

# Bakterie siarkowe zasiedlające czarny lupek Kupferschiefer i ich znaczenie w przemianach nieorganicznych zredukowanych związków siarki

Renata Matlakowska, Wioletta Piotrowska

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

---

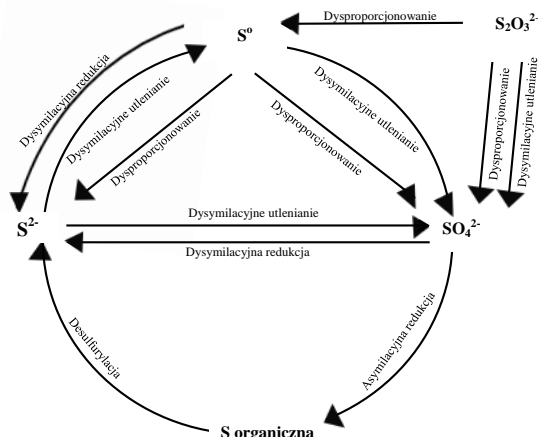
## Streszczenie

Prezentowana praca przeglądowa omawia wyniki badań podstawowych prowadzonych na obszarze podziemnych kopalni miedzi monokliny przedsudeckiej. Czarny lupek Kupferschiefer stanowi jedno z najbogatszych złóż zredukowanych związków siarki na Ziemi i jednocześnie jest jednym z najciekawszych środowisk zasiedlanych przez bakterie siarkowe, które wykorzystują zredukowane związki siarki, jako źródło energii i/lub elektronów. W pracy przedstawiono różnorodność taksonomiczną, fizjologiczną i metaboliczną bakterii siarkowych wykrytych w tym endemicznym środowisku podziemnym. Wśród bakterii siarkowych zasiedlających Kupferschiefer są chemolitotrofy, takie jak *Thiobacillus* spp., *Thiothrix* spp., *Beggiatoa* spp., a także fototrofy anoksygenne m.in. *Chloroflexus* spp. i *Chlorobium* spp. W metaproteomie i metagenomie bakterii występujących w kopalniach miedzi zidentyfikowano enzymy zaangażowane w procesy utleniania związków siarki. Wykryto m.in. oksydoreduktazę siarczkowo-chinonową oraz flawocytochromową dehydrogenazę siarczkową odpowiedzialne za utlenienie siarczków do siarki pierwiastkowej. Ważną grupę enzymów stanowi system TOMES, do którego zaliczane są białka SoxX, SoxA, SoxB, SoxC, SoxD, SoxY i SoxZ związane przede wszystkim z procesami utleniania i dysproporcjonowania tiosiarcznanu. Innymi zidentyfikowanymi enzymami są reduktaza APS, adenylotransferaza siarczanowa oraz oksydoreduktaza siarczynowa zaangażowane w dwa znane szlaki utleniania siarczynów do siarczanów. Aktywność metaboliczna bakterii siarkowych prowadzi do lokalnego zakwaszenia środowiska oraz rozpuszczania minerałów siarczkowych, co skutkuje mobilizacją m.in. siarki, żelaza oraz miedzi do wód podziemnych, a także tworzeniem minerałów wtórnych, takich jak gips i malachit oraz gromadzeniem siarki pierwiastkowej. Powstanie utlenionych związków siarki w omawianym środowisku umożliwia rozwój bakterii redukujących siarczany, co skutkuje kolejnymi przemianami geochemicznymi prowadzącymi nie tylko do powstawania siarkowodoru w środowisku kopalnianym, ale także powstawania wtórnych siarczków, takich jak piryt framboidalny.

## 1. Mikrobiologiczne przemiany związków siarki

Mikroorganizmy prokariotyczne odgrywają ważną rolę w przemianach związków siarki na Ziemi; jako jedyne żywe organizmy są zdolne do bezpośredniego enzymatycznego utleniania i redukcji organicznych i mineralnych związków siarki (Rys. 1) (Ulrich i in., 1998; Ehrlich i Newman, 2009; Madigan i in., 2015). Siarka jest pierwiastkiem biogennym; wchodzi w skład aminokwasów, witamin, i wielu enzymów. Mikroorganizmy asymilują ten pierwiastek najczęściej z utlenionych jej związków w procesie asymilacyjnej redukcji. Utlenione związki siarki są wykorzystywane także przez mikroorganizmy heterotroficzne, jako ostateczny akceptor elektronów w środowiskach beztlenowych. Proces ten nosi nazwę dysymilacyjnej redukcji lub oddychania siarczanowego/siarkowego i jest przeprowadzany przez bakterie i archeony redukujące siarczany/siarkę. W wyniku tego procesu powstają siarczki, w tym

siarkowodór, a także jak się przypuszcza piryty framboidalne (Konhauser, 2007). Wiele mikroorganizmów prokariotycznych bierze udział w rozkładzie organicznych związków siarki do zredukowanych form mineralnych w procesie desulfurylacji.



Rys. 1. Mikrobiologiczne przemiany organicznych i nieorganicznych związków siarki

Zredukowane związki siarki są natomiast wykorzystywane przez mikroorganizmy prokariotyczne, jako źródło energii i/lub elektronów w procesie dysymilacyjnego utleniania. Proces ten przeprowadzają mikroorganizmy chemolitotroficzne i fototrofy anoksygenne. Końcowym produktem dysymilacyjnego utleniania są siarczany. Mikroorganizmy przeprowadzają także procesy dysproporcjonowania siarki pierwiastkowej i tiosiarczanu. W wyniku tych procesów powstają odpowiednio, siarczki i siarczany oraz siarka pierwiastkowa i siarczany.

Większość z wymienionych przemian związków siarki zachodzi zarówno w środowiskach tlenowych, jak i beztlenowych. Jedyne procesy dysymilacyjnej redukcji siarki i siarczanów oraz procesy fotolitotroficznego dysymilacyjnego utleniania związków siarki przez fototrofy anoksygenne zachodzą wyłącznie w środowiskach beztlenowych.

Niezwykle istotnym elementem mikrobiologicznych przemian związków siarki jest powstawanie intermedatów, takich jak siarczyny i polisiarczki oraz produkty powstające w wyniku przemian chemicznych, takie jak tiosiarczany. Siarczyny powstają w procesach dysymilacyjnego utleniania siarczków i siarki pierwiastkowej, jak również w procesach dysymilacyjnej i asymilacyjnej redukcji siarczanów. Polisiarczki natomiast są intermediatem pośrednim w procesie dysymilacyjnego utleniania siarczków do siarki pierwiastkowej, a także w procesie dysproporcjonowania siarki (Findlay, 2016). Tiosiarczan może powstać w wyniku reakcji chemicznej pomiędzy siarczynami a siarką pierwiastkową, które powstają w rezultacie przemian mikrobiologicznych (Chen i Morris, 1972; Mora i in., 2016). Metabolitem pośrednim w tym procesie są także polisiarczki ( $S_x^{2-}$ ):  $S^0 + SO_3^{2-} \rightarrow S_x^{2-} + 3/2O_2 \rightarrow S_2O_3^{2-} + (x-2)S^0$ . Tiosiarczany podobnie jak siarka pierwiastkowa i polisiarczki są wykorzystywane przez mikroorganizmy po wyczerpaniu zasobów siarczków w środowisku.

Mikroorganizmy siarkowe wpływają w istotny sposób na zawartość związków siarki w wodach, a także w skałach osadowych. Na przykład, utleniając siarkowodór powstający

w wyniku rozkładu materii organicznej mikroorganizmy przyczyniają się do zatrzymania siarki w wodach, z kolei powstające siarczany są ważnym akceptorem elektronów umożliwiającym rozkład materii organicznej w warunkach beztlenowych. Utlenianie złóż siarczkowych prowadzi do mobilizacji pierwiastków sulfofilnych, a także do tworzenia pokładów siarki pierwiastkowej.

Oba procesy – mikrobiologicznego utleniania i redukcji związków siarki znajdują zastosowanie w biotechnologii – odpowiednio w bioługowaniu metali z rud siarczkowych i bioremediacji środowisk skażonych metalami ciężkimi.

## 2. Dysymilacyjne utlenianie związków siarki przez mikroorganizmy prokariotyczne

Mikroorganizmy prokariotyczne utleniają zredukowane związki siarki, takie jak siarczki, siarka pierwiastkowa, siarczyny i tiosiarczany (Suzuki i in., 1994). W procesach tych mikroorganizmy wykorzystują tlen jako akceptor elektronów, ale także azotany. Procesy dysymilacyjnego utleniania przebiegają według reakcji:

Warunki tlenowe:

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

Warunki beztlenowe:

- utlenianie siarczku do siarczanu:  $\text{H}_2\text{S} + \text{NO}_3^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{SO}_4^{2-} + \text{NH}_4^+$
- utlenianie siarki do siarczanu:  $\text{S}^0 + 3\text{NO}_3^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{SO}_4^{2-} + 3\text{NO}_2^- + 2\text{H}^+$

W procesach utleniania zredukowanych związków siarki uczestniczą zarówno bakterie, jak i archeony (Madigan i in., 2015). Są wśród nich bakterie i archeony chemolitoautotroficzne (warunkowe i bezwzględne) oraz anoksygenne bakterie fotolitoautotroficzne (fotoautotrofy). Bakterie chemolitotroficzne, nazywane bezbarwnymi bakteriami siarkowymi oraz archeony wykorzystują zredukowane związki siarki jako źródło energii i elektronów, a fototrofy anoksygenne tylko jako źródło elektronów (wykorzystują energię światła). Bakterie i archeony chemolitotroficzne występują w środowiskach tlenowych i beztlenowych, a bakterie fototroficzne utleniające związki siarki wyłącznie w środowiskach beztlenowych. Również niektóre bakterie heterotroficzne – chemolithoheterotrofy – wykorzystują związki siarki jako źródło energii i elektronów (Madigan i in., 2015).

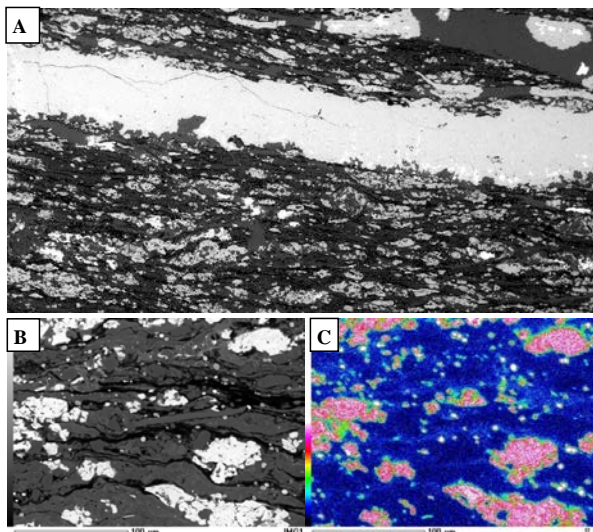
Mikroorganizmy siarkowe występują w środowiskach bogatych w zredukowane związki siarki; są to m.in. złoża siarki, rudy siarczkowe, źródła geotermalne, kopalnie siarki, siarczków i węgla). Są to środowiska o różnorodnym odczynie, zarówno neutralnym (neutrofile), ale także zasadowym (alkalofile) i kwaśnym (acydofile).

Wśród mikroorganizmów siarkowych dominują mezofile, ale związki siarki utleniają także psychrofile (zasiedlą środowiska polarne), jak również termofile (środowiska termalne).

## 3. Czarny łupek Kupferschiefer - rezerwuar zredukowanych związków siarki

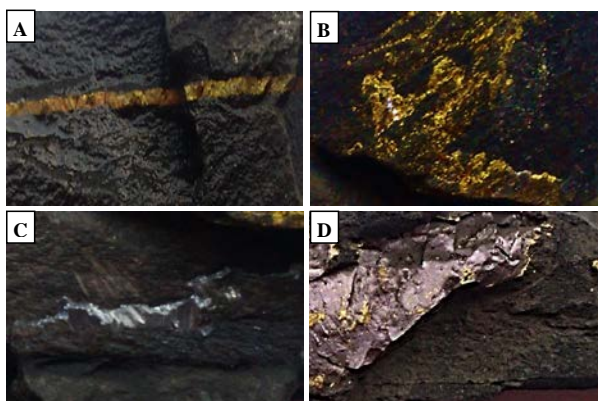
Skały łupkowe należą do jednych z najbogatszych rezerwuarów związków siarki na Ziemi (Rickard, 2012). Średnią zawartość siarki w tych skałach szacuje się na ok. 0,24% wag., a zawartość całkowitą na  $7230 \times 10^{23}$  g.

W czarnym łupku Kupferschiefer zawartość siarki wynosi ok. 1,5%, a lokalne wzbogacenia sięgają nawet 10% (Piestrzyński i Bochajczuk, 1996) (Rys. 2). Siarka w Kupferschiefer występuje zarówno w formie nieorganicznej, jak i organicznej. Wśród nieorganicznych związków siarki dominują formy zredukowane.

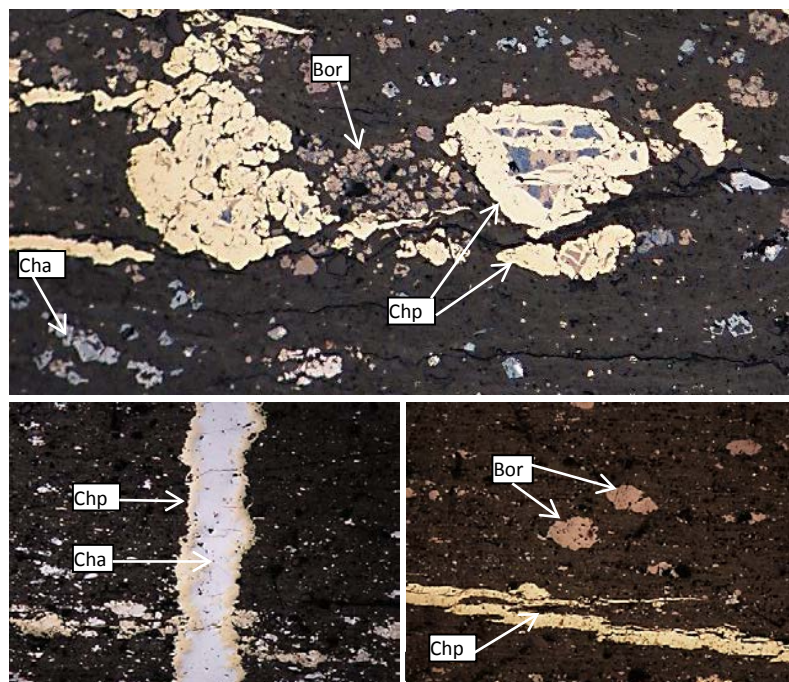


Rys. 2. Dystrybucja siarki w czarnym łupku Kupferschiefer; A, B - elektronowa mikroskopia skaningowa; C - mikroskopia SEM-EDS

Głównymi nośnikami siarki zredukowanej są pospolite w złożu siarczki i siarkosole, takich metali jak Cu, Fe, Pb i Zn (Piestrzyński i Bochajczuk, 1996). Należą do nich chalkozyn, chalkopiryt, bornit, kowelin, piryt, sfaleryt i galena (Rys. 3 i 4). Siarka występuje także w siarkoarsenkach Ni i Co, oraz rzadszych siarczках takich metali, jak Mo, Ag, Bi, Co i Ni.



Rys. 3. Minerale siarczkowe w czarnym łupku Kupferschiefer; A, B – chalkopiryt; C – chalkozyn; D – bornit (obserwacje makroskopowe)



Rys. 4. Wybrane minerały siarczkowe występujące w czarnym łupku Kupferschiefer; Chp – chalkopiryt; Bor – bornit; Cha – chalkozyn (obserwacje w świetle odbitym)

Formę utlenioną siarki nieorganicznej stanowi przede wszystkim gips, który tworzy drobne skupienia. Siarka organiczna występuje w kerogenie oraz w bituminie przede wszystkim w formie tiofenów i benzotiofenów.

Ze względu na dominację w czarnym łupku Kupferschiefer zredukowanych nieorganicznych związków siarki kluczową rolę w przemianach tego pierwiastka odgrywają mikroorganizmy wykorzystujące ww. związki jako źródło energii i/lub elektronów w procesie dysymilacyjnego utleniania.

#### 4. Bakterie siarkowe zasiedlające czarny łupek Kupferschiefer

Zespoły litobiontycznych mikroorganizmów prokariotycznych zasiedlających czarny łupek Kupferschiefer obejmują 23 typy bakterii oraz dwa typy archeonów (Włodarczyk i Matlakowska, 2017). Wśród nich wykryto 21 rodzajów bakterii siarkowych zdolnych do dysymilacyjnego utleniania zredukowanych związków siarki. Nie wykryto archeonów siarkowych. Wśród bakterii dominują chemolitoautotrofy, ale potwierdzono również występowanie fotolitoautotrofów anoksygennych i chemolithoheterotrofów. Wykaz zidentyfikowanych bakterii siarkowych z uwzględnieniem pozycji taksonomicznej przedstawiono w Tabeli 1. Dominują gramujemne bakterie należące do typu *Proteobacteria*, w tym klasy *Beta-* i *Gammaproteobacteria*.

Tabela 1. Siarkowe bakterie chemolitotroficzne i anoksygenne bakterie fotolitotroficzne zasiedlające czarny łupek Kupferschiefer

Typ	Klasa	Rząd	Rodzina	Rodzaj (Gatunek)	
Proteobacteria	Alpha	<i>Rhizobiales</i>	<i>Bradyrhizobiaceae</i>	<i>Rhodopseudomonas</i>	
		<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Rhodovulum</i>	
		<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Rhodobacter</i>	
		<i>Sphingomonadales</i>	<i>Erythrobacteraceae</i>	<i>Erythrobacter</i>	
		<i>Rhizobiales</i>	<i>Hyphomicrobiaceae</i>	<i>Rhodoplanes</i>	
	Beta	<i>Nitrosomonadales</i>	<i>Thiobacillaceae</i>	<i>Thiobacillus</i> ( <i>T. denitrificans</i> , <i>T. thioparus</i> )	
		<i>Burkholderiales</i>	-	<i>Thiobacter</i>	
		<i>Burkholderiales</i>	-	<i>Thiomonas</i>	
		<i>Nitrosomonadales</i>	<i>Gallionellaceae</i>	<i>Sulfuricella denitrificans</i>	
		<i>Nitrosomonadales</i>	<i>Sterolibacteriaceae</i>	<i>Sulfuritalea</i> <i>hydrogenivorans</i>	
	Gamma	<i>Thiotrichales</i>	<i>Thiotrichaceae</i>	<i>Thiothrix</i> ( <i>T. nivea</i> , <i>T. lacustris</i> )	
		<i>Beggiatoa</i>	<i>Thiotrichaceae</i>	<i>Beggiatoa</i>	
		<i>Chromatiales</i>	<i>Chromatiaceae</i>	<i>Thiocapsa</i>	
		<i>Chromatiales</i>	<i>Chromatiaceae</i>	<i>Thioflavococcus</i>	
		<i>Acidiferrobacterales</i>	<i>Acidiferrobacteraceae</i>	<i>Sulfuricaulis limicola</i>	
		<i>Acidiferrobacterales</i>	<i>Acidiferrobacteraceae</i>	<i>Sulfurifustis variabilis</i>	
	Epsilon	<i>Campylobacterales</i>	<i>Helicobacteraceae</i>	<i>Sulfuricurvum</i> ( <i>S. kujjense</i> )	
		<i>Campylobacterales</i>	<i>Helicobacteraceae</i>	<i>Sulfurimonas</i> ( <i>S. autotrophica</i> , <i>S. denitrificans</i> , <i>S. gotlandica</i> )	
	<i>Chloroflexi</i>	<i>Chloroflexia</i>	<i>Chloroflexales</i>	<i>Chloroflexaceae</i>	<i>Chloroflexus</i>
			<i>Chloroflexales</i>	<i>Roseiflexaceae</i>	<i>Roseiflexus</i>
<i>Chlorobi</i>	<i>Chlorobia</i>	<i>Chlorobiales</i>	<i>Chlorobiaceae</i>	<i>Chlorobium</i>	

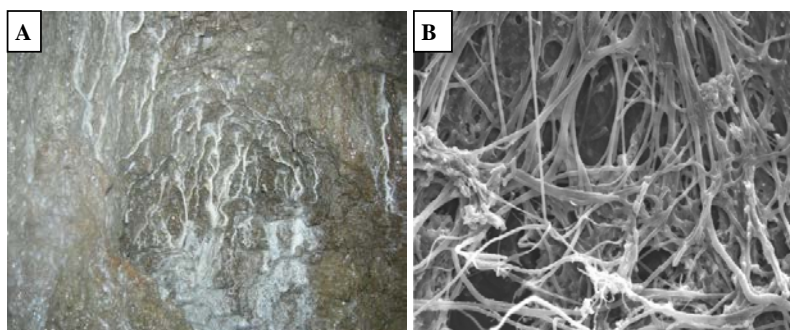
#### 4.1. Bakterie chemolitoautotroficzne

Chemolitoautotrofy to największa grupa bakterii siarkowych zasiedlających czarny łupek Kupferschiefer (Włodarczyk i in., 2018). Są wśród nich zarówno chemolitoautotrofy bezwzględne, jak i warunkowe. Większość z tych bakterii wykorzystuje tlen jako ostateczny akceptor elektronów, ale niektóre w warunkach beztlenowych mogą wykorzystywać również azotany.

Najważniejszymi bakteriami zdolnymi do dysymilacyjnego utleniania związków siarki zidentyfikowanymi wśród bakterii litobiontycznych są bakterie z rodzaju *Thiobacillus* (*Betaproteobacteria*). Zidentyfikowano dwa gatunki należące do tego rodzaju – *T. denitrificans* i *T. thioparus*. Uważa się je za bezwzględne neutrofilne chemolitoautotrofy zdolne do wzrostu w warunkach tlenowych i beztlenowych (Madigan i in., 2015). Utleniają one m.in. siarkowódz, tiosiarczan i siarkę pierwiastkową. W warunkach beztlenowych wykorzystują azotany jako ostateczne akceptory elektronów (denitryfikacja).

W kopalniach monokliny przedsudeckiej na powierzchni czarnego łupka, ale także w wodach podziemnych powszechnie występuje neutrofilny *Thiothrix* (*Gammaproteobacteria*). Zidentyfikowano dwa gatunki tego rodzaju *T. nivea* i *T. lacustris*. Są to nitkowate bakterie tworzące widoczne makroskopowo biofilmy (Rys. 5).





Rys. 5. Biofilm naskalny zdominowany przez bakterie z rodzaju *Thiothrix*;  
A – obraz makroskopowy; B – obserwacje w SEM (pow. 3000X)

Bakterie z tego rodzaju uznawane są za warunkowe chemolitoautotrofy, także zdolne do przeprowadzania procesu denitryfikacji w warunkach beztlenowych. Utleniają siarkowodor i tiosiarczan (Rossetti i in., 2003; Madigan i in., 2015). Podobnymi właściwościami fizjologicznymi charakteryzują się bakterie z rodzaju *Beggiatoa* (*Gammaproteobacteria*) (Madigan i in., 2015).

Rodzaj *Thiomonas* (*Betaproteobacteria*) obejmuje wiele gatunków różniących się właściwościami fizjologicznymi. Jednak większość znanych gatunków jest neutrofilnymi mezofilami oraz fakultatywnymi chemolitoautotrofami zdolnymi do utleniania tiosiarczanu i tetrationiatu (Kelly i in. 2007).

Rodzaj *Thiobacter* (*Betaproteobacteria*) został utworzony w 2005 roku przez Hirayama i in. (2005). Najbardziej znany przedstawiciel tego rodzaju to *T. subterraneus* – termofilny obligatoryjny chemolitoautotrof utleniający siarkę pierwiastkową i tiosiarczan.

Wśród bezbarwnych bakterii siarkowych występujących na łupku Kupferschiefer zidentyfikowano także cztery gatunki bakterii wyizolowane po raz pierwszy z osadów dennych japońskich jezior Mizugaki i Harutori. Są to *Sulfuricella denitrificans* (*Betaproteobacteria*), *Sulfuritalea hydrogenivorans* (*Betaproteobacteria*), *Sulfuricaulis limicola* (*Gammaproteobacteria*) i *Sulfurifustis variabilis* (*Gammaproteobacteria*) (Kojima i Fukui, 2010; 2011; Kojima i in., 2015; Kojima i in., 2016). *S. denitrificans* jest fakultatywnie beztlenową bakterią zdolną do autotroficznego wzrostu poprzez utlenianie siarki pierwiastkowej i tiosiarczanu do siarczanu. *S. denitrificans* jest zdolna do redukcji azotanów do azotu cząsteczkowego. Azotan w warunkach beztlenowych stanowi ostateczny akceptor elektronów. Bakteria ta jest psychrotolerantem i umiarkowanym alkalofilem. *S. hydrogenivorans* jest fakultatywnym autotrofem i tlenowcem. Utlenia tiosiarczan, siarkę pierwiastkową i wodór. W warunkach beztlenowych przeprowadza proces denitryfikacji. Jest mezofilem i neutrofilem. *S. limicola* utlenia tiosiarczan i siarkę pierwiastkową. Nie utlenia siarczku oraz siarczynów. Bakteria ta jest mezofilem i umiarkowanym alkalofilem. *S. variabilis* posiada zdolność do utlenienia tiosiarczanu oraz siarki pierwiastkowej. Jest umiarkowanym termofilem i umiarkowanym alkalofilem.

Kolejnymi chemolitotrofami zdolnymi do utleniania zredukowanych związków siarki występującymi na czarnym łupku Kupferschiefer są bakterie należące do klasy *Epsilonproteobacteria* – rodzaj *Sulfurimonas* i gatunek *Sulfuricurvum kujjense*. Rodzaj

*Sulfurimonas* jest reprezentowany przez gatunki *S. autotrophica*, *S. denitrificans*, *S. gotlandica*. Bakterie te charakteryzują się zróżnicowanymi właściwościami fizjologicznymi (Inagaki i in., 2003; Labrenz, 2013). Są mezofilami, z wyjątkiem gatunku *S. gotlandica*, który jest psychrotolerancyjny. Utleniają siarczki, siarkę pierwiastkową oraz tiosiarczan, a *S. gotlandica* również siarczyny. *Sulfuricurvum kujiense* jest fakultatywnym chemolitoautotrofem warunkowo utleniającym związki siarki (Kodama, 2004).

## 4.2. Anoksygenne bakterie fototroficzne

Wśród mikroorganizmów utleniających związki siarki zidentyfikowanych w kopalniach monokliny przedsudeckiej są także fototrofy anoksygenne. Bakterie te posiadają zielony barwnik – bakteriochlorofil, za pomocą którego absorbują energię świetlną, a jako donor elektronów wykorzystują nieorganiczne związki siarki, a także wodór, związki organiczne lub Fe(II) (Ghosh i Dam, 2009; Madigan i in., 2015). Fotosyntezę przeprowadzają w warunkach beztlenowych lub przy niskim stężeniu tlenu, ale część z nich może również żyć w warunkach tlenowych. Większość wykrytych w kopalni fototrofów anoksygennych charakteryzuje się niezwykle plastycznym metabolizmem, który dostosowują do aktualnie panujących warunków środowiska; w warunkach afotycznych zmieniają swój metabolizm na chemotroficzny. Do fototrofów anoksygennych występujących w badanych kopalniach należą przedstawiciele wszystkich znanych grup tych bakterii – bakterie purpurowe niesiarkowe (rodzaje *Rhodopseudomonas*, *Rhodoplanes*, *Rhodovulum*, *Rhodobacter*, *Erythrobacter*) (*Alphaproteobacteria*), purpurowe siarkowe (rodzaje *Thiocapsa* i *Thioflaviccoccus*) (*Gammaproteobacteria*), zielone siarkowe (rodzaj *Chlorobium*) (*Chlorobi*) oraz nitkowate (rodzaje *Chloroflexus* i *Roseiflexus*) (*Chloroflexi*). Warto dodać, że niektóre fototrofy anoksygenne są również zdolne do degradacji węglowodorów alifatycznych i aromatycznych w warunkach beztlenowych.

## 4.3. Bakterie chemolithoheterotroficzne

Do utleniania związków siarki, zwłaszcza tiosiarczanu zdolne są także bakterie heterotroficzne. Bakterie te wykorzystują związki siarki, jako źródło energii, a związki organiczne jako źródło węgla, są zatem chemolithoheterotrofami. Należą do nich bakterie z rodzaju *Limnobacter* (*Betaproteobacteria*) i *Bradyrhizobium* (*Alphaproteobacteria*).

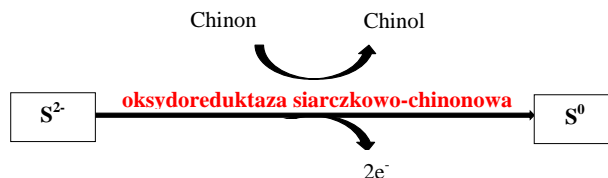
## 5. Szlaki utleniania zredukowanych nieorganicznych związków siarki – analiza metagenomu i metaproteomu bakterii siarkowych zasiedlających czarny łupek Kupferschiefer

W metagenomie i/lub w metaproteomie bakterii litobiontycznych zasiedlających czarny łupek Kupferschiefer zidentyfikowano szereg enzymów katalizujących utlenianie zredukowanych związków siarki. Zidentyfikowane enzymy reprezentują większość opisanych dotychczas szlaków utleniania siarczków, siarki pierwiastkowej, siarczynów i tiosiarczanu (Włodarczyk in., 2018). Wykryto najbardziej powszechny system utleniania siarczków i siarki przez siarczyny do siarczanów, a także system bezpośredniego utleniania tiosiarczanu do siarczanów (Kappler i Dahl, 2001; Ghosh i Dam, 2009; Frierdrich i in., 2005). Najwięcej genów kodujących enzymy zaangażowane w wyżej wymienione procesy pochodziło z bakterii z rodzajów *Thiobacillus* i *Thiothrix* oraz z dwóch gatunków *S. limicola* i *S. variabilis*.



## 5.1. Utlenianie siarczków

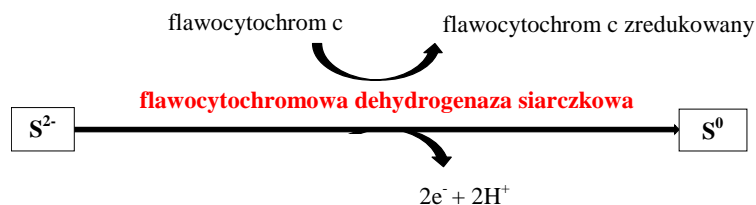
Wykryto trzy enzymy odpowiedzialne za utlenianie siarczków. Pierwszym z nich jest oksydoreduktaza siarczkowo-chinonowa (Sqr, ang. sulfide:quinone oxidoreductase), która utlenia jony siarczkowe do siarki pierwiastkowej (Rys. 6) (Ghosh i Dam, 2009).



Rys. 6. Utlenianie siarczków przez oksydoreduktazę siarczkowo-chinonową

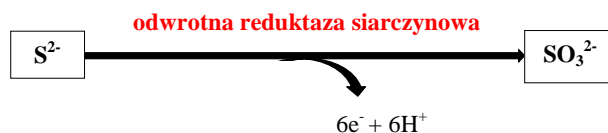
Białko to jest bardzo stare ewolucyjnie, o czym świadczy jego szerokie rozpowszechnienie wśród różnych grup taksonomicznych mikroorganizmów (Schidłowski, 1989). W badanym środowisku Sqr została wykryta m.in. u bakterii *T. denitrificans* i *Thiothrix*.

Drugim enzymem biorącym udział w utlenianiu siarczków jest flawocytochromowa dehydrogenaza siarczkowa (Fcc, ang. flavocytochrome c sulfide dehydrogenase) przenosząca elektrony na cytochrom c. Produktem utleniania siarczków przez ten enzym jest siarka pierwiastkowa (Rys. 7) (Visser i in., 1997; Quentmeier i in., 2004). Enzym ten wykryto u bakterii *T. denitrificans*.



Rys. 7. Utlenianie siarczków przez dehydrogenazę siarczkową flawocytochromu c

Trzecim szlakiem utleniania siarczków zidentyfikowanym u bakterii litobiontycznych jest odwrotny szlak dysymilacyjnej redukcji siarczynów, w którym bierze udział reduktaza siarczynowa (rDsr, ang. reverse-type dissimilatory siroheme sulfite reductase) (Rys. 8). Enzym ten wykryto m.in. u bakterii *T. thioparus*. Produktem utleniania siarczków przez ten enzym jest siarczyn.

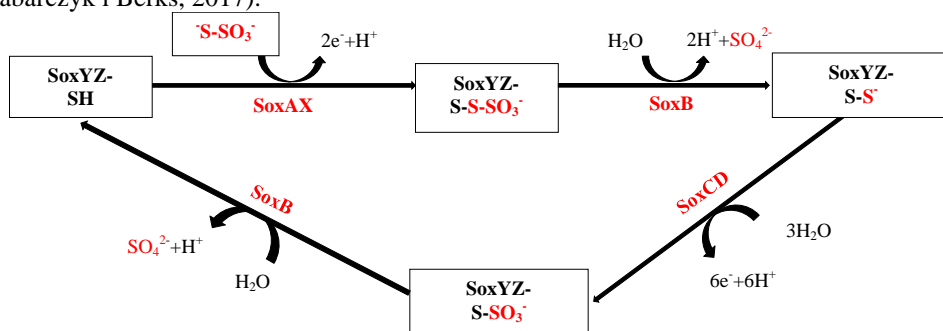


Rys. 8. Utlenianie siarczków przez odwrotną reduktazę siarczynową

## 5.2. Utlenianie tiosiarczanu

Ważną grupę enzymów stanowi system TOMES (ang. thiosulfate-oxidizing multienzyme system), w skład którego wchodzi 15 białek Sox. W metagenomie i metaproteomie bakterii litobiontycznych zasiedlających Kupferschiefer zidentyfikowano białka SoxA, SoxB, SoxC, SoxD, SoxL, SoxX, SoxY i SoxZ. Zostały one wykryte u bakterii *T. denitrificans*, *Thiothrix*, *S. limicola*, *S. variabilis*, a także u *Bradyrhizobium* i *Limnobacter* (Włodarczyk i in., 2018).

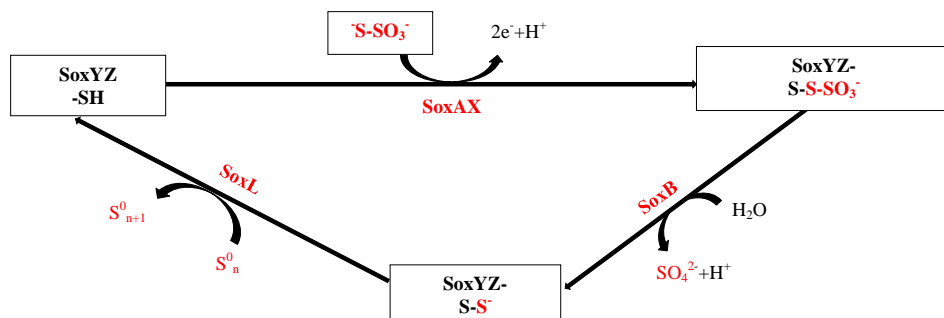
Enzymy systemu TOMES biorą udział w utlenianiu tiosiarczanu bezpośrednio do siarczanów (Rys. 9) lub w szlaku dysproporcjonowania tiosiarczanu do siarczanów i siarki pierwiastkowej (Rys. 10) (Kelly i in., 1995; Friedrich i in., 2005; Grabarczyk i in., 2015; Grabarczyk i Berks, 2017).



Rys. 9. Utlenianie tiosiarczanu do siarczanów z udziałem białek Sox. SoxYZ-SH – kompleks białka SoxYZ z grupą sulfhydrylową SH (reszta cysteiny); SoxYZ-S-S-SO<sub>3</sub><sup>-</sup> – kompleks SoxYZ-S<sup>-</sup> z tiosiarczanem; SoxYZ-S-S<sup>-</sup> – kompleks SoxYZ-S<sup>-</sup> z grupą sulfonową; SoxYZ-S-SO<sub>3</sub><sup>-</sup> – kompleks SoxYZ-S<sup>-</sup> z grupą sulfonianową

Utlenianie tiosiarczanu do siarczanów jest procesem kilkuetapowym. Pierwszy etap polega na przyłączeniu tiosiarczanu do grupy sulfhydrylowej (SH) w kompleksie białek SoxYZ (SoxY – przenośnik w szlaku utleniania tiosiarczanów (ang. thiosulfate oxidation carrier protein); SoxZ – białko utleniające siarkę w tiosiarczanach (ang. sulfur oxidation protein)) za pośrednictwem białek SoxAX (SoxA – cytochrom typu c utleniający siarkę (ang. sulfur-oxidizing c-type cytochrome); SoxX – podjednostka transferazy tiosiarczanowej (ang. thiosulfate transferase)). Następnie kompleks ten ulega hydrolizie przy udziale białka SoxB (hydrolaza siarczanu S-tiocysteiny (ang. S-thiocysteine sulfite hydrolase)). W kolejnym etapie następuje utlenienie kompleksu SoxYZ z grupą sulfonową za pomocą SoxCD (SoxC – dehydrogenaza siarczynowa (ang. sulfite dehydrogenase); SoxD – podjednostka cytochromowa oksydazy siarczynowej (ang. sulfite oxidase cytochrome subunit)). W procesie tym powstaje kompleks SoxYZ z grupą sulfonianową, następnie przekształcany do siarczanów i SoxYZ-SH przez SoxB.

Dysproporcjonowanie tiosiarczanu ma miejsce w przypadku braku białek SoxC i SoxD. W procesie tym elektrony z jednego atomu siarki w cząsteczce tiosiarczanu przenoszone są na drugi atom zamiast na cząsteczkę białka. Efektem tego procesu metabolicznego jest równoczesne utlenienie tiosiarczanu do siarczanów i redukcja do siarki pierwiastkowej. W procesie tym bierze udział białko SoxL (transferaza S-tiocysteinosiarkowa (ang. S-thiocysteine:sulfur sulfurtransferase)).



Rys. 10. Dysproporcjonowanie tiosiarczanu z udziałem systemu Sox

Uważa się, że cykl dysproporcjonowania tiosiarczanów jest odpowiedzialny za wytwarzanie globul siarki pierwiastkowej. Dokładny szlak utleniania tiosiarczanu przy udziale białek Sox nie jest do końca poznany (Grabarczyk i Berks, 2017), a dodatkowo przypuszcza się, że białka te biorą również udział w utlenianiu siarczoków, siarki pierwiastkowej, siarczynów i tetratianu (Wodara i in., 1997).

### 5.3. Utlenianie siarki pierwiastkowej

W badanym środowisku wykryto cztery białka zaangażowane w wewnątrzkomórkowy szlak utleniania siarki pierwiastkowej do siarczynów. Są to przekaźniki siarki DsrC i DsrH (ang. sulfur relay protein) oraz TusB i TusC. Występują one w metagenomie *S. limicola* i *S. variabilis*. Ze względu na brak pozostałych kluczowych białek nie przedstawiono szlaku utleniania siarki pierwiastkowej.

### 5.4. Utlenianie siarczynów

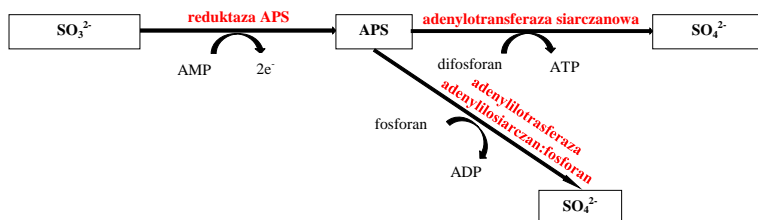
Siarczyny mogą być utleniane bezpośrednio do siarczanów za pośrednictwem oksydoreduktazy siarczynowej (Sor, ang. sulfite oxidoreductase) (Rys. 11) lub pośrednio z wytworzeniem adenylosiarczanu (APS) (Rys. 12) (Kapler i Dahl, 2001). Uniwersalny system utleniania siarczynów za pośrednictwem oksydazy zidentyfikowano w metagenomie bakterii *S. limicola*, *S. variabilis*, oraz *Rhodoplanes* sp. (Włodarczyk i in. 2018).



Rys. 11. Bezpośrednie utlenianie siarczynów do siarczanów

W drugim pośrednim szlaku utleniania siarczynów bierze udział reduktaza APS (Apr, ang. adenylosulfate reductase), która odpowiada za powstanie APS. Następnie APS może być przekształcony do siarczanu i adenylosiarczanu (ADP) przy udziale adenylosiarczanu:fosforan (Apt, ang. adenylosulfate:phosphate adenylyltransferase) i fosforanu (szlak II). Inną opcją jest przekształcenie APS do adenylosiarczanu (ATP) przy udziale adenylosiarczanu:fosforan (Sat, ang. sulfate adenylyltransferase) i difosforanu

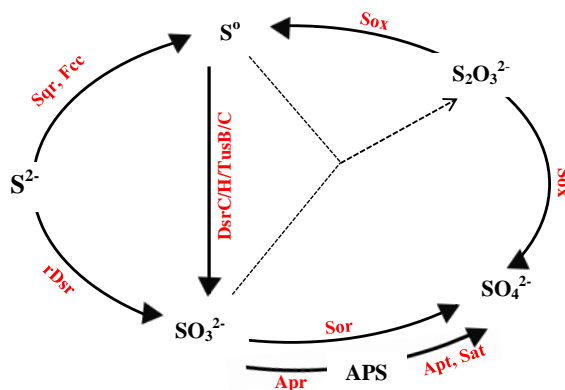
(szlak III) (Rys. 12). Szlaki te wykryto u bakterii *T. denitrificans*, *T. thioparus*, *S. limicola* i *S. variabilis* (Włodarczyk i in., 2018).



Rys. 12. Utlenianie siarczynów do siarczanów z pośrednim związkiem organicznym APS; APS – adenylofosfosiarczan; AMP – adenylomonofosforan; ADP – adenylodifosforan; ATP – adenylotrifosforan

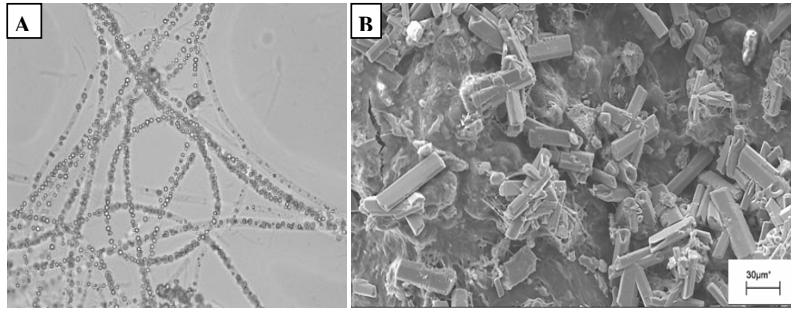
## 5.5. Przemiany zredukowanych nieorganicznych związków siarki w środowisku kopalnianym

Przemiany zredukowanych związków siarki w wyniku dysymilacyjnego utleniania przez chemo- i fotolitolitotroficzne bakterie zasiedlające czarny łupek Kupferschiefer przedstawiono na rysunku 13.



Rys. 13. Mikrobiologiczne przemiany zredukowanych nieorganicznych związków siarki oparte na procesach dysymilacyjnego utleniania zidentyfikowane u bakterii litobiontycznych zasiedlających czarny łupek Kupferschiefer; linia ciągła – procesy biotyczne; linia przerywana – procesy abiotyczne; Sqr – oksydoreduktaza siarczkowo-chinonowa; Fcc – flawocytochromowa dehydrogenaza siarczkowa; Sox – białka systemu utleniania tiosiarczanu; Dsr C/H/TusB/C – przenośniki siarki; rDsr – odwrotna reduktaza siarczynowa; Sor – oksydoreduktaza siarczynowa; Apr – reduktaza APS; Apt – adenyliotransferaza adenyliosiarczan:fosforan; Sat – adenyliotransferaza siarczanowa

Aktywność trzech opisanych enzymów zaangażowanych w proces utleniania siarczków (oksydoreduktaza siarczkowo-chinonowa, flawocytochromowa dehydrogenaza siarczkowa) oraz dysporocjonowanie tiosiarczanu (SoxL) prowadzi do wytwarzania siarki pierwiastkowej, która może być magazynowana wewnątrz komórek, jak również gromadzona zewnątrzkomórkowo. Zjawisko to zaobserwowano w badanych środowisku (Rys. 14).

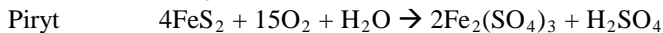
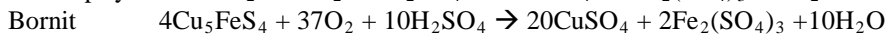
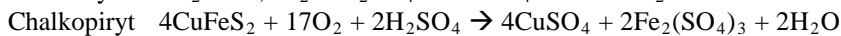
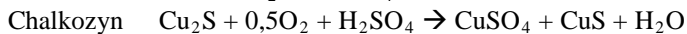
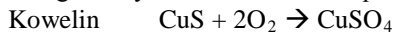


Rys. 14. Siarka pierwiastkowa występująca w komórkach *Thiothrix* sp. (A) (mikroskopia świetlna; pow. 40x) oraz siarka zewnątrzkomórkowa w macie mikrobiologicznej (B) (SEM)

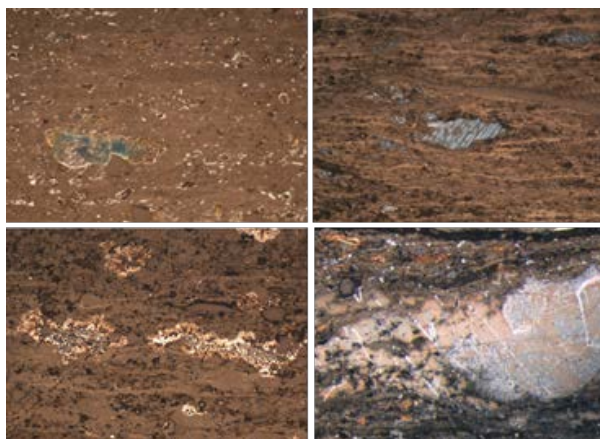
## 6. Wpływ bakterii siarkowych na przemiany czarnego łupka Kupferschiefer

Aktywność metaboliczna opisanych bakterii siarkowych wpływa na przemiany pierwotnych minerałów siarczkowych, mobilizację pierwiastków do wód podziemnych, a także na powstawanie minerałów biogenicznych.

Bakterie siarkowe zasiedlające czarny łupek Kupferschiefer odgrywają ważną rolę w procesach enzymatycznego utleniania minerałów siarczkowych (Rys. 15). Biorą one udział w utlenianiu takich minerałów, jak bornit, chalkopiryt, chalkozyn czy kowelin. Przykładowe reakcje enzymatycznego bioutleniania siarczków miedzi przeprowadzane przez mikroorganizmy chemolitotroficzne przedstawiono poniżej:

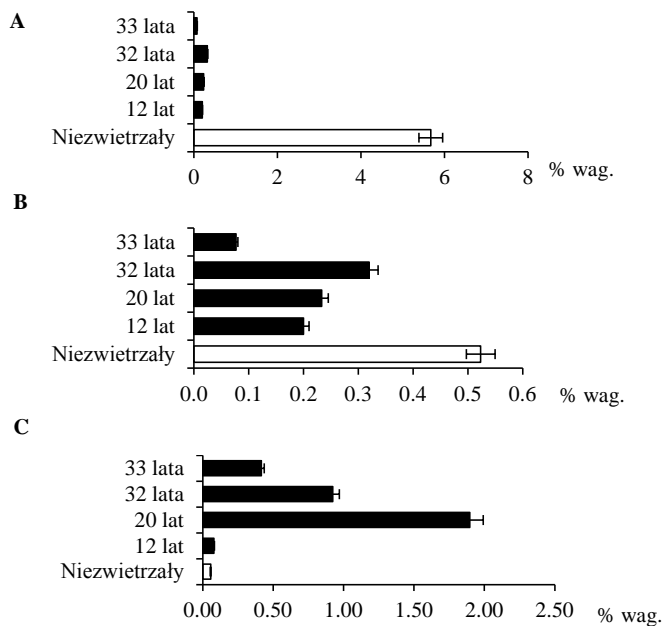


W wyniku utleniania siarczków powstaje kwas siarkowy oraz jon Fe(III), które także pośrednio mogą powodować utlenianie siarczków.



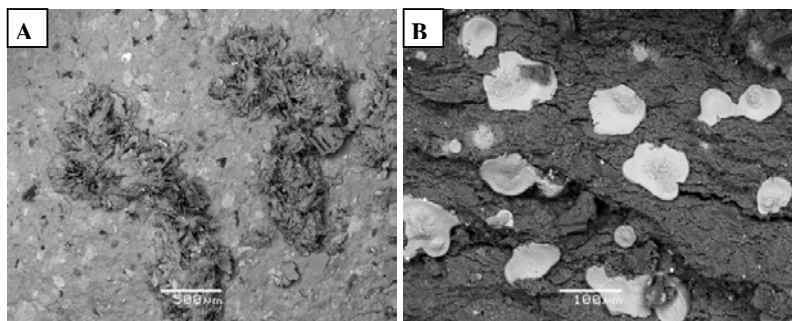
Rys. 15. Utlenione siarczki miedzi w zwietrzałym czarnym łupku Kupferschiefer (obserwacja w świetle odbitym, pow. 10x)

Aktywność bakterii siarkowych prowadzi do utlenienia minerałów siarczkowych, co skutkuje zmniejszeniem zawartości siarki siarczkowej, w tym pirytowej, a jednocześnie wzrostem stężenia siarki siarczanowej (Rys. 16). Skutkiem mikrobiologicznych procesów utleniania minerałów siarczkowych jest mobilizacja siarczanów do wód podziemnych, a także mobilizacja miedzi, żelaza, arsenu, ołowiu i niklu.



Rys. 16. Zawartość siarki siarczkowej (A), pirytowej (B) i siarczanowej (C) w czarnym łupku niewietrzałym i zwietrzałym (czas wietrzenia 12, 20, 32, 33 lat)

Na powierzchni zwietrzałych łupków zidentyfikowano liczne minerały wtórne, przede wszystkim siarczany (np. gips, anglezyt) oraz węglany (np. malachit) (Rys. 17). Przypuszcza się, że część minerałów wtórnych to biominerały powstałe w wyniku mineralizacji indukowanej biologicznie.

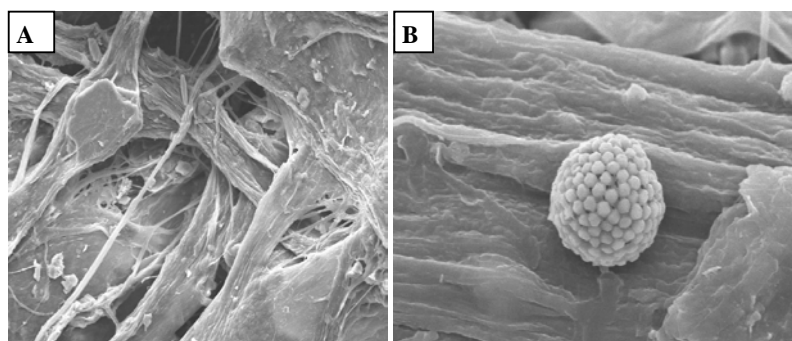


Rys. 17. Gips (A) i malachit (B) na powierzchni zwietrzałych łupków Kupferschiefer (SEM)



## Podsumowanie

Opisane bakterie siarkowe zasiedlające czarny łupek Kupferschiefer przyczyniają się do utleniania siarczaków, co ma wpływ na budowę geochemiczną tej skały, ale także oddziałuje na skład chemiczny wód podziemnych oraz gazów. Inną ważną konsekwencją tych przemian jest sukcesja mikroorganizmów. Wzbogacenie wód podziemnych w siarczany, a także powstawanie minerałów siarczanowych umożliwiają rozwój w środowisku podziemnym bakterii redukujących siarczany. Na zwietrzałych powierzchniach łupka zidentyfikowano liczne bakterie należące do tej grupy metabolicznej, m.in. rodzaj *Desulfovibrio*, *Desulomonas* i *Desulfotomaculum* (Bąkowska i in., 2017). Na powierzchni biofilmów złożonych z tych bakterii zaobserwowano piryty framboidalne (Rys. 18). Przypuszcza się, że mogą one powstawać w wyniku procesów indukowanych biologicznie, w wyniku reakcji siarkowodoru powstającego z redukcji siarczanów z żelazem (II).



Rys. 18. Biofilm bakterii redukujących siarczany (A) i piryt framboidalny na powierzchni biofilmu (B)

Opisane procesy utleniania zredukowanych związków siarki, a następnie redukcji związków utlenionych składają się na mikrobięgi siarki w środowisku podziemnym (sulfureta podziemne). Procesom tym towarzyszy odpowiednio mobilizacja i immobilizacja pierwiastków występujących w związkach siarki. Warto dodać, że procesy biologicznego utleniania zredukowanych związków siarki mają znaczący potencjał biotechnologiczny.

## Podziękowania

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

## Literatura

- BĄKOWSKA A., KARLICKI M., WŁODARCZYK A., MATLAKOWSKA R. 2017. *Geomikrobiologia podziemnych środowisk kopalnianych monokliny przedsudeckiej*. Biuletyn Państwowego Instytutu Geologicznego, 469, 201–216.
- CHEN K.Y., MORRIS J.C. 1972. *Kinetics of oxidation of aqueous sulfide by O<sub>2</sub>*. Environ. Sci. Technol. 6, 529–537.

- EHRlich H.L., NEWMAN D.K. 2009. *Geomicrobiology*, CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton.
- FRIEDRICH C.G., ROTHER D., BARDISCHEWSKY F., QUENTMEIER A., FISCHER J. 2001. *Oxidation of reduced inorganic sulfur compounds by bacteria: emergence of a common mechanism?* Appl. Environ. Microbiol. 67, 2873–2882.
- FRIEDRICH C.G., BARDISCHEWSKY F., ROTHER D., QUENTMEIER A., FISCHER J. 2005. *Prokaryotic sulfur oxidation*. Curr. Opin. Microbiol. 8, 253–259.
- FINDLAY A. 2016. *Microbial impact on polysulfide dynamics in the environment*. FEMS Microbiol. Lett. 363, DOI: 10.1093/femsle/fnw103.
- GRABARCZYK D.B., CHAPPELL P.E., JOHNSON S., STELZL L.S., LEA S.M., BERKS B.C. 2015. *Structural basis for specificity and promiscuity in a carrier protein/enzyme system from the sulfur cycle*. PNAS 112, E7166–75.
- GRABARCZYK D.B., BERKS B.C. 2017. *Intermediates in the Sox sulfur oxidation pathway are bound to a sulfane conjugate of the carrier protein SoxYZ*. PlosOne, DOI: 10.1371/journal.pone.0173395.
- GHOSH W., DAM B. 2009. *Biochemistry and molecular biology of lithotrophic sulfur oxidation by taxonomically and ecologically diverse bacteria and archaea*. FEMS Microbiol. Rev. 33, 999–1043.
- HIRAYAMA H., TAKAI K., INAGAKI F., NEALSON K.H., HORIKOSHI K. 2005. *Thiobacter subterraneus gen. nov., sp. nov., an obligately chemolithoautotrophic, thermophilic, sulfur-oxidizing bacterium from a subsurface hot aquifer*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55, 467–472.
- INAGAKI F., TAKAI K., KOBAYASHI H., NEALSON K.H., HORIKOSHI K. 2003. *Sulfurimonas autotrophica gen. nov., sp. nov., a novel sulfur-oxidizing  $\epsilon$ -proteobacterium isolated from hydrothermal sediments in the Mid-Okinawa Trough*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53, 1801–1805.
- KAPPLER U., DAHL C. 2001. *Enzymology and molecular biology of prokaryotic sulfite oxidation*. FEMS Microbiol. Lett. 203, 1–9.
- KELLY D.P., SHERGILL J.K., LU W.P., WOOD A.P. 1995. *Oxidative metabolism of inorganic sulfur compounds by bacteria*. In: Beijerinck Centennial Symposium on Microbial Physiology and Gene Regulation – Emerging Principles and Applications, Feb 1995. The Hague, Netherlands, 95–107.
- KELLY D.P., UCHINO Y., HUBER H., AMILS R., WOOD A.P. 2007. *Reassessment of the phylogenetic relationships of Thiomonas cuprina*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57, 2720–2724.
- KODAMA, Y. 2004. *Sulfuricurvum kujense gen. nov., sp. nov., a facultatively anaerobic, chemolithoautotrophic, sulfur-oxidizing bacterium isolated from an underground crude-oil storage cavity*. International Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54, 2297–2300.
- KOJIMA H., FUKURI M. 2010. *Sulfuricella denitrificans gen. nov., sp. nov., a sulfur-oxidizing autotroph isolated from a freshwater lake*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60, 2862–2866.
- KOJIMA H., FUKUI M. 2011. *Sulfuritalea hydrogenivorans gen. nov., sp. nov., a facultative autotroph isolated from a freshwater lake*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61, 1651–1655.
- KOJIMA H., SHINOHARA A., FUKUI M. 2015. *Sulfurifustis variabilis gen. nov., sp. nov., a sulfur oxidizer isolated from a lake, and proposal of Acidiferrobacteraceae fam. nov. and Acidiferrobacterales ord. nov.* Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 65, 3709–3713.
- KOJIMA H., WATANABE T., FUKUI M. 2016. *Sulfuricaulis limicola gen. nov., sp. nov., a sulfur oxidizer isolated from a lake*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 66, 266–270.
- KONHAUSER K. 2007. *Introduction to Geomicrobiology*. Blackwell Publishing.
- LABRENZ M., GROTE J., MAMMITZSCH K., BOSCHKER H.T., LAUE M., JOST G., GLAUBITZ S., JURGENS K. 2011. *Sulfurimonas gotlandica sp. nov., a chemoautotrophic and psychrotolerant epsilonproteobacterium isolated from a pelagic redoxcline, and an emended description of the genus Sulfurimonas*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 63, 4141–4148.
- MADIGAN M. T., MARTINKO J. M. 2015. *Brock biology of microorganisms*. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, USA.

- MORA M., LOPEZ L.R., LAFUENTE J., PEREZ J., KLEEREBEZEM R., VAN LOOSDRECHT M.C.M., GAMISANS X., GABRIEL D. 2015. *Respirometric characterization of aerobic sulfide, thiosulfate and elemental sulfur oxidation by S-oxidizing biomass*. *Wat. Res.*, 89, 282–292.
- PIESTRZYŃSKI A., BOCHAJCZUK J. 1996. *Monografia KGHM Polska Miedź*. Cuprum, Lubin CBPM.
- QUENTMEIER A., HELLOWIG P., BARDISCHEWSKY F., WICHMANN R., FRIEDRICH C.G. 2004. *Sulfide dehydrogenase activity of the monomeric flavoprotein SoxF of Paracoccus pantotrophus*. *Biochemistry* 43, 14696–14703.
- RICKARD, D. 2012. *Sulfidic sediments and sedimentary rocks*. Amsterdam: Elsevier.
- ROSSETTI S., BLACKALL L.L., LEVANTESI C., UCCELLETTI D., TANDOI V. 2003. *Phylogenetic and physiological characterization of a heterotrophic, chemolithoautotrophic Thiobrix strain isolated from activated sludge*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 1271–1276.
- SCHIDLÓWSKI M. 1989. *Evolution of the Sulphur Cycle in the Precambrian*. W: Brimblecombe P., Lein A.Y. *Evolution of the Global Biogeochemical Sulphur Cycle*. Wyd. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, Wielka Brytania, 241 s. 3–20.
- SUZUKI I., CHAN C.W., TAKEUCHI T.L. 1994. *Oxidation of Inorganic Sulfur Compounds by Thiobacilli*. W: Alpers C.N., Blowes D.W. *Environmental Geochemistry of Sulfur Oxidation*. Wyd. American Chemical Society, Waszyngton, USA, 681 s. 60–67.
- VISSER J.M., DE JONG G.A.H., ROBERTSON L.A., KUENEN J.G. 1997. *A novel membrane-bound flavocytochrome c sulfide dehydrogenase from the colourless sulfur bacterium Thiobacillus sp. W5*. *Arch. Microbiol.* 167, 295–301.
- ULRICH G.A., MARTINO D., BURGER K., ROUTH J., GROSSMAN E.L., AMMERMAN J.W., SUFLITA J.M. 1998. *Sulfur Cycling in the Terrestrial Subsurface: Commensal Interactions, Spatial Scales, and Microbial Heterogeneity*. *Microb. Ecol.* 36, 141–151.
- WŁODARCZYK A., MATLAKOWSKA R. 2017. *Mikrobiologiczne procesy utleniania kopalnej materii organicznej miedzionośnego łupka bitumicznego Kupferschiefer (monoklina przedsudecka)*. Monografia Łupki miedzionośny III, Kowalczyk PB, Drzymała J. (red) WGGG PW, Wrocław, 19–40.
- WŁODARCZYK A., LIRSKI M., FOGTMAN A., KOBŁOWSKA M., BIDZIŃSKI G., MATLAKOWSKA R. 2018. *The oxidative metabolism of fossil hydrocarbons and sulfide minerals by the lithobiontic microbial community inhabiting deep subterrestrial Kupferschiefer black shale*. *Front. Microbiol.* DOI: 10.3389/fmicb.2018.00972.