

Mikroorganizmy w solankach mezozoiku Nizy Polskiego

Maciej Walczak¹, Arkadiusz Krawiec²



M. Walczak

A. Krawiec

Microorganisms in the brines of the Mesozoic strata from the Polish Lowland. *Prz. Geol.*, 62: 420–423.

Abstract. The paper presents the results of the research into the distribution of microorganisms in brines with the TDS (total dissolved solids) concentration of 40–80 g/dm³, located in the Paleozoic platform of the Polish Lowland. Water samples were collected from boreholes extracting water from the Jurassic and Triassic aquifers. The bacteria were detected in all water samples although the total number of microorganisms in the water samples ranged from about $11 \cdot 10^3$ to more than $40 \cdot 10^3$ cells, while their viability ranged from 13% to 100%. The samples contained both heterotrophic and chemoautotrophic, aerobic, and anaerobic bacteria as well as bacteria participating in the transformation of iron and sulphur compounds.

Keywords: microorganisms, bacteria, brines, mineral waters, Polish Lowland

Życie pod powierzchnią Ziemi występuje znacznie głębiej, niż przypuszczano jeszcze 30 lat temu. Często na dużych głębokościach i w ekstremalnych warunkach (wysokie ciśnienie, temperatura czy zasolenie) żyją mikroorganizmy, które zasiedlają także wody podziemne. Są to głównie bakterie i archeony (wbrew nazwie nieco młodsze od bakterii w ewolucyjnej skali czasu). Wyniki pierwszych, historycznych badań wskazywały, że ogólna liczba mikroorganizmów w wodach podziemnych często przekracza 10^6 komórek na mililitr. Natomiast próby hodowli nie zawsze kończyły się powodzeniem, choć w wielu przypadkach liczebność mikroorganizmów hodowlanych była wysoka i sięgała tysięcy komórek na mililitr wody (Fredrickson i in., 1989; Sinclair & Ghiorse, 1989).

Według Whitmana i in. (1998) ok. 75–94% organizmów prokariotycznych żyje głęboko pod powierzchnią Ziemi, w ekstremalnych warunkach. Wyniki najnowszych badań wskazują także, że biomasa organizmów występujących pod powierzchnią Ziemi znacznie przekracza biomasa organizmów z powierzchni (Adhikari & Kallmeyer, 2010). Mikroorganizmy te często są w pełni aktywne i wpływają na kierunek oraz tempo przemian geologicznych. Badania mikrobiologiczne materiału geologicznego mają coraz częściej cel aplikacyjny. Poszukiwane są unikatowe, odznaczające się nietypowymi cechami i właściwościami mikroorganizmy, które mogłyby być wykorzystane w ochronie środowiska lub w przemyśle (przykładowo bakterie zdolne do oczyszczania ścieków zawierających związki uranu – Jroundi i in., 2007).

Badania z zakresu geomikrobiologii na obszarze Polski prowadzono bardzo rzadko. Celem wykonanych prac było stwierdzenie, czy i w jakim stopniu solanki występujące w warstwach mezozoicznych na Nizy Polskiej są zasiedlone przez mikroorganizmy.

OBSZAR BADAŃ

Według podziału regionalnego wód mineralnych wody analizowanego obszaru, obejmującego północno-zachodnią i centralną część Polski, należą do prowincji platformy paleozoicznej. Występują tu duże struktury geologiczne

o przebiegu NW-SE, takie jak synklinorium brzeżne, antyklinorium środkowopolskie czy synklinorium szczecińsko-lódzko-miechowskie. Formacja salinarna cechsztynu miała duży wpływ na tworzenie się wód mineralnych, szczególnie w strefach ługowania soli ze struktur halokinetycznych. Największe zasoby wód mineralnych znajdują się tutaj w osadach kredy dolnej, jury oraz triasu. Dominują wody chlorkowo-sodowe, które często są eksploatowane do celów leczniczych (np. Świnoujście, Grudziądz, Kamień Pomorski, Kołobrzeg, Połczyn-Zdrój czy Ciechocinek).

Budowa geologiczna i tektonika uskoku obszaru, a szczególnie antyklinorium kujawsko-pomorskiego, przyczyniają się do ascencji zmineralizowanych wód chlorkowych, które niekiedy pojawiają się na powierzchni terenu lub w jej pobliżu. Zjawiska takie znane są np. z rejonu Kamienia Pomorskiego i Kołobrzegu, a także z okolic Łęczycy, Kowala czy Ciechocinka (Kolago, 1964; Dowgiałło, 1971; Krawiec, 1999). W centrum Kołobrzegu, na Wyspie Solnej, znajdują się obecnie źródła solankowe nr 18 i 35 o mineralizacji ok. 51 g/dm³.

MATERIAŁY I METODY BADAŃ

Badania przeprowadzono na próbkach wody (solanki) z sześciu różnych ujęć (oznaczonych kolejnymi literami – A, B, C, D, E i F) o głębokości 100–1700 m z obszaru synklinorium brzeżnego oraz antyklinorium środkowopolskiego. Do analiz pobrano solanki typu Cl–Na o mineralizacji 40–80 g/dm³ (tab. 1). Część spośród badanych wód stosowana jest do rekreacji i w balneoterapii w basenach i wannach. Wody te znajdują się w strefie utrudnionej wymiany i są dobrze izolowane od powierzchni terenu.

Wodę do badań mikrobiologicznych pozyskano bezpośrednio z zaworu na głowicy otworu. Przed pobraniem próbek wodę stagnującą w instalacji spuszczone, a zawór wyjąłono przez opalenie go płomieniem palnika gazowego. Następnie pobrano próbki wody o objętości 1,0 dm³ bezpośrednio do jałowych butelek szklanych. W laboratorium oznaczono:

- ogólną liczbę mikroorganizmów (OLM),
- żywotność komórek mikroorganizmów,

¹ Zakład Mikrobiologii Środowiskowej i Biotechnologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, ul. Lwowska 1, 87-100 Toruń; walczak@umk.pl.

² Katedra Geologii i Hydrogeologii, Wydział Nauk o Ziemi, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, ul. Lwowska 1, 87-100 Toruń; arkadiusz.krawiec@umk.pl.

Tab. 1. Parametry fizykochemiczne próbek wody
Table 1. Physicochemical parameters of the water samples

Parametr Parameter		Miejscowość (próbka) / Locality (sample)					
		Ciechocinek (A)	Grudziądz (B)	Kołobrzeg (C)	Kołobrzeg (D)	Kołobrzeg (E)	Połczyn-Zdrój (F)
Substancje rozpuszczone Total dissolved solids		44 000	77 000	60 200	60 400	55 100	75 000
Ca ²⁺		1320	2400	2160	2020	1940	3100
Mg ²⁺		490	960	700	690	705	870
Na ⁺		14 700	25 500	19 900	20 100	18 000	24 000
K ⁺		163,2	197	150	140	115	55
Fe ²⁺		1,3	10,5	16,2	8	10,8	3,4
HCO ₃ ⁻		356	190	230	250	232	60
SO ₄ ²⁻	[mg/dm ³]	97	510	330	360	295	3100
Cl ⁻		26 230	46 080	36 300	36 500	33 300	42 700
F ⁻		0,6	0,3	–	0	–	0,15
I ⁻		2,1	3,5	4,7	3,5	5,4	2,2
Br ⁻		7,4	98	77	100	125	195
Związki siarki Sulphur compounds S(II) H ₂ S + HS		0,9	wyczuwalny zapach siarkowodoru distinct smell of hydrogen sulphide	–	–	–	–
pH	[–]	6,9	6,2	7,2	6,9	6,9	7,8
Eh	[mV]	10,8	48,7	–5,2	16,5	14,4	–35,9
Głębokość ujęcia Depth of intake	[m]	750	1600	300	200	100	1200
Typ wody / Water type		Cl–Na, I	Cl–Na, I, Fe	Cl–Na, I, Fe	Cl–Na, I	Cl–Na, I, Fe	Cl–Na, I

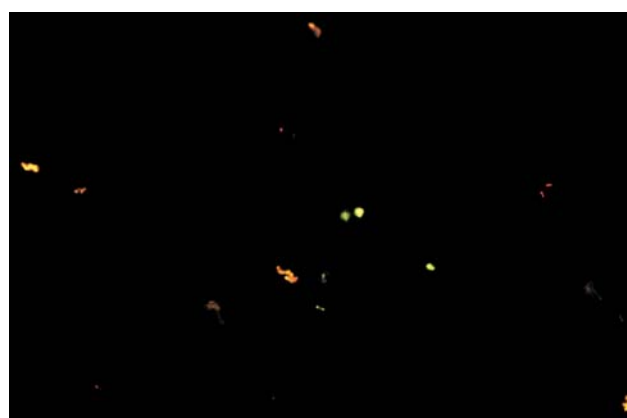
– liczebność tlenowych i beztlenowych bakterii heterotroficznych i chemoautotroficznych (jako jtk – liczbę jednostek tworzących kolonie),

– występowanie i liczebność bakterii utleniających żelazo oraz bakterii redukujących siarczany (jako NPL – najbardziej prawdopodobną liczbę).

Ogólną liczbę mikroorganizmów oznaczono, licząc je pod mikroskopem epifluorescencyjnym. Żywotność komórek mikroorganizmów w badanych próbkach wody ustalono metodą barwienia Live/Dead (Invitrogen). W wyniku zastosowanej metody komórki żywe zostały wybarwione na kolor zielony, natomiast martwe na kolor czerwony lub pomarańczowy (ryc. 1). Liczebność tlenowych i beztlenowych bakterii heterotroficznych oznaczono na podłożu Plate Count Agar, stosując posiew wgłębny. Hodowle inkubowano przez 20 dni. Liczebność tlenowych i beztlenowych bakterii chemoautotroficznych w badanych próbkach wody oznaczono z użyciem pożywki mineralnej na bazie wody pochodzącej z danego ujęcia.

Występowanie i liczebność bakterii utleniających żelazo oznaczono na pożywce o składzie: (NH₄)₂SO₄ – 3,0 g, CaCl₂ – 0,1 g, K₂PO₄ – 0,5 g, MgSO₄ · 7H₂O – 0,5 g, Ca(NO₃)₂ – 0,01 g, H₂SO₄ (10M) – 1 ml, FeSO₄ – 45,0 g i pH wynoszącym 3,0–3,5. Za dodatni wynik badania przyjmowano wystąpienie rdzawego zabarwienia pożywki, co świadczy o utlenieniu żelaza Fe²⁺ do Fe³⁺.

W przypadku bakterii redukujących siarczany zastosowano pożywkę płynną o składzie: baza (K₂HPO₄ – 0,5 g, NH₄Cl – 1,0 g, Na₂SO₄ – 1,0 g, CaCl₂ · 2H₂O – 0,1 g, MgSO₄ · 7H₂O – 2,0 g, mleczan sodu o stężeniu 70% – 3,5 g, pirogronian sodu – 0,5 g, ekstrakt drożdżowy – 1,0 g, H₂O – 980 ml; pH – 7,4), roztwór 2 – 10 ml (FeSO₄ · 7H₂O – 0,5 g), roztwór 3 – 10 ml (kwas askorbinowy – 0,1 g, tioglikolan sodowy – 0,1 g). Roztwory 2 i 3 wyjałowiono



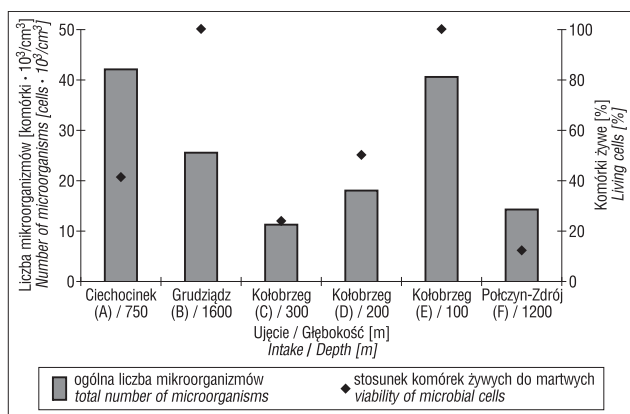
Ryc. 1. Mikroorganizmy w solance (komórki żywe – kolor zielony, komórki martwe – kolor pomarańczowy)

Fig. 1. Microorganisms in the brine (live cells – green color, dead cells – orange color)

metodą sączenia przez filtr strzykawkowy i następnie dodano do bazy po jej sterylizacji w autoklawie. Po zaszczerpieniu do każdej próbki wprowadzono po 2 ml sterylnego oleju parafinowego w celu odcięcia dopływu tlenu. Za dodatni wynik 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.

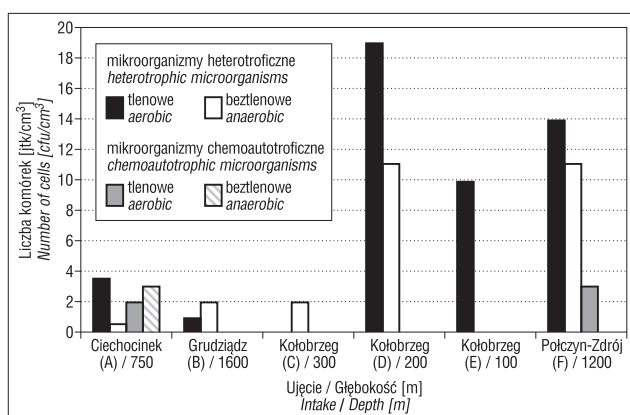
Poszczególne hodowle mikroorganizmów były prowadzone w warunkach termicznych odpowiadających temperaturze wody z danego ujęcia.

Ogólną liczbę mikroorganizmów w badanych próbkach wody przedstawiono na rycinie 2. Liczba ta zmienia się w zakresie od kilkunastu tysięcy do kilkudziesięciu



Ryc. 2. Ogólna liczba mikroorganizmów oraz stosunek komórek żywych do martwych w próbkach wody

Fig. 2. Total number of microorganisms and the viability of microbial cells in the water samples



Ryc. 3. Liczebność tlenowych i beztlenowych mikroorganizmów heterotroficznych oraz chemoautotroficznych w próbkach wody

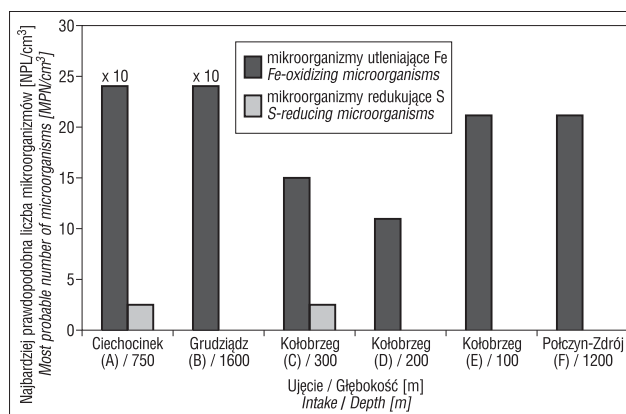
Fig. 3. Number of aerobic and anaerobic heterotrophic and chemoautotrophic microorganisms in water samples

tysiący komórek w 1 cm³ wody. Najwyższą OLM stwierdzono w ujęciu A i było to 42,1 · 10³ komórek/cm³, zaś najniższą w ujęciu C – 11,1 · 10³ komórek/cm³. Żywotność komórek mikroorganizmów w wodzie z badanych ujęć była wysoka. W wodzie z ujęć B i E 100% obserwowanych komórek było żywych. Najniższą żywotność komórek odnotowano w wodzie z ujęcia F – tylko 13%.

Liczebność mikroorganizmów heterotroficznych była dość niska we wszystkich badanych ujęciach (ryc. 3). W wodzie z ujęcia D stwierdzono największą liczbę tlenowych mikroorganizmów heterotroficznych (19 jtk/cm³), natomiast w wodzie z ujęcia C nie stwierdzono ich w ogóle. Najwięcej mikroorganizmów beztlenowych zdolnych do tworzenia koloni na zastosowanym podłożu odnotowano w wodzie z ujęć D i F (11 jtk/cm³). W wodzie z ujęcia E nie stwierdzono tych mikroorganizmów.

Mikroorganizmy chemoautotroficzne wykryto tylko w wodzie z ujęć A i F (ryc. 3). W wodzie z ujęcia A liczebność tlenowych mikroorganizmów chemoautotroficznych wyniosła 2 jtk/cm³, natomiast liczebność beztlenowych – 3 jtk/cm³. W wodzie z ujęcia F wśród mikroorganizmów chemoautotroficznych występowały tylko komórki zdolne do wzrostu w warunkach tlenowych. Ich liczebność wyniosła 3 jtk/cm³.

We wszystkich badanych próbkach wody stwierdzono obecność bakterii zdolnych do utleniania żelaza. Największą ich liczebność odnotowano w wodzie z ujęć A i B



Ryc. 4. Najbardziej prawdopodobna liczba mikroorganizmów utleniających Fe i redukujących S w próbkach wody

Fig. 4. Most probable number of Fe-oxidizing and S-reducing microorganisms in the water samples

(NPL wyniosła 240/cm³). W pozostałych próbkach wody liczebność tych bakterii była co najmniej 10 razy mniejsza (ryc. 4). Bakterie redukujące siarczany i inne utlenione formy siarki wykryto tylko w wodzie z ujęć A i C (ich liczebność była bardzo mała, NPL wyniosła 2,5/cm³).

DYSKUSJA

Po raz pierwszy na świecie badania mikrobiologiczne solanek zostały przeprowadzone na terenie Polski i dotyczyły mikroorganizmów występujących w kopalni Wieliczka (Namysłowski, 1913). Przedstawione w niniejszej pracy wyniki wskazują, że w solankach pochodzących z warstw mezozoicznych Niżu Polskiego występują liczne mikroorganizmy. Największą ich liczbę stwierdzono w wodzie z ujęć A i E (ponad 40 · 10³ komórek/cm³). Uzyskane wyniki są zgodne z danymi z innych prac, w których podawana OLM bardzo często osiąga wartości rzędu 10⁴ komórek/cm³ (Lovley & Goodwin, 1988; Pedersen & Ekendahl, 1990; Krumholz, 2000; Sass & Cypionka, 2004). W przypadku wielu typów wód podziemnych może być to wielkość graniczna ze względu na bardzo niskie stężenia węgla organicznego (Lovley & Goodwin, 1988; Fry i in., 1997).

Liczebność tlenowych i beztlenowych mikroorganizmów heterotroficznych w badanych próbkach wody była bardzo niska. W wodzie z ujęcia D stwierdzono najwięcej mikroorganizmów zdolnych do wzrostu na podłożach zawierających związki węgla organicznego. Łącznie było ich tylko 30 jtk/cm³, z czego większość stanowiły komórki rozwijające się w warunkach tlenowych. Pozornie jest to niemożliwe, gdyż w warunkach, w jakich występują badane wody, nie ma wolnego tlenu. Jednak znaczna część bakterii to organizmy względnie tlenowe lub względnie beztlenowe, co oznacza, że mogą one rozwijać się zarówno w obecności tlenu, jak i wtedy, kiedy go brakuje. Bakterii tlenowych nie stwierdzono jedynie w wodzie z ujęcia C. Tak znikoma liczebność bakterii heterotroficznych w tego typu środowiskach jest skutkiem niedostatecznej ilości związków odżywczych (Sand, 2003).

Z badanych próbek wody wyhodowano także mikroorganizmy autotroficzne, rozwijające się wyłącznie w obecności związków mineralnych, przy czym mikroorganizmy te wyhodowano tylko z wody pobranej z ujęć A i F. Liczebność komórek tych mikroorganizmów była jednak znikoma – zaledwie po kilka jtk w 1 cm³ wody.

Ogólnie ilość komórek zdolnych do wzrostu w badanych wodach jest bardzo niewielka, co wynika z tego, że znaczna część mikroorganizmów należy do mikroorganizmów niehodowlanych, tj. nie wykazuje zdolności do wzrostu na podłożach mikrobiologicznych. Problem ten szczególnie dotyczy próbek wody pochodzącej z głębi Ziemi czy oceanów i został opisany m.in. przez Krumholza (2000).

W badanych próbkach wody stwierdzono także obecność autotroficznych bakterii utleniających żelazo. Ponieważ w wodzie znajdują się znaczne ilości żelaza w formie Fe^{2+} (tab. 1), obecność tych bakterii wydaje się naturalna. Jednak z drugiej strony należą one do ścisłych tlenowców (Brock, 1997) i ich występowanie w wodach podziemnych, pozbawionych dostępu do tlenu, jest zastanawiające. Ponadto wyniki analizy chemicznej badanych wód wskazują, że proces biologicznego utleniania jonów Fe^{2+} w warunkach, jakie panują w górotworze, musi być całkowicie lub prawie całkowicie zahamowany. W przeciwnym wypadku w krótkim czasie nastąpiłoby całkowite utlenienie żelaza Fe^{2+} do Fe^{3+} . W związku z tym nie można wykluczyć, że bakterie te nie występują w badanych wodach głębinowych, ale skolonizowały rury, którymi woda wypływa na powierzchnię, i z tego powodu zostały wykryte.

Obecność bakterii beztlenowych redukujących siarczany i siarczyny stwierdzono tylko w wodach z ujęć A i C (ryc. 4), natomiast jony SO_4^{2-} , które są przez te bakterie redukowane, występują we wszystkich badanych ujęciach (tab. 1). Produktem metabolizmu tych mikroorganizmów jest siarka pierwiastkowa lub siarkowodor. Obecność H_2S potwierdzono w wodzie z ujęcia A, co może być związane z występującymi w niej bakteriami. Powstający H_2S może reagować z jonami Fe^{2+} , w wyniku czego powstaje piryt (FeS_2). Przekształcenia te powinny prowadzić do zmniejszenia stężenia wolnych jonów Fe^{2+} oraz SO_4^{2-} . Znajduje to odzwierciedlenie w składzie chemicznym wody z ujęcia A, w której stężenie jonów Fe^{2+} jest najniższe (tab. 1). W przypadku ujęcia C dane nie wskazują na obecność H_2S w wodzie i brakuje informacji o obecności siarki pierwiastkowej. Z kolei w wodzie z ujęcia B H_2S jest wyczuwalny, ale nie stwierdzono występowania bakterii redukujących siarczany. Ujemny wynik oznaczania tych bakterii może jednak wynikać z niedoskonałości metod badawczych, na co zwrócili uwagę Adhikari i Kallmeyer (2010). Według tych autorów bakterie redukujące siarczany można wykryć metodą hodowlaną tylko wtedy, gdy zachodzi synteza enzymów kodowanych przez geny związane z redukcją siarczanów. W wyniku badań solanek z okolic Berlina, które przeprowadzili Saas i Cypionka (2004), we wszystkich próbkach stwierdzono obecność bakterii redukujących siarczany. Autorzy ci zastosowali jednak przednamnażanie mikroorganizmów, co znacznie zwiększało liczebność komórek w badanym materiale. Z tego powodu rezultatów ich badań nie można bezpośrednio odnieść do wyników zamieszczonych w niniejszej pracy.

WNIOSKI

Przedstawione wyniki wskazują, że wody głębinowych poziomów wodonośnych Niżu Polskiego, podobnie jak na całym świecie, są zasiedlone przez mikroorganizmy. We

wszystkich analizowanych próbkach wody występowały aktywne mikroorganizmy.

Liczba bakterii heterotroficznych w badanych próbkach solanki była bardzo niska. Znikoma liczebność tych bakterii jest prawdopodobnie skutkiem niedostatecznej ilości związków odżywczych lub wynika z występowania mikroorganizmów niehodowlanych.

W badanych próbkach wody stwierdzono także liczne mikroorganizmy autotroficzne (woda z ujęć A i F), w tym bakterie utleniające żelazo. W próbkach wody z ujęć A i C występują również bakterie beztlenowe redukujące siarczany i siarczyny.

Wyniki tych i przyszłych badań mogą ułatwić zrozumienie przemian geochemicznych, które zaszły w minionych epokach geologicznych, a także i tych, które zachodzą obecnie.

Autorzy dziękują Recenzentom za konstruktywne uwagi.

LITERATURA

- ADHIKARI R.R. & KALLMEYER J. 2010 – Detection and quantification of microbial activity in the subsurface. *Chem. Erde*, 70(S3): 135–143.
- BROCK T.D. 1997 – Prokaryotic diversity: bacteria. [W:] Madigan M.T. i in. (red.) *Biology of microorganisms*, 8th edition. Prentice-Hall International, Inc., New Jersey: 635–740.
- DOWGIAŁŁO J. 1971 – Studium genezy wód zmineralizowanych w utworach mezozoicznych Polski północnej. *Biul. Geol. Wydz. Geol. Uniw. Warszaw.*, 13: 133–224.
- FREDRICKSON J.K., GARLAND T.R., HICKS R.J., THOMAS J.M., LI S.W. & MCFADDEN K.M. 1989 – Lithotrophic and heterotrophic bacteria in deep subsurface sediments and their relation to sediment properties. *Geomicrobiol. J.*, 7: 53–66.
- FRY N.K., FREDRICKSON J.K., FISHBAIN S., WAGNER M. & STAHL D.A. 1997 – Population structure of microbial communities associated with two deep, anaerobic, alkaline aquifers. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 1498–1504.
- JROUNDI F., MERROUN M.L., ARIAS J.M., ROSSBERG A., SELENSKA-POBELL S. & GONZÁLEZ-MUÑOZ M.T. 2007 – Spectroscopic and microscopic characterization of uranium biomineralization in *Myxococcus xanthus*. *Geomicrobiol. J.*, 24: 441–449.
- KOLAGO C. 1964 – Wody mineralne województwa szczecińskiego i perspektywy ich wykorzystania. *Prz. Zach.-Pom.*, 5: 65–85.
- KRAWIEC A. 1999 – Nowe wyniki badań izotopowych i chemicznych wód leczniczych Ciechocinka. *Prz. Geol.*, 47: 255–260.
- KRUMHOLZ L.R. 2000 – Microbial communities in the deep subsurface. *Hydrogeol. J.*, 8: 4–10.
- LOVLEY D.R. & GOODWIN S. 1988 – Hydrogen concentrations as an indicator of the predominant terminal electron-accepting reactions in aquatic sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 52: 2993–3003.
- NAMYSŁOWSKI B. 1913 – Über unbekannte halophile Mikroorganismen aus dem Innern des Salzbergwerkes Wieliczka. *Bull. Int. Acad. Sci. Krakow, Ser. B*, 3/4: 88–104.
- PEDERSEN K. & EKENDAHL S. 1990 – Distribution and activity of bacteria in deep granitic groundwaters of southeastern Sweden. *Microb. Ecol.*, 20: 37–52.
- SAND W. 2003 – Microbial life in geothermal waters. *Geothermics*, 32: 655–667.
- SASS H. & CYPIONKA H. 2004 – Isolation of sulfate-reducing bacteria from the terrestrial deep subsurface and description of *Desulfovibrio cavernae* sp. nov. *Sys. Appl. Microbiol.*, 27: 541–548.
- SINCLAIR J.L. & GHIORSE W.C. 1989 – Distribution of aerobic bacteria, protozoa, algae and fungi in deep subsurface sediments. *Geomicrobiol. J.*, 7: 15–31.
- WHITMAN W.B., COLEMAN D.C. & WIEBE W.J. 1998 – Prokaryotes: the unseen majority. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 95: 6578–6583.

Praca wpłynęła do redakcji 13.08.2013 r.
Akceptowano do druku 29.01.2014 r.