
**BADANIA MIKROBIOLOGICZNO-MINERALOGICZNE RUD Z
WYBRANYCH ZŁÓŻ POLSKI**

**MICROBIOLOGICAL AND MINERALOGICAL INVESTIGATION OF
ORES FROM SELECTED POLISH DEPOSITS**

Maciej Pawlikowski *, Maciej Walczak**, Arkadiusz Krawiec ***, Marta Wróbel*

*/ *Katedra Mineralogii, Petrografii i Geochemii Akademia Górniczo-Hutnicza, al. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków*

**/*Zakład Mikrobiologii Środowiskowej i Biotechnologii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń*

***/*Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Wydział Nauk o Ziemi, Katedra Geologii i Hydrogeologii, ul. Lwowska 1, 87-100 Toruń*

Badania zrealizowano w ramach badań statutowych AGH

Streszczenie

Wykonano badania mineralogiczno- petrograficzne oraz mikrobiologiczne skał ze złóż miedzi (Lubin), manganu (Tatry – Dolina Chochołowska) i złóż Zn-Pb (Olkusz). Oznaczono skład mineralny skał. Następnie z wnętrza dużych okazów pobrano sterylnie próbki, które rozkruszono i zalano odpowiednimi pożywkami doprowadzając do namnażania się bakterii żyjących w skałach. Otrzymane szczepy poddano badaniom mikrobiologicznym i skaningowym połączonym z chemicznymi analizami EDS wyhodowanych bakterii.

Udokumentowano występowanie następujących typów fizjologicznych bakterii:

- Skały miedzionośne: heterotroficzne bakterie tlenowe i beztlenowe; bakterie uczestniczące w przemianach związków siarki, w tym beztlenowe heterotroficzne bakterie redukujące siarczany oraz chemoautotroficzne tlenowe bakterie *Thiobacillus thiooxidans*, *Thiobacillus thioparus* a także chemoautotroficzne tlenowe bakterie utleniające żelazo Fe².
- Skały manganonośne: heterotroficzne bakterie tlenowe i beztlenowe; bakterie uczestniczące w przemianach związków siarki, w tym beztlenowe heterotroficzne bakterie redukujące siarczany oraz chemoautotroficzne tlenowe bakterie *Thiobacillus thiooxidans*, *Thiobacillus thioparus*.
- Skały ołowiowo i cynkonośne: heterotroficzne bakterie tlenowe i beztlenowe; bakterie

uczestniczące w przemianach związków siarki, w tym beztlenowe heterotroficzne bakterie redukujące siarczany oraz chemoautotroficzne tlenowe bakterie *Thiobacillus thiooxidans*, *Thiobacillus thioparus* a także chemoautotroficzne tlenowe bakterie utleniające żelazo Fe².

Słowa kluczowe: bakteriologia, mineralogia, minerały kruszcowe

Abstract:

Mineralogical –petrographical as well as microbiological investigation of rocks from Cu deposit (Lubin), Mn deposit (Tatra Mts), and Zn-Pb deposit (Olkusz) have been performed. Mineral composition of rocks devoted for microbiological examination was determined. Material for microbiological examination was taken from center of big samples to keeping sterility. Next obtained material was mixed with nutrient medium for multiplication of bacteria present in rocks. Obtained strains were examined using microbiological as well as mineralogical methods (SEM, EDS).

Following types of bacteria were determined:

- Cu bearing rocks:
- Mn bearing rocks:
- Zn-Pb bearing rocks:

Key words: bacteriology, mineralogy, ore minerals

I. Wprowadzenie

Cel i metody badań

Badania mikrobiologiczne skał złożowych m. in. mioceńskich gipsów prowadzone były już w latach 80. XX wieku (Pawlikowski, 1983). Celem prezentowanych badań było rozpoznanie szczepów bakterii żyjących w skałach kruszczośnych takich jak:

- łupek i piaskowiec miedzionośny (Lubin),
- wapienie manganonośne (kopalnie manganowe w Tatrach)
- dolomity Zn-Pb (Olkusz)

Rozpoznanie mikrobiologiczne szczepów bakterii żyjących w tych złożach stanowi element rozpoznania ich genezy. Może także w przyszłości stanowić podstawę do opracowania technologii odzysku metali z ubogich złóż z wykorzystaniem technologii mikrobiologicznych.

Wstęp

Warstwy podpowierzchniowe Ziemi stanowią znacząca część biosfery. Życie pod powierzchnią terenu rozciąga się znacznie głębiej niż przypuszczano jeszcze 30 lat temu. Głęboko pod powierzchnią ziemi, często w ekstremalnych warunkach (wysokie ciśnienie, temperatura czy

zasolenie) żyją mikroorganizmy. Według Whitman et al. (1998) około 75 – 94% organizmów prokariotycznych zasiedlających Ziemię występuje głęboko pod jej powierzchnią. Najnowsze badania wskazują także, że biomasa organizmów występujących pod powierzchnią ziemi znacznie przekracza tę znaną z powierzchni (Adhikari, Kallmeyer, 2010). Mikroorganizmy występujące pod powierzchnią ziemi często są w pełni aktywne i wpływają na kierunek oraz tempo przemian geologicznych. Mikroorganizmy te zasiedlają także wody głębinowe.

Pomimo tego, że badania mikroorganizmów zasiedlających wnętrze Ziemi należą do bardzo trudnych i kosztownych, jednakże przy obecnym stanie wiedzy nie można dalej ignorować tej części biosfery. Po raz pierwszy na świecie tego typu badania były przeprowadzone na terenie Polski i dotyczyły mikroorganizmów występujących w solankach kopalni Wieliczka (Namysłowski, 1913). W badaniach tych wykazano, że w podziemnych solankach mogą normalnie rozwijać się bakterie. Kolejne i już znacznie szersze badania przeprowadzono w oparciu o próby soli cechszczyńskich pobranych na terenie Niemiec (Dombrowski, 1963, 1966). Wyniki tych prac wskazywały, że w kryształach soli są uwięzione bakterie. Komórki te z powodu skrajnego odwodnienia nie były aktywne, ale po wprowadzeniu do podłoża hodowlanych podjęły czynności życiowe. Dombrowski (1963) w oparciu o przeprowadzone analizy przedstawił hipotezę, według której odwodnienie i równoczesne wysolenie komórek, może zachować je przy życiu nawet przez miliony lat.

Obecnie na świecie prowadzi się liczne prace zmierzające od poznania i wyizolowania mikroorganizmów zasiedlających zarówno wody głębinowe jak materiał skalny. Wyniki tych prac mają nie tylko charakter poznawczy ale przede wszystkim aplikacyjny. Z materiałów skalnych izoluje się szczepy bardzo aktywne w produkcji metanu czy wodoru (Pedersen, 1999; Krumholz, 2000) oraz takie które są zdolne do degradacji produktów ropopochodnych (Sass i Cypionka, 2004). W Polsce niestety prac takich nie ma w ogóle albo mają charakter szczątkowy. Jedne z pierwszych prac dotyczyły skał złożowych m.in. mioceńskich gipsów i prowadzone były w latach 80. XX wieku (Pawlikowski, 1983).

Celem prezentowanych badań było rozpoznanie czy w pobranym materiale skalnym występują żywe i zdolne do wzrostu komórki mikroorganizmów oraz ewentualna próba określenia przemian materii mineralnej dokonywanych przez te organizmy.

Rozpoznanie mikrobiologiczne szczepów bakterii żyjących w tych złożach stanowi element ustalenia ich genezy. Może także w przyszłości stanowić podstawę do opracowania technologii odzysku metali z ubogich złóż z wykorzystaniem technologii mikrobiologicznych

Materiały i metody

Prowadzono badania skał pochodzących z następujących złóż:

- Miedzi - łupek miedzionośny (Lubin),
- Manganu - wapienie manganowe (kopalnie Mn w Tatrach),
- Rud Zn-Pb - dolomity okruszcowane cynkiem i ołowiem (Olkusz).

Metody badań mineralogiczno- petrograficznych

Badania mikroskopowe w spolaryzowanym świetle przechodzącym wykonano dla skał objętych później badaniami mikrobiologicznymi. Prowadzono je z wykorzystaniem preparatów mikroskopowych do spolaryzowanego światła przechodzącego stosując mikroskop Firmy CE produkcji chińskiej. Badania prowadzono przy powiększeniach do 400 x. Wykonano mikrografie analizowanych skał.

Badania skaningowe obejmowały obserwacje i analizy hodowli bakteryjnych Połączono je z analizami chemicznymi wykonanymi metodą EDS. Rozpoznanie prób wykonano przy pomocy mikroskopu Geol 560 produkcji japońskiej dokumentując obserwowane zjawiska mikrografiami i widmami energetycznymi EDS składu chemicznego badanych obiektów.

Metodyka badań mikrobiologicznych

Przed przystąpieniem do analiz mikrobiologicznych zewnętrzne powierzchnie pobranego materiału skalnego poddano sterylizacji poprzez opalenie w płomieniu palnika gazowego. Następnie zachowując warunki jałowości mechanicznie rozdrobniono badane skały na fragmenty o średnicy nie większej niż 1,5 mm. Z uzyskanego drobnoziarnistego materiału odważano 6 porcji po 10g, które przenoszono do 90 ml wcześniej przygotowanych pożywek mikrobiologicznych.

Obecność tlenowych (1) i beztlenowych (2) bakterii heterotroficznych w badanych próbkach skał oznaczono stosując pożywkę R2 o składzie [g/l]:

- pepton - 0,75; ekstrakt drożdżowy - 0,5; trypton - 0,25; glukoza - 0,5; skrobia - 0,5; pirogronian sodu - 0,3; K_2HPO_4 - 0,3; $MgSO_4$ - 0,024.

W hodowlach zmierzających do wykrycia bakterii beztlenowych, po wprowadzeniu materiału skalnego powierzchnię pożywki zalewano sterylnym olejem parafinowym w celu odcięcia dopływu tlenu.

Występowanie bakterii redukujących siarczany (3) badano stosując pożywkę o składzie, baza:

- K_2HPO_4 – 0,5g; NH_4Cl – 1,0g; Na_2SO_4 – 1,0g; $CaCl_2 \times 2H_2O$ – 0,1g; $MgSO_4 \times 7H_2O$ –

2,0g; Mleczan sodu (70%) – 3,5g; Pirogronian sodu – 0,5g; Ekstrakt drożdżowy – 1,0g; H₂O – 980 ml; pH – 7,4; roztwór 2 – 10 ml (skład: FeSO₄ x 7H₂O – 0,5g); roztwór 3 – 10ml (skład: kwas askorbinowy – 0,1g; tioglikolan sodowy – 0,1g).

Roztwory 2 i 3 wyjałowiono metodą sączenia przez filtr strzykawkowy i następnie dodawano do bazy po jej sterylizacji w autoklawie. Po wprowadzeniu materiału skalnego powierzchnię pożywki zalewano sterylnym olejem parafinowym w celu odcięcia dopływu tlenu.

Za wynik dodatni badania przyjmowano wystąpienie czarnego zabarwienia pożywki, co świadczy o zredukowaniu siarczanów i siarczynów do siarkowodoru, który w połączeniu z jonami żelaza daje czarny siarczek żelaza.

Występowanie bakterii utleniających siarkę Thiobacillus thiooxidans (4) badano stosując pożywkę o składzie:

- K₂HPO₄ - 3,5; (NH₄)₂SO₄ - 0,3; MgSO₄ x 7H₂O - 0,5; FeSO₄ x 7 H₂O - 0,018; CaCl₂ - 0,25; Siarka elementarna - 5,0, pH pożywki 3,0.

Występowanie bakterii Thiobacillus thioparus (5) badano stosując pożywkę o składzie:

- Tiosarczan sodu - 5,0; K₂HPO₄ - 4,0; (NH₄)₂SO₄ - 0,4; MgSO₄ x 7H₂O - 0,5; FeSO₄ x 7 H₂O - 0,5; CaCl₂ x 6H₂O - 0,25, pH pożywki 6,0.

Występowanie bakterii utleniających Fe²⁺ (6) oznaczano stosując pożywkę o składzie:

- (NH₄)₂SO₄ – 3,0g; CaCl₂ – 0,1g; K₂PO₄ – 0,5g; MgSO₄ x 7H₂O – 0,5g; Ca(NO₃)₂ – 0,01g; H₂SO₄ (10M) – 1ml; FeSO₄ – 45,0g; pH – 3,0-3,5.

Za wynik dodatni badania przyjmowano wystąpienie rdzawego zabarwienia pożywki, co świadczy o utlenieniu żelaza Fe²⁺ do żelaza Fe³⁺.

Wszystkie hodowle inkubowano przez 14 dni w temperaturze 20 stopni C. Po tym czasie z poszczególnych hodowli pobierano próby, z których wykonywano po 2 preparaty mikroskopowe. Jeden barwiono safraniną i analizowano przy pomocy mikroskopu świetlnego i powiększeniu 1000x, w celu wykrycia obecności komórek mikroorganizmów. Drugi poddawano analizie przy zastosowaniu mikroskopii skaningowej w celu wykonania badań mineralogicznych oraz wykrycia ewentualnych zależności pomiędzy obecnymi bakteriami a przekształceniami związków mineralnych. Ponadto uzyskane hodowle przeszczepiono na świeże analogiczne jak wcześniej pożywki i prowadzono przez kolejne 14 dni. Po zakończeniu drugiego pasażu ponownie wykonano po dwa preparaty mikroskopowe, które poddano analogicznej analizie jak wcześniej.

II. Wyniki badań

Krótką charakterystyka geologiczno- mineralogiczna złóż z których pobrano materiał do badań oraz prób analizowanych skał

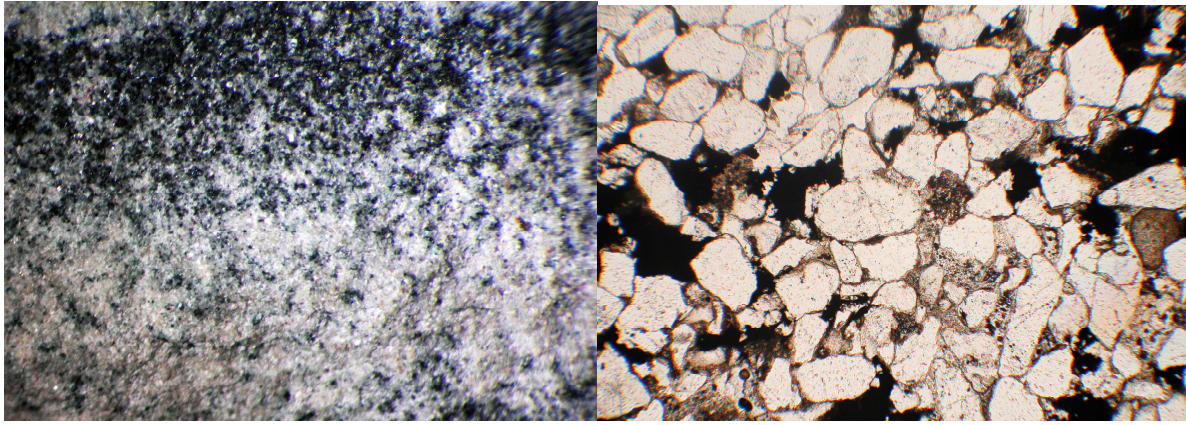
Skały z cechsztyńskiego zagłębia Lubin- Głogów

Geneza tych złóż związana jest zarówno z pierwotną jak i wtórną mineralizacją łupka miedzionośnego. Mineralizacja pierwotna jest efektem zjawisk koncentracji metali zachodzących w warunkach redukcyjnych na dnie zbiornika przed sedymentacją ewaporatów permskich. Mineralizacja wtórna jest efektem migracji zmineralizowanych metalami solanek. Te gorące solanki migrując konwekcyjnie pod łupkiem z głębokich partii obszaru centralnej Polski w płytsze rejony schładzały się. Efektem tego zjawiska było strącanie się kolejnych minerałów, mineralizujących łupek miedzionośny. Na mineralizację wtórną i pierwotną nakładały się inne liczne procesy (Kucha, Pawlikowski, 1986 i 2011; Pieczonka, 2011). Materiał do badań stanowił łupek miedzionośny i piaskowiec białego spągowca zmineralizowany siarczkami, pobrane z kopalni w Lubinie (Fot. A I, II).

Petrograficzna charakterystyka badanych skał

Złoże miedzi w Lubinie obfituje w różnorodne skały osadowe. Dominują tu jednak różne rodzaje łupka miedzionośnego, piaskowca okruszcowanego i dolomitu. Do badań wytypowano dwa rodzaje skał piaskowiec (tzw. biały spągowiec i łupek miedzionośny).

Nierudne minerały łupka miedzionośnego są praktycznie nierozpoznawalne mikroskopowo. Natomiast piaskowiec wykazuje makroskopowo rodzaj laminacji kruszcami wśród których dominuje chalkozyn (Fot. 1. I). W zależności od rejonu kopalni mogą w nim występować także inne minerały miedzi. Nadają one piaskowcowi charakterystyczną pseudolaminację, a wietrzejąc uzyskują barwę zieloną w różnych odcieniach. Obserwacje mikroskopowe wykonane w szlifach do spolaryzowanego światła przechodzącego wskazują, że kruszce lokują się głównie w przestrzeniach między ziarnami kwarcu i innych detrytycznych składników takich jako okruchy skał, skalenie czy sporadycznie łyszczki i minerały ciężkie (Fot. 1., II).



I

II

Fot. 1. I - makroskopowy obraz białego spągowca okruszczonego siarczkami miedzi (ciemne kropki). Skala 1:1. II- mikroskopowy obraz białego spągowca. Widoczne jasne ziarna kwarcu oraz ciemne ziarna kruszców tkwiące w przestrzeniach międzyziarnowych kwarcu i innych minerałów detrytycznych. Mikroskop polaryzacyjny, jeden polaroid X, powiększenie 240 x.

Skąły ze złóó manganu w wapieniach jurajskich Tatr Zachodnich

Zgodnie z danymi literaturowymi (Krajewski, Myska, 1958) pakiety wapieni manganowych znajdujĄ się w górnjej partii liasowych wapieni krynowidowych serii reglowej osłony osadowej. Natomiast występowanie rud żelaza oraz miedzi i srebra stwierdzone zostały zarówno w skałach trzonu krystalicznego jak i osłony osadowej, głównie w serii wierchowej (Jost, Paulo, 1985). Badania te dowodzą występowania głównie węglanu manganu (rodochrozyt) i tlenków manganu (manganit, piroluzyt) którym towarzyszą hematyt i getyt. Mineralizacja ma zarówno charakter pierwotny zwiĄzany z sedymentacją lub wczesną diagenezą jak i charakter wtórny. Mineralizacja pierwotna obejmuje detrytus organiczny wapieni organodetrytycznych (fragmenty koralii, muszli mięczaków i in.). Natomiast mineralizacja wtórna ma charakter żyłkowy (Pawlikowski i in. 2011)

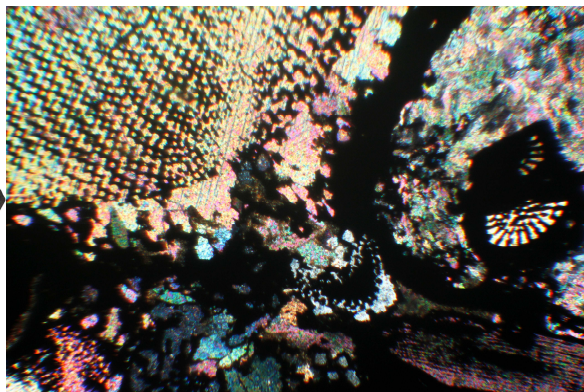
Próbki do badań pobrano ze sztolni starej kopalni manganu występujących w zboczu wzgórz Klina w Dolinie Chochołowskiej (Fot. 2 I, II).

Petrograficzna charakterystyka badanych skał

Wapień kruszonośny przeznaczony do badań to wapień okruszczony manganem i w zmiennym stopniu minerałami żelaza, głównie hematytem (Fot. 2, I). Proporcje minerałów tych dwóch metali zmieniają się w wapieniach w dosyć szerokich granicach. W badanym materiale głównie minerały manganu to manganit i piroluzyt. Sporadycznie towarzyszy im rodochrozyt.

Natomiast towarzyszące minerały żelaza to głównie hematyt, getyt i syderyt.

Obserwacje mikroskopowe w przechodzącym świetle spolaryzowanym wskazują na to, że wapienie mają charakter organodetrytyczny. Budują je fragmenty koralów i skorupki mięczaków (Fot. 2, II). Sama mineralizacja minerałami Mn-Fe ma zarówno charakter pierwotny jak i wtórny.



I

II

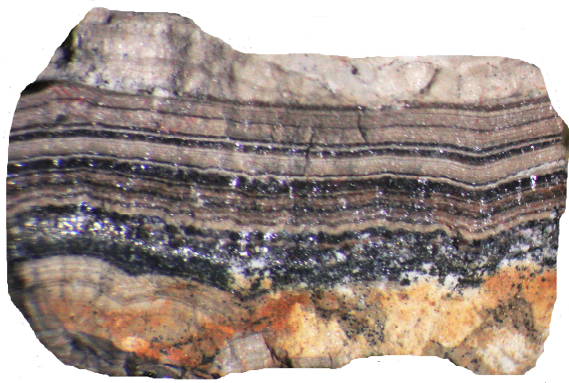
Fot 2 I- makroskopowe zdjęcie koncentracji minerałów manganu z hematytem. Skala 1:1. II – mikroskopowy obraz wapienia organodetrytycznego zbudowanego z fragmentów koralów i muszli mięczaków objętego mineralizacją manganową (czarne skupienia). Mikroskop polaryzacyjny, polaroidy X, powiększenie 240 x.

Skąły ze złoża cynku i ołowiu z triasu śląsko-krakowskiego

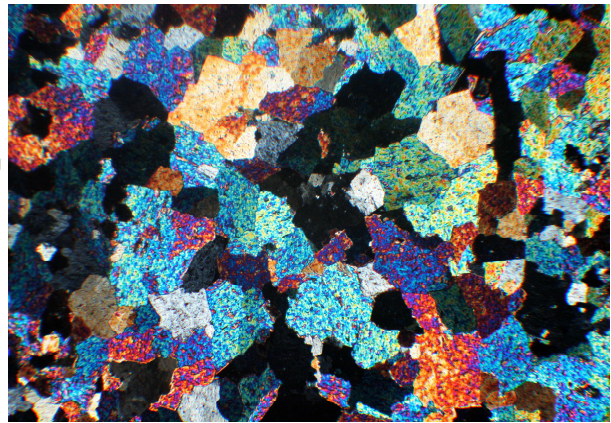
Wieloletnie badania (Sass- Gustkiewicz, 1999) wskazują że złoża Zn-Pb występujące w dolomitach triasowych mają skomplikowaną genezę. Obok zjawisk związanych z pierwotną sedymentacją występują tu zjawiska mineralizacji wtórnej, związanej z migracją zmineralizowanych solanek (Natkaniec- Nowak in., 2007). Osobne zagadnienie stanowią zjawiska związane z krasem. Próbkę skał do badań pobierane były z kopalni Pomorzany koło Olkusza.

Petrograficzna charakterystyka badanych skał

Badaniami objęto dolomity o różnym sposobie występowania mineralizacji Zn-Pb w tym dolomity o charakterze laminowanym – okruszczone galeną i sfalerytem (Fot. 3. I), w których dolomit jest holokrystaliczny i nierównokryształiczny (Fot. 3. II).



I



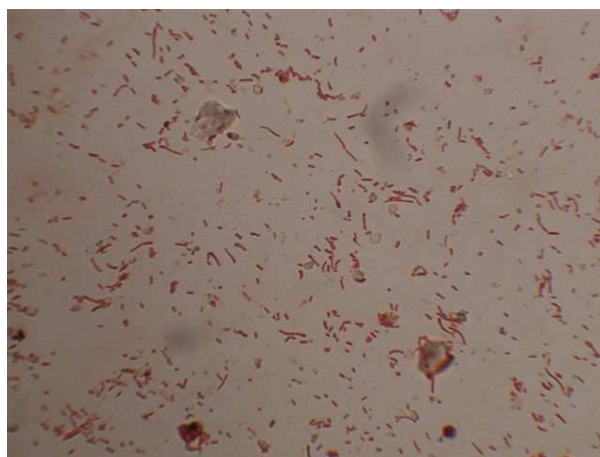
II

Fot. 3. I - laminowane koncentracje galeny i sfalerytu w dolomicie. Skala 1:1, II – mikroskopowy obraz kruszconośnego dolomitu triasowego – widoczne jego kryształy o zróżnicowanej wielkości. Mikroskop polaryzacyjny, polaroidy X, powiększenie 240 x.

II a. Wyniki badań mikrobiologicznych

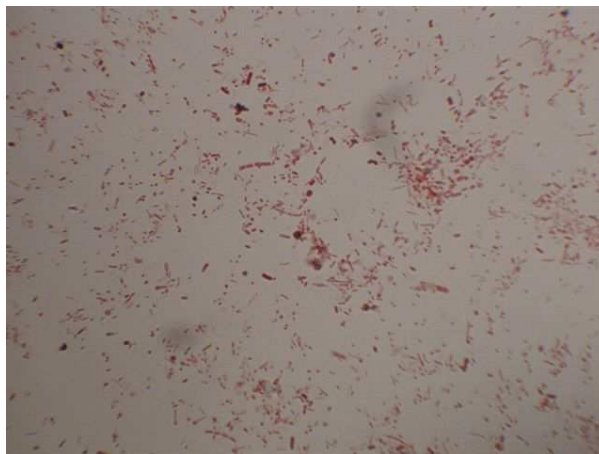
Przeprowadzone badania wykazały obecność licznych bakterii zdolnych do wzrostu w analizowanym materiale skalnym. Tlenowe i beztlenowe bakterie heterotroficzne występujące w poddanym badaniom materiale charakteryzowały się znaczną dynamiką wzrostu. W większości przypadków, już po 14 dniach inkubacji skał w pożywce obserwowano liczne komórki w hodowli.

Po 14 dniach inkubacji w odpowiednich pożywkach tlenowe bakterie heterotroficzne (Fot. 4.) stwierdzono prawie we wszystkich skałach. Wyjątek stanowiły próby o numerach 8 i 10 (Tab. 1). Wynik ten nie uległ zmianie po kolejnych 14 dniach hodowli (Tab. 2.).



Fot. 4. Fotografia mikroskopowa. Tlenowe bakterie heterotroficzne (próba 4)

Beztlenowe bakterie heterotroficzne (Fot. 5.) również były powszechne, ich obecność odnotowano we wszystkich badanych materiałach z wyjątkiem próby o numerze 8 (Tab. 1.). Podobnie jak w przypadku bakterii tlenowych tu również wynik nie uległ zmianie po kolejnych 14 dniach hodowli.



Fot. 5. Fotografia mikroskopowa. Beztlenowe bakterie heterotroficzne (próba 3).

Tabela 1. Wyniki badań obecności poszczególnych typów bakterii w badanym materiale w pierwszych hodowlach (pierwszy pasaż).

Numer próby skalnej	Obecność badanych bakterii					
	Tlenowe bakterie heterotroficzne	Beztlenowe bakterie heterotroficzne	Beztlenowe bakterie redukujące siarczany	Bakterie <i>Thiobacillus thiooxidans</i>	Bakterie <i>Thiobacillus thioparus</i>	Bakterie utleniające Fe ²⁺
1	+	+	+	-	+	-
2	+	+	+	-	-	-
3	+	+	+	-	-	-
4	+	+	+	-	-	-
5	+	+	+	-	+	-
6	+	+	+	+	+	-
7	+	+	+	-	?	-
8	-	bd	?	-	-	-
9	+ (mało)	+	?	-	bd	-
10	-	+	?	-	-	-

Legenda:

- bakterie widoczne w preparacie, - brak bakterii, ? – wynik niejednoznaczny, obecne struktury podobne do komórek bakterii, bd – brak danych

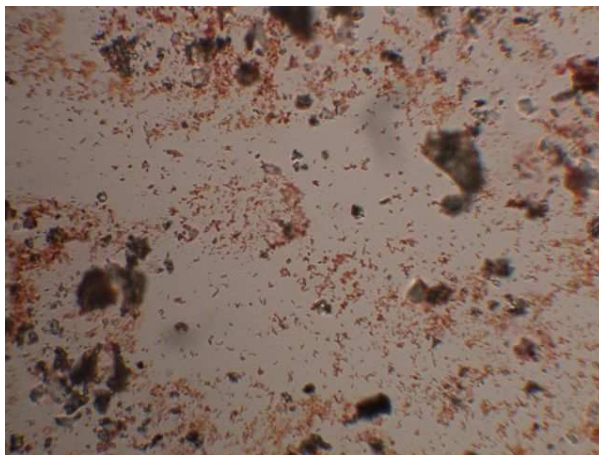
Bardzo powszechne były także bakterie redukujące siarczany (Fot. 6.). Ich obecność po 14 dniach

hodowli stwierdzono w materiałach skalnych o symbolach od 1 do 7 (Tab. 1.). W pozostałych próbach (8-10) wynik był wątpliwy, tzn. pod mikroskopem obserwowano struktury zbliżone kształtem i wielkością do komórek bakteryjnych jednak ich analiza nie pozwalała na jednoznaczne zakwalifikowanie ich do typowych bakterii. Po przeszczepieniu na świeżą pożywkę i kolejnych 14 dniach hodowli bakterie redukujące siarczany stwierdzono już we wszystkich analizowanych skałach (Tab. 2.).



Fot. 6. Fotografia mikroskopowa. Beztlenowe bakterie redukujące siarczany (próba 6) .

Znacznie mniejszą dynamikę wzrostu w analizowanych skałach stwierdzono natomiast w odniesieniu do tlenowych bakterii autotroficznych uczestniczących w przemianach związków siarki. Po pierwszych 14 dniach inkubacji obecność bakterii *Thiobacillus thiooxidans* (Fot. 7.) odnotowano tylko w hodowli zawierającej materiał skalny o symbolu 6. Podobnie w przypadku bakterii *Thiobacillus thioparus*, gdzie po 14 dniach hodowli ich obecność stwierdzono w próbach o symbolach 1, 5 i 6 (Tab. 1.). Jednak po przepasażowaniu hodowli i kolejnych 14 dniach jej prowadzenia obecność bakterii *T. thiooxidans* stwierdzono już w większości badanych prób (2 do 8 i 10). Podobnie bakterie *T. thioparus*, które po kolejnych 14 dniach inkubacji stwierdzono już we wszystkich prowadzonych hodowlach (Tab. 2.). Wskazuje to, że w badanych materiałach skalnych bakterie autotroficzne uczestniczące w przemianach siarki występują dość powszechnie, natomiast do ich wykrycia konieczny jest dość długi czas hodowli.



Fot. 7. Fotografia mikroskopowa. Tlenowe bakterie autotroficzne uczestniczące w przemianach związków siarki (próbna 6, *Thiobacillus thiooxidans*).

Zupełnie inne wyniki uzyskano w hodowlach bakterii uczestniczących w utlenianiu żelaza Fe^{2+} . Po zakończeniu pierwszej hodowli (14 dni), pomimo tego, że płyn pohodowlany miał charakterystyczny rdzawy kolor utlenionego żelaza (Fot. 8.), to w żadnej hodowli nie odnotowano obecności towarzyszących charakterystycznych bakterii.



Fot. 8. Charakterystyczny kolor utlenionego żelaza w hodowlach od PR1 do PR7 oraz PR 9.

Tabela 2. Wyniki badań obecności poszczególnych typów bakterii w badanym materiale w drugiej hodowli (drugi pasaż).

Numer próby skalnej	Obecność badanych bakterii					
	Tlenowe bakterie heterotroficzne	Beztlenowe bakterie heterotroficzne	Beztlenowe bakterie redukujące siarczany	Bakterie <i>Thiobacillus thiooxidans</i>	Bakterie <i>Thiobacillus thioparus</i>	Bakterie utleniające Fe ²⁺
1	+	+	+		+	-
2	+	+	+	+	+ b. nieliczne	-
3	+	+	+ różne	+	+	-
4	+	+	+ różne	+ pojedyncze	+ ziarniaki	-
5	+	+	+ różne	+	+ różne	-
6	+	+	+ siarkowe	+	+ różne	-
7	+	+	+ siarkowe	+ różne	+ różne	-
8	-	-	+ różne	+ siarkowe	-+ b. nieliczne	-
9	+	+	+		+	+
10	-	+	+	+?	+	-

Legenda:

- bakterie widoczne w preparacie, - brak bakterii, ? – wynik niejednoznaczny, obecne struktury podobne do komórek bakterii, bd – brak danych

Sugeruje to, że proces utleniania żelaza przebiegał nie na drodze mikrobiologicznej, lecz czysto chemicznej. Po kolejnych 14 dniach hodowli (drugi pasaż) obecność bakterii *Thiobacillus ferrooxidans* stwierdzono w jednym przypadku. Była to hodowla zawierająca materiał skalny o symbolu 9, czyli pochodzący z kopalni cynku i ołowiu.

II b. Wyniki badań hodowli bakteryjnych wykonane metodą SEM - EDS

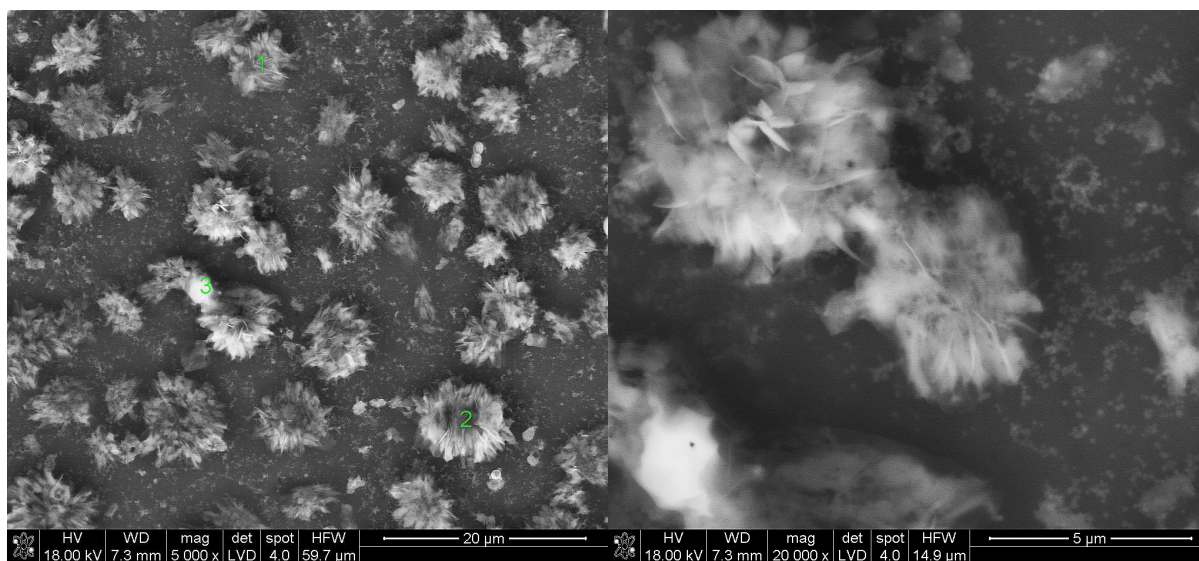
W tej części opracowania zaprezentowano wyłącznie wyniki badań hodowli w których rozpoznano bakterie lub zmineralizowane formy, które mogą być komórkami bakteryjnymi, na których z pożywki wykryły różnoraki wtórne związki zacierające pierwotny obraz morfologii bakterii.

Skały z cechsztyńskiego Zagłębia Lubin-Głogów

Wyniki badań mineralogicznych komórek namnożonych bakterii

Hodowle tlenowych bakterii heterotroficznych

Obserwacje prowadzone metoda SEM pozwoliły stwierdzić, że bakterie te w hodowli stały się prawdopodobnie zalążkami krystalizacji wtórnych siarczanów i węglanów, będących pochodnymi pożywki wykorzystanej do namnażania bakterii (Fot. 9C, 9D, Fig. 1).



9C

9D

Fot. 9 C – kryształy siarczanu wapnia i sodu pokrywające komórki bakterii heterotroficznych. 1D – powiększony obraz bakterii pokrytych krystaliczną „szczotką” siarczanową. SEM, powiększenie wg. skali

Label A: 1PR1 002p3

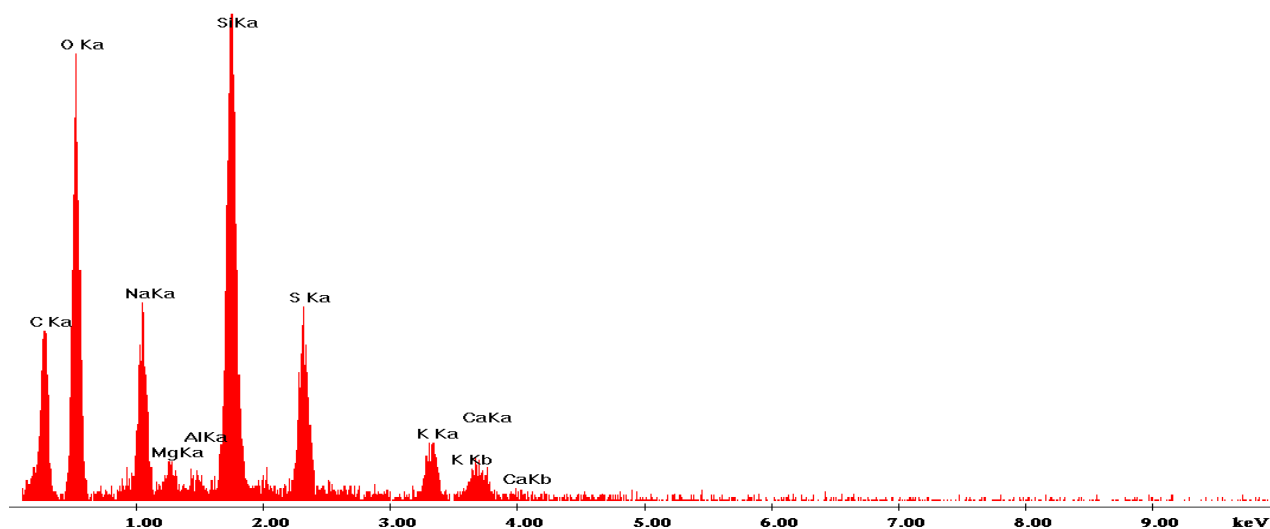
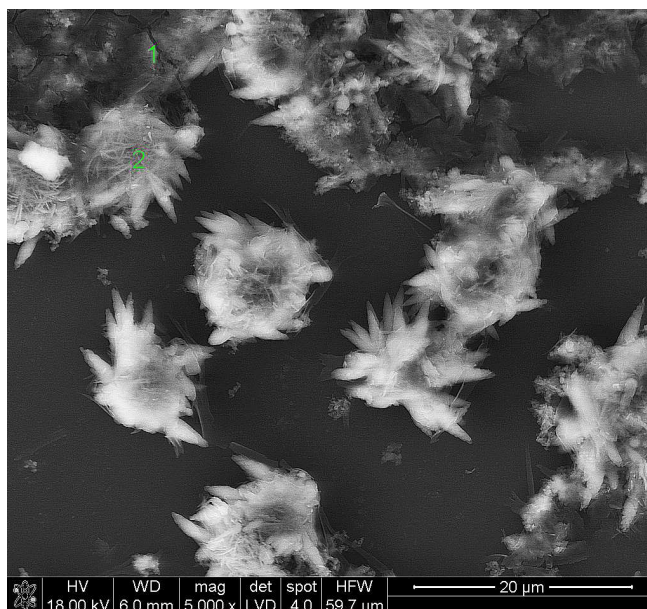


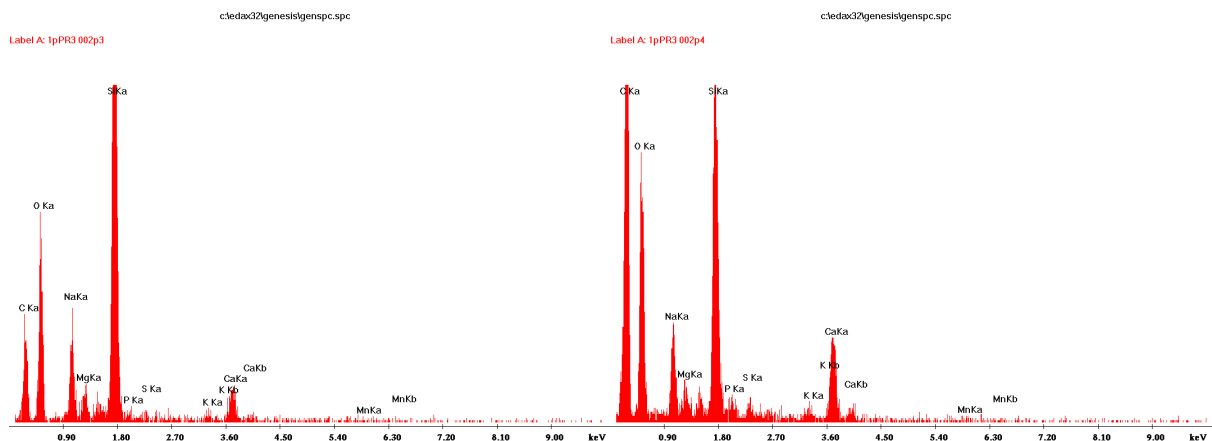
Fig.1A Widmo energetyczne EDS kryształków siarczanowych pokrywających powierzchnie bakterii pokazanych na Fot. 1C, 1D

Hodowle beztlenowych bakterii heterotroficznych

Również w tej hodowli krystalizujące wtórnie siarczany i węglany pokryły komórki bakteryjne, które stały się centrami wtórnej krystalizacji (Fot. 10 E). Obecność wtórnych związków potwierdziły analizy EDS wykonane na kryształkach pokrywających bakterie (Fig. 1B, C)



Fot. 10. E Zmineralizowane siarczanami sodu i wapnia bakterie heterotroficzne.
SEM, powiększenie wg. skali



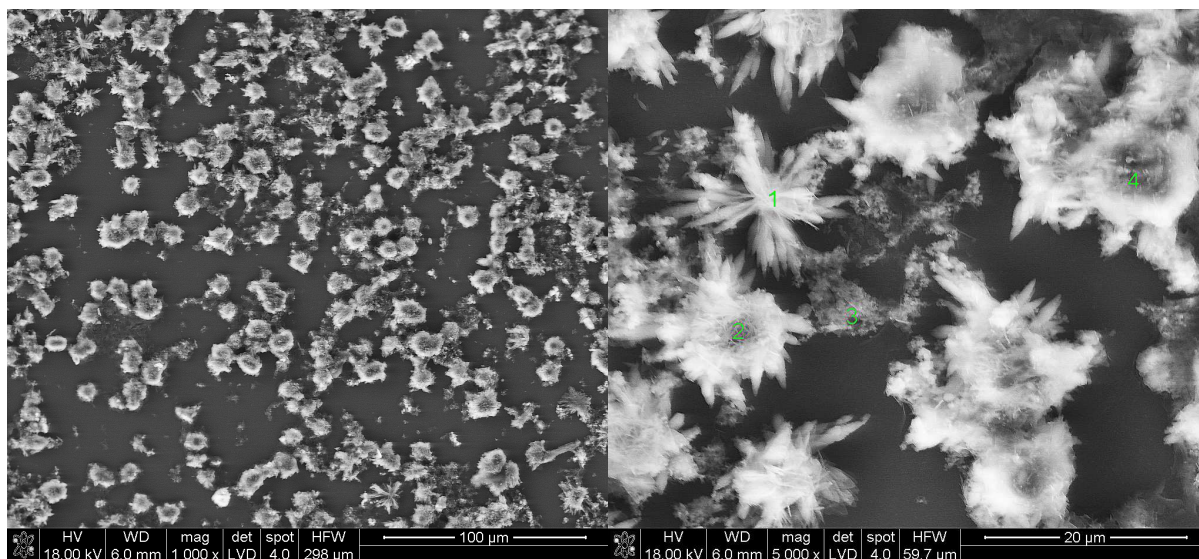
1B

1C

Fig.1B,1C – widma energetyczne EDS kryształów narastających na bakteriach

Hodowle beztlenowych bakterii redukujących siarczany i wytwarzających siarkowodor

Mikroskopowe obserwacje SEM wskazują, że hodowłach namnożyła się znaczna ilość bakterii redukujących siarczany wytwarzających siarkowodor. Jednak komórki bakteryjne i w tym przypadku pokryły wtórnie krystalizujące na nich kryształy związków wykrystalizowane z pożywki (Fot. 11F i 1G). Analizy EDS wykazały, obok innych pierwiastków także obecność krzemionki, której część pochodzi prawdopodobnie z skały mineralizowanej minerałami miedzi (Fig. 1D).



11F

11G

Fot. 11F i 11G Kryształy siarczanów Ca i Na zawierającymi ślady miedzi, wtórnie pokrywające komórki bakterii redukujących siarczany (patrz fig. 1D). SEM - powiększenie wg. skali.

Label A: 2PR1 003p4

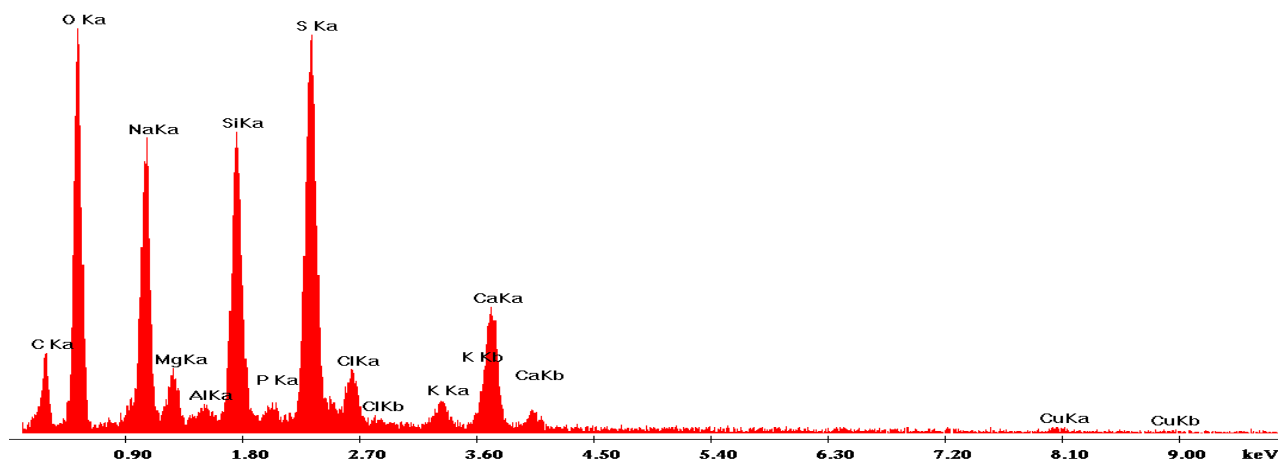
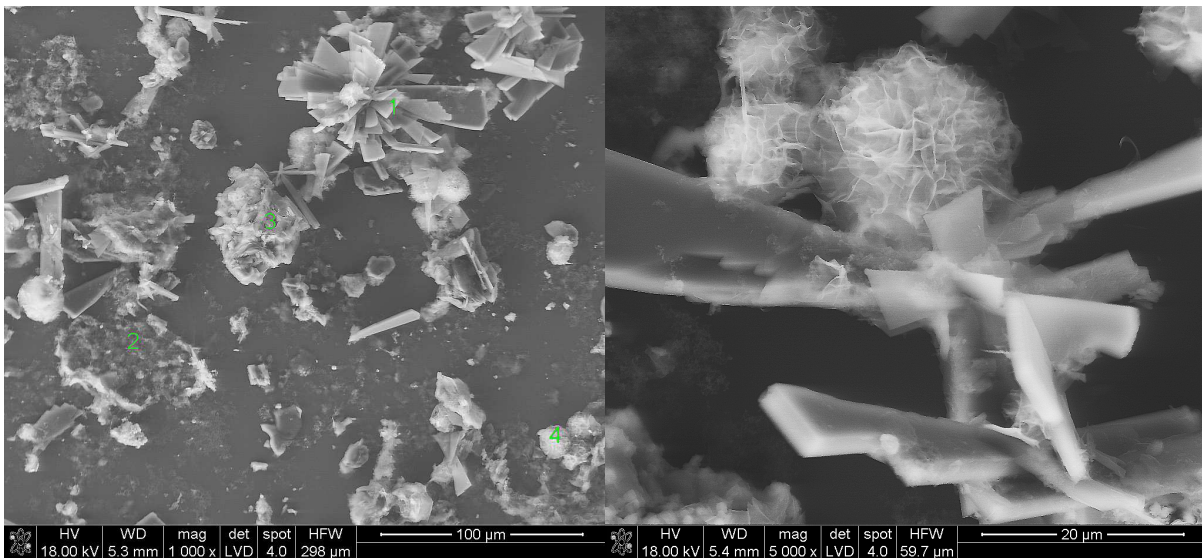


Fig. 1D Widmo energetyczne EDS kryształków wykrystalizowanych na bakteriach redukujących siarczany (Fot. 11F, 11G). Obok pierwiastków głównych (Ca, Na, S, Si, O widoczne domieszki K, P, Mg, Al, oraz ślady Cu.

Hodowle tlenowych bakterii *Thiobacillus thiooxidans* (uczestniczą w przemianach siarki, silnie zakwaszają środowisko)

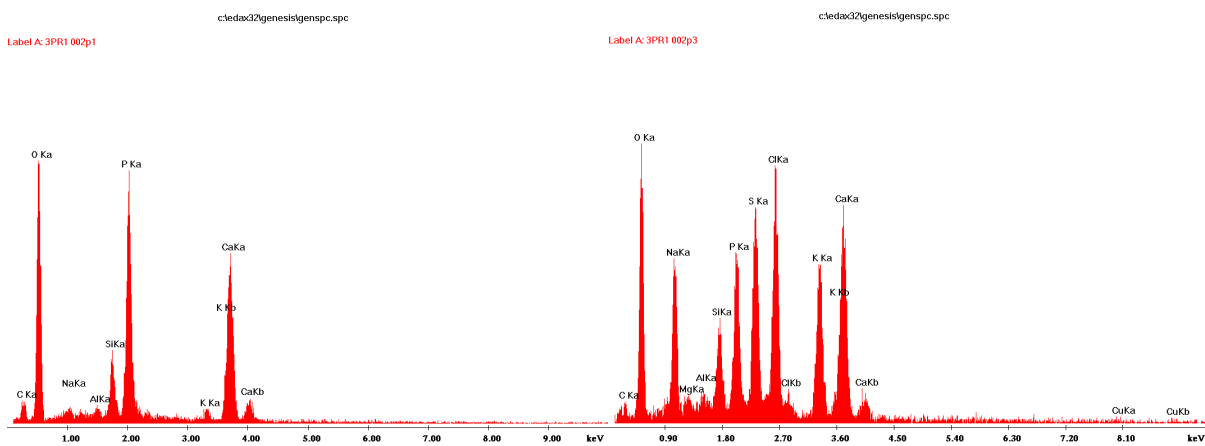
Obserwacje SEM nie wykazały w tej hodowli obecności komórek bakterii. Wyniki tej hodowli zostały jednak zamieszczone ponieważ jej efektem końcowym okazały się zarówno pięknie wykształcone choć drobne kryształy siarczanów wapnia (gipsu) jak też siarczanów i węglanów sodu i potasu (Fot. 12H, 12I). Obecność kuleczkowatych form (Fot. 12I) może sugerować występowanie pojedynczych komórek bakteryjnych pokrytych wtórnymi kryształkami między innymi fosforanów (Fig. 1E i F).



12H

12I

Fot. 12H Wtórne kryształy gipsu i fosforanów (patrz fig.1E). 12I kryształy fosforanów współwystępujące z gipsem towarzyszące badanym bakteriom. SEM. Powiększenie wg. skali.



1E

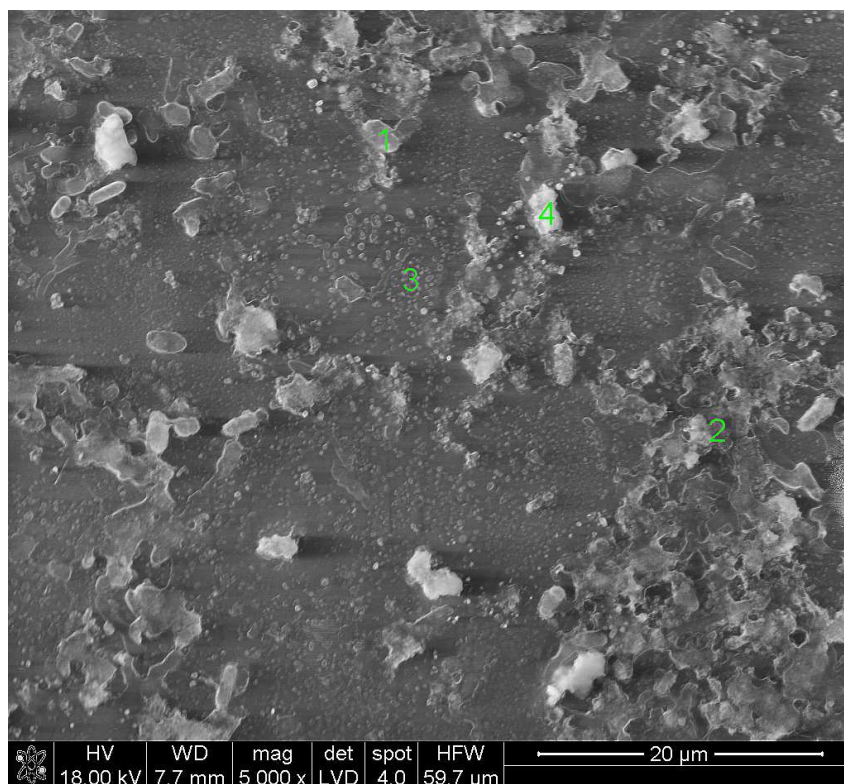
1F

Fig. 1E - widmo energetyczne EDS kryształów gipsu współwystępujących i pokrywających niektóre bakterie. 1F – widmo EDS agregatu kryształów fosforanów i siarczanów współwystępujących z badanymi bakteriami

Skąły ze złóż manganu w wapieniach jurajskich Tatr Zachodnich

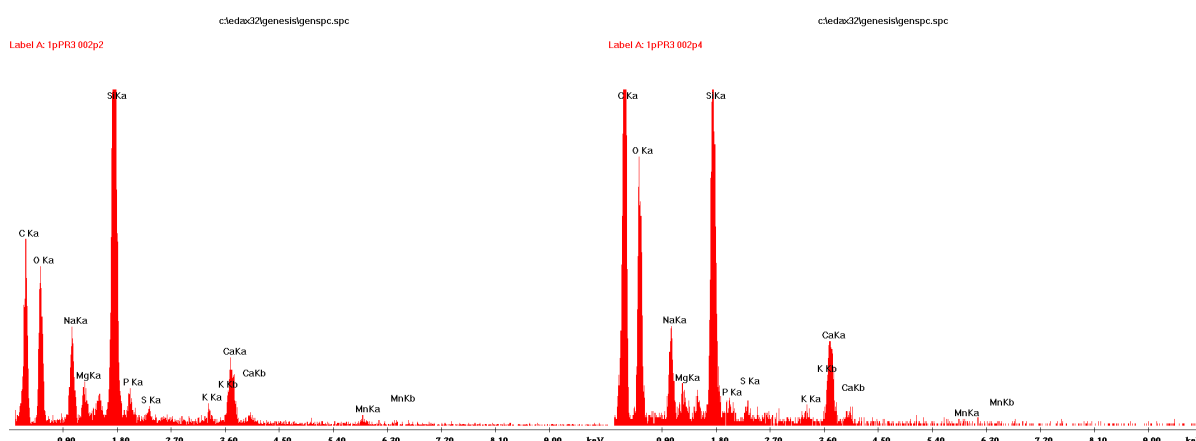
Hodowle beztlenowych bakterii heterotroficznych

Namnażanie tych bakterii doprowadziło do pojawienia się hodowli znacznych ilości wydłużonych elipsoidalnych komórek bakteryjnych (Fot. 13C).



Fot. 13C- pojedyncze bakterie o cylindrycznym kształcie otrzymane z hodowli. Punkty 1-3 wykonania analiz chemicznych metodą EDS. SEM- powiększenie wg. skali.

Energetyczne widma EDS z powierzchni komórek bakteryjnych ujawniły znaczną ilość C, O, Ca, Na, Mg, P oraz ślady Mn (Fig. 2b, C). Na tym etapie badań trudno jest ustalić, które z pierwiastków związane są bezpośrednio z bakteriami a które są pochodną pożywek. Wydaje się, że obecność manganu związana jest z tatrzańskim wapniem manganowym.



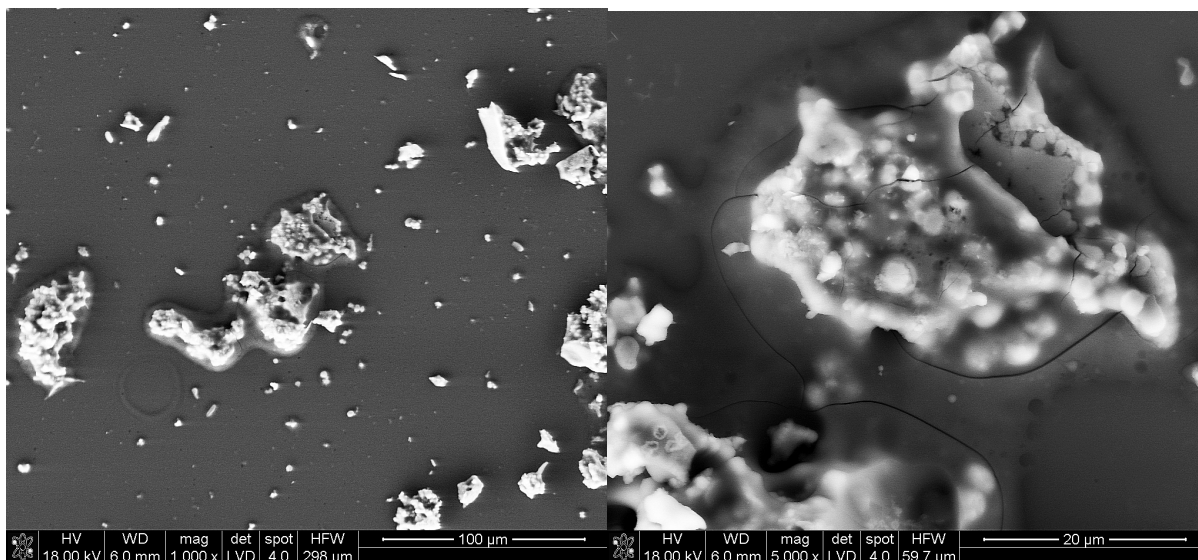
2B

2C

Fig. 2B –widmo EDS powierzchni jednej bakterii pokazanej na Fot. 13 (punkt 1).. Widoczne piki energetyczne C, O, Ca, Na, Mg, P oraz ślady Mn. 2C Widmo EDS substancji znajdującej się w pobliżu bakterii. Na obu widmach pik Si pochodzi od szkła na którym znajduje się próbka.

Hodowle *Thiobacillus ferroxidans*, przekształcają związki siarki i żelaza.

Hodowle tych bakterii dały efekty trudne do jednoznacznej interpretacji. W agregatach skryształizowanej pożywki mineralnej napotkano na kuleczkowate formy (Fot. 14 I, J), które jednak okazały się trudne w obserwacjach i nie dały jednoznacznych podstaw do ich precyzyjnej i jednoznacznej identyfikacji.

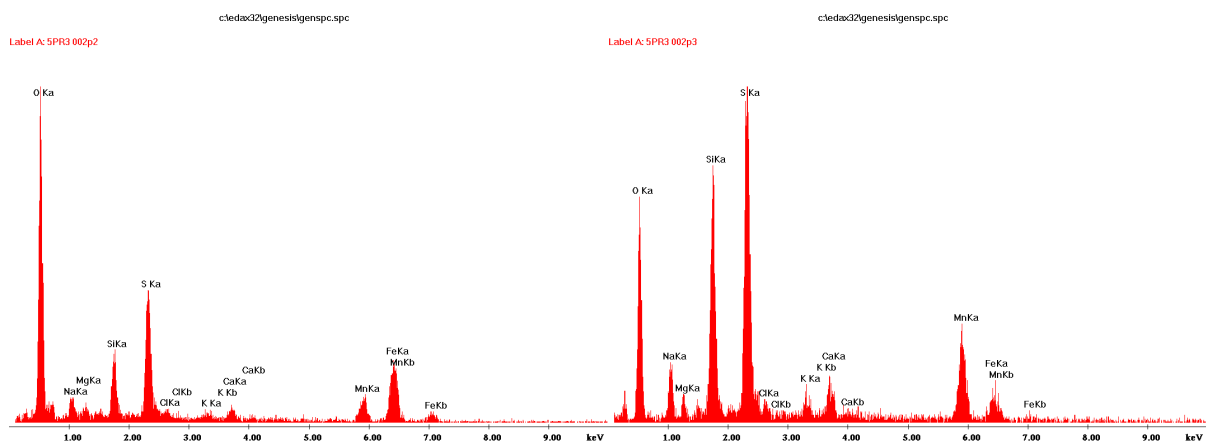


14I

14J

Fot. 14. I - fragmenty hodowli widziane przy małym powiększeniu. 14J – kuleczkowate formy tkwiące w wysuszonej pożywce (bakterie?). SEM – powiększenie wg skali.

Analizy chemiczne obserwowanych obiektów wykonane metodą EDS wykazały ich znacznie zróżnicowany skład. Dotyczy to zwłaszcza zmian ilościowych analizowanych pierwiastków. Inne bowiem ich ilości występują między kuleczkowatymi formami (bakteryjnymi?) a inne na ewentualnych bakteriach (Fig. 14I, 14J). Ta selektywność rozmieszczenia pierwiastków może być związana z ewentualnymi różnicami w podkładzie na którym krystalizowały badane związki, a to może potwierdzać, że wewnątrz kuleczkowatych form stanowią bakterie. Zjawisko to zostanie sprawdzone w toku dalszych badań.



2I

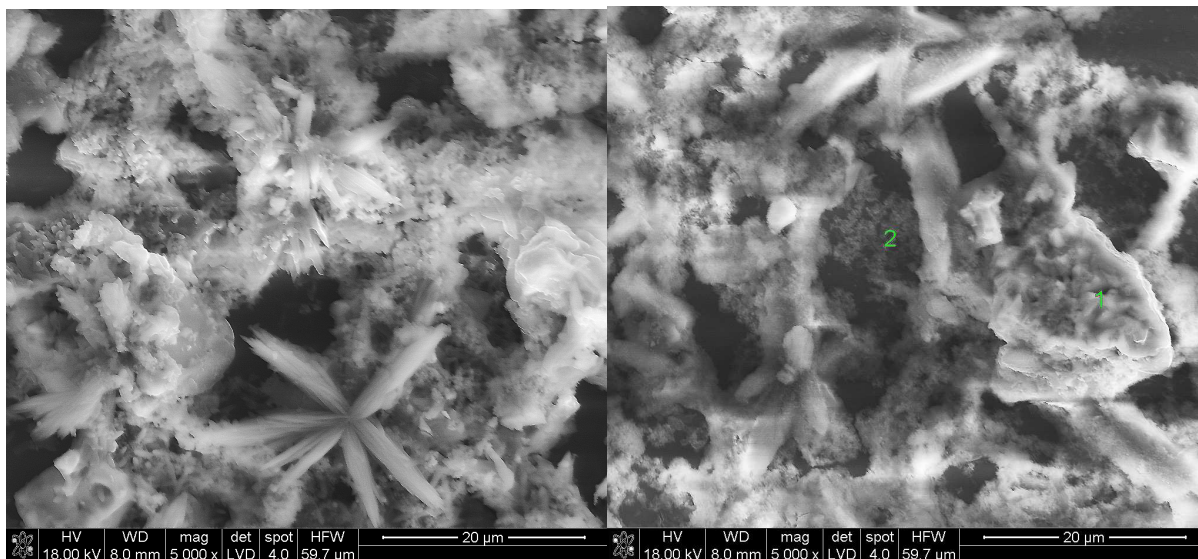
2J

Fig. 2I – widmo energetyczne EDS wysuszonej pożywki użytej do hodowania bakterii *Thiobacillus ferroxidans*. 2J – widmo energetyczne kuleczkowatej formy (bakterii?) pokazanej na Fot. 14J. Widoczne mocne wzbogacenie w S a także w Mn i Fe. SEM- powiększenie wg skali

Skały ze złoża cynku i ołowiu z triasu śląsko-krakowskiego

Hodowle beztlenowych bakterii redukujących siarczany i wytwarzających siarkowodór

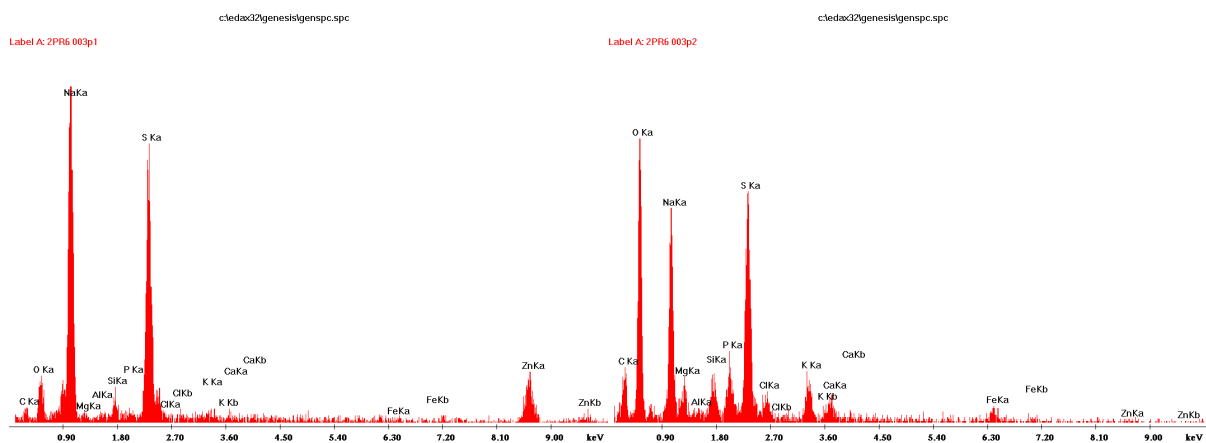
Krystalizacja siarczanów, węglanów i fosforanów jako substancji pochodnych po pożywce spowodowała całkowite zatarcie obrazu hodowli.



15E

15F

Fot. 15E - mikroskopowy obraz przekrystalizowanej pożywki użytej do hodowli bakterii redukujących siarczany i wytwarzających siarkowodór. Widoczne piękne mikrokryształki siarczanu sodu. 15F – mikroskopowy obraz obszaru wysuszonej pożywki wzbogaconego w substancje organiczną. SEM – powiększenie wg skali.



2E

2F

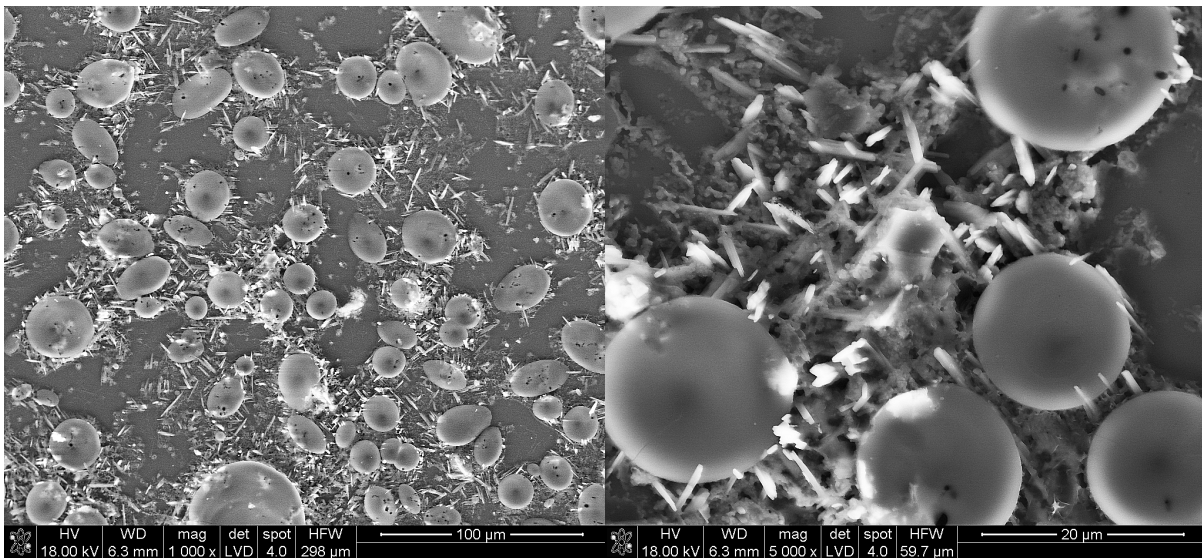
Fig. 2E – widmo energetyczne EDS krystalicznego siarczanu sodu wykrystalizowanego z pożywki (Fot. 15E). 2F – widmo energetyczne EDS partii pożywki wzbogaconej w substancje organiczną (patrz Fot. 15F).

Stosowanie nawet dużych powiększeń (Fot. 15E, 15F) w mikroskopie skaningowym nie pozwoliło na obserwacje komórek bakteryjnych, które jak dowodzą badania mikrobiologiczne powinny znajdować się w preparatach. Obserwowane na widmach EDS energetyczne piki poszczególnych pierwiastków (Fig. 2E i 2F) dowodzą chemicznego zróżnicowanie pożywki w tym występowania miejsc wzbogaconych w substancje organiczną (Fig. 2F) co może być związane z obecnością mineralizowanych bakterii.

Hodowle *Thiobacillu thioparus*

(uczestniczą w przemianach siarki w środowisku obojętnym)

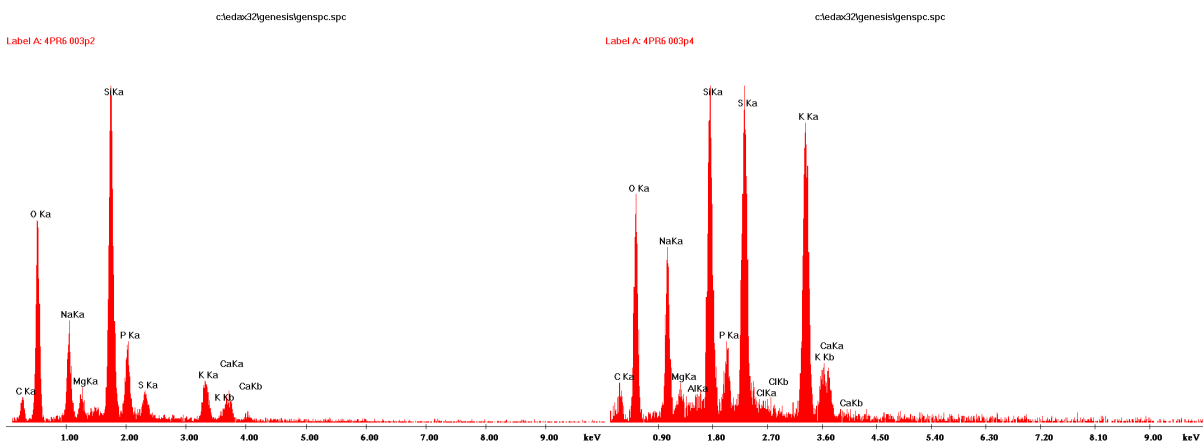
Badania tej hodowli dały bardzo interesujące wyniki. Otrzymano bowiem liczne koncentracje nieidentyfikowalnych form sferycznych, którym towarzyszy niewielka ilość substancji mineralnej wykrystalizowanej z pożywki (Fot. 16I, 16J). Same bakterie pokryte są cienkim „filmem” zawierającym P, K oraz Ca i Na. Kryształki tej substancji o pokroju igiełkowym (Fot. 16J) reprezentują siarczany potasu i sodu.



16I

16J

Fot. 16I – obraz biologicznych form obecnych w hodowli bakterii *Thiobacillu thioparus*. 16J - obraz tych samych form (bakterii?) widziany przy większym powiększeniu. W tle widoczne mikrokryształki, które wykrystalizowały z pożywki. SEM – powiększenie wg skali.



2I

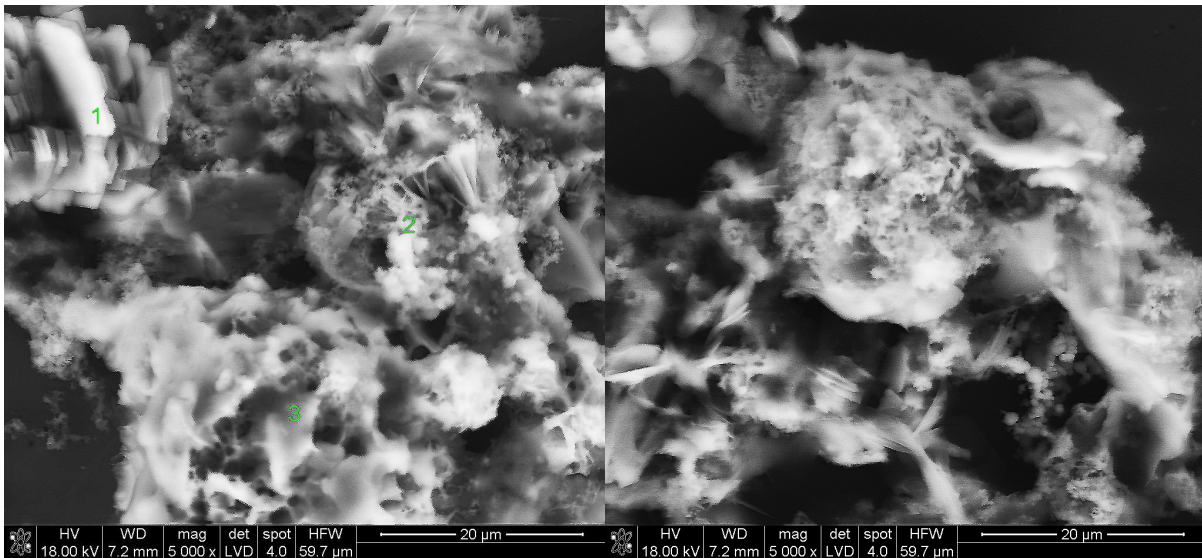
2J

Fig. 2I – widmo energetyczne EDS z powierzchni kryształu pokazanego na fot. 16I. 16J- widmo energetyczne EDS w krystalicznego tła (pik energetyczny Si pochodzi -podobnie jak we wszystkich analizach EDS- od szkiełka na którym znajduje się preparat)

Hodowle *Thiobacillus ferroxidans*, przekształcają związki siarki i żelaza,

Identyfikacja tej grupy bakterii metodą SEM - EDS okazała się w przygotowanych preparatach niejednoznaczna. Obserwowane obrazy ujawniły pożywkę w różnych stanach jej krystalizacji (Fot. 2K, 2L). Pomimo stwierdzenia metodami mikrobiologicznymi występowania w hodowlach bakterii *Thiobacillus ferroxidans* nie udało się ich rozpoznać w obserwacjach mikroskopowych SEM. Co prawda obserwowano agregatowe, sferyczne skupienia w których występuje niewielka ilość węgla,

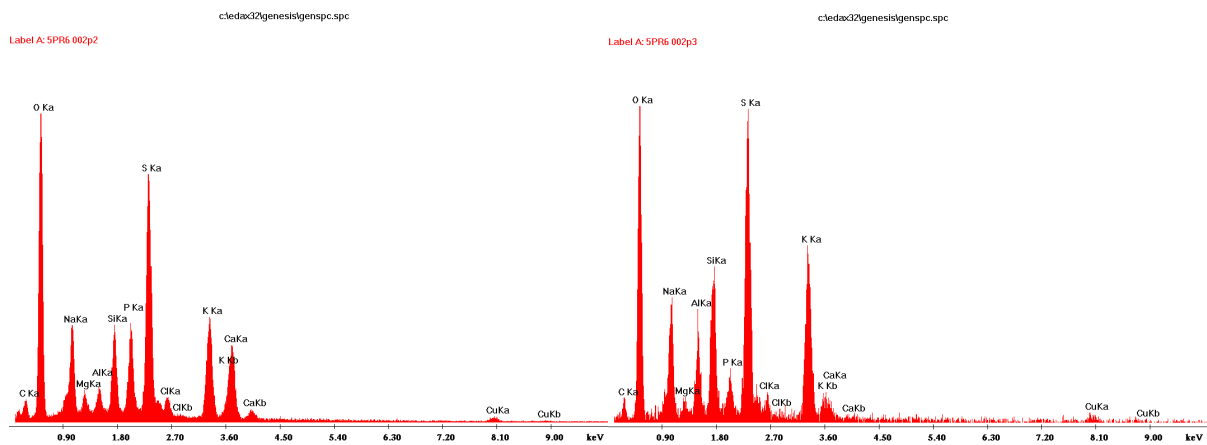
(Fig. 2K, 2L) ale jego obecność jest raczej związana z pożywką niż z fragmentami komórek bakteryjnych



17K

17L

Fot 17K, 17L – mikroskopowy obraz wysuszonej pożywki zawierającej porowate agregaty mineralno- organiczne o kształcie zbliżonym do kuleczek. SEM – powiększenie wg. skali



2K

2L

Fig. 2K - widmo energetyczne EDS substancji pokazanej w punkcie 2 (Fot. 17K).

2L - widmo energetyczne EDS substancji pokazanej w punkcie 3 (Fot. 17K).

III. Podsumowanie i wnioski

Otrzymane wyniki należy traktować jako wstępne i dyskusyjne. Zasadnicze uwagi dotyczą preparatyki materiału hodowlanego przeznaczonego do badań mineralogicznych prowadzonych z użyciem mikroskopu skaningowego i analizatora EDS. Próbki do tych badań powinny być pozbawione pożywki. Jej obecność w preparatach zaciera obraz hodowanych bakterii. Mimo, że są one identyfikowane w mikroskopie biologicznym w preparatach mineralogicznych ich obraz ulega zatarciu i nie jest jednoznaczny

Uzyskane dane pozwalają na sformułowanie wstępnych uwag. Z analiz mikrobiologicznych i mineralogicznych wynika, że w badanych złożach Cu, Mn i Zn-PB występują różne bakterie.

W łupku miedzionośnym i białym spągowcu obserwowano szereg mikrokryształicznych form utworzonych z pożywek najprawdopodobniej na bakteriach, które mogły stanowić centra krystalizacji dla tych substancji.

Zidentyfikowano bakterie:

A - heterotroficzne bakterie tlenowe

B - heterotroficzne bakterie beztlenowe

C - beztlenowe bakterie redukujące siarczany

D - bakterie tlenowe *Thiobacillus thiooxidans*

E - bakterie *Thiobacillus thioparus* - uczestniczą w przemianach siarki w środowisku obojętnym

F - bakterie *Thiobacillus ferrooxidans*, przekształcające związki siarki i żelaza,

Sz szczególnie obficie namnożyły się bakterie z hodowli A, B, C i E – w mniejszym stopniu bakterie hodowli D i F

W złożu Mn z jurajskich wapieni organodetrytycznych Tatr Zachodnich rozpoznano w hodowlach bakterie :

B - heterotroficzne bakterie beztlenowe

C - beztlenowe bakterie redukujące siarczany *Thiobacillus thiooxidans*

Najliczniejsza populacje bakterii obserwowano w hodowli C.

W pozostałych hodowlach (D, E, F) nie potkano bakterii lub napotkano wyłącznie ich pojedyncze okazy (hodowla A).

W złożu rud Zn-Pb z Olkusza rozpoznano w hodowlach następujące bakterie;

A - heterotroficzne bakterie tlenowe –

B - heterotroficzne bakterie beztlenowe

C - beztlenowe bakterie redukujące siarczany

E - bakterie *Thiobacillu thioparus* - uczestniczą w przemianach siarki w środowisku obojętnym

Szczególnie obfitą kolonię bakterii *Thiobacillu thioparus* otrzymano w hodowli E.

Nie rozpoznano bakterii w hodowlach :

D - bakterie tlenowe *Thiobacillus thiooxidans*

F - bakterie *Thiobacillus ferroxidans*, przekształcają związki siarki i żelaza,

choć rozpoznano w tych dwóch pożywkach pojedyncze, trudne do identyfikacji formy organiczne.

W związku z pewną niejednoznacznością niektórych wyników koniecznym jest kontynuowanie. Istotnym jest także prowadzenie tego typu badań mikrobiologiczno-mineralogicznych pod kątem rozpoznania możliwości poszczególnych szczepów bakterii do kumulacji wybranych metali i ich wykorzystania w przemyśle wydobywczym i przeróbce.

Literatura

Dombrowski H., 1963. Bacteria from Paleozoic salt deposits. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 108: 453-460.

Dombrowski H., 1966. Geological problems in the question of living bacteria in Paleozoic salt deposits. In *Second Symposium on Salt*, Vol. 1. Rau, J.L. (ed.). Cleveland, Ohio: Northern Ohio Geological Society: 215-219

Jost H., Paulo A., 1985. Złóża kopalin, dawne górnictwo i przemysł. Mapa 1:50000. *Atlas TPN*, Zakopane-Kraków.

Krajewski R., Myszkowski J., 1958 Wapnienie manganowe w Tatrach między Doliną Chochołowską a Lejową. *Biul. IG*, 126.

Kucha H., Pawlikowski M., 1986 Two-brine model of the genesis of strata -bound Zechstein deposits /Kupferschifer type/, Poland. *Mineralium Deposita* v. 21, str. 70-80.

Kucha H., Pawlikowski M., 2011 Badania genezy cechsztyńskich złóż miedzi w Polsce. *Geologia* z. T, 36, z. 4, str. 513-539.

Namysłowski B., 1913 – Über unbekannte halophile Mikroorganismen aus dem Innern des Salzbergwerkes Wieliczka. *Bull. Int. Acad. Sci. Krakow*, Series B: 88-104.

Natkaniec-Nowak L., Pawlikowski M., Sikora M., Tarkowski J., 2007 Szybkość wzrostu kryształów galeny z kopalni Bolesław koło Olkusza (region śląsko-krakowski). *Przeł. Geol.* V. 55, nr 6, str. 98-502.

Pawlikowski M., 1983 Studium mineralogiczno-petrograficzne produktów przeobrażeń gipsów mioceńskich w złożu siarki Wydrza. *Prace Miner.* nr 72, str. 1-59.

Pawlikowski M., Wróbel M., Trzaska P., 2011 Wstępne mineralogiczno- petrograficzne opracowanie zagadnień związanych z historycznym górnictwem rud manganu w Tatrach. *Materiały Konferencyjne Tatrzańskie Warsztaty Geologiczne*. Zakopane 13-16.10.2011r. str. 87.

Pedersen K., Ekendahl S., 1990 . Distribution and activity of bacteria in deep granitic groundwaters of southeastern Sweden. *Microbial. Ecol.*, 20: 37–52.

Pieczonka J., 2011. Prawidłowości w rozmieszczeniu minerałów kruszcowych w złożu rud miedzi na monoklinie przedsudeckiej. Wydawnictwo AGH..

Sass-Gusktkiewicz M., 1999. Die Blei-Zink-Sulfidvererzung in Oberschlesien (Polen) als ein Beispiel für Paläokarst-Phänomene[The Upper Silesian {Zn-Pb} sulfide ore deposits (Poland) as an example of paleokarst phenomena].S 519-529.

Sass H., Cypionka H., 2004 – Isolation of sulfate-reducing bacteria from the terrestrial deepsubsurface and description of *Desulfovibrio cavernae* sp. *Nov Systematic and Applied Microbiology*, 27: 541-548.

Whitman W.B., Coleman D.C., Wiebe W.J., 1998 – Prokaryotes: The unseen majority. *Proc. Nat. Acad. Sc. USA*, 95: 6578–6583.