

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: zoologie



Dizertační práce

**EKOLOGIE MIKROBIÁLNÍCH SPOLEČENSTEV
V PROSTŘEDÍ SULFIDICKÝCH RUD
ECOLOGY OF MICROBIAL COMMUNITIES IN SULFIDIC
ORE ENVIRONMENTS**

Mgr. Lukáš Falteisek

Školitel: doc. RNDr. Ivan Čepička, Ph.D.

Praha, 2016

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych poděkoval svému školiteli doc. Ivanu Čepičkovi za mimořádný odborný i osobní přístup, trpělivost a poskytnutí neobyčejně velkého prostoru pro samostatnou práci. Velice děkuji prof. Janu Černému za laboratorní zázemí, které nezištně a velkoryse poskytl. Doc. Petrovi Drahotovi děkuji za všestrannou pomoc s geochemickou a mineralogickou problematikou. Dík patří samozřejmě všem kolegům za vytvoření příjemného a tvůrčího prostředí, zejména pak Vojtovi Duchoslavovi, Katce Burkartové a jejich bezpříkladnému nadšení pro geomikrobiologii. V neposlední řadě je třeba ocenit početné montanisty a jeskyňáře, kteří mne doprovázeli při výpravách na podzemní lokality a bez jejichž pomoci by nebylo možné získat řadu důležitých vzorků. Své rodině děkuji za všestrannou podporu během celého studia. Zvláštní dík patří Máří za nápadité ilustrování společně stráveného času (a části této práce).

Tato práce byla finančně podpořena Grantovou agenturou Univerzity Karlovy v Praze (projekt 528613) a Grantovou agenturou České republiky (projekt P210/10/P096).

Bude mi ctí, pokud tato práce pomůže dokázat, že opuštěné doly jsou vědecky hodnotná místa, a že mezi lidmi, kteří je navštěvují, nejsou pouze takzvané „nežádoucí osoby“, ale i poctiví badatelé, kteří tu řeší seriózní odborné otázky.

PROHLÁŠENÍ AUTORA PRÁCE

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného ani stejného akademického titulu.

V Praze 15. 7. 2016



Mgr. Lukáš Falteisek

PROHLÁŠENÍ O PODÍLU NA PUBLIKACÍCH

Výsledky prezentované v této dizertační práci jsou společným dílem uvedených autorů. L. Falteisek je v případě 2 prací korespondenčním autorem, jeho podíl na jednotlivých publikacích je specifikován níže.

Falteisek L, Čepička I (2012). Microbiology of diverse acidic and non-acidic microhabitats within a sulfidic ore mine. *Extremophiles* 16, 911-922.

Podíl L. Falteiska: Návrh studie, odběr vzorků, získání sekvencí 16S rDNA, elektronová mikroskopie, analýzy dat, interpretace výsledků, sepsání a úprava rukopisu.

doc. RNDr. Ivan Čepička, Ph.D.

Falteisek L, Duchoslav V, Čepička I (2016). Substantial variability of multiple microbial communities collected at similar acidic mine water outlets. *Microbial ecology*, DOI 10.1007/s00248-016-0760-6.

Podíl L. Falteiska: Návrh studie, odběr vzorků, tRFLP a pyrosekvence 16S rDNA, statistické analýzy metodou UniFrac, interpretace výsledků, sepsání a úprava rukopisu.

doc. RNDr. Ivan Čepička, Ph.D.

Drahota P, Falteisek L, Redlich A, Rohovec J, Matoušek T, Čepička I (2013). Microbial effects on the release and attenuation of arsenic in the shallow subsurface of a natural geochemical anomaly. *Environmental Pollution* 180, 84-91.

Podíl L. Falteiska: Zpracování molekulárně biologických vzorků, získání sekvencí genů 16S rDNA, aioA, dsrB a arrA, analýzy biologických dat, sepsání a úprava odpovídající části rukopisu.

doc. RNDr. Petr Drahota, Ph.D.

OBSAH

Abstrakt	5
Abstract	6
1. Seznam publikací	7
2. Úvod	8
3. Cíle práce	10
4. Vývoj a současný stav řešených problémů	11
4.1. Molekulární determinace a druhový koncept u bakterií a archeí	11
4.2. Fylogenetická disimilarita a bioindikační potenciál mikrobiálních komunit	15
4.3. Kyselé důlní vody	19
4.4. Beta diverzita mikroorganismů v rámci sulfidického ložiska	21
4.5. Problém mikrobiální hyperdiverzity	26
4.6. Vývěry AMD jako model neutrální variability mikrobiálních společenstev	28
4.7. Mikrobiální srážení realgaru	34
5. Literatura	39
6. Publikace zahrnuté do této práce	46
6.1. Falteisek a Čepička, 2012	47
6.2. Drahota et al., 2013	60
6.3. Falteisek et al., 2016	69
7. Shrnutí a závěr	82
8. Ostatní publikace předkladatele dizertační práce	86

ABSTRAKT

Tato práce se zaměřuje na diverzitu mikroorganismů prokaryotického typu žijících v prostředí mikrobiální dekompozice i tvorby sulfidických minerálů a zkoumá zde vztah mezi složením mikrobiálních komunit a geochemickými procesy. V prostředí rozsáhlého a částečně vytěženého ložiska sulfidických rud byly poprvé charakterizovány mikrobiální komunity v gossanu a jejich role v rámci ekosystému. Kromě toho byla srovnána mikrobiální společenstva ze stanovišť typických pro tvorbu a přeměny kyselých důlních vod (AMD) a byla nalezena diference nik mezi příbuznými mikroorganismy. Nález neobvykle variabilních mikrobiálních komunit v biostalaktitech rostoucích na vývěrech AMD byl využit pro detekci neutrální variability mikrobiálních společenstev. Bylo zjištěno, že jednoduché mikrobiální komunity nevykazují podobnost podle lokality, ačkoliv podobnost prostředí lokalitám odpovídala, ale převážně náhodně. Tím se jednoduché komunity liší od vysoce diverzifikovaných společenstev z půdy, sedimentů a dalších komplexních substrátů, které vykazují vysokou korelaci bioty s faktory prostředí. Předpokládaná příčina tohoto rozdílu je kompozitní charakter bohatých komunit a potlačení náhodných fluktuací průměrováním velkého počtu fyzicky oddělených mikrokomunit. Tomu nasvědčuje i fakt, že podobnost jednoduchých komunit řízená lokalitou byla posílena umělým spojením několika komunit dohromady. V další části výzkumu byly studovány mikrobiální komunity srázející realgar (As_4S_4) v mělkém zvodnělém sedimentu. Bylo zjištěno, že tento sediment obsahuje různé a kontrastující mikrohabitaty, kde v některých případech patrně probíhají protichůdné děje, například autotrofní oxidace a disimilativní redukce arzenu. Tento poznatek vedl k formulaci hypotézy, že biogenní tvorba realgaru je závislá na struktuře prostředí podmiňující existenci mikrohabitátů s vysoce lokalizovanou tvorbou sulfidické síry.

ABSTRACT

This thesis is focused on the diversity of microorganisms of prokaryotic type living in the environments, where microbial sulfidic mineral precipitation or decomposition occur. The relationship between the microbial community composition and geochemical processes was examined. To the best of our knowledge, we were the first to analyze microbial communities from gossan and their significance for the ecosystem of a large sulfidic ore deposit. In addition, we compared the microbial assemblies at multiple habitats associated with generation or transformation of acidic mine drainage (AMD) and described niche partitioning among closely related organisms. The unexpectedly variable communities in stalactites growing on the AMD springs were utilized as a model for assessing neutral variability of the microbial communities. They clustered almost randomly even though the environmental conditions corresponded with the localities. This is an important difference of the simple communities from stalactites and the common highly diversified microbial assemblies. The communities found in sediments, soil, and many other complex substrates usually reveal high correlation with their environment. We propose that neutral fluctuations of the community composition are suppressed by averaging multiple physically separated microcommunities in each highly-diversified microbial community. In agreement with this assumption, the clustering of the stalactite communities by locality was enhanced by pooling few communities from a single site together. The microbial communities precipitating realgar (As_4S_4) in the shallow saturated sediment were examined in the second part of the study. Various and contrasting microhabitats were revealed in the sediment. It is probable that opposing processes, for example autotrophic arsenite oxidation and dissimilative arsenate reduction, take place in close vicinity. Such a patchy structure of the sediment suggests that the highly localized intensive sulfate reduction is essential for the realgar formation.

1. SEZNAM PUBLIKACÍ

Tato práce je založena na níže uvedených článcích publikovaných v impaktovaných časopisech. V textu jsou citovány stejně jako ostatní použitá literatura.

Falteisek L, Čepička I (2012). Microbiology of diverse acidic and non-acidic microhabitats within a sulfidic ore mine. *Extremophiles* 16, 911-922.

Drahota P, Falteisek L, Redlich A, Rohovec J, Matoušek T, Čepička I (2013). Microbial effects on the release and attenuation of arsenic in the shallow subsurface of a natural geochemical anomaly. *Environmental pollution* 180, 84-91.

Falteisek L, Duchoslav V, Čepička I (2016). Substantial variability of multiple microbial communities collected at similar acidic mine water outlets. *Microbial ecology* 72, 163-174.

2. ÚVOD

Geovědní obory zabývající se procesy v podzemních vodách a obecně v mělkých oblastech zemské kůry chápou bakterie a archea jako zásadní katalytický prvek. Aktivita mikroorganismů zajišťuje, že na zemském povrchu a v mělkém podzemí probíhají redoxní reakce mezi sloučeninami, které spolu za daných fyzikálně-chemických podmínek (tlak, teplota, koncentrace) spontánně nereagují nebo reagují velmi pomalu. Při maximálním zobecnění platí, že tyto organismy ovlivňují životní prostředí tím, že maximální možnou rychlostí odstraňují stav, kdy koexistují na jednom místě sloučeniny s výrazně odlišným redukčním potenciálem. Tento vliv je tak silný a rozšířený, že jej ani nejsme zvyklí vnímat jako něco mimořádného. Díky své metabolické a ekologické plasticitě hrají v těchto procesech zásadní roli bakterie a archea. Dále budeme tyto organismy pro zjednodušení souhrnně nazývat prokaryota. Nejde o fylogenetickou skupinu, ale o morfologický pojem zhruba znamenající „doplňek eukaryot“ v rámci buněčných organismů.

Metabolická variabilita prokaryot je známa již od první poloviny 20. století, demonstrují ji i klasické školní pokusy (např. Vinogradského sloupec). Hlubší pochopení ekologické role exotických metabolismů však dlouho zpomalovaly obtíže s detekcí a studiem bakterií a archeí. Náš vhled do jejich života zaznamenal bouřlivý rozvoj teprve s rozšířením metod bezkultivační determinace organismů. První období bylo typické převratnými objevy týkajícími se širší mikrobiální diverzity a faktu, že drtivá většina prokaryot je dosud nekultivovaná, a tudíž v minulosti experimentálně téměř nepřístupná. Nejvýznamnějším objevem z této kategorie bylo vyčlenění domény *Archaea* (původně *Archaeobacteria*) C. Woese v roce 1977. K objevům nových skupin bakterií a archeí na úrovni kmene (ve smyslu *Phylum*, nikoliv „laboratorní kmen“, v tomto významu bude slovo kmen užíváno i nadále) dochází stále, stejně jako nelze považovat za vyřešené fylogenetické vztahy těchto kmenů vůči sobě. Důkazem je například recentní objev několika desítek kmenů extrémně malých a pravděpodobně parazitických mikroorganismů tvořících nejspíše novou hlubokou linii bakterií (Hug et al. 2016; Luef et al. 2015). Odhady celkové diverzity prokaryot se dnes běžně uvádějí v řádu $10^6 - 10^7$ klasicky definovaných druhů. Množství popsanych druhů je přibližně 12 000 a rychlost izolace a popisu nových typových kmenů dosahuje zhruba 600 – 700 za rok (Rosselló-Mora 2012). Z toho plyne, že kultivační charakterizace podstatné části prokaryotické diverzity je (nechceme-li čekat minimálně 1600 let) technicky neproveditelná i v případě, že by se v budoucnu dařilo objevovat metody kultivace stále náročnějších environmentálních izolátů nezmenšenou rychlostí. Logickým řešením je využití jiných způsobů charakterizace mikrobiálních komunit, což by mělo být doprovázeno celkovou

změnou pohledu na mikrobiální diverzitu. Sekvenování téměř kompletních genomů ze směsných environmentálních vzorků a rozdělení získaných kontigů do jednotlivých genomů už je technicky možné. Díky tomu lze popsat mikrobiální procesy na úrovni metagenomů celých komunit a různě kompletních genomů konkrétních nekultivovaných organismů. V současné době (květen 2016) je evidováno 8561 publikovaných genomů bakterií z 35 kmenů a 580 genomů archeí z 12 kmenů a jejich celkový počet roste rychlostí více než 200 za měsíc.

Kromě (meta)genomického pohledu je však stále živý přístup využívající k charakterizaci mikrobiálních společenstev jejich molekulární determinaci. Jeho výhodou je možnost semikvantitativně vyhodnotit velké množství vzorků či společenstev při relativně malých nákladech (finančních, časových i výpočetních). Velké a rychle rostoucí veřejné databáze sekvencí, např. NCBI, také představují stále účinnější nástroj pro ekologickou charakterizaci mikroorganismů známých pouze podle sekvence 16S rDNA (tj. genu pro 16S rRNA). Snadná sekvenace mikrobiálních společenstev spolu s možností metaanalýzy dat z jiných studií dovoluje klást si otázky týkající se globální distribuce mikroorganismů (např. Caporaso et al. 2011; Nemergut et al. 2011). Došlo i k výraznému zlepšení metodiky srovnávání mikrobiálních komunit díky zavedení fylogenetické disimilarity (Faith et al. 2009; Lozupone a Knight 2005) a celkové optimalizaci statistických metod pro práci se společenstvy organismů známých pouze podle sekvencí (Caporaso et al. 2010; Kuczinski et al. 2010).

Environmentální mikrobiologie v postgenomickém období je schopná nejen poměrně účinně charakterizovat nekultivované organismy, ale i funkci a metabolický potenciál celých komunit. Stále však řeší dosti fundamentální otázky týkající se tvorby a složení mikrobiálních komunit. Mimo jiné není dořešeno, zda je složení mikrobiálního společenstva na určitém místě víceméně deterministickým výsledkem environmentální filtrace, který je pouze hrubě ovlivněn dostupností organismů v dané oblasti, anebo zda hrají významnou roli i náhodné procesy během tvorby komunity a interakce mezi mikroby. S tím souvisí problém hyperdiverzity mikroorganismů, tedy otázka, zda obrovská diverzita bakterií a archeí, běžně dosahující několika tisíc předpokládaných druhů v jednom gramu půdy, reflektuje reálnou diverzitu stanovišť a ekologických rolí v prostředí. Drtivá většina mikrobiálních společenstev je pro řešení těchto otázek relativně nevhodná z důvodu vysoké diverzity a především vysokého podílu nedostatečně charakterizovaných organismů (odhad environmentálních preferencí bakterie je podstatně náročnější než rekonstrukce metabolismu). Řešení těchto otázek lze usnadnit tím, že využijeme jako model přirozeně jednoduché mikrobiální komunity obývající dobře definované prostředí.

3. CÍLE PRÁCE

Hlavními cíli dizertační práce bylo:

- popsat alfa a beta diverzitu prokaryot na různých typech stanovišť koexistujících v rámci opuštěného rudného dolu s vyvinutou supergenní zonalitou
- z informací o složení mikrobiálních komunit a chemismu vod a minerálních fází se pokusit rekonstruovat geochemickou funkci přítomných společenstev mikroorganismů
- analyzovat složení několika skupin mikrobiálních komunit obývajících biostalaktity rostoucí na vývěrech kyselých důlních vod
- pokusit se na tomto modelu o odlišení neutrální variability jednoduchých přirozených mikrobiálních společenstev od jejich odezvy na environmentální proměnné

- identifikovat hlavní skupiny mikroorganismů podílející se na redoxních cyklech arzenu a síry v prostředí, kde dochází k biogennímu srážení realgaru (As_4S_4)
- určit hlavní environmentální faktory ovlivňující složení mikrobiálních společenstev a biogeochemické procesy v tomto prostředí
- blíže charakterizovat složení jednotlivých funkčních skupin pomocí sekvenace genů pro enzymy katalyzující redoxní přeměny As a S

4. VÝVOJ A SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÝCH PROBLÉMŮ

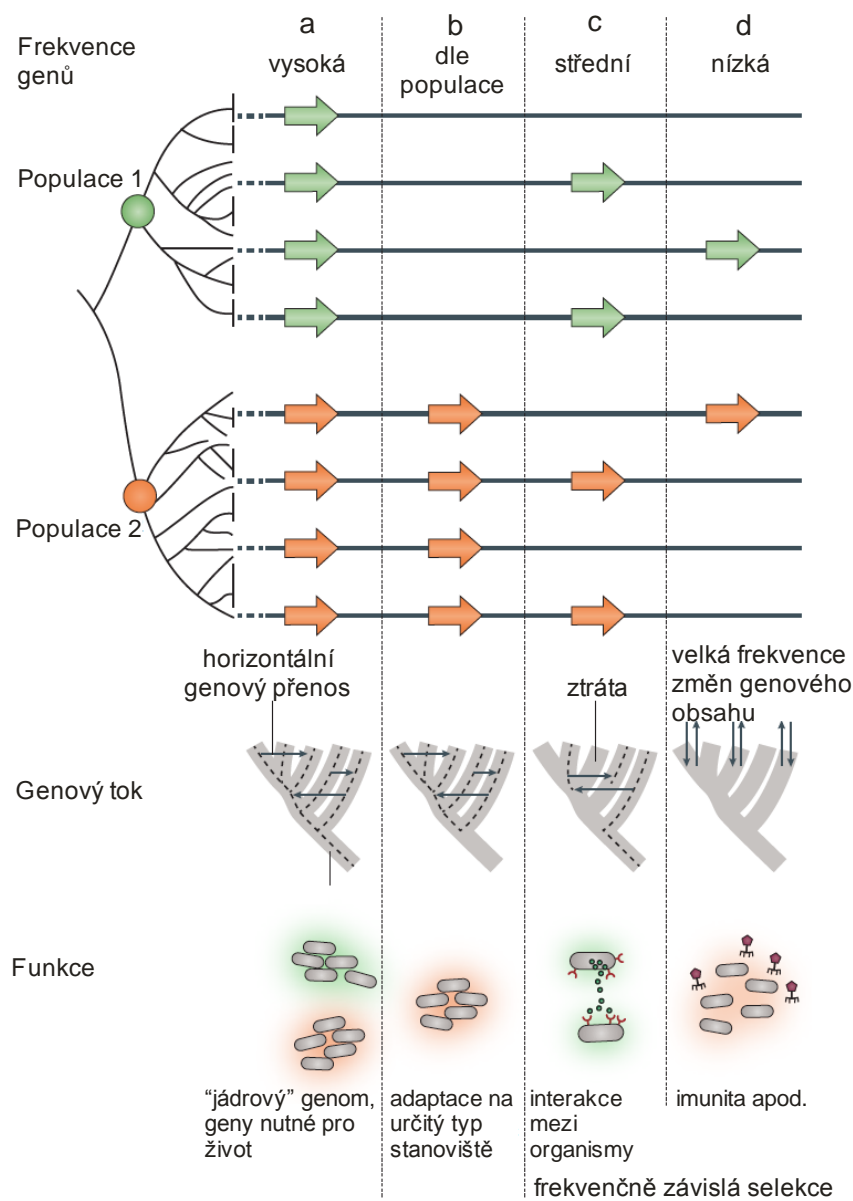
4.1. Molekulární determinace a druhový koncept u bakterií a archeí

V mikrobiologii se stále ještě využívá takzvaná polyfázická taxonomie. Tento přístup definuje druhy bakterií a archeí na základě kombinace růstových charakteristik (nároky na zdroj uhlíku, energie, terminální akceptor elektronů, teplotu, pH a další podmínky), chemotaxonomických údajů (složení membránových lipidů, peptidoglykanů, polyaminů, profil MALDI-TOF proteinů apod.), obsahu GC párů v DNA, shody sekvence 16S rDNA i jiných genů se známými organismy a míry hybridizace genomové DNA zkoumaného organismu s potenciálně příbuznými druhy. Tento přístup se dlouhou dobu zdál být robustní, zejména díky tomu, že dokázal absorbovat zavádění nových metod pouhým přidáváním nových kritérií do definice druhu, a je kompatibilní s fylogenetickým systémem bakterií a archeí (Roseló-Mora 2012).

Ke krizi tohoto přístupu dochází až v posledních letech díky rozšíření sekvenace genomů jako běžné metody charakterizace nových mikroorganismů (Thompson et al. 2015). Jedna kategorie nevýhod polyfázické taxonomie spočívá v tom, že stále ještě považuje za jádro charakterizace mikroorganismů kultivaci a provádění technicky náročných metod, jejichž výsledky často nelze zobecnit na další taxony, což platí například pro měření míry hybridizace DNA. To může být limitující. Například v rodu *Streptomyces* (*Bacteria: Actinobacteria*) je platně popsáno asi 600 druhů (Euzéby 2012). Není představitelné, že by byla testována DNA-DNA hybridizace všech 179 700 dvojic, které z nich lze vytvořit. Trvání na takovýchto procedurách je v době studií popisujících stovky nových genomů z desítek nových hlubokých fylogenetických linií pochopitelně neudržitelné (Brown et al. 2015; Rinke et al. 2013). Pokud by existovaly pouze tyto potíže, bylo by teoreticky možné polyfázický přístup zachránit nahrazením hybridizačních metod analýzou a srovnáváním genomů (Roseló-Mora 2012). Druhý a závažnější zdroj zpochybnění polyfázické taxonomie vychází z krize zavedeného druhového konceptu bakterií a archeí. Používané přístupy v mnoha případech týkajících se nejrůznějších mikrobiálních skupin vedou ke slučování geneticky izolovaných a ekologicky odlišných linií. Tento problém však nelze řešit pouhým zpřísněním požadavků na vzájemnou podobnost pro sloučení sekvencí či izolátů do jednoho druhu vzhledem k tomu, že speciace je dynamický proces a jednotné kritérium z principu neexistuje (Shapiro a Polz 2014). Další zdokonalení druhové definice by tedy mělo spočívat v tom, že za druh prohlásíme skupinu populací, jejichž genomy tvoří monofyletickou skupinu, v níž jsou vnitřní

evoluční vzdálenosti kratší než vzdálenosti ke genomům jiných populací (Thompson et al. 2015). Takováto formulace by se principiálně nelišila od tradiční definice, z níž původně vycházela i polyfázická taxonomie a která říká, že druh je skupina kmenů podobnějších si navzájem než jiným kmenům. Vlastně jde jen o adaptaci tradiční definice pro nový typ dat a autoři sami přiznávají, že tato definice je pragmatická a nečiní si nárok na zcela věrný popis biologické reality. Recentní studie jasně potvrzují, že genomicky blízké organismy zároveň sdílejí ekologické vlastnosti a pokud sdílí stanoviště několik příbuzných, avšak genomicky odlišných linií, vytvářejí zřetelně oddělené populace (shrnuje Thompson et al. 2015).

Takovéto rysy je možné očekávat u „pravých“ druhů odpovídajících biologickým vztahům.



Obr. 1. Různé skupiny prokaryotických genů vymezené na základě zákonitostí jejich distribuce uvnitř populací a mezi populacemi (podle Cordero a Polz 2014)

Biologicky vymezené druhy však musí splňovat i další požadavky. V první řadě by si jejich zástupci měli nějakým způsobem mezi sebou homogenizovat genomy a pokud možno z tohoto procesu vylučovat všechny ostatní. Díky takovému ději by mikrobiální druhy

představovaly paralelu tradičních biologických druhů definovaných pro pohlavně se rozmnožující organismy. Je samozřejmě známo, že bakterie i archea sdílejí geny i se zcela nepříbuznými organismy, takže použití tradiční definice druhů jako geneticky izolovaných jednotek je předem vyloučené. Historicky se objevily i představy, že by pojem druhu měl být u těchto skupin opuštěn a nahrazen jakýmsi genetickým kontinuem, přinejlepším s ostrůvky relativní stability. Genomické studie ale ukazují, že genový tok u bakterií a archeí není prostý zákonitostí ani není determinován jen bezprostřední potřebou funkčních genů. Díky tomu umožňuje vznik geneticky soudržných skupin. Cadillo-Quiroz et al. (2012) našli populaci archea *Sulfolobus islandicus* (*Archaea: Crenarcheota*) prodávající nejspíš časnou fázi sympatrické speciace. Genomy různých izolátů z jediného termálního vývěry tvořily dvě vnitřně homogenní a navzájem odlišné skupiny. Srovnání jejich genového obsahu neodhalilo žádné jasně interpretovatelné funkční rozdíly a kultivační charakterizace zjistila pouze rozdíl v růstové rychlosti a dosažitelné populační hustotě obou skupin. Ze srovnání genomů ovšem vyplynulo, že obsahují několik oblastí, z nichž některé byly zjevně předmětem relativně častého horizontálního přenosu v rámci obou linií, zatímco jiné byly homogenní uvnitř linií, ale nesly stopy, že přenos genů mezi liniemi byl výrazně potlačen. Studie neobjasňuje, zda je příčinou neznámá náhodně vzniklá bariéra v přenosu DNA, která vyústila v izolaci obou populací, disruptivní selekce, která eliminuje jedince se směsným genotypem, anebo jiný, cílenější mechanismus. Podobný jev byl popsán i u *Vibrio cyclitrophicus* (*Bacteria: Gammaproteobacteria*). V tomto případě bylo dokonce doloženo, že rozdílný tok genů umožnil specifické rozšíření adaptivních alel v jedné subpopulaci (Shapiro et al. 2012). Pět skupin definovaných rozdílným tokem genů v rámci skupiny a mezi skupinami bylo rozlišeno u fytopatogenního druhu *Ralstonia solanaceum* (*Bacteria: Betaproteobacteria*). Geny s větší mezipopulační variabilitou tvořily ostrovy v genomu a častěji souvisely s tvorbou sekundárních metabolitů nebo kódovaly méně běžné proteiny s neznámou funkcí (Lefeuvre et al. 2013). V populaci termofilní sinice *Mastigocladus laminosus* (*Bacteria: Cyanobacteria*) obývajících vodní tok s teplotním gradientem byl nalezen variabilní úsek genomu se silně teplotně závislým výskytem jednotlivých forem. Distribuce jednobázových polymorfíí prokazuje potlačení horizontálního přenosu tohoto lokusu souvisejícího se syntézou ochranného pouzdra heterocyst. Jiné lokusy vykazovaly značnou homogenitu, avšak byla zkoumána jen část genomu (Wall et al. 2014). Acidofilní autotrof *Leptospirillum ferrooxidans* (*Bacteria: Nitrospirae*) se vyskytuje v několika varietách lišících se minimálními rozdíly v sekvenci 16S rDNA a drobnými metabolickými odchylkami (např. využívání různých kompatibilních solutů). Tato bakterie vytváří v extrémních prostředích téměř monotypické

biofilmy, v nichž existují domény tvořené téměř čistě jednotlivými varietami. Tyto mikrodomény koexistují v těsném kontaktu a podíl jejich zastoupení se mění během stárnutí biofilmu (Deneff et al. 2010).

Cordero a Polz (2014) na základě těchto a podobných výsledků navrhuji rozlišit jádrový genom obsahující geny nezbytné pro život a přítomné u všech populací daného organismu či skupiny organismů, geny související s adaptací na určitý typ prostředí a přítomné ve vysoké frekvenci v některých populacích a chybějící v jiných a konečně geny přítomné ve střední až nízké frekvenci ve všech populacích a podléhající frekvenčně závislé selekci. Tato hypotéza nabízí interpretaci prokaryotického druhu jakožto skupiny populací, které se samy rozpoznávají a jsou spolu schopné sdílet všechny geny včetně těch klíčových pro přežití na svém typu stanoviště. Tato definice ještě není dokonalá, vzhledem k tomu, že vlastnosti nutné pro přežití na stanovišti lze rozdělit do dvou skupin. V první skupině jsou vlastnosti pro přežití sice zásadní, typicky schopnost odolat určitému toxinu nebo využívat v energetickém metabolismu určitý iont, ale nevyžadující velké přizpůsobení buněčné fyziologie a podmíněně často několika geny v jednom operonu. Takovéto vlastnosti bývají široce sdílené mezi příbuznými i nepříbuznými organismy a jejich narušení přenosem DNA z jiného ekotypu není pravděpodobné. Typická ukázka takové vlastnosti je rezistence na arzen popisovaná v kap. 4.7 (Villegas-Torres et al. 2011). Podobným způsobem nejspíš vznikla i zmiňovaná divertiza rodu *Streptomyces*. Mnozí zástupci se liší jen konkrétním typem sekundárních metabolitů, což je typická vlastnost přenosná omezeným počtem genů, a podobnost jejich 16S rDNA přesahuje 99,5 %. Kromě snadno přenosných metabolických drah existují komplexní vlastnosti, mající charakter spíše vyladění různých regulačních okruhů nebo současné přizpůsobení mnoha enzymů a buněčných komponent. Ukázkou je adaptace na teplotu prostředí nebo na konkrétní režim přísunu určitého metabolického sbustrátu. Tyto vlastnosti jsou závislé na mnoha genech a náhodná náhrada některého genu za jeho ortholog z jiné populace je může narušit. Je možné, že výše zmíněný útlum rekombinace v rozsáhlých a funkčně nejasně definovaných částech genomu *Sulfolobus islandicus* nebo *Ralstonia solanaceum* je příkladem prevence takového děje. Pokud by takovéto populace bránící se vzájemné výměně nezanedbatelné části genomu existovaly dlouhodobě, byly by to nejlepší kandidáti na přirozeně definovanou nejnižší taxonomickou úroveň. Takovéto druhy (či poddruhy apod.) by měly sice velmi podobné vlastnosti a ekologické nároky, ale v případě své koexistence na jednom místě by obývaly disjunktní stanoviště. Podle této teorie by definování druhů nejvíce odpovídajících reálným biologickým interakcím bylo možné jedině studiem genomů skupiny příbuzných, ale nemísících se populací a pochopením zákonitostí

horizontálního přenosu genů mezi nimi. Prozatím pro takový přístup u většiny skupin neexistuje dostatek dat, rozhodně však jde o směr, který si zaslouží být rozvíjen. Důsledek, který by ještě nedávno byl dosti kontrainuitivní, je to, že pro biologicky věrnou klasifikaci prokaryot je nevhodné používat kultivační přístup. Ten nejen není dostatečně univerzální a operativní, ale především míjí jádro problému.

4.2. Fylogenetická disimilarita a bioindikační potenciál mikrobiálních komunit

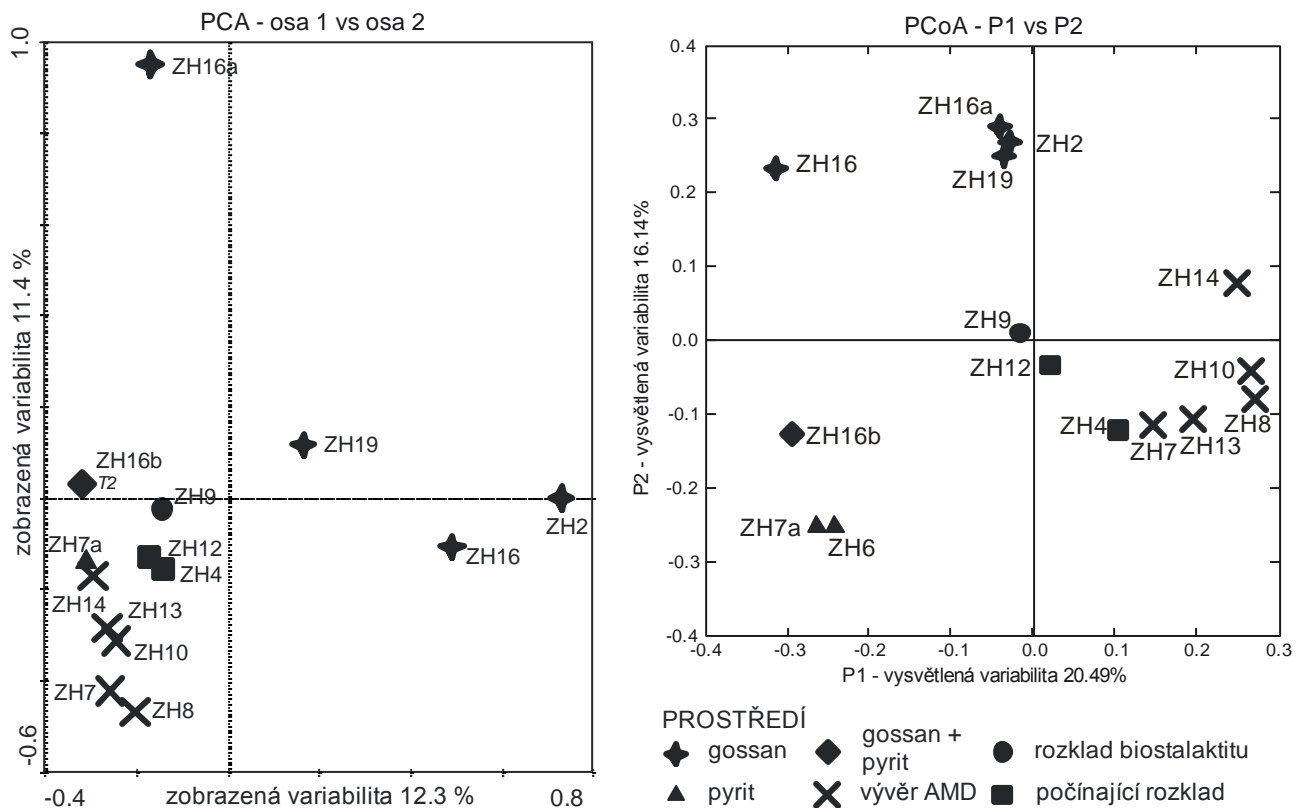
Z předchozí kapitoly vyplývá, že pro environmentální studie je věrné rozlišování biologických druhů prokaryot při použití molekulární determinace na základě 16S rDNA nedosažitelné. Většina studií proto slučuje podobné sekvence do operačních taxonomických jednotek (OTU), které jsou definované vzájemnou podobností sekvencí. OTU sdružující sekvence 16S rDNA shodné minimálně z 97 % (v novějších studiích též 98,7 %) bývají používány jako ekvivalent druhů (Thompson et al. 2015). Je pravděpodobné, že řada hojněji zastoupených OTU odpovídá i v rámci jedné lokality spíše několika vzájemně podobným biologickým druhům než jednomu. Samozřejmě platí, že pokud se podařilo jednoznačně přiřazení OTU ke kvalitním sekvencím z popsaného druhu, tak s velkou pravděpodobností můžeme ztotožnit OTU a tímto druhem alespoň v základních vlastnostech. Na druhou stranu o přesném ekologickém vyladění totéž říci nelze, jak ukazují výše citované studie. Z uvedených důvodů budeme v této práci v kontextu determinace pomocí 16S rDNA hovořit o genotypech nebo OTU a nikoliv druzích bakterií a archeí. Je nutné mít na paměti, že při jejich identifikaci jde o přiřazení druhům vymezeným podle biologicky ne zcela korektní definice, a to i v případech, kdy kvůli plynulosti textu relativní charakter identifikace OTU nezdůrazňujeme.

Vzhledem k výhodám molekulární determinace bakterií a archeí ve srovnání s jakoukoliv jinou metodou jejich detekce je velmi přínosné najít analytické postupy, které by nebyly zatíženy umělým charakterem OTU a umožnily by vytěžit ze sekvenčních dat maximální množství užitečných informací. V zásadě lze rozlišit dva základní typy přístupů. První je srovnání většího počtu mikrobiálních komunit a detekce odezvy na přítomnost environmentálních gradientů, rozhraní či změn v čase i prostoru. Druhý přístup je rozpoznání signálů daných prostředím ve složení a struktuře individuální mikrobiální komunity, tedy vlastně obdoba klasické bioindikace.

Srovnávání mikrobiálních společenstev, většinou založené na metodách mnohorozměrné analýzy, je v mikrobiální ekologii velmi běžné. Jejím základem je obecně uznávaný názor, že prokaryotické mikroorganismy mají unimodální odpověď na faktory

prostředí (Faith et al. 2009). Z toho vyplývá, že by při postupné změně prostředí mělo docházet k postupné změně struktury mikrobiálního společenstva a že rozdílnost mikrobiálních komunit by měla korelovat s rozdílností stanovišť (Ferrier et al. 2007). Experimenty na simulovaných i reálných datech potvrzují, že detekce gradientů i rozlišení mikrobiálních komunit z různých prostředí je možné a stačí (při jinak dobré kvalitě dat) překvapivě malá hloubka prosekvenování dosahující 100 sekvencí/vzorek (Kuczynski et al. 2010). Hluboké prosekvenování 16S rDNA z desítek environmentálně blízkých vzorků však jednoznačně ukazuje, že překryv OTU mezi vzorky bývá velmi nízký (Nemergut et al. 2011; Falteisek et al. 2016). Z toho vyplývá, že veškeré metody převzaté z ekologie makroorganismů, které vycházejí ze vzájemného srovnání vzorků na základě podílu shodných organismů, budou v případě mikrobiálních OTU využívat velmi malou část informace. Jako dnes již rutinní řešení tohoto problému se prosadila náhrada disimilarity založené na sdílených taxonech takzvanou fylogenetickou disimilaritou. Ta je definovaná jako poměr délky fylogenetických větví, které vedou k OTU zastoupeným pouze v jednom vzorku k délce větví (včetně vnitřních větví) vedoucích k zástupcům obou srovnávaných vzorků (Faith et al. 2009; Lozupone a Knight 2005). Díky tomu, že hodnota unikátní frakce fylogenetických větví vlastně nahrazuje míru druhové disimilarity komunit, lze ji použít jako extenzi mnoha klasických metod (Ferrier et al. 2007). Srovnání různých metod založených na fylogenetické disimilaritě potvrdilo jejich velkou robustnost vzhledem k přesné hodnotě prahu pro vymezení OTU, vůči náhodnému zakořenění stromu a přítomnosti dalších taxonů nezahrnutých do srovnání (Parks a Beiko 2013). Nízká citlivost na přesnou determinaci OTU je logická vzhledem k tomu, že variabilita na úrovni blízké příbuzných OTU tvoří zanedbatelný příspěvek k celkové délce unikátních větví. Efektivitu metodiky ilustruje to, že ke klastrování komunit podle základního typu prostředí (např. voda, půda, stolice apod.) dojde již při analýze deseti sekvencí na vzorek (Caporaso et al. 2012). Metaanalýza širokého spektra volně žijících mikrobiálních komunit převzatých z celkem 111 studií řešila otázku, které environmentální faktory zanechávají v různých komunitách navzájem ztotožnitelné signály (Lozupone a Knight 2007). Ukázalo se, že nejsilnější signál ve složení komunit zanechává salinita prostředí, následovaná tím, zda byl sekvenován environmentální vzorek nebo odvozená kultura, a rozdělením na pevné substráty a vody. Nejdůležitější závěr je, že projev určitých environmentálních faktorů je shodný v mikrobiálních komunitách pocházejících z různých prostředí a není překryt projevem jiných rozdílů. Díky tomu lze ekologicky klasifikovat i mikrobiální společenstva z komplexního prostředí, které je proměnlivé ve více různých parametrech současně. Při mnohorozměrné analýze založené na fylogenetické disimilaritě

komunit bude oblak vzorků v různých osách rozdělen podle různých parametrů, a to i v případě, že některé mikrobiální komunity nesdílejí s ostatními žádné OTU (např. Falteisek a Čepička 2012; obr. 2).



Obr. 2. Mnohorozměrná analýza mikrobiálních komunit z polymetalického ložiska Zlaté Hory. Vlevo PCA (analýza hlavních komponent) založená na výskytu a abundanci OTU, vpravo PCoA (analýza hlavních koordinát) založená na fylogenetické disimilaritě komunit. Vzorek ZH6 musel být z PCA vypuštěn, protože nesdílel žádnou OTU s ostatními. Vzorky z gossanu vykazují typickou mikrobiální hyperdiverzitu a významně snižují rozlišení pro ostatní komunity. Fylofenetická PCoA poměrně přesně rozdělila vzorky podle typu stanoviště. Rozkládající se biostalaktity kromě ZH4 (tj. ZH9 a 12) byly vymezeny na základě složení mikrobiální komunity, ostatní skupiny byly rozlišeny podle chemismu a lokalizace v dole (podle Falteisek a Čepička 2012, upraveno).

Je samozřejmé, že ne všechny environmentální proměnné ovlivňují fylogenetické složení mikrobiálních komunit detekovatelným způsobem. Významný faktor, který nevytváří příliš silný signál, je přítomnost toxických látek, například arzenu (Drewniak et al. 2012; Drahotka et al. 2013). Tento jev je pravděpodobně vysvětlitelný tím, že rezistence k arzenu se snadno šíří pomocí horizontálního přenosu genetické informace, takže při dostatečně dlouhé době existence arsenové anomálie dojde ke vzniku dostatečně velkého množství rezistentních organismů, aby se mohla projevit selekce jinými faktory (Villegas-Torres et al. 2011). Takovýto překryv faktorů s nevýrazným projevem ve fylogenetické disimilaritě komunit s

faktory, na které je možná adaptace přenosem genetické informace, je logický a konzistentní s hypotézou, že adaptace na podobné faktory u prokaryot není spojená se speciací. Rozhodně by byla přínosná studie zaměřená na testování této korelace stejně jako na srovnání síly projevu co nejširšího spektra různých environmentálních proměnných, bohužel dosud žádná taková práce nebyla publikována.

Druhý z možných přístupů při analýze mikrobiálních komunit je využití individuálních společenstev pro bioindikaci. Tento přístup má uplatnění při detekci biogeochemických procesů například v podzemních akviferech. Takovéto procesy často nejsou dostupné pro přímé pozorování či vzorkování a nelze je odvodit z pouhého chemického složení vody nebo jiného média. Z výše uvedeného popisu fylogenetické disimilarity vyplývá i rozsah použitelnosti tohoto konceptu pro bioindikaci. Díky relativně nezávislému projevu minimálně některých environmentálních faktorů na strukturu komunity můžeme klasifikovat i jedinou zkoumanou komunitu s využitím referenčních mikrobiálních komunit z podobných prostředí. Tak lze posoudit její asociaci s předpokládanými typy prostředí či procesů (auto- či heterotrofie, vztah k pH, přednostně využívané donory a akceptory elektronů apod.). Nevýhoda je, že výsledek je ovlivněn volbou referenčních komunit, tedy i očekáváním, které faktory budou významné. Pokud platí, že složení celé komunity je ovlivněno určitými faktory prostředí, musí být na stejné faktory se zvýšenou pravděpodobností adaptovány i organismy, které komunitu tvoří. Bylo sice ukázáno, že ani obtížně přenosné adaptace nemusí být nutně sdíleny všemi blízkými organismy, lze ale předpokládat jejich alespoň částečnou konzervaci. Pokud tedy zjistíme environmentální preference u organismů geneticky velmi blízkých tomu zkoumanému, pravděpodobně poznáme i preference zkoumaného organismu. Podobné tvrzení platí i o základních metabolických vlastnostech organismů. Díky existenci obrovských mezinárodních databází sekvencí (např. NCBI) je nalezení podobných genotypů snadné a díky těmto rozsáhlým „faunistickým“ datům lze odvodit poměrně přesné informace i o vlastnostech dosud nijak necharakterizovaných organismů.

Rozpracování konceptu fylogenetické disimilarity mikrobiálních komunit tedy nabízí teoretický rámec a vymezení použitelnosti pro dosud pouze empiricky provozovanou charakterizaci prokaryotických sekvencí pomocí nejbližších BLAST hitů. Definitivní ověření by vyžadovalo náročnou studii, které se zatím nejvíce blíží práce Langille a kol. (2013). Tito autoři rekonstruovali genomy nositelů sekvencí 16S rDNA pomocí jejich zařazení do fylogenetického stromu obsahujícího organismy se známým genomem a vytvoření hypotézy o fylogenetickém rozšíření jednotlivých genů. Následně predikované genomy srovnali s reálně osekvenovaným metagenomem komunit z projektu lidského mikrobiomu i dalších velkých

studií. Korelace predikovaných a skutečných metagenomů pro běžná málo extrémní prostředí dosahovala téměř maximální hodnoty už po analýze 105 sekvencí 16S rDNA ze vzorku. Pro dosažení stejné přesnosti bylo nutné z každé komunity analyzovat 15 000 anotovaných metagenomických sekvencí (což odpovídá asi 72 000 metagenomických čtení). To sice není nijak vysoké číslo, ale existence silného vztahu mezi fylogenetickým zařazením a přinejmenším jádrovou částí genomu bakterie je nesporná. Jde také o další nezávislý výsledek ukazující, že při charakterizaci mikrobiální komunity lze získat většinu informací analýzou přibližně 100 sekvencí.

Je tedy zřejmé, že sekvenací a fylogenetickým zařazením relativně malého počtu mikroorganismů můžeme získat informace o biogeochemických procesech i prostředí, v němž probíhají. To usnadňuje studium komplexnějších systémů, ve kterých je nutné pro pochopení jejich funkce znát biotu většího počtu stanovišť. Jedním z takových dosud komplexně neprozkoumaných prostředí, v němž navíc prokaryotické mikroorganismy zcela dominují, donedávna byla ložiska sulfidických rud a s nimi asociované podzemní vody. Rudní ekosystém je navíc díky své jednoduchosti a značné prozkoumanosti geologických a geochemických procesů dobrým modelem pro studie zkoumající vztah mezi mikroorganismy a prostředím.

4.3. Kyselé důlní vody

Za kyselé důlní vody (AMD - *acidic mine drainage*, resp. ARD - *acidic rock drainage*) se považují extrémně mineralizované roztoky vzniklé při zvětvávání sulfidických rud. Ve složení těchto roztoků typicky dominuje vysoký obsah síranů, dosahující od stovek miligramů až po první desítky gramů na litr, a srovnatelně vysoké obsahy iontů Fe^{2+} a Fe^{3+} . Nejvýznamnější zdroj této mineralizace představují snadno oxidovatelné minerály pyrit (FeS_2), arsenopyrit (FeAsS) a chalkopyrit (CuFeS_2). AMD kromě toho obsahují další kovy a polokovy podle charakteru ložiska (Cu, Zn, Mn, Pb, As, Cd, Hg aj.). Podstatnou složkou AMD jsou i látky uvolněné při jejich reakci s okolní horninou (rozpuštění uhličitanů, přeměna živců a slíd na jílové minerály), zejména jde o ionty Al^{3+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ a sloučeniny křemíku. Obecně platí, že okolní horniny pufrují kyselou reakci AMD, takže výsledné pH závisí nejen na obsahu pyritu, ale i na míře kontaktu AMD s nerudními minerály (Dopson et al. 2008). V extrémních případech může být nižší než 1 (Schrenk et al. 1998), v alumosilikátovém horninovém prostředí je však zpravidla utlumeno na hodnoty přibližně kolem 2,5 až 3 i vyšší (např. Falteisek a Čepička 2012; Falteisek et al. 2016; García-Moyano et al. 2012; Martyčák et al. 1993; Ziegler et al. 2009). V případě další alkalizace dojde při pH

nad cca 3,5 k hydrolyze Fe^{3+} , která působí proti změně pH, ale vede k segregaci železa a většiny těžkých kovů do pevné fáze (Michalková et al. 2013). Vody tímto způsobem ztrácejí charakter AMD a dochází i k velkým změnám jejich mikrobioty.

Zvětrávání sulfidů je mikrobiálně katalyzované a patří mezi tradiční modely pro výzkum interakcí mezi minerály a mikroorganismy. První popsaná chemoautotrofní bakterie schopná žít díky oxidaci krystalického minerálu jako jediného zdroje energie je *Acidithiobacillus ferrooxidans* (*Bacteria* (*Proteobacteria*): *Acidithiobacillia*) (Colmer a Hinkle 1947). Tento primát a relativně snadná kultivace zástupců rodu *Acidithiobacillus* způsobila, že tito byli dlouho považováni za jedinou či hlavní příčinu tvorby AMD a jejich role v environmentálních dějích byla až neuvěřitelně nadhodnocována (např. Golyshina a Timmis 2005). Další významný oxidátor pyritu, *Leptospirillum ferrooxidans* (*Bacteria*: *Nitrospirae*), byl objeven v 70. letech 20. století (Markosian 1972). Další výzkumy ukázaly, že podstatnou roli v oxidaci pyritu hrají archea ze skupiny *Thermoplasmatales* (Golyshina et al. 2000; Golyshina a Timmis 2005), a především rozlišily výrazně větší počet ekotypů mikroorganismů podílejících se na genezi AMD (Johnson 2012). Postupně byla rozpoznána také důležitost habitatů existujících v rámci toků AMD. Hlavním zdrojem energie tu je autotrofní oxidace železa. Produktem oxidace sulfidů železa je roztok obsahující převážně Fe^{2+} (Johnson 1998), v prostředí pórových roztoků a zvodnělých puklin navíc vzniká díky respirativním pochodům anoxie a dochází tu k další mikrobiální redukci Fe^{3+} . Vývěry AMD do prostředí, která jsou v kontaktu s volnou atmosférou (povrch, důlní chodby) proto představují významný habitat pro oxidátory Fe. Mikroorganismy na takovýchto stanovištích často vytvářejí masivní biofilmy obsahující značné množství polysacharidové mezibuněčné hmoty a tvořené nápadně jednoduchými komunitami obsahujícími v extrémně kyselých a mineralizovaných AMD zástupce rodu *Leptospirillum* a archea ze skupiny *Thermoplasmatales* (Bond et al. 2000; Deneff et al. 2010), nebo při hodnotách pH 2 – 3 a nižší mineralizaci kombinaci zástupců rodů *Acidithiobacillus* a *Ferroplasma* (*Bacteria*: *Betaproteobacteria*) (Hallberg et al. 2006, 2010; Johnson et al. 2014). Komunity obsahující *Ferroplasma* spp. mají podle studií založených převážně na metodě tRFLP pozoruhodně velkou stabilitu v čase a malou prostorovou proměnlivost (Kay et al. 2012). Za hlavní faktor udržující dominanci této bakterie lze považovat její schopnost vytvářet mezibuněčnou hmotu a tak kolonizovat tekoucí vody (Johnson et al. 2014).

Rostoucí počet mikroorganismů nalezených v AMD přirozeně vyvolal otázku, jaké jsou zákonitosti jejich distribuce a preference stanovišť v rámci ekosystému rudního ložiska. Většina studií se však zabývala především charakterizací konkrétních taxonů nebo popisem

celkové diverzity mikroorganismů bez důrazu na prostorové rozlišení (např. Golyshina et al. 2000; Hallberg et al. 2006, 2010, 2011; Heinzl et al. 2009; Johnson et al. 2001; Okabayashi et al. 2005; Tan et al. 2007; Xiao et al. 2009). Jen v některých případech rozlišovaly několik blízkých biotopů, například biofilm a okolní vodní sloupec nebo biofilm v různých staničeních v témže odvodňovacím kanálu (Rowe et al. 2007) nebo změny mikrobiálního osídlení stejných stanovišť v čase (García-Moyano et al. 2012; Tan et al. 2009). Tyto práce ovšem neobsahovaly informace dovolující ekologickou interpretaci hlubší, než je pouhý popis preferencí konkrétních izolátů konkrétních mikroorganismů. Přitom už Schrenk et al. (1998) prokázali pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace, že modelové druhy *Acidithiobacillus ferrooxidans* a *Leptospirillum ferrooxidans* mají výrazně nehomogenní distribuci mezi komunitami na různých typech stanovišť. Mimo jiné se v rozporu s rozšířeným přesvědčením ukázalo, že *A. ferrooxidans* na zkoumané lokalitě prakticky chybí na místech oxidace pyritu. Práce Kimury et al. (2011) srovnávající čtyři odlišné habitaty pomocí několika molekulárně-biologických metod ukázala, že složení mikrobiálních komunit na těchto stanovištích se nemusí prakticky vůbec překrývat.

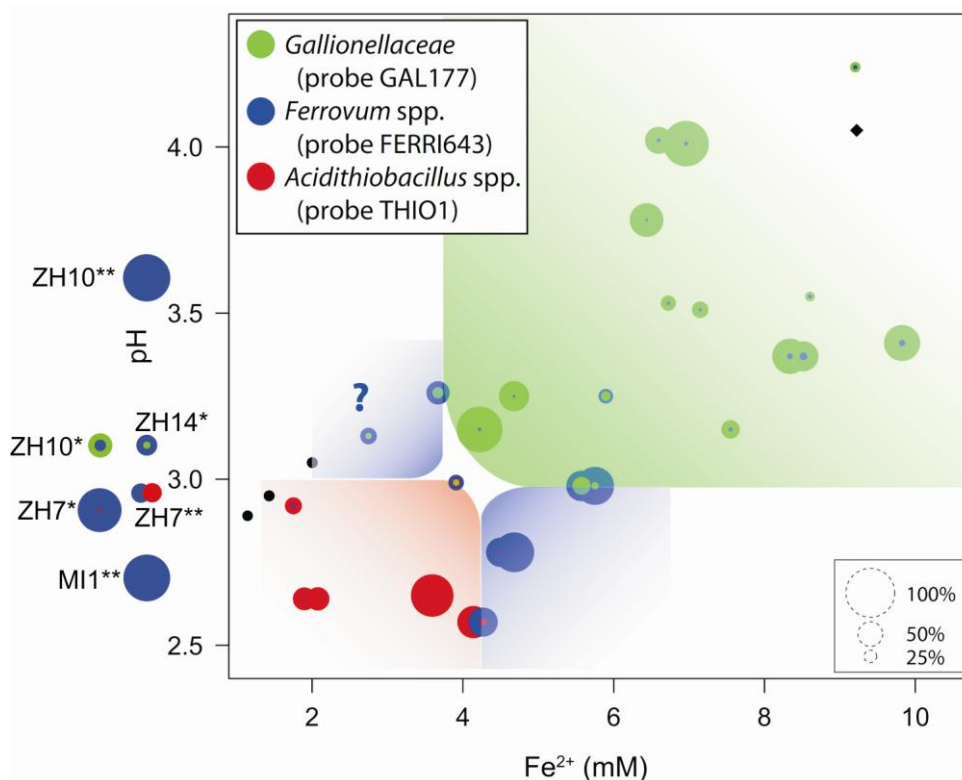
4.4. Beta diverzita mikroorganismů v rámci sulfidického ložiska

Ložisko Zlaté Hory v české části Slezska má několik vlastností, které z něj vytvářejí ideální model pro srovnávací výzkum mikrobiálních komunit. Hlavní výhodou je, že zde byla během těžby odhalena celá dokonale vyvinutá supergenní zonalita (Martyčák et al. 1993). Historická důlní díla blízko k povrchu zpřístupňují zcela vyloučenou zónu obsahující oxidované sekundární minerály železa i dalších kovů (gossan). Pod nimi se nachází spektrum různých zvětralých rudních těles a minimálně alterovaná oblast, která se až do 70. let 20. století nacházela místy více než 200 m pod erozní bází, a byla tudíž velmi dobře chráněna před oxidačními procesy. Rudní akumulace představuje vulkanosedimentární ložisko přibližně odpovídající typu Rosebery. Je tvořeno impregnacemi pyritu a rudních sulfidů v metamorfovaných sedimentech stáří devon, především v kvarcitech a metatufitech (Patočka a Vrba 1989). Díky impregnačnímu charakteru zde nejsou kyselé roztoky omezeny na rudní žíly, ale vznikají v pórovém prostředí v celém objemu horniny. Kontakt s ostatními složkami horniny též pufruje pH puklinových vod ve většině případů na hodnoty vyšší než 2,5 (Falteisek a Čepička 2012; Martyčák et al. 1993). Zdejší AMD se tedy liší od důlních vod hostících *Leptospirillum* spp. na ložiskách s extrémně vysokým obsahem pyritu (např. Iron Mountain v Kalifornii; Schrenk et al. 1998; Deneff et al. 2010) a představuje méně extrémní, avšak rozšířenější typ kyselých vod.

Části ložiska Zlaté Hory-jih (ZH-jih) a východ byly využity pro srovnávací studii 14 vzorků reprezentujících prostředí vzniku AMD, minerální i biogenní stalaktity na jejich vývěru z puklinového prostředí do důlních chodeb i pH neutrální vody a sekundární minerály v oblasti gossanu (Falteisek a Čepička 2012). Sekvence klonovaných amplikonů Sangerovou terminační metodou umožnila identifikovat z každého mikrohabitatu pouze několik desítek mikroorganismů. Ovšem i takový počet je dostatečný pro základní klasifikaci mikrobiálních komunit a pro detekci výrazných ekologických rozdílů a gradientů (Caporaso et al. 2012; Kuczynski et al. 2010). Již při zběžném pohledu na výsledky je patrné, že složení mikrobiálních komunit koreluje s typy geochemických procesů (obr. 2). Po charakterizaci nalezených sekvencí srovnáním se známými taxony i environmentálními klony byly nalezeny zřetelné zákonitosti v distribuci předpokládaných fyziologických vlastností mikroorganismů. To umožnilo odvodit i pravděpodobné biogeochemické procesy probíhající v jednotlivých oblastech ložiska.

Vzorky odebrané ve vyloužené zóně ložiska dosahovaly podle očekávání největší alfa diverzity. Zajímavý nálezný přineslo srovnání vzorků odebraných v komíně odvodňujícím část historických dobývek ložiska ZH-východ. Dva vzorky recentně vysrážených sekundárních minerálů obsahovaly rozdílná, ale funkčně zřejmě obdobná společenstva. Hostily aerobní i anaerobní oligotrofní mikroorganismy, přibližně třetinu klonů tvořili chemoautotrofní oxidátoři sloučenin železa, síry a dusíku. Nezanedbatelný podíl měly i bakterie z acidofilních či přinejmenším acidotolerantních skupin. Naproti tomu ve vzorku vody, která tekla přes tyto minerály, byly nalezeny zcela odlišné ekotypy bakterií. Šlo téměř výhradně o heterotrofní aeroby, z velké části blízce příbuzné známým oxidátorům uhlovodíků a rozpuštěných organických látek ve vodách a patřící mezi beta- a gamaproteobakterie (např. *Acinetobacter* spp., *Burkholderia cenocepacia* a *Achromobacter xylosoxidans*). Takovéto složení mikrobiálních společenstev nabízí zajímavé vysvětlení významu gossanu pro ekosystém AMD. Suspenzní mikroorganismy indikují, že v přítékající vodě dochází k intenzivní degradaci přítékajících organických sloučenin. Velký podíl oligotrofní a zejména autotrofní bakterií v pevné fázi, která podle chemických rozborů obsahovala jen malé množství substrátů pro autotrofní metabolismus, indikuje extrémní limitaci zdroji organického uhlíku. Lze předpokládat, že gossan působí jako bioreaktor zbavující přítékající vody stop organických látek. Existence historických důlních děl, která oblast gossanu provzdušňují a zcela jistě přispěla i ke zvětšení jeho mocnosti, tento děj ještě posiluje. Některé autotrofní mikroorganismy obývající AMD jsou extrémně citlivé na přítomnost organických sloučenin, například *Ferrovum myxofaciens* je inhibováno i přirozenými degradačními produkty agarů

v minerálním médiu, což zbrzdilo jeho laboratorní izolaci a popis o několik let (Johnson et al. 2014). Schopnost heterotrofů různými způsoby podporovat biogenní rozpouštění pyritu byla rozpoznána již dříve (Bacelar-Nicolau a Johnson 1999) a jejich nezbytnost pro udržení citlivých autotrofních společenstev je uznávaný fakt (Méndez-García et al. 2015), ale gossan podle našich znalostí dosud nebyl chápán jako bioreaktor upravující vlastnosti přitékajících vod. Pro potvrzení této hypotézy by pravděpodobně bylo nutné provést manipulační experimenty (např. přímé přivedení povrchové vody do zóny tvorby AMD), avšak je zřejmé, že studium ekosystému AMD v celé šíři může přinést dosud nečekané souvislosti ovlivňující tento intenzivně zkoumaný fenomén.



Obr. 3 Diferenciace nik v AMD mezi autotrofní bakterie oxidující Fe^{2+} . V pravé části výsledky práce Jones et al. (2015), v levé jsou přidány mikrobiální komunity studované v pracích Falteisek a Čepička (2012; *) a Falteisek et al. (2016; **). Zahrnuty jsou pouze komunity, u nichž bylo přesně změřeno pH (koncentrace Fe^{2+} nebyla stanovována) a vyskytovala se v nich některá z vybraných bakterií. Je patrné, že oblast pH tolerovaného rodem *Ferrovum* je větší a nejspíše spjitá.

Dalším nápadným typem habitatů, které byly v práci Falteisek a Čepička (2012) studovány, jsou biostalaktity rostoucí na vývěrech AMD z puklin do důlních chodeb. Nejpřekvapivější byl závěr, že tu v těsné blízkosti koexistují mikrobiální společenstva s odlišným a někdy vysloveně kontrastujícím složením. Sedm z osmi společenstev bylo dominováno známými autotrofy oxidujícími Fe^{2+} , avšak kromě známé kombinace *Ferrovum myxofaciens* a *Acidithiobacillus ferrivorans* byly objeveny komunity s kombinací *F.*

myxofaciens a *Gallionella* sp. V době této studie nebyla takováto kombinace autotrofů v AMD popsána. Z některých vývěřů se bohužel nepodařilo odebrat vzorky vody, které by umožnily zjistit, zda je kombinace autotrofů determinována složením vody. Bylo však vyloučeno, že by příčinou byl průtok, obsah rozpuštěného kyslíku, a zřejmě i pH. Novější studie Jonese a kol. (2015) analyzovala diferenciaci nik mezi stejnými organismy a za faktory určující složení komunity považuje kombinaci pH a koncentrace Fe^{2+} (obr. 3). Tento závěr však výzkum Zlatých Hor nepotvrzuje. Vzorky z ložiska ZH-jih dosahovaly pH přibližně 3, při kterém sice mohou podle citované práce hraničně koexistovat všechny tři bakterie, *A. ferrivorans* byl však v ZH pozorován v prostředích s nejvyšším, a nikoliv nízkým obsahem Fe, a *Gallionella* sp. naopak v nejméně mineralizovaných a relativně oxidovanějších vodách. Jones et al. (2015) uvádí opačný vztah. Za velmi nepravděpodobnou musíme považovat i jím uváděnou představu skoro disjunktních nik jednotlivých bakterií a z toho plynoucí nutnost existence dvou nepropojených oblastí výskytu *F. myxofaciens* (obr. 3).

Práce Falteiska a Čepičky (2012) též ukázala existenci biostalaktitů, které v okamžiku odběru postrádaly primární produkční systém. Vzorek ZH9 byl nalezen v sousedství acidofilního ZH8, morfologicky nápadně odpovídal stalaktitům s *F. myxofaciens*, avšak zcela postrádal známé autotrofy. Nejhojnější sekvence se shoduje s *Metallibacterium scheffleri* (*Bacteria: Gammaproteobacteria*), popsanou z prostředí biostalaktitů (Ziegler et al 2013), většina ostatních byly též patrně acidofilní či acidotolerantní heterotrofové, část sekvencí patřila jednobuněčným eukaryotům, jejich symbiontům a bakteriím z kandidátní skupiny *Dependentiae*. Tyto mikroorganismy žijí patrně symbiotickým či parazitickým způsobem v asociaci s jinými bakteriemi (Yeoh et al. 2016). Lze považovat za téměř jisté, že krápník vznikl činností zástupců rodu *Ferrovum*. Nejhojnější přítomný heterotrof *M. scheffleri* degraduje proteiny za vzniku alkalických produktů a není schopen metabolizovat sacharidy (Ziegler et al. 2013). Tím pádem není schopen rozložit čistě polysacharidovou kostru stalaktitu (Johnson et al. 2014), může ale usnadnit jeho kolonizaci neutrofilními bakteriemi. Příčina poklesu četnosti autotrofů zatím nebyla vysvětlena. Velmi pravděpodobně není příčinou poklesu přísunu roztoku Fe^{2+} , vzhledem k tomu, že čistě heterotrofní biostalaktity byly pozorovány i na místech s nezanedbatelným průtokem (Falteisek et al. 2016 a nepublikované výsledky). Náhodně nalezený čerstvě odpadlý gelovitý stalaktit (vzorek ZH4) obsahoval kromě *F. myxofaciens* i identický genotyp *Ralstonia pickettii*, *Acidobacteria* gen. sp., a dokonce obdobného zástupce jednobuněčných eukaryot jako ZH9. Jmenované organismy jsou z prostředí AMD známé (shrnuje Méndez-García et al. 2015) a je

pravděpodobné, že mohou fungovat i jako oportunní rozkladači odumřelých biostalaktitů. Nic nenasvědčuje existenci příčinné souvislosti mezi jejich výskytem a absencí autotrofie.

Samotná mikrobiální oxidace pyritu (a dalších sulfidů) probíhá v kyselém prostředí takzvaným nepřímým mechanismem, kdy bakterie a archea produkují ionty Fe^{3+} , které pak atakují pyrit už bez biogenní katalýzy (Rohwerder et al. 2003). Z tohoto důvodu jsou za potenciální oxidátory pyritu považovány prakticky všechny acidofilní auto- i heterotrofní mikroorganismy oxidující železo (Bacelar-Nicolau a Johnson 1999; Méndez-García et al. 2015) a většina autorů striktně nerozlišuje mikroflóru přítomnou při oxidaci pyritu a při dalších přeměnách AMD. Na ložisku ZH-jih byly odebrány vzorky z leptových jamek v kusu horniny obsahujícím pyrit a nacházejícím se mimo tekoucí vodu (ZH6) a voda vyvěrající z pukliny v oblasti rudního tělesa (ZH7a). Mikrobiální společenstva na povrchu horniny dotované pouze kondenzační vodou a aerosoly byla tvořena pouze typickými oxidátory pyritu *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans* a *Ferroplasma acidiphilum* (Archaea: Euryarcheota). Ve výtoku z pukliny byl hojný potenciální oxidátor pyritu *Acidiferrobacter thiooxidans* (Bacteria: Gammaproteobacteria) a nepopsané archeum blízké *F. acidiphilum*. Tyto organismy nebyly zaznamenány na žádném jiném stanovišti a s výjimkou jednoho záchytu *A. thiooxidans* nebyly detekovány ani při další výrazně podrobnější studii společenstev vývěrů AMD (Falteisek et al. 2016). Pravděpodobná příčina je odlišná environmentální selekce na zmíněných typech stanovišť, která se samotnou oxidací pyritu souvisí spíše nepřímo. Nápadná je striktní diferenciacie nik mezi blízkými příbuznými *Acidithiobacillus ferrooxidans* a *A. ferrivorans* v prostředí, kde lze předpokládat možnost setkání obou bakterií díky podobnosti prostředí i fyzické blízkosti stanovišť (žijí na různě zvodnělých místech v rámci jedné haldy suti). Tento jev je vysvětlitelný nižší tolerancí *A. ferrivorans* na vysokou aciditu a koncentraci toxických prvků, která vylučuje jeho výskyt na povrchu leptaného minerálu, a zároveň vyšší růstovou rychlostí, a tudíž patrně i vyšší konkurenceschopností této bakterie v méně limitujícím prostředí toků AMD (Hallberg et al. 2010). Je ovšem zajímavé, že tyto rozdíly, které se v laboratorních podmínkách projevují jen mírným posunem růstových optim, způsobují v přirozeném prostředí ostrou diferenciaci nik. Důsledkem je, že různé procesy jsou katalyzovány různými organismy dokonce i v případě, že jejich základní chemická podstata (vyjádřitelná např. jako sumární rovnice biogenního chemického procesu) je stejná. Není však pravděpodobné, že by *A. ferrooxidans* byl na kontakt s pyritem vázaný, spíše jde o kombinaci různých parametrů prostředí. Ve vysoce kyselých AMD bylo naopak prokázáno, že tento mikroorganismus obývá stanoviště mimo místa oxidace pyritu (Schrenk et al. 1998). Je patrné, že k pochopení funkce určité

mikrobiální komunity v takto komplexním systému nestačí znalost metabolických charakteristik jejích členů, pokud není zařazena do kontextu okolních komunit.

4.5. Problém mikrobiální hyperdiverzity

Rostoucí počet studií diverzity mikrobiálních komunit ukazuje, že v komplexně strukturovaných prostředích, jako jsou půdy, různé sedimenty a biofilmy ve vodních tocích, ale i střevní obsah nebo mořská voda, lze detekovat několik tisíc převážně vzácných genotypů prokaryotické 16S rDNA přibližně odpovídajících druhu v každém gramu materiálu (Caporaso et al. 2011; Nemergut et al. 2011). Podobný jev, tradičně označovaný jako paradox planktonu, byl ekologům studujícím mikroorganismy známý již v době před nástupem molekulární taxonomie (Hutchinson 1961). Tak vysoká alfa diverzita organismů nacházejících se na jedné či malém počtu trofických úrovní je obtížně vysvětlitelná vzhledem k tomu, že by mělo docházet ke kompetitivní exkluzi i náhodnému mizení druhů soutěžících o stejné zdroje. Většina obvyklých vysvětlení mikrobiální hyperdiverzity předpokládá, že studované substráty nejsou homogenní a skryté fyzikálně chemické gradienty umožňují diferenciaci ekologických nik (Nemergut et al. 2013). Alternativním vysvětlení je, že prostředí je tak proměnlivé v čase, že mikrobiální společenstva nedosáhnou rovnovážného složení, neboť různé organismy jsou v různých podmínkách různě konkurenčně zdatné. Navíc se v každém okamžiku může nezanedbatelná část společenstva nacházet v dormantním stavu (Cavender-Bares et al. 2009). Každopádně je nutné počítat s tím, že běžně zpracovávané vzorky mohou představovat homogenát prostředí, která jsou z pohledu mikroorganismů značně různorodá, a to, co považujeme za alfa diverzitu, je ve skutečnosti součet diverzit mnoha různých stanovišť, čili v tradičním názvosloví gama diverzita (Nemergut et al. 2011).

Další významný jev lze pozorovat, pokud porovnáme složení 16S rDNA genotypů ve více nezávisle odebraných vzorcích ze stejného typu prostředí. Počet společných OTU bude minimální bez ohledu na přesnou hodnotu sekvenční homologie použité pro determinaci OTU. Velikost tohoto překryvu navíc není výrazněji závislá na geografické vzdálenosti porovnávaných vzorků. Jediná patrná zákonitost je to, že mikroorganismus s vyšší četností v určitém vzorku bude s vyšší pravděpodobností přítomný i v jiném vzorku (Nemergut et al. 2011). Další metaanalýzy sekvenačních studií ukazují, že soběpodobnost mikrobiálních komunit je závislá na jejich geografické blízkosti pouze při vzdálenostech dosahujících maximálně desítek metrů. Při větších vzdálenostech je míra odlišnosti komunit na vzdálenosti prakticky nezávislá (Nemergut et al. 2013). Interpretace těchto pozorování není jednoznačná. Nemergut et al. (2011) se přiklání k výkladu, že jde o důsledek náhodné kolonizace každého

stanoviště. Hojnější mikroorganismy jsou hojněji zastoupeny i mezi migrujícími buňkami, takže se s větší pravděpodobností dostanou na nové stanoviště. Tato hypotéza počítá s tím, že složení mikrobiální komunity není determinováno pouze prostředím, ale i kolonizační historií a náhodným přežíváním taxonů, které na každé potenciální stanoviště přicházejí v nadbytku. Pro platnost tohoto modelu je zcela nezbytné, aby byl splněn předpoklad, že množství druhů či aspoň genotypů mikroorganismů schopných přebývat na libovolném stanovišti je mnohonásobně větší než počet genotypů, které tam přebývají. Klasická představa environmentální filtrace, podle které se mikroorganismy šíří tak účinně a homogenně, že se na každém stanovišti ustaví společenstvo nejlépe přizpůsobené lokálnímu prostředí, tedy musí být doplněna minimálně o vliv kolonizační historie (tj. pořadí, v němž organismy přicházely), omezeného šíření a náhodného vymírání taxonů (Nemergut et al. 2013).

Představa komplexního působení zmíněných jevů při tvorbě mikrobiálních komunit sama o sobě není nijak kontraintuitivní. Vzhledem k prokazatelně existujícímu množství bakteriálních a archeálních taxonů je těžko představitelné, že by model ideálního šíření všech byl fyzicky možný. Potenciálně zajímavé důsledky ovšem vyplynou z kombinace této teorie a výše zmíněného vysvětlení vysoké zdánlivé alfa diverzity bakterií. Jestliže zdánlivá mikrobiální komunita pozorovaná při použití klasických vzorkovacích metod je kompozitem velkého počtu mikrobiálních společenstev obývajících různé mikrohabitaty (dále ji budeme označovat „kompozitní komunita“), lze předpokládat, že jednotlivá mikrospolečenstva budou navzájem nejspíš velmi nepodobná, podobně jako jsou si nepodobné kompozitní komunity odebrané na různých místech. Pozorovaná disimilarita kompozitních komunit může být dokonce ještě snížena „průměrováním“ mnoha mikrostanovišť. V souladu s touto hypotézou bývá největší alfa i beta diverzita pozorována v sedimentech a podobných prostředích, ve kterých existuje heterogenní anorganická matrice a která jsou (v měřítku relevantním pro mikroorganismy) fyzicky nespojitá, takže tu může existovat mnoho stanovišť s individuální kolonizační historií (Lozupone a Knight 2007; Nemergut et al. 2013). Obdobně fyzicky nespojité, ale homogennější půdy dosahují též vysoké alfa diverzity, vykazují ale fylogenetickou underdisperzi přítomných prokaryot (Lozupone a Knight 2007).

Pokud předpokládáme vysokou odlišnost mikrokomunit, nabízí se otázka, jak vzniká odezva kompozitních komunit na environmentální gradienty. Podle empiricky dobře podložené představy (Faith et al. 2009; Ferrier et al. 2007; Kuczynski et al. 2010) se budou při postupné změně podmínek působících na kompozitní komunitu postupně nahrazovat jednotlivé druhy nebo evoluční linie jinými. Všechny úspěšné teorie pracují s postupným poklesem četnosti až vymizením druhu, když se prostředí vzdaluje od jeho optima. Jak ovšem

budou reagovat jednotlivé mikrokomunity? Je možné, že bude ve všech též graduálně klesat četnost určitých druhů a růst četnost jiných podobně jako v kompozitních komunitách, ale též je možné, že bude docházet k víceméně náhlému „přepínání“ z dominance určitých organismů na dominanci jiných nebo i k jiným jevům. Takovou možnost nelze vyloučit ani v případě faktorů působících na všechna mikrostanoviště stejně, např. teploty, nebo v případě zvodnělých prostředí pH či chemického složení pórového roztoku.

Je jasné, že pokud se reálné mikrobiální komunity chovají výrazně odlišně než ty kompozitní, může to mít důsledky pro naše chápání příčin mnoha jevů v ekologii prokaryot. Velikost předpokládaných mikrokomunit navzdory pokroku metod stále limituje jejich přímý výzkum, je ale možné se alespoň částečně v některých ohledech přiblížit jejich charakteru. Ideálním modelem pro výzkum je stanoviště, které je homogenní, fyzicky co nejspojitéjší a hostí pokud možno jednoduché společenstvo mikroorganismů. Další důležitá vlastnost modelového stanoviště je, že se vyskytuje v co největším počtu kopií, které jsou navzájem oddělené, ale dostatečně blízké, aby byl odůvodněný předpoklad, že jsou vystaveny stejným faktorům okolního prostředí a je mezi nimi možná migrace organismů. V takovém uspořádání by čistá environmentální selekce měla vést ke vzniku stejných komunit ve všech kopiích stanoviště. Naopak stochastická tvorba komunit by mohla vést ke vzniku značných odlišností. Pokud bychom měli k dispozici několik sad takových stanovišť, nacházejících se v mírně odlišných podmínkách, bylo by možné sledovat i to, jakým způsobem individuální komunity odpovídají na environmentální gradienty.

4.6. Vývěry AMD jako model neutrální variability mikrobiálních společenstev

Jedním z potenciálních modelů pro studium komunit blížících se ideálním mikrokomunitám by mohly být biogenní stalaktity rostoucí na vývěrech AMD. Různé studie ukázaly, že obsahují druhově chudé mikrobiální komunity (Hallberg et al. 2006; Kimura et al. 2011; Falteisek a Čepička 2012). Mikrobiální společenstva v rámci stalaktitu jsou navíc vystavena homogenizujícímu účinku tekoucí vody a měřením iontově selektivními mikroelektrodami se podařilo zjistit, že prostředí v rámci stalaktitu se mění pouze směrem od povrchu do středu, ale podél dlouhé osy útvaru je značně homogenní (Ziegler et al. 2009, 2013). Proto s velkou pravděpodobností nebudou stalaktity obsahovat různé komunity specifické pro jednotlivé úseky nebo jiné typy výrazné beta diverzity. Studie Falteiska a Čepičky (2012) ukázala, že biostalaktity mohou obsahovat navzájem dost odlišné mikrobiální komunity. Navíc velmi často rostou v početných skupinách na jednom místě, často na jediném vývěru vody. Tyto vlastnosti dávají určitou naději, že by biostalaktity mohly představovat ukázkou navrhovaného

modelu pro studium jednoduchých mikrobiálních komunit. Proto byla navržena studie k ověření neutrální variability mikrobiálních komunit z důlních biostalaktitů.

Na lokalitě ZH-jih se podařilo vytipovat skupinu více než 20 biostalaktitů rostoucích v řadě podél jedné hydraulicky propustné pukliny ve stropě důlní chodby. Z pukliny v celé délce prosakovala AMD a stalaktity vznikly na místech, kde se díky tvaru skály odtrhávaly kapky. Tím pádem bylo možné věřit, že jsou všechny krápníky napájené vodou ze stejného zdroje. Vzdálenosti mezi sousedními stalaktity činily pouze několik centimetrů. Z této skupiny byly odebrány vzorky 21 stalaktitů. Dále bylo odebráno 20 stalaktitů z jiné skupiny, kde vinou železité kůry na stropě nebylo možné tak jednoznačně vystopovat zdroj vody, ale nacházely se v podobně těsném uspořádání jako předchozí skupina. Další jednotlivé vzorky (6 ks) byly odebrány ze Zlatých Hor a tří dalších dolů (Falteisek et al. 2016).

Cílem studie bylo ověřit hypotézu, že jednotlivé stalaktity rostoucí ve stejném prostředí v těsné blízkosti mohou obsahovat výrazně odlišné mikrobiální komunity, v nichž jsou stejné funkční role (gildy) obsazeny různými organismy. Pokud se tento základní předpoklad potvrdí, další cíl je srovnat složení komunit z různých lokalit a zjistit, do jaké míry je množina alternujících se bakterií a archeí omezena na konkrétní místo. Základní předpoklad je, že různé lokality se budou vždy environmentálně lišit víc než sousedící stalaktity na jedné z nich. V tomto případě lze očekávat dva možné typy distribuce organismů. Podle prvního si budou komunity z každého odběrového místa podobnější navzájem než komunitám z jiných míst. Hojně genotypy budou na lokalitě sdíleny všemi nebo skoro všemi vzorky a genotypy dominující jednotlivým společenstvům na jedné lokalitě mohou být přítomny na ostatních lokalitách, ale pravděpodobně s menší četností. Speciální případ distribuce typu 1 je situace, kdy jeden organismus dominuje na všech lokalitách. Takový výsledek by znamenal, že byly vybrány příliš podobné lokality, které pro řešení popsané otázky nejsou vhodné. Při druhém typu distribuce se určité genotypy (resp. potenciální druhy) budou vyskytovat v některých komunitách na více lokalitách a zároveň na žádné nebudou ve všech komunitách. To by mělo platit i pro nejhojnější organismy, které budou dominovat některým komunitám na různých lokalitách, ale každé z nich se bude v roli nejhojnějšího mikroorganismu střídát větší počet různých potenciálních druhů. Pokud na takové komunity aplikujeme klastrovací analýzu, budou podpořeny klastry, které neodpovídají lokalitám (ani jiné zjevně proměnné). V ideálním případě ze složení jedné mikrobiální komunity ani nebude možné poznat, ze které lokality pochází.

Odebrané vzorky byly předběžně charakterizovány pomocí tRFLP (*terminal restriction fragment length polymorphism*), které potvrdilo, že komunity mají poměrně

značnou variabilitu. Z 58 vzorků (počet včetně replikátů z některých stalaktitů) bylo vybráno 34 pro pyrosekvenaci. Vinou značně nerovnoměrné distribuce sekvencí mezi těmito vzorky (což je známý neduh 454 pyrosekvenace; P. Baldrian, osobní sdělení) bylo pouze 24 vzorků hodnotitelných. Porovnání komunit na základě fylogenetické disimilarity ukázalo existenci pěti statisticky podložených klastrů komunit, z nichž čtyři obsahovaly vzorky z více lokalit. Většina klastrů měla jako nejhojnější organismy různé autotrofní oxidátory železa (resp. genotypy 16S rDNA téměř identické s popsányi chemolitotrofními bakteriemi). Na pozici nejhojnějších OTU se nejčastěji objevila dvojice *Acidithiobacillus ferrivorans* a *Ferrovum myxofaciens*, tyto bakterie však byly ve dvou případech přečísleny autotrofem *Acidiferrobacter thiooxidans*, resp. heterotrofním *Metallibacterium scheffleri*. Dalším komunitám výrazně dominovalo samotné *F. myxofaciens* (až 97 % sekvencí) a jeden klaster (jediný omezený na jedinou lokalitu ZH-B) měl v roli pravděpodobného primárního producenta *Gallionella capsiferriformans* a blízkce příbuznou *Sideroxidans litotrophicus* (*Bacteria: Betaproteobacteria*). Jedna skupina vzorků se od ostatních lišila absencí nebo malým podílem autotrofů a převahou různých kombinací heterotrofních proteobakterií (*Acidocella*, *Acidiphilium*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Metallibacterium* aj.).

Celkově byla prokázána značná alternace mikroorganismů v roli pravděpodobných primárních producentů i konzumentů (genotypy blízké známým heterotrofům), a to i v přímo sousedících stalaktitech. Většina hojných mikroorganismů současně žila na několika různých lokalitách, takže důvodem jejich alternace v rámci jednoho vývěru zřejmě nebyla extrémně úzká ekologická valence. Popsané výsledky tedy odpovídají distribuci typu 2.

Při analýze jednotlivých 97% OTU byla vyloučena statisticky významná asociace drtivé většiny z nich s konkrétními lokalitami (s výjimkou stoprocentní asociace betaproteobakterie *Thiobacillus aquaesulis* a pH neutrálního vývěru BN tvořícího pozitivní kontrolu pro tento test). Komunity s vysokou dominancí *F. myxofaciens* byly omezeny na stalaktity s vyšším průtokem, avšak celkově i v rámci jedné lokality (ZH-A) patřily komunity se zvýšeným průtokem k různým typům, přičemž ne ve všech bylo *F. myxofaciens* zastoupeno. Průtok u různých komunit s *F. myxofaciens* se navíc lišil až řádově, pouze platilo, že nikdy nebyl blízký nule. Vyšší průtok je tedy zřejmě podmínkou vysoké dominance *F. myxofaciens* (jeho silná produkce extracelulární hmoty se zdá být dobrou adaptací na taková stanoviště), avšak ani v tomto prostředí není složení komunit uniformní nebo předvídatelné. Není bez zajímavosti, že převaha této bakterie není stálá v čase. Ve vývěru ZH10 při odběru v roce 2009 převažovala *Gallionella* sp. (Falteisek a Čepička 2012) a v roce 2012 tu byla pozorována extrémní dominance *F. myxofaciens*. Při druhém odběru byl zaznamenán

podobný průtok a dokonce vyšší pH (3,6 vs. 3,1) a nižší konduktivita (1,9 vs. 2,3 mS/cm) než při prvním, podmínky se tedy posunuly spíše k optimu pro mizející acidotolerantní zástupce rodu *Gallionella* (Jones et al. 2015). Ve vzorku ZH7 byl současně zaznamenán relativní pokles četnosti *F. myxofaciens*, což snižuje pravděpodobnost, že jde o zkreslení vinou použití různých metod. Přesto je nutné tento dílčí závěr brát s rezervou, je jasné, že srovnání datasetů obsahujících o řád odlišné počty sekvencí je zatíženo větší chybou. Dlouhodobé sledování nárůstů (*streamers*) v rychleji tekoucích AMD naopak naznačuje mimořádnou stálost společenstev s *F. myxofaciens* (Kay et al. 2012).

Popsané výsledky jsou v rozporu s výše citovaným faktem, podloženým mnoha studiemi, že složení mikrobiálních komunit citlivě reflektuje prostředí a pomocí jejich srovnání lze detekovat i málo strmé environmentální gradienty. Jedna z možných hypotéz je, že kompozitní komunity odrážejí charakter prostředí přesněji, protože vznikají průměrováním velkého počtu mikrokomunit. Tím je potlačena neutrální či jiná variabilita mikrokomunit a naopak dojde ke zvýraznění nenápadných, ale konzistentních trendů. V nejsilnější verzi této hypotézy je spojitý růst podílu určité bakterie v kompozitní komunitě při změně prostředí způsoben postupným přibýváním mikrokomunit, kde tato bakterie dominuje, a ubýváním těch, kde je vzácná či chybí. Tato verze je zatím čistě hypotetická, ale mírnější verzi, tedy že specifický charakter každého stanoviště je zvýrazněn průměrováním individuálních komunit, lze částečně testovat na zkoumaném datasetu. Za tímto účelem byly vytvořeny umělé komunity tvořené součtem četností OTU z pouhých tří (v jednom případě dvou) náhodně zvolených stalaktitů ze skupin ZH-A a ZH-B. Přitom bylo pochopitelně vyloučeno opakované použití téže komunity. Takto bylo výrazně posíleno klastrování umělých kompozitních komunit podle lokalit. Dataset bohužel neobsahuje dostatečný počet komunit pro statisticky zcela průkazné ověření, že s rostoucím počtem sloučených společenstev roste vliv lokality, avšak jde minimálně o naznačení směru dalšího výzkumu.

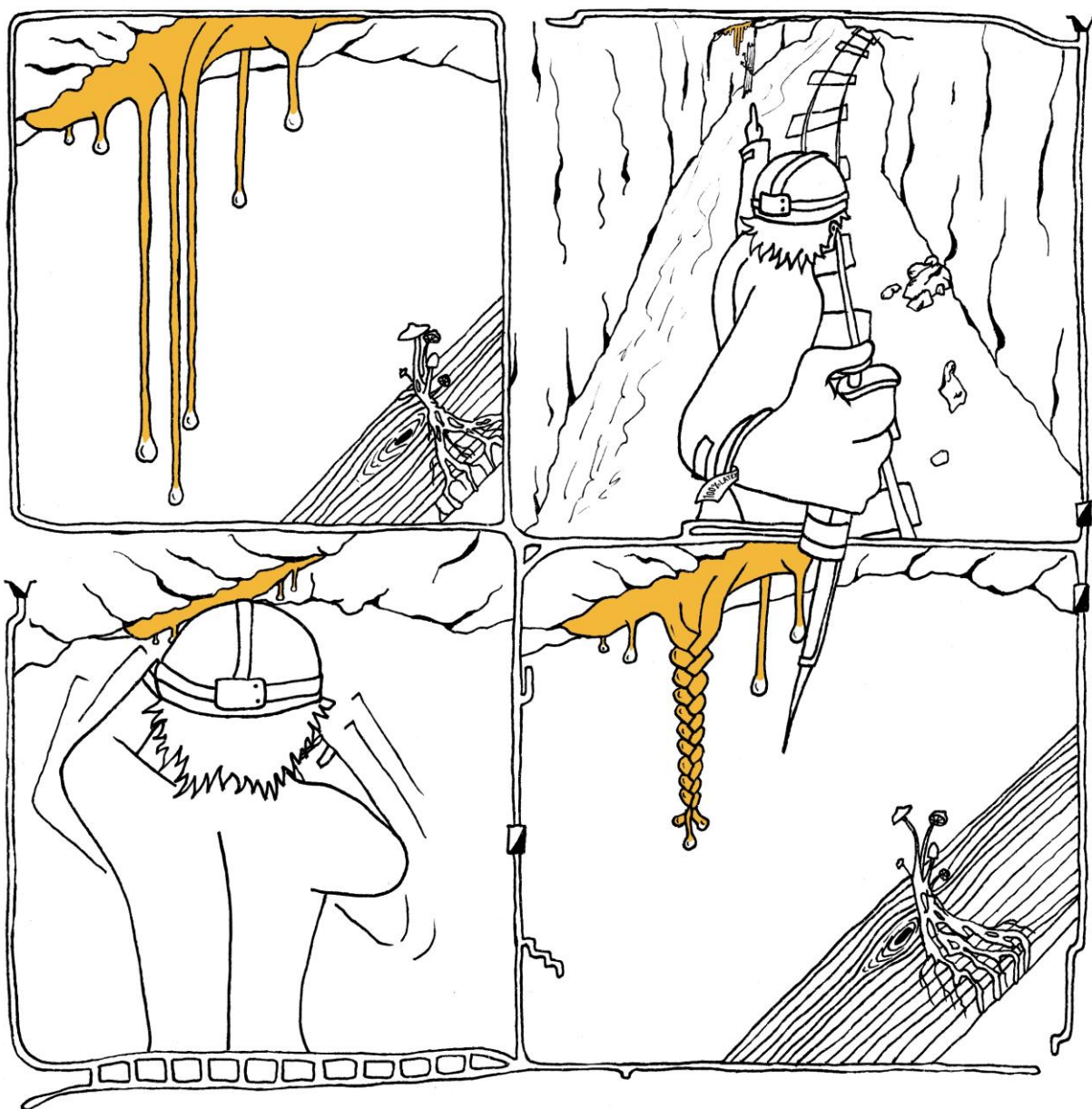
Tyto výsledky je nutné jako celek považovat za předběžné. Kromě zvýšení počtu vzorků a využití účinnějších sekvenčních postupů bude třeba výrazně propracovat charakterizaci jednotlivých stalaktitů. Stále není zcela vyloučená možnost existence environmentálních rozdílů mezi sousedícími stalaktity, byť to rozhodně není nejvíce parsimonní vysvětlení pozorované distribuce mikroorganismů. Nepotvrzují ho ani další experimenty. Nově získané výsledky ukazují, že při opakované regeneraci poškozeného biofilmu (tepelně nebo chemicky) na sulfidickém vývěru vznikají komunity dominované různými bakteriemi, přičemž všechny katalyzují stejný proces, autotrofní oxidaci sirovodíku. Všechny vzorky byly v tomto případě odebírány na identickém místě (biofilm na přelivové

hraně šikmého vrtu v boku štolu) a měření prakticky vylučují vysvětlení změnou chemismu vody, teploty nebo průtoku. Komunita na sousedním vývěru, který byl chráněn před disturbancemi, měla ve stejném období velmi konstantní složení včetně kvantity mikroorganismů (L. Falteisek, nepublikováno).

Představa, že mikrobiální společenstva obsahují skrytou diverzitu, nepozorovanou pomocí běžných makroskopických vzorkovacích metod, samozřejmě není nová (Nemergut et al. 2013). Různé práce ukazují, že i v homogenním prostředí mohou být mikrokomunity tvořené různými organismy, v některých případech dokonce fyziologicky odlišnými populacemi, které jsou si geneticky tak blízké, že je rutinní DNA barcoding ani neodliší (např. Denev et al. 2010). Důležité je, že tyto mikronehomogenity jsou udržovány čistě biotickými procesy. Stochastický vliv kolonizační historie byl pozorován již i při *de novo* kolonizaci nově odhalené půdy (Schmidt et al. 2014). Přesto je přínosné studovat tvorbu a dynamiku struktury jednoduchých mikrobiálních komunit v co nejlépe kontrolovatelných přírodních podmínkách. Jedině takto můžeme propojit složení komunity s kvalitativními i kvantitativními rysy její činnosti a přitom se vyhnout artefaktům kultivační mikrobiologie. Fundamentální otázka, zda přesné složení mikrobiálního společenstva má vliv na průběh biogeochemických dějů, anebo zda můžeme mikroorganismy redukovat na univerzální katalyzátor, který na každém stanovišti předvídatelně přeměňuje přítomné látky na termodynamicky nejstabilnější produkty, je stále otevřená. Její zodpovězení je významné pro pochopení některých rysů funkce celých ekosystémů.

Pokud by bylo potvrzeno, že hyperdiverzita mikroorganismů je neutrální vůči funkci komunit, znamenalo by to mimo jiné definitivní konec názoru, že lze ovlivňovat environmentální procesy tím, že budeme dodávat do prostředí vybrané organismy. Tato doktrína je v praxi stále uplatňovaná a pravděpodobně představuje důležitý faktor zpomalující rozvoj environmentálních biotechnologií v posledních desetiletích. A naopak, pokud by se ukázalo, že existují mikroorganismy schopné ovlivnit účinnost či výsledek procesu například tím, že změní strukturu či nosnou kapacitu prostředí, byla by to cesta k mnohem cílenějšímu ovlivňování environmentálních dějů. Ilustračním příkladem mikroorganismu potenciálně schopného měnit účinnost procesu může být mnohokrát zmiňované *F. myxofaciens*. To díky masivní mezibuněčné hmotě zvyšuje množství biomasy, která je v kontaktu s tekoucí vodou, a prodlužuje dráhu, na níž voda s mikroorganismy (a to nejen s *Ferrovum*, Hallberg et al. 2006; Kay et al. 2012 aj.) může interagovat. Cílené ovlivnění prostředí tak, aby v něm bylo *F. myxofaciens* konkurenčně nejzdatnějším organismem, by tedy mohlo např. zvýšit účinnost oxidativního čištění výtoků AMD. Systematický výzkum testující tuto možnost však zatím

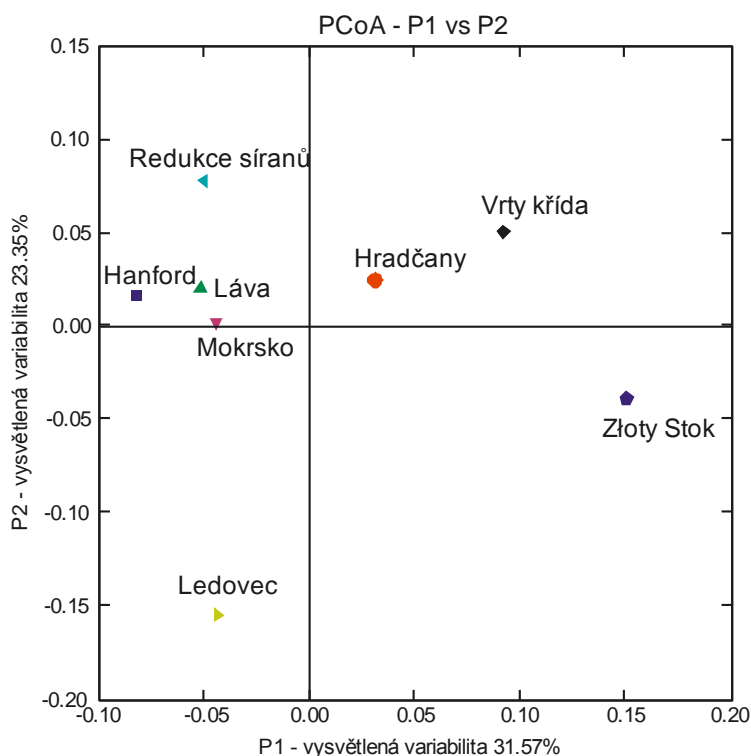
neproběhl, známy jsou pouze víceméně nechtěné pokusy na čisticích stanicích důlních vod (Heinzel et al. 2009).



4.7. Mikrobiální srážení realgaru

Sloučeniny arzenu se v podzemních vodách se vyskytují na mnoha světových lokalitách a vzhledem ke své toxicitě jsou předmětem intenzivního výzkumu (Nordstrom 2002). K jejich mobilizaci dochází často při zvětrávání primárních rud i při mikrobiálním reduktivním rozpouštění oxohydroxidů železa a dalších fází nabohacených As díky jeho sorpci (Hudson-Edwards a Santini 2013). Arzen je pro bakterie a archea obecně toxický, kromě toho ovšem může v podobě arseničnanu sloužit v mikrobiálním energetickém metabolismu jako terminální akceptor elektronů, arsenitan může být donorem elektronů pro chemolitotrofní metabolismus. Některé mikroorganismy dokonce mohou růst s arsenitanem jako jediným donorem elektronů (Cai et al. 2009). V prostředích obývaných mikroorganismy je tedy forma výskytu arzenu silně ovlivněná biologickými procesy.

V oblasti Mokrska ve Středních Čechách existuje přirozená arsenová anomálie v půdě, sedimentech i mělkých podzemních vodách, která souvisí se zdejším ložiskem zlatých rud obsahujících arsenopyrit (Drahota et al. 2009). Při odběrech vzorků na této lokalitě byly v půdě a sedimentech v hloubce prvních desítek centimetrů nalezeny akumulace žlutě zbarvené hmoty, která byla identifikována jako sulfidický minerál realgar (As_4S_4 ; Drahota et al. 2013). Minerál pokrýval i prostupoval pohřbené úlomky dřeva a rostlinnou masu včetně odumřelých kořenů rostlin recentně rostoucích na lokalitě. Tato distribuce svědčí o recentní tvorbě realgaru v půdě zcela mimo dosah hydrotermálních roztoků nebo jiných hypogenních vlivů. Jde o vůbec první detekci makroskopických množství realgaru vzniklých mimo hydrotermální prostředí. Předchozí studie našly realgar v mělkém redukčním prostředí v asociaci s organickou hmotou pouze na dvou lokalitách. V obou případech tvořil mikroskopické akumulace, které bylo možné detekovat jedině pomocí synchrotronové rentgenové absorpční spektroskopie (XAS; O'Day et al. 2004; Langner et al. 2013). Autoři těchto studií předpokládali, že realgar vzniká díky mikrobiální redukci síry v anoxickém prostředí chudém na rozpustné sloučeniny železa. Mikrobiologické analýzy však neprováděli. Další podrobný výzkum se zabýval vznikem biogenních sulfidů arzenu v laboratoři. Z hypersalinních jezer v Chile se podařilo získat směsné kultury srážející pravděpodobně pararealgar (As_4S_4) a z těchto konsorcií byly izolovány dokonce dvě čisté kultury schopné srážet amorfní sulfid se složením zhruba odpovídajícím auripigmentu (As_2S_3). V precipitátech z inkubačních pokusů byla prokázána deplece izotopu ^{34}S , která odpovídá enzymatické redukci síry. Stejný izotopový podpis byl prokázán i u sulfidu arzenu (podle složení patrně auripigmentu) nacházejícího se v sedimentech solných plání (Demergasso et al. 2007).



Obr. 4 Výsledek srovnání mikrobiální komunity z Mokrska s referenčními komunitami z prostředí mělkých podzemních vod.

Referenční komunity: Redukce síranů - sediment kontaminovaný uhlovodíky, síran je jediný akceptor elektronů (Winderl et al. 2008); Hanford - podzemní akvifer na rozhraní aerobní a anaerobní zóny (Lin et al. 2012); Černuc - sediment z vrtů v geochemicky pestrém akviferu obsahujícím As a sírany (L. Falteisek, nepublikováno); Hradčany - akvifer kontaminovaný uhlovodíky, probíhá aerace (Kabelitz et al. 2009); Złoty Stok - částečně aerobní biofilm z vody bohaté na As a metan (Drewniak et al. 2012); Láva - extrémně oligotrofní biofilmy ze stěn lávových tunelů (Northup et al. 2011); Ledovec - recentně odhalená půda pod ledovcem, převážně fototrofní (Nemergut et al. 2007).

Na základě těchto informací byla formulována hypotéza, že realgar v Mokrsku je produktem mikrobiální redukce arzeničnanu a síranu v anoxické podzemní vodě chudé na Fe^{2+} (Drahota et al. 2013). Nízký obsah železa je zde způsoben minerálním složením podloží, které obsahuje jen malé množství pyritu a dalších sulfidů představujících potenciální zdroj železa, a také redukčním prostředím, které vedlo k reduktivní solubilizaci většiny snadno rozpustných minerálů železa v místech srážení realgaru. Vzorky odebrané pro mikrobiologický výzkum představoval regolit velmi chudý na organický uhlík (0,14 hmot. %) a poněkud bohatší sediment (1,4 hmot. %). Oba vzorky obsahovaly špatně rozpustné oxidické minerály obsahující železo a arsen, v sedimentu byl přítomen realgar. Sekvence přibližně 50 klonů 16S rDNA z každého vzorku odhalila velmi diverzifikované mikrobiální komunity (95 OTU při 101 sekvencích). Charakterizace mikroorganismů srovnáním s nejbližšími známými environmentálními sekvencemi odhalila směs aerobních a anaerobních bakterií (vzácně archeí)

většinou adaptovaných na oligotrofní prostředí limitované zdrojem uhlíku. Některé organismy patřily do autotrofních skupin. Analýza fylogenetické disimilarity ukázala, že mezi komunitou ze sedimentu a regolitu není signifikantní rozdíl, ačkoliv nesdílely žádnou OTU. Pro otestování signifikance ekologického zařazení byla komunita srovnána se sadou vybraných komunit z podzemních akviferů a horninového prostředí. Tyto komunity reprezentují prostředí s různě zastoupenou anaerobicitou, respirací síranů, oligotrofií a s různým obsahem arzenu. Komunita z Mokrska jednoznačně vytvářela klastr s oligotrofními společenstvy z redoxně proměnlivých lokalit, neklastovala ani s převážně methylotrófní komunitou z důlních vod silně kontaminovaných As ani s částečně anaerobní, ale nikoliv uhlíkem limitovanou komunitou z arzenem kontaminovaného akviferu stáří cenoman z České křídové pánve (obr. 4). Tento závěr je konzistentní s poznatkem, že rezistence k As je snadno přenosná horizontálním přenosem genů (Villegas-Torres et al. 2011). Navzdory rozsáhlým pokusům se nepodařilo detekovat gen pro běžnou detoxikační reduktázu arzeničnanů *arsC*. Možný důvod je, že v Mokrsku je většina arzenu ve formě arsenitanu díky respirativní redukcí, a převažuje tu tím pádem jiná detoxikační dráha nevyžadující redukcí.

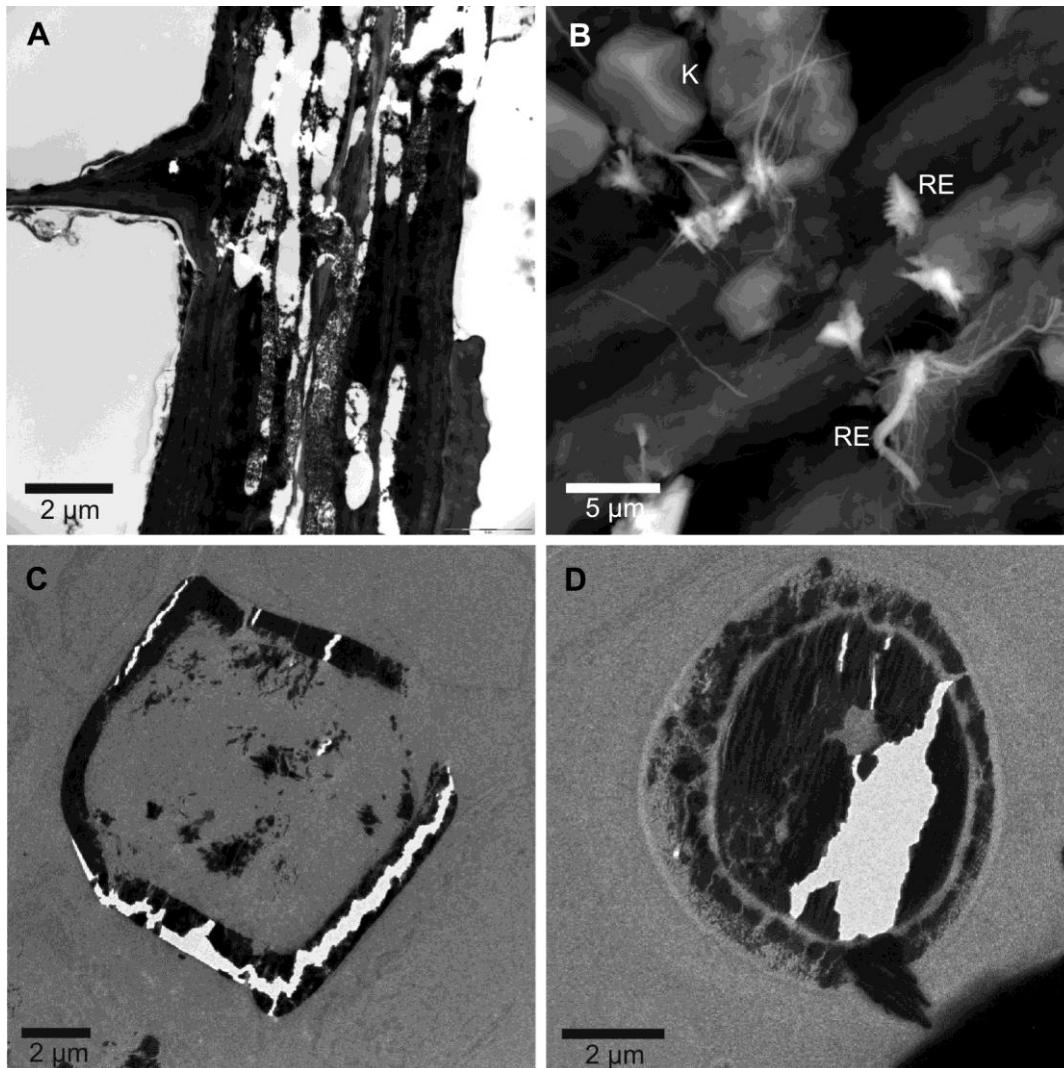
Mikrobiální komunita z regolitu ani sedimentu tedy nebyla nejbližší společenstvům využívajícím redukcí síranů jako hlavní typ respirativního metabolismu. Pro bližší charakterizaci metabolismu byly ze stejných vzorků následně sekvenovány geny pro respirativní reduktázu síranů (*dsrB*) a arzeničnanů (*arrA*) a pro autotrofní oxidázu arzenitanu (*aioA*). Všechny tři geny byly detekovány v obou vzorcích. Fylogenetická diverzita těchto genů, která samozřejmě nemusí odpovídat diverzitě bakterií, kterým zmíněné geny patřily, byla výrazně nižší než diverzita 16S rDNA. Každý gen byl podle očekávání přiřazen k jiným skupinám bakterií. V případě genu *arrA* patřila většina sekvencí k neidentifikované skupině, jejíž zástupci byli předtím detekováni pouze jednou z methylotrófních biofilmů ve zlato-arzenovém dole ve Zlatém Stoku (Drewniak et al. 2012). Všechny klony genu *aioA* byly odvozeny od alfa a beta proteobakterií. Nejvyšší diverzitu vykazoval gen *dsrB*, u kterého byla také jako u jediného prokázána signifikantní fylogenetická odlišnost vzorků sedimentu a regolitu. V sedimentu byly zdrojem *dsrB* především *Desulfobacteria* a *Firmicutes*, v regolitu *Syntrophobacterales* a hlavně neidentifikované skupiny, které se od všech jmenovaných jednoznačně lišily. Nejjednodušší interpretace tohoto stavu je, že v obou vzorcích probíhá redukce síranu ve výrazně odlišných mikroprostředích.

Molekulární determinace mikroroganismů a jejich genů tedy nevylučuje, že ve zkoumaném prostředí probíhají reakce generující prekurzory realgaru. Mikrobiální redukce síry v realgaru byla potvrzena i rozbořem izotopového složení (P. Drahot, osobní sdělení).

Žádné vzorky půdní vody však nebyly vůči realgaru nasycené a naměřené Eh bylo výrazně mimo pole stability tohoto minerálu. Tento závěr je konzistentní s charakterem mikrobiální komunity, která odpovídala směsi různých a zřejmě kontrastujících prostředí. Detekované bakterie patřily do skupin s navzájem neslučitelnými nároky, byly auto- i heterotrofní, aerobní i striktně anaerobní. Vzhledem k sekvenaci jen 101 klonů ze vzorků, v nichž lze očekávat přítomnost několika tisíc OTU i druhů, je pravděpodobné, že byly zachyceny spíše hojně a aktivní organismy než dormantní stádia. Vysvětlení všech ekologicky disjunktních OTU pomocí dormance je extrémně nepravděpodobné. O současné přítomnosti autotrofní oxidace i heterotrofní redukce arzenu svědčí i detekce genů *arrA* a *aioA*. Velká variabilita stanovišť i mikrobiálních komunit v prostředích typu sedimentů je známý fenomén (Nemergut et al. 2013). Je pravděpodobné, že v Mokrsku v sedimentu i okolní půdě a zvětralině existují mikrodomény extrémně redukčního prostředí v těsném okolí částic rostlinné hmoty a dřeva. V těchto místech probíhá respirace síranu jako jediného dostupného akceptoru elektronů a pravděpodobně tu je v prostředí o objemu řádově milimetrů krychlových překročena mez nasycení roztoku vůči realgaru. V takto malém objemu nebylo možné použitými metodami měřit parametry roztoku. Těsná asociace realgaru s organickou hmotou pozorovaná v Mokrsku i na dalších výskytech (Langner et al. 2013) tomuto scénáři odpovídá. Mikroskopické pozorování inkrustovaného dřeva nasvědčuje ohniskovité distribuci realgaru i v rámci jedné dřevní částice (obr. 5). Zviditelnění samotných oblastí redukce síranů se zatím nepodařilo. Recentní výsledky však potvrzují tuto hypotézu, sice nepřímou, ale konzistentně z několika různých úhlů pohledu (P. Drahotka, L. Falteisek, nepublikováno).

Pokud bychom měli zobecnit výsledky výzkumu biogenního srážení realgaru, tak z pohledu environmentální mikrobiologie jde v první řadě o ukázkou situace, kdy běžný jev, tedy mikroheterogenita prostředí a vysoká fylogenetická i funkční diverzita mikrobiálních komunit v malém objemu, vede ke zcela mimořádnému důsledku. Je velmi nepravděpodobné, že by v Mokrsku žila neobvyklá bakterie podmiňující zvláštní biomineralizaci na této lokalitě. Též pokud by docházelo k redukci síranu homogenně v celém objemu sedimentu, lze očekávat, že by se zde realgar nesrážel. Mikrodiverzita a kompozitní charakter mikrobiálních komunit tedy nemá důsledky pouze pro teoretické chápání interakcí mezi mikroorganismy, ale může vést k segregaci některých prvků do pevné fáze, a tedy k ovlivnění celého makroskopického systému i k environmentálně významným důsledkům. Struktura prostředí a prostorová distribuce mikrohabitátů by tedy měla být považována za podstatný prvek ovlivňující biogeochemické procesy. Je možné, že díky budoucímu výzkumu se při analýzách

mikrobiálních procesů stane ze struktury prostředí faktor rovnocenný chemismu vody nebo fylogenetické disimilaritě mikrobiálních komunit.



Obr. 5 Mikrostruktury asociované s biogenním srážením realgaru: A Buněčná stěna rozkládajícího se dřeva s kavernami patrně vytvořenými činností mikroorganismů (TEM, kontrast $\text{UO}_2(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ a $\text{Pb}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2$). B Minerály vysrážené na povrchu dřevní částice v inkubačním experimentu (SEM, identifikace minerálů EDS): K - kalcit, RE - realgar, označen je kostrovitě vyvinutý krystal a vláknitá mikrokystalická hmota patrně vzniklá jako membrána na rozhraní dvou různých roztoků. C, D Realgarem inkrustovaná stěna jedné buňky a stěna a průsvit cévy v dřevní hmotě, která v okolí realgar neobsahuje (TEM, bez kontrastování, identifikace minerálů EDS a SAED). Snímky C, D foto Petr Drahota.

5. LITERATURA

Bacelar-Nicolau P, Johnson DB (1999). Leaching of pyrite by acidophilic heterotrophic iron-oxidizing bacteria in pure and mixed cultures. *Appl. Env. Microbiol.* 65, 585-590.

Bond PL, Smriga SP, Banfield JF (2000). Phylogeny of microorganisms populating a thick, subaerial, predominantly lithotrophic biofilm at an extreme acid mine drainage site. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3842-49.

Brown CT, Hug LA, Thomas BC, Sharon I, Castelle CJ, Singh A, Wilkins MJ, Wrighton KC, Williams KH, Banfield JF (2015). Unusual biology across a group comprising more than 15% of domain Bacteria. *Nature* 523, 208-211.

Cadillo-Quiroz H, Didelot X, Held NL, Herrera A, Darling A, Reno ML, Krause DJ, Whitaker R (2012). Patterns of gene flow define species of thermophilic *Archaea*. *PLoS Biol.* 10, e1001265.

Cai L, Liu G, Rensing C, Wang G (2009). Genes involved in arsenic transformation and resistance associated with different levels of arsenic-contaminated soils. *BMC Microbiology* 9, doi: 10.1186/1471-2180-9-4.

Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunencko T, Zaneveld J, Knight R (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* 7, 335-336.

Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone C, Turnbaugh PJ, Fierer N, Knight R. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 4516-4522.

Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Huntley J, Fierer N, Owens SM, Betley J, Fraser L, Bauer M, Gormley N, Gilbert JA, Smith G, Knight R (2012). Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J.*, 1621-24.

Cavender-Bares, j, Kozak KH, Fine PVA, Kembel SW (2009). The merging of community ecology and phylogenetic biology. *Ecol. Lett.* 12, 693-715.

Colmer AR, Hinkle ME (1947) The Role of Microorganisms in Acid Mine Drainage: A Preliminary Report. *Science* 106, 253-6.

Cordero OXS, Polz MF (2014). Explaining microbial genomic diversity in light of evolutionary ecology. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 263-273.

Denef VJ, Kalnejakis LH, Mueller RS, Wilmes P, Baker BJ, Thomas BC, VerBerkmoes NC, Hettich RL, Banfield JF (2010). Proteogenomic basis for ecological divergence of closely related bacteria in natural acidophilic microbial communities. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 2383–90.

Dopson M, Halinen AK, Rahunen N, Botström D, Sundkvist JE, Riekkola-Vanhanen M, Kaksonen AK, Puhakka JA (2008). Silicate mineral dissolution during heap bioleaching. *Biotechnol. Bioeng.* 99, 811-820.

Drahota P, Rohovec J, Filippi M, Mihaljevič M, Rychlovský P, Červený V, Pertold Z (2009). Mineralogical and geochemical controls of arsenic speciation and mobility under different redox conditions in soil, sediment and water at the Mokrsko-West gold deposit, Czech Republic. *Sci. Total Environ.* 407, 3372e3384.

Drewniak L, Maryan N, Lewandowski W, Kaczanowsky S, Sklodowska A (2012). The contribution of microbial mats to the arsenic geochemistry of an ancient gold mine. *Environ. Pollut.* 162, 190-201.

Euzéby, J.P. (2012). List of Prokaryotic names with standing in nomenclature. www.bacterio.cict.fr

Faith DP, Lozupone CA, Nipperess D, Knight R (2009) The cladistic basis for the phylogenetic diversity (PD) measure links evolutionary features to environmental gradients and supports broad applications of microbial ecology's "phylogenetic beta diversity" framework. *Int J Mol Sci* 10, 4723-4741.

Ferrier S, Manison G, Elith J, Richardson K (2007). Using generalized dissimilarity modelling to analyse and predict patterns of beta diversity in regional biodiversity assessment. *Diversity Distrib.* 13, 252-264.

García-Moyano A, Gonzáles-Toril E, Aguilera Á, Amils R (2012) Comparative microbial ecology study of the sediments and the water column of the Río Tinto, an extreme acidic environment. *FEMS Microbiol. Ecol.* 81, 303-314.

Golyshina OV, Pivovarova TA, Karavaiko GI, Kondratéva TF, Moore ER, Abraham WR et al. (2000). *Ferroplasma acidiphilum* gen. nov., sp. nov., an acidophilic, autotrophic, ferrous-iron-oxidizing, cell-wall-lacking, mesophilic member of the *Ferroplasmaceae* fam. nov., comprising a distinct lineage of the *Archaea*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 997-1006.

Golyshina OV, Timmis KN (2005). *Ferroplasma* and relatives, recently discovered cell wall-lacking archaea making a living in extremely acid, heavy metal-rich environments. *Environ. Microbiol.* 7, 1277-1288.

Hallberg KB, Coupland K, Kimura S, Johnson DB (2006) Macroscopic streamer srowths in acidic, metal-rich mine waters in North Wales consist of novel and remarkably simple bacterial communities. *Appl. Env. Microbiol.* 72, 2022-30.

Hallberg KB, Gonzáles-Toril E, Johnson DB (2010). *Acidithiobacillus ferrivorans*, sp. nov.; facultatively anaerobic, psychrotolerant iron-, and sulfur-oxidizing acidophiles isolated from metal mine-impacted environments. *Extremophiles* 14, 9-19.

Hallberg KB, Hedrich S, Johnson DB (2011). *Acidiferrobacter thiooxydans*, gen. nov. sp. nov.; an acidophilic, thermo-tolerant, facultatively anaerobic iron- and sulfur-oxidizer of the family Ectothiorhodospiraceae. *Extremophiles* 15, 271-279.

Heinzel E, Hedrich S, Janneck E, Glombitza F, Seifert J, Schlömann M (2009). Bacterial diversity in a plant for mine water treatment. *Appl. Env. Microbiol.* 75, 858-861.

Hudson-Edwards KA, Santini JM (2013). Arsenic-microbe-mineral interactions in mining-affected environments. *Minerals* 3, 337-351.

Hug LA, Baker BJ, Anantharaman K, Brown CT, Probst AJ, Castelle CJ, Butterfield CN, Hermsdorf AW, Amano Y, Ise K, Suzuki Y, Dudek N, Relman DA, Finstad KM, Amundson R, Thomas BC, Banfield JF (2016). A new view of the tree of life. *Nat. Microbiol.* 1, 16048.

Hutchinson GE (1961). The paradox of the plankton. *The American Naturalist* 95, 137-145.

Johnson DB (1998). Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms. *FEMS Microbiol. Ecol.* 27, 307-317.

Johnson DB (2012). Geomicrobiology of extremely acidic subsurface environments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 81, 2-12.

Johnson DB, Hallberg KB, Hedrich S (2014). Uncovering a microbial enigma: isolation and characterization of the streamer-generating, iron-oxidizing, acidophilic bacterium “*Ferrovum myxofaciens*”. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 672-680.

Jones DS, Kohl C, Grettenberger C, Larson LN, Burgos WD, Macalady JL (2015). Geochemical niches of iron-oxidizing acidophiles in acidic coal mine drainage. *Appl. Env. Microbiol.* 81, 1242-1250.

Johnson DB, Rolfe S, Hallberg KB, Iversen E (2001). Isolation and phylogenetic characterization of acidophilic microorganisms indigenous to acidic drainage waters at an abandoned Norwegian copper mine. *Environ. Microbiol.* 3, 630-637.

Kabelitz N, Machackova J, Imfeld G, Brennerova M, Pieper DH, Heipieper HJ, Junca H (2009). Enhancement of the microbial community biomass and diversity during air sparging bioremediation of a soil highly contaminated with kerosene and BTEX. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82, 565e577.

Kay CM, Rowe OF, Rocchetti L, Coupland K, Hallberg KB, Johnson DB (2012). Evolution of microbial “streamer” growths in an acidic, metal-contaminated stream draining an abandoned underground copper mine. *Life* 3, 189-210.

- Kimura S, Bryan CG, Hallberg KB, Johnson DB (2011). Biodiversity and geochemistry of an extremely acidic, low-temperature subterranean environment sustained by chemolithotrophy. *Environ. Microbiol.* 13, 2092-2104.
- Kuczynski J, Liu Z, Lozupone C, McDonald D, Fierer N, Knight R (2010). Microbial community resemblance methods differ in their ability to detect biologically relevant patterns. *Nat. Methods* 7, 813-819.
- Langille MGI, Zaneveld J, Caporaso JG, McDonald D, Knights D, Reyes JA, Clemente JC, Burkepile DE, Thurber RLV, Knight R, Beiko RG, Huttenhower C (2013). Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat. Biotechnol.* 31, 814-23.
- Langner P, Mikutta C, Suess E, Marcus MA, Kretzschmar R (2013). Spatial distribution and speciation of arsenic in peat studied with microfocussed X-ray fluorescence spectrometry and X-ray absorption spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* 47, 9706-14.
- Lefevre P, Cellier G, Remenant B, Chiroleu F, Prior P (2013). Constraints on genome dynamics revealed from gene distribution among the *Ralstonia solanacearum* species. *PLoS One* 8, e63155.
- Lin X, Kennedy D, Fredrickson J, Bjornstad B, Konopka A (2012). Vertical stratification of subsurface microbial community composition across geological formations at the Hanford Site. *Environ. Microbiol.* 14, 414e425.
- Lozupone CA, Knight R (2005). UniFrac: A new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8228–35.
- Lozupone CA, Knight R (2007). Global patterns in bacterial diversity. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 11436-40.
- Luef B, Frischkorn KR, Wrighton KC, Holman HN, Birarda G, Thomas BC, Singh A, Williams KH, Siegerist CE, Tringe SG, Downing KH, Comolli LR, Banfield JF (2015). Diverse uncultivated ultra-small bacterial cells in groundwater. *Nat. Commun.* 6, 6372.
- Markosian GE (1972). [Nová bakterie oxidující železo - *Leptospirillum ferrooxidans* Nov. Gen. Nov. Sp.]. [Arménský biologický žurnál] 25, 26-29. Rusky.
- Martyčák K, Zeman J, Vacek-Veselý M (1993) Supergene processes on ore deposits - a source of heavy metals. *Environ. Geol.* 23, 156-165.
- Mendez-García C, Peláez AI, Mesa V, Sánchez J, Golyshina OV, Ferrer M (2015). Microbial diversity and metabolic networks in acid mine drainage habitats. *Front. Microbiol.* 6, 475.

- Michalková E, Schwarz M, Pulišová P, Máša B, Sudovský P (2013). Metals recovery from acid mine drainage and possibilities for their utilization. *Pol. J. Environ. Stud.* 22, 1111-18.
- Nemergut DR, Anderson SP, Cleveland CC, Martin AP, Miller AE, Seimon A, Schmidt SK (2007). Microbial community succession in an unvegetated, recently deglaciated soil. *Microb. Ecol.* 53, 110e122.
- Nemergut DR, Lozupone C, Jiang L, Schmidt SK, Fierer N, Townsend AR, Cleveland CC, Stanish L, Knight R (2011) Global patterns in the biogeography of bacterial taxa. *Environ. Microbiol.* 13, 135-144.
- Nemergut DR, Schmidt SK, Fukami T, O'Neill SP, Bilinski TM, Stanish LF et al. (2013) Patterns and processes of microbial community assembly. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 77, 342-356.
- Nordstrom DK (2002). Public health – Worldwide occurrences of arsenic in ground water. *Science* 296, 2143-45.
- Northup DE, Melim LA, Spilde MN, Hathaway JJM, García MG, Moya M, Stone FD, Boston PJ, Dapkevicius MLNE, Riquelme C (2011). Lava Cave microbial communities within mats and secondary mineral Deposits: implications for life detection on other planets. *Astrobiology* 11, 601e618.
- Okabayashi A, Wakai S, Kanao T, Sugio T, Kamimura K (2005). Diversity of 16S ribosomal DNA-defined bacterial population in acid rock drainage from Japanese pyrite mine. *J. Biosci. Bioeng.* 100, 644-52.
- O'Day PA, Vlassopoulos D, Root RA, Rivera NA (2004). The influence of sulphur and iron on dissolved arsenic concentrations in the shallow subsurface under changing redox conditions. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 13703-08.
- Parks DH, Beiko RG (2013). Measures of phylogenetic differentiation provide robust and complementary insights into microbial communities. *ISME J.* 7, 173-183.
- Patočka F, Vrba J (1989) The comparison of strata-bound massive sulfide deposits using the fuzzy linguistic diagnosis of the Zlaté Hory deposits, Czechoslovakia, as an example. *Miner. Dep.* 24, 192-198.
- Rinke C, Schwientek P, Sczyrba A, Ivanova NN, Anderson IJ, Cheng JF, Darling A, Malfatti S, Swan BK, Gies EA, Dodsworth JA, Hedlund BP, Tsiamis G, Sievert SM, Liu WT, Eisen JA, Hallam SJ, Kyrpides NC, Stepanauskas R, Rubin EM, Hugenholtz P, Woyke T (2013). Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature* 499, 431-437.
- Rohwerder T, Gehrke T, Kinzler K, Sand W (2003). Bioleaching review part A: Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63, 239-248.

- Rosseló-Mora A (2012). Towards a taxonomy of *Bacteria* and *Archaea* based on interactive and cumulative data repositories. *Environ. Microbiol.* 14, 318-334.
- Rowe OF, Sánchez-España J, Hallberg KB, Johnson DB (2007). Microbial communities and geochemical dynamics in an extremely acidic, metal-rich stream at an abandoned sulfide mine (Huelva, Spain) underpinned by two functional primary production systems. *Environ. Microbiol.* 9, 1761–71.
- Schmidt SK, Nemergut DR, Darcy JL, Lynch R (2014) Do bacterial and fungal communities assemble differently during primary succession? *Mol. Ecol.* 23, 254-258.
- Schrenk MO, Edwards KJ, Goodman RM, Hamers RJ, Banfield JF (1998). Distribution of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*: Implications for generation of acid mine drainage. *Science* 279, 1519-1522.
- Shapiro BJ, Friedman J, Cordero OX, Preheim SP, Timberlake SC, Szabó G, Polz MF, Alm EJ (2012). Population genomics of early events in the ecological differentiation of bacteria. *Science* 336, 48-51.
- Shapiro BJ, Polz MF (2014). Ordering microbial diversity into ecologically and genetically cohesive units. *Trends Microbiol.* 22, 235-247.
- Tan GL, Shu WS, Hallberg K, Li F, Lan CY, Huang LN (2007). Cultivation-dependent and cultivation-independent characterization of the microbial community in acid mine drainage associated with acidic Pb/Zn mine tailings at Lechang, Guangdong, China. *FEMS Microbiol. Ecol.* 59, 118-126.
- Tan GL, Shu WS, Zhou WH, Li XL, Lan CY, Huang LN (2009). Seasonal and spatial variations in microbial community structure and diversity in the acid stream draining across an ongoing surface mining site. *FEMS Microbiol. Ecol.* 70, 121-129.
- Thompson CC, Amaral GL, Campeao M, Edwards RA, Polz MF, Dutilh BE, Ussery DW, Sawabe T, Swings J, Thompson FL (2015). Microbial taxonomy in the post-genomic era: Rebuilding from scratch? *Arch. Microbiol.* 197: 359-370.
- Villegas-Torres MF, Bedoya-Reina OC, Salazar C, Vives-Florez MJ, Dussan J (2011). Horizontal *arsC* gene transfer among microorganisms isolated from arsenic polluted soil. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 65, 147-152.
- Wall CA, Koniges GJ, Miller SJ (2014). Divergence with gene flow in a population of thermophilic bacteria: a potential role for spatially varying selection. *Mol. Ecol.* 23, 3371-83.
- Winderl C, Anneser B, Griebler C, Meckenstock RU, Lueders T (2008). Depth resolved

quantification of anaerobic toluene degraders and aquifer microbial community patterns in distinct redox zones of a tar oil contaminant plume. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 792e801.

Xiao S, Xie X, Liu J (2009). Microbial communities in acid water environments of two mines, China. *Environ. Pollut.* 157, 1045-50.

Yeoh YK, Sekiguchi Y, Parks DH, Hugenholtz P (2016). Comparative genomics of candidate phylum TM6 suggests that parasitism is widespread and ancestral in this lineage. *Mol. Biol. Evol.* 33, 915-927.

Ziegler S, Ackermann S, Majzlan J, Gescher J (2009). Matrix composition and community structure analysis of a novel bacterial pyrite leaching community. *Environ. Microbiol.* 11, 2329-38.

Ziegler S, Waidner B, Itoh T, Schumann P, Spring S, Gescher J (2013). *Metallibacterium scheffleri* gen. nov., sp. nov., an alkalizing gammaproteobacterium isolated from an acidic biofilm. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, 1499-1504.

6. PUBLIKACE ZAHRNUTÉ DO TÉTO PRÁCE

6.1. Falteisek a Čepička, 2012

Falteisek L, Čepička I (2012). Microbiology of diverse acidic and non-acidic microhabitats within a sulfidic ore mine. *Extremophiles* 16, 911-922.

Microbiology of diverse acidic and non-acidic microhabitats within a sulfidic ore mine

Lukáš Falteisek · Ivan Čepička

Received: 6 April 2012 / Accepted: 27 September 2012 / Published online: 12 October 2012
© Springer Japan 2012

Abstract A wide variety of microhabitats within the extremely acidic abandoned underground copper mine Zlaté Hory (Czech Republic) was investigated. SSU rDNA libraries were analyzed from 15 samples representing gossan, sulfide-leaching environments in the oxidation zone, and acidic water springs in the mine galleries. Microbial analyses were extended by analyses of chemical composition of water and solid phases and identification of arising secondary minerals. The microbial communities of the three main classes of microenvironments differed in almost every aspect. Among others, ecological partitioning of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and the recently described *A. ferrivorans* was observed. Distinct types of communities inhabiting the water springs were detected. The more extreme springs (pH <3, conductivity >2 mS/cm) were inhabited by “*Ferrovum*” spp. and *A. ferrivorans*, whereas *Gallionella* sp. dominated the less extreme ones. A new role for gossan in the extremely acidic ecosystem is proposed. This zone was inhabited by a large diversity of neutrophilic heterotrophs that appeared to be continuously washed out to the acidic environments localized downstream. Five species originating in gossan were found in several acidic habitats. Here they can survive and probably serve as scavengers of dead biomass, particularly from

chemoautotrophic growths. No such process has been described from acidic mine environments so far.

Keywords Acidophiles · Chemolithotrophy · Microbial consortia · Phylogeny · Gossan · Supergenic processes

Introduction

Ecosystems based on oxidation of sulfides have been attracting the attention of scientists for decades. Moreover, they have large economical potential (Pecina et al. 2010; Puhakka et al. 2007). Since sulfides, and especially pyrite, are very common minerals in the Earth’s crust, numerous extremely acidic environments associated with sulfidic mineral deposits and sulfur-rich water springs can be found. Many studies have focused on describing biodiversity of acidic drainages from sulfidic mines and on the characterization of the most important bacterial species (e.g. Golyshina et al. 2000; Johnson et al. 2001; Okabayashi et al. 2005; Hallberg et al. 2006; Tan et al. 2007; Heinzel et al. 2009; Xiao et al. 2009; Hallberg et al. 2010, 2011). The influence of the season, the depth of the sample in the sediment and the distance of the sampling site from the mine adit on microbial community composition have been thoroughly investigated (Rowe et al. 2007; Tan et al. 2009; Kimura et al. 2011). These efforts resulted in a discovery of a large number of bacterial species involved in the main biogeochemical processes in extremely acidic environments. The association of various processes with particular sets of bacterial species is thus well established and the diversity of acidophiles, although generally rather low, has been described in more detail than the microbial diversity of many less extreme environments. However, most of the studies have been limited to a single or a few

Communicated by M. da Costa.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00792-012-0488-2) contains supplementary material, which is available to authorized users.

L. Falteisek (✉) · I. Čepička
Department of Zoology, Faculty of Science, Charles University
in Prague, Vinicna 7, 128 44 Prague, Czech Republic
e-mail: nealkoholik@email.cz

sampling sites similar to each other within the locality. Yet numerous distinct habitats can be found in a single sulfidic ore mine. The habitats differ primarily in the presence of rock dissolution, in water composition, the presence of bacterial streamers, sediment formation, etc. (Kimura et al. 2011). Another factor which may increase the complexity of the mine ecosystem, but which is usually neglected in geomicrobiological studies, is the presence of the leached zone (gossan). This zone forms the uppermost part of the deposits (Enders et al. 2006). Virtually all water infiltrating the deposit has to pass through gossan. During this passage water may become enriched in certain chemical compounds (Romero et al. 2011). The degree to which gossan affects water composition depends on its thickness and on the way the water passes through (e.g., single, highly permissive fracture vs. filtration through altered rock) both of which influence the retention time and the intensity of contact with gossan. The role of microorganisms in mobilization of silver from gossan has been reported recently (Izawa et al. 2010).

It could be expected that bacterial communities inhabiting various microenvironments within the sulfidic ore deposit vary considerably. It has been well established that the true extent of natural habitats of certain microbes cannot be inferred solely from their requirements in laboratory culture. Although the total diversity of prokaryotes at an ore deposit is dictated mainly by its acidic character, the diversity at a particular microenvironment is driven mostly by the biological processes, like competition or mutualism (Johnson 1998). Ecosystems of sulfidic ore deposits contain numerous types of habitats whose diversity is influenced not only by interactions within a single habitat, but also by interactions with other habitats. The factors shaping microbial diversity should be studied in detail since the composition of microbial communities influences the geochemical processes significantly (e.g. Johnson 1998). However, only few authors have focused on bacterial consortia at various types of habitats within a single locality, or in various microenvironments within a single sampling site (Schrenk et al. 1998; Espana et al. 2007; Macalady et al. 2007; Amaral-Zettler et al. 2011; Kimura et al. 2011).

The combination of bacteriological, mineralogical and chemical analyses can provide deep insight into the processes taking place at particular sites. Certain bacterial species may even serve as indicators of particular biochemical processes (Baker and Banfield 2003; Mendez et al. 2008). Despite major progress in the knowledge of the ecology of various bacterial species as well as whole bacterial communities, the understanding of the sulfidic ecosystem in its complexity remains a challenge.

In the present study, we have chosen a sampling scheme that differed from most of the published works. The large abandoned sulfidic mine Zlaté Hory, with highly acidic

character, has been explored in order to assess the variability of its habitats. Non-acidic sites in the subsurface part of the deposit were also included. Composition of the microbial communities is discussed in the context of local geochemical conditions.

Materials and methods

Site description

The Zlaté Hory deposit is located in Silesia (Czech Republic) in a mountain region (50°12–13'N, 17°23–24'30"E) and reaches an elevation of 540–974 m a.s.l. It is composed of sulfidic ores dispersed in metamorphic Devonian volcano-sedimentary rocks, mostly quartzites, quartzitic shales and metatuffites. The impregnation type of mineralization dominates throughout the deposit (Vaněček 2004). The deposit is strongly altered by oxidative weathering of sulfides. Typical leached zone (gossan) with heavy metals (Fe, Cu, Zn, Pb) present in the form of oxides, sulfates and other oxidized secondary minerals can be found in depths of up to hundred meters below the surface. This zone contains low-mineralized and pH-neutral water. Various secondary minerals (goethite, gypsum, alumogel, allophane, linarite, brochantite, malachite, clay minerals) have been observed in the mine works in gossan. Spontaneous leaching of sulfidic ores causing alteration of the ambient rock and massive formation of acidic mine waters (typical pH 2.5–3.5; total mineralization 2–5 g/L) takes place in the oxidation zone. Both neutral and acidic, metal-rich waters rise from various rock fractures, but the proportion of acidic waters is much larger and increases with the depth. Precipitation of various pH-neutral secondary minerals from the less mineralized neutral water occurs in the oxidation zone as well.

The mining district is divided into several deposits. Our study focused on two deposits, ZH-south and ZH-east (Fig. S1). The deposit ZH-south contains monometallic pyrite–chalcopyrite–pyrrhotite Cu ores. The deposit was partially mined out in 1965–1990. The leached and oxidation zones of ZH-east were extracted in several periods from the fourteenth to the nineteenth century. The oxidation zone containing polymetallic Zn–Pb–Ag sulfidic ores with a significant content of pyrite was partially mined out by sublevel chambering during the twentieth century; the deposit ZH-east was abandoned in 1993 (Kotris 2004).

The vertical range of presently accessible mine works reaches 350 m and represents all zones of the deposit from strongly weathered subsurface rock to unaltered ore bodies. The mine is fully spontaneously ventilated and has a stable air temperature of 8–10 °C and water temperature of 8–9 °C in the deep parts throughout the year. In the area close to the surface the water and air temperature may decrease to

4–5 °C in winter period, certain parts of the zero and first haulage levels may experience sub-zero temperatures.

Sample collection

Initially, 28 samples were collected from sites representing a broad spectrum of combinations of pH, conductivity, oxygenation and secondary minerals. After preliminary chemical and biological analyses (SEM-EDS, XRD, sequencing up to 10 SSU rDNA clones), a set of 15 samples representing main types of environments was selected for further examination.

Samples of secondary minerals, rock biofilms and streamers for microbiological analyses were taken into sterile 15-mL tubes (one biological sample per site). Each mineral was also sampled for XRD and EDS analyses. When samples immersed in water were collected, the pH, conductivity, temperature and dissolved oxygen level of the water were measured using WTW Multi303i universal pocket meter (WTW, Germany). The water samples for microbiological and chemical analyses were collected into sterile 1.5-L plastic bottles without disturbing a potential solid phase. The water flow was estimated from the filling times of the sample bottles (the flow was directed into the bottle quantitatively). All samples were delivered to the laboratory within 24 h. For the TEM analysis, small pieces of material (ca. 2 mm) were collected directly into the fixing solution (see below).

Chemical analyses of water

The chemical analyses of the water samples were conducted in the certified commercial analytical laboratory VZ lab s.r.o. (Prague, Czech Republic). Anions were determined using ion chromatography analyzer ICS 1100 (Dionex, USA), total organic carbon (TOC) using the TOC-VCPN (Shimadzu, Japan), Si and humic substances were determined photometrically following the protocol of Horáková et al. (1986), concentrations of metal cations by AAS using SpectrAA 220FS (Varian, USA), chemical oxygen demand by permanganate (COD_{Mn}) by titration, COD_{Cr} by photometry, and total minerals by gravimetry.

Mineralogical analyses

A representative portion of each solid sample was homogenized and analyzed by XRD using X'Pert Pro (PANalytical BV, Netherlands) in Cu K α at 40 kV, 30 mA, step scanning at 0.05°/250 s in the range 3°–70° 2 θ . Mineral phases were identified using the analytical software X'Pert HighScore 1.0d (PANalytical B.V., Netherlands).

Microstructure of carbon-covered solid samples was examined by scanning electron microscopy (SEM) using CamScan S4 (Siemens, Germany) in both the backscattered

and secondary electron signal at 15 kV. The elemental composition of various morphologically distinguishable materials was identified using energy dispersive spectroscopy (EDS) microanalytic system Link ISIS 300 (Oxford instruments, GB).

Cryo-FESEM

Samples were transferred into a special holder with a slot and clamping facility, mounted into a drop of glue and clamped. The samples were extremely quickly frozen ($>10^3$ K/s) in slushy nitrogen. Then, the samples were transferred into the cryo-stage of the preparation chamber (ALTO2500, Gatan, USA) where they were freeze-fractured at -140 °C, freeze-etched at -95 °C for 3 min, and then coated with 3 nm layer of platinum at -135 °C. The coated samples were inserted into the chamber of the JSM-7401F microscope (JEOL, Japan) precooled to -130 °C. Images were obtained by both the secondary and back-scattered electron signal at 3 kV.

TEM

Immediately after collection, the sample was transferred into a fixative containing 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M SCB (pH 7.2) at mine temperature (ca. 9 °C) and delivered to the TEM laboratory. There, it was postfixed in 2 % OsO_4 in 0.1 M SCB (pH 7.2) at room temperature for 3 h followed by dehydration through ethanol series and substitution with acetone. The sample was embedded in a resin (Epon 812, Polysciences, USA). Ultrathin sections were cut on Leica EM UC6 ultramicrotome (Leica Microsystems) and double-stained with 2% (w/v) uranyl acetate and lead citrate (Reynolds 1963). The sections were observed using JEOL JEM-1011 TEM (Jeol, Japan) with CCD camera Veleta and acquisition software Olympus Soft Imaging Solution (Olympus, Japan).

DNA extraction, amplification, cloning and sequencing

The solid and gelatinous samples were divided by flame-sterilized lancet and forceps. Approximately 250 mg of each sample were used for DNA extraction. 0.5 L of each water sample was filtered using sterile 0.22 μm pore syringe filter (Millipore, USA) and the membrane from the filter was used for DNA extraction. Genomic DNA was isolated using ZR soil microbe DNA kit (Zymo research, USA). The primers U515F (GTGCCAGCMGCCGCGG-TAA) and U1406R (GACGGGCGGTGTGTRCA) (Turner et al. 1999) were used to amplify approximately 860-bp-long fragment of the SSU rRNA gene from *Bacteria*, *Archaea*, and mitochondria. The annealing temperature of 55 °C and LA DNA polymerase (Top-bio, Czech

Republic) were used. PCR products were purified using Zymoclean gel DNA recovery kit (Zymo Research, USA), TA cloned into pGEM-T easy vector (Promega, USA) using chemocompetent *Escherichia coli* TOP10 cells. 45–50 clones of each sample were sequenced on 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). Newly determined sequences have been deposited in GenBank under accession numbers JQ217496–JQ218118.

Phylogenetic analyses

At first, a preemptive data set containing all 614 newly determined sequences was created. The sequences were aligned using MAFFT (Kato et al. 2002) with the help of the EBI server (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/>); both the number of iterations and the number of tree rebuildings were set to 100. Genetic distances (p-distances) of the aligned sequences were computed in PAUP* 4.0b10 (Swofford 2002). Sequences with p-distances lower than 2 % were considered to belong to conspecific organisms. The species identity of up to seven representatives of each putative species was estimated by BLAST. In some cases two already described species with p-distances lower than 2 % were detected (e.g., *At. ferrooxidans* and *At. ferrivorans*). The coverage of microbial diversity was estimated using Chao1-bc diversity estimator (Chao et al. 2005). Four final data sets were created. The first data set consisted of 196 SSU rDNA sequences from GenBank representing broad bacterial diversity and 75 newly determined sequences of non-proteobacterial eubacteria. The second data set consisted of 220 SSU rDNA sequences representing the diversity of *Proteobacteria* and 163 newly determined sequences belonging to *Proteobacteria*; 15 non-proteobacterial sequences were used as outgroups. The third dataset consisted of 40 sequences representing the diversity of main archaeal groups and 11 archaeal sequences from the present study. The fourth dataset consisted of 41 mitochondrial SSU rDNA sequences representing main eukaryotic groups and 7 newly determined sequences; 5 proteobacterial sequences represented outgroup. For divergent sequences (no identified sequence with homology higher than ca. 95 % was found), closest neighbors were found by BLAST and were included in the datasets as well. Sequences from each data set were aligned by MAFFT as described above and the alignments were then manually edited. Phylogenetic trees were constructed by maximum likelihood in RAxML 7.2.6 (Stamatakis 2006) under the GTRGAMMAI substitution model, and were bootstrapped with 1000 replicates.

Statistical methods

Multivariate analyses were run in Canoco 4.5 (ter Braak and Šmilauer 2002). Since the gradient lengths in the data

were long, we used unimodal methods. The variability within the dataset was visualized using a correspondence analysis (CA) and a canonical correspondence analysis (CCA) was applied to test whether the differences in species composition are significantly related to the habitat type. We created dummy variables for each of the habitat types. In case of mixed habitat character, a value was assigned to the two relevant dummy variables.

Results and discussion

Surprisingly high diversity of ecological niches and microbial communities has been found within the abandoned sulfidic ore deposit Zlaté Hory. Samples representing three basic types of habitats—(1) gossan or the border zone between gossan and the acidic environment; (2) the oxidation zone where the rock dissolution dominated and (3) the mine gallery springs, where secondary minerals precipitated from extremely acidic waters—were collected (see Fig. S1 for the spatial arrangement of the sampling sites within the mine and Fig. S2 for the typical in situ appearance of bacterial growths and associated secondary mineral accumulations). The essential characteristics of the samples are summarized in Table 1. Six species of *Archaea*, 137 species of *Bacteria* and 5 species of protists were detected; their identification was confirmed by phylogenetic analyses (Figs. S3–S6). More than 50 % of the total diversity estimated by Chao1-bc was identified in all samples except ZH7a and 16, although the confidence intervals were large in more samples.

The proposed clustering of the samples by the three basic types of environments (i.e. gossan, leaching and acidic springs) was confirmed by a correspondence analysis (Fig. 2). An additional type of samples was established during the analyses. Samples of this type were interpreted as acidic spring growths that were undergoing decay at the time of collection (see below). Differences in bacterial communities living in these types of habitats were significant ($p < 0.002$) and the variable habitat explained 33 % of the observed variability.

Non-acidophilic bacterial communities

Virtually all water infiltrates the mine through gossan. As a result, chemical compounds and bacteria are continuously being transported from gossan to the acidic ecosystem of the mine. We have analyzed samples representing water percolating through gossan (ZH16a—a water stream flowing from old stopes through a contemporary chimney), three different sediments found in proximity of this water stream (ZH16, 16b, and 19), and the sediment from a gossan-like islet found deep in the acidic zone (ZH2, Table 1).

Table 1 The basic characterization of sampled materials and mineral phases identified by XRD

Sample	Physical character	Depth below surface (m)	pH	Conductivity (mS/cm)	Dissolved O ₂ (mg/l)	Temperature (°C)	Estimated water flow (l/s)	Mineralogy
<i>Gossan</i>								
ZH2	Wall crust	140	NA	NA	NA	9	0	Serpierite-deviline, (hendricksite, gypsum)
ZH16	Wall crust	65	6.45	0.76	10.3	8.4	0.2	99 % amorphous
ZH16a	Water	65	6.45	0.76	10.3	8.4	0.2	–
ZH16b	Wall crust	65	6	NA	NA	8.4	>0.05	Goethite
ZH19	Wall crust	65	6.45	0.76	10.3	8.4	0.05	Schulenbergite, cuprian, hydrowoodwardite, zincowoodwardite, ca. 50 % amorphous
<i>Rock dissolving environments</i>								
ZH6	Corroded rock	125	NA	NA	NA	9	0	Quartz, pyrite, K-feldspar, aluminocopiapite, sulfur
ZH7a	Water	190	2.9	3.7	3.09	8.7	0.1	–
<i>Mine gallery springs</i>								
ZH4	Gelatinous	140	NA	NA	NA	9	0	–
ZH7	Gelatinous stalactite	190	2.9	3.7	3.09	8.7	0.1	Schwertmannite
ZH8	Soda straw stalactite	220	NA	NA	NA	9	Very low ^a	Schwertmannite, (gypsum), 90 % amorphous
ZH9	Pendulous stalactite	220	3	NA	NA	9	Very low ^a	Schwertmannite, goethite
ZH10	Hard stalactite	220	3.08	2.3	7.9	9	0.5	Schwertmannite, (gypsum, goethite), 90 % amorphous
ZH12	Soda straw stalactite	180	NA	NA	NA	9.5	Very low ^a	Schwertmannite, goethite, (gypsum), 90 % amorphous
ZH13	Pendulous stalactite	180	3	NA	NA	9.5	Very low ^a	Schwertmannite, (mica, baryte)
ZH14	Streamer	70	3.1	1.94	7.55	4.5	0.4	Schwertmannite, quartz, (muscovite, gypsum), 90 % amorphous

Minerals with minor proportion are in parentheses

^a The stalactites were moist from acidic water, but not enough to measure exact values of dissolved oxygen concentration and conductivity

Samples ZH16, ZH19, and ZH2 were various Cu- and Zn-containing secondary minerals formed at circumneutral pH. ZH16 precipitated from the water stream ZH16a. It was the only sample to contain fibers, probably organic, encrusted by aluminosilicates (Fig. 1h). ZH19 was a dark blue-green material precipitated from the same stream as ZH16, but at the peripheral zone, which had been washed by water only in high-flow periods. Both ZH16 and 19 contained grains enriched in noble earth elements (Table S2).

Although obviously only a fraction of the true bacterial diversity has been identified in these samples, the overall character of bacterial communities was similar (Fig. 3; Table S1). Aerobic or microaerophilic heterotrophs and facultative or obligatory iron- and nitrite-oxidizing autotrophs dominated gossan. ZH16a was ecologically strikingly uniform. Only aerobic (one aerotolerant) neutrophilic heterotrophic bacteria were detected. Known hydrocarbon

degraders were found in ZH16a (*Acinetobacter* spp., *Achromobacter xylosoxidans*, *Burkholderia cenocepacia*; Sette et al. 2007; Boontawan and Boontawan 2011), probably due to an industrial contamination of the mining area. In ZH16, methanogenic *Archaea* indicated the occurrence of anaerobic environments. Frequent iron oxidizers were found in ZH19, which contained almost no iron. Most likely, these bacterial cells were transported to the sampling site from corroding iron supports in the upper parts of the chimney.

ZH16b, which was found at the opposite side of the same chimney as ZH16, differed both chemically (almost pure goethite, Table 1; Table S2) and microbiologically from the other gossan samples. In addition to typical gossan bacteria, a large proportion of acidophilic Fe-oxidizers were found, even though the pH of the sample was neutral (interestingly, the same acidophilic, iron-oxidizing

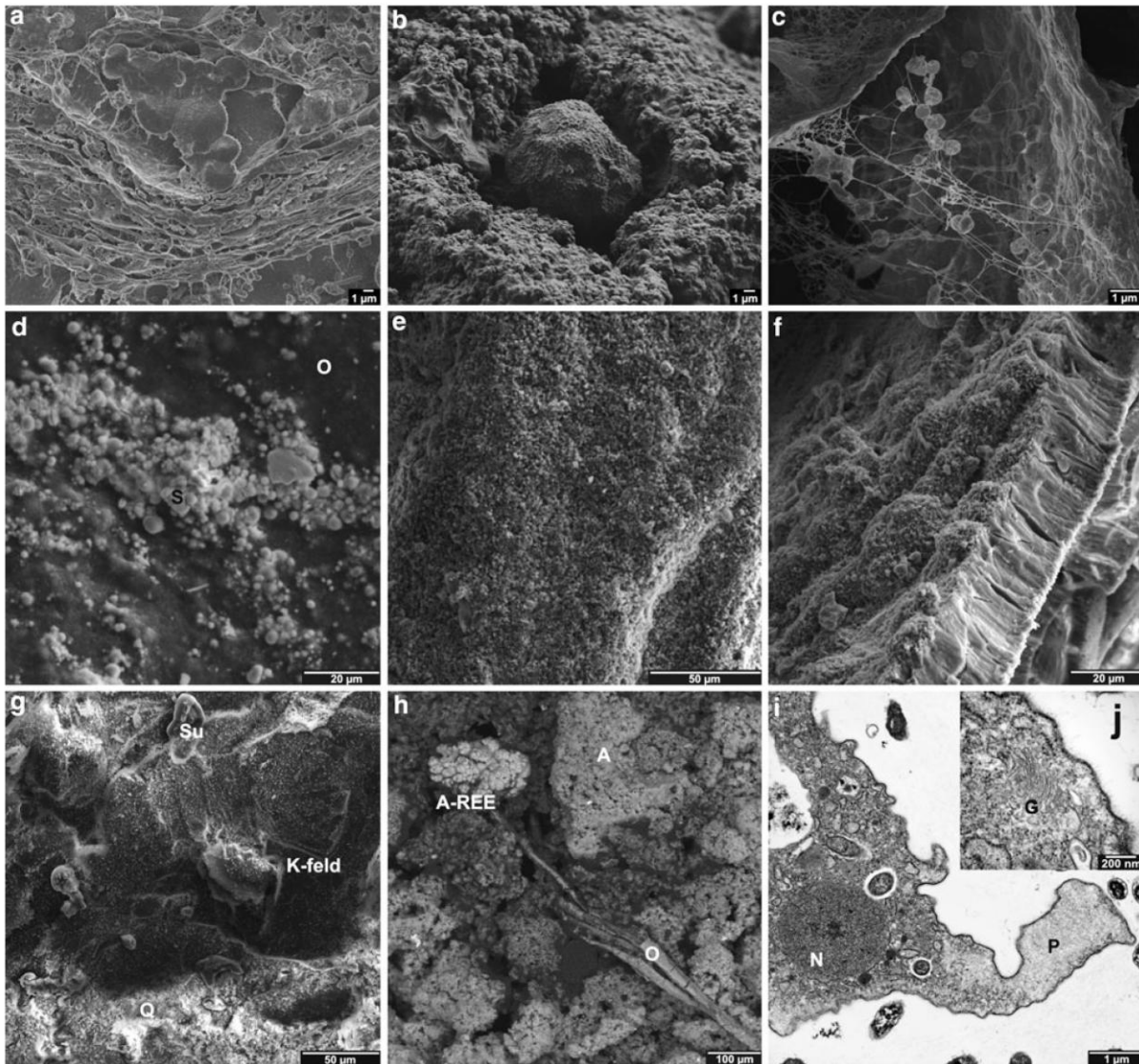


Fig. 1 A typical microstructure of samples as observed by cryogenic (a–c) and classic (d–h) SEM and by TEM (i, j). Minerals were identified by elementary composition and XRD patterns of the samples. **a** Newly formed schwertmannite between bacterial fibers in ZH7. **b** A rock element in the stalactite ZH9. **c** Bacterial cells in the filamentous matrix of ZH13. **d** Mineral domains in the presumably organic material from the gelatinous stalactite ZH7. **e** Schwertmannite–goethite particles covered by presumably organic material in the pendulous stalactite ZH9. **f** A compact schwertmannite crust of the soda straw stalactite ZH12. **g** A corroded surface of the rock ZH6

covered with bacterial cells and sulfur particles. **h** Amorphous Al-, Si- and Cu-rich material of the sample ZH16 with an encrusted, probably organic, fiber and Mn- and Ce-enriched grain. **i, j** Transmission electron microscopy of an unidentified lobose amoeba found in the sample ZH7 **A** amorphous Si- and Al-rich material, **A-REE** amorphous material enriched in noble earths, **K-feld** altered K-feldspar, **O** organic material, **Q** quartz, **S** schwertmannite, **Su** sulfur, **arrows** glycocalyx, **G** Golgi body, **N** nucleus with central nucleolus, **P** pseudopodium with ectoplasm

archaeal species were found in ZH7a—water from a site where pyrite dissolution occurred; Fig. 3). Our interpretation is that ZH16b differed from the other gossan samples in the source of water. The water flowing through samples ZH16 and 19 originated in gossan associated with old mine works above the chimney. In contrast, the water flowing

through ZH16b originated in a modern mining chamber containing an altered ore pile, a possible source of acidic mineralized water. This water would then get neutralized on its way to the chimney. Unfortunately, the water path could not be explored since the outset of the chimney is inaccessible today.

Rock dissolution sites

The habitats of this type were represented by samples ZH6 and ZH7a (Table 1). The sample ZH6 represented strongly corroded quartz rock that had been located in a talus pile in a large mine chamber for 30–40 years. The SEM-EDS examination of a rock cavity from ZH6 showed frequent bacterial cells on the quartz, pyrite, and altered K-feldspar surface. Newly formed grains of elemental sulfur of up to 25 μm in diameter were observed (Fig. 1g). The cavities were partially filled with secondary minerals. Although the volume of the sample ZH6 was not sufficient to perform XRD, an analysis of a very similar material collected from another piece of rock in the same waste pile indicated gypsum and aluminocopiapite. None of the prokaryotes from ZH6 (*At. ferrooxidans*, *F. acidiphilum*, *L. ferrooxidans*) were found in any other sample. These prokaryotes were shown to tolerate lower pH values than bacteria found in less extreme habitats (Bond et al. 2000; Golyshina and Timmis 2005; Hallberg et al. 2010). In ZH6, *At. ferrooxidans* replaced the recently described *At. ferrivorans*, which was found at the other habitats. A possible explanation is the higher extremity of the rock surface. Although the pH value of ZH6 could not be determined due to an insufficient amount of water, we suppose it was extremely low, probably the lowest from all the samples. For decades, the air moisture and possibly minute amounts of splashing water in extremely wet periods had been the only source of water, so the water film covering the sample was extremely concentrated. Remarkable corrosion of K-feldspar and even quartz together with a formation of an acidic evaporite aluminocopiapite (Buckby et al. 2003) support this hypothesis.

ZH7a was collected from a water spring running through a rock crack in the same mine chamber where ZH6 was found (Fig. S1). It represented one of the most acidic water springs in the mine, with high content of sulfates, Fe, Al and Cu (see Table 2). Interestingly, $\text{COD}_{\text{Mn,Cr}}$ was determined several times in 2009 and 2010 and was continuously high with a maximum of 257 mg/l during dry periods.

In contrast to ZH6, the sample ZH7a was dominated by an uncultured *Thermoplasmatales* archeon, which was recently found in various acidic iron-rich waters (e.g. Amaral-Zettler et al. 2011; Kimura et al. 2011), and by Fe- and S-oxidizing *Proteobacteria* which indicated the sulfide dissolution as the main process in the rock fracture. Acidophilic heterotrophic *Dokdonella* sp., possibly acidotolerant *Stenotrophomonas maltophilia* and five species related to poorly described environmental samples were also detected. Elevated concentrations of Al and Si in ZH7a indicated that acidic leaching of aluminosilicate

Table 2 The composition of water from the samples ZH7/7a, 14 and 16/16a

Sample	ZH7a	ZH14	ZH16a
pH	2.7	2.9	7.3
Conductivity (lab, mS/cm)	3.78	1.48	0.649
Ammonia	0	0	0
Nitrites	0	0	0
Nitrates	2.7	0	2.7
Chlorides	8.3	3.6	130
Sulfates	3509	797	68.5
Fluorides	5.1	0.93	0.13
Na	2.9	1.8	55.1
K	2.5	0.91	0.91
Ca	49.7	40.5	66.1
Mg	97.4	21.8	14.9
Fe	774	57.3	0
Mn	26.7	4.4	0.07
Si	18	17	4.7
COD_{Mn}	71.2	1.6	2.6
Total mineralization	5805	915	–
Phosphates	0	0	0
Humic substances	0	0	0
TOC	7.7	4.9	–
As	0.225	0.044	0
Ba	0.82	0.63	2.4
Be	0.0039	0.001	0
Al	131	19.9	0
Cr	0.11	0	0
Cd	0.048	0.007	0
Co	1.5	0.19	0
Cu	90	7.6	0.08
Ni	0.74	0.12	0
Pb	0	0	0
Ag	0	0	0
Zn	5.9	0.91	0.37
Li	0.09	0.023	0

All concentrations, TOC, COD and total mineralization are in mg/l

minerals occurred in the rock surrounding the fracture (see Dopson et al. 2007).

Bacterial communities of the two rock dissolution environments were unique among the examined samples, although the same main biogeochemical reaction (oxidation of Fe^{2+} , Rawlings 2002) was found at many other sites. The only similar community was found in ZH16b, where rock dissolution was also proposed (Figs. 2, 3). This is the first report of ecological differences in situ between *Acidithiobacillus ferrooxidans* (ZH6) and *A. ferrivorans* (ZH7 and 8, Fig. 3). Our data support the laboratory culture results of Hallberg et al. (2010).

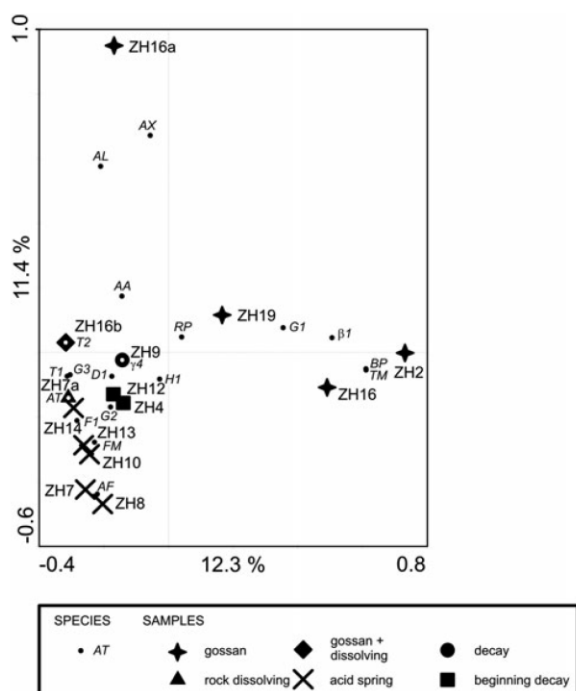


Fig. 2 Correspondence analysis showing clustering of samples into groups corresponding to the main types of environments. Sample ZH6 was left out since it shared no species with other samples and disrupted the clustering of other samples. The dissolving environment ZH7a seems to cluster with acidic springs, but it clearly separated from them and clustered with ZH16b in the third dimension (data not shown). Optimal positions of selected important species are shown. $\beta 1$ *Betaproteobacteria* OTU1, $\gamma 4$ *Gammaproteobacteria* OTU4, AA *Acidovorax avenae*, AF *Acidiferrobacter thiooxidans*, AL *Acinetobacter lwoffii*, AT *Acidithiobacillus ferrooxidans*, AX *Achromobacter xyloxidans*, BP *Burkholderia phenazinium*, D1 *Dokdonella* sp. OTU1, F1 “*Ferrofum*” sp. OTU1, FM “*Ferrofum myxofaciens*”, G1 *Gallionella* sp. OTU1, G2 *Gallionella* sp. OTU2, G3 *Gallionella* sp. OTU3, H1 *Herbaspirillum* sp. OTU1, RP *Ralstonia pickettii*, T1 *Thiomplasmatales* sp. OTU1, T2 *Thiomplasmatales* sp. OTU2, TM *Thiohalomonas* sp.

Extremely acidic waters in mine galleries

A dramatic change occurs when water gets from the rock cracks to the mine gallery. It loses its contact with the rock serving as a source of iron and sulfuric acid, but also as a source of neutralizing agents. Accumulation of schwertmannite, goethite and gypsum is common in mine gallery environment. The acidic water springs are represented by samples ZH4, 7, 8, 9, 10, 12, 13, and 14 (Table 1). Our results show a surprising diversity of habitats and bacterial communities in water springs located within a relatively small territory (Fig. 3 Fig. S1).

As observed during the preliminary site prospection, massive gelatinous growths were abundant in springs with pH lower than 3 and conductivity greater than 2 mS/cm.

They were missing in places where pH increased or conductivity decreased as a result of mixing with contaminating water. In springs with significant water flow (samples ZH7, 10, 14, and a decaying stalactite ZH4) bulky hard or gelatinous stalactites often develop, while at places where acidic water drops slowly (samples ZH8, 13, and decaying stalactites ZH12 and 9), hard soda straw-like stalactites and thin pendulous stalactites are usually formed (Fig. S2, compare with Kimura et al. 2011).

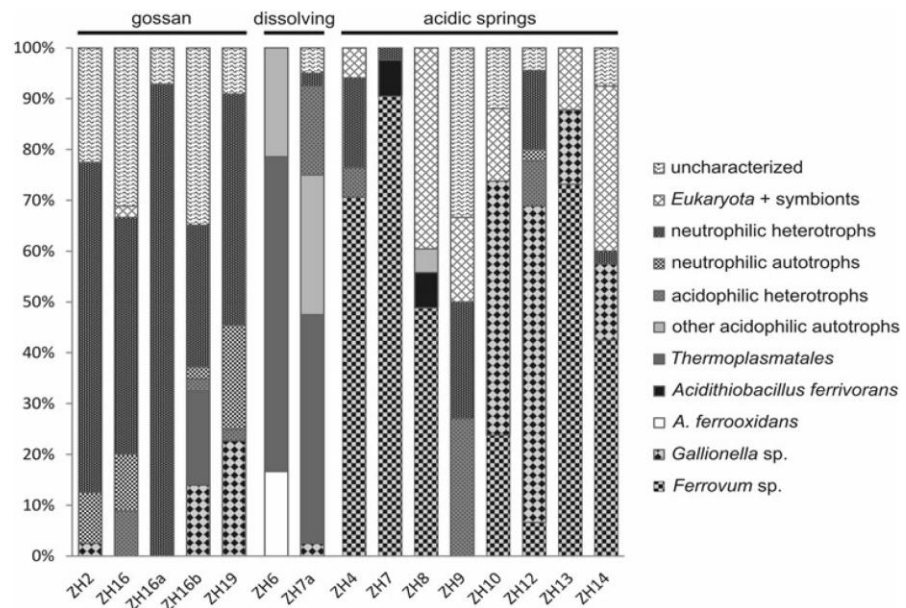
ZH7 was a gelatinous stalactite growing in the water spring sampled as ZH7a. ZH7 consisted mostly of rod-shaped bacteria, usually arranged in fibers, accompanied by mineral grains with predominating schwertmannite (Fig. 1a, d). Microbial community was dominated by iron-oxidizing autotrophs, “*Ferrofum myxofaciens*” and *At. ferrivorans*, and resembled acid streamers described in Hallberg et al. (2006). The same bacterial species also predominated in the streamers growing in highly mineralized acidic water streams in proximity of ZH7 (data not shown). A single clone of a neutrophile was also detected in ZH7 (Fig. 3). Examination by TEM revealed two morphotypes of rod-shaped bacteria and an amoeba with numerous vacuoles containing symbiotic or phagocytized bacteria (Fig. 1i).

Another high-flow spring stalactite, ZH10, grew in highly mineralized water, with pH slightly higher than 3, which was flowing out of a crack in the ceiling. The microbial community of ZH10 differed substantially from ZH7, with predominating iron-oxidizing autotrophic bacteria *Gallionella* sp., “*F. myxofaciens*”, and an uncultured *Acidimicrobiaceae* bacterium (Fig. 3; Table S1). Similarly to the other stalactites where the water pH was higher than 3, ZH10 was formed by porous granular schwertmannite, which was probably layered. The massive gelatinous growths were not observed (Fig. S2a–d).

Another set of conditions, i.e. water with pH fluctuating around 3, but with significantly lower concentrations of the main ions, was found in ZH14. This sample was a gelatinous streamer found right next to a spring which was impossible to sample directly for technical reasons. The water composition was similar to ZH7a, but approximately six times diluted. COD_{Mn} was $44.5\times$ lower in ZH14 (Table 2). A greater diversity of iron-oxidizing autotrophs, including a novel “*Ferrofum*” species, diverse acidophilic, mostly aerobic or facultatively anaerobic, heterotrophs and a single non-acidophile (*Acinetobacter lwoffii*) was detected (Fig. 3; Table S1). The increasing diversity of bacteria is consistent with the decreasing extremity of the habitat (Bond et al. 2000).

These findings underline the essential role of pH and mineralization in the composition and morphology of bacterial communities, even when the energy source, the terminal metabolic products, the hydrodynamic

Fig. 3 Comparison of main microbial ecological groups and selected genera in the Zlaté Hory microhabitats. For characteristics of the samples see Table 1



parameters, and the main biogenic or toxic elements are almost identical. The ecological niches of the bacterial consortia were much more limited than would be assumed from the known growth requirements of particular bacterial species in the laboratory culture. The most likely explanation is that competition limits the occurrence of every species to habitats with optimal physico-chemical conditions (Johnson 1998; Bond et al. 2000).

Eukaryotic organisms and bacteria considered to be their symbionts were detected in all acidic spring samples (Fig. 1i, j). The eukaryotes probably belonged to the Amoebozoa, although the statistical support was sufficient for some clones only (Fig. S6). Eukaryotes are probably common constituents of acidic metal-rich environments (Amaral-Zettler et al. 2002; Macalady et al. 2007).

In order to complete the spectrum of analyzed water streams, we examined four stalactites from places where the water drops slowly from the minor rock cracks (ZH8, 9, 12, 13). Two of the stalactites, one soda straw-like (ZH8) and one pendulous (ZH13), showed simple communities similar to the growths in high-flow highly acidic and mineralized waters (e.g. ZH7, Fig. 3). However, the number of cells per typical visual field of cryo-FESEM was approximately ten times lower (Fig. 1a, c). Additionally, one clone of a divergent amoebozoan and a divergent amoebal endosymbiotic bacteria belonging to *Parachlamydiaceae* and *Rickettsiales* were detected.

Another soda straw stalactite (ZH12) hosted a community of *Gallionella* sp., “*F. myxofaciens*” and four other autotrophs as the primary producers, together with five heterotrophs. Some of them were not typical acidophiles (Table S1). Despite macroscopic similarity to ZH8, the

microstructure of ZH12 was different. The SEM observation showed quiescent crystallization of layered schwertmannite indicating a slower rate of encrustation in ZH12 (Fig. 1f), whereas ZH8 had more chaotic porous structure. We conclude that the low-flow stalactites host microbial associations dependent on the chemoautotrophic oxidation of iron by the primary producers. These associations clustered with the high-flow communities in CA analysis (Fig. 2) while no significant difference was detected by CCA.

The microbiota of the pendulous stalactite ZH9 was completely different. Typical acidophilic autotrophs were replaced by multiple species of acidophilic and neutrophilic heterotrophs. The clones were affiliated to various taxonomic groups including candidate groups TM6 and WS6. *R. pickettii*, *Acidovorax avenae* and *Herbaspirillum* sp. represented the most abundant neutrophilic species (Fig. 3; Table S1). The microstructure of ZH9 differed from the other gelatinous samples. In contrast to samples ZH7 and 13, where the organic matrix was fibrous and porous, with numerous freshly formed schwertmannite beads and bacterial cells (Fig. 1a, c), the structure of ZH9 was compact, without any visible cells or the bulky organic matrix (Fig. 1b, e). It was composed of schwertmannite–goethite in Fe:S ratio varying from 9.1 to 11.7. The proportion of goethite was thus markedly higher than in all other high-flow (Fe:S 2.8–3.9) and low-flow stalactites (Fe:S 4.4–7.7). Therefore, the mineral material of ZH9 must have been older than that of other samples since schwertmannite passes to goethite spontaneously as a result of aging (Schwertmann and Carlson 2005). The most likely explanation of the unique character of ZH9 is that the organic matrix enclosing mineral grains was decomposing at the time of sampling.

These observations are consistent with the growth phase of stalactites being followed by the decay when the supply of ferrous iron becomes insufficient. The primary producers then disappear and are replaced by heterotrophic bacteria decomposing the organic matrix of the stalactite. Alternate explanation that the stalactites does not decay but simply grow at less extreme sites is not applicable for many reasons. Mainly because the less extreme but not decaying samples ZH10 and 14 were inhabited almost strictly by acidophiles that were mostly autotrophic (Fig. 3).

This hypothesis was also supported by the analysis of ZH4. This sample was a fragment of gelatinous stalactite similar to ZH7 found at the bottom of a mining chamber. Most likely, it had fallen down from the mining chamber shortly before the collection and thus is in the beginning phase of decay. If our hypothesis is correct, a mixture of bacteria resembling ZH7 and 9 should be detected in ZH4. Its microbial community consisted of “*F. myxofaciens*” accompanied by *R. picketii* and the same species of *Acidobacteria* and amoebae as in ZH9 (Table S1).

Stalactites in several different phases of the growth–decay cycle were sampled in the recent study: samples ZH7, 8, 10, and 13 represented growing stalactites, ZH4 and 12 were in the initial phase of decay, and ZH9 was in the advanced decay phase after colmatage of its tributary

rock cracks. Our observations are most similar to the results of Kimura et al (2011) showing heterotrophic bacteria flourishing at the bottom of gelatinous acidic water streamers. There, the low supply of ferrous iron and oxygen limited the autotrophs and dissimilative iron reduction may have been favored. However, the microbial community differed from the communities in our present study and no decaying stalactites were explored.

Interestingly, a large portion of the bacteria contributing to the decay in Zlaté Hory mine were not typical acidophiles. Furthermore, five out of ten species of non-acidophilic heterotrophs found at the acidic habitats were abundant in gossan, including the most frequent *R. picketii*, *A. avenae*, and *Herbaspirillum* sp. (Fig. S4; Table S1). Moreover, we expect that the observed proportion of heterotrophs common for both gossan and the acidic zone would increase with more thorough gossan sampling. Such a phenomenon has not yet been reported from acidic environments, although acidotolerant isolates of *Sphingomonas* sp. and *R. picketii* were described recently (Kimura et al. 2011). Due to the high content of heavy metals in gossan, the bacteria should be preadapted to the metal-rich environment. Heavy metal-resistant strains of *Ralstonia*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia*, and *Acinetobacter* have already been reported (Sun et al. 2010; Yang et al. 2010).

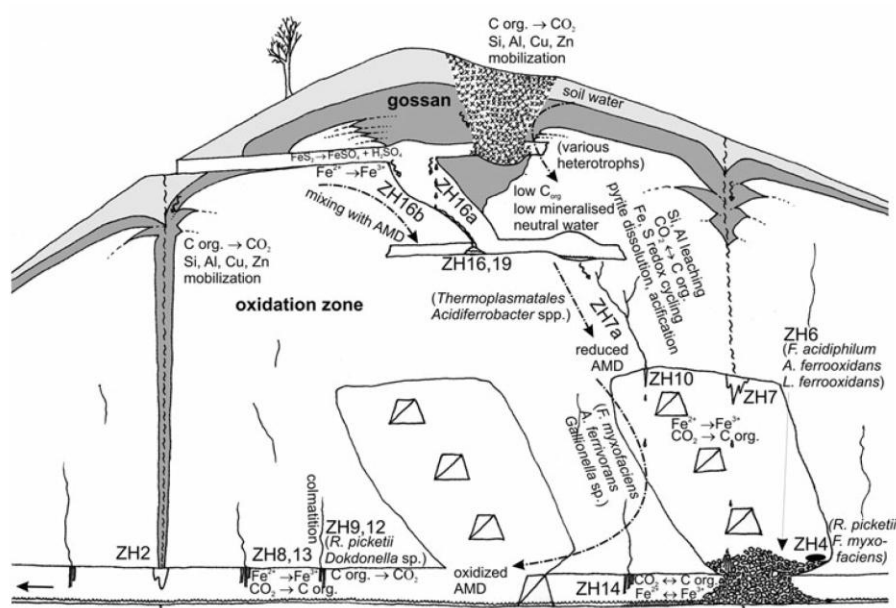


Fig. 4 A scheme showing the main processes, types of habitats and bacterial species identified in the Zlaté Hory mine ecosystem. Mainly aerobic oxidation of organic compounds, mobilization and redeposition of heavy metals, Si and Al occurs in gossan (dark grey). The organics-depleted drainage from gossan percolates in the fissures of the oxidation zone (white), where oxidative dissolution of sulfides by chemolithotrophic bacteria occurs. Water becomes acidic and

enriched in Fe^{2+} (reduced AMD). Autotrophic iron-oxidizing bacterial growths flourish at the places where water discharges from fissures to the mine gallery and in the drainage streams. Heterotrophic bacteria are continuously imported to these growths and may overgrow the autotrophs, especially when the source of ferrous iron is lost due to the local changes in water circulation

We hypothesize that the bacteria living in gossan are continuously being washed out and imported to the deeper zones of the deposit. Here some of them survive the acidic conditions, become part of the ecosystem and serve as decomposers of the organic material. Although non-acidophilic heterotrophs constitute only a minor part of growing acidic streamers, they may overgrow the acidophiles in the decay phase. The adaptation of the bacteria to low pH could be explained by prolonged coexistence of acidic and neutral zones in close proximity. The boundary between the zones represents an optimal environment for adaptation of bacteria. Thus, the heterotrophic bacteria originating in gossan should be recognized as a novel component of the sulfide weathering ecosystem.

Concluding remarks

Geochemical processes maintain distinct microbial communities in the three main zones of the ecosystem (i.e. gossan, the rock dissolution sites in the oxidation zone, and the mine gallery springs; Figs. 2, 4) despite the water flow that continuously transports bacterial cells from gossan to the oxidation zone and from the oxidation zone to the mine gallery springs. In the mine gallery springs, several different consortia of autotrophic bacteria sharply delimited by pH and mineralization grow next to each other (Fig. 4). At the same time, some of the gossan bacteria preadapted to the acidic and toxic conditions and are able to survive even in acidic environment, where they decompose decaying growths of acidophilic bacteria. Stable import of gossan bacteria to the acidic ecosystem may be an important factor influencing the biodiversity and functions of the whole ecosystem. Thus, the role of gossan in the sulfidic ore deposit weathering should not be neglected because it has the potential to change both the chemical and the microbiological processes taking place in the deposit.

Acknowledgments This work was supported by Institutional Research Concept MSM0021620858 and the Czech Science Foundation project (P506/11/1317) and SVV (project SVV-2012-265 206). We thank Jan Černý for providing laboratory facilities; Jan Kotris (Díamo, RD Jeseník) for enabling prospection of the site; Václav Křišťufek for providing access to the Cryo-FESEM facility; Petr Drahoš and Radek Procházka for XRD analyses; Linda Nedbalová for statistical analyses; Marie Mikšaníková and Tomáš Machač for graphic design of some illustrations and Naděžda Brdičková for language corrections. The authors also wish to thank anonymous reviewers for providing a thorough and thoughtful critique of the manuscript.

References

- Amaral-Zettler LA, Gómez F, Zettler E, Keenan BG, Amils R, Sogin ML (2002) Microbiology: eukaryotic diversity in Spain's River of Fire. *Nature* 417:137
- Amaral-Zettler LA, Zettler ER, Theroux SM, Palacios C, Aguilera A, Amils R (2011) Microbial community structure across the tree of life in the extreme Rio Tinto. *ISME J* 5:42–50
- Baker BJ, Banfield JF (2003) Microbial communities in acid mine drainage. *FEMS Microbiol Ecol* 44:139–152
- Bond PL, Smrīga SP, Banfield JF (2000) Phylogeny of microorganisms populating a thick, subaerial, predominantly lithotrophic biofilm at an extreme acid mine drainage site. *Appl Environ Microbiol* 66:3842–3849
- Boontawan A, Boontawan P (2011) Isolation and characterization of *Jatropha* oil degradation by *Enterococcus faecalis* and *Burkholderia cenocepacia* W-1 under anaerobic condition. *Afr J Biotechnol* 10:13841–13851
- Buckby T, Black S, Coleman ML, Hodson ME (2003) Fe-sulphate-rich evaporative mineral precipitates from the Rio Tinto, southwest Spain. *Mineral Mag* 67:263–278
- Chao A, Chazdon RL, Colwell RK, Shen T-J (2005) A new statistical approach for assessing similarity of species composition with incidence and abundance data. *Ecol Lett* 8:148–159
- Dopson M, Halinen AK, Rahunen N, Boström D, Sundkvist JE, Riekkola-Vanhanen M et al (2007) Silicate mineral dissolution during heap bioleaching. *Biotechnol Bioeng* 99:811–820
- Enders MS, Knickerbocker C, Titley SR, Southam G (2006) The role of bacteria in the supergene environment of the Morenci Porphyry Copper Deposit, Greenlee County, Arizona. *Econ Geol* 101:59–70
- Espana JS, Pastor ES, Pamo EL (2007) Iron terraces in acid mine drainage systems: a discussion about the organic and inorganic factors involved in their formation through observations from the Tintillo acidic river (Riotinto mine, Huelva, Spain). *Geosphere* 3:133–151
- Golyshina OV, Timmis KN (2005) *Ferroplasma* and relatives, recently discovered cell wall-lacking archaea making a living in extremely acid, heavy metal-rich environments. *Environ Microbiol* 7:1277–1288
- Golyshina OV, Pivovarova TA, Karavaiko GI, Kondratéva TF, Moore ER, Abraham WR et al (2000) *Ferroplasma acidiphilum* gen. nov., sp. nov., an acidophilic, autotrophic, ferrous-iron-oxidizing, cell-wall-lacking, mesophilic member of the *Ferroplasma*-ceae fam. nov., comprising a distinct lineage of the *Archaea*. *Int J Syst Evol Microbiol* 50:997–1006
- Hallberg KB, Coupland K, Kimura S, Johnson DB (2006) Macroscopic streamer growths in acidic, metal-rich mine waters in North Wales consist of novel and remarkably simple bacterial communities. *Appl Environ Microbiol* 72:2022–2030
- Hallberg KB, González-Toril E, Johnson DB (2010) *Acidithiobacillus ferrivorans*, sp. nov.; facultatively anaerobic, psychrotolerant iron-, and sulfur-oxidizing acidophiles isolated from metal mine-impacted environments. *Extremophiles* 14:9–19
- Hallberg KB, Hedrich S, Johnson DB (2011) *Acidiferrobacter thiooxydans*, gen. nov. sp. nov.; an acidophilic, thermo-tolerant, facultatively anaerobic iron- and sulfur-oxidizer of the family Ectothiorhodospiraceae. *Extremophiles* 15:271–279
- Heinzel E, Janneck E, Glombitza F, Schlömann M, Seifert J (2009) Population dynamics of iron-oxidizing communities in pilot plants for the treatment of acid mine waters. *Environ Sci Technol* 43:6138–6144
- Horáková M, Lischke P, Grünwald A (1986) Chemical and physical analyses of water. SNTL, Praha (in Czech)
- Izawa MRM, Shuster J, Banerjee NR, Flemming RL, Southam G (2010) Microbes influence the mobilization and re-precipitation of Ag in gossans. *Geochim Cosmochim Acta* 74:A450
- Johnson DB (1998) Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms. *FEMS Microbiol Ecol* 27:307–317
- Johnson DB, Rolfe S, Hallberg KB, Iversen E (2001) Isolation and phylogenetic characterization of acidophilic microorganisms

- indigenous to acidic drainage waters at an abandoned Norwegian copper mine. *Environ Microbiol* 3:630–637
- Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T (2002) MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res* 30:3059–3066
- Kimura S, Bryan CG, Hallberg KB, Johnson DB (2011) Biodiversity and geochemistry of an extremely acidic, low-temperature subterranean environment sustained by chemolithotrophy. *Environ Microbiol* 13:2092–2104
- Kotris J (2004) Segmentation of the ore district and overview of the mining performed by Ore Mines Jeseník. In: Pecina V, Večeřa J (eds) Zlaté Hory mine district, proceedings of international conference. Czech geological survey, Jeseník, pp 64–73 (in Czech)
- Macalady JL, Jones DS, Lyon EH (2007) Extremely acidic, pendulous cave wall biofilms from the Frasassi cave system, Italy. *Environ Microbiol* 9:1402–1414
- Mendez MO, Neilson JW, Maier RM (2008) Characterization of a bacterial community in an abandoned semiarid lead–zinc mine tailing site. *Appl Environ Microbiol* 74:3899–3907
- Okabayashi A, Wakai S, Kanao T, Sugio T, Kamimura K (2005) Diversity of 16S ribosomal DNA-defined bacterial population in acid rock drainage from Japanese pyrite mine. *J Biosci Bioeng* 100:644–652
- Pecina ET, Castillo P, Martínez D, Oarrantia E (2010) Biooxidation of an auriferous arsenical pyrite concentrate by means of mesophilic and thermophilic bacteria. *Miner Metall Process* 27:212–218
- Puhakka JA, Kaksonen AH, Riekkola-Vanhanen M (2007) Heap leaching of black schist. In: Rawlings DE, Johnson DB (eds) *Biomining*. Springer, Berlin, pp 139–152
- Rawlings DE (2002) Heavy metal mining using microbes. *Annu Rev Microbiol* 56:65–91
- Reynolds ES (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17:208–212
- Romero A, Gonzalez I, Galan E (2011) Stream water geochemistry from mine wastes in Pena de Hierro, Riotinto area, SW Spain: a case of extreme acid mine drainage. *Environ Earth Sci* 62:645–656
- Rowe OF, Sánchez-España J, Hallberg KB, Johnson DB (2007) Microbial communities and geochemical dynamics in an extremely acidic, metal-rich stream at an abandoned sulfide mine (Huelva, Spain) underpinned by two functional primary production systems. *Environ Microbiol* 9:1761–1771
- Schrenk MO, Edwards KJ, Goodman RM, Hamers RJ, Banfield JF (1998) Distribution of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*: implications for generation of acid mine drainage. *Science* 279:1519–1522
- Schwertmann U, Carlson L (2005) The pH-dependent transformation of schwertmannite to goethite at 25°C. *Clay Miner* 40:63–66
- Sette LD, Simioni KCM, Vasconcelos SP, Dussan LJ, Neto EVS, Oliveira VM (2007) Analysis of the composition of bacterial communities in oil reservoirs from a southern offshore Brazilian basin. *Antonie Van Leeuwenhoek* 91:253–266
- Stamatakis A (2006) RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22:2688–2690
- Sun LN, Zhang YF, He LY, Chen ZJ, Wang QY, Qian M, Sheng XF (2010) Genetic diversity and characterization of heavy metal-resistant-endophytic bacteria from two copper-tolerant plant species on copper mine wasteland. *Bioresour Technol* 101:501–509
- Swofford DL (2002) PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods). Version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA
- Tan GL, Shu WS, Hallberg KB, Li F, Lan CY, Huang LN (2007) Cultivation-dependent and cultivation-independent characterization of the microbial community in acid mine drainage associated with acidic Pb/Zn mine tailings at Lechang, Guangdong, China. *FEMS Microbiol Ecol* 59:118–126
- Tan GL, Shu WS, Zhou WH, Li XL, Lan CY, Huang LN (2009) Seasonal and spatial variations in microbial community structure and diversity in the acid stream draining across an ongoing surface mining site. *FEMS Microbiol Ecol* 70:121–129
- ter Braak CJF, Šmilauer P (2002) CANOCO Reference manual and users guide to Canoco for Windows: software for canonical community ordination (Version 4.5). Microcomputer Power, Ithaca, NY
- Turner S, Pryer KM, Miao VPW, Palmer JD (1999) Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *J Eukaryot Microbiol* 46:327–338
- Vaněček M (2004) Characteristic of the Zlaté Hory ore deposit and quantity of the polymetallic ore reserves. In: Pecina V, Večeřa J (eds) Zlaté Hory mine district, proceedings of international conference, Czech geological survey, Jeseník, pp 50–53 (in Czech)
- Xiao S, Xie X, Liu J (2009) Microbial communities in acid water environments of two mines, China. *Environ Pollut* 157:1045–1050
- Yang F, Pecina DA, Kelly SD, Kim SH, Kemner KM, Long DT, Marsh TL (2010) Biosequestration via cooperative binding of copper by *Ralstonia pickettii*. *Environ Technol* 31:1045–1060

6.2. Drahota et al., 2013

Drahota P, Falteisek L, Redlich A, Rohovec J, Matoušek T, Čepička I (2013). Microbial effects on the release and attenuation of arsenic in the shallow subsurface of a natural geochemical anomaly. *Environmental pollution* 180, 84-91.



Microbial effects on the release and attenuation of arsenic in the shallow subsurface of a natural geochemical anomaly



Petr Drahota^{a,*}, Lukáš Falteisek^b, Aleš Redlich^c, Jan Rohovec^d, Tomáš Matoušek^e,
Ivan Čepička^b

^a Institute of Geochemistry, Mineralogy and Mineral Resources, Charles University, Albertov 6, 128 43 Prague 2, Czech Republic

^b Department of Zoology, Charles University, Viničná 7, 128 43 Prague, Czech Republic

^c Department of Physical and Macromolecular Chemistry, Charles University, Hlavova 2030, 128 43 Prague, Czech Republic

^d Institute of Geology, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Rozvojová 269, 165 00 Prague 6-Lysolaje, Czech Republic

^e Institute of Analytical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Veveří 97, 602 00 Brno, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 February 2013

Received in revised form

18 April 2013

Accepted 1 May 2013

Keywords:

Arsenic

Microbial mobilization

arrA

dsrB

Realgar

ABSTRACT

Critical factors leading to arsenic release and attenuation from the shallow subsurface were studied with multidisciplinary approach in the natural gold–arsenic geochemical anomaly at Mokrsko (Czech Republic). The results show that microbial reduction promotes arsenic release from Fe(III) (hydr)oxides and Fe(III) arsenates, thereby enhancing dissolved arsenic in the shallow groundwater at average concentration of 7.76 mg/L. In the organic-rich aggregates and wood particles, however, microbial sulfate reduction triggers the formation of realgar deposits, leading to accumulation of As in the distinct organic-rich patches of the shallow subsurface. We conclude that precipitation of realgar in the shallow subsurface of soil/sediment depends on specific and non-trivial combination of water and rock chemistry, microbial community composition and spatial organisation of the subsurface zone, where speciation in saturated environments varied on a centimeter scale from reduced (decomposed wood, H₂S and realgar present) to oxidized (goethite and arsenate minerals are present).

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

With elevated levels of arsenic (As) being detected in groundwater, most notably in Bangladesh, West Bengal and other South-east Asian countries (Charlet and Polya, 2006), United States (Welch et al., 2000), and Europe (Lindberg et al., 2006), As has emerged as a serious health concern worldwide.

Among the many different mechanisms proposed to explain As mobilization into the groundwater, reductive dissolution of As-bearing Fe(III) (hydr)oxides has gained particular attention, with several studies providing evidence that dissimilatory Fe(III)-reducing microorganisms can play a critical role in mediating As mobilization (Islam et al., 2004; Smedley and Kinniburgh, 2002). The amount of As released into solution due to the microbial reductive dissolution of Fe(III) minerals has been shown to depend on the As oxidation state and Fe(III) mineralogy (Campbell et al., 2006; Islam et al., 2004; Tufano et al., 2008; Zobrist et al., 2000).

Furthermore, several microbiological studies, e.g. Campbell et al. (2006), Kocar et al. (2006), Tufano et al. (2008) and Zobrist et al. (2000), have suggested that As release via the reductive dissolution of As-bearing Fe(III) (hydr)oxides is negligible under abiotic laboratory simulations, but significant through direct enzymatic reduction of sorbed As(V). Their observations indicated that As retention and release from Fe(III) (hydr)oxides is controlled by complex pathways of Fe biotransformation and that reductive dissolution of Fe(III) (hydr)oxides can promote As sequestration rather than desorption and release into the solution. Direct reduction of As(V) to As(III) is another mechanism by which As may be mobilized. Arsenate is usually not reduced abiotically by any other reductant than sulfide (Rochette et al., 2000), and the presence of As(III) in anoxic, but sulfide-depleted, waters has been attributed to microbial As(V) reduction (Nicholas et al., 2003; Páez-Espino et al., 2009). There are two known microbial pathways for direct reduction of As(V) to As(III). The respiratory pathway (*arrA* pathway) couples the oxidation of an organic substrate with As(V) reduction, resulting in cell growth (Malasarn et al., 2004). Alternatively, microbial reduction of As(V) may occur through a detoxification pathway (*arsC* pathway), during which organisms do not acquire energy for growth (Nicholas et al., 2003; Páez-Espino et al., 2009).

* Corresponding author.

E-mail addresses: petr.drahota@natur.cuni.cz, drahota@natur.cuni.cz (P. Drahota).

Somewhat less attention has been paid to factors that remove As from solution under anoxic conditions, such as precipitation with sulfide, a reaction observed in laboratory studies of microorganisms and in shallow aquifers (Kirk et al., 2004; Ledbetter et al., 2007; McCreadie et al., 2000; O'Day et al., 2004). For these reasons, As concentrations in groundwaters can also be lowered by precipitation with sulfide produced by microbial sulfate reduction (O'Day et al., 2004; Héry et al., 2010; Kirk et al., 2004), and here evolutionarily highly conserved *dsrB* functional gene offers a potentially useful genetic marker for sulfate-reducing microorganisms.

Given the complexity of As release into solution, and the numerous parameters that can regulate it, a multidisciplinary approach using complementary microbiological, mineralogical and geochemical techniques has been used in the present study to identify critical factors promoting this process in the shallow subsurface of the natural geochemical anomaly in the central Czech Republic. The study site is a natural As–Au geochemical anomaly at Mokrsko (central Czech Republic) that is well known to have high concentrations of As present in shallow groundwater (0.13–1.14 mg/L) (Drahotka et al., 2009).

The aims of the study were to: (i) explore the association of As with the solid phase in two contrasting shallow subsurface environments; (ii) characterize the microbial communities present, with particular emphasis on their functions (including chemoautotrophic As(III) oxidation, As(V) detoxification, dissimilatory As(V) respiration, and sulfate reduction); and (iii) investigate the biogeochemical processes associated with As mobilization/attenuation by developing suitable microcosm experiments.

2. Methods

2.1. Sample collection

The sampling site was located in the vicinity of the village of Mokrsko, Czech Republic, at N 49° 44' 42.93" and E 14° 20' 0.69", in area known to have elevated concentrations of As present in shallow groundwaters (Drahotka et al., 2009). To represent the characteristic end-members of the range of the shallow subsurface conditions found in the surroundings of the village, two contrasting samples were chosen for this study. They were collected in triplicate from a depth of one meter. Sample R (regolith) was disintegrated granodiorite material within the range of water table fluctuations, whereas sample S was organic-rich stream sediment from the permanently saturated hyporheic zone. Samples were immediately transferred from the auger to N₂-filled sterile polyethylene bags, de-aerated with a stream of N₂, packed under ice, and transported to the laboratory where they were immediately homogenized using an acid-washed 2 mm nylon sieve in a glove bag under N₂ atmosphere. For microcosm experiments and DNA extraction, both samples were processed within two hours after their removal from the auger. For mineralogical and geochemical characterization, samples were freeze-dried and stored frozen in an N₂ atmosphere until geochemical and mineralogical data collection (within 1 month).

One-meter-long suction lysimeters were installed directly in the holes previously excavated for regolith and sediment samples and left to settle for more than six months. Groundwater pH, Eh, and specific conductivity were measured in the field, following stabilization, with calibrated portable multimeters (WTW). The field-measured Eh values were corrected to be presented relative to the standard hydrogen electrode. Groundwater samples were divided into pre-cleaned HDPE or glass bottles and analyzed within four days, unless noted otherwise.

2.2. Microcosm experiments

Microcosms were set up by mixing 50 g of wet solid samples with 1 L of sterile synthetic groundwater (16 mg/L KNO₃, 240 mg/L CaCO₃, 110 mg/L MgSO₄·7H₂O, 0.72 mg/L KH₂PO₄, with pH adjusted to 7.1 with NaHCO₃) in 1-L bottles. Five different types of microcosms were prepared for regolith and sediment samples: (i) aerobic with no amendment, (ii) aerobic with no amendment and poisoned with azide (10 mM sodium azide); (iii) anaerobic with no amendment, (iv) anaerobic with 50 mM glucose amendment, and (v) anaerobic with 50 mM glucose amendment and poisoned with azide (10 mM sodium azide). Aerobic conditions were maintained by the clamps with a 0.2 μm membrane to allow the free oxygen into the microcosm. Anaerobic conditions were maintained by sealing the bottles with a butyl rubber stopper, sealed with clamps and stored in a glove box under N₂ atmosphere. Each microcosm was performed in triplicate and incubated at 23 ± 2 °C in the dark for 29 days.

Slurry samples (c. 10 mL) were removed from the bottles for analysis on days 0, 2, 5, 9, 14, 19, 24, and 29 using sterile stainless steel hypodermic needles and syringes. Arsenic, Fe, and S in filtered (0.45-μm) and stabilized (2% HNO₃, Suprapure, Merck) samples was determined by ICP OES; changes in solid-phase As and Fe speciation after 29 days of incubation were tracked by sequential extraction.

2.3. Analysis

2.3.1. Regolith/sediment samples

Solid phase concentrations of major and minor elements were determined using an X-ray fluorescence spectrometer (XRF; ARL 9400 XP⁺, Thermo ARL). The total organic carbon (TOC) and S were quantified using an ELTRA CS 530 total carbon analyzer and ELTRA CS 500 total inorganic carbon. All analyses were conducted in triplicate to assess the reproducibility, which was found to be within 11% and 3% for XRF and ELTRA, respectively. In order to characterize As-bearing minerals in the regolith and sediment, heavy minerals were separated using bromoform diluted with 1,4-dioxane ($d = 2.81 \text{ g/cm}^3$) in the 0.1–0.5 mm fraction. Mineral identification of separated particles was undertaken by X-ray diffraction (XRD) using a PANalytical X'Pert Pro diffractometer with CuK α radiation (40 kV, 30 mA, step scanning at 0.02°/200 s in the range 5–70° 2 θ). A scanning electron microscope (SEM; CamScan S4) equipped with an energy dispersive spectrometer (EDS; Oxford Link) was used to image the heavy mineral fraction and semi-quantitatively analysed mineral grains. The distribution of As, Fe, and S within different fractions of the solid phases was determined by sequential extraction, adapted from the method detailed by Wenzel et al. (2001). Extractants were used in the following order: (i) 0.05 M ammonium sulfate; (ii) 0.05 M ammonium dihydrogen phosphate; (iii) 0.2 M ammonium oxalate, pH 3 in the dark; and (iv) 0.2 M ammonium oxalate, pH 3 at 80 °C. To minimize sample oxidation, extractions were performed in a glove box under N₂ atmosphere. All extractions were conducted in triplicate to assess the reproducibility, which was found to be within 27% (avg. 10%).

2.3.2. Aqueous samples

Major cations (Ca, Mg, K, Na, Mn, Al, Fe) were analyzed by ICP OES (IRIS Intrepid II XPS), after the stabilization by 2% HNO₃ (Suprapure, Merck). Field and laboratory duplicates indicated a relatively high level of reproducibility (<8%). Groundwater As species were determined by HPLC-ICP MS (Agilent 7700x ICP MS with Agilent 1200 Series HPLC isocratic pump). The precision of the results was approximately 5%. Groundwater H₂S was preserved with Zn acetate prior to determination by the methylene blue method (APHA, 1998). Aliquots of groundwater were added to 1,10-phenanthroline solutions for Fe²⁺ determination (APHA, 1998). Sulfide and Fe²⁺ concentrations were determined within three hours after their collection on a Cintra 3300 UV-Visible Spectrophotometer (GBC) with a precision of ±15%. Anions (SO₄²⁻, Cl⁻, NO₃⁻) were analyzed by ion chromatography (HPLC, column Dionex ICS-2000), with a precision of about ±8%; dissolved organic carbon (DOC) was determined by a TOC-VW analyzer (Shimadzu); the alkalinity was determined by titration (TitroLine Easy, Schott) with 0.1 M H₂SO₄.

2.3.3. Microbiological samples

Approximately 250 mg of each sample was collected from 50 g of homogenized material for DNA extraction. Genomic DNA was isolated using a ZR soil microbe DNA kit (Zymo Research). An approximately 860 bp-long fragment of 16S rDNA from *Bacteria* and *Archaea* was amplified following Turner et al. (1999). A 160–200 bp-long fragment of dissimilative arsenate reductase gene (*arrA*) was amplified following the touchdown protocol of Malasarn et al. (2004). An approximately 540 bp-long fragment of arsenite oxidase gene (*ainA*) was amplified following Inskeep et al. (2007). A 350 bp fragment of respiration sulfite reductase (*dsrB*) was amplified using the semi-nested PCR protocol of Foti et al. (2007). LA DNA polymerase (Top-bio) was used for all the PCR reactions. For primer sequences see Supplementary Information (Table S1).

PCR products were purified using the Zymoclean gel DNA recovery kit (Zymo Research) and TA cloned into pGEM-T easy vector (Promega) using chemocompetent *Escherichia coli* TOP10 cells. Approximately 50 randomly selected clones of 16S rDNA and 20 clones of each metabolic gene from each sample were reamplified and sequenced on a 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

The newly determined sequences were deposited in the GenBank database under accession numbers KC149573 to KC149744. The newly determined sequences of *arrA* gene are listed in the Supplementary information (Table S2).

2.4. Data analysis

2.4.1. Equilibrium modeling calculation

Equilibrium aqueous speciation and mineral saturation states were calculated using the Geochemist's Workbench software package (Bethke and Yeakel, 2010), version 8.0.12, with a modified version of the thermodynamic database (thermo.dat) by Kirk et al. (2010). We added data for the sulfate form of green rust from Bourrie et al. (1999). The table of reactions for aqueous As species and Fe and As minerals (Table S3) included in the modified dataset is available in the Supplementary information.

Table 1

Overview of microbial communities used in the classification of the community found in the Mokrsko shallow subsurface.

Name	Description	As	Anaerobic respiration	Locality	Reference
Sulfate reducing	Hydrocarbon contaminated river sediment where reduction of sulfates occurs	–	+++	Düsseldorf-Flingern, Germany	Winderl et al. (2008)
Hradčany Lava tube	Hydrocarbon contaminated soil under remediation by aeration Oligotrophic heterotrophic bacterial communities from the walls of the lava tubes	–	++	Hradčany, Czech Republic	Kabelitz et al. (2009)
Zloty Stok Cernuc	As-impacted biofilm with prevailing methylo-trophy and heterotrophy Partially anaerobic underground water naturally containing hydrocarbons, sulfates and arsenic	++	+	Zloty Stok, Poland	Drewniak et al. (2012)
Hanford	Partially anoxic groundwater without As and hydrocarbon contamination	+	++	Černuc and Knežmost, Czech Republic Hanford, USA	Falteisek et al., unpublished Lin et al. (2012)
Mokrsko Glacier	See Methods Mostly phototrophic bacterial community from recently deglaciated soil	–	++	Mokrsko, Czech Republic Cordillera Vilcanota, Peru	This study Nemergut et al. (2007)

As – presence of elevated As concentrations (– not elevated, + partially elevated, ++ greatly elevated); anaerobic respiration – estimated proportion of metabolisms using alternate electron acceptors (+ minor, ++ important part of ecosystem, +++ main metabolism present).

2.4.2. Phylogenetic analysis

The newly determined sequences were aligned using MAFFT (Kato et al., 2002) with the help of the EBI server (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/>); both the number of iterations and the number of tree rebuildings were set to 100. The 16S rDNA sequences with genetic distances (computed by PAUP* 4.0b10; Swofford, 2002) lower than 2% were considered to belong to conspecific organisms. Five final datasets were created: (i) 252 bacterial 16S rDNA sequences from GenBank and 100 newly determined sequences of *Bacteria*, (ii) 31 GenBank sequences and 1 newly determined 16S rDNA sequence of *Archaea*, (iii) 27 GenBank and 28 newly determined sequences of *arrA*, (iv) 42 GenBank and 32 newly determined *aioA* sequences; (v) 34 GenBank and 36 newly determined *dsrB* sequences. All the datasets contained first BLAST hits of the newly determined sequences as well as representatives of the broad diversity of the studied genes. Sequences from each data set were aligned by MAFFT and coding sequences were *in silico* translated. Phylogenetic trees of 16S rDNA were constructed by maximum likelihood in RAxML 7.2.6. (Stamatakis, 2006) under the GTRGAMMAI substitution model, and trees of functional genes in Phym 3.0 under LGGAMMAI model (Guindon and Gascuel, 2003). Node support was assessed by maximum likelihood analysis of 1000 bootstrap datasets.

2.4.3. Microbiological statistical methods

The 16S rDNA clone library was compared with clone libraries from various well-characterized pristine and hydrocarbon-impacted underground environments both impacted and non-impacted by As. These environments are described in Table 1. The final data set contained 100 randomly selected sequences from each environment and all the newly determined eubacterial 16S rDNA sequences. The distances between bacterial communities were calculated and subsequent analyses (PCoA, UPGMA, significance test) were performed using the Fast UniFrac online tool (Hamady et al., 2010) with phylogenetic trees constructed in RAxML.

3. Results

3.1. Characteristics of the regolith, sediment and groundwaters

Characterization of regolith and sediment samples by XRD indicated similar mineralogy, consisting mainly of quartz with lesser amounts of plagioclase, K-feldspar, hornblende and phyllo-silicate minerals, including muscovite, biotite, vermiculite, and chlorite. Major element compositions determined by XRF were consistent with the XRD data, with a high percentage of Si and significant proportions of Al and Fe in both samples (Table 2). Bulk analysis of the As, S and organic C concentrations revealed that the contents of these minor components in the regolith were significantly lower than those in the organic-rich sediment sample (Table 2). Despite the relatively high As content, no As-bearing minerals were identified with XRD, even in the heavy mineral fractions, probably because abundances were below the detection limit of the method (~5 wt%). Nevertheless, examination of heavy mineral fractions by SEM/EDS showed relatively abundant As-bearing goethite (up to 3.9 wt% of As) (Supplementary Information, Fig. S1) and minor bariopharmacosiderite [BaFe₄(AsO₄)₃(OH)₅·5H₂O] and arseniosiderite [Ca₃Fe₄(OH)₆(AsO₄)₄·3H₂O] in the regolith sample (confirmed by XRD of separated particles), which is in agreement with the previous data reported by Filippi

et al. (2007) and Drahota et al. (2009). A minor amount of As-bearing goethite and arseniosiderite was also detected in the heavy mineral fraction of the sediment (Table 2). In addition to these minerals, many organic aggregates and large organic particles contained yellow-orange powdery coatings (Supplementary information, Fig. S2) with only As and S peaks in the EDS analysis, indicative of As sulfide, realgar (As₄S₄) (confirmed by XRD; supplementary information, Fig. S3). These data were consistent with the XRF data, with a considerable accumulation of S and As, suggesting the predominance of As sulfide in the organic-rich sediment.

Concentrations of dissolved As and other constituents in groundwater sampled from lysimeters are reported in Table 3. Groundwater pH ranged from 7.25 to 7.70; field Eh measurements showed a qualitative trend to slightly more reducing conditions in the sediment compared to regolith. Total dissolved As concentrations were very high in both sites (from 7.33 to 8.08 mg/L), with high fraction of As(III) (from 80% to 89%). The groundwater concentrations of Fe(II) and total Fe (up to 3.78 mg/L) were lower than As and agreed within 20%, indicating that Fe(III) was negligible compared with Fe(II). Other dissolved elements did not exhibit very different concentrations from the background levels (Drahota et al., 2011, 2013).

Table 2

Major and minor element concentrations and arsenic mineralogy in the regolith and sediment from 1-m depth samples in the Mokrsko geochemical anomaly.

Component	Regolith R	Sediment S
Major elements (wt%)^a		
SiO ₂	65.44 (±0.98)	65.32 (±1.40)
Al ₂ O ₃	19.88 (±0.47)	19.00 (±0.53)
Fe ₂ O ₃	4.58 (±0.39)	3.86 (±0.40)
Na ₂ O	2.34 (±0.14)	3.15 (±0.04)
K ₂ O	2.65 (±0.09)	2.91 (±0.14)
CaO	2.43 (±0.06)	2.65 (±0.02)
MgO	1.67 (±0.12)	1.86 (±0.12)
Minor elements (ppm)^a		
Mn	658 (±62)	852 (±38)
S	51.07 (±1.28)	1401 (±8.67)
P	360 (±19)	402 (±39)
As	905 (±79)	1750 (±151)
Total inorganic carbon (wt%)	<0.005	<0.005
Total organic carbon (wt%) ^a	0.139 (±0.004)	1.41 (±0.035)
Arsenic mineralogy^b		
Goethite	+++	++
Bariopharmacosiderite	++	
Arseniosiderite	++	+
Realgar		+++

^a Errors refer to 1σ level about the mean of the triplicate sample analyses.

^b Mineral frequency in the heavy mineral fractions estimated from SEM/EDS study: +++ abundant, ++ minor, + rare.

Table 3
Shallow groundwater chemistry in monitoring lysimeters. Concentration of elements is given in mg/L.

Date	Lysimeter R		Lysimeter S	
	5/16/2012	6/29/2012	5/16/2012	6/29/2012
T (°C)	9.5	13.5	4.6	10.8
EC ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	438	479	494	533
pH	7.37	7.25	7.59	7.70
Eh (mV)	143	78	92	42
As _{tot}	7.33	8.08	7.76	7.87
As ^{III}	5.88	6.74	6.35	7.02
As ^V	1.46	1.34	1.41	0.85
Fe _{tot}	2.61	3.78	3.21	3.30
Fe ^{II}	2.38	3.01	3.11	3.08
Na	10.73	13.45	15.72	16.74
K	0.27	1.241	0.51	3.564
Ca	57.94	57.35	78.10	74.22
Mg	15.72	15.34	16.19	15.31
Al	0.05	0.01	0.07	0.02
Mn	1.96	1.77	0.98	0.85
SO ₄ ²⁻	121	108	135	126
$\Sigma\text{H}_2\text{S}$	0.03	0.01	0.01	0.02
NO ₃ ⁻	2.01	<0.2	<0.2	<0.2
Cl ⁻	40.3	33.5	42.1	38.7
HCO ₃ ⁻	94.6	99.1	115.9	117.0
DOC	6.35	4.47	2.57	2.24

3.2. Regolith and sediment incubations

Having characterized the As mineralogy of the regolith and sediment samples, the fate of As during prolonged incubation of

microcosms containing regolith or sediment was determined. The aim of this experiment was to find direct proof that indigenous microorganisms at this site can influence the release or attenuation of As from solid materials. As illustrated in Fig. 1, substantial release of As, arising from As and/or Fe dissimilatory respiration, was observed in the regolith microcosm stimulated by glucose under anaerobic conditions, while no release of As was seen in the sterile microcosm control. In the amended regolith microcosm, the As concentration reached 33% of the total As and the Fe concentration reached 8% of the total Fe. These observed concentrations of released Fe and As are consistent with the data of sequential extraction (Supplementary information, Fig. S4) that indicated a decrease in the As-rich Fe(III) (hydr)oxide concentrations by the end of amended microcosm incubation from 2110 mg/kg to 1030 mg/kg (determined by considering Fe(III) (hydr)oxides as the sum of Fe liberated by the oxalate extractions). Release of As and Fe from amended sediment microcosm under anaerobic conditions reached 5% of the total Fe, whereas the As concentration stayed at the same level for the first 19 days and then increased slightly again, releasing only 3% of the total As. It could thus be concluded that reductive dissolution of As-bearing Fe(III) compounds in both amended microcosms under anaerobic conditions released substantial amounts of Fe and As, but As in the sediment microcosm was immediately sequestered to the fraction that was not sulfate-, phosphate-, or even oxalate-soluble. This fraction may include non-sulfide Fe(II) minerals that are formed by dissimilatory Fe(III)-reducing bacteria (Islam et al., 2005).

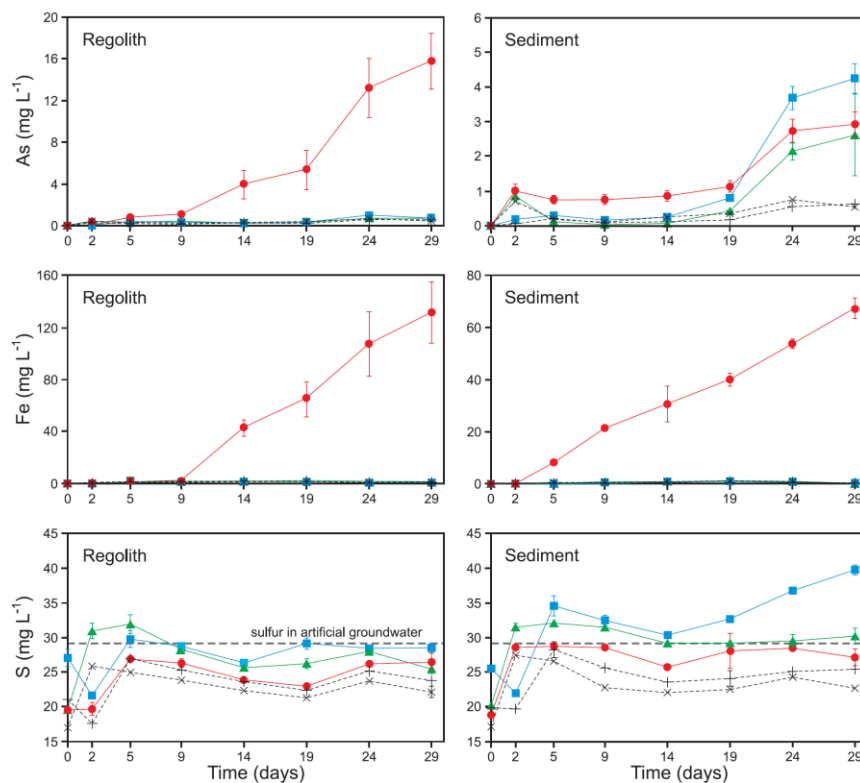


Fig. 1. Variations in As, Fe and S concentrations over the course of microcosms of regolith and sediment from Mokrsko in artificial groundwater. The five sets of microcosms include an amendment with glucose under anaerobic conditions (●), no amendment under anaerobic conditions (▲), a control with amendment of glucose under anaerobic conditions (×), no amendment under aerobic conditions (■), and a control under aerobic condition (+). Note the different scales for the regolith and sediment. Error bars indicate the standard deviation of triplicates; some error bars are obscured by the symbols.

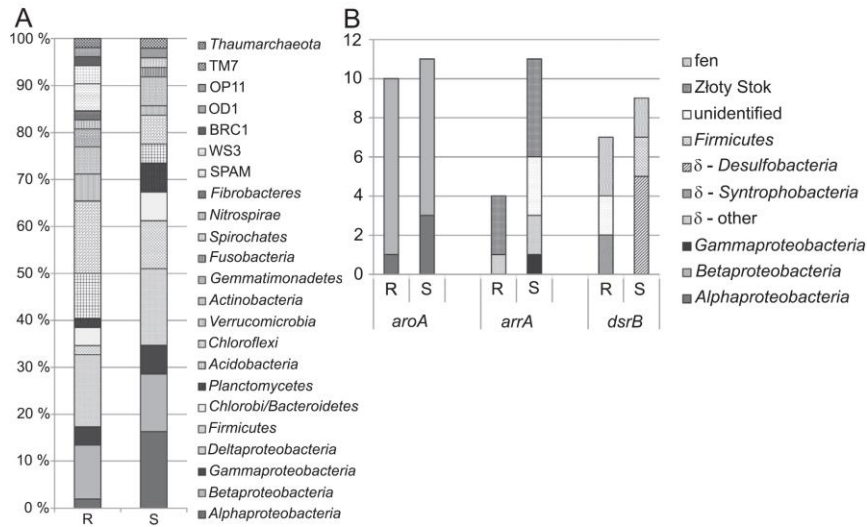


Fig. 2. (A) Contribution of bacterial and archaeal phyla to the bacterial community of regolith (R) and sediment (S) determined by 16S rDNA sequencing. (B) Total numbers and phylogenetic affiliation of OTU of metabolic genes detected in environmental samples. Legend: Zloty Stok – poorly characterized *arrA* clade previously found in Zloty Stok gold mine; fen – poorly characterized *arrA* clade, that seems to be specific for freshwater wetland bacterial communities.

The amount of As released from the sediment in the non-amended anaerobic microcosm was also higher (by a factor of 7 on an average) than the sterile control microcosm. Assuming that the poisoned control microcosms represent the amount of As released into anaerobic Mokrsko groundwater via abiotic processes, it is suggested that the higher amount of As released from the sediment into solution in the non-amended microcosm represents As released by a microbial metabolism based on natural organic matter present in the sediment.

3.3. Molecular characterization of regolith and sediment

The aim of the 16S rDNA sequencing was to detect the most abundant phylogenetic and ecological groups of bacteria rather than to describe the total biodiversity in the samples. 52 clones from regolith and 49 from sediment were sequenced. At the level of phylum, 23 groups were detected and 11 of them were shared by both libraries. None of the 95 OTU at 2% distance level was shared between the regolith and sediment clone libraries (Fig. 2; Supplementary information, Fig. S5).

The UniFrac metrics were selected to classify the regolith and sediment libraries. This method enables comparison of microbial communities even if they do not share any OTU (Lozupone and Knight, 2005). The regolith and sediment libraries were compared with a set of microbial communities at sites representing a gradient in two environmental characteristics: (i) As contamination and (ii) anaerobic sulfate respiration (Table 1). The regolith and sediment libraries were analysed as a single sample since no significant difference ($p > 0.05$) was detected although most samples from other environments differed significantly in the same analysis.

The whole microbial community at Mokrsko did not cluster with communities that originated from As-impacted environments but differed in the predominating metabolism (samples Cernuc, Zloty Stok) in UPGMA clustering (Fig. 3) and PCoA. Both methods placed the Mokrsko community in the group containing microbial communities from either oligotrophic partially anaerobic (samples Lava tube, Hanford) or hydrocarbon-containing and strictly anaerobic environments (sample Sulfate reducing). Consistent with field

observations, a similar spectrum of microhabitats is proposed in the Mokrsko locality, where organic remnants are buried in the prevailing inorganic material.

3.4. Functional genes *arrA*, *aiuA* and *dsrB*

The presence of a microbial community able to metabolize As compounds can be tested by detection of genes encoding metabolic enzymes involved in As solubilization and attenuation (Drewniak et al., 2012).

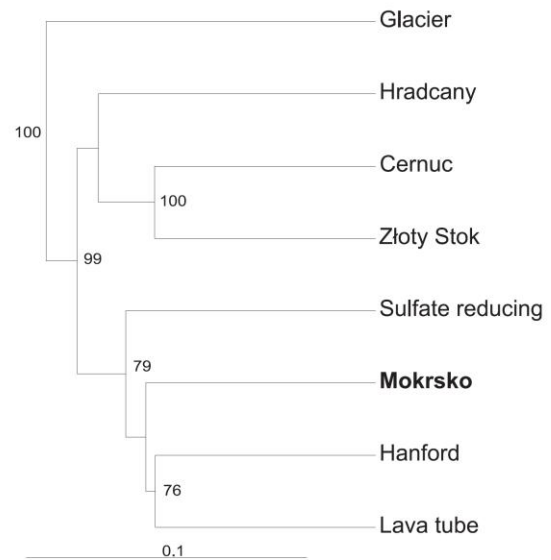


Fig. 3. UPGMA dendrogram of UniFrac distances showing phylogenetic relationship of microbial communities from Mokrsko and other As-impacted and unimpacted underground environments. Jackknife values higher than 70% are shown by the nodes. For the characteristics of the communities see Table 1.

In the regolith, 4 species-level phylogenetic clusters of *arrA* were detected. Three of them were affiliated to an environmental clade previously reported only from Zloty Stok gold mine microbial mat (Drewniak et al., 2012), the last cluster belonged to *Deltaproteobacteria* (Fig. 2; Supplementary Information, Fig. S6A). The diversity in the sediment was markedly higher with 12 species-level clusters detected among 13 sequences. Representatives of *Gammaproteobacteria* and an undescribed group were present in the sediment in addition to the same groups as in the regolith (Fig. 2; Supplementary Information, Fig. S6A).

The gene *aioA* encoding metabolic arsenite oxidase of alpha- and beta-proteobacterial origin was found similarly in both regolith and sediment samples. In contrast to *arrA* and *dsrB*, all the *aioA* sequences were related to previously described bacterial isolates or species (Supplementary Information, Fig. S6B). The dissimilatory sulfite reductase (*dsrB*)-bearing bacteria were represented by *Syntrophobacterales* and two undescribed groups in the regolith, and by *Desulfobacteria*, *Firmicutes* and one of the two undescribed groups in the sediment (Supplementary information, Fig. S6C). Interestingly, the *dsrB* sequences exhibited the lowest similarity between the regolith and sediment libraries among all the functional genes. A significant difference ($p < 0.002$) was confirmed by UniFrac metrics for *dsrB* regolith and sediment libraries, whereas the other pairs of clone libraries did not differ ($p \gg 0.05$). This observation indicates presence of sulfate reducing bacteria in both habitats, but under very different local conditions and thus mediated by different phylogenetic groups of bacteria.

The presence of both autotrophic oxidisers and dissimilative reducers of As may be explained by a mixture of microenvironments with various redox conditions within the sample. Consistently, the obtained 16S rDNA sequences belong to various ecologically different groups. Some sequences were grouped with typical oligotrophic heterotrophs or even chemoautotrophs by BLAST, but others were closely related to isolates from anoxic environments heavily contaminated by hydrocarbons. This observation is consistent with UPGMA clustering analysis (see Chapter 3.3.).

4. Discussion

Due to the devastating impact on the health of millions of people worldwide, a better understanding of the biogeochemical processes controlling As release/attenuation into groundwaters is a crucial issue and has been the subject of numerous recent studies (e.g. Campbell et al., 2006; Héry et al., 2010; Islam et al., 2004; Kocar et al., 2006; Tufano et al., 2008).

Although the groundwater samples obtained from the undisturbed shallow subsurface in this study were slightly reducing (from 42 to 143 mV), they fell within regions where aqueous As(V) and Fe(III) phases (shown as ferrihydrite) or Fe(II,III) phases (shown as green rust) were the predominant species, based on the measured pH and Eh (Pt electrode) (Table 3, Fig. 4). None of the groundwater sample fell within the predominant stability fields of aqueous As(III) and dissolved Fe(II) that were found by chemical analyses as the major aqueous species. Apparent nonequilibrium thermodynamic conditions thus indicate that the As(III) and Fe(II) species are released into the solution by an unexpectedly rapid process. However, neither a strong reducing agent nor a reservoir of As(III) were detected in the groundwater and sediment or regolith. Active biogeochemical reduction of As and Fe from sediment and regolith and partitioning to groundwater thus appear to be the most probable explanation. The microcosm data indicate that indigenous bacteria solubilize As from sediment and regolith samples, whereas almost no solubilization occurs in azide-poisoned parallels. It is noteworthy that

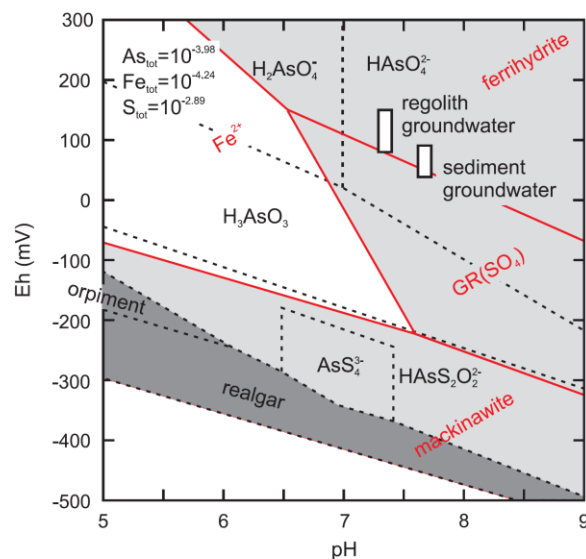


Fig. 4. Eh–pH predominance diagram showing equilibrium among aqueous (unshaded, dashed line) and solid phase (darker-gray shaded) arsenic, and aqueous (unshaded, solid line) and solid phase (lighter-gray shaded) iron at $As_{tot} = 10^{-3.98}$, $Fe_{tot} = 10^{-4.24}$, $S_{tot} = 10^{-2.89}$. Precipitation of thermodynamically stable Fe (hydr)oxides (hematite, goethite, and magnetite) was suppressed in order to examine interactions with the more reactive, metastable solid phases ferrihydrite and green rust. Field-measured Eh and pH ranges from groundwater samples shown as rectangles were taken from lysimeters in the saturated zone at Mokrsko between March and May 2012.

our observed concentrations of As released in the non-amended sediment microcosms under anaerobic conditions were almost consistent with concentrations of As in sediment groundwater, further reinforcing the relevance for microbial processes for As mobilization at this site. The presence of bacteria bearing dissimilative arsenate reductase including so-far undescribed phylogenetic lineages was confirmed by molecular analyses in both the regolith and sediment. The diversity of this gene was three times greater in the sediment, with consistently greater content of organic carbon and thus probably greater rate of anaerobic respiration. Dissolved H_2S generated in the local sulfate-reducing environments in the sediment and potentially in the regolith reacted with the As(III) species, causing them to precipitate as realgar. Depending on the balance between As(III) and H_2S production, some or all of the As(III) produced should be lost from solution. The H_2S levels were near the detection limit (~ 0.01 mg/L) in all the groundwater samples, despite the fact that groundwater SO_4^{2-} concentrations were very high (from 108 to 135 mg/L), suggesting that, in the sampled areas, As(III) production typically exceeded H_2S production. On the basis of these findings, ultimate control of the As concentration in the shallow Mokrsko aquifer cannot be attributed to sulfate-reducing environments with precipitating sulfides.

Thermodynamic calculations show that formation of realgar is possible at ambient temperature depending on the activity of the sulfide and As, and on the system pH and Eh (Couture and Van Cappellen, 2011; Gallegos et al., 2008; O'Day et al., 2004). However, previous studies have also noted the difficulty in precipitating crystalline realgar abiotically at ambient temperature (Gallegos et al., 2008; Kirk et al., 2010; Nordstrom and Archer, 2003), which may point out the importance of microbial mediation in the formation of low-temperature As sulfides. The groundwater samples

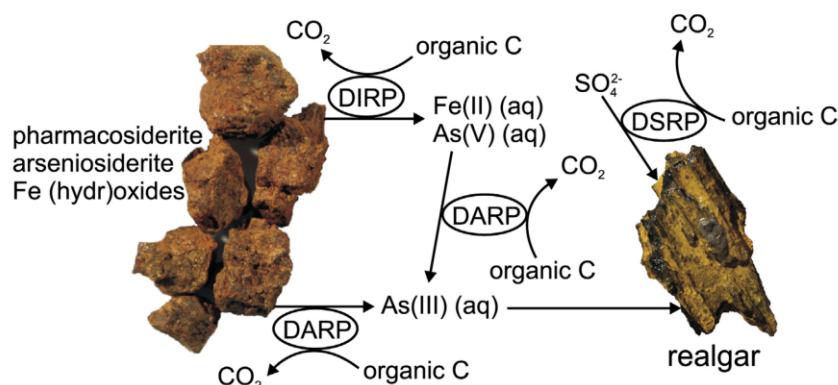


Fig. 5. Conceptual model of arsenic in the shallow subsurface, summarizing the main microbially mediated reactions potentially controlling the As concentration and speciation at the Mokrsko site. DARP: dissimilatory arsenate respiring prokaryotes, DIRP: dissimilatory iron respiring prokaryotes, DSRP: dissimilatory sulfur respiring prokaryotes.

did not really fall within the calculated stability field where realgar is predicted to be dominant (as opposed to mineralogical evidence) (Fig. 4), but this is not surprising since extraction of groundwater from sediment in the vicinity of realgar coatings was unsuccessful. It should be noted that all of the analyzed groundwater was sampled from a nonspecific area of the saturated zone. In fact, mineralogical findings and geochemical modelling in the sediment enable us to formulate the hypothesis that precipitation of realgar at the study site is constrained to sharply delimited anaerobic domains that form around and within buried wood particles and organic aggregates. Two requirements must be fulfilled in these domains. The first one is intensive microbial reduction of sulfate in the presence of As(III). We expect this process here since oxygen and other alternative terminal electron acceptors are limited within the organic matter through microbial respiration, becoming depleted within millimeters of the organic particle and organic aggregate exterior (Masue-Slowey et al., 2011), and sulfate is indisputably the major terminal electron acceptor available in the groundwater (Table 3). Consistently, the *dsrB* and 16S rDNA clone library analyses indicated that sulfate-reducing bacteria represent a functionally important fraction of the total microbial community (Figs. 2 and 3). The second requirement is low concentration of dissolved iron, since iron preferentially reacts with H_2S and thus prevents formation of As sulfides (e.g. Kirk et al., 2010; Saunders et al., 2008). This fact is supported by SEM/EDS and XRD analyses, which demonstrated the absence of easily accessible forms of Fe(III) for bacterial reduction, such as Fe(III) (hydr)oxides and Fe(III) arsenates in the close vicinity (mm scale) of realgar (e.g. Supplementary information, Fig. S3).

Given the spatial proximity (cm scale) of oxidized (Fe(III) (hydr)oxides, Fe(III) arsenate minerals) and reduced (realgar) As species within the sample, our results demonstrate the importance of the soil/sediment structure and local redox transitions when assessing the mobilization and speciation of As species in the shallow subsurface.

5. Conclusions

Our findings provide strong evidence that microbes play a key role in mediating As release as well as attenuation from the shallow subsurface at the Mokrsko natural geochemical anomaly. The main interactions between microbes, As-bearing geologic materials and water that are envisioned to result in the high levels of As in groundwater and regolith/sediment are summarized in the conceptual model (Fig. 5). Notably, our finding that the concentration of reduced As(III) is very high in the shallow groundwater even

under aerobic conditions allows us to conclude that the solubility and the transport of As in the shallow subsurface at the Mokrsko geochemical anomaly is influenced by microbial respiratory reduction of As(V) to As(III) and is consistent with reports from other studies (Héry et al., 2010; Jönsson and Sherman, 2008; Kocar et al., 2006; Tufano et al., 2008). Our conclusions are supported by the molecular analyses and microcosm experiments. Although newly formed realgar was noted as a major sink for As(III) at this site, dissolved As(III) concentrations in shallow groundwater are not obviously limited by realgar formation, further suggesting that sulfate-reducing conditions occur only in local environments that were found to be restricted to the organic-rich particles. Our evidence shows that realgar precipitation was facilitated by a combination of bulk anaerobic, but very oligotrophic sediment (where only weak reductive iron dissolution occurs) and macroscopic insoluble organic particles and aggregates. The existence of these restrictions also explains why precipitation of realgar is not common at As-impacted sites. To our knowledge, this is the first report published to date on the precipitation of macroscopic deposits of realgar in a natural environment at low temperatures.

Acknowledgments

This study was supported by a grant from the Czech Science Foundation (P210/10/P096); by institutional funding from the Ministry of Education, Youth, and Sports of the Czech Republic (MSM 0021620855 and MSM 0021620858); by the Academy of Sciences of the Czech Republic (AVOZ30130516 and RVO68081715) and by SVV (SVV-2013-267 201). The authors thank Helena Kindlová and Lenka Jílková for the chemical analyses. Dr. Madeleine Stulíková is thanked for correction of the English in the paper.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2013.05.010>.

References

- APHA, 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed. American Public Health Association-American Water Work Association, Baltimore, USA.
- Bethke, C.M., Yeakel, S., 2010. The Geochemist's Workbench®. GWB Essentials Guide. University of Illinois.
- Bourrie, G., Trolard, F., Genin, J.M.R., Jaffrezic, A., Maitre, V., Abdelmoula, M., 1999. Iron control by equilibria between hydroxy-green rusts and solutions in hydromorphic soils. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 63, 3417–3427.

- Campbell, K.M., Malasarn, D., Saltikov, C.W., Newman, D.K., Hering, J.G., 2006. Simultaneous microbial reduction of iron(III) and arsenic(V) in suspensions of hydrous ferric oxide. *Environmental Science and Technology* 40, 5950–5955.
- Charlet, L., Polya, D.A., 2006. Arsenic in shallow, reducing groundwaters in southern Asia: an environmental health disaster. *Elements* 2, 91–96.
- Couture, R.M., Van Cappellen, P., 2011. Reassessing the role of sulfur geochemistry on arsenic speciation in reducing environments. *Journal of Hazardous Materials* 189, 647–652.
- Drahotka, P., Mihaljević, M., Grygar, T., Rohovec, J., Pertold, Z., 2011. Seasonal variations in water chemistry in arsenic-rich stream at the Mokrsko gold deposit, Czech Republic. *Environmental and Earth Science* 62, 429–441.
- Drahotka, P., Nováková, B., Matoušek, T., Mihaljević, M., Rohovec, J., Filippi, M., 2013. Diel variation of arsenic, molybdenum and antimony in a stream draining natural As geochemical anomaly. *Applied Geochemistry* 13, 84–93.
- Drahotka, P., Rohovec, J., Filippi, M., Mihaljević, M., Rychlovský, P., Cervený, V., Pertold, Z., 2009. Mineralogical and geochemical controls of arsenic speciation and mobility under different redox conditions in soil, sediment and water at the Mokrsko-West gold deposit, Czech Republic. *Science of the Total Environment* 407, 3372–3384.
- Drewniak, L., Maryan, N., Lewandowski, W., Kaczanowski, S., Skłodowska, A., 2012. The contribution of microbial mats to the arsenic geochemistry of an ancient gold mine. *Environmental Pollution* 162, 190–201.
- Filippi, M., Doušová, B., Machovic, V., 2007. Mineralogical speciation of arsenic in soils above the Mokrsko-west gold deposit, Czech Republic. *Geoderma* 139, 154–170.
- Foti, M., Sorokin, D.Y., Lomans, B., Mussman, M., Zacharova, E.E., Pimenov, N.V., Gijss, Kuenen, J., Muyzer, G., 2007. Diversity, activity, and abundance of sulfate-reducing bacteria in saline and hypersaline soda lakes. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 2093–2100.
- Gállegos, T.J., Han, Y.S., Hayes, K.F., 2008. Model predictions of realgar precipitation by reaction of As(III) with synthetic mackinawite under unoxic conditions. *Environmental Science and Technology* 42, 9338–9343.
- Guindon, S., Gascuel, O., 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52, 696–704.
- Hamady, M., Lozupone, C., Knight, R., 2010. Fast UniFrac: facilitating high-throughput phylogenetic analyses of microbial communities including analysis of pyrosequencing and PhyloChip data. *ISME Journal* 4, 17–27.
- Héry, M., Van Dongen, B.E., Gill, F., Mondal, D., Vaughan, D.J., Pancost, R.D., Polya, D.A., Lloyd, J.R., 2010. Arsenic release and attenuation in low organic carbon aquifer sediments from West Bengal. *Geobiology* 8, 155–168.
- Inskeep, W.P., Macur, R.E., Hamamura, N., Warelow, T.P., Ward, S.A., Santini, J.M., 2007. Detection, diversity and expression of aerobic bacterial arsenite oxidase genes. *Environmental Microbiology* 9, 934–943.
- Islam, F.S., Gault, A.G., Boothman, C., Polya, D.A., Charnock, J.M., Chatterjee, D., Lloyd, J.R., 2004. Role of metal-reducing bacteria in arsenic release from Bengal Delta sediments. *Nature* 430, 68–71.
- Islam, F.S., Pederick, R.L., Gault, A.G., Adams, L.K., Polya, D.A., Charnock, J.M., Lloyd, J.R., 2005. Interactions between the Fe(III)-reducing bacterium *Geobacter sulfurreducens* and arsenate, and capture of the metalloid by biogenic Fe(II). *Applied and Environmental Microbiology* 71, 8642–8648.
- Jönsson, J., Sherman, D.M., 2008. Sorption of As(III) and As(V) to siderite, green rust (fougerite) and magnetite: implications for arsenic release in anoxic groundwaters. *Chemical Geology* 255, 173–181.
- Kabelitz, N., Machackova, J., Imfeld, G., Brennerova, M., Pieper, D.H., Heipieper, H.J., Junca, H., 2009. Enhancement of the microbial community biomass and diversity during air sparging bioremediation of a soil highly contaminated with kerosene and BTEX. *Applied Microbiology and Biotechnology* 82, 565–577.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., Miyata, T., 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research* 30, 3059–3066.
- Kirk, M.F., Holm, T.R., Park, J., Jin, Q., Sanford, R.A., Fouke, B.W., Bethke, C.M., 2004. Bacterial sulphate reduction limits natural arsenic contamination in groundwater. *Geology* 32, 953–956.
- Kirk, M.F., Roden, E.E., Crosse, L.J., Brealey, A.J., Spilde, M.N., 2010. Experimental analysis of arsenic precipitation during microbial sulfate and iron reduction in model aquifer sediment reactors. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 74, 2538–2555.
- Kocar, B.D., Herbel, M.J., Tufano, K.J., Fendorf, S., 2006. Contrasting effects of dissimilatory iron(III) and arsenic(V) reduction on arsenic retention and transport. *Environmental Science and Technology* 40, 6415–6721.
- Ledbetter, R.N., Connon, S.A., Neal, A.L., Dohnalkova, A., Magnuson, T.S., 2007. Biogenic mineral production by a novel arsenic-metabolizing thermophilic bacterium from the Alvord Basin, Oregon. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 5928–5936.
- Lin, X., Kennedy, D., Fredrickson, J., Bjornstad, B., Konopka, A., 2012. Vertical stratification of subsurface microbial community composition across geological formations at the Hanford Site. *Environmental Microbiology* 14, 414–425.
- Lindberg, A.L., Goessler, W., Gurzau, E., Koppova, K., Rudnai, P., Kumar, R., Fletcher, T., Leonardi, G., Slotova, K., Gheorgiu, E., Vahter, M., 2006. Arsenic exposure in Hungary, Romania and Slovakia. *Journal of Environmental Monitoring* 8, 203–208.
- Lozupone, C., Knight, R., 2005. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 8228–8235.
- Malasarn, D., Saltikov, C.W., Campbell, K.M., Santini, J., Hering, J.G., Newman, D.K., 2004. *arrA* is a reliable marker for As(V) respiration. *Science* 306, 455.
- Masue-Slowey, Y., Kocar, B.D., Jofre, S.A.B., Mayer, K.U., Fendorf, S., 2011. Transport implications resulting from internal redistribution of arsenic and iron within constructed soil aggregates. *Environmental Science and Technology* 45, 582–588.
- McCreadie, H., Blowes, D.W., Ptacek, C.J., Jambor, J.L., 2000. Influence of reduction reactions and solid-phase composition on porewater concentrations of arsenic. *Environmental Science and Technology* 34, 3159–3166.
- Nemergut, D.R., Anderson, S.P., Cleveland, C.C., Martin, A.P., Miller, A.E., Seimon, A., Schmidt, S.K., 2007. Microbial community succession in an unvegetated, recently deglaciated soil. *Microbial Ecology* 53, 110–122.
- Nicholas, D.R., Ramamoorthy, S., Palace, V., Spring, S., Moore, J.N., Rosenzweig, F., 2003. Biogeochemical transformations of arsenic in circumneutral freshwater sediments. *Biodegradation* 14, 123–137.
- Nordstrom, D.K., Archer, D.G., 2003. Arsenic thermodynamic data and environmental geochemistry. In: Welch, A.H., Stollenwerk, K.G. (Eds.), *Arsenic in Groundwater*. Kluwer Academic Publishers, pp. 1–25.
- Northup, D.E., Melim, L.A., Spilde, M.N., Hathaway, J.J.M., García, M.G., Moya, M., Stone, F.D., Boston, P.J., Dapkevicius, M.L.N.E., Riquelme, C., 2011. Lava Cave microbial communities within mats and secondary mineral Deposits: implications for life detection on other planets. *Astrobiology* 11, 601–618.
- O'Day, P.A., Vlassopoulos, D., Root, R., Rivera, N., 2004. The influence of sulphur and iron on dissolved arsenic concentrations in the shallow subsurface under changing redox conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 13703–13708.
- Páez-Espino, D., Tamames, J., de Lorenzo, V., Cánovas, D., 2009. Microbial responses to environmental arsenic. *Biomaterials* 22, 117–130.
- Rochette, E.A., Bostick, B.C., Li, G.C., Fendorf, S., 2000. Kinetics of arsenate reduction by dissolved sulfide. *Environmental Science and Technology* 34, 4714–4720.
- Saunders, J.A., Lee, M.K., Shamsudduha, M., Shamal, P., Uddin, A., Chowdhury, M.T., Ahmed, K.M., 2008. Geochemistry and mineralogy of arsenic in (natural) anaerobic groundwaters. *Applied Geochemistry* 23, 3205–3214.
- Smedley, P.L., Kinniburgh, D.G., 2002. A review of the source, behaviour, and distribution of arsenic in natural waters. *Applied Geochemistry* 17, 517–568.
- Stamatakis, A., 2006. RAXML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22, 2688–2690.
- Swofford, D.L., 2002. PAUP*. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods)*. Version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA.
- Tufano, K.J., Reyes, C., Saltikov, C.W., Fendorf, S., 2008. Reductive processes controlling arsenic retention: revealing the relative importance of iron and arsenic reduction. *Environmental Science and Technology* 42, 8283–8289.
- Turner, S., Pryer, K.M., Miao, V.P.W., Palmer, J.D., 1999. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 46, 327–338.
- Welch, A.H., Westjohn, D.B., Helsel, D.R., Wanty, R.B., 2000. Arsenic in ground water of the United States: occurrence and geochemistry. *Ground Water* 38, 589–604.
- Wenzel, W.W., Kirchbaumer, N., Prohaska, T., Stingeder, G., Lombi, E., Adriano, D.C., 2001. Arsenic fractionation in soils using an improved sequential extraction procedure. *Analytica Chimica Acta* 436, 309–323.
- Winderl, C., Anneser, B., Griebler, C., Meckenstock, R.U., Lueders, T., 2008. Depth-resolved quantification of anaerobic toluene degraders and aquifer microbial community patterns in distinct redox zones of a tar oil contaminant plume. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 792–801.
- Zobrist, J., Dowdle, P.R., Davis, J.A., Oremland, R.S., 2000. Mobilization of arsenite by dissimilatory reduction of adsorbed arsenate. *Environmental Science and Technology* 34, 4747–4753.

6.3. Falteisek et al., 2016

Falteisek L, Duchoslav V, Čepička I (2016). Substantial variability of multiple microbial communities collected at similar acidic mine water outlets. *Microbial ecology* 72, 163-174.

Substantial Variability of Multiple Microbial Communities Collected at Similar Acidic Mine Water Outlets

Lukáš Falteisek¹ · Vojtěch Duchoslav² · Ivan Čepička¹

Received: 24 July 2015 / Accepted: 28 March 2016
© Springer Science+Business Media New York 2016

Abstract Deep sequencing of prokaryotic 16S rDNA regularly reveals thousands of microbial species thriving in many common habitats. It is still unknown how this huge microbial diversity, including many potentially competing organisms, may persist at a single site. One of plausible hypotheses is that a large number of spatially separated microcommunities exist within each complex habitat. Smaller subset of the species may exist in each microcommunity and actually interact with each other. We sampled two groups of microbial stalactites growing at a single acidic mine drainage outlet as a model of multiplicated, low-complexity microhabitat. Samples from six other sites were added for comparison. Both tRFLP and 16S rDNA pyrosequencing showed that microbial communities containing 6 to 51 species-level operational taxonomic units (OTU) inhabited all stalactites. Interestingly, most OTUs including the highly abundant ones unpredictably alternated regardless of physical and environmental distance of the stalactites. As a result, the communities clustered independently on sample site and other variables when using both phylogenetic dissimilarity and OTU abundance metrics. Interestingly, artificial communities generated by pooling the biota of several adjacent stalactites together clustered by the locality more strongly than when the stalactites were analyzed separately.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00248-016-0760-6) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Lukáš Falteisek
nealkoholik@email.cz

¹ Department of Zoology, Faculty of Science, Charles University in Prague, Viničná 7, 128 44 Prague, Czech Republic

² Department of Ecology, Faculty of Science, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

The most probable interpretation is that each stalactite contains likely random selection from the pool of plausible species. Such degree of stochasticity in assembly of extremophilic microbial communities is significantly greater than commonly proposed and requires caution when interpreting microbial diversity.

Keywords Acidophiles · Chemolithotrophy · Phylogenetic dissimilarity · Community assembly · Neutral processes

Introduction

Analyses of microbial communities from ecological and biogeographical points of view have recently undergone a rapid progress, thanks to modern sequencing methods. Despite this progress, we are still far from assessing the contribution of environmental filtering and other processes, such as interspecific interactions, dispersal limitation, and colonization history to the microbial community structure [1, 2]. One of so far unexplained phenomena observed in all but most extreme environments is the high level of prokaryotic diversity that is considered hardly sustainable by the theory of ecological communities [1]. Additionally, Nemergut et al. [3] showed that multiple deeply sequenced samples from similar environments show markedly low overlap of prokaryotic 16S rDNA genotype composition. This finding was reproduced in various types of environments on a wide scale of geographical distances and operational taxonomic unit (OTU) definitions [3]. The main problem in understanding the mechanisms that sustain the large diversity is our inability to scale down the sampling in order to examine the true habitats of microbes. Thus, it cannot be determined whether ecologically similar organisms detected within a single sample inhabit spatially isolated microhabitats or are equally distributed. The

important difference between the abovementioned scenarios is that direct competition is enabled only in the latter case [1].

Extreme habitats dominated by bacteria, such as chemolithotrophic microbial growths in acidic or sulfidic waters, host conspicuously low microbial diversity compared to common environments. Only a few species occupying key ecological roles are usually detected at the extreme sites [4–7]. Distinct partitioning of niches among competing microbes with slightly differing growth optima has been reported in microbial communities developing in habitats with low complexity in extreme environments [8, 9].

Diversity of microbial species and metabolisms at various sites impacted by acidic mine drainage (AMD) generated by dissolution of sulfide minerals is described better than in common, highly diversified environments, including soils or surface waters [10]. Many prokaryotic species typically recovered from AMD environments were isolated in culture and formally described [11–15]. However, the majority of the studies were descriptive rather than attempting to get a deeper insight into the ecological processes. Studies focusing on microbial diversity typically employed deep sequencing of a few samples [16] or pooled drip-water from a larger seepage area [17] in order to characterize the typical composition of the microbial assemblages, and thus did not take into consideration distribution of particular species to individual microhabitats. Data from other environments suggest that bacteria can be non-equally distributed among related microhabitats. It has been shown that physiologically similar but genetically distinct populations of bacteria alternate in both spatial and temporal manners in lake biofilms [18].

Typical examples of well-described AMD-related extreme habitats are outlets of iron-rich, acidic mine water from rock fissures [17, 19, 20]. These outlets commonly host macroscopic growths of prokaryotic microorganisms forming stalactite-like structures (i.e., snottites) composed of bacterial biomass and secondary minerals. The species composition of the stalactites is similar to the communities found at other habitats associated with AMD flow. The most conspicuous example are gelatinous snottites strikingly dominated by *Ferrovum myxofaciens* and *Acidithiobacillus ferrivorans*, which are known from both AMD streams and stalactites [4, 15].

The thorough description of organisms inhabiting AMD-related microbial stalactites encourages employing them as a model for research on the variability of natural microbial communities. It has been shown that the environment at the terminal part of a stalactite is relatively uniform despite a slight gradient of oxygenation and iron redox state along the stalactite body [19]. At least, the terminal part of the stalactite represents a homogenous habitat that hosts microbial community with limited diversity. Additionally, the stalactites grow commonly in large groups at a single water seepage area. Stalactites in each such group, supplemented by the same AMD source (i.e., one permeable section of a rock fracture),

represent multiplied microhabitats of a single type. The local environments of each microhabitat show the highest possible rate of similarity that is accessible in naturally occurring microbial habitats. Yet, these microenvironments are physically isolated from each other, and thus, each of them has an individual history. Therefore, we should be able to observe the residual heterogeneity of microbial communities by comparing individual stalactites, while the influence of environmental variability is suppressed.

In this study, we reveal microbial diversity of 51 stalactites and snottites representing two groups, each collected from a single AMD outlet, and ten similar samples from variably distant sites, both geographically and environmentally. We employed tRFLP and 16S rDNA pyrosequencing to compare composition of microbial communities intentionally collected at maximally similar adjacent sites with communities from additional more varied sites in four abandoned mines.

Materials and Methods

Site Description

The samples were collected in four abandoned sulfidic ore mines. Three of them are located in the Czech Republic (Zlaté Hory, Lehnschafter, and Kristýnov) and one in Slovakia (Banská Štiavnica).

The Zlaté Hory-south deposit was described in Falteisek and Čepička [20]. Briefly, it is located in Silesia (Czech Republic; 50°12'N, 17°24'E) and represents a large Rosebery type volcanosedimentary copper deposit [21]. The pyrite-chalcopyrite ore is dispersed in metamorphic Devonian quartzites and shales, forming extensive ore bodies. Mining activities ceased in 1990. The extensive supergenic processes generating acidic mine drainage (AMD), accompanied by typical secondary zonation, were described by Martyčák et al. [22]. All samples were collected at or close to the 3rd haulage level, which represented the typical oxidation zone (190–220 m below the surface).

The Lehnschafter mine in the town of Mikulov is located in Ore Mountains in north-western Bohemia (50°41.46'N, 13°43.28'E). It represents a vein-type Pb-Ag-As sulfidic deposit with orthogneiss and rhyolite as adjoining rocks. The mining operations lasted from the late Middle Ages to 1885. The AMD-related environments are developed locally throughout the mine and depend on weathering of pyrite and arsenopyrite.

Kristýnov mine is located near Plzeň city in western Bohemia (49°43.61'N, 13°26.2'E). The deposit is located in upper proterozoic pyritic shales and was partially exploited by pillar mining in the nineteenth century. The mine is shallow (ca. 15 m) and almost dry, with only local weak seepages of AMD.

Banská Štiavnica mine district is located in Štiavnica Mountains, Slovakia (48°27'N, 18°53'E). It is a large polymetallic deposit consisting of veins and impregnations of Fe, Cu, Pb, Zn, and Ag sulfides developed mostly in andesites and quartz-diorite porphyry. The mining operations ceased in 1993. The AMD seepages occur at multiple sites where significant pyrite impregnations exist. The sampling sites are located in modern mining galleries at the 12th haulage level, ca. 550–600 m below the surface.

Sample Collection

The stalactites for microbiological analyses were harvested directly into sterile 15-mL tubes. Information about their physical appearance (hard, gelatinous, encrusted) and approximate water flow was collected as well. Conductivity, pH, and temperature of the water for samples with significant water flow were measured using WTW Multi303i universal pocket meter (WTW, Germany). Water samples for chemical analyses were collected into clean 50-mL tubes. The water flow was estimated from the filling times of the sample tubes (the flow was directed into the tube quantitatively). Most samples were delivered to the laboratory within 5 h; the samples from Banská Štiavnica within 12 h. After transport, the water was filtered through 0.22- μ m filter with PES membrane (Carl Roth, Germany), and the aliquots designated for analysis of cations were stabilized by 2 % HNO₃ (suprapure, Merck). The solid samples were stored in –80 °C until the DNA extraction.

Chemical Analyses of Water

Anions (SO₄²⁻, F⁻, Cl⁻, Br⁻, PO₄³⁻, and NO₃⁻) were analyzed by ion chromatography (HPLC, column Dionex ICS-2000), with a precision of about \pm 8 %. Major and minor cations (Fe, Al, Cu, As, Si, Ca, Mg, and Mn) were analyzed by ICP OES analyzer iCAP6500 (Winsford, UK).

DNA Extraction, Amplification, and tRFLP Analyses

The stalactites were divided by sterile lancet and forceps. One to three sections ca. 1-cm long were dissected from the near-end region of each sample and used for DNA extraction. Genomic DNA was isolated using ZR soil microbe DNA kit (Zymo research). The universal primers U515F (GTGCCAGCMGCCGCGGTAA) and U1406R (GACGGGCGGTGTGTRCA) [23] at annealing temperature of 55 °C and LA DNA polymerase (Top-bio, Czech Republic) were used to amplify approximately 860-bp long fragment containing V4–V8 regions of the 16S rDNA from *Bacteria*, *Archaea*, and mitochondria.

Primers U515F-A488 and U1406R-A546 labeled by AlexaFluor dyes were used for PCR prior to tRFLP. The PCR products were purified by agarose electrophoresis,

digested by HaeIII (Thermo Scientific), and analyzed by 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

454 Pyrosequencing and Sequence Analyses

PCR amplification of 16S rDNA was performed in triplicates as described above. Products were purified using Zymoclean™ Gel DNA recovery kit (Zymo Research), mixed, and subjected to short (10-cycle) secondary PCR with primers containing 6-bp sequence tags unique for each sample. The tagged PCR products were mixed equally and sequenced on a GS FLX Titanium Platform (Roche) at the Laboratory of Environmental Microbiology, Institute of Microbiology of the ASCR, Prague, Czech Republic.

Sequence data were analyzed by the Seed pipeline [24]. Sequences were extracted and denoised using Mothur 1.28.0 [25]. The reads from both ends of the amplified fragment were present due to random ligation of pyrosequencing adaptors. Only forward reads (i.e., from primer U515F) were selected for further analyses. They were clustered into OTUs with 97 % threshold by usearch 5.2.32 [26], and chimeras were removed by uclust 3.0.167 [26]. Species identities of the consensus sequences were assessed by BLASTn 2.2.26+ [27] against NCBI nt/nr database. Singletons were excluded from further analyses due to a high number of suspect erroneous sequences.

The consensus sequences were aligned using MAFFT [28] with help of the CBRC server (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>). The alignment was manually edited, and a maximum-likelihood phylogenetic tree was constructed by Phylml 3.0 [29] under GTR+ Γ +I substitution model.

The newly determined sequences have been deposited in MG-RAST [30] under project ID 12174, and selected representatives of species-level OTU from each sample were deposited in GenBank under accession numbers KP688592–KP689090.

Statistical Methods

Multivariate analyses of tRFLP patterns were run in Canoco 5.0 [31]. The variability within the dataset was visualized using a detrended correspondence analysis (DCA), and canonical correspondence analysis (CCA) was applied to test whether the differences in tRFLP patterns are significantly related to the stalactite properties and sampling sites. Localities were used as explanatory variables and the other properties (dripping rate, encrustation, and physical character) as covariates. We created dummy variables for each of these variables. The dripping rate was transformed into semi-quantitative categories for this purpose. Association of terminal restriction fragments (i.e., normalized peak area) with sampling sites was tested using one-way ANOVA for each fragment separately. Localities were used as categorical factors and peak areas as

dependent variables. The association of a fragment with sample sites was assessed from F value and p value of the ANOVA.

Clustering of the microbial communities based on a set of if-then logical split conditions was determined from the presence/absence and abundance of principal OTUs using tree-building algorithms in Statistica software package [32]. All samples were randomly subsampled to 300 sequences for this analysis.

The phylogenetic dissimilarity of microbial communities, principal component analyses (PCoA), and UPGMA clustering were performed in Fast UniFrac software package [33] using the maximum-likelihood phylogenetic tree of consensus sequences of individual OTUs. Both weighted normalized and unweighted algorithms were employed. For Jackknife analysis, all the samples were transformed to 1000 sequences per sample, and 75 % of sequences were kept in each replicate.

Results

Field Observations and Sampling

We sampled 51 ferruginous stalactites from eight sites located in four abandoned underground mines (Table 1). The four sites were in Zlaté Hory-south mine (ZH). The ZH-A is a group of gelatinous and hard soda-straw stalactites that grow from water seepage from two parallel rock bedding planes in an area of ca. 0.2×1 m. The water composition was considered to be homogeneous within the site due to the small area and existence of abundant fractures that served as cross-conduits at a centimeter scale (Fig. S1a). The group ZH-B consisted of hard soda-straw stalactites growing from a hard ferrous crust that covered the roof and walls of the mine gallery. Only the central part (ca. 1-m wide) of the large group of stalactites was sampled. Samples ZH7 and ZH10 represent massive, partially gelatinous stalactites growing on greater springs. Both sampling sites were described in detail by Falteisek and Čepička [20]. All the sites in Zlaté Hory mine were localized around a single ore body with the maximum distance between each other being 100 m. Samples from Kristýnov mine (KU) represent six hard or gelatinous stalactites from a single weak seepage area ca. 30-cm wide. In the Lehnschafter mine (MI), a gelatinous snottite flourishing at a water seepage from caved mine gallery was sampled. The main difference from the other sites was a high content of arsenic in the water (Table 1) causing precipitation of amorphous ferric arsenate (pitticite) inside the gelatinous material. Banská Štiavnica mine (BS, BN) differed from the others in temperature, which reached 20–24 °C, in contrast to 9–10 °C in the other mines. Sample BS was an acidic, gelatinous gypsum-encrusted stalactite growing on extremely mineralized, As-containing water. Stalactite BN was uniquely found

at AMD seepage neutralized by filtration through the concrete support of the mine gallery. The stalactite consisted of mineralized and gelatinous parts that were obviously different and were processed as two samples.

tRFLP Analyses

Characteristic patterns with a few dominant peaks, indicating highly unequal abundance of 16S rDNA genotypes (i.e., single or a few highly dominant species in each community), were obtained for all the samples. DCA analysis was performed in order to preliminarily classify tRFLP patterns. The samples formed several visually distinct clusters and gradients (Fig. 1a). Samples selected for subsequent pyrosequencing were dispersed evenly on the DCA plot and thus probably represented the true scale of the microbial community types.

To evaluate possible association of the terminal restriction fragments (TRFs) and sample sites, CCA analyses of all the TRFs, as well as selected TRFs, which represented more than 10 and 20 % of total peak area at least in one sample, were performed. The log-transformed peak areas were used in all the analyses. The sample sites were used as explanatory variables, and the other stalactite properties were included as covariates. Variability explained by sampling site was 30.8 % ($p=0.002$) for all peaks (Fig. 1b), 27.6 % ($p=0.002$) for peaks over 10 % of the total peak area (Fig. 1c), and 22.2 % ($p=0.02$) for peaks over 20 % of the total peak area (data not shown). Although certain localities appeared divergent in the CCA analyses, the huge majority of peaks clustered in the center with no clear association with localities. Significance of association of peaks and localities was tested by ANOVA for each single peak. This analysis showed that most of TRFs, except for several, mostly small, peaks, were not associated with sample site (p value median=0.22). Additionally, the TRFs corresponding to most abundant species-level OTUs as determined by 16S rDNA sequencing were identified and analyzed in the same way. The TRF of *Thiobacillus aquaesulis* was found only in samples from site BN; the rest of the identified TRFs revealed only a weak association with sampling sites (Fig. 1d, ANOVA p value median=0.09). No correlation between TRF's total or average area and the strength of association with sampling site was detected indicating that more abundant organisms were neither more generally distributed nor more confined to certain sites ($p=0.6$). The exception of *T. aquaesulis* may be easily explained by the different chemism of the BN site (see above).

16S rDNA Pyrosequencing

A subset of 24 samples from 21 stalactites was subjected to pyrosequencing of a fragment of 16S rDNA. Samples from two stalactites were doubled to test homogeneity of the microbial assembly, and both hard encrusted and snottite-like

Table 1 Number of samples collected at the sampling sites, characterization of the sites, and water that flowed through the stalactites

Locality	Zlaté Hory				Kristýnov	Lehnschafter	Banská Štiavnica		Total
	ZH-A	ZH-B	ZH7	ZH10			BS	BN	
Sampling site									
No. stalactites	21	19	1	1	6	1	1	1	51
tRFLP samples	23	22	1	1	6	1	2	2	58
Sequenced	9 (7 stal.)	8	1	1	1	1	1	2 (1 stal.)	24 (21 stal.)
Temperature	°C	9.5	9.5	9.5	9.5	10	9	22	20
Water flow	L/s	low	low	0.04	0.2	0	0.02	0.01	0.02
pH		ca. 3	ca. 3	2.95	3.6	ca. 3	2.68	1.92	7.07
Conductivity	mS/cm	n.a.	n.a.	4.8	1.86	n.a.	2.3	30.8	n.a.
Fe	mg/L	n.a.	n.a.	774 ^a	n.a.	n.a.	272	18,780	2.4
Al	mg/L	n.a.	n.a.	131 ^a	n.a.	n.a.	22	510	0
Cu	mg/L	n.a.	n.a.	90 ^a	n.a.	n.a.	0.1	1130	0.0011
As	mg/L	n.a.	n.a.	0.225 ^a	n.a.	n.a.	4.99	50	0.00011
Si	mg/L	n.a.	n.a.	18 ^a	n.a.	n.a.	4.05	110	6.48
Ca	mg/L	n.a.	n.a.	49.7 ^a	n.a.	n.a.	112	500	205.8
Mg	mg/L	n.a.	n.a.	97.4 ^a	n.a.	n.a.	26.3	710	47.4
Mn	mg/L	n.a.	n.a.	26.7 ^a	n.a.	n.a.	3.22	1180	0.05
SO ₄ ²⁻	mg/L	n.a.	n.a.	3509 ^a	n.a.	n.a.	943	42,314	466.65
Cl ⁻	mg/L	n.a.	n.a.	8.3 ^a	n.a.	n.a.	2.45	<1	3.64
NO ₃ ⁻	mg/L	n.a.	n.a.	2.7 ^a	n.a.	n.a.	<0.2	<2	11.23

^a Water composition of ZH7 after Falteisek and Čepička [19]

sections were sampled from the stalactite BN. We obtained 78,077 reads longer than 200 bp in two orientations; 31158 quality-filtered, non-chimeric forward reads were used for further analysis. Microbial diversity ranged from 6 to 51 OTUs per sample at 97 % similarity level (median 28). When sorted by frequency, the top 80 % of sequences represented from 1 to 14 OTUs (median 5). The Chao-1-estimated richness [34] varied from 6 to 53 OTUs per sample (median 36.5; Table S1). In total, 187 OTUs at 97 % similarity level were defined (Table S2). Two OTUs with 42 sequences belonged to *Archaea*, 10 OTUs with 74 sequences were eukaryotic nuclear 18S rDNA sequences, and 10 OTUs with 409 sequences were identified as mitochondrial 12S rDNA. The archaeal and mitochondrial sequences were included in the dataset. Eukaryotic nuclear sequences were discarded due to their heterogeneity and probable bias in the recovered eukaryotic community composition. When all the samples were equalized to 300 randomly selected sequences per sample, a highly similar distribution of 162 OTUs was revealed.

The OTUs related to a known organism with sequence homology greater than 98 % were assigned to this species. Abundant OTUs with lower homology were assigned to higher-level taxa (genera, families, etc.). The most abundant organisms in most samples were iron-oxidizing chemoautotrophs (*F. myxofaciens*, *A. ferrivorans*, *Gallionella capsiferiformans*, *Sideroxydans litotrophicus*,

Acidiferrobacter thiooxidans). Seven samples lacked autotrophs completely or almost completely and were dominated by acidophilic heterotrophic bacteria (*Acidiphilium* sp. PK48, *Acidocella* sp. CFR23, *Metallibacterium* sp. X11) and even organisms closely related to ubiquitous neutrophilic heterotrophs (*Burkholderia* sp., *Bradyrhizobium elkanii*, *Flavobacteria* gen. sp.) (Table 2). Only 14 OTUs reached more than 20 % of sequences in at least one sample. They seemed to form conserved or semi-conserved associations that alternated in the stalactites and usually were not confined to a single sample site. To test this suggestion, an analysis of microbial communities by weighted normalized Fast UniFrac using maximum-likelihood phylogenetic tree of consensus sequences was performed. It revealed four clusters (C1–4) of microbial communities with high statistical support in the jackknife analysis (Fig. 2a, b). The four samples were associated with these clusters but with low statistical support, or remained unclustered. Duplicates from a single stalactite revealed similar composition in both cases. A similar clustering was also obtained by a non-phylogenetic approach based on tree-building algorithm (Fig. S2a). Interestingly, all the clusters but C3 contained stalactites found at more sites, and communities belonging to various clusters were found in stalactites from both deeply sampled sites ZH-A and ZH-B, showing that the clusters were not site-specific. The communities of cluster C2, which was strikingly dominated by *F. myxofaciens*,

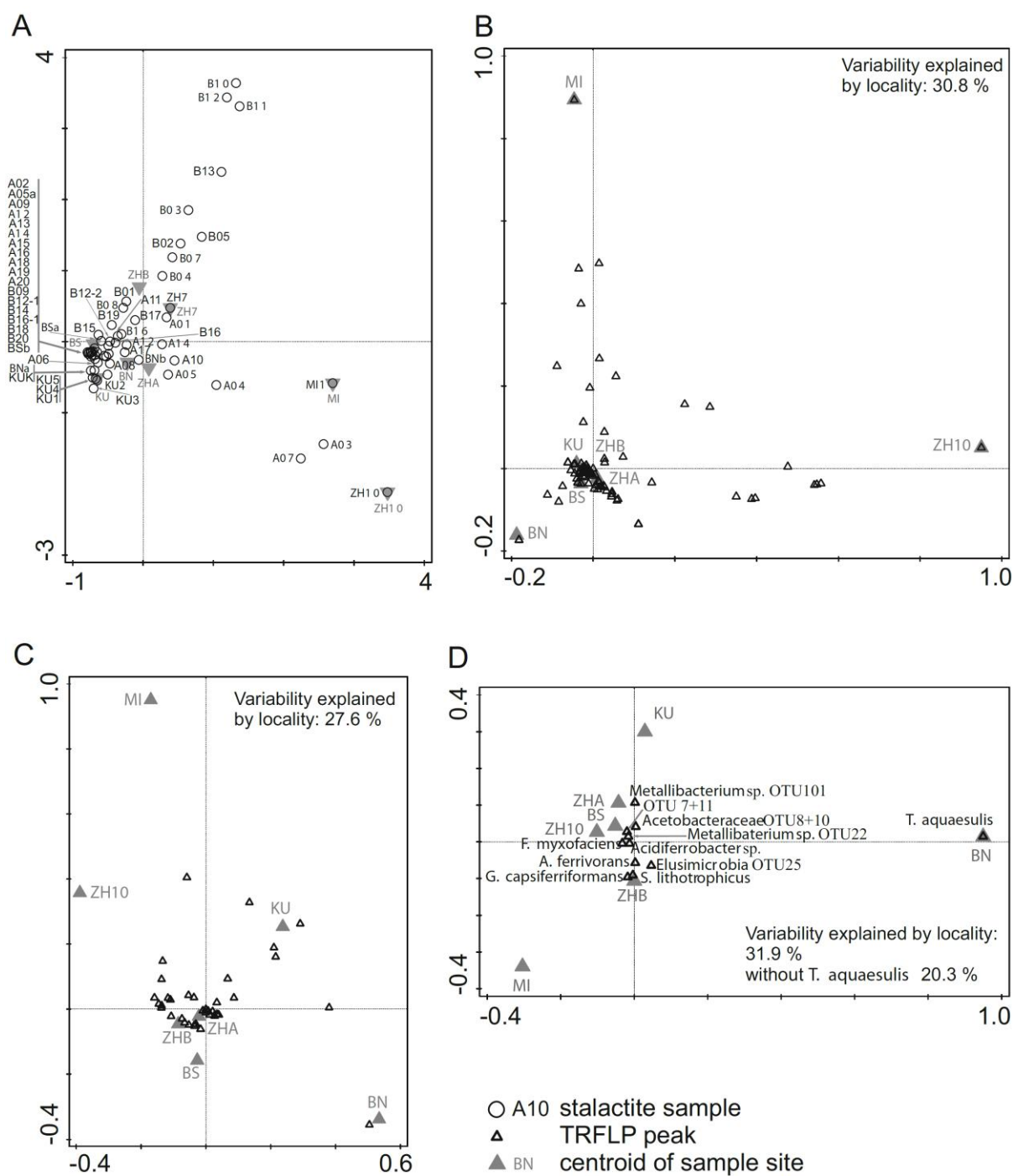


Fig. 1 Results of multidimensional analyses of 16S rDNA tRFLP profiles of 58 samples representing 52 stalactites. The analysis was performed using log-transformed peak areas. Replicated samples from individual stalactites are indicated by commas and replicate numbers. Centroids of the sample sites and variability explained by sampling site are shown. The other stalactite properties (encrustation, water flow) are not visible since they were analyzed as covariates. **a** DCA plot of all the samples. Stalactites selected for 16S rDNA sequencing are shown in *bold*.

b CCA of all detected TRFs. **c** CCA of TRFs representing at least 10% of total peak area in at least one sample. **d** CCA of TRFs related to organisms representing $\geq 20\%$ of sequences in at least one sample. Sample site abbreviations: ZH-A (samples A), ZH-B (samples B), ZH7, ZH10—Zlaté Hory; MI—Mikulov; BSa, b—Banská Štiavnica, acidic spring; BNa, b—Banská Štiavnica, neutral spring; KU—Křtiny; indexed sample names (i.e., A12-1) label duplicated samples from a single stalactite

Table 2 Quantity of OTUs representing $\geq 20\%$ of sequences in at least one sample and overview of physical properties of the stalactites. Samples marked A and B belong to sample groups ZH-A and B, respectively, samples BS and BN were collected at Banská Štiavnica, MI at Mikulov, and KU in Krstýnov mine. Physical characters and approximate dripping rates of the stalactites are shown. The numbers in the rows of bacterial OTUs represent their percentual proportions in the samples

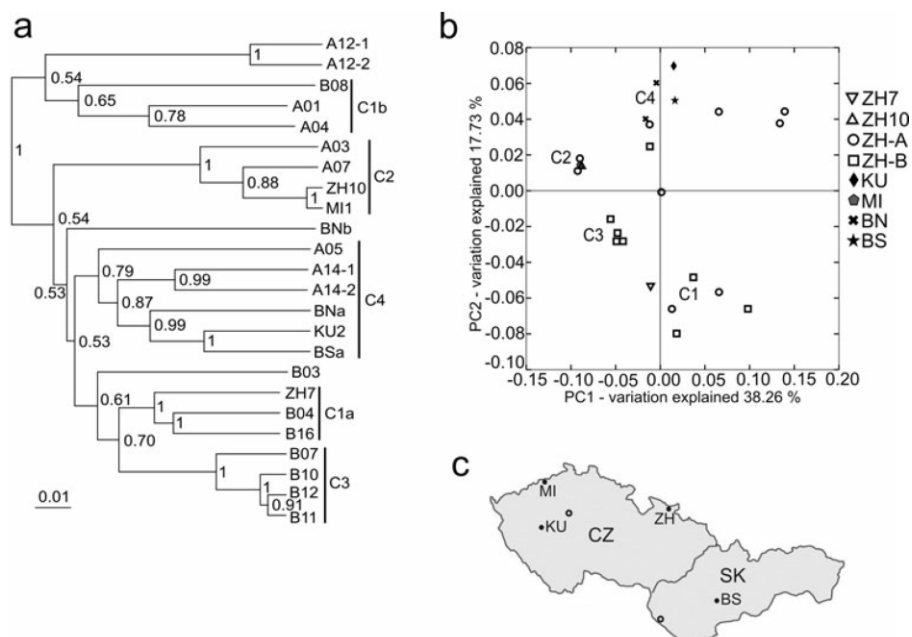
Sample	BNb	BNa	BSa	KU2	MI1	ZH10	ZH7	A01	A12-1	A12-2	A14-1	A14-2	A03	A07	A04	A05	B04	B06	B08	B07	B10	B11	B12	B03	
Dripping rate	2	2	2	0	2	3	3	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Physical character	G	H	GH	H	G	H	G	H	G	G	E	E	G	G	E	G	H	H	H	H	H	H	H	H	H
<i>Ferrovum myxofaciens</i> OTU001	0	0	0	0.3	95.0	97.3	40.3	16.7	0	0	22.0	15.0	72.7	86.0	1.3	2.0	14.3	13.0	1.0	22.0	0.7	2.0	0.3	1.3	
<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i> OTU002	0	0	0	0	0	0	40.0	9.3	0	0	2.3	0	0	0	0	0.3	53.7	45.7	34.7	21.3	12.3	14.0	16.7	0	
<i>Acidiferrobacter</i> sp. OTU015	0	0	0	0	0	0	0	29.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Sideroxydans litotrophicus</i> OTU003	1.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Gallionella capsiferriformans</i> OTU012	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4.0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Elusimicrobia</i> OTU25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6.0	1.3	0	5.7	3.0	5.0	5.3	29.0	
<i>Burkholderia</i> sp. OTU007	1.0	20.3	19.0	19.3	0	0	0	0	3.0	1.3	9.7	22.7	0.3	0	1.3	18.0	1.7	4.0	4.7	0	0	0	0	2.3	
<i>Bradyrhizobium elkanii</i> OTU011	0.3	5.0	13.7	23.3	0	0	0	0	1.3	0.3	1.7	2.0	0	0	1.0	7.3	0	1.3	0.7	0.7	0	0	0	1.3	
<i>Sediminibacterium</i> sp. OTU17	0.3	24.3	11.3	12.0	0	0	0	0	1.0	3.3	2.0	4.7	0.3	0	0.3	1.3	1.7	3.3	1.3	1.0	0	0	0	4.7	
<i>Acidiphilium</i> sp. OTU008	0	0	0	0	0	0	0	0	44.0	35.3	0	0	0	0	3.0	3.7	1.0	3.0	19.0	0	0	0	0	1.3	
<i>Acidocella</i> sp. OTU010	0	0	0	0	0	0	0	2.3	17.3	32.0	0.7	0	1.0	0	5.0	19.0	5.0	0	6.7	0	0	0	0	4.0	
<i>Metallibacterium</i> sp. OTU022	0	0	0	0	0	0	0.7	26.0	0	0.3	10.0	1.0	4.3	4.0	12.3	0	0	0	1.7	0	0	0	0	0	
<i>Metallibacterium</i> sp. OTU101	0	0	0	0	0	0	0.7	5.3	4.0	4.0	9.0	0.7	2.3	0	41.7	4.0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Thiobacillus aqaesulis</i> OTU060	42.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Others	54.7	50.3	56.0	45.0	5.0	2.7	18.3	11.0	29.3	23.3	42.7	54.0	19.0	10.0	34.0	44.3	9.7	28.3	30.3	8.3	12.0	8.7	9.3	20.3	

Legend:

Dripping rate: 0—hanging drop, no dripping observed; 1—rare dripping; 2—intensive dripping; 3—continuous flow

Physical character: H—hard, mineral; G—gelatinous; E—gelatinous, secondarily encrusted; GH—gelatinous growths on a mineral core

Fig. 2 Results of 16S rDNA amplicon sequencing of selected samples. **a** UPGMA clustering of the microbial communities based on weighted normalized UniFrac metrics. Jackknife values higher than 50 % are shown at the nodes (B). **b** PCoA analysis of the microbial communities based on weighted normalized UniFrac metrics. **c** Map showing locations of the sampling sites. Legend: Sample site abbreviations: BS—Banská Štiavnica; CZ—Czech Republic; KU—Kristýnov mine; MI—Lehnschafter mine, Mikulov; SK—Slovakia; ZH—Zlaté Hory. Clusters of similar communities revealed by the UniFrac analyses are labeled C1 (with sub-clusters a and b), C2, C3, and C4



were found only at sites with elevated water flow. The other clusters, C1, C3, and C4, contained microbial communities from both, high- and low-flow sites.

When unweighted UniFrac, which neglects the abundances of OTUs, was used for clustering the samples, only stalactites from C3 sharing also the sampling site remained partially clustered. The other samples clustered roughly by sites, but generally with low statistical support (Fig. S2B).

Discussion

Variability of the Habitats

The aim of this study was to uncover if processes independent on environmental filtering may deeply influence microbial community structure. These processes are commonly elusive due to two phenomena: (i) practical impossibility to detect all relevant environmental variables and subsequently clearly distinguish environmental filtering and other sources of dissimilarity [35]; and (ii) mixing of numerous physically separated microhabitats within a single sample, which commonly leads to examination of the average microbial community instead of multiple real ones [1]. We tested the possibility to circumvent these issues by sampling strategy. The main stalactite groups ZH-A and B were sampled from sites where water from a single source drips at multiple spots, and thus, more stalactites developed in close vicinity there. Therefore, each stalactite hosted a microbial community supplied by the same water but physically separated from the others. Thus, each stalactite

had an individual history. Unfortunately, the existence of minor but important differences between the stalactites (e.g., due to changes in water flow) may not ever be excluded even in a single group. This impossibility was circumvented by adding samples from other undoubtedly more varied sites. If communities from distant sites repeatedly revealed greater similarity than those from adjacent stalactites, the explanation solely by environmental traits would be highly improbable. For this reason, we added stalactites from both geographically and environmentally distant AMD outlets to the sample set. Samples ZH7 and 10 were collected at sites near to ZH-A and B, where, however, the water flow was higher by an order of magnitude [20]. Sample MI was influenced by naturally present As, samples from Banská Štiavnica grew at elevated temperature, and the most divergent site BN was an outlet of ferrous and sulfate-rich but non-acidic water.

The internal homogeneity of each stalactite is as important as the similarity of the stalactites from a single site. The whole stalactite is formed by the same process, and longitudinal water flow maintains only a moderate gradient of the main dissolved compounds [19]. The chemoautotrophic microbial communities inhabiting such environments are known to be conspicuously homogenous in space and time, as was shown by Kay et al. [7] for the assemblage of *F. myxofaciens* and *A. ferrivorans*, which frequently flourish in well-aerated ferruginous acidic mine water outlets and streams with pH between 2 and 3. Similarly, the iron-oxidizing microbial consortia from mine water treatment plants are stable despite variable composition of the water input [36]. Macalady et al. [9] revealed considerable stability of the autotrophic,

sulfur-oxidizing bacterial biofilms growing in sulfidic water outlets in the Frassasi cave system. These biofilms may be formed by several distinct types of microbial communities, which do not mix, even though the conditions below the surface of a biofilm of a certain type can be more suitable for another type. To examine the possibility that the stalactites host homogeneous communities, we sequenced two independent samples from stalactites ZH-A12, A14, and BN. In stalactites ZH-A 12 and 14, the replicated samples were more similar to each other than to samples from different stalactites. The only exception was the stalactite BN, which consisted of two both visually and biologically distinct parts (Table 2, Fig. 2).

Microbial Communities in the Stalactites

Even though certainly not all environmental variables were examined, our experimental design circumvented this constraint by comparing adjacent and thus similar samples with those from distant and dissimilar sites. Both phylogenetic and abundance-based clustering of the microbial communities obviously depended on the presence or absence of a small number of highly abundant OTUs. Some of these OTUs were closely related to typical chemoautotrophs, and they probably represented primary producers in the stalactite ecosystem (*F. myxofaciens*, *A. ferrivorans*, *Sideroxydans litotrophicus*, *Gallionella capsiferiformans*, *Acidiferrobacter* sp.). On the other hand, some stalactites were dominated by presumably heterotrophic bacteria, similarly as in the previous study from Zlaté Hory deposit [20]. Considering the currently available data, it is impossible to decide whether the autotrophs disappeared due to insufficient water flow (excluded for samples BN and BS) or unknown spatial/temporal dynamics of the ecosystem. Nevertheless, it should be noted that a heterotrophs-only community cannot independently persist or even synthesize the organic mass of a snottite in the organic-poor AMD.

Importantly, the majority of the highly abundant species were detected at multiple sites, and, concurrently, various individual stalactites belonging to both groups ZH-A and B were dominated by various species of bacteria. The TRFLP data covering all 51 stalactites were used to test a possible association between the organisms and localities. The variability explained by sampling site was high up to 30.8 %, but the inferred optima for most TRFs and OTUs were not associated with specific sites (Fig. 1b–d). The TRFs, except for those of *T. aquaesulis* and several unidentified minor peaks, were neither sampling site-specific nor followed any monitored environmental variable.

Because a large unexplained variability of the communities was detected, it is important to exclude that it was generated by PCR or sequencing bias, insufficient depth of sequencing, or other artifacts. It is widely accepted that amplicon

sequencing yields not only presence/absence data of particular OTUs but also their approximate quantities [37]. Nevertheless, we verified the reproducibility of the methods used in the study. The PCR-trFLP analyses of most samples were repeated twice, always with high similarity of the replicates (data not shown). Also, the sequencing of replicated samples from certain stalactites showed good reproducibility of the method (see above; Table 2, Fig. 2 a, b). The depth of sequencing was probably insufficient to reveal the complete diversity of rare species in some samples (Table S2). However, most statistical methods used in the community comparison can correctly detect dissimilarities even at a sampling depth of 100 sequences per sample [37]. We analyzed samples with the depth greater than 300 sequences per sample, and the observed patterns were based on substantial variation in abundance of common OTUs and even the absence of certain OTUs in a particular stalactite and their dominance in others (Tables 2 and S2). Such patterns are unlikely to be generated by sequencing bias or undersampling of the rare species.

The amplicon sequencing of the samples from Zlaté Hory mine showed that the microbial community in each acidic ferruginous stalactite may display almost no similarity to the microbial communities in the adjacent stalactites, and that every single stalactite contains only a subset of organisms that can thrive in such environment and are present in the mine. Some stalactites from sites ZH-A and B were even more similar to stalactites from other mines than to the adjacent ones. It is in contradiction to the widely accepted conception, stating that microbial community composition is dictated by environment or by combination of environment and dispersal limitations. It can be objected that the rate of dripping varied considerably even within the stalactite groups ZH-A and B. The dripping rate was not assessed with accuracy sufficient to test its statistic correlation with microbial community composition. However, the same dominant species were found among the samples that differed in water flow by an order of magnitude in both groups ZH-A and B. Clustering analysis by UniFrac confirmed the similarity of these communities (Fig. 2, e.g., ZH7, B04, and B16; B07 and B10; BSA and KU2; ZH10 and MI1). When the stalactites are arranged by dripping rate semi-quantitatively into the four categories (Table 2), different microbial communities appear in each category, and similar communities appear in the different categories as well. The dripping rate (i.e., the number of drops per minute) was considered to be sufficiently accurate estimate of the water flow, because all stalactites had similar area of the terminus and thus produced drops of similar volumes. The differences in dripping rate between stalactites hosting similar communities were securely greater than the possible uncertainty of any estimation method. For these reasons, we conclude that the dripping rate neither determines nor restricts the microbial community composition. More interestingly, all the

clusters of similar communities, apart from C3, contained samples from multiple sites within Zlaté Hory mine or even samples from the other mines as well. It implies that the clustering of the microbial communities does not follow geographic distance, temperature, pH, and concentration of toxic elements (As, Cu). The only exception was the sample BN, which contained a neutrophilic microbial community, almost completely different from the other samples (e.g., *T. aquaesulis*, Fig. 1d). The number of samples was not sufficient to test whether the abovementioned environmental variables influence the probability of the presence of certain organism at a certain site. Nevertheless, the distribution of the community types among the sites (Fig. 2a, b) suggests two different scenarios. Either, some of the unidentified environmental factors, likely the water composition, have a greater spatial variability within the continuous water film originating from a single rock crevice at sites ZH-A and B than among various springs. Or alternatively, the composition of the communities is only delimited, but not determined, by the environmental traits, and thus may considerably vary even at almost identical habitats. From the hydrogeological point of view, the latter explanation is significantly more plausible.

Ecological Implications

These results urge the question whether the influence of the environmental traits can be retrieved from the composition of the stalactite microbial communities. We pooled the communities from randomly selected triads of stalactites from sites ZH-A or ZH-B and analyzed them by UniFrac. Interestingly, the

communities from the triads of stalactites from a single site clustered together (Fig. 3), while the pooling never overlapped. It indicates that the pooled microbial communities show stronger relation to the environment than the individual ones. The simplest explanation is that the pooling suppresses the influence of random processes. This explanation should be confirmed by further research performed on substantially greater set of samples. It supports the theory that environmental traits influence probability whether various individual species will or will not be included in the community, rather than set the frequencies of the species in community containing all suitable organisms.

Our interpretation is not in conflict with findings that microorganisms have unimodal response to the environment and that biological responses to environmental gradients can be retrieved by analyzing the phylogenetic dissimilarity of microbial communities [38]. A recent study showed that bacteria evince more deterministic community composition than larger and more dispersal-limited fungi at the newly emerging habitats [2]. It also concurs with our findings, since these results imply that stochastic processes play a significant role in both bacterial and fungal community assembly. On the other hand, numerous studies focusing on AMD-related environments surprisingly overlooked the effects of neutral processes. Likely, it may be explained by sampling of bulky environments that were non-homogeneous at micro-scale, such as sediments and massive biofilms on submerged surfaces [16, 39–41], or by sampling of diverse rather than similar habitats within a single site [17, 20]. Neither of these sampling strategies enables comparison of individual microbial communities from similar habitats. It has

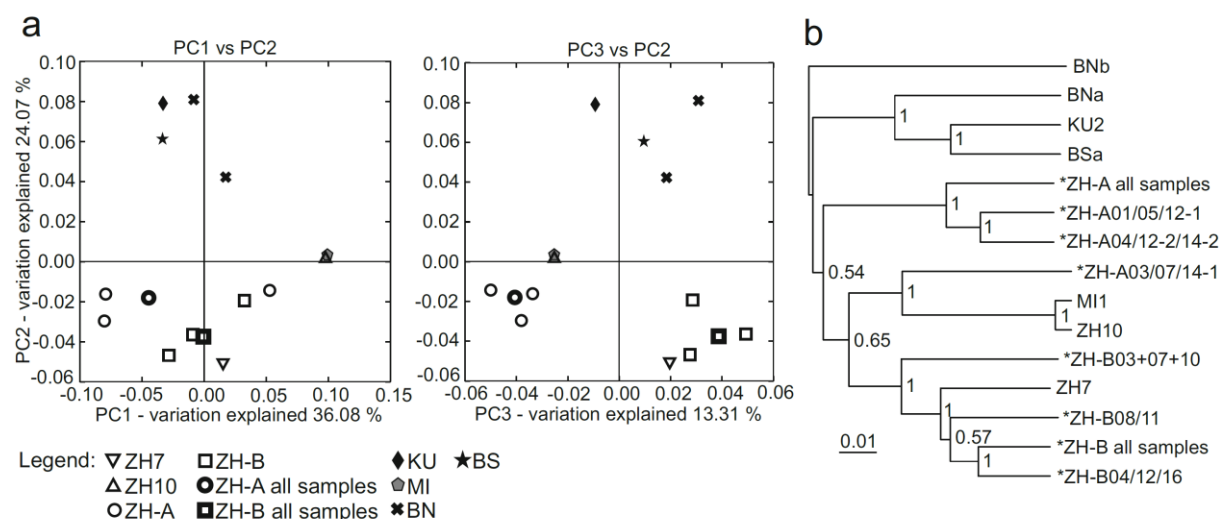


Fig. 3 UniFrac PCoA (**a**) and UPGMA (**b**) clustering of composed microbial communities generated by pooling of three (exceptionally two) randomly selected samples from ZH-A or ZH-B, respectively. Repeated use of any sample in more than one composed community was avoided. Sample site abbreviations are identical to those in Fig. 1.

Pooled samples in (**b**) are marked with an *asterisk* (*), and the names of original samples are listed. All composed communities were subsampled to 1000 sequences prior to analysis in order to avoid potential bias caused by unequal sample sizes

been recently shown that the dissimilarity of AMD-related extremophilic microbial communities might be underestimated also due to low sequencing depth in older studies. Even the seemingly identical biofilm communities dominated by *Leptospirillum* sp. revealed distinct populations of rare species when the whole-community transcriptomes were analyzed [42]. It shows that more microorganisms than was previously expected can thrive in such conditions, and that only part of them is present at a specific site at a specific time.

Conclusions

We observed unexpected dissimilarity of microbial communities thriving in ferruginous mine stalactites. Due to the spatial arrangement of the samples, this dissimilarity can be hardly explained by environmental variability. The important question for further research is whether the observed dissimilarity is restricted to habitats such as the microbial stalactites or represents a generally widespread phenomenon. If the present results will be corroborated in multiple various ecosystems, the widely accepted assumption that microbial species alternate in samples primarily due to environmental gradients should be applied with greater caution for extremophilic communities. The subsequent question is whether the common, highly diversified microbial communities (e.g., revealed by most soil metagenome studies) show robust response to the environmental gradients due to mixing of multiple microcommunities in each sample. The mixing supposedly reduces the noise generated by stochastic community assembly. The first step to answer this question may be to test if such typical communities will be obtained by pooling of large numbers of stalactite samples from a single site.

Acknowledgments This work was supported by the Charles University in Prague (project GA UK 528613) and Charles University specific research grant no. SVV 260 208/2015.

We thank to Jan Čemý for providing molecular biology laboratory, Petr Baldrian for providing the 454 sequencing facility and help with sample preparation, Jan Kotris for enabling prospection of the Zlaté Hory mine, Pavel Chaloupka for enabling prospection of the Lehnschafte mine, Tomáš Herben and Jana Škodová for the significant help with statistical methods, Petr Drahota for chemical analyses, and Johana Rotterová for thorough language correction.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Nemergut DR, Schmidt SK, Fukami T, O'Neill SP, Bilinski TM, Stanish LF et al (2013) Patterns and processes of microbial community assembly. *Microbiol Mol Biol Rev* 77:342–356
- Schmidt SK, Nemergut DR, Darcy JL, Lynch R (2014) Do bacterial and fungal communities assemble differently during primary succession? *Mol Ecol* 23:254–258
- Nemergut DR, Lozupone C, Jiang L, Schmidt SK, Fierer N, Townsend AR et al (2011) Global patterns in the biogeography of bacterial taxa. *Environ Microbiol* 13:135–144
- Hallberg KB, Coupland K, Kimura S, Johnson DB (2006) Macroscopic streamer growths in acidic, metal-rich mine waters in North Wales consist of novel and remarkably simple bacterial communities. *Appl Environ Microbiol* 72:2022–2030
- Macalady JL, Jones DS, Lyon EH (2007) Extremely acidic, pendulous cave wall biofilms from the Frasassi cave system, Italy. *Environ Microbiol* 9:1402–1414
- García-Moyano A, Gonzáles-Toril E, Aguilera Á, Amils R (2012) Comparative microbial ecology study of the sediments and the water column of the Río Tinto, an extreme acidic environment. *FEMS Microbiol Ecol* 81:303–314
- Kay CM, Rowe OF, Rochetti L, Coupland K, Hallberg KB, Johnson DB (2013) Evolution of microbial “streamer” growths in an acidic, metal-contaminated stream draining an abandoned underground copper mine. *Life* 3:189–210
- Baker BJ, Banfield JF (2003) Microbial communities in acid mine drainage. *FEMS Microbiol Ecol* 44:139–152
- Macalady JL, Dattagupta S, Schaperdoth I, Jones DS, Druschel GK, Eastman D (2008) Niche differentiation among sulfur-oxidizing bacterial populations in cave waters. *ISME J* 2:590–601
- Johnson DB (2012) Geomicrobiology of extremely acidic subsurface environments. *FEMS Microbiol Ecol* 81:2–12
- Golyshina OV, Pivovarova TA, Karavaiko GI, Kondratéva TF, Moore ER, Abraham WR et al (2000) *Ferroplasma acidiphilum* gen. nov., sp. nov., an acidophilic, autotrophic, ferrous-iron-oxidizing, cell-wall-lacking, mesophilic member of the *Ferroplasmaceae* fam. nov., comprising a distinct lineage of the *Archaea*. *Int J Syst Evol Microbiol* 50:997–1006
- Hallberg KB, Gonzáles-Toril E, Johnson DB (2010) *Acidithiobacillus ferrivorans*, sp. nov.; facultatively anaerobic, psychrotolerant iron-, and sulfur-oxidizing acidophiles isolated from metal mine-impacted environments. *Extremophiles* 14:9–19
- Schippers A, Breuker A, Blazejak A, Bosecker K, Kock D, Wright TL (2010) The biogeochemistry and microbiology of sulfidic mine waste and bioleaching dumps and heaps, and novel Fe(II)-oxidizing bacteria. *Hydrometallurgy* 104:342–350
- Hallberg KB, Hedrich S, Johnson DB (2011) *Acidiferrobacter thiooxydans*, gen. nov. sp. nov.; an acidophilic, thermo-tolerant, facultatively anaerobic iron- and sulfur-oxidizer of the family Ectothiorhodospiraceae. *Extremophiles* 15:271–279
- Johnson DB, Hallberg KB, Hedrich S (2014) Uncovering a microbial enigma: isolation and characterization of the streamer-generating, iron-oxidizing, acidophilic bacterium “*Ferrofum myxofaciens*”. *Appl Environ Microbiol* 80:672–680
- Amaral-Zettler LA, Zettler ER, Theroux SM, Palacios C, Aguilera A, Amils R (2011) Microbial community structure across the tree of life in the extreme Río Tinto. *ISME J* 5:42–50
- Kimura S, Bryan CG, Hallberg KB, Johnson DB (2011) Biodiversity and geochemistry of an extremely acidic, low-temperature subterranean environment sustained by chemolithotrophy. *Environ Microbiol* 13:2092–2104
- Casamayor EO, Pedrós-Alió C, Muyzer G, Amann R (2002) Microheterogeneity in 16S ribosomal DNA-defined bacterial populations from a stratified planktonic environment is related to temporal changes and to ecological adaptations. *Appl Environ Microbiol* 68:1706–1714
- Ziegler S, Ackermann S, Majzlan J, Gescher J (2009) Matrix composition and community structure analysis of a novel bacterial pyrite leaching community. *Environ Microbiol* 11:2329–2338

20. Falteisek L, Čepička I (2012) Microbiology of diverse acidic and non-acidic microhabitats within a sulfidic ore mine. *Extremophiles* 16:911–922
21. Patočka F, Vrba J (1989) The comparison of strata-bound massive sulfide deposits using the fuzzy linguistic diagnosis of the Zlaté Hory deposits, Czechoslovakia, as an example. *Miner Dep* 24: 192–198
22. Martyčák K, Zeman J, Vacek-Veselý M (1993) Supergene processes on ore deposits—a source of heavy metals. *Environ Geol* 23: 156–165
23. Turner S, Pryer KM, Miao VPW, Palmer JD (1999) Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *J Euk Microbiol* 46:327–338
24. Větrovský T, Baldrian P (2013) Analysis of soil fungal communities by amplicon pyrosequencing: current approaches to data analysis and the introduction of the pipeline SEED. *Biol Fertil Soils* 49: 1027–1037
25. Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB et al (2009) Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 75:7537–7541
26. Edgar RC (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26:2460–2461
27. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389–3402
28. Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T (2002) MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res* 30:3059–3066
29. Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 52:696–704
30. Meyer F, Paarmann D, D'Souza M, Olson R, Glass EM, Kubal M et al (2008) The Metagenomics RAST server—a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC Bioinformatics* 9:386
31. ter Braak CJF, Šmilauer P (2002) CANOCO Reference manual and users guide to Canoco for Windows: software for canonical community ordination (Version 4.5). Microcomputer Power, Ithaca
32. Hill T, Lewicki P (2007) Statistics methods and applications. StatSoft, Tulsa, URL <http://www.statsoft.com/textbook/stathome.html>
33. Hamady M, Lozupone C, Knight R (2010) Fast UniFrac: facilitating high-throughput phylogenetic analyses of microbial communities including analysis of pyrosequencing and PhyloChip data. *ISME J* 4:17–27
34. Chao A, Chazdon RL, Colwell RK, Shen T-J (2005) A new statistical approach for assessing similarity of species composition with incidence and abundance data. *Ecol Lett* 8:148–159
35. Ramette A, Tiedje JM (2007) Multiscale responses of microbial life to spatial distance and environmental heterogeneity in a patchy ecosystem. *PNAS* 104:2761–2766
36. Heinzel E, Janneck E, Glombitza F, Schlömann M, Seifert J (2009) Population dynamics of iron-oxidizing communities in pilot plants for the treatment of acid mine waters. *Environ Sci Technol* 43: 6138–6144
37. Kuczynski J, Liu Z, Lozupone C, McDonald D, Fierer N, Knight R (2010) Microbial community resemblance methods differ in their ability to detect biologically relevant patterns. *Nat Methods* 7:813–819
38. Faith DP, Lozupone CA, Nipperess D, Knight R (2009) The cladistic basis for the phylogenetic diversity (PD) measure links evolutionary features to environmental gradients and supports broad applications of microbial ecology's "phylogenetic beta diversity" framework. *Int J Mol Sci* 10:4723–4741
39. Bond PL, Smriga SP, Banfield JF (2000) Phylogeny of microorganisms populating a thick, subaerial, predominantly lithotrophic biofilm at an extreme acid mine drainage site. *Appl Environ Microbiol* 66:3842–3849
40. Rowe OF, Sánchez-España J, Hallberg KB, Johnson DB (2007) Microbial communities and geochemical dynamics in an extremely acidic, metal-rich stream at an abandoned sulfide mine (Huelva, Spain) underpinned by two functional primary production systems. *Environ Microbiol* 9:1761–1771
41. Tan GL, Shu WS, Zhou WH, Li XL, Lan CY, Huang LN (2009) Seasonal and spatial variations in microbial community structure and diversity in the acid stream draining across an ongoing surface mining site. *FEMS Microbiol Ecol* 70:121–129
42. Aliaga-Goltsman DS, Comolli LR, Thomas BC, Banfield JF (2015) Community transcriptomics reveals unexpected high microbial diversity in acidophilic biofilm communities. *ISME J* 9:1014–1023

7. SHRnutí A ZÁVĚR

V průběhu uplynulých let jsem měl možnost v rámci týmu Ivana Čepičky zavádět do používání různé metody environmentální mikrobiologie a geomikrobiologie. Při tom bylo nutné se potýkat kromě vlastních začátečnických chyb i s tak zdánlivě banálními potížemi, jako je to, že v budově, kde se dlouhá desetiletí pěstují stovky kultur *Escherichia coli* pro potřeby molekulární biologie i dalších oborů, je téměř nemožné připravit sekvenaci, ve které nebude tato bakterie přítomná jako kontaminant. Naopak výhodou byla možnost spojit mikrobiologický výzkum se svojí speleologickou činností, díky které jsem se mohl dostat na různá neobvyklá místa a poznávat různá biologicky extrémní stanoviště. Jedněmi s nich byla i stanoviště vázaná na produkty zvětrávání sulfidických rudních minerálů. Při srovnání terénních pozorování s dostupnými publikacemi bylo zřejmé, že ačkoliv mikrobiální diverzita extrémně kyselých prostředí byla věnována velká pozornost, dosavadní vzorkování mikroorganismů vázaných na rudní ložiska je selektivně zaměřené na několik málo nápadných typů stanovišť. Některé, často dosti běžné typy stanovišť nebyly studovány. Mimo jiné se nepodařilo nalézt práci o systematickém výzkumu gossanu neboli podpovrchové vyloužené části ložiska. Kromě toho však byla patrná tendence většiny studií zabývat se sice podrobným, ale více či méně faunisticky zaměřeným popisem malého počtu stanovišť. Většina prací automaticky spojovala konkrétní biogeochemické procesy s konkrétními organismy.

V první studii (Falteisek a Čepička 2012) proto bylo snahou nalézt a mikrobiologicky i geologicky charakterizovat co nejširší spektrum stanovišť spojených s ekosystémem sulfidického ložiska. Bylo potvrzeno, že vyloužená zóna ložiska obsahuje charakteristická mikrobiální společenstva, jejichž složení odpovídá extrémně oligotrofnímu charakteru stanovišť a jejichž význam zřejmě spočívá v udržování nízkého obsahu organických látek ve vodě napájející vlastní oxidační zónu. V rámci stanovišť s extrémně kyselým prostředím se podařilo na základě složení OTU i fylogenetické vzdálenosti jednoznačně odlišit společenstva žijící na místech oxidace pyritu a v odtékajících kyselých vodách. V obou prostředích je hlavní mikrobiálně katalyzovanou reakcí chemolitotrofní oxidace Fe^{2+} a známá ekologická valence organismů, které se těchto dějů účastní, takovéto rozdělení nepředpovídá. Tento výsledek ukazuje, že pro vymezení výskytu bakterie je zásadní především její konkurenceschopnost, která je daná kombinací velkého počtu podmínek. Výsledek, který se stal podnětem pro další výzkum, bylo zjištění, že na místech vývěrů kyselých železitých vod (AMD) se může nacházet řada různých typů mikrobiálních komunit, které se liší i na

vzájemně blízkých vývěrech. Studie naznačila, že některé z těchto komunit vůbec neobsahují nebo obsahují pouze v malém množství chemoautotrofní mikroorganismy považované za nezbytné primární producenty. Je zřejmé, že jde o přechodný stav, ovšem nebylo vysvětleno, jak a proč vzniká. Někteří z nalezených pravděpodobných heterotrofů dosud nebyli zachyceni na stanovištích přímo ovlivněných AMD.

Pro další výzkum bylo důležité zjištění, že biostalaktity rostou na vývěrech AMD často ve velkých počtech na jednom místě a mohou hostit odlišné mikrobiální komunity. Tyto komunity jsou navíc relativně jednoduché, tvořené v typickém případě jedním až dvěma pravděpodobnými chemoautotrofy, kteří v komunitě výrazně převažují, a dalšími mikroorganismy, z nichž je zpravidla též jen několik hojných. Sousedící stalaktity navíc často bývají napájené vodou ze stejného zdroje a pravděpodobně o stejném složení, takže představují mimořádně dobrou ukázkou oddělených, ale přitom skoro identických přirozených stanovišť. Takovéto uspořádání mikrobiálních komunit bylo v další studii využito k řešení otázky, zda je složení jednotlivých společenstev determinováno prostředím nebo je významná i jiná variabilita (Falteisek et al. 2016). Teoretické pozadí tohoto problému vychází ze současného rozštěpeného pohledu na mikrobiální společenstva. Jednak je evidentní, že pomocí analýz fylogenetické disimilarity mikrobiálních komunit je možné přesně seřadit jednotlivá společenstva podle ekologických gradientů (Faith et al. 2009; Kuczinski et al. 2010), ale na druhou stranu často ani komunity z velmi podobných stanovišť nesdílejí téměř žádné mikrobiální genotypy či OTU (Nemergut et al. 2011). S tím zřejmě souvisí i druhý problém, kterým je mimořádně vysoká diverzita bakterií v různých substrátech, především v nehomogenních materiálech typu půd a sedimentů. Většina současných vysvětlení, proč nedojde ke kompetitivnímu vyloučení části z nich, předpokládá rozdělení těchto společenstev do mnoha jednodušších mikrok komunit (Nemergut et al. 2013). Tím vzniká zajímavá otázka, jak vypadá struktura těchto mikrok komunit. Lze si samozřejmě představit, že mikrokomunity budou podobné zjednodušeným kompozitním komunitám, přítomnost konkrétních OTU i jejich kvantita tedy bude věrně odrážet lokální mikroprostředí. Mikrokomunity však též mohou mít velmi jednoduché a variabilní složení, řízené kromě mikroheterogenity prostředí i náhodou. Výsledná složená komunita, kterou pozorujeme při analýze typického makroskopického vzorku, bude mít náhodnou variabilitu potlačenou díky průměrování mnoha mikrok komunit a její spojitá reakce na spojitou změnu podmínek bude vznikat čistě na statistickém základě.

Biostalaktity se mikrok komunitám podobají svojí relativní homogenitou a jednoduchostí, lze je však snadno analyzovat odděleně (Falteisek et al. 2016). Amplikonová

pyrosekvenace odhalila v některých těsně sousedících stalaktitech společenstva lišící se ve všech hojných OTU a naopak stejné dominantní OTU ve stalaktitech z různých lokalit. Analýza fylogenetické disimilarity ukázala klastrování komunit nečekaně slabě závislé na lokalitách. S jednou výjimkou platí, že podobnost komunit nesouvisela s žádnou testovanou proměnnou. I kdybychom brali do úvahy neúplnou charakterizaci jednotlivých mikroprostředí a možnost existence skryté variability, je velmi málo pravděpodobné, že by environmentální rozdíly v rámci řady stalaktitů rostoucích na prúsku z jediné pukliny podmiňovaly výskyt několika zcela odlišných společenstev a současně by se téměř identické komunity vyskytovaly v různých dolech na vývěrech, mezi nimiž chemické rozbory odhalily rozdíly. Nejpravděpodobnější vysvětlení je, že existuje poměrně velká množina mikroorganismů schopných obývat tento typ stanovišť a z těchto organismů se konkrétní komunity sestavují víceméně náhodným výběrem. Při tom nejspíše platí, že možnost koexistence podobných organismů v každé komunitě je omezená, a především že přesný charakter prostředí pouze mění pravděpodobnost obsazení určité role konkrétním organismem, ale nedeterminuje složení komunity. Při spojitě změně podmínek se tedy nebude spojitě měnit četnost jednotlivých mikroorganismů v komunitě, ale poroste pravděpodobnost, že bude některý z nich nahrazen jiným. Když byly komunity z několika stalaktitů z jednoho vývěru AMD spojeny do umělé kompozitní komunity (s vyloučením opakovaného použití každého stalaktitu), bylo tím výrazně posíleno jejich klastrování podle lokality. Počet vzorků byl příliš malý na exaktní ověření tohoto trendu, ale ukazuje se, že oslabení náhodné variability zvyšuje asociaci s lokalitou, a tedy i prostředím.

Tyto výzkumy mikrobiálních komunit z kyselých důlních vod poskytly základ pro jejich budoucí podrobnější studium a především ukázaly, že to je použitelný model pro řešení obecnějších otázek mikrobiální ekologie. V první řadě jde o pochopení vztahu mezi složením mikrobiální komunity, probíhajícím procesem a faktory prostředí. Je jasné, že nastíněné otázky byly vyřešeny jen částečně a bude nutné spojit analýzy mikrobiálních společenstev s podrobnějším studiem prostředí. Jako velká výhoda AMD se jeví především to, že tu jsou detailně známé mechanismy primární produkce a energetického metabolismu. To umožňuje snadno a poměrně přesně kvantifikovat vstupy do systému a popisovat biodiverzitu ve vztahu k nim.

Další výzkum se týkal prostředí, kde dochází ke srážení sekundárních sulfidů, v tomto případě sulfidu arzenu. Precipitace realgaru na pohřbené rostlinné hmotě v Mokrsku ve středních Čechách představuje jediný známý případ tvorby makroskopického množství tohoto minerálu mimo hydrotermální prostředí (Drahota et al. 2013). Fyzikálně chemické

charakteristiky (pH, redukční potenciál, složení) podzemní vody i pórového roztoku v půdě přitom leží dosti daleko od oblasti stability tohoto minerálu. Jeho tvorba proto byla připsána mikrobiální redukci síranů, což bylo později potvrzeno i srovnáním izotopového složení sulfidické a síranové síry na lokalitě. Analýzy mikrobiálních komunit ze sedimentu obsahujícího realgar a z půdy (resp. regolitu) bez realgaru odhalily v obou případech dosti podobné mikrobiální komunity, odpovídající redoxně i chemicky pestrému prostředí s kontrastujícími aerobními i striktně anaerobními mikrohabitaty. Další sekvenace potvrdily i přítomnost jak autotrofní oxidace arsenitanu, tak disimilativní redukce arseničnanu i síranu. Vzhledem k tomu, že vzorky byly odebrány jako typické „kompozitní“ mikrobiální komunity, je obraz nalezené bioty plně konzistentní s existencí lokálních anoxických mikrohabitátů v okolí organických částic, v nichž probíhá intenzivní redukce síranů a tvorba realgaru. Zajímavé je, že mikrobiální komunity v sedimentu s realgarem a v půdě bez něj vykazovaly minimální fylogenetickou odlišnost, pouze srovnání genů pro sulfát reduktázu (*dsrB*) nasvědčovalo signifikantně odlišnému složení komunity redukující sírany v obou prostředích. Tyto výsledky tedy nabízejí pouze všeobecnou představu způsobu biogenní tvorby realgaru a nestačí pro její bezpečné potvrzení (Drahota et al. 2013). Staly se však základem pro další intenzivní výzkum, který již poskytl řadu dalších nepřímých důkazů, že klíčovým prvkem je mikroheterogenita prostředí a že v homogenním prostředí by realgar pravděpodobně nevznikal. Důležitý závěr je, že mikroskopická heterogenita habitatů i mikroorganismů může vést k segregaci některých prvků do pevné fáze a tedy k ovlivnění funkce celého makroskopického systému i k environmentálně významným důsledkům.

Práce je jako celek ovlivněna především všeobecně rostoucím významem vzhledu, že diverzita biogeochemických pochodů není vysvětlitelná přítomností konkrétních taxonů bakterií a archeí, ale teprve propojením biodiverzity s vlivem struktury prostředí, a to včetně struktury mikroskopické. Struktura prostředí je zároveň tou částí systému, která zodpovídá za to, že procesy nesměřují vždy přímo do termodynamického optima, ale někdy vedou k neočekávaným produktům.

8. OSTATNÍ PUBLIKACE PŘEDKLADATELE DISERTAČNÍ PRÁCE

Slavík M, Bruthans J, Filippi M, Schweigstillová J, Falteisek L, Řihošek J (2016). Biocrust on sandstone: mechanical and hydraulic properties and resistance to erosion. *Geomorphology*, v recenzi.

Falteisek L, Janštová V, Černý J (2013). Simplified technique to evaluate human CCR5 genetic polymorphism. *Am. Biol. Teach.* 75, 704-707.

Ptáčková E, Kostygov AY, Chistyakova LV, Falteisek L, Frolov AO, Patterson DJ, Walker G, Čepička I (2013). Evolution of Archamoebae: Morphological and molecular evidence for pelobionts including Rhizomastix, Entamoeba, Iodamoeba, and Endolimax. *Protist* 164, 380-410.

Kačenka M, Kaman O, Kotek J, Falteisek L, Černý J, Jiráček D, Herynek V, Zacharovová K, Berková Z, Jendelová P, Kupčík J, Pollert E, Veverka P, Lukeš I (2011). Dual imaging probes for magnetic resonance imaging and fluorescence microscopy based on perovskite manganite nanoparticles. *J. Mater. Chem.* 21, 157-164.

Martínková N, Horáček I, Bačkor P, Bartonička T, Blažková P, Červený J, Falteisek L, Gaisler J, Hanza V, Horáček D, Hubálek Z, Jahelková H et al. (2010). Increasing incidence of *Geomyces destructans* fungus in bats from the Czech Republic and Slovakia. *PLoS One* 5, e13853.