

AZ IVÓVÍZ MIKROSKÓPOS VIZSGÁLATÁNAK MÓDSZERTANA ÉS JELENTŐSÉGE

Dr. Török Tamásné, Plutzer Judit, Rábai Erzsébet

OKK-OKI Higiénés vízbiológiai osztály

Kulcsszavak: mikroszkópos vízvizsgálat, 201/2001-es
Kormányrendelet és módosításai, egységes szemlélet

BEVEZETÉS

Az ivóvíz mikroszkópos vizsgálatát a 201/2001. (X.25) Korm rendelet írja elő. Ez a rendelet az EU 98/ 83 direktívája alapján készült. A hazai tapasztalatok alapján egészítették ki a kormány rendeletet az ivóvíz mikroszkópos biológiai vizsgálatának rendszeres ellenőrzési gyakorlatával. Igen fontosnak tartjuk, hogy a mikroszkópos vizsgálatokkal nyerhető igen gyors információk birtokában lehessenek az ivóvíztermelők és a minőséget ellenőrző laboratóriumok. Ezek a vizsgálatok szolgálnak leghamarabb olyan információkkal, melyek alapján megkezdődhetnek a technológiai felülvizsgálatok, beavatkozások. Igen sok helyen már régi gyakorlat az ivóvíz mikroszkópos vizsgálata, azonban igen sok helyen csak a rendelet hatályba lépésével kezdtek hozzá a vizsgálatokhoz. Az osztályunk által szervezett körvizsgálatok azt mutatták, hogy ezen a téren rengeteg feladat vár a vizsgálókra, továbbképzésük feltétlen szükséges, valamint elengedhetetlen az egységes szemlélet a fajok azonosításában, az eredmények értékelésében. Ezért tovább folytatjuk a körvizsgálatokat és minden évben két körvizsgálatot szervezünk a minőségi és mennyiségi meghatározások egységessé tételéhez. Ezt a célt szolgálták az idén februárban megrendezett továbbképző kurzusok is, melyeken 75 vízmű biológus és ÁNTSZ munkatárs vett részt. Ezeken az alkalmakon történt egyeztetések, közös vizsgálati tapasztalatok alapján született meg a következőkben ismertetett módszertani útmutató. Az útmutatóban kitértünk a rendelet módosítására tett javaslatokra is. A mikroszkópos vizsgálatok határértékei a rendelet „E” táblázatában szerepelnek.

A VIZSGÁLAT VÉGZÉSÉHEZ SZÜKSÉGES ANYAGOK ÉS ESZKÖZÖK

A mintavétel eszközei

Egyliteres mintatartó üvegek, jól záró és jól tisztítható dugóval (kupakkal)

hűtőtáska jégakkival

A mintafeldolgozás eszközei

szűrőkészülék (ha lehetséges, tetővel, de a lefedést megoldhatjuk más erre alkalmas eszközzel is, pl. alufóliával)

0,45 mm pórusátmérőjű membránfilter (lehetőleg steril)

kúpos aljú, 0,1 ml-es beosztással rendelkező centrifugacsövek, kupakkal

a szeszton lemosására alkalmas pocelán- vagy üvegtálka (kiöntő csőrrel)

mókusszűrő ecsetek (feltétlenül vegyük figyelembe, hogy minél nagyobb méretű, annál nagyobb a hibalehetőség, a szervezetek elvesztésének lehetősége)

tompa hegyű csipesz

Pasteur-pipetta vagy automata pipetta

Centrifuga (10 ml-es kúpos centrifugacső befogadására és minimum 600 g-re alkalmas)

A vizsgálat eszközei

1–2 ml-es, kihúzott hegyű üvegpipetták és/vagy automata pipetta

fénymikroszkóp (szükséges nagyítások: 100-szoros, 250-szeres, 400-szoros, 1000-szeres)

tárgylemezek, fedőlemezek

Bürker-kamra a megfelelő fedőlemezzel

okulármikrométer

50%-os kénsavoldat és 200 g/l-es KSCN-oldat a rodanid-próbához

immerziós olaj és egyéb határozást segítő anyagok (pl. tus, metilénkék)

AZ ESZKÖZÖK TISZTÍTÁSA

Az eszközök tisztításakor célszerű figyelmet fordítani arra, hogy az edényekbe, eszközökbe ne hagyjunk beleszáradni semmit.

Az eszközök tisztításának javasolt módja:

A mintatartó edényeket üvegmosó kefével, mosogatószerrel alaposan megtisztítjuk, utoljára desztillált vízzel is öblítjük, szárítjuk. A sterilizálás (pl. szárítószekrényben, 180 fokon történő szárítás 1 órán keresztül) tovább csökkenti az edény nem megfelelő tisztaságából adódó laborhiba esélyét. (Ha valamilyen anyag erősen beleszáradt az üvegbe, először krómkénsavval, majd az előbb említett módon tisztítjuk.)

Az üvegpipettákat krómkénsavas áztatás után desztillált vízzel vagy kifogástalan csapvízzel többször átöblítjük, majd sterilizáljuk. Az automata pipettákhoz való műanyag hegyeket használat után ne mosogassuk el, hanem dobjuk ki.

A mintatartó csöveket üvegmosó kefével alaposan elmoszuk (amennyiben szükséges, krómkénsavazzuk), utoljára desztillált vízzel is átöblítjük, szárítjuk.

A szűrőberendezést, a csipeszeket és a szesztón lemosására használt tálkát – nem kifogásolt minőségű hálózati víz esetén – elegendő folyó csapvízzel, (a szűrőtölcsért üvegmosó kefével) alaposan elmosogatni. Kifogásolt minőségű hálózati víz esetén a tisztítást desztillált vizes öblítéssel oldjuk meg.

Külön *ecsetet* használjunk a felszíni és az ivóvizekhez. A fentiekhez hasonlóan az ecsetet is elég csapvízzel alaposan kimosni (ezután lehet fertőtlenítőszeres vízbe áztatni, majd öblíteni), utána a vizet csipeszsel „kihúzni” belőle, majd tiszta, pormentes helyen tárolni.

A *tárgylemezeket* krómkénsavazzuk, utoljára desztillált vízzel is átöblítjük, majd szárítjuk. Az igen vékony fedőlemezeket nem mosogatjuk, mert balesetveszélyes.

A *Bürker-kamrát* és a hozzá tartozó fedőlemezeket használat után közvetlenül csapvízzel alaposan elmoszuk, majd etil-alkoholba áztatjuk, szárítjuk, pormentes helyen tároljuk.

Természetesen a mosogatógép használatára is lehetőség van az edények mosogatásánál, ekkor a maximális öblítésszámmal futó programot alkalmazunk és ha lehetőségünk van rá a programok kiválasztásánál, utoljára desztillált vízzel öblítsünk. Ha a hálózati víz kifogásolt minőségű és a mosogatógép nem alkalmas desztillált vizes öblítésre, a mosogatógép használata nem megfelelő.

A MINTAVÉTEL SZABÁLYAI

-

Rutin vízmintavétel

Minimum 1 liter vizet veszünk a minőségi és a mennyiségi vizsgálathoz. (A nagyobb mennyiségű vízminta növeli a vizsgálati módszer megbízhatóságát.)

A csapot alaposan kiengedjük (2-3 perc), az üveget és az üveg kupakját a mintázandó vízzel 2-szer átöblítjük, majd annyi vizet veszünk az edénybe, hogy fölötte egy kis levegő maradjon, utána lezárjuk. A mintát feldolgozásig sötétben, hűtve (4–8 °C) tartjuk. 24 órán belül fel kell dolgozni.

A MINTA FELDOLGOZÁSA

Az alaposan felrázott vízmintát (minimum 1 liter) két részre osztjuk és két külön mintaként kezeljük. 10 ml-t egy osztott kémcsőben félreteszünk, a maradék 490 ml mintát 0,45 mm pórusátmérőjű membránfilteren leszűrjük. Az esetleges levegő általi szennyeződés (pollenek, gombaspórák stb.) elkerülésére a tölcsért szűrés közben a tetejével vagy alufóliával lezárjuk. Amint a minta leszűrődött (nem engedjük, hogy a vákuum a filtert kiszárítsa), a szesztont ecset segítségével egy porcelán- vagy üvegtálban a 10 ml félretett vízbe mossuk (a végén az ecsetben maradt vizet csipesz segítségével kiszorítjuk, és a mintához adjuk), majd visszaöntjük a kémcsőbe. 600–800 g-vel 10 percig centrifugáljuk. Pasteur-pipettával a végtérfogatot 1 ml-re állítjuk be.

AZ ÜLEDÉK MENNYISÉGÉNEK MEGHATÁROZÁSA

A vizsgálat első lépése az üledék mennyiségének és szabad szemmel látható tulajdonságainak (pl. színének) megállapítása.

MIKROSZKÓPOS VIZSGÁLAT

Minőségi vizsgálat

Az üledéket üvegpipetta vagy automata pipetta segítségével kivesszük, tárgylemezre cseppentjük, fedőlemezzel lefedjük. Ezután végigpásztázzuk az egész fedőlemez alatti területet. Ha nem tudjuk a teljes üledékmennyiséget megvizsgálni, mert olyan sok van, akkor háromszor veszünk ki belőle.

A minőségi vizsgálat során döntjük el azt is, hogy szükség van-e számolásra, illetve, hogy a számolás melyik (borítósos vagy Bürker-kamrás) módját célszerű választani. Ha a talált szervezetek viszonylag kicsik (≤50 µm) és mennyiségük várhatóan meghaladja az ezres nagyságrendet, akkor a Bürker-kamrás módszerrel számoljuk meg őket. Ha nagyobb élőlényeket, pl. férgeket látunk illetve az élőlények száma várhatóan nem haladja meg az ezres nagyságrendet, a borítósos módszert alkalmazzuk.

Mennyiségi vizsgálat

Bürker-kamrás számlálás

A homogenizált, tömörített vízmintával megtöltjük a Bürker-kamrát, és a teljes számlálókamra területén megszámláljuk az élő és élettelen szervezeteket. Javasoljuk, hogy ne 2×144 „nagy négyzetet” számoljunk le, hanem a számlálókamra 144 kockáját magába foglaló részt egyetlen egységnek kezeljük, amelybe 1 ml minta fér. (Így nem kell arra külön figyelni, hogy például egy több „nagy négyzetet” átszelő vasbaktériumszálat melyik négyzethez számoltuk már stb.) Az így kialakult négyzet két oldalán elhelyezkedő szervezeteket beleszámláljuk, a másik két oldalon „kilógókat” nem.

$$N = \frac{a \cdot b}{c \cdot v}$$

A számítás képlete:

Ahol:

N = a szervezetek száma 1 liter mintára vonatkoztatva

a = a megszámlált szervezetek száma

b = a tömörített anyag térfogata mikroliterben

c = a vizsgált térfogat mikroliterben (egy kamratöltés 1 ml)

v = az eredeti vízminta térfogata literben

Borítósos számlálás

A homogenizált szuszpenzióból a tárgylemezre cseppentünk (pl. automata pipettával 20 ml-t), lefedjük, és az egész lefedett területen levő összes szervezetet megszámláljuk.

$$N = \frac{a \cdot b}{c \cdot v}$$

A számítás képlete:

Ahol:

N = a szervezetek száma 1 liter mintára vonatkoztatva

a = a megszámlált szervezetek száma a vizsgálati térfogatban

b = a tömörített anyag térfogata cm^3 -ben

c = a vizsgálati térfogat cm^3 -ben (egy 18×18 mm-es fedőlemez alá kb. $0,02 \text{ cm}^3$ minta fér)

v = az eredeti vízminta térfogata literben

Ugyanakkora méretű fedőlemez alá változó mennyiségű mintát tudunk tenni, ezért pontosan mérjük ki mindig automata pipettával!

A RODANID-PRÓBA

A rodanid-próba víz vastartalmának kimutatására szolgáló gyorseszteszt.

Fontos: a rodanid-próbát a mikroszkópos vizsgálat után kell elvégezni!

Két lépésből áll:

50%-os kénsavat adunk a tömörített, mikroszkóppal már megvizsgált mintához

A Fe^{3+} ionokat a savas közegben kálium-rodaniddal (200 g/l) kimutatjuk

A reakció: $\text{Fe}^{3+} + \text{SCN}^- \rightarrow [\text{FeSCN}]^{2+}$ (vörös komplex)

A rodanid-próba eredménye csak azt mondja meg, hogy a vízben vas van, viszont hogy milyen formában (vas-hidroxid stb.), azt nem.

Az eredményközlés szempontjai

Általános szempontok

Vannak olyan szervezetek, amelyeket külön preparálás, festés nélkül nem lehet faj- vagy még magasabb szintig sem meghatározni – ilyenkor fajnevet ne közöljünk!

A számítógépes adatfeldolgozás előtérbe kerülése miatt célszerű mindent számszerűen kifejezni, tehát a „nem mutatható ki”, „kimutatható”, „ <100 ” helyett is számokat írni.

A számok megadása: százakra kerekítve, 20 500 i/l vagy $2,05 \times 10^4$ i/l formában

Ha valamilyen élőlényt beírunk az előforduló szervezetek közé, akkor annak a táblázatban is meg kell jelennie, és fordítva.

Amit csak lehet – az érthetőség kedvéért –, célszerű magyarul is megfogalmazni, például a táblázatos eredményközlés után, egy rövid szöveges összefoglaló keretében.

Minősítésnél a vízbiológiai vizsgálatok esetében nem használunk (*) jelet. Ha az egyedszám meghaladja a kijelölt határértéket (+) jellel jelöljük (kifogásolt minőségű ivóvízminta).

Az eredményközlés tartalmi elemei

Az üledék mennyisége

Ha az üledék mennyisége 0,1 ml/l alatt van, a mennyiség jellemzésére a következő kifejezéseket javasoljuk: „alig látható”, „nyom”, „jól látható”. Ha az üledék mennyisége 0,1 ml/l vagy több, akkor csak a mért mennyiséget adjuk meg.

Szennyezettségjelző baktériumok

Szennyezettségjelző baktériumok alatt a natív mintában festés nélkül látható, formált, szennyezett vizekre jellemző baktériumokat értjük, melyek meghatározásához nincs szükség elektronmikroszkópos nagyításra. A coccusokat, pálcákat stb. nem számoljuk, mert ezek megbízható meghatározása a fent leírt módszerrel lehetetlen. Ha egy mintában jól láthatóan hemzsegnek a baktériumok, írhatjuk például azt, hogy „élénk baktériumtevékenység”. Ha valóban az ilyen baktériumok nagy mennyisége okoz problémát, azt a bakteriológiai vizsgálat úgymint kimutatja. **Határértéke 0/L.**

Kénbaktériumok

A kénbaktériumok között előfordulnak szennyezettségjelzők valamint olyanok is, amelyek egyébként tiszta, gyógyvíz jellegű vizekben élnek. Ha a mintában szennyezettségjelző kénbaktériumok vannak, valószínűleg más, szennyezettségre utaló szervezeteket is találni fogunk. Tervezett határérték: $10^3/L$, **a jelenleg érvényben levő határérték $10^2/L$.**

Vas- és mangánbaktériumok

Az olyan fajokat, melyek csomókban fordulnak elő a megvizsgált vízben, pl. *Crenothrix* sp. nagyobb súllyal kell figyelembe venni, mint amelyek összetört, hosszabb-rövidebb fonalak formájában, ezért az telepes vas- és mangánbaktériumok tervezett határértéke 100 telep/L, a fonalas és sejtes baktériumoké pedig $5 \times 10^4/L$. **A jelenleg érvényben levő határérték $2 \times 10^4/L$.**

Algák és cianobaktériumok

A cianobaktériumok esetében számolni kell azzal, hogy ha a felhasznált felszíni vízben toxikus vízvirágzás volt, akkor az ivóvízben jelen lehetnek a szervezetek által termelt, oldott toxinok akkor is, ha az ivóvízből nem tudunk jelentős mennyiségű cianobaktériumot kimutatni. Védett vízadó réteg (mélyfúrású kutak) és parti szűrésű kutak esetében a tervezett határérték 10^2 , nem védett vízadó (karsztvíz, talajvíz, forrásvíz) és kevert víz esetén: 3×10^3 , felszíni víz eredetű ivóvíz esetében: 10^4 . **A jelenleg érvényben levő határérték algákra $10^4/L$, cianobaktériumokra $10^2/L$.**

Gombák

A gombafonalak – mivel a fonalak alapján valószínűleg nem tudjuk megállapítani, hogy milyen gomba – kifogásoltnak nyilvánítjuk a vizet.

Tény, hogy amikor a levegőben nagy a gombaspórák (Alternaria, Penicillium, Cladosporium stb.) koncentrációja, akkor azok az ivóvízbe is bekerülnek. Bekerülhetnek ott, ahonnan a víz jön, vagy a laboratóriumban a mintafeldolgozás során (ennek elkerülésére célszerű a minta szűrésekor a tölcseért lefedni). Eddigi ismereteink alapján az ilyen gombák főleg belélegezve okoznak allergiás légúti panaszokat. Mivel ezek a gombák gyakorlatilag mindenhol előfordulhatnak, spóráik jelenléte miatt nem tartjuk szükségesnek az ivóvíz kifogásolását. Javasolnánk, hogy az üledék minősége részben tüntessük fel őket, hiszen a fentiek ellenére információt hordoznak pl. áttételesen a vízmű épületének állagáról.

A szennyvízre, felszíni vizekre jellemző gombák (pl. Fusarium, Leptomitus, Achlya) természetesen be kell, hogy kerüljenek az előforduló szervezetek közé.

Az EPA adatai alapján a biofilmekben az alábbi gombák szaporodhatnak el, melyek kisebb-nagyobb megbetegedést is okozhatnak: Aspergillus fumigatus, Aspergillus flavus, Aspergillus niger, Cryptococcus neoformans, Candida albicans, Mucor sp., Stachybotrys chartarum, Trichophyton sp.. (Ezek a fajok Magyarországon is előfordulhatnak.)

Ha felmerül a gyanú, hogy ezek a gombák jelen vannak az ivóvízben, feltétlenül szükséges a táptalajon való kitenyésztés és pontos azonosítás. A mikroszkópos vízvizsgálatot végző kollégának a feladata arra terjed ki, hogy ha a mikroszkópiai vizsgálat után feltételezi ezen gombák előfordulását, a vizet mikológusnak továbbítsa.

A tervezett és **jelenlegi határérték 0/L.**

Mikológiai kérdésben fordulhatunk a „Johan Béla” Országos Epidemiológiai Központ, Mikrobiológiai Főosztály, Mikológiai Osztályához. Cím: 1097 Budapest, Gyáli u.2-6. Tel.: Nádasné Dr. Zala Judit 06-1-476-1100/2168.

Állati egysejtűek

A WHO adatai alapján az alábbi patogén protozoon fajok terjedhetnek ivóvízzel: *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium több faja*, *Acanthamoeba spp.*, *Naegleria fowleri*, *Toxoplasma sp.*, *Cyclospora sp.*, melyeknek magyarországi vonatkozásuk is lehet.

Az Entamoeba és Achantamoeba élő formában is, míg a Giardia, Cryptosporidium, Toxoplasma, Cyclospora csak ciszta illetve oociszta formájában fordulhat elő.

Az Achantamoeba, Naegleria, Echinamoeba, Hartmanella amőbákban, a Cyclidium, Tetrahymena csillósokban a legújabb kutatások eredménye szerint a Legionella élni és szaporodni képes.

Ha alapos gyanú merül fel, hogy ezek a protozoonok jelen vannak az ivóvízben (pl. a vízfogyasztók széleskörű megbetegedése), feltétlenül szükséges a pontos azonosítás.

A fenti protozoonokkal kapcsolatban az alábbi laborokhoz fordulhatunk segítségért:

Giardia és Cryptosporidium vízből történő vizsgálatát az Fodor József Országos Közegészségügyi Központ-Országos Környezetegészségügyi Intézet Higiénés Vízbológia osztályán végezzék. Cím: 1097 Budapest, Gyáli u.2-6. Tel.: dr. Török Tamásné dr. 06-1-476-1207.

A többi protozoon vízből történő kimutatására sajnos még nincs az országban kidolgozott módszer.

Vannak olyan fajok, melyek jelenléte különböző baktériumok előfordulását is feltételezi pl. Vanella sp., Saccamoeba sp., Ripidomyxa sp.. Ezek az amőbák olyan prokarióta szimbiótákat tartalmaznak, melyektől a víz szag és íz tekintetében kifogásolt lesz.

A tervezett és **jelenlegi határérték 0/L.**

Férgék

A féregpetéket is ide soroljuk. A patogén férgek előfordulásának lehetősége vizeinkben igen kicsi. A határértéket 50/L-re szeretnénk módosítani, mivel több vízszolgáltató is van, aki a jelenlegi határértéket a legszigorúbb eljárások mellett sem tudja tartani. **A jelenlegi határérték 0/L.**

Egyéb többsejtű állatok

Az összes többsejtű állatot ide soroljuk, ami nem féreg. Bryozoa, Arthropoda, Mollusca. A tervezett határérték 0/L, a jelenlegi Kormányrendelet nem foglalkozik ezzel az állatcsoporttal.

Az üledék minősége

Az alábbi jellemzőket értjük alatta: szervesetlen alkotók (pl. szén szemcsék, vashidroxid pelyhek (ez utóbbi megállapítása csak gyakorlott kollégáknak ajánlott)), pollenek, bizonyos gombaspórák (lásd fent), gyökérképletek, szövetdarabok, vastartalom (rodanid-próba).

A 201/2001 (X. 25.) Kormányrendelet **tervezett** változtatásai az „E” táblázatban

(mikroszkópos biológiai ivóvízvizsgálat)

Vízminőségi jellemzők	Egység	Határérték	Megjegyzés
Üledék mennyisége	ml/l	0,1	1.
Szennyezettségjelző baktériumok	szám/l	0	2.
Kénbaktériumok	szám/l	10 ³	
Vas- és mangánbaktériumok	szám/l	baktériumtól függő	3.
Algák és cianobaktériumok	szám/l	az ivóvíz eredetétől függő	4.
Gombák	szám/l	0	5.
Állati egysejtűek	szám/l	0	6.
Férgek	szám/l	50	7.
Egyéb többsejtű állatok	szám/l	0	8.
Üledék minősége:			
Előforduló szervezetek:			9.

Megjegyzések:

1. Legalább 1 liter vízmintából 0,45 µm-es membránszűrőn kiszűrt, lemosott, majd centrifugálva tömörített anyagként mérve. Ez az üledék sem tartalmazhat háztartási, ipari vagy mezőgazdasági eredetű anyagokat. Ha az üledékben csak elpusztult szervezeteket lehet kimutatni, célszerű deklórozott mintából víztoxikológiai ellenőrző vizsgálatot is végezni. Az üledék mennyisége a vezetékhálózatban nem emelkedhet lényegesen a betáplált vízben mért értékhez képest.
2. Olyan formált, szennyezett vizekben előforduló baktériumok, melynek biztos felismeréséhez nem szükséges 1000-szeresnél nagyobb nagyítás és különleges festési eljárás.
3. Határértékek: telepes baktérium esetén 100/L, egyéb esetben 5×10⁴
4. Határértékek: védett vízadó réteg (mélyfúrású kutak) és parti szűrésű kutak esetében: 10², nem védett vízadó (karsztvíz, talajvíz, forrásvíz) és kevert víz esetén: 3×10³, felszíni víz eredetű ivóvíz esetében: 10⁴
5. Nem soroljuk ide a levegőből bekerülő, belélegezve allergiát okozó gombaspórákat (pl. Alternaria, Cladosporium, Penicillium).
6. Flagellaták, Ciliaták, Rhizopodák, Actinopodák.

7. Nematoda, Oligochaeta, Ascarida, Gastrotricha stb. fajok és petéik, cocconjaik.
8. Bryozoa, Arthropoda, Mollusca
9. A betáplált vízben levő szervezetektől eltérő élőlények a vízfogyasztás helyén nem válhatnak jellemzővé

KÖVETKEZTETÉSEK

Az itt felvázolt módosítási ajánlások a 201/2001 Korm. rendeletben szakmai egyeztetések alapján születtek. Reményeink szerint ennek a módszernek az elterjedésével még biztonságosabbá tehetjük az ivóvizek használati és egészségügyi értékét.