

СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ „СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ”
БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА „ОБЩА И ПРОМИШЛЕНА МИКРОБИОЛОГИЯ”

Красимира Стоянова Добрева

***БИОРАЗНООБРАЗИЕ НА АРСЕН-УСТОЙЧИВИ И
АРСЕН-ТРАНСФОРМИРАЩИ БАКТЕРИИ,
ИЗОЛИРАНИ ОТ ЗАМЪРСЕНИ МЕСТООБИТАНИЯ***

АВТОРЕФЕРАТ

за присъждане на образователната научна степен „Доктор”

Научна специалност Микробиология - 01.06.12

Научен ръководител:

Доц. д-р Венета Грудева

София, 2011

Използвани съкращения:

АДФ - Аденозиндифосфат

АТФ - Аденозинтрифосфат

ДГГЕ – Денатурираща градиентна гел електрофореза

ДНК- Дезоксирибонуклеинова киселина

КАС - Калиев ацетат

КОЕ - Колонии образуващи единици

КЦМ - Комбинат за цветни метали

МДК – Медодобивен комбинат

МИК - Минималната Инхибираща Концентрация

МПА - Месопептонен агар

МПБ - Месопептонен бульон

МПЖ - Месопептонна желатина

НА - Нишестен агар

ПДК - Пределно допустими концентрации

РНК- Рибонуклеинова киселина

СБАЛАГ – Специализирана болница за активно лечение по акушерство и гинекология

ХДС - Химически дефинирана среда

16S рДНК - 16S рибозомна ДНК

16S рРНК гени - 16S рибозомални РНК гени

AgNO₃ - Сребрен нитрат

As (III)-Арсенит

As (V)- Арсенат

BLAST - Информационна програма за сравняване на нуклеотидни последователности

bp – Базови двойки

D- Диаметър на колониите

FISH – Флуоресцентната *in situ* хибридизация

ITS – Интергенен спейсър регион

Kb - Килобази

PCR- Полимеразна верижна реакция

pH – Киселинност на средата

RFLP – Полиморфизъм по дължината на рестрикционните фрагменти

rrn – Рибозомален оперон

УВОД

Арсенът е повсеместно разпространен токсичен металоид, постъпващ в природата при ерозията на скалите, както и в резултат на антропогенни фактори. В резултат от индустриализацията, в околната среда попадат огромни количества замърсители с най-разнообразна природа – тежки метали, радиоактивни елементи, фенолни производни, нефтени продукти, пестициди и други. Арсенът е един от сериозните замърсители. Двете най-разпространените форми на арсен в природата са As(III) и As(V), най-често срещани като кислородни йони, съответно арсенат (AsO_4^{3-}) и арсенит (As(OH)_3). И двете форми са токсични за биологичните системи, макар че предизвикват различни увреждания в клетките. Продължителното излагане на високи концентрации на арсен-съдържащи съединения може да доведе до появата на кардиоваскуларни проблеми, високо кръвно налягане, инфаркт, онкологични заболявания, както и до нарушаване на пигментацията на кожата и поражения върху нервната система.

За почистването на околната среда от арсенови замърсявания се прилагат разнообразни методи. Третирането с химични средства намира приложение за почистване на води замърсени предимно с арсенитни йони. Сериозен недостатък на тези методи е вторичното замърсяване на околната среда. Това е основната причина в последните години да се търсят интензивно биологични средства за отстраняването на арсеновите замърсявания. Те се основават на използването на растения и микроорганизми, приложими са за почистване както на води така и на почви. Основното им предимство е отсъствието на допълнително замърсяване. Особено повишен е интересът към микроорганизмите, главно бактерии, резистентни към арсеновите съединения, притежаващи способност за трансформация на арсенатни и арсенитни йони. Изолирането, идентифицирането и охарактеризирането на арсен-трансформиращи бактерии, които имат потенциал за приложение в биоочистващите процеси е от съществено значение за успешното прилагане на тези технологии. От друга страна изучаването на генетичните компоненти, отговорни за устойчивостта и трансформационната способност на изолатите би спомогнало за разработването на методи за бързо откриване на арсен-трансформиращи микроорганизми в проби от околната среда и използването на тези гени като потенциални биомаркери за арсенови замърсявания. Това би било от съществено значение при провеждането на мониторингови изследвания на арсеновите замърсявания в околната среда. Именно на този проблем е посветен настоящият дисертационен труд. Изследванията са насочени към бактерии, изолирани от замърсени с тежки метали и арсен води и почви на територията на България и изучаване на трансформационната им способност по отношение на арсеновите съединения с цел използването им в процеси на биоочистване на замърсени почви и води.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия дисертационен труд е изолиране и изследване на арсен-трансформиращи бактерии от замърсени с тежки метали региони на територията на Р. България, с оглед прилагането им в технологии за отстраняване на арсенови замърсявания в околната среда.

За реализирането на целта бяха поставени следните конкретни задачи :

- 1. Характеристика на микробните популации в изследваните проби.**
- 2. Изолиране на бактерии, устойчиви на As(III) и As(V).**
- 3. Селекциониране на арсен-трансформиращи бактерии.**
- 4. Таксономична идентификация на селектираните изолати с класически и молекулни методи.**
- 5. Характеристика на арсен-трансформационния капацитет и устойчивостта към арсенови съединения на изследваните щамове.**
- 6. Скрининг за арсен- устойчиви, арсенит- оксидазни и арсенат-редуктазни гени в генома на селектираните изолати.**

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

За осъществяване на поставената цел и конкретните задачи са използвани разнообразни микробиологични методи за изолиране, идентификация и култивиране, биохимични изследвания, методи на класическата и молекулната таксономия, методи да изследване на арсен-трансформационен капацитет, подробно описани в раздел Материали и методи на дисертационния труд.

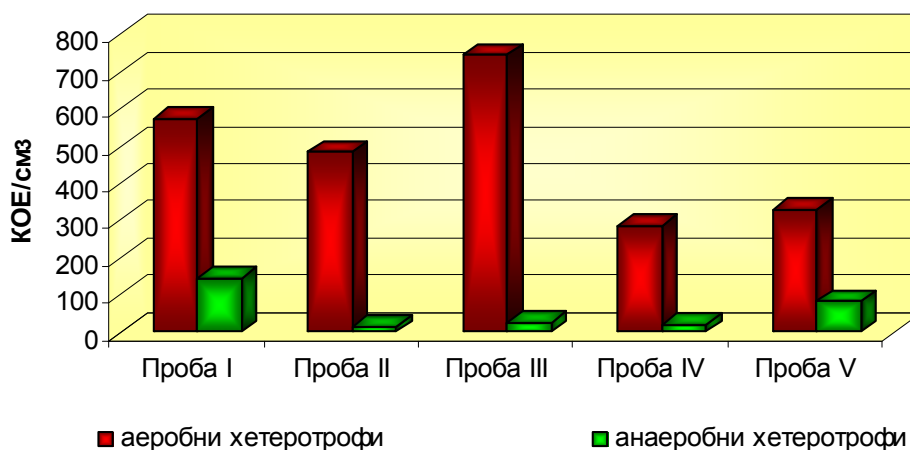
РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

I. Характеристика на микробните популации в изследваните проби

С цел оценка на влиянието на арсена, както и на съпътстващите го токсични метали, върху микробното разнообразие в изследваните проби, беше проведен анализ за наличие на микроорганизми от различни систематични и физиологични групи микроорганизми. Анализирани са общо пет проби:

- Проба “I” – почвена проба, взета на 10 см от желязната ограда на комбината за цветни метали (КЦМ), град Пловдив.
- Проба “II” – почвена проба, взета в близост до канала за отпадни води на КЦМ – Пловдив.
- Проба “III” - почвена проба, взета от необработваема земя, в близост до КЦМ – Пловдив.
- Проба “IV”- почвена проба от необработваема земя, в близост до МДК - град Пирдоп.
- Проба “V” – водна проба от река Марица, взета в близост до мястото на вливане на река Тополница в река Марица.

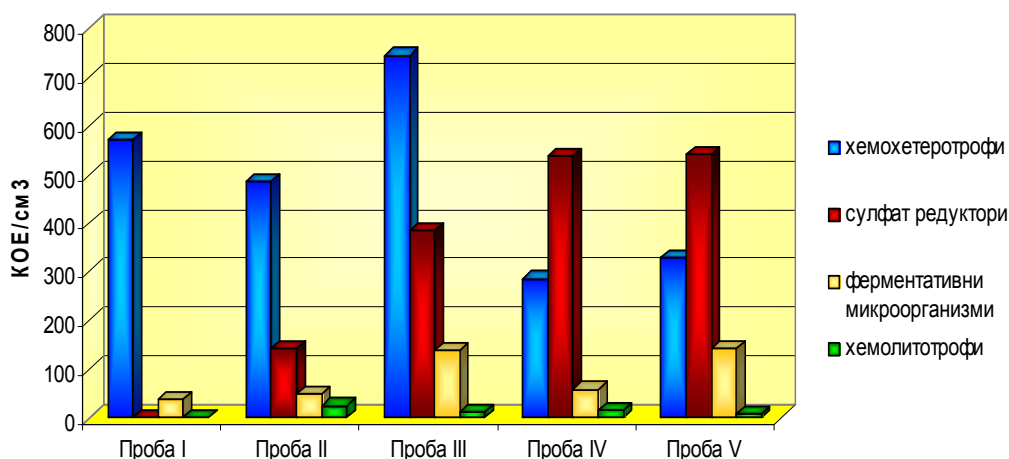
Първоначалният анализ включва определяне на общия брой микроорганизми, както и определяне на количеството на аеробните и анаеробните бактерии (фиг. 1).



Фиг 1: Количество на аеробни и анаеробни хетеротрофи в изследваните проби

Анализът на резултатите показва по-високо съдържание на аеробни микроорганизми в сравнение с анаеробните. Количеството на аеробните хетеротрофи варира в отделните проби, като най-високо е в проба III ($7,45 \cdot 10^2$ КОЕ/см³). Анаеробните хетеротрофни бактерии присъстват в по-големи количества единствено в проба I ($1,43 \cdot 10^2$ КОЕ/см³), макар че количеството им е по-малко от аеробните хетеротрофи в същата проба ($5,73 \cdot 10^2$ КОЕ/см³). Най – високо общо микробно число е установено в проба III ($7,7 \cdot 10^2$ КОЕ/см³), а най- ниско - в проба IV ($3,04 \cdot 10^2$ КОЕ/см³).

От систематичните групи е установено присъствие освен на аеробни хетеротрофи и на ацидофилни хемолитотрофи, сулфат редутори и ферментативни микроорганизми. Изключение прави само проба I, в която присъствие на сулфат редутори и ацидофилни хемолитотрофи не бе установено (фиг. 2).



Фиг.2. Количествен анализ на микроорганизмите от изследваните групи

Въз основа на получените резултати може да се обопи, че независимо от силното замърсяване с метали и металоиди в тези местообитания е формирано стабилно микробно съобщество.

II. Изолране на бактерии, устойчиви на As(III) и As(V)

1. Изолране на щамове, способни да се развиват в присъствието на арсен.

Общо двеста четиридесет и пет арсен устойчиви бактериални щамове са изолирани от изследваните проби. Петдесет от тях бяха изолирани от проба II, взета в близост до канала за отпадни води на комбината за цветни метали (КЦМ), град Пловдив - означени като „K” – изолати. От почвена проба IV са изолирани 62 щамове, показали способност да растат в присъствие на арсен, означени като „V”. От проба I са изолирани 33 различни бактериални щамове, устойчиви на арсен, означени като „S” и 81D1, 81D2 и 81D3. От проба III са изолирани четиридесет и седем различни щамове, обозначени като „M”. От проба V (води от река Марица) са изолирани общо петдесет и три щамове, означени като „C” - изолати.

2. Селекционирание на арсен-трансформиращи бактерии.

Първичен скрининг за наличието на арсен-трансформираща способност в изолираните щамове е проведен съгласно сребърно нитратния тест, директно върху колонии прорасли върху твърда хранителна среда (Muller *et al.* 2003). Тестът се основава на качествена реакция между сребърния нитрат (AgNO_3) и арсенитните, респективно арсенатните йони. Взаимодействайки с арсенитните йони, AgNO_3 дава лимонено жълто оцветяване, а с арсенатните тъмно кафяво.

От всички двеста четиридесет и пет бактериални изолата са селектирани двадесет и седем щамове, показали трансформационна активност. Дванадесет от избраните щамове показват способност да редуцират арсената до арсенит и петнадесет да окисляват арсенита до арсенат (таблица 1).

Таблица 1: Изолати, притежаващи арсен-трансформираща способност

Изолат	Изолиран в присъствието на	Редуцира As(V)	Окислява As(III)
M1	As (V)	+	-
M4	As (III)	-	+
M5	As (III)	-	+
K1	As (V)	+	-
K2	As(V)	+	-
K3	As (V)	+	-
K4	As (V)	+	-
K5	As (III)	-	+
K6	As (III)	-	+
81D2	As (V)	+	-
81D3	As (III)	-	+
C1	As (V)	+	-
C2	As (III)	-	+
C3	As (III)	-	+
C4	As (III)	-	+
C6	As (V)	+	-
C8	As (III)	-	+
V1	As (III)	-	+
V2	As (V)	+	-
V3	As (V)	+	-
V5	As (V)	+	-
V6	As (V)	+	-
S2	As (III)	-	+
S3	As (III)	-	+
S4	As (III)	-	+
S5	As (III)	-	+
S7	As (III)	-	+

Легенда: (+)- наличие на трансформираща активност;
 (-)- липса на трансформираща активност.



Фиг.3: Цвят на преципитата като функция от съотношението $\text{As (V)}/\text{As (III)}$ (Simeonova, *et al.* 2004).

Трансформационната способност на изолатите е потвърдена и посредством т.н. „Микроплаков скрининг тест за доказване на арсенит-окисляващи и арсенат-редуциращи бактерии” (Simeonova *et al.*, 2004). По степента на оцветяване на получената утайка тук може да се съди и за степента на трансформационната способност на изолатите – фиг. 3.

Резултатите от проведения микроплаков скрининг тест потвърждават тези от сребърно – нитратния тест. От всички батериални изолати само двадесет и седем батериални щамове притежават арсен-трансформираща активност. Дванадесет от тях притежават способността да редуцират арсенат, останалите петнадесет проявяват окисляваща активност по отношение на арсенитните йони.

III. Таксономична идентификация на изолираните щамове:

Бактериите, показали арсен-трансформираща способност бяха идентифицирани посредством методи на класическата таксономия, базирани на фенотипни характеристики. Допълнително, таксономичната им принадлежност беше потвърдена и с методи на молекулната таксономия с помощта на съвременни молекулярни техники.

1. Класическа таксономия

За идентификацията на изолатите са използвани следните характеристики:

- ✓ **Макроморфологични характеристики** - Върху твърда хранителна среда (МПА), всички изолирани арсен-трансформиращи бактерии образуват добре оформени колонии, предимно кръгли по форма, със сравнително големи размери (1 до 11 mm в диаметър).
- ✓ **Микроморфологични характеристики** - Клетките на преобладаваща част от изолираните бактерии са с пръчковидна форма, прави или слабо извити, всички с изключение на изолата 81D2 са Грам (-), не образуват спори. Клетките на изследваните щамове са със средна големина между 0,5 – 1,5 μm . Всички, с изключение на щам S4, са подвижни. При изолатите означени като M1, K1, K2, K5, 81D3, C1, V6 и S7 беше наблюдавана капсула.
- ✓ **Физиологични характеристики** –облигатни и факултативни (M5, 81D2, C2, C6, V2, V5 и S4) аеробни микроорганизми, мезофили, неотрофили и халотолерантни бактерии.
- ✓ **Биохимични характеристики** - Всички тествани изолати са каталазо- и оксидазо- позитивни и отделят амоняк при дезаминиране на аминокиселини. Всички изолати с изключение на C3 проявяват способност да редуцират нитрати до нитрити. Преобладаваща част отделят индол при усвояването на триптофан и сероводород при усвояване на сярсъдържащите аминокиселини. Доказано е наличието на ензими хидролизиращи скорбяла – изолати M1, K1, K2, K5, 81D3 и V6. Изолатите C1, V5, S4 и S7 показват способност да хидролизират желатин. Преобладаваща част от тестваните щамове са способни да усвояват цитрат.

Таксономичният статус на изолатите е определен по *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9-th edition* (таблица 2). На базата на получените резултати може да се заключи, че 74% от изолатите се отнасят към семейство *Pseudomonadaceae* и по - точно към род *Pseudomonas*. Останалите 26% от изследваните щамове показват разнообразна таксономична принадлежност. Установено беше, че три от тях (V2, S4 и

V5) се отнасят към семейство *Rhodocyclaceae*. Точната идентификация на тези три изолата до вид, с помощта на класическата таксономия на базата на анализираният признаци не беше успешна. Един от изолатите (щам M5) се отнася към семейство *Alcaligenaceae* с представител *Alcaligenes faecalis*.

Три щамове (M4, C3 и 81D2) не бяха идентифицирани на базата на използваните набори от тестове.

Таблица 2: Таксономичен статус на изолираните арсен-трансформиращи бактерии, въз основа на класическата таксономия.

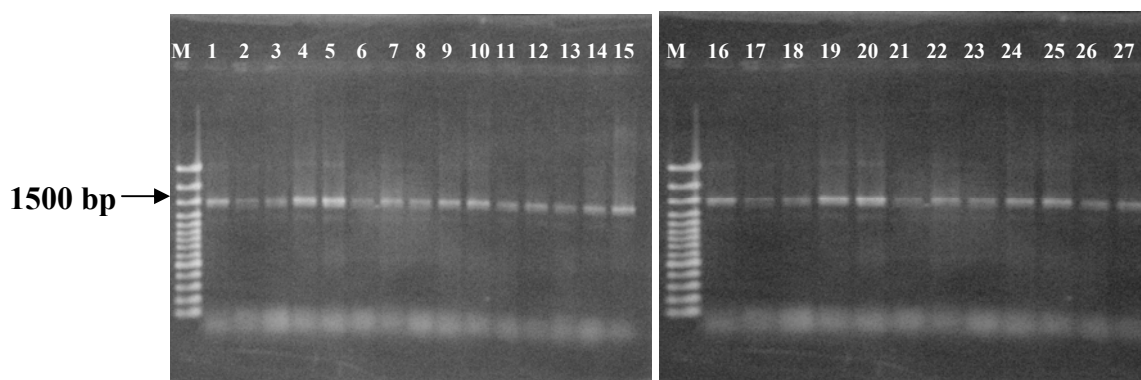
Щам	Трансформира	Идентификация	
		Семейство	Род
S2	As [III]	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>
K3	As [V]	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>
V6	As [V]	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>
C8	As [III]	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>
C1	As [V]	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>
S7	As [III]	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>
K4	As [V]	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>
K6	As [III]	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>
S3	As III]	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>
V1	As [III]	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>
V3	As [V]	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>
C4	As [III]	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>
C2	As [III]	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>
C6	As [V]	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>
S5	As [III]	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>
M1	As [V]	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>
K1	As [V]	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>
K2	As [V]	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>
K5	As [III]	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>
81D3	As [III]	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>
V2	As [V]	<i>Rhodocyclaceae</i>	неидентифициран
S4	As [III]	<i>Rhodocyclaceae</i>	неидентифициран
V5	As [V]	<i>Rhodocyclaceae</i>	неидентифициран
M5	As [III]	<i>Alcaligenaceae</i>	<i>Achromobacter</i>
M4	As [III]	неидентифициран	неидентифициран
C3	As [III]	неидентифициран	неидентифициран
81D2	As [V]	неидентифициран	неидентифициран

Макар и доста информативни, методите на класическата таксономия не позволяват категоричното идентифициране на всички изследвани изолати. Това наложи като следваща стъпка в работата използване на методи на молекулната таксономия, които позволяват както потвърждаване или отхвърляне на установената таксономична принадлежност, така и идентификация на изолатите до вид.

2. Молекулно-генетични методи за идентификация на изолираните бактерии

PCR амплификацията и последващото секвениране на 16S рДНК фрагмента е един от молекулно-генетичните методи, наложили се в идентификацията на неизвестни бактериални видове.

Използвайки “универсални” еубактериални праймери при всички двадесет и седем изолата успешно бе амплифициран 1,5 kb 16S рДНК фрагмент (фиг. 4).

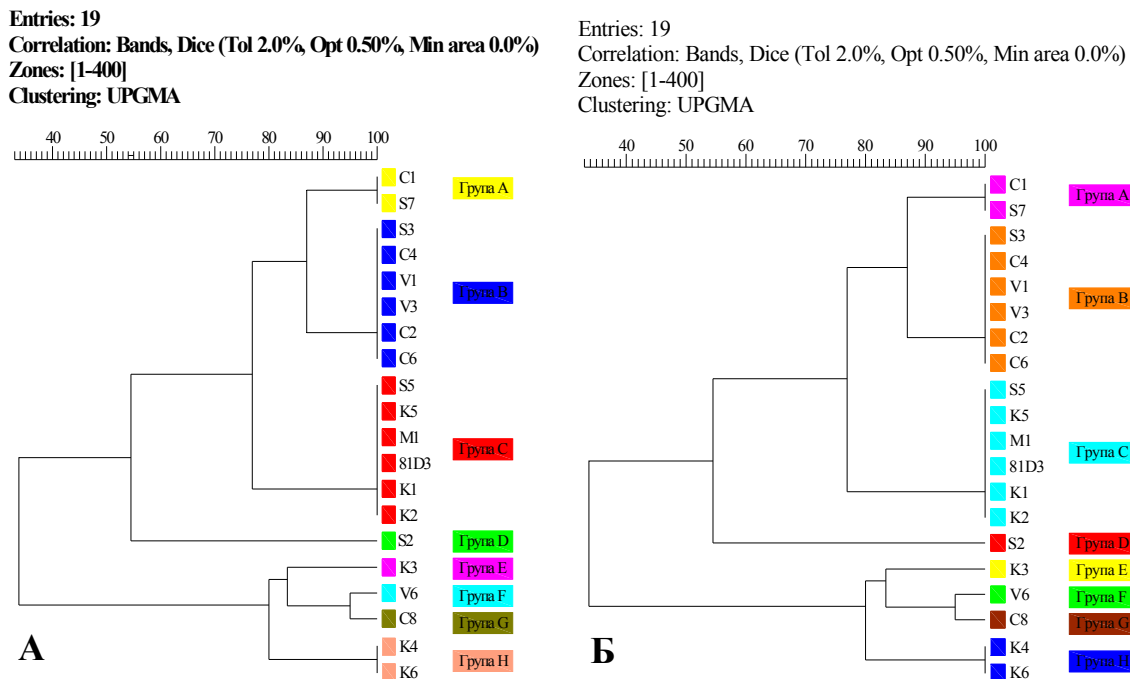


Фиг.4: Електрофоретичен анализ на PCR продуктите получени при амплификация на 16S рДНК (праймери рА - рН') в 1.5% агарозен гел: М - 100bp ДНК маркер; 1–М1; 2–S2; 3–S3; 4–М4; 5–М5; 6–К1; 7–К2; 8–К3; 9–К4; 10–К5; 11–К6; 12–81D2; 13–81D3; 14–С1; 15–С2; 16–С3; 17–С4; 18–S5; 19–С6; 20–S7; 21–С8; 22–V1; 23–V2; 24–V3; 25–S4; 26–V5; 27–V6.

Известно е, че получените след рестрицирането на 16S рДНК фрагмента профили са сходни при представителите от един и същи вид. Предварителното разпределяне на щамовете в RFLP групи позволява да се секвенира 16S рДНК на представители от всяка група, вместо на всички бактериални изолати. За тази цел, PCR амплифицираният 16S рДНК фрагмент на идентифицираните, с класическите методи, като псевдомонадни щамове бе подложен на рестрикция с три тетрамерни, рестрикционни ендонуклеази: *Hha I* (*Hin6I*), *Hae III* (*Bsu RI*) и *Msp I* (фиг. 5).

Рестрикцията с ендонуклеазите: *Hha I* (*Hin6I*) и *Hae III* (*Bsu RI*) даде идентични резултати. Ензимът *Msp I* генерира напълно идентични профили при всички тествани щамове, което го определи като недостатъчно дискриминативен и неприложим за RFLP анализ на 16S рДНК фрагмента при представители на *Pseudomonas*. Получените осем рестрикционни профила показва наличието на поне осем бактериални вида. На този етап от изучаването на изолираните щамове, биха могли да се изберат представители от всяка рестрикционна група и техният 16S рДНК фрагмент да бъде секвениран, с което идентифицирането им до вид ще бъде завършено. Четири от формираните рестрикционни групи включват само по един представител – представящ самостоятелен генотип (таблица 3).

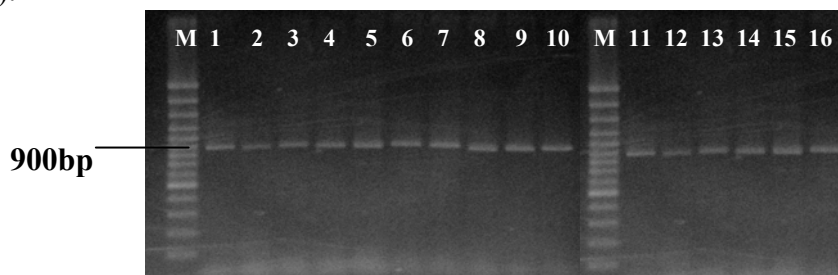
Останалите RFLP групи, включват повече бактериални щамове, някои от които показват различна трансформационна способност. Това ни наведе на предположението за наличието на вътрешновидови различия между щамовете в групата. Като следваща стъпка предприехме установяването на полиморфизъм във всяка RFLP група, включваща повече от един представител. Използван бе по-високо дискриминативен метод, като RFLP анализ на PCR амплифицирания ITS фрагмент от рибозомалния оперон.



Фиг. 5: Дендрограма получена чрез UPGMA клъстерен анализ с програма GelCompar, показваща групирането на щамовете след RFLP анализ на 16S рДНК фрагмента с ензимите: А- *NhaI*; Б- *Hae III*.

След резултатите от този анализ биха могли да бъдат секвенирани 16S рДНК фрагментите на представители с различен генотип. Това от една страна би потвърдило дискриминативността на методиката, а от друга - би потвърдило еднаквата видова принадлежност на представители с вътревидови различия. Наред с това, този подход отменя необходимостта от секвениране на всички двадесет щама, предварително идентифицирани като р. *Pseudomonas*.

Всички щамове, включени според RFLP анализа на 16S рДНК в групите А, В, С и Н бяха подложени на PCR амплификация на техния ITS фрагмент. При всички шестнадесет бактериални щама е получен само един PCR продукт с големина от 900 bp (фиг.6).

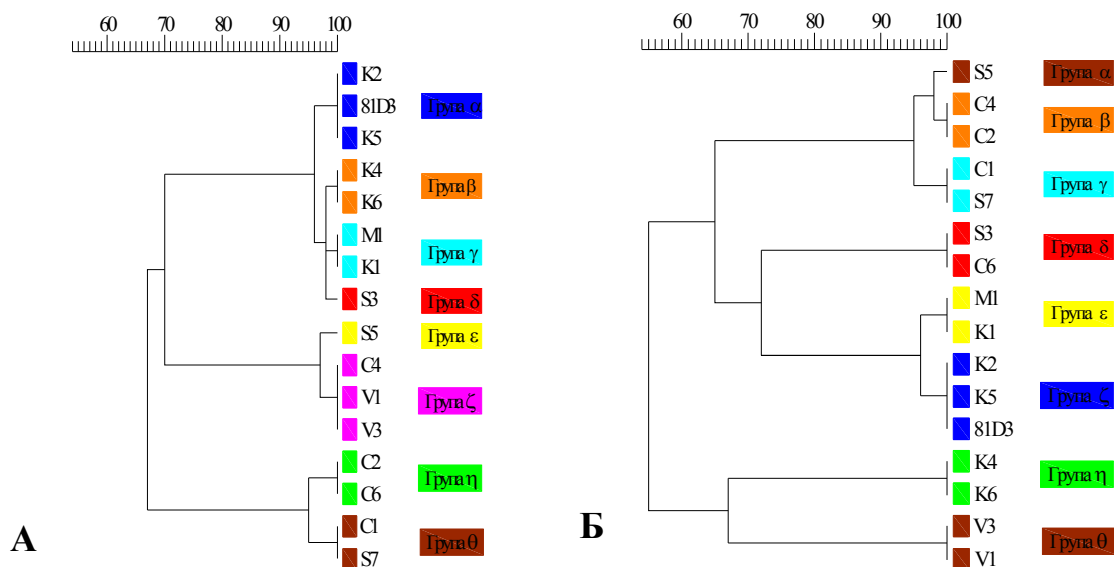


Фиг.6: PCR амплификация на ITS фрагмента от *gpn* оперона на щамовете идентифицирани като различни видове от род *Pseudomonas*. М- 100bp ДНК маркер; 1-S5; 2-M1; 3-81D3; 4-K1; 5-K2; 6-K5; 7-K4; 8-K6; 9-M3; 10-C4; 11-V1; 12-V3; 13-C1; 14-S7; 15-C2; 16-C6.

Полученият след PCR амплификацията ITS ампликон бе подложен на RFLP анализ. Извършена беше рестрикция с три тетрамерни ендонуклеазни ензима *Taq I*, *Alu I* и *Msp I*. Разпределението на изолатите в групи въз основа на проведените RFLP анализи е показано на фиг. 7 и фиг. 8.

Entries: 19
 Correlation: Bands, Dice (Tol 2.0%, Opt 0.50%, Min area 0.0%)
 Zones: [1-400]
 Clustering: UPGMA

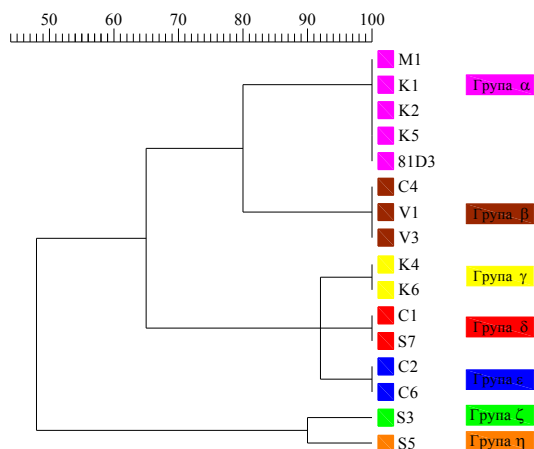
Entries: 19
 Correlation: Bands, Dice (Tol 2.0%, Opt 0.50%, Min area 0.0%)
 Zones: [1-400]
 Clustering: UPGMA



Фиг. 7: Дендрограма получена чрез UPGMA клъстерен анализ с програма GelCompar, показваща групирането на щамовете след RFLP анализ на ITS фрагмента с ензимите: А- *Taq I* и Б- *Alu I*.

На база на RFLP анализа на 16S рДНК щамовете, идентифицирани като различни видове от род *Pseudomonas*, първоначално бяха разпределени в осем групи. Щамовете S2, K3, V6 и C8 попаднаха самостоятелно, всеки в отделна група, с което бяха разграничени от останалите щамове, съответно като генотип 1 – S2; генотип 2 – K3, генотип 3 – V6 и генотип 4 – C8. Резултатите от рестрикционните анализи на ITS фрагмента за щамовете от групите А, В, С и Н, потвърдиха първоначалното разпределение на щамове C1 и S7, както и K4 и K6 в два отделни самостоятелни генотипа (генотип 5 и генотип 6). По отношение на останалите щамове обаче, RFLP анализът показва по-голямо разнообразие. Така например, шестте щамове от група В показаха твърде разнородно групиране при рестрикцията на ITS с ензимите *Taq I* и *Alu I*. Рестрикцията с *Taq I* ги обедини в три групи, съответно: C2 и C4; S3 и C6; V1 и V3. Докато при рестрикцията с ензима *Alu I* също бяха разпределени в три групи, но различни от предходните: S3; C4, V1 и V3; C2 и C6. За категоричното им групиране беше приложен и RFLP на ITS фрагмента с още един допълнителен ензим – *Msp I*. Според него щамовете от група В бяха разделени по начин, съответстващ на разпределението им при рестрикцията с ензима *Alu I*, а именно: S3; C4, V1 и V3; C2 и C6. От тук може да се заключи, че щам S3 формира самостоятелен генотип 7, генотип 8 е формиран от щамовете C4, V1 и V3 и генотип 9 от щамовете C2 и C6. Аналогична е ситуацията и при шестте щамове обединени при RFLP анализа на 16S рДНК в група С. След анализа на ITS фрагмента те бяха по-детайлно диференцирани един от друг. Рестрикцията на ITS фрагмента и с трите ензима категорично отделя щам S5 в самостоятелен RFLP генотип – 10, докато при останалите пет щамове отново се наблюдават разлики в групирането. Рестрикцията с ензима *Msp I* обединява щамовете M1, K1, K2, K5 и 81 D3 в един генотип, а рестрикцията с ензимите *Taq I* и *Alu I* ги разделя в две отделни RFLP групи: M1 и K1 (генотип 11) и K2, K5 и 81 D3 (генотип 12) – таблица 3.

Entries: 19
 Correlation: Bands, Dice (Tol 2.0%, Opt 0.50%, Min area 0.0%)
 Zones: [1-400]
 Clustering: UPGMA



Фиг.8: Дендрограма, получена чрез UPGMA клъстерен анализ с програма GelCompar, показваща групирането на щамовете след RFLP анализ на ITS фрагмента с ензим *Msp I*.

Получените резултати доказват, че RFLP анализът на ITS фрагмента е по-високо дискриминативна методика от 16S рДНК-RFLP анализа и е приложим за доказване на вътревидови различия сред щамове от род *Pseudomonas*.

Проведените RFLP анализи на 16S рДНК и на ITS фрагмента, на изолатите идентифицирани като щамове от род *Pseudomonas*, показват наличието на дванадесет различни генотипа сред анализиранияте щамове. Тези анализи от една страна предоставят информация относно вътревидовото разнообразие на анализиранияте щамове, а от друга страна спестяват необходимостта от секвениране на всичките двадесет щамове, идентифицирани според класическата таксономия като род *Pseudomonas*. След проведените RFLP анализи, за секвениране на 16S рДНК фрагмента е избран по един представител от всяка една генотипна група. Секвениране на всички щамове от род *Pseudomonas* не беше необходимо, тъй като те вече бяха разпределени в групи на база на достатъчно дискриминативна методика. Притежавайки същия рестрикционен профил, останалите членове на групата би следвало да принадлежат към същия бактериален вид.

За секвениране на 16S рДНК фрагмента на щамовете от род *Pseudomonas* бяха избрани щамовете: S2 - генотип 1; K3 - генотип 2; V6 – генотип 3; C8 – генотип 4; S7 - генотип 5; K4 - генотип 6; S3 - генотип 7; V3 - генотип 8; C6 - генотип 9; S5 - генотип 10; M1 - генотип 11; K2 - генотип 12. 16S рДНК фрагмента на всички останали изолати, показали фенотипно различни характеристики от тези на род *Pseudomonas*, също беше подложен на секвениране за точната идентификация на изолатите.

Обработката и анализът на получените секвенции в базата данни е извършено с помощта на програмата BLAST в сайта *Ribosomal Database Project* (<http://rdp.cme.msu.edu>). Анализът на данните, получени от свързването по принципа на комплиментарността, на получените секвенции със секвенциите на известни гени в генбазата показват, че 16S рДНК секвенциите на изолираните щамове имат $\approx 78\%$ сходство със секвенции, характерни за познатите родове от γ -*Proteobacteria*. Резултатите от идентификацията на изолатите, основана на 16S рДНК анализ са посочени в таблица 4.

Таблица 3: RFLP групиране и генотипове на изолатите от р. *Pseudomonas*, получени в резултат на RFLP анализи на 16S рДНК и ITS фрагментите.

Щам	RFLP групи					RFLP Генотип
	16S рДНК		ITS фрагмент			
	<i>Hha I</i>	<i>Hae III</i>	<i>Taq I</i>	<i>Alu I</i>	<i>Msp I</i>	
<i>C1</i>	A	A	γ	θ	δ	5
<i>S7</i>	A	A	γ	θ	δ	5
<i>S3</i>	B	B	δ	δ	ζ	7
<i>C4</i>	B	B	β	ζ	β	8
<i>V1</i>	B	B	θ	ζ	β	8
<i>V3</i>	B	B	θ	ζ	β	8
<i>C2</i>	B	B	β	η	ϵ	9
<i>C6</i>	B	B	δ	η	ϵ	9
<i>S5</i>	C	C	α	ϵ	η	10
<i>K5</i>	C	C	ζ	α	α	12
<i>81D3</i>	C	C	ζ	α	α	12
<i>K2</i>	C	C	ζ	α	α	12
<i>M1</i>	C	C	ϵ	γ	α	11
<i>K1</i>	C	C	ϵ	γ	α	11
<i>S2</i>	D	D	-	-	-	1
<i>K3</i>	E	E	-	-	-	2
<i>V6</i>	F	F	-	-	-	3
<i>C8</i>	G	G	-	-	-	4
<i>K4</i>	H	H	η	β	γ	6
<i>K6</i>	H	H	η	β	γ	6

Таксономичният статус на изолираните арсен-трансформиращи бактериални щамове, получен въз основа на секвенционния анализ на 16S рДНК фрагмента показва присъствие на осем различни вида от род *Pseudomonas*, един изолат от р. *Azoarcus* както и на видовете *Alcaligenes faecalis* и *Thauera aromatica*. Четири от изолатите останаха неидентифицирани до вид, дори и след секвенционния анализ на 16S рДНК фрагмента. Полиморфизъм между щамовете беше установен само при видовете: *Ps. stutzeri* и *Ps. mendocina*.

Добре познати в литературата като арсен-устойчиви и арсен-трансформиращи бактерии са *Alcaligenes faecalis* (Silver & Phung, 2005), *Ps. aeruginosa* (Parvatiyar et al., 2005) и *Ps. putida* (Abrashitova et al, 1986a; Abrashitova et al, 1986b; Abrashitova et al, 1982; Abrashitova et al, 1980; Мунбаева et al., 1990; Parvatiyal et al., 2005). Липсват обаче, литературни данни за видове като *Ps. plecoglossicida*, *Ps. mendocina*, *Ps. fulva* и *Ps. stutzeri* да имат арсен-трансформационна способност, както и да са били изолирани от арсен-замърсени местообитания. Сравнително от скоро като такива са познати и родовете *Thauera* и *Azoarcus*.

Таблица 4: Филогенетична характеристика на бактерии, изолирани от замърсени с арсен местообитания, въз основа секвенция на 16S рРНК гена.

Щам	16S рРНК идентификация			Идентичност
	Семейство	Род	Вид	
S2	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	<i>Ps. plecoglossicida</i>	100%
K3	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	<i>Ps. pseudoalcaligenes</i>	100%
V6	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	<i>Pseudomonas sp.</i>	67%
C8	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	<i>Pseudomonas sp.</i>	79%
C1	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	<i>Ps. aeruginosa</i>	100%
S7	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	<i>Ps. aeruginosa</i>	
K4	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	<i>Ps. putida</i>	100%
K6	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	<i>Ps. putida</i>	
S3	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	<i>Ps. mendocina</i>	100%
V1	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	<i>Ps. mendocina</i>	100%
V3	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	<i>Ps. mendocina</i>	
C4	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	<i>Ps. mendocina</i>	
C2	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	<i>Ps. fulva</i>	100%
C6	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	<i>Ps. fulva</i>	
S5	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	<i>Ps. stutzeri</i>	100%
M1	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	<i>Ps. stutzeri</i>	100%
K1	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	<i>Ps. stutzeri</i>	
K2	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	<i>Ps. stutzeri</i>	99%
K5	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	<i>Ps. stutzeri</i>	
81D3	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	<i>Ps. stutzeri</i>	
M4	Chromatiaceae	Rheinheimera	неидентифицирана γ-протеобактерия	100%
M5	Alcaligenaceae	<i>Achromobacter</i>	<i>A. faecalis</i>	100%
C3	Acetobacteraceae	Acidiphaera	Неидентифицирана Бактерия	66%
V2	Rhodocyclaceae	Rhodoferax	Неидентифицирана β-протеобактерия	77%
S4	Rhodocyclaceae	Azoarcus	<i>Azoarcus sp.</i>	89%
V5	Rhodocyclaceae	Thauera	<i>Thauera aromatica</i>	100%
81D2	неидентифициран щам	неидентифициран щам	неидентифициран щам	-

От изолатите, идентифицирани като таксономично еднакви бактериални щамове и показващи еднаква трансформационна активност по отношение на арсена, беше избран по един представител за по нататъшни изследвания.

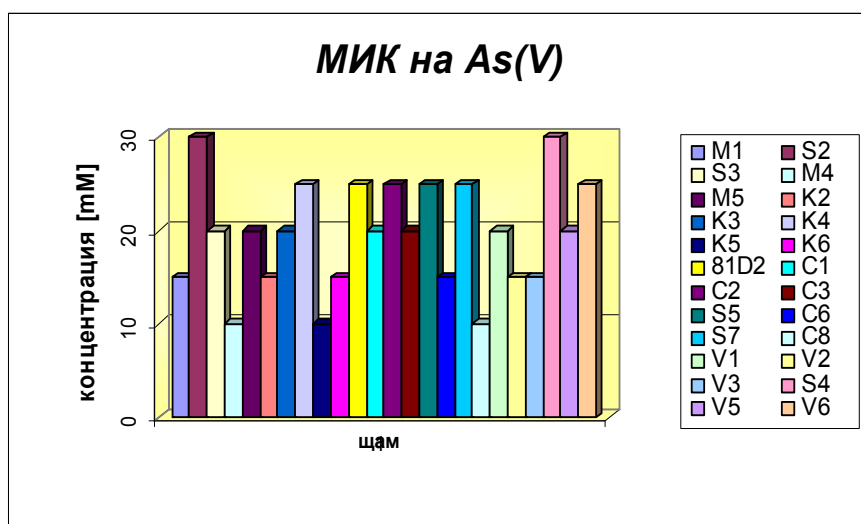
IV. Характеристика на устойчивостта на изследваните щамове към арсенови съединения и на арсен-трансформационния им капацитет

1. Определяне на минималната инхибираща концентрация за As (V) и As (III) на изолираните щамове.

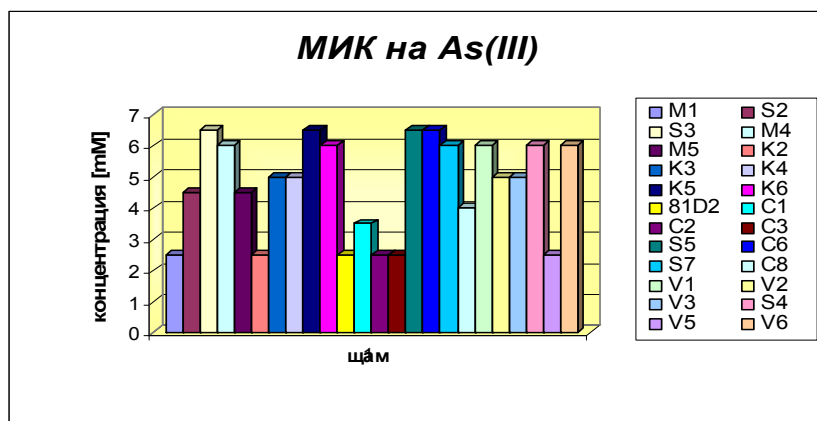
С цел оценка на преживяемостта на изолатите в арсен-замърсени местообитания и потенциалът им за използване в биоремедиационни процедури, беше определена МИК на арсенитните и арсенатните йони. Установено е, че всички селектирани щамове показват устойчивост към сравнително високи концентрации на As(III) и на As(V) – фиг.9 и 10, като едновременно с това не загубват и трансформационната си активност, при тази концентрация. Съгласно данни в литературата бактериите, изолирани от замърсени с арсен местообитания могат да бъдат класифицирани като ниско устойчиви, умерено устойчиви и високо устойчиви на арсен (Hedges & Baumberg 1973, Ordonez *et al.*, 2005). На базата на това, изследваните щамове могат да бъдат причислени към високо устойчивите на арсен бактерии.

Изолираните арсен-трансформиращи бактерии показват устойчивост към концентрации на арсенат по високи от тези, познати в литературата. Референтни организми като *Ps. aeruginosa*, *Ps. putida*, *B. subtilis*, *A. eutrophus*, *E. coli*, *S. aureus*, *S. cerevisiae* и *A. nidulans*, не могат да растат при концентрация на арсената в средата по-висока от 10 mM (Carlin *et al.*, 1995; Wysocki *et al.*, 1997; Canovas *et al.*, 2003; Podol'skaia *et al.*, 2002; Patel *et al.*, 2007).

Всички изолати показват от 2 до 10 пъти по-висока устойчивост спрямо арсенат (по-слабо токсичната форма на арсена) в сравнение с устойчивостта им спрямо арсенита. Може да се отбележи тенденцията, че изолатите с арсенит окисляваща способност показват по-висока устойчивост на арсенит, в сравнение с изолатите проявяващи арсенат редуктазна активност.



Фиг.9: Минимална инхибираща концентрация на As (V) за изолираните бактерии



Фиг.10: Минимална инхибираща концентрация на As (III) за изолираните бактерии

2. Растеж на изолатите в присъствие на арсенитни и арсенатни йони.

С цел оценка зависимостта на развитието на изолираните бактериите от намиращите се в средата арсенови йони е изследван растежът на бактериалните щамове в присъствието и отсъствието на арсенитни и арсенатни йони.

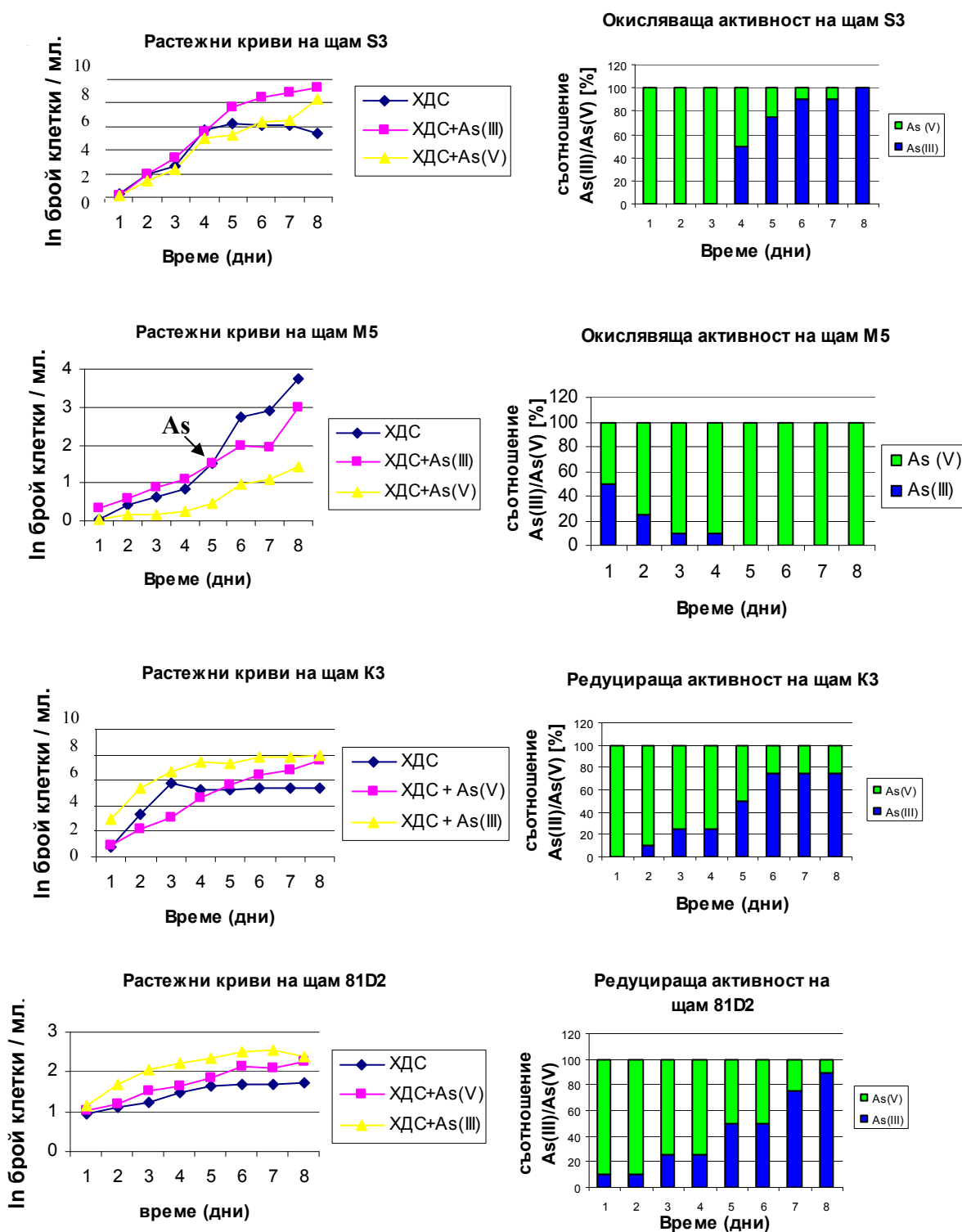
С помощта на микроплаковия скрининг тест е проследена и трансформационната активност на изолатите в продължение на осем дни култивиране. Паралелно с отчитането растежа на изолатите е проследявано и изменението на рН на средата по време на култивирането.

Предварителни изследвания, проведени с „микроплаковия скрининг тест” показват, че промяна в рН на средата не повлиява съотношението на арсенитни/арсенатни йони в нея (Simeonova *et al.*, 2004). Изменения в съотношението на тези йони в средата при този експеримент могат да са в резултат единствено на трансформационната активност на култивирания в средата бактериален щам.

Почти при всички изследвани щамове бе забелязан по-интензивен растеж в присъствието на арсенови йони, което показва, че селектираните изолати са не само устойчиви, но и предпочитано растат в присъствието на арсен. Като цяло за по-голяма част от изолатите по-силно стимулиращ ефект върху развитието им показват арсенатните йони в средата. Те са по-слабо подвижни и по-слабо токсични за бактериалните клетки. Сред изолатите обаче, присъстват и щамове, показали по-интензивен растеж в присъствието на силно токсичните за клетките арсенитни йони (фиг.11). Очевидно тези щамове притежават специфични механизми за арсен устойчивост. За тях бе предположено, че окислението на арсенита е спрегнато с генерирането на енергия.

Интересен се оказа щам М5 (*A. faecalis*), който проявява окислителна активност на 24-ия час от култивирането му в присъствие на As (III) (фиг. 11). До петия ден от развитието на щам М5, As(III) беше напълно трансформиран в As(V). При внасянето в средата на допълнително количество стерилен арсенит на петия ден от развитието му, щамът продължава окислителната си способност със същата активност, както в началото на култивирането му. Ходът на растежната му крива в присъствие на арсенит е типичен за диауксен растеж (появява се кратка стационарна фаза и отново експоненциален растеж). Това може да се обясни с индуктивния характер на системите за преодоляване на токсичността на арсена. Токсичният ефект на арсенитните йони

повлияват развитието на клетките на щам M5, но не оказват влияние върху окислителната му активност.



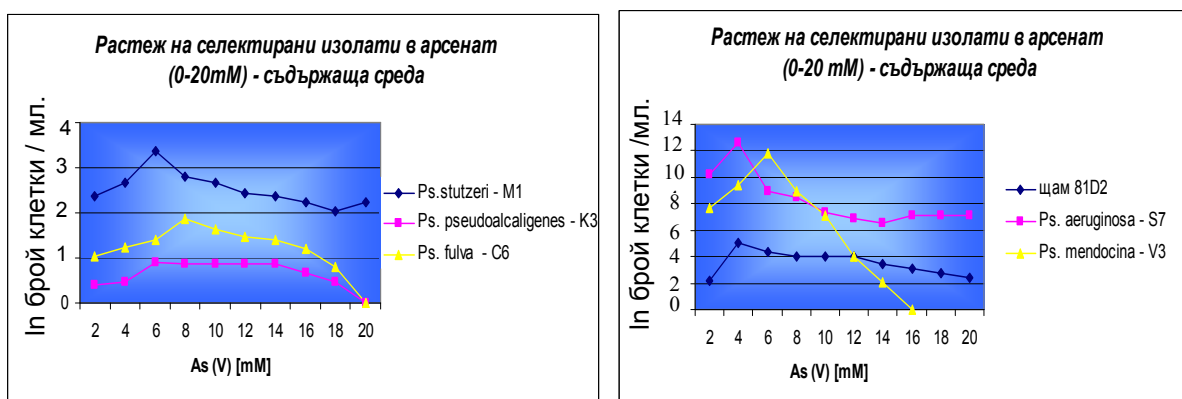
Фиг. 11: Трансформираща активност и растежни криви на избрани щамове в присъствие и отсъствие на арсенит и арсенат.

При по-голяма част от изследваните щамове трансформационната способност на изолатите е в пряка връзка със стимулиращия ефект на даден йон върху растежа и развитието на съответния щам. При едни изолати (V2, V3 и S3) йонът, който подлежи на трансформация стимулира растежа на бактериалния щам, а при други (K2, K6, 81D2, C6, V1, S5 и S7) растежа и развитието на изолатите се засилва от йоните, продукт на трансформационната активност на съответния щам.

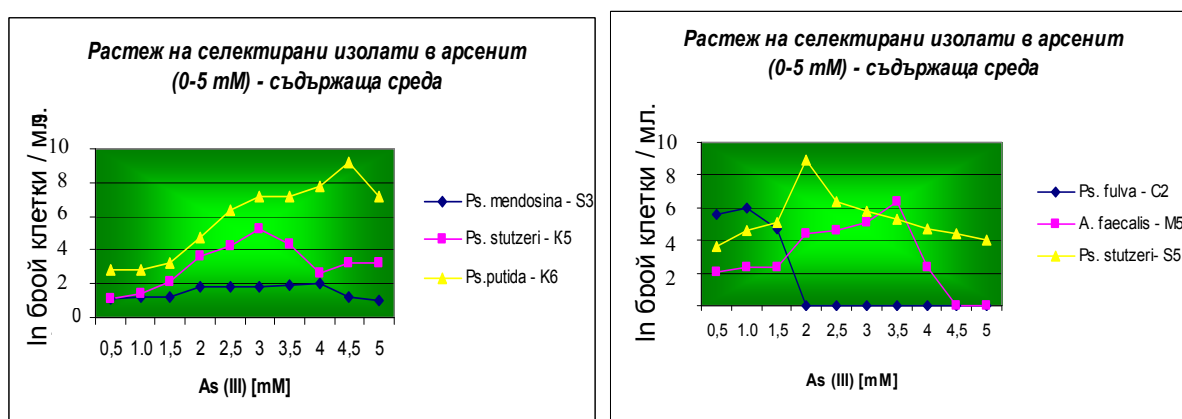
В съответствие с литературните данни при някои от щамовете (C1, C2, V3 и V5) редуцията на арсенат е свързана с алкализиране на средата. Повишаване на рН на средата беше констатирано в резултат на окислителната активност на изолатите M4, M5 и S4.

От анализа на получение резултати би могло да се заключи, че изолатите M5 (*A. faecalis*), K6 (*Ps. putida*), C2 (*Ps. fulva*), C8 (от р. *Pseudomonas*), S5 (*Ps. stutzeri*), V1 (*Ps. mendocina*) и S4 (от р. *Azoarcus*) са перспективни за използването им в технологии за почистване на води и почви от арсенови замърсявания.

От изследваните изолати бяха подбрани следните щамове, показали изменение в растежните си криви при култивиране в присъствие и отсъствие на арсен: M1, M5, K3, K5, K6, 81D2, C2, C6, S3, S5, S7 и V3. За определяне на оптималната за растежа на щамовете концентрация на арсенитни/арсенатни йони, те бяха култивирани при нарастващи концентрации на As(III) от 0 до 5 mM и As(V) от 0 – 20 mM (фиг. 12 и 13).



Фиг.12: Растеж на селектираните изолати в арсенат (0-20 mM)-съдържаща среда.



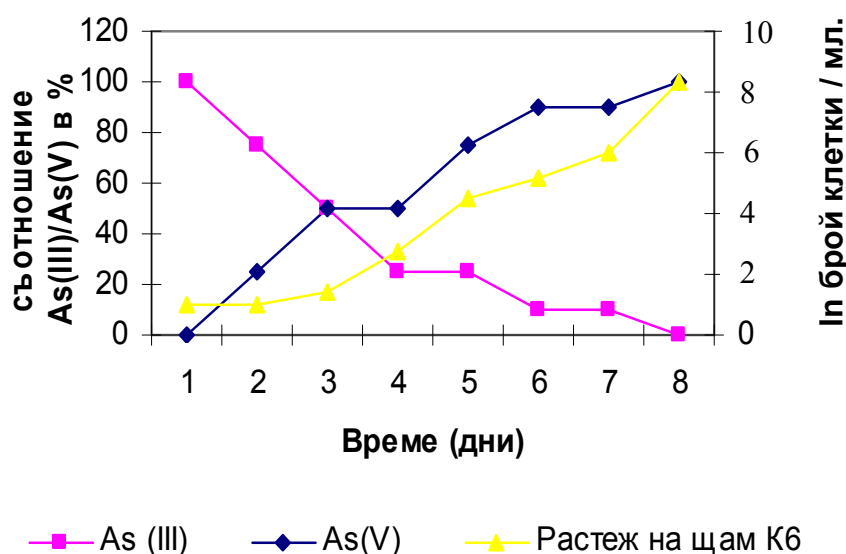
Фиг.13: Растеж на селектираните изолати в арсенит (0-5 mM)-съдържаща среда.

В зависимост от степента на замърсяването на почвите и водите с арсен, може да се подбере изолат с най-добра трансформираща активност, постигащ максимално развитие при съответната концентрация за бързо и ефективно биологично почистване на съответното замърсяване. На базата на получените резултати би могло да се заключи, че щамовете *Ps. putida* - К6 и *Alcaligenes faecalis* - М5 могат да се считат като подходящи за третиране на силно замърсени с арсенитни йони среди. За третиране на местообитанията замърсени с високи концентрации на арсенатни йони, въз основа на получените до тук резултати, като най-ефективен може да бъде предложен шам К3 - *Ps. pseudoalcaligenes*. Високата концентрация на арсенит/арсенат, при която тези изолати показват максимален растеж в това изследване, наред с трансформиращите им способности е основание за това твърдение.

V. Използване на арсенита като енергетичен субстрат

Макар и за повечето бактерии окислението на арсенита да е потенциален детоксифициращ механизъм, днес са известни и прокариоти, които използват арсеновите йони като източник за генериране на енергия или в процеса на арсенит окислението или в процеса на арсенатно дишане. Тази група прокариоти са филогенетично различни и могат да се открият в широк кръг хабитати (Oremland & Stolz, 2003).

При изследване на растежа на арсен-трансформиращи бактерии, в среда съдържаща арсенитни йони, при щамовете S3 (*Ps. mendocina*), K5 (*Ps. stutzeri*), K6 (*Ps. putida*), C2 (*Ps. fulva*) и V1 (*Ps. mendocina*) бе установена вероятност процесът на окисление на арсенит да е спрегнат с генерирането на енергия. С цел да се установи тази вероятност посочените изолати са култивирани в минимална солева среда, към която е добавен арсенит (в концентрация съответстваща на арсенитната концентрация при изследването на растежа им по-горе, т.е. малко по-ниска от МИК за всеки един шам) при 37°C. След осемдневно култивиране на посочените щамове само при изолата К6, идентифициран като *Ps. putida*, е наблюдаван растеж. Едновременно с растежа на изолата отново е проследена и трансформационната му активност. Получените резултати са представени на фиг. 14.



Фиг.14: Растеж на шам К6 (*Ps. putida*) в минимална солева среда с As(III) – 5 mM.

След анализ на получените резултати може да се заключи, че шам К6 генерира енергия в хода на окислението на арсенита до арсенат. В минималната солева среда шамът показва значителен растеж в продължение и на осемте дни. В тази среда като енергетичен източник шамът може да използва единствено допълнително внесените в средата арсенитни йони. Потвърждение на това е и фактът, че в отсъствието на арсенитни йони в средата, растеж на щама не се наблюдава в продължение на целия период на култивиране.

В минимална среда, шам К6 показва същата трансформационна способност – окислителна активност, проявена още на втория ден от култивирането му. Впечатление прави фактът, че през първите три дни от развитието си шамът не показва повишение в броя клетки на милилטר (фиг. 14). Развитие на бактериалния шам е свързано с относително продължителна лаг. фаза. От растежната крива е очевидно, че изолатът запазва експоненциалната си фаза на развитие до осмия ден от култивирането му. (фиг. 14).

За пълната характеристика на хемолитотрофния растеж на шам К6 бяха определени и растежните му параметри. Използвайки арсенитните йони като източник на енергия, шам К6 (*Ps. putida*) показва растежна скорост $\mu = 0,31 \text{ ч}^{-1}$ и генерационно време $t_d = 2 \text{ ч}$ и 11 мин. Тези характеристики на хемолитотрофния растеж на щама го определят като перспективен за приложение в процеси на биоочистване.

При останалите бактериални изолати: S3 (*Ps. mendocina*), K5 (*Ps. stutzeri*), C2 (*Ps. fulva*) и V1 (*Ps. mendocina*) не е отчетен растеж и развитие в минимална среда както в присъствието, така и при липсата на арсенитни йони в средата. Това е доказателство, че за разлика от шам К6, посочените щамове не са способни да генерират енергия от окислението на арсенита, в резултат на което и не се развиват в отсъствието на допълнително добавен енергетичен източник в хранителната среда.

Получените по-горе резултати за МИК за As(III) и As(V) показват, че As(III) в концентрация от 2,5 mM (шам C2), 6 mM (шам V1) и 6,5 mM (S3 и K5) е токсичен за съответния шам, докато концентрации на арсенатните йони до 11 mM (шам K5), 19 mM (шам V1) и съответно 23 mM (шам C2) и 24 mM (шам S3) не оказват токсичен ефект върху бактериалните щамове. Тези резултати предполагат, че за изолатите S3 (*Ps. mendocina*), K5 (*Ps. stutzeri*), C2 (*Ps. fulva*) и V1 (*Ps. mendocina*) окислението на арсенита е по-скоро детоксикационен механизъм.

Шам К6 (*Ps. putida*) се откроява сред останалите със способността си да окислява арсенита и със сравнително кратко генерационно време. Способността му за арсенит окисление при хемолитотрофен растеж го прави приложим и в местообитания, където липсват допълнителни енергийни източници, а краткото му генерационно време го определя като приложим не само за ефикасно, но и бързо очистване на околната среда от арсенит.

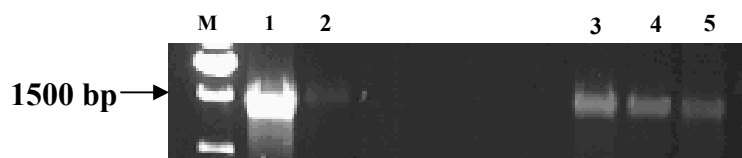
VI. Скрининг за арсен устойчиви, арсенит оксидазни и арсенат редуктазни гени в генома на селектираните изолати.

1. Скрининг (Детекция) на арсенит оксидазни гени

Селектираните изолати, показали способност да трансформират арсеновите форми бяха подложени на скрининг за наличието на арсен- трансформиращи гени. Скринингът беше проведен посредством PCR амплификация със специфични праймери, конструирани за амплификация на *aoxB* гена при *Herminiimonas arsenicoxydans*.

Шест различни двойки праймери: aoxb763 и aoxb65; degaoxb4; uniaoxA; 1F и 1R, са използвани за амплифицирането на *aoxB* гена в генома на изолираните бактериални щамове. Като положителна контрола е използван *H. arsenicoxydans*.

Резултатите, получени след провеждане на PCR амплификацията показват, че в генома на нито един от изследваните в настоящата работа щамове няма гени, комплементарни на праймерите: uniaoxA/aoxb763, uniaoxA/degaoxb4 и 1F/1R. Присъствието, в генома на някои от изследваните арсен трансформиращи бактерии, на гени сходни с тези от *aox* оперона при *H. arsenicoxydans* е потвърдено посредством двойките праймери: aox b763/ aoxb65 и aoxb65/degaoxb4 – фиг. 15.



Фиг. 15: Визуализиране в 1,5% агарозен гел на PCR продукти, получени след амплификация на геномна ДНК с праймери: aoxb65/degaoxb4: М - 1kb ДНК маркер; 1 – *H. arsenicoxydans*; 2 - M1; 3- S5; 4-К3; 5-К5.

Само при три от щамовете, идентифицирани като: *Ps. stutzeri* – M1, K5 и S5; както и при щамовете: К3 - *Ps. pseudoalcaligenes*, С6 - *Ps. fulva* и К6 - *Ps. putida* – след амплифициране с двете двойки праймери (aox b763/ aoxb65 и aoxb65/degaoxb4) е получен PCR продукт. Получените PCR продуктите, в резултат на амплификация с праймерите за *aoxB* гена, кодиращ каталитичната субединица на ензима арсенит оксидаза (aoxb65/degaoxb4), са с големина, идентична на PCR продукта при положителната контрола (*H. arsenicoxydans*) – (1500 bp), фиг. 15.

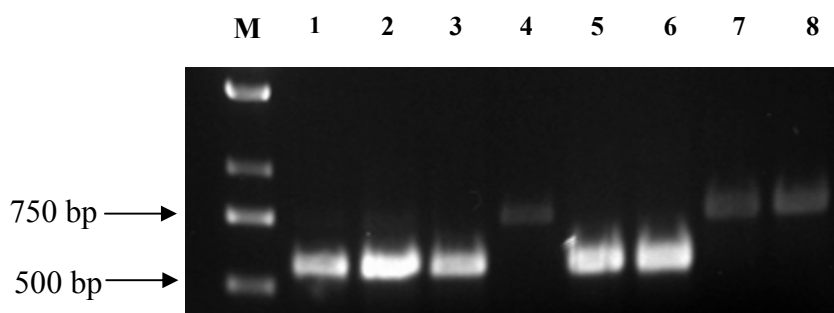
Продуктите от тази амплификация са пречистени и секвенирани. Получените секвенции бяха сравнени с подобни на тях генни секвенции, налични в базата данни. За целта е използвана програмата BLAST (Altschul *et al.*, 1997). Резултатите от сравнителния анализ са обобщени в таблица 5.

След провеждане на сравнителния анализ на получените секвенции с наличните в базата данни, подобие между амплифицираните гени и *aoxB* гена не бе установено (таблица 5).

PCR продуктите, получени с другата двойката праймери - aoxb763/aoxb65 са с по – малка големина от PCR продукта на *aoxB* гена в *H. arsenicoxydans*. От тук може да се предположи, че в генома на тези бактерии съществуват гени, които могат да бъдат амплифицирани с праймерите, конструирани за *aoxB* гена в *H. arsenicoxydans*, но получените продукти не са идентични с този ген. Отсъствието на PCR продукти при останала част от изследваните щамове, не е доказателство, че в бактериите не се съдържат арсенит оксидазни гени. Все още *aox* оперонът е обект на по-детайлно изучаване. Въпреки че, арсен окисляваща способност се среща при редица бактериални родове до 2007 г. само 16 арсенит оксидазни гени (*AroA/AsoA/aoxB*) са налични в базата данни на Генбанката. Изолираните в настоящата работа бактерии не показват сходство с тях. Очевидно ДНК секвенциите на арсенит оксидазните гени в генома на изследваните арсен-трансформиращи бактерии са твърде различни от известните до момента в литературата такива.

2. Скрининг на арсен устойчиви и арсенат редуктазни гени

Детекция на гени от *ars* оперона е проведена отново посредством PCR амплификация с праймери, специфични за: *arsC* (ArsCent и ArsCamont), *arsR* (ArsR-f и ArsR-d) и *arsB* гените (ArsB-f и ArsB-d). Получените след проведените амплификации резултати показват наличието в генома на изследваните бактерии на гени, способни да се амплифицират само с двойката праймери - ArsCent и ArsCamont - фиг. 16.



Фиг. 16: Визуализиране в 1,5% агарозен гел на PCR продукти, получени след амплификация на геномна ДНК с праймери: ArsCent/ArsCamont: М - 1kb ДНК маркер; 1 – *H. arsenicoxydans*; 2- M1; 3-М3; 4-К2; 5-М5; 6-К5; 7-81D2; 8-С2.

PCR продуктите, получени в резултат на проведената амплификация с двойката праймери ArsCent и ArsCamont, най-общо могат да бъдат разделени в две групи: първата - PCR продукти с големина, идентична на големината на PCR продукта на положителната контрола (около 600bp) и втората – PCR продукти с големина от около 750bp.

Всички PCR продукти са пречистени и секвенирани. Проучванията в базата данни е извършен с програмата BLAST X. Резултатите от сравнителния анализ са обобщени в таблица 5.

След провеждането на сравнителния анализ на секвенциите на получените PCR продукти, подобие с наличните в базата данни секвенции на *arsC* гена не е установено. Само при осем от изследваните щамове се оказва, че е амплифициран (с праймерите ArsCent/ArsCamont) и в последствие секвениран генът *arsH*, кодиращ арсен устойчив белтък (*arsH*). Този белтък в настоящата работа е открит в генома на щамове от следните бактериални видове: *Pseudomonas putida* (K4 и K6), *Pseudomonas stutzeri* (M1), *Pseudomonas mendocina* (S3), *Ps. fulva* (C2) и *Alcaligenes faecalis* (M5), *Pseudomonas sp.* (C8), както и при изолат M4 (неидентифицирана бактерия).

Понастоящем информацията за арсен устойчивия белтък - ArsH е оскъдна. Известно е само, че ArsH е белтък, кодиращ и допринасящ за устойчивостта на бактериите спрямо арсен, но точната му функция все още не е напълно изяснена. Доказано е, че присъствието на този белтък, в генома на бактериите е важно за As(III,V) устойчивостта в *Y. enterocolitica* и As(III,V)/Sb(III) устойчивостта в *Sinorhizobium meliloti*. В същото време обаче, в цианобактерията *Synechocystis* и протеобактерията *A. ferrooxidans* ArsH не показва арсен –устойчив фенотип. При *Ps. putida* този фенотип не е изследван.

Таблица 5: Класификация на идентифицираните гени в генома на изследваните бактерии и сравнение с подобни гени в други бактерии

Щам	Праймери	Предполагаема идентификация (сходство с)	Идентичност ^a
S5 <i>Ps. stutzeri</i>	aoxb65/degaoxb4	Хипотетичен белтък PST_1274 (<i>Pseudomonas stutzeri</i>)	82
	ArsCent/ArsCamont	АТФ-зависима ДНК хеликаза Rep (<i>Pseudomonas stutzeri</i>)	83
K2 <i>Ps. stutzeri</i>	ArsCent/ArsCamont	АТФ-зависима ДНК хеликаза Rep (<i>Pseudomonas stutzeri</i>)	37
K3 <i>Ps. pseudoalcaligenes</i>	aoxb65/degaoxb4	Хипотетичен белтък Pmen_2966 (<i>Pseudomonas mendocina ymp.</i>)	50
	ArsCent/ArsCamont	АТФ-зависима ДНК хеликаза Rep (<i>Pseudomonas stutzeri</i>)	65
K4 <i>Ps. putida</i>	ArsCent/ArsCamont	Арсен устойчив белтък ArsH (<i>Pseudomonas putida</i> KT2440)	85
K5 <i>Ps. stutzeri</i>	ArsCent/ArsCamont	АТФ-зависима ДНК хеликаза Rep (<i>Pseudomonas stutzeri</i>)	77
	Aox b763/ aoxb65	Кето киселинна редукто изомераза (<i>Pseudomonas stutzeri</i>)	98
	aoxb65/degaoxb4	Хипотетичен белтък PST_1273 (<i>Pseudomonas stutzeri</i>)	75
K6 <i>Ps. putida</i>	ArsCent/ArsCamont	Арсен устойчив белтък ArsH (<i>Pseudomonas putida</i> KT2440)	93
	aoxb65/degaoxb4	Транспортен белтък ExbD от TonB системата (<i>Pseudomonas putida</i> W619)	75
M1 <i>Ps. stutzeri</i>	ArsCent/ArsCamont	Арсен устойчив белтък ArsH (<i>Pseudomonas putida</i> KT2440)	77
	aoxb65/degaoxb4	Хипотетичен белтък PST_1273 (<i>Pseudomonas stutzeri</i>)	79
M3 <i>Ps. mendocina</i>	ArsCent/ArsCamont	Предполагам арсен устойчив белтък ArsH (<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCBPP-PA14)	73
M4	ArsCent/ArsCamont	Арсен устойчив белтък ArsH (<i>Pseudomonas sp.</i>)	80
M5 <i>A. faecalis</i>	ArsCent/ArsCamont	Арсен устойчив белтък ArsH (<i>Alcalivorax borkumensis</i>)	53
81D2	ArsCent/ArsCamont	АТФ-зависима ДНК хеликаза Rep (<i>Pseudomonas stutzeri</i>)	76
C6 <i>Ps. stutzeri</i>	ArsCent/ArsCamont	АТФ-зависима ДНК хеликаза Rep (<i>Pseudomonas mendocina ymp.</i>)	73
	aoxb65/degaoxb4	Хипотетичен белтък PST_1273 (<i>Pseudomonas stutzeri</i>)	78
C2 <i>Ps. fulva</i>	ArsCent/ArsCamont	Арсен устойчив белтък ArsH (<i>Pseudomonas putida</i> KT2440)	93
C8 <i>Pseudomonas</i>	ArsCent/ArsCamont	Арсен устойчив белтък ArsH (<i>Pseudomonas sp.</i>)	79

Идентичност ^a: – % (идентичност, идентичност идентичност/идентичност).

При проведените изследвания за пръв път е показано наличие на този ген във видове като *Ps. stutzeri*, *Ps. mendocina* и *A. faecalis*. Всички щамове от род *Pseudomonas* показват над 70 % идентичност с известните в базата данни секвенции на *arsH* гена в *Ps. putida* KT2440 или *Pseudomonas sp.* Отчетено беше и наличието на ArsH белтък и в щам M5 от вида *Alcaligenes faecalis* с 54% идентичност на арсен устойчивият белтък - ArsH при *Al. borkumensis*.

Присъствието на ArsH белтъка в представените по-горе бактерии беше установено чрез PCR амплификация с праймери, конструирани за амплификация на *ars C* гена от *ars* оперона, което ни дава основание за предположение, че генът *arsH* в изследваните бактерии е част от *ars* оперона в тях.

В генома на изследваните бактерии гени, кодиращи ензимите арсенат редуктаза и арсенит оксидаза не са установени, макар и използвайки праймери конструирани на базата на вече известни секвенции на такива гени. От получените резултати може да се заключи, че използваните в изследването праймери не са универсални за амплифициране на гените, кодиращи ензими отговорни за трансформирането на арсеновите форми, включени в *aox* и *ars* оперона на бактериите. Те могат да се свързват в различни неспецифични места в генома на изследваните бактерии (таблица 15).

Вероятно ДНК секвенциите както на арсенит оксидазните, така и на арсенат редуктазните гени в генома на изследваните бактерии (арсен-трансформиращи бактерии, изолирани от различни арсен- замърсени региони в България), са твърде различни от наличните в Генбанката такива генни секвенции. За по-категорични заключения в това отношение са необходими допълнителни изследвания.

ОБОБЩЕНИЕ

Анализирането на избраните за изследване хабитати - три от най-силно замърсените с тежки метали райони в България показва, че в тези местообитания се формира стабилно съобщество от микроорганизми устойчиви на арсен, с ефективна трансформационна активност, които биха могли да намерят приложение в биоочистването на околната среда. Проведените първоначални анализи за общата микрофлора в изследваните проби, показва наличието на високоустойчиви на тежки метали предимно аеробни хемохетеротрофи. Установено беше и присъствие на ацидофилни хемолитотрофи, ферментативни и сулфат редуциращи бактерии. Най-силно присъствие на микороорганизми беше установено в проби I и III. Въз основа на получените резултати може да се обопи, че независимо от силното замърсяване с метали и металоиди в тези местообитания е формирано стабилно микробно съобщество.

Изолирането на арсен-устойчиви шамове е извършено по класическата процедура чрез подбор на единични колонии, прорасли върху хранителна среда съдържаща арсенови йони. Изолирани бяха общо двеста четиридесет и пет бактериални щама. За биоочистването важно значение имат микроорганизмите, притежаващи трансформационна способност. От всички арсен-устойчиви шамове бяха селектирани двадесет и седем щама, показали арсен-трансформираща активност. Петнадесет от тях окисляват по-подвижния и в по-висока степен токсичен за биологичните системи арсенит до по-слабо токсичния и с по-висока адсорбционна способност арсенат, а останалите дванадесет бактериални щама редуцират арсената до арсенит.

Селектираните двадесет и седем арсен-трансформиращи бактериални щама бяха идентифицирани до вид по таксономични схеми на базата на класическата таксономия. Подробно са изследвани техните макро-, микро-морфологични, физиологични и биохимични характеристики. Въз основа на получената фенотипна информация е определен таксономичният им статус. Установено беше, че 74% от бактериалните шамове, принадлежат към род *Pseudomonas*, а останалите 26% от изследваните шамове показваха разнообразна таксономична принадлежност. За потвърждаване на таксономичния статус на изолатите бяха използвани и методи на молекулната таксономия. PCR амплификация и последващото секвениране на 16S рДНК фрагмента е един от молекулно-генетичните методи, наложили се в идентификацията на неизвестни бактериални видове. Известно е, че получените след рестрицирането на 16S рДНК фрагмента профили са сходни при представителите от един и същи вид. Предварителното разпределяне на шамовете в RFLP групи позволява да се секвенира 16S рДНК на представители от всяка група, вместо на всички бактериални изолати. За тази цел, PCR амплифицираният 16S рДНК фрагмент на идентифицираните, с класическите методи, като псевдомонадни шамове бе подложен на рестрикция с три тетрамерни, рестрикционни ендонуклеази: *Hha I (Hin6I)*, *Hae III (Bsu RI)* и *Msp I*. Рестрикцията с ендонуклеазите: *Hha I (Hin6I)* и *Hae III (Bsu RI)* даде идентични резултати. Ензимът *Msp I* генерира напълно идентични профили при всички тествани шамове, което го определи като недостатъчно дискриминативен и неприложим за RFLP анализ на 16S рДНК фрагмента при представители на *Pseudomonas*. Получените осем рестрикционни профила показва наличието на поне осем бактериални вида. На този етап от изучаването на изолираните шамове, биха могли да се изберат представители от всяка рестрикционна група и техният 16S рДНК фрагмент да бъде секвениран, с което идентифицирането им до вид ще бъде завършено. Четири от формираните рестрикционни групи включват само по един представител –

представящ самостоятелен генотип. Останалите RFLP групи, включват повече бактериални щамове, някои от които показват различна трансформационна способност. Това ни наведе на предположението за наличието на вътревидови различия между щамовете в групата. Като следваща стъпка предприехме установяването на полиморфизъм във всяка RFLP група, включваща повече от един представител. Използван бе по-високо дискриминативен метод, като RFLP анализ на PCR амплифицирания ITS фрагмент от рибозомалния оперон. След резултатите от този анализ биха могли да бъдат секвенирани 16S рДНК фрагментите на представители с различен генотип. Това от една страна би потвърдило дискриминативността на методиката, а от друга - би потвърдило еднаквата видова принадлежност на представители с вътревидови различия. Наред с това, този подход отменя необходимостта от секвениране на всички двадесет щамове, предварително идентифицирани като р. *Pseudomonas*.

Щамовете, образували RFLP групи с повече от един представител бяха подложени на RFLP анализ на PCR амплифицирания ITS фрагмент с три тетрамерни ендонуклеазни ензима *Taq I*, *Alu I* и *Msp I*. След обработка на резултатите с програмата GelCompaq, се установи, че генерирането на осем рестриционни профила след рестрикция с ензимите *Taq I* и *Alu I* и седем рестриционни профила след рестрикция с ензима *Msp I*. Щамове обединени, на база RFLP анализа на 16S рДНК фрагмента, в една група (респективно представители на един и същи вид), бяха подразделени на групи след RFLP анализа на ITS фрагмента. На база на така получените резултати, е очевидно наличието на вътревидови различия сред изолираните бактериални щамове. Въз основа на проведените RFLP анализи беше установено наличието на 12 различни генотипа сред изследваните щамове- четири обособили се още след RFLP анализа на 16S рДНК фрагмента и останалите осем след ITS-RFLP анализа. За секвениране на 16S рДНК фрагмента бе избран по един представител от всяка една група с различен генотип (от всеки рестриционен профил), за представителите на р. *Pseudomonas*. Притежавайки същия рестриционен профил, останалите членове на групата би следвало да принадлежат към същия бактериален вид. 16S рДНК фрагментът на останалите щамове, показали фенотипни характеристики различни от тези на р. *Pseudomonas*, също беше подложен на секвенционен анализ.

Два от четирите бактериални щамове, формирали самостоятелни групи според RFLP анализа на 16S рДНК и показали висок процент на сходство (95%), след секвениране бяха идентифицирани само като *Pseudomonas sp.* Останалите два секвенирани щамове – всеки с различен генотип са идентифицирани като: *Ps. pseudoalcaligenes* и *Ps. plecoglossicida*. Два от секвенираните бактериални щамове бяха идентифицирани като *Ps. mendocina*. Тези два щамове генерират различен RFLP профил след рестрикция на ITS фрагмента, но бяха обединени в една група на база RFLP анализа на 16S рДНК. Аналогично, други три щамове включени в една и съща група след рестрикция на 16S рДНК, но в три различни след рестрикция на ITS фрагмента, бяха идентифицирани като представители на вида *Ps. stutzeri*. Две от генотипните групи запазиха своята цялост след RFLP анализа, както на 16S рДНК, така и на ITS фрагмента. Секвенирането на представители от тях ги определиха като видове – *Ps. putida* и *Ps. aeruginosa*. Секвенирането на представител от последния генотип беше идентифициран като *Ps. fulva*. Двата щамове генерирали този генотип бяха обособени в самостоятелна генотипна група на база на RFLP на ITS, докато при RFLP анализа на 16S рДНК бяха включени в една група, заедно с щамовете, идентифицирани в последствие като *Ps. mendocina*.

Идентификацията на изолираните арсен-трансформиращи бактериални щамове на база на секвенционния анализ на 16S рДНК фрагмента доказа присъствието на осем различни вида от род *Pseudomonas*, един изолат от р. *Azoarcus* както и на видовете

Alcaligenes faecalis и *Thauera aromatica*. Четири от изолатите останаха неидентифицирани до вид, дори и след секвенционния анализ на 16S рДНК фрагмента. Полиморфизъм между щамовете беше установен само при видовете: *Ps. stutzeri* и *Ps. mendocina*.

Добре познати в литературата като арсен-устойчиви и арсен-трансформиращи бактерии са *Alcaligenes faecalis* (Silver & Phung, 2005), *Ps. aeruginosa* (Parvatiyar *et al.*, 2005) и *Ps. putida* (Abrashitova *et al.*, 1986a; Abrashitova *et al.*, 1986b; Abrashitova *et al.*, 1982; Abrashitova *et al.*, 1980; Мунбаева *et al.*, 1990; Parvatiyal *et al.*, 2005). Липсват обаче, литературни данни за видове като *Ps. plecoglossicida*, *Ps. mendocina*, *Ps. fulva* и *Ps. stutzeri* да имат арсен-трансформационна способност, както и да са били изолирани от арсен-замърсени местообитания. Сравнително от скоро като такива са познати и родовете *Thauera* и *Azoarcus*.

От изолатите, идентифицирани като таксономично еднакви бактериални щамове и показващи еднаква трансформационна активност по отношение на арсена, беше избран по един представител за по нататъшни изследвания. С цел оценка на преживяемостта на изолатите в арсен-замърсени местообитания и потенциалът им за използване в биоремедиационни процеси беше определена МИК на арсенитните и арсенатните йони. Установено бе, че всички селектирани щамове показват устойчивост на сравнително високи концентрации на As(III) и на As(V), като едновременно с това не загубват и трансформационната си активност, при тази концентрация.

За оценка зависимостта на развитието на изолираните бактерии от намиращите се в средата арсенови йони беше изследван растежът на бактериалните щамове в присъствието и отсъствието на арсенитни и арсенатни йони. Почти при всички изследвани щамове растат по-интензивно в присъствието на арсенови йони, което показва, че изолатите са не само устойчиви, но и предпочитано растат в присъствието на арсен. Като цяло за по-голяма част от изолатите по-силно стимулиращ ефект върху развитието им показват арсенатните йони в средата. Те са по-слабо подвижни и по-слабо токсични за бактериалните клетки. Сред изолатите обаче, присъстват и щамове показали по-интензивен растеж в присъствието на силно токсичните за клетките арсенитни йони. Очевидно тези щамове притежават специфични механизми за арсен устойчивост. За тях бе предположено, че окислението на арсенита е спрегнато с генерирането на енергия. Такава способност е установена само при щам К6 от вида *Ps. putida*.

Установено беше, че при по-голяма част от изследваните щамове трансформационната способност на изолатите е в пряка връзка със стимулиращия ефект на даден йон върху растежа и развитието на съответния щам. При едни изолати йонът, който подлежи на трансформация стимулира растежа на бактериалния щам, а при други растежа и развитието на изолатите се засилва от йоните, продукт на трансформационната активност на съответния щам. Както е известно в литературните данни, и тук при някои от щамовете редукцията на арсенат е свързана с алкализирание на хранителната среда. Повишаване на рН на външната среда беше отчетено и в резултат на окислителната активност на някои от щамовете.

Използвайки специфични праймери, конструирани за гените от *aox* и *ars* опероните (известни до момента в литературата), бе проведен скрининг за наличието на такива гени в генома на всички изследвани в настоящия труд щамове. Установено беше наличието само на ген за арсен-устойчив белтък, при някои от тестваните щамове. Такива гени бяха амплифицирани в щамове като *Ps. stutzeri*, *Ps. mendocina* и *A. faecalis*, за които до момента няма данни за наличието на такъв ген в генома им.

Тези резултати представляват добра основа за разработването на стратегии за биологичното почистване на околната среда от арсенови замърсявания. Изолираните, характеризирани и идентифицирани бактериални щамове разширяват кръга на

известните арсен-трансформиращи бактерии. Въз основа на проведените изследвания върху селектираните арсен-трансформиращи бактерии, с най-големи възможности за приложение в процесите на биоочистване са изолатите М5 (*A. faecalis*), К6 (*Ps. putida*), С2 (*Ps. fulva*) и V4 (*Azoarus sp.*). Сред тях като най-перспективни са шамовете М5 и К6 показали значителен растеж при високи концентрации на As(III), ефективна трансформационна активност, съответно и генериране на енергия в процеса на окисление на арсенита за шам К6 (*Ps. putida*).

Тези изолати могат да намерят практическо приложение в технологии за ефективно и бързо очистване на околната среда от арсенови замърсявания, при това без внасянето на вторични замърсявания, което би запазило здравето на милиони хора.

ИЗВОДИ

1. В изследваните проби (почви около КЦМ-Пловдив, МДК – Пирдоп и води от р. Марица) е установено стабилно микробно съобщество от арсен-устойчиви бактерии, способни да трансформират арсеновите съединения. Изолирани са двадесет и седем бактериални щамове с арсен-трансформираща активност. Петнадесет изолата окисляват арсенита до арсенат, а дванадесет редуцират арсената до арсенит.
2. Преобладаващата част от арсен-трансформиращите бактерии принадлежат към γ -*Proteobacteria*. Доминиращи са видовете *Pseudomonas stutzeri* и *Pseudomonas mendocina*. Изолирани са представители и на видовете *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fulva*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* и *Pseudomonas plecoglossicida*.
3. Идентифицирани са представители на родовете *Thauera* и *Azoarcus*, сравнително от скоро познати като арсен-трансформиращи бактерии.
4. Разработената схема на полифазна таксономия, включваща класически и молекулни методи (амплификация на 16S рРНК гена и ITS фрагмента, RFLP анализ на 16S рДНК и ITS фрагмента и секвенирането на 16S рДНК) позволява идентификация до вид на арсен-трансформиращите изолати от родовете *Pseudomonas*, *Azoarcus*, *Thauera* и *Alcaligenes*.
5. 16S рДНК фрагментите на видовете *Ps. fulva* и *Ps. mendocina* имат еднакъв рестрикционен сайт за ендонуклеазите *Hha I* и *HaeIII*, а ензимът *Msp I* е неудачен за RFLP анализ на 16S рДНК фрагмента при представителите на род *Pseudomonas*.
6. Известните праймери (aohb65; degaohb4; ArsCent и ArsCamont) за амплификация на гени от *aoh* и *ars* оперона не могат да се използват като биомаркери за идентификация на арсенови замърсявания, в изследваните от нас проби.
7. При по-голяма част от изследваните щамове трансформационната способност на изолатите е във връзка със стимулиращия ефект на съответния йон върху развитието на щамовете. При част от изолатите (V2, V3 и S3) йонът, подлежащ на трансформация стимулира растежа, а при други (K2, K6, 81D2, C6, V1, S5 и S7) получените след трансформационната активност на бактериите йони повлияват растежа им.
8. Трансформационната активност на изолатите повлиява рН на средата, както при окислението (изолати M4, M5 и S4), така и при редуцията на арсен (изолати K2, C1, C2, V3 и V5).
9. За повечето от изолатите арсен трансформиращата способност най-вероятно е защитен механизъм. Изключение е щам K6 – *Pseudomonas putida*, където окислението на арсенита е спрегнато с генерирането на енергия.
10. Изолатите *Ps. putida* - K6 и *Alcaligenes faecalis* – M5 (висок трансформационен потенциал, максимален растеж при 3,5 mM / 4,5 mM на арсенит / арсенат и относително кратко генерационно време за K6) са подходящи за прилагането им в технологии за отстраняване на арсенови замърсявания.

ПРИНОСИ

1. Създадена е колекция от арсен-трансформиращи бактерии, охарактеризирани подробно по фенотипни и генотипни признаци. Тази информация може да послужи като основна база данни при разработването на технологии за отстраняване на арсенови замърсявания в околната среда.
2. Потвърдена е арсен-трансформиращата способност на видовете *Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Pseudomonas putida*.
3. Установена е арсен-трансформираща способност на видове *Ps. plecoglossicida*, *Ps. mendocina*, *Ps. fulva* и *Ps. Stutzeri*, за които няма данни до настоящия момент за такава активност.
4. Идентифицирани са представители на родовете *Thauera* и *Azoarcus*, сравнително от скоро познати като арсен-трансформиращи бактерии.
5. Разработена и оптимизирана е схема на полифазна таксономия, включваща класически и молекулни методи (амплификация на 16S рРНК гена и ITS фрагмента, RFLP анализ на 16S рДНК и ITS фрагмента и секвенирането на 16S рДНК), позволяваща идентификация до вид на арсен-трансформиращите изолати от родовете *Pseudomonas*, *Azoarcus*, *Thauera* и *Alcaligenes*.
6. Доказано е, че известните праймери (aoxb65; degaoxb4; ArsCent и ArsCamont) за амплификация на гени от *aox* и *ars* оперона не могат да се използват като биомаркери за идентификация на арсенови замърсявания в изследваните проби.
7. За пръв път се съобщава за наличието на ген за арсен-устойчив белтък (*arsH*) в генома на бактерии от видовете *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas mendocina* и *Alcaligenes faecalis*, показващи висок процент на сходство с *arsH* гена в *Pseudomonas putida*.
8. Получената информация за арсен трансформационния капацитет на изолатите е добра основа за разработването на стратегии за съвместно култивиране на арсен-редуциращи и арсен-окисляващи микроорганизми с цел отстраняването от околната среда на арсената включен в състава на твърди частици.
9. Селекциониран е бактериален щам К6 от вида *Pseudomonas putida*, който със способността си да използва арсенита като енергиен субстрат и относително краткото генерационно време ($t_d = 2\text{ч.}11\text{ мин.}$) е перспективен за прилагане в биотехнологии за отстраняване на арсенови замърсявания от околната среда.

Списък на научни публикации

1. **K. Dobрева**, M. Nikolovska and V. Groudeva “Molecular investigation of arsenic-transforming bacteria” (2009) *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 23(2):524-528.
2. **K. Krumova**, M. Nikolovska and V. Groudeva “ Isolation and identification of arsenic-transforming bacteria from arsenic contaminated sites in Bulgaria” (2008) *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 22(2):721-728.
3. **K. Krumova**, M. Nikolovska and V. Groudeva “Characterization of arsenic-transforming bacteria from arsenic contaminated sites in Bulgaria” (2008) *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 22(2):729-735.
4. V. Groudeva, A.Doycheva, **K.Krumova** and S.Groudev (2007). Bioremediation in situ of an alkaline soil polluted with heavy metals. *Advanced Materials Research*, vol. 20-21, 287-290.
5. V.Groudeva, **K. Krumova** and S. Groudev. (2007). Bioleaching of a rich-in-carbonates copper ore at alkaline pH, *Advanced Materials Research*, vol. 20-21, 103-106.
6. **Красимира С. Крумова**, Венета И. Грудева (2005). “Изолиране на арсен резистентни и арсен трансформиращи сулфат-редуциращи бактерии”, *Екологично инженерство и опазване на околната среда*, книжка 3-4/ 2005, 84-94.

Списък на участия в научни конференции и конгреси

Национални форуми:

1. **K. Добрева**, M. Николовска, В. Грудева „Молекулни изследвания на арсен-трансформиращите бактерии”. XI Юбилейна научна конференция с международно участие, Биологически факултет, Софийски университет, 27-29 Май, 2009. София, България.
2. **Красимира С. Крумова**, Венета И. Грудева “Таксономична идентификация на арсен-трансформиращи бактерии. Характеристика на гените обуславящи арсен-устойчивостта и трансформиращата способност в тези бактерии” Международна научна конференция, 6-7 Юни, 2007, Стара Загора, България.
3. **Красимира С. Крумова**, Венета И. Грудева “Изолиране и идентификация на арсен устойчиви и арсен трансформиращи бактерии”. Единадесети конгрес на микробиолозите в България с международно участие 5-7 Октомври 2006, “Св. Св. Константин и Елена”, Варна, България.
4. **Красимира Крумова**, Венета Грудева. Изолиране на арсен резистентни и арсен устойчиви сулфат-редуциращи бактерии. Национална конференция за екологично инженерство и опазване на околната среда. Биологически факултет, Софийски университет, Ноември, 2005, София, България.
5. **Красимира Крумова**, Илиана Иванова, Томас Керестеджиян, В. Младенова, Венета Грудева. - “Взаимодействие на микроорганизмите с кристални повърхности на сулфидни минерали”, Научна конференция с международно участие, Стара Загора, 4-5 Юни, 2004.
6. Илиана Иванова, Кръстина Плачкова, Светломир Емануилов, Томас Керестеджиян, **Красимира Крумова**, Венета Грудева - “Определяне токсичност на води и твърди отпадъци, замърсени с тежки метали чрез тест с растежно инхибиране на *Selenastrum capricornutum* и *Pseudomonas putida* .”, Научна конференция с международно участие, Стара Загора, 4-5 Юни, 2004.

Международни форуми:

1. ***Krasimira Dobрева***, Veneta Groudeva. „RFLP method for identification of bacteria from genus *Pseudomonas*”. VI^{ти} Балкански конгрес по Микробиологија - Микробиологија Балканика, 28-31 Октомври, 2009, Охрид, Македонија.
2. ***Krasimira Stoyanova Krumova***, Daniel Muller, Veneta Groudeva, Marie-Claire Lett - “Screening of a mutant collection of the bacterium *Caenibacter arsenoxydans*: characterisation of genes involved in the stress adaptation to toxic metals”, V^{ти} Балкански конгрес по Микробиологија – Микробиологија Балканика, 23-26 Ноември, 2005, Букурешт, Румъния.