

TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI KONFERENCIA 2024
SAPIENTIA EMTE - CSÍKSZEREDAI KAR

Barót környéki ásványvizek vegyi összetételének és mikrobiális közösségeinek vizsgálata tenyésztés és DNS alapú módszerekkel

Hallgató: *Salamon Tímea* - Fenntartható biotechnológiák mesteri szak, II. év.

Témavezetők: *dr. Máthé István* – Sapientia EMTE, Biomérnöki Tanszék, Csíkszereda
dr. Zsigmond Andrea-Rebeka – Sapientia EMTE, Környezettudomány
Tanszék, Kolozsvár

Csíkszereda

2024

TARTALOM

1. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	3
1.1. Ásványvizek jellemzése	4
1.1.1. Vegyi összetétel.....	4
1.1.2. Ásványvizek főbb típusai	5
1.2. Székelyföld ásványvizeinek rövid jellemzése	5
1.3. Ásványvizekben előforduló mikroorganizmusok.....	6
1.3.1. Autochton mikrobióta.....	7
1.3.2. Allochton mikrobióta.....	8
1.4. Mikrobaközösségek vizsgálata.....	10
1.4.1. Tenyésztéstől függő módszerek	11
1.4.2. Mikrobaközösségek vizsgálata tenyésztéstől független DNS ujjlenyomat módszerekkel	12
2. CÉLKITŰZÉSEK	13
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	14
3.1. Mintavételi helyszínek.....	14
3.2. Mintavételi módszerek	17
3.3. Mikrobiológiai laboratóriumi vizsgálatok.....	17
3.4. Laboratóriumi vízkémiai vizsgálatok.....	19
3.5. Baktériumtörzsek azonosítása MALDI-TOF-MS módszerrel.....	20
3.6. Ásványvizek taxonösszetételének vizsgálata NGS módszerrel.....	21
3.7. Ásványvizes palackok dugóinak vizsgálata	22
4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK.....	23
4.1. Ásványvizek helyszíni vizsgálatának eredményei	23
4.2. Vízkémiai vizsgálatok eredményei	25
4.3. Ásványvizek higiéniai vizsgálatának eredményei.....	27
4.4. Allochton mikrobazonosítás eredményei	30
4.5. Baktériumközösségek új generációs szekvenálással történt vizsgálatának eredményei	32
4.6. Palackdugók mikrobiológiai vizsgálatának az eredményei.....	35
5. KÖVETKEZTETÉSEK	38
ÖSSZEFOGLALÁS.....	40
IRODALOMJEGYZÉK.....	41
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	45
MELLÉKLETEK	46

1. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS

„Székelyföld rendkívül változatos és mennyiségben is igen bámulatos nagy ásványizbőség miatt talán a legalkalmasabb hely az egész földkerekségen arra, hogy a föld életjelenségeibe az ásványvizek útján betekinthesünk.”

Bányai János, 1934

Testtömegünk jelentős részét kitevő víz létfontosságú eleme a szervezetnek. Több hétig képesek lennénk életben maradni élelem nélkül, viszont szervezetünk víz nélkül csupán néhány napig bírná. A víz alapvető szerepet játszik az emésztésben, test hidratáltságában, az agyműködésben stb. Egy egészséges felnőtt napi vízszükséglete kb. 2-2,5 liter ebből 1,5 liter ivóvíz, a többi az elfogyasztott étel-miszer összetételét képező folyadékokból és a táplálékkal bevitt tápanyagok anyagcseréjéből származó vízből ered (Eftimie 2017).

A természetben a víz körforgása folytonos jellegű, így a szárazföldi forrásokból (tavak, folyók, tengerek, óceánok) elpárolgott vizek légköri vizekké alakulnak. A légáramok hordozzák ezt a vizet és a melegebb területekkel érintkezve lecsapódik és a talajra hullik, így felszíni- és felszín alatti vizek keletkeznek. A felszín alatti vizek (bizonyos feltételek mellett) forrásként érkeznek a felszínre, változatos mennyiségben tartalmazva sókat, melyeket a felszín alatt megtett útjuk során kioldottak a kőzetekből. Ha a sótartalom meghaladja az 1 g/l-t szénsavas vagy szénsav mentes ásványvíz keletkezik (Eftimie 2017).

Az ásványvíz definíció az évek során nagyon sokat formálódott, köszönhetően többek között az EU-hoz való csatlakozásnak, másrészt pedig annak, hogy nagyon nehéz egy konkrét meghatározást megfogalmazni a vizek sokfélesége miatt. A meghatározásokban többnyire állandó feltétel, hogy magas ásványi anyag tartalommal és magasabb hőmérséklettel rendelkezzen (Kis és mtsai. 2007).

Korábbi definíció szerint ásványvizeknek azokat a vizeket nevezzük, amelyek olyan felszín alatti védőrétegből származnak, ahol különböző oldódási és más kémiai folyamatok révén telítődnek ásványi anyagokkal – ásványi sókkal és oldott gázokkal. Ásványvízről akkor beszélünk, ha az oldott sótartalom 1 kg/m³ értéket mutat. Ha az oldott sótartalom kisebb értéket mutat, édesvízről beszélünk (Pándi 2009; Kis és mtsai. 2007).

Az Európai Parlament és Bizottság 2009/54/EC Direktívája szerint azokat a vizeket nevezzük ásványvizeknek, amelyek mikrobiológiai szempontból tiszták, vagyis semmilyen külső szennyezés nem érte őket, földalatti víztározóból származnak és természetes módon forrásként vagy fúrás által jutnak a felszínre.

A földalatti származásnak köszönhetően védettek minden szennyeződés ellen és hosszútávon állandó kémiai összetétellel rendelkeznek.

Romániai Egészségügyi Minisztérium a balneológia irányelveihez hasonlóan, ásványvízzé minősítéshez a következő feltételeket adta meg (1020/2005 kormányrendelet):

- minimum 1 % oldott sót tartalmazzon (klorid, szulfát, bikarbonát);
- a következő mennyiségben tartalmazzon gyógyhatással rendelkező összetevőket: Fe 10 mg%, As 0,7 mg%, I 1 mg%, CO₂ 1 gr% és H₂S %;
- gyógyhatással rendelkező gázokat tartalmazzon (CO₂ és H₂S) fent meghatározott mennyiségben;
- 20°C fölötti hőmérséklete legyen;
- gyógyászatban meghatározott radioaktivitással rendelkezzen (29 nC).

Mivel az ásványvizeket élelmiszerek közé soroljuk, így szükség van a pontos definíciók meghatározására. A 1020/2005-ös romániai kormányrendelet (amely az évek során több változtatáson is átesett) kimondja, hogy az ásványvizeknek eredendően szennyezésmentesnek kell lenni, mikrobiológiai szempontból tisztának és védett vízáadó rétegből kell származnia, emellett fogyasztása pozitív hatással kell bírjon az emberi szervezetre (Feru 2012).

Székelyföld és egyben Románia is a földrajzi adottságoknak köszönhetően rendkívül nagy ásványvízbőséggel rendelkezik, ebből adódik, hogy szinte lehetetlen két egyforma vizet találni az ország területén. Ezt a sokféleséget leginkább a Kárpátok, illetve a Hargita eruptciós vonalai határozzák meg (Bányai 1934). Az ásványvizek szempontjából ez még azért is fontos, mivel a korábbi vulkáni tevékenységnek köszönhetően az oldott sók és gázok szempontból igen sokszínű vizeket eredményeznek.

1.1. Ásványvizek jellemzése

1.1.1. Vegyi összetétel

Az ásványvizek vegyi összetétele az oldott sók és gázok tartalmából ered, melyek az adott terület geológiája határozza meg. Ezek az ásványi sók biztosítják az egészségre pozitívan gyakorolt hatásokat. Az ásványvizek legfontosabb összetevői a bennük feloldva megtalálható anionok, kationok és gázok. A leggyakrabban előforduló anionok: hidrogénkarbonátok (HCO₃⁻), klorid (Cl⁻), szulfátok (SO₄²⁻), nitrátok (NO₃⁻). Kationok: kalcium (Ca²⁺), magnézium (Mg²⁺), nátrium (Na²⁺), kálium (K⁺). Az ásványvizekben leggyakrabban megjelenő gáz a széndioxid és kisebb mennyiségben is jellegzetes szagot adó kénhidrogén. Kisebb mennyiségben ugyan, de előfordulhat még az ammóniumion is.

1.1.2. Ásványvizek főbb típusai

Az ásványvizeket többféle szempont szerint lehet csoportosítani, legyen szó akár a pH-ról, hőmérsékletről, oldott sókról és gázokról.

A vizek pH-ja alapján megkülönböztetünk: lúgos ($\text{pH} > 7,2$), semleges ($6,8 < \text{pH} < 7,2$) és savas ($\text{pH} < 6,8$). Hőmérséklet szerint hideg ($< 20^\circ\text{C}$) és termál ($> 20^\circ\text{C}$). Bepárlási maradék alapján négy kategóriát különítünk el (Feru 2012):

- nagyon alacsony mineralizációval rendelkező ($< 50 \text{ mg/l}$);
- alacsony mineralizációjú ($50\text{-}500 \text{ mg/l}$);
- közepes mineralizációjú ($500\text{-}1500 \text{ mg/l}$);
- magas mineralizációval rendelkező vizek ($> 1500 \text{ mg/l}$).

A széndioxid eredete alapján lehetnek: természetesen szénsavas, forrásból hozzáadott széndioxiddal, teljesen vagy részlegesen szénsavtalanított és más forrásból hozzáadott széndioxiddal rendelkező. A széndioxid mennyiségét tekintve lehetnek: CO_2 mentes (CO_2 : $0\text{-}250 \text{ mg/l}$), enyhén savas ($250\text{-}1500 \text{ mg/l}$), közepesen szénsavas ($1500\text{-}2500 \text{ mg/l}$), szénsavas ($2500\text{-}3500 \text{ mg/l}$), erősen szénsavas ($> 4000 \text{ mg/l}$) (Feru 2012; Pándi 2009).

Az ásványvízben oldott ásványi anyagok alapján lehetnek (Vardianu 2021; Feru 2012; 1020/2005-ös kormányrendelet):

- hidrogénkarbonátosak: amikor a HCO_3^- tartalom minimum 600 mg/l ;
- szulfátosak: SO_4^{2-} meghaladja a 200 mg/l -t;
- klóros: a klórtartalom minimum 200 mg/l ;
- kalciumos: $\text{Ca}^{2+} > 150 \text{ mg/l}$;
- magnéziumos: $\text{Mg}^{2+} > 50 \text{ mg/l}$;
- vasas: a Fe tartalom legalább 1 mg/l ;
- nátriumos: $\text{Na}^{2+} > 200 \text{ mg/l}$;
- fluoridtartalmú: ha a fluortartalom nagyobb mint 1 mg/l .

1.2. Székelyföld ásványvizeinek rövid jellemzése

„A székely ember többféle ásványvizet különböztet meg, szénsavas ásványvizet, savanyú vizet vagy borvizet, szejkés vizet, kénes vagy büdös vizet és sósvizet.” (Berszán és mtsai. 2009).

Székelyföld legjellegzetesebb vize a savanyúvíz vagy másnéven borvíz, amelyek a Kelemen-Görgényi-Hargita vulkáni vonulatoknak köszönhetők. A felszálló széndioxidgáz magmai eredetű, amely a mélységi vizekben és talajvizekben oldódva változtatja pezsgőssé a vizet.

A szejkés vizek fehéres színűek, kéntartalmuk miatt nevezik büdös vizeknek. A jellemző záptojás szag előfordulása a vulkáni utóműködés során feltörő kénhidrogénhez kapcsolódik.

Azokat a vizeket nevezzük kénes vizeknek, melyben a kén legalább 1 mg/l mennyiségben van jelen. Jellegzetes szejkés vizek találhatóak meg a Székelyudvarhely melletti Szejkefürdőn.

A bűdös vizek eredete a vulkáni utóműködésekre vezethetők vissza, mely során a széndioxid mellett és a filis rétegekből feltörő kénhidrogén előfordulásnak köszönhető a jellegzetes „bűdös” jelző. Ilyen bűdös víz található meg többek között a csíkszentimrei Bűdösfürdőn.

A szénsavas vizekben a CO₂ koncentrációnak minimum 250 mg/l-nek kell lennie. A széndioxidnak köszönhetően a víz a környező kőzetekből több ásványi anyagot képes kioldani, ennek köszönhető, hogy a szénsavas ásványvizek jóval nagyobb oldott ásványi anyag mennyiséggel rendelkeznek, mint a kevésbé szénsavasok. A sós vizekben leggyakrabban előforduló elemek a nátrium- és magnézium-klorid, ezek az Erdélyi-medence, kárpáti homokkő zónából feltörő nátrium-kloridnak tudható be.

Összeségében az mondható el a székelyföldi borvizekről, hogy a bennük leggyakrabban előforduló kémiai elemek az anionok közül a hidrogénkarbonát, szulfát és klorid ionok, a kationok közül pedig a kalcium, magnézium, nátrium és kálium. A makroelemek alapján több főtípusba sorolhatók: nátrium-kloridos, kalcium-hidrogénkarbonátos, kalcium-szulfátos stb.

1.3. Ásványvizekben előforduló mikroorganizmusok

Az ásványvizekre vonatkozó törvények egyik legfontosabb kritériuma, hogy mikrobiológiailag is tisztának kell lennie. Viszont nem lehet olyan vizet találni (legyen az bármilyen hőmérsékletű vagy érkezzon nagyon nagy mélységekből), amelyben egyáltalán nem fordulnának elő mikroorganizmusok. Az ásványvizek mikrobióta közösségeit két csoportra oszthatjuk: az *autochton* vagy más néven a saját – őshonos mikroorganizmusok, amelyek elsődlegesen vízi szervezetek, és az úgynevezett *allochton* mikrobák, melyek szennyezések útján jutnak be az ásványvizekbe: a talajból vagy talajvizekből, de akár fekális szennyeződések révén (Máthé és mtsai. 2010). Ez utóbbi mikroorganizmusok a melegvérű állatok tápcsatornáiban találhatóak meg és az ürülékek által szennyezhetik a forrásokat.

Az allochton és autochton mikroorganizmusok közti legfőbb különbség a szervesanyag igényük. Az allochton mikrobáknak az életműködéseikhez magas szervesanyag-tartalomra van szükségük. A baktériumok életműködéséhez rendelkezésre álló szervesanyag több különböző forrásból is származhat, lehetnek: geológiai-, felszíni eredetűek és az autotróf szervezetek termékei.

Az, hogy az ásványvizekben milyen mikroorganizmusok fordulnak elő és milyen mennyiségben függ az őket körülvevő környezeti tényezők összességétől. Ahhoz, hogy az ásványvizet mint életemet vizsgálni lehessen, fontos ismerni a mikroorganizmusok a környezethez való alkalmazkodásuk mértékét. A következő hatótényezők, amelyek befolyással vannak az

autochton mikrobiótára (Némedi 2006): vízáadó réteg geológiai állapota, hőmérséklet, sótartalom, szerves és szervetlen anyagok, nyomás és vízmozgás, pH és redoxpotenciál, fényviszonyok, gázok és a biológiai környezet.

Az ásványvizekben előforduló szervetlen anyagok tápanyagforrást nyújtanak az allochton és autochton mikrobáknak egyaránt.

A hőmérséklet az élő szervezetek számára az egyik legfontosabb környezeti tényező. A tűrési határok és az adott szervezet számára az optimum tekintetében is igen nagy eltérések figyelhetők meg. A hőmérsékleti tolerancia alapján három csoport különíthető el (1. táblázat):

1. táblázat: Mikroorganizmusok hőmérséklet szerinti tűréshatárai (Némedi 2006)

	Minimum	Optimum	Maximum
Pszichrofilek	-10 - +5	+10 - +20	+20 - +30
Mezofilek	+10 - +15	+30 - +40	+40 - +50
Termofilek	+25 - +45	+50 - +65	+75 - +80

Ásványvizekben gyakoribbak a mezofil és termofil baktériumok előfordulása, mivel ezek a vizek a mélység és nyomás miatt állandó magasabb hőmérséklettel rendelkeznek.

Az ásványvizek magas sótartalma miatt jellemzően előfordulnak halotoleráns, ritkábban halofil (sótűrő) fajok is, ilyenek lehetnek: *Mycococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, illetve *Halobacterium* nemzetségek képviselői.

1.3.1. Autochton mikrobióta

Az autochton mikroorganizmusok a vizek saját, őshonos mikrobiótáját jelenti, melyek a talajból és talajvizekből kerülnek az ásványvizekbe (György és mtsai. 2007). Az őshonos mikrobák az oligotróf vizekre jellemzőek (Máthé és mtsai. 2010).

Az ásványvizek nem tekinthetők egy steril környezetnek, hanem összetett ökoszisztémák, amelyek rendkívül változatos fenotípusos és genetikai sokféleséggel rendelkeznek az őshonos baktériumokból. Az Európai Unió irányelve kimondja, hogy a természetes ásványvizeket semmilyen fertőtlenítő, sterilizáló, pasztörizáló kezelésnek tilos alávetni vagy bármi más eljárásnak, amely a mikroorganizmusok eltávolítására vagy elpusztítására szolgál. Kísérletek és epidemiológiai adatok kimutatták, hogy az őshonos baktériumok nem hozhatók összefüggésbe semmilyen emberi megbetegedéssel (Casanovas-Massana és Blanch 2012).

Ezeket a mikroorganizmusokat először a kőzetekben figyelték meg és írták le, viszont a mindmáig keveset lehet tudni a mikrobiális ökoszisztémák összetételéről és biológiai sokféleségéről. Tipikusan előfordulnak meleg, hideg, száraz környezetben, ahol a kőzetek

pórusaiban védve vannak a környezeti stresszfaktoroktól, mint például a napsugárzás, hő, hideg. A kőzeteken belül biofilmet hoznak létre a felszín alatt (Horath és Bachofen 2009).

Mivel az ásványvizek ionösszetétele időben állandó, ez alapján megjósolható a várható mikrobióta főbb képviselői. Például, ha a környezeti feltételek is lehetővé teszik, egy vasas ásványvízben nagyobb számban vaskbaktériumok fognak megjelenni, elszaporodni.

A szervesetlen elemek közül a legfontosabbak: a nitrogén, foszfor, szén és a kén, illetve ezek körforgásában résztvevő baktériumok. Ennek megfelelően az ásványvizekben a baktériumok sejtszámai elérhetik a mililiterenként 10^5 - 10^6 -on értéket. A vizekben általában nem egy heterogén, hanem eléggé egységes, homogén mikrobaközösség szaporodik el, tehát a legnagyobb mennyiségben jelen levő iont felhasználó baktériumok lesznek a legnagyobb számban. A nitrogén körforgásban résztvevő obligát aerob nitrifikáló szervezetek a mélységi vizekben jelenlévő fosszilis ammóniát oxidálják. Ez a folyamat leggyakrabban két lépcsőben megy végbe: az ammóniát (NH_3) nitritté (NO_2^-) oxidálódják az ammónia-oxidáló baktériumok (AOB), majd a következő lépésben a nitrit nitráttá (NO_3^-) alakul át a nitrit-oxidáló baktériumok (NOB) révén. Felfedezésük után több mint száz évvel sikerült bizonyítani, hogy vannak olyan nitrifikáló baktériumok, amelyek képesek az ammónia teljes oxidálására, azaz első lépésben nitritté majd nitráttá oxidálni (COMAMMOX baktériumok - COMPLETE AMMONIA OXIDATION) (Daims és mtsai. 2015; van Kessel és mtsai. 2015).

A fémszulfidok primer képzése a szulfitredukáló baktériumok révén, majd a kénhidrogén oxidálása, illetve a pirit oxidációja a *Thiobacillus*-ok által, amikor is az anyagcsere során vas-szulfát képződik (Némedi 2006; Mellbye és mtsai. 2015).

A vaskbaktériumok tagjai növekedve sejtjeiket vas- és mangán-oxi-hidroxid csapadékkal vonják be, változó vegyértékű kationok oxidálásával nyernek energiát, általában képesek széndioxidot fixálni, így ezek a szervezetek kemolitotrófok. A rozsdavörös-barnás színű csapadék a baktériumok tokjában, illetve hüvelyében dúsul fel. A savanyú talajokban és tőzeglápokon ezen baktériumok élettevékenységeinek köszönhető az úgynevezett gypvasérc (fő ásványai a: limonit, hematit) telepek létrejötte. A vas- és mangánbaktériumok a kétértékű vasat oxidálják háromértékű vassá, ez válik ki vas-hidroxid csapadékként és üledéket képez (Kretz 2018).

1.3.2. Allochton mikrobióta

Az allochton mikrobák szennyezés útján jutnak a vizekbe, emellett származhatnak különböző vízáadó rétegek szennyeződéséből vagy kutak fúrása által kerülhetnek be. A szerves szennyező anyagok nagymértékben növelhetik a vizekben a szaprobioták számát, de a legveszélyesebb szennyező tényező a széklet eredetű szennyezés, amellyel akár patogén mikroorganizmusok is a vizekbe juthatnak. A fekáliás eredetű szennyezések kimutatása indikátor mikrobák révén valósul

meg, ilyen mikroorganizmusok a coliform baktériumok és a fekális coliformok (*Escherichia coli*), fekális *Enterococcus*-ok (György és mtsai. 2007; Máthé és mtsai. 2010).

A nitrogén körforgalmában résztvevő szervezetek a mélységi vizekben levő ammóniát oxidálják és ebben a *Nitrobacteriaceae* család vesz részt. Ezek obligát anaerob élőlények, főleg a talajban elterjedtek, de vízkivétel során megjelenhetnek. A jelen levő nitrát aerob baktériumok közreműködésével redukálódhat nitritté, ezt előidéző baktériumok lehetnek: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Escherichia coli* fajok is.

A felszín alatti vizekből legkönnyebben a heterotróf baktériumok mutathatók ki, ezek leggyakrabban olyan aerob légző Gram-negatív pálcák, melyek oxigént használnak fel terminális elektron akceptorként. A *Pseudomonas* sp. fajok nagyon elterjedtek. Több szakirodalom szerint a protozoák is kimutathatók, de számukat mindig meghaladják a baktériumok. Anaerob mikroorganizmusok is jelen lehetnek a felszín alatti vízkészletekben, ilyenek a szulfitredukáló *Clostridium* baktériumok. Nagy ammónia-tartalom mellett aerob körülmények között a nitrifikáció jellemző, de oxigén hiányos környezetben ($>30 \mu\text{mol/l}$) denitrifikáló és nitritredukáló baktériumok is előtérbe kerülnek, például *Thiobacillus* sp. és *Bacillus* sp. fajok (Pap 2011).

A *Pseudomonas aeruginosa* egy pálcika alakú Gram-negatív fakultatív aerob baktérium, amely előszeretettel használja az oxigént, mint végső terminális elektron akceptor. Képes alternatív elektron akceptorok, például nitrit felhasználására is. Különböző akut és krónikus vízzel kapcsolatos fertőzéseket okoz.

Az opportunista kórokozó *Escherichia coli* a bélmikrobióta uralkodó aerob baktériuma és a fekáliával szennyezett vízkészletekben indikátor baktériumként van jelen. 250 ml vízben nem szabad kimutathatónak lenniük olyan bélsárbaktériumoknak, mint az *E. coli* és más kólibaktériumok. Az olyan kórokozó törzsek, mint a vero-toxint termelő *E. coli* vagy az enterotoxikus *E. coli*, valamint az a tény, hogy a vizsgált vízminta bélsárszennyezettségére utal, továbbra is szükségessé teszi az adott vízbázis vizsgálatát. Patogenitása miatt ez a törzs komoly egészségügyi kockázatnak tekinthető (Schalli és mtsai. 2023).

Az *Enterococcus* fajok az évezredek során a legkülönbözőbb gazdaszervezetek (emberek és más emlősök, madarak, hüllők és rovarok) gyomor-bélrendszeri konzorciumainak jól alkalmazkodott tagjaiként fejlődtek ki. A nemzetség ma már több mint 40 különböző fajt foglal magába, különböző előfordulási területekkel, élőhelyekkel. Ezen élőhelyek közé tartozik az állati gazdák, valamint a növények, a talaj és a víz, illetve az ember által előállított termékek, beleértve az erjesztett élelmiszereket és a tejtermékeket. (Lebreton és mtsai. 2014). Bár az enterokokkusok általában a mikrobióta kevesebb, mint 1%-át képviselik, általában jelen vannak a széklet konzorciumában, de más baktériumok, köztük az *Escherichia coli*, a *Clostridium*-ok és a *Bacteroidales* túlsúlyban lehetnek. Az emberi székletben való állandó jelenlétük és a környezetben

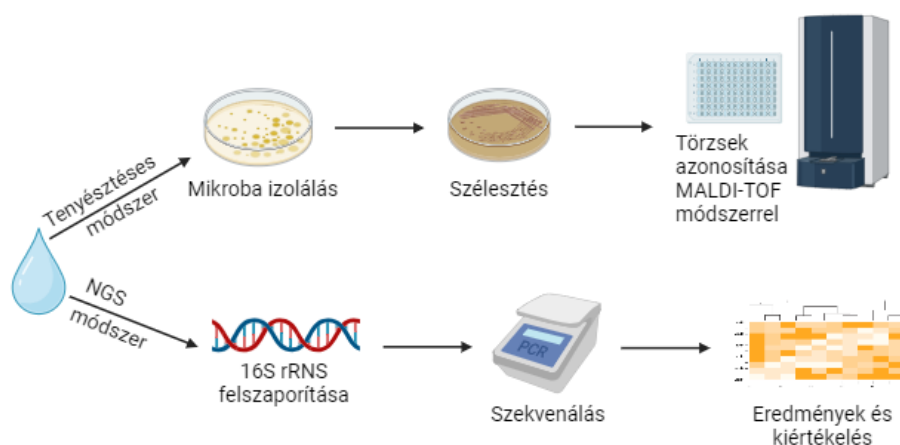
való perzisztenciájuk miatt az enterokokkuszokat az ivóvízbe jutó székletszennyezés indikátorának tekinthetjük (Boehm és Sassoubre 2014).

A *Clostridium perfringens* egy Gram-pozitív baktérium, amely megtalálható a természetben a talajban, bomló növényzetben és a tengeri üledékek normális tagjaként is, emellett emberi és más gerinces állatok bélrendszerében. A mintegy 60 ismert *Clostridium* faj közel fele képes megbetegedést okozni emberi és állati gazdaszervezetekben (Misailă és mtsai. 2023).

Míg az indikátor mikrobák könnyen tenyésztethetők mikrobiológiai vizsgálathoz használt táptalajokon, az őshonos mikrobák izolálása jóval nehezebb és speciális berendezéseket és technikákat igénylenek (Máthé és mtsai. 2010).

1.4. Mikrobaközösségek vizsgálata

A mikroorganizmusok csak nagyon kis százaléka tenyésztethető laboratóriumban, mivel a legtöbbjük nem képes mesterségesen előállított közegben szaporodni, olyan körülményeket igényelnek, melyek nem kivitelezhetők laboratóriumi szinten. A mikroorganizmusok azonosítására technikák széles skálája áll rendelkezésre, melyek lehetnek: tenyésztésen alapulók, melyek magukba foglalják különböző (szelektív és nem szelektív) táptalajok használatát, molekuláris vizsgálatok (például a 16S rRNS gén szekvenálás; új generációs szekvenálás - NGS) és mindezek mellett érdemes megemlíteni a MALDI-TOF tömegspektrometrián alapuló eljárásokat (Pinar-Méndez és mtsai. 2021) is. Ebből kiindulva az ásványvizek mikrobiótájának meghatározására tenyésztéstől függő és tenyésztéstől független módszerek különíthetők el. A tenyésztéses vizsgálatok során szelektív táptalajok alkalmazására van szükség, amelyeket leggyakrabban a fekális szennyeződések kimutatására alkalmazzák. A szelektív táptalajok használata biztosítja az allochton mikrobák számára a megfelelő környezeti feltételeket (például: megfelelő pH-érték, szerves tápanyagok, stb.). Ezzel szemben az autochton mikroorganizmusok nehezen tenyésztethetők laboratóriumi körülmények között (Máthé és mtsai. 2010). Ezekből a szempontokból adódóan, ha pontos eredményt szeretnénk kapni az ásványvizek életközösségét illetően, mind tenyésztéses és attól független módszerek együttes alkalmazására van szükség, melyet az 1. ábra mutat be.



1. ábra: Ásványvizekhez kapcsolódó mikrobiom leírásának stratégiái

1.4.1. Tenyésztéstől függő módszerek

1.4.1.1. Baktériumtörzsek izolálása

A tenyésztési módszerek arra biztosítanak lehetőséget, hogy a mikroorganizmusokat különböző célokra fenntartsák és elszaporítsák, valamint különböző mikrobacsoportok jelenlétét kimutassák (csíraszám meghatározás).

A táptalajok a mikroorganizmusok szaporodására és életképességeik fenntartására szolgálnak, fedezik a mikrobák tápanyag- és energiaforrás-igényeiket és biztosítják a fizikai és kémiai körülményeket. A táptalajoknak tartalmazniuk kell: vizet, szén- és energiaforrást, nitrogénforrást és ásványi anyagokat.

Aerob módon tenyésztethetők azok a mikroorganizmusok, amelyek szaporodásukhoz és életfeltételeikhez oxigént igényelnek vagy azok, amelyek szaporodását nem gátolja az oxigén (aerotoleráns). Anaerob módon tenyésztik azokat a mikroorganizmusokat, amelyek anyagcseréjét és szaporodását gátolja az oxigén.

Mivel a tenyésztési eljárások során az indikátor mikrobák jórészt fekális eredetűek, melyek komoly egészségügyi problémákhoz vezethetnek, jelenlétük az ivóvizekben törvény által szabályozva van, melyet a 2. táblázat mutat be:

2. táblázat: Indikátor szervezetek törvény által előírt határértékei ivóvizekben
(98/83/EK irányelv alapján)

Mikroorganizmus	Határérték (TKE telepképző egység/ml)
Aerob, mezofil összcsíraszám 22°C-on	100 TKE/ml
Aerob, mezofil összcsíraszám 37°C-on	20 TKE/ml
<i>Coliform</i> -ok	0 TKE/250 ml
<i>Escherichia coli</i>	0 TKE/250 ml
<i>Enterococcus</i> -ok	0 TKE/250 ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0 TKE/250 ml
Anaerob, spórás, szulfít-redukáló <i>Clostridium sp.</i>	0 TKE/100 ml

1.4.1.2. Baktériumtörzsek azonosítása MALDI-TOF-MS módszerrel

A mátrix-asszisztált lézer deszorpció, ionizációs, repülési idő mérésen alapuló tömegspektrometria egy olyan módszer, mellyel a különböző mikroorganizmusok faji szintű identifikálására van lehetőség. A módszer lényege, hogy a vizsgált minta molekuláinak ionizációja a mátrixnak nevezett segédanyag hozzáadásával történik meg. A mátrix képes elnyelni az ionizációhoz használt lézer energiáját. A műszerbe való behelyezés után a lézer hatására a makromolekula-mátrix komplexek felszabadulnak a mintából (ezt nevezik deszorpciónak). A keletkezett molekulaionokat a nagyvákuumban egy gyorsítófeszültség juttatja az analizátorba. Az analízis a repülési idő (time of flight – TOF) detektor alkalmazásával történik meg. Lényege, hogy a nagyvákuumban a molekulák a méretükkel arányos sebességgel jutnak el a detektorhoz (kisebb molekulák rövidebb idő alatt, a nagyobb méretű molekuláknak több idő szükséges). A keletkezett tömegspektrumok egy adott fajra, illetve nemzetségre jellemzőek. A tömegspektrum azonosítása egy könyvtár, adatbázishoz történő hasonlítás alapján történik meg. A megbízhatóság érdekében pontszámokat és színkódokat is alkalmaznak: a megbízhatatlan azonosítás piros színnel van jelölve (0,00-1,69), az alacsony megbízhatóságú azonosítás sárgával (1,70-1,99), míg a nagy megbízhatóságú azonosítás zölddel (2,00-3,00) (Nagy és mtsai. 2014; Pinar-Méndez és mtsai. 2021).

1.4.2. Mikrobaközösségek vizsgálata tenyésztéstől független DNS ujjlenyomat módszerekkel

Ahogy arról a fentiekben is szó esett, a klasszikus tenyésztési módszerrel a baktériumtörzsek többsége nem kimutatható, mivel sok mikroorganizmus olyan specifikus szaporodási körülményeket igényel, amelyeket laboratóriumi környezetben nem lehet (könnyen) utánozni. Az új generációs szekvenálás vagy NGS (Next Generation Sequencing) technológia és annak különböző módszertani változatainak alkalmazása ma már lehetővé teszi egy mikrobiális mintán

belüli különböző típusú mikroorganizmusok egyidejű kimutatását, tenyésztéstől független megközelítéssel és egyetlen szekvenálási futtatással. Az NGS lehetővé teszi a kutatóknak, hogy vizsgálják a mikrobapopulációk összetételét és működését nagyon változatos környezetben, példátlan felbontással és áteresztőképességgel. Jelenleg ezeknek a vizsgálatoknak a többsége az NGS-t alkalmazza úgy, hogy: a célzott amplikon szekvenálásra összpontosít, általában a 16S riboszomális RNS (rRNS) gént használva filogenetikai célpontként (azaz a 16S rRNS gén NGS); vagy shotgun metagenomics, a mintában jelenlévő genetikai anyag szekvenálása közvetlenül PCR-független megközelítéssel. Mindkét módszer a nukleinsavak mikrobiális mintából történő extrakciójával kezdődik. Ezután az extrahált DNS-t vagy 16S rRNS gén PCR amplifikációnak vetik alá (16S rRNS gén NGS), vagy kis DNS-fragmensekre hasítják (shotgun metagenomika). Az eredményül kapott 16S rRNS génamplikonokat vagy hasított DNS-fragmenseket NGS-technikákkal szekvenálják. Végül az összes szekvenciaadatot bioinformatikai algoritmusok széles skálájával dolgozzák fel, amelyek lehetővé teszik a kutatók számára, hogy feltárják a vizsgált minta taxonómiai összetételét és/vagy funkcionális kapacitását (Boers és mtsai. 2019).

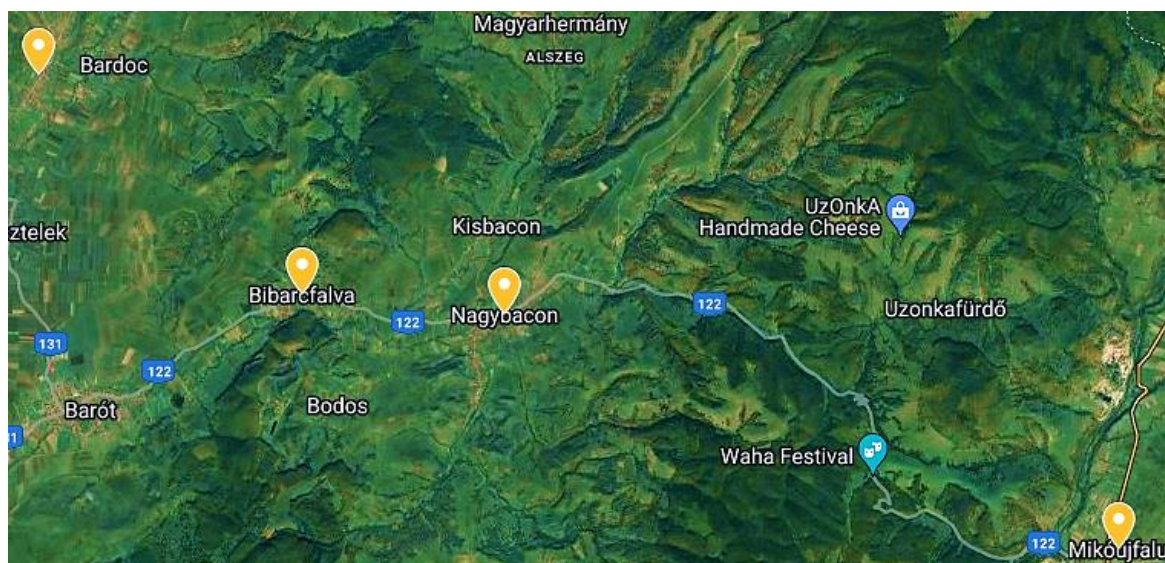
2. CÉLKITŰZÉSEK

Kutatásunk fő célja széles körben fogyasztott ásványvizek vegyi összetételének és mikrobiológiájának a tanulmányozása. További cél volt a potenciálisan jelenlévő kémiai és bakteriológiai szennyezők azonosítása, melyek hatással lehetnek a víz ihatóságára, illetve fogyasztókra. A tenyésztésen alapuló higiéniai-mikrobiológiai vizsgálatokon túl korszerű DNS technológiákat alkalmazva (NGS) meg akartuk ismerni az ásványvizek természetes (autochton) baktérium közösségeit. Fontosnak tartottuk a mikrobiális életközösség és a vízminőség közötti kapcsolat feltárását.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Mintavételi helyszínek

A klasszikus higiéniai-tenyésztési vizsgálat elvégzéséhez négy ásványvízforrásból gyűjtöttünk be vízmintákat négy különböző időpontban. A vizsgált források a: mikóújfalusi Bedő-forrás, nagybaconi Faluborvíz, bibarcfalvi F9-es kút, illetve a száldobosi Faluvégi-forrás voltak (2. ábra). A mintavételezésekre 2023. áprilisi, júniusi, októberi és 2024. februári időpontokban került sor.



2. ábra: Mintavételi helyszínek (Google térképszerkesztő)

Mikóújfalusi Bedő-forrás:

Kovászna megyében, Sepsiszentgyörgytől 23 km-re található, a falu környéke gazdag természetes ásványvízforrásokban. Az itteni források hozama elmarad a szomszédos faluban, Málnásfürdön található forrásokétól. A legnagyobb hozammal a Bedő-forrás (3. ábra) rendelkezik, mely az Olt jobb partjának teraszképződménye alól tör a felszínre. Nátrium-bikarbonátos típusú, enyhén sós, meszes és szénsavas. A szénsavas vizek jelenléte a környéken azzal magyarázható, hogy a település közel helyezkedik el a Csomád-Büdös hegységhez, amely Székelyföld legfiatalabb vulkáni képződménye (Kisgyörgy 2009, 2013; Berszán és mtsai. 2009). A Bedő-forrás nagy népszerűségnek örvend úgy a helyiek, mint a környéken élők számára. A forrást egy, az Olt folyó fölé épített vaspallón keresztül lehet megközelíteni.



3. ábra: Mikóújfalusi Bedő-forrás (Fotó: Salamon Tímea)

Nagybaconi Faluborvíz:

Nagybaconhoz közigazgatásilag több falu is tartozik: Kisbacon, Magyarhermány, Szárazajta és Uzonkafürdő. A falu legismertebb ásványvízforrása a település északkeleti részén megtalálható Faluborvíz vagy Falu borvize (4. ábra) (Kisgyörgy 2009). A víz hőmérséklete langyosnak mondható, pH-ja 5,87 körül van, szénsavas, nagyobb mennyiségben tartalmaz Cl, Na és Fe ionokat. Fontos tudni, hogy csővezetékek segítségével van bevezetve a faluba.



4. ábra: Nagybaconi Faluborvíz (Fotó: Salamon Tímea)

Bibarcfalvi F9-es kút:

Bibarcfalva népszerűségét az ásványvízforrásainak köszönheti, már az 1880-as évektől megkezdődően palackozzák az itt felszínre törő források vizét. A faluban megtalálható borvizek a Baróti-medence üledékes víztároló kőzeteiből erednek. Az évek során az ásványvizek palackozása miatt több forrás is eltűnt. A falu (nyugati) Barót felőli részén felépített palackozó mellett több hidrogeológiai fúrás eredményeképpen jöttek létre az: F7, F8, F1 BIS és az F9 BIS kutak. A fúrásokból kalcium-nátrium-hidrogénkarbonátos víz tör a felszínre. Az F9-es fúrásból (5. ábra) származó víz kalcium-nátrium-magnézium-hidrogénkarbonátos típusú. A faluban napjainkban is zajlik ásványvízpalackozás, melyeket „Biborteni” néven lehet megtalálni (Berszán és mtsai. 2009; Kisgyörgy 2009).



5. ábra: Bibarcfalvi F9-es kút (Fotó: Salamon Tímea)

Székelyszáldobosi Faluvégi-forrás:

Székelyszáldobos a Valál-víz völgyében, a Dél-Hargita lábánál található. A falu alattalajában megtalálhatók limonit és sziderit telepek. A település déli részén található meg a borvizes kút, az ún. Faluvégi vagy Száldobosi borvíz (6. ábra), amely egy méter átmérőjű kúpbe van foglalva. Víz hőmérséklete 11°C körüli, kalcium-magnézium-nátrium-hidrogénkarbonátos (Berszán és mtsai. 2009; Kisgyörgy 2009). Mintavételeink során sajnálattal tapasztaltuk, hogy nagyon rossz állapot uralkodik, a tetőszerkezet rossz állapotban van, a kútba nagyon könnyen jutnak bele szennyezők, például madár ürülék, emellett a kialakított vizes árok, mely a kifolyó víz szabad elfolyását kellene biztosítsa nagyon könnyen feltelik, ezáltal a szennyezett víz a kútba is vissza tud jutni.



6. ábra: Székelyszáldobosi Faluvégi- vagy Száldobosi borvíz (Fotó: Salamon Tímea)

3.2. Mintavételi módszerek

A mintavételezést megelőzően, az előkészületek során 8 darab 1 liter űrtartalmú üveget sterilizáltunk: 121°C-on 20 percet autoklávozva. Minden forrásnál 2 liter vizet gyűjtöttünk be, melyeket a Sapientia EMTE Csíkszeredai Karának mikrobiológiai laboratóriumában dolgoztunk fel. A minták begyűjtése mellett a helyszínen fizikai-kémiai paramétereket is meghatároztunk egy multiparaméter Hach HQ40D mérőműszer segítségével. Ezek a paraméterek a: hőmérséklet ($T^{\circ}\text{C}$), pH, oldott oxigén (DO mg/l), oxigén telítettség (DO%) és elektromos vezetőképesség (mS/cm) voltak. Egy mérőhenger és stopperóra segítségével meghatároztuk a források vízhozamát is. Sor került az ásványvizek makro- és mikroelem koncentrációjának meghatározására is, melyet a Sapientia EMTE Kolozsvári Karának laboratóriumában végeztünk dr. Zsigmond Andrea-Rebeka irányításával.

3.3. Mikrobiológiai laboratóriumi vizsgálatok

A higiéniai vizsgálatok során az ásványvizekben jelenlévő szennyező (allochton) mikrobaközösség tagjainak a kimutatása volt a cél. Mivel ezek a mikrobák nagy szervesanyag-igényűek, ezért tenyésztésükhöz olyan tápközegre volt szükségünk, melyek biztosítanak minden feltételt az ideális növekedésükhöz. Ezen allochton mikrobák kimutatásához szelektív táptalajokat, illetve táplevest alkalmaztunk, emellett a mezofil aerob baktériumok összcsíraszámát is meghatároztuk, különböző hőmérsékleteken.

Az előkészületek során Petri csészéket, kémcsöveket, pipetta hegyeket, szűrőfejeket, tölcséreket sterilizáltunk.

A mezofil aerob összcsíraszám kimutatására Nutrient Agar, coliformok kimutatására Hi Crome Coliform Agar, a *Pseudomonas aeruginosa* kimutatására Pseudomonas Agar Base-t (+ glicerint), az anaerob spórás szulfitredukálók (*Clostridium* sp.) vizsgálatához Clostridial Differential Broth táplevest használtunk. Ezeket a tápközegeket 121°C-on 20 percet autoklávoztuk. Slantez-Bartley Agarral történt a fekális *Enterococcus*-ok kimutatása, mely táptalajt 105°C-on 15 percet autoklávoztunk.

A mezofil aerob összcsíraszám kimutatásához lemezöntést végeztünk. 1 ml vízmintát pipettáztunk a Petri-csészébe, majd a közel 40°C-os agart öntöttünk rá, óvatosan összekevertük, és a már megszilárdult táptalajokat inkubáltuk 22 és 37°C-on. 22°C-on főként az autochton mikrobaközösség tagjai, míg 37°C-on elsősorban az allochton mikrobaközösség tagjai növekedtek. 48 órás inkubálás után leszámoltuk a kifejlődött baktérium telepeket TKE - telepképző egység/ml-ben.

Az indikátor mikrobák (fekális *Enterococcus*, *Pseudomonas aeruginosa*, coliformok, *E. coli* és *Clostridium* sp.) kimutatása vákuumszűrő berendezés és szűrőpapír segítségével történt. Egy 0,45 µm pórusátmérőjű szűrőpapíron 250 ml vizet szűrtünk át, alkohol és gázégő segítségével lesterilizett csipesszel a szűrőpapírokat ráhelyeztük az előre kiöntött táptalajok felületére. A *Clostridium*-ok kimutatásához egy plusz lépés beiktatása szükséges: a mintákat 10 percig 80°C-on vízfürdőben hőkezeltük, ezáltal a spórák nem, de a vegetatív sejtek elpusztultak. A továbbiakban egy paraffin réteg segítségével biztosítottuk az anaerob környezetet.

A tápközegeket 37°C-on 48 órát inkubáltuk, kivételt képeznek ebben az esetben is a *Clostridium*-ok, melyeket 44°C-on inkubáltunk, és a telepképző egység meghatározása helyett az adott minta pozitív vagy negatív eredményét értékeljük. Pozitívnak mondhatók azok a minták, melyek esetében fekete vas-szulfid csapadék képződött szulfitredukció révén és gázképződés figyelhető meg (7. ábra).

A táptalajokban lévő különböző összetevők hatására a kifejlődött telepek eltérő színűek lesznek. A Hi Crome Coliform Agar-on kifejlődő *Escherichia coli* telepek kék színűek, a coliform telepek pedig lilás színűek lettek. A *Pseudomonas aeruginosa* telepek UV fény alatt zöld színben fluoreszkálnak. A fekális *Enterococcus* telepek bordó piros színűek, melyek belül sötétek kifele pedig világosabbak.



7. ábra: *Clostridium* sp. kimutatása (baloldali negatív, jobboldali pozitív minta) (Fotó: Salamon Tímea)

3.4. Laboratóriumi vízkémiai vizsgálatok

Az ásványvizek vízkémiai vizsgálatára a Sapientia EMTE Kolozsvári Karán került sor, ahol anionok, kationok, makro- és mikroelemek és nyomelemek mennyiségét határoztuk meg.

A bikarbonátion meghatározása sav-bázis titrálással történt, 50 ml mintát 0,1 N-os HCl oldattal titráltunk brómkrezolzöld indikátor jelenlétében.

Kloridion meghatározása potenciometriás titrálással történt, mérőoldatként 0,01 N-os AgNO_3 oldatot használtunk. A titrálás egy csapadékképződésen alapuló eljárás, mely során AgCl fehér csapadék képződött. A végpont meghatározása a műszer által folyamatosan regisztrált elektródpotenciálértékek kiértékelése során történt.

Szulfátion meghatározása turbidimetriás módszerrel történt. A mintáinkhoz szilárd BaCl_2 -ot adagoltunk, mely a mintákban levő SO_4^{2-} ionokkal BaSO_4 fehér csapadékot képezett, egy finom szemcsékből álló kolloid oldat képződött. A minta fényszórását spektrofotométerrel határoztuk meg 410 nm-en.

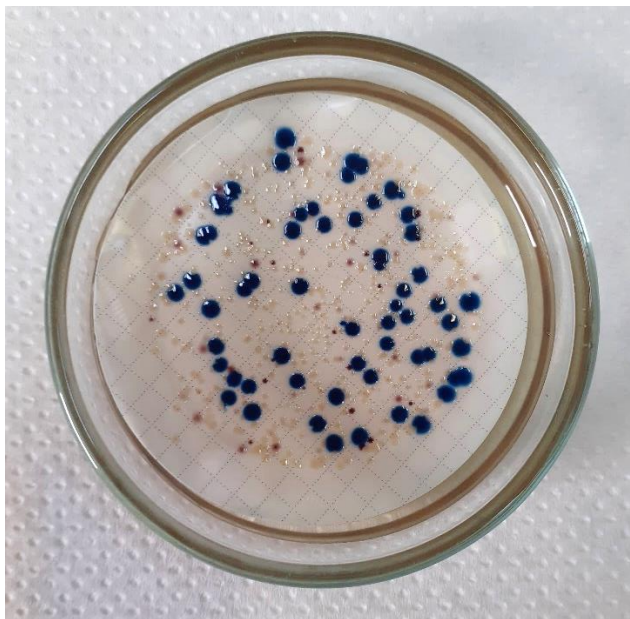
Az ammónium-ion meghatározása spektrofotometriás módszerrel történt, ahol egy zöld színű vegyület képződött. A minták fényelnyelését 655 nm-en mértük.

A kationok, fémionok meghatározása atomemissziós módszerrel történt, MP-AES (mikrohullámú plazmás atomemisszió) spektrométer segítségével, amelynek gerjesztőforrása egy 4500 K fokos nitrogénplazma. A Ca, K, Mg és Na meghatározásához százszoros és tízszeres

hígításokat készítettünk a mintáinkból. A nyomelemek (Si, Sr, Fe, Ba, B, Li, Rb, Mn, Al) meghatározásánál hígítatlan és 10-szeres hígításokkal dolgoztunk.

3.5. Baktériumtörzsek azonosítása MALDI-TOF-MS módszerrel

Munkánk során szeretnénk volna faji szinten is megismerni azokat a mikroorganizmusokat, melyek az allochton mikroflóra részét képezik. A mikrobák hatékony és gyors azonosításához MALDI-TOF módszert alkalmaztunk. A vizsgálatra a Csíkszeredai Megyei Sürgősségi Kórház laboratóriumában került sor Salamon Pál irányításával. Kutatásunk során az alábbi lépéseket követtük: az első lépésként a szelektív táptalajok felületén kifejlődött baktériumtelepek (8. ábra) közül egyaránt választottunk ki olyan telepeket, melyek az adott táptalajon tipikusnak, illetve nem tipikus telepnek számítottak. Ezt követően a kiválasztott telepeket Nutrient táptalajon szélesztettük ki (9. ábra), majd 37°C-on inkubáltuk. A szélesztéshez műanyag, steril Petri-csészéket használtunk, gázláng mellett dolgoztunk, a szélesztést oltóacssal végeztük. MALDI-ra való előkészítés során a táptalajról felvettünk egyedülálló telepeket és a MALDI lemez föltjára helyeztük. Ezután hangyasavval kezeltük a mintákat, amelynek szerepe az ionizáció segítésében van. Hagytuk pár percet, hogy megszáradjanak, majd ezután a mintákra helyeztük a mátrixot (HCCA). Ismételten hagytuk pár percet száradni, majd ezt követően a lemezt behelyeztük a spektrométer ionizációs kamrájába, betápláltuk az adatokat a számítógépbe és a futtatást követően megkaptuk a beazonosított mikrobák neveit.



8. ábra: Higiéniai vizsgálatához használt Hi Crome Coliform Agar (kék telepek *E. coli*, lila telepek coliform baktériumok) (Fotó: Salamon Tímea)



9. ábra: Nutrient agaron kiszélesztett telepek MALDI-TOF-MS vizsgálathoz (Fotó: Salamon Tímea)

3.6. Ásványvizek taxonösszetételének vizsgálata NGS módszerrel

2019-2020 között a Sapientia EMTE csíkszeredai laboratóriumában került sor az ásványvizek bakteriális összetételének meghatározásához szükséges előkészítő lépésekre. Első lépésként egy 0,2 μm pórusátmérőjű steril, nitrocellulóz alapú membránszűrőt használtunk, melyen keresztül 2 liter vízmintát szűrtünk át. Ezután a szűrőpapírokat steril falkonokba helyeztük és fagyasztott állapotban az Eötvös Lóránd Tudományegyetem Mikrobiológiai Tanszékére szállítva itt végezték el a DNS kivonást, szekvenálást és a taxonok beazonosítását.

A DNS izoláláshoz a laboratóriumban DNeasy PowerSoil Kit-et alkalmaztak. A sejtek feltárásához Retsch cég-től származó sejtmalet alkalmaztak, 30 Hz-n 2 perces időtartamban. Ezt követően került sor a polimeráz láncreakcióra (PCR), majd ennek ellenőrzésére gélelektroforézis használatával, 1%-os gélen 20 percig futtatva.

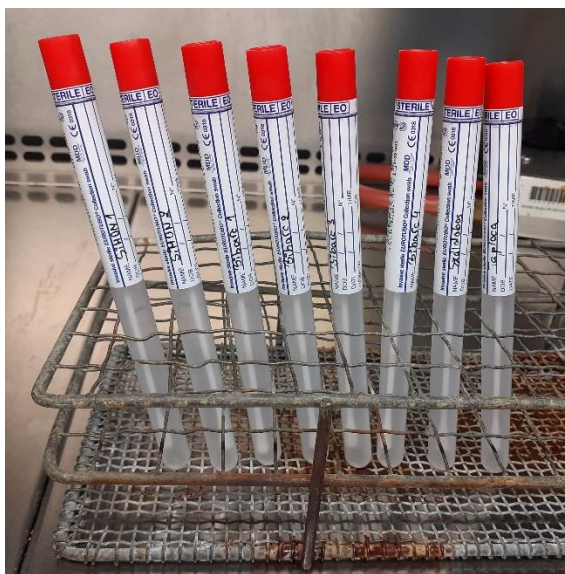
Illumina újgenerációs technológiával határozták meg a DNS szekvenciákat. Ezen módszernek az alapja a fluoreszcens festékkel megjelölt nukleotidok bekötődése. Az utolsó nukleotidhoz kapcsolódva fluoreszcens jelet bocsájtanak ki, ez a jel egy speciális kamera által detektálható. Miután rögzítették a jelet a festékanyagok leválasztódnak a molekulákról, a rendszerből való kimosódásuk után egy újabb ciklus veszi kezdetét (Vajna és mtsai. 2016). Az adatok bioinformatikai elemzése Mothur program használatával történt az ELTE munkatársai által.

Az egyes nemzetségek arányait relatív abundancia alapján vizsgáltuk a mintákban a nyers adatokból.

3.7. Ásványvizes palackok dugóinak vizsgálata

Vizsgálatunk során feltűnt, hogy az otthoni fogyasztásra megtöltött egyes borvizes üvegek dugóin vékony, biofilmszerű lerakódások jelenhetnek meg. Kíváncsiak lettünk, hogy milyen mikrobákról lehet szó, ezért mintavételeink során az egyes vízforrásoknál levő személyektől véletlenszerűen elkértünk ásványvizes palackokat. Főként olyan palackokat kerestünk, melyeket hosszú ideje használnak és felületükön lerakódások figyelhetők meg.

A vizsgálathoz felhasznált palackok bibarcfalvi és csatószegei ásványvizekkel voltak töltve. Egyaránt kértünk olyan palackokat, melyekbe beleisznak, illetve olyat, amelyet kitöltenek az emberek.



10. ábra: A vizsgálathoz felhasznált mintavevő pálcák

Vizsgálatunk első lépése volt, hogy 8 ml steril sóoldatot pipettáztunk a mintavevő pálca tartójába, majd ezt követően óvatos mozdulatokkal a dugó felületéről a nedves mintavevő pálca segítségével kenetet vettünk majd visszahelyeztük a tartóba. A kis mintavevőket (10. ábra) 5 percet rázattuk Vortex-szel, hogy a felületről levett baktériumok eloszoljanak a sóoldatban. A kiöntött Nutrient táptalajokon kiszélesztettünk kétszer 0,1 ml mintát, melyeket 22 és 37°C-on inkubáltunk. Vákuumszűrő segítségével a steril szűrőpapíron átszűrtünk kétszer 3,8 ml mintát, ezután a szűrőpapírokat ráhelyeztük a szelektív táptalajok felületére (Coliform, illetve Slanetz-Bartley Agar) és 37°C-on inkubáltuk, majd 48 óra elteltével leszámoltuk a telepeket. Mivel előzetesen a mintavételi területek pontos méretét egy tolómérce segítségével meghatároztuk, a végén a csíraszámokat telepképző egység/cm²-ben adtuk meg. A kifejlődött telepeket izoláltuk és MALDI-TOF módszerrel beazonosítottuk.

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

2023 áprilisában és júniusában elvégzett higiéniai-bakteriológiai illetve helyszíni fizikai-kémia vizsgálatok eredményeit Salamon Tímea bemutatta a XVII. Nemzetközi Tudományos Konferencián (Sapientia EMTE, Csíkszeredai Kar, 2023. aug. 31). Ezzel kapcsolatban, a konferenciakötetben meg is jelent egy cikk, amelyben Salamon Tímea első szerző (Salamon és mtsai. 2023).

Annak érdekében, hogy az évszakos változásokat is tudjuk tárgyalni (tavasz-nyár-ősz-tél), a jelen TDK dolgozat tartalmazza a fent jelzett tavaszi és nyári eredményeket, amely kiegészült az őszi és téli higiéniai-mikrobiológiai vizsgálatokkal, a nyári és téli laborkémiai eredményekkel, a baktériumközösségek tenyésztéstől független (NGS) vizsgálatának tárgyalásával illetve dugóvizsgálati és törzsazonosítási (MALDI-TOF) eredményekkel.

4.1. Ásványvizek helyszíni vizsgálatainak eredményei

A 2023. áprilisa és 2024. februárja között elvégzett helyszíni mérések fizikai- és kémiai paramétereinek értékeit a 3. táblázat mutatja be:

3. táblázat: Helyszíni fizikai-kémiai mérések eredményei

Mintavételi helyszín	Dátum	Hőmérséklet T(°C)	pH	DO (mg/l)	DO%	EC (mS/cm)	Vízhozam (l/perc)
Mikóújfalu	2023. ápr. 27	10,8	6,02	0,33	3,2	2,24	11,34
	2023. jún. 2.	11,3	5,8	0,8	7,9	2,31	10,54
	2023. okt. 18.	11,5	5,96	0,3	2,9	2,34	10,80
	2024. febr. 6.	10,9	5,91	0,5	4,8	2,14	11,07
Nagybacon	2023. ápr. 27	9,9	5,77	0,23	2,2	0,82	11,10
	2023. jún. 2.	12,9	5,67	1,04	10,5	0,84	9,85
	2023. okt. 18.	13,1	5,62	0,36	3,6	0,85	10,66
	2024. febr. 6.	6,3	5,86	1,02	8,8	0,75	10,65
Székelyszáldobos	2023. ápr. 27	9,8	5,85	0,98	9,2	1,34	-
	2023. jún. 2.	11,1	5,82	0,47	4,5	1,34	-
	2023. okt. 18.	12,4	5,87	1,33	13,1	1,41	1,96
	2024. febr. 6.	11,3	6,02	1,22	11,9	1,19	8,09
Bibarcfalva	2023. ápr. 27	12,9	5,96	0,24	2,4	2,41	35,81
	2023. jún. 2.	13,4	5,98	0,39	4	2,48	32,10
	2023. okt. 18.	13,4	5,94	0,19	1,9	2,48	31,75
	2024. febr. 6.	13,8	5,9	0,05	0,5	2,24	28,46

Megjegyzés: DO – oldott oxigén; DO% - oldott oxigén telítettség százalékos arányban; EC – elektromos vezetőképesség.

A négy ásványvízforrás mindegyike savas jellegű, amely a bennük található oldott szénsavnak tulajdonítható. A szénsav hatására jobban beoldódnak a vizekbe az ásványi anyagok a kőzetekből, növelve ezzel az elektromos vezetőképességüket. A meghatározott paraméterek mindegyike hatással van a víz eltarthatóságára, mivel befolyásolják a víz biológiai-, kémiai- és fizikai tulajdonságait. A savas környezet a mikrobákra nézve pusztító hatással bír, csak úgy, mint az oldott oxigén mennyisége, mivel hiánya vagy nagyon alacsony mennyisége szintén hozzájárulhat a vízi élet pusztulásához.

A hőmérsékleti változást illetően látható, hogy mikóújfalusi Bedő-forrás és a nagybaconi Faluborvíz esetében az évszaknak megfelelően ingadozik a hőmérséklet: tavasszal és télen lecsökken a hőmérsékletük, míg nyárra felmelegszenek, követve a környezeti hőmérséklet változásait. Ezzel szemben a székelyszáldobosi és bibarcfalvi ásványvizek hőmérséklete nem mutat nagyobb ingadozást. A jelen források mindegyike hidegvízű forrásnak minősül, mivel hőmérsékletük nem éri el a 20°C-ot.

A pH mérések során a legalacsonyabb értéket a nagybaconi ásványvíznél mértük, átlagosan $5,73 \pm 0,11$. A legmagasabb értéke a bibarcfalvi ásványvíznek volt, átlagosan $5,94 \pm 0,03$.

A vizek oldott oxigén-tartalma (DO – dissolved oxygen) összefüggésbe hozható a víz hőmérsékletével, sótartalmával, illetve az adott vízbázis szennyezettségével. Minél hidegebb a víz, annál nagyobb az O₂ koncentrációja. Azon ásványvizek esetében, amelyek mikrobiológiailag nem elfogadható minőségűek (Nagybacon és Székelyszáldobos) magas DO érték figyelhető meg, ezt az is bizonyítja, hogy a melegebb vizű és mikrobiológiailag elfogadható minőségű bibarcfalvi forrás alacsonyabb DO értékkel rendelkezik, ez a tendencia figyelhető meg a mikóújfalusi forrás esetében is. A székelyszáldobosi Faluvégi-forrás magas oldott oxigén szintje továbbá azzal is magyarázható, hogy kialakítása megegyezik a háztáji kutakéval, nagy felületen érintkezik a forrás vize a levegővel. Az oxigén telítettség (DO%) azt mutatja meg, hogy a víz mennyire telített oxigénnel, a 100%-os oxigén telítettség azt jelenti, hogy a víz maximálisan telített oxigénnel, ezzel szemben látható, hogy a vizsgált források épp hogy csak elérik a 10%-os telítettséget (Nagybacon és Székelyszáldobos). A vizsgált forrásoknál a DO% értéke szorosan követi a DO értékeket.

Az elektromos vezetőképességet a vízben oldott állapotban jelenlévő különböző ionok mennyisége befolyásolja. A legnagyobb vezetőképességgel a mikóújfalusi, illetve a bibarcfalvi ásványvizek rendelkeznek. Ezen ásványvizek gazdagon tartalmaznak HCO₃⁻ és SO₄²⁻ ionokat (4. táblázat).

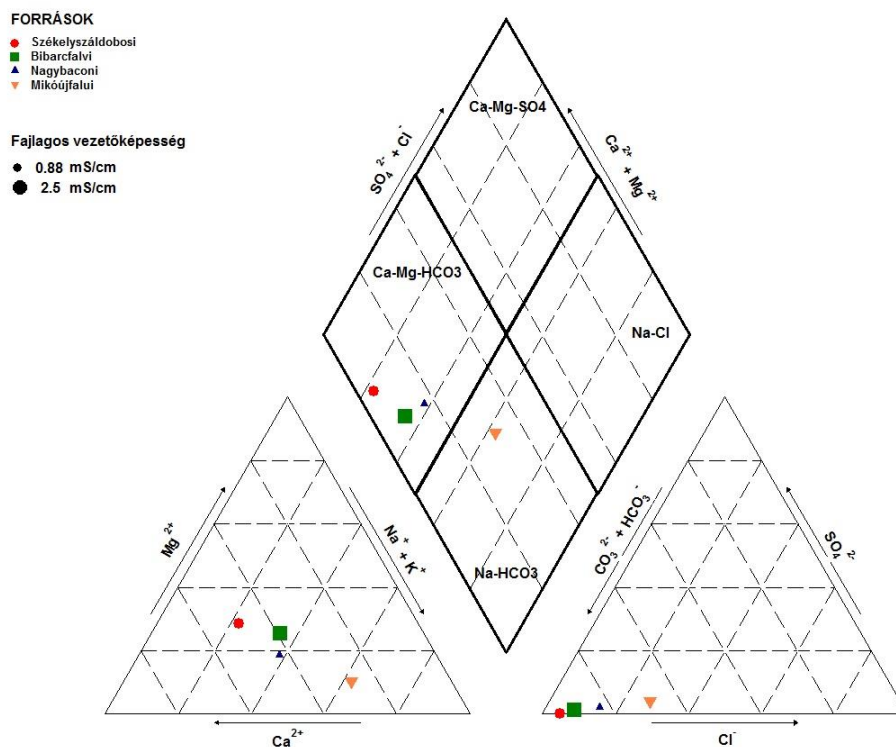
A mintavételi helyszíneken megmértük a vizek hozamát is, melyek értékei átlagosan 35,81 és 1,96 liter/perc között változtak. A legkisebb értékeket (átlagosan 1,96 liter/perc) a székelyszáldobosi ásványvíznél mértük. Az áprilisi és júniusi mintavételek során itt nem tudtunk hozamot mérni, mivel az elvezetőárok fel volt telve vízzel és nem volt kifolyás. Abban az esetben,

ha van kifolyás, akkor az összvízhozam elérheti a 7237 liter/nap-ot. A legnagyobb értéket a bibarcfalvi ásványvíznél mértük, ami átlagosan 32,03 liter/perc volt, az összvízhozam 46123 liter/nap. Mikóújfalusi ásványvíz átlagosan 10,93 liter/perc hozamú, így az összvízhozam 15755 liter/nap. A nagybaconi ásványvíz átlagos hozama 10,56 liter/perc volt átlag, ez 15220 liter/nap összvízhozamot jelent. A mikóújfalusi és a bibarcfalvi ásványvizek több csövön keresztül törnek a felszínre. A négy vizsgált forrás esetében naponta összesen 37,58 m³, azaz 37580 liter ásványvíz folyik el.

4.2. Vízkémiai vizsgálatok eredményei

Az ásványvizek vízkémiai vizsgálatára két időpontban került sor (2023. júniusában és 2024. februárjában), amelynek az volt a célja, hogy megvizsgáljuk a források kémiai összetételét két extrém időjárási viszony közt: nyáron és télen. A vizsgált ásványvizek makro-elemeinek koncentrációit a 4. táblázat mutatja be.

A források geokémiai fáciese (11. ábra) egyrészt Ca-Mg-HCO₃ típusú (székelyszáldobosi, bibarcfalvi és nagybaconi), másrészt Na-HCO₃ (mikóújfalusi). A mikóújfalusi forrás vize a kárpáti flis zónában tör a felszínre, aminek köszönhetően a víz részben NaCl-ban gazdagodik. Ez a magyarázata annak, hogy ebben a forrásban mértük a legnagyobb nátrium- és kloridin koncentrációkat. A többi forrás főleg Ca- és Mg-karbonátokban gazdag, ami a mélységi víznek a neogén vulkanitokkal való kölcsönhatásának az eredménye.



11. ábra: Piper-diagram a vizsgált ásványvizekre

A 1020/2005-ös kormányrendelet alapján: kalciumos víznek tekinthető az a forrás, melynek kalciumtartalma meghaladja a 150 mg/l-t, így ebbe a kategóriába nem tartozik bele a nagybaconi ásványvíz. Magnéziumos ásványvizek azok, amelyek minimum 50 mg/l koncentrációban tartalmaz Mg^{2+} ionokat, ez alapján a székelyszáldobosi, illetve a nagybaconi ásványvíz nevezhető magnéziumosnak. Nátriumos ásványvíznek tekinthetjük a bibarcfalvi és a mikóújfalusi forrásokat, mivel nátriumkoncentrációjuk meghaladta a 200 mg/l-es értéket. A hidrogénkarbonátos ásványvizek 600 mg/l-nél nagyobb mennyiségben tartalmazzák ezt az iont. A 4. táblázatban látható, hogy a vizsgált ásványvizek jóval nagyobb koncentrációban tartalmazzák ezt az aniont, kivételt képez a nagybaconi ásványvíz. A klorid-ionok koncentrációját tekintve a határérték 200 mg/l, ezt egyedül a Bedő-forrás haladta meg. A szulfát-ionok határértéke 200 mg/l. Ezt egyik forrás vize sem haladja meg, sőt a székelyszáldobosi ásványvíz esetében a kimutatási határ alatt volt a szulfátió.

4. táblázat: A vizsgált ásványvízforrások makro-elem koncentrációja

Mintavételi helyszín	Dátum	Ca^{2+} (mg/l)	Mg^{2+} (mg/l)	Na^+ (mg/l)	K^+ (mg/l)	HCO_3^- (mg/l)	Cl^- (mg/l)	SO_4^{2-} (mg/l)
Mikóújfalu	2023. jún.	187	37,9	423	16,1	1207	288	60,9
	2024. feb.	145	37,0	424	16,9	1242	291	52,3
Nagybacon	2023. jún.	114	25,6	95,0	8,2	515	51,5	10,3
	2024. feb.	74,8	24,0	91,3	8,7	521	56,8	8
Székelyszáldobos	2023. jún.	193	62,9	86,5	13,9	1029	30,0	<1
	2024. feb.	165	62,7	86,2	14,0	1033	29,2	<1
Bibarcfalva	2023. jún.	261	104	263	41,1	1830	104	23,2
	2024. feb.	275	105	244	40,3	1814	92,5	15,9

A vas(II)-ionokra megadott határérték 1 mg/l, a vizsgált ásványvizeink kivétel nélkül nevezhetők vasasnak (ezt bizonyítja többek között az is, hogy a terepi vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a helybeliek palackjain vasas lerakódás volt megfigyelhető). A Mn^{2+} határértéke 0,5 mg/l, ez alapján elmondható, hogy a mikóújfalusi és nagybaconi ásványvizek mangánosak. A báriumion maximálisan megengedett értéke 1,0 mg/l, a vizsgált ásványvizeink esetében csak a bibarcfalvi forrás haladta meg ezt az értéket 2023 júniusában (5. táblázat).

5. táblázat: Ásványvizek mikro- és nyomelem koncentrációja

Mintavételi helyszín	Dátum	Al ³⁺ (mg/l)	Fe ²⁺ (mg/l)	Mn ²⁺ (mg/l)	Li ⁺ (mg/l)	Sr ²⁺ (mg/l)	Ba ²⁺ (mg/l)	Si (mg/l)	B (mg/l)
Mikóújfalu	2023. jún.	< 0,006	21,8	1,15	1,46	0,85	0,53	39,2	7,3
	2024. feb.	< 0,010	21,1	1,16	1,37	0,77	0,33	38,9	3,3
Nagybacon	2023. jún.	< 0,006	27,6	0,99	0,39	0,67	0,26	40	3,6
	2024. feb.	< 0,010	15,9	0,97	0,38	0,57	0,17	43,7	3,7
Székelyszáldobos	2023. jún.	< 0,006	15	0,48	0,38	1,11	0,58	38,7	3,9
	2024. feb.	< 0,010	8,3	0,46	0,38	1,07	0,36	41,8	3,3
Bibarcfalva	2023. jún.	< 0,006	8,5	0,29	1,34	2,17	1,2	41	15,1
	2024. feb.	< 0,010	4,8	0,29	1,24	2,11	0,74	45,3	17

Megvizsgáltuk az ammónium-ion koncentrációt is, mivel ez fontos ivóvízminőségi mutató. A két időpontban mért értékek 0,5 és 5 mg/l között változtak. Törvény szerint megengedett határérték 0,5 mg/l, viszont kivételt képez az endogén eredetű ammónia, minek megengedett maximális határértéke a palackozáskor 5 mg/l. Ásványvizekben gyakran előfordulhat a megengedettnél nagyobb mennyiség, de ez valószínűsíthetően geológiai eredetű. A száldobosi ásványvíz esetében 1,0-1,5 mg/l értékeket mértünk, bibarcfalvi esetében 5 mg/l-t, a nagybaconi esetében 0,5 és 0,6 mg/l között változott az érték, Mikóújfalu esetében 2,0 és 0,9 mg/l értékeket jegyeztünk le. A nitrit (NO₂⁻) és nitrát (NO₃⁻) koncentrációk a kimutatási határ alatt voltak (<0,05 mg/l).

4.3. Ásványvizek higiéniai vizsgálatainak eredményei

A higiéniai tenyésztési vizsgálatok eredményei (6. táblázat) alapján elmondható, hogy a mikóújfalusi és a bibarcfalvi ásványvizek minősége mikrobiológiai szempontból megfelel a törvényes előírásoknak (L458-as törvény/08.07.2002; HG1020/2005-ös kormányhatározat), mivel nem mutattuk ki egyik vizsgálati időpontban sem potenciálisan patogén mikroorganizmusok jelenlétét. A csíraszám meghatározás eredményei azt mutatják, hogy a két ásványvíz esetében az aerob mezofil baktériumok összcsíraszámja nem éri el a határértéket sem 22°C-on (100 TKE/ml), sem pedig 37°C-on (20 TKE/ml). Fontos megjegyezni, hogy ez a baktérium csíraszám nem feltétlenül jelent egészségügyi kockázatot, de a víz tisztaságára, illetve minőségére utal.

6. táblázat: A 2023-2024-es higiéniai mikrobiológiai vizsgálatok eredményei (pirossal vannak jelölve azok az értékek, melyek túllépik a törvényesen megszabott határértékeket)

Mintavételi helyszín	Dátum	Összcsíraszám (TKE/ml)		Coliformok (TKE/250ml)	<i>E. coli</i> (TKE/250ml)	Fekális <i>Enterococcus</i> -ok (TKE/250ml)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (TKE/250ml)	<i>Clostridium</i> sp.
		22°C	37°C					
Mikóújfalu	ápr. 27	0	0	0	0	0	0	-
	jún. 2	0	0	0	0	0	0	-
	okt. 18	0	1	0	0	0	0	-
	febr. 6	0	2	0	0	0	0	-
Nagybacon	ápr. 27	0	2	108	0	2	0	+
	jún. 2	3	1	38	0	0	0	-
	okt. 18	56	2	86	61	12	0	+
	febr. 6	0	1	13	0	0	0	-
Székelyszáldobos	ápr. 27	0	3	4	4	0	0	+
	jún. 2	57	15	203	3	60	0	+
	okt. 18	2	1	118	3	5	0	-
	febr. 6	1	5	0	0	0	0	-
Bibarcfalva	ápr. 27	0	0	0	0	0	0	-
	jún. 2	1	0	0	0	0	0	-
	okt. 18	0	2	0	0	0	0	-
	febr. 6	0	1	0	0	0	0	-

Pirossal jelöltük azokat az értékeket, melyek túllépik a megengedett törvényes határértéket, mely mindegyik indikátorszervezet esetében 0 TKE/250 ml (HG1020/2005 kormányhatározat szerint). A táblázatban külön tüntettük fel az *E. coli*-t, azaz a fekálcoli baktériumot, amely szintén a coliform baktériumok közé tartozik, viszont megkülönböztetik a többi coliform baktériumtól, mivel képes a laktózt 44°C-on is fermentálni.

A nagybaconi és székelyszáldobosi minták esetében látható, hogy nagymértékű szennyezésnek vannak kitéve (melyet többek között a MALDI-TOF-fal végzett mikrobaazonosítás is igazol), nagyszámban fordulnak elő bennük a külső szennyezésre utaló indikátor mikrobák.

A nagybaconi ásványvíz esetében az áprilisi mintavétel során volt a legmagasabb az indikátor mikrobák csíraszama (coliformok: 108 TKE/250 ml; fekális *Enterococcus*: 2 TKE/250 ml) és kimutatható volt a *Clostridium* sp. jelenléte.

Székelyszáldobos esetében a nyári vizsgálat során volt a legnagyobb a szennyező baktériumok csíraszama (coliformok: 203 TKE/250 ml, ebből *E. coli* 3 TKE/250 ml; fekális *Enterococcus*: 60 TKE/250 ml) és pozitív eredményt kaptunk a *Clostridium*-okra.

Fontos kiemelni, hogy egyik vizsgálati időpontban sem azonosítottunk be *Pseudomonas aeruginosa* baktériumot.

Várakozásainknak megfelelően a mikrobák csíraszám csökken a téli időszakban, ami a fagyott talajnak köszönhetően csökkenti a felszínről érkező szennyezés lehetőségét.

A száldobosi ásványvíz nagymértékű szennyezettsége betudható annak, hogy a kút védő filagóriaszerű lefödés rossz állapotban van, a madarak fészkelnek a nyitott kút fölött és az ürülékük könnyen belejuthat a vízbe. Másrészt az állandó elfolyást biztosító elvezető árok (12. ábra) csapadékos időszakban könnyen fel tud telni vízzel, a már kifolyt víz keveredik a területen megtalálható belvizekkel, ami által a talaj mikrobái, illetve különböző szennyező mikroorganizmusok így könnyen vissza tudnak jutni a kút vizébe is.



12. ábra: A székelyszáldobosi ásványvíz kivezető csöve és a feltelt elvezető árok
(Fotó: Salamon Tímea)

A nagybaconi ásványvíz szennyezettsége egyrészt az elavult csővezetékekkel magyarázható, amely több száz méterről, a falu határán kívül levő forrásból vezeti be a vizet a faluba. Emellett magyarázat lehet még az ásványvízforrás közvetlen környezetének a szennyezettsége is (13. ábra). A nagybaconi ásványvíz bőségesen csapadékos időszakban keveredik a talajvízzel, ami szintén betudható egy szennyezési forrásnak.



13. ábra: A nagybaconi ásványvíz és (szemetes) környéke 2023. júniusi mintavétel során
(Fotó: Salamon Tímea)

4.4. Allochton mikrobaazonosítás eredményei

A mikrobák azonosítására szintén négy időpontban került sor. A higiéniai vizsgálatához használt táptalajok felületéről izoláltunk szélesztéses technikával baktériumtörzseket és azonosítottunk őket MALDI-TOF módszerrel.

Az azonosítások szárdobosi és nagybaconi mintákból történtek, mivel a másik két minta esetében nem fejlődtek ki a vizsgálni kívánt szennyezést indikáló mikrobák. Az első vizsgálat során 10 telepet választottunk ki meghatározásra, melyekből kettőt nem sikerült beazonosítani. A júniusi vizsgálat során 10 telepet szélesztettünk ki, melyből hatot nem tudtunk beazonosítani. Októberben mind a tíz izolált törzset sikerült azonosítani (kisebb vagy nagyobb megbízhatósággal).

Februárban 5 telepet szélesztettünk (csak nagybaconi mintákból), melyből egy nem fejlődött ki a Nutrient agaron, így azonosítani sem tudtuk, a többi négyből pedig egy lett gyenge megbízhatóságú. Így a négy vizsgálati időpontban összesen 23 különböző baktériumtörzset azonosítottunk be, melyek jó része szennyező, gyakran fekális eredetű baktériumok.

Minden vizsgálat során két futtatást végeztünk és a Melléklet 1. táblázatában azokat baktériumtörzseket jelenítettük meg, melyek a legnagyobb score value értékkel lettek beazonosítva a két futtatást követően.

Szárdobosi mintából, Coliform agarról (az októberi vizsgálat során) beazonosított *Citrobacter freundii* egy fakultatív anaerob, szulfátredukáló, Gram-negatív bacillus. A *Proteobacteria* törzshöz, a *Gammaproteobacteria* osztályba, az *Enterobacteriales* rendbe, az *Enterobacteriaceae*

családba és ezen belül a *Citrobacter* nemzetségbe tartozik. Először talajból izolálták, ma már köztudott, hogy számos különböző természetes élőhelyen előfordul. Kimutatták üledékekben, a talajban, emberek és állatok bélcsatornájában is. Korábban alacsony virulenciájú baktériumnak tekintették, azonban újabb kutatások eredményei azt mutatják, hogy számos fertőzést okozhat, beleértve a tüdőgyulladást, hasmenést és vérmérgezést. Néhány különböző környezetből izolált törzseket több kutatási területen is felhasználnak. Fontos szerepet játszik a nitrogén körforgásban, a környezetében megtalálható nitrátot nitráttá redukálja. Kutatásokat végeztek ezzel a baktériummal szennyvizekből való nehézfémek biológiai eltávolítására és arra a következtetésre jutottak, hogy képes volt csökkenteni a nehézfémek mennyiségét szennyvizekben. A *C. freundii* egy másik törzséről (IFO 13545) megállapították, hogy képes bioflokulálószer termelni, felhasználható vízellátó rendszerben, szennyvízkezelésben és élelmiszertermelésben (Choudhuri és mtsai. 2021; Gomaa és El-Meihy, 2019; Sun és mtsai. 2020). A szaldobosi ásványvízben való megjelenése betudható annak, hogy a vízbe könnyen bejuthat madárürülék, másrészt pedig a talajvízzel az elvezetőárok feltöltődésének következményeként.

A szintén szaldobosi mintából azonosítottunk *Klebsiella oxytoca*-t, amely egy Gram-negatív kiterjedt spektrumú béta-laktamáz termelő baktérium (Essert és mtsai. 2023). A *Klebsiella* fajok jól tanulmányozott mikrobák közé tartoznak mind az orvostudományban – mint az egyik legellenállóbb opportunist kórokozó –, mind pedig az iparban, ígéretes biokémiai tulajdonságaik miatt. A *K. oxytoca* mindenütt megtalálható a természetes környezetben, de az emberi bélrendszerben is. Antibiotikumokkal szemben nagy rezisztenciát mutat. Ezt a törzset folyamatosan izolálják és felhasználnak különböző ipari célokra (pl. bioüzemanyagok előállítása, nanorészecskék és exopoliszacharidok szintézise, stb.) (Tomulescu és mtsai. 2021). Jelenléte betudható ebben az esetben is a küpü és környezetének rossz kialakítanak, illetve a karbantartás hiányának.

Nagybaconi mintából Coliform agarról azonosított *Lelliottia amnigena* (eredeti nevén *Enterobacter amnigenus* 1981-ben írták le, 2013-tól *L. amnigena* néven ismerik) egy Gram-negatív fakultatív anaerob bacillus, melyet először vízforrásokból, majd élelmiszerekből azonosítottak (pl. tejszín, pasztörözött tej, stb.), bizonyos körülmények között fertőzést okozhat az emberben, különösen immunhiányos betegek esetében. Alacsony virulenciájú törzsként tartják számon és antibiotikum érzékeny. A humán patológiában ritkán izolált kórokozó, de fokozottan oda kell figyelni, különösen az immunszupresszált betegeknél, ahol rendkívül súlyos klinikai kórképért lehet felelős (Birlutiu és mtsai. 2023).

A szintén nagybaconi minta Coliform agarról beazonosított *Microvirgula aerodenitrificans* egy denitrifikáló Gram-negatív organizmus, világszerte izolálták, de soha nem írták le klinikai fertőzések okozójaként. Egy esetben kötötték ezt a mikroorganizmust embernél előforduló

megbetegedéshez, amikor is egy 15 hónapos gyermek fertőződött meg. Jelenleg bioaugmentációs kísérletekben is vizsgálják, hogy kiaknázzák potenciális hatékonyságát a szennyvíz denitrifikációjában és a szerves anyagok hasznosításában (Murphy és mtsai. 2012).

Ugyancsak a nagybaconi mintából azonosítottuk a *Serratia fonticola*-t, amely az *Enterobacteriaceae* család tagja, egy szokatlan emberi kórokozó, melyről azt írták le, hogy elsősorban bőr- és légútrészfertőzéseket okoz. Számos környezetben megtalálható, beleértve az ivóvizet, talajt és szennyvizet. Kevés információ áll rendelkezésre a kezeléséről, illetve az érzékenységről (Aljorayid és mtsai. 2016).

A higiénia-mikrobiológiai tenyésztési vizsgálati eredményeink, illetve az izolált és beazonosított egyes potenciálisan patogén baktériumtörzsek jelenléte a forrásvizekben, arra enged következtetni, hogy a vizek nem ihatók, a rossz vízminőség nem feltétlenül csak friss és egyszeri szennyezésnek tudható be, hanem egy folyamatosan fennálló szennyezésnek. Vizsgálataink alapján kijelenthetjük, hogy a székelyszáldobosi és nagybaconi ásványvizek emberi fogyasztásra nem alkalmasak, a bennük lévő szennyező mikrobák akár betegségeket, elsősorban gyomor és bélgyulladást okozhatnak.

4.5. Baktériumközösségek új generációs szekvenálással történt vizsgálatának eredményei

Az ásványvizek olyan specifikus környezetnek számítanak, melyek reprodukálása laboratóriumi környezetben szinte lehetetlen, ebből adódóan a természetes módon jelenlévő mikroorganizmusok beazonosítása is nehézségekbe ütközik. Az azonosítást az is nehezíti, hogy sok olyan faj is előfordulhat, melyeket ezidáig nem írtak le. Ezeket a problémákat kiküszöböli a tenyésztéstől független NGS szekvenálás, és lehetővé teszi az ásványvizek teljes bakteriális diverzitásnak a feltárását.

Az újgenerációs DNS szekvenálási vizsgálatok három időpontban zajlottak (2019 nyár és ősz, 2020 tél) (Melléklet 1. ábra) és az eredmények most kerültek feldolgozásra és kiértékelésre.

Az NGS eredmények alapján elmondható, hogy a relatív abundanciaértékek alapján mind a négy forrás esetében a leggyakoribb baktériumnemzetségek a vasbaktériumok (pl. *Gallionella*, *Sideroxydans*, *Ferritrophium* nemzetségek; relatív abundancia értéke: 1,6-77%) és a kénbaktériumok csoportjaihoz tartoztak (pl. *Sulfurimonas*, *Sulfurospirillum*, *Sulfuricurvum* nemzetségek, relatív abundancia: 1,4-72,5%). A Száldobosi forrás esetében ezek mellett jelentős arányban (relatív abundancia: 23-39%) fordult elő az *Acetobacterium*-ok nemzetsége.

A **székelyszáldobosi ásványvízmintákban** az *Acetobacterium* és *Sulfospirillum* baktériumnemzetségek domináltak. Az *Acetobacterium* Gram-pozitív, anaerob, ovális alakú

pálcák, melyek egy vagy két szubterminális flagellummal mozognak. A *Bacteria* doménen belül az *Eubacteriaceae* család tagjai. A hidrogént oxidálják, a szén-dioxidot pedig ecetsavvá redukálják. Az *Acetobacterium* név abból ered, hogy az acetogének túlnyomórészt ecetsavat termelnek az anaerob anyagcsere melléktermékeként. Az ebbe a nemzetségbe tartozó fajok többsége homoacetogén, azaz anyagcsere-melléktermékként kizárólag ecetsavat termelnek. Az ásványi közegben fermentálódó szerves szubsztrátok közé tartozik a fruktóz, a glükóz, a laktát, a glicerát és a formiát. A pantotenátra mint növekedési faktorra van szükségük. A nemzetség típusfaja az *Acetobacterium woodii*. Az első izolátumok tengeri és édesvízi üledékekből származnak (Balch és mtsai. 1977).

Az *A. woodii* másik alkalmazása az, hogy csökkentheti az üvegházhatást okozó gázok hatását, mivel az *A. woodii* felhasználható CO₂ és CO acetil-CoA-vá történő átalakítására, amelyet aztán más vegyszerek, például etanol és acetát előállítására használhatnak fel (Bertsch és Müller 2015).

A másik gyakori baktériumnemzetség, a *Sulfurospirillum* mikroaerofil baktériumokból áll, amelyek sokféle növekedési szubsztráttal nőnek (Goris és Diekert 2016). A kénbaktériumok számos kénvegyületet képesek felhasználni elektrondonorként, például a kénhidrogént (H₂S), tioszulfátot (S₂O₃²⁻) és az elemi ként (S⁰) is, ezek redukciója leggyakrabban szulfátot eredményez. A növekedési hőmérséklet toleranciájuk 8-36°C. A 16S rRNS génszekvenciák összehasonlítása alapján a *Sulfurospirillum* a *Campylobacteraceae* családba tartozik, amely az *Epsilonproteo* baktériumokhoz tartozik (Stolz és mtsai. 2015).

A **bibarcfalvi ásványvíz** mikrobaközösségében nagy számban dominálnak a *Sulfurimonas* és *Gallionella* nemzetségek. A *Sulfurimonas* fajokat általában szulfidos élőhelyekről izolálják, és számos, a *Sulfurimonas* fajokhoz kapcsolódó 16S rRNS szekvenciát azonosítottak kémiaiilag eltérő környezetben, például hidrotermális mélytengeri árkokban, tengeri üledékekben, az óceán vízoszlopában és szárazföldi élőhelyeken. Néhány ilyen élőhelyen kimutatták, hogy fontos szerepet játszanak a kemoautotróf folyamatokban. Sokféle elektrondonorral és akceptorral növekedhetnek, ami hozzájárulhat széleskörű elterjedésükhöz. A *Sulfurimonas* nemzetségből öt fajt izoláltak és írtak le eddig: a *Sulfurimonas denitrificans* (korábban *Thiomicrospira denitrificans* néven), *S. hongkongensis*, az *S. autotrophica*, *S. paralvinellae* és a *S. gotlandica*. A szekvenciákat különféle tengeri környezetekből, például hidrotermikus szellőzőhelyekről, a Balti- és a Fekete-tenger nyíltvízi redox-környezetéből és a part menti üledékekből, de szárazföldi élőhelyekből, például olajbarlangokból, szennyezett talajvízből vagy üledékekből és szulfidos forrásokból vagy gleccser feletti forrásrendszerekben is megtalálták. Amellett, hogy a *Sulfurimonas* fajok a világon mindenütt megtalálhatók, a baktériumközösség nagy részét is alkotják. A sikerét a kemolitoautotróf növekedési képességének, metabolikus sokoldalúságának (különböző elektrondonorok, elektronakceptorok és szerves szénforrások használata),

oxigéntoleranciájának és környezetérzékelő rendszereinek tulajdonítják. Sokféle redukált kénvegyület - mint például a szulfid, az elemi kén, a tioszulfát és a szulfit - szolgálhat elektrondonorként a növekedésükhöz, de nem minden *Sulfurimonas* faj képes az összes fent említett kénvegyületet felhasználni. A *S. paralvinellae* kivételével minden törzs képes oxidálni a szulfidot és végtermékként szulfátot, közbenső termékként elemi ként és poliszulfidot termelni. (Han és Perner, 2015; Labrenz és mtsai. 2013).

A β -Proteobacterium *Gallionella* szárképző, mikroaerofil vas(II)-oxidálóként ismert, amely gyorsan vas-oxi-hidroxid-csapadékot termel. A redoxpotenciál és a pH-érték döntő tényező abban, hogy a vas-oxi-hidroxid kiválása biotikus vagy abiotikus lesz. A vas(II)-oxidáló *Gallionella* baktérium például alacsonyabb pH-értéket és alacsonyabb redoxpotenciált igényel, mint általában a vas-oxi-hidroxid abiotikus képződéséhez. A vas(II) oxidációt egy külső sejtmembrán vas(II)-oxidáló fehérjéje hajthatja végre, hogy megakadályozza a vas(III) ásványianyag kiválását a sejten belül (Krawczyk-Bärsch és mtsai. 2021). Rendkívül változatos élőhelyekről azonosították már be, például vas tartalmú ásványvízforrásokból, sekély és sós vizekből, tengeri hidrotermikus vizekből, valamint vashoz kapcsolódó talajkörnyezetből. A bibarcfalvi ásványvíz Fe-tartalma (4,8-8,5 mg/l) nem a legmagasabb a négy vizsgált forrás közül, mégis összességében itt a legmagasabb a *Gallionella* nemzetség relatív abundanciája (31-53%). A vastartalom önmagában nem magyarázza a vasbaktérium ilyen nagyszámú jelenlétét, viszont itt a legmagasabb az ásványvíz HCO_3^- és ásványianyag-tartalma, ami kedvez a kemolitoautotróf vasbaktérium növekedésének.

A **nagybaconi ásványvíz** uralkodó mikrobaközössége a *Sulfuricurvum*, *Sulfurimonas*, *Gallionella* és *Thiothrix* baktériumnemzetségekből áll össze. A *Sulfuricurvum* baktériumok a *Helicobacteraceae* családhoz tartoznak. Kemolitoautotróf diazotróf szervezetek, amelyek képesek a növekedésükhöz energiát nyerni az S^0 , szulfid vagy szulfit vagy H_2 oxidációja révén mikroaerob vagy nitrát/nitrogén-oxid-függő oxidációval. Izolálták már többek között édesvízi környezetből, talajvízből, illetve föld alatti nyersolaj-tároló üreg aljáról is (Handley és mtsai. 2014). A ként oxidáló baktériumok és az általuk lakott környezet között összetett kapcsolat áll fenn, mivel szoros kölcsönhatásba lépnek a környezetükben elérhető kénformákkal. Ezért a ként oxidáló baktériumok számára alkalmas környezet típusát korlátozza bizonyos redox állapotú kénvegyületek elérhetősége. Ezekben a környezetekben a kénformákat redukáló mikroorganizmusok által termelt redukált kénvegyületek energiaforrást jelentenek a ként oxidáló baktériumok számára, bár a redukált kénvegyületek nagyobb hányada származhat geológiai folyamatokból. *Thiothrix* fajok a kéngazdag élőhelyek kénoxidáló mikrobaközösségeinek tipikus alkotóinak tekinthetők, valószínűleg geokémiailag kolonizáló képességük miatt a környezetben szélesebb körben elterjedtek. Intracellulárisan raktározzák a ként, ez lehetővé teszi számukra, hogy olyan

környezetben is boldoguljanak, ahol a szulfidnak korlátozott a hozzáférhetősége (Nosalova és mtsai. 2023).

A mikóújfalusi ásványvízben többnyire *Rhodoferrax*, *Gallionella*, *Sideroxydans* és *Thiothrix* nemzetségek dominálnak. A *Rhodoferrax* nemzetség fajai mind vibroid vagy enyhén ívelt Gram-negatív pálcák. Képesek fototróf módon is szaporodni, és barackbarna pigmentet termelni (Kaden és mtsai. 2014). Gyakran előfordulnak fénynek kitett állóvízi rendszerekben. A nemzetség típusfajának leírására használt *R. fermentans*-t először árokvizekből és eleveniszapból izolálták. A *Sideroxydans* egy mikroaerofil, kemolitoautotróf Fe(II) oxidáló baktériumnemzetség (FeOB) a *Gammaproteobaktériumok*on belül. A *Sideroxydans lithotrophicus* Fe(II)-ben gazdag talajvízből izolálták, és 5,5-7,5 pH-értéken növekszik, a növekedéshez optimális pH-tartomány 6,0-6,5 (Hädrich és mtsai. 2019).

Eredményeinket összehasonlítva más, ásványvizekre vonatkozó szakirodalmi adatokkal, az mondható el, hogy egy Olaszországban végzett ásványvizek 16S rRNS vizsgálatai szintén kimutattak kénbaktériumok, pl. a *Sulfurovaceae* és *Thiovulaceae* családba tartozó kénbaktériumokat és *Gallionellaceae* családba tartozó vasbaktériumokat (Corniello és mtsai. 2022), amelyek a baktériumközösség fontos tagjai voltak. Barcelonában elvégzett ásványvíz vizsgálatok során szintén mutattak ki *Proteobacteria* törzsbe és *Gammaproteobacteria* osztályba tartozó baktériumokat, melyek domináltak a vizsgált ásványvizekben (Sala-Comorera és mtsai. 2020). Egy szintén olaszországi vizsgálat során arra a következtetésre jutottak, hogy téli és tavaszi szezonban a *Rhodoferrax* baktériumok domináltak, továbbá azt is megfigyelték, hogy ezek a baktériumok olyan vizekben fordultak elő, melyek kisebb mennyiségben tartalmaztak szénsavat. A kevésbé szénsavas ásványvizek nagyobb diverzitást mutattak, mint a szénsavasak (Carraturo és mtsai. 2021).

Az újgenerációs szekvenálással kimutathatók voltak az *Enterococcus* genus tagjai a nagybaconi és székelyszáldobosi mintákból kis relatív abundancia értékkel, emellett a nagybaconi ásványvízből még az *Escherichia* nemzetség is kimutatható volt 0,01% relatív abundancia értékkel. Ezen higiéniai szempontból problémát jelentő mikrobák a Melléklet 1. ábráján az Egyéb csoportba tartoznak (relatív abundancia <2%).

4.6. Palackdugók mikrobiológiai vizsgálatának az eredményei

A csatószegei palack dugójáról 31 TKE/13,59 cm² összfelület, azaz 2,28 TKE/cm² csíraszámban mutattunk ki coliform baktériumokat. Ezen baktériumok közül négy törzset izoláltunk, majd MALDI-TOF vizsgálatával azonosítottuk őket. Az egyik törzs a *Staphylococcus xylosus* fajhoz tartozott, amely kommenzalista baktériumként az ember és emlősök bőrén gyakori, de a környezetben is előfordulhat (Vela és mtsai. 2012). Egy másik izolát törzs az *Enterococcus*

faecalis-t, amely megtalálható az emberi és állati bélrendszerben. Két törzs a *Candida albicans* sarjadzógombához tartozott, amely normális esetben csak csekély mértékben van jelen az emberi szervezetben, előfordulhat a szájüregben és a bél nyálkahártyájában. Opportunista patogénként akár kórosan is elszaporodhat, candidiázis nevű megbetegedést okozva (Zhang és mtsai. 2024).

A Bibarcfalváról származó palackdugók mikrobiológiai vizsgálatának eredményeit a 7. táblázat mutatja be felületarányosan.

7. táblázat: Négy bibarcfalvi vízzel töltött ásványvizes palack dugóiból kitenyészett baktériumok csíraszám felületarányosan

Minta	Összcsíraszám (TKE/cm ²)		Coliformok (TKE/cm ²)	<i>E. coli</i> (TKE/cm ²)	Fekális <i>Enterococcus</i> (TKE/cm ²)
	22°C	37°C			
Bibarc 1	0	0,07	0,14	0	0
Bibarc 2	8,06	32,84	3,37	0	9,53
Bibarc 3	0,07	0,49	0,07	0	0
Bibarc 4	25,17	2,69	0	0	0,57

A Bibarc 1 és Bibarc 4 jelzéssel ellátott palackokból nem történt közvetlen beleivás, mégis olyan mikrobákat is sikerült izolálni és azonosítani, melyek megtalálhatók többek között a bőr felületén is. A kimutatott *Staphylococcus hominis* baktérium előfordul az emberi test bőrfelszínén, orrban és torokban, kórházi környezetben sebfertőzést is okozhat. A másik faj, a *Serratia liquefaciens* is megtalálható az emberi testben, bőrön és húgyutakban. Ezen baktériumok jelenléte arra enged következtetni, hogy a palackot megtöltő illető beszennyezte az üveg száját és a dugó belső felületét, kézzel megfogva azokat.

A Bibarc 2 és Bibarc 3 jelzéssel ellátott dugóminták esetében a fogyasztók közvetlenül beleittak a palackba. A mikrobiológiai eredmények eléggé aggasztóak, hiszen az izolált és MALDI-TOF-al beazonosított baktériumtörzsek között szerepel *E. coli*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter lwoffii* és *Serratia liquefaciens* baktériumok.

Az *E. coli*-ről köztudott, hogy az emberi vastagbélben természetes módon előfordul, ugyanakkor a fekális szennyezések tipikus indikátora.

A *S. maltophilia* egy opportunistá patogén baktérium, mindenütt jelenlevő aerob, Gram-negatív bacillus, közeli rokonságban áll a *Pseudomonas* fajokkal. Ellenálló lehet többféle antibiotikumokkal szemben és fertőzéseket okozhat súlyosan legyengült egyének esetében. Ilyen fertőzések akár mortalitással is együtt járhatnak. Gyakran izolálják: talajból, vízből, állatokból, növényi anyagokból és kórházi berendezések felületéről (Lewis és Zaas 2022).

A *K. pneumoniae* előfordul bőrön, légzőszervekben és a bélrendszerben. Kórházi környezetben gyakran okoz húgyúti, illetve légzőszervi megbetegedéseket.

Az *A. lwoffii* szintén megtalálható a testünkben, különösen a bőrön és a nyálkahártyákon, előfordulhat kórházi környezetben, főleg súlyosan legyengült, immunszupresszált egyéneknél.

A vizsgálati eredményeink aggasztók, mivel több olyan mikroorganizmust azonosítottunk például, amelyek potenciálisan patogének és a szervezetbe jutva akár fertőzéseket is okozhatnak, elsősorban legyengült immunrendszerű egyéneknél. Fontos kiemelni, hogy bibarcfalvi forrás mellett a csatószege ásványvizetvizet többször is bevizsgáltuk már, és sohasem mutattunk ki szennyezést indikáló szervezeteket (pl. coliform, *E. coli*, *Enterococcus*), tehát a dugókról kimutatott fajok külső szennyezés eredményei: a beleivás révén a szájüregből illetve az emberi kézről kerülhettek az üvegbe, vagy akár a nem megfelelő helyen való tárolás eredményeként.

Baktériumok jelenlétének lecsökkentése érdekében ajánlott, hogy miután kiürült az üveg mossuk ki klóros csapvízzel, illetve a dugót is. Fontos lenne a töltés előtti kézmosás, odafigyelni a töltésre (14. ábra), hogy elkerülhető legyen, hogy a kéz mikrobái a palackra jussanak. Érdeemes elkerülni, hogy a palackok érintkezzenek a talajjal vagy más szennyező források mikrobáival.



14. ábra: Borvizes palackok megtöltése Székelyszáldoboson (Fotó: Salamon Tímea)

5. KÖVETKEZTETÉSEK

1. A fizikai-kémiai mérések eredményei alapján elmondható, hogy a legalacsonyabb fajlagos vezetőképességgel a nagybaconi ásványvíz rendelkezett, az érték 0,75-0,85 mS/cm között változott. Legnagyobb fajlagos vezetőképességgel a bibarcfalvi ásványvíz rendelkezett, helyszíni méréseink során 2,24-2,48 mS/cm közötti értékeket mértünk. A vizsgált források hidegvízűnek minősültek, mivel hőmérsékletük nem haladta meg a 20°C-ot.
2. A legnagyobb pH-val rendelkező ásványvíz a bibarcfalvi ($\text{pH} = 5,9 \pm 0,03$) volt, míg a legalacsonyabb a nagybaconi forrás pH-ja volt, aminek 5,6 és 5,8 között változott.
3. A vízkémiai vizsgálatok szempontjából az ásványvizek megfelelő minőségűnek mondhatók, viszont mikrobiológiai szempontból a tenyésztéses higiéniai vizsgálat azt mutatta, hogy a székelyszáldobosi ásványvíz (a téli mintavétel kivételével) nem volt fogyasztásra alkalmas. A nagybaconi ásványvízből minden évszakban kimutattuk a szennyező indikátormikrobák jelenlétét, ez alapján elmondható, hogy minősége nem megfelelő, emberi fogyasztása nem ajánlott. A mikóújfalusi és bibarcfalvi ásványvizek mikrobiológiai szempontból tisztának mondhatók, fogyasztásra alkalmasak, egyik mintavételi időpontban sem mutattuk ki az indikátormikrobák jelenlétét.
4. A téli mikrobiológiai vizsgálat során azt tapasztaltuk, hogy jelentősen csökkent a mikrobák csíraszama, ami betudható a csapadékszegény hideg időjárás hatásának, és a fagyott feltalajnak.
5. MALDI-TOF módszerrel sikerült megerősíteni a higiéniai vizsgálatok eredményét, több olyan baktériumtörzset izoláltunk és azonosítottunk be (száldobosi és nagybaconi mintákból), melyek különböző fekális szennyeződésekől származnak, mint például az *Escherichia coli*. Ezen beazonosított mikrobák között előfordultak olyanok is, melyek a szervezetbe jutva fertőzéseket, megbetegedéseket is okozhatnak, mint például a *Klebsiella oxytoca*, *Serratia fonticola*, *Citrobacter freundii*. Ez utóbbi baktérium húgyúti fertőzéseket okozhat és különösen veszélyes a gyerekekre, illetve immunhiányos betegekre.
6. A baktériumközösségek tenyésztéstől független módszerrel (NGS) való vizsgálatának eredményei azt mutatták, hogy a vizsgált ásványvizekben többnyire a vas- és kénbaktériumok vannak dominánsan jelen, illetve emellett a száldobosi ásványvízben jelentős arányban fordult elő az *Acetobacterium* nemzetség.
7. A nagybaconi forrás esetében érdemes lenne megvizsgálni a csővezetékét, amely a vizet a faluba vezeti vagy esetleg kicserélni, a szennyezés megszüntetése érdekében. A száldobosi ásványvíz esetében fontos lenne felújítani a tetőszerkezetet, illetve a küpüt lefödni, ezáltal

kizárni, hogy madárürülék kerüljön a vízbe, emellett időnként az elvezető árok kitisztítására, mélyítésére is szükség lenne.

8. A bibarcfalvi, illetve csatószegei ásványvizes palackok dugóin végzett mikrobiális vizsgálatok eredményei meglehetősen aggasztók, mivel olyan potenciálisan patogén baktériumokat (*Staphylococcus hominis*, *Escherichia coli*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter lwoffii*, *Serratia liquefacens* és *Enterococcus faecalis*) és sarjadzógombát (*Candida albicans*) azonosítottunk be, melyek emberi betegségeket, fertőzéseket okozhatnak. Ráadásul a két ásványvíz többszöri bevizsgálása során sem mutattunk ki szennyező indikátor baktériumfajokat, így egyértelmű, hogy a szennyező mikrobák emberi eredetűek, az üvegbe való beleivás, a mocskos kézzel való palacktöltés, nem megfelelő tárolás során kerülhettek a palackok felületére, dugóira. Mindez felhívja a figyelmet a palackokba való beleivás veszélyeire, hiszen így könnyen kaphatunk el másoktól, illetve közvetíthetünk fertőzéseket. Fontos lenne az üvegekből kitölteni az ásványvizet, és a palackokat, illetve a dugókat kimosni klóros csapvízzel.

ÖSSZEFOGLALÁS

Az ásványvizekben különféle mikroorganizmusok találhatók, viszont saját (autochton) mikrobiótájuk nem gyakorol kedvezőtlen hatást az emberi szervezetre. Emberi tevékenységek során szennyeződhetnek akár patogén mikroorganizmusokkal is. Az ivóvizek minősége és mikrobiális „összetétele” kulcsfontosságú a közegészségügy szempontjából. Különösen fontosak a falusi források, borvízkutak, mivel mind a mai napig sokan fogyasztják őket. Az ihatóság szempontjából fontos a potenciálisan patogén mikroorganizmusok vizsgálata, mivel ennek ismeretében elkerülhető a megbetegedések kialakulása.

Kutatásunk célja az volt, hogy négy Kovászna megyei ásványvízforrást (mikóújfalusi Bedő-forrás, nagybaconi Faluborvíz, bibarcfalvi F9-es kút és a székelyszárdobosi Faluvégi-forrás) vizsgáljunk meg vízkémiai (fő kationok és anionok, valamint ammóniumion, nitrit mennyiségi meghatározása), illetve mikrobiológiai szempontból (idegen mikrobióta kimutatása tenyésztéses higiéniai módszerekkel, illetve a természetesen jelen lévő saját mikrobióta vizsgálata újgenerációs DNS szekvenálással). Az izolált idegen baktériumtörzseket MALDI-TOF-MS módszer segítségével azonosítottuk be.

A vizsgált ásványvizek kémhatása a savas tartományba esik (pH=5,62-6,02) és mindegyik szénsavas víznek mondható, ebből adódóan több ásványi anyagot képesek kioldani a kőzetekből (növelve ezzel az elektromos vezetőképességet). A vizsgált források közül a nagybaconi ásványvíznek volt a legalacsonyabb vezetőképessége, ami azt jelenti, hogy ez a forrás rendelkezik a legkevesebb oldott sómennyiséggel. A legmagasabb vezetőképessége a bibarcfalvi forrásnak volt. A vízkémiai paraméterek egyaránt hatást gyakorolnak a vízi élővilágra és a vizek eltarthatóságára is.

Az autochton mikrobióta tagjai között többnyire a vas- és kénbaktériumok domináltak. Vizsgálati eredményeink alapján elmondható, hogy a nagybaconi és székelyszárdobosi ásványvizek minősége mikrobiológiai szempontból nem elfogadható, fogyasztásra nem alkalmasak, a MALDI-TOF-MS módszerrel kimutatott törzsek között zömmel fekális eredetű baktériumok voltak jelen.

A bibarcfalvi, illetve csatószegi ásványvizes palackok dugóin végzett mikrobiális vizsgálatok eredményei meglehetősen aggasztók, mivel olyan potenciálisan patogén baktériumokat (*Staphylococcus hominis*, *Escherichia coli*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter lwoffii*, *Serratia liquefaciens* és *Enterococcus faecalis*) és sarjadzógombát (*Candida albicans*) azonosítottunk be, melyek emberi betegségeket, fertőzéseket okozhatnak. Mindez felhívja a figyelmet a palackokba való beleivás veszélyeire, hiszen így könnyen kaphatunk el másoktól, illetve közvetíthetünk fertőzéseket.

IRODALOMJEGYZÉK

- Aljorayid, A., Viau, R., Castellino, L., Jump, R.L.P. 2016. *Serratia fonticola*, pathogen or bystander? A case series and review of the literature. *IDCases* 5, 6–8.
- Balch, W.E., Schoberth, S., Tanner, R.S., Wolfe, R.S. 1977. *Acetobacterium*, a New Genus of Hydrogen-Oxidizing, Carbon Dioxide-Reducing, Anaerobic Bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 27, 355–361.
- Bányai, J. 1934. *A székeleyföldi ásványvizek*.
- Berszán, J., Jánosi, Cs., Jánosi, K. 2009. *Székeleyföld Borvizei*. Polgár-Társ Alapítvány, Csíkszereda.
- Bertsch, J., Müller, V. 2015. CO Metabolism in the Acetogen *Acetobacterium woodii*. *Applied and Environmental Microbiology* 81, 5949–5956.
- Birlutiu, V., Birlutiu, R.-M., Dobritoiu, E.S. 2023. *Lelliottia amnigena* and *Pseudomonas putida* Coinfection Associated with a Critical SARS-CoV-2 Infection: A Case Report. *Microorganisms* 11, 1–8.
- Boehm, A., Sassoubre, L. 2014. *Enterococci as Indicators of Environmental Fecal Contamination*. Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Boston.
- Boers, S.A., Jansen, R., Hays, J.P. 2019. Understanding and overcoming the pitfalls and biases of next-generation sequencing (NGS) methods for use in the routine clinical microbiological diagnostic laboratory. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 38, 1059–1070.
- Carraturo, F., Del Giudice, C., Compagnone, M., Libralato, G., Toscanesi, M., Trifuoggi, M., Galdiero, E., Guida, M. 2021. Evaluation of Microbial Communities of Bottled Mineral Waters and Preliminary Traceability Analysis Using NGS Microbial Fingerprints. *Water* 13, 1–18.
- Casanovas-Massana, A., Blanch, A.R. 2012. Diversity of the heterotrophic microbial populations for distinguishing natural mineral waters. *International Journal of Food Microbiology* 153, 38–44.
- Choudhuri, I., Khanra, K., Maity, P., Patra, A., Maity, G.N., Pati, B.R., Nag, A., Mondal, S., Bhattacharyya, N. 2021. Structure and biological properties of exopolysaccharide isolated from *Citrobacter freundii*. *International Journal of Biological Macromolecules* 168, 537–549.
- Corniello, A., Guida, M., Stellato, L., Trifuoggi, M., Carraturo, F., Del Gaudio, E., Del Giudice, C., Forte, G., Giarra, A., Iorio, M., Marzaioli, F., Toscanesi, M. 2022. Hydrochemical, isotopic and microbiota characterization of telese mineral waters (Southern Italy). *Environmental Geochemistry and Health* 44, 1949–1970.

- Daims, H., Lebedeva, E.V., Pjevac, P., Han, P., Herbold, C., Albertsen, M., Jehmlich, N., Palatinszky, M., Vierheilig, J., Bulaev, A., Kirkegaard, R.H., von Bergen, M., Rattei, T., Bendinger, B., Nielsen, P.H., Wagner, M. 2015. Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. *Nature* 528, 504–509.
- Eftimie, M. 2017. Study on Mineral Water Consumption in Romania. *Economic Insights –Trends and Challenges*, 51–59.
- Essert, S.M., Zacharias, N., Precht, T., Pankratz, D., Funken, K., Mutters, N.T., Kistemann, T., Schreiber, C. 2023. Persistence of MRSA and ESBL-producing *E. coli* and *K. oxytoca* in river water. *Hygiene and Environmental Health Advances* 7, 1–10.
- Feru, A. 2012. *Ghidul apelor minerale naturale*, Patronatul Apelor Minerale. București.
- Gomaa, E.Z., El-Meihy, R.M. 2019. Bacterial biosurfactant from *Citrobacter freundii* MG812314.1 as a bioremoval tool of heavy metals from wastewater. *Bulletin of the National Research Centre* 43, 43–69.
- Goris, T., Diekert, G. 2016. *The Genus Sulfurospirillum*, In: Lorenz, A., Löffler, F.E. (eds). *Organohalide-Respiring Bacteria*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 209–234.
- György É., Máthé I., Lőrinczi L., Buzás A., Kémenes L. 2007. Gyergyóújfalui ásványvizek és kútvizek mikrobiológiai vizsgálata. *Orvostudományi Értesítő*, 80(1), 67–69
- Hädrich, A., Tallefert, M., Akob, D.M., Cooper, R.E., Litzba, U., Wagner, F.E., Nietzsche, S., Ciobota, V., Rösch, P., Popp, J., Küsel, K. 2019. Microbial Fe(II) oxidation by *Sideroxydans lithotrophicus* ES-1 in the presence of Schlöppnerbrunnen fen-derived humic acids. *FEMS Microbiology Ecology* 95(4), 1–19.
- Han, Y., Perner, M. 2015. The globally widespread genus *Sulfurimonas*: versatile energy metabolisms and adaptations to redox clines. *Frontiers in Microbiology* 6, 1–17
- Handley, K.M., Bartels, D., O’Loughlin, E.J., Williams, K.H., Trimble, W.L., Skinner, K., Gilbert, J.A., Desai, N., Glass, E.M., Paczian, T., Wilke, A., Antonopoulos, D., Kemner, K.M., Meyer, F. 2014. The complete genome sequence for putative H₂- and S-oxidizer *Candidatus Sulfuricurvum* sp., assembled de novo from an aquifer-derived metagenome. *Environmental Microbiology* 16, 3443–3462.
- Horath, T., Bachofen, R. 2009. Molecular Characterization of an Endolithic Microbial Community in Dolomite Rock in the Central Alps (Switzerland). *Microbial Ecology* 58, 290–306.
- Kaden, R., Spröer, C., Beyer, D., Krolla-Sidenstein, P. 2014. *Rhodoferrax saidenbachensis* sp. nov., a psychrotolerant, very slowly growing bacterium within the family Comamonadaceae, proposal of appropriate taxonomic position of *Albidiferrax ferrireducens* strain T118T in the genus *Rhodoferrax* and emended description of the genus *Rhodoferrax*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64, 1186–1193.

- Kis B., Szász Á., Pál Z. 2007. Ásványvíz-definíciók és besorolások fejlődése. *Acta Siculica*, 37–47.
- Kisgyörgy, Z. 2013. *Háromszéki Borvizeskönyv*, Ásványvíz sokadalom a Kárpát-kanyarban. Háromszék Vármegye Kiadó, Spepsiszentgyörgy.
- Kisgyörgy, Z. 2009. *Kovászna megye*, Második kiadás. ed, Barangolás a Székelyföldön 3. Pallas-Akadémia, Csíkszereda.
- Krawczyk-Bärsch, E., Scheinost, A.C., Rossberg, A., Müller, K., Bok, F., Hallbeck, L., Lehrich, J., Schmeide, K. 2021. Uranium and neptunium retention mechanisms in Gallionella ferruginea/ferrihydrite systems for remediation purposes. *Environmental Science and Pollution Research* 28, 18342–18353.
- Kretz, A. 2018. Types of water pollutants with particular reference to biological contaminants. *Műszaki Katonai Közlöny*, 1–13
- Labrenz, M., Grote, J., Mammitzsch, K., Boschker, H.T.S., Laue, M., Jost, G., Glaubitz, S., Jürgens, K. 2013. Sulfurimonas gotlandica sp. nov., a chemoautotrophic and psychrotolerant epsilonproteobacterium isolated from a pelagic redoxcline, and an emended description of the genus Sulfurimonas. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63, 4141–4148.
- Lebreton, F., Willems, R.J.L., Gilmore, M.S. 2014. *Enterococcus Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization*, In: Gilmore, M.S., Clewell, D.B., Ike, Y., Shankar, N. (eds). *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Boston.
- Lewis, S.S., Zaas, A. 2022. Stenotrophomonas maltophilia. In: Sexton, D.J., Bloom, A. (editors): UpToDate (2014). Topic 13961, version 8.0: pages:1–8.
- Máthé, I., Táncsics, A., György, É., Pohner, Z., Vladár, P., Székely, A.J., Márialigeti, K. 2010. Investigation of mineral water springs of Miercurea Ciuc (Csíkszereda) region (Romania) with cultivation-dependent microbiological methods. *Acta Microbiologica Et Immunologica Hungarica* 57, 109–122.
- Mellbye, B.L., Bottomley, P.J., Sayavedra-Soto, L.A. 2015. Nitrite-Oxidizing Bacterium Nitrobacter winogradskyi Produces N-Acyl-Homoserine Lactone Autoinducers. *Applied and Environmental Microbiology* 81, 5917–5926.
- Misăilă, L., Răducanu, D., Bârsan, N., Alexa, I.-C., Patriciu, O.-I., Grosu, L. 2023. Assessment of the microbiota of some mineral water from slanic Moldova (Romania): Seasonal evaluation and after storage in different conditions. *Scientific Study & Research. Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry* 24, 97–110.

- Murphy, M.E., Goodson, A., Malnick, H., Shah, J., Neelamkavil, R., Devi, R. 2012. Recurrent *Microvirgula aerodenitrificans* Bacteremia. *Journal of Clinical Microbiology* 50, 2823–2825.
- Nagy E., Ábrók M., Bartha N., Bereczki L., Juhász E., Kardos G., Kristóf K., Miszti C., Urbán E. 2014. Special application of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical microbiological diagnostics. *Orvosi Hetilap* 155, 1495–1503.
- Némédi, L. 2006. Az ásványvizek mikrobiológiai jellemzői. *Alkoholmentes Italok*, 2006/3, 44-51.
- Nosalova, L., Mekadim, C., Mrazek, J., Pristas, P. 2023. Thiothrix and Sulfurovum genera dominate bacterial mats in Slovak cold sulfur springs. *Environmental Microbiome* 18, 1–12.
- Pándi, G. 2009. *Folyékony halmazállapotú kontinentális vizek*. Casa Cărții de Știință, Kolozsvár.
- Pinar-Méndez, A., Fernández, S., Baquero, D., Vilaró, C., Galofré, B., González, S., Rodrigo-Torres, L., Arahál, D.R., Macián, M.C., Ruvira, M.A., Aznar, R., Caudet-Segarra, L., Sala-Comorera, L., Lucena, F., Blanch, A.R., García-Aljaro, C. 2021. Rapid and improved identification of drinking water bacteria using the Drinking Water Library, a dedicated MALDI-TOF MS database. *Water Research* 203, 1–10.
- Sala-Comorera, L., Caudet-Segarra, L., Galofré, B., Lucena, F., Blanch, A.R., García-Aljaro, C. 2020. Unravelling the composition of tap and mineral water microbiota: Divergences between next-generation sequencing techniques and culture-based methods. *International Journal of Food Microbiology* 334, 1–26.
- Salamon, T., Salamon, P., Zsigmond, A.R., Máthé, I. 2023. *Mikóújfalu és Barót határában található ásványvizek mikrobiológiai vizsgálata*. In: *A Kárpát-medence ásványvizei*. XVII. Nemzetközi Tudományos Konferencia, Sapientia EMTE, Csíkszeredai Kar, pp. 58–75.
- Schalli, M., Platzer, S., Haas, D., Reinthaler, F.F. 2023. The behaviour of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* in bottled mineral water. *Heliyon* 9, 1–8.
- Stolz, J.F., Oremland, R.S., Paster', B.J., Dewhirst, F.E., Vandamme, P. 2015. *Sulfurospirillum*, In: *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 1–7.
- Sun, B., Zhao, H., Zhao, Y., Tucker, M.E., Han, Z., Yan, H. 2020. Bio-Precipitation of Carbonate and Phosphate Minerals Induced by the Bacterium *Citrobacter freundii* ZW123 in an Anaerobic Environment. *Minerals* 10, 1-26.
- Tomulescu, C., Moscovici, M., Lupescu, I., Stoica, R.M., Vamanu, A. 2021. A Review: *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* and Biotechnology. *Romanian Biotechnological Letters*. 26, 2567–2586.

- Vajna, B., Tóth, E., Felföldi, T. 2016. *Methods in Environmental Microbiology and Bacterial Taxonomy*.
- van Kessel, M.A.H.J., Speth, D.R., Albertsen, M., Nielsen, P.H., Op den Camp, H.J.M., Kartal, B., Jetten, M.S.M., Lückner, S. 2015. Complete nitrification by a single microorganism. *Nature* 528, 555–559.
- Vardianu, A. 2021. *Noțiuni generale pentru populație privind categoriile apei potabile*. Institutul National de Sanatate Publica.
- Vela, J., Hildebrandt, K., Metcalfe, A., Rempel, H., Bittman, S., Topp, E., Diarra, M. 2012. Characterization of *Staphylococcus xylosus* isolated from broiler chicken barn bioaerosol. *Poultry Science* 91, 3003–3012.
- Zhang, Q., Zhang, J., Zhang, Y., Sui, Y., Du, Y., Yang, L., Yin, Y. 2024. Antifungal and anti-biofilm activities of patchouli alcohol against *Candida albicans*. *International Journal of Medical Microbiology* 314, 1–9.

- Hotărârea Guvernului României HG nr. 1020/2005 pentru aprobarea Normelor tehnice de exploatare și comercializarea apelor minerale naturale. <http://www.namr.ro/wp-content/uploads/2013/02/hotarare1020> Letöltve: 2024.03.10.
- Directiva 2009/54/CE a Parlamentului European și a Consiliului din 18 iunie 2009 privind exploatarea și comercializarea apelor minerale naturale. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/RO/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009L0054> Letöltve: 2024.03.10.
- Directiva Consiliului din 15 iulie 1980 de apropiere a legislațiilor statelor membre privind exploatarea și comercializarea apelor minerale naturale (80/777/CEE). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/RO/TXT/PDF/?uri=CELEX:31980L0777> Letöltve: 2024.03.10.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

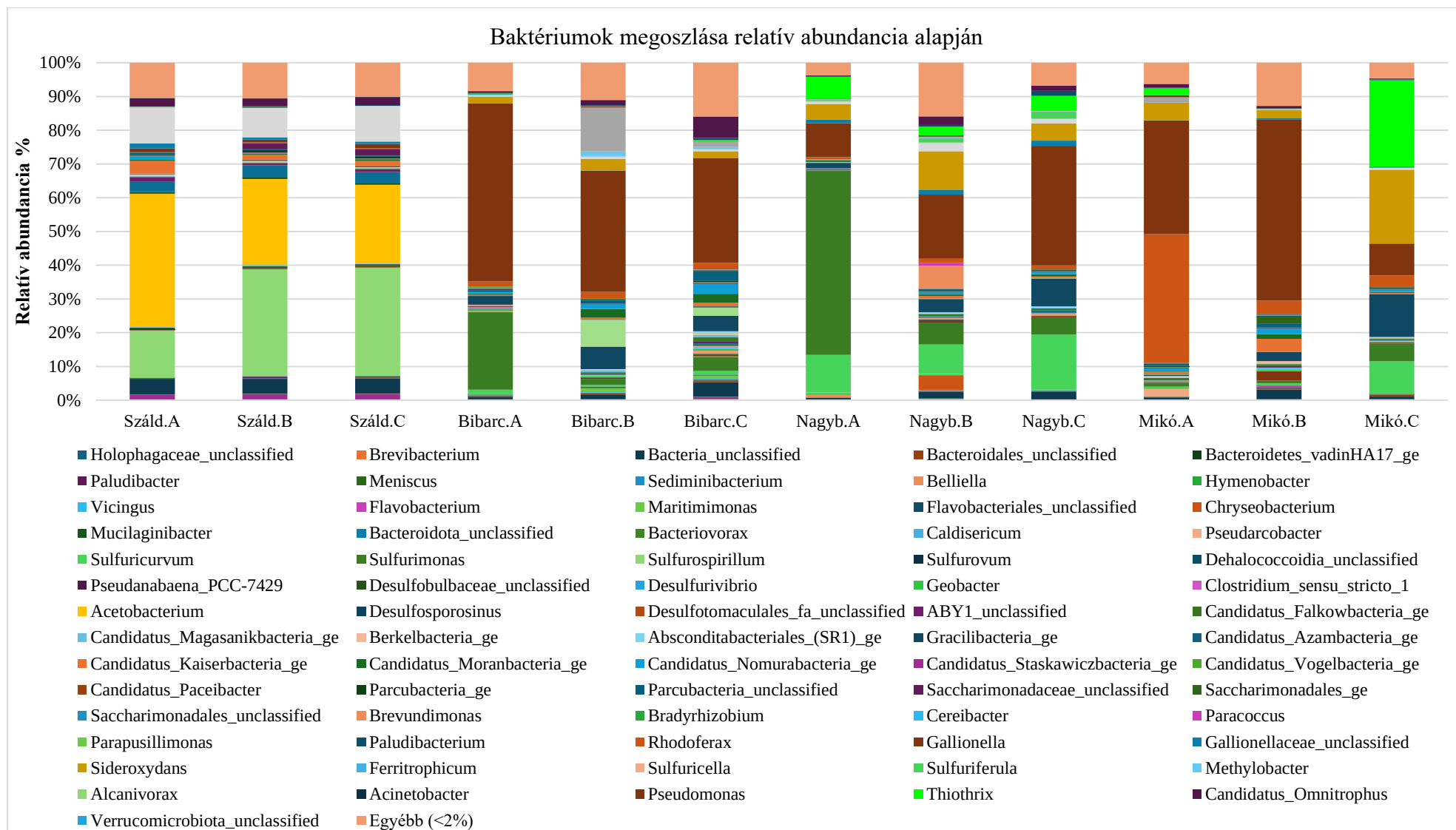
Szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, dr. Máthé István egyetemi docens tanár úrnak és dr. Zsigmond Andrea-Rebeka egyetemi adjunktus tanárnőnek, akik sok segítséget nyújtottak és tanácsaikkal hozzájárultak dolgozatom elkészüléséhez. Külön köszönettel tartozom dr. Salamon Pálnak a MALDI-TOF MS elvégzésében nyújtott segítségéért. Köszönetet szeretnék mondani az ELTE Mikrobiológiai Tanszék munkatársainak az NGS vizsgálatok elvégzéséért és a nyers adatok feldolgozásáért. Köszönöm a Biomérőki Tanszék munkatársainak a segítségüket.

MELLÉKLETEK

1. táblázat: Nagybaconi és székelyszáldobosi vízmintákból MALDI-TOF módszerrel beazonosított mikrobák listája

Sorszám	Táptalaj - forrás	Telep morfológia	MALDI azonosítás	Score value
2023.04.29.				
1.	Slanetz-B. Nagybacon	tipikus (nagy) <i>Enterococcus</i> telep	<i>Enterococcus</i> <i>faecium</i>	2,32
2.	Slanetz-B. Nagybacon	tipikus (kis) <i>Enterococcus</i> telep	<i>Enterococcus</i> <i>termitis</i>	1,88
3.	Pseudomonas Száldobos	nagy csillogó telep	<i>Bacillus</i> <i>megaterium</i>	1,83
4.	Pseudomonas Száldobos	nagy lapos telep középen	<i>Bacillus</i> <i>megaterium</i>	2,37
5.	Coliform Száldobos	kis kék színű telep	<i>Staphylococcus</i> <i>warneri</i>	1,99
6.	Coliform Száldobos	sárga színű telep	<i>Staphylococcus</i> <i>warneri</i>	1,87
7.	Coliform Száldobos	fehér színű telep	<i>Staphylococcus</i> <i>haemolyticus</i>	2,15
8.	Coliform Nagybacon	középen vöröses színű telep	<i>Serratia</i> <i>liquefaciens</i>	2,29
2023.06.15.				
9.	Coliform Száldobos	szétfolyt kék, nem lokalizálható	<i>Bacillus</i> <i>pumilus</i>	1,75
10.	Coliform Száldobos	nagy sötétlila telep	<i>Enterococcus</i> <i>casseliflavus</i>	2,01
11.	Slanetz-B. Száldobos	rózsaszín színű telep	<i>Enterococcus</i> <i>durans</i>	2,35
12.	Coliform Száldobos	világoskék, nem lokalizálható	<i>Bacillus</i> <i>pumilus</i>	1,77
13.	Slanetz-B. Száldobos	kívül rózsaszín, belül sötét bordó	<i>Enterococcus</i> <i>faecium</i>	2,48
14.	Coliform Nagybacon	sötétlila színű telep	<i>Hafnia</i> <i>alvei</i>	2,07

2023.10.23.				
15.	Slanetz-B. Száldobos	tipikus (nagy) <i>Enterococcus</i> telep	<i>Enterococcus</i> <i>faecium</i>	2,44
16.	Slanetz-B. Nagybacon	tipikus (nagy) telep a szélén	<i>Enterococcus</i> <i>durans</i>	2,36
17.	Slanetz-B. Nagybacon	kis bordó színű telep	<i>Enterococcus</i> <i>phoeniculicola</i>	1,76
18.	Coliform Száldobos	nagyobb lila telep középen	<i>Citrobacter</i> <i>freundii</i>	2,11
19.	Coliform Száldobos	halványlila telep oldalt	<i>Klebsiella</i> <i>oxytoca</i>	2,02
20.	Coliform Száldobos	kisebb lila telep oldalt	<i>Enterobacter</i> <i>asburiae</i>	2,07
21.	Coliform Nagybacon	nagy kék telep középen	<i>Escherichia</i> <i>coli</i>	1,94
22.	Coliform Nagybacon	kis lila színű telep	<i>Hafnia</i> <i>alvei</i>	2,1
23.	Coliform Nagybacon	közepes méretű, kék színű telep	<i>Escherichia</i> <i>coli</i>	2,26
24.	Coliform Nagybacon	közepes méretű, kék színű telep, oldalt	<i>Escherichia</i> <i>coli</i>	2,26
2024.02.10.				
25.	Coliform Nagybacon	legnagyobb sötét lila telep	<i>Lelliottia</i> <i>amnigena</i>	2,17
26.	Coliform Nagybacon	közepes sötétlila színű telep	<i>Miccrovirgula</i> <i>aerodenitrificans</i>	2,53
27.	Coliform Nagybacon	kis sötétlila színű telep	<i>Buttiauxella</i> <i>ferragutiae</i>	1,93
28.	Coliform Nagybacon	nyálkás külsejű, sötétlila telep	<i>Serratia</i> <i>fonticola</i>	2,42



1. ábra: Vizsgált ásványvízforrások domináns nemzetségei (Száld. - Székelyszáldobos, Bibarc.- Bibarcfalva, Nagyb.- Nagybacon, Mikó. - Mikóújfalú; A-nyári vizsgálat, B-őszi vizsgálat, C-téli vizsgálat)