

Ludwina Jarzynowska*, Agnieszka Rożek*, Dorota Wolicka*

MIKROORGANIZMY HALOFILNE W WODACH ZŁOŻOWYCH

HALOPHILIC MICROORGANISMS IN PETROLEUM PRODUCED WATERS

Słowa kluczowe: wody złożowe, mikroorganizmy halofilne, remediacja.

Keywords: produced waters, halophilic microorganisms, remediation.

The chemical composition of produced waters from petroleum reservoirs is variable and harmful to the environment, which is influenced by many factors and processes. In addition to aromatic hydrocarbons, in reservoir waters we can find significant quantities of dissolved inorganic compounds such as: chlorides, sulfates, nitrates and phosphates. Due to the high concentrations of sodium chloride in produced waters, microorganisms occurring in them are halophilic or halotolerant. They have a significant impact on the chemical composition of petroleum waters and may contribute to their remediation.

1. WPROWADZENIE

Znaczną część powierzchni Ziemi zajmują wody „słone”, czyli morza i oceany, które zawierają średnio około 35 g/dm³ rozpuszczonych soli, głównie chlorków, siarczanów i węglanów [Oren 2002]. Środowiska charakteryzujące się większym zasoleniem często są spotykane w przybrzeżnych strefach mórz i oceanów. Odcięte od morza laguny, lądowe rozlewiska, czyli tzw. sebki, oraz okresowe jeziora typu playa, będące niegdyś częścią większych basenów, to typowe środowiska zasolone. Nie tylko woda może być określona mianem środowiska zasolonego. Są to również słone bagna, gleby oraz sztuczne stawy ewaporacyjne, które stworzył człowiek, w celu pozyskania soli dzięki procesowi ewaporacji. Typowe solanki występują również przy strukturach solnych oraz złożach ropy naftowej i gazu ziemnego.

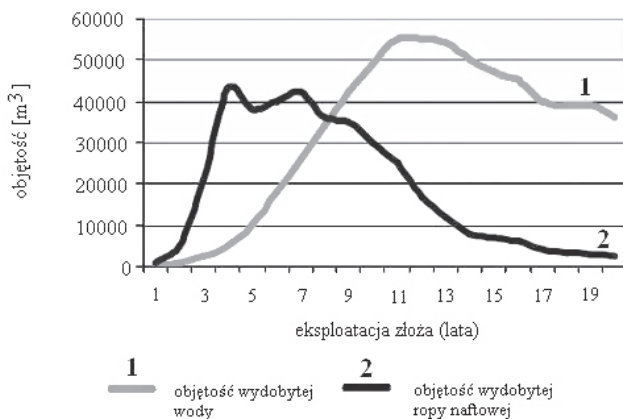
* Mgr Ludwina Jarzynowska, mgr Agnieszka Rożek, dr Dorota Wolicka – Instytut Geochemii, Mineralogii i Petrologii, Wydział Geologii, Uniwersytet Warszawski, 02-089 Warszawa, al. Żwirki i Wigury 93; e-mail: l.jarzynowska@student.uw.edu.pl, a.gojska@student.uw.edu.pl, d.wolicka@uw.edu.pl

2. WŁAŚCIWOŚCI I SKŁAD CHEMICZNY WÓD ZŁOŻOWYCH

Wody złożowe, nazywane wodami produkcyjnymi i solankami pól naftowych, krążą w skałach zbiornikowych wraz z ropą naftową i gazem ziemnym, pojawiając się stopniowo w coraz większych ilościach podczas wydobywania węglowodorów ze złóż. Fizyczne i chemiczne właściwości wód złożowych zależą od wielu czynników, m.in. położenia geograficznego pola naftowego, formacji geologicznej, w jakiej znajdują się wody złożowe oraz od rodzaju skał zbiornikowych, w których przebywały przez tysiące lat. Ich pochodzenie jest często niejednoznaczne i trudne do określenia. Niektórzy geolodzy uważają, że to wody stanowiące pozostałość basenów morskich, w których następowała sedymentacja materiału organicznego lub wody meteoryczne, przenikające w głąb litosfery przez systemy uskoku, spękań, czy przepuszczalne powierzchniowe warstwy skalne. Niezależnie od pochodzenia, wody złożowe na pewno można nazwać wodami interstycjalnymi, czyli zakumulowanymi w porach skały zbiornikowej. Bardzo często, aby stwierdzić pochodzenie wód złożowych, wykorzystuje się różnice w zasoleniu i określa stosunek sód/potas [Michael i Bachu 2001]. Prawdopodobnie prawie zawsze są to wody morskie, ale również mogą być meteoryczne, ewaporacyjne i mieszane. Głównymi procesami, które powodują zwiększenie lub zmniejszenie zasolenia wód złożowych są pary procesów: ewaporacja/rozcieńczanie oraz rozpuszczanie/precypitacja. Stosunek sód/potas ukazuje obecność rozpuszczonych w wodach soli takich jak: chlorek sodu (NaCl), chlorek wapnia (CaCl_2), wodorowęglan sodu (NaHCO_3). Wody meteoryczne i płytkie wody gruntowe zawierają głównie NaHCO_3 i praktycznie nie zawierają chloru, dlatego stosunek sód/chlor jest w nich większy od 1. Stosunek sód/potas w wodach morskich, ewaporacyjnych i głębokich wodach gruntowych, które przede wszystkim zawierają rozpuszczony halit, jest bliski 1. Wody złożowe zawierające duże ilości CaCl_2 o małym stosunku sód/potas, mogły brać udział w albityzacji plagioklazów, wymieniając sód na potas [Michael, Bachu 2001].

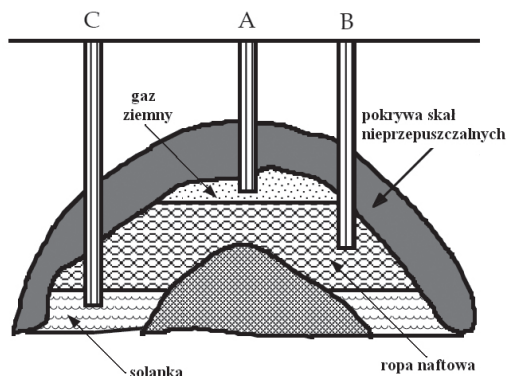
Wody złożowe wydobywające się z węglowodorami stanowią istotny problem dla górnictwa naftowego. Znaczne ilości tych wód produkowane podczas wydobywania węglowodorów są problemem dla koncernów wydobywczych na całym świecie, ponieważ w pewnym momencie produkcja wody ze złoża przewyższa wydobycie węglowodorów (rys. 1).

Skład chemiczny wód złożowych jest bardzo zmienny, na co ma wpływ wiele czynników i procesów. Oprócz dużego stężenia soli wody te zawierają duże ilości gazów oraz zawiesin mineralnych, metali ciężkich, fenoli, merkaptanów, pochodnych tiofenu i heterocyklicznych związków azotu [Różański i Włodkowiec 2002]. Woda złożowa, ze względu na większą gęstość w porównaniu z gęstością ropy naftowej czy gazu ziemnego, zajmuje najniższą pozycję w złożu (rys. 2).



Rys. 1. Profil wydobycia ropy naftowej i wód złożowych w złożach węglowodorów na Północno-Wschodnim Atlantyku (www.naturetechsolution.com)

Fig. 1. Typical production profile for an oilfield in the North East Atlantic (www.naturetechsolution.com)



A, B, C – odwierty

Rys. 2. Przykład ropno-gazowej pułapki antyklinalnej (www.ems.psu.edu/chapter8.pdf)

Fig. 2. Representative geologic structure of an oil trap (www.ems.psu.edu/chapter8.pdf)

Do najbardziej toksycznych związków chemicznych, znajdujących się w wodach złożowych zaliczamy: BTEX (benzen, toluen, etylobenzen, ksylen), wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA), pierwiastki promieniotwórcze (np. rad, uran, aktyn, pluton) oraz metale ciężkie. Ciągły kontakt z węglowodorami występującymi w złożu powoduje zanieczyszczenie solanek i czyni je toksycznymi dla środowiska. Wydobywanie ropy naftowej i gazu

ziemnego prowadzi do powstania znacznych ilości wód złożowych, które są zwykle zrzucane do wód powierzchniowych, najczęściej do rzek. Wody te mogą zawierać nawet $0,05 \text{ g/dm}^3$ ropy naftowej w postaci drobnych kropli oraz $0,035 \text{ g/dm}^3$ rozpuszczonych węglowodorów.

Znaczna zawartość węglowodorów aromatycznych w wodach złożowych nie jest jednak aż tak groźna dla środowiska, jak zawarte w nich nieorganiczne związki. Sole rozpuszczone w wodzie są przynajmniej częściowo zdysocjowane na jony i mogą się łączyć z innymi związkami niż te, w których były pierwotnie [Moore i in. 1965]. Są one znacznie bardziej toksyczne niż sama ropa i kumulują się w wodach powierzchniowych. W przeciwieństwie do ropy naftowej, która tworzy nieprzepuszczalną warstwę na powierzchni wód rzecznych, jeziornych czy morskich, wody złożowe mieszają się z wodami powierzchniowymi. Często są nazywane solankami pól naftowych, ze względu na ich znaczne zasolenie, np. zasolenie wód złożowych z pól naftowych Nigerii wynosi przeciętnie od 3 do 9 g/dm^3 [Obire i Amusan 2003]. Ścieki o wysokim zasoleniu powstają nie tylko w przemyśle petrochemicznym, ale także skórzanym i spożywczym. Zawierają one duże ilości związków organicznych, np. alkanów, węglowodorów aromatycznych oraz substancji mineralnych i radioaktywnych. Rozprowadzanie tych ścieków, nawet po uprzednim oczyszczaniu, powoduje znaczne szkody w środowisku.

Stosuje się różne metody usuwania węglowodorów z tych wód, np. technologie membranowe. Membrany są wykorzystywane do rozdzielania związków i odsalania, ale przed przepuszczeniem takich ścieków przez membranę można zastosować biologiczne usuwanie węglowodorów.

3. MIKROORGANIZMY WYSTĘPUJĄCE W WODACH ZŁOŻOWYCH

Warunki panujące w środowisku wód złożowych są ekstremalne dla mikroorganizmów. Wysokie ciśnienie i temperatura panujące w złożu, duże zasolenie, niski potencjał redoks, obecność szkodliwych gazów, pH w granicach 4–9 i niedostateczna zawartość potencjalnych źródeł węgla znacznie ograniczają liczebność mikroorganizmów [Wolicka 2010]. Dodatkową trudność podczas prowadzenia badań sprawia możliwość łatwego zanieczyszczenia pobranych prób mikroorganizmami ze środowiska zewnętrznego, np. z osadów powierzchniowych, wód dopływających do złoża, czy podczas procesów wydobywania i przeróbki [Nilsen i Torsvik 1996].

W ostatnich latach badania naukowe w większym stopniu skupiają się na biologicznym oczyszczaniu ścieków o wysokim zasoleniu, jednak ścieki takie, zwłaszcza te, w których panują „hipersłone” warunki (przynajmniej 3,5% rozpuszczonych soli) wpływają negatywnie na metabolizm mikroorganizmów (np. powodując plazmolizę komórki). Istnieją jednak mikroorganizmy, które są przystosowane do takich warunków, czyli halofile. Mikroorganizmy halofilne są zdolne w warunkach laboratoryjnych do degradacji składników ropy naftowej. Spotykane są one w wielu naturalnych słonych środowiskach takich jak: Morze

Martwe, Wielkie Jezioro Słone, stawy ewaporacyjne. Te organizmy potrzebują wysokiego stężenia soli w środowisku, w którym żyją (przede wszystkim NaCl). Wytworzyły one wiele przystosowań do życia w tak trudnych warunkach. Akumulują kompatybilne osmotycznie związki chemiczne takie jak K^+ , glicerol, trimetyloglicyna wewnątrz komórki, aby przeciwdziałać ciśnieniu osmotycznemu wywieranemu przez środowisko zewnętrzne. Posiadają również białka i ściany komórkowe zawierające dużą ilość ujemnie naładowanych aminokwasów i polarnych tłuszczów, a duża ilość kationów jest niezbędna do ustabilizowania takiej struktury. Poza tym transport składników pokarmowych jest uzależniony od odpowiedniego stężenia kationów sodu w komórce i w środowisku. Pomijając liczne przystosowania tych mikroorganizmów do życia w wysokim zasoleniu, należy zauważyć ich różnorodność metaboliczną, tzn. możliwość utleniania różnych związków organicznych, korzystania z wielu akceptorów elektronów oraz możliwość współistnienia z wieloma grupami mikroorganizmów, w tzw. konsorcjach, jednak szlaki metaboliczne związków organicznych przeprowadzane przez te mikroorganizmy wymagają dalszych badań.

Z powyższych rozważań wynika, że wszystkie wyizolowane z wód złożowych mikroorganizmy są halofilami lub halotolerantami. Mimo tak trudnych, ekstremalnych warunków, w wodach złożowych stwierdza się ogromną różnorodność mikroorganizmów. Gęstość występowania mikroorganizmów w wodach złożowych zazwyczaj nie jest bardzo duża i wynosi około 10^5 – 10^6 komórek/dm³. Wynika z tego, że w wodach tych występuje ograniczona ilość substancji odżywczych.

Największym problemem jest występowanie w wodach złożowych bakterii redukujących siarczany (BRS). Obecność siarkowodoru przy urządzeniach wydobywających węglowodory została zauważona już w latach dwudziestych XX wieku. Gaz ten jest przyczyną korozji urządzeń wiertniczych i powstawania warstwy siarczku żelaza, blokującego wydobywanie ropy naftowej i gazu ziemnego. Jest on również niebezpieczny dla zdrowia ludzi pracujących przy wydobyciu. Produkcję siarkowodoru i zakwaszenie ropy, które zmniejsza jej wartość rynkową przypisuje się działalności BRS. Te mikroorganizmy charakteryzują się szerokim zakresem tolerancji zarówno na zasolenie (0–17%), jak i temperaturę (4–85°C) [Wolicka 2010].

Większość rop naftowych w około 75% składa się z alifatycznych i aromatycznych węglowodorów. Wody złożowe przenikające ropy również są bogate w te węglowodory. Wzrost BRS na podłożach z ropą naftową jako jedynym źródłem węgla może służyć za model do odtwarzania i zrozumienia mikrobiologicznych procesów, jakie zachodzą w rurach, zbiornikach czy innych odcinkach systemów wydobywających węglowodory. Wiadomo, że przyrost biomasy w warunkach laboratoryjnych jest większy niż w warunkach *in situ*, jednak można uznać, iż procesy, jakie tam zachodzą są takie same, gdyż substraty pokarmowe są identyczne. Bardzo często jest obserwowane niecałkowite utlenianie związków organicznych, np. węglowodorów zawartych w ropie naftowej. Może to mieć kilka przyczyn, np. w składzie chemicznym ropy naftowej może być niewystarczająca ilość siarczanów lub czę-

sto jest ona uwięziona w porach skały zbiornikowej, co utrudnia jej migrację do miejsc bogatszych w wodę, w której rozwój mikroorganizmów jest łatwiejszy. Rozwój BRS może zostać zahamowany na skutek niekorzystnych warunków, takich jak wysoka temperatura czy zasolenie, które występują w czasie generowania węglowodorów. Podczas procesu wydobywczego nowe gatunki BRS mogą dostać się do złoża wraz z tłoczoną wodą. Gatunki te, bardzo często są już odporniejsze na nowe warunki temperaturowe i zasolenia, jakie wytworzyły się podczas wprowadzania wody.

Oprócz węglowodorów, innymi potencjalnymi źródłami węgla w ropie naftowej mogą być np. kwasy tłuszczowe lub inne związki organiczne, produkowane chociażby przez mikroorganizmy tlenowe. Gatunki BRS takie jak: *Archaeoglobus fulgidus*, *Desulfacinum infernum*, *Desulfobacter vibrioformis*, *Thermodesulforhabdus norvegicus* *Desulfacinum infernum*, które zostały wyizolowane z Morza Północnego, mogą wykorzystywać węglowodory ropy naftowej jako źródło węgla, aczkolwiek preferują one kwasy organiczne, takie jak octowy, palmitynowy, masłowy i rosną w zasoleniu 0–50 g NaCl/dm³ [Nilsen i in. 1996]. Z pól naftowych z terenu Rosji zostały wyizolowane: *Desulfotomaculum kuznetsori*, *Desulfotomaculum nigrificans*. W późniejszych latach opisano również obecność płytkich pokładów elementarnej siarki w pobliżu złóż węglowodorów. Siarka ta, jak stwierdzono, jest w dużej mierze wynikiem działalności tlenowych siarkowych bakterii utleniających siarczki, które powstały dzięki działalności BRS, np. *Thiobacillus thioparus* [Jenneman i Gevertz 1999].

Beztlenowy rozkład toluenu został stwierdzony m.in. u bakterii redukujących żelazo III, bakterii denitryfikacyjnych i fermentacyjnych. Z ropy naftowej i wód złożowych wyizolowano również archeony metanogenne, np. z wód złożowych z pola naftowego na Morzu Północnym – *Methanococcus thermolithotrophicu*, które wykorzystują dwutlenek węgla jako źródło węgla i rosną w temperaturze 17–62°C, z optimum w 60°C [Nilsen i Torsvik 1996].

Tylko mikroorganizmy ściśle beztlenowe, wyizolowane z ropy naftowej i wód złożowych, można uznać za autochtoniczne. Mikroorganizmy tlenowe lub fakultatywne beztlenowce mogą stanowić zanieczyszczenie pochodzące ze środowiska zewnętrznego, jednak takie rozróżnienie jest wyjątkowo trudne. Z wód złożowych wyizolowano również bakterie fermentacyjne, które redukują tiosiarczany i siarkę pierwiastkową i wykorzystują związki organiczne, takie jak węglowodory i białka oraz nieorganiczne, takie jak CO₂ i wodór cząsteczkowy, np. *Haloanaerobium acetoehtylicum*, *H. congolense*. Jeżeli w ropie naftowej i wodach złożowych występuje żelazo III lub utlenione związki azotu, to rozwijają się odpowiednio bakterie redukujące żelazo i denitryfikacyjne. Mikroorganizmy denitryfikacyjne zdolne do degradacji n-alkanów i węglowodorów pierścieniowych to np. rodzaje *Azoarcus* należące do *β-Proteobacteria* [Fukui i in. 1999].

Z wód złożowych wyizolowano również wiele grup mikroorganizmów tlenowych, utleniających węglowodory, zarówno bakterii, jak i grzybów – z bakterii – *Pseudomonas sp.*, natomiast z grzybów – *Aspergillus sp.* [Okoro 2009]. Wśród mikroorganizmów wyizolowanych

z wód złożowych z brazylijskich pól naftowych przeważali przedstawiciele: *Bacillus sp.*, *Halanaerobium sp.*, *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *Rhodococcus sp.*, *Streptomyces sp.*, *Acidithiobacillus ferrooxidans* [Oliveira i in. 2008]. Wiele odmian *Bacillus sp.* toleruje szeroki zakres zasolenia (do 15%), pH w zakresie 5–12 i jest częstym mikroorganizmem tlenowym, występującym w wodach złożowych [Illias i in. 2001].

W wodach złożowych istnieją również mikroorganizmy przeprowadzające dysymilacyjną redukcję pierwiastków takich jak: U(VI), Se(VI), Cr(VI), Hg(II), Tc(VII), V(V), Au(III), które potencjalnie mogą być stosowane do usuwania tych pierwiastków ze ścieków. Bakterie redukujące metale i redukujące siarczany mogą spełniać rolę biokolidów, powodujących zatrzymywanie radioaktywnych pierwiastków, również takich jak: ²³²Th, ²³⁸U, ²³⁷Np, ²³⁹Pu, ²⁴³Am. Wiadomo, że taka segregacja składników radioaktywnych od nieradioaktywnych zachodzi na drodze chemicznej, ale również biologicznej. Znane są czyste szczepy takich bakterii, ale przebieg tych procesów w warunkach podpowierzchniowych wymaga jeszcze wielu badań [Nazina i in. 2004].

4. PODSUMOWANIE

Produkcja ropy naftowej i gazu ziemnego oraz operacje wiercenia powodują znaczne zanieczyszczenie wód powierzchniowych i podziemnych oraz gleb obszarów, w których wydobywa się węglowodory. W dzisiejszych czasach zanieczyszczenie pochodzi głównie z dużej ilości solanki wydobywającej się ze złoża wraz z ropą naftową i gazem ziemnym (około 20–30 bilionów baryłek rocznie solanki; 1 baryłka ~ ok. 159 litrów), również w wyniku awarii systemu rurociągów czy podczas wypadków i błędów maszyn lub człowieka. Wody złożowe, które są bardzo zasolone (od 3 do 350 g/dm³ rozpuszczonych soli) i mogą zawierać znaczne ilości toksycznych metali, związków organicznych i nieorganicznych oraz pierwiastki radioaktywne takie jak rad ²²⁶/228, są zazwyczaj zrzucane do strumieni i jezior powodując zatrucie środowiska. Istnieje wiele metod fizykochemicznych służących do oczyszczania tego rodzaju ścieków, jednak w coraz większym stopniu naukowcy zwracają się ku biologicznym metodom oczyszczania. Wykorzystanie autochtonicznych mikroorganizmów halofilnych, które charakteryzują się dużą różnorodnością metaboliczną, prowadzącą do neutralizacji BTEX, metali ciężkich czy radioaktywnych, może stanowić przełom w nowoczesnych metodach bioremediacji wód złożowych.

Badania związane z aktywnością mikroorganizmów halofilnych w wodach złożowych są prowadzone w pracowni Geomikrobiologicznej na Wydziale Geologii UW i finansowane są w ramach grantu BST IGMiP – 26 – 2011.

PIŚMIENNICTWO

- FUKUI M., HARMS G., RABUS R., SCHRAMM A., WIDDEL F., ZENGLER K., BOREHAM C., WILKES H. 1999. Anaerobic degradation of oil hydrocarbons by sulfate – reducing bacteria and nitrate-reducing bacteria. In: Bell C. R., Brylinsky M., Jonson-Green P. (ed.) Microbial Ecology of Oil Fields. Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada.
- ILLIAS R. M., WEI O. S., IDRIS A. K., RAHMAN A. A. 2001. Isolation and characterization of halotolerant aerobic bacteria from oil reservoir. *Jurnal Teknologi* 35: 1–10.
- JENNEMAN G. E., GEVERTZ D. 1999. Identification, characterization and application of sulfide – oxidizing bacteria in oil fields. In: Bell C. R., Brylinsky M., Jonson-Green P. (ed.) Microbial Ecology of Oil Fields. Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada.
- KHARAKA Y. K., THORSEN J. J., KAKOUIROS E., HERKELRATH W. N. 2005. Impacts of petroleum production on ground and surface waters: results from the Osage – Skiatook Petroleum environmental research A site, Osage County, Oklahoma. *Environmental Geosciences* 12(2): 127–138.
- MICHAEL K., BACHU S. 2001. Origin and evolution of formation waters in the west-central part of the Alberta Basin. *Rock the Foundation Convention*: 18–22.
- MOORE A. J., SZASZ S. E., WHITNEY B. F. 1965. Determining formation water resistivity from chemical analysis. *Journal of Petroleum Technology* 3: 373–376.
- NAZINA T. N., KOSAREVA I. M., PETRUNYAKA V. V., SAVUSHKINA M. K., KUDRIAVTSEV E. G., LEBEDEV V. A., AHUNOV V. D., REVENKO Y. A., KHAVIZOV R. R., OSIPOV G. A., BELYAEV S. S., IVANOV M. V. 2004. Microbiology of formation waters from the deep repository of liquid radioactive wastes Severnyi. *FEMS Microbiology Ecology* 49: 97–107.
- NILSEN R. K., TORSVIK T. 1996. *Methanococcus thermolithotrophicus* isolated from North Sea oil field reservoir water. *Applied and Environmental Microbiology* 2(62): 728–731.
- NILSEN R. K., BEEDER J., THORSTENSON T., TORSVIK T. 1996. Distribution of thermophilic marine sulfate reducers in North Sea oil field waters and oil reservoirs. *Applied and Environmental Microbiology* 5(62): 1793–1798.
- OBIRE O., AMUSAN F. O. 2003. The environmental impact of oilfield formation water on a Freshwater Stream in Nigeria. *J. Appl. Sci. Environ.* 7(1): 61–66.
- OKORO C. C. 2009. Microbiological impacts of produce water discharges in nearshore shallow marine waters near Chevron's Escravos Tank Farm, Nigeria. *Journal of American Science* 6(3): 93–101.
- OLIVEIRA V. M., DURAES SETTE L., SIMIONI K. C. M., SANTOS NETO E. V. 2008. Bacterial diversity characterization in petroleum samples from Brazilian reservoirs. *Brazilian Journal of Bacteriology* 39: 445–452.

- OREN A. 2002. Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 28: 56–63.
- RÓŻAŃSKI H., WŁODKOWIC D. 2002. Skutki oddziaływania zanieczyszczeń ropopochodnych na środowisko przyrodnicze. *Wszechświat* 7(9): 223–225
- WOLICKA D. 2010. Mikroorganizmy występujące w ropie naftowej i wodach złożowych. *Nafta-Gaz* 4: 267–273.
- WOOLARD C. R., IRVINE R. L. 1994. Biological treatment of hypersaline wastewater by a biofilm of halophilic bacteria. *Water Environ Res* 66: 230–235.

www.ems.psu.edu/chapter8.pdf

www.naturetechsolution.com