

Cholnoky Jenő Karszt- és Barlangkutató Pályázat  
Budapest, 2012

# Mikrobiális ökológiai vizsgálatok a Budai Termálkarszton

*Molnár János-barlang  
Szemplő-hegyi-barlang*

*Köblös Gabriella*

SZAKDOLGOZAT  
Geográfus MSc.  
Táj- és környezetkutató szakirány  
2011

Eötvös Loránd Tudomány Egyetem  
Természettudományi Kar  
Természetföldrajzi Tanszék



# Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	2
2. Irodalmi áttekintés.....	4
2.1. A Budai Termálkarszt.....	4
2.1.1. Földrajzi áttekintés.....	4
2.1.2. A vízhasználat történeti áttekintése.....	5
2.2. A Molnár János-barlang.....	6
2.2.1. Feltáró kutatások.....	7
2.2.2. Hidrológiai viszonyok.....	8
2.2.3. Természettudományos kutatások.....	10
2.3. A Szemlő-hegyi-barlang.....	12
2.3.1. Természettudományos kutatások.....	12
3. Anyagok és módszerek.....	14
3.1. Mintavételezés.....	14
3.2. Tenyésztéses vizsgálatok.....	16
3.2.1. Az összcsíraszám meghatározása.....	17
3.2.2. Fekál-indikátorok, és egyéb patogének.....	18
3.2.2. Törzsgyűjtemény létrehozása.....	21
3.3. Molekuláris módszerek.....	21
3.3.1. DNS extrakció.....	21
3.3.2. PCR technika.....	22
3.3.3. DGGE (Denaturáló Gradiens Gél Elektroforézis).....	24
3.3.4. Restrikciós vizsgálatok (ARDRA).....	25
4. Eredmények és értékelés.....	26
4.1. A tenyésztések eredményei – összcsíraszám meghatározása.....	26
4.2. A tenyésztések eredményei - fekál-indikátorok.....	29
4.3. A tenyésztések eredményei – egyéb patogének.....	30
4.4. Közösségi PCR alapú vizsgálatok – ARDRA eredmények.....	31
4.5. Közösségi PCR alapú vizsgálatok – DGGE eredmények.....	31
5. Összefoglalás.....	34
Irodalomjegyzék.....	35
Szabványok.....	37

## 1. Bevezetés

A XXI. században egyre inkább meghatározó gazdasági érték az elegendő mennyiségű, és jó minőségű ivóvíz. A vízbázisok védelme ezért korunk egyik legfontosabb környezetvédelmi feladata. Magyarország jelenleg nagy mennyiségű, és jó minőségű felszín alatti vízkészlettel rendelkezik. A vízzáró kőzet alatt felhalmozódott víztestek nem vesznek részt a közművi körforgásban, készletükből csak kivétel történik, a pótlódás geológiai értelemben is lassú folyamat, az emberi tevékenységek által kevésbé befolyásolt. A karsztos ivóvízbázis azonban megújuló, épp ezért fokozottan sérülékeny, az antropogén hatásoknak erősen kitett. Ezek a hatások mérhetőek, azaz tettenérhetőek és nyomon követhetők (NGUYET, V. T. M. - GOLDSCHIEDER, N. 2006).

Évtizedek óta végeznek vízminőségi vizsgálatokat a Budai Termálkarszton. Egyetmünkön is számos tanulmány készült már a víztestek, és csepegő vizek fizikai és kémiai jellemzőiről. A bakteriológiai vizsgálatok e régióból azonban igen régiek, és jellemzően nem jól dokumentáltak. Noha a Baradla-barlang és a Cserszegtomalyi-kútbarlang részletes és alapos felmérését végző ANTEUS csoport itt is végzett alkalmi vizsgálatokat (ezek jelentős része inkább a levegőből vett mintákra épült), az előbbi helyszínekkel ellentétben átfogó bakteriológiai vizsgálatról nem találtam jelentést. Munkám során a hazai felszíni mesterséges- illetve természetes víztestekre alkalmazott vizsgálati módszerek, és a nemzetközi szakirodalom alapján megkíséreltem felállítani egy mikrobiológiai monitorozásra használható vizsgálati rendszert a rózsadombi mintaterületen. Céлом volt a természetes mikroökoszisztéma összetételének vizsgálata mellett az esetleges antropogén szennyezések eredetének bakteriológiai igazolása.

A téma kidolgozásához mikrobiológiai és molekuláris biológiai laborra volt szükségem. A molekuláris háttér munkámból kifolyólag magam biztosítottam dr. Hegedűs Tamás (SE EOK Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet, Membránbiológiai Kutatócsoport) és dr. Váradi András (MTA SzBK Enzimológiai Intézet, Aktív Transzport Fehérjék Kutatócsoport) laborjaiban. Mindkettőjüknek köszönöm a lehetőséget. A mikrobiológiai háttér megszervezésében témavezetőm, dr. Bognár Csaba (MH Közegészségügyi és Katonaorvosi Kutató Intézet) segített. A vízmintákból a közvetlen DNS extrakciót Pereszlényi Csaba (MH Közegészségügyi és

Katonaorvosi Kutató Intézet) végezte. A közösségi vizsgálatok (DGGE) során dr. Borsodi Andrea és Krett Gergely volt segítségemre (ELTE TTK Mikrobiológiai Tanszék). A munka jelentős részét dr. Vargha Márta (OKI Vízhigiénés Főosztály, Vízmikrobiológiai Osztály) laborjában végeztem. Szakmai segítségén túl különösen hálás vagyok bizalmáért és türelméért. Köszönöm továbbá Bánfi Renáta, Barna Zsófia, Demeter Györgyi, Kern Anita, Majsai Endréné Zsuzsanna Lénárt Györgyné Mariann, Pomozi Viola, Szax Anita és dr. Tordai Hedvig szakmai (és baráti) tanácsait. A mintavételezés során Fehér Katalin és Kalinovits Sándor volt segítségemre. Külön köszönöm Storozynski Szabolcs elengedhetetlen és kreatív segítségét, aki a víz alatti mintavételezést végezte. A fotók egy részét Magyar Péter készítette. A háttéranyag összegyűjtésében Egri Csaba (Vidékfejlesztési Minisztérium, Barlangtani és Földtani Osztály), Mari László (ELTE TTK Természetföldrajzi Tanszék), továbbá Virág Magdolna nyújtottak segítséget.

## **2. Irodalmi áttekintés**

### **2.1. A Budai Termálkarszt**

#### **2.1.1. Földrajzi áttekintés**

A Budai-hegység alacsony középhegység, a Dunazug-hegyvidék tagja. Erősen feldarabolódott, a sasbérceket medencék és árkos süllyedékek tagolják. Fő tömegét harmad- és negyedidőszaki karbonátos formációk alkotják. (SCHWEITZER F. 2003)

A völgyek barna erdőtalaját az antropogén hatás sok helyütt humuszkarbonáttá alakította. A gerinceken, sziklás oldalakon rendzina, és sziklás váztalaj található. A terület Budapest közigazgatási határán belül helyezkedik el, ebből adódóan jelentős része beépített. Jellemzően kultúrtáj arculatú, bár a XX. század szőlősei és gyümölcsösei napjainkra eltűntek, sőt a kertvárosi jelleg is kikopóban van. Az egykori kőfejtőkben mészkövet bányásztak, de napjainkra teljesen felhagytak a műveléssel. A beépítetlen részek természetvédelmi oltalom alatt állnak. Telepített parkerdők, karsztbokorerdők, sziklás gyepek borítják. Kifejlett felszíni karsztformái nincsenek. (FEHÉR K. 2009)

A Hármashatár-hegy DK-i elvégződésének karbonátos összeletét nevezzük rózsadombi karsztnak. Tagjai a Vaskapu-hegy, Látó-hegy, Remete-hegy, Mátyás-hegy, Ferenc-hegy, József-hegy és Rókus-hegy. Természetes határai az Ördögárok-völgye, a Duna, illetve a Remete-hegy és Látó-hegy É-i nyergei. Állandó felszíni vízfolyása nincs. (BOLNER K. 1993)

Wein Gyula 1974-ben készült földtani térképegyütteséről leolvasható, hogy a rózsadombi barlangok befoglalóköze az eocén alatti rétegben a Szürke Dolomit, a Fehér, laza, szemcsés Dolomit, és a Tüzköves Dolomit. Erre települt a Budai Márga és a Bryozoás Márga. Ezt Kiscelli Agyag, helyenként lösz, illetve folyami hordalék fedi.

A barlangképződés jellemzően hidrotermális eredetű, de paleokarsztos maradványok a felszínen és a barlangokban is megfigyelhetők: a jelenlegi járatok falán helyenként kirajzolódnak az egykori üregek lencse alakú kitöltései. Az elmúlt 200 millió éves földtörténeti időben a kitöltések kora alapján 5 karsztosodási fázist lehet elkülöníteni, még a jelenlegi barlangokat kialakító hidrotermális szakasz előtt. Ezek a szárazulati időszakokhoz köthetők. E folyamatok során a kőzet porozitása jelentősen megnőtt. A hidrotermális szakaszban a fedőként települt

Kiscelli Agyag több száz m vastag borítása a mélybe zárta a karbonátos kőzetet, s ez kedvezett a hévizes folyamatok zárt konvekciós áramlásainak. A mélyben munkálkodó forró víz vulkáni működéshez köthető eredetét az egykorú kiválások (teléres ásványegyüttesek) támasztják alá. A további hidrotermális folyamatok több lépcsőben oldották ki a járatokat. A Budai-hegység szakaszos kiemelkedésével az egyes barlangok eltérő magasságokba kerültek. A terület erózióbázisa a Duna, így a folyó fokozatos bevágódásával maga az erózióbázis is süllyedt. Ez vezetett az emeletes barlangok kialakulásához. A jelenlegi barlangjáratok mind a hideg vizes, mind a hidrotermális formákat mutatják. Kialakulásukban jelentős szerepet játszott a keveredési korrózió, a kovás zónák kipergéses felharapódzása, és az omlások. A kőfülkék a hidrotermális tevékenységek felszíni nyomai. (NÁDOR A. - KRAUS S. 1993)

A karsztvíz fő áramlási iránya K-Ny-i, É-on a Vörösvári-völgy felé, D-en pedig a természetes megcsapolódásai felé, a Rózsadomb K-i lábánál, a Duna, mint erózióbázis szintjében (104 m tszf.) fakadó források felé irányul. Az egyes források csoportok paramétereiben mért változások antropogén eredetűek, és a vízkivétellel hozhatók kapcsolatba, a természetes működési mechanizmus nem változott (TAKÁCS J. 2010). A beszivárgás a márgával való fedettség, és a beépítettség miatt alacsony: összességében 800 m<sup>3</sup>/napra becsülhető (MAUCHA L. 1993). A korábbi bakteriológiai vizsgálat szerint, a vizsgált helyek 20%-ában a vizek erősen szennyezettek voltak, 20 °C-on tenyésztve 800-as coliform szám, illetve 72 000-es baktériumszám is előfordult (MAUCHA L. 1993). Az eredményekre csak utalást találtam, részletes kifejtés nincs a szakirodalomban. Sejtetően e kiugróan magas adatok a Molnár János-barlangra vonatkoznak. Szeretném megemlíteni, hogy az utóbbi igen csapadékos évben a beszivárgás jelentősen megnőtt. Az észlelő helyeken a csepegés intenzitása jóval magasabb volt, új csepegések jelentek meg, összességében a barlangok „vizesebbek” voltak.

### **2.1.2. A vízhasználat történeti áttekintése**

A Budai Termálkarszt barlangjai zömmel a XX. században váltak ismertté. Feltárásuk a közelmúltban kapott hatalmas lendületet. A Rózsadomb lábánál fakadó hévizes forrásokat azonban már a rómaiak is használták. A Lukács-fürdő építésekor 1895-ben Molnár János olyan cserépcsövekre bukkant, melyek valószínűleg a rómaiak idejéből valók. Az első utaló

megjegyzés egy Claudius idejéből származó felirat, mely a józsef-hegyi illetve gellért-hegyi hévizeket, mint „aqua calidae superiores et inferiores”, azaz alsó illetve felső melegvizet említi. A középkori vízhasználat bizonyítéka a Felhévíz (e nevet Anonymus említi elsőként) településnév, melyet a XII. században a szomszédos Géza Vásárhely is felvesz. Felhévíz templomát egy 1187-es veronai oklevél így említi: „Ecclesia sancte Trinitata de aqua calida”, azaz a Szentháromság temploma a meleg forrásoknál. A forrásokra épített malmok említése a XIII. sz-i malomperek irataival kezdődött. E malmok már valószínűleg a kőgátak építésével nyert Malom-tóból a Duna irányába elfolyó meleg vizet használták fel. Magát a tavat csak a XVI. század elején említik először, de valószínű, hogy a malmokkal együtt létesítették, mert a forrásokkal való hidrosztatikai kapcsoltságának köszönhető szabályzó ereje segítségével a nagyobb vízhozam, és a nagyobb szintkülönbség több malom egyidejű működtetését teszi lehetővé. A fürdőket, pontosabban a fürdömestereket a XIV. századi malomperekben említik először. Királyi és ispotályi fürdők egyaránt létesültek a Duna partján. Ezek a fürdők a mai Császár- és Lukács-fürdő területén lehettek. Egy adományozási okirat is származik ez időből: a szigeti apácák 1355-ben kapták meg a Buda városa fürdőjét a királytól. A török időkben a fürdők virágkorukat élték. A gyógyító tevékenység is folytatódott, a dervisek által fenntartott fürdők mintegy „kórházként” működtek. A kor leghíresebb és legnagyobb fürdője Veli bég fürdője volt. Az épület a XVII. sz-ban tűzvész áldozata lett. A török befolyás elmúltával a fürdőkultúra hanyatlani kezdett, az épületek elromosodtak, fenntartásuk, helyrehozataluk nem tűnt gazdaságosnak. Az újbóli felvirágzás a XIX. századig váratott magára. Ekkor létesül a Császár-fürdő, mely az államosításig az Irgalmas Rend tulajdona volt. A kezelő szerepét ekkor a Fővárosi Fürdőigazgatóság vette át. (KALINOVITS S. 1978)

## **2.2. A Molnár János-barlang**

A budai barlangok közül recens vízkitöltést csak a Molnár János-barlangban találunk, e nagy tömegű víztest miatt választottam ezt a barlangot a mikroökológiai vizsgálatok helyszínéül.

### **2.2.1. Feltáró kutatások**

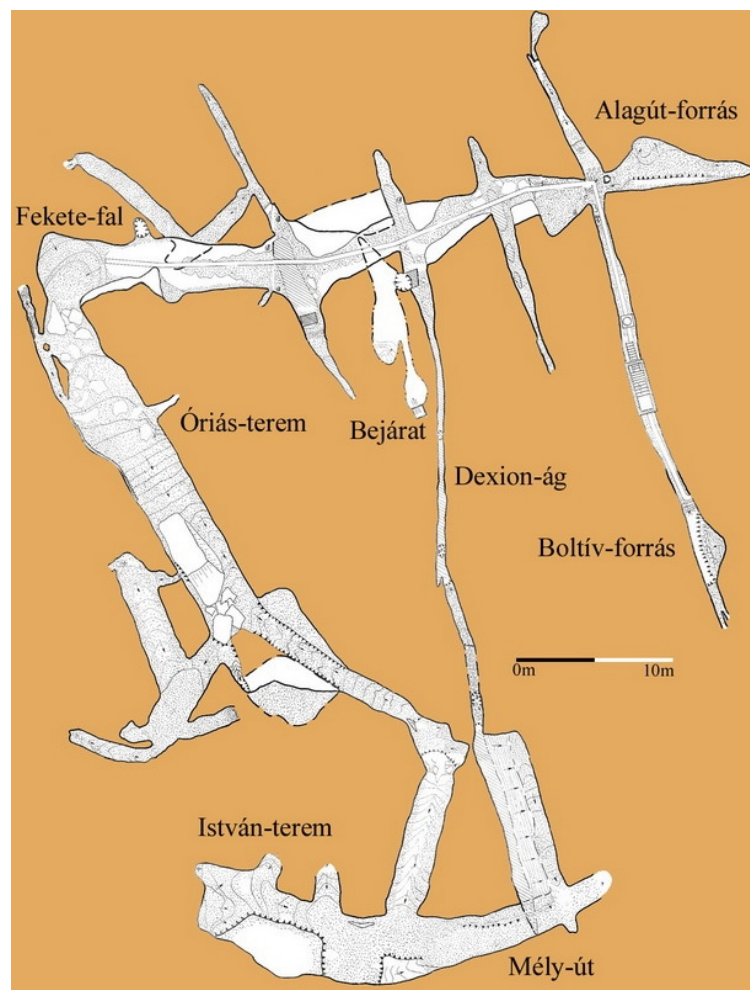
Az Orvosi Hetilap 1858. évi 33. számában megemlíti egy, a Malom-tóhoz kapcsolódó barlang létezését. E cikk nyomán a Molnár János orvos és vegyész az egyik hasadék felszakadt mennyezetén, a forrás mögötti sziklafalon elhelyezkedő résen át bejutott a forrásbarlanga, és az 1860-as években felmérte az elérhető száraz részeket (KORDOS L. 1984). A barlangnak ezen kívül van mégegy ember által járható, és egy elméletileg kimutatott bejárata is. A barlang első publikált felmérését Papp Ferenc és Tarics Sándor készítette, és 1942-ben jelent meg. A víz alatti részek feltárását első ízben Kessler Hubert, Rádai Ödön és Chambre Attila kísérelte meg 1953-ban, expedíciójuk azonban nem járt sikerrel. Az első bejutás 1960-ban az MHSZ BEKSZ bűvárai a Malom-tóból indulva elérték a száraz részeket. 1972-től kezdve a Fürdőigazgatóság kívánalmára (melyet Kessler Hubert kezdeményezett) az FTSK DELFIN szakosztálya a vízminőség javítása érdekében folytathatta a feltárásokat. (KALINOVITS S. 2003) Kutatási Jelentéseikben nyomon követhető a feltárások további menete. A Lukács- és a Császár-fürdő vizét a forrasszájból csövezetéken át emelték ki, ami könnyen szennyeződhetett, s míg a forrásnál kibukkanó víz 22 °C-os, a bűvárok a bentebbi részeken 26 °C-os vízhőmérséklettel is találkoztak. A különböző (nem tértek ki, pontosan honnan vett) minták E. coli száma bizonyítja továbbá, hogy a barlang járataiban a nem túl messziről származó, hideg, szennyezett karsztvíz és a föld alatt hosszabb utat megtett, tehát E. coli mentes hévíz keveredése történik. Az Országos Fürdőigazgatóság ezért 1972-ben elhatározta egy 180 m hosszú táró hajtását a hegység belsejébe vízfoglalás céljából. Céljuk a beljebb található, még nem keveredett hévizet közvetlenül elérni, és egyúttal a hegyoldalba épült SZOT-gyógy szálló vendégeit a táró végéből építendő lifttel közvetlenül lejuttatni a fürdőbe. A kivitelező a Bányászati Aknamélyítő Vállalat volt. Az építkezést a 80-as években is folytatták, de a liftakna végül nem készült el. A táró a Frankel Leó 17. szám alatti Törökfürdő épülete mögött közvetlenül nyílik, és Nyi irányba tart, és vakon végződik. Kőzetanyaga Bryozoás Márga. Több hasadékot is keresztez, melyek kitöltése borsókő, és termális gipsz volt. A 70-es években a duna-parti részen is mélyítettek fúrásokat, ahonnan 40°C-os vizet nyertek. (KRAUS S. 1978) 2002 ismét átütő év volt a feltárások tekintetében. Legnagyobb, részben levegővel kitöltött (a magas szén-dioxid tartalma miatt Szén-dioxidos-teremnek nevezett) termére hosszas hosszas és kitartó munkával 2008-ban sikerült a táróból



rábontani, így ez az egyedülálló szépségű terem bűváfelszerelés nélkül is megközelíthető. A barlang 1982 óta fokozottan védett.

### 2.2.2. Hidrológiai viszonyok

A Ferecvárosi Természetjáró és Sport Klub DELFIN Könnyűbúvár Szakosztálya által az 1970-es és 80-as években benyújtott Kutatási Jelentésekből kirajzolódnak a barlang sajátos áramlási viszonyai. A barlang ez idő tájt még igen kis részben volt ismert, de a geotermikus mérések alapján sejthető közetrések főleg Ény-Dk-i, alárendeltebben Ék-Dnyi irányúak (1. ábra).



1. ábra A Molnár János-barlang alaprajza (Forrás: Országos Barlangnyilvántartás)

A később feltárt járatokról térkép zömmel még nem készült, csak poligonos ábrázolás.

A források részben az eocén Bryozoás Márgából, részben az erre települt fiatal dunai teraszkvicsből fakadnak. E források főként a hideg karsztvízből táplálkoznak. A 25-26 °C-os meleg víz a barlangi járatokban csak a felső 2-3 m-es vízrétegben áramlik. A főbb vízjáratokban mangán-oxidtól feketék a falak, ami valószínűleg a régi vízáramlás fő irányait muttja. E bevonat a barlang maximális vízszintje alatt található, kiválását a mangánbaktériumok okozzák jellemzően a kihűlőben lévő barlangi vizekben. (PLÓZER I. 1973)

A malom tó vizét a barlangrendszer felől jövő két forrás táplálja: a Boltív-forrás (2. ábra) mely a tó hegy felőli oldalán található boltív alatt fakad, illetve az Alagút-forrás, mely egyben a barlang vízalatti bejárata. Utóbbi némiképp melegebb. A hideg és melegebb vizek áramlása a



Malom-tavi Molnár János-barlang bejárata a malom-ág felett.

/Fotó: Söphen L./

járatokban is jól elkülöníthető egymástól. A barlang mélyebb részein áramló víz (kb -16 m-től) hőmérséklete 20 °C. Ez a hidegfolyam az Óriás-terem alsó részébe K-DK-i irányból érkezik, majd az Örvény-folyosón, István-termen és a mélyúton keresztül a Boltív-forrás felé mozog. A felső járatokon (-6 m-ig) 22-24 °C-os víz áramlik Fekete-faltól az alagút forrás irányába. Az alsó járatok vízhőmérséklete állandó, a felsőké periodikus ingadozást mutat. Ez az ingadozás kimutathatóan korrelál a Török-forrás vízkivételi intenzitásával. (KALINOVITS S. 1978)

A források, és a barlang vízének feltárás óta tapasztalható hűlése is a fokozott vízkivétellel magyarázható (1. táblázat).

	Molnár János (1865)	Papp Ferenc (1935-36)	DELFIN (1978)
Boltív-forrás	26,2 °C	23,5-25,4 °C	20,5 °C
Alagút-forrás	32,7 °C	31,0 °C	21,9-22,4 °C

1. táblázat A források hőmérsékletének időbeni változása (*Forrás: Kalinovits Sándor*)

### **2.2.3. Természettudományos kutatások**

#### ***Keveredési korróziós vizsgálatok***

A 70-es években a keveredési korrózió recens folyamatának vizsgálatára a barlang különböző fizikai és kémiai paraméterértékekkel jellemezhető pontjaira mészkő darabokat helyeztek ki, és súlyméréssel követték nyomon az oldódás ütemét (PLÓZER I. 1973).

#### ***Mikrobiológiai mintavételezés***

A Molnár János-barlang termálvizét évszázadok óta a ráépülő fürdők hasznosítják, a kivett víz minőségét ezért közegészségügyi ellenőrzés keretében időről időre megvizsgálják. Az FTSK DELFIN Könnyűbúvár Szakosztály 1980-81-ben végezte az akkori felhasználó Fővárosi Fürdőigazgatóság részére bakteriológia illetve vízkémiai célzatú mintavételezés történt. Az 1970-es években felállított 8 mintavételezési ponton vízhőmérséklet méréseket is végeznek. A 82-es Kutatási Jelentésükben annyit említenek, hogy az eredmények újat nem hoztak.

### ***Planktonikus felmérés***

A Domina Eszter által 2005-2006-ban végzett kutatómunka eredményét az SZKBE által készített, a 2006. évi Cholnoky Jenő Karszt-és Barlangkutatói Pályázat keretében benyújtott jelentés tartalmazza. A vizsgálat során planktonhálóval és csapdával feltérképezték a makroszkópikus parányok birodalmát. Az azonosított fajok Diaptomus, Bosmina, Daphnia, Gamasida, Chydorus, Eucypris és Oribatida csoportok képviselői voltak.

### ***Víz kémia***

Bermann Csaba 2010-ben (A rózsadombi Molnár János-barlang forrás és beszivárgó vizeinek vizsgálata címmel) benyújtott diplomamunkája keretében vízben oldott ionok, és stabilizotópok koncentrációjának meghatározását végezte. A 17 hónapig tartó mintavételezési sorozat keretében a 7 mintavételi ponton havi rendszerességgel vett minták kémiai összetételét vizsgálta titrimetriás és UV-VIS abszorpciós spektrofotometria ill. lángfotometria segítségével. Emellett stabil-oxigén- és hidrogénizotóp méréseket is végzett. Eredményei alapján a csepegő vizek (3 mintavételi pont) profilja eltérő, mely szerinte a lejtőviszonyok, a kőzet, és a felszínborítottság változatosságával magyarázható. A Cseppkő-fal csapadék eredete igazolt a stabilizotóp vizsgálatok eredményeivel, míg a másik két csepegéshez kisebb arányban keveredik a csapadékvíz: az izotóp értékek a közműhálózatiakkal egyeznek, ezért valószínűleg ivó- vagy szennyvíz eredetűek. A magas (14-94 mg/l) nitrátkoncentráció miatt inkább az utóbbit valószínűsíti. A más budai csepegő vizekhez képest magas szulfáttartalom is utalhat szennyvíz besziváráásra, de a kémiai karaktert meghatározó szulfát-tartalom a termálvizek gyakori jellemzője, inkább származik a budai márga piritjéből.

### ***Radon***

Az ELTE TTK Atomfizikai Tanszék bevonásával az Alkalmazott és Környezetföldtani Tanszék már korábban is végzett méréseket a források vizében (PALOTAI M. 2004), s a barlangban jelenleg is folyik radonvizsgálat.

## **2.3. A Szemlő-hegyi-barlang**

A terápiás hasznosítás mellett a fellelhető vízkémiai elemzések bőséges szakirodalma miatt választottam a Szemlő-hegyi barlangot a csepegő vizek antropogén szennyezésének kimutatásához.

### **2.3.1. Természettudományos kutatások**

#### ***Mikrobiológia***

Mikrobiológiai vizsgálatról a legkorábbi fellelhető jelentés az ANTEUS Mikrobiológiai Barlangkutató Csoport 1993-as jelentése, melyben vázolják a mintavételezés körülményeit, de az eredményeket még nem közlik. A csoport az ÁNTSZ Fővárosi Intézete Vízmikrobiológiai laboratóriumával közösen 1 éves vizsgálati sorozatot indított, melynek keretében 4 mintavételi ponton (Purgatórium, Omladék-terem, Létra, Óriás-folyosó) helyeztek el különféle általános, dúsító, és differenciáló táptalajokat (véres, csokoládé, bizmutszulfid, brillantzöld, dezoxikolát-citrát, eosin-metilénkék, endo, Slanec, CYE, és gombákra Saboraud ill. bengálrózsa). Az agarokat levegőütköztetési, illetve szedimentációs mintavételezéssel exponálták 10 perces, illetve 2 órás időintervallumban. Egyidejűleg a terápián részt vevő betegek klinikai bakteriológiai vizsgálatát is elvégezték. Ezen túlmenően két ponton zselatin membránnal levegőszűrési mintavételezés is történt.

#### ***Vízkémia***

A legátfogóbb munka Fehér Katalin 2009-ben készített diplomamunkája, mely komplex megközelítésben számol be a Budai Karsztra ható fokozódó antropogén hatásokról. Dolgozatában hosszú időn át végzett vízkémiai vizsgálatait mutatja be. Az értékelés során az egyes ionok koncentrációi alapján elkülönít és jellemez 4 csoportot. Ezek szerinte eltérő antropogén hatás alatt állnak. Leírja továbbá a felszínborítottság időbeni változásait, és elemzi a beépítettség nagy arányú növekedésének hatásait.

Virág Magdolna (ELTE Általános és Alkalmazott Földtani Tanszék) 2005-től 2,5 éven

keresztül 9 mintavételi helyen heti rendszerességgel gyűjtött csepegővíz adatokat. Vizsgálta a csapadékeseményekkel való összefüggést is. 2010 márciusában 4 helyről bakteriológiai vizsgálat hoz is vettek mintát. Az ionkoncentrációk alapján meghatároztak egy olyan típust (4), ahol a nitrát folyamatosan magas koncentrációja figyelhető meg, mely nagyon tág tartományban ingadozik, mely szerintük csatornából, szikkasztóból történő szivárgásra utal. A közművi eredetet a havonta végzett stabil oxigén-izotóp értékek alátámasztják. A földtani felépítést is figyelembe véve azt tapasztalták, h az antropogén hatások érvényesülését nagy mértékben meghatározza a törmeléktakaró hidraulikai viselkedése. A beépítettség természetesen nem elhanyagolható tényező (3. ábra).



3. ábra A rózsadombi barlangok elhelyezkedése a város alatt (Forrás: Gulyás Ágnes BEAC)

A barlangok fölött kirajzolódnak a már részleges beépítettség után meghatározott védőzónák. A képen csak a leglátogatottabb barlangok szerepelnek.

### **3. Anyagok és módszerek**

Munkám során szerettem volna képet kapni a karsztvíz, mint élőhely mikrobiológiai diverzitásáról. Ehhez olyan módszereket kerestem, amelyek elviselhető költségekkel nyújtanak lehetőleg kis torzítású képet. A hagyományos tenyésztéses módszer mellett ezért nyúltam a molekuláris biológia kínálta lehetőségeihez (SPIEGELMAN, D. et al. 2005), és ezért döntöttem úgy, hogy a faji meghatározás helyett a közösségi mintázatra koncentrálok.

A vizsgálatokhoz 5 különböző helyen végeztem egyszeri mintavételezést. Ebből 4 a Molnár János-barlang víztestéből (2 esetben víz alatti barlangszakaszból!), 1 pedig a Szemplő-hegyi-barlang csepegő vizéből történt. Minden mintát egységes módszerrel dolgoztam fel, mely folyamat alapvetően 4 jól elkülöníthető részre tagolódik:

- a vízmintákból Nutriens és R2A táptalajokra szélesztettem többféle koncentrációban az összcsíraszám, és a diverzitás meghatározása céljából,
- a vízmintákból különféle differenciáló táptalajokra és Vér-agarra szélesztettem fekál-indikátorok, és patogének kimutatása céljából,
- a kitenyészett kolóniákból 119 tagú Törzsgyűjteményt hoztam létre, melyet morfológiai és molekuláris biológiai módszerekkel csoportosítottam.
- a vízmintákból DNS-t vonattam ki a közösség összetételének vizsgálatához.

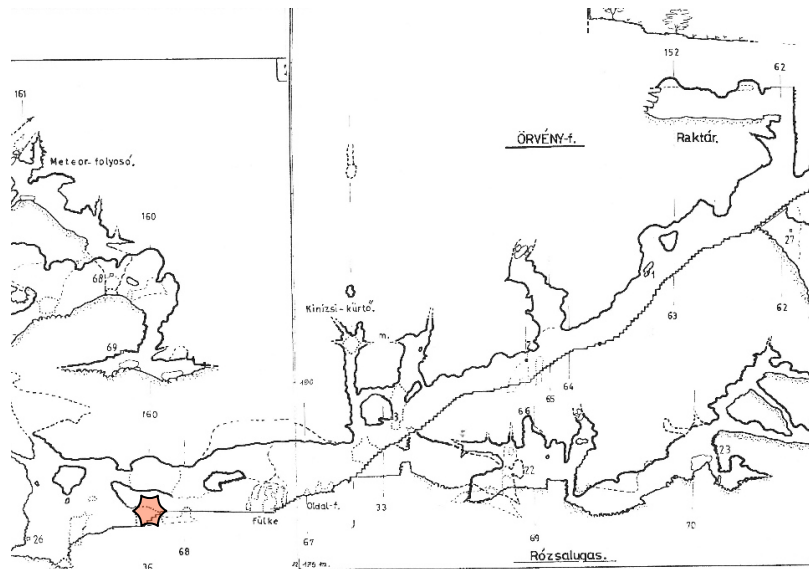
A feldolgozás során módomból volt a paraméterek változtatásával többé-kevésbé a karsztvízre optimalizálni az akkreditált vízminősítési bakteriológiai eljárásokat.

#### **3.1. Mintavételezés**

A karsztvíz, mint élőhely nem egységes paraméterértékekkel jellemezhető, ezért több, eltérő hőmérsékletű és áramlásviszonyú helyet választottam mintavételre. A várhatóan alacsony csíraszám, és nagyobb diverzitás érdekében viszonylag nagy mintatérfogatból indultam ki, és a szélesztésre szánt koncentrációkat is a felszíni vízmintáknál használatosnál töményebbre vettem.

A Kessler Hubert-teremből, és az Alagút-forrás melletti Búvár-bejáróból steril kesztyűvel

kívül-belül steril 2 literes üveg víz alá merítésével vettem mintát. Az üvegből készült eszközök hamar alkalmatlannak bizonyultak, ezért a későbbiekben fél literes műanyag palackokkal próbálkoztam. Csepegő vizet a Szemlő-hegyi-barlang Óriás-folyosójának alsó bejárati lépcsőjén vettem (4. ábra), és a szükségesnél több edényt használtam egyidejűleg, ezzel a mintavételi idő, s így a kontaminációnak való kitettség lerövidíthető. A steril mintavétel a víz alatt igen nehézkes feladat (5. ábra). Az üres edényeket sterilen levinni vagy levegővel (ilyenkor a mintavevő palack felszáll, és egy sziklarepedésben ragad), vagy steril desztillált vízzel (ilyenkor azonban lehetetlen a teljes átöblítés, a minta így felhígul, esetleg a desztillálókészülékben tenyésző baktériumok sterilizálás után szétesett genomjainak törmelékével szennyeződik) töltve lehet. Többszöri kísérlet után felhagytam a bűvárok üvegekkel való kínzásával, és javaslatukra 10 db steril 100 ml-s fecskendőt vásároltam a város egyetlen gyógyszertárában, ahol ez kapható (volt). Az így felszívott víz a lebegő agyagra nézve is tisztább volt, a szűrési idő lerövidült. Ez azért fontos, mert a szűrés folyamán a minta kontaminációnak van kitéve. Az ideális mintatérfogat 1,5 liter volna, de ez a csepegő vizekből lassan gyűlik össze, és a bűvárok számára már nehezen kezelhető mennyiség. Tapasztalataim alapján 1 liter mintából már megbízható eredményekre lehet jutni.



4. ábra A Szemlő-hegyi-barlang hosszmetzeti képén (részlet) jól látszik a csillaggal jelölt mintavételi pont felszínhez való viszonya. (Forrás: Országos barlangnyilvántartás)





5. ábra A mintavételi pontok ábrázolása a Molnár János-barlang aktuális feltárásokkal kiegészített poligonrajzán. A térképre viszonyításképp ráhelyeztem az 1. ábrán bemutatott alaprajzot. A sötét karikák víz alatti pontokat jelölnek. (Forrás: Storozyński Szabolcs)

I. – Búvár-bejáró (Alagút-forrás mellett)

II. – Kessler Hubert-terem (a táróból megközelíthető, más néven CO<sub>2</sub>-os-terem)

III. – hideg beáramlás

IV. – meleg beszivárgás.

### 3.2. Tenyésztéses vizsgálatok

A vízminősítési eljárások első és alapvető lépése a heterotróf összcsíraszám meghatározása. Az összcsíraszám a minta egységnyi térfogatára eső élő és az adott körülmények között szaporodni képes összes baktériumok száma. A méréshez sterilen elkészített nem szelektív táptalajt szennyezzük a homogén (víz esetében jól elkevert) minta ismert térfogatával, majd a táptalajt a steril körülményeket fenntartva állandó hőmérsékleten tartjuk a rákerült csírákból származó telepek kifejlődéséig. Ezt követően a telepeket megszámloljuk, és a kapott értéket adott térfogatra vonatkoztatjuk.

Baktériumok a Föld minden élőhelyén – beleértve a legszélsőségebbeket is – előfordulnak. Vannak olyan fajok, melyek kifejezetten az extrém körülményekhez alkalmazkodtak, azaz specialisták (például termofil, vagy halofil fajok), míg mások mindenhol előfordulnak, un. generalisták. Várható, hogy utóbbiak jelen vannak a barlangi vizekben is, s mivel könnyen kitenyésznek, túlsúlyban lesznek a mintákban. Szintén torzításhoz vezet, hogy a baktériumok alapvetően r strategisták, azaz ha optimális életfeltételeket találnak, korlátlan mértékű szaporodásba kezdenek, mely során a populáció egyedszám változása exponenciális függvénnyel írható le. Bizonyos idő elteltével azonban eléri azt a maximális populációméretet, amelyet az adott környezet még el tud tartani, vagy – ami laboratóriumi körülmények között jellemzőbb – saját anyagcsere-termékeik gátolják a populáció további növekedését. Ezt követően a populáció összeomlik, egyedszáma drasztikusan lecsökken. A populációméret ilyen szélsőséges ingadozása rövid idő alatt játszódik le, ezért az amúgy gyenge tápanyagellátottságú élőhelyek – a barlangok tipikusan ilyenek (BARTON, H. A. – JURADO, V. 2007) – fajai a tápanyagdús agarokon nem tenyésznek ki, azaz nem hoznak létre látható, stabil telepeket. Mindebből adódik, hogy a tenyésztési vizsgálatok eredménye egy igen torz reprezentáció a valós közösségi összetételről.

### **3.2.1. Az összcsíraszám meghatározása**

Az összcsíraszám meghatározására a vízminősítési eljárások során használt módszerben alkalmaztam, és 2 féle körülmények között tenyésztettem ki a baktériumokat:

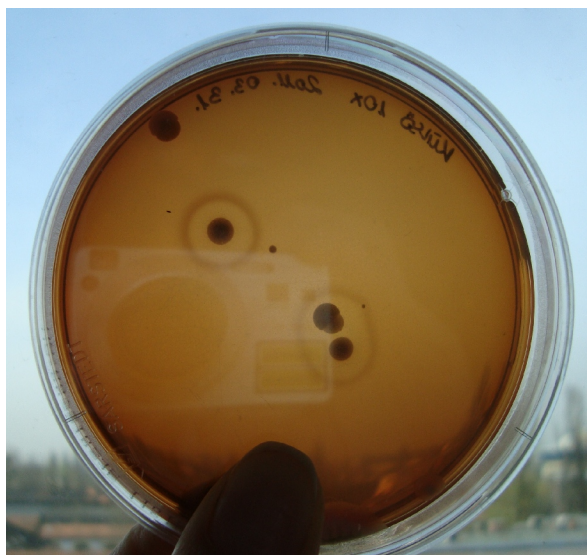
1. általános hús-pepton agaron (nutrient) inkubáltam 37°C-on 2-5 napig. Olyan fajok nőnek fel, amelyek táplálkozás szempontjából nem igényesek. A telepek gyorsan kifejlődnek.
2. kis tápanyag tartalmú, un. R2A táptalajon 22°C-on inkubáltam 8 napig, mivel a telepek igen lassan nőnek. A táplemezeket a hosszú inkubáció miatt a kiszáradástól védeni kell.

A táplemezek a felnövesztés után 4°C-on még egy hónapig eltarthatóak.

Az első két mintánál  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  hígítási sort készítve 100-100  $\mu$ l-t szélesztettem 3 párhuzamosban, de ez a koncentráció nagyon alacsonynak bizonyult, ezért a későbbiekben a következő 3 -féle koncentrációt használtam: 10 ml-t átszűrve 2 párhuzamosban, 100  $\mu$ l tömény minta 3 párhuzamosban, és 100  $\mu$ l 100x híg mintát 3-párhuzamosban.

### 3.2.2. Fekál-indikátorok, és egyéb patogének

A kórokozók összcsíraszámát is meghatározható a fent bemutatott módon véres-agarra szélesztett minta 48 órán 37°C-on inkubálásával. Ezen a táptalajon a patogén mikróba előszeretettel képeznek telepeket, melyek erősen haemolizálják a táptalajba kevert marhavért, az amúgy élénkörös agar a telepek környékén egyre terjedő sugárban feltisztul. A generalisták ezen a táptalajon is kitenyésznek, esetenként gyengén haemolizálják is azt (6. ábra).



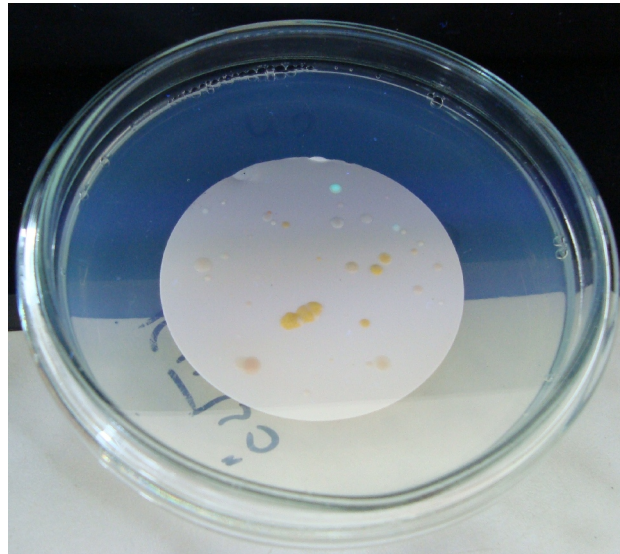
6. ábra Gyengén haemolizáló, nem patogének csíráiból kinőtt telepek 48 órás véres-agaron

A szennyeződés kimutatására sokszor elegendő egy meghatározott baktériumfaj jelenlétét igazolni. Ilyen elven működik a szennyvíz kimutatása is. A vastagbélben tenyésztő *Escherichia coli* és *Enterococcus faecalis* jelenléte erősen feltételezi a minta szennyvíz általi érintettségét. Az *Enterococcus* fajok igen ellenállóak, ezért egy korábbi szennyezés kimutatására is alkalmasak. Közegészségügyi szempontból fontos az egyéb kórokozók kiszűrése is, s mivel a tenyésztéseket akkreditált vízminősítő laborban végeztem, lehetőségem volt *Legionella* fajok, és a fakultatív patogén, amúgy talajban is előforduló *Pseudomonas aeruginosa* kimutatására is.

Az ilyen célzott tenyésztéseket szelektív, vagy differenciáló agaron végzik, melynek

speciális kémiai komponense biztosítja, hogy a kimutatni kívánt fajok vagy egyedként nőjenek fel rajta, vagy jól megkülönböztethetőek legyenek. Ehhez a baktériumok saját biokémiai tulajdonságait használják fel, és általában színváltozás, vagy csapadékképződés jelzi a pozitív telepeket.

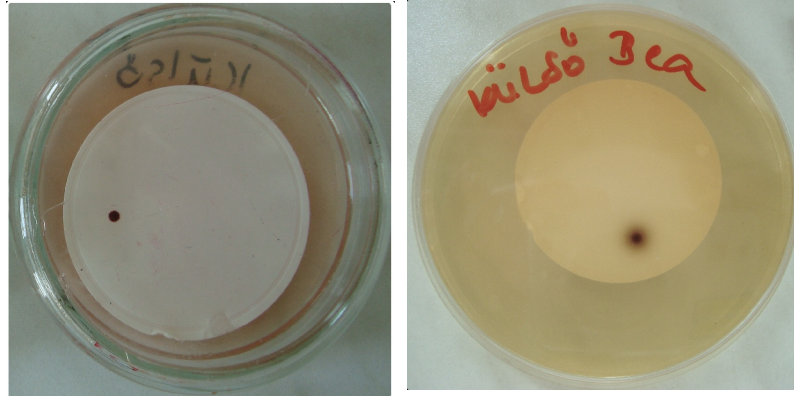
A *Pseudomonas* kimutatására használt un. CN agar magnéziumot és kálium sókat tartalmaz a pigment termelés (pyocianin, fluorescein) fokozására. A kinőtt telepek UV fényrel megvilágítva fluoreszkálnak (7. ábra). Jellegzetes hársfaillatuk is árulkodó bélyeg. A patogén *P. aeruginosa* fajszerű azonosítására megerősítő tenyésztés szükséges. Erre például az acetamid-levess alkalmas (ISO 16266).



7. ábra Az UV lámpa alá helyezett táplemezen a *Pseudomonas* fajok csíráiból kinőtt telep világít, Búvár-bejáratból vett vízből 10 ml minta átszűrve CN táptalajon

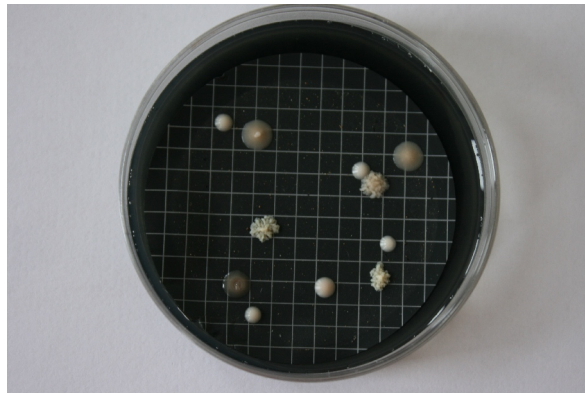
A Slanetz táptalaj az enterococcusok elkülönítésére szolgál (ISO 7899-2). Nátrium-azid tartalma gátolja az eltérő sejtfalstruktúrával rendelkező (un. Gram-negatív) szervezetek szaporodását. Az enterococcusok redukálják az agar tetrazolium-klorid tartalmát formazánná, ezért a kinőtt telepek vörös színűek lesznek. A reakció azonban nem kizárólagos enterococcusokra, ezért megerősítő vizsgálatot kell végezni, vagyis a telepeket át kell oltani

(jelen esetben a filtert áthelyezni) epe-eszkulin (un. BEA) agarra. 44°C-on történő 1 óras inkubálás után a pozitív telepek körül fekete csapadék jelenik meg a táptalajban (8. ábra).



8. ábra Az enterococcus meggypiros telepe (balra), és a megerősítő vizsgálat (jobbra)

A Legionella fajokat savkezelés (5 perc, HCL pH=2,2) után pufferolt aktív szén - élesztőkivonat agaron (BCYE) tenyésztik (11731-2). Az ilyen kezelés után kinőtt háttértelepek (vagyis azok, melyek nem legionellák) savtűrő baktériumok csíráiból származnak (9. ábra).



9. ábra BCYE táptalajon savkezelés után kinőtt háttérflóra (víz alatti meleg beáramlásból)

A coliform baktériumok a zöld színű TA agaron sárga, nyúlós telepeket képeznek, a táptalajt is sárgára színezik. Coliform baktériumok a talajban is nagy számban előfordulnak, ezért a fekáli-indikátor *Escherichia coli* azonosításához további biokémiai vizsgálatokat kell végezni (ISO 9308-1).

### **3.2.2. Törzsgyűjtemény létrehozása**

Az összcsíraszám meghatározásához használt táptalajokról (táplemezekről) az elkülönülten növény telepeket egyenként átoltottam steril táptalajra, így a heterogén fajösszetételű táplemezek helyett tiszta tenyészeteket tartalmazó új táplemezeket kaptam. Ezeket rendszeres átoltással jellemzésükig tenyészetben tartom fenn. Az azonosítás biokémiai és mikroszkópos vizsgálatok alapján történik. A törzseknek jelenleg még csak a telepmorfológiáját vizsgáltam.

### **3.3. Molekuláris módszerek**

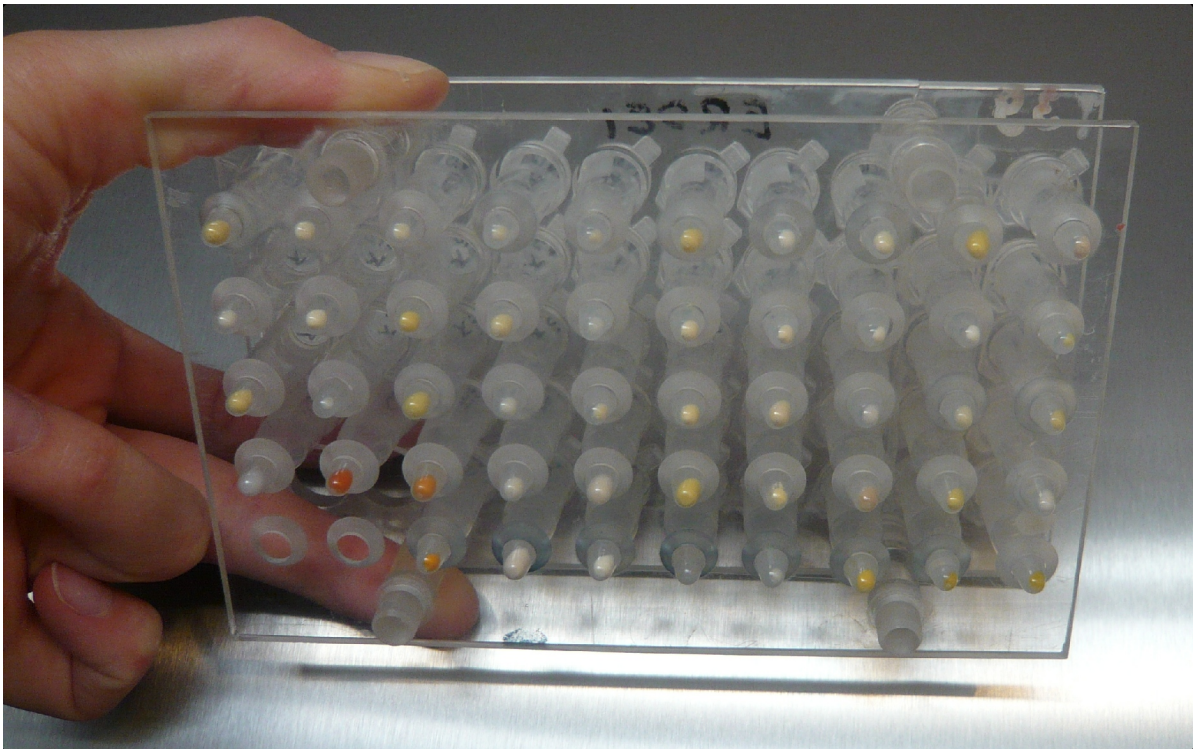
Míg a tenyésztésbe bevonható baktériumok közössége nem reprezentálja kellően a minta eredeti összetételét, a molekuláris módszerekkel ez a hiba csökkenthető, de sajnos nem küszöbölhető ki teljesen, mivel a felhasznált reakciók hatékonysága az egyes törzsek esetében eltérő lehet. Ez azonban elsősorban mennyiségi eltolódáshoz vezet, mely a kimutathatóság határán fals negatív eredményt hozhat.

#### **3.3.1. DNS extrakció**

Kiindulásként 500-1000 ml vízmintából vákuumos szűréssel elkülönítettem a baktériumokat, melyek fennakadtak a víz útjába helyezett 0,2  $\mu\text{m}$  pórusátmérőjű membránon. A membránt lefagyasztottam, és az MH laboratóriumba szállítottam. Ott SOIL Kit-tel történt a baktériumok feltárása és a genomiális DNS kivonása (a nukleinsav extrakciót Pereszlényi Csaba végezte). Az így kapott oldatok heterogén összetételűek, azaz az adott mintában élő minden baktérium genetikai állományát tartalmazzák. Az oldatok koncentrációját Nano-Drop készülék segítségével határoztam meg.

Az egyes izolált törzsekből is készítettem genomiális DNS kivonatot. Ehhez a minták nagy száma miatt egy sokkal olcsóbb módszert választottam (RAY CHAUDHURI, S. et al. 2006). A sejteket enzimatikus úton feltártam (lyzozim), a fehérjéket (Proteináz-K) és az RNS-t (RN-áz) szintén enzimatikus úton lebontottam, majd a törmelékét, és a megmaradt fehérjéket fenol-kloroformos kirázással távolítottam el. Végül a megtisztított, de nagy térfogatú oldatból só hozzáadása után (ammónium-acetát) alkoholos kicsapással eltávolítottam a DNS-t, és

centrifugálást követően az oldat eltávolítása után a már tiszta, és kiszáritott genomális DNS-t a további enzimatikus reakciók számára semleges kis térfogatú oldatban vettem fel (Tris-EDTA puffer). Sajnos, a hatékonyság körülbelül 60 %-os volt, ezért a baktériumtörzsek egy részéből nem sikerült detektálható mennyiségű DNS-t izolálnom. Ezen sejtek valószínűleg nem táródtak fel az eljárás elején. A baktériumok sokfélesége (10. ábra) miatt számítottam a veszteségre, ezért is dolgoztam nagy mintaszámmal.

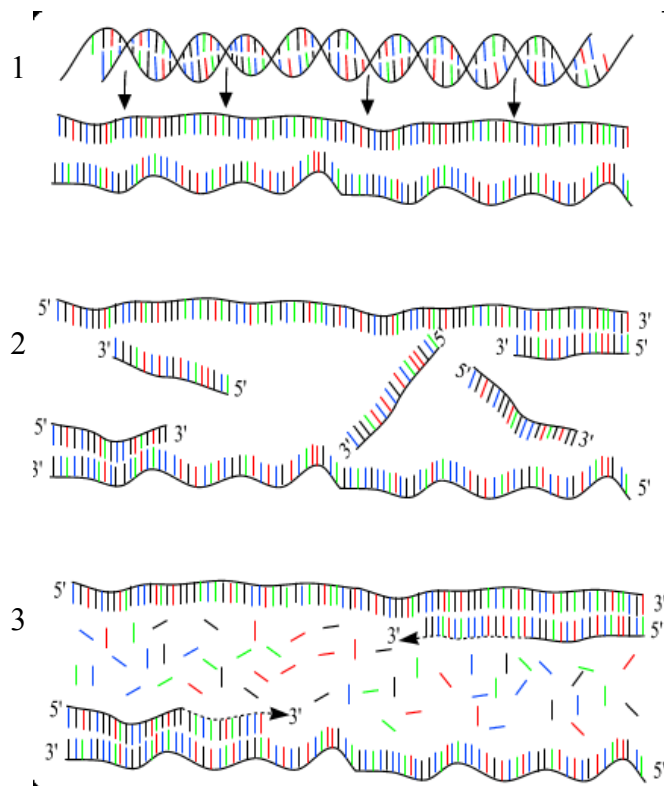


10. ábra Izolált baktériumtörzsek még a feltárás előtt.

### 3.3.2. PCR technika

Minden faj genetikai állománya egyedi, a többitől eltérő szekvenciát mutat. A fajokon belül egyes ún. konzervatív DNS szakaszok teljesen megegyeznek. A bakteriális taxonómiában általánosan a riboszómális 16S rRNS kódoló génjét alkalmazzák faji azonosításra, mivel ez valamennyi baktériumban előfordul, és változatossága optimális a filogenetikai kapcsolatok

jellemzéséhez (WEISBURG, W. G. et al 1991). A 16S rDNS egy szakaszát polimeráz lánc reakcióban (PCR) felszaporítottam (11. ábra). A reakció során az oldatot addig melegítjük, míg a DNS két szála elválik egymástól (1). Ezt követően az oldatot hűteni kezdjük, minek hatására a kívánt szakasz kezdetéhez az előzőleg az oldathoz adott meghatározott (a célszekvenciát kiegészítő) rövid DNS darabok (primerek) tapadnak (2). A primerek határozzák meg a felszaporítandó DNS szakaszt. Ezen kezdőszakaszok szükségesek egy (szintén az oldathoz adott) hőstabil enzim (polimeráz) számára, amely a kezdőszakaszt (primer) az eredeti szekvencia (templát) kiegészítő párjaként meghosszabítja (3). Általában két, egymással ellentétes szalon elhelyezkedő, primert adunk az oldathoz, a termék hossza ezzel meghatározható. Ez a folyamat a célkészülékben a hőmérséklet ciklikus váltogatásával többször egymás után (általában 30-szor) lezajlik. Minden körben megduplázódik a termék mennyisége, így a reakció végén a reakcióelegy túlnyomórészt a kívánt DNS szakaszt tartalmazza.



11. ábra A PCR működésének sematikus ábrája (Forrás: Andy Vierstraete 1999)



### 3.3.3. DGGE (Denaturáló Gradiens Gél Elektroforézis)

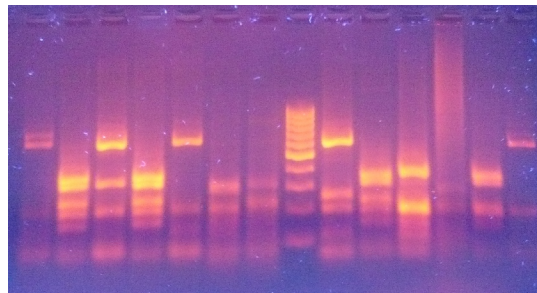
A mikrobiális közösség jellemzése molekuláris biológiai módszerrel leggyakrabban ún. közösségi ujjlenyomat módszerekkel történik. Ezek során közösségi összetétel diverzitásának meghatározásához nem azonosítjuk a mintán belül az egyes fajokat, hanem olyan módszert alkalmazunk, amely egy komplex, de a mintára egyedileg jellemző mintázatot ad. Egy ilyen módszer a denaturáló gradiens gélelektroforézis (DGGE). A DGGE módszer a kétszálú DNS egy fontos fizikai tulajdonságán, az olvadási hőmérsékleten ( $T_m$ ) alapul, mely a DNS bázisösszetételétől függ. A GC bázispárok ugyanis 3 hidrogénhid kötéssel kapcsolódnak, míg az AT bázispárok csak kettővel. Az előzetesen PCR-rel felszaporított azonos hosszúságú DNS szakaszok szétválasztásához annál nagyobb energia kell, minél több GC bázispárt tartalmaz. A szétválasztást nemcsak a hőmérséklet emelésével, hanem redukálószer (urea és formamid) hozzáadásával is elérhetjük. A DNS enyhén negatív töltöttségű, ezért elektroforézis során a + pólus felé fog elmozdulni. Ha ezt a mozgást nem oldatban, hanem gél állapotú közegben (agaróz, vagy poliakrilamid) teszi, a különböző sebességgel vándorló szálak a futásirányra merőleges csíkokba rendeződnek. A futás sebessége általában a DNS darab méretétől függ, de ha a gélben redukáló gradienst hozunk létre a + pólus felé növekvő koncentrációval, a bázisösszetételük alapján rendeződnek csíkokba. A gélét etidium-bromiddal (vagy egyéb DNS festékkel) megfestve a csíkok UV fényel megvilágítva láthatóvá válnak, mivel a festékszemesék bekötnek a kettős szál közé (interkalálódó festék). Ha egyazon minta többféle szekvenciát tartalmaz, a művelet végén létraszerű mintázatot kapunk. Ez történik közösségi minták esetében, ahol elméletileg valamennyi nagyobb számban jelenlevő szervezetet a mintázat egy-egy csíkja képvisel. Több minta egymás melletti futtatásával a közösségi mintázatok összevethetők (PORTILLO, M. C. - GONZALEZ, J. M. 2009).

Említettem, hogy a közösség összetétele és egyedszáma igen gyorsan reagál az élőhely kémiai és fizikai paramétereinek változására, ezért olyan alkalmas indikátorszervezetek a mikrobák, de ebből adódóan a környezetből vett minták mindig csak az adott időpillanatra érvényes értékeket tükrözik. A természetes mikrobiális élőközösség az élőhely rendszeres monitorozásával azonban ennek ellenére meghatározható (PRONK, M. et al. 2009).

### 3.3.4. Restriktációs vizsgálatok (ARDRA)

Szerettem volna meghatározni a kitenyészhető törzsek heterogenitását is, ezért az izolált törzseimen is elvégeztem a PCR reakciót. A nagy mintaszám miatt, és azért, hogy a későbbi azonosításokat elősegítsem, egy másik módszert alkalmaztam a szekvenciák összehasonlítására. A kapott termékek az egyes mintákon belül homogének, szekvenciájuk egyféle. Szekvenálásra igen alkalmasak, azonban az eljárás költségessége miatt nem végezhettem el ekkora mintaszámra. Az emésztésen (restriktáción) alapuló vizsgálatokat találtam legalkalmasabbnak erre a célra. A reakció hátterében egy olyan enzim áll, mely a DNS-t egy kizárólag rá jellemző meghatározott szekvencia mentén felhasítja. Egy DNS szakaszt annyi helyen hasít el, ahány helyen az általa preferált szekvencia előfordul. A hasítási termékeket agaróz gélen megfuttatva a szálak méret szerint szétválnak. Számtalan ilyen enzim létezik, s mindnek más és más a felismerési szekvenciája. Ezeket az enzimeket baktériumok termelik védekezésépp az idegen genomok ellen. Az enzimeket kivonják, és többnyire genetikailag módosítják, hogy labor körülmények között (in vitro) jobb hatékonysággal működjön. Kétféle gyakran hasító enzimmel (jelen vizsgálatban ez a HinfI és az AluI volt) vizsgálódva már kielégítően egyedi mintázatot tudtam elérni, amely fajon belül azonos, fajok között viszont eltérő. Így bár a pontos faji meghatározást nem végezhettem el, az azonos hasítási mintázatot adó egyedeket meg tudtam határozni.

A mintázatot úgy tudtam láthatóvá tenni, hogy az enzimreakció után a felhasogatott DNS darabokat tartalmazó oldatot etidium-bromidot tartalmazó agaróz gélben elektroforézis tankban megfuttattam, majd UV megvilágításba helyeztem (12. ábra).



12. ábra A gél felső részén kialakított zsebekől indulva futnak a DNS darabok a gél alja felé. Középen viszonyítás végett egy DNS létrát vittem fel, melynek csíkjai ismert hosszúságúak.

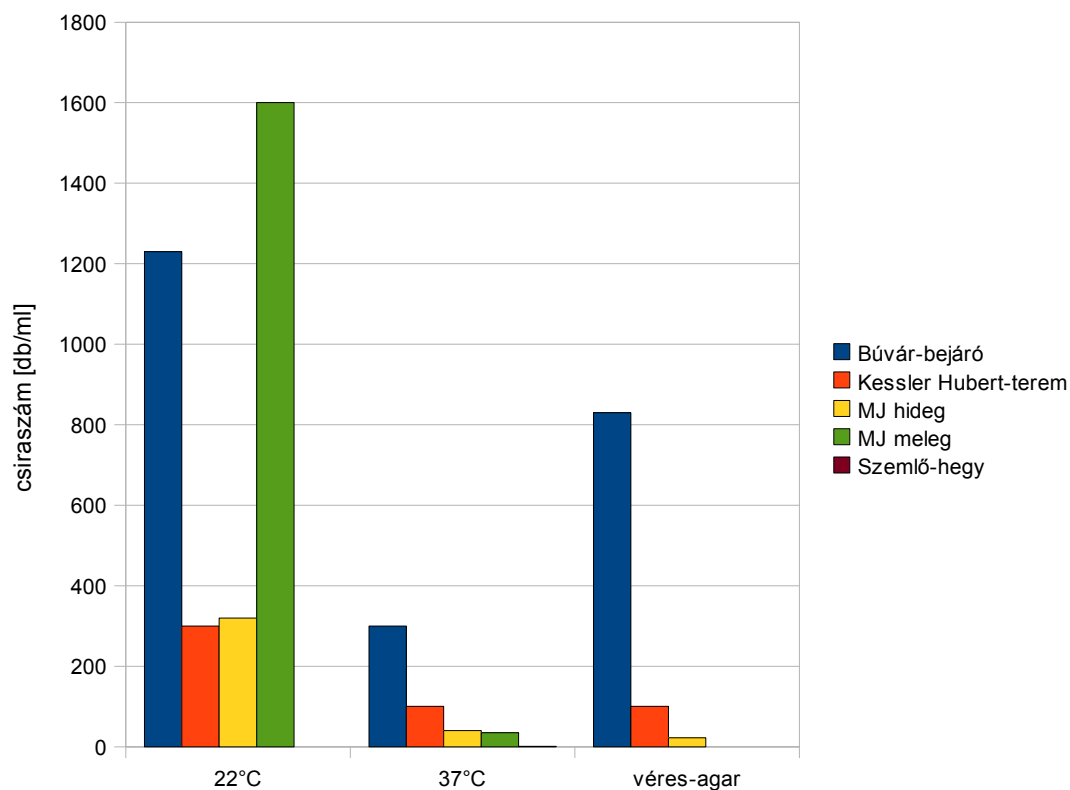
## 4. Eredmények és értékelés

### 4.1. A tenyésztések eredményei – összcsíraszám meghatározása

A szabványban előírtaknak megfelelően meghatároztam a vízminták összcsíraszámát. Az értékeket a 2. táblázatban összesítettem, majd grafikonon ábrázoltam (13. ábra).

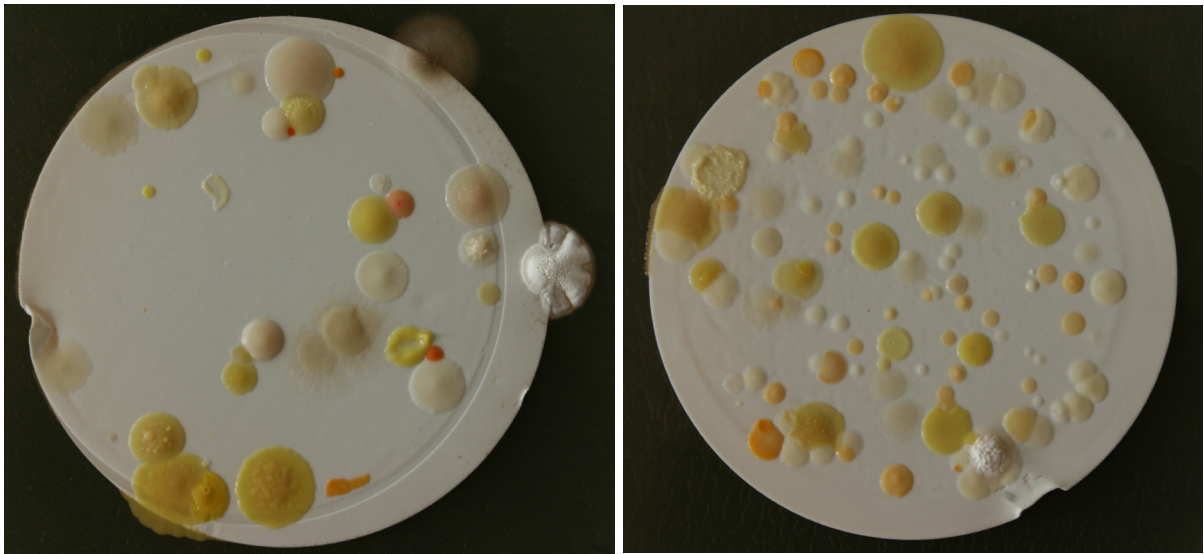
	Búvár-bejáró	Kessler Hubert-terem	MJ hideg	MJ meleg	Szemplő-hegy
22°C	1230	300	320	1600	2,75
37°C	300	100	40	35	1
véres-agar	830	100	22	9,4	0,4

2. táblázat Az egyes mintákhoz tartozó összcsíraszámok (db/ml) a háromféle táplemezen.



13. ábra Az egyes mintavételi helyekhez kapcsolódó összcsíraszámok típusonként ábrázolva.

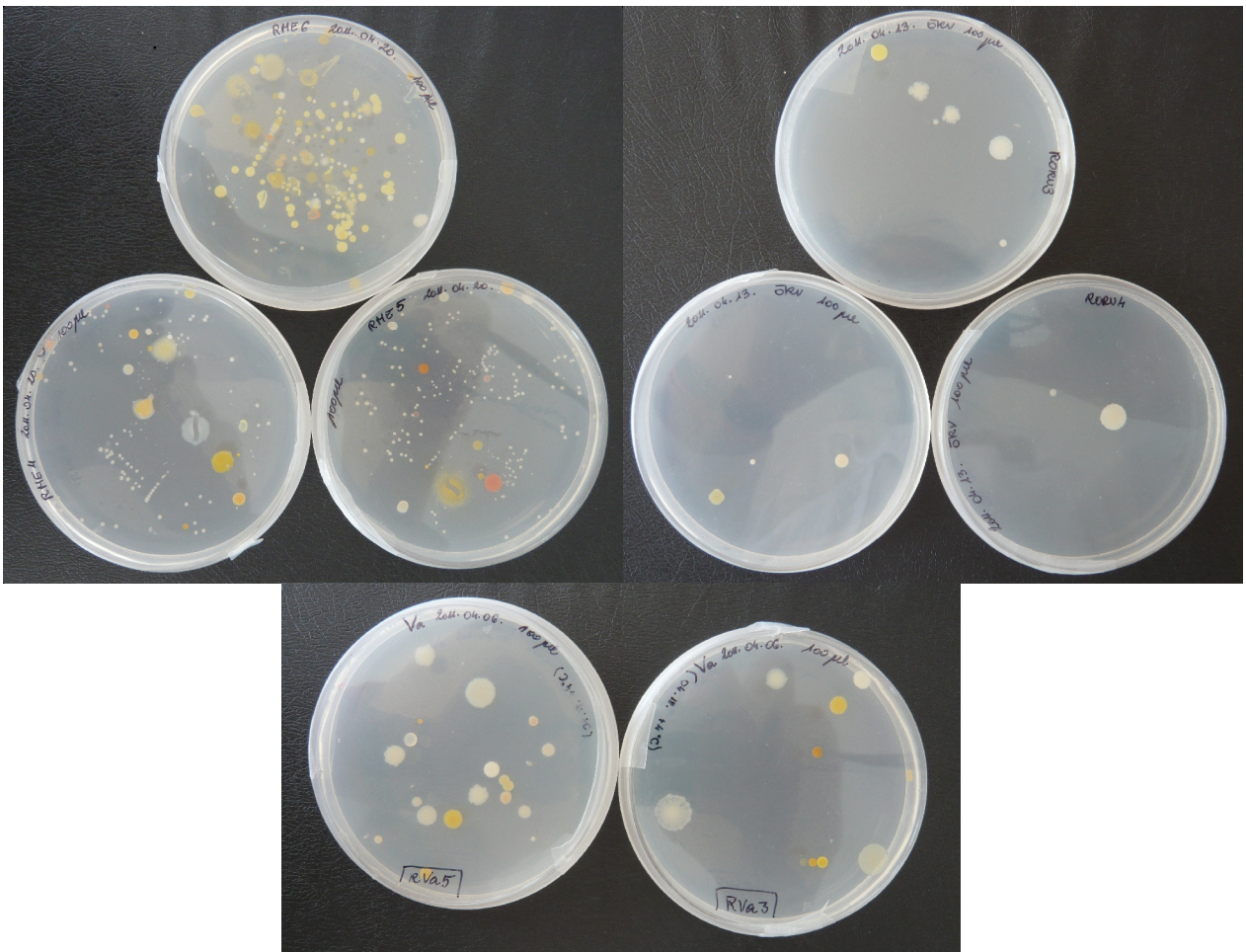
Az egyes mérési pontokhoz tartozó értékeket összehasonlítva elmondható, hogy a vártnak megfelelően az R2A táptalaj bizonyult a legkedvezőbbnek. A legalacsonyabb csíraszám a Szemlő-hegyi mintában volt, ami feltevésem szerint a szélsőségesen oligotróf élőhelynek köszönhető. A nagy tömegű víztestekből vett mintákban jóval magasabb értékeket kaptam. A legmagasabbat a meleg beszivárgás helyén vett mintából (a kis tápanyag tartalmú lemezén a többi lemezéhez képest is kugróan nagy csíraszámot tapasztaltam). Ez lehet akár a kedvező fizikai paraméterek következménye., de még ez is elmarad a felszíni vizekben mérhető csíraszámoktól. A második legmagasabb érték a Búvár-bejáróhoz kapcsolódott. Külön kiemelném, hogy az az általános tendencia, mi szerint a véres-agaron kapjuk a legkisebb csíraszámot (mivel az szelektív) erre a mintára nem volt igaz. Véleményem szerint a véres-agaron kinőtt emelkedett csíraszám oka, hogy az összes mintavételi pont közül ez áll a legerősebb antropogén behatás alatt, és a kinőtt baktériumok nem kifejezetten patogének, inkább az emberi bőrön, ruházaton élő generalisták. Megjegyezném továbbá, hogy a Szemlő-hegyi mintában voltak jelen leginkább a különböző penészek, bár ezek az organizmusok nem képezték vizsgálatom tárgyát.



14. ábra Nutrient agaron kinőtt telepek. Bal oldalon: 10 ml vízminta frissen feldolgozva. Jobb oldalon: 10 ml 24 órát 4°C-on tárolt vízminta. A szűrés, a táptalajra helyezés, valamint a fotózás azonos időben történt.

Kipróbáltam, történik-e változás a mintában, ha nem kerül azonnal feldolgozásra, ezért az egyik miniatvételező flaskát a felhasználás előtt 20 órát hűtőszekrényben tároltam. Azt tapasztaltam, hogy a csíraszám megnőtt, a közösségi diverzitás azonban lecsökkent (14. ábra), vagyis valószínűleg egyes fajok túlnőttek a megváltozott körülmények hatására.

A legváltozatosabb közösségek az R2A táptalajon nőttek ki (15. ábra). A lemezeket összehasonlítva kiszámolható a diverzitáskülönbségek, legalábbis a kitenyészhető baktériumok halmaza.



15. ábra R2A táptalajra szélesztett, 100-100 µl mintatérfogatból indított 8 napos tenyészetek.

Balra fent: Molnár János-barlang meleg vize.

Jobbra fent: Szemlő-hegyi barlang csepegő vize.

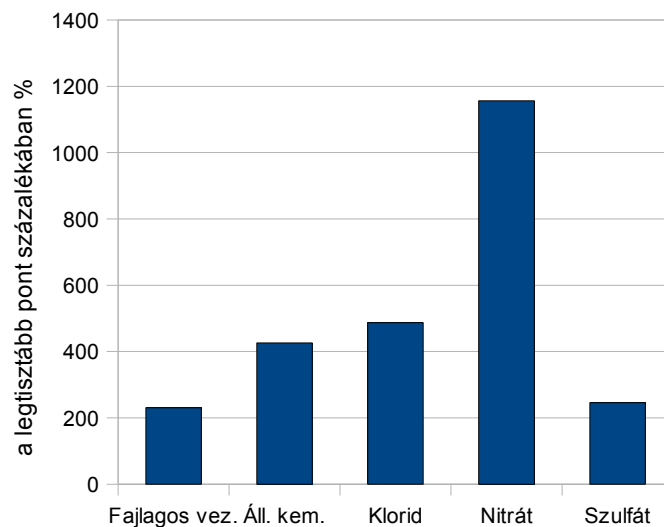
Lent középen: Molnár János-barlang hideg vize.

A kinőtt telepeket megvizsgálva elmondható, hogy a melegebb vízből vett mintában nemcsak a csíraszám volt magas, a telepek morfológiai diverzitása is. A csepegő vízből vett minta morfológiailag igen szegényes, a közösség gyaníthatóan csak a talajból bemosódott generalistákból áll.

#### 4.2. A tenyésztések eredményei - fekál-indikátorok

A Molnár János-barlang vizéből a 4 ponton összesen egyetlen egy darab enterococcut sikerült izolálnom a Búvár-bejárónál vett mintából (a 8. ábrán szerepel a megerősítő vizsgálata is). E. coli nem tenyésztett ki, de többször is találtam néhány coliformot. Ez azonban nem utal szennyezésre.

Csepegő vízből származó mintával kísérleti jelleggel végeztem vizsgálatot. Semmilyen szakirodalmat nem találtam erre vonatkozóan. Elsősorban arra voltam kíváncsi, hogy ki tudom-e mutatni a vízkémiai mérések alapján előrejelzett szennyvízbemosódást. Ezért Fehér Katalin egy olyan mérőpontját választottam, ahol feltűnően magas volt a nitrát tartalom (16. ábra).

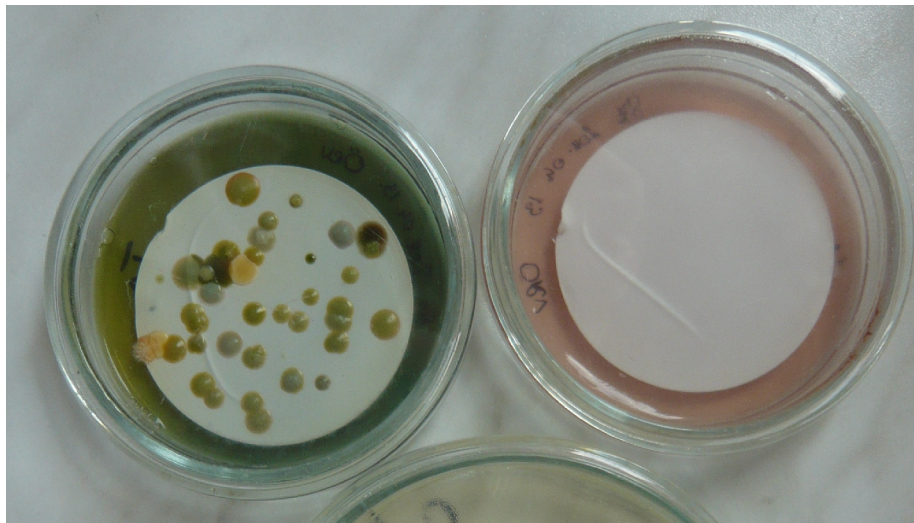


16. ábra A mintavételi pontom kémiai paraméterei a vonatkozó időszakban a barlang legtisztább mérőpontjának adataihoz viszonyítva. (Fehér Katalin adatai nyomán)

A kiépített szakaszban, az Óriás-folyósó távolabbi végén lévő lépcsőkre a csepegések alá

helyeztem el a kívül belül steril 0,5 literes üvegeket, majd 40 perc elteltével begyűjtöttem azokat. A mintavételi pontom már csak azért is releváns, mert a barlangterápiás foglalkozások helyszínén található. A mintavétel időszakában ez a szakasz le volt zárva, így minimálisra csökkent az esetleges látogatóktól származó hatás. Fekál-indokátort ezen a helyen sem tudtam kimutatni.

A negatív eredmény (17. ábra) nem zárja ki a kimutatott nagy mennyiségű nitrát és foszfát ionok szennyvíz eredetét. A baktériumok előszeretettel telepsznek meg a különböző felületek biofilmjein, kevésbé fordulnak elő a tápanyagszegény áramló vizekben. Nagyon valószínű, hogy már a talajban, vagy a kőzetek hajszálrepedéseiben elakadnak, így nem jutnak el a csepegés helyére. Célszerű volna az egy-egy nagyobb csapadékeseményt követő intenzívebb bemosódás vizéből végigvinni ugyanezeket a tenyésztéseket (BUTSCHER, C. et al 2011).



17. ábra Differenciáló táplémezek 5 nap elteltével. 100-100 ml vízmintát membránon szűrtem át, melyeket aztán a lemezekre helyeztem. Balra TA, jobbra Slanetz táptalaj.

#### **4.3. A tenyésztések eredményei – egyéb patogének**

Környezeti eredetű, de potenciálisan patogén szervezetek jelenlétét is megvizsgáltam minden mintában. Pseudomonast a Búvár-bejáratból (a 7. ábrán már bemutattam) és a Szemlő-hegyi mintában mutattam ki. Előbbiből 1 telep, utóbbiból 2 nőtt ki. Egyik sem *P. aeruginosa* volt.

A Búvár-bejáratból 1 darab Lpu 2-14 szerotípusú Legionella telepet izoláltam, A Kessler Hubert-teremből pedig 3, szerológiailag nem azonosítható („egyéb” kategóriájú) telepet kaptam. A szerológiai besorolást Szax Anita végezte, Latex Agglutinációs Kittel.

Ezek a szervezetek nem jeleznek szennyezést, a környezetben kis számban gyakran előfordulnak, s csak a mesterséges vízrendszerekbe jutva szaporodnak fel annyira, hogy betegséget okozzanak.

#### **4.4. Közösségi PCR alapú vizsgálatok – ARDRA eredmények**

Morfológiai és hasítási mintázat alapján kijelenthetem, hogy vannak olyan típusok, melyek minden mintában előfordulnak. Ezek valószínűleg generalista fajok, és a talajból, vagy az emberről kerültek a karsztvízbe. Nagyobb varianciát tapasztaltam a víz alatti járatokból vett mintákban, mint a többi háromban. Ezt Szemlő-hegyi-barlang esetében azzal magyarázom, hogy a csepegő víz ökoszisztémája lényegesen szegényebb, mint egy állandó víztestnek. A Molnár János-barlang másik két pontjáról vett minták esetében pedig még erősen meghígított mintát szélesztettem, később tértem át a csírák szűréssel való dúsítására.

Míg az egyéni minták segítségével, a faj szintű azonosítással pontos egzakt képet kapok az összetételről, a közösségek valódi változatosságát jobban jellemzi a metodikailag kissé bonyolultabb, de jóval kisebb fáradtsággal elvégezhető totál DNS-ből kiinduló közösségi PCR során kapott szekvenciamintázat. A hatékonyság itt sem tekinthető 100%-osnak, de jóval magasabb érték, mint az törzsenkénti kezelés esetében. Pontos mértéke azonban nem meghatározható.

#### **4.5. Közösségi PCR alapú vizsgálatok – DGGE eredmények**

A felszíni vizek közösségi vizsgálatokkor 100 ml vízből izolálják a genomális DNS-eket. Azt gondoltam azonban, hogy a karsztvíz alacsony egyedszámú közösségeinek jó

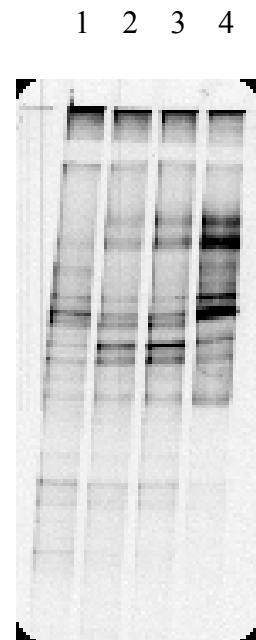


reprezentációjához nagyobb kiindulási mennyiségre lesz szükség. A szükséges térfogat meghatározásához elvégeztem egy előzetes mérést, melynek során azonos vételezésből származó, de eltérő mennyiségben leszűrt vizek közösségi mintázatát hasonlítottam össze. A Búvár-bejáróból származó vízből 100, 400 és 1000 ml-t szűrtem át a membránon, melyből aztán a DNS-t vontam ki. A 18. ábrán bemutatott DGGE eredményekből látszik, hogy a 100 ml kevésnek bizonyult, a 400 és az 1000 ml között azonban nincs különbség. Eredményeim alapján 0,5 l-ben határoztam meg a szükséges és elégséges mintatérfogatot.

18. ábra Nested PCR-rel előállított minták 30-60%-os DGGE-en  
(inverz ábrázolással).

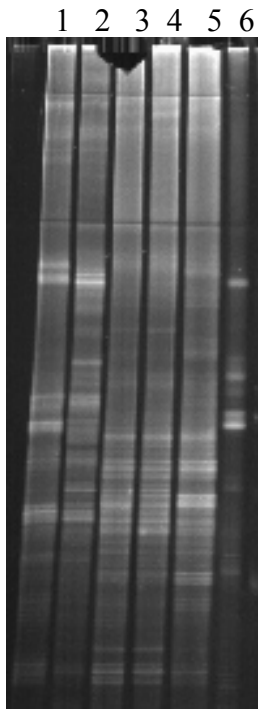
A minták balról jobbra:

1. 100 ml Búvár-bejárat
2. 400 ml Búvár-bejárat
3. 1000 ml Búvár-bejárat
4. 400 ml Kessler Hubert-terem



A PCR során lehetőség van olyan primerek használatára, melyek nem univerzálisan használhatóak a baktériumok körében, hanem csak egy szűkebb spektrum, valamely tetszőlegesen megválasztott taxonómiai csoport (akár faj szintű is lehet) kimutatására alkalmasak. A 19. ábrán látható mintázat Archea specifikus primerrel készült. Ez a csoport nem tenyésztethető ki az általam alkalmazott módszerrel, de a molekuláris biológia jóvoltából nemcsak igazolhatjuk jelenlétüket, hanem össze is vethetjük a közösségalkotó profilokat az egyes mintákban (CHEN, Y. et al. 2009). Jól látszik, hogy a hideg vizes beáramlás helyén kimutatott közösség mintázata megegyezik a csepegő vízből származóéval, a meleg vizes áramlatból származó minta közössége ehhez némiképp hasonló, míg a légkörrel közvetlen kapcsolatban álló víztestekből származó minták ettől, és egymástól is nagyon eltérnek. A jobb szélén egy másik

primerpárral felszaporított ismert törzseket tartalmazó in vitro kevert kultúrát alkalmaztam markerént. A 20. ábra univerzális primerekkel készült PCR termékeket ábrázol. Sokkal homogénebb képet mutat, eltérés itt csak a két felszínnel, és emberrel közvetlenül érintkező bejárat-közeli víztestekben mutatkozik.

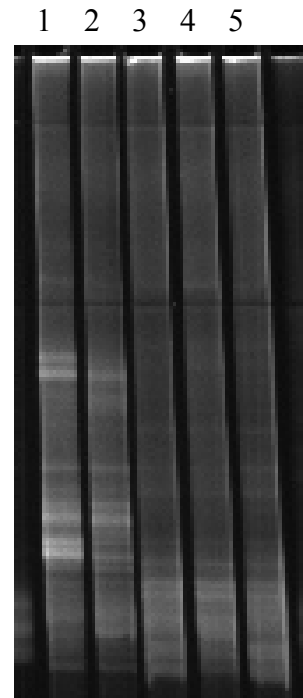


19. ábra DGG Archea specifikus primerekkel.

1. Búvár-bejáró
2. Kessler Hubert-terem
3. Molnár János-barlang hidegvíz
4. Szemlő-hegyi-barlang csepegés
5. Molnár János-barlang melegvíz
6. marker

20. ábra DGG általános primerekkel.

1. Búvár-bejáró
2. Kessler Hubert-terem
3. Molnár János-barlang hidegvíz
4. Molnár János-barlang melegvíz
5. Szemlő-hegyi-barlang csepegés



A Szemlő-hegyi-barlangból származó közösségi mintázat feltűnő hasonlóságot mutat a Molnár János-barlang vízzel kitöltött járataiból származókéval. Ez jelentheti azt is, hogy hidrológiai kapcsolatban állnak, de inkább azt, hogy a bennük ható tényezők (ez antropogén is lehet) hasonlóak, mely azonos irányba befolyásolja a közösség összetételét. Az Archea baktériumok kifejezetten a meleg vizes élőhelyeket kedvelik. Ezért meglepő, hogy nincs nagyobb különbség a Molnár János-barlang meleg, illetve hideg vizes mintái közt.

## 5. Összefoglalás

A baktériumok intenzív és sajátos anyagcsere folyamataik révén formálják közvetlen környezetüket. Az évezredekkel ezelőtti társulások nyomai ma is fellelhetők a barlangok kitöltéseiben és falain. Diplomamunkámban olyan témát szerettem volna bevezetni, amely nemcsak környezetvédelmi szempontból kurrens, hanem karsztkutatási relevanciája is van. A karsztok mikroökológiájának megismerése közelebb visz a karsztosodás folyamatainak, a kiválások kémiájának és mechanikájának megértéséhez is.

Jelen munkámban lefektettem egy hosszabb távú vizsgálat alapjait, melynek tanulságai akkor is felhasználhatóak, ha ez a kutatás most nem folytatódik.

Hiánypótló bakteriológiai vizsgálatokat kezdeményeztem a Budai Termálkarszton, melynek eredményeként 5 különböző fizikai és kémiai paraméterértékkel bíró helyről összesen 142 törzset izoláltam. Ebből további (morfológiai és biokémiai) vizsgálatok céljából jelenleg 119 törzset tartok fenn. A DNS-t 96 törzsből kíséreltem meg kivonni, ebből 54 esetben sikerrel jártam. Molekuláris biológiai módszerekkel a minták közösségi összetételét is megvizsgáltam.

A Szemlő-hegyi barlang csepegő vizéből baktériumokat izoláltam. Szennyvízre utaló fajokat nem találtam. Az összcsíraszámot meghatároztam.

A Molnár János-barlangban nem sikerült tettenérem az irodalomban említett *E. coli* szennyezést. Valószínűnek tartom, hogy az elmúlt 30 év alatt a térség csatornahálózatában beállt jelentős javulás következtében a szennyezés forrása(i) megszűnt(ek).

A továbbiakban szeretném azonosítani az izolált törzseket, és monitoring jelleggel folytatni a közösségi összetételre vonatkozó vizsgálatokat. Nem tartom kizártnak, hogy az új mintavételezések során olyan baktériumfajokkal is találkozhatunk, melyeknek kizárólagos természetes élőhelye a karsztvíz (GOLDSCHIEDER, N. et al. 2006 és SHABAROVA, T. - PERNTHALER, J. 2010).

## Irodalomjegyzék

- BARTON, H. A. – JURADO, V. 2007: What's Up Down There? Microbial Diversity in Caves. Microorganisms in caves survive under nutrient-poor conditions and are metabolically versatile and unexpectedly diverse - *Microbe* Vol. 2. No. 3. pp. 132-138.
- BOLNER K. 1993: Ajánlás a budai Rózsadomb és környéke termálkarsztja UNESCO Világöröksélistára történő felterjesztéséhez (szerk.: Hazslinszky Tamás – Dr. Nádor Annamária – Szablyár Péter) – *RÓMAI Kiadó és Nyomdaipari Bt.*, Budapest. pp. 6-9.
- BUTSCHER, C. et al 2011: Validation of a Numerical Indicator of Microbial Contamination for Karst Springs - *GROUND WATER*. Vol. 49. No. 1. pp. 66–76.
- CHEN, Y. et al. 2009: Life without light: microbial diversity and evidence of sulfur- and ammonium-based chemolithotrophy in Movile Cave – *The ISME Journal*. Vol. 3. pp. 1093–1104
- FEHÉR K. 2009: A Rózsadombi-Termálkarszt szennyeződés-veszélyeztetettségi vizsgálata – *magánkiadás*, Budapest
- GOLDSCHIEDER, N. et al. 2006: Review: Microbial biocenoses in pristine aquifers and an assessment of investigative methods - *Hydrogeology Journal*. Vol. 14. pp. 926–941
- KALINOVITS S. 1978: Kutatási Jelentés 1978, Ferencvárosi Természetbarát SK DELFIN Könnyűbúvár Szakosztály Vízalatti Kutatócsoport, Budapest. IV. fejezet
- KALINOVITS S. 2003: Magyarország fokozottan védett barlangjai (szerk.: Székely Kinga) – *Mezőgazda Kiadó*, Budapest. pp. 260-263.
- KORDOS L. 1984: Magyarország barlangjai – *Gondolat Kiadó*, Budapest
- MAUCHA L. 1993: Ajánlás a budai Rózsadomb és környéke termálkarsztja UNESCO Világöröksélistára történő felterjesztéséhez (szerk.: Hazslinszky Tamás – Dr. Nádor Annamária – Szablyár Péter) – *RÓMAI Kiadó és Nyomdaipari Bt.*, Budapest. pp. 14-20.
- NÁDOR A. - KRAUS S. 1993: Ajánlás a budai Rózsadomb és környéke termálkarsztja UNESCO Világöröksélistára történő felterjesztéséhez (szerk.: Hazslinszky Tamás – Dr. Nádor Annamária – Szablyár Péter) – *RÓMAI Kiadó és Nyomdaipari Bt.*, Budapest. pp. 20-32.

- NGUYET, V. T. M. - GOLDSCHIEDER, N. 2006: A simplified methodology for mapping groundwater vulnerability and contamination risk, and its first application in a tropical karst area, Vietnam - *Hydrogeology Journal*. 14. pp. 1666–1675.
- PALOTAI M. 2004: A Gellért-hegy és a Lukács-fürdő vizeiben mért radon- és rádiumtartalom lehetséges forrásai - TDK Dolgozat, Budapest
- PLÓZER I. 1973: Kutatási Jelentés 1972-73, Ferencvárosi Természetbarát SK DELFIN Könnyűbúvár Szakosztály Vízalatti Kutatócsoport, Budapest
- PORTILLO, M. C. - GONZALEZ, J. M. 2009: Comparing bacterial community fingerprints from white colonizations in Altamira Cave (Spain) – *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. Vol. 25. Nr. 8. pp. 1347-1352
- PRONK, M. et al. 2009: Microbial communities in karst groundwater and their potential use for biomonitoring - *Hydrogeology Journal*. 17. pp. 37-48.
- RAY CHAUDHURI, S. et al. 2006: Microbial DNA extraction from samples of varied origin - *Current Science*. Vol. 91, No. 12
- SCHWEITZER F. 2003: Magyarország fokozottan védett barlangjai (szerk.: Székely Kinga) – *Mezőgazda Kiadó*, Budapest. pp. 240.
- SHABAROVA, T. - PERNTHALER, J. 2010: Karst pools in subsurface environments: collectors of microbial diversity or temporary residence between habitat types - *Environmental Microbiology*. 12(4). pp. 1061–1074
- SPIEGELMAN, D. et al. 2005: A survey of the methods for the characterization of microbial consortia and communities. - *Canadian Journal of Microbiology*. Vol. 51. pp. 355-386
- TAKÁCS J. 2010: Kutatási Jelentés 2010, ELTE Általános és Alkalmazott Földtani Tanszék
- WEISBURG, W. G. et al 1991: 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study - *Journal of Bacteriology* Jan. 1991. pp. 697-703

## **Szabványok**

MSZ EN ISO 7899-2:2000 Vízminőség. Az enterococcus bélbaktériumok kimutatása és megszámlálása 2. rész: Membránszűrési módszer

MSZ EN ISO 9308-1:2001 Vízminőség. Az *Escherichia coli* és coliform baktériumok kimutatása és megszámlálására 1. rész: Membránszűrési módszer

MSZ EN ISO 16266:2008 Vízminőség. *Pseudomonas aeruginosa* kimutatása és megszámlálása Membránszűrési módszer (ISO 16266:2006)

MSZ EN ISO 11731-2:2008 Vízminőség. *Legionella* kimutatása és megszámlálása. 2. rész. Közvetlen membránszűrési módszer kis baktériumszámú vizek esetén (ISO 11731-2:2004)