

## РЕЦЕНЗИЯ

от доц. д-р Златка Милчева Алексиева,

Институт по микробиология „Стефан Ангелов”, БАН

Относно: Научната продукция на гл. ас., д-р Галина Динкова Стоянчева за участие в конкурс за присъждане на академичната длъжност „Доцент” по направление 4.3. Биологически науки; научна специалност Микробиология - Разработване на нови функционални храни, за нуждите на „Департамент „Обща Микробиология”, Лаборатория „Микробна генетика“, ИМикБ-БАН, обявен в ДВ бр. 29 от 12.04.2022 г.

Д-р Галина Динкова Стоянчева, гл. ас. в лаборатория „Микробна генетика“ към Департамент „Обща Микробиология“ в И-т по микробиология, БАН е единственият кандидат, подал документи по обявения конкурс. Документите по конкурса отговарят на изискванията на ЗРАСРБ и съответните към него Правилници.

### ПРОФЕСИОНАЛНА БИОГРАФИЯ

Галина Стоянчева получава висшето си образование (Магистър) през 1997 г. със специалност Биотехнологични процеси, Генно и клетъчно инженерство, в Биологически факултет, СУ “Св. Климент Охридски”.

Постъпва като специалист в Института по микробиология на БАН през 1998 г., от 2000 г. заема длъжността научен сътрудник III ст. От 2007 г. до настоящия момент заема длъжността „Главен асистент“ след защита на докторска дисертация и придобиване на научната и образователна степен „Доктор“ в Институт по Микробиология „Стефан Ангелов“ – БАН през 2006 г.

Д-р Галина Стоянчева е провела две специализации в Laboratory of General and Food Microbiology, Departement of Science and Technology, University of Verona, Verona, Italy, 2007 и 2008. Темите на тези специализации оказват съществено влияние върху нейното развитие, като учен с широк спектър от виждания и подходи за изследвания, свързани с акцента на изследователската ѝ дейност, представена в настоящия конкурс.

Значително е и участието на кандидатката в научно-изследователски проекти. Списъкът съдържа 17 проекти, от които 12 национални и 5 международни проекти. Галина Стоянчева е ръководител на четири от тези проекти.

Д-р Галина Стоянчева е член на Съюза на учените в България, Секция Микробиология и на Federation of European Microbiological Societies (FEMS). Участвала е в обучението на студенти по Програма „Студентски практики“.

Д-р Галина Стоянчева е спечелила стипендия на FEMS и Годишна награда на Фондация “Стефан Ангелов” за най-добра работа на млад микробиолог за 2007 г. Удостоена е с Грамота от конкурс на ВАК, СУБ и ФНС за научни постижения на докторанти защитили през 2006 г. Представен е списък от 16 участия в международни и 14 - в национални научни форуми на които е представяна научната дейност на кандидатката.

## ОСНОВНИ НАУКОМЕТРИЧНИ ПОКАЗАТЕЛИ, СВЪРЗАНИ С КОНКУРСА

Анализът на данните, отнасящи се към показателите по Националните минимални изисквания от Правилника за приложение на ЗРАСРБ, показва следното:

За притежаването на ОНС „Доктор“ са определени 50 т. По показатели от група В са представени 5 публикации: 1 с Q1; 3 - с Q2; и 2 - с Q4, което приведено в точки дава сума от 109 т. По показателите от група Г, в рамките на показател 7 са представени 15 публикации, от които 1 - с Q1; 7 публикация с Q2; 3 публикация с Q3; 4 публикации с Q4. По показател Г т.8 са включени 2 глави от книги. Тези данни дават общо сумата от 288 т.

От показателя за цитирания на публикациите в световно известни бази данни с научна информация (Web of Science и Scopus) или общо за показатели Д, са представени 300 цитирания без автоцитати, с които се набират 600 т. Ръководството и участието в научно-изследователски проекти и привлечените средства от тях, не са описани в група показатели Е.

Общият брой точки от данните попълнени в Таблицата за минималните национални изисквания е 1047 т. при минимално необходими 430 т.

Изводът е, че д-р Галина Стоянчева преизпълнява изискванията по всяка една от групите показатели, необходими за заемане на научната длъжност „Доцент“ и като цяло набира значително повече точки от задължителния минимум.

Относно „Допълнителни критерии за израстване на академичния състав в ИМикБ“ също може да се отбележи, че критериите са преизпълнени. За конкурса в тази му част д-р Галина Стоянчева е представила 22 публикации в списания реферирани в WoS/Scopus и 6 публикации в рецензирани издания: 2 глави от книги и 3 сборници от международни форуми (публикувани в пълен текст). Общ ИФ 27.49, общ брой цитирания – 300 и Н-индекс = 7. В 8 от публикациите д-р Стоянчева е първи/кореспондиращ автор. Изискваните стойности за ИФ и Н-индекс са значително надвишени. Многократно е

надвишено и допълнителното изискване за участие и ръководство на научно-изследователски проекти.

## ОСНОВНИ НАУЧНИ ПРИНОСИ

Основната дейност на д-р Галина Стоянчева след защитата на дисертационния труд на тема „Комбиниран подход за молекулярно-таксономична характеристика на лактобацили“ е в областта на характеризирането на новоизолирани и утвърдени млечнокисели бактерии с пробиотично действие и продукцията на биологично активни вещества.

Наличните данни от лабораторни изследвания и медицинската практика ясно показват, че употребата на микроорганизми - пробиотици в ежедневието ни и в лечението има голям потенциал, особено с нарастващата заплаха от прекомерната употреба на антибиотици и разпространението на резистентни към тях микроорганизми. Съществено място в хетерогенната група млечнокисели бактерии заемат лактобацилите, които са естествена част от човешкия микробиом при здрави хора. Изследванията на техните физиологични и генетични характеристики са в основата на използването им в пробиотични препарати. Например, лактобацилите са най-разпространените вагинални бактерии при жените. Те инхибират свързването на други бактерии с епителните клетки и произвеждат млечна киселина, която убива или инхибира растежа на много други микроорганизми. Характеристиките и ползите от различните пробиотични щамове, като цяло са специфични за щама и отделните щамове трябва да бъдат изпитвани за всяко свойство.

В този контекст, разработките, свързани с идентификация на различни видове вагинални лактобацили са важен принос в развитието на това научно направление.

Прилагането на метода Dot хибридизация на обща геномна ДНК с белязани сонди е оценен като обещаващ и сравнително лесен метод за откриване, групиране и първоначална идентификация на новоизолирани вагинални лактобацили, който в комбинация с други високо дискриминативни молекулярни методи на полифазната таксономия води до точно определяне на таксономичната принадлежност на видове *Lactobacillus* в смесени култури (10).

В редица следващи разработки е приложен таксономичен анализ на основата на секвениране на 16S rDNA.

Изолирани, идентифицирани и охарактеризирани са тридесет щама на различни видове *Lactobacillus*, сред които са установени седемнадесет нови вагинални щамове с

антимикробно действие срещу редица щамове на патогенни микроорганизми, сред които щамове на *Klebsiella*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* и *Candida parapsilosis*. Природата на активното съединение с антимикробно действие е изследвано и е доказано наличието на бактериоциноподобни вещества. В три от новоизолираните щамове са идентифицирани и секвенирани гените, свързани с продуцирането на бактериоцини. Важно е да се подчертае, че за първи път е описано наличието на оперон за бактериоцина газсерин А в генома на вида *Lactobacillus crispatus* (1). Оригинален принос имат резултатите от геномния анализ на пет щамове на *L. Crispatus*, при които е потвърдено наличието на ген, отговорен за синтеза на бактериоцина хелветин. В генома на два от тях са описани два варианта на този ген. Осъщественият молекулярен анализ е показал, че разликите в секвенциите на този ген могат да бъдат използвани за определяне на филогенетичната близост на различните видове от род *Lactobacillus* (2).

Изолиран, идентифициран и характеризирани е оригинален щам *L. lactis* subsp. *lactis*, продуциращ бактериоцин (bacHV219) и с изявено антимикробно действие. Установени са оптималните условия за продуциране и факторите, влияещи върху активността на бактериоцина. Чрез прилагането на атомно-силовата микроскопия (Atomic force microscopy) е установен бактериолитичният механизъм на действие (7).

За първи път е проведено молекулярно-генетично изследване на вагинални лактобацили изолирани от български жени. Изследването обхваща резултатите от анализ на 48 щамове *Lactobacillus* изолирани от вагинални проби, събрани от 60 българки в репродуктивна възраст. За разкриване на биоразнообразието на изследваните щамове *Lactobacillus* са приложени шест молекулярни метода (риботипиране, ARDRA, геп-PCR, PCR с видоспецифични праймери, хибридизация с видоспецифични сонди и секвенционен анализ). Установено е, че преобладаващият вид в изследваната група е *L. fermentum*. Три щамове, притежаващи висока антимикробна активност са изследвани чрез секвенционен анализ на 16S rDNA. Избрани са активни щамове, инхибиращи растежа на патогени. Използването на пробиотици за контролиране на определени инфекции и за възстановяване на човешката бактериална микробиота се приема като алтернатива на конвенционалната антибиотична терапия (26).

С цел селекция на пробиотични щамове, са изолирани и признати за „пробиотици“ десет вагинални щамове *Lactobacilli*. В резултат на изследванията е направен изводът, че наред с натрупването на биомаса, продуцирането на бактериоцини и  $H_2O_2$ , количеството на продуцирана млечна киселина и вътрешното подкисляване са

основен механизъм за антибактериалната активност и съответно поддържане на нормалната вагинална екосистема. Резултатите показват, че изследваната група вагинални лактобацили притежават потенциал за разработване на алтернативно лечение на урогенитални заболявания (6).

Представено е първото цялостно изследване за плазмидно съдържание на 20 български ендемични щамове *Streptococcus thermophilus*, използвани за индустриална ферментация на мляко. *S. thermophilus* принадлежи към разнообразна група индустриални микроби, известни като млечнокисели бактерии. В много страни е прието индустриалните щамове да са безплазмидни, тъй като наличието на плазмиди може да създава проблеми при селекцията им. Установено е, че общо 6 от 20-те анализирани щамове *S. thermophilus* от най-добрите български закваски за кисело мляко съдържат различни плазмиди, които не показват хомология с характерни за *Lactobacillus* плазмиди. Плазмидът pt38, принадлежащ към семейството на плазмидите pC194 е допълнително характеризирани и спецификата на получената рестрикционна карта дава основание да се приеме, че може да послужи като совалков вектор за хетероложна генна експресия в грам-положителни и грам-отрицателни гостоприемници (9).

В друга разработка с щам LBB.A на *S. thermophilus*, компонент на индустриална закваска, е демонстрирано широкото генетично разнообразие от фаги, които в същото време са силно специфични за своя гостоприемник. Щамът е заразен от осем генетично несвързани cos-тип фаги. След прецизен молекулярен анализ е приложена двуетапна процедура за селекция, включваща последователно третиране на бактериалната култура с фА1 и фА7 и са получени нечувствителни към заразяване с бактериофаги мутанти от технологичен интерес, устойчиви на всичките осем фага. Щам LBB.A е определен като много добър модел за изследвания на взаимодействието фаг-гостоприемник при *S. thermophilus* (13).

Докладвано е мащабно проучване на изолирани от различни източници и изследвани за антимикробна активност 57 щамове МКБ от родове *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* и *Leuconostoc*. Всички щамове са идентифицирани с помощта на 16S рДНК секвенционен анализ. Установено е, че 60% от тях произвеждат бактериоцинови субстанции, активни срещу различни Грам (+) и Грам (-) микроорганизми и *Candida*. Създадено е филогенетично дърво демонстриращо еволюционните връзки на част от изолираните щамове на базата на 16S rRNA генни последователности. Анализите са проведени в софтуер MEGA4. Изследвана е физикохимичната природа на активните субстанции. Доказано е наличието на гени за

бактериоцините: gassericin A, gassericin T, acidocin LF221A и helveticin в генома на някои активни изолати. Секвенирани са гените, свързани с производството на бактериоцин от пет щамове. Повечето инхибиторни спектри на изолати са специфични на ниво щам, което предполага използването на комбинация от бактериоциногенни щамове за инхибиране на различни нежелани микроорганизми (24).

Към тематиката обхващаща проучвания на млечнокисели бактерии може да се добави и проучването на микробното съдържание на домашно приготвени и закупени от пазара млечни продукти. В процеса на изследването са изолирани двадесет и шест чисти култури, изследвани чрез набор от физиологични и молекулярно-генетични методи за точна видова идентификация и генотипиране. Установено е, че сред микроорганизмите, участващи във ферментацията и зреенето на млечни продукти преобладават щамове на *L. delbrueckii*, *L. helveticus* и *L. plantarum*. Установено е и наличието на замърсители, като щамове, представители на родовете *Kluveromyces*, *Rhodotorula* и *Candida*. Получените резултати отново повдигат въпроса за ефикасността на микробиологичния контрол при производството и съхранението на млечните продукти (5).

Д-р Галина Стоянчева е съавтор в научен обзор „Starch-modifying enzymes of lactic acid bacteria – structures, properties, and applications“ в който за първи път се обобщават наличните в литературата данни за ензимите от амилолитични млечнокисели бактерии (ALAB), модифициращи нишесте, като единствен въглероден източник. Направено е сравнение на аминокиселинни последователности и анализ на генната експресия на гени, кодиращи амилазни ензими в клетки на ALAB. Направен е извод, че ALAB щамовете могат да се използват за директно превръщане на нишесте в млечна киселина, както и тяхното участие в производството на храни (14).

Значителна част от разработките, представени в настоящия конкурс са посветени на изследване на биоразнообразието на микроорганизми (бактерии, дрожди и гъби) в различни екосистеми. Проведените изследвания не са самоцелни и винаги имат резултати, които са принос към решаване на проблеми с важен приложен характер. Основна част от тези изследвания са насочени към таксономично определяне на фунги.

Проведено е изследване на гъбичното замърсяване в седем египетски гробници и джамии. Това проучване е първото по рода си и обхваща 30 гъбични изолати от 13 проби от 6 различни материала в исторически гробници и джамии в Египет. Изолирани и идентифицирани чрез секвениране и сравнителен анализ на ITS региони, LSU и SSU рибозомна РНК, *tef1- $\alpha$*  гена (translation elongation factor 1 alpha) и *tub2* гена (beta-tubulin) са шестнадесет щамове от групи Ascomycota и Basidiomycota. Доказано е, че щамове на

родовете *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* и *Bjerkandera* обитават върху каменни повърхности в древни египетски гробници. В проведеното изследване е установена доминацията на представители на *Penicillium* и *Aspergillus*. Изследването на микробното разнообразие в историческите паметници и тяхната роля в разрушителните процеси е проблем от глобален интерес и е важен принос в намирането на подходящи противогъбични средства за премахване на микробния растеж (4).

Известно е, че екстремните условия, като ниски температури, водят до натрупване на свободни кислородни радикали в клетката. Основният защитен механизъм на клетките се осигурява от хидропероксидазите, които включват няколко типа каталазни ензими, понижаващи оксидативния стрес чрез детоксикация на клетъчния водороден пероксид. Филаментозните гъби често притежават голям брой каталази, които са обект на нарастващ интерес и особено каталазите, индуцирани при ниско температурен оксидативен стрес, данните за които са оскъдни.

Изолирани са 19 антарктически гъбични щамове, които притежават значителна извън- и вътреклетъчна каталазна активност. Представители на *Penicillium chrisogenum* и *Aspergillus fumigatus* са перспективни продуценти на студено-активни каталазни ензими (16). В първоначалните изследвания се съобщава, че антарктически щам *Penicillium griseofulvum* P29 активно продуцира студено-активна каталаза (17). С водещото участие на д-р Галина Стоянчева е осъществено идентифицирането, секвенирането и експресионен анализ на каталазни гени в щам *P. griseofulvum* P29. В представената разработка, с помощта на оригинално създадени олигонуклеотидни праймери са получени PCR продукти и по метода „genome walking“ и обработката на получените секвенции с програмата CAP3 (Sequence Assembly Program) са получени пълните секвенции на петте каталазни гена в генома на щама.

Количествената PCR (qPCR), по-често наричана PCR в „реално време“ е широко използван метод за количествена оценка на генната експресия. Методът се нарича обратна транскрипция (RT)-qPCR, тъй като амплификацията изисква преобразуване на РНК матрица в cДНК като предварителна стъпка. Резултатите от изследването на генната експресия на 5-те каталазни гена по приложеният метод при две различни температури: 10°C и 25°C, показват, че четири от гените са индуцирани от ниска температура като отговор на оксидативния стрес, като са включени в механизма, позволяващ растежа на *P. griseofulvum* P29 при условия на оксидативен стрес, предизвикан от ниска температура. Най-значимо е повишена експресията на ген *cat1* кодиращ ензим с каталазо-пероксидаза активност (3).

Интересна е разработката, при която е изолиран и характеризирен щам на *Trametes trogii*, ефективен продуцент на лигнинолитични ензими, който може да се използва при оптимизиране процесът на делигнификация и биотехнологично производство на лаказа (15).

Изследвана е ролята на антиоксидативния отговор в толерантността на гъбичките към различни концентрации на смес от метални йони. Експериментите с два щамове, *A. fumigatus* G и *A. fumigatus* 3-2 изолирани от силно замърсена с тежки метали почви в България (около гр. Пазарджик) и Украйна (около гр. Кривой рог) показват, че благодарение на по-активната си антиоксидантна защита, демонстрират по-добра толерантност към присъствието на смеси от Cu, Cd, Ni и Zn в културалната среда. Тези резултати показват добър биоремедиационен потенциал на изследваните нишковидни гъбични видове (18).

Изолирана, характеризирана и идентифицирана чрез физиологични, биохимични и молекулярно-таксономични методи е бактерия *Microbacterium* sp., способна да инхибира растежа и причинява смърт на лабораторни култури от щамове на антарктически микроводорасли: цианобактерии *Synechocystis salina* и зелени микроводорасли *Choricistis minor*, илюстрирано чрез трансмисионна електронна микроскопия. Изследването на подобни щамове показва възможността за използването им като биологични агенти при прекомерния цъфтеж на водораслите в замърсени води и допринася за оптимизирането на използването на водорасли в биотехнологични производства (8).

Изолирани и таксономично идентифицирани са и 20 щамове дрожди, принадлежащи към различни родове и способни да разграждат нишестето като единствен източник на въглерод и притежаващи различна степен на амилалитична активност (11). Обзорът, посветен на идентифицирането на дрожди разглежда основни съвременни геномни инструменти, използвани в таксономията на дрождите (12).

Към анализирани по-горе оригинални приноси с важно научно значение трябва да се добави, че с водещото участие на д-р Галина Стоянчева по отношение на молекулярно-таксономичната идентификация са идентифицирани над 250 щамове филamentosни гъби, сред които изолирани от почвени проби от националния резерват Denali, Аляска, изолирани от пещера Магурата, щамове продуценти на ензими и др. (15-22).

Създадени са множество специфични олигонуклеотидни праймери, необходими за анализа на гени за бактериоцини, каталазни гени и референтни („housekeeping“) гени;



създаването на филогенетично дърво, което представя еволюционните връзки между 35 таксона *Lactobacillus*; филогенетичното дърво, създадено на базата на секвенирани ITS региони на 28 щамове нишковидни гъби, изолирани в националния резерват Denali, Аляска, включващо 46 таксона и др.

В базата данни GenBank на NCBI са регистрирани 187 от получените секвенции.

Разгледаните в този раздел научни приноси на д-р Г. Стоянчева могат да бъдат обобщени и представени в следните формулировки, които съответстват на научната област и научно направление на настоящия конкурс:

1. Изолирани, селектирани и пълноценно характеризирани са редица оригинални щамове *Lactobacillus*, с висока пробиотична активност, продуциращи бактериоцини, активни срещу различни патогени микроорганизми.
  - За първи път е идентифициран оперон за бацтериоцина „gasericin A“ в генома на вида *Lactobacillus crispatus*.
  - Изолиран е щам *Lactococcus lactis* HV219, продуциращ бактериоцин HV219
- Проведен е молекулярно-биологичен анализ на гени, кодиращи синтеза на бактериоцини, като gasericin A, хелветицин, бактериоцин HV219. Определени са условията на растеж и състава на средата, необходими за оптимално производство на бактериоцини.
2. Проведен е полифазен таксономичен анализ и са идентифицирани са над 250 щамове филаментозни гъби, изолирани от почвени проби от Антарктика и Аляска, изолати от пещера Магура, от исторически паметници в Египет.
  - За първи път е проведено изследване за биоразнообразието на гъби, обитаващи различни материали от исторически паметници в Египет.
  - За първи път е осъществено детайлно молекулярно-биологично изследване на температурно-чувствителна каталаза от антарктически щам *Penicillium griseofulvum* P29.
  - За първи път е изследвано влиянието на температурата като фактор в регулацията на експресията на каталазни гени при филаментозни гъби.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Включените за оценка в този конкурс разработки се отличават с оригиналност, актуалност и обществена значимост. Те са обединени с пряката връзка между

фундаментални и приложни изследвания и с умелото прилагане и логично комбиниране на редица най – съвременни изследователски методологични подходи. Д-р Галина Стоянчева се е оформила като квалифициран специалист в осъществяването на съвременни молекулярно биологични изследвания при микроорганизми, базирани на секвениране на 16S rDNA, ITS , идентифициране и секвениране на гени (SSU rRNA, LSU rRNA, tef1- $\alpha$ ), анализ на генната експресия с помощта на Real-Time PCR (RT-PCR) (каталазни гени), механизъм на действие на бактериоцин чрез атомно-силова микроскопия (AFM) и други методически подходи от сферата на микробната физиология и биохимия и електронна микроскопия.

Постиженията на д-р Галина Стоянчева са публикувани в авторитетни научни списания и са намерили широк положителен отзвук в научната общност по света, намерили са отражение в редица финансирани научно-изследователски проекти, което безспорно потвърждава значимостта на разработваните задачи и приложимостта на получените резултати.

Наукометричните данни на д-р Галина Стоянчева значително надвишават минималните национални и допълнителните изисквания на ЗРАС РБ, и съответния Правилник на ИМикБ за заемане на академичната длъжност „Доцент” в Професионалното направление 4.3. Биологически науки.

Бъдещите изследвания на д-р Стоянчева са насочени към всестранно проучване на експресията и приложението на бактериоцини, продуцирани от млечнокисели бактерии, както и на рекомбинантни пептиди и тяхната хетероложна експресия, подбор и проучване на щамове микроорганизми за влагане в храни със специфични здравни ползи - функционални храни.

Всичко това ми дава основание да подкрепя кандидатката и убедено да препоръчам на уважаемите членове на Научното жури да оценят положително и да предложат на НС на ИМикБ да присъди на гл. ас. д-р Галина Динкова Стоянчева, академичната длъжност „Доцент”.

София, 27.07.2022 г.

РЕЦЕНЗЕНТ:

(доц. д-р Златка Алексиева)