

**Резюмета на научни публикации на английски и български, съгласно
минималните национални критерии по ЗРАСРБ и допълнителните
изисквания на ИМик-БАН**

на гл. ас. д-р Яна Ганчева Гочева

за участие в конкурс за заемане на академична длъжност „доцент“ в област на висшето образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3. Биологични науки (специалност: Микробиология/Ензимология), обявен в ДВ бр. 84 от 04.10.2024, за нуждите на Лаборатория „Микробна биохимия“, Департамент „Обща микробиология“, Институт по микробиология „Стефан Ангелов“ при БАН.

Публикации са разпределени по групи показатели съгласно изискванията на ЗРАСРБ в съответното професионално направление, както следва: общо 29 публикации, 6 включени по показател В и 15 по показател Г; и 8 публикации и доклади, публикувани в нереферирани списания или сборници с научно рецензиране.

Публикации по Група от показатели В на ЗРАСРБ

1. Bucur, B., Mallat, E., Gurban, A., **Gocheva, Y.**, Velasco, C., Marty, J.M. & Noguier, T. (2006). Strategies to develop malic acid biosensors based on malate quinone oxidoreductase (MQO). *Biosensors and Bioelectronics*, 21(12), 2290-2297. (Q1)

Abstract:

An amperometric biosensor based on malate quinone oxidoreductase (MQO) was developed for monitoring of the malolactic fermentation of wines. Screen-printed electrodes coupled with appropriate mediators were used as transducers for this novel biosensor. MQO was immobilized by physical entrapment in a photo-cross-linkable poly (vinyl alcohol) polymer (PVA-SbQ) on the surface of the working electrode. Several electrochemical mediators were studied in order to lower the applied potential and minimise the matrix effects. Among them, 2,6-dichlorophenol indophenol (DPIP) and phenazine methosulfate (PMS) were chosen for further development. The working conditions (mediator concentration, applied potential and pH) were optimised for both DPIP and PMS. Detection limits for both types of biosensors were of 5 μ M malic acid. Sensitivities obtained for the linear part of the calibration curve were 0.85 and 1.7 mA/M for the biosensors based on DPIP and PMS, respectively. Interferences due to non-specific oxidations were shown to be negligible when using PMS as mediator.

Резюме:

Разработен е амперометричен биосензор на базата на малат хинон оксидоредуктаза (MQO) за наблюдение на ябълчно-лактичната ферментация на вина. Електроди, съчетани с подходящи медиатори, бяха използвани като преобразуватели за този нов биосензор. Ензимът беше имобилизиран чрез физическо улавяне във фото-омрежен поли (винил алкохол) полимер (PVA-SbQ) на повърхността на работния електрод. Бяха изследвани няколко електрохимични медиатора, за да се намали приложеният потенциал и да се сведат до минимум ефектите на

матрицата. Сред тях 2,6-дихлорофенол индофенол /ДХИ/ и феназин метосулфат /ФМ/ бяха избрани за по-нататъшно развитие. Работните условия концентрация на медиатор, приложен потенциал и рН) бяха оптимизирани както за ДХИ, така и за ФМ. Границите на откриване и за двата вида биосензори са 5 µМ ябълчена киселина. Чувствителността, получена за линейната част на калибрационната крива, беше съответно 0,85 и 1,7 mA/M за биосензорите, базирани на ДХИ и ФМ. Показано е, че смущенията, дължащи се на неспецифични окисления, са незначителни при използване на ФМ като медиатор.

2. Urshev, Z., **Gocheva, Y.**, Hristova, A., Savova, T., Krusteva, R. & Ishlimova, D. (2012). Gene-specific PCR amplification of technologically important lactococcal genes. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 26(1), 39-44. (Q3)

Abstract:

A set of gene-specific PCR techniques were used to characterize lactococcal cultures from the LBB collection. Initially the species identification of lactococci was confirmed by targeting the glutamate decarboxylase gene (*gadB*). PCR amplification of the genes for membrane proteinase (*prtP*) and citrate permease (*citP*) was used to select strains which grow rapidly in milk and/or ferment citrate. The *prtP* + and *citP* + phenotype was confirmed using differentiating microbiological media. It was proved that the *citP* + phenotype was always associated with strains of *L. lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* – an important aroma forming variety of dairy lactococci. In all *diacetylactis* strains the *citP* gene was localized on a 8.2 kbp plasmid. The lactococcal cultures were also tested for the presence of nisin synthesis (*nisA/Z*) genes. Potentially lysogenic lactococcal cultures which carry in their genome the gene of prophage integrase (*int*) were detected. From the tested strains nearly one third were *int*-positive. The thermal induction of prophage activity was demonstrated for the *int* + strain *L. lactis* ssp. *lactis* LBB.C1/6.

Резюме:

За характеризиране на лактококовите култури от колекцията на ЕЛБИ бяха използвани набор от генно-специфични PCR техники. Първоначално видовата идентификация на лактококите беше потвърдена чрез насочване към гена на глутаматдекарбоксилазата (*gadB*). PCR амплификацията на гените за мембранна протеиназа (*prtP*) и цитратна пермеаза (*citP*) беше използвана за селектиране на щамове, които растат бързо в мляко и/или ферментират цитрат. Фенотипът *prtP*+ и *citP*+ е потвърден с помощта на диференциращи микробиологични среди. Беше доказано, че фенотипът *citP* + винаги е свързан с щамове на *L. lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* - важна ароматообразуваща разновидност на млечните лактококи. При всички щамове *diacetylactis* генът *citP* е локализиран върху плазмид с дължина 8,2 kbp. Лактококовите култури бяха тествани и за наличие на гени за синтез на нисин (*nisA/Z*). Бяха открити потенциално лизогенни лактококови култури, които носят в генома си гена на профаговата интеграна (*int*). Почти една трета от изследваните щамове бяха *int*-положителни. Термичното индуциране на профагеналната активност беше доказано за *int*+ щам *L. lactis* ssp. *lactis* LBB.C1/6.

3. Eneva, R., Engibarov, S., **Gocheva, Y.**, Mitova, S., Arsov, A., Petrov, K. Abrashev, R., Lazarkevich, I. & Petrova, P. (2022). Safe sialidase production by the saprophyte *Oerskovia paurometabola*: gene sequence and enzyme purification. *Molecules*, 27(24), 8922. (Q1)

Abstract

Sialidase preparations are applied in structural and functional studies on sialoglycans, in the production of sialylated therapeutic proteins and synthetic substrates for use in biochemical research, etc. They are obtained mainly from pathogenic microorganisms; therefore, the demand for apathogenic producers of sialidase is of exceptional importance for the safe production of this enzyme. Here, we report for the first time the presence of a sialidase gene and enzyme in the saprophytic actinomycete *Oerskovia paurometabola* strain O129. An electrophoretically pure, glycosylated enzyme with a molecular weight of 70 kDa was obtained after a two-step chromatographic procedure using DEAE cellulose and Q-sepharose. The biochemical characterization showed that the enzyme is extracellular, inductive, and able to cleave $\alpha(2\rightarrow3,6,8)$ linked sialic acids with preference for $\alpha(2\rightarrow3)$ bonds. The enzyme production was strongly induced by glycomacropeptide (GMP) from milk whey, as well as by sialic acid. Investigation of the deduced amino acid sequence revealed that the protein molecule has the typical six-bladed β -propeller structure and contains all features of bacterial sialidases, i.e., an YRIP motif, five Asp-boxes, and the conserved amino acids in the active site. The presence of an unusual signal peptide of 40 amino acids was predicted. The sialidase-producing *O. paurometabola* O129 showed high and constant enzyme production. Together with its saprophytic nature, this makes it a reliable producer with high potential for industrial application.

Резюме:

Сиалидазите намират приложение при изследвания на функциите на сиалоглигани, в производството на сиалирани терапевтични протеини и синтетични субстрати и др. Те се получават главно от патогенни микроорганизми; следователно търсенето на апатогенни производители на сиалидаза е от изключително значение за безопасното производство на този ензим. Тук за първи път съобщаваме за наличието на сиалидазен ген и ензим в сапрофитния актиномицет *Oerskovia paurometabola* щам O129. Електрофоретично чист, гликозилиран ензим с молекулно тегло от 70 кДА беше получен след двуетапна хроматографска процедура с използване на ДЕАЕ-целулоза и Q-сефароза. Биохимичната характеристика показва, че ензимът е извънклетъчен, индуктивен и способен да разцепва $\alpha(2\rightarrow3,6,8)$ свързани сиалови киселини с предпочитание към $\alpha(2\rightarrow3)$ връзки. Производството на ензим е силно индуцирано от гликомакропептид (ГМП) от млечна суроватка, както и от сиалова киселина. Изследването на аминокиселинната последователност на белтъчната молекула, разкри, че протеиновата молекула има типичната структура на β -пропелера с шест върха и съдържа всички характеристики на бактериалните сиалидази, т.е. YRIP мотив, пет Asp-кутии и запазените аминокиселини в активния сайт. Предсказано е наличието на необичаен сигнален пептид от 40 аминокиселини. Ситезиращият сиалидаза, *O. paurometabola* щам O129 показва високо и постоянно производство на ензими. Характеристики, като саспрофитен характер и висока степен на продукция на сиалидаза са предпоставка за индустриално приложение на изследваният щам.

4. Eneva, R., Engibarov, S., **Gocheva, Y.**, Mitova, S. & Petrova, P. (2023). Novel sialidase from non-pathogenic bacterium *Oerskovia paurometabola* strain O129. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 78(1-2), 49-55. (Q3)

Abstract:

Bacterial sialidases are enzymes that are involved in a number of vital processes in microorganisms and in their interaction with the host or the environment. Their wide application for scientific and applied purposes requires the search for highly effective and non-pathogenic producers. Here, we report the first description of sialidase from *Oerskovia paurometabola*. The extracellular enzyme preparation was partially purified. The presence of sialidase was confirmed in native PAGE treated with the fluorogenic substrate 4MU-Neu5Ac. Maximum enzyme activity was registered at 37 °C and in the pH range of 4.0–5.5. The influence of metal ions and EDTA was examined. It was demonstrated that EDTA, Mn²⁺ and Ba²⁺ ions inhibit the sialidase activity to different extent, while Cd²⁺, Fe²⁺ and Fe³⁺ have stimulating effect on it. These features are studied for the first time concerning sialidase of *Oerskovia* representative. Cell bound sialidase and sialate aldolase were also established.

Резюме:

Бактериалните сиалидази са ензими, които участват в редица жизненоважни процеси в микроорганизмите и при тяхното взаимодействие с гостоприемника или околната среда. Широкото им използване за научни и приложни цели, налага търсенето на високоефективни и непатогенни продуценти. Тук се докладва първото описание на сиалидаза от *Oerskovia paurometabola*. Извънклетъчният ензимен препарат беше частично пречистен. Наличието на сиалидаза се потвърждава в нативна гел електрофореза, третирана с флуорогенния субстрат 4МУ-Neu5Ac. Максимална ензимна активност е регистрирана при 37 °C и в диапазона на рН 4,0 – 5,5. Изследвано е влиянието на някои метални йони и ЕДТА върху ензимната активност. Доказано е, че ЕДТА, Mn²⁺ и Ba²⁺ йони инхибират в различна степен сиалидазната активност, докато Cd²⁺, Fe²⁺ и Fe³⁺ имат стимулиращ ефект върху нея. Тези характеристики са проучени за първи път по отношение на сиалидазата на представител на *Oerskovia*. Установени са също клетъчно свързана сиалидаза и сиалат алдолаза.

5. Abrashev, R., Krumova, E., Petrova, P., Eneva, R., Dishliyska, V., **Gocheva, Y.**, ... & Angelova, M. (2024). Glucose Catabolite Repression Participates in the Regulation of Sialidase Biosynthesis by Antarctic Strain *Penicillium griseofulvum* P29. *Journal of Fungi*, 10(4), 241. (Q1)

Abstract

Sialidases (neuraminidases) catalyze the removal of terminal sialic acid residues from glycoproteins. Novel enzymes from non-clinical isolates are of increasing interest regarding their application in the food and pharmaceutical industry. The present study aimed to evaluate the participation of carbon catabolite repression (CCR) in the regulation of cold-active sialidase biosynthesis by the psychrotolerant fungal strain *Penicillium griseofulvum* P29, isolated from Antarctica. The presence of glucose inhibited sialidase activity in growing and non-growing fungal mycelia in a dose- and time-dependent manner. The same response was demonstrated with maltose and sucrose. The replacement of glucose with glucose-6-phosphate also exerted CCR. The addition of cAMP resulted in the partial de-repression of sialidase synthesis. The CCR in the psychrotolerant strain *P. griseofulvum* P29 did not depend on temperature. Sialidase might be subject to glucose

repression by both at 10 and 25 °C. The fluorescent assay using 4MU-Neu5Ac for enzyme activity determination under increasing glucose concentrations evidenced that CCR may have a regulatory role in sialidase production. The real-time RT-PCR experiments revealed that the sialidase gene was subject to glucose repression. To our knowledge, this is the first report that has studied the effect of CCR on cold-active sialidase, produced by an Antarctic strain.

Резюме:

Сиалидазите (неврамидазите) катализират отстраняването на крайните остатъци от сиалова киселина от гликопротеините. Новите ензими от неклинични изолати представляват все по-голям интерес по отношение на приложението им в хранително-вкусовата и фармацевтичната промишленост. Настоящото изследване има за цел да оцени участието на катаболитната репресия в следствие на въглеродния източник (КРВ) в регулирането на биосинтеза на сиалидаза, с ниско температурен оптимум, получена от психротолерантния гъбен щам *Penicillium griseofulvum* P29, изолиран от Антарктика. Наличието на глюкоза инхибира сиалидазната активност в растящ и нерастящ гъбен мицел по начин, зависим от дозата и времето. Същият отговор е демонстриран с малтоза и захароза. Заместването на глюкозата с глюкозо-6-фосфат също предизвиква катаболитната репресия. Добавянето на цикличен аденозид монофосфат води до частична де-репресия на синтеза на сиалидаза. Катаболитната репресия в психротолерантния щам *P. griseofulvum* P29 не зависи от температурата. Сиалидазата може да бъде подложена на потискане от глюкозата както при 10 °C, така и при 25 °C. Флуоресцентният анализ с използване на 4MU-Neu5Ac за определяне на ензимната активност при нарастващи концентрации на глюкоза доказва, че катаболитната репресия в следствие на въглеродния източник може да има регулаторна роля в производството на сиалидаза. Експериментите с RT-PCR в реално време разкриват, че генът на сиалидазата е подложен на глюкозана репресия. Доколкото ни е известно, това е първият доклад, който изследва ефекта на катаболитната репресия в следствие на въглеродния източник върху сиалидаза, с ниско температурен оптимум, синтезирана от антарктически щам.

6. Dolashki, A., Abrashev, R., Kaynarov, D., Krumova, E., Velkova, L., Eneva, R., Engibarov, S., **Gocheva, Y.**, Miteva-Staleva, J., Dishliyska, V., Spasova, B., Angelova M. & Dolashka, P. (2024). Structural and functional characterization of cold-active sialidase isolated from Antarctic fungus *Penicillium griseofulvum* P29. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 37, 101610. (Q2)

Abstract:

The fungal strain, *Penicillium griseofulvum* P29, isolated from a soil sample taken from Terra Nova Bay, Antarctica, was found to be a good producer of sialidase (P29). The present study was focused on the purification and structural characterization of the enzyme. P29 enzyme was purified using a Q-Sepharose column and fast performance liquid chromatography separation on a Mono Q column. The determined molecular mass of the purified enzyme of 40 kDa by SDS-PAGE and 39924.40 Da by matrix desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-TOF/MS) analysis correlated well with the calculated mass (39903.75 kDa) from the amino acid sequence of the enzyme. P29 sialidase shows a temperature optimum of 37 °C and low-temperature stability, confirming its cold-active nature. The enzyme is more active towards $\alpha(2 \rightarrow 3)$ sialyl linkages than those containing $\alpha(2 \rightarrow 6)$ linkages.

Based on the determined amino acid sequence and 3D structural modeling, a 3D model of P29 sialidase was presented, and the properties of the enzyme were explained. The conformational stability of the enzyme was followed by fluorescence spectroscopy, and the new enzyme was found to be conformationally stable in the neutral pH range of pH 6 to pH 9. In addition, the enzyme was more stable in an alkaline environment than in an acidic environment. The purified cold-active enzyme is the only sialidase produced and characterized from Antarctic fungi to date.

Резюме:

Установено е, че гъбният щам *Penicillium griseofulvum* P29, изолиран от почвена проба, взета от залива Terra Nova, Антарктида, е добър продуцент на сиалидаза (P29). Настоящото изследване е фокусирано върху пречистването и структурното охарактеризиране на ензима. Ензимът P29 беше пречистен с помощта на колона Q-Sepharose и разделяне чрез бързодействаща течна хроматография на колона Mono Q. Определената молекулна маса на пречистения ензим от 40 кДа чрез SDS-PAGE и 39924,40 Да чрез анализ с матрична десорбционна/ионизационна маспектрометрия (MALDI-TOF/MS) корелира добре с изчислената маса (39903,75 кДа) от аминокиселинната последователност на ензима. Сиалидазата от P29 показва температурен оптимум от 37 °C и стабилност при ниски температури, което потвърждава нейната студеноактивна природа. Ензимът е по-активен към $\alpha(2 \rightarrow 3)$ сиалилови връзки, отколкото към тези, съдържащи $\alpha(2 \rightarrow 6)$ връзки.

Въз основа на определената аминокиселинна последователност и 3D структурното моделиране е представен 3D модел на сиалидаза P29 и са обяснени свойствата на ензима. Конформационната стабилност на ензима беше проследена чрез флуоресцентна спектроскопия и беше установено, че новият ензим е конформационно стабилен в неутралния pH диапазон от pH 6 до pH 9. Освен това ензимът е по-стабилен в алкална среда, отколкото в кисела среда. Новият ензим е конформационно стабилен в неутралния pH диапазон от pH 6 до pH 9. Освен това ензимът е по-стабилен в алкална среда, отколкото в кисела среда. Пречистеният ензим, активен при ниски температури е единствената сиалидаза, произведена и характеризирана от антарктически гъби до момента.

Публикации по Група от показатели Г на ЗРАСРБ

7. Kabadjova, P., **Gotcheva, I.**, Ivanova, I. & Dousset, X. (2000). Investigation of bacteriocin activity of lactic acid bacteria isolated from boza. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 14(1), 56-59. (Q4)

Abstract

The contents of the micro flora isolated from boza has been studied. Of 80 isolated strains of lactic acid bacteria a group of 33 types showed antibacterial activity against different test microorganisms (*Listeria innocua* F, *L. plantarum* 73, *L. cremoris* 117, *E. coli*). The most prospective strains have been characterized by means of a test. The strain defined as *Lactococcus lactis sbsp. lactis* 14 has been isolated. Its growth curve and its ability to produce bacteriocin under different conditions of cultivation have been studied. An attempt has been made for initial purification of bacteriocin by means of a classical method.

Резюме

Изследвано е съдържанието на микрофлората, изолирана от боза. От 80 изолирани щама на млечнокисели бактерии група от 33 вида показаха антибактериална активност срещу различни тестови микроорганизми (*Listeria innocua* F, *L. plantarum* 73, *L. cremoris* 117, *E. coli*). Най-перспективните щамове са характеризирани чрез тест. Определеният щам като *Lactococcus lactis* sbsp. *lactis* 14 е изолиран. Изследвани са неговата крива на растеж и способността му да произвежда бактериоцин при различни условия на култивиране. Направено е първоначално пречистване на бактериоцин по класически метод.

8. Gocheva, Y., Krumova, E., Slokoska, L., Gesheva, V. & Angelova, M. (2005). Isolation of filamentous fungi from Antarctica. *COMPTES RENDUS-ACADEMIE BULGARE DES SCIENCES*, 58(4), 403. (Q3)

Abstract:

This study reports results concerning the isolation and identification of filamentous fungi from different regions of Antarctica. The genera with the greatest number of species were *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Verticillium*, and *Botrytis*. The isolates were grouped according to their temperature range for growth (4 – 28 °C). They were classified as extremely psychrophilic, psychrotrophic or mesophilic fungi. Temperature-dependent modifications in growth, conidia formation, and colony morphology on agar medium were noticed.

Резюме:

Това проучване представя резултати относно изолирането и идентифицирането на нишковидни гъби от различни региони на Антарктика. Родовете с най-голям брой видове са *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Verticillium* и *Botrytis*. Изолатите бяха групирани според техния температурен диапазон за растеж (4 – 28 °C). Те бяха класифицирани като изключително психрофилни, психротрофни или мезофилни гъби. Бяха забелязани температурно-зависими модификации в растежа, образуването на конидии и морфологията на колониите върху агаровата среда.

9. Gocheva, Y., Krumova, E., Slokoska, L., Miteva, J., Vassilev, S. & Angelova, M. (2006). Cell response of Antarctic and temperate strains of *Penicillium* spp. to different growth temperature. *Mycological research*, 110 (11), 1347-1354. (Q2)

Abstract:

The effect of growth temperature (10, 15, 20, 25, and 30 °C) on the cell response was compared between two Antarctic *Penicillium* sp. strains (*Penicillium* sp. p14 and *Penicillium* sp. m12) and a European temperate strain, *Penicillium* sp. t35. According to the temperature profiles, *Penicillium* sp. p14 was identified as psychrophilic, while *Penicillium* sp. m12 and *Penicillium* sp. t35 as mesophilic fungi, respectively. The results demonstrated that the growth at low temperature does clearly induce oxidative stress events in all strains tested. Decreases in growth temperature below the optimal coincided with markedly enhanced protein carbonyl content, an indicator of oxidatively damaged proteins. Also, the cellular response to growth temperature in terms of reserve carbohydrate was determined. In the mesophilic strains there was essentially no enhancement of glycogen content. This was in contrast to the psychrophilic *Penicillium* sp. p14, which gradually accumulated glycogen in response to cold (10 °C) during the exponential phase. In addition, elevated endogenous levels of

trehalose upon low-temperature stress were exhibited by all model microorganisms. Compared with temperate mesophilic *Penicillium* sp. t35, Antarctic strains (psychrophilic *Penicillium* sp. p14 and mesophilic *Penicillium* sp. m12) demonstrated a marked rise in activities of protective enzymes such as superoxide dismutase and catalase at decreasing temperatures. The results suggested that low-temperature resistance is partially associated with enhanced scavenging systems.

Резюме:

Ефектът от температурата на растеж (10, 15, 20, 25 и 30 °C) върху клетъчния отговор беше сравнен между два антарктически *Penicillium* sp. щамове (*Penicillium* sp. p14 и *Penicillium* sp. m12) и европейски умерен щам, *Penicillium* sp. t35. Според температурните профили *Penicillium* sp. p14 е идентифициран като психрофилен, докато *Penicillium* sp. m12 и *Penicillium* sp. t35 като мезофилни гъби, съответно. Резултатите показват, че растежът при ниска температура наистина индуцира окислителен стрес във всички тествани щамове. Намалването на температурата при култивиране под оптималната, съвпада с подчертано повишено съдържание на увредени белтъци. Също така беше определен клетъчният отговор към температурата на растеж по отношение на резервния въглехидрат. В мезофилните щамове по същество нямаше повишаване на съдържанието на гликоген. Това беше в контраст с психрофилния *Penicillium* sp. p14, който постепенно натрупва гликоген в отговор на ниски температури (10 °C) по време на експоненциалната фаза. В допълнение, повишени ендогенни нива на трехалоза при нискотемпературен стрес бяха показани от всички моделни микроорганизми. В сравнение с мезофилния *Penicillium* sp. t35, антарктически щамове (психрофилен *Penicillium* sp. p14 и мезофилен *Penicillium* sp. m12) показват значително повишаване на активността на защитните ензими като супероксид дисмутаза и каталаза при понижаващи се температури

10. Gocheva, Y., Tosi, S., Krumova, E., Slokoska, L., Miteva, J., Vassilev, S. & Angelova, M. (2009). Temperature downshift induces antioxidant response in fungi isolated from Antarctica. *Extremophiles*, 13, 273-281. (Q2)

Abstract:

Although investigators have been studying the cold-shock response in a variety of organisms for the last two decades or more, comparatively little is known about the difference between antioxidant cell response to cold stress in Antarctic and temperate microorganisms. The change of environmental temperature, which is one of the most common stresses, could be crucial for their use in the biotechnological industry and in ecological research. We compared the effect of short-term temperature downshift on antioxidant cell response in Antarctic and temperate fungi belonging to the genus *Penicillium*. Our study showed that downshift from an optimal temperature to 15° or 6°C led to a cell response typical of oxidative stress: significant reduction of biomass production; increase in the levels of oxidative damaged proteins and accumulation of storage carbohydrates (glycogen and trehalose) in comparison to growth at optimal temperature. Cell response against cold stress includes also increase in the activities of SOD and CAT, which are key enzymes for directly scavenging reactive oxygen species. This response is more species-dependent than dependent on the degree of cold-shock. Antarctic psychrotolerant strain *Penicillium olsonii* p14 that is adapted to life in extremely cold conditions demonstrated enhanced tolerance to temperature downshift in comparison with both mesophilic strains (Antarctic *Penicillium waksmanii* m12 and temperate *Penicillium* sp. t35).

Резюме:

Въпреки че през последните две десетилетия изследователите изучават реакцията на нискотемпературен стрес при различни организми, сравнително малко се знае за разликата между антиоксидантната реакция на клетките към нискотемпературен стрес при антарктическите микроорганизми и микроорганизмите от умерения пояс. Промяната на температурата на околната среда, която е един от най-често срещаните стресове, би могла да бъде от решаващо значение за използването им в биотехнологичната индустрия и в екологичните изследвания. Сравнен е и ефекта на краткосрочното понижаване на температурата върху антиоксидантния клетъчен отговор при антарктически микромицети и такива, изолирани от умерени климатични региони, принадлежащи към род *Penicillium*. Нашето изследване показва, че понижаването на температурата от оптимална до 15 ° или 6 °C води до клетъчен отговор, типичен за оксидативен стрес: значително намаляване на производството на биомаса; повишаване на нивата на увредените от оксидацията протеини и натрупване на резервни въглехидрати (гликоген и трехалоза) в сравнение с растежа при оптимална температура. Клетъчният отговор срещу студовия стрес включва също така повишаване на активността на ензимите супероксиддисмутаза и каталаза, които са ключови за директно отстраняване на реактивните кислородни радикали. Този отговор е по-скоро видово зависим, отколкото зависим от степента на нискотемпературния стрес. Антарктическият психотолерантен щам *Penicillium olsonii* p14, който е адаптиран към живот в изключително студени условия, демонстрира повишена толерантност към понижаване на температурата в сравнение с двата мезофилни щама (антарктическият *Penicillium waksmanii* m12 и умерения *Penicillium* sp. t35).

11. Voloshin, O., **Gocheva, Y.**, Gutnick, M., Movshovich, N., Bakhrat, A., Baranes-Bachar, K., Bar-Zvi, D., Parvari, R., Gheber, L. & Raveh, D. (2010). Tubulin chaperone E binds microtubules and proteasomes and protects against misfolded protein stress. *Cellular and molecular life sciences*, 67, 2025-2038. (Q1)

Abstract:

Mutation of tubulin chaperone E (TBCE) underlies hypoparathyroidism, retardation, and dysmorphism (HRD) syndrome with defective microtubule (MT) cytoskeleton. TBCE/yeast Pac2 comprises CAP-Gly, LRR (leucine-rich region), and UbL (ubiquitin-like) domains. TBCE folds α -tubulin and promotes α/β dimerization. We show that Pac2 functions in MT dynamics: the CAP-Gly domain binds α -tubulin and MTs, and functions in suppression of benomyl sensitivity of *pac2Δ* mutants. Pac2 binds proteasomes: the LRR binds Rpn1, and the UbL binds Rpn10; the latter interaction mediates Pac2 turnover. The UbL also binds the Skp1-Cdc53-F-box (SCF) ubiquitin ligase complex; these competing interactions for the UbL may impact on MT dynamics. *pac2Δ* mutants are sensitive to misfolded protein stress. This is suppressed by ectopic *PAC2* with both the CAP-Gly and UbL domains being essential. We propose a novel role for Pac2 in the misfolded protein stress response based on its ability to interact with both the MT cytoskeleton and the proteasomes.

Резюме:

Мутацията на тубулин чаперон Е (TBCE) е в основата на синдрома на хипопаратироидизъм, изоставане и дисморфизъм (HRD) с дефектен цитоскелет на микротубулите (MT). TBCE/дрожди Pac2 съдържа CAP-Gly, LRR (богат на левцин регион) и

UbL (подобен на убиквитин) домени. TBCE сгъва α -тубулина и насърчава α/β димеризацията. Ние показваме, че Pac2 функционира в динамиката на МТ: домейнът CAP-Gly свързва α -тубулин и МТ и функционира при потискане на беномилната чувствителност на pac2 Δ мутанти. Pac2 свързва протеазомите: LRR свързва Rpn1, а UbL свързва Rpn10. UbL също така свързва убиквитин лигазния комплекс Skp1-Cdc53-F-box (SCF); тези конкуриращи се взаимодействия за UbL могат да повлияят на динамиката на МТ. pac2 Δ мутанти са чувствителни към неправилно нагъната белтъчна молекула в условията на стрес. Това се потиска от ектопичния PAC2, като CAP-Gly и UbL домейните са от съществено значение. Предложена е нова роля за Pac2 в получаването на неправилна четвъртична структура на белтъци в отговор на стрес, въз основа на неговата способност да взаимодейства както с микротубулите, така и с протеазомите.

12. Krumova, E., Najdenski, H., Dishlijska, V., Abrashev, R., Stoyancheva, G., **Gocheva, Y.**, Kostadinova, N., Miteva-Staleva, J., Spasova, B. & Angelova, M. (2020). Capacity of fungi for biodegradation of cellulose wastes generated at manned space flight. *Acta Microbiologica Bulgarica*, 36 (1), 19 - 29. (Q4)

Abstract:

The amount of waste generated on manned long-duration space missions away from Earth orbit creates the daunting challenge of how to manage the waste through reuse, rejection, or recycling. Microbial degradation, for both economic and ecological reasons, has become an increasingly popular alternative for the treatment of cellulose containing organic waste in the space stations. This approach offers several advantages: low energy, mild operation conditions, control on biological hazard of the wastes, etc. Fungi are the main cellulose-degrading microorganisms in the nature and their cellulolytic features are object of intensive studies. This review describes the ability of anaerobic, aerobic, and microaerophilic fungi to degrade organic wastes generated during manned space flight.

Резюме:

По време на пилотируемите космически мисии, далеч от земната орбита в станциите се натрупват големи количества органични, целулоза съдържащи отпадъци. Тяхното управление чрез повторна употреба, изхвърляне или рециклиране е изключително предизвикателство за науката. Микробното разграждане на място, в космическите станции, се превръща във все по-популярна алтернатива по икономически и екологични причини. Този метод предлага няколко предимства: ниска енергоемкост, меки условия на работа и контрол върху биологичната опасност на отпадъците. Гъбите са основните микроорганизми, които разграждат целулозата в природата и техните целулозолитични свойства са обект на интензивни проучвания. Този обзор разглежда способността на анаеробните, аеробните и микроаерофилните гъби да разграждат органичните отпадъци, натрупвани по време на пилотируемите космически полети.

13. Abrashev, R., Krumova, E., Petrova, P., Eneva, R., Kostadinova, N., Miteva-Staleva, J., Engibarov, S, Stoyancheva, G, **Gocheva, Y.**, Kolyovska, V., Dishliyska, V., Spassova, B. & Angelova, M. (2021). Distribution of a novel enzyme of sialidase family among native filamentous fungi. *Fungal biology*, 125(5), 412-425. (Q1)

Abstract:

Sialidases (neuraminidases, EC 3.2.1.18) are widely distributed in biological systems but there are only scarce data on its production by filamentous fungi. The aim of this study was to obtain information about sialidase distribution in filamentous fungi from non-clinical isolates, to determine availability of sialidase gene, and to select a perspective producer. A total of 113 fungal strains belonging to *Ascomycota* and *Zygomycota* encompassing 21 genera and 51 species were screened. Among them, 77 strains (11 orders, 14 families and 16 genera) were able to synthesize sialidase. Present data showed a habitat-dependent variation of sialidase activity between species and within species, depending on location. Sialidase gene was identified in sialidase-positive and sialidase-negative strains. .

Among three perspective strains, the best producer was chosen based on their sialidase production depending on type of cultivation, medium composition, and growth temperature. The selected *P. griseofulvum* P29 was cultivated in 3L bioreactor at 20 °C on medium supplemented with 0.5% milk whey. The results demonstrated better growth and 2.3-fold higher maximum enzyme activity compared to the shaken flask cultures. Moreover, the early occurring maximum (48 h) is an important prerequisite for future up scaling of the process.

Резюме:

Сиалидазите (невраминидази, ЕС 3.2.1.18) са широко разпространени в биологичните системи, но има само оскъдни данни за производството им от нишковидни гъби. Целта на това проучване беше да се получи информация за разпространението на сиалидазата във филamentosни гъби от неклинични изолати, да се определи наличието на сиалидазен ген и да се избере перспективен производител. Бяха изследвани общо 113 гъбни щама, принадлежащи към *Ascomycota* и *Zygomycota*, включващи 21 рода и 51 вида. От тях 77 щама (11 разреда, 14 семейства и 16 рода) бяха в състояние да синтезират сиалидаза. Представените данни показаха, че сиалидазната активност между видовете и в рамките на видовете варира в зависимост от местонахождението на местообитанието. Сиалидазният ген беше идентифициран в сиалидаза-позитивни и сиалидаза-негативни золати.

От три перспективни щама беше избран най-добрият продуцент въз основа на тяхната продукция на сиалидаза в зависимост от вида на култивиране, състава на средата и температурата на растеж. Избраният *P. griseofulvum* P29 беше култивиран в 3 литров биореактор при 20 °C върху среда, с добавена 0,5% млечна суроватка. Резултатите показват по-добър растеж и 2,3 пъти по-висока максимална ензимна активност в сравнение с културите в колби, поставени на клатачка. Ранно настъпващият максимум на растеж (48 часа) е важна предпоставка за бъдещо мащабиране на процеса.

14. Gocheva, Y., Angelova, M. & Krumova, E. (2021). Potential of halotolerant and halophilic fungi as a source of new extracellular enzymes and antimicrobial compounds. *Acta Microbiol. Bulg.*, 37(2) 57-68. (Q4)

Abstract:

The scope of this review is the literature published over the last 10 years and presents information on studies conducted on microscopic fungi isolated from various natural saline ecosystems (aquatic and terrestrial). Another interesting point is that it presents a classification of halophilic fungi and the concepts of halotolerant and halophilic microorganisms. The main aim of this review is to show fungal diversity of different natural salinity ecosystems and the biotechnological potential of

halophilic and halotolerant fungi as producers of biologically active substances (antibiotics, enzymes, polysaccharides). A careful study on halophilic and halotolerant fungi could offer new biologically active compounds that could be used in many industrial processes taking place in unfavourable conditions, such as high salt concentration, low water activity, high pressure or high temperature, etc.

Резюме:

Настоящият обзор представя преглед на литературата, публикувана през последните 10 години относно изследванията върху микроскопични гъби, изолирани от различни естествено солени екосистеми (водни и сухоземни). Едновременно с това, той запознава читателите с класификацията на тези гъби и концепцията за халотолерантни и халофилни микроорганизми. Проследено е разнообразието им в различни екосистеми с естествена соленост, както и техният биотехнологичен потенциал като продуценти на биологично активни вещества (антибиотици, ензими, полизахариди). Внимателното проучване на халофилните и халотолерантни гъби е предпоставка за получаването на нови биологично активни съединения с цел използването им в редица индустриални процеси, протичащи при неблагоприятни условия, като напр.- висока концентрация на сол, ниска водна активност, високо налягане или висока температура и други.

15. Chorukova, E., Hubenov, V., **Gocheva, Y.** & Simeonov, I. (2022). Two-Phase Anaerobic Digestion of Corn Steep Liquor in Pilot Scale Biogas Plant with Automatic Control System with Simultaneous Hydrogen and Methane Production. *Applied Sciences*, 12(12), 6274. (Q2)

Abstract:

Experimental studies of two-phase anaerobic digestion of corn steep liquor in semi-continuous automatic and semi-automatic modes of operation of a cascade of two anaerobic bioreactors with monitoring and control systems were performed. Corn steep liquor—a waste product from the process of treating corn grain for starch extraction—was used as a substrate in the process of anaerobic digestion with simultaneous hydrogen and methane production. The daily yields of biohydrogen in bioreactor 1 of the cascade (with a working volume of 8 dm³) are variable. In good operation, they are in the range of 0.7 to 1.0 L of biogas from a 1 dm³ working volume of the bioreactor, and the optimal pH is in the range of 5.0–5.5. The concentration of hydrogen in the biogas from the hydrogen bioreactor 1 is in the range of 14–34.7 %. The daily yields of biomethane in bioreactor 2 of the cascade (with a working volume of 80 dm³) vary in the range 0.4 to 0.85 L of biogas from a 1 dm³ working volume of the bioreactor, and the concentration of methane in the biogas from bioreactor 2 is high and remains practically constant (in the range 65–69%). At a dilution rate of 0.4 day⁻¹ and an organic loading rate of 20 gL for bioreactor 1, respectively, and a dilution rate of 0.05 day⁻¹ for bioreactor 2, the best results were obtained. The computer control system is presented. Some energetical considerations were discussed.

Резюме:

Проведени са експериментални изследвания на двуфазно анаеробно разграждане на царевична утайка в полунепрекъснат автоматичен и полуавтоматичен режим на работа на каскада от два анаеробни биореактора със системи за наблюдение и контрол. Царевичната стръмна течност - отпадъчен продукт от процеса на обработка на царевично зърно за извличане на нишесте - беше използвана като субстрат в процеса на анаеробно разграждане с едновременно производство на водород и метан. Дневните добиви на биоводород в биореактор 1 на каскадата (с работен обем 8 дм³) са променливи. При добра работа те са в диапазона от 0,7

до 1,0 л биогаз от 1 дм³ работен обем на биореактора, а оптималното рН е в диапазона 5,0-5,5. Концентрацията на водород в биогаза от водородния биореактор 1 е в диапазона 14-34,7 %. Дневният добив на биометан в биореактор 2 на каскадата (с работен обем 8 дм³) варира в диапазона от 0,4 до 0,85 л биогаз от 1 дм³ работен обем на биореактора, а концентрацията на метан в биогаза от биореактор 2 е висока и остава практически постоянна (в диапазона 65-69 %). Най-добри резултати са получени при скорост на разреждане от 0,4 дни-1 и норма на органично зареждане от 20 г/л съответно за биореактор 1 и скорост на разреждане от 0,05 дни-1 за биореактор 2. Представена е компютърната система за управление. Обсъдени са някои енергийни съображения.

16. Gocheva, Y., Engibarov, S., Lazarkevich, I. & Eneva, R. (2023). Phytases-Types, sources, and factors affecting their activity. *Acta Microbiologica Bulgarica*, 39(3), 249-263. (Q4)

Abstract:

Phytases are a large group of enzymes that hydrolyze phytate and its complexes. This most abundant organic phosphate in the world is commonly found in plant-based foods. It can bind to essential minerals, making them less available for absorption. Enzymatic hydrolysis of phytates is the most beneficial method for reducing their content in foods and feeds. Phytase supplementation enables more efficient utilization of phytate phosphorus. The enzyme is produced by prokaryotic and eukaryotic microorganisms, plants, and animals. Several types of phytases, depending on certain structural and kinetic properties are described. Phytase activity is influenced by metal ions, surfactants, and various plant extracts.

Резюме:

Фитазите са голяма група ензими, които хидролизират фитата и неговите комплекси. Този най-изобилен органичен фосфат в света обикновено се среща в растителните храни. Може да се свърже с основни микро- и макроелементи, което ги прави по-малко достъпни за усвояване. Ензимната хидролиза на фитатите е най-полезният метод за намаляване на съдържанието им в храните и фуражите. Добавянето на фитаза позволява по-ефективно използване на фитатния фосфор. Ензимът се продуцира от прокариотни и еукариотни микроорганизми, растения и животни. Описани са няколко типа фитази в зависимост от определени структурни и кинетични свойства. Активността на фитазата се влияе от метални йони, повърхностноактивни вещества и различни растителни екстракти.

17. Gocheva, Y., Nikolova, M., Engibarov, S., Lazarkevich, I., Mitova, S. & Eneva, R. (2024). Study of Bulgarian Plant Extracts Effect on Three Bacterial Sialidases. *Acta Microbiologica Bulgarica*, 40(2), 236-241. (Q4)

Abstract

Since sialidase is a pathogenicity factor in certain microbes, it is important to inhibit it as this could have both preventative and therapeutic impacts on a number of diseases. Viral sialidase inhibitors have previously produced significant effects, but there are few experiments of the same kind on bacterial enzymes. The ability of some extracts from Bulgarian plants to inhibit the sialidases of *Vibrio cholerae* non-O1, *Arthrobacter nicotianae*, and *Oerskovia paurometabola* was investigated. Extracts from *Rosa damascena*, essential oil from *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* and acetone exudate

from *Helichrysum arenarium* were found to have an inhibitory effect on the studied enzymes. The influence of the extracts on bacterial sialidase activity was investigated for the first time. It was found that 5% Triton X-100 used for extract dilution has inhibitory effect on sialidase produced from *O. paurometabola* (76%), from *V. cholerae* non-O1 (30%) and has no effect on *A. nicotinae*.

Резюме

При някои микроорганизми сиалидазите са патогенен фактор. Ето защо намирането и изучаването на нови инхибитори на тези ензими представлява интерес за учените, тъй като те могат да имат както превантивно, така и терапевтично въздействие върху редица болести. Докато инхибиторите на вирусни сиалидази са подробно проучени през годините и е ясен техният значителен ефект, то подобни опити проведени с инхибитори на бактериални сиалидази са малко на брой. В настоящата работа е изследвана способността на някои екстракти от български растения да инхибират сиалидази от *Vibrio cholerae* non-O1, *Arthrobacter nicotinae* и *Oerskovia paurometabola*. Инхибиращ ефект спрямо трите изследваните ензима оказват екстракти от *Rosa damascena*, етерично масло от *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* и ацетонен екстракт от *Helichrysum arenarium*. Влиянието на избраните екстракти от български растения върху бактериална сиалидазна активност е изследвано за пръв път. Установено е, че 5% Тритон X-100, използван за разтваряне и разреждане на екстрактите има потискащ ефект спрямо сиалидази от *O. paurometabola* (76%) и *V. cholerae* non-O1 (30%) и не оказва ефект спрямо ензима от *A. nicotinae*.

18. Gocheva, Y., Nikolova, M., Engibarov, S., Lazarkevich, I. & Eneva, R. (2024). Effective inhibition of bacterial sialidases by phenolic acids and flavonoids. *International Journal of Secondary Metabolite*, 11(3), 514-521. (Q4)

Abstract

As a pathogenicity factor in some microorganisms, sialidase is a key target for inactivation, as this would have curative and preventive effects on various diseases. Significant results are already achieved with viral sialidase inhibitors, while such studies on bacterial enzymes are scarce. Pure natural compounds representing phenols and flavonoids, were tested for their inhibitory effect on sialidases from *Vibrio cholerae* non-O1, *Arthrobacter nicotinae* and *Oerskovia paurometabola*. All three enzymes were isolated, purified beforehand and stored under suitable conditions. Quinic and gallic acids showed the highest inhibitory activity - 76 to 100 % against the three sialidases. Fisetin had a significant inhibitory activity on two of the enzymes. The structurally related thymol and thymoquinone exerted from 80 to 100% inhibition on at least one of the enzymes. Catechin and rutin had significant inhibitory activity, varying from 49 to 100 %, on some of the enzymes. Quercetin, known for its inhibitory effect on viral sialidases, had a lesser impact on the studied enzymes. The suppressive effect of quinic acid, rutin and fisetin on bacterial sialidases is observed for the first time.

Резюме

Като патогенен фактор в някои микроорганизми, сиалидазата е ключова цел за инактивиране, тъй като това би имало лечебен и превантивен ефект върху различни заболявания. Значителни резултати вече са постигнати с инхибитори на вирусни сиалидази, докато подобни изследвания върху бактериални ензими са оскъдни. Чисти природни съединения, представляващи феноли и флавоноиди, бяха тествани за инхибиторния им ефект върху сиалидазите от *Vibrio cholerae* non-O1, *Arthrobacter nicotinae* и *Oerskovia paurometabola*.

И трите ензима бяха изолирани, предварително пречистени и съхранени при подходящи условия. Хининовата и галовата киселина показаха най-висока инхибираща активност - 76 до 100 % срещу трите сиалидази. Фисетинът имаше значителна инхибираща активност върху два от ензимите. Структурно свързаните тимол и тимохинон упражняват от 80 до 100 % инхибиране върху поне един от ензимите. Катехинът и рутинът имат значителна инхибираща активност, варираща от 49 до 100 %, върху някои от ензимите. Кверцетинът, известен с инхибиращия си ефект върху вирусните сиалидази, има по-слабо въздействие върху изследваните ензими. За първи път се наблюдава потискащият ефект на квининовата киселина, рутина и фисетина върху бактериалните сиалидази.

19. Lazarkevich, I., Engibarov, S., Mitova, S., Popova, S., Vacheva, E., Stanchev, N., Eneva, R., **Gocheva Y.**, Lalovska, I., Paunova-Krasteva, T., Ilieva, Y. & Najdenski, H. (2024). Pathogenic Potential of Opportunistic Gram-Negative Bacteria Isolated from the Cloacal Microbiota of Free-Living Reptile Hosts Originating from Bulgaria. *Life*, 14 (5), 566. (Q2)

Abstract

Reptiles are known to be asymptomatic carriers of various zoonotic pathogens. A number of Gram-negative opportunistic commensals are causative agents of bacterial infections in immunocompromised or stressed hosts and are disseminated by reptiles, whose epidemiological role should not be neglected. Since most studies have focused on exotic species, in captivity or as pet animals, the role of wild populations as a potential source of pathogens still remains understudied. In the present study, we isolated a variety of Gram-negative bacteria from the cloacal microbiota of free-living lizard and tortoise hosts (Reptilia: Sauria and Testudines) from the Bulgarian herpetofauna. We evaluated their pathogenic potential according to their antibiotic susceptibility patterns, biofilm-forming capacity, and extracellular production of some enzymes considered to play roles as virulence factors. To our knowledge, the phenotypic manifestation of virulence factors/enzymatic activity and biofilm formation in wild reptile microbiota has not yet been widely investigated. All isolates were found to be capable of forming biofilms to some extent and 29.6% of them could be categorized as strong producers. Two strains proved to be excellent producers. The majority of the isolated strains showed extracellular production of at least one exoenzyme. The most pronounced pathogenicity could be attributed to the newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* strain due to its multiresistance, excellent biofilm formation, and expression of exoenzymes.

Резюме

Известно е, че влечугите са безсимптомни преносители на различни зоонозни патогени. Редица грам-отрицателни опортюнистични коменсали са причинители на бактериални инфекции при имунокомпрометирани или стресирани гостоприемници и се разпространяват от влечуги, чиято епидемиологична роля не бива да се пренебрегва. Тъй като повечето проучвания са съсредоточени върху екзотични видове, отглеждани в плен или като домашни любимци, ролята на дивите популации като потенциален източник на патогени все още остава недостатъчно проучена. В настоящото проучване изолирахме разнообразни Грам-отрицателни бактерии от клоакалната микрофлора на свободно живеещи гущери и костенурки (Reptilia: Sauria и Testudines) от българската херпетофауна. Оценихме патогенния им потенциал според моделите им на чувствителност към антибиотици, способността им да образуват биофилм и извънклетъчната продукция на някои ензими, за които се смята, че играят роля на фактори на

вирулентност. Доколкото ни е известно, фенотипното проявление на факторите на вирулентност/ензимната активност и формирането на биофилм в микрофлората на диви влечуги все още не е широко изследвано. Установено е, че всички изолати са способни да образуват биофилми до известна степен, а 29,6 % от тях могат да бъдат категоризирани като силни продуценти. Два щамове се оказали отлични продуценти. По-голямата част от изолираните щамове показват извънклетъчно производство на поне един екзоензим. Най-силно изразената патогенност може да се отнесе към новоизолирания щам *Pseudomonas aeruginosa* поради неговата мултирезистентност, отлично образуване на биофилм и експресия на екзоензими.

20. Lazarkevich, I., Engibarov, S., Mitova, S., Vacheva, E., Popova, S., Stanchev, N., Eneva, R., **Gocheva, Y.**, Ilieva, Y. & Najdenski, H. (2024) Diversity of the aerobic cloacal microbiota of syntopic lizard species (Reptilia: Sauria) from a low-mountain area in Western Bulgaria. *Ecologica Montenegrina*, 75, Biotaxa, 119-132. (Q2)

Abstract

Compared to other reptile groups in Europe, lizards have generally been neglected and understudied in terms of microbiota research. In this study, we aimed to isolate, identify and characterize the aerobic cloacal microflora of wild-dwelling lizard hosts. We examined a total of 86 individuals from five species belonging to three families: the European green lizard (*Lacerta viridis*), the common wall lizard (*Podarcis muralis*), the meadow lizard (*Darevskia praticola*) (*Lacertidae*), the European snake-eyed skink (*Ablepharus kitaibelii*) (*Scincidae*) and the European slow worm (*Anguis fragilis*) (*Anguillidae*) which co-occur in a low-mountain region in Western Bulgaria. In general, a similar composition of the resident microbial communities in the cloaca was found, accompanied by variation in the relative abundance of some bacterial taxa between the lizard species. A variety of Gram-negative and Gram-positive bacteria was isolated from the cloacal samples. Some of these bacteria are also known as opportunistic pathogens, both for hosts and humans. The bacterial species *Hafnia alvei*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca* and representatives of *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. and *Enterococcus* spp. were among the most prevalent.

Резюме

В сравнение с други групи влечуги в Европа гушерите като цяло са пренебрегвани и недостатъчно проучвани по отношение на изследванията на микробиотата. В това проучване имаме за цел да изолираме, идентифицираме и характеризираме аеробната клоакална микрофлора на диво живеещи гущери-гостоприемници. Изследвахме общо 86 индивида от пет вида, принадлежащи към три семейства: европейски зелен гущер (*Lacerta viridis*), обикновен стенен гущер (*Podarcis muralis*), ливаден гущер (*Darevskia praticola*) (*Lacertidae*), европейски змиевиден скункс (*Ablepharus kitaibelii*) (*Scincidae*) и европейски бавен червей (*Anguis fragilis*) (*Anguillidae*), които се срещат съвместно в нископланински район в Западна България. Като цяло беше установен сходен състав на резидентните микробни съобщества в клоаката, придружен от вариации в относителната численост на някои бактериални таксони между видовете гущери. От клоакалните проби бяха изолирани разнообразни Грам-отрицателни и Грам-положителни бактерии. Някои от тези бактерии са известни и като опортюнистични патогени, както за гостоприемниците, така и за хората. Сред най-разпространените бактериални видове са *Hafnia alvei*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca* и представители на *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. и *Enterococcus* spp.

21. Абрашев, Р., Крумова, Е., Петрова, П., Долашка, П., Енева, Р., Фениче, М., Енгибаров, С., Стоянчева, Г., **Гочева, Я.**, Велкова, Л., Долашки, А., Митева-Сталева, Ж., Дишлийска, В., Спасова, Б., Кольовска, В., Ангелова, М. Нови ензими от групата на сиалидазите при филаментозни гъби. Прес Продукт Лайн ООД, 2024.
Друго – колективна монография

Abstract

Sialidases (also known as neuraminidases, N-acetylneuraminic acid hydrolases, EC 3.2.1.18) are a family of glycohydrolytic enzymes that cleave terminal sialic acids from various sialo derivatives. They hydrolyze terminal neuraminic acids linked by α 2,3-, α 2,6- or α 2,8-linkages to glycoproteins, glycolipids, polysaccharides, mucopolysaccharides and oligosaccharides. Based on their amino acid sequences, sialidases are classified into four families of CAZy hydrolases as follows: (i) families GH33, GH34 and GH83 contain exosialidases and release terminal sialic acids from oligosaccharides; (ii) the GH58 family includes endosialidases that cleave the chain of polysialic acids. Despite the low degree of sequence similarity (<40% identity), all sialidases share a similar catalytic domain seen in viral, bacterial and eukaryotic enzymes. These enzymes are widely distributed in nature, including viruses, protozoa, bacteria, fungi, and animals. While the GH34 and GH83 families are characteristic of viral neuraminidases, the GH33 family is characteristic of all known bacterial and mammalian exosialidases. In animals, sialidases are localized in various tissues and perform specific functions by regulating the cellular sialic acid profile. Viruses and microbial pathogens have acquired these enzymes in their evolution to ensure their interaction with host cells and tissues, and hence the spread of infection. In viruses, this enzyme is critical to the infectious cycle due to its role in releasing virions into infected cells. A number of studies have been published on sialidases from influenza A virus, swine influenza A viruses known to synthesize sialidase. The main function of bacterial sialidases involves interaction with sialic acids - the terminal structures of glycoproteins or glycolipids on the cell surface. They are considered virulence factors in many pathogenic organisms, such as *Vibrio cholerae*, 1995, human parainfluenza virus type 3, and others. Today, there are over 70 species of prokaryotes *Streptococcus pneumoniae*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Corynebacterium diphtheriae*, group B streptococci, which colonize mucosal surfaces. Evidence has been published that these enzymes are involved in the infectious process and tissue destruction, removal of peroxides during oxidative stress, modulation of host innate immunity, and bacterial proliferation. Published data on microbial sialidases cover mostly prokaryotes and unicellular eukaryotes. There are only isolated reports of such enzymes found in fungi, mentioning sialidases without specifying families, genera or species. Inferences about their biological significance, which are based on bacterial, viral and protozoan sialidases, probably apply to fungal sialidases as well. Furthermore, the molecular and genetic basis for the synthesis of sialidase in fungi has not yet been elucidated. Also of note is the significant potential of sialidase for medical and biotechnological applications. There is a growing interest in the production of novel sialidase, especially from non-virulent strains for applications in the food and pharmaceutical industries. Due to the possibility of easy overexpression and purification, the secreted fungal sialidase would be very valuable for large-scale production, which can greatly improve the economic effect on an industrial scale. The present monograph presents new information on the distribution of the sialidase enzyme in a previously unexplored taxonomic group of microorganisms such as filamentous fungi. Strains isolated from different habitats were included in the research, data were obtained regarding the mechanisms of

regulation of enzyme synthesis, the preparation of a purified enzyme preparation and characterization of its properties.

Резюме

Сиалидазите (известни също като неураминидази, хидролази на N- ацетилнеураминовата киселина, ЕС 3.2.1.18) са семейство гликохидролитични ензими, които откъсват крайни сиалови киселини от различни сиалопроизводни. Те хидролизират крайните неураминови киселини, свързани с $-\alpha 2,3-$, $\alpha 2,6-$ или $\alpha 2,8-$ връзки с гликопротеини, гликолипиди, полизахариди, мукополизахариди и олигозахариди. Въз основа на техните аминокиселинни последователности, сиалидазите са класифицирани в четири семейства CAZy хидролази, както следва: (i) семейства GH33, GH34 и GH83 съдържат екзосиалидази и освобождават крайни сиалови киселини от олигозахариди; (ii) семейство GH58 включва ендосиалидази, които разцепват веригата на полисиаловите киселини. Въпреки ниската степен на сходство по отношение на техните секвенции (<40% идентичност), всички сиалидази притежават подобен каталитичен домейн, наблюдаван при вирусни, бактериални и еукариотни ензими. Тези ензими са широко разпространени в природата, включително при вируси, протозои, бактерии, гъби и животни. Докато семействата GH34 и GH83 са характерни за вирусните неураминидази, семейството GH33 е характерно за всички известни екзосиалидази от бактерии и бозайници. При животните, сиалидазите се локализируют в различни тъкани и изпълняват специфични функции чрез регулиране профила на клетъчните сиалови киселини. Вирусите и микробните патогени са придобили тези ензими в своята еволюция, за да си осигурят взаимодействието с клетките и тъканите на гостоприемника, а от тук и разпространението на инфекцията. При вирусите този ензим е от решаващо значение за инфекциозния цикъл поради ролята му в освобождаването на вирионите в заразените клетки. Публикувани са редица изследвания върху сиалидази от грипен вирус А, вируси на свинския грип А, човешки параинфлуенца вирус тип 3 и др. Днес има над 70 вида прокариоти, за които е известно, че синтезират сиалидаза. Основната функция на бактериалните сиалидази включва взаимодействие със сиаловите киселини - крайните структури на гликопротеини или гликолипиди на клетъчната повърхност. Те се считат за фактори на вирулентност в много патогенни организми, като *Vibrio cholerae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Corynebacterium diphtheriae*, стрептококи от група В, които колонизират лигавичните повърхности. Публикувани са доказателства, че тези ензими участват в инфекциозния процес и разрушаването на тъканите, отстраняването на пероксидите по време на оксидативния стрес, модулирането на вродения имунитет на гостоприемника и бактериалната пролиферация. Публикуваните данни относно микробиалните сиалидази обхващат най-вече прокариоти и едноклетъчни еукариоти. Има само отделни съобщения за такива ензими, установени в гъби, като се споменават сиалидази, без да уточняват семейства, родове или видове. Изводите за тяхното биологично значение, които се базират на бактериални, вирусни и протозойни сиалидази, вероятно се отнасят и за фунгалните сиалидази. Освен това, молекулярната и генетична база за синтезата на сиалидаза в гъбите все още не е изяснена. Трябва да се отбележи също значителният потенциал на сиалидазата за медицински и биотехнологични приложения. Нараства интересът към получаването на нова сиалидаза, особено от невирулентни щамове за приложения в хранителната и фармацевтичната промишленост. Например, сиалидазите намаляват съдържанието на белтъци в кисели млечни продукти и от тук необходимостта от добавяне на стабилизатори и пектин. Поради

възможността за лесна свръхекспресия и пречистване, секретираната фунгална сиалидаза би била много ценна за производството в големи количества, което значително може да подобри икономическия ефект в индустриален мащаб. Настоящата монография представя нова информация за разпространението на ензима сиалидаза в неизследвана досега таксономична група микроорганизми, каквито са филаментозните гъби. В изследванията са включени шамове, изолирани от различни местообитания, получени са данни относно механизмите на регулация на ензимната синтеза, получаването на пречистен ензимен препарат и охарактеризиране на неговите свойства

Други публикации

22. Chorukova, E., Hubenov, V., Kabaivanova, L., **Gocheva, Y.** & Simeonov, I. (2020). Two-phase anaerobic digestion of corn steep liquor. *Ecological Engineering and Environment Protection*, 4, 75-84.

Abstract

Experimental studies of two-phase anaerobic digestion of corn steep liquor in continuous automatic and semi-automatic modes of the cascade system with simultaneous operation of both monitoring and control systems were performed. Corn steep liquor - a waste product from the process of treatment corn grain for starch extraction – was used as a substrate in the process of anaerobic biodegradation with hydrogen and methane production. The daily yields of biohydrogen in bioreactor 1 of the cascade (with working volume of 10 dm³) are variable and in good operation are in the range of 0.7 to 1.0 l of biogas from 1 dm³ working volume of the bioreactor, and the optimal pH range is in the range of 5.0 - 5.5. The concentration of hydrogen in the biogas from the hydrogen bioreactor 1 when a good process is accomplished is in the range of 14 - 34.7%. The daily yields of biomethane in bioreactor 2 of the cascade (with working volume of 80 dm³) vary in the range from 0.4 to 0.85 l of biogas from 1 dm³ working volume of the bioreactor, and the concentration of methane in the biogas from bioreactor 2 is high and remains practically constant (in the range 65-69%). At a dilution rate of 0.4 day⁻¹ and a organic loading rate of 20 g/l for bioreactor 1, respectively a dilution rate of 0.05 day⁻¹ for bioreactor 2, the best results were obtained.

Резюме

Бяха проведени експериментални изследвания на двуфазно анаеробно разграждане на царевична утайка в непрекъснат автоматичен и полуавтоматичен режим на каскадната система с едновременна работа на двете системи за мониторинг и контрол. Царевичната стръмна течност - отпадъчен продукт от процеса на обработка на царевично зърно за извличане на нишесте - беше използвана като субстрат в процеса на анаеробно биоразграждане с производство на водород и метан. Дневните добиви на биоводород в биореактор 1 на каскадата (с работен обем 10 дм³) са променливи и при добра работа са в диапазона от 0,7 до 1,0 л биогаз от 1 дм³ работен обем на биореактора, а оптималният диапазон на рН е в диапазона 5,0 - 5,5. Концентрацията на водород в биогаза от водородния биореактор 1, когато е постигнат добър процес, е в диапазона 14 - 34,7 %. Дневният добив на биометан в биореактор 2 на каскадата (с работен обем 8 дм³) варира в диапазона от 0,4 до 0,85 л биогаз от 1 дм³ работен обем на биореактора, а концентрацията на метан в биогаза от биореактор 2 е висока и остава практически постоянна (в диапазона 65-69 %). Най-добри

резултати са получени при скорост на разреждане от 0,4 дни⁻¹ и норма на органично натоварване от 20 г/л за биореактор 1, съответно при скорост на разреждане от 0,05 дни⁻¹ за биореактор 2.

23. Engibarov, S., Eneva, R., **Gocheva, Y.**, Kolyovska, V. & Mitova, S. Studies on enzymes of sialic acid metabolism in bacteria. Modern microbiology: A challenge for improving the quality of life. 75th Anniversary of The Stephan Angelov Institute of Microbiology. Publishing House “Farrago”, 2022, ISBN:978-619-206-207-1, 61-71.

Abstract

This article presents some of the more significant research by scientists from the Laboratory of Microbial Biochemistry in the last few years. The main topic is the study of sialidases - enzymes that are key in animals and many microorganisms that are in close contact with them. The research is aimed at the discovery and characterization of novel sialidases, produced by non-pathogenic bacteria. In the course of the research the secretion of enzyme catalyzing the next step in the catabolism of sialic compounds - sialate aldolase was observed. New data for the sialidases of the non-pathogenic cholera vibrios, *Aeromonas caviae*, and *Oerskovia* sp., were obtained for the first time. Their characterization in terms of molecular weight, pH and temperature optimum, influence of metal ions on enzyme activity, glycoprotein nature, amino acid sequence, etc. reveals new, hitherto unknown properties of these enzymes.

Резюме

Тази статия представя някои от по-значимите изследвания на учени от Лаборатория „Микробна биохимия“ през последните няколко години. Основната тема е изследването на сиалидазите – ензими, които са ключови при животните и много микроорганизми, които са в близък контакт с тях. Изследването е насочено към откриването и характеризирането на нови сиалидази, произведени от непатогенни бактерии. В хода на изследването се наблюдава отделянето на ензим, катализиращ следващата стъпка в катаболизма на сиаловите съединения - сиалат алдолаза. За първи път са получени нови данни за сиалидазите на непатогенните холерни вибриони *Aeromonas caviae* и *Oerskovia* sp. Тяхното характеризиране по отношение на молекулно тегло, рН и температурен оптимум, влияние на металните йони върху ензимната активност, гликопротеиновата природа, аминокиселинната последователност и др. разкрива нови, неизвестни досега свойства на тези ензими.

24. Krumova, E., Abrashev, R., Petrova, P., Eneva, R., Stoyancheva, G., Engibarov, S., Kostadinova, N., Miteva-Staleva, J., **Gocheva, Y.**, Kolyovska V., Dishliyska, V., Spassova B. & Angelova, M. A novel sialidase among filamentous fungi isolated from non-clinical substrates. Modern microbiology: a challenge for improving the quality of life. 75th Anniversary of The Stephan Angelov Institute of Microbiology. Publishing house “Farrago”, 2022, ISBN: 978-619-206-207-1., 245-257.

Abstract

Sialidases (neuraminidases, EC 3.2.1.18) are a very important enzyme family that cleaves sialic acid on the surfaces of cells in viruses, protozoa, bacteria, fungi, vertebrates, and higher animals. Bacterial and viral sialidases distribution, their biochemical properties, and molecular characterization, as well as their catalytic mechanism, contribution to virulence, and pathogenicity, have been studied in

detail but there are only scarce data on the sialidase production by filamentous fungi, especially isolated from native sources. The present study was conducted to determine the ability of filamentous fungi from non-clinical isolates to produce this enzyme to determine the presence of the sialidase gene and to select an effective producer. A total of 113 fungal strains belonging to *Ascomycota* and *Zygomycota* compassing 21 genera and 51 species were screened. Almost 68% of them were able to synthesize sialidase. *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Talaromyces*, and *Mucor* were the dominant genera. A habitat-dependent variation of sialidase activity between species and within species, depending on location was established. The sialidase gene was identified in sialidase-positive and sialidase-negative strains. The presence of Asp boxes and R-I/L-P motif and a mass of about 40 kDa characterized this protein as sialidase. *Penicillium griseofulvum* P29 was selected as the best producer of the fungal sialidase from a non-pathogenic strain. A laboratory method for enzyme production in a 3L bioreactor was developed.

Резюме

Сиалидазите (невраминидази, ЕС 3.2.1.18) са много важна група ензимно, които отцепват сиаловата киселина по повърхността на клетките на вируси, протозои, бактерии, гъбички, гръбначни и висши животни. Разпространението на бактериалните и вирусните сиалидази, техните биохимични свойства и молекулярно охарактеризиране, както и каталитичният им механизъм, приносът им към вирулентността и патогенността, са подробно проучени, но има само оскъдни данни за производството на сиалидази от нишковидни гъби, особено изолирани от местни източници. Настоящото проучване е проведено с цел да се определи способността на филаментозни гъби от неклинични изолати да произвеждат този ензим, за да се определи наличието на сиалидазен ген и да се избере ефективен продуцент. Бяха изследвани общо 113 гъбни щамове, принадлежащи към *Ascomycota* и *Zygomycota*, включващи 21 рода и 51 вида. Почти 68 % от тях бяха в състояние да синтезират сиалидаза. Преобладаващите родове бяха *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Talaromyces* и *Mucor*. Установена е зависима от местообитанията променливост в сиалидазната активност между видовете и в рамките на видовете. Сиалидазният ген беше идентифициран в сиалидаза-позитивни и сиалидаза-негативни щамове. Наличието на Asp кутийки и R-I/L-P мотив и масата от около 40 кДа характеризират този протеин като сиалидаза. *Penicillium griseofulvum* P29 беше избран като най-добър продуцент на гъбична сиалидаза от непатогенен щам. Разработен е лабораторен метод за производство на ензим в биореактор с обем 3 литра.

25. Dimitrova, L., Hubenov, V., Kabaivanova, L., **Gocheva, Y.**, Angelov, P. & Najdenski, H. (2022). Bacterial degradation of cellulosic substrates under terrestrial and long term manned space mission conditions: A review (part I). *Ecological Engineering and Environment Protection*, 2, 60-67.

Abstract:

The Earth and the lower atmosphere (troposphere and stratosphere) are constantly faced with numerous environmental challenges, one of which is the growing pollution due to the incineration of cellulose-containing waste with accumulating potential. In recent years scientists have focused on the complexity of ecological mechanisms in the biosphere of our planet - Earth, starting from laboratory, scaled and closed ecosystems. Onboard the spacecraft, textile products with antimicrobial properties are widely used which limits the spread of infections and ensures safety, comfort and resistance of the user. Another type of waste is the remains of sanitary and medical consumables, personal hygiene

materials (e.g. wet and dry wipes, toilet paper, etc.), paper, inedible parts of greenhouse plants, etc., being usually subjected to microbial degradation. On Earth, the accumulation of these cellulose containing waste can cause serious environmental problems. Nowadays, many researchers are trying in experimental conditions on Earth to solve the problem of cellulose-containing waste by means of different approaches – burning, composting, burial, etc. The main risk and environmental problem is that the burial of waste in the soil and composting should contribute to the spread of microorganisms with pathogenic potential. Nevertheless, a promising approach is the microbial degradation of cellulose containing substrates realized by microbial consortia depending on the conditions of the surrounding environment. Therefore, the recent review aims to make a comparative analysis of the bacterial species involved in the degradation processes of cellulose-containing waste and to assess their potential for possible application in space conditions, including the International Space Station.

Резюме

Земята и долните слоеве на атмосферата (тропосферата и стратосферата) са постоянно изправени пред множество екологични предизвикателства, едно от които е нарастващото замърсяване поради изгарянето на съдържащи целулоза отпадъци с акумулиращ потенциал. През последните години учените се фокусираха върху сложността на екологичните механизми в биосферата на нашата планета - Земята, като се започне от лабораторни, мащабирани и затворени екосистеми. На борда на космическия кораб широко се използват текстилни продукти с антимикробни свойства, които ограничават разпространението на инфекции и осигуряват безопасност, комфорт и устойчивост на потребителя. Друг вид отпадъци са остатъците от санитарни и медицински консумативи, материали за лична хигиена (напр. мокри и сухи кърпички, тоалетна хартия и др.), хартия, негодни за консумация части от оранжерийни растения и др., които обикновено са подложени на микробно разграждане. На Земята натрупването на тези съдържащи целулоза отпадъци може да причини сериозни екологични проблеми. В днешно време много изследователи се опитват в експериментални условия на Земята да решат проблема с целулозните отпадъци чрез различни подходи – изгаряне, компостиране, заравяне и др. Основният риск и екологичен проблем е, че заравянето на отпадъците в почвата и компостирането може допринесе за разпространението на микроорганизми с патогенен потенциал. Независимо от това, обещаващ подход е микробното разграждане на субстрати, съдържащи целулоза, реализирано от микробни консорциуми в зависимост от условията на околната среда. Следователно скорошният преглед има за цел да направи сравнителен анализ на бактериалните видове, участващи в процесите на разграждане на съдържащи целулоза отпадъци и да оцени техния потенциал за възможно приложение в космически условия, включително на Международната космическа станция.

26. Gocheva, Y., Dimitrova, L., Hubenov, V., Kabaivanova, L., Algelov, P., Simeonov, I. & Najdenski, H. (2023) Cellulolytic microorganisms: aerobic, microaerophilic, anaerobic bacteria and microbial consortia (part II). *Ecological Engineering and Environmental Protection*, 1, 36-53

Abstract.

In nature, cellulose, lignocellulose and lignin are major sources of plant biomass therefore their recycling is indispensable for the carbon cycle. The synergistic action of a variety of microorganisms is needed for recycling lignocellulosic materials. The capacities of microorganisms to assimilate complex carbohydrates, such as cellulose, hemicellulose and lignin, depend on the ability to produce

the enzymes that work synergically. Populations growing in compost piles consist mainly of bacteria (including actinobacteria) and fungi. Polymers such as hemicellulose, cellulose, and lignin are only degraded once the more easily degradable compounds have been consumed. Afterwards, the lignocellulosic materials are partly transformed into humus. In the present review, numerous studies on the isolation of cellulose-degrading bacteria and fungi, their identification, enzymatic activities, and their ability to grow in the presence of lignocellulose and components of these industrial waste streams (phenolic compounds, sulfides, and dyes are analyzed and discussed. This is of particular interest to design future studies to isolate those bacteria that can specifically degrade cellulose matrix and more recalcitrant components such as lignin and aromatic lignin degradation products. Cultivation and characterization of microorganisms alone is not adequate without preservation techniques that do not alter the morphology, physiology or genetics of pure strains. Careful preservation is imperative for future research, teaching and industrial applications.

Резюме

В природата целулозата, лигноцелулозата и лигнинът са основните източници на растителна биомаса, поради което тяхното рециклиране е незаменимо за въглеродния цикъл. За рециклирането на лигноцелулозните материали е необходимо синергичното действие на различни микроорганизми. Способността на микроорганизмите да асимилират сложни въглехидрати, като целулоза, хемицелулоза и лигнин, зависи от способността да произвеждат ензими, които работят синергично. Популациите, растящи в компостните купчини, се състоят основно от бактерии (включително актинобактерии) и гъбички. Полимери като хемицелулоза, целулоза и лигнин се разграждат само след като са изразходвани по-лесно разградимите съединения. След това лигноцелулозните материали се превръщат частично в хумус. В настоящия обзор са анализирани и обсъдени многобройни изследвания върху изолирането на бактерии и гъби, разграждащи целулоза, тяхната идентификация, ензимни активности и способността им да растат в присъствието на лигноцелулоза и компоненти на тези промишлени отпадъчни потоци (фенолни съединения, сулфили и багрила. Това е от особен интерес за планиране на бъдещи проучвания за изолиране на онези бактерии, които могат да разграждат специфично целулозната матрица и по-неприспособими компоненти като лигнин и ароматни продукти от разграждането на лигнина. Култивирането и характеризирането на микроорганизмите само по себе си не е адекватно без техники за съхранение, които не променят морфологията, физиологията или генетиката на чистите щамове. Внимателното съхраняване е наложително за бъдещи изследвания и промишлени приложения.

27. Енгибаров, С., Лазаркевич, И., Митова, С., Енева, Р., **Гочева, Я.**, Вачева, Е., Попова, С., Станчев, Н., Илиева, Я. (2023). Антибиотична чувствителност и ензими-потенциални фактори на вирулентност при опортюнистични патогенни бактерии, изолирани от клоакалната микрофлора на гущери (Sauria, Reptilia). *Екологично инженерство и опазване на околната среда*, 3-4, 5-14

Abstract:

The detection of pathogens that could be transmitted from animals to humans and pose a potential health risk is a matter of increasing importance. Reptiles are known to be asymptomatic carriers of various zoonotic pathogens. We isolated and identified 24 opportunistic bacteria from the cloacal microflora of five lizard species, belonging to *Lacertidae*, *Scincidae* and *Anguidae* families.

Their antibiotic susceptibility and enzyme production (sialidase, sialate aldolase, protease, lipase, hyaluronidase, gelatinase) as virulence factors were evaluated. The majority of the isolates were not resistant to most of the applied antibiotics. We found limited extracellular enzyme production (proteases were detected in 14, sialidase – in 3, lipase – in 2 and gelatinase – in 4 isolates). One isolate - *Pseudomonas aeruginosa* indicated a relatively high pathogenic potential. The limited production of enzymes that could play role in pathogenesis, and the antibiotic susceptibility of most isolates, suggest a relatively low health hazard. However, their opportunistic character should be kept in mind in close contact with reptiles because of a potential risk of infection.

Резюме

Откриването на патогени, които могат да се предават от животни на хора и да представляват потенциален риск за здравето, е въпрос с нарастващо значение. Известно е, че влечугите са безсимптомни преносители на различни зоонозни патогени. Ние изолирахме и идентифицирахме 24 опортюнистични бактерии от клоакалната микрофлора на пет вида гущери, принадлежащи към семействата *Lacertidae*, *Scincidae* и *Anguidae*. Беше оценена тяхната чувствителност към антибиотици и производството на ензими (сиалидаза, сиалат алдолаза, протеаза, липаза, хиалуронидаза, желатиназа) като фактори на вирулентност. По-голямата част от изолатите не бяха резистентни към повечето от прилаганите антибиотици. Установихме ограничена продукция на извънклетъчни ензими (протеази бяха открити при 14, сиалидаза - при 3, липаза - при 2 и желатиназа - при 4 изолата). Един изолат - *Pseudomonas aeruginosa*, показва сравнително висок патогенен потенциал. Ограничената продукция на ензими, които биха могли да играят роля в патогенезата, и антибиотичната чувствителност на повечето изолати предполагат сравнително ниска опасност за здравето. Въпреки това техният опортюнистичен характер трябва да се има предвид при близък контакт с влечуги поради потенциалния риск от инфекция.

28. Lazarkevich, I., Engibarov, S., Mitova, S., Vacheva, E., Popova, S., Stanchev, N., Eneva, R., **Gocheva, Y.**, Boyadzhieva, I. & Gerginova, M. (2024). 16S rRNA Gene Sequencing-Based Identification and Comparative Analysis of the Fecal Microbiota of Five Syntopic Lizard Species from a Low-Mountain Area in Western Bulgaria. *Applied Microbiology*, 4(1), 181-193.

Abstract

Studies on the gut microbiome of free-living reptiles in Europe are generally fragmentary and still missing in Bulgaria. We aimed to identify and compare the fecal microbiota profiles of five syntopic lizard species from three families: the European green lizard (*Lacerta viridis*), the common wall lizard (*Podarcis muralis*), the meadow lizard (*Darevskia praticola*) (Lacertidae), the European snake-eyed skink (*Ablepharus kitaibelii*) (Scincidae), and the European slow worm (*Anguis fragilis*) (Anguidae), which coinhabit a low mountainous area in the western part of the country. A high-throughput sequencing of the hypervariable V3-V4 region of the 16S rRNA gene, performed on the Illumina HiSeq2500 platform, was used. The core microbiota of lizard hosts seems to be species-specific. A dynamic phyla proportion between hosts was found. The richest alpha diversity was observed in *D. praticola*, and the lowest alpha diversity was observed in *P. muralis* and *A. fragilis*. Within the three lacertids, the microbiota of *D. praticola* and *L. viridis* were more closely related to each other than they were to those of *P. muralis*. Sharing a largely common trophic resource (all species except *A. fragilis* are mainly insectivorous) was not an indication of similarity in their gut microbial communities.

Резюме

Проучванията върху чревния микробиом на свободно живеещи влечуги в Европа са откъслечни, а в България все още липсват. Целта ни беше да идентифицираме и сравним профили на фекалната микрофлора на пет синоптични вида гущери от три семейства: зелен гущер (*Lacerta viridis*), стенен гущер (*Podarcis muralis*), ливаден гущер (*Darevskia praticola*) (*Lacertidae*), змиевиден скинк (*Ablepharus kitaibelii*) (*Scincidae*) и бавен червей (*Anguis fragilis*) (*Anguillidae*), които обитават нископланински район в западната част на страната. Използвано е високопроизводително секвениране на хипервариабилния V3-V4 регион на 16S рРНК гена, извършено на платформата Illumina HiSeq2500. Основната микрофлора на гущерите-гостоприемници изглежда е видово специфична. Установено е динамично съотношение на филите между гостоприемниците. Най-богатото алфа-разнообразие е наблюдавано при *D. praticola*, а най-ниското алфа-разнообразие - при *P. muralis* и *A. fragilis*. В рамките на трите лацертиди микрофлората на *D. praticola* и *L. viridis* е по-тясно свързана помежду си, отколкото с тази на *P. muralis*. Споделянето на до голяма степен общ хранителен ресурс (всички видове, с изключение на *A. fragilis*, са предимно насекомоядни) не беше признак за сходство в техните чревни микробни съобщества.

29. Lazarkevich, I., Engibarov, S., Mitova, S., Eneva, R., Paunova-Krasteva, T., Borisova, D., Vacheva, E., Stanchev, N., Popova, S., **Gocheva, Y.** & Gerginova, M. (2024). The Isolation, Identification and Characterization of a Wild-Type Strain *Pseudomonas aeruginosa* PM1012 from the Cloacal Microbiota of a Common Wall Lizard (*Podarcis muralis* Laurenti, 1768). *Applied Microbiology*, 4(3), 1396-1410.

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is a ubiquitous environmental Gram-negative bacterium and also an opportunistic pathogen for both humans and animals, causing acute or chronic infections. It has been frequently detected in healthy and diseased reptiles, more commonly in captive ones. Since most studies are primarily on clinical isolates, the pathogenic potential of strains originating from wild animals is poorly explored. We isolated the strain *P. aeruginosa* PM1012 from the cloacal microbiota of a common wall lizard (*Podarcis muralis* Laurenti, 1768) from a free-living population. The effect of temperature, pH and salinity on its growth was evaluated. Antibiotic resistance, the expression of several virulence factors as some extracellular enzymes, pyocyanin production and biofilm formation were also assessed. Apart from intrinsic resistance, the newly isolated strain *P. aeruginosa* PM1012 presented an antibiotic susceptibility profile with a low resistance rate limited to meropenem and intermediate to ceftazidime and aztreonam. Protease, lipase and gelatinase secretion was detected. Strong pyocyanin production was observed in the optimal range of growth conditions. An excellent biofilm-forming capacity was manifested.

Резюме

Pseudomonas aeruginosa е повсеместно разпространена грам-отрицателна бактерия в околната среда, а също и опортюнистичен патоген както за хора, така и за животни, причинявайки остри или хронични инфекции. Често се открива при здрави и болни влечуги, по-често при отглеждани в плен. Тъй като повечето изследвания са предимно върху клинични изолати, патогенният потенциал на щамове, произхождащи от диви животни, е слабо проучен. Изолирахме щам *P. aeruginosa* PM1012 от клоакалната микробиота на обикновен стенен гущер

(*Podarcis muralis* Laurenti, 1768) от свободно живееща популация. Беше оценен ефектът на температурата, рН и солеността върху неговия растеж. Резистентността към антибиотици, експресията на няколко фактора на вирулентност като някои извънклетъчни ензими, производството на пиоцианин и образуването на биофилм също бяха оценени. Освен присъщата резистентност, новоизолираният щам *P. aeruginosa* PM1012 показва профил на антибиотична чувствителност с нисък процент на резистентност, ограничен до меропенем и междинен към цефтазидим и азтреонам. Установена е секреция на протеаза, липаза и желатиназа. Наблюдава се усилен синтез на пиоцианин в при оптимални условия на растеж. Проявява се отличен капацитет за образуване на биофилм.