



Párkány-Simon Beatrix<sup>1</sup>, Dr. Brumbauer Anikó<sup>1</sup>

Érkezett/Received: 2014. március/March – Elfogadva/Accepted: 2014. április/April

## Telepszámok szerepe az ivóvíz-szolgáltatásban

**Kulcsszavak:** ivóvíz, termelés, szolgáltatás, fertőtlenítés, telepszám, identifikáció, közegészségügy, klórezisztencia

### Összefoglalás

Az ivóvíz az egyik legszigorúbban ellenőrzött élelmiszer, amelyre jellemző, hogy kémiai-fizikai tulajdonságai állandónak mondhatók, de biológiailag aktív közeg, amit a víziközmű üzemeltetők fertőtlenítéssel tudnak szabályozni. A kezelés hatékonyságának ellenőrzésében a fekális szennyeződést jelző baktériumok mellett az un. indikátor szervezeteknek is fontos szerepük van, így a telepszámnak is. A vizek általános mikrobiológiai jellemzésére használatos telepszám a 22°C és 37°C-on tenyészthető baktériumok telepeinek összessége, amelynek szabvány szerinti vizsgálata az általános bakteriológiai fertőzöttségre jellemző mennyiségi információt ad az üzemeltetőnek. Célunk az volt, hogy megismerjük a Fővárosi Vízművek Zrt. termelési és szolgáltatási területén előforduló mikroorganizmusokat és klóralapú fertőtlenítőszerrel szembeni rezisztenciájukat. Eredményeink alapján az azonosított baktériumok vizes rendszerekben gyakran előforduló, biofilm alkotó, egészségre nem káros szervezeteknek bizonyultak. Mindezek mellett a hálózatban alkalmazott klórozáshoz képest csak több tízszeres klórkoncentráció esetén értünk el hatékony fertőtlenítést a termelési területekről izolált törzsek esetén.

### 2. Bevezetés és irodalmi áttekintés

Az ivóvíz kémiai jellemzőit elsősorban a vízbázis határozza meg, és azok a vízkezelési technológia megfelelő megválasztásával stabil szinten tarthatók. Az ivóvíz azonban nem steril közeg, így előfordulhatnak benne baktériumok, amelyek megjelenését a vízbázis, a vízkezelés folyamata, a fertőtlenítés, a hálózat állapota és egyes fizikai tényezők is befolyásolják [1]. Az ivóvíz mikrobiológiai vizsgálati köre kiterjed a fekális szennyeződést jelző baktériumokra és az un. indikátor paraméterekre [2]. Ez utóbbiak között szerepelnek, mint gyűjtőparaméterek, a 22°C és 37°C-on tenyészthető baktériumok, amelyek mennyiségi információt adnak a vízben megjelent mikroorganizmusokról. Hasznos információt nyújtanak az ivóvíz jellemzéséhez, felügyeletéhez, így a vízkezelési eljárások hatékonyságának értékeléséhez, a vízelosztó rendszerek állapotának monitorozásához vagy komoly szennyeződések előrejelzéséhez. A telepszámok legnagyobb értéke, a hosszú távú megfigyeléseken alapuló, a várt értékekhez képest bekövetkező változások észlelésében rejlik [3].

A megszokott értékeknél nagyobb telepszám az ivóvízben a mikrobiológiai aktivitás növekedésére utal, amelynek az alábbi okai, illetve jellemző faktorai lehetnek [4]:

- energia- és szénforrás mennyiségének növekedése a vízben (szerves anyag tartalom);
- az ivóvízzel érintkező szennyezett/fertőzött anyagok, eszközök ;
- üledékek jelenléte;
- vízhőmérséklet változása (növekedése);
- hidraulikai állapotok (áramlási sebesség) változásai, turbulencia kialakulásának lehetősége;
- fertőtlenítőszer jelenléte/hiánya, fertőtlenítőszer hatásmechanizmusa;
- a technológiában megengedethez képest nagyobb tartózkodási idő (pangó víz).

Az ivóvíz mikrobiológiai aktivitását elsősorban fertőtlenítéssel csökkenthetjük. Az oxidáló hatású fertőtlenítőszer hatásmechanizmusának lényege a mikroorganizmusok enzimrendszerének irreverzibilis befolyásolása, ennek következtében az élő szervezet elpusztítása. Leggyakrabban alkalmazott szerek a klór, nátrium-hypoklorit, klór-dioxid és ózon. Ismert még az ezüst, a jód és a bróm használata is, azonban ezek a módszerek nagyobb mértékben nem terjedtek el ivóvízes alkalmazásban [5].

<sup>1</sup> Fővárosi Vízművek Zrt.

<sup>1</sup> Waterworks of Budapest Private Company Limited by Shares



A Fővárosi Vízművek Zrt. átlagosan 0,3-0,5 mg/l behatási klórkoncentrációt alkalmaz a fogyasztói hálózaton másodlagos fertőzések megakadályozására. Egyéb megelőző tevékenységként pedig a termelő kutaknál rendszeres 2 mg/l-es üzem közbeni fertőtlenítést és esetenként, kútleállítással együtt járó 10 mg/l-es fertőtlenítést is végeznek.

Sok baktérium túlél a fertőtlenített ivóvízben is azáltal, hogy olyan mikro környezetbe kerül, vagy olyat alakít ki magának, ahol védelemmel élve a különféle fertőtlenítőszerrel szemben. A fertőtlenítő szerekkel szemben az alábbi faktorok jelenthetnek védelmet a baktériumsejteknek [6]:

- megtelepedést elősegítő felületek/biofilm;
- betokozódás/kapszulaképzés;
- sejtek aggregálódása;
- adaptálódás a környezeti feltételekhez (kevés tápanyag jelenléte esetén);
- különbségek a természetben előforduló törzsek között (érzékenység különböző fertőtlenítőszerrel szemben);
- rezisztencia-mechanizmusok interakciója.

### 3. Anyag és módszer

#### 3.1. Mintavételek és értékelés

Vizsgálati mintáink több éves időszakból származtak, és kísérleteink utolsó szakaszában a víztestek tartózkodási idejét is figyelembe véve ún. vízvonalak mentén követtük nyomon a víz útját. A Fővárosi Vízművek Zrt. szentendrei-szigeti vízbázisától, azaz termelő területeitől a fogyasztó hálózatiig végeztünk mintavételeket.

Összességében 67 db mintából 339 db baktériumtelep biokémiai azonosítása történt meg, és 13 db mikroorganizmus törzs klórrezisztencia-vizsgálatát végeztük el különböző klórkoncentrációk alkalmazásával. Az adatok kiértékelésekor, a könnyebb áttekinthetőség érdekében a mintákat származási helyük alapján csoportosítottuk: klórozatlan és klórozott termelési területre, valamint szolgáltatott vízre, amely utóbbi magába foglalja az összes mintavételi pontot az ivóvíz hálózatba történő belépésétől a fogyasztói csapig.

#### 3.2. Telepszámok tenyésztéses vizsgálata

A szakirodalom alapján a telepszámok vizsgálatára számos módszer áll rendelkezésre, amelyek a táptalaj összetételében, a termosztálási idő- és hőmérséklet-beállításokban térnek el egymástól. A magyarországi szabályozás azonban az „MSZ EN ISO 6222:2000 szabvány [8] alkalmazását követeli meg. A mintákat a szabványnak megfelelően 22 és 37°C-on is inkubáltuk.

#### 3.3. Telepek biokémiai azonosítása

Az MSZ EN ISO:6222 által előírt táptalajon megjelenő telepek biokémiai azonosítását ún. BBL Crystal Identification (BBL) technikával végeztük el, amely a mikrobák biokémiai sajátosságai alapján képes fajszintű meghatározást adni. Ehhez a telepszám vizsgálatához alkalmazott táptalajon megjelenő te-

lepekből - morfológiai differenciálás alapján (telepek színe, megjelenési formája, alakja, táptalajban való elhelyezkedése) - biokémiai azonosításra mintánként 1-15 telepet készítettünk elő.

#### 3.4. Klórrezisztencia-vizsgálatok

A klórrezisztencia-vizsgálatokat az MSZ EN 1276:2010 szabvány [9] szerint végeztük el. A megfelelő fertőtlenítő hatás feltétele a kiindulási baktériumszámhoz képest az 5 log értékű (99,999% hatékonyság) mikrobaszám-csökkenés elérése.

Az izolált mikroorganizmusok klórrezisztencia-vizsgálatának kísérleti feltételei:

- szabad klórkoncentrációk: 1-2-10 mg/L NaOCl;
- behatási idő: 1-2-4-6-24 óra;
- teszhőmérséklet: átlag vízhőmérséklet 13°C.

### 4. Eredmények

#### 4.1. Biokémiailag azonosított mikroorganizmusok elemzése

Az azonosításba bevont telepek közül összesen 24 féle mikroorganizmust sikerült valamely ismert nemzetségbe sorolni. A kinőtt baktérium-kolóniák közül 27 telep nem volt beazonosítható.

Elsőként a két inkubálási hőmérsékleten (22°C-on és 37°C-on) vizsgáltuk meg a mikroorganizmus-csoportok közötti különbségeket. Mindkét hőmérsékleten nagy számban fordultak elő *Acinetobacterium*, *Brevundimonas*, *Corynebacterium*, *Exiguobacterium*, *Micrococcus*, *Staphylococcus* és *Pseudomonas* nemzetségek tagjai. A *Stomatococcus*, *Stenotrophomonas* és *Sphingomonas* genus tagjai inkább 37°C-on, a *Flavimonas* sp. viszont csak a 22°C-on tenyésztett mintáknál jelent meg. Mivel ezen mikroorganizmusok optimális növekedési és szaporodási hőmérséklete tág határok között változik, elemzéseinknél nem tettünk különbséget az eltérő inkubálási hőmérsékleten vizsgált minták között.

Továbbiakban a mikroorganizmusok **területi megoszlását** vizsgáltuk (**1. ábra**), amelyből kitűnik, hogy

- 7 féle mikroorganizmus csoport mindegyik mintavételi területen előfordult;
- 7 törzs csak a termelési területről volt izolálható;
- 4 törzs csak fogyasztói csapokról vett mintákból volt azonosítható.

# The role of colony count in water supply

Beatrix Párkány-Simon, Dr. Anikó Brumbauer

**Keywords:** drinking water, production, service, disinfection, colony count, identification, public health, resistance to chlorine

## 1. summary

Drinking water is one of the most strictly controlled foods, characterized by the fact that its chemical and physical properties are by and large stable, but it is a biologically active medium, which is controlled by water companies using disinfection. In addition to bacteria indicating fecal contamination, so-called indicator organisms, such as colony counts, also play an important role in checking the efficiency of the treatment. Colony counts used for the general microbiological characterization of waters are the number of colonies of bacteria culturable at 22 and 37 °C, and their testing according to the standard provides the operator with quantitative information about general bacteriological contamination. Our goal was to identify microorganisms occurring in the production and service areas of the Waterworks of Budapest, and also their resistance to chlorine-based disinfectants. Based on our results, the bacteria identified are biofilm-forming organisms not harmful to health that commonly occur in aqueous systems. However, in case of strains isolated from production areas, efficient disinfection was only achieved by using chlorine concentrations several tens of times higher than that applied during chlorination of the supply network.

## 2. Introduction and literature overview

Chemical characteristics of drinking water are determined mainly by the water source, and they can be kept stable by choosing a suitable water treatment technology. However, drinking water is not a sterile medium, so it might contain bacteria and their presence is influenced by the water source, the water treatment process, disinfection, the condition of the network and certain physical factors [1]. Microbiological testing of drinking water extends to bacteria indicating fecal contamination and to so-called indicator parameters [2]. The latter include, as cumulative parameters, bacteria that can be cultured at 22 and 37 °C, which provide quantitative information about microorganisms present in the water. They provide useful information to the characterization and supervision of drinking water, such as evaluation of the efficiency of water treatment procedures, monitoring of the condition of water distribution systems or forecasting serious contaminations. The major benefit of colony counts lies in observing changes relative to expected values, based on long-term observations [3].

Colony counts larger than usual values indicates increased microbiological activity in drinking water, which can be caused by the following reasons or factors [4]:

- increased amount of energy and carbon sources in water (organic matter content);
- contaminated/infected materials or equipment in contact with drinking water;
- presence of sediments;
- change (increase) in water temperature;
- changes in hydraulic conditions (flow rate), possible development of turbulence;
- presence/absence of disinfectant, mechanism of action of disinfectant;

- residence time longer than allowed in the technology (stagnant water).

Microbiological activity of drinking water can be reduced primarily by disinfection. The essence of the mechanism of action of oxidizing disinfectants is the irreversible action on the enzyme system of the microorganism and, as a result, destruction of the living organism. Most commonly used agents are chlorine, sodium hypochlorite, chlorine dioxide and ozone. Also known are the use of silver, iodine and bromine, however, these methods have not gained much ground in drinking water applications [5].

The Waterworks of Budapest uses an average chlorine concentration of 0.3 to 0.5 mg/l in the supply network to prevent secondary infections. As other preventive activities, production wells are regularly treated with 2 mg/l of chlorine during operation and, on occasion, 10 mg/l disinfections with stoppage of the well are performed.

Many bacteria can survive in disinfected drinking water by finding or developing a microenvironment where they are protected from different disinfectants. Factors that provide protection against disinfectants for bacterial cells include the following [6]:

- surfaces promoting colonization/biofilm;
- encapsulation;
- aggregation of cells;
- adaptation to environmental conditions (in the presence of low nutrient amounts);
- differences between naturally occurring strains (sensitivity towards different disinfectants);
- interaction of resistance mechanisms.

## 3. Materials and methods

### 3.1. Sampling and evaluation

Our test samples came from a period of several years and, during the last stage of our experiments, the path of water was followed by tracing the so-called water line, taking into account the residence times of the water bodies. Samples were taken starting from the production areas, i.e. the water resources of the Waterworks of Budapest on Szentendre Island, and extending to the supply network.

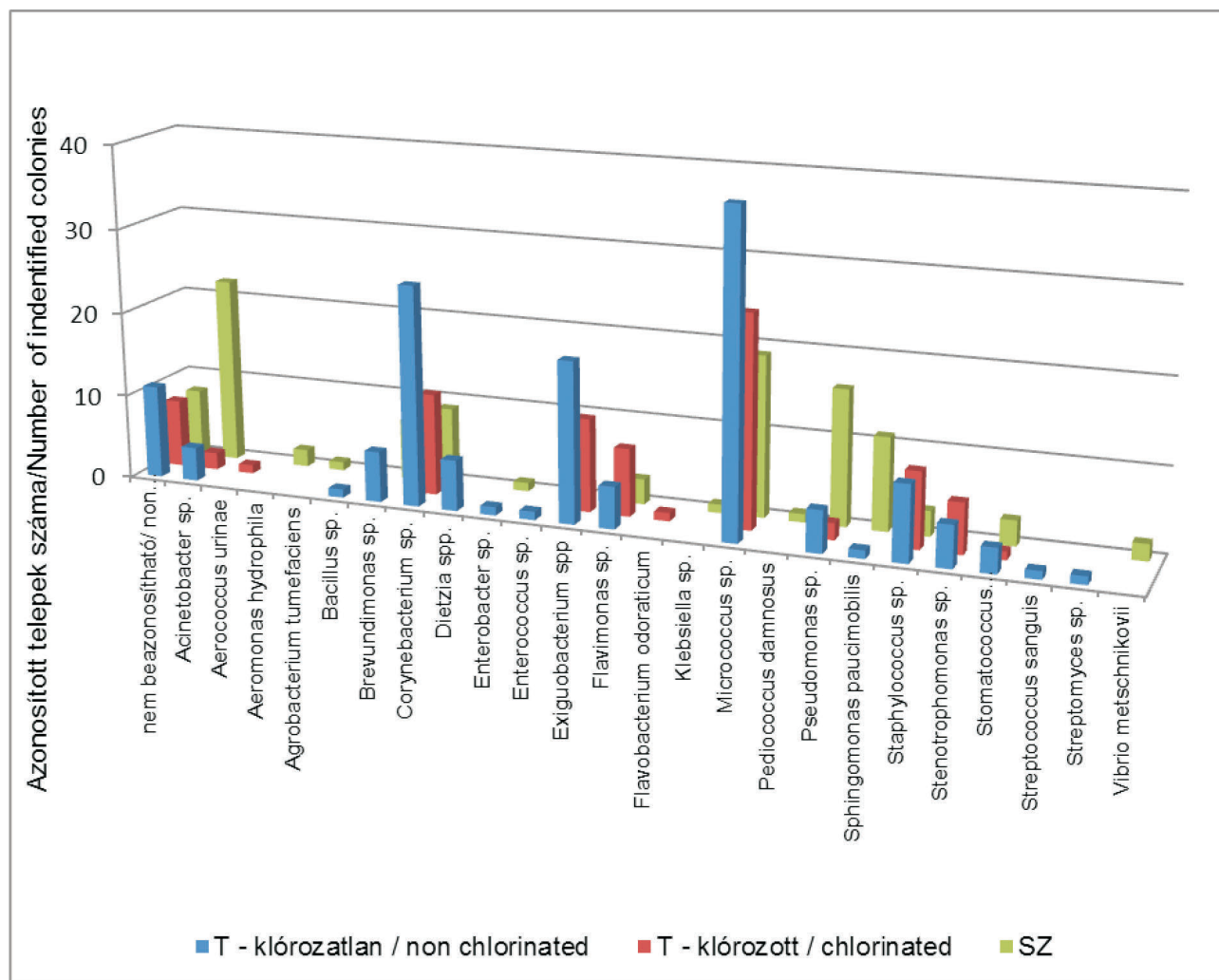
Overall, biochemical identification of 339 bacterial colonies in 67 samples was performed, and the resistance to chlorine of 13 microorganism strains were tested using different concentrations of chlorine. When evaluating data, to make overview easier, samples were grouped according to places of origin: chlorinated and non-chlorinated production areas and supplied water, the latter including all sampling locations starting from where drinking water enters the supply network, up to the tap of the consumer.

### 3.2. Colony counts by culturing

According to the literature, there are several methods available for the determination of colony counts, which differ in culture media compositions, as well as thermostating time and temperature settings. However, Hungarian regulation requires the application of standard „MSZ EN ISO 6222:2000 [8]. Samples were incubated at 22 and 37 °C, in accordance with the standard.

### 3.3. Biochemical identification of colonies

Biochemical identification of colonies on ISO:6222 culture medium was carried out using the so-called BBL Crystal Identification (BBL) technique, which is able to provide



1. ábra: Mikroorganizmusok területi megoszlása (T: termelés/production, SZ: szolgáltatás/supplied)

Figure 1: Spatial distribution of microorganisms (T: termelés/production, SZ: szolgáltatás/supply)

A területi különbségek feltárására érdekében vízvonalak mentén is végeztünk mintavételeket végighaladva a termelés (vízadó, vízgyűjtő objektumok) és a szolgáltatás (betáplálási pont, elosztó hálózat) pontjain keresztül (2a, 2b, 2c. ábrák).

Az 1. vízvonalon a Szentendrei-sziget keleti víznyerő ágát jellemzi. A gyakran megjelenő mikroorganizmusok közül *Corynebacterium* és *Exiguobacterium* csak termelési területen fordult elő, *Micrococcus* pedig minden mintavételi helyen jelen volt. A hálózati pontnál viszont más típusú baktériumfajok is megjelentek (*Sphingomonas*, *Staphylococcus*).

A Szentendrei-sziget nyugati területén a 2. vízvonali mintáiban a keleti ághoz hasonlóan itt is *Corynebacterium*, *Exiguobacterium*, *Micrococcus* nemzetségek tagjai domináltak, és *Staphylococcus* is jelen volt. A betáplálási ponton *Corynebacterium* mellett *Flavimonas* jelent meg, de ennél a mintánál csak 2 telep képződött az alaptáptalajon.

A Szentendrei-sziget nyugati területén egy másik időpontban a 3. vízvonali esetén szintén *Corynebacterium*, *Exiguobacterium*, *Micrococcus* fajokat találtunk. A termelés klórozatlan pontjánál, üledékekben gyakran előforduló *Dietzia* genust is azonosítottuk, míg ezek a klórozott mintavételi pontoknál már nem

voltak jelen, ugyanakkor a klórozott mintákban megjelentek új fajok (*Aerococcus urinae*, *Bacillus brevis*, *Flavobacterium odoraticum*).





species-level determination of microbes, based on their biochemical characteristics. To do so, 1 to 15 of the colonies appearing on the culture media used for the determination of colony counts were prepared for biochemical identification per sample, based on morphological differentiation (colony color, form of appearance, shape, location in the medium).

### 3.4. Testing resistance to chlorine

Resistance to chlorine was tested according to standard MSZ EN 1276:2010 [9]. Acceptable antiseptic effect was defined as a 5 log reduction in microbe numbers (99.999% efficiency) compared to the original value.

Experimental conditions for testing the resistance of isolated microorganisms to chlorine:

- free chlorine concentrations: 1-2-10 mg/L NaOCl;
- exposure time: 1-2-4-6-24 hours;
- test temperature: 13 °C average water temperature.

## 5. Results

### 5.1. Analysis of biochemically identified microorganisms

Of the colonies involved in the identification, a total of 24 different microorganisms were classified as members of a known genus. 27 of the bacterial colonies grown were not identifiable.

First, differences between microorganism groups were examined at two incubation temperatures (22 and 37 °C). Members of the genera *Acinetobacterium*, *Brevundimonas*, *Corynebacterium*, *Exiguobacterium*, *Micrococcus*, *Staphylococcus* and *Pseudomonas* were found at both temperatures. Members of the genera *Stomatococcus*, *Stenotrophomonas* and *Sphingomonas* were mainly present at 37 °C, while *Flavimonas sp.* was only observed in samples cultured at 22 °C. Since optimum growth and proliferation temperatures of these microorganisms vary widely, during our analyses we did not distinguish between samples tested at different incubation temperatures.

Next, **spatial** distribution of the microorganisms was investigated (**Figure 1**), which shows that

- 7 microorganism groups occurred in each sampling area;
- 7 strains were only isolated from the production area;
- 4 strains were only isolated in samples from consumer taps.

*Figure 1: Spatial distribution of microorganisms (T: termelés/production, SZ: szolgáltatás/supply)*

To explore spatial differences, samples were also taken along water lines, following the points of production (aqui-fers, water collection objects) and service (feed point, distribution network) (Figures 2a, 2b and 2c).

The eastern water collection arm of Szentendre Island is characterized by water line 1. Of microorganisms frequently encountered, *Corynebacterium* and *Exiguobacterium* were present only in production areas, while *Micrococcus* was present at all sampling locations. Other bacterial species also appeared at the supply network location (*Sphingomonas*, *Staphylococcus*).

In the samples of water line 2 on the western side of Szentendre Island, similarly to the eastern arm, dominant

genera were *Corynebacterium*, *Exiguobacterium* and *Micrococcus*, with *Staphylococcus* also present. In addition to *Corynebacterium*, *Flavimonas* appeared at the feed point, but in this sample only 2 colonies formed on the basic medium.

On the western side of Szentendre Island at a different time *Corynebacterium*, *Exiguobacterium* and *Micrococcus* species were found again, in the case of water line 3. The genus *Dietzia*, often present in sediments, was also identified at non-chlorinated points of production, while they were not present any more at chlorinated sampling locations, however, there were new species in the chlorinated samples (*Aerococcus urinae*, *Bacillus brevis*, *Flavobacterium odoraticum*).

*Figure 2a: Microorganism distribution (T: termelés/production, SZ: szolgáltatás/supply) – Water line 1*

*Figure 2b: Microorganism distribution (T: termelés/production, SZ: szolgáltatás/supply) – Water line 2*

*Figure 2c: Microorganism distribution (T: termelés/production, SZ: szolgáltatás/supply) – Water line 3*

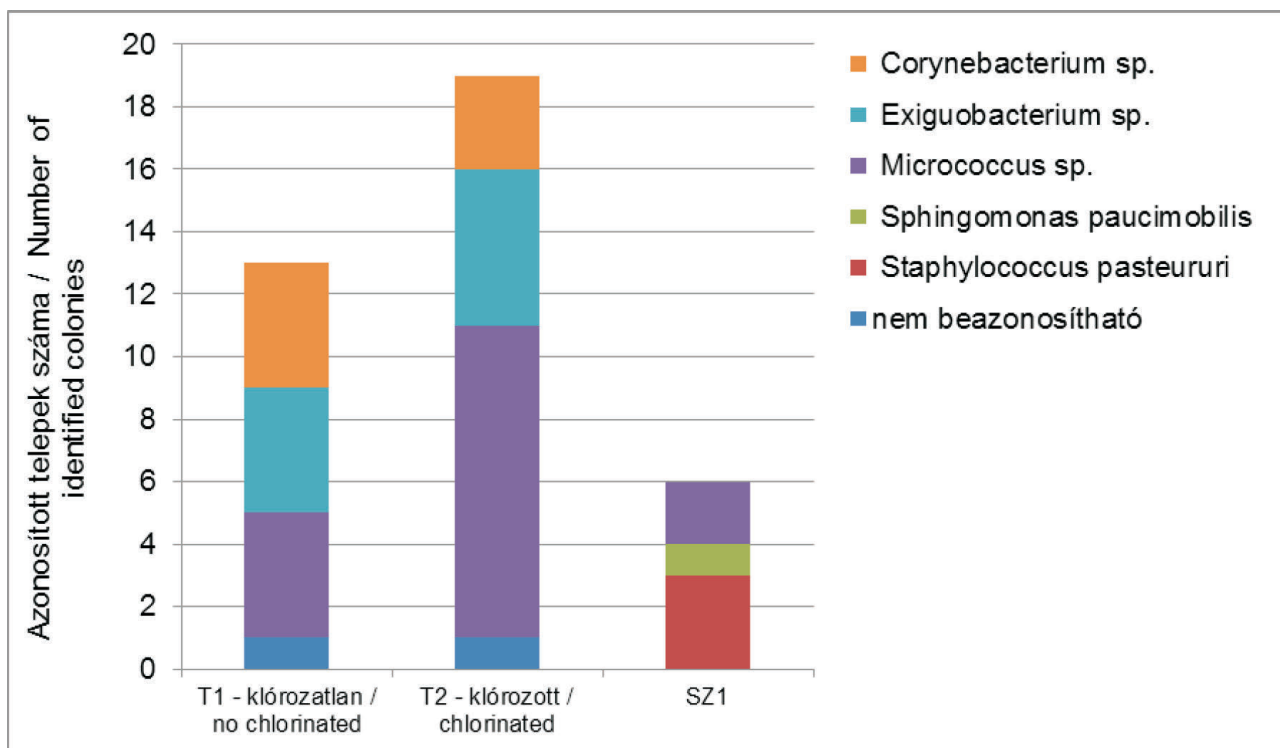
Reviewing the data shows that there are differences between the production area and supply network points, both in terms of the composition of the community and the number of isolable strains. Compared to the production area, colony counts are lower at the feed points and the supply network, and the quality changes as well. When comparing the eastern and western arms of Szentendre Island, it is apparent that there are more kinds of microorganisms on the west side, so the microbial community of the different sampling locations is more diverse here.

However, when drawing conclusions, it must be taken into account that the number of identified colonies was not the same for each sample, and certain colonies became unviable during inoculation. So, instead of comprehensive conclusions, only assumptions can be made that, in all probability, there are different microbial communities present in production areas and in the supply network.

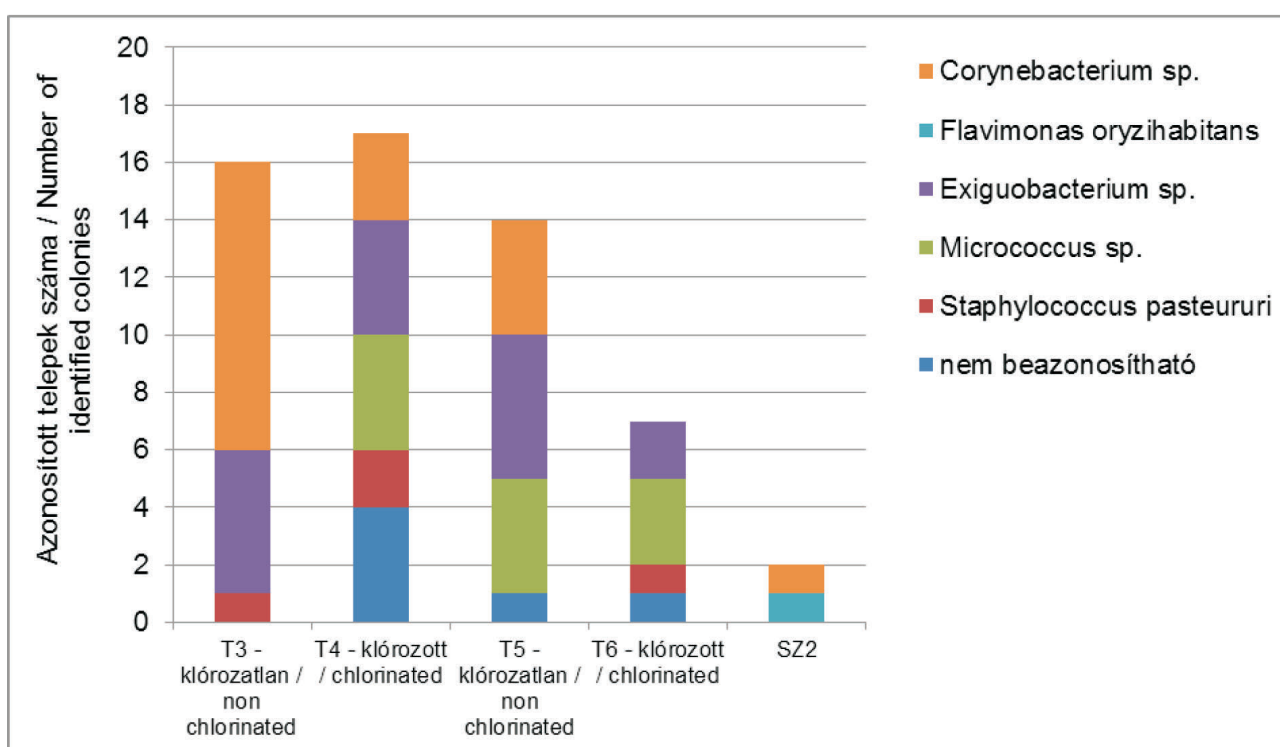
Examining **seasonal differences**, *Corynebacterium sp.*, *Micrococcus sp.* and *Pseudomonas sp.* species were always present not only spatially, but also in every season (**Figure 3**). Frequently identified members of the genera *Acinetobacter* and *Brevundimonas* – with the exception of winter –, and of genera *Staphylococcus* and *Stenotrophomonas* – with the exception of fall –, were also observed in all seasons. In case of certain microorganisms (*Aerococcus*, *Agrobacterium*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Streptomyces*, *Vibrio*) seasonal changes were not applicable, because of their low incidence. Certain strains showed seasonal changes, for example *Micrococcus sp.*, *Staphylococcus sp.* and *Corynebacterium sp.* were dominant in the winter-spring period, but their presence diminished from summer to fall. However, *Acinetobacter sp.* illustrates clearly the increasing frequency of occurrence going from winter to fall.

*Figure 3: Seasonal distribution of microorganisms*

Characteristics of strains and genera identified in the colonies were examined from many aspects, for example their Gram-staining properties, based on the structure of the cell walls of bacteria, and indicating the mechanical protection and the resilience of bacterial cells. Our measurements show that 59% of the colonies were Gram-positive (mainly *Micrococcus sp.*, *Corynebacterium sp.*), 33% were Gram-negative (*Acinetobacter sp.*, *Flavimonas sp.*, *Pseudomonas sp.*), and their ratio showed a seasonal variation. During late winter and spring periods, Gram-positive bacteria were dominant with a share of



2a. ábra: Mikroorganizmusok eloszlása (T: termelés/production, SZ: szolgáltatás/supplied) – 1. vízvoal  
 Figure 2a: Microorganism distribution (T: termelés/production, SZ: szolgáltatás/supply) – Water line 1



2b. ábra: Mikroorganizmusok eloszlása (T: termelés/production, SZ: szolgáltatás/supplied) - 2. vízvonall  
 Figure 2b: Microorganism distribution (T: termelés/production, SZ: szolgáltatás/supply) – Water line 2

83%, in summer the ratio became more balanced, while samples from October and November consisted mainly of Gram-negative bacteria 91%).

The vast majority of the species identified has a tendency to form biofilms, which protects microorganisms against disinfectants, and provides a favorable microenvironment for survival even under nutrient-deficient conditions.

About the public health significance of the bacteria tested, it can be generally stated that they do not cause waterborne infections. Some of them can be carriers of virulence factors, but they do not directly impact human health. Members of the heterotrophic flora, such as *Pseudomonas*, however, can pose a risk as opportunistic pathogens to the elderly, hospital patients, people with weakened immune systems and young children. Fortunately, their infective doses are generally high, reported values in the literature are  $10^6$  to  $10^{10}$  cells [7].

## 5.2. Results of chlorine resistance tests

In order to optimize the efficiency of the disinfection method, resistance to chlorine of the microbes most frequently found in the samples was tested.

Only strains from non-chlorinated areas were studied, generally originating from different sampling locations and taken at different times. Initially, several chlorine concentrations were tried, but chlorine concentrations of 1 or 2 mg/L only resulted in a 1 log reduction of bacterial counts (90% efficiency), which occurred in the first hour of the experiment, and no further decrease was observable.

Thus, resistance to chlorine was henceforth tested using a chlorine concentration of 10 mg/L and exposure times of 2, 4 and 24 hours (**Figures 4.a and 4.b**). Mainly microorganisms were chosen that occurred frequently in our system, and the literature provided little information about their resistance to disinfectants, or came from non-chlorinated production areas. In their case, the following disinfection efficiencies were achieved:

- 5 log reduction for *Micrococcus sp.* after 4 hours;
- 4 log reduction for *Staphylococcus sp.* and *Brevundimonas sp.* over 24 hours;
- 3 log reduction for *Flavimonas sp.* over 24 hours;
- for *Pseudomas*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, *Stomatococcus* and *Corynebacterium* species, only a 1 to 2 log reduction was observed after 2 hours, and there was no further reduction.

Figure 4a: Results of chlorine resistance tests

Figure 4b: Results of chlorine resistance tests

Next, chlorine resistance of microorganisms identified from the same sampling point of production (Kútgépház 1), but taken at different times, were tested, again using a chlorine concentration of 10 mg/L, and a maximum of 6 hour exposure time (**Figure 5**). Based on this experiment, the desired 5 log reduction was already achieved after 2 hours for all bacteria tested.

Figure 5: Results of chlorine resistance tests

**Figures 4 and 5** show that Gram-positive strains coming from different sampling locations gave different results (*Corynebacterium sp.*, *Micrococcus sp.*, *Staphylococcus sp.*). Chlorine resistance of the species *Corynebacterium aquaticum* showed significant differences according to the origin of the strain. A strain isolated from one point of production showed a 5 log reduction already after 2 hours (**Figure 5**), while only a 1 log reduction was observed even after 24 hours for the same strain isolated from a different point of production (**Figure 4**). Similar, but not so drastic differences were also observed for species belonging to the same genus (*Staphylococcus pasteurii*, *Staphylococcus haemolyticus*) for samples taken at different sampling locations.

## 6. Conclusions

Summarizing the results of microorganisms identified using biochemical techniques, it can be stated that the microbial communities of water production and the water supply network are different and, as a result of disinfection, colony counts in the network decreased both in terms of quantity and quality.

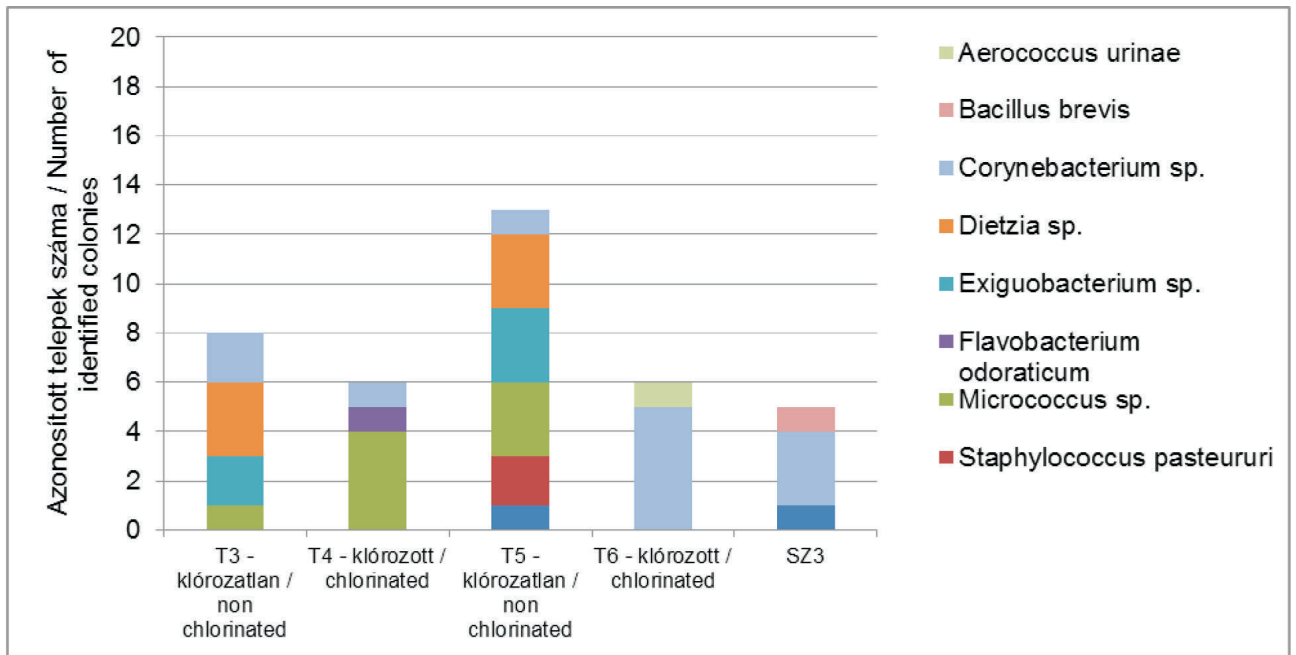
Main characteristics of the strains isolated:

- ubiquitous in nature;
- species that occur frequently in aqueous systems;
- biofilm-forming, therefore, presumably possess increased chlorine resistance;
- their public health significance is limited, i.e. they are microorganisms that are not harmful to health.

Disinfection was not always effective during chlorine resistance testing: of the 13 strains tested only 5 showed a 5 log reduction in microbial count, and only when the chlorine concentration was 10 mg/L. Therefore, to increase the safety of the drinking water supply, testing of alternative disinfection techniques is planned in the future.







2c. ábra: Mikroorganizmusok eloszlása (T: termelés/production, SZ: szolgáltatás/supplied) – 3. vízvezeték

Figure 2c: Microorganism distribution (T: termelés/production, SZ: szolgáltatás/supply) – Water line 3

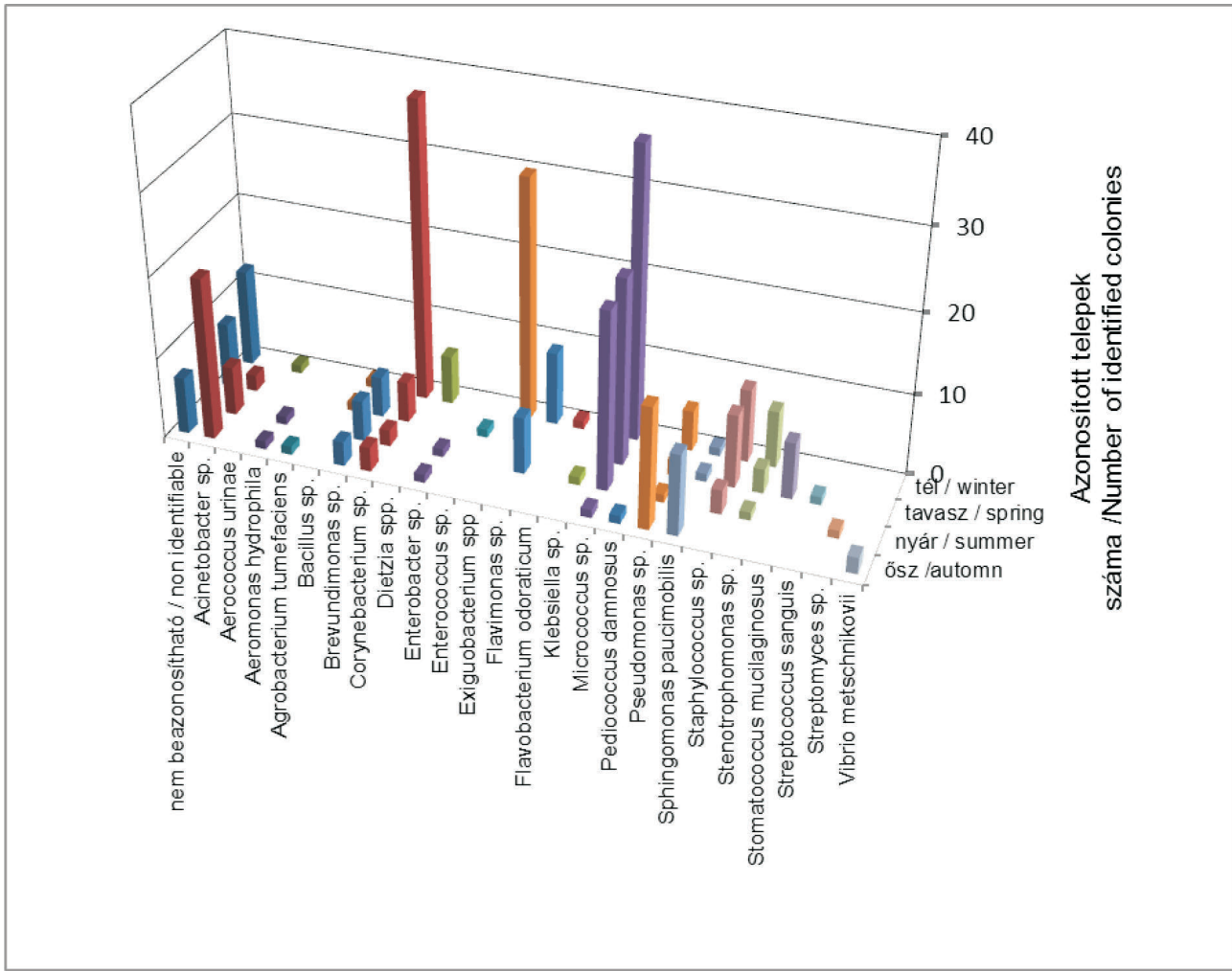
Az adatokat áttekintve látható, hogy a termelési terület és a hálózati pontok között is van különbség a közösség összetételében és az izolálható törzsek számában is. A termelési területhez képest a betáplálási pontokon és a hálózaton csökkenés tapasztalható a megjelenő telepszámok mennyiségében, illetve minőségi változás is történik. A Szentendrei-sziget keleti és nyugati ágának összehasonlításából pedig kitűnik, hogy a nyugati ágon több fajta mikroorganizmus jelent meg, így itt változatosabb az egyes mintavételi helyek mikrobaközössége.

A következtetések levonásakor azonban mindenképpen figyelembe kell venni, hogy az egyes mintáknál a táptalajon megjelenő telepekből nem azonos számú telep került azonosításra és az átoltások során egyes telepek életképtelenné váltak. Így az eredményekből átfogó következtetések helyett csak feltételezések vonhatók le, amelyek szerint nagy valószínűséggel eltérő mikrobaközösségek fordulnak elő a termelési

és a hálózati területeken.

Az **évszakos különbséget** megvizsgálva a *Corynebacterium sp.*, *Micrococcus sp.* és *Pseudomonas sp.* fajok nemcsak területi megoszlásban voltak mindenhol jelen, hanem minden évszakban megjelentek (**3. ábra**). A gyakran azonosított *Acinetobacter* és *Brevundimonas* - a tél kivételével -, a *Staphylococcus* és *Stenotrophomonas* genus tagjai - pedig az ős kivételével -, szintén minden évszakban megfigyelhetők voltak. Egyes mikroorganizmusoknál (*Aerococcus*, *Agrobacterium*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Streptomyces*, *Vibrio*) azonban a szezonális változások nem értelmezhetők ritka előfordulási arányuk miatt. Bizonyos törzsek szezonális változást is mutattak, így a *Micrococcus sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Corynebacterium sp.* téli-tavaszi időszakban dominált, majd jelenlétük nyártól ősre egyre csökkent. Ugyanakkor az *Acinetobacter sp.* jól szemlélteti az előfordulási gyakoriság növekedését téltől ős felé haladva.





3. ábra: Mikroorganizmusok szezonális eloszlása

Figure 3: Seasonal distribution of microorganisms

A telepekből identifikált törzsek, nemzetségek tulajdonságait több szempontból is megvizsgáltunk, így Gram-tulajdonságukat, amelynek jelentősége a baktérium sejtfalának felépítésében rejlik, ez utóbbi a baktérium sejt mechanikai védelmére, ellenálló képességére utal. Mérési eredményeink alapján a telepek 59%-ban Gram-pozitív (főként *Micrococcus sp.*, *Corynebacterium sp.*), 33%-ban Gram-negatív (*Acinetobacter sp.*, *Flavimonas sp.*, *Pseudomonas sp.*) baktériumok voltak, és arányuk szezonálisan változott. A tévégi és tavaszi időszakban 83%-ban a Gram-pozitívak domináltak, nyáron az arány kiegyenlítetté vált, míg az októberi, novemberi minták alkotóit 91%-ban már Gram-negatív baktériumok adták.

Az identifikált fajok túlnyomó többsége biofilmképző hajlammal rendelkezik, amely a mikroorganizmusok számára védelmet nyújt a fertőtlenítőszerrel szemben, és akár tápanyaghiányos viszonyok között is biztosítja a túléléshez szükséges kedvező mikroökoszisztémát.

A vizsgált baktériumok közegészségügyi jelentőségéről általánosan az mondható el, hogy vízeredetű fertőzést nem okoznak. Néhányuk virulencia faktor hordozói lehetnek, de közvetlenül nincs humán egészségügyi hatásuk. Opportunista patogénekként ugyanakkor a heterotróf flóra tagjai, mint pl. a *Pseu-*

*domonasok* kockázatot jelenthetnek időseknél, kórházi betegeknél, legyengült immunrendszerű egyéneknél és kisgyerekeknél. Azonban infektív dózisuk általában magas,  $10^6$ - $10^{10}$  sejtet jelölnek a szakirodalomban [7].

#### 4.2. Klórrezisztencia-vizsgálatok eredményei

A fertőtlenítési módszer hatékonyságának optimalizálása érdekében a vizsgált mintákban leggyakrabban előforduló mikrobákat klórrezisztencia-vizsgálatnak vetettük alá.

Csak klórozatlan területről származó törzseket vizsgáltunk, amelyek általában különböző mintavételi helyekről és időben is különböző mintákból származtak. Kezdetben több klórkoncentráció is kipróbáltunk, azonban az 1, illetve 2 mg/L klórkoncentrációk csak 1 log baktériumszám-csökkenést (90%-os hatékonyság) eredményeztek, amely már a kísérlet 1. órájában jelentkezett és további csökkenés nem volt megfigyelhető.

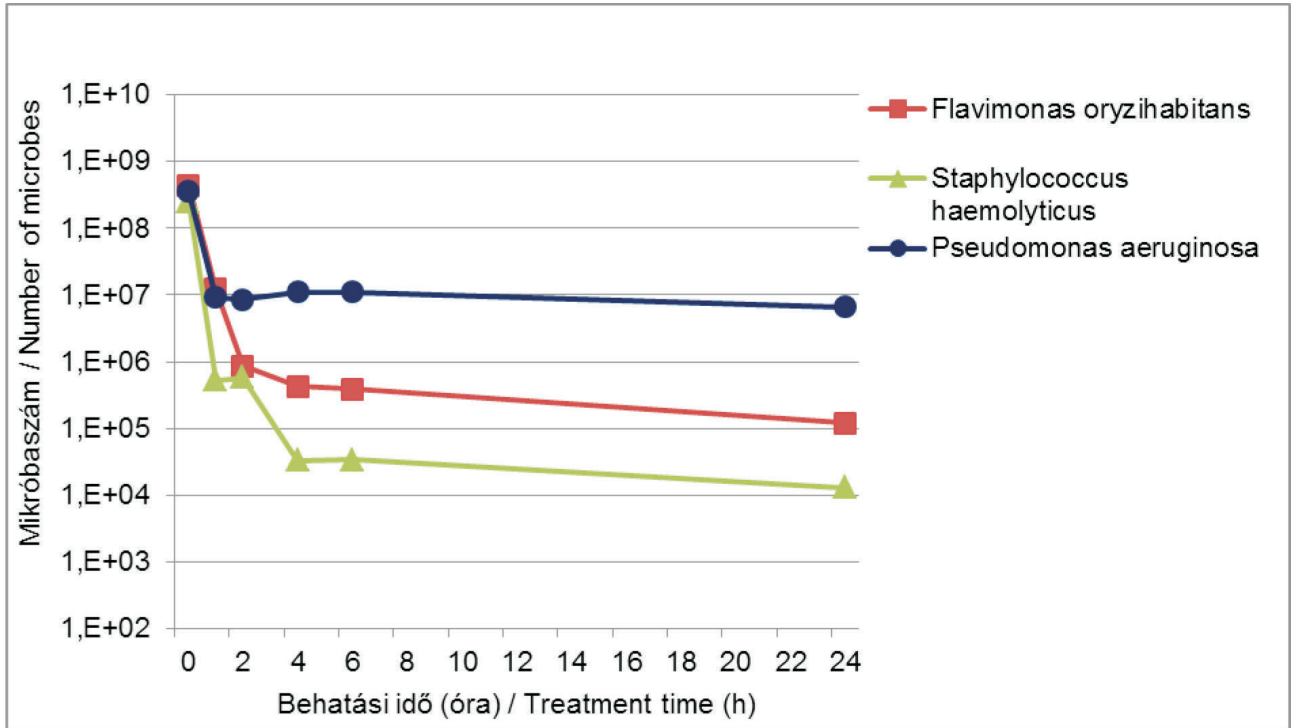
Így a továbbiakban a 10 mg/L klórkoncentráció és 2, 4, 24 óra behatási idők mellett kerültek elvégzésre a rezisztencia vizsgálatok (4.a, 4.b ábrák). Főként olyan mikroorganizmusokat választottunk, amelyek gyakran előfordultak a rendszerünkben, és a szakirodalom kevés információt ad a fertőtlenítőszerrel szembeni ellenálló képességükről, illetve a termelés

klórozatlan területeiről származtak. Esetükben az alábbi hatékonyságú fertőtlenítést értük el:

- 5 log értékű csökkenés *Micrococcus sp.* esetén a vizsgálat 4. órájában;
- 4 log értékű csökkenés *Staphylococcus sp.* és *Brevundimonas sp.* esetén 24 óra alatt;
- 3 log értékű csökkenés *Flavimonas sp.* ese-

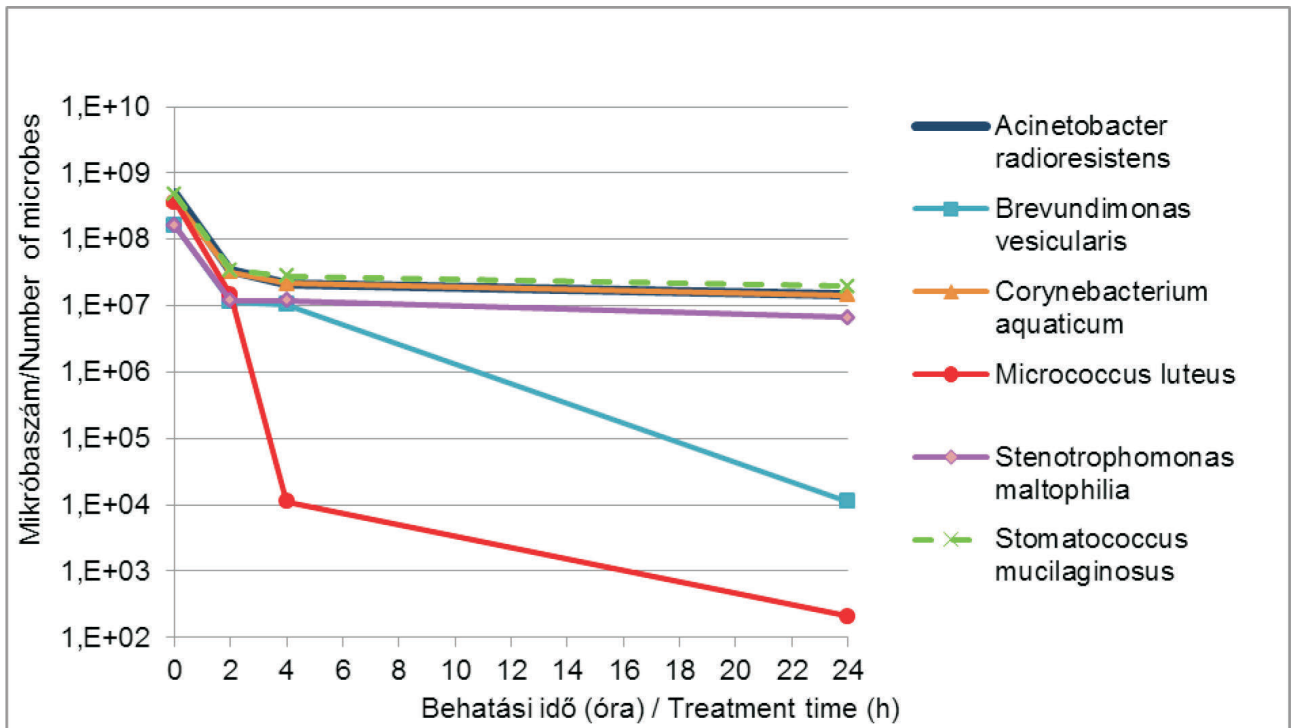
tén 24 óra alatt;

- *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, *Stomatococcus* és *Corynebacterium* fajoknál ezzel szemben mindössze 1-2 log csökkenés következett be a kísérlet 2. órájában, és további csökkenés nem volt tapasztalható.



4a. ábra: Klórrezisztencia-vizsgálatok eredménye

Figure 4a: Results of chlorine resistance tests



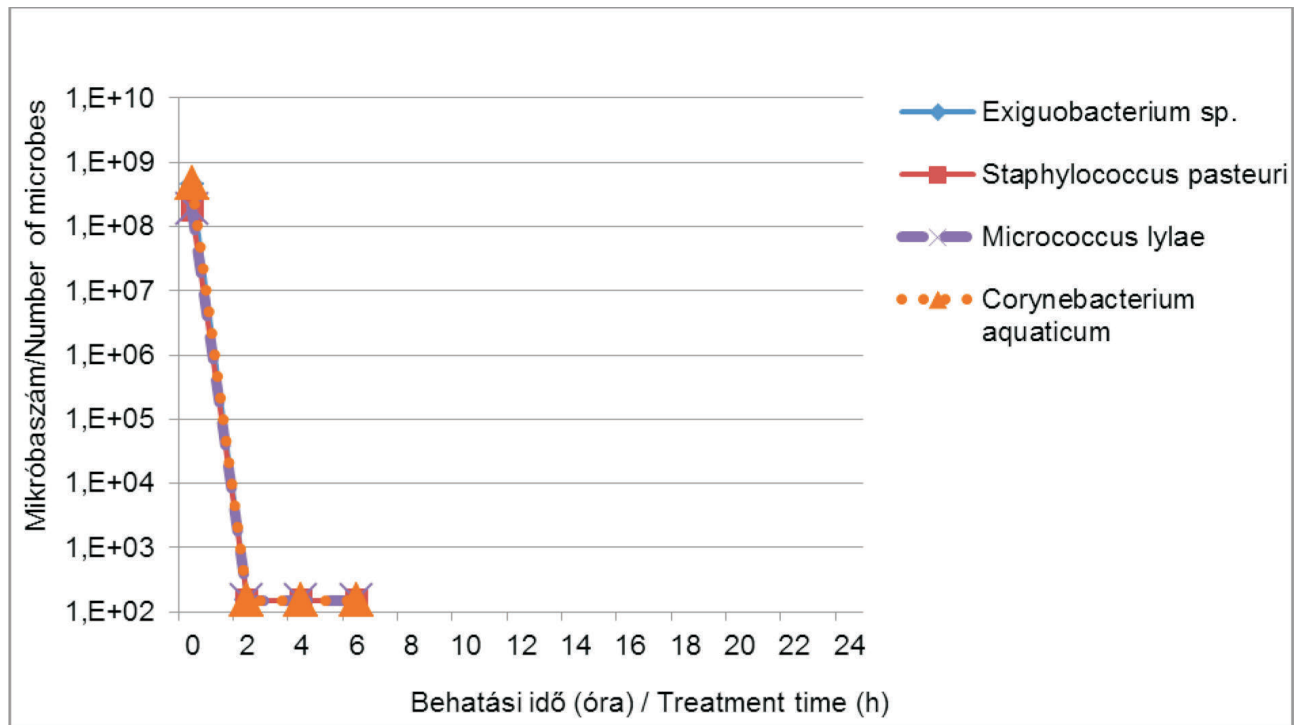
4b. ábra: Klórrezisztencia-vizsgálatok eredménye

Figure 4b: Results of chlorine resistance tests



A következőkben a termelés egyazon mintavételi pontjáról (Kútgépház 1) – de két időpontból származó mintából – azonosított mikroorganizmusok klórrezisztenciáját teszteltük szintén 10 mg/L klórkon-

centrációval, a behatási időt 6 órában maximálva (**5. ábra**). A kísérlet alapján az itt vizsgált összes baktériumnál már a 2. órában elértük a kívánt 5 log értékű csökkenést.



5. ábra: Klórrezisztencia vizsgálatok eredménye

Figure 5: Results of chlorine resistance tests

Az **4. és 5. ábráról** leolvasható, hogy más-más mintavételi helyről származó Gram-pozitív törzsek esetén eltérő eredményt kaptunk (*Corynebacterium sp.*, *Micrococcus sp.*, *Staphylococcus sp.*). A *Corynebacterium aquaticum* faj klórrezisztenciája jelentős különbséget mutatott a törzs származási helye szerint is. A termelés egyik pontjáról izolált törzs már 2 óra után 5 log értékű csökkenést mutatott (**5. ábra**), míg ugyanennél a törzsnél a termelés egy másik pontján 24 óra elteltével is csak 1 log értékű csökkenés volt tapasztalható (**4b. ábra**). Hasonló, bár nem ilyen mértékű eltérést tapasztalhattunk azonos nemzetségbe tartozó fajoknál is (*Staphylococcus pasteurii*, *Staphylococcus haemolyticus*) különböző mintavételi pontokról származó mintáknál.

## 5. Következtetések

A biokémiai technikával azonosított mikroorganizmusok eredményeit összegezve megállapítható, hogy a víztermelés és a vízhálózat mikrobaközössége különbözik, és a fertőtlenítés hatásaként, a telepszámok mennyiségében, illetve minőségében egyaránt csökkenés tapasztalható a hálózaton.

Az azonosított törzsekre vonatkozó fontosabb jellemzők:

- ubiquiterek, azaz a természetben mindenütt előfordulnak;
- vizes rendszerekben is gyakran megjelenő fajok;
- biofilmalkotók, így feltételezhetően megnövekedett klórrezisztenciával rendelkeznek;
- közegészségügyi jelentőségük limitált, azaz az egészségre nem káros mikroorganizmusok.

A klórrezisztencia vizsgálatok során nem minden esetben volt hatékony az alkalmazott fertőtlenítés: 13 törzsből csak 5 esetén és kizárólag 10 mg/L klórkoncentráció mellett volt 5 log a mikrobaszám csökkenés. Ezért az ivóvíz-szolgáltatás biztonságának emelése érdekében alternatív fertőtlenítési technikák kipróbálását tervezzük a jövőben.

## 7. Irodalom/References

- [1] Öllős, G. (1998): Víz tisztítás – üzemeltetés. Egre Nyomda Kft.
- [2] 201/2001 (X.25.): Kormányrendelet az ivóvíz minőségi követelményeiről és ellenőrzés rendjéről
- [3] Bartram, J., Cotruvo, J., Exner, M., Fricker, C., Glasmacher, A. (2003): Heterotrophic plate counts and drinking-water safety: The significance of HPCs for water quality and the human health. WHO.
- [4] Chowdhury S. (2012): Heterotrophic bacteria in drinking water distribution system: a review. Environ Monit Assess 184, 6087-6137.
- [5] <http://www.wqa.org> (Hozzáférés: 2014. 04.30.)
- [6] Le Chevallier M.W., Cawthorn C.D., Lee R.G (1988): Factors promoting survival of bacteria in chlorinated water supplies. Appl. Environ. Microbiol. 54, 649-654.
- [7] Rusin, P.A., Rose J.B., Gerba C.P. (1997): Health significance of pigmented bacteria in drinking water. Water Science and Technology 35, 21-27.
- [8] MSZ EN ISO 6222:2000 Vízminőség. Tenyészthető mikroorganizmusok számának meghatározása. Telepszám-meghatározás agar táptalaj beoltásával
- [9] MSZ EN 1276:2010 Kémiai fertőtlenítőszeres és antiszeptikumok baktériumölési hatékonyságának értékelésére