζώιτης που είναι υπεύθυνος για την πρόκληση νοσηρότητας και ως αδρανής κύστη που είναι υπεύθυνη για τη μετάδοση και διασπορά της λοίμωξης (Katz et al., 2006).



Εικόνα 5: Ο κύκλος ζωής της *Giardia* (Πηγή: Esch & Petersen, 2013, αναπροσαρμογή)

Η λοίμωξη προκαλείται λόγω της κατανάλωσης νερού ή τροφίμων που έχουν μολυνθεί από κόπρανα, καθώς και μέσω της επαφής με επιφάνειες που συνιστούν εστίες μικροβίων. Στο πεπτικό σύστημα του ξενιστή και πιο συγκεκριμένα στο λεπτό έντερο, κάθε κύστη που έχει εισχωρήσει, παράγει 2 τροφοζωίτες, οι οποίοι στη συνέχεια διαιρούνται με διχοτόμηση. Παραμένουν στον αυλό του λεπτού εντέρου, είτε ελεύθεροι, είτε προσκολλημένοι στη βλεννογόνο στιβάδα. Η δημιουργία ανθεκτικών κύστεων από τροφοζωίτες επιτελείται στο κόλον του ξενιστή. Στα κόπρανα του μολυσμένου ατόμου εντοπίζονται, τόσο κύστες, όσο και τροφοζωίτες. Οι κυστοειδείς μορφές του παρασίτου είναι ιδιαίτερα ανθεκτικές στο περιβάλλον και

μπορούν να επιβιώσουν για αρκετούς μήνες σε νερά με χαμηλή θερμοκρασία (Omarova et al., 2018).

Το πρώτο περιστατικό γιαρδίασης σημειώθηκε το 1982 στην Πολιτεία της Ουάσινγκτον και αφορούσε τη χρήση πισίνας για τη διεξαγωγή μαθημάτων κολύμβησης σε βρέφη και μικρά παιδιά. Η διερεύνηση του ζητήματος άρχισε όταν έγιναν αναφορές για συμπτώματα διάρροιας μεταξύ των συμμετεχόντων. Συνολικά, 75 παιδιά έλαβαν συμμετοχή στα συγκεκριμένα μαθήματα. Από δείγματα κοπράνων που ελήφθησαν, βρέθηκε το παράσιτο σε 43 παιδιά (61%), σε 21 μητέρες (39%) και σε 6 πατέρες (28%). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός, ότι κατά το μικροβιολογικό έλεγχο δειγμάτων νερού από 2 πισίνες της εγκατάστασης, δεν ανιχνεύθηκαν ούτε ολικά κολοβακτηριοειδή, ούτε μεσόφιλοι μικροοργανισμοί (OMX). Η αλκαλικότητα και το pH ήταν εντός των αποδεκτών ορίων. Ωστόσο, οι τιμές θολότητας ήταν αυξημένες, ενώ το ελεύθερο υπολειμματικό χλώριο δεν ξεπερνούσε τα 3 ppm. Η διασπορά του παρασίτου αποδόθηκε σε ατυχήματα απελευθέρωσης περιττωμάτων από τα μικρά παιδιά μέσα στο νερό, καθώς και στο μεγάλο αριθμό χρηστών (παιδιά και ενήλικες) εντός της δεξαμενής κατά τη διεξαγωγή των μαθημάτων (Harter et al., 1984).

Ένα δεύτερο περιστατικό γιαρδίασης σημειώθηκε το 1986 σε ένα ξενοδοχείο στον Καναδά, όπου συνολικά προσβλήθηκαν από το παράσιτο 59 επισκέπτες (30 κλινικά επιβεβαιωμένοι) ηλικίας 3-58 ετών. Στα συμπτώματα περιλαμβάνονταν: διάρροια (n=48), κράμπες (n=38), κόπρανα με πολύ δυσάρεστη οσμή (n=29), απώλεια όρεξης (n=23), κόπωση (n=20), εμετοί (n=18), υδαρά κόπρανα (n=15), πυρετός (n=11) και απώλεια βάρους (n=10). Όλοι οι ασθενείς είχαν κάνει χρήση της νεροτσουλήθρας του ξενοδοχείου, στην οποία εφαρμόζονταν βρωμίωση και διύλιση του νερού σε αμμόφιτρα ως τεχνικές επεξεργασίας και καθαρισμού. Η λοίμωξη αποδόθηκε στην κατάποση ποσοτήτων νερού κατά τη χρήση της νεροτσουλήθρας, το οποίο είχε μολυνθεί από μια φουσκωτή πισίνα για παιδιά, το περιεχόμενο της οποίας άδειασε στην κολυμβητική δεξαμενή με τη νεροτσουλήθρα (Greensmith et al., 1988).

Το μοναδικό καταγεγραμμένο περιστατικό γιαρδίασης στην Ελλάδα, σημειώθηκε σε ξενοδοχείο της Κρήτης την περίοδο Μάιος-Ιούνιος 1997, όπου 70 Άγγλοι τουρίστες προσβλήθηκαν από το παθογόνο, ύστερα από κατανάλωση μολυσμένου πόσιμου νερού. Η μόλυνση του νερού αποδόθηκε στη διείσδυση λυμάτων από τον αγωγό

αποχέτευσης στην ιδιόκτητη πηγή υδροληψίας. Δεν υπήρχε σύστημα φίλτρανσης του νερού, ούτε επαρκής απολύμανσή του (Hadjichristodoulou et al., 1998).

4.2.3. Αμοιβάδες του γένους *Naegleria* και *Acanthamoeba*

Οι αμοιβάδες που ανήκουν στα γένη *Acanthamoeba*, *Naegleria* και *Balamuthia* είναι αερόβια, ευκαιριακά παθογόνα για τον άνθρωπο, με παγκόσμια κατανομή και διαβιούν ελεύθερες σε υδάτινα ενδιαιτήματα και στο έδαφος και τρέφονται με βακτήρια (Karanis et al., 2007; ΚΕΕΛΠΝΟ, 2016). Το μοναδικό είδος της *Naegleria* που προκαλεί λοιμώξεις στον άνθρωπο είναι η *Naegleria fowleri*. Εντοπίζεται κυρίως σε συστήματα εσωτερικών υδάτων, όπως λίμνες και ποτάμια. Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης για τη *Naegleria fowleri* είναι 40-45 °C και για την *Acanthamoeba* 25-30 °C (Karanis et al., 2007). Επομένως, οι αμοιβάδες αυτές απαντώνται σε θερμά νερά, όπως φυσικές ιαματικές πηγές, γεωθερμικές πηγές, θερμά υγρά απόβλητα βιομηχανιών. Τέλος, δύνανται να ανιχνευθούν και σε πισίνες οι οποίες υφίστανται ανεπαρκή συντήρηση και μερική ή καθόλου χλωρίωση (CDC, 2020b).

Προκαλούν σοβαρές λοιμώξεις στους ανθρώπους. Πιο αναλυτικά, προκαλούν πρωτοπαθή αμοιβαδική μηνιγγοεγκεφαλίτιδα (*Naegleria fowleri*) και κοκκιωματώδη αμοιβαδική εγκεφαλίτιδα (*Acanthamoeba*, *Balamuthia*), καθώς μεταδίδονται μέσω μολυσμένων θερμών υδάτων (Karanis et al., 2007; CDC, 2020b). Εισέρχονται μέσω της ρινικής κοιλότητας και από εκεί καταλήγουν στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα του προσβεβλημένου ατόμου, όπου προκαλούν θανάτωση του εγκεφαλικού ιστού (CDC, 2020b).

Η *Naegleria fowleri* σχετίζεται με ένα μεγάλο αριθμό θανατηφόρων κρουσμάτων μηνιγγοεγκεφαλίτιδας σε άτομα που έκαναν χρήση της ίδιας εσωτερικής κολυμβητικής δεξαμενής, το διάστημα 1962-1965 στην Τσεχία. Ο εκτιμώμενος αριθμός ατόμων που μολύνθηκαν από το παράσιτο ανέρχεται στα 16 άτομα. Ακολούθησε ανακατασκευή της κολυμβητικής δεξαμενής και άνοιγμα εκ νέου 2 χρόνια αργότερα. Στελέχη του παθογόνου απομονώθηκαν για πρώτη φορά το 1977. Η ανεπαρκής απολύμανση του νερού, σε συνδυασμό με μια κοιλότητα σε ένα κατεστραμμένο τμήμα του τοιχώματος της δεξαμενής, διαμόρφωσαν τις απαραίτητες προστατευτικές συνθήκες που ευνόησαν την επιβίωση και αναπαραγωγή του παρασίτου. Την περίοδο που έγινε η έξαρση των κρουσμάτων, ως μέσο απολύμανσης

εφαρμοζόταν χλώριο σποραδικά, από ανθρώπινο χέρι, με αποτέλεσμα τα επίπεδα του ελεύθερου υπολειμματικού χλωρίου να είναι ιδιαίτερα μειωμένα (Kadlec et al., 1980).

Οι βιβλιογραφικές αναφορές για το γένος *Acanthamoeba* είναι αρκετά σπάνιες. Ωστόσο, συστήνεται σε άτομα που χρησιμοποιούν φακούς επαφής, να αποφεύγουν να τους φορούν, όταν εισέρχονται σε κολυμβητικές δεξαμενές (Stehr-Green et al., 1987).

4.3. Βακτήρια

4.3.1. Κοπρανόδους προέλευσης - *Shigella spp.*

Τα είδη του γένους *Shigella* είναι Gram (-) αρνητικοί, προαιρετικά αναερόβιοι, ραβδόμορφοι βάκιλλοι. Ζυμώνουν τη γλυκόζη, όχι όμως τη λακτόζη, παράγοντας οξύ, αντί για αέριο (WHO, 2006). Στο συγκεκριμένο βακτηριακό γένος ανήκουν 4 είδη/οροομάδες (ΕΟΔΥ, 2021b):

1. *Shigella dysenteriae* (οροομάδα Α)
2. *Shigella flexneri* (οροομάδα Β)
3. *Shigella boydii* (οροομάδα C)
4. *Shigella sonnei* (οροομάδα D)

Η περίοδος επώασης του βακτηρίου μέχρι την εκδήλωση της αυτοπεριοριζόμενης νόσου είναι 1-3 ημέρες. Τα συμπτώματα διαρκούν περίπου για 1 εβδομάδα (WHO, 2006). Η συμπτωματολογία της σιγκέλλωσης χαρακτηρίζεται από διάρροια (συνήθως αιμορραγική), ναυτία, εμετό, πυρετό και συσπάσεις του κοιλιακού τοιχώματος (WHO, 2006; ΚΕΕΛΠΝΟ, 2016).

Το βακτήριο της *Shigella* υπάρχει σε αφθονία στις διαρροϊκές κενώσεις ατόμων που έχουν μολυνθεί από το μικροοργανισμό, για χρονικό διάστημα έως και 2 εβδομάδες μετά το πέρας της νόσου. Στις περισσότερες περιπτώσεις, το βακτήριο μεταδίδεται μέσω της εντεροστοματικής οδού, άμεσα ή έμμεσα (από κόπρανα ή μη πλυμένα χέρια στο στόμα κάποιου ατόμου) (ΕΟΔΥ, 2021b). Η λοιμογόνος δόση (Infective Dose, ID₅₀) που επηρεάζει το 50% του εκτιθέμενου πληθυσμού, για τη *Shigella* είναι 10 έως 100 μικροοργανισμοί. Παρόλα αυτά, μικρότερες δόσεις από τις προαναφερόμενες προκαλούν εκδήλωση νόσου σε βρέφη, παιδιά και ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς (WHO, 2006).

Άλλος αναφερόμενος τρόπος μετάδοσης του βακτηρίου είναι μέσω της κατανάλωσης μολυσμένων τροφίμων και νερού ή έπειτα από κολύμβηση σε μολυσμένα ύδατα, επιφανειακά, κολυμβητικών δεξαμενών ή δεξαμενών υδρομάλαξης (ΚΕΕΛΠΝΟ, 2016; ΕΟΔΥ, 2021b).

Βιβλιογραφικά, αναφέρεται επιδημία σιγκέλλωσης, έπειτα από τη χρήση παιδικής κολυμβητικής δεξαμενής στην οποία πραγματοποιούνταν άδειασμα και πλήρωση με νερό από το δίκτυο σε ημερήσια βάση. Το συμβάν σημειώθηκε το 2001 στην Πολιτεία Αιόβα (Iowa) των Η.Π.Α. Η περιβαλλοντική διερεύνηση έδειξε ότι χρήση της πισίνας (η οποία δεν ξεπερνούσε σε βάθος τα 35 cm) έκαναν κυρίως πολύ μικρά σε ηλικία παιδιά, τα οποία δεν είχαν εκπαιδευτεί πλήρως στη χρήση τουαλέτας, καθώς και άτομα με συμπτώματα διάρροιας. Δεν εφαρμοζόταν καμία τεχνική απολύμανσης ή ανάδευσης του νερού της παιδικής πισίνας. Σε ένα από τα ληφθέντα δείγματα νερού ανιχνεύθηκαν θερμοανθεκτικά κολοβακτηριοειδή και *E. coli*. Συνολικά, νόσησαν 69 άτομα, εκ των οποίων τα 26 περιστατικά ήταν εργαστηριακά επιβεβαιωμένα. Η σιγκέλλωση προκλήθηκε από το είδος *Shigella sonnei* (οροομάδα D) (CDC, 2001).

4.3.2. Μη κοπρανώδη παθογόνα βακτήρια - *Legionella spp.*

Τα βακτήρια του γένους *Legionella* είναι Gram (-) αρνητικοί, ετερότροφοι, υποχρεωτικά αερόβιοι κοκκοβάκιλλοι, μεγέθους 0.3 μm-0.9 μm σε πλάτος και 2-20 μm σε μήκος και αποτελούν φυσική χλωρίδα του νερού. Για τη βέλτιστη ανάπτυξη και απομόνωσή τους, τόσο από κλινικές, όσο και από περιβαλλοντικές πηγές, απαιτούνται κατάλληλα θρεπτικά υλικά, κυρίως σίδηρος σε διαλυτή μορφή και κυστεΐνη (WHO, 2006; Diederer, 2008). Απαντώνται στο φυσικό περιβάλλον, σε συστήματα εσωτερικών υδάτων (ποτάμια, λίμνες, υδατορέματα), σε λάσπη και εδάφη με υγρασία, καθώς και σε τεχνητά συστήματα, όπως δεξαμενές υδρομάλαξης, σωληνώσεις, κρουνοί, πύργοι ψύξης συστημάτων κλιματισμού, δεξαμενές αποθήκευσης ύδατος, ντους, βρύσες, υδροψύκτες, κολυμβητικές δεξαμενές, ιαματικά λουτρά, σιντριβάνια και διακοσμητικές πισίνες (Diederer, 2008; ΕΟΔΥ, 2021a; CDC, 2021b). Οι ιδανικές θερμοκρασίες πολλαπλασιασμού τους κυμαίνονται στους 25-43 °C, ωστόσο μπορούν να επιβιώσουν και σε συστήματα θερμών υδάτων, όπου οι θερμοκρασίες ξεπερνούν τους 55 °C (Leoni et al., 2001).

Είναι ιδιαίτερα ανθεκτικά ως βακτήρια και μπορούν να επιβιώσουν σε πολύ ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες, για μεγάλο χρονικό διάστημα, σε ένα θερμοκρασιακό εύρος 0-68 °C και εύρος pH 5.0-8.5. Είναι ανθεκτικά στη συνήθη χλωρίωση που εφαρμόζεται κατά την επεξεργασία του νερού, με αποτέλεσμα να είναι εφικτή η είσοδος και ο πολλαπλασιασμός τους σε θερμά περιβάλλοντα (Diederer, 2008). Είδη του συγκεκριμένου γένους προκαλούν τη Λεγεωνέλλωση, μια οξεία βακτηριακή λοίμωξη του αναπνευστικού συστήματος (ΕΟΔΥ, 2021). Η νόσος διακρίνεται σε 2 κλινικές οντότητες (WHO, 2006; ΕΟΔΥ, 2021a), όπου αναφορικά με τα ψυχαγωγικά ύδατα συνδέονται με δημόσιες και ημιδημόσιες δεξαμενές υδρομάλαξης και φυσικές θερμές πηγές (WHO, 2006):

- τον πυρετό Pontiac (επώαση 3-5 ημέρες), μια αυτοπεριοριζόμενη λοίμωξη, η οποία οδηγεί στην εμφάνιση συμπτωμάτων παρόμοιων με εκείνων της γρίπης (γριπώδης συνδρομή)
- τη νόσο των Λεγεωναρίων (επώαση 2-10 ημέρες), μια οξεία βακτηριακή λοίμωξη του κατώτερου αναπνευστικού. Εκδηλώνεται πνευμονία, η οποία δυνητικά επιφέρει θάνατο στο 5-30% του συνόλου των κρουσμάτων.

Η νόσος των Λεγεωναρίων, οφείλεται στην εισπνοή αεροζόλ (aerosol), δηλαδή αέρα εμπλουτισμένου με σταγονίδια που περιέχουν το βακτήριο της *Legionella*. Τα σταγονίδια δεν ξεπερνούν σε διάμετρο τα 5 μm, επομένως μπορούν να διεισδύσουν στο κατώτερο αναπνευστικό σύστημα των ανθρώπων (Bollin et al., 1985).

Η νόσος των Λεγεωναρίων, προκαλείται από όλα τα είδη της *Legionella*, ωστόσο το είδος *Legionella pneumophila* ευθύνεται για το 75% περίπου των ανθρώπινων λοιμώξεων από *Legionella*. Ο ορότυπος 1 του είδους αποτελεί την πιο συχνή ταυτοποιημένη μορφή του βακτηρίου που απομονώνεται από ασθενείς (Fields et al., 2002; Papadakis et al., 2018). Έως σήμερα, έχουν περιγραφεί περισσότερα από 52 είδη της *Legionella*, με τουλάχιστον 73 διαφορετικούς οροτύπους. Από αυτά, περίπου 20-28 είδη σχετίζονται με την εκδήλωση νόσου στον ανθρώπινο πληθυσμό (Marric, 2009; ΕΟΔΥ, 2021a). Η περίοδος επώασης κυμαίνεται από 2 έως 10 ημέρες (Diederer, 2008), ωστόσο σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να ξεπερνά τις 16 ημέρες μετά την αρχική έκθεση στο βακτήριο (Papadakis et al., 2018).

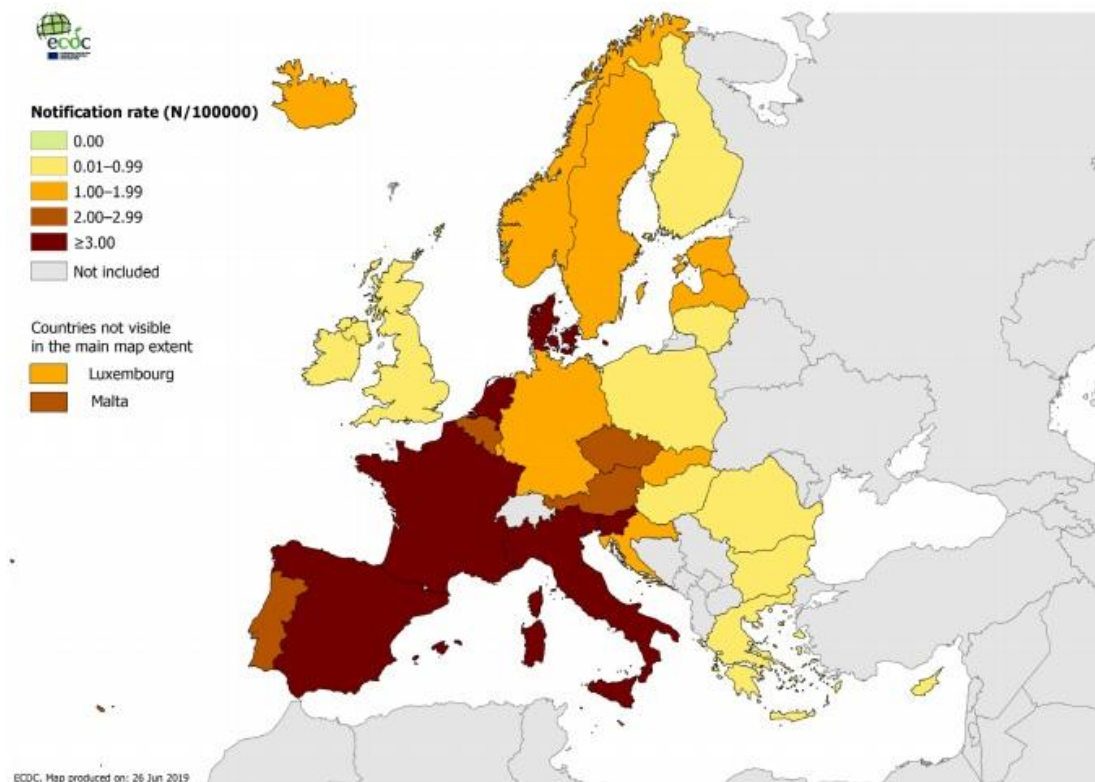
Στις ομάδες υψηλού κινδύνου υπάγονται άτομα που (WHO, 2006; ΕΟΔΥ, 2021a; CDC, 2021b):

- έχουν εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα
- έχουν υποβληθεί σε μεταμόσχευση οργάνων
- πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη, χρόνιες πνευμονοπάθειες, νεφρική ανεπάρκεια, ηπατική ανεπάρκεια και νεοπλασματικά νοσήματα
- είναι καρκινοπαθείς
- ευρίσκονται υπό αγωγή με κορτικοστεροειδή
- είναι άνω των 50 ετών
- είναι καπνιστές ή πρώην καπνιστές

Η *Legionella*, είτε ζει ελεύθερη στο περιβάλλον, είτε συμβιωτικά με πρωτόζωα και αμοιβάδες. Όταν οι περιβαλλοντικές συνθήκες είναι βέλτιστες, η *Legionella* αναπτύσσεται ταχύτατα σε φίλτρα κοκκώδους ενεργού άνθρακα (GAC), σχηματίζοντας αποικίες υπό τη μορφή βιομεμβρανών (biofilms) (WHO, 2006). Η βιομεμβράνη λειτουργεί ως μία μόνιμη εστία η οποία μολύνει το νερό του δικτύου διανομής, λόγω της συνεχούς απελευθέρωσης μικροοργανισμών σε αυτό. Επιπροσθέτως, λειτουργεί σα μία σταθερή πηγή θρεπτικών για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, ενώ παράλληλα συμβάλλει στην προστασία τους από τη δράση βιοκτόνων ουσιών. Η αλλαγή της πίεσης του νερού μέσα στο δίκτυο διανομής ευνοεί τη μετανάστευση και την εξάπλωση των βακτηρίων σε όλο το μήκος του. Σε κτίρια ή υποδομές που διαθέτουν περίπλοκα συστήματα σωληνώσεων μεγάλης εκτάσεως (π.χ. ξενοδοχειακές εγκαταστάσεις, κρουαζιερόπλοια, νοσοκομεία), εντείνεται η δημιουργία βιομεμβρανών (Γιαννάρας, 2018; CDC, 2021b).

Η Λεγεωνέλλωση που συνδέεται με την πραγματοποίηση ταξιδιών (Travel-associated Legionnaires' disease, TALD), αφορά περιστατικά ανθρώπων που μολύνθηκαν από το βακτήριο στη χώρα που επισκέφθηκαν κατά το ταξίδι τους, αλλά η διάγνωση της νόσου έγινε μετά την επιστροφή στη χώρα τους. Αυτό οφείλεται στη μεγάλη περίοδο επώασης του βακτηρίου (2-10 ημέρες), επομένως τα συμπτώματα εκδηλώνονται ετεροχρονισμένα μετά το πέρας του ταξιδιού (Mouchtouri & Rudge, 2015).

Η Λεγεωνέλλωση παραμένει μία ασυνήθιστη και σποραδικά μεταδιδόμενη λοίμωξη του αναπνευστικού. Ο ολικός ρυθμός περιστατικών Λεγεωνέλλωσης στην Ευρωπαϊκή Ένωση το 2018 ήταν 2.2/100000 πληθυσμού (ECDC, 2020). Στην Εικόνα 6 παρουσιάζεται η κατανομή της νόσου στις χώρες της Ε.Ε., με βάση τα περιστατικά/100000 πληθυσμού.



Εικόνα 6: Κατανομή περιστατικών Λεγεωνέλλωσης ανά 100000 πληθυσμού στις Ευρωπαϊκές χώρες (Πηγή: ECDC, 2020).

Σε ορισμένες χώρες ο ρυθμός ξεπερνούσε τα 3 περιστατικά/100000, όπως στην Ιταλία, Ισπανία, Βέλγιο, Δανία και Ολλανδία. Ωστόσο, σε άλλες χώρες, συμπεριλαμβανομένης της Ελλάδας και της Κύπρου, ο ρυθμός ήταν μικρότερος από 1/100000. Στον Πίνακα 1 περιγράφονται ο ρυθμός και ο αριθμός περιστατικών Λεγεωνέλλωσης στην Ελλάδα, τη χρονική περίοδο 2014-2018.

Πίνακας 1: Κατανομή της νόσου στη χώρα μας κατά τα έτη 2014-2018 (Πηγή: ECDC, 2020).

Έτος	Περιστατικά	Ρυθμός (περιστατικά/100000)
2014	27	0.2
2015	29	0.3
2016	31	0.3
2017	43	0.4
2018	65	0.6

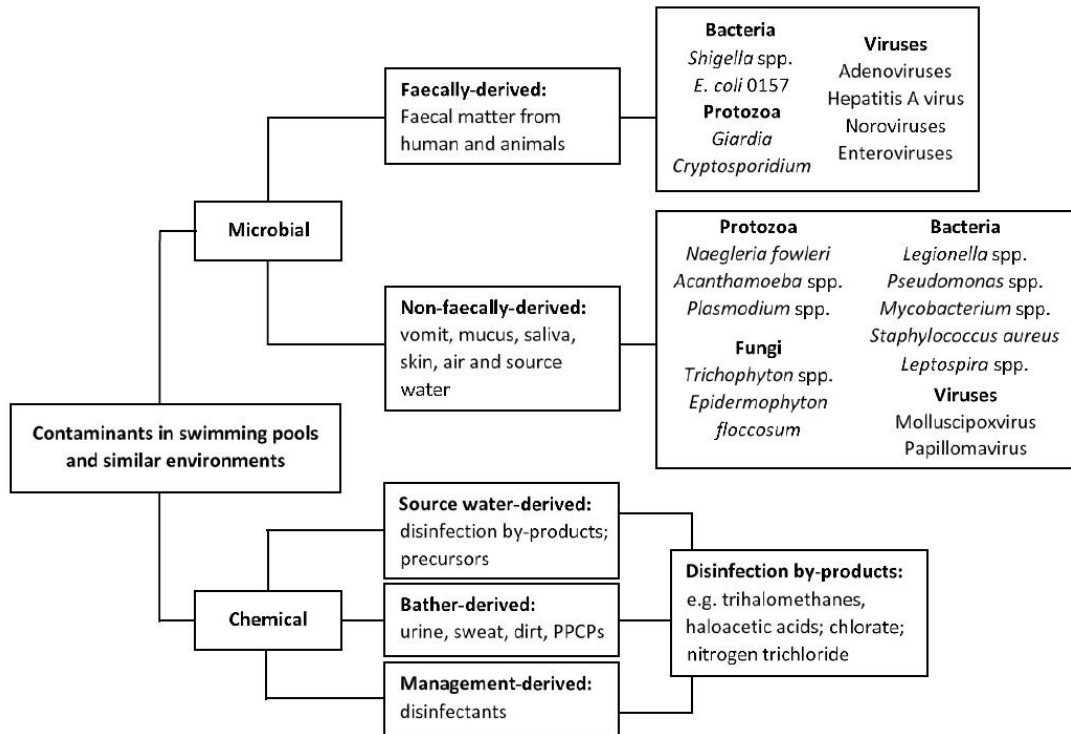
Το 2011, καταγράφηκαν 14 περιστατικά Λεγεωνέλλωσης μεταξύ επισκεπτών από την Αγγλία και την Ουαλία, οι οποίοι είχαν ταξιδέψει στο νησί της Κέρκυρας, περίπου 14 ημέρες πριν την εκδήλωση των συμπτωμάτων. Τα αποτελέσματα των επιτόπιων επιδημιολογικών ελέγχων και των μικροβιολογικών αναλύσεων κλινικών και περιβαλλοντικών δειγμάτων, κατέδειξαν μεγάλο αριθμό καταλυμάτων ως θέσεις σποραδικής εξάπλωσης του μικροβίου. Δείγματα συλλέχθηκαν, όπου αυτό ήταν εφικτό, από όλα τα δωμάτια, τα ντους και τα φίλτρα πισινών, τα οποία είχαν επισκεφθεί τα καταγεγραμμένα περιστατικά. Σε 8 από τα 10 εξεταζόμενα καταλύματα ανιχνεύθηκε ο ορότυπος 1 του είδους *Legionella pneumophila* (Maini et al., 2012).

5. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΥΔΑΤΩΝ ΚΟΛΥΜΒΗΤΙΚΩΝ ΔΕΞΑΜΕΝΩΝ

Σκοπό των μικροβιολογικών αναλύσεων του νερού συνιστά η απομόνωση και ο προσδιορισμός των παθογόνων μικροοργανισμών που μπορεί να περιέχει. Ωστόσο, ο έλεγχος της μικροβιολογικής ποιότητας του νερού και της πιθανότητας μετάδοσης ασθενειών υδατογενούς προέλευσης δε διενεργείται με συγκεκριμένους παθογόνους μικροοργανισμούς, αλλά με μικροοργανισμούς «δείκτες» (WHO, 2006). Όσον αφορά τους μικροβιολογικούς δείκτες, πρόκειται για αλλόχθονους μικροοργανισμούς, οι οποίοι καταλήγουν για μικρό χρονικό διάστημα στο υδάτινο σώμα και προέρχονται συνήθως από το γαστρεντερικό σύστημα ανθρώπων και ζωικών οργανισμών (EPA, 1976). Επιπλέον, ενδέχεται να συνοδεύονται από παθογόνους μικροοργανισμούς, οι ίδιοι όμως δεν είναι απαραίτητα παθογόνοι (Μαυρίδου et al., 2014).

Οι συγκεκριμένοι δείκτες εντοπίζονται σε δείγματα νερού σε μεγαλύτερη αφθονία σε σύγκριση με τα παθογόνα (WHO, 2006). Επιπλέον, η απομόνωση και καταμέτρησή τους καθίσταται πιο εύκολη, συγκριτικά με τους παθογόνους μικροοργανισμούς, για τους οποίους απαιτούνται πολύπλοκες και μεγαλύτερης χρονικής διάρκειας διαδικασίες (Μαυρίδου et al., 2014). Επομένως, η χρήση μικροβιακών δεικτών στοχεύει στην εκτίμηση της πιθανότητας ύπαρξης παθογόνων μικροοργανισμών στο εξεταζόμενο δείγμα νερού (WHO, 2006). Η παρουσία των συγκεκριμένων μικροοργανισμών σε κολυμβητικές δεξαμενές ή σε δεξαμενές υδρομάλαξης (Spa, Whirlpool, Jacuzzi) υποδεικνύει πιθανή αναποτελεσματική απολύμανση, ανεπαρκή ανανέωση υδάτων και μη ορθή συντήρηση των εγκαταστάσεων (ΑΡΗΑ, 1998).

Από τους μικροβιακούς δείκτες, εκείνοι που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι τα ολικά κολοβακτηριοειδή, τα κολοβακτηρίδια κοπρανώδους προέλευσης (*E. Coli*), οι εντερόκοκκοι/στρεπτόκοκκοι, η πυοκυανική ψευδομονάδα (*Pseudomonas aeruginosa*), τα θειαναγωγικά κλωστρίδια (*Clostridium perfringens*) και η ολική μεσόφιλη χλωρίδα (OMX, ολικός αριθμός μεσόφιλων μικροοργανισμών - Heterophilic Plate Count, HPC) (WHO, 2006; Μαυρίδου et al., 2014).



Εικόνα 7: Πιθανοί μικροβιολογικοί και χημικοί παράγοντες κινδύνου σε κολυμβητικές δεξαμενές και παρόμοια περιβάλλοντα (Πηγή: Ekowati, 2019, αναπροσαρμογή από WHO, 2006)

Από τις προαναφερόμενες κατηγορίες, η ολική μεσόφιλη χλωρίδα και τα ολικά κολοβακτηριοειδή αποτελούν τους κύριους δείκτες, ενώ τα κολοβακτηρίδια κοπρανώδους προέλευσης και οι κοπρανώδεις εντερόκοκκοι αποτελούν δείκτες περιττωματικής μόλυνσης (WHO, 2006; Nikaeeen et al., 2009; Schets et al., 2020). Εκτός από τους συνήθεις δείκτες, η προσοχή των ερευνητών στρέφεται και σε δύο άλλα βακτηριακά είδη, τον Σταφυλόκοκκο Χρυσίζων (*Staphylococcus aureus*) και την Πυοκυανική Ψευδομονάδα (*Pseudomonas aeruginosa*) που αποτελούν δείκτες κινδύνου για την υγεία (Nikaeeen et al., 2009). Η *P. aeruginosa*, ένα παθογόνο που μεταδίδεται μέσω της επαφής και κατανάλωσης μολυσμένου νερού, συνιστά ένδειξη πιθανής ανάπτυξης μικροβιακών αποικιών και σχηματισμού βιομεμβρανών στο νερό. Αναφορικά με τον *Staphylococcus aureus*, προτείνεται η συμπερίληψή του στους μικροοργανισμούς για τους οποίους είναι απαραίτητο να πραγματοποιείται έλεγχος κατά τη μικροβιολογική εξέταση δειγμάτων νερού προερχόμενων από κολυμβητικές δεξαμενές, καθώς πρόκειται για ένα ευκαιριακό παθογόνο-δείκτη ανθρωπογενούς ρύπανσης και μόλυνσης των υδατικών πόρων (Faria et al., 2009; Schets et al., 2020).

Ο έλεγχος της μικροβιολογικής ποιότητας του νερού με χρήση «δεικτών» συστήνεται και από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), όπως περιγράφεται στην Κατευθυντήρια Οδηγία «Guidelines for safe recreational water environments, Volume 2, Swimming pool sand similar environments, 2006». Μια ουσιαστική διαφορά ανάμεσα στα όσα ορίζονται από την Ελληνική Νομοθεσία και στις απαιτήσεις του WHO, είναι ότι ο WHO δεν απαιτεί μετρήσεις ολικών κολοβακτηριοειδών, αλλά μετρήσεις για *Pseudomonas aeruginosa* (< 1 cfu/100 ml), *Legionella spp.* (< 1 cfu/100ml) και *Staphylococcus aureus* (< 100 cfu/100 ml). Ως cfu εννοείται ο αριθμός Μονάδων Σχηματισμού Αποικιών. Επιπροσθέτως, σε συμφωνία με όσα ορίζονται από την αντίστοιχη ελληνική Υγειονομική Διάταξη, ο WHO απαιτεί μέτρηση του συνολικού αριθμού των αναπτυσσόμενων αποικιών μικροβίων (ομοίως να μην ξεπερνά τις 200 αποικίες ανά ml νερού μετά από επώαση στους 37°C επί 24 ώρες) και των κοπρανωδών κολοβακτηριοειδών (*E. coli*) (δεν πρέπει να υπάρχουν καθόλου στα 100 ml νερού) (WHO, 2006).

5.1. Χαρακτηριστικά ιδανικών μικροβιακών δεικτών

Ο ιδανικός μικροβιακός δείκτης παρέχει την καλύτερη συσχέτιση μεταξύ της πυκνότητάς του και των κινδύνων για την υγεία των λουόμενων που οφείλονται σε ένα συγκεκριμένο τύπο μόλυνσης των υδάτων (ARHA, 1998). Στη συνέχεια παρατίθενται τα πιο βασικά χαρακτηριστικά των μικροβιακών δεικτών (EPA, 1976; Μαυρίδου, 1995; WHO, 2006; Halkman & Halkman, 2014):

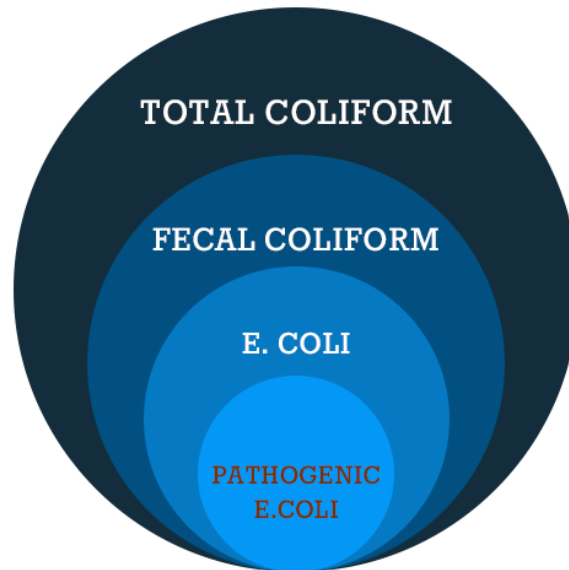
- Αδυναμία πολλαπλασιασμού σε συνθήκες περιβάλλοντος
- Απόντες σε μη μολυσμένα περιβάλλοντα και παρόντες όταν απαντάται και η πηγή μόλυνσης των εξεταζόμενων παθογόνων μικροοργανισμών (π.χ. μόλυνση από κόπρανα)
- Κοινή πηγή προέλευσης με τα παθογόνα είδη
- Μεγαλύτερη αφθονία σε σύγκριση με τα παθογόνα είδη
- Συγκέντρωσή τους ανάλογη του βαθμού ρύπανσης του υδάτινου σώματος
- Μεγαλύτερος ή παραπλήσιος χρόνος ζωής από τους παθογόνους μικροοργανισμούς
- Εύκολη εργαστηριακή απομόνωση, αναγνώριση και καταμέτρηση
- Σταθερά βιοχημικά χαρακτηριστικά κατά την ανίχνευση

- Αντίστοιχη απόκριση με εκείνη των παθογόνων μικροοργανισμών σε παρόμοια καθεστάτα έκθεσης (φυσικές περιβαλλοντικές συνθήκες, εφαρμογή απολυμαντικών τεχνικών κατά την επεξεργασία του νερού)
- Αβλαβείς για την υγεία ανθρώπων και ζωικών οργανισμών
- Διενέργεια μικροβιολογικών ελέγχων για του δείκτες με εύκολο τρόπο, ακρίβεια, επαναληψιμότητα και χαμηλό κόστος, προκειμένου να είναι εφικτή η λήψη περισσότερων δειγμάτων, εφόσον κριθεί απαραίτητο
- Υψηλή ταχύτητα ανάλυσης: οι έλεγχοι για την παρουσία οργανισμών δεικτών συνήθως απαιτούν λιγότερο χρόνο για την παροχή αποτελεσμάτων, σε σύγκριση με τους ελέγχους για παθογόνους μικροοργανισμούς, επιτρέποντας την άμεση ανάληψη δράσης σε περίπτωση μόλυνσης
- Κοινή μέθοδος ανίχνευσης, εφαρμόσιμη σε όλους τους τύπους δειγμάτων νερού

Οι μικροβιολογικοί έλεγχοι για τα είδη *Legionella spp.* και *Pseudomonas aeruginosa*, οι οποίοι διεξάγονται ανά τακτά χρονικά διαστήματα, αφορούν κατά κύριο λόγο τις θερμαινόμενες δεξαμενές υδρομάλαξης. Αντιθέτως, ο έλεγχος για *Staphylococcus aureus* δε διεξάγεται κάθε φορά που εξετάζεται ένα δείγμα νερού, αλλά στα πλαίσια μιας ευρύτερης και ολοκληρωμένης έρευνας, αναφορικά με τη μικροβιολογική ποιότητα των υδάτων, όταν υπάρχουν ενδείξεις και αναφορές περιστατικών νοσηρότητας, έπειτα από την έκθεση ατόμων σε νερό κολυμβητικής δεξαμενής ή δεξαμενής αναζωογόνησης (ΚΕΕΛΠΝΟ, 2016).

5.2. Ομάδα Ολικών Κολοβακτηριοειδών (Total Coliforms-TC)

Στην ομάδα των Ολικών Κολοβακτηριοειδών περιλαμβάνονται όλα τα προαιρετικά αναερόβια, αρνητικά κατά Gram μη σπορογόνα βακτηρίδια, τα οποία μπορούν να ζυμώσουν τη λακτόζη με την παραγωγή οξέος και αερίου (EPA, 1976; Li & Liu, 2019) και παράγουν το ένζυμο β-D-γαλακτοσιδάση (Tryland & Fiksdal, 1998) στους 35-37 °C έπειτα από χρόνο επώασης 24 ωρών (Halkman & Halkman, 2014; Li & Liu, 2019) ή 48 ωρών (APHA, 1998; Lebaron, 2005; Halkman & Halkman, 2014). Τα ολικά κολοβακτηριοειδή χρησιμοποιούνται ευρέως ως δείκτες της μικροβιολογικής ποιότητας του νερού και των τροφίμων (Li & Liu, 2019).



Εικόνα 8: Ομάδα των Κολοβακτηριοειδών (Πηγή: Bioscience, 2021).

Τα μέλη της συγκεκριμένης ομάδας βακτηρίων ανήκουν στην Οικογένεια των *Enterobacteriaceae* και κατατάσσονται επιμέρους σε 7 κύρια γένη (Tatini & Kauppi, 2002; Curutiu et al., 2019):

1. *Citrobacter*
2. *Enterobacter*
3. *Escherichia*
4. *Hafnia*
5. *Klebsiella*
6. *Serratia*
7. *Yersinia*

Η σχετικά απλή σε εφαρμογή και χαμηλή σε κόστος μεθοδολογία μικροβιολογικού ελέγχου των συγκεκριμένων μικροοργανισμών, τους καθιστά κατάλληλους δείκτες με ευρεία εφαρμογή (Curutiu et al., 2019).

Δεν αποικίζουν απαραίτητως το γαστρεντερικό σωλήνα των θερμόαιμων ζώων, για αυτό το λόγο ο συγκεκριμένος μικροβιολογικός δείκτης έχει τεθεί υπό αμφισβήτηση. Μπορούν να ανιχνευθούν, είτε στο νερό, είτε στο έδαφος, είτε σε βιομεμβράνες (Li & Liu, 2019). Η ύπαρξη κολοβακτηριοειδών, αν και δεν αποτελεί ένδειξη κοπρανώδους μόλυνσης, υποδεικνύει μη ορθή ή ανεπαρκή συντήρηση του συστήματος ύδρευσης, ελλείψεις κατά τα στάδια επεξεργασίας-αποθήκευσης-διανομής του νερού, πιθανή βακτηριακή ανάπτυξη και δημιουργία βιομεμβρανών, καθώς και ενδεχόμενη εισροή

χώματος ή μολυσμένου νερού στο σύστημα ύδρευσης διαμέσου των συνδέσεων των σωληνώσεων (Vaughan et al., 2005; Paradh, 2015). Η παρουσία κολοβακτηριακών ειδών σε ένα εξεταζόμενο δείγμα νερού αποτελεί δείκτη του βαθμού ακεραιότητας και καθαρότητας των συστημάτων διανομής νερού και της πιθανής ανάπτυξης βιοϋμενίων, αλλά και ένδειξη επιμόλυνσης του υδάτινου σώματος από εξωγενείς παράγοντες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα εξωγενών παραγόντων αποτελούν τα παθογόνα βακτήρια, όπως τα *Vibrio cholerae*, *Salmonella spp.* και *Shigella spp.*, χωρίς ωστόσο να είναι απαραίτητα κοπρανώδους προέλευσης (Curutiu et al., 2019):

Παρόλο που τα ολικά κολοβακτηριοειδή, συνήθως, δεν προκαλούν νοσηρότητα με την εκδήλωση σοβαρών ασθενειών, η παρουσία τους στο νερό συνιστά ένδειξη ύπαρξης παθογόνων μικροοργανισμών, των οποίων η παρουσία ενδεχομένως να οφείλεται σε περιττωματική μόλυνση του εξεταζόμενου δείγματος νερού (Li & Liu, 2019). Σε αυτά τα παθογόνα πέρα από βακτήρια, περιλαμβάνονται και ιοί, πρωτόζωα ή πολυκύτταρα παράσιτα (Li & Liu, 2019).

Πολλά γένη ολικών κολοβακτηριοειδών, όπως τα *Erwinia* και *Enterobacter*, συχνά αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της φυσικής χλωρίδας σε λαχανικά και συνήθως δεν συνιστούν κίνδυνο για τη Δημόσια Υγεία (Brackett, 1993).

5.2.1. Κοπρανώδη κολοβακτηριοειδή (Faecal Coliforms-FC)

Μια υποομάδα των ολικών κολοβακτηριοειδών, η οποία ονομάζεται κοπρανώδη κολοβακτηριοειδή, συχνά αποτελεί ένδειξη παρουσίας της *Escherichia coli* στο νερό. Η *E. coli* είναι μέλος της οικογένειας των εντεροβακτηριακών που εκφράζουν τη β-D-γλυκουρονιδάση και τη β-D-γαλακτοσιδάση. Τα κολοβακτηριοειδή εκφράζουν μόνο τη β-D-γαλακτοσιδάση. Η εμφάνιση της *E. coli* στο εξεταζόμενο δείγμα συσχετίζεται με τη χρήση μολυσμένου νερού στη δεξαμενή, παρουσία περιττωμάτων ή αναποτελεσματική απολύμανση και κακές συνθήκες υγιεινής στην εγκατάσταση (Brackett & Splittstoesser, 1992).

Το εντεροαιμορραγικό βακτήριο *E. coli* (Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC) προκαλεί τη Νόσο του Οιδήματος που είναι μία εντεροτοξιναιμία οξείας μορφής, όπου αναπτύσσονται οιδήματα στο σώμα, αλλοιώσεις του εγκεφάλου και συχνά προκαλεί θάνατο. Η τοξίνη Shiga (Stx2e), την οποία παράγουν συγκεκριμένοι παθότυποι της *E. coli*, ευθύνεται για την πρόκληση της νόσου. Άλλα συμπτώματα περιλαμβάνουν την εκδήλωση αιμορραγικής ή μη αιμορραγικής υδαρούς διάρροιας

και αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο (Haemolytic Uraemic syndrome, HUS). Το σύνδρομο HUS αποτελεί την κύρια αιτία νεφρικής ανεπάρκειας σε βρέφη και παιδιά (Karch et al., 2005; WHO, 2006).

Από τους 200 οροτύπους που έχουν αναγνωριστεί για το εντεροαιμορραγικό κολοβακτηρίδιο, σχετίζονται με την εμφάνιση νόσου περίπου οι 100. Περίπου το ήμισυ των λοιμώξεων προκαλείται από διάφορους οροτύπους, π.χ. O26, O41, O103, O111, O121 και O145, ωστόσο υψίστης κλινικής σημασίας θεωρείται ο ορότυπος O157:H7 (Karch et al., 2005; ΚΕΕΛΠΝΟ, 2016).

Τα κοπρανώδη κολοβακτηριοειδή εντοπίζονται αποκλειστικά στο γαστρεντερικό σύστημα ανθρώπων και θερμόαιμων ζώων. Ο πιο σημαντικός παράγοντας που τα διαφοροποιεί από τα ολικά κολοβακτηριοειδή, είναι η ικανότητά τους να αναπτύσσονται σε υψηλές θερμοκρασίες (44.5 °C). Επιπλέον, μπορούν να ζυμώσουν τη λακτόζη με την παραγωγή οξέος και αερίου (EPA, 1976). Πρόκειται για επαμφοτερίζοντες οργανισμούς, δηλαδή μπορούν να ζήσουν παρουσία ή απουσία ελεύθερου οξυγόνου (Oram, 2020). Το πιο γνωστό και σύνθηδες μέλος αυτής της υποομάδας είναι η *Escherichia coli*, καθώς και τα γένη *Enterobacter*, *Citrobacter* και *Klebsiella*. (EPA, 1976).

Τα θερμοανθεκτικά κολοβακτηριοειδή και η *E. coli*, ως κύριοι δείκτες κοπρανώδους μόλυνσης, είναι απαραίτητο να γίνεται εκτίμηση της παρουσίας τους και μέτρηση των πληθυσμών τους σε όλες τις δημόσιες και ημι-δημόσιες κολυμβητικές δεξαμενές, τα φυσικά λουτρά και τις δεξαμενές αναζωογόνησης (EPA, 1976; WHO, 2006). Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας ορίζει ως ανώτερο αποδεκτό όριο για τη συγκεκριμένη υποομάδα τα < 1 cfu/100 mL (WHO, 2006). Αξίζει να αναφερθεί πως παρόλο που η παρουσία στο νερό των κοπρανωδών κολοβακτηριδίων αποτελεί σαφή ένδειξη κοπρανώδους μόλυνσης, το νερό δε θεωρείται υγειονομικά επικίνδυνο εάν παράλληλα με τα κολοβακτηριοειδή δεν έχει ανιχνευθεί και η παρουσία παθογόνων παραγόντων. Η κοπρανώδης υποομάδα συνίσταται, τόσο από παθογόνα, όσο και από μη παθογόνα μικρόβια (Halkman & Halkman, 2014). Με άλλα λόγια, τα κοπρανώδη κολοβακτηριοειδή δεν είναι απαραίτητα φορείς ασθενειών υδρικής προέλευσης, αλλά δείκτες παρουσίας άλλων παθογόνων μικροοργανισμών στο μέσο που εντοπίζονται (Oram, 2020).

Σύμφωνα με το πρότυπο ΕΛΟΤ EN ISO 9308-1 η καταμέτρηση κολοβακτηριοειδών (ολικά, κοπρανώδη, *E. coli*) περιλαμβάνει ως μέθοδο δοκιμής τη διήθηση δείγματος νερού μέσω μεμβράνης, την καλλιέργεια των κολοβακτηριοειδών σε χρωμογόνο άγαρ (Chromogenic Coliform Agar - CCA) και εν συνεχεία την καταμέτρηση των μικροβιακών αποικιών που έχουν αναπτυχθεί στην καλλιέργεια. Λόγω της χαμηλής εκλεκτικότητας του θρεπτικού υποστρώματος, η συγκεκριμένη μέθοδος ενδείκνυται για νερά μικρού μικροβιακού φορτίου (ανάπτυξη <100 αποικίες/τρυβλίο), όπως είναι το νερό που προκύπτει έπειτα από κατάλληλη επεξεργασία σε μονάδα επεξεργασίας πόσιμου νερού (ΜΕΝ) ή νερό κολυμβητικών δεξαμενών. Επομένως, η μέθοδος κρίνεται ακατάλληλη για επιφανειακά νερά ή νερά που ως πηγή υδροληψίας έχουν πηγάδια και φρέατα με μικρό βάθος υδροληψίας από τον υπόγειο ορίζοντα.

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, κάποια στελέχη της *E. coli* εκφράζουν τη β-D-γλυκουρονιδάση και τη β-D-γαλακτοσιδάση. Στελέχη τα οποία είναι αρνητικά στη β-D-γλυκουρονιδάση, π.χ. η *E. coli* O157, δε θα ανιχνευθούν στην καλλιέργεια με το CCA ως *E. coli*, αλλά ως κολοβακτηριοειδή, εφόσον είναι θετικά μόνο στη β-D-γαλακτοσιδάση.

5.2.2. Εντερόκοκκοι εντερικής προέλευσης

Η ομάδα των στρεπτόκοκκων κοπρανώδους προέλευσης αποτελείται από είδη του γένους *Streptococcus*, όπως: *S. avium*, *S. bovis*, *S. equinus*, *S. faecalis*, *S. faecium* και *S. gallinarum*. Οι στρεπτόκοκκοι βρίσκονται στο γαστρεντερικό σωλήνα θερμόαιμων ζώων, οπότε ανιχνεύονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα κόπρανά τους, ωστόσο ορισμένα είδη (*S. avium*, *S. bovis*, *S. equines*) δεν εντοπίζονται αποκλειστικά σε ζωικούς οργανισμούς (ΑΡΗΑ, 1998).

Οι εντερόκοκκοι είναι Gram (+) θετικά, προαιρετικά αναερόβια βακτήρια, ανθεκτικά στο χλωριούχο νάτριο και σε αλκαλικό pH και απαντώνται, είτε σε ζεύγη, είτε σε μικρές αλυσίδες, είτε μεμονωμένα (Μαυρίδου et al., 2014). Η ειδοποιός διαφορά της υποομάδας των εντερόκοκκων από την ομάδα των κοπρανωδών στρεπτόκοκκων, στην οποία υπάγονται, είναι η ικανότητα των πρώτων να αναπτύσσονται σε διάλυμα χλωριούχου νατρίου 6.5%, pH 9.6, σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται μεταξύ 10 και 45 °C. Επίσης, ανθίσταται σε υψηλές θερμοκρασίες (60 °C) για 30 λεπτά και έχουν την ικανότητα να μειώνουν το κυανό του μεθυλενίου 1% (χλωριούχο μεθυλοθειονίνιο, Methylene blue) (WHO, 2003). Οι εντερόκοκκοι συνιστούν έναν

πολύτιμο βακτηριακό δείκτη, ενδεικτικό της έκτασης της περιττωματικής μόλυνσης των επιφανειακών υδάτων αναψυχής και της ποιότητάς τους (ΑΡΗΑ, 1998). Αναλυτικά, στα πλαίσια επιδημιολογικής μελέτης, προσδιορίστηκε η σχέση του επιπέδου μόλυνσης των υδάτων από εντερόκοκκους και του κινδύνου εμφάνισης νόσου, ως απόρροια της κολύμβησης σε μολυσμένο νερό. Ο κίνδυνος εκτιμήθηκε στο 1%, δηλαδή 1 περιστατικό ανά 100 περιπτώσεις, το οποίο σύμφωνα με τους ερευνητές είναι ιδιαίτερα υψηλό συγκριτικά με το αντίστοιχο ποσοστό εμφάνισης γαστρεντερίτιδας μη συνδεδεμένης με την κολύμβηση (Kay et al., 1994).

Ο επιπολασμός των στρεπτόκοκκων διαφέρει στα κόπρανα ζωικής και ανθρώπινης προέλευσης. Τα επικρατέστερα είδη εντερόκοκκων σε επιβαρυμένα υδάτινα περιβάλλοντα είναι τα *Enterococcus durans*, *E. hirae*, *E. faecalis* και *E. faecium* (Volterra et al., 1986; Μαυρίδου et al., 2014). Αξίζει να σημειωθεί, ότι η παρουσία ορισμένων εντερόκοκκων στο νερό δεν οφείλεται σε μόλυνση από κόπρανα, καθώς μπορεί να προέρχονται από το έδαφος (Μαυρίδου et al., 2014).

Οι εντερόκοκκοι εντοπίζονται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στα ανθρώπινα κόπρανα, οι οποίες κυμαίνονται μεταξύ 10^4 έως 10^6 βακτήρια ανά γραμμάριο νοπού βάρους (Slanetz & Bartley, 1957; Boehm & Sassoubre, 2014). Παρόλα αυτά, αποτελούν ένα πολύ μικρό ποσοστό της εντερικής μικροβιακής χλωρίδας (< 1%), καθώς υπερτερούν σε αριθμό άλλα βακτηριακά είδη, όπως η *E. coli* (Zubrzycki & Spaulding, 1962). Αν και δεν πολλαπλασιάζονται στο υδάτινο περιβάλλον, οι εντερόκοκκοι είναι πιο ανθεκτικοί από την *E. coli* στη χλωρίωση και σε συνθήκες ξηρασίας (Μαυρίδου et al., 2014).

Σύμφωνα με όσα ορίζονται στο πρότυπο ΕΛΟΤ EN ISO 7899-2, πραγματοποιείται η καταμέτρηση μικροοργανισμών του γένους των Εντεροκόκκων εντερικής προέλευσης και κυρίως των ειδών *E. durans*, *E. hirae*, *E. faecalis* και *E. faecium*. Παράλληλα, σε μικρότερη συχνότητα με την ίδια μέθοδο πραγματοποιείται και η ανίχνευση λοιπών ειδών εντεροκόκκων, καθώς και ειδών του γένους *Streptococcus*. Τα δύο κυριότερα είδη κοπρανωδών στρεπτόκοκκων, που ανήκουν στη φυσιολογική χλωρίδα του εντέρου θερμόαιμων ζώων, είναι τα *S. bovis* και *S. equines*. Τα δύο συγκεκριμένα είδη, λόγω της αδυναμίας επιβίωσής τους στο νερό για μεγάλα χρονικά διαστήματα, δεν καταμετρώνται τις περισσότερες φορές. Περιλαμβάνει ως μέθοδο δοκιμής τη διήθηση δείγματος νερού μέσω μεμβράνης, την καλλιέργεια των

κολοβακτηριοειδών σε χρωμογόνο άγαρ (Chromogenic Coliform Agar - CCA) και εν συνεχεία την καταμέτρηση των μικροβιακών αποικιών που έχουν αναπτυχθεί στην καλλιέργεια.

Στο προσχέδιο αναθεώρησης της Ολλανδικής νομοθεσίας περί κολυμβητικών δεξαμενών, οι εντερόκοκκοι δεν πρέπει να ξεπερνούν σε συγκέντρωση τις 50 αποικίες ανά 100 mL εξεταζόμενου δείγματος νερού (≤ 50 cfu/100 mL) (Schets et al., 2020).

5.3. Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα

Σύμφωνα με όσα ορίζονται στο πρότυπο ΕΛΟΤ EN ISO 6222, πραγματοποιείται η καταμέτρηση καλλιεργήσιμων μικροοργανισμών. Ο όρος Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα περιλαμβάνει «όλα τα αερόβια βακτήρια, ζύμες, και μύκητες που είναι ικανά να σχηματίζουν αποικίες στο θρεπτικό υλικό υπό τις διαμορφωμένες συνθήκες», όπως αυτές ορίζονται στην εφαρμοζόμενη μέθοδο καλλιέργειας και καταμέτρησής τους.

Αυτή η πληθώρα μικροοργανισμών προέρχεται από διαφορετικές πηγές, όπως η βλάστηση, το έδαφος και οι υδατικοί πόροι. Η εκτίμηση του συνολικού τους αριθμού σε ένα εξεταζόμενο δείγμα νερού από κολυμβητική δεξαμενή, παρέχει πληροφορίες αναφορικά με τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του νερού, την ακεραιότητα του συστήματος διανομής του νερού εντός της δεξαμενής και την αποτελεσματικότητα των τεχνικών επεξεργασίας του, προκειμένου να διενεργείται ορθή και τακτική παρακολούθηση της μικροβιολογικής ποιότητάς του.

Η ολική μεσόφιλη χλωρίδα περιλαμβάνει 2 κατηγορίες οργανισμών, ως προς τη θερμοκρασία στην οποία αναπτύσσονται. Ορισμένοι αναπτύσσονται αερόβια στους 22 °C και άλλοι στους 36 °C σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα Yeast Extract Agar. Ειδικά για τα δείγματα νερού κολυμβητικών δεξαμενών, η επώαση πραγματοποιείται μόνο στους 36 °C.

5.4. Μη κοπρανώδη παθογόνα μικρόβια

5.4.1. Πυοκυανική Ψευδομονάδα-*Pseudomonas aeruginosa*

Η Πυοκυανική Ψευδομονάδα ή Αεριογόνος Ψευδομονάδα θεωρείται ένα ευκαιριακό παθογόνο σε υδάτινα ενδιαιτήματα (ΕΛΟΤ EN ISO 16266:2009; Tirodimos et al., 2010; Amagliani et al., 2013). Στο Πρότυπο ΕΛΟΤ EN ISO 16266:2009 ως *Pseudomonas aeruginosa* ορίζεται το είδος μικροοργανισμών «που αναπτύσσονται σε

εκλεκτικό θρεπτικό υλικό κετριμίδης, το οποίο περιέχει και ναλιδιξικό οξύ (CN) και είτε παράγουν πυοκυανίνη, είτε είναι οξειδάση θετικοί». Επιπλέον, το συγκεκριμένο είδος παράγει φθορισμό υπό την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας στα 360 ± 20 nm, λόγω της παραγωγής φθορεσκεΐνης, καθώς διαθέτει και την ικανότητα παραγωγής αμμωνίας από ακεταμίδη.

Ανήκει σε ένα ευρύ γένος υποχρεωτικά αερόβιων, μη σπορογόνων, Gram αρνητικών βακίλων που ανήκει στην οικογένεια *Pseudomonadaceae*. Εμφανίζει ευρεία εξάπλωση στη φύση και διαβιεί κυρίως σε περιβάλλοντα με υψηλά ποσοστά υγρασίας, όπως είναι το νερό, τα λύματα, το έδαφος, η χλωρίδα, αλλά και σε ζωικούς οργανισμούς (Goldberg, 2000). Στους υδατικούς πόρους που απαντάται ο μικροοργανισμός, περιλαμβάνονται νερά προερχόμενα από ποταμούς, θάλασσα, λύματα και εμφιαλωμένα μεταλλικά νερά (Hunter, 1993; Kimata et al., 2004; Tirodimos et al., 2010).

Ως ευκαιριακό παθογόνο, η ψευδομονάδα μπορεί να εντοπιστεί σε νερά αναψυχής (Papadopoulou, et al., 2008; Guida, et al., 2009), καθώς συσσωρεύεται συχνά υπό τη μορφή σχηματιζόμενων βιομεμβρανών (biofilms), με αποτέλεσμα να εμφανίζει υψηλή ανθεκτικότητα στις παραδοσιακές απολυμαντικές τεχνικές (Leoni et al., 1999; WHO, 2006; Amagliani et al., 2013). Βακτήρια του γένους *Pseudomonas* είναι ιδιαίτερα ευέλικτα και έχουν αναπτύξει προσαρμοστικούς μηχανισμούς που επιτρέπουν την επιβίωσή τους σε πληθώρα ενδονημάτων και περιβαλλοντικών συνθηκών (Guida et al., 2016).

Επιπροσθέτως, η *P. aeruginosa* τείνει να συσσωρεύεται στα φίλτρα και σε σημεία εντός της κολυμβητικής δεξαμενής, όπου υπάρχουν επικαθίσεις και βιοϋμένια. Οι βιομεμβράνες συνιστούν ταυτόχρονα πηγή θρεπτικών για την ανάπτυξη της *P. aeruginosa* και προστατευτικό περιβάλλον για το μικροοργανισμό, καθώς παρεμποδίζουν τη δράση των απολυμαντικών μέσων (Ratnam et al., 1986; Price & Aheam, 1988). Το θερμό και υγρό περιβάλλον των κολυμβητικών δεξαμενών, σε συνδυασμό με την ανεπαρκή ή αναποτελεσματική απολύμανση του νερού και κακή συντήρηση των σωληνώσεων των εγκαταστάσεων ευνοεί την ανάπτυξη της ψευδομονάδας (Guida et al., 2009; ΚΕΕΛΠΝΟ, 2016). Απελευθερώνεται στο νερό από τις εκκρίσεις των χρηστών της κολυμβητικής δεξαμενής και μπορεί να

μεταφερθεί μέσω δερματικής επαφής με το μολυσμένο νερό και στους υπόλοιπους χρήστες (Guida et al, 2009; Nikaeen et al., 2009).

Στις δερματικές παθήσεις σχετιζόμενες με την κολύμβηση, ανήκει η πρόκληση επιπεφυκίτιδας (Conjunctivitis-Pink eye), οξεία εξωτερική ωτίτιδα (κοινή ονομασία: «αυτί του κολυμβητή» / «swimmer's ear»), εξανθήματα όμοια με αυτά της ανεμευλογιάς, φλεγμονή του θύλακα της τρίχας (θυλακίτιδα), καθώς και πνευμονία (Nikaeen et al., 2009; Amagliani et al., 2013; ΚΕΕΛΠΝΟ, 2016). Στις ευπαθείς ομάδες που προσβάλλονται από την παρουσία της ψευδομονάδας, συγκαταλέγονται τα άτομα με κινητικά προβλήματα, οι γυναίκες σε κύηση, οι ηλικιωμένοι, άτομα με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα και άτομα με κυστική ίνωση (γενετική διαταραχή) (Guida et al., 2009; Amagliani et al., 2013). Επίσης, συνιστά παράγοντα ευκαιριακής λοίμωξης σε ασθενείς με εγκαύματα (Tirodimos et al., 2010).

Στην κατηγορία των δεξαμενών υδρομάλαξης, οι πιο σημαντικές λοιμώξεις που σχετίζονται με την παρουσία ψευδομονάδας είναι οι λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος, του αναπνευστικού συστήματος και οφθαλμικές λοιμώξεις του κερατοειδούς χιτώνα (Guida et al., 2009). Ο μικροοργανισμός εμφανίζει υψηλό βαθμό προσαρμογής σε αυτή την κατηγορία δεξαμενών, καθώς και σε εσωτερικές κολυμβητικές δεξαμενές λόγω των υψηλών θερμοκρασιών του νερού. Τα θερμά νερά είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα σε επιμολύνσεις, κυρίως σε περιόδους αιχμής, καθώς είναι ιδιαίτερα δύσκολη η διατήρηση επαρκών επιπέδων απολυμαντικού μέσου, π.χ. συγκέντρωση ελεύθερου υπολειμματικού χλωρίου. Δε γίνεται εκτενής αναφορά στη δημοσιευμένη βιβλιογραφία για την παρουσία της ψευδομονάδας σε κολυμβητικές δεξαμενές και δεξαμενές υδρομάλαξης (Tirodimos et al., 2010).

Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Οδηγία 98/83/EK του Συμβουλίου της 3ης Νοεμβρίου 1998 σχετικά με την ποιότητα νερού ανθρώπινης κατανάλωσης, τα αποδεκτά όρια για την παρουσία της *P. aeruginosa* σε νερά κολυμβητικών δεξαμενών είναι < 1 cfu/100 mL και 0 cfu/100 mL για νερό του δικτύου διανομής.

Στο χρονικό διάστημα 1999 έως 2008 καταγράφηκαν στις Η.Π.Α. 52 εξάρσεις δερματικών λοιμώξεων λόγω της παρουσίας *Pseudomonas aeruginosa*, με τα περιστατικά νοσηρότητας να φθάνουν σε αριθμό τα 955 (Tirodimos et al., 2018). Η ψευδομονάδα και το κρυπτοσπορίδιο, θεωρούνται δύο από τα πιο επικρατή παθογόνα σε κολυμβητικές δεξαμενές και δεξαμενές υδρομάλαξης (Tirodimos et al., 2018).

Όπως αναφέρθηκε, η *Pseudomonas aeruginosa* είναι υπεύθυνη για την πρόκληση μεταξύ άλλων, σοβαρών δερματικών λοιμώξεων, στις οποίες περιλαμβάνεται και η θυλακίτιδα (Hot foot syndrome / Hot tub folliculitis / Hot tub rash) (Fiorillo et al., 2001). Εκδηλώνεται με την εμφάνιση εκτεταμένων βλατίδων σε όλο το σώμα, ιδιαίτερα στις περιοχές οι οποίες καλύπτονται με μαγιό. Βλατίδες (papules) ορίζονται οι μόνιμες ανυψώσεις του δέρματος, μικρού μεγέθους (όσο η κεφαλή μιας καρφίτσας), οι οποίες δεν υποχωρούν σε εφαρμοζόμενη πίεση (James et al., 2006).

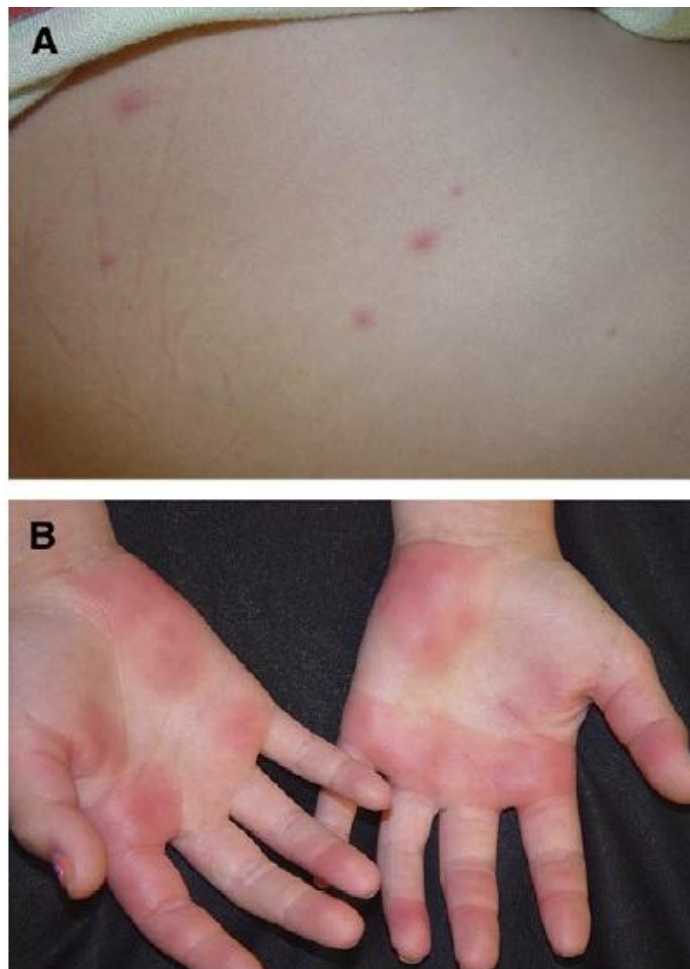


Εικόνα 9: Οζίδια ερυθρού χρώματος στα πέλματα ασθενή, έπειτα από τη δερματική επαφή με μολυσμένο από *Pseudomonas aeruginosa* νερό κοινοτικής κολυμβητικής δεξαμενής (Πηγή: Fiorillo et al., 2001).

Σε γενικές γραμμές τα παιδιά επηρεάζονται σε μεγαλύτερο βαθμό από την παρουσία ψευδομονάδας στα κολυμβητικά νερά, σε σχέση με τους ενήλικες (AOCD, 2021). Τα συμπτώματα της μόλυνσης εκδηλώνονται σε χρονικό διάστημα μερικών ωρών, έως και λίγες ημέρες μετά την έκθεση σε νερό δεξαμενών υδρομάλαξης ή κολυμβητικών δεξαμενών στο οποίο εφαρμόζεται ελλιπής ή αναποτελεσματική απολύμανση και καθαρισμός (AOCD, 2021). Ο όρος «hot foot syndrome» χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στην έρευνα των Fiorillo et al. (2001), στην οποία μελετήθηκαν οι ιατρικοί φάκελοι 40 παιδιών τα οποία εκδήλωσαν ιδιαίτερα επίπονα και έντονα εξανθήματα με βλατίδες ερυθρού χρώματος στην περιοχή των πελμάτων τους. Την περίοδο μεταξύ Μαρτίου και Μαΐου 1998, οι 40 ασθενείς ηλικίας 2 έως 15 ετών είχαν χρησιμοποιήσει την ίδια κοινοτική πισίνα. Σε δείγματα νερού που ελήφθησαν, ανιχνεύθηκαν υψηλές συγκεντρώσεις ψευδομονάδας. Σε όλους τους ασθενείς τα

συμπτώματα είχαν παρόμοια αλληλουχία. Αρχικά, εκδηλώθηκε έντονος πόνος στην περιοχή των πελμάτων τους, ακολουθούμενος εντός ολίγων ωρών από έντονο πρήξιμο, ερυθρότητα και αίσθηση καψίματος συνοδευόμενη από υπερβολικό πόνο στα πόδια τους, καθιστώντας αδύνατη τη στήριξη του βάρους του σώματός τους στις επηρεασμένες περιοχές.

Ένα άλλο κρούσμα θυλακίτιδας λόγω παρουσίας *P. aeruginosa* στο νερό, αφορούσε 34 παιδιά τα οποία ήρθαν σε επαφή με μολυσμένο νερό θερμής πισίνας. Αρχικά, 2 από τους 34 ασθενείς είχαν υψηλό αριθμό λευκοκυττάρων και έντονους πόνους στα πέλματα και τις παλάμες τους, όπου είχαν αναπτυχθεί βλατίδες ερυθρού χρώματος. Επιπλέον, το ένα από τα δύο παιδιά είχε αναπτύξει εξανθήματα και στην περιοχή του προσώπου και του θώρακά του. Οι υπόλοιποι 32 ασθενείς εκδήλωσαν επίσης δερματικές βλάβες 6 έως και 48 ώρες μετά την επαφή με το νερό της κολυμβητικής δεξαμενής (Yu et al., 2007).



Εικόνα 10: Ερυθρές βλατίδες στην περιοχή του θώρακα (Εικόνα Α) και ερυθρά οζίδια στις παλάμες (Εικόνα Β) (Πηγή: Yu et al., 2007).

5.4.2. Σταφυλόκοκκος Χρυσίζων - *Staphylococcus aureus*

Το γένος *Staphylococcus* αποτελείται από μη κινητούς, μη σπορογόνους, θετικούς κατά Gram κόκκους μεγέθους 0.5-1.5 μm . Ο σταφυλόκοκκος μπορεί να διασπάσει τη γλυκόζη, ενώ αναπτύσσεται, τόσο αερόβια, όσο και αναερόβια. Επίσης, συνήθως είναι καταλάση θετικός και απαντάται μεμονωμένα, σε μικρά ζεύγη, τετράδες, μικρές αλυσίδες ή και ακανόνιστα τμήματα (WHO, 2006). Πρόκειται για ένα συνηθισμένο είδος μικροοργανισμού που υπάρχει στο δέρμα, ενώ μπορεί να ανιχνευθεί σε νερό κολυμβητικής δεξαμενής, συνιστώντας έναν δείκτη διακινδύνευσης για εκδήλωση δερματικών και οφθαλμικών παθήσεων (Totaro et al., 2019). Οι σωματικές εκκρίσεις των κολυμβητών οδηγούν στην απελευθέρωση και τη συσσώρευση του μικροοργανισμού σε υμένια (films) στην επιφάνεια του νερού σε κάθε υδάτινο σώμα (Robinton & Mood, 1966), συμπεριλαμβανομένων και των κολυμβητικών δεξαμενών που υφίστανται χλωρίωση (Rocheleau et al., 1986). Κλινικά το πιο σημαντικό είδος σταφυλόκοκκου είναι ο Σταφυλόκοκκος Χρυσίζων (*Staphylococcus aureus*) (Duerden et al., 1990), καθώς εντοπίζεται στον ανθρώπινο οργανισμό στο εσωτερικό της ρινικής οδού, στο δέρμα και στα κόπρανα υγιών ατόμων (WHO, 2006).

Στη βιβλιογραφία αναφέρεται πως όταν η πυκνότητα χρηστών στα ύδατα αναψυχής είναι υψηλή, τότε υπάρχει υψηλή διακινδύνευση μόλυνσης από σταφυλόκοκκο, αντίστοιχη με τη διακινδύνευση εκδήλωσης γαστρεντερίτιδας λόγω κολύμβησης σε ύδατα επιβαρυσμένα με περιττωματική μόλυνση (De Araujo et al., 1990; WHO, 2006). Με άλλα λόγια, υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας και ανίχνευσης σταφυλόκοκκου με τον αριθμό κολυμβητών στο νερό (Goodwin et al., 2012; Fogarty et al., 2014). Επομένως, η συμπερίληψη του σταφυλόκοκκου στους εξεταζόμενους δείκτες κατά τον έλεγχο της μικροβιολογικής ποιότητας του νερού, θα επιτρέψει την καλύτερη διαχείριση της κολυμβητικής δεξαμενής και τον καθορισμό ενός κατάλληλου αριθμού χρηστών της δεξαμενής κάθε χρονική στιγμή, λαμβάνοντας υπόψη τη χωρητικότητα της δεξαμενής και την εφαρμοζόμενη απολυμαντική μέθοδο του νερού (Schets et al., 2020).

Ορισμένα από τα συμπτώματα που προκαλεί η επαφή κατά την κολύμβηση με μολυσμένο νερό πισίνας από σταφυλόκοκκο είναι τα δερματικά εξανθήματα, τα μολυσματικά κηρία κυρίως στο πρόσωπο που οφείλονται σε βακτηριακή λοίμωξη του δέρματος, λοιμώξεις σε ανοιχτές πληγές, ουρολοιμώξεις και ερεθισμοί των οφθαλμών (Calvert & Storey, 1988; Rivera & Adera, 1991). Συνήθως, γίνονται αντιληπτά μετά

το πέρας 48 ωρών από τη στιγμή της κολύμβησης (WHO, 2006). Κατά κανόνα το ήμισυ των σταφυλόκοκκων που ανιχνεύονται σε δείγματα νερού πισίνας ανήκουν στο είδος *Staphylococcus aureus* (Favero et al., 1964; Crone & Tee, 1974).

Η πρόταση για συμπερίληψη των σταφυλόκοκκων ως δεικτών ποιότητας των υδάτων κολυμβητικών δεξαμενών, έγκειται στην υψηλή ανθεκτικότητά τους στο χλώριο (5 έως 20 φορές πιο ανθεκτικοί από τα κολοβακτηριοειδή) και σε άλλες αλογονούχες ενώσεις, που χρησιμοποιούνται ως απολυμαντικά μέσα (Alico and Dragonjac, 1986). Ως συμβιωτικό βακτήριο των ανθρώπινων οργανισμών, ο σταφυλόκοκκος αποτελεί αναπόσπαστο τμήμα της μικροβιακής χλωρίδας του γαστρεντερικού και αναπνευστικού συστήματος, του δέρματος και της ρινικής κοιλότητας. Επομένως, η εμφάνιση του σώματος σε ένα υδάτινο σώμα, οδηγεί στην απελευθέρωση μεγάλου αριθμού του μικροοργανισμού στο νερό και η παρουσία του ειδικά στις κολυμβητικές δεξαμενές συνδέεται με ένα μεγάλο αριθμό λοιμώξεων των κολυμβητών (Masoud et al., 2016).

6. ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΚΙΝΔΥΝΟΥ-ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗΣ

Η ορθή διαχείριση και επεξεργασία του νερού είναι απαραίτητη για την αποτροπή μετάδοσης μολυσματικών ασθενειών υδατογενούς προέλευσης μέσω της μείωσης, της καταστροφής ή της αδρανοποίησης παθογόνων, κυρίως, μικροοργανισμών που περιέχονται στο νερό. Τα βασικά στάδια για τη βελτίωση της ποιότητας του νερού των κολυμβητικών δεξαμενών είναι η χρήση φίλτρων για τη διύλιση του νερού, η εφαρμογή ενώσεων του χλωρίου κατά το στάδιο της απολύμανσης, η ρύθμιση του pH του νερού και η χρήση κροκιδωτικών ουσιών για βελτίωση της διαύγασης (Bilajac, 2012).

Ως **απολύμανση** ορίζεται η επεξεργασία του νερού που αποσκοπεί στη μείωση του μικροβιακού πληθυσμού σε αποδεκτά επίπεδα ώστε να μην αποτελούν σημαντικό κίνδυνο για την υγεία, στην καταστροφή ή την αδρανοποίηση παθογόνων μικροοργανισμών, αλλά όχι των ανθεκτικών τους μορφών (π.χ. σπόροι) με φυσικά (π.χ. ακτινοβολία UV) ή χημικά μέσα (π.χ. χλωρίωση) (WHO, 2006; Εγκύκλιος Δ1(δ)/ΓΠοικ 32179/2020).

Ορισμένα κριτήρια που καθορίζουν την επιλογή του κατάλληλου απολυμαντικού μέσου, είναι η ασφάλεια της απολυμαντικής ουσίας κατά τη μεταφορά, αποθήκευση και χρήση στην εγκατάσταση, η απολυμαντική της δράση ως προς το χρόνο και ο βαθμός αποτελεσματικότητας της ουσίας, το pH και ο τύπος του νερού της πισίνας (θαλασσινό ή γλυκό), ο εκτιμώμενος αριθμός κολυμβητών, το μέγεθος και η κατηγορία της κολυμβητικής δεξαμενής (Esterman et al. 1984; WHO, 2006; Nikaeen et al., 2009). Εξίσου σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την αποτελεσματικότητα της απολύμανσης, είναι η ορθή χρήση της απολυμαντικής ουσίας και η ρύθμιση του pH από ένα άρτια καταρτισμένο και εκπαιδευμένο προσωπικό (Rabi et al., 2008; WHO, 2006).

Τα κύρια χαρακτηριστικά του κατάλληλου μέσου για την απολύμανση του νερού παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί και είναι αναγκαίο να λαμβάνονται ως κριτήρια αξιολόγησης κατά την επιλογή της απολυμαντικής μεθόδου που θα εφαρμοστεί σε μια κολυμβητική δεξαμενή (WHO, 2006; ΣΕΕΠΥ, 2020).

Πίνακας 2: Κύρια χαρακτηριστικά των μέσων απολύμανσης νερού.

Ιδιότητες απολυμαντικού μέσου
ταχύτατη και αποτελεσματική αδρανοποίηση παθογόνων
υπολειμματική δράση
χαμηλό κόστος
τοξικό μόνο για τους μικροοργανισμούς σε χαμηλές συγκεντρώσεις
απουσία ανεπιθύμητων επιδράσεων στην υγεία των χρηστών στις συνήθεις εφαρμοζόμενες δόσεις
ταχεία, άμεση και εύκολη μέτρηση της συγκέντρωσης του απολυμαντικού με αναλυτικά tests
δυνατότητα απομακρυσμένου ελέγχου της συγκέντρωσης του απολυμαντικού (μέσω διαδικτύου) και αυτοματοποιημένη καταγραφή και ρύθμιση των παραμέτρων της εγκατάστασης των κολυμβητικών δεξαμενών

Τα επίπεδα του ελεύθερου υπολειμματικού χλωρίου είναι απαραίτητο να είναι εντός των αποδεκτών ορίων όπως αυτά θεσπίζονται από την Εθνική νομοθεσία και τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας. Όταν τα επίπεδα χλωρίου είναι κάτω των αποδεκτών τιμών, ευνοείται η επικράτηση και η ανάπτυξη μικροοργανισμών, ενώ όταν οι συγκεντρώσεις ξεπερνούν τα πρότυπα ποιότητας, ενέχουν κίνδυνοι για την υγεία των χρηστών της κολυμβητικής δεξαμενής, λόγω των ερεθισμών των οφθαλμών, του δέρματος και του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος, αλλά και λόγω της παραγωγής ανεπιθύμητων προϊόντων (παραπροϊόντα χλωρίωσης) από την αντίδραση του χλωρίου που προστίθεται κατά την απολύμανση με τις οργανικές ουσίες που περιέχονται στο νερό. Η επικρατέστερη ομάδα σχηματιζόμενων παραπροϊόντων χλωρίωσης είναι τα τριαλογονομεθάνια (THMs), όπως είναι το χλωροφόρμιο (CHCl_3) (WHO, 2006). Απαιτείται ρύθμιση του pH του νερού μεταξύ 7-7.4, προκειμένου να εξασφαλιστεί η μέγιστη δράση του απολυμαντικού (ΣΕΕΠΥ, 2020).

Στον Πίνακα 2 αναφέρονται τα συνήθη μέσα για την απολύμανση του νερού των κολυμβητικών δεξαμενών, με το χλώριο να αποτελεί το πιο ευρέως εφαρμοζόμενο, λόγω της υπολειμματικής δράσης που διαθέτει (WHO, 2006). Η απολύμανση με όζον και υπεριώδη ακτινοβολία οδηγεί σε θανάτωση ή αδρανοποίηση των μικροοργανισμών, ωστόσο αυτές οι δύο μέθοδοι δε χαρακτηρίζονται από

υπολειμματική απολυμαντική δράση. Επομένως, μετά τον οζονισμό ή την απολύμανση με UV είναι απαραίτητη η εφαρμογή πρόσθετης ποσότητας ενώσεων του χλωρίου ή του βρωμίου με υπολειμματική απολυμαντική δράση (WHO, 2006; Pyas et al., 2018; Omarova et al., 2018; ΣΕΕΠΥ, 2020).

Πίνακας 3: Κύρια απολυμαντικά μέσα για κολυμβητικές δεξαμενές και συναφή περιβάλλοντα (Πηγή: WHO, 2006).

Μεγάλες κολυμβητικές δεξαμενές, με έντονη χρήση	Μεσαίου μεγέθους κολυμβητικές δεξαμενές και δεξαμενές υδρομάλαξης	Μικρού μεγέθους και ιδιωτικής χρήσης κολυμβητικές δεξαμενές
Χλώριο <ul style="list-style-type: none"> ▪ αέριο ▪ υποχλωριώδη άλατα Na και Ca ▪ ηλεκτρόλυση ▪ ισοκυανουρικά 	Βρώμιο <ul style="list-style-type: none"> ▪ υγρό ▪ βρωμιούχο Na και υποχλωριώδη άλατα 	Βρώμιο
BCDMH	Υποχλωριώδες λίθιο	Υποχλωριώδη άλατα
ClO ₂		UV
O ₃		UV- O ₃
UV		Ιώδιο H ₂ O ₂ / ιόντα χαλκού και αργύρου

Κατά την απολύμανση του νερού προστίθεται χλώριο σε δόσεις (**αρχική δόση**) που καλύπτουν τη ζήτηση σε χλώριο, δηλαδή την αρχική δέσμευση και κατανάλωση από τις περιεχόμενες οργανικές ενώσεις του νερού (**δεσμευμένο χλώριο - απαιτούμενη δόση**), αλλά και την ύπαρξη επαρκούς ποσότητας ελεύθερου **υπολειμματικού χλωρίου**, το οποίο δρα απολυμαντικά (Wyczarska-Kokot et al., 2020). Η ύπαρξη υπολειμματικού χλωρίου στο σύστημα ανακυκλοφορίας αποτελεί ένδειξη καλής μικροβιολογικής ποιότητας του νερού της κολυμβητικής δεξαμενής, καθώς η ποσότητα αυτή θα καταναλωθεί σε περίπτωση πιθανής μόλυνσης (WHO, 2006).

Τα **συνήθη μέσα απολύμανσης** που εφαρμόζονται κατά τα στάδια επεξεργασίας του νερού των κολυμβητικών δεξαμενών είναι τα εξής:

- Χλώριο
- Βρώμιο
- Ηλεκτρόλυση
- Οζονισμός
- Υπεριώδης ακτινοβολία (UV)
- Ενεργό οξυγόνο
- Ιονισμός

6.1. Χλωρίωση

Το χλώριο συνιστά το πιο διαδεδομένο μέσο για την απολύμανση του νερού, καθώς εξουδετερώνει όλους τους παθογόνους οργανισμούς που συνήθως περιέχονται στο νερό της κολυμβητικής δεξαμενής. Υπάρχει ως αέριο χλώριο, αν και βρίσκεται σήμερα περιορισμένη εφαρμογή, ως υποχλωριώδη άλατα του ασβεστίου, νατρίου και λιθίου σε στερεή ή υγρή μορφή, καθώς και ως χλωριωμένα παράγωγα του ισοκυανουρικού οξέος (WHO, 2006).

Σε δημόσιες κολυμβητικές δεξαμενές τύπου 1 ή 2 είναι επιτρεπτή η χρήση ανόργανων ενώσεων, όπως αέριο χλώριο, είτε σε φιάλες, είτε παραγόμενο επιτόπου με ηλεκτρόλυση, υποχλωριώδες ασβέστιο $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ σε κόκκους ή ταμπλέτες περιεκτικότητας $> 65\%$ w/w και 5 – 10% νερό, διάλυμα NaClO συγκέντρωσης 150 g/L χλωρίου και 12 g/L υδροξειδίου του νατρίου (pH = 11), διάλυμα NaClO παραγόμενο επιτόπου με ηλεκτρόλυση διαλύματος NaCl (ΣΕΕΠΥ, 2020).

Κατά την προσθήκη χλωρίου ή ενώσεών του στο νερό σχηματίζεται υποχλωριώδες οξύ, το οποίο είναι ασθενές και δίσταται σε αλκαλικό περιβάλλον σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Η παρουσία του υποχλωριώδους οξέος στο νερό εξαρτάται κυρίως από το pH και σε μικρότερο βαθμό από τη θερμοκρασία. Για τιμές pH < 6 υπερισχύει το HOCl που διαθέτει και τη μεγαλύτερη απολυμαντική ικανότητα, ενώ για pH 6.5-8.5 το HOCl δίσταται και τα υποχλωριώδη ιόντα καθίστανται η κύρια δραστική μορφή κατά την απολύμανση (WHO, 2006).

Κατά τη χρήση χλωριωμένων παραγώγων του ισοκυανουρικού οξέος, παράγεται έμμεσα υποχλωριώδες οξύ με ταυτόχρονη παραγωγή κυανουρικού οξέος, σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Υψηλές συγκεντρώσεις κυανουρικού οξέος, οδηγούν σε μείωση της συγκέντρωσης του ελεύθερου υπολειμματικού χλωρίου στο νερό, άρα σε μειωμένη απολυμαντική δράση, κάτι το οποίο συμβαίνει σε συγκεντρώσεις $\text{C}_3\text{H}_3\text{N}_3\text{O}$ άνω των 200 mg/L. Επομένως, συνιστάται η παρακολούθηση και ο έλεγχος της συγκέντρωσης του κυανουρικού οξέος, η οποία δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 100 mg/L. Ο εμπλουτισμός του νερού της κολυμβητικής δεξαμενής με κυανουρικό οξύ δεν αντισταθμίζεται με τις συνήθεις εφαρμοζόμενες τεχνικές επεξεργασίας και απαιτείται προσθήκη καθαρού νερού από το δίκτυο και ανάμειξη του με το προϋπάρχον, προκειμένου να γίνει διατήρηση των συγκεντρώσεων στα επιθυμητά επίπεδα (WHO, 2006).

Τα αποδεκτά όρια ελεύθερου υπολειμματικού χλωρίου παρουσιάζουν διαφοροποιήσεις μεταξύ των κρατών, καθώς και μεταξύ των διαφόρων κατηγοριών δεξαμενών. Για παράδειγμα, στις δεξαμενές υδρομάλαξης όπου το νερό είναι θερμό συνιστάται εφαρμογή δόσης χλωρίου υψηλότερης από την αντίστοιχη που εφαρμόζεται σε κολυμβητικές δεξαμενές. Τα όρια κυμαίνονται από < 1 mg/L έως και 3 mg/L για τις κολυμβητικές δεξαμενές και 5 mg/L για τις δεξαμενές υδρομάλαξης (WHO, 2006). Σύμφωνα με τον γερμανικό κανονισμό DIN 19643 οι επιτρεπτές τιμές υπολειμματικού χλωρίου κυμαίνονται μεταξύ 0.3 - 0.6 mg/L, ενώ η κολύμβηση απαγορεύεται όταν η συγκέντρωση ξεπερνά τα 1.2 mg/l. Σύμφωνα με τον Κώδικα Πρακτικής του ΣΕΕΠΥ, θα πρέπει να γίνεται αναστολή της χλωρίωσης όταν οι τιμές του υπολειμματικού χλωρίου ξεπερνούν τα 5 mg/L, ενώ για τιμές άνω των 10 mg/L, θα πρέπει να γίνεται απαγόρευση της κολύμβησης (ΣΕΕΠΥ, 2020).

Χαμηλότερες συγκεντρώσεις ελεύθερου υπολειμματικού χλωρίου προστατεύουν από ανεπιθύμητες επιδράσεις την υγεία των χρηστών, εφόσον συνδυάζονται με άλλες ορθές πρακτικές προσωπικής υγιεινής των χρηστών και ορθής διαχείρισης του νερού (επαρκής κροκίδωση - συσσωμάτωση, διύλιση σε φίλτρα, οξονισμός, απολύμανση με UV). Σε περίπτωση χρήσης χλωριωμένων παραγώγων του ισοκυανουρικού οξέος, ο

Π.Ο.Υ. συνιστά οι δόσεις να βρίσκονται εντός του εύρους 50-100 mg/L (WHO, 2006).

Η μέτρηση του ελεύθερου υπολειμματικού χλωρίου, αλλά και του συνδυασμένου χλωρίου υπό τη μορφή χλωραμινών στο νερό των κολυμβητικών δεξαμενών γίνεται κυρίως χρωματογραφικά με τη μέθοδο DPD (N, N διαιθυλο-p-φαινυλενοδιαμίνη) (Gordon et al., 1991) και θα κυμαίνεται μεταξύ 0,4 και 0,7 mg/l, σύμφωνα με την Εγκύκλιο με Αριθ. πρωτ. Γ1δ/ΓΠ.οικ.57120 σχετικά με την «παρακολούθηση λειτουργίας κολυμβητικών δεξαμενών».

Η λειτουργία των σύγχρονων συστημάτων των κολυμβητικών δεξαμενών βασίζεται σε ένα κλειστό σύστημα κυκλοφορίας του νερού, με ενεργή υπερχειλίση και επεξεργασία του νερού. Στις δημόσιες κολυμβητικές δεξαμενές, πραγματοποιείται υποχρεωτική απολύμανση του νερού με ενώσεις του χλωρίου, προκειμένου να επιτευχθεί οξείδωση του συνόλου των οργανικών και ανόργανων ενώσεων που περιέχονται στο νερό της δεξαμενής. Η ποσότητα και η κατηγορία των παραπροϊόντων χλωρίωσης που προκύπτουν, ποικίλει ανάλογα με την εφαρμοζόμενη απολυμαντική μέθοδο, το υδραυλικό σύστημα και τα τεχνικά χαρακτηριστικά της δεξαμενής, το ρυθμό ανακυκλοφορίας του νερού εντός της ημέρας, τον αριθμό των χρηστών, τη διάρκεια παραμονής τους εντός της κολυμβητικής δεξαμενής και την κατηγορία των ρύπων που καταλήγουν στο νερό από τις εκκρίσεις των χρηστών (Wyczarska-Kokot et al., 2020).

Ενδεικτική της ποσότητας των παραπροϊόντων που καταλήγουν στο νερό της πισίνας, είναι η αρχική ποσότητα του χλωρίου που δεσμεύεται από τις ουσίες που υπάρχουν στο νερό. Επομένως, τόσο το δεσμευμένο, όσο και το ελεύθερο χλώριο που δρα ως απολυμαντικό, είναι δύο σημαντικές παράμετροι ενδεικτικές της μικροβιολογικής ποιότητας του νερού της κολυμβητικής δεξαμενής, που καθορίζουν κατά πόσο επιτρεπτή είναι η χρήση της χωρίς ανεπιθύμητες επιδράσεις στην υγεία των χρηστών (WHO, 2006; Wyczarska-Kokot et al., 2020).

Αυξημένη υπερχλωρίωση (shock dosing) χρησιμοποιείται για να λύσει συγκεκριμένα προβλήματα, όπως την καταστροφή αλγών και την αντιμετώπιση προβλημάτων με τη διαύγεια και το χρώμα του νερού. Σα μέθοδος αποτελεί αναπόσπαστο τμήμα στα πλαίσια της στρατηγικής για ολοκληρωμένη διαχείριση της κολυμβητικής δεξαμενής.

Σε αυτήν την περίπτωση, η δόση του χλωρίου είναι μεγαλύτερη (5 - 7 φορές) από ό,τι στην προληπτική υπερχλωρίωση. Ακριβώς λόγω των υψηλών συγκεντρώσεων χλωρίου που εφαρμόζονται κατά τη χλωρίωση σοκ (> 20 mg/L), θα πρέπει να αποφεύγεται ως πανάκεια, για να αντισταθμίσει τυχόν άλλες αναποτελεσματικές πρακτικές διαχείρισης. Συνιστάται η χρήση της μόνο όταν υπάρχει σημαντικό πρόβλημα επικράτησης βιομεμβρανών και χλωραμινών στο νερό (WHO, 2006). Στη χλωρίωση σοκ, μπορεί να χρησιμοποιηθεί δίχλωρο-ισοκυανουρικό νάτριο (περιεκτικότητα 55-62%) το οποίο διατίθεται σε σκόνη ή σε κόκκους, λόγω της άμεσης και ισχυρής οξειδωτικής δράσης του (ΣΕΕΠΥ, 2020).

Ενδεικτικά, για την καταστροφή χλωραμινών απαιτείται δόση ελεύθερου υπολειμματικού χλωρίου 10 φορές, τουλάχιστον, μεγαλύτερη από τη συγκέντρωση του συνδυασμένου χλωρίου. Κατά την προληπτική υπερχλωρίωση, η συνήθης πρακτική αφορά την ανύψωση των συγκεντρώσεων του ελεύθερου υπολειμματικού χλωρίου στα 10 mg/L για χρονικό διάστημα 1 έως 4 ωρών. Σε περίπτωση ατυχήματος απελευθέρωσης κοπράνων στην κολυμβητική δεξαμενή, διενεργείται χλωρίωση σοκ με δόσεις χλωρίου άνω των 20 mg/L, σε pH 7.2-7.5 για χρονικό διάστημα 8 ωρών (WHO, 2006). Ο σχεδιασμός των συστημάτων χλωρίωσης θα πρέπει να καλύπτει τις μέγιστες απαιτήσεις αναφορικά με την απολύμανση του νερού και θα πρέπει να επιτυγχάνονται οι εξής παροχές ανάλογα με τον τύπο (ανοιχτού ή κλειστού τύπου) της κολυμβητικής δεξαμενής (ΣΕΕΠΥ, 2020):

- $\geq 2 \text{ g Cl}_2 / \text{m}^3$ ανακυκλοφορίας (για κλειστού τύπου)
- $\geq 5 \text{ g Cl}_2 / \text{m}^3$ ανακυκλοφορίας (για ανοιχτού τύπου)

Η χλωρίωση με ClO_2 , δε συνιστάται για κολυμβητικές δεξαμενές. Στο Ηνωμένο Βασίλειο έχει καθοριστεί ως όριο τα 0.5 mg/l στο νερό των κολυμβητικών δεξαμενών για το διοξείδιο του χλωρίου και τα χλωριώδη (ΣΕΕΠΥ, 2020). Το αέριο διοξείδιο του χλωρίου διαλύεται στο νερό σε εύρος pH 6.0-9.0. Είναι ένα ισχυρό απολυμαντικό και, κατά κανόνα, θεωρείται ότι η βιοκτόνος αποτελεσματικότητά του είναι συγκρίσιμη ή ελαφρώς υψηλότερη από αυτήν του χλωρίου υπό ορισμένες συνθήκες (Omarova et al., 2018). Το διοξείδιο του χλωρίου είναι ένα αποτελεσματικό απολυμαντικό έναντι των πρωτοζώων του γένους *Giardia* και *Cryptosporidium* (περίπου 90% αδρανοποίηση κύστεων και ωοκύστεων). Ωστόσο, σχηματίζει τοξικά

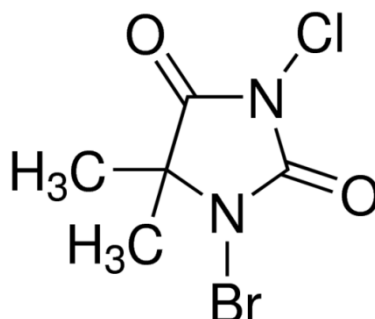
παραπροϊόντα, όπως χλωριώδη και χλωρικά. Επιπλέον, το διοξείδιο του χλωρίου είναι περίπου 5-10 φορές πιο ακριβό από το χλώριο (Omarova et al., 2018).

Το διοξείδιο του χλωρίου διαφοροποιείται από τις λοιπές ενώσεις του χλωρίου, καθώς πρόκειται για ένα ασταθές αέριο που πρέπει να παράγεται λίγο πριν την εφαρμογή και δεν αποθηκεύεται, ενώ σημαντικό μειονέκτημα είναι η μη παραγωγή ελεύθερου χλωρίου. Διασπάται σε χλωριώδη (ClO^{2-}) και χλωρικά (ClO^{3-}) σε ουδέτερο περιβάλλον. Η τοξικότητα του ClO_2 και των χλωρικών ανάγεται σε τοξικότητα χλωριωδών, λόγω της μετατροπής τους σε χλωριώδη στον ανθρώπινο οργανισμό. Τα χλωριώδη προκαλούν μεθαιμοσφαιριναιμία, ενώ εκδηλώνονται και διαταραχές στο ήπαρ και στο θυρεοειδή αδένα (WHO, 2005).

Ο Π.Ο.Υ. συστήνει ως αποδεκτό όριο για τα χλωριώδη και τα χλωρικά τα 0.7 mg/L για το νερό ανθρώπινης κατανάλωσης, βάσει μιας ημερήσιας πρόσληψης (TDI - Tolerable daily intake) 0.03 mg/kg βάρους σώματος. Λόγω της πιθανής συσσώρευσης αυτών των ιόντων στο νερό που ανακυκλοφορεί στην κολυμβητική δεξαμενή, συνιστάται η συγκέντρωσή τους να μην υπερβαίνει τα 3 mg/L νερού πισίνας (WHO, 2006).

6.2. Βρωμίωση

Το βρώμιο σε υγρή μορφή χρησιμοποιείται σπάνια κατά την απολύμανση του νερού πισίνας. Διατίθεται στο εμπόριο, συνήθως σε μορφή ταμπλετών 1-βρωμο-3-χλωρο-5,5-διμεθυλο-υδαντοΐνης (BCDMH) αργής διάλυσης ή χρησιμοποιείται άλας βρωμίου το οποίο διαλύεται στο νερό και ενεργοποιείται με την προσθήκη μιας επιπλέον οξειδωτικής ουσίας (π.χ. όζον) (WHO, 2006; “Piscinity”, 2021).

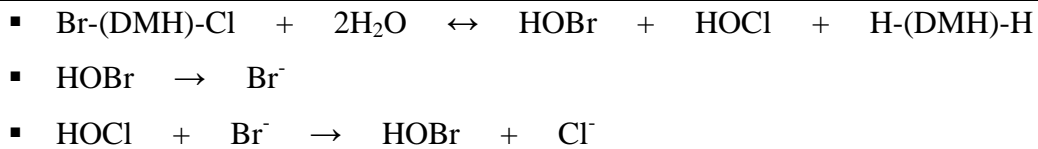


Εικόνα 11: Συντακτικός τύπος BCDMH

Ορισμένα από τα οφέλη που προκύπτουν από τη χρήση του βρωμίου είναι ότι παραμένει αποτελεσματικό σε υψηλές τιμές pH άνω του 7.8, καθώς και ότι η μικρή

ποσότητα βρωμίου που δεσμεύεται από τις υπάρχουσες οργανικές ενώσεις του νερού, οδηγεί σε μεγαλύτερη συγκέντρωση ελεύθερου υπολειμματικού απολυμαντικού. Η χρήση του βρωμίου, θα πρέπει να γίνεται σε συνδυασμό με το χλώριο σε μια αναλογία 2/3 βρώμιο και 1/3 χλώριο (“Piscinity”, 2021).

Στη συνέχεια παρουσιάζονται οι βασικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάλυση των ταμπλετών στο νερό.



Ο Π.Ο.Υ. συνιστά η συγκέντρωση του ολικού βρωμίου στο νερό της κολυμβητικής δεξαμενής να μην ξεπερνά τα 2-2.5 mg/L. Γενικά, η χρήση ενώσεων του βρωμίου ως απολυμαντικά δε βρίσκει ευρεία εφαρμογή σε εξωτερικές πισίνες και δεξαμενές υδρομάλαξης, λόγω της μεγάλης ευαισθησίας τους στην ηλιακή ακτινοβολία.

Επιπλέον, τα σχηματιζόμενα βρωμιωμένα THMs αποτελούν καρκινογόνες και μεταλλαξιόγόνες ενώσεις. Στο γερμανικό κανονισμό DIN 19643, το βρώμιο δεν περιλαμβάνεται ως προτεινόμενη απολυμαντική ουσία, καθώς ως ασθενές οξειδωτικό μπορεί να συμβάλλει στην υπέρμετρη παραγωγή βρωμιωμένων παραπροϊόντων, σε συγκεντρώσεις άνω των 100 µg/L (ΣΕΕΠΥ, 2020). Επιπροσθέτως, το υψηλό κόστος του συγκριτικά με το χλώριο, συνιστά σημαντικό μειονέκτημα και αποτρέπει την εκτεταμένη χρήση του ως απολυμαντικό.

6.3. Ηλεκτρόλυση

Η ηλεκτρόλυση (Electrochemically Generated Mixed Oxidants - EGMO) βασίζεται στην παραγωγή χλωρίου από την ηλεκτρόλυση διαλύματος υδροχλωρικού οξέος ή υποχλωριώδους νατρίου ή χλωριούχου νατρίου, με το σχηματιζόμενο υποχλωριώδες οξύ να αποτελεί το δραστικό συστατικό κατά την απολύμανση (Ilyas et al., 2018; ΣΕΕΠΥ, 2020).

Η εγκατάσταση των συστημάτων ηλεκτρολυτικής παραγωγής υποχλωριώδους νατρίου γίνεται στο σύστημα ανακυκλοφορίας. Μετά την αρχική προσθήκη της απαραίτητης ποσότητας άλατος, το νερό με την ανακυκλοφορία διέρχεται από το θάλαμο ηλεκτρόλυσης, όπου παράγεται το απολυμαντικό χλώριο (“Piscinity”, 2021).

Η τεχνική βασίζεται στην εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος (200-400 V) σε διάλυμα αλατιού συγκέντρωσης 3000-6000 mg/L. Εκτός από υποχλωριώδες οξύ, είναι πιθανή η παραγωγή και άλλων οξειδωτικών σε πολύ μικρότερο βαθμό, όπως ρίζες υδροξυλίου, υπεροξειδίου του υδρογόνου, διοξειδίου του χλωρίου και όζον (Pyas et al., 2018). Ωστόσο, η μέθοδος της ηλεκτρόλυσης έχει ως μειονέκτημα την παραγωγή τριαλογονομεθανίων, αντίστοιχα με τη χλωρίωση (Dowd, 1994).

Η απλή κατασκευή και το χαμηλό κόστος των συστημάτων ηλεκτρόλυσης συμβάλλουν στην εκτεταμένη χρήση τους. Επιπλέον, το χλώριο που προκύπτει μέσω της ηλεκτρολυτικής διαδικασίας, επιφέρει λιγότερους ερεθισμούς και καλύτερη ποιότητα νερού ως προς την οσμή και τη γεύση, σε σύγκριση με το βιομηχανικό χλώριο (“Piscinity”, 2021).

6.4. Οζονισμός

Το όζον και η υπεριώδης ακτινοβολία απομακρύνουν τυχόν μικροοργανισμούς που περιέχονται στο νερό της πισίνας, σκοτώνοντας ή αδρανοποιώντας τους, καθώς αυτό διέρχεται μέσα από ειδικές συσκευές, τους οζονιστήρες και τις συσκευές ακτινοβολήσης με λυχνίες UV, αντίστοιχα (WHO, 2006).

Τόσο ο οζονισμός, όσο και η απολύμανση με υπεριώδη ακτινοβολία δεν έχουν υπολειμματική δράση, με αποτέλεσμα να μην μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αποκλειστικές μέθοδοι απολύμανσης του νερού, αλλά απαιτείται συνδυασμός τους με την εφαρμογή χλωρίου (Omarova et al., 2018). Ο συνδυασμός μεθόδων αυξάνει την αποτελεσματικότητα της απολύμανσης, ενώ ταυτόχρονα περιορίζει το σχηματισμό παραπροϊόντων χλωρίωσης (Betancourt & Rose, 2004).

Κατά τον οζονισμό του νερού στις κολυμβητικές δεξαμενές, υπάρχει ο κίνδυνος διαρροής όζοντος στην ατμόσφαιρα από τη διάταξη παραγωγής του όζοντος ή από τη δεξαμενή επαφής του αερίου με το νερό. Για αυτό το σκοπό, είναι απαραίτητη η πρόβλεψη εφαρμογής ενός σταδίου καταστροφής της περίσσειας του όζοντος, για τον έλεγχο τυχόν διαρροών (WHO, 2006).

Η μειωμένη μικροβιοκτόνος ικανότητα του χλωρίου σε σύγκριση με το όζον, οδηγεί σε σταδιακή εγκατάλειψη του πρώτου και επικράτηση του δεύτερου ως απολυμαντικό. Ενδεικτικό της ικανότητας μιας χημικής ένωσης να προκαλεί οξείδωση των οργανικών ουσιών είναι το δυναμικό οξειδοαναγωγής. Το όζον φέρει

μεγαλύτερο δυναμικό οξειδοαναγωγής ($E_0 = 2.07 \text{ V}$), άρα και μεγαλύτερη οξειδωτική ικανότητα συγκριτικά με το χλώριο ($E_0 = 1.36 \text{ V}$), όπως παρουσιάζεται και στον πίνακα που ακολουθεί (Pyas et al., 2018).

Πίνακας 4: Δυναμικό οξειδοαναγωγής των κυριότερων οξειδωτικών που χρησιμοποιούνται κατά την απολύμανση του νερού (Πηγή: Pyas et al., 2018).

Χημική ουσία	Δυναμικό Οξειδοαναγωγής (V)
OH^\cdot	2.86
O_3	2.07
H_2O_2	1.78
Cl_2	1.36
ClO_2	1.27

Καθώς το όζον διασπάται στο νερό σε υψηλές τιμές pH, σχηματίζονται ελεύθερες ρίζες HO_2 και OH^\cdot , οι οποίες έχουν υψηλή οξειδωτική ισχύ και αποτελούν τα δραστικά συστατικά κατά την απολύμανση του νερού (EPA, 1999).

Παρόλα αυτά, το όζον είναι ιδιαίτερα ασταθές ως αέριο και δεν είναι εφικτή η παραγωγή και εν συνεχεία η αποθήκευσή του, διότι διασπάται γρήγορα σε οξυγόνο με ταυτόχρονη έκλυση θερμότητας (EPA, 1999). Επομένως, η απουσία υπολειμματικής δράσης, λόγω της γρήγορης αποσύνθεσής του, το καθιστά ακατάλληλο ως απολυμαντικό για το νερό κολυμβητικών δεξαμενών (Pyas et al., 2018). Επιπροσθέτως, δημιουργεί την ανάγκη χρήσεως εξαιρετικά υψηλών δόσεων όζοντος για την επίτευξη του επιθυμητού αποτελέσματος, σε συνδυασμό με ένα στάδιο καταστροφής της περισσειας του όζοντος και ένα στάδιο χλωρίωσης μετά τον οζονισμό, για την εξασφάλιση ελεύθερου υπολειμματικού απολυμαντικού στο νερό (Hansen et al., 2016).

Αν και πρόκειται για ένα από τα πιο ισχυρά οξειδωτικά που χρησιμοποιούνται στην επεξεργασία του νερού, το όζον σε υψηλές συγκεντρώσεις αποτελεί κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία. Υπό ορισμένες συνθήκες μπορεί να παραχθούν παραπροϊόντα με μεταλλαξιογόνες και πιθανώς καρκινογόνες ιδιότητες (Carmichael et al., 1982). Επιπλέον, μπορεί να προκαλέσει σημαντικές βλάβες στο αναπνευστικό σύστημα, ακόμα και θάνατο (Lippman, 1989). Επομένως, καθίσταται αναγκαίος ο έλεγχος των συγκεντρώσεών του στον αέρα του περιβάλλοντα χώρου των κολυμβητικών

εγκαταστάσεων. Το αποδεκτό όριο για τη συγκέντρωση του όζοντος στην ατμόσφαιρα ανέρχεται στα 0.12 mg/m^3 , εξασφαλίζοντας την απαραίτητη προστασία για την υγεία των χρηστών της πισίνας και των εργαζομένων της εγκατάστασης (WHO, 2000).

Στη συνέχεια περιγράφονται συνοπτικά ορισμένα από τα κυριότερα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της χρήσης όζοντος για την απολύμανση του νερού.

Πίνακας 5: Οφέλη και μειονεκτήματα του οζονισμού του νερού (Πηγή: WHO, 2006; Pyas et al., 2018; Omarova et al., 2018).

Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
1. Πιο αποτελεσματικό απολυμαντικό για την καταστροφή ιών, βακτηρίων και κυστών πρωτοζώων σε σχέση με το χλώριο	1. Έλλειψη υπολειμματικής δράσης
2. Μικρός χρόνος επαφής-Άμεση απολύμανση	2. Υψηλό κόστος παραγωγής, λειτουργίας και εγκατάστασης
3. Μη μεταβολή των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του νερού, καθώς δεν προστίθενται χημικές ενώσεις	3. Περίπλοκη τεχνολογία συγκριτικά με την παραδοσιακή μέθοδο της χλωρίωσης
	4. Εξαιρετικά ερεθιστικό και πιθανόν τοξικό για τον άνθρωπο

6.5. UV

Κατά την απολύμανση του νερού με υπεριώδη ακτινοβολία επιτυγχάνεται καταστροφή παθογόνων μικροοργανισμών μέσω της ικανότητάς της να διαπερνά το κυτταρικό τοίχωμα τους, αλλά και ορισμένων ρύπων, όπως οι χλωραμίνες, με φωτοοξείδωση (WHO, 2006). Μέσα στον μικροοργανισμό, προκαλεί φωτοχημική προσβολή του μικροβιακού DNA και RNA. Η ανεπανόρθωτη καταστροφή του γενετικού υλικού, οδηγεί σε διακοπή της αναπαραγωγής των κυττάρων ή / και κυτταρικό θάνατο, ακριβώς λόγω της παρεμπόδισης μεταφοράς των γενετικών πληροφοριών (Snicer et al., 2000). Η μικροβιοκτόνος δράση της UV επιτυγχάνεται σε εκπεμπόμενα μήκη κύματος μεταξύ 200 έως 300 nm (WHO, 2006).

Στα πλεονεκτήματα της συγκεκριμένης μεθόδου περιλαμβάνεται η μη εξάρτησή της από τη χρήση χημικών προσθέτων, επομένως δε μεταβάλλονται τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του νερού, η αποτελεσματική απενεργοποίηση των πρωτοζωικών παρασίτων και ο σύντομος χρόνος επαφής με το νερό (Betancourt & Rose, 2004). Στα μειονεκτημάτά της, ωστόσο, περιλαμβάνονται οι διαφορές στην απόδοση μεταξύ διαφόρων τύπων λυχνιών UV και σχεδίων αντιδραστήρων, αδυναμία μέτρησης και ελέγχου στην πράξη της αποτελεσματικότητας των λυχνιών UV, η παρεμπόδιση της απολύμανσης σε νερά με αυξημένες τιμές θολότητας και η έλλειψη υπολειμματικής δράσης στο σύστημα ανακυκλοφορίας του νερού της πισίνας (Betancourt & Rose, 2004).

Προκειμένου να ενισχυθεί η απόδοση των UV λυχνιών, είναι απαραίτητη η προεπεξεργασία του νερού για αφαίρεση των αιωρούμενων στερεών και κolloειδών σωματιδίων που προκαλούν θολότητα. Τα σωματίδια παρέχουν προστασία στους μικροοργανισμούς από τη δράση του απολυμαντικού μέσου. Η παρουσία αιωρούμενων σωματιδίων στο νερό, μειώνει την αποτελεσματικότητα του συστήματος (WHO, 2006). Προκειμένου όλος ο όγκος νερού να διέλθει από το ηλεκτρόδιο, απαιτείται ρύθμιση της ταχύτητας της ροής του στις σωληνώσεις και εξασφάλιση μιας επαρκούς ανακυκλοφορίας (“Piscinity”, 2021). Επιπλέον, είναι σημαντική η ορθή συντήρηση και τακτικός καθαρισμός των λυχνιών για την αφαίρεση τυχόν επικαθίσεων (WHO, 2006).

Η απολύμανση με ακτινοβολία UV χρησιμοποιείται ευρέως ως συμπληρωματική τεχνική σε πισίνες που υφίστανται χλωρίωση και είναι αρκετά αποτελεσματική στον έλεγχο των παρασίτων *Cryptosporidium parvum* και *Giardia lamblia* (Hijnen et al., 2006). Ωστόσο, υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές για παραγωγή παραπροϊόντων (π.χ. αλογονοακετονιτρίλια, HANs) κατά την απολύμανση του νερού της πισίνας με εφαρμογή UV ή με συνδυασμό UV/χλωρίωσης (Spiliotopoulou et al., 2015).

Ο οζονισμός και κυρίως η απολύμανση με UV χρησιμοποιούνται, προκειμένου να μειωθεί η απαιτούμενη ποσότητα χλωρίου που πρέπει να εφαρμοστεί κατά την απολύμανση του νερού, καθώς και τα ανεπιθύμητα χλωριωμένα παράγωγα (Disinfection by-products, DBPs) που προκύπτουν. Παρόλα αυτά, η υπερϊώδης ακτινοβολία συντελεί στην αύξηση της αντιδραστικότητας του χλωρίου και την παραγωγή χλωροοργανικών παραπροϊόντων, π.χ. τριαλογονομεθάνια. Σε έρευνα των

Cheema et al., (2017) ελέγχθηκε η υπόθεση αν η υπεριώδης ακτινοβολία προκαλεί αντίστοιχη αύξηση της αντιδραστικότητας του όζοντος.

Με τον οζονισμό είναι πιθανός ο κορεσμός της αντιδραστικότητας του χλωρίου που προκαλείται από την επεξεργασία του νερού με υπεριώδη ακτινοβολία, καθώς και ο μετριασμός του σχηματισμού πτητικών παραπροϊόντων απολύμανσης. Η υπόθεση των ερευνητών επιβεβαιώθηκε, καθώς παρατήρησαν πως το όζον είχε χρόνο ημιζωής 5 λεπτά σε πισίνα της οποίας το νερό δεν είχε υποστεί επεξεργασία με UV, ενώ το όζον εξαντλούταν σε λιγότερο από 2 λεπτά σε πισίνες στις οποίες είχε εφαρμοστεί απολύμανση με UV. Παράλληλα, παρατηρήθηκε μείωση της αντιδραστικότητας του χλωρίου, άρα και περιορισμός της παραγωγής τοξικών παραπροϊόντων (π.χ. τριχλωρονιτρομεθάνιο), κατά την αύξηση της δόσης του όζοντος πριν το στάδιο της χλωρίωσης. Τα τοξικά παραπροϊόντα απομακρύνθηκαν πλήρως από το νερό της κολυμβητικής δεξαμενής με συνδυαστικό οζονισμό/UV και εναλλαγή με χλωρίωση σε διάστημα 24 ωρών.

Κατά το στάδιο της χλωρίωσης που εφαρμόζεται σε νερό πισίνας, μετά την αρχική απολύμανση με όζον ή υπεριώδη ακτινοβολία, παρατηρείται σταδιακή αύξηση των χλωριωμένων παραπροϊόντων (Spiliotopoulou et al., 2015). Σε άλλη έρευνα των Cheema et al., (2018) ελέγχθηκε εργαστηριακά η παραγωγή DBPs σε δείγματα νερού κολυμβητικών δεξαμενών στις οποίες είχε εφαρμοστεί ως απολυμαντικό μέσο, είτε όζον, είτε υπεριώδης ακτινοβολία. Επίσης, ελέγχθηκε κατά πόσο το όζον, που έχει παρόμοια αντιδραστικότητα με το χλώριο, συμβάλλει στον περιορισμό σχηματισμού των DBPs, έπειτα από απολύμανση με UV. Τα αποτελέσματα της έρευνας, έδειξαν περιορισμό των συγκεντρώσεων των DBPs κατά τον συνδυασμό UV/όζοντος. Επιπροσθέτως, παρατηρήθηκε καταστροφή των DBPs που είχαν προκύψει από την αρχική επεξεργασία του νερού με συνδυασμό όζοντος/χλωρίου, έπειτα από επεξεργασία με φωτόλυση.

6.6. Ενεργό οξυγόνο

Σε περίπτωση υπερχλωρίωσης του νερού μιας κολυμβητικής δεξαμενής, είναι αναγκαία η μείωση της συγκέντρωσης του υπολειμματικού χλωρίου σε ασφαλή για τους λουόμενους επίπεδα, μέσω της διαδικασίας της αποχλωρίωσης. Αποχλωρίωση του νερού μπορεί να γίνει, είτε με την προσθήκη όγκου καθαρού νερού και ανανέωση μέρους του υπάρχοντος, είτε με προσθήκη H_2O_2 σε υγρή μορφή ή σε σκόνη (ΣΕΕΠΥ,

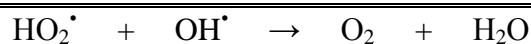
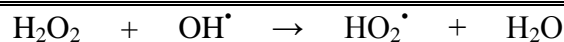
2020; “Piscinity”, 2021). Το H_2O_2 προσφέρει το πλεονέκτημα της μη παραγωγής ανεπιθύμητων χλωριωμένων προϊόντων και της μη αύξησης των ολικών διαλυμένων στερεών (ΣΕΕΠΥ, 2020).

Πριν από το στάδιο εφαρμογής της υπεριώδους ακτινοβολίας είναι απαραίτητα η προεπεξεργασία του νερού, προκειμένου να επιτευχθεί ο έλεγχος της θολότητας, του χρώματος και άλλων φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του νερού που πιθανόν να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα της μεθόδου. Κατάλληλο για αυτό το σκοπό είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου, λόγω της ασφάλειας κατά τη χρήση του σε μικρές δόσεις και της παραγωγής οξυγόνου και νερού ως τελικά προϊόντα. Η αποτελεσματικότητα των συνδυαζόμενων μεθόδων UV / H_2O_2 , βασίζεται σε μια 24ωρη εφαρμογή τους σε ημερήσια βάση (CDC, 2006).

Η οξειδωτική ικανότητα των UV / H_2O_2 οφείλεται στο σχηματισμό ελευθέρων ριζών υδροξυλίου, σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Απαιτείται μεγαλύτερη δόση ενεργού οξυγόνου και μεγαλύτερος χρόνος εφαρμογής της υπεριώδους ακτινοβολίας, συγκριτικά με το συνδυασμό των μεθόδων UV / O_3 . Ωστόσο, περίσσεια του H_2O_2 μπορεί να αντιδράσει με τη σχηματιζόμενη OH^\bullet , παράγοντας τη λιγότερο δραστική ρίζα HO_2^\bullet . Από την άλλη πλευρά, χαμηλές συγκεντρώσεις H_2O_2 οδηγούν σε ανεπαρκή σχηματισμό ελεύθερων ριζών OH^\bullet και σε πιο αργό ρυθμό οξείδωσης (Muruganandham et al., 2014).



Όταν το ενεργό οξυγόνο είναι σε μορφή σκόνης, χρησιμοποιείται σε υψηλές δόσεις, αντίστοιχα με τη χλωρίωση σοκ και η εφαρμοζόμενη δόση είναι $1 \text{ kg}/100 \text{ m}^3$. Συνίσταται η εφαρμογή του μετά από μεγάλες χρονικές περιόδους που δεν έχει γίνει χρήση της κολυμβητικής δεξαμενής και για προληπτικούς σκοπούς κάθε 1 μήνα (“Piscinity”, 2021).

Για την απολύμανση του νερού με υπεροξειδίο του υδρογόνου σε υγρή μορφή, η εφαρμοζόμενη δόση είναι 250 mL/50 m³ νερού κολυμβητικής δεξαμενής (“Piscinity”, 2021). Για την εξουδετέρωση 1 g χλωρίου, είναι απαραίτητη η προσθήκη 1.5 mL υπεροξειδίου του υδρογόνου (30%) (ΣΕΕΠΥ, 2020).

Η αποτελεσματικότητά του επηρεάζεται άμεσα από την τιμή του pH, με αποδεκτό εύρος το 7.0 - 7.4, από τη θερμοκρασία του νερού, η οποία δεν πρέπει να υπερβαίνει τους 28 °C, καθώς οδηγεί σε πλήρη απενεργοποίηση του ενεργού οξυγόνου και από το οργανικό φορτίο. Τέλος, σημαντικό μειονέκτημα αποτελεί το αυξημένο κόστος για την εγκατάσταση του δοσομετρικού συστήματος (“Piscinity”, 2021).

6.7. Ιονισμός

Ως ιονισμός νοείται η απολυμαντική μέθοδος με ιόντα αργύρου και χαλκού, για την εξουδετέρωση των περιεχόμενων στο νερό οργανικών και ανόργανων ουσιών (Fewtrell, 2014). Η ηλεκτρολυτική παραγωγή των ιόντων πραγματοποιείται από ηλεκτρόδια, τα οποία αποτελούνται σε ποσοστό 97% από χαλκό και σε ποσοστό 3% από άργυρο (“Piscinity”, 2021), ενώ μπορεί να γίνει και χρήση αλάτων αργύρου και χαλκού (Fewtrell, 2014).

Στις Η.Π.Α., ο ιονισμός με ιόντα αργύρου-χαλκού συνιστά εναλλακτική μέθοδο απολύμανσης του νερού κολυμβητικών δεξαμενών, που συμβάλλει στη μείωση της χρήσης χλωρίου κατά 80% και έχει ως στόχο τη μείωση των παραγόμενων παραπροϊόντων. Παρόλα αυτά, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αποκλειστική μέθοδος απολύμανσης, αλλά σε συνδυασμό με άλλες. Αυτό οφείλεται στο γεγονός πως με τον ιονισμό δε γίνεται απομάκρυνση της οργανικής ύλης από το νερό (π.χ. δερματικός ιστός, νεκρά δερματικά κύτταρα, τρίχες, ούρα) (“Lenntech”, 2021).

Σε περίπτωση εφαρμογής δόσης άνω των συνιστώμενων ορίων, είναι πιθανή η δημιουργία ανεξίτηλων στιγμάτων σε κολυμβητικές δεξαμενές με μεμβράνη, καθώς και πρασίνισμα των μαλλιών και του δέρματος των χρηστών (“Piscinity”, 2021).

Η απολύμανση με ιονισμό χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο για τον έλεγχο εμφάνισης του βακτηριδίου της Λεγεωνέλλας στο δίκτυο και τα συστήματα διανομής ζεστού νερού των νοσοκομείων (Fewtrell, 2014; Εγκύκλιος Αριθ. πρωτ. Δ1δ/ΓΠ.οικ.56075, 2019). Παράλληλα, σε ερευνητικό επίπεδο έχει ελεγχθεί η

αποτελεσματικότητα της συγκεκριμένης τεχνικής για την επεξεργασία νερού των κολυμβητικών δεξαμενών, ως συμπληρωματική μέθοδος της χλωρίωσης. Σε έρευνα των Yayha et al. (1990), συγκέντρωση χαλκού 0.4 mg/L, αργύρου 0.04 mg/L και ελεύθερου υπολειμματικού χλωρίου 0.3 mg/L σε νερό με χαρακτηριστικά νερού πισίνας, οδήγησε σε log απομάκρυνσης βακτηρίων του γένους *Staphylococcus* 0.03, 0.03 και 1.5, αντίστοιχα. Ο συνδυασμός χαλκού/αργύρου, συνέβαλε στην επίτευξη μεγαλύτερης τιμής, όπου το log απομάκρυνσης ισούταν με 2.4 για χρόνο επαφής 2 λεπτά. Σε άλλη έρευνα, ο συνδυασμός χαλκού/αργύρου και χλωρίωσης ήταν αποτελεσματικός στην αδρανοποίηση των βακτηριακών ειδών *P. aeruginosa*, *S. aureus* και *L. pneumophila* (Landeem et al., 1989).

Οι περιοριστικοί παράγοντες εφαρμογής της συγκεκριμένης μεθόδου σε κολυμβητικές δεξαμενές και δεξαμενές υδρομάλαξης είναι το κόστος, η αργή βακτηριοκτόνος δράση και το υψηλό ρυπαντικό φορτίο που προέρχεται από τις σωματικές εκκρίσεις των χρηστών (CDC & HUD, 2006). Λόγω της φωτοευαισθησίας του χαλκού, είναι πιθανή η δημιουργία μαύρων ή σκούρων πράσινων επικαθίσεων στα τοιχώματα της δεξαμενής (CDC & HUD, 2006; “Piscinity”, 2021).

Σε μικρές και ιδιωτικές κολυμβητικές δεξαμενές μπορούν να εφαρμοστούν και άλλα απολυμαντικά συστήματα, όπως υπεροξείδιο του υδρογόνου μαζί με ιόντα αργύρου και χαλκού. Ωστόσο, είναι απαραίτητη ανά τακτά χρονικά διαστήματα η αντικατάσταση του νερού, προκειμένου να αποφευχθεί η υπέρμετρη συσσώρευση ιόντων (WHO, 2006).

Σε χώρες όπως η Ολλανδία και οι Η.Π.Α., το υπεροξείδιο του υδρογόνου χρησιμοποιείται, είτε μόνο του, είτε συνδυαστικά με ιόντα αργύρου, ως συμπληρωματικό απολυμαντικό μέσο για δημόσιες κολυμβητικές δεξαμενές. Ο άργυρος για την επεξεργασία νερού χρησιμοποιείται αρκετά σπάνια, καθώς δεν αποδομείται, αλλά μπορεί να παρατηρηθεί συσσώρευσή του στο νερό της πισίνας, αλλά και στα λύματα. Σε έρευνα του Borgmann-Strahsen (2003), εξετάστηκε η μικροβιοκτόνος ικανότητα του ενεργού οξυγόνου με ή χωρίς ιόντα αργύρου, τα οποία χρησιμοποιούνται ως απολυμαντικά σε ιδιωτικές κυρίως πισίνες, έναντι της αντιμικροβιακής δράσης του υποχλωριώδους νατρίου. Στα εξεταζόμενα δείγματα νερού των οποίων τα χαρακτηριστικά προσομοίαζαν αυτά ενός δείγματος νερού

προερχόμενου από κολυμβητική δεξαμενή, εφαρμόστηκαν οι εξής συγκεντρώσεις απολυμαντικών:

- 1 mg/L NaClO,
- 150 mg/L H₂O₂ και
- 150 mg/kg (= 150 ppm) H₂O₂ + 23:6 μg/kg (= 23:6 ppb) AgNO₃ που αντιστοιχεί σε 15 μg/kg (= 15 ppb) ιόντα αργύρου

Στη συνέχεια υπολογίστηκε ο δείκτης της μικροβιοκτόνου δράσης των απολυμαντικών ουσιών, σύμφωνα με την εξίσωση $ME = \log N_C - \log N_D$, όπου:

- N_C = ο συνολικός αριθμός μικροοργανισμών (σε cfu/ml) που προστέθηκαν στο δείγμα νερού (test mixture) σε συγκεκριμένους χρόνους: 30 s, 10 min, 20 min και 30 min
- N_D = ο αριθμός των ζωντανών μικροοργανισμών (σε cfu/ml) που ανιχνεύθηκαν σε υγρό δείγμα με συντελεστή αραιώσης 10 σε σχέση με το δείγμα νερού (test mixture).

Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι τα απολυμαντικά μέσα που περιέχουν υπεροξείδιο του υδρογόνου, με ή χωρίς ιόντα αργύρου, έχουν μικρότερο δείκτη ME και δεν αποτελούν εξίσου αποτελεσματικό μέσο, από μικροβιολογική σκοπιά, με το υποχλωριώδες νάτριο και άλλες ενώσεις του χλωρίου.

7. ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ ΚΟΛΥΜΒΗΤΙΚΩΝ ΔΕΞΑΜΕΝΩΝ

Τα επιδιωκόμενα πρότυπα ποιότητας των υδάτων κολύμβησης, η διενέργεια μικροβιολογικών ελέγχων στις κολυμβητικές δεξαμενές, και η ορθή διαχείριση των εγκαταστάσεων των κολυμβητηρίων της χώρας μας, καθορίζονται από το εξής νομοθετικό πλαίσιο (Μαυρίδου et al., 2014; ΕΛΙΝΥΑΕ, 2021):

- Υγειονομική Διάταξη Γ1/443/1973 (ΦΕΚ 87/Β/1973) «Περί κολυμβητικών δεξαμενών μετά οδηγιών κατασκευής και λειτουργίας αυτών», όπως όπως αυτή τροποποιήθηκε με την υπ' αριθμ. Γ4/1150/76 (ΦΕΚ 937/ Β'/1976) Υγειονομική Διάταξη.
- Υπουργική Απόφαση ΔΥΓ2/80825/05/2006 (ΦΕΚ 120/ Β'/2006) «Τροποποίηση της υπ' αριθμ. Γ1/443/1973 (ΦΕΚ 87 Β) Υγ. Διατάξεως, όπως τροποποιήθηκε με την υπ' αριθμ. Γ4 1150/1976 (ΦΕΚ 937 Β) όμοια περί λειτουργίας κολυμβητικών δεξαμενών (Υγειονομική Διάταξη)». Στην εγκύκλιο ΔΥΓ2/99932/06/22.3.07 παρατίθενται οδηγίες και διευκρινήσεις «εφαρμογής των Υγ. Διατάξεων για τη λειτουργία κολυμβητικών δεξαμενών».
- Εγκύκλιος ΔΥΓ2/41059/12-7-2004 του Υπουργείου Υγείας με θέμα «Χρήση συστημάτων φίλτρανσης, καθαρισμού και ανακυκλοφορίας νερού στην κατασκευή κολυμβητικών δεξαμενών».
- Εγκύκλιος ΔΥΓ2/50801/06/22-6-2005 του Υπουργείου Υγείας με θέμα «Λειτουργία κολυμβητικών δεξαμενών».
- Εγκύκλιος ΔΥΓ2/99932/06/22-3-2007 «Οδηγίες - διευκρινήσεις εφαρμογής των Υγ. Διατάξεων για τη λειτουργία κολυμβητικών δεξαμενών».
- Υπουργική Απόφαση Αριθ. Ειβ/221/65 (ΦΕΚ 138/Β/24-2-65) «Περί διαθέσεως λυμάτων και βιομηχανικών αποβλήτων».
- Υπουργική Απόφαση 17414/2009 (ΦΕΚ 2215/Β/2-10-2009) «Τροποποίηση της υπ' αριθμ. 16655/22-12-2006 απόφασης Υπουργού Τουριστικής Ανάπτυξης «Διαδικασία αναγνώρισης ιαματικών φυσικών πόρων» (ΦΕΚ Β' 1932)».
- Υπουργική Απόφαση Αριθ. 7888/8-5-2017 (ΦΕΚ 1654/Β/2017) «Απλούστευση πλαισίου λειτουργίας και χρήσης κολυμβητικών δεξαμενών».

- Αριθ. πρωτ. Δ1δ/ΓΠ.οικ.57290 Εγκύκλιος του Υπουργείου Υγείας με θέμα «Προστασία της δημόσιας υγείας μέσω ασφαλούς λειτουργίας δημόσιων κολυμβητικών δεξαμενών».
- Ν. 3766/2009 (ΦΕΚ 102/Α/2009) «Λειτουργική Αδειοδότηση κολυμβητικών δεξαμενών» όπως ισχύει σήμερα.
- Ν. 4688/2020 (ΦΕΚ 101/Α/24-5-2020) «Ειδικές μορφές τουρισμού, διατάξεις για την τουριστική ανάπτυξη και άλλες διατάξεις».
- Εγκύκλιος Δ1(δ)/ΓΠοικ 32179/2020 (ΦΕΚ /21-5-2020) «Μέτρα προστασίας της Δημόσιας Υγείας στο πλαίσιο αποφυγής της διασποράς του κορωνοϊού SARS-CoV-2 μετά την έναρξη λειτουργίας των κολυμβητικών δεξαμενών, που αδειοδοτούνται σύμφωνα με την Υ.Δ. Γ1/443/1973 (ΦΕΚ 87/Β'/1973) «Περί κολυμβητικών δεξαμενών μετά οδηγιών κατασκευής και λειτουργίας αυτών».
- Εγκύκλιος Δ1δ/Γ.Π. οικ 14947/2020 (ΦΕΚ /4-3-2020) «Λήψη μέτρων προστασίας στις εγκαταστάσεις κολυμβητικών δεξαμενών λόγω κορωνοϊού».
- Εγκύκλιος Δ1δ/ΓΠ.οικ.57290/2019 (ΦΕΚ /2-8-2019) «Προστασία της δημόσιας υγείας μέσω ασφαλούς λειτουργίας δημόσιων κολυμβητικών δεξαμενών».
- Εγκύκλιος Δ1δ/ΓΠ.11611/2018 (ΦΕΚ /11-4-2018) «Αδειοδότηση δημόσιων κολυμβητικών δεξαμενών».
- Εγκύκλιος Γ1δ/ΓΠ.οικ.57120/2017 (ΦΕΚ /24-7-2017) «Παρακολούθηση λειτουργίας κολυμβητικών δεξαμενών».
- Υ.Α. 7888/2017 (ΦΕΚ 1654/Β` 15.5.2017) «Απλούστευση πλαισίου λειτουργίας και χρήσης κολυμβητικών δεξαμενών».
- Εγκύκλιος Δ.ΥΓ2/16931/2009 (ΦΕΚ /26-5-2009) «Διευκρινήσεις για τη λειτουργία κολυμβητικών δεξαμενών».
- Ν. 3199/2003 (ΦΕΚ 280/Α` 9.12.2003) «Προστασία και διαχείριση των υδάτων - Εναρμόνιση με την Οδηγία 2000/60/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 23ης Οκτωβρίου 2000».
- Ν. 1739/1987 (ΦΕΚ 201/Α/20-11-1987) «Διαχείριση των υδατικών πόρων και άλλες διατάξεις».

Αναφορικά με τη νομοθεσία που καθορίζει τη μικροβιολογική ποιότητα υδάτων και τη διενέργεια μικροβιολογικών ελέγχων στις κολυμβητικές δεξαμενές, σε ισχύ είναι η

υπ' αριθμ. Γ1/443/73 Υγειονομική Διάταξη «Περί κολυμβητικών δεξαμενών μετά οδηγιών κατασκευής και λειτουργίας αυτών».

Σύμφωνα με την υγειονομική διάταξη Γ1/443/73 (ΦΕΚ 87/Β/1973):

1. Ο αριθμός των συνολικά αναπτυσσόμενων μικροβιακών αποικιών σε θρεπτικό άγαρ μετά από επώαση στους 37°C επί 24 ώρες δεν πρέπει να υπερβαίνει τις 200 ανά ml ύδατος.
2. Ο πιθανός αριθμός των κολοβακτηριοειδών δεν πρέπει να είναι ανώτερος από 15 ανά 100 ml ύδατος.
3. Κανένα κολοβακτηρίδιο (*E. coli*) δεν πρέπει να περιέχεται σε 100 ml ύδατος.

Πίνακας 6: Όρια των θεσπισμένων από την Ελληνική Νομοθεσία παραμετρικών τιμών για τους μικροβιολογικούς δείκτες που εξετάζονται υποχρεωτικά σε μικροβιολογικούς ελέγχους υδάτων κολυμβητικών δεξαμενών (Πηγή: ΚΕΕΛΠΝΟ, 2016).

Μικροβιολογικοί δείκτες	Αποδεκτά Όρια
Κοινοί αερόβιοι μικροοργανισμοί (Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα)	< 200 cfu/mL
Ολικά Κολοβακτηριοειδή	15 cfu/100 mL
Κοπρανώδη Κολοβακτηριοειδή - Κολοβακτηρίδια (<i>Escherichia Coli</i>)	0 cfu/100 mL

Η συχνότητα και τα σημεία ελέγχου της μικροβιολογικής ποιότητας του νερού, ποικίλλουν και καθορίζονται, προκειμένου να διαμορφωθεί μια αντιπροσωπευτική εικόνα της υγειονομικής κατάστασης της κολυμβητικής δεξαμενής. Όπως ορίζεται και από την Ελληνική νομοθεσία, συνιστάται η λήψη τουλάχιστον ενός δείγματος την εβδομάδα. Στα πλαίσια προστασίας της ποιότητας των υδάτων των κολυμβητικών δεξαμενών από τον νέο κορωνοϊό, συνιστάται ο διπλασιασμός της συχνότητας των δειγματοληψιών, τουλάχιστον 2 δείγματα την εβδομάδα (Εγκύκλιος Δ1(δ)/ΓΠοικ 32179/2020). Κάθε είδος μικροοργανισμού μπορεί να αναπτυχθεί σε αποικίες υπό ευνοϊκές περιβαλλοντικές συνθήκες. Στο εργαστήριο η ανάπτυξη των μικροοργανισμών πραγματοποιείται σε κατάλληλα μικροβιολογικά θρεπτικά υποστρώματα, διαφορετικά για κάθε είδος, τα οποία καλύπτουν τις θρεπτικές τους απαιτήσεις. Τα κύρια συστατικά ενός θρεπτικού υποστρώματος είναι τα εξής: νερό (70%), πηγή άνθρακα (υδατάνθρακες, πρωτεΐνες κλπ.), πηγή αζώτου (ανόργανα αζωτούχα άλατα, πρωτεΐνες κλπ.), πηγή αλάτων, καθώς και διάφορα ιχνοστοιχεία.

8. ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπό της παρούσας μελέτης συνιστά η διενέργεια μικροβιολογικών αναλύσεων και ο προσδιορισμός της παρουσίας *Pseudomonas aeruginosa* σε δείγματα υδάτων που προέρχονται από δημόσια ελληνικά κολυμβητήρια (δημοτικές και αθλητικές εγκαταστάσεις), στην ευρύτερη περιοχή της Αθήνας, στα πλαίσια λειτουργίας του προγράμματος «ΚΟΛΥΜΒΗΤΗΡΙΑ». Το Πρόγραμμα είναι σε εφαρμογή από τους Ολυμπιακούς Αγώνες του 2004 στην Αθήνα, έως σήμερα. Εγκαινιάστηκε από το Τμήμα Μικροβιολογίας της πρώην Εθνικής Σχολής Δημόσιας Υγείας, με απώτερο στόχο την αξιολόγηση της μικροβιολογικής ποιότητας του νερού των κολυμβητικών δεξαμενών στην περιοχή των Αθηνών.

Επιπρόσθετο στόχο της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας αποτελεί η εξοικείωση με μοριακές τεχνικές και τεχνικές μικροβιολογικής ανάλυσης νερού με τη μέθοδο της διήθησης μεμβρανών. Με αυτόν τον τρόπο θα γίνει προσδιορισμός της παρουσίας παθογόνων μικροοργανισμών ή δεικτών τους σε δείγματα μολυσμένου νερού. Επιπλέον, θα γίνει αναφορά στα ποιοτικά χαρακτηριστικά των εξεταζόμενων δειγμάτων, σε σύγκριση με τις προτεινόμενες οριακές τιμές που προβλέπονται σχετικά με τη χημική και μικροβιολογική τους σύσταση, από διεθνείς φορείς, όπως ο WHO, η EPA και σε εθνικό επίπεδο. Στη συνέχεια, θα αναπτυχθεί και θα περιγραφεί αναλυτικά η μεθοδολογία έρευνας, η οποία θα βασίζεται σε προτυποποιημένες μεθόδους και θα παρουσιαστούν τα βασικά αποτελέσματα. Τέλος, έπειτα από ενδελεχή βιβλιογραφική ανασκόπηση και σύγκριση με άλλες έρευνες, θα πραγματοποιηθεί η σύγκριση και αξιολόγηση των νέων αποτελεσμάτων με προηγούμενα δημοσιοποιημένα στοιχεία και θα παρουσιαστούν τα κυριότερα συμπεράσματα της μελέτης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΧΗΜΙΚΑ - ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

1.1. Εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα *Pseudomonas* CN Agar Base ISO (CAT.: 1153, Condalab)

Περιέχει (g/L): άγαρ 13, πεπτόνη από ζελατίνη 16, ναλιδιζικό οξύ 0.015, άνυδρο θειικό κάλιο 10, κετριμίδη 0.2, άνυδρο χλωριούχο μαγνήσιο 1.4, υδρόλυμα κασεΐνης 10. Διάλυση 50.6 g σε 1000 ml απιονισμένου νερού και προσθήκη πριν την αποστείρωση 10 ml γλυκερόλης. Διάλυση με βρασμό και ταυτόχρονη συνεχή ανάδευση. Αποστείρωση στο αυτόκαυστο στους 118 °C για 15 min και στη συνέχεια όταν το υπόστρωμα φτάσει σε θερμοκρασία 45°C-50°C διαμοιρασμός επαρκούς ποσότητας σε τρυβλία, ώστε το υπόστρωμα να έχει πάχος τουλάχιστον 5 mm.

1.2. Γενικό θρεπτικό υπόστρωμα για ανακαλλιέργειες - Nutrient agar (LAB008, M0003, LABM, Neogen)

Περιέχει (g/L): πεπτόνη 5, εκχύλισμα κρέατος 3, χλωριούχο νάτριο 8, άγαρ 12. Διάλυση 28 g σε 1000 ml απιονισμένου νερού. Διάλυση με βρασμό και ταυτόχρονη συνεχή ανάδευση. Αποστείρωση στο αυτόκαυστο στους 121 °C για 15 min και στη συνέχεια όταν το υπόστρωμα φτάσει σε θερμοκρασία 47 °C διαμοιρασμός σε τρυβλία.

1.3. King's B Agar, USP Medium (KAB20500, Biolab)

Περιέχει (g/L): πεπτόνη 20, ένυδρο θειικό μαγνήσιο 1.5, γλυκερόλη 10 mL, όξινο φωσφορικό κάλιο 1.5, άγαρ 13. Διάλυση 32.5 g σε 1000 ml απιονισμένου νερού. Διάλυση με βρασμό και ταυτόχρονη συνεχή ανάδευση. Αποστείρωση στο αυτόκαυστο στους 121 °C για 15 min και στη συνέχεια όταν το υπόστρωμα φτάσει σε θερμοκρασία 60-65 °C προσθήκη υπό άσηπτες συνθήκες 16 mL King B Supplement, καλή ανάδευση και διαμοιρασμός του υλικού σε αποστειρωμένα δοκιμαστικά σωληνάρια (5 mL στο καθένα).

1.4. Acetamide Broth (N. 40101012, Biolife)

Περιέχει (g/L): δισόξινο φωσφορικό κάλιο 1, χλωριούχο νάτριο 0.2, άνυδρο θειικό μαγνήσιο 0.2, ακεταμίδη 2, μολυβδαινικό νάτριο 0.005, επταϋδρικός θειικός σίδηρος

0.0005. Διάλυση 3.4 g σε 1000 ml απιονισμένου νερού. Βρασμός έως ότου το διάλυμα γίνει διαυγές. Διαμοιρασμός του υλικού σε αποστειρωμένα δοκιμαστικά σωληνάρια (5 mL στο καθένα), κλείσιμο των σωληναρίων με καπάκι και αποστείρωσή τους στους 121 °C για 15 min.

1.5. Αντιδραστήριο Nessler (345148, SIGMA-ALDRICH)

Περιέχει (g/L): χλωριούχος υδράργυρος 10, ιωδιούχο κάλιο 7, υδροξείδιο του νατρίου 16.

1.6. Ταινίες οξειδάσης (Oxidase Strips, MB0266A, Thermo Fisher Scientific/Oxoid)

Χάρτινα ραβδία εμποτισμένα με τη χημική ένωση N,N,N,N-τετραμεθυλ-ρ-φαινυλενοδιαμίνη, η οποία συνιστά ένα δείκτη που αλλάζει χρώμα όταν αντιδρά με το ένζυμο οξειδάση κυτοχρώματος c των υποχρεωτικώς αερόβιων βακτηρίων.

1.7. Θρεπτικό υπόστρωμα φύλαξης στελεχών στους -80°C, Brain Heart + 20% glycerol (CM1135, Oxoid)

Περιέχει σε (g/L): brain heart infusion solids 17.5, πεπτόνη 10, γλυκόζη 2, χλωριούχο νάτριο 5 και όξινο φωσφορικό νάτριο 2.5. Διάλυση 37 g σε 1000 ml απιονισμένου νερού και αποστείρωση στους 121 °C για 15 min. Μετά την αποστείρωση προστίθεται 20% γλυκερόλη (N. 0009088-R001000, Glycerol BP/USP PHARM/CAL).

1.8. Θρεπτικό υπόστρωμα Mueller-Hinton Agar (CM0337, Oxoid)

Υπόστρωμα που χρησιμοποιείται σε διαδικασίες ελέγχου της μικροβιακής ευαισθησίας σε αντιβιοτικά.

Περιέχει (g/L): άγαρ 17, όξινο υδρόλυμα κασεΐνης 17.5, εκχύλισμα κρέατος 300 και διαλυτό άμυλο 1.5. Διάλυση 38 g σε 1000 ml απιονισμένου νερού. Διάλυση με βρασμό και ταυτόχρονη συνεχή ανάδευση. Αποστείρωση στο αυτόκαυστο στους 121 °C για 15 min και στη συνέχεια όταν το υπόστρωμα φτάσει σε θερμοκρασία περίπου 47 °C διαμοιρασμός σε τετράγωνα τρυβλία.

1.9. Tris-EDTA (TE) buffer για DNA extraction

Περιέχει 2-άμινο-2-υδροξυμέθυλο-1,3-προπανοδιόλη, THAM, Tris base, τρομεθαμίνη (tris-υδρόξυμεθυλ-αμινομεθάνιο), τρομεταμόλη, (Trizma base, T1503-

500G, Sigma-Aldrich), υψηλής καθαρότητας νερό και διάλυμα EDTA pH 8.0, συγκέντρωσης 0.5 M (A4892,0500, PanReac Applichem).

1.10. 10x Tris-Borate EDTA Buffer (TBE) (Ref: GB12.0110, Grisp)

Διάλυμα κατάλληλο για ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR (φράγματα DNA <1.5 kb) σε gel αγαρόζης ή πολυακρυλαμίδιου.

Περιέχει 0.89 M Tris, 0.88 M βορικό οξύ και 0.02 M EDTA και νερό υψηλής καθαρότητας.

Για την παρασκευή διαλύματος TBE συγκέντρωσης 0.5x, το οποίο απαιτείται, τόσο για το gel αγαρόζης, όσο και για την πλήρωση της συσκευής ηλεκτροφόρησης, πραγματοποιείται αραίωση με την προσθήκη 5 mL TBE 10x σε 95 mL ενέσιμου ύδατος (Water for Injection, ΒΙΟΣΕΡ).

1.11. Gel αγαρόζης για ηλεκτροφόρηση

Προσθήκη 1 g agarose (No: 15510-027, Invitrogen Life Technologies) σε 50 mL TBE 0.5x σε κωνική φιάλη. Ακολουθεί βρασμός και στη συνέχεια όταν το δείγμα φθάσει σε θερμοκρασία περίπου 47 °C, προστίθενται 4 μL Xpert Green DNA Stain 20.000X (Ref: GS01.0001, Grisp).

1.12. Αντιβιοτικά

Στην παρούσα εργασία έγινε προσδιορισμός της ευαισθησίας των απομονωμένων στελεχών της ψευδομονάδας από τα εξεταζόμενα δείγματα νερού και των πρότυπων στελεχών σε 15 αντιβιοτικά. Στη συνέχεια, παρατίθεται η λίστα με τους εμποτισμένους δίσκους που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη μέθοδο διάχυσης των αντιβιοτικών (Kirby-Bauer Disk Diffusion Test) σε τετράγωνα τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα Mueller-Hinton.

Πίνακας 7: Λίστα αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν κατά τον έλεγχο της ευαισθησίας των εξεταζόμενων στελεχών.

	Αντιβιοτικό	Συγκέντρωση (μg)	Εταιρεία
TIC	Ticarcillin	75	Bio-Rad (67458)
CN	Gentamicin	10	Oxoid (CT0024B)
FOX	Cefoxitin	30	Oxoid (DD0026B)
IPM	Imipenem	10	Oxoid (CT0455B)

Αντιβιοτικό		Συγκέντρωση (μg)	Εταιρεία
MEM	Meropenem	10	Oxoid (CT0774B)
CIP	Ciprofloxacin	5	Oxoid (CT0425B)
FEP	Cefepime	30	Oxoid (CT0771B)
PRL	Piperacillin	30	Oxoid (CT1619B)
PTZ	Pirepacillin/Tazobactam	30/6	Mast Diagnostics (PTZ366)
TOB	Tobramycin	10	Oxoid (CT0056B)
CTX	Cefotaxime	5	Oxoid (CT0407B)
AMC	Amoxicillin/Clavulanic acid	30 (2:1)	Oxoid (CT0223B)
CAZ	Ceftazidime	10	Oxoid (CT1629B)
CAZ	Ceftazidime	30	Oxoid (CT0412B)
AK	Amikacin	30	Oxoid (CT0107B)

2. ΣΤΕΛΕΧΗ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν ως στελέχη αναφοράς τα εξής:

- *Pseudomonas aeruginosa*: παραχωρήθηκε από το Κεντρικό Εργαστήριο Δημόσιας Υγείας, ΚΕΔΥ, Βάρη Αττικής, Ελλάδα, από τη συλλογή της κας Όλγας Παππά στέλεχος με εγγενή αντοχή σε CTX, TIC, TCC
- *Escherichia coli* ATCC 25922

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ

- μαγνητικός αναδευτήρας και θερμαντική πλάκα
- κωνική φιάλη
- γυάλινη φιάλη αποθήκευσης 250, 500, 1000 mL
- ογκομετρικός κύλινδρος 10, 250, 500 mL
- μικροβιολογικοί κρίκοι, ανοξείδωτες λαβίδες, δοκιμαστικά σωληνάρια, μηχανικές πιπέτες, tips με φίλτρο, erpendorf πλαστικά σωληνάρια (0.2 & 1.5 mL), cryovials, βαμβakoφόροι στυλεοί
- λυχνία Bunsen
- συσκευή διήθησης δια μεμβρανών 3 θέσεων

- μετρητής αποικιών Colony Counter Quartz (PBI International)
- φίλτρα μικροβιακής μεμβράνης Whatman, με άνοιγμα πόρων 0.45 μm και διάμετρο 47 mm (Cat No.: 13406870, GE Healthcare Life Sciences)
- τρυβλία Petri στρογγυλά 50 mm, 90 mm και τετράγωνα 120 mm (Promed, FL Medical)
- ζυγός ακριβείας δεύτερου δεκαδικού ψηφίου (BL610, Sartorius)
- ψυγείο βαθειάς ψύξης Ultra Cold Freezer (UF601, Dometic)
- επωαστικός κλίβανος 37.0 °C CO₂ Incubator (MCO-17A, Sanyo)
- αυτόκαυστος κλίβανος (3870E, Tuttnauer)
- αναδευτήρας Vortex Genie 2 (Scientific Industries)
- θάλαμος παρατήρησης μικροοργανισμών UV ακτινών με μήκος κύματος 360 \pm 20 nm
- θολοσίμετρο McFarland (AU0108A, Oxoid, Thermo Scientific) και standard για ρύθμιση της θολερότητας στα 0.5 McFarland (R20410, Remel)
- antimicrobial susceptibility discs dispenser (Oxoid)
- συσκευή ηλεκτροφόρησης 200/2.0 Power Supply (Bio-Rad)
- θάλαμος παρατήρησης με κάμερα και λάμπες UV για την παρατήρηση του gel ηλεκτροφόρησης (Universal Hood II - S.N. 76S/00969, Bio-Rad)
- θερμικός κυκλοποιητής SimpliAmp Thermal Cycler (Cat: A24811, Applied Biosystems)
- μικροφυγόκεντρος ScanSpeed Mini (Labogene)
- ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές σε συγκέντρωση 10 mM (Invitrogen-Thermo Scientific, Germany)

- μείγμα τριφωσφορικών νουκλεοτιδίων (dNTPs) γουανίνης, αδενίνης, θυμίνης και κυτοσίνης περιεκτικότητας 10mM από το καθένα (Invitrogen-Thermo Scientific, Germany)
- διαλύτης για ενέσιμα (water for injection) (ADIPHARM)
- ρυθμιστικό διάλυμα Taq DNA πολυμεράσης με 1.5 mM μαγνήσιο 1x (10x Taq Buffer A, FastGene, Nippon Genetics Europe)
- Taq DNA πολυμεράση συγκέντρωσης 5u/μL (FastGene, Nippon Genetics Europe)
- 6x Loading Buffer (TaKaRa)
- 100-3000 bp DNA Rainbow Ladder 0.1 μg/μL (Cat.: 307-105, GeneON, Italy)

4. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Συνολικά, εξήντα πέντε δείγματα νερού από 18 διαφορετικές κολυμβητικές δεξαμενές, 12 συνεργαζόμενων φορέων στην περιοχή των Αθηνών συλλέχθηκαν και αναλύθηκαν στο χρονικό διάστημα Ιούνιος-Αύγουστος 2021. Τα δείγματα συλλέχθηκαν σε σκούρες αποστειρωμένες γυάλινες φιάλες χωρητικότητας 500 mL, που περιείχαν 20-50 mg θειοθειικού νατρίου ανά λίτρο νερού και αποστάλθηκαν στο εργαστήριο, σύμφωνα με το πρόγραμμα «ΚΟΛΥΜΒΗΤΗΡΙΑ» της Μονάδας Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας, του Εργαστηρίου Επιτήρησης Λοιμωδών Νοσημάτων (ΕΕΛΝΟ), του Τμήματος Πολιτικών Δημόσιας Υγείας, της Σχολής Δημόσιας Υγείας, του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής.

4.1. Διήθηση των δειγμάτων και απομόνωση αποικιών

Η επεξεργασία των 65 δειγμάτων νερού πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη πρότυπη μέθοδο δοκιμής ISO 16266:2009 “Water quality-Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa*-Method by membrane filtration”. Σύμφωνα με την τεχνική της γενικής μεθόδου διήθησης δια μεμβρανών (ISO 8199), διηθήθηκαν 100 ml από κάθε δείγμα νερού κολυμβητικών δεξαμενών, με απώτερο στόχο την απομόνωση στελεχών *Pseudomonas aeruginosa*. Η διήθηση έγινε σε κατάλληλη διηθητική συσκευή μέσω μικροβιακής μεμβράνης Whatman, με άνοιγμα πόρων 0.45 μm και διάμετρο 47 mm. Μετά την ολοκλήρωση της διήθησης, κάθε μεμβράνη

τοποθετήθηκε σε στρογγυλό τρυβλίο Petri 50 mm με εκλεκτικό υπόστρωμα για το βακτήριο, το *Pseudomonas* CN Agar Base ευνοώντας με αυτόν τον τρόπο την ανάπτυξή του και παρεμποδίζοντας την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών. Τα τρυβλία επώαστηκαν στους 37 °C σε αερόβιες συνθήκες για 48 h. Έλεγχος των μεμβρανών πραγματοποιήθηκε στις πρώτες 22 ± 2 ώρες επώασης σε υποψία υπερανάπτυξης και συνένωσης των αποικιών. Για κάθε δείγμα, στα πλαίσια των εργασιών ρουτίνας του εργαστηρίου, αξιολογήθηκαν και οι προβλεπόμενες από την ελληνική νομοθεσία μικροβιολογικοί παράμετροι: καλλιεργήσιμοι μικροοργανισμοί σύμφωνα με το πρότυπο ΕΛΟΤ EN ISO 6222, εντερόκοκκοι εντερικής προέλευσης σύμφωνα με το πρότυπο ΕΛΟΤ EN ISO 7899-2 και κολοβακτηριοειδή & *E. coli* σύμφωνα με το πρότυπο ΕΛΟΤ EN ISO 9308-1.

4.2. Φθορισμός των αποικιών *Pseudomonas aeruginosa*

Στη συνέχεια παρατηρήθηκε με χρήση λάμπας υπεριώδους ακτινοβολίας ($\lambda=360 \pm 20$ nm) η ανάπτυξη αποικιών επάνω στη μεμβράνη, είτε επιβεβαιωμένων που παράγουν πυοκυανίνη και φέρουν κυανοπράσινο χρώμα, είτε ύποπτων φθορίζουσών ή καστανέρυθρων αποικιών.

Οι αποικίες της ψευδομονάδας σε εκλεκτικά υλικά ποικίλουν μορφολογικά. Οι αποικίες που παράγουν τη φθορίζουσα ουσία πυοκυανίνη φέρουν κυανοπράσινο χρώμα, έχουν έντονο φθορισμό και σχηματικά είναι στρογγυλές με λείες άκρες. Αυτές οι αποικίες θεωρούνται επιβεβαιωμένες αποικίες *Pseudomonas aeruginosa*. Επιπλέον, υπάρχουν αποικίες κίτρινες ή λευκές με έντονο φθορισμό, καθώς και μη φθορίζουσες κόκκινες-καφέ, οι οποίες θεωρούνται ύποπτες-πιθανές αποικίες ψευδομονάδας και απαιτούν επιβεβαιωτικές βιοχημικές δοκιμασίες, προκειμένου να ταυτοποιηθούν.

4.3. Βιοχημική Ταυτοποίηση

4.3.1. Ανακαλλιέργειες επιβεβαιωμένων και ύποπτων στελεχών

Από κάθε τρυβλίο με *Pseudomonas* CN Agar Base επιλέχθηκαν ≥ 1 αποικίες διαφορετικών μορφολογιών και ανακαλλιεργήθηκαν σε τρυβλία Petri 90 mm με το γενικό θρεπτικό υπόστρωμα Nutrient agar. Η ανακαλλιέργεια πραγματοποιήθηκε υπό άσηπτες συνθήκες με την τεχνική της αραίωσης, προκειμένου να εξασφαλιστούν από κάθε διαφορετικό στέλεχος του ίδιου πληθυσμού καθαρές καλλιέργειες. Ακολούθησε επώαση υπό αερόβιες συνθήκες στους 37 °C για 22 ± 2 h.

4.3.2. Παραγωγή οξειδάσης

Μετά την ανακαλλιέργεια σε ΝΑ, μια προκαταρκτικά θετική μη φθορίζουσα αποικία καστανέρυθρου χρώματος ελέγχθηκε για την παραγωγή οξειδάσης. Το τεστ πραγματοποιείται με ταινίες οξειδάσης (Oxidase strips) εμποτισμένες με N,N,N,N-τετραμεθυλ-p-φαινυλενοδιαμίνη. Το ένζυμο οξειδάση κυτοχρώματος c των υποχρεωτικώς αερόβιων βακτηρίων, το οποίο ανιχνεύεται με τη συγκεκριμένη δοκιμή, προκαλεί αλλαγή του χρωματισμού του δείκτη σε μωβ και το τεστ θεωρείται θετικό.

4.3.3. Παραγωγή αμμωνίας

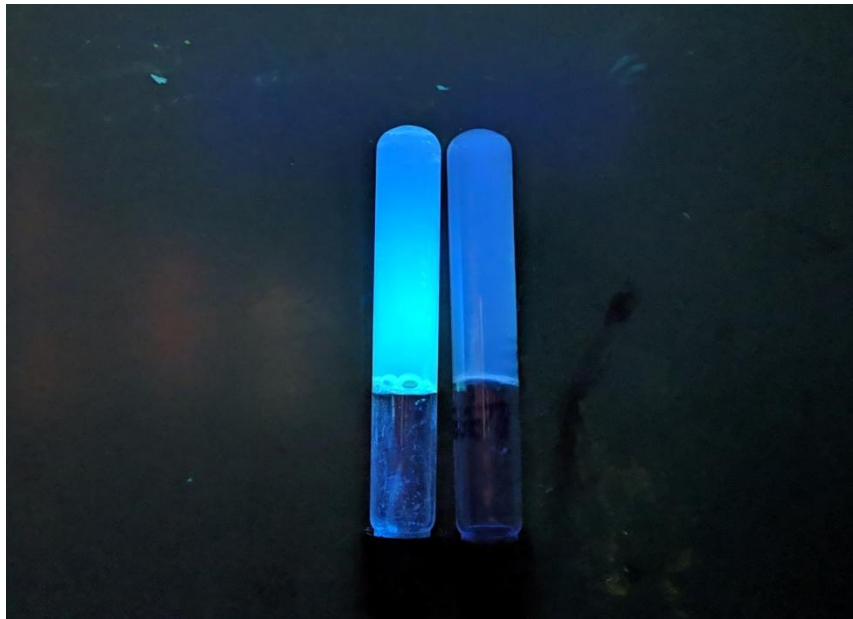
Μια μεμονωμένη αποικία ψευδομονάδας από το γενικό θρεπτικό υπόστρωμα, είτε είναι φθορίζουσα λευκού ή κίτρινου χρώματος, είτε καστανέρυθρη με θετικό τεστ οξειδάσης, εμβολιάστηκε σε δοκιμαστικό σωληνάριο που περιείχε Acetamide broth. Ακολούθησε επώαση σε αερόβιες συνθήκες στους 37 °C για 24 h και την επομένη, προστέθηκαν 1-2 σταγόνες αντιδραστηρίου Nessler σε κάθε σωληνάριο για τον έλεγχο παραγωγής αμμωνίας. Σε περίπτωση θετικού αποτελέσματος, δηλαδή αν έχει παραχθεί αμμωνία, παρατηρείται ανάπτυξη χρώματος από κίτρινο έως κόκκινο κεραμιδί. Τότε, όλες οι αρχικά φθορίζουσες μόνο αποικίες υπολογίζονται ως επιβεβαιωμένες *Pseudomonas aeruginosa*. Για τις καστανέρυθρες αποικίες απαιτείται επιπρόσθετος έλεγχος ως προς την παραγωγή φθορεσκειΐνης.



Εικόνα 12: Υπόδειγμα αρνητικού (αριστερά) και θετικού (δεξιά) αποτελέσματος, ως προς την παραγωγή αμμωνίας.

4.3.4. Παραγωγή φθορεςκεΐνης

Μια μεμονωμένη αποικία καστανέρυθρου χρώματος από το γενικό θρεπτικό υπόστρωμα, εμβολιάστηκε σε δοκιμαστικό σωληνάριο με King's Agar. Ακολούθησε επώαση σε αερόβιες συνθήκες στους 37 °C για χρονικό διάστημα 3-5 μέρες. Έπειτα, ελέγχθηκε η παρουσία έντονου φθορισμού υπό λυχνία UV, οπότε και το τεστ θεωρείται θετικό. Όσα στελέχη έδωσαν θετικό αποτέλεσμα και στις τρεις επιβεβαιωτικές διαδικασίες, θεωρήθηκαν επιβεβαιωμένες αποικίες *Pseudomonas aeruginosa* και ακολούθησε φύλαξή τους στους -80°C σε θρεπτικό υπόστρωμα Brain Heart + 20% glycerol.



Εικόνα 13: Υπόδειγμα αρνητικού (δεξιά) και θετικού (αριστερά) αποτελέσματος, ως προς την παραγωγή φθοροσκεΐνης.

4.4. Εκχύλιση DNA

Από τα φυλαγμένα στελέχη απομονώθηκε DNA με την ακόλουθη διαδικασία: αρχικά έγινε εμβολιασμός μικρής ποσότητας σε τρυβλία με *Pseudomonas* CN Agar Base με την τεχνική της αραιώσης. Ακολούθησε επώαση σε αερόβιες συνθήκες στους 37 °C για 24 h. Έπειτα, έγινε ανακαλλιέργεια μιας χαρακτηριστικής αποικίας σε τρυβλίο με γενικό θρεπτικό υπόστρωμα Nutrient Agar και ακολούθησε επώαση στους 37 °C για 24 h. Την επόμενη μέρα, σε αποστειρωμένα erpendorf tubes χωρητικότητας 1.5 mL προστέθηκαν 200 μ L TE. Έπειτα, με τη χρήση tip συλλέχθηκε μικρή ποσότητα δείγματος από το τρυβλίο με το γενικό θρεπτικό υπόστρωμα, η οποία προστέθηκε στο erpendorf με το TE. Τα δείγματα αναδεύτηκαν με τη χρήση vortex, πριν το βρασμό σε νερό για 15 min. Ακολούθως, φυγοκεντρήθηκαν στα 10 rpm για 10 min. Το υπερκείμενο από κάθε δείγμα συλλέχθηκε με πιπέτα, τοποθετήθηκε σε erpendorf tube και έγινε φύλαξή του στους -20 °C.

4.5. Μοριακή Ταυτοποίηση

Για τη μοριακή ταυτοποίηση των απομονωμένων στελεχών, χρησιμοποιήθηκε ένα σετ εκκινητών (Πίνακας 8) για το γονίδιο *oprL* που κωδικοποιεί μια λιποπρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης του μικροοργανισμού. Σύμφωνα με τους De Vos et al., (1997), το *oprL* δεν εντοπίζεται σε άλλα είδη του γένους *Pseudomonas*, οπότε συνιστά ένα συντηρημένο γονίδιο.

Πίνακας 8: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη μοριακή ταυτοποίηση των εξεταζόμενων στελεχών.

Εκκινητής	Γονίδιο στόχος	Αλληλουχία εκκινητών	Θερμοκρασία καλής λειτουργίας εκκινητών (T _m °C)	Βιβλιογραφία
oprL F	<i>oprL</i>	ATGGAAATGCTGAAATTTCGGC	57°C	De Vos et al., 1997
oprL R		CTTCTTCAGCTCGACGCGACG		

Τα δείγματα υποβλήθηκαν σε:

- αποδιάταξη του DNA στους 94°C για 5 min και στη συνέχεια σε
- 30 κύκλους που ο καθένας αποτελούνταν από:
 - αποδιάταξη στους 94°C για 30 sec
 - υβριδισμό στους 54°C για 30 sec
 - επιμήκυνση στους 72°C για 1 min
- τελική επιμήκυνση στους 72°C για 10 min.

Στην PCR συμπεριλήφθηκε ένα στέλεχος αναφοράς και αρνητικός μάρτυρας. Τα προϊόντα της PCR μεθόδου, ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2% μαζί με 100-3000 bp DNA Rainbow Ladder και αναλύθηκαν με χρήση του λογισμικού Quantity One 1-D Analysis Software (Bio-Rad, έκδοση 4.6.3.).

4.6. Φαινοτυπικές δοκιμασίες ελέγχου μικροβιακής ευαισθησίας των στελεχών

4.6.1. Έλεγχος μικροβιακής ευαισθησίας

Ο έλεγχος του φαινοτύπου αντοχής πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες πρότυπης μεθόδου του Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (agar dilution method) (CLSI, 2013). Τα επιβεβαιωμένα στελέχη *Pseudomonas aeruginosa* εξετάστηκαν ως προς την ευαισθησία τους σε 15 ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά, τα οποία ανήκουν σε 4 διαφορετικές τάξεις:

1. **β-λακταμικά μη καρβαπενέμες:** τικαρκιλίνη (TIC, 75 μg), τικαρκιλίνη-κλαβουλανικό (TCC, 75 μg/10 μg), κεφοξιτίνη (FOX, 30 μg), κεφεπίμη (FEP, 30 μg), πιπερακιλλίνη (PRL, 30 μg), πιπερακιλλίνη-ταζομπακτάμη (PTZ, 30 μg/6 μg), κεφοταξίμη (CTX, 5 μg), αμοξυκιλλίνη-κλαβουλανικό (AMC, 30 μg 2:1), κεφταζιδίμη (CAZ, 10 και 30 μg)
2. **καρβαπενέμες:** ιμιπενέμη (IPM, 10 μg), μεροπενέμη (MEM, 10 μg),
3. **αμινογλυκοσίδες:** γενταμυκίνη (CN, 10 μg), τομπραμυκίνη (TOB, 10 μg), αμικασίνη (AK, 30 μg)
4. **φθοριοκινολόνες:** σιπροφλοξασίνη (CIP, 5 μg)

Σε επιστρωμένο τετράγωνο τρυβλίο 120 mm με θρεπτικό υλικό Mueller-Hinton agar με βακτηριακό εναιώρημα θολερότητας ίσης με 0.5 της κλίμακας McFarland, τοποθετήθηκαν 15 δίσκοι αντιβιοτικών. Η τοποθέτηση των δίσκων έγινε με συγκεκριμένη διάταξη, προκειμένου να είναι επιτρεπτή η ανίχνευση πιθανών μηχανισμών αντοχής. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με οδηγίες, από την ανασκόπηση της υπάρχουσας βιβλιογραφίας (Livermore, 2002).

4.6.2. Φαινοτυπικές διαγνωστικές δοκιμασίες συνέργειας

Ακολούθησε η διενέργεια ελέγχου του φαινοτύπου αντοχής των απομονωμένων στελεχών, σύμφωνα με τη μέθοδο διάχυσης των αντιβιοτικών (Kirby-Bauer Disk Diffusion Test). Στη δοκιμασία οι εμποτισμένοι δίσκοι με τα διάφορα αντιβιοτικά, τοποθετήθηκαν με συγκεκριμένη διάταξη στο τρυβλίο με το θρεπτικό υλικό Mueller-Hinton. Με αυτό τον τρόπο, ήταν εφικτός ο έλεγχος ύπαρξης φαινοτυπικών μεθόδων συνέργειας.

Σύμφωνα με τις οδηγίες των Ranellou et al. (2012), πραγματοποιήθηκε έλεγχος της παραγωγής ευρέως φάσματος β-λακταμασών (ESBL) με τη δοκιμασία συνέργειας

δίσκων (Double Disk Synergy Test-DDST). Σε επιστρωμένο τρυβλίο Mueller-Hinton agar με βακτηριακό εναιώρημα θολερότητας ίσης με 0,5 της κλίμακας McFarland τοποθετήθηκαν δίσκοι κεφοταξίμης (CTX 5 μg), σε απόσταση 20 mm κέντρο με κέντρο από δίσκους αμοξυκιλίνης/κλαβουλανικού (AMC 30 μg) και κεφαζιδίμης (CAZ 30 μg). Ακολούθησε επώαση των τρυβλίων στους 37°C σε αερόβιες συνθήκες για 16-18 ώρες.



Εικόνα 14: Υπόδειγμα DDST test για τον έλεγχο της παραγωγής ευρέος φάσματος β -λακταμασών (ESBL), με εμφανή τη ζώνη αναστολής γύρω από το δίσκο CAZ και CTX ως προς τον δίσκο του αναστολέα AMC. (Πηγή: Helmy & Wasfi, 2014)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Γ: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Ταυτοποίηση στελεχών *Pseudomonas aeruginosa*

Από τα 65 δείγματα νερού που διηθήθηκαν, αναπτύχθηκαν αρχικές αποικίες στο 83% (n=54/65) των τρυβλίων με το εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα *Pseudomonas* CN Agar Base. Ο αριθμός των αποικιών που καταγράφηκαν ανερχόταν στις 2986. Συνολικά, 265 προκαταρκτικά θετικές αποικίες τριών τύπων απομονώθηκαν από τα διηθητικά φίλτρα μικροβιακής μεμβράνης. Οι τρεις τύποι αφορούν τις πράσινες φθορίζουσες (τύπος Α), τις φθορίζουσες άλλου χρώματος (τύπος Β) και τις μη φθορίζουσες καστανέρυθρες (τύπος Γ) αποικίες. Από τις αποικίες που απομονώθηκαν το 11.3% (n=30) ήταν επιβεβαιωμένες πράσινες, το 81.5% (n=216) ήταν φθορίζουσες λευκές ή κίτρινες ή ροζ και το 7.1% (n=19) ήταν καστανέρυθρες μη φθορίζουσες. Τελικά, μόνο στο 12.3% των δειγμάτων νερού κολυμβητικών δεξαμενών (n=8/65) βρέθηκαν αποικίες, στο σύνολο 30 και όλες τύπου Α, οι οποίες επιβεβαιώθηκαν ως *Pseudomonas aeruginosa* (Πίνακας 9). Η επιβεβαίωσή τους βασίστηκε, τόσο στις βιοχημικές διαδικασίες της πρότυπης μεθόδου ISO 16266:2009, όσο και στη μοριακή ταυτοποίηση με PCR, σύμφωνα με όσα προτείνονται από τους De Vos et al., (1997).

Δύο προκαταρκτικά θετικές λευκές φθορίζουσες αποικίες (δείγμα 338-α και 340-3), έδωσαν θετικό αποτέλεσμα ως προς την παραγωγή αμμωνίας και φθορεσκείνης (Εικόνα 15).



Εικόνα 15: Δείγμα 338-α (δεξιά) θετικό ως προς την παραγωγή αμμωνίας κατά την προσθήκη αντιδραστήριου Nessler στο θρεπτικό υπόστρωμα Acetamide broth.

Ωστόσο κατά την ανακαλλιέργειά τους σε θρεπτικό υπόστρωμα CN, προκειμένου να γίνει φύλαξή τους σε βαθειά ψύξη, δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη. Επομένως, δεν ήταν εφικτή η περαιτέρω μοριακή ταυτοποίησή τους. Όλες οι πληροφορίες αναφορικά με τα δείγματα και τα αποτελέσματα των επιβεβαιωτικών διαδικασιών κατά ISO παρατίθενται αναλυτικά στον Πίνακα 13 του Παραρτήματος.

Πίνακας 9: Σύνολο απομονωμένων αποικιών ψευδομονάδας τύπου A από τα εξεταζόμενα δείγματα νερού, για τις οποίες ακολούθησε μοριακή ταυτοποίηση.

Α/Α	Α/Α συνόλου	ΔΕΙΓΜΑ	ΦΟΡΕΑΣ	ΗΜΕΡ. ΑΦΙΕΞΗΣ ΚΑΙ ΔΙΗΘΗΣΗΣ	ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ (48 h μετά διηθήσεων)	ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΑΠΟΙΚΙΩΝ	ΑΠΟΙΚΙΕΣ
1	5	250	Α (ΕΞΩΤΕΡΙΚΗ ΠΙΣΙΝΑ)	7/6/2021	ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΜΕΝΕΣ ΠΡΑΣΙΝΕΣ	>200	1
							2
							3
							4
							5
2	25	294	Β (ΕΞΩΤΕΡΙΚΗ ΠΙΣΙΝΑ)	23/6/2021	ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΜΕΝΕΣ ΠΡΑΣΙΝΕΣ ΜΗ ΣΧΗΜΑΤΙΖΟΜΕΝΕΣ	4	1s
							2s
							3s
							4s
3	27	296	Γ (ΜΙΚΡΗ ΠΙΣΙΝΑ)	23/6/2021	ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΜΕΝΕΣ ΠΡΑΣΙΝΕΣ	1	α'
4	38	335	Γ (ΜΙΚΡΗ ΠΙΣΙΝΑ)	7/7/2021	ΠΡΑΣΙΝΕΣ ΕΝΤΟΝΑ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ	40	1
							2
							3
							4
							5
					ΠΡΑΣΙΝΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ	320	α
							β
							γ
							δ
							ε
5	50	353	Β (ΕΞΩΤΕΡΙΚΗ ΠΙΣΙΝΑ)	12/7/2021	ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΜΕΝΕΣ ΠΡΑΣΙΝΕΣ	1	1
6	59	372	Γ (ΝΕΑ ΠΙΣΙΝΑ)	21/7/2021	ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΜΕΝΕΣ ΠΡΑΣΙΝΕΣ	3	1
							2
							3
7	60	373	Δ (ΜΕΓΑΛΗ ΠΙΣΙΝΑ)	21/7/2021	ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΜΕΝΕΣ ΠΡΑΣΙΝΕΣ	4	1
							2
							3
							4
8	61	374	Δ (ΜΙΚΡΗ ΠΙΣΙΝΑ)	21/7/2021	ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΜΕΝΕΣ ΠΡΑΣΙΝΕΣ	2	1
							2

Ο Πίνακας 10 παρουσιάζει τα επίπεδα της μικροβιακής μόλυνσης των 6 εξεταζόμενων κολυμβητικών δεξαμενών των 4 φορέων στον οποίων τα δείγματα νερού ανιχνεύθηκαν επιβεβαιωμένες αποικίες ψευδομονάδας.

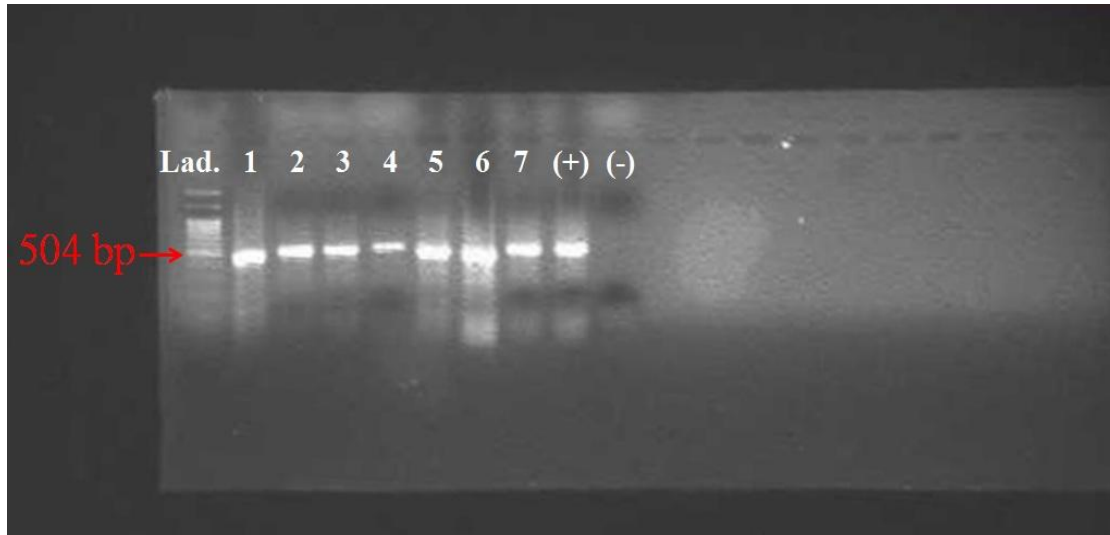
Πίνακας 10: Μικροβιακές αποικίες των υποχρεωτικών δεικτών στα εξεταζόμενα δείγματα νερού στα οποία ανιχνεύθηκαν πράσινες αποικίες ψευδομονάδας. (TC = Ολικά κολοβακτηριοειδή, OMX = Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα).

Α/Α	Α/Α συνόλου	ΔΕΙΓΜΑ	ΦΟΡΕΑΣ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΑΠΟΙΚΙΩΝ	cfus/100 mL			
				<i>P. aeruginosa</i>	TC	<i>E. coli</i>	OMX	ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΟΙ
1	5	250	Α (ΕΞΩΤΕΡΙΚΗ ΠΙΣΙΝΑ)	>200	0	0	5	0
2	25	294	Β (ΕΞΩΤΕΡΙΚΗ ΠΙΣΙΝΑ)	4	0	0	11	0
3	27	296	Γ (ΜΙΚΡΗ ΠΙΣΙΝΑ)	1	0	0	3	0
4	38	335	Γ (ΜΙΚΡΗ ΠΙΣΙΝΑ)	40	0	0	6	0
				320				
5	50	353	Β (ΕΞΩΤΕΡΙΚΗ ΠΙΣΙΝΑ)	1	7	7	15	0
6	59	372	Γ (ΝΕΑ ΠΙΣΙΝΑ)	3	0	0	11	0
7	60	373	Δ (ΜΕΓΑΛΗ ΠΙΣΙΝΑ)	4	0	0	8	0
8	61	374	Δ (ΜΙΚΡΗ ΠΙΣΙΝΑ)	2	0	0	9	0

Τα αποτελέσματα από την εφαρμογή της PCR για τον πολλαπλασιασμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου *oprL* και την ηλεκτροφόρηση για την ανάλυση των θραυσμάτων περιορισμού του συγκεκριμένου DNA μορίου με μοριακό βάρος 504 bp (Algammal et al., 2020), ήρθαν σε απόλυτη συμφωνία με τα θετικά

αποτελέσματα των βιοχημικών διαδικασιών, καθώς και οι 30 εξεταζόμενες αποικίες επιβεβαιώθηκαν ως *Pseudomonas aeruginosa*.

Στην Εικόνα 16 παρουσιάζονται ενδεικτικά ορισμένα από τα εξεταζόμενα καλλιεργήματα, μαζί με το στέλεχος αναφοράς και τον αρνητικό μάρτυρα.



Εικόνα 16: Ηλεκτροφόρηση DNA επτά εξεταζόμενων καλλιεργημάτων με τη χρήση εκκινητών για το γονίδιο-στόχο *oprL* (504 bp). Lad.: δείκτης μοριακών βαρών (DNA Ladder), 1: δείγμα 250-1, 2: δείγμα 294-1s, 3: δείγμα 296-α', 4: δείγμα 335-1, 5: δείγμα 353-1, 6: δείγμα 372-1, 7: δείγμα 373-1, (+): θετικός μάρτυρας - πρότυπο στέλεχος *Pseudomonas aeruginosa*, (-): αρνητικός μάρτυρας - διάλυμα χωρίς DNA.

2. Φαινοτυπικές δοκιμασίες ελέγχου μικροβιακής ευαισθησίας των στελεχών

Ο έλεγχος της ευαισθησίας σε αντιβιοτικά διεξήχθη σε 9 αντιπροσωπευτικά απομονωμένα στελέχη της *P. aeruginosa*. Όπως φαίνεται και στους Πίνακες 10 και 11, όλα τα εξεταζόμενα καλλιεργήματα ακολούθησαν το ίδιο πρότυπο αντοχής με το στέλεχος αναφοράς. Το 100% των δειγμάτων ήταν ανθεκτικά στα αντιβιοτικά CTX και AMC. Τα δείγματα ελέγχθηκαν μαζί με τα πρότυπα στελέχη της ψευδομονάδας και της *E.coli ATCC 25922* ως προς την ευαισθησία στο αντιβιοτικό κεφοξιτίνη (FOX). Όλα τα δείγματα ψευδομονάδας ήταν ανθεκτικά στο FOX. Το 88.9 % (8/9) των εξεταζόμενων αποικιών ήταν μετρίως ευαίσθητα στην πιπερακιλλίνη-ταζομπακτάμη (PTZ) και το 77.8% (7/9) ήταν μετρίως ευαίσθητα στην τικαρκιλίνη (TIC).

Πίνακας 11: Κριτήρια μικροβιακής ευαισθησίας και εύρη ζωνών αναστολής (breakpoints), σύμφωνα με το Clinical and Laboratory Standards Institute Guidelines, καθώς και προφίλ μικροβιακής αντοχής για 9 αντιπροσωπευτικά απομονωμένα στελέχη *P. aeruginosa* προερχόμενων από κολυμβητικές δεξαμενές συνεργαζόμενων φορέων.

A/A	ΔΕΙΓΜΑ	TIC	CN	FOX	IPM	MEM	CIP	FEP	PRL	PTZ	TOB	CTX	AMC	CAZ	AK
	<i>R</i> (Ανθεκτικό)	≤15	≤12	-	≤15	≤15	≤15	≤14	≤14	≤14	≤12	≤14	-	≤14	≤14
	<i>I</i> (Μέτρια ευαίσθητο)	16-23	13-14	-	16-18	16-18	16-20	15-17	15-20	15-20	13-14	15-22	-	15-17	15-16
	<i>S</i> (Ευαίσθητο)	≥24	≥15	-	≥19	≥19	≥21	≥18	≥21	≥21	≥15	≥23	-	≥18	≥17
1	ATCC 25922 <i>E. Coli</i>	24	19	23	29	32	30	28	22	19	17	27	20	25	18
2	Στέλεχος αναφοράς <i>P. aeruginosa</i> 1	27	21	6	26	40	38	31	27	24	23	9	6	30	26
3	Στέλεχος αναφοράς <i>P. aeruginosa</i> 2	24	19	6	24	35	33	27	22	21	22	8	6	26	21
4	250-1	21	21	6	30	42	37	28	24	19	22	6	6	31	26
5	294-1s	20	21	6	29	42	38	27	24	19	22	6	6	30	26
6	296-α'	21	21	6	30	42	37	28	24	18	23	6	6	31	26
7	335-1	25	21	6	28	42	38	30	26	22	23	8	6	30	26
8	353-1	22	19	6	25	40	36	26	24	19	21	6	6	30	24
9	372-1	22	17	6	24	37	36	26	22	17	20	6	6	28	21
10	373-1	19	16	6	23	37	35	24	25	16	19	6	6	24	20
11	374-1	24	17	6	25	37	35	27	22	17	20	6	6	28	22
12	374-2	23	17	6	24	37	35	26	24	16	20	6	6	27	21

Πίνακας 12: Κριτήρια μικροβιακής ευαισθησίας και εύρη ζωνών αναστολής (breakpoints), σύμφωνα με το Clinical and Laboratory Standards Institute Guidelines, καθώς και προφίλ μικροβιακής αντοχής για 9 αντιπροσωπευτικά απομονωμένα στελέχη *P. aeruginosa* προερχόμενων από κολυμβητικές δεξαμενές συνεργαζόμενων φορέων με τους χαρακτηρισμούς: ευαίσθητο (S), μέτρια ευαίσθητο (I) και ανθεκτικό (R).

A/A	ΔΕΙΓΜΑ	TIC	CN	FOX	IPM	MEM	CIP	FEP	PRL	PTZ	TOB	CTX	AMC	CAZ	AK
	<i>R</i> (Ανθεκτικό)	≤15	≤12	-	≤15	≤15	≤15	≤14	≤14	≤14	≤12	≤14	-	≤14	≤14
	<i>I</i> (Μέτρια ευαίσθητο)	16-23	13-14	-	16-18	16-18	16-20	15-17	15-20	15-20	13-14	15-22	-	15-17	15-16
	<i>S</i> (Ευαίσθητο)	≥24	≥15	-	≥19	≥19	≥21	≥18	≥21	≥21	≥15	≥23	-	≥18	≥17
1	ATCC 25922 <i>E. Coli</i>	24	19	23	29	32	30	28	22	19	17	27	20	25	18
2	Στέλεχος αναφοράς <i>P. aeruginosa</i> 1	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S
3	Στέλεχος αναφοράς <i>P. aeruginosa</i> 2	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S
4	250-1	I	S	R	S	S	S	S	S	I	S	R	R	S	S
5	294-1s	I	S	R	S	S	S	S	S	I	S	R	R	S	S
6	296-α'	I	S	R	S	S	S	S	S	I	S	R	R	S	S
7	335-1	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S
8	353-1	I	S	R	S	S	S	S	S	I	S	R	R	S	S
9	372-1	I	S	R	S	S	S	S	S	I	S	R	R	S	S
10	373-1	I	S	R	S	S	S	S	S	I	S	R	R	S	S
11	374-1	S	S	R	S	S	S	S	S	I	S	R	R	S	S
12	374-2	I	S	R	S	S	S	S	S	I	S	R	R	S	S

Κανένα από τα στελέχη δεν έδωσε θετικά αποτελέσματα κατά τη φαινοτυπική δοκιμασία συνέργειας DDST test, όπως φαίνεται στην Εικόνα 17. Δεν παρουσιάστηκε συνέργεια μεταξύ των αντιβιοτικών CAZ, CTX και του αναστολέα AMC, επομένως τα στελέχη δεν εκφράζουν ευρέους φάσματος β-λακταμάσες (ESBLs).



Εικόνα 17: Φαινοτυπική δοκιμασία συνέργειας DDST test για το πρότυπο στέλεχος και το δείγμα 373-1 ως προς τα αντιβιοτικά CAZ-AMC-CTX με αρνητικό αποτέλεσμα.

Τα απομονωμένα στελέχη παρουσιάζουν φαινότυπο αντοχής AmpC β-λακταμάσες «κεφαλοσπορινάσες», είναι ανθεκτικά στις κεφαμυκίνες (FOX), δίνουν αρνητικό αποτέλεσμα κατά τη φαινοτυπική δοκιμασία συνέργειας DDST test και είναι ευαίσθητα σε κεφαλοσπορίνες 4^{ης} γενιάς (κεφεπίμη-FEP) - η κεφεπίμη γενικά δεν υδρολύεται από β-λακταμάσες AmpC.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Δ: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η αξιολόγηση της μικροβιολογικής ποιότητας του νερού έχει ως στόχο την προστασία της Δημόσιας υγείας και του γενικού πληθυσμού από ασθένειες υδρικής προέλευσης που σχετίζονται με την επαφή ή την κατάποση υδάτων μολυσμένων με παθογόνα, όπως η *Pseudomonas aeruginosa*. Το βακτηριακό είδος *Pseudomonas aeruginosa* αποτελεί ένα ευκαιριακό παθογόνο, το οποίο οδηγεί σε υψηλά ποσοστά νοσηρότητας και θνησιμότητας σε ανοσοκατεσταλμένους και με κυστική ίνωση ασθενείς (Pang et al., 2019).

Στο υδάτινο περιβάλλον το βακτήριο εντοπίζεται σε κοινοτικά συστήματα ύδρευσης και συστήματα κυκλοφορίας του νερού, τα οποία διαμορφώνουν ένα ευνοϊκό ενδιαίτημα για τη γρήγορη ανάπτυξη και εξάπλωση του μικροβίου, θέτοντας σε κίνδυνο κυρίως τις ευπαθείς ομάδες του πληθυσμού. Στις ευπαθείς ομάδες περιλαμβάνονται ανοσοκατεσταλμένα άτομα, γυναίκες σε κύηση, ηλικιωμένοι, μικρά παιδιά και βρέφη. Σε έρευνα του CDC για το χρονικό διάστημα 2011-2012, αναφορικά με λοιμώξεις υδρικής προέλευσης από κολυμβητικές δεξαμενές ή υδρομάλαξης, καταγράφηκαν 69 επιδημίες με σύνολο κρουσμάτων 1309 άτομα, εκ των οποίων 73 νοσηλεύτηκαν και 1 απεβίωσε. Οι περισσότερες επιδημίες καταγράφηκαν κυρίως του μήνες Ιούνιο-Αύγουστο (61%), ενώ τα κυριότερα αίτια ήταν το κρυπτοσπορίδιο (52%), ακολουθούμενο από τα *Legionella* spp., *E.coli* O157:H7, *Norovirus*, *Pseudomonas aeruginosa* (2 επιδημίες, 16 περιστατικά), *Giardia intestinalis* και *Shigella sonnei* (Hlavsa et al., 2015).

Στην παρούσα εργασία συλλέχθηκαν, απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν, καλλιεργητικά κατά ISO πρότυπα και μοριακά με PCR, περιβαλλοντικά στελέχη του βακτηρίου *Pseudomonas aeruginosa*, τα οποία προήλθαν από δείγματα νερού κολυμβητικών δεξαμενών από φορείς στην περιοχή της Αθήνας. Στη συνέχεια, για τα επιβεβαιωμένα στελέχη προσδιορίστηκε ο φαινότυπος αντοχής τους, κατά τον έλεγχο της μικροβιακής ευαισθησίας σε 15 επιλεγμένα αντιβιοτικά.

Αξίζει να σημειωθεί πως τα περισσότερα παθογόνα που εξετάζονται για την παρουσία τους σε νερά αναψυχής, είναι συνήθως πιο ανθεκτικά στη χλωρίωση από τα κολοβακτηριοειδή, όπως για παράδειγμα, τα γένη *Pseudomonas* και *Staphylococcus* (Grabow et al., 1991). Επομένως, υπάρχει η πιθανότητα ανίχνευσής τους σε ένα

εξεταζόμενο δείγμα νερού, ακόμα και αν δεν έχει καταμετρηθεί καμία αποικία κολοβακτηριοειδών στην καλλιέργεια (Rigas et al., 1998).

Οι μελέτες Ελλήνων ερευνητών που αφορούν τη μικροβιολογική ποιότητα κολυμβητικών δεξαμενών στη χώρα μας πληθαίνουν με το πέρασμα των χρόνων. Μια από τις πρώτες και πιο ολοκληρωμένες μελέτες είναι εκείνη των Papadopoulou et al. (2008), κατά την οποία συλλέχθηκαν και αναλύθηκαν σε διάστημα 8 ετών 462 δείγματα νερού από 5 κολυμβητικές δεξαμενές υδροθεραπείας νοσοκομείου, αθλητικών εγκαταστάσεων, εκπαιδευτηρίων για παιδιά, ξενοδοχείου και μια ιδιωτική. Το βακτήριο *P. aeruginosa* ανιχνεύθηκε σε 3/5 πισίνες πλην της ιδιωτικής και της δημόσιας πισίνας της αθλητικής εγκατάστασης. Το 32.9% των δειγμάτων δεν ικανοποιούσε τα θεσπισμένα από την ελληνική νομοθεσία πρότυπα ποιότητας, ενώ ψευδομονάδα ανιχνεύθηκε στο 12.1%. Η δεξαμενή υδροθεραπείας ήταν αυτή που παρουσίασε την πιο χαμηλή μικροβιολογική ποιότητα νερού και την πιο υψηλή αφθονία πολυανθεκτικών σε αντιβιοτικά βακτηριακών στελεχών. Συνολικά, σε 8/132 δείγματα που συλλέχθηκαν από τη συγκεκριμένη κολυμβητική δεξαμενή, αναπτύχθηκαν περισσότερες από 1500 αποικίες ψευδομονάδας ανά 100 mL.

Σε άλλη μελέτη, στην περιοχή της Αθήνας, έγινε έλεγχος της ποιότητας του νερού 11 κολυμβητικών δεξαμενών, αθλητικών και αναψυχής. Τα ευρήματα των Rigas et al. (1998) έδειξαν για τις φυσικοχημικές παραμέτρους υψηλές τιμές θολερότητας και για τις μικροβιολογικές παραμέτρους παρουσία και επικράτηση των ειδών *S. aureus* και *P. aeruginosa*, τα οποία αποδόθηκαν σε κακό σχεδιασμό και λειτουργία των δεξαμενών, λόγω ελλιπούς εκπαίδευσης του υπεύθυνου προσωπικού.

Σε άλλες μελέτες Ελλήνων ερευνητών επίσης διαπιστώθηκε η παρουσία ψευδομονάδας σε εγκαταστάσεις υδάτων αναψυχής. Πιο αναλυτικά, στην έρευνα των Blougoura et al. (2012), πραγματοποιήθηκε διερεύνηση για βακτηριακή μόλυνση, προσδιορισμός και μετρήσεις φυσικοχημικών παραμέτρων και μικροβιολογικές αναλύσεις σε δείγματα νερού από 60 διαφορετικές κολυμβητικές δεξαμενές, εκ των οποίων το 75% αφορούσε δημόσιες ή αθλητικές εγκαταστάσεις, με υπαίθριες ή εσωτερικές πισίνες. Η *Pseudomonas aeruginosa* εμφανίζεται και πολλαπλασιάζεται σε χώρους κολυμβητηρίων, όταν οι συνθήκες λειτουργίας τους δεν είναι σε ικανοποιητικά επίπεδα. Από τα 60 εξεταζόμενα κολυμβητήρια, με το 38.33% να βρίσκεται στην Αθήνα, βρέθηκε ότι οι υπερχλωριωμένες δεξαμενές αποτελούσαν το

80% των δεξαμενών που συμπεριλήφθηκαν στην έρευνα. Οι τιμές του ελεύθερου υπολειμματικού χλωρίου στις συγκεκριμένες δεξαμενές ξεπερνούσαν τα 3 mg/L (Μπλουγουρά, 2011). Ψευδομονάδα ανιχνεύθηκε στο 76.6% του συνόλου των δεξαμενών, εκ των οποίων το 35% υφίσταντο υπερχλωρίωση. Στο 42% των δεξαμενών που ανιχνεύθηκε το βακτήριο, απουσίαζαν άλλοι μικροβιολογικοί δείκτες.

Αντίστοιχα, στη δική μας μελέτη και στα 8 εξεταζόμενα δείγματα (Πίνακας 10) που ανιχνεύθηκε ψευδομονάδα απουσίαζαν ένας ή περισσότεροι μικροβιολογικοί δείκτες. Αναλυτικά, οι κοινοί αερόβιοι μικροοργανισμοί ήταν εντός των θεσπισμένων ορίων. Σε κανένα δείγμα δεν ανιχνεύθηκαν εντερόκοκκοι, ενώ μόνο σε ένα δείγμα ανιχνεύθηκε *E. coli* σε συγκέντρωση 7 cfus/100 mL μη ικανοποιώντας το πρότυπο ποιότητας των 0 cfus ανά 100 mL. Τα έως τώρα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν ότι ο μικροοργανισμός παρουσιάζει αντοχή στις συνήθεις εφαρμοζόμενες δόσεις χλωρίου και ο πολλαπλασιασμός του ευνοείται σε «νεκρές ζώνες» όπου τα νερά μένουν στάσιμα, αλλά και σε επιφάνειες και τοιχώματα της κολυμβητικής δεξαμενής που υπάρχουν πλακίδια σπασμένα και είναι δύσκολος ο καθαρισμός τους.

Οι Tirodimos et al. (2018) εξέτασαν 2844 δείγματα νερού προερχόμενα από κολυμβητικές δεξαμενές και δεξαμενές υδρομάλαξης (spa, jacuzzi), την περίοδο 2011-2016. Τα 2712 από τα 2844 δείγματα (95.4%) ικανοποιούσαν τα θεσπισμένα από την ελληνική νομοθεσία όρια, αναφορικά με τις συγκεντρώσεις των κοινών αερόβιων μικροοργανισμών (Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα), των ολικών κολοβακτηριοειδών και της *E.coli*. Ανιχνεύθηκε ψευδομονάδα στο 15.2% των δειγμάτων (433) και η παρουσία της ξεπέρασε κατά πολύ τον αριθμό των δειγμάτων στον οποίο ανιχνεύθηκε η *E. coli* (0.6% των δειγμάτων), η οποία περιλαμβάνεται στην Υγειονομική Διάταξη του 1973 για τις κολυμβητικές δεξαμενές. Όταν ελήφθη υπόψη και η ψευδομονάδα, προκειμένου να γίνει προσδιορισμός των δειγμάτων που ικανοποιούν τα πρότυπα ποιότητας, το ποσοστό των δειγμάτων μειώθηκε από 95.4% σε 81.1%.

Σύμφωνα με στοιχεία του Κεντρικού Εργαστηρίου Δημόσιας Υγείας για την δετία 2010-2016, ανιχνεύθηκε το βακτήριο *P. aeruginosa* σε 41 από τα 492 εξεταζόμενα δείγματα νερού (8,3%), τα οποία προέρχονταν κυρίως από πισίνες νοσοκομείων (5/40) και ξενοδοχείων (17/175). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως στο 50%

των θετικών δειγμάτων για την ψευδομονάδα, οι υπόλοιπες μικροβιολογικές παράμετροι ήταν εντός των προβλεπόμενων ορίων (Theofilou et al., 2017).

Για το χρονικό διάστημα 2004-2016, κατά τη λειτουργία του προγράμματος «ΚΟΛΥΜΒΗΤΗΡΙΑ» στην Μονάδα Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας, του Τμήματος Πολιτικών Δημόσιας Υγείας, καταχωρήθηκαν 111145 εγγραφές στη βάση δεδομένων του εργαστηρίου για κάθε εξεταζόμενη παράμετρο: Ολικά κολοβακτηριοειδή, Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα, Ψευδομονάδα. Παρόλο που η ψευδομονάδα δεν περιλαμβάνεται ως δείκτης στην Υγειονομική Διάταξη του 1973, το 2.8% των εξεταζόμενων δειγμάτων της Μονάδας, ξεπερνούσαν το όριο των 0 cfus/100 mL για τον συγκεκριμένο μικροοργανισμό. Μάλιστα, το 20% αυτών των δειγμάτων (62/308) προερχόταν από θεραπευτικές κολυμβητικές δεξαμενές (Pappa et al., 2017).

Σε έρευνα των Nikaeeen et al. (2009), από ένα σύνολο 234 δειγμάτων νερού από 25 εσωτερικές κολυμβητικές δεξαμενές, ανιχνεύθηκε ψευδομονάδα στο 0.85% των δειγμάτων, τα οποία προέρχονταν από 18/25 πισίνες. Επίσης, ανιχνεύθηκε σταφυλόκοκκος στο 2.1% των δειγμάτων, κατατάσσοντας την ποιοτική κατάστασή τους ως απαράδεκτη/μη αποδεκτή. Στις συγκεκριμένες πισίνες, οι φυσικοχημικές παράμετροι ήταν εντός ορίων, με το ελεύθερο υπολειμματικό χλώριο να είναι > 1 και το pH μεταξύ 7.2-7.8. Για τα ίδια δείγματα νερού, προσδιορίστηκαν και οι συγκεντρώσεις των ολικών κολοβακτηριοειδών ($< 1/100$ mL) και της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας (< 200 mL), οι οποίες ήταν εντός των συνιστώμενων ορίων.

Αυτό αποδεικνύει πως σα μικροοργανισμοί, η ψευδομονάδα και ο σταφυλόκοκκος παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντοχή στις συνήθεις εφαρμοζόμενες δόσεις των απολυμαντικών μέσων, οπότε είναι πιθανή η ανίχνευσή τους σε δείγματα νερού απαλλαγμένα από κολοβακτηριοειδή (Rigas et al., 1998). Η μέγιστη συγκέντρωση ψευδομονάδας που αναπτύχθηκε σε δείγμα νερού ήταν 234 αποικίες ανά 100 mL, ξεπερνώντας κατά πολύ το προτεινόμενο από τον ΠΟΥ όριο του 1 cfu/100 mL, ενώ ο μέσος όρος όλων των δειγμάτων αναφορικά με το συγκεκριμένο βακτήριο υπολογίστηκε στα 3.4 cfu/100 mL. Στην παρούσα εργασία, ο μέγιστος αριθμός αποικιών που αναπτύχθηκαν σε καλλιέργεια ήταν 320 cfu για διηθούμενο όγκο νερού 200 mL. Πρωταρχικός μας στόχος ήταν η εξέταση ενός επαρκούς αριθμού δειγμάτων νερού (n=65) για την ανίχνευση του βακτηρίου *Pseudomonas aeruginosa* και τη

μετέπειτα απομόνωση και καλλιέργεια μιας χαρακτηριστικής αποικίας για περαιτέρω μοριακή ταυτοποίηση. Επομένως, σε πολλές περιπτώσεις δε διηθήθηκαν αυστηρά 100 mL από κάθε δείγμα, άλλα ένας μεταβλητός όγκος μεταξύ 100-200 mL και για αυτό το λόγο δεν υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις του μικροοργανισμού σε κάθε δείγμα, αλλά γίνεται αναφορά μόνο ως προς το συνολικό αριθμό αποικιών που καταμετρήθηκαν στο εκάστοτε τρυβλίο (Πίνακας 9).

Σε έρευνα των Barben et al. (2005) συλλέχθηκαν σε διάστημα διαίτας δείγματα νερού από 56 εσωτερικές και 46 εξωτερικές δημόσιες πισίνες από μία πόλη της Ελβετίας, τα οποία και αναλύθηκαν ως προς την παρουσία ψευδομονάδας. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως κατά το πρώτο έτος (2002) και τα 72 δείγματα προερχόμενα από 28 εξωτερικές πισίνες δεν περιείχαν ψευδομονάδα. Ωστόσο, την επόμενη χρονιά, κατά τη θερινή περίοδο, 3/117 δείγματα από 46 εξωτερικές πισίνες (4%) ήταν θετικά ως προς την ψευδομονάδα. Και τα 3 θετικά δείγματα προέρχονταν από παιδικές πισίνες. Αναφορικά με τις εσωτερικές κολυμβητικές δεξαμενές, 2/128 δείγματα από 56 εσωτερικές πισίνες περιείχαν ψευδομονάδα. Και τα 2 θετικά δείγματα προέρχονταν από κολυμβητικές δεξαμενές υδροθεραπείας.

Σε έρευνα των Schets et al. (2014) μελετήθηκε η παρουσία *Pseudomonas aeruginosa* σε βοηθήματα κολύμβησης, είτε φουσκωτά, είτε από αφρό, σε δημόσιες κολυμβητικές δεξαμενές στην Ολλανδία. Συνολικά συλλέχθηκαν 230 δείγματα από 175 διαφορετικά αντικείμενα. Ο μικροοργανισμός ανιχνεύθηκε σε 63 δείγματα, τα οποία προέρχονταν από 47 διαφορετικά αντικείμενα 19 διαφορετικών πισινών. Από τη συγκεκριμένη έρευνα εξήχθη το συμπέρασμα, πως είναι απαραίτητος ο τακτικός έλεγχος από τους αρμοδίους της εγκατάστασης όλων των βοηθητικών αντικειμένων που χρησιμοποιούνται κατά την κολύμβηση και ο σχολαστικός καθαρισμός και στέγνωμά τους.

Οι λοιμώξεις από ψευδομονάδα είναι αρκετά δύσκολο να αντιμετωπιστούν, εξαιτίας της ικανότητας των στελεχών του βακτηρίου να αξιοποιούν, τόσο εγγενείς, όσο και επίκτητους μηχανισμούς για την ανάπτυξη αντίστασης σε πλήθος αντιβιοτικών (Lister et al., 2009). Στους εγγενείς μηχανισμούς αντοχής, περιλαμβάνονται η χρωμοσωμική κεφαλοσπορινάση AmpC, το εκτεταμένο σύστημα αντλιών εκροής και η χαμηλή διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης (oprD Loss). Πολυανθεκτικά στελέχη του βακτηρίου (Multi Drug Resistant isolates: MDR) μπορούν να προκύψουν

από το συνδυασμό 2 εγγενών μηχανισμών αντοχής (*oprD* loss + efflux pumps) (Ikonomidis et al., 2008). Η ανθεκτικότητα προσαρμογής (*adaptive resistance*) του μικροοργανισμού στα αντιβιοτικά είναι ένας πρόσφατα χαρακτηρισμένος μηχανισμός, ο οποίος αφορά την αντοχή λόγω της δημιουργίας βιομεμβρανών, με αποτέλεσμα τη δημιουργία πολυανθεκτικών κλινικών στελεχών του βακτηρίου υπεύθυνων για την υποτροπή λοιμώξεων (Driscoll et al., 2007; Pang et al., 2019).

Σημαντικές ελλείψεις υπάρχουν στη βιβλιογραφία αναφορικά με τα περιβαλλοντικά στελέχη της *Pseudomonas aeruginosa*. Υπάρχουν αναφορές για στελέχη ψευδομονάδας ανθεκτικά στο αντιβιοτικό μιπενέμη, η οποία αντοχή σχετίζεται με μεταλλάξεις στο γονίδιο *oprD* και την απώλεια των αντίστοιχων πορινών, καθώς και σε συνδυασμό με εκτεταμένα συστήματα αντλιών εκροής. Τα συγκεκριμένα περιβαλλοντικά στελέχη εντοπίζονται σε δείγματα νερού από νοσοκομεία (Deplano et al., 2005; Quick et al., 2014; Schiavano et al., 2017), σε εγκαταστάσεις υδροθεραπείας (Pereira et al., 2011), κολυμβητικές δεξαμενές, καταλύματα, δημόσια δίκτυα ύδρευσης και νοικοκυριά στην Ιταλία (Schiavano et al., 2017), σε δείγματα επιφανειακών υδάτων στην Ισπανία (Sanchez et al., 2014) και στον ποταμό Δούναβη (Kittinger et al., 2016).

Το σχετικά μεγάλο γονιδίωμα της *Pseudomonas aeruginosa* (5.5-7 Mbp) σε σύγκριση με το γονιδίωμα άλλων βακτηρίων, όπως το *Bacillus subtilis* (4.2 Mbp), *Mycobacterium tuberculosis* (4.4 Mbp) και *Escherichia coli* (4.6 Mbp), επιτρέπει την κωδικοποίηση μεγάλου αριθμού ρυθμιστικών ενζύμων του μεταβολισμού. Η αυξημένη ικανότητα κωδικοποίησης του βακτηρίου, του προσδίδει αυξημένο βαθμό προσαρμοστικότητας σε περιβαλλοντικές μεταβολές και αυξημένη μεταβολική ευελιξία (Stover et al., 2000 & Klockgether et al., 2011). Παρόλο που σπάνια επηρεάζει υγιή άτομα, είναι το πιο συχνό παθογόνο από την ομάδα των ESKAPE παθογόνων (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* και *Enterobacter* spp.) που σχετίζεται με νοσοκομειακές λοιμώξεις και την πρόκληση πνευμονίας σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς (Barbier et al., 2013; Santajit & Indrawattana, 2016).

Μεγάλο ενδιαφέρον από περιβαλλοντική και κλινική άποψη, παρουσιάζουν τα βακτήρια της *Pseudomonas aeruginosa* που υπερεκφράζουν την χρωμοσωμική AmpC β-λακταμάση. Η υπερέκφραση που συνδέεται με απώλεια ή αλλαγή μιας

πορίνης στην εξωτερική μεμβράνη του βακτηρίου, οδηγεί σε υψηλή αντοχή όχι μόνο σε όλες τις πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, κεφαμυκίνες και μονομπακτάμες, αλλά και στις καρβαπενέμες, λόγω ελαττωμένης διαπερατότητας της εξωτερικής μεμβράνης και συνεπώς ελαττωμένης πρόσληψης του αντιβιοτικού (Jacoby, 2009; Lister et al., 2009).

Αναφορικά, με την αντοχή στα αντιβιοτικά, κανένα από τα απομονωμένα στελέχη στην έρευνά μας δεν εμφάνισε αντοχή στην ιμιπενέμη, φαίνεται να διαθέτουν το βασικό εγγενή μηχανισμό αντοχής του βακτηρίου (AmpC), όπως αυτός περιγράφεται στη Διδακτορική διατριβή της Δρ. Παππά Όλγας (Παππά, 2016). Οι Schiavano et al. (2017), συνέλεξαν 8351 δείγματα νερού από κολυμβητικές δεξαμενές, υγειονομικές υπηρεσίες, καταλύματα, δημόσια έργα ύδρευσης και οικίες στην Ιταλία. Από τις εξεταζόμενες δομές, ο μικροοργανισμός βρέθηκε με μεγαλύτερη συχνότητα στις κολυμβητικές δεξαμενές. Από τα 207 δείγματα νερού που προέρχονταν από 41 κολυμβητικές δεξαμενές, στο 4.83% (10/207) ανιχνεύθηκε το βακτήριο. Συνολικά, από τα 53 καλλιεργήματα τα οποία εξετάστηκαν ως προς την ευαισθησία τους στα αντιβιοτικά, το 9.43% παρουσίασε αντοχή στην ιμιπενέμη, ένα στέλεχος ήταν ανθεκτικό στο TCC και ένα στέλεχος παρουσίασε πολυανθεκτικότητα στο TCC (τικαρκιλίνη + κλαβουλανικό) και στην PRL (πιπερακιλλίνη). Τρία στελέχη που απομονώθηκαν από δείγμα νερού πισίνας ήταν μετρίως ευαίσθητα στη μεροπενέμη, ενώ στη δική μας μελέτη όλα τα στελέχη ήταν ευαίσθητα στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό.

Οι Tirodimos et al., (2010), κατά τη διάρκεια ενός έτους ανέλυσαν 271 δείγματα νερού τα οποία προήλθαν από 4 θεραπευτικές πισίνες (n=8), 4 δεξαμενές υδρομάλαξης (n=49) και 21 κολυμβητικές δεξαμενές (n=214) στην περιοχή της Μακεδονίας και της Θράκης. Από τα δείγματα που εξετάστηκαν, στα 39/214 από τις κολυμβητικές δεξαμενές (18.2%), στα 4/49 από τις δεξαμενές υδρομάλαξης (8.2%) και στα 2/8 από τις πισίνες υδροθεραπείας (25%) ανιχνεύθηκε ψευδομονάδα. Τα αποτελέσματα του ελέγχου της ευαισθησίας σε αντιβιοτικά της συγκεκριμένης μελέτης έρχονται σε συμφωνία με την παρούσα εργασία. Και στις δύο περιπτώσεις, όλα τα εξεταζόμενα καλλιεργήματα ήταν ευαίσθητα στα αντιβιοτικά τομπραμυκίνη, πιπερακιλλίνη, γενταμυκίνη, σιπροφλοξασίνη, κεφταζιδίμη, κεφεπίμη και αμικασίνη. Η μόνη διαφορά είναι πως στη δική μας μελέτη 9/9 καλλιεργήματα (100% έναντι 97.8% στην άλλη έρευνα) ήταν ευαίσθητα στην ιμιπενέμη και μεροπενέμη. Το υψηλό

ποσοστό παρουσίας του μικροοργανισμού στις πισίνες υδροθεραπείας αποδόθηκε, αντίστοιχα με τη μελέτη των Rigas et al., (1998), στην έλλειψη κατάλληλης εκπαίδευσης του τεχνικού προσωπικού, καθώς και στη μη τήρηση των κανόνων υγιεινής από τους χρήστες των δεξαμενών.

Η αύξηση των ανθεκτικών στελεχών της ψευδομονάδας σε καρβαπενέμες και σε 3ης και 4ης γενιάς κεφαλοσπορίνες αποτελεί κλινικό πρόβλημα παγκοσμίως. Το κύριο αίτιο της αντίστασης του είδους στις κεφαλοσπορίνες είναι η υπερέκφραση του χρωμοσωμικού ενζύμου AmpC (κυρίως αντοχή στην κεφταζιδίμη) και η παραγωγή μεταλλο-β-λακταμασών (MBLs, αντοχή σε κεφαλοσπορίνες και καρβαπενέμες) (Laudy et al., 2017). Για αυτό το λόγο, κρίνεται απαραίτητη, τόσο η άμεση ταυτοποίησή τους εργαστηριακά, όσο και η κατανόηση του πλήρους μηχανισμού επαγωγής της κεφαλοσπορινάσης, προκειμένου να είναι εφικτή και αποτελεσματική η αντιμετώπισή τους (Driscoll et al., 2007; Lister et al., 2009).

Αναφορικά με τα νοσοκομειακά περιβάλλοντα, σε συνθήκες περιβαλλοντικού στρες, όπως συμβαίνει κατά τη διενέργεια θεραπειών ακτινοβολήσης, οι βακτηριακές κοινότητες συσσωρεύονται και θυλακώνονται σχηματίζοντας βιομεμβράνες (biofilms) σε επιφάνειες νερού. Όπως είναι γνωστό, οι βιομεμβράνες αυξάνουν το βαθμό επιβίωσης και την αντοχή της ψευδομονάδας έναντι αντιμικροβιακών παραγόντων (Stewart & Costerton, 2001; Mah et al., 2003). Βιομεμβράνες ως επί το πλείστον σχηματίζονται σε ιατρικά όργανα, όπως καθετήρες, εμφυτεύματα, συσκευές υποβοήθησης της αναπνοής και συσκευές αιμοκάθαρσης (Hall-Stoodley et al., 2004). Μόνο ελάχιστα αντιβιοτικά δρουν αποτελεσματικά έναντι ελεύθερων μεμονωμένων βακτηριακών κυττάρων, αλλά αποτυγχάνουν ως προς την εξάλειψη των βακτηρίων που σχηματίζουν βιομεμβράνες, καθώς η συγκεκριμένη κατηγορία μικροβίων είναι έως και 1000 φορές πιο ανθεκτική σε αντιμικροβιακούς παράγοντες (Sproering & Lewis, 2001; Ma et al., 2009). Οι σχηματιζόμενες βιομεμβράνες μπορούν να αποκοπούν από μία αρχική περιοχή και να εξαπλωθούν σχηματίζοντας νέες σταθερές δομές για τη δημιουργία αποικιών ψευδομονάδας (Murray et al., 2007; Moreau-Marquis, 2009).

Με βάση όσα έχουν ήδη αναφερθεί, η εξάλειψη της αντοχής στα αντιβιοτικά είναι άκρως απαραίτητη ως μέτρο πρόληψης και θεραπείας σε περίπτωση μόλυνσης από ψευδομονάδα. Μελλοντικά, η έρευνα θα πρέπει να επικεντρωθεί στη δοκιμή

συνδυαστικών θεραπειών, καθώς αποφαίνονται ένα αποτελεσματικό εργαλείο έναντι της αντοχής του βακτηρίου. Η συνεργιστική δράση δύο ή περισσότερων αντιμικροβιακών παραγόντων και πιο συγκεκριμένα, ο συνδυασμός πολυμυξίνης και τομπραμυκίνης, φαίνεται πως μπορεί να αναχαιτίσει την αντίσταση του βακτηρίου παρεμποδίζοντας το σχηματισμό βιομεμβρανών (Zhanel et al., 2006).

Ωστόσο, η θεραπεία της ψευδομονάδας αποτελεί σημαντική πρόκληση, ακριβώς λόγω της μεγάλης προσαρμοστικότητας του βακτηρίου και της αντίστασης που παρουσιάζει στο μεγαλύτερο εύρος των έως τώρα διαθέσιμων αντιβιοτικών (Lister et al., 2009). Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, η ψευδομονάδα με αντίσταση στις καρβαπενέμες, συνιστά 1 από τα 3 είδη για τα οποία είναι επιτακτική ανάγκη η ανάπτυξη νέων αντιβιοτικών για την αντιμετώπιση λοιμώξεων (Tacconelli et al., 2017). Την πρώτη θέση κατέχει το ανθεκτικό στις καρβαπενέμες *Acinetobacter baumannii* και την τρίτη θέση η οικογένεια *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Serratia* spp., *Morganella* spp. και *Providencia* spp) που παρουσιάζει αντοχή στις καρβαπενέμες και στις 3ης γενιάς κεφαλοσπορίνες.

Η *Pseudomonas aeruginosa* αποτελεί τη δεύτερη πιο συχνή αιτία εξάρσεων νόσων σχετιζόμενων με ύδατα αναψυχής μετά το κρυπτοσπορίδιο (Craun et al., 2005). Μολύνσεις των αυτιών και οξεία εξωτερική ωτίτιδα σε χρήστες κολυμβητικών δεξαμενών, προκαλούνται σε μεγάλη συχνότητα, υπό την παρουσία του συγκεκριμένου βακτηρίου (Guida et al., 2009). Οι ερευνητικές μελέτες που διερευνούν την παρουσία ψευδομονάδας σε ύδατα αναψυχής είναι περιορισμένες σε αριθμό (Barben et al., 2005; Papadopoulou et al., 2008; Guida et al., 2009; Nikaeen et al., 2009).

Η πρώτη από τις μελέτες που η μεθοδολογία τους βασίστηκε σε μέθοδο PCR για την ανίχνευση και μοριακή ταυτοποίηση του είδους ήταν η έρευνα των Amagliani et al. (2012). Οι ερευνητές αξιολόγησαν τη μικροβιολογική ποιότητα νερού μιας κολυμβητικής δεξαμενής που χρησιμοποιούνταν για αθλητικές και ψυχαγωγικές δραστηριότητες. Συνέλεξαν 44 δείγματα νερού τα οποία και τα ανέλυσαν ακολουθώντας τις βιοχημικές διαδικασίες της πρότυπης μεθόδου ISO 16266:2008, αλλά και με Real-Time PCR. Σύμφωνα με την ISO μέθοδο, το βακτήριο ανιχνεύθηκε στο 6% των δειγμάτων. Όλα τα απομονωμένα στελέχη ψευδομονάδας ήταν στελέχη

τύπου A, λόγω της παραγωγής πυοκυανίνης. Σύμφωνα με τη μοριακή μέθοδο, το βακτήριο ανιχνεύθηκε στο 23% των ίδιων δειγμάτων νερού. Συμπερασματικά, η εφαρμογή της PCR για την ανίχνευση της *P. aeruginosa* στο νερό παρέχει υψηλά επίπεδα ευαισθησίας και ειδικότητας με ταυτόχρονη σημαντική μείωση του απαιτούμενου χρόνου ανάλυσης για λήψη των αποτελεσμάτων.

Σύμφωνα με τις συστάσεις του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, προτείνεται ο έλεγχος ψευδομονάδας σε κολυμβητικές δεξαμενές, μόνο όταν υπάρχουν ενδείξεις προβλημάτων αναποτελεσματικής λειτουργίας των συστημάτων απολύμανσης και φίλτρανσης του νερού ή/και καταγεγραμμένα περιστατικά νοσηρότητας. Επιπλέον, συνιστάται η τακτική παρακολούθηση της *Pseudomonas aeruginosa* σε δημόσιες και ημι-δημόσιες δεξαμενές υδρομάλαξης με θερμό νερό (hot tubs) και σε φυσικές θερμές και ιαματικές πηγές. Στις κολυμβητικές δεξαμενές με συνεχή απολύμανση τα αποδεκτά όρια παρουσίας της ψευδομονάδας είναι $< 1/100$ ml, ενώ στις φυσικές πηγές, στις οποίες δεν εφαρμόζεται απολυμαντικό με υπολειμματική δράση, ως αποδεκτό όριο ορίζονται τα $< 10/100$ ml (WHO, 2006). Σε περίπτωση υπέρβασης των προτεινόμενων αποδεκτών ορίων, οι συντηρητές της εγκατάστασης είναι υποχρεωμένοι να ακολουθήσουν μια σειρά από βήματα, όπως τον προσδιορισμό της θολότητας του νερού, της συγκέντρωσης του υπολειμματικού απολυμαντικού και του pH (WHO, 2006).

Ο κίνδυνος μόλυνσης μπορεί να μειωθεί μέσω της συνεχούς φίλτρανσης του νερού, της εφαρμογής επαρκούς δόσης απολυμαντικού με υπολειμματική δράση, όπως το χλώριο και μέσω της επαρκούς ανανέωσης των υδάτων, προκειμένου να αποφεύγονται οι υψηλοί χρόνοι υδραυλικής παραμονής (AOCD, 2021). Συνιστάται στους κολυμβητές η αφαίρεση του μαγιό και το ντους με σαπούνι αμέσως μετά τη χρήση δεξαμενών υδρομάλαξης. Επίσης, το μαγιό θα πρέπει να πλένεται έπειτα από κάθε χρήση. Τέλος, επειδή ο κίνδυνος εκδήλωσης συμπτωμάτων μετά την επαφή με μολυσμένο νερό παραμένει ιδιαίτερα υψηλός, είναι απαραίτητος ο προληπτικός έλεγχος του νερού από τον ίδιο το λουόμενο πριν από τη χρήση της δεξαμενής. Ο έλεγχος μπορεί να πραγματοποιηθεί με ειδικές ταινίες για τον προσδιορισμό του υπολειμματικού χλωρίου και του pH (CDC, 2020a).

Ορισμένοι από τους παράγοντες που εντείνουν την εκδήλωση δερματικών λοιμώξεων είναι η ανεπαρκής επεξεργασία του νερού, ο παρατεταμένος χρόνος έκθεσης στο νερό

της πισίνας και ο υπερβολικά μεγάλος αριθμός χρηστών εντός της δεξαμενής μια δεδομένη χρονική στιγμή (AOCD, 2021). Το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (Centers for Disease Control and Prevention - CDC) προτείνει τα εξής επίπεδα ορισμένων φυσικοχημικών παραμέτρων (CDC, 2020a):

- ελεύθερο υπολειμματικό χλώριο: 3-10 ppm (δεξαμενές υδρομάλαξης) και 1-10 ppm (κολυμβητικές δεξαμενές)
- βρώμιο: 4-8 ppm (δεξαμενές υδρομάλαξης) και 3-8 ppm (κολυμβητικές δεξαμενές)
- pH: 7.2-8 (και για τις δύο κατηγορίες)

Σύμφωνα με την ελληνική Υγειονομική Διάταξη Γ1/443/1973, το ελεύθερο υπολειμματικό χλώριο στις κολυμβητικές δεξαμενές θα πρέπει να είναι σε συγκέντρωση άνω των 0,4 mg/L και να μην υπερβαίνει τα 0,7 mg/L. Επιπλέον, συνίσταται η εγκατάσταση ποδολουτήρων για πλύσιμο των ποδιών των κολυμβητών πριν τη χρήση της κολυμβητικής δεξαμενής. Στους ποδολουτήρες, πρέπει να περιέχεται υδατικό διάλυμα χλωρίου 0,3-0,6%.

Ορισμένα προτεινόμενα μέτρα για τη μείωση των αρνητικών επιδράσεων στην υγεία των χρηστών μιας κολυμβητικής δεξαμενής είναι: 1) η μείωση του συνολικού αριθμού των χρηστών, 2) η αποφυγή χρήσης της κολυμβητικής δεξαμενής από μικρά παιδιά που φορούν πάνες, 3) η σύσταση αποφυγής της κολύμβησης σε άτομα με συμπτώματα οξείας γαστρεντερίτιδας, 4) η αποφυγή κατάποσης νερού πισίνας και 5) η εκπαίδευση του κοινού για αποφυγή της ούρησης εντός της κολυμβητικής δεξαμενής και χρήση του ντους πριν από τη χρήση της πισίνας ή της δεξαμενής υδρομάλαξης (Stewart et al., 2002; ΚΕΕΛΠΝΟ, 2016; CDC, 2021c). Το ντους για διάρκεια μόλις 1 λεπτό απομακρύνει υπολείμματα ούρων και κοπράνων, ιδρώτα και καλλυντικά, συμβάλλοντας σε υψηλό βαθμό καθαρότητας του νερού της κολυμβητικής δεξαμενής και μειώνοντας την απαιτούμενη δόση απολυμαντικού (π.χ. χλώριο ή βρώμιο) για τη θανάτωση ή αδρανοποίηση των μικροοργανισμών (ΚΕΕΛΠΝΟ, 2016; CDC, 2021c).

Η μη συμμόρφωση των χρηστών στις απαγορεύσεις και τις συστάσεις των υπευθύνων της εγκατάστασης, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του οργανικού φορτίου στο νερό της δεξαμενής. Οι οργανικές ουσίες που εκκρίνονται από τους λουόμενους, οι οποίοι δεν τηρούν τους κανόνες υγιεινής, αντιδρούν με το χλώριο που εφαρμόζεται ως κύριο απολυμαντικό μέσο. Από την αντίδραση με το χλώριο παράγονται ανεπιθύμητα χλωριωμένα παραπροϊόντα, όπως τριαλογονομεθάνια, αλογονομένοι υδρογονάνθρακες, τα οποία επιδρούν αρνητικά στην ανθρώπινη υγεία και σχετίζονται με την πρόκληση άσθματος (AWWA 1990; Rigas et al., 1998; ΚΕΕΛΠΝΟ, 2016).

Τα παραπροϊόντα χλωρίωσης, θεωρούνται ύποπτες ενώσεις για την πρόκληση μακροπρόθεσμης τοξικότητας στον άνθρωπο. Για παράδειγμα, το χλωροφόρμιο είναι ενδεχομένως καρκινογόνο για τον άνθρωπο, καθώς κατατάσσεται στην Ομάδα 2B βάσει της ταξινόμησης του Διεθνούς Κέντρου Έρευνας για τον Καρκίνο (International Agency for Research on Cancer-IARC) (IARC, 2018).

Επιπροσθέτως, απαραίτητη είναι η διενέργεια καθαρισμού και πλυσίματος των φίλτρων της δεξαμενής με ανάστροφη ροή (Backwash). Αυτή η διαδικασία αφορά την αναστροφή της ροής του νερού από την πισίνα προς την αποχέτευση, με αποτέλεσμα την απομάκρυνση όλων των υπολειμμάτων και των επίμονων μολυσματικών παραγόντων που σχηματίζουν αποικίες και βιομεμβράνες στα φίλτρα. Διαρκεί μόλις λίγα λεπτά, έως ότου το νερό που εξέρχεται στην αποχέτευση να είναι διαυγές, οπότε στη συνέχεια η δεξαμενή πληρώνεται ξανά με νερό (Hallett Taylor, 2020). Μετά την πλήρωση της δεξαμενής, είναι απαραίτητη η συλλογή νέου δείγματος για μικροβιολογικό έλεγχο. Αν ανιχνευθεί ξανά ψευδομονάδα σε τιμές που υπερβαίνουν τα προτεινόμενα αποδεκτά όρια, η κολυμβητική δεξαμενή θα πρέπει να τεθεί εκτός λειτουργίας και να πραγματοποιηθεί άδειασμα, σχολαστικός καθαρισμός και απολύμανσή της. Στις δεξαμενές υδρομάλαξης προτείνονται αντίστοιχες επανορθωτικές ενέργειες: παύση λειτουργίας, εκκένωση, καθαρισμός, επαναπλήρωση με καθαρό νερό (WHO, 2006).

Οι Guida et al., (2009) σε διετή έρευνα που πραγματοποίησαν στην Νάπολη της Ιταλίας, εξέτασαν συνολικά 406 δείγματα νερού πισίνας (7 κολυμβητικές δεξαμενές εκ των οποίων οι 3 ήταν υδροθεραπείας και οι 4 αναψυχής). Η ψευδομονάδα ανιχνεύθηκε σε υψηλό ποσοστό αγγίζοντας το 23% για δείγματα νερού από δεξαμενές υδροθεραπείας και το 25% για τις κολυμβητικές δεξαμενές αναψυχής.

Στην έρευνά μας, η ψευδομονάδα ανιχνεύθηκε στο 12.3% των δειγμάτων. Μάλιστα, 2 από τα 8 δείγματα για τα οποία επιβεβαιώθηκε η παρουσία ψευδομονάδας τύπου A (δείγμα 294 και 353) προέρχονταν από την ίδια δεξαμενή υδροθεραπείας, ενός κέντρου αποθεραπείας και αποκατάστασης. Τα υψηλά ποσοστά θετικών δειγμάτων, πιθανότατα οφείλονται στο σχηματισμό biofilm στα συστήματα φίλτρανσης. Ορισμένοι φορείς, εξαιτίας της πανδημίας από το νέο στέλεχος Κορωνοϊού SARS-CoV-2 και το lockdown που ακολούθησε έως τον Μάιο του 2021, αποφάσισαν εξαιτίας της αναστολής λειτουργίας των εγκαταστάσεων να προχωρήσουν σε άδειασμα των δεξαμενών, με αποτέλεσμα να μην υπάρχει ανακυκλοφορία καθαρού νερού διαμέσου των φίλτρων, η οποία σε συνδυασμό με την έλλειψη τακτικής παρακολούθησης και συντήρησης των εγκαταστάσεων, δημιούργησε τις ευνοϊκές συνθήκες για την εμφάνιση και επικράτηση του μικροοργανισμού σε σημεία με στάσιμα νερά.

Η ικανότητα της ψευδομονάδας να δημιουργεί βιοϋμένια σε όλες τις επιφάνειες, ευνοεί την επιβίωσή της σε ύδατα που υφίστανται επεξεργασία, στα οποία η συγκέντρωση του ελεύθερου υπολειμματικού χλωρίου είναι μικρότερη από 1 mg/L. Σα μικροοργανισμός, παρουσιάζει μεγάλη αντοχή σε διεργασίες καθαρισμού του νερού με μηχανικά μέσα και στα συνήθη απολυμαντικά διαλύματα που εφαρμόζονται στις κολυμβητικές δεξαμενές (Guida et al., 2016). Σε νομοθεσίες αρκετών κρατών και κατευθυντήριες οδηγίες λαμβάνεται υπόψη ο κίνδυνος έξαρσης σοβαρών μολυσματικών ασθενειών, λόγω της παρουσίας του συγκεκριμένου μικροοργανισμού σε ύδατα αναψυχής και καθορίζονται κατάλληλα διαχειριστικά μέτρα (WHO, 2006; Health Canada, 2012; CDC, 2018).

Οι γλοιώδεις επικαθίσεις και οι βιομεμβράνες είναι απαραίτητο να απομακρύνονται με τακτικό καθαρισμό καθημερινά ή εβδομαδιαίως σε όλες τις δεξαμενές επίπλευσης/απομόνωσης (Floatation tanks), τις κολυμβητικές δεξαμενές, τις τσουλήθρες και όλους τους προσβάσιμους από επισκέπτες χώρους των εγκαταστάσεων. Για αυτό το λόγο, προτείνονται ημερήσιες υγειονομικές επιθεωρήσεις και εργασίες συντήρησης των εγκαταστάσεων (CDC, 2018). Παράλληλα, πέρα από τη διενέργεια τακτικών μικροβιολογικών ελέγχων, τη ρύθμιση του pH του νερού, την απολύμανσή του και τον καθαρισμό των εγκαταστάσεων, μεγάλη προσοχή εφιστάται στους επισκέπτες, των οποίων ο αριθμός εντός της

πισίνας πρέπει να είναι ελεγχόμενος, ενώ πριν την είσοδό τους στο νερό πρέπει να έχει προηγηθεί ντους (WHO, 2006).

Σε έρευνα των Guida et al., (2016) ελέγχθηκε η παρουσία ψευδομονάδας σε 9 κολυμβητικές δεξαμενές στη Νάπολη της Ιταλίας. Συνολικά, συλλέχθηκαν 126 δείγματα εκ των οποίων 67 (50.8%) ήταν θετικά ως προς την παρουσία της ψευδομονάδας, αλλά αρνητικά για *E. coli*. Η ικανότητα σχηματισμού βιομεμβρανών, εξετάστηκε με τη μέτρηση της οπτικής απορρόφησης των δειγμάτων στα 570 nm. Σε όλα τα θετικά δείγματα, τα απομονωμένα στελέχη παρουσίασαν μέτρια ή υψηλή ικανότητα σχηματισμού βιομεμβρανών ($OD_{570} = 0.7-1.2$).

Υπάρχουν τεχνολογίες ικανές να τροποποιήσουν τη φυσική κατάσταση του νερού, διαμορφώνοντας μη ευνοϊκές συνθήκες για την ανάπτυξη μικροοργανισμών. Ο σχηματισμός βιομεμβρανών εξαρτάται άμεσα από το βαθμό προσκόλλησης των μικροοργανισμών σε ένα υπόστρωμα, ο οποίος καθορίζεται σε ποσοστό έως 97% από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του υδάτινου μέσου. Αυτές οι τεχνολογίες βασίζονται σε φυσικά μοντέλα που έχουν αναπτυχθεί την τελευταία 20ετία, σύμφωνα με τα οποία τα σωματίδια του νερού απαντώνται σε δύο καταστάσεις, τη σταθερή/συνεκτική ή ασταθή/μη συνεκτική. Στη σταθερή κατάσταση, τα σωματίδια του νερού υπό την επίδραση των ηλεκτρομαγνητικών πεδίων κινούνται οργανωμένα στο χώρο και το χρόνο. Αντίθετα, στη μη συνεκτική κατάσταση η κίνησή τους είναι τυχαία και ανοργάνωτη.

Υλικά όπως το αλουμίνιο, το ασήμι και το γυαλί, δεν απορροφούν, αλλά αποδίδουν την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία από αρκετά μέτρα απόσταση στα σωματίδια του νερού, χρησιμοποιώντας ως περιβαλλοντικούς φορείς άλλα φυσικά πεδία (μαγνητικό πεδίο της Γης, κοσμικές ακτινοβολίες και τυπικές ηλεκτρομαγνητικές κινήσεις της ιονόσφαιρας). Αξιοποιώντας την ιδιότητα των συγκεκριμένων υλικών, στη μελέτη τους οι ερευνητές εξέτασαν την αποτελεσματικότητα μιας αντίστοιχης τεχνολογίας, του Quantum FreeBioEnergy©, (QFBE, FreeBioEnergy, Brisighella, Italy) που επιτρέπει στο νερό να αλληλεπιδράσει με βυθισμένες βιολογικές δομές και να τις καταστήσει ως ακατάλληλα μέσα για την επικράτηση και ανάπτυξη βακτηριακών αποικιών για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Τα αποτελέσματα έδειξαν αποτελεσματική μείωση της ανάπτυξης μικροοργανισμών και της ψευδομονάδας στην επιλεγμένη για την έρευνα κολυμβητική εγκατάσταση,

εξετάζοντας δείγματα νερού τα οποία λαμβάνονταν μηνιαίως. Παρόλα αυτά, ο περιορισμός της μόλυνσης του νερού δεν ήταν πάντα στατιστικά σημαντικός. Κρίνεται απαραίτητη η διενέργεια περισσότερων μελετών, προκειμένου να διαπιστωθεί κατά πόσο η συγκεκριμένη τεχνολογία μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτική απολυμαντική μέθοδος έναντι της υπερχλωρίωσης, εξασφαλίζοντας σημαντικά οφέλη για το κύκλωμα κυκλοφορίας του νερού, για τον έλεγχο της ανάπτυξης της ψευδομονάδας, αλλά και για την υγεία των κολυμβητών (Guida et al., 2016).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ε: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπερασματικά, ο κίνδυνος μικροβιακής μόλυνσης από ψευδομονάδα και πρόκλησης ασθενειών σε χρήστες κολυμβητικών δεξαμενών και δεξαμενών υδρομάλαξης, είναι περιορισμένος, εφόσον λαμβάνονται τα απαραίτητα μέτρα διαχείρισης της δεξαμενής (ορθή λειτουργία των φίλτρων, περιορισμένος αριθμός χρηστών, τακτική παρακολούθηση φυσικοχημικών παραμέτρων, συγκέντρωση υπολειμματικού απολυμαντικού). Οι δοκιμές για την εξέταση των υποχρεωτικών και των συνιστώμενων μικροβιολογικών παραμέτρων, είναι χρήσιμες για την παροχή πληροφοριών, αναφορικά με την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας των λαμβανόμενων μέτρων από τους αρμόδιους των εγκαταστάσεων και την αξιολόγηση της ανάγκης λήψης επιπρόσθετων μέτρων. Οι μικροβιολογικές παράμετροι είναι αναγκαίο να ελέγχονται σε τακτά χρονικά διαστήματα εβδομαδιαίως.

Τόσο από τις δύο ελληνικές μελέτες των Blougoura et al. (2012), Tirodimos et al. (2018), όσο και από την παρούσα εργασία, επισημαίνεται η ανάγκη αναθεώρησης της Υγειονομικής Διάταξης του 1973, καθώς και η συμπερίληψη της *Pseudomonas aeruginosa* ως υποχρεωτική εξεταζόμενη μικροβιολογική παράμετρο για τον προσδιορισμό της ποιότητας των υδάτων με στόχο την προστασία της υγείας των ευπαθών πληθυσμιακών ομάδων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΣΤ: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Γιαννάρας, Δ., (2018). *Διερεύνηση Λεγεωνέλλας*. https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2018/12/dierevnisi_legeonellas.pdf (Ανάκτηση 12/6/2021).
2. Εγκύκλιος Αριθ. πρωτ. Γ1δ/ΓΠ.οικ.57120, (24/7/2017). *Παρακολούθηση λειτουργίας κολυμβητικών δεξαμενών*. <https://www.moh.gov.gr/articles/health/dieythynsh-dhmosias-ygieinhs/ygieinh-periballontos/prostasia-roiiothtas-ydatwn/roiiothta-neroy-kolymbhtikwn-deksamenwn/4851-egkyklios-parakoloythsh-leitoyrgias-kolymbhtikwn-deksamenwn-24-7-2017?fdl=11935> (Ανάκτηση 18/7/2021).
3. Εγκύκλιος Αριθ. πρωτ. Δ1δ/ΓΠ.οικ.56075, (29/7/2019). *Πρόληψη της νόσου των Λεγεωναρίων*. <https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2019/01/egkiklios-legionella-2019.pdf> (Ανάκτηση 29/7/2021).
4. ΕΟΔΥ, Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας, (2021a). *Λεγιονέλλωση-Νόσος των Λεγεωναρίων*. <https://eody.gov.gr/disease/legionellosi/> (Πρόσβαση 12/6/2021).
5. ΕΟΔΥ, Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας, (2021b). *Σιγκέλλωση*. <https://eody.gov.gr/disease/sigkellosi/> (Πρόσβαση 13/6/2021).
6. ΕΛΙΝΥΑΕ, Ελληνικό Ινστιτούτο Υγιεινής και Ασφάλειας της Εργασίας, (2021). *Κολυμβητική δεξαμενή*. <https://www.elinyae.gr/lexeis-kleidia/kolymbitiki-dexameni> (Πρόσβαση 30/5/2021).
7. ΚΕΕΛΠΝΟ, (2016, Ιούλιος). *Ενημερωτικό Δελτίο του ΚΕΕΛΠΝΟ για το μήνα Ιούλιο, αφιερωμένο στη ποιότητα και ασφάλεια κολυμβητικών δεξαμενών*. Ιατρικός Σύλλογος Ρόδου: <http://www.isrodou.gr/images/18.09.2016.pdf> (Ανάκτηση 22/3/2021).
8. Μαυρίδου, Α., (1995). *Μικροβιολογία του υδάτινου περιβάλλοντος*. Αθήνα: Τραυλός.
9. Μαυρίδου, Α., Βανταράκης, Α., Ευστρατίου, Μ. Α., & Αρβανιτίδου-Βαγιωνά, Μ., (2014). *Μικροβιολογία και Επιδημιολογία Νερού: Θεωρία και Τεχνικές*. Αθήνα: Ιατρικές Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης.

10. Μπλουγουρά, Α., (2011). *Διερεύνηση της Υγειονομικής κατάστασης των ελληνικών κολυμβητηρίων*. Διπλωματική εργασία. ΠΜΣ Εφαρμοσμένη Δημόσια Υγεία και Περιβαλλοντική Υγιεινή, κατεύθυνση Ποιότητα και Ασφάλεια Τροφίμων και Υδάτων και Δημόσια Υγείας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής, Εργαστήριο Υγιεινής και Επιδημιολογίας.
11. Παππά, Ο., (2016). *Μοριακός Χαρακτηρισμός του πληθυσμού Pseudomonas aeruginosa που απομονώθηκε από υδάτινα περιβάλλοντα του Ελλαδικού χώρου*. Διδακτορική διατριβή. Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής. (Επιβλέπων: Γαλάνης Αλέξης).
12. ΣΕΕΠΥ, (2020). *Σχεδιασμός, Κατασκευή, Λειτουργία και Συντήρηση Κολυμβητικών Δεξαμενών Δημόσιας Χρήσης*. ΚΩΔΙΚΑΣ ΠΡΑΚΤΙΚΗΣ ΣΥΛΛΟΓΟΥ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΕΩΝ ΠΙΣΙΝΑΣ & ΥΔΡΟΜΑΣΑΖ (ΣΕΕΠΥ).
13. Algammal, A. M., Mabrok, M., Sivaramasamy, E. et al., (2020). Emerging MDR-*Pseudomonas aeruginosa* in fish commonly harbor *oprL* and *toxA* virulence genes and *blaTEM*, *blaCTX-M*, and *tetA* antibiotic-resistance genes. *Sci Rep*, 10, 15961 (2020). doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72264-4> (Ανάκτηση 11/11/2021).
14. Alico, R. K., & Dragonjac, M. F., (1986). Evaluation of culture media for recovery of *Staphylococcus aureus* from swimming pools. *Applied and Environmental Microbiology*, 51 (4), pp. 699-702. doi: [10.1128/aem.51.4.699-702.1986](https://doi.org/10.1128/aem.51.4.699-702.1986) (Ανάκτηση 12/7/2021).
15. Amagliani, G., Parlani, M. L., Brandi, G., Sebastianelli, G., Stocchi, V., & Schiavano, G. F., (2012). Molecular detection of *Pseudomonas aeruginosa* in recreational water. *International Journal of Environmental Health Research*, 22 (1), pp. 60-70. doi: <https://doi.org/10.1080/09603123.2011.588325> (Ανάκτηση 25/11/2021).
16. Amagliani, G., Schiavano, G. F., Stocchi, V., Bucci, G., & Brandi, G., (2013). Application of real-time PCR to *Pseudomonas aeruginosa* monitoring in a public swimming pool. *Microchemical Journal*, 110, pp. 656-659. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2013.08.001> (Ανάκτηση 4/6/2021).

17. AOCD, American Osteopathic College of Dermatology, (2021). *Hot Tub Folliculitis*. <https://www.aocd.org/page/HotTubFolliculitis> (Πρόσβαση 5/6/2021).
18. APHA, American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. (1998). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 20th Edition. Washington, D.C.: APHA-AWWA-WEF. (Ανάκτηση 13/3/2021).
19. AWWA, American Water Works Association, F.W. Pontius (1990). *Water Quality and Treatment, A Handbook of Community Water Supply*. 4th Edition. New York: McGraw-Hill Publishing Company.
20. Barben, J., Hafen, G., & Schmid, J., (2005). *Pseudomonas aeruginosa* in public swimming pools and bathroom water of patients with cystic fibrosis. *J Cystic Fibros*, 4, pp. 227-231. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2005.06.003> (Ανάκτηση 21/11/2021).
21. Barbier, F., Andremont, A., Wolff, M., & Bouadma, L., (2013). Hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia: recent advances in epidemiology and management. *Curr Opin Pulm Med*, 19 (3), pp. 216-228. doi: [10.1097/MCP.0b013e32835f27be](https://doi.org/10.1097/MCP.0b013e32835f27be) (Ανάκτηση 21/11/2021).
22. Barrett, C. E., Pape, B. J., Benedict, K. M., Foster, M. A., Roberts, V. A., Rotert, K., Mattioli, M. C., & Yoder, J. S., (2019). Impact of Public Health Interventions on Drinking Water-Associated Outbreaks of Hepatitis A - United States, 1971-2017. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report*, 68 (68), pp. 766-770. doi: [10.15585/mmwr.mm6835a4](https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6835a4) (Ανάκτηση 9/6/2021).
23. Betancourt, W. Q., & Rose, J. B., (2004). Drinking water treatment processes for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Vet. Parasitol.*, 126 (1-2), pp. 219-234. doi: [10.1016/j.vetpar.2004.09.002](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.09.002) (Ανάκτηση 13/8/2021).
24. Bilajac, L., Vukić Lušić, D., Doko Jelinić, J., & Rukavina, T., (2012). Microbiological and chemical indicators of water quality in indoor hotel swimming pools before and after training of swimming pool operators. *Journal of Water and Health*, 10 (1). pp. 108-115. doi: <https://doi.org/10.2166/wh.2011.125> (Ανάκτηση 9/8/2021).

25. Bioscience, BioScience Diagnostics Pte Ltd, (2021). *Food Safety - E. coli and Coliform*. <https://www.bioscience.com.sg/e-coli-and-coliform/> (Πρόσβαση 30/5/2021).
26. Blougoura, A., Smeti, E. & Mavridou, A., (2012). Sanitary surveillance of Greek swimming pools. *Hellenic Center for Disease Control and Prevention Newsletter*, 4, pp. 8-12.
27. Boehm, A. B., Sassoubre, L. M., (2014 February 5). *Enterococci as Indicators of Environmental Fecal Contamination*. In: Gilmore, M. S., Clewell, D. B., Ike, Y., et al., editors. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection [Internet]*. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190421/> (Πρόσβαση 6/7/2021).
28. Bollin, G. E., Plouffe, J. F., Para, M. F., & Hackman, B., (1985). Aerosols containing *Legionella pneumophila* generated by shower heads and hot-water faucets. *Applied and Environmental Microbiology*, 50 (5), pp. 1128-1131. doi: [10.1128/aem.50.5.1128-1131.1985](https://doi.org/10.1128/aem.50.5.1128-1131.1985) (Ανάκτηση 12/6/2021).
29. Borgmann-Strahsen, R., (2003). Comparative assessment of different biocides in swimming pool water. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51, pp. 291-297. doi: [10.1016/S0964-8305\(03\)00040-4](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(03)00040-4) (Ανάκτηση 14/8/2021).
30. Brackett, R. E., & Splittstoesser, D. L., (1992). Fruits and vegetables. In Vanderzant, C., & Splittstoesser, D. L. (Ed.). *Compendium for the Microbiological Examination of Food* (1st ed., pp. 287-293).
31. Brackett, R. E., (1993). Chapter 6-Microbial Quality. In Shewfelt, R. L. & Prussia, S. E. (Ed.). *Food Science and Technology, Postharvest Handling: A systems approach* (1st ed., pp. 125-148). Cambridge, Massachusetts: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-092576-9.50012-4> (Ανάκτηση 30/5/2021).
32. Breidenstein, E. B., de la Fuente-Nunez, C., & Hancock, R. E. W., (2011). *Pseudomonas aeruginosa* all roads lead to resistance. *Trends Microbiol*, 19 (8), pp. 419-426. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.04.005> (Ανάκτηση 18/11/2021).

33. Britannica, T. E., (2020, October 29). *Gram stain*. Encyclopaedia Britannica: <https://www.britannica.com/science/Gram-stain> (Ανάκτηση 28/5/2021).
34. Caldwell, G. G., Lindsey, N. J., Wulff, H., Donnelly, D. D., & Bohl, F. N., (1974). Epidemic of Adenovirus type 7 acute conjunctivitis in swimmers. *American Journal of Epidemiology*, 99 (3), pp. 230-234. doi: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a121607> (Ανάκτηση 11/6/2021).
35. Calvert, J., & Storey, A., (1988). Microorganisms in swimming pools – are you looking for the right one? *Journal of the Institution of Environmental Health Officers*, 96 (7), pp. 12.
36. Carmichael, N. G., Winder, C., Borges, S. H., Backhouse, B. L., & Lewis, P. D., (1982). Minireview: the health implications of water treatment with ozone. *Life Sciences*, 30 (2), pp. 117-129. doi: [10.1016/0024-3205\(82\)90643-9](https://doi.org/10.1016/0024-3205(82)90643-9) (Ανάκτηση 19/7/2021).
37. CDC, Centers for Disease Control and Prevention, (2001). Shigellosis outbreak associated with an unchlorinated fill-and-drain wading pool-Iowa. *MMWR*, 50 (37), pp. 797-800. PMID: 11785570. <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5037a1.htm> (Πρόσβαση 13/6/2021).
38. CDC, Centers for Disease Control and Prevention & HUD, U.S. Department of Housing and Urban Development (2006). *Healthy Housing Reference Manual*. Atlanta: US Department of Health and Human Services. <https://www.cdc.gov/nceh/publications/books/housing/cha14.htm> (Ανάκτηση 26/7/2021).
39. CDC, Centers for Disease Control and Prevention, (2018). *The Model Aquatic Health Code*. 3rd Edition. Atlanta, GA, USA: CDC.
40. CDC, Centers for Disease Control and Prevention, (2019, August 28). *Adenoviruses*. <https://www.cdc.gov/adenovirus/index.html> (Πρόσβαση 8/6/2021).
41. CDC, Centers for Disease Control and Prevention, (2020a, July 1). *Hot Tub Rash (Pseudomonas/Folliculitis)*.

- <https://www.cdc.gov/healthywater/swimming/swimmers/rwi/rashes.html>
(Πρόσβαση 5/6/2021).
42. CDC, Centers for Disease Control and Prevention, (2020b, September 29). *Parasites - Naegleria fowleri - Primary Amebic Meningoencephalitis (PAM) - Amebic Encephalitis*. <https://www.cdc.gov/parasites/naegleria/general.html>
(Πρόσβαση 11/6/2021).
43. CDC, Centers for Disease Control and Prevention, (2021a, March 5). *Norovirus*. <https://www.cdc.gov/adenovirus/index.html> (Πρόσβαση 8/6/2021).
44. CDC, Centers for Disease Control and Prevention, (2021b, March 25). *Legionella (Legionnaire's Disease and Pontiac Fever)*. <https://www.cdc.gov/legionella/about/index.html> (Πρόσβαση 12/6/2021).
45. CDC, Centers for Disease Control and Prevention, (2021c, April 14). *Diarrhea and Swimming*. <https://www.cdc.gov/healthywater/swimming/swimmers/rwi/diarrheal-illness.html>
(Πρόσβαση 28/5/2021).
46. Cheema, W. A., Kaarsholm, K. M. S. & Andersen, H. R., (2017). Combined UV treatment and ozonation for the removal of by-product precursors in swimming pool water. *Water Research*, 110, pp. 141-149. doi: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.12.008> (Ανάκτηση 14/8/2021).
47. Cheema, W. A., Andersen, H. R., Kaarsholm, K. M. S., (2018). Improved DBP elimination from swimming pool water by continuous combined UV and ozone treatment. *Water Research*, 147, pp. 214-222. doi: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.09.030> (Ανάκτηση 14/8/2021).
48. Cloteaux, A., Gérardin, F., & Midoux, N., (2013). Influence of Swimming Pool Design on Hydraulic Behavior: A Numerical and Experimental Study. *Engineering*, 5 (5), pp. 511-524. doi: [10.4236/eng.2013.55061](https://doi.org/10.4236/eng.2013.55061) (Ανάκτηση 10/8/2021).
49. CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute, (2013). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. Approved Standard M100-S23.

50. Cox, F. E. G., (2002). History of human parasitology. *Clinical Microbiology Reviews*, 15 (4), pp. 595-612. doi: [10.1128/CMR.15.4.595-612.2002](https://doi.org/10.1128/CMR.15.4.595-612.2002) (Ανάκτηση 11/6/2021).
51. Craun, G. F., Calderon, R. L., & Craun, M. F., (2005). Outbreaks associated with recreational water in the United States. *Int J Environ Health Res*, 15 (4), pp. 243-262. doi: [10.1080/09603120500155716](https://doi.org/10.1080/09603120500155716) (Ανάκτηση 21/11/2021).
52. Crone, P. B., & Tee, G. H., (1974). Staphylococci in swimming pool water. *Journal of Hygiene (London)*, 73 (2), pp. 213-220. doi: [10.1017/s0022172400024049](https://doi.org/10.1017/s0022172400024049) (Ανάκτηση 12/7/2021).
53. Curutiu, C., Iordache, F., Gurban, P., Lazar, V., & Chifiriuc, M. C., (2019). 14 - Main Microbiological Pollutants of Bottled Waters and Beverages. In Grumezescu, A. M., & Holban, A. M. (Ed.). *Bottled and Packaged Water* (1st ed., pp. 403-422). Cambridge, England: Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815272-0.00014-3> (Ανάκτηση 30/5/2021).
54. D'Angelo, L. J., et al., (1979). Pharyngoconjunctival fever caused by adenovirus type 4: report of a swimming pool-related outbreak with recovery of virus from pool water. *The Journal of Infectious Diseases*, 140 (1), pp. 42-47. doi: [10.1093/infdis/140.1.42](https://doi.org/10.1093/infdis/140.1.42) (Ανάκτηση 12/6/2021).
55. de Araujo, M. A., Guimaraes, V. F., Mendonca-Hagler, L. C. S., & Hagler, A. N., (1990). *Staphylococcus aureus* and faecal streptococci in fresh and marine waters of Rio de Janeiro, Brazil. *Revista de Microbiologia*, 21 (2), pp. 141-147.
56. Deplano, A., Denis, O., Poirel, L., Hocquet, D., Nonhoff, C., Byl, B., et al, (2005). Molecular characterization of an epidemic clone of panantibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol*, 43 (3), pp. 1198-1204. doi: [10.1128/JCM.43.3.1198-1204.2005](https://doi.org/10.1128/JCM.43.3.1198-1204.2005) (Ανάκτηση 19/11/2021).
57. De Vos D., Lim A., Pirnay J.P., Struelens M., Vandenvelde C., Duinslaeger L., Vanderkelen A., & Cornelis P., (1997). Direct detection and identification of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical samples such as skin biopsy specimens and expectorations by multiplex pcr based on two outer membrane lipoprotein genes,

- oprI* and *oprL*, *J Clin Microbiol*, 35 (6), pp. 1295-1299. doi: [10.1128/jcm.35.6.1295-1299.1997](https://doi.org/10.1128/jcm.35.6.1295-1299.1997) (Ανάκτηση 18/10/2021).
58. Diederens, B. M. W., (2008). *Legionella* spp. and Legionnaire's disease. *Journal of Infection*, 56 (1), pp. 1-12. doi: [10.1016/j.jinf.2007.09.010](https://doi.org/10.1016/j.jinf.2007.09.010) (Ανάκτηση 12/6/2021).
59. Dowd, M., (1994). Assessment of THM formation with MIOX. Master's Thesis, University of North Carolina, Chapel Hill, SC, USA.
60. Drenkard, E., (2003). Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect*, 5 (13), pp. 1213-1219. doi: [10.1016/j.micinf.2003.08.009](https://doi.org/10.1016/j.micinf.2003.08.009) (Ανάκτηση 18/11/2021).
61. Driscoll J. A., Brody S. L., & Kollef, M. H., (2007). The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs*, 67 (3), pp. 351-368. doi: [10.2165/00003495-200767030-00003](https://doi.org/10.2165/00003495-200767030-00003) (Ανάκτηση 18/11/2021).
62. Duerden, B. I., Reid, T. M. S., Jewsbury, J. M., & Turk, D. C., (1990). Microbial and parasitic infection. London, Edward Arnold, pp. 74-76.
63. DuPont, H. L., Chappell, C. L., Sterling, C. R., Okhuysen, P. C., Rose, J. B., & Jakubowski, W., (1995). The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *New England Journal of Medicine*, 332 (13), pp. 855-859. doi: [10.1056/NEJM199503303321304](https://doi.org/10.1056/NEJM199503303321304) (Ανάκτηση 9/6/2021).
64. ECDC, European Centre for Disease Prevention and Control, (2020, July 23). *Legionnaires' disease - Annual Epidemiological Report for 2018*. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/legionnaires-disease-annual-epidemiological-report-2018> & https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/AER_for_2018_Legionnaires.pdf (Ανάκτηση 13/6/2021).
65. Echavarría, M., (2004) Adenoviruses. In: Zuckerman, A. J., Banatvala, J. E., Pattison, J. R., Griffiths, P. D., Schoub, B. D. (Ed.). *Principles and Practice of Clinical Virology* (5th ed., pp. 343-360). Chichester, England: John Wiley & Sons, Ltd.

66. Ekowati, Y., (2019). *Protection of public health from microbial and chemical hazards in swimming pool environments*. Leiden, the Netherlands: CRC Press/Balkema. doi: [10.1201/9780429286261](https://doi.org/10.1201/9780429286261) (Ανάκτηση 13/3/2021).
67. EPA ,US Environmental Protection Agency, (1976). *Quality Criteria for Water (“Red Book”)*. Washington, DC: USEPA. <https://www.epa.gov/sites/production/files/2018-10/documents/quality-criteria-water-1976.pdf> (Ανάκτηση 30/5/2021).
68. EPA ,US Environmental Protection Agency, (1999). Wastewater Technology Fact Sheet - Ozone Disinfection. <https://www3.epa.gov/npdes/pubs/ozon.pdf> (Ανάκτηση 19/7/2021).
69. Esch, K. J.; & Petersen, C. A., (2013). Transmission and Epidemiology of Zoonotic Protozoal Diseases of Companion Animals. *Clinical Microbiology Reviews*, 26 (1), pp. 58-85. doi: [10.1128/CMR.00067-12](https://doi.org/10.1128/CMR.00067-12) (Ανάκτηση 11/6/2021).
70. Esterman, A., Roder, D. M., Cameron, A. S., Robinson, B. S., Walters, R. P., Lake, J. A. & Christy, P. E., (1984). Determinants of the microbiological characteristics of South Australian swimming pools. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47 (2), pp. 325-328. doi: <https://doi.org/10.1128/aem.47.2.325-328.1984> (Ανάκτηση 9/8/2021).
71. Faria, C., Vaz-Moreira, I., Serapicos, E., Nunes, O. C., & Manaia, C. M., (2009). Antibiotic resistance in coagulase negative staphylococci isolated from wastewater and drinking water. *Science of the Total Environment*, 407, 3876-3882. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.02.034> (Ανάκτηση 22/3/2021).
72. Favero, M. S., Drake, C. H., & Randall, G. B., (1964). Use of staphylococci as indicators of swimming pool pollution. *Public Health Reports*, 79, pp. 61-70. doi: <https://doi.org/10.2307/4592053> (Ανάκτηση 12/7/2021).
73. Fewtrell, L., (2014). *Silver: water disinfection and toxicity*. Geneva: Centre for Research into Environment and Health, World Health Organization. https://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/Silver_water_disinfection_toxicity_2014V2.pdf (Ανάκτηση 14/8/2021).

74. Fields, B. S., Benson, R. F., & Besser, R. E., (2002). *Legionella* and Legionnaire's Disease: 25 Years of Investigation. *Clinical Microbiology Reviews*, 15 (3), pp. 506-526. doi: [10.1128/CMR.15.3.506-526.2002](https://doi.org/10.1128/CMR.15.3.506-526.2002) (Ανάκτηση 12/6/2021).
75. Fiore, A. E., (2004). Hepatitis A transmitted by food. *Clinical Infectious Diseases*, 38 (5), pp. 705–715. doi: <https://doi.org/10.1086/381671> (Ανάκτηση 9/6/2021).
76. Fiorillo, L., Zucker, M., Sawyer, D., & Lin, A. N., (2001). The Pseudomonas Hot-Foot Syndrome. *The New England Journal of Medicine*, 345, pp. 335-338. <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejm200108023450504> (Ανάκτηση 5/6/2021).
77. Fogarty, L. R., Haack, S. K., Johnson, H. E., Brennan, A. K., Isaacs, N. M., & Spencer, C., (2015). *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) at ambient freshwater beaches. *J. Water Health*, 13 (3), pp. 680-692. doi: <https://doi.org/10.2166/wh.2014.278> (Ανάκτηση 12/7/2021).
78. Foy, H. M., Cooney, M. K., & Hatlen, J. B., (1968). Adenovirus type 3 epidemic associated with intermittent chlorination of a swimming pool. *Archives of Environmental Health*, 17 (5), pp. 795-802. doi: [10.1080/00039896.1968.10665321](https://doi.org/10.1080/00039896.1968.10665321) (Ανάκτηση 11/6/2021).
79. Gebel Berg, E., (2015, April 28). *A New Spin On The Old Gram Stain*. Chemical & Engineering News: <https://cen.acs.org/articles/93/web/2015/04/New-Spin-Old-Gram-Stain.html> (Ανάκτηση 28/5/2021).
80. Goldberg, J. B., (2000). Pseudomonas: global bacteria. *Trends in Microbiology*, 8, pp. 55-57. doi: [10.1016/s0966-842x\(99\)01671-6](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(99)01671-6) (Ανάκτηση 4/6/2021).
81. Goodwin, K., D., McNay, M., Cao, Y., Ebentier, D., Madison, M., & Griffith J., F., (2012). A multi-beach study of *Staphylococcus aureus*, MRSA, and enterococci in seawater and beach sand. *Water Research*, 46 (13), pp. 4195-4207. doi: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.04.001> (Ανάκτηση 12/7/2021).
82. Gordon, G., Sweetin, D. L., Smith, K., & Pacey, G. E., (1991). Improvements in the N,N-diethyl-p-phenylenediamine method for the determination of free and combined residual chlorine through the use of FIA. *Talanta*, 38 (2), pp. 145-149. doi: [10.1016/0039-9140\(91\)80122-g](https://doi.org/10.1016/0039-9140(91)80122-g) (Ανάκτηση 18/7/2021).

83. Grabow, W. O. K., (1991) New trends in infections associated with swimming pools. *Water SA*, 17 (2), pp. 173-177.
84. Graczyk, T. K., Sunderland, D., Tamang, L., Lucy, F. E., & Breysee, P. N., (2007). Bather density and levels of *Cryptosporidium*, *Giardia*, and pathogenic microsporidian spores in recreational bathing water. *Parasitol Res*, 101, pp. 1729-1731. doi: [10.1007/s00436-007-0734-1](https://doi.org/10.1007/s00436-007-0734-1) (Ανάκτηση 28/5/2021).
85. Greensmith, C. T., Stanwick, R. S., Elliot, B. E., & Fast, M. V., (1988). Giardiasis associated with the use of a water slide. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 7 (2), pp. 91-94. doi: [10.1097/00006454-198802000-00005](https://doi.org/10.1097/00006454-198802000-00005) (Ανάκτηση 11/6/2021).
86. Guerrant, G. L., (1997). Cryptosporidiosis: an emerging, highly infectious threat. *Emerg Infect Dis*, 3, pp. 51-57. doi: [10.3201/eid0301.970106](https://doi.org/10.3201/eid0301.970106) (Ανάκτηση 9/6/2021).
87. Guida, M., Gallè, F., Mattei, M. L., Anastasi, D., & Liguori, G., (2009). Microbiological quality of the water of recreational and rehabilitation pools: a 2-year survey in Naples, Italy. *Public Health*, 123, pp. 448-451. doi: <https://doi.org/10.1016/j.puhe.2009.03.008> (Ανάκτηση 4/6/2021).
88. Guida, M., Di Onofrio, V., Gallè, F., Gesuele, R., Valeriani, F., Liguori, R., Romano Spica, V., & Liguori, G., (2016). *Pseudomonas aeruginosa* in Swimming Pool Water: Evidences and Perspectives for a New Control Strategy. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13 (919). doi: [10.3390/ijerph13090919](https://doi.org/10.3390/ijerph13090919) (Ανάκτηση 4/6/2021).
89. Hadjichristodoulou, C., Gkikas, A., Peditidis, Y., & Tselentis, Y., (1998). Outbreak of giardiasis among English tourists in Crete. *Lancet*, 351 (9095), pp. 65-66. doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)78057-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)78057-0) (Ανάκτηση 11/6/2021).
90. Hajdu, A., Vold, L., Østmo, T. A., Helleve, A., Helgebostad, S. R., Krogh, T., Robertson, L., de Jong, B., & Nygård, K., (2008). Investigation of Swedish cases reveals an outbreak of cryptosporidiosis at a Norwegian hotel with possible links

- to in-house water systems. *BMC Infectious Diseases*, 8 (152). doi: [10.1186/1471-2334-8-152](https://doi.org/10.1186/1471-2334-8-152) (Ανάκτηση 9/6/2021).
91. Halkman, H. B. D., & Halkman, A. K., (2014). Indicator Organisms. In Batt, C. A., & Tortorello, M. L. (Ed.). *Encyclopedia of Food Microbiology* (2nd ed., pp. 358-362). Cambridge, Massachusetts: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00396-7> (Ανάκτηση 30/5/2021).
92. Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., & Stoodley, P., (2004). Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2 (2), pp. 95-108. doi: [10.1038/nrmicro821](https://doi.org/10.1038/nrmicro821) (Ανάκτηση 21/11/2021).
93. Hallett Taylor, L., (2020, August 8). *What Is Backwash or Backwashing? Swimming Pool Maintenance*. The Spruce. <https://www.thespruce.com/how-to-backwash-a-pool-2736842> (Πρόσβαση 4/6/2021).
94. Hansen, K. M. S., Spiliotopoulou, A., Cheema, W. A., & Andersen, H. R., (2016). Effect of ozonation of swimming pool water on formation of volatile disinfection by-products - A laboratory study. *Chem. Eng. J.*, 289, pp. 277-285. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.12.052> (Ανάκτηση 13/8/2021).
95. Harter, L., Frost, F., Grunenfelder, G., Perkins-Jones, K., & Libby, J., (1984). Giardiasis in an infant and toddler swim class. *American Journal of Public Health*, 74 (2), pp. 155-156. doi: <https://doi.org/10.2105/AJPH.74.2.155> (Ανάκτηση 11/6/2021).
96. Health Canada, (2012). *Guidelines for Canadian Recreational Water Quality*. 3rd Edition. Ottawa, Canada: Health Canada.
97. Helmy, M. M., & Wasfi, R., (2014). Phenotypic and Molecular Characterization of Plasmid Mediated AmpC β -Lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., and *Proteus mirabilis* Isolated from Urinary Tract Infections in Egyptian Hospitals. *BioMed Research International*, Volume 2014, Article ID 171548, pp. 1-8. doi: <https://doi.org/10.1155/2014/171548> (Ανάκτηση 1/11/2021).
98. Hijnen, W. A. M., Beerendonk, E. F., & Medema, G. J., (2006). Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: A

- review. *Water Res.*, 40 (1), pp. 3-22. doi: [10.1016/j.watres.2005.10.030](https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.10.030) (Ανάκτηση 14/8/2021).
99. Hlavsa, M. C., Roberts, V. A., Kahler, A. M.; Hilborn, E. D., Mecher, T. R., Beach, M. J., Wade, T. J., & Yoder, J. S., (2015, June 26). Outbreaks of Illness Associated with Recreational Water — United States, 2011-2012. *MMWR*, 64 (24), pp. 668-672.
<https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6424a4.htm>
(Πρόσβαση 22/11/2021).
100. Hunter, P. R., (1993). The microbiology of bottled natural mineral waters. *Journal of Applied Bacteriology*, 74, pp. 345–52. doi: [10.1111/j.1365-2672.1993.tb05137.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1993.tb05137.x) (Ανάκτηση 4/6/2021).
101. Hunter, P. R., (1997) Adenoviral infections. *Waterborne disease: Epidemiology and Ecology*. pp. 240. Chichester, England: John Wiley & Sons.
102. IARC, International Agency for Research on Cancer, (2018). Agents Classified by the IARC Monographs, Volume 1-123.
<https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/09/ClassificationsAlphaOrder.pdf> (Ανάκτηση 28/5/2021).
103. Ikonomidis, A., Tsakris, A., Kantzanou, M., Spanakis, N., Maniatis, A. N., & Pournaras, S., (2008). Eflux system overexpression and decreased OprD contribute to the carbapenem heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett*, 279 (1), pp. 36-39. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00997.x> (Ανάκτηση 18/11/2021).
104. Ilyas, H., Ilyas, M., & van der Hoek, J. P., (2018). Disinfection Methods for Swimming Pool Water: Byproduct Formation and Control. *Water*, 10 (6), 797. doi: <https://doi.org/10.3390/w10060797> (Ανάκτηση 19/7/2021).
105. Jacoby, G. A., (2009). AmpC β -Lactamases. *Clin Microbiol Rev*, 22 (1), pp. 161-182. doi: [10.1128/CMR.00036-08](https://doi.org/10.1128/CMR.00036-08) (Ανάκτηση 22/11/2021).
106. James, W. D., Berger, T. G., Elston, D. M., & Odom, R. B., (2006). *Andrews' diseases of the skin: clinical dermatology* (10th ed.). Philadelphia: Saunders Elsevier.

107. Joce, R. E., Bruce, J., Kiely, D., Noah, N. D., Dempster, W. B., Stalker, R., Gumsley, P., Chapman, P. A., Norman, P., Watkins, J., Smith, H. V., Price, T. J., & Watts, D., (1991). An outbreak of cryptosporidiosis associated with a swimming pool. *Epidemiol. Infect.* 107, pp. 497-508. doi: <https://doi.org/10.1017/S0950268800049190> (Ανάκτηση 9/6/2021).
108. Kadlec, V., Skvářová, J., Cerva, L., & Nebáznivá, D., (1980). Virulent *Naegleria fowleri* in indoor swimming pool. *Folia Parasitologica*, 27 (1), pp. 11-17. PMID: 7364343. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7364343/> (Ανάκτηση 11/6/2021).
109. Karanis, P., Papadopoulou, C., Kimura, A., Economou, E., Kourenti, C., & Sakkas, H., (2002). *Cryptosporidium* and *Giardia* in Natural, Drinking, and Recreational Water of Northwestern Greece. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, 30 (1), pp. 49-58. doi: [0.1002/1522-401X\(200207\)30:1<49::AID-AHEH49>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/1522-401X(200207)30:1<49::AID-AHEH49>3.0.CO;2-R) (Ανάκτηση 9/6/2021).
110. Karanis, P., Kourenti, C., & Smith, H., (2007). Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *J Water Health*, 5, pp. 1-38. doi: [10.2166/wh.2006.002](https://doi.org/10.2166/wh.2006.002) (Ανάκτηση 9/6/2021).
111. Karch, H., Tarr, P. I., & Bielaszewska, M., (2005). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. *International Journal of Medical Microbiology*, 295 (6-7), pp. 405-418. doi: [10.1016/j.ijmm.2005.06.009](https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2005.06.009) (Ανάκτηση 13/6/2021).
112. Katz, D. E., Heisey-Grove, D., Beach, M., Dicker, R. C., & Matyas, B. T., (2006). Prolonged outbreak of giardiasis with two modes of transmission. *Epidemiology and Infection*, 134 (5), pp. 935-941. doi: [10.1017/S0950268805005832](https://doi.org/10.1017/S0950268805005832) (Ανάκτηση 11/6/2021).
113. Kay, D., Fleisher, J. M., Salmon, R. L., Jones, F., Wyer, M. D., Godfree, A. F., Zelenauch-Jacquotte, Z., & Shore, R., (1994). Predicting likelihood of gastroenteritis from sea bathing: results from randomized exposure. *The Lancet*, 344 (8927), pp. 905-909. doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(94\)92267-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(94)92267-5) (Ανάκτηση 5/7/2021).

114. Keemer, N. M., & Miskovsky, E. P., (2000). Hepatitis A. *Infectious Disease clinics of North America*, 14 (3), pp. 605-615. doi: [10.1016/s0891-5520\(05\)70123-9](https://doi.org/10.1016/s0891-5520(05)70123-9) (Ανάκτηση 9/6/2021).
115. Kimata, N., et al., (2004). *Pseudomonas aeruginosa* isolated from marine environments in Tokyo bay. *Microbial Ecology*, 47, pp. 41-47. doi: [10.1007/s00248-003-1032-9](https://doi.org/10.1007/s00248-003-1032-9) (Ανάκτηση 4/6/2021).
116. Kittinger, C., Lipp, M., Baumert, R., Folli, B., Koraimann, G., Toplitsch, D., Liebmann, A., Grisold, A. J., Farnleitner, A. H., Kirschner, A., & Zarfel, G., (2016). Antibiotic resistance patterns of *Pseudomonas* spp. isolated from the River Danube. *Front. Microbiol.*, 7:586. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00586> (Ανάκτηση 19/11/2021).
117. Klockgether, J., Cramer, N., Wiehlmann, L., Davenport, C. F., & Tummeler, B., (2011). *Pseudomonas aeruginosa* Genomic Structure and Diversity. *Front Microbiol*, 2, 150. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00150> (Ανάκτηση 19/11/2021).
118. Kummerer, K., (2009). Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. *Chemosphere*, 75 (4), pp. 417-434. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.11.086> (Ανάκτηση 18/11/2021).
119. Landeen, L. K., Yayha, M. T., Kutz, S. M., & Gerba, C. P., (1989). Microbiological evaluation of copper:silver disinfection units for use in swimming pools. *Water Science and Technology*, 21 (3), pp. 267-270. doi: <https://doi.org/10.2166/wst.1989.0115> (Ανάκτηση 14/8/2021).
120. Laudy, A. E., Rog, P., Smolinska-Krol, K., Cmiel M., Sloczynska, A., Patzer J., et al., (2017). Prevalence of ESBL-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Warsaw, Poland, detected by various phenotypic and genotypic methods. *PLoS ONE*, 12 (6), e0180121. doi: [10.1371/journal.pone.0180121](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180121) (Ανάκτηση 21/11/2021).
121. Lebaron, P., Henry, A., Lepeuple, A. S., Pena, G., & Servais, P., (2005). An operational method for the real-time monitoring of *E. coli* numbers in bathing

- waters. *Marine Pollution Bulletin*, 50, pp. 652–659. doi: [10.1016/j.marpolbul.2005.01.016](https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2005.01.016) (Ανάκτηση 30/5/2021).
122. Lenntech, 2021. “Disinfectants Copper-silver ionization”. <https://www.lenntech.com/processes/disinfection/chemical/disinfectants-copper-silver-ionization.htm> (Πρόσβαση 14/8/2021)
123. Leoni, E., Legnani, P., Guberti, E. & Masotti, A., (1999). Risk of infection associated with microbiological quality of public swimming pools in Bologna, Italy. *Public Health*, 113, pp. 227-232. doi: [10.1038/sj.ph.1900569](https://doi.org/10.1038/sj.ph.1900569) (Ανάκτηση 4/6/2021).
124. Leoni, E., Legnani, P. P., Bucci Sabattini, M. A., & Righi, F., (2001). Prevalence of *Legionella* spp. in swimming pool environment. *Water Research*, 35 (15), pp. 3749-3753. doi: [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00075-6](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00075-6) (Ανάκτηση 12/6/2021).
125. Li, H., Luo, Y. F., Williams, B. J., Blackwell, T. S., & Xie, C. M., (2012). Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: from antibiotic resistance to novel therapies. *Int J Med Microbiol*, 302 (2), pp. 63-68. doi: [10.1016/j.ijmm.2011.10.001](https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.10.001) (Ανάκτηση 18/11/2021).
126. Li, D., & Liu, S., (2019). Chapter 12-Water quality monitoring in aquaculture. In Li, D., & Liu, S. (Ed.). *Water quality monitoring and management: Basis, technology and case studies* (1st ed., pp. 303-328). Cambridge, Massachusetts: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811330-1.00012-0> (Ανάκτηση 30/5/2021).
127. Lippman, M, (1989). Health effects of ozone, a critical review. *JAPCA*, 39 (5), pp. 672-695. doi: <http://dx.doi.org/10.1080/08940630.1989.10466554> (Ανάκτηση 19/7/2021).
128. Lister, P. D., Wolter, D. J., & Hanson, N. D., (2009). Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev*, 22, pp. 582-610. doi: [10.1128/CMR.00040-09](https://doi.org/10.1128/CMR.00040-09) (Ανάκτηση 18/11/2021).

129. Livermore, D. M., (2002). Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare?, *Clinic Infect Dis*, 34 (5), pp. 634-640. doi: [10.1086/338782](https://doi.org/10.1086/338782) (Ανάκτηση 25/10/2021).
130. Lugo, J. L., Lugo, E. R., & de la Puente, M., (2021). A systematic review of microorganisms as indicators of recreational water quality in natural and drinking water systems. *Journal of Water and Health*, 19 (1), pp. 20-28. <https://doi.org/10.2166/wh.2020.179> (Ανάκτηση 8/6/2021).
131. Ma, L., Conover, M., Lu, H., Parsek, M. R., Bayles, K., & Wozniak, D. J., (2009). Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PLoS Pathogens*, 5 (3), e1000354. doi: [10.1371/journal.ppat.1000354](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000354) (Ανάκτηση 21/11/2021).
132. Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J., (2003). *BROCK: Βιολογία των μικροοργανισμών (Τόμος I)*. 1η έκδοση. Αθήνα: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
133. Maini, R., Nalk, F., Harrison, T. G., Mentasti, M., Spala, G., Velonakis, E., Hadjichristodoulou, C., de Jong, B., Vatopoulos, A., & Phin, N., (2012). Travel-associated Legionnaires' disease in residents from England and Wales travelling to Corfu, Greece, August to October 2011. *Euro Surveill.*, 17 (32), 20240. doi: <https://doi.org/10.2807/ese.17.32.20240-en> (Ανάκτηση 13/6/2021).
134. Mah, T. F., Pitts, B., Pellock, B., Walker, G. C., Stewart, P. S., & O'toole, G. A., (2003). A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature*, 426 (6964), pp. 306-310. doi: [10.1038/nature02122](https://doi.org/10.1038/nature02122) (Ανάκτηση 21/11/2021).
135. Mahoney, F. J., Farley, T. A., Kelso, K. Y., Wilson, S. A., Horan, J. M., & McFarland, L. M., (1992). An outbreak of hepatitis A associated with swimming in a public pool. *The Journal of Infectious Diseases*, 165 (4), pp. 613-618. doi: [10.1093/infdis/165.4.613](https://doi.org/10.1093/infdis/165.4.613) (Ανάκτηση 11/6/2021).
136. Marrie, T. J. (2009). *Legionella*: Molecular Microbiology. *Emerging Infectious Diseases*, 15 (1), 139. doi: <https://doi.org/10.3201/eid1501.081248> (Ανάκτηση 12/6/2021).

137. Martins, M. T., Sato, M. I. Z., Alves, M. N., Stoppe, N. C., Prado, V. M., & Sanchez, P. S., (1995). Assessment of microbiological quality for swimming pools in South America. *Water Research*, 29 (10), pp. 2417-2420. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(95\)00063-Q](https://doi.org/10.1016/0043-1354(95)00063-Q) (Ανάκτηση 28/5/2021).
138. Martone, W. J., Hierholzer, J. C., Keenlyside, R. A., Fraser, D.W., D'Angelo, L. J., & Winkler, W. G., (1980). An outbreak of adenovirus type 3 disease at a private recreation center swimming pool. *American Journal of Epidemiology*, 111 (2), pp. 229-237. doi: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a112890> (Ανάκτηση 11/6/2021).
139. Masoud, G., Abbass, A., Abaza, A., & Hazzah, W., (2016). Bacteriological quality of some swimming pools in Alexandria with special reference to *Staphylococcus aureus*. *Environ Monit Assess*, 188, 412. doi: <https://doi.org/10.1007/s10661-016-5427-8> (Ανάκτηση 12/7/2021).
140. McAnulty, J. M., Fleming, D. W., & Gonzalez, A. H., (1994). A community-wide outbreak of cryptosporidiosis associated with swimming at a wave pool. *JAMA*, 272 (20), pp. 1597-1600. PMID: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7966870/> (Ανάκτηση 9/6/2021).
141. Morgan-Ryan U. M., Fall, A., Ward, L. A., Hijjawi, N., Sulaiman, I., Fayer, R., Thompson, R. C. A., Olson, M., Lal, A., & Xiao, L., (2002). *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from Homo sapiens. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 49 (6), pp. 433-440. doi: [10.1111/j.1550-7408.2002.tb00224.x](https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2002.tb00224.x) (Ανάκτηση 11/6/2021).
142. Moreau-Marquis, S., Stanton, B. A., & O'Toole, G. A., (2008). *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation in the cystic fibrosis airway. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 21 (4), pp. 595-599. doi: [10.1016/j.pupt.2007.12.001](https://doi.org/10.1016/j.pupt.2007.12.001) (Ανάκτηση 21/11/2021).
143. Moresco, V., Viancelli, A., Nascimento, M. A., Souza, D. S. M., Ramos, A. P. D., Garcia, L. A. T., Simoes, C. M. O. & Barardi, C. R. M., (2012). Microbiological and physicochemical analysis of the coastal waters of southern Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, 64 (1), pp. 40-48. doi: [10.1016/j.marpolbul.2011.10.026](https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.10.026) (Ανάκτηση 8/6/2021).

144. Morgan-Ryan, U. M., Fall, A., Ward, L. A., Hijjawi, N., Sulaiman, I., Fayer, R., Andrew Thompson, A., Olson, M., Lal, A., & Xiao, L., (2002). *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 49 (6), pp. 433-440. doi: [10.1111/j.1550-7408.2002.tb00224.x](https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2002.tb00224.x) (Ανάκτηση 9/6/2021).
145. Murray, T. S., Egan, M., & Kazmierczak, B. I., (2007). *Pseudomonas aeruginosa* chronic colonization in cystic fibrosis patients. *Current Opinion in Pediatrics*, 19 (1), pp. 83-88 .doi: [10.1097/MOP.0b013e3280123a5d](https://doi.org/10.1097/MOP.0b013e3280123a5d) (Ανάκτηση 21/11/2021).
146. Muruganandham, M., Suri, R. P. S., Jafari, Sh., Sillanpää, M., Lee, G. J., Wu, J. J., & Swaminathan, M., (2014). Recent Developments in Homogeneous Advanced Oxidation Processes for Water and Wastewater Treatment. *International Journal of Photoenergy*, 2014, 821674. doi: <https://doi.org/10.1155/2014/821674> (Ανάκτηση 14/8/2021).
147. Nelson, N. P., Weng, M. K., Hofmeister, M. G., et al., (2020). Prevention of Hepatitis A Virus Infection in the United States: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices. *MMWR Recomm Rep* 2020; 69 (No. RR-5): pp. 1–38. doi: [http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.rr6905a1external icon](http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.rr6905a1external_icon) (Ανάκτηση 9/6/2021).
148. Nikaeen, M., Hatamzadeh, M., Vahid Dastjerdi, M., & Hassanzadeh, A., (2009). Predictive indicators of the safety of swimming pool waters. *Water Science & Technology*, 60, (12), pp. 3101-3107. <https://doi.org/10.2166/wst.2009.746> (Ανάκτηση 22/3/2021).
149. Omarova, A., Tussupova, K., Berndtsson, R., Kalishev, M., & Sharapatova, K., (2018). Protozoan Parasites in Drinking Water: A System Approach for Improved Water, Sanitation and Hygiene in Developing Countries. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15 (3): 495. doi: [10.3390/ijerph15030495](https://doi.org/10.3390/ijerph15030495) (Ανάκτηση 10/6/2021).
150. Oram, B., (2020). *Fecal coliform bacteria in water*. Water Research Center. <https://www.water-research.net/index.php/fecal-coliform-bacteria-in-water> (Πρόσβαση 30/5/2021).

151. Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T. J., & Cheng, Z., (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances*, 37, pp. 177-192. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013> (Ανάκτηση 18/11/2021)
152. Papadakis, A., Chochlakis, D., Sandalakis, V., Keramarou, M., Tselentis, Y., & Psaroulaki, A., (2018). *Legionella* spp. Risk Assessment in Recreational and Garden Areas of Hotels. *International Journal of Environmental Research Public Health*, 15 (4), 598. doi: <https://doi.org/10.3390/ijerph15040598> (Ανάκτηση 12/6/2021).
153. Papadopoulou, C., Economou, V., Sakkas, H., Gousia, P., Giannakopoulos, X., Dontorou, C. Filioussis, G., Gessouli, H., Karanis, P., & Leveidiotou, S., (2008). Microbiological quality of indoor and outdoor swimming pools in Greece: investigation of the antibiotic resistance of the bacterial isolates. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, 211, pp. 385-397. doi: [10.1016/j.ijheh.2007.06.007](https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2007.06.007) (Ανάκτηση 4/6/2021).
154. Papapetropoulou, M., & Vantarakis, A. C., (1998) Detection of adenovirus outbreak at a municipal swimming pool by nested PCR amplification. *Journal of Infection*, 36 (1), pp. 101-103. doi: [https://doi.org/10.1016/S0163-4453\(98\)93414-4](https://doi.org/10.1016/S0163-4453(98)93414-4) (Ανάκτηση 11/6/2021).
155. Pappa, O., Mandilara, G., Michalopoulou, D., & Vatopoulos, A., (2017). Assessment of swimming pools in the light of new pool and spa regulations in Greece. *7th Swimming Pool and Spa International Conference, Kos, Greece (oral presentation)*.
https://8thswimspaspa.sciencesconf.org/data/pages/swimming_pool_spa_7th_international_conference_kos_island_greece_may_2017_book_of_abstracts_plus_program_compressed_1.pdf (Ανάκτηση 26/11/2021).
156. Paradh, A. D., (2015). 8 - Gram-negative spoilage bacteria in brewing. In Hill, A. E. (Ed.). *Brewing Microbiology: Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste. A volume in Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition* (1st ed., pp. 175-194). Cambridge, England: Woodhead

- Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-331-7.00008-3> (Ανάκτηση 30/5/2021).
157. Pereira, S.G., Paixao, J., Leitao, R. & Cardoso, O., (2011). *Pseudomonas aeruginosa* in a hydrophobic facility: diversity, susceptibility and imipenem resistance mutation. *Let Appl Microbiol*, 53 (5), pp. 518-524. doi: [10.1111/j.1472-765X.2011.03139.x](https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03139.x) (Ανάκτηση 19/11/2021).
158. Piscinity, 2021. “Τρόποι απολύμανσης του νερού πισίνας”. <https://piscinity.com/el/προιοντα-πισινας/τροποι-απολυμανσης-του-νερου-πισινας> (Πρόσβαση 17/7/2021).
159. Podewils, L. J., Zanardi, Blevins, L., Hagenbuch, M., Itani, D., Burns, A., Otto, C., Blanton, L., Adams, S., Monroe, S. S., Beach, M. J., & Widdowson, M., (2006). Outbreak of norovirus illness associated with a swimming pool. *Epidemiol. Infect.*, 135, pp. 827–833. doi: [10.1017/S0950268806007370](https://doi.org/10.1017/S0950268806007370) (Ανάκτηση 8/6/2021).
160. Price, D., & Ahearn, D. G., (1988). Incidence and persistence of *Pseudomonas aeruginosa* in whirlpools. *J Clin Microbiol*, 26, pp. 1650-1654. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC266689/> (Ανάκτηση 4/6/2021).
161. Quick, J., Cumley, N., Wearn, C. M., Niebel, M., Constantinidou, C., Thomas C. M. et al., (2014). Seeking the source of *Pseudomonas aeruginosa* infections in a recently opened hospital: an observational study using whole-genome sequencing. *BMJ Open*, 4 (11), e0062784. doi: [10.1136/bmjopen-2014-006278](https://doi.org/10.1136/bmjopen-2014-006278) (Ανάκτηση 19/11/2021).
162. Rabi, A., Khader, Y., Alkafajei, A., & Abu Aqoulah, A., (2008). Sanitary conditions of public swimming pools in Amman, Jordan. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2008, 5 (3), pp. 152-157. doi: <https://doi.org/10.3390/ijerph5030152> (Ανάκτηση 9/8/2021).
163. Ranellou, K., Kadlec, K., Poulou, A., Voulgari, E., Vrioni, G., Schwarz, S., & Tsakris, A., (2012). Detection of *Pseudomonas aeruginosa* isolates of the international clonal complex 11 carrying the blaPER-1 extended-spectrum β-

- lactamase gene in Greece. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67 (2), pp. 357-361. doi: <https://doi.org/10.1093/jac/dkr471> (Ανάκτηση 1/11/2021).
164. Ratnam, S., Hogan, K., March, S. B., & Butler, R. W., (1986). Whirlpool-associated folliculitis caused by *Pseudomonas aeruginosa*: report of an outbreak and review. *J Clin Microbiol*, 23, pp. 655-659. doi: [10.1128/jcm.23.3.655-659.1986](https://doi.org/10.1128/jcm.23.3.655-659.1986) (Ανάκτηση 4/6/2021).
165. Rigas, F., Mavridou, A., & Zacharopoulos, A., (1998). Water quality of swimming pools in Athens area. *International Journal of Environmental Health Research*, 8, pp. 253-260. doi: [10.1080/09603129873525](https://doi.org/10.1080/09603129873525) (Ανάκτηση 28/5/2021).
166. Rivera, J. B., & Adera, T., (1991). Assessing water quality. Staphylococci as microbial indicators in swimming pools. *Journal of Environmental Health*, 53 (6), pp. 29-32. <https://www.jstor.org/stable/44537938> (Ανάκτηση 12/7/2021).
167. Robinton, E. D., & Mood, E. W., (1966). A quantitative and qualitative appraisal of microbial pollution of water by swimmers: a preliminary report. *Journal of Hygiene (London)*, 64 (4), pp. 489-499. doi: [10.1017/s0022172400040808](https://doi.org/10.1017/s0022172400040808) (Ανάκτηση 12/7/2021).
168. Rocheleau, S., Desjardins, R., Lafrance, P., & Briere, F., (1986). Control of bacteria populations in public pools. *Sciences et Techniques de l'eau*, 19, pp. 117-128.
169. Sanchez, D., Gomila, M., Bennasar, A., Lalucat, J., & Garcia-Valdes E., (2014). Genome analysis of environmental and clinical *P. aeruginosa* isolates from sequence type-1146. *PLoS ONE*, 9 (10), e107754. doi: [10.1371/journal.pone.0107754](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107754) (Ανάκτηση 19/11/2021).
170. Santajit, S., & Indrawattana, N., (2016). Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *Biomed Res Int.*, 2016, 2475067. doi: <https://doi.org/10.1155/2016/2475067> (Ανάκτηση 21/11/2021).
171. Schiavano, G. F., Carloni, E., Andreoni, F., Magi, S., Chironna, M., Brandi, G., & Amagliani, G., (2017). Prevalence and antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in water samples in central Italy and molecular characterization of

- oprD* in imipenem resistant isolates. *PLoS ONE*, 12 (12), e0189172. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189172> (Ανάκτηση 19/11/2021).
172. Schets, F. M., van den Berg, H. H., Baan, R., Lynch, G. & de Roda Husman, A. M., (2014). *Pseudomonas aeruginosa* on vinyl-canvas inflatables and foam teaching aids in swimming pools. *Journal of Water and Health*, 12 (4), pp. 772-781. doi: [10.2166/wh.2014.066](https://doi.org/10.2166/wh.2014.066) (Ανάκτηση 4/6/2021).
173. Schets, F. M., Harold, van den Berg, H. H. J. L., Lynch, G., de Rijk, S., de Roda Husman, A. M., & Schijven, J. F., (2020). Evaluation of water quality guidelines for public swimming ponds. *Environment International*, 105516. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105516> (Ανάκτηση 22/3/2021).
174. Shields, P., & Cathcart, L., (2010). Oxidase Test Protocol. *American Society for Microbiology*. <https://asm.org/getattachment/00ce8639-8e76-4acb-8591-0f7b22a347c6/oxidase-test-protocol-3229.pdf> (Ανάκτηση 24/8/2021).
175. Sinclair, R. G., Jones, E. L., & Gerba, C. P., (2009). Viruses in recreational water-borne disease outbreaks: a review. *Journal of Applied Microbiology*, 107, pp. 1769-1780. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04367.x> (Ανάκτηση 8/6/2021).
176. Slanetz, L. W., Bartley, C. H., (1957). Numbers of enterococci in water, sewage, and feces determined by the membrane filter technique with an improved medium. *J Bacteriol.*, 74 (5), pp. 591-5. doi: [10.1128/jb.74.5.591-595.1957](https://doi.org/10.1128/jb.74.5.591-595.1957) (Ανάκτηση 6/7/2021).
177. Smith, H. V., (1998). Detection of parasites in the environment. *Parasitology*, 117, pp. 113S-141S. PMID: 10660936. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10660936/> (Ανάκτηση 11/6/2021).
178. Snicer, G. A., Malley, J. P., Margolin, A. B., & Hogan, S. P., (2000). UV Inactivation of Viruses in Natural Waters; AWWA Research Foundation and American Water Works Association: Denver, CO, USA, pp 108.
179. Solt, K., Nagy, T., Csohan, A., Csanady, M., & Hollos, I., (1994). An outbreak of hepatitis A due to a thermal spa. *Budapesti Kozegeszsegugy*, 26 (1), pp. 8-12.

180. Spiliotopoulou, A., Hansen, K. M. S., & Andersen, H. R., (2015). Secondary formation of disinfection by-products by UV treatment of swimming pool water. *Sci. Total Environ.*, 520, pp. 96-105. doi: [10.1016/j.scitotenv.2015.03.044](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.03.044) (Ανάκτηση 14/8/2021).
181. Spoering, A. L., & Lewis, K., (2001). Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *Journal of Bacteriology*, 183 (23), pp. 6746-6751. doi: [10.1128/JB.183.23.6746-6751.2001](https://doi.org/10.1128/JB.183.23.6746-6751.2001) (Ανάκτηση 21/11/2021).
182. Stehr-Green J. K., Bailey, T. M., Brandt, F. H., et al., (1987). *Acanthamoeba keratitis* in soft contact lens wearers. *JAMA*, 258 (1), pp. 57-60. doi: [10.1001/jama.1987.03400010061028](https://doi.org/10.1001/jama.1987.03400010061028).
<https://jamanetwork.com/journals/jama/article-abstract/366892> (Ανάκτηση 11/6/2021).
183. Stewart, P. S., & Costerton, J. W., (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet*, 358 (9276), pp. 135-138. doi: [10.1016/s0140-6736\(01\)05321-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(01)05321-1) (Ανάκτηση 21/11/2021).
184. Stewart, M. H., Yates, M. V., Anderson, M. A., Gerba, C. P., Rose, J. B., De Leon, R., & Wolfe, R. L., (2002). Predicted public health consequences of body-contact recreation on a potable water reservoir. *Journal American Water Works Association*, 94 (5), pp. 84-97. <https://doi.org/10.1002/j.1551-8833.2002.tb09473.x> (Ανάκτηση 28/5/2021).
185. Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrener, P., et al., (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406 (6799), pp. 959–964. doi: [10.1038/35023079](https://doi.org/10.1038/35023079) (Ανάκτηση 19/11/2021).
186. Suppes, L. M., Canales, R. A., Gerba, C. P., & Reynolds, K. A., (2016). *Cryptosporidium* risk from swimming pool exposures. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 219 (8), pp. 915-919. doi: [10.1016/j.ijheh.2016.07.001](https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2016.07.001) (Ανάκτηση 9/6/2021).

187. Tacconelli, E., Magrini, N., Carmeli, Y., Harbarth, S., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Mendelson, M., Pulcini, C., Singh, N., & Theuretzbacher, U., (2017). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. World Health Organization 1–7. https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf (Πρόσβαση 21/11/2021).
188. Tankeshwar, A., (2015, February 2). *Gram Staining: Principle, Procedure and Results*. Learn Microbiology Online-Medical Microbiology Guide: <https://microbeonline.com/gram-staining-principle-procedure-results/> (Ανάκτηση 28/5/2021).
189. Tatini, S. & Kauppi, K. L., (2002). Analysis: Microbiological analyses. In Roginski, H. (Ed.). *Encyclopedia of Dairy Sciences* (1st ed., pp. 74-79). Cambridge, Massachusetts: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227235-8/00021-3> (Ανάκτηση 30/5/2021).
190. Theofilou, A., Spiliopoulou, I., Aivalioti, K., & Vatopoulos, A., (2017). Assessment of microbiological quality of water from swimming pools in Greece: 7 years data from the Central Public Health Laboratory. https://8thswimpoolspa.sciencesconf.org/data/pages/swimming_pool spa 7th international conference kos island greece may 2017 book of abstracts plus program compressed_1.pdf (Ανάκτηση 26/11/2021).
191. Tirodimos, I., Arvanitidou, M., Dardavessis, T., Bisiklis, A., & Alexiou-Daniil, S., (2010). Prevalence and antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from swimming pools in northern Greece. *Eastern Mediterranean Health Journal*, 16 (7), pp. 783-787. doi: [10.26719/2010.16.7.783](https://doi.org/10.26719/2010.16.7.783) (Ανάκτηση 4/6/2021).
192. Tirodimos, I., Christoforidou, E. P., Nikolaidou, S., & Arvanitidou, M., (2018). Bacteriological quality of swimming pool and spa water in northern Greece during 2011–2016: is it time for *Pseudomonas aeruginosa* to be included in Greek regulation?. *Water Science & Technology: Water Supply*, 18 (6), pp. 1937-1945. doi: <https://doi.org/10.2166/ws.2018.015> (Ανάκτηση 4/6/2021).

193. Totaro, M., Vaselli, O., Nisi, B., Frendo, L., Cabassi, J., Profeti, S., Valentini, P., Casini, B., Privitera, G., & Bagglani, A., (2019). Assessment, control, and prevention of microbiological and chemical hazards in seasonal swimming pools of the Versilia district (Tuscany, central Italy). *Journal of Water and Health*, *17* (3), pp. 490-498. doi: [10.2166/wh.2019.208](https://doi.org/10.2166/wh.2019.208) (Ανάκτηση 12/7/2021).
194. Tryland, I., & Fiksdal, L., (1998). Enzyme Characteristics of b-D-Galactosidase- and b-D-Glucuronidase-Positive Bacteria and Their Interference in Rapid Methods for Detection of Waterborne Coliforms and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, *64* (3), pp. 1018-1023. <https://aem.asm.org/content/aem/64/3/1018.full.pdf> (Ανάκτηση 30/5/2021).
195. Vaughan, A., O’Sullivan, T., & Sinderen, D. (2005). Enhancing the microbiological stability of malt and beer-a review. *Journal of the Institute of Brewing*, *111* (4), 355–371. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2005.tb00221.x> (Ανάκτηση 30/5/2021).
196. Volterra, L., Bonadonna, L., & Aulicino, F. A., (1986). Fecal streptococci recoveries in different marine areas. *Water, Air and Soil Pollution*, *29*, pp. 403-413. doi: <https://doi.org/10.1007/BF00283446> (Ανάκτηση 6/7/2021).
197. Wyczarska-Kokot, J., Lempart-Rapacewicz, A., & Dudziak, M., (2020). Analysis of Free and Combined Chlorine Concentrations in Swimming Pool Water and an Attempt to Determine a Reliable Water Sampling Point. *Water*, *12*, 311. doi: <https://doi.org/10.3390/w12020311> (Ανάκτηση 10/8/2021).
198. WHO, (2000). Disinfectants and disinfectant by-products. Geneva, World Health Organization (Environmental Health Criteria 216).
199. WHO, World Health Organization, (2003). *Guidelines for safe recreational water environments. Volume 1, Coastal and fresh waters*. Geneva, Switzerland: WHO. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42591> (Ανάκτηση 6/7/2021).
200. WHO, World Health Organization, (2006). *Guidelines for safe recreational water environments, Volume 2, Swimming pools and similar environments*. Geneva, Switzerland: WHO. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/43336> (Ανάκτηση 13/3/2021).

201. Yayha, M. T., Landeen, L. K., Mesina, M. C., Kutz, S. M., Schultze, R., & Gerba, C. P., (1990) Disinfection of bacteria in water systems by using electrolytically generated copper: silver and reduced levels of free chlorine. *Canadian Journal of Microbiology*, 36, pp. 109-116. doi: [10.1139/m90-020](https://doi.org/10.1139/m90-020) (Ανάκτηση 14/8/2021).
202. Yu, Y., Cheng, A. S., Wang, L., Dunne, W. M., & Bayliss, S. J., (2007). Hot tub folliculitis or hot hand-foot syndrome causes by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 57 (4), pp. 596-600. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2007.04.004> (Ανάκτηση 5/6/2021).
203. Zhanel, G. G., Mayer, M., Laing, N., & Adam, H. J., (2006). Mutant prevention concentrations of levofloxacin alone and in combination with azithromycin, ceftazidime, colistin (Polymyxin E), meropenem, piperacillin-tazobactam, and tobramycin against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50 (6), pp. 2228-2230. doi: [10.1128/AAC.01620-05](https://doi.org/10.1128/AAC.01620-05) (Ανάκτηση 21/11/2021).
204. Zubrzycki, L., & Spaulding, E. H., (1962). Studies on the stability of the normal human fecal flora. *J Bacteriol.*, 83 (5), pp. 968-974. doi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16561946> (Ανάκτηση 5/6/2021).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 13: Σύνολο δειγμάτων νερού κολυμβητικών δεξαμενών που αναλύθηκαν με τη μέθοδο της διήθησης μεμβρανών, σύνολο προκαταρκτικά θετικών αποικιών τύπου Α, Β ή Γ και τα αποτελέσματα όλων των επιβεβαιωτικών σταδίων για τη βιοχημική τους ταυτοποίηση έως το στάδιο της τελικής φύλαξης των επιβεβαιωμένων αποικιών τύπου Α (NT = Not Tested).

A/A	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΗΜΕΡ. ΔΙΗΘΗΣΗΣ	ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ (48 h μετά διηθήσεων)	ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΑΠΟΙΚΙΩΝ	ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΣΕ ΜΙΚΡΟ CN	ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΣΕ ΜΕΓΑΛΟ ΝΑ	ΤΕΣΤ ΟΞΕΙΔΑΣΗΣ	ΠΡΟΣΘΗΚΗ NESSLER	ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ KING'S AGAR	ΚΑΘΑΡΣΗ ΣΕ ΜΕΓΑΛΟ CN	ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΣΕ ΜΕΓΑΛΟ ΝΑ (18h/37 °C)	ΦΥΛΑΞΗ ΣΕ ΨΥΞΗ	
1	246	8/6/2021	-	0									
2	247	8/6/2021	-	0									
3	248	8/6/2021	-	0									
4	249	8/6/2021	-	0									
5	250	7/6/2021	ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΜΕΝΕΣ ΠΡΑΣΙΝΕΣ	>200	1	9/6/2021					14/6/2021	15/6/2021	16/6/2021
					2	9/6/2021				14/6/2021	15/6/2021	16/6/2021	
					3	9/6/2021				14/6/2021	15/6/2021	16/6/2021	
					4	9/6/2021				14/6/2021	15/6/2021	16/6/2021	
					5	9/6/2021				14/6/2021	15/6/2021	16/6/2021	
6	251	8/6/2021	-	0									
7	252	8/6/2021	-	0									
8	253	8/6/2021	-	0									
9	254	8/6/2021	-	0									
10	255	8/6/2021	-	0									
11	245	8/6/2021	ΚΙΤΡΙΝΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΕΓΑΛΕΣ	15		1	10/6/2021	NT	-	NT			
		8/6/2021				2	10/6/2021	NT	-	NT			
		8/6/2021				3	10/6/2021	NT	-	NT			
		8/6/2021				4	10/6/2021	NT	-	NT			
		8/6/2021				5	10/6/2021	NT	-	NT			
		8/6/2021	ΚΙΤΡΙΝΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΙΚΡΕΣ	9		α	10/6/2021	NT	-	NT			
		8/6/2021				β	10/6/2021	NT	-	NT			
		8/6/2021				γ	10/6/2021	NT	-	NT			
		8/6/2021	ΚΑΣΤΑΝΕΡΥΘΡΕΣ ΜΗ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ	6		α'	10/6/2021	+	-	-			
8/6/2021		β'			10/6/2021	+	-	-					

A/A	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΗΜΕΡ. ΔΙΗΘΗΣΗΣ	ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ (48 h μετά διηθήσεων)	ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΑΠΟΙΚΙΩΝ	ΑΝΑΚΑΛΛΙΠΤΕΡΓΙΑ ΣΕ ΜΙΚΡΟ CN	ΑΝΑΚΑΛΛΙΠΤΕΡΓΙΑ ΣΕ ΜΕΓΑΛΟ ΝΑ	ΤΕΣΤ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ	ΠΡΟΣΘΗΚΗ NESSLER	ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ KING'S AGAR	ΚΑΘΑΡΣΗ ΣΕ ΜΕΓΑΛΟ CN	ΑΝΑΚΑΛΛΙΠΤΕΡΓΙΑ ΣΕ ΜΕΓΑΛΟ ΝΑ (18h/37 °C)	ΦΥΛΑΞΗ ΣΕ ΨΥΞΗ
12	256	8/6/2021	ΚΙΤΡΙΝΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΕΓΑΛΕΣ	17*4		1	10/6/2021	NT	-	NT		
		8/6/2021				2	10/6/2021	NT	-	NT		
		8/6/2021				3	10/6/2021	NT	-	NT		
		8/6/2021				4	10/6/2021	NT	-	NT		
		8/6/2021				5	10/6/2021	NT	-	NT		
		8/6/2021	ΚΙΤΡΙΝΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΙΚΡΕΣ	25*4		α	10/6/2021	NT	-	NT		
		8/6/2021				β	10/6/2021	NT	-	NT		
		8/6/2021				γ	10/6/2021	NT	-	NT		
		8/6/2021				δ	10/6/2021	NT	-	NT		
		8/6/2021				ε	10/6/2021	NT	-	NT		
13	282	17/6/2021	ΛΕΥΚΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ	18		1	22/6/2021	NT	-	NT		
			ΚΙΤΡΙΝΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΙΚΡΕΣ	20		α	22/6/2021	NT	-	NT		
14	283	17/6/2021	ΚΙΤΡΙΝΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΙΚΡΕΣ	1		1	22/6/2021	NT	-	NT		
			ΚΙΤΡΙΝΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΕΓΑΛΕΣ	1		α	22/6/2021	NT	-	NT		
15	284	17/6/2021	ΚΙΤΡΙΝΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΙΚΡΕΣ	11		α	22/6/2021	NT	-	NT		
			ΛΕΥΚΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ	13*4		1	22/6/2021	NT	-	NT		
						2	22/6/2021	NT	-	NT		

A/A	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΗΜΕΡ. ΔΙΗΘΗΣΗΣ	ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ (48 h μετά διηθήσεων)	ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΑΠΟΙΚΙΩΝ	ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΣΕ ΜΙΚΡΟ CN	ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΣΕ ΜΕΓΑΛΟ ΝΑ	ΤΕΣΤ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ	ΠΡΟΣΘΗΚΗ NESSLER	ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ KING'S AGAR	ΚΑΘΑΡΣΗ ΣΕ ΜΕΓΑΛΟ CN	ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΣΕ ΜΕΓΑΛΟ ΝΑ (18h/37 °C)	ΦΥΛΑΞΗ ΣΕ ΨΥΞΗ
16	285	17/6/2021	ΚΙΤΡΙΝΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ	5		1 22/6/2021	NT	-	NT			
			ΚΙΤΡΙΝΟΜΠΙΕΖ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ	10*4		2 22/6/2021	NT	-	NT			
			ΚΙΤΡΙΝΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ	6		α 22/6/2021	NT	-	NT			
						β' 22/6/2021	NT	-	NT			
17	286	17/6/2021	ΚΙΤΡΙΝΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΕΓΑΛΕΣ	18*4		1 22/6/2021	NT	-	NT			
			ΚΙΤΡΙΝΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ	9		2 22/6/2021	NT	-	NT			
						3 22/6/2021	NT	-	NT			
				α 22/6/2021	NT	-	NT					
18	287	17/6/2021	ΛΕΥΚΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ	24*4		1 22/6/2021	NT	-	NT			
			ΚΙΤΡΙΝΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΙΚΡΕΣ	30		2 22/6/2021	NT	-	NT			
						α 22/6/2021	NT	-	NT			
				β 22/6/2021	NT	-	NT					
19	288	17/6/2021	ΚΙΤΡΙΝΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ	2		1 22/6/2021	NT	-	NT			
					2 22/6/2021	NT	-	NT				
20	289	17/6/2021	ΚΙΤΡΙΝΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΕΓΑΛΕΣ	20		1 22/6/2021	NT	-	NT			
			ΚΙΤΡΙΝΕΣ ΜΙΚΡΕΣ ΜΗ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ	40*4		2 22/6/2021	NT	-	NT			
						3 22/6/2021	NT	-	NT			
						α 22/6/2021	+	-	-			
			ΚΑΣΤΑΝΕΡΥΘΡΕΣ ΜΗ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ	13		β 22/6/2021	+	-	-			
						γ 22/6/2021	+	-	-			
	α' 22/6/2021	+	-	-								
21	290	17/6/2021	ΚΙΤΡΙΝΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ	2		1 22/6/2021	NT	-	NT			
					2 22/6/2021	NT	-	NT				

Α/Α	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΗΜΕΡ. ΔΙΗΘΗΣΗΣ	ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ (48 h μετά διηθήσεων)	ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΑΠΟΙΚΙΩΝ	ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΣΕ ΜΙΚΡΟ CN	ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΣΕ ΜΕΓΑΛΟ ΝΑ	ΤΕΣΤ ΟΞΕΙΔΑΣΗΣ	ΠΡΟΣΘΗΚΗ NESSLER	ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ KING'S AGAR	ΚΑΘΑΡΣΗ ΣΕ ΜΕΓΑΛΟ CN	ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΣΕ ΜΕΓΑΛΟ ΝΑ (18h/37 °C)	ΦΥΛΑΞΗ ΣΕ ΨΥΞΗ	
22	291	22/6/2021	ΚΙΤΡΙΝΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΙΚΡΕΣ	3		1	24/6/2021	NT	-	NT			
					2	24/6/2021	NT	-	NT				
					3	24/6/2021	NT	-	NT				
				ΛΕΥΚΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ	2		α	24/6/2021	NT	-	NT		
	β	24/6/2021	NT	-		NT							
23	292	23/6/2021	ΛΕΥΚΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΙΚΡΕΣ	13		1	28/6/2021	NT	-	NT			
					2	28/6/2021	NT	-	NT				
					3	28/6/2021	NT	-	NT				
				ΚΙΤΡΙΝΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ	2		α	28/6/2021	NT	-	NT		
	β	28/6/2021	NT	-		NT							
24	293	23/6/2021	ΛΕΥΚΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΙΚΡΕΣ	7		1	28/6/2021	NT	-	NT			
					2	28/6/2021	NT	-	NT				
					3	28/6/2021	NT	-	NT				
				ΚΙΤΡΙΝΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΙΚΡΕΣ	1		α	28/6/2021	NT	-	NT		
25	294	23/6/2021	ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΜΕΝΕΣ ΠΡΑΣΙΝΕΣ ΜΗ ΣΧΗΜΑΤΙΖΟΜΕΝΕ Σ	4						5/7/2021	6/7/2021	7/7/2021	
									5/7/2021	6/7/2021	7/7/2021		
									5/7/2021	6/7/2021	7/7/2021		
									5/7/2021	6/7/2021	7/7/2021		
				ΛΕΥΚΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΕΓΑΛΕΣ	6		1	28/6/2021	NT	-	NT		
				2		28/6/2021	NT	-	NT				
				3		28/6/2021	NT	-	NT				
				4		28/6/2021	NT	-	NT				
	ΛΕΥΚΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ	4		α	28/6/2021	NT	-	NT					
	β		28/6/2021	NT	-	NT							

A/A	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΗΜΕΡ. ΔΙΗΘΗΣΗΣ	ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ (48 h μετά διηθήσεων)	ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΑΠΟΙΚΙΩΝ	ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΣΕ ΜΙΚΡΟ CN	ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΣΕ ΜΕΓΑΛΟ ΝΑ	ΤΕΣΤ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ	ΠΡΟΣΘΗΚΗ NESSLER	ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ KING'S AGAR	ΚΑΘΑΡΣΗ ΣΕ ΜΕΓΑΛΟ CN	ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΣΕ ΜΕΓΑΛΟ ΝΑ (18h/37 °C)	ΦΥΛΑΞΗ ΣΕ ΨΥΞΗ	
26	295	23/6/2021	ΛΕΥΚΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΙΚΡΕΣ	30		1	28/6/2021	NT	-	NT			
						2	28/6/2021	NT	-	NT			
						3	28/6/2021	NT	-	NT			
						4	28/6/2021	NT	-	NT			
			ΚΑΣΤΑΝΕΡΥΘΡΕΣ ΜΗ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ	1	α	28/6/2021	-	NT	NT				
27	296	23/6/2021	ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΜΕΝΕΣ ΠΡΑΣΙΝΕΣ	1						25/6/2021	29/6/2021	30/6/2021	
			ΛΕΥΚΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΙΚΡΕΣ	15		1	28/6/2021	NT	-	NT			
						2	28/6/2021	NT	-	NT			
						3	28/6/2021	NT	-	NT			
			ΚΙΤΡΙΝΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ	2	α	28/6/2021	NT	-	NT				
β	28/6/2021	NT			-	NT							
28	306	29/6/2021	ΛΕΥΚΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΙΚΡΕΣ	1		1	5/7/2021	NT	-	NT			
29	307	29/6/2021	ΚΙΤΡΙΝΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ	6		1	5/7/2021	NT	-	NT			
						2	5/7/2021	NT	-	NT			
			ΚΙΤΡΙΝΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ	3	α	5/7/2021	NT	-	NT				
					β	5/7/2021	NT	-	NT				
			ΛΕΥΚΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ	2	α'	5/7/2021	NT	-	NT				
β'	5/7/2021	NT			-	NT							
30	308	29/6/2021	ΚΙΤΡΙΝΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΕΓΑΛΕΣ	3		1	5/7/2021	NT	-	NT			
						2	5/7/2021	NT	-	NT			
						3	5/7/2021	NT	-	NT			
			ΛΕΥΚΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ	7	α	5/7/2021	NT	-	NT				
					β	5/7/2021	NT	-	NT				
ΚΙΤΡΙΝΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΙΚΡΕΣ	1	α'	5/7/2021	NT	-	NT							

Α/Α	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΗΜΕΡ. ΔΙΗΘΗΣΗΣ	ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ (48 h μετά διηθήσεων)	ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΑΠΟΙΚΙΩΝ	ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΣΕ ΜΙΚΡΟ CN	ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΣΕ ΜΕΓΑΛΟ ΝΑ	ΤΕΣΤ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ	ΠΡΟΣΘΗΚΗ NESSLER	ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ KING'S AGAR	ΚΑΘΑΡΗ ΣΕ ΜΕΓΑΛΟ CN	ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΣΕ ΜΕΓΑΛΟ ΝΑ (18h/37 °C)	ΦΥΛΑΞΗ ΣΕ ΨΥΞΗ
31	309	29/6/2021	ΚΙΤΡΙΝΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΕΓΑΛΕΣ	1		1	5/7/2021	NT	-	NT		
			ΚΙΤΡΙΝΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ	2		α	5/7/2021	NT	-	NT		
			ΛΕΥΚΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΙΚΡΕΣ	1		β	5/7/2021	NT	-	NT		
32	310	29/6/2021	ΚΙΤΡΙΝΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ	4		α'	5/7/2021	NT	-	NT		
			ΛΕΥΚΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ	5		β	5/7/2021	NT	-	NT		
			ΚΑΣΤΑΝΕΡΥΘΡΕΣ ΜΗ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ	12	α'	5/7/2021	+	-	-			
					β'	5/7/2021	+	-	-			
					γ'	5/7/2021	+	-	-			
					δ'	5/7/2021	+	-	-			
ε'	5/7/2021	+	-	-								
33	311	29/6/2021	ΚΙΤΡΙΝΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΕΓΑΛΕΣ	13		1	5/7/2021	NT	-	NT		
					2	5/7/2021	NT	-	NT			
					3	5/7/2021	NT	-	NT			
					4	5/7/2021	NT	-	NT			
			ΛΕΥΚΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ	2		α	5/7/2021	NT	-	NT		
34	312	29/6/2021	ΛΕΥΚΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΙΚΡΕΣ	5		β	5/7/2021	NT	-	NT		
					1	5/7/2021	NT	-	NT			
					2	5/7/2021	NT	-	NT			
					3	5/7/2021	NT	-	NT			
		ΛΕΥΚΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΕΓΑΛΕΣ	1		α	5/7/2021	NT	-	NT			

A/A	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΗΜΕΡ. ΔΙΗΘΗΣΗΣ	ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ (48 h μετά διηθήσεων)	ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΑΠΟΙΚΙΩΝ	ΑΝΑΚΑΛΛΙΠΤΕΡΓΙΑ ΣΕ ΜΙΚΡΟ CN	ΑΝΑΚΑΛΛΙΠΤΕΡΓΙΑ ΣΕ ΜΕΓΑΛΟ ΝΑ	ΤΕΣΤ ΟΞΕΙΔΑΣΗΣ	ΠΡΟΣΘΗΚΗ NESSLER	ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ KING'S AGAR	ΚΑΘΑΡΗ ΣΕ ΜΕΓΑΛΟ CN	ΑΝΑΚΑΛΛΙΠΤΕΡΓΙΑ ΣΕ ΜΕΓΑΛΟ ΝΑ (18h/37 °C)	ΦΥΛΑΞΗ ΣΕ ΨΥΞΗ
35	313	29/6/2021	ΚΙΤΡΙΝΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΕΓΑΛΕΣ	1		α	5/7/2021	NT	-	NT		
			ΛΕΥΚΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΙΚΡΕΣ	5		1	5/7/2021	NT	-	NT		
					2	5/7/2021	NT	-	NT			
					3	5/7/2021	NT	-	NT			
36	328	5/7/2021	ΛΕΥΚΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΕΓΑΛΕΣ	1		α	7/7/2021	NT	-	NT		
			ΛΕΥΚΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΙΚΡΕΣ	18		1	7/7/2021	NT	-	NT		
					2	7/7/2021	NT	-	NT			
					3	7/7/2021	NT	-	NT			
					4	7/7/2021	NT	-	NT			
	5	7/7/2021	NT	-	NT							
37	329	5/7/2021	ΚΙΤΡΙΝΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΕΓΑΛΕΣ	1		α	7/7/2021	NT	-	NT		
			ΛΕΥΚΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΕΓΑΛΕΣ	13		1	7/7/2021	NT	-	NT		
					2	7/7/2021	NT	-	NT			
					3	7/7/2021	NT	-	NT			
					4	7/7/2021	NT	-	NT			
			ΛΕΥΚΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΙΚΡΕΣ	36*4		α'	7/7/2021	NT	-	NT		
					β'	7/7/2021	NT	-	NT			
					γ'	7/7/2021	NT	-	NT			
	δ'	7/7/2021	NT		-	NT						

Α/Α	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΗΜΕΡ. ΔΙΗΘΗΣΗΣ	ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ (48 h μετά διηθήσεων)	ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΑΠΟΙΚΙΩΝ	ΑΝΑΚΑΛΛΙΠΕΡΓΙΑ ΣΕ ΜΙΚΡΟ CN	ΑΝΑΚΑΛΛΙΠΕΡΓΙΑ ΣΕ ΜΕΓΑΛΟ ΝΑ	ΤΕΣΤ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ	ΠΡΟΣΘΗΚΗ NESSLER	ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ KING'S AGAR	ΚΑΘΑΡΗ ΣΕ ΜΕΓΑΛΟ CN	ΑΝΑΚΑΛΛΙΠΕΡΓΙΑ ΣΕ ΜΕΓΑΛΟ ΝΑ (18h/37 °C)	ΦΥΛΑΞΗ ΣΕ ΨΥΞΗ			
38	335	7/7/2021	ΠΡΑΣΙΝΕΣ ΕΝΤΟΝΑ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ	40							8/7/2021	12/7/2021	13/7/2021		
											8/7/2021	12/7/2021	13/7/2021		
											8/7/2021	12/7/2021	13/7/2021		
											8/7/2021	12/7/2021	13/7/2021		
						80*4							8/7/2021	12/7/2021	13/7/2021
												8/7/2021	12/7/2021	13/7/2021	
													8/7/2021	12/7/2021	13/7/2021
													8/7/2021	12/7/2021	13/7/2021
39	336	7/7/2021	ΛΕΥΚΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ	20		1	12/7/2021	NT	-	NT					
						2	12/7/2021	NT	-	NT					
40	337	7/7/2021	ΚΙΤΡΙΝΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΙΚΡΕΣ	1		1	12/7/2021	NT	-	NT					
						α	12/7/2021	NT	-	NT					
			ΛΕΥΚΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ	11		β	12/7/2021	NT	-	NT					
41	338	7/7/2021	ΛΕΥΚΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΙΚΡΕΣ	20*4		1	12/7/2021	NT	-	NT					
						2	12/7/2021	NT	-	NT					
						3	12/7/2021	NT	-	NT					
				ΛΕΥΚΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΕΓΑΛΕΣ	1		α	12/7/2021	NT	+	+	14/7/2021 δεν παρουσιάστηκε ανάπτυξη			
42	339	7/7/2021	ΛΕΥΚΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΙΚΡΕΣ	22		1	12/7/2021	NT	-	NT					
						2	12/7/2021	NT	-	NT					
						3	12/7/2021	NT	-	NT					
			ΚΑΣΤΑΝΕΡΥΘΡΕΣ ΜΗ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ	4		α	12/7/2021	+	-	-					
						β	12/7/2021	+	-	-					
			γ	12/7/2021	+	-	-								
			δ	12/7/2021	+	-	-								

Α/Α	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΗΜΕΡ. ΔΙΗΘΗΣΗΣ	ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ (48 h μετά διηθήσεων)	ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΑΠΟΙΚΙΩΝ	ΑΝΑΚΑΛΛΙΠΕΡΓΙΑ ΣΕ ΜΙΚΡΟ CN		ΑΝΑΚΑΛΛΙΠΕΡΓΙΑ ΣΕ ΜΕΓΑΛΟ ΝΑ		ΤΕΣΤ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ	ΠΡΟΣΘΗΚΗ NESSLER	ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ KING'S AGAR	ΚΑΘΑΡΗ ΣΕ ΜΕΓΑΛΟ CN	ΑΝΑΚΑΛΛΙΠΕΡΓΙΑ ΣΕ ΜΕΓΑΛΟ ΝΑ (18h/37 °C)	ΦΥΛΑΞΗ ΣΕ ΨΥΞΗ
43	340	7/7/2021	ΛΕΥΚΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΙΚΡΕΣ	12			1	12/7/2021	NT	-	NT			
							2	12/7/2021	NT	-	NT			
							3	12/7/2021	NT	+	+	14/7/2021 δεν παρουσιάστηκε ανάπτυξη		
44	342	7/7/2021	ΛΕΥΚΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΕΓΑΛΕΣ	3			1	12/7/2021	NT	-	NT			
			ΛΕΥΚΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ	24			α	12/7/2021	NT	-	NT			
			ΚΙΤΡΙΝΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΙΚΡΕΣ	4			β	12/7/2021	NT	-	NT			
45	343	7/7/2021	ΛΕΥΚΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΙΚΡΕΣ	3			1	12/7/2021	NT	-	NT			
			ΚΙΤΡΙΝΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΙΚΡΕΣ	1			α	12/7/2021	NT	-	NT			
46	344	7/7/2021	ΚΙΤΡΙΝΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΙΚΡΕΣ	1			1	12/7/2021	NT	-	NT			
47	350	12/7/2021	ΛΕΥΚΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΕΓΑΛΕΣ	1			1	14/7/2021	NT	-	NT			
			ΛΕΥΚΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ	2			α	14/7/2021	NT	-	NT			
							β	14/7/2021	NT	-	NT			

Α/Α	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΗΜΕΡ. ΔΙΗΘΗΣΗΣ	ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ (48 h μετά διηθήσεων)	ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΑΠΟΙΚΙΩΝ	ΑΝΑΚΑΛΛΙΠΤΕΡΓΙΑ ΣΕ ΜΙΚΡΟ CN	ΑΝΑΚΑΛΛΙΠΤΕΡΓΙΑ ΣΕ ΜΕΓΑΛΟ ΝΑ	ΤΕΣΤ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ	ΠΡΟΣΘΗΚΗ NESSLER	ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ KING'S AGAR	ΚΑΘΑΡΣΗ ΣΕ ΜΕΓΑΛΟ CN	ΑΝΑΚΑΛΛΙΠΤΕΡΓΙΑ ΣΕ ΜΕΓΑΛΟ ΝΑ (18h/37 °C)	ΦΥΛΑΞΗ ΣΕ ΨΥΞΗ
48	351	12/7/2021	ΛΕΥΚΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΕΓΑΛΕΣ	7		1	14/7/2021	NT	-	NT		
			ΛΕΥΚΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ	147		α	14/7/2021	NT	-	NT		
			ΚΙΤΡΙΝΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ	38		β	14/7/2021	NT	-	NT		
			ΚΙΤΡΙΝΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ			α'	14/7/2021	NT	-	NT		
			ΚΙΤΡΙΝΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ			β'	14/7/2021	NT	-	NT		
49	352	12/7/2021	ΛΕΥΚΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΙΚΡΕΣ	2		1	14/7/2021	NT	-	NT		
50	353	12/7/2021	ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΜΕΝΕΣ ΠΡΑΣΙΝΕΣ	1							14/7/2021	15/7/2021
			ΚΙΤΡΙΝΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ	12		α	14/7/2021	NT	-	NT		
			ΚΙΤΡΙΝΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ	55*4		β	14/7/2021	NT	-	NT		
			ΚΙΤΡΙΝΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ			α'	14/7/2021	NT	-	NT		
			ΚΙΤΡΙΝΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ			β'	14/7/2021	NT	-	NT		
51	354	12/7/2021	ΛΕΥΚΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΕΓΑΛΕΣ	3		1	14/7/2021	NT	-	NT		
			ΛΕΥΚΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ	19		α	14/7/2021	NT	-	NT		
			ΛΕΥΚΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ			β	14/7/2021	NT	-	NT		
52	355	12/7/2021	ΛΕΥΚΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ	5		α	14/7/2021	NT	-	NT		
			ΛΕΥΚΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ			β	14/7/2021	NT	-	NT		
			ΡΟΖ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΑ ΜΕΓΑΛΗ	1		1	14/7/2021	NT	-	NT		
			ΛΕΥΚΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ	17*4		α'	14/7/2021	NT	-	NT		
			ΛΕΥΚΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ			β'	14/7/2021	NT	-	NT		

A/A	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΗΜΕΡ. ΔΙΗΘΗΣΗΣ	ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ (48 h μετά διηθήσεων)	ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΑΠΟΙΚΙΩΝ	ΑΝΑΚΑΛΛΙΠΤΕΡΓΙΑ ΣΕ ΜΙΚΡΟ CN	ΑΝΑΚΑΛΛΙΠΤΕΡΓΙΑ ΣΕ ΜΕΓΑΛΟ ΝΑ	ΤΕΣΤ ΟΞΕΙΔΑΣΗΣ	ΠΡΟΣΘΗΚΗ NESSLER	ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ KING'S AGAR	ΚΑΘΑΡΗ ΣΕ ΜΕΓΑΛΟ CN	ΑΝΑΚΑΛΛΙΠΤΕΡΓΙΑ ΣΕ ΜΕΓΑΛΟ ΝΑ (18h/37 °C)	ΦΥΛΑΞΗ ΣΕ ΨΥΞΗ
53	356	12/7/2021	ΛΕΥΚΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ	4		1	14/7/2021	NT	-	NT		
			ΛΕΥΚΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ	33		2	14/7/2021	NT	-	NT		
			ΛΕΥΚΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ			α	14/7/2021	NT	-	NT		
			ΛΕΥΚΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ			β	14/7/2021	NT	-	NT		
54	357	12/7/2021	ΚΙΤΡΙΝΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΙΚΡΕΣ	68*4		1	14/7/2021	NT	-	NT		
			ΚΙΤΡΙΝΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΙΚΡΕΣ			2	14/7/2021	NT	-	NT		
			ΚΙΤΡΙΝΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΙΚΡΕΣ			3	14/7/2021	NT	-	NT		
			ΚΙΤΡΙΝΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΙΚΡΕΣ			4	14/7/2021	NT	-	NT		
55	368	20/7/2021	ΚΙΤΡΙΝΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΕΓΑΛΕΣ	6		α	26/7/2021	NT	-	NT		
			ΛΕΥΚΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΙΚΡΕΣ	60		1	26/7/2021	NT	-	NT		
			ΛΕΥΚΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΙΚΡΕΣ			2	26/7/2021	NT	-	NT		
			ΛΕΥΚΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΙΚΡΕΣ			3	26/7/2021	NT	-	NT		
			ΛΕΥΚΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΙΚΡΕΣ			4	26/7/2021	NT	-	NT		
			ΛΕΥΚΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΙΚΡΕΣ			5	26/7/2021	NT	-	NT		
56	369	21/7/2021	-	0					NT			
57	370	21/7/2021	ΛΕΥΚΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΙΚΡΕΣ	2		1	27/7/2021	NT	-	NT		
58	371	21/7/2021	ΛΕΥΚΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΙΚΡΕΣ	1		ΚΑΜΙΑ	27/7/2021					

A/A	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΗΜΕΡ. ΔΙΗΘΗΣΗΣ	ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ (48 h μετά διηθήσεων)	ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΑΠΟΙΚΙΩΝ	ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΣΕ ΜΙΚΡΟ CN	ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΣΕ ΜΕΓΑΛΟ ΝΑ	ΤΕΣΤ ΟΞΕΙΔΑΣΗΣ	ΠΡΟΣΘΗΚΗ NESSLER	ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ KING'S AGAR	ΚΑΘΑΡΣΗ ΣΕ ΜΕΓΑΛΟ CN	ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΣΕ ΜΕΓΑΛΟ ΝΑ (18h/37 °C)	ΦΥΛΑΞΗ ΣΕ ΨΥΞΗ	
59	372	21/7/2021	ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΜΕΝΕΣ ΠΡΑΣΙΝΕΣ	3						27/7/2021	28/7/2021	29/7/2021	
			ΚΙΤΡΙΝΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΙΚΡΕΣ	2		α'	27/7/2021	NT	-	NT	27/7/2021	28/7/2021	29/7/2021
			ΛΕΥΚΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΙΚΡΕΣ	11		α	27/7/2021	NT	-	NT			
					β	27/7/2021	NT	-	NT				
					γ	27/7/2021	NT	-	NT				
			60	373	21/7/2021	ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΜΕΝΕΣ ΠΡΑΣΙΝΕΣ	4						27/7/2021
									27/7/2021	28/7/2021	29/7/2021		
									27/7/2021	28/7/2021	29/7/2021		
									27/7/2021	28/7/2021	29/7/2021		
ΛΕΥΚΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ	4					α	27/7/2021	NT	-	NT			
ΛΕΥΚΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΙΚΡΕΣ	10					β	27/7/2021	NT	-	NT			
		α'				27/7/2021	NT	-	NT				
	β'	27/7/2021				NT	-	NT					
	γ'	27/7/2021	NT	-	NT								
ΚΙΤΡΙΝΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΙΚΡΕΣ	5		α"	27/7/2021	NT	-	NT						
61	374	21/7/2021	ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΜΕΝΕΣ ΠΡΑΣΙΝΕΣ	2						27/7/2021	28/7/2021	29/7/2021	
									27/7/2021	28/7/2021	29/7/2021		
			ΚΙΤΡΙΝΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ	35		α	27/7/2021	NT	-	NT			
					β	27/7/2021	NT	-	NT				
			ΛΕΥΚΕΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΜΙΚΡΕΣ	30		α'	27/7/2021	NT	-	NT			
					β'	27/7/2021	NT	-	NT				
					γ'	27/7/2021	NT	-	NT				
	δ'	27/7/2021	NT		-	NT							

A/A	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΗΜΕΡ. ΔΙΗΘΗΣΗΣ	ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ (48 h μετά διηθήσεων)	ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΑΠΟΙΚΙΩΝ	ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΣΕ ΜΙΚΡΟ CN	ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΣΕ ΜΕΓΑΛΟ ΝΑ	ΤΕΣΤ ΟΞΕΙΔΑΣΗΣ	ΠΡΟΣΘΗΚΗ NESSLER	ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ KING'S AGAR	ΚΑΘΑΡΣΗ ΣΕ ΜΕΓΑΛΟ CN	ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΣΕ ΜΕΓΑΛΟ ΝΑ (18h/37 °C)	ΦΥΛΑΞΗ ΣΕ ΨΥΞΗ
62	375	21/7/2021	ΛΕΥΚΕΣ	27		1	27/7/2021	NT	-	NT		
			ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ			2	27/7/2021	NT	-	NT		
			ΜΙΚΡΕΣ			3	27/7/2021	NT	-	NT		
			ΚΙΤΡΙΝΕΣ	20		α	27/7/2021	NT	-	NT		
			ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ			β	27/7/2021	NT	-	NT		
63	379	26/7/2021	ΛΕΥΚΕΣ	3		1	28/7/2021	NT	-	NT		
			ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ			2	28/7/2021	NT	-	NT		
			ΛΕΥΚΕΣ	36		α	28/7/2021	NT	-	NT		
			ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ			β	28/7/2021	NT	-	NT		
			ΚΑΣΤΑΝΕΡΥΘΡΕΣ ΜΗ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ	7		α'	28/7/2021	+	-	-		
			β'	28/7/2021	+	-	-					
			γ'	28/7/2021	+	-	-					
64	380	26/7/2021	ΛΕΥΚΕΣ	6		1	28/7/2021	NT	-	NT		
			ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ			2	28/7/2021	NT	-	NT		
			ΜΕΓΑΛΕΣ			3	28/7/2021	NT	-	NT		
			ΛΕΥΚΕΣ	30		α	28/7/2021	NT	-	NT		
			ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ			β	28/7/2021	NT	-	NT		
ΚΙΤΡΙΝΕΣ	1		α'	28/7/2021	NT	-	NT					
65	381	27/7/2021	-	0								