

University of South Bohemia in České Budějovice
Faculty of Science
Department of Ecosystem Biology
České Budějovice
Czech Republic

**Diverse archaeal community of bat guano heap in
Domica cave (Slovak Karst, Slovakia)**

Alica Chroňáková
Rigorous thesis

Supervisor:

Ing. Václav Krištůfek, CSc.
Biology Centre AS CR, v. v. i. - Institute of Soil Biology

Consultant:

RNDr. Dana Elhottová, Ph.D.
Biology Centre AS CR, v. v. i. - Institute of Soil Biology

České Budějovice 2009

Chroňáková, A.: Diverse Archaeal Community of a Bat Guano Pile in Domica Cave (Slovak Karst, Slovakia). Rigorous thesis, in English – 18 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

Annotation

Relative proportion of *Archaea* and the composition of their community were studied in the bat guano pile in Domica Cave. To study this, CARD-FISH and PCR-cloning-sequencing of 16S rRNA genes were applied. Significant differences in the composition of archaeal communities between upper and basal part of bat guano pile were determined, while relative proportion of *Archaea* was similar. The dominance of *Crenarchaeota* in clone library was described and phylogenetic analysis revealed the presence of both soil and subsurface - born *Crenarchaeota* in bat guano deposits.

Financial Support

This study was largely supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (LC06066) and by the Research Plan of the Institute of Soil Biology (AV OZ 6066 0521). Partial financial assistance for this study was provided by Agreement between AS CR and Slovak Academy of Sciences “Study of diversity of the cave microflora and fauna in West Carpathians and their food preferences”. We are indebted to the Slovak Caves Administration in Liptovský Mikuláš (Slovakia) for the sampling and research permit.

Declaration

I declare here that I worked out this thesis on my own only with the use of the cited literature and other cited sources. I declare that in accordance with the Czech legal code § 47b law No. 111/198 in valid version I consent to the publication of my dissertation in an edition made by removing marked parts archived by Faculty of Science in an electronic way in the public access section of the STAG database run by the University of South Bohemia in České Budějovice on its web pages.

Prohlašuji, že jsem svoji rigorózní práci vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své disertační práce, a to v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách.

České Budějovice, 17 March 2009

Alica Chroňáková

Author's contribution

Alica Chroňáková was responsible for major DNA work regarding DNA extraction, amplification of targeted genes and molecular analysis and also contributed to the completion of data and writing the manuscripts.

Co-author's agreement

We hereby declare that Alica Chroňáková had a major contribution to the paper.

RNDr. Dana Elhottová, Ph.D., -

Ing. Václav Krišťufek, CSc., -

Diverse Archaeal Community of a Bat Guano Pile in Domica Cave (Slovak Karst, Slovakia)

A. Chroňáková^{a,b}, A. Horák^{c,d}, D. Elhottová^a, V. Křišťufek^a

^aBiology Centre, Academy of Sciences of the Czech Republic, v. v. i. - Institute of Soil Biology, 370 05 České Budějovice, Czechia

e-mail alicach@upb.cas.cz

^bFaculty of Sciences, University of South Bohemia, 370 05 České Budějovice, Czechia

^cBiology Centre, Academy of Sciences of the Czech Republic v. v. i. - Institute of Parasitology, 370 05 České Budějovice, Czechia

^dUniversity of British Columbia, Department of Botany, Vancouver, BC, V6T 1Z4 Canada

Abbreviations

SEM Scanning Electron Microscopy

CARD-FISH Catalyzed Reporter Deposition – Fluorescence In Situ Hybridization

DAPI 4,6-diamidino-2-phenylindole

PCR Polymerase Chain Reaction

dNTP Deoxynucleotide Triphosphate

rRNA Ribosomal Ribonucleic Acid

OTU Operational Taxonomic Unit

ANOVA Analysis Of Variance

Abstract

Although the microbial biodiversity of terrestrial habitats is studied in a great scale, little is known about microbial communities in caves and related habitats. Here we examined the molecular diversity of *Archaea* in a bat guano pile in Cave Domica (Slovakia), temperate cave ecosystem with significant bat colony (about 1,600 individuals). Guano pile was created mainly by an activity of the Mediterranean horseshoe bat (*Rhinolophus euryale*) and provides a source of organic carbon and other nutrients in the oligotrophic subsurface ecosystem. The upper and the basal parts of guano surface were sampled where the latter one had higher pH and higher admixture of limestone bedrock and increased colonization of invertebrates. The relative proportion of *Archaea* determined using CARD-FISH in both parts ranged between 3.5 – 3.9 % (the basal and upper part, respectively). The archaeal community of the bat guano pile was dominated by non-thermophilic *Crenarchaeota* (99 % of clones). Phylogenetic analysis of 115 16S rDNA sequences revealed presence of *Crenarchaeota* previously isolated from temperate surface soils (group 1.1b, 62 clones), deep subsurface acid waters (group 1.1a, 52 clones) and *Euryarchaeota* (1 clone). Four of the analyzed sequences were found to have little similarity to those in public databases. The composition of both studied archaeal communities differed, with respect to higher diversity of *Archaea* in the upper part of the bat guano pile. Our study revealed for the first time that a high diversity archaeal population is present in the bat guano deposit and consists of both soil and subsurface - born *Crenarchaeota*.

Abstrakt

Ačkoliv je biodiverzita mikroorganismů v terestrických ekosystémech studována ve velké míře, jenom málo je známo o mikrobiálních společenstvech v jeskyních a příbuzných prostředích. V této práci jsme pomocí molekulární analýzy studovali diversitu archeí kupy netopýřího

guána v jeskyni Domica (Slovensko), typické temperátní jeskyni s významnou kolonií netopýřů (kolem 1 600 jedinců). Guánová kupa byla vytvořena aktivitou Vrápence jižního (*Rhinolophus euryale*) a slouží jako zdroj organického uhlíku a živin v oligotrofním podpovrchovém ekosystému. Byly vzorkovány horní a bazální části povrchu guánové kupy, přičemž druhá z nich byla charakteristická vyšším pH a větší příměsí vápencového podloží a také zvýšenou kolonizací bezobratlými živočichy. Relativní zastoupení archeí v obou místech určené metodou CARD-FISH se pohybovalo mezi 3.5 až 3.9 % (bazální a horní část, resp.). Ve společenstvu archeí kupy netopýřího guána převládala netermofilní *Crenarchaeota* (99 % klonů). Fylogenetická analýza 115 sekvencí genu 16S rRNA odhalila přítomnost *Crenarchaeota*, která byla dříve izolována z temperátních povrchových půd (skupina 1.1b, 62 klonů) a z hlubinných podpovrchových kyselých vod (skupina 1.1a, 52 klonů), a přítomnost *Euryarchaeota* (1 klon). Čtyři analyzované klony vykazovaly velice nízkou příbuznost se sekvencemi z veřejných databází. Struktura obou studovaných společenstev archem se lišila, s ohledem na vyšší diversitu archeí v horní části guánové kupy. Naše studie poprvé odhalila, že ložisko netopýřího guána skýtá vysokou diversitu společenstva archeí, které je složeno jak ze zástupců původně půdních, tak podpovrchových *Crenarchaeota*.

Následující pasáž o rozsahu 11 stran obsahuje utajované skutečnosti a je obsažena pouze v archivovaném originále disertační práce uloženém na Přírodovědecké fakultě Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.

Contribution: 80 %