

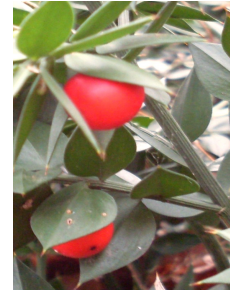


1. Ábra: Csodabogyós-barlang, L-akna, fotó: Sinka Gábor



**Styx Barlangkutató Csoport
Évkönyve
2018.**

Styx Barlangkutató Csoport
8312 Balatonederics Bakosdomb u. 2.
E-mail: szisziba65@asat.hu
tel: 06-30-3066050



Tárgy: kutatási jelentés

Balaton-felvidéki Nemzeti Park Igazgatóság

8229 Csopak, Kossuth u. 16.

Puskás Zoltán
Igazgató úr részére

Kutatási Engedély ügy. száma: VE-09Z/07758-04/2017

Tisztelt Nemzeti Park Igazgatóság!

A Styx Barlangkutató Csoport tagjai a saját munkáinkon kívül más csoportok munkáiban, feladataiban is részt vettek. Így pl:

- Eredményes munkakapcsolat van a Vulkánszpeleológiai Kollektíva tagjaival, részt veszünk programjaikon, barlangkutató táboraikban
- Tagjaink önkéntes segítőként, John Szilárd elnök a Balatonedericsi Szakasz felelőseként vett részt a BfNP által is támogatott, második alkalommal megrendezésre került Vadlán Ultra Terep 108 Km-es futóverseny lebonyolításában. Frissítő, és ellenőrző pontunk a Balatonedericsi Tájház épületénél volt. Az eredményes lebonyolításnak, és a pozitív visszajelzésnek is köszönhetően a verseny a 2019-es országos versenynaptárban továbbra is szerepel.
- Tovább folytattuk Sinka Gáborral, a BfNPI Keszthelyi-hegység Tájegység vezetőjével a Csodabogyós-barlang fotódokumentációját. Kezdetben a kaland túra útvonalak (Alap, E 1., E. 2.), ebben az évben a nemrég feltárt BP-ág, a későbbiekben tervezzük a barlang további szakaszainak fotódokumentációját is.

Csoporttársaim és a csoport Elnökségi tagjainak nevében köszönöm 2018. évi támogatásukat, segítségüket.

További munkájukhoz eredményekben gazdag 2019. évet kívánunk!

Tisztelettel:

John Szilárd
elnök
Styx Barlangkutató Csoport

Balatonederics, 2019. február 13.

Csodabogyós-barlang (Kat. szám: 4440-4) és a Széllik-barlang (Kat. szám: 4440-83) kutatása

2018.

Feltáró kutatás:

Ebben az évben a Styx Barlangkutató Csoport nem végzett önálló feltáró kutatást a Csodabogyós-barlang, és a Széllik-barlang területén.

Tudományos, és terepi munkák elvégzéséhez nyújtottunk segítséget:

- Folytattuk a 2007.-ben elkezdett csepegő víz, és azok stabil izotóp geokémiai vizsgálatát, illetve a barlangi hőmérséklet, szén-dioxid méréseket. A mérések havi rendszerességgel, a barlang több pontján folynak. A mintákat a MTA Geokémiai Kutatóintézetben vizsgálják. (Dr. Czuppon György,)
- Terepi mintavételezés: John Szilárd, Kovács Zsófia Adrienn végezte
- **A mikrobiológiai kutatások előzetes eredményeként elkészült egy szakdolgozat Makk Judit és Enyedi Nóra Tünde (ELTE TTK Mikrobiológiai Tanszék) témavezetésével:**

1. kép



2. kép



1. kép: Barlangkutató Csoportunk tagjai a Szlovák Paradicsomban túráztak (Fotó: John Szilárd)

2. kép: Futók, segítők, és a tájékoztató tábla a VUT 2018. Balatonedericsi frissítő, és váltó pontján (Fotó: John Szilárd)

2018

Enyedi Nóra Tünde

Jelentés a Csodabogyós-barlangban végzett mikrobiológiai kutatásokról

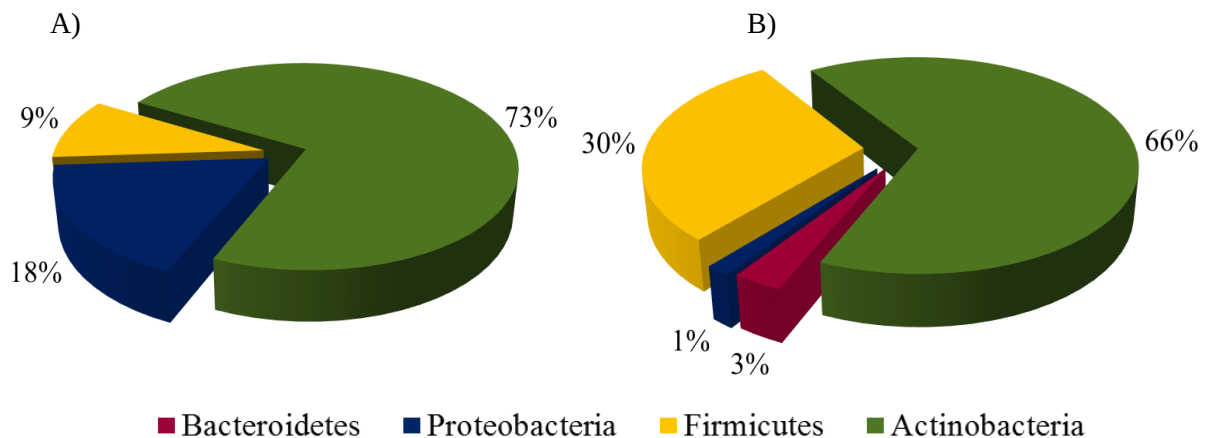
A Csodabogyós-barlangban folytatott stabilizotóp-geokémiai monitoring jellegű kutatást a 2017-2018-as években mikrobiológiai vizsgálatokkal egészítettük ki, hiszen a barlangban ezidáig nem történt vizsgálat a mikrobiális diverzitás széleskörű feltárására. A nemzetközi irodalom alapján feltételezhető, hogy a barlangi környezetben élő baktériumközösségek változatos anyagcsere-folyamataik révén szerepet játszhatnak a barlangképződésben a lokális fizikai-kémiai paraméterek változtatásán keresztül. Mivel a barlang alacsony szerves anyag-, de magas kalcium-tartalommal jellemezhető extrém élőhelyet kínál a mikrobák számára, ezért azok adaptációs folyamatai közé tartozhat a karbonát-kiválás indukálása (Banks és mtsai, 2010; Ortiz és mtsai, 2014; Baskar és mtsai, 2016; Fang és mtsai, 2017). Külső felszínük és az általuk képzett biofilmek mátrixanyagának kémiai jellege befolyásolhatja a CaCO_3 morfológiáját és kristályszerkezetét (Braissant és mtsai, 2003), amellyel hatással lehetnek a klímakutatás során gyűjtött adatok interpretálására is (Demény és mtsai, 2016). A mikrobiális karbonát-precipitáció ígéretes technológia lehet a talaj megerősítésében, a nehézfém bioremediációban, az önjavító beton használatában, az épületek, műemlékek megőrzésében és a CO_2 megkötésben (Anbu és mtsai, 2016). A folyamat hatásmechanizmusát befolyásoló tényezők megismerése szükséges a biotechnológiai kezelések alkalmazhatóságának szempontjából is.

A kutatás célja a karsztbarlangok morfológiájának kialakulásához vezető mikrobiális eredetű folyamatok tanulmányozása, különös tekintettel a mikroorganizmusok barlangképződésben és ásványkiválások kialakulásában betöltött szerepére.

Eredmények

A mikrobiális közösség összetételének vizsgálatához a barlangban végzett monitoring vizsgálatok helyéül is szolgáló Függőkert- és Lián-termekben kijelölt reprezentatív helyekről vett mintákat (csepegő víz, cseppkőfelszíni biofilmek) vontuk tenyésztésbe a barlangi környezeteket reprezentáló táptalajok segítségével és törekedtünk azok optimalizálására az extrém környezetek tulajdonságainak megfelelően (barlangi üledékkivonat, kalcium és ásványi anyag tartalom megnövelése útján).

A Csodabogyós-barlang két terméből összesen 138 baktériumtörzset izoláltunk. A baktériumtörzsek 16S rRNS-gén bázissorend-elemzésével 58 csoportot tudtunk megkülönböztetni (Krett és mtsai, 2017; Yoon és mtsai, 2017). Az azonosított baktériumtörzsek többsége 97% fölötti hasonlóságot mutatott a referencia törzséhez és a következő négy filogenetikai törzs képviselőiként azonosítottuk: Bacteroidetes, Proteobacteria (Alpha- és Gammaproteobacteria osztály), Firmicutes és Actinobacteria (1. ábra). Mindkét mintaterület esetében az Actinobacteria törzs képviselői hasonlóan magas arányban jelentek meg.



1. ábra: A Csodabogyós-barlangból származó mintákból tenyésztésbe vont baktériumtörzsek filogenetikai törzsek szerinti megoszlása.

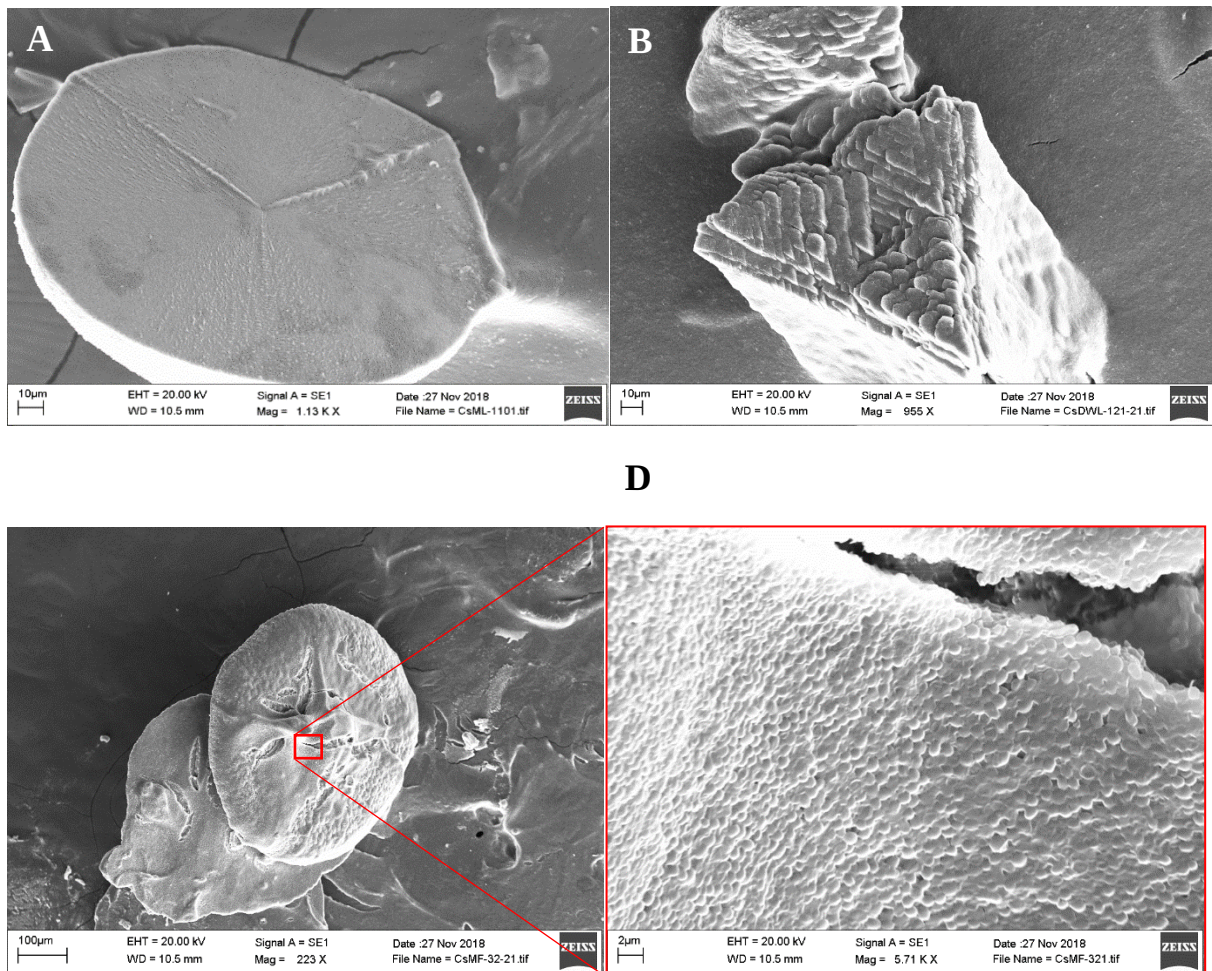
A) A Lián-teremből izolált törzsek.

B) A Függőkertből izolált törzsek.

A különböző minták bevonásával és a speciális összetételű táptalajok használatával 28 nemzetség képviselőit sikerült azonosítani, amelyek leggyakrabban a *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Micrococcus*, *Paeniglutamicibacter*, *Rhodococcus* és *Streptomyces* nemzetségbe sorolható baktériumfajok voltak. Az általunk kimutatott nemzetségek képviselőit izolálták más karbonát barlangokból is (Baskar és mtsai, 2016; Fang és mtsai, 2017). Az alacsony szerves anyag tartalommal rendelkező Csodabogyós-barlangból származó iszap extraktumot tartalmazó szilárd tápagon nagyobb számú baktériumtörzset sikerült tenyésztésbe vonnunk, köztük a *Microbacterium*, *Kribbella*, *Psychrobacillus*, *Planomicrobium*, *Paenibacillus* és *Acinetobacter* nemzetségek törzseit csak ezen a táptalajon sikerült kitenyésztünk. Patogén baktériumok jelenléte nem volt kimutatható. Eredményeik azt mutatják, hogy a Csodabogyós-barlang alacsony szerves anyag tartalommal jellemezhető környezeti feltételeinek ellenére diverz heterotróf baktériumközösséggel rendelkezik. Az általunk használt táptalajoknál alacsonyabb szerves anyag tartalmú táptalajok használatával további baktériumtörzsek kitenyésztése lehetséges, illetve a barlang üledék extraktuma kedvezőbb körülményeket biztosít a barlangból származó baktériumközösségeknek. A kimutatott legközelebbi rokon fajok mezofil, illetve hidegtűrő (pszichrotoleráns), talaj- és víz közeli élőhelyeken elterjedt, illetve gyakran növényekhez asszociált heterotróf baktériumok. Több biofilmképzésben, illetve a nitrogén-körforgalomban is résztvevő baktériumnemzetség képviselőit is kimutattuk.

A mikrobiális ásványképződés tanulmányozásához az izolált baktériumtörzsek karbonát-precipitációs képességét kalcium-acetátot, élesztőt és glükózt tartalmazó táptalajon figyeltük meg. A telepek felszínén kialakult kristályok változatos mérete, színe és mennyisége szabad szemmel is jól látható volt, de változatos morfológiájuk csak fény- és pásztázó elektronmikroszkópos (SEM) felvételeken detektálhattuk (2. ábra). A kristályok alakjának változatossága nem csak a különböző törzsek precipitátumait összehasonlítva volt jellemző, hiszen egy adott törzs gyakran többféle morfológiájú kristály egyidejű precipitációját is eredményezte.

A SEM-mel készített felvételeken jól látszódik, hogy a kristályokat baktériumsejtek borítják [2. ábra C-D)].



2. ábra. SEM felvételek a baktériumok által precipitált változatos morfológiájú kristályokról.

- A) *Oerskovia enterophila* CsML-110;
- B) *Stenotrophomonas humi* CsDWL-121;
- C) *Planomicrobium chinense* CsMF-32;
- D) a C) ábrán kijelölt rész nagyítása.

A kristályok pontos összetételét és a kalcium-karbonát szerkezetét mikro-röntgenpordiffrakciós mérésekkel kalcitként, aragonitként és vateritként azonosítottuk. Az általunk izolált baktériumtörzsek között a tudományra nézve új karbonát-precipitáló törzseket ismertünk meg. Eredményeink alapján a barlangból izolált baktériumtörzsek többsége képes a kalcium-karbonát kiválás folyamatának indukálására laboratóriumi körülmények között.

Felhasznált irodalom

Anbu, P.; Kang, C. H.; Shin, Y. J.; So, J. S. Formations of calcium carbonate minerals by bacteria and its multiple applications. *Springerplus* **2016**, 1;5, 250. <http://dx.doi.org/10.1186/s40064-016-1869-2>.

Banks, E. D .; Taylor, N. M .; Gulley, J .; Lubbers, B. R .; Giarrizzo, J. G .; Bullen, H. A.; Hoehler, T. M .; Barton, H. A. bacterial calcium carbonate precipitation in cave environments: a function of calcium homeostasis, *Geomicrobiology J.* **2010**, 27 (5), 444-454.

Baskar, S.; Routh, J.; Baskar, R.; Kumar, A.; Miettinen, H.; Itävaara, M. Evidences for microbial precipitation of calcite in speleothems from Krem Syndai in Jaintia Hills, Meghalaya, India. *Geomicrobiology J.* **2016**, 33(10), 906-933.

Braissant, O.; Cailleau, G.; Dupraz, C.; Verrecchia, E. P. Bacterially induced mineralization of calcium carbonate in terrestrial environments: the role of exopolysaccharides and amino acids. *J. Sediment. Res.* **2003**, 73, 485-490.

Demény, A.; Németh, P.; Czuppon, G.; Leél-Őssy, S.; Szabó, M.; Judik, K.; Németh, T.; Stieber, J. Formation of amorphous calcium carbonate in caves and its implications for speleothem research. *Scientific Reports* **2016**, 6, 39602. <http://dx.doi.org/10.1038/srep39602>.

Fang, B. Z.; Salam, N.; Han, M. X.; Jiao, J. Y.; Cheng, J.; Wei, D. Q.; Xiao, M.; Li, W. J. Insights on the effects of heat pretreatment, pH, and calcium salts on isolation of rare Actinobacteria from karstic caves. *Front. Microbiol.* **2017**, 8 (8),1535. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.01535>.

Krett, G.; Szabó, A.; Felföldi, T.; Márialigeti, K.; Borsodi, K. A. The effect of reconstruction works on planktonic bacterial diversity of a unique thermal lake revealed by cultivation, molecular cloning and next generation sequencing. *Arch. Microbiol.* **2017**, 199, 1077-1089.

Ortiz, M.; Legatzki, A.; Neilson, J. W.; Fryslie, B.; Nelson, W. M.; Wing, R. A.; Soderlund, C. A.; Pryor, B. M.; Maier, R. M. Making a living while starving in the dark: metagenomic insights into the energy dynamics of a carbonate cave. *ISME J.* **2014**, 8, 478-491.

Yoon, S. H.; Ha, S. M.; Kwon, S.; Lim, J.; Kim, Y.; Seo, H.; Chun, J. Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2017**, 67, 1613-1617.

Kutatásunkat az OTKA FK123871 pályázat támogatásával végeztük.

A kutatás résztvevői: Enyedi Nóra Tünde, Makk Judit, Borsodi Andrea, Czuppon György, Németh Péter, Berényi Bernadett, Leél-Őssy Szabolcs, John Szilárd

A mikrobiológiai kutatások előzetes eredményeként elkészült egy szakdolgozat Makk Judit és Enyedi Nóra Tünde (ELTE TTK Mikrobiológiai Tanszék) témavezetésével:

Halmy Réka: Karbonátképző baktériumok a Csodabogyós-barlangból