

# Mikrobiologiczna generacja metanu ze skały potencjalnie macierzystej – skład gazu oraz zmiany parametrów geochemicznych substancji organicznej

## Microbial methane generation from potential source rock – gas composition and geochemical characterization of organic matter

Marek Janiga, Joanna Brzeszcz, Wojciech Bieleń, Piotr Kapusta

*Instytut Nafty i Gazu – Państwowy Instytut Badawczy*

**STRESZCZENIE:** Większość węglowodorów naftowych, bez względu na budowę chemiczną, może być transformowana do związków prostych ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), które metabolizowane są przez konsorcja metanogenne. W ramach eksperymentu próbka skały (dolomit) zawierająca substancję organiczną została poddana działaniu konsorcjum mikrobiologicznego w celu odtworzenia procesu powstawania biogenicznego, wtórnego metanu. Konsorcja metanogenne zostały wyizolowane z próbek gleb pochodzących z miejsc występowania naturalnych wycieków ropy naftowej w polskich Karpatach. Materiał skalny wraz z podłożem mikrobiologicznym i inokulum mikroorganizmów był umieszczony w anaerostacie, a następnie inkubowany. Analizy składu molekularnego generowanego gazu wykonano dwukrotnie – w 30. i w 109. dniu trwania eksperymentu. Zsumowane wartości wydzielonych składników gazowych wynosiły: dla konsorcjum P – 30,5 mmol, a dla konsorcjów O-S i L1 – 27,8 mmol. Głównym składnikiem wydzielonych gazów był azot. Największe ilości wydzielonego metanu odnotowano w przypadku próbki P (1,58 mmol), a najmniejsze w przypadku próbki L1 (0,14 mmol). Wykonano również analizy elementarne substancji organicznej uzyskanej po kwasowaniu materiału skalnego po zakończeniu eksperymentu. Analizy te nie wykazały znaczącego ubytku węgla organicznego. Analizy GC-MS frakcji nasyconej i aromatycznej nie ujawniły śladów biodegradacji, a jedyną różnicą pomiędzy próbkami kontrolną i pozostałymi było pojawienie się siarki elementarnej. Mimo braku oznak działania mikroorganizmów na substancję organiczną w próbkach poddanych eksperymentowi nastąpiła generacja gazu. Dodatkowo, w końcowej fazie trwania eksperymentu, z materiału poddanego działaniu mikroorganizmów udało się zobrazować aktywne rybosomy należące do domeny Archaea oraz rzędu Methanosarcinales (wyniki analizy FISH). Wskazuje to na przebieg procesu metanogenezy w zastosowanych warunkach doświadczalnych.

Słowa kluczowe: konsorcja metanogenne, substancja organiczna, biometan.

**ABSTRACT:** Most of petroleum hydrocarbons, regardless of chemical structure, can be transformed to simple compounds ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), being metabolised by methanogenic consortia. In the experiment, a rock sample (dolomite) containing organic matter was treated with a microbial consortium to replicate the formation of biogenic secondary methane. Methanogenic consortia were isolated from soil samples from natural oil seepages sited in the Polish Carpathians. The rock material together with the microbial medium and microbial inoculum was placed in an anaerostat and then incubated. Analyses of the molecular composition of the generated gas were performed twice – on day 30 and on day 109 of the experiment. The summed values of the separated gas components were as follows: for the P consortium it was 30.5 mmol, and for the O-S and L1 consortia it was 27.8 mmol. The main component of the generated gases was nitrogen. The highest amount of methane separated was recorded for sample P (1.58 mmol) and the lowest for sample L1 (0.14 mmol). Elemental analyses of the organic matter obtained after acidification of the rock material were also carried out. GC-MS analyses of the saturated and aromatic fractions showed no signs of biodegradation, and the only difference between the control and other samples was the appearance of elemental sulphur. Despite the absence of signs of microbial activity on the organic matter, gas generation occurred in the microbial-inoculated samples. In addition, in the final phase of the experiment, active ribosomes belonging to the Archaea domain and the order Methanosarcinales could be visualised from the microorganism-treated material (results of FISH analysis). This indicates that methanogenesis is taking place under the experimental conditions discussed.

Keywords: methanogenic consortia, organic matter, biomethane.

Autor do korespondencji: Marek Janiga, e-mail: [janiga@inig.pl](mailto:janiga@inig.pl)

Artykuł nadesłano do Redakcji: 23.12.2024 r. Zatwierdzono do druku: 23.02.2026 r.

## Wstęp

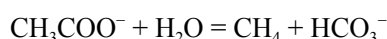
Metanogeneza stanowi końcowy etap beztlenowej biodegradacji organicznych związków węgla, w wyniku którego generowany jest  $\text{CH}_4$ . Jednakże proces ten poprzedzony jest szeregiem złożonych przemian materii organicznej, która występuje w postaci związków o wysokim stopniu skomplikowania struktury (przykładowo: białka, kwasy nukleinowe, tłuszcze). Te wysokocząsteczkowe biopolimery poddawane są działaniu konsorcjum mikroorganizmów, które przeprowadzają kolejno hydrolizę, kwasogenezę, octanogenezę, a w ostatnim stadium – metanogenezę. Trzy pierwsze fazy prowadzone są przez bakterie fermentacyjne, których aktywność wiąże się z powstaniem prostych produktów –  $\text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , związków metylowych. Te substancje z kolei są wykorzystywane w biosyntezie metanu przez metanogenne archeony należące do taksonu Euryarchaeota. Brak tlenu oraz ograniczona zawartość azotanów, siarczanów lub utlenionego żelaza i manganu również determinują ich wzrost i rozwój.

Biorąc pod uwagę rodzaj substratu wykorzystywanego do produkcji metanu, wyróżnia się trzy kategorie metanogenów (Błaszczuk, 2010; Brzeszcz, 2022):

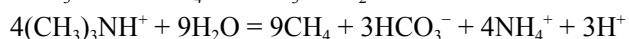
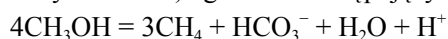
1. archeony hydrogenotroficzne, które wykorzystują dwutlenek węgla i wodór jako źródła odpowiednio węgla i elektronów – jest to najliczniejsza grupa w obrębie omawianych mikroorganizmów, poniższe równanie opisuje procesy metanogenezy hydrogenotroficznej przebiegające z udziałem tej grupy organizmów:



2. najmniej liczne archeony acetoklastyczne, metabolizujące octan – proces tworzenia metanu z octanu prowadzony przez organizmy z tej kategorii zachodzi zgodnie z poniższym równaniem:



3. archeony metylotroficzne, prowadzące procesy transformacji prostych związków metylowych (metanol, metyloamina, metylosiarczki) zgodnie z następującymi równaniami:



Większość węglowodorów naftowych, bez względu na budowę chemiczną, może być transformowana do związków prostych ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), które metabolizowane są przez konsorcja metanogenne. Powstały w ten sposób metan jest nazywany wtórnym, a jego udział w światowych zasobach konwencjonalnego gazu szacowany jest w przedziale od 5% do 11% (Milkov, 2011).

Celem pracy była odpowiedź na pytanie, czy w warunkach laboratoryjnych możliwe jest przeprowadzenie procesu powstawania metanu z materii organicznej zawartej w skałach typu dolomitycznego przy użyciu konsorcjów mikroorganizmów występujących w miejscach, w których metan może tworzyć się na drodze mikrobiologicznej. Założono, że w przypadku biogeneracji gazu możliwe będzie poznanie składu molekularnego powstałego gazu oraz zaobserwowanie zmian w składzie substancji organicznej.

## Materiał badawczy i metody

Do wykonania eksperymentu wykorzystano próbkę skały dolomitycznej, która została skruszona do frakcji 0,16–1,6 mm oraz poniżej 0,16 mm. Metanogenne konsorcja zostały pozyskane w ramach realizacji prac zleconych w Zakładzie Mikrobiologii INiG – PIB. Konsorcja zostały wyizolowane z próbek gleb pochodzących z miejsc występowania naturalnych wycieków ropy naftowej w polskich Karpatach. Były to konsorcja: P, O-S i L1 (oznaczenia literowe od nazw miejscowości). W tym celu pobrano blisko 500 g próbki gleby, z warstw znajdujących się na głębokości 50–100 cm pod powierzchnią terenu, bezpośrednio z miejsca wycieku. Pobraną próbkę gleby umieszczono w sterylnym litrowym słoiku zaopatrzonego we wkład Anaerocult (Merck, Niemcy), który zapewnia wytworzenie atmosfery beztlenowej. Tak pobrane próbki przetransportowano w temperaturze ok. 0–5°C do Zakładu Mikrobiologii INiG – PIB, a następnie poddano procedurze wzbogacenia, aby uzyskać konsorcja metanogenne. W tym celu w sterylnej probówce umieszczono 5 g gleby, następnie dodano 20 ml podłoża metanogenne. Probówkę zamknięto za pomocą ścisłego korka wykonanego z waty i umieszczono w pojemniku typu Anaerostat (Merck, Niemcy), który zawierał wkład Anaerocult (Merck, Niemcy). Pojemnik szczelnie zamknięto, całość inkubowano w temperaturze pokojowej przez okres 4 miesięcy, prowadząc obserwacje pojawiających się zmian (tj. powstawanie bąbelków gazu). Dla każdej z próbek gleby wykonano dwa powtórzenia, łącznie uzyskując sześć hodowli. Otrzymane w ten sposób hodowle przeniesiono do 250-mililitrowych sterylnych butelek z gumowym korkiem (Schott, USA) i dodano podłoże wzbogacone zawierające octan sodu (0,02% (m/v)), wypełniając całą objętość butelki. Tak przygotowane hodowle inkubowano w temperaturze pokojowej, obserwując intensywne tworzenie się bąbelków gazu i zmętnienie podłoża (do 2 tygodni).

W dwulitrowym anaerostacie (Schuett-Biotec, Niemcy) umieszczono 400 g materiału skalnego (100 g frakcji o średnicy ziaren <0,16 mm oraz 300 g frakcji o średnicy ziaren mieszczącej się w przedziale 0,16–1,6 mm), następnie wprowadzono

900 ml podłoża mineralnego Bushnell Haas (1 g/L  $K_2HPO_4$ , 1 g/L  $KH_2PO_4$ , 1 g/L  $NH_4NO_3$ , 0,02 g/L  $CaCl_2$ , 0,05 g/L  $FeCl_3$ , 0,2 g/L  $MgSO_4$ , 1 g/L  $NaCl$ , wraz z dodatkiem roztworu pierwiastków śladowych SL-10 (1 ml), pH  $7,0 \pm 0,2$ ). Całość autoklawowano ( $121^\circ C$ , 30 min, 0,15 MPa). Następnie do tak przygotowanego układu wprowadzono 100 ml inokulum mikroorganizmów (L, O-S, P). W analogiczny sposób przygotowano próbkę kontrolną, zastępując konsorcjum mikroorganizmów odpowiednią objętością podłoża mineralnego. Całość zamknięto, przez układ przepuszczono hel w celu usunięcia powietrza i stworzenia warunków beztlenowych. Łącznie przygotowano 4 próbki (3 próbki inokulowane mikroorganizmami, 1 próbka kontrolna), które inkubowano w temperaturze pokojowej w warunkach statycznych przez 6 miesięcy. W 30. i 109. dniu trwania eksperymentu wykonano analizy składu chemicznego gazu pobranego z przestrzeni wolnej anaerostatu. Analizy składu molekularnego wydzielonego gazu przeprowadzono z wykorzystaniem chromatografów gazowych Agilent 7890A wyposażonych w detektory: płomieniowo-jonizacyjny (FID), ciepłoprzewodnościowy (TCD) i płomieniowo-fotometryczny (FPD), według metodyki opisanej w pracy Kani i Janigi (2011). Zakres analiz obejmował oznaczenia zawartości następujących związków:  $C_1$ ,  $C_2$ ,  $C_3$ ,  $i-C_4$ ,  $n-C_4$ ,  $neo-C_5$ ,  $i-C_5$ ,  $n-C_5$ , sumy węglowodorów  $C_6$ ,  $C_7$ ,  $C_8$ ,  $C_9$ ,  $C_{10}$ ,  $O_2$ ,  $N_2$ ,  $CO_2$ ,  $CO$ ,  $H_2$ , He oraz  $H_2S$ .

W 180. dniu eksperyment został przerwany, gdyż przez około 10 tygodni nie zaobserwowano generowania się gazu w żadnej z próbek inokulowanej mikroorganizmami. Po zakończeniu eksperymentu materiał skalny został przepłukany wodą destylowaną, wysuszony i poddany działaniu kwasu solnego. Pozostała substancja organiczna została poddana analizie składu elementarnego dla oceny ubytku węgla związanego z działalnością mikroorganizmów. Oznaczenia zostały wykonane za pomocą analizatora FlashSmart firmy Thermo Scientific. Zasada oznaczenia składu elementarnego polega na automatycznym, katalitycznym, całkowitym spalaniu próbki o masie ok. 1 mg, umieszczonej w specjalnej cynowej kapsułce, w obecności tlenu w temperaturze  $950^\circ C$ .

Ekstrakcję bituminów z materiału skalnego prowadzono w aparacie Soxhleta, stosując mieszaninę dichlorometan–metanol (93 : 7 (v/v)) jako czynnik ekstrahujący. 100 gramów próbki umieszczano w tulei o średnicy 32 mm i wysokości 120 mm. Ekstrakcję prowadzono przez 24 godziny. Otrzymany roztwór bituminów zateżono, odparowując nadmiar rozpuszczalnika, przesączono, a następnie zważono. Rozdział grupowy otrzymanego ekstraktu przeprowadzono w kolumnie przeznaczonej do chromatografii cieczowej. Frakcję węglowodorów nasyconych eluowano *n*-heksanem, zadając na kolumnę około 50 ml eluentu porcjami po około 4 ml. Następnie wydzielono frakcję węglowodorów aromatycznych, używając około 35 ml

mieszaniny heksan–toluen (1 : 4 (v/v)). Proces prowadzono do zaniku luminescencji kolumny przy naświetlaniu promieniami UV. Pozostałe na kolumnie żywice wmywano, używając 30 ml mieszaniny dichlorometan–metanol (1 : 1 (v/v)). Frakcję asfaltenów, pozostającą na pasku bibułowym, wydzielono za pomocą dichlorometanu. Izolację asfaltenów prowadzono aż do odbarwienia się paska bibuły.

Dystrybucję i identyfikację specyficznych biomarkerów występujących we frakcjach aromatycznej oraz nasyconej przeprowadzono za pomocą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią masową (GC-MS). Analizy wykonano za pomocą chromatografu gazowego Trace GC Ultra wyposażonego w kolumnę RTX-5 MS (30 m × 0,25 mm, grubość filmu – 0,25 μm) i połączonego z pułapką jonową POLARIS Q. Prawidłowy rozdział analizowanych związków na kolumnie chromatograficznej wymagał zastosowania następującego programu temperaturowego: temperatura początkowa  $60^\circ C$  (izoterma – 1 min), narost temperatury  $4^\circ C/min$  do  $310^\circ C$ , temperatura końcowa  $310^\circ C$  (izoterma – 15 min). Hel został użyty jako gaz nośny (przepływ 1 ml/min). Każdorazowo dozowano 1 μl próbki rozpuszczonej w *n*-heksanie. Spektrogramy masowe frakcji aromatycznej i nasyconej analizowanych próbek otrzymano w trybie pełnego skanowania TIC (Bieleń i Matyasik, 2014).

Po zakończeniu eksperymentu wyekstrahowano mikroorganizmy z materiału skalnego oraz towarzyszącego mu płynu, które poddano analizie fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (dalej: FISH, ang. *fluorescence in situ hybridization*) według oryginalnej metodyki opisanej przez Pernthaler i in. (2001) oraz Fuchsa i in. (2007), a zmodyfikowanej w pracy Kapusty i in. (2025). Celem tej części badań było stwierdzenie obecności żywych mikroorganizmów metanogennych. Z każdej próbki inokulowanej konsorcjum pobrano 5 g mokrego osadu skalnego i umieszczono go w sterylnej probówce wirówkowej typu Falcon. Następnie dodano 21,7 ml zbuforowanego roztworu soli fizjologicznej (1 × PBS, pH 7,2; skład: 10 mM  $Na_2HPO_4$ , 10 mM  $NaH_2PO_4$ , 130 mM  $NaCl$ ) i 2,5 ml 10% (v/v) sterylnego metanolu. Całość inkubowano w łaźni ultradźwiękowej w temperaturze  $36^\circ C$  przez 30 min, a następnie zwirowano (2000 × g, 2 min). Pobrano niewielką (0,2 ml) próbkę nadsącza, którą analizowano przy użyciu mikroskopu świetlnego wyposażonego w obiektyw 40× (Eclipse e200, Nikon). Obecność mikroorganizmów w pobranym płynie świadczyła o pozytywnym wyniku ekstrakcji i stanowiła sygnał dla kontynuacji kolejnych kroków procedury bez konieczności powtórzenia etapu ekstrakcji. Pozostały nadsącz zawierający mikroorganizmy przeniesiono do sterylnej próbki typu Falcon i dodano ok. 25 ml etanolu (96%). Utrwalenie próbki prowadzono przez 20 godzin w temperaturze  $4^\circ C$ . Następnie zateżono próbkę na filtrze poliwęglanowym (średnica porów 0,2 μm, GTTP, Millipore) za pomocą aparatu filtracyjnego

**Tabela 1.** Szczegółowe informacje dotyczące zastosowanej metody FISH (sekwencje użytych sond, skład buforów hybrydyzacyjnego i myjącego)

**Table 1.** Details of the FISH method (sequences of probes, composition of hybridisation and washing buffers)

Sonda	Sekwencja sondy	Skład	
		bufor hybrydyzacyjny	bufor myjący
ARC915	5'-GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT-3'	formamid: 20% (v/v), NaCl: 0,9 M, Tris/HCl (pH 8,0): 20 mM, SDS: 0,02% (m/v)	NaCl: 0,215 M, Tris/HCl (pH 8,0): 20 mM, EDTA (pH 8,0): 5 mM, SDS: 0,01% (m/v)
MSSH859	5'-TCGCTTCACGGCTCCCT-3'	formamid: 35% (v/v), NaCl: 0,9 M, Tris/HCl (pH 8,0): 20 mM, SDS: 0,02% (m/v)	NaCl: 70 mM, Tris/HCl (pH 8,0): 20 mM, EDTA (pH 8,0): 5 mM, SDS: 0,01% (m/v)

Pyrex (Millipore). Filtr przechowywano w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$  przed dalszym użyciem. Filtr pocięto na mniejsze fragmenty za pomocą sterylnego skalpela. Na uzyskane w ten sposób fragmenty naniesiono 50  $\mu\text{l}$  roztworu agarozy (0,5% (m/v)), całość inkubowano w temperaturze  $35^{\circ}\text{C}$  przez 30 min. Następnie usunięto wodę z fragmentów filtra, umieszczając je w coraz bardziej stężonych roztworach etanolu (50%, 80%, 95%). Czas kontaktu z odpowiednim roztworem etanolu wynosił około 5 min. Po wyschnięciu filtrów wykonano hybrydyzację z odpowiednimi sondami oligonukleotydowymi. Użyto sond swoistych dla domeny Archaea (sonda ARC915A, Alm i in., 1996) oraz dla rzędu Methanosarcinales (sonda MSSH859, Boetius i in., 2000). Każda z sond była znakowana za pomocą fluorochromu Cy3 na końcu 5' (Thermo Fisher Scientific). Na uprzednio przygotowane fragmenty filtra nakładano odpowiedni bufor hybrydyzacyjny (100  $\mu\text{l}$ ) oraz sondę (5 ng). Proces hybrydyzacji prowadzono przez 15 godzin w temperaturze  $46^{\circ}\text{C}$ . Niezwiązane sondy odplukano, inkubując filtr w buforze

myjącym w temperaturze  $48^{\circ}\text{C}$ . Skład buforów hybrydyzacyjnych i myjących został zawarty w tabeli 1. Następnie filtry umieszczono w sterylnej wodzie destylowanej. Po osuszeniu na każdy filtr naniesiono roztwór 4',6-diamidyno-2-fenylindolu (dalej: DAPI, 1  $\mu\text{g}/1\text{ml}$  (m/v)) i inkubowano w temperaturze pokojowej w ciemności przez 20 min. Niezwiązany barwnik DAPI odplukano jałową wodą destylowaną. Tak przygotowane preparaty (fragmenty filtra) suszono w ciemności i analizowano za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego Eclipse 50i (Nikon), stosując obiektyw immersyjny 100 $\times$ .

## Wyniki i dyskusja

### Skład gazu

Analizy składu molekularnego generowanego gazu wykonano dwukrotnie – w 30. i w 109. dniu trwania eksperymentu. Wyniki analiz zostały przedstawione w tabeli 2. Wysoki

**Tabela 2.** Skład chemiczny powstających gazów w 30. i 109. dniu trwania eksperymentu [% (v/v)]

**Table 2.** Chemical composition of the gases on the 30<sup>th</sup> and 109<sup>th</sup> day of the experiment [% (v/v)]

	P		O-S		L1	
	I pobór	II pobór	I pobór	II pobór	I pobór	II pobór
C <sub>1</sub>	0,19141	4,59184	0,43158	2,52009	0,24490	0,14269
C <sub>2</sub>	0,00000	0,00043	0,00012	0,00128	0,00012	0,00077
C <sub>3</sub>	0,00000	0,00070	0,00000	0,00047	0,00000	0,00086
i-C <sub>4</sub>	0,00000	0,00010	0,00000	0,00011	0,00000	0,00022
n-C <sub>4</sub>	0,00000	0,00033	0,00000	0,00033	0,00000	0,00054
neo-C <sub>5</sub>	0,00041	0,00000	0,00029	0,00000	0,00000	0,00000
i-C <sub>5</sub>	0,00000	0,00016	0,00000	0,00012	0,00000	0,00027
n-C <sub>5</sub>	0,00000	0,00025	0,00000	0,00026	0,00000	0,00032
$\Sigma\text{C}_6$	0,00000	0,00035	0,00000	0,00143	0,00000	0,00655
$\Sigma\text{C}_7$	0,00000	0,00052	0,00000	0,00073	0,00000	0,00095
$\Sigma\text{C}_8$	0,00000	0,00044	0,00000	0,00095	0,00000	0,00063
$\Sigma\text{C}_9$	0,00000	0,00067	0,00000	0,00072	0,00000	0,00028
$\Sigma\text{C}_{10}$	0,00000	0,00021	0,00000	0,00011	0,00000	0,00000

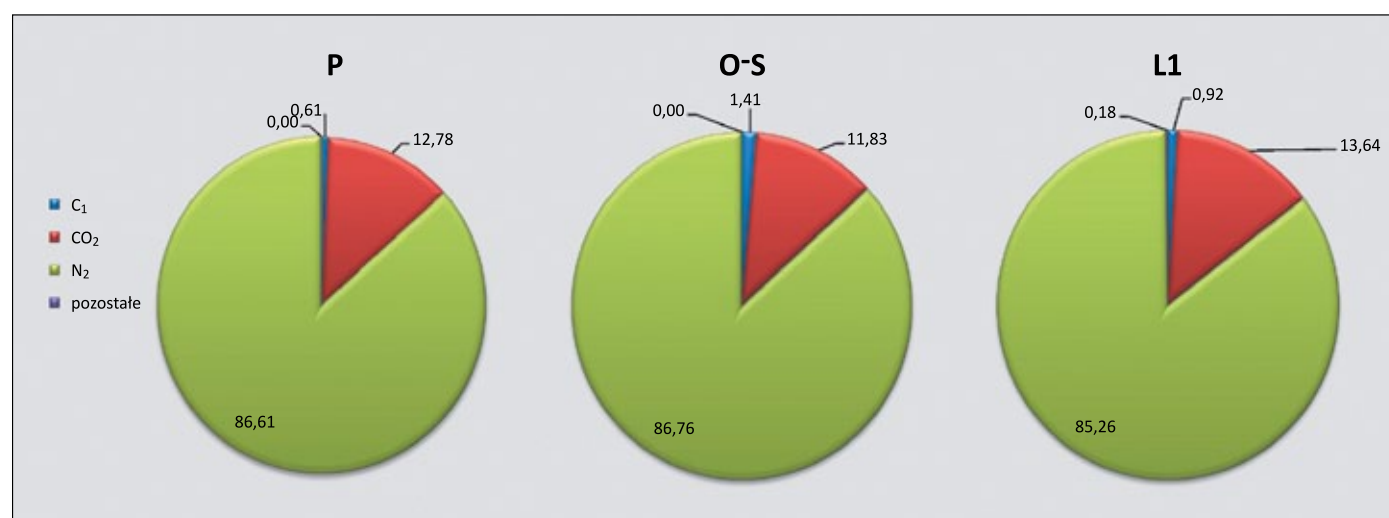
cd. Tabela 2/cont. Table 2

	P		O-S		L1	
	I pobór	II pobór	I pobór	II pobór	I pobór	II pobór
CO <sub>2</sub>	4,01488	0,09097	3,62568	0,73497	3,64737	0,21935
N <sub>2</sub>	27,20352	52,01013	26,59669	45,49030	22,80037	54,21028
CO	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
He	68,58977	43,30290	69,34564	51,24813	73,25872	45,41630
H <sub>2</sub>	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
H <sub>2</sub> S	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,04677	0,00000
Mer. metyl.	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00175	0,00000
Mer. etyl.	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	śląd	0,00000
Siarcz. dimetyl.	0,00001	0,00000	0,00001	0,00001	0,00002	0,00001
Mer. i-prop.	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	śląd	0,00000
Mer. n-prop.	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Mer. i-butył.	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Mer. n-butył.	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000

udział helu (ok. 43,3–73,3% (v/v)) w składzie gazów wynika z procedury przygotowania próbek – płukania anaerostatów tym gazem w celu minimalizacji zanieczyszczenia powstającego gazu powietrzem. Składnikami produkowanego gazu były węglowodory (głównie metan), ditlenek węgla, azot oraz wspomniany gaz szlachetny (tabela 2). W pierwszych 30 dniach procesu (I pobór) najwięcej wydzielilo się azotu (od 22,80037% dla L1 do 27,20352% dla P) i ditlenku węgla (od 3,62568% dla O-S do 4,01488% dla P) (rysunek 1). W próbce L1 stwierdzono obecność siarkowodoru (0,04677%) oraz niskie stężenia pozostałych związków siarki. Z kolei w próbkach P i O-S wystąpiły niewielkie ilości siarczku dimetylowego. Porównując wyniki gazu uzyskane dla dwóch punktów czasowych doświadczenia, widać większe zawartości

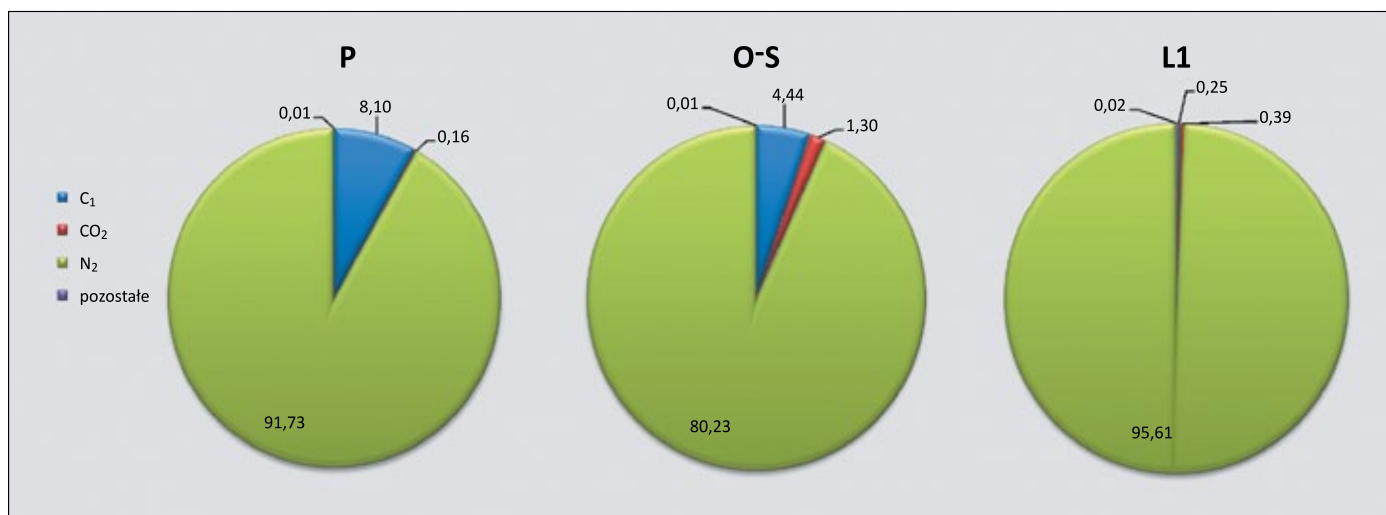
metanu i wyższych węglowodorów (aż do C<sub>10</sub> dla P i O-S oraz do C<sub>9</sub> dla L1) w próbkach odpowiadających drugiemu poborowi (zawartości metanu: 4,59184% dla P, 2,52009% dla O-S i 0,14269% dla L1). Ta obserwacja wskazuje: (a) na generację metanu z materii organicznej poddanej działaniu mikroorganizmów oraz że (b) wraz z upływem czasu trwania eksperymentu wzrasta tempo procesu syntezy. Ponadto skład gazu w 109. dniu różnił się pod względem zawartości CO<sub>2</sub> w stosunku do gazu analizowanego w 30. dniu. Wraz z upływem czasu zawartość tego związku spadała. Ta zależność wskazuje na usuwanie CO<sub>2</sub> z układu, który wykorzystywany został do biosyntezy metanu.

W drugim poborze wzrosła zawartość azotu w gazach (od 45,49030% dla O-S do 54,21028% dla L1), a spadała



Rysunek 1. Skład molekularny gazu pobranego w 30. dniu eksperymentu [% (v/v)]

Figure 1. Molecular composition of the gas sampled on the 30<sup>th</sup> day of the experiment [% (v/v)]



**Rysunek 2.** Skład molekularny gazu pobranego w 109. dniu eksperymentu [% (v/v)]

**Figure 2.** Molecular composition of the gas sampled on the 109<sup>th</sup> day of the experiment [% (v/v)]

zawartość ditlenku węgla (od 0,09097% dla P do 0,73497% dla O-S) (rysunek 2). W analizach gazów z drugiego poboru nie stwierdzono siarkowodoru oraz pozostałych związków siarki.

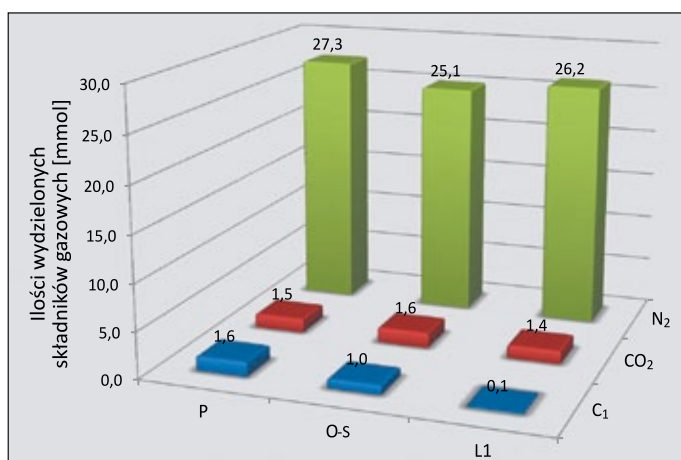
Sumaryczne ilości wydzielonych składników gazowych dla poszczególnych próbek są do siebie zbliżone. Tylko nieznacznie wyższe wartości cechują próbkę P, a próbki O-S i L1 są pod tym względem prawie identyczne. Zsumowane wartości wydzielonych składników gazowych przedstawione w milimolach są następujące: dla P to 30,5 mmol, dla O-S i L1 to 27,8 mmol (rysunek 3). Zaskakujący jest niski udział metanu w składzie gazów, choć podobny skład gazów był obserwowany w przypadku gazu pozyskanego w wyniku biogazowania węgla kamiennego (Janiga i in., 2018). Natomiast w innych pracach podano metan jako dominujący składnik gazu (Mach i in., 2015; Goswami i in., 2016; Park i Liang, 2016). Niska zawartość metanu w generowanym gazie wynika z niskiej

szybkości reakcji metanogenezy, która z kolei określona jest przez stężenie substratów, tj. dwutlenku węgla, wodoru i/lub octanu. Przypuszczalnie materia organiczna zawarta w materiale skalnym użytym w doświadczeniu jest trudno dostępna dla mikroorganizmów. Możliwe jest, że występuje ona w porach, do których mikroorganizmy mają utrudniony dostęp. Być może wykorzystanie ekstraktu tej materii poprawiłoby wydajność procesu generowania się metanu. Należy również zauważyć, że procesy beztlenowe są znacznie wolniejsze niż analogiczne przemiany zachodzące w obecności tlenu. Zatem niskie tempo anaerobowych przemian materii organicznej, jej ograniczona dostępność mogą mieć wpływ na ilość CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub> oraz octanu generowanego w procesach poprzedzających metanogenezę, a tym samym na ilość powstającego metanu.

### Substancja organiczna

Skład elementarny substancji organicznej został przedstawiony w tabeli 3. Całkowita zawartość węgla organicznego (TOC) w próbce kontrolnej wynosiła 0,162% (m/m), zaś w próbkach poddanych działaniu mikroorganizmów zawierała się w przedziale 0,152–0,176% (m/m). Co ciekawe, wartość parametru TOC w próbce L1 była wyższa niż w próbce kontrolnej. Z kolei w próbkach O-S i P zawartość TOC była niższa niż w próbce kontrolnej. Może to oznaczać, że analiza składu elementarnego nie jest wystarczająco czułą metodą śledzenia niewielkich zmian związanych z mikrobiologiczną generacją gazu. Dodatkowo należy wziąć pod uwagę brak pełnej homogeniczności próbki.

Otrzymana frakcja nasycona oraz aromatyczna ekstraktów bitumicznych została poddana jakościowej analizie GC-MS, której celem było określenie zmian (np. ubytków) związków



**Rysunek 3.** Sumy wydzielonych gazów: metanu, azotu i ditlenku węgla [mmol]

**Figure 3.** Sums of produced gases: methane, nitrogen and carbon dioxide [mmol]

**Tabela 3.** Zawartość węgla, azotu, siarki i wodoru w analizowanych próbkach [% (m/m)]

**Table 3.** Content of carbon, nitrogen, sulphur and hydrogen in the analysed samples [% (m/m)]

Analizowane próbki	Zawartość w substancji organicznej otrzymanej po kwasowaniu [% (m/m)]				TOC w skale [% (m/m)]
	N	C	H	S	
<b>Kontrola</b>	0,44	55,34	3,80	3,78	0,162
<b>L1</b>	0,44	50,92	3,47	4,07	0,176
<b>O-S</b>	0,53	55,69	3,73	4,53	0,158
<b>P</b>	0,53	53,77	3,58	4,32	0,152

organicznych występujących w analizowanej materii organicznej. Analiza frakcji nasyconej ekstraktów bitumicznych uzyskanych z analizowanych próbek wykazała różnice pomiędzy próbką kontrolną, gdzie nie występuje siarka elementarna (oktagonalna, S<sub>8</sub>), a pozostałymi próbkami poddanymi działaniu mikroorganizmów: P, L1 i O-S, w których zidentyfikowano obecność siarki oktogonalnej w znacznej ilości (rysunek 4). Przypuszczalnie występowanie tej odmiany siarki może wynikać z obecności mikroorganizmów, które mogły zredukować jony siarczanowe(VI) zawarte w podłożu do H<sub>2</sub>S, a następnie utlenić ten związek do S<sub>8</sub>. Poza tą ewidentną różnicą chromatogramy otrzymane dla próbek P, L1, O-S nie

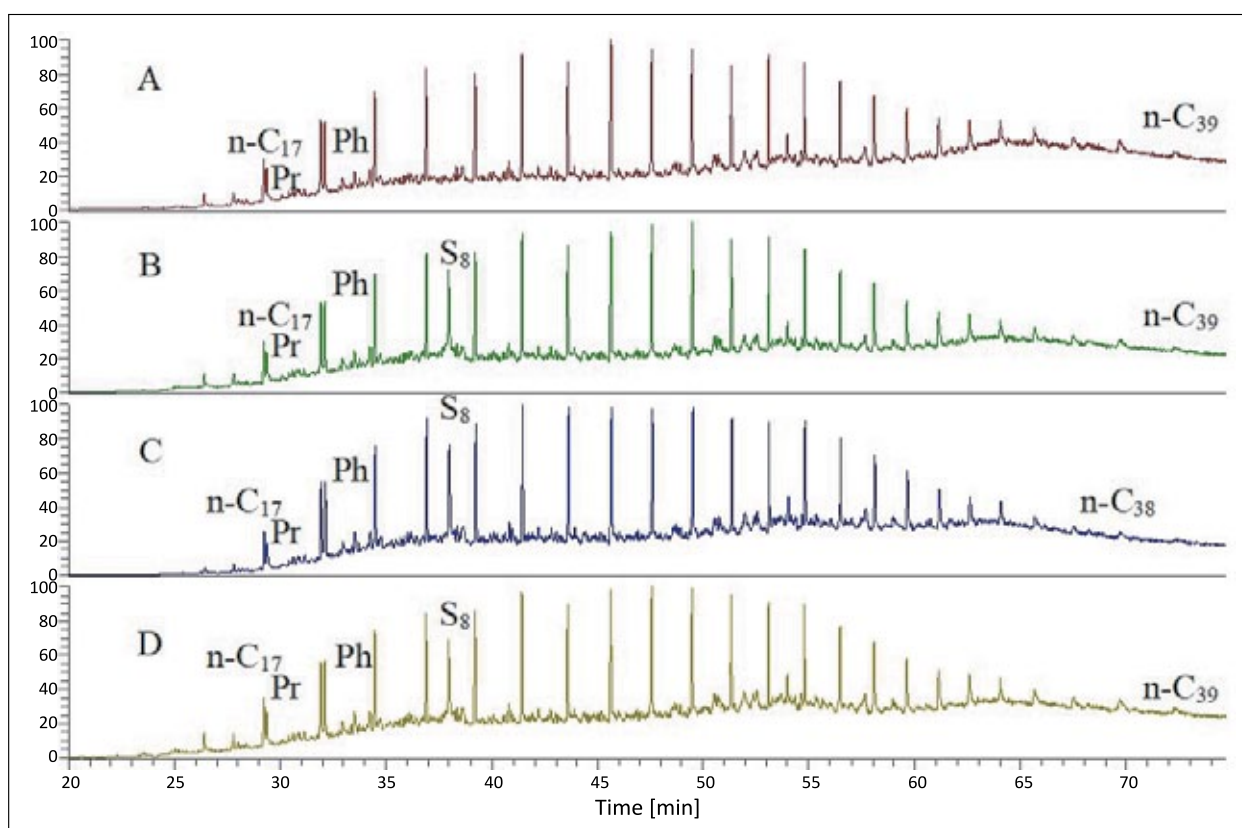
wykazują wyraźnych różnic w porównaniu z chromatogramem zarejestrowanym dla próbki kontrolnej.

Nie zaobserwowano znaczących różnic (pomiędzy próbkami) w składzie biomarkerów z grupy hopanów i tricyklicznych terpenów. Podobnie rzecz się ma w przypadku biomarkerów z grupy steranów. Zarówno hopany, jak i sterany są obecne w małych lub bardzo małych ilościach, a niektóre ze związków z tych grup nie występują (lub występują w śladowych ilościach).

Nie zaobserwowano oznak biodegradacji we frakcji nasyconej badanej za pomocą GC-MS, co potwierdzone jest przez nienaruszony szereg *n*-alkanów. Biodegradacja w warunkach naturalnych objawia się w pierwszym rzędzie zmniejszoną wyraźnie względem pozostałych związków (np. izoprenoidów) ilością *n*-alkanów lub brakiem części homologów z tej grupy związków (Matyasik i in., 2012; Szubert i in., 2020; Wang i in., 2022).

Analiza frakcji aromatycznej również nie wykazała znaczących różnic w składzie związków. W ilości znacznej występują fenantren i jego pochodne oraz metylo-dibenzotiofeny. W niewielkich względnie ilościach są obecne związki naftalenowe.

Choć nie zaobserwowano oznak biodegradacji materii organicznej (wyniki analiz GC-MS frakcji organicznej i nasyconej), nie można wykluczyć, że proces ten miał miejsce, gdyż uzyskano przyrost metanu w każdym wariantcie eksperymentalnym



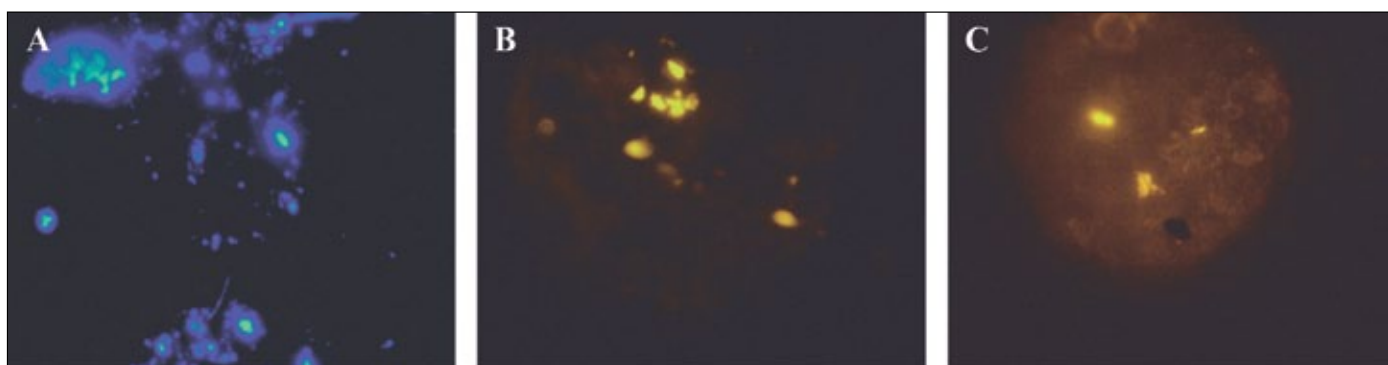
**Rysunek 4.** Rozkład węglowodorów frakcji nasyconej próbek: kontrola (A), P (B), L1 (C), O-S (D)

**Figure 4.** Hydrocarbon distribution of the saturated fraction of samples: control (A), P (B), L1 (C), O-S (D)

w stosunku do układu kontrolnego. Dodatkowo, w końcowej fazie trwania eksperymentu, z materiału poddanego działaniu mikroorganizmów udało się zobrazować aktywne rybosomy należące do domeny Archaea oraz rzędu Methanosarcinales (wyniki analizy FISH).

### Analiza FISH

Celem analizy FISH było potwierdzenie lub wykluczenie obecności aktywnych archeonów, w tym szczególnej grupy archeonów metanogennych, tj. mikroorganizmów należących do rzędu Methanosarcinales. Biorąc pod uwagę preferencyjne wybieranie osadów jako nisz zasiedlanych przez te mikroorganizmy, analiza FISH została wykonana dla mikroorganizmów wyizolowanych z materiału skalnego.



**Rysunek 5.** Przykładowe mikrofotografie przedstawiające mikroorganizmy wyizolowane z badanego materiału, których obecność wykryto za pomocą metody FISH. (A) Mikrofotografia przedstawiająca komórki mikroorganizmów wybarwione za pomocą barwnika DAPI. Przykładowe mikrofotografie odpowiadające hybrydyzacji z sondą ARC915 (B) i MSSH859 (C). Powiększenie 1000×

**Figure 5.** Examples of microphotographs showing microorganisms isolated from the test material whose presence was detected by FISH. (A) Micrograph showing microbial cells stained with DAPI dye. Example micrographs corresponding to hybridisation of with ARC915 probe (B) and with MSSH859 probe (C). Magnification 1000×

W każdej z badanych próbek obecne były mikroorganizmy, które wybarwiły się za pomocą znacznika DAPI (rysunek 5A). Barwnik ten łączy się z DNA zarówno żywych, jak i martwych mikroorganizmów.

Pozytywne sygnały zostały uzyskane w przypadku obu użytych sond, tj. ARC915 i MSSH859, dla każdej z badanych próbek (rysunki 5B–C), co wskazuje na obecność aktywnych archeonów, w tym mikroorganizmów Methanosarcinales. Metoda FISH polega na hybrydyzacji sondy z odpowiednim (komplementarnym) fragmentem rDNA mikroorganizmu (Moter i Göbel, 2000). Zatem pozytywny sygnał sondy oznacza obecność aktywnych rybosomów, co w konsekwencji jest dowodem na obecność żywych mikroorganizmów (Moter i Göbel, 2000).

Wyniki analiz FISH sugerują, że w końcowej fazie eksperymentu (180. dniu) w dalszym ciągu były obecne żywe archeony, w tym archeony metanogenne.

### Podsumowanie

Pomimo nieznacznego ubytku węgla organicznego w próbkach poddanych działaniu mikroorganizmów nastąpiła generacja metanu. Dodatkowo obecność aktywnych archeonów metanogennych z grupy Methanosarcinales wskazuje na przebieg procesu metanogenezy w omawianych warunkach doświadczalnych. Zatem wyniki tych badań sugerują, że materia organiczna zawarta w skale dolomitycznej poddana działaniu konsorcjum metanogenego może ulegać przemianom z wytworzeniem metanu. Jednakże należy uwzględnić, że tempo procesów beztlenowych jest znacznie wolniejsze niż procesów tlenowych, czego świadectwem jest stosunkowo niska zawartość metanu w składzie powstającego gazu (jego głównym składnikiem był azot).

Niniejszy materiał powstał na podstawie pracy statutowej *Mikrobiologiczne i geochemiczne aspekty generowania się metanu w odniesieniu do gazu ziemnego zakumulowanego w utworach dolomitu głównego*, praca INiG – PIB, nr zlecenia: 0080/SM/SG/2023, nr archiwalny: DK-4100-63/2023.

### Podziękowanie

Autorzy wyrażają serdeczne podziękowania dla dr hab. inż. Ireny Matyasik, prof. INIG – PIB, a także Yulii Amashukeli, Aleksandry Dudy i Agnieszki Wciślak-Oleszyckiej za inspirowanie dyskusje oraz udzieloną pomoc techniczną.

### Literatura

- Alm E.W., Oerther D.B., Larsen N., Stahl D.A., Raskin L., 1996. The oligonucleotide probe database. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 3557–3559.
- Bieleń W., Matyasik I., 2014. Ropy naftowe i ekstrakty bituminów o niskiej zawartości biomarkerów – preparatyka próbek przeznaczonych do analizy GC-MS. *Nafta-Gaz*, 12: 868–873.

- Błaszczak M.K., 2010. Degradacja materii organicznej w warunkach beztlenowych. [W:] Mostowik K. (red.). *Mikrobiologia środowisk. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa*: 93–234.
- Boetius A., Ravenschlag K., Schubert C., Rickert D., Widdel F., Gieseke A., Amann R., Jørgensen B., Witte U., Pfannkuche O., 2000. A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature*, 407: 623–626.
- Brzeszcz J., 2022. Rola archeonów w biologicznym rozkładzie węglowodorów. *Nafta-Gaz*, 6: 407–421. DOI: 10.18668/NG.2022.06.01.
- 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.
- Goswami R., Chattopadhyay P., Shome A., 2016. An overview of physico-chemical mechanisms of biogas production by microbial communities: a step towards sustainable waste management. *3 Biotech*, 6: 72. DOI: 10.1007/s13205-016-0395-9.
- Janiga M., Kapusta P., Kania M., Szubert A., 2018. Microbiological coal biogasification under laboratory conditions – biogas quantity and quality. *Nafta-Gaz*, 9: 647–654. DOI: 10.18668/NG.2018.09.03.
- Kania M., Janiga M., 2011. Elementy walidacji metody analitycznej oznaczania w mieszaninie gazowej związków węglowodorowych oraz N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, CO i CO<sub>2</sub> za pomocą dwukanałowego, zaworowego chromatografu gazowego AGILENT 7890A. *Nafta-Gaz*, 11: 812–824.
- Kapusta P., Brzeszcz J., Turkiewicz A., Janiga M., 2025. Identyfikacja i selekcja mikroorganizmów zdolnych do wytwarzania biowodoru w celu potencjalnego wykorzystania w złożach karpaccich. *Nafta-Gaz*, 81(12): 876–886. DOI: 10.18668/NG.2025.12.05.
- Mach V., Blaser M.B., Claus P., Chaudhary P.P., Rulik M., 2015. Methane production potentials, pathways, and communities of methanogens in vertical sediment profiles of river Sitka. *Frontiers in Microbiology*, 6: 506. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00506.
- Matyasik I., Bieleń W., Janiga M., Jankowski L., 2012. Geochemiczna charakterystyka naturalnych powierzchniowych wycieków węglowodorowych na podstawie badań GC oraz GC-MS. *Nafta-Gaz*, 11: 789–796.
- Milkov A.V., 2011. Worldwide distribution and significance of secondary microbial methane formed during petroleum biodegradation in conventional reservoirs. *Organic Geochemistry*, 42: 184–207.
- Moter A., Göbel U.B., 2000. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 41: 85–112.
- Park S., Liang Y., 2016. Biogenic methane production from coal: A review on recent research and development on microbially enhanced coalbed methane (MECBM). *Fuel*, 166: 258–267. DOI: 10.1016/j.fuel.2015.10.121.
- 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.
- Szubert A., Kapusta P., Matyasik I., 2020. Parameters and methods for evaluation of lignite processing method into biogas. *Physicochemical Problems of Mineral Processing*, 56(2): 396–405. DOI: 10.37190/ppmp/118433.
- Wang D., Cai C., Yun L., Cao Z., Zhang J., Qi Y., Liu J., Jiang Z., Hu Y., 2022. Geochemical evidence for secondary microbial gas in deep hot reservoirs of the Tarim Basin. *Chemical Geology*, 587: 120630. DOI: 10.1016/j.chemgeo.2021.120630.



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](mailto:marek.janiga@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](mailto:joanna.brzeszcz@inig.pl)



Mgr inż. Wojciech BIELEŃ  
Starszy specjalista badawczo-techniczny w Zakładzie  
Geologii i Geochemii  
Instytut Nafty i Gazu – Państwowy Instytut Badawczy  
ul. Lubicz 25 A  
31-503 Kraków  
E-mail: [wojciech.bielen@inig.pl](mailto:wojciech.bielen@inig.pl)



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](mailto:piotr.kapusta@inig.pl)