

MIKROBIÁLNY SKRÍNING VODY V ŠTYROCH JASKYNIACH SLOVENSKEHO KRASU S POUŽITÍM KONVENČNÝCH A MOLEKULÁRNO-BIOLOGICKÝCH METÓD

**RNDr. Miloslava Prokšová, CSc.¹⁾, RNDr. Marianna Cíchová, PhD.¹⁾,
Mgr. Barbora Gaálová²⁾, doc. RNDr. Milan Seman, CSc.²⁾**

¹⁾Výskumný ústav vodného hospodárstva, Nábr. L. Svobodu 5, 812 49 Bratislava,
proksova@vuvh.sk

²⁾Katedra molekulárnej biológie, Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského,
Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, gaalova.b@gmail.com

Slovensko je bohaté na krasové územia. Najväčším takýmto územím je Slovenský kras situovaný v južnej časti krajiny, tvoriaci jednu z orografických jednotiek Západných Karpát. Územie Slovenského krasu je po geologickej stránke v prevažnej miere budované vápencami, dolomitmi a v podloží pieskovicami a bridlicami silického príkrovu. Vápence, pochádzajúce zo stredného a vrchného triasu, sú chemicky veľmi čisté (obsah CaCO_3 až do 99 %), najrozšírenejší z nich je wettersteinský typ. Geologická štruktúra Slovenského krasu preto poskytuje vhodné podmienky pre vznik povrchových a podzemných krasových javov, predovšetkým jaskýň. Slovenský kras je bohaté teritórium s vysokou hustotou jaskýň na malej ploche a väčšina krasových javov sa nachádza na Silickej planine, ktorá predstavuje najväčšiu planinu Slovenského krasu s rozlohou asi 150 km^2 [1, 2].

Krasový geosystém je špecifickou sústavou abiotických a biotických prvkov, ktoré sú mimoriadne labilné a citlivo reagujú na vonkajšie vplyvy. Dôvodom tejto lability je vnútorné odvodnenie krasu a úzke prepojenie povrchu s podzemím rôznymi krasovými kanálmi a jaskyňami. Krasový geosystém tvorí najmä hornina, reliéf, ovzdušie, voda, sedimenty a biota. V prípade narušenia ktoréhokolvek z týchto prvkov môže byť ohrozený celý systém. Podstatnú úlohu v tomto systéme hrá voda, ktorá sa v krase rýchlo dostane do vnútra masívu a cez jaskynné priestory, krasové kanály takmer bez filtrácie do vyvieraciek resp. do hĺbkového obehu [3].

Krasové vody obsahujú väčší podiel uhličitanov, presakujú vápencom, dolomitmi alebo pieskovicami. Podľa Panoša [4] sú to všetky vody cirkulujúce v endokrasovej a exokrasovej zóne rozpustných hornín. Krasové územia zaberajú na Slovensku plochu vyše $2\,700 \text{ km}^2$, kde sa vytvorilo mnoho jaskýň.

Krasové vody sa pre svoju čistotu a kvalitu pokladajú za dôležitý zdroj pitných vôd. Celkový objem zdrojov krasových podzemných vôd je nad $27 \text{ m}^3/\text{s}$. Využitá je z toho len menšia časť [5].

Krasové podzemné vody sú pomerne zraniteľné, citlivosť krasu na antropické vplyvy je veľmi výrazná. Je to zapríčinené slabou ochrannou vrstvou pôdy, zložitým režimom vôd, často veľkou rýchlosťou prúdenia vôd, nízkou filtráciou, chudobným zastúpením organizmov, čo spomaľuje samočistiaci proces. Tieto podmienky dovoľujú zvýšenú pohyblivosť a množenie mikroorganizmov [6]. Znečistenie môže nastať najmä sezónne

po návaloch dažďa, topení snehu, infiltráciou krasových vodných systémov z komunálnych odpadových vôd a z chovov zvierat [7].

Charakteristika odberových miest

V našej práci v čase od 2007 do 2013 bolo pre sledovanie kvality krasovej podzemnej vody vybraných 10 odberových miest v štyroch jaskyniach nachádzajúcich sa na území Silickej planiny Slovenského krasu.

Jaskyňa Domica je lokalizovaná na juhu západného okraja Silickej planiny. Dĺžka jaskyne na území Slovenska je 5 368 m, tvorí pôvodný jednotný systém s jaskyňou Baradla v Maďarsku s celkovou dĺžkou 25,5 km. Do jaskyne Domica priteká voda, ktorú pohlcujú tzv. ponory (hltače). Nimi sa voda dostáva najskôr do jaskyne Čertova diera, ktorá je prepojená s Domicou a preteká do jaskyne Baradla na Maďarskom území [8]. Ponor Domického potoka – **D2**, zbiera vodu z okolitých polí, tak predstavuje najzraniteľnejšiu jednotkou z hľadiska kontaminácie. V okolí jaskyne sa nachádzajú 3 farmy, ktoré chovajú dobytok a ovce, spásajúce lúky v blízkosti jaskyne. Hlavným tokom jaskyne je podzemná riečka Styx. **D1** je vstup podzemnej riečky Styx do majkovho domu, cca 15 m nad Rímskymi kúpeľami. **D3** je podzemný tok Styx na konci, tzv. Druhá plavba. Podzemný tok Styxu a mladšie freatické toky vyvierajú na povrch vo vyvieracke Jósva blízko dediny Jósvalő v Maďarsku. Vodozberná oblasť riečky Styx bola niekoľko krát znečistené vďaka poľnohospodárskej aktivite. Niekoľko allochtónnych tokov tečie z nekrasového územia štrkovej pokrývky, a tieto prepadávajú do podzemia cez ponory na rozhraní/štrku. Tieto občasné toky vytvorili laterálne riečky v jaskynnom systéme, ktoré končia v riečke Styx (napr. Domický potok, Potok meandrovej chodby, Čerňanská vetva, Malé Baradlá, Acheron, Torok mecset a Retek na maďarskej strane). Domica je s teplotou 10-12 °C zimovisko netopierov a nachádzajú sa tu invertebráty [3, 9].

Gombasecká jaskyňa, lokalizovaná v Západnej časti Silickej planiny, dĺžka 1 525 m, je súčasťou tzv. Silicko-gombaseckého hydrologického systému. Ten začína ponorom, ktorý býval v minulosti znečistený, tzv. Farárovou jamou, preteká Silickou ľadnicou a vyteká v Gombaseckej jaskyni. Podzemný tok má 2 bočné vetvy a to ponor Červenej skaly a ponorná priepasť a vtekajú do Čierneho potoka (odberové miesto **G1**). Existuje ďalšia južná vetva jaskyne s Mramorovým jazierkom (odberové miesto **G2**), ktorého pôvod vôd zatiaľ nie je známy [8].

Jaskyňa Milada, lokalizovaná v centrálnej časti Silickej planiny, dĺžka 800 m. Podzemný tok jaskyne Milada pochádza z dvoch vetiev. Jedna vetva je v Slepej doline pri Silickej Brezovej. Druhá vetva ide zo Slepej doliny vychádzajúcej od Kráľovej studne. V podzemí sa oba ponorné toky spoja a pretekajú jaskyňou Milada (odberové miesto **M**) a objavujú sa v Bezodnej ľadnici a nakoniec na povrch vyvierajú v Kečovskej vyvieracke [8].

Krásnohorská jaskyňa, lokalizovaná na severe Silickej planiny, dĺžka 1 556 m. Vodný tok v Krásnohorskej jaskyni v úseku od vyvieracky po Marikino jazero dosahuje dĺžku 520 m. Prevažnú časť toku tvorí kaňonovitá chodba (**K4** tesne pred vyústením riečky Buzgó z jaskyne, koniec štôlne), ktorá je na priečných poruchách rozšírená do mohutných dómov vysokých až 45 m (**K2** pravý prítok v Abonyiho dome). Na podzemnom riečisku sú miestami prietokové jazerá. Severne od Marikinho jazera (**K1**) je bočný ľavostranný prítok vody (**K3** ľavý prítok), ktorý odvodňuje prilahlú západnú časť vodozbernej oblasti jaskyne.

Celkovo bolo uskutočnených 19 odberov. V roku 2007 5 odberov: jarný, 3 letné, jesenný a dva zimné. V roku 2008 boli vzorky odoberané jedenkrát v každom ročnom období. V roku 2009 bol vynechaný zimný odber, v roku 2010 bol uskutočnený len jarný a jesenný odber a v rokoch 2011 a 2012 boli uskutočnené len jesenné odbery. V roku 2013 bol uskutočnený jeden letný odber. Niektoré odbery boli vynechané z dôvodu deficitu vody, alebo naopak, z dôvodu záplav.

Fyzikálno-chemické analýzy

Počas odberu boli robené terénne merania základných fyzikálno-chemických parametrov, a to teploty vody, konduktivity, pH, oxido-redukčného potenciálu, obsahu rozpusteného kyslíka, kyslíkového nasýtenia a zákalu. Teplota vody bola zvyčajne konštantná na všetkých odberových miestach a pohybovala sa v rozmedzí 9,2 - 9,6 °C. Teplota z odberového miesta D2 bola vždy o 0,5-1°C vyššia. Hodnota pH sa pohybovala v rozsahu medzi 7,17 - 7,98. Voda zo všetkých odberových miest mala v priemere nižšiu vodivosť, hodnoty sa pohybovali medzi 52,9 - 77,2 mS/m. Koncentrácia rozpusteného kyslíka bola konštantne nízka (< 2mg/L) okrem odberových miest D2 a D3 v jaskyni Domica.

Mikrobiologické analýzy

Vo vzorkách vody sme robili mikrobiologický rozbor zameraný na kultivačné stanovenie používaných indikátorov kvality vody, koliformných baktérií, črevných enterokokov a kultivovateľných mikroorganizmov pri 22 °C. Hodnoty minima, maxima a mediánu stanovených počtov indikátorových mikroorganizmov sú uvedené v tabuľke č. 1. Počty koliformných baktérií sa pohybovali rádovo od 0 do 10³ KTJ/1 ml, počty črevných enterokokov od 0 do 10² KTJ/1 ml. Počty kultivovateľných mikroorganizmov sa pohybovali vo všetkých sledovaných jaskyniach od 10 do 10³ KTJ/ml. Len odberové miesto D2 v jaskyni Domica, vykazuje zvýšené počty koliformných baktérií aj kultivovateľných mikroorganizmov.

Celkovo vyššie počty baktérií boli zaznamenané počas zvýšeného prietoku vody v jaskyniach, napr. počas topenia snehu, pri búrkach, väčších dažďoch.

Tabuľka 1. Stanovené počty mikrobiologických ukazovateľov kvality vody

Odber. Miesto	D1	D2	D3	G1	G2	M	K1	K2	K3	K4
N	11	14	17	18	8	17	7	6	6	8
KB	KTJ/ml									
Min	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Max	750	1000	1000	1000	8	1000	42	13	50	1000
Medián	5	73	5	5	0	6	0	0	0	29
EK	KTJ/ml									
Min	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Max	9	500	37	82	0	23	1	0	0	3
Medián	0	9,5	0	0	0	0	0	0	0	0
KM22	KTJ/ml									
Min	40	147	14	12	1	7	8	0	2	0
Max	1000	1000	1000	1500	1000	1000	500	1000	500	1000
Medián	92	454	117	70	4	100	96	13	19	259

N – počet odobratých vzoriek, KTJ – kolónia tvoriaca jednotka, KB – koliformné baktérie, EK – črevné enterokoky, KM22 – kultivovateľné mikroorganizmy pri 22 °C.

Výsledky stanovenia mikrobiologických ukazovateľov poukazujú na niektorých odberových miestach, napríklad D1, D2, D3, G1 M, K1, K4 na viditeľné mikrobiálne znečistenie krasových podzemných vôd.

Ukazovateľ kultivovateľné mikroorganizmy pri teplote 22 °C (celkový počet kolónií) predstavuje celkové znečistenie vnesenými mikroorganizmami alebo organickými látkami. Je to doplnkový ukazovateľ kvality vody. Zahŕňa stanovenie chemo-heterotrofných baktérií vyskytujúcich sa vo vodnom prostredí, bez ohľadu, či sú alochtónneho alebo autochtónneho pôvodu. V prípade čistých, málo organicky znečistených vôd tvoria kultivovateľné baktérie 0,1 % z celkového počtu baktérií, ktoré sa v tomto prostredí nachádzajú.

Pre získanie všeobecnej charakteristiky celkového mikrobiálneho spoločenstva vôd vybraných jaskýň Slovenského krasu bola otestovaná metóda určenia priamych počtov s použitím fluochrómu DAPI (farbivo s modrou fluorescenciou), ktorý sa viaže na molekulu DNA a počet buniek je potom detegovaný pomocou fluorescenčnej mikroskopie. Najnižší pomer počtov kultivovateľných mikroorganizmov a celkových počtov bol zaznamenaný v mieste D2, ktoré vykazuje znaky znečistenia.

Indikátory fekálneho znečistenia vôd, črevné enterokoky a koliformné baktérie, boli bližšie identifikované biochemickými testami. Získané izoláty črevných enterokokov boli potvrdené pomocou EN-COCCUStest (Erba Lachema). Z odberových miest jaskýň Domica (D2) a z Gombaseckej jaskyne (G1) boli izolované najmä druhy *Enterococcus faecalis* a *E. faecium*. Častejšie bol identifikovaný aj druh *Globicatella sanguinis* z odberových miest jaskyne Domica (D2) a Milada.

Skupina koliformných baktérií sa v minulosti považovala za hlavný indikátor fekálneho znečistenia. Tradičná definícia koliformných baktérií je, gramnegatívne paličky patriace do čeľade *Enterobacteriaceae*. V súčasnosti ich význam ako indikátora fekálneho znečistenia stratil na dôležitosť. Jedná sa o heterogénnu skupinu baktérií, skupina zahŕňa aj druhy, ktoré sa vo fekáliách nevyskytujú. Pre bližšiu identifikáciu izolátov koliformných baktérií sme teda potvrdzovanie biochemickými testami doplnili aj molekulárnou metódou sekvenčnej analýzy DNA.

Pre biochemickú identifikáciu získaných izolátov koliformných baktérií sme použili komerčne dostupný set ENTEROtest 24 (Erba Lachema). Získané výsledky boli spracované pomocou programu TNWL CCM Brno. Celkovo sme získali zo všetkých odberových miest 561 izolátov koliformných baktérií. Z celkového súboru izolátov dosahovalo vyhovujúce identifikačné skóre (ID \geq 90%) iba 352 izolátov (63%). Celkové taxonomické spektrum identifikovaných izolátov koliformných baktérií je v tabuľke č. 2. Z pohľadu druhového zastúpenia boli dominujúce druhy *Escherichia coli* (88 izolátov), *Serratia fonticola* (66 izolátov) a *S. marcescens* (33 izolátov) ako aj druhy *Enterobacter cloacae*, *E. amnigenus*, *Hafnia alvei* a *Morganella morgani*.

Z identifikácie druhového spektra je zrejmé, že nie všetky zachytené enterobaktérie súvisia s fekálnou kontamináciou. *Escherichia coli* predstavuje významný indikátor fekálneho znečistenia. Vždy pochádza z črevného traktu človeka alebo teplotných živočíchov na rozdiel od iných zástupcov skupiny koliformných baktérií alebo termotolerantných koliformných baktérií, ako sú *Enterobacter* a *Citrobacter* a vo vodnom prostredí sa nerozmnožuje. Najvyšší výskyt bol v odberovom mieste D2, ktoré je výrazne ovplyvnené povrchovými vodami. Znečistenie podzemných krasových vôd v jaskyni Domica je dokumentované aj v článku [10], kde autori dokumentujú prítomnosť baktérií rodu *Enterobacter* na viac antibiotic (3 – 10).

Tabuľka 2. Taxonomické spektrum izolátov z čeľade *Enterobacteriaceae* z krasovej podzemnej vody v sledovaných jaskyniach v jednotlivých odberových miestach

	D1	D2	D3	G1	G2	M	K1	K2	K3	K4	N
<i>Averyella dalhousiensis</i>				3							1
<i>Buttiauxella gaviniae</i>		1	1	2							3
<i>Cedecea lapagei</i>			1								1
<i>Citrobacter farmerii</i>						1					1
<i>Citrobacter freundii</i>						2					1
<i>Citrobacter gilenei</i>				1		3					2
<i>Enterobacter aerogenes</i>										1	1
<i>Enterobacter amnigenus</i>		4		5		1				1	4
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	1										1
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	7	3	6		3					5
<i>Enterobacter dissolvens</i>	1		1	1		1					4
<i>Enterobacter gergoviae</i>			2								1
<i>Enterobacter intermedius</i>	2	1									2
<i>Enterobacter pyrinus</i>				4							1
<i>Escherichia coli</i>		69	3	10		5	1				5
<i>Hafnia alvei</i>			10			4				1	3
<i>Klebsiella ornithinolytica</i>			1	1							2
<i>Klebsiella oxytoca</i>		2		2							2
<i>Klebsiella ozanae</i>			2			3					2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>							1				1
<i>Kluyvera georgiana</i>						1					1
<i>Moellerella wisconsensis</i>						2					1
<i>Morganella morganii</i>	1	3	5	1							4
<i>Pantoea dispersa</i>				3							1
<i>Proteus vulgaris</i>		5				3					2
<i>Providencia alcalifaciens</i>		2	3			1					3
<i>Providencia rettgerii</i>		1				2					2
<i>Rahnella aquatilis</i>				2		2					2
<i>Raoultella terrigena</i>			4	11							2
<i>Serratia ficaria</i>				1							1
<i>Serratia fonticola</i>	1	3	9	27	4	19	1	1	1	4	10
<i>Serratia grimesii</i>				1							1
<i>Serratia liquefaciens</i>						1					1
<i>Serratia marcescens</i>	2		26	1	1	3					5
<i>Serratia odorifera</i>		1		1		2					3
<i>Serratia plymuthica</i>		1				1	4				3
<i>Serratia proteamaculans</i>				1							1
<i>Serratia quinivorans</i>						2					1
<i>Yersinia enterocolitica</i>		1	1			1				1	4

N – počet odberových miest s pozitívnym nálezom

Pre potvrdenie biochemickej identifikácie metódou sekvenčnej analýzy DNA bolo vybraných 26 izolátov koliformných baktérií. Pre sekvenčnú analýzu bol vybraný gén pre ribozomálnu podjednotku 16S rRNA. Sekvencie izolátov biochemicky identifikovaných ako *Citrobacter freundii* (2), *C. gilenei*,(1), *Proteus vulgaris* (1) a *E. coli* (2) vykazovali podobnosť 99 až 100% k sekvenciám 16S rRNA príslušných referenčných kmeňov na druhej úrovni. Sekvencie izolátov biochemicky identifikovaných ako *Buttiauxella gaviniae* (1), *B. ferragutiae* (1), *Pantoea dispersa* (1)

boli sekvenčnou analýzou potvrdené iba na rodovej úrovni. Izoláty rodu *Enterobacter* netvorili koherentný klaster s referenčnými kmeňmi. *Enterobacter amnigenus* (1) bol sekvenčne blízko s *Raoultella terrigena*, *E. amnigenus* (1) a *E. cloacae* (1) s *Cedecea davisae*. Druhy identifikované biochemicky ako *Kluyvera georgiana* (1), *Klebsiella pneumoniae* (1) a *Citrobacter gilensis* (1) sa vo fylograme nachádzali mimo svojich referenčných ekvivalentov, čo potvrdilo, že ide o iné rody.

Záver

V našej práci sme sa zamerali na mikrobiálny skrining podzemných krasových vôd z hľadiska ich významu ako zdroja pitnej vody. Z kultivačného stanovenia indikátorov mikrobiologickej kvality vody sme získali veľký počet izolátov, ale stretli sme sa s veľkým problémom pri ich identifikácii. Z výsledkov nám vyplýva, že pre spoznanie mikrobioty týchto vôd nebudú dostačujúce v súčasnosti používané kultivačné metódy a následná identifikácia mikroorganizmov založená na ich fenotypových prejavoch. Bude potrebné hľadať nové metódy a pohľady na mikrobiológiu vody.

Literatúra

- [1] Mello J., Elečko M., Pristaš J., Reichwalder P., Snopko L., Vass D., Vozárová A., Gaál Ľ., Hanzel V., Hók J., Kováč P., Slavkay M., Steiner A. (1997) Vysvetlivky ku geologickej mape Slovenského krasu 1 : 50 000, pp 1-255. GÚDŠ, Bratislava
- [2] Gaál Ľ. (2008) Geodynamics and development of caves in the Slovak Karst. *Speleologia Slovaca* 1: 1–166.
- [3] Jakál J. (1986) Krasová krajina ako špecifický prírodný geosystém. *Slovenský kras*, 24, 3-26.
- [4] Panoš, V. 2001: Karsologická a speleologická terminológia. Výkladový slovník s ekvivalenty ve slovenštine a jednacích jazycích Medzinárodní speleologické unie (UNESCO). Knižné centrum, Žilina. 352 s.
- [5] Kullman, E. st. 1996: Zdroje a zásoby podzemných vôd, ich ochrana a vzťah k ekológii. *Podzemná Voda* 2/1996. SAH. Bratislava. 12-18.
- [6] Pasquarell G, Boyer D (1995) Agricultural impacts on bacterial water quality in karst groundwater. *J Environ Qual* 24: 959-969.
- [7] Pasquarell G., Boyer D. (1995) Agricultural impacts on bacterial water quality in karst groundwater. *J Environ Qual* 24:959-969.
- [8] Haviarová D. (2007) Výskum krasových vôd z pohľadu ochrany jaskýň na slovensku. *Podzemná voda* XIII 2/2007, 153-161.
- [9] Bella P. (1995) Princípy a teoreticko-metodologické aspekty klasifikácie morfológických typov jaskýň. *Slovenský kras*. 33: 3-15.
- [10] Gaálová B., Donauerová A., Seman M., Bujdaková H. (2014) Identification and β -lactam resistance in aquatic isolates of *Enterobacter cloacae* and their status in microbiota of Domica Cave in Slovak Karst (Slovakia) *International Journal of Speleology*, 43, 69-77.