

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Ústav pro životní prostředí



**Mikrobiální aktivita hlubinných miocenních sedimentů
Sokolovské hnědouhlené pánve**

Microbial activity of deep subsurface miocen sediments near Soklov

Diplomová práce

Vedoucí práce: Doc. Ing. Mgr. Jan Frouz, CSc.

Diplomant: Bc. Renata Galertová

Květen 2012

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Doc. Ing. Mgr. Jana Frouze, CSc. s využitím uvedené literatury a informací, na něž odkazuji. Svoluji k jejímu zapůjčení s tím, že veškeré (i přejaté) informace budou řádně citovány. Rovněž prohlašuji, že předložená diplomová práce je totožná s elektronickou verzí vloženou do SIS.

V Praze dne

.....

Podpis

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu své diplomové práce panu Doc. Ing. Mgr. Janu Frouzovi, CSc. za čas, trpělivost, odborné vedení a podnětné připomínky, čímž vším přispěl k vypracování této diplomové práce. Můj dík také patří kolegovi Martinovi Bartuškoví, který svou prací přispěl k realizaci experimentů. Dále bych chtěla poděkovat mé rodině a přátelům, kteří mě při studiu podporovali.

Abstrakt:

Ve své práci jsem sledovala mikrobiální aktivitu v miocenních sedimentech získaných ze dvou různých hloubek – 30 a 150 metrů – v Lomu družba, který se nachází v Sokolovské hnědouhelné pánvi. Byly odebrány tři typy sedimentu: lamelární, amorfni a přechodný. Vzorky byly získány za sterilních podmínek a část ze vzorků přechodného jílovce byla ovlivněna přidáním glukózy, vlhčením a mrazením.

Mým cílem bylo sledovat aktivitu původní hlubinné mikroflóry v různých hloubkách a její ovlivnění environmentálními faktory, kterým mohou být odtěžené jílovce po umístění na výsypky vystaveny. Mikrobiální činnost byla hodnocena za pomoci měření uvolněného CO₂ (titrace). Naměřené hodnoty mikrobiální aktivity neukázaly výrazný rozdíl mezi respirací sedimentů různého stáří (hloubek), ale rozdíly mezi různými druhy sedimentů signifikantní byly, přičemž nejvyšší hodnoty byly naměřeny u lamelárního sedimentu.

Ovlivnění vzorků potom do aktivity bioty přineslo odezvu, která napovídá, že společenstva velkých hloubek jsou limitována živinami. Protože aplikace glukózy nepřinesla až tolik výrazný efekt, je možné se domnívat, že tato společenstva jsou specializována na přítomnou fosilní organickou hmotu, kterou jsou schopna rozkládat, což má velký význam hlavně v počátečních stádiích rozvoje výsypek.

Klíčová slova: mikrobiální aktivita, miocenní sedimenty, Sokolovská hnědouhelná pánev, glukóza, vlhčení, mrazení, výsypky.

Abstract:

In my diploma thesis I observed microbial activity in Miocene sediments collected at two different depths - 30 and 150 meters - in the „Družba“ open-mine pit, which is located in Sokolov Brown Coal Basin. There were three different types of sediment: lamellar, amorphous and transitional. Samples were obtained under sterile conditions and following treatments were applied to the transitional sediment: addition of glucose, wetting and freezing.

The aim of my study was to observe the activity of the original microflora at various depths and the impact of environmental factors that can affect the quarried claystones after being put on heaps. Microbial activity was evaluated by measuring released CO₂ (titration). Obtained values of microbial activity did not show any differences between the respiration of sediments of different ages (depths), but differences between different types of sediments were significant, the highest values were found in lamellar sediment.

Affection of samples then showed biota activity response suggesting that microbial communities at lower depths are limited by nutrients. Because the application of glucose did not show any noteworthy effect, we can assume that these communities are specialize on present fossil organic matter they are able to decompose, which is important especially in the early stages of heaps development.

Keywords: microbial activity, Miocene claystones, Sokolov Brown Coal Basin, glucose, wetting, freezing, heaps.

OBSAH:

Obsah

1. Úvod.....	7
1.1. Hlubinná mikroflóra	9
1.1.1. Výskyt mikroorganismů v podzemí.....	9
1.1.2. Výskyt mikroorganismů v půdních typech	10
1.1.3. Dostupnost živin.....	11
1.1.4. Původ mikroorganismů	13
1.2. Biogeochemické procesy	15
1.2.1. Vodík jako zdroj energie	17
1.2.2. Redukce kovů	18
1.2.3. Využití síry	21
1.2.4. Ekosystémy nezávislé na fotosyntéze	23
1.3. Detekce a kvantifikace.....	25
1.3.1. Techniky založené na analýze nukleových kyselin.....	27
1.3.2. Kvantifikace mikrobiální aktivity	29
1.4. Cyprisová formace Sokolovské hnědouhelné pánve	32
1.4.1. Organická hmota	35
1.4.2. Přítomná mikroflóra	36
2. Metodika.....	38
2.1. Materiál.....	38
2.1.1. Studovaná oblast	38
2.1.2. Vzorky	38
2.2. Uspořádání pokusu	40
2.3. Analýzy.....	40
2.3.1. Stanovení bazální respirace půdy	40
2.3.2. Zpracování dat.....	42
3. Výsledky.....	43
4. Diskuze.....	46
5. Závěr.....	48
6. Použitá literatura	50

1. Úvod

Zájem člověka o mikrobiální život pod povrchem je zapříčiněn mnoha faktory. Nutnost se touto oblastí zabývat vyvolala třeba stále se zhoršující kvalita podzemních vod, které jsou postiženy kontaminací půd. Potřeba nakládání s radioaktivním odpadem otevřela otázku podzemních skladišť, jejich mikrobiálního osídlení a potenciálních dopadů. Bioremediace je potom jedním z účinných a hlavně levných způsobů dekontaminace prostředí znečištěných těžkými kovy či radioaktivními látkami [Haldeman a Amy, 1993].

Neméně motivačním důvodem je neutuchající zájem lidstva o úplné počátky života na Zemi. Mikroorganismy pohřbené stovky metrů pod zemí by mohly být živoucím důkazem pradávného života na Zemi a mohly by napomoci i pátrání po životě na jiných planetách [Dong a Yu, 2007].

Přežit v tak extrémních podmínkách, jaké ve velkých hloubkách panují, mohou pouze výjimečně vybavené organismy. Studie jejich životních projevů a strategií tudíž mohou přinést nové poznatky využitelné v lékařství i vědě. Například přetrvávání těchto organismů v klidových stádiích, která se mnohdy odlišují od těch, jež jsou využívány povrchovými organismy, může přinést nové informace v oblasti kryptobiosy.

Činností člověka se mikroflóra, která by s největší pravděpodobností jen tak nespátřila světlo světa, dostává na povrch a zapojuje se do cyklů základních prvků a fungování moderních ekosystémů.

Do této kategorie lidského vlivu patří i povrchová těžba hnědého uhlí. Hlušina z výsypek povrchových lomů iniciovala podrobnější studium mikrobiální aktivity díky zjištění, že vyvážený materiál – ač mnohdy pochází ze značných hloubek - není sterilní, ale je

osídlen populacemi mikroorganismů [Elhottová at al., 2006]. Přesto, že fosilní mikroflóra je hojně dokumentována, o jejím osudu po vytěžení hlubinných vrstev víme velmi málo, ačkoli činnost mikrobiálních společenstev je z hlediska sukcese výsypek velmi důležitým faktorem.

Hlušina tvořící výsypky obsahuje nejen mikrobiotu, ale také organickou hmotu, kterou přítomné mikroorganismy mohou rozkládat. Ve své diplomové práci jsem se zaměřila právě na procesy mikrobiálního rozkladu organické hmoty.

Mým cílem bylo jednak porovnat rychlost mikrobiální respirace hlubinných společenstev miocenního jílu odebraného z různých hloubek a různých fází a dále sledovat ovlivnění mikrobiální respirace environmentálními faktory, kterým mohou být jílovce na povrchu vystaveny - zejména vlhčení, mrznutí a přísun snadno dostupného uhlíku.

Snažila jsem se odpovědět na následující otázky:

1) Může mikrobiální společenstvo hlubinných vrstev hrát významnou roli v mikrobiální aktivitě iniciálních stádií rozvoje výsypek?

2) Je mikrobiální aktivita ovlivněna typem sedimentu a jeho stářím (hloubkou)?

3) Jak mohou fyzikální a chemické stimuly, kterým je hlušina po vytěžení vystavena, ovlivnit mikrobiální aktivitu?

1.1. Hlubinná mikroflóra

1.1.1. Výskyt mikroorganismů v podzemí

První zmínka o tom, že ani hlubinné ekosystémy nepostrádají život, pochází od Bastina [1926], který kultivoval bakterie redukující sulfát ze vzorků pocházejících z ropných polí Illionoi. Mikroorganismy schopné kultivace byly potom objeveny v saturované i nesaturované zóně podzemí v hloubkách až 2,7 km a teplotách vyšších než 60°C [Balkwill et al., 1997].

Od dob prvotní zprávy o existenci mikrobiální aktivity v podzemních ekosystémech si tuto oblast za cíl svého studia zvolilo mnoho výzkumníků. Pestrá škála míst, na kterých byly mikroorganismy nalezeny, zahrnuje podmořská i terestrická prostředí. Životoschopné mikroorganismy byly dosud zaznamenány například v granitových horninách [Pedersen, 1997], ve zvodních, sedimentárních horninách, v pískovcích a břidlicích.

O zájmu o tuto oblast svědčí i ustanovení The Subsurface Microbial Culture Collection (SMCC), ve které jsou shromažďovány informace o mikroorganismech izolovaných z podzemních prostředí a která v současnosti obsahuje téměř 10 000 druhů mikroorganismů, většinou bakterií [Balkwill et al, 1997].

Výskyt živých mikroorganismů beze sporu závisí na prostředí. Podmínky hlubokého kontinentálního podloží jsou typicky reprezentované anaerobní podmínkami, vysokým či nízkým pH, vysokou teplotou a tlakem, vysokými hodnotami záření (z rozkladu radioaktivních prvků) a vysokou salinitou [Rothschild a Mancinelli, 2001].

Obecně existují tři kategorie kontinentálních podpovrchových prostředí: podpovrchové zvodně a/či hydrotermální vody; sedimentární pánve/ropná ložiska a krystalické metamorfované/magmatické horniny [Dong a Yu, 2007]. Charakteristiky

jednotlivých stanovišť určují, zda a v jakém množství bude mikroflóra přítomná a determinují i metabolismus organismů.

Například Colwell et al. [1997] provedli analýzu hlubinných systémů, jež byly speciálně vybrány pro svou geologicky podmíněnou hydrologickou izolaci a maximální paleoteploty (120-140°C). Předpoklady, že tyto podmínky znemožnily přežití přítomných organismů, se potvrdily - kulturační a biomarkerová analýza neukázala obsah žádných životaschopných mikroorganismů.

Naopak analýza vzorků z hydrologicky propojených podzemních oblastí, které nebyly vystaveny tak vysokým paleoteplotám, přinesla objev malého množství životaschopných sulfát redukujících, gram pozitivních bakterií *Desulfotomaculum* [Colwell et al., 1997].

1.1.2. Výskyt mikroorganismů v půdních typech

Kieft et al. [1995] provedli při svém výzkumu v Hanford Site ve Washingtonu srovnání vzorků z několika odlišných hloubek i vrstev obsahujících jezerní sedimenty, paleosol a hrubozrnné říční sedimenty.

Lakustrinní sedimenty se tradičně vyznačují vyšším obsahem organické hmoty a s tím souvisí i vyšší počty životaschopných mikroorganismů v těchto vzorcích. Ty byly ovšem značně nižší, než by odpovídalo moderním jezerním sedimentům. To je pravděpodobně důsledek jemnozrnné povahy těchto usazenin, která limituje pohyblivost mikroorganismů i mobilitu rozpuštěných živin [Kieft et al., 1995].

Také Frederickson et al. [1995] srovnávali abundanci mikrobioty v jezerních a říčních sedimentech a v paleosolu. Shodně s Kieft et al. popisují nejvyšší koncentrace mikrobiální biomasy v málo propustných lakustrinních sedimentech, ve kterých byly také zjištěny vysoké

koncentrace organického uhlíku [Frederickson et al., 1995]. Opět je zde zmíněn význam malé propustnosti těchto sedimentů, díky níž může docházet k dlouhodobému uchování bakterií i organického uhlíku. Systém je totiž limitován nedostatečnou dodávkou rozpustných akceptorů elektronů, které jsou nutné pro mikrobiální respiraci [Frederickson et al., 1995].

Přítomnost nebo nepřítomnost fosilního organického uhlíku v málo propustných sedimentech je tak důležitou podmínkou pro udržení životaschopných mikroorganismů v těchto usazeninách. Je pravděpodobné, že organický uhlík poskytl energii pro dlouhodobé přežití mikrobioty a to zvláště v jemnozrnných jezerních usazeninách [Kieft et al., 1995]. To, že v tomto prostředí docházelo k transportu živin difuzí a množství životaschopných mikroorganismů bylo relativně nízké, má za následek, že část původní organické hmoty v sedimentech jezera mohla přetrvat po miliony let [Kieft et al., 1995].

V paleosolech objevili Kieft et al. [1995] nízkou mikrobiální aktivitu. Zapříčinil ji zřejmě nedostatek organické hmoty v důsledku mikrobiální mineralizace a/či loužení organické hmoty z půdy poté, co se dostala pod povrch. Ke zmíněnému velkou měrou přispěla větší velikost zrn daného sedimentu [Kieft et al., 1995].

Nedostatek organické hmoty a mikrobiální aktivity v říčních písčínách potom v daném experimentu souvisel s obecně nižším obsahem organického hmoty v říčních sedimentech již v době depozice.

To, že se vertikální distribuce mikroorganismů v půdním profilu různí v závislosti na půdním typu zmiňují ve své práci i Federle et al. [1986].

1.1.3. Dostupnost živin

Výskyt mikroorganismů v hlubokém podloží je určen i strukturou a složením v daném

prostředí přítomných sedimentů a hornin. Na nich závisí množství živin a jejich dostupnost. Dostupnost ovlivňuje již výše zmíněná velikost pórů. Fredricson et al. [1997] uvádí ve své práci hodnotu ústí pórů menší než 0,2 μm jako hranici, pod kterou nebyla ve vzorcích pozorována metabolická aktivita bakterií – redukce acetátu, glukózy a SO_2 . Toto má zjevnou souvislost s velikostí známých bakterií, pro které jsou tyto póry příliš malé a živiny v nich tudíž nedostupné. To se ve zmíněném experimentu potvrdilo během další inkubace, kdy byl daný vzorek obohacen živinami a tento zásah vedl k metabolické aktivitě bakterií redukujících sulfát [Fredricson et al., 1997]. Na druhé straně vzorky s dostatečným množstvím pórů větších než 0,2 μm vykazovaly výraznou metabolickou aktivitu bez jakéhokoliv obohacení [Fredricson et al., 1997].

Fyzikální překážky v metabolické aktivitě bakterií zmiňují i White et al. [1998]. Podle nich je nedostatek propojenosti v různorodých rozptýlených mikrobiálních společnostech rychle prokazatelný významným zvýšením metabolické aktivity těchto společenství po přidání vody či drcení usazenin, aniž by se ke vzorkům přidávaly nějaké další substráty [White et al., 1998].

Sedimenty označuje jako vhodný habitat mikroorganismů Stevens [1997]. Protože sedimentární horniny jsou typicky porózní, umožňují pomalý průtok podzemní vody a tím i distribuci živin skrz formace [Stevens, 1997].

Na druhé straně i jemnozrné břidlice s drobnými póry mohou být pro bakterie žádaným prostředím v případě, že se vyskytují v sousedství pískovců. Živiny pomalu se z nich uvolňující totiž slouží k výživě mikroorganismům, které využívají jako životní prostor větší póry v pískovci [Fredricson et al., 1997].

Vzhledem k extrémním podmínkám hlubinného prostředí jsou živiny loužené z okolních hornin a sedimentů pro přežití mikrobioty velice podstatné. Jelikož většina rozpustných živin, které jsou přinášeny spolu s vodou infiltrující se z povrchu, je odebrána

organismy žijícími v půdě a blízko pod povrchem, hluboko do podloží se dostává voda na živiny chudá [Fredricson et al., 1997]. Z tohoto důvodu považují Fredricson et al. [1997] za pravděpodobné, že většina z živin, které využívají bakterie v hlubokých podpovrchových prostředích, je získána z okolních hornin a usazenin.

1.1.4. Původ mikroorganismů

Původ mikroorganismů v hlubokém podzemí může být zřejmě dvojitý – buď jde o organismy, které se do podloží dostaly v nedávné minulosti průnikem ze zemského povrchu a nebo to může být biota, která v těchto hloubkách přežila již od doby prvotní depozice. V některých místech může jít o kombinaci obou variant.

To, zda je možná mobilita organismů podzemím, je to dáno velikostí pórů daného podloží, které musí být dostatečně prostorné pro jejich průchod, v opačném případě se dá předpokládat, že jde o mikroorganismy původní.

Například v Clay Mesa Shale označují Fredricson et al. [1997] organismy přítomné ve zdejších lakustrinních sedimentech jako pravděpodobně shodné s těmi, které se zde vyskytovaly během depozice a rané diagenese.

I ve své dřívější práci popisují Fredricson et al. [1995] fyzikální podmínky (malou propustnost jezerních sedimentů) jako jednu z příčin zachování původní organické hmoty a mikroorganismů v miocenních jezerních sedimentech odebraných z různých hloubek v oblasti na jihu Washingtonu. Některé z těchto organismů podle nich pravděpodobně přežily dlouhá období díky extrémně pomalému metabolismu a růstu [Fredricson et al., 1995]. Může tak jít o mikroorganismy odvozené z živočichů přítomných v sedimentech jezera uložených před 6-8

miliony lety [Fredricson et al., 1995].

Studii jezerních sedimentů se zabývali i Elhottová at al. [2006], konkrétně v oblasti Sokolovské hnědouhelné pánve. Udávají, že během experimentu zjištěný relativně vysoký obsah životaschopné biomasy a spektrum saprotrofních fungi a heterotrofních bakterií ukazuje, že na jílu bohaté sedimenty jsou mikrobiálně bohatým geologickým médiem, ve kterém fungi a bakterie mohou přežít po dlouhá období [Elhottová at al., 2006].

Sedimenty jako prostředí obsahující signifikantní populace mikroorganismů v době depozice uvádí i Stevens [1997]. Podle něj sedimenty často obsahují velké koncentrace organické hmoty, které mohou následně udržet mikrobiální metabolismus.

Speciální pozici jemnozrnných hornin, konkrétně jílovců, jako hornin schopných uchovat životaschopné bakterie po dobu až milionů let, udávají ve své studii i Mauclaire et al. [2007]. Při studiu formace Opalinus Clay, 170 milionů let starého mezozoického jílovce, který vznikl sedimentací na dně mělkého moře, objevili mimo jiné sulfát redukující bakterie, které jsou shodné s typem mikroorganismů které bychom v tomto prostředí našli v době depozice a časně diagenese [Mauclaire et al., 2007].

To, zda v hornině přetrvávají životaschopné organizmy i po dlouhých časových úsecích, závisí samozřejmě i na horninovém vývoji konkrétních oblastí. V Opalinus Clay, ačkoli obsahuje velmi zhutněné jílovce, nejsou ani po 170 milionech let vzorky zcela bez života. Mauclaire et al. [2007] vidí příčinu v tom, že v tomto přírodním jílu probíhalo zhutňování extrémně pomalou rychlostí (přes milion let); sušení a zmenšení prostoru tak bylo postupné, což dalo bakteriím příležitost k tomu, aby se přizpůsobily drsným podmínkám prostředí.

1.2. Biogeochemické procesy

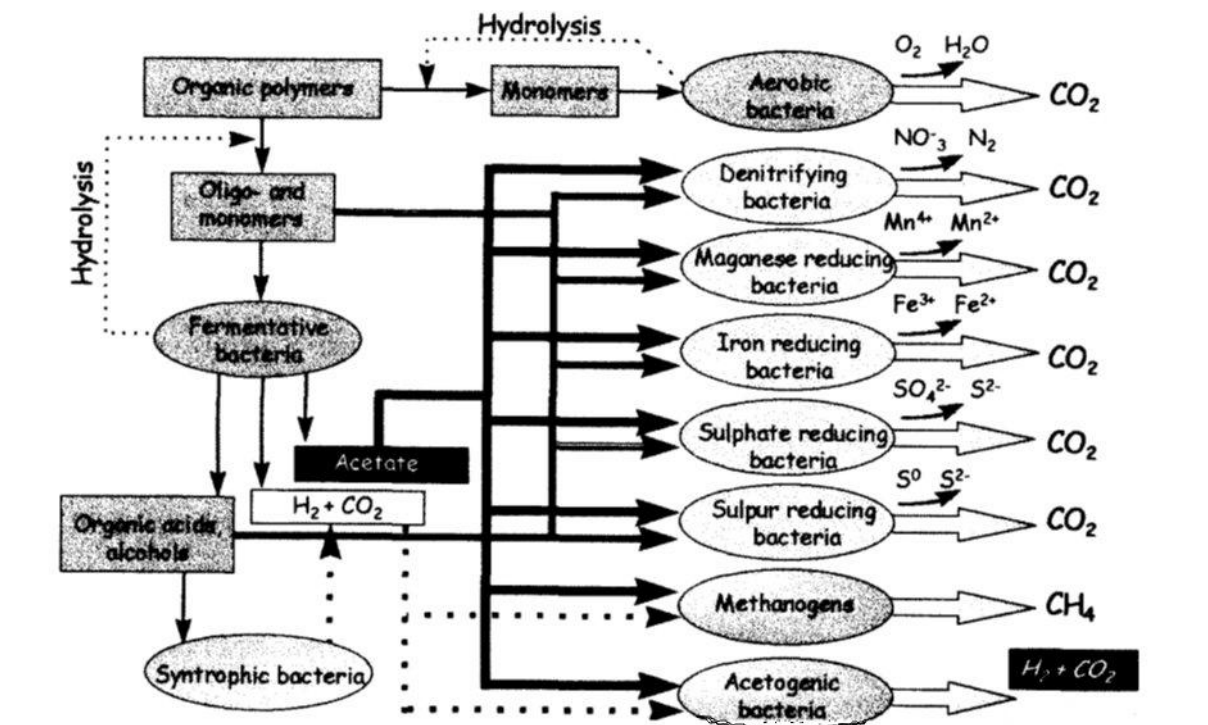
Je známo, že mikroorganismy jsou schopny katalyzovat reakce, které by v daných podmínkách bez jejich přispění probíhaly příliš pomalu nebo by neprobíhaly vůbec. Typickým příkladem je bakteriální redukce sulfátu na sulfid v anoxických vodách [Pedersen, 1997]. Bakteriální aktivita také ovlivňuje redoxní potenciál prostředí [Pedersen, 1997]. V podmínkách bohatých na Fe^{3+} a organickou hmotu tak bývají hojné bakterie redukující železo, díky jejichž činnosti roste v prostředí obsah Fe^{2+} a CO_2 [Pedersen, 1997].

Neméně zjevným příkladem je koexistence hydrogenní a metanogenní mikrobioty. H_2 vzniká činností hydrogenních bakterií při fermentaci a respiraci organické hmoty do té doby, než se rozklad organického materiálu kvůli jeho vysokým koncentracím zastaví. Methanogeni následně využijí vodík a oxid uhličitý pro produkci metanu, sníží koncentrace vodíku v prostředí a dekompozice organické hmoty se znovu obnoví [Pedersen, 1997].

Mikrobiální produkce a dekompozice organické hmoty závisí na tom, zda jsou přítomny zdroje energie a akceptory elektronů [Pedersen, 1997].

I pro pouhé přežití potřebují hlubinné mikroorganismy dostatečný přísun energie pro udržení bazálního metabolismu. Pedersen [1997] označuje za možné energetické zdroje v hlubinném terestrickém prostředí organický uhlík, redukované anorganické molekuly a vodík. Lovely et al. [1996] demonstrovali, že huminové látky, které jsou v podzemí všudypřítomné, mohou některé mikroorganizmy využívat jako příjemce elektronu při anaerobní oxidaci organických sloučenin a vodíku.

Na obrázku níže jsou nakresleny možné způsoby, jakými podle Pedersena [1997] může hlubinná mikrobiota získávat energii z dostupných zdrojů s využitím různých akceptorů elektronu.



Obr. 1.: Možné způsoby toku C podzemním prostředím. Organický uhlík je respirován s kyslíkem, pokud je přítomen, nebo se účastní fermentace nebo anaerobní respirace s řadou různých akceptorů elektronu [Pedersen, 1997].

V nákresu najdeme procesy aerobní, anaerobní i fermentační. Ale protože nasycení vody kyslíkem je nízké a také z důvodu, že právě kyslík je přednostně využívaný akceptor elektronu pro mnoho mikroorganismů využívajících organické složky v podzemní vodě těsně pod povrchem, v oblastech pozemního hlubinného prostředí obvykle převládají anaerobně redukované prostředí a podmínky [Pedersen, 1997].

Podle Amend a Teske, [2005] v oxických systémech převládá aerobní respirace, se stoupající zvyšující se hloubkou a klesající koncentrací kyslíku následovaná denitrifikací, disimilační redukcí Mn, Fe a síranu a nakonec autotrofní metanogenezi; ve velmi nízkých redoxních potenciálech se vyskytují také fermentace a aceticlastická metanogeneze.

1.2.1. Vodík jako zdroj energie

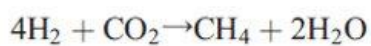
Chapelle [2000] považuje za pravděpodobně nejdůležitější substrát pro terestrická litotrofní mikrobiální společenstva H_2 . Ten je vzhledem ke svému hojnému výskytu vhodným zdrojem energie a je využíván řadou druhů organismů, například reducenty dusičnanu, Mn(III) a Fe(III), sulfátu a metanogenními organismy [Dong a Yu, 2007]. Využitelnost vodíku zvyšuje i fakt, že jeho vysoká difuzivita zajišťuje rychlý přísun H_2 i organismům žijícím v půdních pórech [Dong a Yu, 2007].

H_2 v hlubinných ekosystémech vzniká několika způsoby:

- 1) tepelnou dekompozicí organické hmoty [Dong a Yu, 2007]
- 2) fermentací organické hmoty [Chapelle, 2000]
- 3) procesem zvaným serpentinizace: reakcí mafických a ultramafických hornin s fluidy, která jimi protékají [Dong a Yu, 2007]
- 4) radiolytickou disociací H_2O během poklesu radioaktivity U, Th, a K v hornině [Lin et al., 2005]

Podle Lin et al. [2005] je abiotická tvorba H_2 základní součástí podpovrchových ekosystémů, které jsou opravdu nezávislé na povrchové fotosyntéze. Slobodkin [2005] ve své práci uvádí, že mnoho sulfát redukujících termofilních organismů umí využívat molekulární vodík a u některých z nich byl studován i autotrofní růst. Například u *Geoglobus ahangari* a *Sulfurihydrogenibium subterraneum* byla prokázána schopnost využít H_2 a Fe(III) k růstu, aniž by tyto druhy vyžadovaly přítomnost organických zdrojů uhlíku [Aguiar et al., 2004; Kashefi et al., 2002].

Pedersen [1997] zkoumal hlubinnou mikrobiotu ve zvodních žulové skály v Fennoscandian Shield, ve Švédsku, a předložil model methanogenních a homoacetogenních společenstev, která tvoří základ potravního řetězce spotřebováním H₂ a CO₂ v následujících řetězových reakcích:



a



Acetogenní bakterie podle Pedersena [1997] využívají reakce H₂ a CO₂ vedoucí ke vzniku acetátu k tvorbě energie (ATP). Vznikající kyselina octová (CH₃COOH) může být anaerobně respirována a využita například metanogenními organismy nebo reducenty Fe(III) či síry. Biomasa syntetizovaná tímto hypotetickým společenstvím organismů pak může sloužit jako zdroj uhlíku a energie pro anaerobní organismy [Amend, Teske, 2005].

Metanogeneze hraje důležitou roli v degradaci organických sloučenin, protože je konečným krokem v toku uhlíku anaerobními prostředím [Adhikari a Kallmeyer, 2010].

1.2.2. Redukce kovů

Mnoho kovů hraje důležitou roli v biogeochemických cyklech, protože pro výměnu poskytují snadno dostupné elektrony [Adhikari a Kallmeyer, 2010]. Mikroorganismy jsou schopny enzymaticky redukovat nejrůznější z nich [Lovley, 1993].

Některé organismy mohou uchovávat energii pro svůj růst propojením oxidace jednoduchých organických kyselin a alkoholů, H_2 , nebo aromatických sloučenin s redukcí Fe(III) nebo Mn(IV) [Lovley, 1993]. Tato disimilační redukce železa a manganu ovlivňuje geochemické procesy anaerobních akvatických sedimentů a podzemních vod.

Redukce kovů může v buněčném metabolismu plnit nejrůznější funkce: může generovat energii (již výše zmíněná disimilační redukce), plnit biosyntetickou funkci (asimilační redukce) nebo funkci detoxifikační, případně může také přesnou funkci postrádat (nespecifická redukce) [Slobodkin, 2005]. Co se týče množství kovů, účastnících se těchto reakcí, potom disimilační procesy vyžadují o několik řádů vyšší hodnoty než reakce asimilační [Slobodkin, 2005].

Kromě Fe(III) a Mn(IV) využívá mikrobiota jako terminální akceptor elektronu například i U(VI), Se (VI), Cr(VI), Hg(II) a další, méně prozkoumané kovy, jako jsou vanad, molybden, zlato, stříbro a měď [Lovley, 1993]. Mikroorganismy, které využívají kovy jako konečné akceptory elektronů nebo kovy redukují v průběhu detoxifikačních mechanismů, významně ovlivňují geochemické podmínky akvatických sedimentů, podmáčených půd a terestrického podzemí [Lovley, 1993].

1.2.2.1. Redukce železa

Vzhledem ke své dostupnosti v podzemí je železo ideálním prvkem pro metabolické procesy hlubinné mikroflóry. Slobodkin [2005] uvádí, že tento kov je životně důležitým makroelementem pro většinu organismů.

1.2.2.2. Termofilní reducenti Fe(III)

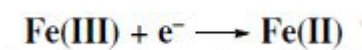
Redukce kovů termofilními mikroorganismy je úzce spjatá s lidskou činností prostřednictvím bioremediace těžkých kovů a radioaktivních nuklidů v opuštěných jaderných zařízeních a skládkách odpadu [Dong a Yu, 2007].

Bylo potvrzeno, že mikrobiální respirace, při které jsou jako konečné akceptory elektronů využívány oxidy Fe(III), je důležitý proces v anoxických prostředích a také, že takřka veškerá redukce Fe(III) probíhá za pomoci enzymatické katalýzy [Lovley, et al., 1993].

Slobodkin [2005] udává, že mikroorganismy schopné disimilační redukce Fe(III) byly nalezeny ve všech známých typech termálních ekosystémů, včetně terestrických a marinních hydrotermálních komínů a geotermálně vyhřívaných podpovrchových vod a sedimentů.

S tím souhlasí i poznatky Dong a Yu [2007], kteří popisují, že termofilní reducenti kovu jsou přítomni prakticky ve veškerých možných lokalitách, od sedimentárních pánví (zásobníky ropy), pozemních hydrotermálních vod až k hlubinným podpovrchovým krystalickým horninám.

Fe(III) je mikrobiotou redukován na Fe(II) [Luu a Ramsay, 2003].



Schopnost vyžít Fe(III) jako exogenní akceptor elektronu byla zjištěna u termofilních mikroorganismů s různými typy metabolismu [Slobodkin, 2005]. Můžeme ji nalézt u fermentorů a obligátně respirujících anaerobů s různými typy respirace (reducenti sulfuru, manganu a nitrátu) stejně tak jako u aerobních mikroorganismů za nepřítomnosti kyslíku [Slobodkin, 2005]. Ovšem pro většinu z uvedených, vyjma *Geothermobacteriumferrireducens* a *Geoglobus ahangari*, není Fe(III) jediným využívaným akceptorem elektronu [Slobodkin, 2005].

Mnohé ze sloučenin, které obsahují železo, jsou nerozpustné, což mikrobiotu vedlo k nejrůznějším strategiím, jak tyto zdroje redukovat. Organismy využívají přímý kontakt, chelatované složky, zprostředkovatele endogenních a exogenních nosičů a interakce s elektronovou sférou [Slobodkin, 2005].

Termofilní reducenti jsou pro redukcí Fe(III) schopni využívat široké spektrum organických sloučenin [Slobodkin, 2005]. Acetát, klíčový meziprodukt dekompozice organické hmoty za anaerobních podmínek, je reducenty kovů zcela metabolizován v celém rozsahu jejich růstových teplot [Slobodkin, 2005].

1.2.3. Využití síry

Vědci se domnívali, že v kyselém prostředí (například kyselé důlní vody, vody vyloužené z rud) slouží Fe(III) pouze jako nebiologický oxidant, ale výzkumy Brocka a Gustafsona [1976] napovídají, že bakteriální katalýza může hrát významnou roli v reaktivitě Fe(III). Zmínění vědci zkoumali chemickou reakci mezi elementární sírou a Fe(III). Ve sterilních vzorcích při pokojové teplotě redukcí železa nepozorovali, vyšší teplota (70°C) už k signifikantní nebiologické redukcí vedla, ovšem její rozsah nedosahoval hodnot pozorovaných v kontrolních, bakteriemi osídlených, vzorcích [Brock a Gustafson, 1976].

1.2.3.1. Oxidace síry

V extrémních prostředích, která se vyskytují pod zemským povrchem, panují unikátní podmínky, jimž se mikroorganismy musely přizpůsobit, aby mohly přežít. Namísto klasických cest, vedoucích přes organické sloučeniny, tak byly nuceny hledat jiné metabolické cesty ke získání energie.

Například geotermální pukliny, solfatáry a horké prameny nabízejí mikrobiotě spíše než organický uhlík redukované sloučeniny a proto organismy využívají je. Mezi v těchto prostředích přítomnými chemolitoautotrofními organismy můžeme často nalézt biotu schopnou oxidovat sloučeniny síry ve spojení s redukcí nitrátu a kyslíku, protože sloučeniny síry a elementární síra mohou posloužit jako donor stejně tak i jako akceptor elektronů a mnoho z mikroorganismů je využívá k růstu [Dong a Yu, 2007]

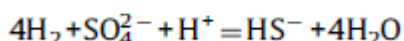
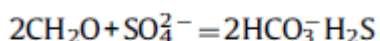
Dong a Yu [2007] uvádí, že většina archeálních oxidantů síry jsou aerobní či fakultativně anaerobní, chemolitoautotrofní, thermoacidofilní s *Acidianus ambivalens*, *A. infernos* a *A. brierleyi* z řádu *Sulfolobales* a říše *Crenarchaeota* jako hlavními reprezentanty.

Aragno [1992] potom rozdělil obyvatele termálních oblastí schopné oxidovat síru do 4 skupin:

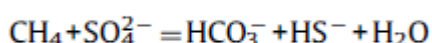
- 1) bakterie oxidující síru a vodík – obligátně chemolitoautotrofní bakterie skupiny *Aquifex-Hydrogenobacter* a fakultativně chemolitoautotrofní *Bacillus schlegelii*
- 2) *Thermothrix* - striktně termofilní organismy oxidující síru
- 3) mírně termofilní, acidofilní organismy oxidující síru – *Thiobacillus*
- 4)) mírně termofilní, silně acidofilní organismy oxidující síru a kovy

1.2.3.2. Redukce sulfátu

Jørgensen [1978a, 1978b] popisuje ve svých pracích organoklastickou redukci sulfátu, při které slouží jako donory elektronu hydrogen nebo nízkomolekulární substráty (jako jsou například nestabilní mastné kyseliny) vznikající při fermentaci částečně rozpuštěné organické hmoty, například podle reakcí:



Martens a Berner [1974] potom ve své studii uvádí redukci sulfátu založenou na oxidaci metanu, označovanou také jako anaerobní oxidace metanu, kterou může popsat následující reakce:



1.2.4. Ekosystémy nezávislé na fotosyntéze

Studium podpovrchových ekosystémů přivedlo výzkumníky na možnost, že hlubinná biosféra nemusí být zcela závislá na fotosyntetických procesech probíhajících povrchu Země. Při sedimentaci se sice do podzemí dostává i organická hmota produkovaná autotrofními organismy při fotosyntéze, ale během ubíhajícího času se může díky zde přítomným organismům její zásoba značně ztenčit. Organické zbytky také podléhají půdním procesům jako je kompakce, cementace a zmenšování půdních pórů, čímž se stávají pro biotu velice těžko dostupné [Stevens, 1997]. Organismy jsou tak nuceny začít využívat jiné zdroje, pokud chtějí přežít.

Alternativou ke klasickému detritovému systému využívajícímu fotosyntetickou primární produkci může být v podzemních ekosystémech primární produkce, při které jsou vyžívány in situ přítomné energetické zdroje geochemického původu [Stevens, 1997]. Při chemolitoautotrofii tak jak donor, tak akceptor elektornu pocházejí z geochemických zdrojů.

O tom, že co se týče hlubinných mikroorganismů, jde často o anaerobní a termofilní chemolitotrofy – značně odlišné od organismů povrchových – hovoří i Dong a Yu [2007]

Vyvěřelé horniny by se mohly zdát jako naprosto nevhodné prostředí pro výskyt podpovrchových mikroorganismů [Stevens, 1997]. Tyto krystalické skály vznikají z tuhnoucího magmatu; proto obvykle nejsou příliš porózní a navíc nejspíš neobsahují organickou hmotu [Stevens, 1997]. Ovšem prostor pro přežití mikrobiota nachází ve zlomech a prasklinách, které se v nich vytvořily a kterými prochází podzemní voda. Právě reakce této vody s magmatickými horninami (za vhodných podmínek) může poskytovat dostatek energie litoautotrofním společenstvím a právě tato společenstva by mohla proto být nezávislá na povrchové fotosyntéze [Stevens, 1997].

Podle Dong a Yu [2007] mohou být v geotermálních puklinách, solfatárách a horkých pramenech redukované sírné sloučeniny důležitějšími dárci elektronu než organické sloučeniny uhlíku, protože tato prostředí často obsahují vysoké koncentrace neústrojných sloučenin jako jsou CO_2 , SO_2 , N_2 , CO , H_2 , dusičnany, různé oxidy kovů a sulfidy (H_2S). Následkem toho je primární produkce biomasy v těchto prostředích dotována energií z chemolitoautotrofních redukčních reakcí těchto anorganických sloučenin [Dong a Yu, 2007].

1.3. Detekce a kvantifikace

Výzkum hlubinných organismů je ztížen výraznou náročností jejich kultivace. Tu komplikují mnohé faktory, mezi nejvýznamnější však patří naprosto unikátní podmínky, ve kterých tyto mikroorganismy žijí a pomalý růst, jenž je pro tyto organismy specifický [Dong a Yu, 2007]. Většina mikroorganismů nalezených v podzemí nemá kultivovatelné či známé příbuzné ve světě na povrchu a tak jediné, co je o nich dosud známo, je jejich genetický kód [Adhikari a Kallmeyer, 2010].

Pro odhady biomasy, diversity a aktivity podpovrchových mikrobiálních společností je využívána široká paleta metod, jejichž aplikovatelnost záleží na konkrétním prostředí. Tyto metody zahrnují více než sto let staré techniky růstu mikroorganismů na miskách s pevným médiem, přes jejich kultivaci a počítání [Pedersen, 1993] až po metody molekulární biologie, kde je využívána extrakce DNA z prostředí a její následná analýza [Stackebrandt and Goodfellow, 1991].

Esterifikované fosfolipidové mastné kyseliny (PLFAs) jsou vynikající mírou životaschopné či potenciálně životaschopné biomasy v širokém rozsahu prostředí, protože životaschopná mikrobiota má nedotčené membrány, které obsahují fosfolipidy (a PLFAs) [White et al., 1998].

Počítáním bakterií je možné získat údaje jednak o počtech těch životaschopných případně o počtech celkových; stanovení životaschopných bakterií je významně ovlivněno správným růstovým médiem, které je nutné stanovit pro konkrétně přítomnou skupinu bakterií [Pedersen, 1993]. Tato podmínka nebývá mnohdy splněna a odhady živoucí biomasy tak často bývají podhodnocené.

Celkový počet bakterií umožňuje lepší představu o počtu přítomných bakterií, ale při této metodě zase chybí informace o životaschopnosti a diverzitě společenství [Pedersen, 1993].

Pro studium diverzity bakteriálních společenství se klasicky využívá metoda, při níž jsou vzorky ze studovaného prostředí inokulována pevná a kapalná média. Následuje inkubace při různých teplotách a rostoucí bakterie jsou pak spočítány a klasifikovány na základě jejich morfologických, chemických a fyziologických vlastností [Pedersen, 1993].

Ringelberg et al. [1997] uvádí, že klasické techniky, se kterými se daří izolovat a kultivovat organismy pocházející z hlubokého podzemí pouze velice neúspěšně, často vedou k popisu méně než 10% ve skutečnosti přítomné bioty. Nejen, že neumožňují popsat celková společenstva, ale navíc zakrývají možné interakce a kvantitativní odhady heterogenity v distribuci mikroorganismů a jejich aktivit [Ringelberg et al., 1997].

Namísto využívání kultivačních technik, které se ukázaly jako nevhodné, je tudíž dáována přednost metodám molekulárním, které jsou schopné zachytit reprezentativní část organismů přítomných v hlubokém podzemí. Většina studií zabývajících se biodiverzitou tak využívá metod zahrnujících přímou extrakci nukleových kyselin ze sedimentů a PCR (Polymerase Chain Reaction) amplifikaci 16S rRNA genů [Giovannoni et al., 1990] a/ nebo funkční geny označující klíčové anaerobní sedimentární procesy (jako jsou metanogeneze a redukce sulfátu) [Fry et al., 2008].

Navzdory nedávným pokrokům v molekulární biologii, spojení mezi fylogenetickou informací (např. 16S ribozomální RNA geny) a funkčními geny ve stejném genomu je stále značně neprobádáno, což neumožňuje dát do souvislostí identitu s funkcí [Adhikari a Kallmeyer, 2010].

Molekulární techniky přináší i další úskalí. Fry et al. [2008] hovoří o obtížích spojených s výzkumem hlavně hlubokomořských sedimentů – jednak o současné nechtěné extrakci substancí jako jsou huminové a fulvokyseliny a také o problémech s nízkým počtem prokaryotních buněk, s čímž následně souvisí i nízké koncentrace extrahovatelných nukleových kyselin.

Kromě obtíží souvisejících s určením přítomného genetického materiálu je výzkum hlubinných ekosystémů ztížen možností kontaminace studovaných materiálů. Před mikrobiologickou analýzou je tudíž nutné ujistit se, že vzorky sedimentů mají dostatečnou kvalitu a nebyly při odebrání kontaminovány fluidy, jako je v případě mořských sedimentů mořská voda [Fry et al., 2008].

Jedna z dalších metod výzkumu využívá fakt, že bakterie upřednostňují lehčí izotopy před těžšími - prostřednictvím studia frakcionace stabilních izotopů tak lze určit diversitu a aktivitu mikroorganismů v nejrůznějších prostředích [Pedersen, 1993].

1.3.1. Techniky identifikace bakterií založené na analýze nukleových kyselin

Ludwig [2007] ve své práci shromáždil a popsal běžně užívané metody pro identifikaci a rozlišení užívané pro bakterie. Tyto metody rozřazuje do dvou hlavních skupin:

1) nepřímé postupy, které poskytují informace potřebné k rozlišení bez přesné znalosti příslušné primární struktury oblasti

2) přímé přístupy určující nebo zaměřující se na sekvenci úseku (sequence stretches)

Mezi nepřímé metody například uvádí:

a) Obsah G + C v genomu

Jeden z prvních postupů v dané problematice. Složení G + C příslušné DNA slouží jako vhodný parametr pro minimální popis taxonomických jednotek, protože rozdílný obsah G + C indikuje rozdílné organismy [Ludwig, 2007].

b) Kvantitativní hybridizace nukleových kyselin

DNA reasociační metody umožňují zhruba odhadovat genomovou podobnost dvojice znaků nebo blízce příbuzných druhů – využívá se zde kvantifikace množství reasociací komplementárních úseků či oblastí jednovláknové DNA různého původu [Ludwig, 2007].

c) Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP)

Metoda, která využívá zpracování čisté genomové DNA s využitím vhodných restrikčních endonukleáz. Vzniklé fragmenty jsou posléze využívány k rozlišení i blízce příbuzných druhů [Ludwig, 2007].

d) Polymorfismus náhodně amplifikované DNA

Metoda patřící mezi PCR (Polymerase Chain Reaction) techniky – pomocí PCR amplifikace úseků DNA (s využitím náhodně zvolených PCR primerů) umožňuje zjistit polymorfismus v DNA [Ludwig, 2007].

Mezi přímé metody, které poskytují mnohem více informací Ludwig [2007], potom zařazuje například:

a) Zachované markery:

- rRNA – veřejné databáze nabízejí více jak 300 000 úplných a částečných sekvencí [Ludwig, 2007]

b) Molekulární hybridizace in situ (FISH)

Při této metodě je využívána schopnost malého úseku DNA navázat se na komplementární úsek DNA. Tato takzvaná sonda je označena fluorescenčním barvivem, místo, kde se sonda navázala, je možné zjistit fluorescenčním mikroskopem [Ludwig, 2007].

c) RING- FISH - Recognition of Individual Genes by FISH

Metoda využívaná pro vizualizaci přítomnosti chromozomálních genů [Ludwig, 2007].

1.3.2. Kvantifikace mikrobiální aktivity

Metabolické a enzymatické analýzy patří mezi typické způsoby kvantifikace mikrobiální aktivity. Metabolismus je možné sledovat pomocí změn v koncentracích substrátů a/ nebo produktů v průběhu času či díky konverzi označeného substrátu [Adhikari a Kallmeyer, 2010]. Pro rozlišení se velice hodí stabilní či radioaktivní izotopy, ovšem značení pomocí fluorescence je při využití v sedimentech limitováno rušením fluorescenčního signálu sedimentárními částicemi [Adhikari a Kallmeyer, 2010].

Jako v současnosti nejpřesnější a nejcitlivější techniku uvádí Adhikari a Kallmeyer [2010] experimenty s radioizotopy, ovšem ani tato technika nemusí být dostatečně citlivá v případech, kdy je metabolický obrat extrémně pomalý.

1.3.2.1. *Metody užívané ke kvantifikaci mikrobiální aktivity v podzemí*

Redukce sulfátu

Díky tomu, že mikroorganismy redukující sulfát jsou v podzemním prostředí velmi hojně zastoupenou složkou bioty, jsou metody užívané ke kvantifikaci jejich metabolické aktivity vhodným příkladem těchto metod.

Jørgensen [1978] popsal několik technik vhodných pro sledování redukce sulfátu:

1) Radioizotopovou techniku, při které je díky malému množství roztoku obsahujícímu označený sulfát, jež je vpraven do sedimentu, možné měřit in situ rychlosti redukce sulfátu [Jørgensen, 1978a]

2) Matematický model, který charakterizuje vertikální gradienty sulfátu jako funkci difúze, bakteriální redukce a sedimentace a umožňuje vypočítat rovnovážné rychlosti redukce sulfátu [Jørgensen, 1978b]

3) Odhady založené na chemických a bakteriologických datech z místa měření jako jsou počty bakterií redukujících sulfát, chemické gradienty apod. [Jørgensen, 1978c]

Jørgensen et al. [2001] srovnávali první dvě techniky detekce rychlosti sulfátové redukce v sedimentech Černého moře – využívali jednak experimentální metodu s $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ a potom dva matematické modely difuzních reakcí. Zatímco v povrchových vrstvách sedimentu docházelo díky reoxidaci k ovlivnění koncentrace a distribuce sulfátu, což se u matematických modelů projevilo podhodnocením skutečných rychlostí redukce, v hlubších vrstvách, kde distribuci sulfátu ovlivňuje pouze difúze, modelovaná data zřejmě poskytla realistický odhad rychlostí redukce sulfátu [Jørgensen et al., 2001].

Právě z tohoto důvodu považují Adhikari a Kallmeyer [2010] – v terestrickém prostředí, kde se vyskytuje laterální tok fluid zvodněmi - za obzvláště důležitou dobrou znalost hydrologických vlastností studované oblasti, protože bez ní nemohou matematické modely poskytnout smysluplné výsledky.

1.4. Cyprisová formace Sokolovské hnědouhelné pánve

Geologické prostředí Sokolovské a Chebské pánve je dědictvím období miocénu, pro které je typický postupný pokles dynamiky tektonických a vulkanických procesů. Převážně drobnozrnný materiál terestrického původu v té době začal sedimentovat v trvalých sladkovodních jezerech a sedimentace pokračovala i v občasných brakických meromiktických jezerech [Rojík, 2004]. K sedimentaci přispívalo i klima, které se vyznačovalo vyššími teplotami a sklony k aridizaci.

Název cyprisové souvrství pochází od ostrakoda *Cypris angusta* [Internet 1]. Kropáček a Malkovský [1993] určili na základě magnetostratigrafie stáří této jednotky na asi 22,8–21,3 Ma.

Určující sedimenty Cyprisové formace jsou vrstvené jílovce s nezbytnou přítomností kaolinitu, illitu a mineralů smektitové skupiny, ve kterých navíc nalezneme konstantní příměs dispergovaných primárních uhličitánů a organickou hmotu pocházející z řas a pylů; tloušťka cyprisů potom dosahuje 182 metrů v centrální části pánve, nalezneme ovšem i oblasti mocné 133 metrů [Rojík, 2004].

Podle Kříbka et al. [1998] se svrchní část sokolovské hnědouhelné pánve sestává hlavně z hnědých lakustrinních jílu a jílovců obohacených organickou hmotou (2–18% TOC), hlubší část stratigrafického profilu potom tvoří hlavně kaolinit-illitové jíly a jílovce; obsah montmorillonitu roste ve svrchní oblasti.

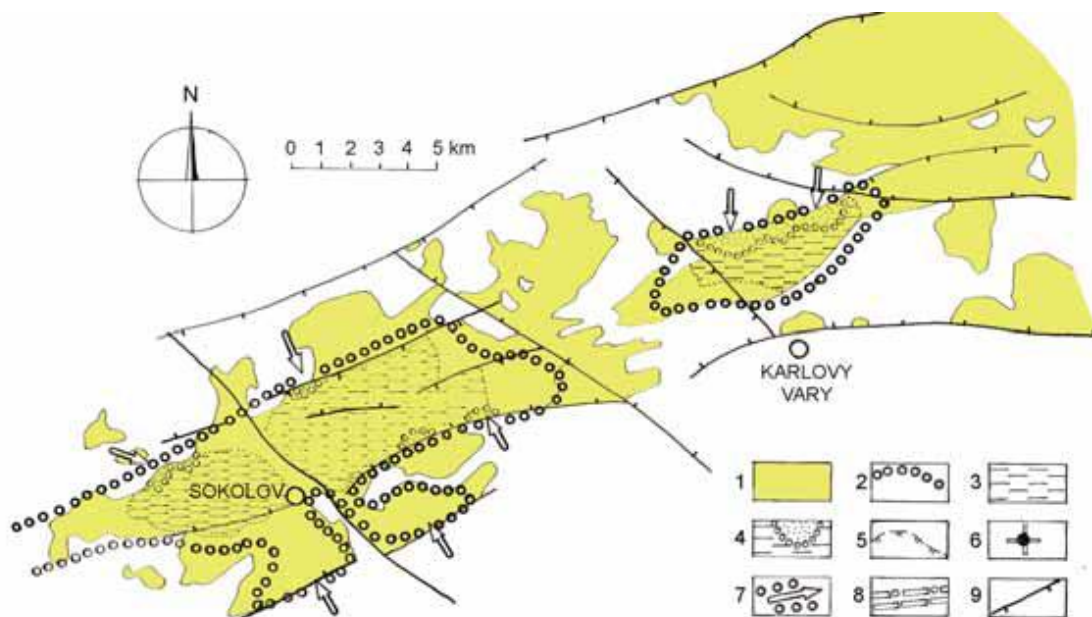
Slabě karbonátické bitumenní jílovce, ze kterých je takřka celé cyprisové souvrství tvořeno, obsahují střídající se světlejší a tmavší vrstvy o průměrné tloušťce kolem 0,2 mm [Internet 1]. Zmíněné vrstvy s největší pravděpodobností vznikly následkem střídání sušších a vlhčích období roku.

Příměs uhličitanů dosahuje hodnot 5 – 22 %; jedná se převážně o siderit, méně často o kalcit, dolomit a ankerit [Internet 1].

Močály, dávající později vzniknout uhelným slojím, se v průběhu geologického vývoje měnily na jezera a tyto změny regionálního rozsahu měly za následek, že hranice mezi Cyprisovou formací a sousední Sokolovskou formací je velmi ostrá, lokálně oscilující, téměř izochronní [Rojík, 2004].

Zavodňování močálů této oblasti měla zřejmě na svědomí dlouhodobá subsidence. Ta byla pravděpodobně vyvolána kombinací tektonických a kompakčních procesů a procesů spojených se vznikem uhlí. Cyprisová formace je nejmladší terciální formací Sokolovské hnědouhelné pánve [Rojík, 2004].

Jak bylo uvedeno výše, sedimenty cyprisového souvrství jsou jezerního původu. Podle Internet 1 se na území Sokolovské pánve se zřejmě vyskytovala dvě jezera. To rozsáhlejší z nich bychom našli v centrální a západní části pánve a dle výskytu příbřežní facie s přítomností jemnozrnných pískovců lze odhadovat, že mělo přibližně stejné rozměry, jako dnešní pánevní deprese [Hnedo, 2001]. Menší z jezer potom vzniklo v otovické části pánve, přičemž od centrální části jej odděloval hornberský hřbet [Internet 1]. Vizte obrázek 2.



Obr.2: Paleogeografická skica cyprisového souvrství. P. Rojík [Internet 1]. 1 – rozšíření terciálních depozitů před zahájením těžby, 2 – předpokládaný původní rozsah litostratigrafické jednotky, 3 – rozšíření litostratigrafické jednotky před zahájením těžby, 4 – rozšíření písčité sedimentace před zahájením těžby, 5 – rozšíření sloje Anežka před zahájením těžby, 6 – synsedimentárně aktivní vulkanická centra, 7 – předpokládané hlavní přínosové, resp. odtokové směry 8 – osy sedimentace, 9 – zlomy.

Jezera se vyskytovala v režimu, který lze charakterizovat jako střídání období, kdy byla voda sladká s těmi, kdy převažovala zvýšená salinita. Zdroj Internet 1 udává, že nárůst salinity mohl být umocněn koncentracemi látek a jejich usazením u dna jezer i hydrotermy tamtéž, která byla vyvolána reakcemi spojenými s tvorbou uhlí ve sloji Antonín.

Stálá jezera byla zhruba po 0,4 milionech let vystřídána jezery občasnými, které vykazovaly díky nedostatečnému promísení těžší a slanější vody u dna meromiktní režim s permanentním rozvrstvením vody [Internet 1].

V suchých obdobích potom jezera podléhala intenzivnímu vysychání.

Co se týče vztahu Cyprisové formace se sousední Chebskou pánví, v Sokolovské pánvi lze pro jeho stanovení využít pouze místní biostratigrafickou korelaci na základě

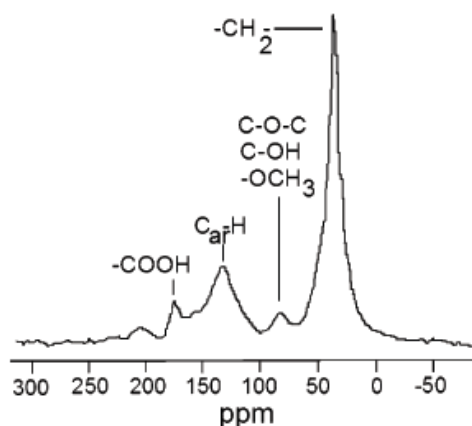
nahromadění ryb, protože se zde vyvinuly pouze dvě rybí biozóny: zona I B *Palaetonica egeriana* a *Leuciscus sokoloviensis* [Rojík, 2004].

1.4.1. Organická hmota

Množství organického uhlíků v přítomných sedimentech kolísá v průměru od 1 do 18% TOC, přičemž obecně lze říci, že hodnoty TOC v horní části sokolovské formace rostou ode dna pánve směrem ke svrchní části – spodní sedimenty obsahují průměrně 3% TOC, ty svrchní potom 4,8 % TOC [Křibek et al., 1998]. Ovšem ve stratigrafickém profilu můžeme najít i vrstvy o tloušťce vyšší než 1 metr, kde obsah TOC nabývá hodnot od 10 až k 18 %; tyto na organickou hmotu tak bohaté horniny jsou převážně plošně laminované [Křibek et al., 1998].

S obsahem TOC v sedimentech při zmiňované studii souvisel i typ přítomné organické hmoty. Analýza odhalila, že zatímco vrstvy bohaté na organickou složku obsahovaly algální kerogen, vrstvy s nízkým zastoupením organické hmoty disponovaly smíšeným kerogenem [Křibek et al., 1998].

Frouz et al. [2011] ve své práci uvádí následující složení organické hmoty miocenních jílovců cyprisové formace ze třicetimetrové hloubky určené na základě ¹³C NMR spektroskopie:



Obr. 3: Charakteristika ^{13}C NMR spektra organické hmoty lakustrinných jílovců [Frouz et al., 2011]

1.4.2. Přítomná mikroflóra

Studiem životaschopné mikroflóry Sokolovské hnědouhelné pánve se zabývali Elhottová at al. [2006], kteří zkoumali původní biotu cyprisové formace vyzdvižené z hloubky 200 metrů pod povrchem. Studovány byly nedotčené vzorky sedimentů, přičemž bylo dbáno na to, aby nedošlo ke kontaminaci nepůvodní mikroflórou.

Pomocí analýzy fosfolipidů mastných kyselin (PLFA) mohli charakterizovat a kvantifikovat životaschopné organismy přítomných společenstev, celkové profily mastných kyselin (TLFA) zas byly použity pro obecné hodnocení životaschopné, uložené a odumřelé biomasy v sedimentech [Elhottová at al., 2006].

Analýza PLFA ukázala relativně velké množství životaschopné bioty ve zkoumaných lakustrinních sedimentech; celkové množství zjištěných PLFA potom představovalo přibližně 6 % z celkového množství TLFA, což znamená, že převážná část TLFA zahrnuje odumřelou a uloženou biomasu [Elhottová at al., 2006]. Podle Chroňákové et al. [2004] by právě tato odumřelá organika mohla sloužit jako snadno dostupný substrát pro heterotrofní bakterie a

vysvětlit relativně značný heterotrofní růst bakterií osidlujících čerstvý materiál na výsypkách.

K identifikaci heterotrofních bakterií posloužilo Elhottové at al. [2006] srovnání jejich profilů buněčných mastných kyselin s Sherlock Aerobic bacterial and Actinomycetal databází (TSBA50, Actino) a klasifikace mikrofungi potom proběhla na základě mikromorfologických charakteristik kolonií rostoucích na izolačním mediu [Elhottová at al., 2006].

Z šestnácti izolátů bakterií získaných z lakustrinních sedimentů sokolovské hnědouhelné pánve, které se podařilo kultivovat, bylo čtrnáct označeno jako grampozitivní a pouze zbylé dva patřily mezi gramnegativní [Elhottová at al., 2006]. Co se týče přesné klasifikace, byli nalezeni zástupci rodů *Nocardiopsis*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Kocuria*, *Rothia*, *Clavibacter*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Microbacterium*, *Acinetobacter* and *Pseudomonas* [Elhottová at al., 2006].

Ze studované oblasti izolované podpovrchové saprotrofní mikrofungi označené jako *Penicillium subg. Furcatum*, *Penicillium subg. Biverticillium*, *Verticillium spp.*, *Cladosporium spp.*, *Aspergillus spp.*, představují obvyklé a čteně rozšířené půdní zástupce, což naznačuje, že tyto rody přetrvaly v sedimentech sokolovské pánve, které pravděpodobně slouží jako bohatý a vhodný zásobník mikroorganismů, dlouhá období [Elhottová at al., 2006].

Při výzkumu bylo objeveno i mnoho známek přítomnosti fungi, bakterií a aktinomycet, ale polynenasycené mastné kyseliny značící přítomnost protozoí a hlavně řas chyběly [Elhottová at al., 2006].

2. Metodika

2.1. Materiál

2.1.1. Studovaná oblast

Materiál pro měření půdní respirace pocházel z miocénních jílových sedimentů cyprisového souvrství Sokolovské pánve.

Cyprisová formace se zde vyvinula v době před 16 a 21 miliony lety, kdy se v dané oblasti vyskytovala velká jezera, v nichž jíly sedimentovaly [Šourková et al., 2005].

Průměrná nadmořská výška území je 500-700 m.n.m.; průměrné roční srážky jsou 650 mm a průměrná roční teplota je 6,8 °C. Výsypky tvoří hlavně cyprisové jíly, které byly v povrchových lomech odtěženy jako nadloží uhelných slojí [Šourková et al., 2005]. Odtěžený substrát obsahuje neznámá množství fosilního C [Šourková et al., 2005], má pH 7-9 a jako převažující minerály se vyskytují kaolinit, illit, vápenec a křemen [Baldrián et al., 2008].

2.1.2. Vzorky

Vzorky pro experiment byly odebrány ze dvou různých hloubek – 30 a 150 metrů a ze tří rozdílných typů sedimentů: lamelárního, amorfního a přechodného (v obou hloubkách). Během pokusu byla měřena jednak půdní respirace vzorků z těchto různých hloubek a sedimentárních typů bez jakéhokoli zásahu a potom také respirace po ovlivnění části vzorků

transitního sedimentu přidáním glukózy, vlhčením, mrazením, případně kombinací dvou z těchto faktorů.

Jako zdroj materiálu z udaných hloubek byl využit uhelný lom Družba, který umožnil získat jíl z dostatečně hluboké vrstvy. Pomocí těžební techniky byly uvolněny bloky půdy, následně ručně naporcovány na kusy dostatečně velké na to, aby bylo zajištěno, že v jejich jádru zůstane nekontaminovaný materiál (cca 50 kg), umístěny do sterilních polyethylenových pytlů a dopraveny do laboratoře.

Následovalo ošetření UV zářením ve flowboxu, který zajišťuje sterilní prostředí a jako druhý stupeň ochrany před kontaminací bylo použito ošetření plamenem. Ve flowboxu byla po odstranění svrchní vrstvy z rozměrného bloku jílu vypreparována požadovaná gramáž půdy (cca 10 g) a umístěna do vzduchotěsných lahvíček se šroubovacím víčkem.

Některé vzorky byly následně ošetřeny již výše zmíněným způsobem (vlhčení, přídavek glukózy, zmrazení či kombinace dvou z těchto faktorů) a následovala dvoutýdenní inkubace při 20°C.

2.1.2.1. Ošetření vzorků

Ošetření vybraných vzorků přechodného sedimentu z obou hloubek proběhlo na začátku dvoutýdenního měření respirace následujícím způsobem:

- 1) Pro zjištění účinku vlhčení bylo k vybraným vzorkům přidáno 5 ml vody
- 2) Pro zjištění účinku vstupu snadno dostupných organických sloučenin bylo k vybraným vzorkům přidáno 5 ml 2 % roztoku glukózy

3) Pro zjištění účinku mrazu byly vzorky po dobu 24 hodin ponechány při teplotě -18°C a poté 24 hodin rozmrzaly ve 20°C

4) Pro zjištění účinku mrazu v kombinaci s vlhčením bylo k vzorkům po vystavení mrazu a rozmrznutí za výše uvedených podmínek přidáno 5 ml vody

5) Pro zjištění účinku mrazu v kombinaci se vstupem snadno dostupných živin bylo k vzorkům po vystavení mrazu a rozmrznutí za výše uvedených podmínek přidáno 5 ml 2 % roztoku glukózy

2.2. Uspořádání pokusu

Na povrch půdy v každé lahvičce jsem umístila plastový kalíšek s 2 ml 0,5 M NaOH a lahvičky byly poté vzduchotěsně uzavřeny. NaOH byl exponován i ve třech prázdných lahvičkách bez půdy pro korekci CO₂ lapeného při manipulaci a ze vzduchu uzavřeného v lahvičce.

2.3. Analýzy

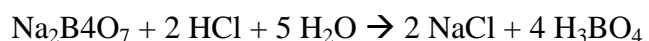
2.3.1. Stanovení bazální respirace půdy

Pro zjištění, kolik oxidu uhličitého se uvolnilo z půdy, jsem použila titrační metodu dle Bornemanna [1920] v modifikaci Schinner et al. [1996]. Ta funguje na principu reakce

oxidu uhličitého s hydroxidem sodným, přičemž NaOH je použit v nadbytku a následnou titrací zjistíme, jaké množství z aplikovaného hydroxidu se reakce nezúčastnilo.

Titraci hydroxidu jsem prováděla ve čtyřech opakováních ve čtrnáctidenních intervalech 0,05M kyselinou chlorovodíkovou. Do kádinky jsem vylila obsah kalíšku a důkladně ho vypláchla destilovanou vodou, poté následovalo přidání 1 ml 12,5 % roztoku chloridu barnatého a několika kapek fenolftaleinu. Titrace jsem prováděla do doby, než se fialová barva změnila přes růžovou na průhlednou.

Protože přesná koncentrace kyseliny chlorovodíkové, která se k titraci používá, není známa, je nutné ji zjistit titrací. Ke stanovení se používá tetraboritan sodný:



Ke 4.25 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové jsem přidala 0,2 g tetraboritanu sodného a doplnila vodou na objem 20 ml. K obarvení jsem použila metyloranž a titraci prováděla do oranžové barvy.

Veškerá manipulace se vzorky probíhala za přísně sterilních podmínek ve flowboxu a stejně tak veškeré používané nástroje a chemikálie byly předem pečlivě sterilizovány. Tato opatření byla použita s cílem zamezit kontaminaci vzorků ze studované oblasti nepůvodní mikrobiotou.

Výpočet:

$$R = (A-B) \cdot c_{\text{HCl}} \cdot 6005 / (\text{navážka} \cdot \text{sušina} \cdot \text{doba inkubace}) \text{ [}\mu\text{g C-CO}_2 \text{ / g půdy} \cdot \text{hod.]}$$

A.....spotřeba HCl na titraci kontroly v ml

B..... spotřeba HCl na titraci vzorku v ml

c_{HCl}přesná koncentrace roztoku HCl v mol. l⁻¹

6005.....přepočtový koeficient

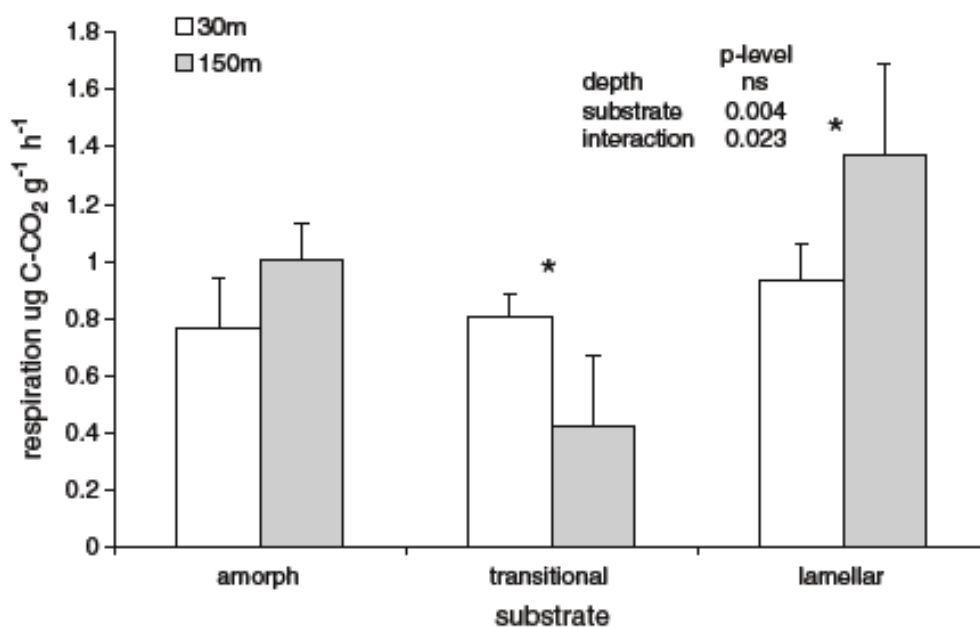
2.3.2. Zpracování dat

K porovnání naměřených hodnot mikrobiální respirace vzorků odebraných z různých hloubek a z různých typů sedimentů byla využita dvoucestná ANOVA, tam, kde byly významné interakce mezi hloubkou a dalšími faktory, byla využita ANOVA jednocestná. Ke statistické analýze posloužil program Statistica 6.0.

3. Výsledky

Graf 1. zobrazuje mikrobiální respiraci lamelárního, amorfního a přechodného typu sedimentu odebraného z hloubek 30 a 150 metrů.

Zatímco rozdíly v respiraci mezi vzorky z různých hloubek se neukázaly jako výrazné, totéž nelze říct o rozdílech mezi různými typy sedimentů, které byly signifikantní. Nejvýraznější respirace se projevila u lamelárního typu sedimentu a to u vzorků z 30metrové hloubky. Naopak nejnižší hodnoty byly pozorovány u přechodného jílu ze 150metrové hloubky, kde byla respirace vyšší než u přechodného jílu z mělčí oblasti.



Graf 1: Mikrobiální respirace lamelárního, amorfního a přechodného typu sedimentu odebraného z hloubek 30 a 150 metrů

Jak můžeme pozorovat na grafu 2, který ukazuje mikrobiální respiraci přechodného typu sedimentu po ošetření (vlhčení, přidavek glukózy, zmrazení či kombinace dvou z těchto faktorů), celkově nebyl rozdíl v respiraci půd z rozdílných hloubek nijak výrazný.

U půd bez jakéhokoliv ošetření byly výraznější hodnoty respirace pozorovány u vzorků pocházejících z hlubší části lomu. U materiálu z třicetimetrové hloubky byly hodnoty velmi nízké, o více jak polovinu nižší než u vzorků ze stejné hloubky, které byly po odběru nějakým zásahem upraveny.

Vlhčení mělo nepatrně vyšší vliv na mikrobiální respiraci u vzorků z třicetimetrové hloubky, hodnoty respirace půdy získané z hlubší oblasti zhruba odpovídaly (nebo byly dokonce nižší) hodnotám naměřeným v půdě, která nebyla nijak ošetřena.

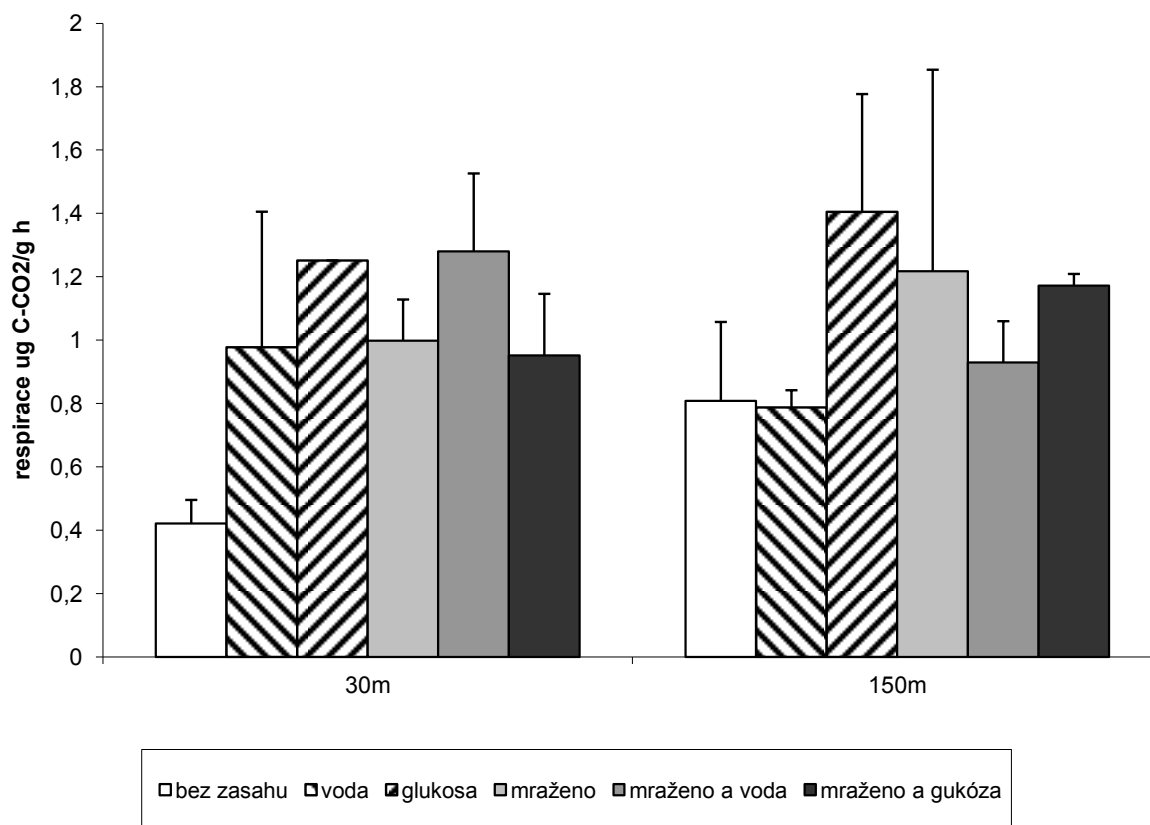
Po přidavku glukózy nastala odezva u vzorků z obou studovaných hloubek, mikrobiální společenstva tedy reagovala na vstup snadno dostupného zdroje uhlíku. Výraznější efekt můžeme v tomto případě pozorovat u materiálu pocházejícího z oblasti 150 metrů pod povrchem.

Také ovlivnění mrazením vyvolalo efekt - půda z obou hloubkových zdrojů reagovala zvýšením respirace, o něco vyšší hodnoty můžeme pozorovat u materiálu pocházejícího z hlubšího prostředí.

Kombinace dvou různých vlivů - vlhčení a mrazení - měla větší efekt v případě vzorků z třicetimetrové hloubky, kde šlo dokonce o největší naměřené hodnoty mikrobiální respirace z této zdrojové oblasti. U půdy ze stopadesátimetrové hloubky měl tento zásah efekt poměrně výrazně menší.

Poslední zásah do půdy, který spočíval v mrazení získaného materiálu a přidání glukózy vyvolal reakci u půdy z největší hloubky (tj. 150 metrů), půda z hloubky bližší povrchu reagovala zvýšením respirace oproti vzorku bez jakéhokoli ovlivnění také významně.

Vše výše uvedené zaznamenává graf 2.



Graf 2: Mikrobiální respirace přechodného typu sedimentu po ošetření (vlhčení, přidavek glukózy, zmrazení či kombinace dvou z těchto faktorů)

4. Diskuze

Dle očekávání se v odebraných vzorcích miocenních lakustrinních sedimentů během experimentu projevila existence původní hlubinné mikrobioty. Tato přítomnost nedotčených životaschopných mikrobiálních společností odkrytých v oblasti Sokolovské hnědouhelné pánve během těžby v povrchových lomech a nahromaděných na výsypkách byla potvrzena už Elhottovou at al. [2006].

Naměřené hodnoty respirace u vzorků, které nebyly nijak obohaceny ani nepodstoupily mražení, jsou srovnatelné s hodnotami, které ve stejné oblasti naměřili Frouz a Nováková [2005] při výzkumu vytěženého materiálu uloženého na výsypkách lomů. Jelikož v jejich výzkumu byly vzorky odebrány z hlušiny na výsypky teprve nedávno umístěné (stáří 0 - pět let), můžeme se domnívat, že i na této mikrobiální respiraci se podílela svou aktivitou převážně biota hlubokého podloží, která se na povrch dostala díky těžbě.

Respirace naměřená v tomto experimentu je taktéž srovnatelná s hodnotami naměřenými ve svrchních vrstvách půdy (minerální horizont) výsypek zaznamenanými ve studii Helingerové et al. [2010], která probíhala na odkladištích hlušiny Sokolovské hnědouhelné pánve, tedy ve stejné oblasti.

Podle Elhottové at al. [2006] může vysoký obsah a bohatá škála mastných kyselin v neživé mikrobiální biomase sloužit jako snadno dostupný zdroj uhlíku pro pionýrská heterotrofní společenstva, která kolonizují vytěženou hlušinu.

Reakce aktivity mikroorganismů na ošetření studovaných vzorků napovídají, že činnost podzemních mikroorganismů může být limitována dostupností živin. Například organické hmoty je sice v jezerních sedimentech tradičně relativní dostatek [Kieft et al, 1995],

ale jde zřejmě o organiku vázanou do komplexních sloučenin, tedy pro organismy těžce dostupnou Frouz et al. [2011].

Proto ovlivnění vzorků přidáním snadno dostupné energie – glukózy – vyvolalo nárůst mikrobiální aktivity. Jak již bylo zmíněno, přítomná organika, která má komplexnější charakter, není pro mikrobiotu nijak snadno rozložitelným zdrojem a proto zřejmě nastala zvýšená respirace po vstupu dostupnějšího materiálu. Takový efekt pozorovali při svých experimentech i Fredricson et al. [1995], v jejich výzkumu došlo po obohacení substrátu živinami ke zvýšené metabolické aktivitě přítomných organismů.

Vlhčení materiálu vyvolalo u měřených vzorků odezvu, která může být způsobena tím, že voda slouží jako médium, které k organismům dopraví rozpuštěné živiny z okolního prostředí. Mikrobiota je tak schopna využít dostupnou energii. Tato domněnka se shoduje i s prací White et al. [1998], kteří ve své práci uvádí zvýšení metabolické aktivity po přidání vody ke vzorkům.

Jelikož během půdního vývoje dostupnost přítomného organického materiálu klesá, může mrazení substrátu mikroorganismům otevřít cestu k dosud nevyužitelným zásobám energie. Fyzikální překážky, které brání aktivitě mikroorganismů, ve svých pracích udávají i White et al. [1998].

Kombinace mrazení a vody a mrazení a glukózy potom spojuje výše uvedené efekty a příčiny nárůstu metabolické aktivity hlubinných mikroorganismů.

5. Závěr

Co se týče mikrobiálních společenstev hlubinných vrstev, tak jejich význam v iničiálních stádiích rozvoje výsypek je zjevný. Ať už jako neživá biomasa sloužící heterogenním kolonizátorům či přítomným žijícím organismům jako zdroj energie nebo jako respirující biota zahajující sukcesi výsypek, mají původní společenstva neopomenutelnou funkci.

To, že ani po přidavku glukózy, nejsou hodnoty mikrobiální respirace nijak výrazné, naznačuje, že se společenství těchto mikroorganismů skládá spíše z pomalu rostoucích K-stratégů specializovaných na komplexnější organickou hmotu. Ta tvoří základ kerogenu, dominantní formy fosilní organické hmoty jílovců cyprisového souvrství a je jinak obtížně mikrobiálně degradovatelná. Z toho plyne, že hlubinná mikroflóra může hrát významnou roli při zvětrávání těchto hornin.

Zatímco stáří sedimentu – tedy jeho hloubka – se neukázalo jako významná proměnná co se mikrobiální aktivity týče, typ sedimentu už významnější roli hrál. Lamelární sediment, tedy typ sedimentu vznikající pravděpodobně za silně anoxických podmínek, vykázal nejvyšší hodnoty mikrobiální aktivity.

Výsypky jsou stanoviště, která jsou zpočátku nekrytá vegetací, vystavená mrazu a dalším povětrnostním vlivům a vyznačují se i nedostatečným vstupem čerstvé organické hmoty. Proto je důležité znát chování původně hlubinných mikroorganismů, které jsou zde přítomny od chvíle uložení vytěženého materiálu, za podmínek, kterým budou s postupujícím časem zákonitě vystaveni. Proto byly hodnoceny účinky mrazu, vlhkosti a vstupu snadno dostupných sloučenin (případně kombinaci těchto faktorů) na studovaný materiál. Ovlivnění

materiálu přineslo odezvu a proto lze tvrdit, že fyzikální a chemické faktory působící na vytěžený materiál dokáží stimulovat mikrobiální aktivitu přítomných společenstev.

Ve všech případech jde zřejmě o zpřístupnění či dodání živin přítomné biotě. Mražením se pravděpodobně zvyšuje dostupnost organiky vázané v agregátech, voda umožňuje distribuci živin i z dříve nedostupných oblastí a glukóza je potom snadno dostupný zdroj energie.

6. Použitá literatura

Adhikari, R. R., Kallmeyer, J. (2010): Detection and quantification of microbial activity in the subsurface, *ELSEVIER* 70: 135–143.

Aguiar, P., Beveridge, T.J., Reysenbach, A.-L. (2004): *Sulfurihydrogenibium azorense*, sp. nov., a Thermophilic Hydrogen-Oxidizing Microaerophile from Terrestrial Hot Springs in the Azores, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 33–39.

Amend, J.P., Teske, A. (2005), Expanding frontiers in deep subsurface microbiology: Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology 219: 131–155.

Aragno, M. (1992): Aerobic, chemolithoautotrophic, thermophilic bacteria. In *Thermophilic bacteria*, CRC Press, 77–103.

Baldrian, P., Trögl, J., Frouz, J., Šnajdr, J., Valášková, V., Merhautová, V., Cajthaml, T., Herinková, J. (2008): Enzyme activities and microbial biomass in topsoil layer during spontaneous succession in spoil heaps after brown coal mining, *Soil Biology & Biochemistry* 40: 2107- 2115.

Balkwill, D.L., Reeves, R.H. , Drake, G.R., Reeves, J.Y., Crocker, F.H., King, M.B., Boone, D.R. (1997): Phylogenetic characterization of bacteria in the subsurface microbial culture collection, *FEMS Microbiology Reviews* 20: 201-216.

Bastin, E. (1926): The presence of sulphate reducing bacteria in oil field waters. *Nature* 63: 21-24.

Bornemann, L. (1920): Kohlensäure und Pflanzenwachstum. *Mitt. Dtsch. Landwirtsch.-Ges.* 35:363.

Brock, T. D., Gustafson, J. (1976): Ferric iron reduction by sulfur- and iron-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 32:567-71.

Colwell, F.S., Onstott, T.C., Delwiche, M.E., Chandler, D., Fredrickson, J.K., Yao J.-Q., McKinley, J.P., Boon, D., Griffiths, R., Phelps, T.J. et al. (1997): Microorganisms from deep, high temperature sandstones: constraints on microbial colonization, *FEMS Microbiol Rev.* 20: 425-435.

Dong, H. L.; Yu, B. S. (2007): Geomicrobiological processes in extreme environments: A review. *EPISODES* 30: 202- 216.

Elhottová, D., Křišťufek, V., Frouz, J., Nováková, A., Chroňáková, A. (2006): Screening for microbial markers in Miocene sediment exposed during open-cast brown coal mining, *International Journal of General and Molecular Microbiology* 89: 459-463.

Federle, T. W., Dobbins, D. C., Thornton-Manning, J. C., Jones, D. D. (1986): Microbial Biomass, Activity, and Community Structure in Subsurface Soils, *Ground Water* 24: 365–374.

Fredrickson, J. K., Mckinley, J. P., Nierzwicki-Bauer, S. A., White, D. C., Ringelberg, D. B., Rawson, S. A., Shu-Mei Li, Brockman, F. J., Bjornstad, B. N. (1995): Microbial community structure and biogeochemistry of Miocene subsurface sediments: implications for long-term microbial survival. *Molecular Ecology* 4: 619 – 626.

Fredrickson, J.K., McKinley, J.P., Bjornstead, B.N., Long, P.E., Ringelberg, D.B., White, D.B., Krumholz, L.K., Suflita, J.M., Colwell, F.S., Lehman, L.R. (1997): Pore-size constraints on the activity and survival of subsurface bacteria in a late Cretaceous shale-sandstone sequence, Northwestern New Mexico. *Geomicrobiology Journal* 14: 183-202.

Frouz, J, Nováková, A. (2005): Development of soil microbial properties in top soil layer during spontaneous succession in heaps after brown coal mining in relation to soil microstructure development, *Geoderma* 129: 54–64.

Frouz, J., Cajthaml, C., Kříbek, B., Schaeffer, P., Bartuška, M., Galertová, R., Rojík, P., Křišťufek, P. (2011): Deep, subsurface microflora after excavation respiration and biomass and its potential role in degradation of fossil organic matter, *Folia Microbiol.* 56: 389-396.

Fry, J. C., Parkes, J., Cragg, B. A., Weightman, A. J., Webster, G. (2008): Prokaryotic biodiversity and activity in the deep seafloor biosphere, *FEMS Microbiol Ecol.* 66: 181-196.

Giovannoni, S.J., Britschgi, T.B., Moyer, C.L., Field, K.G. (1990): Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton, *Nature* 345: 60–63.

Haldeman, D. L., Amy, P. S. (1993): Bacterial heterogeneity in deep subsurface tunnels at Rainier Mesa, Nevada test site, *Microbial Ecology* 2: 183-194.

Helingerová, M., Frouz J, Šantrůčková, H. (2010): Microbial activity in reclaimed and unreclaimed post-mining sites near Sokolov (Czech Republic). *Ecol Eng* 36: 768–776.

Chapelle, F.H. (2000): *Ground-Water Microbiology and Geochemistry*, New York: John Wiley & Sons, 477 str.

Chroňáková, A., Elhottová, D., Malý, S., Krištůfek, V. (2004): Approaches applied in study of soil microbial diversity in brown coal post-mining chronosequences, *Phytopedon* 3: 35–39.

Internet 1: Sokolovská pánev: Úvod a stručná charakteristika útvarů [online]. [cit. 2012-04-16]. Dostupné z:

http://web.natur.cuni.cz/ugp/main/staff/skin/publikace/Hnedeuhli_138_205.def.indd.pdf

Jørgensen, B.B. (1978a): A comparison of methods for the quantification of bacterial sulfate reduction in coastal marine sediments 1. Measurement with radio- tracer techniques, *Geomicrobiology Journal* 1: 11–27.

Jørgensen, B.B. (1978b): A comparison of methods for the quantification of bacterial sulfate reduction in coastal marine sediments 2. Calculation from mathematical models, *Geomicrobiology Journal* 1: 29–47.

Jørgensen, B.B. (1978c): A comparison of methods for the quantification of bacterial sulfate reduction in coastal marine sediments 3. Estimation from chemical and bacteriological field data, *Geomicrobiology Journal* 1: 49–64.

Jørgensen, B.B., Weber, A., Zopfi, J. (2001): Sulfate reduction and anaerobic methane oxidation in Black Sea sediments, *Deep Sea Research* 148: 2097–2120.

Kashefi, K., Tor, J.M., Holmes, D.E., Gaw, Van., Praagh, C.V., Reysenbach, A.L., Lovley, D.R. (2002): *Geoglobus ahangari* gen. nov., sp. nov., a Novel Hyperthermophilic Archaeon Capable of Oxidizing Organic Acids and Growing Autotrophically on Hydrogen with Fe(III), *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 719 – 728.

Kieft, T. L., Fredrickson, J. K., McKinley, J. P., Bjornstad, B. N., Rawson, S. A., Phelps, T. J., Brockman, F. J., Pfiffner, S. M. (1995): Microbiological Comparisons within and across Contiguous Lacustrine, Paleosol, and Fluvial Subsurface Sediments, *Appl Environ Microbiol.* 61: 749–757.

Kropáček, V., Malkovský, M. (1993): Dosavadní výsledky magentostratigrafických výzkumů terciérních sedimentů sokolovské pánve, *Sborník 7. uhelně geol. konf.*: 113 – 115, Praha.

Kropáček, V., Malkovský, M. (1993): Paleomagnetické datování spodnomiocenních sedimentů karpatské neogenní předhlubně (vrt Nosislav-3), *Knihovnička Zemního plynu a nafty* 15: 105-117.

Krumholtz L.R., McKinley J.P., Ulrich G.A., Suflita J.M. (1997): Confined subsurface microbial communities in Cretaceous rock. *Nature* 386: 64 – 66.

Krumholz, L. R. (2000): Microbial communities in the deep subsurface, *Hydrogeology Journal* 8: 6 – 10.

Kříbek B., Strnad M., Boháček Z., Sykorova I., Čejka J. & Sobalik Z. (1998): Geochemistry of Miocene lacustrine sediments from the Sokolov Coal Basin (Czech Republic). *Int. J. Coal Geol.* 37: 207–233.

Lin, L.H., Hall, J., Lippmann-Pipke, J., Ward, J.A., Lollar, B.S., DeFlaun, M. et al. (2005): Radiolytic H₂ in continental crust: Nuclear power for deep subsurface microbial communities: *Geochemistry, Geophysics, Geosystems* 6: Q07003.

Lovley, D.R., Coates, J.D., Blunt-Harris, E.L., Phillips, E.J.P., Woodward, J.C. (1996): Humic substances as electron acceptors for microbial respiration, *Nature* 382:445- 448.

Lovley, D. R. (1991): Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Microbiol. Rev.* 55:259-87.

Lovley, D.R. (1993): Dissimilatory metal reduction. *Annual Reviews in Microbiology* 47: 263–290.

Ludwig, W. (2007): Nucleic acid techniques in bacterial systematics and identification, *Int. J. Food Microbiol.* 120: 225–236.

Luu, Y-Su, Ramsay, J. A. (2003): Review: microbial mechanisms of accessing insoluble Fe(III) as an energy source, *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 19: 215–225.

Martens, C.S., Berner, R.A. (1974): Methane production in the interstitial waters of sulfate-depleted marine sediments, *Science* 185: 1167–1169.

Mauclaire, L., McKenzie, J. A., Schwyn, B., Bossart, P. (2007): Detection and cultivation of indigenous microorganisms in Mesozoic claystone core samples from the Opalinus Clay Formation (Mont Terri Rock Laboratory), *Physics and Chemistry of the Earth* 32: 232–240.

Pedersen, K. (1993): The deep subterranean biosphere, *Earth-Sci. Rev.* 34: 243-260.

Pedersen, K., (1997). Microbial life in deep granitic rock. *FEMS Microbiol. Rev.* 20: 399–414.

Ringelberg, D. B., Sutton, S., White, D. C. (1997): Biomass, bioactivity and biodiversity: microbial ecology of the deep subsurface: analysis of ester-linked phospholipid fatty acids, *FEMS Microbiology Reviews* 20: 371-377.

Rojík, P. (2004): New stratigraphic subdivision of the Tertiary in the Sokolov Basin in Northwestern Bohemia, *Journal of the Czech Geological Society* 49/3-4.

Rothschild, L.J., Mancinelli, R.L. (2001): Life in extreme environments, *Nature* 409: 1092–1101.

Serving as the Sole Electron Acceptor, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 719–728.

Schinner, F., Ohlinger, R., Kandeler, E., Margesin, R. (1996): *Methods in soil biology*, Berlin, Vienna Springer Verlag.

Slobodkin, A. I. (2005): Thermophilic Microbial Metal Reduction, *Microbiology* 74: 501 – 514.

Stackebrandt, E. a Goodfellow, M. (1991). Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics, *Journal of Basic Microbiology* 31: 479 – 480.

Stevens , T., (1997): Lithoautotrophy in the subsurface, *FEMS Microbiology Reviews* 20: 327–337.

Stevens ,T.O., McKinley, J.P. (1995): Lithotrophic microbial ecosystems in deep basalt aquifers. *Science*, 270:450 - 454

Straub, K.L., Benz, M., Schink, B., Widdel, F. (1996): Anaerobic, nitrate- dependent microbial oxidation of ferrous iron. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1458-1460.

Šourková, M., Frouz, J., Šantrůčková, H. (2005): Accumulation of carbon, nitrogen and phosphorus during soil formation on alder spoil heaps after brown-coal mining, near Sokolov (Czech Republic), *Geoderma* 124: 203- 214.

White D.C., Ringelberg D.B. (1996): Monitoring deep subsurface microbiota for assessment of safe long-term nuclear waste disposal. *Can J Microbic* 42: 375-381.

White, D.C., Phelps, T.J., Onstott, T.C. (1998): What's up down there? *Current Opinion in Microbiology* 1: 286-290.