

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



## **АВТОРЕФЕРАТ**

за присъждане на образователна и научна степен „доктор”  
Професионално направление 4.3. Биологични науки  
(Микробиология)

**МИЛЕНА МИЛЕНОВА МИТОВА**

**Микробна колонизация на скалните рисунки в  
Магурата и стратегия за ограничаването на  
деструкционния ѝ ефект**

Научен ръководител: проф. д-р В. Грудева

София  
2017

Дисертационният труд съдържа 177 страници на формат А4, 29 таблици и 41 фигури.

В библиографската справка са включени 472 заглавия.

Експерименталната работа е извършена в лабораторията по „Геологична микробиология“ към Катедра „Обща и промишлена микробиология“ на СУ „Св. Климент Охридски“ и Федерален институт по материални науки и изследвания (БАМ), Катедра по материали и околна среда, Берлин, Германия по линия на Еразъм.

Сканиращата електронна микроскопия е направена във Факултета по химия и фармация към СУ „Св. Климент Охридски“.

Достъпът до залата с рисунките на пещера Магура е осъществен със съдействието на Кмета на град Белоградчик и Директора на Историческия музей в Белоградчик, а опробването със съдействието на пещерен клуб „Хеликтит“.

Дисертационният труд е обсъден на разширено заседание на катедрата по Обща и промишлена микробиология към Биологически факултет на СУ „Св. Кл. Охридски“, проведено на 05.01.2017 г. и насрочен за защита пред научно жури, сформирано със заповед № ..... на Ректора на СУ „Св. Кл. Охридски“.

- Научно жури: 1. проф. д-р Пенка Ангелова Мончева  
2. проф. д-р Венета Иванова Грудева  
3. проф. д-р Елена Иванова Георгиева  
4. доц. д-р Галина Симеонова Радева  
5. доц. д-р Галина Христова Сачанска

Защитата на дисертационния труд ще се състои на ..... от ..... часа в сградата на Биологически факултет на СУ „Св. Кл. Охридски“.

Материалите по защитата се намират на сайта на Биологически факултет и в катедрата по Обща и промишлена микробиология.

**СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ „СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ”**

**БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ  
КАТЕДРА „ОБЩА И ПРОМИШЛЕНА МИКРОБИОЛОГИЯ”**



---

**МИЛЕНА МИЛЕНОВА МИТОВА**

**Микробна колонизация на скалните рисунки в  
Магурата и стратегия за ограничаването на  
деструкционния ѝ ефект**

**Автореферат**

за присъждане на образователна и научна степен „доктор”  
Професионално направление 4.3. Биологични науки  
(Микробиология)

Научен ръководител: проф. д-р В. Грудева

София  
2017

## Списък на използваните съкращения

**AP-PCR** (polymerase chain reaction with arbitrary primer) – полимеразна верижна реакция с произволни праймери  
**ARDRA** (Amplified ribosomal DNA Restriction Analysis) - Рестрикционен анализ на амплифицирана рДНК  
**ATCC** (American Type Culture Collection) – Американска колекция за микроорганизми  
**AWCD** (Average Well Color Development)  
**AWCDN** (Normalized Average Well Color Development)  
**ARISA** (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis) – автоматизиран рибозомален интергенен анализ  
**BC** - бензалкониев хлорид  
**BLAST** (Basic Local Alignment Search Tool)  
**bp** (base pairs) – Базови двойки  
**СЕМ** - Сканиращ електронен микроскоп  
**CARD-FISH** (Catalyzed reporter deposition Fluorescence In Situ Hybridization)  
**CFU** (Colony-forming unit) - колония образувачи единици  
**CV** (Coefficient of Variability) – Коефициент на вариабилност  
**ДДХ** - ДНК-ДНК хибридизация  
**ДЕВ** (deoxyerythronolide B) - Дезоксиеритронолид В  
**DGGE** (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) - Денатурираща градиентна гел електрофореза  
**DRBC**- Розбенгал хлорамфеникол агар  
**ENA** - European Nucleotide Archive  
**FISH** (fluorescence in situ hybridization) – флуоресцентна in situ хибридизация  
**GenBank NCBI** (National Center for Biotechnology Information)  
**GOLD** (The Genomes Online Database) – онлайн геномна база данни  
**HPLC** (High-performance Liquid Chromatography) - Високоэффективна течна хроматография  
**IMG** (Integrated Microbial Genomes) – интегрирани микробни геноми  
**ISP** (International Streptomyces Project) - Международен стрептомицетен проект  
**ISR** (intergenic spacer region) - вътрегенен спейсърен регион  
**ITS** (Internal transcribed spacer) – вътрегенен транскрибиран спейсърен регион  
**MEGAN** (MEtaGenome ANalyzer)  
**NA** (Nutrient Agar) - Месопептонен агар  
**ОИТ** - 2-октил-4-изотиазолин  
**PCR** (Polymerase Chain Reaction) - Полимеразна верижна реакция  
**RAPD** (Random Amplified Polymorphic DNA) – Полиморфизъм на амплифицирана ДНК със случайни праймери  
**RFLP** (Restriction Fragment Length Polymorphism) - Полиморфизъм в дължината на амплифицирания фрагмент  
**TLC** (Thin-layer Chromatography) - Тънкослойна хроматография  
**UV** - Ултравioletови лъчи  
**UV-VIS** (Ultraviolet-visible Spectroscopy)

## РЕЗЮМЕ

Обект на изследване в дисертацията е микробната колонизация на Галерията с уникалните праисторически рисунки в пещера Магура. Проведен е обстоен анализ на 17 физиологични и систематични групи микроорганизми за охарактеризиране на микробиоценозите в Галерията с рисунките на пещерата.

Анализът на получените резултати категорично потвърждава схващането, че в Галерията с рисунките е формирано стабилно микробно съобщество. Като компоненти на микробните популации постоянно присъстват аеробни хетеротрофи, факултативни психрофили, спорообразуващи бактерии, амонификатори, денитрификатори, силикатни бактерии, актиномицети и гъби. Вариациите в количествата на откритите физиологични и систематични групи микроорганизми в отделните проби не са съществени и проведеният мониторинг на изследваните групи потвърждава това схващане.

Чрез прилагането на методите за изолиране на чисти култури са изолирани 108 изолата от бактерии, 15 изолата от актиномицети и 78 гъбни изолата, които са подложени на идентификация чрез методи на класическата и молекулната таксономия.

Резултатите от фенотипния анализ, потвърдени от осъществените RCR анализ на 16S РНК, секвенционния анализ и биоинформатичния анализ на бактериалните изолати установяват принадлежност към 8 рода – *Bacillus*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Sphingobacterium*, *Pantoea*, *Pseudomonas* и *Raoultella*. Родът *Bacillus* е доминиращ като преобладават видовете *B. safensis*, *B. invictae* и *B. pumilus*. Няколко от изолатите са отнесени към род *Sphingobacterium*, два към род *Enterobacter*, три към род *Serratia* и шест към родове *Pseudomonas*, *Enterococcus*, *Pantoea* и *Raoultella*.

Постоянен компонент на микробните ценози в пещерата са актинобактериите и чрез фенотипен и молекулен анализ те са идентифицирани като представители на родовете *Streptomyces*, *Kocuria* и *Promicromonospora*. Постоянен компонент на микробните популации в пещерата са и гъбите. От изолираните 78 чисти култури на базата на микроморфологичен, макроморфологичен и молекулен анализ е установено присъствие на представители на 21 рода, като преобладаващи са представителите на родовете *Penicillium*, *Mucor* и *Aspergillus*. Тридесет и девет от изолатите са представители на род *Penicillium*, а 10 изолата на род *Aspergillus*.

При изследване на антагонистични взаимоотношения между компонентите на

микробните ценози такива са установени между бактерии, изолирани от галерията и актиномицети, също изолирани от този хабитат. Част от актиномицетните култури имат изразен антагонистичен ефект спрямо представители на родовете *Bacillus*, *Sphingobacterium*, *Serratia* и *Pseudomonas*.

Съществен момент в консервацията на паметниците на изкуството в пещери е третиране с подходящи биоциди, ограничаващи микробната колонизация. Изпитано е действието на седем биоцида. Най-активен спрямо бактериалните изолати е медният сулфат. Гъбните изолати имат диференцирана чувствителност към тестваните биоциди. Най-силно изразен инхибиращ ефект се констатира при биоцида Превентол RI 50, а Биоцидите Bio Stone Protect BF 8001 и Busan 1292 са неефективни спрямо тези изолати.

Данните от проведените изследвания позволяват да се очертае и стратегия за запазване на рисунките, а именно: извършване на действия за запазване на относително постоянните физико-химични параметри в Галерията с рисунките; регулиран поток на туристи; периодичен микробиологичен контрол за присъствие на доказани детериогени в пещерни системи с произведения на изкуството.

## УВОД

Опазването на паметниците на културата е актуален световен проблем. Запазването на произведенията на изкуството в пещери представлява световен интерес. Праисторическите рисунки в тези хабитати са уникално завещание с изключителна важност. Праисторическите рисунки са изложени на разнообразие от потенциално увреждащи физични, химични и биологични фактори. Измежду последните микроорганизмите са от специално значение, поради установения им биодеструкционен ефект. Анализът на увреждащите ефекти и изясняването на механизмите на биодеструкцията изискват задължително познания относно характера на микробната колонизация. Началото на проучванията, свързани със състава на микробните ценози върху скални праисторически рисунки е през 2002 г. в пещера Алтамира, Испания, а понастоящем вече има доста информация за състава на микробните съобщества в пещерите със скални рисунки.

Анализът на резултатите от провеждани проучвания върху бактериалната контаминация в различни пещерни системи показва присъствие на хетеротрофни и хемолитотрофни бактерии с различен таксономичен статус. Повечето гъби, откривани в пещерите са от родовете *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* и *Trichoderma*. В пещерите се срещат и различни представители на археите.

При анализа на микробните съобщества в пещерите с праисторически рисунки, обаче възникват редица проблеми, които не са изяснени и често пъти са причина за доста противоречиви резултати. Сериозните проблеми, обект на дискусия са свързани с начините на пробовземането, условията на култивиране, методите на идентификация. Дискусия съществува и по отношение на подходите за реставрирането на увредените участъци, средствата с които трябва да се третира контаминирани участъци, ограничаването на деколонизацията на третираните вече участъци и общите принципи на стратегиите за опазването на тези произведения.

Пещера Магура, с нейните уникални скални рисунки, представлява световен и национален интерес и наличието на информация за характера на микробиоценозите в нея е задължително за опазването на това културно богатство.

## **ЦЕЛ И ОСНОВНИ ЗАДАЧИ**

*Целта на дисертационния труд е да се изследва спелеомикрофлората на пещера Магура като се акцентира върху микрофлората в Галерията с рисунките и се предложи стратегия за опазването им.*

### **Основни задачи**

1. Количествен и качествен анализ на спелеомикрофлората в пещерата.
2. Микробиологичен мониторинг на спелеомикрофлората и определяне на преобладаващите физиологични и систематични групи микроорганизми.
3. Идентификация на преобладаващите видове бактерии, актиномицети и гъби на базата на полифазната таксономия.
4. Изследване на антагонистичните взаимоотношения между бактерии и актиномицети, изолирани от пещерата.
5. Изследване на ефекта на различни биоциди върху преобладаващите видове.
6. Разработване на стратегия за опазването на уникалните скални рисунки.



# МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

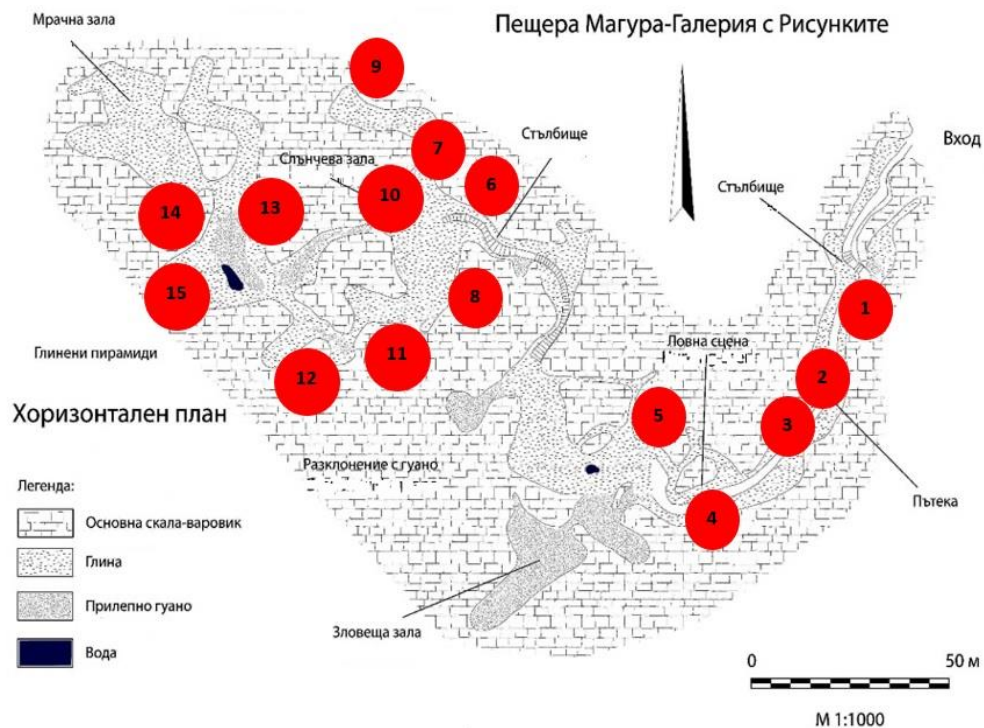
## Материали

### 1. Пробовземане

Обект на изследване е Галерията с рисунките, като проби са взети и от други галерии.

Вземането на пробите, тяхното транспортиране и съхранение до последващото им обработване е осъществено в съответствие със стандартните изисквания за микробиологичен анализ на елементи от околната среда (Bulgarian State Standards). Към пробите не са добавяни консерванти, тъй като главната цел на изследването е да се определят само жизнеспособните клетки. Приоритет при вземане на пробите имаха местата със следи от възможна биодegradираща активност (самите рисунки, влажни повърхности, места с различен цвят), както и натрупвания по подовата повърхност от прилепно гуано. Местата на пробовземанията от посочената галерия са означени на фиг.1. Тези местоположения на пробовземането са спазвани точно при последвалите опробвания за микробиологичния мониторинг на биоценозите в пещерата, като допълнително са включени проби от други галерии.

Проби са взети от следните места: Галерията с рисунките; Входната галерия, Галерията на прилепите, Галерията на падналия бор, Галерията на сталактоните, седименти/гуано, водни проби от различни елементи на пещерата.



Фигура №1. Карта на местата на вземане на проби от Галерията с рисунките.

## 2. Хранителни среди

За количествената характеристика на биоценозите, мониторинговите изследвания, изолиране на чисти култури от бактерии, актиномицети и гъби и тяхната идентификация по фенотипни признаци и молекулна таксономия, както и други изследвания, свързани с доказване на наличие на патогени и антагонистична активност са използвани различни елективни и селективни хранителни среди както следва:

- ⇒ Месопептонен агар
- ⇒ Месопетонен бульон
- ⇒ Фенилетил алкохолен агар (PEA) (Atlas 2010)
- ⇒ Среда за определяне на подвижност (MM) (Atlas 2010)
- ⇒ Среда за ацидофилни железобактерии -  $9K+ Fe^{2+}$  (Silverman & Lundgren, 1959)
- ⇒ Среда за ацидофилни тионовни бактерии  $9K+ S^0$
- ⇒ Среда за неутрофилни тионовни бактерии – Старки (Starkey et al., 1934)
- ⇒ Среда за сулфат-редуциращи бактерии - Уидъл и Пфенинг-(Widdel, 1981)
- ⇒ Среда за нитрифициращи бактерии – Саратчанда (Sarathchandra, 1979)
- ⇒ Среда за уробактерии – Федоров (Atlas 2010)
- ⇒ Среда за денитрифициращи бактерии – Гилтей (Alexander, 1965)
- ⇒ Среда за олиготрофи – Кузнецов (Kuznetsov et al., 1979)
- ⇒ Среда за актиномицети – Гаузе (Rehacek, 1959)
- ⇒ Среда за гъби – Сабуро с хлорамфеникол 0.05 г/л (Sabouraud, 1892)
- ⇒ Среда с дрождев и малцов екстракт (pH 7.3) (Atlas 2010)
- ⇒ Среда с триптон и дрождев екстракт (pH 7.0-7.2) (Atlas 2010)
- ⇒ Овесен агар (pH 7.2) (Atlas 2010)
- ⇒ Скорбелен агар с неорганични соли (pH 7.2) (Atlas 2010)
- ⇒ Пептонов агар с дрождев екстракт и желязо (Atlas 2010)
- ⇒ Глицерол - аспарагинов агар (pH 7.0-7.4) (Atlas 2010)
- ⇒ Агар с тирозин (pH 7.2-7.4) (Atlas 2010)
- ⇒ Среда за усвояване на въглехидрати (pH 6.8-7.0)
- ⇒ Бирен агар(БА)
- ⇒ Нишестен агар (НА)
- ⇒ Картофен агар (КА)
- ⇒ Среда за психрофили (PSC)(Juck, D., 2000)
- ⇒ Среда за усвояване на въглехидрати
- ⇒ Среда на Адлер (Ellis D., 2003)
- ⇒ Малцов агар с дрождев екстракт (YMA) (Atlas 2010)
- ⇒ Картофено-глюкозен агар (КГА) (Atlas 2010)
- ⇒ Chromagar ECC (Atlas 2010)
- ⇒ Rambach Agar (Atlas 2010)
- ⇒ TBX агар (Atlas 2010)
- ⇒ Chromagar E.coli (Atlas 2010)
- ⇒ Кръвен агар (Atlas 2010)
- ⇒ Среда за гъби (DRBC) (King et al., 1979)
- ⇒ Малцов агар (MEA) (Atlas 2010)
- ⇒ TSA агар (MacFaddin 1985)

### **3. Микроорганизми**

След изолиране на чисти култури и проверка за чистотата им обект на следващи изследвания са 108 изолата от бактерии, 15 изолата от актиномицети и 78 гъбни изолата.

#### **Методи**

1. Количествена характеристика на микробната колонизация
2. Мониторинг на микробната колонизация в пещерата
3. Изолиране на чисти култури и съхранение на изолатите
4. Методи за доказване на таксономичната принадлежност на изолатите
  - 4.1. Класически методи за идентификация
    - 4.1.1. Идентификация на бактериалните изолати по фенотипни свойства
    - 4.1.2. Идентификация на актиномицетните изолати
    - 4.1.3. Идентификация на гъбните изолати
  - 4.2. Молекулни методи за идентификация
    - 4.2.1. Молекулна идентификация на бактериалните изолати
      - 4.2.1.1. Изолиране на тотална ДНК от бактериалните изолати
      - 4.2.1.2. Провеждане на 16S ДНК PCR реакция с матрична ДНК, изолирана от бактериалните изолати
      - 4.2.1.3. Секвениране на амплифицирани PCR фрагменти и биоинформатичен анализ на получените 16S ДНК секвенции
    - 4.2.2. Молекулна идентификация на актиномицетните изолати
      - 4.2.2.1. Изолиране на тотална ДНК
      - 4.2.2.2. Амплификация на 16S рДНК с родово специфични праймери
      - 4.2.2.3. Амплификация на 16s рДНК с универсални еубактериални праймери
    - 4.2.3. Молекулна идентификация на гъбните изолати
      - 4.2.3.1. Изолиране на тотална ДНК
      - 4.2.3.2. PCR-анализ
      - 4.2.3.3. Секвениране на получените ДНК фрагменти
      - 4.2.3.4. DGGE анализ
5. Анализ на чувствителността на изолатите към различни биоциди
  - 5.1. Анализ на чувствителността на бактериалните изолати
  - 5.2. Анализ на чувствителността на актиномицетните изолати
  - 5.3. Анализ на чувствителността на гъбните изолати
6. Анализ на антагонистичните взаимоотношения между актиномицети и бактерии, изолирани от Галерията с рисунките

## РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

### 1. Визуален оглед на Галерията с рисунките и определяне на точките на пробовземане

Осъществен е обстоен визуален оглед на галерията, имащ за цел определяне на местата на пробовземане, като приоритетно бяха инспектирани скалните рисунки, измененията по тях и скалната повърхност, както и наличните отлагания от гуано в различните части на галерията, както е показано на снимките, представени на фиг. 2.



Фигура №2. Визуален оглед на местата за пробовземане.

След направения оглед на галерията, бяха подбрани точки за пробовземане, намиращи се в различни елементи от галерията и покриващи цялата ѝ обходна част.

Специално внимание беше отделено на рисунки с видими изменения и подозрителни за микробна колонизация - наличие на налепи върху рисунките, промяна в цвета на рисунките, видими пожълтявания или наличие на цветни петна по рисунките. Точното разположение на тези локации е отразено във фиг. 1.

Същите точки са използвани и при последвалите пробовземания за анализ на динамиката на микробиоценозите при проведените мониторингови изследвания.

### 2. Количествена характеристика на микробните съобщества в пещерата

Пробовземането, съхранението на пробите и тяхното транспортиране са извършени съгласно стандартни процедури. Обработването на всички проби е осъществено до 6 часа от тяхното събиране.

След подробен предварителен анализ за композицията и структурата на микробни ценози, обитаващи сходни пещерни системи по света, отчитане на геоморфологичните характеристики на пещерата, както и нейните специфични климатични и физикохимични условия бяха подбрани 17 групи микроорганизми, като обект на изследване. Избраните групи микроорганизми, представляващи интерес за отчитане на микробиологичната компонента в галерията са както следва: хетеротрофни бактерии, олиготрофи, облигатни психрофили, факултативни психрофили, спорообразуващи бактерии, амонификатори, нитрификатори, денитрификатори, уробактерии, силикатни бактерии, неутрофилни железобактерии, ацидофилни железобактерии, ацидофилни тионовни бактерии, неутрофилни тионовни бактерии, сулфат-редуциращи бактерии, актиномицети и гъби. Основната част от анализите са извършени в Галерията с рисунките (ГР) – 15 проби и Входната галерия (ВГ) – 10 проби. За сравнение са анализирани и 5 проби от седименти с гуано, както и по няколко проби от три други галерии на пещерата – Галерията на прилепите, Галерията на падналия бор и Галерията със сталактоните. Част от резултатите от количествения анализ на микроорганизмите в изследваните проби са представени в табл.1 - 4.

**Таблица №1.** Количествена характеристика на микробната колонизация в Галерията с рисунките.

Група МО	Проба №	П1 бр.кл./мл	П2 бр.кл./мл	П3 бр.кл./мл	П4 бр.кл./мл	П5 бр.кл./мл
1.Аеробни хетеротрофи		2.5x10 <sup>6</sup> ±0.2	0.7x10 <sup>7</sup> ±0.3	0.7x10 <sup>6</sup> ±0.2	1.5x10 <sup>6</sup> ±0.5	5.5x10 <sup>5</sup> ±0.2
2.Обл. психрофили		1.5x10±0.1	2.5x10 <sup>1</sup> ±0.4	0.5x10 <sup>1</sup> ±0.1	0.5x10 <sup>1</sup> ±0.7	0.5x10 <sup>1</sup> ±0.1
3.Фак.психрофили		<b>0.7x10<sup>4</sup>±0.2</b>	<b>1.5x10<sup>3</sup>±0.5</b>	<b>2.5x10<sup>4</sup>±0.4</b>	<b>0.5x10<sup>5</sup>±0.4</b>	<b>1.5x10<sup>5</sup>±0.2</b>
4.Олиготрофи		0.4x10 <sup>1</sup> ±0.1	0.9x10 <sup>2</sup> ±0.2	1.5x10 <sup>1</sup> ±0.4	0.5x10 <sup>1</sup> ±0.3	0.5x10 <sup>1</sup> ±0.2
5.Уробактерии		0.2x10 <sup>2</sup> ±0.2	0.9x10 <sup>3</sup> ±0.4	1.5x10 <sup>2</sup> ±0.2	1.6x10 <sup>3</sup> ±0.1	0.5x10 <sup>4</sup> ±0.3
6.Спорообразуващи		<b>1.5x10<sup>5</sup>±0.5</b>	<b>0.1x10<sup>4</sup>±0.7</b>	<b>1.5x10<sup>5</sup>±0.5</b>	<b>5.5x10<sup>4</sup>±0.3</b>	<b>1.5x10<sup>5</sup>±0.5</b>
7.Амонификатори		<b>2.5x10<sup>6</sup>±0.7</b>	<b>1.5x10<sup>5</sup>±0.2</b>	<b>1.5x10<sup>4</sup>±0.2</b>	<b>1.5x10<sup>5</sup>±0.2</b>	<b>0.5x10<sup>4</sup>±1.0</b>
8.Денитрификатори		<b>1.5x10<sup>5</sup>±0.2</b>	<b>1.5x10<sup>6</sup>±0.6</b>	<b>0.5x10<sup>6</sup>±0.4</b>	<b>0.5x10<sup>6</sup>±0.8</b>	<b>0.5x10<sup>6</sup>±0.2</b>
9.Нитрификатори		< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>
10.Ац.железобактерии		< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>
11.Неут. железобактерии		0.2x10 <sup>1</sup> ±0.3	1.5x10 <sup>1</sup> ±0.1	1.2x10 <sup>1</sup> ±0.4	1.1x10 <sup>1</sup> ±0.1	0.8x10 <sup>1</sup> ±0.1
12.Ац.тиобацили		< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>
13.Неутр. тиобацили		< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>
14.Силикатни бактерии		1.5x10 <sup>2</sup> ±0.2	1.5x10 <sup>1</sup> ±0.1	0.3x10 <sup>2</sup> ±0.1	2.8x10 <sup>2</sup> ±0.2	7.5x10 <sup>1</sup> ±0.4
15.Сулфатредуктори		< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>
16.Актиномицети		<b>3.5x10<sup>2</sup>±0.1</b>	<b>1.5x10<sup>2</sup>±0.4</b>	<b>1.5x10<sup>2</sup>±0.3</b>	<b>0.2x10<sup>1</sup>±0.2</b>	<b>0.3x10<sup>2</sup>±0.2</b>
17.Гъби		<b>1.3x10<sup>3</sup>±0.4</b>	<b>1.5x10<sup>3</sup>±0.2</b>	<b>2.5x10<sup>2</sup>±0.1</b>	<b>1.5x10<sup>3</sup>±0.3</b>	<b>2.5x10<sup>3</sup>±0.3</b>

**Легенда:** П1 - проби от рисунките от ловната сцена; П2 – проби от рисунката на човека с лъка; П3 – проби от рисунката на кучето П4 – проби от рисунката на танцуваща жена; П5 - проби рисунки от слънчевата зала

**Таблица №2.** Количествена характеристика на микробната колонизация във Входната галерия.

Група МО	Проба № П16 Бр.кл./мл	П17 Бр.кл./мл	П18 Бр.кл./мл	П19 Бр.кл./мл	П20 Бр.кл./мл
1.Аеробни хетеротрофи	$2.1 \times 10^5 \pm 0.6$	$2.1 \times 10^6 \pm 0.3$	$7.1 \times 10^7 \pm 0.7$	$2.6 \times 10^5 \pm 0.3$	$2.0 \times 10^7 \pm 0.3$
2.Обл. психрофили	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$
3.Фак.психрофили	$2.8 \times 10^4 \pm 0.3$	$2.3 \times 10^5 \pm 0.5$	$2.6 \times 10^4 \pm 0.2$	$2.2 \times 10^5 \pm 0.4$	$2.8 \times 10^4 \pm 0.3$
4.Олиготрофи	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$
5.Уробактерии	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$
6.Спорообразуващи	$2.1 \times 10^4 \pm 0.3$	$2.2 \times 10^4 \pm 0.3$	$2.1 \times 10^4 \pm 0.2$	$2.1 \times 10^3 \pm 0.1$	$2.8 \times 10^3 \pm 0.2$
7.Амонификатори	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$
8.Денитрификатори	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$
9.Нитрификатори	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$
10.Ац.железобактерии	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$
11.Неут. железобактерии	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$
12.Ац.тиобацили	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$
13.Неутр. тиобацили	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$
14.Силикатни бактерии	$2.1 \times 10^3 \pm 0.3$	$2.1 \times 10^3 \pm 0.7$	$2.2 \times 10^5 \pm 0.1$	$2.2 \times 10^5 \pm 0.3$	$< 10^1$
15.Сулфатредуктори	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$
16.Актиномицети	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$
17.Гъби	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$

**Легенда:** П16 – проба непосредствено след входа; П17 - проба от скалата, вляво от входа; П18 - проба от средната част на ВГ, в дясно; П19 - проба от средната част, в ляво; П20 - проба от водна локва във ВГ

**Таблица №3.** Количествена характеристика на микробната колонизация в седименти от гуано.

Група МО	Проба № П26 Бр.кл./мл	П27 Бр.кл./мл	П28 Бр.кл./мл	П29 Бр.кл./мл	П30 Бр.кл./мл
1.Аеробни хетеротрофи	$1.2 \times 10^5 \pm 0.1$	$1.2 \times 10^7 \pm 0.2$	$1.0 \times 10^5 \pm 0.4$	$1.3 \times 10^4 \pm 0.3$	$2.2 \times 10^4 \pm 0.3$
2.Обл. психрофили	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$
3.Фак.психрофили	$1.5 \times 10^4 \pm 0.1$	$1.2 \times 10^3 \pm 0.3$	$1.2 \times 10^4 \pm 0.2$	$1.2 \times 10^5 \pm 0.3$	$2.2 \times 10^3 \pm 0.1$
4.Олиготрофи	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$
5.Уробактерии	$1.2 \times 10^1 \pm 0.1$	$1.4 \times 10^3 \pm 0.4$	$1.2 \times 10^3 \pm 0.1$	$1.8 \times 10^4 \pm 0.3$	$1.1 \times 10^4 \pm 0.4$
6.Спорообразуващи	$1.2 \times 10^3 \pm 0.1$	$1.2 \times 10^3 \pm 0.6$	$1.2 \times 10^4 \pm 0.1$	$1.2 \times 10^2 \pm 0.2$	$1.2 \times 10^3 \pm 0.3$
7.Амонификатори	$1.2 \times 10^4 \pm 0.9$	$1.6 \times 10^4 \pm 0.2$	$1.2 \times 10^4 \pm 0.2$	$1.4 \times 10^4 \pm 0.3$	$1.3 \times 10^5 \pm 0.2$
8.Денитрификатори	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$1.8 \times 10^1$	$1.1 \times 10^2 \pm$
9.Нитрификатори	$1.2 \times 10^1 \pm 0.5$	$1.2 \times 10^1 \pm 0.2$	$1.2 \times 10^1 \pm 0.1$	$1.2 \times 10^1 \pm 0.4$	$1.2 \times 10^1 \pm 0.6$
10.Ац.железобактерии	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$
11.Неут. железобактерии	$1.2 \times 10^1 \pm 1.0$	$1.2 \times 10^1 \pm 0.3$	$1.2 \times 10^1 \pm 0.2$	$1.2 \times 10^1 \pm 0.2$	$1.2 \times 10^1 \pm 0.3$
12.Ац.тиобацили	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$
13.Неутр. тиобацили	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$
14.Силикатни бактерии	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$
15.Сулфатредуктори	$1.4 \times 10^1 \pm 0.3$	$1.8 \times 10^1 \pm 0.5$	$1.4 \times 10^1 \pm 0.2$	$1.1 \times 10^1 \pm 0.1$	$1.4 \times 10^1 \pm 0.1$
16.Актиномицети	$1.2 \times 10^1 \pm 0.4$	$< 10^1$	$1.2 \times 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$
17.Гъби	$1.2 \times 10^2 \pm 0.3$	$3.2 \times 10^2 \pm 0.2$	$1.8 \times 10^2 \pm 0.4$	$2.2 \times 10^2 \pm 0.1$	$0.2 \times 10^3 \pm 0.1$

**Легенда:** П26 - проба от гуано в ГР; П27 - проба от гуано в началото на ГР; П28 - проба от гуано в дъното на ГР; П29 - проба друго натрупване на гуано в дъното на ГР; П30 - Проба от натрупване на гуано в ГР, в ляво

**Таблица № 4.** Количествена характеристика на микробната колонизация в други елементи на пещерата

Група МО	Проба №	ПЗ1 бр.кл./мл	ПЗ2 бр.кл./мл	ПЗ3 бр.кл./мл	ПЗ4 бр.кл./мл	ПЗ5 бр.кл./мл
1. Аеробни хетеротрофи		$0.1 \pm 1.2 \times 10^3$	$0.2 \pm 1.1 \times 10^6$	$0.2 \pm 1.8 \times 10^4$	$0.2 \pm 1.8 \times 10^4$	$0.1 \pm 1.8 \times 10^4$
2. Обл. психрофили		$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$1.1 \pm 1.2 \times 10^1$	$0.2 \pm 1.4 \times 10^1$
3. Фак. психрофили		$0.2 \pm 1.0 \times 10^4$	$0.1 \pm 1.8 \times 10^4$	$1.0 \pm 1.6 \times 10^4$	$0.1 \pm 1.4 \times 10^4$	$0.5 \pm 1.1 \times 10^4$
4. Олиготрофи		$< 10^1$	$< 10^1$	$0.1 \pm 2.8 \times 10^1$	$5.5 \pm 1.2 \times 10^1$	$0.1 \pm 1.1 \times 10^1$
5. Уробактерии		$0.1 \pm 1.8 \times 10^3$	$0.2 \pm 1.7 \times 10^3$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$
6. Спорообразувачи		$0.5 \pm 1.1 \times 10^3$	$0.1 \pm 1.8 \times 10^3$	$0.2 \pm 1.8 \times 10^4$	$1.3 \pm 1.4 \times 10^4$	$0.1 \pm 1.8 \times 10^4$
7. Амонификатори		$0.1 \pm 0.2 \times 10^4$	$0.6 \pm 4.2 \times 10^4$			
8. Денитрификатори		$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$1.6 \pm 1.2 \times 10^3$	$0.1 \pm 1.8 \times 10^2$
9. Нитрификатори		$0.1 \pm 1.2 \times 10^3$	$0.1 \pm 1.3 \times 10^4$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$
10. Ац. железобактерии		$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$
11. Неут. железобактерии		$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$
12. Ац. тиобацили		$< 10^1$	$< 10^1$	$1.0 \pm 1.4 \times 10^1$	$0.1 \pm 2.4 \times 10^1$	$0.3 \pm 1.2 \times 10^1$
13. Неутр. тиобацили		$< 10^1$	$< 10^1$	$0.1 \pm 1.8 \times 10^2$	$0.1 \pm 1.8 \times 10^2$	$0.3 \pm 1.4 \times 10^1$
14. Силикатни бактерии		$< 10^1$	$< 10^1$	$0.4 \pm 1.4 \times 10^3$	$0.2 \pm 2.1 \times 10^4$	$0.1 \pm 2.8 \times 10^3$
15. Сулфатредуктори		$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$
16. Актиномицети		$0.1 \pm 1. \times 10^1$	$0.1 \pm 1.8 \times 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$
17. Гъби		$0.4 \pm 1.1 \times 10^3$	$0.1 \pm 2.2 \times 10^3$	$0.2 \pm 3.2 \times 10^3$	$1.0 \pm 2.1 \times 10^3$	$< 10^1$

**Легенда:** ПЗ1 – проба от Галерията на прилепите; ПЗ2 - проба от Галерията на прилепите; ПЗ3 - проба от Галерията на падналия бор; ПЗ4 - проба от Галерията на падналия бор; ПЗ5 - Проба от Залата на сталактоните

На базата на получените резултати се налагат няколко основни извода:

- ⇒ Не се откриват особено съществени различия в състава на микрофлората в отделните елементи на пещерата.
- ⇒ Микробните ценози имат специфичен състав в зависимост от типа на пробата.
- ⇒ В Галерията с рисунките доминират амонификатори и денитрификатори, за които няма данни за изразен детериогенен ефект.
- ⇒ Постоянен компонент на микробиоценозата в Галерията с рисунките са актиномицетите и гъбите.
- ⇒ Относително слабо е присъствието на бактерии, възприети като типични биодетериогени като нитрификатори, ацидофилни железобактерии и ацидофилни тионовни бактерии.
- ⇒ В Галерията с рисунките се откриват силикатни бактерии, което е неблагоприятен факт с оглед биодетериогенния ефект на тези бактерии.
- ⇒ Физико-химичните параметри на средата повлияват в значителна степен състава на микробната колонизация в пещерата.

### 3. Мониторинг на микробните съобщества в Галерията с рисунките

Микробиологичният мониторинг е осъществен в периода 2013 - 2016 г. Резултатите от тези анализи са посочени в табл.5А и Б.

Анализът на получените резултати категорично потвърждава схващането, че в Галерията с рисунките е формирано стабилно микробно съобщество. Вариациите в количествата на изследваните физиологични и систематични групи микроорганизми са незначителни както следва:

- ⇒ Аеробни хетеротрофи –  $10^5$ -  $10^7$  кл./мл
- ⇒ Факултативни психрофили –  $10^3$ -  $10^4$  кл./мл
- ⇒ Спорообразувачи –  $10^3$ -  $10^5$  кл./мл
- ⇒ Амонификатори –  $10^4$ -  $10^4$  кл./мл
- ⇒ Денитрификатори –  $10^4$ -  $10^5$  кл./мл
- ⇒ Олиготрофи  $\sim 10^1$  кл./мл
- ⇒ Уробактерии  $\sim 10^1$  кл./мл
- ⇒ Силикатни бактерии –  $10^2$ -  $10^4$  кл./мл
- ⇒ Актиномицети –  $10^1$ - $10^2$  кл./мл
- ⇒ Гъби –  $10^2$ -  $10^4$  кл./мл

Останалите анализирани групи практически отсъстват в пробите от галерията.

**Таблица №5/А.** Мониторинг на микробиоценозите в Галерията с рисунките.

Група МО	Година	2013/IV бр.кл./мл	2013/VIII бр.кл./мл	2013/IX. бр.кл./мл	2013/XII бр.кл./мл
1. Аеробни хетеротрофи		0.1±1.5x10 <sup>5</sup> 0.2±0.4x10 <sup>7</sup>	0.1±0.5x10 <sup>4</sup> 0.2±1.5x10 <sup>7</sup>	0.2±0.3x10 <sup>3</sup> 0.1±0.5x10 <sup>7</sup>	0.1±0.8x10 <sup>3</sup> 0.2±1.5x10 <sup>7</sup>
2.Обл. психрофили		< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>
3.Фак.психрофили		0.2±2.6x10 <sup>3</sup> 0.2±2.2x10 <sup>5</sup>	0.2±2.6x10 <sup>3</sup> 0.3±1.6x10 <sup>4</sup>	0.1±2.8x10 <sup>3</sup> 0.2±2.4x10 <sup>3</sup>	0.2±1.6x10 <sup>5</sup> 0.1±2.6x10 <sup>6</sup>
4.Олиготрофи		< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>
5.Уробактерии		0.2±1.6x10 <sup>1</sup> 0.1±2.4x10 <sup>1</sup>	0.1±2.6x10 <sup>1</sup> 0.2±2.8x10 <sup>2</sup>	0.2±2.0x10 <sup>1</sup> 0.1±2.6x10 <sup>2</sup>	0.2±1.6x10 <sup>1</sup> 0.1±2.6x10 <sup>3</sup>
6.Спорообразувачи		1.2±2.5x10 <sup>4</sup> 0.2±2.6x10 <sup>5</sup>	0.2±2.1x10 <sup>5</sup> 0.1±2.6x10 <sup>5</sup>	1.2±2.0x10 <sup>4</sup> 0.2±1.6x10 <sup>6</sup>	0.2±1.6x10 <sup>5</sup> 0.3±3.6x10 <sup>6</sup>
7.Амонификатори		0.2±2.6x10 <sup>4</sup> 5.2±2.6x10 <sup>5</sup>	0.2±2.6x10 <sup>4</sup> 0.1±2.6x10 <sup>3</sup>	1.1±2.6x10 <sup>6</sup> 0.2±2.6x10 <sup>3</sup>	0.2±2.6x10 <sup>7</sup> 0.1±1.6x10 <sup>7</sup>
8.Денитрификатори		0.2±2.6x10 <sup>3</sup> 0.1±2.0x10 <sup>3</sup>	1.2±2.6x10 <sup>3</sup> 0.2±2.6x10 <sup>3</sup>	0.2±2.6x10 <sup>3</sup> 0.1±2.1x10 <sup>3</sup>	0.3±2.6x10 <sup>3</sup> 0.2±2.6x10 <sup>4</sup>
9.Нитрификатори		< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>
10.Ац.железобактерии		< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>
11.Неут. железобактерии		< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>
12. Ац.тиобацили		< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>
13.Неутр. тиобацили		< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>
14.Силикатни бактерии		0.2±2.3x10 <sup>3</sup> 1.1±2.1x10 <sup>4</sup>	0.2±2.6x10 <sup>3</sup> 0.1±2.5x10 <sup>4</sup>	0.2±2.6x10 <sup>4</sup> 0.2±2.6x10 <sup>5</sup>	0.2±2.2x10 <sup>5</sup> 1.2±1.6x10 <sup>6</sup>
15.Сулфатредуктори		< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>
16.Актиномицети		1.2±1.6x10 <sup>2</sup> 3.8±2.3x10 <sup>2</sup>	0.2±2.7x10 <sup>2</sup> 3.2±2.6x10 <sup>2</sup>	0.2±2.1x10 <sup>3</sup> 2.2±2.4x10 <sup>3</sup>	5.2±2.6x10 <sup>2</sup> 1.2±1.6x10 <sup>3</sup>
17. Гъби		1.2±2.8x10 <sup>3</sup> 3.2±1.6x10 <sup>4</sup>	1.2±1.6x10 <sup>2</sup> 1.2±3.6x10 <sup>3</sup>	0.2±1.6x10 <sup>2</sup> 3.1±3.6x10 <sup>3</sup>	0.2±4.6x10 <sup>2</sup> 0.2±2.7x10 <sup>3</sup>

**Легенда:** Посочени са установените най-ниски и най-високи стойности за всяка група



Като основни изводи от проведеното мониторингово изследване могат да се посочат:

⇒ В Галерията с рисунките е формирано стабилно микробно съобщество, чиято динамика е незначителна.

⇒ Запазва се преобладаващото присъствие на факултативните психрофили, спорообразуващите и силикатните бактерии, амонификаторите, денитрификаторите актиномицетите и гъбите.

⇒ Основната причина за тази висока стабилност на микробните популации в Галерията с рисунките е свързана с относително постоянните физикохимични параметри на средата в галерията и ограничения поток на туристи в галерията, тъй като в периода на изследването Галерията с рисунките е затворена за посетители.

**Таблица №5/Б.** Мониторинг на микробиоценозите в Галерията с рисунките.

Година Група МО	2014/IV бр.кл./мл	2014/X бр.кл./мл	2015/ IV бр.кл./мл	2015/X бр.кл./мл	2016/III бр.кл./мл
1. Аеробни хетеротрофи	0.1±8.6x10 <sup>5</sup> 1.0±7.6x10 <sup>6</sup>	0.2±1.8x10 <sup>4</sup> 0.2±2.6x10 <sup>5</sup>	0.2±1.9x10 <sup>6</sup> 0.1±1.1x10 <sup>7</sup>	0.2±2.6x10 <sup>6</sup> 0.2±1.9x10 <sup>7</sup>	0.2±1.6x10 <sup>5</sup> 0.2±1.6x10 <sup>7</sup>
2.Обл. психрофили	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>
3.Фак.психрофили	<b>0.1±1.6x10<sup>4</sup></b> <b>0.4±8.6x10<sup>5</sup></b>	<b>0.1±1.6x10<sup>5</sup></b> <b>0.5±8.6x10</b>	<b>0.1±2.4x10<sup>5</sup></b> <b>0.2±1.6x10<sup>6</sup></b>	<b>0.1±1.6x10<sup>4</sup></b> <b>0.2±1.6x10<sup>5</sup></b>	<b>0.1±1.6x10<sup>3</sup></b> <b>0.1±3.6x10<sup>4</sup></b>
4.Олиготрофи	< 10 <sup>1</sup> 0.1±1.x10 <sup>1</sup>	0.1±1.2x10 <sup>1</sup> 0.1±2.9x10 <sup>1</sup>	0.1±1.0x10 <sup>1</sup> 0.2±1.9x10 <sup>1</sup>	0.1±1.0x10 <sup>1</sup> 0.1±3.9x10 <sup>1</sup>	0.8±1.9x10 <sup>1</sup> 0.1±2.9x10 <sup>1</sup>
5.Уробактерии	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>
6.Спорообразуващи	<b>0.2±1.6x10<sup>4</sup></b> <b>0.1±2.6x10<sup>5</sup></b>	<b>0.1±1.6x10<sup>3</sup></b> <b>0.1±8.0x10<sup>5</sup></b>	<b>0.1±1.6x10<sup>3</sup></b> <b>0.3±1.6x10<sup>5</sup></b>	<b>3.3±2.6x10<sup>4</sup></b> <b>3.8±8.1x10<sup>5</sup></b>	<b>0.1±1.6x10<sup>3</sup></b> <b>0.1±1.4x10<sup>5</sup></b>
7.Амонификатори	<b>0.2±1.8x10<sup>4</sup></b> <b>0.2±9.6x10<sup>4</sup></b>	<b>0.2±1.8x10<sup>4</sup></b> <b>0.2±1.6x10<sup>5</sup></b>	<b>0.2±9.6x10<sup>4</sup></b> <b>0.3±1.8x10<sup>5</sup></b>	<b>1.2±1.8x10<sup>4</sup></b> <b>0.2±1.1x10<sup>5</sup></b>	<b>0.2±9.6x10<sup>5</sup></b> <b>0.2±1.2x10<sup>6</sup></b>
8.Денитрификатори	0.1±1.6x10 <sup>2</sup> 0.1±2.6x10 <sup>5</sup>	0.1±1.6x10 <sup>3</sup> 0.1±2.6x10 <sup>3</sup>	0.1±1.6x10 <sup>3</sup> 0.1±3.6x10 <sup>5</sup>	1.1±1.6x10 <sup>4</sup> 3.3±8.0x10 <sup>5</sup>	0.1±3.6x10 <sup>5</sup> 0.2±2.6x10 <sup>5</sup>
9.Нитрификатори	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>
10.Ац.железобактерии	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>
11.Неут. железобактерии	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>
12. Ац.тиобацили	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>
13.Неутр. тиобацили	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>
14.Силикатни бактерии	<b>0.1±2.6x10<sup>3</sup></b> <b>1.1±7.6x10<sup>4</sup></b>	<b>0.1±1.6x10<sup>3</sup></b> <b>0.1±1.8x10<sup>4</sup></b>	<b>4.1±2.6x10<sup>4</sup></b> <b>3.3±1.6x10<sup>5</sup></b>	<b>0.2±0.6x10<sup>5</sup></b> <b>0.4±1.6x10<sup>5</sup></b>	<b>0.1±1.2x10<sup>5</sup></b> <b>0.2±1.9x10<sup>5</sup></b>
15.Сулфатредуктори	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>
16.Актиномицети	<b>3.0±1.6x10<sup>1</sup></b> <b>2.1±2.8x10<sup>2</sup></b>	<b>0.4±3.6x10<sup>2</sup></b> <b>0.1±7.6x10<sup>2</sup></b>	<b>0.1±1.6x10<sup>1</sup></b> <b>0.3±8.6x10<sup>2</sup></b>	<b>0.1±3.6x10<sup>2</sup></b> <b>0.1±9.6x10<sup>2</sup></b>	<b>3.0±3.3x10<sup>1</sup></b> <b>3.1±2.6x10<sup>2</sup></b>
17. Гъби	<b>4.1±2.6x10<sup>3</sup></b> <b>1.1±2.9x10<sup>4</sup></b>	<b>0.1±2.6x10<sup>2</sup></b> <b>0.3±2.0x10<sup>3</sup></b>	<b>0.1±2.8x10<sup>2</sup></b> <b>0.1±2.2x10<sup>3</sup></b>	<b>0.1±1.6x10<sup>3</sup></b> <b>0.3±8.6x10<sup>3</sup></b>	<b>1.0±2.0x10<sup>2</sup></b> <b>0.8±1.6x10<sup>3</sup></b>

**Легенда:** Посочени са установените най-ниски и най-високи стойности за всяка група

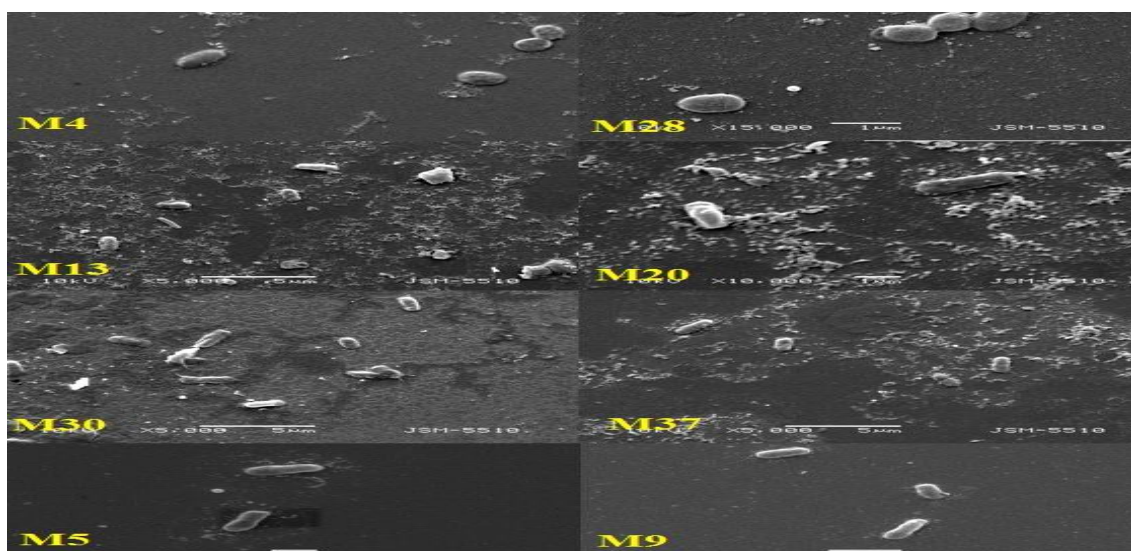
## 4. Идентификация на изолираните чисти култури

### 4.1. Идентификация на бактериалните изолати

След вторичен разсев, проверка за чистота на културите и групирането им според типа на колонииите от всички бактериални изолати за 31 представителни изолата са приложени таксономичните схеми по определителя на Бърджи и е осъществена молекулярна идентификация.

#### 4.1.1. Идентификация на бактериалните изолати чрез методите на класическата таксономия.

Използвани са класически схеми на идентификация, включващи морфологични, физиологични и биохимични свойства. Изолатите са подложени и на електронно-микроскопски анализ, имащ за цел потвърждаване на наблюдаваната клетъчна морфология. Снимки на някои от изолатите са посочени на фиг.3.



Фигура. №3. Електронно-микроскопски снимки на изолатите.

На базата на получените резултати от проведения анализ на морфологичните, физиологичните и биохимичните характеристики на изследваните бактериални изолати, съгласно използваните схеми последните бяха определени таксономично, както следва:

##### Грам-положителни бактерии

14 изолата са отнесени към род *Bacillus*. За по-точното видово идентифициране на изолатите, отнесени към род *Bacillus* е използван HiBacillus™ Identification kit. Резултатите от идентификацията с посочения тест потвърдиха таксономичната принадлежност на тези 14 изолата към род *Bacillus*. Анализът на резултатите отнася изследваните изолати от род *Bacillus* както следва: **M2, M8 и M16** – *B. pumilus*; **M5 и M13** – *B. licheniformis*; **M10, M12, M26, M64** – *B. cereus*; **M37 и M58** – *B. thuringensis*; **M3, M20, M30** – *B. circulans*.

Доказването на доминиращото присъствие на представители на род *Bacillus* в анализиранияте проби не е изненадващо, тъй като информация за присъствие на бактерии от този род в подобни пещерни хабитати е налична в литературата. Особено внимание с оглед на биодетиорационен потенциал, изискват

представителите на вида *B. circulans*, отнасящ се към групата на силикатните бактерии. Представителите на тази група са типични биодеструктори, разрушаващи силикати и алуминосиликати като чрез първоначална атака с продуцирани органични киселини освобождават силиций, който комплексират чрез екзополisahариди. Тези екзополisahариди се съдържат в слизестите капсули на бактериите.

⇒ Три от изследваните изолати (**M4**, **M15** и **M17**) са отнесени към род *Sphingobacterium* (Class – Sphingobacteria; Order – Sphingobacteriales; Family – Sphingobacteriaceae). Първоначално родът включва два вида – *S. spiritivorum* и *S. multivorum*, прехвърлени от род *Flavobacterium* (Holmes, 1986).

Видовото типичане на изолати **M4**, **M15** и **M17** не е извършено, тъй като се налага провеждането на допълнителни изследвания (хепариназа, Г+Ц% и др.). Откриването на бактерии от този род в проби от Галерията с рисунките също заслужава сериозно внимание, тъй като досега няма много данни за тяхно присъствие в екологични ниши от типа на пещера Магура. При изследване на бактериалната контаминация в пещерата Nerja (Испания), Dosampio et al. (2001) откриват представители на род *Sphingobacterium*. В същото време за рода е характерен изключителен диверситет по отношение на тяхната екология и изразена психрофилност.

⇒ Изолат **M42** е определен таксономично като представител на род *Enterococcus*. Откриването на представители на този род в проби от пещерата е тясно свързано с антропогенния фактор, както и с плътната прилепна популация в различни части на галериите.

#### Грам-отрицателни бактерии

⇒ Изолати **M1** и **M68** са отнесени към род *Pseudomonas*. Родът е типов за сем. Pseudomonadaceae, и представлява една от таксономично най-разнородните групи Грам (–) бактерии, притежаващи фенотипни характеристики, сходни с тези на много други родове. Към настоящия момент няма данни за доказано присъствие на тези бактерии в аналогични пещерни системи. Също така не е доказан и биодетериогенен ефект от тях, дори точно обратното – съществуват данни за доказан антагонистичен ефект спрямо други бактерии и гъби. Изследванията върху тези изолати ще бъдат задълбочени в следващ етап от работата.

⇒ Изолати **M27**, **M33** и **M46** таксономично принадлежат към род *Serratia*.

⇒ Изолати **M42**, **M44**, **M45** и **M65** са определени като род *Enterobacter*.

⇒ Изолати M43 и M50 са определени като представители на род *Klebsiella*.

#### 4.1.2. Идентификация на изолираните чисти култури бактерии чрез методите на молекулната таксономия

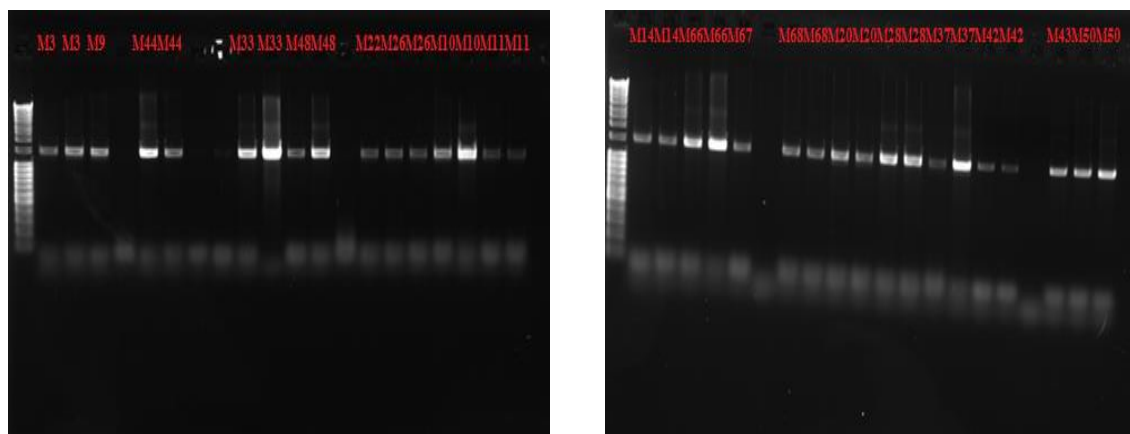
За идентифицирането на изолатите от Галерията с рисунките в пещера Магура са използвани PCR амплификация на 16S рДНК, секвениране на амплифицираните продукти, последвано от биоинформатичен и филогенетичен анализ на получените секвенции.

##### ⇒ Изолиране на тотална ДНК от изследваните изолати

Изолираната ДНК беше подложена на спектрофотометричен и електрофоретичен анализ, за определяне на нейното качество и количество. Спектрофотометричният анализ на всички проби показва стойности на съотношението A260/A280 в диапазона 1.7-1.9, което е показател за чистотата на изолираната ДНК матрица. Определянето на концентрацията на изолираната геномна ДНК е осъществено чрез използването на Qubit Fluorometer (Invitrogen) и Nano Drop 2000c Spectrophotometer (PeQlab).

##### ⇒ PCR амплификация на 16S рДНК от изследваните изолати

“Универсални” еубактериални праймери: 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') и 142-2R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'), конструирани върху консервативните терминални секвенции на 16S рДНК на *E. coli*, бяха успешно приложени за амплифициране на 16S рДНК при изолатите. Осъществената амплификация на 16S рДНК позитивира очаквания 1428 бд фрагмент при всички изследвани проби (фиг.4).



**Фигура №4.** Електрофоретичен анализ на част от PCR-продуктите, получени при амплификация на 16S рДНК от бактериалните изолати (праймери 27F – 142-2R) в 1,5 % агарозен гел.

Получените 16S рДНК амплифицирани фрагменти бяха изпратени за секвениране - 16S рДНК тотален анализ (full sequencing) от Macrogen (Холандия).

### 4.1.3. Биоинформатичен секвенционен анализ

Получените нуклеотидни секвенции са подложени на секвенционен анализ. С помощта на специализиран софтуер (BLAST®) бе установена генетичната идентичност на изследваните 16S рДНК фрагменти от всеки един изолат. Резултатите са представени в табл.6.

**Таблица №6.** Секвенционен анализ на част от бактериалните изолати.

Изолат	Молекулна Идентификация	Референтен вид (GenBank)	Номер	Идентичност (%)
M1	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas fragi</i>	KT900502.1	98%
M2	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus pumilus</i>	GU998809.1	98%
M3	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus safensis</i>	KT758565.1	99%
M4	<i>Sphingobacterium</i> sp.	<i>Sphingobacterium faecium</i>	AB680842.1	98%
M5	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus invictae</i>	JX183147.2	98%
M8	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus pumilus</i>	JX312578	97%
M10	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus pumilus</i>	FJ237277	98%
M12	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus pumilus</i>	JX083960.1	96%
M13	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus pumilus</i>	EU867353	97%
M15	<i>Sphingobacterium</i> sp.	<i>Sphingobacterium faecium</i>	KM114909	97%
M16	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus pumilus</i>	KR982689	98%
M17	<i>Sphingobacterium</i> sp.	<i>Sphingobacterium kitahiroshimense</i>	NR_041636.1	99%
M20	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus invictae</i>	KT720245.1	99%
M26	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus pumilus</i>	NZ_JOJX02000003.	99%
M27	<i>Serratia</i> sp.	<i>Serratia liquefaciens</i>	NZ_CP011303.1	97%
M28	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>Enterococcus mundtii</i>	AF061013.1	98%
M30	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus altitudinis</i>	KM054685	96%
M33	<i>Serratia</i> sp.	<i>Serratia liquefaciens</i>	NZ_CP011303.1	97%
M37	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus safensis</i>	KJ427751.1	98%
M42	<i>Enterobacter</i> sp.	<i>Enterobacter asburiae</i>	DQ068932	96%
M43	<i>Pantoea</i> sp.	<i>Pantoea agglomerans</i>	DQ307453.1	99%
M44	<i>Enterobacter</i> sp.	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	HM131221.1	99%
M45	<i>Enterobacter</i> sp.	<i>Enterobacter aerogenes</i>	EU855208	96%
M46	<i>Serratia</i> sp.	<i>Serratia liquefaciens</i>	JN596115.1	95%
M50	<i>Pantoea</i> sp.	<i>Pantoea agglomerans</i>	EF492002.1	98%
M58	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus aerius</i>	KR935249.1	97%
M64	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus altitudinis</i>	KJ020355.1	98%
M65	<i>Enterobacter</i> sp.	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	KM019804.1	95%
M66	<i>Serratia</i> sp.	<i>Serratia grimesii</i>	EF491959.1	98%
M67	<i>Raoultella</i> sp.	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	NR_114502.1	99%
M68	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas panacis</i>	AY787208.3	98%

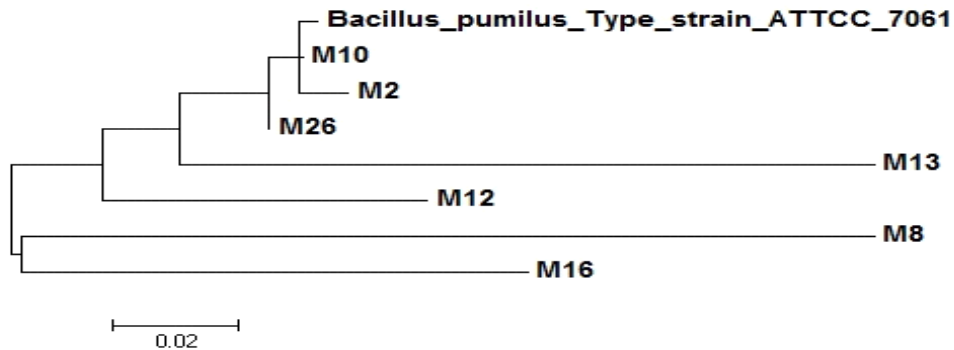
Анализът на резултатите от проведения секвенционен анализ, могат да бъдат обобщени както следва:

#### ⇒ Изолати, отнесени към род *Bacillus*

Към този род са отнесени най-голям брой изолати и те представляват доминиращата група. Тези резултати потвърждават извода, че най-често изолираните бактерии от пещерни системи, подложени на засилено антропологичено



проведен филогенетичен анализ на изолати М2, М8, М10, М12, М13, М16, М26, отнесени към типовия за вида щам АТСС 7061. Филогенетичното групиране на секвенциите е представено на фиг.6.



(Линията в долния ляв ъгъл показва филогенетично разстояние, съответстващо на 5% заместване в нуклеотидната секвенция)

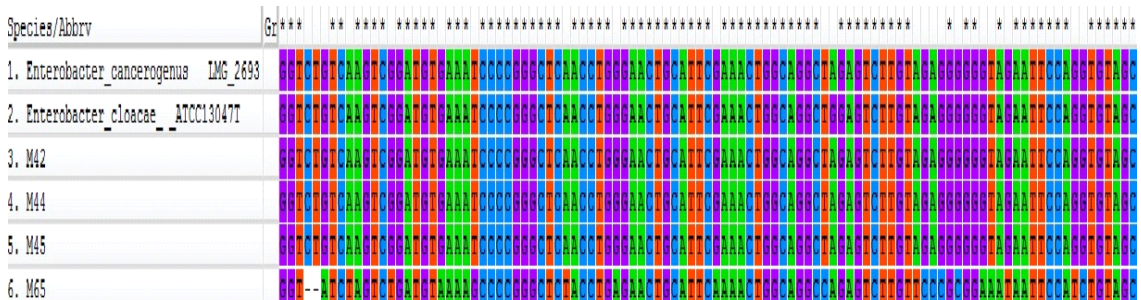
**Фигура №6.** Филогенетично дърво на еволюционната дистанция на 16S рДНК секвенции от изолати, определени като *Bacillus* sp. и типовия за вида *Bacillus pumilus* щам АТСС 7061.

В самостоятелен клъстер попадат типовия щам 7061, изолати М10 и М2. Изолати М8 и М16 формират самостоятелен клъстер, който образува дълбоко разклонение във филогенетичното дърво и ги отличава съществено от групата.

#### ⇒ Изолати, отнесени към род *Enterobacter*

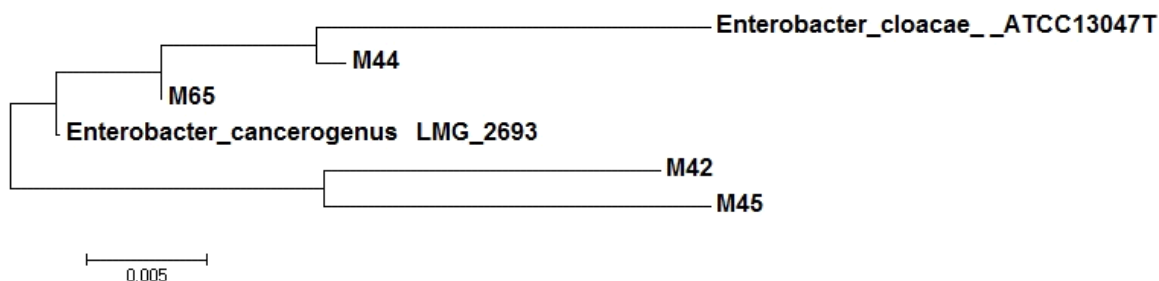
Този род съставлява 12.9% от изследваните изолати. Основни предпоставки за тази микробиологична находка могат да представляват изключително интензивния туристопоток в изследваната галерия, дренажната вода по стените и тавана на коридорите, както и плътната прилепна популация, зимуваща в галерията.

На базата на получената секвенционна подредба е проведен филогенетичен анализ на изолатите, отнесени към типовите щамове на видовете *E. cloacae* (АТСС 13047) и *E. cancerogenus* (АТСС 2693). Филогенетичното групиране на секвенциите е представено на фиг.7.



**Фигура №7.** Секвенционно сравнение на фрагменти от 16S рДНК на изолати, определени като *Enterobacter* sp.

На базата на получената секвенционна подредба е проведен филогенетичен анализ на изолати M42, M44, M45, отнесени към типовите щамове на видовете *E. cloacae* (ATCC 13047) и *E. cancerogenus* (ATCC 2693). Филогенетичното групиране на секвенциите е представено на фиг.8.



**Фигура №8.** Филогенетично дърво за еволюционната дистанция на 16S рДНК секвенции от изолати, определени като *Enterobacter* sp.

Резултатите ясно показват филогенетичната близост на изолати M44 и M65, с типовите за двата вида щамове. Изолати M42 и M45 формират самостоятелен клъстер.

#### ⇒ Изолати, отнесени към род *Serratia*

Към род *Serratia* са отнесени общо осем изолата. Прилагането на 16S рДНК идентификация среща съществени затруднения относно междувидовото дискриминиране в рамките на рода (Dauga, 1990). Родът включва 10 вида, характеризиращи се със сравнително ниски стойности на ДНК-ДНК хибридизация достигащи до 60%. С типов вид *Serratia marcescens*. До 1971 видът, към които с най-голяма степен се отнасят изолатите от Галерията с рисунките *Serratia liquefaciens*, е определян като *Enterobacter liquefaciens*, но след детайлни генетични проучвания е рекласифициран. Съществуват данни за изолиране на представители на рода от прилепи, хиберниращи в различни пещерни системи (García, 2015). Трябва да бъде отчетено и присъствието на плътна прилепна популация и в пещера Магура, както и липсата на микробиологични изследвания в тази насока.

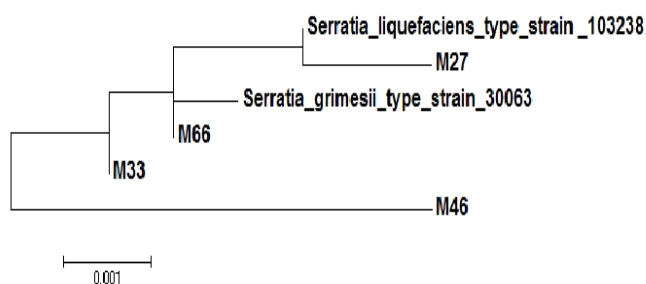
Секвенционната идентичност на изолати, показващи принадлежност към род *Serratia* е представена на фиг.9. Включени са 16S рДНК секвенции на типовите щамове за видовете *Serratia grimesii* (AJ233430) и *Serratia liquefaciens* (AJ306725).



Species/Abbrv	Gr	*
1. <i>Serratia grimesii</i> _type_strain_30063		*****
2. <i>Serratia liquefaciens</i> _type_strain_10		*****
3. M27	-	*****
4. M33		*****
5. M46		*****
6. M66		*****

**Фигура №9.** Секвенционно сравнение на фрагменти от 16S рДНК на изолати определени като *Serratia* sp.

На базата на получената секвенционна подредба е проведен филогенетичен анализ на изолати M27, M33, M46 и M66, отнесени към типовите щамове на видовете *Serratia grimesii* (AJ233430) и *Serratia liquefaciens* (AJ306725). Филогенетичното групиране на секвенциите е представено на фиг.10.



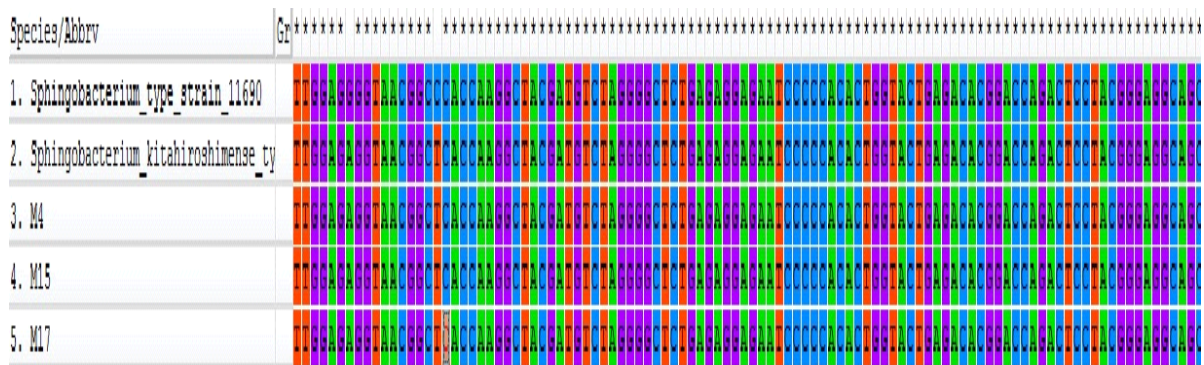
**Фигура №10.** Филогенетично дърво за еволюционната дистанция на 16S рДНК секвенции от изолати, определени като *Serratia* sp.

Резултатите поставят изолат M27 в самостоятелен клъстер с 16S рДНК секвенция от *Serratia liquefaciens* (AJ306725). Филогенетично близки са и изолати M66 и M33. Единствено изолат M46 образува дълбоко разклонение във филогенетичното дърво и се отличава съществено от групата.

⇒ **Изолати, отнесени към род *Sphingobacterium***

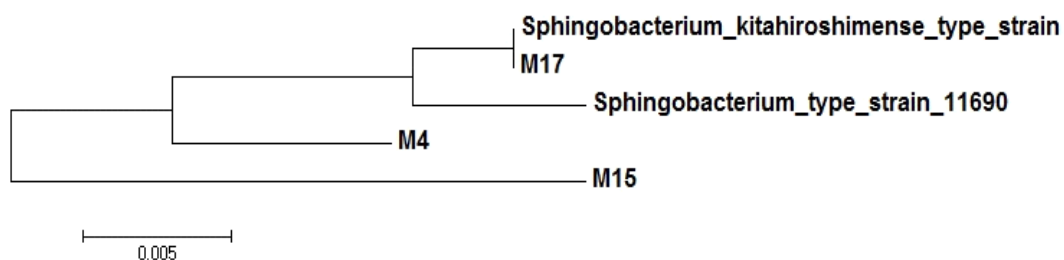
Секвенционната идентичност на представителни изолати, отнесени към род *Sphingobacterium* е представена на фиг.11.

Включени са 16S рДНК секвенции на типовите щамове за видовете *S. kitahiroshimense* (AB361248) и *S. faecium* (AJ438176).



**Фигура №11.** Секвенционно сравнение на фрагменти от 16S рДНК на изолати, определени като *Sphingobacterium* sp.

На базата на получената секвенционна подредба е проведен филогенетичен анализ на изолати M4, M15 и M17, като са включени типовите шамове на видовете *S. kitahiroshimense* (AB361248) и *S. faecium* (AJ438176). Филогенетичното групиране на секвенциите е представено на фиг.12.



**Фигура №12.** Филогенетично дърво за еволюционната дистанция на 16S рДНК секвенции от изолати, определени като *Sphingobacterium* sp.

Изолат M17 попада в самостоятелен клъстер с типовия щам за вида *S. kitahiroshimense* (генетичната идентичност между двете секвенции е 99%). Изолати M4 и M15 формират разклонения във филогенетичното дърво и не обособяват отделен клъстер.

⇒ **Изолати, отнесени към родове *Pseudomonas*, *Enterococcus*, *Pantoea* и *Raoultella***

Установена е принадлежност към тези родове на 11 от изследваните изолати. Към момента, редица автори докладват изолирането и молекулната идентификация, базирана на 16S рДНК на представители на род *Pseudomonas* от различни пещерни системи (Banks et al., 2010; Barton et al., 2014). Трябва да бъде отчетен фактът, че род *Pseudomonas* се характеризира с изключително висока степен на физиологична и генетична хетерогенност - представители на рода се изолират от различни по своите физико-химични особености местообитания (Spiers, 2000). Размерът на

бактериалния геном за вида, варира в широки граници -  $3\pm 7$  Mbp при *Pseudomonas stutzeri* (Ginard et al., 1997) и до  $7\pm 1$  Mbp при *Pseudomonas aeruginosa* (Schmidt et al., 1996). Установява се значителен диверситет по отношение на RFLP профилите на щамове, изолирани и от сходни хабитати (Grothues et al., 1988; Ginard et al., 1997; Rainey et al., 1994).

Към настоящия момент към род *Pantoea* се включват 7 вида и 2 подвида. Независимо от сравнително често изолиране на видовете *P. ananatis*, *P. dispersa*, *P. citrea*, *P. punctata* и *P. terrea*, липсват достатъчно депозирани техни секвенции. Наблюдава се изключително сходство по отношение на фенотипни характеристики, химичен състав и консервативност на наличните 16S ДНК секвенции (Stackebrandt et al., 1999), което затруднява значително видовото типизиране на изолатите.

Род *Raoultella* е таксономично признат през 2001 г. При провеждане на филогенетичен анализ, включващ типови щамове от 9 вида на род *Klebsiella*, се установява групиране в три клъстера – към клъстер II са отнесени видовете *Klebsiella planticola*, *Klebsiella trevisanii* и *Klebsiella terrigena* (притежаващи способност за растеж при 10 °C и усвояване на L-сорбоза). Секвенционният анализ налага отделянето им от род *Klebsiella* и рекласифицирането им в род *Raoultella* (Drancourt et al., 2001).

От проведените анализи за идентификация на бактериалните изолати се налагат няколко съществени заключения, а именно :

⇒ Бактериалният компонент на микробиоценозите не се характеризира с голямо разнообразие.

⇒ Доминиращи са представителите на род *Bacillus*, което е потвърдено и от молекулния анализ, като най - типичните представители са *Bacillus safensis*, *Bacillus invictae* и *Bacillus pumilus*.

⇒ В резултат проведения секвенционен анализ на 16S рДНК фрагменти от изолати, отнесени към род *Bacillus*, секвенциите бяха депозирани в GenBank®. След необходимата проверка, последните бяха приети със следните номера KU517690, KU517691, KU517693, KU517695, KU517696, KU517697, KU517698, KU517699, KU517700, KU517701, KU517702.

⇒ Един от изолатите, отнесени към род *Sphingobacterium* е в самостоятелен клъстер с типовия щам *S. kitahiroshimense*, а два от изолатите формират самостоятелен клъстер като получената 16S рДНК секвенция от изолат М4 е подадена и приета в GenBank® под номер KU517692.

⇒ Два от изолатите отнесени към род *Enterobacter* формират клъстер с типовия щам, а останалите два – самостоятелен клъстер. Техните секвенции също са подадени в GenBank® и очакват приемане.

⇒ Три от изолатите, отнесени към род *Serratia* формират клъстер с *Serratia grimesii* и *Serratia liquefaciens*, а четвъртият изолат образува дълбоко разклонение във филогенетичното дърво и се отличава съществено от групата.

⇒ Единадесет от изолатите са отнесени към родове *Pseudomonas*, *Enterococcus*, *Pantoea* и *Raoultella*.

## **4.2. Идентификация на изолираните чисти култури актиномицети.**

### **4.2.1. Идентификация на изолираните чисти култури чрез методи на класическата таксономия**

Обект на изследване са 15 щамове. Последните са изолирани от Галерията с рисунките и Входната галерия. Идентификацията е извършена съгласно методите на полифазната таксономия.

#### **⇒ Макроморфология**




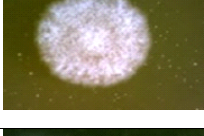

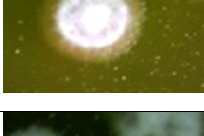
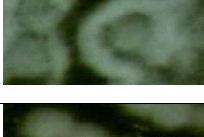
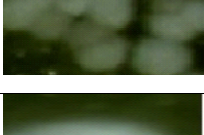

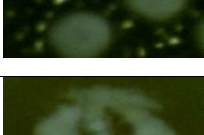
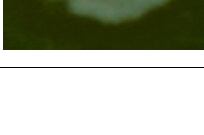
За изучаването на морфологията на колонии на изолираните щамове те са разсявани върху повърхността на твърда хранителна среда Гаузе I за получаване на единични колонии, а също така са проучени и цветовете на въздушните и субстратните мицели, както и на разтворимите в средата пигменти (табл.7).

Наблюдава се изразена вариация в морфологичния тип на колонии, което показва вероятна различна таксономична принадлежност. Анализът на резултатите показва съществени вариации в цвета на въздушния мицел при изследваните изолати, в зависимост от използваната среда. Доминира сивото оцветяване (изолати AM1, AM3, AM5 и AM15).

Установява се също различен цвят при изследваните изолати, в зависимост от използваната хранителна среда. Преобладава кафявата гама – изолати AM2, AM5, AM8, AM12, в съответните вариации на основния цвят – кафеникав, червеникаво кафяв, кафяво-виолетов. Субстратен мицел в оранжевата гама се наблюдава при изолати AM8, AM9 и AM10.

При всички изследвани изолати се наблюдава формирането на разтворим пигмент в средата.

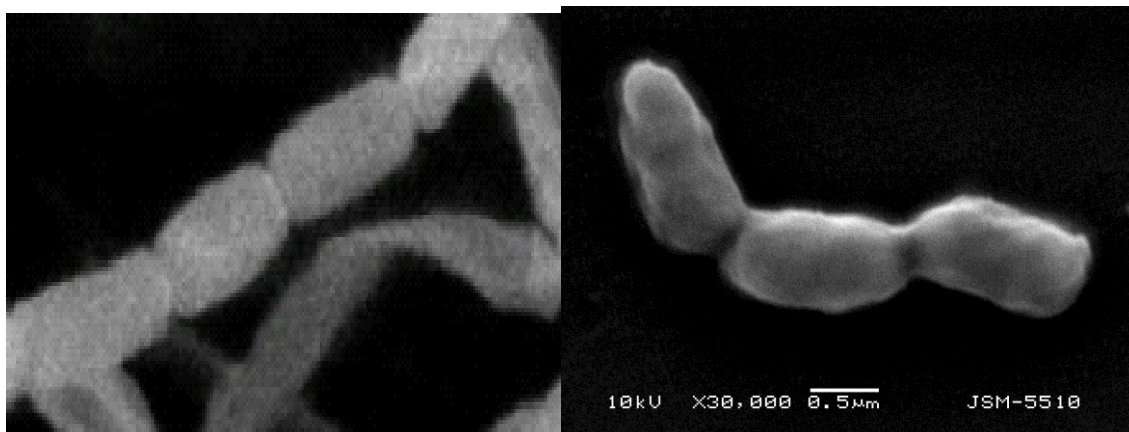
**Таблица №7.** Макроморфологична характеристика на изследваните изолати.

Изолат	Общ изглед	Описание
AM1		Бял, пухкав, въздушен мицел. Ясно обособен плосък център, покрит с по-рехав въздушен мицел. Бял субстратен мицел, не отделя пигмент в средата.
AM2		Бял, пухкав въздушен мицел. Белезникав субстратен мицел. Плосък център с бял пухкав въздушен мицел около него. Отделя белезникав пигмент в средата.
AM3		Белезникав субстратен мицел; отделя пигмент в средата; конусовидни колонии със светлорозов ореол в основата; тъмнорозово-сиви връхчета и бял пухкав въздушен мицел.
AM4		Бял въздушен мицел. Кафяво-керемиден субстратен мицел. Издаден бял център с по-белезникав кръг около него. Отделя кафяво-керемиден пигмент в средата.
AM5		Субстратен мицел – с неопределен цвят, бели и пухкави колонии, бял въздушен мицел.
AM6		Бял пухкав въздушен мицел и тъмнокафяв субстратен мицел. Бял неравен ръб. Изпъкнал център с въздушен мицел. Обграден от кафяв кръг. Отделя кафяв пигмент в средата.
AM7		Бял, пухкав въздушен мицел. Белезникав субстратен мицел. Плосък център с бял пухкав въздушен мицел около него. Отделя белезникав пигмент в средата.
AM8		Отделя пигмент, белезникав до бял субстратен мицел, бял въздушен мицел, малки бели, кръгли колонии, със светъл ореол от страни, на върха с по-тъмна част, неравна повърхност.
AM9		Отделя пигмент; субстратен мицел – без разграничаващ се цвят.
AM10		Отделя пигмент, субстратен мицел – без разграничаващ се цвят. Въздушен мицел - бял, колонии с вдлъбнатина в средата.
AM11		Оранжев субстратен мицел, отделя пигмент в средата, правилни конусовидни колонии с бял пухкав въздушен мицел.

⇒ **Микроморфология** - Обект на определяне са форма на спороносните хифи и морфологията на споровата повърхност. Наблюденията са извършвани съгласно изискванията – трикратно в продължение на 21 денонощия за формата на спороносците (на 7, 14 и 21-и ден) и на 21-ия ден за морфологията на споровата повърхност. Крайният резултат за всеки признак се взема от онова наблюдение, след което признакът остава без промяна. Наблюденията са извършвани под светлинен и електронен микроскоп.

Изследваните изолати се характеризират с разнообразна морфология на спороносещите хифи. При по-голямата част от изолатите (AM4, AM8) се наблюдават различни по тип спороносци - от прави, през извити, до отворени спирали. При част от изолатите се наблюдава един единствен тип морфология на спороносците – отворени спирали – AM1, AM6, AM11. При изолат AM15 се наблюдават прави и извити спирали.

Преобладаващата част от изолатите формират спори с гладка повърхност (фиг.13).



**Фигура №13.** Морфология на споровата повърхност.

#### ⇒ **Усвояване на различни въглеродни източници**

Изследвана е способността за усвояване на различни въглеродни източници на изследваните изолати (табл.8).

Изолатите показват различна реакция по отношение на усвояването на изследваните 8 въглеродни източника, присъстващи в средата като единствени. Четири от изследваните изолати усвояват всичките 8 изпитвани въглеродни източници – AM4, AM5, AM6 и AM15. Изолати AM7 и AM13 не могат да усвояват един от източниците – инозит, респ. маноза. Изолат AM8 демонстрира способност за усвояване само на два от изследваните въглеродни източника. Най-усвояваните въглеродни източници са арабиноза и ксилоза – почти всички изолати показват растеж на среди с тези източници. В най-малка степен се усвоява захарозата, където

е отчетен изключително слаб растеж.

**Таблица №8.** Усвояване на въглеродни източници.

Изолат	Въглеродни източници								Изолат	Въглеродни източници							
	1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8
AM1	+	+	-	-	+	+	+	-	AM9	+	+	-	-	+	+	-	-
AM2	+	-	+	+	+	-	-	-	AM10	+	+	+	+	+	-	+	+
AM3	+	+	-	-	-	-	-	-	AM11	-	+	-	+	-	-	-	-
AM4	+	+	+	+	+	+	+	+	AM12	+	+	+	+	-	+	+	+
AM5	+	+	+	+	+	+	+	+	AM13	+	+	+	-	+	+	+	+
AM6	+	+	+	+	+	+	+	+	AM14	+	+	-	-	+	-	+	-
AM7	+	+	-	+	+	+	+	+	AM15	+	+	+	+	+	+	+	+
AM8	+	+	+	+	-	-	+	-									

1- Ara; 2- Xyl; 3- Ino; 4- Man; 5- Fru; 6- Sac; 7- Rha; 8- Raf.

Анализът на резултатите показва групиране на изследваните актиномицетни изолати в два клъстера:

⇒ Изолати AM1, AM2, AM3, AM4, AM5, AM6, AM7, AM8, AM9 формират най-голямата група. Това са изолати, които усвояват най-голям брой въглеродни източници. Спороносещите хифи при тези изолати са предимно извити или отворени спирали. Преобладаващата част от тях формират разтворим пигмент в средата, както и продуцират меланинов пигмент. Въздушният мицел на изолатите от тази група е преобладаващо оцветен в бяло, сиво-бялата гама. Субстратният мицел е оцветен предимно в нюанси на кафявия цвят.

⇒ Изолати AM11, AM12, AM13, AM14 и AM15 формират отделна група. Обединяващ признак за тези щамове е способността им да синтезират разтворим в средата пигмент в кафяво-оранжевата гама, неспособност или слабо изразена такава да формират меланинов пигмент и голям брой неусвоявани въглеродни източници.

#### **4.2.2. Идентификация на изолираните чисти култури чрез методи на молекулната таксономия**

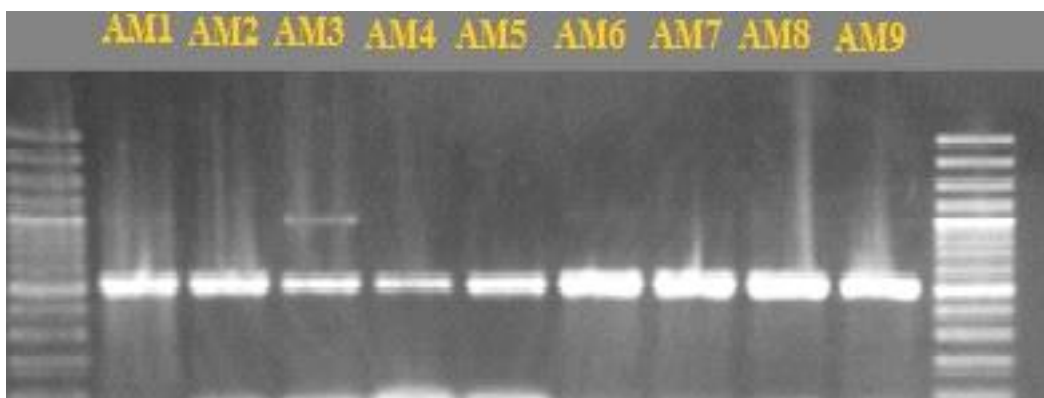
Важно за реализацията на поставената експериментална схема бе съчетаване и потвърждаване на резултатите, получени чрез класическата таксономия с дискриминативния потенциал на PCR методологията, позволяваща бърза и надеждна идентификация. За идентифицирането на изолатите от Галерията с рисунките са използвани PCR амплификация на 16S рДНК, с използване на родово специфични праймерни последователности.

#### ⇒ **Изолиране на тотална ДНК от изследваните изолати**

Изолираната ДНК от анализираниите щамове бе подложена на спектрофотометричен и електрофоретичен анализ, за определяне на нейното количество и качество. Спектрофотометричният анализ на всички проби, показва стойности на съотношението A260/A280 в диапазона 1.7 – 1.9, което е показател за чистотата на изолираната ДНК матрица. Определянето на концентрацията на изолираната геномна ДНК, е осъществено чрез използване на QubitFluorometer (Invitrogen). Може да бъде обобщено, че изолираната ДНК матрица е с качество и количество, позволяващо използването ѝ в редица молекулярни методи (PCR, Real time PCR, PCR-DGGE анализ и др.). Изолираната тотална ДНК от изолатите беше подложена на PCR за доказване на родова принадлежност на изолатите.

#### ⇒ **PCR амплификация на 16S рДНК с родово специфични праймери за род *Streptomyces***

Проведена е PCR-амплификация на 16S рДНК със специфични за род *Streptomyces* праймери. От всеки щам е изолирана ДНК, след което е проведена PCR-амплификация с праймери StrepB/StrepE специфични за рода. При 9 от изолираните и анализирани 15 изолати с праймери StrepB/StrepE се амплифицира продукт с дължина около 520 bp, характерен за род *Streptomyces* (Rintala et al., 2001; Suutari et al., 2001) (фиг.14).



**Фигура №14.** PCR-амплификация на ДНК от изолираните актиномицетни щамове със специфични праймери за род *Streptomyces* (StrepB и StrepE).

Предварително пречистени ампликони от изолатите, които не се позитивират като стрептомицети са изпратени за секвениране в Macrogen (Холандия). Те са секвенирани с помощта на автоматично секвенираща техника - “plate forme technique de l’IBMP”. За секвенирането са използвани AmpliTaq FS ДНК полимераза и BIGDYE TM терминази (версия 1). Секвенционните реакции бяха анализирани с Applied Biosystems 373 XL секвенатор. Биоинформатичният анализ на получените



секвенционни последователности е осъществен с помощта на специализиран софтуер (BLAST), (MultAlin, Corpet, 1988), (Sequence scanner v1.0, Applied Biosystems, USA) Резултатите от секвенционния анализ са посочени в табл.9.

**Таблица №9.** Секвенционен анализ на актиномицетните изолати.

Изолат	Молекулна Идентификация	Най-близък референтен вид(GenBank)	Номер	Идентичност (%)
AM10	<i>Kocuria</i> sp.	<i>K. rhizophila</i>	NZ_CZJW01000	98%
AM11	<i>Kocuria</i> sp.	<i>K. rhizophila</i>	NZ_CZJW01000	97%
AM12	<i>Promicromonospora</i> sp.	<i>P. flava</i>	NR_115102.2.	96%
AM13	<i>Promicromonospora</i> sp.	<i>P. flava</i>	NR_076977.1	89%
AM114	<i>Promicromonospora</i> sp.	<i>P. flava</i>	NR_076977.1	95%

Анализът на получените данни позволява да се заключи, че преобладащата част от изолатите принадлежат към род *Streptomyces*. В литературата съществуват значителен брой данни относно присъствието на стрептомицети като компонент на микробната колонизация на пещери с произведения на изкуството (Groth and Saiz-Jimenez, 1999; Groth et al., 1999).

Пет от изолатите са отнесени към родовете *Kocuria* и *Promicromonospora*. Представителите на род *Promicromonospora* са типични почвени микроорганизми. В същото време, притежават значителен биодеструктивен ефект. Особено добре се развиват върху скални повърхности, дължащо се на нишковидната им морфология.

Родът *Kocuria* е обособен от род *Micrococcus* на базата на филогенетичен и хемотаксономичен анализ и включва видовете *K. rosea*, *K. varians*, *K. kristinae*, *K. palustris*, *K. rhizophila*, *K. polaris*, *K. marina*, *K. himachalensis* и *K. aegyptia*. Изолат се от разнообразни местообитания – животинска кожа, почви, ризосфера, ферментирали храни, сладководни и морски местообитания. Продуцират разнообразни антибиотици, в състояние са да разграждат трудно деградируеми съединения като феноли, крезол и други. Установени са като компонент на микробните съобщества в пещери с различни скални рисунки, тракийските гробници край Казанлък, но няма данни за биодеструкционен ефект.

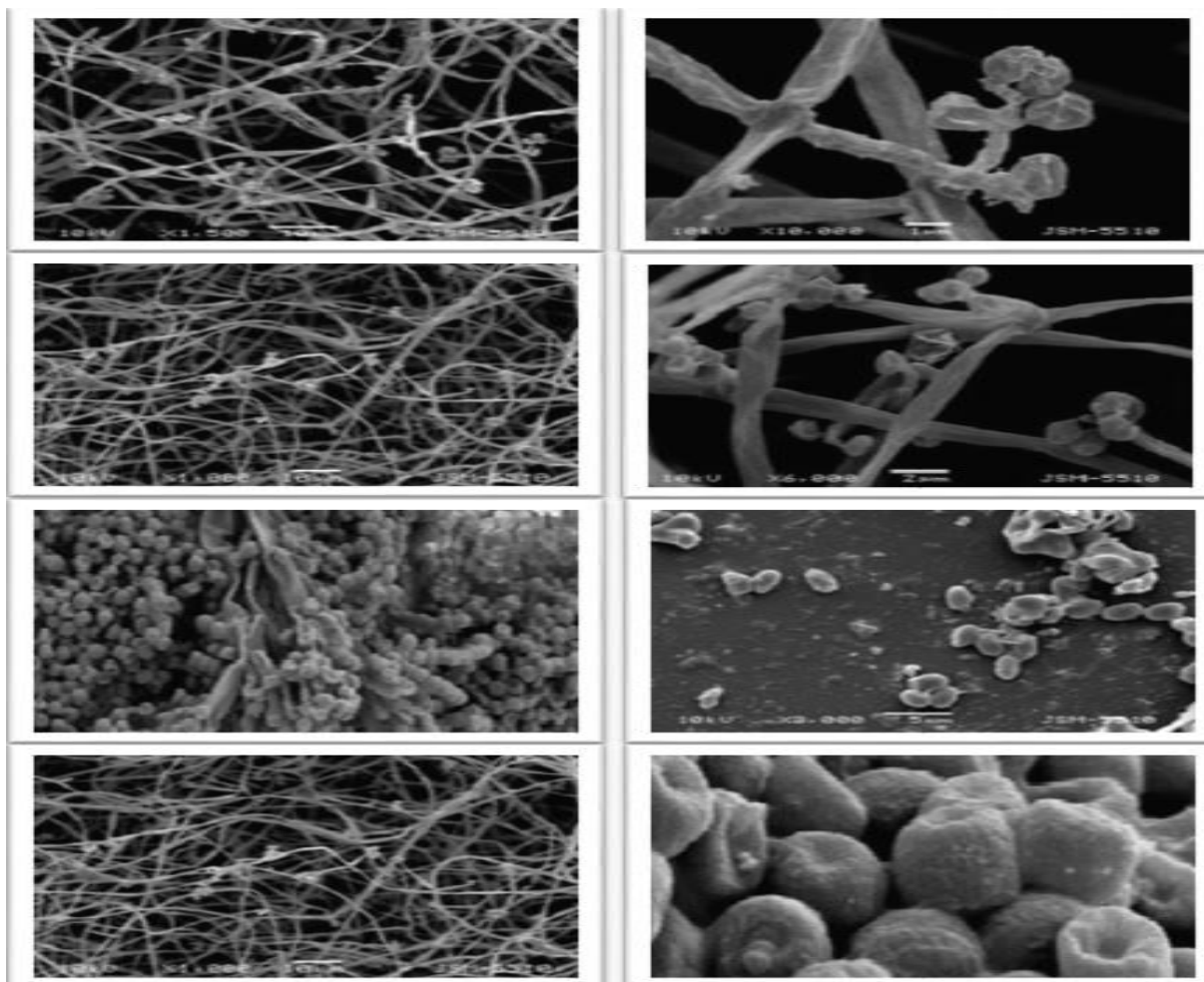
### 4.3. Идентификация на изолираните чисти гъбни култури

#### 4.3.1. Идентификация на изолираните чисти гъбни култури чрез методите на класическата таксономия

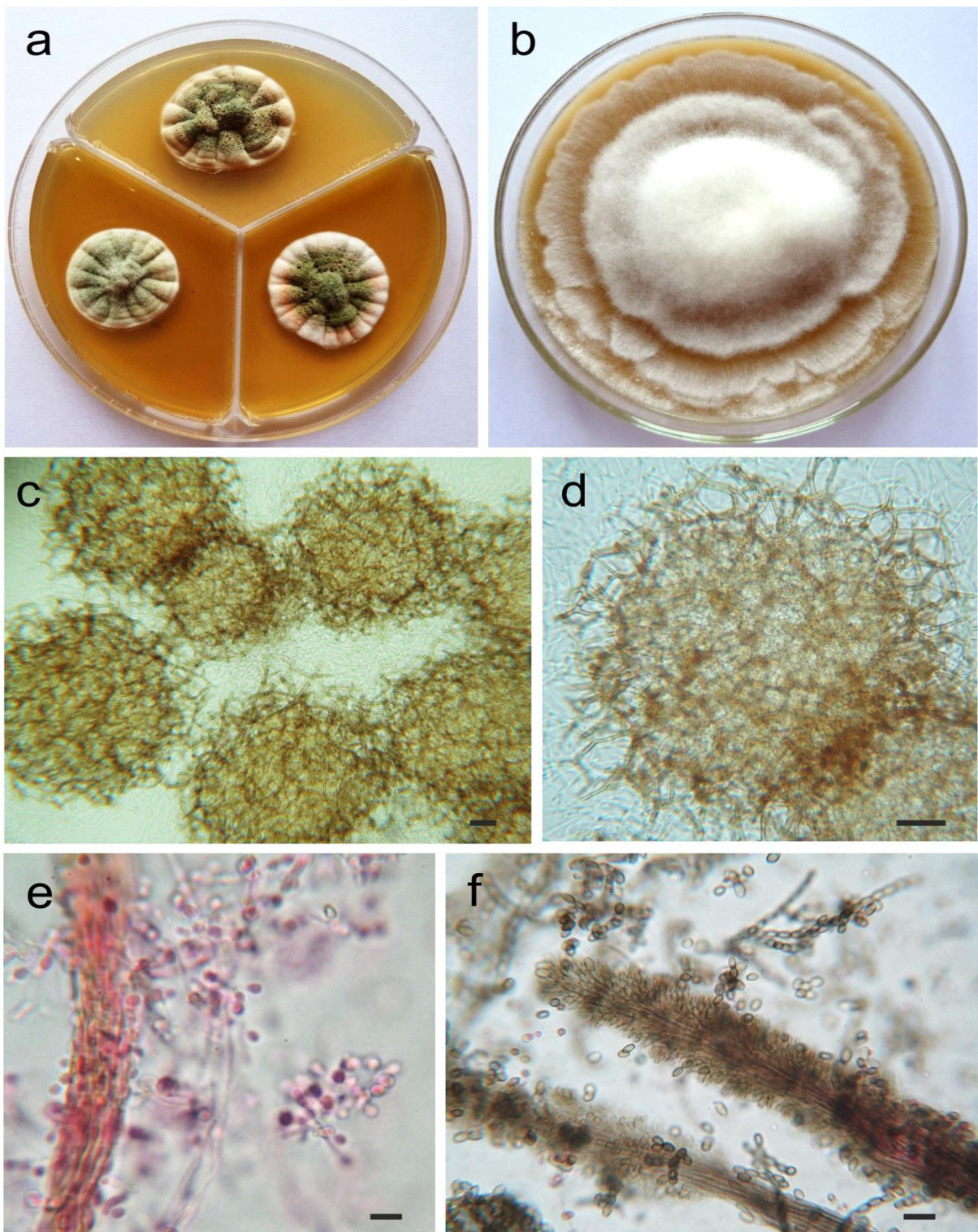
Гъбните изолати са идентифицирани до род на базата на макроморфологични и микроморфологични характеристики съгласно определител на почвените гъби (Compendium of Soil Fungi, 1980).

За микроморфологичната характеристика е извършен микроскопски анализ на хифи, плодни тела чрез светлинна и електронна микроскопия (фиг.15).

За макроморфологичната характеристика са получени единични гигантски колонии на гъбните изолати при култивиране на изолатите върху картофенодекстрозен агар, малцов агар и Сабуро (фиг16).



Фигура. №15. Сканираща електронна микроскопия на мицел, хифи и спори на изолат 11\_1



**Фигура №16.** Морфологични анализи на някои гъбни изолати.

**a.** *Aspergillus* sp.P23; **b.** *Mortierella* sp. S1-3, **c, d.** *Gymnoascus reessii* 5-2;  
**e.** *Pseudogymnoascus* sp. strain P31-2, **f.** *Doratomyces* sp. (cf. *microsporus*) S2-4.

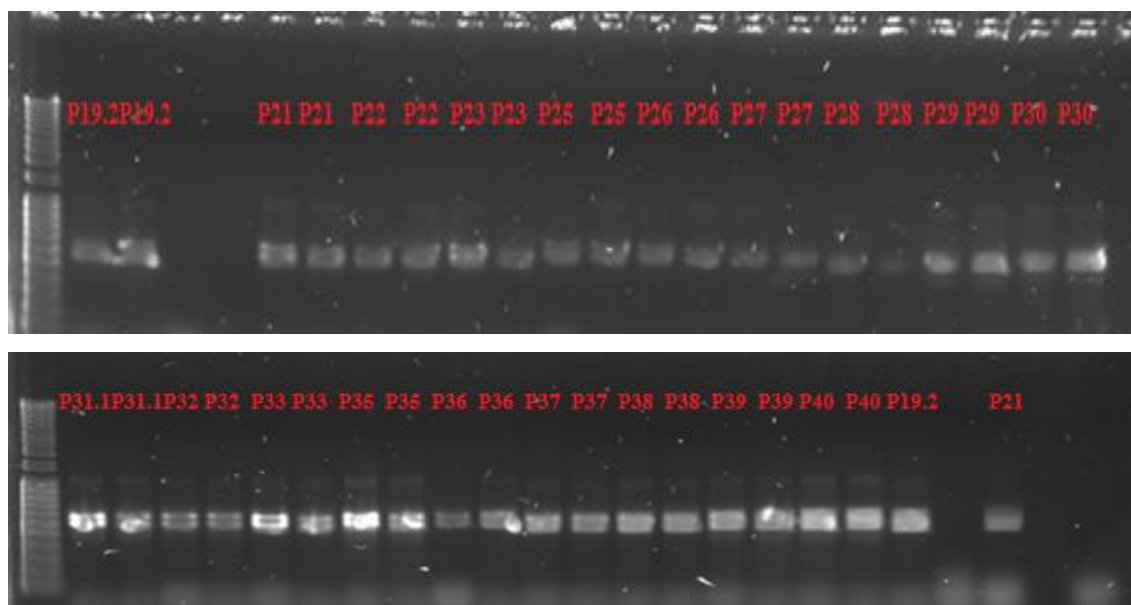
### 4.3.2. Молекулна идентификация на гъбните изолати

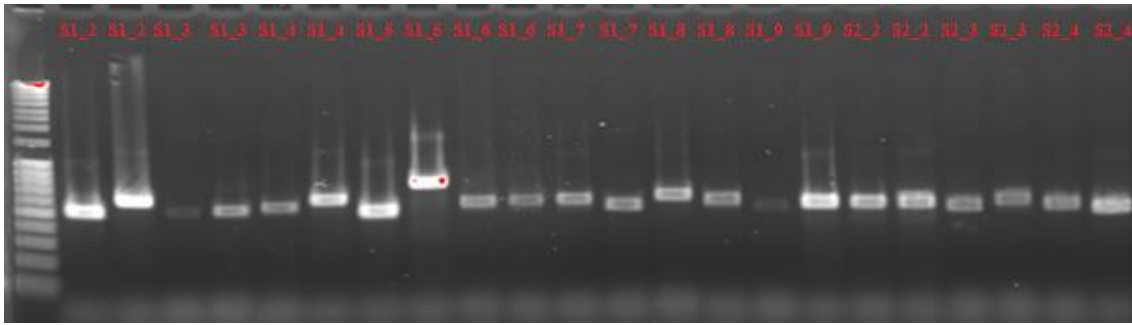
#### ⇒ Изолиране на тотална ДНК от изследваните изолати

Експерименталната работа започна с изолирането на тотална ДНК от всички изолати, обект на изследването (78 гъбни изолата). Изолираната ДНК беше подложена на спектрофотометричен и електрофоретичен анализ за определяне на нейното качество и количество. Спектрофотометричният анализ на всички проби показва стойности на съотношението A260/A280 в диапазона 1.7-1.9, което е показател за чистотата на изолираната ДНК матрица. Определянето на концентрацията на изолираната геномна ДНК е осъществено чрез използването на NanoDrop 2000c Spectrophotometer (PeQlab). Може да бъде обобщено, че изолираната ДНК матрица е с качество и количество, позволяващо използването ѝ в редица молекулярни методи (PCR, Real time PCR, PCR-DGGE анализ и др.). Изолираната тотална ДНК от посочените изолати беше използвана за провеждането на PCR за доказване на видова и родова принадлежност на изолатите и за провеждане на DGGE анализи.

#### ⇒ PCR амплификация на ITS региона от изследваните изолати

Праймери ITS1 – ITS4, амплифициращи ITS региона бяха успешно приложени. Предварително осъществената амплификация позитивира очаквания фрагмент при всички изследвани проби (фиг.17).

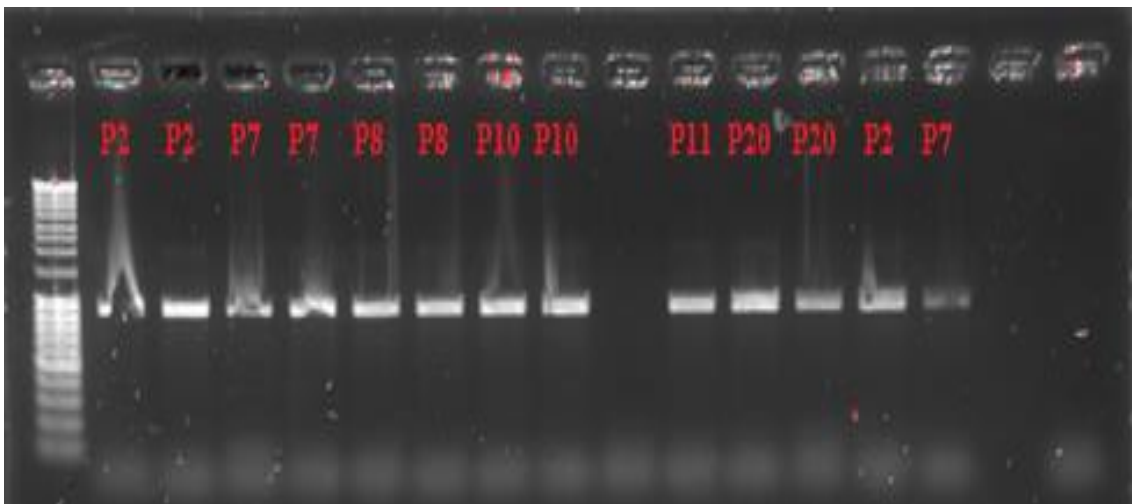




**Фигура №17.** Електрофоретичен анализ на част от PCR-продуктите, получени при амплификация на ITS региона от гъбните изолати (праймери ITS1 - ITS4) в 1,5 % агарозен гел.

#### ⇒ PCR амплификация на 18S рДНК от изследваните изолати

Праймери 817-1750-3'бяха успешно приложени за амплифициране на 18S рДНК при няколко от гъбните изолати, поради неуспешна амплификация на ITS региона. Осъществената амплификация на 18S рДНК позитивира очаквания фрагмент при всички изследвани проби (фиг.18).



**Фигура №18.** Електрофоретичен анализ на PCR-продуктите, получени при амплификация на 18S рДНК от гъбни изолати (праймери 817-1750-3') в 1,5 % агарозен гел.

### 4.3.3. Биоинформатичен секвенционен анализ

Получените нуклеотидни секвенции бяха изпратени за секвенционен анализ. С помощта на специализиран софтуер (BLAST®) бе установена генетичната идентичност на изследваните ДНК фрагменти от всеки един изолат. Резултатите са представени в табл.10А и Б.

**Таблица №10/А.** Секвенционен анализ на гъбните изолати.

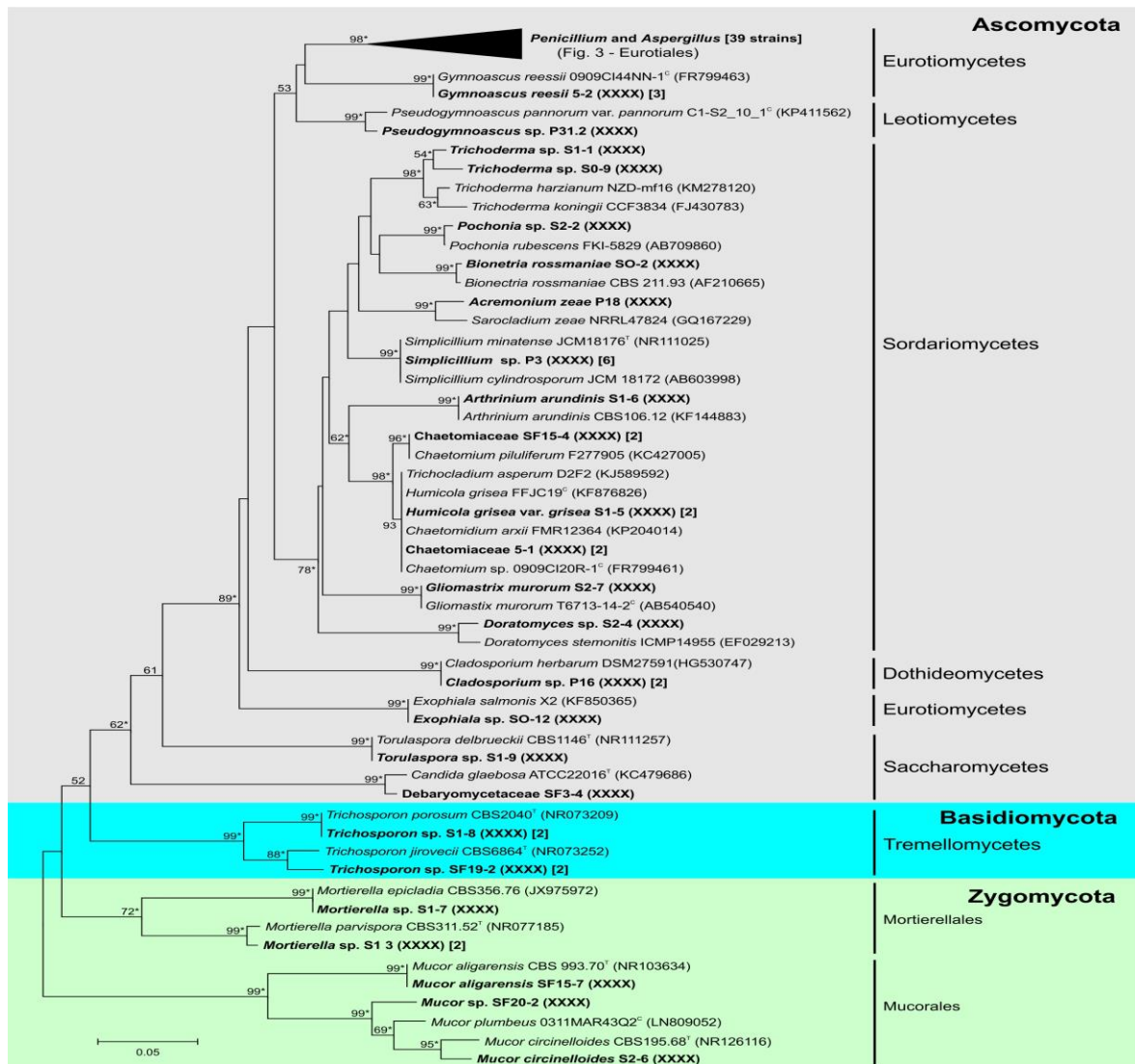
Изолат	Брой Изолати	Молекулна Идентификация	Референтен вид (GenBank)	Идентичност (%)
P5	12	<i>Penicillium</i> sp.	<i>P. cordubense</i> , <i>P. polonicum</i> , <i>P. lapidosum</i> ,	100
P7	6	Eurotiales	<i>Penicillium malachiteum</i>	100
P31.1	4	<i>Penicillium</i> sp.	<i>P. commune</i> , <i>P. oxalicum</i> , <i>P. camemberti</i>	100
S0-3	1	<i>Penicillium</i> sp.	<i>P. lanosum</i> , <i>P. halotolerans</i>	99
S1-4	1	<i>Penicillium</i> sp.	<i>P. janthinellum</i> , <i>P. ochrochloron</i>	99
2-1	1	<i>Penicillium</i> sp.	<i>P. pancosmium</i>	99
2-2	1	<i>Penicillium</i> sp.	<i>P. biourgeianum</i> , <i>P. brevicompactum</i>	100
2-3	1	<i>Penicillium</i> sp.	<i>P. coprophilum</i> , <i>P. chrysogenum</i> ,	100
2-7	1	<i>Penicillium</i> sp.	<i>P. echinulatum</i> , <i>P. commune</i> , <i>P. solitum</i> ,	100
SF20-3	1	<i>Penicillium</i> sp.	<i>P. concentricum</i>	98
P23	8	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>A. versicolor</i>	100
P28	2	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>A. versicolor</i>	100

**Таблица №10/Б.** Секвенционен анализ на гъбните изолати.

Изолат	Брой Изолати	Молекулна Идентификация	Референтен вид (GenBank)	Идентичност (%)
P3	6	<i>Simplicillium</i> sp.	<i>S. cylindrosporium</i> , <i>S. minatense</i>	99
5-1	2	Chaetomiaceae	<i>Chaetomium arxii</i>	98
SF15-4	2	Chaetomiaceae	<i>Chaetomium piluliferum</i>	99
S1-8	2	<i>Trichosporon</i> sp.	<i>T. porosum</i>	100
SF19-2	2	<i>Trichosporon</i> sp.	<i>T. jirovecii</i>	98
5-2	3	<i>Gymnoascus</i> sp.	<i>G. reessii</i>	99
S1-3	2	<i>Mortierella</i> sp.	<i>M. parvispora</i> , <i>M. Jenkinii</i>	99
S1-7	1	<i>Mortierella</i> sp.	<i>M. verticillata</i> , <i>M. Epicladia</i>	99
S2-6	1	<i>Mucor</i> sp.	<i>M. circinelloides</i>	100
SF15-7	1	<i>Mucor aligarensis</i>	<i>M. aligarensis</i>	100
SF20-2	1	<i>Mucor</i> sp.	<i>M. plumbeus</i>	100
P16	2	<i>Cladosporium</i> sp.	<i>C. variabile</i>	100
S1-5	2	Ascomycota	<i>Humicola grisea</i> , <i>Trichocladium asperum</i>	99
S0-9	1	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>T. koningii</i> , <i>T. hispanicum</i> , <i>T. viride</i>	100
S1-1	1	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>T. harzianum</i>	100
P18	1	Hyprocreales	<i>Sarocladium zaeae</i> , <i>Sarocladium strictum</i>	94
S0-12	1	<i>Exophiala</i> sp.	<i>E. salmonis</i>	100
S0-2	1	<i>Bionectria</i> sp.	<i>B. rossmaniae</i>	99
S1-6	1	<i>Arthrinium</i> sp.	<i>A. arundinis</i>	100
S1-9	1	<i>Torulaspora</i> sp.	<i>T. delbrueckii</i>	99
S2-2	1	<i>Pochonia</i> sp.	<i>P. rubescens</i> , <i>P. suchlasporia</i>	98
S2-4	1	<i>Doratomyces</i> sp.	<i>D. stemonitis</i> , <i>D. purpureofuscus</i> , <i>D. castaneus</i>	99
SF3-4	1	Debaryomycetaceae	<i>Debaryomyces</i> sp.	100
S2-7	1	Bionectriaceae	<i>Gliomastix murorum</i>	100
P31.2	1	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	<i>P. pannorum</i>	99

#### 4.3.4. Филогенетичен анализ

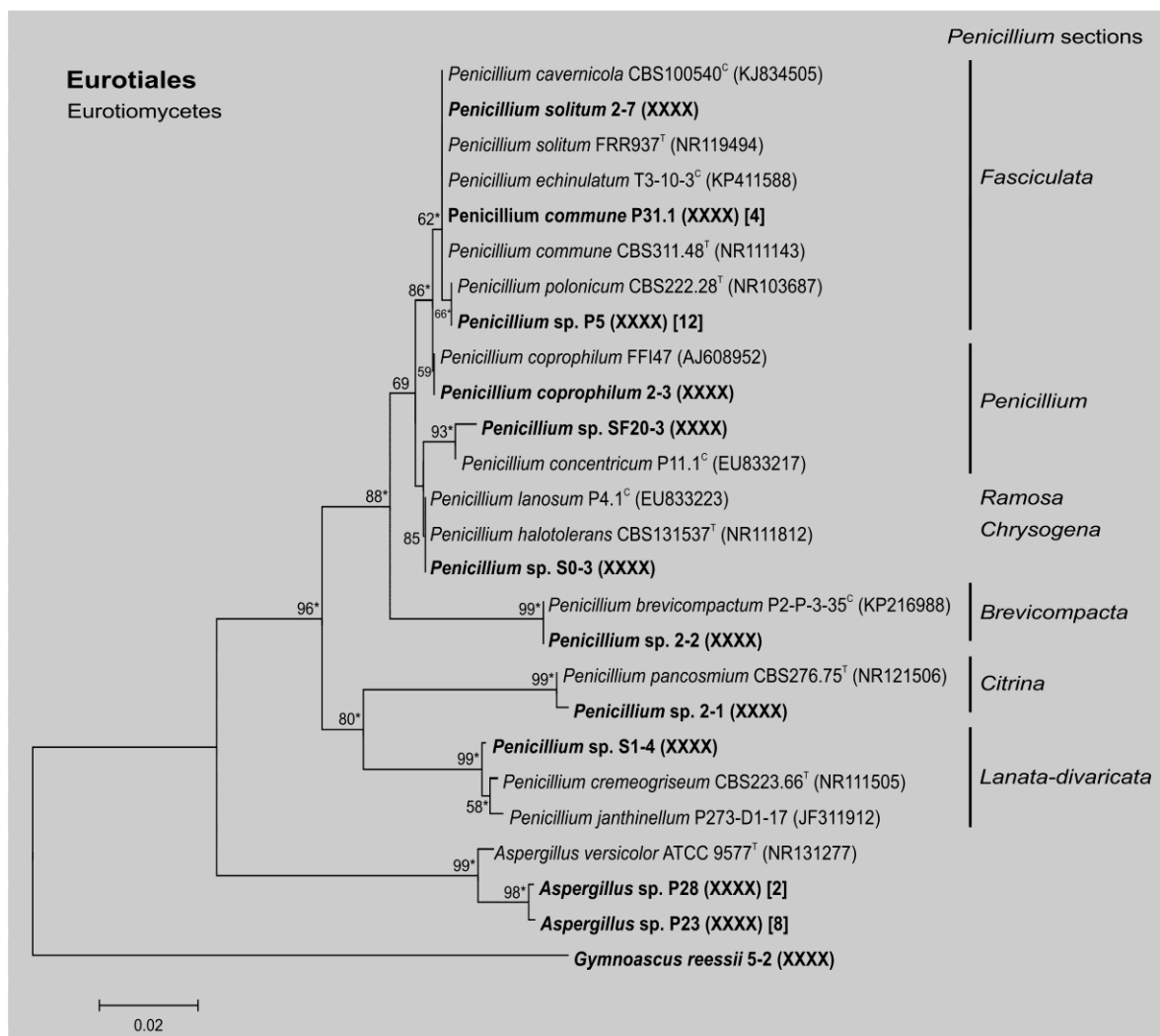
На базата на молекулната идентификация е направен филогенетичен анализ на различните гъбни таксони и най-близките референтни щамове на GenBank. (фиг.19).



**Фигура №19.** Филогенетично дърво на гъбните изолати спрямо най-близките референтни щамове.

Според филогенетичния анализ 81% от изолатите са представители на Ascomycota, два изолата са представители на Basidiomycota (*Trichosporon*) и 6 изолата на Zygomycota (родовете *Mucor* и *Mortierella*). Представителите на Ascomycota, включват изолати от род *Penicillium* (39 щама) и род *Aspergillus* (10 щама), както и дванадесет изолата от клас Sordariomycetes.

Специално внимание заслужава филогенетичната позиция на изолатите от род *Penicillium*. Повечето щамове от род *Penicillium* принадлежат към секция *Fasciculata* (59%). Според класификацията на Houbraeken and Samsom (2011), включваща видовете *P. commune* и *P. solitum*, шест щама са идентични с *Penicillium malachiteum*. Филогенетичната позиция на тези изолати е посочена на фиг.20.



**Фигура №20.** Филогенетично дърво на изолати от родовете *Penicillium* и *Aspergillus* и най-близките референтни щамове.

Тридесет и шест от секвенциите на анализираниите гъбни изолати са депозирани в European Nucleotide Archive, приети са и ще бъдат официално публикувани през 2017.

Анализът на резултатите от проведения секвенционен анализ, могат да бъдат обобщени както следва: Като цяло гъбното разнообразие открито в Галерията с рисунките, пещера Магура е относително ниско. Фактът, че в гъбните съобщества доминират представители на родовете *Penicillium* и *Aspergillus* съответства на много други проучвания проведени в пещери. Ascomycota е най-често откриваната доминираща група независимо дали се използват класически или молекулни методи за анализ (Adetutu et al., 2011; Vanderwolf et al., 2013; Gherman et al., 2014). Най-често откриваните родове, включват: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Fusarium* и *Cladosporium*, което може да се дължи на тяхното посевместно разпространение в природата. Повечето от родовете изолирани в пещера Магура се откриват често в



околната среда и също са били описани в други пещери в Европа, както в проби от седименти, така и в проби от скална повърхност (Vanderwolf et al., 2013). Това не е изненада, като се има предвид високата концентрация на гъбни спори в пещери обитавани от прилепи и достъпни за туристи.

Според Nieves-Rivera (2003), Novakova (2009) и Vanderwolf et al. (2013) най-многобройни гъби в пещерите са от родовете *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Fusarium*, *Trichoderma* и тези от род *Cladosporium*. Нашите резултати са сходни. Docampo et al. (2011) откриват, че гъбни спори от родовете *Aspergillus*, *Penicillium* и *Cladosporium* са доминирали във въздушни проби от пещера в Испания (Netja Cave, Spain).

Нашите резултати показват, че видовете изолирани от пещера Магура, включват гъби с антропогенен произход.

Пещерите обикновено са олиготрофни среди, но посетителите внасят органична материя в големи количества от външните местообитания (Chelius et al., 2009), което води да значителни промени в хранителните вериги и техните членове (Saiz-Jimenez et al., 2011). Степента на посещаемост на пещерите повлиява гъбните съобщества в тях. В пещера в Аризона (Kartchner Caves), Ikner et al. (2007) откриват, че разнообразието намалява с увеличаване на посещенията от туристи. Отварянето на пещерата за туристи може да доведе до промяна в микроклиматичните условия. Високата концентрация на въглероден диоксид може да потисне растежа на олиготрофните видове гъби и да стимулира растежа на чужди за тази екосистема гъби. В действителност, пещери подложени на силни промени в количеството на органичната материя страдат от замяна на техните алохтони (олиготрофни) микроорганизми от организми, които разграждат по-бързо органичната материя (Jurado et al., 2009). От всички пещерни микроорганизми гъбите са най-притеснителни поради високата продукция на спори и тяхното лесно разпространение. Това могат да бъдат причините за ниското разнообразие в Галерията с рисунките в пещера Магура.

Някои от гъбите изолирани в пещера Магура могат да представляват потенциална опасност за скалната повърхност и рисунките, тъй като те секретират много органични киселини, които могат да причинят биодетериорация. Много от представителите на родовете *Aspergillus* и *Penicillium* принадлежат към тази група микроорганизми. Сред гъбите изолирани от скалната повърхност в близост до рисунките най-често откриваните представители са *Penicillium tricolor*, *Penicillium*

*commune* и *P. malachiteum*. *Penicillium tricolor* е описан като нов вид през 1995 г. и продуцира няколко микотоксини – ксантомегнин, виомелеин, виоксантин и алкалоиди. *Penicillium polonicum* продуцира пеницилинова киселина, верококсидин, патулин, анацин, 3-метоксивиридикатин и гликопептиди.

Гъбните видове, принадлежащи към род *Simplicillium* се изолират от почви, инфектирани растителни тъкани, гъби, нематоди и човешки нокти (Chen et al., 2008; Liu et al., 2012; Nonaka et al., 2013; Ward et al., 2012; Zhao et al., 2013). Този род е филогенетично свързан с *Cordyceps* (Sung et al., 2007), но неговите морфологични характеристики приличат на тези на *Lecanicillium*, което често води до грешки при класификацията. При използването на комбинация от морфологични и филогенетични характеристики родът може ясно да бъде диференцират от близко родствените гъби родове (Sung et al., 2007). Някои видове от род *Simplicillium* са известни като паразити (Ward et al., 2011). Видове от род *Simplicillium* са били описани и като ентомопатогени.

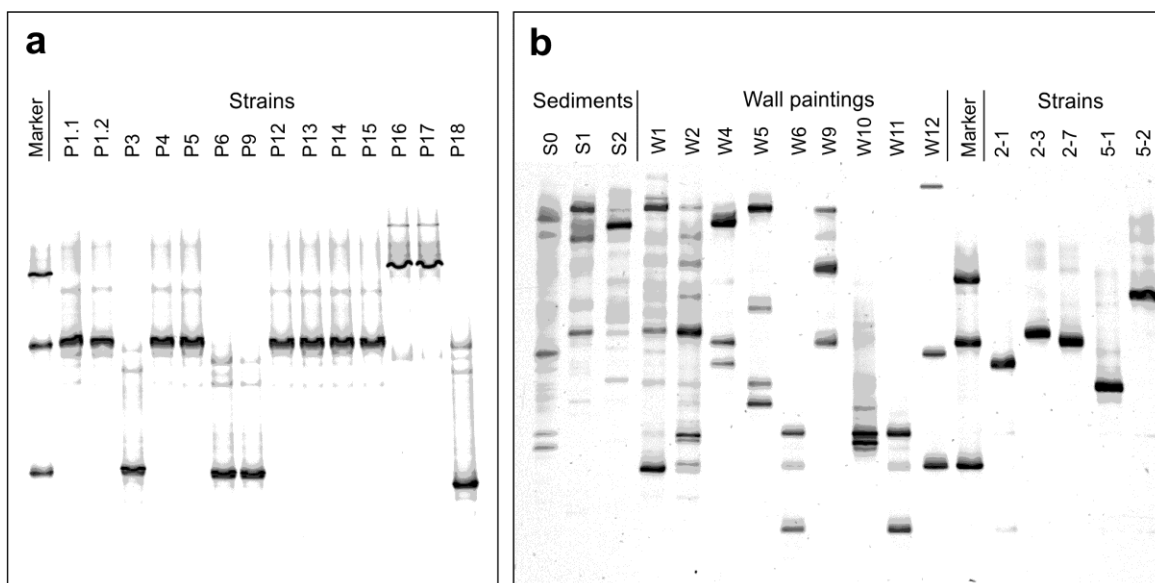
Дрождите от род *Trichosporon* често се откриват в проби от гуано. Novakova et al. (2015) изолират два нови вида от род *Trichosporon* от пещера. Видове от род *Trichosporon* са били изолирани от проби от гуано, взети от пещера обитавана от прилепи в Япония (Sugita et al., 2005). Дрождите от видът *Trichosporon porosum* потискат растежа на аскомицети и базидиомицети принадлежащи към 52 рода. Това се дължи на секрецията на термостабилни фунгицидни вещества. Потискането е максимално при рН 3.5–4.0. Фунгицидният препарат е смес от целобиоциди (cellobiosides) на дихидродеканова киселина (dihydrodecane acid) с различна степен на ацетилиране на целобиозния остатък. Има изразен летален ефект спрямо *Candida albicans* и *Filobasidiella neoformans* при концентрация 0.2 и 0.03 mM, съответно (Kulakovskaya et al., 2010).

Видовете от род *Mortierella* принадлежат към разред Mortierellales в подотдел Mucoromycotina (отдел: Zygomycota). Родът съдържа 85 вида, които живеят като сапрофити в почвата, върху разлагаша се органична материя. Други видове живеят върху фекални пелети или екзоскелети на членестоноги. Видовете *Mortierella* обикновено не са патогенни за животните и хората. Рядък пример за патоген е *Mortierella wolfii*, които до сега е единственият патоген описан по хората и животните. *Mortierella wolfii*, нормално се изолира от почва, лош силаж и подобни субстрати, причинява аборти при говедата, пневмония и системни микози. По време на проучване на гъби от род *Mortierella*, са били изолирани много видове от родът от

проби от прилепно гуано събрани в пещери. В такива местообитания обикновено изобилни са видовете *Mortierella alpina*, *M. indohii*, *M. polycephala*, *M. reticulata*, *M. tuberosa* и др. (Degawa and Gams, 2004).

#### 4.3.5. Денатурираща градиентна гел електрофореза (DGGE)

За потвърждаване на гъбното разнообразие в пещерата беше проведена и денатурираща градиентна гел електрофореза. За целта бяха използвани гъбни изолати, проби от седименти, богати на гуано и проби от скалната повърхност, в близост до рисунките в Галерията с рисунките. DGGE профили на гъбните изолати са посочени на фиг.21.



**Фигура №21.** DGGE профили на гъбните щамове и проби от пещерата.

**a/** Щамове от *Penicillium* sp., *Simplicillium* sp., *Aspergillus* sp, *Cladosporium* sp. и *Acremonium zeae* **b/**. Седиментни проби (S), богати на гуано, проби от стените с рисунките (W) в близост до рисунките и някои щамове от рисунките (*Penicillium* sp. 2-1, *Penicillium coprophilum* 2-3 и *Penicillium solitum* 2-7) (*Chaetomiaceae* 5-1 и *Gymnoascus reessii* 5-2).

Както е описано от Man et al. (2015) при изследване на гъбното разнообразие в пещера Heshang в Китай и при анализ на гъбното разнообразие в пещера Магура е отрито различие в състава на съобществата в пробите от рисунките и тези от седиментите, богати на гуано и повърхността на скалите. Важно е да се отбележи, че в изследваната галерия не беше наблюдавано обилно развитие на гъби и такива участъци с видимо присъствие на гъби бяха относително малко. Това може отчасти да обясни относително ниското количество на гъбите при проведения количествен анализ на микробиоценозите. DGGE анализът обаче, показва относително високо разнообразие на гъбните съобщества отчитайки и некултивируемите гъби в субстратите от прилепното гуано. Независимо от коментираните ограничения на

DGGE анализа (Neilson et al., 2013) при сравняване на проби от околната среда и изолирани щамове е очевидно, че структурата на гъбното съобщество в пробите от скалната повърхност е доста по различна при сравняване на пробите, взети в близост до входа на галерията и останалите локации. Родовете *Penicillium*, *Aspergillus*, *Simplicillium*, *Gymnoascus* и *Cladosporium* са най-представителните родове в тези проби. Родовете *Aspergillus* и *Penicillium* продуцират различни органични киселини, които могат да причиняват биодетериорация на скалната повърхност (Sterflinger, 2000). От друга страна в пробите от прилепно гуано е установено значително разнообразие на гъби, като е потвърдено и от DGGE анализът. Макар че, род *Penicillium* е доминантният род в този субстрат установено е и присъствие на редица други родове: *Trichosporon*, *Mortierella*, *Mucor*, *Humicola* и *Trichoderma*. Jurado et al. (2010) установяват обилен растеж на *Mucor circinelloides* и *Fusarium solani* в проби от седименти с гуано в пещерата Castañar de Ibor, Испания. Сходни са и резултатите от изследванията на Nováková (2009) за състава на гъбните популации в пещерна система Домика в Словакия. Изолирани са 195 таксона като най-голям брой таксони (92) са установени в пробите с прилепно гуано като доминиращи са родовете *Penicillium*, *Mucor*, *Doratomyces* и *Trichoderma*. Освен това, представителите на род *Mucor* колонизират активно седиментите и се наблюдава обилен видим растеж. Проби от прилепно гуано са изследвани и от други пещери в Словакия и е установено, че доминиращите родове са *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor* и *Rhizopus* (Ogórek et al., 2016). Представителите на род *Trichosporon* са активно разпространени в седиментите от гуано, което е резервоар за потенциално патогенни гъби (Saiz-Jimenez, 2012). Редица автори докладват за нови видове от този род от седименти на гуано в пещери в Япония и Словакия (Sugita et al., 2005; Nováková et al. 2015). Видове от род *Mortierella* винаги се изолират от проби от гуано в пещери в Япония (Degawa and Gams, 2004). Представители на родовете *Mucor*, *Mortierella*, *Trichoderma* и *Pseudogymnoascus* са изолирани от умрели прилепи от пещерата Berryton, Канада (Vanderwolf et al., 2016).

Резултатите от проведените изследвания на гъбното разнообразие в Магура показват, че в този хабитат присъстват представители на гъбите, характерни за голям брой карстови пещери. Очевидно присъствието на седименти от прилепно гуано има съществено значение за обезпечаването на микрофлората с органика. Същевременно по скалната повърхност и самите рисунки гъбният растеж е оскъден.

Както беше допуснато и потвърдено от получените резултати автохтонните

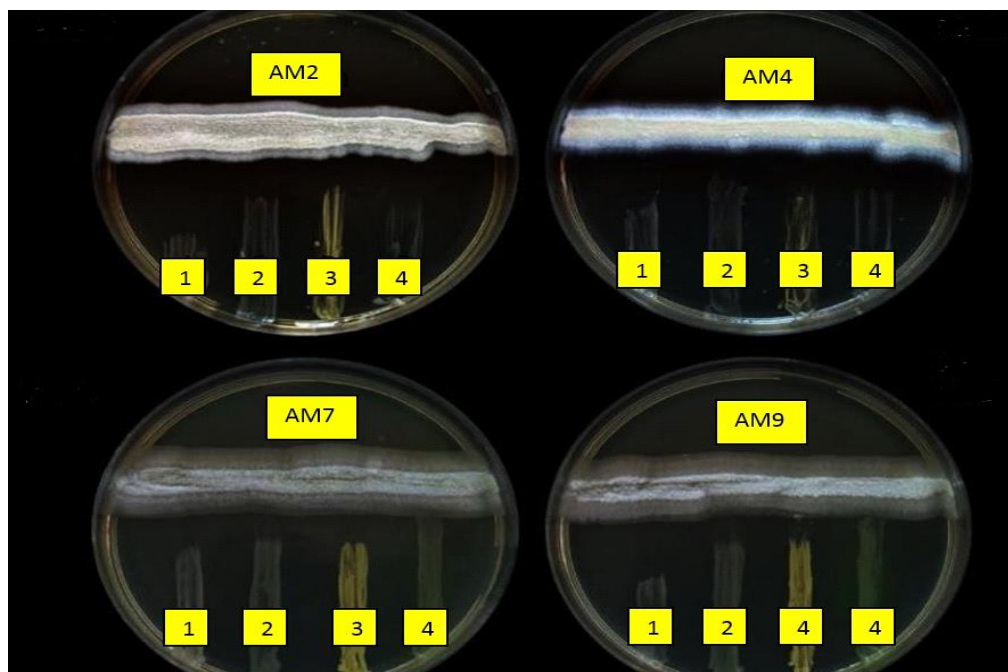
микробни съобщества в пещерата са формирани от гуанофилни микроорганизми, които вероятно имат важно значение за екологичното равновесие в пещерата и Галерията с рисунките и това е от съществено значение за запазването на рисунките. От проведените изследвания и получените резултати за идентификацията на гъбните изолати се налагат няколко по-съществени заключения:

- ⇒ Гъбното разнообразие в пробите от пещерата включва присъствие на 21 рода.
- ⇒ 81% от изолатите са представители на Ascomycota, 4 изолата са представители на Basidiomycota (*Trichosporon*) и 6 изолата на Zygomycota (родовете *Mucor* и *Mortierella*).
- ⇒ Представителите на Ascomycota, включват изолати от род *Penicillium* (39 щам) и род *Aspergillus* (10 щам).
- ⇒ По скалната повърхност в близост до рисунките присъстват представители на родовете: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Simplicillium*, *Gymnoascus* и *Cladosporium*.
- ⇒ Най-често откриваните представители от род *Penicillium* са *Penicillium tricolor*, *Penicillium commune* и *P. malachiteum*.
- ⇒ В седиментите от прилепно гуано е установено присъствие на родовете *Penicillium*, *Trichosporon*, *Mortierella*, *Mucor*, *Humicola* и *Trichoderma*.
- ⇒ Тридесет и шест от секвенциите на анализирани гъбни изолати са депозираны в European Nucleotide Archive и са приети със съответните номера.

## **5. Изследване на антагонистичните взаимоотношения между бактерии и актиномицети, изолирани от пещерата**

Изследван е антагонизмът на изолираните актиномицетни видове спрямо бактериални изолати от Галерията с рисунките от родовете: *Bacillus*, *Sphingobacterium*, *Serratia* и *Pseudomonas*.

Резултатите от тестването са посочени на фиг.22.



1 – *Bacillus* sp.; 2 – *Sphingobacterium* sp.; 3- *Serratia* sp.; 4- *Pseudomonas* sp.

**Фигура №22.** Антагонистичен ефект на актиномицети спрямо бактериални изолати от Галерията с рисунките.

При 4 изолата – **AM2**, **AM4**, **AM7** и **AM9** се наблюдава изразен антагонистичен ефект както следва:

⇒ Изолат **AM2** – силно изразен ефект спрямо тест-микроорганизъм от род *Bacillus*; наблюдава се потискане на растежа на тест-бактериите от родовете *Sphingobacterium*, *Serratia* и *Pseudomonas*.

⇒ Изолат **AM4** – наблюдава се потискане в растежа на всички тест-микроорганизми, като отново по-силно изразен е антагонистичния ефект спрямо род *Bacillus*.

⇒ Изолат **AM7** – отчита се потискане на тест-микроорганизми от родовете *Bacillus*, *Sphingobacterium* и *Serratia*. Не се наблюдава антагонизъм спрямо *Pseudomonas*.

⇒ Изолат **AM9** – силно изразен антагонистичен ефект спрямо тест-микроорганизъм от род *Bacillus*, по-слабо изразен ефект спрямо тест-микроорганизми от родове *Sphingobacterium* и *Serratia*. Не се наблюдава антагонизъм спрямо *Pseudomonas*.

Тези резултати, макар и само спрямо 4 тест-бактерии потвърждават схващането, че между членовете на биоценозите в пещерата съществуват различни форми на взаимоотношение между актиномицетите и бактерии. Това вероятно има отношение към протичащите саморегулационни процеси и сравнително слабите флукуации в

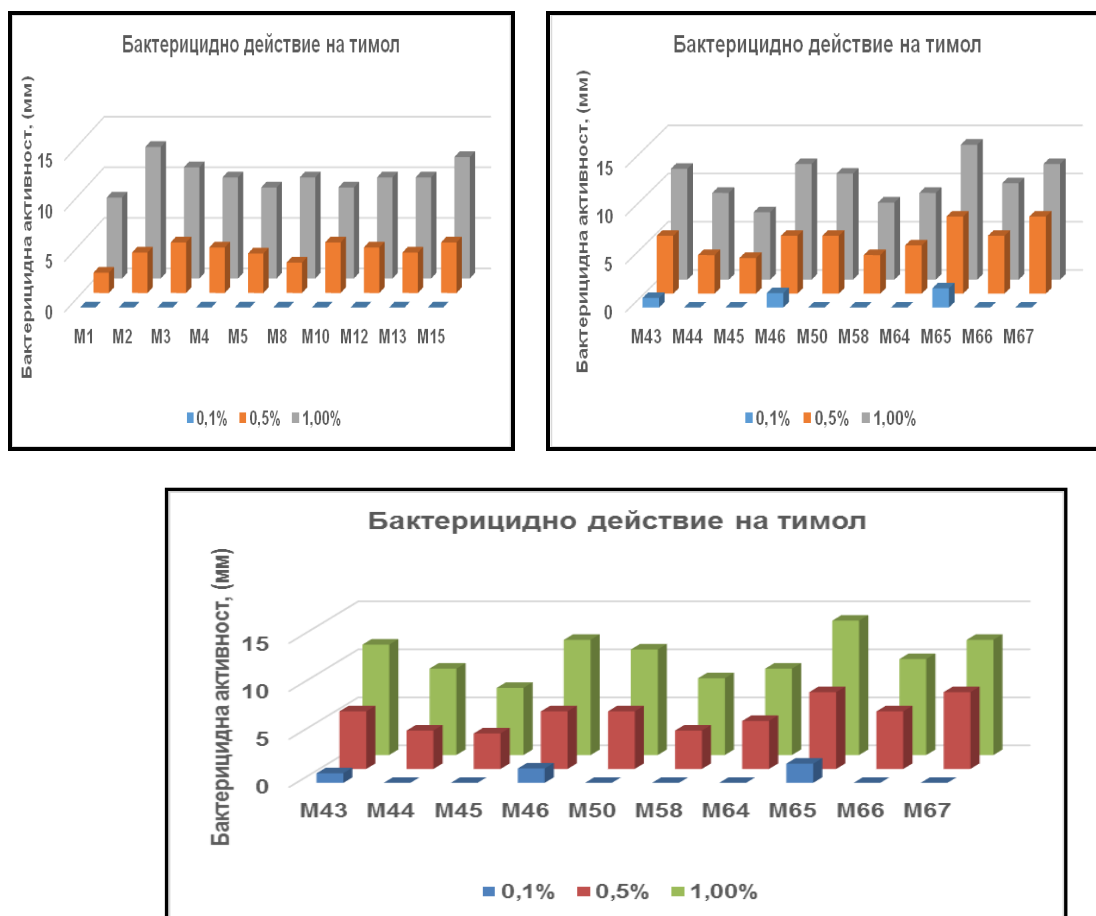
количеството на микроорганизмите от различните физиологични и систематични групи, компоненти на съответната биоценоза.

## 6. Изследване на ефекта на различни биоциди

За изследване на ефекта на различни биоциди върху изолирани чисти култури бактерии, актиномицети и гъби са използвани такива биоциди, които се препоръчват за третиране на скални повърхности и имат по-широк спектър на действие поради комплексния характер на микробиоценозите в естествените хабитати.

### 6.1 Ефект на биоцидите върху бактериалните изолати

Използвани са три бактериоида - Тимол, Сребърен нитрат и Меден сулфат. Инхибиращият ефект на тимола е посочен на фиг.23.



Фигура №23. Инхибиращ ефект на тимол върху бактериалните изолати.

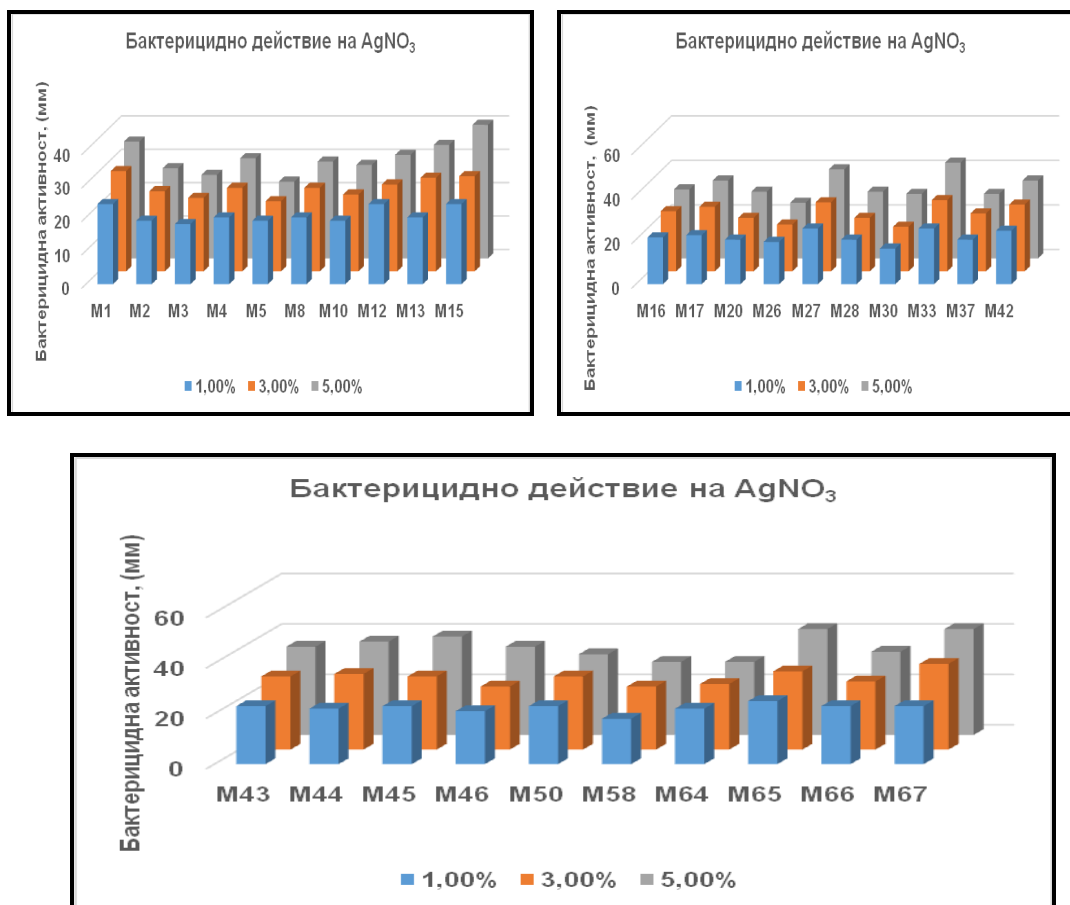
Инхибиране на растежа се наблюдава при всички изследвани изолати. Незначително въздействие при контакт с най-ниската концентрация – 0.1% се отчита при 6 изолата – M17, M27, M33, M43, M46 и M65. При останалите не се наблюдава потискане на растежа. Концентрациите 0.5% и 1.0% оказват изразено инхибиращо

действие върху изследваните щамове. Особено висока чувствителност показват изолати M3, M33, M42 и M66.

Използваното съединение намира широко приложение в качеството си на бактерицид, показва висока активност при ниски концентрации спрямо различни групи микроорганизми, включително *E. coli* и *S. aureus* (Cosentino et al., 1999; Nazzaro, 2013). Не се наблюдава активност спрямо представители на *Pseudomonas aeruginosa* (Sivropoulou et al., 1996).

Анализът на резултатите при въздействие със сребърен нитрат, показва очаквано инхибиране на растежа и развитието при всички изследвани изолати (фиг.24).

Наблюдава се значително по-изразена устойчивост при Грам-отрицателните изолати в сравнение с ефекта върху грам-положителните.



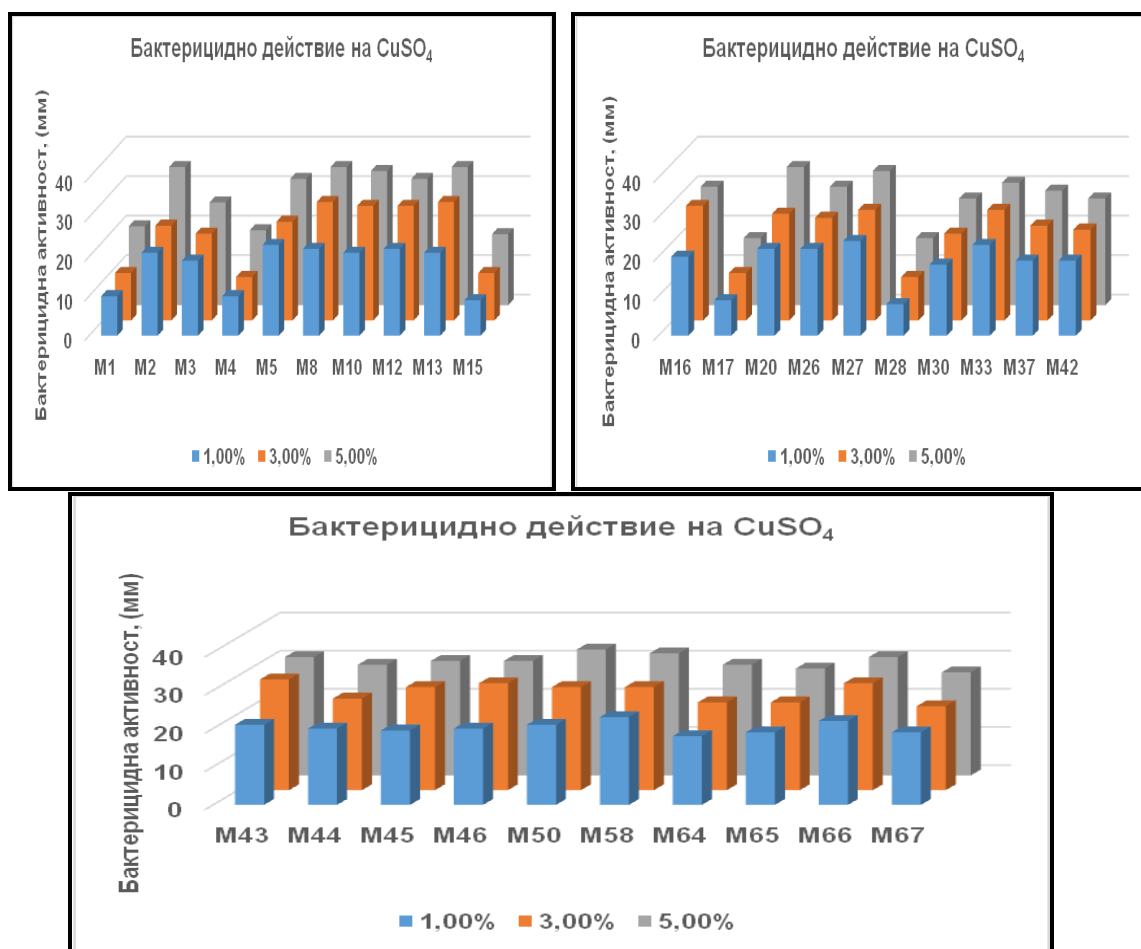
Фигура №24. Инхибиращ ефект на сребърен нитрат върху бактериалните изолати.

Високата антибактериална активност на сребърния нитрат е свързана пряко с механизма на действие, насочен към сулфохидрилните групи (Belly, 1982; Furr, 1994). Като цяло Грам-положителните микроорганизми демонстрират по-висока устойчивост при контакт със сребърен нитрат, което се потвърждава и от нашите



изследвания, но са описани и редица изключения (Kawahara, 2000; Rhim, 2006; Kim, 2007). При изследване на ефекта на сребърния нитрат върху растежа и развитието на различни микроорганизми е установено, че за *Bacillus cereus* минималната инхибираща концентрация е 31.2 мкг/мл, докато за *E. coli* тя е 7.8 мкг/мл (Eger, 2009).

Проявената антибактериална активност на  $\text{CuSO}_4$  спрямо изследваните изолати е показана на фиг.25.



Фигура №25. Инхибиращ ефект на  $\text{CuSO}_4$  върху бактериални изолати.

Наблюдава се инхибиране на растежа при всички изследвани изолати, като ефектът се увеличава при по-високите изпитвани концентрации на биоцида. При изолати M1, M4, M15 и M17 се наблюдава значително изразена устойчивост спрямо използвания биоцид. Тези изолати са определени като грам-отрицателни бацили. Това потвърждава описаната устойчивост на тези микроорганизми спрямо  $\text{CuSO}_4$  (Kapes, 2012). Изразена устойчивост се наблюдава и при изолат M28, определен таксономично като *Enterococcus* sp. Към момента има редица изследвания относно

антибактериалната активност на медния сулфат към различни микроорганизми, включително *E. coli*, *S. aureus*, *C. difficile*, няма достатъчно проучвания върху антимикробния ефект спрямо представители на род *Enterococcus* (Sanhuezza, 2013).

Като обобщение на тези резултати могат да се направят следните по-важни изводи:

- ⇒ Изпитаните биоциди притежават изразен инхибиращ ефект при концентрации > от 0.1%.
- ⇒ Тестваните изолати са чувствителни на тези съединения с незначителни изключения.
- ⇒ Активността на биоцидите е различна. Най-висока е тази на медния сулфат, следвана от сребърния нитрат и тимола.
- ⇒ От трите използвани биоцида единствено тимолът е подходящ за обработка на скалните изображения в изследваната галерия. Причините за това са, че посоченото съединение е прозрачно, безцветно и потиска бактериалния растеж в ниски концентрации и не уврежда рисунките.

## **6.2. Ефект на биоциди върху изолираните актиномицетни щамове**

С цел установяването на най-ефективните препарати за третиране на актиномицети, колонизиращи скалните рисунки в изследваната галерия, всички изолирани актиномицети са третирани с различни биоциди както следва:

⇒ Три типични бактериоицида - тимол, сребърен нитрат и меден сулфат в концентрации.

⇒ Пет биоцида, които се препоръчват за третиране на скални материали и паметници като потискащи развитие на бактерии и главно на еукариотни микроорганизми.

Три от биоцидите: БиотинR, Превентол RI 50 и Fennosan R 20 са тествани при различни концентрации, а биоцидите Busan 1292 и BioStone Protect BF 8001 в концентрации, които се предлагат като търговски продукти.

Резултатите от третирането с бактериоицидите са посочени в табл.11 и 12.

**Таблица №11.** Ефект на тимол, меден сулфат и сребърен нитрат.

Биоцид %	Т			М			С		
	0.1	0.5	1.0	1	3	5	1	3	5
AM1	-	4.2	13.5	-	2.6	18.2	-	1.5	32.3
AM2	-	2.0	14.2	-	2.0	25.2	-	1.5	30.2
AM3	-	2.0	14.4	-	2.0	25.5	-	2.0	35.4
AM4	-	2.5	12.5	-	2.0	20.1	-	2.0	30.6
AM5	-	3.0	12.6	-	1.8	25.5	-	2.6	30.4
AM6	-	3.5	11.0	-	1.8	30.3	-	1.5	30.2
AM7	-	4.0	14.3	-	1.6	20.4	-	2.0	28.2
AM8	-	2.0	10.3	-	1.5	25.1	-	2.0	30.3
AM9	-	1.5	9.5	-	1.7	24.3	-	2.5	30.2
AM10	-	1.5	8.4	-	2.0	32.1	-	3.0	30.2
AM11	-	1.5	10.0	-	2.5	30.3	-	1.5	25.0
AM12	-	1.5	8.5	-	2.5	35.2	-	2.0	32.2
AM13	-	4.5	8.5	-	2.0	30.2	-	2.5	35.0
AM14	-	2.6	11.0	-	2.0	28.0	-	2.5	30.3
AM15	-	1.5	10.5	-	2.8	30.3	-	1.0	30.1

Легенда: Т- тимол, М- Меден сулфат, С- Сребърен нитрат

Анализът на резултатите показва, че изолираните актиномицети са чувствителни към използваните биоциди. Видимо потискане на растежа се констатира при концентрации > 1%, като най-силно проявен е бактерицидният ефект на медния сулфат. Най-слабо е действието на тимола, в сравнение с останалите два биоцида.

Анализът на резултатите дава основание да се направят следните по-съществени изводи:

- ⇒ Актиномицетните изолати са чувствителни спрямо използваните бактериоциди.
- ⇒ Най-силно изразен е инхибиращият ефект на медния сулфат.
- ⇒ Изолатите са силно чувствителни към Превентол RI 50 при концентрация 3%.
- ⇒ Биоцидите Busan 1292 и Bio Stone Protect BF 8001 нямат инхибиращ ефект спрямо актиномицетните изолати.
- ⇒ Биоцидът Биотин R имат относително слаб инхибиращ ефект.
- ⇒ Биоцидът Fennosan R20 проявява изразен инхибиращ ефект при концентрации 1.5%.

Таблица №12. Инхибиращ ефект на Биотин R; Превентол RI 50; Fennosan R20; Busan 1292 и Био - Bio Stone Protect BF 8001

Биоци д %	Б 3.0	Б 3.5	Б 5.0	Пр 1.0	Пр 2.0	Пр 3.0	Ф 0.5	Ф 1.0	Ф 1.5	Бу 10	Био 1.0
AM1	2	3.0	12.5	2.4	10.0	> 18	-	2.5	18.0	1.0	2.0
AM 2	2	2.0	14.0	2.5	10.0	> 25		1.5	20.5	1.0	3.0
AM 3	2	2.0	14.0	2.0	12.0	> 25	-	2.5	25.0	1.0	2.0
AM 4	<2	2.0	12.5	4.0	12.0	> 20	-	1.0	20.2	1.0	4.0
AM5	2	3.0	12.0	1.5	14.8	> 25	-	2.5	23.0	1.0	3.0
AM6	<2	3.0	11.0	2.4	13.6	> 30	-	3.5	23.40	1.0	2.0
AM7	2	4.0	15.0	2.5	14.6	> 20	-	<2.0	28.0	1.0	3.0
AM8	2	2.0	10.0	3.0	15.5	> 30	-	<2.0	23.0	-	3.0
AM9	-	1.5	9.0	4.0	15.7	> 30	-	<2.5	30.0	-	-
AM10	-	1.5	9.0	3.5	12.0	> 30	-	3.0	31.0	-	-
AM11	-	1.5	10.0	4.5	21.5	> 30	-	1.5	25.3	-	-
AM12	-	1.5	8.8	3.0	22.5	> 30	-	2.0	30.0	-	-
AM13	-	4.5	8.5	4.2	21.0	> 30	-	2.5	29.5	-	-

Активността е изразена в мм стерилна зона

Легенда: Б - Биотин R; Пр - Превентол RI 50; Ф - Fennosan R 20; Бу - Busan 1292; Био - Bio Stone Protect BF 8001

### 6.3. Ефект на биоциди върху изолираните гъбни щамове

Изпитани са 7 биоцида за инхибиращ ефект върху гъбните изолати. Биоцидите са както следва:

⇒ Биотин R, Превентол RI 50 и Fennosan R 20 в различни концентрации.

⇒ Busan 1292 и Bio Stone Protect BF 8001 в концентрации, предлагани като търговски препарати.

⇒ Безалкониев хлорид в три концентрации.

⇒ 2-Октил-4-изотиозолин (PESTANAL®) в три различни концентрации.

Резултатите от третирането са посочени в табл.13 и 14.

**Таблица №13.** Инхибиращ ефект на изпитаните биоциди, спрямо изолираните гъбни видове.

Биоцид%	Б 3.0	Б 3.5	Б 5.0	Пр 1.0	Пр 2.0	Пр 3.0	Ф 0.5	Ф 1.0	Ф 1.5	Бу 10	Био 1.0
Изолат											
<i>Penicillium</i> sp. P31	2	3.0	12.5	2.4	10.0	> 18	-	2.5	18.0	~ 1.0	2.0
<i>Penicillium</i> sp. S0_3	2	2.0	14.0	2.5	10.0	> 25		1.5	20.5	~ 1.0	3.0
<i>Penicillium</i> sp. 2-7	<2	2.0	12.5	4.0	12.0	> 20	-	1.0	20.2	~ 1.0	4.0
<i>Penicillium</i> sp. 2-1	2	3.0	12.0	1.5	14.8	> 25	-	2.5	23.0	~ 1.0	3.0
<i>Penicillium</i> sp. P7	<2	3.0	11.0	2.4	13.6	> 30	-	3.5	23.40	~ 1.0	2.0
<i>Aspergillus</i> sp. P23	2	4.0	15.0	2.5	14.6	> 20	-	<2.0	28.0	~ 1.0	3.0
<i>Simplicillium</i> sp. P3	2	2.0	10.0	3.0	15.5	> 30	-	<2.0	23.0	-	3.0
<i>Chaetomium</i> sp. 5-1	-	1.5	9.0	4.0	15.7	> 30	-	<2.5	30.0	-	-
<i>Trichosporon</i> sp. S1-8	-	1.5	9.0	3.5	12.0	> 30	-	3.0	31.0	-	-
<i>Trichosporon</i> sp. SF19-2	-	1.5	10.0	4.5	21.5	> 30	-	1.5	25.3	-	-
<i>Mortierella</i> sp. S1-3	-	1.5	8.8	3.0	22.5	> 30	-	2.0	30.0	-	-
<i>Gymnoascus</i> sp.5_2	-	4.5	8.5	4.2	21.0	> 30	-	2.5	29.5	-	-
<i>Mucor</i> sp. S2-6	-	-	-	15.0	22.0	25.0	25.0	25.0	25.0	-	-
<i>Cladosporium</i> sp. P16	--	4.5	12.5	12.0	18.0	>25.0	>20.0	>20.0	>20.0		
<i>Trichoderma</i> sp. S0-9	-	-	-	>20.0	>20.0	>25.0	15.0	25.0	>25.0	~ 5	~ 5
<i>Acremonium</i> sp. P18	7.0-	8.0	8.0	~10	~10	~10	~ 10	~ 10	~ 10	-	-
<i>Exophiala</i> sp. S0-12	14.	18.5	21.0	>20.0	>20.0	>20.0	12.0	12.0	-	-	-
<i>Bionectria</i> sp. S0-2	-	-	-	15.0	25.0	>25.0	>15.0	>15.0	>15.0	-	-
<i>Arthrinium</i> sp. S1_6	-	-	-	>20.0	>20.0	>20.0	-	-	-	-	-
<i>Pochonia</i> sp. S2_2	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	2.0	2.0	2.0	-	-

Инхибиращият ефект е изразен като диаметър стерилна зона в мм

**Легенда:** Б - Биотин R, Пр - Превентол RI 50, Ф - Fennosan R 20, Бу - Busan 1292, Био – Bio Stone Protect BF 8001

**Таблица №14.** Ефект на биоцидите Бензалкониев хлорид (BC) и 2-октил-4-изотиазолин (ОИТ)

Изолат №	BC диаметър зона на инхибиране (mm)			ОИТ диаметър зона на инхибиране (mm)		
	1000 mg/L	500mg/L	100mg/L	1000mg/L	500mg/L	100mg/L
<i>Penicillium</i> sp. 2-7	16.7 ± 1.7	10.0±0	0	45.0±0	41.7±1.7	31.7±1.7
<i>Aspergillus</i> sp. P28	17.3±1.5	13.3±0.9	9±0.6	42.0±1.5	38.3±1.7	21.7±1.7
<i>Simplicillium</i> sp. P3	15.0±0	10.0±0.1	0	38.3±1.7	38.3±1.7	20.0±0
<i>Trichosporon</i> sp. S1-8	21.0±1	16.7±1.3	10±0	21.7±1.7	18.3±1.7	10.0±0
<i>Gymnoascus</i> sp. 5-2	18.3±1.7	11.7±1.7	5.7±0.3	33.3±1.7	30.0±0	23.3±3.3
<i>Mucor</i> sp.S2-6	9.3±1.8	4.0	0	19.0±1.7	10.7±1.8	7.7±1.3
<i>Trichoderma</i> sp. S0-9	1.3±1.7	0	0	25±0	20±0	0
<i>Humicola</i> sp.S1-5	15.0±0.6	9.0±1.2	6	25.0±0	23.3±1.7	17.3±2.7
<i>Acremonium</i> sp. P18	12.7±1.5	9.0±1	0	45.7±0.7	45.0±0	35.0±0
<i>Exophiala</i> sp. S0-12	26.7±1.7	20.0±0	11.7±1.7	76.7±3.3	66.7±3.3	40.0±0
<i>Bionectria</i> sp. S0-2	15.0±0	8.0±0	0	45.0±0	45.0±0	31.7±1.7
<i>Arthrinium</i> sp. S1-6	15.0±2.9	8.3±5.3	2.0±3.5	43.3±1.7	41.7±1.7	32.0±3.5
<i>Torulasporea</i> sp. S1-9	25.0±0	20.0±0	10.0±0	15.0±0	15.0±0	10.0±0
<i>Pochonia</i> sp. S2-2	10.7±0.7	7.7±0.3	4	46.0±0.6	40.0±0	31.3±0.9
<i>Doratomyces</i> sp. S2-4	21.7±1.7	13.3±1.7	5.0±0	70.0±0	60.0±0	46.7±3.3
<i>Pseudogymnoascus</i> sp. P31.2	15.0±0	10.0±	0	-	-	-

Като по-съществени изводи от резултатите могат да се посочат:

- ⇒ Гъбните изолати от род *Penicillium* са най-чувствителни към изпитваните биоциди.
- ⇒ Изолатите *Exophiala salmonis* S0-12 и *Acremonium zeae* P18 се инхибират единствено от биоцида Биотин R.
- ⇒ Най-силно изразен инхибиращ ефект се констатира при биоцида Превентол RI 50, където при концентрация 3% развитие на гъбите не се наблюдава.
- ⇒ Биоцидът Фенозан R 20 проявява инхибиращ ефект при концентрации 3%.
- ⇒ Биоцидите Bio Stone Protect BF 8001 и Busan 1292 са неефективни спрямо тези изолати.
- ⇒ Биоцидът бензалкониев хлорид проявява незначителен инхибиращ ефект спрямо *Mucor* sp., *Trichoderma* sp., *Acremonium* sp. и е най-активен спрямо *Trichosporon* sp., *Exophiala* sp. и *Torulasporea* sp.
- ⇒ Биоцидът 2-октил-4-изотиазолин (ОИТ) има изразен инхибиращ ефект спрямо *Penicillium* sp. и *Simplicillium* sp. и напълно инхибира растежа на *Exophiala* sp. и *Doratomyces* sp.

Тези резултати дават достатъчно информация относно чувствителността на изолираните щамове към някои от най-използваните и препоръчваните за третиране на хабитати от типа на пещера Магура биоциди.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ И СТРАТЕГИЯ ЗА ОПАЗВАНЕ НА СКАЛНИТЕ РИСУНКИ**

Запазването на скалните рисунки в пещера Магура е важна национална задача. Към настоящия момент интересът на институциите е силно нараснал. Министерството на културата започва процедура за вписване на праисторическите рисунки в пещера Магура в Списъка на световното културно и природно наследство на ЮНЕСКО. Едно от основните изисквания в необходимите документи е наличие на информация за микробната контаминация на хабитата и евентуална стратегия за опазване на скалните рисунки. Данните от проведените изследвания относно микробната колонизация на Галерията с рисунките, изследванията на антагонистичните взаимоотношения, както и резултатите от изпитване на ефекта на различни биоциди спрямо микроорганизми, изолирани от пещерата показват, че в Галерията с рисунките е формирано стабилно микробно съобщество като неговите компоненти нямат изразен детериогенен ефект върху рисунките. Установеното екологично равновесие в галерията до голяма степен е свързано с относително постоянните физико-химични условия и ограничения поток на туристи.

На базата на получените резултати може да се очертае и стратегия за опазването на рисунките. Тази стратегия може да се сведе до няколко основни изисквания, а именно:

⇒ Създаване на условия за запазване на относително постоянните физико-химични параметри в Галерията с рисунките и установеното екологично равновесие на микробните популации.

⇒ Регулирано използване на концертната зала с оглед ограничаване на възможността за попадането на алохтонни микроорганизми в Галерията с рисунките.

⇒ Регулиран поток на туристи и предписания за тях при посещението на галерията.

⇒ Периодичен микробиологичен контрол, включващ както визуален оглед така и контрол на определени групи микроорганизми, класифицирани като активни детериогени в пещерни системи с произведения на изкуството.

⇒ Внимателно третиране с биоциди, задължително след консултация с реставратори при възникване на активна микробна контаминация.

## ОСНОВНИ ИЗВОДИ

1. В Галерията с рисунките на пещера Магура е формирано микробно съобщество с преобладаващо присъствие на амонификатори, денитрификатори, спорообразуващи бактерии, актиномицети и гъби, като е относително слабо присъствието на типични детериогени с изключение на силикатните бактерии.
2. При проведения мониторинг на микробиоценозата не са констатирани сериозни флуктуации в количествения и качествения състав на микробното съобщество в Галерията с рисунките.
3. Проведените фенотипичен, молекулен, секвенционен и биоинформатичен анализ установиха принадлежност на изолираните бактериални щамове към 8 рода – *Bacillus*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Sphingobacterium*, *Pantoea*, *Pseudomonas* и *Raoultella*. Преобладаващ е родът *Bacillus* и видовете *Bacillus safensis*, *Bacillus invictae* и *Bacillus pumilus*.
4. Изолираните актиномицетни видове принадлежат към родовете *Streptomyces*, *Kocuria*, с преобладаващ вид *K. rhizophila* и *Promicromonospora*, с преобладаващ вид *P. flava*.
5. Гъбното разнообразие в пробите от рисунките според филогенетичния анализ включва представители на Ascomycota (81%) (родове *Penicillium* и *Aspergillus*), Basidiomycota (род *Trichosporon*) и Zygomycota (родовете *Mucor* и *Mortierella*), като преобладаващ е родът *Penicillium* и видовете *P. commune*, *P. solitum* и *P. malachiteum*.
6. По скалната повърхност в близост до рисунките присъстват представители на родовете *Penicillium*, *Aspergillus*, *Simplicillium*, *Gymnoascus* и *Cladosporium*, а в седиментите от гуано родовете *Penicillium*, *Trichosporon*, *Mortierella*, *Mucor*, *Humicola* и *Trichoderma*.
7. Изолираните актиномицетни видове проявяват изразен антагонизъм спрямо бактериални изолати от родовете *Bacillus*, *Sphingobacterium* и *Serratia* и не са активни срещу *Pseudomonas*.
8. Биоцидите тимол, меден сулфат и сребърен нитрат имат инхибиращ ефект спрямо бактериалните изолати, като най-силен е този на медния сулфат.
9. Биоцидите меден сулфат, Превентол RI 50 и Fennosan R 20 проявят инхибиращ ефект спрямо актиномицетните изолати.
10. Спрямо гъбните изолати най-силно изразен инхибиращ ефект е установен за биоцидите Превентол RI 50, Фенозан R 20 и 2-октил-4-изотиазолин (ОИТ), като най-чувствителни са изолатите от род *Penicillium*.
11. Стратегията за опазване на скалните рисунки в пещерата трябва да включва мерки за запазване на физикохимичните параметри на средата, регулиран поток на туристи и периодичен микробиологичен контрол. Третирането с биоциди трябва да бъде крайна мярка при екстремна ситуация.



## **ПРИНОСИ**

1. За пръв път е проведено обстойно изследване на микробната колонизация в Галерията с рисунките на пещера Магура.
2. Получена е информация за бактериалната, актиномицетната и гъбната микрофлора, определени са преобладаващите родове и видове допълнена е информацията за спелеомикрофлората на пещерите с произведения на изкуството.
3. Получени са данни относно антагонистичните взаимоотношения между актиномицетните и бактериалните изолати от пещерата, които могат да бъдат в основата на относително стабилните микробни съобщества в Галерията с рисунките.
4. Получени са данни относно инхибиращият ефект на 8 биоцида спрямо бактериални, актиномицетни и гъбни изолати, които могат да бъдат използвани при мероприятия по консервация на рисунките.
5. Предложена е стратегия за запазване на скалните рисунки и ограничаване на микробната колонизация.

## Списък на публикациите и участията в научни форуми във връзка с дисертацията

### Публикации

1. **Mitova M.**, Iliev M., Angelova R., Groudeva V. (2014). Analysis of the microbial colonization in view of preserving rock paintings. Bulgarian e-Journal of Archaeology, Supplementa 3 (2014) 85–92, <http://be-ja.org>, Second Doctoral Conference on Studying the Cultural-Historical Heritage – Challenges and Perspectives, 28 – 29.11.2013, Sofia, Bulgaria
2. **Mitova M.**, Iliev M., Angelova R., Voynova V., Groudeva V. (2014). Microbial diversity in the gallery with paintings, Magoura cave Bulgaria”, Third Balkan Scientific Conference of Biology, J. BioSci. Biotech. SE/ONLINE: 51-54 ISSN: 1314-6246, 30 May – 1 June 2014, Plovdiv, Bulgaria
3. **Mitova M.**, Iliev M., Angelova R., Groudeva V., (2015). Deteriogenic effect of microbial colonization of prehistoric paintings in Magoura cave, Bulgaria”, *Annuaire de l’Université de Sofia “St. Kliment Ohridski” Faculte de Biologie*, volume 100, livre 4, pp. 253-259, First National Conference of Biotechnology, Sofia, 17-18.10.2014
4. **Mitova M.**, Iliev I., Groudeva V. (2015). Identification of *Bacillus* strains isolated from rock paintings in Magoura cave, Bulgaria. J. BioSci. Biotechnol. 2015, SE/ONLINE: 303-306, ISSN: 1314-6246
5. **Mitova M.**, Iliev M., Nováková A., Gorbushina A., Groudeva V., Martin-Sanchez P. (2016). Diversity and biocide susceptibility of fungal assemblages dwelling in the Art Gallery of Magura Cave, Bulgaria, *International J. of Speleology* (accepted) <http://dx.doi.org/10.5038/1827-806X.46.1.2061>
6. Iliev M., **Mitova M.**, Ilieva R., Groudeva V., Grozdanov P. (2016). Bacterial isolates from rock paintings of Magura cave and sensitivity to different biocides, *Comptes redus de l’Academmie bulgare des Sciences* (submitted)
7. **Mitova M.**, Ivanova M, Iliev M. (2016). *Actinobacteria* as a component of microbial community formed on rock paintings of Magura Cave, Bulgaria. *Annuaire de l’Université de Sofia “St. Kliment Ohridski” Faculte de Biologie* (submitted)

## Участия в научни форуми

1. **Mitova M.**, Iliev M., Ilieva R., Angelova R., Stoichkov K., Groudeva V. (2013) Quantitative characterization of culturable bacteria from Magoura cave, Bulgaria, International conference of young scientists – Plovdiv'2013, Bulgaria, 13-16.06.2013
2. **Mitova M.**, Iliev M., Angelova R., Groudeva V. (2013). Quantitative characterization of culturable bacteria from the Magoura Cave, Bulgaria, *Microbiologia Balkanica*'13 Veliko Tarnovo, Bulgaria, 8th Balkan Congress of Microbiology, 02-05.10.2013
3. **Mitova M.**, Iliev M., Angelova R., Groudeva V. (2013). Microbiological monitoring of Magoura cave, Bulgaria, in aspect of preservation and conservation activities on the rock paintings, International Conference "*Bioscience - development and new opportunities*" – *Kliment's days*, 20-22.11.2013, Sofia, Bulgaria
4. **Mitova M.**, Iliev M., Angelova R., Groudeva V. (2013). Analysis of the microbial colonization in view of preserving rock paintings, Second Doctoral Conference on Studying the Cultural-Historical Heritage – Challenges and Perspectives, 28 – 29.11.2013, Sofia, Bulgaria
5. **Mitova M.**, Iliev M., Angelova R., Voynova V., Groudeva V. (2014). Microbial diversity in the gallery with paintings, Magoura cave Bulgaria., Third Balkan Scientific Conference of Biology, 30 May – 1 June 2014, Plovdiv, Bulgaria
6. **Mitova M.**, Iliev M., Angelova R., Voynova V., Groudeva V. (2014). Microbial diversity in the gallery with paintings, Magoura cave Bulgaria, Jubilee Conference: "40 Years of environmental education, conservation and restoration of the environment" at University of forestry, 12 - 13 June 2014, Sofia, Bulgaria
7. **Mitova M.**, Iliev M., Angelova R., Groudeva V. (2014). Deteriogenic effect of microbial colonization of prehistoric paintings in Magoura cave, Bulgaria", First National Conference of Biotechnology, Sofia, 17-18.10.2014
8. **Mitova M.**, Iliev I., Groudeva V. (2015). Identification of *Bacillus* strains isolated from rock paintings in Magoura cave, Bulgaria, Second National Youth Conference „Biological sciences for a better future“, Plovdiv, October 30-31, 2015
9. **Mitova M.**, Ivanova M., Iliev M. (2016). *Actinobacteria* as a component of microbial community formed on rock paintings of Magoura cave, Bulgaria, Scientific Conference for Young Researchers “Kliment's days”, 17-18 November, 2016, Sofia

## **Участия в научни проекти**

1. Микробно разнообразие в Българската пещера Магура и опазване на уникалните скални рисунки“ - ДДВУ02/73/2010МОМН - 04.2011
2. Нови материали за електрониката на базата на биогенни оксиди“ - ДИД02/38/09МОМН – 10.2010 – 12.2014
3. Оптимизиране на протокол за ARDRA анализ, с цел вътревидово типизиране на естествени изолати на вид *A. ferrooxidans*” – № 13/2013, Изследователски проект в подкрепа на докторантите към Софийски Университет „Свети Климент Охридски“:
4. Характеристика на неутрофилни железобактерии, изолирани от естествени местообитания” - № 165/04/2014, Изследователски проект в подкрепа на докторантите към Софийски Университет „Свети Климент Охридски”
5. Получаване и изследване на наноразмерни биогенни железни оксиди/оксихидрокси за приложение в катализа, електрониката и екологията, Т02-17/12.12.2014, МОМН