



БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ

**ИНСТИТУТ ПО МОЛЕКУЛЯРНА БИОЛОГИЯ
„АКАД. РУМЕН ЦАНЕВ“**

Радина Николаева Николова

**Структурни и функционални характеристики на почвените
микробни съобщества в отговор на дълготрайно замърсяване с
тежки метали**

АВТОРЕФЕРАТ

За присъждане на образователна и научна степен „Доктор“

Професионално направление 4.3. Биологически науки

Научна специалност „Молекулярна генетика“

Научни ръководители

доц. д-р Галина Радева

проф. д-р Анелия Кенарова

СОФИЯ, 2025

ДИСЕРТАЦИЯТА ОБХВАЩА 197 СТРАНИЦИ, СЪДЪРЖА 27 ФИГУРИ И 33 ТАБЛИЦИ. БИБЛИОГРАФСКАТА СПРАВКА ВКЛЮЧВА 303 ЗАГЛАВИЯ.

ДИСЕРТАЦИОННИЯТ ТРУД Е ПРЕДСТАВЕН И ОБСЪДЕН НА РАЗШИРЕН СЕМИНАР НА СЕКЦИЯ „РЕГУЛАЦИЯ НА ГЕННАТА АКТИВНОСТ“, ИНСТИТУТ ПО МОЛЕКУЛЯРНА БИОЛОГИЯ „АКАД. РУМЕН ЦАНЕВ“ - БАН, НА 29.07.2025 Г.

ДИСЕРТАЦИОННИЯТ ТРУД Е ФИНАНСИРАН С ПОДКРЕПАТА НА НАУЧЕН ПРОЕКТ ДН11/4/2017, ФНИ, НА ТЕМА „МИКРОБИОМЪТ НА ПОЧВАТА КАТО ИНДИКАТОР ЗА БИОРАЗНООБРАЗИЕТО И ЕВОЛЮЦИЯ НА МИКРОБНИ СЪОБЩЕСТВА ПРИ ТРАЙНО ЗАМЪРСЯВАНЕ С ТЕЖКИ МЕТАЛИ“ И ПРОГРАМА ЕРАЗЪМ+.

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ:

ARDRA – Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis

bp – base pairs (базови двойки)

ДНК – Дезоксирибонуклеинова киселина

рДНК – Рибозомална ДНК

AWCD – Average Well Color Development

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool

ССА – Каноничен корелационен анализ (Canonical Correlation Analysis)

CLPP – Community Level Physiological Profile

CFU – Колония-образуващи единици

DGGE – Denaturing – gradient gel electrophoresis

dNTP – Дезоксирибонуклеотидтрифосфати

EDTA - Етилен диаминоететраацетат

INT - i2-р-йодофенил-3-р-нитрофенил-5- фенилтетразолиев хлорид (2-p-iodophenyl-3-p-nitrophenyl-5-phenyltetrazolium chloride)

IPTG – Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

ITS – транскрибиран спейсър район (Internal Transcriber Spacer)

KO – KEGG Orthology

KEGG – Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

LB – Luria- Bertani

NCBI – National Center for Biotechnology and Information

NGS – Next – generation sequencing

NMDS – non-metric multidimensional scaling

OD – оптична плътност (optical density)

OTUs – операционно – таксономични единици (operational taxonomic units)

PCA – Principal Component Analysis (принципен компонентен анализ)

PCR – Полимеразна Верижна Реакция (Polymerase Chain Reaction)

pNP – p-нитрофенил

pNPG – p-нитрофенил- β -D-глюкопиранозид

PGPF – Plant Growth Promoting Fungi

PGPR – Plant Growth Promoting Rhizobacteria

RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism

RISA – Ribosomal Intergenic Spacer Analysis

TBE – Трис-боратен-EDTA

TE – Трис-EDTA

TOC – Total organic carbon

TM – тежки метали/металоид

UV – Ултравиолетова светлина

X-gal – 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside

Съдържание

1. Увод.....	7
2. Цел и задачи	8
2.1. Цел.....	8
2.2. Задачи.....	8
3. Материали и методи	9
3.1. Пробонабиране	9
3.2. Физикохимични анализи на почвите.....	10
3.2.1. Съдържание на тежки метали и металоид	10
3.2.2. Механичен състав на почвите	10
3.2.3. рН на почвите	10
3.2.4. Съдържание на влага в почвите.....	10
3.2.5. Съдържание на общ органичен въглерод	10
3.3. Концентрация на биологично достъпни неорганични йони	10
3.3.1. Нитратен азот	10
3.3.2. Амониев азот	10
3.3.3. Фосфатен фосфор.....	10
3.4. Микробиологични анализи на почвите.....	10
3.4.1. Ензимни активности на почвените микробни съобщества	10
3.4.1.1. Обща дехидрогеназна активност	10
3.4.1.2. Бета-глюкозидазна активност	10
3.4.1.3. Уреазна активност	10
3.4.1.4. Фосфатазна активност.....	10
3.4.1.5. Арилсулфатазна активност.....	10
3.4.2. Метаболитен профил на почвените бактериални съобщества.....	10
3.4.3. Определяне на функционалното разнообразие на почвените бактериални съобщества	10
3.5. Молекулярно-генетични анализи	10
3.5.1. Екстрахиране на геномна ДНК от почвите.....	10
3.5.2. Конструирание на 16S рДНК клонови библиотеки	10
3.5.2.1. PCR амплификация на бактериалната геномна ДНК.....	10

3.5.2.2.	Пречистване на PCR продуктите с GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, САЩ)	11
3.5.2.3.	Клониране на ДНК фрагмент с TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, САЩ)	11
3.5.2.4.	Трансформация в компетентни клетки E. coli TOP 10F'	11
3.5.2.5.	Култивиране на рекомбинантни клонове.....	11
3.5.2.6.	In situ PCR амплификация за проверка на рекомбинантните клонове	11
3.5.2.7.	Съхранение на клоновите библиотеки	11
3.5.2.8.	Полиморфизъм по дължината на рестрикционните фрагменти (Restriction Fragment Length Polymorphism) – RFLP.....	11
3.5.2.9.	Секвениране и филогенетичен анализ на 16S рДНК последователностите	11
3.5.3.	Определяне обилието на микробните съобщества чрез количествен PCR.....	11
3.5.3.1.	Количествен PCR за определяне на бактериалното обилие на копията на 16S рРНК гена 11	
3.5.3.2.	Количествен PCR за определяне на гъбното обилие на копията на ITS региона. 11	
3.5.4.	Метагеномен анализ чрез таргетно ампликон секвениране на 16S рРНК гена.....	11
3.5.4.1.	Екстрахиране на геномна ДНК от почвите	11
3.5.5.	Метагеномен анализ чрез таргетно ампликон секвениране на ITS региона	11
3.5.5.1.	Екстрахиране на геномна ДНК от почвите	11
3.5.5.2.	PCR амплификация на ITS региона	11
3.5.5.3.	Пречистване на PCR продуктите с MinElute PCR Purification Kit	11
3.5.5.4.	Репарация на двата края на ДНК и лигиране на адаптери с TruSeq DNA PCR-Free LP 11	
3.5.5.5.	Пречистване на ITS библиотеката	11
3.5.5.6.	Количествен PCR (qPCR) за количествена оценка и нормализация на ITS ампликонова библиотека с KAPA Library Quantification Kit	11
3.5.5.7.	Денатуриране на ITS библиотеката	11
3.6.	Статистически анализи за обработка на резултатите	11
4.	Резултати	12
4.1.	Характеристики на почвите	12
4.1.1.	Концентрации на тежки метали/металоид в почвите и ниво на замърсяване	12
4.2.	Физикохимични свойства на почвите	13
4.2.1.	Механичен състав на почвите	13
4.2.2.	рН на почвите	13

4.2.3.	Съдържание на влага в почвите	14
4.2.4.	Съдържание на общ органичен въглерод	14
4.2.5.	Концентрация на неорганични соли.....	14
4.2.5.1.	Минерален азот.....	14
4.2.5.2.	Минерален фосфор.....	15
4.3.	Определяне на обилието на бактериалните съобщества	15
4.3.1.	Бактериално обилие изразено чрез колония образувачи единици (CFU).....	16
4.3.2.	Бактериално обилие изразено чрез количествен PCR (qPCR)	16
4.3.3.	Корелационни зависимости между бактериалното обилие и абиотичните характеристики на почвите	17
4.4.	Таксономичен състав и структурата на бактериалните съобщества	18
4.4.1.	Разнообразие и структура на бактериалните съобщества чрез конструиране на 16S рРНК генни клонови библиотеки	18
4.4.2.	Характеристики на 16S рРНК генните клонови библиотеки	18
4.4.3.	Алфа-разнообразие на бактериалните съобщества в клоновите библиотеки	19
4.4.4.	Таксономично разнообразие на бактериалните съобщества на ниво отдел и клас	20
4.4.5.	Филогенетично разнообразие на бактериалните съобщества на ниво вид.....	22
4.5.	Разнообразие и структура на бактериалните съобщества чрез таргетно ампликон секвениране на 16S рРНК гена	23
4.5.1.	Алфа-разнообразие на бактериалните съобщества от таргетното ампликон секвениране на 16S рРНК гена	23
4.5.2.	Таксономичен състав на бактериалните съобщества на ниво отдел и клас чрез таргетно ампликон секвениране на 16S рРНК гена	24
4.5.3.	Таксономичен състав на бактериалните съобщества на ниво род чрез таргетно ампликон секвениране на 16S рРНК гена.....	26
4.5.4.	Корелационни зависимости между бактериалното таксономичното разнообразие на ниво клас и тежките метали	26
4.6.	Таксономичен състав и структурата на гъбните съобщества	29
4.6.1.	Обилие на гъбните съобщества.....	29
4.6.2.	Таксономичен състав и структурата на гъбните съобщества	30
4.6.2.1.	Алфа-разнообразие на гъбните съобщества от таргетното ампликон секвениране на ITS региона	30
4.6.2.2.	Таксономичен състав и структурата на гъбните съобщества на ниво отдел	31
4.6.2.3.	Таксономичен състав и структурата на гъбните съобщества на ниво клас	31

4.6.2.4. Таксономичен състав и структурата на гъбните съобщества на ниво род.....	34
4.7. Влияние на факторите на средата върху биологичното разнообразие на микробните съобщества	36
4.8. Метаболитни функции на микробните съобщества	38
4.8.1. Прогнозни функционални профили на бактериалните съобщества на базата на метагеномното секвениране.....	38
4.8.2. Метаболитен потенциал и метаболитни профили на почвените бактериални съобщества, определени чрез системата Biolog Ecoplate™	42
4.8.2.1. Средна метаболитна активност (AWCD)	42
4.8.2.2. Функционален профил на бактериалните съобщества (CLPP)	43
4.8.2.3. Функционално разнообразие.....	44
4.8.3. Почвени ензимни активности	45
4.9. Влияние на факторите на средата върху функциите на почвените микробни съобщества....	46
5. Обсъждане на резултатите	48
5.1. Характеристика на средата.....	48
5.2. Обилие и разнообразие на почвените микробни съобщества.....	49
5.3. Таксономичен състав на почвените микробни съобщества.....	50
5.3.1. Таксономичен състав на ниво отдел.....	50
5.3.2. Таксономичен състав на ниво клас и род	52
5.3.3. Таксономичен състав на ниво вид	56
5.4. Прогнозни механизми за резистентност в бактериалните съобщества	57
5.5. Функционални характеристики на почвените микробни съобщества	58
6. Изводи.....	60
7. Приноси на дисертационния труд	60
8. Използвана литература.....	62
Публикации по темата на дисертацията	68
Други публикации.....	68
Участия в конференции.....	69

1. Увод

Почвите са динамична среда, съдържаща огромно разнообразие от микроорганизми, които имат съществено значение за кръговрата на веществата, разграждането на органичната материя и цялостното здраве на почвата. Почвеният микробиом играе ключова роля в поддържането на екосистемните функции, включително метаболитните процеси и адаптацията към различни стресови фактори.

Основните замърсители на почви в България са тежките метали. Този тип замърсяване предизвиква голямо безпокойство в световен мащаб, тъй като представлява сериозна заплаха за околната среда и човешкото здраве. Замърсяването с тежки метали променя както микробното обилие и таксономичното разнообразие, така и функцията на почвения микробиом. В почви с повишени концентрации на тежки метали, често се наблюдава намалена метаболитна активност на чувствителните микроорганизми и увеличаване на относителното обилие на резистентни и толерантни таксони.

Физико-химичните свойства на почвата модифицират токсичността на тежките метали и оказват влияние върху формирането и динамиката на микробните съобщества. Определени физико-химични свойства на почвата – като рН, съдържание на органичен въглерод, текстура и други – се оказват също значими фактори, влияещи върху разпространението и активността на определени бактериални и гъбни таксони. По този начин, взаимодействието между замърсяването и локалните почвени характеристики формира селективен натиск, който определя доминиращите микробни таксони в дадена почвена среда.

Съвременният подход за изучаване на комплексните микробни съобщества е метагеномния подход, който в комбинация с микробиологични и молекулярно-генетични методи дава цялостна представа за структурата на микробиома в замърсени с тежки метали почви. Освен това, метагеномният анализ позволява задълбочено проучване на метаболитните способности на бактериалните съобщества, чрез прогнозиране на техния функционален потенциал и специфични адаптивни механизми.

В научната литература има множество изследвания, прилагащи различни подходи и методи за изследване на структурата и функцията на микробните съобщества в замърсени с тежки метали почви. Резултатите, обаче показват, че не съществува „типичен“ почвен микробиом. Поради тази причина изучаването на почвения микробиом в различни географски райони и мащаби, и на различни нива – локално, и регионално – е наложително за по-задълбочено разбиране на микробното разнообразие и промените в структурата на съобществата.

Досега в България липсват изследвания, свързани с прилагането на метагеномен подход за изследване на микробиома в трайно замърсени с тежки метали почви. Дисертационният труд цели да изясни влиянието на тежките метали и конкретните фактори на средата върху структурата и функцията на микробните съобщества, с прилагането на съвременни молекулярни, биоинформатични и статистически подходи.

2. Цел и задачи

2.1. Цел

Целите на настоящата дисертационна работа са да се установи 1) таксономичният състав и функционалната активност на микробиома на трайно замърсени с тежки метали почви и 2) да се определят ключовите фактори на околната среда с ефект върху характеристиките на микробните съобщества.

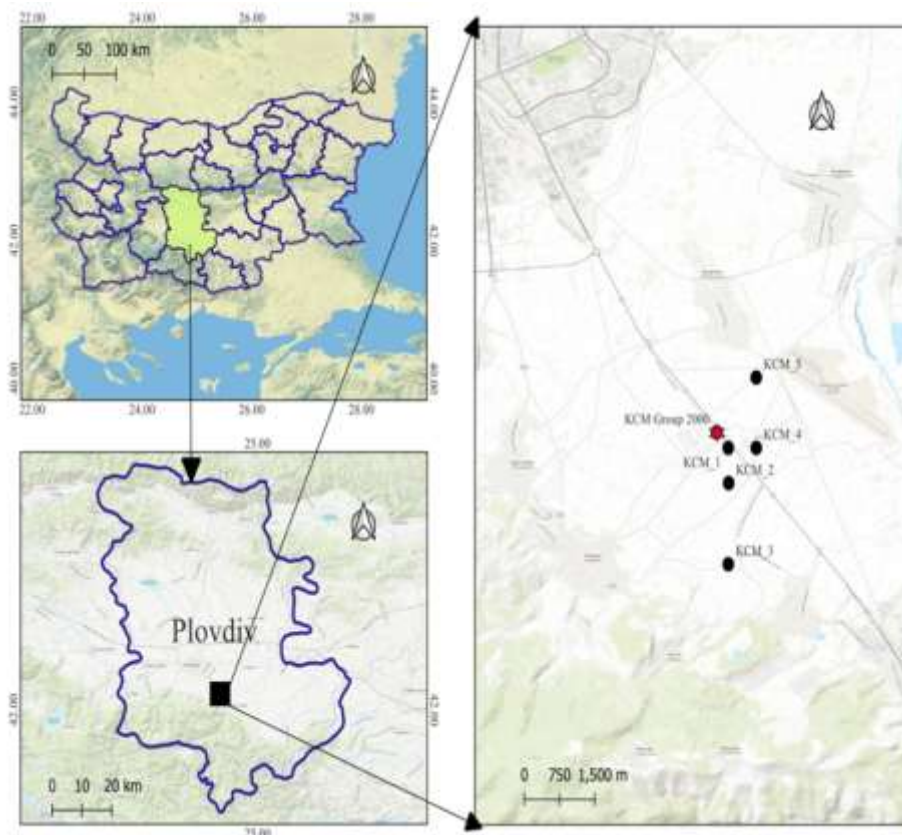
2.2. Задачи

1. Пробонабиране на почвени проби по градиента на замърсяване с тежки метали (цинк, олово, кадмий, мед) и металоида арсен от района на КЦМ 2000, гр. Пловдив.
2. Определяне на физикохимичните и механични свойства на почвите, концентрацията на тежките метали/металоиди и техните биодостъпни форми.
3. Определяне на функционалното разнообразие и ензимна активност на почвените микробни съобщества.
4. Определяне на микробното обилие на съобществата.
5. Установяване на таксономичния състав на бактериалните и гъбните съобщества.
6. Установяване на взаимовръзката между физикохимичните свойства на почвите, концентрацията на тежките метали/металоид и характеристиките на микробиома.

3. Материали и методи

3.1. Пробонабиране

Пробонабирането е извършено през месец юни 2020 г. по концентрационния градиент на дълготрайно замърсяване на почвите с цинк (Zn), олово (Pb), кадмий (Cd), мед (Cu) и металоида арсен (As) от района на КЦМ 2000, гр. Пловдив. Пробите са взети от пет географски точки, разположени на различно разстояние от КЦМ 2000 (фигура 1).



Фигура 1. Географско разположение на точките на пробонабиране от района на КЦМ 2000, гр. Пловдив.

Почвените проби са взети от две дълбочини: 0 – 20 cm (повърхностен почвен слой) – КСМ 1.1, КСМ 2.1, КСМ 3.1, КСМ 4.1 и КСМ 5.1, и 20 – 40 cm (подповърхностен почвен слой) – КСМ 1.2, КСМ 2.2, КСМ 3.2, КСМ 4.2 и КСМ 5.2. Използвани са средни проби за всяка точка, съставени от пет индивидуални бода с почвоведска сонда.

3.2. Физикохимични анализи на почвите

3.2.1. Съдържание на тежки метали и металоид

3.2.2. Механичен състав на почвите

3.2.3. рН на почвите

3.2.4. Съдържание на влага в почвите

3.2.5. Съдържание на общ органичен въглерод

3.3. Концентрация на биологично достъпни неорганични йони

3.3.1. Нитратен азот

3.3.2. Амониев азот

3.3.3. Фосфатен фосфор

3.4. Микробиологични анализи на почвите

3.4.1. Ензимни активности на почвените микробни съобщества

3.4.1.1. Обща дехидрогеназна активност

3.4.1.2. Бета-глюкозидазна активност

3.4.1.3. Уреазна активност

3.4.1.4. Фосфатазна активност

3.4.1.5. Арилсулфатазна активност

3.4.2. Метаболитен профил на почвените бактериални съобщества

3.4.3. Определяне на функционалното разнообразие на почвените бактериални съобщества

3.5. Молекулярно-генетични анализи

3.5.1. Екстрахиране на геномна ДНК от почвите

3.5.2. Конструиране на 16S рДНК клонови библиотеки

3.5.2.1. PCR амплификация на бактериалната геномна ДНК

- 3.5.2.2. Пречистване на PCR продуктите с GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, САЩ)
- 3.5.2.3. Клониране на ДНК фрагмент с TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, САЩ)
- 3.5.2.4. Трансформация в компетентни клетки E. coli TOP 10F'
- 3.5.2.5. Култивиране на рекомбинантни клонове
- 3.5.2.6. In situ PCR амплификация за проверка на рекомбинантните клонове
- 3.5.2.7. Съхранение на клоновите библиотеки
- 3.5.2.8. Полиморфизъм по дължината на рестрикционните фрагменти (Restriction Fragment Length Polymorphism) – RFLP
- 3.5.2.9. Секвениране и филогенетичен анализ на 16S рДНК последователностите
- 3.5.3. Определяне обилието на микробните съобщества чрез количествен PCR
 - 3.5.3.1. Количествен PCR за определяне на бактериалното обилие на копията на 16S рРНК гена
 - 3.5.3.2. Количествен PCR за определяне на гъбното обилие на копията на ITS региона
- 3.5.4. Метагеномен анализ чрез таргетно ампликон секвениране на 16S рРНК гена
 - 3.5.4.1. Екстрахиране на геномна ДНК от почвите
- 3.5.5. Метагеномен анализ чрез таргетно ампликон секвениране на ITS региона
 - 3.5.5.1. Екстрахиране на геномна ДНК от почвите
 - 3.5.5.2. PCR амплификация на ITS региона
 - 3.5.5.3. Пречистване на PCR продуктите с MinElute PCR Purification Kit
 - 3.5.5.4. Репарация на двата края на ДНК и лигиране на адаптери с TruSeq DNA PCR-Free LP
 - 3.5.5.5. Пречистване на ITS библиотеката
 - 3.5.5.6. Количествен PCR (qPCR) за количествена оценка и нормализация на ITS ампликонова библиотека с KAPA Library Quantification Kit
 - 3.5.5.7. Денатуриране на ITS библиотеката
- 3.6. Статистически анализи за обработка на резултатите

4. Резултати

4.1. Характеристики на почвите

4.1.1. Концентрации на тежки метали/металоид в почвите и ниво на замърсяване

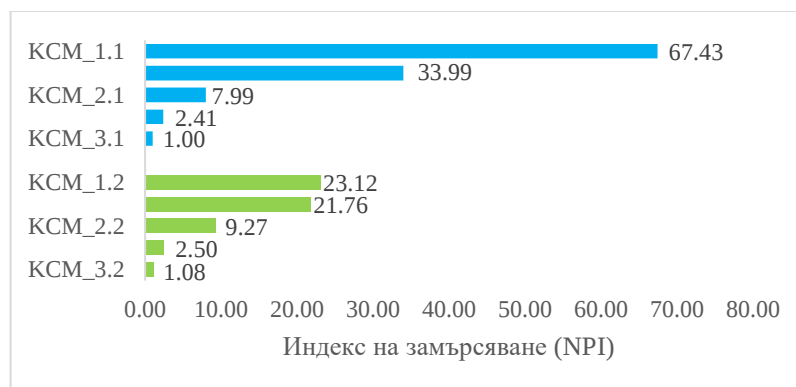
В 10те изследвани почви е установено наличие на Zn, Pb, Cd, Cu и As, в концентрации над максимално допустимите концентрации (МДК) според Наредба №3/2008г. за нормите за допустимо съдържание на вредни вещества в почвите (eea.government.bg/bg/legislation/soil/normipochvi.doc) (таблица 1).

Таблица 1. Концентрации на тежки метали/металоид в почвите.

Почва	Съдържание на тежки метали (mg/kg)				
	Zn	Pb	Cd	Cu	As
KCM_1.1	9452	11569	184.9	891.4	191.0
KCM_2.1	1558.2	1370.1	15.7	138.9	13.4
KCM_3.1	216.2	135.6	3.9	53.7	9.6
KCM_4.1	6872	5723	86.2	570.3	80.0
KCM_5.1	740.0	335.0	9.3	98.2	15.5
KCM_1.2	3457.1	3744	61.8	331.1	60.6
KCM_2.2	1711.9	1480.3	38.6	155.1	5.0
KCM_3.2	250.0	130.0	3.6	60.0	9.0
KCM_4.2	4843.1	3424	55.7	341.5	63.5
KCM_5.2	810.0	330.0	9.0	88.2	12.7
*МДК	320	100	2	150	25

*МДК – максимално допустимите концентрации според Наредба №3/2008г. за нормите за допустимо съдържание на вредни вещества в почвите. В **червено** са отбелязани стойностите над МДК, в **зелено** – под МДК.

За да се определи нивото на замърсяване в почвите е изчислен индекса на замърсяване на Nemerow (Nemerow pollution index – NPI) (фигура 2).



Фигура 2. Индекс на замърсяване (NPI) на почвите

Както е представено на фигура 2, NPI е в диапазона 1.00 – 67.43, следователно по степен на замърсяване почвите се подреждат във възходящ ред КСМ_3 (слабо замърсени) < КСМ_5 (средно замърсени) < КСМ_2 < КСМ_4 < КСМ_1 (силно замърсени). С по-високо съдържание на ТМ е повърхностният (средна стойност на NPI - 20.09 ± 25.37) в сравнение с подповърхностния (средна стойност на NPI - 10.12 ± 8.96) почвен слой. Тези резултати са очаквани в резултат на известната до момента слаба подвижност на ТМ и склонност да се натрупват в по-голяма степен в повърхностния почвен слой.

Определени са биологично достъпните форми на ТМ в почвите (таблица 2).

Таблица 2. Стойности на биологично достъпните форми на Pb, Zn и Cd в почвите.

Почви	aPb (mg/kg)	aZn (mg/kg)	aCd (mg/kg)
КСМ_1.1	2.6	8.2	9
КСМ_2.1	0.2	0.1	0.2
КСМ_3.1	0.9	0.1	0.5
КСМ_4.1	0.2	1.3	1.1
КСМ_5.1	0.4	0.8	0.3
КСМ_1.2	0.5	2.4	4.4
КСМ_2.2	0.9	0.12	6.4
КСМ_3.2	0.8	0.7	0.5
КСМ_4.2	0.2	1.7	0.3
КСМ_5.2	0.2	0.2	0.2

Почвата КСМ_1.1 показва най-високи концентрации на биологично достъпни форми на Pb (2.6 mg/kg), Zn (8.2 mg/kg) и Cd (9 mg/kg) в сравнение с останалите изследвани почви. Средните стойности на биологично достъпните форми за почвите са 0.69 ± 0.73 mg/kg (aPb), 1.56 ± 2.46 mg/kg (aZn) и 2.29 ± 3.18 mg/kg (aCd). Тези стойности показват, че наличието на биодостъпни форми на Pb, Zn и Cd варира значително между различните почви.

4.2. Физикохимични свойства на почвите

4.2.1. Механичен състав на почвите

Резултатите показват, че механичният състав на почвите е песъчливо-глинест. При КСМ_3 и КСМ_5 хоризонтът не е прекъснат, а при останалите има отчетлива граница в процентите при повърхностен и подповърхностен почвен слой.

4.2.2. pH на почвите

Почвеното pH варира слабо в границите от слабо кисело: 6.6 - 6.8 (КСМ 4.1, КСМ_5.1 и КСМ_5.2) до неутрално: 7.0 – 7.2 (останалите почви) (таблица 3). Не се установява разлика на pH в дълбочина, с изключение на КСМ_4 където почвата от повърхностния почвен слой се класифицира като слабо кисела, а от подповърхностния – с неутрално pH.

Таблица 3. Физикохимични свойства на почвите

Почва	pH	Влага (%)	ТОС (g/kg)	NO ₃ -N (mg/g)	NH ₄ -N (mg/g)	Общ минерален азот (mg/g)	P ₂ O ₅ (mg/kg)
КСМ_1.1	7.0	16.7	9.65	43.38 ± 0.64	6.62 ± 0.44	50.0	5.69 ± 0.23
КСМ_2.1	7.1	12.3	14.07	16.32 ± 0.12	5.13 ± 5.57	21.45	24.02 ± 0.41
КСМ_3.1	7.2	9.3	6.45	3.01 ± 0.19	3.26 ± 1.05	6.27	7.42 ± 1.11
КСМ_4.1	6.7	14.7	12.33	5.13 ± 0.26	2.25 ± 0.24	7.38	6.89 ± 0.61
КСМ_5.1	6.8	22.7	7.035	*НД	2.22 ± 0.32	*НД	*НД
КСМ_1.2	7.0	16.7	11.1	19.65 ± 0.21	6.84 ± 0.75	26.49	4.81 ± 0.59
КСМ_2.2	7.1	8.7	11.9	5.06 ± 0.51	5.35 ± 0.32	10.41	16.09 ± 0.43
КСМ_3.2	7.1	6.7	7.5	4.72 ± 0.29	5.41 ± 0.67	10.13	4.18 ± 0.26
КСМ_4.2	7.1	11	16.7	4.42 ± 0.19	3.64 ± 0.4	8.06	10.82 ± 0.27
КСМ_5.2	6.6	19.0	7.4	*НД	3.77 ± 0.96	*НД	25.13 ± 1.88

*НД – няма данни

4.2.3. Съдържание на влага в почвите

Количеството на влагата в почвата е определено, тъй като има отношение към физиологичното състояние на почвените микробни съобщества, разтворимостта на хранителните вещества и мобилността на ТМ. Количеството на почвената влага варира от 6.7% (КСМ_3.2) до 22.7% (КСМ_5.1), като с малко по-висока влажност е повърхностният почвен слой (средно 15.14±5.05%) в сравнение с подповърхностния (12.42±5.25%) (таблица 4).

4.2.4. Съдържание на общ органичен въглерод

Най-малко количество на общ органичен въглерод е установено в почва КСМ_3.1 (6.45%), а най-добре запасена е почва КСМ_4.2 (16.7%), както е представено в таблица 4. Няма значима разлика в средната стойност на запасеност на повърхностния (9.91±3.29 g/kg) и подповърхностния (10.92±3.82 g/kg) почвени слоеве с органичен въглерод (F=0.003; p=0.95).

4.2.5. Концентрация на неорганични соли

4.2.5.1. Минерален азот

Анализирани са количествата на разтворим неорганичен азот под формата на нитратни и амониеви йони.

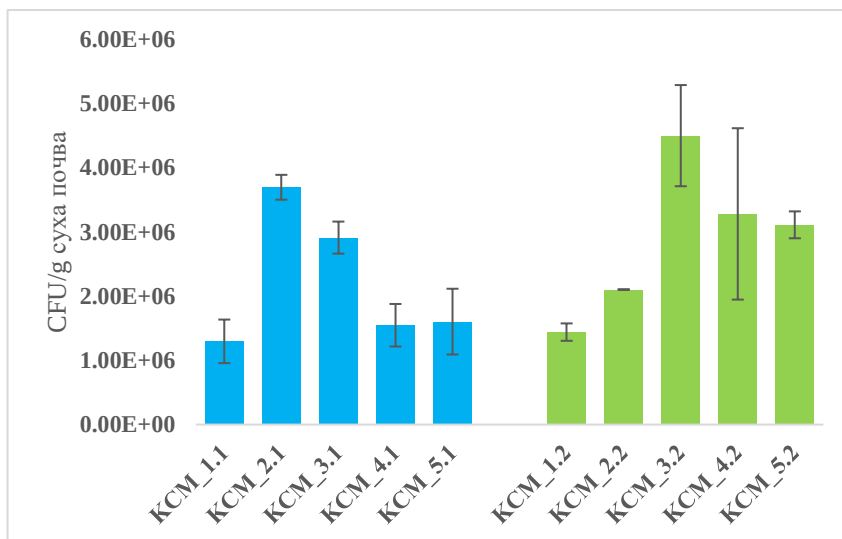
Общото съдържание на неорганичен достъпен азот е сравнително близко по стойност във всички почви, с изключение на КСМ_1, където е установено с около 4 - 5 пъти по-високо съдържание в сравнение с останалите почви (таблица 4). По-високи нива на минерален азот са установени и в почва КСМ_2.1. В някои от почвите (КСМ_1, КСМ_2.1 и КСМ_4.1) преобладава количеството на достъпния нитратен азот (от 69.51% до 86.76% от общия неорганичен азот), а в останалите почви съотношението между нитратната и амониева форма на достъпен минерален азот е около 50:50.

който показва броя на жизнеспособните бактерии в почвите и 2) молекулярно-генетичен метод – определени са броя копия на на 16S рРНК гена чрез количествен PCR (qPCR), който показва общото обилие от бактерии. И двата метода са важни за оценката на здравето и продуктивността на почвата, както и за влиянието на различни фактори на средата върху бактериалното обилие по градиента на замърсяване с ТМ.

4.3.1. Бактериално обилие изразено чрез колония образувачи единици (CFU)

На фигура 4 са представени резултатите от определянето на бактериалното обилие чрез CFU. Обилието на култивирани хетеротрофни бактерии в повърхностния слой се разпределя както следва: KCM_2.1 ($3.7 \pm 0.19 \times 10^6$ CFU/g почва), KCM_3.1 ($2.91 \pm 0.25 \times 10^6$ CFU/g почва), KCM_5.1 ($1.6 \pm 0.51 \times 10^6$ CFU/g почва), KCM_4.1 ($1.55 \pm 0.33 \times 10^6$ CFU/g почва) и KCM_1.1 ($1.3 \pm 0.34 \times 10^6$ CFU/g почва). В подповърхностния почвен слой най-високо обилие на култивирани хетеротрофни бактерии по градиента на замърсяване е установено в слабо замърсената почва KCM_3.2 ($4.5 \pm 0.79 \times 10^6$ CFU/g почва), следвана от KCM_4.2 ($3.28 \pm 1.33 \times 10^6$ CFU/g почва), KCM_5.2 ($3.11 \pm 0.21 \times 10^6$ CFU/g почва), KCM_2.2 ($2.1 \pm 0.00 \times 10^6$ CFU/g почва) и KCM_1.2 ($1.44 \pm 0.14 \times 10^6$ CFU/g почва).

Сравнявайки двата слоя на пробонабиране се установява, че подповърхностният почвен слой ($2.89 \pm 0.45 \times 10^6$ CFU/g почва) има по-високи стойности на култивирани хетеротрофни бактерии в сравнение с повърхностния почвен слой ($2.21 \pm 0.32 \times 10^6$ CFU/g почва). Бактериалното обилие рязко намалява в силно замърсените почви KCM_1.1 (с 41.4% по-ниско от средната стойност за повърхностния слой) и KCM_1.2 (с 50.2% по-ниско от средната стойност за подповърхностния слой).



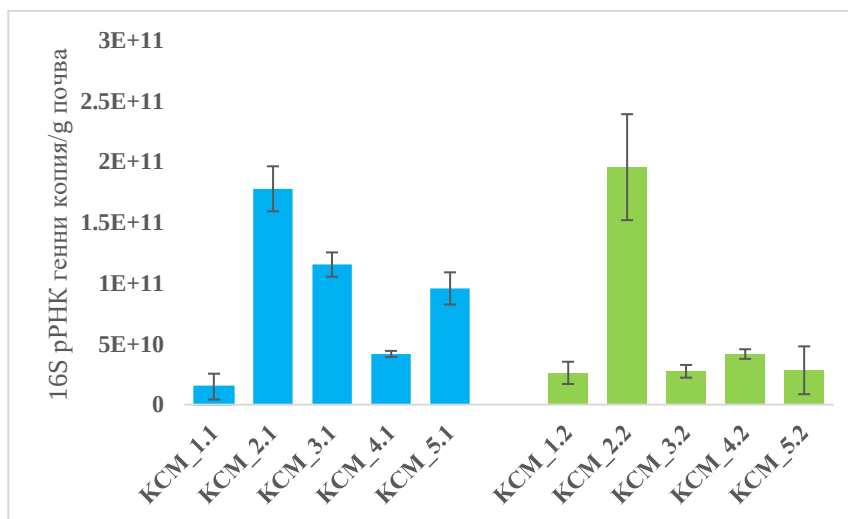
Фигура 4. Бактериално обилие на култивируемите хетеротрофни бактерии в повърхностния (в синьо) и в подповърхностния (в зелено) почвени слоеве

4.3.2. Бактериално обилие изразено чрез количествен PCR (qPCR)

На фигура 5 са представени резултатите от определянето на бактериалното обилие чрез количествен PCR (qPCR). В повърхностния почвен слой, най-високо обилие на копията на 16S рРНК гена е определено в силно замърсената почва KCM_2.1 ($1.78 \pm 0.18 \times 10^{11}$), следвана от KCM_3.1 ($1.15 \pm 0.10 \times 10^{11}$) и KCM_5.1 ($0.95 \pm 0.12 \times 10^{11}$). По-ниско е обилието в силно замърсените KCM_4.1 ($0.41 \pm 0.025 \times 10^{11}$) и KCM_1.1 ($0.14 \pm 0.11 \times 10^{11}$). В подповърхностния почвен слой, отново най-

високото обилие на копията на 16S рРНК гена е установено в силно замърсената почва КСМ_2.2 ($1.95 \pm 0.44 \times 10^{11}$). Останалите почви от подповърхностния почвен слой се характеризират с по-ниско обилие, както следва: КСМ_4.2 ($0.41 \pm 0.04 \times 10^{11}$), КСМ_5.2 ($0.28 \pm 0.2 \times 10^{11}$), КСМ_3.2 ($0.27 \pm 0.05 \times 10^{11}$), КСМ_1.2 ($0.26 \pm 0.09 \times 10^{11}$).

Сравнявайки двата почвени слоя, по-високо бактериално обилие се наблюдава в повърхностния слой (средна стойност $8.91 \pm 0.10 \times 10^{10}$ копия/г почва), от подповърхностният слой (средна стойност $6.38 \pm 0.14 \times 10^{10}$ копия/г почва), противоположно на резултатите, получени от култивационния метод. Бактериалното обилие намалява в силно замърсените почви КСМ_1.1 (с 83.34% спрямо останалите почви от повърхностния почвен слой) и КСМ_1.2 (с 58.92% спрямо останалите почви от подповърхностния почвен слой).



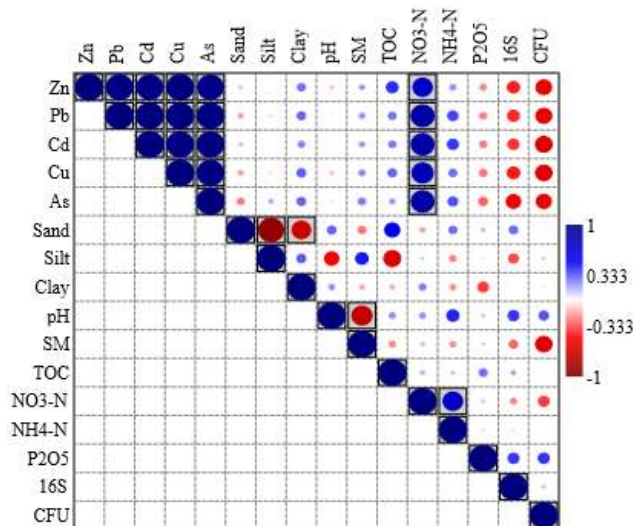
Фигура 5. Бактериално обилие на копията на 16S рРНК гена в повърхностния (в синьо) и в подповърхностния (в зелено) почвени слоеве

4.3.3. Корелационни зависимости между бактериалното обилие и абиотичните характеристики на почвите

За да се установи от кои абиотични характеристики на почвата зависи разпределението на бактериалното обилие (хетеротрофни бактерии и брой копия на 16S рРНК гена), е проведен корелационен линеен анализ по Pearson, и резултатите са представени на фигура 6.

Изчислените корелационните зависимости са статистически незначими ($p > 0.05$). Въпреки това, за повърхностния и подповърхностен почвен слой корелационният анализ показва умерена положителна корелация на бактериалното обилие (CFU и 16S рРНК генни копия) с почвеното рН (съответно, $r = 0.39$ и $r = 0.33$) и концентрацията на фосфатите (P_2O_5) (съответно, $r = 0.39$ и $r = 0.39$).

Сравнително силна отрицателна корелация е установена между бактериалното обилие (CFU и 16S рРНК генни копия) и концентрацията на ТМ в почвите (r варира от -0.40 до -0.60). Отрицателна корелация се наблюдава също и между бактериалното обилие по CFU с почвената влага (SM; $r = -0.60$) и NO_3-N ($r = -0.39$). 16S рРНК копията на гена корелират умерено отрицателно и с количеството на наносни частици в почвата ($r = -0.36$).



Фигура 6. Линеини корелационни зависимости на Pearson между бактериалното обилие (CFU и копия на 16S рРНК гена) и абиотичните характеристики на почвите. Големината на кръгчетата отразява силата на корелация, а включените в квадратчета корелационни зависимости са значими.

Забелязва се, че корелационните коефициенти са тенденциозно по-високи (макар и статистически незначими) между CFU и ТМ в сравнение с корелациите с копията на 16S рРНК гена, вероятно показвайки по-голям ефект на замърсяването върху присъствието на култивируемите (активните в момента на пробовземане) в сравнение с общия брой (култивируеми и некултивируеми видове) бактерии.

4.4. Таксономичен състав и структурата на бактериалните съобщества

Таксономичният състав и структурата на бактериалните съобщества са определени чрез два молекулярни метода: 1) конструиране на 16S рРНК генни клонови библиотеки и 2) таргетно ампликон секвениране на 16S рРНК гена.

4.4.1. Разнообразие и структура на бактериалните съобщества чрез конструиране на 16S рРНК генни клонови библиотеки

Конструирането на 16S рРНК генни клонови библиотеки е молекулярна техника, която определя доминантните представители в бактериалните съобщества и позволява идентифицирането им до ниво вид, поради клонирането на целия размер на 16S рибозомалния РНК ген (~1500 бд) във вектор *E. coli*. На базата на последващото секвениране на клонирания 16S рРНК ген и получените секвенции се определя филогенетичното родство на идентифицираните бактериалните видове като се използват референтни секвенции от общодостъпни бази данни (NCBI GeneBank).

4.4.2. Характеристики на 16S рРНК генните клонови библиотеки

Конструирани са девет 16S рРНК генни клонови библиотеки на почвените проби. За почвата KCM_3.2 липсва клонова библиотека, поради неуспешните опити за клониране на PCR продукта във вектора. Статистическите данни за наличните 16S рРНК генни клонови библиотеки

са обобщени в таблица 4.

Таблица 4. Статистически данни за 16S рПНК генните клонови библиотеки

Почва	Общ брой клонове	Брой OTU	RFLP/MspI	Секвенирани клонове
KCM_1.1	109	42	81	57
KCM_2.1	109	54	71	13
KCM_3.1	104	60	83	56
KCM_4.1	105	46	71	10
KCM_5.1	112	68	82	9
KCM_1.2	104	60	84	8
KCM_2.2	100	63	74	7
KCM_4.2	108	56	68	2
KCM_5.2	101	56	72	4
Общо	952	505	686	166

Клоновите библиотеки съдържат общо 952 клона, 686 от които са групирани визуално според рестрикционните им профили (RFLP) в общо 505 операционни таксономични единици (OTU). Броят на OTU варира от 42 (KCM_1.1) до 68 (KCM_5.1) за всяка клонова библиотека. Подбрани са общо 166 клона за секвениране, според техните рестрикционни профили. След Sanger секвениране и обработка на секвенциите, **166 достоверни 16S рДНК последователности** са аотирани в базата данни на GenBank с Accession No OQ422575-OQ422639; OQ422707-OQ422751; OQ422861-OQ422916.

Определено е таксономичното ниво на всяка секвенция, както следва:

- **Ниво вид:** 9.04% от всички секвенции показват хомология между 99 и 100% с най-близкия си роднина и са определени до вид (най-много установени секвенции до ниво вид са определени в почви KCM_3.1 и KCM_5.1).
- **Ниво род:** 19.28% от всички секвенции показват хомология между 97 и 98% с най-близкия си роднина и са определени до ниво род.
- **Ниво клас:** 47.59% от всички секвенции показват хомология между 90 и 96% с най-близкия си роднина и са определени до ниво клас.
- **Ниво отдел:** 24.10% от всички секвенции показват хомология < 90% с най-близкия си роднина и са определени до ниво отдел.

Бактериалното разнообразие в почвите показва наличието на нови некултивируеми бактериални видове – 24.10% от всички секвенции с хомология по-малко от 90% с референтни секвенции на 16S рПНК гена от база данни на NCBI.

4.4.3. Алфа-разнообразие на бактериалните съобщества в клоновите библиотеки

Данните от клоновите библиотеки са използвани за изчисляване на индексите на обилие (Chao1 и ACE) и алфа-разнообразие (Shannon) на почвените бактериални съобщества и резултатите са представени в таблица 5.

Според стойностите на индексите за обилие Chao1 и ACE, почвите KCM_4.2 (Chao1: 1414; ACE: 1138) и KCM_5.1 (Chao1: 1033; ACE: 742.4) се отличават с по-голямо богатство на бактериалните съобщества. Стойностите на индекса на Shannon варират много слабо между почвите: от 3.708 (KCM_1.1) до 4.494 (KCM_5.1). Силно замърсената почва KCM_1.1 се

характеризира с най-ниски стойности на трите индекса (Chao1: 77.67; ACE: 93.93, Shannon: 3.708), което показва по-ограничено и еднообразно бактериално съобщество.

Таблица 5 Стойности на индексите за обилие (Chao1, ACE) и алфа-разнообразие (Shannon) в изследваните почви.

Почва	Chao1	ACE	Shannon
KCM_1.1	78	94	3.708
KCM_2.1	258	288	4.207
KCM_3.1	162	203	4.301
KCM_4.1	119	201	3.897
KCM_5.1	1033	742	4.494
KCM_1.2	766	504	4.237
KCM_2.2	470	715	4.466
KCM_4.2	1414	1138	4.186
KCM_5.2	334	262	4.314

4.4.4. Таксономично разнообразие на бактериалните съобщества на ниво отдел и клас

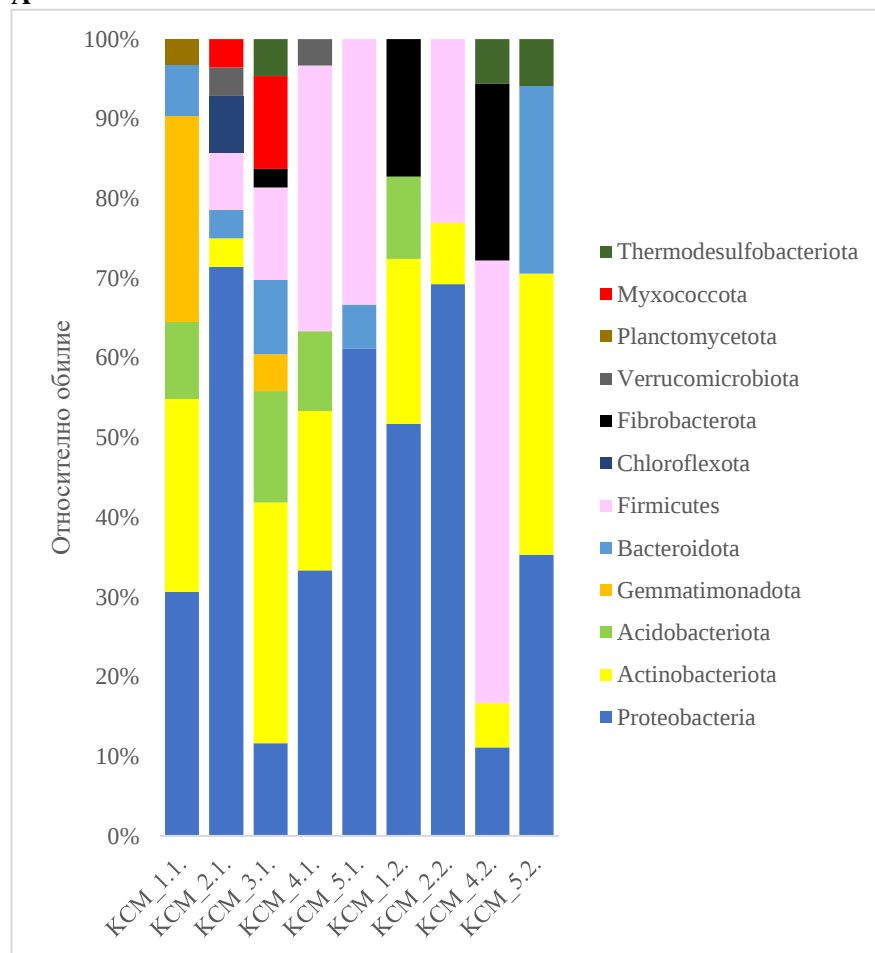
Бактериалното разнообразие на съобщества е представено от 12 отдела в повърхностния и 7 отдела в подповърхностния почвени слоеве (фигура 7А). Във всички изследвани почви, доминантен отдел е Proteobacteria (30.65% - 71.43% от обилието), освен в KCM_3.1 (11.63%) и KCM_4.2 (11.11%), където доминират са Actinobacteriota (KCM_3.1: 30.23%) и Firmicutes (KCM_4.2: 55.56%). Gemmatimonadota (KCM_1.1: 25.81%), Bacteroidota (KCM_5.2: 23.53%) и Fibrobacterota (KCM_4.2: 22.22%) са субдоминантни в съответните почви.

Proteobacteria (11.11 - 71.43%), Actinobacteriota (до 35.29%), Acidobacteriota (до 13.95%), Bacteroidota (до 23.53%), Firmicutes (до 55.56%), Fibrobacterota (до 22.22%) и Thermodesulfobacteriota (до 5.88%) са разпределени и в двата почвени слоя. Отделите Gemmatimonadota, Chloroflexota, Verrucomicrobiota, Planctomycetota и Muxococcota присъстват единствено в повърхностния почвен слой на KCM_2.1, KCM_3.1, KCM_4.1. Останалите отдели са разпределени неравномерно във всички почви, като Chloroflexota и Planctomycetota са открити само в KCM_2.1 (7.14%) и KCM_1.1 (3.23%).

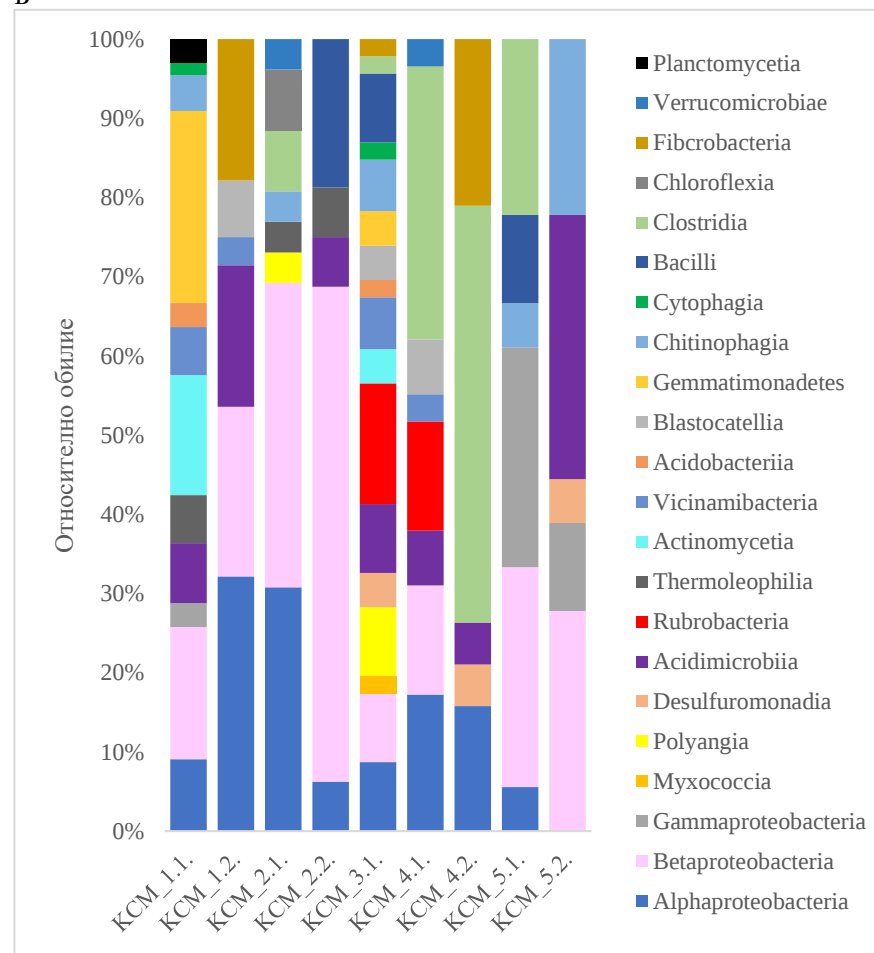
На ниво клас разнообразието на бактериите е представено от 24 класа в повърхностния и 12 класа в подповърхностния почвен слой (фигура 7Б). Доминантен клас във всички почви е Alphaproteobacteria (освен в KCM_5.2), следван от Betaproteobacteria (освен в KCM_4.2). Alphaproteobacteria доминира в бактериалните съобщества от 5.56% (KCM_5.1) до 32.14% (KCM_1.2). Betaproteobacteria доминира в бактериалните съобщества от 8.70% (KCM_3.1) до 62.50% (KCM_2.2). Gammaproteobacteria (27.78%), Betaproteobacteria (27.78%) и Clostridia (34.48%) доминират в KCM_5.1. Clostridia преобладава в силно замърсените почви KCM_4.1 (34.48%) и KCM_4.2 (52.63%).

Класове Acidimicrobiia (KCM_5.2 и KCM_1.2), Rubrobacteria (KCM_3.1 и KCM_4.1), Gemmatimonadetes (KCM_1.1), Chitinophagia (KCM_5.2), Bacilli (KCM_2.2), Chloroflexia (KCM_2.1) и Fibrobacteria (KCM_1.2 и KCM_4.2) показват преференция само към посочените почви (от 13.79% до 24.24% от относителното обилие на бактериалните съобщества). Основните класове открити единствено в силно замърсената почва KCM_1.1 са Gemmatimonadetes и Planctomycetia.

А



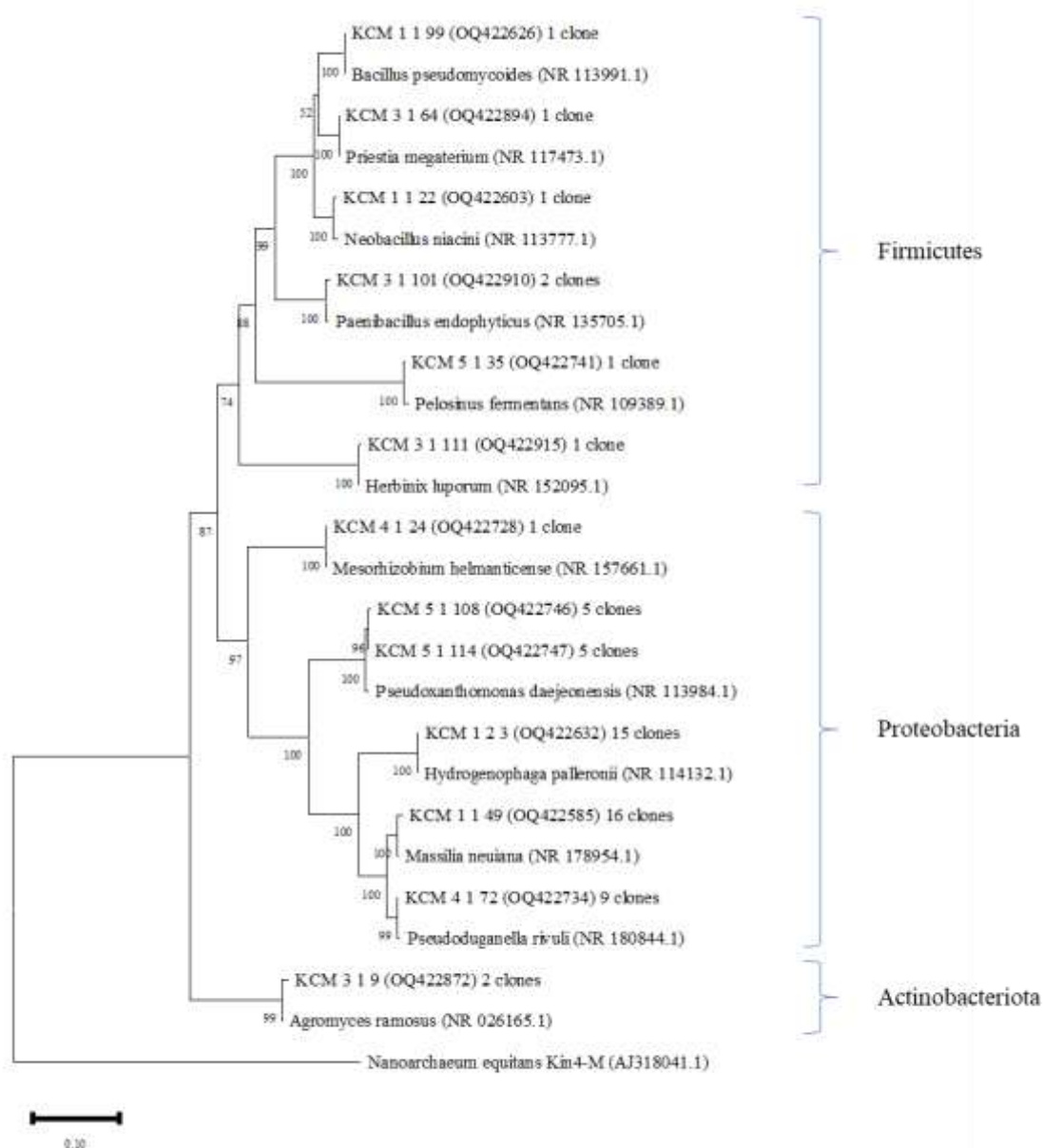
Б



Фигура 7. Относително обилие на таксономичните отдели (А) и класове (Б) на бактериалните съобщества в почвите, на базата на секвенираните 16S рДНК последователности.

4.4.5. Филогенетично разнообразие на бактериалните съобщества на ниво вид

Филогенетичното разнообразие в почвите е представено само на базата на 16S рДНК секвенции, които показват хомология $\geq 99\%$ с най-близкия си роднина, според NCBI и са определени до вид (фигура 8).



Фигура 8. Филогенетично дърво по метода на най-близкия съсед (neighbor-joining method) на базата на 16S рДНК секвенциите с хомология $\geq 99\%$, с еволюционно разстояние между видовете 0.10. Дървото е с общ корен, като извън него е изнесена 16S рДНК секвенцията на *Nanoarchaeum equitans* щам Kin4-M (AJ318041.1)

Идентифицираните бактериални видове са 13. Те принадлежат към три основни отдела: Proteobacteria (6 секвенции), Actinobacteriota (6 секвенции) и Firmicutes (1 секвенция).

Секвенция KCM_1_1_49 (OQ422585) е най-разпространена, с 16 клона в повърхностните почви. Тя има 99.17% сходство с *Massilia neuiana*, strain PTW21 (NR_178954.1).

Секвенция KCM_1_2_3 (OQ422632) е представена от 15 клона, идентифицирани в подповърхностните почви KCM_1.2, KCM_2.2 и KCM_5.2. Тя показва 99.59% сходство с *Hydrogenophaga palleronii*, strain NBRC 102513 (NR_114132.1).

Секвенция KCM_4_1_72 (OQ422734) е представена от 9 клона, разпределени в повърхностните слоеве на силно (KCM_4.1) и умерено (KCM_5.1) замърсените почви. Тя има 99.52% хомология с *Pseudoduganella rivuli*, strain FT92W (NR_180844.1).

Секвенции KCM_5_1_108 (OQ422743) и KCM_5_1_114 (OQ422746) имат по 5 клона всяка и присъстват в повърхностния слой на KCM_5. Те показват хомология от 99.25% и 99.11%, съответно, с *Pseudoxanthomonas daejeonensis*, strain NBRC 101159 (NR_113984.1) от 99.25% и 99.11%, съответно.

Секвенция KCM_3_1_9 (OQ422872) е представена от 2 клона, идентифицирани в слабо замърсената почва KCM_3.1, и има 99.03% сходство с *Agromyces ramosus*, strain DMS 43045 (NR_026165.1).

Останалите идентифицирани последователности на 16S рДНК са представени от 1 до 2 клона, и принадлежат предимно към видове от отдел Firmicutes (хомология: 99.18% - 100%).

4.5. Разнообразие и структура на бактериалните съобщества чрез таргетно ампликон секвениране на 16S рРНК гена

Таргетното ампликон секвениране на 16S рРНК гена се базира на амплификация на малък фрагмент/и от хипервариабилните региони на 16S рРНК гена, в нашия случай това е региона V3-V4 (~385 bp), и последващо секвениране на Illumina MiSeq платформа.

4.5.1. Алфа-разнообразие на бактериалните съобщества от таргетното ампликон секвениране на 16S рРНК гена

Получени са 181136 - 196090 двустранно секвенирани (paired-end) последователности на хипервариабилния регион V3-V4 на 16S рРНК гена за 10те почви, които са групирани в OTUs от 324 (KCM_3.2) до 557 (KCM_1.2). На базата на тези данни са изчислени индексите за алфа-разнообразие (Shannon и Simpson). Резултатите са представени в таблица 6.

Най-голям брой OTUs и разнообразие на бактериалните съобщества е установено в най-замърсените почви KCM_1.1 и KCM_1.2. Слабо замърсената почва KCM_3.2 показва най-ниските стойности на OTUs (324) и Shannon (7.916).

Таблица 6. Характеристики и индекси на алфа-разнообразието на повърхностни и подповърхностни почви от таргетното ампликон секвениране на 16S рРНК гена.

Почва	Секвенции		Индекси на разнообразие	
	Ридове	Общо OTUs	Shannon	Simpson
KCM_1.1	165732	520	8.591	0.996
KCM_2.1	168680	466	8.417	0.996
KCM_3.1	180510	507	8.518	0.996

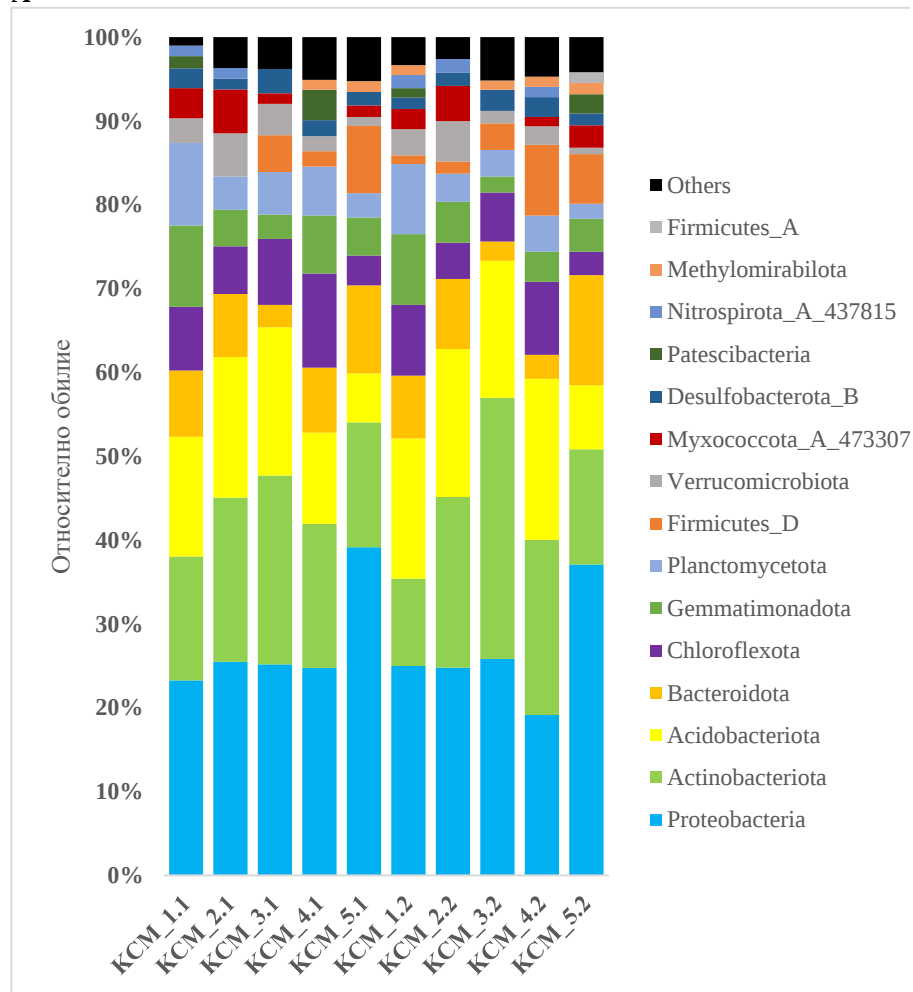
KCM_4.1	174644	531	8.468	0.996
KCM_5.1	165606	436	8.203	0.995
KCM_1.2	181136	557	8.625	0.996
KCM_2.2	151890	376	7.958	0.994
KCM_3.2	175612	324	7.916	0.998
KCM_4.2	196090	471	8.333	0.996

4.5.2. Таксономичен състав на бактериалните съобщества на ниво отдел и клас чрез таргетно ампликон секвениране на 16S рРНК гена

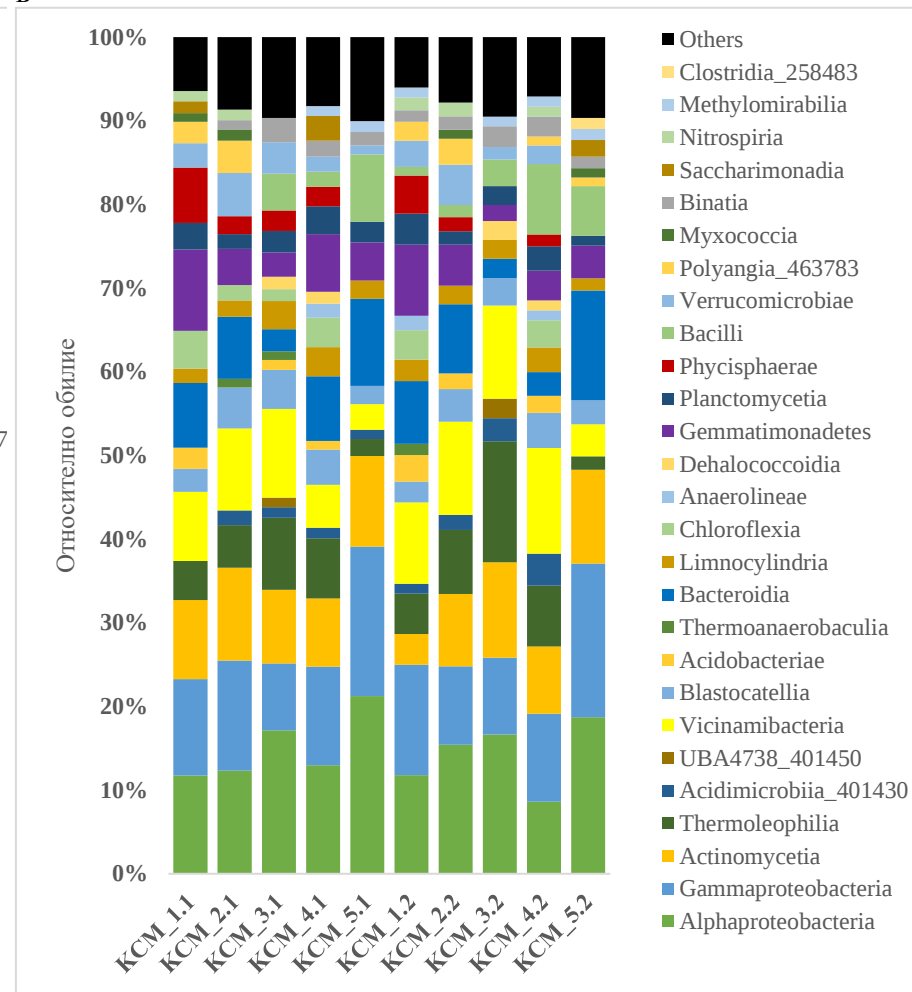
Относителното таксономичното обилие на бактериалните съобщества е представено от общо 15 отдела (фигура 9А). Доминантен отдел е Proteobacteria (19.13 - 39.13%), следван от Actinobacteriota (10.41 - 31.15%) и Acidobacteriota (5.84 - 19.23%). Субдоминантните отделы във всички почви са Bacteroidota (2.29 - 13.14%), Chloroflexota (2.78 - 11.2%) и Gemmatimonadota (1.91 - 9.71%). Gemmatimonadota и Planctomycetota присъстват в силно замърсените почви KCM_1.1 (9.71% и 9.84%) и KCM_1.2 (8.47% и 8.36%). В средно замърсените почви KCM_5.1 и KCM_5.2 се наблюдава значително увеличение на процентното разпределение на отделите Proteobacteria (37.07 - 39.13%) и Bacteroidota (10.51 - 13.14%), докато Acidobacteriota намалява обратно пропорционално на дълбочината (5.84 - 7.63%). Chloroflexota е най-добре представен в KCM_4.1 и KCM_1.2 (11.2% и 8.42%, съответно), докато Verrucomicrobiota има най-висок процент присъствие в KCM_2.1 и KCM_4.2 (съответно, 5.16% и 4.83%).

Таксономичното разнообразие на бактериалните съобщества е представено от общо 27 класа (фигура 9Б). Най-широко разпространен доминантен клас във всички почви е Alphaproteobacteria (8.62 - 21.23%), следван от Gammaproteobacteria (8.01 - 18.37%) и Actinobacteriota (3.68 - 11.53%). Субдоминантните класове в структурата на съобществата са Thermoleophilia (1.63 - 14.48%), Vicinamibacteria (3.06 - 12.64%) и Bacteroidia (2.29 - 13.11%). Класовете Gemmatimonadetes (8.47 - 9.71%) и Planctomycetia (3.19 - 3.71%) са открити в силно замърсените почви KCM_1.1 и KCM_2.1. В средно замърсените почви KCM_5.1 и KCM_5.2 е установено по-високо съдържание на Alphaproteobacteria (18.7 - 21.23%), Gammaproteobacteria (17.89 - 18.37%), както и на класовете Bacilli (5.94 - 8.03%) и Bacteroidia (10.42 - 13.11%). Vicinamibacteria (10.6 - 11.1%) и Thermoleophilia (8.62 - 14.48%) са застъпени в слабо замърсените почви.

А



Б

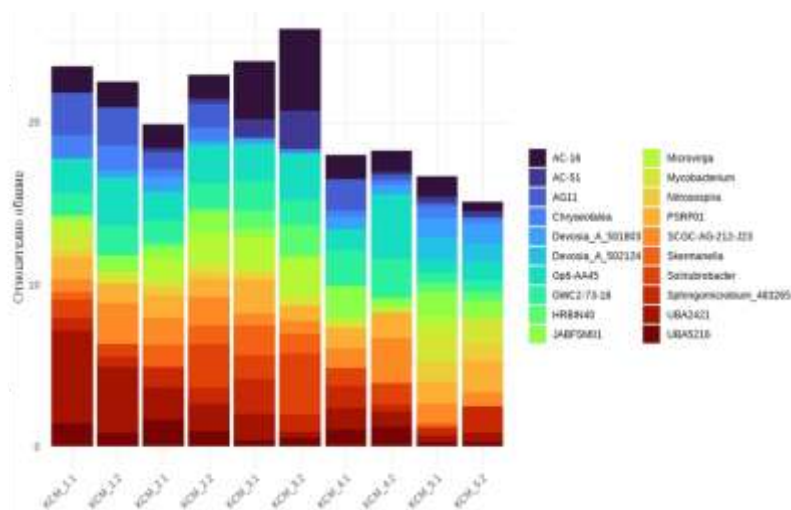


Фигура 9. Относително обилие на таксономичните отдели (А) и класове (Б) на бактериалните съобщества в почвите. „Others“ представляват неклаифицираните таксони и относителното обилие <1%

4.5.3. Таксономичен състав на бактериалните съобщества на ниво род чрез таргетно ампликон секвениране на 16S рРНК гена

Бактериалното обилие на ниво род е представено от 43 рода, принадлежащи към различни класове и отдели. Поради високия дял на неидентифицирани родове (61.44–74.32%), анализът е съсредоточен върху 20 основни бактериални рода, показани на фигура 10.

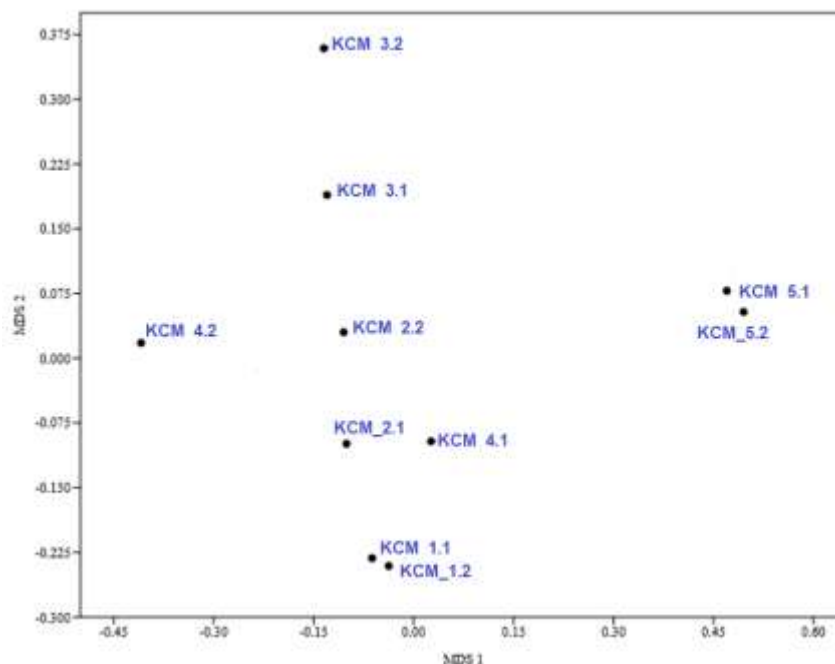
Родовете *Gp6-AA45* и *PSRF01* (>1%) са установени във всички почви по градиента на замърсяване. В най-силно замърсената почва (KCM_1) са идентифицирани родовете *UBA2421* (*Phycisphaerae*, *Planctomycetota*), *AG11* (*Gemmatimonadetes*, *Gemmatimonadota*) и *Sulfotelmato bacter* (*Acidobacteriae*, *Acidobacteriota*). Родът *Aquicella_A* (*Gammaproteobacteria*, *Proteobacteria*) е установен само в силно замърсената почва KCM_4 (NPI = 27.88). В умерено замърсената почва (KCM_5) се срещат *JAABRT01* (*Gemmatimonadetes*, *Gemmatimonadota*), *Mycobacterium* (*Actinomycetia*, *Actinobacteriota*), *Devosia_A_501803*, *Devosia_A_502124* (*Alphaproteobacteria*, *Proteobacteria*) и *Nitrosospira* (*Gammaproteobacteria*, *Proteobacteria*). За слабо замърсената почва KCM_3 са характерни родовете *AC-16* (*Thermoleophilia*, *Actinobacteriota*), *Solirubrobacter* (*Gemmatimonadetes*, *Gemmatimonadota*), *Sphingomicrobium_483265*, *HRBIN40* (*Alphaproteobacteria*, *Proteobacteria*) и *AC-51* (*UBA4738_401450*, *Actinobacteriota*).



Фигура 10. Таксономичен състав на бактериалните съобщества на ниво род. Представени са 20-те най-разпространени бактериални рода

4.5.4. Корелационни зависимости между бактериалното таксономичното разнообразие на ниво клас и тежките метали

За да се визуализира сходството на бактериалните съобщества по относителното обилие на бактериалните класове в тях, е проведен многомерен ординационен анализ (Multidimensional scaling; MDS) (фигура 11).



Фигура 11. MDS плот на таксономичното сходство на почвените бактериални съобщества на ниво клас по евклидов индекс за подобие. Стрес – 0.079.

Високо таксономично сходство се установява между почви KCM_2 и KCM_4, които се характеризират с ниво на замърсяване от NPI=7.99 (KCM_2.1) до NPI=33.99 (KCM_4.1). Останалите почви формират самостоятелни групи, които са отдалечени по сходство както от групата на предходно споменатите почви, така и помежду си.

За да се провери кой от двата основни изследвани фактори (ниво на замърсяване и почвена дълбочина) има отношение към разпределението на класовете в почвите, е проведен Пермутационен многовариационен анализ на варианса (two-way PERMANOVA) (таблица 7).

Таблица 7. Резултати от two-way PERMANOVA за влиянието на нивото на замърсяване с тежки метали и почвената дълбочина върху разпространението на бактериалните класове.

Фактор на вариация	Сума от квадратите	Степен на свобода	Среден квадрат	F	p
NPI	2269.87	4	567.47	1796.1	0.0001
дълбочина	121.91	1	121.91	385.87	0.0001
Взаимодействие между NPI и почвената дълбочина	426.033	4	106.51	337.12	0.0001
Остатъци	6.31876	20	0.31594		
Общо	2824.1	29			

PERMANOVA доказва значимото влияние на замърсяването ($F=1796$; $p=0.0001$), както и на почвената дълбочина ($F=356$; $p=0.0001$) върху разпределението на бактериалните класове в почвата. Значимо влияние оказва и взаимодействието между тези два фактора ($F=337$; $p=0.0001$).

За да се определи кои са най-съществените класове с принос във вариацията на бактериалните класове, е направен SIMPER (процент на сходство) анализ и резултатите са представени в таблица 8.

Таблица 8. Резултати от SIMPER анализа за принос на таксономичните класове към общото несходство (29.05%) на почвените бактериални съобщества

Клас	Средно несходство	Индивидуален принос (%)	Кумулативен принос (%)
Alphaproteobacteria	2.64	9.09	9.09
Thermoleophilia	2.42	8.32	17.41
Gammaproteobacteria	2.37	8.15	25.56
Bacteroidia	2.34	8.05	33.61
Vicinamibacteria	2.23	7.67	41.28
Bacilli	2.02	6.97	48.24
Gemmatimonadetes	1.66	5.71	53.95
Actinomycetia	1.41	4.83	58.79
Phycisphaerae	1.37	4.72	63.50
Chloroflexia	1.21	4.15	67.66
Verrucomicrobiae	1.15	3.97	71.62
Polyangia_463783	0.99	3.42	75.04
Acidobacteriae	0.78	2.68	77.73
Acidimicrobiia_401430	0.72	2.46	80.19
Blastocatellia	0.65	2.25	82.44
Planctomycetia	0.56	1.94	84.38
Saccharimonadia	0.56	1.92	86.30
Dehalococcoidia	0.55	1.89	88.19
Binatia	0.54	1.85	90.04
Nitrospira	0.47	1.63	91.66
Limnocyndria	0.45	1.54	93.21
Anaerolineae	0.42	1.46	94.66
Methylomirabilia	0.39	1.34	96.01
UBA4738_401450	0.39	1.33	97.33
Myxococcia	0.35	1.20	98.53
Thermoanaerobaculia	0.29	0.98	99.51
Clostridia_258483	0.14	0.49	100.00

Няколко са класовете със значима роля в определянето на несходството между почвените бактериални съобщества – Alphaproteobacteria, Thermoleophilia, Gammaproteobacteria, Bacteroidia, Vicinamibacteria и Bacilli. Тези класове определят около 53% от общото несходство на бактериалните съобщества.

Вариабилността в таксономичния състав е функция както на нивото на замърсяване, така и на почвената дълбочина, а вероятно и на други фактори на средата. По тази причина е проведен корелационен анализ по Pearson, за да се установи кои класове са чувствителни към нивото на замърсяване с ТМ и към почвената дълбочина.

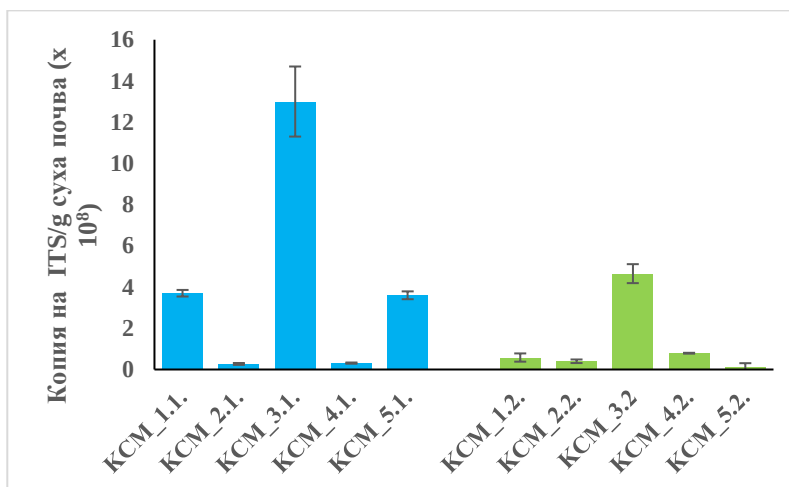
Значима корелационна зависимост съществува между NPI и Alphaproteobacteria ($r=-0.56$; $p=0.0005$), UBA4738_401450 ($r=-0.34$; $p=0.041$), Acidobacteriae ($r=0.63$; $p=0.0002$), Chloroflexia ($r=0.85$; $p<0.001$), Gemmatimonadetes ($r=0.84$; $p<0.0001$), Planctomycetia ($r=0.61$; $p=0.0004$), Phycisphaerae ($r=0.83$; $p<0.0001$), Binatia ($r=-0.58$; $p=0.022$), Bacilli ($r=-0.36$; $p=0.048$), Saccharimonadia ($r=0.45$; $p=0.013$) и Nitrospira ($r=0.39$; $p=0.033$). Повечето от тези корелации са положителни, което свързваме с устойчивостта на представителите на класовете с наличното дълготрайно замърсяване

от ТМ. Други корелации са отрицателни и демонстрират негативният ефект на замърсяването върху присъствието на съответните бактериални класове. Отново съобразно резултатите от корелационния анализ по Pearson, е установено че почвената дълбочина е с по-малка значимост за разпределението на бактериалните класове. Значими корелации са установени между почвената дълбочина и класове Acidimicrobiia_401430 ($r=0.38$; $p=0.04$), Vicinamibacteria ($r=0.36$; $p=0.047$) и Methylomirabilia ($r=0.40$; $p=0.03$). Всички корелационни коефициенти са положителни, което предполага предпочитания на представителите на тези класове към местообитания с по-ниско съдържание на кислород.

4.6. Таксономичен състав и структурата на гъбните съобщества

4.6.1. Обилие на гъбните съобщества

Определянето на гъбното обилие чрез броя на копията на ITS региона на рибозомалния РНК ген при извършен количествен PCR (qPCR) показва разпределението на представителите на гъбните съобщества в почвите съобразно нивото на замърсяване с ТМ и почвената дълбочина (фигура 12).



Фигура 12. Обилие на гъбните съобщества в почвите изразено чрез броя на копията на ITS региона на рРНК гена (за g суха почва).

В почвите от повърхностния почвен слой, най-високото обилие на ITS региона на рРНК гена е наблюдавано в слабо замърсената почва KCM_3.1 ($12.6 \pm 1.69 \times 10^8$), следвана от KCM_1.1 ($3.73 \pm 0.16 \times 10^8$) и KCM_5.1 ($3.55 \pm 0.19 \times 10^8$). По-малък брой копия на ITS региона са отчетени в силно замърсените почви KCM_4.1 ($0.31 \pm 0.03 \times 10^8$) и KCM_2.1 ($0.26 \pm 0.04 \times 10^8$).

В почвите от подповърхностния почвен слой, най-високо обилие на ITS региона на рРНК гена се наблюдава отново в слабо замърсената почва KCM_3.2 ($4.65 \pm 0.46 \times 10^8$), следвана от KCM_5.2 ($1.36 \pm 0.17 \times 10^8$). По-ниски стойности са отчетени в силно замърсените KCM_4.2 ($0.78 \pm 0.02 \times 10^8$), KCM_2.2 ($0.39 \pm 0.09 \times 10^8$) и KCM_1.2 ($0.58 \pm 0.19 \times 10^8$).

Забелязва се значително по-висока концентрация на копията на ITS региона в повърхностния слой (средно $4.09 \pm 0.42 \times 10^8$) спрямо подповърхностния слой (средно $1.56 \pm 0.22 \times 10^8$), което показва по-голямо обилие с 162.18%. В почвите KCM_1, KCM_3, KCM_5, стойността на копията на ITS региона е по-висока в повърхностния почвен слой, докато в KCM_2 и KCM_4 се наблюдава обратна

тенденция, с по-висока концентрация на ITS региона в подповърхностния почвен слой. Разпространението на копията на ITS региона в дълбочина на почвената покривка е статистически достоверно ($F=6.76$; $p=0.015$).

Слабо замърсените почви от KCM_3 се различават значимо по копията на ITS региона спрямо всички останали почви ($F>6.79$; $p<0.0005$). Между останалите почви не е установена статистически значима разлика в броя на копията на ITS региона.

4.6.2. Таксономичен състав и структурата на гъбните съобщества

Таргетното ампликон секвениране на ITS региона амплифицира специфичен регион от ITS, който е част от rРНК гена, с последващо високопроизводително секвениране.

4.6.2.1. Алфа-разнообразие на гъбните съобщества от таргетното ампликон секвениране на ITS региона

Получени са 2889 - 11045 двустранно секвенирани (paired-end) последователности на ITS региона за 10те почви, които са групирани в OTUs, с численост от 44 (KCM_1.1) до 118 (KCM_4.1). На базата на тези данни са изчислени индексите за алфа-разнообразие (Shannon и Simpson). Резултатите са представени в таблица 10.

Най-голям брой OTUs са установени в замърсените почви KCM_2.1 (117), KCM_4.1 (118) и KCM_4.2 (107). Високо гъбното разнообразие, изразено чрез индексите Shannon и Simpson се наблюдават отново в KCM_2.1 (съответно, 5.991 и 0.975). Средно замърсената почва от повърхностния почвен слой KCM_5.1 показва най-ниските стойности на OTUs (32) и Shannon (3.702). Най-ниски стойности на Simpson са наблюдавани в силно замърсената почва KCM_1.1 (0.867) (таблица 9).

Таблица 9 Характеристики и индекси на алфа-разнообразието гъбните съобщества от повърхностни и подповърхностни почви от таргетното ампликон секвениране на ITS региона.

Почва	Секвенции		Индекси на разнообразие	
	Ридове	Общо OTUs	Shannon	Simpson
KCM_1.1	5203	44	3.757	0.867
KCM_2.1	7037	117	5.991	0.975
KCM_3.1	5121	97	5.714	0.972
KCM_4.1	11045	118	4.836	0.909
KCM_5.1	2588	32	3.702	0.880
KCM_1.2	6189	60	4.072	0.863
KCM_2.2	2889	60	4.944	0.949
KCM_3.2	3594	50	4.637	0.941
KCM_4.2	6178	107	5.419	0.964
KCM_5.2	4066	47	4.274	0.908

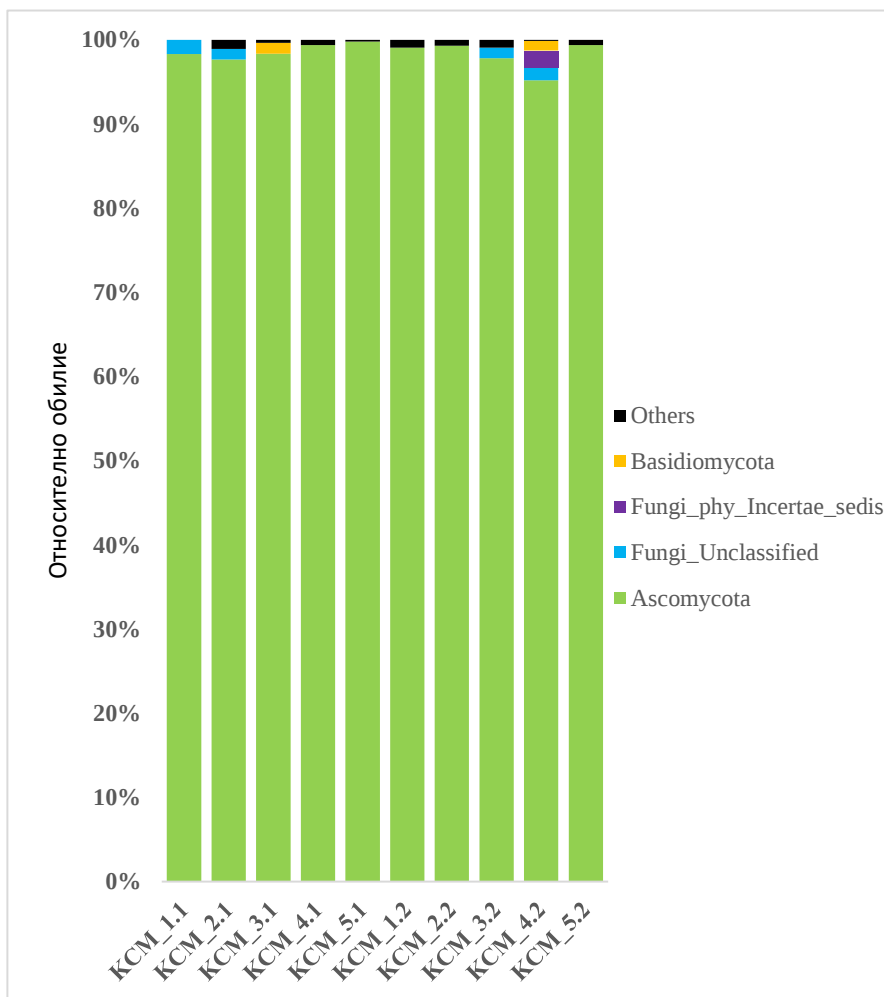
4.6.2.2. Таксономичен състав и структурата на гъбните съобщества на ниво отдел

Таксономичният състав на гъбните съобщества е представен от 4 отдела (фигура 13А). Доминантен отдел в почвите от повърхностния и подповърхностен почвени слоеве е Ascomycota с 95.2 - 99.79% от общото обилие. Следван е от отдел Fungi_Unclassified (1.22 - 1.70%), който присъства в силно замърсените почви КСМ_1.1 (1.7%), КСМ_2.1 (1.26%), и КСМ_4.2 (1.52%), както и в слабо замърсената почва КСМ_3.2 (1.22%) в относително ниско обилие. Basidiomycota се установява само в КСМ_3.1 (1.29%) и КСМ_4.2 (1.14%) и то в ниско обилие.

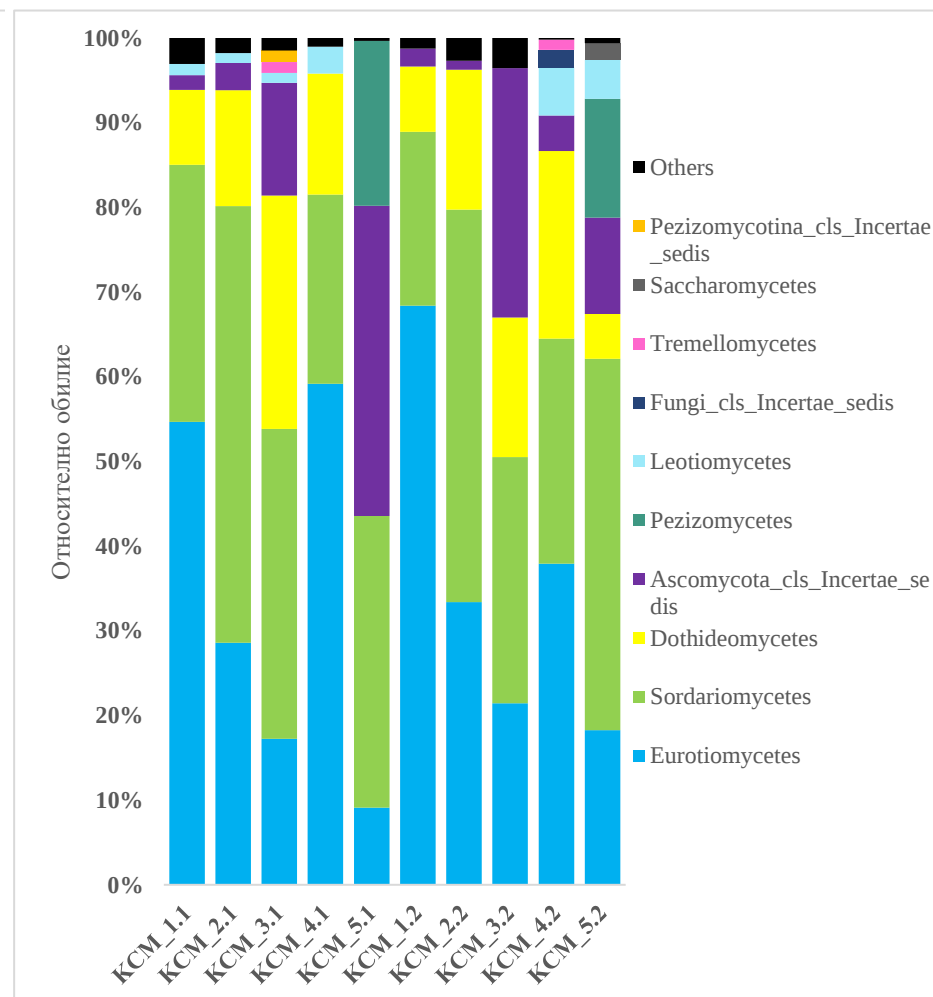
4.6.2.3. Таксономичен състав и структурата на гъбните съобщества на ниво клас

На ниво клас в гъбните съобщества в изследваните почви са идентифицирани 10 различни класа (фигура 13Б). Три от тях – Sordariomycetes (средно 34.49% от общото обилие), Eurotiomycetes (средно 34.02%) и Dothideomycetes (средно 13.17%) – са с почти повсеместно разпространение, като Sordariomycetes и Eurotiomycetes могат да се тълкуват като доминанти в гъбните съобщества, а останалите класове като субдоминантни.

А



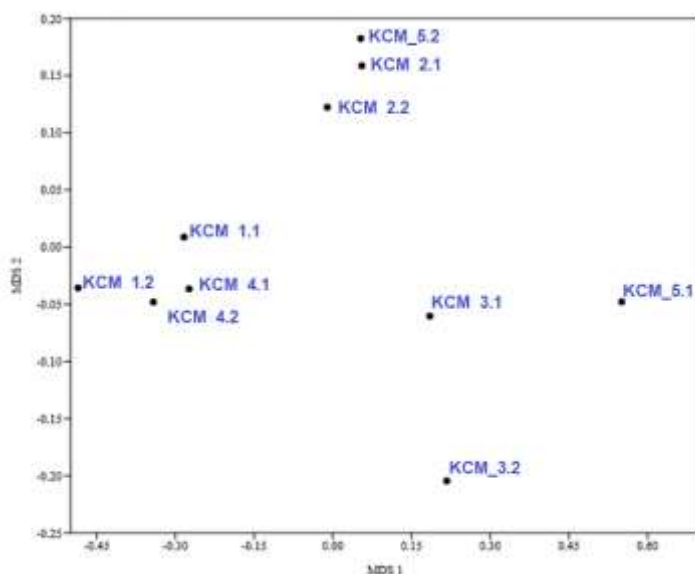
Б



Фигура 13. Относително обилие на гъбните съобщества на ниво отдел (А) и на ниво клас (Б) в почвите. „Others“ представляват неклаифицираните таксони с относителното обилие <1%

Извършен е многофункционален ординационен анализ за установяване на сходството на гъбните съобщества съобразно разпределението на класовете в тях (фигура 14).

Ординацията по таксономичния състав на гъбните съобщества формира две основни групи. Първата група обхваща KCM_1 и KCM_4 (силно замърсени; $NPI > 21.76$), а втората група се състои от почви KCM_2.1, KCM_2.2 (силно замърсени, но с $NPI < 9.27$) и KCM_5.2 (средно замърсена с $NPI = 2.5$). Останалите почви (KCM_3.1, KCM_3.2 и KCM_5.1) не формират компактна група, въпреки че всички те са локализирани в четвърти квадрант на ординационния плот, което предполага сравнително близко сходство. За да се провери влиянието на нивото на замърсяване и почвената дълбочина върху таксономичното разпределение (сходство) на гъбните съобщества е проведен two-way PERMANOVA (таблица 10).



Фигура 14. MDS плот на таксономичното сходство на почвените гъбни съобщества на ниво клас по евклидов индекс за подобие. Стрес : 0.077.

Таблица 10. Резултати от two-way PERMANOVA за влиянието на нивото на замърсяване с тежки метали и почвената дълбочина върху разпространението на гъбните класове.

Фактор на вариация	Сума от квадратите	Степен на свобода	Среден квадрат	F	p
NPI	17790.3	4	4447.6	3323.7	0.0001
дълбочина	85.6214	1	85.621	63.984	0.0001
Взаимодействие между NPI и почвената дълбочина	3264.6	4	816.15	609.9	0.0001
Остатъци	26.7632	20	1.3382		
Общо	21167	29			

Както при бактериалните, така и при гъбните съобщества значими за разпределението на гъбните класове са както нивото на замърсяване, така и почвената дълбочина. Значимо е и взаимодействието между тях. За разлика от бактериите, с по-голяма значимост е взаимодействието

между замърсяване и дълбочина ($F=609$; $p=0.0001$), отколкото дълбочината ($F=63.98$; $p=0.0001$) като индивидуален параметър. Не са установени значими корелации между дълбочината на почвата и класовете гъби, което е в съгласие с резултатите от PERMANOVA за малката сила на въздействие на почвената дълбочина върху гъбното разпределение.

За да се установят най-силно допринасящите класове за междугруповите разлики в общото несъответствие между гъбните съобщества е проведен SIMPER анализ (таблица 12).

Таблица 11. Резултати от SIMPER анализа за приноса на таксономичните класове към общото несходство (37.18%) на почвените гъбни съобщества

Източник на вариация	Средно несходство	Индивидуален принос (%)	Кумулативен принос (%)
Eurotiomycetes	12.64	34	34
Ascomycota_cls_Incertae_sedis	7.243	19.48	53.48
Sordariomycetes	6.837	18.39	71.87
Dothideomycetes	5.145	13.84	85.71
Pezizomycetes	3.392	9.124	94.84
Leotiomycetes	1.154	3.104	97.94
Tremellomycetes	0.2193	0.5899	98.53
Fungi_cls_Incertae_sedis	0.2058	0.5535	99.08
Saccharomycetes	0.2012	0.5411	99.63
Pezizomycotina_cls_Incertae_sedis	0.1393	0.3748	100

С най-голям дял (34%) в общото несходство на гъбните съобщества е вариационността в обилието на клас Eurotiomycetes. Този клас корелира значимо и положително с нивото на замърсяване.

4.6.2.4. Таксономичен състав и структурата на гъбните съобщества на ниво род

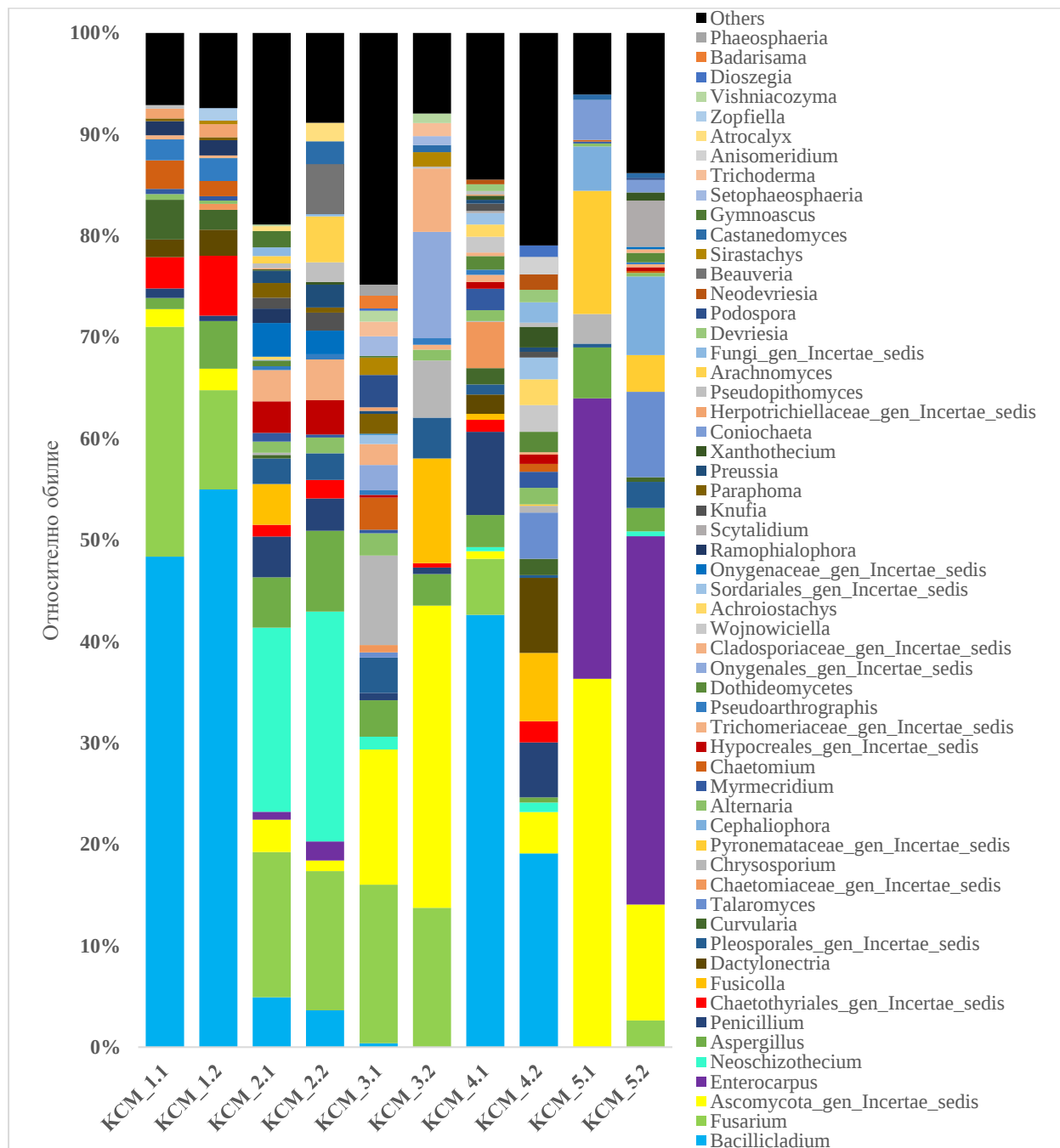
Таксономичното профилиране на гъбните съобщества на ниво род е изключително богато, тъй като са установени 57 различни рода (фигура 15). Най-голямото разнообразие се наблюдава в подповърхностния слой на силно замърсените почви КСМ_2.2 и КСМ_4.2 (по 20 рода), а най-ниско – в повърхностния и подповърхностния слой на средно замърсената почва КСМ_5 (7 рода за КСМ_5.1. и 10 рода за КСМ_5.2).

Един от доминантните родове в силно замърсени с ТМ почви е *Bacillicladium*. Неговото относително обилие е най-високо в КСМ_1.1 (48.37%), КСМ_1.2 (55%), КСМ_4.1 (42.63%) и КСМ_4.2 (19.1%), като в КСМ_2.1 и КСМ_2.2 процентното му съдържание намалява съответно до 4.91% и 3.64%. Друг доминиращ род в тези почви е *Fusarium*, с относително обилие в КСМ_1.1 (22.67%), КСМ_2.1 (14.34%) и КСМ_4.2 (13.72%). Важно е да се отбележи, че *Penicillium* също присъства в силно замърсените почви КСМ_4.1 (8.21%) и КСМ_4.2 (5.43%), но с по-ниско относително обилие. *Neoschizothecium* доминира само в КСМ_2.2 (22.67%) и КСМ_2.1 (18.14%).

За средно замърсените с ТМ почви КСМ_5.1 и КСМ_5.2 е характерен род *Enterocarpus* (27.64% и 36.32%, съответно). Освен този род, в тези почви се срещат и родове *Cephaliophora* (4.36 - 7.74%) и *Coniochaeta* (1.22 - 3.95%), но с по-ниско процентно разпределение.

В слабо замърсените почви, разнообразието на ниво род в гъбните съобщества е най-голямо в повърхностния слой на KCM_3.1, с 18 рода, докато в подповърхностния слой на KCM_3.2 са идентифицирани само 11 рода. В тези почви се срещат и значителен брой неопределени родове, отбелязани като "Others" (Други), които съставляват 30% от гъбното съобщество в повърхностния слой и 12.89% в подповърхностния слой.

Сред доминиращите родове в слабо замърсените почви се открояват *Fusarium* (13.73 - 15.64%) и *Chrysosporium* (5.64 - 8.83%). Характерни за тези почви е присъствието на *Sirastachys* (1.41 - 1.72%) и *Trichoderma* (1.27 - 1.47%), макар и в ниско относително обилие се срещат в двете дълбочини на почвите.

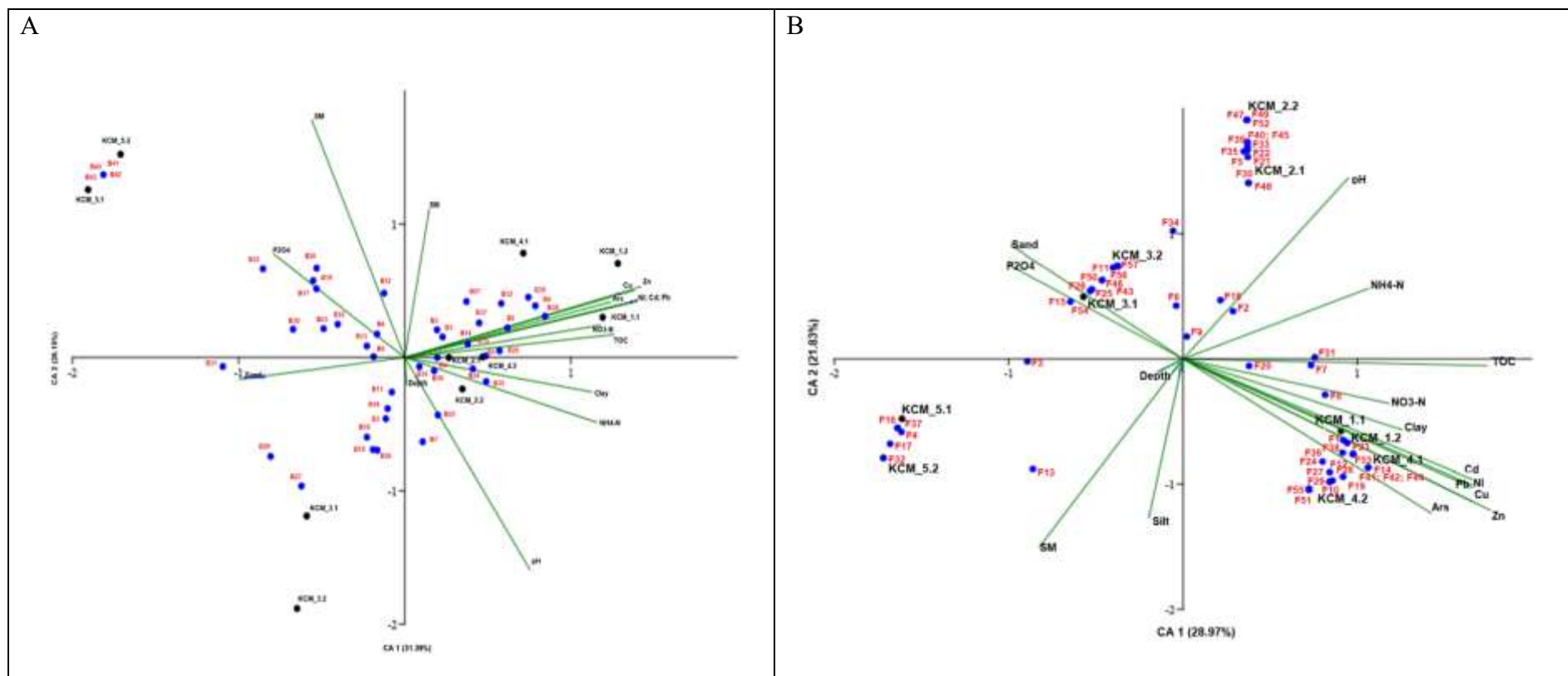


Фигура 15. Относително обилие на гъбните съобщества на ниво род в почвите. „Others“ представляват неклассифицираните таксони с относителното обилие <1%

4.7. Влияние на факторите на средата върху биологичното разнообразие на микробните съобщества

В тази точка са разгледани възможните въздействия на изследваните фактори на средата върху таксономичния състав на бактериалните и гъбните съобщества. Това въздействие е оценено на ниво род, тъй като се смята, че реакцията-отговор на микроорганизмите на това ниво е специфична и много по-информативна в сравнение с по-горните нива на таксономична принадлежност. За оценката е използвана ординационна техника – каноничен кореспондентен анализ (ССА; Canonical Correspondence Analysis). Разпределението на почвите по състав на бактериалните (А) и гъбни (В) съобщества е демонстрирано на фигура 16.

Първите две оси на ординация сумарно обясняват 57.54% (бактериални съобщества) и 50.70% (гъбни съобщества) от общата вариация на съобществата. От ординационния плот ясно личи групиране на съобществата съобразно нивото на замърсяване с ТМ. И при двата отдела съобщества, слабо замърсената KCM_3 и средно замърсената KCM_5 почви се обособяват в лявата част на диаграмата, съответно в ляв горен и ляв долен квадрант. Съобществата на силно замърсените почви са разположени в дясната част на диаграмата, като при бактериалните съобщества групата е разпръсната, а при гъбните съобщества - KCM_2 (NPI: 7.99 – 9.27) се обособява в десен горен квадрант, а KCM_1 и KCM_4 (NPI: 21.76 – 67.43) заемат десен долен квадрант. Всяка група почви се асоциира с преобладаващо присъствие на определени характеристични бактериални и гъбни родове. Например за бактериалните съобщества на KCM_3 е характерно присъствието на родове AC-51 (B27; UBA4738_401450) и HRBIN40 (B29; Alphaproteobacteria), които се приемат за чувствителни към ТМ, докато за силно замърсените почви характеристично е присъствието на родове UBA2421 (B2), AG11 (B9), *Aquicella_A* (B32; Gammaproteobacteria), ELB16-189 (B38; Bacteroidia), Z2-YC6860 (B39; Alphaproteobacteria) (KCM_1 и KCM_4.1). При гъбните съобщества, характеристични за KCM_3 са родове *Aspergillus* (F6; Eurotiomycetes), *Chrysosporium* (F15; Eurotiomycetes), *Podospora* (F43; Sordariomycetes), *Neodevriesia* (F44; Sordariomycetes) и др. Обратно, характеристични за силно замърсените с ТМ почви (KCM_1 и KCM_4) са родове *Bacillicladium* (F1; Eurotiomycetes), *Dactylonectria* (F10; Sordariomycetes), *Pseudoarthrographis* (F23; Dothideomycetes) и много други. Представителите на първата група родове приемат за слабо толерантни, а на втората група - резистентни към влиянието на ТМ.



Фигура 16. Плът на каноничен кореспондентен анализ (CCA), представящ влиянието на основни фактори на средата (вектори) върху разпределението на бактериалните (А) и гъбни (В) родове (отбелязани в червено) в състава на почвените микробни съобщества от района на КЦМ 2000.

Присъствието на тези родове в силно замърсените почви показва добра адаптивна стратегия, висока резистентност и възможност да се възползват от предимствата на местообитанието. Съществува положителна корелация между всички изброени по-горе бактериални и гъбни родове с почвената концентрация на ТМ и съответно нивото на замърсяване. Приемаме, че определящ фактор за тяхното разпространение е концентрацията на ТМ.

При някои родове въздействието на факторите на средата е комплексно, като освен влиянието на ТМ са отчетени и други фактори с ефект върху тяхното разпространение. Например, при бактериалните родове *Gp6-AA45* (B1; Vicinamibacteria), *Sulfotelmato bacter* (B15; Acidobacteriae) и *Haliangium_463188* (B28; Polyangia_463783) с положителен ефект са не само ТМ, но и съдържанието на органичен въглерод (TOC) и нитратен азот ($\text{NO}_3\text{-N}$), а отрицателен ефект има по-високото съдържание на пясъчни частици (sand) в почвата. Бактериални родове, които се повлияват освен от ТМ, но и от по-високото съдържание на глинести частици в почвата (clay) и амониеви йони ($\text{NH}_4\text{-N}$) са *Pedosphaera* (B24; Verrucomicrobiae) и *Blastococcus* (B35; Actinomycetia).

Съдържанието на фосфати в почвата има силен ефект върху разпределението на голям брой бактериални родове, измежду които са *Devosia_A_502124* (B40; Alphaproteobacteria), *Luteimonas_C_615545* (B41; Gammaproteobacteria), *Singulisphaera* (B42; Planctomycetia) и *Corynebacterium* (B43; Actinomycetia). pH е със влияние върху *Solirubrobacter* (B7; Gemmatimonadetes) и *Chryseolinea* (B25; Bacteroidia), докато разпределението на род SCUD01 (B31; Gammaproteobacteria) в почвата се повлиява от съдържанието (%) на пясъчните частици (sand).

Разпространението на много от чувствителните на ТМ гъбни родове (F15, F25, F26, F43, F50, F54 и др.) се асоциира не само с тяхната чувствителност, но и с повишаване на съдържанието на фосфати в почвите и промяна на почвената структура към по-песъчлив механичен състав. Много родове се повлияват от pH на средата (F2, F18, F48), количеството на органичния въглерод (F7, F20, F31) или нитратен азот (F8). За някои родове (F13) от съществено значение е влагата в почвата.

Като общо, може да се заключи, че разпределението на микробните родове в почвата се определя от чувствителността или резистентността им към наличните концентрации на ТМ, количеството на фосфати и органичен въглерод, pH на средата и механичен състав на почвата. За разлика от PERMANOVA, CCA не установява съществено влияние на почвената дълбочина върху разпространението на бактериалните и гъбни родове (PERMANOVA показва слаба, макар и статистически достоверна, сила на въздействие).

4.8. Метаболитни функции на микробните съобщества

4.8.1. Прогнозни функционални профили на бактериалните съобщества на базата на метагеномното секвениране

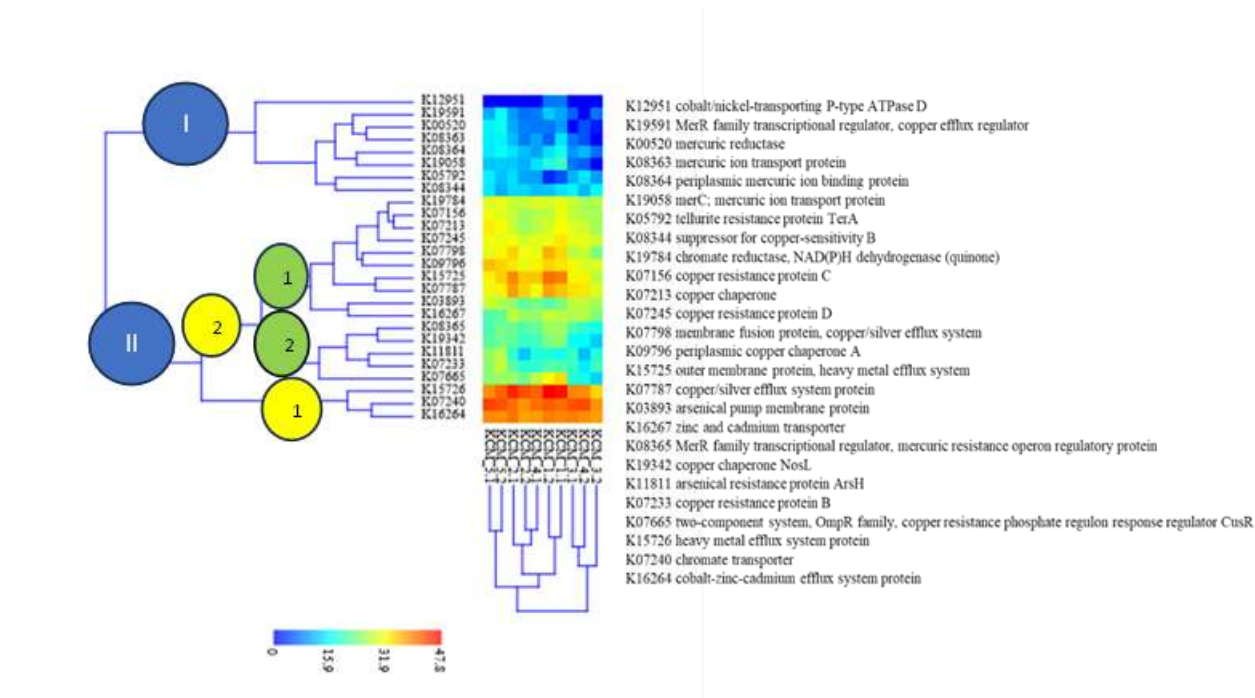
Метагеномният анализ дава възможност на базата на получените последователности от таргетното ампликон секвениране на 16S рРНК гена да се прогнозира метаболитните профили на бактериалните съобщества чрез софтуера PICRUSt2, който използва базата KEGG Orthology (KO).

Прогнозираната от PICRUSt2 функция на бактериалните съобщества в почвите откри наличието на различни KEGG пътища в численост от 5 389 (KCM_3.2) до 6 199 (KCM_5.1) и честота на срещане от 16 604 969 (KCM_3.2) до 22 202 383 (KCM_2.1) (таблица 12).

Таблица 12. Брой и честота на срещане на прогнозни KEGG пътища в почвите.

Почва	Брой KEGG пътища	Честота на срещане
КСМ_1.1	5693	19410771
КСМ_2.1	6074	22202383
КСМ_3.1	5702	21819060
КСМ_4.1	5537	18388859
КСМ_5.1	6199	18893739
КСМ_1.2	5400	20959375
КСМ_2.2	5774	17621695
КСМ_3.2	5389	16604969
КСМ_4.2	5555	19114849
КСМ_5.2	6046	17953730

Интерес представлява установяването на метаболитни пътища, ензими или протеини, участващи в адаптацията на бактериите към замърсена с ТМ среда. Целенасоченият анализ показва наличието на 26 ензими и протеини с различно обилие на последователностите във всички изследвани почви. Тези 26 ензими и протеини се групират в два главни клъстера и няколко под-клъстера (фигура 17).



Фигура 17. Дендограма базирана на Вох-Сох трансформирана матрица от данни за KEGG метаболитните пътища, свързани с адаптация на почвените бактерии към замърсени с тежки метали среди.

Анализът обособи 2 главни клъстера, (отбелязани в синьо на фигура 17).

В клъстер I се намират протеини и ензими с най-ниско (0 - 884) обилие в почвите, които играят роля за детоксикация от ТМ, главно Hg. Това са:

1. cobalt/nickel-transporting P-type ATPase D ctpD (K12951) – транспортер за кобалт и никел. Регулира нивата на кобалт и никел в клетката, предотвратявайки токсичността.

2. MerR family transcriptional regulator, copper efflux regulator cueR (K19591) – транскрипционен регулатор на ефлукс системата за мед. Регулира експресията на гени, свързани с устойчивостта към мед.
3. mercuric reductase merA (K00520) – ензим, редуциращ живачните йони до елементарен живак и помага за детоксикация на клетките от активен живак.
4. mercuric ion transport protein merT (K08363) – протеин за транспорт на живачни йони. Участва в механизма за детоксикация на живак.
5. periplasmic mercuric ion binding protein merP (K08364) – протеин за свързване на живачни йони в периплазмата. Участва в детоксикацията на живачни йони.
6. mercuric ion transport protein merC (K19058) – протеин за транспорт на живачни йони. Допринася за детоксикацията на живак.
7. tellurite resistance protein TerA (K05792) – протеин за устойчивост на телурит. Помага за защита на бактериите от токсичността на телурит.
8. suppressor for copper-sensitivity B scsB (K08344) – протеин за потискане на чувствителността към мед.

Клъстер II се разделя на 2 субклъстера (отбелязани в жълто на фигура 17). Субклъстер 1 обособява трите най-разпространени протеина (5238-15794), участващи в ефлукс системите за защита от токсичността на ТМ. Това са:

1. heavy metal efflux system protein czcA, cusA, cnrA (K15726) – протеин, участващ в детоксикацията на Co^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} чрез изпомпването им извън клетката.
 2. chromate transporter ChrA (K07240) – протеин, участващ в ефлукс системите, подпомагащ отстраняването на Cr от клетката.
 3. cobalt-zinc-cadmium efflux system protein (K16264) – протеин, осигуряващ защита на бактериите от токсични концентрации на Co^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} като ги изпомпва извън клетката.
- Субклъстер 2, съдържа още две добре оформени подразделения (отбелязани в зелено):

1) Протеини и ензими с високо обилие (1 068 – 9 346), отговорни за намаляване на токсичността на ТМ (основно Cu, Zn, Cd, Cr и As) в клетката.

1. chromate reductase, NAD(P)H dehydrogenase (quinone) (K19784) – ензим, редуциращ хромати до по-малко токсични форми.
2. copper resistance protein C, copC, pcoC (K07156) – протеин, осигуряващ защита на клетката от токсични концентрации на мед.
3. copper chaperone ATOX1, ATX1, copZ, golB (K07213) – шаперон, осигуряващ правилното транспортиране и разпределение на мед в клетката.
4. copper resistance protein D pcoD (K07245) – протеин, допринасящ за детоксикацията на мед.
5. membrane fusion protein, copper/silver efflux system cusB, silB (K07798) – мембранен протеин, част от ефлукс системата за защита от мед и сребро. Участва в експортния механизъм на мед и сребро.
6. periplasmic copper chaperone A pccA (K09796) – периплазмен шаперон за мед, спомага за правилното разпределение и детоксикация на мед.
7. outer membrane protein, heavy metal efflux system czcC K15725 – протеин на външната мембрана, част от ефлукс система за ТМ. Участва в детоксикацията на Co^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} чрез изпомпването им извън клетката.
8. copper/silver efflux system protein cusA, silA (K07787) – протеин на ефлукс системата за мед и сребро.
9. arsenical pump membrane protein, arsB (K03893) – мембранен протеин за изпомпване на арсен.

10. zinc and cadmium transporter (K16267) – транспортер за цинк и кадмий, участва в регулацията на вътреклетъчните нива на цинк и кадмий, като предотвратява токсичността им.

2) Протеини и ензими (обилие: 205 – 5 073) в почвите, свързани с устойчивостта на клетките към мед и арсен. Те са изброени по-долу:

1. MerR family transcriptional regulator, mercuric resistance operon regulatory protein (K08365) – транскрипционен регулатор на системата за устойчивост към живак. Регулира експресията на гени, свързани с устойчивостта към живак.
2. copper chaperone NosL (K19342) – шаперон за мед, участващ в транспорта и разпределението на мед в клетката.
3. arsenical resistance protein ArsH (K11811) – протеин за устойчивост на арсен.
4. copper resistance protein B pcoB, copB (K07233) – протеин за устойчивост на мед.
5. two-component system, OmpR family, copper resistance phosphate regulon response regulator CusR (K07665) – регулаторен протеин от двукомпонентна система за устойчивост на мед. Регулира експресията на гени, свързани с устойчивостта към мед.

Като общо може да се каже, че клъстер I обхваща механизми за защита основно от Hg, а в клъстер II са включени преобладаващо системи за защита на клетките от Cu, Zn, Cd и As. Честотата на срещане на системите за детоксикация на Cu, Zn, Cd и As е много по-висока в сравнение с тези за Hg, което напълно отговаря на регистрираното замърсяване.

Резултатите от метагеномния анализ са използвани също и за прогнозиране на съществуващи KEGG ензими (пътища) свързани с енергийния метаболизъм и регулацията на клетъчните биохимични процеси при бактериите. С най-голяма честота на срещане са ензимите:

1. 3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase (K00059) - ензим, участващ в биосинтеза на мастни киселини.
2. acetyl-CoA C-acetyltransferase (K00626) - ензим, участващ в метаболизма на липиди.
3. UDP-glucose 4-epimerase (K01784) - ензим, участващ в метаболизма на въглехидрати.
4. long-chain acyl-CoA synthetase (K01897) - ензим, участващ в активацията на дълговерижни мастни киселини.
5. serine/threonine protein kinase, bacterial (K08884) - ензим, участващ в сигналната трансдукция чрез фосфорилиране на серин/треонин остатъци в протеини. Фосфорилирането регулира активността на много ензими и протеини като контролира клетъчните процеси и стрес-отговори.

Честотата на срещане на тези ензими в изследваните почви е 24 358 (КСМ_5.2) – 79 110 (КСМ_3.1).

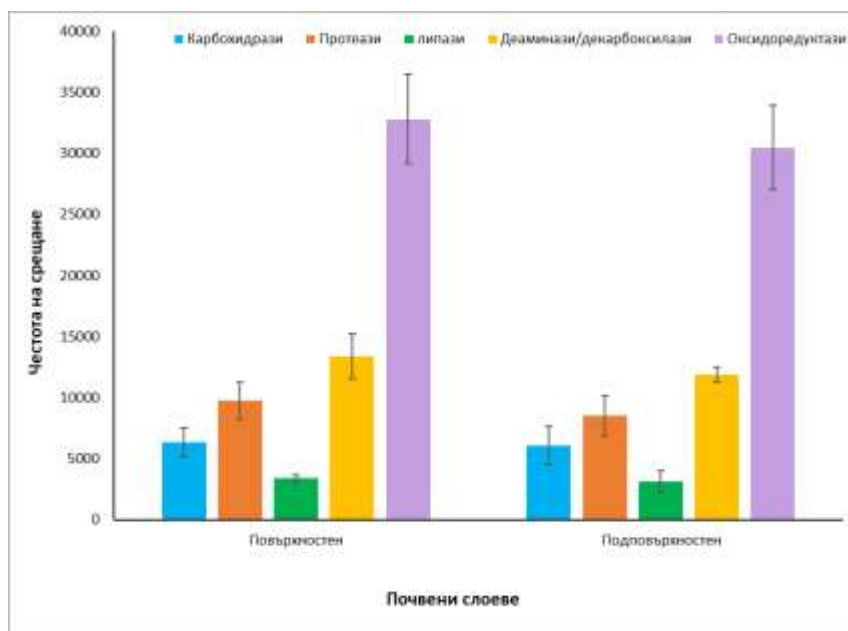
Допълнително, KEGG ензимите участващи в разграждането на органични вещества са групирани съобразно типа на биохимичните реакции, в които участват и механизма на разграждане:

- хидролази (амилази или карбохидрази, протеази, липази, деамилази и декарбоксилази);
- оксидоредуктази (дехидрогенази).

Разпределението на групите ензими в двете почвени дълбочини, изразено като средни стойности на честота на срещане е показано на фигура 18.

С най-голяма честота на срещане са оксидоредуктазите (средно за повърхностен почвен слой – 32 778 и подповърхностен почвен слой – 30 462), следвани от дезаминазите/декарбоксилазите (средно за повърхностен – 13 356 и подповърхностен – 11 870) и протеазите (средно за повърхностен – 9 762 и подповърхностен – 8 517). С най-ниска честота на срещане са липазите (средно за

повърхностен – 3 385 и подповърхностен – 3 140). Като цяло, при всички ензимни групи, честотата на срещане е по-висока в повърхностния в сравнение с подповърхностния почвен слой, но разликата не е статистически достоверна ($F < 2.92$; $p > 0.12$).



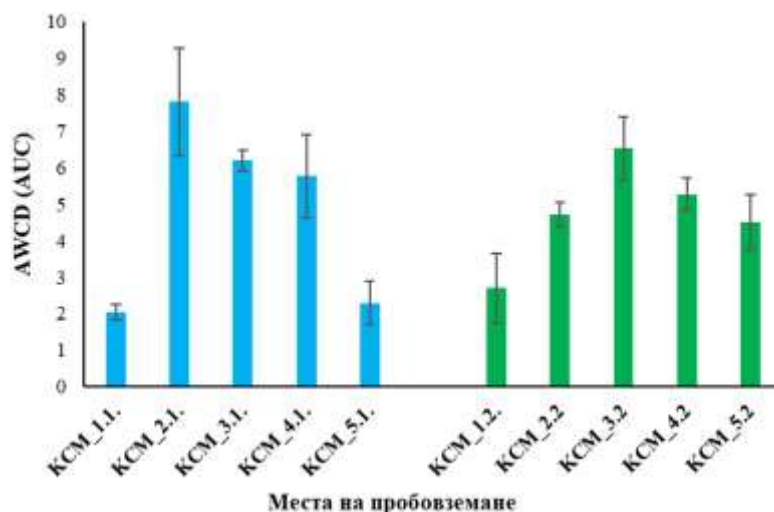
Фигура 18. Честота на срещане на ензимите, принадлежащи към групата на хидролазите и оксидоредуктазите в двете почвени дълбочини.

4.8.2. Метаболитен потенциал и метаболитни профили на почвените бактериални съобщества, определени чрез системата Biolog Ecoplate™

За да се характеризира по-задълбочено влиянието на замърсяването и почвената дълбочина върху бактериалния метаболизъм е използвана системата Biolog Ecoplate™, която отразява метаболитните особености на култивируеми хетеротрофни бактерии. Като основни характеристики са изследвани: 2.1) средната метаболитна активност (AWCD); 2.2) функционалните профили (CLPP) и 2.3) функционалното разнообразие (Shannon) на хетеротрофните бактериални съобщества.

4.8.2.1. Средна метаболитна активност (AWCD)

Средната метаболитна активност (AWCD) служи като индикатор за оценка на способността на почвените бактериални съобщества да метаболизират набор от 31 естествени източници на въглерод, заложили в Ecoplate микротитърната плака. AWCD варира съобразно местата на пробовземане и стойностите на метаболитната активност са представени на фигура 19. Потенциалът на бактериалните съобщества от района на КЦМ 2000 варира от 2.04 ± 0.042 AUC (KCM_1.1) до 7.79 ± 0.146 AUC (KCM_2.1).



Фигура 19. Потенциал на бактериалните съобщества от повърхностния и подповърхностния почвен слой да усвояват източници на въглерод

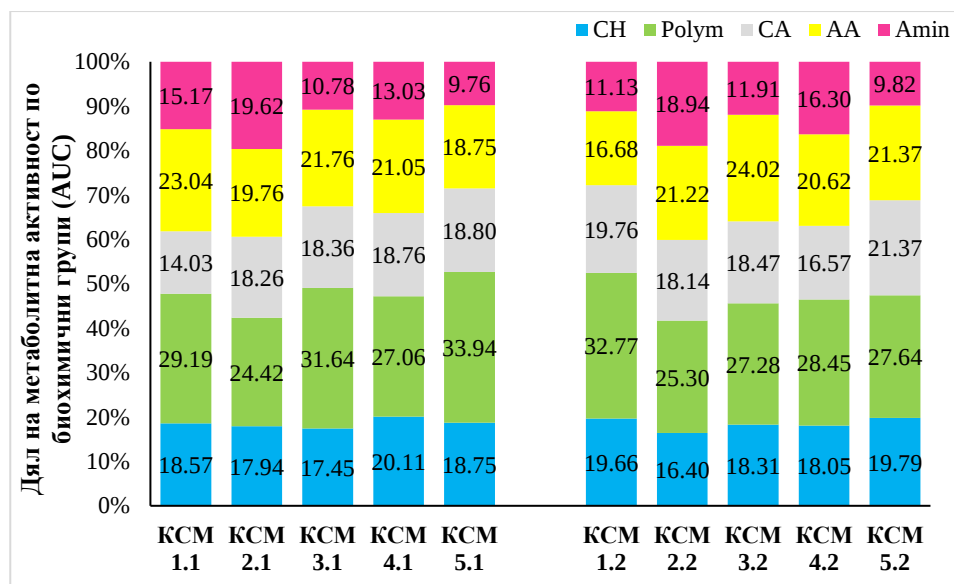
С нисък метаболитен потенциал се характеризират бактериалните съобщества от KCM_1.1 (2.04 ± 0.017 AUC) и KCM_1.2 (2.69 ± 0.96 AUC), както и KCM_5.1 (2.29 ± 0.96 AUC). Вероятната причина за това са неблагоприятните условия на средата, основно свързани с високи нива на замърсяване на почвите с ТМ (KCM_1). В KCM_5.1 замърсяването се приема като средно ниво, но вероятно там съществуват и други конкретни фактори на средата, които потискат метаболитната активност на бактериалните хетеротрофни съобщества.

По-висок е метаболитния потенциал на бактериалните съобщества от контролната почва KCM_3 (средно 6.34 ± 0.61 AUC), която е най-слабо замърсена с ТМ, и KCM_2.1 (7.79 ± 1.46 AUC), характерно за която е по-високото съдържание на общ органичен въглерод (14.07 g/kg) и по-ниско ниво на замърсяване (NPI: 7.99).

Средната стойност на AWCD на повърхностния почвен слой (4.81 ± 2.54 AUC) е много близка с тази на дълбочинния почвен слой (4.74 ± 1.39 AUC) и разликата не е статистически достоверна ($F=0.01$; $p=0.92$).

4.8.2.2. Функционален профил на бактериалните съобщества (CLPP)

CLPP е определен съобразно нивото на усвояване на биохимичните групи източници на въглерод и съобразно индивидуалните такива. Въглеродните източници от микротитърните плаки са групирани в пет биохимични категории въглеводороди – въглехидрати (CH), полимери (Polym), карбоксилни киселини (CA), аминокиселини (AA) и амини/амиди (Amin) (Weber and Legge 2009). Делът на усвояването на тези биохимични групи в общата метаболитна активност на почвените бактериални съобщества е представен на фигура 20.



Фигура 20. Потенциал на почвените бактериални съобщества да усвояват различни биохимични групи въглерод-съдържащи вещества като процент от общата метаболитна активност.

Резултатите демонстрират тенденция на сравнително равномерно усвояване на отделните биохимични групи въглерод-съдържащи вещества във всички почви. С най-висока степен на усвояване са Polym: 24.42 - 33.94% от AWCD, следвани от CH (16.4 – 20.11%), и протеин- (AA) и непротеин- (CA) образуващи карбоксилни киселини (14.03 – 24.02%). С най-ниска усвояемост са Amin (9.76 – 19.62%). Съществуват и малки отклонения от тази тенденция, като например: в почвите KCM_2 и KCM_1.1, най-ниско усвояеми са съответно CH и CA, а не Amin.

4.8.2.3. Функционално разнообразие

Данните от CLPP са използвани за изчисление на индексите за:

- функционално разнообразие по Shannon (H');
- изравненост на степените на усвояване на източниците на въглерод по Pielou (E).

Резултатите са представени в таблица 13.

Таблица 13. Индекси за функционално разнообразие на почвените бактериални съобщества от повърхностен и подповърхностен почвени слоеве.

Почва	Shannon (H')	Pielou (E)
KCM 1.1	3.284±0.14	0.956±0.02
KCM 2.1	3.342±0.05	0.973±0.02
KCM 3.1	3.335±0.06	0.971±0.02
KCM 4.1	3.343±0.06	0.973±0.02
KCM 5.1	3.291±0.12	0.958±0.02
KCM 1.2	3.289±0.11	0.958±0.02
KCM 2.2	3.302±0.08	0.962±0.01
KCM 3.2	3.283±0.06	0.969±0.02
KCM 4.2	3.336±0.06	0.972±0.02
KCM 5.2	3.350±0.07	0.976±0.01

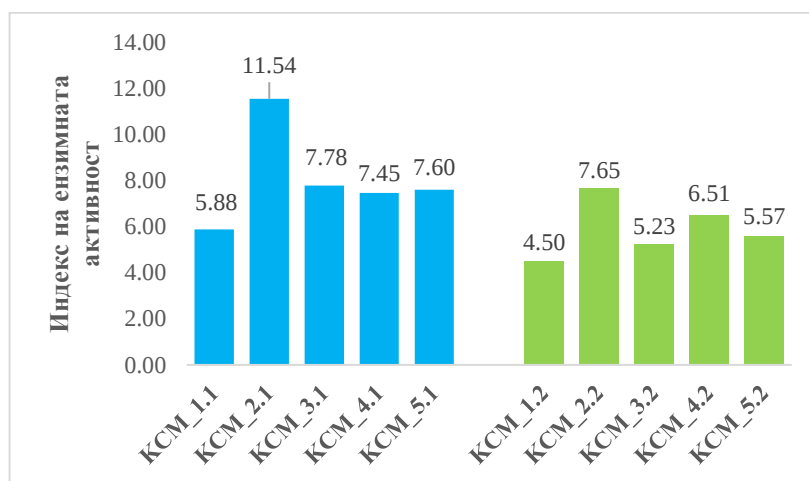
Стойностите на изчислените индекси показват високо функционално разнообразие и високо ниво на изравненост на усвояването на Ecoplate източниците на въглерод. Не съществува статистически достоверна разлика между почвите ($F < 0.29$, $p > 0.88$), както и между почвените

дълбочини ($F < 0.006$, $p > 0.92$) в стойностите на тези индекси. Тези резултати демонстрират запазена широкоспектрна метаболитна активност дори и при високите нива на замърсяване с ТМ. Тази констатация не е изненадваща поради дълготрайното замърсяване, което е повече от две десетилетия и вероятно реализиран потенциал на бактериите да се адаптират към средата на обитание.

4.8.3. Почвени ензимни активности

Определени са активностите на шест почвени ензими – обща дехидрогеназа (Dha), бета-глюкозидаза (BGl), уреаза (Ur), кисела (AcP) и алкална (AlP) фосфатази и арилсулфатаза (Ars) с цел да се оцени влиянието на ТМ върху тях и съответно кръговратите на веществата, в които участват отделните ензими.

Тенденцията в неговата промяна е показана на фигура 21, а стойностите на ензимните активности - в таблица 14.



Фигура 21. Индекс на почвената ензимна активност.

Най-нисък индекс на обща ензимна активност се наблюдава в KCM_1.2 (4.50), а най-висок в KCM_2.1 (11.54). В повърхностния почвен слой с нисък индекс на ензимна активност се характеризира и почва KCM_1.1 (5.88). Общата ензимна активност варира съобразно мястото на пробовземане и разликата е значима ($F = 24.98$, $p < 0.001$). Значима разлика съществува в общата ензимна активност и между двете почвени дълбочини ($F = 12.3$, $p = 0.002$). В повърхностния слой на почвата, ензимите са по-активни от тези в подповърхностния слой, с изключение на уреазата (Ur), чиято активност не зависи от дълбочината на почвата ($F = 0.003$; $p = 0.95$). В повърхностния слой на почвата ензимните активности са по-високи със 172% (дехидрогеназа; Dha), 54% (бетаглюкозидаза; BGl), 39% (кисела фосфатаза; AcP), 32% (алкална фосфатаза; AlP) и 7% (арилсулфатаза; Ars) от тези в подповърхностния почвен слой. Най-ниските стойности на ензимните активности на Dha, AlP и Ars са регистрирани при KCM_1.2, а на BGl и AcP при KCM_5.2.

Таблица 14. Стойности на ензимните активности за Dha, BGl, AlP, AcP, Ars и Ur ($\mu\text{g/g/h}$).

Почва	Dha	BGl	AlP	AcP	Ars	Ur
KCM_1.1	24.21 $\pm$ 0.4	20.82 $\pm$ 6.7	18.06 $\pm$ 2.4	8.27 $\pm$ 2.5	2.57 $\pm$ 0.2	1.68 $\pm$ 0.1
KCM_2.1	60.91 $\pm$ 7.4	61.71 $\pm$ 6.6	49.51 $\pm$ 7.6	10.02 $\pm$ 1.0	6.82 $\pm$ 0.9	2.26 $\pm$ 0.2

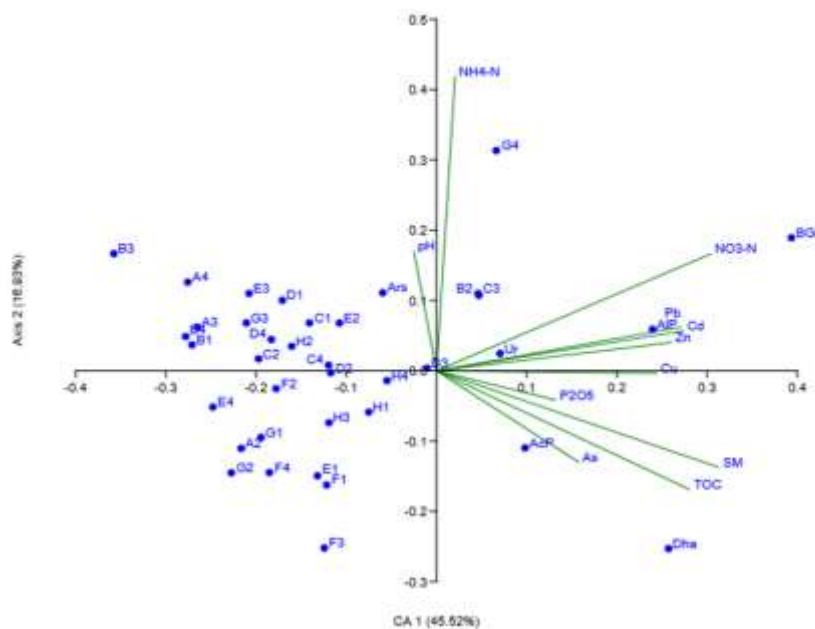
KCM_3.1	40.32 ± 6.1	19.68 ± 6.5	21.22 ± 7.6	8.72 ± 1.5	6.98 ± 1.7	2.14 ± 0.2
KCM_4.1	45.27 ± 6.2	23.59 ± 4.3	23.30 ± 3.2	13.04 ± 2.1	2.50 ± 0.6	1.86 ± 0.6
KCM_5.1	31.96 ± 5.6	14.73 ± 6.8	39.25 ± 0.3	8.19 ± 0.6	2.24 ± 0.8	3.45 ± 1.0
KCM_1.2	7.10 ± 3.2	28.57 ± 3.4	14.53 ± 1.3	5.48 ± 0.3	1.61 ± 0.5	1.62 ± 0.3
KCM_2.2	20.32 ± 7.4	33.21 ± 4.3	36.29 ± 7.4	6.60 ± 0.8	5.08 ± 0.8	2.04 ± 0.4
KCM_3.2	11.95 ± 0.1	8.78 ± 0.6	18.71 ± 0.8	7.90 ± 0.9	5.12 ± 0.6	1.40 ± 0.5
KCM_4.2	16.84 ± 3.3	16.85 ± 3.9	27.26 ± 1.3	9.49 ± 1.6	2.36 ± 1.1	2.40 ± 0.7
KCM_5.2	14.05 ± 3.4	8.25 ± 0.8	23.64 ± 7.5	5.17 ± 0.5	3.22 ± 1.6	4.92 ± 0.9

Асоциирането на по-високите ензимни активности със слабо замърсените повърхностни почви подсказва, че както замърсяването, така и почвената дълбочина имат инхибиращ ефект върху биологичната активност на почвените микробни съобщества.

4.9. Влиние на факторите на средата върху функциите на почвените микробни съобщества

Анализиран е ефектът на изследваните абиотични фактори на средата върху усвояването на Biolog Ecoplate™ източниците на въглерод и върху почвените ензимни активности. За целта е използвана ординационната техника каноничен кореспондентен анализ (CCA) и резултатите са изобразени на фигура 22.

За ординацията са използвани първите две канонични оси, които съдържат максимална вариация изразена чрез променливите на околната среда (общо 62.45% от вариацията на връзката бактериална функция – среда на обитание). Първата ос обяснява 45.5% от вариацията на тази зависимост и корелира предимно със съдържанието на почвена влага, нитратен азот, общ органичен въглерод и ТМ. Втората ос с 16.9% от обяснената вариация на връзката бактериална функционалност – местообитание корелира с общото съдържание на амониев азот.



Фигура 22. Каноничен кореспондентен анализ (CCA) на бактериалните функционални профили и почвените ензимни активности, и абнотичните фактори на средата за установяване на връзката „микробна функционалност – среда на обитание“.

Разпространението на BGL, Dha и AIP активностите корелира положително с количеството на влага в почвите, съдържанието на нитратен азот и органичен въглерод, както и със съдържанието на ТМ. Тези фактори имат отрицателен ефект върху усвояването на някои въглехидрати (B1, G1, A2, C2 и G2) и протеин-образуващи (A4, B4 и E4) и протеин-необразуващи (A3, B3, E3 и G3) карбоксилни киселини (<https://www.biolog.com/wp-content/uploads/2023/08/00A-012-Rev-F-EcoPlate-IFU.pdf>). Допълнително, съдържанието на амониум йони в почвите повлиява благоприятно върху метаболизма на G4 (амин) и метаболизма на BGL, и отрицателно върху активността на Dha и усвояването на F3 (карбоксилна к-на).

5. Обсъждане на резултатите

Резултатите, получени в дисертационния труд, показват как конкретните условия в дългосрочно замърсени с ТМ почви в района на КЦМ 2000 - Пловдив влияят върху таксономичния състав и функцията на почвения микробиом. С над 70 години добив и обогатяване на руда, компанията „КЦМ 2000“ е значим индустриален фактор с дългосрочно въздействие върху околната среда в района.

5.1. Характеристика на средата

Изследването на факторите на средата е от съществено значение, за установяване на ефектите на въздействие на замърсителите върху почвения микробиом.

Основен фактор, който е проследен в това изследване е вида и нивото на замърсяване с ТМ на почвите в района на КЦМ 2000 – Пловдив. Установено е високо ниво на замърсяване с Zn, Pb, Cu, Cd и As, като в повечето почви нивата на тези метали са над ПДК (таблица 1). В този случай е налице комбинирано замърсяване с ТМ, което има различен токсичен ефект върху микробните съобщества. С висока степен на токсичност са например Pb, Cd и As, тъй като имат липоиден характер и сравнително лесно преодоляват клетъчната мембрана (Davidova et al., 2024; Jaishankar et al., 2014). Тяхното съдържание е най-високо в КСМ_1, наред с това и на останалите замърсители.

Много автори приемат, че по-показателни за токсичността на ТМ към почвените организми са биологично достъпните им форми (Yang et al., 2022). В това изследване, те представляват средно от 0.06% до 6.78% от общото количество на ТМ и според автори (Zhu et al., 2023; Prokop et al., 2003) тяхната концентрация е не само функция на количеството на ТМ, но и на факторите на средата като рН, механичен състав на почвата, влага и др. С най-високо ниво на замърсяване с биологично достъпните форми на ТМ е почва КСМ_1.

Тъй като замърсяването с ТМ е комплексно, важно е да се определи единен показател, който да служи за отправна точка при оценка на влиянието на замърсяването върху почвените микробни съобщества. В случая е избран индекса на Nemerow (NPI), който отчита не само концентрацията на замърсителите, но и тяхната индивидуална токсичност за клетката. Според NPI, като слабо замърсена се приема почва КСМ_3, като средно замърсена КСМ_5 и като силно замърсена с увеличаващо се ниво на натоварване са съответно почви КСМ_2 < КСМ_4 < КСМ_1. Ординационният анализ на почвите по физико-химични характеристики ясно показва, че тяхното групиране е спрямо съдържанието на ТМ. Откроява се добре оформен градиент на замърсяване с ТМ и очакванията ни са по този градиент да наблюдаваме промени в състава и функциите на микробните съобщества, ако ефектите на ТМ не се модифицират от конкретните фактори на средата.

Отбелязахме, че много от характеристиките на средата могат да модифицират действието на ТМ върху почвените микробни съобщества. Изследваните почви са с песъчливо-глинест механичен състав, което предполага по-нисък буферен капацитет (Chen et al. 2019) и по-ясно изразен биологичен ефект на ТМ. Песъчливият характер на почвите може да повлияе също върху дифузията на ТМ (Chen et al. 2019), задържането на влагата и съответно физиологичното състояние на микробните съобщества (Islam et al., 2022). Почвената влага, въпреки че е важен показател за състоянието на ТМ и микробните съобщества, е изключително вариабилна, зависи от климатичните условия и е само моментна представа за стойността на този показател. В момента на пробовземане, почвената влага варира от 6.7% до 16.7%, и с малко по-високи стойности при КСМ_5 – 22.7%. Тези

стойности на влага се приемат като достатъчно количество за поддържане на добър физиологичен статус на почвените микробни съобщества (Siebielec et al., 2020). Подобно на влагата, pH на средата е важен фактор за функционирането на почвените организми и за дисоциацията на ТМ (Sintorini et al., 2021). Стойностите на pH на почвите от района на КЦМ 2000 варират в тесен диапазон (6.6 – 7.2) и са близки до неутралната точка. Това не води до значителни ефекти върху мобилността на ТМ, което е в съгласие с резултатите от Rutgers et al. (2016).

Мъртвата органика в почвата заедно с глинестите почвени частици определя буферния капацитет на почвата и способността ѝ да намали токсичността на ТМ върху микробните съобщества (Stefanowicz et al. 2020; Kwiatkowska-Malina, 2018). В изследването е установено, че слабо замърсените почви КСМ_3.1 и КСМ_3.2 се характеризират с по-ниско съдържание на ТОС (6.45 g/kg и 7.5 g/kg, съответно) в сравнение със средната стойност (10.41 ± 3.4 g/kg). Предполагаме, че това може да е резултат от по-висока разграждаща активност на бактериалните хетеротрофни съобщества в сравнение с тези от по-замърсените почви. Ако това предположение е вярно, това би означавало, че нивата на замърсяване с ТМ на почва КСМ_3 са напълно или частично преодолени за микробните съобщества. От друга страна, по-високите нива на запасеност с ТОС в по-замърсените почви увеличава техния буферен капацитет и има предпазващ ефект върху почвените съобщества.

За стабилността и устойчивостта на микробните съобщества от значение освен органичния въглерод са и неорганичният азот и фосфор (Ogunsola et al. 2020). Съдържанието на нитратен и амониев азот е най-високо в КСМ_1, а на фосфати в КСМ_2. Приемаме, че това са конкретни особености на средата и е възможно по-високото ниво на $\text{NO}_3\text{-N}$ в КСМ_1 да се дължи и на извършено наторяване. От друга страна, ефект върху съдържанието на минерални вещества може да има и микробната активност. Например, почва КСМ_3.2, с най-ниска влажност (6.7%), се характеризира с ниски стойности на P_2O_5 (4.18 mg/kg) и общ минерален азот (10.13 mg/g). Получените резултати са в съгласие с данни от литературата, които посочват, че ниската почвена влага ограничава усвояването на въглерод и другите хранителни вещества от бактериалните съобщества, като по този начин намалява тяхната ензимна активност и потенциала за формиране на органична материя (Butcher et al., 2020).

5.2. Обилие и разнообразие на почвените микробни съобщества

Обилието и разнообразието на бактериалните съобщества е определено чрез най-често използваните за целта показатели (CFU, копия на 16S рПНК гена, 16S рПНК генни клонови библиотеки) и индекси (Chao 1, ACE, Shannon). Получените резултати не са еднопосочни и според нас това се дължи на използваната техника. При използване на култивационни методи, количествен PCR (qPCR) и конструиране на 16S рПНК генни клонови библиотеки, с най-високо обилие са слабо до средно замърсените почви КСМ_3.1 (CFU, копия на 16S рПНК гена и 16S рДНК) и КСМ_5.1 (копия на 16S рПНК гена и 16S рДНК), но също така високо обилие се отчита и в силно замърсените почви КСМ_2.2 (копия на 16S рПНК гена и 16S рДНК) и КСМ_1.2 (16S рДНК). Получените резултати са в съответствие с наши предишни изследвания, в които бактериалното обилие (CFU и 16S рПНК генни копия) намалява в дълготрайно замърсени с Cu, Zn и Pb почви от района на Златица-Пирдоп (Alekssova et al. 2020; Palov et al. 2020). Нашите резултати са в съгласие и с общата тенденция в научната литература, според която броят на култивируемите хетеротрофни бактерии намалява с увеличаване на концентрацията на ТМ (Pacwa-Plociniczak et al. 2018). Други автори показват

обратната тенденция, че ТМ (Cu, Zn, Pb и Cd) повлияват слабо обилието, но силно разнообразието на бактериалните съобщества (Stan et al., 2011; Tipyayno et al., 2018; Huang et al., 2021).

Бактериалното разнообразие установено с 16S рДНК библиотеки е най-високо в КСМ_5.1, КСМ_5.2 и КСМ_3.1 (слабо до средно замърсени почви) и най-ниско в КСМ_1.1 и КСМ_4.1 (силно замърсени почви). По-различни са резултатите при таргетното ампликон секвениране на 16S рПНК гена – с най-високо бактериално разнообразие са силно замърсените почви КСМ_1.1 и КСМ_1.2, следвани от слабо замърсената почва КСМ_3.1. С най-ниско бактериално разнообразие са почвите КСМ_3.2 и КСМ_2.2. Тези различия в бактериалното разнообразие се дължат на по-високата таксономична чувствителност и разделителна способност на таргетното ампликон секвениране, докато секвенирането на целия 16S рПНК ген осигурява по-висока таксономична точност. Подобно заключение е направено и от други автори, които посочват, че секвенирането на целия 16S рПНК ген позволява по-точна таксономична идентификация, включително на редки или слабо представени в бактериалните съобщества, които често остават неидентифицирани при секвенирането по-къси региони от 16S рПНК гена (например V4 региона) (Wilkinson et al., 2025; Zhang et al., 2023). Следователно, отчетеното по-високо бактериално разнообразие в силно замърсените проби при таргетното ампликон секвениране на 16S рПНК гена не се тълкува като директен биологичен ефект от замърсяването, а по-скоро като отражение на по-високата резолюция на използваната молекулярна техника.

Направена е съпоставка на обилието/ разнообразието на бактериалните съобщества от двата почвени слоя. Като общо, тези показатели са с по-високи стойности за повърхностния почвен слой, но разликата с подповърхностния не е статистически достоверна. Този резултат е в съгласие с изследването на Wilkinson et al. (2025), което показва, че бактериалното разнообразие е по-високо в горните почвени слоеве, но разликата с по-дълбоките слоеве не винаги достига до статистическа значимост.

Обилието на гъбните съобщества е определено чрез броя копия на ITS региона на рПНК гена и е установено, че с най-голям брой копия този ген е представен в най-ниско замърсената почва КСМ_3, следвана от средно (КСМ_5.1) и силно (КСМ_1.1) замърсени почви (фигура 12). В дълбочина на почвения профил, броят на копията намаляват, но разликата не е статистически достоверна. Статистически недостоверна е и разликата на броя копия на ITS региона на рПНК гена и по градиента на замърсяване с ТМ. Проучванията показват, че обилието на ITS региона е по-високо в незамърсени или слабо замърсени почви и намалява с увеличаване на ТМ (Wang et al., 2025; Li et al., 2025; Bourceret et al., 2016; Petkova et al., 2022) и почвената дълбочина (Zhang et al., 2021; Estrada et al., 2024). Това води до цялостна промяна в структурата на гъбните съобщества, защото чувствителните таксони намаляват значително относителното си обилие за сметка на резистентните (Wang et al., 2025).

5.3. Таксономичен състав на почвените микробни съобщества

5.3.1. Таксономичен състав на ниво отдел

В състава на почвените бактериални съобщества са установени 12 (16S рПНК генни клонови библиотеки) и 15 (таргетно ампликон секвениране на 16S рПНК гена) бактериални отдела (фигури 11А и 13А). Като доминанти или субдоминанти и по двете техники в относителното обилие на съобществата са отделите Proteobacteria, Actinobacteriota, Acidobacteriota, Bacteroidota, Chloroflexota, Gemmatimonadota, Planctomycetota, и Firmicutes. Наличието на тези отдели е очаквано,

като се има предвид повсеместното им разпространение в почвите и адаптивността им към разнообразни местообитания, включително почви замърсени с ТМ (Fajardo et al., 2020; Song et al., 2018; Cui et al., 2018; Radeva et al., 2013). Високата резистентност и приспособеност на бактериите от тези отдели към средата се определя от широката им трофична ниша, висока скорост на растеж и наличие на приспособителни механизми за устойчивост към ТМ (Sreedevi et al., 2022; Nnaji et al., 2023). *Proteobacteria*, *Acidobacteriota* и *Bacteroidota* са установени също и в почви с високо съдържание на уран (Radeva et al. 2013). Освен това, характерно за много от представителите на тези отдели е предпочитанието им към почви с неутрално рН (Nacke et al., 2011), каквито са тези от района на КЦМ 2000. Според Zeng et al. (2020), *Actinobacteriota*, *Bacteroidota* и *Chloroflexota* увеличават относителното си обилие в силно замърсени с ТМ почви, а други отдели като *Proteobacteria* и *Acidobacteriota* намаляват присъствието си. Подобна тенденция не е регистрирана в изследваните от нас почви. Нашите резултати показват повишаване на относителното обилие на *Gemmatimonadota* и *Planctomycetota* в почви КСМ_1 в сравнение с останалите. He et al. (2020) установяват по същия начин повишаване на числеността на *Gemmatimonadota* и на *Nitrospirota* в почви с по-високи концентрации на ТМ. Присъствието на *Gemmatimonadetes* в силно замърсени с ТМ почви е потвърдено и от други изследвания (Guo et al., 2017; Hemmat-Jou et al., 2018). Възможно е тази динамика в относителната численост на *Gemmatimonadota* и *Planctomycetota* съобразно нивото на замърсяване да се определя не само от устойчивостта към ТМ на двата отдела, но и от редица други фактори (изследвани и неизследвани) на средата. Например, установено е, че резистентността на *Proteobacteria* и *Firmicutes* към ТМ се определя от съдържанието на органичен въглерод и влага в почвата (Zhao et al., 2019). Някои автори (DeBruyn et al., 2011; Fawaz, 2013) свързват преобладаването на *Gemmatimonadota* в екстремни почви с тяхната висока сухоустойчивост. От друга страна, високата екологична пластичност на представителите на *Planctomycetota* се определя и от тяхната способност да разграждат и използват изключително комплексни органични съединения, които не са достъпни за микроорганизми от други таксони (Wiegand et al. 2020).

По отношение на дълбочинното разпределение на горепосочените отдели няма единна тенденция установена чрез двата използвани метода. Според конструираните 16S рРНК генни клонови библиотеки, разлика в дълбочинното разпределение има при отделите *Gemmatimonadota* и *Actinobacteriota*, които са в по-високо относително обилие в повърхностния почвен слой и *Fibrobacterota*, които увеличават обилието си в подповърхностния почвен слой. *Gemmatimonadetes* и *Actinobacteria* намаляват относителното си обилие с нарастване на дълбочината на почвата, което е свързано с по-високото съдържание на лесноусвоими въглехидратни източници в повърхностните слоеве, които тези таксони използват ефективно (Hao et al., 2021). Съгласно с таргетното ампликон секвениране на 16S рРНК гена, *Acidobacteriota* намалява по-чувствително обилието си в дълбочина. Както и при градиента на почвеното замърсяване с ТМ може да приемем, че конкретните условия на средата повлияват дълбочинното разпределение на таксоните и променят структурата на съобществата. Редица проучвания посочват, че обилието на *Acidobacteriota* намалява с почвената дълбочина в различни екологични ниши, като тяхното разпределение е тясно свързано с конкретни условия на средата, като ТОС и рН, които варират в дълбочина (Christiansen et al., 2025; Fierer et al., 2017; Banerjee et al., 2021).

Като пример за наличие на повишаване на относителното обилие в почвите могат да се посочат КСМ_5, КСМ_2 и КСМ_1.2 с по-голям относителен дял в общото бактериално обилие на *Proteobacteria*, както и КСМ_3.1 и КСМ_5.2 с по-голям относителен дял на *Actinobacteriota*. Тези особености на почвите не можем да асоциираме със стойностите на измерените абиотични параметри. Разликата на почва КСМ_5 от останалите е в по-ниските стойности на рН (6.6 – 6.8) и

органичен въглерод, както и по-високото съдържание на влага. Възможно е тези фактори и средното ниво на замърсяване с ТМ да са стимулиращи за развитието на Proteobacteria и Actinobacteriota. За останалите почви не са установени съществени разлики в стойностите на факторите на средата с изключение на съдържанието на ТМ.

Почвените гъбни съобщества са доминирани изцяло от Ascomycota (95.2% - 99.79%) (фигура 13А). Установени са още 3 отдела, сред тях Basidiomycota и два недефинирани (Fungi_Unclassified и Fungi_phylum_Incertae_sedis), всички те в много нисък процент на обилие. Редица автори установяват повсеместното разпространение на Ascomycota в почвите като считат, че устойчивостта и успешния начин на разпространение на спорите чрез силата на вятъра са механизмите за тяхната широка инвазия (Egidi et al. 2019; Tedersoo et al. 2014). В нашите изследвания, относителното обилие на Ascomycota не корелира значимо с нивото на ТМ в почвата. Подобни резултати са получени от Passarini et al. (2022) при изследване на почви замърсени с ТМ в Бразилия. Те докладват, че голяма част от установените OTUs принадлежат на Ascomycota и само малка част (1.1%) принадлежат на отдел Basidiomycota. Авторите установяват най-високо относително обилие на Ascomycota в незамърсена почва.

5.3.2. Таксономичен състав на ниво клас и род

Едни от най-широко разпространените класове бактерии със средно относително обилие в бактериалните съобщества от 5.12% до 24.12% са Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria и Gammaproteobacteria (Proteobacteria); Actinomycetia, Thermoleophilia и Acidimicrobiia (Actinobacteriota); Clostridia (Firmicutes); Vicinamibacteria (Acidobacteriota); Bacteroidia (Bacteroidota); и Gemmatimonadetes (Gemmatimonadota) (фигури 7Б и 9Б). Някои от тези класове са доминантни според анализа на 16S рПНК генни клонови библиотеки (Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Acidimicrobiia и Clostridia), а други (Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Actinomycetia, Thermoleophilia, Vicinamibacteria, Bacteroidia и Gemmatimonadetes) според таргетно ампликон секвениране на 16S рПНК гена. Това е очаквано, тъй като различните методи за анализ на таксономичния профил на бактериалните съобщества се характеризират с различна степен на таксономична резолюция.

С най-голям брой класове като високо относително обилие са отделите Proteobacteria и Actinobacteriota. От отдел Proteobacteria с най-високо обилие са класове Alphaproteobacteria и Betaproteobacteria. Те са разпространени във всички почви, но преобладават в почва КСМ_2 и КСМ_1.2, които са с NPI от 7.99 до 9.27 (КСМ_2) и 23.12 (КСМ_1.2). Gammaproteobacteria също е с широко и сравнително равномерно разпространение, но най-високото обилие за този клас е установено в КСМ_5 (NPI: от 2.41 до 2.50). Фактът, че всички класове на отдел Proteobacteria са разпространени по целия градиент на замърсяване с ТМ показва тяхната толерантност към този антропогенен фактор на средата. Интересното е, че някои класове доминират в почви с NPI около 10, което предполага, че това ниво на замърсяване или стимулира тези класове бактерии или инхибира останалите и с това се увеличава техният дял в общото обилие. Редица изследвания доказват високата устойчивост на Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria и Gammaproteobacteria към факторите на средата (Tsementzi et al., 2016; Yim et al., 2022), включително и към редица замърсители (Song et al., 2018; Cui et al., 2018). Присъствието на тези бактериални класове в почвите осигурява редица важни екологични процеси като азотфиксация, минерализация и денитрификация (Alphaproteobacteria), разграждане на комплексни природни съединения (Betaproteobacteria и Gammaproteobacteria) и биодеградация на замърсители (Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria и Gammaproteobacteria) (Hartman et al., 2022). В предишни проучвания на нашия колектив е установено, че в замърсени почви с U, Cu, Zn, Pb и As от райони на минодобивна дейност в България

доминиращи са също представители от класове Alphaproteobacteria и Betaproteobacteria (Radeva et al. 2005, 2013). Liao et al. (2007) също установяват разпространението на тези класове в миннодобивни райони.

В настоящето изследване, Actinobacteriota е представена от три класа Actinomycetia, Thermoleophilia и Acidimicrobiia, с по-високо представителство в бактериалните съобщества на Actinomycetia и Acidimicrobiia (по около 9%). Thermoleophilia е представен от 1.8% (16S рРНК генни клонови библиотеки) до 6.4% (таргетно ампликон секвениране на 16S рРНК гена). Представителите на тези класове са устойчиви на влиянието на факторите на средата поради редица техни белези като високо съдържание на G+C (>60 -70 mol%), ригидни клетъчни стени, при някои наличие на мицеларен растеж (Actinomycetia), способност да разграждат комплексни органични съединения (Barka et al., 2016), способност да оцеляват в сухи, топли и олиготрофни среди (Thermoleophilia), както и способност да обитават среди с по-ниски стойности на рН (Acidimicrobiia) (Jones et al., 2025; Gao and Gupta, 2012). Acidimicrobiia се характеризира и с добра способност да окислява желязото и сярата, както и да трансформира метални съединения (Hanada et al. 2003). Въпреки високата им устойчивост, представителите на всички тези класове се срещат с по-високо относително обилие в слабо замърсената почва KCM_3 (Thermoleophilia; 8.62% - 14.48%) и в средно замърсената почва KCM_5 (Actinomycetia и Acidimicrobiia; 10.8% - 33.3%). С висока представителност е и клас Bacteroidia в KCM_5. Противоположно на всички тях, клас Gemmatimonadetes увеличава относителното си обилие в силно замърсената почва KCM_1.1 до 24% (16S рРНК генни клонови библиотеки) и в KCM_1 до 9.1% (таргетно ампликон секвениране на 16S рРНК генни клонови библиотеки) от общото обилие при средна стойност за всички останали почви съответно от 0.54% (16S рРНК генни клонови библиотеки) и 4.13% (таргетно ампликон секвениране на 16S рРНК генни клонови библиотеки). Подобна тенденция проявява и клас Chloroflexia, както и клас Bacilli, но при него повишеното обилие е в почва KCM_4, където нивото на замърсяване е високо (средна стойност на NPI: 27.87), но по-ниско от това на почва KCM_1 (средна стойност на NPI: 45.28).

Интересно е разпространението на класове Mucosoccia, Polyangia и Nitrospiria. Всички те са с ниска представителност (1% - 2%) в отделните почви, и всички те липсват в най-слабо замърсената почва KCM_3. Предполагаме, че в случая има друг ограничаващ фактор за развитието на тези класове в KCM_3 извън влиянието на ТМ. Подобно ниско относително разпределение (~1.5%) на клас Mucosoccota е установено и от Jiang et al. (2024) в почви с ниски нива на замърсяване с ТМ.

С използването на таргетно ампликон секвениране на 16S рРНК гена са определени редица родове на почвените бактериални съобщества (фигура 10). Голяма част от представителите на Alphaproteobacteria (*Sphingomicrobium_483265*, *Microvirga*, *Skermanella*, *Devosia_A_501803*, *Devosia_A_502124*, HRBIN40) са с най-високо обилие в слабо (KCM_3) и средно (KCM_5) замърсените почви, което е в съответствие с техния екологичен профил и участие в симбиотични взаимодействия (Liu et al., 2020). При родове от клас Gammaproteobacteria не е установено стриктно разпространение съобразно нивото на замърсяване, което е в съответствие с резултати от Zhou et al. (2019) Някои родове (SCGC-AG-212-J23, UBA5216) са повсеместно разпространени; други (*Solirubrobacter*, *Povalibacter*, SCUD01, *Nitrosospira*, *Luteimonas_C_615545*) преобладават в слабо или средно замърсени почви, а трети са с най-високо обилие в силно замърсените почви на KCM_4 (*Aquicella_A*). Това е потвърдено от Zhou et al. (2019), които съобщават, че родовете от клас Gammaproteobacteria са генералисти с висока екологична пластичност. Actinobacteriota и по-специално клас Actinomycetia са представени от редица родове с широко разпространение (*Nocardioides_A_392796*, *Streptomyces_G_399870*, *Blastococcus*), както и такива с конкретни предпочитания (*Mycobacterium*, *Corynebacterium*) към почви с ниско и средно ниво на замърсяване.

От отдел Actinobacteriota, клас Thermoleophilia е представен род AC-16, който се развива по-добре в силно замърсената почва KCM_4. Високата устойчивост към ТМ на родовете от отдел Actinobacteriota се свързва с ефективни антиоксидантни системи и механизми за детоксикация (Alvarez et al., 2021). Клас Bacteroidia е представен от родове *Chryseotalea* в KCM_1, и *Chryseolinea*, *Flavobacterium* и ELB16-189 в по-слабо замърсените почви. В силно замърсената почва на KCM_1 се установяват с по-високо обилие на родове в сравнение с останалите почви. Установени са UBA2421 (клас Phycisphaerae, отдел Planctomycetota), AG11 (клас Gemmatimonadetes, отдел Gemmatimonadota), *Sulfotelmato bacter* (клас Acidobacteriae, отдел Acidobacteriota), *Chryseotalea* (клас Bacteroidia, отдел Bacteroidota), което предполага развити механизми за резистентност към ТМ. Известно е, че UBA2421 имат важна роля в цикъла на сярата и азота, като тази активност може да бъде допълнително повлияна и дори стимулирана от наличието на ТМ в почвите (Lenferink et al., 2024). Противоположно на AG11, род JAABRT01 който също принадлежи на клас Gemmatimonadetes се развива най-добре в слабо замърсената почва KCM_5.

Проведеният ординационен анализ на таксономичното разнообразие на бактериалните съобщества (фигура 11) на ниво клас показва високо подобие на състава на бактериалните съобщества от почви KCM_2 и KCM_4, и голяма разлика между тях и останалите бактериални съобщества, както и между съобществата на почви KCM_3, KCM_5 и KCM_1. Предполагаме, че тези разлики основно се обуславят от присъствието на по-редки таксони, с ниска представителност. Вероятно, почви KCM_2 и KCM_4 се обитават от резистентни към ТМ таксони, но развитието на тези таксони вече е инхибирано в почва KCM_1 от по-високите нива на замърсяване. Отчитайки резултатите от фигура 16, можем да приемем съществуването на комплексен ефект на факторите на средата върху разпространението на бактериалните родове и тяхното относително обилие в съответните съобщества.

Проведеният PERMANOVA показва, че замърсяването с ТМ и в много по-малка степен дълбочината на почвата са значими фактори, които повлияват състава на бактериалните съобщества. В синхрон с тези резултати са и значимите корелации между съдържание на ТМ / почвена дълбочина и разпространението на някои класове бактерии. Тези резултати се потвърждават и от ССА на ниво род (фигура 16). Значима положителна корелация с нивото на замърсяване се наблюдава при разпространението на класове Acidobacteriae, Chloroflexia, Gemmatimonadetes, Planctomycetia, и по-редките класове Phycisphaerae, Saccharimonadia и Nitrospiria. Негативно от замърсяването се повлияват Alphaproteobacteria, Bacilli и по-редките класове UBA4738_401450 и Binatia. Спецификата и значимостта на реакцията отговор на бактериалните съобщества към нивото на замърсяване се определя от комбинираният ефект на замърсителите и стойностите на факторите на средата, които при други обстоятелства може да са различни. Важно е да отбележим, че макар замърсяването да е дълготрайно, все още се отчита селективната сила на ТМ върху бактериалните съобщества, което представлява външен фактор в тяхната еволюция и процеса на адаптация към средата на обитание.

Дълбочинното разпределение на представителите на установените класове е значимо само при Acidimicrobiia, Vicinamibacteria и Methylospiralia. Всички те увеличават относителната си численост в дълбочина на почвения профил. Възможните причини за този тип на разпределение може да са различни, например, предпочитания към по-ниски нива на кислород, по-ниско ниво на замърсяване в подповърхностния почвен слой, или комбинация от тези два фактора. Увеличение на относителното обилие на класовете Acidimicrobiia, Vicinamibacteria и Methylospiralia в почвена дълбочина е установено в различни проучвания и е свързано с ниско pH и ниски нива на кислород и хранителни вещества (Huber et al., 2022; Li et al., 2022; McReynolds et al., 2024).

Сравнителният анализ на резултатите показва, че обилието и разнообразието не корелира значимо с нивото на замърсяване и дълбочинното разпространение на бактериите, докато при таксономичния състав на съобществата се установява подобна корелация. Този на пръв поглед противоречив резултат подсказва, че промени в разпределението се извършват само при някои таксони. Това ни дава основание да приемем, че промените в таксономичния състав и структурата на бактериалните съобщества е по-чувствителен критерий за оценка на влиянието на ТМ в сравнение с показателите за обилие и разнообразие дори и в почви с десетилетна история на замърсяване.

Представителите на гъбните почвени съобщества са обединени в 10 класа, като най-разпространени от тях са Sordariomycetes, Eurotiomycetes, Dothideomycetes и Ascomycota_cls_Incertae_sedis (фигура 13Б). Профилът им на разпределение и структура предполага висока степен на устойчивост към ТМ и развитие в екстремни местообитания за сметка на други таксони (Eurotiomycetes; доминират в КСМ_1 и КСМ_4), както и промяна в обилието в зависимост от нивото на замърсяване (Sordariomycetes, Dothideomycetes и Ascomycota_cls_Incertae_sedis). Според корелационният анализ, Eurotiomycetes корелират значимо и положително с нивото на замърсяване, а Sordariomycetes и Dothideomycetes се повлияват негативно (фигура 14). Често профилът на разпределение и относителното обилие на тези класове се свързва и с етапите на разграждане на мъртвата органика в почвата – Dothideomycetes процъфтява в началните етапи, а Sordariomycetes и Eurotiomycetes - в края на процеса (Guo et al. 2022). Възможно е тази зависимост от състоянието на мъртвата органична материя в почвите да модифицира реакцията отговор към замърсяването с ТМ. Други автори също установяват широко разпространение на Eurotiomycetes в замърсени с ТМ почви (Ye et al. 2020; Muggia et al. 2017; Passarini et al. 2022). Например, Mohammadian et al. (2017), както и Passarini et al. (2022), установяват високо обилие на родове *Penicillium* и *Aspergillus*, които принадлежат към клас Eurotiomycetes и за които е установена способност да дезактивират Cr, Ni и други ТМ (Iram et al. 2012). В изследваните от нас почви, *Penicillium* и *Aspergillus* присъстват, но с по-високо относително обилие тези родове са при нива на замърсяване до NPI: 33.99. При по-голямото замърсяване на почвите, делът им в общото обилие бързо намалява – от 4.96% средно за двата рода на 1.81% в КСМ_1. В изследваните почви, с най-висока резистентност спрямо ТМ е род *Bacillicladium* (клас Eurotiomycetes, отдел Ascomycota), който присъства в КСМ_1 като 51.68% от общото обилие, в КСМ_4 като 30.86% от общото обилие, а в другите почви – средно като 1.98%. В почвите около КЦМ 2000 – Пловдив, освен горепосочените, Eurotiomycetes присъства с голям брой родове, като повечето (*Knufia*, *Arachnomycetes* и *Castanedomyces*) са преобладаващи в почви с ниво на замърсяване до NPI: 9.27.

По-голямата чувствителност на Sordariomycetes и Dothideomycetes към замърсявания с ТМ е потвърдена и от други автори (Sim et al., 2018), но както посочихме вече този отговор може да е модифициран от състоянието на мъртвата органична материя в почвата. Клас Sordariomycetes доминира с род *Fusarium*, които е почти повсеместно разпространен и представлява средно около 14.98% от общото обилие, но и с множество други родове (*Enterocarpus*, *Neoschizothecium*, *Myrmecridium*, *Dothideomycetes*, *Achroistachys*, Sordariales_gen_Incertae_sedis и *Coniochaeta*), които се развиват предимно в по-замърсени почви, но до нива на NPI от 33.99. Dothideomycetes е представен предимно от родове с конкретно разпространение, като с по-широко присъствие в изследваните почви е единствено род *Alternaria*, най-често свързан с разграждането на мъртвата органика в почвата и заболявания при растенията (Pavón et al., 2012). Както при предходните класове, съществуват родове с по-високо присъствие в по-слабо замърсените почви или обратно.

При гъбните съобщества, както и при бактериалните, нивото на замърсяване и в по-малка степен почвената дълбочина са значими фактори за разпространението на гъбните класове. Ординационният анализ на състава на гъбните съобщества на ниво клас (фигура 14) подкрепя този резултат. Гъбните съобщества в най-силно замърсените почви (КСМ_1 и КСМ_4) се сегрегират в компактна група, докато другите съобщества формират различни по степен на компактност групи. Въпреки това, слабо и средно замърсените почви се локализируют в един квадрант на ординационния плот, което предполага сравнително близки по таксономичен състав и структура съобщества. Тези резултати предполагат, че представителите на по-горепосочените гъбни класове имат потенциала да преодоляват стреса от замърсяването, но този потенциал се ограничава от нивото на замърсяване и вероятно се модулира от конкретните фактори на средата. Корелационният анализ не показва значима зависимост между дълбочината на почвата и промяната в обилието на гъбните класове. Това се потвърждава от редица проучвания, които показват, че таксономичния профил на гъбните съобщества се променя значително под въздействие на ТМ, докато почвената дълбочина няма ефект или оказва слабо и статистически незначимо влияние (Wang et al., 2021; Zhou et al., 2019; Rajapaksha et al., 2004).

Като заключение може да се твърди, че направеният таксономичен анализ на почвените микробни съобщества установява различия в техния състав и структура по градиента на замърсяването с ТМ. Съществуват класове и принадлежащите им родове, които са по-широко разпространени, което предполага добра адаптация към факторите на средата, както и към съдържанието на ТМ в почвата. При много от тези таксони, обаче, разпределението е ограничено от ниво на замърсяване до NPI 9.27 и само при някои до NPI 33.99. Много са малко таксоните (добре оценено предимно на ниво род), които са успели да преодолеят токсичността на ТМ и да се развият и в почва КСМ_1.1 с NPI от 67.43.

В зависимост от модела на таксономичния профил и промените в структурата на съобществата, можем да разграничим чувствителни, толерантни и резистентни класове както в бактериалните, така и в гъбните съобщества. Тази класификация е субективна, защото се определя от нивото на замърсяване (слабо, средно и високо в три степени на NPI), но зависи и от модифициращите ефекти на конкретните фактори на средата. Към чувствителните таксони причисляваме бактериалните класове Thermoleophilia и Bacteroidia, както и гъбния клас Ascomycota_cls_Incertae_sedis; към толерантните бактериални класове отнасяме Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Actinomycetia и Vicinamibacteria, а при гъбните съобщества – клас Dothideomycetes и клас Sordariomycetes; като резистентни класове определяме Gemmatimonadetes, Chloroflexia и Bacilli от бактериалните съобщества и Eurotiomycetes от гъбните съобщества. Бактериални родове с висока степен на резистентност са определени в КСМ_1 и те са UBA2421 (Phycisphaerae, Planctomycetota), AG11 (Gemmatimonadetes, Gemmatimonadota), Sulfotellmatobacter (Acidobacteriae, Acidobacteriota), Chryseotalea (Bacteroidia, Bacteroidota). Високо резистентни гъбни родове са Bacillicladium (Eurotiomycetes, Ascomycota), Curvularia (Dothideomycetes, Ascomycota) и в по-ниска степен Aspergillus и Penicillium (Eurotiomycetes, Ascomycota), и Fusarium (Sordariomycetes, Ascomycota). Всички тези таксони не само преодоляват токсичността на ТМ, но успяват да увеличат обилието си и да променят структурата на микробните съобщества на замърсените почви на нива, които са определени от техния екологичен и физиологичен потенциал.

5.3.3. Таксономичен състав на ниво вид

Конструирането на 16S рПНК генни клонови библиотеки позволява идентифициране на 16S рДНК последователности на ниво вид (~ 1500 bp), на базата на които е проведен филогенетичен

анализ (фигура 8). Филогенетичният анализ на 16S рДНК секвенциите идентифицира щамове като *M. neuiana*, strain PTW21 [KCM_1_1_49 (OQ422585)], *H. palleronii*, strain NBRC 102513 [KCM_1_2_3 (OQ422632)] и *P. rivuli*, strain FT92W [KCM_4_1_72 (OQ422734)] (Proteobacteria, Betaproteobacteria), *P. daejeonesis*, strain NBRC 101159 [KCM_5_1_108 (OQ422743) и KCM_5_1_114 (OQ422746); Proteobacteria, Gammaproteobacteria], както и *P. endophyticus*, strain PECAE04 [KCM_3_1_101 (OQ422910)] (Firmicutes, Bacilli). Горепосочените бактериални видове са разпределени в почви с различни нива на замърсяване, което потвърждава способността им да преживяват в екстремни среди, благодарение на наличието на гени, кодиращи устойчивост на ТМ (Holochova et al., 2020; Li et al., 2022). В слабо замърсената почва KCM_3.1 са идентифицирани 16S рДНК последователности, хомоложни с *A. ramosus*, strain DMS 43045 [KCM_3_1_9 (OQ422872)], което показва слаба толерантност на този вид към ТМ.

Филогенетичният анализ на 16S рДНК последователностите идентифицира ключови бактериални видове с високо таксономично сходство (>99% хомология) с щамове, принадлежащи главно към отделите Proteobacteria и Firmicutes. Видовете идентифицирани в силно замърсените почви са потенциални биоиндикатори за високо ниво на антропогенно замърсяване с ТМ. Същевременно, идентифицирането на вида *A. ramosus* само в слабо замърсените почви показва чувствителност към ТМ. Следователно този вид може да бъде причислен към чувствителните биоиндикатори, чието отсъствие сигнализира за влошено качество на средата.

5.4. Прогнозни механизми за резистентност в бактериалните съобщества

Проведеният метагеномен анализ позволи да установим прогнозни пътища на възникнала резистентност при бактериалните съобщества, използвайки наличната платформа KEGG Orthology (КО). Не е установена значима линейна корелация между нивото на замърсяване и броя/ честота на срещане на метаболитните пътища за резистентност. Това означава, че бактериалните съобщества, претърпяли дълга селекция поради дългогодишното замърсяване са резистентни към ТМ, независимо от конкретното ниво на замърсяване. Това са например бактериални съобщества, които могат да детоксикират наличните в почвата ТМ (Cu, Zn, Cd, As), както и такива като Hg. Установените основни механизми за устойчивост при бактериите към ТМ са синтез на ензими с принос при детоксикацията, както и протеини с различно предназначение – регулатори, експресори, транспортни системи и др.

Най-високата честота на гените, свързани с резистентност към ТМ е установена в силно замърсените почви от района на КЦМ 2000, което е вследствие от дълготрайното замърсяване. Установени са 26 ензими и протеини с различно обилие в изследваните почви, които участват в отстраняването на ТМ (фигура 17). Тези ензими са основни компоненти на механизмите за устойчивост към токсични метали. Сред тях, трите най-разпространени протеина (K15726, K07240 и K16264) са свързани с ефлукс системи за отстраняване на ТМ. Останалите KEGG пътища, които се срещат във висока честота в силно замърсените почви (например K12951, K15726, K15725, K07665, K07787 и K07798) са свързани с детоксикация на Cu, Co/Ni и Cr. Установено е, че след модификация тези пътища могат да бъдат използвани от бактериите за защита срещу Zn, Cd и Pb (Nies, 2003). Някои от тези пътища служат за основна защита на клетката срещу ТМ, а други са силно специализирани и се срещат само при добре адаптирани бактерии (Nies, 2003). Feng et al. (2018) също откриват увеличение в честотата на KEGG пътищата, свързани с метаболизма на аминокиселини, мастни киселини и нуклеотиди в почви, замърсени с Cd. Те предполагат, че микроорганизмите в замърсените почви адаптират метаболизма си, за да устоят на токсичните

ефекти на Cd, което е в съответствие с нашите резултати за адаптивни промени в прогнозната функция на почвените микробни съобщества. Goswami et al. (2022) определят директни корелации между концентрациите на Pb, Mn и Zn и обилието на KEGG пътища, свързани с гени за антибиотична резистентност и устойчивост към ТМ, което в съгласие с нашите резултати за влиянието на ТМ върху бактериалните съобщества и техните адаптационни механизми.

5.5. Функционални характеристики на почвените микробни съобщества

За да се установи влиянието на ТМ върху микробните съобщества е определена и тяхната функционална активност чрез анализ на почвената ензимна активност (гъби и бактерии) и чрез анализ на потенциала на бактериите да разграждат различни по химичен състав природни източници на въглерод.

Известно е, че продуценти на почвени ензими са основно почвените гъби, но също така в по-малка степен бактерии и растителност (Veena et al., 2011; Güsewell and Gessner, 2009; Burns et al. 2013). В изследването е определена активността на ключови ензими от различни метаболитни пътища (Dha, BGI, Ur, AcP, AlP, Ars), както и сумарната ензимна активност като резултат на сумата от тяхното действие. Общата ензимна активност варира между почвите, както и почвените слоеве. PERMANOVA показва, че нивото на замърсяване и почвената дълбочина са фактори, които повлияват върху ензимните активности в изследваните почви. SIMPER доказва общо несходство от около 30%, което основно се поддържа от Dha и BGI (общ принос в общото несходство около 65%). Има редица изследвания върху чувствителността на ензимите като биоиндикатори на почвеното здраве и ефектите на интоксикация на ТМ и много от тях посочват Dha като един от най-чувствителните ензими (Yang et al. 2016; Kenarova and Radeva, 2010; Kenarova et al., 2013; Palov et al., 2020).

С по-висока обща активност от изследваните почви са KCM_2 (индекс за ензимна активност: 9.59 ± 2.75) и повърхностния почвен слой като цяло. С най-ниска ензимна активност са почви KCM_1 (5.19 ± 0.87). Трудно може да се обясни високата активност в KCM_2, но предполагаме, че фактори за това могат да бъдат: високото съдържание на фосфати, ТОС и влага, едни от най-високите стойности на гъбно обилие (OTUs), голямо гъбно разнообразие (индекса на Shannon е с най-висока стойност в KCM_2.1), както и възможността по-ниските нива на замърсяване (NPI: 7.99 – 9.27) да стимулират микробната активност. ССА потвърждава тези резултати, като допълнително посочва като съществен фактор и съдържанието на ТМ.

По-прецизен анализ на ефектите на почвените параметри, включително ТМ, върху кръговрата на въглерода е направен с използване на тест Biolog Ecoplate. Отново, както и при изследването с ензимите, с най-висок метаболитен потенциал е почва KCM_2, а с най-нисък - KCM_1 (фигура 19). Статистически значима разлика в метаболитния потенциал между двете почвени дълбочини не съществува. Сравнително еднаквата активност на бактериалните съобщества показва, че те имат потенциала да компенсират до определено ниво ефектите на интоксикация чрез своята метаболитна пластичност. Много видове усвояват един и същ въглероден източник, което се постига чрез промени в състава на съобщества като чувствителните таксони се изместват от резистентни. Следователно, бактериалната активност може да се стимулира от конкретни фактори на средата, което до известна степен да маскира ефекта на интоксикация.

Метаболитните профили на усвояване на различни групи въглеродни съединения показват, че най-предпочитани са полимерните (Polym) източници на въглерод, следвани от въглехидратите

(CH) и аминокиселините (AA) (фигура 20). Това е естествен ред на предпочитания, тъй като микроорганизмите са се адаптирали към наличните в средата източници на въглерод, преобладаващо полимери, и тъй като при използването на тези източници се генерира най-голямо количество енергия (Martinez-Toledo et al. 2021; Xia et al., 2022). Предполагаме, че замърсяването изисква по-висок добив на енергия за поддържане на метаболитните пътища за дезактивация на ТМ и бактериите се насочват към разграждане на въглехидрати, които са с най-висока стойност на произведена енергия за молекула разграден субстрат. Аминокиселините освен източник на въглерод са и източник на азот. Скорошно проучване (Chinthalapudi et al, 2023) също посочва, че микробните сообщества, адаптирани към стресова среда показват предпочитание към AA. Подобна тенденция на по-усилено усвояване на Polym, CH и AA при замърсени с ТМ почви, е установена и от други автори (Feigl et al. 2017; Pradhan et al., 2019; Candan et al. 2021). Подобен механизъм на защита се включва при стресови състояния, когато бактериалните сообщества пренасочват метаболизма си към преференциално усвояване на определени категории източници на въглерод (Kenarova et al., 2014; Aleksova et al., 2021). Освен това, предишни изследвания на нашия колектив (Kenarova et al., 2013) не откриват значителна връзка между ТМ и метаболитната активност. Тези резултати подчертават значението на фактори като рН и съдържанието на ТОС, които могат да смекчат токсичния ефект на ТМ.

6. Изводи

1. Моделът на промяна на таксономичния профил на микробните съобщества по градиента на замърсяване с тежки метали показва, че замърсителят влияят значително върху състава, структурата и функцията на почвения микробиом, като се идентифицират и биоиндикаторни таксони за различни нива на замърсяване.
2. Конкретни абиотични фактори – почвена влага, органичен въглерод и фосфати – модифицират ефекта на интоксикация на тежките метали върху микробните съобщества.
3. Анотираните 26 метаболитни пътища, свързани с адаптацията на бактериалните съобщества към тежките метали в почвите, не корелират значимо с нивото на замърсяване, което показва висок потенциал за устойчивост на микробиома в изследваните почви.
4. Установеното високо микробно обилие и разнообразие във всички почви потвърждава устойчивостта на микробиома към тежките метали, което е предпоставка за реализиране на основните екологични процеси в антропогенно замърсените почви.
5. Установеното наличие на биоиндикаторни таксони като *Chloroflexia*, *Gemmatimonadetes*, *Planctomycetia* и *Bacillilcladium*, определя конкретния таксономичен профил, свързан с резистентността към тежките метали и предоставя методическа възможност за бърза индикация на ефектите на замърсяване с тежки метали върху почвени микробни съобщества.
6. Метаболитните профили на хетеротрофните бактерии се изместват към по-активно разграждане на сложни въглехидрати с акумулиране на повече енергия за нуждите на тяхната устойчивост.
7. Дехидрогеназата и бета-глюкозидазата са установени като индикатори за промените в замърсените почви, което показва запазена функционална активност в почвените процеси, дори и при високи нива на замърсяване.

7. Приноси на дисертационния труд

Приноси с оригинален характер

1. Проведено е първото комплексно изследване на микробиома в замърсени с тежки метали почви в България, което определи съществени промени в неговите състав, структура и функция по градиента на замърсяване.
2. Първо документирано присъствие на биоиндикаторни видове – *Neobacillus niacini*, *Massilia neuiana* и *Bacillus pseudomycooides*, свързани с устойчивост към тежките метали и *Agromyces ramosus* за слабо замърсяване в почви от района на КЦМ 2000, гр. Пловдив.
3. Доказване на ключови таксони в почвения микробиом по отношение на адаптацията към тежките метали:
 - ✓ Резистентни – представители на бактериалните класове: *Gemmatimonadetes*, *Chloroflexia* и *Bacilli* и на гъбния клас *Eurotiomycetes*.
 - ✓ Толерантни – представители на бактериалните класове *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Actinomycetia* и *Vicinamibacteria*, и на гъбните класове *Dothideomycetes* и *Sordariomycetes*.
 - ✓ Чувствителни – представители на бактериалните класове *Thermoleophilia* и *Bacteroidia* и гъбния клас *Ascomycota_cls_Incertae_sedis*.

Приноси с потвърдителен характер

1. Дълготрайното замърсяване на почвите с тежки метали води до влошаване на почвеното здраве в земеделски земи и оказва селективен натиск, който оформя структурата на микробиома и функционалния потенциал, водейки до доминиране на устойчиви и адаптирани микробни таксони.
2. Доказани са ключови таксони, които са характерни за замърсени с тежки метали почви, присъствието на бактериалните отдели *Proteobacteria*, *Acidobacteriota* и *Actinobacteriota* и гъбния отдел *Ascomycota*.

8. Използвана литература

1. Aleksova, M., Kenarova, A., Boteva, S., Georgieva, S., Chanev, C., & Radeva, G. (2021). Effects of increasing concentrations of fungicide Quadris® on bacterial functional profiling in loamy sand soil. *Archives of Microbiology*, 203(7), 4385–4396. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02423-2>
2. Aleksova, M., Palov, D., Dinev, N., Boteva, S., Kenarova, A., Dimitrov, R., & Radeva, G. (2020). Bacterial abundance along a gradient of heavy metal contaminated soils in the region of Zlatitsa-Pirdop valley, Western Bulgaria. *Proceedings of the Bulgarian Academy of Sciences*, 73(3), 395–403.
3. Banerjee, S., Zhao, C., Kirkby, C. A., Coggins, S., Zhao, S., Bissett, A., van der Heijden, M. G. A., Kirkegaard, J. A., & Richardson, A. E. (2021). Microbial interkingdom associations across soil depths reveal network connectivity and keystone taxa linked to soil fine-fraction carbon content. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 320, 107559. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2021.107559>
4. Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., et al. (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of the Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80, 1–43. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00019-15>
5. Bourceret, A., Cébron, A., Tisserant, E., Beguiristain, T., Leyval, C., & Leyval, C. (2016). The bacterial and fungal diversity of an aged PAH- and heavy metal-contaminated soil is affected by plant cover and edaphic parameters. *Microbial Ecology*, 71(3), 753–768. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0682-8>
6. Burns, R. G., DeForest, J. L., Marxsen, J., et al. (2013). Soil enzymes in a changing environment: Current knowledge and future directions. *Soil Biology and Biochemistry*, 58, 216–234. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.11.009>
7. Butcher, K. R., Nasto, M. K., Norton, J. M., & Stark, J. M. (2020). Physical mechanisms for soil moisture effects on microbial carbon-use efficiency in a sandy loam soil in the western United States. *Soil Biology and Biochemistry*, 150, 107969. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107969>
8. Candan, E. D., İdil, N., & Candan, O. (2021). The microbial community in a green turtle nesting beach in the Mediterranean: Application of the Biolog EcoPlate approach for beach pollution. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 49685–49696. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14196-8>
9. Chen, Y., Jiang, Y., Huang, H., Mou, L., Ru, J., Zhao, J., & Xiao, S. (2018). Long-term and high-concentration heavy-metal contamination strongly influences the microbiome and functional genes in Yellow River sediments. *Science of The Total Environment*, 637–638, 1400–1412.
10. Chinthalapudi, D. P. M., Pokhrel, S., Kingery, W. L., Shankle, M. W., & Ganapathi Shanmugam, S. (2023). Exploring the synergistic impacts of cover crops and fertilization on soil microbial metabolic diversity in dryland soybean production systems using Biolog EcoPlates. *Applied Biosciences*, 2(3), 328–346. <https://doi.org/10.3390/applbiosci2030022>
11. Christiansen, C. T., Engel, K., Hall, M., Neufeld, J. D., Walker, V. K., & Grogan, P. (2025). Arctic tundra soil depth, more than seasonality, determines active layer bacterial community variation down to the permafrost transition. *Soil Biology and Biochemistry*, 200, 109624. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2024.109624>
12. Cui, H., Liu, L.-L., Dai, J.-R., Yu, X. N., Guo, X., Yi, S.-J., Zhou, D.-Y., Guo, W.-H., & Du, N. (2018). Bacterial community shaped by heavy metals and contributing to health risks in cornfields. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 166, 259–269. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.09.094>
13. Davidova, S., Milushev, V., & Satchanska, G. (2024). The mechanisms of cadmium toxicity in living organisms. *Toxics*, 12(12), 875. <https://doi.org/10.3390/toxics12120875>

14. DeBruyn, J. M., et al. (2013). *Gemmatirosa kalamazoonesis* gen. nov., sp. nov., a member of the rarely-cultivated bacterial phylum *Gemmatimonadetes*. *Journal of General and Applied Microbiology*, 59, 305–312. <https://doi.org/10.2323/jgam.59.305>
15. Egidi, E., Delgado-Baquerizo, M., Plett, J. M., et al. (2019). A few *Ascomycota* taxa dominate soil fungal communities worldwide. *Nature Communications*, 10, 2369. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10373-z>
16. Estrada, R., Porras, T., Romero, Y., Sandoval-Denis, M., & Rangel-Castro, J. I. (2024). Soil depth and physicochemical properties influence microbial dynamics in the rhizosphere of two Peruvian superfood trees, cherimoya and lucuma, as shown by PacBio-HiFi sequencing. *Scientific Reports*, 14, 19508. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-69945-9>
17. Fajardo, C., Sánchez-Fortún, S., Costa, G., Nande, M., Botías, P., García-Cantalejo, J., Mengs, G., & Martín, M. (2020). Evaluation of nanoremediation strategy in a Pb, Zn and Cd contaminated soil. *Science of The Total Environment*, 706, 136041. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136041>
18. Fawaz, M. N. (2013). *Revealing the ecological role of Gemmatimonadetes through cultivation and molecular analysis of agricultural soils* (Master's thesis). University of Tennessee.
19. Feigl, V., Ujaczki, É., Vaszita, E., & Molnár, M. (2017). Influence of red mud on soil microbial communities: Application and comprehensive evaluation of the Biolog EcoPlate approach as a tool in soil microbiological studies. *Science of the Total Environment*, 595, 903–911. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.266>
20. Feng, G., Xie, T., Wang, X., et al. (2018). Metagenomic analysis of microbial community and function involved in Cd-contaminated soil. *BMC Microbiology*, 18, 11. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1152-5>
21. Fierer, N. (2017). Embracing the unknown: Disentangling the complexities of the soil microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 15(10), 579–590.
22. Gao, B., & Gupta, R. S. (2012). Phylogenetic framework and molecular signatures for the main clades of the phylum Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(1), 66–112. <https://doi.org/10.1128/MMBR.05011-11>
23. Goswami, A., Adkins-Jablonsky, S. J., Barreto Filho, M. M., Shilling, M. D., Dawson, A., Heiser, S., O'Connor, A., Walker, M., Roberts, Q., & Morris, J. J. (2023). Heavy metal pollution impacts soil bacterial community structure and antimicrobial resistance at the Birmingham 35th Avenue Superfund Site. *Microbiology Spectrum*, 11(2), e0242622. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02426-22>
24. Guo, Y., Cheng, S., Fang, H., Yang, Y., Li, Y., & Zhou, Y. (2022). Responses of soil fungal taxonomic attributes and enzyme activities to copper and cadmium co-contamination in paddy soils. *Science of The Total Environment*, 844, 157119. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157119>
25. Güsewell, S., & Gessner, M. O. (2009). N:P ratios influence litter decomposition and colonization by fungi and bacteria in microcosms. *Functional Ecology*, 23(1), 211–219.
26. Hao, J., Chai, Y., Lopes, L. D., Ma, Y., Lin, J., & Schachtman, D. P. (2021). The effects of soil depth on the structure of microbial communities in agricultural soils in Iowa, USA. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.02673-20>
27. Hartmann, M., & Six, J. (2023). Soil structure and microbiome functions in agroecosystems. *Nature Reviews Earth & Environment*, 4, 4–18. <https://doi.org/10.1038/s43017-022-00366-w>
28. Hemmat-Jou, M. H., Safari-Sinegani, A. A., Mirzaie-Asl, A., & Tahmourespour, A. (2018). Analysis of microbial communities in heavy metals-contaminated soils using the metagenomic approach. *Ecotoxicology*, 27(9), 1281–1291. <https://doi.org/10.1007/s10646-018-1981-x>
29. Holochova, P., Maslanova, I., Sedlacek, I., et al. (2020). Description of *Massilia rubra* sp. nov., *M. aquatica* sp. nov., *M. mucilaginis* sp. nov., *M. frigida* sp. nov., and one *Massilia* genomospecies isolated from Antarctic streams, lakes and regoliths. *Systematic and Applied Microbiology*, 43(5), 126112.

30. Huang, C.-C., Liang, C.-M., Yang, T.-I., et al. (2021). Shift of bacterial communities in heavy metal-contaminated agricultural land during a remediation process. *PLOS ONE*, 16(7), e0255137. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255137>
31. Huber, K. J., Vieira, S., Sikorski, J., Wüst, P. K., Fösel, B. U., Gröngroft, A., & Overmann, J. (2022). Differential response of Acidobacteria to water content, soil type, and land use during an extended drought in African savannah soils. *Frontiers in Microbiology*, 13, 750456. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.750456>
32. Islam, W., Noman, A., Naveed, H., and Huang, Z. (2022). Role of environmental factors in shaping the soil microbiome. *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10471-2>.
33. Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew, B. B., & Beeregowda, K. N. (2014). Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdisciplinary Toxicology*, 7(2), 60–72. <https://doi.org/10.2478/intox-2014-0009>
34. Jones, J. M., Benucci, G. M. N., & Evans, S. E. (2025). Drought increases microbial allocation to stress tolerance but with few tradeoffs among community-level traits. *Soil Biology and Biochemistry*, 205, 109787. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2025.109787>
35. Kenarova, A., & Radeva, G. (2010). Effects of copper and zinc on soil microbial enzymes. *Comptes Rendus de l'Académie Bulgare des Sciences*, 63, 105–112.
36. Kenarova, A., Radeva, G., Traykov, I., & Boteva, S. (2013). Community-level physiological profiles of bacterial communities inhabiting uranium mining impacted sites. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 100, 226–232. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.11.012>
37. Lenferink, W. B., van Alen, T. A., Jetten, M. S. M., Op den Camp, H. J. M., van Kessel, M. A. H. J., & Lückner, S. (2024). Genomic analysis of the class Phycisphaerae reveals a versatile group of complex carbon-degrading bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 117(1), 104. <https://doi.org/10.1007/s10482-024-02002-7>
38. Li, D., Zhang, X., Zhang, H., Fan, Q., Guo, B., & Li, J. (2025). A global meta-analysis reveals effects of heavy metals on soil microorganisms. *Journal of Hazardous Materials*, 491, 138018. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2025.138018>
39. Li, H., Ai, C., Zhao, X., et al. (2022). The capability of *Bacillus pseudomycoides* from soil to remove Cu(II) in water and prevent it from entering plants. *Journal of Applied Microbiology*, 132(3), 1914–1925.
40. Li, X., Cui, Y., Ma, D., Song, D., & Liu, L. (2022). Vertical distribution of bacterial community diversity in the Greater Khingan Mountain permafrost region. *Ecology and Evolution*, 12(7), e9106. <https://doi.org/10.1002/ece3.9106>
41. Liu, H., Wang, C., Xie, Y., Luo, Y., Sheng, M., Xu, F., & Xu, H. (2020). Ecological responses of soil microbial abundance and diversity to cadmium and soil properties in farmland around an enterprise-intensive region. *Journal of Hazardous Materials*, 392, 122478. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122478>
42. Martinez-Toledo, A., Gonzalez-Mille, D. J., Garcia-Arreola, M. E., Cruz-Santiago, O., Trejo-Acevedo, A., & Ilizaliturri-Hernandez, C. A. (2021). Patterns in utilization of carbon sources in soil microbial communities contaminated with solid wastes from San Luis Potosí, Mexico. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208, 111493. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.111493>
43. McReynolds, E., Elshahed, M. S., & Youssef, N. H. (2024). An ecological-evolutionary perspective on the genomic diversity and habitat preferences of the Acidobacteriota. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2024.07.05.601421> (Update forthcoming in *Microbial Genomics*, 2025).
44. Nacke, H., Thumer, A., Wollherr, A., Will, C., Hodac, L., Herold, N., et al. (2011). Pyrosequencing-based assessment of bacterial community structure along different management types in German forest and grasslands soils. *PLoS ONE*, 6(2), e17000.

45. Nies, D. H. (2003). Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, 27, 313–339. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00048-2](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00048-2)
46. Pacwa-Plociniczak, M., Plociniczak, T., Yu, D., Kurola, J. M., Sinkkonen, A., Piotrowska-Seget, Z., & Romantschuk, M. (2018). Effect of *Silene vulgaris* and heavy metal pollution on soil microbial diversity in long-term contaminated soils. *Water, Air, & Soil Pollution*, 229, 13. <https://doi.org/10.1007/s11270-017-3683-7>
47. Palov, D. D., Aleksova, M. R., Nikolova, R. N., et al. (2020). Relationships between soil microbial activity, bacterial diversity and abiotic factors along the heavy metal contamination gradient. *Ecology*, 3, 31–39.
48. Passarini, M. R. Z., Ottoni, J. R., Costa, P. E., et al. (2022). Fungal community diversity of heavy metal contaminated soils revealed by metagenomics. *Archives of Microbiology*, 204, 255. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-02860-7>
49. Pavón Moreno, M. Á., González Alonso, I., Martín de Santos, R., & García Lacarra, T. (2012). Importancia del género *Alternaria* como productor de micotoxinas y agente causal de enfermedades humanas. *Nutrición Hospitalaria*, 27(6), 1772–1781. <https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.6.6017>
50. Petkova, M., Nankova, N., Kancheva, V., Boteva, S., Kenarova, A., & Radeva, G. (2023). Distribution of microbial abundance in long-term copper contaminated soils from Topolnitsa-Pirdop valley, Southern Bulgaria. In S. Chankova, K. Danova, M. Beltcheva, G. Radeva, V. Petrova, & K. Vassilev (Eds.), *Actual problems of ecology (BioRisk)*, 20, pp. 23–35. <https://doi.org/10.3897/biorisk.20.97795>
51. Pradhan, S. K., Kumar, U., Singh, N. R., & Thatoi, H. (2019). Functional diversity and metabolic profile of microbial community of mine soils with different levels of chromium contamination. *International Journal of Environmental Health Research*, 30(4), 461–473. <https://doi.org/10.1080/09603123.2019.1601686>
52. Prokop, Z., Cupr, P., Zlevorova-Zlamalikova, V., Komarek, J., Dusek, L., & Holoubek, I. (2003). Mobility, bioavailability, and toxic effects of cadmium in soil samples. *Environmental Research*, 91(2), 119–126. [https://doi.org/10.1016/s0013-9351\(02\)00012-9](https://doi.org/10.1016/s0013-9351(02)00012-9)
53. Radeva, G., Kenarova, A., Bachvarova, V., et al. (2013). Bacterial diversity at abandoned uranium mining and milling sites in Bulgaria as revealed by 16S rRNA genetic diversity study. *Water, Air, and Soil Pollution*, 224, Article 1748. <https://doi.org/10.1007/s11270-013-1748-1>
54. Rajapaksha, R. M. C. P., Tobor-Kapoin, M. A., & Baath, E. A. (2004). Metal toxicity affects fungal and bacterial diversity differently. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 2966–2973.
55. Siebielec, S., Siebielec, G., Klimkowicz-Pawlas, A., et al. (2020). Impact of water stress on microbial community and activity in sandy and loamy soils. *Agronomy*, 10(10), 1429.
56. Sim, C. S. F., Cheow, Y. L., Ng, S. L., et al. (2018). Discovering metal-tolerant endophytic fungi from the phytoremediator plant *Phragmites*. *Water, Air, & Soil Pollution*, 229, 68. <https://doi.org/10.1007/s11270-018-3733-1>
57. Sintoni, M. M., Widyatmoko, H., Sinaga, E., & Aliyah, N. (2021). IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci., 737, 012071. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/737/1/012071>
58. Song, J., Shen, Q., Wang, L., Qiu, G., Shi, J., Xu, J., Brookes, P. C., & Liu, X. (2018). Effects of Cd, Cu, Zn and their combined action on microbial biomass and bacterial community structure. *Environmental Pollution*, 243, 510–518. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.09.011>
59. Stan, V., Gament, E., Cornea, C. P., Voaides, C., Dusa, M., & Plopeanu, G. (2011). Effects of heavy metal from polluted soils on the *Rhizobium* diversity. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 39(1), 88–95.
60. Stefanowicz, A. M., Kapusta, P., Zubek, S., Stanek, M., & Woch, M. W. (2020). Soil organic matter prevails over heavy metal pollution and vegetation as a factor shaping soil microbial communities at historical Zn–Pb mining sites. *Chemosphere*, 247, 124922. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124922>

61. Tedersoo, L., Bahram, M., Põlme, S., Kõljalg, U., Yorou, N. S., Wijesundera, R., ... & Abarenkov, K. (2014). Global diversity and geography of soil fungi. *Science*, 346, 1256688. <https://doi.org/10.1126/science.1256688>
62. Tipayno, S. C., Truu, J., Samaddar, S., Truu, M., Preem, J.-K., Oopkaup, K., ... & Sa, T. (2018). The bacterial community structure and functional profile in the heavy metal contaminated paddy soils surrounding a nonferrous smelter in South Korea. *Ecology and Evolution*, 8, 10704–10714. <https://doi.org/10.1002/ece3.4170>
63. Wang, X., Du, C., Li, Y., Liu, S., Zeng, X., Li, Y., Wang, S., & Jia, Y. (2025). Metal pollution-induced alterations in soil fungal community structure and functional adaptations across regional scales. *Journal of Hazardous Materials*, 494, 138553. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2025.138553>
64. Wang, Z., Luo, P., Zha, X., Xu, C., Kang, S., Zhou, M., Nover, D., & Wang, Y. (2022). Overview assessment of risk evaluation and treatment technologies for heavy metal pollution of water and soil. *Journal of Cleaner Production*, 379(Part 2), 134043. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.134043>
65. Weber, K., & Legge, R. (2009). One-dimensional metric for tracking bacterial community divergence using sole carbon source utilization patterns. *Journal of Microbiological Methods*, 79(1), 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.07.020>
66. Wiegand, S., Jogler, M., Boedeker, C., et al. (2020). Cultivation and functional characterization of 79 planctomycetes uncovers their unique biology. *Nature Microbiology*, 5, 126–140. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0588-1>
67. Wilkinson, J. E., Bruand, J., Chua, K. P., Ferrao, H., Lee, D., Zhou, J., Locken, K., Tang, S., Thai, E., Sherman, J., Farthing, B., & Tseng, E. (2025). High-resolution microbiome species profiling at scale with the Kinnex kit for full-length 16S rRNA sequencing. *PacBio & Zymo Research*.
68. Yang, J., Yang, F., Yang, Y., et al. (2016). A proposal of “core enzyme” bioindicator in long-term Pb–Zn ore pollution areas based on topsoil property analysis. *Environmental Pollution*, 213, 760–769. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.03.074>
69. Yang, Q., Zhang, L., Wang, H., & Delgado, J. (2022). Bioavailability and health risk of toxic heavy metals (As, Hg, Pb and Cd) in urban soils: A Monte Carlo simulation approach. *Environmental Research*, 214, 113772. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113772>
70. Yim, B., Ibrahim, Z., Rüger, L., Ganther, M., Maccario, L., Sørensen, S. J., Heintz-Buschart, A., Tarkka, M. T., Vetterlein, D., Bonkowski, M., Blagodatskaya, E., & Smalla, K. (2022). Soil texture is a stronger driver of the maize rhizosphere microbiome and extracellular enzyme activities than soil depth or the presence of root hairs. *Plant and Soil*, 478, 229–251.
71. Zeng, X.-Y., Li, S.-W., Leng, Y., & Kang, X.-H. (2020). Structural and functional responses of bacterial and fungal communities to multiple heavy metal exposure in arid loess. *Science of the Total Environment*, 723, 138081. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138081>
72. Zhang, C., Chen, Z., Zhang, M., & Jia, S. (2023). KEGG_Extractor: An effective extraction tool for KEGG orthologs. *Genes*, 14(2), 386. <https://doi.org/10.3390/genes14020386>
73. Zhang, C., Lin, Z., Que, Y., Fallah, N., Tayyab, M., Li, S., Luo, J., Zhang, Z., Abubakar, A. Y., & Zhang, H. (2021). Straw retention efficiently improves fungal communities and functions in the fallow ecosystem. *BMC Microbiology*, 21, 52. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02115-3>
74. Zhou, Y., Wang, L., Xiao, T., Chen, Y., Beiyuan, J., She, J., Zhou, Y., Yin, M., Liu, J., Liu, Y., Wang, Y., & Wang, J. (2020). Legacy of multiple heavy metal(loid)s contamination and ecological risks in farmland soils from a historical artisanal zinc smelting area. *Science of The Total Environment*, 720, 137541. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137541>
75. Zhou, Z., Wang, C., & Luo, Y. (2020). Meta-analysis of the impacts of global change factors on soil microbial diversity and functionality. *Nature Communications*, 11, 3072. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16881-7>

76. Zhu, Q., Ji, J., Tang, X., Wang, C., & Sun, H. (2023). Bioavailability assessment of heavy metals and organic pollutants in water and soil using DGT: A review. *Applied Sciences*, 13(17), 9760. <https://doi.org/10.3390/app13179760>

Публикации по темата на дисертацията

1. **Nikolova, R.**, Kenarova, A., Boteva, S., Dinev, N., Radeva G. 2024. Diversity and structure of soil bacterial communities in the area of non-ferrous metal plant revealed by 16S rRNA gene retrieval. *Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences*, vol. 77 (8), 1260–1268, IF=0.3, <https://doi.org/10.7546/CRABS.2024.08.18>, Q3
2. **Nikolova, R.**, Boteva, S., Kenarova, A., Dinev, N., Radeva, G. 2023. Enzyme activities in soils under heavy metal pollution: a case study from the surroundings of a non-ferrous metal plant in Bulgaria. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 37 (1), doi.org/10.1080/13102818.2022.2149348, IF=1.762, Q3
Забелязани цитати към 01.08.25- 22
3. **Nikolova, R.**, Petkova, M., Dinev, N., Kenarova, A., Boteva, S., Berov D, Radeva G. 2022. Correlation between bacterial abundance, soil properties and heavy metal contamination in the area of non-ferrous metal processing plant, Southern Bulgaria. *BioRisk* (17), pp. 19–30.DOI: 10.3897/biorisk.17.77458, SJR=0.17, Q4
Забелязани цитати към 01.08.25: 7
4. **Nikolova, R.**, Radeva, G., Kirilov, K., Dinev, N., Boteva, S., Kenarova, A. 2023. Анотирани са 166 достоверни 16S ribosomal RNA gene, partial sequences в GenBank, accession No OQ422575-OQ422639; OQ422707-OQ422751; OQ422861-OQ422916.

Други публикации

1. Palov, D., **Nikolova, R.**, Aleksova, M., Dinev, N., Boteva, S., Kenarova, A., Dimitrov, R., Radeva, G. 2019. Анотирани са 99 достоверни 16S ribosomal RNA gene, partial sequences в GenBank с accession No MN708054 – MN708152.
2. Palov, D., Aleksova, M., **Nikolova, R.**, Dinev, D., Kenarova, A., Boteva, B., Dimitrov, R., Radeva, G. 2020. Relationships between soil microbial activity, bacterial diversity and abiotic factors along the heavy metal contamination gradient. *Ecologia Balkanica*, 12(3), 31–39.

Участия в конференции

1. **Николова, Р.**, Радева, Г. Таксономичен и функционален анализ на почвения микробиом по концентрационния градиент на замърсяване с тежки метали. Първо национално лятно училище по природни продукти с приложение в медицината, 28.06-02.07.2021, Творчески дом на БАН, Варна. Доклад.
2. **Nikolova, R.**, Aleksova, M., Dinev, N., Kenarova, A., Boteva, S., Berov, D., Radeva, G. Correlation between bacterial abundance, soil properties and heavy metal contamination in the area of non-ferrous metal processing plant, Southern Bulgaria. International Seminar of Ecology – 2021 “Current trends of ecology”, 29-30 September 2021, Online seminar. Доклад.
Спечелена награда: Award Certificate for the best oral presentation
3. Radeva, G., **Nikolova, R.**, Gatev, E., Kenarova, A., Petkova, M., Dinev, N., Boteva, S. Impact of heavy metal pollution on soil bacterial community structure in the area of a non-ferrous metal processing plant, Southern Bulgaria.“. International Conference on DNA Barcoding and Biodiversity (ICDBB). 25-27 May 2022. Sofia, Bulgaria. Постер.
4. **Nikolova, R.**, Kenarova, A., Boteva, S., Dinev, N., Gatev, E., Radeva, G. Composition and functioning of the bacterial communities in heavy metal contaminated soils: A case study from the surroundings of a non-ferrous metal plant in Bulgaria“. 100 anniversary of the birth of Acad. Roumen Tsanev conference, 5-7 October 2022, Sofia. Доклад.
5. **Николова, Р.**, Кирилов, К., Динев, Н., Кенарова, А., Радева, Г. Два молекулярни подхода за изучаване структурата на бактериалните съобщества. Трето национално лятно училище по природни продукти с приложение в медицината, 27.06-02.07.2023, Бургас. Доклад.
6. **Nikolova, R.**, Kirilov K., Dinev, N., Kenarova, A., Boteva, S., Radeva, G. Impact of heavy metals on the structure of soil bacterial communities in the area of non-ferrous metal plant. 4th Interdisciplinary PhD Forum with International Participation, 16-19 May 2023, Sandanski, Bulgaria. Постер.
7. Radeva, G., **Nikolova, R.**, Gatev, E., Kirilov, K., Kenarova, A., Boteva, S., Dinev, N. What are the key factors determining the diversity and abundance of soil microbial community along a gradient of heavy metal contamination. International seminar of Ecology – 2023 “Cutting Edge Research of Ecology”, 28-29 September 2023, Sofia, Bulgaria. Пленарен доклад.
8. **Nikolova, R.**, Kirilov, K., Dinev, N., Kenarova, A., Boteva, S., Radeva, G. Impact of heavy metals on the structure of soil bacterial communities in the area of non-ferrous metal plant. International seminar of ecology – 2023 “Cutting Edge Research of Ecology”, 28-29 September 2023, Sofia, Bulgaria. Доклад.
Спечелена награда: Award Certificate for the best oral presentation
9. Bidzhova, L., Georgiev, S., Radeva, G., **Nikolova, R.** Mercury in soils near a base metal smelting plant, Plovdiv, Bulgaria. 37th International Geological Congress 2024, 25-31 August 2024, Busan, South Korea. Постер.