

## GEOMIKROBIOLOGIA PODZIEMNYCH ŚRODOWISK KOPALNIANYCH MONOKLINY PRZEDSUDECKIEJ

### GEOMICROBIOLOGY OF SUBSURFACE MINE OF THE FORE-SUDETIC MONOCLINE

AGNIESZKA BĄKOWSKA<sup>1</sup>, MICHAŁ KARLICKI<sup>1</sup>, AGNIESZKA WŁODARCZYK<sup>1</sup>, RENATA MATLAKOWSKA<sup>1</sup>

**Abstrakt.** W wyniku działalności górniczej na obszarze monokliny przedsudeckiej powstało unikalne środowisko podziemne, w którym żyją mikroorganizmy – bakterie, archeony i grzyby. Są to przede wszystkim tzw. litobionty, dla których miedzionośny łupek bitumiczny zwany Kupferschiefer jest źródłem węgla i energii oraz makro- i mikroelementów. Wśród mikroorganizmów zasiedlających podziemne kopalnie wykryto wiele ciekawych rodzajów i gatunków wykazujących przystosowanie do tego wyjątkowego środowiska. Szczególnie ciekawe są zespoły mikroorganizmów, które reprezentują różnorodne strategie metaboliczne. Są to m.in. mikroorganizmy, które wykorzystują związki organiczne (organoheterotrofy), ale także takie, które mogą żyć korzystając jedynie ze związków mineralnych (chemolitoautotrofy), mikroorganizmy produkujące metan (metanogeny) oraz takie, które metan rozkładają (metanotrofy). Ponadto w kopalniach miedzi występują mikroorganizmy odporne na metale ciężkie oraz tolerujące duże zasolenie. Mikroorganizmy odgrywają ważną rolę w transformacji łupka bitumicznego Kupferschiefer, wpływają na jego skład geochemiczny i właściwości fizykochemiczne, a także decydują o składzie chemicznym wód podziemnych. Aktywność metaboliczna mikroorganizmów powoduje bioutlenienie kopalnej materii organicznej, w tym kerogenu oraz bioutlenienie minerałów siarczkowych. W wyniku tych procesów powstaje szereg utlenionych związków organicznych i nieorganicznych. Wśród nich są produkty degradacji materii organicznej, takie jak: alkohole, kwasy, ketony, aldehydy, oraz wtórne związki nieorganiczne, w tym liczne biominerały (m.in. siarczany). Część z tych związków ulega mobilizacji do wód podziemnych, część immobilizacji w formie osadów naskalnych.

**Słowa kluczowe:** Kupferschiefer, mikrobiocenoza, heterotrofia, chemolitotrofia, metanotrofia, fototrofia, metanogeneza.

**Abstract.** The unique underground environment developed in the area of Fore-Sudetic Monocline as a result of mining activity. This environment is inhabited by bacteria, archaea and fungi. They are mainly lithobionts for which copper-bearing (Kupferschiefer) black shale is the source of carbon and energy as well as macro- and microelements. Among them, many interesting genera and species adapted to this unique environment were found. Particularly interesting are microbial communities that represent a variety of metabolic strategies: microorganisms using organic compounds (organoheterotrophs), utilizing only mineral compounds (chemolitoautotrophs), producing methane (methanogens) and degrading it (methanotrophs). Additionally, underground mines inhabit microorganisms resistant to heavy metals and high salinity. Microorganisms play an important role in the transformation of Kupferschiefer, affecting its geochemical composition and physicochemical properties, and the groundwater chemistry. Microbial metabolic activity leads to biooxidation of fossil organic matter (including kerogen) and sulphide minerals. As a result of these processes a number of oxidized organic and inorganic compounds are formed. They are products of organic matter degradation, such as alcohols, organic acids, ketones and aldehydes as well as secondary inorganic compounds, including numerous biominerals (*e.g.*, sulphates). Some of these compounds are mobilized to groundwater; some are immobilized in the form of sediments.

**Key words:** Kupferschiefer, bacteria, heterotrophy, chemolitotrophy, methanotrophy, phototrophy, methanogenesis.

---

<sup>1</sup> Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii, Pracownia Analizy Skazań Środowiska, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa;  
e-mail: rmatlakowska@biol.uw.edu.pl.

## LITOSFERA JAKO ŚRODOWISKO ŻYCIA MIKROORGANIZMÓW

Mikroorganizmy żyjące na Ziemi przez procesy metaboliczne i fizjologiczne determinują cykle geochemiczne zachodzące na naszej planecie. Wpływają one na budowę litosfery, a także kontrolują skład gazów w atmosferze i skład chemiczny wód. Mikrobiologiczne procesy wietrzenia minerałów i kopalnin organogenicznych oraz procesy biogenicznej mineralizacji i litogenezy są kluczowymi komponentami cykli geochemicznych pierwiastków na Ziemi. Szczególną rolę w tych cyklach odgrywają mikroorganizmy zasiedlające podpowierzchniowe warstwy litosfery, stanowiące dominującą część wszystkich mikroorganizmów żyjących na Ziemi. Szacuje się, że spośród ok. 5,2 kwintylionów ( $10^{30}$ ) komórek prokariotycznych, znajdujących się we wszystkich ziemskich sferach łącznie, podpowierzchniowe warstwy litosfery stanowią siedlisko życia dla ok. 4,9 kwintyliona z nich, czyli ponad 90% (Whitman i in., 1998). Są wśród nich zarówno bakterie, jak i archeony należące do różnych grup filogenetycznych oraz reprezentujące różne strategie fizjologiczne i metaboliczne.

Tak znaczną dominację mikroorganizmów w litosferze można wytłumaczyć koncentracją właśnie w tej sferze ziemskiej pierwiastków biogennych i mikroelementów. Jednak zależnie od budowy geologicznej i właściwości fizycznych i chemicznych podziemnych biotopów są one zasiedlane przez mikroorganizmy reprezentujące różną fizjologię i różne typy pokarmowe. W środowiskach podziemnych dominują bakterie i archeony chemolitotroficzne, beztlenowe

bakterie dysymilacyjnie redukujące siarczany i metanogenne archeony, ale szczególnie ważne są tzw. multitroficzne zespoły mikroorganizmów. Zespoły takie wykształciły unikalne strategie metaboliczne, które pozwalają im na przeżycie w ekstremalnych warunkach, a jednocześnie odgrywają niezwykle ważną rolę w biogeochemii Ziemi. Przykładem takich zespołów są m.in. syntroficzne układy AOM (ang. *anoxic methane oxidation*) złożone z archeonów beztlenowo utleniających metan i bakterii redukujących siarczany, czy SLIME (ang. *subsurface lithoautotrophic microbial ecosystem*) złożone z metanogenów, acetogenów i bakterii redukujących siarczany. Warto dodać, że w takich środowiskach jak dna oceaniczne, kopalnie czy źródła geotermalne wciąż są odkrywane nowe zespoły mikroorganizmów i opisywane nieznane dotychczas procesy metaboliczne i interakcje międzygatunkowe.

Przykładem jednego z najgłębszych środowisk podziemnych, w którym wykryto obecność mikroorganizmów jest kopalnia złota TauTona (Carletonville, RPA). W próbkach wody pobranych z głębokości ponad 5000 m wykryto bakterie redukujące siarczany z rodzaju *Desulfotomaculum*, a także metanogenne archeony z rodzaju *Methanobacterium* (Moser i in., 2005). W innym rejonie świata w Gravberg (Szwecja) w skale granitowej pobranej z głębokości 6779 m wykryto termofilne bakterie zidentyfikowane jako rodzaje *Thermoanaerobacter* i *Thermoanaerobium* (Szewzyk i in., 1994).

## GEOMIKROBIOLOGIA ŁUPKÓW BITUMICZNYCH

Łupki bitumiczne występują w wielu rejonach na całym świecie, ale w zależności od miejsca różnią się wiekiem oraz budową geologiczną. Skały te, oprócz znaczenia gospodarczego, stanowią szczególny obiekt zainteresowania geomikrobiologii, ze względu na fakt, że są one jednym z największych na świecie rezerwarów kopalnego węgla organicznego, a także zredukowanych związków siarki (Tourtelot, 1979; Rickard, 2012). Tylko mikroorganizmy są zdolne do degradacji kopalnej materii organicznej zdeponowanej w skałach osadowych, jak również do utlenienia minerałów siarczkowych. Biologiczne procesy wietrzenia łupków bitumicznych mają zatem ogromne znaczenie w obiegu węgla i siarki na Ziemi. Bioutlenienie kopalnej materii organicznej, a jednocześnie bioutlenienie zredukowanych związków siarki przez mikroorganizmy może prowadzić do redystrybucji węgla i siarki budujących litosferę, a także wywierać wpływ na skład chemiczny wód i zawartość gazów w atmosferze. Z tego względu mikroorganizmy prokariotyczne zasiedlające łupki bitumiczne stanowią kluczowy element cykli biogeochemicznych tych dwóch biogennych pierwiastków, a w przypadku łupków polimetalicznych mają również ogromne znaczenie w biogeochemii wielu metali.

Pomimo tak dużej roli mikroorganizmów w cyklach geochemicznych na Ziemi wciąż niewiele wiemy na temat mikroorganizmów zasiedlających łupki bitumiczne i ich udziału w przemianach tych skał osadowych. Procesy mikrobiologicznego utlenienia zredukowanych nieorganicznych związków siarki występujących w kwaśnych złożach przez bakterie chemolitotroficzne są znane od końca lat 50. ubiegłego wieku (Bryner i in., 1954), natomiast heterotroficzne procesy degradacji kopalnej materii organicznej odkryto dopiero na początku XXI wieku (Petsch i in., 2001). Jednocześnie procesy te są badane i opisywane niezależnie, tymczasem w przypadku skał osadowych, takich jak łupki bitumiczne Kupferschiefer, mogą one współwystępować, jednak nasza wiedza na ten temat jest uboga. Dotychczas opisano mikroorganizmy występujące tylko w trzech rodzajach łupków bitumicznych, które odsłaniały się na powierzchni Ziemi. Petsch i in. (2001, 2005) jako pierwsi dowiedli, że mikroorganizmy zasiedlające łupki New Albany Shale (Clay City, USA) degradują kopalną materię organiczną zawartą w tej skale i wykazali zdolność mikroorganizmów do asymilacji kopalnego węgla. Berlendis i in. (2014) badający łupki bitumiczne pochodzący z Autun

(Francja) wykryli w materiale genetycznym wyizolowanym z tej skały geny potencjalnie kodujące dioksygenazy – enzymy uczestniczące w degradacji związków organicznych. Li i in. (2014), którzy badali łupkę bitumiczną pochodzącą z Chengkou County (Chiny), wykazali natomiast, że tę ska-

łą zasiedlają głównie bakterie chemolitotroficzne, których aktywność metaboliczna związana z utlenianiem siarki pirytowej i produkcją  $H_2SO_4$ , a także utlenianiem i redukcją żelaza wpływa na przemiany geochemiczne badanej skały.

## KOPALNIE MIEDZI MONOKLINY PRZEDSUDECKIEJ – UNIKALNE ŚRODOWISKO PODZIEMNE

Do jednych z najważniejszych dla geomikrobiologii stanowisk łupków bitumicznych bez wątpienia należy zaliczyć miedzionośny łupkę bitumiczny Kupferschiefer. W wyniku działalności górniczej prowadzonej od lat 60. XX wieku, na obszarze ok. 158 km<sup>2</sup> powstało unikalne środowisko podziemne – jedno z największych na świecie. Na głębokości ok. 300–1200 m jest zlokalizowanych kilkadziesiąt tysięcy kilometrów korytarzy. Wyjątkowość tego środowiska determinuje przede wszystkim specyficzna budowa geologiczna złoża, które charakteryzuje się dużą zawartością materii organicznej, silną mineralizacją i polimetalicznością, a także jego wiek (loping) oraz wspomniana wielkość.

Podziemną mikrobiocenozę kopalni miedzi monokliny przedsudeckiej kształtują właściwości geochemiczne i fizyczne Kupferschiefer. Kluczowym czynnikiem decydującym o możliwości zasiedlenia tego środowiska podziemnego przez mikroorganizmy heterotroficzne jest obecność materii organicznej, zarówno trudno degradowalnej, występującej w formie węglowodorów alifatycznych i aromatycznych, jak i prostych węglowodorów i wtórnych utlenionych związków organicznych. Znaczna zawartość zredukowanych pierwotnych związków, przede wszystkim siarki oraz wtórnych utlenionych związków mineralnych, umożliwia jednak rozwój odpowiednio chemolitotrofów i fototrofów anoksygenowych oraz chemoorganotrofów oddychających beztlenowo. Duża wilgotność powietrza (ok. 70–80%), optymalna temperatura (20–35°C), neutralny odczyn to inne czynniki fizyczne, które także sprzyjają rozwojowi mikroorganizmów. Jednak oprócz tych czynników można wyróż-

nić także mniej korzystne lub wręcz szkodliwe, jak np. duże zasolenie, obecność wielu toksycznych metali ciężkich lub brak światła jako źródła energii.

W ramach projektu „Biogeochemiczne transformacje polimetalicznych łupków bitumicznych Kupferschiefer (monoklina przedsudecka) przez mikroorganizmy autochtoniczne – detekcja i identyfikacja długoterminowych procesów w podziemnym środowisku kopalnianym” zbadano różnorodność filogenetyczną mikroorganizmów, ich fizjologię oraz strategię metaboliczną, a także określono potencjalną rolę w przemianach geochemicznych, zachodzących w podziemnym środowisku kopalnianym i ich znaczenie w kształtowaniu podziemnej litosfery i hydrosfery. Dodatkowym zadaniem projektu było wskazanie potencjału biotechnologicznego unikalnej mikrobiocenozy podziemnej.

Przebadano ok. 50 próbek skał, osadów naskalnych, wody, osadów dennych, biofilmów i mat mikrobiologicznych pochodzących z kopalni Lubin, Rudna i Polkowice-Sieroszowice (fig. 1). Przeprowadzono kompleksowe badania terenowe i laboratoryjne o charakterze interdyscyplinarnym. Badania biologiczne oparto na najnowocześniejszych metodach metaanalizy – obejmowały metagenomikę (analiza DNA), metaproteomikę (analiza białek enzymatycznych i strukturalnych) oraz metabolomikę (analiza metabolitów organicznych i nieorganicznych). Uzupełnieniem badań biologicznych była charakterystyka geochemiczna próbek obejmująca poznanie składu pierwiastkowego, mineralnego oraz identyfikację związków organicznych.

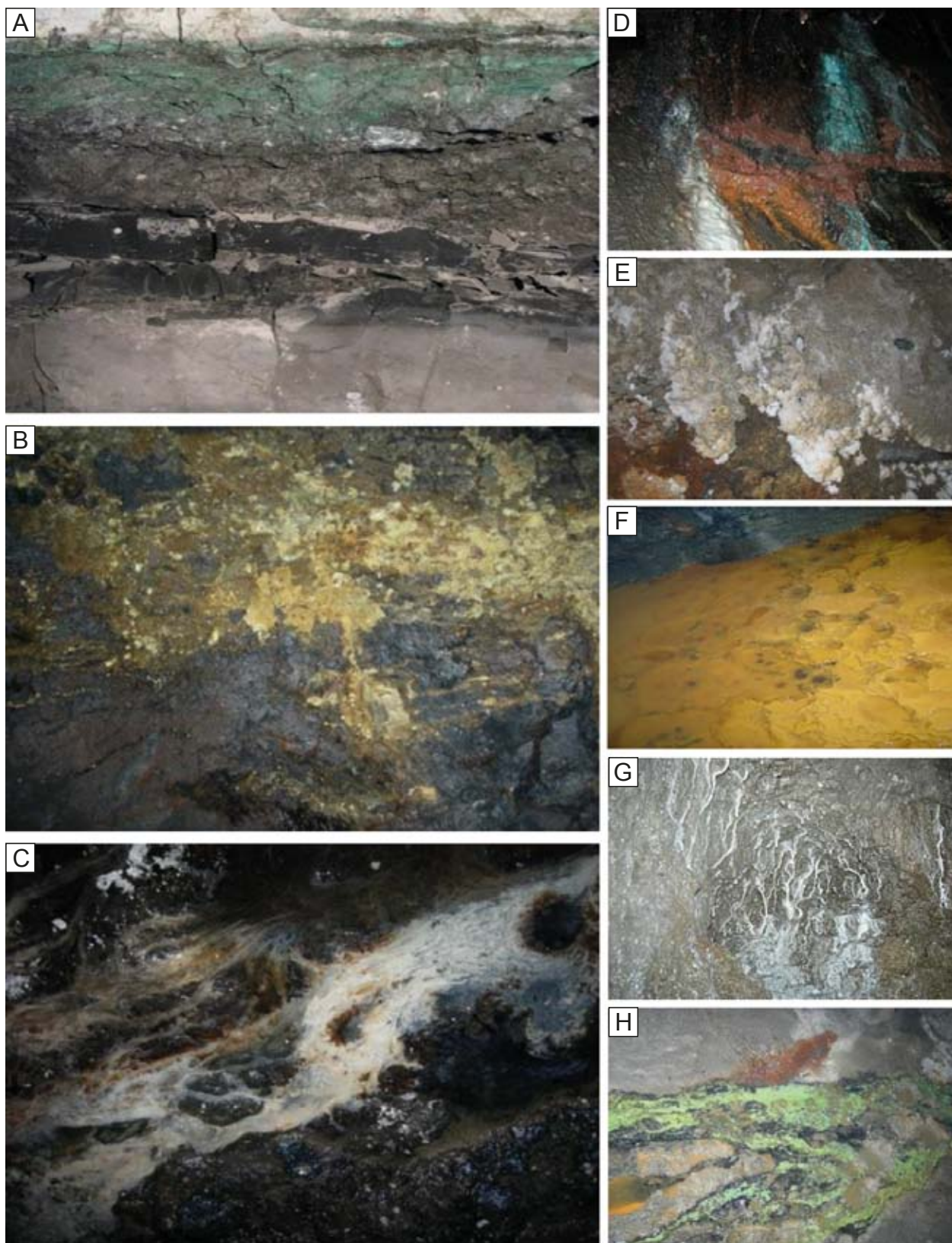
## MIKROORGANIZMY PODZIEMNYCH ŚRODOWISK KOPALNIANYCH MONOKLINY PRZEDSUDECKIEJ – RÓŻNORODNOŚĆ FILOGENETYCZNA, FIZJOLOGICZNA I METABOLICZNA

W podziemnych kopalniach miedzi monokliny przedsudeckiej zidentyfikowano zarówno mikroorganizmy prokariotyczne (bakterie i archeony), jak i eukariotyczne (grzyby). Pod względem ilościowym i jakościowym dominują bakterie (99%). Są one reprezentowane przez 24 typy filogenetyczne (fig. 2). Bakterie należące do klasy *Gammaproteobacteria* dominują w podziemnym środowisku (40–60%) (fig. 3). Archeony są reprezentowane przez dwa typy filogenetyczne (fig. 2); podobnie dotychczas zidentyfikowano dwa typy filogenetyczne grzybów (*Ascomycota*, *Basidiomycota*).

Dominująca część mikroorganizmów to tzw. litobionty, żyjące na łupku bitumicznym Kupferschiefer, który jest dla nich źródłem węgla i energii oraz makro- i mikroelementów (fig. 1A, 4 i 5). Pozostałe mikroorganizmy występują w wodach (fig. 6) oraz osadach dennych (fig. 1F i 7), a także wtórnych osadach naskalnych (fig. 1B, D i E).

Zidentyfikowane mikroorganizmy to zarówno tlenowce, jak i beztlenowce. Dominującą grupą mikroorganizmów są neutrofile, aczkolwiek zidentyfikowano również kilka gatunków bakterii alkalofilnych, dla których optymalne pH





**Fig. 1. Podziemne biotopy i mikrobiocenozy w kopalniach miedzi monokliny przedsudeckiej**

A – zwietrzały łupek bitumiczny Kupferschiefer (kopalnia Rudna); B, D, E – osady naskalne (kopalnie Lubin i Rudna); C, F, H – maty mikrobialne (kopalnia Lubin); G – biofilm naskalny (kopalnia Polkowice-Sieroszowice)

Subterrestrial biotops and microbiocenoses in copper mines of the Fore-Sudetic Monocline

A – weathered Kupferschiefer black shale (Rudna mine); B, D, E – sediments on the rock surface (Lubin and Rudna mines); C, F, H – microbial mats (Lubin mine); G – biofilm on the rock surface (Polkowice-Sieroszowice mine)

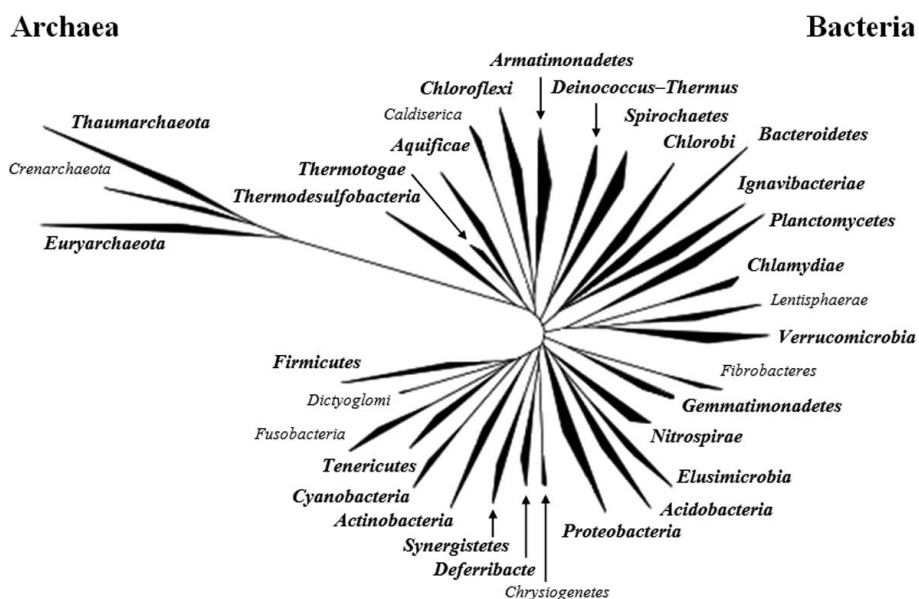


Fig. 2. Typy bakterii i archeonów (pogrubione) zidentyfikowane w kopalniach miedzi monokliny przedsudeckiej

Bacterial and archaeal phyla (bold) identified in copper mines of the Fore-Sudetic Monocline

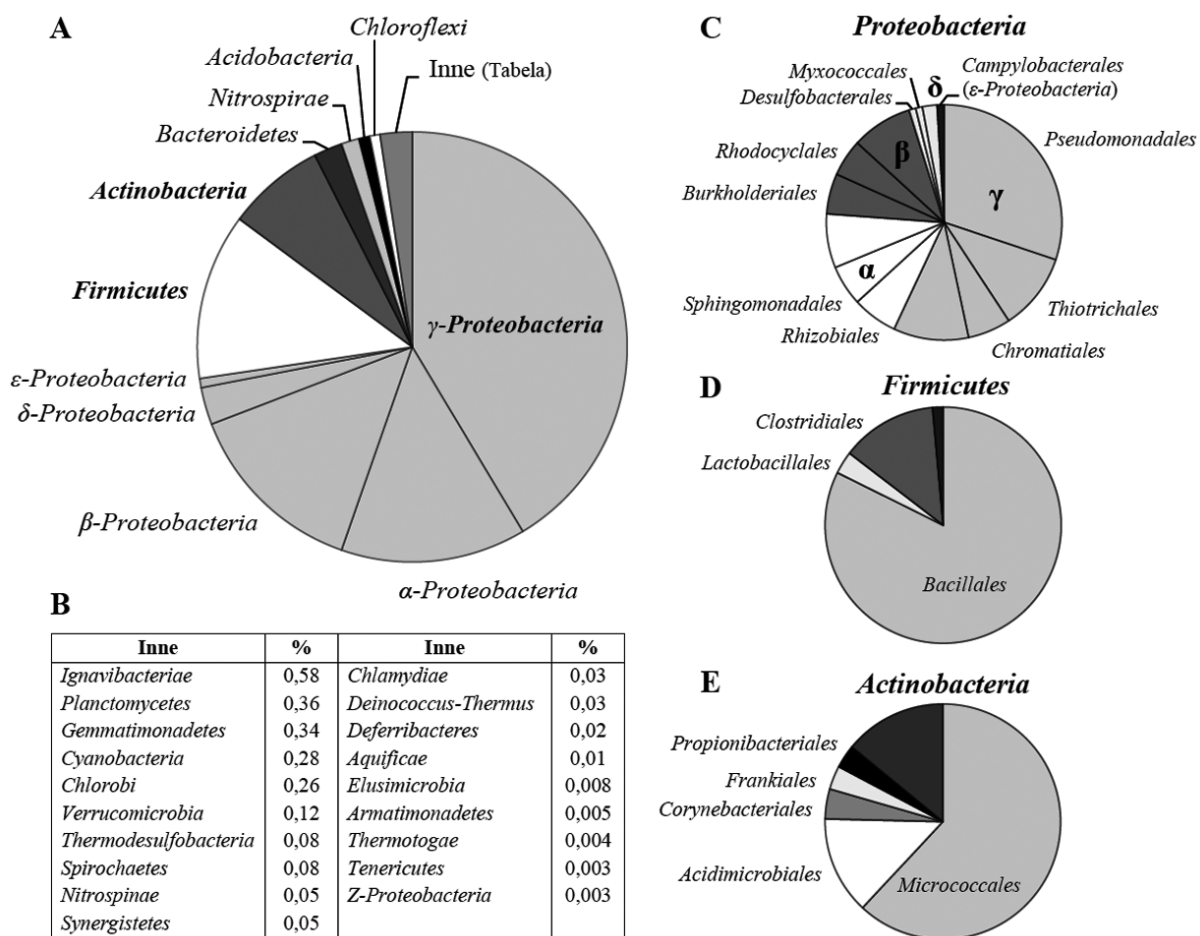
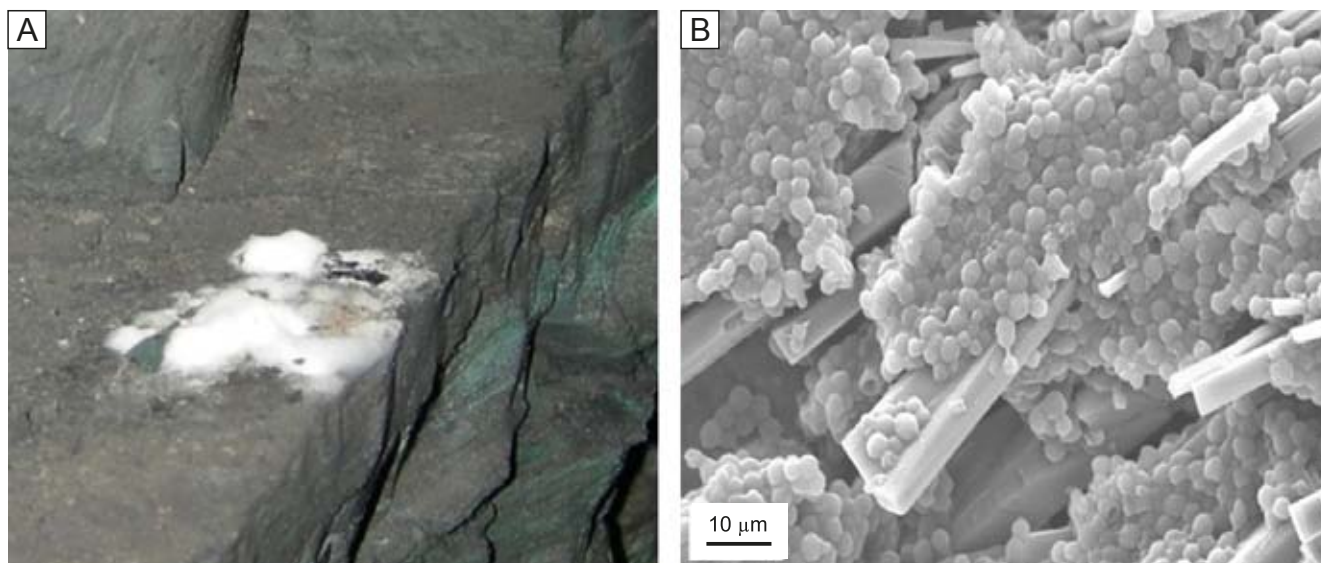


Fig. 3. Dominujące typy bakterii (A), pozostałe typy bakterii (B) oraz dominujące klasy: *Proteobacteria* (C), *Firmicutes* (D) i *Actinobacteria* (E) zidentyfikowane w kopalniach miedzi monokliny przedsudeckiej

Dominant bacterial phyla (A), remaining bacterial phyla (B) and dominant bacterial classes of *Proteobacteria* (C), *Firmicutes* (D) and *Actinobacteria* (E) detected in copper mines of the Fore-Sudetic Monocline





**Fig. 4. Grzyby litobiontyczne na powierzchni łupka bitumicznego Kupferschiefer**

A – grzyb w kopalni Lubin; B – *Rhodotorula mucilaginosa* (hodowla laboratoryjna, elektronowa mikroskopia skaningowa)

Lithobiontic fungi on the surface of Kupferschiefer black shale

A – fungi in the Lubin mine; B – *Rhodotorula mucilaginosa* (laboratory culture, scanning electron microscopy)

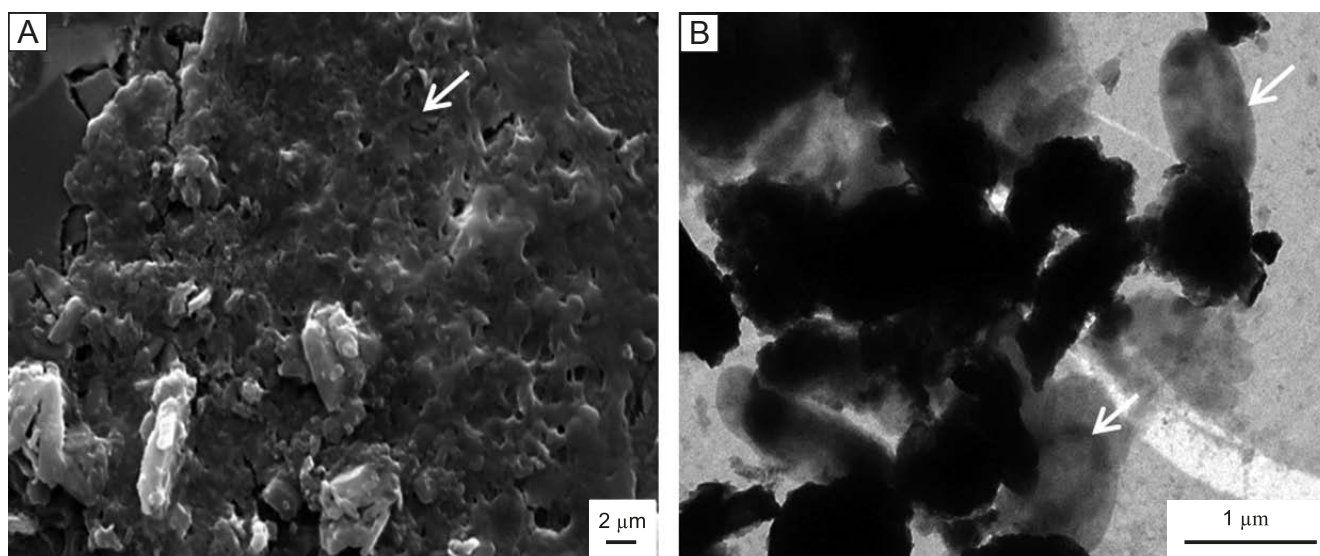
wynosi ok. 9 (*Sulfuricaulis limicola*, *Sulfurifustis variabilis* oraz *Yonghaparkia alkaliphila*), jak również kwasolubnych (*Acidithiobacillus ferrooxidans*, pH optymalne ok. 2,5). Pod względem temperatury mikroorganizmy kopalniane są mezofilami (temp. optymalna 26–30°C), ale część z nich toleruje także temperatury wyższe (50°C) oraz niższe (4°C) (Matlakowska, Skłodowska, 2009b). Znaczna część mikroorganizmów charakteryzuje się tolerancją na metale ciężkie, w tym przede wszystkim na miedź, ale także arsen, kadm, ołów i rtęć, oraz jest halotolerancyjna, czyli toleruje duże zasolenie (do 5%) (Matlakowska i in., 2008; Rajpert i in., 2013; Karlicki, 2015). Najliczniejszą grupą metaboliczną mikroorganizmów są heterotrofy zdolne do tlenowej i beztlenowej degradacji węglowodorów alifatycznych i aromatycznych. Do heterotrofów zaliczają się także tzw. wtórni redukcenci, wykorzystujący utlenione związki organiczne (alkohole, aldehydy, kwasy organiczne) w warunkach tlenowych oraz beztlenowych, w tym bakterie fermentacyjne. Niezwykle ciekawą grupą mikroorganizmów są bakterie wykorzystujące związki C1 (metylotrofy), w tym m.in. metan (metanotrofy). W środowisku podziemnym występują także autotrofy, dla których źródłem węgla jest CO<sub>2</sub> zawarty w powietrzu lub HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> w wodzie, a źródłem energii i elektronów – zredukowane związki mineralne, takie jak siarczki miedzi, żelaza czy arsenu (chemolitoautotrofy). Zidentyfikowano także bakterie zdolne do wykorzystania związków organicznych, jako źródła węgla, i nieorganicznych, jako źródła energii (chemolitoheterotrofy). Część beztlenowych mikroorganizmów heterotroficznych przeprowadza proces dysymilacyjnej redukcji siarczanów oraz związków żelaza, czyli wykorzystuje te utlenione związki jako akceptor elektronów. Oprócz wspomnianych metanotrofów, w kilku badanych

próbkach wykryto również obecność beztlenowych archeonów zdolnych do produkcji metanu (metanogeny). Kolejną niezwykle interesująca grupą mikroorganizmów są fototrofy, zarówno anoksygenowe, jak i oksygenowe, które wykorzystują energię słoneczną, a w środowisku afotycznym zmieniają swój metabolizm. Wśród wyżej wymienionych mikroorganizmów są także bakterie nityfikacyjne (utleniające związki azotu), denityfikacyjne (redukujące związki azotu) oraz diazotrofy wiążące azot atmosferyczny.

W wyniku przeprowadzonych izolacji uzyskano kolekcję mikroorganizmów zdolnych do wzrostu w warunkach laboratoryjnych. Kolekcja ta obejmuje kilkadziesiąt konsorcjów mikroorganizmów, zarówno tlenowych, jak i beztlenowych reprezentujących wyżej wymienione strategie metaboliczne i fizjologiczne. W dalszej części pracy omawiając poszczególne grupy mikroorganizmów korzystano z opracowania Madigana i in., 2008.

#### MIKROORGANIZMY HETEROTROFICZNE DEGRADUJĄCE KOPALNĄ MATERIE ORGANICZNĄ

Mikroorganizmy heterotroficzne wykorzystujące kopalną materię organiczną jako źródło węgla i energii są najliczniejszą grupą metaboliczną i filogenetyczną. Ich szczególną dominację oraz duże zróżnicowanie zaobserwowano na powierzchni łupka bitumicznego Kupferschiefer (fig. 5). Wśród nich dominują tlenowe Gram-ujemne bakterie należące do typu *Proteobacteria*, w tym *Gammaproteobacteria* (m.in. rodzaje *Pseudomonas* i *Acinetobacter*), *Betaproteobacteria* (m.in. rodzaje *Limnobacter* i *Diaphorobacter*) oraz *Alphaproteobacteria* (m.in. rodzaje *Bradyrhizobium*, *Phenylobacterium*, *Sphingopyxis* i *Sphingomonas*). Najbar-



**Fig. 5. Bakterie heterotroficzne z rodzaju *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Microbacterium* i *Bacillus* na powierzchni łupka bitumicznego Kupferschiefer**

A – elektronowa mikroskopia skaningowa; B – elektronowa mikroskopia transmisyjna; strzałki – biofilm naskalny i komórki bakterii

Heterotrophic bacteria of *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Microbacterium* and *Bacillus* genus on the surface of Kupferschiefer black shale

A – scanning electron microscopy; B – transmission electron microscopy; arrows – epilithic biofilm and bacterial cells

dziej dominującym gatunkiem bakterii heterotroficznych jest *Pseudomonas stutzeri*, stanowiący do 14% mikrobiocenozy kopalnianej. W kopalniach miedzi monokliny przedsudeckiej występują także Gram-dodatnie *Actinobacteria* (m.in. rodzaje *Microbacterium* i *Yonghaparkia*) oraz *Firmicutes* (głównie rodzaj *Bacillus*). Wśród zidentyfikowanych bakterii heterotroficznych degradujących węglowodory są też beztlenowe *Proteobacteria*, reprezentowane przez rodzaje *Dechloromonas*, *Azoarcus* i *Thauera* (*Betaproteobacteria*).

Wykazano, że mikroorganizmy heterotroficzne są zdolne do tlenowej lub beztlenowej degradacji węglowodorów alifatycznych oraz aromatycznych, w tym węglowodorów policyklicznych. Utlenianie węglowodorów alifatycznych do kwasów karboksylowych przebiega wg:  $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3 \rightarrow \text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_2\text{OH} \rightarrow \text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{COH} \rightarrow \text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ ; natomiast tlenową degradację związków aromatycznych na przykładzie benzenu można przedstawić w następujący sposób:  $\text{C}_6\text{H}_6$  (benzen) +  $\text{O}_2$  +  $2\text{H}^+$  →  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_2$  (dihydrodiol) →  $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2$  (katechol) +  $2\text{H}^+$ .

Badania terenowe oraz laboratoryjne pozwoliły na wykrycie w metagenomie i metaproteomie mikroorganizmów odpowiednio specyficznych genów oraz enzymów bakteryjnych zaangażowanych w wyżej wymienione procesy. Wśród nich są obecne monooksygenazy, dioksygenazy i hydroksylazy (oraz kodujące je geny) uczestniczące w bezpośredniej degradacji węglowodorów, a także lakazy rozkładające związki fenolowe. Zidentyfikowano również liczne dehydrogenazy alkoholowe i aldehydowe, biorące udział w przemianach alkoholi i aldehydów powstałych z węglowodorów. Zidentyfikowano trzy szlaki degradacji węglowodorów alifatycznych przez oksydację terminalną, subterminalną

i diterminalną (Ji i in., 2013). W pierwszym z nich węglowodory są bioutleniane do kwasów monokarboksylowych przez alkohole monohydroksylowe pierwszorzędowe i aldehydy, w drugim – przez alkohole monohydroksylowe drugorzędowe, ketony i estry, a w trzecim – do kwasów dikarboksylowych. Wykryto również główne produkty tlenowej degradacji węglowodorów aromatycznych, jak np. katechol (benzeno-1,2-diol) oraz kwas fiałowy (kwas 1,2-benzenodikarboksylowy) (Fuchs i in., 2011), a także zidentyfikowano oksydacyjne otwarcie pierścienia aromatycznego katecholu w szlaku orto za pośrednictwem 1,2-dioksygenazy katecholowej oraz meta za pośrednictwem 2,3-dioksygenazy katecholowej.

#### MIKROORGANIZMY METANO- I METYLOTROFICZNE UTLENIAJĄCE ZWIĄZKI JEDNOWĘGLOWE

Kolejną interesującą grupą, lecz mniej liczną, występującą w kopalniach na obszarze monokliny przedsudeckiej są metanotrofy i metylotrofy, czyli tlenowe mikroorganizmy wykorzystujące metan i inne proste jednowęgłowe związki organiczne (np. metanol, metyloaminy, kwas mrówkowy, aldehyd mrówkowy), jako źródło energii i budulec wykorzystywany w biosyntezie związków komórkowych. Metanotrofy dzielą się na dwie grupy, tzw. typ pierwszy i typ drugi. Metanotrofy pierwszego i drugiego typu należą odpowiednio do klas *Gammaproteobacteria* oraz *Alphaproteobacteria*. Oprócz różnic w morfologii komórek, najistotniejszą różnicą pomiędzy wspomnianymi typami jest sposób asymilacji węgla. Metanotrofy typu pierwszego korzystają ze szlaku rybulozomonofosforanowego, natomiast metano-

trofy typu drugiego asymilują węgiel w szlaku serynowym. Obie grupy posiadają jednak kluczowy dla procesu utleniania metanu enzym – monooksygenazę metanową. Badania nad metanotrofią wykazały dwa rodzaje tego enzymu: niezależną od miedzi sMMO (ang. *soluble methane monooxygenase*) i zależną od miedzi pMMO (ang. *particulate methane monooxygenase*). Stwierdzono również większe powinowactwo pMMO do metanu, co skutkuje lepszym wzrostem mikroorganizmów posiadających ten enzym. W związku z tym obecność miedzi w środowisku często jest istotnym warunkiem występowania metanotrofii, a same mikroorganizmy w drodze ewolucji wykształciły wiele sposobów pobierania tego pierwiastka (Bürgmann, 2011). Metylotrofy natomiast są grupą bardziej zróżnicowaną ze względu na mnogość wykorzystywanych substratów. W procesach utlenienia wykorzystują enzymy o aktywności dehydrogenaz. Ponadto występuje ścisły związek między metanotrofami i metylozofiami, gdyż metylozofie wykorzystują produkty końcowe utlenienia metanu, których to nagromadzenie powoduje zahamowanie procesu metanotrofii (tj. metanol i aldehyd mrówkowy). Ciąg reakcji wspomnianych powyżej to:  $\text{CH}_4 \rightarrow \text{CH}_3\text{OH} \rightarrow \text{CH}_2\text{O} \rightarrow \text{COOH} \rightarrow \text{CO}_2$ .

Na terenie kopalń miedzi wśród metanotrofów dominują metanotrofy typu pierwszego, bakterie Gram-ujemne z typu *Proteobacteria*: *Gammaproteobacteria* (rodzaje: *Methylobacter*, *Methylosarcina*, *Methylobacter*, *Methylovulum*). Wśród metylozofii stwierdzono obecność bakterii Gram-ujemnych z typu *Proteobacteria*: *Betaproteobacteria* (rodzaje: *Methylophilus*, *Methylobacillus*) oraz *Alphaproteobacteria* (rodzaj *Hyphomicrobium*).

W metaproteomie mikroorganizmów kopalnianych zidentyfikowano monooksygenazę metanową – pMMOs i dehydrogenazy kolejnych produktów utlenienia, tworzące pełny szlak, począwszy od utleniania metanu po asymilację węgla (odpowiadający metanotrofii typu pierwszego) i utylizację dalszych produktów (metylotrofia). Badania terenowe wykazały, że mikroorganizmy metano- i metylozoficzne występują wspólnie, punktowo na terenie kopalń miedzi monokliny przedsudeckiej, tworząc przy tym wielogatunkowe ekosystemy. Najprawdopodobniej jest to związane z ograniczoną dostępnością kluczowego substratu – metanu.

#### ARCHEONY METANOGENNE

Występowanie opisanych powyżej bakterii metanotroficznych sugeruje obecność w badanym środowisku metanu. Co ciekawe, na powierzchni Kupferschiefer zidentyfikowano produkujące metan beztlenowe archeony z rodzaju *Methanosarcina* (typ *Euryarchaeota*). Procentowy udział metanogenów w mikrobiocenozie jest niewielki (0,05%). W metaproteomie zidentyfikowano jednak wiele białek tych mikroorganizmów. Otrzymane wyniki dowodzą zatem, że metanogenne archeony mogą uczestniczyć w końcowym etapie rozkładu materii organicznej łupka, a jak wiadomo z literatury nawet niewielka liczba metanogenów w środo-

wisku może zapewnić dopływ metanu w ilości niezbędnej do wzrostu populacji mikroorganizmów metanotroficznych (Lau i in., 2016).

#### MIKROORGANIZMY DYSYMLACYJNIE UTLENIAJĄCE ZREDUKOWANE ZWIĄZKI SIARKI

Do mikroorganizmów dysymilacyjnie utleniających zredukowane związki siarki zidentyfikowanych w kopalniach monokliny przedsudeckiej należą wyłącznie bakterie. Uzyskują one energię z utleniania związków siarki, takich jak  $\text{S}^{2-}$ ,  $\text{S}^0$ ,  $\text{SO}_3^{2-}$ ,  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ , m.in. wg reakcji:

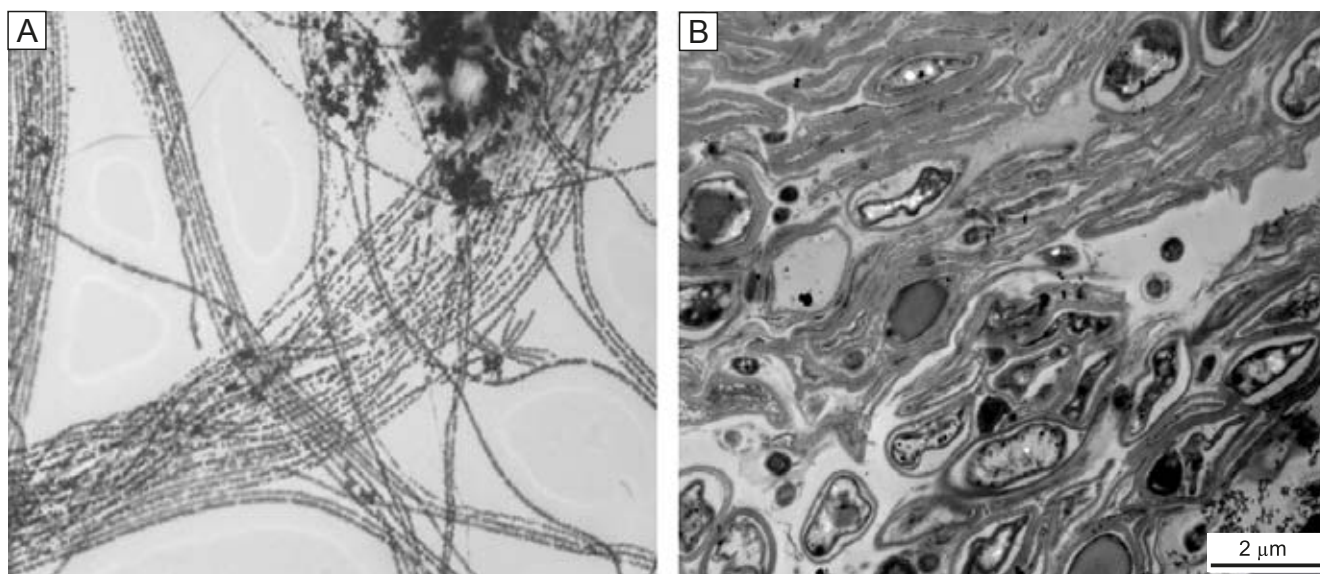
$\text{H}_2\text{S} + 2\text{O}_2 \rightarrow \text{SO}_4^{2-} + 2\text{H}^+$  (utlenianie siarczku do siarczanu)  
 $\text{HS}^- + \text{H}^+ + 0,5\text{O}_2 \rightarrow \text{S}^0 + \text{H}_2\text{O}$  (utlenianie siarczku do siarki)  
 $\text{S}^0 + 1,5\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{SO}_4^{2-} + 2\text{H}^+$  (utlenianie siarki do siarczanu)  
 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-} + \text{H}_2\text{O} + 2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{SO}_4^{2-} + 2\text{H}^+$  (utlenianie tiosiarczanu do siarczanu).

Są wśród nich zarówno chemolitoautotrofy, chemolithoheterotrofy, jak i fotolitoautotrofy anoksygenowe. Najważniejszymi bakteriami przeprowadzającymi wyżej wymienione procesy są bakterie z rodzaju *Thiobacillus* (*Betaproteobacteria*), przede wszystkim *Thiobacillus denitrificans* i *Thiobacillus thioparus*. W kopalniach monokliny przedsudeckiej również występuje powszechnie neutrofilny *Thiothrix* (m.in. *Thiothrix nivea* i *Thiothrix lacustris*) (*Gammaproteobacteria*) oraz bakterie należące do rodzaju *Beggiatoa* (*Gammaproteobacteria*) i *Thiobacter* (*Betaproteobacteria*). Mikroorganizmy te zasiedlają przede wszystkim wilgotne powierzchnie Kupferschiefer, ale także zidentyfikowano je w wodach podziemnych, w których tworzą maty mikrobiałne (fig. 6).

Do chemolithotroficznych bakterii utleniających związki siarki należą także neutrofilne bakterie *Sulfuricella denitrificans*, *Sulfuritalea hydrogenivorans* (*Betaproteobacteria*), *Sulfuricurvum kujiense*, *Sulfurimonas autotrophica*, *Sulfurimonas denitrificans*, *Sulfurimonas gotlandica*, *Sulfurospirillum deleyianum* (*Epsilonproteobacteria*) oraz alkalofilne bakterie *Sulfuricaulis limicola* i *Sulfurifustis variabilis* (*Gammaproteobacteria*). Większość z wymienionych bakterii wykorzystuje tlen jako ostateczny akceptor elektronów, ale niektóre z nich w warunkach beztlenowych mogą wykorzystywać również azotany. Do utleniania związków siarki, zwłaszcza tiosiarczanu, zdolne są także wspomniane wcześniej bakterie heterotroficzne z rodzaju *Limnobacter* i *Bradyrhizobium*. Bakterie te wykorzystują związki siarki, jako źródło energii, a związki organiczne jako źródło węgla, są zatem chemolithoheterotrofami.

Wśród mikroorganizmów zidentyfikowanych w kopalniach monokliny przedsudeckiej, które utleniają związki siarki są także fototrofy anoksygenowe. Bakterie te posiadają zielony barwnik – bakteriochlorofil, za pomocą którego absorbują energię świetlną, a jako donator elektronów wykorzystują nieorganiczne związki siarki, a także wodór, związki organiczne lub Fe(II). Fotosyntezę przeprowadzają w warunkach beztlenowych lub przy niskim stężeniu tlenu,





**Fig. 6. Bakterie chemolitotroficzne dysymilacyjnie utleniające zredukowane związki siarki**

A – nitkowate komórki *Thiothrix* sp. (mikroskopia świetlna, pow.  $\times 40$ ); B – ultrastruktura maty mikrobialnej zdominowanej przez bakterie siarkowe (transmisyjna mikroskopia elektronowa)

#### Chemolithotrophic bacteria oxidizing reduced sulphur compounds

A – filamentous cells of *Thiothrix* sp. (light microscopy, mag.  $\times 40$ ); B – ultrastructure of microbial mat dominated by sulphur bacteria (transmission electron microscopy)

ale część z nich może również żyć w warunkach tlenowych. Większość wykrytych w kopalni fototrofów anoxygenowych charakteryzuje się niezwykle plastycznym metabolizmem, który dostosowują do aktualnie panujących warunków środowiska. Rosną także w ciemności, stając się wówczas chemotrofami. Do fototrofów anoxygenowych występujących w badanych kopalniach należą przedstawiciele wszystkich znanych grup tych bakterii – bakterie purpurowe niesiarkowe (rodzaje *Rhodospseudomonas*, *Rhodoplana*, *Rhodovulum*, *Rhodobacter*, *Erythrobacter*) (*Alphaproteobacteria*), purpurowe siarkowe (rodzaje *Thiocapsa* i *Thioflavicoccus*) (*Gammaproteobacteria*), zielone siarkowe (rodzaj *Chlorobium*) (*Chlorobi*) oraz nitkowate (rodzaje *Chloroflexus* i *Roseiflexus*) (*Chloroflexi*). Warto dodać, że niektóre fototrofy anoxygenowe są również zdolne do degradacji węglowodorów alifatycznych i aromatycznych w warunkach beztlenowych.

W metaproteomie bakterii występujących w kopalniach miedzi zidentyfikowano szereg enzymów katalizujących utlenianie zredukowanych związków siarki do siarczanów. Zidentyfikowane enzymy reprezentują wszystkie opisane dotychczas szlaki utleniania związków siarki. Wykryto m.in. enzym SQR (reduktazę siarczkowo-chinonową) oraz dehydrogenazę siarczkową, odpowiedzialne za utlenienie siarczków. Innymi zidentyfikowanymi enzymami są reduktaza APS oraz adenylotransferaza siarczanowa zaangażowane w szlak utleniania siarczynów do siarczanów. Ważną grupę

enzymów stanowi system TOMES (ang. *thiosulfate-oxidizing multi-enzyme system*), do którego są zaliczane białka SoxX, SoxA, SoxB, SoxC, SoxD, SoxY i SoxZ.

#### MIKROORGANIZMY DYSYMLACYJNIE REDUKUJĄCE UTLENIONE ZWIĄZKI SIARKI

Mikroorganizmy prokariotyczne to jedyne organizmy, które mogą wykorzystywać egzogenne związki nieorganiczne jako akceptory elektronów. Takimi związkami mogą być m.in. siarczany, a także siarka pierwiastkowa, a procesy oddychania z ich wykorzystaniem nazywamy odpowiednio oddychaniem siarczanowym lub siarkowym. Bakterie redukują siarczany w warunkach beztlenowych wg reakcji:  $4\text{H}_2 + \text{SO}_4^{2-} + \text{H}^+ \rightarrow \text{HS}^- + 4\text{H}_2\text{O}$ . Są one bezwzględnie beztlenowcami i zwykle wykorzystują proste związki organiczne, jako źródło węgla, ale niektóre z nich są także zdolne do degradacji związków aromatycznych, w tym węglowodorów.

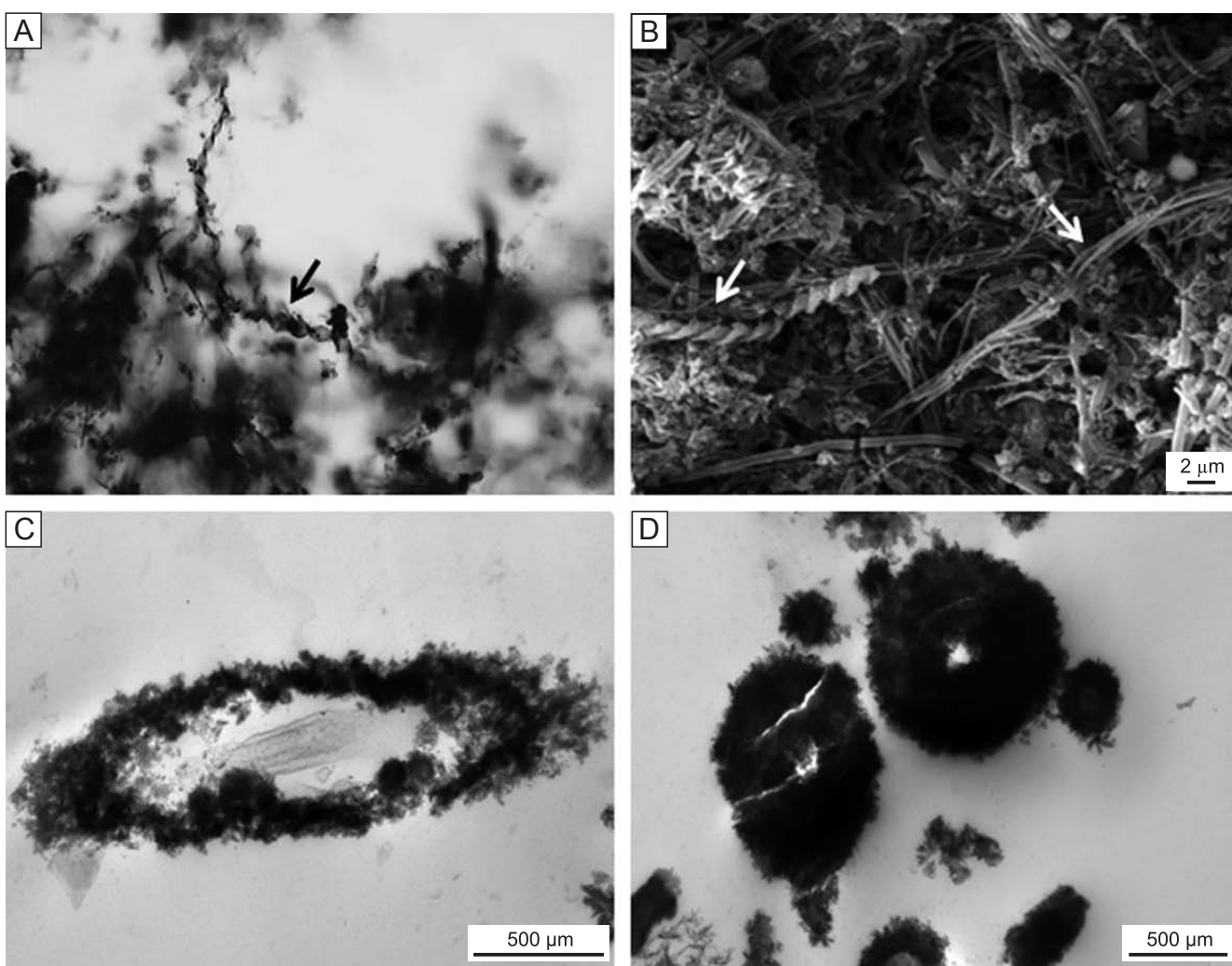
W kopalniach miedzi monokliny przedsudeckiej bakterie redukujące siarczany nie dominują ani pod względem jakościowym, ani ilościowym, aczkolwiek wykryto bakterie z klasy *Deltaproteobacteria*, które są najbardziej powszechnymi tego typu bakteriami, m.in. rodzaje *Desulfobacula*, *Desulfobulbus*, *Desulfotignum*, *Desulfocapsa* oraz gatunki *Desulforegula conservatrix*, *Desulfobacterium catecholicum* i *Desulfovibrio dechloracetivorans*.

### MIKROORGANIZMY DYSYMLACYJNIE UTLENIAJĄCE ZREDUKOWANE ZWIĄZKI ŻELAZA

Zredukowane związki żelaza(II) mogą być dla mikroorganizmów źródłem energii i donorem elektronów. Proces utleniania żelaza(II) w warunkach tlenowych przebiega zgodnie z reakcją:  $2\text{Fe}^{2+} + 0,5\text{O}_2 + 2\text{H}^+ \rightarrow 2\text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O}$ . W badanych środowiskach kopalnianych monokliny przedsudeckiej zidentyfikowano neutrofilne i acydofilne chemolitotrofy przeprowadzające tlenowe procesy utleniania żelaza, a także bakterie redukujące azotany oraz fototrofy anoksygenowe, które utleniają żelazo(II) w warunkach beztlenowych.

Utlenianie związków żelaza w środowisku o odczynie neutralnym jest obserwowane w strefach przejściowych pomiędzy środowiskiem beztlenowym i tlenowym. Mikro-

organizmy wykorzystują jako źródło energii i/lub elektronów jony  $\text{Fe}^{2+}$ , przemieszczające się z warunków beztlenowych do warunków tlenowych, zanim żelazo zostanie utlenione przez tlen atmosferyczny. Bakterie żelazowe utleniając  $\text{Fe}^{2+}$  tworzą tzw. ochrę – rude osady tlenków i wodorotlenków żelaza, które są odkładane na zewnątrz komórki (fig. 1F). Większość znanych neutrofilnych bakterii żelazowych to mezofilne, tlenowe lub mikroaerofilne chemolitotrofy. Do najczęściej identyfikowanych przedstawicieli bakterii utleniających żelazo w środowiskach kopalnianych monokliny przedsudeckiej zaliczają się chemolitotroficzne Gram-ujemne bakterie *Gallionella ferruginea* oraz *Leptothrix ochracea* należące do klasy *Betaproteobacteria*. Komórka *G. ferruginea* ma charakterystyczny kształt fasoli i wytwarza słuzową helikalną wypustkę, w skład której wchodzi



**Fig. 7. Bakterie chemolitotroficzne utleniające zredukowane związki żelaza**

A – nóżka *Gallionella* sp. (strzałka; mikroskopia świetlna, pow.  $\times 40$ ); B – nóżki *Gallionella* sp. i rurki *Leptothrix* sp. (strzałki) inkrustowane wodorotlenkiem żelaza (elektronowa mikroskopia skaningowa); C, D – przekrój podłużny i poprzeczny przez rurki otaczające komórki *Leptothrix* sp. (elektronowa mikroskopia transmisyjna)

#### Chemolithotrophic bacteria oxidizing reduced iron compounds

A – twisted iron filament from *Gallionella* sp. (arrow; light microscopy, mag.  $\times 40$ ); B – twisted filament from *Gallionella* sp. and tubes of *Leptothrix* sp. (arrows) inlaid with iron hydroxide (scanning electron microscopy); C, D – longitudinal and cross ultrathin section through the tubes surrounding cells of *Leptothrix* sp. (transmission electron microscopy)

polisacharydy. Wypustka ta jest wtórnie inkrustowana tlenkami i wodorotlenkami żelaza, co można zaobserwować pod mikroskopem – spiralnie skręcona struktura (fig. 7A i B). Te same związki odkładają się na organicznych osłonkach nitkowej bakterii *L. ochracea* (fig. 7C i D).

Innym przedstawicielami tej grupy bakterii jest również Gram-ujemna *Sideroxydans lithotrophicus* i *Ferriphaselus amnicola* (*Betaproteobacteria*). Dodatkowo w niektórych zwietrzałych łupkach bitumicznych o odczynie kwaśnym zidentyfikowano bakterie acydofilne z rodzaju *Acidithiobacillus* (*Acidithiobacillus ferrooxidans*) (*Acidithiobacillia*) i *Acidiferrobacter* (*Gammaproteobacteria*) oraz *Leptospirillum ferrooxidans* (*Nitrospirae*).

W podziemnym środowisku kopalnianym monokliny przedsudeckiej występują także bakterie utleniające żelazo z jednoczesną redukcją azotanów w warunkach beztlenowych.

Przykładowymi rodzajami bakterii denitryfikacyjnych są Gram-ujemne *Azospira* sp. i *Dechloromonas* sp. Wymienione gatunki są fakultatywnymi beztlenowcami i należą do klasy *Betaproteobacteria*. Bakterie te używają związków nieorganicznych oraz organicznych jako donora elektronów, a tlen, chlorany, nadchlorany oraz azotany jako alternatywne akceptory elektronów.

Drugą grupą bakterii utleniającą zredukowane związki żelaza w warunkach beztlenowych są fototroficzne bakterie anoksygenowe reprezentowane przez purpurowe bakterie niesiarkowe (*Alphaproteobacteria*). Fotoautotroficzne utlenianie związków żelaza nie jest procesem dostarczającym energii. Bakterie anoksygenowe wykorzystują jony  $Fe^{2+}$  jako donora elektronów podczas procesu asymilacji  $CO_2$ . Wśród fototrofów anoksygenowych wykrytych w kopalniach monokliny przedsudeckiej są obecne bakterie należące do klasy *Alphaproteobacteria*, jak wspomniane wcześniej *Rhodopseudomonas*, *Rhodoplanes*, a także *Erythrobacter*.

#### MIKROORGANIZMY DYSYMLACYJNIE REDUKUJĄCE ZWIĄZKI ŻELAZA

Utlenione żelazo(III) może być wykorzystane przez mikroorganizmy jako końcowy akceptor elektronów. Proces ten zachodzi w warunkach beztlenowych i jest to tzw. oddychanie żelazowe. Dysymilacyjna redukcja żelaza jest jedną z ważniejszych form oddychania beztlenowego i przebiega według reakcji:  $0,5H_2 + Fe(OH)_3 \rightarrow Fe^{2+} + 2OH^- + H_2O$ . Proces ten jest związany z produkcją energii, aczkolwiek zysk energetyczny uzyskany w jego wyniku jest mniejszy niż z oddychania tlenowego. Uważa się, że dysymilacyjna redukcja żelaza, podobnie jak opisane wcześniej oddychanie siarkowe, jest jednym z najstarszych ewolucyjnie procesów dostarczających energię. Najlepiej poznanymi mikroorganizmami zdolnymi do oddychania żelazowego są heterotroficzne, Gram-ujemne, bezwzględnie beztlenowe bakterie z rodzaju *Geobacter* (*Deltaproteobacteria*) oraz fakultatywnie beztlenowe bakterie z rodzaju *Shewanella* (*Gammaproteobacteria*). Oba rodzaje bakterii zostały wykryte w kopalniach monokliny przedsudeckiej. Ponadto w kopalniach

miedzi zidentyfikowano beztlenową bakterię *Ferribacterium limneticum* należącą do klasy *Betaproteobacteria*.

#### MIKROORGANIZMY FOTOTROFICZNE OKSYGENOWE

Obok wspomnianych wcześniej fototrofów anoksygenowych badane środowisko podziemne zasiedlają również fototrofy oksygenowe, czyli cyjanobakterie – sinice (*Cyanobacteria*) należące do trzech klas (*Oscillatorioophycidae*, *Nostocales* i *Synechococcales*) i 17 rodzajów. Bakterie te absorbują energię świetlną za pomocą chlorofilu, a jako donora elektronów wykorzystują wodę, która jest rozkładana z wydzieleniem tlenu. Cyjanobakterie wykryte na powierzchni łupka, takie jak *Calothrix*, *Microcystis*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Scytonema* i *Tolypothrix*, przy braku światła są zdolne do wzrostu heterotroficznego.

#### MIKROORGANIZMY UTLENIAJĄCE ZWIĄZKI AZOTU (NITRYFIKACYJNE)

Mikroorganizmy nitryfikacyjne to najczęściej bezwzględne chemolitoautotrofy. Zredukowane związki azotu stanowią dla nich źródło energii i elektronów w łańcuchu oddechowym. Ze względu na rodzaj przeprowadzanej reakcji bakterie nitryfikacyjne można podzielić na dwie grupy – mikroorganizmy przeprowadzające utlenianie amoniaku do azotynu zgodnie z reakcją:  $NH_4^+ + 1,5O_2 \rightarrow NO_2^- + 2H^+ + H_2O$ , mające w nazwie przedrostek „Nitroso” (np. *Nitrosococcus*, *Nitrosomonas*) oraz przeprowadzające utlenianie azotynu do azotanu zgodnie z reakcją:  $NO_2^- + 0,5O_2 \rightarrow NO_3^-$ , mające w nazwie przedrostek „Nitro” (np. *Nitrobacter*, *Nitrococcus*). Bakterie nitryfikacyjne to ściśle tlenowce wiążące  $CO_2$  w cyklu Calvina. Charakteryzują się wolnym przyrostem biomasy oraz wykorzystywaniem dużych ilości substratów ze względu na krótki łańcuch oddechowy.

Bakterie nitryfikacyjne są różnicowane filogenetycznie, większość należy do czterech różnych klas typu *Proteobacteria*, jeden rodzaj *Nitrospira* jest zaliczany do typu *Nitrospirae* oraz jeden *Nitrolancea* do typu *Chloroflexi*. Do mikroorganizmów nitryfikacyjnych należą również archeony należące do typu *Thaumarchaeota* (np. *Nitrososphaera*, *Nitrosotalea*). W badanym środowisku kopalnianym występują bakterie utleniające amoniak należące do rodzaju *Nitrospira* (*Nitrospirae*) oraz bakterie utleniające azotyny należące do rodzaju *Nitrosomonas* i *Nitrosospira* (*Proteobacteria*), a także wspomniane archeony *Nitrososphaera*.

#### MIKROORGANIZMY REDUKUJĄCE ZWIĄZKI AZOTU (DENITRYFIKACYJNE)

Mikroorganizmy mogą redukować związki azotu w procesie zwanym denitryfikacją lub oddychaniem azotanowym. W procesie denitryfikacji utlenione związki azotu są alternatywnym akceptorem elektronów w łańcuchu oddechowym i ulegają redukcji do produktów gazowych zgodnie z reakcją:  $NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO \rightarrow N_2O \rightarrow N_2$ . Łańcuch oddechowy



w oddychaniu azotanowym jest jednak krótszy niż w oddychaniu tlenowym, co skutkuje mniejszym zyskiem energetycznym procesu.

Mikroorganizmy przeprowadzające denitryfikację są zróżnicowane filogenetycznie i metabolicznie. Do denitryfikatorów należą bakterie i archeony. Wśród bakterii oddychanie azotanowe przeprowadzają przedstawiciele sześciu typów, z czego pięć klas należy do typu *Proteobacteria*. Większość bakterii oddychających azotanami to warunkowe tlenowce, ale są wśród nich również beztlenowce. Prawie wszystkie denitryfikatory to chemoorganotrofy, które wykorzystują związki organiczne jako źródło energii i donor elektronów. Bakterie z rodzaju *Pseudomonas* występują powszechnie i mogą być uważane za najaktywniejsze denitryfikatory w środowisku naturalnym. W badanym środowisku kopalnianym wykryto wiele gatunków bakterii z rodzaju *Pseudomonas* mogących przeprowadzać denitryfikację, np. *Pseudomonas stutzeri* oraz *Pseudomonas balearica*.

W kopalniach monokliny przedsudeckiej wykryto obecność bakterii denitryfikacyjnych należących do typu *Proteobacteria*: *Deftuviimonas denitrificans*, *Sulfurimonas denitrificans*, *Bradyrhizobium denitrificans*, *Thiobacillus denitrificans*, w tym bakterie halofilne *Halovibrio denitrificans*, *Thiohalorhabdus denitrificans* i *Halospina denitrificans*.

#### MIKROORGANIZMY WIĄŻĄCE AZOT ATMOSFERYCZNY – DIAZOTROFY

Mikroorganizmy potrafią pobierać azot z różnorodnych źródeł (amoniak, aminokwasy, azotan, azot cząsteczkowy, mocznik, związki pochodzenia biogenego zawierające azot, np. aminocukry, puryny, pirymidyny). Zdolność do wiązania azotu atmosferycznego (diazotrofia) to unikatowa cecha bakterii i archeonów – zachodzi tylko wtedy, gdy w środowisku nie ma innych dostępnych źródeł azotu. Do mikro-

organizmów wiążących azot atmosferyczny należą gatunki wolnożyjące, jak i symbionty innych organizmów, głównie roślin. Diazotrofy to grupa zróżnicowana pod względem fizjologicznym. Do bakterii wiążących azot należą tlenowce oraz beztlenowce będące przedstawicielami różnorodnych typów metabolicznych.

W środowisku kopalnianym wykryto obecność bakterii wiążących azot swobodnie żyjących w wodach i glebie z rodzaju *Clostridium* (*Firmicutes*), *Spirochaeta* (*Spirochaetes*) oraz *Acidithiobacillus* (*Proteobacteria*) oraz bakterie żyjące w symbiozie z roślinami motylkowymi z rodzaju *Bradyrhizobium* (*Proteobacteria*). Stwierdzono, że występują również diazotrofy beztlenowe, fotosyntetyzujące, z rodzaju *Rhodobacter* (*Proteobacteria*).

W metaproteomie mikroorganizmów kopalnianych wykryto nitrogenazy, kompleksy enzymatyczne, które są niezbędne do przeprowadzenia procesu asymilacji azotu. Nitrogenazy są wrażliwe na tlen, dlatego mikroorganizmy wykształciły różnorodne strategie ochrony tych enzymów. Bakterie wiążące azot żyją w beztlenowych warstwach mat mikrobialnych, np. *Clostridium* sp., *Spirochaeta* sp. Mikroorganizmy żyjące w symbiozie z roślinami motylkowymi zasiedlają te części rośliny, które charakteryzują się niskim stężeniem tlenu. Diazotrofy wykryte na zwietrzałym łupku bitumicznym Kupferschiefer mogą żyć w porach tej skały, gdzie stężenie tlenu jest dużo niższe lub panują warunki beztlenowe.

Mikroorganizmy wiążące azot atmosferyczny odgrywają istotną rolę w biogeochemicznym cyklu tego pierwiastka. W wyniku działalności diazotrofów dochodzi do zwiększenia łatwo dostępnych związków azotu w środowisku (związki amonowe, białka). W miejscach ubogich w przyswajalny biologicznie azot, jak podziemne kopalnie, diazotrofy są organizmami pionierskimi i zazwyczaj stanowią istotną część populacji, co również potwierdziły badania terenowe autorów (Dashtin i in., 2015).

### PROCESY GEOMIKROBIOLOGICZNE W ŚRODOWISKACH KOPALNIANYCH MONOKLINY PRZEDSUDECKIEJ I ICH ROLA W TRANSFORMACJI ŁUPKA BITUMICZNEGO KUPFERSCHIEFER

W podziemnych kopalniach miedzi monokliny przedsudeckiej możemy zaobserwować liczne „dowody” aktywności mikroorganizmów. Do najważniejszych i najbardziej dostrzegalnych zalicza się widoczne makroskopowo zmiany łupka bitumicznego Kupferschiefer (fig. 8), które nie mają charakteru lokalnego, a występują na całym obszarze kopalń, zwłaszcza w starszych wyrobiskach.

Badania fizyko- i geochemiczne zwietrzałych łupków bitumicznych Kupferschiefer wskazują na istotne zmiany w ich właściwościach fizycznych i składzie geochemicznym. Zwykle zwietrzały łupek charakteryzuje się alkalicznym odczynem (pH 8,0–8,5), chociaż w niektórych rejonach obserwuje się także zakwaszenie (pH 4,0–5,5) oraz zdecydowanie wyższym potencjałem oksydoredukcyjnym (200–300 mV).

Typową cechą zwietrzałych łupków jest także znacznie większa porowatość (8–16%) i zasolenie (5–60 g NaCl/kg). Najważniejsze obserwowane zmiany dotyczą jednak składu geochemicznego, w tym składu pierwiastkowego i mineralogicznego, a także składu materii organicznej. Przypuszcza się, że zmiany te mogą być spowodowane czynnikami abiotycznymi (tlen, woda), ale także, a może przede wszystkim, aktywnością mikroorganizmów. Przedstawione wyniki badań różnorodności filogenetycznej mikroorganizmów zasiedlających kopalnie miedzi monokliny przedsudeckiej, głównie łupka bitumicznego Kupferschiefer, wskazują na potencjalną rolę podziemnej biosfery w przemianach geochemicznych. Dodatkowo wyniki badań metagenomowych, metaproteomicznych i metabolomicznych, zarówno terenowych, jak

i laboratoryjnych, potwierdzają jednoznacznie, że mikroorganizmy zasiedlające podziemne kopalnie miedzi monokliny przedsudeckiej wpływają na skład geochemiczny łupka bitumicznego Kupferschiefer, a także mają wpływ na skład chemiczny wód podziemnych. Przemiany dwóch głównych komponentów Kupferschiefer – organicznych związków węgla oraz nieorganicznych zredukowanych związków siarki, należy wyróżnić jako te, w których mikroorganizmy odgrywają kluczową rolę.

#### MIKROBIOLOGICZNE PRZEMIANY ORGANICZNYCH ZWIĄZKÓW WĘGLA

Pierwotna kopalna materia organiczna jest wykorzystywana przez mikroorganizmy heterotroficzne opisane wcześniej jako źródło węgla i energii. Aktywność metaboliczna mikroorganizmów heterotroficznych oparta głównie na tlenowej enzymatycznej degradacji węglowodorów alifatycznych i aromatycznych prowadzi do wietrzenia materii organicznej. W zwietrzalnych skałach obserwuje się zmniejszenie ilości węglowodorów alifatycznych (do 40%) i aromatycznych (do 80%), a jednocześnie wzrost zawartości utlenionych związków organicznych (40–70%). Wśród utlenionych związków organicznych powstałych przy udziale bakterii są alkohole (mono-, di- i trihydroksylowe), aldehydy, kwasy organiczne (mono- i dikarboksyłowe), estry i ketony. Jednocześnie obserwuje się wzrost zawartości węglowodorów ekstrahowalnych (bituminu) (200–300%). Prawdopodobnie źródłem tych węglowodorów jest kerogen, który pod wpływem mikroorganizmów ulega utlenieniu. Kerogen w zwietrzalnych łupkach bitumicznych charakteryzuje się znacznie wyższym indeksem tlenowym (do 450%), a jednocześnie niższym indeksem wodorowym (do 90%), co świadczy o zmianach jego stopnia dojrzałości, a także potencjału węglowodorowego. Zwietrzałe skały są zdominowane przez całkowicie nieproduktywny i pozbawiony wodoru rezidualny i geochemicznie zmieniony kerogen typu III lub IV, który najczęściej uznaje się jako produkt silnej chemicznej i/lub biologicznej degradacji kerogenu odpowiednio typu II lub III. Biologiczna degradacja kerogenu przez mikroorganizmy zasiedlające łupkę bitumiczny Kupferschiefer oraz zmiany w składzie chemicznym kopalnej materii organicznej Kupferschiefer zostały jednoznacznie potwierdzone w eksperymentach laboratoryjnych (Matlakowska i in., 2010; Matlakowska, Skłodowska, 2011; Matlakowska i in., 2013). W badaniach laboratoryjnych wskazano także potencjalną rolę mikroorganizmów w biotransformacji geoporfiryn występujących w łupku bitumicznym (Matlakowska, Skłodowska, 2009a).

Dodatkowo, przemiany materii organicznej prowadzą również do mobilizacji związków węgla do wód oraz wtórnych osadów naskalnych (fig. 1B, D i E). Utlenione związki organiczne są wykorzystywane jako źródło węgla przez tlenowe i beztlenowe mikroorganizmy heterotroficzne, które wtórnie zasiedlają środowisko.

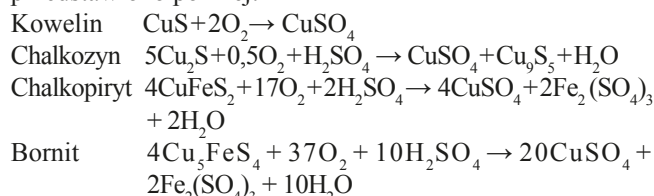


Fig. 8. Zwietrzały łupek bitumiczny Kupferschiefer (kopalnia Lubin)

Weathered Kupferschiefer black shale (Lubin mine)

#### MIKROBIOLOGICZNE PRZEMIANY NIEORGANICZNYCH ZREDUKOWANYCH ZWIĄZKÓW SIARKI

Bakterie odgrywają ważną rolę w procesach enzymatycznego i nieenzymatycznego wietrzenia minerałów rudnych. Nieorganiczne zredukowane związki siarki są wykorzystywane przez mikroorganizmy chemolitotroficzne, czyli bakterie siarkowe i żelazowe opisane wcześniej jako źródło energii i elektronów. Aktywność tej grupy metabolicznej mikroorganizmów prowadzi do enzymatycznego utlenienia minerałów siarczkowych, co skutkuje zmniejszeniem zawartości siarki siarczkowej, w tym pirytowej (do 90%), a jednocześnie wzrostem stężenia siarki siarczanowej (do 3000%). Przykładowe reakcje bioutleniania siarczków miedzi przeprowadzane przez mikroorganizmy chemolitotroficzne przedstawiono poniżej:



Procesom tym towarzyszy mobilizacja siarczanów do wód podziemnych. Dodatkowo obserwuje się redystrybucję innych pierwiastków występujących w łupku bitumicznym, w tym metali ziem rzadkich (lantanowce i skandowce), metali szlachetnych (złoto, srebro), żelaznych (Fe, Ti, V, Mn, Co, Ni, W, Mo), nieżelaznych (Cu, Zn, Ga, As, Cd, Sn, Sb, Hg, Pb, Tl, Bi), promieniotwórczych (U), alkalicznych (Li, Be, Na, Mg, Al, K, Ca, Sr, Sc, Ba) oraz niemetalu (C, N, Si, P, S, Se, Te) (dane niepublikowane).

Na powierzchni zwietrzalnych łupków zidentyfikowano liczne minerały, przede wszystkim siarczany (np. gips, anglezyt), węglany (np. malachit), a także chlorki (np. halit, atakamit, kotunit). Większość z tych minerałów zawiera miedź i ołów. Można przypuszczać, że część minerałów wtórnych występujących na powierzchni zwietrzalnych łupków to biominerały powstałe w wyniku mineralizacji indukowanej biologicznie. Tworzenie wtórnych siarczków

miedzi i siarczanów przy udziale mikroorganizmów zostało potwierdzone eksperymentalnie w warunkach laboratoryjnych (Matlakowska i in., 2012).

Wykazano również, że siarczki miedzi występujące w łupku bitumicznym Kupferschiefer mogą ulegać wietrzeniu pod wpływem związków organicznych powstających w wyniku rozkładu kopalnej materii organicznej oraz metabolitów bakteryjnych (Matlakowska i in., 2012;

Matlakowska i in., 2014; Włodarczyk i in., 2015; Włodarczyk i in., 2016). Wśród tych związków zidentyfikowano wiele metabolitów aktywnych w procesach acydolizy (kwasy organiczne), kompleksolizy (siderofory), redoksolizy (związki redoks aktywne), a także związków powierzchniowo czynnych. Do najciekawszych należy fenazyne, ester tributylowy kwasu fosforowego, estry kwasu ftalowego, dodekanol, a także mocznik.

## PODSUMOWANIE

Podziemne kopalnie rud miedzi są unikalnymi środowiskami endemicznymi i dlatego ich poznanie ma dla biologii dużą wartość naukową. Mikroorganizmy zasiedlające podziemne środowiska kopalniane, a zwłaszcza multitroficzne zespoły mikroorganizmów, wykazują wiele unikatowych cech fizjologicznych niespotykanych u mikroorganizmów naziemnych, przez co mają one ogromne znaczenie aplikacyjne, które może znacząco usprawnić metody metalurgiczne.

Przeprowadzone badania terenowe umożliwiły poznanie różnorodności filogenetycznej, fizjologicznej i metabolicznej mikrobiocenozy podziemnych kopalń miedzi na monoklinie przedsudeckiej. Wskazano główne grupy troficzne mikroorganizmów kluczowe dla przemian geochemicznych łupka bitumicznego Kupferschiefer. Dodatkowo poznano kilka unikatowych zespołów mikroorganizmów złożonych z różnych rodzajów mikroorganizmów reprezentujących różne strategie metaboliczne. Przypuszcza się, że właśnie takie zespoły mikroorganizmów występujące w formie biofilmów na skałach (fig. 1G) oraz w formie mat mikrobialnych w wodach podziemnych (fig. 1C i H) odgrywają kluczową rolę w kształtowaniu litosfery, hydrosfery i atmosfery. Szczegółowa analiza bioinformatyczna metagenomów i metaproteomów tych zespołów umożliwi w przyszłości precyzyjne określenie tej roli.

Przemiany biogeochemiczne łupka bitumicznego Kupferschiefer przez bakterie heterotroficzne, degradujące kopalną materię organiczną, oraz chemolitotrofy, utleniające minerały siarczkowe, inicjują dalszy ciąg procesów mikrobiologicznych oraz sukcesję mikroorganizmów. Do najważniejszych z nich należy biodegradacja utlenionych związków

organicznych przez beztlenowe bakterie fermentacyjne oraz bakterie redukujące siarczany czy związki żelaza oraz azotu.

Na podstawie uzyskanych wyników badań możliwe jest również wskazanie potencjału biotechnologicznego mikrobiocenozy podziemnej. W wyniku przeprowadzonych badań terenowych i laboratoryjnych opracowano teoretyczne podstawy biotechnologii odzysku metali z miedziośnych łupków bitumicznych. Przypuszcza się, że degradacja kopalnej materii organicznej przez wybrane mikroorganizmy heterotroficzne mogłaby skutecznie zwiększyć efektywność wzbogacenia rud miedzi w procesie flotacji. Również mikrobiologiczne procesy enzymatycznego i nieenzymatycznego rozkładu minerałów rudnych mają potencjał biotechnologiczny. Procesy te mogą także znaleźć zastosowanie w zagospodarowaniu odpadów przemysłu metalurgicznego, zawierających łupki bitumiczne. W ramach przeprowadzonych badań uzyskano kolekcję tlenowych i beztlenowych mikroorganizmów, w tym również konsorcja mikrobiologiczne o znaczącym potencjale biotechnologicznym.

**Podziękowania.** Autorzy dziękują KGHM Polska Miedź S.A. za umożliwienie prowadzenia badań w podziemnych kopalniach miedzi oraz pomoc w ich realizacji. Szczególne podziękowania są kierowane do Pana dr. Wojciecha Kaczmarska za pomoc w organizacji ekspedycji naukowej oraz Panów: Grzegorza Bidzińskiego, Artura Kuczaka, Jarosława Suchana i Alberta Włocha za pomoc w poborze materiału badawczego.

*Badania prowadzono w ramach projektu OPUS finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (2012/07/B/NZ8/01904).*

## LITERATURA

- BERLENDIS S., BEYSSAC O., DERENNE S., BENZERARA K., ANQUETIL C., GUILLAUMET M., ESTEVE I., CAPELLE B., 2014 — Comparative mineralogy, organic geochemistry and microbial diversity of the Autun black shale and Graissessac coal (France). *Int. J. Coal. Geol.*, **132**: 147–157.
- BRYNER L.C., BECK J.V., DAVIS B.B., WILSON D.G., 1954 — Microorganisms in leaching sulfide minerals. *Ind. Eng. Chem.*, **46**, 12: 2587–2592.
- BÜRGMANN H., 2011 — Methane Oxidation (Aerobic). *W: Encyclopedia of Geobiology* (red. J. Reitner, V. Thiel): 575–578. Dordrecht, Springer Netherlands ([https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9212-1\\_139](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9212-1_139)).
- DASHTI N., ALI N., ELIYAS M., KHANAFER M., SORKHOH N.A., RADWAN S.S., 2015 — Most hydrocarbonoclastic bacteria in the total environment are diazotrophic, which highlights their value in the bioremediation of hydrocarbon contaminants. *Microbes Environ.*, **30**, 1: 70–75.
- FUCHS G., BOLL M., HEIDER J., 2011 — Microbial degradation of aromatic compounds - from one strategy to four. *Nat. Rev. Microbiol.*, **9**, 11: 803–816.



- JI Y., MAO G., WANG Y., BARTLAM M., 2013 — Structural insights into diversity and n-alkane biodegradation mechanisms of alkane hydroxylases. *Front. Microbiol.*, **4**, 58: 1–13.
- KARLICKI M., 2015 — Mikroorganizmy halotolerancyjne zasiedlające podziemne kopalnie miedzi monokliny przedsudeckiej – znaczenie w procesach biogeochemicznych w podziemnym środowisku kopalnianym [pr. licen.]. Wydział Biologii UW, Warszawa.
- LAU M.C.Y., KIEFT T.L., KULOYO O., LINAGE B., VAN HEERDEN E., LINDSAY M.R., MAGNABOSCO C., WANG W., WIGGINS J.B., GUO L., PERLMAN D.H., KYIN S., SHWE H.H., HARRIS R.L., OH Y., YI M.J., ONSTOTT T.C., 2016 — An oligotrophic deep subsurface community dependent on syntrophy is dominated by sulfur-driven autotrophic denitrifiers. *PNAS (USA)*, **113**, 49. Doi: 10.1073/pnas.1612244113.
- LI J., SUN W., WANG S., SUN Z., LIN S., PENG X., 2014 — Bacteria diversity, distribution and insight into their role in S and Fe biogeochemical cycling during black shale weathering. *Environ. Microbiol.*, **16**, 11: 3533–3547.
- MADIGAN M.T., MARTINKO J.M., DUNLAP P.V., CLARK D.P., 2008 — Brock Biology of Microorganisms, 12th edn. Pearson Higher Education, New York.
- MATLAKOWSKA R., SKŁODOWSKA A., 2009a — Uptake and degradation of copper and cobalt porphyrins by indigenous microorganisms of Kupferschiefer. *Hydrometallurgy*, **104**, 501–505.
- MATLAKOWSKA R., SKŁODOWSKA A., 2009b — The culturable bacteria isolated from organic-rich black shale potentially useful in biometallurgical procedures. *J. Appl. Microbiol.*, **107**, 3: 858–866.
- MATLAKOWSKA R., SKŁODOWSKA A., 2011 — Biodegradation of Kupferschiefer black shale organic matter (Fore-Sudetic Monocline, Poland) by indigenous microorganisms. *Chemosphere*, **83**, 9: 1255–1261.
- MATLAKOWSKA R., DREWNIĄK L., SKŁODOWSKA A., 2008 — Arsenic hypertolerant *Pseudomonads* isolated from ancient gold mine and cooper bearing black shale ore. *Geomicrobiol. J.*, **25**: 357–362.
- MATLAKOWSKA R., NARKIEWICZ W., SKŁODOWSKA A., 2010 — Biotransformation of organic-rich copper bearing black shale ore by indigenous microorganisms isolated from Lubin copper mine (Poland). *Environ. Sci. Technol.*, **44**, 7: 2433–2440.
- MATLAKOWSKA R., RUSZKOWSKI D., SKŁODOWSKA A., 2013 — Microbial transformations of fossil organic matter of Kupferschiefer black shale - elements mobilization from metalloorganic compounds and metalloporphyrins by a community of indigenous microorganisms. *Physicochem. Probl. Miner. Process.*, **49**, 1: 223–231.
- MATLAKOWSKA R., SKŁODOWSKA A., NEJBERT K., 2012 — Bioweathering of Kupferschiefer black shale (Fore-Sudetic Monocline, SW Poland) by indigenous bacteria: implication for dissolution and precipitation of minerals in deep underground mine. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **81**, 1: 99–110.
- MATLAKOWSKA R., WŁODARCZYK A., SŁOMIŃSKA B., SKŁODOWSKA A., 2014 — Extracellular elements-mobilizing compounds produced by consortium of indigenous bacteria isolated from Kupferschiefer black shale – implication for metals biorecovery from neutral and alkaline polymetallic ores. *Physicochem. Probl. Miner. Process.*, **50**, 1: 87–96.
- MOSER D.P., GIHRING T.M., BROCKMAN F.J., FREDRICKSON J.K., BALKWILL D.L., DOLLHOPF M.E., SHERWOOD-LOLLAR B., PRATT L.M., BOICE E., SOUTHAM G., WANGER G., BAKER B.J., PFIFFNER S.M., LIN L.H., ONSTOTT T.C., 2005 — *Desulfotomaculum* and *Methanobacterium* spp. dominate a 4- to 5-kilometer deep fault. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 12: 8773–8783.
- PETSCH S.T., EGLINTON T.I., EDWARDS K.J., 2001 — <sup>14</sup>C-dead living biomass: evidence for microbial assimilation of ancient organic carbon during shale weathering. *Science*, **292**, 5519: 1127–1131.
- PETSCH S.T., EDWARDS K.J., EGLINTON T.I., 2005 — Microbial transformations of organic matter in black shales and implications for global biogeochemical cycles. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.*, **219**: 157–170.
- RAJPERT L., SKŁODOWSKA A., MATLAKOWSKA R., 2013 — Biotransformation of copper from Kupferschiefer black shale (Fore-Sudetic Monocline, Poland) by yeast *Rhodotorula mucilaginosa* LM9. *Chemosphere*, **91**, 9: 1257–1265.
- RICKARD D., 2012 — Sulfidic sediments and sedimentary rocks. Development of sedimentology (red. A.J. Van Loon). Vol. 65. Elsevier, Amsterdam.
- SZEWCZYK U., SZEWCZYK R., STENSTRÖM T.A., 1994 — Thermophilic, anaerobic bacteria isolated from a deep borehole in granite in Sweden. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 5: 1810–1813.
- TOURTELOT H.A., 1979 — Black shale deposition and diagenesis. *Clays Clay Miner.*, **27**: 313–321.
- WHITMAN W.B., COLEMAN D.C., WIEBE W.J., 1998 — Prokaryotes: The unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 12: 6578–6583.
- WŁODARCZYK A., STASIUK R., SKŁODOWSKA A., MATLAKOWSKA R., 2015 — Extracellular compounds produced by bacterial consortium promoting elements mobilization from polymetallic Kupferschiefer black shale (Fore-Sudetic Monocline, Poland). *Chemosphere*, **122**: 273–279.
- WŁODARCZYK A., SZYMAŃSKA A., SKŁODOWSKA A., MATLAKOWSKA R., 2016 — Determination of factors responsible for the bioweathering of copper minerals from organic-rich copper-bearing Kupferschiefer black shale. *Chemosphere*, **148**: 416–425.

## SUMMARY

Microbial processes dominate geochemical cycles on the Earth today. Biogenic weathering of rocks, minerals and fossil organic matter and, on the other hand, biogenic mineralization are key components of the global cycle of elements on the Earth's near-surface and subsurface. They affect the lithosphere and control the oxygen concentration in the atmosphere as well as the chemistry of waters. A special role in these processes is played by microorganisms inhabiting the deep subsurface of the lithosphere. It is estimated that they represent approx. 90% of all microorganisms living on the Earth. They include bacteria, archaea and fungi belonging to different phylogenetic groups and representing different metabolic and physiological strategies.

The area of Fore-Sudetic Monocline (SW Poland) provides a unique underground environment that has arisen during the Kupferschiefer copper ore exploitation. It is one of the largest underground environments in the world. Mining activities conducted since 1968 led to the formation of thousands of kilometres of corridors in the area of approx. 158 km<sup>2</sup>, located at a depth of 300–1200 metres. This environment can be classified as endemic and extreme. Microbial growth is supported by the geochemistry of the Kupferschiefer deposit, which is a sedimentary rock rich in fossil organic matter and sulphide minerals, as well as by high humidity and optimal temperature prevailing in the mines.

The study deals with the geomicrobiology of three subsurface copper mines located in this region (Lubin, Polkowice-Sieroszowice and Rudna). Fifty samples were collected from these mines. They included secondary mineral precipitates and microbial biofilms found on the rock surface as well as in water and bottom sediments. The samples were collected from different depths (300–1200 m) and represented different physicochemical properties (pH, temperature, humidity). Geochemical and microbiological studies of the samples were performed. The former involved the analysis of elemental, mineral and organic composition. The microbiological studies comprised metagenomics, metaproteom-

ics and metabolomics, as well as isolation and identification of culturable microorganisms.

The microbiological studies allowed us to discover 24 phyla of bacteria, two phyla of archaea, and two phyla of fungi. The most common microorganisms inhabiting the underground mines were Gram-negative *Proteobacteria*, particularly *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria* and *Betaproteobacteria*. In addition, bacteria belonging to other phyla, such as Gram-positive *Actinobacteria* and *Firmicutes*, were detected. These microorganisms represent different physiological and metabolic strategies. They were mainly aerobes, however facultative anaerobes were also found. Among them, mesophiles, thermophiles, alkaliphiles and halophiles were detected. The majority of the isolated bacteria were organoheterotrophs, however, facultative chemolithotrophs oxidizing the reduced S and Fe compounds were also found. Proteins detected in the studied samples confirm the role of microorganisms in the colonization and biotransformation of the polymetallic ore as well as in the adaptation to extreme conditions found in this environment, such as high concentration of heavy metals and high salinity. We identified the enzymes (*e.g.*, oxygenases, laccases and dehydrogenases), involved in the oxidative degradation of primary organic compounds, included in the fossil organic matter of the black shale (*e.g.*, long-chain aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons). The biooxidation of bitumens and the change of kerogen type and its hydrocarbon potential are shown. The redistribution of primary fossil organic carbon and the presence of secondary oxidized organic compounds (*e.g.*, carboxylic acids, alcohols, aldehydes, ketones and esters) in the weathered black shale is confirmed. Simultaneously, the reduced inorganic sulphur compounds were oxidized by neutrophilic and alkaliphilic chemolithotrophic bacteria. The geochemical consequences of microbial activity were the oxidation of primary fossil organic matter, the dissolution of massive concentration of sulphide mineral, and the redistribution of a number of elements.