

ANALIZA MIKROBIOLOGICZNA I MOLEKULARNA DLA ZROZUMIENIA ZJAWISK W PORZUCONYM OTWORZE STUDIENNYM

MICROBIOLOGICAL AND MOLECULAR ANALYSIS FOR UNDERSTANDING PHENOMENA IN AN ABANDONED WATER WELL

ANDRZEJ BORKOWSKI¹, DARIUSZ DOBRZYŃSKI², PAWEŁ KOWALCZYK³, DOROTA WOLICKA⁴

Abstrakt. W porzuconym otworze studziennym funkcjonującym w krajowej sieci monitoringu wód podziemnych przeprowadzono badania geomikrobiologiczne. Stwierdzono powszechne, rozległe zarośnięcie ścian otworu oraz wypełnienie światła otworu biomasą mikrobiologiczną na głębokości około 100 m. Przy pomocy analizy mikrobiologicznej wykryto znaczną ilość mikroorganizmów w wodzie, natomiast analiza molekularna próbek biomasy wykazała obecność współistniejących bakterii redukujących siarczany oraz bakterii cyklu żelazowo-siarkowego. Obecność tak rozwiniętych zespołów mikrobiologicznych może być oznaką dopływu wraz z wodą materii organicznej oraz jonów SO_4^{2-} i Fe^{2+} niezbędnych do wzrostu mikroorganizmów stwierdzonych w biomacie, co z kolei może znacząco wpływać na chemizm wody.

Słowa kluczowe: analiza mikrobiologiczna, procesy geomikrobiologiczne, genetyka molekularna, porzucony otwór studzienny, zagrożenie wód podziemnych, wody podziemne.

Abstract. Geomicrobiological studies were performed in the abandoned water well which still function in the national groundwater monitoring network. Extensive biofouling of cases and screens, as well as microbial mat, which completely fill-up the well at the depth of about 100 m, have been found. The microbiological analysis documented abundant microorganisms in water, while the molecular analysis of microbial mat revealed the coexistence of sulphate reducing and iron-sulphur cycle bacteria. The presence of such developed microbiological communities might indicate organic matter and SO_4^{2-} and Fe^{2+} ions supply necessary for the growth of microorganisms found in the mat, which in turn would significantly affect the water chemistry.

Key words: microbiological analysis, geomicrobiological processes, molecular genetics, abandon water well, groundwater threat, groundwater.

¹ Uniwersytet Warszawski, Wydział Geologii, Katedra Ochrony Środowiska i Zasobów Naturalnych, ul. Żwirki i Wigury 93, 02-089 Warszawa; e-mail: a.borkowski@uw.edu.pl

² Uniwersytet Warszawski, Wydział Geologii, Instytut Hydrogeologii i Geologii Inżynierskiej, ul. Żwirki i Wigury 93, 02-089 Warszawa; e-mail: d.r.dobrzynski@uw.edu.pl

³ Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Wydział Rolnictwa i Biologii, Samodzielny Zakład Biologii Mikroorganizmów, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa; e-mail: pawel_kowalczyk@sggw.pl

⁴ Uniwersytet Warszawski, Wydział Geologii, Instytut Geochemii, Mineralogii i Petrologii, ul. Żwirki i Wigury 93, 02-089 Warszawa

WSTĘP

Prezentowane badania skupiały się na procesach biogeochemicznych zachodzących w porzuconym otworze studziennym, który funkcjonuje w ramach krajowej sieci monitoringu wód podziemnych (nr PL06G110_004). Wody podziemne oraz obecne w otworze studziennym mogą być środowiskiem o znacznej aktywności biochemicznej. Jej widocznym efektem jest występowanie złożonych zespołów mikrobiologicznych. Zespoły te charakteryzują się zdolnością do kolonizowania elementów konstrukcyjnych otworu studziennego zależnie od warunków fizyczno-chemicznych (Taylor i in., 1997; Flemming, 2002; Videla, Herrera, 2005). Skrajnym przypadkiem rozwoju aktywności mikrobiologicznej jest kolonizacja dostępnej w otworze powierzchni przez silnie rozwinięte biomyty mikrobiologiczne, w których mogą współwystępować liczne grupy fizjologiczne mikroorganizmów. Biorąc pod uwagę funkcjonalność otworu proces kolonizowania przez zespoły mikrobiologiczne jest niekorzystny. Wpływa silnie na chemizm wody, a także przyspiesza korozję elementów otworu. Jest wynikiem aktywności różnych mikroorganizmów zarówno heterotroficznych ta-

kich, jak np. bakterie redukujące siarczany, czy też chemolitoautotroficznych takich, jak tlenowe bakterie cyklu siarkowego i żelazowego, np. z rodzaju *Thiobacillus*, *Acidithiobacillus* i *Gallionella* (Rao i in., 2000). Obecność bakterii redukujących siarczany może powodować wzrost stężenia siarkowodoru w środowisku i w efekcie obniżenie potencjału oksydoredukcyjnego, z kolei aktywność bakterii siarkowych – wzrost stężenia utlenionych form siarki i obniżenie wartości pH.

Przedmiotem przeprowadzonych badań były procesy geomikrobiologiczne zachodzące w środowisku wodnym porzuconego otworu studziennego, w którym stwierdzono obecność bardzo silnie rozwiniętej biomyty mikrobiologicznej (rozwiniętych zespołów mikroorganizmów porastających powierzchnie). Celem badań było zidentyfikowanie zespołów mikrobiologicznych w wodzie i osadzie z otworu oraz próba wyjaśnienia, na tej podstawie, niepokojących zjawisk notowanych w otworze studziennym. Celem artykułu jest zwrócenie uwagi na przydatność metod geomikrobiologicznych w rozwiązywaniu problemów hydrogeochemicznych.

METODY BADAŃ

Oznaczenie ogólnej liczby bakterii wykonano metodą płytkową z wykorzystaniem gotowych płytek z agarem odżywczym (Nutrient Agar, BIOCORP). Próbkę wody wysiewano na agar metodą powierzchniową po wykonaniu szeregu rozcieńczeń w jałowym roztworze 0,9% NaCl. Płytki inkubowano przez 48 h w temperaturze 25°C, a następnie zliczano wyhodowane kolonie. Badanie wykonano w trzykrotnym powtórzeniu. Oznaczenie obecności bakterii redukujących siarczany w próbce biomyty wykonano za pomocą testu EasyCult S (Orion Diagnostica), natomiast oznaczenie obecności bakterii utleniających żelazo wykonano na podłożu Silvermana.

Analizę zawartości żelaza w próbce biomyty mikrobiologicznej wykonano po uprzednim zliofilizowaniu jej w liofilizatorze (FreeZone, Labconco). Następnie odważoną próbkę rozpuszczono w stężonym kwasie solnym i w otrzymanym roztworze, za pomocą metod spektrofotometrycznych z wykorzystaniem odpowiednio fenantroliny oraz tiocyjanianu amonu oznaczono zawartość jonów Fe^{2+} oraz Fe^{3+} .

Analizę molekularną (16S rDNA) próbek biomyty wykonano po izolacji DNA, do której wykorzystano komercyjne zestawy firmy A&A Biotechnology. Do amplifikacji genów 16S rDNA stosowano, uniwersalne dla królestwa Eubacteria, startery 27F (5'AGAGTTTGATCTGGCTCAG3')

Tm = 56 0C i 1492R, (5'GGTTACCTTGTTACGACTT3') Tm = 54 0C flankujące gen 16s rRNA o wielkości około 1600 par zasad. Produkty amplifikacji genów 16s rDNA oczyszczano z zastosowaniem zestawu QIAquick PCR Purification Qia-gen lub Wizar Genomie DNA purification kit (Promega) w robocie Janus firmy Perkin Elmer, zgodnie z zaleceniami producenta. Następnie sekwencjonowano niezależnie z zestawem obu primerów 27F i 1492R. Sekwencjonowanie przeprowadzono z wykorzystaniem sekwencjatora AbiPrism 3100 Genetic Analyser. Obróbkę i analizę uzyskanych sekwencji DNA przeprowadzono z zastosowaniem programów Finch TV v.2.0 i Chromas oraz BLAST2 Sequences i Blast.

Analizę zawartości węglowodorów aromatycznych i alifatycznych w próbkach wody oraz skał przeprowadzono przy użyciu metod chromatografii gazowej (Trace GC Ultra, Thermo) po wcześniejszej ekstrakcji analitów z matrycy za pomocą heksanu lub metodą ekstrakcji do fazy stałej (SPE). Warunki rozdziału uwzględniały dozownik typu split, detektor FID oraz program temperaturowy pieca w zakresie 50–280°C. Rozdział związków organicznych przeprowadzono na kolumnie kapilarnej Rtx-5 (Restek). Analizę mikroskopową próbek biomyty przeprowadzono z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej po barwieniu materiału oranżem akrydyny.

ZARYS WARUNKÓW GEOLOGICZNYCH I HYDROGEOLOGICZNYCH

Badany otwór studzienny znajduje się w miejscowości Sokołowsko, na południe od Wałbrzycha. W otworze o głębokości 350 m, w skałach osadowych permu dolnego, ujęte są łącznie cztery strefy wodonośne różniące się ciśnieniami i składem chemicznym wód. Otwór, od czasu wykonania w 1980 r., pozostaje nieczynny i porzucony z uwagi na wypadkową złą jakość wody, która wynika głównie z wadliwej jego konstrukcji. Kompleksową charakterystykę warunków geologicznych, hydrogeologicznych, geochemii i mineralogii skał wodonośnych oraz chemizmu wód podziemnych przedstawił Dobrzyński (2009). W wyniku różnicy ciśnień następuje w otworze pionowy przepływ mineralnych wód siarczanowych z dwóch niżej leżących poziomów do płytszych poziomów zawierających wody zwykłe.

Na podstawie wszechstronnych badań stwierdzono w otworze szereg niepokojących zjawisk. Rozwój mikroorganizmów spowodował rozległą intensywną kolmatację

filtrów i rur międzyfiltrowych osadem, zbudowanym głównie z siarczku żelaza i węglanu wapnia. W efekcie czego wewnętrzna średnica otworu uległa zwężeniu o około 5–8 cm. Na głębokości około 100 m, przy użyciu kamery, stwierdzono biomatę wypełniającą już całe jego światło. W ostatnich latach stwierdzono pogorszenie się jakości wody w otworze, m.in.: spadek stężenia tlenu i E_H oraz wzrost pH (Dobrzyński, Mitreǵa, 2013). W quasi-stagnującej wodzie zanotowano obecność różnorodnych związków organicznych (głównie benzen, toluen, etylobenzen oraz ksyleny – tzw. BTEX, oraz WWA i węglowodory alifatyczne) (Dobrzyński, Mitreǵa, 2013). Trwająca od ponad 30 lat intruzja wód mineralnych w poziomy wód zwykłych zagraża jakości tych ostatnich. Wadliwa konstrukcja sprawia również, że otwór, który nadal funkcjonuje w sieci monitoringu krajowego, dostarcza niemiernodajnych danych (Dobrzyński, Mitreǵa, 2013).

WYNIKI I DYSKUSJA

Oznaczenia ogólnej liczby bakterii w próbkach wody pobranych z różnych głębokości z otworu studziennego wykazały obecność znacznej liczby mikroorganizmów, przekraczającej 4000 jtk/ml w próbkach wody pobranych najbliższej zwierciadła (tab. 1). Wraz z głębokością, generalnie, ilość bakterii spadała osiągając wartość 67 jtk/ml na głębokości 90 m.

W badanym otworze studziennym stwierdzono obecność silnie rozwiniętej struktury mikrobiologicznej o charakterze gęstej homogennej czarnej biomaty. Pobrana z głębokości około 97 m p.p.t. próbka ujawniła, że biomata ta jest zbudowana prawie w całej objętości z nitkowatych kolonii mikroorganizmów (fig. 1). Za pomocą oznaczeń hodowlanych wyizolowano heterotroficzne bakterie redukujące siarczany (BRS), a także autotroficzne mikroorganizmy utleniające jony Fe^{2+} . Wynik ten jest interesujący, bowiem za utlenianie

żelaza odpowiadają mikroorganizmy wymagające środowiska tlenowego, natomiast BRS są organizmami stricte bez-tlenowymi. Współistnienie tych dwóch grup bakterii może się wydawać zaskakujące, jednak, jeżeli przyjąć, że aktywność BRS prowadzi do powstawania, potwierdzonego mineralogicznie, siarczku żelaza (II) to obecność w wodzie nawet nieznacznych ilości tlenu promuje wzrost bakterii utleniających żelazo w warunkach mikroaerofilnych. Obecnie stężenie tlenu rozpuszczonego w quasi-stagnującej wodzie wynosi około 0,25 mg/L (Dobrzyński, Mitreǵa, 2013). W badanej biomacie mikrobiologicznej stwierdzono aż 28 mg Fe^{2+} /g s.m. oraz 111 mg Fe^{3+} /g s.m. Analiza molekularna próbek maty na podstawie amplifikacji i sekwencjonowania silnie konserwowanego fragmentu genu 16S rDNA wykazała obecność BRS z rodzajów: *Desulfovibrio*, *Desulfomonas*,

Tabela 1

Ogólna liczba bakterii w próbkach wody z różnych głębokości w otworze

The total number of bacteria in water samples at various depths in water well

Głębokość [m poniżej zwierciadła]	Średnia liczba bakterii [jtk/ml]	SD	N
5	4537	387	3
33	310	30	3
50	957	91	3
90	67	15	3

jtk – jednostki tworzące kolonie, SD – odchylenie standardowe, N – liczba powtórzeń
cfu – colony forming units, SD – standard deviation, N – number of replicates

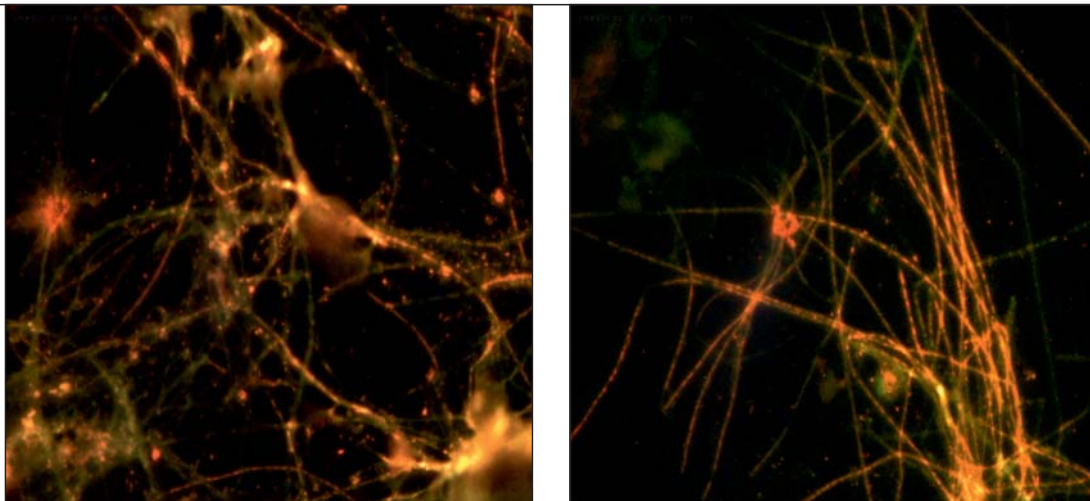


Fig. 1. Nitkowate kolonie mikroorganizmów budujące biomatę

Obrazy mikroskopii fluorescencyjnej (600x). Barwienie oranżem akrydyny

Filamentous colonies of microorganisms building the microbial mat

Fluorescence microscopy pictures (600x). Staining with acridine orange

Desulfobacillus, *Desulfobulbus*, *Desulfonema*, oraz tlenowych bakterii utleniających żelazo z rodzajów *Acidithiobacillus* i *Gallionella* (tab. 2). Należy podkreślić, że w literaturze przedmiotu są opisywane układy mikrobiologiczne, w których stwierdza się obecność i wzrost BRS w warunkach mikroaerofilnych. Bade i in. (2000) stwierdzają możliwość wzrostu tych bakterii szczególnie w warunkach tzw. konsorcjów mikrobiologicznych.

W celu wyjaśnienia powstania w otworze tak rozwiniętej maty mikrobiologicznej można przyjąć dwie zbieżne, co do

efektów, hipotezy. Pierwsza wskazuje, że wzrost BRS mógł być uwarunkowany dopływem wraz z wodami materii organicznej oraz jonów SO_4^{2-} , które są wykorzystywane jako ostatni akceptor elektronów. Hipotezę tę potwierdza obecność w wodzie związków ropopochodnych (Dobrzyński, Mitrega, 2013), głównie BTEX, które są dobrym źródłem węgla organicznego dla BRS. Drugą hipotezą jest rozwój maty w wyniku pierwotnej produkcji autotroficznych mikroorganizmów utleniających Fe^{2+} . Produkty tej grupy bakterii wraz z jonami SO_4^{2-} również mogą uzasadnić rozwój BRS. W obydwu

Tabela 2

Szczepy mikroorganizmów charakteryzujące się największym podobieństwem sekwencji fragmentu genu 16S rDNA do materiału wyizolowanego z próbki biomaty

Strains of microorganisms which characterise the highest similarity of sequence the 16S rDNA genome fragment to material isolated from the microbial mat sample

Szczep	% podobieństwa
<i>Thermosulfobacterium</i> sp.	100
<i>Thermosulfobacterium</i> sp.	99
<i>Desulfovibrio</i> sp.	99
<i>Desulfomonas</i> sp.	99
<i>Desulfobacillus</i> sp.	99
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	98
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	98
<i>Desulfonema limicola</i>	98
<i>Desulfobulbus propionicus</i>	98
<i>Sulfolobus</i> sp.	98
<i>Gallionella ferruginea</i>	98

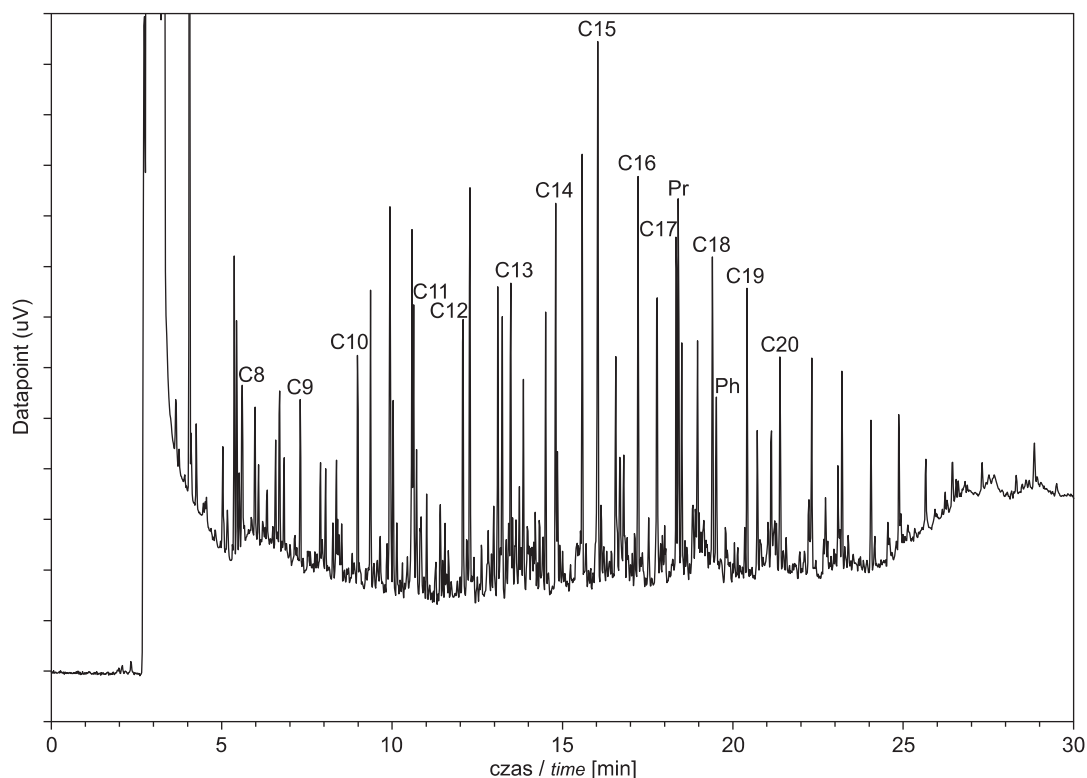


Fig. 2. Chromatogram związków ropopochodnych wyekstrahowanych z próbki skały łupkowej

Zaznaczono sygnały pochodzące od alkanów (C₈–C₂₀) oraz biomarkery: Pr – pristan, Ph – fitan

Chromatogram of petroleum products extracted from the shale rock sample

Noted signals from alkanes (C₈–C₂₀) and biomarkers: Pr – pristane, Ph – phytane

przypadkach, rozwój maty może wtórnie wpływać na chemizm wody w otworze. Bakterie redukujące siarczany produkują siarkowodór, co może prowadzić do wzrostu pH głównie w wyniku hydrolizy siarczków, a także wytrącania się nierozpuszczalnych siarczków, jak np. mackinawitu (FeS). Z kolei, utlenianie FeS przez bakterie „żelazowe” w obecności niewielkich ilości tlenu powoduje biokorozję otworu studziennego (Rao i in., 2000). Wykonana przez

autorów analiza próbek skał łupkowych z badanego terenu ujawniła w nich obecność alkanów na poziomie 10 mg/kg (fig. 2), oraz mono- i wielo- pierścieniowych węglowodorów aromatycznych, co wspiera postawione wyżej hipotezy i wskazuje, że źródłem zanieczyszczenia wód węglowodorami może być ośrodek skalny, a nie materiały użyte do konstrukcji otworu.

WNIOSKI

Wykorzystanie metod mikrobiologicznych i molekularnych pozwala na znacznie pełniejsze wnioskowanie o procesach odpowiedzialnych za kształtowanie składu chemicznego wód. Może ono pomóc także w planowaniu i wdrażaniu działań prewencyjnych i remediacyjnych służących poprawie sprawności studzien.

Konstrukcja badanego otworu studziennego i zachodzące w nim procesy stworzyły wieloletnie zagrożenie dla jakości zwykłych wód podziemnych.

Wskazane procesy biogeochemiczne modyfikują skład chemiczny wody i generują substancje pogarszające jej ja-

kość. Procesy te sprzyjają równocześnie kolmatacji i korozji otworu.

Przydatność danych pochodzących z badanego otworu do celów monitoringu jest wątpliwa, a jego reprezentatywność wymaga pilnej rewizji (Dobrzyński, Mitrega, 2013). Wyniki badań mikrobiologicznych i molekularnych wykazały, że prowadząc weryfikację i ocenę reprezentatywności punktów monitoringu wód podziemnych należy wykorzystywać także możliwości, jakie dają nowoczesne metody geomikrobiologiczne.

LITERATURA

- BADE K., MANZ W., SZEWZYK U., 2000 — Behavior of sulfate reducing bacteria under oligotrophic conditions and oxygen stress in particle-free systems related to drinking water. *FEMS Microbiology Ecology*, **32**: 215–223.
- DOBRYŃSKI D., 2009 — Geochemistry and age of groundwater in a hydrochemically diversified aquifer (Permo-Carboniferous, the Intra-Sudetic Synclinorium, SW Poland) derived from geochemical modelling and isotopic studies. *Acta Geol. Pol.*, **59**, 3: 371–411.
- DOBRYŃSKI D., MITRĘGA J., 2013 — Research in abandoned well questions the practice or well representativity criteria used in selecting for groundwater monitoring sites. *Biul. Państw. Inst. Geol.*, **456**, *Hydrogeol.* 14/1: 105–112.
- FLEMMING H.C., 2002 — Biofouling in water systems – cases, causes and countermeasures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **59**: 629–640.
- RAO T.S., SAIRAM T.N., VISWANATHAN B., NAIR K.V.K., 2000 — Carbon steel corrosion by iron oxidising and sulphate reducing bacteria in a freshwater cooling system. *Corrosion Science*, **42**: 1417–1431.
- TAYLOR S.W., LANGE C.R., LESOLD E.A., 1997 — Biofouling of contaminated ground-water recovery wells: characterization of microorganisms. *Ground Water*, **35**, 6: 973–980.
- VIDELA H.A., HERRERA L.K., 2005 — Microbiologically influenced corrosion: looking to the future. *International Microbiology*, **8**: 169–180.

SUMMARY

Multidisciplinary research methods from the hydrogeochemistry-microbiology borderland have been successfully applied for better understanding the phenomenon of monitoring water well colonization by the microbial communities. Analysis of water chemistry combined with microbiological and molecular genetics studies allowed to indentify the succession of microbiological consortium, and the role of groundwater chemistry. The community of coexisting sulphate reducing and iron-sulphur cycle bacteria responses for serious bio-

fouling of the well. Mineral groundwater supplies the studied microbial system with organic compounds (hydrocarbons) as well as sulphate and iron ions necessary for bacteria growth.

Geomicrobiological factors significantly influence the groundwater chemistry, and should be also taken into account during the evaluation of well construction stability, as well as during verification of water wells' suitability for groundwater monitoring system.