

Identyfikacja i selekcja mikroorganizmów zdolnych do wytwarzania biowodoru w celu potencjalnego wykorzystania w złożach karpackich

Identification and selection of microorganisms capable of generating biohydrogen for potential use in Carpathian deposits

Piotr Kapusta, Joanna Brzeszcz, Anna Turkiewicz, Marek Janiga

Instytut Nafty i Gazu – Państwowy Instytut Badawczy

STRESZCZENIE: W niniejszej pracy zbadano, czy w wodach złożowych oraz w miejscach samoistnych wycieków ropy naftowej obecne są bakterie zdolne do wytwarzania biowodoru na skutek procesów fermentacji substancji organicznych. Zagadnienie to ma ścisły związek z przyjętą przez UE strategią Europejskiego Zielonego Ładu, zakładającą redukcję emisji o 55% do 2030 roku. Elementami tej strategii są technologie wytwarzania biowodoru (zwanego białym bądź złotym wodorem). W strategię tę wpisuje się również synteza biometanu (biogenego metanu) z CO₂ i H₂. Analizie poddano próbki wód złożowych oraz próbki gleby pochodzące z miejsc naturalnych wycieków ropy naftowej. Szczegółową analizę wykonano za pomocą sekwencjonowania metataksonomicznego, natomiast w analizach dotyczących liczebności mikroorganizmów posłużono się metodami klasycznymi z użyciem podłoży mikrobiologicznych, a obecność metanogennych archeonów potwierdzono metodą FISH (ang. *fluorescence in situ hybridization* – fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*). Obecność bakterii generujących biowodór wykazano we wszystkich analizowanych próbkach, jednak tylko w jednym przypadku udało się wygenerować biowodór w stężeniu niemal 4%, natomiast w drugim tylko jego ślady. Uzyskano natomiast metan w trzech przypadkach w ilościach dużych (>60% w otrzymanym biogazie), zaś w jednym w ilości dostatecznej. W pozostałych przypadkach otrzymano najwyżej śladowe ilości metanu, co było najprawdopodobniej wynikiem aktywności bakterii homoacetogennych i powstawania biogenego octanu (proces acetogenezy zużywa powstający biowodór, hamując tym samym także metanogenezę). O ile uzyskanie biowodoru z wykorzystaniem bakterii wyizolowanych ze środowiska naturalnego jest procesem trudnym, o tyle uzyskanie biogenego metanu jest możliwe i docelowo wydaje się, że taki proces można spróbować przeprowadzić w warunkach przemysłowych na jednym ze szcerpanych karpackich złóż ropy naftowej i gazu ziemnego.

Słowa kluczowe: mikroorganizmy, biowodór, biometan, metanogeneza, wody złożowe.

ABSTRACT: This paper examines the presence of bacteria capable of producing biohydrogen through the fermentation of organic substances in formation water and at sites of spontaneous oil seeps. This issue is closely related to the EU's European Green Deal strategy, which aims to reduce emissions by 55% until 2030. Technologies for producing biohydrogen, also referred to as white or gold hydrogen, are part of this strategy. The synthesis of biomethane (biogenic methane) from CO₂ and H₂ is also included within this framework. Samples of reservoir waters and soil from six natural oil seep sites were analyzed. Detailed analyses were performed using metataxonomic sequencing, while qualitative analyses of microorganism abundance were carried out using conventional methods with microbiological media. The presence of methanogenic Archaea was confirmed using FISH (fluorescence *in situ* hybridization). The presence of biohydrogen-generating bacteria was demonstrated in all analyzed samples; however, only one sample yielded biohydrogen at a concentration of nearly 4%, while the others yielded only trace amounts of this product. Methane was generated in three cases in large quantities (>60% of the resulting biogas) and in one case in sufficient quantities. In the remaining cases, only trace amounts of methane were produced, most likely due to the activity of homoacetogenic bacteria and the formation of biogenic acetate (acetogenesis consumes the resulting biohydrogen, thus inhibiting methanogenesis). While obtaining biohydrogen with bacteria isolated from the natural environment is difficult, the production of biogenic methane is possible. Ultimately, it appears that such a process can be attempted under industrial conditions in one of the depleted crude oil and natural gas fields.

Key words: microorganisms, biohydrogen, biomethane, methanogenesis, reservoir waters.

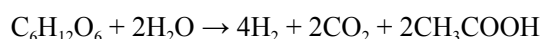
Autor do korespondencji: P. Kapusta, e-mail: piotr.kapusta@inig.pl

Artykuł nadesłano do Redakcji: 05.08.2025 r. Zatwierdzono do druku: 16.12.2025 r.

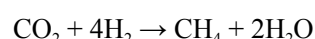
Wstęp

Przyjęta przez UE strategia Europejskiego Zielonego Ładu zakłada redukcję emisji CO₂ o 55% do 2030 roku (Golombek i in., 2022). Podobnie optymistyczne założenia zostały przyjęte przez rząd USA – redukcja o 50% do końca tego samego roku (Bistline i in., 2022). Uzyskanie tak optymistycznego wyniku nie będzie możliwe bez konieczności sekwestracji CO₂ w podziemnych składowiskach gazu, budowanych w strukturach geologicznych (Koukouzas i in., 2022). Z drugiej strony, w tzw. okresie przejściowym, głównym paliwem służącym zarówno do ogrzewania, jak i do produkcji elektryczności ma być gaz ziemny, stopniowo zastępowany przez gazy o niskiej zawartości węgla: wodór (Khatiwada i in., 2022), biogaz (Lindfors i in., 2022) i gaz syntetyczny (Alibrahim i in., 2021). Jeszcze jednym aspektem polityki klimatycznej UE jest produkcja energii elektrycznej z OZE, której nadwyżki mogą i powinny być magazynowane w postaci wodoru (Hassan i in., 2021). Magazynowanie wodoru stanowi poważne wyzwanie i podobnie jak w przypadku sekwestracji CO₂ rozważa się wykorzystanie do tego rozmaitych struktur geologicznych (Mouli-Castillo i in., 2021) oraz przede wszystkim kavern solnych (Caglayan i in., 2020; Małachowska i in., 2022). Istnieje jednak szereg przesłanek wskazujących na to, że wodór, CO₂ i gaz ziemny można magazynować w tych samych formacjach geologicznych (Tarkowski i in., 2021). Jednocześnie ostatnio pojawiło się coraz większe zainteresowanie tzw. białym wodorem. Termin ten odnosi się do wodoru, który naturalnie występuje w skorupie ziemskiej, w odróżnieniu od wodoru pochodzącego z przeróbki węgla (określanego jako czarny), gazu ziemnego (szary) oraz pochodzącego z elektrolizy wody z wykorzystaniem prądu z odnawialnych źródeł energii (zielony) (Osselin i in., 2022). Wydaje się, że liczba kolorów użyta do opisu różnego rodzaju źródeł wodoru wzrasta, jednak największym zainteresowaniem cieszy się biały wodór, zwany też złotym (Arcos i Santos, 2023). Biały wodór może występować w szeregu struktur geologicznych i jest stosunkowo często wykrywany, aczkolwiek jego stężenie rzadko przekracza 10% (Zgonnik, 2020). Doniesiono, że w strukturach geologicznych istnieją akumulacje naturalnego wodoru o znacznie większym stężeniu (nawet 90%), co stwarzałoby zupełnie nowe perspektywy dla osiągnięcia neutralności klimatycznej (Bettayeb, 2023; Truche i in., 2024). Koszt uzyskania takiego wodoru może być nawet dziesięciokrotnie niższy niż wodoru uzyskanego z elektrolizy wody. Istnieje jednak jeszcze jedno źródło wodoru cząsteczkowego, które jest całkowicie ekologiczne. Mianowicie wodór może powstawać w wyniku procesów metabolicznych mikroorganizmów. Dwa z tych procesów, tj. biofotoliza (Javed i in., 2022) oraz fotofermentacja (Hitam i Jalil, 2023), znajdują się poza zainteresowaniami badawczymi przemysłu naftowego, ponieważ są one ściśle uzależnione od

światła słonecznego. W tym kontekście zwraca uwagę trzeci z nich, tzw. ciemna fermentacja (Łukajtis i in., 2018), który jest procesem przebiegającym bez dostępu światła, a polega na przemianie materii organicznej (głównie cukrów złożonych) w warunkach beztlenowych. Jego produktami oprócz wodoru są kwasy, alkohole i CO₂:

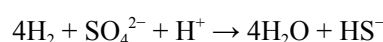


Ze względu na fakt, że środowisko złożowe jest beztlenowe, istnieje uzasadnione przypuszczenie co do możliwości prowadzenia fermentacji beztlenowej w szcerpanych złożach ropy naftowej lub/i gazu ziemnego, a co więcej – można by w tym celu wykorzystać różnego rodzaju odpady. Znanych jest szereg bakterii zdolnych do wytwarzania wodoru, które wykazują potencjał rozwoju w takim środowisku, jednakże to pozornie proste zagadnienie jest w istocie o wiele bardziej skomplikowane. Mianowicie wszędzie tam, gdzie rozwijają się mikroorganizmy, powstaje sieć wzajemnych powiązań między nimi, w których jedne korzystają z produktów wytwarzanych przez inne. Bakteriom wydzielającym wodór cząsteczkowy bardzo często towarzyszą metanogenne archeony. Organizmy te, należące do domeny Archaea i królestwa Euryarchaeota, odpowiedzialne są za proces tworzenia biogenego metanu i występują w rozmaitych środowiskach, takich jak bagna, osady morskie, układy pokarmowe zwierząt, wysypiska śmieci, w tym także w środowiskach ekstremalnych, jak np. w złożach ropy naftowej, gorących źródłach czy kominach hydrotermalnych (Demirel i Scherer, 2008). Taksonomia wyróżnia kilka grup metanogenów (Anderson i in., 2009). Metanogeneza jest formą zdobywania energii przez te mikroorganizmy. Tworzenie biogenego metanu przebiega na drodze trzech procesów biochemicznych, jednak z punktu widzenia zapotrzebowania na biogeny wodór istotna jest metanogeneza hydrogenotroficzna:



Jak widać, metanogenne archeony korzystają zarówno z H₂, jak i CO₂ powstającego w procesie ciemnej fermentacji. Jest to niekorzystne zjawisko, natomiast gdyby proces metanogenezy zachodził w szcerpanym złożu gazu, nie miałoby to negatywnych konsekwencji.

Drugim procesem wykorzystującym biogeny wodór jest biologiczna redukcja siarczanów. Reakcja ta przebiega następująco:



Proces ten jest prowadzony przez zróżnicowaną grupę bakterii określaną jako SRB (ang. *sulfate reducing bacteria*), aczkolwiek należy pamiętać, że może być również częścią metabolizmu niektórych archeonów (Zhang i in., 2022). Obecnie w literaturze pojawiają się sugestie, aby wszystkie te organizmy

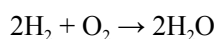
zaliczyć do wspólnej grupy SRM – mikroorganizmów redukujących siarczany/siarczyny (ang. *sulfate/sulfite reducing microorganisms*) (Diao i in., 2023). Ich obecność jest zdecydowanie niekorzystna, tworzenie biogenego siarkowodoru to bowiem nie tylko obniżenie jakości ropy/gazu, ale także inne problemy, np. korozja.

Trzeci proces to homoacetogeneza, czyli powstawanie biogenego octanu (Willems i in., 1989). Wyspecjalizowana grupa bakterii potrafi wykorzystywać wodór do redukcji CO₂, lecz w odróżnieniu od działania metanogennych archeonów produktem ich metabolizmu jest kwas octowy:



Choć proces ten nie jest tak niekorzystny jak mikrobiologiczna redukcja siarczanów (kwas octowy jest słabym kwasem i może też być substratem dla metanogenezy), to również i w tym przypadku zużywa produkty powstające w trakcie ciemnej fermentacji (oczywiście poza kwasami), a ponadto wydajność takiej reakcji jest duża (ponad 40% biowodoru może zostać w ten sposób stracone) (Saady, 2013).

Ostatni biologiczny proces, który powoduje straty wodoru, to jego biologiczne utlenianie. Jest on stosunkowo najmniej niekorzystny, ponieważ odbywa się przede wszystkim w warunkach tlenowych, a ponadto tylko nieliczne bakterie potrafią go przeprowadzić (Willems i in., 1989). Ponadto jego produktem jest wyłącznie woda:



Zdolność mikroorganizmów do generowania wodoru lub/i do syntezy metanu z wodoru i CO₂ (metanogeneza hydrogennotroficzna) stwarza ciekawą możliwość z punktu widzenia obecnej polityki klimatycznej. Istnieją przesłanki, że takie mikroorganizmy mogą być aktywne w warunkach podziemnego magazynowania gazu (Dopfel i in., 2021, Molíková i in., 2022).

W niniejszej pracy zbadano, czy istnieje możliwość pozyskania z próbek środowiskowych bakterii wytwarzające wodór w procesie ciemnej fermentacji i czy w związku z tym będzie można wykorzystać je w warunkach karpackich złóż.

Materiały i metody

W pracy poddano analizie próbki wód pochodzących z karpackich złóż oraz próbki gleb pochodzących z miejsc naturalnych wycieków ropy naftowej. Ze względu na posiadanie próbek wód pobranych w ramach prac wykonanych dla zleceniodawcy zewnętrznego, oznaczono je tutaj w sposób zakodowany (X, Y, Z). Próbki pobrane z miejsc wycieków nie zostały zakodowane. Po wstępnych analizach metagenomicznych (opis w dalszej części) wykluczono próbki, które nie

zawierały bakterii produkujących wodór lub też zawierały je w skrajnie niskiej liczebności.

Próbki gleb pobrane z miejsc wycieków:

LMP-1 (Łęczany–Miejsce Piastowe) – 49°39'03,6"N
21°47'19,7"E

LMP-2 (Łęczany–Miejsce Piastowe) – 49°39'01,99"N
21°47'21,40"E

Ł-1 (Łosie) – 49°34'49,8"N 21°05'46,7"E

O-1 (Owczary) – 49°36'56,4"N 21°09'39,4"E

P-1 (Płowce) – 49°32'30,1"N 22°10'19,5"E

S-1 (Sękowa) – 49°36'55,6"N 21°11'52,4"E

Oprócz tego przeanalizowano 3 próbki wód złożowych (zakodowano je pod literami X, Y, Z).

Podłoża mikrobiologiczne

- Ogólna liczba heterotroficznych mikroorganizmów beztlenowych: gotowe podłoże stałe według Brewera (Merck).
- Ogólna liczba metanogenów hydrogenotroficznych: selektywne podłoże według Barkera.
CaCO₃ 20,0 g, NH₄Cl 1,0 g, K₂HPO₄ · 3H₂O 0,4 g, MgCl₂ · 6H₂O 0,1 g, woda destylowana 1 dm³, pH 7,0.
- Ogólna liczba metanogenów acetotroficznych:
CaCO₃ 10,0 g, octan wapnia 2,0 g, NH₄Cl 1 g, K₂HPO₄ · 3H₂O 0,4 g, MgCl₂ · 6H₂O 0,1 g, roztwór Na₂S · 9H₂O (0,1 g/10 cm³) 3,0 cm³, roztwór Na₂CO₃ (0,5 g/10 cm³) 3,0 cm³, woda destylowana 1 dm³, pH 7,0.

Mikroorganizmy wzbogacono w standardowych próbkach umieszczonych w anaerostacie Merck, wykorzystując bulion wzbogacony (BD Difco) z dodatkiem octanu sodu (0,2%). Hodowlę pozyskanych mikroorganizmów prowadzono w borokrzemowych butelkach laboratoryjnych 250 cm³ DURAN SCHOTT® wyposażonych w gumowy korek, pełniący funkcję zaworu bezpieczeństwa, a w większych ilościach w anaerostacie Schuett-Biotec (2 dm³).

Wszystkie składniki zakupiono w firmie Avantor Performance Materials Poland SA (dawniej POCH Gliwice).

Analizy mikrobiologiczne

Analizy metodami tradycyjnymi wykonano w celu oszacowania ogólnej liczby mikroorganizmów beztlenowych i metanogennych archeonów. W tym celu posłużono się metodą lanych płytek Kocha dla bakterii beztlenowych oraz metodą najbardziej prawdopodobnej liczby (NPL) dla metanogennych archeonów. Wszystkie analizy przeprowadzono z wykorzystaniem anaerostatu firmy Merck, a atmosferę beztlenową uzyskano dzięki użyciu wkładu Anaerocult® A. Wstępnej oceny obecności metanogennych archeonów dokonywano

poprzez obserwację tworzenia bąbelków gazu powstających w probówkach z podłożem selektywnym.

Metoda FISH (ang. *fluorescence in situ hybridization*)

Z próbki wody złożowej pobierano 1 ml, dodawano 3 cm³ 4-proc. roztworu formaldehydu i sączono przez sączek poliwęglanowy albo dodawano 1 cm³ wody złożowej do 2 cm³ 4-proc. roztworu formaldehydu, kolejno odwirowywano przy około 10 000 obrotów na minutę (5 min), odrzucano nadsącz, zawieszano w PBS (1,5 cm³), powtarzano ten krok dwukrotnie, dodając na końcu 48-proc. roztwór etanolu w PBS. Tak przygotowaną próbkę przechowywano w temperaturze -20°C, względnie od razu poddawano dalszej analizie.

Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* została wykonana na 10-dołkowym laminowanym epoksydem szkiełka mikroskopowym (Marienfeld, Niemcy) według metodyki opisanej przez Pernthaler i in. (2001) oraz Fuchsa i in. (2007) po dostosowaniu jej do analizowanych próbek. Hybrydyzację z sondami oligonukleotydowymi (sonda ARCH915 dla Archaea oraz sondy swoiste dla metanogennych Archaea) prowadzono w buforze o następującym składzie: 360 cm³ NaCl 5 M (końcowe stężenie 900 mM), 40 cm³ Tris · HCl 1 M (końcowe stężenie 20 nM), formamid, woda destylowana (uzupełniana do całkowitej objętości buforu 2 cm³), 2 cm³ 10% SDS (końcowe stężenie 0,01%). Sondy były wyznakowane fluoroforem Cy-3. Dla potrzeb hybrydyzacji mieszano 2 cm³ roztworu sondy z 18 cm³ buforu hybrydyzacyjnego w mikroprobówce 0,5 cm³ (typ probówek stosowanych w PCR). Filtry membranowe cięto na kilkanaście cienkich fragmentów, w zależności od liczby sond. Fragmenty mocowano na szkiełkach i pokrywano mieszaniną hybrydyzacyjną. Równocześnie umieszczano kawałek bibuły nasączonej buforem hybrydyzacyjnym w probówce plastikowej, gdzie następnie umieszczano szkiełka z fragmentami sączków. Hybrydyzację prowadzono przez 2 godziny w temperaturze 46°C. W tym czasie przygotowywano bufor do przepłukiwania (50 cm³) o następującym składzie: 5M NaCl (zależnie od % formamidu w buforze hybrydyzacyjnym, końcowe stężenie 900 nM), 1 cm³ 1 M Tris · HCl (końcowe stężenie 20 mM), woda destylowana (uzupełniana do 50 cm³), 50 cm³ 10% SDS

(końcowe stężenie 0,01%). Po zakończeniu procesu hybrydyzacji szybko przenoszono fragmenty w celu przepłukiwania buforem płuczącym i inkubowano przez 15 min w 48°C. Po przeniesieniu fragmentów na szkiełkę Petriego przepłukiwano je wodą destylowaną, a następnie pozwalano wyschnąć na bibule filtracyjnej. Z kolei filtry barwiono kontrastowo 50 cm³ roztworu DAPI (4',6'-diamidyno-2-fenylindol, wzbudzenie przy 358 nm, maksimum emisji przy 461 nm) przez 3 min. Niezwiązany barwnik odpłukiwano 80-proc. etanolem, po którym fragmenty przepłukiwano jeszcze wodą destylowaną. Po wysuszeniu montowano fragmenty filtrów na szkiełkach mikroskopowych w mieszaninie 4 : 1 CitiFluor AP-1 i Vecta Shield, a rezultaty oglądano za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego Nikon Eclipse 50i z cyfrową analizą obrazu. W tabeli 1 przedstawiono sekwencję selektywnych sond użytych do identyfikacji organizmów metanogennych.

Metodę FISH zastosowano wyłącznie jako metodę jakościową w celu oceny, jakie mikroorganizmy występują w konkretnych próbkach wody złożowej i gleby.

Analiza metagenomiczna populacji mikroorganizmów

Analiza metagenomiczna populacji bakterii i archeonów została przeprowadzona na bazie hiperzmiennego regionu V3-V4 genu 16S rRNA w firmie Genomed SA.

Do amplifikacji wybranego regionu i przygotowania biblioteki zostały użyte specyficzne sekwencje starterów 341F oraz 785R (analiza 16S). Analizę PCR (ang. *polymerase chain reaction* – reakcja łańcuchowa polimerazy) przeprowadzono z użyciem Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix, zastosowano warunki reakcji zgodnie z zaleceniami producenta.

Sekwencjonowanie wykonano na aparacie MiSeq, w technologii *paired-end* (PE), 2 × 300 nt., z użyciem zestawu v3 firmy Illumina (San Diego, USA). Szczegółowe informacje dostępne są na stronach internetowych producentów odczynników. Automatyczna wstępna analiza danych została przeprowadzona na sekwenatorze MiSeq z użyciem oprogramowania MiSeq Reporter (MSR) v2.6. Analiza składała się z dwóch etapów:

- 1) automatycznego demultipleksowania próbek;
- 2) generowania plików fastq, zawierających surowe odczyty.

Tabela 1. Sondy oligonukleotydowe użyte w analizach metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ*

Table 1. 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes used for fluorescence *in situ* hybridization

Sonda	Selektywność	Sekwencja sondy (5'–3')	Miejsce docelowe ^a	FA ^b [%]	NaCl ^c [mM]	Literatura
MC1109	<i>Methanococcales</i>	GCAACATAGGGCACGGGTCT	16S (1109)	35	80	Díaz i in., 2003 Boetius i in., 2000
MEB859	<i>Methanobacteriales</i>	GCAGCCACCCGTAGGTGT	16S (859)	25	159	
MG1200	<i>Methanomicrobiales</i>	GCTGCCACCCGTAGGTGT	16S (1200)	5	636	
MSSH859	<i>Methanosarcinales</i>	TCGCTTCACGGCTTCCCT	16S (859)	35	80	

^a miejsce hybrydyzacji sondy ustalone na podstawie sekwencji *Escherichia coli*; ^b stężenie formamidu w buforze hybrydyzacyjnym (v/v), ^c stężenie NaCl w buforze przemywającym (v/v)

Analiza bioinformatyczna zapewniająca klasyfikację odczytów do poziomu gatunku została przeprowadzona pakietem oprogramowania QIIME 2 (Estaki i in., 2020) na podstawie bazy sekwencji referencyjnych Silva 138. Został wykorzystany pakiet DADA2 (Callahan i in., 2016), który pozwolił na wyszczególnienie sekwencji pochodzenia biologicznego od tych nowo powstałych w procesie sekwencjonowania.

Pakiet ten posłużył również do wyodrębnienia unikatowych sekwencji biologicznego pochodzenia, czyli tzw. sekwencji ASV (ang. *amplicon sequence variant*). Dokładny opis przedstawiono w pracy Brzeszcz i in. (2020).

Wyniki

Próbek gleb, ze względu na fakt, że z reguły zawierają dużą liczbę mikroorganizmów, nie poddano analizie ilościowej, tylko od razu dokonywano wzbogacenia.

1. Próbką LMP-1 charakteryzowała się ogromną bioróżnorodnością. Dominowały w niej następujące mikroorganizmy: *Proteiniphilum* (8,59%), *Dechloromonas* (4,58%), *Caldisericum* (4,00%), przedstawiciel rzędu RBG-13-54-9 (3,77%), C1-B045 (3,64%), *Leptolinea* (3,43%), przedstawiciel rodziny Comamonadaceae (3,41%), *Longilinea* (3,29%), *Mycobacterium* (2,97%), przedstawiciel rodziny Dysgonomonadaceae (2,53%), przedstawiciel rodziny Bacteroidetes_vadinHA17 (2,47%), *Parvibaculum* (2,31%), przedstawiciel klasy SJA-28 (2,26%), przedstawiciel rodziny Rhodocyclaceae (2,16%), *Methylocystis* (2,00%), przedstawiciel rodziny Paludibacteraceae (1,82%), *Magnetospirillum* (1,63%), przedstawiciel rodziny Acetobacteraceae (1,535%), *Methanosarcina* (1,35%), *Paludibacter* (1,25%), przedstawiciel klasy Dojkabacteria (1,17%), *Afipia* (1,14%), *Azospira* (1,13%), przedstawiciel rodziny Spirochaetaceae (1,12%), przedstawiciel typu Armatimonadota (1,11%), *Thermomonas* (1,07%), *KCM-B-112* (1,04%), *Extensimonas* (1,00%), przedstawiciel rodziny Anaerolineaceae (0,93%), *Rhizobacter* (0,93%), *Sulfuritalea* (0,88%), przedstawiciel rodziny Methylophilaceae (0,83%), *Immundisolibacter* (0,82%), przedstawiciel rodziny WD2101_soil_g (0,78%), przedstawiciel rodzaju g_Christensenellaceae_R-7_group (0,72%), *Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium* (0,70%), przedstawiciel rodziny Acetobacteraceae (0,62%), *Methanoregula* (0,61%), *Williamsia* (0,51%), przedstawiciel rodziny Holophagaceae (0,50%), *Flexilinea* (0,50%), przedstawiciel rodziny Hyphomicrobiaceae (0,49%), przedstawiciel rodziny Prevotellaceae (0,47%), przedstawiciel rodziny SRB2 (0,45%), przedstawiciel rodziny Christensenellaceae (0,40%), inny przedstawiciel rodziny Christensenellaceae

(0,49%), *Ruminiclostridium* (0,37%), przedstawiciel rodziny Hydrogenedensaceae (0,37%), *Rhodanobacter* (0,36%). Oprócz tego stwierdzono obecność przedstawiciela rodziny Syntrophomonadaceae, organizmów syntroficznych pośredniczących w procesie metanogenezy. Obecność metanogenów archeonów (*Methanosarcina*, *Methanoregula*), jak również szeregu organizmów potencjalnie wytwarzających biowodór (*Proteiniphilum*, *Leptolinea*, przedstawiciele rodziny Christensenellaceae, *Ruminiclostridium*) sugerowała, że produktami procesów metabolicznych tego konsorcjum powinny być metan, CO₂ oraz biowodór. Ten ostatni zapewne powstaje, jednakże najprawdopodobniej w całości ulega przetworzeniu w metan (70,93%) – tabela 2.

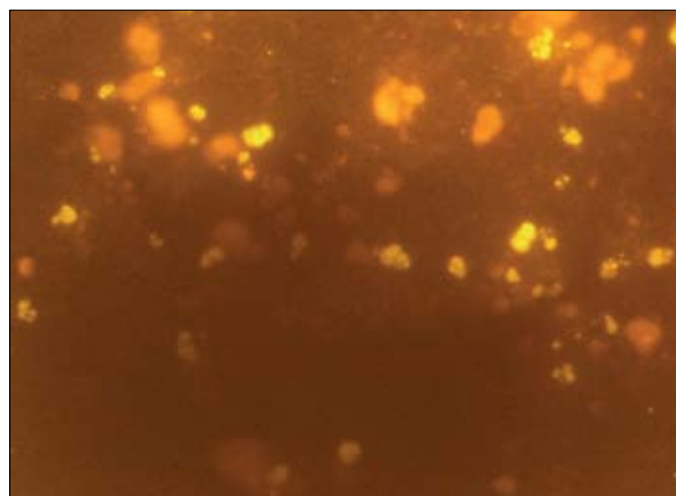
2. W próbce LMP-2 dominującym organizmem był *Bacterioides*, którego względna liczebność wynosiła 21,40%. Poza tym w próbce stwierdzono występowanie większej liczebności takich mikroorganizmów jak: *Macellibacteroides* (13,41%), *Pseudomonas* (12,94%), *Methanosarcina* (3,61%), *Rhodococcus* (3,51%), *Azotobacter* (3,20%), przedstawiciel rzędu Bacteroidales (3,10%), *Caproiciproducens* (2,78%), *Oscillibacter* (2,15%), przedstawiciel rodziny Peptococcaceae (1,95%), *Fonticella* (1,915%), przedstawiciel rodziny Prevotellaceae (1,865%), *Clostridium_sensu_stricto_12* (1,24%), *Bact-08* (1,00%), *Clostridium_sensu_stricto_13* (0,94%), *Clostridium_sensu_stricto_1* (0,94%), *Mycobacterium* (0,84%), *Proteiniphilum* (0,82%), *Parabacteroides* (0,79%), *Anaerofilum* (0,77%), *UCG-004* (0,72%), przedstawiciel rzędu RF39 (0,63%), przedstawiciel rodziny Thermaceae (0,62%), przedstawiciel rodziny Lachnospiraceae (0,61%), *Rhodanobacter* (0,59%), przedstawiciel rodziny Oscillospiraceae (0,51%), *Lachnoclostridium* (0,46%), *Sedimentibacter* (0,45%). W próbce stwierdzono występowanie metanogenów archeonów, oprócz przedstawicieli rodzaju *Methanosarcina* zidentyfikowano śladową liczebność przedstawicieli rodzaju *Methanomassiliococcus* i rodziny *Methanomethylophilaceae*. Odnotowano również obecność organizmów potencjalnie wydzielających biowodór, takich jak *Clostridium_sensu_stricto_12*, *Clostridium_sensu_stricto_13*, *Clostridium_sensu_stricto*, *Proteiniphilum* i *Lachnoclostridium*. W efekcie uzyskano biogaz zawierający duże stężenie metanu (68,79%) – tabela 2. Rysunek 1 przedstawia komórki *Methanosarcina*, które zobrazowano z wykorzystaniem selektywnej dla rzędu *Methanosarcinales* sondy oligonukleotydowej MSSH859.
3. W próbce Ł-1 dominował rodzaj *Bifidobacterium*, którego względna liczebność wynosiła 24,21%. Oprócz tego mikroorganizmu stwierdzono większe liczebności następujących bakterii: *Cloacibacillus* (12,45%), *Bacterioides* (8,31%), *Lachnoclostridium* (potencjalny producent

- biowodoru – 8,18%), *Akkermansia* (5,63%), *Anaeroglobus* (3,87%), *Collinsella* (3,69%), *Eubacterium* (3,60%), przedstawiciela rodziny Selenomonadaceae (2,875%), *Bilophila* (2,785%), *Enterococcus* (2,18%), przedstawiciela rodziny Lachnospiraceae (1,73%), *Alistipes* (1,70%), *Oscillibacter* (1,51%), *Blautia* (1,24%), *Fusobacterium* (1,17%), *Centipeda* (0,85%), *Roseburia* (0,82%), przedstawiciela rządu Rhodospirillales (0,80%), *Mycobacterium* (0,77%), drugiego przedstawiciela rodziny Lachnospiraceae (0,72%), *Flavonifractor* (0,71%), *Sutterella* (0,66%), *Sellimonas* (0,62%), *Sporomusa* (0,56%), *Subdoligranulum* (0,55%), *Eisenbergella* (0,50%), *Parabacteroides* (0,47%), *Marvinbryantia* (0,43%), *Lactobacillus* (0,42%), przedstawiciela rodziny Oscillospiraceae (0,37%), *Hungatella* (0,35%). W próbce nie stwierdzono metanogennych archeonów. Niestety, stosunkowo duża liczebność organizmów homoacetogennych (*Eubacterium*, *Sporomusa* i *Blautia*) zniwelowała szansę na otrzymanie jakichkolwiek ilości wodoru (pH próbki po zakończonym eksperymencie wynosiło poniżej 5,0).
4. Gleba O-1 okazała się próbka, w której dominował przedstawiciel rodzaju *Enterobacter* (56,68%). Oprócz tego stwierdzono obecność przedstawicieli rodzajów *Acinetobacter* (17,15%), *Bradyrhizobium* (9,72%), *Bacillus* (5,95%), *Sedimentibacter* (2,145%), *Achromobacter* (0,96%), przedstawiciela rodziny Lachnospiraceae (0,67%), *Lachnoclostridium* (0,585%), *Cellulomonas* (0,49%), *Mycobacterium* (0,48%), *Actinomyces* (0,33%), *Clostridium_sensu_stricto_12* (0,32%), *Anaerocolumna* (0,298%), *Ruminiclostridium* (0,25%), *Clostridium_sensu_stricto_13* (0,23%), *Rhodoplanes* (0,22%), *Clostridium_sensu_stricto_8* (0,18%), przedstawiciela rodziny LWQ8 (0,17%), *Anaerospomusa* (0,15%), przedstawiciela rządu Microtrichales (0,145%). Nie zaobserwowano metanogennych archeonów, wykazano natomiast obecność organizmów generujących potencjalnie wodór, takich jak *Enterobacter*, *Lachnoclostridium*, *Clostridium_sensu_stricto_12*, *Clostridium_sensu_stricto_13*, *Ruminiclostridium* i *Clostridium_sensu_stricto_8*. Była to jedyna próbka, w której odnotowano większe ilości wodoru – 3,79%. Stwierdzono również wydzielenie dużej ilości CO₂ – 28,86% oraz śladów metanu – 0,00992% (tabela 2).
 5. W próbce P-1 dominował przedstawiciel rodziny Peptococcaceae (16,96%). Oprócz niego stwierdzono występowanie w dużej liczebności następujących organizmów: *Azotobacter* (10,79%), *Megasphaera* (7,10%), *Bacteroides* (6,90%), *Parabacteroides* (5,50%), przedstawiciela rządu Bacteroidales (4,42%), *Proteiniphilum* (3,33%), *Fonticella* (2,64%), przedstawiciela rodziny Ethanoligenenaceae o niepewnej pozycji (2,50%), *Telmatospirillum* (2,37%), *Lactobacillus* (2,36%), *Caproiciproducens* (2,34%), przedstawiciela rodziny Acidaminococcaceae (1,88%), *Lachnoclostridium* (1,78%), *Ruminiclostridium* (1,60%), przedstawiciela rządu Coriobacteriales (1,50%), *Anaerocella* (1,445%), przedstawiciela rodziny Prevotellaceae (1,40%), *Methanosarcina* (1,155%), *Actinomyces* (1,13%), przedstawiciela rodziny Ruminococcaceae o niepewnej pozycji (1,11%), *Catabacter* (1,02%), przedstawiciela rządu RF39 (0,98%), *Rikenellaceae_RC9_gut_group* (0,66%), *Oscillibacter* (0,64%), *Citrobacter* (0,56%), *Enterococcus* (0,53%), przedstawiciela rządu Veillonellales-Selenomonadales (0,51%), *Prevotellaceae_UCG-004* (0,44%). Obecne były także metanogenne archeony – oprócz *Methanosarcina* stwierdzono obecność w śladowych ilościach przedstawicieli rodziny Methanomethylphilaceae oraz rodzajów *Methanobacterium* i *Methanomassiliicoccus*. Ich obecność oraz występowanie bakterii potencjalnie generujących biowodór (*Megasphaera*, *Proteiniphilum*, *Lachnoclostridium*, *Ruminiclostridium*, *Citrobacter* i *Enterococcus*) przełożyły się na produkcję metanu w zadowalającym stopniu (otrzymano 62,80% metanu) – tabela 2.
 6. W glebie S-1 dominował przedstawiciel homoacetogennego rodzaju *Sporomusa* (37,00%). Oprócz tego stwierdzono obecność następujących rodzajów bakterii: *Lysinibacillus* (16,33%), *Telmatospirillum* (9,95%), *Serratia* (7,12%), *Rhodanobacter* (3,64%), *Bacillus* (2,31%), *Actinomyces* (2,07%), przedstawiciela rodziny Lachnospiraceae (1,73%), *Sedimentibacter* (1,30%), *Proteiniphilum* (1,26%), *Cellulomonas* (1,20%), *Cupriavidus* (1,19%), *Lachnoclostridium* (1,095%), *Paludibacter* (1,09%), *Mycobacterium* (1,06%), *Ruminiclostridium* (0,92%), *Paludibaculum* (0,89%), *Oscillibacter* (0,64%), *Pleomorphomonas* (0,55%), *Pseudoxanthomonas* (0,44%). W próbce nie zidentyfikowano metanogennych archeonów. Jakkolwiek znajdowały się tam bakterie prawdopodobnie wytwarzające wodór, takie jak *Proteiniphilum*, *Lachnoclostridium* i *Ruminiclostridium*, to tak duża liczebność acetogennego organizmu, jakim jest *Sporomusa*, spowodowała, że nie otrzymano żadnego gazu, a pH roztworu spadło poniżej 5.
 7. Próbką X cechowała się stosunkowo małą bioróżnorodnością i – nieoczekiwanie – dominowały w niej bakterie tlenowe, występujące w liczebności $5,8 \cdot 10^5$ jtk/cm³, zaś liczebność bakterii beztlenowych była dużo niższa – zaledwie $2,1 \cdot 10^2$ jtk/cm³. Jednak brak metanogennych archeonów zdecydował, że próbkę poddano wzbogaceniu. Po wykonaniu analizy okazało się, że nadal dominowały w niej bakterie tlenowe. Względna liczebność prezentowała się następująco: *Enterobacter* (57,95%), *Bacillus* (13,91%), *Citrobacter* (2,46%), *Clostridium_sensu_stricto_1* (0,98%),

nieoznaczony przedstawiciel Enterobacteriaceae (0,90%), *Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium* (0,84%), *Lysinibacillus* (0,10%), *Azotobacter* (0,077%), przedstawiciel rodziny Peptococcaceae (0,074%), *Bacteroides* (0,072%), *Sporomusa* (0,052%), *Pediococcus* (0,028%), *Psychrobacillus* (0,023%), *Desulfosporosinus* (0,023%), *Megasphaera* (0,022%), *Telmatospirillum* (0,014%). Organizmy przypuszczalnie zdolne do generowania biowodoru to: *Citrobacter*, *Clostridium_sensu_stricto_1*, przedstawiciel rodziny Peptococcaceae i *Megasphaera*. Oprócz wymienionych w śladowej liczebności stwierdzono obecność przedstawiciela rodziny Acidaminococcaceae (0,01%), również znanej ze zdolności produkcji biowodoru. Niestety eksperyment nie potwierdził powstawania istotnych ilości gazu, natomiast pH podłoża obniżyło się aż do 5, co sugeruje że nastąpił intensywny rozwój bakterii acetogennych (np. z rodzaju *Sporomusa*).

8. Próbkę Y – w próbce tej dominowały organizmy beztlenowe w liczebności $4,9 \cdot 10^4$ jtk/cm³. Stwierdzono śladową liczbę metanogennych archeonów, jednak pomimo tego poddano próbkę wzbogaceniu. Po wykonaniu analizy metagenomicznej okazało się, że w próbce dominują następujące rodzaje: *Alcaligenes* – szereg gatunków w obrębie tego rodzaju potrafi rozwijać się w warunkach beztlenowych (33,05%), *Haloplasma* (10,74%), *Lysinibacillus* (5,41%), *Tissierella* (4,51%), *Flavobacterium* (3,77%), *Proteiniborus* (3,68%), *Proteiniphilum* (3,52%), nieoznaczony przedstawiciel rodziny Dysgonomonadaceae (3,36%), g_UCG-010 (2,46%), g_Christensenellaceae_R-7_group (2,19%), *Sedimentibacter* (2,06%), *Lutispora* (2,05%), *Myroides* (2,00%), *Dysgonomonas* (1,82%), *Fermentimonas* (1,72%), *Paenicaligenes* (1,36%), g_MBA03 (0,95%), *Clostridium_sensu_stricto_13* (0,82%) i *Brevundimonas* (0,81%). Organizmy potencjalnie zdolne do produkcji biowodoru to *Tissierella*, *Proteiniborus*, *Proteiniphilum*, przedstawiciel rodziny Christensenellaceae, *Clostridium_sensu_stricto_13* oraz występujący w śladowej liczebności przedstawiciel rodzaju *Hydrogenoanaerobacterium* (0,125%). W próbce stwierdzono niewielką liczebność metanogennych archeonów z rodzajów *Methanomassiliicoccus* (0,57%), *Methanosarcina* (0,47%) i *Methanoculleus* (0,39%). Odnotowano obecność metanu w ilości 16,26% (tabela 2).
9. Próbkę Z (woda złożowa pochodząca ze złoża ropy naftowej) charakteryzowała się dużą liczbą bakterii tlenowych ($5,6 \cdot 10^5$ jtk/cm³) oraz beztlenowych ($4,1 \cdot 10^4$ jtk/cm³). Próbkę ta cechowała się zaskakująco dużą bioróżnorodnością jak na próbkę wody złożowej. Dominowały w niej następujące organizmy: przedstawiciel rodziny Moraxellaceae (7,28%), *CI-B045* (4,15%), *Gemmatimonas* (2,89%), *Ellin6067* (2,89%), inny przedstawiciel rodziny

Gemmatimonadaceae (2,67%), przedstawiciel rodziny Microbacteriaceae (2,43%), *Sphingomonas* (2,26%), *KCM-B-112* (2,18%), *Pseudarthrobacter* (1,83%), *Phenyllobacterium* (1,63%), *Lysobacter* (1,62%), przedstawiciel rodziny Vicinamibacteraceae (1,44%), *Rhizobacter* (1,38%), *Arenimonas* (1,37%), przedstawiciel rodziny Chitinophagaceae (1,25%), *Flavobacterium* (1,20%), przedstawiciel rodziny Blastocatellaceae (1,19%), *Bryobacter* (1,16%), *Pseudomonas* (1,11%), *Thermomonas* (1,085%), przedstawiciel rzędu Subgroup_7 z rzędu Holophagae (1,04%), przedstawiciel klasy KD4-96 (1,02%), przedstawiciel rodziny SC-I-84 (0,97%), *Sulfuritalea* (0,96%), *Cavicella* (0,895%), przedstawiciel rodziny Micropepsaceae (0,89%), *Candidatus_Solibacter* (0,84%), *Subgroup_10* z rodziny Thermoanaerobaculaceae (0,81%), przedstawiciel rodziny Comamonadaceae (0,76%), przedstawiciel rodziny f_A21b (0,76%), *Terrimonas* (0,75%), *Chthoniobacter* (0,74%), *Candidatus_Udaeobacter* (0,70%), przedstawiciel rodziny Immundisolibacteraceae (0,70%), *Bradyrhizobium* (0,69%), *Dokdonella* (0,64%), *Rhodanobacter* (0,61%), przedstawiciel rodziny Xanthobacteraceae (0,59%), przedstawiciel rodziny Microscillaceae (0,57%), *RB41* (0,56%), *Immundisolibacter* (0,53%), *Herminiimonas* (0,53%), *Luteimonas* (0,51%), *Reyranella* (0,505%), przedstawiciel rzędu IMCC26256 (0,50%). Nie stwierdzono obecności metanogennych archeonów, odnotowano natomiast niewielką liczebność organizmów utleniających wodór z rodzaju *Hydrogenophaga* (0,08%). Nie stwierdzono także występowania organizmów acetogennych, jednakże analiza gazu wykazała obecność tylko śladów biowodoru (0,012%), a co ciekawe – także śladów metanu (0,15%) oraz dużej ilości CO₂ (37,53%) – tabela 2.



Rysunek 1. Komórki archeonów z rodzaju *Methanosarcina* wyznakowane sondą MSSH859 (fot. J. Brzeszcz)

Figure 1. Archaeal cells of the *Methanosarcina* genus stained with MSSH859 probe (photo by J. Brzeszcz)

Tabela 2. Skład chemiczny próbek biogazu [% obj.]**Table 2.** Chemical composition of the gas samples [% vol.]

Skład	Próbka LMP-1	Próbka LMP-2	Próbka P-1	Próbka Y	Próbka O-1	Próbka Z
C ₁	70,93566	68,79073	62,34624	16,26457	0,00992	0,14839
C ₂	0,00008	0,00140	0,00017	0,00004	0,00000	0,02827
C ₃	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	nd	nd
i-C ₄	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	nd	nd
n-C ₄	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	nd	nd
neo-C ₅	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	nd	nd
i-C ₅	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	nd	nd
n-C ₅	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	nd	nd
ΣC ₆	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	nd	nd
ΣC ₇	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	nd	nd
ΣC ₈	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	nd	nd
ΣC ₉	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	nd	nd
ΣC ₁₀	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	nd	nd
CO ₂	7,46956	23,28757	30,75680	4,92679	29,85740	37,53940
N ₂	20,41849	7,14017	5,97390	65,40383	58,86640	56,12830
O ₂	1,17620	0,78012	0,92306	13,40475	1,76275	2,41333
CO	poniżej LoD	poniżej LoD	0,00000	0,00000	nd	nd
He	poniżej LoD	poniżej LoD	0,00000	0,00000	nd	nd
H ₂	poniżej LoD	poniżej LoD	0,00000	0,00000	3,79086	0,01243
H ₂ S	poniżej LoD	poniżej LoD	0,00000	0,00000	nd	nd
Merkaptan metylowy	poniżej LoD	poniżej LoD	0,00000	0,00000	nd	nd
Merkaptan etylowy	poniżej LoD	poniżej LoD	0,00000	0,00000	nd	nd
Siarczek dimetylowy	poniżej LoD	poniżej LoD	ślad	ślad	nd	nd
Merkaptan izopropylowy	poniżej LoD	poniżej LoD	0,00000	0,00000	nd	nd
Merkaptan n-propylowy	poniżej LoD	poniżej LoD	0,00000	0,00000	nd	nd
Merkaptan izobutylowy	poniżej LoD	poniżej LoD	0,00000	0,00000	nd	nd
Merkaptan n-butylowy	poniżej LoD	poniżej LoD	0,00000	0,00000	nd	nd

nd – nie oznaczono (ang. *not determined*); LoD – granica wykrywalności (ang. *limit of detection*)

Dyskusja

Analiza występowania organizmów generujących biowodor nie jest prosta, ponieważ mogą się one rozwijać wyłącznie w warunkach beztlenowych. Oznacza to, że bardzo wiele zależy od sposobu poboru, transportu, jak i przechowywania próbek. Niejednokrotnie nawet niewielkie ilości tlenu atmosferycznego mogą całkowicie zahamować aktywność tych organizmów, podobnie jak w przypadku metanogennych archeonów. Dlatego niejednokrotnie wynik negatywny nie musi oznaczać braku aktywności tych organizmów w danym środowisku. Z drugiej strony, nawet wykazanie obecności tych bakterii wcale nie musi oznaczać sukcesu w próbach uzyskania zadowalających ilości biowodoru. Po pierwsze, cząsteczka wodoru jest wyjątkowo mała, co oznacza, że gaz ten może wydostawać się

z układów, które są wystarczająco szczelne dla metanu, tlenu, azotu czy CO₂. Ponadto, co już omówiono, wodór jest donorem elektronów w szeregu procesów biochemicznych i zasadniczo w ramach normalnego obiegu pierwiastków na Ziemi niemal cały wodór powstały w wyniku procesów fermentacyjnych jest zużywany w kolejnych procesach (patrz: Wstęp). We wszystkich analizowanych próbkach wykazano obecność bakterii potencjalnie generujących biowodor, co należy uznać za zadowalający wynik, jednak tylko w jednej uzyskano jego zauważalnie mierzalną ilość. W pozostałych próbkach stwierdzono albo zakwaszenie środowiska, albo – co korzystne – syntezę biometanu. Wynik ten wskazuje jednoznacznie na obecność także innych procesów mikrobiologicznych niż generowanie biowodoru, ponieważ jest on substratem do metanogenezy i acetogenezy. Trzeba jednak zwrócić uwagę na ogromną

bioróżnorodność we wszystkich analizowanych próbkach, szczególnie zaś w próbkach pobranych w miejscach naturalnych wycieków ropy naftowej. Oznacza to, że praktycznie nie ma możliwości otrzymania naturalnych konsorcjów, które będą zawierały wyłącznie korzystne mikroorganizmy, ponieważ w każdym środowisku istnieje sieć wzajemnych powiązań między nimi. Z pozytywnych obserwacji – nie stwierdzono obecności siarkowodoru. Zarówno metanogeneza, jak i acetogeneza to procesy konkurencyjne dla generowania biogenego siarkowodoru. Z drugiej strony, ponieważ ropa naftowa może być degradowana w złożu w warunkach beztlenowych (Sierra-Garcia i in., 2020), istnieje duże prawdopodobieństwo, że wprowadzenie odpowiednich mikroorganizmów do szcherpanego złoża będzie skutkowało powstaniem biowodoru i/lub metanu. Zostało to potwierdzone w warunkach laboratoryjnych przez Dopffel i in. (2022). Można więc wyciągnąć wniosek, że obecność licznych heterotroficznych bakterii beztlenowych w każdej z badanych próbek, a więc „dostarczycieli” substratów do metanogenezy, może zawsze prowadzić do generowania biowodoru i/lub biometanu, a kwestią, jaką należy rozwiązać, jest hamowanie aktywności konkurujących mikroorganizmów, takich jak bakterie homoacetogenne (poprzez kontrolowanie pH środowiska) i bakterie redukujące siarczany (wybór środowiska bez obecności siarczanów/siarczynów). Innymi słowy, wydaje się prawdopodobne, że w warunkach złożowych również będą istnieć analogiczne zależności pomiędzy mikroorganizmami odpowiedzialnymi za beztlenowy rozkład substancji organicznej a metanogennymi archeonami. Co więcej, może to oznaczać, że jeśli takie mikroorganizmy zostaną wprowadzone do środowiska złożowego, to zawsze otrzyma się korzystny produkt, albo biowodór, albo biometan. Natomiast w przypadku stwierdzenia obecności hydrogenotroficznych metanogennych archeonów można będzie połączyć generowanie biometanu z promowaną obecnie sekwestracją CO₂. Wnioski te znajdują potwierdzenie w pracy opublikowanej przez Tyne i in. (2021). Autorzy ci wykazali, że w złożu ropy naftowej Olla (Luizjana, USA), do którego zatłaczano CO₂ w celu intensyfikacji wydobycia ropy naftowej, nastąpił proces tworzenia metanu przez metanogenne archeony.

Tak więc wprowadzenie CO₂ do środowiska złożowego może okazać się niezwykle korzystne nie tylko z punktu widzenia osiągnięcia założonych celów ograniczenia poziomu gazów cieplarnianych, ale i w sensie generowania odnawialnych źródeł energii, jakim jest biometan.

Wnioski

1. Obecność bakterii potencjalnie wytwarzających wodór została stwierdzona we wszystkich analizowanych prób-

kach wód złożowych i gleb, co sugeruje, że występują one powszechnie w środowiskach beztlenowych.

2. Powstający wodór zostaje wykorzystany przez inne mikroorganizmy, takie jak metanogenne archeony lub bakterie homoacetogenne, dla których jest on niezbędnym substratem w procesach wzrostowych.
3. Otrzymanie biogenego metanu zamiast biowodoru może być korzystnym zjawiskiem, zwłaszcza z perspektywy sekwestracji CO₂ w środowisku złożowym.
4. Ograniczenie aktywności metanogennych archeonów i/lub bakterii homoacetogennych powinno prowadzić do otrzymania większych ilości biowodoru.
5. Dalsze badania powinny zostać przeprowadzone w symulowanych warunkach złożowych.

Artykuł powstał na podstawie pracy statutowej pt. *Identyfikacja i selekcja mikroorganizmów zdolnych do generowania biowodoru w warunkach karpackich złóż*, praca INiG – PIB; nr zlecenia: 0070/SM/2024, nr archiwalny: DK-4100-0055/2024.

Literatura

- Alibrahim H.A., Khalafalla S.S., Ahmed U., Park S., Lee C.-J., Zahida U., 2021. Conceptual design of syngas production by the integration of gasification and dry-reforming technologies with CO₂ capture and utilization. *Energy Conversion and Management*, 244: 114485. DOI: 10.1016/j.enconman.2021.114485.
- Anderson I., Ulrich L.E., Lupa B., Susanti D., Porat I., Hooper S.D., Lykidis A., Sieprawska-Lupa M., Dharmarajan L., Goltsman E., Lapidus A., Saunders E., Han C., Land M., Lucas S., Mukhopadhyay B., Whitman W.B., Woese C., Bristow J., Kyripides N., 2009. Genomic characterization of Methanomicrobiales reveals three classes of methanogens. *PLoS ONE*, 4: e5797. DOI: 10.1371/journal.pone.0005797.
- Arcos J.M.M., Santos D.M.F., 2023. The hydrogen color spectrum: Techno-economic analysis of the available technologies for hydrogen production. *Gases*, 3: 25–46. DOI: 10.3390/gases3010002.
- Bettayeb K., 2023. A gigantic hydrogen deposit in northeast France? CNRS News. <<https://news.cnrs.fr/articles/a-gigantic-hydrogen-deposit-in-northeast-france>> (dostęp: 25.06.2025).
- Bistline J., Abhyankar N., Blanford G., Clarke L., Fakhry R., McJeon H., Reilly J., Roney C., Wilson T., Yuan M., Zhao A., 2022. Actions for reducing US emissions at least 50% by 2030. *Science*, 376: 922–924. DOI: 10.1126/science.abn0661.
- Boetius A., Ravenschlag K., Schubert C., Rickert D., Widdel F., Gieseke A., Amann R., Jørgensen B.B., Witte U., Pfannkuche O., 2000. A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature*, 407: 623–626. DOI: 10.1038/35036572.
- Brzeszcz J., Kapusta P., Steliga T., Turkiewicz A., 2020. Hydrocarbon removal by two differently developed microbial inoculants and comparing their actions with biostimulation treatment. *Molecules*, 25: 661. DOI: 10.3390/molecules25030661.
- Caglayan D.G., Weber N., Heinrichs H.U., Linßen J., Robinius M., Kukla P.A., Stolten D., 2020. Technical potential of salt caverns for hydrogen storage in Europe. *International Journal of Hydrogen Energy*, 45: 6793–6805. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2019.12.161.

- Callahan B.J., McMurdie P.J., Rosen M.J., Han A.W., Johnson A.J.A., Holmes S.P., 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13, 581–583. DOI: 10.1038/nmeth.3869.
- Demirel B., Scherer P., 2008. The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 7: 173–190. DOI: 10.1007/s11157-008-9131-1.
- Diao M., Dykma S., Koeksoy E., Ngugi D.K., Anantharaman K., Loy A., Pester M., 2023. Global diversity and inferred ecophysiology of microorganisms with the potential for dissimilatory sulfate/sulfite reduction. *FEMS Microbiology Reviews*, 47: 1–18. DOI: 10.1093/femsre/fuad058.
- Díaz E., Amils R., Sanz J.L., 2003. Molecular ecology of anaerobic granular sludge grown at different conditions. *Water Science and Technology*, 48: 57–64. DOI: 10.2166/wst.2003.0357.
- Dopffel N., Florczyk Vik B., Mukherjee S., Djurhuus K., 2022. Bio-hydrogen production under pressure by pressure-adapted subsurface microbes. *International Journal of Hydrogen Energy*, 47: 3690–3698. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2021.11.030.
- Dopffel N., Jansen S., Gerritse J., 2021. Microbial side effects of underground hydrogen storage – Knowledge gaps, risks and opportunities for successful implementation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 46: 8594–8606. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2020.12.058.
- Estaki M., Jiang L., Bokulich N.A., McDonald D., González A., Kosciółek T., Martino C., Zhu Q., Birmingham A., Vázquez-Baeza Y., Dillon M.R., Bolyen E., Caporaso J.G., Knight R., 2020. QIIME 2 enables comprehensive end-to-end analysis of diverse microbiome data and comparative studies with publicly available data. *Current Protocols in Bioinformatics*, 70: e100. DOI: 10.1002/cpbi.100.
- Fuchs B., Pernthaler J., Amann R., 2007. Single cell identification by fluorescence in situ hybridization. [W:] Reddy C.A., Beveridge T.J., Breznak J.A., Marzluf G.A., Schmidt T.M., Snyder L.R. (eds.). *Methods for General and Molecular Microbiology*. Third Edition. ASM Press, Washington: 886–896. DOI: 10.1128/9781555817497.ch39.
- Golombek R., Lind A., Ringkjøb H.-K., Seljom P., 2022. The role of transmission and energy storage in European decarbonization towards 2050. *Energy*, 239: 122159. DOI: 10.1016/j.energy.2021.122159.
- Hassan I.A., Ramadan H.S., Saleh M.A., Hissel D., 2021. Hydrogen storage technologies for stationary and mobile applications: Review, analysis and perspectives. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 149: 111311. DOI: 10.1016/j.rser.2021.111311.
- Hitam C.N.C., Jalil A.A., 2023. A review on biohydrogen production through photo-fermentation of lignocellulosic biomass. *Biomass Convers. Biorefin*, 13: 8465–8483. DOI: 10.1007/s13399-020-01140-y.
- Javed M.A., Zafar A.M., Hassan A.A., Zaidi A.A., Farooq M., El Badawy A., Lundquist T., Mohamed M.M.A., Al-Zuhair S., 2022. The role of oxygen regulation and algal growth parameters in hydrogen production via biophotolysis. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10: 107003. DOI: 10.1016/j.jece.2021.107003.
- Khatiwada D., Vasudevana R.A., Santos B.H., 2022. Decarbonization of natural gas systems in the EU – Costs, barriers, and constraints of hydrogen production with a case study in Portugal. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 168: 112775. DOI: 10.1016/j.rser.2022.112775.
- Koukoulas N., Christopoulou M., Giannakopoulou P.P., Rogkala A., Gianni E., Karkalis C., Pyrgaki K., Krassakis P., Koutsovitis P., Panagiotaras D., Petrounias P., 2022. Current CO₂ capture and storage trends in Europe in a view of social knowledge and acceptance. *A short review. Energies*, 15: 5716. DOI: 10.3390/en15155716.
- Lindfors A., Hagman L., Eklund M., 2022. The Nordic biogas model: Conceptualization, societal effects, and policy recommendations. *City and Environment Interactions*, 15: 100083. DOI: 10.1016/j.cacint.2022.100083.
- Łukajtis R., Hołowacz I., Kucharska K., Glinka M., Rybarczyk P., Przyjazny A., Kamiński M., 2018. Hydrogen production from biomass using dark fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 91: 665–694. DOI: 10.1016/j.rser.2018.04.043.
- Małachowska A., Łukasik N., Mioduska J., Gębicki J., 2022. Hydrogen storage in geological formations – The potential of salt caverns. *Energies*, 15: 5038. DOI: 10.3390/en15145038.
- Molíková A., Vítězová M., Vítěz T., Buriánková I., Huber H., Dengler L., Hanišáková N., Onderka V., Urbanová I., 2022. Underground gas storage as a promising natural methane bioreactor and reservoir? *Journal of Energy Storage*, 47: 103631. DOI: 10.1016/j.est.2021.103631.
- Mouli-Castillo J., Heinemann N., Edlmann K., 2021. Mapping geological hydrogen storage capacity and regional heating demands: An applied UK case study. *Applied Energy*, 283: 116348. DOI: 10.1016/j.apenergy.2020.116348.
- Osselin F., Soulaire C., Fauguerolles C., Gaucher E.C., Scaillet B., Pichavant M., 2022. Orange hydrogen is the new green. *Natural Geoscience*, 15: 765–769. DOI: 10.1038/s41561-022-01043-9.
- Pernthaler J., Glöckner F.O., Schönhuber W., Amann R., 2001. Fluorescence in situ hybridization (FISH) with rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Methods in Microbiology*, 30: 207–210, IN1–IN7, 211–226. DOI: 10.1016/S0580-9517(01)30046-6.
- Saady N.M.C., 2013. Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 30: 13172–13191. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2013.07.122.
- Sierra-García I.N., Belgini D.R.B., Torres-Ballesteros A., Paez-Espino D., Capilla R., Santos Neto E.V., Gray N., de Oliveira V.M., 2020. In depth metagenomic analysis in contrasting oil wells reveals syntrophic bacterial and archaeal associations for oil biodegradation in petroleum reservoirs. *Science of the Total Environment*, 715: 136646. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.136646.
- Tarkowski R., Uliasz-Misiak B., Tarkowski P., 2021. Storage of hydrogen, natural gas, and carbon dioxide – Geological and legal conditions. *International Journal of Hydrogen Energy*, 46: 20010–20022. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2021.03.131.
- Truche L., Donzé F.-V., Goskolli E., Muceku B., Loisy C., Monnin C., Dutoit H., Cerepi A., 2024. A deep reservoir for hydrogen drives intense degassing in the Bulqizë ophiolite. *Science*, 338: 618–621. DOI: 10.1126/science.adk9099.
- Tyne R.L., Barry P.H., Lawson M., Byrne D.J., Warr O., Xie H., Hillemonds D.J., Formolo M., Summers Z.M., Skinner B., Eiler J.M., Ballentine C., 2021. Rapid microbial methanogenesis during CO₂ storage in hydrocarbon reservoirs. *Nature*, 600: 670–674. DOI: 10.1038/s41586-021-04153-3.
- Willems A., Busse J., Goor M., Pot B., Falsen E., Jantzen E., Hoste B., Gillis M., Kersters K., Auling G., De Ley J., 1989.

Hydrogenophaga, a new genus of hydrogen-oxidizing bacteria that includes *Hydrogenophaga flava* comb. nov. (formerly *Pseudomonas flava*), *Hydrogenophaga palleronii* (formerly *Pseudomonas palleronii*), *Hydrogenophaga pseudoflava* (formerly *Pseudomonas pseudoflava* and “*Pseudomonas carboxydoflava*”), and *Hydrogenophaga taeniospiralis* (formerly *Pseudomonas taeniospiralis*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 39: 319–333. DOI: 10.1099/00207713-39-3-319.

Zgonnik V., 2020. The occurrence and geoscience of natural hydrogen: A comprehensive review. *Earth-Science Reviews*, 203: 103140. DOI: 10.1016/j.earscirev.2020.103140.

Zhang Z., Zhang C., Yang Y., Zhang Z., Tang Y., Su P., Lin Z., 2022. A review of sulfate-reducing bacteria: Metabolism, influencing factors and application in wastewater treatment. *Journal of Cleaner Production*, 376: 134109. DOI: 10.1016/j.jclepro.2022.134109.



Dr Piotr KAPUSTA
 Adiunkt; kierownik Zakładu Mikrobiologii
 Instytut Nafty i Gazu – Państwowy Instytut Badawczy
 ul. Lubicz 25 A
 31-503 Kraków
 E-mail: piotr.kapusta@inig.pl



Dr Anna TURKIEWICZ
 Adiunkt w Zakładzie Mikrobiologii
 Instytut Nafty i Gazu – Państwowy Instytut Badawczy
 ul. Lubicz 25 A
 31-503 Kraków
 E-mail: anna.turkiewicz@inig.pl



Dr Joanna BRZESZCZ
 Adiunkt w Zakładzie Mikrobiologii
 Instytut Nafty i Gazu – Państwowy Instytut Badawczy
 ul. Lubicz 25 A
 31-503 Kraków
 E-mail: joanna.brzeszcz@inig.pl



Dr inż. Marek JANIGA
 Adiunkt w Zakładzie Geologii i Geochemii
 Instytut Nafty i Gazu – Państwowy Instytut Badawczy
 ul. Lubicz 25 A
 31-503 Kraków
 E-mail: marek.janiga@inig.pl