

**SLOVENSKÁ AKADEMIA VIED**  
**ÚSTAV FYZIOLOGIE HOSPODÁRSKÝCH ZVIERAT**  
**KOŠICE**



*Záverečný protokol o výsledku analýzy výskytu bakteriofága H40/1 vo vzorkách vody počas stopovacej skúšky v Pustej jaskyni (Achátový dóm)*

**Košice, 21. december 2010**

**doc. RNDr. Peter Pristaš, CSc.**

## **Analýza výskytu bakteriofága H40/1 vo vzorkách vody zo stopovacej skúšky v Pustej jaskyni (Achátový dóm) - 17. 12. 2010 – 18. 12. 2010**

Na stopovacu skúšku sa použilo 8 litrov fágovej suspenzie bakteriofága H40/1, pripravenej na Ústave fyziológie hospodárskych zvierat SAV (ÚFHZ SAV) v Košiciach s početnosťou fágov  $10^{12}$  na mililiter suspenzie. Táto suspenzia sa aplikovala do podzemného toku v Pustej jaskyni (v Achátovom dóme) a následne sa odoberali vzorky vody na vybraných odberných miestach. Vzorky vody boli doručené na ÚFHZ SAV dňa 20. 12. 2010 o 11.00 a okamžite spracované. Vzhľadom na to, že medzi prípravou fágovej suspenzie a jej aplikáciou ubehla relatívne dlhšia doba (14 dní), v prvom kroku sa vzorka suspenzie odobratá tesne pred aplikáciou opakovane testovala na počet životoschopných fágov. Analýza potvrdila, že fágy boli dostatočne životoschopné a v 1 mililitri suspenzie sa detegovali bakteriofágy v početnosti medzi  $10^{12}$  až  $10^{13}$  pfu (plaque forming unit) na mililiter. Pri analýze výskytu bakteriofágov v odoberaných vzorkách sa vzhľadom na očakávané riedenie a hydrologické pomery na lokalite skúšky sa v prvom kroku na analýzu výskytu bakteriofágových častíc použilo 100  $\mu$ l vzorky. Ku vzorke sa pridalo 900  $\mu$ l sterilnej destilovanej vody, 100  $\mu$ l vzorky čerstvej kultúry *Pseudoalteromonas gracilis* a po 15 minútovej inkubácii pri izbovej teplote sa k tejto zmesi pridalo 3,5 ml soft SWA agaru. Po zatuhnutí agaru sa platne kultivovali pri izbovej teplote po dobu 24 hodín. Počet fágových častíc sa stanovil vizuálne na základe počtu plakov, tj. zón bez rastu indikátorovej kultúry *P. gracilis*.

Vo vzorkách s vysokým počtom bakteriofágových častíc (viac než 350 častíc na platňu) sa analýza opakovala s použitím menšieho objemu vzorky (10  $\mu$ l). U vzoriek s nízkym počtom bakteriofágových častíc (menej než 10 častíc na platňu) sa analýza opakovala minimálne raz s použitím väčšieho objemu vzorky (1 ml).

Celkovo sa analyzovalo 200 vzoriek. Získané výsledky sú sumarizované v priložených tabuľkách. Analýza ukázala, že fágové častice H40/1 sa na odbernom mieste 1 (Vodná puklina) detegovali už o 21.30 – maximálna frekvencia výskytu bakteriofágov sa pozorovala o 21.45 a potom frekvencia fágov klesala na rádovo 10 fágov na mililiter a od 03.45 sa na tomto odbernom mieste nedetegovali žiadne fágy. Na odbernom mieste 2 (Pieskový dóm) sa prvé fágy detegovali vo vzorkách odobratých 21.45 – maximálna početnosť bakteriofágov sa pozorovala o 22.00 a potom podobne ako na odbernom mieste 1 frekvencia fágov klesala na rádovo 10 fágov na mililiter a od 06.00 sa na tomto odbernom mieste nedetegovali žiadne fágy. Na odbernom mieste 3 (Balkón) sa prvé fágy detegovali o 23.30. Na tomto odbernom

mieste sa nepozorovalo žiadne výrazne maximum v početnosti bakteriofágov. Ich počet osciloval medzi 300 až 2300 pfu na mililiter až do ukončenia stopovacej skúšky. Zaujímavý priebeh početnosti sa pozoroval na odbernom mieste 4 (Pekelný dóm), kde sa pozorovali dve maximá v početnosti bakteriofágov. Prvé fágy sa detegovali o 22.35 s maximom prietoku o 23.15, keď početnosť bakteriofágov dosiahla 2600 pfu na mililiter. Po tomto maxime početnosť bakteriofágov klesla na približne 10 pfu na mililiter o 03.00. Po tomto odbere sa početnosť bakteriofágov začala znova zvyšovať až dosiahla maximálnu početnosť 750 pfu na mililiter o 05.30 a potom ich početnosť začala klesať, až o 10.30 fágy na tomto odbernom mieste prakticky vymizli.

Na odbernom mieste 5 povrchová Demänovka nad Vyvieraním sa prvé bakteriofágy objavili o 02.00, keď dosiahli aj maximálnu početnosť približne 10 pfu na mililiter. V následných odberoch sa detegovali bakteriofágy len sporadicky s početnosťou len 1 pfu na mililiter, na hranici citlivosti použitej metódy.

V Košiciach, 21. decembra 2010



doc. RNDr. Peter Pristaš, CSc.

vedúci laboratória  
genetiky mikroorganizmov

**Analýza výskytu bakteriofága H40/1 vo vzorkách vody zo stopovacej skúšky v  
Pustej jaskyni dňa 17. 12. 2010 – 18. 12. 2010**

<b>Čas odberu</b>	<b>Počet detegovaných fágových častíc (pfu na 1 mL vzorky)</b>			
	<b>Odborné miesto 1 – Vodná puklina</b>	<b>Odborné miesto 2 – Pieskový dóm</b>	<b>Odborné miesto 3 - Balkón</b>	<b>Odborné miesto 4 – Pekelný dóm</b>
20:55			0	0
21:00			0	
21:15	0	0	0	0
21:30	12900	0	0	0
21:45	18600	11600	0	0
22:00	7200	16300	0	0
22:15	2900	9300	0	0
22:30	1210	6200	0	40
22:45	890	470	0	1040
23:00	230	1410	0	2190
23:15	710	920	0	2560
23:30	82	360	6	690
23:45	14	190	2	1010
24:00	21	52	8	720
00:15	65	81	23	660
00:30	21	47	105	150
00:45	3	32	430	34
01:00	27	13	1080	26
01:15	11	4	690	90
01:30	19	13	460	72
01:45	11	9	1190	34
02:00	8	11	1170	12
02:15	6			
02:30		2	1420	19
02:45	4			
03:00		0	2280	9
03:15	1			
03:30		1	580	310
03:45	0			
04:00		8	840	670
04:15	0			
04:30		2	1330	390
04:45	0			
05:00		12	780	560
05:15	0			
05:30		0	2160	740
05:45	0			
06:00		0	360	180

06:15	0			
06:30		0	260	210
06:45	0			
07:00		0	540	160
07:15	0			
07:30		0	670	33
07:45	0			
08:00		0	370	11
08:15	0			
08:30		0	650	5
08:45	0			
09:00		0	720	22
09:15	0			
09:30		0	1280	3
09:45	0			
10:00		1	815	2
10:15	0			
10:30		0	1180	0
10:45	0			
11:00		0	1140	0
11:15	0			
11:30		0	1190	0
11:45	0			
12:00		0	620	0
13:00	0	0		0
14:00	0	0		0
15:00	0	0		0
16:00	0	0		0
17:00	0	0		0

**Výskyt bakteriofágov na odbernom mieste č. 5 – povrchová Demänovka  
nad Vyvieraním**

<b>Čas odberu</b>	<b>Počet detegovaných fágových častíc (pfu na 1 mL vzorky)</b>
20:50	0
21:00	0
22:00	0
23:00	0
24:00	0
01:00	0
02:00	9
03:00	0
04:00	0
05:00	1
06:00	0
07:00	0
08:00	0
09:00	0
10:00	1
11:00	0
12:00	0
13:00	0
14:00	0
15:00	0
16:00	0
17:00	0