

Eötvös Loránd Tudományegyetem
Természettudományi Kar
Környezettudományi Doktori Iskola
Környezetbiológia Doktori Program

Budapesti gyógyfürdők mikrobiológiai vizsgálata

- doktori értekezés –

LIPPAI ANETT

Témavezető

Dr. Tóth Erika

Habilitált egyetemi docens

A Környezettudományi Doktori Iskola vezetője

Prof. Dr. Turányi Tamás

egyetemi tanár

A Környezetbiológia Program vezetője

Dr. Tóth Erika

Habilitált egyetemi docens

ELTE Mikrobiológiai Tanszék

Budapest 2021

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	4
2. Bevezetés	6
3. Irodalmi áttekintés	7
3.1. Magyarország földtani adottságai	7
3.2. Földtani jellegzetességek és a fürdőzés hatása a természetes mikrobaközösségekre	9
3.3. Termálforrások mikrobaközösségeinek vizsgálata	10
3.4. Fürdővizek vizsgálata Magyarországon	16
3.4.1. Hazai vízügyi és egészségügyi szabályozás	16
3.4.2. Medencevizekkel összefüggésbe hozható mikrobiológiai kockázatok	19
3.4.3. Fürdővizek mikrobiológiai vizsgálata	21
3.5. Fürdővizek vízkezelése	22
3.6. Baktériumközösségek jellemzésére alkalmazható vizsgáló módszerek	24
3.6.1. Tenyésztéses módszerek	24
3.6.2. Molekuláris vizsgáló módszerek	27
4. Célkitűzések	30
5. Anyag és módszer	31
5.1. A doktori kutatás során vizsgált gyógyfürdők jellemzése	31
5.2. Mintavétel	32
5.3. Mintafeldolgozás	33
5.3.1. A kútvizek fizikai és kémiai tulajdonságainak mérése	34
5.3.2. Szabványos mikrobiológiai vizsgálatok	34
5.3.3. Mikroszkópos sejtszám meghatározása	36
5.3.4. Speciális tenyésztéses vizsgálatok	37
5.3.5. Heterotróf csíraszám becslés oligotróf táptalajokon	38
5.3.6. Molekuláris vizsgálatok	38
6. Eredmények és értékelésük	44
6.1. Kútvizek fizikai és kémiai jellemzői	44
6.2. Heterotróf csíraszámbeclés és a mikroszkópos sejtszám vizsgálat eredményei ...	44
6.3. Kútvizek természetes baktériumközösségeinek összehasonlítása	46
6.4. Medencevizek jellemző baktériumközösségei	54

6.4.1. Beltéri, töltő-ürítő rendszerű 36-38°C-os medencék baktériumközösségei	54
6.4.2. Beltéri, töltő-ürítő 20°C-os medencék összehasonlítása.....	58
6.4.3. Kültéri, visszaforgatásos 38°C-os medencék összehasonlítása	60
6.4.4. A kútvizek és medencevizek baktériumközösségeinek áttekintése	62
6.5. Medencevizek higiénés vizsgálatának eredményei és értékelésük	65
6.6. Vízelkezelések hatásának elemzése	70
7. Összefoglalás	75
8. Summary	77
9. Köszönetnyilvánítás	79
10 Irodalomjegyzék	80
11. Függelék	94

1. Rövidítések jegyzéke

AOX	adszorbeálható szerves halogén
ACE	fajszámbecslő index (abundance-based coverage estimator)
ARDRA	amplifikált rDNS restrikciós analízis (Amplified RibosomalDNA Restriction Analysis)
bp	bázispár
BTK	Budai Termálkarszt
CRBSI	kanülrel összefüggő fertőzés (Catheter Related Bloodstream Infection)
CDC	Amerikai Járványügyi Központ (Center of Disease Control)
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DGGE	denaturáló gradiens gélelektroforézis (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)
DEPC	dietil-polikarbonát
dNTP	dezoxi-ribonukleotid-5-trifoszfát
EMMI	Emberi Erőforrások Minisztériuma
<i>erm</i>	eritromicin riboszóma metiláció (erythromycin ribosome methylation)
ESBL	kiterjedt spektrumú β -laktamáz (extended spectrum β -lactamases)
Eüm	Egészségügyi Minisztérium
HAA	halogénessav
HMP	humán mikrobiom projekt (Human Microbiome Project)
KOI	kémiai oxigénigény
MBC	legkisebb baktericid koncentráció (Minimal Bactericide Concentration)
MIC	minimális gátló koncentráció (Minimal Inhibitory Concentration)
<i>mef</i>	makrolid efflux (macrolide efflux)
<i>mrsA</i>	methicillin rezisztens <i>Staphylococcus aureus</i> (methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>)
MM	minimál médium
MPN	legvalószínűbb szám (Most Probable Number)
NGS	újgenerációs szekvenálás (Next Generation Sequencing)
NM	Népjóléti Minisztérium
NNK	Nemzeti Népegészségügyi Központ
OTU	operatív rendszertani egység (Operative Taxonomy Unit)
PBS	foszfát puffer oldat (Phosphate Buffer Solution)

PCR	polimeráz láncreakció (Polymerase Chain Reaction)
PFA	paraformaldehid
PLFA	foszfolipid zsírsav analízis (Phospholipid Fatty Acid Analysis)
PUF	purhab tömb (PolyUrethane Phoam)
REP PCR	repetitív intergénés palindrom szekvenciákra tervezett PCR
SNP	egyedi nukleotid polimorfizmus (Sinlge Nucleotide Polimorphism)
sp, spp	faj, fajok
THM	trihalometán
TKE	telepképző egység
TOC	összes szerves széntartalom (Total Organic Carbon)
T-RFLP	terminális restrikciós fragment hossz polimorfizmus (Terminal Restriction Fragment Length Polimorphism)
WHO	Egészségügyi Világszervezet

2. Bevezetés

Magyarország kiemelkedően gazdag termálvíz készlettel rendelkezik, az ország mintegy 70-80%-án találhatóak 30°C-nál magasabb hőmérsékletű hévizek. Az évszázadok során fokozatosan fejlődő fürdőkultúra és ennek hatására létesített népszerű fürdők miatt méltán nevezhetjük Magyarországot „fürdőnagy hatalomnak”. Annak ellenére, hogy ilyen gazdag termálvíz készlettel rendelkezünk, közfürdőink vizsgálata elsősorban a jogszabályokban rögzített higiénés vizsgálatokra terjed ki, amelyek során szabványos módszerek segítségével mutatják ki a mikroorganizmusokat.

A hazai szabályozás (37/1996 (X.18.) NM rendelet) szerint a közfürdők medencéinek üzemeltetése történhet vízforgatással (fertőtlenítőszer alkalmazásával) vagy töltő-ürítő rendszerrel. Azokat a medencéket, ahol a fertőtlenítés a gyógyvíz gyógyhatású összetevőit károsíthatja, töltő-ürítő rendszert alkalmaznak. A rendelet ezen pontját több üzemeltető használja ki, ezáltal Magyarországon a gyógymedencék túlnyomó többsége töltő-ürítő módon, fertőtlenítés nélkül üzemel. A közelmúltban nincs tudomásunk fürdővízzel kapcsolatos tömeges megbetegedésről, azonban a töltő-ürítő medencék fertőtlenítőszer nélküli üzemeltetése növeli a közegészségügyi kockázatot.

Jelenleg igen kevés információ áll rendelkezésünkre a termálforrások természetes mikrobaközösségeivel kapcsolatosan, amelyek a vízi ökoszisztémákban nagyon fontos szerepet töltenek be pl. anyagcsere tulajdonságaik révén befolyásolják a vízminőséget, segíthetnek a kórokozó mikroorganizmusok visszaszorításában (Valeriani és mtsai, 2018). A természetes mikrobaközösségek vizsgálatához célszerű, a termálforrások kémiai tulajdonságait figyelembe véve, speciális tápközegeket, illetve tenyésztéstől független módszereket alkalmazni, hogy egy egységes képet kaphassunk a termálforrások baktérium közösségeiről, annak megértéséről, hogyan tudnak alkalmazkodni a baktériumok az extrém környezeti feltételekhez, milyen anyagcsere folyamat révén befolyásolják a vízminőséget.

A források természetes baktériumközösségei a medencékbe kerülve számos új tényezővel találkoznak: fizikai paraméterek megváltozásával, a környezetből (köztük az emberek közvetítésével) bekerülő mikrobákkal, amelyek gyors szaporodásukkal elnyomják a forrásokat benépesítő baktériumokat, nem utolsósorban a vízkezeléssel, amelyek szintén befolyásolják a természetes mikrobaközösségeket.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. Magyarország földtani adottságai

Termálvizeink kialakulása a Kárpát-medence kedvező földtani körülményeinek köszönhető. A Kárpát-medence földkéreg vastagsága eltér a világtól (30-35 km): mindössze 24-26 km vastag. A földkéreg ezen tulajdonságának köszönhetően a forró magma közelebb esik a földfelszínhez, ezáltal a Kárpát-medencei, így a magyarországi geotermikus gradiens értéke átlagosan 5°C/100 m. A világtól képest, amely 3°C/100m, elmondhatjuk, hogy hazánk geotermikus gradiens értéke másfélszer magasabb annál (Liebe, 2001). Ez még önmagában nem elegendő ahhoz, hogy a hévizeink kialakuljanak és a felszín alatt tárolódjanak. A földkéreg vastagságán kívül nagy szerepet játszanak a jó hőszigetelő üledékek, többek közt az agyag és a homok, és a vizet tárolni és leadni képes kőzetek jelenléte is (Hárs, 2006). Ezen kedvező földtani adottságoknak köszönhetően Magyarország kiemelkedően gazdag gyógy- és termálvíz készlettel rendelkezik, ami által a gyógyturizmus folyamatosan fejlődő iparágnak minősül, fürdőinket a világ minden tájáról látogatják.

Az egyes országok földtani adottságainak megfelelően a termálvizek hőmérsékleti határértéke nemzetközi szinten nem egységes. Hazánkban 1953-tól 1984-ig a 35°C-nál magasabb hőmérsékletű felszíni vízkifolyók minősültek hévíznek. Mivel más országokban viszonylag ritka az ilyen magas hőmérsékletű víz, már a 30°C-os vizeket is termálvíznek tartják. Ezt a gyakorlatot Magyarország is követte, így a kifolyásnál 30°C-nál melegebb vizű kutakat és forrásokat tekintjük termálvízkutaknak, illetve hévforrásoknak. Hévízekben hazánk igen gazdag, az ország területének mintegy 70-80%-án feltárhatók (Liebe, 2006). Termálvizeink minőségét, kémiai összetételét azok a hévíztározók befolyásolják, amelyekből a felszínre törnek. Termálforrások tekintetében a karbonátos rendszerek játszanak nagyon fontos szerepet, hiszen azok a termálvizek, amelyek karbonátos víztározókból erednek, számos termálfürdőt látnak el szerte a világban, beleértve a hazánkat is, pl. a Budai Termálkarszt rendszernek (BTK) köszönhetően (Anda és mtsai, 2015). A Duna mindkét oldalán megtalálható Budai Termálkarszt rendszer vizei jellemzően kalcium-magnézium-hidrogénkarbonátosak, a mélyebb rétegekből származó források nátrium-klorid tartalma is jelentős. Abban az esetben, amennyiben a termálvíz szulfidtartalmú ásvánnyal érintkezik (pl. pirit), megnövekedhet a forrásvíz szulfid-, illetve szulfáttartalma. A medencebeli porózus hévíztározók vizének sótartalma viszonylag magas, jellegzetesen alkáli hidrogénkarbonátosak. A víz a felszínre törve, áramlás közben a vízzáró agyagrétegek mellett halad, ezáltal a felszín felé haladva veszít keménységéből, továbbá a felszínre kerülve gázképződés is jellemző, így a víz mellett

különböző gázok pl. szén-dioxid, metán is feltörhetnek. A karsztos képződmények jellegzetesen csapadékvízzel kapják az utánpótlást, majd több ezer éves tartózkodás és nagy mélységig történő leáramlás után a kőzetekből kioldott ásványi anyagokkal gazdagodva és a hévízzel keveredve a felszínre törnek. A jó vízvezető képződmények akár 2,5 km mélyre nyúlva lehetővé teszik az akár 130-150°C-os hőmérsékletet. A földfelszín felé haladva a termálvizek hőmérséklete csökken, a felszínre érve ritkán haladja meg a 100°C-ot (Liebe, 2001).

Budapest területén a hévforrás tevékenység első fázisában kovás, fluoritos, baritos, vasas ásványkiválás volt jellemző. A folyamat a pliocén végéig tarthatott, melyet hidrogén-karbonátos tevékenység váltott fel. Ennek köszönhetően alakultak ki azok a vastag forrásmész-kő rétegek a Budai-hegységben, amelyek mentén a hévforrások ma is működnek. A hévíztárolók üledékösszetételüket tekintve egyszerű felépítésűek: uralkodóan dolomit, kisebb mértékben mészkő, amelyek kristályos szerkezetű, tömött kőzetek – ennek megfelelően igen kis porozitás jellemző rájuk. Általában a tömött, kristályos tároló kőzetet ún. másodlagos hézagosság jellemzi, amely kiegyenlíti az elsődleges (mátrix porozitás) hiányát. Ez jellemző a budapesti karbonátos hévíztározókra is, ahol a másodlagos hézagosság egyrészt a hegység szerkezeti mozgásokból, másrészt az oldódási folyamatok révén kialakuló kőzetrészekből, hasadékokból adódnak. A kőzettani viszonyok és a hegység szerkezeti mozgások az áteresztőképességet is befolyásolják, a hézagossághoz hasonlóan az elsődleges áteresztőképesség igen csekély, a tektonikai folyamatok azonban helyenként jelentős, ún. hasadékos áteresztőképességet eredményeznek. Az áteresztőképességi viszonyok a karsztosodási és oldódási folyamatoknak köszönhetően helyenként kedvezőek – kőzettani tulajdonságok alapján a mészkő könnyebben oldódik, mint a dolomit, amely jól kifejlődött üreg és barlangrendszerekhez vezetett. A mélyből feltörő hévizeknek a hasadérendszer kioldásában, üregek és barlangok kialakításában nagyon fontos szerepe van (Alföldi, 1968).

A Budai Termálkarszt rendszer gazdag különböző hőmérsékletű és kémiai összetételű forrásokban. A Dunántúli-középhegység karbonátos víztározó rendszeréhez tartozó termálkarszt rendszer tanulmányozása évtizedekre nyúlik vissza: a Duna mentén elhelyezkedő budapesti termálvizek kémiai jellemzése Papp (1942), majd Alföldi (1968) nevéhez fűződik – munkájuk révén az első kémiai felmérések készültek el a BTK forrásvizeiről. A természetes vizekben, így a hévizekben is a szerves és szervetlen alkotók különböző koncentrációban találhatóak – a környezetet, a víztároló kőzetet, amellyel a víz a leghosszabban érintkezett földalatti tartózkodása során, a makroelemek fajtájával jellemezhető. Ilyen, nagy koncentrációban megtalálható anyagok a nátrium ion, kálium ion, kalcium ion, magnézium ion, klorid ion, hidrogén-karbonát, szulfát ionok, metakovasav és szén-dioxid. A Dunántúli-

középhegységben nagy távolságban is állandó hőmérsékletű és kémiai összetételű (10-14°C hőmérsékletű, 300-700 mg/liter összes oldott ásványi anyagtartalmú) hévizek jellemzők, a Budai-hegység peremvidékén, Budapesten azonban igen változatos hőmérsékletű és kémiai összetételű források találhatók (Alföldi, 1968). Déri-Takács és munkatársai 4 csoportba sorolták a BTK forrásvizeit, fizikai-kémiai tulajdonságaik alapján, amely szerint a Déli csoportba tartozó források vize a legmagasabb kalcium, magnézium és szulfát tartalommal jellemezhető, átlagosan 35-47°C hőmérsékletűek. Ezek a források látják el a Rác, Rudas, Gellért és Csepel területén található fürdőket, ezért Gellért-hegyi forráscsoportnak is nevezik őket. A Gellért tározó egy 1969-1978 között épült 1100 m hosszú mesterséges alagút, mely a Gellért-fürdő szivattyúházából indul északnyugati irányban, követve a Duna-part vonalát, majd a Rác-fürdőnél lévő támfalat áttörve éri el a végszelvényt. Az alagút jobb és bal oldalán összesen 4 üzemelő és 14 megfigyelő kút van. Napjainkban a GT-I. és a GT-III. sz. kút a Gellért-fürdő termálvíz ellátását szolgálja, míg a GT-II. és GT-VI. üzemelő kutak pedig a Rudas-fürdő termálvíz ellátását biztosítják (Vojnits, 2008).

Az Északi hideg vizes csoportba tartozó források bizonyultak a legalacsonyabb hőmérsékletűnek (20-27°C) és az összes vizsgált kémiai komponenst a legalacsonyabb koncentrációban tartalmazzák. Ezek a források látják el a Római, Csillaghegy és Pünkösfürdő területén elhelyezkedő fürdőket. Az Északi meleg vizes csoport a Margitsziget északi területét és a Dagály fürdőt ellátó források, amelyek minden paraméter tekintetében közép kategóriájúnak tekinthetők, tehát nem a legalacsonyabb és nem is a legmagasabb értékekkel jellemezhető vizek, hőmérsékletük 35-45°C közötti. A negyedik csoportot a mély karsztrendszerek képezik, amelyek a legmagasabb hőmérsékletűek (65-78°C). Kémiai paramétereket tekintve a Déli csoportba tartozó forrásokhoz hasonlóak. Ilyen magas hőmérsékletű források a Margitsziget déli területein és a Széchenyi fürdőnél találhatók (Déri-Takács és mtsai, 2015).

3.2. Földtani jellegzetességek és a fürdőzés hatása a természetes mikrobaközösségekre

A termálforrások fizikai, kémiai és geológiai tulajdonságai befolyásolják az adott termálvízre jellemző természetes (autochton) élőlényközösség kialakulását. A források hőmérséklete, pH értéke, redoxpotenciálja, ionösszetétele és az ionok koncentrációja (pl. szulfátió, szulfidion, vas(II)-ion, vas(III)-ion, nátriumion és nitrogénformák), az oxigénkoncentráció, nyomás valamint a víz mozgása befolyásolják a termálvizek élőlényeit, köztük a mikrobiális közösségeket (Némedi, 2013). A termálforrások extrém környezetek, ahol számos limitáló

tényező érvényesül, amelyek hatással vannak a természetes mikrobaközösségekre: toxikus elemek előfordulása (pl. higany, arzén), alacsony/magas pH, kevés hasznosítható tápanyag, alacsony oxigénszint. Ezek a tényezők olyan speciális körülményeket teremtenek, ahol a környezeti feltételekhez való mikrobiális alkalmazkodás különleges példáit lehet felfedezni. Az ásványi anyag lerakódások, amelyek ezekben a rendszerekben megfigyelhetőek fontos szerepet töltenek be a természetes mikrobaközösségek összetételében. A környezettel való interakció következtében a baktériumok anyagcseréjükkel szintén befolyásolják a termálforrások kémiai összetételét, így összességében egy komplex rendszerről beszélhetünk, amelyben a biotikus és abiotikus hatások közösen alakítják ki az adott ökoszisztéma jellegét (Valeriani és mtsai, 2018). A földtani jellegzetességek hatása mellett az autochton mikrobaközösségek összetételére egyéb tényezők is hatással vannak, különösen jellemző ez a medencékre, ahol a forrásokat benépesítő mikrobákat számos hatás éri. A forrásokhoz képest ahhoz, hogy a fürdőzés kellemes tevékenységgé váljon, a források hőmérsékletét csökkenteni kell (ez gyakran hálózati vízzel való keveréssel történik, de egyre népszerűbb a hőcserélők beépítése is). A medencékbe kerülve a mikroorganizmusok új környezetbe jutnak, ahol olyan hatásoknak vannak kitéve, mint maga a megváltozott fizikai környezet vagy a külső környezetből (beleértve a fürdőzőket is) bekerülő allochton mikroorganizmusok, amelyek gyors alkalmazkodó képességük és szaporodásuk révén kiszoríthatják a természetes közösség tagjait. Nem utolsósorban a természetes közösségekre hatással vannak a különböző vízkezelési technikák, amelyek több lépéses fizikai és kémiai folyamatok (vegyszeres kezelés) révén befolyásolják azok összetételét.

3.3. Termálforrások mikrobaközösségeinek vizsgálata

A termálvizes élőhelyek a mikroorganizmusok számára extrém környezeti feltételeket nyújtanak, amelyekhez számos Archaea és Bacteria domén körébe tartozó prokarióta adaptálódott az idők során (Meyer-Dombard és mtsai, 2005). A termálforrásokat benépesítő mikrobák fontos szerepet játszanak a geotermális ökoszisztémák formálásában, egyedülálló tulajdonságaiknak köszönhetően nem hasonlíthatók pl. a talajban található, a tengeri vagy a humán mikrobiótához. A források jellegzetesen termofil, hipertermofil, termorezisztens prokarióták élőhelyei, számos Archaea domén képviselőjével. Több kutatás alátámasztja a termálforrások ökoszisztémáinak változatosságát, amelyekben a prokarióták mellett olyan eukarióták, mint például az *Ascomycota* és *Basidiomycota* szervezetek is fontos szerepet játszanak a termálforrások mikrobiológiai folyamataiban (Li és mtsai, 2019). A tenyésztés limitáló tényezői miatt a kutatások során legújabbban többnyire molekuláris módszerek segítségével térképezik fel a termálforrások természetes mikrobaközösségét.

Számos kutatás irányult a gejzirjeiről és hőforrásairól világhírű Yellowstone Nemzeti Park vizsgálatára, hogy feltérképezze a hőforrásokban található autochton mikroorganizmusokat, amelyek változatos pH-jú, hőmérsékletű és ion összetételű környezetben élnek. Hall és munkatársai (2008) a Coffee Pot Hot Spring (39,3-74,1°C; pH 5,75-6,91) forrást tanulmányozták, amelynek oldott kation és anion tartalma a Yellowstone Nemzeti Parkban található többi forráshoz képest relatíve alacsony. Molekuláris vizsgálatokkal (16S rRNS gén szekvencia elemzés és kvantitatív PCR segítségével) a termofil, kemolitoautotróf mikrobákat tartalmazó Aquificae (*Sulfurihydrogenibium*, *Hydrogenobaculum*, *Thermocrinis*), továbbá Alpha-, Beta-, és Gammaproteobacteria, Firmicutes, Acidobacteria és Deinococcus-Thermus taxonok képviselőit mutatták ki. Kutatásuk során megállapították, hogy a kemolitotróf életmódnak kedvező redukált kénformák, hidrogén és vas(II)- ionok vannak jelen a vizsgált termálforrásokban (Hall és mtsai, 2008).

Meyer-Dombard és munkatársai (2005) az Obsidian Pool, a Sylvan Spring és a 'Byson Pool' (Yellowstone Nemzeti Park) források vizét (79,9-82,6°C, pH 5,5 és 8,1) vizsgálták molekuláris klónozással. Mindhárom forrásban kimutathatóak voltak a Bacteria (Aquificae, Thermodesulfobacteria, Gammaproteobacteria) és az Archaea domén tagjai. A Korarchaeota törzs képviselőit csak az Obsidian Pool forrásból származó vízmintában azonosították. A három hőforrás mikrobiológiai közösségbeli eltérését azok különböző geokémiai feltételeinek, és ebből következően a rendelkezésre álló különböző energiaforrásoknak tulajdonították (Meyer-Dombard és mtsai, 2005).

Jackson és munkatársai (2001) a Yellowstone Nemzeti Park savas kémhatású (pH: 3,1), szulfát-kloridos, arzén tartalmú Norris Basin termálforrását (58-62°C) tanulmányozták DGGE (denaturáló gradiens gélelektroforézis) és 16S rRNS gén szekvencia elemzés segítségével. Ismert tulajdonsága a prokariótáknak az, hogy az arzenátot (As^{5+}) elektron akceptorként képesek hasznosítani, anaerob vagy mikroaerofil körülmények között, amely során arzenit (As^{3+}) keletkezik. A kutatás során nagy hangsúlyt fektettek az arzenit/arzenát arány meghatározására is. A termálforrásban a Bacteria domén legjelentősebb képviselői a *Hydrogenobacter acidophilum* (Aquificae törzs) és a *Desulfurella* spp. (Proteobacteria törzs) voltak. Az Archaea doménból pedig a Crenarchaeota és Euryarchaeota phylumokhoz tartozó taxonokat azonosították (Jackson és mtsai, 2001).

Hirayama és munkatársai (2005) a japán Hishikari aranybányában található hőforrás anaerob, felszín alatti (50-55°C, pH: 4,8), középső (59-62°C, pH: 4,9) és felszíni (63-69°C, pH: 5) részéről származó vízmintákat elemezték. A felszín alatti és a középső rétegben a Bacteroidetes, a nitritoxidáló Nitrospirae, Beta -, és Gammaproteobacteria, Planctomycetes, Chloroflexi (zöld

nem-kén baktériumok) taxonok képviselői voltak jelen. A felszíni rétegben Beta-, és Gammaproteobacteria, Nitrospirae, Aquificae taxonok képviselőit és zöld nem-kén baktériumokat (Chloroflexi) mutattak ki molekuláris klónozás segítségével. A felszíni rétegben termofil, metanotróf Gammaproteobacteria baktériumokkal rokon klónok relatív abundanciája volt a legmagasabb, továbbá a *Sulfurihydrogenibium* és *Nitrospira* nemzetség tagjait is kimutatták. A felszín alatti és a középső rétegben pedig a *Nitrosomonas* és *Nitrospira* nemzetséggel rokon klónok voltak dominánsak (Hirayama és mtsai, 2005).

Kubo és munkatársai (2011) a japán Nakabusa forrást (65-75°C) tanulmányozták 16S rRNS gén szekvencia analízisével és DGGE segítségével. A forrásra jellemző, hogy kémhatása enyhén alkalikus és szulfidban gazdag. Az Aquificae törzsbe tartozó aerob, kemolitotróf szulfidoxidáló, az anaerob szulfátredukáló Thermodesulfobacteria, és a Chloroflexi törzsbe tartozó fonalas anoxikus fotoszintetizáló baktériumokat mutattak ki (Kubo és mtsai, 2011).

Adiguzel és munkatársai (2009) Törökországban található négy termálforrást vizsgáltak (Pamukcu, Ilica, Akdag, és Sorgun) tenyésztéses és molekuláris módszerekkel (16S rRNS gén szekvencia analízis és REP-PCR), amelyek hőmérséklete 40-78°C volt. Mind a négy forrásban a Firmicutes törzs három nemzetségének képviselőit (*Bacillus*, *Geobacillus* és *Anoxibacillus*) detektálták nagy számban. Az általuk izolált fajok növekedése 56°C körül, pH 7,5-10 között és 2-4%-os só koncentráció mellett volt optimális (Adiguzel és mtsai, 2009).

Lau és munkatársai (2009) Indiában, Közép-Tibet területén található öt különböző forrás bakteriális közösségét elemezték molekuláris klónozással. A források 60-65°C hőmérsékletűek voltak. Legnagyobb mennyiségben a Beta- és Gammaproteobacteria, a Cyanobacteria, és a Chlorobi taxonok képviselőit mutatták ki, mellettük megjelentek Nitrospirae, Firmicutes, Aquificae és Alphaproteobacteria taxonba tartozó fajok is (Lau és mtsai, 2009).

Sayeh és munkatársai (2010) Tunéziában 12 termálforrás vizét tanulmányozták tenyésztésen alapuló és molekuláris vizsgálatokkal. A minták Észak-, Közép- és Dél-Tunéziából származtak, ahol a termálforrások hőmérséklete 37-73°C fokig terjed, pH értékük megközelítőleg semleges. Tenyésztésen alapuló módszerekkel a Firmicutes, Thermotogae, Proteobacteria, Synergistetes, Bacteroidetes, molekuláris klónozással kimutatták továbbá a Deinococcus-Thermus, Aquificae, illetve Chloroflexi törzsek képviselőit is. A Bacteria domén tagjai mellett az Archaea domén tagjait, mégpedig az Euryarchaeota és a Crenarchaeota törzs képviselői is megtalálhatók voltak a forrásokban. A kutatás során viszonylag kevés taxont sikerült tenyésztésbe vonni, molekuláris módszerrel a legmagasabb hőmérsékletű forrásokból (60-70°C) a Firmicutes törzs tagjait mutatták ki legnagyobb számban, míg alacsonyabb hőmérsékleten a Proteobacteria törzs

képviselői, az Alphaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Gammaproteobacteria osztályok tagjai domináltak (Sayeh és mtsai, 2010).

Az Indiában található Sikkim szintén gazdag extrém vizes környezetekben (50-77°C, pH 5-8). Najar és mtsai (2018) két termálforrás vizsgálatát végezték el tenyésztéses és tenyésztéstől független (NGS (újgenerációs szekvenálás) és PLFA (foszfolipid zsírsav analízis)) módszerekkel a természetes mikrobaközösség feltárására. Az NGS vizsgálatok eredményei alapján a Bacteria domén dominanciája volt jellemző, a Proteobacteria, Acidobacteria, Nitrospirae, Firmicutes, Parcubacteria és Spirochaetes phylumok képviselőit mutatták ki. A PLFA és a tenyésztéses eredmények alapján egyaránt a Gram-pozitív baktériumok dominanciája volt jellemző: *Geobacillus* és *Anoxybacillus* nemzetségek képviselői. A termálforrások geokémiai tulajdonságait figyelembe véve megállapították, hogy a hőmérséklet, pH, lúgosság, Ca²⁺, Mg²⁺, Cl⁻ és a kén tartalom befolyásolja a természetes mikrobaközösségek összetételét és diverzitását (Najar és mtsai, 2018).

Power és munkatársai (2018) 925 geotermális forrás vizét kutatták Új-Zélandon metagenomikai módszerekkel. Vizsgálataik során a Proteobacteria (*Acidithiobacillus*) és az Aquificae (*Venenivibrio*, *Hydrogenobaculum*, *Hydrogenobacter*, *Sulfurihydrogenibium*, *Thermocrinis* és *Aquifex*) képviselői bizonyultak dominánsak. Az *Acidithiobacillus* baktériumok jellemzően mezofil/mérsékelt termofil, acidofil, kemolitoautotróf baktériumok, amelyek redukált kénvegyületek mellett vas(II) iont és/vagy hidrogént hasznosítanak elektron donorként. Az Aquificae képviselőit több termálforrásban kimutatták korábbi kutatások során is, termofil, kemolitoautotróf szervezetek, amelyek redukált kénvegyületek és hidrogén hasznosítása mellett képesek heterotróf életmódra is. Az új-zélandi kutatások során Power és munkatársai megállapították, hogy a diverzitást 70°C alatt a pH, 70°C felett a hőmérséklet befolyásolja elsősorban (Power és mtsai, 2018).

Hazai vonatkozásban a forrásokat benépesítő autochton mikrobaközösségek feltárása több kutatás tárgyát képezte. Ilyen például a Villányi-hegység harkányi kénes hévízkútjainak (Miseta, 2012), a Budai Termálkarszt rendszerhez tartozó Molnár János barlangnak és a Rudas-Török forrásbarlangnak (Borsodi és mtsai, 2012), a Diana-Hygieia forrás tanulmányozása (Anda és mtsai, 2014), valamint a városligeti Széchenyi fürdőt ellátó kutak (Anda és mtsai, 2015) vizsgálata.

Miseta és munkatársai (2012) a Villányi-hegység lábánál található négy harkányi kénes hévízkút vizét tanulmányozták (18-60°C) molekuláris klónozás segítségével. A kutatás során egy 60°C-os termálkutat, 2 langyos vízű (18-23°C) gyógyviz kutat és egy langyos vízű (25-26°C) ásványvíz kút vizsgálatát végezték el. A kutak vize között jelentős fizikai-kémiai és

hidrogeológiai különbségek figyelhetők meg: a langyosvízű termelőkutak magas kalcium és alacsony szulfid tartalmúak, valamint a kifolyó vizeket egymáshoz képest viszonylag alacsony vízkor jellemezte; a magas hőmérsékletű termálkút vize gazdag nátriumban és szulfidban, magas vízkorú, míg a langyosvízű ásványvíz kút fizikai-kémiai profilja a hidrogeológiai adottságoknak köszönhetően az előzőektől eltérő, szulfid tartalma és vízkora a langyos vízű gyógyvíz kutakra és a termál kutakra jellemző értékek között volt jellemző. Molekuláris klónozással a kénkörforgalomban fontos szerepet játszó obligát vagy fakultatív kén-, illetve szulfidoxidáló és szulfát/tioszulfátredukáló Proteobacteria (Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Deltaproteobacteria és Epsilonproteobacteria osztályok) és Chloroflexi képviselőit mutatták ki. Kizárólag a 60°C-os forrásban voltak jelen az Aquificae és Chlorobi törzsekhez tartozó taxonok. A teljesség igénye nélkül a langyos vízű kutak jellemző baktérium nemzetségei a *Thiobacillus*, *Thiothrix*, *Thiovirga*, *Desulfocapsa*, *Geobacter*, *Sulfurospirillum*, *Sulfurimonas*, *Sulfuritalea*, *Geothrix*, *Bellinea* voltak, a langyos vízű ásványvíz kút baktériumközösségét pedig heterotróf proteobaktériumok alkották, a kénbaktériumokkal rokon klónok relatív abundanciája alacsony volt, továbbá hiányoztak a kén- és tioszulfát-oxidáló *Sulfuritalea* rokon klónok. Hasonlóan a magas hőmérsékletű termálvíz kút közössége is eltért az előzőektől: a Betaproteobacteria osztályba tartozó *Sulfuritalea*-val távol rokon klónok alkották a közösség legnagyobb részét, továbbá kimutatták a *Methylobacterium*, *Sulfuryhydrogenibium* és *Chlorobi* baktériumokkal rokon klónokat. A fizikai-kémiai vizsgálatok eredményei alapján megállapították, hogy a legfontosabb közösség alkotó tényezők a hőmérséklet, oldott oxigénszint továbbá a különböző kénformák voltak (Miseta, 2012).

Borsodi és munkatársai (2012) a Budai Termálkarszt rendszerhez tartozó Molnár János barlang és a Rudas-Török forrásbarlangot tanulmányozták molekuláris klónozással, amelyek forrásvíze szulfátos-karbonátos és mérsékelten meleg hőmérsékletű. Kutatásuk tárgya a barlangi környezetből származó biofilmek bakteriális közösség szerkezetének vizsgálata volt. A 26,9°C fokos Molnár János barlang mintából származó klónkönyvtárat zömmel termofil aerob és anaerob Firmicutes baktériumokkal rokon klónok alkották. Alacsonyabb relatív abundanciával fordultak elő kénoxidáló, illetve kénredukáló baktériumok (Aquificae, Thermodesulfobacteria, Chloroflexi, Chlorobi, Deltaproteobacteria képviselői), valamint aerob vasoxidálókkal (*Acidithiobacillus ferrooxidans*), illetve anaerob vasredukálókkal (*Geothermobacterium ferrireducens*) rokon szekvenciák is. A 30,1°C hőmérsékletű Rudas-Török barlangban pedig a kén- és szulfátredukáló deltaproteobaktériumok képviselői (*Geobacter*, *Desulfatibacillum*, *Desulfuromonas*, *Geothermobacter*) voltak dominánsak. Viszonylag magas arányban megjelentek továbbá egyéb kénbaktériumokkal (*Thiothrix*, *Thermodesulfobacteria*,

Chloroflexi), valamint a vasredukáló *Geothermobacterium ferrireducens*-szel rokon szekvenciák is (Borsodi és mtsai, 2012).

Anda és munkatársai (2014) a Budai Termálkarszt 31,4 °C-os Diana-Hygieia forrásvíz és biofilm mintáit tanulmányozták tenyésztéses (R2A és *Sphaerotilus-Leptothrix* vas-szulfát tartalmú táptalaj) módszerekkel és molekuláris klónozással. A biofilm és a vízminták bakteriális közössége között jelentős különbségek mutatkoztak: a biofilm mintákból klónozással a Deltaproteobacteria, Nitrospirae, Firmicutes, Actinobacteria és Betaproteobacteria, míg a vízminták esetében a Betaproteobacteria képviselő jelentek meg magas relatív abundanciával. A biofilm esetében a Deltaproteobacteria és a Nitrospirae volt domináns: a vasredukáló *Desulfuromonas alkaliphilus*, az anaerob termofil szulfátredukáló *Desulfosoma profundum*, a hidrogén- és acetát oxidáló, metánredukáló *Geobacter sulfurreducens*, a termofil nitritoxidáló *Nitrospira calida* fajokkal rokon szekvenciákat sikerült detektálni. A vízmintákból klónozással a Betaproteobacteria osztályt, a *Thiobacillus* nemzetséggel rokon szekvenciákat mutatták ki legnagyobb mennyiségben. A biofilm mintákhoz hasonlóan a *Nitrospira* nemzetség is jelen volt a vízmintákban, a *N. moscoviensis* baktériummal rokon szekvenciák által. Tenyésztéssel a Proteobacteria, Firmicutes és Actinobacteria képviselőit azonosították. A Firmicutes bizonyult dominánsnak a *Bacillus* nemzetségnek köszönhetően a biofilm és a vízmintákból egyaránt. (Anda és mtsai, 2014).

Anda és munkatársai (2015) a városligeti Széchenyi fürdőt ellátó Városliget-II kút 74°C-os vizét és a vízvezeték falán lévő vöröses biofilm minták mikrobiális összetételét vizsgálták molekuláris klónozással. A legtöbb klón kemolitotróf fajokkal mutatott rokon szekvenciát. Az Archea képviselői (Euryarchaeota, Ciliarchaeota, Thaumarchaeota) mindkét mintában jelen voltak, a kemolitotróf ammóniaoxidáló *Nitrososphaera* és *Nitrosocaldus* nemzetségek (Thaumarchaeota) bizonyultak dominánsnak. A Bacteria esetében a vízmintában a kénoxidáló *Thiobacillus* (Betaproteobacteria), a biofilm esetében a *Sulfurihydrogenibium* (Aquificae), *Thermus* (Deinococcus-Thermus) és *Bellilinea* (Chloroflexi) nemzetségekkel rokon szekvenciák alkották a klónkönyvtár legnagyobb hányadát (Anda és mtsai, 2015).

A fenti esettanulmányok alapján levonhatjuk azt a következtetést, hogy a termálforrásokban számos prokarióta szervezet található meg, amelyek változatos alkalmazkodási képességgel, különleges anyagcsere tulajdonságaik révén alkalmazkodnak az extrém környezeti feltételekhez. A természetes mikrobaközösségek vizsgálata többet jelent, mint a mikrobaközösségek összetételének feltárását, segít megérteni a mikrobák közötti kapcsolatokat, ráláthatunk arra, hogy milyen szerepük van a biogeokémiai ciklusokban, hogyan

képesek befolyásolni a termálforrások kémiai összetételét, megváltoztatva ezáltal az egész ökoszisztéma jellegét.

3.4. Fürdővizek vizsgálata Magyarországon

3.4.1. Hazai vízügyi és egészségügyi szabályozás

A balneoterápia alkalmazásának jótékony hatása nem vitatható, számos kutatás tárgyát képezte annak vizsgálata, hogy milyen megbetegedések esetén javallott a gyógyfürdők látogatása. Különösen mozgásszervi, keringési, bőrgyógyászati, valamint nőgyógyászati problémák esetében hatásos terápia lehet a gyógyvizek használata (Bender és munkatársai, 2014). A balneoterápia pontos hatásmechanizmusa még napjainkban sem teljesen feltérképezett, feltételezhetően a biológiailag aktív komponensek bőrön keresztül felszívódva fejtik ki hatásukat, azonban ennek bizonyítására nem áll rendelkezésre elegendő információ. A nemzetközi szakirodalom alapján a szulfid bőrön keresztül történő abszorbeálódásáról, valamint fájdalomcsillapító hatásával kapcsolatban találunk tanulmányokat győződhetünk. A radon szintén könnyedén bejut a bőrön át, valamint a légző rendszeren keresztül az emberi szervezetbe, így tudja fájdalomcsökkentő, valamint gyulladáscsökkentő hatását érvényesíteni, ugyan radioaktív volta miatt megoszlanak a vélemények arról, hogy jótékony hatásának tekinthető-e. Mindenesetre a gyógyvizek alkalmazása hosszú múltra nyúlik vissza, Magyarországon kb. 100 gyógyvizes létesítmény áll a fürdőzni vágyók rendelkezésére.

Hazánkban jelenleg több rendelet vonatkozik a közfürdők és gyógyfürdők létesítésére, üzemeltetésére, vizsgálatára: 37/1996 (X.18.) NM (Népjóléti Minisztérium) rendelet; 121/1996 (VII.24.) Kormányrendelet; 74/1999 (XII.25.) EüM (Egészségügyi Minisztérium) Rendelet. További útmutatásokat a fürdőmedencék vízkezeléséről az MSZ 15234:2012 szabvány; a mintavételek ütemezéséről, a vizsgálatok típusairól és a határértékekről az 1989-es MSZ 13690 jelzetű szabványsorozat ír. Látható, hogy a jelenlegi szabályozások többsége több mint 20 éves, azóta jelentős technológiai változáson estek át a közfürdők. A közegészségügyi szempontból fontos *Legionella* baktériumok vizsgálata és a kockázatelemzés a hazai szabályozásban 2015-ben jelent meg a 49/2015 (XI.6.) EMMI (Emberi Erőforrások Minisztériuma) rendelet által, holott külföldi gyakorlatban kimutatásuk a rutinszerű vizsgálatok tárgyát képezik. Különösen igaz ez az élmény elemekkel ellátott fürdőknél, ahol az aeroszol képződés mértéke jelentős. Az MSZ 15234:2012 korszerű, a nemzetközi gyakorlattal jobban összhangban áll, azonban a fürdővizek értékelése a 37/1996 (X.18.) NM rendelet alapján az MSZ 13690-3:1989 szabvány szerint történik, amely különösen a töltő-ürítő rendszerű medencék esetében igencsak megengedő határértékeket szab meg. Általában a termálmedencék ülő használatára

hivatkoznak, amely kisebb expozíciót jelent, azonban a fertőzések és a gyakorlati tapasztalatok sem ezt mutatják - gyakori az úszás, illetve a gyerekek fürdőzése is, melyek az enterális kórokozók által okozott fertőzések kockázatát növelik.

A vonatkozó 37/1996 (X.18.) NM rendelet alapján higiénés és vízgazdálkodási szempontok miatt a medencéket visszaforgatásos rendszerrel kell üzemelni, amely során a medencevíz kémiai flokkuláción, szűrésen és (legtöbb esetben klóros) fertőtlenítésen megy keresztül (MSZ 15234:2012). Ennek ellenére kevés kivétellel hazánkban a gyógymedencék töltő-ürítő rendszerrel üzemelnek. Felmentést kapnak a gyógyvizes medencék a vízforgatás alól, arra hivatkozva, hogy a vízkezelés károsítja azokat a biológiailag aktív, jótékony komponenseket, amelyek a gyógyhatásért felelősek (37/1996 (X.18.) NM rendelet). Megjegyzendő, hogy jelenleg kevés információ áll rendelkezésünkre arra vonatkozóan, hogy a fertőtlenítőszeres vízkezelés milyen hatással van a gyógyvizek biológiailag aktív komponensekre, illetve a nemzetközi szakirodalmak alapján sem vonható le egyértelmű következtetés.

A hazai gyakorlat szerint a vízforgatás alóli felmentést gyakran már a fürdő létesítését megelőzően kezdeményezik, mivel nem szükséges annak igazolása, hogy a fürdő gyógyhatású komponenseit a vízkezelés befolyásolná. Felmentést nemcsak a nagyobb kiterjedésű termálfürdők kaphatnak, hanem sok esetben a kisebb méretű szauna medencék, amelyek alacsonyabb hőmérséklettel üzemelnek, a gyors vízcseré is könnyebben kivitelezhető, ezáltal alacsonyabb közegészségügyi kockázatot jelentenek. Ahhoz, hogy a töltő-ürítő rendszerű medencék által közvetített mikrobiológiai kockázatok mérséklődjenek, fontos tényező a fürdőzők számának csökkentése, a megfelelő vízcseré, illetve az élményelemek megszüntetése. A töltő-ürítő medencék rendszerint fertőtlenítés nélkül üzemelnek, a vízcserét az elhasznált víz leengedésével, majd friss víz utánpótlásával biztosítják. Ez azonban a tapasztalatok alapján a fenntartható vízgazdálkodás kérdése mellett növeli a mikrobiológiai kockázatokat. A medencékbe kerülő szervezetek a medencék falán ún. élőbevonatot, biofilmet képeznek, amelyek védelmet nyújtanak a mikroorganizmusok, köztük a patogének számára is. A biofilmekben a mikroorganizmusok a saját maguk által termelt EPS (extracelluláris poliszacharid) mátrixba ágyazódnak. Ez főként poliszacharidokat, fehérjéket, nukleinsavakat, lipideket, fosfolipideket, humin anyagokat tartalmaz, felszínhez kötődése elektrosztatikus- és hidrogén-kötések révén valósul meg. A mikrobákat a biofilmben tér- és időbeli heterogenitás jellemzi, aerob, anaerob légző és fermentáló mikroorganizmusok élnek benne szoros együttműködésben. A biofilm számos előnyt nyújt a mikroorganizmusok számára. Könnyebb tápanyag elérhetőséget biztosít a benne élőknek, olyan fontos vegyületek halmozódhatnak fel benne, amelyek például az oligotróf környezetben való túléléshez feltétlenül szükségesek.

Képes megtartani a vizet, így véd a kiszáradástól, az EPS mechanikai stabilitást biztosít, elősegíti a mikrobák megkötődését, együtt tartja őket, és segíti a sejtek közötti kommunikációt. Az EPS mátrix védelmet biztosít a beágyazódó mikroorganizmusok számára, amelyek így kevésbé érzékenyek a környezeti stresszhatásokra (pl. UV-sugárzás, hőmérsékleti és pH változások, ozmotikus sokk), mint planktonikus életformát folytató társaik (Flemming, 2002; Palmer és White, 1997). A fertőtlenítés hiánya hozzájárulhat a biofilmek fennmaradásához, amelyek eltávolítása sokszor biocidos kezelés segítségével sem vagy nem teljes mértékben kivitelezhető.

A nemzetközi gyakorlatot tekintve a medencéket szűrővel és fertőtlenítőszer adagolással üzemeltetik, követve a WHO (Egészségügyi Világszervezet) útmutatásait (WHO, 2006). Kivételt képezhetnek a kisebb víztérfogatú kádak vagy pl. a hazánkban is elterjedőben lévő alacsony hőmérsékletű Kneipp medencék, ahol az alacsony vízhőmérséklet és víztérfogat mellett biztosítható a gyakori vízcseré (Vargha és mtsai, 2017). A mértékadó német DIN 19643-as szabványsorozat, az Egyesült Királyság (PWTAG, 2020) és az ausztrál szabályozás (CHO, 2020) is egyértelműen a szűrővel, fertőtlenítéssel történő üzemeltetést írja elő. Nemcsak az üzemeltetésben, hanem a vizsgálandó paraméterekben és azok határértékeiben is eltérések figyelhetők meg a hazai és külföldi gyakorlat között.

Paraméter	Hazai szabályozás VF	Hazai szabályozás TŰ	Egyesült Királyság	Ausztrália	Németország
<i>E. coli</i>	1/100 ml	100/100 ml	0/100 ml	0/100 ml	0/100 ml
Coliform	10/100 ml	100/100 ml	-	-	-
<i>S. aureus</i>	1/100 ml	20/100 ml	-	-	-
<i>Micrococcus</i>	250/100 ml	2500/100 ml	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	0/100 ml	50/100 ml	0/100 ml	0/100 ml	0/100 ml
<i>Legionella</i> spp.	10/100 ml	10/100 ml	-	-	1/100 ml
Szabad aktív klór	0,8-2 mg/l	-	0,5-1 mg/l	1-3 mg/l	0,3-0,6 mg/l
Kötött aktív klór	0,3-0,5 mg/l	-	1 mg/l*	<30%/1-3 mg/l**	0,2 mg/l
THM	50 µg/l	-	-	-	20 µg/l

1. táblázat. A hazai szabályozásban szereplő mikrobiológiai-, és a fertőtlenítéssel összefüggésbe hozható paraméterek összehasonlítása a nemzetközi gyakorlattal. VF=visszaforgatásos medencék, TŰ=töltő-ürítő medencék.

*a határérték 1 mg/l, vagy nem haladhatja meg a szabad aktív klór mennyiségének felét.

** a kötött aktív klór mennyisége nem haladhatja meg a szabad aktív klór mennyiségének 30%-át.

Mikrobiológiai vizsgálatok szempontjából nem egységes a vizsgálandó paraméterek köre és határértéke: míg az *E. coli* és a *Pseudomonas aeruginosa* minden szabályozásban szerepel,

addig a telepszám 37°C, a coliform, de akár a *Legionella* baktériumok tekintetében is eltérő a gyakorlat (1. táblázat).

Jelentős különbség figyelhető meg a fertőtlenítést jelző szabad aktív és kötött aktív klór koncentrációjában is: az MSZ 15234:2012 vízforgatásos medencékre vonatkozó szabvány szerint a szabad aktív klór minimum értéke 7,4 pH-ig 0,8 mg/l; 7,4 pH felett 1 mg/l, melegvizes medencék esetében 2,0 mg/l értéket határoz meg, míg a kötött aktív klór esetében nyitott medencékre 0,5 mg/l, fedett medencékre 0,3 mg/l a felső határtérték. A WHO útmutatója szerint a szabad aktív klór akár 5 mg/l is lehet, míg a kötött aktív klór határértéke 0,2 mg/l (WHO, 2006). A CDC 1-3 mg/l szabad klórt javasol (mivel 1 mg/l alatt a *Cryptosporidium* inaktivációja nem hatékony), kötött klórra pedig 0,4 mg/l-t, bár optimális a 0,2 mg/l az kötött aktív klór egészséghatása miatt (CDC, 2016). Az Egyesült Királyságban a javasolt tartomány szabad klórra 0,5-1 mg/l (esetileg lehet 3 mg/l), míg a kötött klór nem érheti el az 1 mg/l-t, vagy a szabad aktív klór felét (PWTAG, 2020). A legtöbb szabályozás továbbá a THM (trihalometánok), mint klórozási melléktermékre nem állapít meg határértéket, a hazai előírás medencevízre 50 µg/l. A német DIN 19463 szabványsorozat alapján ez az érték 20 µg/l (1. táblázat).

Hazánkban is folyamatos a fürdővizek minőségének monitorozása, mind az üzemeltetők, mind a hatóság részéről, megjegyzendő azonban, hogy az üzemeltetők és a hatóság által végzett mintavételek eredményei sokszor eltérőek, ami annak köszönhető, hogy az üzemeltetők rendszerint nyitás előtt, vagy nyitás követően végzik a mintavételeket, amikor a fürdők kihasználtsága alacsony. A jogszabályi előírásoknak megfelelően a hatósági mintavételekre akkor kerül sor, amikor a közfürdő terheltsége a legmagasabb. Emellett előfordul, hogy az ismert mintavételi időpontok előtt a fürdők ún. sokkfertőtlenítést alkalmaznak, amely többlet fertőtlenítőszer adagolást jelent (Vargha és mtsai, 2015).

A töltő-ürítő rendszerű medencék különböző paraméterek miatt kerülhetnek kifogásoltság alá a határérték túllépése miatt: az *E. coli* és *Enterococcus* baktériumok száma a fekális szennyeződésre, a *Staphylococcus aureus* és az összes coccus szám határértéket meghaladó száma a medence túlterheltségére utal, a *Pseudomonas aeruginosa* és a *Legionella* szám jogszabályban/szabványokban előírt határértékeinek túllépése üzemeltetési, karbantartási problémákra utal, pl. biofilm jelenlétére a rendszerekben.

3.4.2. Medencevizekkel összefüggésbe hozható mikrobiológiai kockázatok

A WHO útmutatója alapján medencés fürdővizekkel kapcsolatos mikrobiológiai kockázatok fekális szennyeződéssel és nem fekális úton kerülhetnek a vizekbe (WHO, 2006). A teljesség

igénye nélkül az alábbiakban a leggyakrabban előforduló, fürdőzéssel összefüggésbe hozható mikroorganizmust mutatunk be a WHO útmutatójának megfelelően.

1. Fekális szennyeződés által közvetített, betegségkókozó mikroorganizmusok:

A *Shigella* (leggyakrabban a *S. sonnei*) és az *E. coli* O157 fekális szennyeződés által kerülnek a medencevízbe, amelyek lázzal, hányással, hasmenéssel járó megbetegedéseket okoznak. Utóbbi ún. hemolitikus uraemiás szindrómát is kialakíthat, jelenlegi ismereteink alapján kisgyermekkorban súlyos megbetegedések kiváltói.

A fekális szennyeződések nemcsak baktériumok, hanem egysejtűek megjelenését is okozhatják, amelyeknek szintén mikrobiológiai kockázattal bírnak. Az egysejtűek közül a legismertebb, fürdővízzel összefüggésbe hozható a *Giardia* és a *Cryptosporidium*, amelyek cisztái és oocisztái ellenállóak a környezeti stresszhatásokkal és a fertőtlenítéssel szemben is. Mindkettő gasztrointesztinális tünetekkel (hányás, hasmenés) járó megbetegedést okoz.

2. Nem fekális eredetű, betegségkókozó mikroorganizmusok:

Nem fekális szennyeződésekre utal baktériumok közül a *Legionella*, *Pseudomonas*, *S. aureus*, *Mycobacterium*, *Leptospira*; egysejtűek közül pedig a *Naegleria* és *Acanthamoeba* mikrobák jelenléte a medencevizekben. A melegvizes medencék, különösen az élményelemekkel ellátottak potenciális veszélyt jelentenek a *Legionella* és a *Pseudomonas* baktériumok miatt. A legionellózis nyakzuhanyok és jacuzzi vizekkel hozhatók összefüggésbe, amely enyhébb, influenzaszerű tünetekkel járó Pontiac-lázzal vagy súlyos tüdőgyulladással járó megbetegedést foglal magában. A *P. aeruginosa* fürdővizekben jellegzetesen folliculitis kialakulásáért lehet felelős, de külső fülgyulladást, kiválasztó- és légző szervrendszeri problémákat is okozhat, valamint a szemek gyulladása folyamatában is szerepet játszik. A *Staphylococcus* nemzetség tagjai közül az *S. aureus*, *S. epidermidis* és *S. saprophyticus* bír klinikai jelentőséggel. Közülük is a legfontosabb a *S. aureus*, amely számára az emberi test jelenti a rezervoárt, így megtalálható bőrfelületen, orr- és garat nyálkahártyán egészséges emberi szervezetben. Medencés fürdővizekkel kapcsolatban bőr- és sebfertőzések és kötőhártya gyulladással kapcsolatban ismert baktériumok. *Mycobacterium* fertőzések medence vizekben a *M. marinum* által okozott bőrelváltozások és a *M. avium* okozta légzőszervrendszeri megbetegedések. Utóbbi a *Legionella* baktériumokhoz hasonlóan melegvizes fürdőkben, nyakzuhanyokban, fertőzött aeroszol formájában kerülhet az emberi szervezetbe, valamint egysejtűek révén képes a vizes rendszerekben túlélni.

Az egysejtűek közül az *Acanthamoeba* és *Naegleria* fajok hozhatók fürdővízzel összefüggésbe. Ezek a fakultatív paraziták természetes körülmények között talajokban és vizekben fordulnak elő, baktériumokkal, gombákkal és algákkal táplálkoznak. Az egyik legismertebb a *N. fowleri*,

amely fertőzött aeroszol révén vagy úszás közben a fertőzött víz orrba kerülésével jut az emberi szervezetbe, agyvelőgyulladás okozója. Az *Acanthamoeba* nemzetség tagjai közül az *A. polyphaga*, *A. castellanii* és *A. culbertsoni* fajok humán fertőzések okozói, agyhártyagyulladással és szaruhártyagyulladással hozhatók összefüggésbe. Az egysejtűek és baktériumok mellett a vírusok is mikrobiológiai kockázatot jelentenek a fürdővizekben: nem fekális eredetű, medencevizekkel összefüggésbe hozható vírusok a WHO útmutatója alapján az Adenovírusok (garat kötőhártya gyulladás), Molluscipoxvírus és Papillomavírus ((közvetlen kontaktus révén, szemölcsök kialakulásával járó fertőzés) (WHO, 2006).

A WHO minden fent említett mikroorganizmussal kapcsolatban a megfelelő üzemeltetést és vizsgálatok rendjét hangsúlyozza. Ennek megfelelően a továbbiakban tárgyaljuk a hazai szabványos mikrobiológiai vizsgálatokat és a vízkezelési típusokat.

3.4.3. Fürdővizek mikrobiológiai vizsgálata

A fürdővizek mikrobiológiai vizsgálata a higiénés szempontból lényeges, indikátor jellegű baktériumokra terjed ki, amelyek közé elsősorban a fekális eredetű baktériumok tartoznak, de ide sorolható a fürdőzők bőréről, illetve technológiai problémákat kísérő baktériumok sokasága is. Mindezek közegészségügyi szempontból kockázatot jelentenek. A 37/1996 (X.18.) NM rendelet értelmében – korábbi rossz eredmények hiányában – elegendő a fürdővizek *E. coli* és *Micrococcus* (összes coccus) szám vizsgálata. A vízkezelés típusától függően a vízforgatásos medencéknél havonta, a töltő-ürítő rendszerű medencéknél kéthavonta írja elő ezen paraméterek vizsgálatát.

Amennyiben az utolsó két vizsgálati sor eredménye kifogásolt, a rendelet *P. aeruginosa* és *S. aureus* vizsgálatát is előírja, illetve rendkívüli szennyezettség, üzemzavar vagy a járási hivatal utasítása alapján a coliform és *Enterococcus* baktériumok számát is meghatározzák. Azonban a vizsgálatok rendjében nem egységes a hazai gyakorlat.

A fekális eredetű mikroorganizmusokat, mint klasszikus higiénés indikátor szervezeteket azért is vizsgálják, mert az enterális megbetegedéseket okozó patogének, elsősorban vírusok jelenlétére utalhatnak. A tapasztalatok alapján a fekális eredetű mikroorganizmusok nem utalnak egyértelműen a humán adenovírusok jelenlétére, illetve egyértelmű következtetés sem vonható le a vírusok titere között, ugyanis mikrobiológiai szempontból megfelelő vízminőségű medencék esetében is kimutattak magas víruskoncentrációt, továbbá jelentős eltérés sem volt jellemző a töltő-ürítő és a vízforgatásos medencék között. Megjegyzendő, hogy a nukleinsav alapú diagnosztikai vizsgálatok a vírusok fertőzőképességével kapcsolatban információt nem adnak (Vargha és mtsai, 2015).

3.5. Fürdővizek vízkezelése

A mikrobiológiai kockázatok csökkentése érdekében a mesterséges fürdővizek vízkezelése nélkülözhetetlen. A vízkezelés több lépéses folyamat, az egyik, ha nem a legfontosabb része a fertőtlenítés, azonban számos egyéb folyamat van, amelyre hangsúlyt kell fektetni. A vízforgatással üzemelő medencék vizét rendszerint a következő lépések szerint tisztítják (MSZ 15234:2012 szerint):

1. durva szűrés: segítségével a 3 mm-nél nagyobb szennyeződések távolíthatók el
2. szűrés: általában homokszűrőn keresztül történik, amely az egyik legfontosabb eleme a vízkezelésnek, nélküle nagyobb mennyiségben kell a fertőtlenítőszer adagolni, amely a káros melléktermékek felhalmozódását is jelenti. Megjegyzendő, hogy maga a szűrő is lehet mikroorganizmusok forrása, ezért a megfelelő üzemeltetéshez a szűrőket rendszeresen karban kell tartani.
3. pelyhesítés (kémiai flokkuláció): segítségével a vízbe került lebegő anyagok, kolloid állapotú szennyeződések kiszűrhetők. A pelyhek a szűrőn másodlagos szűrőréteget képeznek, amelyek nagy fajlagos felülete és töltése megköti a szennyezőket, ezt követően homokszűrőn keresztül tisztítják mechanikusan, hogy a vízbe kerülő törmelékeket, apróbb szennyeződésekkel eltávolítsák.
4. pH szabályozás: a víz pH-jának biztosítása nélkülözhetelen a pelyhesítéshez és a fertőtlenítéshez. A pH érték továbbá hatással van a víz egyensúlyi állapotára és a fürdőzők komfortérzetére is.
5. Fertőtlenítés: a vízbe került kórokozókat ártalmatlanítja.
6. Algásodásgátlás: a külső környezetből az algaspórák a medencékbe kerülnek, amelyek a medence fenekén vagy falán megtelepednek és az esztétikai problémák mellett bőrtüneteket is okozhatnak. Ennek elkerülése érdekében időszakosan algásodásgátló szert adnak a medencevízhez.

A mikrobiológiai kockázatok csökkentésére az egyik legfontosabb része a folyamatnak a fertőtlenítés. A fertőtlenítési eljárásokat két csoportra oszthatjuk: elsődleges (fertőtlenítőszer alapú) és másodlagos vagy ún. kiegészítő fertőtlenítésre. Elsődleges fertőtlenítésre halogénalapú (klórgáz, nátrium-hipoklorit, kalcium-hipoklorit, brómvegyületek, cianur-kloridok) és oxigénalapú vegyületeket (peroxidbázisú, perszulfátbázisú) alkalmaznak. Kiegészítő fertőtlenítésre az ózon, klór-dioxid vagy az UV kezelés szolgál, amelyek önmagukban alkalmazva nem elterjedtek, mivel nincs a medencében maradékhatás.

A gyakorlatban leggyakrabban nátrium-hipoklorit tartalmú szereket alkalmaznak a mikrobák csíraszámának csökkentése céljából, kétségkívül ez a legköltséghatékonyabb. Hátránya azonban a klórozási melléktermékek képződése, pl. trihalometánok, haloecetsavak, haloacetonitrilek, klóraminok formájában, amelyek közül több karcinogén, illetve bőrvizketést, nyálkahártyák irritációját, de asztmát is okozhatnak (Borgmann-Strahsen, 2003). Az utóbbi időben egyre népszerűbb a hidrogén-peroxid alkalmazása, az MSZ 15234:2012 szabvány irányelvei alapján azonban önmagában nem használható fertőtlenítésre, csak hidrogén-peroxidezüst vagy hidrogén-peroxid kvaterner ammónium formájában, mivel a vízben könnyen lebomlik. Előnye a klór alapú fertőtlenítőszerrel szemben, hogy megfelelő adagolás esetében nem képződnek egészségre káros, illetve kellemetlen szagú melléktermékek. Használatára a nemzetközi gyakorlatban is találunk példát, azonban mind a WHO (Egészségügyi Világszervezet), mind a mértékadó ausztrál szabályozás is kisméretű medencék vízkezelésére javasolják stabilizátor alkalmazásával (WHO, 2006; QLD, 2004). A CDC (Amerikai Járványügyi Központ) a hidrogén-peroxidot kiegészítő fertőtlenítőszerként ajánlja pl. UV vagy ózonos kezeléssel vagy más, nem klóros fertőtlenítőszerrel együttesen az alkalmazását (CDC, 2016).

Számos tanulmány tárgyát képezi a cianursav alkalmazása medencevizek fertőtlenítése céljából. Különösen használatos kültéri medencék esetében, ahol az UV hatására a hagyományos klór alapú fertőtlenítőszer degradálódik, csökkentve ezzel a fertőtlenítés hatékonyságát. A cianursav segít a szabad aktív klór mennyiségének fenntartásában azáltal, hogy védi a klór alapú fertőtlenítőszerrel az UV degradációtól (CDC, 2016).

A brómos fertőtlenítés magával a brómmal nem lehetséges: bromidó és egy oxidáló aktiválóanyag (klór vagy ózon) adagolásával vagy szerves hordozóhoz kötötten alkalmazzák (MSZ 15234:2012). A gyakorlatban költséghatékonyság miatt kevésbé használják.

Az utóbbi időben egyre több üzemeltető alkalmaz klór-dioxidot, amely kisebb melléktermék képződés mellett hatékonyabb fertőtlenítést biztosít, annak köszönhetően, hogy alkalmas lehet a biofilm eltávolítására is. Előállítása általában a helyszínen történik, de elérhetőek stabilizált készítmények is. Alkalmazása különösen *Pseudomonas aeruginosa* és *Legionella* kolonizációja esetében javasolt (Khyer és mtsai, 2021). A szintén kiegészítő fertőtlenítésre javasolt ózon, mivel erélyes oxidálószer képes gyorsabban elpusztítani a kórokozókat, azonban a fertőtlenítés csak az eszközön áthaladó víz esetében valósul meg, tehát maga a medence továbbra is közegészségügyi veszélyforrás marad. A klórozási melléktermékek elbontásában azonban hasznos (Krutihof és mtsai, 2007).

A hazai szabályozás értelmében bármilyen fertőtlenítőszer alkalmaznak a vízkezelés során, a biológiailag aktív komponenseket azok nem károsíthatják. Az NNK (Nemzeti Népegészségügyi Központ) által végzett korábbi felmérés alapján, amely során a hagyományos hipoklorit tartalmú és a hidrogén-peroxiddal kezelt vizekben vizsgálták a fertőtlenítőszer hatását azt tapasztalták, hogy a hagyományos szerek csökkentik a gyógyvíz bromid, jodid és szulfid tartalmát, míg a hidrogén-peroxid nem okozott változást a víz bromid és jodid tartalmában, azonban a szulfid mennyiségét ez a hatóanyag is csökkentette. A fertőtlenítés mellett azonban olyan tényezők, mint a forrás hideg vízzel történő hűtése vagy azok a technológiai folyamatok, amelyek során a termelő kútból a medencéig ér a víz, nagyobb hatással volt a biológiailag aktív komponensekre, mint maga a fertőtlenítés. Ezek a lépések a töltő-ürítő rendszerű gyógyvizeknél is jelen vannak, különösen a hideg vízzel való keverés, befolyásolva ezzel a gyógyvíznek minősített kútvíz összetételét. A hűtésre azonban a legtöbb gyógyfürdőnél szükség van, célszerű lenne hőcserélőkkel ellátni minden rendszert (Gere és munkatársai, 2018).

3.6. Baktériumközösségek jellemzésére alkalmazható vizsgáló módszerek

3.6.1. Tenyésztési módszerek

A hagyományos környezeti mikrobiológiai eljárások alapját a tenyésztési vizsgálatok képezik. Ismert tény, hogy a baktériumoknak bármely környezetből kevesebb, mint 10%-a vonható tenyésztésbe (Overmann, 2013), ez az érték az oligotróf környezetekben kevesebb, akár 0,1-0,001% is lehet. A tenyésztési eljárások során a táptalajok mindig szelektívek, egy adott táptalajon a táptalaj összetevőinek megfelelő baktériumtenyészet megjelenésére számíthatunk, továbbá egyféle táptalaj sosem tudja visszaadni az eredeti környezet összes paraméterét. Egy közeg természetes baktériumközösségének vizsgálatához ezért célszerű minél többféle tápközeg és tenyésztési eljárást alkalmazni.

A termálvizek tápanyagszegény élőhelyek, amelyek szénforrást alacsony (1-15 mg/l) koncentrációban tartalmaznak. Ennek ellenére a mikroorganizmusok nagyfokú túlélő képességük és metabolikus flexibilitásuk révén képesek ebben a környezetben is fennmaradni. Limitált tápanyag- és energiaforrás esetén különböző stratégiákat alkalmaznak túlélésük érdekében, ilyen a visszafogott szaporodás, csökkent sejtméret, vagy valamilyen felszínhez kötődés, az élőbevonatok (biofilmek) létrehozása (Melo és Bott, 1997). A tenyészhetőséget számos tényező befolyásolja, sikertelenségének okai lehetnek: a nem megfelelő táptalaj alkalmazása; ha a baktériumok életciklusának nyugalmi szakaszát nem tudjuk megszakítani; a szintróf partner hiánya; ha különleges tápanyagok, körülmények szükségesek az adott

baktériumok növekedéséhez, vagy ha baktericidok, antimikrobiális ágensek gátolják a szervezetek szaporodását. Ismert továbbá a jelmolekulák szerepe a tenyésztés során, amely molekulák hatását a hagyományos tenyésztési módszerek valószínűleg nem engedik kifejteni. A tenyésztés sikeressége valószínűleg nem csak attól függ, hogy mely tápanyagokat használjuk, hanem sokkal inkább attól, hogy ezeket milyen mennyiségben adagoljuk a táptalajhoz (Zengler, 2009).

Manapság a közösségi vizsgálatokhoz gyakran használnak molekuláris módszereket, amelyekkel ki tudjuk mutatni az adott szervezetek jelenlétét, azonban a tenyésztésbe vont baktériumoknak határozhatjuk meg a környezetben betöltött szerepüket, fiziológiai jellemzőiket, például a velük szemben alkalmazandó vegyszerekre mutatott reakciójukat, érzékenységüket.

3.6.1.1. A hazai szabályozásban alkalmazott tenyésztéses módszerek

A hazai szabályozásban (37/1996 (X.18.) NM rendelet, 49/2015 XI.6. EMMI rendelet) megjelölt szabványos módszerek a higiénés szennyeződés mértékének indikátoraként szolgáló baktériumok, baktériumközösségek mennyiségének kifejezésére klasszikus tenyésztéses technikát jelölnek meg szelektív táptalajok alkalmazásával. A heterotróf telepszám ez alól kivétel, meghatározása élesztő kivonat/húspepton agar segítségével történik lemezöntéses vagy felületi szélesztéses módszerrel. A különböző indikátor szerepet játszó baktériumok kimutatására a legelterjedtebb a membránszűréses technikák alkalmazása, amely során 0,45 µm pórusátmérőjű membránfilteren keresztül koncentrálnak a vízben lévő baktériumokat, majd a filtereket a keresett baktériumnak megfelelő szelektív táptalaj felszínére helyezik. A szabványok jellemzően 1-1 biokémiai megerősítést írnak elő, a szelektív táptalajra helyezett membránfilteren kifejlődött telepek morfológiája (pl. szín, forma, az UV fluoreszcencia) alapján, holott egy-egy mikroba biztonságosabb azonosításhoz több megerősítő vizsgálatra lenne szükség. A vizsgálatok harmadik típusa a legvalószínűbb csíraszám, a Most-Probable-Number (MPN) dúsító tenyésztéses eljárás alapuló mennyiségi meghatározás. Közülük legismertebb és legelterjedtebb típusa többcsöves módszer, a mikrotiter lemezek alkalmazása (*E. coli*, *Enterococcus* szám), vagy az IDEXX gyors tesztjei. A Colilert segítségével a coliform/*E. coli* kimutatása válik lehetővé mindössze 18 óra inkubációs időt követően. Hasonló módszer a Pseudalert a *P. aeruginosa*, vagy az Enterolert az *Enterococcus* baktériumok kimutatására. Ezek az MPN módszerek gyors eredményt biztosítanak, azonban jóval költségesebbek, mint a korábban feltüntetett technikák.

3.6.1.2. Tenyésztés alacsony tápanyag ellátottságú vizes környezetekből

A hagyományos tenyésztési vizsgálatoknál alkalmazott tápközegek általában magasabb tápanyag koncentrációval jellemezhetők, amelyek kedveznek a gyorsan növekvő baktériumok viszonylag korai megjelenésének. A megemelkedett tápanyag összetételnek azonban gyakran gátló hatása van, így az oligotróf környezethez adaptálódott k-stratégista mikrobák tenyésztése komoly nehézséget okozhat. Mindezeket figyelembe véve a csökkentett tápanyag koncentrációjú tápközegek alkalmazása lehetővé tette olyan baktériumok izolálását, amelyeket korábban nem tudtak tenyésztésbe vonni (Ferrari és mtsai, 2005). Manapság a gyakorlatban az oligotróf közegekből történő tenyésztéshez R2A táptalajt (Reasoner és mtsai, 1985); hígított húspepton agart (Kim és mtsai, 1997), illetve M-27 (Stevenson és mtsai, 2004) és ún. oligotróf (McAlister és mtsai, 2002) táptalajokat alkalmaznak, az aerob heterotróf baktériumok meghatározásához.

Mivel az oligotróf közegekből történő tenyésztésnek számos nehézsége van, ezért célszerű a hagyományos tenyésztési technikákat finomítani. A teljesség igénye nélkül az alábbi speciális tenyésztési eljárások alkalmazhatók a sikeres tenyésztéshez:

1. Az inkubációs idő növelése az alacsonyabb tápanyag koncentrációjú táptalajokon magasabb telepszámot eredményez; a közösségre jellemző, de ritkán előforduló és a lassabban növekvő vagy sokáig lag fázisban lévő mikroorganizmusok megjelenésének szintén kedvez a megnövekedett inkubációs idő (1-3 hét) (Davis és mtsai, 2004).

2. Alternatív szilárdító anyagok használata: Robert Koch óta a legtöbb mikrobiológus agar-agar szilárdító anyagot használ baktériumok tenyésztéséhez és izolálásához. A hipertermofilok, acidofilok vagy olyan mikrobák tenyésztésére, amelyek különösen érzékenyek a szerves anyagokra célszerű az agar-agar mellett alternatív szilárdító ágensek használata. Ilyen pl. a gellángumi (pl. Gelrite), a *Sphingomonas* nemzetség tagjai által termelt extracelluláris heteropoliszacharid. Molekuláris struktúrája lineáris heteropoliszacharidból áll: β -D-glükóz, β -D-glükuronsav és α -L-rhamnóz ismétlődő egységekből épül fel. A gellángumi CaCl_2 , MgSO_4 sók hozzáadásával termostabil gélt képez, olvadáspontja magasabb az agar-aggarral készített táptalajokhoz képest, amely széles pH tartományban is stabil. Összehasonlítva az agar-aggarral, a képződő áttetsző gél előnyös a mikrobák tenyésztésében, mivel lehetővé teszi az halvány/áttetsző mikrokolóniák könnyebb észlelését és szelektálását a lemezekken. A gellángumi alkalmazása továbbá segíti, vagy nem befolyásolja azon mikrobák növekedését, amelyeknek a megjelenését az agar-agar gátolja, lehetővé teszi az addig tenyésztésbe nem vont mikrobák tenyésztését és izolálását (Kamagata és Tamaki, 2005).

3. Hordozók felhasználása a tenyésztéshez: Yasumoto-Hirose és munkatársai (2005) alkalmaztak először különböző összetételű agar-agar táptalajjal bevont PUF (poliuretán habot) tengeri baktériumok csapdába ejtésére. A PUF tömbök alkalmazásával különböző tulajdonságú, környezetben élő baktériumok dúsítása vált lehetségessé. A tengervízben elhelyezett PUF-ban kialakuló mikrokörnyezetek különböző körülményeket biztosítottak a mikroorganizmusok növekedéséhez. A környezetben élő mikrobák feltételezhetően a PUF tömbök belsejében lévő táptalaj felszínére tapadnak, és növekedésüket a táptalaj összetevői teszik lehetővé (Yasumoto-Hirose és mtsai, 2005).

3.6.2. Molekuláris vizsgáló módszerek

A molekuláris biológiai vizsgálatok segítségével számos olyan kérdésre választ kaphatunk, amelyek a tenyésztéses vizsgálatok alkalmazásával függőben maradnak, nem utolsósorban olyan mikroorganizmusok kimutatását teszik lehetővé, amelyek tenyésztésbe nem vonhatóak.

A nemtenyésztéses környezeti mikrobiológiai eljárások a sejtek kémiai alkotóelemein alapulnak: nukleinsav (DNS/RNS) vagy a lipid összetevők kivonásán. A mikroorganizmusokból származó nukleinsavak és az erre épülő molekuláris módszerek segítségével információt nyerhetünk a mikrobiális közösség összetételéről, nagyságáról, valamint a diverzitásáról (Töwe és mtsai, 2011; Semenov és mtsai, 2018). A 16S rRNS-t kódoló gén minden baktériumban jelen van, konzervált és variábilis régiókból áll, ezért a filogenetikai összefüggések vizsgálhatók vele. Vizsgálatukat manapság már rutinszerűen alkalmazzák. A különböző minták mikrobaközössége összehasonlítható a genetikai ujjlennyomattal, további statisztikai kiértékeléssel lehetővé válik a közösség szerkezetének vizsgálata (Tsai és mtsai, 2009), információt szolgáltatnak az összes mikrobiális közösségi genomról (genomterképezés, speciális gének keresése, filogenetikai- és funkcionális diverzitás kiértékelése) (Soliman és mtsai, 2017). Továbbá az rDNS génekben lévő eltérő G+C kapocs arányok alapján a közösségek kevésbé domináns tagjai is kiszűrhetők (Nüsslein és Tiedje, 1998).

Kétségtelenül napjainkban a nukleinsav alapú vizsgálatok a legelterjedtebbek. Az ujjlennyomat módszereknél a PCR (polimeráz láncreakció) során kapott heterogén termékeket nem választjuk szét, hanem további eljárás segítségével kapunk közösségi ujjlennyomatot. Az ujjlennyomat technikák közötti alapvető különbség az, hogy méret (hossz) vagy a szekvencia heterogenitáson alapul-e a PCR termékek elválasztása. Azt, hogy egy adott mikrobiális közösség vizsgálatához mely módszer alkalmazható, természetesen a kinyerni kívánt információ határozza meg, de megjegyzendő az is, hogy sok esetben ez inkább a laboratórium technikai felszereltségétől függ. A molekuláris ujjlennyomat módszerek előnyei: gyors, egyszerre több minta parallel elemezhető, megbízható és gyors a reprodukálhatósága, minőségi

és mennyiségi információt nyújt a populációról a közösségen belül. A közösségi tagok közt lévő filogenetikai kapcsolatot összehasonlítja az adatbázisban levő fragment méretekkel és szekvenciákkal (Tsai és mtsai, 2009). A molekuláris ujjlenyomat vizsgálatok közül a leggyakrabban a DGGE és T-RFLP (terminális restrikciós fragment hossz polimorfizmus) módszereket alkalmazzák, amelyek segítségével a közösségszerkezet tér-időbeli változásait, szennyezésekre adott válaszait akár sok minta esetében is nagy felbontással tudjuk követni (Vladár és mtsai, 2008; Osborn és mtsai, 2000).

A közösségek szerkezetének vizsgálatában a 2000-es évek közepétől egyre inkább elterjednek az ún. „újgenerációs” DNS szekvenálási technikák (Soliman és mtsai, 2017). Ezek az eljárások lehetővé teszik több minta mikrobaközösségének szimultán feltárását, nagyságrendekkel megnövelik a szekvenálás sebességét, és nem utolsósorban ezeknek az NGS eljárásoknak az egy nukleotid meghatározására szükséges költsége nagyságrendekkel alacsonyabb, mint a Sanger-módszer esetében. Az újgenerációs szekvenálások közös jellemzője, hogy sok szálon párhuzamosan folyik a DNS szekvenálása. Összehasonlítva a Sanger-módszerrel, rövidebb a leolvasási hossz és a párhuzamos ampliton feldolgozásnak köszönhetően a végteljesítmény nagyobb, akár több ezer bázis másodpercenként. Napjainkban a különböző szekvenátorok már számos gyártó által elérhetővé váltak (Roche, Illumina, ABI, Helicos stb), amelyek saját módszereikkel teszik lehetővé a nagy mennyiségű adatfeldolgozást. Az új generációs szekvenálási módszerek kritikus pontja a bioinformatikai kiértékelés, éppen a hatalmas mennyiségű adat miatt, amelyekről referenciához viszonyítva kapunk információt. A részletes kiértékelés a génexpresszió mérését, SNP-k (egyedi nukleotid polimorfizmus) azonosítását, poszttranszkripcionális nukleotidvariációk detektálását, fúziós gének azonosítását, új fajok genomjának meghatározását, az RNS másodlagos szerkezetének meghatározását stb. tartalmazhatja. A kritikus bioinformatikai elemzés azonban egy rendkívül gyorsan fejlődő terület, ahol a programok akár már egy év múlva is elavultak lehetnek. Mindenesetre ezekkel az új módszerekkel lehetővé válik a baktériumtörzsek teljes genomjának a meghatározása, mikrobaközösségek taxonómiai összetételének metagenomikai elemzése (Mihály és Györffy, 2011; Deshmukh és mtsai, 2016).

A molekuláris vizsgálatok egy része manapság már rutin vizsgálatok alapját képezi, amely során az adott mikroba - kórokozó vagy fakultatív kórokozó - jelenléte a kérdés. A vízhygiénés vizsgálatokban azonban a szabványos tenyésztéses módszereket alkalmazzák, holott számos molekuláris módszer alkalmazható a patogének célzott vizsgálatára. Az egyik ilyen nukleinsav alapú detektálási módszer a taxon specifikus PCR vizsgálat, amely során célzottan a kérdéses mikroba jelenléte kimutatható a mintából. A módszer lényege, hogy adott baktériumtaxonokra

specifikus primerek segítségével a mintából kivont közösségi DNS-ből felszaporíthatók az adott baktériumcsoportra jellemző DNS szakaszok.

A patogének vizsgálatának egy másik lehetősége az antibiotikum rezisztencia vizsgálata, ezek a rutin vizsgálatokban szintén egyre inkább elterjedtek, főként tenyésztéses, szabványos módszerekkel. Ilyen például a MIC (minimális gátló koncentráció) az antibiotikumnak az a legkisebb koncentrációja, amely a vizsgált törzs növekedését teljesen gátolja 24 órás inkubálás után; és az MBC (legkisebb baktericid koncentráció) vizsgálatok. Nukleinsav alapon, multiplex PCR módszert alkalmazva vizsgálható a makrolid rezisztencia, illetve a széles spektrumú β -laktamázok termeléséért felelős gének is, amelyekből közösségi szinten is információt nyerhetünk, a közösségben jelen lévő patogénekről.

4. Célkitűzések

Jelen tudomásunk szerint a múltban nem született olyan munka, amely a gyógyfürdők átfogó mikrobiológiai vizsgálatával foglalkozna, első sorban higiénés paraméterekre fókuszáló irodalom áll rendelkezésünkre.

Munkánk célja 3 budapesti gyógyfürdő mikrobiológiai vizsgálata volt a termelő kúttól a medencéig, higiénés és ökológiai vonatkozásban egyaránt, hogy átfogó képet kaphassunk a termálkútak természetes baktériumközösségeiről, az antropogén hatásokról, emellett össze tudjuk hasonlítani az egyes közfürdőkben alkalmazott vízkezelési technikák vízminőségre gyakorolt hatékonyságát. Ezek megvalósításához általános kémiai, szabványos (higiénés) mikrobiológiai, speciális tenyésztéses és különböző molekuláris módszereket alkalmaztunk.

Kutatásunk során az alábbi célokat tűztük ki:

- I. a kútvizek kémiai összetételének megismerése
- II. kútvizek természetes mikrobaközösségének feltárása
- III. a medencevizekben érvényesülő antropogén hatás és a vízkezelés technikák mikrobaközösségekre gyakorolt hatásvizsgálata
- IV. a medencevizek higiénés vizsgálata, humán eredetű mikroorganizmusok azonosítása, potenciális kórokozó baktériumok jelenlétének megállapítása
- V. A különböző vízkezelési technikák hatásának elemzése az összesített eredmények függvényében

5. Anyag és módszer

5.1. A doktori kutatás során vizsgált gyógyfürdők jellemzése

A doktori kutatás során 3 budapesti gyógyfürdő kútvizét és medence vizeit vizsgáltunk, a gyógyfürdőket a továbbiakban GY1, GY2 és GY3 jelöléssel használjuk.

A GY1 fürdő forrása 43°C-os hőmérséklettel tör a felszínre. A gyógyfürdőt 2, ugyanazt a forrást használó kút látja el (21,55 és 15,10 méter mélységű), amelyekből a víz búvárszivattyú segítségével jut a tározókba műanyag csöveken keresztül. A fürdőt 4 tározó tartály szolgálja ki, amelyek alsó oldalukon össze vannak nyitva, onnan szintén szivattyúk segítségével jut a gyógyvíz a medencéig. Időközben a gyógyvíz semmilyen vízkezelést nem kap. A termálmedencéket fertőtlenítőszer adagolás nélkül, töltő-ürítő rendszerben üzemeltetik. A vízforgatásos medencék esetében hőcserélő segítségével szabályozzák a hőmérsékletet, a víz homokszűrőn keresztül sósav és nátrium-hipoklorit adagolással kerül a medencékbe. A forrásvíz nátriumot is tartalmazó kalcium-magnézium-hidrogénkarbonátos és szulfátos-kloridos hévíz, melynek fluoridion-tartalma is jelentős. A gyógyvizet ajánlják gerinc megbetegedések, idült és félheveny ízületi gyulladások, porckorong bántalmak, idegzsábák, érszűkület, keringési zavarok és ízületek degeneratív betegségeinek kezelésére.

A GY2 forrása 372 méteres mélységből, 44°C-os hőmérséklettel tör a felszínre. A gyógyvíz, hasonlóan a GY1 kútvizéhez, műanyag csővezetéken keresztül jut a felhasználási helyekig: a termálmedencéket szintén töltő-ürítő rendszerrel, a vízforgatásos medencéket homokszűrőn keresztül vegyszeradagolással üzemeltetik. A gyógyvíz kémiai összetételét tekintve kalcium-magnézium-hidrogénkarbonátos és szulfátos-kloridos hévíz, amelynek nátrium és fluoridion-tartalma is jelentős. A kútvíz a medencék táplálása mellett ivókúraként az emésztőrendszer javítására alkalmas; míg a fürdözést ízületi gyulladások, porckorongsérv, idegzsábák, illetve nőgyógyászati jellegű problémák kezelésére ajánlják.

A GY3 gyógyvize 1246 méter mélységből, 76°C-os hőmérséklettel érkezik a felszínre, gravitációs úton, szivattyúk alkalmazása nélkül. A forrásvizet 2 tározóba gyűjtik, ahonnan szivattyúk segítségével jut a medencéig. Üzemeltetés szempontjából a töltő-ürítő és a vízforgatásos rendszer az előzőekkel megegyezik. A gyógyvíz kalcium-magnézium-hidrogénkarbonátos-szulfátos hévíz, amely jelentős fluorid, metabórsav és nátrium tartalommal jellemezhető. Ivókúra formájában emésztőrendszeri, kiválasztó szervrendszeri, légzőszervi, csontrendszeri rendellenességek, míg fürdőzés formájában ízületi megbetegedések kezelésére javasolják.

5.2. Mintavétel

Az első budapesti gyógyfürdő (GY1) esetében mintavétel (2013. 10. 28.) a forrásvízből (36°C) és egy töltő-ürítő medencéjéből (36°C) történt, a mikrobiológia szabályait követve 1 literes, 7,0 m/m %-os nátrium-tioszulfátot tartalmazó steril üvegbe. A forrásvíz mintavétele a medence falában található, folyamatosan a medencébe áramló forrásvíz-befolyóból történt, a medence vízből pedig a vízfelszíntől 10-15 cm-es mélységből, merítéses módszerrel történt a mintavétel. A mintákat a laboratóriumba jégakkukkal ellátott hűtőládában szállítottuk (4°C), a mintafeldolgozást a mintavételtől számított 1 órán belül elkezdtük.

A további két gyógyfürdő vizsgálata során a forrásvíz mellett különböző hőmérsékletű, elhelyezkedésű és üzemeltetésű medencékből is történt mintavétel. A GY2 fürdő esetében a forrásvíz (44°C) mintavétele a fürdőben található fali ivókútból történt, a medencék közül egy beltéri 38°C-os töltő-ürítő termálmedencéből, egy beltéri 20°C-os töltő-ürítő szauna-merülő medencéből és egy kültéri 38°C-os vízforgatásos élménymedencéből (2015. 03. 04.). A GY3 fürdő mintavételezése során (2014. 10. 22.) szintén az ivókútból és egy beltéri 38°C-os töltő-ürítő termálmedencéből, egy beltéri 20°C-os töltő-ürítő szauna-medencéből és egy kültéri 38°C-os vízforgatásos élménymedencéből történt, a fürdő forrásvíze 76°C-os (2. táblázat).

Paraméterek	GY1K	GY1TÜ36	GY2K	GY2TÜ38	GY2TÜ20	GY2VF38	GY3K	GY3TÜ38	GY3TÜ20	GY3VF38
hőmérséklet	36°C	36°C	44°C	38°C	20°C	38°C	76°C	38°C	20°C	38°C
elhelyezkedés	kútvíz befolyó	beltéri	fali ivókút	beltéri	beltéri	kültéri	ivókút	beltéri	beltéri	kültéri
üzemeltetés	-	töltő-ürítő	-	töltő-ürítő	töltő-ürítő	víz-forgatásos	-	töltő-ürítő	töltő-ürítő	víz-forgatásos
fürdőzők száma	-	12	-	12	1	8	-	1	1	11
funkció	kútvíz	termál-medence	kútvíz	termál-medence	merülő szauna-medence	élmény elemekkel ellátott medence	kútvíz	termál-medence	merülő szauna-medence	élmény elemekkel ellátott medence
vízfelület vagy forrás mélysége	21,55 m; 15,10 m	19,2 m ²	372 m	26,5 m ²	13,5 m ²	62 m ²	1246 m	16 m ²	7 m ²	600 m ²

2. táblázat. Mintavételi helyek és azok jellemzői. GY1K, GY2K, GY3K: kútvizek; TÜ36: 36°C-os töltő-ürítő medence; TÜ38: 38°C-os töltő-ürítő medencék; TÜ20: 20°C-os töltő-ürítő medencék; VF38: 38°C-os visszaforgatásos medencék.

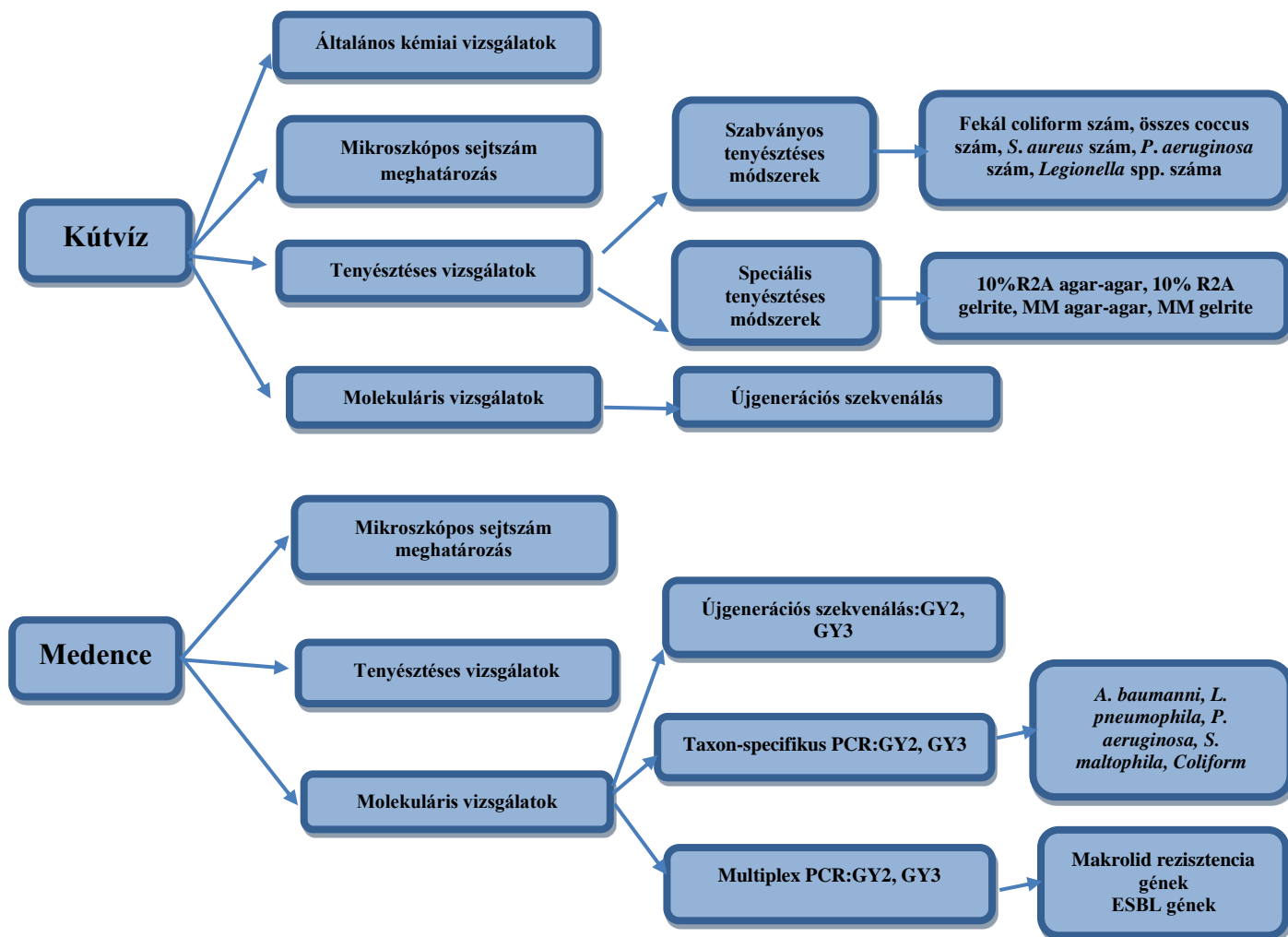
A GY2 és GY3 fürdő esetében molekuláris vizsgálatokhoz sor került második mintavételre is az első mintavételeket követő következő hónapban. A mintavételekre minden esetben a fürdő nyitását követően került sor. A fürdők mikroba terheltségének vizsgálatához ezekből a

gyógyfürdőkben nyitás előtti és nyitás utáni mintavételeket végeztünk összes sejtszám meghatározásához 2016 februárjától 4 hónapon keresztül.

5.3. Mintafeldolgozás

A GY1 fürdő esetében a kútvízből általános fizikai-kémiai, szabványos tenyésztéses, speciális tenyésztéses és NGS vizsgálatokat végeztünk el, a medencevíz esetében pedig szabványos tenyésztéses és speciális tenyésztéses vizsgálatok történtek, továbbá meghatároztuk a vízminták összes sejtszámát.

A GY2 és GY3 fürdők esetében a vizsgálatok körét bővítettük további molekuláris módszerekkel, a GY1 fürdő során alkalmazott technikák mellett a medencékből taxonspecifikus és multiplex PCR vizsgálatokat végeztünk. A medencékből továbbá egymást követő 4 hónapon keresztül mikroszkópos sejtszámok meghatározását is elvégeztük. A doktori munka során végzett vizsgálatokat az 1. ábra szemlélteti.



1. ábra. A kútvizekből és medencevizekből végzett vizsgálatok áttekintése. A medencevizek tenyésztéses vizsgálata a kútvizekkel megegyező módon történt.

5.3.1. A kútvizek fizikai és kémiai tulajdonságainak mérése

A kútvizek kémiai paramétereinek meghatározásához szabványos módszereket alkalmaztunk, amelyet a 3. táblázatban foglaltunk össze. A hőmérséklet, pH és fajlagos elektromos vezetőképesség mérése a mintavétel során, a helyszínen történt a WTW pH/Cond 340i mérőműszer segítségével.

Paraméterek	Alkalmazott szabvány
hőmérséklet, pH	MSZ 1484-22:2009
fajlagos elektromos vezetőképesség	MSZ EN 27888:1998
összkeménység	MSZ 448-21:1986
lúgosság	MSZ EN ISO 9963-1:1998
nátrium, kálium, kalcium, magnézium, vas, mangán	MSZ 1484-3:2006
szulfid	MSZ 448-14:1990
ammónium	MSZ ISO 7150-1:1992
hidrogén-karbonát	MSZ EN ISO 9963-2:1998
foszfát	MSZ 448-18:2009
jodid	MSZ EN 27888:1998
bromid, fluorid, nitrát, nitrit, szulfát	MSZ EN ISO 10304-3:1999
arzén	MSZ EN ISO 17294-2:2005
KOIps	MSZ 12750-21:1971
TOC	MSZ EN 1484:1998
összes kén	MSZ EN ISO 11885:2009

3. táblázat. A kútvizek fizikai-kémiai tulajdonságainak méréséhez alkalmazott szabványos módszerek listája.

5.3.2. Szabványos mikrobiológiai vizsgálatok

A kútvíz és a medencevíz mintákat a hazai jogszabályozásban rögzített szabványos módszerekkel dolgoztuk fel az MSZ 13690-2:1989 szerint, míg a minták telepszám meghatározását az MSZ EN ISO 6222:2000 szabvány szerint; a *Legionella* baktériumok számát az MSZ EN ISO 11731-2:2008 szerint végeztük el az alább részletezett módon. Az eredményeket a membránszűréses módszerek esetében 100 ml, *Legionella* esetében 1 liter, telepszám meghatározása esetében 1 ml mintára vonatkoztattuk. A membránszűrésekhez 0,45µm átmérőjű fehér filtert használtunk (Merck, Millipore, Darmstadt, Németország), kivéve a *Legionella* vizsgálatnál, ahol fekete filtert alkalmaztunk. A kútvíz minták esetében minden vizsgálathoz 100 ml mintát szűrtünk. A vizsgálatok során alkalmazott táptalajok, táplevesek és oldatok összetételét a Függelék 11, 11.2. pontja tartalmazza.

5.3.2.1. Fekál coliform szám az MSZ 13690-2:1989 szerint

A visszaforgatásos medencék esetében 100 ml-t, a töltő-ürítő rendszerű medencéknél 100-10-1-0,1 és 0,01 ml-eket szűrtünk, a filtereket Endo táptalaj felszínére helyeztük. A táptalajokat 44°C-on 24-48 órán át inkubáltuk. A fémfényű zöld színű gyanús telepeket tovább oltottuk laktóz fenolvörös bouillon levesbe, amelyeket 44°C-on inkubáltuk 24 órán keresztül, majd a sav- és gázképződést mutató csöveket pozitívnak minősítettük.

5.3.2.2. *Micrococcus* (összes coccus) szám az MSZ 13690-2:1989 szerint

A visszaforgatásos rendszerű fürdővizekből 50 ml-t, a töltő-ürítő rendszerű medencékből 5 és 0,5 ml-t szűrtünk, a filtereket sós-véres agar felszínére helyeztük, majd 37°C-on 24-48 óráig inkubáltuk. A filtereken megjelenő telepek döntő többsége Gram pozitív coccus, a filteren kinőtt coccus szám adja a vízminta összes coccus számát.

5.3.2.3. *Staphylococcus aureus* szám az MSZ 13690-2:1989 szerint

A visszaforgatásos rendszerű fürdővizekből 100 ml-t, töltő-ürítő medencékből 100, 5 és 0,5 ml-t szűrtünk, a filtereket Vogel-Johnson táptalaj felszínére helyeztük, majd 37°C-on 24-48 óráig inkubáltuk. A táptalajon a *S. aureus* fekete színű telepeket képez, szélük sárga színű (mannitbontás). Megerősítő vizsgálatként az azonosításhoz Pastorex™ Staph-Plus (Biorad, Marnes-la-Coquette, Franciaország) latex agglutinációs tesztet is alkalmaztunk.

5.3.2.4. *Pseudomonas aeruginosa* szám az MSZ 13690-2:1989 és az MSZ EN ISO 16266:2008 szerint

A minták feldolgozásához a 1989-es fürdővízes szabvány által javasolt térfogatokban dolgoztuk fel a mintákat: visszaforgatásos medencékből 100 ml-t, a töltő-ürítő fürdővizekből 50-10 és 0,1 ml-t szűrünk szelektív táptalajra. A filtereket a hazai laboratóriumi gyakorlatot követve az MSZ EN ISO 16266:2008 szabványban megjelölt cetrimid táptalaj felszínére helyeztük. A lemezeket 37°C-on 24-48 órán át inkubáltuk. A kékes-zöld színű, piocianint termelő telepek esetében további biokémiai megerősítést nem alkalmaztunk. Az UV fluoreszkáló oxidáz pozitív telepeket acetamid levesbe oltottuk, majd 37°C-on 24 óráig inkubáltuk. A *Pseudomonas aeruginosa* baktériumra jellemző az acetamidból történő ammóniaképzés, amelyet Nessler reagens segítségével mutattunk ki. A vörösesbarna telepek esetében az oxidáz és acetamid teszt mellett KingB táptalajon a fluoreszcenciát 5 napon keresztül vizsgáljuk.

5.3.2.5. *Legionella* szám az MSZ EN ISO 11731-2:2008 szerint

A vízmintákból 100-10-1 ml-eket szűrtünk fekete membránfilterre. A háttér mikrobióta visszaszorítása érdekében a filtereket pH 2,2 savas pufferral kezeltük, 5 percen keresztül. A savas kezelést követően a filtereket 10x foszfát pufferral mostuk át, majd GVPC táptalaj

felszínére helyeztük. A mintákat 37°C-on 10 napig inkubáltuk, a 3., 5., és 7. napon a gyanús telepeket ciszteines BCYE és cisztein mentes BCYE/húspepton táptalajra oltottuk át. Azok a telepek, amelyek a cisztein tartalmú táptalajon szaporodást mutatnak, de a cisztein mentes táptalajon nem *Legionella* baktériumnak tekinthetők. A *Legionella pneumophila* további azonosítására szolgál a Latex teszt (Oxoid), amely segítségével a szerotípus meghatározható.

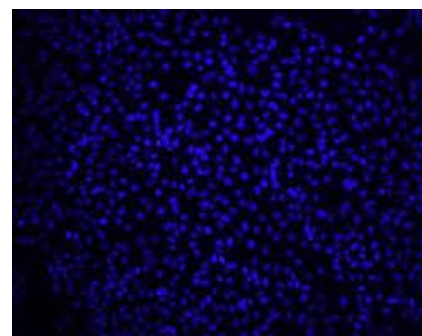
5.3.2.6. Telepszám az MSZ EN ISO 6222:2000 szerint

A telepszám meghatározására a szabványos módszer átdolgozásra került: a vízmintákból fiziológiás sóoldattal hattagú hígítási sort készítettünk, majd lemezöntéses technikát alkalmaztunk. A szabványban szereplő élesztőkivonat agar táptalaj helyett húspepton agart használtunk. A forrásból származó mintákat GY1 esetében 36°C-on, GY2 esetében 44°C-on, a GY3 esetében 55°C-on, míg a medencék esetében a medencék hőmérsékletének megfelelően termosztáltuk (20°C és 38°C). A lemezeket a speciális tenyésztési vizsgálatokkal megegyezően 1 hétig inkubáltuk.

5.3.3. Mikroszkópos sejtszám meghatározása

A fürdővízben található baktériumok mikroszkópos sejtszámának meghatározását DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) festést követően epifluoreszcens mikroszkóp (Nikon 80i) és Image ProPlus programcsomag segítségével végeztük el. A DAPI festék áthatol az intakt sejtmembránon, majd a duplaszálú DNS-hez kötődik. A vizsgálathoz tízszeres PBS-t (foszfátpuffert) és 100 ml, 2%-os végtérfogatú PFA (paraformaldehid) oldatot készítettünk (Függelék 11, 11.1. pont). A PFA oldathoz 5 ml steril, 20x-os PBS-t adtunk, majd az elegy 35 ml-ét (2%-os PFA) steril 0,2 µm pórusátmérőjű filteren szűrtük (Millipore, Billerica, MA, USA).

A kútvizekből 200 ml-t, a medencék vizéből 10 ml-t, steril polikarbonát szűrőn (Millipore, Billerica, MA, USA) keresztül koncentráltunk. A szűrőkészülék és a preparátum készítéséhez használt membránszűrő közé 0,2 µm pórusátmérőjű cellulózfiltert tettünk (Millipore, Billerica, MA, USA). A filtereket a PFA oldatban 1 éjszakán keresztül, 4°C-on termosztáltuk. Az inkubációs idő letelte után a fixált vízminták szűréséhez használt membrán-filterek egy-egy darabját kivágtuk és DAPI festékekkel festettük. A detektálás során kapott képeket kiértékeltek és az egyes látótereken előforduló sejteket megszámláltuk, majd az értékeket átlagoltuk és meghatároztuk a minták milliliterenkénti sejtszámát.



1. kép. Egy medence vizének DAPI festéssel készült mikroszkópos képe

5.3.4. Speciális tenyésztési vizsgálatok

A kútvizek és a medencék vizének speciális tenyésztési vizsgálata során 10%-os R2A táptalajt (Reasoner és Geldreich, 1985), valamint szerves anyagokat alacsony koncentrációban tartalmazó MM (minimál médium) táptalajt alkalmaztunk (Kéki és mtsai, 2013). A táptalajokat agar-agar és gelrite szilárdító ágensekkel készítettük el. A táptalajok pontos összetételét a Függelék 11, 11.2. pont tartalmazza.

A táptalajok elkészítéséhez az előírt desztillált víz helyett a fürdőből származó kútvizet használtuk, ami eleve tartalmazott olyan sókat, amelyek lehetővé teszik a gelrite gélképzését, így nem volt szükség a gellángumit tartalmazó táptalajokban további ionos vegyületek (például CaCl_2 és MgSO_4) hozzáadására. A táptalajokat autoklávban 121°C -on, 1 atm túlnyomáson sterilizáltuk. Az így elkészített táptalajok pH-ját a fürdőviznek megfelelően 7,2-re állítottuk be 1 mol/l sósav és 1 mol/l nátrium-hidroxid oldat segítségével.

- ***a kútvíz minták hagyományos dúsítása***

A kútvíz minták hagyományos dúsítása során a 10% R2A és Minimál Médium levesek 250 ml-jéhez 50 ml vízmintát mértünk, majd azokat 3 hétig, a GY1 esetében 36°C -on, GY2 esetében 44°C -on, a GY3 esetében 55°C -on, mágneses keverőlapon kevertettük. A dúsított mintákból 3 tagú 10x-es hígítási sorozatot (10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6}) készítettünk. A hígítási tagokból 100-100 μl -t szélesztettünk mind a négyféle táptalajra (agar-aggarral és gelrite-tal elkészített minimál médium és 10%-os R2A), majd a dúsításokkal megegyező hőmérsékleten egy hétig inkubáltuk azokat.

- ***dúsítás purhab tömbök segítségével***

A kútvízből származó vízminták esetében purhab tömbök segítségével dúsítást is végeztünk (1. kép), amihez kétféle dúsító levest alkalmaztunk: 10%-os R2A-t és minimál médiumot. A körülbelül 1 cm^3 térfogatú poliuretán blokkok sterilizálása után azokat négyféle steril táptalajba mártottuk, majd hagytuk, hogy a táptalajok megszilárduljanak a purhab kockák felszínén és belsejében. Mindegyik dúsító táplevesbe (10%-os R2A és minimál médium) a megfelelő táptalajjal átítatott 2-2 db purhab blokkot tettük bele (2 db agar-aggarral és 2 db gelrite szilárdító anyaggal elkészítettet). A levesek 250 ml-éhez 50 ml vízmintát mértünk, majd azokat 3 hétig, a GY1 esetében 36°C -on, GY2 esetében 44°C -on, a GY3 esetében



2. kép. A dúsító táplevesben elhelyezett poliuretán blokkok (fotó: Szuróczki Sára)

55°C -on mágneses keverőlapon kevertettük. Az inkubációs idők letelte után steril dörzsoszorókban steril dörzs segítségével a pur hab kockákból kipréselt folyadékból

háromtagú 10x-es hígítási sorozatot (10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6}) készítettünk, melynek mindegyikéből 100-100 μ l-t pipettáztunk a négyféle táptalajra, majd a dúsításokkal megegyező hőmérsékleten egy hétig inkubáltuk azokat.

5.3.5. Heterotróf csíraszám becslés oligotróf táptalajokon

A kútvíz mintákból 3 tagú, míg a medencékből hattagú hígítási sorozatot készítettünk steril fiziológiás sóoldat segítségével. A hígítási tagokból 100-100 μ l-nyi mennyiséget szélesztettünk a négyféle tápanyagszegény táptalaj felszínére. Az egyes tagokból 3, illetve 5 párhuzamos mintát készítettünk.

A kútvízből származó mintákat GY1 esetében 36°C-on, GY2 esetében 44°C-on, a GY3 esetében 55°C-on, míg a medencékből szélesztett mintákat a medencék hőmérsékletének megfelelően termosztáltuk egy hétig, ezt követően minden táptalajon elvégeztük a minták heterotróf csíraszámbecslését.

5.3.6. Molekuláris vizsgálatok

5.3.6.1. A táptalajokról izolált baktérium törzsek azonosítása

- ***Baktérium törzsek izolálása***

Az inkubációs idők letelte után a különböző táptalajokról nem szelektív módon izoláltuk a különálló telepeket, és oltókaccsal tisztítottuk azokat. A tiszta tenyészeteket a továbbiakban a saját izoláló táptalajával megegyező ferde táptalajon tartottuk fenn.

- ***DNS izolálás a különböző táptalajokról izolált törzsekből***

A baktériumtörzsek DNS-ének izolálásához mechanikai sejtfeltárást alkalmaztunk, majd a kinyerést követően tisztítottuk azokat. A sejtfeltárást üveggyöngyös, illetve sejtmalmos technika segítségével végeztük: 600 μ l-es Eppendorf-csővekbe 100-100 μ l DEPC-cel (diethyl-pirokarbonát) kezelt RN-áz mentes vizet (dH_2O) pipettáztunk, majd mindegyik csőbe 100 μ l steril üveggyöngyöt tettünk. Ezt követően a tisztított, fiatal (48-72 órás) baktériumtenyészetekből egy kacsnyi mennyiséget szuszpendáltunk az Eppendorf-csővekbe, majd Mixer Mill MM301 típusú sejtmalommal (Retsch, Haan, Germany) 2 percen keresztül 30 Hz-en rázattuk őket. A sejtfeltárást követően a csöveket centrifugáltuk (5000g), majd a nyers lizátumot GeneAmp PCR System 2700 készülékben (Applied Biosystems) 5 percen át 98°C-on denaturáltuk. Ezt követte a csövek 5 percen át történő centrifugálása (10000g). A DNS mintákat -20°C-on tároltuk.

- ***A baktériumtörzsek 16S rRNS génjének felszaporítása***

A PCR során két Bacteria specifikus primert használtunk: 27F és 1492R (a primerek bázissorozatát a Függelék 11, 11.3. pontjában ismertettük). A PCR terméket agaróz

gélelektroforézis segítségével ellenőriztük: 2,5 µl DNS festéket (GR DNA Stain; Fermentas, Lithuania) tartalmazó 1%-os agaróz gélben 20 percig, 100 V-on, TBE pufferben futtattuk a termékeket. A DNS termékek méretének meghatározásához molekulásúly markerként EcoRI+HindIII Marker 3-at (Fermentas, Lithuania) használtunk. A polimeráz láncreakció végeztével a kapott termékeket agaróz gélelektroforézis segítségével ellenőriztük: 1,5 µl DNS festéket tartalmazó, 1%-os agaróz gélben futtattuk 100 V-on, 20 percig. A futást követően a festett terméket UV fényben detektáltuk. Az alkalmazott polimeráz-láncreakció összetételét és hőprofilját a Függelék 11, 11. 4. és 11.5. pontja alatt tüntettük fel.

- ***Baktériumtörzsek csoportosítása ARDRA vizsgálattal***

ARDRA (amplifikált riboszómális DNS restrikciós analízis) során csoportokat hoztunk létre a különböző restrikciós endonukleázok emésztési mintázata alapján.

A korábban PCR technika segítségével felszaporított 16S rRNS gén emésztését kétféle restrikciós endonukleáz segítségével végeztük el, a két endonukleáz a hasítási helyükkel: *BsuRI* (GG↓CC) és *MspI* (C↓CGG). Az ARDRA vizsgálat során alkalmazott reakcióelegy összetételét a Függelék 11, 11.6. pontja tartalmazza.

A *BsuRI*-hez a *BufR* puffert (Fermentas, Lithuania) míg az *MspI*-hez a *Tango* puffert (Fermentas, Lithuania) alkalmaztuk. Az így összemért mixből 10 µl-eket pipettáztunk szét 0,6 ml-es Eppendorf csövekbe, majd a PCR termékekből szintén 10 µl-t adtunk hozzá. Az így kapott elegyet 3 órán keresztül, 37°C-os vízfürdőbe helyeztük. Az inkubációs idő leteltével a kapott DNS szakaszok elválasztása következett agaróz gélelektroforézis segítségével. Az emésztési reakció során kisebb DNS fragmentumok keletkeztek, mint a PCR során, ezért azok elválasztásához nagyobb felbontás szükséges. Ezt az agaróz gél töményítésével (2%-os), valamint az elektroforézis idejének növelésével értük el. Emellett a PCR során alkalmazott 100 V-os feszültséget is lecsökkentettük 80 V-ra. A mintákat TBE pufferben (Függelék 11, 11.7.), 80 percig futtattuk, pUC Mix Marker8 (Fermentas, Lithuania) molekulásúly marker használata mellett.

A baktériumtörzseket a kapott hasítási mintázatok alapján csoportosítottuk: a mindkét restrikciós enzimmel azonos hasítási mintázatot adó mintákat egy csoportba soroltuk és az általunk kiválasztott csoportrepresentáns, valamint az egyedi, csoportokba nem sorolható törzseket, azok pontos taxonómiai helyzetének meghatározása céljából 16S rRNS génjük részleges szekvencia analízisének vetettük alá.

- ***A 16S rRNS gének szekvencia analízise***

A 16S rRNS gének szekvencia analízisét és a kapilláris elektroforézist a LGC Genomics GmbH (Berlin, Németország) végezte el. A szekvencia analízis Sanger-féle láncterminációs

módszerrel automata ABI 3730 XL (Applied Biosystems, Waltham, USA) szekvenátorral történt. Az így kapott szekvenciákat a Chromas programcsomag (Technelysium Pty Ltd, Tewantin, Ausztrália) segítségével ellenőriztük, javítottuk majd a faji szintű azonosításokat az EzTaxon (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>) adatbázisban végeztük el, összevetve a jelenleg érvényes baktériumfajok típusörzseinek szekvenciáival. A szekvenciák a Genbank adatbázisában az MH790296-MH790311, MH915675-MH915682, MH917333- MH917341, MN096612-MN096646, MN096669-MN096733 azonosítók alatt érhetőek el.

- ***DNS kivonás molekuláris vizsgálatok céljából***

A molekuláris vizsgálatokhoz a kútvizek esetében 500 ml, a medence vizek esetében 200 ml minta mennyiséget koncentráltunk 0,2 µm pórusátmérőjű cellulóz filteren (Millipore, Billerica, MA, USA) vákuumpumpa segítségével. A közösségi DNS kivonását az UltraClean Soil DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories Inc, USA) segítségével végeztük, a gyártó utasításait követve. Felhasználásig a kinyert közösségi DNS mintákat -20°C-on tároltuk.

5.3.6.2. Újgenerációs szekvenálás

A piroszekvenálás alapelve eltér a Sanger-féle szekvenálástól: alapja az, hogy a DNS-t szintetizáló DNS polimeráz enzim aktivitását egy másik, fénykibocsátó (luciferáz) enzim segítségével detektálják. A szekvenálás folyamán amikor egy nukleotid beépül a DNS szálba, pirofoszfát (PPi) keletkezik ennek mennyiségét mérjük egy kapcsolt biokémiai reakcióssal, amelyet a luciferáz enzim felvillanással jelez. A fény intenzitása arányos a beépülő nukleotidok számával. A szekvenálás során a négy lehetséges nukleotidból egyszerre egyet juttatnak a reakcióterbe. Ezek után a be nem épült nukleotidokat kimossák, és egy másik nukleotidot adnak a rendszerhez. Ezt a folyamatot ciklikusan ismétlik. Az adott pozícióban bekövetkező fényvillanások megadják a kérdéses DNS szál nukleotidszekvenciáját. Az eljárás emulziós PCR reakcióval kiegészíthető, így nincs szükség a szekvenciálandó DNS darabok klónozására.

Munkánk során az újgenerációs amplitikon szekvenáláshoz a 16S rRNS génjének V1-V3 régióját szaporítottuk fel PCR segítségével 27F és 534R primerek segítségével, amelyeket mintaazonosítóval („barcode”) és a szekvenáló reakcióhoz szükséges adapter szekvenciákkal láttunk el. A primerek bázisrendjét a Függelék 11, 11.3. pontja tartalmazza. A polimeráz láncreakció során létrejövő sztochasztikus hatások minimalizálása érdekében a PCR-t mintánként 3 párhuzamosban, összesen 3x20 µl-es végtérfogatban végeztük el. A reakcióelegyek összetételét a Függelék 11, 11.4. pontjában, a PCR reakció hőprofilját a Függelék 11, 11.5. pontjában foglaltuk össze.

A reakció sikerességét gélelektroforézissel ellenőriztük, majd az azonos mintához tartozó PCR termékeket egy Eppendorf csőbe gyűjtöttük. A PCR termékeket a High Pure PCR Cleanup Micro Kit (Roche/454 Life Sciences, Branford, CT, USA) segítségével tisztítottuk, a minőségi ellenőrzést és a DNS koncentrációjának mérését Model 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) készülékkel végeztük el. A DNS-szekvenálás GS Junior (Roche, Branford, CT, USA) platformon történt a gyártó utasításai szerint. Az emulziós PCR és a piroszekvenálás folyamata a gyártó utasításainak megfelelően zajlott (Lib-L protokoll, 2012. március, Roche/454) GS Junior szekvenáló berendezésen (Roche/454, Branford, CT, USA). A szekvenáló reakció során kapott jelek feldolgozása a gyártó gsRunProcessor 3.0 szoftverével történt. A nyers szekvencia adatokat az NCBI Sequence Read Archive adatbázisában helyeztük el és a PRJNA602207 BioProject azonosítón keresztül elérhetők. Ezt követően a kapott szekvenciákat a mothur v1.35 szoftver (Schloss és mtsai, 2009) segítségével elemeztük. Az elemzési lépések kiválasztása és végrehajtási sorrendje Schloss és munkatársai javaslatainak megfelelően történt (454 SOP - http://www.mothur.org/wiki/454_SOP –2015. 04. 07-én elérhető verzió) (Schloss és mtsai, 2011). A PCR amplifikáció és a szekvenáló reakció során keletkezett műtermékeket (kimérák, homopolimerek) és az egyszer előforduló (singleton) szekvenciákat a bioinformatikai elemzés során kiszűrtük. Továbbá töröltük az adathalmazból a túl rövid szekvenciákat ($nt \leq 200$) is. Az így nyert jó minőségű szekvenciasort a SINA v1.2.11 szoftver (Pruesse és mtsai, 2012) segítségével illesztettük, a taxonómiai azonosítás az ARB-SILVA NR99 – Silva Release 123 referencia adatbázis (Quast és mtsai, 2013) használatával történt. A szekvenciák taxonokhoz történő hozzárendelése szintén ezzel az adatbázissal történt. A leolvasásokhoz egy adott taxonómiai szint hozzárendelése a mothur bootstrap ≥ 80 érték esetén történt 10000 iteráció alapján. Amennyiben egy taxonómiai rang 80 alatti bootstrap értéket kapott, akkor az adott taxonómiai szintet „unclassified”-ként jelöltük meg. A szekvenciákat 97%-os bázissorrendbeli egyezés fölött rendeltük operatív taxonómiai egységekhez (OTU), mivel ez az érték a bakteriális taxonómiában általánosan használt „faj-határ” (Tindall és mtsai, 2010). Statisztikai értékelésünkhöz a relatív abundancia-értékeket vettük alapul. A fajszám és a diverzitásbecslő indexeket szintén a mothur program segítségével számoltuk, a szekvenciák újramintavételezését követően a legkisebb szekvenciaszámú minta alapján. A szekvenciák az NCBI Sequence Read Archive adatbázisában a PRJNA602207 BioProject azonosító alatt elérhetők. Az NGS vizsgálatokban és az eredmények statisztikai értékelésében Dr. Szabó Attila segített.

5.3.6.4. Taxon specifikus PCR

Taxon specifikus PCR segítségével egyrészt a hazai szabályozásban szereplő *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila* és coliform baktériumok mellett az *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia* fajok, valamint a *Legionella* és a *Pseudomonas* nemzetség jelenlétének vizsgálatát végeztük el. Vizsgálatunk célja azoknak a baktérium fajoknak/nemzetségeknek a kimutatása volt, amelyek mesterséges fürdővizekben közegészségügyi jelentőséggel bírnak, lehetnek fekális indikátorok, utalhatnak technológiai problémákra és a fürdőzők által is bekerülhetnek a fürdővizekbe.

Minden taxonspecifikus PCR esetében ugyanazt a reakcióelegyet használtuk, amely összetételét a Függelék 11, 11.4. pontjában foglaltuk össze.

1. *Pseudomonas* spp. kimutatása

A nemzetség jelenlétének vizsgálatát nested PCR technikával végeztük el. Első lépésben a 16S rRNS gént szaporítottuk fel a 27F és 1492R primerek segítségével. A reakciót követően felszaporított a 16S rRNS génekből kiindulva még egy PCR reakciót alkalmaztunk, Spilker és munkatársai (2004) alapján a PA-GS-F és PA-GS-R primerekkel, amelyek egy, a *Pseudomonas*-okra jellemző génszakaszt szaporít fel.

2. *Pseudomonas aeruginosa* kimutatása

A vizsgálat Lavenier és munkatársai (2007) leírásának megfelelően történt. A baktérium jelenlétének vizsgálata során az *ecfX* gént szaporítottuk fel az ECF1 és ECF2 primerek segítségével.

3. *Legionella* spp. kimutatása

A csoport jelenlétének vizsgálatát nested PCR technikával végeztük. Először a 16S rRNS gént szaporítottuk fel a 27F és 1492R primerek segítségével. A reakciót követően felszaporított 16S rRNS génekből kiindulva még egy PCR reakciót elvégeztünk Cloud és munkatársai (2000) alapján a JRP és JFP primerekkel, amelyek egy a *Legionellák*-ra jellemző 16S rRNS génszakaszt szaporít fel.

4. *Legionella pneumophila* kimutatása

A taxon jelenlétét nested PCR technikával vizsgáltuk Fiume és munkatársai (2005) alapján. Első lépésben a *mip* gént szaporítottuk fel, amely egy fontos virulenciafaktoroként szolgáló membránfehérjét kódol. A reakció a *mip3* és *mip4* primerek segítségével zajlott.

A reakciót követően felszaporított *mip* génekből kiindulva még egy PCR reakciót elvégeztünk, ugyanilyen reakcióeleggyel, *mip5* és *mip6* primerekkel, amelyek a *mip* gén egy fajra specifikus régiójára specifikusak

5. Coliform baktériumok kimutatása

A vizsgálat során Bej és munkatársai (1990) alapján a ZL1675 és ZR2025 primerek segítségével detektáltuk a baktériumok jelenlétét. Az említett primerek a LacZ génre specifikusak. A LacZ gén a β -galaktozidáz enzimet kódolja, ami egy laktóz permeáz fehérje, amely minden coliform baktériumban megtalálható.

6. *Acinetobacter baumannii* kimutatása

A vizsgálat során Tsai és munkatársai (2018) alapján a P-Ab-ITSF és P-AbI-TSB primerek segítségével mutattuk ki a baktériumok jelenlétét. A primerek a 16S-23S rRNS gének között lévő, *Acinetobacter baumannii*-ra jellemző intragén régiókra specifikusak.

7. *Stenotrophomonas maltophilia* kimutatása

A vizsgálat során nested PCR technikát alkalmaztunk. Először a 16S rRNS gént szaporítottuk fel a 27F és 1492R primerek segítségével. A reakciót követően felszaporított 16S rRNS génekből kiindulva még egy PCR reakciót elvégeztünk Karpati és Jonasson (1996) alapján az SmF és SmR primerekkel, amelyek egy *Stenotrophomonas maltophilia*-ra jellemző génszakaszra specifikusak.

A PCR reakciók sikerességét agaróz gélelektroforézis segítségével ellenőriztük.

A taxonspecifikus PCR reakciókhoz használt primerek bázissorendjét a Függelék 11, 11.3., a reakciók hőprofilját a Függelék 11, 11.5. pontjai tartalmazzák.

5.3.6.5. Multiplex PCR

A multiplex PCR vizsgálatok során vizsgált kiterjedt spektrumú β -laktamáz (ESBL) cél gének a SHV (739 bp), TEM (422 bp) és CTX-M (590 bp) gének voltak. A makrolid-rezisztencia gének esetében az ermA, ermB, ermC, msrA, és mef gének vizsgálatát végeztük el, Trung és munkatársai (2015) és Zmantar és munkatársai protokolljának megfelelően (2011). A vizsgálatok során alkalmazott primereket a Függelék 11, 11.3. pontja tartalmazza. Az SHV és a CTX-M gének vizsgálatához Phire Green Hot Start II Master mix-et használtunk (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts) míg a TEM gének vizsgálatához Dream Taq polimerzát (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts) alkalmaztunk. A multiplex PCR vizsgálatokhoz használt reakcióelegyek összetételét a Függelék 11, 11.4. pontja, a PCR reakciók hőprofilját a Függelék 11, 11.5. pontja ismerteti. A vizsgálatokhoz pozitív kontrollként az ELTE Mikrobiológiai Tanszékén fenntartott MRSA és *Klebsiella pneumoniae* baktériumot használtunk. Előbbi az ermC és ermA géneket, utóbbi a CTX és TEM géneket tartalmazta. A PCR reakciók sikerességét agaróz gélelektroforézis segítségével ellenőriztük (Függelék 11, 11.7. pont).

6. Eredmények és értékelésük

6.1. Kútvizek fizikai és kémiai jellemzői

A kútvizek fizikai-kémiai paramétereit között több átfedés figyelhető meg: mindhárom kútvízre jellemző (a hálózati vízhez képest) a jelentős nátrium ion, kalcium ion, magnézium ion, klorid ion és hidrogén-karbonát ion tartalom. A GY1 kútvíze az arzén, a GY2 kútvíze a vas és szulfát, a GY3 kútvíze a fluorid tartalomban mutat egyedi jellegzetességeket (2. táblázat). Az összes szerves széntartalom (TOC) és a KOIps alapján a kútvizek szerves anyagban szegény vizek.

Paraméter (mg/l)	GY1K	GY2K	GY3K
Hőmérséklet	35,7 °C	43,0 °C	74,8 °C
pH	7,5	7,2	7,2
Összkeménység	410	397	316
m-lúgosság (mmol/liter)	9,2	9,5	9,1
Ammónium	0,45	0,54	0,7
Nitrit	0,003	0,009	0,003
Nitrát	0,05	0,2	0,1
Foszfát	0,06	0,07	0,12
Nátrium	144	155	145
Kálium	19,2	18,6	19,9
Jodid	28,5	27,2	68
Bromid	0,38	0,47	0,59
Kalcium	199	148	169
Magnézium	56,6	56,4	33,8
Fluorid	2,06	0,78	3,29
Klorid	150	184	198
Hidrogén-karbonát	559	579	550
Szulfát	350	600	210
Szulfid	0,01	0,02	0,04
Vas (µg/l)	44,2	128	16,5
Mangán (µg/l)	16,1	11,1	12,8
Összes kén	106	107	69
Arzén (µg/l)	11,8	7,5	5,1
Összesen	1630	1384	1752
TOC	0,7	0,7	0,4
KOIps	0,6	0,14	0,5

4. táblázat. Az oldott ásványi anyagok mennyisége a gyógyfürdők kútvizében. GY1K, GY2K, GY3K: kútvizek.

6.2. Heterotróf csíraszámbebecslés és a mikroszkópos sejtszám vizsgálat eredményei

Az általunk alkalmazott táptalajok segítségével a medencék becsült csíraszámát legalább egy nagyságrenddel magasabb volt a kútvizekhez képest (5. táblázat). Ez egyrészt a medencékben érvényesülő fürdőző hatásnak köszönhető, másrészt pedig a kútvízhez képest megváltozott környezeti tényezőknek, a külső környezetből bekerülő mikroorganizmusoknak, különösen a kültéri medencék esetében. A medencék csíraszámait igen változatosak, alapvetően elmondható, hogy a töltő-ürítő rendszerű medencék minden fürdő esetében magasabb csíraszámot

jellemezhető, amely feltételezhetően az üzemeltetésnek (a fertőtlenítőszer hiányának) köszönhető.

A táptalajok összetételének hatásának pontos megállapítására a tenyésztető diverzitásra vonatkozóan több vizsgálat szükséges, azonban a kútvizek vizsgálatai alapján megállapítható, hogy magasabb csíraszámokat tapasztaltunk MM táptalajon, illetve gelrite-al elkészített 10%-os R2A táptalajon. Ez azért lényeges megállapítás, mert a legtöbb kutatás során az R2A táptalajt alkalmazzák hagyományosan oligotróf környezetek baktériumközösségek feltérképezésére. Az is megállapítható, hogy a speciális tápközegek használatakor minden esetben magasabb csíraszámot kaptunk, mint a szabványos hús-pepton agaron, amely szintén felhívja a figyelmet arra, hogy a heterotróf összcsíraszám meghatározásához az alacsony tápanyagellátottságú közegekből a szabványosan előírt táptalajok nem megfelelőek.

A mikroszkópos sejtszámokat tekintve a kútvizek összes sejtszáma a tenyésztéses eredményekhez képest legalább egy (a GY1 és GY2 fürdőben 2-3 nagyságrenddel) magasabb volt. Ezt a jelenséget „great plate count anomaly”-nak nevezték el, ami azon a megfigyelésen alapul, hogy a mikroszkópos sejtszámolások során az értékek mindig nagyságrendekkel magasabbak, mint a tenyésztés során kaptak (Vartoukian és mtsai, 2010).

Vízminták	Mikroszkópos sejtszám (sejt/ml)	Összcsíraszám speciális táptalajokon (TKE/ml)	Összcsíraszám húspepton agaron (TKE/ml)	10% R2A agar-agar (TKE/ml)	10% R2A gelrite (TKE/ml)	MM agar-agar (TKE/ml)	MM gelrite (TKE/ml)
GY1K	670000	340	0	12,5	630	108	608
GY1TÜ36	930000	8200	400	560	11000	10400	11000
GY2K	14000	170	20	110	120	210	240
GY2TÜ38	4900000	400000	20000	910000	250000	340000	102000
GY2TÜ20	2600000	170000	2300	9800	140000	6400	11000
GY2VF38	780000	130000	1600	490000	19000	17000	1100
GY3K	6100	120	0	10	12	200	270
GY3TÜ38	1400000	64000	1700	60000	61000	68000	69000
GY3TÜ20	370000	8200	6500	6500	9200	5800	11000
GY3VF38	900000	2200	150	2300	2200	2300	2200

5. táblázat A vízminták mikroszkópos sejtszám meghatározásának és heterotróf csíraszám becslésének eredményei hőterkép formájában ábrázolva. A táblázat tartalmazza a hagyományos húspepton táptalajjal és a speciális táptalajokon végzett összcsíraszám becslés eredményeit. Utóbbiakat a vizsgálatok során alkalmazott 4 féle táptalajra külön-külön is feltüntettük. GY1K, GY2K, GY3K: kútvizek; TÜ36: 36°C-os töltő-ürítő medence; TÜ38: 38°C-os töltő-ürítő medencék; TÜ20: 20°C-os töltő-ürítő medencék; VF38: 38°C-os visszaforgatós medencék. MM: minimál-médium. A színskála az alacsonyabb értékektől (zöld) halad a legmagasabb értékig (piros).

A GY3 kútvíz esetében a tenyésztéses és a mikroszkópos sejtszámok esetében is alacsonyabb értékeket kaptunk, mint a másik két gyógyfürdő kútvíze esetében. Ez feltételezhetően a kútvíz magas, 76°C-os hőmérsékletével magyarázható.

A doktori kutatás során a GY2 és GY3 fürdő esetében az első mintavételezéseket követően egymást követő 4 hónapon át 4 alkalommal mintavételeket végeztünk a kútvizekből és a medencékből egyaránt mikroszkópos sejtszám meghatározására, az eredményeket a 6. táblázat szemlélteti. A kútvizek mikroszkópos sejtszáma nagyságrendileg azonos volt a mintavételi napokon, amely annak köszönhető, hogy a kútvizek nincsenek kitéve külső környezeti és a fürdőző hatásnak. A medencék tekintetében a nyitás előtti értékek a töltő-ürítő medencékben legalább egy nagyságrenddel magasabbak, mint a vízforgatásos medencéknél és ez a tendencia a nyitás után, fürdőző hatás mellett is megmarad. A medencék tekintetében, a tenyésztéses vizsgálatokhoz hasonlóan, a mikroszkópos sejtszám értékek a töltő-ürítő medencéknél mindig magasabbak voltak, mint a vízforgatással üzemelő rendszerek. Természetesen a fürdőzők száma és a medencék mérete fontos tényező ebből a szempontból.

Vízminták	Mikroszkópos sejtszám nyitás előtt (sejt/ml)	Mikroszkópos sejtszám nyitás után 1. (sejt/ml)	Mikroszkópos sejtszám nyitás után 2. (sejt/ml)	Mikroszkópos sejtszám nyitás után 3. (sejt/ml)
GY2K	15000	11000	59000	27000
GY2TÜ38	590000	3900000	510000	2400000
GY2TÜ20	1600000	1700000	270000	210000
GY2VF38	200000	280000	86000	380000
GY3K	4800	55000	6200	3900
GY3TÜ38	1900000	2900000	980000	1900000
GY3TÜ20	320000	250000	1400000	240000
GY3VF38	27000	2000000	450000	750000

6. táblázat. Egymást követő 4 hónap mintavételezése során kapott mikroszkópos sejtszám meghatározásának eredményei hőtérkép formájában ábrázolva. GY2, GY3: kútvizek; TÜ38: 38°C-os töltő-ürítő medencék; TÜ20: 20°C-os töltő-ürítő medencék; VF38: 38°C-os visszaforgatásos medencék. A színskála az alacsonyabb értékektől (zöld) halad a legmagasabb értékig (piros).

6.3. Kútvizek természetes baktériumközösségeinek összehasonlítása

A tenyésztéses vizsgálatok során közvetlen szélesztéssel viszonylag kevés taxont tudtunk kimutatni a kútvizekből, számos baktérium esetében a purhab tömbös dúsítás hozott nagyobb sikert. Több nemzetség esetében pedig a nemzetség csupán 1-1 képviselőjét izoláltuk. A dúsításos és a közvetlen szélesztéses tenyésztés eredményeit táblázatos formában foglaltuk össze (7. táblázat).

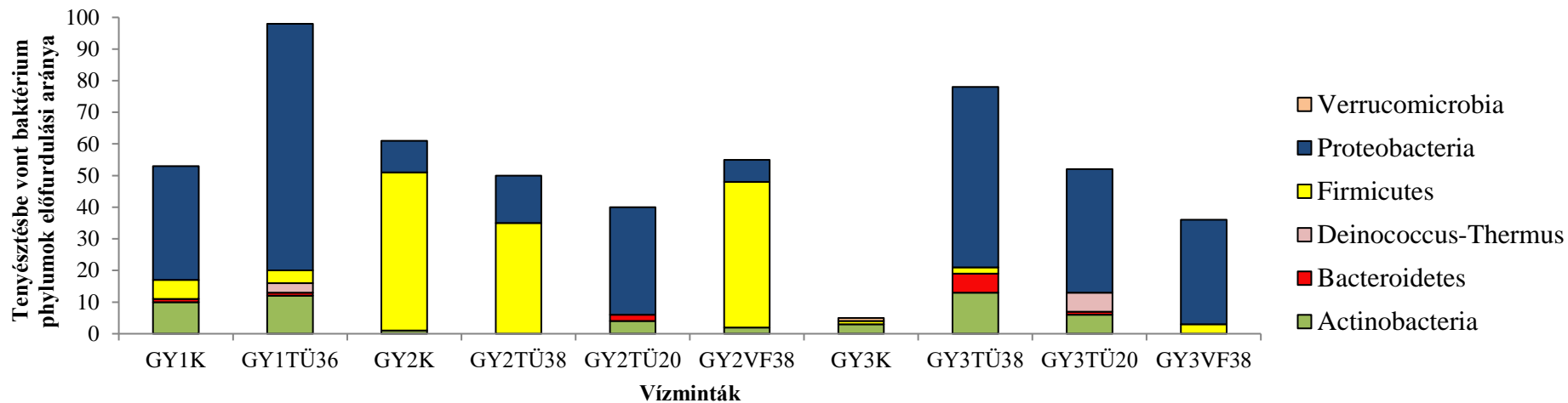
GY1K	GY2K	GY3K
<i>Brevibacillus</i>	<i>Brevibacillus</i>	<i>Brevibacillus</i>
<i>Micrococcus</i>	<i>Micrococcus</i> *	<i>Micrococcus</i>
<i>Ferrovibrio</i>	<i>Ferrovibrio</i>	<i>Meiothermus</i>
<i>Brevundimonas</i> *	<i>Brevundimonas</i>	<i>Mycobacterium</i>
<i>Brachybacterium</i> *		<i>Roseimicrobium</i>
<i>Bacillus</i>		
<i>Caldibacterium</i> *		
<i>Chthonobacter</i>		
<i>Corynebacterium</i> *		
<i>Ferrovibrio</i>		
<i>Limnobacter</i>		
<i>Methylobacterium</i> *		
<i>Micrococcus</i>		
<i>Nocardioides</i> *		
<i>Paracoccus</i> *		
<i>Pseudomonas</i> *		
<i>Sphingobacterium</i> *		
<i>Sphingopyxis</i> *		
<i>Tistrella</i> *		

7. táblázat. A vizsgált kútvizekből (GY1K, GY2K, GY3K) tenyésztési módszerekkel kimutatott baktérium nemzetségek, a * -gal jelöltek esetében az izolált baktériumok száma 1. A táblázatban piros színnel bekeretezve jelöltük azokat a nemzetségeket, amelyeket több gyógyfürdő kútvizéből is tenyésztésbe vontunk.

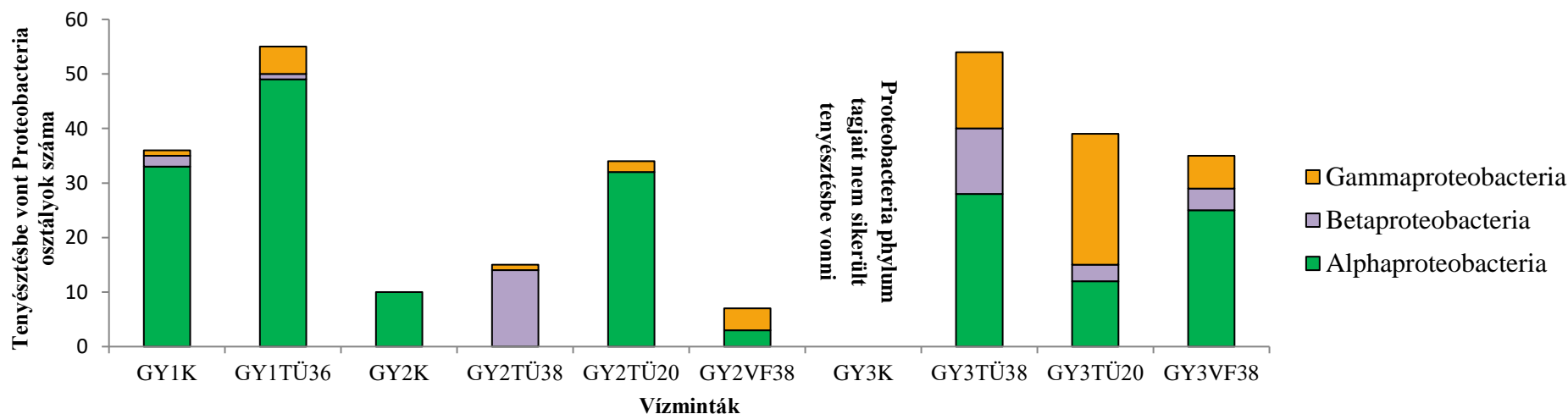
Közvetlen szélesztési módszerrel a GY1 kútvíz esetében a Proteobacteria és az Actinobacteria törzs, a GY2K esetében a Firmicutes és Proteobacteria, míg a GY3 kútvíz esetében az Actinobacteria törzs képviselőit sikerült a legnagyobb számban kitenyészteni (2/a. ábra). A Proteobacteria phylumot 2 kútvíz esetében tenyésztésbe vontuk, az osztályok megoszlását a 2/b. ábra szemlélteti. A Proteobacteria képviselői a környezetben széles körben elterjedtek, különböző vizes közegek jellemző baktériumai. A GY1 és GY2 kútvizek esetében az Alphaproteobacteria osztály képviselői voltak dominánsak.

Az eredmények alapján a GY1 gyógyfürdő esetében a kútvíz baktérium nemzetségei a *Chthonobacter*, *Chelatococcus*, *Micrococcus*, *Ferrovibrio*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, és *Pseudomonas* nemzetség képviselői (7. táblázat). A *Bacillus* és *Pseudomonas* nemzetségeket közvetlen szélesztési és dúsítási technikával egyaránt kimutattuk, míg a többi nemzetséget kizárólag dúsítás segítségével sikerült tenyésztésbe vonni.

A GY2 kútvizében tenyésztési módszerekkel a *Brevibacillus* nemzetség volt domináns, továbbá a *Ferrovibrio* és *Brevundimonas* képviselőit sikerült tenyésztésbe vonni. A GY3 kútvizből kevés baktériumot sikerült kitenyészteni, ez feltehetően a kútvíz magas hőmérsékletének köszönhető: nemzetségei a *Brevibacillus*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Roseimicrobium* és *Meiothermus* nemzetség képviselői, utóbbit kizárólag dúsítási technikával sikerült kimutatni (7. táblázat).



2/a ábra. Tenyésztés (közvetlen szélesztés) vizsgálatok során izolált baktérium phylumok aránya a vizsgált vízmintákban. GY1K, GY2K, GY3K: kútvizek, TÜ36: 36°C-os töltő-ürítő medencék; TÜ38: 38°C-os töltő-ürítő medencék; TÜ20: 20°C-os töltő-ürítő medencék; VF38: 38°C-os visszaforgatásos medencék.



2/b ábra. A Proteobacteria phylum osztályainak megoszlása a vízmintákban. GY1K, GY2K, GY3K: kútvizek, TÜ36: 36°C-os töltő-ürítő medencék; TÜ38: 38°C-os töltő-ürítő medencék; TÜ20: 20°C-os töltő-ürítő medencék; VF38: 38°C-os visszaforgatásos medencék.

A kútvizek baktériumközössége változatos képet mutatott, néhány nemzetség tekintetében tapasztaltunk átfedést a vizsgált gyógyfürdők között: a *Brevibacillus* és *Micrococcus* nemzetség mindhárom fürdő forrásában megtalálható, a *Ferrovibrio* és *Brevundimonas* képviselői pedig a GY1 és GY2 kútvizében voltak jelen. Mindegyik nemzetségről ismert, hogy különböző vizes környezeteket népesítenek be (Sikorski és mtsai, 2002; Busse és mtsai, 2002; Szuróczki és mtsai, 2016).

A GY2 és GY3 kútvizek jellemző domináns szervezete a *Brevibacillus choshinensis*, amelyet először Japánban földmintákból izoláltak (Takagi és mtsai, 1993). Növekedési optimuma 30-40°C között tapasztalható, különböző fehérjéket és toxinokat is képes kiválasztani a környezetébe, melyek által más szervezetek növekedését gátolja (D'Urzo és mtsai, 2013), ezáltal lehetséges, hogy az általa termelt antimikrobiális anyagok tehetőek felelőssé a dominanciájáért a tenyésztéses vizsgálatok során. Mindezek mellett könnyen tenyészthető mikroorganizmus, amely túlnőhet a közösség többi tagját.

Szintén a GY2 és GY3 kútvizekben megtalálható volt a *Ferrovibrio denitrificans*, egy fakultatív anaerob, vas(II)-oxidáló baktérium, melyet Oroszországban egy alacsony sókoncentrációjú forrásból izoláltak először (Sorokina és mtsai, 2012). Valószínűleg a kútvizek kémiai paraméterei kedveznek ezen baktérium megjelenésének, tenyésztésbe vonni nem nehéz, hiszen organotróf, lithoheterotróf és mixotróf növekedésre is képes, szaporodásának hőmérsékleti optimuma 35-45°C-ig terjed. Anyagcseréjére jellemző, hogy a nitrátot elektron akceptorként használja fel.

A GY2 és GY3 kútvizekből a *Micrococcus aloeverae*-t is sikerült kimutatni. A *Micrococcus* nemzetség fajai a környezetben (természetes vizek, levegő, talaj stb.) széles körben elterjedtek, munkánk során mindhárom gyógyfürdőből kimutattuk a nemzetség képviselőit.

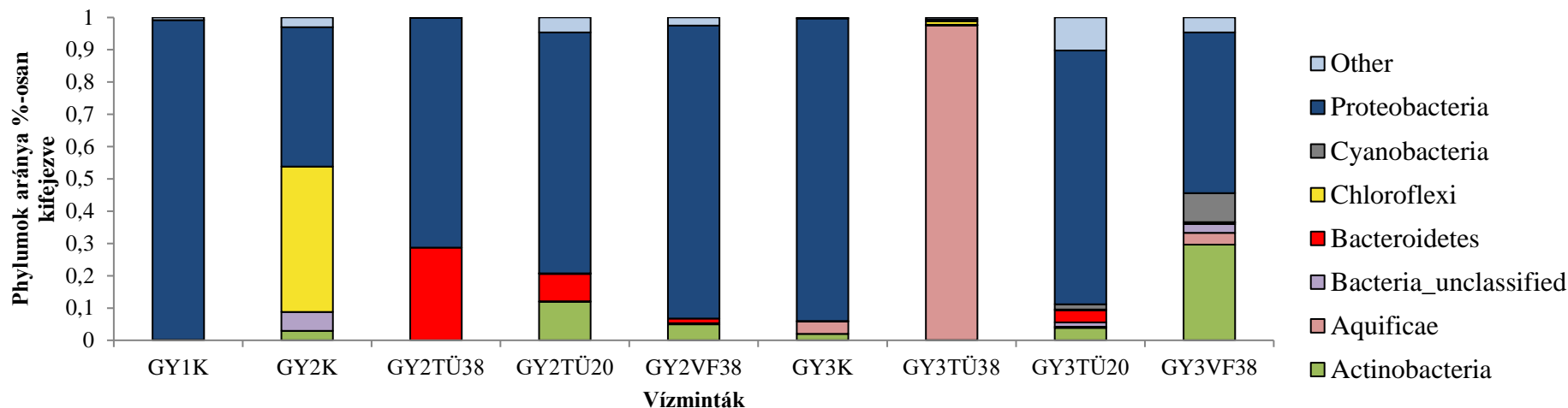
Tenyésztéses vizsgálatok során kizárólag a GYF3 76°C-os forrásvizéből mutattuk ki a *Meiothermus silvanus* és *Roseimicrobium gellanilyticum* baktériumokat. Előbbit purhab tömbös dúsítás segítségével sikerült tenyésztésbe vonni, korábban különböző forrásvizekből izolálták, mint termofil, jellegzetes sárga biofilmeket képező szervezetet (Sikorski és mtsai, 2010). A *R. gellanilyticum* baktériumot elsőként talajmintából írták le, neve is utal gellánbontó tulajdonságára (Otsuka és mtsai, 2013). Vizsgálataink során kizárólag a gelrite szilárdító ágenssel készített minimál médium táptalajról izoláltuk. A doktori kutatás során tenyésztésbe vont baktériumfajokat, a 16S rRNS gén szekvencia hasonlósági értékeket és az izolált baktériumok számát a Függelék 11, 11.8. pontjában található táblázatok tartalmazzák.

Az NGS vizsgálatok során meghatároztuk az egyes minták szekvencia számát és diverzitás indexeit, valamint fajszámbecslő indexeit az eredményeket a 8. táblázat szemlélteti.

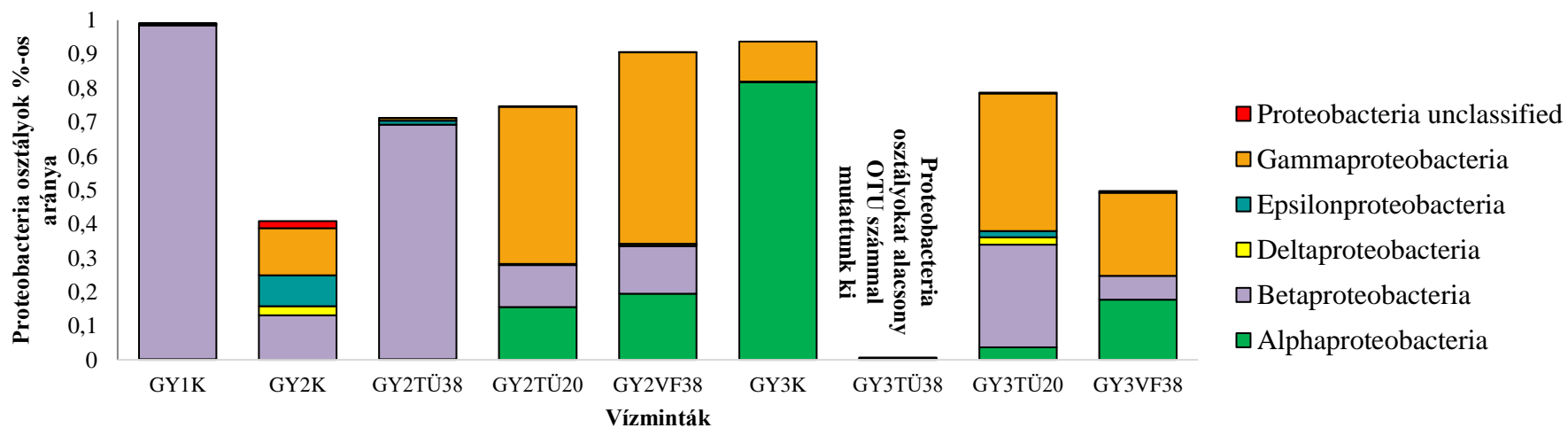
Víz minta	Szekvenciaszám	OTU-k száma	Fajszámbecslő indexek		Diverzitás indexek	
			Chao	ACE	Inverz Simpson	Shannon
GY1K	2610	13	14	14	1,04	0,1
GY2K	1424	40	40	41	7,1	2,6
GY2TÜ38	11320	16	32	33	1,8	0,8
GY2TÜ20	8233	145	232	233	11,8	3,6
GY2VF38	5662	109	258	160	3,5	2,4
GY3K	1867	30	31	32	1,8	1,2
GY3TÜ38	15499	19	51	52	1,1	0,2
GY3TÜ20	3750	204	270	270	8,5	3,4
GY3VF38	2884	125	139	139	26,2	3,8

8. táblázat. A 16S rDNS ampikon szekvenálással kapott bakteriális OTU szám és diverzitás indexek. GY2, GY3: kútvizek; TÜ38: 38°C-os töltő-ürítő medencék; TÜ20: 20°C-os töltő-ürítő medencék; VF38: 38°C-os visszaforgatásos medencék. A színskála az alacsonyabb értékektől (zöld) halad a legmagasabb értékig (piros).

A kútvizek közül a legmagasabb szekvencia szám a GY1K vízmintára volt jellemző (2610), azonban a diverzitás indexeket tekintve ehhez a mintához tartoztak a legalacsonyabb értékek. A GY2K és GY3K minták hasonló fajszámmal jellemezhetők, diverzitás indexeket tekintve azonban a GY2K mintához magasabb értékek társultak. A medence vizekben minden esetben magasabb értékek figyelhetők meg, közülük a 20°C-os töltő-ürítő és a kültéri vízforgatásos medencék magasabb szekvencia számmal, OTU számmal és diverzitás indexekkel jellemezhetők. A legmagasabb Inverz Simpson és Shannon diverzitás érték a kültéri vízforgatásos GY3VF38 medencéhez tartozik. Újgenerációs szekvenálással a GY1 kútvízben a Proteobacteria törzs (3/a. ábra), Betaproteobacteria osztály bizonyult dominánsnak, a további rendszertani kategóriákat tekintve azonban a 80 alatti bootstrap érték miatt az „unclassified” Betaproteobacteria taxonómiai rangot jelöltük meg. Ez a kategória a GY1K mintában 99%-os aránnyal volt jellemezhető, ennek köszönhető alacsonyabb Shannon-diverzitás index, a többi kútvízhez viszonyítva. A GY2 kútvízben a Proteobacteria (Betaproteobacteria és Gammaproteobacteria) (3/b. ábra) és Chloroflexi (Anaerolinea) törzsek jelentek meg a legnagyobb relatív abundanciával, ezek mellett az Actinobacteria képviselőit is kimutattuk. A GY3 fürdő kútvizét tekintve, szintén a Proteobacteria dominanciáját figyelhetjük meg (Alphaproteobacteria), valamint az Actinobacteria és Aquificae phylumokat is detektáltuk. Utóbbi kizárólag a GY3 gyógyfürdőben volt jelen (3/a. ábra).

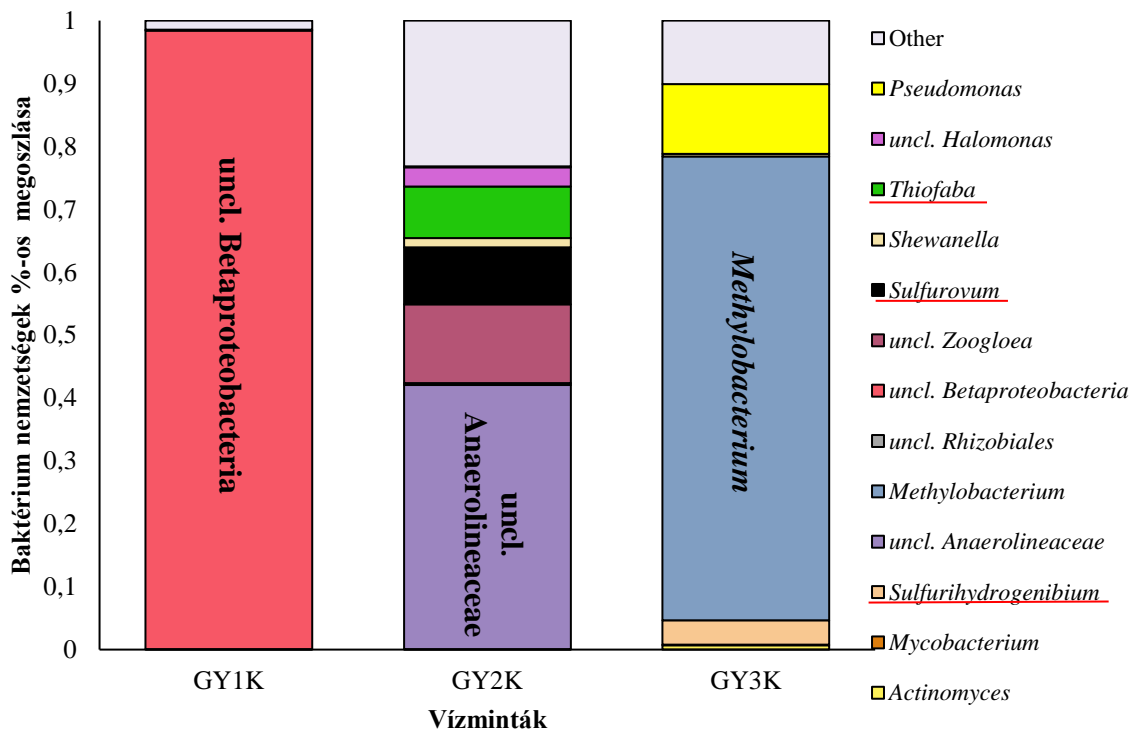


3/a. ábra. Az Újgenerációs szekvenálás során kimutatott baktérium phylumok %-os aránya a vizsgált vízmintákban. GY1K, GY2K, GY3K: kútvizek; TÜ36: 36°C-os töltő-ürítő medencék; TÜ38: 38°C-os töltő-ürítő medencék; TÜ20: 20°C-os töltő-ürítő medencék; VF38: 38°C-os visszaforgatásos medencék.



3/b. ábra. A Proteobacteria phylum osztályainak megoszlása a vízmintákban. GY1K, GY2K, GY3K: kútvizek; TÜ36: 36°C-os töltő-ürítő medencék, TÜ38: 38°C-os töltő-ürítő medencék TÜ20: 20°C-os töltő-ürítő medencék, VF38: 38°C-os visszaforgatásos medencék.

A GY2K mintában nemzetségek tekintetében domináns az „unclassified” Anaerolineaceae (Chloroflexi), míg a Proteobacteria törzs esetében a *Sulfurovum*, *Thiofaba*, *Shewanella*, *Mycobacterium*, *Actinomyces* és *Pseudomonas* és az „unclassified” *Zoogloea* nemzetség tagjai voltak jellemzők. A GY3 kútvíz esetében NGS módszerrel a *Methylobacterium* nemzetség jelent meg a legnagyobb relatív abundanciával. További jellemző nemzetségei a fürdő kútvizének a *Sulfurihydrogenibium*, *Mycobacterium*, *Actinomyces*, *Shewanella* és a *Pseudomonas* voltak (4. ábra).



4. ábra. A kútvizekből újgenerációs szekvenálással kimutatott baktérium nemzetségek. uncl.=unclassified.

Az általunk vizsgált kútvizek nagy szulfát tartalmúak, ennek köszönhetően különböző, a kén körforgalomban szerepet játszó taxonokat is kimutattunk, mint pl. a *Sulfurovum*, *Thiofaba* és *Sulfurihydrogenibium* nemzetségeket NGS módszerrel, utóbbit kizárólag a GY3 gyógyfürdőből. Kemolitoautotróf kénbaktériumokat termálforrásokból korábban szerte a világon már leírtak, anyagcsere tulajdonságaik révén a közösségek fontos tagjai. A *Sulfurovum* nemzetség képviselői mezofil, fakultatív anaerob, kén- és tioszulfát oxidáló szervezetek. Néhány típusfaja a nemzetségnek a hidrotermális kúrtókban kimutatott *Sulfurovum lithotropicum* (Inagaki és mtsai, 2004), *S. denitrificans* (Mori és mtsai, 2018), *S. riftiae* (Giovanelli és mtsai, 2016) fajok. A *Thiofaba* nemzetséghez obligát aerob kemolitoautotróf baktériumok tartoznak, kén-, szulfid- és tioszulfát oxidáló baktériumok. Termálforrásokból kimutatott képviselői például a *Thiofaba tepidiphila* (Mori és mtsai, 2008). A

Sulfurihydrogenibium nemzetség tagjai fakultatív anaerob, termofil, szulfid-, kén- és tioszulfát oxidálók, melyeket kénes hévforrásokból izoláltak szerte a világon. Néhány példa a nemzetség képviselőire: *Sulfurihydrogenibium subterraneum* (Takai és mtsai, 2003), *S. yellowstonense* (Nakagawa és mtsai, 2005), *S. azorensis* (Aguilar és mtsai, 2004), *S. rodmanii* (O’Neill és mtsai, 2008) és *S. kristjanssonii* (Flores és mtsai, 2008).

A GY3 kútvízben a fakultatív metilotróf (szén-szén kötést nem tartalmazó vegyületeket hasznosító, ún. C1 baktériumok) *Methylobacterium* nemzetség volt jellemezhető a legnagyobb relatív abundanciával (4. ábra). Amin és mtsai (2017) 9 termálforrás vizsgálata során metilotróf baktériumokat írtak le, mint a közösség domináns tagjait: *Methylobacterium*, *Methyloligella*, *Methyloversatilis*, *Methylothermus* baktériumokat.

A kútvizekből számos olyan baktérium taxont mutattunk ki, amelyeket korábban vizes környezetekből, termálforrásokból leírtak és anyagcsere tulajdonságaik révén az ökoszisztémák fontos tagjai, továbbá hozzájárulnak a kútvizek kémiai összetételének szabályozásához is. Tenyésztéses vizsgálataink során a Firmicutes phylum tagjai (*Brevibacillus*, *Bacillus*) nagy számban kimutathatóak voltak, több esetben gyors növekedésüknek és anyagcsere tulajdonságaiknak köszönhetően domináns szervezetekként jelentek meg. Valódi dominanciáról azonban a tenyésztéses módszerek „hátrányai” miatt nem beszélhetünk, a táptalajok szelektív hatása, mikrobák anyagcsere tulajdonságainak (pl. antimikrobiális anyagtermelés) vagy az inkubációs hőmérséklet miatt.

NGS segítségével a tenyésztésbe vont szervezetek mellett olyan mikroorganizmusokat is kimutattunk, amelyeket termálforrásokban/egyéb vizes környezetekben megtalálhatók, és a nitrogén vagy a kén körforgalmában kulcsfontosságú szerepet tölthetnek be, ezáltal a közösség fontos tagjai, mivel fontos szerepet töltenek be a közösségi anyagcserében.

A kútvizek eltérő közösségét számos tényező befolyásolja, így az eltérő fizikai-kémiai jellemzők, mint a források mélysége (aerob, anaerob viszonyok), hőmérséklete, kémiai összetétele, amelyekhez a prokarióták változatos anyagcseréjükkel alkalmazkodnak. A mikrobák anyagcsere tulajdonságainak nagyon fontos szerepe van a víz kémiai minőségének szabályozásában, továbbá ezen jellemzők ismerete segíthet megérteni a prokarióták közötti kapcsolatot, valamint a környezetben betöltött szerepüket. A molekuláris vizsgálatok során „unclassified”-ként jelölt taxonok ugyanakkor felhívják a figyelmet arra, hogy lehetséges, hogy a gyógyfürdők vizében számos, a tudomány számára nézve új baktérium is található. Ennek igazolása további kutatások tárgyát képezhetik.

6.4. Medencevizek jellemző baktériumközösségei

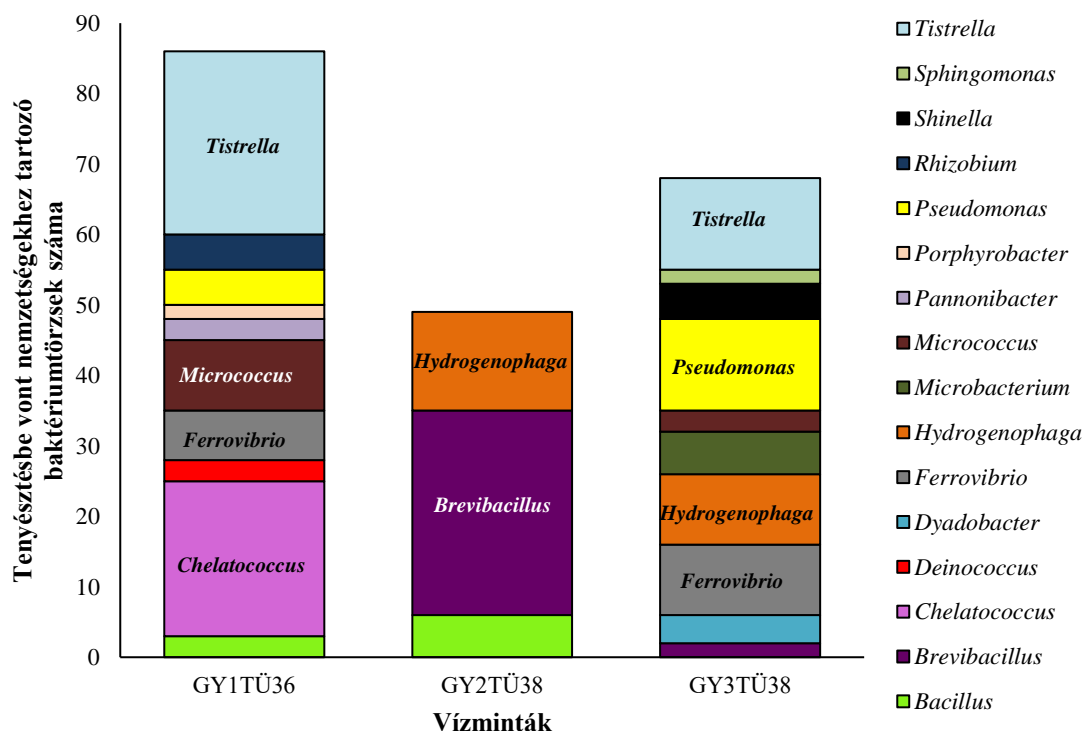
Az általunk vizsgált medencék eltérő elhelyezkedésűek, vízkezelésűek és hőmérsékletűek, ezért a továbbiakban ezen paraméterek figyelembevételével hasonlítjuk össze a medencék baktériumközösségeit. A GY1 fürdő medencéjéből csak tenyésztési vizsgálatokat, míg a GY2 és GY3 fürdő esetében tenyésztéstől független eljárásokat is alkalmaztunk.

Az NGS vizsgálatok során kapott szekvenciaszámokat tekintve általánosságban elmondhatjuk, hogy a töltő-ürítő medencék magasabb szekvencia számmal jellemezhetők, a vízforgatásos medencékhez képest (8. táblázat). A fajszámbecslő és diverzitás indexek változatos képet mutatnak, mindkét fürdőben (GY2, GY3) a beltéri töltő-ürítő 20°C-os és a kültéri vízforgatásos medencékhez tartoztak magasabb értékek.

6.4.1. Beltéri, töltő-ürítő rendszerű 36-38°C-os medencék baktériumközösségei

Mindhárom gyógyfürdő esetében vizsgáltunk 1-1, zárt térben elhelyezkedő, töltő-ürítő rendszerű medencét (GY1TÜ36, GY2TÜ38 és GY3TÜ38 minták).

A GY1TÜ 36 medencében tenyésztési módszerekkel a Proteobacteria törzs (Alphaproteobacteria osztály) bizonyult dominánsnak (2/a. ábra). Legnagyobb számban a *Tistrella* és a *Chelatococcus* nemzetségekbe tartozó baktériumok voltak jelen (5. ábra).



5. ábra. A beltéri töltő-ürítő 36-38°C-os medencékből tenyésztési vizsgálatokkal kimutatott baktérium nemzetségek.

Mivel a medence vize a kútvízből származik, néhány nemzetség (*Bacillus*, *Ferrovibrio*, *Micrococcus*, *Nocardioides*, *Porphyrobacter*, *Pseudomonas*, *Tistrella*) a kútvízből és a medencék vizéből is kimutatható, de a kútvíz és a medence baktériumközössége között kevés átfedést tudunk kimutatni (9. táblázat). A medence vizéből több olyan baktériumfajt is izoláltunk, amelyek képesek egyedüli szénforrásként aminosavakat hasznosítani, mint pl. *Kinneretia asaccharophila* (Gomila és mtsai, 2010), *Acinetobacter baumannii* (Bouvet és Grimont, 1986), *Fictibacillus nanhaiensis* (Chen és mtsai, 2010), *Pannonibacter phragmitetus* (Borsodi és mtsai, 2003), *Phenylobacterium falsum* (Tiago és mtsai, 2005), *Rhizobium alkalisoni* (Lu és mtsai, 2009), *Porphyrobacter colymbi* (Furuhata és mtsai, 2013) és *Pseudomonas knackmussii* (Stolz és mtsai, 2007) fajok. Ezen mikrobák részben az emberi hámfelületről származó fehérjék bomlástermékeit használhatták fel szénforrásként (Yassin és mtsai, 2006).

A GY1TÜ36 medence vizének egyik domináns baktériumfaja a *Tistrella mobilis* volt, amelyet eddig a Közép-Atlanti-hátságából (Cui és Shao, 2009) és szennyvízből (Shi, 2002) származó vízmintákból írtak le. Ez a baktérium irodalmi adatok szerint egy didemnin nevű antimikrobiális vegyületet termel, ezáltal nem kizárt, hogy az általa termelt antimikrobiális anyag is felelős lehet domináns megjelenéséért.

A *Deinococcus grandis*, *Dietzia cinnamea* és *Acinetobacter baumannii* fajokat korábban humán mintákból is leírták, és ezek a fajok az általunk vizsgált GY1 fürdő medencéjének vizében is megtalálhatóak voltak. A *Deinococcus grandis* fajt a Human Microbiome Project során emberi bőrfelületről izolálták (The NIH HMP working group, 2009). A *Dietzia cinnamea* fajt egy csontvelő transzplantáción átesett páciens végbélkörnyéki bőrfelületéről írták le (Yassin és mtsai, 2006). Az *Acinetobacter baumannii*, amelyet a vízminőség indikátor szervezetként is használnak, egy opportunista patogén, amely legyengült szervezetű emberekben tüdőgyulladást, húgyúti fertőzéseket, sebfertőzéseket és agyhártyagyulladást okozhat (Choi és mtsai, 2008).

A medencéből izolált *Bacillus licheniformis* szintén opportunista patogén, amely szepszist (Haydushka és mtsai, 2012), szívbelhártya gyulladást (Santini és mtsai, 1995) és ételmérgezést (Mikkola és mtsai, 2003) képes okozni; a *Pseudomonas alcaligenes* a véráramba kerülve szívbelhártya gyulladást okozhat, de súlyos fertőzéseket viszonylag csak ritkán vált ki (Flores-Carrero és mtsai, 2016). Patogénként azonban olyan mérgezőanyagok termelésére is képes, melyek a környező mikroorganizmusokra, illetve a fertőzött sejtekre citotoxikus hatással vannak (Silverman és mtsai, 2013). Megjegyzendő, hogy az általunk izolált *Pseudomonas* fajok patogenitási faktorait nem vizsgáltuk. Valenstein és munkatársai (1983) eredetileg endocarditist

okozó opportunistá patogénként írták le, bár azóta számos, természetes környezetben kimutatták.

A GY2TÜ38 medencében tenyésztési módszerekkel viszonylag kevés baktériumot mutattunk ki, több nemzetség esetében csupán a nemzetség 1-1- képviselőit. A vizsgálatok során a Firmicutes (Bacilli osztály) és a Proteobacteria (Betaproteobacteria osztály) képviselői jelentek meg a legnagyobb számban. A Firmicutes dominanciája a *Bacillus* nemzetségbe tartozó baktériumoknak köszönhető - érdemes azonban megjegyezni, hogy a *Bacillus* nemzetség tagjai endospórát képeznek, így gyakran inaktív, „dormans” állapotban képesek túlélni bizonyos környezetekben. Tenyésztés során, mivel általában jól növekedő, heterotróf baktériumok, a táptalajokon gyakran „túlnövik” a lassabban szaporodó társaikat. Ezért itt valódi dominanciáról nem beszélhetünk, bár kétségtelenül a tenyésztés során ezen osztály tagjait találtuk meg legnagyobb számban. Tenyésztési módszerekkel a medence baktérium közösségének jellegzetes tagjai továbbá a *Hydrogenophaga atypica* és a *Pseudomonas stutzeri* baktériumok voltak. Kämpfer és mtsai a *Hydrogenophaga atypica*-t először eleveniszapból izolálták Németországban (Kämpfer és mtsai, 2005). Nemzetségének egyéb képviselőivel ellentétben nem képes H₂-n történő kemolitotróf szaporodásra.

A *Pseudomonas stutzeri* a természetben széleskörűen elterjedt baktérium. Leggyakrabban különféle vizes, illetve vizekhez köthető élőhelyeken fordul elő (Sikorski és mtsai, 2002), ugyanakkor emberekben opportunistá patogénként is megjelenhet (Lalucat és mtsai, 2006), legelőször gerincvelői folyadékából izolálták (Noble és mtsai, 1994). Számos fertőzés esetében kimutatták pl. endocarditis esetében (Halabi és mtsai, 2019), érrendszeri beavatkozások után (Bonares és mtsai, 2016), légúti és húgyúti fertőzések során (Deshpande és mtsai, 2014).

A GY2TÜ38 medencében NGS módszerrel a Proteobacteria mutatható ki a legnagyobb relatív abundanciával, a Betaproteobacteria osztály által. A tenyésztési módszerekkel összehasonlítva a *Hydrogenophaga* nemzetség bizonyult abszolút dominánsnak a medencéből. Az NGS vizsgálatok alapján a Proteobacteria phylum mellett a Bacteroidetes képviselőit is sikerült kimutatni, a *Cloacibacterium* nemzetség képviselőinek szekvenciái jelentős számban kerültek elő ebből a mintából. Ezt a baktériumot különböző környezetekből: édesvízi üledékből, szennyvízből, szennyvíziszapból és állatok béltraktusából korábban izolálták, ezáltal feltételezhető, hogy a medencébe antropogén úton kerülhetett be.

A GY3TÜ38 medencében tenyésztéssel a Proteobacteria és az Actinobacteria törzs bizonyult dominánsnak, a *Pseudomonas*, *Ferrovibrio*, *Hydrogenophaga* és *Microbacterium* nemzetségek által. A medence vizéből néhány fakultatív kórokozó baktériumot is kimutattunk, mint például *Pseudomonas aeruginosa*, *Microbacterium paraoxydans*, *Moraxella osloensis*.

GY1TÜ36	GY2TÜ38	GY2TÜ20	GY2VF38	GY3TÜ38	GY3TÜ20	GY3VF38
<i>Acinetobacter</i> *	<i>Bacillus</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Achromobacter</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Acidovorax</i>
<i>Azospirillum</i> *	<i>Brevibacillus</i>	<i>Brevundimonas</i>	<i>Blastomonas</i>	<i>Azospirillum</i>	<i>Brevundimonas</i>	<i>Allorhizobium</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Hydrogenophaga</i>	<i>Flavobacterium</i>	<i>Brevibacillus</i>	<i>Bosea</i>	<i>Chryseobacterium</i>	<i>Bacillus</i>
<i>Blastomonas</i> *	<i>Pseudomonas</i> *	<i>Micrococcus</i> *	<i>Microbacterium</i> *	<i>Brevibacillus</i>	<i>Deinococcus</i>	<i>Hydrogenophaga</i>
<i>Brevundimonas</i> *		<i>Mycobacterium</i> *	<i>Micrococcus</i> *	<i>Brevundimonas</i>	<i>Ensifer</i>	<i>Jeotgalibacillus</i>
<i>Caenispirillum</i> *		<i>Paracoccus</i> *	<i>Porphyrobacter</i>	<i>Chelatococcus</i>	<i>Gordonia</i>	<i>Methyloversatilis</i>
<i>Chelatococcus</i>		<i>Porphyrobacter</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Dyadobacter</i>	<i>Hydrogenophaga</i>	<i>Porphyrobacter</i>
<i>Deinococcus</i>		<i>Rhizobium</i>		<i>Ferrovibrio</i>	<i>Kocuria</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Dietzia</i> *		<i>Rhodococcus</i> *		<i>Hydrogenophaga</i>	<i>Methyloversatilis</i>	<i>Rhizobium</i>
<i>Ferrovibrio</i>		<i>Sphingomonas</i> *		<i>Janibacter</i>	<i>Moraxella</i>	<i>Sphingopyxis</i>
<i>Fictibacillus</i> *		<i>Sphingopyxis</i> *		<i>Kocuria</i>	<i>Paracoccus</i>	
<i>Gellertiella</i> *				<i>Leadbetterella</i>	<i>Pseudomonas</i>	
<i>Kinneretia</i> *				<i>Microbacterium</i>	<i>Pseudoxanthomonas</i>	
<i>Micrococcus</i>				<i>Micrococcus</i>	<i>Rheinheimera</i>	
<i>Pannonibacter</i>				<i>Niveispirillum</i>	<i>Rhizobium</i>	
<i>Phenylobacterium</i> *				<i>Pseudomonas</i>	<i>Sphingopyxis</i>	
<i>Porphyrobacter</i>				<i>Rhizobium</i>		
<i>Pseudomonas</i>				<i>Roseimicrobium</i>		
<i>Rhizobium</i>				<i>Shinella</i>		
<i>Sphingobacterium</i> *				<i>Sphingomonas</i>		
<i>Tistrella</i>				<i>Tistrella</i>		
				<i>Vogesella</i>		
				<i>Xanthobacter</i>		

9. táblázat. A medencékből tenyésztési módszerekkel kimutatott baktérium nemzetségek. TÜ36: 36°C-os töltő-ürítő medence; TÜ38: 38°C-os töltő-ürítő medencék; TÜ20: 20°C-os töltő-ürítő medencék; VF38: 38°C-os visszaforgatásos medencék. A *-gal jelölt nemzetségek esetében az izolált baktériumok száma 1.

A *Pseudomonas aeruginosa* a környezetben széles körben elterjedt, vizes környezetek gyakori baktériuma, nozokomiális fertőzése okozója, különböző rezisztencia mechanizmusai révén. A beltéri medencék fontos rezervoárt jelentenek ezen baktériumoknak, mivel az emberi bőr és a zárt tér és a hőmérséklet optimális környezetet biztosítanak számukra. Irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy a medencék és pezsgőkádak különösen kedveznek a *P. aeruginosa* megtelepedésének, a nehezen fertőtleníthető eleményelemeken (fűvókák) kialakuló biofilmek által (Lutz és mtsai, 2011). Megjegyzendő, hogy ez nemcsak a *P. aeruginosa* esetében igaz, hanem valamennyi mikroorganizmusra is. Az aerob *Microbacterium paraoxydans* a medencében alacsony számban fordult elő. Irodalmi adatok szerint egyes egészségügyi intézményekben opportunistá patogénként nozokomiális fertőzések kialakulásában játszhat szerepet főként legyengült immunrendszerű egyének esetében (Chorost és mtsai, 2018).

A *Moraxella osloensis* szintén nozokomiális fertőzések okozója, számos környezetből izolálták már korábban, többek között különböző kórházi berendezésről, egészséges felnőttek légzőtraktusából is, valamint fül, orr és garat problémával rendelkező egyénekből. Ezt a baktériumot a doktori kutatás során több medencéből is sikerült tenyésztésbe vonni: a GY3 fürdő mindkét töltő-ürítő medencéjéből, a nemzetség jelenlétét NGS segítségével pedig a GY2 fürdő minden medencéjéből kimutattuk.

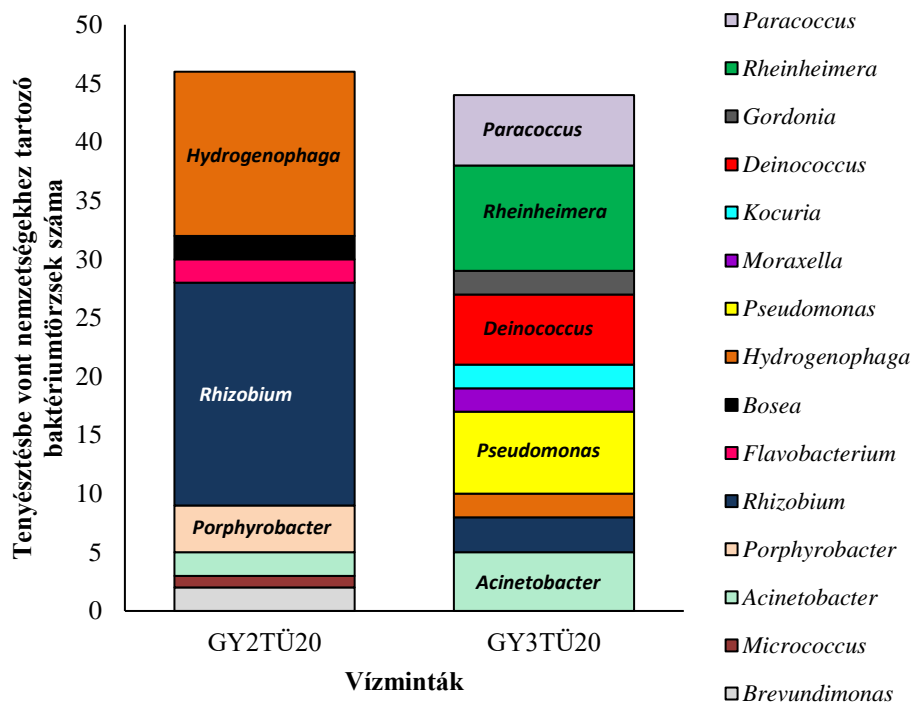
NGS-sel a GY3TÜ38 medencében az Aquificae bizonyult dominánsnak, emellett a tenyésztéses vizsgálatokkal megegyezően a Proteobacteria és az Actinobacteria törzsek képviselői szintén kimutathatók. A medence domináns nemzetsége, a kútvízben is magas relatív abundanciával jelentkező *Sulfurihydrogenibium*, dominanciája feltehetően a víz kémiai összetételének köszönhető. A kútvízhez hasonlóan további, a kén körforgalomban szerepet játszó taxonok is megtalálhatók a medencében (*Sulfurovum*). A medencéből kimutatott további nemzetségek a *Hydrogenophaga*, *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Moraxella* (6. ábra). A medencék esetében is láthattuk, hogy a NGS-sel több esetben is „unclassified”-ként jelöltük meg a taxonómiai csoportokat, tehát nemcsak a kútvizekre igaz az a feltételezés, hogy az általunk vizsgált medencevizekben is megtalálhatóak akár a tudomány számára új baktériumok.

6.4.2. Beltéri, töltő-ürítő 20°C-os medencék összehasonlítása

A GY2 és GY3 fürdőben vizsgáltunk beltéri, töltő-ürítő, 20°C-os, szaunázás után használatos, merülő medencéket.

A GY2TÜ20 medencében tenyésztéses módszerekkel viszonylag kevés taxont sikerült kimutatni: a Proteobacteria törzs bizonyult dominánsnak a *Rhizobium herbae* által, amelyet eredetileg gyökérgümőkéből izoláltak (Rhen és mtsai, 2011). Ezt a baktériumot a kútvízből nem mutattuk ki az általunk alkalmazott módszerekkel, továbbá a fürdő többi medencéjében sem

volt jellemző, ezért feltételezhetően a külső környezetből került a medencébe. A *Rhizobium* mellett kimutatott nemzetségek továbbá a medencében a *Porphyrobacter* és *Sphingophyxis* (7. ábra), számos esetben azonban tenyésztéssel az adott nemzetség csak 1-1 képviselőjét sikerült tenyésztésbe vonni (pl. *Acinetobacter*, *Bosea*, *Brevundimonas*, *Paracoccus*, *Flavobacterium*, *Mycobacterium*, *Micrococcus*) (9. táblázat).

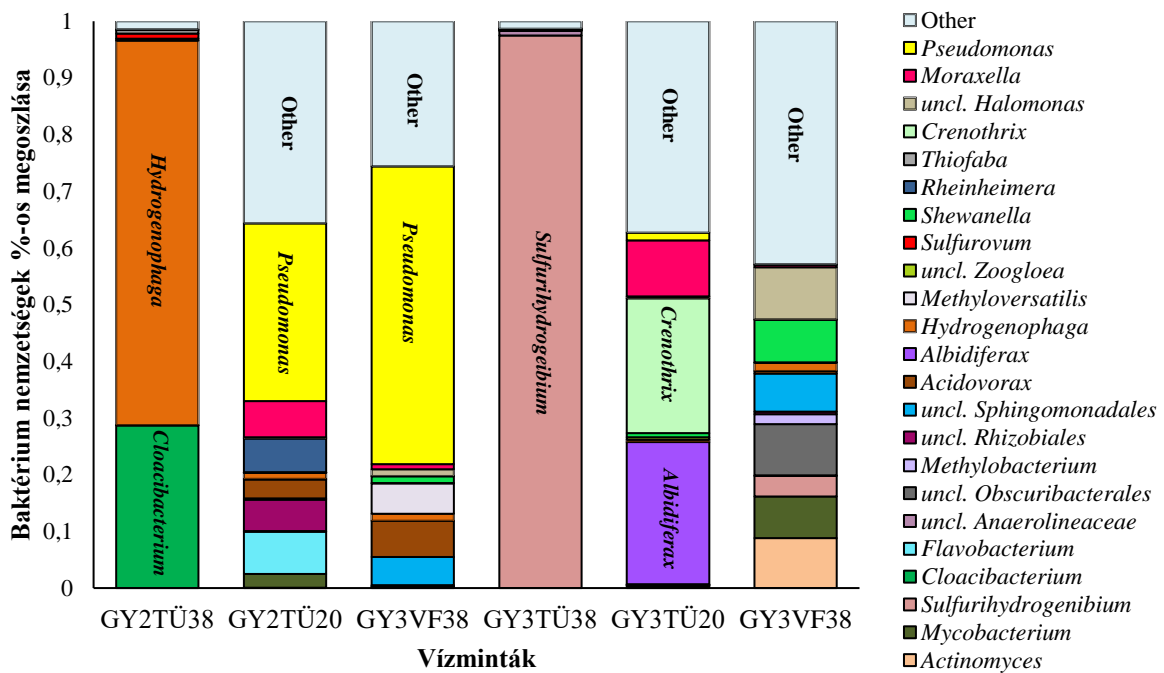


7. ábra A beltéri töltő-ürítő 20°C-os medencékből tenyésztéssel vizsgálatokkal kimutatott baktériumok nemzetségei.

NGS módszerrel szintén a Proteobacteria törzs jelent meg a legmagasabb relatív abundanciával, továbbá az Actinobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi képviselőit mutattuk ki (3/a. ábra). Domináns nemzetséggként a *Pseudomonas* jelent meg, továbbá kimutattuk a *Moraxella*, *Hydrogenophaga*, *Shewanella*, *Sulfurovum*, *Flavobacterium*, *Actinomyces* (9. táblázat) – utóbbiak alacsony relatív abundanciával jellemezhetők, akárcsak a tenyésztéssel dominánsnak bizonyult *Rhizobium* nemzetség.

A GY3TÜ20 medencében szintén a Proteobacteria törzs képviselőit sikerült a legnagyobb számban tenyésztésbe vonnunk, a *Pseudomonas*, *Rheinheimera*, *Paracoccus*, *Acinetobacter*, *Hydrogenophaga* és *Moraxella* nemzetségekkel (9. táblázat). Az NGS eredményei szintén azt mutatták, hogy a Proteobacteria törzs a domináns (3/a. ábra). Nemzetségeket tekintve a medence változatos képet mutat a molekuláris vizsgálat alapján: legnagyobb relatív abundanciával a *Crenothrix* és az *Albidiferax* volt jellemző (6. ábra), amelyek tagjai régóta

ismert, különböző vizes környezetekben megtalálható vasbaktériumok. Oswald és munkatársai (2017) a *Chrenothrix* nemzetséget, mint karsztvizekben nagyon fontos szerepet játszó metanotróf nemzetséget is azonosították (Oswald és mtsai, 2017). A *Crenothrix* genusz tagjait kizárólag ebből a medencéből mutattuk ki az általunk vizsgált összes mintából, míg az *Albidiferax* tagjai alacsony relatív abundanciával a GY2TÜ20 medencében is jelen voltak. A GY3TÜ20 további NGS-sel kimutatott nemzetségei a *Pseudomonas*, *Hydrogenophaga*, *Moraxella*, *Shewanella*, *Acidovorax*, *Methylobacterium*, *Flavobacterium* voltak (6. ábra).



6. ábra. A medencéből újgenerációs szekvenálással kimutatott baktérium nemzetségek. TÜ36: 36°C-os töltő-ürítő medence; TÜ38: 38°C-os töltő-ürítő medencék; TÜ20: 20°C-os töltő-ürítő medencék; VF38: 38°C-os visszaforgatásos medencék. uncl.=unclassified.

6.4.3. Kültéri, visszaforgatásos 38°C-os medencék összehasonlítása

A GY2 és GY3 fürdő esetében vizsgáltunk kültéri, visszaforgatásos 38°C-os medencéket, amelyek a vízkezelésnek köszönhetően folyamatos fertőtlenítőszer adagolással működnek.

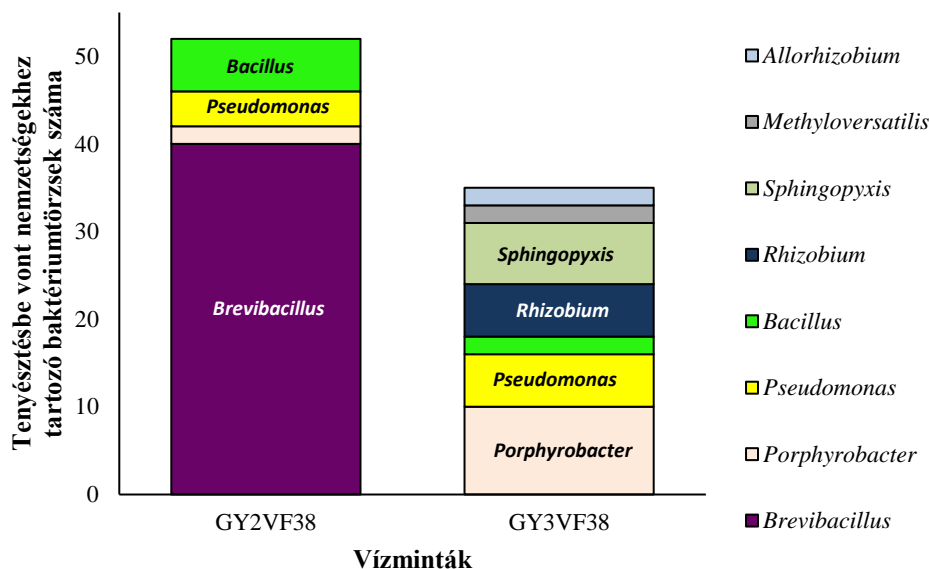
A GY2VF38 medencében a tenyésztési vizsgálatok során a *Bacillus* és *Brevibacillus* nemzetségnek köszönhetően a Firmicutes törzs képviselőit izoláltuk a legnagyobb számban, a Proteobacteria és a Deinococcus-Thermus phylumok mellett (2/a. ábra). A *Pseudomonas* nemzetség képviselőit (*P. alcaligenes*, *P. guguensis*) a *Bacillus* és *Brevibacillus* dominanciájának köszönhetően kis számban mutattuk ki. A *P. guguensis*-t először Taiwanon izolálták forró termálforrásokból (Liu és mtsai, 2013), erről a fajról nem sikerült eddig kórokozó képességet igazolni.

NGS vizsgálattal a medencében a domináns Proteobacteria phylum képviselői a *Pseudomonas*, *Acidovorax*, *Hydrogenophaga*, *Methyloversatilis*, *Sulfurovum*, *Shewanella* és *Moraxella* nemzetségek voltak (6. ábra). A gyógyfürdő beltéri töltő-ürítő 38°C-os medencéjéhez hasonlóan a *Cloacibacterium* (Bacteroidetes) nemzetséget szintén kimutattuk, bár relatív abundanciája elenyésző, a töltő-ürítő medencéhez képest.

Tenyésztéses vizsgálatokkal a fent említett Firmicutes dominancia a *Brevibacillus brevis*, *Brevibacillus choshinensis* és *Bacillus subtilis subsp. inaquorosum* fajoknak volt köszönhető, ezek a jól növekvő kemoheterotróf baktériumok újgenerációs szekvenálással nem jelentek meg, döntő többségük tenyésztéssel valószínűleg azzal magyarázható, hogy tenyésztés során túlnőhették társaikat. Alacsony számban izoláltuk a *Blastomonas natatoria*, a *Microbacterium paraoxydans*, illetve a *Micrococcus luteus* képviselőit. Az Alphaproteobacteria osztályba tartozó aerob *Blastomonas natatoria* fakultatív fototrófiára is képes baktérium (Hiraishi és mtsai, 2000). Az obligát aerob *Micrococcus luteus* a környezetben számos helyen előfordulhat: korábban izolálták úszómedencék vizéből, levegőből, porból, földből, illetve emberi hámfelületről is (Wieser és mtsai, 2002), és csak nagyon ritka esetekben válhat kórokozóvá, ekkor is a legyengült immunrendszerű egyéneket támadja meg.

A GY3VF38 medencében tenyésztéses vizsgálatokkal a Proteobacteria phylum bizonyult dominánsnak (2. ábra) a *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Porphyrobacter* és *Methyloversatilis* nemzetségek képviselőivel (8. ábra), kisebb számban a Firmicutes képsivelőit is sikerült kimutatni (*Bacillus*) (9. táblázat). Az NGS eredményei is a Proteobacteria dominanciát támasztja alá (*Pseudomonas*), a tenyésztéssel izolált nemzetségek mellett a *Hydrogenophaga*, *Sulfurovum*, *Shewanella*, *Thiofaba* és *Moraxella* nemzetségek képviselőit mutattuk ki (6. ábra). A GYF2 gyógyfürdőhöz hasonlóan ebből a medencéből is alacsony relatív abundanciával mutattuk ki a *Cloacibacterium* nemzetség tagjait, a töltő-ürítő 38°C-os medencéhez képest.

A medencéből legnagyobb számban izolált fajok a *Porphyrobacter colymbi*, *Pseudomonas guguanensis*, *Rhizobium rosettiformans* és a *Sphingopyxis flava* voltak. A *Rhizobium rosettiformans* baktériumot Kaur és mtsai (2011) Indiában hexaklórhexán szennyezett felszín



8. ábra. A kültéri vízforgatásos 38°C-os medencékből tenyésztéssel vizsgálatokkal kimutatott baktérium nemzetségek.

alatti vízmintákból izolálták. A nemzetség többi tagjához hasonlóan képes a nitrogén megkötésére (Kaur és mtsai, 2011). A nitrogén-kötésre való képesség kulcsfontosságú a tápanyagszegény környezetekben, mivel a nitrogén gyakran limitált mennyiségben fordul elő. A *Sphingopyxis* nemzetség tagjai a környezetben szintén széles körben elterjedtek (talaj, szennyvíz, felszíni vizek, sós vizek), a *S. flava* baktériumot Verma és mtsai (2015) ugyancsak hexaklórhexán szennyezett talajmintából izolálták Indiában (Verma és mtsai, 2015). A hexaklórhexán, mint növényvédőszer az 1950-es évektől elterjedt, rendkívül perzisztens, a környezetben hosszú ideig megmarad, lebontásukban a mikroorganizmusok nagyon fontos szerepet játszanak, olyan baktériumok által, mint pl. a *Rhizobium* és *Sphingobium* fajok (Chen és mtsai, 2015).

6.4.4. A kútvizek és medencevizek baktériumközösségeinek áttekintése

A kútvizek és a medencék képe változatos, a sikeresen tenyésztésbe vont baktériumokat NGS segítségével is kimutattuk, molekuláris módszerrel megjelentek továbbá olyan taxonok is, amelyeket korábban szintén molekuláris vizsgálatokkal mutattak ki szerte a világon, különböző termálforrásokból. Munkánk során a kútvizekből és a medencékből számos, vizes környezetben megtalálható taxont sikerült kimutatni az alkalmazott vizsgálati módszerekkel, mintánkenti csoportosításukat, valószínű eredetüket a 8. ábra mutatja.

A kútvizekben a Proteobacteria phylum képviselői bizonyultak dominánsnak relatív abundanciájuk alapján, az osztályok és a nemzetségek tekintetében az egyes kútvizek között azonban kevés átfedés tapasztalható, ami feltételezhetően az eltérő fizikai-kémiai tényezőknek

köszönhető. Vizsgálataink során számos olyan taxont mutattunk ki, amelyek az elemek körforgalmában fontos szerepet töltenek be, ezáltal hatással vannak az ökoszisztémákra és a víz kémiai tulajdonságaira.

A kútvizekben megtalálható taxonok (Aquificae, Proteobacteria, Firmicutes, Deinococcus-Thermus phylum tagjai) korábbi kutatások alapján termálforrásokban világszerte megtalálhatók. Jelenlétük feltételezhetően az extrém környezetnek köszönhető: a termálforrások magas hőmérséklete, kémhatása, kémiai tulajdonságai befolyásolják a termálforrásokban kialakuló természetes közösségeket. A kútvizek fizikai és kémiai paraméterei hatással vannak a természetes mikrobaközösségek összetételére és diverzitására - a fizikai és kémiai vizsgálatok eredményei alapján a kútvizünk (a hálózati ivóvízhez képest) magas nátrium ion, kalcium ion, magnézium ion, klorid ion, esetenként magas arzén tartalommal jellemezhetőek, továbbá szulfáttartalmuk is jelentős.

Mivel a medencék vize a kútvízből származik, ezért várható volt, hogy sikerül olyan taxonokat kimutatni, melyeket mind a kútvízben, mind a medencékben jelen vannak. A kútvizekhez hasonlóan a tenyésztésbe vont nemzetségeket NGS segítségével is kimutattunk, relatív abundanciájuk azonban változó volt. A medencékben tenyésztési módszerekkel a Firmicutes és Proteobacteria volt domináns. A Proteobacteria phylum mind tenyésztéssel, mind újgenerációs szekvenálással domináns előfordulásának bizonyult a mintákban a Firmicutes phylum azonban csak igen csekély relatív abundanciával volt jellemezhető a korábban részletezett tenyésztési módszereknek „hátrányainak” köszönhetően.

Tenyésztési és molekuláris vizsgálatokkal is kimutattunk olyan taxonokat, amelyeket korábban vizes környezetekből izoláltak (pl. *Ferrovibrio*, *Tistrella*, *Mycobacterium*, *Flavobacterium*, *Acidovorax*, *Methyloversatilis*, *Rheinheimera*, *Hydrogenophaga*, *Rhizobium*, *Brevundimonas*, *Sphingomonas*, *Pseudomonas*), ezek megoszlása a kútvizek és medencék között változó volt, mivel a kútvizekhez képest a medencékben több paraméter is megváltozik. A medencék baktériumközösségeit számos tényező befolyásolja: a kútvizekből a mikroorganizmusok egy új környezetbe kerülnek, ahol: erőteljes antropogén hatás érvényesül, emellett a külső környezetből (levegőből medence faláról, emberi bőrfelületről stb.) is számos baktérium bejuthatott a medencékbe, illetve bizonyos forrás eredetű mikroorganizmusok nem

GY1K
36°C

Phylumok: Proteobacteria, Actinobacteria
Osztályok: α -, β -, γ -proteobacteria, Bacilli
Nemzetségek: *Chthonobacter*, *Micrococcus*, *Brevibacillus*

GY2K
44°C

Phylumok: Proteobacteria, Chloroflexi, Actinobacteria, Firmicutes
Osztályok: α -, β -, γ -, δ -, ε -proteobacteria, Anaerolineae, Actinobacteria, Bacilli
Nemzetségek: *Sulfurovum*, *Thiofaba*, *Shewanella*, *Brevibacillus*, *Brevundimonas*, *Ferrovibrio*

GY3K
76°C

Phylumok: Proteobacteria, Aquificae, Actinobacteria, Firmicutes, Deinococcus-Thermus
Osztályok: α -, γ -proteobacteria, Aquificae, Actinobacteria, Bacilli, Deinococci
Nemzetségek: *Methylobacterium*, *Sulfurihydrogenibium*, *Mycobacterium*, *Micrococcus*, *Meiothermus*

Medence vizek

GY1TÜ38 (töltő-ürítő)

Nem forrás eredetű domináns nemzetség:
Chelatococcus

GY2TÜ38 (töltő-ürítő)

Nem forrás eredetű domináns nemzetség:
Hydrogenophaga

GY2TÜ20 (töltő-ürítő)

Nem forrás eredetű domináns nemzetségek:
Hydrogenophaga, *Rhizobium*, *Flavobacterium*, *Rheinheimera*

GY2VF38 (vízforgatásos)

Nem forrás eredetű domináns nemzetségek:
Hydrogenophaga, *Rheinheimera*, *Acidovorax*, *Methyloversatilis*

GY3TÜ38 (töltő-ürítő)

Nem forrás eredetű domináns nemzetségek:
Ferrovibrio, *Hydrogenophaga*

GY3TÜ20 (töltő-ürítő)

Nem forrás eredetű domináns nemzetségek:
Rheinheimera, *Acinetobacter*, *Paracoccus*, *Albidiferax*, *Thiofaba*

GY3VF38 (vízforgatásos)

Nem forrás eredetű domináns nemzetségek:
Sphingopyxis, *Porphyrobacterium*, *Hydrogenophaga*, *Shewanella*

**FÜRDŐZŐ
HATÁS**



Potenciálisan humán eredetű nemzetségek:
Acinetobacter, *Moraxella*, *Cloacibacterium*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Brevundimonas*

Potenciálisan humán eredetű fajok:
Acinetobacter johnsonii, *Acinetobacter baumannii*, *Moraxella osloensis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas stutzeri*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Microbacterium paraoxydans*, *Brevundimonas nasdae*

Potenciálisan humán eredetű nemzetségek 1 % relatív abundancia alatt:
Dermabacter, *Dermacoccus*, *Kytococcus*, *Yimella*, *Mobilicoccus*, *Atopobium*, *Tannerella*, *Prevotella*, *Nosocomiicoccus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Murdochiella*, *Anaerostipes*, *Blautia*, *Fusicatenibacter*, *Faecalibacterium*, *Intestinimonas*, *Oscillibacter*, *Subdoligranulum*, *Catenibacterium*, *Dialister*, *Fusobacterium*, *Victivallis*, *Leptotrichia*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Treponema*

képesek túlélni a medencékben, amit megváltozott környezet (pl. hőmérséklet) és a vízkezelés jellege is okozhat. A medencékben található baktériumok többségét korábban úszómedencékből, rekreációs fürdőkből, egyéb fürdőhelyekről kimutatták, néhány közülük opportunista patogén, amelyek különböző megbetegedésekkel hozhatók kapcsolatba. A medencék baktériumközösségeit tekintve azonban nem ezek a mikroorganizmusok bizonyultak dominánsnak, bár megjegyzendő, hogy a töltő-ürítő és a vízforgatásos medencék között a vízkezelésnek köszönhetően különbségek figyelhetők meg.

A medencék vizeiben több esetben a domináns nemzetségeket a forrásokban nem mutattunk ki, így ezek a külső környezetből, akár az emberek közvetítésével kerülhettek a medencékbe.

6.5. Medencevizek higiénés vizsgálatának eredményei és értékelésük

A szabványos tenyésztési módszerekkel a hazai szabályozásban megjelölt paraméterek vonatkozásában vizsgáltuk a vízmintákat. Mindhárom kútvíz esetében a vízminták a határértékeknek megfelelnek, *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* és *Legionella* spp. szervezeteket egyetlen kútvízből sem mutattunk ki (10/a. táblázat).

A GY1 fürdő 36°C-os töltő-ürítő medencéjének (GY1TÜ36) mintavételezése és vizsgálata nyitás előtt történt, a vizsgálatokat a Budapest Gyógyfürdő és Hévízei Zrt. vizsgálólaboratóriuma végezte. A nyitás előtti eredmények megfelelőek voltak.

A GY2 és GY3 fürdő esetében nyitás után végeztünk vizsgálatokat minden medence esetében. Fekális indikátor és *Legionella* szervezetek egyik fürdőből sem voltak kimutathatóak. A GY2 beltéri töltő-ürítő 38°C-os medencéje (GY2TÜ38) a *Micrococcus* (összes coccus) szám és a *Pseudomonas aeruginosa* tekintetében, továbbá mindkét fürdő kültéri vízforgatásos 38°C-os medencéje szintén a *P. aeruginosa* tekintetében meghaladta a határértéket (10/a. táblázat). A hatályos jogszabályi határértékeket a 9/b táblázatban tüntettük fel.

Míg a coccus szám a medence túlterheltségének indikátora, a *P. aeruginosa* biofilmek jelenlétére, illetve technológiai problémákra utal. A töltő-ürítő rendszerű medencénél biofilmek a medence faláról kerülhettek be a vízbe, fertőtlenítőszer adagolás hiányában pedig a baktériumok szaporodása nem gátolt. A vízforgatásos medencék általában homoksűrővel rendelkeznek, amely azonban kiváló helyet kínálnak a baktériumok megtelepedésének, így számuk a fertőtlenítőszer adagolása mellett is meghaladhatja a határértéket. Megjegyzendő, hogy a *P. aeruginosa* száma a töltő-ürítő medencében jóval magasabb – habár a határértékek is megengedőbbek –, mint a vízforgatásos medencékben. Ez a megállapítás igaz a többi vizsgált paraméterre is, számuk magasabb volt a töltő-ürítő medencékben (10/a. táblázat).

Vízminták	Fekál coliform szám (TKE/100 ml)	<i>Micrococcus</i> (Összes coccus) szám (TKE/100 ml)	<i>Staphylococcus aureus</i> száma (TKE/100 ml)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> száma (TKE/100 ml)	<i>Legionella</i> spp. száma (TKE/100 ml)
GY1K	0	0	0	0	0
GY1TÜ36	0	800	2	10	0
GY2K	0	0	0	0	0
GY2TÜ38	0	4020*	18	80*	0
GY2TÜ20	0	2000	0	50	0
GY2VF38	0	76	0	15*	0
GY3K	0	0	0	0	0
GY3TÜ38	0	2000	10	50	0
GY3TÜ20	0	400	0	0	0
GY3VF38	0	50	0	10*	0

10/a. táblázat. A vízminták szabványos, higiénés vizsgálatának eredményei. GY1K, GY2K, GY3K: kútvezek; TÜ36: 36°C-os töltő-ürítő medence; TÜ38: 38°C-os töltő-ürítő medencék; TÜ20: 20°C-os töltő-ürítő medencék; VF38: 38°C-os visszaforgatásos medencék. A színskála az alacsonyabb értékektől (zöld) halad a legmagasabb értékig (piros).
*meghaladta a hazai szabályozásban érvényes határértéket.

Üzemeltetés típusa	Határértékek				
	<i>E. coli</i> (TKE/100 mL)	<i>Micrococcus</i> (TKE/100 mL)	<i>S. aureus</i> (TKE/100 mL)	<i>P. aeruginosa</i> (TKE/100 mL)	<i>Legionella</i> (TKE/1000 mL)
Töltő-ürítő	100	2500	20	50	100
Vízforgatásos	1	250	1	2	100

10/b. táblázat. Mikrobiológiai határértékek az MSZ 13690-3:1989; MSZ 15234:2012 és 49/2015 (XI. 6.) EMMI rendelet szerint.

A szabványos tenyésztési módszereket a GY2 és GY3 gyógyfürdő esetében molekuláris vizsgálatokkal is kiegészítettük: taxon specifikus és multiplex PCR-rel. A tenyésztési módszerekkel összehasonlítva a taxon specifikus PCR-ek eredményei alapján *Acinetobacter baumannii* és a *Legionella pneumophila* nemzetség képviselői nem volt kimutathatók a mintákból. A *Pseudomonas aeruginosa* a GY2 beltéri töltő-ürítő medencéjében (GYF2TÜ38) megjelent, ahogyan a coliform baktériumok szintén a 38°C-os töltő-ürítő medencékben voltak jellemzők (GY2TÜ38 és GY3TÜ38). A *Stenotrophomonas maltophilia* a GY3 fürdő minden mintájában és a GY2 beltéri töltő-ürítő 38°C-os medencéjéből volt kimutatható (11. táblázat).

Minták jelölése	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Coliform	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Makrolid rezisztencia gének	ESBL gének
GY1TÜ36	-	-	-	-	-	-	-
GY2TÜ38	-	-	+	+	+	-	+
GY2TÜ20	-	-	-	-	-	-	-
GY2VF38	-	-	-	-	-	-	-
GY3TÜ38	-	-	-	+	+	-	-
GY3TÜ20	-	-	-	-	+	-	-
GY3VF38	-	-	-	-	+	-	-

11. táblázat. A taxonspecifikus PCR és a multiplex PCR vizsgálatok eredményei. TÜ38: 38°C-os töltő-ürítő medencék, TÜ20: 20°C-os töltő-ürítő medencék, VF38: 38°C-os visszaforgatásos medencék.

Multiplex PCR vizsgálatokkal makrolid-rezisztencia géneket egy mintában sem mutattunk ki, míg az ESBL gének csak a GY2 beltéri töltő-ürítő 38°C-os medencéjében voltak jelen. Utóbbi szintén a kórokozó/fakultatív kórokozó baktériumok előfordulására utal a medencében. Higiénés szempontból fontos taxonokat a fürdők baktériumközösségeinek vizsgálata során is tenyésztésbe vontunk, mint pl. a *Pseudomonas stutzeri*, *P. alcaligenes*, *Acinetobacter johnsonii*, *Moraxella osloensis*, *Microbacterium paraoxydans*, *Brevundimonas nasdae*, továbbá NGS segítségével is kimutattunk olyan nemzetségeket, amelyeknek opportunista patogén tagjai is vannak mint például a *Legionella* és a *Cloacibacterium* nemzetségeket, utóbbi relatív abundanciája a GY2TÜ38 töltő-ürítő medencében 28,7%-os volt.

Újgenerációs szekvenálással minimális relatív abundanciával (1% alatt) mutattunk ki még olyan nemzetségeket, amelyek emberi eredettel hozhatók összefüggésbe (pl. *Dermabacter*, *Dermacoccus*, *Kytococcus* stb.), amelyeket az 12. táblázatban foglaltunk össze. A kimutatott nemzetségek többsége a normál humán bőr és bélmikrobióta tagjai, amelyek a fürdőzők által kerülhettek be a medencékbe. Ezeket a baktériumokat minden típusú medencéből kimutattunk, a *Staphylococcus* nemzetség tagjai jelentek meg a töltő-ürítő és a vízforgatásos medencékben egyaránt.

Baktérium nemzetségek (1% alatti relatív abundanciával)	Töltő-ürítő medencék	Visszaforgatásos medencék	Előfordulás	Lehetséges megbetegedések
<i>Dermabacter</i>	+	-	bőr	CRBSI
<i>Dermacoccus</i>	+	-	bőr	CRBSI
<i>Mobilicoccus</i>	+	-	bélmikrobióta	-
<i>Prevotella</i>	+	-	szájüreg bőr légző szervrendszer	periodontidisz bakteriális vaginózis rheumatoid arthritis
<i>Nosocomiicoccus</i>	+	-	női genitália bélmikrobióta	-
<i>Enterococcus</i>	+	-	bélmikrobióta	húgyúti, kismedencei fertőzés, bakterémia, endocarditis
<i>Anaerostipes</i>	+	-	bélmikrobióta	bőr és lágy szöveti fertőzés bypass graft fertőzés, bakterémia
<i>Intestinimonas</i>	+	-	bélmikrobióta	-
<i>Subdoligranulum</i>	+	-	bélmikrobióta	-
<i>Catenibacterium</i>	+	-	bélmikrobióta	-
<i>Dialister</i>	+	-	bélmikrobióta	agytályog tüdőgyulladás periodontidisz fogínygyulladás
<i>Victivallis</i>	+	-	bélmikrobióta	-
<i>Legionella</i>	+	-	-	tüdőgyulladás
<i>Treponema</i>	+	-	bélmikrobióta	Pontiac-láz periodontidisz fogínygyulladás
<i>Kytococcus</i>	+	-	bőr	szifilisz CRBSI
<i>Yimella</i>	-	+	bőr	-
<i>Atopobium</i>	-	+	bélmikrobióta	fojtályog hasüregi, medencei tályog
<i>Tannerella</i>	-	+	szájüreg	periodontidisz
<i>Murdochiella</i>	-	+	bőr	sebfertőzés bakteriális vaginózis
<i>Blautia</i>	-	+	bélmikrobióta	-
<i>Fusicanibacter</i>	-	+	bélmikrobióta	-
<i>Neisseria</i>	-	+	orr, garat	meningitis gonorrhoea
<i>Haemophilus</i>	-	+	légző szervrendszer	meningitis otitis media sinusitis
<i>Staphylococcus</i>	+	+	bőr orr, garat	pneumonia bőr fertőzés nozokomiális torokgyulladás húgyúti fertőzés szepszis

12. táblázat. A töltő-ürítő és a vízforgatásos medencék higiéniés szempontból fontos baktérium nemzetségei NGS alapján 1 % alatti relatív abundanciával. CRBSI= kanüllel összefüggő fertőzés (Catheter Related Bloodstream Infection)

Ugyan különböző megbetegedésekkel, fertőzésekkel kapcsolatba hozhatóak, megjegyzendő, hogy a baktériumközösségek vizsgálata során kimutatott taxonokhoz hasonlóan ezek a baktériumok is csupán fakultatív kórokozók, gyakran egészséges egyénben semmilyen kórfolyamatot nem indukálnak. A szabványos módszerekkel a vizsgált medencék összes coccus számától és *P. aeruginosa* számától eltekintve nem mutattak eltérést a szabványhoz képest és

az üzemeltetés szerint minden rendben volt, semmiféle megbetegedést nem jeleztek. Nem szabad továbbá megfélekedni arról sem, hogy a DNS alapú vizsgálatok alapja a PCR reakció, amely a mintában jelen lévő nukleinsavat felszaporítja és ennek ellenére is 1% alatti relatív abundanciával jellemezhetők azok a nemzetségek, amelyeket emberi eredettel hozhatunk összefüggésbe. Nem utolsó sorban a molekuláris alapon kimutatott taxonok életképességéről, aktivitásáról sem nyerünk információt.

Az általunk kimutatott potenciális kórokozó taxonok főként a 2-es kockázati csoportba sorolhatók, amelyek emberben betegséget okozhatnak és veszélyt jelenthetnek, azonban nem valószínű, hogy közösségben elterjednek, általában hatékony megelőzés és kezelés áll rendelkezésre velük szemben (13. táblázat).

Nemzetség	Gyógyfürdő	Kimutatási módszer	Fajok	Kockázati csoport	Lehetséges megbetegedések	Üzemeltetés típusa
<i>Acinetobacter</i>	GY1, GY2, GY3	NGS és tenyésztés	<i>A. johnsonii</i>	2	Pneumonia	TÜ
			<i>A. baumannii</i>	2	Pneumonia, szepszis, meningitis, húgyúti fertőzés	TÜ
<i>Moraxella</i>	GY2, GY3	NGS és tenyésztés	<i>M. osloensis</i>	2	Kötőhártya gyulladás	TÜ és VF
<i>Cloacibacterium</i>	GY2, GY3	NGS	-	1	Húgyúti fertőzés	TÜ és VF
<i>Stenotrophomonas</i>	GY2, GY3	taxon-specifikus PCR	<i>S. maltophilia</i>	2	Pneumonia, endocarditis,	TÜ és VF
			<i>P. aeruginosa</i>	2	Bőr, húgyúti, gasztrointesztinális betegségek	TÜ és VF
<i>Pseudomonas</i>	GY1, GY2, GY3	NGS, taxon-specifikus PCR és tenyésztés	<i>P. alcaligenes</i>	2	Szepszis, endocarditis	TÜ és VF
			<i>P. stutzeri</i>	1	Szepszis, légúti, húgyúti fertőzés	TÜ
<i>Legionella</i>	GY2, GY3	NGS	-	2	Légionárius betegség, Pontiac-láz	TÜ és VF
<i>Staphylococcus</i>	GY2, GY3	NGS és tenyésztés	<i>S. aureus</i>	2	Bőr, légúti, idegrendszeri betegségek	TÜ és VF
<i>Microbacterium</i>	GY2	tenyésztés	<i>M. paraoxydans</i>	1	Hashártyagyulladás, katéterrel összefüggő betegségek	VF
<i>Brevundimonas</i>	GY2, GY3	NGS és tenyésztés	<i>B. nasdae</i>	1	Légmell, empiéma	TÜ

13. táblázat. Potenciálisan patogén baktériumok a vizsgált gyógyfürdőkben. TÜ: töltő-ürítő medencék, VF: vízforgató medencék.

6.6. Vízkezelések hatásának elemzése

Ahogy a kútvizek és medencék baktériumközösségeinek összehasonlításánál láthattuk, a kútvízre jellemző baktériumok kis számban voltak jelen a medencékben, amelyet a megváltozott környezeti tényezők mellett a medencékben alkalmazott vízkezelés is okozhat. A csíraszámok, mikroszkópos sejtszámok és az általunk alkalmazott módszerekkel kimutatott oportunisták kórokozó szervezetek tekintetében a visszaforgatásos medencék bizonyulnak mikrobiológiai szempontból biztonságosabbnak.

Pándics Tamás doktori munkája során (2013-2017) vizsgálta a medencevizek kifogásoltságát a szabványos, higiénés paraméterekre vonatkozóan, összehasonlítva a különböző üzemeltetésű medencéket. Eredményei alapján a vízforgatással, fertőtlenítőszer adagolással üzemeltetett medencék minősége általában megfelelő, az általuk vizsgált időszakban a vízforgatásos medencék 70-80%-a megfelelő minőségű, a súlyosan kifogásolt kevesebb, mint 10%-a a vizsgált mintáknak. A töltő-ürítő medencék esetében azonban a kifogástalan medencék aránya mindössze 30-40%, és 30%-uk esik a súlyosan szennyezett kategóriába. Ezek az eredmények évtizedek óta változatlanok, és komoly különbségek mutatkoznak a hatóság által végzett és az önellenőrző vizsgálatok között is. Míg az önellenőrző vizsgálatok eredményei alapján a töltő-ürítő rendszerű medencék esetében 10%-a kifogásolt, addig a hatósági mintavételek esetében ez az arány 50% feletti, de a vízforgatásos medencék esetében is közel 20%. Ez annak köszönhető, hogy az önellenőrző vizsgálatokat nyitás előtti mintákból végzik el. A Nemzeti Népegészségügyi Központ által végzett évtizedes vizsgálatok szintén megerősítik a töltő-ürítő rendszerű medencék mikrobiológiai kifogásoltságát, amelyet munkánk során mi is tapasztaltunk, továbbá megállapítható az is, hogy jelentős különbségek figyelhetők meg a medencék felhasználási módja között is, így a termálmedencék és gyógymedencék a legtöbb esetben kifogásoltak, az alacsonyabb hőmérsékletű, kis kiterjedésű szauna medencék esetében a kifogásoltság alacsonyabb. A vízforgatásos medencék esetében *E. coli* szennyezettség a gyermek és tanmedencékben jellemző; az úszómedencékben az összes coccus, a jacuzzi esetében a *P. aeruginosa* számának határérték túllépése miatt voltak eseti jelleggel kifogásoltak (Pándics, 2018; Vargha és mtsai, 2015). Ez a megállapítás a *P. aeruginosa* tekintetében az általunk vizsgált gyógyfürdőkre is helytálló, mivel számuk minden kültéri vízforgatásos élménymedencében a határértéket meghaladta. *E. coli* és az összes coccus számot tekintve a vízforgatásos medencék vize megfelelő volt.

Az üzemeltetés módja nem minden higiénés paraméter esetében befolyásolja a határérték túllépést. Az NNK által végzett vizsgálatok alapján például a *Legionella* baktériumokat

nagyobb mennyiségben lehet kimutatni a vízforgatásos medencékben, mivel a medencék homokszűrője és különösen a pezsgőmedencék üzemeltetése kedvez a *Legionella*-k megtelepedésének és terjedésének. Ökológiai vonatkozásokat tekintve a *Legionella* baktériumokra jellemző az alacsony kompetitív képesség, a közösség többi tagja gyakran túlnövi ezeket a baktériumokat (Barna és Kádár, 2012). Szabványos kimutatásuk sem egyszerű, a tenyésztéses vizsgálatokat gyakran megnehezítik az élménymedencékben szintén gyakran megtalálható *Pseudomonas* fajok. Az általunk végzett vizsgálatok során *Legionella* baktériumokat nem sikerült tenyésztésbe vonni és a taxonspecifikus PCR vizsgálatok sem igazolták, a nemzetség jelenlétét alacsony gyakorisággal NGS vizsgálatokkal sikerült ugyan kimutatni - de ezen vizsgálatok mélysége nemzetség szintig terjed. *L. pneumophila* baktérium jelenlétét egyetlen általunk alkalmazott módszerrel sem sikerült igazolni.

Az általunk vizsgált töltő-ürítő rendszerű medencékben egy medence összes coccus és *P. aeruginosa* száma haladta meg a határértéket, mégis szembetűnő a nagyságrendi különbség a vízforgatásos medencékhez képest (9/a és 9/b táblázat). A túlzottan megengedő határértékek miatt megfelelő minőségűnek jelölünk olyan vízmintákat is, ahol akár több ezres nagyságrendben vannak jelen a baktériumok például az összes coccus szám esetében, de valamennyi paraméternél jelentős különbség figyelhető meg (9/b. táblázat). A különböző üzemeltetésű medencékre vonatkozó határértékek értelmezése sem egységes, a vízforgatásos medencék esetében a határértékek a vízkezelés hatásosságát jelzik, míg a töltő-ürítő medencék esetében azt mutatják, hogy a terhelés elérte-e a kockázatos szintet. Jelenlegi tudomásuk szerint az elavult szabályozás korszerűsítése, egy új, egységes rendelet kialakítása folyamatban van, amely kockázat szempontjából különbözteti meg a medencéket. Eszerint az I., és II. kockázatú medencékre és a felmentett gyógymedencékre különböző, de szigorúbb határértékek vonatkoznának (13. táblázat). A rendelet tervezet szerint az I. kockázatú medencék azok, amelyeknél a rendeltetészerű használat mellett lenyelésnek vagy belélegzésnek kockázata van (pl. úszómedencék, élményelemekkel ellátott medencék). A II. kockázatú csoportba az ülőmedencék, míg a fertőtlenítés alól felmentett gyógymedencék továbbra is külön kategóriába tartoznak, továbbá a rendelet tervezet különbséget tesz a határértékekben a kültéri nyitott medencék esetében is (Vargha és mtsai, 2015).

Munkánkat és az NNK által végzett több évtizedes eredményeket is figyelembe véve megállapítható, hogy fertőtlenítés nélkül a töltő-ürítő rendszerű medencék megfelelő hidraulika és bőséges vízpótlás biztosítás esetén sem üzemeltethetőek úgy, hogy a mikrobiológiai vízminőség megfelelő legyen. Paradox módon a gyógyvizek jelentenek így kiemelten nagy egészségkockázatot (Vargha és mtsai, 2015).

Paraméter	Mértékegység	MSZ 13690-3:1989 (töltő-ürítő medencék)	MSZ 15234:2012 (vízforgatásos medencék)	Rendelet módosítás tervezet		
				I. kockázatú medencék	II. kockázatú medencék	Felmentett gyógymedencék
<i>E. coli</i>	TKE/100 ml	100	1	0	2	5
<i>P. aeruginosa</i>	TKE/100 ml	50	0	0	10	20
<i>Micrococcus</i>	TKE/100 ml	2500	250	100/250**	500	1000
<i>S. aureus</i>	TKE/100 ml	20	2	0	2	1000
<i>Legionella</i> ***	TKE/100 ml	-	100	10	-	-
<i>Enterococcus</i>	TKE/100 ml	100	1	0	0	5
Coliform	TKE/100 ml	1000	10*	-	-	-
Endo szám	TKE/100 ml	50000	1000	-	-	-
Telepszám 22°C-on	TKE/ml	-	100	100/300*	500	-

13. táblázat. Határtértékek az MSZ 13690-3:1989 és MSZ 15234:2012 szabványok, valamint a rendelet módosítás tervezet szerint.

*az MSZ 13690-3:1989 szerinti határérték, az MSZ 15234:2012 szabványban nem szabályozott paraméter

**kültéri nyitott medencék esetében

***csak aeroszol képző medencéknél kötelező vizsgálni

Vizsgálataink során a mikroszkópos sejtszám, a heterotróf csíraszámbeccslés és a szabványos tenyésztéses eredmények is alátámasztják azt, hogy a vízforgatással üzemelő medencék biztonságosabb vízminőséget eredményeznek, mint a fertőtlenítés nélkül üzemelő töltő-ürítő rendszerek. Speciális tenyésztéses módszerekkel és NGS-sel szintén ezen medencékből többféle baktérium nemzetséget mutattunk ki, megjegyzendő, hogy a taxonspecifikus PCR vizsgálatok fakultatív kórokozók jelenlétét többször igazolták a töltő-ürítő, mint a vízforgatásos medencékből.

Ugyan a vízforgatásos medencék szűrője egy potenciális veszélyt jelent higiénés szempontból (Barna és Kádár, 2012), a töltő-ürítő medencékkel összehasonlítva a folyamatos fertőtlenítőszer adagolással a mikrobiológiai kockázatok csökkenthetők. A kültéri medencék elhelyezkedése további, a külső környezetben megtalálható mikroorganizmusok bekerülését is jelenti, ami a víz mikrobiológiai minőségét negatívan befolyásolja, ezáltal minden kültéri medencét célszerű volna vízforgatásos technikával üzemeltetni. Ezt a gyakorlatot azonban több hazai fürdő nem alkalmazza, a gyógyhatású komponensekre hivatkozva.

A töltő-ürítő üzemeltetést, mint „hungarikumot” helyettesítheti alternatív vízkezelés is, mint ahogyan hazánkban is van példa hidrogén-peroxiddal fertőtlenített, keringtetett töltő-ürítő típusú medencékre is. A gyógyhatású komponensekre való hivatkozást kiküszöbölhetik olyan kutatások, amelyek célzottan a fertőtlenítőszeres gyógyhatású komponensekre való hatását célozzák meg. Gere és munkatársai (2018) a gyógyvizek fertőtlenítési lehetőségeinek vizsgálata során azt tapasztalták, hogy a hagyományos hypoval történő fertőtlenítés a gyógyvizek jodid bromid és szulfid tartalmát csökkentette jelentősen, szemben a hidrogén- peroxidos kezeléssel, amely egyik komponens esetén sem okozott szignifikáns változást. A gyógyvíz egyéb komponensei közül hipoklorit alkalmazása esetén az ammónium ionok koncentrációja csökkent (valószínűleg klóraminok képződése miatt), a klorid, a pH, és az AOX (adszorbeálható szerves halogén vegyületek) értékei nőttek, valamint megjelentek a klórozási melléktermékek (THM (trihalometánok), HAA (halogénessav)). Hidrogén-peroxidot alkalmazva jelenleg kevésbé ismert káros melléktermékek megjelenése, ennek ellenére, elsősorban költségvetési szempontokat figyelembe véve kevésbé alkalmazzák az alternatív fertőtlenítőszereseket. Mindezek mellett megjegyzendő, hogy egy-egy komponens koncentrációjának változása nem feltétlenül vonja maga után a gyógyhatás változását, ezt csak klinikai vizsgálatokkal lehetne alátámasztani. Fontos tény, hogy a gyógyvizek gyógyhatását a klinikai vizsgálatok során a kútvizekkel végzik, holott a medencéket gyakran kezelt vízzel töltik fel, legtöbbször hálózati víz hozzáadásával a forrázásveszély miatt. Minden hatás, ami a kútvizet a medencébe történő beengedésig éri és megváltoztatja az összetételét, befolyásolhatja akár a gyógyhatást is. A hálózati vízzel történő keverés helyett célszerű hőcserélőket használni, amely a gyógyhatású komponensek változását kevésbé érinti (Gere és mtsai, 2018).

Mindezek mellett szükséges lenne a szabályozás megújítása -különösen a határértékek tekintetében-, a fürdők műszaki korszerűsítésére, a gyógyvizek mikrobiológiai minőségének javulása érdekében. Megjegyzendő továbbá, hogy a vizsgálatoknak célszerű lenne kitérni azokra a mikroorganizmusokra is, amelyek a fertőtlenítőszeresekkel szembeni ellenállóképességük miatt a fertőtlenített medencékben is jelen lehetnek, növelve ezzel a közegészségügyi kockázatot. A jelenlegi szabályozás indikátor szervezetekre fókuszál, azonban gyakran az indikátorok és a víz eredetű kórokozók közötti összefüggés nem igazolható. Célszerű lenne a rutin vizsgálatokat kibővíteni például enterális vírusok kimutatásával, amelyet jelenleg a 37/1996 NM rendelet járványügyi helyzet esetében ír csak elő. Ilyen jellegű vizsgálatok pedig igencsak ritkák, mivel a fertőzések víz eredete általában nem igazolható, az enterális megbetegedéseket gyakran egyéb potenciális fertőzésforrásnak pl. élelmiszernek tulajdonítják. Kern Anita doktori munkája során (2014) 15 töltő-ürítő és 10 vízforgató

medencét vizsgált vírusok vonatkozásában: 20 esetben humán adenovírus, 11 esetben norovírus és 3 medence esetében enterovírus jelenlétét mutatta ki molekuláris módszerekkel. Az adenovírusok gyomor-bélrendszeri, légúti megbetegedéseket, szem- és fülgyulladást, az enterovírusok és a norovírusok hányással, hasmenéssel járó kórképet okoznak. Utóbbiak jelentenek különösen nagy közegészségügyi kockázatot, mivel kis mennyiség is (10 vírusrészecske) elegendő ahhoz, hogy megbetegedést okozzanak. Kiss és mtsai (2014) vizsgálatai során szabadon élő amőbákat és *Legionella* baktériumokat mutattak ki különböző fürdővizekből: *Legionella* a töltő-ürítő medencék 20%-ában volt jelen (míg a vízforgatásos medencékben 10%), szabadon élő amőbák esetében ez az arány több, mint 50% volt (vízforgatásos medencékben 40%). Az amőbák közül a keratitist okozó *Acanthamoeba* emelhető ki, de egyes uszoda vizekből kimutattak *Naegleria* fajokat is, bár utóbbival kapcsolatos megbetegedést világszerte nagyon kevés esetben írtak le (Cole és mtsai, 2016). Jelenlegi tudomásunk szerint Magyarországon *Legionella* baktériummal kapcsolatban ismert 3 járvány (ezen belül 2 haláleset), amely minden esetben a nem megfelelő üzemeltetésre vezethető vissza így pl. alacsony szabad aktív klór, vizsgálatok hiánya, nem megfelelő higiénés állapotok. Az üzemeltetés és a fakultatív kórokozók tekintetében nemcsak a töltő-ürítő medencékre, hanem az utóbbi időben egyre divatosabbá váló, eltérő üzemeltetésű medencékre (pl. Kneipp medencék, sörfürdő, buborékfürdő) és a megváltozott fürdőzési szokásokra (pl. babaúszás, wellness) is figyelmet kell fordítani, mivel ezek új expozíciós lehetőségként megnövelik a közegészségügyi kockázatot (Vargha és mtsai, 2015).

7. Összefoglalás

A kutatás célja a budapesti gyógyfürdők mikrobiológiai vizsgálata – szabványos módszerek mellett speciális tenyésztési és molekuláris vizsgálatokkal a termáلكutakat benépesítő természetes mikrobaközösségek feltérképezése, továbbá a medencéket érő antropogén hatások felmérése tekintettel a vízkezelési típusokra.

A kútvizek baktériumközössége változatos képet mutat - számos, vizes környezetben megtalálható baktérium taxont mutattunk ki, amelyek anyagcsere tulajdonságuknak köszönhetően fontos szerepet töltenek be a vízi ökoszisztémákban. Mivel a kútvizek nincsenek kitéve külső környezeti és antropogén hatásnak, stabil baktériumközösségek alakulhatnak ki bennük. Tenyésztési módszerekkel a kútvizekből viszonylag kevés taxont sikerült kimutatni, a molekuláris módszerek eredményei azonban felhívják a figyelmet arra, hogy a kútvizekben a tudomány számára számos, eddig ismeretlen taxonok fordulhatnak elő. Megjegyzendő, hogy ez a feltételezés a medencevizekre is igaz. A kútvizekben tenyésztési módszerekkel a Proteobacteria, Firmicutes és Actinobacteria phylumot mutattuk, előfordulásuk és megoszlásuk forrásonként változó volt. Néhány nemzetség tekintetében tapasztaltunk csak átfedést pl. *Brevibacillus*, *Ferrovibrio*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* esetében. NGS segítségével a Proteobacteria mellett az Aquificae képviselőit is kimutattuk.

Mivel a medencék vize a kútvizekből származik, ezért több, a kútvízben is megtalálható baktériumot mutattunk ki az általunk alkalmazott módszerekkel. A medencék baktériumközösségét azonban számos tényező befolyásolja - a baktériumok a kútvízből új környezetbe kerülnek, ahol a vízkezelés, a külső környezet megváltozása és a fürdőzők hatással vannak közösségekre.

A higiénés vizsgálatok alapján a töltő-ürítő rendszerrel üzemelő medencék bizonyultak néhány paraméter vonatkozásában kifogásoltnak, amelyek a hazai szabályozásban érvényes határértékeket meghaladták. Megjegyzendő, hogy a higiénés paramétereket célzó molekuláris módszerek esetében is a vízforgatással üzemelő medencék bizonyultak mikrobiológiailag biztonságosabbnak, a töltő-ürítő medencékkel szemben. A kutatás során a standard higiénés paraméterek mellett kimutattunk néhány opportunista kórokozó szervezetet is (pl. *Pseudomonas stutzeri*, *P. alcaligenes*, *Acinetobacter johnsonii*, *A. baumannii*, *Moraxella osloensis*, *Microbacterium paraoxydans*, *Brevundimonas nasdae*, *Cloacibacterium*, *Legionella* nemzetség tagjai), amelyek szintén a töltő-ürítő medencékben fordultak elő nagyobb számban. Mindezek mellett megjegyzendő, hogy nem ezek a baktériumok a medencevizekben megtalálható baktériumközösségek fő tagjai.

A medencék megfelelő mikrobiológiai minőségének érdekében célszerű minden medencét visszaforgatással üzemeltetni, akár alternatív fertőtlenítőszer alkalmazásával a gyógyhatású komponensek védelme érdekében. A megfelelő szabályozás és műszaki feltételek kialakítása mindenképpen szükséges ahhoz, hogy a gyógyvizek mikrobiológiai szennyezettsége csökkenjen, és a gyógyvizek használata biztonságossá váljon.

8. Summary

The aim of the present study was the microbiological investigations of thermal baths using standard and special cultivation techniques and molecular methods to study the natural bacterial communities of the well waters and examine the effect of water treatment as well as the anthropogenic influence on the microbial communities.

The wells have diverse bacterial communities - several prokaryotic taxa were described from aquatic habitats which have important roles in aquatic ecosystems due to their metabolic properties. As the wells are not exposed to external and anthropogenic disturbance, stable bacterial communities can develop there. With cultivation only a few bacterial taxa were detected, meanwhile the results of molecular studies indicate the possibility of the presence of till now undescribed bacterial taxa. With cultivation Proteobacteria, Firmicutes and Actinobacteria phyla were detected although their presence and rate were diverse in the wells. Overlap between the well waters was revealed in the case of *Brevibacillus*, *Ferrovibrio*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*. Besides Proteobacteria members of Aquificae were also detected with NGS.

As the pool waters originate from the wells, several common taxa were detected in the water of the pools and wells by the applied methods. At the same time, the bacterial communities of the pool waters are influenced by several outside factors - bacteria from the well water flow into a new environment where the water treatment and the anthropogenic effect influence the bacterial growth.

Based on hygienic investigations the microbial quality of the wells are adequate, although in several cases (mainly the charging-unloading pool operation type) the microbial quality of the waters exceeded the standard limit values due to the Hungarian regulations. It should be noted that with molecular methods the recirculating pool operation type is much more effective in the eliminating of microbes as compared to charging-unloading systems. During our studies besides the standard hygienic parameters a few opportunistic pathogens were also detected, mainly from the charging-unloading pools. Though it should be stated that the main prokaryotic members of the waters of the pools were not these bacteria.

To maintain the appropriate microbiological quality of the pool waters, recirculating operation mode should be applied in case of every pool, using alternative disinfections to protect the chemical compounds of the water which can be responsible for the therapeutic effects of the

water. With proper regulation and technical conditions the microbial contamination of pool waters can be reduced, therefore, usage of thermal waters is possible to keep safe.

9. Köszönetnyilvánítás

Témavezetőmnek, **Dr. Tóth Erikának** köszönöm a belém vetett bizalmát, az éveken át tartó szakmai és emberi támogatását, türelmét. Segítsége nélkül ez a munka nem készülhetett volna el.

Köszönöm a Budapest Gyógyfürdői és Hévízei Zrt. laboratóriumvezetőjének, **Szunyogh Lillának**, hogy biztosította a fürdők látogatását, mintavételezését és minden szakmai segítséget. Doktori képzésemet a Fővárosi Közerület Fenntartó Zrt. biológusaként kezdtem 2014-ben, ahol a doktori kutatáshoz kapcsolódó vizsgálatok egy részét végeztem. Köszönettel tartozom akkori laboratóriumvezetőmnek, **Király Gábornak**, aki mindig segítette a munkámat.

Ezt követően a KVI-PLUSZ Kft. mikrobiológiai laboratóriumvezetőjeként egy nagyon családias légkörben dolgozhattam: köszönetet mondok a **mikrobiológiai laboratóriumnak**, akik a fokozatszerzési eljárásom végén bíztattak. Köszönöm **Dr. Ágoston Csabának** hogy a kitűzött céljaim elérésében igen sok szempontból támogatott a szakmai tevékenységen túl is. Szakmai útmutatásokban Reskóné Dr. Nagy Mária is segítségemre volt.

Doktori munkám elvégzésében sok segítséget kaptam az ELTE Mikrobiológiai Tanszékén **Dr. Szabó Attilától, Dr. Vajna Balázstól és Szuróczki Sárától** különösen a molekuláris módszerekkel kapcsolatban. Nekik is hálás köszönet jár támogatásukért.

A laboratóriumi munkákban az évek alatt több dolgozó is részt vett az ELTE Mikrobiológiai Tanszékén, akiknek a segítsége szintén elengedhetetlen volt a dolgozat alapját képező munka elvégzéséhez. Nekik is nagyon sok köszönet jár ezért. Ők Káli Szandra és Farkas Rózsa.

A doktori kutatás nem valósulhatott volna meg az ELTE Intézményi Kiválósági Pályázata nélkül, amelyet a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Iroda támogatott (NKFIH-1157-8/2019-DT). A pályázat a molekuláris vizsgálatokat (taxonspecifikus PCR és NGS) támogatta. Az FKF Nonprofit Zrt., a KVI-PLUSZ Kft. és az ELTE Mikrobiológiai Tanszék minden további dolgozójának köszönöm, hogy segítségükre mindig számíthattam.

Nem utolsó sorban köszönöm a **Családomnak**, akik az idáig vezető úton is mindig, mindenben támogattak és bíztattak.

10 Irodalomjegyzék

Szakirodalmi hivatkozások

Adiguzel, A., Ozkan, H., Baris, O., Inan, K., Gulluce, M., Sahin, F. (2009): Identification and characterization of thermophilic bacteria isolated from hot springs in Turkey. *J Microbiol Methods*. 79: 321-328.

Aguiar, P., Beveridge, T.J., Reysenbach A.L. (2004) *Sulfurihydrogenibium azorense*, sp. nov., a thermophilic hydrogen-oxidizing microaerophile from terrestrial hot springs in the Azores. *Int J Syst Evol. Microbiol* 54:33-39.

Alföldi, L., Bélteky, L., Böcker, T., Horváth, J., Korim, K., Liebe, P., Rémi, R. (1968) Budapest Hévízei (Thermal waters of Budapest). Vituki, Budapest, p. 11-59

Anda, D., Bükki G., Krett G., Makk, J., Márialigeti, K., Eróss, A., Mádl-Szőnyi, J., Borsodi, K., A. (2014) Diversity and morphological structure of bacterial communities inhabiting the Diana-Hygieia thermal spring (Budapest, Hungary). *Acta Microbiol Immunol Hung* 61:329-346.

Anda, D., Makk, J., Krett, G., Jurecska, L., Márialigeti, K., Mádl-Szőnyi, J., Borsodi, K., A. (2015) Thermophilic prokaryotic communities inhabiting the biofilm and well water of a thermal karst system located in Budapest (Hungary). *Extremophiles* 19(4):787-97.

Barna, Z., Kádár, M. (2012): The risk of contracting infectious diseases in public swimming pools. A review. *Annt Ist Super Sanita* 48(4):374-86.

Bej, A.K., Steffan, R.J., DiCesare, J., Haff, L., Atlas, R.M. (1990) Detection of coliform bacteria in water by polymerase chain reaction and gene probes. *Appl Environ Microbiol* 56(2):307–314.

Bonares, M., Vaisman, A., Sharkawy, A. (2016) Prosthetic vascular graft infection and prosthetic joint infection caused by *Pseudomonas stutzeri*. *ID Cases* 6:106-108.

Borgmann-Strahsen, R. (2003) Comparative assessment of different biocides in swimming pool water. *Int Biodeterior. Biodegradation*, 51(4):291–297.

Borsodi, A., Knáb, M., Krett, G., Makk, J., Márialigeti, K., Eróss, A., Mádl-Szőnyi, J. (2012) Biofilm bacterial communities inhabiting the cave walls of Buda Thermal Karst System, Hungary. *Geomicrobiology Journal* 29:611-627.

Borsodi, A.K., Micsinai, A., Kovács, G., Tóth, E., Schumann, P., Kovács, A.L., Böddi, B., Márialigeti, K. (2003) *Pannonibacter phragmitetus* gen. nov., sp. nov., a novel alkalitolerant

bacterium isolated from decomposing reed rhizomes in a Hungarian soda lake. *Int J Syst Evol Microbiol* 53:555-561.

Bouvet, P.J.M., Grimont, P.A.D. (1986) Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov. *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov. *Acinetobacter johnsonii* sp. nov. and *Acinetobacter junii* sp. nov. and Emended Descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. *Int J Syst Bact* 36:228-240.

CDC (2016) Model aquatic health code. Center for Disease Control and Prevention. U.S. Department of Health and Human Services. Atlanta, USA.

Chen M., Xu P., Zeng G., Yang C., Huang D., Zhang J. (2015) Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavy metals by composting: applications, microbes and future research needs. *Biotechnol Adv* 33:745–755.

Chen, Y.G., Zhang, L., Zhang, Y.Q., He, J.W., Klenk, H.P., Tang, S.K., Zhang, Y.X., Li, W.J. (2010) *Bacillus nanhaiensis* sp. nov., isolated from an oyster. *Int J Syst Bact* 61: 888-893.

Choi, W., Lee, C., Kim, A., Choi, J. W., Seo, S., Lee, J., Pío, H., Kwon, Y.J. (2006) CAPD peritonitis due to *Brevundimonas vesicularis*. *Peritoneal Dialysis Int* 26: 510-512.

CHO (2020) Code of Practice for the Design, Construction, Operation, Management & Maintenance of Aquatic Facilities. Elérhető: <https://ww2.health.wa.gov.au/-/media/Files/Corporate/general-documents/water/PDF/CoP-for-design-construction-operation-management-maintenance-aquatic-facilities.pdf>.

Cloud, J.L., Carroll, K.C., Pixton, P., Erali, M., Hillyard, D.R. (2000) Detection of *Legionella* species in respiratory specimens using PCR with sequencing confirmation. *J Clin Microbiol* 38(5):1709–1712.

Cope, J.R., Ali, I.K. (2016) Primary amebic meningoencephalitis: What have we learned in the last 5 years? *Curr Infect Dis Rep* 18(10): 31.

Cui, Z., Shao, Z. (2009) Predominant strains of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading consortia from deep sea of the Middle Atlantic Ridge. *Acta Microbiologica Sinica* 49:902-909.

Davis, K.E.R., Joseph S.J., Janssen, P.H. (2004) Effects of growth medium, inoculum size, and incubation time on culturability and isolation of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 71:826-834.

- Déri-Takács, J., Eröss, A., Kovács, J.** (2014) The chemical characterization of the thermal waters in Budapest, Hungary by using multivariate exploratory techniques. *Environ Earth Sci* 74(12).
- Deshmukh, R.A., Joshi, K., Bhand, S., Roy, U.** (2016) Recent developments in detection and enumeration of waterborne bacteria: a retrospective minireview. *Microbiol Open* 5(6):901-922.
- Deshpande, L.M., Jones, R.N., Woosley, L.N., Castanheira, M.** (2014) Retrospective Molecular Analysis of DIM-1 Metallo- β -Lactamase Discovered in *Pseudomonas stutzeri* from India in 2000. *Antimicrob Agents Chemother* 58:596-598.
- D'urzo, N., Martinelli, M., Nenci, C., Brettoni, C., Telfordz, J.L., Maione, D.** (2013) High-level intracellular expression of heterologous proteins in *Brevibacillus choshinensis* SP3 under the control of a xylose inducible promoter. *Microb cell factories* 1-12.
- Ferrari, B.C., Binnerup, S.J., Gillings, M.G.** (2005) Microcolony cultivation on a soil substrate membrane system selects for previously uncultured soil bacteria. *Appl Environ Microbiol* 71:8714-8720.
- Fiume, L., Sabattini, B., Poda, G.** (2005) Detection of *Legionella pneumophila* in water samples by species-specific real-time and nested PCR assays. *Lett Appl Microbiol* 41(6): 470–475. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2005.01779.x>.
- Flemming, H.C.** (2002) Biofouling in water systems-cases, causes and countermeasures. *Appl Microbiol Biotechnol* 59:629-640.
- Flores, G.E, Liu, Y., Ferrera, I., Beveridge, T.J., Reysenbach, A.L.** (2008) *Sulfurihydrogenibium kristjanssonii* sp. nov., a hydrogen- and sulfur-oxidizing thermophile isolated from a terrestrial Icelandic hot spring. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:1153-1158.
- Flores-Carrero, A., Paniz-Mondolfi, A., Araque M.** (2016) Nosocomial bloodstream infection caused by *Pseudomonas alcaligenes* in a preterm neonate from Mérida, Venezuela. *J Clin Neonatol* 5(2):131-133.
- Furuhata, K., Edagawa, A., Miyamoto, H., Kawakami, Y., Fukuyama, M.** (2013) *Porphyrobacter colymbi* sp. nov. isolated from swimming pool water in Tokyo, Japan. *J Gen Appl Microbiol* 59:245-250.
- Gere, D., Róka E., Erdélyi, N., Bufa-Dórr, Zs., Vargha, M, Záray, Gy.** (2018) Gyógyvizek fertőtlenítési lehetőségeinek vizsgálata. A Magyar Hidrológiai Társaság Országos XXXVI. Vándorgyűlése. ISBN 978-963-8172-39-6.

- Giovanelli, D., Chung, M., Staley, J., Starovoytov, V., Le Bris, N., Vetriani C.** (2016) *Sulfurovum riftiae* sp. nov., a mesophilic, thiosulfate-oxidizing, nitrate-reducing chemolithoautotrophic epsilonproteobacterium isolated from the tube of the deep-sea hydrothermal vent polychaete *Riftia pachyptila*. Int J Syst Evol Microbiol 66:2697-2701.
- Gneiding, K., Rfrod R., Funke, R.G.** (2008) Identities of *Microbacterium* spp. encountered in human clinical specimens. J Clin Microbiol 46(11):3646-3652.
- Gomila, M., Pinhassi, J., Falsen, E., Moore, E.R.B., Lalucat, J.** (2009) *Kinneretia asaccharophila* gen. nov., sp. nov., isolated from a freshwater lake, a member of the *Rubrivivax* branch of the family *Comamonadaceae*. Inter J Syst Evol Microbiol 60:809-814.
- Halabi, Z., Mocadie, M., Zein, S.E., Kanj, S.S.** (2019) *Pseudomonas stutzeri* prosthetic valve endocarditis: A case report and review of the literature. J Infect Public Health 12:434-437.
- Hall, J.R., Mitchell, K.R., Jackson-Weaver, O., Kooser, A.S., Cron, B.R., Crossey, L.J., Takacs-Vesbach, C.D.** (2008) Molecular characterization of the diversity and distribution of a thermal spring microbial community by using rRNA and metabolic genes. Appl Environ Microbiol 74:4910-4922.
- Hárs, T.** (2006) A termálvizek környezetterhelési és gazdasági hatásai. - Doktori értekezés, SZIE., 16-20.
- Haydushka, I.A., Markova, N., Kirina, V., Atanassova, M.** (2012): Recurrent sepsis due to *Bacillus licheniformis*. J Glob Infect Dis 4:82-83.
- Hirayama, H., Takai, K., Inagaki, F., Yamato, Y., Suzuki, M., Nealson, K. H., Horikoshi, H.** (2005): Bacterial community shift along a subsurface geothermal water stream in a Japanese gold mine. Extremophiles. 9: 169-184.
- Holmgreen, J.** (2012): Options for Rainwater Disinfection 12-13.
- Inagaki, F., Takai, K., Nealson, K.H., Horikoshi, K.** (2004) *Sulfurovum lithotrophicum* gen. nov., sp. nov., a novel sulfur-oxidizing chemolithoautotroph within the ϵ Proteobacteria isolated from Okinawa Trough hydrothermal sediments. Int J Syst Evol Microbiol 54:1477-1482.
- Jackson, C.R., Langner, H.W., Donahoe-Christiansen, J., Inskeep, W.P., McDermott, T.R.** (2001) Molecular analysis of microbial community structure in an arsenite-oxidizing acidic thermal spring. Environ Microbiol 3:532-542.
- Kamagata, Y. és Tamaki H.** (2005) Cultivation of uncultured fastidious microbes. Microb Environ 20:85-91.

- Kämpfer, P., Schulze, R., Jäckel, U., Malik, K.A., Amann, R., Spring, S.** (2005) *Hydrogenophaga defluvii* sp. nov. and *Hydrogenophaga atypica* sp. nov., isolated from activated sludge. Int J Syst Evol Microbiol 55(1):341-344.
- Karpati, F., Jonasson, J.** (1996) Polymerase chain reaction for the detection of *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Burkholderia cepacia* in sputum of patients with cystic fibrosis. Mol Cell Probes 10(6):397–403. <https://doi.org/10.1006/mcpr.1996.0055>.
- Kaur, J., Verma, M., Lal, R.** (2011) *Rhizobium rosettiformans* sp. nov., isolated from a hexachlorocyclohexane dump site, and reclassification of *Blastobacter aggregatus* Hirsch and Muller 1986 as *Rhizobium aggregatum* comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol 61:1218-1225.
- Kéki, Z., Grébner, K., Bohus, V., Márialigeti K., Tóth E.** (2013) Application of special oligotrophic media for cultivation of bacterial communities originated from ultrapure water. - Acta Microbiol Immunol Hung 60(3):345-357.
- Kern, A.** (2014) Kórokozó vírusok előfordulása Magyarországi felszíni- és fürdővizekben, doktori értekezés.
- Khayer, B., Róka, E., Vargha, M.** (2021) Módszertani levél *Legionella* által okozott fertőzési kockázatot jelentő közegekre, illetve létesítményekre vonatkozó kockázat értékeléséről és a kockázatsökkentő beavatkozásokról. Nemzeti Népegészségügyi Központ, 2021. 6. kiadás. pp:5-30.
- Kim, I.S., Kim, S., Hwang, J.** (1997) Nutritional flexibility of oligotrophic and copiotrophic bacteria isolated from deionized-ultrapure water made by high-purity water manufacturing system in a semiconductor manufacturing company. J Microbiol Biotechnol 7:200-203.
- Kiss, C., Barna, Z., Vargha, M., Török, J.K.** (2014): Incidence and molecular diversity of *Acanthamoeba* species isolated from public baths in Hungary. Parasitol Rese 113:2551-2557.
- Kruithof, J.C., Kamp, P.C., Martijn, B.J.** (2007) UV/H₂O₂Treatment: A Practical Solution for Organic Contaminant Control and Primary Disinfection. Ozone: Science & Engineering, 29(4):273–280.
- Kubo, K., Knittel, K., Amann, R., Fukui, M., Matsuura, K.** (2010): Sulfur-metabolizing bacterial populations in microbial mats of the Nakabusa hot spring, Japan. Sys Appl Microbiol 34:293-302.

- Laffineur, K., Avesani, V., Cornu, G., Charlier, J., Janssens, M., Wauters, G., Delmée, M.** (2003): Bacteremia due to a novel *Microbacterium* species in a patient with leukemia and description of *Microbacterium paraoxydans* sp. nov. J Clin Microbiol 41(5):2242-2246.
- Lalucat, J., Bennasar, A., Bosch, R., García-Valdés, E., Palleroni, N.J.** (2006) Biology of *Pseudomonas stutzeri*. MMBR 70(2):510-547.
- Lau, M.C.Y., Aitchison, J.C., Pointing, S.B.** (2009): Bacterial community composition in thermophilic microbial mats from five hot springs in central Tibet. Extremophiles. 13:139-149.
- Lavenir, R., Jocktane, D., Laurent, F., Nazaret, S., Cournoyer, B.** (2007) Improved reliability of *Pseudomonas aeruginosa* PCR detection by the use of the species-specific *ecfX* gene target. J Microbiol Methods 70(1):20–29. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.03.008>.
- Liebe, P.** (2001): Termákvíz-készleteink, hasznosításuk és védelmük. - Környezetvédelmi Minisztérium (Tájékoztató). VITUKI Kiadvány:2-5.
- Liebe, P.** (2006): Felszín alatti vizeink II. - Környezetvédelmi és Vízügyi Minisztérium (Tájékoztató). VITUKI Kiadvány:1-73.
- Liu, Y.C., Young, L.S., Lin, S.Y., Hameed, A., Hsuz, Y.H., Lai, W.A., Shen, F.T., Young, C.C.** (2013) *Pseudomonas guguangensis* sp. nov., a gammaproteobacterium isolated from a hot spring. Int J Syst Evol Microbiol 63(12):4591-4598.
- Liu, W.T., Marsh, T.L., Cheng, H., Forney, L.J.** (1997) Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. Appl Environ Microbiol 63(11):4516-4522.
- Lu, Y.L., Chen, W.F., Han, L.L., Wang, E.T., Chen, W.X.** (2009) *Rhizobium alkalisoli* sp. nov., isolated from *Caragana intermedia* growing in saline-alkaline soils in the north of China. Int J Syst Evol Microbiol 59:3006-3011.
- Lutz, J.K., és Lee, J.** (2011) Prevalence and Antimicrobial-Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in Swimming Pools and Hot Tubs. Int. J. Environ. Res. Public Health 8:554-564.
- McAlister, M.B., Kulakov, L.A., O’Hanlon, M.J., Larkin, J.F., Ogden, K.L.** (2002) Survival and nutritional requirements of three bacteria isolated from ultrapure water. J Ind Microbiol Biotechnol 29:75-82.
- Melo, L.F., Bott, T.R.** (1997) Biofouling in water systems. Exp Therm Fluid Sci 14:375-381.
- Meyer-Dombard, D.R., Shock, E.L., Amend, J.P.** (2005) Archaeal and bacterial communities in geochemically diverse hot springs of Yellowstone National Park, USA. Geobiology 3:211-227.

- Mihály, Z., Győrffy, B.** (2011) Következő generációs szekvenálási technológiák kifejlődése és alkalmazásai. *Orvosi hetilap*, 152(2):55-62.
- Mikkola, R., Kolari, M., Andersson, M.A., Helin, J., Salkinoja-Salonen, M.S.** (2003) Toxic lactonic lipopeptide from food poisoning isolates of *Bacillus licheniformis*. *Eur J Bio* 267:4068-4074.
- Miseta, R.** (2012) A Harkány Gyógyfürdő termelőkútjainak kénes karsztvizében előforduló baktériumközösségek filogenetikai diverzitása. - Doktori disszertáció, ELTE:7-93.
- Mori, K. és Suzuki, K.** (2008) *Thiofaba tepidiphila* gen. nov., sp. nov., a novel obligately chemolithoautotrophic, sulfur-oxidizing bacterium of the Gammaproteobacteria isolated from a hot spring. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:1885-1891.
- Mori, K., Yamaguchi, K., Hanada, S.** (2018) *Sulfurovum denitrificans* sp. nov., an obligately chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing epsilonproteobacterium isolated from a hydrothermal field. *Int J Syst Evol Microbiol* 68:2183-2187.
- Najar, I.N., Sherpa, M.T., Das, S., Saurav, Das, Nagendra, Thakur** (2018) Microbial ecology of two hot springs of Sikkim: Predominate population and geochemistry. *Sci Total Environ* 637–638:730–745.
- Nakagawa, S., Shtaih, Z., Banta, A., Beveridge, T.J., Sako Y., Reysenbach, A.L.** (2005) *Sulfurihydrogenibium yellowstonense* sp. nov., an extremely thermophilic, facultatively heterotrophic, sulfur-oxidizing bacterium from Yellowstone National Park, and emended descriptions of the genus *Sulfurihydrogenibium*, *Sulfurihydrogenibium subterraneum* and *Sulfurihydrogenibium azorense*. *Int J Syst Evol Microbiol* 55:2263-2268.
- Némedi, L.** (2013) Az ásványvizek mikrobiológiai jellemzői. Dr. Borszéki B. Gy. A Kárpát-medence ásvány- és gyógyvizei. - Nagy és Társa Nyomda és Kiadó Kft. Budapest:168-195.
- Noble, R.C., Overman, S.B.** (1994) *Pseudomonas stutzeri* infection. A review of hospital isolates and a review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis* 19(1):51-56.
- Nunan, N, Daniell T.J., Singh, B.K., Papaert, A., Mcnicol J.W., Prosser J.I.** (2005) Links between plant and rhizoplane bacterial communities in grassland soils, characterized using molecular techniques. *Appl Environ Microbiol* 71: 6784-6792.
- Nüsslein, K., Tiedje, J.M.** (1998): Characterization of the dominant and rare members of a young Hawaiian soil bacterial community with small-subunit ribosomal DNA amplified from DNA fractionated on the basis of its guanine and cytosine composition. *Appl Environ Microbiol* 64(4):1283-1289.

- O'Neill, A.H., Liu, Y., Ferrera I., Beveridge, T.J., Reysenbach, A.L.** (2008) *Sulfurihydrogenibium rodmanii* sp. nov., a sulfur-oxidizing chemolithoautotroph from the Uzon Caldera, Kamchatka Peninsula, Russia, and emended description of the genus *Sulfurihydrogenibium*. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:1147-1152.
- Osborn, A.M., Moore, E.R.B., Timmis, K.N.** (2000) An evaluation of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environ. Microbiol* 2:39-50.
- Oswald, K., Graf, J.S., Littmann, S., Tienken, D., Brand, A., Wehrli, B., Albertsen, M., Daims, H., Wagner, M., Kuypers, M.M.M., Schubert, C.J., Milucka, J.** (2017) Crenothrix are major methane consumers in stratified lakes. *ISME Journal*:1-17.
- Otsuka, S., Ueda, H., Suenaga, T., Uchino, Y., Hamada, M., Yokota, A., Senoo, K.** (2013) *Roseimicrobium gellanilyticum* gen. nov., sp. nov., a new member of the class Verrucomicrobiae. *Int J Syst Evol Microbiol* 63:1982-1986.
- Overmann, J.** (2013) Principles of enrichment, isolation, cultivation, and preservation of prokaryotes. - In the prokaryotes: Prokaryotic biology and symbiotic associations 149-207.
- Paise, S., Coulon, F., Goni-Urriza, M., Peperzak, L., Mcgenity, T., Duran, R.** (2008) Structure of bacterial communities along a hydrocarbon contamination gradient in a coastal sediment. *FEMS Microbiol Ecol* 66(2):295-305.
- Palmer, R.J.JR., White, D.C.** (1997) Developmental biology of biofilms: implications for treatment and control. *Trends Microbiol* 5:435-440.
- Pándics, T.** (2018) Ivóvíz és medencés fürdővíz komplex egészséghatása. Doktori értekezés, ELTE:15-20.
- Papp, F.** (1942) Budapest meleg gyógyforrásai. – Bp. Központi Gyógy és Üdülöhelyi Bizottság.
- Power, J. F., Carere, C. R., Lee, C.K., Wakerley, G.L.J., Evans, W.D., Button, M., White, D., Climo, D.M., Hinze, M.A., Morgan, C.X., McDonald, R.I., Cary, C.S., Stott, B.M.** (2018) Microbial biogeography of 925 geothermal springs in New Zealand. *Nat Commun* DOI: 10.1038/s41467-018-05020-y.
- Prakash, O., Nimonkar, Y., Munot, H., Sharma, A., Vemuluri, V.R., Chavadar, M.S., Shouche, Y.S.** (2014) Description of *Micrococcus aloeverae* sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from *Aloe vera*. *Int J Syst Evol Microbiol* 64(Pt 10):3427-3433.
- Pruesse, E., Peplies, J., Glöckner, F.O.** (2012) SINA: accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. *Bioinformatics* 28:1823–1829.

- PWTAG** (2020) Code of practice for swimming pool water. Pool Water Technical Advisory Group. Elérhető: <https://www.pwtag.org/swimming-pool-water-book/>.
- QLD** (2004) Queensland health swimming and spa pool water quality and operational guidelines. Elérhető: <https://qha.org.au/wp-content/uploads/2017/08/Queensland-Health-Swimming-n-Spa-Pool-Guidelines.pdf>.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F.O.** (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucl Acids Res* 41:D590–D596.
- Radolf, J.D.** (1996) Medical Microbiology. 4 th Edition. Chapter 12 *Staphylococcus*. The University of Texas Medical Branch at Galveston.
- Radolf, J.D.** (1996) Medical Microbiology. 4 th Edition. Chapter 36 *Treponema*. The University of Texas Medical Branch at Galveston.
- Reasoner, D. J., Geldreich, E.E.** (1985) A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl Environ Microbiol* 49:1-7.
- Ren, D.W., Wang, E.T., Chen, W.F., Sui, X.H., Zhang, X.X., Liu, H.C., Chen, W.X.** (2011) *Rhizobium herbae* sp. nov. and *Rhizobium giardinii*-related bacteria, minor microsymbionts of various wild legumes in China. *Int J Syst Evol Microbiol* 61:1912-1920.
- Révész, D.** (2019) Fertőtlenítés hatása gyógyvizek gyógyhatású tényezőire. – Szakdolgozat, BME 5-11.
- Santini, F., Borghetti, V., Amalfitano, G., Mazzucco, A.** (1995) *Bacillus licheniformis* prosthetic aortic valve endocarditis. *J Clin Microbiol* 33:3070-3073.
- Sayeh, R., Birrien, J.L., Alain, K., Barbier, G., Hamdi, M., Prieur, D.** (2010): Microbial diversity in Tunisian geothermal springs as detected by molecular and culture-based approaches. *Extremophiles* 14:501-514.
- Schloss, P.D., Gevers, D., Westcott, S.L.** (2011) Reducing the effects of PCR amplification and sequencing artifacts on 16S rRNA-based studies. *PloS One* 6:e27310.
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thallinger, G.G., Van Horn, D.J., Weber, C.F.** (2009) Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 75:7537–7541.

- Semenov, M., Blagodatskaya, E., Stepanov, A., Kuzyakov, Y.** (2018) DNA-based determination of soil microbial biomass in alkaline and carbonaceous soils of semi-arid climate. *J Arid Environ*:150:54-61.
- Shi, B.H., Arunpairojana, V., Palakawong, S., Yokota, A.** (2002) *Tistrella mobilis* gen. nov., sp. nov., a novel polyhydroxyalkanoate-producing bacterium belonging to α -Proteobacteria. *J Gen Appl Microbiol* 48:335-343.
- Sikorski, J., Mohle, M., Wackernagel, W.** (2002) Identification of complex composition, strong strain diversity and directional selection in local *Pseudomonas stutzeri* populations from marine sediment and soils. *Environ Microbiol* 4(8):465-476.
- Sikorski, J., Tindall, B.J., Lowry, S., Lucas, S., Nolan, M., Copeland, A., Del Rio, G.T., Trice H., Cheng, J.F., Han, C., Pitluck, S. és mtsai** (2010) Complete genome sequence of *Meiothermus silvanus* type strain (VI-R2T). *Stand Genomic Sci* 3:37-46.
- Silverman, J.M., Brunet, Y.R., Cascales, E., Mougous, J.D.** (2012) Structure and regulation of the type VI secretion system. *Annu Rev Microbiol* 66:453-472.
- Soliman, T., Yang, S.Y., Yamazaki, T., Jenke-Kodama, H.** (2017) Profiling soil microbial communities with next-generation sequencing: the influence of DNA kits election and technician technical expertise. *PeerJ* 5:4178.
- Sorokina, A.Y., Chernousova, E.Y., Dubinina, G.A.** (2012) *Ferrovibrio denitrificans* gen. nov., sp. nov., a novel neutrophilic facultative anaerobic Fe(II)-oxidizing bacterium. - *FEMS Microbiol Lett* 335(1):19-25.
- Spilker, T., Coenye, T., Vandamme, P., Lipuma, J.J.** (2004) PCR-Based Assay for Differentiation of. *Society* 42(5):2074–2079. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.5.2074>.
- Stevenson, B. S., Eichorst, S. A., Wertz, J. T., Schmidt, T. M., Breznak, J. A.** (2004) New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes. *Appl Environ Microbiol* 70:4747-4755.
- Stolz, A., Busse, H.-J., Kämpfer, P.** (2007) *Pseudomonas knackmussii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:572-576.
- Suzuki, M., Suzuki, S., Matsui, M., Hiraki, Y., Kawano, F., Shibayama, K.** (2013) Genome sequence of a strain of the human pathogenic bacterium *Pseudomonas alcaligenes* that caused bloodstream infection. *Genome Announc* 1(5):1-2.
- Szili-Kovács, T., Kátai, J., Takács, T.** (2011) Mikrobiológiai indikátorok alkalmazása a talajminőség értékelésében. 1. Módszerek. *Agrokémia és Talajtan* 60(1):73-286.

- Szuróczi, S., Kéki, Zs., Káli, Sz., Lippai, A., Márialigeti, K., Tóth, E.** (2016) Microbiological investigations on the water of a thermal bath at Budapest. *Acta Microbiol Immunol Hung* 63(2):229-241.
- Takagi, H., Shida O., Kadowaki, K., Komagata, K., Udaka, S.** (1993) Characterization of *Bacillus brevis* with descriptions of *Bacillus migulanus* sp. nov., *Bacillus choshinensis* sp. nov., *Bacillus parabrevis* sp. nov., and *Bacillus galactophilus* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 43(2):221-231.
- Takai, K., Kobayashi, H., Neelson, K.H., Horikoshi, K.** (2003) *Sulfurihydrogenibium subterraneum* gen. nov., sp. nov., from a subsurface hot aquifer. *Int J Syst Evol Microbiol* 53:823-827.
- The NIH HMP Working Group** (2009) The NIH Human Microbiome Project. *Genome Research* 19:2317-2323.
- Tiago, I., Mendes, V., Pires, C., Morais, P.V., Veríssimo, A.** (2005) *Phenylobacterium falsum* sp. nov., an *Alphaproteobacterium* isolated from a nonsaline alkaline groundwater, and emended description of the genus *Phenylobacterium*. *Syst Appl Microbiol* 28:295-302.
- Tindall, B.J., Rossello-Mora, R., Busse, H.J., Ludwig, W., Kämpfer, P.** (2010) Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *Int J Syst Evol Microbiol* 60:249–266.
- Töwe, S., Wallisch, S., Bannert, A., Fischer, D. és mtsai** (2011): Improved protocol for the simultaneous extraction and column-based separation of DNA and RNA from different soils. *J Microbiol Met* 84(3):406-412.
- Trung, N.T., Hien, T.T.T., Huyen, T.T.T. és mtsai** (2015) Simple multiplex PCR assays to detect common pathogens and associated genes encoding for acquired extended spectrum betalactamases (ESBL) or carbapenemases from surgical site specimens in Vietnam. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 14:23.
- Tsai, H.C., Chou, M.Y., Shih, Y.J., Huang, T.Y., Yang, P.Y., Chiu, Y.C., Hsu, B.M.** (2018) Distribution and genotyping of aquatic *Acinetobacter baumannii* strains isolated from the Puzi River and its tributaries near areas of livestock farming. *Water (Switzerland)* 10(10). <https://doi.org/10.3390/w10101374>.
- Tsai, S. H., Selvam, A. D. G., Chang, Y. P., Yang, S.S.** (2009) Soil bacterial community composition across different topographic sites characterized by 16S rRNS gene clones in the Fushan forest of Taiwan. *Botanical Studies*, 50 (1):57-68.
- Valenstein, P., Bardy, G.H., C. Cox, C.C., Zwadyk, P.** (1983) *Pseudomonas alcaligenes* endocarditis. *Am J Clin Pathol* 79(2):245-247.

- Valeriani, F., Crognale, S., Protano, C. és mtsai.** (2018) Metagenomic analysis of bacterial community in a travertine depositing hot spring. *New Microbiol* 41(2):126-135.
- Vargha, M., Róka E., Barna, Zs., Kiss, Cs., Kern, A.** (2015): Magyarországi fürdők mikrobiológiai vízminősége. Országos Közegészségügyi Központ Országos Környezetegészségügyi Igazgatóság Vízhigiénés osztály. Magyar Fürdőszövetség Közgyűlés 2015:1-6.
- Vargha, M., Bufa-Dórr, Zs., Róka, E.** (2017) Szervezeti változások a fürdők hatósági rendszerében. Épületgépészeti és Vízgazdálkodási továbbképzés, Budapesti és Pest Megyei Mérnöki Kamara, 2017. 12. 06. Elérhető: <https://docplayer.hu/105380095-Szervezeti-valtozasok-a-furdok-hatosagi-rendszereben.html>.
- Vartoukian, S.R., Palmer, R.M., Wade, W.G.** (2018): Strategies for culture of ‘unculturable’ bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 309:1-7.
- Verma, H., Rani, P., Kumar Singh, A., Kumar, R., Dwivedi, V., Negi, V., and Lal, R.** (2015) *Sphingopyxis flava* sp. nov., isolated from a hexachlorocyclohexane (HCH)-contaminated soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 65:3720-3726.
- Vladár, P., Rusznyák, A., Márialigeti, K., Borsodi, A.K.** (2008) Diversity of sulphate-reducing bacteria inhabiting rhizosphere of *Phragmites australis* in Lake-Velencei (Hungary) revealed by a combined cultivation based and molecular approach. *Microb Ecol* 56:64-75.
- WHO** (2006) Guidelines for safe recreational water environments. Volume 2. Swimming pools, spas and similar recreational-water environments. Egészségügyi Világszervezet, Genf, Svájc.
- Wieser, M., Denner, E.B.M., Kampfer, P., Schumann, P., Tindall, B., Steiner, U., Vybiral, D., Lubitz, W., Maszenan, A.M., Patel, B.K.C., Seviour, R.J., Radax, C., and Busse, H.J.** (2002) Emended descriptions of the genus *Micrococcus*, *Micrococcus luteus* (Cohn 1872) and *Micrococcus lylae* (Kloos et al. 1974). *Int J Syst Evol Microbiol* 52:629-637.
- Yassin, A.F., Hupfer, H., Schaal, K.P.** (2006) *Dietzia cinnamea* sp. nov., a novel species isolated from a perianal swab of a patient with bone marrow transplant. *Int J Syst Evol Microbiol* 56:641-645.
- Yasumoto-Hirose, M., Nishijima, M., Ngirchchol, M.K., Kanoh, K., Shizuri, Y., Miki, W.** (2006) Isolation of marine bacteria by in situ culture on media –supplemented polyurethane foam. *Marine Biotechnology* 8:227-237.
- Zengler, K.** (2009) Central role of the cell in microbial ecology. *Microbiol Mor Biol Rev* 73:712-729.

Zmantar, T., Kouidhi, B., Miladi, H. és mtsai (2011) Detection of macrolide and disinfectant resistance genes in clinical Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci. BMC Research Notes:453.

Hivatkozott jogszabályok

121/1996 (VII. 24.) Kormányrendelet a közfürdők létesítéséről és működéséről.

74/1999. (XII. 25.) EüM rendelet a természetes gyógytényezőkről.

37/1996 (X. 18.) NM rendelet a közfürdők létesítésének és üzemeltetésének közegészségügyi feltételeiről.

49/2015 (XI. 6.) EMMI rendelet a Legionella által okozott fertőzési kockázatot jelentő közegekre, illetve létesítményekre vonatkozó közegészségügyi előírásokról.

Hivatkozott szabványok

MSZ 12750-21:1971 Felszíni vizek vizsgálata. Oxigénfogyasztás, kémiai oxigénigény (KOI) meghatározása. Magyar Szabványügyi Testület, Budapest.

MSZ 1484-22:2009 vízminőség. 22. rész: A pH és az egyensúlyi pH meghatározása. Magyar Szabványügyi Testület, Budapest.

MSZ 1484-3:2006 vízvizsgálat. 3. rész: Az oldott, a lebegő anyaghoz kötött és az összes fémtartalom meghatározása AAS- és ICP-OES-módszerrel. Magyar Szabványügyi Testület, Budapest.

MSZ 448-14:1990 Ivóvízvizsgálat. A szulfidion-tartalom meghatározása. Magyar Szabványügyi Testület, Budapest.

MSZ 448-18:2009 Az ortofoszfát és az összes foszfor meghatározása spektrofotometriás módszerrel. Magyar Szabványügyi Testület, Budapest.

MSZ 448-21:1986 Az összes, a karbonát- és a nemkarbonát-keménység meghatározása. Magyar Szabványügyi Testület, Budapest.

MSZ EN 1484:1998 Az összes szerves széntartalom (TOC) és az oldott szerves széntartalom (DOC) meghatározásának irányelvei. Magyar Szabványügyi Testület, Budapest.

MSZ EN 27888:1998 vízminőség. Az elektromos vezetőképesség meghatározása (ISO 7888:1985). Magyar Szabványügyi Testület, Budapest.

MSZ EN ISO 10304-1:2009 Az oldott anionok meghatározása ionkromatográfiával. 1. rész: A bromid, a klorid, a fluorid, a nitrát, a nitrit, a foszfát és a szulfát meghatározása (ISO 10304-1:2007). Magyar Szabványügyi Testület, Budapest.

MSZ EN ISO 10304-3:1999 Az oldott anionok meghatározása ionkromatográfiával. 3. rész: Kromát-, jodid-, szulfid-, tiocianát- és tiosulfátion meghatározása (ISO 10304-3:1997). Magyar Szabványügyi Testület, Budapest.

MSZ EN ISO 11885:2009 Egyes kiválasztott elemek meghatározása induktív csatolású plazma ionforrású optikai emissziós spektrometriával (ICP-OES) (ISO 11885:2007). Magyar Szabványügyi Testület, Budapest.

MSZ EN ISO 17294-2:2005 Az induktív csatolású plazma ionforrású tömegspektrometria (ICP-MS) alkalmazása. 2. rész: 62 elem meghatározása (ISO 17294-2:2003). Magyar Szabványügyi Testület, Budapest.

MSZ EN ISO 9963-1:1998 A lúgosság meghatározása. 1. rész: Az összes és az összetett lúgosság meghatározása (ISO 9963-1:1994). Magyar Szabványügyi Testület, Budapest.

MSZ ISO 7150-1:1992 Az ammónium meghatározása vízben. Manuális spektrofotometriás módszer. Magyar Szabványügyi Testület, Budapest.

MSZ 13690-2:1989 Fürdővíz. Mintavétel és bakteriológiai vizsgálat. Magyar Szabványügyi Testület, Budapest.

MSZ 13690-3:1989 Fürdővíz. Minősítés bakteriológiai vizsgálat alapján. Magyar Szabványügyi Testület, Budapest.

MSZ 15234:2012 Fürdőmedencék vízkezelése vízforgatással. Magyar Szabványügyi Testület, Budapest.

MSZ EN ISO 11731-2:2008 vízminőség. Legionella kimutatása és megszámlálása. 2. rész. Közvetlen membránszűrési módszer kis baktériumszámú vizek esetén (ISO 11731-2:2004). Magyar Szabványügyi Testület, Budapest.

MSZ EN ISO 16266:2008 vízminőség. Pseudomonas aeruginosa kimutatása és megszámlálása. Membránszűrési módszer (ISO 16266:2006). Magyar Szabványügyi Testület, Budapest.

MSZ EN ISO 7899-2:2000 vízminőség. Az enterokokkusz bélbaktériumok kimutatása és megszámlálása. 2. rész: Membránszűrési módszer (ISO 7899-2:2000). Magyar Szabványügyi Testület, Budapest.

MSZ EN ISO 9308-1:2001 vízminőség. Az Escherichia coli és a coliform baktériumok kimutatása és megszámlálása. 1. rész: Membránszűrési módszer (ISO 9308-1:2000). Magyar Szabványügyi Testület, Budapest.

11. Függelék

11.1. A DAPI festéshez használt oldatok összetétele:

10x foszfátpuffer (PBS):

NaCl	80 g
KCl	2 g
Na ₂ HPO ₄	14,4 g
KH ₂ PO ₄	2,4 g
Desztillált víz	1000 ml
pH	7,2

Paraformaldehid oldat (PFA):

Desztillált víz	95 ml
Paraformaldehid	8 g
1 mol/l NaOH	2 csepp
Steril 20x PBS	5 ml
pH	7,0

11.2. A tenyésztés vizsgálatokhoz alkalmazott táptalajok összetétele

Endo táptalaj összetétele (1 liter)

Húspepton	10 g
Húskivonat	10 g
Nátrium-klorid	5 g
Laktóz	10 g
Nátrium-szulfid	2 g
Bázikus fukszin oldat	5,5 ml
Desztillált víz	1000 ml
pH	7,4

(autoklávozás 115°C-on, 30 percig, 1 atm túlnyomáson)

Bázikus fukszin oldat:

11-12 g bázikus fukszin 96%-os etanolban oldunk fel. Az oldatot néhány napig állni hagyjuk, majd leszűrjük.

Laktóz-fenolvörös bouillon

Húskivonat	3 g
Pepton	5 g
25% Laktóz oldat	20 ml
Fenolvörös oldat	25 ml
Desztillált víz	1000 ml
pH	7,2

(autoklávozás 115°C-on, 30 percig, 1 atm túlnyomáson)

Fenolvörös oldat:

Fenolvörös	0,2 g
0,1 mol/l NaOH	6,3 ml
Desztillált víz	1000 ml

Cetrimid táptalaj összetétele (1 liter)

Zselatin pepton	16 g
-----------------	------

Kazein (hidrolizált)	10 g
Kálium-szulfát (vízmentes)	10 g
Magnézium-klorid (vízmentes)	1,4 g
Glicerol	10 ml
Agar	11-18 g
Cetrimid	0,2 g
Nalidixilsav	0,05 g
Desztillált víz	1000 ml
pH	7,1

(autoklávozás 121°C-on, 15 percig, 1 atm túlnyomáson)

Mivel a cetrimid és a nalidixilsav hőérzékeny, az autoklávozás után 45-50°C-ra lehűtött táptalajhoz adható hozzá úgy, hogy 2 ml steril desztillált vízben oldjuk fel a komponenseket.

King B táptalaj összetétele (1 liter)

Pepton	20 g
Glicerol	10 ml
Dikálium-hidrogén-foszfát	1,5 g
Magnézium-szulfát-heptahidrát	1,5 g
Agar	15 g
Desztillált víz	1000 ml
pH	7,2

(autoklávozás 121°C-on, 15 percig, 1 atm túlnyomáson)

Acetamid leves összetétele (1 liter)

„A” oldat	900 ml
„B” oldat	1 ml

(autoklávozás 121°C-on, 15 percig, 1 atm túlnyomáson)

„A” oldat:

Kálium-dihidrogén-foszfát	1 g
Magnézium-szulfát (vízmentes)	0,2 g
Acetamid	2 g
Nátrium-klorid	0,2 g
Desztillált víz	900 ml

„B” oldat:

Nátrium-molibdát	0,5 g
Vas-szulfát (heptahidrát)	0,05 g
Desztillált víz	1000 ml

Húspepton agar összetétele (1 liter)

Pepton	5 g
Húskivonat	3 g
Agar	15 g
Desztillált víz	1000 ml
pH	7,4

(autoklávozás 121°C-on, 15 percig, 1 atm túlnyomáson)

Nessler reagens összetétele (100ml)

Higany-klorid	10 g
---------------	------

Kálium-klorid	7 g
Nátrium-hidroxid	16 g
Desztillált víz	100 ml

Sós-véres agar táptalaj összetétele (1 liter)

Tripton	15 g
Szója pepton	5 g
Nátrium-klorid	75 g
Desztillált víz	1000 ml
pH	7,3

(autoklávozás 121°C-on, 30 percig, 1 atm túlnyomáson)

A 45°C-ra lehűtött táptalaj 1000 ml-éhez 50 ml defibrinált marha vagy birkavért adagolunk.

BCYE összetétele (1 liter)

Élesztő kivonat	10 g
Agar	12 g
Aktív szén	2 g
α-ketoglutarát, monokálium só	1 g
ACES puffer (N-2-acetamido-2-aminoetánszulfonsav)	10 g
Kálium-hidroxid	2,8 g
L-cisztein hidroklorid monohidrát	0,4 g
Vas (III) pirofoszfát	0,25 g
Desztillált víz	1000 ml
pH	6,8

(autoklávozás 121°C-on, 15 percig, 1 atm túlnyomáson)

Szelektív táptalaj kiegészítők GVPC táptalajhoz (1 liter)

Ammónium-mentes glicin	3 g
Polimixin B foszfát	80000 IU
Vankomicin hidroklorid	0,001 g
Cikloheximid	0,08 g

Savas puffer *Legionella* vizsgálathoz

„A” oldat	3,9 ml
„B” oldat	25 ml
pH	2,2

„A” oldat

Hidrogén-klorid	17,4 ml
Desztillált víz	1000 ml

„B” oldat

Kálium-klorid	14,9 g
Desztillált víz	1000 ml

Foszfát puffer *Legionella* vizsgálathoz

Nátrium-klorid	0,12 g
Magnézium-szulfát (heptahidrát)	0,004 g
Kalcium-klorid	0,004 g

Dinátrium-hidrogén-foszfát	0,142 g
Kálium-dihidrogén-foszfát	0,136 g
Desztillált víz	1000 ml

10%-os R2A agar és gelrite összetétele (1 liter)

Proteóz pepton	0,05 g
Casamino sav	0,05 g
Élesztőkivonat	0,05 g
Glükóz	0,05 g
Oldható keményítő	0,05 g
KH ₂ PO ₄	0,03 g
MgSO ₄	0,005 g
Na-piruvát	0,03 g
Agar-agar/gelrite	16 g / 14 g
Kútvíz	1000 ml
pH	7,2

(autoklávozás 121°C-on, 20 percig, 1 atm túlnyomáson)

Minimál médium agar és gelrite (1 liter)

Nyomelemoldat	1 ml
Makroelem oldat	100 ml
Na-acetát	0,5 g
Metanol	2 ml
Glicerin	2 ml
Agar-agar/Gelrite	20,0 g/12,0 g
Kútvíz	1000 ml
pH	7,0

Minimál Médium táptalaj oldatainak összetétele (1 liter):

Nyomelem oldat:

FeSO ₄ × 7 H ₂ O	2,0 g
H ₃ BO ₃	0,03 g
MnCl ₂ × 4 H ₂ O	0,1 g
CoCl ₂ × 6 H ₂ O	0,19 g
NiCl ₂ × 6 H ₂ O	0,024 g
CaCl ₂ × 2 H ₂ O	0,002 g
ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	0,144 g
Na ₂ MoO ₄ × 2 H ₂ O	0,036 g
EDTA	5,2 g
Desztillált víz	1000 ml
pH	7,0

Makroelem oldat:

KNO ₃	1 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	0,1 g
CaCl ₂ × 2 H ₂ O	0,02 g
Desztillált víz	1000 ml
pH	7,0

Vitamin oldat:

4-aminobenzoésav	40 mg
D(+)-biotin	10 mg
Nikotinsav	100 mg
Ca-D(+)-pantoteát	50 mg
Piridoxin-hidroklorid	100 mg
Tiamin-hidroklorid	100 mg
Desztillált víz	1000 ml
pH	7,0

Mivel a vitamin oldat hőérzékeny, így az autoklávban nem sterilizálható, a többi oldattól külön, 0,2 µm pórusátmérőjű polikarbonát filteren (Millipore, Billerica, MA, USA) átszűrve sterilizáltuk, ezt követően adtuk a táptalajhoz. A nyomelem-, illetve makroelem oldatot autoklávban sterilizáltuk 121°C-on, 20 percig, 1 atm túlnyomáson.

11.3. A PCR reakciókhoz alkalmazott primerek**A baktériumtörzsek azonosításához használt primerek:**

27F	5' -AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG- 3'
1492R	5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3'

NGS vizsgálatokhoz használt primerek:

27F	5' -AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG- 3'
534R	5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3'

A taxonspecifikus PCR reakciókhoz használt primerek:

PA-GS-F	5'GACGGGTGAGTAATGCCTA-3'
PA-GS-R	5'-CACTGGTGTTTCCTTCCTATA-3'
ECF1	5'-ATGGATGAGCGCTTCCGTG-3'
ECF2	5'-TCATCCTTCGCCTCCCTG-3'
JRP	5'- CCAACAGCTAGTTGACATCG-3'
JFP	5'- AGGGTTGATAGGTTA AGAGC-3'
mip3	5'- AAAGGCATGCAAGACGCTAT-3'
mip4	5' ACGTTGCTGGCTTACCAGTT-3'
mip5	5'-TTTGATGGCAAAGCGTACTG-3'
mip6	5'-TTGCAAACCACTTGGCAATA-3'
ZL1675	5'ATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCC-3'
ZR2025	5'CACCATGCCGTGGGTTTCAATATT-3'
P-Ab-ITSF	5'- CATTATCACGGTAATTAGTG-3'
P-AbI-TSB	5'- AGAGCACTGTGCACTTAAG-3'
SmF	5'-GTG GAT ACT GGA CGA CTA GAG TGT-3'
SmR	5'-GCG TGC CAA ATT GCA CCC AAC AT-3'
SHV-F	5'-TGT ATT ATC TC(C/T) CTG TTA GCC(A/G) CCC TG-3'
SHV-R	5'-GCT CTG CTT TGT TAT TCG GGC CAA GC- 3'
TEM-F	5'-TCG CCG CAT ACA CTA TTC TCA GAA TGA C-3'
TEM-R	5'-CAG CAAT AAA CCA GCC AGC CGG AAG-3'
CTX-M-F	5'-ATG TGC AGY ACC AGT AAR GTK ATG GC-3'
CTX-M-R	5'-GGT RAA RTA RGT SAC CAG AAY CAG CGG-3'
ermA-F	5'-TAT CTT ATC GTT GAG AAG GGA TT-3'
ermA-R	5'-CTA CAC TTG GCT TAG GAT GAA A-3'

ermB-F	5'-GTTTACTCTTGGTTTAGGATGAAA-3'
ermB-R	5'-GTT TAC TCT TGG TTT AGG ATG AAA-3'
ermC-F	5'-CTT GTT GAT CAC GAT AAT TTC C-3'
ermC-R	5'-ATC TTT TAG CAA ACC CGT ATT-3'
mrsA-F	5'-TCC AAT CAT AGC ACA AAA TC-3'
mrsA-R	5'-AAT TCC CTC TAT TTG GTG GT-3'
mef-F	5'-AGT ATC ATT AAT CAC TAG TGC-3'
mef-R	5'-TTC TTC TGG TAC AAA AGT GG-3'

11.4. Az alkalmazott PCR reakciók reakcióelegyeinek összetétele

A baktériumtörzsek 16S rRNS génjének PCR reakciójához alkalmazott reakcióelegy (50 μ l):

dH ₂ O	28 μ l
dNTP (1mM; Fermentas)	10 μ l
10X <i>Taq</i> puffer (Fermentas)	5 μ l
MgCl ₂ oldat	4 μ l
27F primer	0,5 μ l
1492R primer	0,5 μ l
<i>Taq</i> DNS polimeráz (1U* μ l ⁻¹ ; Fermentas)	1 μ l
+DNS templát	1 μ l

NGS vizsgálatokhoz használt reakcióelegy összetétele (1205 μ l):

1X Phusion puffer (Fermentas)	0,6 ml
dNTP (1mM; Fermentas)	0,2 ml
BSA (Fermentas)	0,4 μ l
27F primer	0,5 μ l
534R primer	0,5 μ l
Phusion DNS polimeráz (0,4U* μ l ⁻¹ Thermo Fisher Scientific)	0,4 ml
+ templát (PCR termék)	5 μ l

Taxonspecifikus PCR reakciók reakcióelegye (25 μ l):

dH ₂ O	15,8 μ l
dNTP (1mM; Fermentas)	5 μ l
10X Dream <i>Taq</i> puffer (Fermentas)	2,5 μ l
F primer	0,25 μ l
R primer	0,25 μ l
Dream <i>Taq</i> DNS polimeráz (1U* μ l ⁻¹ ; Fermentas)	0,2 μ l
+DNS templát	1 μ l

Multiplex PCR SHV és a CTX-M gének vizsgálatának reakcióelegye (25 μ l):

dH ₂ O	6,5 μ l
Phire Green Hot Start II	
PCR Master mix (Thermo Fisher Scientific)	12,5 μ l

SHVF primer	1 µl
SHVR primer	1 µl
CTX-MF primer	1 µl
CTX-MR primer	1 µl
+ DNS templát	2 µl

Multiplex PCR TEM gének vizsgálatának reakcióelegye (25 µl):

dH ₂ O	6,5 µl
dNTP (1mM; Fermentas)	12,5 µl
TEMF primer	1 µl
TEMR primer	1 µl
Dream Taq DNS polimeráz (1U*µl ⁻¹ ; Fermentas)	0,5 µl
10X Dream Taq puffer (Fermentas)	2,5 µl
+ DNS templát	2 µl

Multiplex PCR ermA, ermC, msrA, és mef gének vizsgálatának reakcióelegye (25 µl):

dH ₂ O	2,5 µl
enzim mix	12,5 µl
ermAF primer	1 µl
ermAR primer	1 µl
ermCF primer	1 µl
ermCR primer	1 µl
mrsAF primer	1 µl
mrsAR primer	1 µl
mefF primer	1 µl
mefR primer	1 µl

+ DNS templát 2 µl

Multiplex PCR ermB gének vizsgálatának reakcióelegye (25 µl):

dH ₂ O	2,5 µl
enzim mix	12,5 µl
ermBF primer	1 µl
ermBR primer	1 µl

+ DNS templát 2 µl

11.5. Az alkalmazott PCR reakciók hőprofilja

A baktériumtörzsek 16SrRNS génjének PCR hőprofilja:

Kezdeti denaturáció	98°C	3 perc	} 32 ciklus
Denaturáció	94°C	0,5 perc	
Anelláció	52°C	0,5 perc	
Extenzió	72°C	0,45 perc	
Végső extenzió	72°C	10 perc	

Az NGS vizsgálatok során alkalmazott PCR reakció hőprofilja:

Kezdeti denaturáció	98°C	5 perc	
Denaturáció	95°C	} 0,4 perc	25 ciklus
Anelláció	55°C		
Extenzió	72°C	} 2 perc	
		} 1 perc	
Végső extenzió	72°C	10 perc	

***Pseudomonas* spp. kimutatás taxonspecifikus PCR-rel 1. reakció:**

Kezdeti denaturáció	98°C	5 perc	
Denaturáció	94°C	} 0,5 perc	32 ciklus
Anelláció	52°C		
Extenzió	72°C	} 0,5 perc	
		} 1 perc	
Végső extenzió	72°C	10 perc	

***Pseudomonas* spp. kimutatás taxonspecifikus PCR-rel 2. reakció:**

Kezdeti denaturáció	95°C	2 perc	
Denaturáció	94°C	} 0,3 perc	30 ciklus
Anelláció	54°C		
Extenzió	72°C	} 0,3 perc	
		} 0,6 perc	
Végső extenzió	72°C	1 perc	

***Pseudomonas aeruginosa* kimutatása taxonspecifikus PCR-rel:**

Kezdeti denaturáció	95°C	5 perc	
Denaturáció	94°C	} 0,45 perc	38 ciklus
Anelláció	58°C		
Extenzió	72°C	} 0,45 perc	
		} 0,45 perc	
Végső extenzió	72°C	5 perc	

***Legionella* spp. kimutatása taxonspecifikus PCR-rel 1. reakció:**

Kezdeti denaturáció	95°C	5 perc	
Denaturáció	94°C	} 0,3 perc	32 ciklus
Anelláció	52°C		
Extenzió	72°C	} 0,3 perc	
		} 0,5 perc	
Végső extenzió	72°C	10 perc	

***Legionella* spp. kimutatása taxonspecifikus PCR-rel 2. reakció:**

Kezdeti denaturáció	95°C	5 perc	
Denaturáció	94°C	} 0,45 perc	40 ciklus
Anelláció	55°C		
Extenzió	72°C	} 1,5 perc	
Végső extenzió	72°C		

***Legionella pneumophila* kimutatása taxonspecifikus PCR-rel 1. reakció:**

Kezdeti denaturáció	98°C	5 perc	
Denaturáció	94°C	} 0,45 perc	35 ciklus
Anelláció	57°C		
Extenzió	72°C	} 1 perc	
Végső extenzió	72°C		

***Legionella pneumophila* kimutatása taxonspecifikus PCR-rel 2. reakció:**

Kezdeti denaturáció	98°C	5 perc	
Denaturáció	94°C	} 0,45 perc	40 ciklus
Anelláció	57°C		
Extenzió	72°C	} 1 perc	
Végső extenzió	72°C		

Coliform baktériumok kimutatása taxonspecifikus PCR-rel:

Kezdeti denaturáció	94°C	2,5 perc	
Denaturáció	94°C	} 1 perc	40 ciklus
Anelláció	45°C		
Extenzió	72°C	} 1,5 perc	
Végső extenzió	72°C		

***Acinetobacter baumannii* kimutatása taxonspecifikus PCR-rel:**

Kezdeti denaturáció	94°C	5 perc	
Denaturáció	95°C	} 0,5 perc	32 ciklus
Anelláció	55°C		
Extenzió	72°C	} 2 perc	
Végső extenzió	72°C		

***Stenotrophomonas maltophilia* kimutatása taxonspecifikus PCR-rel 1. reakció:**

Kezdeti denaturáció	94°C	5 perc	
Denaturáció	94°C	} 0,5 perc	32 ciklus
Anelláció	52°C		
Extenzió	72°C	} 1 perc	
Végső extenzió	72°C		

***Stenotrophomonas maltophilia* kimutatása taxonspecifikus PCR-rel 2. reakció:**

Kezdeti denaturáció	94°C	5 perc	
Denaturáció	94°C	} 0,5 perc	35 ciklus
Anelláció	55°C		
Extenzió	72°C	} 0,5 perc	
Végső extenzió	72°C		

Multiplex PCR SHV és a CTX-M gének hőprofilja:

Kezdeti denaturáció	98°C	3 perc	
Denaturáció	98°C	} 5 perc	35 ciklus
Anelláció	58°C		
Extenzió	72°C	} 0,4 perc	
Végső extenzió	72°C		

Multiplex PCR TEM gének hőprofilja:

Kezdeti denaturáció	95°C	4 perc	
Denaturáció	94°C	} 0,2 perc	30 ciklus
Anelláció	63,9°C		
Extenzió	72°C	} 1 perc	
Végső extenzió	72°C		

Multiplex PCR makrolid rezisztencia gének hőprofilja:

Kezdeti denaturáció	98°C	3 perc	
Denaturáció	98°C	} 0,1 perc	30 ciklus
Anelláció	52°C		
Extenzió	72°C	} 0,2 perc	
Végső extenzió	72°C		

11.6. Az ARDRA vizsgálat során alkalmazott premix összetétele mintánként a következő volt:

dH ₂ O (steril, HPLC tisztaságú)	7,7 µl
puffer	2 µl
enzim	0,3 µl
+ templát (PCR termék)	10 µl

11.7. Az agaróz-gélelektroforézis során használt anyagok

A 1X TBE oldattal összetétele:

Tris	10,78 g l ⁻¹
Bórsav	5,5 g l ⁻¹
Na ₂ EDTA x H ₂ O	0,82 g l ⁻¹
pH	8,3

Az agaróz gél összetétele:

TBE oldat	100 ml
Agaróz	1, ill. 2 g*
GR DNA Stain (Thermo Scientific)	2,5 µl

*Attól függően, hogy 1%-os vagy 2%-os gélt készítünk.

A töltőpuffer összetétele:

Glicerín (87 v/v%)	28,75 ml
Brómfenolkék (5 mM)	2,5 ml
Xilencianol (5 mM)	2,5 ml
dH ₂ O	16,25 ml

11.8. A tenyésztéses vizsgálatok során kimutatott baktériumtörzsek listája, a baktériumtörzsek 16S rRNS génjének bázissorrend elemzése során kapott legközelebbi rokon fajok, az azokhoz viszonyított hasonlóság foka (%).

Függelék 1. táblázat. A GY1 fürdőből tenyésztéses módszerekkel kimutatott baktériumtörzsek listája. A táblázat tartalmazza az izolált baktériumtörzsek számát, a baktériumtörzsek 16S rRNS génjének bázissorrend elemzése során kapott legközelebbi rokon fajokat, az azokhoz viszonyított hasonlóság fokokat (%) és a tenyésztéses technikákat. KSZ=közvetlen szélesztés, D=dúsítás.

Legközelebbi rokon faj	Hasonlósági fok (%)	Izolált törzsek száma	Tenyésztéses technika	Víz minta
<i>Acinetobacter baumannii</i>	99,88	1	KSZ	GY1TÜ36
<i>Azospirillum rugosum</i>	97,77	1	KSZ	GY1TÜ36
<i>Bacillus licheniformis</i>	99,62	3	KSZ	GY1TÜ36
<i>Blastomonas natatoria</i>	100	1	KSZ	GY1TÜ36
<i>Brachybacterium paraconglomeratum</i>	99,75	1	KSZ	GY1K
<i>Brevibacillus choshinensis</i>	97,93	7	D	GY1K
<i>Brevundimonas vesicularis</i>	97,24	1	D	GY1K
<i>Brevundimonas viscosa</i>	99,88	1	KSZ	GY1TÜ36
<i>Caenispirillum bisanense</i>	99,61	1	KSZ	GY1TÜ36
<i>Caldimonas meghalayensis</i>	99,86	1	D	GY1K
<i>Chelatococcus daeguensis</i>	100	21	KSZ	GY1TÜ36
<i>Corynebacterium humireducens</i>	99,00	1	KSZ	GY1K
<i>Deinococcus grandis</i>	98,49	3	KSZ	GY1TÜ36
<i>Dietzia cinnamea</i>	99,62	1	KSZ	GY1TÜ36
<i>Ferrovibrio denitrificans</i>	100	7	KSZ	GY1K
				GY1TÜ36
<i>Fictibacillus nanhaiensis</i>	100	1	KSZ	GY1TÜ36
<i>Chthonobacter albigriseus</i>	98,49	26	D	GY1K
<i>Kinneretia asaccharophilia</i>	99,75	1	KSZ	GY1TÜ36
<i>Limnobacter thiooxidans</i>	99,87	2	KSZ	GY1K
<i>Methylobacterium goesingense</i>	99,39	1	D	GY1K
<i>Micrococcus luteus</i>	100	25	D és KSZ	GY1K
				GY1TÜ36
<i>Nocardioides furvisabuli</i>	98,5	1	D	GY1K
<i>Paenibacillus lautus</i>	99,09	2	KSZ	GY1TÜ36
<i>Pannonibacter phragmitetus</i>	99,66	2	KSZ	GY1TÜ36
<i>Paracoccus siganidrum</i>	98,19	1	KSZ	GY1K
<i>Phenylobacterium falsum</i>	98,40	1	KSZ	GY1TÜ36
<i>Porphyrobacter colymbi</i>	99,50	2	KSZ	GY1TÜ36
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	99,76	2	KSZ	GY1TÜ36
<i>Pseudomonas azotifigens</i>	97,91	1	KSZ	GY1TÜ36
<i>Pseudomonas balearica</i>	99,64	1	KSZ	GY1TÜ36
<i>Pseudomonas knackmussii</i>	97,57	1	KSZ	GY1TÜ36
<i>Rhizobium alkalisoli</i>	97,23	3	KSZ	GY1TÜ36
<i>Rhizobium straminoryzae</i>	99,09	2	KSZ	GY1TÜ36
<i>Sphingobacterium composti</i>	99,47	1	D	GY1K
<i>Sphingopyxis indica</i>	98,99	1	D	GY1K
<i>Tistrella mobilis</i>	99,64	26	KSZ	GY1TÜ36

Függelék 2. táblázat. A GY2 fürdőből tenyésztési módszerekkel kimutatott baktériumtörzsek listája. A táblázat tartalmazza az izolált baktériumtörzsek számát, a baktériumtörzsek 16S rRNS génjének bázissorrend elemzése során kapott legközelebbi rokon fajokat, az azokhoz viszonyított hasonlóság fokokat (%) és a tenyésztési technikákat. KSZ=közvetlen szélesztés, D=dúsítás.

Legközelebbi rokon faj	Hasonlósági fok (%)	Izolált törzsek száma	Tenyésztési technika	Víz minta
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	99,4	1	KSZ	GY2TÜ20
<i>Acinetobacter parvus</i>	99,79	1	KSZ	GY2TÜ20
<i>Bacillus subtilis subs. Inaquosorum</i>	99,88	12	KSZ	GY2TÜ38, GY2VF38
<i>Blastomonas natatoria</i>	100	1	KSZ	GY2VF38
<i>Bosea nassilensis</i>	99,47	2	KSZ	GY2TÜ20
<i>Brevibacillus brevis</i>	97,81	19	D és KSZ	GY2K, GY2TÜ38, GY2VF38
<i>Brevibacillus choshinensis</i>	99,7	100	D és KSZ	GY2K, GY2TÜ38, GY2VF38
<i>Brevundimonas lenta</i>	98,52	1	KSZ	GY2TÜ20
<i>Brevundimonas nasdae</i>	98,6	1	KSZ	GY2TÜ20
<i>Brevundimonas viscosa</i>	99,69	5	D	GY2K
<i>Ferrovibrio denitrificans</i>	99,9	5	D	GY2K
<i>Flavobacterium chunkgbukense</i>	98,15	1	KSZ	GY2TÜ20
<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	97,78	1	KSZ	GY2TÜ20
<i>Hydrogenophaga atypica</i>	98,44	24	KSZ	GY2TÜ38, GY2VF38
<i>Microbacterium paraoxydans</i>	99,48	1	KSZ	GY2VF38
<i>Micrococcus aloeverae</i>	99,89	2	D és KSZ	GY2K, GY2TÜ20
<i>Micrococcus luteus</i>	100	1	KSZ	GY2VF38
<i>Mycobacterium frederikbergense</i>	99,42	1	KSZ	GY2TÜ20
<i>Paracoccus carotinifaciens</i>	100	1	KSZ	GY2TÜ20
<i>Porphyrobacter colymbi</i>	99,4	4	KSZ	GY2TÜ20
<i>Porphyrobacter dokdonensis</i>	98,18	4	KSZ	GY2TÜ20
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	97,17	2	KSZ	GY2VF38
<i>Pseudomonas guguanensis</i>	98,48	2	KSZ	GY2VF38
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	99,88	1	KSZ	GY2TÜ38
<i>Rhizobium herbae</i>	98,52	19	KSZ	GY2TÜ20
<i>Rhodococcus fasciens</i>	100	1	KSZ	GY2TÜ20
<i>Sphingomonas faeni</i>	98,23	1	KSZ	GY2TÜ20
<i>Sphingophyxis bauzanensis</i>	99,38	3	KSZ	GY2TÜ20
<i>Sphingophyxis chilensis</i>	99,58	1	KSZ	GY2TÜ20

Függelék 3. táblázat. A GY3 fürdőből tenyésztéses módszerekkel kimutatott baktériumtörzsek listája. A táblázat tartalmazza az izolált baktériumtörzsek számát, a baktériumtörzsek 16S rRNS génjének bázissorrend elemzése során kapott legközelebbi rokon fajokat, az azokhoz viszonyított hasonlóság fokokat (%) és a tenyésztéses technikákat. KSZ=közvetlen szélesztés, D=dúsítás.

Legközelebbi rokon faj	Hasonlósági fok (%)	Izolált törzsek száma	Tenyésztéses technika	Víz minta
<i>Achromobacter insolitus</i>	99,69	1	KSZ	GY3TÜ38
<i>Acidovorax temperans</i>	99,57	1	KSZ	GY3VF38
<i>Acinetobacter baumannii</i>	99,68	3	KSZ	GY3TÜ20
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	98,6	1	KSZ	GY3TÜ20
<i>Allorhizobium pseudoryzae</i>	98,7	1	KSZ	GY3VF38
<i>Azospirillum picis</i>	99,14	1	KSZ	GY3TÜ38
<i>Bacillus paralicheniformis</i>	99,75	1	KSZ	GY3VF38
<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	99,9	1	KSZ	GY3VF38
<i>Bosea enae</i>	99,7	1	KSZ	GY3TÜ38
<i>Brevibacillus choshinensis</i>	97,77	3	KSZ	GY3K GY3TÜ38
<i>Brevundimonas nasdae</i>	99,69	1	KSZ	GY3TÜ38
<i>Brevundimonas vesicularis</i>	99,26	1	KSZ	GY3TÜ20
<i>Chelatococcus daeguensis</i>	99,81	1	KSZ	GY3TÜ38
<i>Chryseobacterium haifense</i>	99,87	1	KSZ	GY3TÜ20
<i>Deinococcus grandis</i>	99,67	4	KSZ	GY3TÜ20
<i>Dyadobacter fermentans</i>	99,63	4	KSZ	GY3TÜ38
<i>Ensifer morelensis</i>	99,67	1	KSZ	GY3TÜ20
<i>Ferrovibrio denitrificans</i>	100	10	KSZ	GY3TÜ38
<i>Gordonia hongkongensis</i>	99,89	2	KSZ	GY3TÜ20
<i>Hydrogenophaga atypica</i>	98,4	2	KSZ	GY3TÜ38
<i>Hydrogenophaga intermedia</i>	99	6	KSZ	GY3TÜ38
<i>Hydrogenophaga taeniospiralis</i>	98,02	5	KSZ	GY3TÜ38 GY3TÜ20 GY3VF38
<i>Janibacter hoylei</i>	99,9	1	KSZ	GY3TÜ38
<i>Jeotgalibacillus campisalis</i>	99,16	1	KSZ	GY3VF38
<i>Kocuria marina</i>	99,79	2	KSZ	GY3TÜ20
<i>Kocuria rhizophila</i>	100	1	KSZ	GY3TÜ38
<i>Leadbetterella byssohila</i>	98,27	1	KSZ	GY3TÜ38
<i>Meiothermus silvanus</i>	100	43	D	GY3K
<i>Methyloversatilis discipulorum</i>	99,18	2	KSZ	GY3TÜ20 GY3VF38
<i>Microbacterium paraoxydans</i>	99,9	6	KSZ	GY3TÜ38
<i>Micrococcus aloeverae</i>	100	4	KSZ	GY3K GY3TÜ38
<i>Micrococcus endophyticus</i>	100	1	KSZ	GY3TÜ38
<i>Micrococcus luteus</i>	99,75	4	D	GY3K,
<i>Moraxella osloensis</i>	100	4	KSZ	GY3TÜ38 GY3TÜ20 GY3VF38
<i>Mycobacterium vaccae</i>	99,29	3	KSZ	GY3K GY3TÜ38
<i>Niveispirillum cyanobacteriorum</i>	97,73	1	KSZ	GY3TÜ38
<i>Paracoccus sanguinis</i>	100	2	KSZ	GY3TÜ20

Legközelebbi rokon faj	Hasonlósági fok (%)	Izolált törzsek száma	Tenyésztési technika	Víz minta
<i>Paracoccus sphaerophysae</i>	99,9	2	KSZ	GY3TÜ20
<i>Paracoccus yeei</i>	100	2	KSZ	GY3TÜ20
<i>Porphyrobacter colymbi</i>	99,9	9	KSZ	GY3VF38
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100	9	KSZ	GY3TÜ38, GY3VF38
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	99,9	2	KSZ	GY3TÜ38, GY3TÜ20
<i>Pseudomonas alcaliphila</i>	100	1	KSZ	GY3TÜ38
<i>Pseudomonas balearica</i>	99,6	4	KSZ	GY3TÜ38 GY3TÜ20
<i>Pseudomonas guganensis</i>	99,3	8	KSZ	GY3TÜ20, GY3VF38
<i>Pseudomonas sihuiensis</i>	99,6	1	KSZ	GY3TÜ38
<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i>	100	1	KSZ	GY3TÜ20
<i>Rheinheimera aquatica</i>	98,47	8	KSZ	GY3TÜ20
<i>Rheinheimera arenilitoris</i>	98,81	1	KSZ	GY3TÜ20
<i>Rhizobium daejeonense</i>	97,54	4	KSZ	GY3TÜ38 GY3TÜ20
<i>Rhizobium rosettiformans</i>	100	5	KSZ	GY3VF38
<i>Rhizobium subbaraonis</i>	99,26	1	KSZ	GY3VF38
<i>Roseimicrobium gellanilyticum</i>	99,4	2	KSZ	GY3K
<i>Shinella fusca</i>	97,15	3	KSZ	GY3TÜ38
<i>Shinella zoogloeoides</i>	97,9	2	KSZ	GY3TÜ38
<i>Sphingomonas oligophenolica</i>	97,73	1	KSZ	GY3TÜ38
<i>Sphingomonas pseudosanguinis</i>	99,7	1	KSZ	GY3TÜ38
<i>Sphingopyxis indica</i>	98,77	1	KSZ	GY3VF38
<i>Sphingopyxis flava</i>	98,79	6	KSZ	GY3VF38
<i>Sphingopyxis soli</i>	99,77	1	KSZ	GY3TÜ20
<i>Tistrella mobilis</i>	99,84	4	KSZ	GY3TÜ38
<i>Vogesella perlucida</i>	99,9	1	KSZ	GY3TÜ38
<i>Xanthobacter autotrophicus</i>	97,93	1	KSZ	GY3TÜ38

Függelék 3. táblázat. Folytatás

ADATLAP

a doktori értekezés nyilvánosságra hozatalához*

I. A doktori értekezés adatai

A szerző neve: Lippai Anett

MTMT-azonosító:10054879

A doktori értekezés címe és alcíme: Budapesti gyógyfürdők mikrobiológiai vizsgálata

DOI-azonosító:10.15476/ELTE.2021.093

A doktori iskola neve: Környezettudományi Doktori Iskola

A doktori iskolán belüli doktori program neve: Környezetbiológia

A témavezető neve és tudományos fokozata: Dr. Tóth Erika, habilitált egyetemi docens

A témavezető munkahelye: ELTE Mikrobiológiai Tanszék

II. Nyilatkozatok

1. A doktori értekezés szerzőjeként

a) hozzájárulok, hogy a doktori fokozat megszerzését követően a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban. Felhatalmazom a Természettudományi kar Dékáni Hivatali Doktori, Habilitációs és Nemzetközi Ügyek Csoportjának ügyintézőjét, hogy az értekezést és a téziseket feltöltse az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba, és ennek során kitöltse a feltöltéshez szükséges nyilatkozatokat.

b) kérem, hogy a mellékelt kérelemben részletezett szabadalmi, illetőleg oltalmi bejelentés közzétételéig a doktori értekezést ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban;

c) kérem, hogy a nemzetbiztonsági okból minősített adatot tartalmazó doktori értekezést a minősítés (dátum)-ig tartó időtartama alatt ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban;

d) kérem, hogy a mű kiadására vonatkozó mellékelt kiadó szerződésre tekintettel a doktori értekezést a könyv megjelenéséig ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban, és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban csak a könyv bibliográfiai adatait tegyék közzé. Ha a könyv a fokozatszerzést követően egy évig nem jelenik meg, hozzájárulok, hogy a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban.

2. A doktori értekezés szerzőjeként kijelentem, hogy

a) az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba feltöltendő doktori értekezés és a tézisek saját eredeti, önálló szellemi munkám és legjobb tudomásom szerint nem sértem vele senki szerzői jogait;

b) a doktori értekezés és a tézisek nyomtatott változatai és az elektronikus adathordozón benyújtott tartalmak (szöveg és ábrák) mindenben megegyeznek.

3. A doktori értekezés szerzőjeként hozzájárulok a doktori értekezés és a tézisek szövegének plágiumkereső adatbázisba helyezéséhez és plágiumellenőrző vizsgálatok lefuttatásához.

Kelt: 2021. június 16.

.....
a doktori értekezés szerzőjének aláírása

*ELTE SZMSZ SZMR 12. sz. melléklet