

Łupek miedzionośny a metabolizm metanu – znaczenie mikroorganizmów metanogennych i metanotroficznych w kopalniach monokliny przedsudeckiej

Agnieszka Daszczyńska, Renata Matlakowska

Zakład Geomikrobiologii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa, e-mail: adaszczynska@biol.uw.edu.pl

Streszczenie

Kopalnie miedzi monokliny przedsudeckiej to niezwykle i złożone środowiska. Występują w nich różnorodne pod względem taksonomicznym i metabolicznym mikroorganizmy. Zalicza się do nich także te pełniące ważną rolę w lokalnym obiegu metanu, a tym samym w obiegu węgla w podziemnym środowisku. Łupek miedzionośny obecny w złożach monokliny przedsudeckiej bogaty jest w kopalną materię organiczną, która może być utleniana przez mikroorganizmy, a następnie przekształcona w metan. Z kolei powstały metan może być utleniony przez różnorodne grupy metanotrofów. Procesy związane z metabolizmem metanu potwierdzają dane metagenomiczne, metaproteomiczne, a także obserwacje mikroskopowe. Aktywność opisywanych mikroorganizmów wpływa na strukturę złoża powodując lokalne rozpuszczanie oraz wtórne strącanie węglanów, a także może mieć wpływ na redystrybucję metali takich jak miedź, nikiel, wapń i lantan.

Wprowadzenie

Metan (wzór chemiczny: CH₄) jest związkem organicznym, najprostszym (jednowęglowym) nasyconym węglowodorem. W temperaturze pokojowej przyjmuje postać bezbarwnego i bezwonnego gazu. Jest lżejszy od powietrza. Pali się niebieskim płomieniem. Stosuje się go powszechnie jako gaz opałowy.

Znane są trzy mechanizmy powstawania metanu. Metan powstaje na drodze procesu zwanego termogenezą, czyli fizycznym rozpadem materii organicznej pod wpływem wysokiej temperatury i ciśnienia (metan termogeniczny). W powstawaniu metanu mogą brać udział również mikroorganizmy (metan biogeniczny). Jest to beztlenowy proces przeprowadzany przez archeony, określane jako metanogeneza. Metan może także powstawać poprzez procesy magmowe lub w wyniku reakcji wody ze skałami (Kietäväinen i Purkamo, 2015).

Naturalnymi źródłami emisji metanu są tereny podmokłe, oceany oraz zbiorniki wody słodkiej, erupcje wulkanów i pęknięcia skorupy ziemskiej, a także zwierzęta przeżuwające i termity. Do antropogenicznych emisji metanu do atmosfery zalicza się m.in.: wydobywanie węgla, gazu ziemnego i ropy naftowej, transport i przetwórstwo bogactw naturalnych, hodowlę zwierząt domowych, uprawę ryżu, składowanie odpadów i oczyszczalnie ścieków oraz spalanie kopalni. Udział procentowy źródeł naturalnych i antropogenicznych jest trudny do oszacowania i zmienny w czasie.

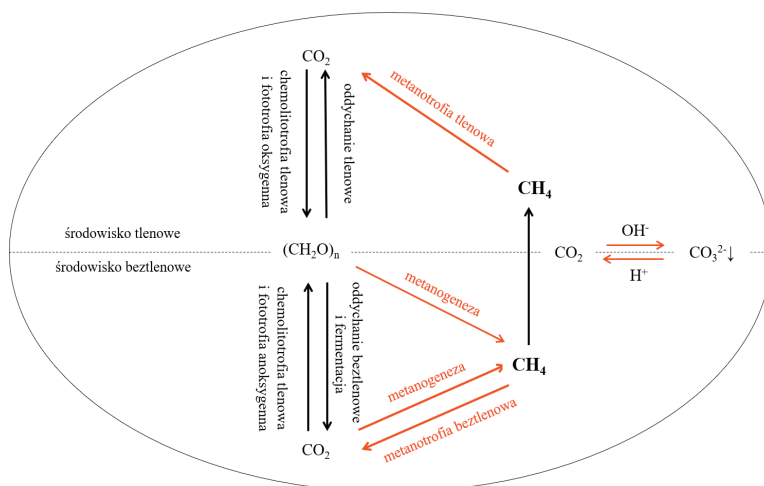
Powszechnie znaną formą występowania metanu jest gaz ziemny. Jego pokłady znajdują się w skorupie ziemskiej, niekiedy pod wysokim ciśnieniem. Występuje samodzielnie lub towarzyszy złożom ropy naftowej lub węgla kamiennego. Największe zasoby metanu należą do Rosji, Iranu i Kataru, które łącznie posiadają ok. 57% światowych zasobów gazu ziemnego (Mokrzycki i wsp., 2008).

Metan występuje także w atmosferze. Jest zaliczany do najistotniejszych gazów cieplarnianych, zaraz obok dwutlenku węgla. Jest odpowiedzialny za ok. 20% wymuszenia radiacyjnego (bez uwzględnienia pary wodnej), które przyczynia się do powstawania efektu cieplarnianego. Wymuszenie radiacyjne metanu jest 120 razy większe od dwutlenku węgla, jednak należy pamiętać, że jest go mniej w atmosferze (Balcombe i wsp., 2018). Niepokoi natomiast fakt, że obserwuje się ciągle średni roczny wzrost stężenia metanu w atmosferze ziemskiej. Obecnie średnie stężenie metanu w atmosferze wynosi ponad 1850 ppb (Prather i Holmes, 2017).

Kolejną, istotną formą występowania metanu na Ziemi są klatraty. Klatraty metanu (hydrat metanu, metanowy lód, wodzian metanu) jest to substancja krystaliczna złożona z cząsteczek wody i metanu. Złoża klatratów metanu występują głównie na stokach kontynentalnych i na terenach wiecznej zmarzliny. Największe z dotychczas odkrytych złóż występują na dnie jeziora Bajkał, u wybrzeży Karoliny Północnej, w Zatoce Meksykańskiej oraz rowie Nankai u wybrzeży Japonii (Hester i Brewer, 2009).

Jak wspomniano powyżej, mikroorganizmy biorą udział w tworzeniu metanu. Proces ten zachodzi tylko w środowiskach beztlenowych. Szacuje się, że ponad 70% metanu na Ziemi powstaje przy udziale mikroorganizmów – beztlenowych archeonów. Jednakże większość tego metanu nie przedostaje się do atmosfery, ponieważ jest natychmiast utleniana przez inną grupę mikroorganizmów – głównie bakteryjne metanotrofy. Utlenianie metanu może zachodzić zarówno w środowiskach tlenowych, jak i beztlenowych. Metanotrofia tlenowa jest znana od ponad 100 lat, natomiast beztlenowe utlenianie metanu zostało odkryte dopiero pod koniec ubiegłego wieku.

Należy zaznaczyć ogromny wpływ mikroorganizmów na bilans metanu na Ziemi. Warto także podkreślić w tym miejscu, istotne znaczenie mikrobiologicznych przemian metanu w globalnym cyklu węgla na Ziemi, co zostało zobrazowane na rycinie 1.



Rycina 1. Mikrobiologiczny obieg węgla na Ziemi. Kolorem czerwonym oznaczono przemiany opisane w tej pracy; $(CH_2O)_n$ – materia organiczna

Dotyczy to zarówno metanogenów jak i metanotrofów. Metanogeny odgrywają ważną rolę w końcowym etapie rozkładu obumarłej materii organicznej. Metanotrofy natomiast usuwają

ze środowiska metan. Procesy metanotrofii mają znaczenie lokalne, np. w podziemnych kopalniach, ale także globalne. Przypuszcza się, że mikroorganizmy metanotroficzne, a zwłaszcza zespoły beztlenowo utleniające metan termogeniczny w środowiskach oceanicznych mają kluczowe znaczenie w zapobieganiu zmianom klimatycznym. Także w dobie ocieplenia klimatu, kiedy obserwuje się rozpuszczanie klatratów metanu, metanotrofia ma szczególne znaczenie w ograniczeniu emisji metanu do atmosfery.

Metanogeneza

Za powstawanie metanu odpowiadają beztlenowe archeony metanogenne. Wyróżnia się archeony chemolitoautotroficzne i organotroficzne. Do pierwszej grupy zalicza się archeony, które wykorzystują tylko dwutlenek węgla, jako źródło węgla i energii oraz wodór, jako źródło elektronów (metanogeneza hydrogenotroficzna). Do drugiej grupy zalicza się archeony, które wykorzystują jako źródło węgla związki posiadające grupę metylową, np. octany (metanogeneza acetoklastyczna), a także metanol, metyloaminy i metylosiarczki (metanogeneza metylo-troficzna).

Pomimo tego, że substraty reakcji są prostymi związkami to sam proces metanogenezy pod względem biochemicznym jest niezwykle złożony. Poznano ponad 200 genów kodujących białka i koenzymy uczestniczące w metanogenezie. Wspólne dla wszystkich poznanych szlaków metanogenezy są trzy etapy: 1) transfer grupy metylowej do koenzymu M (CoM-SH), 2) redukcja metylowanego koenzymu M przy udziale koenzymu B (CoB-SH) oraz 3) regeneracja heterodisiarczku CoM-S-S-CoB za sprawą reduktazy heterodisiarczku.

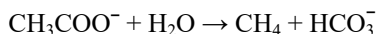
Należy jednak pamiętać, że metanogeneza jest poprzedzona zwykle szeregiem złożonych procesów rozkładu materii organicznej występującej w postaci polimerów (m.in. hydrolizą, kwasogenezą, octanogenezą) przebiegających przy udziale różnych grup mikroorganizmów syntroficznych.

Archeony przeprowadzające metanogenezę hydrogenotroficzną redukują dwutlenek węgla do metanu wykorzystując wodór lub mrówczan jako donor elektronów, co można zapisać korzystając z równania:



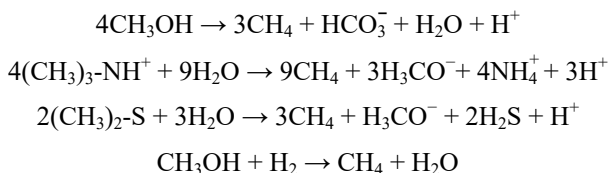
Do hydrogenotrofów zalicza się głównie archeony należące do rzędów *Methanopyrales*, *Methanococcales* oraz *Methanobacterales*. Metanogeneza hydrogenotroficzna zachodzi w głębokich osadach morskich oraz układzie pokarmowym ludzi i zwierząt. Stanowi łącznie źródło jednej trzeciej biogenego metanu.

Metanogeneza acetoklastyczna zachodzi w środowiskach o obniżonym stężeniu wodoru (np. w wyniku działalności metanogenów hydrogenotroficznych), gdyż tylko wtedy powstają warunki właściwe do tworzenia octanu. Octan jest substratem reakcji, a produktami metan i dwutlenek węgla, który w wodzie może przyjąć postać jonu wodorowęglowego:



Metanogeneza acetoklastyczna mimo tego, że najbardziej powszechna na Ziemi, to jest przeprowadzana przez archeony należące tylko do dwóch rodzajów rzędu *Methanosarcinales*: *Methanosarcina* oraz *Methanoxtrix* (*Methanosaxeta*). *Methanosarcina* może wykorzystywać różne substraty w metanogenezie, jednak dla rodzaju *Methanoxtrix* octan stanowi jedyny substrat. Metanogeny acetoklastyczne występują na mokradłach i polach ryżowych. Ich działalność przyczynia się do emisji dwóch trzecich biogenego metanu.

Metanogeneza metylotroficzna jest powszechna w morskich oraz silnie zasolonych, bogatych w siarczany osadach, w których występują metylowane związki, takie jak: metanol, trimetyloaminy, siarczany dimetylu. Zachodni według równań:



Klasyczne metanogeny metylotroficzne należą do rodziny *Methanosarcinaceae*. Uważa się, że ich udział w produkcji biogenego metanu w porównaniu z dwoma poprzednimi grupami jest niewielki (Lyu i wsp., 2017).

Metanotrofia

Metanotrofy to mikroorganizmy prokariotyczne, które utleniają metan zarówno w środowiskach tlenowych, jak i beztlenowych. Metan stanowi dla nich źródło węgla i źródło energii. Zdolność do utleniania metanu w obecności tlenu charakteryzuje bakterie, natomiast beztlenowo metan utleniany jest przez archeony (jedynym poznanym wyjątkiem jest bakteria *Candidatus Methyloirabilis oxyfera*). Do metanotrofów utleniających metan w obecności tlenu można zaliczyć bakterie należące do klasy *Alpha-* oraz *Gammaproteobacteria*, a także *Verrucomicrobia*. Beztlenowe metanotroficzne archeony (ANME) występują w konsorcjum z różnymi bakteriami.

Tlenowe metanotrofy charakteryzuje wykorzystanie metanu lub metanolu jako jedyne źródła węgla i energii. Jednakże wyjątkiem są niektóre bakterie z rodzaju *Methylocella*, które oprócz metanu są zdolne do wykorzystywania różnorodnych związków organicznych (Dunfield i Dedysh, 2014).

W obecności tlenu metan utleniany jest przez szeroko rozpowszechnione i różnorodne fizjologicznie bakterie należące do klasy *Alpha-* oraz *Gammaproteobacteria*, które wyróżniają się posiadaniem kluczowego dla tego procesu enzymu – monooksygenazy metanowej. Niedawno odkryto, że metanotrofy klasy *Gammaproteobacteria* występują także w środowiskach, gdzie tlenu jest niewiele (warunki mikroaerobowe) lub nawet w środowiskach beztlenowych. Wtedy utlenianie metanu przeprowadzają najprawdopodobniej w troficznych konsorcjach z fototrofami oksygennymi lub metylotrofami lub też używają akceptorów elektronów innych niż tlen. Do aerobowego utleniania metanu zdolne są również bakterie typu *Verrucomicrobia*. Są to mikroorganizmy występujące w środowiskach charakteryzujących się szerokim zakresem temperatur, jednak spotyka się je głównie w środowiskach geotermalnych o kwaśnym odczynie (pH 1,8–5) (Kallistova i wsp., 2017).

Warto dodać, że w literaturze często spotyka się podział bakterii metanotroficznych należących do typu *Proteobacteria* uwzględniający morfologię komórek, filogenezę oraz szlak asymilacji węgla. Na podstawie tych kryteriów wyróżnia się dwie grupy metanotrofów: typ I oraz typ II (wcześniej istniał także typ X, jednak obecnie jest włączony do typu I). Do typu I zaliczają się metanotrofy, które asymilują związki jednowęglowe korzystając ze szlaku rybulozomonofosforanowego (RuMP) oraz należą do klasy *Gammaproteobacteria*. Bakterie metanotroficzne typu II używają szlaku serynowego do asymilacji związków jednowęglowych oraz reprezentują klasę *Alfaproteobacteria* (Madigan i wsp., 2014). Stosowany powszechnie podział

jest już jednak niewystarczający dla zobrazowania różnorodności filogenetycznej, morfologicznej i fizjologicznej metanotrofów. Z tego powodu w poniższej pracy zdecydowano się zaprezentować charakterystykę metanotrofów, uwzględniając ich taksonomię. Porównanie poszczególnych rodzin, stanowiące równocześnie zbiór najważniejszych informacji o tlenowych metanotrofach, zostało zawarte w tabeli 1.

Tabela 1. Ogólna charakterystyka rodzin tlenowych metanotrofów; +/- – różni się w zależności od gatunku

Rodzina	<i>Methylococcaceae</i>	<i>Methylocystaceae</i>	<i>Beijerinckaceae</i>	<i>Methylacidiphilaceae</i>
Typ	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Verrucomicrobia</i>
Rodzaj	<i>Methylobacter</i> <i>Methylococcus</i> <i>Methylocaldum</i> <i>Methylohalobius</i> <i>Methylomicrobium</i> <i>Methylomonas</i> <i>Methylosoma</i> <i>Methylosarcina</i> <i>Methylosphaera</i> <i>Methylothermus</i> <i>Crenothrix</i> <i>Clonothrix</i>	<i>Methylosinus</i> <i>Methylocystis</i>	<i>Methylocapsa</i> <i>Methylocella</i>	<i>Methylacidiphilum</i>
Szlak RuMP	+	-	-	-
Szlak Serynowy	-	+	+	+
Szlak Rubisco	Rzadko	-	-	+
sMMO	+/-	+/-	+/-	-
pMMO	+/-	+	+/-	+
Wiązanie azotu	+/-	+/-	+	+/-
Wewnątrzplazmatyczne struktury błonowe	Wiązki pęcherzyków w kształcie dysków ułożone prostopadłe do błony komórkowej	Stosy pęcherzyków w kształcie dysków ułożone równoległe do błony komórkowej	<i>Methylocapsa</i> – pęcherzyki błonowe równoległe do dłuższej osi komórki, występujące po jednej stronie błony komórkowej; <i>Methylocella</i> – inwaginacja błony cytoplazmatycznej	-
Struktury podobne do karboksosomów lub pęcherzyki	-	-	+	+
G+C mol%	43–65	62–67	60–63	41–46

Charakterystyczne dla metanotrofów jest posiadanie systemu błon wewnątrzplazmatycznych. U metanotrofów w zależności od ich przynależności taksonomicznej zaobserwowano stosy błon w centralnej części komórki lub błony rozmieszczone peryferyjnie, równoległe do błony komórkowej, czasami rozciągającymi się na całą komórkę bakteryjną. Metanotrofy należące do klasy *Verrucomicrobia* nie posiadają systemu błon wewnątrzplazmatycznych, jednak w ich komórkach występują pęcherzyki błonowe (Semrau i wsp., 2010). Opis morfologii komórek metanotrofów został zamieszczony w tabeli 1.

Wspólną cechą tlenowych metanotrofów jest zdolność utlenienia metanu do dwutlenku węgla i wody. Poszczególne etapy tego procesu wraz z enzymami kluczowymi zostały przedstawione na rycinie 2. Produktami pośrednimi reakcji mikrobiologicznego utlenienia metanu są metanol, formaldehyd oraz mrówczan.

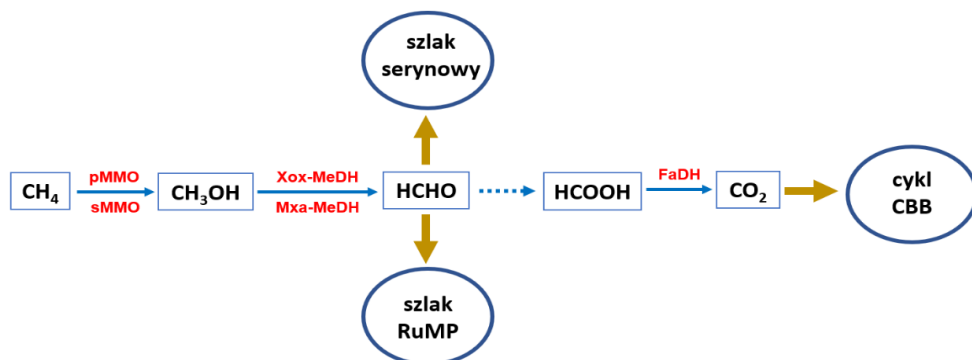
Pierwszym etapem jest utlenienie metanu do metanolu. Enzymem odpowiedzialnym za aktywację tlenu jest monooksygenaza metanowa. W przyrodzie istnieją dwa rodzaje tego enzymu. Pierwszy rodzaj (sMMO), to rozpuszczalna forma monooksygenazy metanowej, która posiada w centrum aktywnym dwa atomy żelaza. Drugi rodzaj (pMMO) jest zależny od miedzi i występuje w formie nierozpuszczalnej, związanej z błoną komórkową. Oba rodzaje monooksygenazy metanowej nie są ze sobą genetycznie powiązane i kodują je dwa osobne geny. Enzym sMMO jest ekspresjonowany przez grupę metanotrofów, natomiast enzym pMMO jest ekspresjonowany przez większość metanotrofów. Często zdarza się, że bakteria metanotroficzna posiada oba rodzaje enzymu. W takich komórkach, gdy stężenie miedzi w komórce jest duże obserwuje się zwiększoną ekspresję pMMO i jednoczesne wyciszenie ekspresji sMMO. Natomiast, gdy stężenie miedzi w komórce spada ekspresja pMMO zostaje zmniejszona, a sMMO zwiększona. Jest to tak zwany mechanizm „przełącznika miedzi” (ang. *copper switch*) (Ross i Rosenzweig, 2017).

W związku z tym, że miedź jest istotnym pierwiastkiem w procesie utlenienia metanu, to metanotrofy musiały wykształcić sposób pobierania tego metalu ze środowiska. W środowiskach o kwaśnym odczynie miedź występuje w formie rozpuszczonej, czyli dostępnej dla komórki bakteryjnej. Zatem jedynie acydofile, takie jak *Methylocella* sp. oraz *Methylocapsa* sp., a także metanotrofy należące do typu *Verrucomicrobia* występujące w kwaśnych środowiskach nie mają problemu z dostępnością miedzi. Pozostałe metanotrofy, jak również inne bakterie potrzebujące do prawidłowego funkcjonowania miedzi, wykorzystują metanobaktynę. Metanobaktyna (Mbn) to produkowany rybosomalnie, modyfikowany post-translacyjnie peptyd o wysokim powinowactwie do miedzi. Poza komórką metanobaktyna wiąże się z miedzią, a następnie za pośrednictwem transportu aktywnego kompleks Mbn-Cu jest kierowany do wnętrza komórki (Semrau i wsp., 2010).

Dehydrogenaza metanolowa (MeDH) jest odpowiedzialna za utlenienie metanolu. Centrum aktywne enzymu u bakterii Gram-ujemnych jest zbudowane z pirolochinolinochinonu (PQQ). Do tej pory opisano dwa homologi tego enzymu: dehydrogenazę metanolową zależną od wapnia oraz dehydrogenazę metanolową zależną od lantanowców. Lepiej poznana dehydrogenaza metanolowa zależna od wapnia – MxaFI-MeDH jest heterotetramerem składającym się z dwóch dużych podjednostek katalitycznych (MxaF) oraz dwóch małych podjednostek (MxaI). Enzym MxaFI-MeDH wiąże wapń jako kofaktor, który jest niezbędny do katalizy. Z kolei, niedawno odkryta dehydrogenaza metanolowa zależna od lantanowców – XoxF-MeDH jest homodimerem, w którym brak jest małej podjednostki, a rolę wapnia pełnią lantanowce. Wykorzystanie lantanowców może przyczyniać się do lepszych zdolności katalitycznych. W odróżnieniu od enzymów z grupy MxaFI-MeDH, które utleniają metanol do formaldehydu, enzymy XoxF-MeDH utleniają metanol raczej do mrówczanu (Keltjens i wsp., 2014).

Powstały na drodze utlenienia metanolu formaldehyd jest toksyczny dla komórek. Bakterie muszą więc go utlenić do dwutlenku węgla lub zasymilować. Formaldehyd jest utleniany przez niektóre bakterie do mrówczanu w szlaku tetrahydrofaliowym lub szlaku tetrahydrometanoptyrynowym. Następnie mrówczan jest utleniany do dwutlenku węgla przez dehydrogenazę mrówczanową (FaDH), której kofaktorem jest selen. Bakterie asymilujące formaldehyd korzystają alternatywnie z dwóch mechanizmów asymilacji związków C1 – szlaku rybulozomono-

fosforanowego (RuMP) lub szlaku serynowego. Zasymilowany formaldehyd służy komórce bakteryjnej do syntezy kluczowych produktów pośrednich metabolizmu podstawowego. Jednakże niektóre metanotrofy nie asymilują węgla z formaldehydu, a wiążą dwutlenek węgla w cyklu Calvina–Bensona–Basshama (CBB) np.: *Methyloacidiphilum fumariolicum* SolV, *Methylacidimicrobium* spp., i „*Candidatus M. oxyfera*” (Semrau i wsp., 2018).



Rycina 2. Szlak utleniania metanu tlenowych metanotrofów z zaznaczeniem kluczowych enzymów – na podstawie Semrau i wsp., 2018 z modyfikacją własną. Oznaczenia: pMMO – monooksygenaza metanowa zależna od miedzi; sMMO – rozpuszczalna monooksygenaza metanowa; Xox-MeDH – dehydrogenaza metanolowa zależna od lantanowców; Mxa-MeDH – dehydrogenaza metanolowa zależna od wapnia; FaDH – dehydrogenaza mrówczanowa; strzałka przerywana sygnalizuje miejsce uproszczenia schematu. CBB – szlak asymilacji CO₂ Calvina-Bensona-Basshama

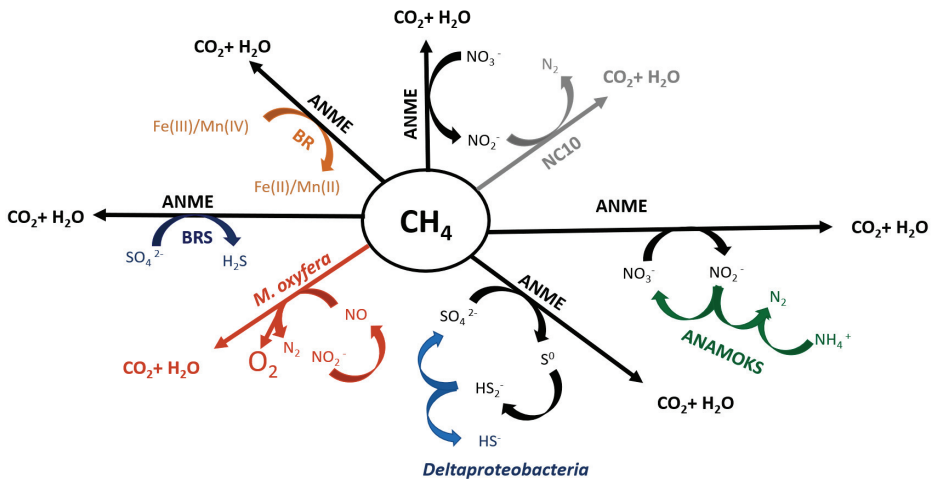
Mikrobiologiczne utlenianie metanu w warunkach beztlenowych zwane w literaturze angielskiej AOM (ang. *anaerobic oxidation of methane*) odkryto w latach 90. XX wieku. Proces ten wykryto w dnie oceanicznym w rejonach tzw. zimnych wysięków (ang. *cold seeps*). Są to strefy dna morskiego występujące głównie na obszarach ryftów i stoków kontynentalnych, w których dochodzi do przesiąkania m.in. metanu. Pierwsze badania AOM prowadzono w Zatoce Meksykańskiej, u wybrzeży Kalifornii, na Morzu Śródziemnym oraz Bałtyckim. Dotychczas odkryto kilka mechanizmów AOM, przebiegających przy udziale archeonów tzw. ANME (ang. *anaerobic methanotrophic archaea*) oraz różnych grup troficznych bakterii. Najważniejsze z tych mechanizmów polegają na syntroficznym utlenieniu metanu w połączeniu z 1) redukcją siarczanów, 2) redukcją tlenków Mn lub Fe, 3) dysproporcjonowaniem disiarczków, 4) denitryfikacją i procesem anamoks oraz 5) dysmutacją tlenku azotu (Joye, 2012). Ogólny schemat tych przemian przedstawiono na rycinie 3.

Pierwszy ze wspomnianych mechanizmów i jednocześnie najwcześniej odkryty przebiega przy udziale konsorcjum złożonego z archeonów ANME (rzędy – *Methanobacteriales* i *Methanosarcinales*) oraz bakterii redukujących siarczany należących do rodzajów *Desulfosarcina* i *Desulfococcus* (Hinrichs i wsp., 1999; Boetius i wsp., 2000). Proces ten wykryto w tzw. SMTZ (ang. *sulfate-methane transpiration zone*), czyli strefach dna oceanicznego, w których metan współwystępuje z siarczanami. Proces ten przebiega według reakcji chemicznej: $\text{CH}_4 + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{HS}^- + \text{H}_2\text{O}$. Uważa się, że utlenianie metanu przez ANME w warunkach beztlenowych może być połączone również z bakteryjną redukcją tlenków manganu lub żelaza, ale dotychczas nie

wskazano rodzajów bakterii współwystępujących w takich konsorcjach z archeonami (Beal i wsp., 2009).

Innym niezwykle ważnym odkryciem w zakresie opisywanych procesów jest przeprowadzane przez ANME i *Deltaproteobacteria* utlenianie metanu połączone z dysproporcjonowaniem disiarczków opisane przez Milucka i wsp. (Milucka i wsp., 2012). W procesie tym ANME utleniają metan jednocześnie redukując siarczany do siarki. Następnie siarka reagując z siarczami występującymi w środowisku tworzy disiarczki, które są przekształcane przez bakterie z klasy *Deltaproteobacteria* do siarczanów i siarczków: $4\text{HS}^{2-} + 4\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{SO}_4^{2-} + 7\text{HS}^- + 5\text{H}^+$. Powstałe w tej reakcji siarczany mogą być ponownie redukowane przez ANME.

Szczególnie interesujący jest mechanizm utleniania metanu przez bakterię *Candidatus M. oxyfera*, która przy udziale enzymu dysmutazy przekształca tlenek azotu do tlenu i azotu; tlen powstały w tym procesie jest wykorzystywany do utleniania metanu: $3\text{CH}_4 + 8\text{NO}_2^- + 8\text{H}^+ \rightarrow 3\text{CO}_2 + 4\text{N}_2 + 10\text{H}_2\text{O}$ (Etwig i wsp., 2010; Oremland, 2010). Tlenek azotu powstaje w wyniku denitryfikacji z dwutlenku azotu. Jest to jedyny opisany dotychczas mechanizm utleniania metanu w warunkach beztlenowych przez bakterie bez udziału archeonów.



Rycina 3. Mikrobiologiczne utlenianie metanu w warunkach beztlenowych. BRS – bakterie redukujące siarczany;

BR – bakterie redukujące żelazo i mangan. Kolor czarny – procesy przeprowadzane przez archeony ANME

(utlenianie metanu; redukcja siarczanów i denitryfikacja); pozostałe kolory – procesy przeprowadzane przez bakterie:

kolor granatowy – redukcja siarczanów; kolor brązowy – redukcja związków żelaza i manganu;

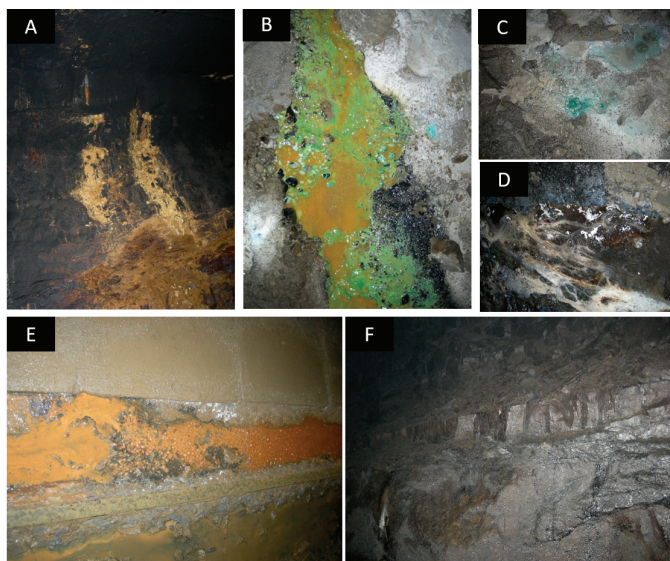
kolor niebieski – dysproporcjonowanie disiarczków; kolor czerwony – dysmutacja tlenu azotu;

kolor zielony – procesy anamoks; kolor szary – denitryfikacja

Przemiany związków azotu, a dokładnie denitryfikacja i procesy anamoks (ang. *anaerobic ammonia oxidation*) towarzyszą utlenianiu metanu przez konsorcja archeonów ANME zgodnie z równaniem: $\text{CH}_4 + 4\text{NO}_3^- \rightarrow \text{CO}_2 + 4\text{NO}_2^- + 2\text{H}_2\text{O}$. W pierwszym przypadku metan może być utleniany zarówno przez archeony, jak również bakterie (szczep N10). Jednocześnie ANME przeprowadzają redukcje azotanów do azotynów, a szczep N10 redukcję azotynów do azotu (Raghoebarsing i wsp., 2006). W drugim, ANME utleniają metan i jednocześnie redukują azotany, a bakterie anamoks przeprowadzają proces beztlenowego utleniania amoniaku z jednoczesną redukcją azotynów (Haroon i wsp., 2013).

Mikrobiologiczne przemiany metanu i ich znaczenie w obiegu węgla w środowisku kopalnianym monokliny przedsudeckiej

Kopalnie miedzi na monoklinie przedsudeckiej są niezwykle ciekawym środowiskiem podziemnym, zasiedlonym przez złożone zespoły mikroorganizmów, które występują w osadach dennych i naskalnych, jak również na skałach (rycina 4). Złożoność ta dotyczy zarówno taksonomii, jak i metabolizmu i fizjologii mikroorganizmów i jest determinowana budową geochemiczną skał oraz składem chemicznym wód i warunkami fizyczno-chemicznymi panującymi pod ziemią.



Rycina 4. Wybrane środowiska występowania zespołów mikroorganizmów metanogenicznych i metanotroficznych w kopalniach monokliny przedsudeckiej. Zdjęcia przedstawiają kolejno: A – osad naskalny; B, C, D, E – osady dennie; F – łupek miedzionośny

Skały monokliny przedsudeckiej (szczególnie skały łupkowe) są znacznie wzbogacone w kopalną materię organiczną, której zawartość wynosi od 1 do 30% wag. przy szacunkowej średniej zawartości około 6%. Materia organiczna jest pochodzenia morskiego i jest to kerogen typu II, zdominowany przez wityrynit, liptynit i inertynit (Sawłowicz, 1989).

Dotychczas wykazano, że skały podziemne są zasiedlane głównie przez mikroorganizmy heterotroficzne, które wykorzystują materię organiczną jako źródło węgla. W wyniku badań profili skalnych wykazano silne utlenienie i odwodornienie kerogenu przez mikroorganizmy, głównie bakterie, co zostało również potwierdzone w badaniach laboratoryjnych (Stasiuk i wsp., 2017; Włodarczyk i wsp. 2018). Zidentyfikowano szereg enzymów, a także kodujące je geny, odpowiedzialne za utlenienie związków węgla organicznego. Ponadto, wykazano powstawanie różnego rodzaju związków organicznych (metabolitów) – wytwarzanych przez mikroorganizmy w wyniku utlenienia kerogenu. Wśród nich były również związki C1, takie jak metan, metanol, formaldehyd czy kwas mrówkowy.

Środowisko podziemne jest również wzbogacone w pierwiastki takie jak miedź, nikiel, wapń, selen czy lantan, które są kofaktorami wspomnianych wcześniej enzymów kluczowych

w procesach metanogenezy i metanotrofii. W skałach monokliny przedsudeckiej rozpoznano ponad sto minerałów Cu, Ag, Fe, Ni, Co, Mo, Hg, Bi, Au, Pt i Pd. Minerale rudy wraz z minerałami skałotwórczymi, takimi jak węglany i glinokrzemiany, są rozproszone w matrycy ilastej (Speczik, 1994; 1995). W skałach monokliny przedsudeckiej szczególnie wysoka jest zawartość miedzi, wynosząca nawet do 10% wag. Dane literaturowe wskazują także na znaczące wzbogacenie skał w lantanowce (całkowita zawartość 60–210 mg/kg), szczególnie lekcje lantanowce (35–118 mg/kg) (Bechtel i wsp., 2001).

Tabela 2. Mikroorganizmy potencjalnie biorące udział w metabolizmie metanu zidentyfikowane w kopalniach miedzi monokliny przedsudeckiej

Rodzaj	Rodzina	Klasa	Typ	
Metanogeny				
<i>Methanosarcina</i> *	<i>Methanosarcinaceae</i>	<i>Methanomicrobia</i>	<i>Euryarchaeota</i>	
<i>Methanolobus</i>				
<i>Methanococcoides</i>				
<i>Methanobrevibacter</i>	<i>Methanobacteriaceae</i>			
<i>Methanobacterium</i>				
<i>Methanoculleus</i>	<i>Methanomicrobiaceae</i>			
<i>Methanospirillum</i>	<i>Methanospirillaceae</i>			
<i>Methanoregula</i>	<i>Methanoregulaceae</i>			
<i>Methanococcus</i>	<i>Methanococcaceae</i>	<i>Methanococci</i>		
Metanotrofy tlenowe				
<i>Methylomonas</i>	<i>Methylococcaceae</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	
<i>Methylocaldum</i>				
<i>Methylobacter</i>				
<i>Methylocrobia</i>				
<i>Methylosarcina</i>				
<i>Methylococcus</i>				
<i>Crenothrix</i>	<i>Crenotrichaceae</i>			
<i>Methylohalobius</i>	<i>Methylothermaceae</i>			
<i>Methylocystis</i>	<i>Methylocystaceae</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>		
<i>Methylosinus</i>				
<i>Methylocella</i>	<i>Beijerinckiaceae</i>			
Bakterie redukujące siarczany				
<i>Desulfobacterium</i>	<i>Desulfobacteraceae</i>	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	
<i>Desulfococcus</i>				
<i>Desulfosarcina</i>				
<i>Desulfobulbus</i>				<i>Desulfobulbaceae</i>
<i>Desulfovibrio</i>				<i>Desulfovibrionaceae</i>
<i>Desulfomicrobium</i>				<i>Desulfomicrobiaceae</i>
<i>Desulfuromonas</i>	<i>Desulfuromonadaceae</i>			
Bakterie redukujące żelazo i mangan				
<i>Shewanella</i>	<i>Shewanellaceae</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	
<i>Geobacter</i>	<i>Geobacteraceae</i>	<i>Deltaproteobacteria</i>		
Bakterie redukujące azotany/azotyny				
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Shewanellaceae</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	
<i>Paracoccus</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>		
<i>Thiobacillus</i>	<i>Thiobacillaceae</i>	<i>Betaproteobacteria</i>		
<i>Alcaligenes</i>	<i>Alcaligenaceae</i>	<i>Betaproteobacteria</i>		
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>		
<i>Bacillus</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Firmicutes</i>	

* metanotrof beztlenowy.

Aktualnie prowadzone są badania nad mikrobiologiczną produkcją metanu z kopalnej materii organicznej. Istnieje wiele przesłanek, aby sądzić, że w kopalniach monokliny przedsudeckiej, metan powstaje w wyniku działalności mikroorganizmów. Co istotne, udało się na podstawie analiz metagenomicznych zespołów mikroorganizmów zidentyfikować metanogeny należące do klasy *Methanomicrobia* oraz *Methanococci*. Przykłady rodzajów archeonów metanogennych podano w tabeli 2.

Ponadto, w metaproteomie izolowanym z zespołów mikroorganizmów kopalnianych wykryto enzymy związane z charakterystycznymi dla metanogenezy etapami, czyli pierwszym i ostatnim (tabela 3). Reduktaza heterodisiarczkowa odpowiada za redukcję ferredoksyny. To właśnie zredukowana postać ferredoksyny katalizuje pierwszy etap metanogenezy. Z kolei reduktaza metylokoenzymu M, spotykana tylko u archeonów metanogennych przeprowadza ostatni etap metanogenezy – bez względu z jakiego substratu powstaje metan. Do katalizy wymaga koenzymu F430, który wiąże jony niklu.

Analiza metagenomiczna wykazała, że w środowisku kopalnianym monokliny przedsudeckiej występują tlenowe bakterie należące do I oraz II typu metanotrofów. Wykryto przedstawicieli klas *Gammaproteobacteria* oraz *Alphaproteobacteria*. Przykłady zidentyfikowanych taksonów znajdują się w tabeli 2.



Rycina 5. Komórki bakterii pochodzących z maty mikrobiologicznej występującej w kopalni miedzi Lubin; czerwonymi strzałkami oznaczono błony wewnętrzplazmatyczne

Dzięki zastosowaniu transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) udało się zidentyfikować komórki bakteryjne posiadające charakterystyczne dla metanotrofów systemy błon wewnętrzplazmatycznych (rycina 5). Jest to dodatkowe potwierdzenie, że w środowisku kopalnianym monokliny przedsudeckiej występują bakterie metanotroficzne i prawdopodobnie zachodzić mikrobiologiczne utlenienie metanu.

Potencjalne utlenienie metanu przez tlenowe metanotrofy potwierdzają analizy metaproteomiczne. Wykryto kluczowe enzymy zaangażowane w ten proces (tabela 3). Przykładem jest monooksygenaza metanowa zależna od miedzi (pmoB-amoB), która katalizuje pierwszy etap reakcji, czyli utlenienie metanu do metanolu. Obecność miedzi w środowisku często warunkuje zachodzenie procesu biologicznego utlenienia metanu.

W metaproteomie zespołów mikroorganizmów kopalnianych obecne są także enzymy odpowiedzialne za drugi etap metanotrofii, czyli utlenienie metanolu. Zidentyfikowano oba homologii dehydrogenazy metanolowej: zależną od wapnia (MxaF) oraz zależną od lantanowców (XoxF) (tabela 3).

Tabela 3. Wybrane enzymy potencjalnie odpowiedzialne za przemiany metanu zidentyfikowane w metaproteomie mikroorganizmów zasiedlających podziemne kopalnie miedzi; EC – ang. *enzyme catalogue*

Enzym	Funkcja	EC	Pochodzenie (przykładowe taksony)
Reduktaza metylokoenzymu M	metanogeneza/metanotrofia beztlenowa; przeprowadza ostatni etap metanogenezy – wymaga koenzymu F430 do katalizy	2.8.4.1	<i>Methanosaeta harundinacea</i>
Reduktaza heterodisiarczkowa	metanogeneza/metanotrofia beztlenowa; redukcja ferredoksyny – zredukowana ferredoksyna napędza pierwszy etap metanogenezy	1.8.7.3 1.8.98.4 1.8.98.5 1.8.98.6	<i>Methanobrevibacter smithii</i> <i>Aciduliprofundum boonei</i> <i>Archaeoglobus fulgidus</i> <i>Methanococcus maripaludis</i> <i>Desulfosarcina</i> sp. BuS5 <i>Thiobacillus denitrificans</i> <i>Desulfobacterium autotrophicum</i>
Monookygenaza metanowa [pmoB-amoB]	metanotrofia; utlenienie metanu	1.14.13.25	<i>Methylomarinum vadi</i> <i>Methylovulum miyakonense</i> HT12
Dehydrogenaza metanolowa (zależna od Ca) [MxaF]	metanotrofia, utlenienie metanolu	1.1.2.7	<i>Methylobacter tundripaludum</i> <i>Methylococcus capsulatus</i> <i>Methylorubrum populi</i> <i>Methylobacterium nodulans</i> <i>Methylomonas methanica</i> <i>Methylomicrobium alcaliphilum</i> <i>Methylocystis</i> sp. SC2
Dehydrogenaza metanolowa (zależna od Ln) [XoxF]	metanotrofia, utlenienie metanolu	1.1.2.10	<i>Methyloversatilis universalis</i> <i>Methylomonas methanica</i> <i>Methylomicrobium alcaliphilum</i>
Reduktaza azotanowa	denitryfikacja, redukcja azotanów	1.7.5.1 1.7.99.-	<i>Nitratiruptor</i> sp. SB155-2 <i>Nitrospira defluvii</i> <i>Terasakiella pusilla</i> <i>Magnetospira</i> sp. QH-2 <i>Azovibrio restrictus</i> <i>Methylotenera mobilis</i> <i>Herminiimonas arsenicoxydans</i> <i>Neisseria wadsworthii</i> <i>Arcobacter butzleri</i>
Reduktaza azotynowa	denitryfikacja, redukcja azotynów	1.7.2.1 1.7.99.1	<i>Hydrogenivirga</i> sp. 128-5-R1-1 <i>Streptomyces viridosporus</i> <i>Nitrospira defluvii</i> <i>Pseudomonas</i> sp. CBZ-4
Reduktaza tlenku azotu	denitryfikacja, redukcja tlenku azotu do azotu	1.7.2.4	<i>Rhodothermus marinus</i>
Reduktaza siarczanowa	redukcja siarczanów	1.8.99.2	<i>Desulfococcus multivorans</i> <i>Thiocapsa roseopersicina</i> <i>Desulfatiglanis anilini</i> DSM 4660 <i>Desulfatibacillum</i> sp. Pnd3 <i>Annwoodia aquaesulis</i>
Reduktaza siarczynowa	redukcja siarczynów	1.8.99.5	<i>Desulfovibrio carbinoliphilus</i> <i>Desulfobacter postgatei</i> <i>Desulfomonile tiedjei</i> <i>Desulfofustis glycolicus</i> <i>Desulfovirga adipica</i> <i>Desulfotalea psychrophila</i> <i>Methylomonas</i> sp. MK1

Dotychczas w opisywanych środowiskach kopalnianych nie prowadzono badań beztlenowego utleniania metanu, jednak potwierdzono występowanie grup mikroorganizmów znanych z literatury jako zdolne do syntroficznego utlenienia metanu w warunkach beztlenowych. Były to przede wszystkim archeony należące do rodzaju *Methanosarcina* oraz bakterie zdolne do redukcji siarczanów, żelaza i manganu, a także bakterie denitryfikacyjne (tabela 2). Ponadto zidentyfikowano enzymy odpowiedzialne za redukcję siarczynów, oraz azotynów. Wspomniany wcześniej przy opisie procesów metanogenezy enzym reduktaza metylokoenzymu M (tabela 3) może być także wykorzystywana przez kopalniane metanotrofy w warunkach beztlenowych. Wyniki te są przesłanką do podjęcia szczegółowych badań procesu beztlenowego utleniania metanu.

Opisane procesy metanogenezy i metanotrofii mają istotne znaczenie w obiegu węgla w środowiskach podziemnych jakimi są kopalnie monokliny przedsudeckiej (rycina 6).

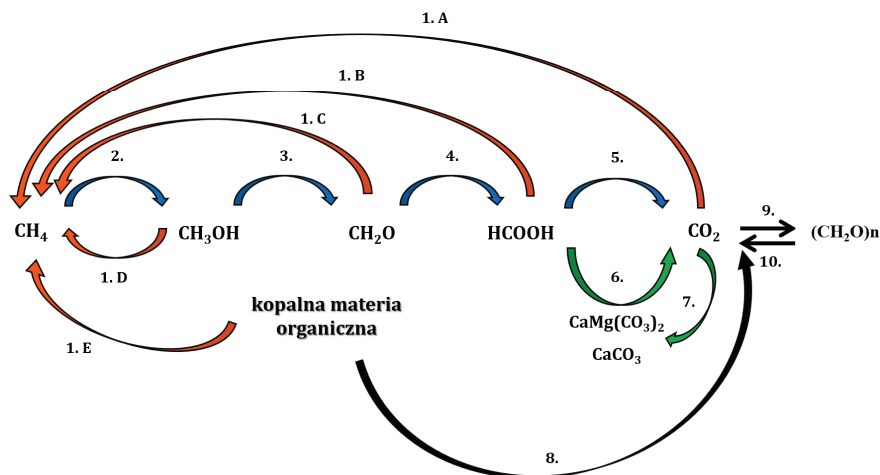
W wyniku działalności mikroorganizmów kopalna materia organiczna może zostać utleniona. Powstałe utlenione związki organiczne ulegają przekształceniom w kolejnych etapach fermentacji metanowej. Zidentyfikowano heterotroficzne bakterie odpowiadające za hydrolizę związków organicznych i kwasogenezę, czyli „fermentację kwaśną”, np. *Pseudomonas* sp. oraz beztlenowe *Clostridium* sp. i *Bacillus* sp., a także bakterie octanowe *Syntrophomonas* sp. oraz *Syntrophobacter* sp. Wytwarzane przez nie octany mogą stanowić substrat dla metanogennych archeonów acetoklastycznych. W wyniku kwasotwórczej działalności mikroorganizmów powstają: kwas octowy, propionowy, mlekowy, walerianowy, masłowy, alkohol etylowy oraz dwutlenek węgla. Związki te mogą przyczynić się do miejscowego zakwaszenia środowiska i lokalnego rozpuszczania skał węglanowych (kalcytów, dolomitów) stanowiących główny komponent złóż monokliny przedsudeckiej. Reakcja ta jest odwracalna, a więc rozpuszczony w wodzie kopalnianej dwutlenek węgla może ulegać wtórnemu strącaniu w formie węglanów (w warunkach alkalicznych). Dwutlenek węgla może zostać również wykorzystany do metanogenezy przez archeony hydrogenotroficzne, a także przez autotrofy, w tym chemolitoautotrofy. Chociaż zwykle procentowy udział metanogenów w mikrobiocenozach kopalnianych jest niewielki, to w metaproteomie identyfikuje się wiele białek tych mikroorganizmów, co świadczy o ich aktywności.

Powstały w wyniku działalności archeonów metan jest następnie utleniany przez metanotrofy. Należy mieć na uwadze, że nawet niewielka liczba archeonów metanogennych może przyczynić się do zapewnienia metanu w ilości wystarczającej do rozwoju mikroorganizmów metanotroficznych (Lau i wsp., 2016).

Metanotrofy mają zdolność do całkowitego utlenienia metanu do dwutlenku węgla lub utleniają metan do związków jednowęglowych, takich jak metanol, formaldehyd i kwas mrówkowy. Jednowęglowe produkty metabolizmu metanotrofów mogą być następnie wykorzystane i utleniane przez kolejną grupę mikroorganizmów jaką są metylootrofy lub mogą służyć jako substraty dla metanogenów. Metanotrofy i metylootrofy przez produkcję kwasów mogą przyczynić się do zakwaszenia środowiska i opisywanego już wcześniej rozpuszczania węglanów. Produkowany przez metanotrofy oraz metylootrofy dwutlenek węgla stanowi źródło węgla dla autotrofów. Inkorporowany do komórek jest przekształcany do prostych związków organicznych (rycina 6).

Wartym dalszych badań jest temat wykorzystywanych przez mikroorganizmy metanotroficzne i metanogenne kofaktorów posiadających w swojej strukturze metale. Interesujące jest poznanie mechanizmów pobierania metali w środowiskach kopalnianych przez mikroorganizmy. Prawdopodobne jest, że mikroorganizmy wykorzystują nie tylko jony

metali rozpuszczone w wodzie, ale także pobierają metale z mineralów, a tym samym mogą powodować ich wietrzenie. Szczególnie ważne i interesujące jest poznanie mechanizmów pobierania do komórki lantanowców, gdyż na ten temat na razie niewiele wiadomo (Picone, 2019).



Rycina 6. Przemiany węgla organicznego i nieorganicznego zidentyfikowane w podziemnym środowisku kopalnianym związane z metanogenezą i metanotrofią; 1) A-E metanogeneza – archeony metanogenne, proces beztlenowy; 2) utlenienie metanu (monooksygenaza metanowa); 3) utlenienie metanolu (dehydrogenaza metanolowa); 4) utlenienie formaldehydu; 5) utlenienie mrówczanu (dehydrogenaza mrówczanowa); 6) nieenzymatyczne rozpuszczanie węglanów w skałach; 7) wytrącanie CO_2 – powstawanie węglanów (w warunkach alkalicznych); 8) utlenienie kopalnej materii organicznej przez heterotrofy; 9) wiązanie CO_2 przez autotrofy; 10) degradacja obumarłej materii organicznej przez heterotrofy. Strzałki czerwone – metanogeneza; strzałki niebieskie – metanotrofia; strzałki zielone – przemiany węgla nieorganicznego; strzałki czarne – przemiany węgla przez inne grupy organizmów

Literatura

- BALCOMBE P., SPEIRS J.F., BRANDON N.P., HAWKES A.D., 2018. *Methane emissions: choosing the right climate metric and time horizon*, Environmental Science: Processes and Impacts, 20(10), 1323–1339. <https://doi.org/10.1039/c8em00414e>.
- BEAL E.J., HOUSE C.H., ORPHAN V.J., 2009. *Manganese- and iron-dependent marine methane oxidation*, Science, 325, 184–187.
- BECHTEL A., GHAZI A.M., ELLIOTT W.C., OSZCZEPALSKI S., 2001. *The occurrences of the rare earth elements and the platinum group elements in relation to base metal zoning in the vicinity of Rote Fäule in the Kupferschiefer of Poland*, Applied Geochemistry 16, 375–86.
- BOETIUS A., RAVENSCHLAG K., SCHUBERT C.J., RICKERT D., WIDDEL F., GIESEKE A., AMANN R., JORGENSEN B.B., WITTE U., PFANNKUCHE O., 2000. *A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane*, Nature 407, 623–626.
- ETTWIG K.F., BUTLER M.K., LE PASLIER D., PELLETIER E., MANGENOT S., KUYPERS M.M., SCHREIBER, F., DUTILH B.E., ZEDELIOUS J., DE BEER D., GLOERICH J., WESSELS H.J., VAN ALEN T., LUESKEN F., WU M. L., VAN DE PAS-SCHOONEN K.T., OP DEN CAMP H.J., JANSSEN-MEGENS E.M., FRANCOIJS K.J., STUNNENBERG H., WEISSENBACH J., JETTEN M.S., STROUS M., 2010. *Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria*, Nature, 464, 543–548.

- HAROON M.F., HU S., SHI Y., IMELFORT M., KELLER J., HUGENHOLTZ P., YUAN Z., TYSON G.W., 2013. *Anaerobic oxidation of methane coupled to nitrate reduction in a novel archaeal lineage*, *Nature*, 500, 567–570.
- HESTER K.C., BREWER P.G., 2009. *Clathrate hydrates in nature*, *Annual Review of Marine Science*, 1, 303–327, <https://doi.org/10.1146/annurev.marine.010908.163824>.
- HINRICHS K.U., HAYES J.M., SYLVA S.P., BREWER P.G., DELONG E.F., 1999. *Methane-consuming archaeobacterial in marine sediments*, *Nature* 398, 802–805.
- JOYE S.B., 2012. *A piece of methane puzzle*, *Nature*, 491, 538–539.
- KALLISTOVAA A.Yu., MERKELA A.Yu., TARNOVETSKIIB I.Yu., PIMENOVA N.V., 2017. *Methane formation and oxidation by prokaryotes*, *Microbiology*, (86)6, 671–691.
- KELTJENS J.T., POL A., REIMANN J., OP DEN CAMP H.J.M., 2014. *PQQ-dependent methanol dehydrogenases: Rare-earth elements make a difference*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(14), 6163–6183. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5766-8>.
- KIETÄVÄINEN R., PURKAMO L., 2015. *The origin, source, and cycling of methane in deep crystalline rock biosphere*, *Frontiers in Microbiology*, 6, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00725>.
- LAU M.C.Y., KIEFT T.L., KULOYO O., LINAGE-ALVAREZ B., VAN HEERDEN E., LINDSAY M.R., MAGNABOSCO C., WANG W., WIGGINS J.B., GUO L., PERLMAN D.H., KYIN S., SHWE H.H., HARRIS R.L., OH Y., YI M. J., PURTSCHERT R., SLATER G.F., ONO S., WEIK S., LI L., SHERWOOD LOLLAR,B., ONSTOTT T.C., 2016. *An oligotrophic deep-subsurface community dependent on syntrophy is dominated by sulfur-driven autotrophic denitrifiers*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(49), E7927–E7936, <https://doi.org/10.1073/pnas.1612244113>.
- LYU Z., SHAO N., AKINYEMI T., WHITMAN W.B., 2018. *Methanogenesis*. *Current Biology*, 28(13), 727–732. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.05.021>.
- MADIGAN M.T., MARTINKO J.M., BENDER K.S., BUCKLEY D.H., STAHL D.A., BROCK T., 2014. *Brock Biology of Microorganisms* (14th Edition), Pearson.
- MILUCKA J., FERDELMAN T.G., POLERECKY L., FRANZKE D., WEGENER G., SCHMID M., LIEBERWIRTH I., WAGNER M., WIDDEL F., KUYPERS M.M.M., 2012. *Zero-valent sulphur is a key intermediate in marine methane oxidation*, *Nature*, 491, 541–546.
- MOKRZYCKI E., NEY R., SIEMEK J., 2008. *Światowe zasoby surowców energetycznych – wnioski dla Polski*, *Rynek Energii*, 6, 2–13.
- OREMLAND R., 2010. *NO connection with methane*, *Nature*, 464(7288), 500–1.
- PICONE N., OP DEN CAMP H.J., 2019. *Role of rare earth elements in methanol oxidation*, *Current Opinion in Chemical Biology*, 49, 39–44, <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.09.019>.
- PRATHER M.J., HOLMES C.D., 2017. *Overexplaining or underexplaining methane's role in climate change*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(21), 5324–5326. <https://doi.org/10.1073/pnas.1704884114>.
- RAGHOEBARSING A.A., POL A., VAN DE PAS-SCHOONEN K.T., SMOLDERS A.J.P., ETTWIG K.F., RIJPSTRA W.I.C., SCHOUTEN S., SINNIGHE DAMSTE J.S., OP DE CAMP H.J.M., JETTEN M.S.M., STROUS, M., 2006. *A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification*, *Nature*, 440, 918–921.
- ROSS M.O., ROSENZWEIG A.C., 2017. *A tale of two methane monooxygenases*, *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 22(2–3), 307–319, doi:10.1007/s00775-016-1419-y.
- SAWŁOWICZ Z., 1989. *Organic matter in the Zechstein Kupferschiefer from the Fore-Sudetic Monocline. I. Bitumen*, *Mineralogia Polonica*, 20, 69–86.
- SEMPRAU J.D., DISPIRITO A.A., YOON S., 2010. *Methanotrophs and copper*, *FEMS Microbiology Reviews*, 34(4), 496–531, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00212.x>.
- SEMPRAU J.D., DISPIRITO A.A., GU W., YOON S., 2018. *Metals and Methanotrophy*, *Applied and Environmental Microbiology*, 84(6), 7–14.

- SPECZIK S., 1994. *Kupferschiefer mineralization in the light of organic geochemistry and coal petrology studies*, Geological Quarterly, 38, 639–650.
- SPECZIK S., 1995. *The Kupferschiefer mineralization of Central Europe: New aspects and major areas of future research*, Ore Geology Reviews, 9, 411–426.
- STASIUK R., WŁODARCZYK A., KARZ P., JANAS M., SKŁODOWSKA A., MATLAKOWSKA R., 2017. *Bacterial weathering of fossil organic matter and organic carbon mobilization from subterranean Kupferschiefer black shale – long-term laboratory studies*, Environmental Microbiology Reports, 9, 459–466, doi: 10.1111/1758-2229.12559.
- WŁODARCZYK A., LIRSKI M., FOGTMAN A., KOBŁOWSKA M., BIDZIŃSKI G., MATLAKOWSKA R., 2018. *The oxidative metabolism of fossil hydrocarbons and sulfide minerals by the lithobiontic microbial community inhabiting deep subterranean Kupferschiefer black shale*, Frontiers in Microbiology, 9, 972, doi: 10.3389/fmicb.2018.00972.