



Tolerancja szczepu bakterii *Cupriavidus metallidurans* na jony metali

Bacterium *Cupriavidus metallidurans* Strain's Tolerance of Metal Ions

Hana VOJTKOVÁ ¹⁾, Romana JANULKOVÁ ²⁾, Pavla ŠVANOVÁ ³⁾

¹⁾ Mgr., Ph.D.; Institute of Environmental Engineering, Faculty of Mining and Geology, VŠB – Technical University of Ostrava 17. listopadu 15, 708 33 Ostrava – Poruba, Czech Republic, e-mail: hana.vojtkova@vsb.cz, tel.: (+420) 597 323 541

²⁾ Bc.; Institute of Environmental Engineering, Faculty of Mining and Geology, VŠB – Technical University of Ostrava 17. listopadu 15, 708 33 Ostrava – Poruba, Czech Republic, e-mail: romana.janulkova@seznam.cz

³⁾ Bc.; Institute of Environmental Engineering, Faculty of Mining and Geology, VŠB – Technical University of Ostrava 17. listopadu 15, 708 33 Ostrava – Poruba, Czech Republic, e-mail: pavla.svanova@centrum.cz

Streszczenie

W doświadczeniu eksperymentalnie zbadano tolerancję szczepu bakterii *Cupriavidus metallidurans* CCM 7663 na wybrane stężenie jonów metalu. Wyniki pokazują bardzo dobrą tolerancję na jony Ni^{2+} , Cd^{2+} , Ag^+ , Pb^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} . Zidentyfikowane wartości tolerancji uzupełniono przez właściwości fizjologiczne szczepu oznaczając w ten sposób możliwość zastosowania bakterii w procesach aktywnej biomineralizacji i metodach biotechnologicznych przetwarzania rud i odzysku trudno dostępnych metali.

Słowa kluczowe: biomineralizacja, opór metalu, tolerancja, *Cupriavidus metallidurans*

Wprowadzenie

Nowe, zmodyfikowane, metody biotechnologii mineralnych umożliwiają zastosowanie odpowiednich mikroorganizmów w metodach odzyskiwania użytecznych metali ze złóż, w specjalnych metodach ekstrakcyjnych i odzyskiwaniu rzadkich metali z niskogatunkowych rud, w wmywaniu rudy metodami ekstrakcji biochemicznej lub w przypadku oczyszczania wody odpływowej pochodzącej z wzbogacania rud i jej późniejszej przeróbki przemysłowej (Kusnierova i Fecko, 2001). Na przebieg zastosowanych w praktyce bioprocessów znaczący wpływ może mieć użycie odpowiednio przystosowanych szczepów mikroorganizmów. Znaczącą grupą bakterii związaną z procesami są metalofile, które mogą być wyizolowane ze środowiska zawierającego duże stężenie przenośnych jonów metali.

Rodzaj *Cupriavidus* jest środowiskowo ważną grupą bakterii, której dominujący status został udowodniony wewnątrz naturalnej mikroflory w środowiskach zanieczyszczonych metalami ciężkimi (Goris i inni, 2001; Diels i inni, 1995). Pomiędzy opisanymi jako pierwsze, gatunkami sklasyfikowanych wśród „nieobli-

Summary

The study experimentally examines the tolerance of the bacterium *Cupriavidus metallidurans* strain CCM 7663 of the selected ion metal concentration. The results show a very good metallic tolerance of Ni^{2+} , Cd^{2+} , Cr^{3+} , Ag^+ , Pb^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} ions. The identified tolerance values are complemented by the physiological properties of the strain and thus imply its possible application in the processes of active biomineralization and biotechnological methods of ore processing and retrieval of rare or less available metals.

Keywords: biomineralization, metal resistance, tolerance, *Cupriavidus metallidurans*

Introduction

New modified procedures of mineral biotechnologies facilitate applications of suitable microorganisms in the working methods of useful metals from mineral deposits, in additional extraction methods and in retrieval of residual metals from low-grade, non-balance ores, in other extraction methods of biological-chemical leaching of ore leaching, or in treating waste water arising from mineral dressing and their further industrial processing (Kusnierová and Fečko 2001). The course of the applied bioprocesses in practice may be predominantly influenced by an application of conveniently physiologically adapted strains of microorganisms. A significant group of bacteria involved in the processes are metallophilic microorganisms which may be isolated from environments containing high concentrations of mobile metallic ions.

Cupriavidus genus is an environmentally important group of bacteria whose dominant status has been proven within the natural microflora in environments contaminated by heavy metals (Goris et al. 2001, Diels et al. 1995). Despite the first described species being classified among “non-obligate bacterial predators of

gatoryjnych bakteryjnych drapieżników różnych gleb” (Makkar i Casida, 1987; Vandamme i Coenye, 2004), kilkadziesiąt przedstawicieli rodzaju zostało zastosowane w wielu ciekawych procesach biotechnologicznych, głównie w obszarze biotechnologii mineralnej (Reith i inni, 2006; Seo i inni, 2009).

Cupriavidus metallidurnas jest obecnie charakteryzowany jako ważny reprezentant rodzaju z gramujemną komórką w postaci pręcików wokołorzęsy. Metabolizm jest oksydacyjny z kilkoma aminokwasami użytymi jako źródła węgla i azotu, katalaza i oksydaza są aktywne i opór wobec różnych metale można określić. Taksonomia szczepu bakteryjnego jest poddawana wielu przemianom – nazwę szczepu zmieniono z *Ralstonia metallidurans* (Vandamme i Coenye, 2004), poprzednio znany był jako *Ralstonia eutropha* i *Alcaligenes eutrophus* (Gori i inni, 2001; Vaneechoutte i inni, 2004).

Substancje i metody

Szczepy bakteryjne i kultywowanie

Szczepy bakteryjne *Cupriavidus metallidurans* CCM 7663^T (DSM 2839 = LMG 1195 = NEU 2109 = szczep CH34) otrzymano z Czeskiego Zbioru Mikroorganizmów (CZM, ang. CCM). Szczep został wyodrębniony ze zbiornika dekantacyjnego w fabryce cynku jako bakteria odporna na jony Zn²⁺. Próbkę przygotowano na krążkach żelatynowych i reaktywowano przy użyciu standardowej procedury zgodnej z metodą CCM (http://www.sci.muni.cz/ccm/download/oziv_GD.pdf). Tryptonowa pożywka sojowa i tryptonowy agar sojowy (HiMedia Laboratories Ltd., Mumbai, India) zostały użyte w celu hodowli szczepu.

Przygotowanie roztworu jonów metalu

Jony metaliczne zostały dodane w formie NiSO₄, CdSO₄, MgSO₄, FeSO₄, CuSO₄, Pb(NO₃)₂, AgNO₃, Cr(NO₃)₃ jako równoważnik proporcji wagowej do płynnego medium w celu otrzymania końcowego stężenia wynoszącego 10mM/l; ta koncentracja została wybrana na podstawie wcześniej opublikowanych badań aby zaobserwować opór szczepów bakteryjnych na działanie jonów metali ciężkich (Keramati i inni, 2011; Fleck i inni 2000; Bruins i inni 2000) oraz zgodnie z oczekiwaną zawartością metali niebezpiecznych w glebach i osadach w aglomeracji przemysłowej. Roztwory zostały wyjałowione przy użyciu filtra membranowego i mikrofiltrów Millipore o porach średnicy 0,22 μm użytych następnie w celu przygotowania odczynnika finalnego do obserwacji wzrostu szczepu bakterii.

Identyfikacja maksymalnej tolerancji na metal

Roztwór końcowy został rozcieńczony dzięki ste-

various soil bacteria” (Makkar and Casida 1987, Vandamme and Coenye 2004), to date several tens of representatives of the genus have been characterized with a number of interesting biotechnological applications, mainly in the field of mineral biotechnology (Reith et al. 2006) and environmental biotechnology (Cuadrado et al. 2010, Monchy et al. 2006, Seo et al. 2009).

Cupriavidus metallidurnas is nowadays characterized as an important representative of the genus with a Gram-negative cell of peritrichously flagellated rods. The metabolism is oxidative with several aminacids used as sole carbon and nitrogen sources, catalase and oxidase activity is produced and resistance to various metals is described. The taxonomy of the bacterial strain is undergoing a number of changes – the strain has been renamed from *Ralstonia metallidurans* (Vandamme and Coenye 2004), previously known as *Ralstonia eutropha* and *Alcaligenes eutrophus* (Gori et al. 2001, Vaneechoutte et al. 2004).

Materials and methods

Bacterial strain and cultivation

Bacterium *Cupriavidus metallidurans* strain CCM 7663^T (DSM 2839 = LMG 1195 = NEU 2109 = strain CH34) was obtained from the Czech Collection of Microorganisms (CCM), which had been isolated as a resistant bacterium to Zn²⁺ ions from a decantation tank in a zinc factory. The samples were prepared on gelatin discs and reactivated using the standard procedure according to CCM method (http://www.sci.muni.cz/ccm/download/oziv_GD.pdf). Trypton soya broth and Trypton soya agar (HiMedia Laboratories Ltd., Mumbai, India) were used to culture the strain.

Preparation of metal solution

Metallic ions were added in the form of Ni SO₄, CdSO₄, MgSO₄, FeSO₄, CuSO₄, Pb(NO₃)₂, AgNO₃, Cr(NO₃)₃ as an equivalent weight proportion to the liquid medium volume to obtain the final concentration of 10 mM/l; this concentration was selected on the basis of previous published studies to observe bacterial strain resistance to heavy metal ions (Keramati et al. 2011, Fleck et al. 2000, Bruins et al. 2000) and with regard to the expected content of hazardous metals in the soils and sediments in the industrial agglomeration. The solutions were sterilized using a membrane filtration and Millipore microfilters of 0.22 μm pore size, and further used for the preparation of the final medium to observe the bacterial strain growth.

Identification of maximum metal tolerance

The final metal solution was diluted by a sterile

rylnemu odczynnikowi o koncentracji 1 – 10 mM/l. Rurki zostały zaszczipione bakteriami w fazie eksponentialnego wzrostu, który odnosił się do kultur 48-godzinnych. Wzrost szczepu bakteryjnego był obserwowany przez następne 48 godzin i jednocześnie zaszczipiano płytki Petriego zawierające tryptonowy agar sojowy.

Wyniki i dyskusja

Maksymalna tolerowalna koncentracja i adaptacja szczepów bakteryjnych

Wyniki maksymalnej tolerancji na wybrane stężenia jonów metali (MDS – maksymalne dopuszczalne stężenie, ang. MTC) w szczepach bakterii *Cupriavidus metallidurans* CCM 7663 zestawiono w Tabeli 1.

Bardzo wysoki opór w obrębie stężenia 1 – 10 mM/l został zaobserwowany w przypadku Ni, Mg, Fe i Pb; interesujący jest fakt, że jony Ag działały jak hamulec.

Porównując otrzymane rezultaty z dostępnymi wynikami badań (Malik i Aleem, 2011; Hussein i inni, 2004) dla 18 odizolowanych szczepów bakterii *Pseudomonas*genus (reprezentowane głównie przez gatunek *Pseudomonasputida*) z wody odpadowej zanieczyszczonej metalami ciężkimi, szczepy te odznaczają się wysoką odpornością i akumulowaniem jonów metali ciężkich. Wszystko wskazuje na to, że szczep bakterii *Cupriavidus metallidurans* CCM 7663 jest szczególnie ze względu na jego wysoką tolerancję na badane jony metali (patrz Rys. 1).

Różnice w jakości przyrostu bakteryjnego w zależności od powierzchni do adaptacji zostały również opisane przez innych autorów (Bruins i inni, 2000; Sengor i inni, 2009), a prace pokazują wzrost tolerancji na metale w zależności od stężenia metali w środowisku pochodzenia (Vojtkova i inni, 2012). Tolerancja szczepu na wysokie stężenie metali, antybiotyków i całej innej gamy zanieczyszczeń organicznych i nieorganicznych w środowisku jest wspierana przez naturalne współistnienie mechanizmów adaptacyjnych. Podczas badania podstaw genetycznych odporności bakterii na jony metali dowiedziono, że dysponują one szerokim spektrum kompatybilnych plazmidów (Diels i inni, 1995). W szczepie *C. metallidurans* zidentyfi-

medium in the concentration set 1 – 10 mM/l. Tubes were inoculated with bacterial strains in the exponential growth phase, which corresponds to 48-hour cultures. The bacterial strain growth was observed for the next 48 hours having been re-inoculated onto Petri dishes containing Trypton soya agar medium.

Results and discussions

Maximum tolerable concentration and metal adaptation of bacterial strain

The results of maximum tolerance to the selected metallic ion concentration (MTC – maximum tolerable concentration) in the bacterium *Cupriavidus metallidurans* strain CCM 7663 are in Table 1.

A very high capacity of resistance within the examined metal concentration 1–10 mM/l was manifested in Ni, Mg, Fe and Pb; an interesting finding is a high capacity of inhibition by Ag ions.

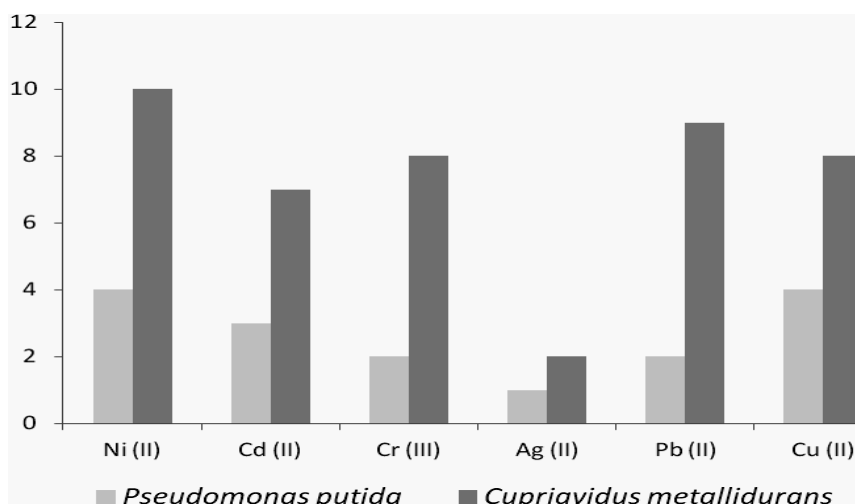
Comparing the results with available study results (Malik and Aleem 2011, Hussein et al. 2004) for 18 isolated strains of *Pseudomonas* genus (predominantly represented by *Pseudomonas putida* species), from heavy metal contaminated wastewater site, these isolates have a high ability to resist and accumulate heavy metal ions, it is implied that the bacterium *Cupriavidus metallidurans* strain CCM 7663 is remarkable for its very high tolerance of the observed metallic ions (see Figure 1).

Differences in the quality of bacterial growth in dependence on the capacity to adapt were also reported by other authors (Bruins et al. 2000, Sengör et al. 2009), and the works show a clear increase in the ability of metal tolerance in dependence on the metal concentration in the original environment (Vojtková et al. 2012). The strain's tolerance of high concentrations of metals, antibiotics and a whole number of organic as well as inorganic contaminants in the environment is supported by the natural coexistence of adaptation mechanisms. Examining the genetic principle of bacterial resistance to metallic ions, it was proved that they dispose of a wide spectrum of compatible plasmids (Diels et al. 1995). In *C. metallidu-*

Tabela 1
Wyniki MDS w szczepach bakterii
Cupriavidus metallidurans CCM 7663

Średnie MDS Mean MTC	Ni (II)	Cd(II)	Cr (III)	Ag (I)	Pb (II)	Mg (II)	Fe (II)	Cu (II)
<i>C. metallidurans</i>	> 10	7	8	2	9	> 10	> 10	8

Table 1
The results of MTC in *Cupriavidus metallidurans*
strain CCM 7663



Rys. 1
Porównanie średniej MDS w szczepie *Pseudomonas putida* i szczepie *Cupriavidus metallidurans*

Fig. 1
Comparison of mean MTC in *Pseudomonas putida* strain and *Cupriavidus metallidurans* strain

kowano wiele plazmidów i megaplazmidów, których analiza transkryptomyczna pozwoliła odkryć geny kodujące znane już białka odporne na metale ciężkie, kilka nowych białek odpornych na metale ciężkie, białka membranowe, obcięte traspozazy i sprzężony transfer wielu nieznanych białek (Monchy i inni, 2007; Hantke, 2001). Podczas analizy całej sekwencji genomu szczepu *Cupriavidus metallidurans* (Janssen i inni, 2010) udowodniono naturę genetyczną odporności szczepów na jony metaliczne, która zależy od strumienia jonów, lecz również kompleksacji metali i redukcji na poziomie komórkowym. Genom został scharakteryzowany w swojej złożoności jako zdolny do przyjmowania i wydobywania cudzych genów, obecności plazmidów i transpozonów, które zapewniają doskonałą adaptację szczepów bakteryjnych. Generalnie można stwierdzić, że ochrona komórkowa bakterii *Cupriavidus metallidurans* przeciwko metalom ciężkim łączy, poza genomem dynamicznym, różnego rodzaju mechanizmy regulacyjne na różnych poziomach włączając w to specyficzne reakcje metali (Von Rozycky i Nies, 2009; Crichton, 2008).

Podsumowanie

Przedstawiciele *Cupriavidus metallidurans* stanowią interesującą grupę mikroorganizmów obecnych głównie w zanieczyszczonych glebach i osadach w okolicach dotkniętych działaniem górnictwa, przemysłu metalurgicznego i chemicznego; ich kosmopolityczne występowanie odbija się na zmianie warunków środowiska włączając w to odpowiedzialność za obfite zanieczyszczenia (Langevin i inni, 2011; Sato i inni, 2006; Goris i inni, 2001). W licznych szczepach bakterii *Cupriavidus* wykazano wysoką

rans strain a number of plasmids and megaplasmids have already been identified, whose transcriptomic analysis revealed regulation of genes that coded for all known heavy metal resistance proteins, some new heavy metal resistance proteins, membrane proteins, truncated transposases, and a conjugative transfer of many unknown proteins (Monchy et al. 2007, Hantke 2001). Analysing the complete genome sequence of *Cupriavidus metallidurans* strains (Janssen et al. 2010) the genetic nature of bacterial resistance to metallic ions was proved, which lies in an ion efflux but also by metal-complexation and metal-reduction at the cellular level. Genome was characterized in its complexity and a high ability to take in and express foreign genes, presence of plasmids and transposons which ensure excellent adaptation capacities of the bacterial strain. In general, it may be stated that the cell protection of *Cupriavidus metallidurans* against heavy metal stress includes, apart from a dynamic genome, various regulation mechanisms on diverse levels, including metal-specific reactions (Von Rozycky and Nies 2009, Crichton 2008).

Conclusions

The representatives of *Cupriavidus metallidurans* form an interesting group of microorganisms predominantly abundant in contaminated soils and sediments in the localities affected by mining, metallurgical and chemical industries; their cosmopolitan occurrence reflects their high capacity of adaptation to constantly changing physical-chemical conditions of the environment, including the ability to respond to the abundance of various pollutants (Langevin et al. 2011, Sato et al. 2006, Goris et al 2001). In numerous bacterial strains

tolerancję na wiele zanieczyszczeń pochodzenia organicznego i nieorganicznego.

W tym eksperymencie zbadano maksymalną tolerancję szczepu bakterii *Cupriavidus metallidurans* CCM 7663 na wybrane jony metali, a jego wyniki pokazują, że szczep, głównie *Pseudomonas*, jest bardzo odporny w przeciwieństwie do wyników innych publikacji ukazujących się do tej pory. To odkrycie uzupełnia podstawową charakterystykę fizjologiczną szczepu bakterii *Cupriavidus metallidurans* CCM 7663. Szczep ten może być użyty w rozwoju przyszłych procesów biotechnologicznych w biotechnologii mineralnej w odzyskiwaniu metali lub oczyszczania miejscowości przemysłowych zanieczyszczonych metalami toksycznymi.

Przypisy

Referat ten powstał w ramach Project of Specific University Research (SGS) SP 2012/93. Autorzy składają wyrazy podziękowania dla Wydziału Górnicztwa i Geologii VŠB – Uniwersytetu Technicznego w Ostrawie za wsparcie i pomoc w powstaniu tego projektu.

Cupriavidus a high ability of tolerance of a great number of organic and inorganic pollutants has been experimentally confirmed.

In this study, maximum metal tolerance of *Cupriavidus metallidurans* strain CCM 7663 of selected metallic ions was examined and the experiment results manifest an excellent capacity of the strain's resistance in contrast to the other published studies so far, predominantly including *Pseudomonas* strains. Those findings complement the basic physiological characteristics of the bacterium *Cupriavidus metallidurans* strain CCM 7663. They may be used in the development of new prospective biotechnological processes in mineral biotechnology in the retrieval of prospective metals or decontamination of industrial localities polluted by toxic metals.

Acknowledgment

This paper was compiled within the Project of Specific University Research (SGS) SP 2012/93. The authors would like to thank the Faculty of Mining and Geology of VŠB – Technical University of Ostrava for the project support.

Literatura – References

1. Bruins M. R., Kapil S., Oehme F. W. *Microbial resistance to metals in the environment. Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2000, vol. 45(3), p. 198-207, doi: 10.1006/eesa.1999.1860
2. Crichton R. R. *Biological Inorganic Chemistry: An Introduction*. Amsterdam: Elsevier, 2008. ISBN 978-0-444-52740-0
3. Cuadrado V., Gomila M., Merini L., Giulietti A. M., Moore E. R. B. *Cupriavidus pampae* sp. nov., a novel herbicide-degrading bacterium isolated from agricultural soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, vol. 60(11), p. 2606-2612, doi: 10.1099/ijs.0.018341-0
4. Diels L., Dong Q., Van der Lelie D., Baeyens W., Mergeay M. *The czc operon of Alcaligenes eutrophus CH34: from resistance mechanism to the removal of heavy metals. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 1995, vol. 14(2), p. 142-153, doi: 10.1007/BF01569896
5. Fleck L. C., Bicca F. C., Ayub M. A. Z. *Physiological aspects of hydrocarbon emulsification, metal resistance and DNA profile of biodegrading bacteria isolated from oil polluted sites. Biotechnology Letters*, 2000, vol. 22(4), p. 285-289, doi: 10.1023/A:1005607112566
6. Goris J., De Vos P., Coenye T., Hoste B., Janssens D., Brim H., Diels L., Mergeay M., Kersters K., Vandamme P. *Classification of metal-resistant bacteria from industrial biotopes as Ralstonia campinensis* sp. nov., *Ralstonia metallidurans* sp. nov. and *Ralstonia basilensis* Steinle et al. 1998 emend. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, vol. 51(5), p. 1773-1782, doi: 10.1099/00207713-51-5-1773
7. Hantke K. *Bacterial zinc transporters and regulators. BioMetals*, 2001, vol. 14(3-4), p. 239-249, doi: 10.1023/A:1012984713391
8. Hussein H., Moawad H., Farag, S. *Isolation and characterization of Pseudomonas resistant to heavy metals contaminants. Arab Journal of Biotechnology*, 2004, vol. 7(1), p. 13-22.

9. Janssen P. J., Van Houdt R., Moors H., Monsieurs P., Morin N., Michaux A., Benotmane M. A., Leys N., Vallaeys T., Lapidus A., Monchy S., Médigue C., Taghavi S., McCorkle S., Dunn J., Van der Lelie D., Mergeay M. The complete genome sequence of *Cupriavidus metallidurans* strain CH34, a master survivalist in harsh and anthropogenic environments. *PLoS ONE*, 2010, vol. 5(5): e10433, doi:10.1371/journal.pone.0010433
 10. Keramati P., Hoodaji M., Tahmourespour A. Multi-metal resistance study of bacteria highly resistant to mercury isolated from dental clinic effluent. *African Journal of Microbiology Research*, 2011, vol. 5(7), p. 831-837, doi: 10.5897/AJMR10.860
 11. Kušnierová M., Fečko, P. *Minerálne biotechnologie I v ťažbe a úprave sulfidických ložísk*. Ostrava: VŠB – TU Ostrava, 2001. ISBN 80-248-0023-3
 12. Langevin S., Vincelette J., Bekal S., Gaudreau Ch. First case of invasive human infection caused by *Cupriavidus metallidurans*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2011, vol. 49(2), p. 744-745, doi: 10.1128/JCM.01947-10
 13. Makkar N. S., Casida L. E. *Cupriavidus necator* gen. nov., sp. nov.: a nonobligate bacterial predator of bacteria in soil. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1987, vol. 37(4), 323–326, doi: 10.1099/00207713-37-4-323
 14. Malik A., Aleem A. Incidence of metal and antibiotic resistance in *Pseudomonas* sp. from the river water, agricultural soil irrigated with wastewater and groundwater. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2011, vol. 178(1-4), p. 293-308, doi: 10.1007/s10661-010-1690-2
 15. Monchy S., Benotmane M. A., Janssen P., Vallaeys T., Taghavi S., Van der Lelie D., Mergeay M. Plasmids pMOL28 and pMOL30 of *Cupriavidus metallidurans* are specialized in the maximal viable response to heavy metals. *Journal of Bacteriology*, 2007, vol. 189(20), p. 7417-7425, doi: 10.1128/JB.00375-07
 16. Reith F., Rogers S. L., McPhail D. C., Webb D. Biomineralization of gold: biofilms on bacterioform gold. *Science*, 2006, vol. 313(5784), p. 233-236, doi: 10.1126/science.112587
 17. Sato Y., Nishihara H., Yoshida M., Watanabe M., Rondal J. D., Concepcion R. N., Ohta H. *Cupriavidus pinatubonensis* sp. nov. and *Cupriavidus laharis* sp. nov., novel hydrogen-oxidizing, facultatively chemolithotrophic bacteria isolated from volcanic mudflow deposits from Mt. Pinatubo in the Philippines. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006, vol. 56(5), p. 973-978, doi: 10.1099/ijs.0.63922-0
 18. Sengör S. S., Barua S., Gikas P., Ginn T. R., Peyton B., Sani R. K., Spycher N. F. Influence of heavy metals on microbial growth kinetics including lag time: mathematical modeling and experimental verification. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2009, vol. 28(10), p. 2020-2029, doi: 10.1897/08-273.1
 19. Seo J. S., Keum, Y. S., Li Q. X. Bacterial degradation of aromatic compounds. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2009, 6(1), 278- 309, doi: 10.3390/ijerph6010278
 20. Vandamme P., Coenye T. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, vol. 54(6), p. 2285-2289, doi: 10.1099/ijs.0.63247-0
 21. Vanechoutte M., Kämpfer P., De Baere T., Falsen E., Verschraegen G. *Wautersia* gen. nov., a novel genus accommodating the phylogenetic lineage including *Ralstonia eutropha* and related species, and proposal of *Ralstonia* [*Pseudomonas*] *syzygii* (Roberts et al. 1990) comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, vol. 54(2), p. 317-327, doi: 10.1099/ijs.0.02754-0
 21. Vojtková H., Janulková R., Švanová P. Physiological aspects of metal tolerance in *Pseudomonas* bacteria isolated from polluted sites in Ostrava, Czech Republic. 12th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2012, Bulgaria – Albena: 17.-23. 6. 2012. Conference Proceedings, vol. IV, p. 177-183, doi: 10.5593/sgem2012
 22. Von Rozycki T., Nies D. H. *Cupriavidus metallidurans*: evolution of a metal-resistant bacterium. *Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 2009, vol. 96(2), p. 115-139, doi: 10.1007/s10482-008-9284-5
- coal flotation. In *Polish journal of chemical technology* vol. 12. Warsaw: Versita. 2010. pp. 62-66.