

# Tężnie

jako czynnik kształtujący  
mikrobiologiczną jakość powietrza  
w uzdrowisku



Aleksandra Burkowska-But

# Tężnie

jako czynnik kształtujący  
mikrobiologiczną jakość powietrza  
w uzdrowisku



WYDAWNICTWO NAUKOWE  
UNIwersYTETU  
MIKOŁAJA KOPERNIKA

Toruń 2016

Recenzent  
*Krzysztof Frączek*

Redakcja  
*Magdalena Szczepańska*

Projekt okładki  
*Tomasz Jaroszewski*

© Copyright by Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Mikołaja Kopernika  
Toruń 2016

ISBN 978-83-231-3714-6

WYDAWNICTWO NAUKOWE UMK  
ul. Gagarina 5, 87-100 Toruń  
REDAKCJA: tel. (56) 611 42 95; fax (56) 611 47 05  
e-mail: [wydawnictwo@umk.pl](mailto:wydawnictwo@umk.pl)  
DYSTRYBUCJA: tel./fax (56) 611 42 38  
e-mail: [books@umk.pl](mailto:books@umk.pl)  
[www.wydawnictwoumk.pl](http://www.wydawnictwoumk.pl)  
DRUK I OPRAWA: Drukarnia WN UMK

## Spis treści

1. Wstęp .....	9
2. Przegląd literatury .....	11
2.1. Mikrobiologiczne zanieczyszczenie powietrza .....	11
2.1.1. Powietrze jako środowisko występowania drobnoustrojów .....	16
2.1.2. Bioaerazol miejski .....	18
2.1.3. Znaczenie bioaerozoli dla zdrowia człowieka .....	22
2.2. Miejscowości uzdrowskowe .....	24
2.2.1. Stan badań jakości powietrza w uzdrowskach w Polsce	26
2.2.2. Mikroklimat strefy okołotężniowej .....	27
2.3. Charakterystyka solanek leczniczych .....	29
2.3.1. Solanki lecznicze Ciechocinka .....	30
2.3.2. Solanki lecznicze w Inowrocławiu .....	32
2.3.3. Solanki jako środowisko życia drobnoustrojów .....	32
2.4. Formowanie biofilmu jako strategia przetrwania bakterii w niekorzystnych warunkach .....	35
3. Założenia i cel pracy .....	39
4. Materiały i metody .....	41
4.1. Charakterystyka badanych obiektów .....	41
4.1.1. Uzdrowsko Ciechocinek .....	41
4.1.2. Uzdrowsko Inowrocław .....	43
4.1.3. Tężnie .....	44
4.2. Lokalizacja i charakterystyka stanowisk badawczych .....	48
4.2.1. Lokalizacja i charakterystyka stanowisk badawczych w Ciechocinkui .....	48
4.2.2. Lokalizacja i charakterystyka stanowisk badawczych w Inowrocławiu .....	50
4.3. Pobór próbek powietrza do badań mikrobiologicznych .....	52

---

4.4. Pomiar parametrów mikroklimatycznych .....	52
4.5. Oznaczanie liczebności drobnoustrojów w powietrzu .....	53
4.6. Ocena zanieczyszczenia mikrobiologicznego powietrza .....	54
4.7. Analiza jakościowa bioaerozolu .....	54
4.7.1. Analiza jakościowa aerozolu bakteryjnego .....	54
4.7.2. Analiza jakościowa aerozolu grzybowego .....	55
4.8. Analiza solanek tęźniowych .....	55
4.8.1. Pobór solanek do badań .....	55
4.8.2. Analiza chemiczna solanek tęźniowych.....	56
4.8.3. Oznaczenie ogólnej liczby bakterii w solankach tęźniowych .....	56
4.9. Ocena bioróżnorodności drobnoustrojów w solankach tęźniowych .....	57
4.10. Przeżywalność bakterii w solankach tęźniowych .....	58
4.11. Tworzenie biofilmu przez potencjalne patogeny układu oddechowego w solankach tęźniowych .....	59
4.11.1. Tworzenie biofilmu na powierzchni płytek titracyjnych .....	59
4.11.2. Ocena ilości wytworzonego biofilmu .....	60
4.11.3. Tworzenie biofilmu na gałązkach tarniny .....	61
4.11.4. Oznaczanie stężenia tanin uwalnianych z gałązek tarniny .....	61
4.11.5. Aktywność hydrolityczna biofilmu .....	62
4.12. Analiza statystyczna .....	62
5. Wyniki i dyskusja .....	63
5.1. Analiza ilościowa i jakościowa bakterii w powietrzu uzdrowiska Ciechocinek .....	63
5.2. Analiza ilościowa i jakościowa grzybów pleśniowych w powietrzu uzdrowiska Ciechocinek .....	76
5.3. Analiza porównawcza liczebności bakterii i grzybów pleśniowych występujących w powietrzu uzdrowisk Ciechocinek i Inowrocław .....	85
5.4. Analiza solanek tęźniowych z Ciechocinka .....	90
5.5. Ocena bioróżnorodności mikroorganizmów w solankach tęźniowych Ciechocinka .....	92
5.6. Przeżywalność potencjalnych patogenów układu oddechowego w solankach tęźniowych .....	97

---

5.7. Tworzenie biofilmu w środowisku solanek tężniowych .....	107
5.7.1. Aktywność hydrolityczna biofilmu .....	116
5.8. Analiza wpływu aerozolu solankowego na mikrobiologiczne zanieczyszczenia powietrza w otoczeniu otwartych inhalatorów .....	119
6. Podsumowanie i wnioski .....	125
7. Literatura .....	129
8. Streszczenie .....	155



## Wstęp

Powietrze jest jednym z podstawowych komponentów środowiska, otacza człowieka zewsząd i przez całe życie. W ciągu doby człowiek wykonuje ok. 20–22 tysięcy oddechów, podczas których pobiera do płuc około 10–12 tys. litrów, czyli 12–14 kg powietrza (Cabral 2010; Chmiel i wsp. 2015). Jest to bez porównania więcej niż wypija w tym czasie wody i spożywa żywności. Dlatego jakość powietrza, którym oddycha człowiek, ma znaczący wpływ na jego zdrowie. Dowodzi to istotności tego środowiska i konieczności jego ochrony przed coraz większym zanieczyszczeniem (Liang i wsp. 2012; Stern i wsp. 2014).

Źródła zanieczyszczeń powietrza są bardzo różnorodne. W powietrzu atmosferycznym, obok różnego typu szkodliwych dla zdrowia pyłów, gazów i par, występują także liczne mikroorganizmy. W związku z tym słuszne jest stwierdzenie, że już od pierwszego oddechu żyjemy w oceanie drobnoustrojów. Powietrze jest środowiskiem niesprzyjającym przeżyciu mikroorganizmów, bo nie mogą one w nim rosnąć i dzielić się, ale jest ośrodkiem ich czasowego przebywania i umożliwia im przemieszczanie się nawet na duże odległości (Otake i wsp. 2010; Després i wsp. 2012; Polymenakou 2012).

Obecnie coraz bardziej popularne są metody leczenia wykorzystujące walory środowiska naturalnego. Kontakt z przyrodą, a także bodźce klimatyczne sprzyjają uruchomieniu naturalnych mechanizmów regeneracyjnych i odpornościowych organizmu (Helbin, Kotlarczyk 2005). Warunkiem przydatności danego obszaru do leczenia uzdrowiskowego są m.in. jego walory krajobrazowe, naturalne czynniki lecznicze,

w tym odpowiednie warunki bioklimatyczne. Właściwa jakość powietrza, również pod względem mikrobiologicznym, powinna być jednym z podstawowych kryteriów rozważania funkcji leczniczych i profilaktycznych uzdrowiska. Niestety nawet w uzdrowiskach, w których leczy się choroby dróg oddechowych, stosunkowo rzadko przeprowadza się badania mikrobiologicznych zanieczyszczeń powietrza.

Niezaprzeczalnie biologiczne zanieczyszczenia powietrza wywierają ogromny wpływ na zdrowie osób, które już cierpią na przewlekłe choroby układu oddechowego i z tego powodu korzystają z lecznictwa uzdrowiskowego (Prunk i wsp. 2008; Krupa 2009). W związku z powyższym w niniejszej pracy dokonano oceny wpływu aerozolu solankowego emitowanego przez tężnie, coraz częściej budowane w polskich uzdrowiskach, na mikrobiologiczną jakość powietrza.

## Przegląd literatury

### 2.1. Mikrobiologiczne zanieczyszczenie powietrza

Atmosfera jest najbardziej zewnętrzną powłoką otaczającą Ziemię. Ta stosunkowo cienka warstwa mieszaniny gazów pozbawionych zapachu i smaku często nazywana jest zamiennie „powietrzem atmosferycznym”. Zawartość poszczególnych składników atmosfery zależy od różnych czynników, m.in. od położenia geograficznego, aktywności wulkanów, intensywności procesu fotosyntezy, stopnia antropopresji bądź też działalności organizmów żywych. W wyniku rozwoju przemysłu i powstawania obszarów silnie zurbanizowanych do powietrza atmosferycznego wprowadza się coraz więcej różnorodnych zanieczyszczeń, wpływających na powstawanie zagrożeń dla zdrowia ludzi (Stern i wsp. 2014).

Poza zanieczyszczeniami pyłowymi i gazowymi powietrze zawsze zawiera pewną ilość zanieczyszczeń mikrobiologicznych. Szacuje się, że ponad jedną czwartą całkowitej ilości cząstek stałych zawieszonych w powietrzu mogą stanowić cząstki biologiczne (Matthais-Maser i wsp. 2000; Jones, Harrison 2004). Zaliczamy do nich wirusy, bakterie, grzyby i ich zarodniki, a także pyłki i wszelkie fragmenty roślin i zwierząt występujące w powietrzu w postaci aerozoli (Fuzzi i wsp. 2006; Després i wsp. 2012; Polymenakou 2012).

Biologiczne zanieczyszczenia w powietrzu budziły zainteresowanie od początku badań naukowych aerozoli atmosferycznych. Pod koniec XIX wieku badaniem bioaerozoli zajmował się m.in. Ludwik Pasteur, natomiast Pierre Miguel wykazał, że śmiertelność ludzi w Paryżu zale-

ży od stężenia bakterii w powietrzu. Od tego czasu aerobiologia, czyli nauka badająca cząstki biologiczne w powietrzu stała się uznaną wielodyscyplinarną dziedziną badań naukowych, która współdziała z szeregiem nauk fizycznych, biologicznych i medycznych (Xu i wsp. 2011; Després i wsp. 2012).

Obecnie zanieczyszczeniom mikrobiologicznym powietrza poświęca się coraz więcej uwagi. Wynika to przede wszystkim z negatywnego wpływu drobnoustrojów na stan zdrowia ludzi, zwierząt czy roślin (Rossi i wsp. 2005; Dalziel i wsp. 2013; Stern i wsp. 2014). Przenoszona drogą powietrzną mikroorganizmy powodują też korozję i rozkład materiałów budowlanych (Mohammadi, Krumbein 2008), psucie żywności i niszczenie materiałów archiwalnych (Aira i wsp. 2007). Należy przy tym podkreślić, że rozprzestrzenianie zanieczyszczeń mikrobiologicznych następuje najszybciej właśnie drogą powietrzną (Griffin i wsp. 2007; Polymenakou 2012). Ilość drobnoustrojów wprowadzanych każdego roku do atmosfery w skali globalnej szacuje się na  $10^{24}$  (Burrows i wsp. 2009b).

Zanieczyszczenia biologiczne w atmosferze występują w postaci bioaerozoli (tab. 1). Aerozol biologiczny to swoisty układ koloidalny 2- lub 3-składnikowy, zbudowany z fazy rozpraszającej (dyspersyjnej), czyli powietrza, oraz z fazy rozproszonej w formie stałej bądź też ciekłej. W skład fazy rozproszonej bioaerozoli wchodzi niewielkie cząstki wody, związki organiczne pochodzące od ludzi i zwierząt, a także cząstki stałe, takie jak: zarodniki grzybów, komórki bakterii, pyłki roślin i cząsteczki kurzu (Libudzisz i wsp. 2007; Liang i wsp. 2012).

Tabela 1. Podział bioaerozoli (Krzysztofik 1992)

Kategoria podziału	Podział	Charakterystyka
Źródło zanieczyszczenia	naturalne	podnoszenie pyłu glebowego, pyłki roślin, zarodniki grzybów
	antropogeniczne	rolnictwo, przemysł, aktywność bytowa człowieka
Charakter źródła	punktowe	oczyszczalnia ścieków, kompostownia, kurnik
	obszarowe	łąka, pole uprawne
	liniowe	droga, ciąg komunikacyjny

Tabela 1. Podział bioaerozoli (Krzysztofik 1992) cd.

Szkodliwość dla zdrowia	saprofityczne	mikroorganizmy saprofityczne
	patogenne	mikroorganizmy chorobotwórcze
	mieszane	mikroorganizmy saprofityczne i chorobotwórcze
Wielkość cząstek	faza gruboziarnista	$\varnothing > 100 \mu\text{m}$
	faza drobnoziarnista	$\varnothing 50\text{--}100 \mu\text{m}$
	faza kropelkowo-jądrowa	$\varnothing 1\text{--}50 \mu\text{m}$
	faza pyłu bakteryjnego	$\varnothing 0,2\text{--}50 \mu\text{m}$

Rozmiar cząstek bioaerozolu zależy przede wszystkim od rodzaju materiału, który go tworzy. Pyłki roślin wiatropylnych mają zwykle średnicę 17–58  $\mu\text{m}$ , zarodniki grzybów mieszczą się zazwyczaj w granicach 1–30  $\mu\text{m}$ , bakterie mają rozmiar 0,25–8  $\mu\text{m}$ , a średnica wirusów jest zwykle mniejsza niż 0,3  $\mu\text{m}$  (Jones, Harrison 2004). Bakterie w powietrzu mogą występować jako aglomeraty komórek, mogą też być transportowane na fragmentach roślinnych lub zwierzęcych, a także na cząstkach gleby lub pyłkach. Z kolei wirusy najczęściej są transportowane w większych kropelkach płynów i wydzielin wytwarzanych przez zwierzęta i ludzi (Jones, Harrison 2004). Ze względu na pochodzenie bioaerozole dzieli się na naturalne i antropogeniczne (Krzysztofik 1992). Bioaerozole naturalne powstają najczęściej podczas wietrznej pogody, kiedy do atmosfery wprowadzane są cząstki gleby, szczątki roślin i aerozole wodne. Natomiast bioaerozole generowane w wyniku działalności człowieka powstają m.in. podczas zabiegów agrotechnicznych, w zakładach gospodarki komunalnej (przede wszystkim w kompostowniach, w sortowniach i na składowiskach odpadów, a także w oczyszczalniach ścieków) oraz w trakcie hodowli zwierząt na dużych fermach (Lighthart, Mohr 2012; Gotkowska-Płachta i wsp. 2013; Kalwasińska i wsp. 2014). Ważnym źródłem bioaerozoli antropogenicznych jest transport samochodowy. Ponadto sam człowiek i jego codzienna aktywność życiowa (oddychanie, kaszel, kichanie, rozmowa, czynności higieniczne) wprowadzają do powietrza atmosferycznego liczne drobnoustroje (Libudzisz i wsp. 2007; Lighthart, Mohr 2012).

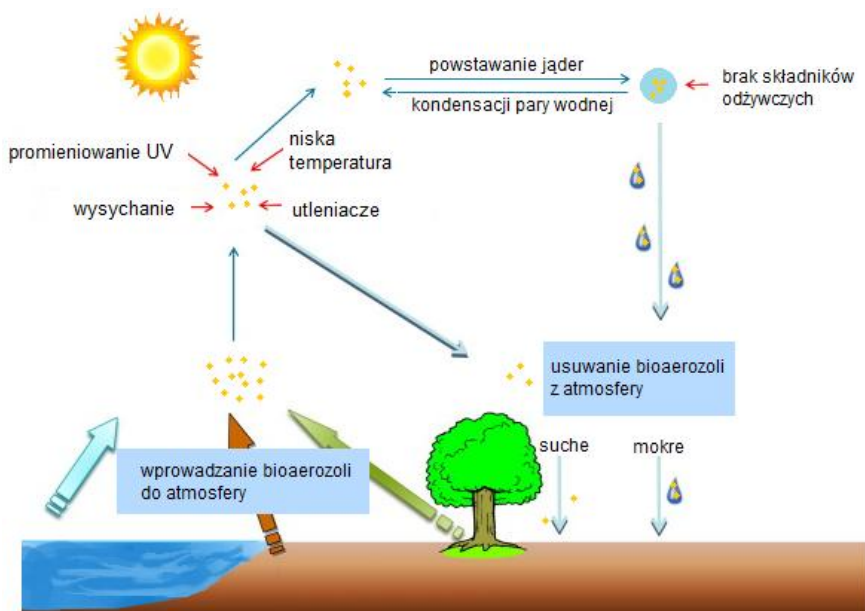
Uwolnienie drobnoustrojów z podłoża i wprowadzenie ich do atmosfery jest uzależnione zarówno od parametrów mikroklimatycznych (temperatury, wilgotności, siły wiatru), jak i od sposobu wykorzystania i pokrycia szatą roślinną danego terenu (tereny miejskie, wiejskie, zbiorniki wodne). Mechanizmy biorące udział w tych procesach, mimo licznych badań, z powodu dużej złożoności nadal pozostają nie do końca poznane. Nawet pojedyncze czynniki nie zawsze działają jednoznacznie, a zachodzące pomiędzy nimi interakcje dodatkowo utrudniają wyjaśnienie złożonych procesów decydujących o obecności mikroorganizmów w powietrzu atmosferycznym.

Rozprzestrzenianie cząstek aerozoli biologicznych odbywa się głównie przez przenoszenie ich za pomocą konwekcyjnych prądów powietrza. Szczególnie cząstki o średnicy aerodynamicznej 3–10  $\mu\text{m}$  mogą pozostawać zawieszane w powietrzu przez dłuższy czas, co umożliwia ich transport na znaczne odległości, sięgające tysięcy kilometrów. Na przykład mikroorganizmy osadzone na cząstkach saharyjskiego pyłu mogą być transportowane przez Atlantyk. Ich obecność stwierdzano m.in. w północno-wschodniej Amazonii i na Florydzie (Griffin i wsp. 2001; Prospero i wsp. 2005).

Czas pozostawania każdej cząstki w atmosferze zależy od wielu czynników (ryc. 1). Na tempo jej sedymentacji oraz prędkości transportu wpływają m.in. gęstość oraz kształt. Przeżywalność cząstki biologicznej w powietrzu atmosferycznym zależy również od jej wielkości – mniejsze cząstki są bardziej podatne na uszkodzenia powodowane przez czynniki środowiskowe (Jones, Harrison 2004).

Dostępność wody i temperatura wpływają przede wszystkim na intensywność rozwoju grzybów pleśniowych i bakterii wchodzących w skład bioaerozoli, czyli decydują o ilości obecnego w środowisku „materiału źródłowego”. Ponadto ściśle określone warunki meteorologiczne mogą być konieczne do uwolnienia cząstek biologicznych do atmosfery, np. niektórym grzybom obecność wody w postaci deszczu lub rosy jest niezbędna do aktywnego uwalniania zarodników. Z drugiej jednak strony duża wilgotność lub występowanie opadów często utrudnia wprowadzanie mikroorganizmów do powietrza, ponieważ w przypadku bioaerozoli uwalnianych z po-

wierzchni gleby materiał, z którego są podnoszone, powinny być suche (Stout 2001).



Ryc. 1. Schemat cyklu życiowego mikroorganizmów w atmosferze z uwzględnieniem czynników limitujących ich przeżywalność (na podst. Amato 2006 oraz Delort i wsp. 2010)

Trzeba również wziąć pod uwagę, że przy odpowiednio wysokiej wilgotności cząstki stałe zawieszone w powietrzu, w tym cząstki bioaerozoli, mogą pełnić funkcję jąder kondensacji pary wodnej i przyczyniać się do powstawania opadów atmosferycznych (Delort i wsp. 2010; Joly i wsp. 2013). Dzięki opadom deszczu, śniegu lub gradu troposfera jest szybko oczyszczana zarówno z pyłów i gazów, jak i z mikroorganizmów wchodzących w skład bioaerozoli. W ten sposób obecność niektórych typów zanieczyszczeń przyczynia się do oczyszczania atmosfery.

Również wpływ wiatru na obecność bioaerozoli w powietrzu nie jest jednoznaczny. Jednym z głównych mechanizmów wprowadzających mikroorganizmy do atmosfery jest podnoszenie cząstek glebowych właśnie przez wiatr (Lighthart i wsp. 2009; Lighthart, Mohr

2012). Paradoksalnie również brak wiatru, ograniczając mieszanie mas powietrza, może w konsekwencji powodować wyższe stężenia bioaerozoli (Jones, Harrison 2004; Delort i wsp. 2010).

### 2.1.1. Powietrze jako środowisko występowania drobnoustrojów

Ze względu na niesprzyjające warunki środowiskowe atmosfera jest miejscem jedynie czasowego bytowania mikroorganizmów. Burrows i wsp. (2009a) oszacowali, że średni czas przebywania komórki bakteryjnej w powietrzu atmosferycznym może wynosić 3–25 dni, w zależności od źródła emisji i warunków meteorologicznych. Wiele badań wskazuje, że drobnoustroje mogą nie tylko przetrwać, ale i zachować pełną żywotność w tym środowisku. Metabolicznie aktywne mikroorganizmy były wykrywane w atmosferze na wysokości 20–70 km (Womack i wsp. 2010; Bowers i wsp. 2012; Maki i wsp. 2013). Bakterie obecne w próbkach powietrza pobieranych z chmur były aktywne i zdolne do rozmnażania nawet podczas inkubacji w warunkach przechłodzonych, ale ich czas generacji mieścił się pomiędzy 3,6 a 19,5 doby (Sattler i wsp. 2001; Amato i wsp. 2007a; Amato i wsp. 2015).

Przeżywalność drobnoustrojów w powietrzu zależna jest od odporności właściwej dla danego mikroorganizmu (Delort i wsp. 2010) oraz od warunków środowiskowych (Tang 2009). Zdecydowanie lepiej do przeżycia w powietrzu przystosowane są formy przetrwalne mikroorganizmów, np. spory bakterii z rodzaju *Bacillus*. Wysoka zawartość kwasu dwupikolinowego (do 10% s.m.), zapewniająca odporność na wysychanie i szkodliwe działanie promieniowania UV, umożliwia im przeżycie w warunkach abiotycznych przez długi, praktycznie nieograniczony czas (Setlow 2001). Także inne formy przetrwalne drobnoustrojów, m.in. konidia promieniowców i zarodniki grzybów, mogą w powietrzu przeżyć zdecydowanie dłużej niż formy wegetatywne.

Ważnym mechanizmem decydującym o przeżyciu komórek wegetatywnych mikroorganizmów w powietrzu jest wytwarzanie barwników karotenoidowych. Pełnią one funkcję przeciwutleniaczy i chronią przed fotooksydacją pod wpływem promieniowania UV (González-Toril i wsp. 2009).

Głównymi czynnikami fizycznymi mającymi wpływ na przeżywalność drobnoustrojów w atmosferze są: promieniowanie słoneczne, wilgotność i temperatura. Światło widzialne, wchodzące w skład promieniowania słonecznego, może mieć słabe działanie bakteriobójcze, oparte głównie na wywoływaniu efektu fotodynamicznego (Maish 2006). Promieniowanie ultrafioletowe (250–400 nm) jest bardziej szkodliwe dla mikroorganizmów (Chen i wsp. 2009; Garrido-Pereira i wsp. 2013). Stosunkowo mały rozmiar cząstek bioaerozolu, a także duże natężenie UV w promieniowaniu słonecznym i jednocześnie zubożenie warstwy ozonowej w stratosferze, zwłaszcza na dużych wysokościach, powodują letalne uszkodzenia materiału genetycznego drobnoustrojów. W konsekwencji następuje eliminacja najbardziej wrażliwych gatunków drobnoustrojów i zmiana składu gatunkowego bioaerozoli (Amato i wsp. 2007c).

Bakterie mogą pochłaniać z powietrza znaczne (w odniesieniu do ich suchej masy) ilości wody (Peccia i wsp. 2001; Chaudhry i wsp. 2013). Mimo to przemieszczanie się drobnoustrojów w postaci bioaerozoli jest nierozzerwalnie związane ze stresem środowiskowym powodowanym wysuszeniem komórki. Zmiany zachodzące podczas wysychania najprawdopodobniej prowadzą do reakcji sieciowania cząsteczek białkowych, co powoduje utratę ich funkcji biologicznych. Dodatkowo odwodnione komórki bakteryjne mogą być bardziej wrażliwe na inne czynniki środowiskowe, np. promieniowanie UV, ponieważ zmiana struktury białek enzymatycznych wpływa na skuteczność systemów naprawy DNA (Peccia i wsp. 2001). W związku z tym mikroorganizmy mogą lepiej przetrwać w środowisku o dużej wilgotności względnej (Wang i wsp. 2001). Funkcję ochronną przed wysychaniem pełnią m.in. otoczki, występujące np. u bakterii z rodzaju *Klebsiella*, lub duża zawartość lipidów w ścianie komórkowej u *Mycobacterium tuberculosis*.

Podwyższenie temperatury, szczególnie przy niskiej wilgotności powietrza, zwykle prowadzi do wysuszania komórek bakterii. Natomiast obniżenie temperatury poniżej 0°C może prowadzić do powstania kryształków lodu, które uszkadzają struktury wewnątrzkomórkowe i błonę cytoplazmatyczną. Dlatego do ekstremalnych warunków temperaturowych często panujących w atmosferze zdecydowanie lepiej

niż formy wegetatywne przystosowane są formy przetrwalne. Stabilność aerozolu złożonego z zarodników *Bacillus subtilis* obserwowano w zakresie temperatur -29–49°C (Ehrlich i wsp. 1970).

Oprócz warunków meteorologicznych ważnym czynnikiem wpływającym na przeżywalność drobnoustrojów w powietrzu atmosferycznym są pyłowe i gazowe zanieczyszczenia powietrza. Wysoka zawartość w powietrzu nietoksycznych aerozoli niebiologicznych (pyły, mgły) powoduje rozpraszanie i pochłanianie promieniowania słonecznego, zwiększając szanse na przeżycie mikroorganizmów (Hara, Zhang 2012; Cao i wsp. 2014). Natomiast niektóre zanieczyszczenia chemiczne (węglowodory, tlenki azotu, tlenek węgla) pod wpływem promieniowania UV tworzą silnie reaktywne utleniacze fotochemiczne, które oddziałują toksycznie na wszelkie organizmy żywe bytujące w powietrzu (Bartosz 2008).

### 2.1.2. Bioaerazol miejski

Bioaerazole różnych miast różnią się pod względem składu gatunkowego i liczebności bakterii, dlatego nie można stworzyć jednego opisu typowego bioaerazolu miejskiego (Brodie i wsp. 2007; Barberán i wsp. 2015). Większość przeprowadzonych dotychczas analiz i porównań bioaerazoli miejskich oraz innych środowisk koncentrowała się raczej na porównaniu liczebności bakterii niż ich bioróżnorodności (tab. 2).

Tabela 2. Liczebności drobnoustrojów w bioaerazolu miejskim

Miejsce badań	Liczebność bakterii	Liczebność grzybów pleśniowych	Metoda poboru prób/metoda oznaczania liczebności	Źródło
Sztokholm, Szwecja	100–4000 jtk·m <sup>-3</sup>		impakcyjna/hodowlana	Bovallius i wsp. 1978
Marsylia, Francja	80–2800 jtk·m <sup>-3</sup>	6–556 jtk·m <sup>-3</sup>	impakcyjna/hodowlana	Giorgio i wsp. 1996
Corvallis, Oregon, USA	450–1000 jtk·m <sup>-3</sup>		impakcyjna/hodowlana	Shaffer, Lighthart 1997
Górny Śląsk, Polska	13–4344 jtk·m <sup>-3</sup>	4–4121 jtk·m <sup>-3</sup>	impakcyjna/hodowlana	Pastuszka i wsp. 2000

Tabela 2. Liczebności drobnoustrojów w bioaerozolu miejskim cd.

Oregon, USA	$1,2 \cdot 10^4 - 1,0 \cdot 10^6$ jtk·m <sup>-3</sup>	$1,7 \cdot 10^3 - 6,2 \cdot 10^7$ jtk·m <sup>-3</sup>	filtracyjna/ hodowlana	Durand i wsp. 2002
Tereny pod- miejskie Paryża, Francja	$6,3 \cdot 10^4 - 1,1 \cdot 10^5$ komórek·m <sup>-3</sup>		filtracyjna/ bezpośrednie liczenie na filtrach	Maron i wsp. 2005
Birmingham, Wielka Brytania	900–36 000 komórek·m <sup>-3</sup>		filtracyjna/ bezpośrednie liczenie na filtrach	Harrison i wsp. 2005
Pekin, Chiny	71–22 100 jtk·m <sup>-3</sup>		impakcyjna/ hodowlana	Fang i wsp. 2007
Kalmar, Szwecja	30–4700 jtk·m <sup>-3</sup>		filtracyjna/ hodowlana	Fahlgren i wsp. 2010

Liczebność bakterii w powietrzu w środowisku miejskim zależna jest przede wszystkim od działalności człowieka (Fang i wsp. 2007). W miastach bioaerozole są emitowane głównie ze źródeł punktowych, dlatego liczebność bakterii bioaerozoli miejskich wykazuje bardzo dużą zmienność przestrzenną. Szczególnie na obszarach o dużym natężeniu ruchu pojazdów obserwuje się wyższe stężenia drobnoustrojów w powietrzu w porównaniu do bardziej naturalnych obszarów, takich jak parki miejskie lub tereny przedmieść.

Bioaerozole miejskie podlegają zmianom ilościowym w cyklu dziennym i tygodniowym oraz sezonowym. Maron i wsp. (2006) sugerują, że za zmienność dobową oraz w cyklach tygodniowych odpowiadają przede wszystkim źródła antropogeniczne. W badaniach dobowej zmienności maksymalne liczebności bakterii zwykle obserwowano w powietrzu rano i wieczorem (Fang i wsp. 2007). Na obszarach silnie zurbanizowanych sezonowy cykl zmian zanieczyszczeń w powietrzu często jest słabo zaznaczony, ale jeżeli jest obserwowany, to najwyższe liczebności drobnoustrojów w powietrzu miejskim stwierdza się w lecie i jesienią (Fang i wsp. 2007; Kaarakainen i wsp. 2008).

Zarówno w miastach, jak i na obszarach naturalnych liczebności bakterii w powietrzu są bardzo zróżnicowane, a różnorodność gatunkowa jest bardziej złożona niż wcześniej przypuszczano. Mimo że liczebność bakterii jest często wyższa w powietrzu miejskim niż wiejskim

(Fang i wsp. 2007; Fahlgren i wsp. 2010), to różnorodność bioaerozoli obszarów wiejskich jest na ogół większa (Després i wsp. 2007; Després i wsp. 2012; Barberán i wsp. 2015).

Przy zastosowaniu metod hodowlanych na ogół w bioaerozolu notuje się więcej bakterii Gram-dodatnich (Kellogg, Griffin 2006; Amato i wsp. 2007b; Fang i wsp. 2007; Fahlgren i wsp. 2010), podczas gdy zastosowanie technik niehodowlanych prowadzi do stwierdzenia dominacji bakterii Gram-ujemnych (Maron i wsp. 2005; Brodie i wsp. 2007; Després i wsp. 2007; Fierer i wsp. 2008; Fahlgren i wsp. 2011).

W powietrzu miejskim najczęściej obserwowane są takie grupy filogenetyczne jak Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes (tab. 3). Spośród bakterii należących do klasy Proteobacteria w powietrzu miejskim regularnie odnotowywano  $\gamma$ - i  $\beta$ -proteobacteria, ale  $\alpha$ -,  $\delta$ - i  $\epsilon$ -proteobacteria również były obserwowane. Dodatkowo w niektórych badaniach wykryto obecność bakterii z gromad Verrucomicrobia, Cyanobacteria, Acidobacteria, Planctomycetes i Chloroflexi (Harrison i wsp. 2005; Fang i wsp. 2007; Després i wsp. 2012). Ogólny trend wyłaniający się z dostępnych badań jest taki, że w powietrzu miast dominują bakterie należące do grup, które są obecne również w glebie (Després i wsp. 2012; Cao i wsp. 2014).

Tabela 3. Identyfikacja bakterii w bioaerozolu miejskim

Miejsce badań	Metoda identyfikacji bakterii	Dominujące grupy	Źródło
Colorado, USA	Bergey's Manual of Determinative Bacteriology	<i>Micrococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Aerococcus</i> , <i>Bacillus</i>	Mancinelli, Shulls 1978
Corvallis, Oregon, USA	Biolog Microstation System	<i>Bacillus</i> , <i>Curtobacterium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Xanthomonas</i>	Shaffer, Lighthart 1997
Salt Lake City, Utah, USA	sekwencjonowanie 16s rDNA	Gram-dodatnie, bakterie o wysokiej zawartości G+C, <i>Bacillus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i> , Proteobacteria	Radosevich i wsp. 2002

Tabela 3. Identyfikacja bakterii w bioaerozolu miejskim cd.

Paryż, Francja	sekwencjonowanie 16s rDNA	Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria	Maron i wsp. 2005
Birmingham, Wielka Brytania	sekwencjonowanie 16s rDNA	<i>Bacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Stenotrophomonas</i>	Harrison i wsp. 2005
Austin, San Antonio, USA	mikromacierze, klonowanie, PCR i sekwencjonowanie	Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria	Brodie i wsp. 2007
Pekin, Chiny	Biolog Microstation System	<i>Micrococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Pseudomonas</i>	Fang i wsp. 2007
Monachium, Niemcy	T-RFLP	$\gamma$ -proteobacteria, $\beta$ -proteobacteria, Actinobacteria, $\alpha$ -proteobacteria	Després i wsp. 2007
Boulder, Colorado, USA	sekwencjonowanie 16s rDNA	Bacteroides, Proteobacteria, Firmicutes	Fierer i wsp. 2008
Kalmar, Szwecja	sekwencjonowanie 16s rDNA	$\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ -proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes	Fahlgren i wsp. 2010
Pekin, Chiny	sekwencjonowanie 16s rDNA	Actinobacteria, Proteobacteria, Chloroflexi, Firmicutes, Bacteroidetes	Cao i wsp. 2014

Ważną grupą mikroorganizmów w powietrzu miast są także zarodniki i fragmenty grzybni grzybów pleśniowych (Elbert i wsp. 2007; Bauer i wsp. 2008). Pod względem ilościowym w bioaerozolu miejskim zwykle dominują zarodniki grzybów z rodzajów *Alternaria*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, a także *Epicoccum*. Często stwierdza się też obecność różnych drożdży, patogenów roślinnych (np. śniedzi i rdzy), a także zarodniki podstawczaków (Elbert i wsp. 2007).

### 2.1.3. Znaczenie bioaerozoli dla zdrowia człowieka

Wśród drobnoustrojów wymienianych jako składniki bioaerozoli miejskich zdecydowanie dominują mikroorganizmy saprofityczne, głównie z rodzajów *Bacillus*, *Micrococcus*, *Sarcina*, *Staphylococcus* (Fang i wsp. 2007; Després i wsp. 2012; Burkowska i wsp. 2012).

Nawet jeśli bioaerozole nie zawierają mikroorganizmów patogennych, nie zawsze są w pełni bezpieczne dla człowieka (tab. 4). Najbardziej istotne ze zdrowotnego punktu widzenia są małe cząstki biologiczne, o rozmiarach  $< 7 \mu\text{m}$ , stanowiące tak zwaną frakcję respirabilną. Z wdychanym powietrzem wnikają one do górnych i dolnych dróg oddechowych – cząstki o średnicy aerodynamicznej  $4,7\text{--}7 \mu\text{m}$  osadzają się w gardle, o wielkości  $3,3\text{--}4,7 \mu\text{m}$  dostają się do tchawicy i oskrzeli pierwszorzędowych, cząstki o wielkości  $1,1\text{--}3,3 \mu\text{m}$  docierają do oskrzeli drugorzędowych i końcowych, a mniejsze niż  $1,1 \mu\text{m}$  mogą wnikać aż do oskrzelików płucnych (Górny 2004).

Inhalacja mikroorganizmów i ich elementów (fragmenty ścian komórkowych, rzęski), a także licznych metabolitów (endotoksyny, mykotoksyny, peptydoglikany,  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3) glukany) może powodować reakcje alergiczne oraz niealergiczne choroby układu oddechowego (Xu i wsp. 2011; Gładysz i wsp. 2010). Ocenia się, że wzrost częstotliwości ataków astmy oraz hiperaktywność oskrzeli są związane ze zwiększoną ilością bioaerozolu w powietrzu (Eduard i wsp. 2012; Kim i wsp. 2013). Szczególnie zarodniki grzybów pleśniowych mogą stanowić bezpośrednią przyczynę wielu chorób alergicznych (Knutsen i wsp. 2012).

Zdecydowanie bardziej niebezpieczne dla człowieka są bioaerozole patogene (tab. 4). Liczne chorobotwórcze mikroorganizmy (m.in. *Staphylococcus aureus*, *Neisseria meningitidis*, *Ralstonia paucula*, *Mycobacterium tuberculosis*) w sprzyjających warunkach długo utrzymują się przy życiu w stanie wysuszenia, stanowiąc potencjalne zagrożenia dla zdrowia (Polymenakou 2012; Tshilombo i wsp. 2015). Głównym ich źródłem są oddziały zakaźne szpitali, ale także inne duże skupiska ludzi. W odpowiednich warunkach może dochodzić do zakażenia kropelkowego drobnoustrojami występującymi w postaci bioaerozolu (Polymenakou 2012, Jie i wsp. 2011). Stopień zagrożenia chorobą zależy

Tabela 4. Choroby wywoływane przez czynniki etiologiczne przenoszone drogą powietrzną

Typ schorzenia	Choroby	Czynniki etiologiczne
Infekcyjne	ospa wietrzna, półpasiec	wirus Varicella Zoster (VZV)
	odra	wirus odry (MV)
	grypa	wirusy grypy FLUAV, FLUBV, FLUCV,
	mononukleoz	wirus Epstein-Barr (EBV)
	różyczka	wirus różyczki (RUBV)
	świnka (nagminne zapalenie przyusznic)	wirus świnki (MuV)
	polio	Poliovirus
	zapalenie gardła, krtani, oskrzeli i płuc	adenowirusy, rinowirusy, koronawirusy, wirusy paragrypy, RSV
	nieżyt nosa	rinowirusy
	bakteryjne	zapalenie oskrzeli i płuc
gruźlica płuc		<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
blonica		<i>Corynebacterium diphtheriae</i>
krztusiec		<i>Bordetella pertussis</i>
płonica, promienica płuc		<i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Actinomyces israelii</i> , <i>A. meyeri</i>
aspergiloza płuc		<i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. flavus</i>
grzybicze	mukormykoza płuc	grzyby z rodzajów <i>Cunninghamella</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Mucor</i> , <i>Rhizomucor</i> i <i>Absidia</i>
	kryptokokoza płuc	<i>Cryptococcus neoformans</i>
Nieinfekcyjne	niealergiczne	astma niealergiczna, niealergiczny nieżyt nosa, podrażnienie błony śluzowej nosa, przewlekłe zapalenie oskrzeli, syndrom toksyczny wywołany pyłem organicznym
	alergiczne	grzyby, bakterie, <i>Actinomycetes</i> , endotoksyny, $\beta$ (1 $\rightarrow$ 3) glukany, mykotoksyny, inne niezidentyfikowane składniki roślinne i niemikrobiologiczne
Nieinfekcyjne	alergiczne	astma alergiczna, katar alergiczny, zapalenie płuc z nadwrażliwości, alergiczne zewnątrzpochodne zapalenie pęcherzyków płucnych, płuco farmera
		grzyby, bakterie, enzymy, białka roślinne, pyłki roślin, białka zwierząt kręgowych (gryzonie, koty, krowy itp.), białka bezkręgowców (pająki, roztocza, ćmy itp.)

od infekcyjności i żywotności wdychanych mikroorganizmów. Skutki zdrowotne z powodu wdychania bioaerozoli zależą także od liczby żywych cząstek, jednak dawki infekcyjne dla poszczególnych patogenów nie są dokładnie ustalone, ponieważ zależą zarówno od warunków środowiskowych, jak i od indywidualnej odporności człowieka (Rengasamy i wsp. 2004).

## 2.2. Miejscowości uzdrowiskowe

Naturalne metody leczenia wykorzystujące walory środowiska są coraz bardziej popularne. Wspomagają one medycynę konwencjonalną, a nawet często z nią konkurują, znajdując zastosowanie szczególnie w profilaktyce, leczeniu i rehabilitacji chorób przewlekłych, stanowiących największy problem społeczny współczesnej medycyny. W Polsce obecnie z leczenia w 44 uzdrowiskach korzysta rocznie ok. 350 000 osób (Helbin, Kotlarczyk 2005).

Podstawowym dokumentem prawnym regulującym kwestie uzdrowisk i gmin uzdrowiskowych w Polsce jest ustawa z dnia 28 lipca 2005 r. o lecznictwie uzdrowiskowym, uzdrowiskach i obszarach ochrony uzdrowiskowej oraz o gminach uzdrowiskowych (Dz.U. 2005, Nr 167, poz. 1399) z późniejszymi zmianami (Dz.U. 2011, Nr 73, poz. 390). W rozumieniu tej ustawy uzdrowiskiem jest obszar, na terenie którego prowadzone jest lecznictwo uzdrowiskowe, wydzielony w celu wykorzystania i ochrony znajdujących się na jego obszarze naturalnych surowców leczniczych. Natomiast definicja Polskiego Komitetu Normalizacyjnego, oparta na normie zatytułowanej „Uzdrowiska. Terminologia, klasyfikacja i wymagania ogólne” (PN-2001/Z-11000), uznaje za uzdrowisko obszar mający złoża naturalnych surowców leczniczych, dostęp do wody morskiej i klimat o właściwościach leczniczych (albo jeden z tych czynników) oraz zakłady i urządzenia lecznictwa uzdrowiskowego, jak również sprzyjające warunki środowiskowe i sanitarne, w którym prowadzone jest metodyczne leczenie określonych chorób oraz może być prowadzona działalność wypoczynkowo-turystyczna.

Polskie obszary i gminy uzdrowiskowe, aby uzyskać status uzdrowiska, muszą posiadać (Solan 2012):

- klimat lokalny o walorach leczniczych,
- unikalne, naturalne złoża surowców uzdrowiskowych,
- zakłady opieki zdrowotnej udzielające świadczeń z zakresu lecznictwa uzdrowiskowego przez wysoko wykwalifikowane kadry medyczne,
- obiekty szpitalne i sanatoryjne z pełnym zapleczem, o wysokim standardzie,
- urządzenia przeznaczone do korzystania z uzdrowiskowych zasobów naturalnych,
- wymagania określone w przepisach prawa o ochronie i kształtowaniu środowiska,
- odpowiedni obszar pozwalający na wyodrębnienie stref ochrony uzdrowiskowej,
- pełną infrastrukturę techniczną,
- znaczenie ponadlokalne.

Zwykle w leczeniu uzdrowiskowym stosuje się programy lecznicze uwzględniające kilka metod, m.in. balneoterapię, klimatoterapię i hydroterapię. Metody leczenia uzdrowiskowego są skuteczne, przyjemne dla pacjenta i zwykle nie mają skutków ubocznych, a wyniki leczenia w chorobach przewlekłych często utrzymują się dłużej niż po zastosowaniu leczenia konwencjonalnego (Helbin, Kotlarczyk 2005; Ponikowska 2012).

Jednym z najważniejszych działów lecznictwa stosowanym w każdym uzdrowisku jest balneoterapia. Wykorzystuje się w niej właściwości naturalnych surowców leczniczych. Między innymi do kąpieli, kuracji pitnych i inhalacji stosuje się wody lecznicze (chlorkowo-sodowe, siarczkowo-siarkowodorowe, szczawowy, termalne, radonowe). W balneoterapii znalazły też zastosowanie torfy lecznicze (peloidy) zwane borowinami oraz gazy lecznicze (dwutlenek węgla, siarkowódór, radon, tlen, mieszanka ozonowo-tlenowa) (Helbin, Kotlarczyk 2006; Solan 2012). Wodę o różnym ciśnieniu i temperaturze wykorzystuje się również w zabiegach hydroterapii – do natrysków, masaży podwodnych oraz kąpieli wirowych i perełkowych (Helbin, Kotlarczyk 2006).

Istotną rolę w leczeniu uzdrowiskowym odgrywają również czynniki środowiskowe, przede wszystkim klimat i mikroklimat uzdrowiska, a także warunki krajobrazowe. Korzystne warunki środowiskowe i przyrodnicze uzdrowiska powinny zapewniać nie tylko spokój i relaks, ale także wypoczynek. Klimatoterapia wykorzystuje dla celów leczniczych, a także profilaktycznych zalety środowiska przyrodniczego. Ta forma terapii uzdrowiskowej obejmuje wszelkie zabiegi związane z ruchem na świeżym powietrzu: zabiegi ruchowe, kąpiele powietrzne oraz słoneczne, a także inhalacje. Aerozoloterapia jest coraz częściej stosowaną metodą leczenia uzdrowiskowego, ponieważ droga wziewna stanowi szybki i dogodny sposób wprowadzenia substancji leczniczych do organizmu (Helbin, Kotlarczyk 2006).

### 2.2.1. Stan badań jakości powietrza w uzdrowiskach w Polsce

W latach 1961–1981 opublikowano wiele opracowań monograficznych, a także dotyczących poszczególnych elementów meteorologicznych i wskaźników bioklimatycznych wielu polskich uzdrowisk. Na przykład dla Ciechocinka powstało 36, a dla Inowrocławia 17 opracowań na temat klimatu i bioklimatu. Jednak w większości są to prace, które powstały w latach 60. i 70. XX wieku, a często nawet wcześniej (Kozłowska-Szczęśna 2000).

Niestety nieliczne z nich dotyczą analizy powietrza w strefie okołotęźniowej (Borowicz i wsp. 1967; Borowicz i wsp. 1969). Tylko w jednym dotychczasowym opracowaniu (Burkacka-Łaukajtys, Zwolska 1973) poruszono problematykę wpływu bioaerozolu w strefie okołotęźniowej na bakteriologiczną czystość powietrza. Zdecydowanie zauważyć można brak nowych opracowań, uwzględniających chociażby zanieczyszczenia powietrza, zarówno pyłowe, chemiczne, jak i mikrobiologiczne.

W pozostałych uzdrowiskach, w których leczy się choroby dróg oddechowych, również stosunkowo rzadko bada się mikrobiologiczne zanieczyszczenie powietrza. Biologiczne zanieczyszczenia powietrza wywierają niewątpliwie ogromny wpływ na zdrowie osób, które korzystają z lecznictwa uzdrowiskowego z powodu przewlekłych chorób układu oddechowego (Prunk i wsp. 2008; Krupa 2009). W miarę liczne są jedy-

nie prace podejmujące problematykę zanieczyszczeń chemicznych i pyłowych w uzdrowiskach. Oceny takiej dokonano m.in. dla uzdrowisk sudeckich (Zalupska i wsp. 1996; Wójcik 2011), uzdrowisk aglomeracji krakowskiej (Lewińska, Wodzeń 1989) i Buska (Bogacki i wsp. 1992).

Wojewódzki Inspektorat Ochrony Środowiska w Bydgoszczy wyznaczył na terenie uzdrowisk województwa kujawsko-pomorskiego dwie stałe stacje pomiarowe, monitorujące zanieczyszczenia chemiczne i pyłowe w powietrzu tych miast. Jednak w rocznych ocenach jakości powietrza atmosferycznego w województwie kujawsko-pomorskim wyniki badań z terenów uzdrowisk są uwzględniane łącznie dla całej strefy kujawsko-pomorskiej, a nie są oceniane oddzielnie dla obszarów uzdrowiskowych (Jutrowska i wsp. 2014).

Stosunkowo dobrze poznany został jedynie bioaerazol w komorach sanatoryjnych służących do subterraneoterapii, zlokalizowanych w kopalniach soli w Wieliczce i Bochni (Doleżał i wsp. 1983; Olechnowicz-Bobrowska i wsp. 2000; Bis i wsp. 2004; Grzyb i wsp. 2008; Frączek i wsp. 2013).

### 2.2.2. Mikroklimat strefy okołoteżniowej

Bodźcem do wybudowania w Ciechocinku tężni i warzelni była produkcja soli. Jednak eksploatacja solanki do celów leczniczych, a po kilkudziesięciu latach także działalność uzdrowiskowa zdominowały produkcję przemysłową. Obecnie produkcja warzelniana jest podtrzymywana tylko w celu pozyskiwania produktów leczniczych, m.in. szlamu i ługu leczniczego, które są stosowane do kąpieli i inhalacji.

Tężnie pełnią przede wszystkim funkcję wielkich otwartych inhalatorów, wokół których panują specyficzne warunki mikroklimatyczne. W porównaniu z pozostałym terenem uzdrowiska w okolicy tężni panuje niższa temperatura powietrza, szczególnie podczas upalnych dni, kiedy straty ciepła na odparowywanie wody z solanki spływającej po tarninie są największe. Parowanie solanki zapewnia też wyższą wilgotność względną powietrza. Tężnie stanowią także specyficzną osłonę, zmniejszającą prędkość wiatru pomiędzy nimi (Ponikowska, Marciński 1988).

Najważniejszą z punktu widzenia terapii i jednocześnie najbardziej specyficzną cechą mikroklimatu panującego wokół tężni jest obecność w powietrzu aerozolu powstającego podczas spływu solanki po konstrukcji tężni. Spływając po gałązkach tarniny, solanka ulega rozdrobieniu na niewielkie cząstki – kropelki i kryształki, których znaczna część jest rozprowadzana w otaczającym powietrzu przez wiatr. Pod tym względem tężnie działają podobnie jak bryza morska, z tym że solanka tężniowa zawiera znacznie mniej zanieczyszczeń niż woda morską (Gaweł, Kuczaj 2012).

Cząstki bioaerozolu rozproszonego wokół tężni zawierają chlorek sodu, związki bromu, jodu i żelaza, dlatego wykazują działanie lecznicze. Przebywanie w strefie okołotężniowej umożliwia inhalacje w naturalnych warunkach (Ponikowska, Marciniak 1988; Czajka i wsp. 2006). Spacerując wokół tężni, kuracjusze wdychają zawarte w solance minerały i przez błony śluzowe dróg oddechowych oraz skórę uzupełniają niedobory mikroelementów (Gaweł, Kuczaj 2012). Szczególnie skuteczne wydaje się uzupełnianie tym sposobem niedoborów jodu (Czajka i wsp. 2006), o czym świadczą pozytywne wyniki leczenia chorych z zaburzeniami czynności tarczycy (Ponikowska i wsp. 1979).

Jednocześnie ocenia się, że bakteriobójcze działanie składników solanki, głównie jodków, ale także chlorku sodu, może przyczyniać się do eliminacji drobnoustrojów w powietrzu strefy okołotężniowej (Burkowska-But i wsp. 2014). Jod i jodki wykazują działanie bakteriobójcze zarówno na formy wegetatywne bakterii, jak też ich spory, a także działają biobójczo w stosunku do grzybów, pierwotniaków oraz eliminują z powietrza wirusy (McDonnell, Russell 1999; Różalski 2007). Działanie jodu jest niespecyficzne i obejmuje niewybiórcze wiązanie się z błonami komórkowymi, denaturację białka i hamowanie aktywności enzymów oddechowych mikroorganizmów. W związku z tym jod wchodzący w skład aerozolu tężniowego jest naturalnym środkiem odkażającym powietrze, bez ujemnego wpływu na zdrowie człowieka. Zawartość jonów I<sup>-</sup> w strefie okołotężniowej w Ciechocinku wynosi od 0,083 do 3,74 g·m<sup>-3</sup> powietrza, czyli koncentracja jodu jest podobna jak w powietrzu rejonu nadmorskiego (Czajka i wsp. 2006). Burkacka-Łaukajtys i Zwolska (1973) stwierdziły, że powietrze strefy okołotężniowej

w Ciechocinku charakteryzuje się dużym stopniem czystości bakteriologicznej, a ogólna liczebność bakterii pozostaje w korelacji ze stężeniem jodu w powietrzu. Dodatkowo krople bioaerozolu, również dzięki przyspieszeniu sedymentacji, usuwają w strefie tężni zanieczyszczenia stałe i gazowe (Ponikowska, Marciniak 1988).

Ilość, kierunek i zasięg rozprzestrzeniania się aerozolu tężniowego są zależne od warunków meteorologicznych, przede wszystkim od nasłonecznienia, kierunku i siły wiatru oraz opadów atmosferycznych. Silny wiatr powoduje nadmierne rozpraszanie cząstek aerozolu solankowego w powietrzu, dlatego najczęściej aerozolu wokół tężni znajduje się w słoneczny dzień, przy umiarkowanym wietrze. Również odległość od tężni znacząco wpływa na zawartość cząstek solanki w powietrzu – np. zawartość jodu w odległości 15 m od tężni jest ponad 3-krotnie wyższa niż w odległości 150 m (Ponikowska, Marciniak 1988).

Do wytwarzania aerozolu solankowego wykorzystywana jest także fontanna „Grzyb”, która stanowi również naturalne inhalatorium. W fontannie tej wykorzystywana jest solanka ze źródła nr 11, o stężeniu NaCl ok. 5%, z zawartością bromu, jodu i żelaza. Źródło to jest eksploatowane od 1932 roku tylko w celu zasilania fontanny „Grzyb” i tężni (Ponikowska, Marciniak 1988).

Na terenach uzdrowiskowych Inowrocławia budowę tężni rozpoczęto w latach 90. XX stulecia, a została ona oddana do użytku w roku 2001. Inowrocławska tężnia ma kształt dwóch połączonych ze sobą wieloboków, mierzy 9 m wysokości i 300 m długości. Solanka podawana na tężnię w Inowrocławiu zawiera mniej jodków niż solanka ciechocińska, dlatego nie stwierdza się tu obecności jonów I<sup>-</sup> w strefie okołotężniowej. Natomiast sprzyjający kumulacji aerozolu kształt tężni powoduje, że stężenie NaCl w powietrzu może tu okresowo być wyższe niż w Ciechocinku (Czajka i wsp. 2006).

### 2.3. Charakterystyka solanek leczniczych

Zgodnie z kryterium hydrogeologicznym do solanek zalicza się wody o mineralizacji ogólnej równej co najmniej  $35 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ , a ich głównymi

składnikami, odpowiadającymi za wysoką mineralizację, są jony chlorkowe, sodowe i wapniowe. Z kolei w balneologii jako solanki definiuje się wody chlorkowo-sodowe, zawierające co najmniej  $15 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$  składników rozpuszczonych (Krawiec, Walczak 2012). Dodatkowe wymagania fizyko-chemiczne, chemiczne i mikrobiologiczne dla wód leczniczych w Polsce określone są przez Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 13 kwietnia 2006 r. (Dz.U. 2006, Nr 80, poz. 565). Solanki występują powszechnie niemal na całym terytorium Polski. Największe zasoby tych wód znajdują się na obszarze Niżu Polskiego i są powszechnie wykorzystywane w balneologii w większości uzdrowisk na tym terenie. Solanki wykorzystywane do celów leczniczych na terenie Niżu Polskiego najczęściej występują w strefach utrudnionej wymiany wód, w tym w strukturach zamkniętych, odizolowanych od powierzchni przez utwory nadległe, i w związku z tym są dobrze izolowane od zanieczyszczeń zewnętrznych, ale też zwykle słabo odnawialne. Ze składników specyficznych o znaczeniu farmakodynamicznym występują w nich głównie jony jodkowe, czasem żelazo (Krawiec, Walczak 2012). Aktualnie solanki są wykorzystywane przede wszystkim do balneoterapii, jako surowiec stosowany do zabiegów oraz jako produkty lecznicze (sole, ługi, szlamy lecznicze oraz solanki) w 12 miejscowościach: Busku-Zdroju, Ciechocinku, Dębowcu, Goczałkowicach-Zdroju, Kołobrzegu, Konstancinie-Jeziornej, Łapczycy, Połczyniu-Zdroju, Sopotcie, Świnoujściu, Ustroniu i Zabłociu (mineralne.pgi.gov.pl).

### 2.3.1. Solanki lecznicze Ciechocinka

W rejonie Ciechocinka warunki hydrogeologiczne są ściśle powiązane z budową geologiczną i geomorfologią tego rejonu. Można tu wydzielić dwa piętra wodonośne: czwartorzędowe i jurajskie (Krawiec 2005). Czwartorzędowe piętro wodonośne związane jest z aluwialnym kompleksem piaszczysto-żwirowym o swobodnym zwierciadle wód, które w zależności od morfologii terenu znajduje się na głębokości od 1 do 5 m. Wody te są zasolone – na znacznym obszarze zawartość jonu  $\text{Cl}^-$  w wodach piętra czwartorzędowego przekracza  $250 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ , a w centrum Ciechocinka dochodzi do kilku tysięcy  $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ . W stre-

fach bezpośredniego kontaktu osadów czwartorzędowych i jurajskich (rejon centrum Ciechocinka) wody z tych dwóch pięter mogą ulegać mieszanii, ponieważ wody piętra jurajskiego znajdują się pod znacznym ciśnieniem i mogą zasilać piętro czwartorzędowe przez ascenzję (Krawiec 1999). Wody jurajskiego piętra wodonośnego to głównie wody szczelinowe, solanki chlorkowo-sodowe, fluorkowe, bromkowe, jodkowe, borowe oraz wody słabo zmineralizowane chlorkowo-sodowe, występujące w spękanych i uszczelinionych seriach piaskowców oraz wapieni.

Tabela 5. Czynne ujęcia wód leczniczych Ciechocinka (Krawiec 1999; 2005)

Numer ujęcia	Rok wykonania	Głębokość otworu [m]	Wiek warstw wodonośnych	Mineralizacja [g·dm <sup>-3</sup> ]	Cl	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Br	I
					[g·dm <sup>-3</sup> ]	[mg·dm <sup>-3</sup> ]	[mg·dm <sup>-3</sup> ]	[mg·dm <sup>-3</sup> ]
11 „Grzyb”	1911	450 (414)	J <sub>2</sub>	45,2	26,5	730	89,6	3,5
14	1932	760 (1305)	J <sub>2</sub>	45,8	27,3	80	91,6	3,4
16	1952	1378	J <sub>1</sub>	52,6	31,6	168	83,6	5,4
19a „Krystynka”	1978	36	J <sub>3</sub>	3,3	1,6	61	6,9	0,5

W Uzdrowisku Ciechocinek obecnie eksploatowane są następujące ujęcia: nr 11 („Grzyb”), nr 14 (Terma I), nr 16 (Terma II) oraz nr 19a („Krystynka”) (tab. 5). Nieczynne są otwory nr 18 (Terma III) oraz ujęcia 17, 17a i 17b. Otwory eksploatujące wodę z warstw jury, oprócz otworu nr 11, mają samowypływy. Z otworu nr 11 solankę pobiera się za pomocą pompy, co powoduje depresję i może być przyczyną lokalnego dopływu wód młodych z płytszych warstw. Według Poprawskiego i wsp. (1998) długotrwała eksploatacja solanki z otworu nr 11 powoduje wysłodzenie wody na skutek mieszania się wód wysoko zmineralizowanych z infiltrującymi od powierzchni wodami o niższej mineralizacji. Dlatego w przypadku solanki z otworu nr 11 obserwuje się stopniowy powolny spadek mineralizacji oraz stężenia chlorków z 31 g·dm<sup>-3</sup> w roku 1974 do 26,0 g·dm<sup>-3</sup> obecnie (Krawiec 2005).

Ujęcie nr 11 („Grzyb”) pobiera wodę z piaskowców doggeru z głębokości 302–405 m (Krawiec 2005). Następnie solanka ta przepom-

powywana jest na tężnie, gdzie spływając po gałązkach tarniny, ulega odparowaniu i zatężeniu do około 27%, po czym przesyłana jest rurociągiem do warzelni soli.

### 2.3.2. Solanki lecznicze w Inowrocławiu

Na terenie Inowrocławia do zabiegów przyrodoleczniczych stosowana jest woda chlorkowo-sodowa, siarczkowa, termalna o mineralizacji  $13,1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Jest ona wydobywana z otworu IL-1 o głębokości 507 m i ma na wypływie temperaturę około  $23^\circ\text{C}$ . Drugi z odwiertów – Źródło Królowej Jadwigi (studnia nr 3) o głębokości 70 m – ujmuje warstwę wodonośną jury górnej, z której pobierana jest woda chlorkowo-sodowo-wapniowa o mineralizacji około  $2,9 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Woda ta stosowana jest do kuracji pitnych. Na terenie miasta butelkowana jest także woda mineralna „Inowrocławianka”, która eksploatowana jest z warstw czwartorzędu, ze studni o głębokości 48 m. Jest to woda chlorkowo-wodorowęglanowo-sodowo-wapniowa o mineralizacji  $1,7 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$  (atlas.kujawsko-pomorskie.pl).

### 2.3.3. Solanki jako środowisko życia drobnoustrojów

W przeciwieństwie do wód powierzchniowych zasiedlonych przez ogromne ilości drobnoustrojów, które mają dostęp do pierwiastków biogennych oraz łatwo przyswajalnej materii organicznej, wody podziemne z powodu małej ilości biogenów mogą być uznane za środowiska ekstremalne. Dodatkowo wody infiltrujące krystaliczne podłoża skalne są często zasolone (suma substancji rozpuszczonych w zakresie  $10\text{--}250 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) i panują w nich warunki beztlenowe (Itävaara i wsp. 2011). Mimo to wszystkie wody głębinowe są zasiedlone przez mikroorganizmy. W wodach głębinowych notuje się bakterie w ilości  $10^3\text{--}10^6 \text{ komórek}\cdot\text{cm}^{-3}$  (Kotowski, Burkowska 2011; Roudnew i wsp. 2012), a w solankach podziemnych stwierdzano ogólną liczebność bakterii w zakresie od  $10^3$  do  $10^5 \text{ komórek}\cdot\text{cm}^{-3}$  (Itävaara i wsp. 2011; Walczak, Krawiec 2014). Ponadto badania żywotności komórek bakteryjnych wykazały, że 13–100% obecnych w solankach bakterii to komórki żywe (Walczak,

Krawiec 2014). W związku z tym głębokie solankowe poziomy wodonośne można uznać za środowiska, w których potencjalnie występują żywe i aktywne mikroorganizmy. Nawet w wyjątkowo zasolonych (ponad 30% NaCl) środowiskach spotyka się halofilne archeony oraz bakterie (Anton i wsp. 2000; Maturrano i wsp. 2006; Pappa i wsp. 2010).

W celu określenia zależności mikroorganizmów od obecności i stężenia NaCl wprowadzono różne systemy klasyfikacji. Najpowszechniej używany system klasyfikacji przedstawiony w tabeli 6 został sformułowany przez Kushnera (1978). Wyróżnia on bakterie o różnym stopniu halofilności, a także mikroorganizmy halotolerancyjne, które nie wymagają do wzrostu wysokiego zasolenia, ale są w stanie rozwijać się przy wysokim stężeniu NaCl i innych soli. Bakterie z rodzaju *Staphylococcus* są dobrym przykładem tej kategorii, ponieważ rosną zarówno przy braku soli, jak i przy stężeniu NaCl w granicach 10–15%, a nawet wyższym (Oren 2008). Ogólnie różnorodność filogenetyczna mikroorganizmów podlega istotnym zmianom wraz ze zmieniającym się stężeniem soli (Oren 2006).

Tabela 6. Podział mikroorganizmów halofilnych według Kushnera (1978)

Kategoria	Stężenie soli wymagane do wzrostu [mol·dm <sup>3</sup> ]	Przykłady
Słabo halofilne	0,2–0,5	większość bakterii morskich
Umiarkowanie halofilne	0,5–2,5	<i>Salinivibrio costicola</i>
Granicznie ekstremalnie halofilne	1,5–4,0	<i>Halorhodospira halophila</i>
Ekstremalnie halofilne	2,5–5,2	<i>Halobacterium salinarum</i>
Halotolerancyjne	nie wymagają soli do wzrostu, ale tolerują jej wysokie stężenie	<i>Staphylococcus aureus</i>

Podstawowym fizjologicznym problemem wszystkich mikroorganizmów halofilnych jest to, że ich cytoplazma musi być co najmniej izotoniczna względem otaczającego środowiska. Błona cytoplazmatyczna jest przepuszczalna dla wody, a zależny od energii transport wody w celu skompensowania jej utraty w procesach osmotycznych nie jest energetycznie możliwy.

Mikroorganizmy halofilne wykształciły więc dwie zasadniczo różne strategie stosowane w celu osmotycznego zrównoważenia ich cytoplazmy ze środowiskiem.

Pierwsza (strategia *salt-in*) polega na gromadzeniu w cytoplazmie wysokich stężeń niektórych jonów. Cytoplazmatyczna zawartość jonów chloru jest zwykle podobna do obecnej w środowisku. Zawartość jonów sodu w cytoplazmie może być niższa niż w środowisku, natomiast jony potasu mogą występować w większych stężeniach w porównaniu do środowiska zewnętrznego komórki (Sochocka, Boratyński 2011). Ta strategia wymaga adaptacji układu enzymatycznego – białka powinny zachować prawidłową konformację i aktywność w prawie nasyconych roztworach soli. Proteom takich mikroorganizmów jest bardzo kwaśny, białka mają specyficzny skład aminokwasowy – niektóre z aminokwasów, takie jak kwas asparaginowy, występują w znacznej ilości, podczas gdy inne, takie jak lizyna, są praktycznie nieobecne (DasSarma, DasSarma 2012). Większość białek ulega denaturacji po zawieszeniu w roztworach o małej zawartości soli, dlatego mikroorganizmy stosujące strategię *salt-in* na ogół nie mogą przetrwać w środowiskach o niskich stężeniach soli. Strategię tę wykorzystuje niewielka liczba mikroorganizmów ograniczonych do rzadkich nisz ekologicznych, na przykład wysoce wyspecjalizowane mikroorganizmy zdolne do życia w niemal nasyconych solankach: halofilne archeony (*Halobacteriaceae*), niektóre tlenowe i beztlenowe halofilne bakterie (*Salinibacter ruber*) (Detkova, Boltyanskaya 2007; Oren 2008).

Większość mikroorganizmów stosuje drugą strategię, określaną jako *salt-out*, która polega na utrzymywaniu w cytoplazmie stałego, niskiego stężenia jonów nieorganicznych. Niski potencjał osmotyczny wody mimo obecności wysokich pozakomórkowych stężeń soli jest osiągnięty dzięki gromadzeniu cząsteczek osmoregulacyjnych. Są to małe, rozpuszczalne w wodzie cząsteczki organiczne, które nie wpływają na centralny metabolizm komórki, nawet jeśli są gromadzone w dużych stężeniach, m.in. aminokwasy (prolina, betaina, glutamina i glutaminiany), krótkie peptydy, cukry (sacharoza, trehaloza) czy alkohole wielowodorotlenowe (glukozyglicerol) (Empadinhas, da Costa 2008; Sochocka, Boratyński 2011). Ponadto u mikroorganizmów stosujących

strategię *salt-out* ważną rolę odgrywają mechanizmy utrzymujące na stałym poziomie stosunek jonów  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  w cytoplazmie (Shabala i wsp. 2009).

#### 2.4. Formowanie biofilmu jako strategia przetrwania bakterii w niekorzystnych warunkach

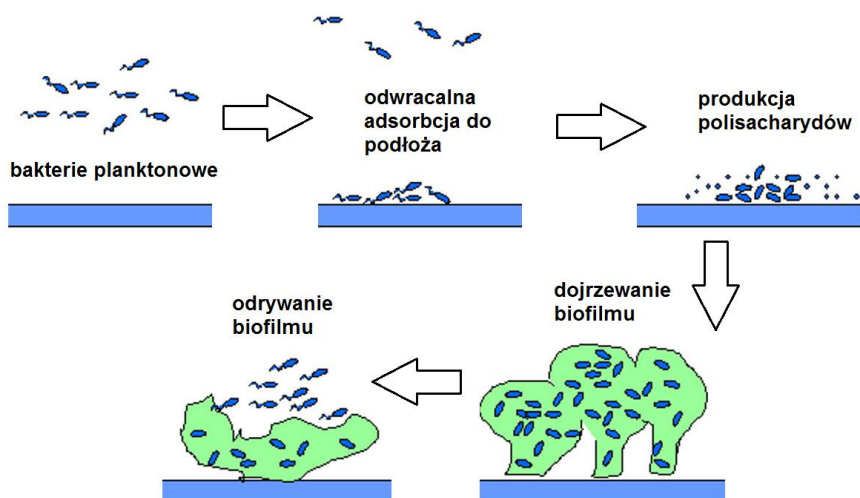
Przez wiele lat bakterie były postrzegane jako swobodnie żyjące organizmy żywe. Tymczasem drobnoustroje w środowisku naturalnym rzadko występują w postaci pojedynczych rozproszonych komórek (Mnichowska-Polanowska i wsp. 2009; Vu i wsp. 2009). Najczęściej obserwowanym zjawiskiem jest tworzenie formacji zwanych biofilmem (Vu i wsp. 2009).

Biofilm jest to wielokomórkowy twór złożony z drobnoustrojów jednego lub wielu gatunków czy rodzajów. Struktura ta przylega do powierzchni stałych lub powierzchni komórek innych organizmów (Li, Logan 2004; Czaczyk, Myszka 2007). Zdolność do tworzenia biofilmu mają mikroorganizmy autotroficzne, jak i heterotroficzne, w tym drobnoustroje patogenne (Kołwzan 2011). Kolonizację różnych powierzchni przez mikroorganizmy umożliwiają ich właściwości adhezyjne, a struktura powstałego biofilmu jest stabilizowana przez substancje polimeryczne wydzielane pozakomórkowo, tzw. EPS (*extracellular polymeric substances*) (Flemming 2009; Kołwzan 2011). EPS składa się głównie z polisacharydów i jest podstawowym materiałem macierzy (*matrix*) biofilmu, stanowiąc 50% do 90% całości organicznego węgla biofilmu (Donlan 2002). Oprócz polisacharydów substancja ta zawiera także białka, kwasy nukleinowe, surfaktanty, lipidy oraz wodę. Zdolność polimerów macierzy do cyklicznego gromadzenia i oddawania wody nadaje jej cechy hydrożelu o właściwościach wysoko elastycznych. Dodatkowo hydrożelowa macierz chroni komórki biofilmu przed wysuszeniem, zmianami warunków fizycznych otoczenia, szkodliwym działaniem promieniowania UV, wahaniami temperatury i pH (Furowicz i wsp. 2010).

Tworzenie biofilmu często jest uruchamiane jako strategia przeżycia w niesprzyjających warunkach, np. przy ograniczonym dostępie tle-

nu, deficycie jonów Fe, przy subletalnych stężeniach antybiotyków lub w innych sytuacjach stresowych, do których należy też silne zasolenie (Götz 2002; Lim i wsp. 2004).

Proces formowania biofilmu rozpoczyna się od wstępnego przytwierdzenia do powierzchni pojedynczych komórek (ryc. 2). Ważną rolę w procesie adhezji odgrywają wytwarzane przez mikroorganizmy biofilmu polimery zewnątrzkomórkowe, lipopolisacharydy i białka ściany komórkowej. Dużą rolę w tym procesie mają także struktury zewnątrzkomórkowe takie jak fimbrie i rzęski. Na kolonizację ma wpływ również struktura zasiedlanej powierzchni, przede wszystkim wszelkie jej uszkodzenia i chropowatości (Kołwzan 2011).



Ryc. 2. Etapy powstawania biofilmu (na podst. eng-sc.syr.edu)

W kolejnych etapach bakterie przekazują sygnały stymulujące przyłączone mikroorganizmy do rozmnażania i tworzenia mikrokolonii oraz dojrzewania biofilmu. W dojrzewającym biofilmie powstaje EPS, a gradienty chemiczne umożliwiają współistnienie drobnoustrojów różnych gatunków oraz znajdujących się w różnych stadiach metabolicznych na zasadzie syntropii (Kolter, Watnick 2000). W komórkach bakterii dochodzi do aktywacji lub hamowania ekspresji niektórych

genów, co prowadzi do zanikania niepotrzebnych już bakteriom struktur (np. rzęsek). Bakterie z wnętrza biofilmu są narażone na ograniczenie dostępu tlenu, w związku z czym zmienia się ich metabolizm – wzrasta aktywność beztlenowych szlaków metabolicznych (desulfurykacji, denitryfikacji i fermentacji), zahamowaniu ulega synteza niektórych enzymów (np. proteaz, fosfolipazy C) oraz toksyn. Dzięki tym zjawiskom komórki bakterii wchodzące w skład biofilmu wykazują odmienne cechy niż komórki żyjące w postaci wolnej (Vu i wsp. 2009; Furowicz i wsp. 2010; Kołwzan 2011). Kiedy biofilm osiąga tzw. krytyczną grubość, stopniowo przestaje utrzymywać istniejącą formę (ryc. 2). Komórki z peryferyjnych części dojrzałego biofilmu opuszczają strukturę w celu utworzenia nowych skupisk przez kolonizację innych powierzchni (Baranowska, Rodziewicz 2008). Przypuszcza się, że w procesie oderwania komórek dochodzi do degradacji polimerowej matrycy, aktywacji aparatów ruchowych i zmian fizjologicznych w komórkach, umożliwiających ich egzystencję poza biofilmem. Przyczyną tego zjawiska może być także wyczerpanie składników pokarmowych lub problemy z ich przepływem w obrębie biofilmu (Kołwzan 2011).

Prawidłowe funkcjonowanie wytworzonej błony biologicznej jest zapewnione przez międzykomórkową sygnalizację opartą na wytwarzaniu cząsteczek sygnałowych – *quorum sensing* (QS). Możliwość „porozumiewania się” komórek sprawia, że biofilm może funkcjonować w sposób przypominający prymitywny organizm wielokomórkowy (Kołwzan 2011).

Bakterie tworzące biofilm, w tym bakterie patogenne, są wielokrotnie mniej wrażliwe na czynniki środowiskowe, co ułatwia ich przeżywanie nawet w skrajnie niesprzyjających warunkach (Moscoso i wsp. 2006; Palmer i wsp. 2007; Tamayo i wsp. 2010; Xu i wsp. 2011). Biofilm jako forma bytowania drobnoustrojów stwarza im możliwość łatwiejszego dostępu do składników odżywczych, a także chroni komórki przed niekorzystnym wpływem szkodliwych czynników fizycznych i chemicznych (Singh i wsp. 2006; Czaczyk, Myszka 2007; Vu i wsp. 2009). Dlatego też biofilm może funkcjonować w warunkach, w których przetrwanie pojedynczych komórek jest trudne, a w wielu przypadkach nawet niemożliwe (Leid 2009; Vu i wsp. 2009; Furowicz i wsp. 2010).

W związku z tym w solankach tętniowych teoretycznie możliwy jest rozwój bakterii w postaci biofilmu. Mikroorganizmy, w tym patogeny układu oddechowego są w stanie przeżyć przez dłuższy czas nawet w bardzo niesprzyjających warunkach środowiskowych, również przy dużym zasoleniu środowiska (Kilvington, Price 1990; Ohno i wsp. 2003). Szczególnie dobrze w takim środowisku przeżywają gronkowce (Asperger, Zangerl 2002; Oren 2008). Potencjalnie, wraz z aerozolem tętniowym, mikroorganizmy tworzące biofilm w solankach mogłyby być rozprowadzane w otoczeniu otwartych inhalatorów.

## Założenia i cel pracy

Aerozol tężniowy ma niewątpliwy udział w kształtowaniu się zarówno ilościowego, jak i jakościowego składu drobnoustrojów w powietrzu w otoczeniu otwartych inhalatoriów. Z jednej strony aerozol taki może powodować obniżenie liczebności drobnoustrojów w powietrzu ze względu na mechaniczne oczyszczanie powietrza przez krople aerozolu solankowego, a także zawarty w solance chlorek sodu oraz związki jodu. Z drugiej strony aerozol tężniowy może stanowić dodatkowe źródło zanieczyszczeń – do atmosfery w takim wypadku mogą być wprowadzane drobnoustroje obecne w solance (zarówno autochtoniczne, jak i wprowadzone ze środowiska zewnętrznego) oraz wypłukiwane z powierzchni gałązek tarniny. Długoterminowe badania mikrobiologicznej jakości powietrza w uzdrowiskach posiadających otwarte inhalatoria solankowe nie były dotychczas prowadzone.

Głównym celem naukowym niniejszej pracy było określenie wpływu aerozolu solankowego emitowanego przez tężnie na mikrobiologiczną jakość powietrza atmosferycznego w uzdrowisku, szczególnie w otoczeniu otwartych inhalatoriów.

Do zrealizowania głównego celu badań wyznaczono następujące szczegółowe cele badawcze:

1. Dokonanie długoterminowej, ilościowej i jakościowej, analizy bioaerozoli bakteryjnych i grzybowych na terenach miejskich, uzdrowiskowych i w otoczeniu otwartych inhalatoriów uzdrowiska Ciechocinek.

2. Przeprowadzenie, na podstawie uzyskanych wyników, oceny mikrobiologicznego zanieczyszczenia powietrza atmosferycznego na terenie uzdrowiska.
3. Przeanalizowanie wpływu czynników mikroklimatycznych, zmienności sezonowej i położenia punktów pomiarowych w uzdrowisku na mikrobiologiczną jakość powietrza.
4. Porównanie mikrobiologicznej jakości powietrza na terenach miejskich, uzdrowiskowych i w otoczeniu otwartych inhalatoriów w Ciechocinku i Inowrocławiu – dwóch uzdrowiskach dysponujących tężniami solankowymi i jednocześnie charakteryzujących się odmienną strukturą urbanistyczną.
5. Oznaczenie bioróżnorodności drobnoustrojów występujących w solankach tężniowych Ciechocinka oraz ocena ich wpływu na skład bioaerozoli w otoczeniu inhalatoriów.
6. Ocena możliwości przeżywania szczepów bakterii potencjalnie patogennych w solankach w różnych warunkach troficznych i temperaturowych, z uwzględnieniem tworzenia biofilmu jako mechanizmu umożliwiającego przetrwanie drobnoustrojów w niekorzystnych warunkach.

## Materiały i metody

### 4.1. Charakterystyka badanych obiektów

#### 4.1.1. Uzdrowisko Ciechocinek

Ciechocinek położony jest na Kujawach, na lewym brzegu Wisły, w odległości 25 kilometrów od Torunia (52°52'N, 18°47'E). Jest największym w Polsce uzdrowiskiem nizinnym, którego leczniczymi bogactwami są obfite złoża solanek oraz korzystne warunki klimatyczne.

Powstanie i rozwój uzdrowiska Ciechocinek są ściśle związane z obecnymi na tym terenie wodami mineralnymi o charakterze solanek. Za początek funkcjonowania uzdrowiska przyjmuje się rok 1836. Wówczas w miejscowym zajeździe zainstalowano 4 miedziane wanny, w których do leczenia wykorzystywano naturalne zasoby wód solankowych. Początkowo leczenie w uzdrowisku Ciechocinek opierało się wyłącznie na wykorzystywaniu solanek do kąpieli leczniczych w tak zwanych Łazienkach (obecnie Zakłady Przyrodolecznicze). Tężnie solankowe wybudowano w latach 1824–1833 i 1859, lecz pierwotnie były one instalacją przemysłową służącą do zagęszczania solanki przed procesem warzenia soli. Jednakże po kilkudziesięciu latach produkcja przemysłowa soli została zdominowana przez działalność uzdrowiskową (Ponikowska, Marciniak 1988).

W połowie XIX wieku w Ciechocinku leczyło się ok. 1100 osób rocznie, głównie w okresie od maja do września. Podczas I wojny światowej uzdrowisko zostało przejęte przez wojska niemieckie, a z za-

kładów kąpielowych korzystało przeciętnie 5000 kuracjuszy rocznie. Rozwój uzdrowiska nastąpił wkrótce po odzyskaniu przez Polskę niepodległości i podporządkowaniu lecznictwa uzdrowiskowego Ministerstwu Zdrowia. W tym czasie urządzono m.in. Park Zdrowia z basenem termosolankowym oraz rozbudowano i unowocześniono bazę balneologiczną. Podczas II wojny światowej miasto, którego nazwę zmieniono na Hermannsbad, pełniło funkcję szpitala wojskowego dla Niemców oraz uzdrowiska wyłącznie dla obywateli niemieckich. Specjaliści niemieccy bardzo wysoko ocenili jakość ciechocińskich źródeł solankowych w porównaniu ze źródłami na terenie Niemiec, a źródło termalne nr 14 nazwali wręcz „cudem natury”.

Wojna nie dokonała wielkiego spustoszenia w uzdrowisku, a najważniejsze dla prowadzenia działalności leczniczej obiekty ocalały. Od roku 1949 Ciechocinek funkcjonuje jako uzdrowisko całoroczne, a w roku 1967 został wpisany na listę uzdrowisk statutowych (Kozłowska-Szczęsna 2000; Małecka, Marcinkowski 2007). Obecnie Ciechocinek jest jednym z największych i jednocześnie najbardziej znanych uzdrowisk w Polsce. Obszar uzdrowiska Ciechocinek ma całkowitą powierzchnię 1534 ha. W zakresie lecznictwa uzdrowiskowego w Ciechocinku działa 5 szpitali uzdrowiskowych oraz 16 sanatoriów. Opierając się na udokumentowanych właściwościach leczniczych solanek i leczniczym klimacie, ustalono dla uzdrowiska profil leczniczy. U osób dorosłych leczy się w Ciechocinku choroby: ortopedyczno-urazowe, układu nerwowego, reumatologiczne, kardiologiczne i nadciśnienie naczyń obwodowych, górnych dróg oddechowych, otyłość, osteoporozę oraz choroby kobiece. U dzieci rekomendowane jest leczenie w uzdrowisku Ciechocinek chorób ortopedyczno-urazowych, układu nerwowego, reumatologicznych oraz górnych dróg oddechowych (Statut Uzdrowiska Ciechocinek 2008). Z punktu widzenia badań przeprowadzonych w niniejszej pracy szczególnie ważny jest profil leczniczy uzdrowiska związany z leczeniem chorób układu oddechowego zarówno u dzieci, jak i u dorosłych. Jak podaje Kubiak (2001), w Ciechocinku leczy się przede wszystkim:

- nieżyty oskrzeli,
- przewlekłe nieżyty gardła,
- przewlekłe nieżyty krtani i tchawicy,

- przewlekłe zapalenie trąbki słuchowej,
- przewlekły stan zapalny błony śluzowej nosa i gardła,
- przewlekłe zapalenie błony śluzowej krtani,
- stan zapalny zatok przynosowych,
- stany pooperacyjne w obrębie górnych dróg oddechowych,
- pylicę płuc z objawami nieżytowymi.

W roku 2012 w Ciechocinku dostępnych było ok. 4330 miejsc dla pacjentów (Koreleska, Stefański 2013). Należy jednak pamiętać, że obok kuracjuszy Ciechocinek licznie odwiedzają turyści. Szacuje się, że rocznie odwiedza Ciechocinek ponad 70 tysięcy kuracjuszy i turystów.

#### 4.1.2. Uzdrawisko Inowrocław

W celu określenia wpływu charakteru miasta uzdrawiskowego (wielkość, obecność obiektów przemysłowych, udział strefy uzdrawiskowej w obszarze całego miasta) na mikrobiologiczne zanieczyszczenia powietrza w strefie otwartych inhalatorów przeprowadzono badania porównawcze w uzdrawisku Inowrocław.

Inowrocław, położony na Pojezierzu Wielkopolsko-Kujawskim (52°47'N, 18°15'E), jest jednym z największych miast województwa kujawsko-pomorskiego (około 77,6 tys. mieszkańców). Obecnie miasto pełni dwie funkcje – ośrodka gospodarczego oraz ośrodka uzdrawiskowego (Kozłowska-Szczęśna 2000).

Inowrocław jest jednym z ważniejszych ośrodków gospodarczych województwa z rozwiniętym przemysłem chemicznym, maszynowym, szklarskim, poligraficznym. Większość zakładów przemysłowych skupia się jednak w południowej części miasta i jest dobrze izolowana od dzielnicy uzdrawiskowej. Dzięki temu zanieczyszczenie powietrza atmosferycznego w części uzdrawiskowej Inowrocławia nie przekracza norm dla obszarów ochrony uzdrawiskowej (Sziwa 1999).

Obszar, na którym usytuowane jest miasto, znany jest przede wszystkim z występowania bogatych pokładów soli kamiennej. Na terenie Inowrocławia istniała prawdopodobnie najstarsza warzelnia soli, jaką do tej pory odkryto na ziemiach polskich, również dzisiaj inowrocławskie kopalnie soli są ważną gałęzią przemysłu (Gawlak 1999).

W 1875 roku z inicjatywy dr. Zygmunta Wilkowskiego powstało uzdrowisko zwane „Solanki Inowrocławskie”. Największym uzdrowiskowym bogactwem Inowrocławia są solanki gorzkie (chlorkowo-sodowo-magnezowe), zaliczane do najsilniej stężonych w Europie. Litr solanki inowrocławskiej zawiera ogółem ponad 313 g składników mineralnych przy gęstości  $1,1956 \text{ g}\cdot\text{cm}^3$  w temperaturze  $18^\circ\text{C}$ . Inowrocławskie solanki wykorzystywane są m.in. do kąpeli mineralnych w wannach, inhalacji oraz do kuracji pitnych po uprzednim zagęszczeniu, a następnie rozcieńczeniu. Obecnie Inowrocław jest drugim po Ciechocinku największym uzdrowiskiem nizinnym w Polsce. Kierunki lecznicze tego uzdrowiska obejmują choroby reumatyczne, ortopedyczno-urazowe, kardiologiczne, naczyń obwodowych, kobiece, układu trawienia, dróg oddechowych i skóry (Gawlak 1999; Ponikowska 2012).

#### 4.1.3. Tężnie

Tężnie wykorzystywane w Ciechocinku jako otwarte inhalatoria są unikalnymi obiektami nie tylko w skali Polski, ale i Europy. Z dokumentów historycznych wynika, że pierwsze tężnie solankowe budowano około XIV wieku w Lombardii (północne Włochy). Niewiele później, około 1580 roku, zaczęto budować tężnie na terenie środkowej Europy. Niestety z licznych dawniej tężni obecnie w Europie pozostało niewiele tego typu obiektów. Do dziś istnieją i zatężają solankę, głównie w celach zdrowotnych i rekreacyjnych, tężnie m.in. w: Bad Dürrenberg, Bad Kreuznacher, Bad Rothenfelde, Bad Sassendorf oraz Bad Kissingen (Gaweł, Kuczaj 2012).

W Polsce prawdopodobnie już w VII–VIII wieku prężny ośrodek warzenia soli działał w Kołobrzegu. Później, w latach 1710–1794, wybudowano tam 6 tężni solankowych o długości około 285 m każda. Po I rozbiórce Polski, kiedy podkrakowskie kopalnie soli znalazły się w zaborze austriackim, w Polsce centralnej zaistniała konieczność poszukiwania źródeł solanki czy innych złóż solnych, co przyczyniło się do rozwoju Ciechocinka jako ośrodka solowarskiego. Początkowo, w latach 1827–1829, wybudowano dwie tężnie: Tężnię 1 o długości 651,5 m (ryc. 3) oraz Tężnię 2 o długości 723,8 m. Zaprojektował je profesor Akademii

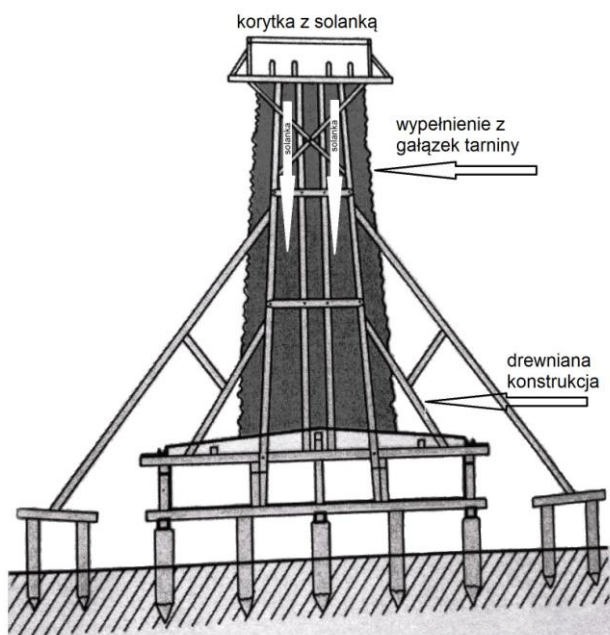
Górnicy w Kielcach Jakub Graff. Są one usytuowane równolegle w odległości ok. 300 m od siebie, ale prostopadle do przeważających w tym obszarze wiatrów. W roku 1859 wybudowano Tężnię 3 o długości 366,2 m. Dzięki temu powstał jeden z największych kompleksów tężniowych w Europie o łącznej długości tężni równej 1741,5 m (Ponikowska, Marciniak 1988; Gaweł, Kuczaj 2012).



Ryc. 3. Tężnia 1 w Ciechocinku (fot. A. Burkowska-But)

Podstawę tężni stanowi około 7000 wbitych w ziemię dębowych pali, na których umieszczono świerkowo-sosnową konstrukcję wypełnioną gałązkami tarniny (*Prunus spinosa*), po których spływa solanka (ryc. 4).

Solanka do tężni pompowana jest ze źródła nr 11 (znajdującego się pod fontanną „Grzyb” – ryc. 5) i włączana na górę do korytek zainstalowanych na ich szczycie. Stąd spływa kroplami po ścianach tężni i pod wpływem wiatru oraz promieni słonecznych intensywnie paruje,



Ryc. 4. Schemat tężni solankowej (na podst. Korzeniewski 2001)



Ryc. 5. Fontanna „Grzyb” (fot. A. Burkowska-But)

co powoduje zwiększanie stężenia soli. Najmniejsze stężenie ma solanka po spłynięciu z Tężni 1 (9%), na Tężni 3 zatężeja się do 16%, a po procesie odparowywania na Tężni 2 końcowe stężenie soli wynosi 27% (tab. 7). Stąd solanka rurociągami kierowana jest do warzelnicy soli (trzeci etap produkcji soli).

Podobnie jak w Ciechocinku, jednym z najbardziej charakterystycznych elementów współtworzących mikroklimat uzdrowiska Inowrocław jest tężnia solankowa. Istniejąca od 2001 roku konstrukcja ma kształt dwóch połączonych wieloboków i jest drugą co do wielkości w Polsce (ryc. 6). Stężenie NaCl w solance kierowanej na tężnię w Inowrocławiu jest niższe niż w Ciechocinku i wynosi 3% (tab. 7).

Cały teren przylegający do inowrocławskiej tężni izolowany jest od strefy miejskiej ponadstuletnim Parkiem Solankowym o powierzchni 55 ha. Jak podaje Gawlak (1999), dobór różnorodnych gatunków drzew i krzewów wydzielających fitoncydyny dodatkowo zwiększa znaczenie „Solanek” dla usuwania mikrobiologicznych zanieczyszczeń z powietrza w uzdrowisku.



Ryc. 6. Tężnia w Inowrocławiu (fot. A. Burkowska-But)

Tabela 7. Charakterystyka otwartych inhalatorów

Obiekt	Długość [m]	Szerokość [m]	Wysokość [m]	Objętość [m <sup>3</sup> ]	Stężenie NaCl w solance [%]	Ilość kuracjuszy w otoczeniu obiektu
Ciechocinek						
Fontanna „Grzyb”	5 (średnica)		3	38	5	bardzo liczni
Tężnia 1	648	9	14	5800	9	bardzo liczni
Tężnia 2	719	9	16	6300	27	nieliczni
Tężnia 3	333	9	12	2900	16	liczni
Inowrocław						
Tężnia solankowa	300	6	9		3	bardzo liczni

## 4.2. Lokalizacja i charakterystyka stanowisk badawczych

### 4.2.1. Lokalizacja i charakterystyka stanowisk badawczych w Ciechocinku

Na terenie Ciechocinka zlokalizowano 11 stanowisk badawczych (ryc. 7 i 8). Stanowiska podzielono na trzy grupy, zgodnie z dominującym sposobem wykorzystywania danego terenu przez kuracjuszy i mieszkańców miasta:

a) **tereny miejskie** charakteryzowały się dużym ruchem samochodowym, zabudową miejską z niewielkim udziałem terenów zielonych, wykorzystywane były głównie przez stałych mieszkańców uzdrowiska.

Na terenach typowo miejskich stanowiska badawcze usytuowano:

CM1 – przy wjeździe do Ciechocinka od strony Torunia, przy skrzyżowaniu ulic Kopernika i Bema;

CM2 – na ulicy Kopernika, naprzeciwko dworca PKP;

CM3 – na ulicy Widok.

b) **tereny uzdrowiskowe** charakteryzowały się bardzo dużym udziałem terenów zielonych (trawniki, zadrzewienia), odwiedzane były głównie przez kuracjuszy i turystów, dominował tu ruch pieszy, zabudowa była bardzo rozproszona.

Na terenach uzdrowiskowych stanowiska badawcze zlokalizowane były:

CU1 – w Parku Zdrojowym przed Pijalnią Wód;

CU2 – na północno-wschodnim krańcu parku;

CU3 – na deptaku przy ulicy Tężniowej.

c) **strefa oddziaływania inhalatorów** otoczona była głównie terenami zielonymi, odbywał się tu jedynie pieszy ruch kuracjuszy i turystów. Stanowiska badawcze wyznaczono w następujących punktach:

G1 – w odległości 1 m od fontanny „Grzyb” zasilanej solanką z Ujęcia nr 11, zgodnie z kierunkiem dominujących wiatrów;

G10 – w odległości 10 m od fontanny „Grzyb” zasilanej solanką z Ujęcia nr 11, zgodnie z kierunkiem dominujących wiatrów;

CI1 – na deptaku przy Tężni 1;

CI2 – na deptaku przy Tężni 2;

CI3 – na deptaku przy Tężni 3;



Ryc. 7. Stanowiska badawcze w Ciechocinku: a) CM2 na terenach typowo miejskich, b) CU1 na terenach uzdrowiskowych, c) CI1 w strefie oddziaływania inhalatorów (fot. A. Burkowska-But)

Ponadto w celu dokonania oceny, czy solanki tężniowe mogą być czynnikiem wprowadzającym mikroorganizmy do powietrza, w strefie oddziaływania inhalatorów liczebność bakterii mezofilnych oraz liczebność mikroorganizmów halofilnych („mikroorganizmy modelowe”, występujące jedynie w solankach) oznaczano dodatkowo na następujących stanowiskach:

a) w otoczeniu Tężni 1

S1 – w odległości 1 m od tężni po stronie ze spływem solanki;



Ryc. 8. Rozmieszczenie stanowisk badawczych w Ciechocinku (na podst. [www.google.pl/maps](http://www.google.pl/maps))

S10 – w odległości 10 m od tężni po stronie ze spływem solanki;

N1 – w odległości 1 m od tężni po stronie bez spływu solanki;

N10 – w odległości 10 m od tężni po stronie bez spływu solanki;

b) w otoczeniu fontanny „Grzyb” – na stanowiskach G1 i G10 opisanych powyżej.

#### 4.2.2. Lokalizacja i charakterystyka stanowisk badawczych w Inowrocławiu

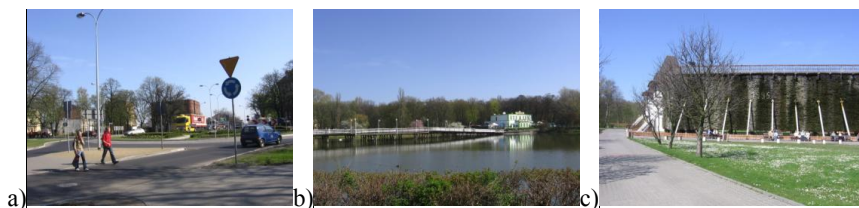
Na terenie Inowrocławia wyznaczono 6 stanowisk poboru próbek powietrza (ryc. 9 i 10). Podobnie jak w Ciechocinku stanowiska zostały podzielone na 3 kategorie, zgodnie z dominującym sposobem wykorzystywania danego terenu:

a) na terenach miejskich:

IM1 – w pobliżu Kościoła NMP przy ulicy Biskupa Antoniego Laubitz;

IM2 – przy Urzędzie Miasta Inowrocław przy ulicy F. D. Roosevelta;

- b) na terenach rekreacyjno-uzdrowiskowych:
  - IU1 – w centralnej części Parku Solankowego;
  - IU2 – na pomoście przy restauracji „Nad Stawkiem”;
- c) w strefie oddziaływania tężni solankowej:
  - II1 – we wnętrzu wielobocznej konstrukcji tężni;
  - II2 – na zewnątrz wieloboku tężni w odległości ok. 10 metrów od tego obiektu.



Ryc. 9. Stanowiska badawcze w Inowrocławiu: a) IM1 na terenach typowo miejskich, b) IU2 na terenach uzdrowiskowych, c) II2 w strefie oddziaływania inhalatorów (fot. A. Burkowska-But)



Ryc. 10. Rozmieszczenie stanowisk badawczych w Inowrocławiu (na podst. [www.google.pl/maps](http://www.google.pl/maps))

### 4.3. Pobór próbek powietrza do badań mikrobiologicznych

Próbki powietrza pobierano zgodnie z zaleceniami normy (PN-89/Z-04008/08), na wysokości 1,3 m nad powierzchnią gruntu. W Ciechocinku próbki powietrza na każdym z badanych stanowisk badawczych były pobierane raz w miesiącu w okresie od 2005 do 2008 roku oraz w cyklu sezonowym (wiosną, latem, jesienią i zimą) od lata 2009 do wiosny 2011 roku. Badania w Inowrocławiu wykonano również, uwzględniając zmienność sezonową, pobierając próbki od lata 2009 do wiosny 2011 roku.

Próbki powietrza pobierano metodą zderzeniową, używając mikrobiologicznego próbnika powietrza MAS-100 firmy Merck. Prędkość przepływu strugi powietrza przez impaktor równała się około  $11 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ , co odpowiada poziomowi 5 próbnika Andersena i pozwala na wychwycenie cząstek o rozmiarach  $> 1 \mu\text{m}$  (Pascual i wsp. 2003). Objętość powietrza kierowanego na szalkę Petriego z odpowiednim podłożem ustalano, uwzględniając przewidywaną liczebność badanej grupy mikroorganizmów, stanowisko badawcze oraz warunki meteorologiczne. Wszystkie analizy wykonywano w trzech równoległych powtórzeniach, co gwarantowało minimalizację błędu związanego z przypadkowością badanych próbek.

Płytki z podłożami, na które pobrano próbki powietrza, przewożono do laboratorium w pojemniku termoizolacyjnym w temperaturze  $4^{\circ}\text{C}$ .

### 4.4. Pomiar parametrów mikroklimatycznych

Równocześnie z poborem próbek dokonywano pomiarów parametrów mikroklimatycznych, które odgrywają kluczową rolę w ocenie jakości powietrza. Badania przeprowadzano na każdym stanowisku pomiarowym i obejmowały one pomiar temperatury i wilgotności względnej powietrza, prędkości wiatru oraz występowania opadów atmosferycznych. W celu określenia powyższych parametrów meteorologicznych posługiwano się anemometrem Kestrel 3500.

#### 4.5. Oznaczenie liczebności drobnoustrojów w powietrzu

Analiza mikrobiologiczna powietrza obejmowała oznaczenie liczebności w powietrzu następujących grup drobnoustrojów:

- a) bakterii mezofilnych – według Polskiej Normy (PN-89/Z-04111/02) hodowlę prowadzono na agarze odżywczym, w temp. 37°C przez 48 h;
- b) gronkowców mannitolododatnich – zgodnie z Polską Normą (PN-89/Z-04111/02), używając podłoża Chapmana, hodowlę prowadzono w temp. 37°C przez 48 h; po inkubacji zliczano tylko otoczone żółtą strefą kolonie gronkowców mannitolododatnich;
- c) bakterii hemolizujących – według Polskiej Normy (PN-89/Z-04111/02) hodowlę prowadzono na agarze z dodatkiem krwi baraniej, w temp. 37°C przez 48 h; po okresie inkubacji oddzielnie zliczano kolonie bakterii wykazujące hemolizę typu  $\alpha$  – z wąską, częściową strefą przejaśnienia wokół kolonii oraz bakterie wykazujące hemolizę typu  $\beta$  – z całkowitą, wyraźną strefą przejaśnienia wokół kolonii;
- d) bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* – stosując podłoże MacConkeya, hodowlę prowadzono w temp. 37°C przez 48 h;
- e) promieniowców – na pożywce Pochona (PN-89/Z-04111/02), inkubując hodowlę przez 5 dni w temp. 26°C;
- f) grzybów pleśniowych – zgodnie z Polską Normą (PN-89/Z-04111/03) hodowlę prowadzono na podłożu Czapek-Dox do 7 dni oraz na pożywce brzezkowo-agarowej do 5 dni w temperaturze 26°C. Począwszy od drugiej doby inkubacji, kolonie na wszystkich płytkach liczono codziennie. Inkubację uznawano za zakończoną, gdy przez 3 kolejne doby nie stwierdzano przyrostu liczby kolonii grzybów;
- g) bakterii halofilnych – w otoczeniu otwartych inhalatorów próbki powietrza pobierano na podłoże HM (Caton i wsp. 2004) o stężeniu NaCl odpowiednim do stężenia solanki używanej na badanym obiekcie, o składzie:  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  10,0g; KCl 5,0 g;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,2g;  $\text{KNO}_3$  1,0g; cytrynian 2-sodowy 3,0g; hydroli-

zat kazeiny 5,0g; ekstrakt drożdżowy 1,0g; agar 10,0g; H<sub>2</sub>O dest. 1 dm<sup>3</sup>; pH 7,2–7,4; inkubacja prowadzona była w temp. 20°C przez 7 dni.

Po odpowiednim okresie inkubacji zliczano wyrosłe na płytkach kolonie i przeliczano na liczbę jednostek tworzących kolonie na metr sześcienny powietrza (jtk·m<sup>-3</sup>). W obliczeniach uwzględniano objętości pobranej próbki powietrza i poprawki z tablicy konwersyjnej (stworzonej przez producenta impaktora).

#### 4.6. Ocena zanieczyszczenia mikrobiologicznego powietrza

Ocenę stopnia zanieczyszczenia powietrza atmosferycznego bakteriami przeprowadzono zgodnie z PN-89/Z-04/111/02. Natomiast do określenia poziomu zanieczyszczeń powietrza grzybami pleśniowymi wykorzystano PN-89/Z-04/111/03. W ocenie uwzględniono także Propozycje Zespołu Ekspertów ds. Czynników Biologicznych dotyczące stopnia zanieczyszczenia mikrobiologicznego powietrza atmosferycznego (Augustyńska i Pośniak 2014).

#### 4.7. Analiza jakościowa bioaerozolu

##### 4.7.1. Analiza jakościowa aerozolu bakteryjnego

W celu dokonania analizy jakościowej aerozolu bakteryjnego z próbek powietrza pobranego na stanowiskach pomiarowych w uzdrowisku Ciechocinek izolowano czyste kultury bakteryjne wyrosłe na płytkach zawierających agar odżywczy. W roku 2008 w każdym miesiącu odszczepiano po 100 kolonii łącznie ze wszystkich stanowisk pomiarowych i przenoszono je na skosy zawierające tę samą pożywkę. Morfologię komórek bakterii określano w preparatach barwionych metodą Grama wykonanych z 2- i 5-dniowych hodowli bakteryjnych prowadzonych w bulionie odżywym.

Identyfikacji szczepów bakteryjnych dokonano z wykorzystaniem odpowiednich testów API firmy bioMérieux. Pałeczki Gram-ujemne

identyfikowano na podstawie testu API 20 E, ziarniaki katalazo-dodatnie – na podstawie testu API Staph, ziarniaki katalazo-ujemne – na podstawie testu API 20 Strep, natomiast laseczki Gram-dodatnie identyfikowano, stosując test API 50 CH. Po odczytaniu wyników testu i uzyskaniu profilu numerycznego identyfikacji dokonywano, wykorzystując oprogramowanie komputerowe *apiweb*<sup>TM</sup>.

Szczepy, dla których w testach API nie uzyskano wiarygodnej identyfikacji (co najmniej „doskonała identyfikacja do rodzaju” zgodnie z programem *apiweb*<sup>TM</sup>), dodatkowo poddawano identyfikacji metodą spektroskopii masowej z użyciem techniki MALDI TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry), opartej na analizie niepowtarzalnego dla każdego gatunku bakterii profilu białkowego. Analizy porównawcze widm uzyskanych przy użyciu analizatora MALDI Biotyper (firmy Bruker Daltonik) z profilami wzorcowymi drobnoustrojów z bazy MBT DB-5627 (Bruker Daltonik) były wykonane przez program MALDI-Biotyper 3.0 (Bruker Daltonik).

#### 4.7.2. Analiza jakościowa aerozolu grzybowego

Z próbek powietrza pobranych w uzdrowisku Ciechocinek w roku 2008 wyizolowano 480 czystych szczepów grzybowych. Ich przynależność systematyczną określano na podstawie cech morfologicznych kolonii oraz obrazu mikroskopowego, stosując następujące klucze: Fassatiowa (1983), Singh i wsp. (1991), Domsch i wsp. (1993), Hoog i Guarro (1995), Klich (2002). W przypadkach wątpliwych dodatkowo identyfikację potwierdzano, stosując opisaną powyżej metodę MALDI TOF MS z wykorzystaniem programu MALDI-Biotyper 3.0 (Bruker Daltonik) i bazy Filamentous Fungi Library 1.0 (Bruker Daltonik).

### 4.8. Analiza solanek tęźniowych

#### 4.8.1. Pobór solanek do badań

Solanki do badań chemicznych oraz mikrobiologicznych pobierano trzykrotnie (14.05.2012; 3.06.2013; 8.09.2014). Próbkę solanek pobie-

rano bezpośrednio z Ujęcia nr 11 oraz Tężni 1, 2 i 3 w Ciechocinku (ze zbiorników gromadzących solankę po przepłynięciu przez tężnię) do sterylnych butli szklanych o pojemności 2 dm<sup>3</sup>. Solanki przewożono do laboratorium w pojemniku termoizolacyjnym w temperaturze 4°C i analizowano bezpośrednio po dostarczeniu do laboratorium.

#### 4.8.2. Analiza chemiczna solanek tężniowych

Dla powyższych solanek wykonano następujące analizy chemiczne:

- a) oznaczenie zawartości węgla (TC – węgiel całkowity, TOC – całkowity węgiel organiczny, TIC – całkowity węgiel nieorganiczny) – metodą wysokotemperaturową, zgodnie z instrukcją producenta, z zastosowaniem analizatora TOC-L (firmy Shimadzu);
- b) oznaczenie zawartości jonów NH<sup>4+</sup> – metodą spektrofotometryczną z wykorzystaniem testów Spectroquant i spektrofotometru SQ118 (firmy Merck), zgodnie z instrukcją producenta;
- c) zawartość azotu ogólnego (N<sub>tot</sub>) – podanego jako suma azotu amonowego oznaczanego metodą Kjeldahla (Dojlido i wsp. 1999) i azotanów(III) i (V) oznaczonych metodą chromatografii jonowej zgodnie z normą PN-EN ISO 10304-1 (2009).

Analizy chemiczne solanek wykonano w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalityki Wydziału Chemii UMK w Toruniu. Dane dotyczące stężenia NaCl w solankach pochodzących z Ujęcia nr 11 oraz zbiorników Tężni 1, 2 i 3 przy każdym poborze próbek uzyskiwano z laboratorium Zakładu Produkcji Zdrojowej Przedsiębiorstwa Uzdrowisko Ciechocinek S.A.

#### 4.8.3. Oznaczenie ogólnej liczby bakterii w solankach tężniowych

W próbkach solanek opisanych powyżej (rozdział 3.7.1.) oznaczano ogólną liczbę bakterii, stosując metodę bezpośredniego liczenia bakterii na filtrach membranowych (Zimmermann 1981). Bakterie wybarwione oranżem akrydynowym liczone pod mikroskopem epifluorescencyjnym firmy Nikon H550S, stosując powiększenie 1000×.

#### 4.9. Ocena bioróżnorodności drobnoustrojów w solankach tęźniowych

Badanie bioróżnorodności drobnoustrojów przeprowadzono, wykorzystując solanki pobrane w Ciechocinku (8.09.2014 r.) w sposób opisany w punkcie 3.7.1. Próbkę solanek pochodzących z Ujęcia 11 oraz Tęźni 1, 2 i 3 o objętości 250 cm<sup>3</sup> filtrowano przez filtry poliwęglanowe o średnicy porów 0,22 μm, następnie z komórek zatrzymanych na powierzchni filtrów wyizolowano całkowity materiał genetyczny, stosując metodę opisaną przez Zhou i wsp. (1996). Stężenie metagenomowego DNA mierzono fluorymetrycznie z wykorzystaniem urządzenia Qubit 2.0 (firmy Invitrogen), stosując zgodnie z protokołem producenta zestaw Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). Metagenomowy DNA w ilości 1 ng z każdej próbki posłużył jako matryca do amplifikacji sekwencji 16S rDNA w reakcji PCR (*polymerase chain reaction*) przy użyciu enzymu HF Phusion Polymerase (w ilości 1 U na reakcję) oraz następujących par uniwersalnych starterów o możliwie najszerszym spektrum amplifikacji w obrębie danej domeny:

– primery dla domeny Bacteria

F:CCTACGGGAGGCAGCAG (Muyzer i wsp. 1993)

R:ACCAGGGTATCTAAWCC (Gołębiewski i wsp. 2014)

– primery dla domeny Archea

F:GGTGYCAGCCGCCGCGGTAA (Deja-Sikora, w druku)

R:GTGCTCCCCGCCAATTYCT (Deja-Sikora, w druku).

Reakcje PCR przeprowadzano według następującego schematu: wstępna denaturacja 98°C przez 30 s; następnie 30 cykli: 95°C przez 10 s, 55°C przez 15 s i 72°C przez 10 s oraz końcowa polimeryzacja w temperaturze 72°C przez 5 minut. Stężenie produktów PCR sprawdzano spektrofotometrycznie. Podczas kolejnej rundy PCR produkty znakowano identyfikatorami (sekwencjami MID), unikalnymi dla poszczególnych prób (Gołębiewski, dane niepublikowane). Następnie przygotowano biblioteki DNA dla bakterii i archeonów, które oczyszczono zgodnie z instrukcją producenta zestawem AMPure XP (Agencourt Bioscience). Dla oczyszczonych bibliotek, w celu oceny zawartości pogarszających jakość sekwencjonowania niskocząsteczkowych frakcji DNA, wykonano analizę elektroforetyczną, używając zestawu

Agilent High Sensitivity DNA Analysis Kit (Agilent Technologies) oraz urządzenia Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Dla próbek, w których stwierdzono obecności niskocząsteczkowego DNA, etap oczyszczania i elektroforezy powtarzano.

Biblioteki poddawano analizie ilościowej, wykorzystując technikę Real-time PCR z zastosowaniem zestawu Kapa Library Preparation Kit (Kapa Biosystems) zgodnie z instrukcją producenta oraz urządzenia LightCycler 480 (Roche) i łączono, tak aby otrzymać odpowiednią reprezentację każdej z nich w sekwencjonowaniu. Następnie zgodnie z instrukcją producenta zestawu MiSeq Reagent Kit v3 (600-cycles) (MiSeq System) biblioteki bakteryjne i archeonowe przygotowano do sekwencjonowania. Biblioteki zsekwencjonowano techniką NGS (next-generation sequencing) z wykorzystaniem aparatu MiSeq (firmy Illumina), stosując standardowy program producenta 16S amplicon.

Wygenerowane sekwencje 16S rDNA poddano analizie bioinformatycznej, która obejmowała odszumienie, odrzucenie sekwencji chimerycznych i składanie sekwencji w tzw. *paired ends* i następnie przypisano do poszczególnych pozycji taksonomicznych do poziomu rodziny w oparciu na bazie mothur v1.35 zgodnie ze standardową procedurą operacyjną (Schloss i wsp. 2009; Kozich i wsp. 2013). Operacyjne jednostki taksonomiczne (OTUs, *operational taxonomic units*) wyznaczono przy 97% poziomie identyczności.

Badania bioróżnorodności mikroorganizmów w solankach tężniowych wykonano we współpracy z Zakładem Mikrobiologii Uniwersytetu Eötvös Loránd w Budapeszcie.

#### 4.10. Przeżywalność bakterii w solankach tężniowych

W badaniach wykorzystano 3 szczepy, potencjalne patogeny układu oddechowego: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 oraz *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603. W eksperymentach wykorzystano solanki pobrane z Ujęcia nr 11 oraz Tężni 1, 2 i 3 w Ciechocinku. Oznaczenie żywotności bakterii patogennych w obecności solanek przeprowadzono w dwóch wariantach:

- w naturalnych solankach;
- w warunkach zanieczyszczenia solanek substancjami organicznymi – jako substancję symulującą zanieczyszczenie zastosowano ekstrakt drożdżowy, którego końcowe stężenie w solankach wynosiło 0,25%.

W kolbach o pojemności 500 cm<sup>3</sup> umieszczono 200 cm<sup>3</sup> odpowiedniej solanki i sterylizowano. Następnie do solanek wprowadzono po 1 cm<sup>3</sup> zawiesiny bakteryjnej badanego szczepu o gęstości optycznej 0,5 w skali McFarlanda, co odpowiadało liczebności komórek 1,5·10<sup>8</sup> jtk·cm<sup>-3</sup>.

Oznaczanie liczebności żywych komórek bakteryjnych przeprowadzono natychmiast po zaszczepieniu kolb z solankami oraz po 7, 14, 24 dniach inkubacji w temperaturze 20°C. W celu oznaczania liczebności żywych komórek bakteryjnych w solankach stosowano metodę posiewu wgłębnego, używając pożywki PCA (firmy Biocorp) o składzie: hydrolyzate kazeiny 5,0g; ekstrakt drożdżowy 2,5g; glukoza 1,0g; agar 15,0 g; H<sub>2</sub>O dest. 1000 cm<sup>3</sup>. Wysiewy inkubowano w temp. 37°C przez 48 h, a następnie zliczono wyrosłe kolonie. Liczebność żywych bakterii wyrażoną jako jtk·cm<sup>-3</sup> wyznaczano za pomocą wzoru:

$$x = \frac{a \cdot R}{v}, \text{ gdzie:}$$

$x$  – liczebność żywych bakterii [jtk·cm<sup>-3</sup>];

$a$  – średnia liczba wyrosłych kolonii;

$R$  – współczynnik rozcieńczenia;

$v$  – objętość wysianej próbki.

#### 4.11. Tworzenie biofilmu przez potencjalne patogeny układu oddechowego w solankach tęźniowych

##### 4.11.1. Tworzenie biofilmu na powierzchni płytek titracyjnych

Tworzenie biofilmu oznaczano ilościowo, stosując metodę opisaną przez Fleminga i wsp. (2009) oraz Kim i wsp. (2009). Eksperyment

opierał się na badaniach biofilmów jednogatunkowych utworzonych przez szczepy *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 i *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442.

Badania przeprowadzono w dwóch wariantach, tak jak badanie przeżywalności bakterii patogennych (rozdział 3.9.), czyli w naturalnych solankach pochodzących z Ujęcia nr 11 oraz Tężni 1, 2 i 3 w Ciechocinku oraz w warunkach zanieczyszczenia tych solanek substancjami organicznymi (ekstrakt drożdżowy 0,25%).

Bulionową hodowlę szczepów *P. aeruginosa* i *S. aureus* prowadzoną przez 24 h w temp. 37°C rozcieńczano 100-krotnie odpowiednią, sterylną solanką do gęstości optycznej 0,5 w skali McFarlanda, co odpowiadało liczebności komórek  $1,5 \cdot 10^8$  jtk $\cdot$ cm $^{-3}$ . Badane roztwory umieszczano w polistyrenowych 24-dołkowych płytkach titracyjnych w objętości 2 cm $^3$  i inkubowano statycznie w czasie 24 oraz 48 h w temperaturze 22 oraz 37°C. Po inkubacji usuwano niezwiązane komórki bakterii przez 3-krotne płukanie buforem PBS, po czym biofilm utrwalano przez suszenie (1 h, 60°C).

#### 4.11.2. Ocena ilości wytworzonego biofilmu

Po wysuszeniu płytek do każdego wgłębienia dodawano po 2 cm $^3$  1% roztworu fioletu krystalicznego w celu zabarwienia zaadsorbowanych na powierzchni komórek bakterii tworzących biofilm. Po 15-minutowej inkubacji barwnik wypłukiwano bieżącą wodą z kranu, a płytki ponownie suszono (1 h, 20°C). W celu odpłukania związanego przez biofilm barwnika dołki płytek wypełniano 70% alkoholem etylowym (po 2 cm $^3$  do każdego dołka). Natężenie barwy uzyskanych roztworów mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali 570 nm za pomocą spektrofotometru Hitachi U-1900, wobec próby ślepej, którą stanowił 70% alkohol etylowy. Natężenie barwy alkoholowego roztworu fioletu krystalicznego jest wprost proporcjonalne do ilości wytworzonego biofilmu.

Wartość odcięcia (ODc) zdefiniowano zgodnie z propozycją Stepanović i wsp. (2007) jako trzy odchylenia standardowe (SD) powyżej wartości gęstości optycznej (OD) dla kontroli negatywnej:

$OD_c = \text{średnie OD dla kontroli negatywnej} + (3 \times \text{SD dla kontroli negatywnej})$ .

Wartość odcięcia ( $OD_c$ ) określano oddzielnie dla każdej użytej w badaniach solanki. Wartość OD badanego szczepu wyrażano jako średnią z sześciu powtórzeń.

Wyniki zgodnie z propozycją Stepanovicia i wsp. (2007) podzielono na następujące kategorie:

$OD \leq OD_c$  – brak produkcji biofilmu

$OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$  – słaba produkcja biofilmu

$2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$  – umiarkowana produkcja biofilmu

$4 \times OD_c < OD$  – silna produkcja biofilmu

#### 4.11.3. Tworzenie biofilmu na gałązkach tarniny

Hodowle szczepów *S. aureus* i *P. aeruginosa* przygotowano analogicznie jak w przypadku analizy tworzenia biofilmu na płytkach titracyjnych (3.10.1). Gałązki do badań mikrobiologicznych pochodziły z krzewu tarniny (*Prunus spinosa*). W studzienkach 24-dołkowej płytki titracyjnej umieszczono po jednej gałązce tarniny o długości 2 cm i średnicy 3 mm. W celu zapobiegania wnikaniu solanki i barwnika do wewnętrznych tkanek badanego materiału końce każdej z gałązek zaślepiono parafiną. Studzienki napełniano odpowiednią zawiesiną bakteryjną w solance w objętości równej 2 cm<sup>3</sup>. Płytki następnie inkubowano statycznie w temperaturze 20°C przez okres 24 i 48 h. Po inkubacji gałązki przenoszono do nowej sterylnej płytki, suszono (1 h, 60°C) i przeprowadzano ocenę ilości wytworzonego biofilmu metodą opisaną powyżej (3.10.2.).

#### 4.11.4. Oznaczanie stężenia tanin uwalnianych z gałązek tarniny

W celu oznaczenia stężenia tanin uwalnianych z gałązek tarniny do solanek użytych w badaniach tworzenia biofilmu zastosowano metodę z użyciem odczynnika Folina-Denis (Saxena i wsp. 2013). Stężenie

tanin mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali 700 nm, przy użyciu spektrofotometru Hitachi U-1900 (Hitachi).

#### 4.11.5. Aktywność hydrolityczna biofilmu

Dla wszystkich układów doświadczalnych, dla których notowano produkcję biofilmu, oznaczano ogólną aktywność hydrolityczną biofilmu metodą z wykorzystaniem dwuocianu fluoresceiny (FDA) (Adam, Duncan 2001). Zawiesiny bakteryjne do analizy przygotowano analogicznie jak w punkcie 3.9.1. Uzyskane zawiesiny umieszczono w dołkach sterylnej 24-dołkowej płytki titracyjnej w objętości równej 2 cm<sup>3</sup>, po czym płytki inkubowano statycznie w temperaturze 20°C przez 24 h. Po inkubacji wszystkie niezwiązane bakterie odpłukiwano trzykrotnie, używając buforu PBS. Do dołka płytki titracyjnej wprowadzano 2 cm<sup>3</sup> sterylne buforu PBS i dodawano 20 µl roztworu FDA w acetonie o stężeniu 1 mg·cm<sup>-3</sup>. Próbkę inkubowano w ciemności przez 3 h w temperaturze 30°C. Ilość uwolnionej fluoresceiny mierzono, używając spektrofluorymetru Hitachi F-2500 (Hitachi), przy długości fali emisji 505 nm i fali wzbudzenia 480 nm.

#### 4.12. Analiza statystyczna

Analizę uzyskanych wyników przeprowadzono, wykorzystując komputerowy program STATISTICA 6.0 (StatSoft Polska).

Normalność rozkładów analizowanych danych oceniano testem Shapiro-Wilka, natomiast jednorodność wariancji testem Levene'a.

W celu wykazania różnic (lub ich braku) pomiędzy dwoma grupami danych wykorzystywano test t-Studenta. Przy większej ilości porównywanych grup danych wykonywano analizę wariancji (ANOVA) uzupełnioną testami post-hoc Tukeya. Za statystycznie istotne uznawano wartości, dla których poziom istotności różnic pomiędzy średnimi  $p < 0,05$ .

Stopień korelacji pomiędzy zmiennymi oceniano za pomocą współczynnika korelacji Pearsona ( $r$ ), przyjmując za istotne statystycznie wartości przy  $p < 0,05$ .

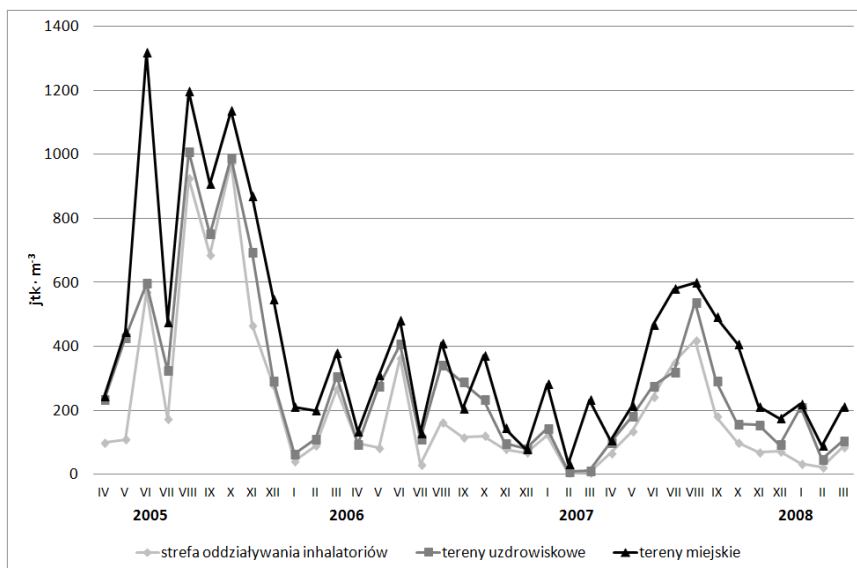
## Wyniki i dyskusja

### 5.1. Analiza ilościowa i jakościowa bakterii w powietrzu uzdrowiska Ciechocinek

Zanieczyszczenia powietrza, zarówno pyłowe, gazowe, jak i mikrobiologiczne, wpływają na zdrowie człowieka. Zarówno z epidemiologicznego, jak i ekonomicznego punktu widzenia ocena mikrobiologicznego stanu czystości powietrza jest w pełni uzasadniona (Rossi i wsp. 2005; Stern i wsp. 2014), ale badania mikrobiologiczne rzadko są uwzględniane w ocenie jakości powietrza w miastach, również tych, które mają status uzdrowiska (Jutrowska i wsp. 2014).

W latach 2005–2008 najwyższe liczebności bakterii mezofilnych w powietrzu stwierdzano w miesiącach letnich i wczesnojesiennych, zwykle od czerwca do października (ryc. 11). W roku 2005 notowano w tym okresie wyjątkowo wysokie liczebności bakterii, na terenach miejskich średnio przekraczające wartość  $10^3$  jtk·m<sup>-3</sup> powietrza. W opisywanym okresie jedynie w lipcu stwierdzono obniżenie liczebności bakterii w powietrzu uzdrowiska poniżej 500 jtk·m<sup>-3</sup>, czego przyczyną była wysoka temperatura (27,3°C) i jednocześnie niższa niż podczas pozostałych poborów próbek powietrza wilgotność względna (51,1%). W pozostałych latach liczebność bakterii mezofilnych w powietrzu na całym obszarze uzdrowiska nawet w miesiącach letnich nie przekraczała 600 jtk·m<sup>-3</sup>. W lipcu 2006 stwierdzono, podobnie jak w roku poprzedzającym, obniżenie liczebności bakterii w powietrzu uzdrowiska (do wartości poniżej 100 jtk·m<sup>-3</sup>), uwarunkowane wysoką temperaturą (31,5°C) i niską wilgotnością względną (48,1%). Najniższe liczebności

bakterii (zwykle poniżej  $100 \text{ jtk}\cdot\text{m}^{-3}$ ) stwierdzano w powietrzu uzdrowiska w miesiącach zimowych – styczniu i lutym (ryc. 11).



Ryc. 11. Liczebność bakterii mezofilnych w powietrzu uzdrowiska Ciechocinek – dane uśrednione dla poszczególnych rejonów uzdrowiska. Dane z okresu maj 2005–kwiecień 2006 opublikowano w pracy Burkowska i Donderski (2007)

Podstawę interpretacji wyników i klasyfikacji powietrza zewnętrznego pod względem czystości mikrobiologicznej stanowi w Polsce norma PN-89/Z-04111/02. W całym badanym okresie na całym obszarze uzdrowiska Ciechocinek liczebność bakterii mezofilnych w zdecydowanej większości (ponad 86%) pobranych próbek powietrza nie przekraczała liczebności  $10^3 \text{ jtk}\cdot\text{m}^{-3}$ . Pozwala to zaklasyfikować powietrze jako niezanieczyszczone bakteriami mezofilnymi. Największy odsetek próbek powietrza zakwalifikowanych jako niezanieczyszczone (96,9%) pobrano w bezpośrednim otoczeniu inhalatoriów. Co istotne, w żadnej próbce nie stwierdzono liczebności bakterii przekraczającej  $3\cdot 10^3 \text{ jtk}\cdot\text{m}^{-3}$ , co świadczyłoby o silnym zanieczyszczeniu powietrza (tab. 8).

Tabela 8. Stopień zanieczyszczenia powietrza bakteriami w uzdrowisku Ciechocinek w latach 2005–2008 (zgodnie z Polską Normą PN-89/Z-04111/02)

Grupa bakterii	Zakres wartości [jtk·m <sup>-3</sup> ]	Stopień zanieczyszczenia powietrza	Otoczenie inhalatoriów	Tereny uzdrowiskowe	Tereny miejskie
Bakterie mezofilne	< 1·10 <sup>3</sup>	niezanieczyszczone	96,9*	92,2*	86,3*
	1–3·10 <sup>3</sup>	średnio	3,1	7,8	13,7
	> 3·10 <sup>3</sup>	silnie	0	0	0
Bakterie α-hemolizujące	brak	niezanieczyszczone	8,3	36,4	41
	≤ 25	średnio	91,7	62,3	53,4
	> 25	silnie	0	1,3	5,6
Bakterie β-hemolizujące	brak	niezanieczyszczone	56,4	58,3	50,0
	≤ 50	średnio	43,6	39,6	47,9
	> 50	silnie	0	0,8	2,1
Promieniowce	< 10	niezanieczyszczone	87,5	64,2	58,2
	10–100	średnio	12,5	33,7	37,6
	> 100	silnie	0	2,1	4,2

\* – % udział próbek należących do danej kategorii

Zgodnie z Propozycjami Zespołu Ekspertów ds. Czynników Biologicznych dotyczącymi stopnia zanieczyszczenia mikrobiologicznego powietrza atmosferycznego za akceptowalne uznaje się stężenie bakterii w powietrzu  $\leq 5 \cdot 10^3$  jtk·m<sup>-3</sup> (Augustyńska i Pośniak 2014). Stężenie bioaerozolu bakteryjnego we wszystkich próbkach powietrza pobranych w Ciechocinku w całym okresie badawczym nie przekraczało tej wartości. Poziom mikrobiologicznego zanieczyszczenia powietrza zewnętrznego w Ciechocinku w latach 2005–2008 można więc uznać za akceptowalny.

Przedstawione powyżej dane wskazują, że zachowanie uzdrowskiego charakteru miasta Ciechocinek (brak przemysłu, liczne tereny zielone, brak gęstej zabudowy) wpływa korzystnie na mikrobiologiczną jakość powietrza atmosferycznego. Powietrze w Ciechocinku, nawet na terenach typowo miejskich, można uznać za czyste w porównaniu z powietrzem dużych, gęsto zaludnionych aglomeracji miejskich. W mikrobiologicznych badaniach powietrza przeprowadzanych w europejskich miastach zwykle maksymalne liczebności bakterii mezofilnych mie-

ściły się w granicach  $3\text{--}5\cdot 10^3$  jtk·m<sup>-3</sup> (Pastuszka i wsp. 2000; Fahlgren i wsp. 2010). Filipiak i wsp. (2004) oraz Bugajny i wsp. (2005) w podobnych badaniach przeprowadzonych w Poznaniu odnotowali wyniki nawet 10-krotnie wyższe niż uzyskane w Ciechocinku. Liczebność bakterii mezofilnych latem w Poznaniu osiągała wartość do  $13\cdot 10^3$  jtk·m<sup>-3</sup>. Natomiast Fang i wsp. (2007) podczas badań prowadzonych w Pekinie na terenach o dużej aktywności ludzkiej i dużym natężeniu ruchu samochodowego stwierdzali do  $22\cdot 10^3$  jtk·m<sup>-3</sup>.

Ważną rolę w kształtowaniu liczebności drobnoustrojów w powietrzu odgrywają parametry mikroklimatyczne. Wyniki pomiarów temperatury i wilgotności powietrza oraz prędkości wiatru w Ciechocinku podczas pobierania próbek powietrza do badań mikrobiologicznych przedstawiono w tabeli 9. Z analizy wariancji (ANOVA) wynika, że wartości poszczególnych parametrów meteorologicznych różniły się istotnie ( $p < 0,001$ ) w poszczególnych porach roku (tab. 10).

Tabela 9. Wartości parametrów mikroklimatycznych powietrza w Ciechocinku w latach 2005–2008

Pora roku	Temperatura [°C]			Wilgotność względna [%]			Prędkość wiatru [m·s <sup>-1</sup> ]		
	zakres	średnia	SD	zakres	średnia	SD	zakres	średnia	SD
Wiosna	0,7–21,8	10,5	4,3	25,3–77,1	54,8	8,7	0,5–2,4	1,3	0,5
Lato	18,0–31,5	23,1	3,4	48,1–73,2	58,6	6,2	0,5–5,6	1,8	1,3
Jesień	1,7–23,1	12,6	3,9	60,7–92,0	70,3	7,8	0,8–3,5	1,7	1,1
Zima	-8,4–7,0	0,6	3,5	57,9–92,8	77,8	8,6	0,5–4,1	2,2	0,6

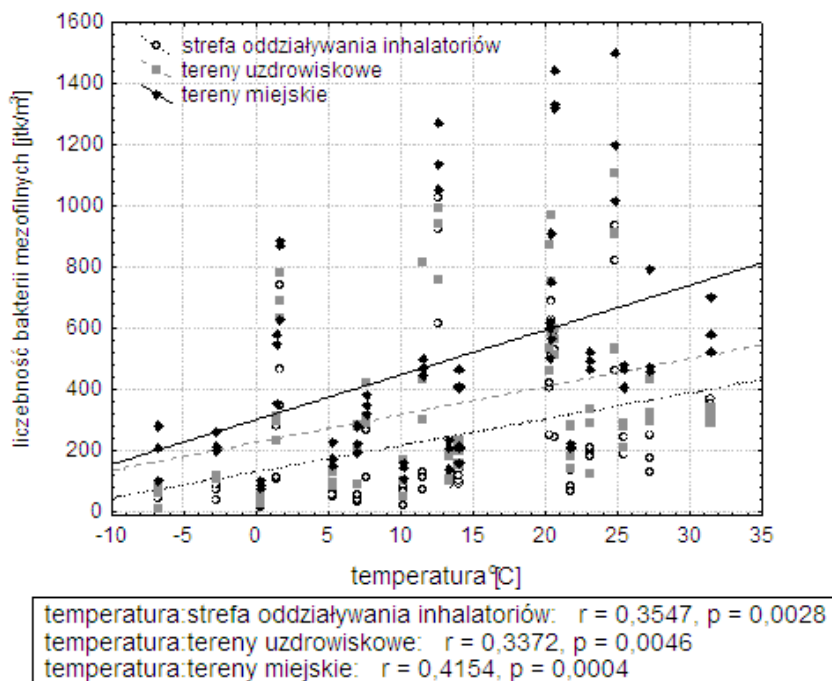
SD – odchylenie standardowe

Tabela 10. Wyniki jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA sprawdzającej istotność różnic wartości parametrów mikroklimatycznych powietrza w zależności od pory roku

Parametr mikroklimatyczny	F	P	Grupy jednorodne w teście Tukeya (HSD)
Temperatura	51,56	< 0,0001	[Z] [L] [W,J]
Wilgotność względna	20,71	< 0,0001	[W,L] [J,Z]
Prędkość wiatru	7,60	0,0002	[W,L,J] [Z]

W – wiosna, L – lato, J – jesień, Z – zima, F – stosunek wariancji międzygrupowej do wariancji wewnątrzgrupowej, p – poziom istotności

Oceny wpływu zarejestrowanych podczas poboru próbek parametrów mikroklimatycznych na liczebność bakterii mezofilnych w powietrzu uzdrowiska Ciechocinek dokonano na podstawie współczynnika korelacji Pearsona ( $r$ ). Liczebność bakterii mezofilnych w powietrzu była we wszystkich strefach badanego uzdrowiska istotnie statystycznie skorelowana z temperaturą powietrza ( $p < 0,01$ ). Współczynniki korelacji  $r$  wynosiły od 0,33 na terenach uzdrowskich do 0,41 na terenach miejskich (ryc. 12). Nie stwierdzono natomiast statystycznie istotnego wpływu pozostałych parametrów meteorologicznych (wilgotności względnej i prędkości wiatru) na liczebność bakterii w powietrzu. Podobnie jak w prezentowanej pracy, również Bowers i wsp. (2012) oraz Ravva i wsp. (2012) stwierdzali, że jedynym istotnym czynnikiem atmosferycznym kształtującym liczebność bioaerozolu jest temperatura powietrza.



Ryc. 12. Korelacja pomiędzy liczebnością bakterii mezofilnych a temperaturą powietrza

Dodatnią korelację pomiędzy temperaturą a liczebnością drobno-ustrojów w powietrzu, zarówno w miastach, jak i na terenach wiejskich, potwierdzano w wielu wcześniejszych badaniach (Shaffer, Lighthart 1997; Bugajny i wsp. 2005; Fang i wsp. 2007). Wysoka liczebność bakterii mezofilnych notowana w sezonie letnim jest związana nie tylko z optymalną dla nich temperaturą powietrza, ale również wyższą wilgotnością względną i z intensywnością ruchu turystycznego. Jak wynika z informacji uzyskanych w Przedsiębiorstwie „Uzdrowisko Ciechocinek” (dane na podst. sprzedaży biletów wstępu na tereny w otoczeniu inhalatoriów), nasilony ruch turystyczny w otoczeniu tężni rozpoczyna się w maju i trwa do końca września, osiągając maksymalne natężenie w lipcu i sierpniu, co odpowiada zmianom liczebności bakterii mezofilnych w otoczeniu otwartych inhalatoriów. Fang i wsp. (2007) również sugerują, że aktywność ludzka może być bardzo ważnym czynnikiem determinującym liczebność bakterii w powietrzu. Autorzy ci przy podobnej temperaturze powietrza podczas święta narodowego (obecność świętujących tłumów na ulicach Pekinu) notowali znacznie wyższe liczebności bakterii niż w dni powszednie.

Obok bakterii typowo saprofitycznych, pochodzących najczęściej z różnych elementów środowiska naturalnego, składnikami bioaerozoli mogą być także mikroorganizmy potencjalnie chorobotwórcze. Norma PN-89/Z-04111/02 uznaje obecność bakterii hemolizujących za wskaźnik obecności w powietrzu bioaerozoli pochodzących z dróg oddechowych ludzi i zwierząt. Liczebności bakterii  $\alpha$ -hemolizujących w powietrzu wszystkich badanych rejonów uzdrowiska były najwyższe latem, ale ich średnie wartości były niewielkie i nawet w strefie miejskiej nie przekraczały  $18 \text{ jtk}\cdot\text{m}^{-3}$ , a maksymalne notowane wartości wynosiły  $50 \text{ jtk}\cdot\text{m}^{-3}$  (tab. 11). Liczebność bakterii  $\beta$ -hemolizujących na terenach uzdrowiskowych i miejskich osiągała maksimum wiosną, a w otoczeniu inhalatoriów latem (tab. 11). Zgodnie z normą PN-89/Z-04111/02 na całym terenie uzdrowiska notowano głównie średnie zanieczyszczenie powietrza bakteriami  $\alpha$ -hemolizującymi. Na terenach uzdrowiskowych i w otoczeniu otwartych inhalatoriów przeważały próbki powietrza niezanieczyszczone bakteriami  $\beta$ -hemolizującymi. Co najważniejsze, w strefie oddziaływania inhalatoriów w żadnej próbce powietrza pobra-

nej w całym okresie badań liczebność bakterii  $\beta$ -hemolizujących nie przekroczyła wartości wskazującej na silne zanieczyszczenie (tab. 8).

Tabela 11. Liczebność bakterii hemolizujących [ $\text{jtk}\cdot\text{m}^{-3}$ ] w powietrzu uzdrowiska Ciechocinek w latach 2005–2008

	Strefa oddziaływania inhalatoriów			Tereny uzdrowiskowe			Tereny miejskie		
	zakres	średnia	SD	zakres	średnia	SD	zakres	średnia	SD
bakterie $\alpha$ -hemolizujące									
Wiosna	0–10	3,33	1,07	0–20	3,06	1,52	0–50	13,89	4,43
Lato	0–25	15,27	3,60	5–33	15,56	2,52	0–43	17,50	3,24
Jesień	0–25	5,06	1,62	0–20	7,78	2,19	0–40	8,89	2,70
Zima	0–10	1,67	0,99	0–20	3,06	1,22	0–50	5,83	3,11
bakterie $\beta$ -hemolizujące									
Wiosna	0–20	4,17	1,58	0–85	11,39	5,88	0–200	34,44	15,15
Lato	0–25	8,89	2,19	0–40	8,61	2,74	0–43	13,89	3,39
Jesień	0–25	4,67	1,57	0–23	9,72	2,33	0–103	14,98	6,08
Zima	0–5	0,56	0,38	0–5	0,83	0,45	0–50	4,72	2,84

SD – odchylenie standardowe

Latem w próbkach powietrza pobranych na terenie całego uzdrowiska Ciechocinek stwierdzano wyraźnie zwiększenie średniej liczebności bakterii  $\alpha$ -hemolizujących. W otoczeniu otwartych inhalatoriów latem stwierdzano również zwiększenie średniej liczebności bakterii  $\beta$ -hemolizujących w powietrzu. Ponieważ bakterie hemolizujące stanowią naturalny składnik bioaerozoli emitowanych z dróg oddechowych, przyczyną wysokiej liczebności tych bakterii w powietrzu w szczycie sezonu turystycznego niewątpliwie jest obecność licznych kuracjuszy i turystów. Karwowska (2003) potwierdza, że liczebność tych drobnoustrojów jest ściśle powiązana z ilością osób stanowiących potencjalne źródło emisji bakterii hemolizujących. Mimo to, ze względu na oddziaływanie aerozolu solankowego, w otoczeniu inhalatoriów nie notowano silnego zanieczyszczenia powietrza bakteriami  $\alpha$ - i  $\beta$ -hemolizującymi.

Podobnie jak bakterie hemolizujące, również gronkowce mannitolododatnie są wskaźnikiem zanieczyszczeń powietrza pochodzących głównie z dróg oddechowych człowieka lub zwierząt stałocieplnych. Jak

wynika z danych przedstawionych w tabeli 12, liczebności gronkowców w powietrzu uzdrowiska były wyższe niż bakterii hemolizujących i dla próbek powietrza pobieranych we wszystkich strefach Ciechocinka osiągały maksimum jesienią. Podobnie jak w przypadku innych grup drobnoustrojów, w otoczeniu inhalatoriów na ogół (z wyjątkiem próbek pobieranych zimą) stwierdzano niższe liczebności gronkowców niż na pozostałych obszarach uzdrowiska.

Tabela 12. Liczebność gronkowców mannitolododatnich [jtk·m<sup>-3</sup>] w powietrzu uzdrowiska Ciechocinek w latach 2005–2008

	Strefa oddziaływania inhalatoriów			Tereny uzdrowiskowe			Tereny miejskie		
	zakres	średnia	SD	zakres	średnia	SD	zakres	średnia	SD
Wiosna	0–20	4,89	1,62	0–33	5,38	2,31	0–55	21,77	4,56
Lato	0–23	7,06	1,66	0–64	19,67	4,64	0–140	26,06	7,63
Jesień	0–143	30,01	7,83	3–284	57,56	15,62	3–345	87,11	22,31
Zima	0–52	17,11	4,27	0–43	9,06	2,76	0–50	15,17	4,02

SD – odchylenie standardowe

Bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae* są powszechnie stosowanym wskaźnikiem zanieczyszczenia fekalnego wód (Dz.U. 2007, Nr 61, poz. 417; PN-EN ISO 9308-1). Norma Polska PN-89/Z-04111/02 nie uwzględnia liczebności bakterii kałowych jako kryterium oceny mikrobiologicznej powietrza. Występowanie bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* w powietrzu najczęściej bada się jedynie w otoczeniu obiektów gospodarki komunalnej, które mogą być poważnym źródłem bioaerozoli zawierających drobnoustroje fekalne (Korzeniewska i wsp. 2009; Korzeniewska, Harnisz 2012; Kalwasińska, Burkowska 2013; Gotkowska-Płachta i wsp. 2013).

Liczebności bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* notowane w powietrzu w Ciechocinku były bardzo niskie – wszystkie wartości w całym okresie badawczym mieściły się w zakresie 0–50 jtk·m<sup>-3</sup> (tab. 13). W latach 2005–2008 w strefie oddziaływania inhalatoriów w próbkach powietrza pobieranych jesienią i zimą w ogóle nie stwierdzono obecności bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*. Podczas badań prowadzonych w Toruniu również liczebności bakterii kałowych w powietrzu były wy-

jątkowo niskie i nie przekraczały  $10 \text{ jtk}\cdot\text{m}^{-3}$  (Donderski i wsp. 2005). Badanie obecności bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* przeprowadzono w Ciechocinku ze względu na potencjalną emisję tych drobno-ustrojów z oczyszczalni ścieków zlokalizowanej przy ulicy Sportowej. W strefie jej oddziaływania znajduje się m.in. stanowisko w otoczeniu Tężni 2, zlokalizowane w odległości 600 m na południowy wschód od oczyszczalni. Jednak wyniki prezentowanych badań w zasadzie wykluczają jakikolwiek wpływ oczyszczalni ścieków na powietrze w strefie okołotężniowej. Badania opublikowane przez Korzeniewską i wsp. (2009) oraz Gotkowską-Płachtę i wsp. (2013) również wykazały, że bakterie fekalne były obecne w powietrzu jedynie na terenie oczyszczalni ścieków.

Tabela 13. Liczebność bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* [ $\text{jtk}\cdot\text{m}^{-3}$ ] w powietrzu uzdrowiska Ciechocinek w latach 2005–2008

	Strefa oddziaływania inhalatorów			Tereny uzdrowiskowe			Tereny miejskie		
	zakres	średnia	SD	zakres	średnia	SD	zakres	średnia	SD
Wiosna	0–5	0,27	0,26	0–30	1,94	0,79	0–50	3,89	0,89
Lato	0–20	2,11	0,69	0–10	0,56	0,24	0–35	6,33	1,92
Jesień	0	0	0	0–7	2,5	0,27	0–55	11,83	4,55
Zima	0	0	0	0–10	0,72	0,29	0	0	0

SD – odchylenie standardowe

Zgodnie z normą PN-89/Z-04111/02 promieniowce są wskaźnikiem zanieczyszczeń powietrza bioaerozolem pochodzenia glebowego. Występują one głównie w glebie oraz na podłożach zasobnych w szczątki organiczne, a ich wnoszenie do atmosfery odbywa się przede wszystkim na skutek ruchów powietrza. Najwyższe liczebności promieniowców w powietrzu uzdrowiska Ciechocinek obserwowano w szczycie sezonu wegetacyjnego, czyli latem i jesienią. W całym okresie badawczym na terenach typowo miejskich średnie liczebności *Actinomycetes* były wyższe niż na terenach uzdrowiskowych oraz w otoczeniu inhalatorów (tab. 14). Na podstawie PN-89 Z-04111/02 powietrze w Ciechocinku można zakwalifikować głównie jako niezanieczyszczone (58,2–87,5% analizowanych próbek powietrza w zależności od rejonu uzdrowiska)

lub średnio zanieczyszczone (12,5–37,6 %). Tereny otaczające otwarte inhalatoria (parki, trawniki, pola, duże otwarte przestrzenie) mogłyby sprzyjać wprowadzaniu promieniowców do powietrza również w tej strefie. Jednak tylko na terenach miejskich (4,2% próbek powietrza) i uzdrowiskowych (2,1%) notowano liczebności promieniowców tak wysokie, że wskazywały na silne zanieczyszczenie powietrza bioaerozolem pochodzenia glebowego (tab. 8).

Tabela 14. Liczebność promieniowców [jtk·m<sup>-3</sup>] w powietrzu uzdrowiska Ciechocinek w latach 2005–2008

	Strefa oddziaływania inhalatoriów			Tereny uzdrowiskowe			Tereny miejskie		
	zakres	średnia	SD	zakres	średnia	SD	zakres	średnia	SD
Wiosna	0–30	7,78	2,32	0–30	8,61	2,68	0–80	17,11	5,43
Lato	0–60	7,92	3,58	0–80	16,06	5,15	0–85	23,05	5,37
Jesień	0–50	10,74	2,94	0–110	21,06	5,39	0–140	28,00	8,42
zima	0–10	1,02	0,67	0–10	1,11	0,62	0–10	2,11	0,91

SD – odchylenie standardowe

Promieniowce występują powszechnie w aerozolach atmosferycznych szczególnie w sezonie wegetacyjnym (Kaarakainen i wsp. 2008; Raisi i wsp. 2013). W związku z tym Kaźmierczuk i wsp. (2004) uznali, że bakterie te nie stanowią wartościowego wskaźnika sanitarnej czystości powietrza. Natomiast Barabasz i wsp. (2001) stwierdzili, że nawet gatunki promieniowców wyizolowane w pobliżu obiektów gospodarki komunalnej nie stanowią zagrożenia z punktu widzenia epidemiologii.

Należy podkreślić, że średnie liczebności wszystkich badanych grup bakterii były na terenach typowo miejskich wyższe niż w pozostałych rejonach uzdrowiska (ryc. 11, tab. 11–14). Najniższe liczebności badanych bakterii notowano w strefie oddziaływania otwartych inhalatoriów. Tendencja taka utrzymywała się we wszystkich porach roku i różnice te były istotne statystycznie ( $p < 0,05$  – bakterie mezofilne,  $p < 0,01$  – pozostałe grupy bakterii) (tab. 15).

Tabela 15. Wyniki jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA sprawdzającej wpływ lokalizacji stanowiska badawczego na liczebność bakterii

Badana grupa drobnoustrojów	F	p	Grupy jednorodne w teście Tukeya (HSD)
Bakterie mezofilne	4,77	0,0105	[I, U] [U, M]
Gronkowce mannitolododatnie	5,22	0,0061	[I, U] [U, M]
Bakterie $\alpha$ -hemolizujące	5,56	0,0044	[I, U] [U, M]
Bakterie $\beta$ -hemolizujące	5,39	0,0052	[I, U] [M]
<i>Enterobacteriaceae</i>	6,27	0,0023	[I, U] [M]
Promieniowce	5,55	0,0045	[I, U] [U, M]

I – strefa oddziaływania inhalatoriów, U – tereny uzdrowiskowe, M – tereny miejskie, F – stosunek wariancji międzygrupowej do wariancji wewnątrzgrupowej, p – poziom istotności

Podobną zależność stwierdzano także podczas badań prowadzonych na terenie uzdrowiska Inowrocław (Burkowska, Donderski 2008b). Liczebność mikroorganizmów w powietrzu zależy m.in. od gęstości zaludnienia i intensywności działalności gospodarczej (Fang i wsp. 2007), pyłowego i chemicznego zanieczyszczenia powietrza (Lin, Li 2000; Rasi i wsp. 2013) i szaty roślinnej (Pepeljnjak, Šegvić 2003), dlatego też mikrobiologiczne zanieczyszczenia powietrza osiągają wyższe wartości na terenach typowo miejskich (Fahlgren i wsp. 2010).

Ponadto na liczebność drobnoustrojów w strefie oddziaływania otwartych inhalatoriów miał wpływ aerozol tężniowy. Powietrze w strefie okołotężniowej charakteryzuje się mniejszym niż w strefie miejskiej stężeniem zanieczyszczeń pyłowych i gazowych (Ponikowska, Marciniak 1988). Sedymentujące krople aerozolu usuwają z powietrza również bioaerozole. Ponadto poza jonami  $\text{Cl}^-$  oraz  $\text{Na}^+$  ciechocińska solanka rozpylana na tężniach zawiera również jony  $\text{F}^+$ ,  $\text{Br}^+$ ,  $\text{J}^+$  oraz  $\text{B}^+$ , co niewątpliwie wzmacnia bakteriobójcze działanie aerozolu tężniowego (Burkacka-Łaukajtys, Zwolska 1973; Krawiec 1999; Krawiec 2005). Badania prowadzone przez Walczaka i wsp. (2011) wskazują na znaczną eliminację bakterii *E. coli* i *S. aureus* inkubowanych w solankach z Ciechocinka.

Zdecydowanie mniejsze mikrobiologiczne zanieczyszczenie powietrza w strefie oddziaływania inhalatoriów ma istotne znaczenie w uzdrowisku, w którego profilu leczniczym znajdują się choroby dróg oddechowych. W przypadku rehabilitacji pulmonologicznej duży na-

cisk kładzie się na zapewnienie chorym maksimum ruchu na świeżym powietrzu. Uzdrowiska, w których leczy się choroby układu oddechowego, powinny zapewniać dobre warunki higieniczne powietrza (Zhilina, Dobrodceeva 2005; Prunk i wsp. 2008; Krupa 2009). Ze względu na bardzo różne wymagania środowiskowe mikroorganizmów patogennych trudno dobrać jedną skuteczną metodę eliminacji drobnoustrojów z powietrza (Tang 2009). Tężnie solankowe stają się coraz popularniejszym sposobem na poprawę jakości powietrza w uzdrowiskach. W ciągu ostatnich kilkunastu lat tężnie zbudowano m.in. w Inowrocławiu, Busku Zdroju, Rabce, Wieliczce oraz w Gołdapi.

Liczni autorzy wykazali, że liczebność mikroorganizmów w powietrzu jest bardzo zmienna i zależy m.in. od czynników klimatycznych (Rossi i wsp. 2005; Klarić, Pepeljnjak 2006). Zmiany mogą odbywać się w długim czasie (pory roku), ale również następować dynamicznie w ciągu jednej doby (Maron i wsp. 2006; Abdel Hameed i wsp. 2009). Dla prawie wszystkich grup bakterii (oprócz *Enterobacteriaceae*) stwierdzono również statystycznie istotne różnice liczebności ( $p < 0,05$ ) w poszczególnych porach roku (tab. 16).

Tabela 16. Wyniki jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA sprawdzającej wpływ pory roku na liczebność bakterii w powietrzu uzdrowiska Ciechocinek

Badana grupa drobnoustrojów	F	p	Grupy jednorodne w teście Tukeya (HSD)
Bakterie mezofilne	12,04	< 0,0001	[W, Z] [L, J]
Gronkowce mannitolododatnie	17,25	< 0,0001	[W, L, Z] [J]
Bakterie $\alpha$ -hemolizujące	9,58	< 0,0001	[W, J, Z] [L]
Bakterie $\beta$ -hemolizujące	3,56	0,0151	[L, J, Z] [W, L, J]
<i>Enterobacteriaceae</i>	2,35	0,0730	
Promieniowce	9,83	< 0,0001	[W, L, J] [Z]

W – wiosna, L – lato, J – jesień, Z – zima, F – stosunek wariancji międzygrupowej do wariancji wewnątrzgrupowej, p – poziom istotności

Wiele badań bioaerozoli na terenach miejskich potwierdza sezonową zmienność liczebności bakterii w powietrzu (Bugajny i wsp. 2005; Maron i wsp. 2006; Fang i wsp. 2007; Brodie i wsp. 2007; Kaarakainen

i wsp. 2008). Jednak niektórzy autorzy uważają, że sezonowe wahania liczebności na terenach typowo miejskich są słabsze niż w środowiskach bardziej naturalnych, takich jak parki miejskie czy lasy (Harrison i wsp. 2005; Lee i wsp. 2007).

Wśród bakterii wyizolowanych z próbek powietrza pobranych w Ciechocinku dominowały Gram-dodatnie laseczki – 70,6% wszystkich identyfikowanych szczepów. Należały one w zdecydowanej większości do rodzaju *Bacillus* (68,2% wszystkich szczepów). Liczne były też Gram-dodatnie ziarniaki (25,6%), reprezentowane głównie przez rodzaje *Staphylococcus* i *Micrococcus*. Gram-ujemne pałeczki stanowiły zaledwie 3,8% szczepów wyizolowanych z powietrza uzdrowiska Ciechocinek. Pałeczki reprezentowane były przede wszystkim przez rodzaje *Pseudomonas* i *Serratia* (tab. 17).

Bioaerozole w środowisku miejskim mogą zawierać nawet 1800 różnych gatunków bakterii, w tym liczne bakterie chorobotwórcze (Brodie i wsp. 2007; Fahlgren i wsp. 2010; Ravva i wsp. 2012). Bakterie wyizolowane w trakcie badań prowadzonych w Ciechocinku to mikroorganizmy powszechnie stwierdzone w powietrzu. Ich występowanie w bioaerozolu miejskim potwierdzają badania licznych autorów (Shaffer, Lighthart 1997; Filipiak i wsp. 2004; Harrison i wsp. 2005; Fang i wsp. 2007). Większość obecnych w powietrzu uzdrowiska bakterii to saprofity, jednak sporadycznie pojawiają się też gatunki potencjalnie patogenne, m.in. *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecium* czy *Aeromonas hydrophila*. Są to mikroorganizmy powszechnie występujące jako składniki biomu organizmu ludzkiego, ale ich obecność w powietrzu była stwierdzana także we wcześniejszych badaniach bioaerozoli miejskich (Fang i wsp. 2007; Ravva i wsp. 2012). Możliwość pojawiania się w bioaerozolach miejskich drobnoustrojów patogennych potwierdza potrzebę regularnego monitorowania mikrobiologicznej czystości powietrza, szczególnie w miastach o charakterze uzdrowiskowym.

Tabela 17. Identyfikacja bakterii mezofilnych występujących w powietrzu uzdrowiska Ciechocinek

Forma morfologiczna	Rodzaj	Udział w stosunku do wszystkich zidentyfikowanych szczepów bakteryjnych [%]	Dominujące gatunki (zgodnie z częstością występowania)
Laseczki (70,6%)	<i>Bacillus</i>	68,2	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus pumilus</i> <i>Bacillus mycoides</i> <i>Bacillus muralis</i> <i>Bacillus simplex</i> <i>Bacillus circulans</i>
	<i>Brevibacillus</i>	1,5	<i>Brevibacillus brevis</i> <i>Brevibacillus agri</i>
	inne	0,9	
Ziarniaki (25,6%)	<i>Staphylococcus</i>	9,4	<i>Staphylococcus lentus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus xylosum</i> <i>Staphylococcus aureus</i>
	<i>Micrococcus</i>	8,9	<i>Micrococcus luteus</i> <i>Micrococcus roseus</i>
	<i>Enterococcus</i>	3,6	<i>Enterococcus faecium</i>
	<i>Aerococcus</i>	2,0	<i>Aerococcus viridans</i>
	inne	1,7	
Pałeczki (3,8%)	<i>Pseudomonas</i>	1,8	<i>Pseudomonas luteola</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas xanthomarina</i>
	<i>Serratia</i>	1,2	<i>Serratia liquefaciens</i>
	<i>Aeromonas</i>	0,3	<i>Aeromonas hydrophila</i>
	<i>Stenotrophomonas</i>	0,3	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
	inne	0,2	

## 5.2. Analiza ilościowa i jakościowa grzybów pleśniowych w powietrzu uzdrowiska Ciechocinek

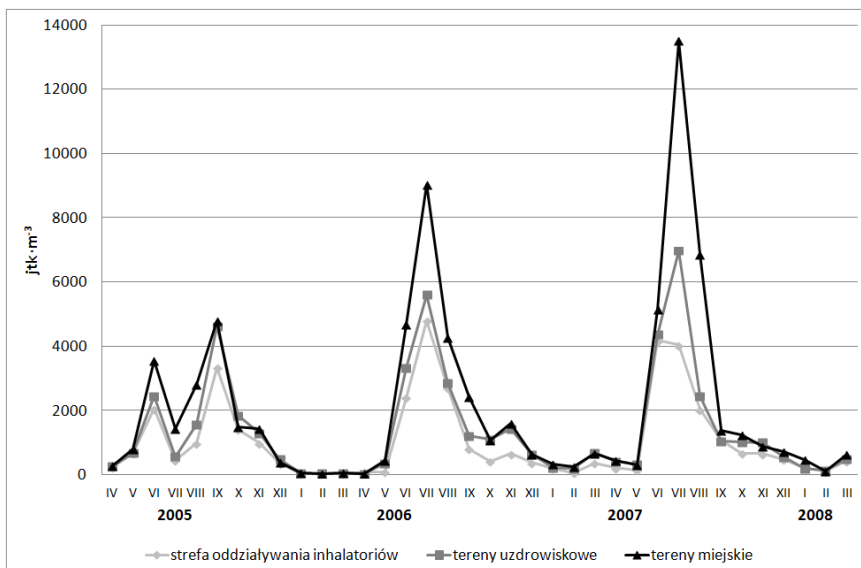
Grzyby pleśniowe są wszechobecne, występują we wszystkich środowiskach naturalnych i antropogennych na Ziemi. Zarodniki grzybów oraz fragmenty grzybnii osadzone na pyłach lub zawieszane w powie-

trzu stanowią istotny, a często nawet dominujący składnik bioaerozoli zanieczyszczających powietrze atmosferyczne (Womiloju i wsp. 2003; Filipiak i wsp. 2004; Elbert i wsp. 2007; Bauer i wsp. 2008; Crawford i wsp. 2009; Raisi i wsp. 2013). Jednocześnie grzyby pleśniowe są najbardziej zagrażającym zdrowiu człowieka składnikiem bioaerozolu (Knutsen i wsp. 2012; Żukiewicz-Sobczak i wsp. 2015; Crameri i wsp. 2014). Znaczenie epidemiologiczne ma zarówno liczebność, jak i skład gatunkowy tych drobnoustrojów.

W całym okresie badań, czyli w latach 2005–2008, najwyższe liczebności grzybów pleśniowych w powietrzu stwierdzano w miesiącach letnich, od czerwca do sierpnia (ryc. 13). Latem w roku 2006 i 2007 liczebność pleśni na całym obszarze uzdrowiska przekraczała  $2 \cdot 10^3$  jtk·m<sup>-3</sup>. W roku 2005 wysokie wartości liczebności grzybów (powyżej  $3 \cdot 10^3$  jtk·m<sup>-3</sup> we wszystkich rejonach uzdrowiska) utrzymywały się aż do września, natomiast obniżenie ich liczebności (do wartości poniżej  $1,5 \cdot 10^3$  jtk·m<sup>-3</sup>) nastąpiło w lipcu, z powodu wysokich temperatur i niskiej, w porównaniu do innych miesięcy, wilgotności względnej powietrza (51,1%). W lipcu 2007 roku na terenach miejskich liczebność grzybów osiągnęła najwyższą wartość w całym badanym okresie –  $13,5 \cdot 10^3$  jtk·m<sup>-3</sup>, co zgodnie z Polską Normą PN-89/Z-04111/03 jest klasyfikowane jako zanieczyszczenie zagrażające środowisku naturalnemu człowieka. Najmniej grzybów pleśniowych było obecnych w powietrzu uzdrowiska Ciechocinek w miesiącach zimowych – styczniu i lutym. Zimą liczebność grzybów pleśniowych w powietrzu na wszystkich stanowiskach badawczych mieściła się w granicach  $0-3 \cdot 10^2$  jtk·m<sup>-3</sup> (ryc. 13).

Uzyskane w powietrzu Ciechocinka liczebności grzybów pleśniowych są zbliżone lub niższe od notowanych w innych miastach Polski. W Krakowie na stanowisku oddalonym od głównych szlaków komunikacyjnych liczebność grzybów zimą również mieściła się w granicach do  $340$  jtk·m<sup>-3</sup> (Mędrała-Kuder 2004), ale latem wzrosła tylko do  $2,8 \cdot 10^3$  jtk·m<sup>-3</sup>. Pastuszka i wsp. (2000) odnotowali w powietrzu zewnętrznym na Śląsku liczebności grzybów do  $4 \cdot 10^3$  jtk·m<sup>-3</sup> latem i do  $1 \cdot 10^3$  jtk·m<sup>-3</sup> zimą. Natomiast wyniki badań przeprowadzonych przez Bugajnego i wsp. (2005) wskazują na silniejsze zanieczyszczenie powietrza miejskiego bioaerozolem grzybowym. Najwyższe liczebności grzy-

bów pleśniowych stwierdzone w Poznaniu przez powyższych autorów osiągały wartości około  $16 \cdot 10^3$  jtk·m<sup>-3</sup>, czyli były wyższe niż maksymalne wartości uzyskane w Ciechocinku.



Ryc. 13. Liczebność grzybów pleśniowych w powietrzu uzdrowiska Ciechocinek – dane uśrednione dla poszczególnych rejonów uzdrowiska. Dane z okresu maj 2005–kwiecień 2006 opublikowano w pracy Burkowska i Donderski (2008a)

Jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA wykazała, że liczebności grzybów pleśniowych różniły się istotnie w poszczególnych porach roku ( $p > 0,0001$ ), a test post-hoc (Tukeya HSD) wykazał brak istotnych różnic dla liczebności grzybów pleśniowych w zimie i wiosną (tab. 18).

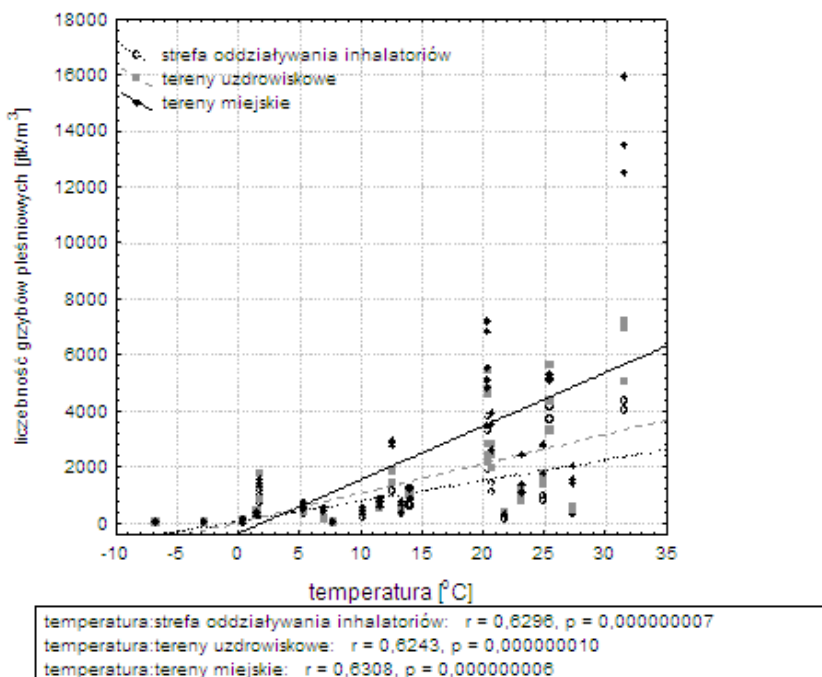
Jak podają liczni autorzy (Mędreła-Kuder 2000; Kasprzyk, Worek 2006; Filipiak i wsp. 2004; Bugajny i wsp. 2005; Stepalska, Wołek 2005), pleśnie pojawiają się w powietrzu wczesną wiosną, ale szczytowe stężenia osiągają późnym latem i wczesną jesienią. Również w Ciechocinku na przełomie lata i jesieni notowano znacznie wyższe liczebności grzybów pleśniowych niż w okresach wiosny i zimy.

Tabela 18. Wyniki jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA dla liczebności grzybów pleśniowych w powietrzu uzdrowiska Ciechocinek

Badany czynnik	F	P	Grupy jednorodne w teście Tukeya (HSD)
Rejon uzdrowiska	2,48	0,084	
Pora roku	31,04	< 0,0001	[W, Z] [L] [J]

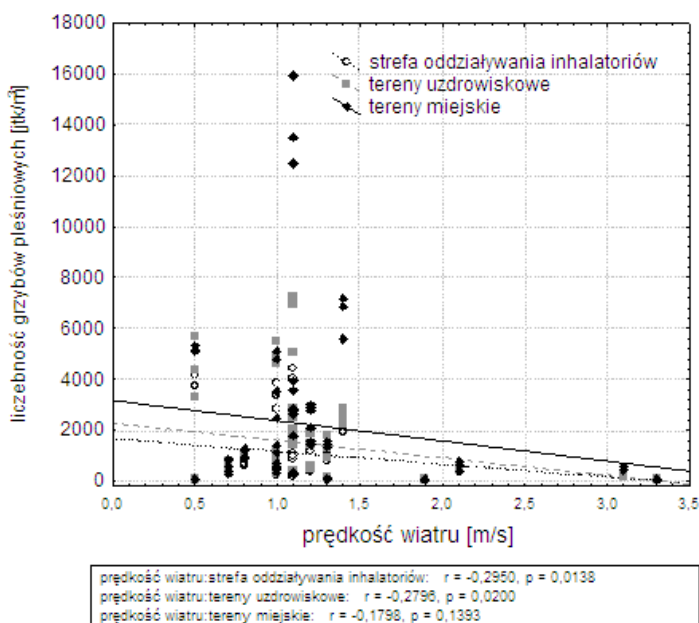
W – wiosna, L – lato, J – jesień, Z – zima, F – stosunek wariancji międzygrupowej do wariancji wewnątrzgrupowej, p – poziom istotności

Na liczebność grzybów w powietrzu atmosferycznym może wpływać wiele czynników, m.in. warunki pogodowe, w tym ilość opadów, temperatura, ruch i wilgotność powietrza (Lacey 1994). Liczebność grzybów pleśniowych w powietrzu Ciechocinka była istotnie statystycznie skorelowana z temperaturą powietrza i we wszystkich strefach uzdrowiska współczynnik korelacji  $r$  wynosił 0,6 przy współczynnikach istotności  $p < 0,0001$  (ryc. 14). Na terenach uzdrowiskowych oraz w otocze-



Ryc. 14. Korelacja pomiędzy liczebnością grzybów pleśniowych a temperaturą powietrza

niu inhalatoriów stwierdzono również istotną statystycznie ( $p < 0,05$ ) ujemną korelację liczebności grzybów pleśniowych z prędkością wiatru ( $r$  odpowiednio  $-0,27$  i  $-0,29$ ) (ryc. 15). Mędręła-Kuder (2004) na terenie Krakowa stwierdziła, że latem, kiedy następuje maksimum występowania spor w powietrzu, zwiększoną liczebność grzybów obserwuje się przede wszystkim w okresach o złej wentylacji, czyli przy prędkości wiatru poniżej  $1 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ . W Ciechocinku najwyższe liczebności pleśni w powietrzu stwierdzano przy prędkościach wiatru równej  $1,2 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ . Nie odnotowano natomiast statystycznie istotnej korelacji pomiędzy wilgotnością względną powietrza a ilością aerozolu grzybowego.



Ryc. 15. Korelacja pomiędzy liczebnością grzybów pleśniowych a prędkością wiatru

Na terenach typowo miejskich przez cały okres badań notowano zwykle najwyższe liczebności grzybów pleśniowych, natomiast w strefie oddziaływania inhalatoriów grzybów w powietrzu było na ogół najmniej (ryc. 13). Jednak, jak wynika z jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA (tab. 18), różnice te nie były istotne statystycznie ( $p > 0,05$ ).

Również Filipiak i wsp. (2004) obserwowali wyższe liczebności grzybów pleśniowych w powietrzu na stanowiskach w centrum miasta ( $1,5-16 \cdot 10^3$  jtk·m<sup>-3</sup>), niższe zaś na stanowisku oddalonym od centrum ( $8 \cdot 10^2-8,6 \cdot 10^3$  jtk·m<sup>-3</sup>). Mędręła-Kuder (2000) na stanowiskach w pobliżu ruchliwych ulic notowała ponaddwukrotnie wyższe liczebności pleśni niż na terenach oddzielonych pasem zieleni od ciągów komunikacyjnych. Obserwacjom tym przeczą jednak wyniki uzyskane przez Kasprzyk i Worek (2006). Stwierdzili oni wyższe liczebności zarodników grzybów pleśniowych w środowisku wiejskim niż na stanowiskach zlokalizowanych w mieście (Rzeszów). Dodatkowo w strefie oddziaływania inhalatorów, w Ciechocinku, istotnym czynnikiem wpływającym na liczebność grzybów jest solankowy aerozol, który sedymentując, oczyszcza powietrze z zanieczyszczeń (Burkacka-Łaukajtys, Zwolska 1973).

Tabela 19. Stopień zanieczyszczenia powietrza grzybami pleśniowymi w uzdrowisku Ciechocinek w latach 2005–2008 zgodnie z Polską Normą PN-89/Z-04111/03

Zakres wartości [jtk·m <sup>-3</sup> ]	Stopień zanieczyszczenia powietrza	Otoczenie inhalatoriów	Tereny uzdrowiskowe	Tereny miejskie
< 3·10 <sup>3</sup>	czyste	94,5*	81,1*	80,5*
3–5·10 <sup>3</sup>	przeciętnie czyste	5,5	6,3	12,8
5–10·10 <sup>3</sup>	negatywnie oddziałujące na środowisko naturalne	0	12,6	6,7
>10·10 <sup>3</sup>	zagrożające środowisku naturalnemu	0	0	0

\* – % udział próbek w danej kategorii

Dla zdrowych osób wdychanie zarodników grzybów pleśniowych nie powinno stanowić zagrożenia. Jednak ze względu na niewielkie rozmiary, zawierające się w granicach 2–100 µm, a najczęściej wynoszące poniżej 10 µm, zarodniki grzybów pleśniowych mogą penetrować głęboko drogi oddechowe i docierać nawet w obręb pęcherzyków płucnych (Żukiewicz-Sobczak i wsp. 2015). Zarodniki grzybów pleśniowych uznawane są za jedne z głównych, obok pyłków roślinnych, alergenów oddechowych.

Zgodnie z normą PN-89/Z-04111/03 zdecydowaną większość próbek powietrza pobranych w Ciechocinku można zaklasyfikować jako niezanieczyszczone grzybami pleśniowymi (tab. 19). W strefie oddziaływania inhalatoriów notowano tylko próbki niezanieczyszczone i przeciętnie czyste. Na terenach uzdrowiskowych 12,6% stanowiły próbki negatywnie oddziałujące na środowisko naturalne ze względu na liczebność grzybów pleśniowych. Tylko na terenach typowo miejskich w 0,5% pobranych próbek odnotowano liczebności grzybów przekraczające  $10^4$  jtk·m<sup>-3</sup>, czyli zanieczyszczenie zagrażające środowisku naturalnemu. Małecka-Adamowicz i wsp. (2010) na terenach parkowo-rekreacyjnych w Bydgoszczy stwierdzili zdecydowanie silniejsze zanieczyszczenie powietrza. Wszystkie pobrane próbki zaklasyfikowali jako średnio lub silnie zanieczyszczone.

W Propozycjach Zespołu Ekspertów ds. Czynników Biologicznych dotyczących stopnia zanieczyszczenia mikrobiologicznego powietrza atmosferycznego za nieakceptowalne uznaje się stężenie grzybów w powietrzu  $\geq 5 \cdot 10^3$  jtk·m<sup>-3</sup> (Augustyńska i Pośniak 2014). W całym okresie badawczym w otoczeniu otwartych inhalatoriów w Ciechocinku poziom mikrobiologicznego zanieczyszczenia powietrza zewnętrznego można uznać za akceptowalny. Natomiast na terenach miejskich (6,7% pobranych próbek powietrza) i uzdrowiskowych (12,6%) stwierdzano przekroczenia dopuszczalnego stężenia bioaerozolu grzybowego.

Dla zdrowia ludzi istotna jest nie tylko liczebność grzybów pleśniowych w powietrzu, ale przede wszystkim ich skład rodzajowy i gatunkowy. W powietrzu uzdrowiska Ciechocinek dominujące były grzyby należące do rodzajów *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium* i *Penicilium* (tab. 20). Dane z wcześniej publikowanych badań potwierdzają dużą różnorodność gatunkową grzybów pleśniowych w powietrzu w Ciechocinku, szczególnie latem i jesienią (Burkowska, Donderski 2008a).

Tabela 20. Skład gatunkowy grzybów pleśniowych wyizolowanych z próbek powietrza uzdrowiska Ciechocinek (w tabeli przedstawiono tylko rodzaje mające udział &gt;1% w ogóle wyizolowanych grzybów pleśniowych)

Rodzaj	Udział procentowy [%]	Dominujące gatunki (zgodnie z częstością występowania)
<i>Cladosporium</i>	57,9	<i>Cladosporium cladosporioides</i> <i>Cladosporium herbarum</i>
<i>Alternaria</i>	11,1	<b><i>Alternaria alternata</i></b> <i>Alternaria humicola</i>
<i>Aspergillus</i>	7,9	<b><i>Aspergillus versicolor</i></b> <b><i>Aspergillus flavus</i></b> <b><i>Aspergillus niger</i></b> <b><i>Aspergillus clavatus</i></b> <b><i>Aspergillus fumigatus</i></b> <i>Aspergillus penicillioides</i>
<i>Penicillium</i>	7,1	<b><i>Penicillium chrysogenum</i></b> <b><i>Penicillium citrinum</i></b> <b><i>Penicillium expansum</i></b> <b><i>Penicillium notatum</i></b> <i>Penicillium rubrum</i> <b><i>Penicillium citreonigrum</i></b>
<i>Fusarium</i>	6,3	<b><i>Fusarium nivale</i></b> <b><i>Fusarium oxysporum</i></b>
<i>Mucor</i>	4,2	<i>Mucor mucedo</i> <b><i>Mucor racemosus</i></b>
<i>Botrytis</i>	1,1	<i>Botrytis cinerea</i>

**bold** – gatunki potencjalnie toksynotwórcze

W badanym okresie w powietrzu uzdrowiska Ciechocinek dominowały grzyby z rodzaju *Cladosporium*. Wiele badań wskazuje, że jest to rodzaj dominujący w mikroflorze powietrza zewnętrznego i może stanowić nawet 50–90% wszystkich grzybów pleśniowych (Mędręła-Kuder 2003; Miklaszewska, Grajewski 2005; Kasprzyk, Worek 2006). Również badania prowadzone w innych krajach europejskich potwierdzają powyższe obserwacje (Nikkels i wsp. 1996; Pyrri, Kapsanaki-Gotsi 2007). Drugą pod względem liczebności grupą były grzyby z rodzaju *Alternaria*, licznie występowały też w powietrzu uzdrowiska grzyby rodzajów *Aspergillus* oraz *Penicilium*. Wszystkie te rodzaje są powszechnymi składnikami bioarozolu grzybowego (Durand i wsp. 2002). Jednocześnie są one najważniejszymi alergenami pleśniowymi. Po wnikięciu do organizmu zarodniki pleśni mogą powodować sze-

reg reakcji organizmu – od kataru alergicznego, po astmę oskrzelową czy nawet choroby infekcyjne, szczególnie u osób z poważnie osłabionym układem odpornościowym (Knutsen i wsp. 2012; Żukiewicz-Sobczak i wsp. 2015; Crameri i wsp. 2014). Jak podają D'Amato i Spieksma (1995), obecność zarodników gatunku *Cladosporium herbarum* w ilości  $3 \cdot 10^3$  w  $m^3$  powietrza można uznać za przyczynę wystąpienia objawów choroby u osób uczulonych na ten grzyb. W uzdrowisku Ciechocinek liczebność wszystkich pleśni w zdecydowanej większości próbek powietrza (80,5–94,5% w zależności od rejonu uzdrowiska – tab. 19) nie przekraczała wartości  $3 \cdot 10^3$  jtk·m<sup>-3</sup>. Można więc wnioskować, że liczebności pleśni z rodzaju *Cladosporium* (57,9% ogółu pleśni) były niższe niż wartość progowa wystąpienia objawów alergii.

Niektóre gatunki grzybów pleśniowych są zdolne do wytwarzania mikotoksyn, mogących mieć wysoce szkodliwy wpływ na organizmy żywe. W powietrzu uzdrowiska stwierdzono obecność grzybów potencjalnie toksynotwórczych, m.in. *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger* i *Aspergillus flavus*. Grzyby toksynotwórcze z rodzajów *Alternaria* i *Aspergillus* notowali w powietrzu również inni autorzy (Bis i wsp. 2004; Frączek 2004; Grzyb i wsp. 2004).

Obecny w powietrzu uzdrowiska *Aspergillus versicolor* może wytwarzać duże ilości (do 1% biomasy) sterigmatocystyny, która ma działanie hepatotoksyczne i jest silnym inhibitorem ruchu rzęsek tchawicy (Nielsen 2003). Zdaniem Grajewskiego i Twarużek (2004) część wtórnych metabolitów jest kumulowana także w zarodnikach pleśni. W literaturze opisano przypadki zatrucia inhalacyjnego mikotoksynami zawartymi w zarodnikach grzybów pleśniowych, m.in. *Stachybotrys chartarum*, *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Trichoderma sp.* oraz *Paecilomyces sp.* (Mücke, Lemmen 1999; Grajewski, Twarużek 2004).

Jednak stwierdzenie w powietrzu uzdrowiska obecności gatunków grzybów potencjalnie toksynotwórczych nie świadczy jeszcze bezwzględnie o zagrożeniu zdrowotnym. Zdolność do wytwarzania toksyn jest bowiem cechą specyficzną niektórych szczepów w ramach gatunku, a nie cechą ściśle specyficzną gatunkowo (Miklaszewska, Grajewski 2005).

### 5.3. Analiza porównawcza liczebności bakterii i grzybów pleśniowych występujących w powietrzu uzdrowisk Ciechocinek i Inowrocław

Na stężenie bioaerozoli znaczący wpływ ma uprzemysłowienie i gęstość zaludnienia badanego terenu. Liczebność mikroorganizmów w powietrzu kształtuje także pyłowe i chemiczne zanieczyszczenie powietrza, będące konsekwencją wymienionych wcześniej czynników (Lin, Li 2000; Fang i wsp. 2007).

Na terenie województwa kujawsko-pomorskiego zlokalizowane są dwa popularne uzdrowiska nizinne – Ciechocinek i Inowrocław. Profil leczniczy tych uzdrowisk jest podobny, ponieważ ich najcenniejszym bogactwem naturalnym są solanki stosowane do kąpeli i innych zabiegów balneoterapeutycznych. Zarówno w Ciechocinku, jak i w Inowrocławiu wybudowano również łąźnie, które umożliwiają korzystanie z inhalacji aerozolem solankowym nie tylko kuracuszom, ale także turystom i mieszkańcom miasta. Mimo tych podobieństw Ciechocinek i Inowrocław znacząco się różnią, szczególnie wielkością i zagospodarowaniem terenów, na których wydzielono uzdrowiska. W Ciechocinku charakter uzdrowiskowo-turystyczny ma całe niewielkie miasteczko, zamieszkałe przez 10 tys. mieszkańców. Natomiast w Inowrocławiu uzdrowisko zostało wydzielone w mieście zamieszkałym przez prawie 75 tys. osób, które jest nie tylko uzdrowiskiem, ale i znaczącym ośrodkiem przemysłowym. W związku z tym w niniejszej pracy podjęto próbę oceny, czy sposób zagospodarowania otoczenia uzdrowiska wpływa na mikrobiologiczną czystość powietrza, również w strefie oddziaływania otwartych inhalatoriów.

W tabeli 21 zestawiono średnie liczebności bakterii mezofilnych i grzybów pleśniowych w próbkach powietrza pobranych w latach 2009–2011 w uzdrowiskach Ciechocinek i Inowrocław. W badanym okresie stężenia bioaerozolu bakteryjnego i grzybowego (porównując odpowiednie rejony uzdrowisk) były wyższe w Inowrocławiu niż w Ciechocinku. Najwyższe stężenia bioaerozolu bakteryjnego notowano na stanowiskach zlokalizowanych na terenach miejskich uzdrowisk, zarówno w Ciechocinku ( $233 \text{ jtk}\cdot\text{m}^{-3}$ ), jak i w Inowrocławiu ( $526 \text{ jtk}\cdot\text{m}^{-3}$ ). Również stężenie bioaerozolu grzybowego było najwyższe na stano-

wiskach zlokalizowanych na terenach miejskich (Ciechocinek – 1076 jtk·m<sup>-3</sup>, Inowrocław – 1509 jtk·m<sup>-3</sup>). Z kolei najniższe w danym uzdrowisku średnie liczebności bakterii (Ciechocinek – 115 jtk·m<sup>-3</sup>, Inowrocław – 187 jtk·m<sup>-3</sup>) i grzybów (Ciechocinek – 715 jtk·m<sup>-3</sup>, Inowrocław – 1272 jtk·m<sup>-3</sup>) stwierdzano w powietrzu w otoczeniu otwartych inhalatoriów (tab. 19).

Ocena stopnia zanieczyszczenia powietrza zgodnie z PN-89/Z-04111/02 wykazała, że pod względem obecności w powietrzu bakterii mezofilnych wszystkie próbki powietrza pobrane w latach 2009–2011 w Ciechocinku, we wszystkich rejonach miasta, można zakwalifikować jako niezanieczyszczone. W Inowrocławiu na terenach uzdrowiskowych i w otoczeniu inhalatoriów powietrze można zakwalifikować również jako niezanieczyszczone bakteriami mezofilnymi. Natomiast na terenach miejskich w Inowrocławiu 15% próbek powietrza sklasyfikowano jako średniozanieczyszczone (tab. 22).

Tabela 21. Liczebność mikroorganizmów [jtk·m<sup>-3</sup>] w powietrzu uzdrowisk Ciechocinek i Inowrocław w 2009–2011

		Bakterie mezofilne			Grzyby pleśniowe		
		średnia	zakres	SD	średnia	zakres	SD
Ciechocinek	strefa oddziaływania inhalatoriów	115	23–351	32	715	20–1929	598
	tereny uzdrowiskowe	181	26–469	69	921	30–2800	679
	tereny miejskie	233	69–491	121	1076	10–2950	574
Inowrocław	strefa oddziaływania inhalatoriów	187	26–420	56	1272	112–3860	974
	tereny uzdrowiskowe	216	35–580	97	1346	94–4350	992
	tereny miejskie	526	26–1320	194	1509	120–5126	1127

SD – odchylenie standardowe

Tabela 22. Stopień zanieczyszczenia powietrza w uzdrowiskach Ciechocinek i Inowrocław w latach 2009–2011 zgodnie z Polskimi Normami PN-89/Z-04111/02 i PN-89/Z-04111/03

Grupa mikroorganizmów	Zakres wartości (jtk·m <sup>-3</sup> )	Stopień zanieczyszczenia powietrza	Otoczenie inhalatoriów	Tereny uzdrowiskowe	Tereny miejskie
Ciechocinek					
Bakterie mezofilne	< 1·10 <sup>3</sup>	niezanieczyszczone	100*	100*	100*
	1–3·10 <sup>3</sup>	średnio	0	0	0
	> 3·10 <sup>3</sup>	silnie	0	0	0
Grzyby pleśniowe	< 3·10 <sup>3</sup>	czyste	100	100	100
	3–5·10 <sup>3</sup>	przeciętnie czyste	0	0	0
	5–10·10 <sup>3</sup>	negatywnie oddziałujące na środowisko naturalne	0	0	0
	> 10·10 <sup>3</sup>	zagrożające środowisku naturalnemu	0	0	0
	Inowrocław				
Bakterie mezofilne	< 1·10 <sup>3</sup>	niezanieczyszczone	100	100	85
	1–3·10 <sup>3</sup>	średnio	0	0	15
	> 3·10 <sup>3</sup>	silnie	0	0	0
	< 3·10 <sup>3</sup>	czyste	90	75	70
Grzyby pleśniowe	3–5·10 <sup>3</sup>	przeciętnie czyste	10	25	25
	5–10·10 <sup>3</sup>	negatywnie oddziałujące na środowisko naturalne	0	0	5
	> 10·10 <sup>3</sup>	zagrożające środowisku naturalnemu	0	0	0

\* – % udział próbek w danej kategorii

Według PN-89/Z-04111/03 wszystkie próby powietrza pobrane na stanowiskach zlokalizowanych w Ciechocinku można zaklasyfikować jako niezanieczyszczone grzybami pleśniowymi. Natomiast w Inowrocławiu we wszystkich strefach stwierdzono obecność próbek powietrza przeciętnie czystych (10–25%), a w strefie miejskiej 5% stanowiły

próbki, w których liczebność grzybów pleśniowych mogła negatywnie oddziaływać na środowisko naturalne.

Zgodnie z Propozycjami Zespołu Ekspertów ds. Czynników Biologicznych dotyczącymi stopnia zanieczyszczenia mikrobiologicznego powietrza atmosferycznego (Augustyńska i Pośniak 2014) poziom mikrobiologicznego zanieczyszczenia powietrza bakteriami w Ciechocinku i Inowrocławiu w latach 2009–2011 można uznać za akceptowalny. Natomiast stężenie bioaerozolu grzybowego w 5% próbek pobranych na terenach miejskich w Inowrocławiu przekroczyło dopuszczalną wartość ( $\leq 5 \cdot 10^3$  jtk·m<sup>-3</sup>).

Najistotniejszy jest fakt, że w żadnej badanej próbce powietrza nie stwierdzono liczebności grzybów pleśniowych przekraczającej wartość 10<sup>4</sup> jtk·m<sup>-3</sup>, co zgodnie z normą PN-89/Z-04111/03 świadczyłoby o zanieczyszczeniu zagrażającym środowisku naturalnemu człowieka.

Wyniki testu t-Studenta dla prób zależnych wskazują, że liczebności bakterii mezofilnych w powietrzu uzdrowisk Ciechocinek i Inowrocław różnią się statystycznie istotnie ( $p < 0,05$ ). Również różnice liczebności bakterii mezofilnych pomiędzy poszczególnymi rejonami uzdrowisk (tab. 23) są istotne statystycznie zarówno w Ciechocinku ( $p < 0,01$ ), jak i w Inowrocławiu ( $p < 0,05$ ). Natomiast zgodnie z wynikami testu t-Studenta dla prób zależnych liczebności grzybów pleśniowych w powietrzu Ciechocinka i Inowrocławia nie różniły się istotnie ( $p > 0,05$ ). Różnice liczebności grzybów pleśniowych pomiędzy poszczególnymi rejonami miast nie są istotne statystycznie w obu uzdrowiskach ( $p > 0,05$ ).

Tabela 23. Wyniki jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) dla liczebności drobnoustrojów w powietrzu w poszczególnych rejonach uzdrowisk Ciechocinek i Inowrocław (latach 2009–2011)

Grupa mikroorganizmów	Uzdrowisko	F	p	Grupy jednorodne w teście Tukeya (HSD)
Bakterie mezofilne	Ciechocinek	6,16	0,0043	[I, U] [U, M]
	Inowrocław	5,30	0,0136	[I, U] [U, M]
Grzyby pleśniowe	Ciechocinek	0,25	0,7804	
	Inowrocław	0,18	0,8287	

I – strefa oddziaływania inhalatoriów, U – tereny uzdrowiskowe, M – tereny miejskie, F – stosunek wariancji międzygrupowej do wariancji wewnątrzgrupowej, p – poziom istotności

Porównanie liczebności bakterii mezofilnych w kujawskich uzdrowiskach potwierdza więc obserwacje innych autorów, że na terenach typowo miejskich (uprzemysłowionych, gęsto zaludnionych i z intensywną komunikacją samochodową) mikrobiologiczne zanieczyszczenia powietrza osiągają wyższe wartości (Fang i wsp. 2007; Fahlgren i wsp. 2010; Cao i wsp. 2014). Natomiast liczebność grzybów pleśniowych w powietrzu bardziej zależy od czynników mikroklimatycznych niż od sposobu zagospodarowania terenu, co wynika także z opisanej wcześniej analizy liczebności grzybów pleśniowych w Ciechocinku w latach 2005–2008.

Najistotniejsze jest, że ze względu na specyficzny mikroklimat oraz niewielkie mikrobiologiczne zanieczyszczenie powietrza w otoczeniu inhalatoriów, a także na terenach rekreacyjnych, zarówno Ciechocinek, jak i Inowrocław mogą doskonale pełnić funkcję uzdrowisk, w których leczone są choroby górnych dróg oddechowych. Przedstawione dane potwierdzają także wpływ tężni i aerozolu solankowego na eliminację bakterii mezofilnych z powietrza. W otoczeniu tężni stwierdzano mniejsze liczebności tych drobnoustrojów niż na terenach miejskich opisywanych uzdrowisk. Liczebności bakterii w otoczeniu inhalatoriów były niższe także w porównaniu z powietrzem na terenach rekreacyjnych. Zatem budowanie otwartych inhalatoriów jest dobrą metodą na poprawę mikrobiologicznej jakości powietrza w uzdrowiskach.

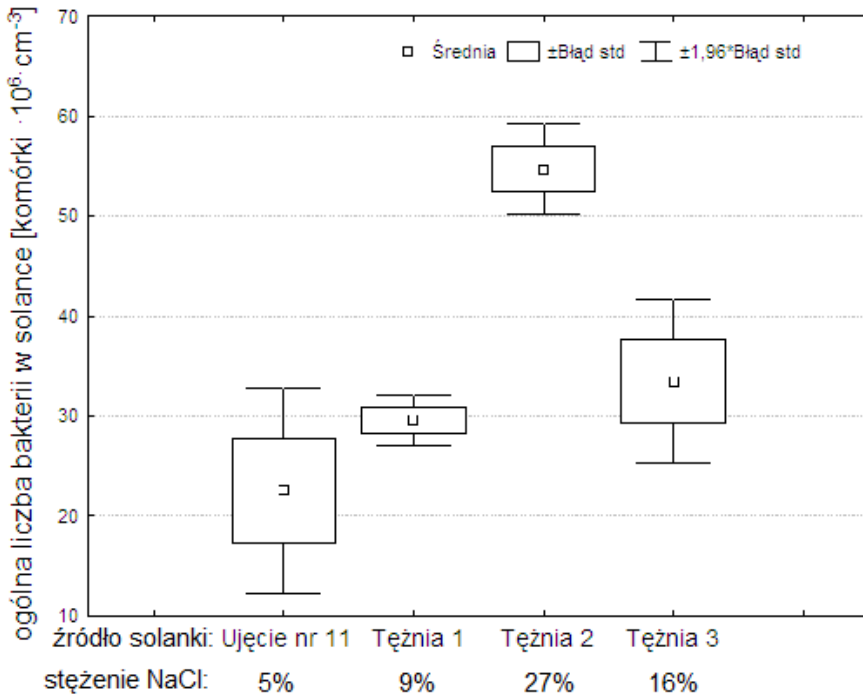
Ustawa z dnia 28 lipca 2005 r. o lecznictwie uzdrowiskowym (Dz.U. 2005, Nr 167, poz. 1399) z późniejszymi zmianami (Dz.U. 2011, Nr 73, poz. 390) zakłada, że część opisowa operatu uzdrowiskowego powinna uwzględniać m.in. informacje o stanie czystości powietrza. Mimo to dane na temat jakości powietrza w uzdrowiskach polskich są nieliczne i dotyczą zwykle tylko zanieczyszczeń pyłowych oraz chemicznych. Drobnoustrojom w powietrzu, nawet w uzdrowiskach, w których leczy się choroby układu oddechowego, poświęca się zaskakująco mało uwagi. Niniejsza praca jest pierwszą próbą długoterminowej oceny mikrobiologicznych zanieczyszczeń powietrza w uzdrowisku nizinnym. Możliwości porównania uzyskanych wyników z danymi dotyczącymi powietrza atmosferycznego w innych uzdrowiskach są ograniczone. Opublikowane dotychczas badania dotyczyły przed wszystkim zanie-

czyszczeń powietrza w komorach kopalnianych wykorzystywanych w subterraneoterapii (Bis i wsp. 2004; Grzyb i wsp. 2008; Frączek i wsp. 2013) oraz w zamkniętych pomieszczeniach sanatoryjnych (Frączek i wsp. 2008; Frączek, Grzyb 2010; Frączek, Górny 2011).

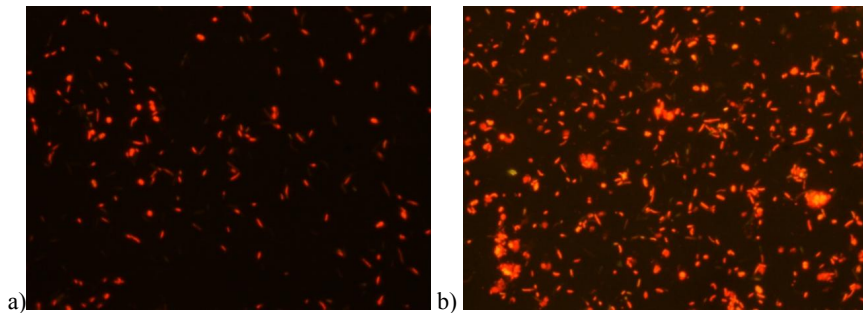
#### 5.4. Analiza solanek tęźniowych z Ciechocinka

Próby oceny zarówno liczebności, jak i bioróżnorodności mikroorganizmów zasiedlających solanki były podejmowane już wcześniej. Badania takie dotyczyły zasolonych wód podziemnych (Itävaara i wsp. 2011; Morozova i wsp. 2010; Walczak, Krawiec 2014), a także wysoko zasolonych wód powierzchniowych (Oren i wsp. 2009; Pappa i wsp. 2010; Casamayor i wsp. 2013) i prowadzone były zarówno klasycznymi metodami hodowlanymi (Haveman, Pedersen 2002), jak i metodami niezależnymi od hodowli (Fang i wsp. 2006; Casamayor i wsp. 2013; Wu i wsp. 2015). Jednak ze względu na unikalność zastosowania tęźni w skali światowej – zarówno do celów technologicznych (zateżnianie solanki), jak i celów uzdrowiskowych (otwarte inhalatoria) – środowiska solanek tęźniowych dotychczas nie opisano pod względem mikrobiologicznym. Przedstawione poniżej wyniki badań są pierwszą próbą scharakteryzowania bioróżnorodności mikroorganizmów zasiedlających solanki tęźniowe i opisanie zmian bioróżnorodności podczas przepływania solanki przez kolejne tęźnie.

Ogólna liczba bakterii oznaczona metodą bezpośredniego liczenia na filtrach była najniższa w solance pochodzącej z Ujęcia nr 11 i wynosiła  $22,5 \cdot 10^6$  komórek·cm<sup>-3</sup> (ryc. 16 i 17). Z danych opublikowanych przez Itävaarę i wsp. (2011) oraz Walczaka i Krawca (2014) wynika, że ogólna liczba bakterii w solankach podziemnych zwykle nie przekracza wartości  $10^5$  komórek·cm<sup>-3</sup>. W solankach pochodzących z kolejnych etapów zateżniania ogólna liczba bakterii była jeszcze wyższa, a jej maksymalna wartość (w solance z Tęźni 2) wynosiła  $54,8 \cdot 10^6$  komórek·cm<sup>-3</sup> (ryc. 16 i 17). Analiza wariancji (ANOVA) wykazała, że pochodzenie solanki z określonej tęźni było czynnikiem istotnie wpływającym na ogólną liczbę bakterii. Była też ona istotnie skorelowana ze stężeniem soli ( $r = 0,87$ ,



Ryc. 16. Ogólna liczba bakterii w solankach tężniowych Ciechocinka



Ryc. 17. Bakterie z solanek z Ujęcia 11 (a) i Tężni 2 (b) wybarwione oranżem akrydynowym (mikroskop epifluorescencyjny Nikon H550S, powiększenie 1000×)

$p < 0,05$ ). Ze względu na unikalność solanek tężniowych i brak wcześniejszych badań nad mikroorganizmami tego środowiska nie ma możliwości porównania uzyskanych danych z wynikami innych badaczy.

W zbiornikach służących do zatężania wody morskiej w celu pozyskania soli, czyli w środowisku o podobnej funkcji technologicznej, ale jednak o zupełnie innym pochodzeniu, notuje się zwykle zbliżoną lub wyższą ogólną liczbę bakterii w zakresie  $10^6$ – $10^8$  komórek·cm<sup>-3</sup> (Ochsenreiter i wsp. 2002; Burns i wsp. 2004; Maturrano i wsp. 2006).

Wyniki podstawowych analiz chemicznych solanek tęźniowych przedstawiono w tabeli 24. Najwyższe stężenie węgla całkowitego ( $141 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) oraz węgla nieorganicznego ( $61,7 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) stwierdzono w solance pochodzącej z Ujęcia 11. Najwięcej węgla organicznego ( $90,36 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) zawierała solanka pobrana z Tężni 2. Solanka pochodząca ze zbiornika Tężni 1 zawierała najwyższe stężenia azotu całkowitego ( $10,6 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ ), a także azotu amonowego ( $0,039 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ ).

Nie stwierdzono statystycznie istotnych korelacji ( $p > 0,05$ ) pomiędzy stężeniem poszczególnych form węgla i azotu a stopniem zatężenia solanki. Ogólna liczba bakterii także nie była statystycznie istotnie skorelowana ze stężeniem węgla i azotu ( $p > 0,05$ ).

Tabela 24. Wyniki analizy chemicznej solanek tęźniowych z Ciechocinka

Pochodzenie solanki	Zawartość węgla			Zawartość azotu	
	TC [mg·dm <sup>-3</sup> ]	TOC [mg·dm <sup>-3</sup> ]	TIC [mg·dm <sup>-3</sup> ]	N <sub>tot</sub> [mg·dm <sup>-3</sup> ]	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> [mg·dm <sup>-3</sup> ]
Ujęcie nr 11 (5% NaCl)*	141,0 ±2,87	68,29	61,70 ±1,56	7,7 ±0,02	0,035 ±0,002
Tężnia 1 (9% NaCl)	88,23 ±1,11	48,24	39,99 ±0,74	10,6 ±0,02	0,039 ±0,001
Tężnia 2 (27% NaCl)	116,9 ±1,89	90,36	26,52 ±0,9	9,5 ±0,02	0,04 ±0,004
Tężnia 3 (16% NaCl)	91,25 ±2,13	61,70	29,55 ±0,89	8,8 ±0,01	0,037 ±0,002

\* – dane z laboratorium Zakładu Produkcji Zdrojowej w Ciechocinku, TC – węgiel całkowity, TOC – całkowity węgiel organiczny, TIC – całkowity węgiel nieorganiczny, N<sub>tot</sub> – azot całkowity, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> – azot amonowy.

### 5.5. Ocena bioróżnorodności mikroorganizmów w solankach tęźniowych Ciechocinka

Badania bioróżnorodności mikroorganizmów w solankach tęźniowych wykonano z wykorzystaniem sekwencjonowania nowej generacji (NGS), która nie wymaga wcześniejszego klonowania fragmentów DNA w wektorach. NGS jest obecnie często wykorzystywana do anali-

zy bioróżnorodności metagenomów różnych środowisk (Kozdrój 2013; Gandolfi i wsp. 2013; Pompanon, Samadi 2015). W próbkach solanek tężniowych z Ciechocinka po odfiltrowaniu sekwencji chimerycznych i klastrowaniu odczytów przy 97% poziomie identyczności otrzymano łącznie 30 112 sekwencji, z których wyodrębniono 318 bakteryjnych operacyjnych jednostek taksonomicznych (OTUs). Największą liczbę sekwencji (łącznie bakteryjnych i archeonowych) stwierdzono w solance pochodzącej z Tężni 3 (tab. 25).

Tabela 25. Wyniki sekwencjonowania nowej generacji (NGS) próbek solanek tężniowych z Ciechocinka

	Ogółem	Ujęcie nr 11	Tężnia 1	Tężnia 2	Tężnia 3
Liczba sekwencji po analizie bioinformatycznej	30 112	6 096	6 394	7 447	10 085
Sekwencje archeonów	9 476	0	989	3 448	5 039
Sekwencje bakterii	20 636	6 096	5 405	3 999	5 046
Liczba bakteryjnych OTUs (97% identyczności)	318	62	105	122	181

OTUs – operacyjne jednostki taksonomiczne (*operational taxonomic units*)

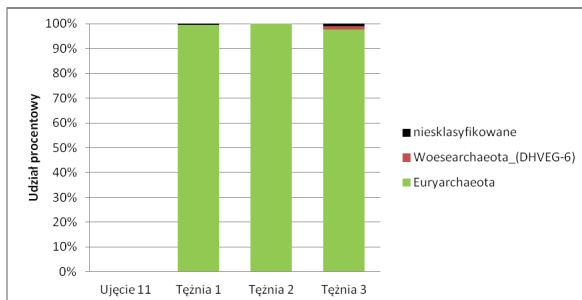
We wszystkich solankach dominowały sekwencje bakteryjne. Badając bioróżnorodność mikroorganizmów w słonych wodach jeziornych, Borsodi i wsp. (2013) również stwierdzili przewagę różnorodności bakterii nad Archeae. Sekwencje archeonowe najliczniej występowały w solance z Tężni 3. W próbce pochodzącej z Ujęcia nr 11 stwierdzono wcale obecności sekwencji archeonów, ale jednocześnie w solance tej odnotowano najwięcej sekwencji bakteryjnych. Mimo że z ogólnie przyjętych danych ekologicznych wynika, że w ekstremalnych warunkach środowiskowych (np. wysokim zasoleniu) na ogół spada bioróżnorodność (Frontier 1985), to w badanych solankach najwyższą liczbę sekwencji, a także największą liczbę bakteryjnych OTUs stwierdzono w solance o stężeniu 16% NaCl. Odnotowano spadek liczby sekwencji bakteryjnych wraz ze wzrostem zasolenia, ale liczba sekwencji archeonowych w badanych solankach zwiększała się ze wzrostem zasolenia. Również Casamayor i wsp. (2013) nie stwierdzali zmniejszania się różnorodności organizmów prokariotycznych wraz ze wzrostem

zasolenia wód jeziornych, szczególnie do stężenia 15% NaCl, a nawet zaobserwowali, że bioróżnorodność bakterii jest pozytywnie skorelowana ze stężeniem soli w środowisku. Natomiast Baati i wsp. (2008) w zbiornikach ewaporacyjnych do pozyskiwania soli morskiej, podobnie jak solankach tężniowych, obserwowali zmniejszenie różnorodności bakterii, a wzrost zróżnicowania archeonów w gradiencie zasolenia.

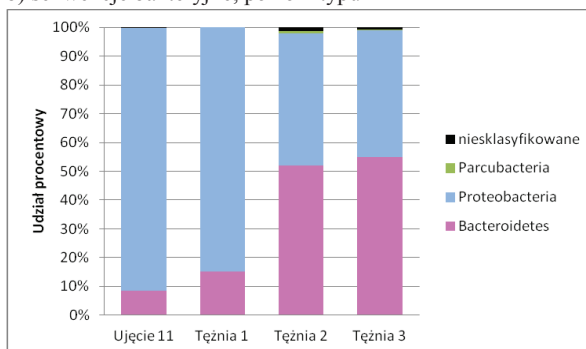
Zdecydowaną większość sekwencji archeonów uzyskanych z próbek solanek tężniowych przypisano do typu Euryarchaeota (ryc. 18a). W badaniach wód zasolonych Casamayor i wsp. (2013) oraz Abdallah i wsp. (2016) także notowali głównie archeony zaklasyfikowane do tych typów. Niewielki odsetek stanowiły sekwencje należące do Woesearchaeota. Do tego typu, dawniej zaliczanego do Euryarchaeota i określanego jako klastery Deepsea Hydrothermal Vent Euryarchaeotic Group 6 (DHVEG-6), należą przede wszystkim niehodowane mikroorganizmy halofilne (Casamayor i wsp. 2013; Ortiz-Alvarez, Casamayor 2016). Obecność jego przedstawicieli wykrywano wcześniej głównie w osadach hydrotermalnych (Nunoura i wsp. 2010) oraz środowiskach hipersolonych (Ghai i wsp. 2011; Narasingarao i wsp. 2012; Schneider i wsp. 2013; Casamayor i wsp. 2013), ale sekwencje DHVEG-6 wykryto także w wodach jezior słodkowodnych (Hugoni i wsp. 2015).

Z kolei analiza sekwencji bakteryjnych na poziomie typu wykazała największy udział Proteobacteria (wśród których dominowały klasy  $\gamma$ -Proteobacteria i  $\alpha$ -Proteobacteria) oraz Bacteroidetes (ryc. 18b). Wyniki licznych badań środowisk zasolonych wskazują, że Proteobacteria są dominującym typem bakterii zarówno w silnie zasolonych wodach powierzchniowych (Casamayor i wsp. 2013; Borsodi i wsp. 2013), jak i w solankach podziemnych (Beyer i wsp. 2015a; Beyer i wsp. 2015b). Stwierdzona w opisywanych badaniach dominacja klasy  $\gamma$ -Proteobacteria w obrębie typu Proteobacteria opisywana była również dla innych solanek i wód podziemnych (Pronk i wsp. 2009; Navarro-Noya i wsp. 2013; Liu i wsp. 2014; Missimer i wsp. 2014; Beyer i wsp. 2015a). Także bakterie z typu Bacteroidetes są powszechnie notowane w solankach (Casamayor i wsp. 2013; Borsodi i wsp. 2013; Beyer i wsp. 2015a). Analizując sekwencje na poziomie rodzin, stwierdzono, że we wszystkich solankach obecne były sekwencje należące do rodzin *Idio-*

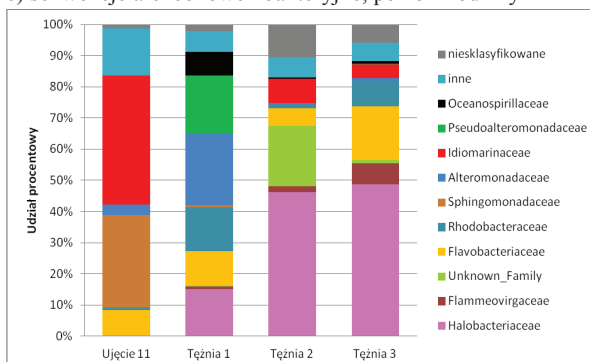
a) sekwencje archeonowe, poziom typu



b) sekwencje bakteryjne, poziom typu



c) sekwencje archeonowe i bakteryjne, poziom rodziny



Ryc. 18. Dystrubucja sekwencji uzyskanych podczas sekwencjonowania nowej generacji (NGS) metagenomowego DNA wyizolowanego z solanek tężniowych

Na poziomie typu i rodziny dystrybucja została wyrażona jako udział procentowy w ogóle sekwencji – przedstawiono tylko taksony mające udział większy niż 5% w co najmniej jednej próbce

*marinaceae*, *Flavobacteriaceae* oraz *Rhodobacteraceae* (ryc. 18c). Solanka pochodząca z Ujęcia nr 11 różniła się od pozostałych próbek, ponieważ stwierdzono w niej stosunkowo znaczny udział sekwencji z rodzin *Idiomarinaceae* oraz *Sphingomonadaceae*. Solanka z Tężni 1 charakteryzowała się znacznym udziałem sekwencji przypisanych do rodzin *Alteromonadaceae* i *Pseudoalteromonadaceae*. Natomiast solanki pochodzące z Tężni 2 i 3 wykazywały podobieństwo względem siebie – m.in. stwierdzono w nich duży udział sekwencji *Halobacteriaceae* (ryc. 18c). Wszystkie archeony należące do tej rodziny mają wysokie wymagania względem soli i optymalny wzrost wykazują przy stężeniu soli powyżej 150–200 g·dm<sup>-3</sup> (Oren 2014). Prawie wszystkie rodziny drobnoustrojów obecnych w badanych solankach (*Oceanospirillaceae*, *Pseudoalteromonadaceae*, *Idiomarinaceae*, *Alteromonadaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Flavobacteriaceae*, *Flammeovirgaceae*) to mikroorganizmy związane ze środowiskami wód słonych. Ich obecność stwierdzano przede wszystkim w przybrzeżnych i otwartych wodach oceanicznych, morskich osadach dennych i w organizmach ryb morskich, ale także w skrajnie zasolonych środowiskach, m.in. hipersłonnych mokradłach i zbiornikach ewaporacyjnych służących do pozyskiwania soli morskiej (Shigematsu i wsp. 2009; Albuquerque i da Costa 2014; Ivanova i wsp. 2014; López-Pérez i Rodriguez-Valera 2014; Pujalte i wsp. 2014; Tully i wsp. 2014; Zhong i wsp. 2014). Jedynie bakterie z rodziny *Sphingomonadaceae* nie są ściśle związane ze środowiskiem słonowodnym i notowano je również w glebie, wodach słodkich i osadzie czynnym, a także w phyllosferze i rhizosferze roślin (Glaeser i Kämpfe 2014). Najbardziej zateżona solanka (27% NaCl) pochodząca z Tężni 2 charakteryzowała się stosunkowo dużym udziałem sekwencji zaklasyfikowanych jako „nieznana rodzina”.

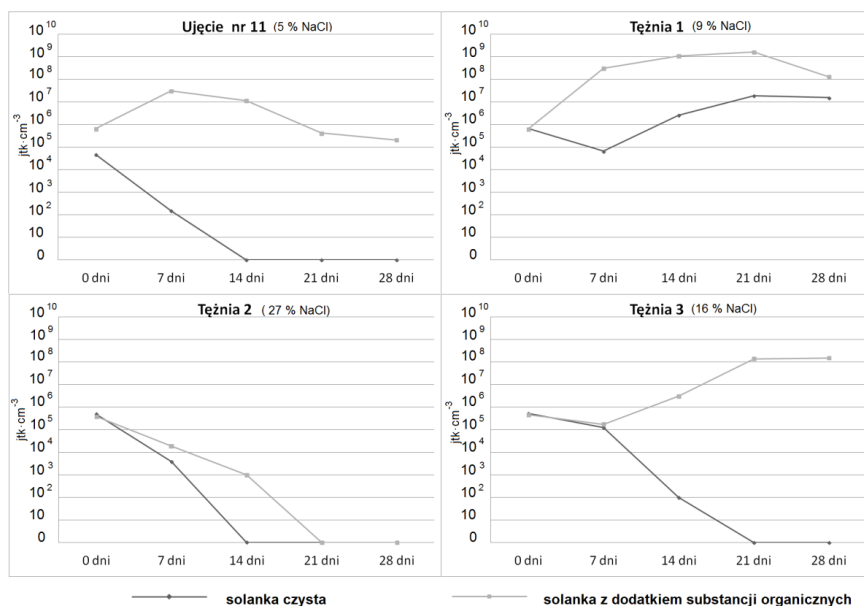
Wstępnie założono, że solanki podczas procesu technologicznego, obejmującego transport z Ujęcia nr 11 do tężni oraz rozprowadzanie po konstrukcji kolejnych tężni, mogą być wzbogacane o mikroorganizmy występujące w środowisku. Szczególnie podczas spływania solanki w postaci kropeł po gałązkach tarniny wypełniających tężnie drobnoustroje obecne w powietrzu mogłyby dostawać się do roztworu i wzbogacać jego bioróżnorodność na kolejnych etapach zateżniania. Jednak wyniki badań bioróżnorodności nie potwierdziły tego założenia.

Wprawdzie liczba sekwencji archeonowych, a także liczba OTUs jest najwyższa w solance pochodzącej z Tężni 3, czyli po przepłynięciu przez konstrukcję dwóch tężni, ale większa bioróżnorodność wynika przede wszystkim z większego zróżnicowania mikroorganizmów halofilnych, a nie ze wzbogacenia solanki mikroorganizmami pochodzącymi z powietrza. Zarówno w badaniach własnych (tab. 17), jak i w badaniach innych autorów (tab. 3) w powietrzu zwykle w dużej ilości stwierdzano obecność bakterii z typu Firmicutes, głównie z rodziny *Bacillaceae*. W badanych solankach bakterie z tej rodziny były nieliczne, a udział sekwencji *Bacillaceae* w ogóle sekwencji bakteryjnych wynosił zaledwie 0,02%. Niektórzy autorzy (Després i wsp. 2007; Fahlgren i wsp. 2010; Cao i wsp. 2014) notowali w powietrzu wysoki udział bakterii typu Bacteroidetes oraz z klasy  $\gamma$ -Proteobacteria. Podobne wyniki uzyskano w solankach tężniowych z Ciechocinka. Jednak głębsza analiza danych na poziomie rodzin wykazała, że w solankach z wymienionych powyżej taksonów występowały prawie wyłącznie rodziny związane ze środowiskami słonymi.

### 5.6. Przeżywalność potencjalnych patogenów układu oddechowego w solankach tężniowych

W solankach, oprócz drobnoustrojów autochtonicznych, do których należą głównie halofilne archeony i bakterie, występują także drobnoustroje ze źródeł antropogenicznych. Mikroorganizmy pochodzące z powietrza oraz z dróg oddechowych kuracjuszy mogą dostawać się do spływających solanek używanych w otwartych inhalatoriach, a także kolonizować ich elementy, co może pogarszać stan sanitarny wód leczniczych i aerozoli emitowanych przez inhalatoria. Patogeny, głównie układu oddechowego, są w stanie przeżyć nawet w bardzo niesprzyjających warunkach, także w dużym zasoleniu (Kilvington, Price 1990; Heller i wsp. 1998; Ohno i wsp. 2003). W związku z tym możliwość występowania mikroorganizmów chorobotwórczych w wodzie przeznaczonej do celów leczniczych i rekreacyjnych skłania do kontroli możliwości przeżycia bakterii potencjalnie patogennych w solankach tężniowych.

Analizując przeżywalność *Staphylococcus aureus* w czystych solankach Ciechocinka, można stwierdzić, że szczep ten zachował najlepszą żywotność w solance o zasoleniu około 9% NaCl (ryc. 19). Żywe komórki *Staphylococcus aureus* w tej solance były notowane do końca trwania eksperymentu, czyli po 28 dniach inkubacji, a jednocześnie liczebności stwierdzane na poszczególnych etapach badań były wyższe niż w pozostałych solankach, osiągając maksymalne wartości równe  $10^7$  jtk·cm<sup>-3</sup>. Tylko w tej solance, po początkowym spadku liczebności (z wartości początkowej  $8,5 \cdot 10^5$  jtk·cm<sup>-3</sup> do  $9,1 \cdot 10^4$  jtk·cm<sup>-3</sup>), odnotowano w miarę trwania eksperymentu przyrost liczebności bakterii w stosunku do wartości początkowej. W pozostałych solankach czystych stwierdzano systematyczny spadek liczebności gronkowca. W konsekwencji, w solankach z Ujęcia nr 11 oraz Tężni 2 nie notowano żywych komórek *Staphylococcus aureus* już po 14 dniach, a w solance z Tężni 3 po 21. dniu eksperymentu.



Ryc. 19. Przeżywalność *Staphylococcus aureus* w solankach z otwartych inhalatoriów Ciechocinka w zależności od dodatku substancji organicznych

Dodatek ekstraktu drożdżowego, symulujący zanieczyszczenie solanek tężniowych substancjami organicznymi, spowodował wyraź-

ny wzrost czasu przeżywania *Staphylococcus aureus* w poszczególnych solankach, a także znacząco zwiększył liczbę żywych bakterii (ryc. 19). Jedynie w najbardziej stężonej solance (27% NaCl) po 21 dniach inkubacji nie notowano żywych bakterii. W pozostałych solankach wzbogaconych w substancje organiczne gronkowce pozostały żywe do końca badania. Ponadto w solankach o stężeniu 9 i 16% NaCl ich liczebność wzrosła ponad 100-krotnie w porównaniu z początkiem eksperymentu, co świadczy o możliwości rozmnażania się *Staphylococcus aureus* w solankach zanieczyszczonych (wzbogaconych) substancjami organicznymi. Najwyższe liczebności gronkowca odnotowano w solance o stężeniu 9% NaCl wzbogaconej w substancje organiczne. W 21. dniu inkubacji osiągnęły one wartość  $10^9$  jtk-cm<sup>-3</sup>.

Ciśnienie osmotyczne i aktywność wody są jednymi z głównych parametrów fizycznych środowiska, które limitują możliwość przeżycia i rozmnażania się bakterii (Beuchat i wsp. 2013). Jednocześnie *Staphylococcus aureus* uznaje się za mikroorganizm, który jest w stanie przeżyć i rozwijać się w wielu niszach ekologicznych, często w skrajnych warunkach środowiskowych (Clements, Foster 1999). W środowiskach o wysokiej osmolarności gronkowiec złoisty gromadzi w cytoplazmie cholinę, betainę i glicynę, a także w mniejszych ilościach prolinę oraz taurynę (Graham, Wilkinson 1992; Clements, Foster 1999; Sochocka, Boratyński 2011). Ponadto zmiany struktury peptydoglikanu ściany komórkowej nadają komórce mechaniczną wytrzymałość i sprężystość, pozwalając oprzeć się zmianom ciśnienia (Clements, Foster 1999).

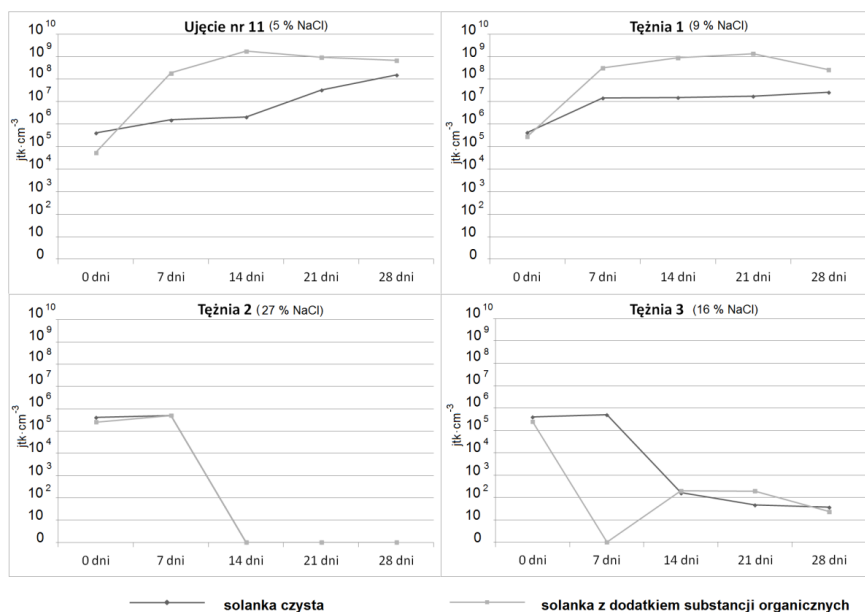
Największą żywotność (zarówno liczebność, jak i czas przeżycia) *Staphylococcus aureus* zaobserwowano w solance pochodzącej z Tężni 1, o zasoleniu 9% NaCl. Po inkubacji w tej solance stwierdzano nawet 1000-krotnie wyższe liczebności bakterii (po 21 dniach) niż w tym samym czasie w solance z Ujęcia nr 11 (5% NaCl). Mechanizm takiego zjawiska może być oparty na tym, że przechodząc przez konstrukcję tężni, solanka wzbogaca się o dodatkowe zanieczyszczenia, co sprzyja rozwojowi drobnoustrojów. Badania chemiczne solanek tężniowych potwierdzają najwyższe stężenie azotu ogólnego (10,6 mg-dm<sup>3</sup>) w solance pochodzącej z Tężni 1, a analiza statystyczna wykazała istotną ko-

relację ( $r = 0,5$ ;  $p < 0,05$ ) pomiędzy stężeniem azotu ogólnego w solance czystej a przeżywalnością *S. aureus* w opisywanym eksperymencie. Marshall i wsp. (1971) wnioskuje, że przy dostępie odpowiedniej ilości substancji odżywczych NaCl nie hamuje dostatecznie tempa wzrostu *Staphylococcus aureus*.

Mimo możliwości przeżywania i rozwoju *Staphylococcus aureus* w solankach tęźniowych, szczególnie tych zanieczyszczonych substancjami organicznymi, ryzyko zakażenia i wywołania choroby przez gronkowce obecne w solankach jest ograniczone. Jak podają Clements i Foster (1999) oraz Joe i wsp. (2013), ekspresja wielu determinantów wirulencji gronkowców jest tłumiona przez wysoką osmolarność środowiska.

Wraz ze wzrostem stężenia NaCl przeżywalność *Staphylococcus aureus* malała, mimo że jest to bakteria odporna na wysokie ciśnienie osmotyczne. Zbliżone wyniki uzyskał Lim i wsp. (2004), badając wpływ NaCl i glukozy na tworzenie biofilmu przez *Staphylococcus aureus* na materiałach szklanych i polistyrenowych.

Szczep *Pseudomonas aeruginosa* w solankach pochodzących z Ujęcia nr 11 (5% NaCl) oraz Tężni 1 (9% NaCl), niewzbogaconych substancjami organicznymi, zachował żywotność do 28. dnia inkubacji, a jego liczebność wzrosła w stosunku do wartości początkowej (ryc. 20). Szczególnie duży (ponad 100-krotny, do wartości  $10^8$  jtk·cm<sup>-3</sup>) wzrost liczebności zaobserwowano w „czystej” solance zasilającej fontannę „Grzyb” (Ujęcie nr 11), a przyrost liczebności był notowany przez cały czas trwania eksperymentu. W solance pochodzącej z Tężni 1 także odnotowano wzrost liczebności powyżej wartości początkowej po 7 dniach eksperymentu. W kolejnych terminach badawczych liczebność *Pseudomonas* w tej solance ustabilizowała się na poziomie  $10^7$  jtk·cm<sup>-3</sup>. Również w solance „czystej” z Tężni 3 (16% NaCl) *Pseudomonas aeruginosa* zachował żywotność do 28. dnia doświadczenia, ale od 14. dnia liczebność bakterii gwałtownie spadała, osiągając ostatecznie wartość poniżej 100 jtk·cm<sup>-3</sup>. W najbardziej stężonej solance (27% NaCl) od 14. dnia inkubacji nie stwierdzano żywych komórek *Pseudomonas aeruginosa*.



Ryc. 20. Przeżywalność *Pseudomonas aeruginosa* w solankach z otwartych inhalatorów Ciechocinka w zależności od dodatku substancji organicznych

Podobnie jak *Staphylococcus aureus*, również *Pseudomonas aeruginosa* uzyskiwał wyższe liczebności w solankach pochodzących z Ujęcia nr 11 i Tężni 1 wzbogaconych w substancje organiczne (ryc. 20). W solankach tych notowano wzrost liczebności bakterii w porównaniu z wartością początkową ( $10^4$ – $10^5$  jtk·cm<sup>-3</sup>) do wartości  $10^9$  jtk·cm<sup>-3</sup>. Do 28. dnia eksperymentu w obu tych solankach liczebność *Pseudomonas aeruginosa* nie spadła poniżej  $10^8$  jtk·cm<sup>-3</sup>. W solance o stężeniu 16% NaCl (Tężnia 3) w 7. dniu eksperymentu nie zaobserwowano obecności żywych komórek pałeczki ropy błękitnej. Jednak w kolejnych terminach badawczych stwierdzano w solance obecność żywych komórek, a ich liczebność wahała się ok. 100 jtk·cm<sup>-3</sup>. Stężenie NaCl na poziomie 27%, nawet przy wzbogaceniu solanki w substancje organiczne, umożliwiło przeżycie *Pseudomonas aeruginosa* poniżej 14 dni inkubacji.

Podsumowując, wzrost *Pseudomonas aeruginosa* obserwowano nawet przy minimalnej ilości związków odżywczych, czyli w solankach „czystych”, ponadto szczep ten charakteryzował się długim cza-

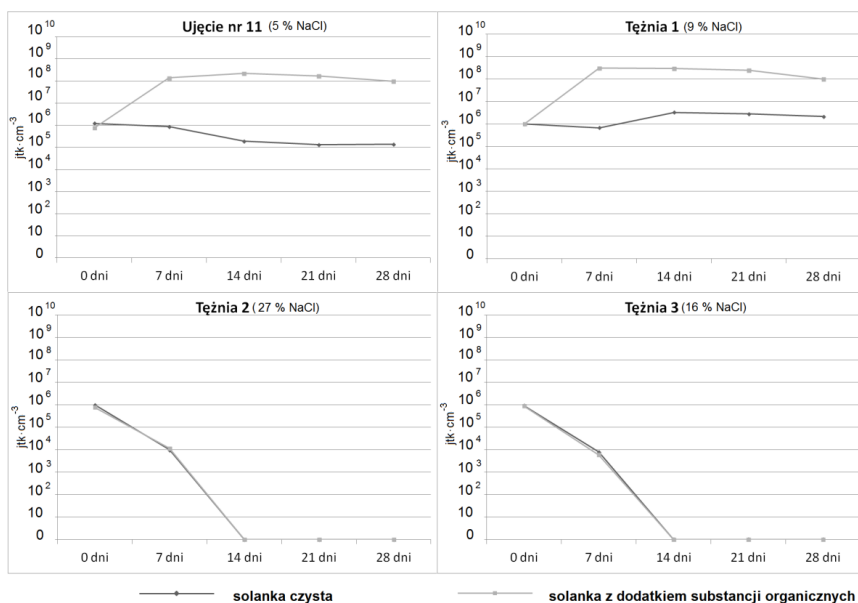
sem przeżywania (do 28. dnia) i wysoką liczebnością ( $10^4$ – $10^5$  jtk-cm<sup>-3</sup>) przy stężeniu NaCl równym 5–9%. Również podczas badań prowadzonych przez Walczaka i wsp. (2011) *Pseudomonas aeruginosa* nie tylko przeżywał przez 4 tygodnie, ale i namnażał się w zasolonych wodach geotermalnych pochodzących z ujęć nr 14 w Ciechocinku oraz IG-1 w Grudziądzu.

Powszechnie wiadomo, że bakteria ta jest odporna na wiele czynników fizykochemicznych (Bednarczuk i wsp. 2008; Walczak i wsp. 2011), a jej oporność na antybiotyki i środki dezynfekujące jest głównym czynnikiem infekcyjności. Duży rozmiar i złożoność genomu *P. aeruginosa* odzwierciedla wyjątkowo rozwinięte mechanizmy adaptacyjne, które pozwalają na rozwój tego potencjalnego patogenu w różnych, często ekstremalnych niszach ekologicznych. *P. aeruginosa* ma szerokie możliwości zarówno transportu, jak i metabolizmu substancji organicznych, a jednocześnie zdolności do usuwania związków niepożądanych z wnętrza komórki z udziałem różnych systemów wydzielania. Jednocześnie złożoność genetyczna *Pseudomonas aeruginosa* jest związana z dużym udziałem genów regulatorowych, które modulują biochemiczne możliwości tej bakterii w zmieniających się warunkach środowiska. Dzięki wyjątkowo dużym zdolnościom regulacyjnym *P. aeruginosa* ma większe możliwości adaptacji do skrajnych warunków środowiskowych, w tym do wysokiego zasolenia, niż inne bakterie, szczególnie te z mniejszymi genomami (Stover i wsp. 2000). Ponadto powszechna u szczepów bakterii z rodzaju *Pseudomonas* zdolność do wytwarzania biosurfaktantów może ułatwiać pozyskiwanie substancji odżywczych i przeżycie w skrajnych warunkach środowiskowych (Burch i wsp. 2014; Stevenson i wsp. 2015).

W prezentowanych badaniach pałeczki ropy błękitnej nie przeżywały w zasoleniu ponad 20% (w solance z Tężni 2) i ginęły przed upływem 14 dni. Badając wpływ środków dezynfekujących zawierających wysokie stężenia NaCl na żywotność *Pseudomonas aeruginosa*, Kiura i wsp. (2002) stwierdzili, że przeżywalność tych bakterii maleje wraz ze stężeniem soli.

Dla bakterii *Klebsiella pneumoniae* graniczne stężenie NaCl umożliwiające przeżycie do 28. dnia eksperymentu, zarówno w solan-

kach niesuplementowanych, jak i suplementowanych materią organiczną, wynosiło poniżej 16% (ryc. 21). W solankach wykorzystywanych w fontannie „Grzyb” (5% NaCl) oraz Tężni 1 (9% NaCl) *Klebsiella* zachowała żywotność do 4. tygodnia. W wyżej wymienionych solankach czystych liczebność tej bakterii podlegała niewielkim zmianom. Natomiast w solankach wzbogaconych w substancje organiczne liczebność *Klebsiella pneumoniae* z początkowej wartości  $10^6$  jtk·cm<sup>-3</sup> wzrosła do  $10^8$  jtk·cm<sup>-3</sup> i do końca badania nie spadła poniżej tej wartości. W solankach zawierających ponad 16% NaCl, czyli pochodzących z Tężni 2 i 3, nie stwierdzano obecności żywych komórek już w 14. dniu inkubacji.



Ryc. 21. Przeżywalność *Klebsiella pneumoniae* w solankach z otwartych inhalatorów Ciechocinka w zależności od dodatku substancji organicznych

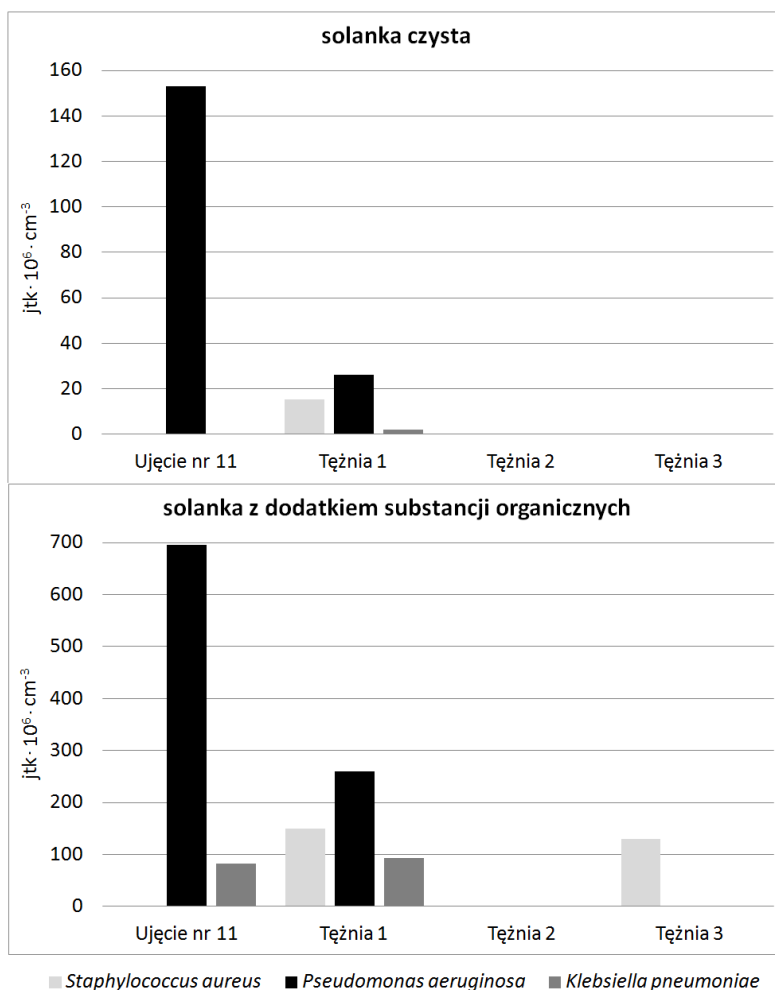
LeRudulier i Bouillard (1983) stwierdzili, że w warunkach stresu osmotycznego wzrost *Klebsiella pneumoniae* jest hamowany. Przyczyną jest zahamowanie pobierania związków azotowych. Autorzy ci podają, że z kolei przy niskich stężeniach soli następuje wzmożenie aktywności osmolitów, szczególnie betainy we wnętrzu komórki *K. pneumoniae*,

oraz stymulacja rozwoju bakterii. Dodatkowym czynnikiem chroniącym przed niesprzyjającymi warunkami środowiskowymi, a szczególnie stresem osmotycznym może być także w pewnym zakresie polisacharydowa otoczka wytwarzana przez *K. pneumoniae* (Wang i wsp. 2013).

Analizując czas przeżycia badanych bakterii w solankach wykorzystywanych w otwartych inhalatoriach Ciechocinka, można stwierdzić, że wszystkie badane bakterie przeżywały co najmniej 7 dni w warunkach opisanego eksperymentu – zarówno w solankach „czystych”, jak i wzbogaconych w substancje organiczne. Co prawda w 7. dniu eksperymentu nie stwierdzono zdolnych do wzrostu komórek *Pseudomonas aeruginosa* w wzbogaconej solance z Tężni 3, ale ponieważ w kolejnych terminach badawczych notowano w tej solance żywe bakterie w ilości około  $100 \text{ jtk} \cdot \text{cm}^{-3}$ , należy uznać, że nie oznacza to śmierci komórek, a może być wynikiem chwilowej niezdolności do aktywnego wzrostu. Podobne zjawisko obserwowali Walczak i wsp. (2011), badając przeżywalność gronkowca złocistego w wodach geotermalnych z Grudziądzka i Ciechocinka.

Do końca trwania eksperymentu, czyli przez 28 dni, wszystkie badane szczepy zachowały żywotność jedynie w solance z Tężni 1, zarówno czystej, jak i wzbogaconej substancjami organicznymi. Natomiast w najbardziej stężonej solance pochodzącej z Tężni 2 po 28 dniach inkubacji nie notowano obecności żywych bakterii (ryc. 22). Spośród badanych szczepów najlepszą żywotnością do końca eksperymentu charakteryzowała się pałeczka ropy błękitnej – jej liczebności były wyższe w porównaniu z liczebnościami pozostałych badanych szczepów.

Zgodnie z przeprowadzoną dwuczynnikową analizą wariancji ANOVA dla wszystkich badanych szczepów stężenie solanki było czynnikiem istotnie wpływającym na przeżywalność bakterii. Również dodatek substancji organicznych był czynnikiem istotnym statystycznie ( $p < 0,05$ ). W przypadku wszystkich szczepów stwierdzono także istotną statystycznie interakcję pomiędzy badanymi czynnikami (tab. 26). Z przeprowadzonych testów post-hoc Tukeya wynika, że liczebności *Staphylococcus aureus* po inkubacji w solance z Tężni 1 wzbogaconej w substancje organiczne istotnie różnią się od liczebności



Ryc. 22. Przeżywalność badanych szczepów po 28 dniach eksperymentu

tego drobnoustroju inkubowanego w pozostałych solankach ( $p < 0,05$ ). Również liczebności *Pseudomonas aeruginosa* i *Klebsiella pneumoniae* inkubowanych w solankach Ujęcia nr 11 oraz Tężni 1 suplementowanych substancjami organicznymi były istotnie wyższe niż podczas inkubacji w innych badanych solankach ( $p < 0,05$ ).

Tabela 26. Wyniki dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) przeżywalności bakterii w solankach tęźniowych w zależności od stężenia solanki i dodatku substancji organicznych

Badany szczep	Czynnik	F	p
<i>Staphylococcus aureus</i>	stężenie solanki	3,89	0,0177
	dodatek substancji organicznych	4,86	0,0348
	stężenie solanki · dodatek substancji organicznych	3,71	0,0214
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	stężenie solanki	3,88	0,0179
	dodatek substancji organicznych	9,56	0,0041
	stężenie solanki · dodatek substancji organicznych	3,25	0,0344
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	stężenie solanki	7,08	0,0009
	dodatek substancji organicznych	19,03	0,0001
	stężenie solanki · dodatek substancji organicznych	6,86	0,0011

F – stosunek wariancji międzygrupowej do wariancji wewnątrzgrupowej, p – poziom istotności

Dodatek substancji organicznych powodował zwiększenie liczebności oraz przedłużenie czasu przeżycia badanych bakterii, szczególnie podczas inkubacji w solankach z Ujęcia nr 11 i Tężni 1. Badania Walczaka i wsp. (2011) oraz Krawca i Walczaka (2012) potwierdzają, że wprowadzenie dodatkowej puli materii organicznej do wód solankowych skutkowało znaczącym zwiększeniem możliwości przetrwania bakterii z gatunków *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa*.

Można zatem wnioskować, że zanieczyszczenia (np. w postaci olejów stosowanych do naoliwiania mechanizmów pompowych) mogą również być wykorzystywane przez drobnoustroje jako składniki pokarmowe. Potencjalnym źródłem materii organicznej mogą być także zanieczyszczenia pyłowe, które dostają się do solanek przy wietrznej pogodzie i mogą stymulować rozwój mikroorganizmów, również potencjalnie patogenych. Dlatego należy zapobiegać dostawaniu się zanieczyszczeń do solanki, a jednocześnie wody solankowe powinny być poddawane stałej kontroli mikrobiologicznej w celu zapewnienia dodatkowego bezpieczeństwa zdrowotnego kuracjuszy, którzy odwiedzają otwarte inhalatoria.

### 5.7. Tworzenie biofilmu w środowisku solanek tężniowych

W środowisku naturalnym drobnoustroje rzadko występują w postaci pojedynczych rozproszonych komórek. Często obserwowanym zjawiskiem jest tworzenie biofilmu przylegającego do powierzchni stałych (Dolan 2002; Czaczyk, Mysza 2007; Vu i wsp. 2009). Szczególnie w niesprzyjających warunkach i sytuacjach stresowych, do których należy też silne zasolenie, tworzenie biofilmu może być uruchamiane jako strategia przeżycia, ponieważ taka forma bytowania drobnoustrojów chroni komórki przed niekorzystnym wpływem szkodliwych czynników środowiskowych (Götz 2002; Lim i wsp. 2004).

Badania Singha i wsp. (2006) potwierdzają, że bakterie tworzą biofilm niemal we wszystkich środowiskach wilgotnych. Opisowane badania dotyczyły zdolności formowania biofilmu przez *S. aureus* i *P. aeruginosa*, które są ważnymi patogenami układu oddechowego (Tenenbaum i wsp. 2012; Grijalva i wsp. 2014). Badania Gajewskiej i Cieniek (2009) potwierdzają, że zdolność do tworzenia biofilmu jest powszechna wśród bakterii chorobotwórczych bądź potencjalnie chorobotwórczych, Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. Biofilm formują m.in. *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Citrobacter amalonaticus*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Micrococcus luteus*, *Enterobacter sp.* oraz bakterie z rodzaju *Clostridium*.

Tworzenie biofilmu przez *Staphylococcus aureus* zaobserwowano we wszystkich solankach czystych inkubowanych w 22°C przez 1 dobę (tab. 25). Po 48 godzinach inkubacji obecność biofilmu stwierdzono tylko w solankach czystych o stężeniu NaCl do 16%. We wszystkich przypadkach była to produkcja biofilmu na poziomie słabym. Najwyższą wartość absorbancji, a tym samym największą ilość wytworzonego biofilmu w 22°C uzyskano po inkubacji szczepu *S. aureus* w solance z Tężni 2 bez dodatku substancji organicznych po 1 dobie inkubacji (OD = 0,059). Po inkubacji w 22°C nie zaobserwowano natomiast biofilmu wytworzonego przez *Staphylococcus aureus* w żadnej solance wzbogaconej substancjami organicznymi.

Podczas inkubacji *Staphylococcus aureus* w wyższej temperaturze tworzenie biofilmu było intensywniejsze (tab. 27). W temperaturze

37°C więcej biofilmu *Staphylococcus aureus* tworzył w solankach wzbogaconych substancjami organicznymi – najwyższą wartość OD równą 0,307 zanotowano po inkubacji bakterii w solance z Tężni 1, co odpowiadało silnej produkcji biofilmu.

Tabela 27. Tworzenie biofilmu przez *S. aureus* w solankach ciechocińskich według kategorii Stepanovicia i wsp. (2007).

Temperatura inkubacji	Pochodzenie i stężenie solanki [% NaCl]		Czas inkubacji			
			24 h		48 h	
			S	S + SO	S	S + SO
22°C	Ujęcie nr 11	5	0,051*	0,039	0,043	0,039
	Tężnia 1	9	0,056	0,040	0,044	0,049
	Tężnia 2	27	0,059	0,037	0,045	0,039
	Tężnia 3	16	0,058	0,037	0,049	0,040
37°C	Ujęcie nr 11	5	0,036	0,223	0,035	1,083
	Tężnia 1	9	0,038	0,307	0,042	1,179
	Tężnia 2	27	0,043	0,033	0,047	0,040
	Tężnia 3	16	0,039	0,106	0,043	0,645

\* – wartość OD (absorbancji) przy długości fali 560 nm, S – solanka czysta, S + SO – solanka wzbogacona w substancje organiczne (wyciąg drożdżowy o końcowym stężeniu 0,25%)

brak produkcji biofilmu
słaba produkcja biofilmu
umiarkowana produkcja biofilmu
silna produkcja biofilmu

*Pseudomonas aeruginosa* tworzył biofilm jedynie w solankach z Ujęcia nr 11 i Tężni 1. W pozostałych solankach, o wyższym stężeniu NaCl, biofilmu nie notowano, bez względu na temperaturę i czas inkubacji, a także obecność lub brak substancji organicznych w solance (tab. 28).

Po inkubacji szczepu *Pseudomonas aeruginosa* w wyżej wymienionych solankach w 22°C stwierdzano brak lub słabą produkcję biofilmu. Największą ilość biofilmu (OD = 0,070) wytworzonego przy inkubacji w temperaturze 22°C zanotowano dla bakterii inkubowanych w solance z Tężni 1 wzbogaconej ekstraktem drożdżowym.

Tabela 28. Tworzenie biofilmu przez *P. aeruginosa* w solankach ciechocińskich według kategorii Stepanovicia i wsp. (2007)

Temperatura inkubacji	Pochodzenie i stężenie solanki [% NaCl]		Czas inkubacji			
			24 h		48 h	
			S	S + SO	S	S + SO
22°C	Ujęcie nr 11	5	0,038*	0,042	0,037	0,054
	Tężnia 1	9	0,057	0,037	0,043	0,070
	Tężnia 2	27	0,044	0,032	0,048	0,041
	Tężnia 3	16	0,040	0,038	0,044	0,043
37°C	Ujęcie nr 11	5	0,027	0,080	0,076	0,049
	Tężnia 1	9	0,030	0,154	0,037	0,217
	Tężnia 2	27	0,034	0,033	0,046	0,045
	Tężnia 3	16	0,031	0,030	0,039	0,041

\* – wartość OD (absorbancji) przy długości fali 560 nm, S – solanka czysta, S + SO – solanka wzbogacona w substancje organiczne (wyciąg drożdżowy o końcowym stężeniu 0,25%)

brak produkcji biofilmu
słaba produkcja biofilmu
umiarkowana produkcja biofilmu
silna produkcja biofilmu

Natomiast po inkubacji *Pseudomonas aeruginosa* w 37°C notowano wyraźnie większą ilość biofilmu – w trzech przypadkach na poziomie umiarkowanym. Najwyższą wartość OD (0,217) otrzymano również w solance z Tężni 1 wzbogaconej ekstraktem drożdżowym, przy czym był to wynik 3 razy wyższy niż w temperaturze 22°C.

Przeprowadzona jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA wykazała, że czas był czynnikiem determinującym ilość biofilmu tworzego przez oba badane szczepy zarówno w temperaturze 22°C, jak i w 37°C (tab. 29). Zależność ta zachodziła w solankach czystych i wzbogaconych w substancje organiczne.

Podobne wnioski można znaleźć w pracy Baczyk-Łopuch i Lostera (2010), w której opisano adhezję bakterii do materiałów zamków ortodontycznych. Autorzy wykazali wzrost przylegania bakterii do powierzchni materiału wraz z wydłużeniem czasu inkubacji. Należy jednak pamiętać, że struktura biofilmu najlepiej rozwija się w początkowej

fazie jego powstawania, a przedłużanie czasu inkubacji biofilmu może obniżać wyniki z powodu odrywania struktur biofilmu podczas procedury jego wybarwienia.

Stężenie soli w większości przypadków istotnie wpływało na ilość powstającego biofilmu ( $p < 0,001$ ). Jedynie ilość biofilmu wytworzonego przez *Pseudomonas aeruginosa* w czystych solankach inkubowanych w temperaturze 37°C nie różniła się istotnie w zależności od stopnia zasolenia ( $p > 0,05$ ).

Tabela 29. Wyniki analizy wariancji (ANOVA) ilości biofilmu tworzonego przez *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa* w zależności od czasu inkubacji i stężenia solanki

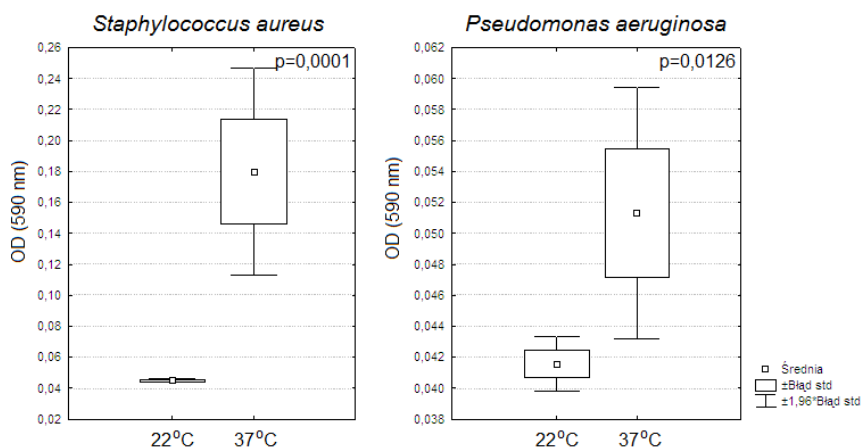
Szczep	Rodzaj solanki	Czynnik	Poziom istotności	
			22°C	37°C
<i>Staphylococcus aureus</i>	czysta	czas inkubacji	< 0,0001	0,0013
		stężenie solanki	0,0006	< 0,0001
	wzbogacona substancjami organicznymi	czas inkubacji	0,0009	< 0,0001
		stężenie solanki	< 0,0001	< 0,0001
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	czysta	czas inkubacji	0,0008	0,0013
		stężenie solanki	< 0,0001	0,1047
	wzbogacona substancjami organicznymi	czas inkubacji	< 0,0001	0,0204
		stężenie solanki	0,0010	< 0,0001

Wyniki przeprowadzonych badań potwierdziły zależność intensywności tworzenia biofilmu od stopnia zasolenia. Wzrost stężenia soli powyżej 9% w badanym środowisku powodował zmniejszenie ilości biofilmu, szczególnie utworzonego przez *P. aeruginosa*. Wpływ na rozwój błony biologicznej może mieć obecność jonów sodu, wapnia i magnezu w wodzie. McEldowney i Fletcher (1986) wykazali pozytywny wpływ wyżej wymienionych jonów, ale wyłącznie na etap adhezji komórek do podłoża, ponieważ wiązanie jonów przez komórki bakteryjne prowadzi do zmian właściwości powierzchni ich komórek.

Z kolei Rachid i wsp. (2000) wykazali, że wysoka osmolarność wynikająca z wysokiego stężenia soli stymuluje tworzenie biofilmu przez

*S. aureus*. Jednak autorzy ci badali tworzenie biofilmu w niższych stężeniach NaCl niż występują w solankach ciechocińskich. W badaniach Rachida i wsp. (2000) maksymalna ilość biofilmu była tworzona w zakresie stężeń od 1,6 do 4,8% i pozostawała na stałym poziomie, jednak przy stężeniu > 5,6% biofilm nie był już produkowany. Jak podają Lim i wsp. (2004), *S. aureus* może tolerować o wiele wyższe stężenia NaCl, ale prawdopodobnie mechanizm regulowany bezpośrednio lub pośrednio przez gen *rbf* może hamować tworzenie biofilmu, gdy NaCl osiągnie 5,6%. Natomiast Zdybek (2005) w środowisku wzbogaconym o dodatkowe jony chlorkowe odnotował zarówno zahamowanie procesu tworzenia biofilmu bakteryjnego, jak i zmniejszenie żywotności pojedynczych komórek bakteryjnych szczepów *S. aureus* i *P. aeruginosa*. W przeprowadzonych badaniach *P. aeruginosa* również nie tworzył biofilmu w solankach o stężeniu soli powyżej 9%, ale *S. aureus* w środowisku niewzbogaconym w dodatkową pulę materii organicznej tworzył biofilm nawet w bardziej stężonych solankach.

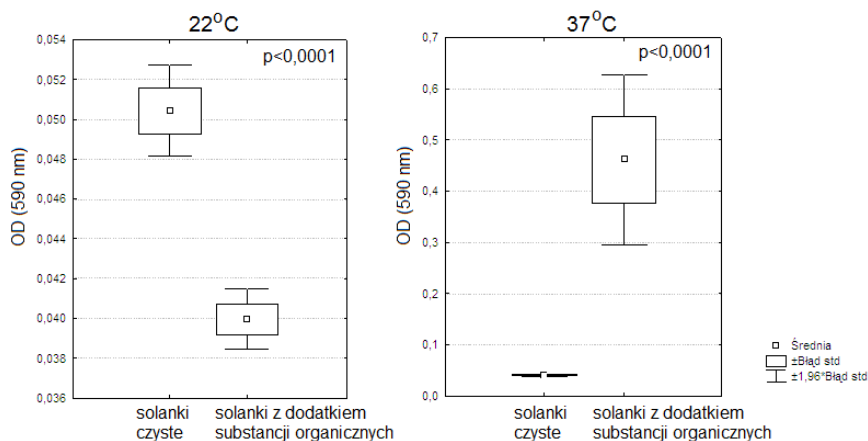
Zarówno dla szczepu *Staphylococcus aureus* ( $p < 0,001$ ), jak i *Pseudomonas aeruginosa* ( $p < 0,05$ ) stwierdzono statystycznie istotny wpływ temperatury na rozwój biofilmu (ryc. 23). W temperaturze 37°C notowano zdecydowanie większą produkcję biofilmu. Tendencja ta była szczególnie widoczna dla biofilmów utworzonych przez gronkowca.



Ryc. 23. Wpływ temperatury na tworzenie biofilmu przez szczepy *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa* w solankach ciechocińskich

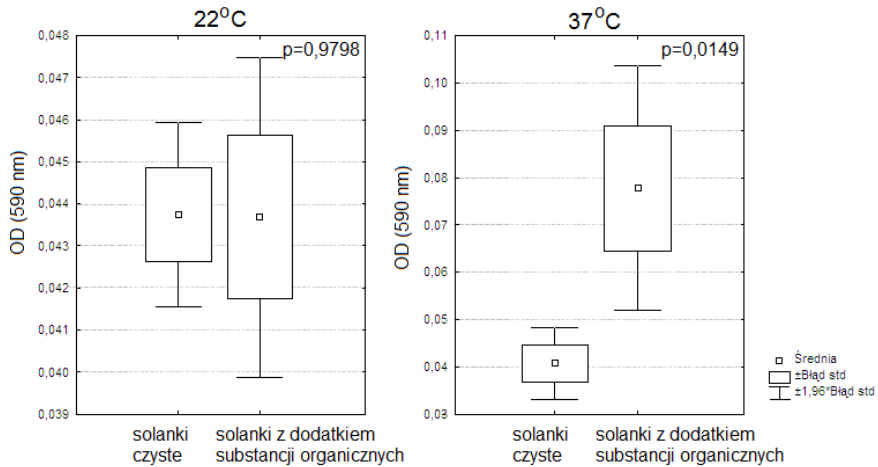
Podobne rezultaty uzyskali Hošťacká i wsp. (2010), badając wpływ temperatury na wytwarzanie biofilmu bakteryjnego przez bakterie potencjalnie patogenne (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Vibrio cholerae*). Warto jednak podkreślić, że tętnie solankowe w Ciechocinku zatężają solankę z ok. 5,5% do ok. 27%, ale temperatura podczas przeprowadzania tego procesu nie przekracza temperatury otoczenia i nie dochodzi do 37°C. Bardzo mała produktywność biofilmu w solankach uzyskana w niższej temperaturze świadczyć może o niewielkim narażeniu środowiska tętni ciechocińskich na tworzenie biofilmu przez szczepy *P. aeruginosa* i *S. aureus*.

Kolejnym czynnikiem wpływającym na ilość powstającego biofilmu było wzbogacenie solanki w związki organiczne. W temperaturze 22°C więcej biofilmu *Staphylococcus aureus* wytwarzał w solankach czystych (ryc. 24). Natomiast w temperaturze 37°C szczep ten zdecydowanie więcej biofilmu wytwarzał w solankach wzbogaconych wyściągą drożdżowym. Zgodnie z testem t-Studenta dla prób zależnych różnice te były istotne statystycznie ( $p < 0,0001$ ).



Ryc. 24. Wpływ obecności substancji organicznych na wytwarzanie biofilmu przez *Staphylococcus aureus* w solankach ciechocińskich

Szczep *Pseudomonas aeruginosa* w solankach suplementowanych substancjami organicznymi statystycznie istotnie ( $p < 0,05$ ) więcej biofilmu wytwarzał tylko w temperaturze 37°C (ryc. 25).

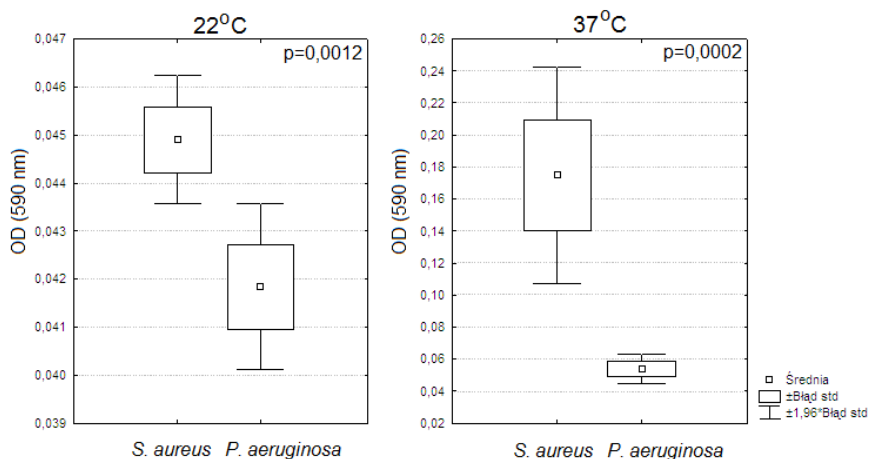


Ryc. 25. Wpływ obecności substancji organicznych na wytwarzanie biofilmu przez *Pseudomonas aeruginosa* w solankach ciechocińskich

Do rozwoju biofilmu wymagana jest obecność wszystkich biogennów, przede wszystkim azotu, fosforu czy węgla organicznego, a wzrost ich zawartości jest równoznaczny z szybszym i intensywniejszym przyrostem biomasy (Świdarska-Bróż 2010). Jak podaje Kołwzan (2011), od składu ilościowego i jakościowego dostarczanych substancji odżywczych zależy ilość wytwarzanego polimeru EPS. Lim i wsp. (2004) wykazali, że wzrost stężenia glukozy do 2,7% w analizowanym środowisku powoduje zwiększenie biomasy utworzonego przez bakterie biofilmu. Wpływ stymulującego działania substancji organicznych na intensywność tworzenia biofilmu potwierdzają także badania innych autorów (Castellanos i wsp. 2000; Marić, Vranes 2007; Singh i wsp. 2006; Gomez-Suares i wsp. 2010; Pan i wsp. 2010).

Interesujące są wyniki uzyskane dla *S. aureus*. W temperaturze 37°C szczep ten lepiej tworzył biofilm w środowisku bogatym w substancje organiczne. Badania Stepanovicia i wsp. (2007) potwierdzają, że tworzenie biofilmu przez gronkowce jest ogólnie zwiększone podczas inkubacji bakterii w bulionie, który zapewnia optymalne warunki tworzenia biofilmu. Z drugiej jednak strony w temperaturze 22°C większe wytwarzanie biofilmu stwierdzono w solankach czystych. Jak podają Myszką i wsp. (2005), dostępność składników odżywczych w środowisku

sku wpływa na adhezję mikroorganizmów do powierzchni. W badaniach przeprowadzonych na drobnoustrojach występujących naturalnie w środowisku wodnym (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter cloacae* i *Enterococcus faecalis*) autorzy ci wykazali wyraźną adhezję bakterii do badanych powierzchni oraz tworzenie mikrokolonii w środowiskach o ograniczonej dostępności substancji pokarmowych.



Ryc. 26. Porównanie intensywności tworzenia biofilmu przez szczepy *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa*

W obu badanych temperaturach inkubacji *Staphylococcus aureus* wytwarzał biofilm intensywniej niż *P. aeruginosa* (ryc. 26), a test t-Studenta dla prób zależnych wykazał, że różnice te były istotne statystycznie ( $p < 0,01$  w temperaturze 22°C,  $p < 0,0001$  w temperaturze 37°C).

*Pseudomonas aeruginosa* jest modelowym mikroorganizmem do przeprowadzania badań nad biofilmem. Najczęściej zarówno szczepy *Pseudomonas* bytujące w środowisku naturalnym, jak i wywołujące choroby występują w postaci biofilmu (Mann, Woźniak 2012). Mniejsza, w porównaniu z *S. aureus*, ilość biofilmu, którą stwierdzono w eksperymentach z *P. aeruginosa*, może być tłumaczona faktem, że wytwarza on biofilm ograniczony do granicy faz powietrze–ciecz (Bendouah i wsp. 2006). Gronkowiec złocisty wykazuje zdolność do tworzenia biofilmu

na powierzchniach zanurzonych, a produkcja biofilmu jest rozłożona równomiernie na całej powierzchni studzienki (w całej głębokości) płytki titracyjnej (Bendouah i wsp. 2006). Ponadto gronkowiec złocisty jest oporny na wysokie stężenia NaCl, dzięki wytworzeniu mechanizmów oporności na działanie soli różnych pierwiastków (Obłąk, Gamian 2010), co umożliwiało obfitsze tworzenie biofilmu w solankach ciechocińskich.

Istotną rolę podczas tworzenia biofilmu odgrywa rodzaj podłoża (Götz 2002; Kokare i wsp. 2009). Wzrost porowatości powierzchni materiału wiąże się bezpośrednio ze zwiększoną adhezją komórek mikroorganizmów (Sawhney, Berry 2009; Flint i wsp. 2000). W związku z tym przeprowadzono analizę tworzenia biofilmu na powierzchni gałązek tarniny stanowiących wypełnienie konstrukcji tężni. Powierzchnia gałązek jest bardziej porowata niż powierzchnia płytek titracyjnych, więc powinna stanowić lepsze podłoże do powstawania biofilmu. Analiza tworzenia biofilmu na powierzchni gałązek tarniny nie potwierdziła jednak powyższych założeń.

W trakcie eksperymentu obserwowano intensywne uwalnianie się garbników z gałązek tarniny podczas inkubacji w solankach (tab. 32, ryc. 27). Stężenie uwolnionych tanin było silnie ujemnie skorelowane ze stężeniem NaCl w solankach ( $r = -0,98$ ,  $p < 0,05$ ). Zarówno w środowisku czystym, jak i wzbogaconym w substancje organiczne nie zaobserwowano tworzenia biofilmu przez badane szczepy (*S. aureus* i *P. aeruginosa*) na powierzchni gałązek tarniny.

Śliwa tarnina (*Prunus spinosa*) od dawna stosowana jest jako roślina lecznicza (Tagarelli i wsp. 2010). Jej działanie lecznicze jest wynikiem obecności w liściach, korze oraz owocach niskocząsteczkowych związków o charakterze fenolowym, tzw. garbników roślinnych. Fizjologiczna rola garbników nie jest do końca poznana, ale wiadomo, że pełnią one funkcję antyseptyków chroniących roślinę przed grzybami i owadami (Veličković i wsp. 2014; Radovanović i wsp. 2013). W tkankach *P. spinosa* stwierdzono obecność m.in. kumaryny, flawonoidów, izoprenoidowych glikozydów, proantocyjanidyn, długołańcuchowych estrów kwasów tłuszczowych i terpenoidów. Jednocześnie stwierdzono, że ekstrakty z tkanek tarniny wykazywały aktywność bakteriobójczą przeciwko bakteriom Gram-dodatnim (*Lactobacillus plantarum*, *Sta-*

*phylococcus aureus*) oraz Gram-ujemnym (*Citrobacter freundii*, *Salmonella spp.*) (Kumarasamy i wsp. 2004; Gündüz 2013).

Tabela 30. Stężenie tanin uwolnionych z gałązek tarniny

Źródło solanki	Stężenie uwolnionych tanin [mg·cm <sup>-3</sup> ]
Ujęcie nr 11	0,157
Tężnia 1	0,160
Tężnia 2	0,094
Tężnia 3	0,133



Ryc. 27. Uwalnianie tanin z gałązek tarniny

Podczas przeprowadzonych badań związki fenolowe (taniny) były uwalniane ze struktury kory do analizowanej solanki. W konsekwencji spowodowało to ograniczony rozwój szczepów *S. aureus* i *P. aeruginosa* oraz zahamowanie procesu tworzenia biofilmu.

#### 5.7.1. Aktywność hydrolityczna biofilmu

Metoda barwienia biofilmu fioletem krystalicznym, zastosowana do otrzymania wyników opisanych powyżej, jest powszechnie stosowana do ilościowego badania biofilmów utworzonych przez szeroki zakres drobnoustrojów (Stepanović i wsp. 2000; Stepanović i wsp. 2007). Jed-

nak test ten nie daje powtarzalnych wyników, szczególnie dla szczepu *P. aeruginosa* (Peeters i wsp. 2008). Jednocześnie metoda ta słabo nadaje się do oceny żywotności komórek biofilmu, ponieważ fiolet krystaliczny wybarwia zarówno komórki (żywe i martwe), jak również matrycę biofilmu. W związku z tym test ten ma ograniczone zastosowanie w badaniach wrażliwości biofilmu na czynniki środowiskowe czy środki dezynfekujące (Pitts i wsp. 2003; Peeters i wsp. 2008).

Alternatywą, umożliwiającą ocenę żywotności i aktywności komórek biofilmu, jest metoda z zastosowaniem dwuocianu fluoresceiny (FDA). Metoda ta jest prosta, szybka, a powtarzalność wyników jest wysoka, w związku z czym metoda doskonale sprawdza się w kwantyfikacji biofilmu (Honraet i wsp. 2005; Prieto i wsp. 2004; Peeters i wsp. 2008).

Biofilm wytworzony przez *Staphylococcus aureus* podczas inkubacji w 22°C nie wykazywał aktywności hydrolitycznej lub była ona bardzo mała. Aktywności biofilmów powstałych w 37°C były znacznie wyższe (tab. 31). Najwyższe stężenia uwolnionej fluoresceiny stwierdzono dla biofilmów, które powstały w solance pochodzącej z Ujęcia nr 11 zasilającego fontannę „Grzyb” (5% NaCl). Wraz ze wzrostem stężenia solanki aktywność enzymatyczna biofilmu spadała.

Tabela 31. Aktywność hydrolityczna biofilmu wytworzonego przez *S. aureus* w solankach ciechocińskich

Temperatura inkubacji	Pochodzenie i stężenie solanki [%NaCl]		Czas inkubacji			
			24 h		48 h	
			S	S + SO	S	S + SO
22°C	Ujęcie nr 11	5	0,001*	nb	0,014	nb
	Tężnia 1	9	0	nb	0,001	nb
	Tężnia 2	27	0	nb	nb	nb
	Tężnia 3	16	0	nb	0	nb
37°C	Ujęcie nr 11	5	0	0,695	nb	0,547
	Tężnia 1	9	0,002	0,596	0,002	0,330
	Tężnia 2	27	nb	nb	nb	nb
	Tężnia 3	16	nb	0,343	nb	0,216

\* – stężenie uwolnionej fluoresceiny [ $\mu\text{g cm}^{-3}$ ], nb – nie badano ze względu na brak tworzenia biofilmu we wcześniejszych eksperymentach, S – solanka czysta, S + SO – solanka wzbogacona w substancje organiczne (wyciąg drożdżowy o końcowym stężeniu 0,25%)

Aktywność hydrolityczna biofilmu wytworzonego przez *P. aeruginosa* inkubowanego w 22°C również była niewielka (tab. 32). Tylko dla biofilmu wytworzonego w solance z Tężni 1 podczas inkubacji przez 2 doby odnotowano wynik 0,388  $\mu\text{g}$  uwolnionej fluoresceiny- $\text{cm}^{-3}$ , świadczący o wyższej aktywności hydrolitycznej. Po inkubacji *P. aeruginosa* w 37°C aktywność hydrolityczna wytworzonego biofilmu była wyższa niż w 22°C. Największą aktywność zanotowano dla biofilmu, który powstał w solance z Tężni 1 wzbogaconej w substancje organiczne po 2 dobach inkubacji. Ilość uwolnionej fluoresceiny równa 1,084  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$  była prawie 3-krotnie wyższa niż w 22°C w tej samej solance (0,388  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ ).

Tabela 32. Aktywność hydrolityczna biofilmu wytworzonego przez *P. aeruginosa* w solankach ciechocińskich

Temperatura inkubacji	Pochodzenie i stężenie solanki [%NaCl]		Czas inkubacji			
			24 h		48 h	
			S	S + SO	S	S + SO
22°C	Ujęcie nr 11	5	0,021*	nb	0,002	nb
	Tężnia 1	9	0,014	nb	0,004	0,388
	Tężnia 2	27	nb	nb	nb	nb
	Tężnia 3	16	nb	nb	nb	nb
37°C	Ujęcie nr 11	5	nb	0,172	0,011	nb
	Tężnia 1	9	nb	0,486	0,021	1,084
	Tężnia 2	27	nb	nb	nb	nb
	Tężnia 3	16	nb	nb	nb	nb

\* – stężenie uwolnionej fluoresceiny [ $\mu\text{g cm}^{-3}$ ], nb – nie badano ze względu na brak tworzenia biofilmu we wcześniejszych eksperymentach, S – solanka czysta, S + SO – solanka wzbogacona w substancje organiczne (wyciąg drożdżowy o końcowym stężeniu 0,25%)

W wyniku przeprowadzenia testu t-Studenta nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy ( $p > 0,05$ ) aktywności biofilmów tworzonych przez *S. aureus* i *P. aeruginosa*. Natomiast dla obu badanych szczepów stwierdzono statystycznie istotną korelację ( $p > 0,05$ ) pomiędzy ilością wytworzonego biofilmu a jego aktywnością hydrolityczną ze współczynnikami korelacji  $r = 0,57$  dla *S. aureus* i  $r = 0,94$  dla *P. aeruginosa*.

Ocena aktywności hydrolitycznej z zastosowaniem FDA wykazała obecność biofilmu aktywnego metabolicznie głównie w próbkach

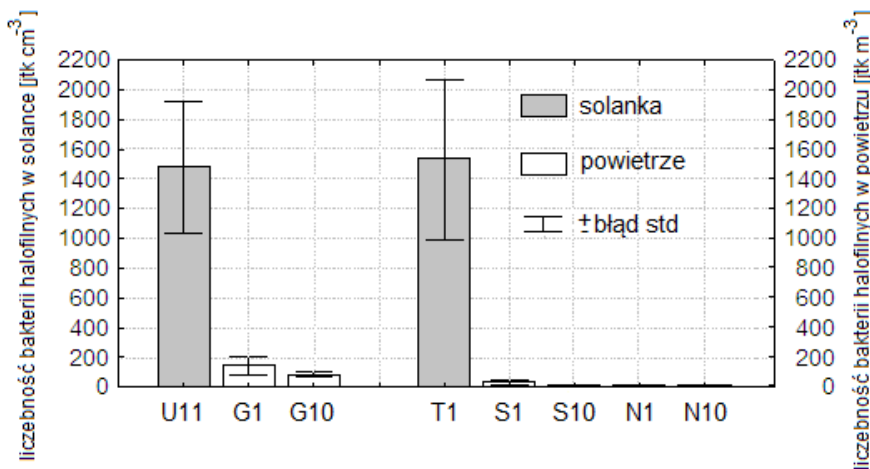
o najniższym stężeniu soli (<9% NaCl). Najwyższą aktywność hydrolaz biofilmu notowano w solankach zawierających dodatkową pulę składników odżywczych (wyciąg drożdżowy). Oznacza to, że w pozostałych układach doświadczalnych, nawet jeśli biofilm powstawał, warunki środowiskowe były na tyle niekorzystne (szczególnie stężenie NaCl), że uniemożliwiały aktywne funkcjonowanie komórek bakteryjnych nawet w postaci biofilmu.

#### 5.8. Analiza wpływu aerozolu solankowego na mikrobiologiczne zanieczyszczenia powietrza w otoczeniu otwartych inhalatorów

Otwarte inhalatoria oraz ich otoczenie są bardzo specyficznym środowiskiem, w którym działają dwa przeciwstawne mechanizmy decydujące o obecności mikroorganizmów w powietrzu. Solanki rozprowadzane na tężniach oraz wykorzystywane w fontannie „Grzyb” nie są wolne od zanieczyszczeń mikrobiologicznych i zawsze zawierają pewną ilość mikroorganizmów. Również poszczególne etapy procesu zatężania solanki – transport rurami ze źródła do tężni, rozprowadzanie solanki drewnianymi korytkami po konstrukcji inhalatorium, a także spływ solanki po gałązkach tarniny – mogą powodować wprowadzanie dodatkowych mikroorganizmów do solanki. W związku z tym aerozol solankowy rozpylany wokół inhalatorów może wprowadzać pewną ilość mikroorganizmów do powietrza w strefie oddziaływania inhalatorów. Jednocześnie opadające krople aerozolu solankowego w sposób mechaniczny oczyszczają powietrze z wszelkich zanieczyszczeń, w tym z drobnoustrojów. Dodatkowo zarówno NaCl, jak i inne składniki mineralne obecne w solankach mogą przyczyniać się do eliminacji drobnoustrojów.

W związku z powyższym, jako podsumowanie badań opisanych w niniejszej pracy, podjęto próbę oceny, czy otwarte inhalatoria stanowią czynnik eliminujący, czy raczej wprowadzający mikroorganizmy do powietrza w strefie okołotężniowej. Jako „mikroorganizmy modelowe”, świadczące o wprowadzaniu do powietrza drobnoustrojów wraz z aerozolem solankowym, wybrano bakterie halofilne, występujące w solankach i nieobecne w innych środowiskach.

Badania przeprowadzone w otoczeniu najczęściej odwiedzanych przez kuracjuszy inhalatoriów (fontanna „Grzyb” i Tężnia 1) wykazały, że bakterie halofilne są obecne zarówno w solankach, jak i w powietrzu w otoczeniu badanych obiektów (ryc. 28). Średnia liczebność bakterii halofilnych, mimo odmiennego stężenia NaCl, nie różniła się istotnie w badanych w solankach i wynosiła około  $1,5 \cdot 10^3$  jtk $\cdot$ cm $^{-3}$ .



Ryc. 28. Liczebność bakterii halofilnych w solankach i w powietrzu w otoczeniu otwartych inhalatoriów

U11 - solanka pochodząca z Ujęcia nr 11, T1 - solanka pochodząca z Tężni 1; G1, G10, S1, S10, N1, N10 - próbki powietrza pobrane w otoczeniu otwartych inhalatoriów na stanowiskach zgodnie z opisem w rozdziale 4.2.1.

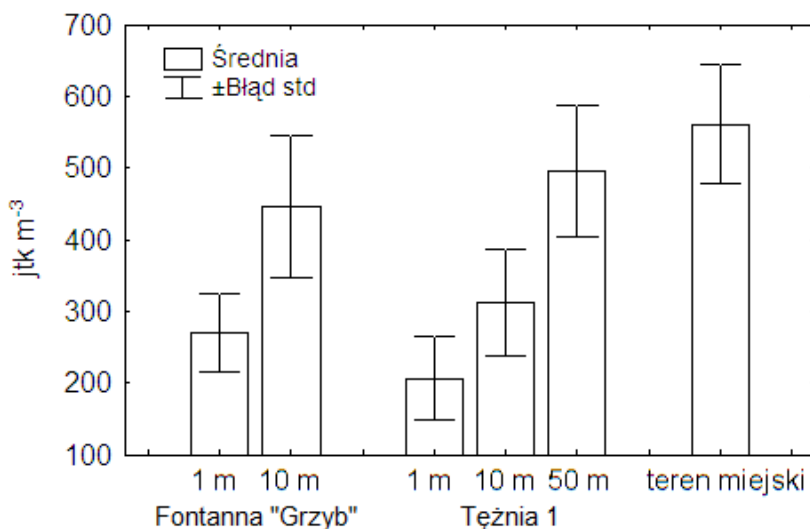
Drobnoustroje halofilne są znajdowane we wszystkich środowiskach słonych (Oren 2006), a w solankach wykorzystywanych do celów balneologicznych i rekreacyjnych notowano ogólną liczebność bakterii w zakresie  $10^3$ – $10^8$  komórek $\cdot$ cm $^{-3}$  (Walczak, Krawiec 2014; Walczak i wsp. 2016).

Drobnoustroje halofilne stanowiły również składnik bioaerozoli w powietrzu w bezpośrednim otoczeniu otwartych inhalatoriów. Jednak tylko w najbliższym sąsiedztwie fontanny „Grzyb” (w odległości 1 m) stwierdzono statystycznie istotną korelację ( $r = 0,49$ ,  $p < 0,05$ ) pomiędzy liczebnością bakterii halofilnych w solance i w powietrzu. Po przeprowadzeniu analizy wariancji (ANOVA) w otoczeniu Tężni 1

nie stwierdzono istotnie statystycznej różnicy ( $p > 0,05$ ) w liczebności bakterii halofilnych w powietrzu pomiędzy stanowiskami badawczymi zlokalizowanymi po stronie ze spływającą solanką (S1 i S10) i po „suchej” stronie tężni (stanowiska N1 i N10). Także odległość od tężni nie wpływała istotnie ( $p > 0,05$ ) na liczebność halofili notowanych w powietrzu. W związku z powyższym można stwierdzić, że solanki emitowane przez otwarte inhalatoria nie stanowią istotnego źródła mikroorganizmów emitowanych do powietrza uzdrowska, ale z pewnością emisja taka zachodzi, bo specyficzne dla solanek bakterie halofilne są w otoczeniu inhalatoriów obecne również w powietrzu.

Jednocześnie, jak opisano wcześniej, średnie liczebności wszystkich grup bakterii w otoczeniu otwartych inhalatoriów były niższe niż w strefie miejskiej czy też uzdrowskiej. W związku z tym podjęto próbę oceny, w jakiej odległości od otwartego inhalatorium zaznacza się wpływ aerozolu solankowego na liczebność bakterii w powietrzu. W celu dokonania oceny wpływu odległości od inhalatoriów na liczebność bakterii w powietrzu wykorzystano wyniki liczebności bakterii mezofilnych uzyskane na dodatkowych stanowiskach (S1, N1, S10, N10) zlokalizowanych w odległości 1 m, 10 m od Tężni 1 oraz na stanowisku CU3, znajdującym się 50 m od tego inhalatorium. W otoczeniu fontanny „Grzyb”, znajdującej się w centrum Ciechocinka, możliwe było wykorzystanie do analiz wyników tylko z dwóch stanowisk G1 i G10 – w odległości 1 m i 10 m, ponieważ w odległości 50 m to inhalatorium otoczone jest przez tereny typowo miejskie.

Zarówno w sąsiedztwie fontanny „Grzyb”, jak i Tężni 1 w miarę oddalania się od inhalatorium obserwowano wzrost liczebności bakterii (ryc. 29). W otoczeniu fontanny „Grzyb” tylko na stanowisku zlokalizowanym bezpośrednio (w odległości 1 m) przy inhalatorium stwierdzono istotnie niższe liczebności bakterii niż na terenach miejskich (tab. 31). Natomiast wokół Tężni 1 strefa istotnego wpływu inhalatorium na stężenie bioaerozolu wynosiła co najmniej 10 m. Na stanowisku zlokalizowanym w odległości 50 m mikrobiologiczne zanieczyszczenie powietrza nie różniło się istotnie ( $p > 0,05$ ) od stanowisk zlokalizowanych na terenach miejskich (tab. 33).



Rycina 29. Wpływ odległości od inhalatorów na liczebność bakterii mezofilnych w powietrzu w Ciechocinku

1 m, 10 m, 50 m – odległość stanowisk od inhalatorium

Tabela 33. Wyniki jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA sprawdzającej wpływ odległości stanowiska badawczego od inhalatorium na liczebność bakterii mezofilnych w powietrzu w Ciechocinku

Inhalatorium	F	p	Grupy jednorodne w teście Tukeya (HSD)
Fontanna „Grzyb”	3,32	0,0420	[1 m, 10 m] [10 m, M]
Tężnia 1	3,90	0,0113	[1 m,10 m] [50 m, M]

1 m, 10 m, 50 m – odległość stanowisk od inhalatorium, M – tereny miejskie, F – stosunek wariancji międzygrupowej do wariancji wewnątrzgrupowej, p – poziom istotności

Ponikowska i Marciniak (1988) podają, że bakteriobójcze działanie składników aerozolu tężniowego przejawia się głównie w bezpośrednim sąsiedztwie tężni. Na przykład zawartość w powietrzu jonów jodu, który może przyczyniać się do eliminacji drobnoustrojów w strefie okołotężniowej, jest ponad 3-krotnie mniejsza w odległości 150 m niż 15 m od tężni.

Warto podkreślić, że tereny wokół otwartych inhalatoriów to najczęściej odwiedzane przez kuracjuszy i turystów rejonu Ciechocinka.

Badania, prowadzone co prawda w odmiennych warunkach – w komorach kopalnianych wykorzystywanych do subterraneoterapii oraz w zamkniętych pomieszczeniach sanatoryjnych, wykazały, że właśnie obecność kuracjuszy znacząco wpływa na zwiększenie mikrobiologicznego zanieczyszczenia powietrza, a w skład bioaerozolu wchodzi głównie drobnoustroje biomu ludzkiego (Frączek, Górny 2011; Frączek i wsp. 2013). Mimo intensywnego ruchu turystycznego i obecności licznych osób stanowiących źródło bioaerozoli, jak wskazują wyniki badań opisanych we wcześniejszych rozdziałach, w otoczeniu otwartych inhalatoriów Ciechocinka powietrze zawiera istotnie mniej drobnoustrojów niż w pozostałych rejonach miasta. Potwierdza to istotną rolę aerozolu solankowego w eliminacji mikrobiologicznych zanieczyszczeń powietrza.



## Podsumowanie i wnioski

Zanieczyszczenia powietrza wywierają niewątpliwie ogromny wpływ na zdrowie osób korzystających z lecznictwa uzdrowiskowego, szczególnie z powodu przewlekłych chorób układu oddechowego. Niestety badania monitoringowe powietrza w uzdrowiskach zwykle nie uwzględniają zanieczyszczeń mikrobiologicznych.

W ostatnich latach budowanie otwartych inhalatoriów stało się popularnym sposobem na przyciągnięcie turystów i uatrakcyjnienie miejscowości uzdrowiskowych. Tężnie solankowe mogą być nie tylko atrakcją turystyczną, ale i ważnym obiektem leczniczym. Jednak brak doniesień literaturowych na temat ich funkcjonowania i oddziaływania tężni, szczególnie w kontekście mikrobiologii środowiskowej oraz zdrowia publicznego. Oddziaływanie otwartych inhalatoriów na otoczenie nie jest jednoznaczne – aerozol tężniowy może powodować obniżenie liczebności drobnoustrojów w powietrzu ze względu na mechaniczne oczyszczanie powietrza przez krople solanki, ale też może stanowić dodatkowe źródło zanieczyszczeń wprowadzanych do powietrza atmosferycznego.

Przedstawiona praca zawiera pierwszą długoterminową ocenę mikrobiologicznego zanieczyszczenia powietrza na terenie uzdrowisk Ciechocinek i Inowrocław ze szczególnym uwzględnieniem otoczenia naturalnych inhalatoriów. Podjęto próbę odpowiedzi na pytanie, czy otwarte inhalatoria stanowią element środowiska eliminujący, czy raczej wprowadzający mikroorganizmy do powietrza. Sprawdzono również, czy w określonych warunkach środowiskowych istnieje możliwość

zasiedlania solanek przez mikroorganizmy potencjalnie patogenne, co mogłoby powodować zagrożenie dla zdrowia kuracjuszy i turystów.

Na podstawie badań zaprezentowanych w niniejszej pracy można wyciągnąć następujące wnioski:

1. Aeroszol solankowy emitowany przez otwarte inhalatoria ma pozytywny wpływ na mikrobiologiczną jakość powietrza – na terenach objętych jego oddziaływaniem liczebność drobnoustrojów w powietrzu jest niższa niż na pozostałych terenach (rekreacyjnych i typowo miejskich) uzdrowisk Ciechocinek i Inowrocław. W konsekwencji powietrze na terenach otaczających otwarte inhalatoria można uznać za czyste pod względem mikrobiologicznym. W związku z tym budowanie otwartych inhalatoriów solankowych można uznać za skuteczny sposób poprawy jakości powietrza w uzdrowiskach.
2. Ze względu na specyficzny mikroklimat i mikrobiologiczną jakość powietrza Ciechocinek i Inowrocław mogą doskonale pełnić funkcję uzdrowisk, w których leczone są choroby górnych dróg oddechowych.
3. Na liczebność drobnoustrojów w powietrzu wpływ ma przede wszystkim lokalizacja stanowiska badawczego. Obserwowano również sezonową zmienność liczebności drobnoustrojów, a najbardziej istotnym parametrem mikroklimatycznym wpływającym na liczebność drobnoustrojów w powietrzu jest temperatura. Oznacza to, że w celu dokonywania obiektywnej oceny mikrobiologicznej jakości powietrza w uzdrowiskach należy przeprowadzać badania długoterminowe, a stanowiska badawcze powinny obejmować swoim zasięgiem całą miejscowość uzdrowską.
4. W powietrzu uzdrowiska Ciechocinek dominują bakterie powszechnie występujące jako składniki bioaerozoli i jedynie sporadycznie pojawiają się gatunki potencjalnie chorobotwórcze. Ważnym składnikiem bioaerozolu w Ciechocinku są alergogenne pleśnie z rodzaju *Cladosporium*, jednak ich liczebność nie przekracza stężeń progowych, odpowiedzialnych za wystąpienie objawów alergii u osób uczulonych. W związku z tym wy-

niki analizy jakościowej bioaerozoli bakteryjnych i grzybowych potwierdzają mikrobiologiczną czystość powietrza w Ciechocinku.

5. Solanki emitowane przez otwarte inhalatoria nie stanowią istotnego źródła mikroorganizmów emitowanych do powietrza uzdrowiska, a obecne w nich drobnoustroje to niepatogenne mikroorganizmy związane ze środowiskami słonymi.
6. W solankach tężniowych z Ciechocinka rozwój bakterii potencjalnie patogennych (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*) jest możliwy, jednak przeżywalność wszystkich szczepów maleje wraz ze wzrostem zasolenia próby. Jednocześnie obecność w solankach zanieczyszczeń organicznych wydłuża czas przeżycia bakterii potencjalnie patogennych oraz zwiększa ich namnażanie. Oznacza to, że wprowadzenie zanieczyszczeń organicznych podczas eksploatacji i zabiegów technicznych dokonywanych na tężniach może stymulować rozwój drobnoustrojów obecnych w solankach. W związku z tym należy zapobiegać dostawaniu się zanieczyszczeń (szczególnie organicznych) do solanki, a wody solankowe powinny być poddawane stałej kontroli mikrobiologicznej.
7. Przeprowadzone badania w zasadzie wykluczyły możliwość tworzenia biofilmu bakteryjnego przez badane patogeny układu oddechowego (*S. aureus* i *P. aeruginosa*) w warunkach naturalnych dla otwartych inhalatoriów, czyli solankach czystych na gałązkach tarniny. Wybór tarniny jako materiału wypełniającego tężnie jest słuszny nie tylko ze względów techniczno-konstrukcyjnych. Obecność garbników wyklucza możliwość formowania się biofilmu, co sprawia, że otoczenie tężni jest bezpieczne dla kuracjuszy i turystów.



## Literatura

- Abdallah M.B., Karray F., Mhiri N., Mei N., Quéméneur M., Cayol J.-L. i wsp. (2016) *Prokaryotic diversity in a Tunisian hypersaline lake, Chott El Jerid*. Extremophiles, DOI 10.1007/s00792-015-0805-7.
- Abdel Hameed A.A., Koder M.I., Yuosra S., Osman A.M., Ghanem S. (2009) *Diurnal distribution of airborne bacteria and fungi in the atmosphere of Helwan area, Egypt*. Sc. Tot. Environ., 407: 6217–6222.
- Adam G., Duncan H. (2001) *Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils*. Soil Biol. Biochem., 33: 943–951.
- Aira M., Jato V., Stchigel A., Rodríguez-Rajo F., Piontelli E. (2007) *Aeromycological study in the Cathedral of Santiago de Compostela (Spain)*. Int. Biodeterior. Biodegrad., 60: 231–237.
- Albuquerque L., da Costa M.S. (2014) *The Family Idiomarinaceae*. [w:] The Prokaryotes (E. Rosenberg, E.F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, F. Thomson, red.), Springer-Verlag, Berlin–Heidelberg.
- Amato P. (2006) *Les communautés microbiennes de l'eau des nuages: implication dans la chimie atmosphérique*. PhD thesis No. D.U. 1712, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand.
- Amato P., Demeer F., Melaouhi A., Fontanella S., Martin-Biesse A., Sancelme M. i wsp. (2007a) *A fate for organic acids, formaldehyde and methanol in cloud water: their biotransformation by microorganisms*. Atmosphere. Chem. Phys., 7: 4159–4169.
- Amato P., Hennebelle R., Magand O., Sancelme M., Delort A.M., Barbante C. i wsp. (2007b) *Bacterial characterization of the snow cover at Spitzberg, Svalbard*. FEMS Microbiol. Ecol., 59: 255–264.

- Amato P., Parazols M., Sancelme M., Laj P., Mailhot G., Delort, A.-M. (2007c) *Microorganisms isolated from the water phase of tropospheric clouds at the puy de Dôme: major groups and growth abilities at low temperatures*. FEMS Microbiol. Ecol., 59: 242–254.
- Amato P., Joly M., Schaupp C., Attard E., Möhler O., Morris C.E. i wsp. (2015) *Survival and ice nucleation activity of bacteria as aerosols in a cloud simulation chamber*. Atmos. Chem. Phys. Discuss., 15: 4055–4082.
- Anton J., Rossello-Mora R., Rodriguez-Valera F., Amann R. (2000) *Extremely Halophilic Bacteria in Crystallizer Ponds from Solar Salterns*. Appl. Environ. Microbiol., 62: 316–322.
- Asperger H., Zangerl P. (2002) *Staphylococcus aureus*. W: Rogiński H., Fuquay J., Fox P., (red.) *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Academic Press, Amsterdam. atlas.kujawsko-pomorskie.pl
- Augustyńska D., Pośniak M. (red.) (2014) *Czynniki szkodliwe w środowisku pracy: wartości dopuszczalne 2014*. Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy, Warszawa.
- Baati H., Guermazi S., Amdouni R., Gharsallah N., Sghir A., Ammar E. (2008) *Prokaryotic diversity of a Tunisian multipond solar saltern*. Extremophiles, 12: 505–518.
- Baczyk-Łopuch O., Loster B. (2010) *Adhezja bakterii z rodzaju streptococcus mutans do zamków ortodontycznych oraz ryzyko demineralizacji szkliwa u pacjentów leczonych stałymi aparatami cienkołukowymi*, Por. Stomatolog. X: 88–91.
- Barabasz W., Jaśłowska M., Kultys H., Flak K. (2001) *Składowiska odpadów a bioróżnorodność mikroorganizmów w powietrzu atmosferycznym aglomeracji krakowskiej*. W: Kotarba M.J. (red.) *Przemiany Środowiska Naturalnego a Ekorozwój*, Wyd. Geosfera TBPŚ, Kraków.
- Baranowska K., Rodziewicz A. (2008) *Molekularne interakcje w biofilmach bakteryjnych*. Kosmos: Probl. Nauk Biol., 57: 29–38.
- Barberán A., Ladau J., Leff J.W., Pollard K.S., Menninger H.L., Dunn R.R. i wsp. (2015) *Continental-scale distributions of dust-associated bacteria and fungi*. PNAS, 112: 5756–5761.
- Bartosz G. (2008) *Druga twarz tlenu: wolne rodniki w przyrodzie*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Bauer H., Schueller E., Weinke G., Berger A., Hitznerberger R., Marr I.L. i wsp.

- (2008) *Significant contributions of fungal spores to the organic carbon and to the aerosol mass balance of the urban atmospheric aerosol*. Atmos. Environ., 42: 5542–5549.
- Bednarczuk B., Kawalec M., Mizerski W. (2008) *Słownik bakterii*. Wydawnictwo Adamantan, Warszawa.
- Bendouah Z., Barbeau J., Hamad W., Desrosiers M. (2006) *Biofilm formation by Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa is associated with an unfavorable evolution after surgery for chronic sinusitis and nasal polyposis*. Otolaryngology-Head and Neck Surgery, 134: 991–996.
- Beuchat L.R., Komitopoulou E., Beckers H., Betts R.P., Bourdichon F., Fanning S. i wsp. (2013) *Low-Water Activity Foods: Increased Concern as Vehicles of Foodborne Pathogens*. J. Food Protect., 76: 150–172.
- Beyer A., Burow K., Büchel G., Kothe E. (2015a) *Bacterial communities in salt marine evaporate rocks and pristine Zechstein aquifers*. Geomicrobiol. J., DOI:10.1080/01490451.2015.1099764.
- Beyer A., Rzanny M., Weist A., Möller S., Burow K., Gutmann F. i wsp. (2015b) *Aquifer community structure in dependence of lithostratigraphy in groundwater reservoirs*. Environ. Sci. Pollut. Res., 22: 19342–19351.
- Bis H., Grzyb J., Barabasz W., Frączek K. (2004) *Kształtowanie się liczebności grzybów – Micromycetes w komorach sanatoryjnych kopalni soli w Bochni i Wieliczce*. Acta Agr. Silv. XLII: 29–39.
- Bogacki M., Dworak Z., Mazur M. (1992) *Stan jakości powietrza w Uzdrowisku Busko-Solec*. Aura, 12: 12–14.
- Borowicz A., Błażejewska B., Plackowski R., Tyczka S. (1967) *Badania nad zawartością aerozolu w powietrzu w strefie okołotężniowej w Ciechocinku*. Otolar. Pol. XXI: 766–780.
- Borowicz A., Jastrzębska B., Tyczka S. (1969) *Badania porównawcze koncentracji aerozolu na Wybrzeżu Bałtyku i w strefie okołotężniowej w Ciechocinku*. Bal. Pol. XIV: 79–83.
- Borsodi A.K., Felföldi T., Máthé I., Bognár V., Knáb M., Krett G. i wsp. (2013) *Phylogenetic diversity of bacterial and archaeal communities inhabiting the saline Lake Red located in Sovata, Romania*. Extremophiles, 17: 87–98.
- Bovallius A., Bucht B., Roffey R., Anas P. (1978) *Three-year investigation of the natural airborne bacterial flora at four localities in Sweden*. Appl. Environ. Microbiol., 35: 847–852.

- Bowers R.M., McCubbin I.B., Hallar A.G., Fierer N. (2012) *Seasonal variability in airborne bacterial communities at a high-elevation site*. Atmos. Environ., 50: 41–49.
- Brodie E.L., DeSantis T.Z., Moberg Parker J.P., Zubietta I.X., Piceno Y.M., Andersen G.L. (2007) *Urban aerosols harbor diverse and dynamic bacterial populations*. PANS, 104: 299–304.
- Bugajny A., Knopkiewicz M., Piotraszewska-Pająk A., Sekulska-Stryjakowska M., Stach A., Filipiak M. (2005) *On the Microbiological Quality of the Outdoor Air In Poznań, Poland*. Pol. J. of Environ. Stud. 14(3): 287–293.
- Burch A.Y., Zeisler V., Yokota K., Schreiber L., Lindow S.E. (2014) *The hygroscopic biosurfactant syringafactin produced by Pseudomonas syringae enhances fitness on leaf surfaces during fluctuating humidity*. Environ. Microbiol. 16: 2086–2098.
- Burkacka-Łaukajtys E., Zwolska K. (1973) *Badania środowiskowe w Ciechocinku – wpływ jodu aerosolu strefy okołoteżniowej na czystość bakteriologiczną powietrza*. Baln. Pol., 18: 337–342.
- Burkowska A., Donderski W. (2007) *Bacterial pollution of air in the health resort Ciechocinek*. Pol. J. Natur. Sc., 22: 633–644.
- Burkowska A., Donderski W. (2008a) *Airborne molds in the air of Ciechocinek spa*. Pol. J. Natur. Sc., 23: 790–800.
- Burkowska A., Donderski W. (2008b) *Drobnoustroje w powietrzu miejskich i uzdrowiskowych terenów Inowrocławia*. Ekol. Tech. XVI: 25–28.
- Burkowska A., Kalwasińska A., Walczak M. (2012) *Airborne mesophilic bacteria at the Ciechocinek health resort*. Pol. J. Environ. Stud., 21: 307–312.
- Burkowska-But A., Kalwasińska A., Swiontek Brzezinska M. (2014) *The role of open-air inhalatoria in the air quality improvement in spa towns*. Int. J. Occup. Med. Environ. Health, 27: 560–570.
- Burns D.G., Camakarlis H.M., Janssen P.H., Dyall-Smith M.L. (2004) *Combined use of cultivation-dependent and cultivation-independent methods indicates that members of most haloarchaeal groups in an Australian crystallizer pond are cultivable*. Appl. Environ. Microbiol., 70: 5258–5265.
- Burrows S.M., Butler T., Jockel P., Tost H., Kerkweg A., Pöschl U. i wsp. (2009a) *Bacteria in the global atmosphere – Part 2: Modeling of emissions and transport between different ecosystems*. Atmos. Chem. Phys. 9: 9281–9297.
- Burrows S.M., Elbert W., Lawrence M.G., Pöschl U. (2009b) *Bacteria in the*

- global atmosphere – Part 1: Review and synthesis of literature data for different ecosystems*. Atmos. Chem. Phys., 9: 9263–9280.
- Cabral J.P.S. (2010) *Can we use indoor fungi as bioindicators of indoor air quality? Historical perspectives and open questions*. Sci. Total Environ., 408: 4285–4295.
- Cao C., Jiang W., Wang B., Fang J., Lang J., Tian G. i wsp. (2014) *Inhalable microorganisms in Beijing's PM<sub>2.5</sub> and PM<sub>10</sub> pollutants during a severe smog event*. Environ. Sci. Tech., 48: 1499–1507.
- Casamayor E.O., Triad'o-Margarit X., Castañeda C. (2013) *Microbial biodiversity in saline shallow lakes of the Monegros Desert, Spain*. FEMS Microbiol. Ecol., 85: 503–518.
- Castellanos T., Ascencio F., Rossi M. (2000) *Starvation-induced changes in the cell surface of Azospirillum lipofeum*. FEMS Microbiol. Ecol., 33(1): 1–9.
- Caton T.M., Witte L.R., Ngyuen H.D., Buchheim J.A., Buchheim M.A., Schneegurt M.A. (2004) *Halotolerant aerobic heterotrophic bacteria from the Great Salt Plains of Oklahoma*. Microb. Ecol., 48: 449–462.
- Chaudhry Z., Ratnesar-Shumate S.A., Buckley T.J., Kalter J.M., Gilberry J.U., Eshbaugh J.P. i wsp. (2013) *Understanding water uptake in bioaerosols using laboratory measurements, field tests, and modeling*. [w:] Proc. SPIE 8710, Chemical, Biological, Radiological, Nuclear, and Explosives (CBRNE) Sensing XIV, 871017 (May 29, 2013).
- Chen R.Z., Craik S.A., Bolton J.R. (2009) *Comparison of the action spectra and relative DNA absorbance spectra of microorganisms: information important for the determination of germicidal fluence (UV dose) in an ultraviolet disinfection of water*. Water Res., 43: 5087–5096.
- Chmiel M.J., Frączek K., Grzyb J. (2015) *Problemy monitoringu mikrobiologicznych zanieczyszczeń powietrza*. Woda – Środowisko – Obszary Wiejskie, 49: 17–27.
- Clements M.O., Foster S.J. (1999) *Stress resistance in Staphylococcus aureus*. Trends Microbiol., 7: 458–462.
- Cramer R., Garbani M., Rhyner C., Huitema C. (2014) *Fungi: the neglected allergenic sources*. Allergy 69: 176–185.
- Crawford C., Reponen T., Lee T., Iossifova Y., Levin L., Adhikari A. i wsp. (2009) *Temporal and spatial variation of indoor and outdoor airborne fungal spores, pollen, and (1–3)-beta-d-glucan*. Aerobiol., 25: 147–158.

- Czaczyk K., Myszką K. (2007) *Mechanisms determining bacterial biofilm resistance to antimicrobial factors*. Biotechnol., 76: 40–52.
- Czajka K., Sziwa D., Drobnik M., Latour T. (2006) *Porównanie właściwości mikroklimatu i aerozoli w wyrobiskach kopalnianych i naziemnych grotach solnych*. Balneol. Pol., 3: 176–181.
- D'Amato G., Spieksma F.Th.M. (1995) *Aerobiologic and clinical aspects of mould allergy in Europe*. Allergy, 50: 870–877.
- Dalziel B.D., Pourbohloul B., Ellner S.P. (2013) *Human mobility patterns predict divergent epidemic dynamics among cities*. Proc. R. Soc. B., 280: 20130763.
- DasSarma S., DasSarma P. (2012) *Halophiles*. University of Maryland, Baltimore.
- Delort A.-M., Vařtilingom M., Amato P., Sancelme M., Parazols M., Mailhot G. i wsp. (2010) *A short overview of the microbial population in clouds: Potential roles in atmospheric chemistry and nucleation processes*. Atmos. Res., 98: 249–260.
- Després V., Huffman A.J., Burrows S.M., Hoose C., Safatov A.S., Buryak G. i wsp. (2012) *Primary biological aerosol particles in the atmosphere: a review*. Tellus B, 64, doi: 10.3402/tellusb.v64i0.15598.
- Després V.R., Nowojsky J.F., Klose M., Conrad R., Andreae M.O., Pöschl U. (2007) *Characterization of primary biogenic aerosol particles in urban, rural, and high-alpine air by DNA sequence and restriction fragment analysis of ribosomal RNA genes*. Biogeosci. 4: 1127–1141.
- Detkova E.N., Boltyanskaya Y.V. (2007) *Osmoadaptation of haloalkaliphilic bacteria: role of osmoregulators and their possible practical application*. Microbiol., 76: 581–593.
- Dojlido J., Dożańska W., Hermanowicz W., Koziarowski B., Zerbe J. (1999) *Fizyczno-chemiczne badanie wody i ścieków*. Wydawnictwo Arkady, Warszawa.
- Doleżał M., Doleżał M., Żuławą G. (1983) *Mikroflora komór podziemnych stacji badawczej subterraneoterapii w Wieliczce. Biozanieczyszczenia w budynkach a zdrowie*. Zeszyty Naukowe AWF w Krakowie, 35: 55–65.
- Domsch K.H., Gams W., Anderson T.H. (1993) *Compendium of soil fungi*. IHW-Verlag, Eching.
- Donderski W., Walczak M., Pietrzak M. (2005) *Microbiological contamination of air within the city Toruń*. Pol. J. Environ. Stud., 14: 223–230.

- Donlan R.M. (2002) *Biofilm: microbial life on surface*. Emerg. Infect. Dis., 8(9): 881–890.
- Durand K.T.H., Muilenberg M.L., Burge H.A., Seixas N.S. (2002) *Effect of sampling time on the culturability of airborne fungi and bacteria sampled by filtration*. Ann. Occup. Hyg., 46: 113–118.
- Dz.U. z 2005 r., Nr 167, poz. 1399. Ustawa z dnia 28 lipca 2005 r. o lecznictwie uzdrowiskowym, uzdrowiskach i obszarach ochrony uzdrowiskowej oraz gminach uzdrowiskowych.
- Dz.U. z 2006 r., Nr 80, poz. 565. Rozporządzenie ministra zdrowia z dnia 13 kwietnia 2006 r. w sprawie zakresu badań niezbędnych do ustalenia właściwości leczniczych naturalnych surowców leczniczych i właściwości leczniczych klimatu, kryteriów ich oceny oraz wzoru świadectwa potwierdzającego te właściwości.
- Dz.U. z 2007 r., Nr 61 poz. 417. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 29 marca 2007 r. w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi.
- Dz.U. z 2011 r., Nr 73, poz. 390. Ustawa z dnia 4 marca 2011 r. o zmianie ustawy o lecznictwie uzdrowiskowym, uzdrowiskach i obszarach ochrony uzdrowiskowej oraz o gminach uzdrowiskowych oraz niektórych innych ustaw.
- Eduard W., Heederik D., Duchaine C., Green B.J. (2012) *Bioaerosol exposure assessment in the workplace: the past, present and recent advances*. J. Environ. Monit., 14: 334–339.
- Ehrlich R., Miller S., Walker R.L. (1970) *Relationship Between Atmospheric Temperature and Survival of Airborne Bacteria*. Appl. Microbiol. 19: 245–249.
- Elbert W., Taylor P.E., Andreae M.O., Poschl U. (2007) *Contribution of fungi to primary biogenic aerosols in the atmosphere: wet and dry discharged spores, carbohydrates, and inorganic ions*. Atmos. Chem. Phys., 7: 4569–4588.
- Empadinhas N., da Costa M.S. (2008) *Osmoadaptation mechanisms in prokaryotes: distribution of compatible solutes*. Int. Microbiol., 11: 151–161. eng-sc.syr.edu.
- Fahlgren C., Bratbak G., Sandaa R.-A., Thyraug R., Zweifel U.L. (2011) *Diversity of airborne bacteria in samples collected using different devices for aerosol collection*. Aerobiologia 27: 107–120.

- Fahlgren C., Hagström A., Nilsson D., Zweifel U.L. (2010) *Annual variations in the diversity, viability, and origin of airborne bacteria*. Appl. Environ. Microbiol., 76: 3015–3025.
- Fang J., Chan O., Joeckel R.M., Huang Y., Wang Y., Bazylynski D.A. i wsp. (2006) *Biomarker analysis of microbial diversity in sediments of a saline groundwater seep of Salt Basin, Nebraska*. Org. Geochem. 37: 912–931.
- Fang Z.G., Ouyang Z.Y., Zheng H., Wang X.K., Hu L.F. (2007) *Culturable airborne bacteria in outdoor environments in Beijing, China*. Microb. Ecol., 54: 487–496.
- Fassatiova O. (1983) *Grzyby mikroskopowe w mikrobiologii technicznej*. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa.
- Fierer N., Liu Z.Z., Rodriguez-Hernandez M., Knight R., Henn M., Hernandez M.T. (2008) *Short-term temporal variability in airborne bacterial and fungal populations*. Appl. Environ. Microbiol., 74: 200–207.
- Filipiak M., Piotraszewska-Pająk A., Stryjakowska-Sekulska M., Stach A., Silyn W. (2004) *Mikroflora wokół i wewnątrz budynków dydaktycznych wyższej uczelni w Poznaniu*. Post. Dermatol. Alergol., XXI: 121–127.
- Fleming K., Klingenberg C., Cavanagh J.P., Sletteng M., Stensen W., Svendsen J.S. (2009) *High in vitro antimicrobial activity of synthetic antimicrobial peptidomimetics against staphylococcal biofilms*. J. Antimicrob. Chemother., 63: 136–145.
- Flemming H.C. (2009) *Why Microorganisms Live in Biofilms and the Problem of Biofouling*, W: *Marine and Industrial Biofouling*, Flemming H.-C., Sriyutha Murthy P., Venkatesan R., Cooksey K. (red.), Springer, Berlin–Heidelberg.
- Flint S.H., Brooks J.D., Bremer P.J. (2000) *Properties of the stainless steel substrate, influencing the adhesion of thermo-resistant streptococci*. J. Food Engin., 43: 235–242.
- Frączek K., Grzyb J., Górny R., Wlazło A. (2008) *Badania aerozolu biologicznego w pomieszczeniach sanatorium naziemnego w Szczawnicy*. Ekologia i Technika, 16: 150–154.
- Frączek K. (2004) *Oddziaływanie składowiska odpadów komunalnych w Tarnowie Krzyżu na liczebność grzybów w środowisku glebowym ze szczególnym uwzględnieniem grzybów toksynotwórczych*. Acta Agr. Silv., XLII: 87–95.

- Frączek K., Górny R.L. (2011) *Microbial Air Quality at Szczawnica Sanatorium, Poland*. Ann. Agricult. Environ. Med., 18: 63–71.
- Frączek K., Górny R.L., Ropek D. (2013) *Bioaerosols of subterranean therapy chambers at salt mine health resort*. Aerobiologia, 29: 481–493.
- Frączek K., Grzyb J. (2010) *Analyses of Bacterial Aerosol Occurring in Health Resorts in Bochnia and Szczawnica*. Ecol. Chem. Engin., 17: 55–63.
- Frontier S. (1985) *Diversity and structure in aquatic ecosystems*. Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev., 23: 253–312.
- Furowicz A., Boroń-Kaczmarek A., Ferlas M., Czernomyły-Furowicz D., Po-bucewicz A. (2010) *Bakteryjny biofilm oraz inne elementy i mechanizmy pozwalające na przeżycie drobnoustrojów w warunkach ekstremalnych*. Med. Wet., 66: 444–448.
- Fuzzi S., Andreae M.O., Huebert B.J., Kulmala M., Bond T.C., Boy M. i wsp. (2006) *Critical assessment of the current state of scientific knowledge, terminology, and research needs concerning the role organic aerosols in the atmosphere, climate, and global change*. Atmos. Chem., 6: 2017–2038.
- Gajewska J., Cieniek K. (2009) *Identification of microorganisms forming biofilms on the swimming pool filters*. Ochr. Środ. Zas. Natur., 41: 310–321.
- Gandolfi I., Bertolini V., Ambrosini R., Bestetti G., Franzetti A. (2013) *Unravelling the bacterial diversity in the atmosphere*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 97: 4727–4736.
- Garrido-Pereira A.M., Braga A.L., Rocha A.F., Sampaio L.A., Abreu P.C. (2013) *Effect of ultraviolet (UV) radiation on the abundance and respiration rates of probiotic bacteria*. Aquaculture Res., 44: 261–267.
- Gaweł J., Kuczaj P. (2012) *W cieniu tężni*. Wszechświat, 113: 128–131.
- Gawlak E. (1999) *125 lat lecznictwa uzdrowiskowego w Inowrocławiu*. Balneol. Pol., 41: 47–51.
- Ghai R., Pasic L., Fernandez A.B., Martin-Cuadrado A.B., Megumi Mizuno C., McMahon K.D. i wsp. (2011) *New abundant microbial groups in aquatic hypersaline environments*. Sci. Rep., 1: 135.
- Giorgio D., Krempff A., Guiraud H., Binder P., Tiret C., Dumenil G. (1996) *Atmospheric pollution by airborne microorganisms in the city of Marseilles*. Atmos. Environ., 30: 155–160.
- Gładysz J., Grzesiak A., Nieradko-Iwanicka B., Borzęcki A. (2010) *Wpływ za-*

- nieczyszczeń powietrza na stan zdrowia i spodziewaną długość życia ludzi.* Probl. Hig. Epidemiol., 91: 178–180.
- Glaeser S.P., Kämpfe P. (2014) *The Family Sphingomonadaceae.* [w:] *The Prokaryotes* (E. Rosenberg, E.F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, F. Thomson, red.), Springer-Verlag, Berlin–Heidelberg.
- Gołębiewski M., Deja-Sikora E., Cichosz M., Tretyn A., Wróbel B. (2014) *16S rDNA Pyrosequencing Analysis of Bacterial Community in Heavy Metals Polluted Soils.* Microb. Ecol., 67: 635–647.
- Gómez-Suárez C., Busscher H.J., van der Mei H.C. (2001) *Analysis of bacterial detachment from substratum surfaces by the passage of air-liquid interfaces.* Appl. Environ. Microbiol., 67: 2531–2537.
- González-Toril E., Amils R., Delmas R.J., Petit J.-R., Komárek J., Elster J. (2009) *Bacterial diversity of autotrophic enriched cultures from remote, glacial Antarctic, Alpine and Andean aerosol, snow and soil samples.* Biogeosciences 6: 33–44.
- Górny R.L. (2004) *Cząstki grzybów i bakterii jako składniki aerozolu pomieszczeń: właściwości, mechanizmy emisji, detekcja.* Instytut Medycyny Pracy i Zdrowia Środowiskowego, Sosnowiec.
- Gotkowska-Płachta A., Filipkowska Z., Korzeniewska E., Janczukowicz W., Dixon B., Gołaś I. i wsp. (2013) *Airborne microorganisms emitted from wastewater treatment plant treating domestic wastewater and meat processing industry wastes.* Clean – Soil, Air, Water, 41: 429–436.
- Götz F. (2002) *Staphylococcus and biofilms.* Mol. Microbiol., 43: 1367–1378.
- Graham J.E., Wilkinson B.J. (1992) *Staphylococcus aureus osmoregulation: roles for choline, glycine, betaine, proline, and taurine.* J. Bacteriol., 4: 2711–2716.
- Grajewski J., Twarużek M. (2004) *Zdrowotne aspekty oddziaływania grzybów pleśniowych i mikotoksyn.* Alergia, 3: 45–49.
- Griffin D.W., Garrison V.H., Herman J.R., Shinn E.A. (2001) *African desert dust in the Caribbean atmosphere: Microbiology and public health.* Aerobiologia 17: 203–213.
- Griffin D.W., Kubilay N., Kocak M., Gray M.A., Borden T.C., Shinn E.A. (2007) *Airborne desert dust and aeromicrobiology over the Turkish Mediterranean coastline.* Atmos. Environ. 41: 4050–4062.
- Grijalva C.G., Griffin M.R., Edwards K.M., Williams J.V., Gil A.I., Verastegui

- H. i wsp. (2014) *Cohort Profile: The study of respiratory pathogens in Andean children*. *Int J Epidemiol.*, 43: 1021–1023.
- Grzyb J., Frączek K., Bis H., Marcinowska K. (2004) *Occurrence of toxicogenic fungi in atmospheric air and soil in the area of municipal landfill site in Barycz near Kraków*. *Acta Agr. Silv.*, XLII: 155–161.
- Grzyb J., Frączek K., Niesler A., Łudzeń-Izbińska B. (2008) *Badania aerozolu biologicznego w komorach subterraneoterapii w Kopalni Soli w Bochni – badania wstępne*. *Ekol. Tech.*, 16: 219–223.
- Gündüz G.T. (2013) *Antimicrobial activity of sloe berry purees on Salmonella spp.* *Food Control.*, 32: 354–358.
- Hara K., Zhang D. (2012) *Bacterial abundance and viability in long-range transported dust*. *Atmos. Environ.* 47: 20–25.
- Harrison R.M., Jones A.M., Biggins P.D.E., Pomeroy N., Cox C.S., Kidd S.P. i wsp. (2005) *Climate factors influencing bacterial count in background air samples*. *Int. J. Biometeorol.*, 49: 167–178.
- Haveman S.A., Pedersen K. (2002) *Distribution of culturable microorganisms in Fennoscandian Shield groundwater*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 39: 129–137.
- Helbin J., Kolarzyk E. (2005) *Wykorzystanie walorów środowiska naturalnego we wspomaganiu leczenia farmakologicznego*. *Prob. Hyg. Epidemiol.*, 86: 22–26.
- Helbin J., Kolarzyk E. (2006) *Czynniki fizyczne wykorzystywane w metodach lecznictwa uzdrowiskowego*. *Prob. Hyg. Epidemiol.*, 87: 166–171.
- Heller R., Höller C., Süßmuth R., Gunermann K.O. (1998) *Effect of salt concentration and temperature on survival of Legionella pneumophila*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 26: 64–68.
- Honraet K., Goetghebeur E., Nelis H.J. (2005) *Comparison of three assays for the quantification of Candida biomass in suspension and CDC reactor grown biofilms*. *J. Microbiol. Methods.*, 63: 287–295.
- Hoog G.S., Guarro J. (1995) *Atlas of clinical fungi*. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn.
- Hošťacká A., Čižnár I., Štefkovičová M. (2010) *Temperature and pH affect the production of bacterial biofilm*. *Folia Microbiol.*, 55: 75–78.
- Hugoni M., Domaizon I., Taib N., Biderre-Petit C., Agogué H., Galand P.E. (2015) *Temporal dynamics of active Archaea in oxygen-depleted zones of two deep lakes*. *Environ. Microbiol. Rep.*, 7: 321–329.

- Itävaara M., Nyyssönen M., Kapanen A., Nousiainen A., Ahonen L., Kukkonen I. (2011) *Characterization of bacterial diversity to a depth of 1500 m in the Outokumpu deep borehole, Fennoscandian Shield*. FEMS Microbiol. Ecol., 77: 295–309.
- Ivanova E.P., Jun Ng H., Webb H.K. (2014) *The Family Pseudoalteromonada-ceae*. [w:] *The Prokaryotes* (E. Rosenberg, E.F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, F. Thomson, red.), Springer-Verlag, Berlin–Heidelberg.
- Jie Y., Houjin H., Feng J., Jie X. (2011) *The role of airborne microbes in school and its impact on asthma, allergy, and respiratory symptoms among school children*. Rev. Med. Microbiol., 22: 84–89.
- Joe H., Kim K., Lee H., Lee S., Kim S., Oh S. i wsp. (2013) *The Effect of Temperature and Water Activity on Kinetic Behavior of Staphylococcus aureus on Cheese*. [w:] 2013 Annual Meeting (July 28–31, 2013). International Association for Food Protection.
- Joly M., Attard E., Sancelme M., Deguillaume L., Guilbaud C., Cindy E. i wsp. (2013) *Ice nucleation activity of bacteria isolated from cloud water*. Atmos. Environ. 70: 392–400.
- Jones A.M., Harrison R.M. (2004) *The effects of meteorological factors on atmospheric bioaerosol concentrations – a review*. Sci. Tot. Environ. 326: 151–180.
- Jutrowska E., Goszczyński J., Ślachciak W. (2014) *Raport o stanie środowiska województwa kujawsko-pomorskiego w 2013 roku*. Inspekcja Ochrony Środowiska, Bydgoszcz.
- Kaarakainen P., Meklin T., Rintala H., Hyvärinen A., Kärkäinen P., Vepsäläinen A. (2008) *Seasonal variation in airborne microbial concentrations and diversity in landfill, urban, and rural sites*. Clean – Soil, Air, Water, 36: 556–563.
- Kalwasińska A., Burkowska A. (2013) *Municipal landfill sites as sources of microorganisms potentially pathogenic to humans*. Environ. Sci.: Processes and Impacts, 15: 1078–1086.
- Kalwasińska A., Burkowska A., Swiontek Brzezinska M. (2014) *Exposure of workers of municipal landfill site to bacterial and fungal aerosol*. Clean – Soil, Air, Water 42: 1337–1343.
- Karwowska E. (2003) *Microbiological air contamination in some educational settings*. Pol. J. Environ. Stud., 12: 181–185.

- Kasprzyk I., Worek M. (2006) *Airborne fungal spores in urban and rural environments in Poland*. *Aerobiologia*, 22: 169–176.
- Kaźmierczuk M., Kalisz L., Sałbut J. (2004) *Mikrobiologiczne zanieczyszczenia powietrza w otoczeniu obiektów gospodarki komunalnej*. Monografia. Wydawnictwo Naukowe Gabriel Borowski, Warszawa.
- Kellogg C.A., Griffin D.W. (2006) *Aerobiology and the global transport of desert dust*. *Trend. Ecol. Evol.*, 21: 638–644.
- Kilvington S., Price J. (1990) *Survival of Legionella pneumophila within cysts of Acanthamoeba polyphaga following chlorine exposure*. *J. Appl. Microbiol.*, 68: 519–525.
- Kim K.H., Jahan S.A., Kabir E. (2013) *A review on human health perspective of air pollution with respect to allergies and asthma*. *Environ. Internation.*, 59: 41–52.
- Kim Y., Wang X., Ma Q., Zhang X.-S., Wood T.K. (2009) *Toxin-antitoxin systems in Escherichia coli influence biofilm formation through YjgK (TabA) and fimbriae*. *J. Bacteriol.*, 191: 1258–1267.
- Kiura H., Sano K., Morimatsu S., Nakano T., Morita C., Yamaguchi M. i wsp. (2002) *Bactericidal activity of electrolyzed acid water from solution containing sodium chloride at low concentration, in comparison with that at high concentration*. *J. Microbiol. Methods*, 49: 285–293.
- Klarić M., Pepeljnjak S. (2006) *Year-round aeromycological study in Zagreb area, Croatia*. *Ann Agric Environ Med*. 2006, 13: 55–64.
- Klich M.A. (2002) *Identification of common Aspergillus species*. CBS, Utrecht.
- Knutsen A.P., Bush R.K., Demain J.G., Denning D.W., Dixit A., Fairs A. i wsp. (2012) *Fungi and allergic lower respiratory tract diseases*. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 129: 280–291.
- Kokare C.R., Chakraborty S., Khopade A.N., Mahadik K.R. (2009) *Biofilm: Importance and applications*. *Indian J. Biotechnol.*, 8: 159–168.
- Kolter R., Watnick P. (2000) *Biofilm, City of Microbes*. *J. Bacteriol.*, 182: 2675–2679.
- Kołwzan B. (2011) *Analiza zjawiska biofilmu – warunki jego powstawania i funkcjonowania*. *Ochr. Środ.*, 33: 3–12.
- Koreleska E., Stefański G. (2013) *Źródła informacji oraz usługi uzdrowiskowe w opinii kuracjuszy Ciechocinka i Inowrocławia*. *Studia i Materiały Polskiego Stowarzyszenia Zarządzania Wiedzą*, 66: 51–61.

- Korzeniewska E., Filipkowska Z., Gotkowska-Płachta A., Janczukowicz W., Dixon B., Czulowska M. (2009) *Determination of emitted airborne microorganisms from a BIO-PAK Wastewater Treatment Plant*. *Wat. Res.*, 43: 2841–2851.
- Korzeniewska E., Harnisz M. (2012) *Culture-dependent and culture-independent methods in evaluation of emission of Enterobacteriaceae from sewage to the air and surface water*. *Water, Air and Soil Pollution*, 223: 4039–4046.
- Korzeniewski B.R. (2001) *Tężnie w Ciechocinku*. Wydawnictwo Urbański, Toruń.
- Kotowski T., Burkowska A. (2011) *The influence of bacterial reduction on concentrations of sulphates in deep aquifers in river drainage basin*. *Pol. J. Environ. Stud.*, 20: 379–386.
- Kozdrój J. (2013) *Metagenom – źródło nowej informacji o mikroorganizmach glebowych*. *Post. Mikrobiol.*, 52: 185–200.
- Kozich J.J., Westcott S.L., Baxter N.T., Highlander S.K., Schloss P.D. (2013) *Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 79: 5112–5120.
- Kozłowska-Szczęśna T. (2000) *Stan badań klimatu i bioklimatu uzdrowisk polskich*. Instytut Geografii i Przestrzennego Zagospodarowania PAN, Warszawa.
- Krawiec A. (1999) *Nowe wyniki badań izotopowych i chemicznych wód leczniczych Ciechocinka*. *Prz. Geol.*, 47: 255–260.
- Krawiec A. (2005) *Wody lecznicze Ciechocinka*. [w:] *Hydrogeologia Kujaw i Dolnego Powiśla* (A. Krawiec, red.), Wyd. UMK, Toruń.
- Krawiec A., Walczak M. (2012) *Potencjalny czas przeżycia bakterii w solankach leczniczych*. *Acta Balneol.*, 2: 101–108.
- Krupa W.A. (2009) *Warunki niezbędne do prawidłowego funkcjonowania lecznictwa uzdrowiskowego*. *Proceedings of the VIII Congress of Polish Health Resorts*, Muszyna.
- Krzysztofik B. (1992) *Mikrobiologia powietrza*. Wydawnictwa Politechniki Warszawskiej, Warszawa.
- Kubiak S. (2001) *Ciechocinek: dzieje uzdrowiska*. Oficyna Wydawnicza LEGA, Włocławek.
- Kumarasamy Y., Cox P.J., Jaspars M., Nahar L., Sarker S.D. (2004) *Comparative*

- studies on biological activities of Prunus padus and P. spinosa*. *Fitoterapia*, 75: 77–80.
- Kushner D.J. (1978) *Life in high salt and solute concentrations*. [w:] *Microbial Life in Extreme Environments* (D.J. Kushner, red.), Academic Press, London.
- Lacey J. (1994) *Indoor aerobiology and health*. [w:] *Building Mycology* (J. Singh, red.), Chapman&Hall, London.
- Lee A.K.Y., Lau A.P.S., Cheng J.Y.W., Fang M., Chan C.K. (2007) *Source identification analysis for the airborne bacteria and fungi using a biomarker approach*. *Atmos. Environ.*, 41: 2831–2843.
- Leid J.G. (2009) *Bacterial biofilms resist key host defenses*. *Microbe*, 4: 66–70.
- LeRudulier D., Bouillard L. (1983) *Glycine betaine, an osmotic effector in Klebsiella pneumoniae and Other Members of the Enterobacteriaceae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46: 152–159.
- Lewińska J., Wodzeń M. (1989) *Zanieczyszczenie powietrza uzdrowisk aglomeracji krakowskiej*. *Probl. Uzdrów.*, 1–2: 113–123.
- Li B., Logan B.E. (2004) *Bacterial adhesion to glass and metal-oxide surfaces*. *Coll. Surf.*, 36: 81–90.
- Liang L., He K., Duan F. (2012) *Progress on quantitative assessment methods of biological aerosols in the atmosphere*. *Biogeosci. Dis.*, 9: 1511–1528.
- Libudzisz Z., Kowal K., Żakowska Z. (2007) *Mikrobiologia techniczna. T. 1. Mikroorganizmy i środowiska ich występowania*. Wydawnictwa Naukowe PWN, Warszawa.
- Lighthart B., Mohr A.J. (2012) *Atmospheric microbial aerosols: theory and applications*. Chapman & Hall Inc., New York.
- Lighthart B., Shaffer B.T., Frisch A.S., Paterno D. (2009) *Atmospheric culturable bacteria associated with meteorological conditions at a summer-time site in the mid-Willamette Valley, Oregon*. *Aerobiologia*, 25: 285–295.
- Lim Y., Jana M., Luong T.T., Lee Ch.Y. (2004) *Control of glucose- and NaCl-induced biofilm formation by rbf in Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, 186: 722–729.
- Lin W., Li C. (2000) *Associations of fungal aerosols, air pollutants, and meteorological factors*. *Aerosol Sci. Tech.*, 32: 359–368.
- Liu K., Jiao J.J., Gu J.D. (2014) *Investigation on bacterial community and diversity in the multilayer aquifer-aquitard system of the Pearl River Delta, China*. *Ecotoxicology*, 23: 2041–2052.

- López-Pérez M., Rodríguez-Valera F. (2014) *The Family Alteromonadaceae*. [w:] *The Prokaryotes* (E. Rosenberg, E.F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, F. Thomson, red.), Springer-Verlag, Berlin–Heidelberg.
- Maish T. (2006) *Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future?* *Lasers Med. Sci.*, 22: 83–91.
- Maki T., Kakikawa M., Kobayashi F., Yamada M., Matsuki A., Hasegawa H. i wsp. (2013) *Assessment of composition and origin of airborne bacteria in the free troposphere over Japan*. *Atmosph. Environ.*, 74: 73–82.
- Małecka-Adamowicz M., Donderski W., Okoniewska A. (2010) *Evaluation of microbial air quality in a Forest Recreation Park*. *Pol. J. Environ. Stud.*, 19: 107–113.
- Małecka B., Marcinkowski J.T. (2007) *Rys historyczny rozwoju lecznictwa uzdrowiskowego*. *Probl. Hig. Epidemiol.*, 88: 139–142.
- Mancinelli R.L., Shulls W.A. (1978) *Airborne bacteria in an urban environment*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 35: 1095–1101.
- Mann E., Woźniak D. (2012) *Pseudomonas biofilm matrix composition and niche biology*. *FEMS Microbiol. Rev.*, 36: 893–916.
- Marić S., Vranes J. (2007) *Characteristics and significance of microbial biofilm formation*. *Period. Biol.*, 109(2): 115–121.
- Maron P.-A., Lejon D.P.H., Carvalho E., Bizet K., Lemanceau P., Ranjard L. i wsp. (2005) *Assessing genetic structure and diversity of airborne bacterial communities by DNA Fingerprinting and 16S rDNA clone library*. *Atmos. Environ.*, 39: 3687–3695.
- Maron P.-A., Mougél C., Lejon D.P.H., Carvalho E., Bizet K., Marck G. i wsp. (2006) *Temporal variability of airborne bacterial community structure in an urban area*. *Atmos. Environ.*, 40: 8074–8080.
- Marshall B.J., Ohye D.E., Christian J.H.B. (1971) *Tolerance of bacteria to high concentrations of NaCl and glycerol in the growth medium*. *Appl. Microbiol.*, 2: 363–364.
- Matthais-Maser S., Obolkin V., Khodzer T., Jaenicke R. (2000) *Seasonal variation of primary biological aerosol particles in the remote continental region of Lake Baikal Siberia*. *Atmos. Environ.*, 34: 3805–3811.
- Maturrano L., Fernando Santos, Rosselló-Mora R., Antón J. (2006) *Microbial Diversity in Maras Salterns, a Hypersaline Environment in the Peruvian Andes*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 3887–3895.

- McDonnell G., Russell A.D. (1999) *Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance*. Clin. Microbiol. Rev., 12: 147–179.
- McEldowney S., Fletcher M. (1986) *Variability of the influence of physicochemical factors affecting bacterial adhesion to polystyrene substrat*. Appl. Environ. Microbiol., 52: 460–465.
- Mędreła-Kuder E. (2000) *Mycological air pollution at sites of heavy traffic in Cracow*. Acta Biol. Cracov., Ser. Botanica, 42: 21–24.
- Mędreła-Kuder E. (2004) *Charakterystyka aerozolu grzybowego w okresach, gdy prędkość wiatru  $v < 1$* . Acta Agr. Silv., XLII: 311–316.
- Mędreła-Kuder E. (2003) *Seasonal variations in the occurrence of culturable airborne fungi in outdoor and indoor air in Craców*. Int. Biodeter. Biodegr., 52: 203–205.
- Miklaszewska B., Grajewski J. (2005) *Patogenne i alergogenne grzyby pleśniowe w otoczeniu człowieka*. Alergia, 2: 45–50.
- mineralne.pgi.gov.pl
- Missimer T.M., Hoppe-Jones C., Jadoon K.Z., Li D., Al-Mashharawi S.K. (2014) *Hydrogeology, water quality, and microbial assessment of a coastal alluvial aquifer in western Saudi Arabia: potential use of coastal wadi aquifers for desalination water supplies*. Hydrogeol. J., 22: 1921–1934.
- Mnichowska-Polanowska M., Kaczała M., Giedrys-Kalemba S. (2009) *Charakterystyka biofilmu Candida*. Mykol. Lek., 16: 159–164.
- Mohammadi P., Krumbein W.E. (2008) *Biodeterioration of ancient stone materials from the Persepolis monuments (Iran)*. Aerobiologia, 24: 27–33
- Morozova D., Wandrey M., Alawi M., Zimmer M., Vieth A., Zettlitzer M. i wsp. (2010) *Monitoring of the microbial community composition in saline aquifers during CO<sub>2</sub> storage by fluorescence in situ hybridization*. Int. J. Greenhouse Gas Contr., 4: 981–989.
- Moscoso M., García E., López R. (2006) *Biofilm formation by Streptococcus pneumoniae: Role of choline, extracellular DNA, and capsular polysaccharide in microbial accretion*. J. Bacteriol., 188: 7785–7795.
- Mücke W., Lemmen Ch. (1999) *Schimmelpilze-Vorkommen, Gesundheitsgefahren, Schutzmaßnahmen*. Ecomed, Landsberg.
- Muyzer G., de Waal E.C., Uitterlinden A.G. (1993) *Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA*. Appl. Environ. Microbiol., 59: 695–700.

- Myszka K., Białas W., Czaczyk K. (2005) *Kinetyka tworzenia biofilmów bakteryjnych na materiałach technicznych w zależności od dostępności składników odżywczych*. Żywność Nauka Technologia Jakość, 3(44): 127–137.
- Narasingarao P., Podell S., Ugalde J.A., Brochier-Armanet C., Emerson J.B., Brocks J.J. i wsp. (2012) *De novo metagenomic assembly reveals abundant novel major lineage of Archaea in hypersaline microbial communities*. ISME J., 6: 81–93.
- Navarro-Noya Y.E., Suárez-Arriaga M.C., Rojas-Valdes A., Montoya-Ciriaco N.M., Gómez-Acata S., Fernández-Luqueño F. i wsp. (2013) *Pyrosequencing analysis of the bacterial community in drinking water wells*. Microb. Ecol., 66: 19–29.
- Nielsen K.F. (2003) *Mycotoxin production by indoor molds*. Fungal Genet. Biol., 39: 103–117.
- Nikkels A.H., Terstegge P., Spieksma F.Th.M. (1996) *Ten types of microscopically identifiable air-borne fungal spores at Leiden, The Netherlands*. Aerobiologia, 12: 107–112.
- Nunoura T., Oida H., Nakaseama M., Kosaka A., Ohkubo S.B., Kikuchi T. (2010) *Archaeal diversity and distribution along thermal and geochemical gradients in hydrothermal sediments at the Yonaguni Knoll IV hydrothermal field in the Southern Okinawa trough*. Appl. Environ. Microbiol., 76: 1198–1211.
- Obłąk E., Gamian A. (2010) *Biologiczna aktywność czwartorzędowych soli amoniowych (CSA)*. Post. Hig. Med. Dośw., 64: 201–211.
- Ochsenreiter T., Pfeifer F., Schleper C. (2002) *Diversity of Archaea in hypersaline environments characterized by molecular-phylogenetic and cultivation studies*. Extremophiles, 6: 267–274.
- Ohno A., Kato N., Yamada K., Yamaguchi K. (2003) *Factors influencing survival of Legionella pneumophila serotype 1 in hot spring water and tap water*. Appl. Environ. Microbiol., 69: 2540–2547.
- Olechnowicz-Bobrowska B., Wojkowski J., Fraczek K., Grzyb J. (2000) *Charakterystyka mikroklimatyczna i mikrobiologiczna komór leczniczych w kopalni soli w Bochni i Wieliczce [w:] VI Krajowy Kongres Ekologiczny EKO-MED. Tarnów, „Środowiskowe zagrożenia dla społeczeństwa u progu XXI wieku”, 151–156*.
- Oren A. (2006) *Life at High Salt Concentrations*, Prokaryotes, 2: 263–282.

- Oren A. (2008) *Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity*. Saline Systems, 4:2.
- Oren A., Baxter B.K., Weimer B.C. (2009) *Microbial communities in salt lakes: phylogenetic diversity, metabolic diversity, and in situ activities*. Nat. Resour. Environ., 15: 257–263.
- Oren A. (2014) *Taxonomy of halophilic Archaea: current status and future challenges*. Extremophiles, 18: 825–834.
- Ortiz-Alvarez R., Casamayor E.O. (2016) *High occurrence of Pacearchaeota and Woesearchaeota (Archaea superphylum DPANN) in the surface waters of oligotrophic high altitude lakes*. Environ. Microbiol. Rep., doi: 10.1111/1758–2229.12370.
- Otake S., Dee S., Corzo C., Oliveira S., Deen J. (2010) *Longdistance airborne transport of infectious PRRSV and Mycoplasma hyopneumoniae from a swine population infected with multiple viral variants*. Vet. Microbiol., 145: 198–208.
- Palmer J., Flint S., Brooks J. (2007) *Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm*. J. Indust. Microbiol. Biotechnol., 34: 577–588.
- Pan Y., Breidt F. Jr., Gorski L. (2010) *Synergistic effects of sodium chloride, glucose, and temperature on biofilm formation by Listeria monocytogenes serotype 1/2a and 4b strains*. Appl. Environ. Microbiol., 76: 1433–1441.
- Pappa A., Sánchez-Porro C., Lazoura P., Kallimanis A., Perisynakis A., Ventosa A. i wsp. (2010) *Bacillus halochares sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a solar saltern*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 60: 1432–1436.
- Pascual L., Pérez-Luz S., Yanez M.A., Santamaría A., Gibert K., Salgot M. i wsp. (2003) *Bioaerosol emission from wastewater treatment plants*. Aerobiologia, 19: 261–270.
- Pastuszka J.S., Paw U.K.T., Lis D.O., Wlazlo A., Ulfig K. (2000) *Bacterial and fungal aerosol in indoor environment in Upper Silesia, Poland*. Atmos. Environ. 34: 3833–3842.
- Peccia J., Werth H.M., Miller S., Hernandez M. (2001) *Effects of Relative Humidity on the Ultraviolet Induced Inactivation of Airborne Bacteria*. Aerosol Sci. Technol., 35: 728–740.
- Peeters E., Nelis H.J., Coenye T. (2008) *Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates*. J. Microbiol. Methods, 72: 157–165.

- Pepeljnjak S., Šegvić M. (2003) *Occurrence of fungi in air and on plants in vegetation of different climatic regions in Croati*. *Aerobiologia*, 19: 11–19.
- Pitts B., Hamilton M.A., Zelver N., Stewart P.S. (2003) *A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal*. *J. Microbiol. Methods*, 54: 269–276.
- PN-2001/Z-11000 (2001) Polska Norma. *Uzdrowiska – Terminologia, klasyfikacja i wymagania ogólne*. Polski Komitet Normalizacyjny, Warszawa.
- PN-89/Z-04008/08 (1989) Polska Norma. *Ochrona czystości powietrza. Pobieranie próbek. Pobieranie próbek powietrza atmosferycznego (imisja) do badań mikrobiologicznych metodą aspiracyjną i sedymentacyjną*. Polski Komitet Normalizacyjny, Warszawa.
- PN-89/Z-04111/02 (1989) Polska Norma. *Ochrona czystości powietrza. Badania mikrobiologiczne. Oznaczanie liczby bakterii w powietrzu atmosferycznym (imisja) przy pobieraniu próbek metodą aspiracyjną i sedymentacyjną*. Polski Komitet Normalizacyjny, Warszawa.
- PN-89/Z-04111/03 (1989) Polska Norma. *Ochrona czystości powietrza. Badania mikrobiologiczne. Oznaczanie liczby grzybów mikroskopowych w powietrzu atmosferycznym (imisja) przy pobieraniu próbek metodą aspiracyjną i sedymentacyjną*. Polski Komitet Normalizacyjny, Warszawa.
- PN-EN ISO 10304-1 (2009) *Jakość wody – Oznaczanie rozpuszczonych anionów za pomocą chromatografii jonowej – Część 1: Oznaczanie bromków, chlorków, fluorków, azotanów, azotynów, fosforanów i siarczanów*.
- PN-EN ISO 9308-1 (2014) *Jakość wody. Oznaczanie ilościowe Escherichia coli i bakterii grupy coli. Część 1: Metoda filtracji membranowej do badania wód o małej ilości mikroflory towarzyszącej*. Polski Komitet Normalizacyjny, Warszawa.
- Polymenakou P.N. (2012) *Atmosphere: A Source of Pathogenic or Beneficial Microbes?* *Atmosphere*, 3: 87–102.
- Pompanon F., Samadi S. (2015) *Next generation sequencing for characterizing biodiversity: promises and challenges*. *Genetica*, 143: 133–138.
- Ponikowska I. (2012) *Kompendium balneologii: rekomendacje krajowego konsultanta*. Wydawnictwo Adam Marszałek, Toruń.
- Ponikowska I., Marciniak K. (1988) *Ciechocinek – terenoterapia uzdrowiskowa*. Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa–Poznań.

- Ponikowska I., Marciniak K., Graczykowska-Koczorowska A. (1979) *Wykorzystanie mikroklimatu tężniowego w Ciechocinku do leczenia nadciężności tarczycy*. Baln. Pol. 24: 603–610.
- Poprawski L., Jasiak T., Wąsik M. (1998) *Analiza zmian chemizmu wód leczniczych Ciechocinka w trakcie wieloletniej eksploatacji*. Prz. Geol., 46: 331–336.
- Prieto B., Silva B., Lantes O. (2004) *Biofilm quantification of stone surfaces: comparison of various methods*. Sci. Total Environ., 333: 1–7.
- Pronk M., Goldscheider N., Zopfi J. (2009) *Microbial communities in karst groundwater and their potential use for biomonitoring*. Hydrogeol. J., 17: 37–48.
- Prospero J.M., Blades E., Mathison G., Naidu R. (2005) *Interhemispheric transport of viable fungi and bacteria from Africa to the Caribbean with soil dust*. Aerobiologia, 21: 1–19.
- Prunk A., Azman J., Frkovic V., Skrobonja A., Muzur A. (2008) *Physician Albin Eder and his contribution to the development of health resorts in the Northern Adriatic area*. Publ. Health, 122: 1131–1133.
- Pujalte M.J., Lucena T., Ruvira M.A., Arahal D.R., Macián M.C. (2014) *The Family Rhodobacteraceae* [w:] *The Prokaryotes* (E. Rosenberg, E.F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, F. Thomson, red.), Springer-Verlag, Berlin–Heidelberg.
- Pyrri I., Kapsanaki-Gotsi E. (2007) *A comparative study on the airborne fungi in Athens, Greece, by viable on non-viable sampling methods*. Aerobiologia, 23: 3–15.
- Rachid S., Ohlsen K., Wallner U., Hacker J., Hecker M., Ziebuhr W. (2000) *Alternative transcription factor  $\sigma_B$  is involved in regulation of biofilm expression in a Staphylococcus aureus mucosal isolate*. J. Bacteriol., 182: 6824–6826.
- Radosevich J.L., Wilson W.J., Shinn J.H., DeSantis T.Z., Andersen G.L. (2002) *Development of a high-volume aerosole collection system for the identification of airborne microorganisms*. Lett. Appl. Microbiol., 34: 162–167.
- Radovanović B.C., Milenković Anđelković A.S., Radovanović A.B., Anđelković M.Z. (2013) *Antioxidant and antimicrobial activity of polyphenol extracts from wild berry fruits grown in southeast Serbia*. Tropic. J. Pharm. Res., 12: 813–819.
- Raisi L., Aleksandropoulou V., Lazaridis M., Katsivela E. (2013) *Size distribu-*

- tion of viable, cultivable, airborne microbes and their relationship to particulate matter concentrations and meteorological conditions in a Mediterranean site.* *Aerobiologia*, 29: 233–248.
- Ravva S.V., Hernlem B.J., Sarreala C.Z., Mandrella R.E. (2012) *Bacterial communities in urban aerosols collected with wetted-wall cyclonic samplers and seasonal fluctuations of live and culturable airborne bacteria.* *J. Environ. Monit.*, 14: 473–481.
- Rengasamy A., Zhuang Z., BerryAnn R. (2004) *Respiratory protection against bioaerosols: Literature review and research needs.* *Am. J. Infect. Control*, 32: 345–354.
- Rossi V., Bugiani R., Giosué S., Natali P. (2005) *Patterns of airborne conidia of *Stemphylium vesicarium*, the causal agent of brown spot disease of pears, in relation to weather conditions.* *Aerobiol.*, 21: 203–216.
- Roudnew B., Seymour J.R., Jeffries T.C., Lavery T.J., Smith R.J., Mitchell J.G. (2012) *Bacterial and virus-like particle abundances in purged and unpurged groundwater depth profile.* *Groundwat. Monitor. Remed.*, 32: 72–77.
- Różalski A. (2007) *Ćwiczenia z mikrobiologii ogólnej. Część I – teoretyczna.* Wydanie V. Wyd. Uni. Łódź., Łódź.
- Sattler B., Puxbaum H., Psenner R. (2001) *Bacterial growth in supercooled cloud droplets.* *Geophys. Res. Lett.*, 28: 239–242.
- Sawhney R., Berry V. (2009) *Bacterial biofilm formation, pathogenicity, diagnostics and control: An overview.* *Indian. J. Med. Sci.*, 63: 313–321.
- Saxena V., Mishra G., Saxena A., Vishwakarma K.K. (2013) *A comparative study on quantitative estimation of tannins in *Terminalia chebula*, *Terminalia belerica*, *Terminalia arjuna* and *Saraca indica* using spectrophotometer.* *Asian J. Pharm. Clin. Res.*, 6: 148–149.
- Schloss P.D., Westcott S.L., Ryabin T., Hall J.R., Hartmann M., Hollister E.B. i wsp. (2009) *Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities.* *Appl. Environ. Microbiol.*, 75: 7537–7541.
- Schneider D., Arp G., Reimer A., Reitner J., Daniel R. (2013) *Phylogenetic analysis of a microbialite-forming microbial mat from a hypersaline lake of the Kiritimati atoll, Central Pacific.* *PLoS ONE*, 8: e66662.
- Setlow P. (2001) *Resistance of spores of *Bacillus* species to UV light.* *Environ. Mol. Mutagen.*, 38: 97–104.

- Shabala L., Bowman J., Brown J., Ross T., McMeekin T., Shabala S. (2009) *Ion transport and osmotic adjustment in Escherichia coli in response to ionic and non-ionic osmotica*. Environ. Microbiol., 11: 137–148.
- Shaffer B.T., Lighthart B. (1997) *Survey of culturable airborne bacteria at four diverse locations in Oregon: urban, rural, forest, and coastal*. Microb. Ecol., 34: 167–177.
- Shigematsu T., Hayashi M., Kikuchi I., Ueno S., Masaki H., Fujii T. (2009) *Aculture-dependent bacterial community structure analysis based on liquid cultivation and its application to a marine environment*. FEMS Microbiol. Lett., 293: 240–247.
- Singh K., Frisvad J.C., Thrane U., Mathur S.B. (1991) *An illustrated manual on identification of some seed-borne Aspergilli, Fusaria, Penicillia and their mycotoxins*. The Technical University of Denmark, Frederiksberg.
- Singh R., Paul D., Jain R.K. (2006) *Biofilms: implications in bioremediation*. Trends Microbiol., 14: 389–397.
- Sochocka M., Boratyński J. (2011) *Osmoregulacja – ważny parametr rozwoju bakterii*. Postępy Hig. Med. Dośw., 65: 714–724.
- Solan M. (2012) *Ramy prawne oraz zakres działalności uzdrowisk w świetle ustawy uzdrowiskowej*. Inż. Ekol. 30: 153–159.
- Statut Uzdrowiska Ciechocinek (2008) Uchwała Rady Miejskiej Ciechocinka z dnia 3 listopada 2008 r. – w sprawie ustanowienia Statutu Uzdrowiska Ciechocinek.
- Stepalska D., Wołek J. (2005) *Variation in fungal spore concentration of selected taxa associated to weather conditions in Cracow, Poland, in 1997*. Aerobiologia, 21: 43–52.
- Stepanović S., Vuković D., Dakić I., Savić B., Svabić-Vlahović M. (2000) *A modified microtiter plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation*. J. Microbiol. Methods, 40: 175–179.
- Stepanović S., Vuković D., Hola V., Bonaventura G., Djukić S., Cirković I. i wsp. (2007) *Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci*. APMIS, 115: 891–899.
- Stern A.C., Wohlers H.C., Boubel R.W., Lowry W.P. (2014) *Fundamentals of air pollution*. Academic Press, New York–London.
- Stevenson A., Burkhardt J., Cockell C.S., Cray J.A., Dijksterhuis J., Fox-Powell M.

- i wsp. (2015) *Multiplication of microbes below 0.690 water activity: implications for terrestrial and extraterrestrial life*. Environ. Microbiol. 17: 257–277.
- Stout J.E. (2001) *Dust and environment in the Southern High Plains of North America*. J. Arid Environ., 47: 425–441.
- Stover C.K., Pham X.Q., Erwin A.L., Mizoguchi S.D., Warrener P., Hickey M.J. i wsp. (2000) *Complete genome sequence of Pseudomonas aeruginosa PAO1, an opportunistic pathogen*. Nature, 406: 959–964.
- Świdowska-Bróz M. (2010) *Czynniki współdecydujące o potencjale powstawania i rozwoju biofilmu w systemach dystrybucji wody*. Ochr. Środ., 32: 7–11.
- Sziwa D. (1999) *Wpływ warunków meteorologicznych na wielkość średniodobowych stężeń SO<sub>2</sub> w uzdrowisku Inowrocław*. Acta Uni. Lodz., Folia Geogr. Phys., 3: 515–518.
- Tagarelli G., Tagarelli A., Piro A. (2010) *Folk medicine used to heal malaria in Calabria (southern Italy)*. J. Ethnobiol. Ethnomed., 6: 27–43.
- Tamayo R., Patimalla B., Camilli A. (2010) *Growth in a biofilm induces a hyperinfectious phenotype in Vibrio cholera*. Infect. Immun., 78: 3560–3569.
- Tang J.W. (2009) *The effect of environmental parameters on the survival of airborne infectious agents*. J. R. Soc. Interface, 6: S737–S746.
- Tenenbaum T., Franz A., Neuhausen N., Willems R., Brade J., Schweitzer-Krantz S. i wsp. (2012) *Clinical characteristics of children with lower respiratory tract infections are dependent on the carriage of specific pathogens in the nasopharynx*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 31: 3173–3182.
- Tshilombo K., Mehtar S., Sampson S., Warren R., Steyn N. (2015) *Survival and re-aerosolization in dust of Mycobacterium smegmatis, a surrogate marker for Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob. Resis. Infect. Control, 4(Suppl 1):100.
- Tully B.J., Sachdeva R., Heidelberg K.B., Heidelberg J.F. (2014) *Comparative genomics of planktonic Flavobacteriaceae from the Gulf of Maine using metagenomic data*. Microbiome, 2: 34–48.
- Veličković J.M., Kostić D.A., Stojanović G.S., Mitic S.S., Mitic M.N., Randjelović S.S. i wsp. (2014) *Phenolic composition, antioxidant and antimicrobial activity of the extracts from Prunus spinosa L. fruit*. Hemijska industrija, 68: 297–303.
- Vu B., Chen M., Crawford R.J., Ivanova E.P. (2009) *Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation*. Molecules, 14: 2535–2524.

- Walczak M., Burkowska-But A., Swiontek Brzezinska M., Krawiec A. (2016) *Distribution of Legionella pneumophila in thermal pools*. Clean – Soil, Air, Water, 44: 532–537.
- Walczak M., Krawiec A. (2014) *Mikroorganizmy w solankach mezozoiku Niżu Polskiego*. Prz. Geol., 62: 420–423.
- Walczak M., Lalke-Porczyk E., Krawiec A. (2011) *Przeżywalność bakterii w wodach geotermalnych*. Technika Poszukiwań Geologicznych Geotermia, Zrównoważony Rozwój, 1 2: 413–423.
- Wang H., Wilksch J.J., Lithgow T., Strugnell R.A., Gee M.L. (2013) *Nanomechanics measurements of live bacteria reveal a mechanism for bacterial cell protection: the polysaccharide capsule in Klebsiella is a responsive polymer hydrogel that adapts to osmotic stress*. Soft Matter 9: 7560–7567.
- Wang Z., Reponen T., Grinshpun S.A., Górny R.L., Willeke K. (2001) *Effect of sampling time and air humidity on the bioefficiency of filter samplers for bioaerosol collection*. Aerosol Sci. 32: 661–674.
- Wójcik J. (2011) *Zanieczyszczenie pyłowe powietrza w uzdrowiskach sudeckich w latach 1990–2005*. Ochr. Pow. Probl. Odpadów, 45: 114–124.
- Womack A.M., Bohannon B.J.M., Green J.L. (2010) *Biodiversity and biogeography of the atmosphere*. Philos. Trans. R. Soc. B365: 3645–3653.
- Womiloju T.O., Miller J.D., Mayer P.M., Brook J. R. (2003) *Methods to determine the biological composition of particulate matter collected from outdoor air*. Atmos. Environ., 37: 4335–4344.
- Wu X., Holmfeldt K., Hubalek V., Lundin D., Åström M., Bertilsson S. i wsp. (2015) *Microbial metagenomes from three aquifers in the Fennoscandian shield terrestrial deep biosphere reveal metabolic partitioning among populations*. ISME J., doi: 10.1038/ismej.2015.185.
- [www.google.pl/maps](http://www.google.pl/maps)
- Xu H., Lee H.-Y., Ahn J. (2011) *Characteristics of biofilm formation by selected foodborne pathogens*. J. Food Saf., 31: 91–97.
- Xu Z., Wu Y., Shen F., Chen Q., Tan M., Yao M. (2011) *Bioaerosol Science, Technology, and Engineering: Past, Present, and Future*. Aerosol Sci. Technol., 45: 1337–1349.
- Zalupska M., Suwalska K., Kabsch P. (1996) *Dobowa zmienność zanieczyszczenia powietrza w górskim uzdrowisku na przykładzie Dusznik Zdroju*. Ochr. Pow. Probl. Odp., 30: 128–132.

- Zdybek I. (2005) *Wpływ jonów chlorkowych na efektywność biologicznej defosfatacji ścieków*. Ochr. Środ., 27: 13–17.
- Zhilina L.P., Dobrodceeva L.K. (2005) *Features of the physical state of school children before and after a stay at a sanatorium*. Human Physiol., 31: 142–144.
- Zhong Z.P., Liu Y., Liu H.C., Wang F., Song L., Liu Z.P. (2014) *Idiomarina planktonica sp. nov., isolated from a saline lake*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 64: 3411–3416.
- Zhou J., Bruns M.A., Tiedje J.M. (1996) *DNA recovery from soils of diverse composition*. Appl. Environ. Microbiol., 62: 316–322.
- Zimmermann R. (1981) *Determination of the total number and biomass of aquatic bacteria*. [w:] Recommendations on methods for marine microbiological studies in the Baltic Sea (M. Maciejowska, J. Becker-Birck, G.H. Hoppe, J. Schneider, red.). Res. Inst. on Environ. Development, Warszawa.
- Żukiewicz-Sobczak W., Cholewa G., Sobczak P., Zagórski J., Wojtyła-Buciora P. (2015) *Health risks associated with exposure to fungi*. Agricult. Agricult. Sci. Proc., 7: 313–317.

## Graduation towers as a factor shaping microbial air quality in spa towns

### Summary

In addition to dust particles and chemical contaminants, the air contains many microorganisms including bacteria, fungi and viruses. There is no doubt that biological pollutants in the air affect people's health. Spa patients who suffer from chronic respiratory diseases are particularly vulnerable. Unfortunately, investigations of air quality even in spas specializing in the treatment of respiratory diseases are not conducted regularly.

Ciechocinek and Inowrocław are popular lowland spa towns in the Province of Kujawy and Pomerania, Poland. Their natural resources include brines used for treatments offered in numerous sanatoria located in these health resorts. The towns are also well-known for their graduation towers, considered unique open inhalatoria. The microclimate around the towers contains aerosol, formed when the salt water runs down the structures and partly evaporates. Due to its healing properties, the aerosol is believed to support the treatment of many diseases.

Aerosol in the vicinity of the graduation towers affects the size and species composition of microbial communities in the air. On the one hand, it can reduce the number of microorganisms as a result of mechanical air purification by brine droplets, and also due to the presence of sodium chloride and iodine compounds. On the other

hand, it constitutes a source of contamination because microorganisms present in the brine, including those rinsed from blackthorn twigs, may be introduced into the atmosphere.

The main objective of this study was to determine the impact of aerosol emitted from the graduation towers on the microbial air quality in two spa towns, especially in the vicinity of these structures. It was also aimed at assessing the biodiversity of microorganisms in the brine and their impact on the composition of bioaerosols found in the areas surrounding these unique inhalatoria. Another aspect under investigation was the survival rate and biofilm formation ability of potentially pathogenic bacteria present in the brine, in different trophic and thermal conditions.

The concentration of microbial bioaerosol was measured in Ciechocinek (monthly in 2005–2008 and in the seasonal cycle from summer 2009 to spring 2011) and Inowrocław (in the seasonal cycle from summer 2009 to spring 2011), at research sites located in urban areas, spa areas, and in the vicinity of the open air inhalatoria. Cultivation-dependent methods were used to determine the number of mesophilic, hemolytic and halophylic bacteria as well as mannitol-positive staphylococci, Enterobacteriaceae, actinomycetes, and fungi in the air. The qualitative analysis of bacterial bioaerosol was carried out using biochemical methods. Fungal bioaerosol was evaluated on the basis of microscopic images and morphological characteristics of colonies. These classical methods for microbial identification were accompanied by MALDI TOF MS technique (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry). Biodiversity of microorganisms in the brine collected from the graduation towers in Ciechocinek was evaluated by isolating metagenomic DNA, followed by sequencing DNA libraries of bacteria and archaea, using NGS technology. The survival rate of potentially pathogenic bacterial strains and their ability to form biofilm in the brine were assessed in an uncontaminated environment (natural brine) and in the brine contaminated with organic compounds.

The results indicate that saline aerosol emitted from open air inhalatoria has a positive effect on microbial air quality; in areas

influenced by this bioaerosol the number of microorganisms in the air was lower than in other parts of both towns. Brines evaporating from the open air inhalatoria are not an important source of microbes. They contain non-pathogenic micro-organisms associated with saline environments.

In brines collected in Ciechocinek the development of potentially pathogenic bacteria is possible, but their survival rate decreases with an increased NaCl concentration. Since the presence of organic contaminants in brines prolongs the survival and promotes the growth of these bacteria, it is extremely important to prevent the introduction of contaminants into brines. Moreover, regular microbial monitoring of brines is highly recommended.

The choice of blackthorn as a filling material in graduation towers is justified not only for technical reasons. The presence of tannins excludes the possibility of microbial biofilm formation on the twigs in the presence of brines. As a consequence, the environment in the vicinity of these structures is safe for tourists and patients.

