

MIKROORGANIZMY WYBRANYCH WÓD CHLORKOWYCH KARPAT POLSKICH

MICROORGANISMS OF SELECTED CHLORIDE WATERS OF THE POLISH CARPATHIANS

MACIEJ WALCZAK¹, LUCYNA RAJCHEL²

Abstrakt. W artykule zaprezentowano wyniki badań fizykochemicznych i mikrobiologicznych wytypowanych wód chlorkowych z obszaru Karpat fliszowych z miejscowości: Rabka-Zdrój, Krynica-Zdrój, Poręba Wielka, Wysowa-Zdrój, Lubatówka, Iwonicz-Zdrój i Rymanów-Zdrój, oraz solankę z dewońskich utworów podłoża Karpat z Ustronia-Zdroju. Analizowane wody chlorkowe to wody słonawe, słone i solanki charakteryzujące się mineralizacją od 1,5 do 100,3 g/dm³. Badane wody należą do leczniczych wód mineralnych, które wykorzystywane są w balneoterapii. We wszystkich próbkach wody stwierdzono obecność mikroorganizmów. Liczebność mikroorganizmów hodowlalnych na ogół była jednak bardzo niska. W przypadku dwóch ujęć (Ustroń odw. U-3 oraz Rabka odw. IG 2) nie udało wyhodować się żadnych mikroorganizmów. Identyfikacja pozyskanych izolatów potwierdziła inne doniesienia świadczące o tym, że skład gatunkowy mikroorganizmów wód podziemnych jest ściśle powiązany ze składem chemicznym. W wielu ujęciach solanek stwierdzono np. mikroorganizmy halofilne lub halotolerancyjne.

Słowa kluczowe: wody chlorkowe, mikroorganizmy wód podziemnych, halofile, Karpaty fliszowe.

Abstract. The article presents the results of physicochemical and microbiological tests of selected chloride waters from the Flysch Carpathians in Rabka-Zdrój, Krynica-Zdrój, Poręba, Wysowa-Zdrój, Lubatówka, Iwonicz-Zdrój and Rymanów-Zdrój, as well as brine from Devonian deposits of the Carpathians in Ustroń-Zdrój. These chloride waters are represented by brackish water, salt water and brines characterized by mineralization ranging from 1.5 to 100.3 g/dm³. They are curative mineral waters used in balneotherapy. The presence of microorganisms was found in all tested waters. The number of cultivated microorganisms was, however, generally very low. In the case of two intakes (Ustroń U-3 and Rabka IG 2), no microorganisms have been cultivated. The identification of the isolates obtained confirms other reports indicating that the species composition of groundwater microorganisms is closely related to the chemical composition. In many intakes of brines, for example, either halophilic or halotolerant microorganisms have been found.

Key words: chloride waters, deep groundwaters microorganisms, halophiles, Flysch Carpathians.

WSTĘP

Do badań mikrobiologicznych i fizykochemicznych wytypowano wody chlorkowe (słonawe i słone) z kredowo-paleogeńskich utworów fliszowych Karpat zewnętrznych z miejscowości: Rabka-Zdrój, Krynica-Zdrój, Poręba Wielka, Wysowa-Zdrój, Lubatówka, Iwonicz-Zdrój i Rymanów-Zdrój, oraz jedną solankę z utworów dewonu z podłoża Karpat, z Ustronia-Zdroju. Analizowane wody należą do leczniczych wód mineralnych i w większości wykorzysty-

wane są w balneoterapii w uzdrowiskach do kąpeli leczniczych lub krenoterapii, niektóre w przemyśle rozlewniczym. Analizowane wody charakteryzują się obecnością składników swoistych, nadających wodzie cech leczniczych. Są to: mineralizacja, dwutlenek węgla, jodki, żelazo i temperatura (Rajchel, 2012).

Badania mikroorganizmów występujących w leczniczych wodach mineralnych prowadzono sporadycznie, stąd wiedza na ich temat jest dość uboga (Rajchel i in., 2002; Walczak i in., 2017; Krawiec i in., 2018). Tymczasem, jak

¹ Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, ul. Lwowska 1, 87-100 Toruń; e-mail: walczak@umk.pl.

² AGH Akademia Górniczo-Hutnicza, Wydział Geologii, Geofizyki i Ochrony Środowiska, al. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków; e-mail: lucynar@agh.edu.pl.

dowiedziano wiele mikroorganizmów zasiedla wody głębinowe, nawet wówczas, kiedy są zasolone, ubogie w związki węgla i azotu, są gorące lub zimne albo panuje tam wysokie ciśnienie hydrostatyczne. Według Whitmana i in. (1998) 75–94% organizmów prokariotycznych Ziemi żyje pod powierzchnią planety. Co więcej, niektóre z prac wskazują, że biomasa organizmów żyjących pod ziemią znacząco przekracza biomasa znaną z powierzchni (Adhikari, Kallmeyer, 2010). Mikroorganizmy zasiedlające podziemne nisze ekologiczne, łącznie z wodami głębinowymi, są w pełni aktywne i znacząco wpływają na kierunki i intensywność przemian geochemicznych, takich jak przekształcenia związków chemicznych, rozpuszczanie lub strącanie soli, powstawanie różnych gazów (Onstott i in., 1998; Łebkowska, Karwowska, 2010).

MATERIAŁY I METODY BADAŃ

CHARAKTERYSTYKA ANALIZOWANYCH WÓD CHLORKOWYCH

Próbki wód do badań pobrano z obszaru płaszczowiny magurskiej i śląskiej Karpat fliszowych (fig. 1). Do badań mikrobiologicznych i składu fizykochemicznego wytypowano wody chlorkowe z miejscowości: Ustron-Zdrój, Poręba Wielka, Rabka-Zdrój, Krynica-Zdrój, Lubatówka, Iwonicz-Zdrój i Rymanów-Zdrój.

Celem badań było oznaczenie bioróżnorodności bakterii zasiedlających różne typy wód chlorkowych o zróżnicowanej zawartości Cl-Na (wody słone, słone i solanki).

Próbki wód do badań z Ustronia pobrano z odwiertu U-3. Odwiert o głębokości 1740 m udostępnia solankę o mineralizacji 100,3 g/dm³ (tab. 1) z dewońskich wapieni i dolomitów podłoża Karpat fliszowych, zalegających na głębokości 1280–1740 m. Udostępniona solanka ma temperaturę 20°C, a jej typ hydrochemiczny jest Cl–Na–Ca+I+Fe+T (Rajchel i in., 2007).

W Porębie Wielkiej do badań pobrano próbki wód z odwiertu Poręba Wielka IG 1 o głębokości 2002,4 m. Wodę ujęto w piaskowcowo-zlepieńcowatych warstwach inoceramowych. Jest to termalna woda chlorkowa o temperaturze 42°C i mineralizacji 23,7 g/dm³, typu Cl–HCO₃–Na+I+T (tab. 1). Wodzie towarzyszy metan.

Z Rabki analizowano wodę z odwiertu Rabka IG 2 o głębokości 1215 m. Odwiert udostępnia wodę chlorkową o mineralizacji 24,6 g/dm³, temperaturze 20°C typu Cl–Na+I+T (tab. 1). Wodzie towarzyszy metan, który migruje z głębszych stref podłoża strefami nieciągłości (Chrzastowski, 1965; Rajchel, 2009; Rajchel, Czop, 2012).

Do badań pobrano również próbki wód w Krynicy z odwiertu Zuber III o głębokości 935,7 m z gruboławicowych piaskowców tzw. zuberowskich. Udostępniona woda to szczawa o mineralizacji 25,6 g/dm³ a jej typ jest HCO₃–Na+CO₂+I (tab. 1). Szczawa ta została zaliczona do szczaw chlorkowych (Świdziński, 1972; Rajchel, 2012).

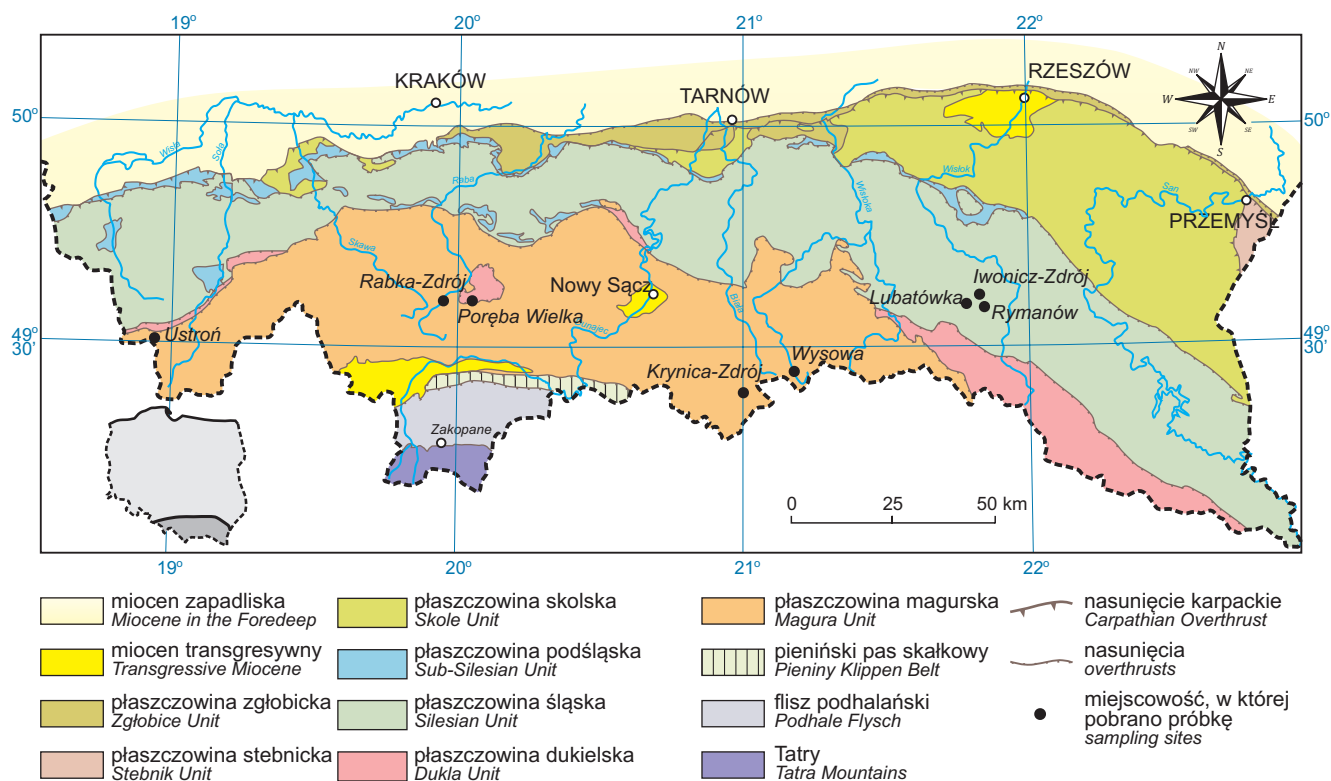


Fig. 1. Miejscowości, z których pobrano próbki wód do badań na tle mapy geologicznej Karpat polskich

The sampling sites against the background of the geological map of the Polish Carpathians

Tabela 1

Wybrane dane fizykochemiczne analizowanych wód

Major physicochemical parameters of the waters

Dane	Ustroń odw. U-3	Poreęba Wielka odw. IG 1	Rabka odw. IG 2	Krynica odw. Zuber III	Wysowa odw. Aleksandra	Wysowa odw. W-15	Lubatówka odw. Lubatówka 12	Iwonicz odw. Elin7	Rymanów odw. RZ-6	Rymanów odw. RZ-7
SSS [g/dm ³]	100,3	23,7	24,6	25,6	24,4	5,9	17,5	6,3	3,0	1,5
pH	6,7	8,6	6,5	7,0	6,9	6,4	6,9	7,2	6,9	7,2
temp. [°C]	20	42,1	20,0	8,6	9,4	10,5	23	16,3	14	14
CO ₂ [g/dm ³]	brak	brak	brak	2,2	1,9	2,6	0,61	0,67	0,25	brak
[mg/dm ⁻³]										
Na ⁺	25880	7567	8835	6311	6606	1502	6143	1991	872	375
K ⁺	607	627	89,3	337,2	128,8	42	37,7	19,4	15	7,8
Ca ²⁺	8230	4,9	72,1	174,1	279,8	112	62,8	41,4	70,5	65,6
Mg ²⁺	2282	2,3	41,2	304,4	30,0	28,3	70	12,2	8,7	15
Ba ²⁺	1,3	9,9	1,9	0,56	5,6	1,3	21	4,6	3,4	1,7
Si ²⁺	367	2,5	40,7	0,81	1,9	0,5	15,5	4,1	2,9	1,6
Fe ²⁺	18	1,1	1,8	4,7	20,7	5,7	1,1	0,8	1,9	0,3
Mn ²⁺	0,6	0,04	0,08	0,08	0,78	0,4	0,01	0,07	0,07	0,04
F ⁻	0,9	1,6	0,8	0,28	0,3	0,3	0,83	0,89	0,6	0,6
Cl ⁻	62900	7465	14084	968	3618	709	7456	2028	849	365
Br ⁻	320	18,4	37,4	5,2	13,6	3,7	38	9,1	1,8	1,0
I ⁻	14,2	4,8	25,8	0,34	3,5	0,7	16,9	2,3	0,5	0,4
SO ₄ ²⁻	0,5	46,8	0,5	49,2	3,5	3,0	0,65	0,94	0,1	7,4
HCO ₃ ⁻	107	7757	829	17141	12732	3258	3428	2089	1164	604
HBO ₂	34,7	117,1	528,5	11,8	868	203	146,6	94,8	65,5	20,6
H ₂ SiO ₃	1,9	41,8	16,2	36,6	11,7	9,9	16,8	13,3	14	12,7

W Wysowej do badań wytypowano wody udostępnione odwiertem Aleksandra i odwiertem W-15. Odwiert Aleksandra o głębokości 100 m ujmuje szczywy z warstw inoceramowych o mineralizacji 24,7 g/dm³ typu HCO₃-Cl-Na+CO₂+I+Fe. Szczywy z odwiertu Aleksandra uważane są za najbardziej zbliżone do typowych wód diagenetycznych (Duliński i in., 2017). Odwiert W-15 o głębokości 76 m udostępnia szczywę z warstw inoceramowych o mineralizacji 5,9 g/dm³ typu HCO₃-Cl-Na+CO₂ (tab. 1).

Wodę z Lubatówki pobrano z odwiertu Lubatówka-12 o głębokości 958 m. Woda ujęta w interwale 625–958 m z I, II i III piaskowca ciężkowickiego to termalna woda kwasowęgłowa o temperaturze 23°C, mineralizacji 17,5 g/dm³ i o typie Cl-HCO₃-Na+CO₂+I (tab. 1).

W Iwoniczu do badań pobrano wodę z odwiertu Elin 7 o głębokości 1030 m. Obecnie wodę ujmuje się z głębokości 85–238 m z II piaskowca ciężkowickiego. Woda o mineralizacji 6,3 g/dm³ to woda kwasowęgłowa typu Cl-HCO₃-Na+CO₂+I (tab. 1).

Do realizowanych badań pobrano również wodę z Rymanowa z odwiertów RZ-6 i RZ-7. Odwiert Rymanów RZ-6 o głębokości 250 m ujmuje wodę kwasowęgłową z I piaskowca ciężkowickiego o mineralizacji 3,0 g/dm³ typu HCO₃-Cl-Na+CO₂. Odwiert RZ-7 o głębokości 178 m ujmuje w I piaskowcu ciężkowickim wodę o mineralizacji 1,5 g/dm³ typu HCO₃-Cl-Na (tab. 1).

Analizowane wody z Lubatówki, Iwonicza-Zdroju i Rymanowa-Zdroju współwystępują ze złożami bituminów, a obecny w nich dwutlenek węgla należy wiązać z procesami metanogenezy, czyli bakteryjnej przemiany materii organicznej, której produktami są metan i dwutlenek węgla (Zuber i in., 2007; Rajchel, 2012).

METODY OZNACZANIA SKŁADU FIZYKOCHEMICZNEGO WÓD

Próbki wód chlorkowych do badań mikrobiologicznych i chemicznych pobrano jednocześnie w okresie IX–XI 2013 r. W terenie zmierzono parametry nietrwałe wód: temperaturę, pH, przewodnictwo elektrolityczne właściwe (PEW), wykorzystując przenośny miernik firmy WTW 340i/set. Stężenie jonów HCO₃⁻ oznaczano metodą miareczkowania z wykorzystaniem roztworu 10% kwasu solnego i wskaźnika w postaci oranżu metylowego. Zawartość wolnego dwutlenku węgla oznaczano aparatem karat. Do badań składu chemicznego pobierano próbki wód do jednorazowych butelek 100 ml wykonanych z polietylenu. Po pobraniu próbki przewożono ją w lodówce terenowej do laboratorium. Stężenia jonów głównych określano za pomocą spektrometru emisyjnego z plazmą wzbudzoną indukcyjnie (ICP-OES) Plasm 40 firmy Perkin Elmer. Stężenia mikroelementów oznaczono za pomocą spektrometru masowego z plazmą wzbudzoną

indukcyjnie (ICP-MS) Elan 6100 firmy Perkin Elmer. Analizy fizykochemiczne wykonano w Laboratorium Hydrogeologii na Wydziale Geologii, Geofizyki i Ochrony Środowiska AGH.

ANALIZY MIKROBIOLOGICZNE

Ogólną liczbę mikroorganizmów oznaczano metodą bezpośredniego liczenia na filtrach membranowych, używając w tym celu filtrów Nucleopore firmy Millipore o średnicy porów 0,22 μm . Z próbek pobierano odpowiednią objętość wody i sączono przez filtr membranowy z użyciem pompy próżniowej. Po przesączeniu próbki zatrzymane na filtrze komórki barwiono przez 3–5 min. oranżem akrydynowym (o stężeniu 100 mg/dm^3). Następnie filtr przemywano 2–3-krotnie sterylną wodą destylowaną w celu usunięcia nadmiaru barwnika z filtru. Zabarwione bakterie liczone pod mikroskopem epifluorescencyjnym Nikon Eclipse E200 wyposażonym w zestaw filtrów wzbudzających i odcinających odpowiednich dla użytego fluorochromu. Do analiz stosowano obiektyw Planachromat o powiększeniu $\times 100$ i aperturze 1.30 oraz okulary o powiększeniu $\times 10$. Liczbę komórek na analizowanym filtrze zliczano za pomocą programu do analizy obrazu MultiScan Base v.18.03, a następnie przeliczano na 1 ml próby.

Liczebność heterotroficznych mikroorganizmów tlenowych

Oznaczenie liczebności zdolnych do wzrostu **tlenowych** mikroorganizmów heterotroficznych o znacznych wymaganiach pokarmowych wykonano metodą wysiewu lanego. Do sterylnych szalek Petriego wprowadzano 1 ml badanej wody i dodawano ok. 25 ml sterylnej i upłynnionej pożywki agar odżywczy o składzie: Pepton bakteriologiczny – 5,0 g; wyciąg drożdżowy – 3,0 g; woda pochodząca z danego punktu poboru – 1000 ml. Całość delikatnie mieszano i pozostawiono do zastygnięcia. Po zastygnięciu pożywki, całość przenoszono do inkubatora. Inkubacje prowadzono w temperaturze zbliżonej do temperatury danego źródła przez 30 dni w warunkach tlenowych. Wzrost kolonii obserwowano co 5 dni, zliczając wyrosłe kolonie, a ich liczbę przeliczano na liczebność komórek w wodzie danego źródła.

Liczebność heterotroficznych mikroorganizmów beztlenowych

Oznaczenie liczebności zdolnych do wzrostu **beztlenowych** mikroorganizmów heterotroficznych o znacznych wymaganiach pokarmowych wykonano analogiczną metodą, jak w przypadku mikroorganizmów beztlenowych. Do składu pożywki dodano jednak czynniki obniżające potencjał redox: winian potasu – 3,8 g/dm^3 , siarczyn sodowy – 1,2 g/dm^3 .

Ponadto po wykonaniu wysiewu lanego i zastygnięciu pożywki całość zalewano dodatkową warstwą agaru wodnego (15 g/dm^3 agaru) w celu odcięcia dopływu tlenu do pożywki.

Inkubacje prowadzono w temperaturze zbliżonej do temperatury danego źródła przez 30 dni. Wzrost kolonii obserwowano co 5 dni, zliczając wyrosłe kolonie. Po okresie inkubacji zliczano wyrosłe kolonie, a ich liczbę przeliczano na liczebność mikroorganizmów w 1 ml badanej wody.

Liczebność tlenowych mikroorganizmów chemoautotroficznych lub heterotroficznych o znikomych wymaganiach pokarmowych

Badanie wykonano metodą posiewu lanego. Do sterylnych szalek Petriego wprowadzano 1 ml badanej wody i dodawano ok. 25 ml sterylnej i upłynnionej pożywki agarowej o składzie: octan sodu – 0,1 g/dm^3 , woda z danego źródła – 1000 ml. Całość delikatnie mieszano i pozostawiono do zastygnięcia. Po zastygnięciu pożywki, całość przenoszono do inkubatora. Inkubacje prowadzono w temperaturze zbliżonej do temperatury danego źródła w warunkach tlenowych przez 30 dni. Wzrost kolonii obserwowano co 5 dni, zliczając wyrosłe kolonie, a ich liczbę przeliczano na liczebność bakterii w badanej próbce.

Liczebność beztlenowych mikroorganizmów chemoautotroficznych lub heterotroficznych o znikomych wymaganiach pokarmowych

Badanie również wykonano metodą wysiewu lanego. Do sterylnych szalek Petriego wprowadzano 1 ml badanej wody i dodawano ok. 25 ml sterylnej i upłynnionej pożywki agarowej o składzie: octan sodu – 0,1 g/dm^3 , winian potasu – 3,8 g/dm^3 , siarczyn sodu – 1,2 g/dm^3 , woda z danego źródła – 1000 ml. Całość delikatnie mieszano i pozostawiono do zastygnięcia. Następnie powierzchnię pożywki zalewano dodatkową warstwą agaru wodnego (15 g/dm^3 agaru) w celu odcięcia dopływu tlenu do pożywki. Po zastygnięciu, całość przenoszono do inkubatora. Inkubacje prowadzono w temperaturze zbliżonej do temperatury danego źródła przez 30 dni. Wzrost kolonii obserwowano co 5 dni, zliczając wyrosłe kolonie, a ich liczbę przeliczano na liczebność mikroorganizmów w danej próbce.

Identyfikacja dominujących typów morfologicznych wyizolowanych na podłożach hodowlanych.

W pierwszej kolejności ustalano dominujące typy morfologiczne w poszczególnych wysiewach. Podczas analizy brano pod uwagę rozmiar i kolor koloni, jej brzeg, sposób wzrostu, wzniesienie. Następnie z dominujących typów koloni pobierano biomasę mikroorganizmów i wykonywano izolacje DNA. Komórki lizowano w roztworze lizozymu. Następnie DNA izolowano metodą chloroformową w mieszaninie fenol / chloroform / izoamyl.

Pozyskane DNA poszczególnych izolatów stanowiło matrycę do reakcji PCR. W toku prac amplifikowano gen DNA kodujący fragment 16S rRNA. Do badań użyto starterów bakteryjnych 1492R i 27F. Po zamplifikowaniu matrycy wykonano elektroforezę produktu oraz sekwencjonowanie nukleotydów w produkcie DNA. Na podstawie wyników sekwencjonowania (sekwencję nukleotydów) ustalono przy-

należność taksonomiczną izolatów. W tym celu posłużono się ogólnościową bazą sekwencji BLAST.

WYNIKI I DYSKUSJA

Analizowane wody chlorkowe charakteryzują się mineralizacją od 1,5 do 100,3 g/dm³.

Są to głównie wody słone (mineralizacja 5–35 g/dm³), dwie należą do słonawych (1–5 g/dm³), a jedna reprezentuje solankę (mineralizacja od 35 g/dm³). Odczyn wód pH jest zawarty w przedziale od 6,4 do 8,6, a temperatura od 8,6 do 42,1°C. Zawartość CO₂ w szczawach i wodach kwasowęglowych jest zawarta w przedziale 0,25–2,60 g/dm³ (tab. 1). Zawartość poszczególnych jonów waha się w szerokich granicach i wynosi w mg/dm³: Na⁺ od 375 do 25 880; Ca²⁺ od 4,9 do 8230,0; Mg²⁺ od 2,3 do 2282,0; Fe²⁺ 0,3 do 20,7; Cl⁻ od 365 do 62 900; SO₄²⁻ od 0,1 do 49,2; HCO₃⁻ od 107 do 17 141 (tab. 1).

Liczebność badanych grup drobnoustrojów była bardzo zróżnicowana w poszczególnych próbkach. Najwyższą ogólną liczbę komórek mikroorganizmów odnotowano w próbce z odwiertu Poręba Wielka IG 1 – 1461,05 × 10³ ml (tab. 2), a najniższą w próbce z odwiertu Rymanów RZ-7 – 29,44 × 10³/ml. W wodzie tej również nie stwierdzono mikroorganizmów chemoautotroficznych, a liczebność bakterii heterotroficznych była stosunkowo niska. W związku z tym skażenie materiałem glebowym jest mało prawdopodobne. Ponadto tezę tę potwierdzają dominujące taksony bakterii. Są to bakterie typowo wodne, zdolne do wzrostu przy znikomych

stężeniach związków odżywczych (*Pseudomonas* sp., *Pseudomonas fluorescens*). Natomiast obecność w tej wodzie *Planomicrobium flavidum* może być pewnym zaskoczeniem. Wynika to z tego, że woda ta jest mało zmineralizowana, natomiast bakteria ta preferuje środowiska umiarkowanie zasolone (Jung i in., 2009).

Niewątpliwie do najciekawszych wód, z mikrobiologicznego punktu widzenia, należą wody z tych ujęć, w których stwierdzono najwięcej mikroorganizmów chemoautotroficznych lub takich, które wykazywały wzrost na podłożu minimalnym. Są to wody z Krynicy odw. Zuber III, Poręby Wielkiej odw. IG 1, Wysowej odw. Aleksandra, Iwonicza odw. Elin 7 i ewentualnie Lubatówki odw. Lubatówka 12.

W wodzie z odw. Zuber III w Krynicy sytuacja jest najciekawsza, gdyż na pożywkach dla mikroorganizmów chemoautotroficznych uzyskano ogółem więcej mikroorganizmów niż na pożywkach dla heterotrofów. Wynik taki jednoznacznie wskazuje, że mamy do czynienia ze zbiorowiskiem mikroorganizmów pochodzących z dość głębokiego odwiertu, nieskażonego zanieczyszczeniami glebowymi. Dominującymi taksonami, które wyhodowano z wody tego ujęcia były *Rhodococcus* sp., *Bogoriella caseinolytic*, *Nesterenkonia* sp., *Planococcus* sp. Wyizolowana tu *Bogoriella caseinolytic* to promieniowiec, po raz pierwszy opisany w alkalicznych jeziorach sodowych Afryki. Należy do mikroorganizmów halofilnych, preferujących dość mocno alkaliczne środowiska (Groth i in., 1997).

W wodzie z odwiertu Poręba IG 1 ogólna liczba mikroorganizmów jest dość znaczna (1461,05 × 10³). Jednak przy tak wysokiej ogólnej liczbie mikroorganizmów, liczebność

Tabela 2

Wyniki analiz mikrobiologicznych badanych wód
Results of microbiological analyses of the waters

Ujęcie	OLM [komórki × 10 ³ /cm ³]	Liczebność mikroorganizmów heterotroficznych [jtk/cm ³]		Liczebność mikroorganizmów chemoautotroficznych [jtk/cm ³]		Dominujące szczepy bakterii. Identyfikacja na podstawie sekwencji genów 16S rRNA
		tlenowe	beztlenowe	tlenowe	beztlenowe	
Poręba Wielka IG 1	1461,05	2000	1000	100	500	<i>Halomonas</i> sp.; <i>Belliella baltica</i> ; <i>Halomonas nitritophilus</i> ; <i>Aquiflexum</i> sp.; <i>Bacillus simplex</i>
Wysowa Aleksandra	408,45	63	78	15	29	<i>Belliella</i> sp.; <i>Halomonas</i> sp.; <i>Aquiflexum</i> sp.
Wysowa W-15	113,64	7	50	10	0	<i>Micrococcus luteus</i> ; <i>Rhodococcus</i> sp.; <i>Psychrobacillus psychrodurans</i> ; <i>Kocura polustris</i> ;
Lubatówka Lubatówka 12	493,08	500	200	0	100	<i>Microcella alkaliphila</i> ; <i>Halomonas</i> sp.; <i>Pseudomonas stutzeri</i>
Iwonicz Elin 7	526,20	140	140	50	45	<i>Pseudomonas mandelli</i> ; <i>Hydrogenophaga taeniospiralis</i>
Rymanów RZ-6	117,75	4,5	2,5	0	0	<i>Rhizobium</i> sp. – bardzo liczne; <i>Micrococcus luteus</i> ;
Rymanów RZ-7	29,44	135	170	0	0	<i>Pseudomonas</i> sp.; <i>Planomicrobium flavidum</i> ; <i>Pseudomonas fluorescens</i>
Krynica Zuber III	324,68	500	2000	1000	750	<i>Rhodococcus</i> sp.; <i>Bogoriella caseinolytic</i> ; <i>Nesterenkonia</i> sp.; <i>Planococcus</i> sp.
Ustroń U-3	383,12	0	0	0	0	brak izolatów
Rabka IG 2	74,68	0	0	0	0	brak izolatów

heterotroficznych drobnoustrojów hodowlanych na poziomie 1000–2000 jest stosunkowo niewielka. Również liczebność hodowlanych mikroorganizmów chemoautotroficznych w porównaniu do ogólnej liczby mikroorganizmów jest niezbyt duża. Wskazuje to albo na duży udział mikroorganizmów martwych w badanej wodzie, albo, co jest bardziej prawdopodobne, na to, że większość mikroorganizmów tego ujęcia wymaga bardzo specyficznych warunków do wzrostu, co uniemożliwia ich hodowlę. Podobne relacje między OLM a liczebnością mikroorganizmów hodowlanych zostały także stwierdzone w innych badaniach (Sand, 2003; Walczak i in., 2017). Mimo tego, wśród dominujących mikroorganizmów, które udało się wyhodować oznaczono m.in. bakterie z rodzaju *Halomonas*, czyli typowe bakterie środowisk zasolonych (Kalwasińska i in., 2018). W odniesieniu tych wyników do mineralizacji wody z tego odwiertu wydaje się to zupełnie uzasadnione. Ciekawostką w tej wodzie jest obecność bakterii *Beliella baltica*, którą po raz pierwszy opisano w 2004 r. wśród izolatów pochodzących z Morza Bałtyckiego. Może to wskazywać, że jest to gatunek kosmopolityczny, zdolny do kolonizacji bardzo różnych środowisk pod względem termicznym (zimne wody Bałtyku i ciepłe wody tego ujęcia).

W przypadku wody z odw. Aleksandra w Wysowej, mimo tego, że jest to dość płytki odwiert, ilość mikroorganizmów chemoautotroficznych i heterotroficznych jest mniej więcej na tym samym poziomie. Z tego względu woda z tego odwiertu to również ciekawy obiekt badawczy. Identyfikacja najczęściej występujących izolatów wykazała, że do powszechnie występujących tam mikroorganizmów należą *Micrococcus luteus*, *Rhodococcus* sp., *Psychrobacillus psychrodurans* oraz promieniowce *Kocura polustris*. Ten ostatni mikroorganizm wydaje się być częstym mieszkańcem wód słonych, gdyż już wcześniej został stwierdzony w solankach Niżu Polskiego (Walczak i in., 2017).

W wodzie z odw. Elin 7 z Iwonicza również uzyskano wzrost dość znacznej liczby mikroorganizmów chemoautotroficznych. Wśród mikroorganizmów dominujących stwierdzono heterotroficzne bakterie *Pseudomonas mandelli*, które podobnie jak cały rodzaj *Pseudomonas* są uważane za typowo wodne. Ponadto jest to bakteria preferująca zimne środowiska, rośnie w temperaturze 4°C, ale nie rośnie w temperaturze 37°C. Poza tym jest to dość ciekawy przypadek bakterii, ponieważ po raz pierwszy zostały one opisane w wodach mineralnych Korei, a więc geograficznie w bardzo odległym terenie (Jang i in., 2012). Być może wskazana byłaby w tym przypadku analiza porównawcza danych geologicznych i składu fizykochemicznego wód z obu tych odwiertów, która wyjaśniłaby występowanie tych bakterii w pewnych rodzajach wód mineralnych. W tym ujęciu ciekawsza jest jednak obecność bakterii *Hydrogenophaga taeniospiralis*. Jest to bakteria zdolna do odżywiania zarówno na drodze heterotroficznej, jak i chemoautotroficznej. Przy czym źródłem

energii podczas odżywiania chemoautotroficznego jest dla niej wodór pierwiastkowy (Willems i in., 1989). Jej obecność w wodzie świadczy o tym, że do wody tej dopływa wodór cząsteczkowy albo powstaje na drodze procesów fermentacyjnych katalizowanych, np. przez bakterie metanogenne lub inne beztlenowce. Biorąc pod uwagę głębokość tego ujęcia, nie ma mowy o przypadkowym skażeniu komórkami tej bakterii. Jest to bardzo ciekawy przykład obecności nietypowych mikroorganizmów w głębokich ujęciach wód podziemnych.

Interesująca jest także woda z odwiertu Lubatówka 12 w Lubatówce, w której oprócz mikroorganizmów heterotroficznych stwierdzono liczne mikroorganizmy chemoautotroficzne, rozwijające się w warunkach beztlenowych. Ponadto w wodzie tego ujęcia stwierdzono typowo wodne bakterie *Pseudomonas stutzeri*. Cechą charakterystyczną tych bakterii jest zdolność przeprowadzania denitryfikacji, co często jest określane jako oddychanie azotanowe. Właściwość ta jest istotna dla mikroorganizmów, które rozwijają się w warunkach braku dostępu do tlenu cząsteczkowego, co w tym przypadku ze względu na głębokość odwiertu jest bardzo prawdopodobne. Jednocześnie bakterie te potrafią wiązać azot atmosferyczny, mogą więc być niezależne od organicznych źródeł azotu, których w tej wodzie brak lub ich stężenia są śladowe. Co więcej podczas denitryfikacji ostatecznym produktem reakcji jest właśnie azot atmosferyczny. Można więc przypuszczać, że bakterie te, prowadząc proces denitryfikacji, zaspokajają jednocześnie dwie potrzeby: po pierwsze wykorzystują azotany do utleniania związków organicznych w procesie oddychania komórkowego, a po drugie wytwarzają źródło azotu, który posłuży im jako komponent do syntezy białek i nukleotydów.

Kolejnym ciekawym szczepem w wodzie z tego odwiertu jest *Microcella alkaliphila*. Bakterie te preferują środowiska silnie alkaliczne, lecz nie zasolone (Tiaro i in., 2006). Natomiast biorąc pod uwagę rodzaj wody tego ujęcia, jest to raczej woda kwaśna. Można więc zakładać, że bakterie te wcale nie są charakterystyczne dla wody tego ujęcia, ale uległy wylugowaniu przez kwaśne wody z jakiegoś materiału skalnego o charakterze alkalicznym, z którym woda ta ma bezpośredni kontakt. Ponadto w wodzie z tego odwiertu stwierdzono także bakterie z rodzaju *Halomonas*, typowe dla wód zasolonych, co jest zgodne z mineralizacją tej wody.

Bakterie takie jak *Rhizobium* obecne w wodach z odwiertu Rymanów RZ-6, świadczą natomiast o silnym skażeniu tych wód materią glebową. Z tego powodu, wody te nie stanowią ciekawego obiektu badań.

Praca została zrealizowana w AGH na Wydziale Geologii, Geofizyki i Ochrony Środowiska oraz Zakładzie Mikrobiologii Środowiskowej i Biotechnologii UMK w Toruniu.

Podziękowania. Autorzy dziękują recenzentom – panu prof. dr hab. inż. Wojciechowi Ciężkowskiemu i panu dr hab. inż. Arkadiuszowi Krawcowi – za cenne uwagi.

LITERATURA

- ADHIKARI R.R., KALLMEYER J., 2010 – Detection and quantification of microbial activity in the subsurface. *Chemie der Erde*, **70** (Supplement 3): 135–143.
- CHRZAŚTOWSKI J., 1965 – Ekshalacje metanu w Rabce Zdroju na tle budowy geologicznej. *Zesz. Nauk. AGH., Geologia*, **6**: 75–100.
- DULIŃSKI M., DEMBSKA-SIĘKA P., RAJCHEL L., GORCZYCA Z., 2017 – Zmienność parametrów chemicznych i izotopowych wody z odwiertu Franciszek w Wysowej Zdroju. *Prz. Geol.*, **65**, 11/1: 951–955.
- GROTH I., SCHUMANN P., RAINEV F.A., MARTIN K., SCHUE-TZE B., AUGSTEN K., 1997 – Bogoriella caseilytica gen. nov., sp. nov., a new alkaliphilic actinomycete from a soda lake in Africa. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **47**: 788–794.
- JANG S.H., KIM J., KIM J., HONG S.L., LEE C., 2012 – Genome sequence of cold-adapted *Pseudomonas mandelii* strain JR-1. *J. Bacteriol.*, **12**: 3263.
- JUNG Y.T., KANG S.J., OH T.K., YOON J.H., KIM B.H., 2009 – *Planomicrobium flavidum* sp. nov., isolated from a marine solar saltern, and transfer of *Planococcus stackebrandtii* Mayilraj et al. 2005 to the genus *Planomicrobium* as *Planomicrobium stackebrandtii* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **59**: 2929–2933.
- KALWASIŃSKA A., DEJA-SIKORA E., BURKOWSKA-BUT A., SZABO A., FELFÖLDI T., KOSOBUECKI P., KRAWIEC A., WALCZAK M., 2018 – Changes in bacterial and archaeal communities during the concentration of brine at the graduation towers in Ciechocinek spa (Poland). *Extremophiles*, **22**: 233–246.
- KRAWIEC A., DEJA-SIKORA E., KARWASIŃSKA A., 2018 – Bakterie uczestniczące w przemianach związków siarki w wodach leczniczych rejonu Buska-Zdroju. *Acta Balneol.*, **60**, 4: 245–252.
- LEBKOWSKA M., KARWOWSKA E., 2010 – Mikroorganizmy występujące w wodach siarczkowych. *Balneologia Polska*, **52**: 60–63.
- ONSTOTT T.C., PHELPS T.J., KIEFT T., COLWELL F.S., BALKWILL D.L., FREDRICKSON J.K., BROCKMAN F.J., 1998 – A global perspective on the microbial abundance and activity in the deep subsurface. *W: Enigmatic Microorganisms and Life in Extreme Environments* (red. J. Seckbach): 489–499. Kluwer Publisher.
- RAJCHEL L., 2009 – Występowanie i wykorzystanie wód chlorkowych Rabki-Zdroju. *Geol. AGH*, **35**, 2/1: 271–278.
- RAJCHEL L., 2012 – Szczawy i wody kwasowęglowe Karpat polskich. Wydaw. AGH, Kraków.
- RAJCHEL L., CZOP M., 2012 – Hydrogeochemical modeling of chloride mineral water from Rabka spa (Carpathian Mountains, Poland). *Geol. Quart.*, **56**, 4: 681–690.
- RAJCHEL L., RAJCHEL J., WOŁOWSKI K., 2002 – Microorganisms in selected sulphuric springs of the Polish Carpathians. *Geol. Quart.*, **46** (2): 189–198.
- RAJCHEL L., ŚLIWA T., WALIGÓRA J., 2007 – Uwagi o wodach leczniczych Ustronia. *W: „Współczesne Problemy Hydrogeologii i Ochrony Środowiska AGH, Kraków*, **13**, 3: 969–976.
- SAND W., 2003 – Microbial life in geothermal waters. *Geothermics*, **32**: 655–667.
- ŚWIDZIŃSKI H., 1972 – Geologia i wody mineralne Krynicy. PAN, Oddział w Krakowie. *Pr. Geol.*, **70**: 1–105.
- TIARO I., MORAIS P.V., COSTA M.S., VERISSIMO A., 2006 – *Microcella alkaliphila* sp. nov., a novel member of the family Microbacteriaceae isolated from a non-saline alkaline groundwater, and emended description of the genus *Microcella*. *Int. J. Syst. Vol. Microbiol.*, **10**: 2313–2316.
- WALCZAK M., DEJA-SIKORA E., KALWASIŃSKA A., POLATOWSKI M., KRAWIEC A., 2017 – Distribution of bacteria in the mineral waters of the Polish Lowlands. *Geol. Quart.*, **1**: 177–185.
- WHITMAN W.B., COLEMAN D.C., WIEBE W.J., 1998 – Prokaryotes: The unseen majority. *Proc. National Acad. Sci. USA*, **95**: 6578–6583.
- WILLEMS A., BUSSE J., GOOR M., POT B., FALSEN E., JANTZEN E., HOSTE B., GILS M., KERSTERS K., AULING G., DELEY J., 1989 – *Hydrogenophaga*, a new genus of Hydrogen-Oxidizing bacteria that includes *Hydrogenophaga flava* comb. nov. (formerly *Pseudomonas flava*), *Hydrogenophaga palleronii* (formerly *Pseudomonas palleronii*), *Hydrogenophaga pseudoflava* (formerly *Pseudomonas pseudoflava* and “*Pseudomonas carboxydoflava*”), and *Hydrogenophaga taeniospiralis* (formerly *Pseudomonas taeniospiralis*). *Int. J. System. Bacteriol.*, **7**: 319–333.
- ZUBER A., RÓŻAŃSKI K., CIĘŻKOWSKI W., 2007 – Metody znacznikowe w hydrogeologii. Poradnik metodyczny. Oficyna Wydaw. PWroc., Wrocław.

SUMMARY

Physical, chemical and microbiological tests of chloride waters from the Carpathian area have shown their high chemical and microbiological diversity. Mineralization of the examined waters ranged from 5 to 35 g/dm³. The reaction of these waters was similar, while the temperature varied significantly from 8.6 to over 42.0°C. The results of microbiological tests showed that microorganisms were present in all examined waters. However, the number of examined micro-

organism groups was low. The greatest number of microorganisms was found in the Poręba Wielka IG 1 intake, while the lowest one in the Rabka IG 2 intake. The identification of isolates showed that most of the shots contained microorganisms adapted to the conditions prevailing there, e.g. the presence of halophilic bacteria in saline waters. Surprisingly, the waters also contain microorganisms, e.g. *Rhizobium* genus – typical for the soil environment.

