

**Резюмета на публикации на английски и български език, участващи в
справката за изпълнение на минималните национални критерии по ЗРАСРБ и
допълнителните критерии на ИМикБ-БАН,
на главен асистент д-р Галина Стоянчева, кандидат в конкурс за академична
длъжност „Доцент“, дв бр. 29/12.04.2022 г**

Отнасящи се към Група от показатели В:

1. Bacteriocin production and gene sequencing analysis from vaginal *Lactobacillus* strains

Galina Stoyancheva, Marta Marzotto, Franco Dellaglio & Sandra Torriani (2014) Archives of microbiology, 196 (9), 645-653, (IF 1.667)

Abstract

The human vagina is a complex and dynamic ecosystem containing an abundance of microorganisms. In women of childbearing age, this system is dominated by *Lactobacillus* spp. In the present work, seventeen newly isolated vaginal strains were identified by 16S rDNA sequencing and were investigated for their antimicrobial properties. Twelve of the isolated *Lactobacillus* strains showed activity against one or more microorganisms. Six and five of them produced substances that inhibited the growth of two different *Klebsiella* strains and *Staphylococcus aureus*, respectively. Two lactobacilli strains were active against an *Escherichia coli* strain, one isolate was active against an *Enterococcus faecalis* strain and another lactobacilli strain showed antimicrobial activity against a *Candida parapsilosis* strain. The nature of the active compounds was additionally studied, and the presence of bacteriocin-like substances was proved. The genes related to the bacteriocin production in three of the newly isolated strains were identified and sequenced. The presence of gassericin A operon in the genome of the species *Lactobacillus crispatus* was described for the first time. The presence of antimicrobial activity contributes to their possible use as potential probiotic strains after further research.

Резюме

Човешката вагина е сложна и динамична екосистема, съдържаща изобилие от микроорганизми. При жените в детородна възраст тази система е доминирана от *Lactobacillus* spp. В настоящата работа, седемнадесет новоизолирани вагинални щамове бяха идентифицирани чрез секвениране на 16S rDNA и бяха изследвани за техните антимикробни свойства. Дванадесет от изолираните щамове *Lactobacillus* показват активност срещу един или повече микроорганизми. Шест и пет от тях произвеждат вещества, които инхибират растежа на два различни щамове *Klebsiella* и *Staphylococcus aureus*, съответно. Два щамове лактобацили са активни срещу щам *Escherichia coli*, един изолат е активен срещу щам *Enterococcus faecalis*, друг лактобацилен щам показва антимикробна активност срещу щам *Candida parapsilosis*. Допълнително е проучена природата на активните вещества и е доказано наличието на бактериоциноподобни вещества. Гените, свързани с производството на бактериоцин в три от новоизолираните щамове, бяха идентифицирани и секвенирани. За първи път е описано наличието на

gassericin A оперон в генома на вида *Lactobacillus crispatus*. Наличието на антимикробна активност допринася за евентуалното им използване като потенциални пробиотични щамове след допълнителни изследвания.

2. Study of helveticin gene in *Lactobacillus crispatus* strains and evaluation of its use as a phylogenetic marker

Galina Stoyancheva (2020) *Arch Microbiol* 202, 205–208. (IF 2.552)

Abstract

Lactobacilli are a part of the human microbiome in healthy humans. Studies of their physiological and genetic characteristics are the basis for their use in probiotic preparations. This report is a brief description of the helveticin gene found in two *Lactobacillus crispatus* strains, which are a part of the human microbiome. Our analysis showed that the two variants of the gene are not solely characteristic of strains isolated from humans. In the phylogenetic analysis, we found that the studied sequence (this gene) showed a significant difference between the species of the genus *Lactobacillus* and could be used as a phylogenetic marker.

Резюме

Лактобацилите са част от човешкия микробиом при здрави хора. Изследванията на техните физиологични и генетични характеристики са в основата на използването им в пробиотични препарати. Този доклад е кратко описание на гена за бактериоцина хелветицин, открит в два щамове *Lactobacillus crispatus*, които са част от човешкия микробиом. Нашият анализ показва, че двата варианта на гена не са характерни само за щамове, изолирани от хора. При филогенетичния анализ установихме, че изследваната последователност (този ген) показва значителна разлика между видовете от рода *Lactobacillus* и може да се използва като филогенетичен маркер.

3. Characterization of bacteriocin HV219, produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* HV219 isolated from human vaginal secretions

Svetoslav D. Todorov, Svetla T. Danova, Carol A. Van Reenen, Martina Meincken, Galina Dinkova, Iskra V. Ivanova, Leon M. T. Dicks (2006) *Journal of basic microbiology*, 46(3), 226-238. (IF 0.722)

Abstract

Bacteriocin HV219, produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* HV219, is active against Gram-positive and Gram-negative bacteria. Activity was lost when treated with proteolytic enzymes, SDS, Triton X-114 and Triton X-100, but not at pH 2.0 to 10.0 or after 20 min at 121 °C. Growth in the presence of yeast extract as sole nitrogen source yielded 3200 AU/ml. No bacHV219 activity was recorded in MRS broth with maltose, mannose, lactose or sucrose as sole carbohydrate, but fructose yielded 1600 AU/ml. K₂HPO₄ at 10.0 g/l yielded 3200 AU/ml. Addition of 1.0 mg/l cyanocobalamin, l-ascorbic acid and thiamine to MRS broth yielded 3200 AU/ml, 1600 AU/ml and 1600 AU/ml, respectively. The mode of activity is bacteriolytic, as confirmed by atomic force microscopy.

Резюме

Бактериоцин HV219, произведен от *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* HV219, е активен срещу грам-положителни и грам-отрицателни бактерии. Активността се губи при третиране с протеолитични ензими, SDS, Triton X-114 и Triton X-100, но не при рН от 2,0 до 10,0 или след 20 минути при 121 °С. Растежът в присъствието на екстракт от дрожди като единствен източник на азот показва активност 3200 AU/ml. Не е регистрирана активност на bacHV219 в MRS бульон с малтоза, маноза, лактоза или захароза като единствен източник на въглехидрати, но при MRS бульон с фруктозата показва активност 1600 AU/ml. K_2HPO_4 при 10.0 g/l показва активност 3200 AU/ml. Добавянето на 1,0 mg/l цианокобаламин, l-аскорбинова киселина и тиамин към MRS бульон показва активност 3200 AU/ml, 1600 AU/ml и 1600 AU/ml, съответно. Начинът на действие е бактериолитичен, както се потвърждава от направената атомно-силовата микроскопия (Atomic force microscopy).

4. Molecular Study of the useful and the Contaminant Microflora in Fermented Dairy Products

G. Stoyancheva, D. Gouliamova & P. Petrova (2009) *Biotechnology & Biotechnological equipment*, vol. 23, 551 – 553 (IF 0.291)

Abstract

Lactic acid bacteria have been used as starter strains in the production of fermented dairy products for centuries. Most of the dairy products contain lactic acid bacteria, but also other bacteria involved as contaminant microflora. We explored the microbial content of home-made dairy products and those purchased from the market. In our study twenty-six pure cultures were isolated. The isolated strains were investigated by a set of physiological and molecular-genetic methods for their accurate species identification and genotyping. From the microorganisms, involved in fermentation and ripening of dairy products with proven health benefits to human, in studied foods predominated *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus plantarum*. Another part of the isolated strains, representatives of the genus *Kluyveromyces*, *Rhodotorula* and *Candida* were contaminant microflora, as a result of poor hygiene in the manufacture and storage of the dairy products. Some of these strains were isolated from commercially available dairy products. The obtained results raise again the question about the efficacy of microbiological quality control and food safety.

Резюме

Млечнокиселите бактерии са били използвани като стартерни щамове в производството на ферментирани млечни продукти от векове. Повечето от млечните продукти съдържат млечнокисели бактерии, но и други бактерии, участващи като замърсяваща микрофлора. Проучихме микробното съдържание на домашно приготвените млечни продукти и такива, закупени от пазара. В нашето изследване бяха изолирани двадесет и шест чисти култури. Изолираните щамове са изследвани чрез набор от физиологични и молекулярно-генетични методи за точна видова идентификация и генотипиране. От микроорганизмите, участващи във ферментацията и зреенето на млечни продукти с

доказана здравна полза за човека, в изследваните храни преобладават *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus helveticus* и *Lactobacillus plantarum*. Друга част от изолираните щамове, представители на родовете *Kluyveromyces*, *Rhodotorula* и *Candida*, са замърсители, в резултат на лоша хигиена при производството и съхранението на млечните продукти. Някои от тези щамове са изолирани от млечни продукти достъпни в търговската мрежа. Получените резултати отново повдигат въпроса за ефикасността на микробиологичния контрол на качеството и безопасността на храните.

5. Probiotic properties of Bulgarian vaginal lactobacillus isolates

Penka Petrova, Kaloyan Petrov, Galina Stoyancheva (2007) *Comptes Rendus de l'Academie Bulgare des Sciences*, vol. 60 (8), 873-880 (IF 0.106)

Abstract

The vaginal lactobacilli are known to maintain powerful defence mechanisms against pathogenic bacterial invasions. Aiming selection of probiotic strains, applicable in alternative treatment of urogenital disorders, ten vaginal *Lactobacillus* isolates from Bulgarian samples were studied. All strains were evaluated as "probiotics" since they suppressed the growth of two different *Escherichia coli* strains (HB101 and C600). The main factors influencing the antimicrobial activity were analysed comparing the strains' production of antimicrobial compounds (lactic acid, hydrogen peroxide, and ethanol) and biomass accumulation. Our results suggested that the H₂O₂ generation was important, but not crucial antibacterial factor. Highest activity against *E. coli* was obtained by the strains able to produce both compounds (HV13 and HV27) thanks to possible synergic action.

Although yielded in significant quantity by the heterofermentative strains, the ethanol did not increase significantly their antimicrobial activity.

The cell surface hydrophobicity of the isolates ranged from low to medium indicating that the vigorous growth of the strains overlaps their weak possibilities for non-specific adhesion.

Резюме

Известно е, че вагиналните лактобацили поддържат мощни защитни механизми срещу патогенни бактериални инвазии. С цел селекция на пробиотични щамове, приложими при алтернативно лечение на урогенитални заболявания, бяха изследвани десет вагинални изолата от род *Lactobacillus*, изолирани от български клинични проби. Всички щамове бяха оценени като „пробиотици“, тъй като те потискат растежа на два различни щамове *Escherichia coli* (HB101 и C600). Анализирани са основните фактори, влияещи върху антимикробната активност, като се сравнява производството на антимикробни съединения от щамовете (млечна киселина, водороден перексид и етанол) и натрупване на биомаса. Нашите резултати предполагат, че генерирането на H₂O₂ е важен, но не и решаващ антибактериален фактор. Най-висока активност срещу *E. coli* е постигната от щамовете, способни да произвеждат и двете съединения (HV13 и HV27) благодарение на възможно синергично действие.

Въпреки че се получава в значителни количества от хетероферментативните щамове, етанолът не повишава значително тяхната антимикробна активност.

Хидрофобността на клетъчната повърхност на изолатите варира от ниска до средна, което показва, че бързия растеж на шамовете припокрива слабите им възможности за неспецифична адхезия.

6. Sequencing and gene expression analysis of catalase genes in Antarctic fungal strain *Penicillium griseofulvum* P29

Galina Stoyancheva, Vladislava Dishliyska, Jeny Miteva-Staleva, Nedelina Kostadinova, Radoslav Abrashev, Maria Angelova & Ekaterina Krumova (2022) *Polar Biology*, 45, 437–447. (IF 2.310- 2020)

Abstract

Catalases are key antioxidant enzymes in aerobic organisms, including fungi that mitigate oxidative stress by detoxification of cellular hydrogen peroxide. Filamentous fungi possess an increasing number of catalases that have been object of growing interest. Despite the many studies on catalase enzymes, data on cold-active catalases are extremely scarce. The Antarctic strain *Penicillium griseofulvum* is a producer of a cold-active catalase. The growth at temperature below optimum lead to enhanced enzyme synthesis as a response to low-temperature induced oxidative stress. The aim of the present study was to detect and sequence the catalase genes present in the *P. griseofulvum* P29 and to determine whether these genes are associated with cell survival at low temperatures. In addition, the expression level of each of them under cold stress was investigated. Using PCR and sequencing the presence of five catalase genes was evaluated. The expression levels of these fungal catalases were quantified with reverse-transcription Quantitative Real-Time PCR (RT-PCR). The results demonstrated that four of the genes were induced by low temperature as a response to oxidative stress. The most pronounced increase in the expression of the gene *cat1*, encoding catalase-peroxidase enzyme was measured. The present evidence suggested that these four genes and mainly *cat1* are involved in the mechanism enables the growth of *P. griseofulvum* P29 under conditions of oxidative stress induced by low-temperature.

Резюме

Каталазите са ключови антиоксидантни ензими в аеробните организми, включително гъбичките, които смекчават оксидативния стрес чрез детоксикация на клетъчния водороден пероксид. Филаментозните гъби притежават все по-голям брой каталази, които са обект на нарастващ интерес. Въпреки многото изследвания върху каталазните ензими, данните за студено активните каталази са изключително оскъдни. Антарктическият шам *Penicillium griseofulvum* е производител на студено-активна каталаза. Растежът при температура под оптималната, води до засилен синтез на ензими като отговор на предизвикан от ниска температура оксидативен стрес. Целта на настоящото изследване е да се открият и секвенират каталазните гени, присъстващи в *P. griseofulvum* P29 и да се определи дали тези гени са свързани с оцеляването на клетките при ниски температури. Освен това беше изследвано нивото на експресия на всеки от тях при студен стрес. С помощта на PCR и секвениране беше оценено присъствието на пет каталазни гена. Нивата на експресия на тези гъбични каталази бяха

определени количествено с reverse-transcription Quantitative Real-Time PCR (RT-PCR). Резултатите показват, че четири от гените са индуцирани от ниска температура като отговор на оксидативния стрес. Измерено е най-изразеното увеличение на експресията на гена *cat1*, кодиращ ензима каталаза-пероксидаза. Настоящите доказателства предполагат, че тези четири гена и главно *cat1* са включени в механизма, позволяващ растежа на *P. griseofulvum* P29 при условия на оксидативен стрес, предизвикан от ниска температура.

Отнасящи се към Група от показатели Г:

7. Biodiversity of contaminant fungi at different colored materials in ancient Egypt tombs and mosques

Galina Stoyancheva, Ekaterina Krumova, Nedelina Kostadinova, Jeny Miteva-Staleva, Petar Grozdanov, Mohamed F. Ghaly, Akmal A. Sakr, Maria Angelova (2018) *Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences*, 71, No 7, pp. 907-915 (IF 0.321)

Abstract

Microbial diversity in historical monuments and their role in the destructive processes is a problem of great interest. Different groups of microorganisms could be a part of this negative effect. Lower Egypt abounds in important cultural remains (tombs and mosques) and special attention is required for their protection. Fungi are involved significantly in deterioration of Egyptian tombs and mosques to the East and West of the Nile Delta. The present study is focused on biodiversity of contaminant fungi from different materials in these historical monuments. A total of 30 isolates were obtained from the analyses of 13 samples taken from different tombs in Egypt. Isolated strains were identified using ITS region and the SSU ribosomal RNA gene sequencing. The dominant genera among isolates were *Penicillium* and *Aspergillus*. This study is a first report on the taxonomy of fungi inhabiting the mentioned part of world cultural heritage. The chemical composition of pigments and limestone was also investigated. Current results are a summarized study of fungal strains from seven monuments and can be included in conservation methods development.

Резюме

Микробното разнообразие в историческите паметници и ролята им в деструктивните процеси е проблем от голям интерес. Различни групи микроорганизми могат да бъдат част от този негативен ефект. Долен Египет изобилства с важни културни останки (гробници и джамии) и за опазването им се изисква специално внимание. Гъбите участват значително в разрушаването на египетските гробници и джамии на изток и запад от делтата на Нил. Настоящото изследване е фокусирано върху биоразнообразието на гъби в различни материали от тези исторически паметници. Общо 30 изолата бяха получени от анализите на 13 проби, взети от различни гробници в Египет. Изолираните щамове бяха идентифицирани чрез секвениране на ITS региона и гена за малката рибозомална субединица (SSU). Доминиращите родове сред изолатите са *Penicillium* и *Aspergillus*. Това изследване е първи доклад за таксономията на гъбите, обитаващи споменатата част от световното културно наследство. Изследван

е и химичният състав на пигментите и варовика. Текущите резултати са обобщено изследване на гъбични щамове от седем паметника и могат да бъдат включени в разработването на консервационни методи.

8. Lysis of Antarctic algal strains by bacterial pathogen

Juliana Ivanova, Galina Stoyancheva, Irina Pouneva (2014) *Antonie van Leeuwenhoek*, 105 (6), pp. 997–1005 (IF 1.806)

Abstract

The present paper describes the isolation, physiological and genetic characteristic of a bacterial agent which inhibits the growth of algae and causes death of laboratory cultures of Antarctic microalgal strains: prokaryotic cyanobacteria *Synechocystis salina* and green eukaryotic microalga *Choricistis minor*. The bacterial strain LB1 was isolated from algal damaged laboratory cultures of *S. salina*. It was established that this bacterium is obligate aerobic, Gram-positive, non-spore-forming, immotile, irregular rods with dimensions 0.3–2 μm . Our results showed that LB1 has algicidal effect to *S. salina* as well as to *C. minor*. Transmission electron microscopy observations confirmed the destruction of *S. salina* by the bacterium. Biochemical analysis of LB1 revealed positive reaction to D-glucose, catalase, hydrolysis of gelatin, acid production from: lactose, L-arabinose, L-rhamnose, esculin and β -galactosidase. The partial sequence (1,404 bp) of the 16S rRNA gene of LB1 showed 99 % similarity with type strains of the genus *Microbacterium*. The results of the biochemical, antimicrobial and of 16S rRNA analysis of LB1 allowed us to identify LB1 as *Microbacterium* sp. Studying expression of pathogenicity of the bacteria to algal cultures will help to solve the problem of algal production for biotechnological purposes.

Резюме

Настоящата публикация описва изолирането, физиологичните и генетичните характеристики на бактериален агент, който инхибира растежа на водораслите и причинява смърт на лабораторни култури от щамове на антарктически микроводорасли: прокариотни цианобактерии *Synechocystis salina* и зелени еукариотни микроводорасли *Choricistis minor*. Бактериалният щам LB1 е изолиран от замърсени лабораторни култури на *S. salina*. Установено е, че тази бактерия е облигатен аероб, Грам-положителна, неспорообразуваща, неподвижна, неправилни пръчици с размери 0,3–2 μm . Нашите резултати показват, че LB1 има алгициден ефект върху *S. salina*, както и върху *C. minor*. Наблюденията с трансмисионна електронна микроскопия потвърдиха унищожаването на *S. salina* от бактерията. Биохимичният анализ на LB1 разкрива положителна реакция към D-глюкоза, каталаза, хидролиза на желатин, производство на киселина от: лактоза, L-арабиноза, L-рамноза, ескулин и β -галактозидаза. Частичната последователност (1404 bp) на 16S rRNA гена на LB1 показва 99% сходство с типовите щамове от рода *Microbacterium*. Резултатите от биохимичния, антимикробния и 16S rRNA анализа на LB1 ни позволиха да идентифицираме LB1 като *Microbacterium* sp. Изследването на проявата на патогенност

на бактериите към култури от водорасли ще помогне за решаването на проблема с използването на водорасли за биотехнологични производства.

9. **Starch-modifying enzymes of lactic acid bacteria – structures, properties, and applications**

Penka Petrova, Kaloyan Petrov, Galina Stoyancheva (2013) *Starch-Starke* 65 (1/2), 34-47, ISSN 0038-9056 (IF 1.22)

Abstract

In spite that lactic acid bacteria (LAB) are used for production of fermented foods and drinks for millennia, their ability to grow using starch as a sole carbon source was noticed by the scientists in the last 30 years. A number of amyolytic LAB (ALAB) strains were isolated and several detailed investigations of biochemical and genetic basis of starch hydrolysis were performed. The purpose of this review is to summarize for the first time the available data about the starch-modifying enzymes in ALAB. The most important amyolytic representatives of the genera *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, and *Weissella* are described. Amino acid sequences, corresponding to ALAB amylase enzymes are compared and some features of the gene expression are analyzed. The possible application of ALAB strains for direct production of lactic acid from starch, as well as their participation in food manufacturing is discussed.

Резюме

Въпреки че млечнокиселите бактерии (LAB) се използват за производство на ферментирани храни и напитки от хилядолетия, способността им да растат, използвайки нишесте като единствен източник на въглерод, е забелязана от учените през последните 30 години. Бяха изолирани редица амилолитични LAB (ALAB) щамове и бяха извършени няколко подробни изследвания на биохимичната и генетична основа на хидролизата на нишестето. Целта на този преглед е да се обобщят за първи път наличните данни за ензимите, модифициращи нишестето в ALAB. Най-важните амилолитични представители на родовете *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium* и *Weissella* са описани. Сравнихме аминокиселинни последователности, съответстващи на ALAB амилазните ензими и анализирахме някои характеристики на генната експресия. Обсъжда се възможното приложение на щамове ALAB за директно производство на млечна киселина от нишесте, както и тяхното участие в производството на храни.

10. **Potential of ligninolytic enzymatic complex produced by white-rot fungi from genus *Trametes* isolated from Bulgarian forest soil**

Ekaterina Krumova, Nedelina Kostadinova, Jeni Miteva-Staleva, Galina Stoyancheva, Boryana Spassova, Radoslav Abrashev, Maria Angelova (2018) *Engineering in Life Sciences*, 18(9), 692-701, (IF 1.936)

Abstract

Because of the crucial role of ligninolytic enzymes in a variety of industrial processes, the demand for a new effective producer has been constantly increasing. Furthermore, information on enzyme synthesis by autochthonous fungal strains is very seldom found. Two fungal strains producing ligninolytic enzymes were isolated from Bulgarian forest soil. They were identified as being *Trametes trogii* and *T. hirsuta*. These two strains were assessed for their enzyme activities, laccase (Lac), lignin peroxidase (LiP) and Mn-dependent peroxidase (MnP) in culture filtrate depending on the temperature and the type of nutrient medium. *T. trogii* was selected as the better producer of ligninolytic enzymes. The production process was further improved by optimizing a number of parameters such as incubation time, type of cultivation, volume ratio of medium/air, inoculum size and the addition of inducers. The maximum activities of enzymes synthesized by *T. trogii* was detected as 11100 U/L for Lac, 2.5 U/L for LiP and 4.5 U/L for MnP after 14 days of incubation at 25°C under static conditions, volume ratio of medium/air 1:6, and 3 plugs as inoculum. Among the supplements tested, 5% glycerol increased Lac activity to a significant extent. The addition of 1% veratryl alcohol had a positive effect on MnP.

Резюме

Поради решаващата роля на лигнинолитичните ензими в различни индустриални процеси, търсенето на нов ефективен производител непрекъснато нараства. Освен това много рядко се намира информация за ензимния синтез от автохтонни гъбични щамове. От българска горска почва са изолирани два гъбични щамове, продуциращи лигнинолитични ензими. Те бяха идентифицирани като *Trametes trogii* и *T. hirsuta*. Тези два щамове бяха оценени за тяхната ензимна активност, лаказа (Lac), лигнин пероксидаза (LiP) и Mn-зависима пероксидаза (MnP) във филтрат на културата в зависимост от температурата и вида на хранителната среда. *T. trogii* е избран като по-добър производител на лигнинолитични ензими. Производственият процес беше допълнително подобрен чрез оптимизиране на редица параметри като време на инкубация, вид на култивиране, обемно съотношение среда/въздух, размер на инокулума и добавяне на индуктори. Максималната активност на ензимите, синтезирани от *T. trogii*, е установена като 11100 U/L за Lac, 2,5 U/L за LiP и 4,5 U/L за MnP след 14 дни инкубация при 25°C при статични условия, обемно съотношение на средата /въздух 1:6 и 3 тапи като инокулум. Сред тестваните добавки 5% глицерол повишава активността на Lac в значителна степен. Добавянето на 1% вератрилов алкохол има положителен ефект върху MnP.

11. Selection of catalase producers among Antarctic fungi

Ekaterina Krumova, Nedelina Kostadinova, Radoslav Abrashev, Jeni Miteva-Staleva, Galina Stoyancheva, Vladislava Dishlijska, Boryana Spassova, Maria Angelova (2020) *Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences*, Vol 73, No2, pp. 220-226, DOI: 10.7546/CRABS.2020.02.10 (IF 0.378)

Abstract

During a survey of cold-adapted fungi in the permanent Bulgarian Antarctic base on Livingston Island, 19 fungal strains isolated at temperature 4°C demonstrated significant extra- and intracellular catalase activity. Thus, Antarctic fungi could be a suitable source for producing cold-active catalase enzymes. Among these strains, *Penicillium chrisogenum* and *Aspergillus fumigatus* were selected as perspective producers. Maximum enzyme production was achieved at a temperature 25°C after 96 h submerged cultivation. Both strains exhibited intracellular catalase level comparable to the published data. *P. chrisogenum* presented three times higher extracellular activity than *A. fumigatus*.

Резюме

По време на изследване на адаптирани към студ гъби в постоянната българска антарктическа база на остров Ливингстън, 19 гъбични щама, изолирани при температура 4°C, демонстрират значителна извън- и вътреклетъчна каталазна активност. По този начин антарктическите гъби могат да бъдат подходящ източник за производство на студено-активни каталазни ензими. Сред тези щамове, *Penicillium chrisogenum* и *Aspergillus fumigatus* са избрани като перспективни производители. Максимално производство на ензими се постига при температура 25°C след 96h култивиране. И двата щамове показват ниво на вътреклетъчна каталаза, сравнимо с публикуваните данни. *P. chrisogenum* показва три пъти по-висока извънклетъчна активност от *A. fumigatus*.

12. Comparison of the Oxidative Stress Response of Two *Aspergillus fumigatus* Strains Isolated from Polluted Soils against Combined Heavy Metal Toxicity

Ekaterina Krumova, Nikolai Andreyinski, Radoslav Abrashev, Galina Stoyancheva, Nedelina Kostadinova, Jeny Miteva-Staleva, Vladislava Dishlijska, Borjana Spasova, Maria Angelova (2021) *Geomicrobiology Journal*, 38(6), 515-523. (IF 2.308-2020)

Abstract

Heavy metal polluted soils are major sources of fungi exhibiting high tolerance toward metal toxicity. These fungi use various defense mechanisms to survive under extreme conditions. But, a little is known about the role of antioxidant response in the fungal tolerance to varied concentrations of mixture of metal ions. The aim of present study was to compare the cell response of two *Aspergillus fumigatus* strains, isolated from heavily polluted soils, against multi-metal (Cd, Cu, Ni, and Zn ions) treatment. Both strains demonstrated high tolerance to increasing concentrations of multi-metal systems. The data confirmed a relationship between oxidative stress and heavy metal toxicity. The treatment with multi-metal mixture declined fungal growth, glucose uptake and extracellular protein synthesis in a dose-dependent manner. Combination of heavy metal ions in diverse concentrations induced an increase in the levels of carbonylated-damaged proteins and changes in glycogen and trehalose content. Our results showed a distinct profile of antioxidant enzymes. While the SOD activity was stimulated by metal containing solutions, CAT activity tended to decrease. Comparison between both strains

revealed that *A. fumigatus* G showed higher tolerance than *A. fumigatus* 3-2 with increasing concentrations of multi-metal systems due to more active antioxidant defence.

Резюме

Замърсените с тежки метали почви са основни източници на гъбички, проявяващи висока толерантност към метална токсичност. Тези гъби използват различни защитни механизми, за да оцелеят при екстремни условия. Но малко се знае за ролята на антиоксидативния отговор в толерантността на гъбичките към различни концентрации на смес от метални йони. Целта на настоящото изследване беше да се сравни клетъчният отговор на два *Aspergillus fumigatus* щамове, изолирани от силно замърсени почви, срещу третиране с няколко метални йони (Cd, Cu, Ni и Zn). И двата щамове демонстрират висока толерантност към нарастващи концентрации на мултиметални системи. Данните потвърждават връзката между оксидативния стрес и токсичността на тежките метали. Третирането с мултиметална смес намалява растежа на гъбичките, усвояването на глюкоза и извънклетъчния протеинов синтез по дозозависим начин. Комбинацията от йони на тежки метали в различни концентрации предизвиква повишаване на нивата на карбонилирани-увредени протеини и промени в съдържанието на гликоген и трехалоза. Нашите резултати показваха различен профил на антиоксидантни ензими. Докато активността на SOD се стимулира от разтвори, съдържащи метал, активността на САТ има тенденция да намалява. Сравнението между двата щамове разкри, че *A. fumigatus* G показва по-висока толерантност от *A. fumigatus* 3-2 с нарастващи концентрации на мултиметални системи поради по-активна антиоксидантна защита.

13. Development and application of random DIG labelled probes based on total genomic *Lactobacillus* DNA

Danova S., Stoyancheva G., Manasiev Y. and Miteva V., *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2005, vol. 21, Numbers 6-7, p. 835 – 842 (IF 0.634)

Abstract

Nine *Lactobacillus*-specific and non-isotopically (digoxigenin) labelled probes were developed on the basis of *Lactobacillus* total chromosomal DNA. Their specificity and applicability for *Lactobacillus* discrimination was proven by DNA–DNA hybridization to reference strains from the American Type Culture Collection (ATCC). The DNA probes were divided into three groups depending on the ability to hybridize to DNA from the same and/or from a group of related *Lactobacillus* strains. They were assayed in the species-specific detection of vaginal strains from the genus *Lactobacillus*. Six DNA probes were successfully applied for characterization of 21 newly isolated vaginal *Lactobacilli*. The species affiliation of some isolates was determined. The developed DNA probes were evaluated for usage as a qualitative hybridization test for detection of *Lactobacillus* species in mixed cultures, obtained directly from vaginal samples without strain isolation.

Резюме

Девет специфични за лактобацили и неизотопно (дигоксигенин) белязани сонди са разработени на базата на общата хромозомна ДНК на *Lactobacillus*. Тяхната специфичност и приложимост за дискриминация на *Lactobacillus* е доказана чрез ДНК-ДНК хибридизация с референтни щамове от Американската колекция от типови култури (ATCC). ДНК сондите бяха разделени на три групи в зависимост от способността за хибридизиране с ДНК от същата и/или от група сродни щамове *Lactobacillus*. Те бяха анализирани при специфичното за вида откриване на вагинални щамове от рода *Lactobacillus*. Шест ДНК сонди бяха успешно приложени за характеризиране на 21 новоизолирани вагинални лактобацили. Установена е видовата принадлежност на някои изолати. Разработените ДНК сонди бяха оценени за използване като качествен хибридизационен тест за откриване на видове *Lactobacillus* в смесени култури, получени директно от вагинални проби без изолиране на шам.

14. Cold-active catalase from the psychrotolerant fungus *Penicillium griseofulvum*

Ekaterina Krumova, Radoslav Abrashev, Vladislava Dishliyska, Galina Stoyancheva, Nedelina Kostadinova, Jeny Miteva-Staleva, Boryana Spasova, Maria Angelova (2021). *J Basic Microbiol.* 61(9), 782-794. (IF 2.281-220)

Abstract

Cold-active catalase (CAT) elicits great interest because of its vast prospective at the medical, commercial, and biotechnological levels. The study paper reports the production of cold-active CAT by the strain *Penicillium griseofulvum* P29 isolated from Antarctic soil. Improved enzyme production was achieved by optimization of medium and culture conditions. Maximum CAT was demonstrated under low glucose content (2%), 10% inoculum size, temperature 20°C, and dissolved oxygen concentration (DO) 40%. An effective laboratory technology based on changing the oxidative stress level through an increase of DO in the bioreactor was developed. The used strategy resulted in a 1.7- and 1.4-fold enhanced total enzyme activity and maximum enzyme productivity. The enzyme was purified and characterized. *P. griseofulvum* P29 CAT was most active at approximately 20°C and pH 6.0. Its thermostability was in the range between 5°C and 40°C.

Резюме

Студено-активната каталаза (CAT) предизвиква голям интерес поради огромната си перспектива за приложение на медицинско, търговско и биотехнологично ниво. Проучването съобщава за производството на студено-активен CAT от щама *Penicillium griseofulvum* P29, изолиран от антарктичката почва. Повишено производство на ензими беше постигнато чрез оптимизиране на условията на средата и културата. Максималният CAT беше демонстриран при ниско съдържание на глюкоза (2%), 10% размер на инокулума, температура 20°C и концентрация на разтворен кислород (DO) 40%. Разработена е ефективна лабораторна технология, базирана на промяна на нивото на оксидативния стрес чрез повишаване на DO в биореактора. Използваната стратегия доведе до 1,7- и 1,4-кратно повишена обща ензимна активност и максимална ензимна

производителност. Ензимът беше пречистен и охарактеризиран. *P. griseofulvum* P29 CAT е най-активен при приблизително 20°C и pH 6,0. Термостабилността му е в диапазона между 5°C и 40°C.

15. Isolation and characterization of plasmids from strains of *Streptococcus thermophilus* Bulgarian yogurt starters

Petrova P., Danova S., Stoyancheva G., Miteva V. (2003) *Biotechnology & Biotechnological equipment*, vol. 1, 105-113 IF (0.055)

Abstract

Twenty Bulgarian *Streptococcus thermophilus* strains used in industrial milk fermentation were analyzed for their plasmid content. Six of them were found to contain one or two plasmids. The newly isolated plasmids were divided into three groups based on DNA homology. Six plasmids, sharing homology with pt38 and p2992, were classified within group I, two plasmids were classified into group II and one plasmid, p2991, possessing homology only with itself, was classified in Group III. Hybridization experiments revealed low homology between streptococcal and *Lactobacillus* plasmids. Using plus-origin- specific (dso) DIG-labeled probes we determined that two of the plasmids (pt38 and p2992) belong to the pC194 plasmid family, that uses the rolling circle mode of replication. One plasmid from group I, pt38 was further characterized. We constructed a restriction map and identified the restriction fragment bearing the dso of replication. pt38 appears to be an excellent candidate for creation of a shuttle vector for gene expression in *Escherichia coli* and the *Streptococcus thermophilus* because it is small in size, has five unique restriction sites and known location of the plus-origin of replication.

Резюме

Анализирани са 20 български щама *Streptococcus thermophilus*, използвани за индустриална ферментация на мляко, за съдържанието на плаزمиди. Установено е, че шест от тях съдържат един или два плаزمиди. Новоизолираните плазмиди бяха разделени на три групи въз основа на ДНК хомология. Шест плазмиди, споделящи хомология с pt38 и p2992, бяха класифицирани в група I, два плазмиди бяха класифицирани в група II и един плазмид, p2991, притежаващ хомология само със себе си, беше класифициран в група III. Експериментите за хибридизация разкриват ниска хомология между стрептококови и *Lactobacillus* плазмиди. Използвайки специфични за начало на репликация (dso) DIG-маркирани сонди, ние установихме, че два от плазмидите (pt38 и p2992) принадлежат към семейството на плазмидите pC194, което използва режима на репликация с въртящ се кръг. Един плазмид от група I, pt38 беше допълнително характеризирани. Ние изградихме рестрикция карта и идентифицирахме рестрикцияния фрагмент, носещ dso на репликация. pt38 изглежда е отличен кандидат за създаване на совалков вектор за генна експресия в *Escherichia coli* и *Streptococcus thermophilus*, тъй като е малък по размер, има пет уникални рестрикцияни места и известно местоположение на началото на репликация.

16. Starch-degrading activities of Bulgarian yeast isolates

Petrova P., Gouliamova D., Petrov K., Stoyancheva G., Dimitrov R. (2009) *Biotechnology & Biotechnological equipment*, vol. 23, 651 – 654 (IF 0.291)

Abstract

Twenty yeast strains, able to degrade starch as a sole carbon source were isolated from plants and insects, inhabiting Bulgarian mountains, as well as from fermented foods. The probes were taken aseptically and the corresponding microflora was isolated as pure cultures in selective media. The strains' identification was based on classical taxonomy criteria, including cells and colony morphology, physiological requirements, carbohydrate utilization profiles and enzyme activities tests. The new isolates belong to genera *Saccharomyces*, *Geotrichum*, *Candida*, *Metschnikowia*, *Clavispora*, *Wickerhamiella*, *Debaryomyces*, *Kloeckera* and *Rhodotorula*. Aiming to find out strains with possible biotechnological application, the main fermentation products of our isolates were estimated. After aerobic cultivation in medium, containing 20 g/l glucose fourteen strains accumulated high amounts of ethanol; all formed some lactic acid and six strains—succinic acid. The starch-degrading activity was evaluated quantitatively by measuring the light absorption of the iodine-starch complex. The kinetic experiments, carried out using 10 and 20 g/l starch, showed that all strains were capable to degrade it at different levels. In view of the strains' vigorous growth in starch-containing media, the potential of the isolates to produce valuable chemicals from starch was studied.

Резюме

От растения и насекоми, обитаващи българските планини, както и от ферментирали храни са изолирани 20 щамове дрожди, способни да разграждат нишестето като единствен източник на въглерод. Пробите се вземат асептично и съответната микрофлора се изолира като чисти култури в селективна среда. Идентифицирането на щамове се основава на класически критерии за таксономия, включително морфология на клетките и колонията, физиологични изисквания, профили на използване на въглехидрати и тестове за ензимна активност. Новите изолати принадлежат към родове *Saccharomyces*, *Geotrichum*, *Candida*, *Metschnikowia*, *Clavispora*, *Wickerhamiella*, *Debaryomyces*, *Kloeckera* и *Rhodotorula*. С цел откриване на щамове с възможно биотехнологично приложение бяха оценени основните ферментационни продукти на нашите изолати. След аеробно култивиране в среда, съдържаща 20 g/l глюкоза, четиринадесет щамове натрупаха големи количества етанол; всички образуват малко млечна киселина и шест щамове — янтарна киселина. Активността на разграждането на нишестето се оценява количествено чрез измерване на абсорбцията на светлина на комплекса йод-нишесте. Кинетичните експерименти, проведени с 10 и 20 g/l нишесте, показаха, че всички щамове са способни да го разграждат в различна степен. С оглед на енергичния растеж на щамове в среда, съдържаща нишесте, беше проучен потенциалът на изолатите да произвеждат ценни химикали от нишесте.

17. Genetic diversity of bacteriophages highly specific for *Streptococcus thermophilus* strain LBB.A

Ishlimova D., Urshev Z., Stoyancheva G., Petrova P. Minkova S. Doumanova L. (2009) *Biotechnology & Biotechnological equipment*, vol. 23, 1340-1345. (IF 0.291)

Abstract

Eight virulent bacteriophages ϕ A1, ϕ A2, ϕ A5, ϕ A6, ϕ DmA, ϕ SfA, ϕ PtA and ϕ A7, that showed high specificity for *Streptococcus thermophilus* strain LBB.A, the streptococcal component of an industrial yogurt starter, were isolated. The comparison of the HindIII and EcoRV restriction patterns of the phage DNA revealed limited relatedness between the isolates, clustering together only ϕ A5 with ϕ A6 and indicating similarity between ϕ SfA, ϕ PtA and ϕ A7. All eight bacteriophages were classified as costype phages. An internal region within a conserved 2.2 kbp EcoRI DNA fragment typical for the majority of *S. thermophilus* bacteriophages was present in six of the phage isolates and was absent in ϕ DmA and ϕ A1. PCR amplification of the VR2 region of the antireceptor gene yielded an 800 bp product for seven of the phages and a 700 bp product for ϕ A2. The genome size of the eight phage isolates was in the range of 33.4–37.3 kbp. Of a total of 62 other *S. thermophilus* cultures ϕ A1, ϕ DmA and ϕ PtA were able to infect only two strains with reduced effectiveness of plaquing. Despite the broad genetic diversity of phages of *S. thermophilus* strain LBB.A, a two-step selection procedure, involving successive challenge of the bacterial culture with ϕ A1 and ϕ A7, was sufficient to obtain mutants resistant to all eight phases.

Резюме

Осем вирулентни бактериофаги ϕ A1, ϕ A2, ϕ A5, ϕ A6, ϕ DmA, ϕ SfA, ϕ PtA и ϕ A7, които показват висока специфичност за *Streptococcus thermophilus* щам LBB.A, стрептококов компонент на индустриална закваска, са изолирани. Сравнението на рестрикционните профили на HindIII и EcoRV на фаговата ДНК разкрива ограничена свързаност между изолатите, групира само на ϕ A5 с ϕ A6 и показва на сходство между ϕ SfA, ϕ PtA и ϕ A7. Всичките осем бактериофаги бяха класифицирани като фаги от costype. Вътрешен регион в рамките на запазен 2.2 kbp EcoRI ДНК фрагмент, типичен за по-голямата част от бактериофагите на *S. thermophilus*, присъства в шест от фагови изолати и отсъства в ϕ DmA и ϕ A1. PCR амплификацията на VR2 областта на антирецепторния ген дава 800 bp продукт за седем от фагите и 700 bp продукт за ϕ A2. Размерът на генома на осемте фагови изолати е в диапазона от 33,4–37,3 kbp. От общо 62 други култури на *S. thermophilus*, ϕ A1, ϕ DmA и ϕ PtA са бяха в състояние да заразят само два щамата с намалена ефективност на „plaquing“. Въпреки широкото генетично разнообразие от фаги на *S. thermophilus* щам LBB.A, двуетапна процедура за селекция, включваща последователно третиране на бактериалната култура с ϕ A1 и ϕ A7, е достатъчна за получаване на мутанти, устойчиви на всичките осем фаги.

18. Genomic approaches to yeast taxonomy

Gouliamova D., Dimitrov R., Petrova P., Stoyancheva G., Petrov K. (2009) *Biotechnology & Biotechnological equipment*, vol. 23, 519 – 523. (IF 0.291)

Abstract

Yeasts have ecological, medical and biotechnological importance. They are primary drivers of global carbon cycle and they belong to the most valuable microorganisms for industrial applications. Despite their importance, yeast remain poorly classified, particularly at the level of strains. Accurate identification of yeasts is essential in medicine, biotechnology and for understanding interactions in the ecosystem. Our review will focus on genomic tools currently used in taxonomy of yeasts.

Резюме

Дрождите имат екологично, медицинско и биотехнологично значение. Те са основни двигатели на глобалния въглероден цикъл и принадлежат към най-ценните микроорганизми за промишлени приложения. Въпреки важността си, дрождите остават слабо класифицирани, особено на ниво щамове. Точното идентифициране на дрождите е от съществено значение в медицината, биотехнологиите и за разбирането на взаимодействията в екосистемата. Нашият преглед ще се съсредоточи върху геномните инструменти, използвани в момента в таксономията на дрождите.

19. Production of bacteriocins by lactic acid bacteria

Stoyancheva G., Stoyanov A. (2017) *Microbiology for a better health and industry, jubilee book 70th anniversary of the Stephan Angeloff Institute of Microbiology*, pp. 61-70, ISBN:978-954-92882-2-3

Abstract

Bacteriocins are small ribosomally synthesized antimicrobial peptides produced by bacteria that kill or inhibit the growth of other bacterial strains. Many Lactic Acid Bacteria produce a high variety of different bacteriocins which are structurally, functionally, and ecologically diverse. Lately there is an increased interest to bacteriocins from LAB due to their potential as both natural food preservatives and as next-generation antibiotics targeting the multiple-drug resistant pathogens. Our work includes isolation of LAB strains from different Bulgarian ecosystems, study of their antimicrobial activities and bacteriocin production. The explore strains belonged to the genus: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* and *Leuconostoc*. All strains were identified using 16S rDNA sequencing analysis. We analyzed the genes encoding for bacteriocins and determined primary the physicochemical nature of those active substances. Many strains producing bacteriocin substances active against various Gram+ and Gram- microorganisms and *Candida* were found. The genes related to the bacteriocin production in different strains were identified and sequenced. The presence of genes for gassericin A, gassericin T, acidocin LF221A and helveticin operon in the genome of some active isolates was proved. Selected *Lactobacillus* isolates inhibit the growth of pathogen

microorganisms and are part of Human Microbiota. After additional researches, they can use in developing probiotic products for reduce the risk of infections.

Резюме

Бактериоцините са малки рибозомно синтезирани антимикуробни пептиди, произвеждани от бактерии, които инхибират растежа или убиват други бактериални щамове. Много млечнокисели бактерии (МКБ) произвеждат бактериоцини, които са структурно, функционално и екологично различни. Напоследък има повишен интерес точно към бактериоцини от МКБ поради техния потенциал като естествени хранителни консерванти и като терапевтични антибиотици срещу мулти-резистентни патогенни щамове. Нашата работа включва изолиране на щамове МКБ от различни български екосистеми, проучване на техните антимикуробни активности и способността им да продуцират бактериоцини. Изследваните изолати принадлежат към род: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* и *Leuconostoc*. Всички щамове бяха идентифицирани с помощта на 16S рДНК секвенционен анализ. Като следващ етап от работата ни анализирахме наличието на гени, кодиращи бактериоцини и изследвахме физикохимичната природа на активните субстанции. Бяха намерени много щамове продуциращи бактериоцин-подобни вещества активни срещу различни Грам + и Грам – микроорганизми и *Candida*. Гените, свързани с бактериоциновата продукция при различни щамове бяха идентифицирани и секвенирани. Наличието на гени за бактериоцините: gassericin A, gassericin T, acidocin LF221A и helveticin в генома на някои активните изолати беше доказано. Избрани лактобацилни изолати потискат растежа на патогенни микроорганизми и са част от човешката микрофлора. След допълнителни изследвания, те могат да бъдат използвани при разработването на пробиотични продукти за намаляване риска от инфекции.

Отнасящи се към допълнителните критерии на ИМикБ-БАН:

20. Study of vaginal lactobacilli from Bulgarian women

Stoyancheva G., Dimitonova S., Petrova P., Aleksandrova R., Tzvetkova I., Danova S., XI congress of Microbiology, 4-7 October 2006, Varna, Bulgaria, Proceedings book, (пленарен доклад)

Abstract

The human vagina is a complex dynamic ecosystem containing an abundance of microorganisms. In women of childbearing age this system is dominated by *Lactobacillus* spp., producing a variety of metabolites including lactic acid which maintains the acidic conditions (pH<4.0), hydrogen peroxide (H₂O₂), bacteriocins and other antimicrobial substances as important inhibitors of the pathogenic organisms in the vagina. The use of probiotics to control certain infections and to reestablish the human bacterial microbiota is gaining acceptance as an alternative to conventional antibiotic therapy. The present study summarised results from three-years research project on *Lactobacillus* microflora of sixty reproductive-age Bulgarian women. Forty eight strains isolated from collected vaginal samples were determined as *Lactobacillus* sp. Antagonistic activity of all vaginal lactobacilli

were evaluated by different *in vitro* methods. Active strains inhibiting the growth of pathogens were selected. Qualitative tests for H₂O₂ and exopolysaccharides production was made. Some of these exopolysaccharides promoted *Lactobacillus* adhesion to epithelial cells and it is important for vagina colonization. In order to revealed the biodiversity of studied *Lactobacillus* strains six molecular methods (ribotyping, ARDRA, rep-PCR, PCR with species-specific primers, hybridization with species-specific probes and sequencing analysis) were applied. The predominant species in the studied group was *L. fermentum*. Three strains, possessing high antimicrobial activity were studied by sequencing analysis of 16S rDNA. After additional research, these strains could be used as therapeutic agents for the treatment and prevention of urogenital infections. This work was financially supported by National Council for Scientific Research of Republic of Bulgaria. (Grant МУ-Л-1406/2004).

Резюме

Вагиналната микробиота е динамична екосистема, която включва множество микроорганизми. При жени в детеродна възраст тази система е доминирана от видове *Lactobacillus* spp., произвеждащи различни метаболити, включително млечна киселина, която поддържа киселинните условия (pH<4,0), водороден прекис (H₂O₂), бактериоцини и други антимикробни вещества, важни инхибитори 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.

Настоящото изследване обобщава резултатите от тригодишен изследователски проект за *Lactobacillus* микрофлора на 60 българки в репродуктивна възраст. Четиридесет и осем щамове, изолирани от събрани вагинални проби, бяха определени като *Lactobacillus* sp. Антагонистичната активност на всички вагинални лактобацили се оценява чрез различни *in vitro* методи. Избрани са активни щамове, инхибиращи растежа на патогени. Извършени са качествени тестове за производство на H₂O₂ и екзополисахариди. Някои от тези екзополисахариди насърчават адхезията на *Lactobacillus* към епителните клетки и това е важно за колонизацията на вагината. За разкриване на биоразнообразието на изследваните щамове *Lactobacillus* бяха приложени шест молекулярни метода (риботипиране, ARDRA, rep-PCR, PCR с видоспецифични праймери, хибридизация с видоспецифични сонди и секвенционен анализ). Преобладаващият вид в изследваната група е *L. fermentum*. Три щамове, притежаващи висока антимикробна активност, бяха изследвани чрез секвенционен анализ на 16S rDNA. След допълнителни изследвания тези щамове могат да се използват като терапевтични средства за лечение и профилактика на уrogenитални инфекции. Работата е с финансова подкрепа на Националния фонд за научни изследвания на Република България. (Грант МУ-Л-1406/2004).