

Mikrobiologiczne procesy utleniania kopalnej materii organicznej miedzionośnego łupka bitumicznego Kupferschiefer (monoklina przedsudecka)

Agnieszka Włodarczyk, Renata Matlakowska

Pracownia Analizy Skażeń Środowiska, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski,
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa, tel. 225541007, e-mail: rmatlakowska@biol.uw.edu.pl

Streszczenie

W pracy opisano udział mikroorganizmów w biowietrzeniu kopalnej materii organicznej łupka bitumicznego Kupferschiefer, w tym kerogenu, oraz mobilizacji utlenionego węgla kopalnego. Badano długoterminowe (do 33 lat) procesy biowietrzenia podziemnych łupków bitumicznych i potwierdzono bioutlenienie kerogenu. Mikroorganizmy prokariotyczne zasiedlające łupki bitumiczne stanowią kluczowy element cykli biogeochemicznych węgla, a w przypadku łupków zmineralizowanych i polimetalicznych mają również znaczenie w biogeochemii wielu innych pierwiastków.

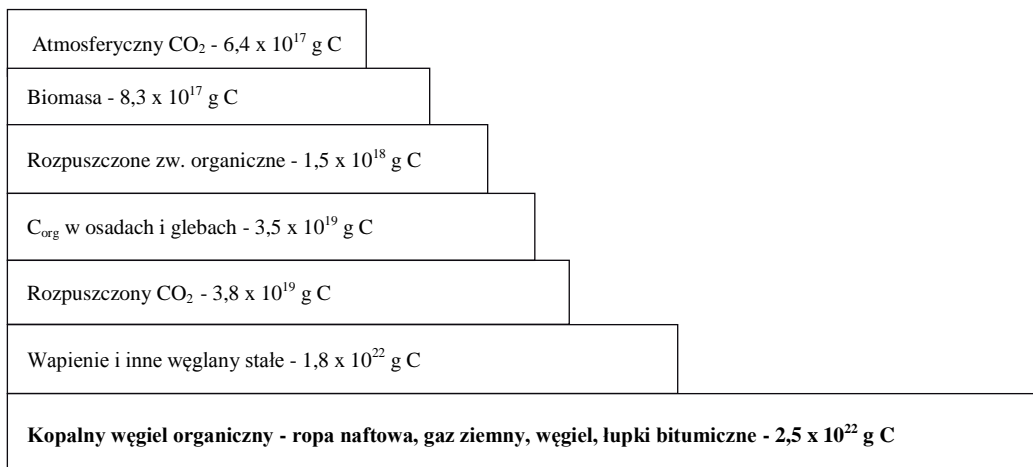
Wprowadzenie

Całkowita zawartość węgla na Ziemi jest szacowana na ok. $4,3 \times 10^{22}$ g. Pierwiastek ten występuje we wszystkich geosferach Ziemi aczkolwiek jego dystrybucja jest zróżnicowana (Bolin, 1970). W atmosferze węgiel występuje jedynie jako CO_2 ($\sim 6,4 \times 10^{17}$ g C). Znacznie więcej tego pierwiastka znajduje się w hydrosferze w formie rozpuszczonego CO_2 ($\sim 3,8 \times 10^{19}$ g C) i rozpuszczonych związków organicznych ($\sim 1,5 \times 10^{18}$ g C). Jednak największa koncentracja węgla występuje w litosferze. W tej geosferze Ziemi węgiel jest znajdowany w formie nieorganicznej, jako skały węglanowe ($\sim 1,8 \times 10^{22}$ g C) oraz w formie organicznej. Węgiel organiczny to materia występująca w glebach i osadach ($\sim 3,5 \times 10^{18}$ g C), a przede wszystkim kopalna materia organiczna występująca w skałach osadowych i kopalinach organogenicznych (ropa naftowa, gaz, węgle) ($\sim 2,5 \times 10^{22}$ g C).

Jednym z najciekawszych i najważniejszych osadowych depozytów bogatych w kopalną materię organiczną są łupki bitumiczne. Zawierają one średnio ~ 2 – 10% wag. węgla organicznego, ale znane są również łupki bardziej bogate w ten pierwiastek (~ 20 – 30% wag.) (Tourtelot, 1979; Rickard, 2012). W tych skałach osadowych węgiel organiczny występuje w formie metastabilnego, wysokomolekularnego kerogenu ($\sim 98\%$ wag.), a także stałych węglowodorów, czyli bituminu (~ 1 – 2% wag.) (Parnell i in., 1993).

Węgiel jest pierwiastkiem biogennym i głównym komponentem biosfery ($8,3 \times 10^{17}$ g C), a zatem obieg węgla ma ważne znaczenie dla życia na Ziemi. Kluczową rolę w przemianach geochemicznych węgla, zarówno organicznego, jak i nieorganicznego odgrywiają mikroorganizmy (Fenchel i Blackburn, 1979). Bakterie fotoautotroficzne oraz bakterie i archeony chemoautotroficzne wykorzystują CO_2 zawarty w atmosferze lub CO_3^{2-} rozpuszczony w wodzie jako źródło węgla. Natomiast bakterie i archeony heterotroficzne degradują materię organiczną i produkują CO_2 , który ulatnia się do atmosfery lub rozpuszcza w wodach. W wyniku aktywności metabolicznej tych mikroorganizmów dochodzi do

wytrącania lub rozpuszczania węglanów, co jest istotnym elementem przemian węgla nieorganicznego.



Rys. 1. Dystrybucja węgla na Ziemi (wg Ehrlich i Newman, 2009)

Niezwykle ważnym komponentem przemian węgla na Ziemi jest również utlenienie termogenicznego metanu zarówno w warunkach tlenowych, a zwłaszcza beztlenowych, jak i produkcja metanu biogenicznego. Szczególnie istotna i jednocześnie słabo poznana jest rola mikroorganizmów degradujących kopalną osadową materię organiczną. Do niedawna uważano, że węgiel organiczny zdeponowany w formie kerogenu i bituminu nie podlega przemianom biologicznym. Jednak w 2001 Petsch i in. (2001) dowiedli, że bakterie zasiedlające łupek New Albany Shale (Clay City, USA) degradują kopalną materię organiczną zawartą w tej skale i również asymilują kopalny węgiel. Następnie Berlandis i in. (2014) badający łupek bitumiczny pochodzący z Autun (Francja) wykryli w materiale genetycznym wyizolowanym z tej skały geny potencjalnie kodujące dioksygenazy – enzymy uczestniczące w degradacji węglowodorów aromatycznych. Badania te nie wskazały jednak ani przemian geochemicznych kerogenu i bituminu, ani szlaków biochemicznych odpowiedzialnych za te przemiany.

Interdyscyplinarne badania nad biowietrzeniem kopalnej materii organicznej miedzionośnego łupka bitumicznego Kupferschiefer

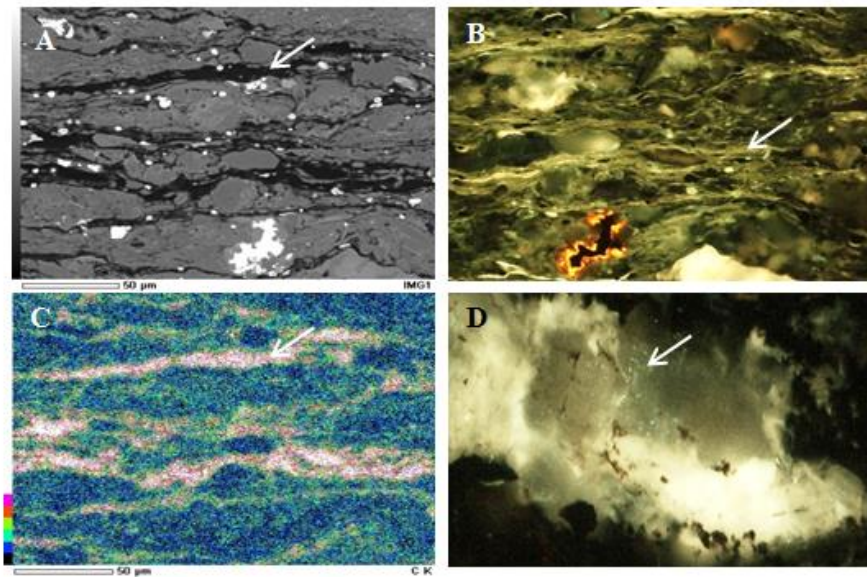
Jednym z największych złóż łupków bitumicznych na świecie jest miedzionośny łupek bitumiczny występujący na obszarze monokliny przedsudeckiej zwany Kupferschiefer. Zawartość węgla organicznego w tej skale osadowej wynosi nawet do 30% wag. W kopalnej materii organicznej łupka bitumicznego Kupferschiefer możemy wyróżnić dwie główne grupy składników: gazotwórczy i ropotwórczy kerogen II, nieekstrahowalny rozpuszczalnikami organicznymi i nieorganicznymi oraz ekstrahowalny rozpuszczalnikami organicznymi bitumin. Ekstrahowalna materia organiczna to przede wszystkim długołańcuchowe węglowodory alifatyczne i policykliczne węglowodory aromatyczne (tabela 1) oraz kwasy karboksylowe,

organiczne związki siarki, a także metaloporfiryny (Matlakowska i in., 2010; Matlakowska i Skłodowska, 2011; Matlakowska i in., 2013).

Kopalna materia organiczna występuje w łupku bitumicznym w postaci lamin ułożonych naprzemianlegle z laminami materiału ilastego (rys. 2A,B,C). Przyjmuje ona postać macerałów (głównie grupy liptynitów, ale także witynitów i inertynitów), stałego bituminu, materiału amorficznego oraz inkluzji ciekłych węglowodorów w agregatach dolomitu i kalcytu (rys. 2D) (Nowak, 2000).

Tabela 1. Węglowodory alifatyczne i aromatyczne oraz ich pochodne zidentyfikowane w łupku bitumicznym Kupferschiefer

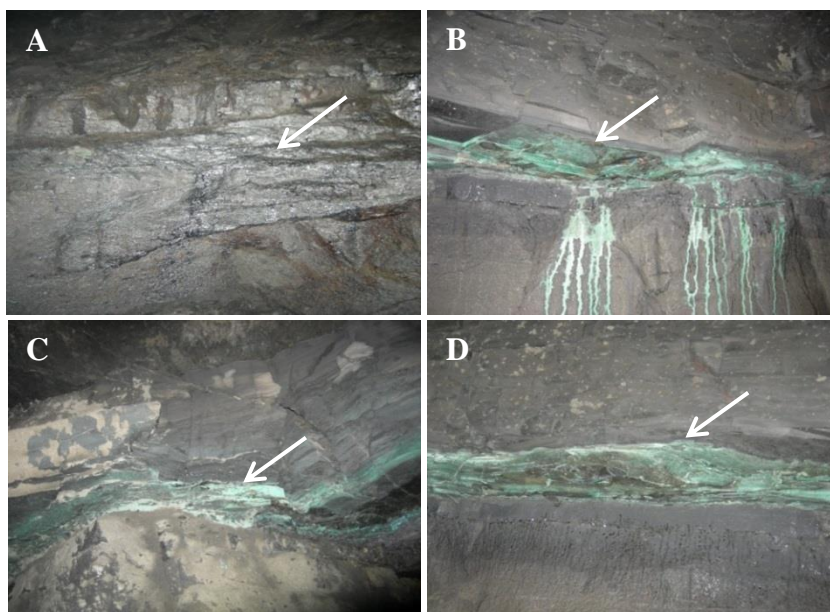
| Długołańcuchowe węglowodory alifatyczne | Policykliczne węglowodory aromatyczne |
|---|--|
| Dekan, Deken, Undekan, Dodekan, Tridekan, Tetradekan, Pentadekan, Heksadekan, Heptadekan, Oktadekan, Nonadekan, Ikozan, Henekozan, Dokoza, Trikoza, Tetrakoza, Heptakoza, Oktakoza, Dotriakontan, Heksatriakontan, Skwale | Fenantren, Antracen, Naftalen, Bifenyl, Chrysen, Fluoranten, Piren, Benzopiren, Benzofluoranten, Dimetylofenantren, Trimetylofenantren, Tetrametylofenantren, Metyloantracen, Dimetyloantracen, Tetrametyloantracen, Etyloantracen, Metylopiren, Metylochrysen, Dimetylopiren, Dimetylo-naftalen, Trimetylofenylo-naftalen, Dimetylobenzofenantren |



Rys. 2. Materia organiczna w Kupferschiefer (strzałka); (A) mikroskopia skaningowa; (B) mikroskopia fluorescencyjna; (C) mikroskopia SEM-EDS; (D) inkluzje węglowodorów (mikroskopia fluorescencyjna)

W ramach projektu „Biogeochemiczne transformacje polimetalicznych łupków bitumicznych Kupferschiefer (monoklina przedsudecka) przez mikroorganizmy autochtoniczne – detekcja i identyfikacja długoterminowych procesów w podziemnym środowisku kopalnianym” badano różnorodność filogenetyczną mikroorganizmów naskalnych zasiedlających łupki bitumiczne Kupferschiefer, ich fizjologię oraz strategię metaboliczną. Jednak głównym celem

badania było określenie potencjalnej roli mikroorganizmów w przemianach geochemicznych zachodzących w łupku bitumicznym Kupferschiefer i kształtowaniu podziemnych warstw litosfery i hydrosfery. Szczególną uwagę zwrócono na mikroorganizmy heterotroficzne i ich znaczenie w przemianach kopalnej materii organicznej, w tym kerogenu. Zbadano 15 prób łupka pochodzących z kopalni Lubin, Rudna i Polkowice-Sieroszowice (rys. 3). Próby te różniły się między sobą czasem (bio)wietrzenia. Czas ten umownie określono od momentu odsłonięcia profilu skały w wyniku prac górniczych.



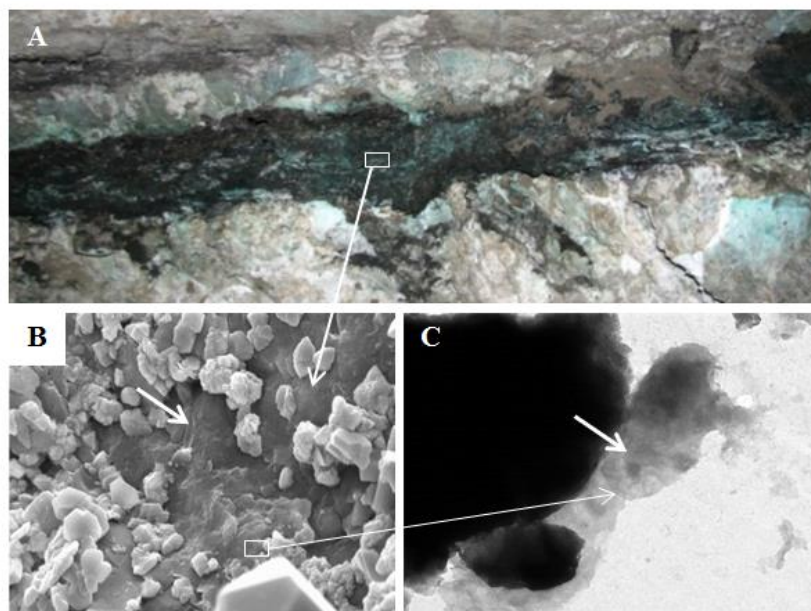
Rys. 3. (Bio)zwietrzały łupek bitumiczny Kupferschiefer w podziemnych kopalniach miedzi (strzałka); (A) Lubin (12 lat^{*}); (B) Lubin (20 lat^{*}); (C) Rudna (32 lata^{*}); (D) Polkowice-Sieroszowice (33 lata^{*}); ^{*}czas (bio)wietrzenia liczony od odsłonięcia profilu skały w wyniku prac górniczych

Hipoteza badawcza zakładała, że skała odsłonięta w czasie eksploatacji podlega działaniu czynników abiotycznych (tlen, woda) oraz czynników biotycznych, czyli mikroorganizmów ją zasiedlających. Celem badań było wskazanie roli mikroorganizmów oraz identyfikacja czynników enzymatycznych i nieenzymatycznych kluczowych w procesach biowietrzenia kopalnej materii organicznej, a także opisanie zmian w budowie geochemicznej i właściwościach fizyko-chemicznych skał (bio)zwietrzałych.

Badania czynników biotycznych były oparte na metodach metaanalizy i obejmowały metagenomikę (wysokoprzepustowe sekwencjonowanie DNA), metaproteomikę (analiza białek enzymatycznych i strukturalnych; chromatografia cieczowa z tandemową spektrometrią mas) oraz metabolomikę (analiza metabolitów organicznych; chromatografia gazowa ze spektrometrią mas). Uzupełnieniem badań była charakterystyka materii organicznej (bio)zwietrzałych skał (analiza pirolityczna Rock-Eval oraz chromatografia gazowa ze spektrometrią mas). Zidentyfikowane przemiany biogeochemiczne zweryfikowano w eksperymentach laboratoryjnych.

Łupek bitumiczny Kupferschiefer jako środowisko życia dla mikroorganizmów

Na odsłoniętej w czasie prac górniczych powierzchni łupka bitumicznego Kupferschiefer panują korzystne warunki dla rozwoju mikroorganizmów, zarówno autochtonicznych, jak i allochtonicznych. Te ostatnie dostają się do podziemnego środowiska wraz z wodami podziemnymi, powietrzem, a także mogą być zawleczone przez ludzi. Korzystne warunki dla mikroorganizmów to duża wilgotność powietrza (ok. 70-80%), optymalna temperatura (20-35°C), neutralny odczyn skały, a przede wszystkim obecność materii organicznej oraz znaczna zawartość zredukowanych związków mineralnych.



Rys. 4. Biofilm naskalny na powierzchni łupka bitumicznego Kupferschiefer (kopalnia Lubin); (A) Obserwacje makroskopowe; (B) Elektronowa mikroskopia skaningowa; (C) Elektronowa mikroskopia transmisyjna

Mikroorganizmy zasiedlające łupek bitumiczny Kupferschiefer nie tworzą jednak widocznych makroskopowo biofilmów, które często możemy obserwować na skałach. Również ze względu na strukturę łupka mikroorganizmy są trudne do wykrycia w czasie obserwacji mikroskopowych. Jak widać na rycinie 4BC stosując elektronową mikroskopię skaningową lub transmisyjną możemy zaobserwować jedynie struktury przypominające biofilmy naskalne (rys. 4B) lub pojedyncze komórki mikroorganizmów (rys. 4C). Obecność mikroorganizmów w takim środowisku znacznie łatwiej jest wykryć metodami molekularnymi, np. analizując ich materiał genetyczny (metagenom) lub białka (metaproteom).

W metaproteomie mikroorganizmów naskalnych wykryto liczne białka komórkowe pośrednio lub bezpośrednio związane z kolonizacją oraz tworzeniem biofilmów. Wśród nich możemy wyróżnić białka zaangażowane w chemotaksję, czyli ruch komórek bakterii w kierunku rosnącego stężenia danego związku chemicznego lub w stronę przeciwną, takie

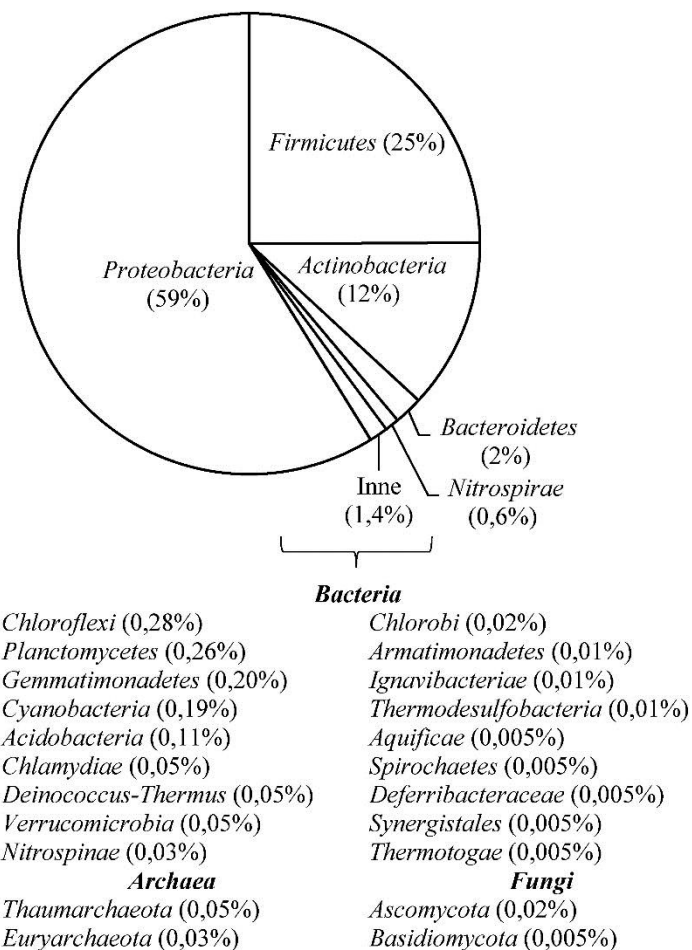
jak chemoreceptory MCP (ang. methyl-accepting chemotaxis proteins), białko chemotaktyczne CheY oraz białka odpowiedzialne za syntezę i budowę wici. Chemoreceptory MCP znajdują się na powierzchni komórek bakterii i wiążą cząsteczki danego związku chemicznego, co powoduje wzbudzenie sygnału, który przenoszony jest przez szereg białek chemotaktycznych Che na kompleks białkowy wici. Zidentyfikowane białko CheY przekazuje sygnał bezpośrednio do struktury białkowej rotora kontrolującego kierunek rotacji wici, który wpływa na kierunek ruchu komórki bakterii. Przepuszcza się, że chemoreceptory MCP mogą odpowiadać za przemieszczanie się niektórych bakterii z rodzaju *Pseudomonas* w stronę źródła węglowodorów alifatycznych (van Beilen i in., 2001). Wici bakterii odpowiadają nie tylko za chemotaktyczny ruch komórek związany z kolonizacją środowiska, ale również mogą uczestniczyć w pierwszych etapach tworzenia biofilmu pełniąc funkcję adhezyjną, które ułatwiają komórkom przyleganie do podłoża (Haiko i Westerlund-Wikström, 2013).

W metaproteomie mikroorganizmów zasiedlających łupki zidentyfikowano także białka biorące udział w syntezie i transporcie poliamin (putrescyny i spermidyny) – związków organicznych o małej masie molowej obdarzonych ładunkiem dodatnim, które odgrywają kluczową rolę w tworzeniu biofilmów przez bakterie (Patel i in., 2006). Poliaminy powstają w wyniku przekształcenia dwóch aminokwasów: ornityny w putrescynę oraz argininy w agmatynę, która hydrolizowana jest przez agmatynazę do putrescyny i mocznika. Następnie putrescyna przekształcana jest w spermidynę. Dowiedziono, że putrescyna i spermidyna, a także inne poliaminy, kontrolują etapy dojrzewania i rozwoju biofilmów tworzonych przez bakterie, a brak tych związków może zahamować rozwój biofilmu (Karatan i Michael, 2013). Opisane powyżej białka zostały wykryte w metaproteomie bakterii zasiedlających łupki bitumiczny Kupferschiefer w warunkach laboratoryjnych, jak i w środowisku kopalnianym.

Różnorodność filogenetyczna, fizjologiczna i metaboliczna mikroorganizmów naskalnych zasiedlających łupki bitumiczny Kupferschiefer

Mikroorganizmy zasiedlające łupki bitumiczny Kupferschiefer należą do 23 typów filogenetycznych bakterii oraz dwóch typów archeonów i dwóch typów grzybów (rys. 5). Gram-ujemne bakterie zaliczane do typu *Proteobacteria* (klasy α -, β -, γ -, ϵ - i δ) stanowią prawie 60% wszystkich zidentyfikowanych mikroorganizmów. Gram-dodatnie bakterie z typu *Firmicutes* i *Actinobacteria*, obejmują odpowiednio 25% i 12%. Pozostałych 20 typów bakterii stanowi łącznie 1,4%, a archeony i grzyby odpowiednio około 0,08% i 0,025% mikroorganizmów.

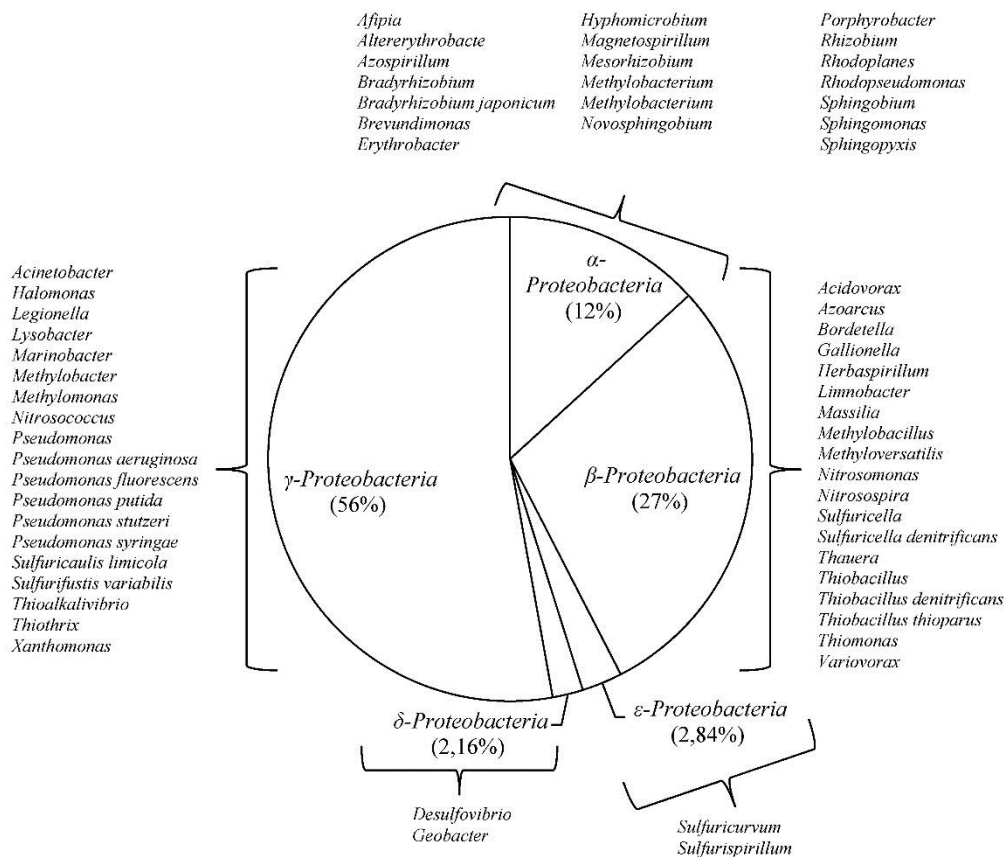
Wśród mikroorganizmów naskalnych zasiedlających łupki bitumiczny Kupferschiefer dominują bakterie tlenowe, neutrofilne (optymalne pH 7) i mezofilne (optymalna temperatura 26-30°C), odporne na metale ciężkie, takie jak miedź, arsen, kadm, ołów i rtęć, a także tolerujące wysokie zasolenie środowiska (halotolerancyjne). Obok nich zidentyfikowano także mikroorganizmy preferujące obniżone stężenie tlenu (mikroaerofilne), a także żyjące w warunkach beztlenowych, oraz bakterie alkalofilne, (optymalne pH 9), acidofilne (pH<5), termofilne (wzrost w temperaturze powyżej 50°C) i psychrofilne (wzrost w temperaturze 4°C).



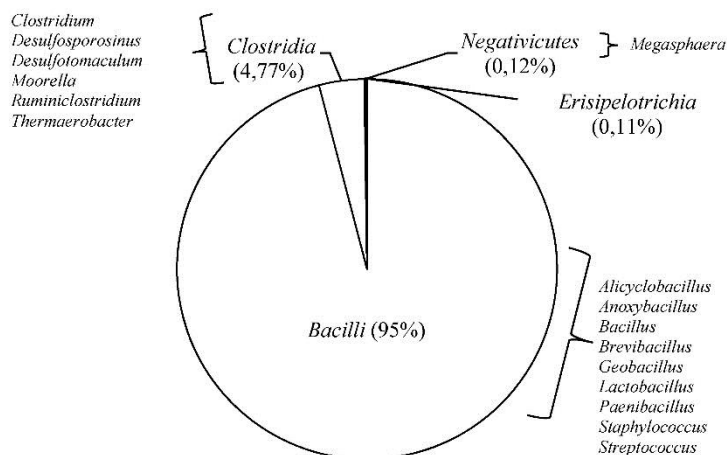
Rys. 5. Typy bakterii, archeonów i grzybów zasiedlające łupkę bitumiczną Kupferschiefer (% – udział procentowy poszczególnych typów mikroorganizmów w mikrobiocenozie naskalnej)

W mikrobiocenozie naskalnej dominują bakterie chemoorganoheterotroficzne zdolne do tlenowej i beztlenowej degradacji materii organicznej i wykorzystania jej, jako źródła węgla i energii. Wśród nich dominują heterotrofy tlenowe wykorzystujące tlen jako ostateczny akceptor elektronów, takie jak bakterie z rodzaju *Pseudomonas* i *Acinetobacter* (γ -*Proteobacteria*), *Novosphingobium*, *Sphingobium*, *Sphingomonas*, *Sphingopyxis*, *Mesorhizobium* (α -*Proteobacteria*), oraz *Yonghaparkia* i *Microbacterium* (*Actinobacteria*), a także *Bacillus* (*Firmicutes*) (rys. 6 i 7, tabela 2). Heterotrofy beztlenowe jako ostateczny akceptor elektronów wykorzystują azotany, siarczany lub związki żelaza. Do tej grupy metabolicznej należy m.in. rodzaj *Desulfovibrio* i *Geobacter* (δ -*Proteobacteria*) dysymilacyjnie redukujące utlenione związki siarki i żelaza, a także rodzaje *Thauera* i *Azoarcus* (β -*Proteobacteria*) redukujące związki azotu. Ciekawym przykładem bakterii heterotroficznych jest rodzaj *Limnobacter* (β -*Proteobacteria*), który jako źródło energii wykorzystuje zredukowane związki siarki (chemolitoheterotrof), a także rodzaj *Bradyrhizobium* (α -*Proteobacteria*), który jest zdolny do

asymilacji azotu atmosferycznego. Natomiast bakterie z rodzaju *Clostridium*, *Lactobacillus* i *Megasphaera* (*Firmicutes*) charakteryzują się beztlenowym metabolizmem fermentacyjnym i mogą wykorzystywać utlenione związki organiczne. Łupek bitumiczny Kupferschiefer zasiedlają także metylotryfy wykorzystujące związki jednowęglowe, w tym metanotrofy utylizujące metan (np. rodzaje *Methylobacterium* i *Hyphomicrobium* (α -*Proteobacteria*)). Co ciekawe, w Kupferschiefer wykryto również beztlenowe archeony z rodzaju *Methanosarcina* (*Euryarchaeota*) zdolne do produkcji metanu. Kolejną ważną grupą metaboliczną mikroorganizmów są chemolitoautotrofy i fotolitoautotrofy asymilujące węgiel z CO_2 . Źródłem energii dla pierwszej grupy mikroorganizmów są zredukowane związki siarki, żelaza i azotu. Wśród nich są bakterie z rodzaju *Thiobacillus* i *Thiomonas* (β -*Proteobacteria*) oraz *Sulfurifustis*, *Sulfuricaulis* i *Thiothrix* (γ -*Proteobacteria*) utleniające zredukowane związki siarki; bakterie z rodzaju *Gallionella* (β -*Proteobacteria*) utleniające związki żelaza; oraz bakterie z rodzaju *Nitrospira* (*Nitrospira*), *Nitrosospira* i *Nitrosomonas* (β -*Proteobacteria*) utleniające zredukowane związki azotu.



Rys. 6. Klasy i dominujące rodzaje oraz gatunki bakterii należących do typu *Proteobacteria* zasiedlające łupek bitumiczny Kupferschiefer



Rys. 7. Klasy i dominujące rodzaje bakterii należących do typu *Firmicutes* zasiedlające łupek bitumiczny Kupferschiefer

Fototrofy wykorzystują energię promieniowania świetlnego, a w ciemności zmieniają swój metabolizm na chemotroficzny. Wśród nich wykryto beztlenowe fototrofy anoksygenowe wykorzystujące zredukowane związki siarki i żelaza, jako źródło elektronów np. *Rhodospseudomonas*, *Rhodoplanes*, *Erythrobacter* (α -*Proteobacteria*), *Chlorobium* (*Chlorobi*) oraz *Chloroflexus* (*Chloroflexi*). Ponadto łupek bitumiczny Kupferschiefer zasiedlają fototrofy oksygenowe należące do typu *Cyanobacteria*.

Tabela 2. Dominujące rodzaje i gatunki bakterii należące do typu *Actinobacteria* reprezentowanego przez jedną klasę *Actinobacteria* zasiedlające łupek bitumiczny Kupferschiefer

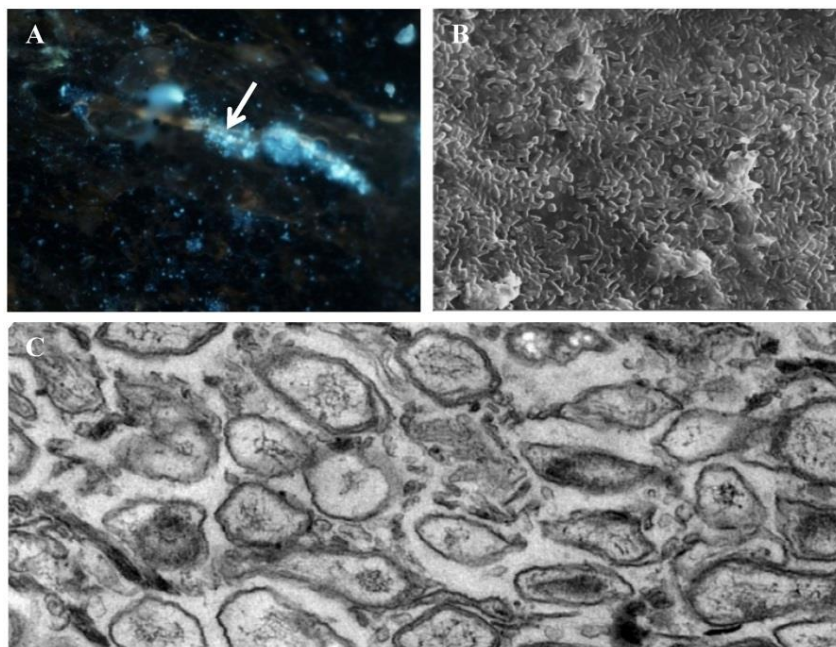
| | | |
|------------------------|--------------------------------------|--------------------------|
| <i>Agrococcus</i> | <i>Kocuria</i> | <i>Mycobacterium</i> |
| <i>Agromyces</i> | <i>Leifsonia</i> | <i>Nocardia</i> |
| <i>Amycolatopsis</i> | <i>Leucobacter</i> | <i>Nocardioides</i> |
| <i>Arthrobacter</i> | <i>Microbacterium</i> | <i>Propionibacterium</i> |
| <i>Cellulomonas</i> | <i>Microbacterium chocolatum</i> | <i>Pseudonocardia</i> |
| <i>Corynebacterium</i> | <i>Microbacterium ginsengisoli</i> | <i>Rathayibacter</i> |
| <i>Cryobacterium</i> | <i>Microbacterium laevaniformans</i> | <i>Rhodococcus</i> |
| <i>Curtobacterium</i> | <i>Microbacterium profundum</i> | <i>Streptomyces</i> |
| <i>Gordonia</i> | <i>Microcella alkaliphila</i> | <i>Yonghaparkia</i> |

Bakterie naskalne kluczowe w przemianach kopalnej materii organicznej łupka bitumicznego Kupferschiefer

Kluczowym elementem przemian kopalnej materii organicznej obecnej w łupku bitumicznym Kupferschiefer są mikrobiologiczne procesy biodegradacji węglowodorów alifatycznych i aromatycznych. Mikroorganizmy są zdolne do degradacji węglowodorów zarówno w warunkach tlenowych, jak i beztlenowych, chociaż te ostatnie są znane dopiero od lat 80 XX wieku. Bakterie heterotroficzne zasiedlające łupek bitumiczny Kupferschiefer zdolne do degradacji węglowodorów alifatycznych i aromatycznych stanowią około 87% wszystkich mikroorganizmów. Należą one przede wszystkim do trzech typów: *Proteobacteria*, *Firmicutes*

i *Actinobacteria*. Najwięcej rodzajów bakterii heterotroficznych zdolnych do degradacji węglowodorów obejmuje typ *Proteobacteria*. Wśród nich dominują bakterie z rodzaju *Pseudomonas* i *Acinetobacter* zdolne do tlenowej degradacji zarówno węglowodorów alifatycznych, jak i aromatycznych. Oprócz nich bakterie należące do rodzajów *Novosphingobium*, *Sphingobium*, *Sphingomonas*, *Sphingopyxis*, *Mesorhizobium*, *Limnibacter* i *Bradyrhizobium* także są potencjalnie zdolne do tlenowego rozkładu węglowodorów. Ponadto, do typu *Proteobacteria* należą bakterie degradujące węglowodory w warunkach beztlenowych, np. rodzaje *Azoarcus* i *Thauera*. Heterotroficzne bakterie z typu *Actinobacteria*, m.in. rodzaje *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Yonghaparkia* również są zdolne do degradacji węglowodorów. Pośród bakterii należących do typu *Firmicutes* zdolnych do tlenowej degradacji węglowodorów dominuje rodzaj *Paenibacillus*.

Zdolność wybranych bakterii zasiedlających Kupferschiefer do degradacji węglowodorów alifatycznych i aromatycznych potwierdzono w badaniach laboratoryjnych. Wykazano, że konsorcjum mikroorganizmów złożone z ośmiu szczepów bakterii należących do rodzajów *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Microbacterium* oraz *Bacillus* jest zdolne do degradacji kopanej materii organicznej łupka bitumicznego Kupferschiefer w czasie 30-360 dni (Matlakowska i Skłodowska, 2009; Matlakowska i in., 2010; Matlakowska i in., 2011; Włodarczyk i in., 2016a; Stasiuk i in., 2017). W badaniach laboratoryjnych potwierdzono selektywną kolonizację materii organicznej przez bakterie heterotroficzne oraz tworzenie biofilmu na łupku bitumicznym Kupferschiefer (Matlakowska i in., 2012) (rys. 8).



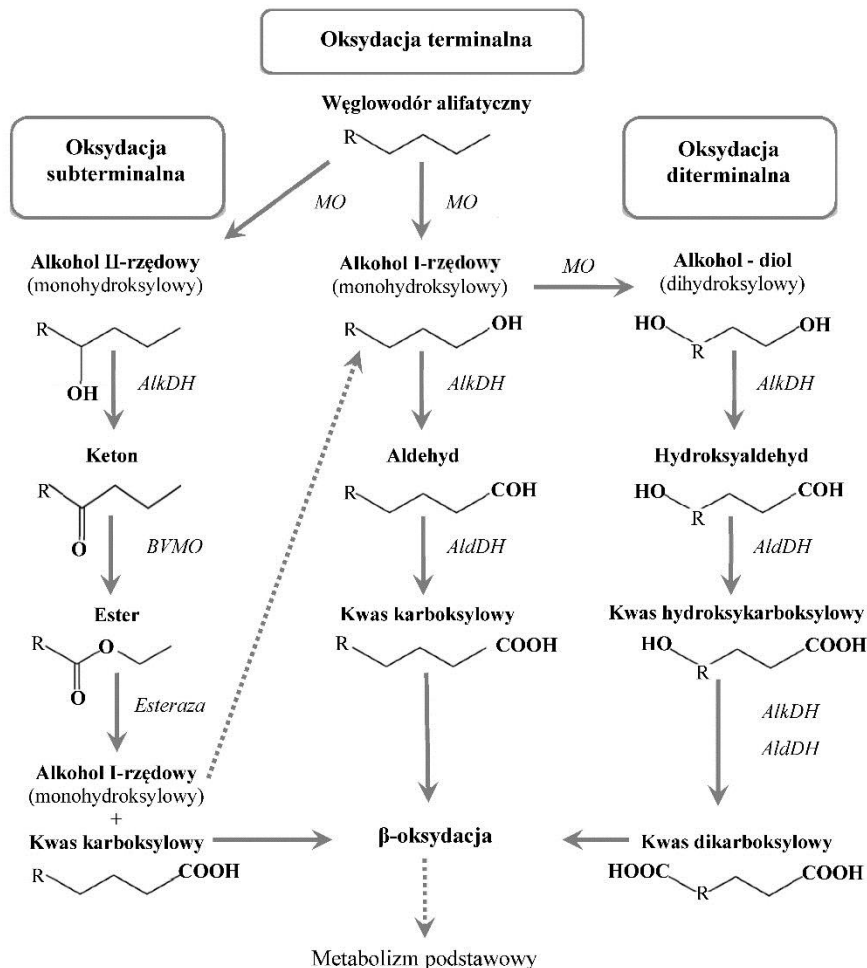
Rys. 8. Biofilm na łupku bitumicznym Kupferschiefer (badania laboratoryjne).
(A) Mikroskopia fluorescencyjna (strzałka - biofilm zabarwiony barwnikiem DAPI);
(B) Elektronowa mikroskopia skaningowa; (C) Elektronowa mikroskopia transmisyjna

Mikrobiologiczna degradacja węglowodorów występujących w łupku bitumicznym Kupferschiefer

Większość bakterii heterotroficznych zasiedlających łupki bitumiczne Kupferschiefer przeprowadza tlenowy rozkład węglowodorów z wykorzystaniem cząsteczki tlenu, która w tym procesie pełni rolę akceptora elektronów. Węglowodory i ich pochodne po wnikięciu do wnętrza komórki bakterii ulegają tzw. aktywacji z udziałem specyficznych enzymów – oksygenaz, które włączają tlen do cząsteczki degradowanego związku. Znamy mono-oksygenazy, które wprowadzają jeden atom tlenu do struktury substratu oraz dioksygenazy wprowadzające jednocześnie dwa atomy tlenu. Pierwsze z nich uczestniczą przeważnie w degradacji węglowodorów alifatycznych, a drugie w degradacji węglowodorów aromatycznych. Warto nadmienić, że różne związki organiczne charakteryzują się różną podatnością na działanie oksygenaz i tak najbardziej dostępne dla mikroorganizmów są: węglowodory alifatyczne (n-alkany) > rozgałęzione węglowodory alifatyczne > niskocząsteczkowe węglowodory aromatyczne > węglowodory cykliczne > węglowodory aromatyczne z podstawnikami alkilowymi > węglowodory aromatyczne > wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (powyżej trzech pierścieni) (Leahy i Colwell, 1990). Do degradacji tych ostatnich są zdolne tylko niektóre mikroorganizmy, w tym dominujące w Kupferschiefer bakterie z rodzaju *Pseudomonas*.

Rycina 9 przedstawia trzy szlaki degradacji węglowodorów alifatycznych różniące się miejscem wprowadzenia atomu tlenu do cząsteczki węglowodoru przez monooksygenazę. W pierwszym z nich, zwanym oksydacją terminalną, monooksygenaza (MO) oddziałuje z terminalną grupą metylową ($-CH_3$) cząsteczki węglowodoru utleniając go do alkoholu monohydroksylowego I-rzędowego. Alkohol utleniany jest przez dehydrogenazę alkoholową do aldehydu, a ten przekształcany do kwasu karboksylowego (kwasu tłuszczowego) przez dehydrogenazę aldehydową. Drugi szlak zwany oksydacją subterminalną zachodzi wtedy, gdy MO oddziałuje z grupą metylenową ($-CH_2$) cząsteczki węglowodoru utleniając go do alkoholu monohydroksylowego II-rzędowego. Następnie dehydrogenaza alkoholowa utlenia alkohol do ketonu, a Baeyer-Villiger monooksygenaza (BVMO) utlenia keton do estru, który rozszczepiany jest przez esterazę do alkoholu I-rzędowego i kwasu karboksylowego (Markovetz i Kallio, 1971). W niektórych komórkach bakterii szlaki terminalnej i subterminalnej oksydacji węglowodorów zachodzą jednocześnie (Rojo, 2009). Trzeci szlak (diterminalny) ma miejsce wtedy, gdy utlenione zostaną oba końce degradowanego węglowodoru. Powstaje wtedy odpowiedni alkohol dihydroksylowy (diol), a następnie hydroksyaldehyd i kwas dikarboksylowy. Końcowym etapem wszystkich trzech szlaków jest powstanie kwasu (di)hydroksylowego, który degradowany jest w procesie β -oksydacji. Warto wspomnieć, że węglowodory z podwójnym wiązaniem (alkeny) utleniane są poprzez epoksydy, alkohole i ketony do kwasów karboksylowych.

Związki aromatyczne zazwyczaj utleniane są przez mikroorganizmy do jednego z dwóch intermedatów: katecholu (benzeno-1,2-diolu) lub protokatechinianu (3,4-dihydroksybenzoesanu). Hydroksylacja pierścienia aromatycznego węglowodoru ma na celu przygotowanie go do rozerwania i dalszej degradacji. Jeśli pierścień posiada podstawnik alkilowy, to w pierwszej kolejności on jest utleniany, a następnie dochodzi do rozszczepienia pierścienia (Kwapisz, 2006).

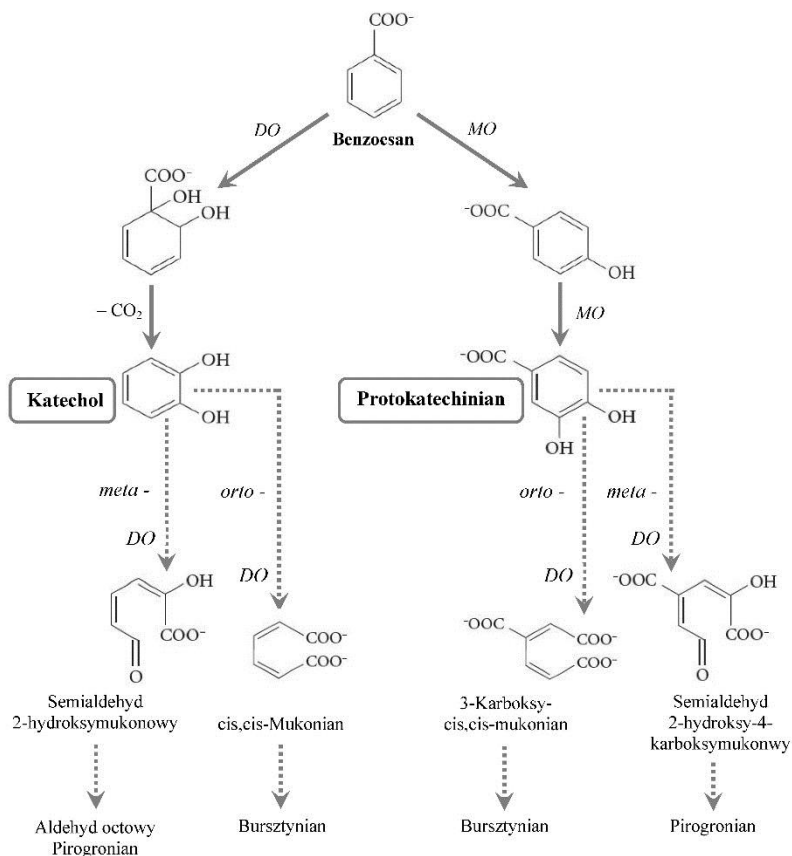


Rys. 9. Szlaki tlenowej biodegradacji węglowodorów alifatycznych; MO – monoooksygenaza, BVMO – Baeyer–Villiger monoooksygenaza, AlkDH – dehydrogenaza alkoholowa, AldDH – dehydrogenaza aldehydowa (wg Kwapisz, 2006)

Obecność grupy metylowej ułatwia rozerwanie pierścienia, natomiast liczne podstawniki sprawiają, że związek jest bardziej odporny na biodegradację (Gibson i Parales, 2000).

Rycina 10 przedstawia dwa szlaki tlenowej degradacji związków monoaromatycznych na przykładzie benzoenu. W pierwszym z nich, w wyniku działania dioksygenazy, do cząsteczki benzoenu zostają włączone dwa atomy tlenu (hydroksylacja). Następnie odłączeniu ulega grupa CO₂, co prowadzi do powstania katecholu. Kolejne reakcje katalizowane przez 2,3-dioksygenazę katecholową i 1,2-dioksygenazę katecholową powodują rozszczepienie pierścienia katecholu odpowiednio w pozycji meta (rozszczepienie ekstradiolowe) lub orto (rozszczepienie intradiolowe) i powstanie semialdehydu 2-hydroksymukonowego lub cis,cis-mukonianu. W kolejnym etapie związki te metabolizowane są do aldehydu octowego, pirogronianu i bursztynianu.

W drugim szlaku degradacji związków aromatycznych aktywność dwóch monoooksygenaz prowadzi do powstania protokatechinianu, który również może zostać rozszczepiony w pozycji *meta* lub *orto* odpowiednio przez 4,5-dioksygenazę protokatechinianową i 3,4-dioksygenazę protokatechinianową. Powstają wtedy semialdehyd 2-hydroksy-4-karbosymukonowy lub 3-karbosky-cis,cis-mukonian, które zostają przekształcone do pirogronianu i bursztynianu.



Rys. 10. Szlaki tlenowej biodegradacji związków monoaromatycznych;
DO – dioksygenaza, MO – monoooksygenaza (wg Fuchs, 2011)

Zbadano metagenom i metaproteom mikroorganizmów naskalnych zasiedlających (bio)zwietrzale łupki bitumiczne Kupferschiefer. W metagenomie stwierdzono występowanie 5758 genów kodujących enzymy, które mogą być zaangażowane w degradację węglowodorów alifatycznych i aromatycznych obecnych w kopalnej materii organicznej (tabela 3) (Włodarczyk i Matlakowska, 2017a).

Wykryto geny kodujące monoooksygenazy, w tym monoooksygenazę metanową utleniającą węglowodory C1-C4 oraz cytochrom P450 uczestniczący w utlenianiu węglowodorów C5-C16. Ponadto wykryto geny kodujące dehydrogenazy alkoholowe i aldehydowe uczestniczące w trzech opisanych powyżej szlakach tlenowej biodegradacji węglowodorów (rys. 9) oraz Baeyer-Villiger monoooksygenazę, która bierze udział w subterminalnej oksydacji tych

związków. Zidentyfikowane geny odpowiedzialne za syntezę dehalogenazy, dioksygenazy nitropropanowej, czy hydroperoksydazy także mogą uczestniczyć w rozkładzie alifatycznych komponentów kopalnej materii organicznej. W metagenomie bakterii naskalnych wykryto również geny kodujące dioksygenazy uczestniczące w procesie hydroksylacji (dioksygenaza benzenowa i benzoesanowa) oraz bezpośredniego rozerwania pierścienia aromatycznego związków organicznych, w tym cztery opisane wcześniej dioksygenazy uczestniczące w rozszczepieniu pierścienia katecholu i protokatechinianu zarówno w pozycji *meta*, jak i *orto* (rys. 10). Do innych ważnych genów należą te kodujące dioksygenazę naftalenową i bifenylową, monooksygenazę fenolową i toluenową oraz lakazę.

Tabela 3. Geny oraz białka enzymatyczne zidentyfikowane w metagenomie i metaproteomie mikroorganizmów zasiedlających łupki bitumiczny Kupferschiefer potencjalnie odpowiedzialne za biodegradację węglowodorów

| Biodegradacja węglowodorów alifatycznych | Liczba | | Biodegradacja węglowodorów aromatycznych | Liczba | |
|--|--------|--------|--|--------|--------|
| | genów | białek | | genów | białek |
| Monooksygenazy | | | Dioksygenazy | | |
| Cytochrom P450 | 402 | 12 | 1,2-Dioksygenaza benzenowa | 10 | – |
| Baeyer-Villiger monooksygenaza | 48 | – | 1,2-Dioksygenaza benzoesanowa | 28 | – |
| Monooksygenaza alkanowa | 55 | – | 1,2-Dioksygenaza katecholowa | 36 | – |
| Monooksygenaza cykloheksanonowa | 129 | – | 1,2-Dioksygenaza naftalenowa | 4 | – |
| Monooksygenaza cyklopentanonowa | 15 | – | 2,3-Dioksygenaza bifenyłowa | 3 | – |
| Monooksygenaza metanowa | 14 | 3 | 2,3-Dioksygenaza katecholowa | 41 | – |
| Pozostałe monooksygenazy | 430 | 5 | 3,4-Dioksygenaza protokatechinianowa | 90 | – |
| Dehydrogenazy alkoholowe | | | 4,5-Dioksygenaza protokatechinianowa | 15 | – |
| Dehydrogenaza alkoholowa | 917 | 11 | Dioksygenazy hydroksylujące pierścień | 162 | – |
| Dehydrogenaza metanolowa | – | 2 | Pozostałe dioksygenazy | 496 | 4 |
| Dehydrogenaza etanolowa | 12 | – | Monooksygenazy | | |
| Dehydrogenaza butanolowa | 3 | – | Monooksygenaza hydroksybenzoesanowa | 28 | – |
| Dehydrogenaza cykloheksanolowa | – | 2 | Monooksygenaza fenolowa | 58 | – |
| Dehydrogenazy aldehydowe | | | Monooksygenaza toluenowa | 17 | – |
| Dehydrogenaz aldehydowa | 1075 | 12 | Pozostałe monooksygenazy | 52 | 4 |
| Dehydrogenaza acetaldehydowa | 38 | – | Pozostałe enzymy | | |
| Pozostałe enzymy | | | Dekarboksylaza karboksymukolaktonowa | 113 | 2 |
| Dehalogenaza | 470 | 4 | Hydroksylaza | 149 | – |
| Dehalogenaza haloalkilowa | 19 | – | Hydrolaza dienololaktonowa | 189 | 2 |
| Dioksygenaza 2-nitropropanowa | 216 | 2 | Lakaza | 51 | 1 |
| Hydroperoksydaza | 76 | 3 | Oksydoreduktaza izochinolinowa | 95 | 2 |
| Oksydaza aldehydowa | 142 | 1 | Oksygenaza | 60 | – |

Wymienione geny wskazują na potencjał mikroorganizmów do degradacji węglowodorów. Potencjał ten został potwierdzony w badaniach metaproteomu, w którym zidentyfikowano 72 różne białka enzymatyczne bezpośrednio uczestniczące w opisanych przemianach (tabela 3).

Ich różnorodność jest o wiele mniejsza niż zidentyfikowanych genów, ale wśród nich są obecne kluczowe enzymy szlaków biodegradacji, takie jak mono- i dioksygenazy oraz dehydrogenazy alkoholowe i aldehydowe. Warto dodać, że enzymy takie jak monooksygenaza metanowa i dehydrogenaza alkoholowa zostały zidentyfikowane również w zewnątrzkomórkowych strukturach błonowych stanowiących integralną część biofilmów naskalnych (Włodarczyk i in., 2016b). W badanym metagenomie i metaproteomie nie zidentyfikowano enzymów oraz kodujących je genów, zaangażowanych w beztlenową degradację węglowodorów.

Mikrobiologiczne utlenienie bituminu

Wykazano, że w (bio)zwietrzałych łupkach bitumicznych Kupferschiefer zasiedlonych przez mikroorganizmy wzrasta udział procentowy ekstrahowalnej materii organicznej (do 5 %) w porównaniu z łupkami niezwiertzałymi (rys. 11). Skład jakościowy i ilościowy ekstraktu również ulega zmianie (rys. 11 i 14). W (bio)zwietrzałych łupkach obserwuje się wyraźne zmiany w zawartości węglowodorów aromatycznych i alifatycznych (rys. 11). Jednocześnie ekstrakt organiczny wszystkich (bio)zwietrzałych łupków wykazuje wzrost zawartości związków utlenionych (Włodarczyk i Matlakowska, 2017b).

Bioutlenienie bituminu potwierdzono również w eksperymencie laboratoryjnym, w którym łupek bitumiczny Kupferschiefer został poddany działaniu konsorcjum złożonym z ośmiu szczepów bakterii wyizolowanych z tej skały przez 365 dni (Stasiuk i in., 2017). W czasie tych badań przeprowadzono również eksperyment kontrolny, w którym łupek bitumiczny inkubowano w sterylnym podłożu, co pozwoliło na potwierdzenie udziału mikroorganizmów w przemianach bituminu.

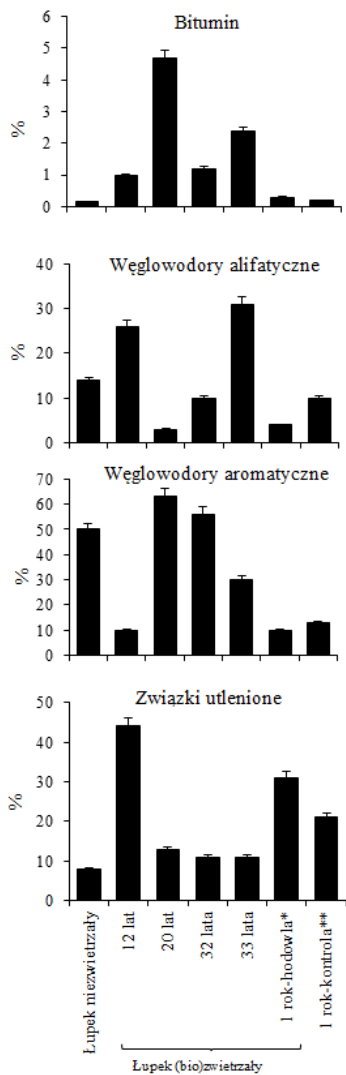
Mikrobiologiczne utlenienie kerogenu

Długoterminowa aktywność mikroorganizmów prowadzi także do utlenienia kerogenu (Stasiuk i in., 2017; Włodarczyk i Matlakowska, 2017b). Kerogen (bio)zwietrzałych łupków charakteryzuje się znaczenie wyższym indeksem tlenowym (OI) oraz niższym indeksem wodorowym (HI) w porównaniu do łupków niezwiertzałych (rys. 12 i 13). Zawartość wolnych węglowodorów (S1) oraz potencjał węglowodorowy (S2) (zawartość węglowodorów powstałych podczas pierwotnego krakingu kerogenu) w (bio)zwietrzałych łupkach maleje (rys. 13). Ponadto, w (bio)zwietrzałych łupkach zawartość całkowitego węgla organicznego (TOC) jest wyższa niż w niezwiertzałej skale, co najprawdopodobniej jest związane z obecnością biofilmów bakteryjnych.

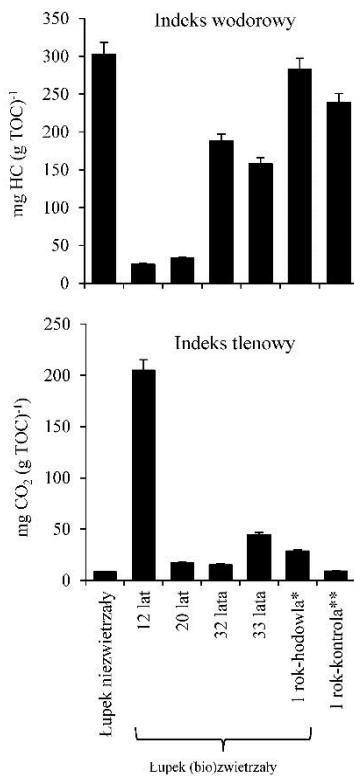
Biorąc pod uwagę powyższe parametry (bio)zwietrzałe łupki możemy zaklasyfikować, jako: (1) słabe skały macierzyste w odniesieniu do generowania węglowodorów (20 i 32 lata); materia organiczna zawarta w tych skałach to zdegradowany, zubożony w wodór i utleniony kerogen typu III (rys. 13A) lub (2) skały pozbawione macierzystości względem generowania węglowodorów (12 i 33 lata) wyraźnie wzbogacone w nieproduktywny, rezydualny, pozbawiony wodoru kerogen typu IV, który nie może być źródłem węglowodorów (rys. 13A). Kerogen typu IV, uznaje się za produkt silnej chemicznej i biologicznej degradacji kerogenu typu III lub II lub w skrajnych przypadkach kerogenu typu I.

Niezwiertzały łupek bitumiczny Kupferschiefer jest potencjalnie dobrą skałą macierzystą w odniesieniu do generowania węglowodorów, która nie zrealizowała swojego potencjału węglowodorowego. Jest on zdominowany przez kerogen umiejscowiony dokładnie na granicy

między ropotwórczym kerogenem typu II, a gazotwórczym kerogenem typu III (rys. 13A), który jest wzbogacony w wodór i nie przejawia oznak utlenienia.

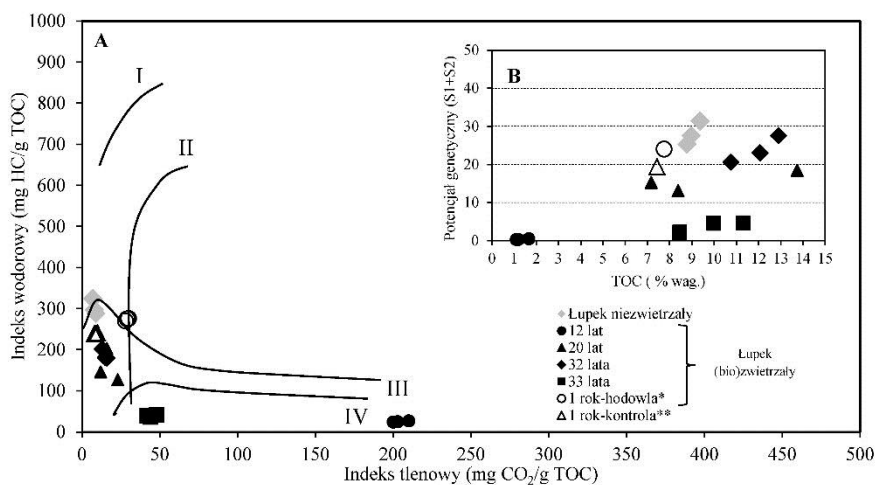


Rys. 11. Procentowy udział bituminu, węglowodorów alifatycznych i aromatycznych oraz związków utlenionych w (bio)zwitterałach i niezwitterałach łupkach Kupferschiefer; * eksperyment laboratoryjny z wykorzystaniem konsorcjum bakteryjnego; ** kontrolny eksperyment laboratoryjny (sterylne podłoże)



Rys. 12. Porównanie wartości indeksu wodorowego i tlenowego łupków (bio)zwitterałach i niezwitterałach (Rock-Eval). * eksperyment laboratoryjny z wykorzystaniem konsorcjum bakteryjnego; ** kontrolny eksperyment laboratoryjny (sterylne podłoże)

Mikrobiologiczne utlenienie kerogenu potwierdzono również w warunkach laboratoryjnych w długoterminowym eksperymencie, w czasie którego łupek bitumiczny Kupferschiefer został poddany działaniu konsorcjum złożonym z ośmiu szczepów bakterii (Stasiuk i in., 2017). Wykazo wzrost indeksu tlenowego kerogenu o 250% i jednoczesny spadek indeksu wodorowego o ok. 15% po 365 dniach eksperymentu w porównaniu do łupka niezwiertzałego (rys. 12). W eksperymencie kontrolnym nie zaobserwowano utlenienia kerogenu, a jedynie wzrost indeksu wodorowego.



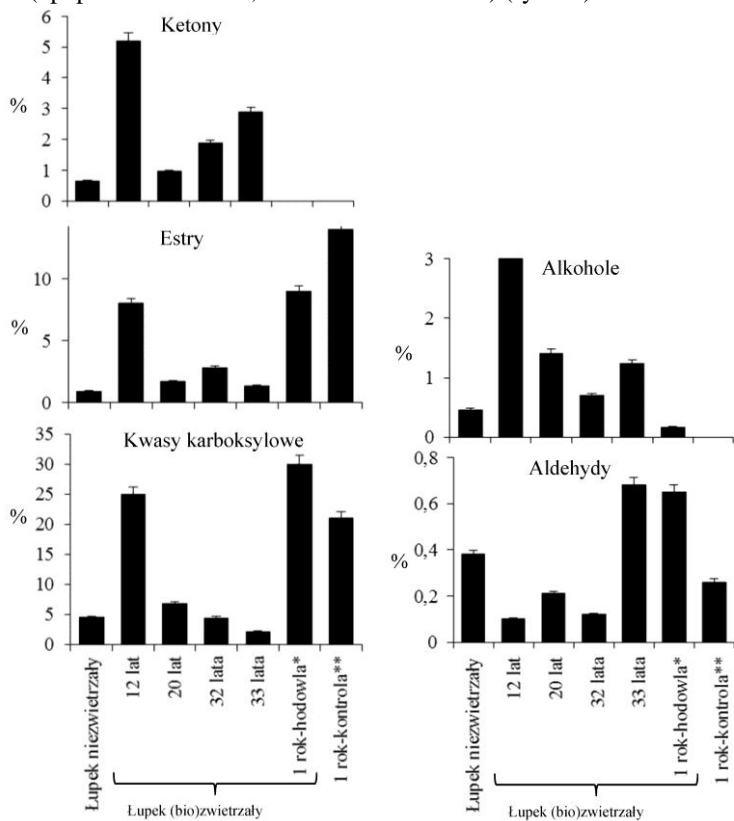
Rys. 13. (A) Zależności pomiędzy wskaźnikiem wodorowym (HI) a wskaźnikiem tlenowym (OI) (bio)zwiertzałych i niezwiertzałych łupków bitumicznych Kupferschiefer; (B) Potencjał węglowodorowy łupków (bio)zwiertzałych i niezwiertzałych na podstawie korelacji zależności pomiędzy potencjałem genetycznym (S1+S2) a zawartością węgla organicznego (TOC). * eksperyment laboratoryjny z wykorzystaniem konsorcjum bakteryjnego; ** kontrolny eksperyment laboratoryjny (sterylne podłoże)

Przypuszcza się, że mikrobiologiczne utlenienie kerogenu może wpływać na zawartość ekstrahowalnych węglowodorów alifatycznych i aromatycznych (rys. 11). Jednocześnie zawartość tych związków może również ulegać zmianom pod wpływem działalności mikroorganizmów. Opisane bakterie heterotroficzne degradujące długołańcuchowe węglowodory alifatyczne i policykliczne węglowodory aromatyczne oraz ich pochodne mogą przyczyniać się do powstawania krótkołańcuchowych węglowodorów alifatycznych oraz węglowodorów monoaromatycznych, a w dalszej kolejności utlenionych związków organicznych mobilizowanych do wód podziemnych lub asymilowanych przez mikroorganizmy.

Biomobilizacja węgla kopalnego – utlenione związki organiczne

Utlenione związki organiczne, których zawartość wyraziła wzrosła w (bio)zwiertzałych łupkach Kupferschiefer zasiedlonych przez mikroorganizmy, najprawdopodobniej są intermediami szlaków tlenowej biodegradacji węglowodorów alifatycznych i aromatycznych. Wśród nich zidentyfikowano alkohole, aldehydy, ketony, estry oraz kwasy karboksylowe (rys. 14, tabela 4) (Włodarczyk i Matlakowska, 2017b; Stasiuk i in., 2017). Analiza ilościowa wykazała, że we wszystkich (bio)zwiertzałych łupkach zawartość alkoholi wzrosła w porównaniu ze skałą niezwiertzałą. Alkohole są pierwszym produktem szlaków tlenowej biodegradacji zarówno

węglowodorów alifatycznych jak i aromatycznych, zatem wzrost ich zawartości w (bio)zwietrzałych skałach może potwierdzać rozkład kopalnej materii organicznej przez mikroorganizmy. Zawartość aldehydów, ketonów, estrów oraz kwasów karboksylowych również uległa zmianie aczkolwiek zaobserwowano różne kierunki tych zmian (rys. 14). Uważa się, że utlenione związki organiczne powstające w wyniku biodegradacji węglowodorów ulegają dalszym przemianom mikrobiologicznym, co wpływa na ich zawartość i uniemożliwia jednoznaczną interpretację uzyskanych wyników. Jednocześnie obecność zidentyfikowanych bakterii, genów kodujących enzymy, wreszcie enzymów *in situ* w środowisku kopalnianym, oraz *ex situ* w eksperymentach laboratoryjnych jednoznacznie potwierdza, że kopalna materia organiczna ulega przemianom mikrobiologicznym. Dodatkowo, tezę tę potwierdza analiza jakościowa utlenionych związków organicznych będących mikrobiologicznymi metabolitami (tabela 4). Zidentyfikowane alkohole to głównie związki monohydroksylowe, które mogą powstawać w czasie terminalnej oksydacji węglowodorów alifatycznych (np. tetradekan-1-ol, heksadekan-1-ol, oktadekan-1-ol, ikozan-1-ol i dokosan-1-ol) (rys. 9), utlenienia węglowodorów cyklicznych (np. pochodne cykloheksan-1-olu i cykloheksadien-1-olu) oraz hydroksylacji pierścienia aromatycznego poprzedzającej jego rozszczepienie (np. pochodne fenolu, fenantrenolu i naftolu) (rys. 10).



Rys. 14. Procentowy udział alkoholi, aldehydów, ketonów, estrów oraz kwasów karboksylowych w (bio)zwietrzałych i niezwieterzałych łupkach bitumicznych Kupferschiefer

Tabela 4. Utlenione związki organiczne zidentyfikowane w (bio)zwietrzalnych łupkach bitumicznych Kupferschiefer

| Nazwa związku |
|---|
| Alkohole monohydroksylowe |
| 2-(1-Metyloetylo)naft-1-ol 4,5-Dimetoksy-2-(2-propenylo)fenol 4-Fenylonaft-1-ol Dokosan-1-ol Heksadekan-1-ol Ikozan-1-ol Oktadekan-1-ol Pentachlorofenol Pochodna 1-fenantrenometanolu Pochodna cykloheksan-1-ol Pochodna cykloheksadien-1-ol Tetradekan-1-ol |
| Alkohole dihydroksylowe |
| 3,4-Dimetoksybenzeno-1,2-diol Acetylo-3-(1-metylo-2-pirolilo)-benzeno-1,4-diol |
| Aldehydy |
| 1,1'-Bifenylo-4-karboksyaldehyd Pochodna 1H-indolo-3-karbaldehydu Pochodna aldehydu benzoesowego Pochodna aldehydu octowego |
| Ketony |
| 10-Fenylo-9-oksadispiro[2.1.2.1]dekano-4,8-dion 1-Etylo-3,3-dimethylspiro[4.5]dek-1-eno-6,9-dion 7-Metoksy-10H-benzeno[b][1,7]naftyridin-5-on Pochodna antracen-7-onu Pochodna cykloheksan-1-onu Pochodna cyklohepten-7-onu Pochodna furano-2,5-dionu Pochodna indan-1-onu Pochodna izochinolin-1(2H)-onu Pochodna piran-6-onu |
| Estry |
| Ester dioktylowy kwasu benzeno-1,2-dikarboksyłowego Ester dwubutyłowy kwasu benzeno-1,2-dikarboksyłowego Ester etylowy kwasu metylofenylobutanodiowego Ester metylowy kwasu dodekanowego Ester metylowy kwasu tridekanowego |
| Kwasy karboksylowe |
| Kwas benzeno-1,2-dikarboksyłowy Kwas benzoesowy Kwas dodekanowy Kwas heksadekanowy Kwas heptadekanowy Kwas nonanowy Kwas oktadekanowy Kwas pentadekanowy Kwas tetradekanowy |

W (bio)zwietrzalnych łupkach zidentyfikowano pochodną katecholu (benzeno-1,2-diolu), która jest jednym z dwóch głównych intermediatów szlaku tlenowej biodegradacji węglowodorów aromatycznych (rys. 10). Wykryto również związki posiadające grupę aldehydową (karbonylową) dołączoną do większej jednostki, np. układu pierścieni aromatycznych, a także pochodną aldehydu octowego będącego jednym z ostatnich produktów szlaku rozszczepienia katecholu w pozycji *meta* (rys. 10). Ponadto wśród utlenionych związków organicznych są obecne ketony posiadające jedną lub dwie grupy karbonylowe dołączone m.in. do pierścienia antracenu, furanu, indanu, izochinoliny i piranu. Pochodne cykloheksan-1-onu i cyklohepten-7-onu mogą być produktami tlenowej degradacji węglowodorów cyklicznych, podobnie jak wspomniane wyżej alkohole cykliczne (Hornick i in., 1983). Zidentyfikowany kwas benzeno-1,2-dikarboksylowy (ftalowy) jest intermediatem szlaków biodegradacji węglowodorów aromatycznych, takich jak fenantren, fluoren, naftalen i piren (Grifoll i in., 1994; Kiyohara i Nagao, 1977; Heitkamp i in., 1988; Annweiler i in., 2000). Intermediatem szlaku biodegradacji naftalenu może być również kwas benzoesowy wykryty w (bio)zwietrzalnych łupkach bitumicznych (Annweiler i in., 2000). Wspomniany kwas ftalowy może także powstawać w wyniku enzymatycznej degradacji estrów tego kwasu, również wykrytych w badanych próbkach. Pozostałe kwasy karboksylowe, np. kwas nonanowy, heksadekanowy czy heptadekanowy, należą do typowych produktów biodegradacji węglowodorów alifatycznych (rys. 9).

Podsumowanie

W wyniku interdyscyplinarnych badań terenowych i laboratoryjnych potwierdzono udział mikroorganizmów w biowietrzeniu kopalnej materii organicznej łupka bitumicznego Kupferschiefer, w tym kerogenu, oraz mobilizacji utlenionego węgla kopalnego. Przeprowadzone badania były pionierskie – po raz pierwszy badano długoterminowe (do 33 lat) procesy biowietrzenia podziemnych łupków bitumicznych. Warto również podkreślić, że po raz pierwszy w badaniach biologicznych zastosowano metodę Rock-Eval, dzięki której potwierdzono bioutlenienie kerogenu.

Biologiczne procesy wietrzenia kopalnej materii organicznej występującej w łupkach bitumicznych mają ogromne znaczenie w obiegu węgla na Ziemi. Bioutlenienie kopalnej materii organicznej prowadzi do redystrybucji węgla, a także ma wpływ na skład chemiczny wód podziemnych i zawartość gazów w atmosferze. Z tego względu, mikroorganizmy prokariotyczne zasiedlające łupki bitumiczne stanowią kluczowy element cykli biogeochemicznych węgla, a w przypadku łupków zmineralizowanych i polimetalicznych mają również znaczenie w biogeochemii wielu innych pierwiastków.

W ramach opisanych badań stworzono kolekcję mikroorganizmów zdolnych do degradacji kopalnej materii organicznej i bioutlenienia kerogenu, która może zostać w przyszłości wykorzystana w biotechnologii wspomagającej wzbogacenie rudy w siarczki miedzi w procesie flotacji.

Podziękowania

Badania prowadzono w ramach projektu OPUS finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (2012/07/B/NZ8/01904). Autorki dziękują KGHM Polska Miedź S.A. za umożliwienie prowadzenia badań w podziemnych kopalniach miedzi oraz pomoc w ich realizacji. Szczególne podziękowania są kierowane do Pana dr. Wojciecha Kaczmarka za pomoc w organizacji ekspedycji naukowej oraz Panów Grzegorza Bidzińskiego, Artura Kuczaka i Jarosława Suchana za pomoc w poborze materiału

badawczego. Autorki dziękują również Panu dr. Krzysztofowi Nejbertowi (Wydział Geologii Uniwersytetu Warszawskiego) za pomoc w wykonaniu zdjęć prezentowanych na Rys. 2.

Literatura

- ANNWEILER E., RICHNOW H.H., ANTRANIKIAN G., HEBENBROCK S., GARMS C., FRANKE S., FRANCKE W., MICHAELIS W. (2000) *Naphthalene degradation and incorporation of naphthalene-derived carbon into biomass by the thermophilic Bacillus thermoleovorans*. Appl. Environ. Microbiol., 66, 518–523.
- BERLENDIS S., BEYSSAC O., DERENNE S., BENZERARA K., ANQUETIL C., GUILLAUMET M., ESTEVE I., CAPELLE B. (2014) *Comparative mineralogy, organic geochemistry and microbial diversity of the Autun black shale and Graissessac coal (France)*. Int. J. Coal Geol., 132, 147–157.
- BOLIN B. (1970) The carbon cycle. Sci. Am., 223, 124–132.
- EHRlich H.L., NEWMAN D.K. (2009) *Geomicrobiology*, CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton.
- FENCHEL T., BLACKBURN T.H. (1979) *Bacteria and mineral cycling*. Academic Press, London.
- FUCHS G., BOLL M., HEIDER J. (2011) *Microbial degradation of aromatic compounds - from one strategy to four*. Nat. Rev. Microbiol., 9, 803–816.
- GIBSON D.T., PARALES R.E. (2000) *Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology*. Curr. Opin. Biotechnol., 11, 236–243.
- GRIFOLL M., SELIFONOV S.A., CHAPMAN P.J. (1994) *Evidence for a novel pathway in the degradation of fluorene by Pseudomonas sp. strain F274*. Appl. Environ. Microbiol., 60, 2438–2449.
- HAIKO J., WESTERLUND-WIKSTRÖM B. (2013) *The Role of the bacterial flagellum in adhesion and virulence*. Biology, 2, 1242–1267.
- HEITKAMP M.A., FREEMAN J.P., MILLER D.W., CERNIGLIA C.E. (1998) *Pyrene degradation by Mycobacterium sp.: identification of ring oxidation and ring fission products*. Appl. Environ. Microbiol., 54, 2556–2565.
- HORNICK S.B., FISHER R.H., PAOLINI P.A. (1983) *Land Treatment of Hazardous Wastes*, eds. Parr J.F., Marsh P.B., Kla J.M., Noyes Data Corp., Park Ridge, New Jersey, 321–337.
- KARATAN E., MICHAEL A.J. (2013) *A wider role for polyamines in biofilm formation*. Biotechnol. Lett., 35, 1715–1717.
- KIYOHARA H., NAGAO K. (1977) *Enzymatic conversion of 1-hydroxy-2-naphthoate in phenanthrene - grown Aeromonas sp. S45P1*. Agric. Biol. Chem., 41, 705–707.
- KWAPISZ E. (2006) *Szlaki tlenowej biodegradacji węglowodorów ropy naftowej*. Biotechnologia, 2, 166–188.
- LEAHY J.G., COLWELL R.R. (1990) *Microbial degradation of hydrocarbons in the environment*. Microbiol. Rev., 54, 305–315.
- LYONS T.W., FIKE D.A., ZERKE A. (2015) *Emerging Biogeochemical views of Earth's ancient microbial worlds*. Elements, 11, 415–421.
- MARKOVETZ A.J., KALLIO R.E. (1971) *Subterminal oxidation of aliphatic hydrocarbons by microorganisms*. Crit. Rev. Microbiol., 1, 225–237.
- MATLAKOWSKA R., SKŁODOWSKA A. (2011) *Biodegradation of Kupferschiefer black shale organic matter (Fore-Sudetic Monocline, Poland) by indigenous microorganisms*. Chemosphere, 83, 1255–1261.
- MATLAKOWSKA R., NARKIEWICZ W., SKŁODOWSKA A. (2010) *Biotransformation of organic-rich copper bearing black shale ore by indigenous microorganisms isolated from Lubin copper mine (Poland)*. Environ. Sci. Technol., 44, 2433–2440.
- MATLAKOWSKA R., RUSZKOWSKI D., SKŁODOWSKA A. (2013) *Microbial transformations of fossil organic matter of Kupferschiefer black shale - elements mobilization from metalloorganic*

- compounds and metalloporphyrins by a community of indigenous microorganisms*. Physicoch. Probl. Miner. Proc., 49, 223–231.
- MATLAKOWSKA R., SKŁODOWSKA A. (2009) *The culturable bacteria isolated from organic-rich black shale potentially useful in biometallurgical procedures*. J. Appl. Microbiol., 107, 858–866.
- MATLAKOWSKA R., SKŁODOWSKA A., NEJBERT K. (2012) *Bioweathering of Kupferschiefer black shale (Fore-Sudetic Monocline, SW Poland) by indigenous bacteria: implication for dissolution and precipitation of minerals in deep underground mine*. FEMS Microbiol. Ecol., 81, 99–110.
- NOWAK G. (2000) *Wstępne dane nt. składu materii organicznej cechsztyńskiego łupku miedzionośnego z obszaru monokliny przedsudeckiej*. Zeszyty Naukowe. Górnictwo/Politechnika Śląska, 373–381.
- PARNELL J., KUCHA H., LANDAIS P. (1993) *Clay-organic Matrix of the Black Shale*. In: *Bitumens in Ore Deposits*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- PATEL C.N., WORTHAM B.W., LINES J.L., FETHERSTON J.D., PERRY R.D., OLIVEIRA M.A. (2006) *Polyamines are essential for the formation of plague biofilm*. J. Bacteriol., 188, 2355–2363.
- PETSCH S.T., EGLINTON T.I., EDWARDS K.J. (2001) *¹⁴C-dead living biomass: evidence for microbial assimilation of ancient organic carbon during shale weathering*. Science, 292, 1127–1131.
- RICKARD D. (2012) *Sulfidic sediments and sedimentary rocks*. Development of sedimentology. Vol. 65, ed. van Loon A.J., Elsevier, Amsterdam.
- ROJO F. (2009) *Degradation of alkanes by bacteria*. Environ. Microbiol., 11, 2477–2490.
- STASIUK R., WŁODARCZYK A., KARCZ P., JANAS M., SKŁODOWSKA A., MATLAKOWSKA R. (2017) *Bioweathering of fossil organic matter and organic carbon mobilization from subsurface organic-rich Kupferschiefer black shale – long-term laboratory studies*. Environmental Microbiology Reports, doi: 10.1111/1758-2229.12559
- TOURTELOT H.A. (1979) *Black shale deposition and diagenesis*. Clays Clay Miner., 27, 313–321.
- VAN BEILEN J.B., PANKE S., LUCCHINI S., FRANCHINI A.G., RÖTHLISBERGER M., WITHOLT B. (2001) *Analysis of Pseudomonas putida alkane degradation gene clusters and flanking insertion sequences: evolution and regulation of the alk-genes*. Microbiology, 147, 1621–1630.
- WŁODARCZYK A., SZYMAŃSKA A., SKŁODOWSKA A., MATLAKOWSKA R. (2016a) *Determination of factors responsible for the bioweathering of copper minerals from organic-rich copper-bearing Kupferschiefer black shale*. Chemosphere, 148, 416–425.
- WŁODARCZYK A., SZYMAŃSKA A., BĄKOWSKA A., SKŁODOWSKA A., MATLAKOWSKA R. (2016b) *Extracellular membrane structures – a component of the epilithic biofilm on the Kupferschiefer black shale*. Geomicrobiol. J., 34, 166–175.
- WŁODARCZYK A., MATLAKOWSKA R. (2017a) *The long-term oxidative weathering of fossil organic matter and sulfide minerals of the subterrestrial Kupferschiefer black shale by lithobiontic microbial community – metaomics field studies* (dane niepublikowane)
- WŁODARCZYK A., MATLAKOWSKA R. (2017b) *Deep subterrestrial bioweathering of fossil organic matter and organic carbon redistribution of Kupferschiefer black shale – detection and identification of long-term bacterial processes in the mines* (dane niepublikowane)