

17. Списък от резюмета на публикации на английски и български език

Списък от резюмета на публикации на английски и български език на

гл. ас. д-р Иванка Петрова Бояджиева,

кандидат в конкурс за академична длъжност „Доцент“,

обявен за нуждите на Департамент по „Обща микробиология“,

лаборатория „Екстремофилни микроорганизми“,

Професионално направление 4.3 Биологически науки,

ДВ бр. 30 от 08.04.2025г.

(съгласно минималните национални критерии по ЗРАСРБ и допълнителните
изисквания на ИМикБ-БАН)

Публикации по Група от показатели В

1. Radchenkova, N., **Boyadzhieva, I**, Atanasova, N, Kambourova, M. High bioreactor production and emulsifying activity of an unusual exopolymer by *Chromohalobacter canadensis* 28. Engineering in Life Sciences, 20, 8, Wiley Online Library, 2020, ISSN:16180240, 357-367

Abstract

Unusual composition of an exopolymer (EP) from an obligate halophilic bacterium *Chromohalobacter canadensis* 28 has triggered an interest in development of an effective bioreactor process for its production. Its synthesis was investigated in 2-L bioreactor at agitation speeds at interval 600-1000 rpm, at a constant air flow rate of 0.5 vvm; aeration rates of 0.5, 1.0, and 1.5 vvm were tested at constant agitation rate of 900 rpm. EP production was affected by both, agitation and aeration. As a result twofold increase of EP yield was observed and additionally increased up to 3.08 mg/mL in a presence of surfactants. For effective scale-up of bioreactors mass transfer parameters were estimated and lowest values of KLa obtained for the highest productivity fermentation was

established. Emulsification activity of EP exceeded that of trade hydrocolloids xanthan, guar gum, and cellulose. A good synergism between EP and commercial cellulose proved its potential exploration as an enhancer of emulsifying properties of trade emulsions. A pronounced lipophilic effect of EP was established toward olive oil and liquid paraffin. Cultivation of human keratinocyte cells (HaCaT) with crude EP and purified γ -polyglutamic acid (PGA) showed higher viability than control group.

Резюме:

Необичаният състав на екзополимер (ЕП) от облигатната халофилна бактерия *Chromohalobacter canadensis* 28 предизвиква интерес към разработването на ефективен биореакторен процес за неговата синтеза. Тя е изследвана в 2-л биореактор при скорости на разбъркване в интервал 600-1000 об/мин, при постоянен дебит на въздуха от 0,5 об/об. мин; тествани са скорости на аерация от 0,5, 1,0 и 1,5 об/об. мин при постоянна скорост на разбъркване от 900 об/мин. Установено е, че продукцията на ЕП се повлиява както от разбъркването, така и от аерацията. В резултат е наблюдавано двукратно увеличение на добива на ЕП и допълнително увеличение до 3,08 мг / мл в присъствието на повърхностноактивни вещества. За ефективно разширяване на биореакторите са оценени параметрите на масообмен и са установени най-ниските стойности на KLa , получени за ферментация с най-висок добив. Емулгиращата активност на ЕП надвишава тази на търговските хидроколоиди ксантан, гуарова гума и целулоза. Добрият синергизъм между ЕП и търговската целулоза доказва потенциала му като подобрител на емулгиращите свойства на търговските емулсии. Установен е подчертан липофилен ефект на ЕП спрямо зехтина и течния парафин. Култивирането на човешки кератиноцитни клетки (HaCaT) с непречистен ЕП и пречистена γ -полиглутаминова киселина (PGA) показва по-висока жизнеспособност от контролната група.

2. Atanasova, N., Paunova-Krasteva, T., Stoitsova, S., Radchenkova, N., **Boyazdchieva, I.**, Petrov, K., Kambourova, M. Degradation of poly(ϵ -caprolactone) by a thermophilic community and *Brevibacillus thermoruber* strain 7 isolated from Bulgarian hot spring. Biomolecules, 11, 10, 2021, ISSN:2218273X, 1488

Abstract

The continual plastic accumulation in the environment and the hazardous consequences determine the interest in thermophiles as possible effective plastic degraders, due to their unique metabolic mechanisms and change of plastic properties at elevated temperatures. PCL is one of major biodegradable plastics with promising application to replace existing non-biodegradable polymers. Metagenomic analysis of the phylogenetic diversity in plastic contaminated area of Marikostinovo hot spring, Bulgaria revealed a higher number taxonomic groups (11) in the sample enriched without plastic (Marikostinovo community, control sample, MKC-C) than in that enriched in the presence of poly- ϵ -caprolactone (PCL) (MKC-P), (7). A strong domination of the phylum *Proteobacteria* was observed for MKC-C, while the dominant phyla in MKC-P were *Deinococcus-Thermus* and *Firmicutes*. Among the strains isolated from MKC-P, the highest esterase activity was registered for *Brevibacillus thermoruber* strain 7 at 55 °C. Its co-cultivation with another isolate resulted in ~10% increase in enzyme activity. During a 28-day biodegradation process, a decrease in PCL molecular weight and weight loss were established resulting in 100% degradation by MKC-P and 63.6% by strain 7. PCL degradation intermediate profiles for MKC-P and pure strain were similar. Broken plastic pieces from PCL surface and formation of a biofilm by MKC-P were observed by SEM, while the pure strain caused significant deformation of PCL probes without biofilm formation.

Резюме:

Непрекъснатото натрупване на пластмаси в околната среда и опасните последици от това обуславят интереса към термофилите като възможни ефективни разграждащи пластмасите микроорганизми, поради уникалните им метаболитни механизми и промяната на свойствата на пластмасите при повишени температури. Поликапролактонът (ПКЛ) е една от основните биоразградими пластмаси с обещаващо приложение за замяна на съществуващите небiorазградими полимери. Метагеномният анализ на филогенетичното разнообразие в замърсената с пластмаса зона на горещия извор Марикостиново, България, разкри по-голям брой

таксономични групи (11) в пробата, обогатена без пластмаса (Марикостиновска общност, контролна проба, МКС-К), отколкото в тази, обогатена в присъствието на поли-ε-капролактон (ПКЛ) (МКС-П), (7). За МКС-К се наблюдава силно доминиране на филума *Proteobacteria*, докато доминиращите филуми в МКС-П са *Deinococcus-Thermus* и *Firmicutes*. Сред щамове, изолирани от МКС-Р, най-висока естеразна активност е регистрирана за щам 7 на *Brevibacillus thermoruber* при 55 °C. Съвместното му култивиране с друг изолат води до ~10% увеличение на ензимната активност. По време на 28-дневен процес на биоразграждане е установено намаляване на молекулното тегло на ПКЛ и загуба на тегло, което води до 100% разграждане от МКС-П и 63,6% от щам 7. Междинните профили на разграждане на ПКЛ за МКС-П и чистия щам са сходни. Чрез сканираща електронна микроскопия бяха наблюдавани счупени пластмасови парчета от повърхността на ПКЛ и образуване на биофилм от МКС-П, докато чистият щам предизвика значителна деформация на ПКЛ без образуване на биофилм.

3. Atanasova, N, Paunova-Krasteva, T, Kambourova, M, **Boyadzhieva, I.** A Thermostable Lipase Isolated from *Brevibacillus thermoruber* Strain 7 Degrades ε-Polycaprolactone. BioTech, 12, 1, MDPI, 2023, ISSN:26736284

Abstract

The tremendous problem with plastic waste accumulation has determined an interest in biodegradation by effective degraders and their enzymes, such as thermophilic enzymes, which are characterized by high catalytic rates, thermostability, and optimum temperatures close to the melting points of some plastics. In the present work, we report on the ability of a thermophilic lipase, by *Brevibacillus thermoruber* strain 7, to degrade ε-polycaprolactone (PCL), as well as the enzyme purification, the characterization of its physicochemical properties, the product degradation, and its disruptive effect on the PCL surface. The pure enzyme showed the highest reported optimum temperature at 55 °C and a pH of 7.5, while its half-life at 60 °C was more than five hours. Its substrate specificity referred the enzyme to the subgroup of lipases in the esterase group. A strong inhibitory effect was observed by detergents, inhibitors, and Fe^{3+} while Ca^{2+} enhanced its activity.

The monomer ϵ -caprolactone was a main product of the enzyme degradation. Similar elution profiles of the products received after treatment with ultra-concentrate and pure enzyme were observed. The significant changes in PCL appearance comprising the formation of shallower or deeper in-folds were observed after a week of incubation. The valuable enzyme properties of the lipase from *Brevibacillus thermoruber* strain 7, which caused a comparatively quick degradation of PCL, suggests further possible exploration of the enzyme for effective and environment-friendly degradation of PCL wastes in the area of thermal basins, or in thermophilic remediation processes.

Резюме:

Огромният проблем с натрупването на пластмасови отпадъци предизвиква интерес към биоразграждането им чрез ефективни микроорганизми и техните ензими, като термофилните ензими, например, които се характеризират с високи каталитични скорости, термостабилност и оптимални температури, близки до точките на топене на някои пластмаси. В настоящото изследване представяме способността на термофилна липаза, изолирана от щам 7 на *Brevibacillus thermoruber*, да разгражда ϵ -поликапролактон (ПКЛ), както и пречистването на ензима, характеристиките на неговите физикохимични свойства, продуктите от разграждането и неговото въздействие върху повърхността на ПКЛ. Чистият ензим показва най-високата докладвана досега оптимална температура от 55 °C и pH 7,5, а неговият полуживот при 60 °C беше над пет часа. Специфичността към субстрати го отнася към подгрупата на липазите в групата на естеразите. Силен инхибиторен ефект бе наблюдаван от детергенти, инхибитори и Fe^{3+} , докато Ca^{2+} засили ензимната активност. Основният продукт от разграждането на ензима бе мономерът ϵ -капролактон. Наблюдавани бяха сходни елуационни профили на продуктите след третиране както с ултраконцентриран, така и с чист ензим. Значителни промени във външния вид на ПКЛ, включващи формирането на плитки или дълбоки вдлъбнатини, се наблюдаваха след една седмица инкубация. Ценните свойства на липазата от *Brevibacillus thermoruber* щам 7 предполагат възможност за по-нататъшно приложение на ензима за ефективно и щадящо околната среда

разграждане на ПКЛ отпадъци в райони с термални извори или в термофилни ремедиационни процеси.

4. **Boyadzhieva I.**, Berberov K., Atanasova N., Krumov N., Kabaivanova L. Extracellular Haloalkalophilic Pectinase Produced by *Virgibacillus salarius* Strain 434—A Useful Tool for Biotechnological Applications. Appl. Sci., 2024, 14, 9295

Abstract

The interest in microbial pectinases is increasing due to their use in the biotechnological and food industries in response to global demand. In this study, among the 22 halophilic bacterial strains screened, 20 showed pectinase activity. The highest activity was measured for *Virgibacillus salarius* strain 434. As pectinase production meets many parameter optimization constraints, optimal production conditions for maximizing the yield of the pectinase synthesized using the investigated strain were followed. Enzyme purification was accomplished at up to 11.5-fold via ultrafiltration and gel filtration chromatography, until the enzyme's specific activity had increased 10-fold (104.3 U/mg). The enzyme's molecular weight was determined to be 68 kDa. Km and Vmax values of 0.38 mg/mL and 120 U/mg, respectively, were determined. The purified pectinase from *Virgibacillus salarius* strain 434 showed good thermal stability. A half-life of 20 min at 70 °C and high catalytic activity under haloalkaline conditions (pH 9 and 70 g L⁻¹ NaCl) were observed. Its storage stability at -20 °C exceeded 2 months. This demonstrates its potential for application in industries where these extremes are present, as the harsh conditions in industrial processes require novel pectinases with unique properties instead of the use of hazardous chemicals.

Резюме:

Интересът към микробните пектинази нараства поради тяхното приложение в биотехнологичната и хранително-вкусовата промишленост в отговор на глобалното търсене. В това изследване, измежду 22 халофилни бактериални щамове, подложени на скрининг, 20 показваха пектиназна активност. Най-висока активност бе измерена при щам *Virgibacillus salarius* 434. Тъй като производството на пектиназа изисква

оптимизация на множество параметри, бяха установени оптимални условия за максимално добиване на ензима, синтезиран от изследвания щам. Пречистването на ензима бе постигнато до 11,5-кратно чрез ултрафилтрация и гел-филтрационна хроматография, като специфичната му активност се увеличи 10 пъти (104,3 U/mg). Молекулното тегло на ензима беше определено на 68 kDa. Стойностите на K_m и V_{max} бяха съответно 0,38 mg/mL и 120 U/mg. Пречистената пектиназа от щам *Virgibacillus salarius* 434 показва добра термостабилност. Бе отчетен полуживот от 20 минути при 70 °C и висока каталитична активност при халоалкални условия (pH 9 и 70 g/L NaCl). Стабилността при съхранение при –20 °C надвишаваше 2 месеца. Това демонстрира потенциала ѝ за приложение в индустрии, при които се срещат екстремни условия, тъй като индустриалните процеси често изискват нови пектинази с уникални свойства, вместо използването на опасни химикали.

5. **Boyadzhieva, I.**, Berberov, K, Atanasova, N, Krumov, N, Kabaivanova, L. Isolation, Purification and In Vitro Characterization of a Newly Isolated Alkalophilic Phytase Produced by the Halophile *Cobetia marina* Strain 439 for Use as Animal Food Supplement. *Fermentation*, 2025, 11(1), 39

Abstract

Economic development increases and brings about issues such as the secure supply of food in a sustainable way. Phytases are enzymes catalyzing phytate hydrolysis to release phosphorus in an inorganic form. Animal feeds could be supplemented with bacterial phytases to increase their phosphorus and micronutrients bioavailability. To the best of our knowledge, this is the first report on the purification and characterization of an alkalophilic phytase from *Cobetia marina*. The purified newly isolated phytase from the halophilic *Cobetia marina* strain 439 appears to be appropriate for use as an additive in food and feed processing. Its molecular weight was determined to be 43 kDa by gel filtration and 40 kDa by SDS–polyacrylamide gel electrophoresis. The purified enzyme had maximum activity at pH 8.0 and 45 °C, while at 70 °C, it was 80% and about 50% at 80 °C for 40 min, showing its thermostability. Enzyme activity was retained at a broad pH range from 6.5 to 9.0. The half-life of the phytase of 15 min at pH 10 and 30 min at

pH 4.0 was registered. The enzyme was proven to be with high substrate specificity. In addition, the purified phytase showed strong proteolytic tolerance against trypsin and pepsin. The pH profile, its thermostability, and proteolytic tolerance of the studied phytase as a halophilic bacterial product determine it as a unique candidate for application in agriculture, food, and feed industries.

Резюме:

Икономическият напредък води до нарастващи предизвикателства, свързани с осигуряването на екологосъобразно хранене. Фитазите са ензими, които катализират хидролизата на фитата с цел освобождаване на фосфор в неорганична форма. Животинските фуражи могат да бъдат допълвани с бактериални фитази, за да се повиши тяхната бионаличност на фосфор и микроелементи. До колкото е известно, това е първият доклад за пречистване и характеристика на алкалофилна фитаза от *Cobetia marina*. Пречистената, новоизолирана фитаза от халофилния щам *Cobetia marina* 439 се оказва подходяща за използване като добавка в хранително-вкусовата промишленост и при производството на фуражи. Молекулното тегло на ензима е определено на 43 kDa чрез гел-филтрация и 40 kDa чрез SDS-полиакриламиден гел електрофореза. Пречистеният ензим показва максимална активност при pH 8.0 и 45 °C, като при 70 °C се запазват 80% от активността, а около 50% при 80 °C за 40 минути, което доказва неговата термостабилност. Ензимната активност се запазва в широк pH диапазон от 6.5 до 9.0. Установен е полуживот на фитазата от 15 минути при pH 10 и 30 минути при pH 4.0. Ензимът се отличава с висока субстратна специфичност. Освен това пречистената фитаза проявява силна протеолитична устойчивост към трипсин и пепсин. pH профилът, термостабилността и протеолитичната устойчивост на изследваната фитаза като продукт на халофилна бактерия я определят като уникален кандидат за приложение в селското стопанство, хранително-вкусовата и фуражната промишленост.

Публикации по Група от показатели Г

6. Kuncheva M., Panchev I, Kamburova M., Radchenkova N., **Boyadzhieva I.** Surface active properties of a newly synthesized biopolymer from halophilic microorganisms. Scientific works UFT, "Food science, engineering and technologies, LXII, 2015, ISSN:1314-7102, 487-489

Abstract

The subject of this study were the surface active properties of an exopolysaccharide (EPS) synthesized from halophilic bacterial strains isolated from Bulgarian salty sea waters. The synthesized biopolymer was found to lower the surface tension of water, i.e. it showed surface activity. The emulsifying and stabilizing ability of EPS were tested in model systems with 50% oil phase of an oil-in-water emulsion. Emulsion dispersion and stability were followed at different concentrations of EPS. It was established that the newly synthesized EPS had 100% emulsifying and stabilizing activities. It was shown that the EPS had a high foaming ability and foam stability.

Резюме:

Предмет на това изследване са повърхностно активните свойства на екзополisahарид (ЕПЗ), синтезиран от халофилни бактериални щамове, изолирани от български солени морски води. Установено е, че синтезият биополимер понижава повърхностното напрежение на водата, т.е. проявява повърхностна активност. Емулгиращата и стабилизиращата способност на ЕПЗ бяха тествани в моделни системи с 50% маслена фаза на емулсия „масло във вода“. Дисперсията и стабилността на емулсията бяха проследени при различни концентрации на ЕПЗ. Установено е, че новосинтезият ЕПЗ има 100% емулгираща и стабилизираща активност. Доказано е, че ЕПЗ има висока способност за разпенване и стабилност на пияната.

7. Samuneva, B., Kadiyska, E., Djambaski, P., Dobрева, E., **Bojadjieva, I.**, Kabaivanova, L. Sol-gel Synthesis of Glassy Hybrid Matrices for Cell Immobilization. Glass Science and Technology, 2002

Abstract

The sol-gel technology has created a unique link between the chemistry of inorganic, organic materials and biochemistry. In the last years the immobilization of enzymes, cells and other proteins in sol-gel matrices appears to be one of the fastest growing direction in the sol-gel science and technology. This is a highly promising method as its conditions are quite gentle and the entrapped biomolecules retain their biological activity and organization. It has become possible a variety of new materials to be created by the sol-gel method. A great number of whole cells have been successfully incorporated within different sol-gel silica /1-3/ and hybrid /4/ matrices. Immobilization of bacteria producing nitrilase on PVA /5/, DEAE Cellulose /6/ and alginate /7/ matrices is carried out as a means of increasing catalyst longevity. However immobilization of thermophilic bacterial cells, having nitrilase activity in silica and hybrid matrices has not been described. The aim of the present work is to create series of hybrid matrices with and without alcohol, using different precursors and to investigate the influence of the organics on the enzyme activity and operational stability of the immobilized bacterial cells.

Резюме:

Сол-гел технологията създава уникална връзка между неорганичната и органичната химия и биохимията. През последните години имобилизирането на ензими, клетки и други протеини в сол-гел матрици се утвърждава като едно от най-бързо развиващите се направления в науката и технологиите, свързани със сол-гел процесите. Това е изключително обещаващ метод, тъй като условията му са достъпни, а вградените биомолекули запазват своята биологична активност и организация. Сол-гел методът позволява създаването на разнообразни нови материали. Голям брой цели клетки са успешно инкорпорирани в различни сол-гел силициеви /1–3/ и хибридни /4/ матрици. Имобилизацията на бактерии, продуциращи нитрилаза, върху PVA /5/, DEAE целулоза /6/ и алгинатни /7/

матрици се извършва като средство за удължаване на живота на катализатора. Въпреки това, имобилизацията на термофилни бактериални клетки с нитрилазна активност в силициеви и хибридни матрици все още не е описана. Целта на настоящата работа е да се създадат серии от хибридни матрици – със и без алкохол – чрез използване на различни прекурсори и да се изследва влиянието на органичните съставки върху ензимната активност и оперативната стабилност на имобилизираните бактериални клетки.

8. Lazarkevich, I., Engibarov, S., Mitova, S., Vacheva, E., Popova, S., Stanchev, N., Eneva, R., Gocheva, Y., **Boyadzhieva, I.**, Gerginova, M. 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, MDPI, 2024, ISSN:2673-8007

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 профилите на фекалната микробиота на пет синтопични 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*) (*Anguidae*), които обитават нископланински район в западната част на страната. Използвано е секвениране на хипервариабилния V3-V4 регион на 16S рПНК гена. Основната микрофлора на гущерите-гостоприемници изглежда е видово специфична. Най-богатото алфа-разнообразие е наблюдавано при *D. praticola*, а най-ниското алфа-разнообразие - при *P. muralis* и *A. fragilis*. 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.

9. Gocheva, Y., Engibarov, S., Eneva, R., Lazarkevich, I., Mitova, S., **Boyadzhieva, I.** Exploring novel horizons-Bacterial phytases and their potential applications. Novel Research in Microbiology Journal, 8, 6, 2024

Abstract

The aims of this review are to focus on updating the current knowledge regarding the diversity of bacterial phytases, their importance in increasing the availability of phosphorus and other nutrients necessary for the growth and development of various plants and animals, and their roles in maintaining environmental sustainability. Phytases, enzymes that catalyze the hydrolysis of phytic acid, play a major role in various biotechnological processes; especially in agriculture. Among the diverse sources of phytases as prokaryotic and eukaryotic organisms, bacterial phytases have gained considerable attention due to their specific characteristics, potentials for genetic manipulation, and various biotechnological and industrial applications. Aerobic and anaerobic bacteria with phytase activity have been isolated from diverse ecological niches, including soils, fermented foods, plant rhizospheres, and manure. Additionally,

probiotic bacteria, essential for maintaining a healthy microbiota, have been shown to produce phytase, suggesting their potential applications in animal and plant growth, human nutrition, and food and feed industry.

Резюме:

Целите на този обзор са да се съсредоточи върху актуализирането на настоящите познания относно разнообразието на бактериалните фитази, тяхното значение за увеличаване на наличието на фосфор и други хранителни вещества, необходими за растежа и развитието на различни растения и животни, както и ролята им за поддържане на устойчивостта на околната среда. Фитазите, ензими, които катализират хидролизата на фитинова киселина, играят важна роля в различни биотехнологични процеси, особено в селското стопанство. Сред разнообразните източници на фитази като прокариотни и еукариотни организми, бактериалните фитази са привлекли значително внимание поради специфичните си характеристики, потенциала за генетични манипулации и различни биотехнологични и промишлени приложения. Аеробни и анаеробни бактерии с фитазна активност са изолирани от различни екологични ниши, включително почви, ферментирали храни, растителни коренища и тор. Освен това е доказано, че пробиотични бактерии, които са от съществено значение за поддържането на здравословна микробиота, произвеждат фитаза, което предполага потенциалното им приложение в растежа на животните и растенията, храненето на хората и хранително-вкусовата промишленост.

10. Kambourova, M., Tomova, I., **Boyadzhieva, I.**, Radchenkova, N., Vasileva-Tonkova, E. Phylogenetic analysis of the bacterial community in a crystallizer pond, Pomorie salterns, Bulgaria. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 31, 2, 2017

Abstract

The aim of this study was to investigate the bacterial community habituating P18, the biggest crystallizer pond in Pomorie salterns (34% salinity). The obtained results showed that the bacterial community differs from many previous reports of low bacterial diversity

in hypersaline environments and demonstrates unusually high diversity of presented taxa, some unusual domination of diverse genera not reported before as dominant and identification of previously unknown 16S rRNA sequences. The retrieved 23 bacterial operational taxonomic units (OTUs) affiliated with 15 bacterial genera from four phyla – *Firmicutes*, 47.5%; *Proteobacteria*, 23.1%; *Bacteroidetes*, 22%; *Deinococcus–Thermus*, 2.4%; and one-candidate division SR1, 4.8%. Representatives of the phylum *Firmicutes* predominated in the bacterial community with almost half of the retrieved sequences. Almost all clones branched together with cultured halophiles or uncultured clones retrieved from saline niches. Despite of the high salt concentration, some of the closest phylogenetic neighbours were moderate halophiles. New sequences represented 42.3% of bacterial OTUs. Some of them formed separate branches with similarity less than 85%.

Резюме:

Целта на това проучване беше да се изследва бактериалното съобщество, обитаващо P18, най-голямото солено езеро в Поморийските солници (34% соленост). Получените резултати показват, че бактериалното съобщество се различава от много предишни доклади за ниско бактериално разнообразие в хиперсолени среди и демонстрира необичайно голямо разнообразие на представените таксони с доминиране на различни родове, които не са докладвани преди като доминиращи и идентифициране на неизвестни досега 16S рРНК секвенции. Те бяха групирани в 23 бактериални оперативни таксономични единици (OTU), отнесени към 15 бактериални рода от четири типа- *Firmicutes*, 47,5%; *Proteobacteria*, 23,1%; *Bacteroidetes*, 22%; *Deinococcus – Thermus*, 2,4%; и един-кандидат тип SR1, 4,8%. Представителите на типа *Firmicutes* преобладават в бактериалната общност с почти половината от идентифицираните секвенции. Новите секвенции представляват 42,3% от бактериалните OTU. Някои от тях образуваха отделни клонове с подобие по-малко от 85%.

- 11. Boyadzhieva, I., Radchenkova, N, Tomova, I., Kambourova, M., Poli, A., Vasileva-Tonkova, E.** Diversity of Heterotrophic Halophilic Bacteria Isolated from Coastal Solar

Abstract

Biodiversity of heterotrophic aerobic bacteria isolated from two salterns, Pomorie salterns and Burgas salterns located at Burgas Bay, Black Sea coast, Bulgaria, as well as ability of the isolates to synthesize biotechnologically valuable compounds were investigated. The results revealed high taxonomic and metabolic bacterial diversity—we isolated 20 morphologically different moderately halophilic and two halotolerant strains affiliated with 11 species from eight genera referred to the phyla *Proteobacteria*, *Firmicutes*, and *Actinobacteria*. Gram negative bacteria belonged to the genera *Halomonas*, *Chromohalobacter*, *Salinivibrio*, *Cobetia*, and *Nesiotobacter*, and gram-positive strains were representatives of the genera *Virgibacillus*, *Salinicoccus*, and *Brevibacterium*. All isolates were found to be alkalitolerant, and 41% of them were psychrotolerant. The strains degraded nine of the tested 18 substrates; polygalacturonase, catalase, phytase, and lipase producers were predominant. This is the first reported detection of xanthan lyase, gellan lyase, arabinase, and phytase activities in halophilic bacteria. Nine of the strains belonging to five different genera were found to produce exopolysaccharides (EPS). The highest level of EPS was observed in *Chromohalobacter canadensis* strain 28. More than a half of the strains displayed antimicrobial activity against one to five test bacteria and yeasts. The present study is the first report on halophilic bacteria isolated from salterns at the Black Sea coast indicating that the investigated area is an untapped resource of halophilic bacteria with biotechnological potential.

Резюме:

Изследвано е биоразнообразието на хетеротрофни аеробни бактерии, изолирани от два солника, Поморийски и Бургаски, разположени в Бургаския залив, България, както и способността на изолатите да синтезират биотехнологично ценни съединения. Резултатите показаха високо таксономично и метаболитно бактериално разнообразие - изолирани са 20 морфологично различни умерено

халофилни и два халотолерантни щама, отнесени към осем рода, от типовете *Proteobacteria*, *Firmicutes* и *Actinobacteria*. Грам-отрицателните бактерии принадлежат към родовете *Halomonas*, *Chromohalobacter*, *Salinivibrio*, *Cobetia* и *Nesiotobacter*, а Грам положителните щамове са представители на родовете *Virgibacillus*, *Salinicoccus* и *Brevibacterium*. Установено е, че всички изолати са алкалотолерантни и 41% от тях са психротолерантни. Щамовете разграждат девет от тестваните 18 субстрата; продуцентите на полигалактуроназа, каталаза, фитаза и липаза са преобладаващи. Това е първото съобщение за откриване на ксантан лиаза, гелан-лиаза, арабиназа и фитазна активност при халофилни бактерии. Установено е, че девет от щамовете, принадлежащи към пет различни рода, продуцират екзополisahариди (ЕПЗ). Най високото ниво на ЕПЗ е наблюдавано при щам 28 - *Chromohalobacter canadensis*. Повече от половината от щамовете проявяват антимикробна активност срещу една до пет тестови бактерии и дрожди. Настоящото проучване е първото съобщение за халофилни бактерии, изолирани от солени води по Черноморието, което показва, че изследваната зона е неизползван ресурс от халофилни бактерии с биотехнологичен потенциал.

- 12. Boyadzhieva, I.,** Radchenkova, N., Atanasova, N., Poli, A., Finore, I., Kambourova, M. Isolation and characterization of a thermostable pectinase by *Anoxybacillus gonensis* strain 357. *Comptes Rendus de l 'Academie Bulg. des Sci.*, 74, 12, 2021

Abstract

Microbial pectinases are amongst the most available enzymes on the polysaccharide degrader market. Industrial pretreatment of pectin at about 60 °C and slightly alkaline pH determines the special interest toward thermo-alkaline enzymes. A total of 30 bacterial strains were isolated from a terrestrial hot spring, village Varvara, Bulgaria, and tested for pectinase activity. Among the selected five strains *Anoxybacillus gonensis* strain 357 showed highest ex tracellular activity. After optimization of the medium and physicochemical parameters for cultivation the isolate was found to produce maximum pectinase (230 U/ml) after 48 h of incubation at 55 °C and pH 7.5. Purified enzyme demonstrated highest activity at pH 8.5 and temperature of 60°C. It preserved 100% of its

activity after one hour pretreatment at the same temperature. The enzyme showed high stability towards some metal ions and detergents.

Резюме:

Микробните пектинази са сред най-достъпните ензими на пазара за разграждане на полизахариди. Промислената предварителна обработка на пектина при около 60 °C и леко алкално рН определя специалния интерес към термоалкалните ензими. Общо 30 бактериални щама бяха изолирани от горещ извор, с. Варвара, България, и изследвани за пектиназна активност. Сред избраните пет щама *Anoxybacillus gonensis* щам 357 показва най-висока екстрацелуларна активност. След оптимизиране на средата и физикохимичните параметри за култивиране беше установено, че изолатът произвежда пектиназа с максимален добив (230 U/ml) след 48 часа инкубация при 55°C и рН 7,5. Пречистеният ензим демонстрира най-висока активност при рН 8,5 и температура 60°C. Той запазва 100% от активността си след едночасова предварителна обработка при същата температура. Ензимът показва висока стабилност спрямо някои метални йони и детергенти.

13. Kabaivanova, L., Dimitrov, P., **Boyadzhieva, I.**, Engibarov, S., Dobрева, E., Emanuilova E. Nitrile degradation by free and immobilized cells of the thermophile *Bacillus* sp. UG-5B, isolated from polluted industrial waters. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, ISSN:0959-3993

Abstract

A moderately thermophilic Gram-positive, sporulating, rod-shaped strain of *Bacillus* with nitrile degrading activity was isolated from polluted industrial waters. Whole cells and cell-free extracts from the end of exponential growth phase expressed 7.6 nkat mg⁻¹ and 2.0 nkat mg⁻¹ benzonitrile-degrading activity, respectively, after cultivation in a fermentor with complex medium containing benzonitrile as an inducer. The benzonitrile degradation took place via the nitrilase pathway directly to benzoic acid without intermediate formation of benzamide. Samples with benzonitrilase activity of 7.6 nkat mg⁻¹ converted 3 mg benzonitrile in 1 h at 45°C. The half-life of benzonitrilase activity

for a whole cell suspension and for cells immobilized in 2% agar was 4.5 min and 6 min at 70°C without substrate and 3 min at 90°C with substrate, respectively. The nitrilase had a broad substrate spectrum. The active biocatalyst obtained by immobilization was used in a continuous process and total biodegradation of 14.1 mM benzonitrile and 37.2 mM 4-cyanopyridine in a column bioreactor at 50°C for 5 h was achieved.

Резюме:

От замърсени промишлени води е изолиран умерено термофилен Грам-положителен, спорулиращ, пръчковиден щам на *Bacillus* с нитрилоразграждаща активност. Цели клетки и безклетъчни екстракти от края на експоненциалната фаза на растеж показват съответно 7,6 nkat mg⁻¹ и 2,0 nkat mg⁻¹ бензонитрил-разграждаща активност след култивиране във ферментатор със среда, съдържаща бензонитрил като индуктор. Разграждането на бензонитрила се извършва по нитрилазен път директно до бензоена киселина без междинно образуване на бензамид. Проби с бензонитрилазна активност от 7,6 nkat mg⁻¹ преобразуваха 3 mg бензонитрил за 1 час при 45 °C. Полуживотът на нитрилзата за цяла клетъчна суспензия и за клетки, имобилизирани в 2% агар, е съответно 4,5 min и 6 min при 70°C без субстрат и 3 min при 90°C със субстрат. Нитрилазата има широк субстратен спектър. Активният биокатализатор, получен чрез имобилизация, беше използван в непрекъснат процес и беше постигнато пълно биоразграждане на 14,1 mM бензонитрил и 37,2 mM 4-цианопиридин в колонен биореактор при 50°C за 5 h.

14. Atanasova N, Kitayska T, **Bojadjieva, I**, Yankov D. Tonkova A. A novel cyclodextrin glucanotransferase from alkaliphilic *Bacillus pseudocaliphilus* 20RF: Purification and properties. Process Biochemistry, 46, 1, 2011, 116-122

Abstract

A new cyclodextrin glucanotransferase (CGTase, EC 2.4.1.19) from the obligated alkaliphile *Bacillus pseudocaliphilus* 20RF, isolated from Bulgarian soils, was purified up to 18-fold by ultrafiltration and starch adsorption with a recovery of 63% activity. The enzyme was a monomer with a molecular weight 70 kDa estimated by SDS-PAGE. The

CGTase exhibited two pH optima at pH 6.0 and 9.0 and was optimally active at 60°C. The enzyme could be effectively used for conversion of raw starch into cyclodextrins (CDs) in a wide pH range, from 5.0 to 10.0 and temperatures 60–70°C. The enzyme was more heat resistant after its pretreatment in alkaline pH 9.0 at high temperatures 65–70°C, than at pH 6.0 under the same reaction conditions. The CGTase showed a significant stability in the presence of 15mM various metal ions and reagents after 30min incubation at 25°C. The purified CGTase could be used for an efficient cyclodextrin production without any additives which is of an industrial interest. The achieved high conversion of an insoluble raw commercial corn starch into cyclodextrins (47%) with production of only two types of cyclodextrins, β - and γ -CD (80%:20%) in alkaline pH 9.0, makes *B.pseudocaliphilus* 20RF CGTase industrially desired for cyclodextrin manufacture.

Резюме:

Нова циклодекстринглюканотрансфераза (CGTase, EC 2.4.1.19) от облигатно алкалофилен *Bacillus pseudocaliphilus* 20RF, изолиран от български почви, е пречистена до 18 пъти чрез ултрафилтрация и адсорбция на нишесте с повишаване с 63% на активността. Ензимът е мономер с молекулно тегло 70 kDa, оценено чрез SDS-PAGE. ЦГТазата показва два pH оптимума при pH 6,0 и 9,0 и е оптимално активна при 60°C. Ензимът може да се използва ефективно за превръщане на сурово нишесте в циклодекстрини (ЦД) в широк диапазон на pH от 5,0 до 10,0 и температури 60-70°C. Ензимът е по-устойчив на топлина след предварителната му обработка в алкално pH 9,0 при високи температури 65-70°C, отколкото при pH 6,0 при същите условия на реакция. ЦГТазата показва значителна стабилност в присъствието на 15 mM различни метални йони и реагенти след 30-минутна инкубация при 25°C. Пречистената ЦГТаза може да се използва за ефективно производство на циклодекстрин без никакви добавки, което представлява промишлен интерес. Постигнатата висока степен на превръщане на неразтворимо сурово царевично нишесте в циклодекстрини (47 %) с производство само на два вида циклодекстрини, β - и γ -CD (80 %:20 %) в алкално pH 9,0, прави ЦГТазата от *B.pseudocaliphilus* 20RF индустриално желана за производство на циклодекстрини.

15. Radchenkova, N., Hasköylü, M. E., Vassilev, S., Yıldız, S. Y., **Boyadzhieva, I.**, Oner, E. T., Kambourova, M. Improved Exopolymer Production by *Chromohalobacter canadensis* Cultures for Its Potential Cosmeceutical Applications. *Microorganisms*, 8, 12, MDPI, 2020

Abstract

Several exopolymers with different chemical composition and correspondingly variety in their physico-chemical properties from halophilic microorganisms have still been described, however, with a low production yield. *Chromohalobacter canadensis* 28 isolated from Pomorie saltern synthesized an unusual exopolymer (EP) containing 72% γ -polyglutamic acid (PGA), an essential cosmeceutical additive. Current work suggests a novel approach for effective EP synthesis by *C. canadensis* 28 using continuous cultures. Highest production was observed at low dilution rates reaching a level of 2.1 mg/mL at $D = 0.035$, similar to those in batch cultures (2.34 mg/mL), however avoiding all disadvantages of discontinuous fermentation processes. At steady state, the total quantities of the synthesized EP after 48 h cultivation for the given equipment volume in $D = 0.035 \text{ h}^{-1}$ and $D = 0.075 \text{ h}^{-1}$ were 8.67 and 12 g, correspondingly, while it was 2.9 g for batch culture. Process parameters did not change after a ten-day run at $D = 0.35 \text{ h}^{-1}$. A degree of purity of EP fraction received from continuous cultures was significantly increased up to 93–96%. A lack of cytotoxicity and high cell viability were observed for human dermal fibroblast cells after 24 h incubation with crude EP from *C. canadensis* 28 and purified PGA fraction that could suggest its high potential for cosmetic applications.

Резюме:

Описани са само няколко екзополимера с различен химичен състав и разнообразие на техните физико-химични свойства от халофилни микроорганизми, но с нисък добив. *Chromohalobacter canadensis* 28, изолиран от солници в Поморие, синтезира необичаен екзополимер (ЕП), съдържащ 72% γ полиглутаминова киселина (PGA), която е съществена козметична добавка. Настоящата работа предлага нов подход за ефективен синтез на ЕП от *C. canadensis* 28, посредством непрекъснати култури. Най-висок синтез беше наблюдаван при ниски скорости на разреждане, достигачи

ниво от 2,1 mg / ml при $D = 0,035$, подобно на тези в периодичните култури (2,34 mg / ml), но избягвайки всички недостатъци на непрекъснатите ферментационни процеси. В стационарно състояние общите количества от синтезирания ЕП след 48 h култивиране за дадения обем на оборудването в $D = 0,035 \text{ h}^{-1}$ и $D = 0,075 \text{ h}^{-1}$ са съответно 8,67 и 12 g, докато за периодичната култура е 2,9 g. Параметрите на процеса останаха непроменени след десетдневна работа при $D = 0,35 \text{ h}^{-1}$. Степента на чистота на фракцията на ЕП, получена от непрекъснати култури, беше увеличена значително до 93–96%. Липса на цитотоксичност и висока клетъчна жизнеспособност бяха наблюдавани за човешки дермални фибробластни клетки след 24 часа инкубация с непречистен ЕП от *C. canadensis* 28 и пречистена PGA фракция, което предполага неговия висок потенциал за козметични приложения.

16. Penchev, H., Ivanova, G., Hubenov, V., **Boyadzhieva, I.**, Budurova, D., Ublekov, F., Gigova, A., Stoyanova, A. Supercapacitor Cell Performance with Bacterial Nanocellulose and Bacterial Nanocellulose/Polybenzimidazole Impregnated Membranes as Separator. Membranes, 15(1), 12, 2025

Abstract

Supercapacitors are advanced energy storage devices renowned for their rapid energy delivery and long operational lifespan, making them indispensable across various industries. Their relevance has grown in recent years due to the adoption of environmentally friendly materials. One such material is bacterial nanocellulose (BNC), produced entirely from microbial sources, offering sustainability and a bioprocess-driven synthesis. In this study, BNC was synthesized using a symbiotic microbial community. After production and purification, pristine BNC membranes, with an average thickness of 80 microns, were impregnated with an alkali-alcohol meta-polybenzimidazole (PBI) solution. This process yielded hybrid BNC/PBI membranes with improved ion-transport properties. The BNC membranes were then doped with a 6 M KOH solution, to enhance OH^- conductivity, and characterized using optical microscopy, ATR FT-IR, XRD, CVT, BET analysis, and impedance spectroscopy. Both BNC and BNC/PBI membranes were tested as separators in laboratory-scale symmetric supercapacitor cells, with performance

compared to a commercial Viledon® separator. The supercapacitors employing BNC membranes exhibited high specific capacitance and excellent cycling stability, retaining performance over 10,000 charge/discharge cycles. These findings underscore the potential of BNC/KOH membranes for next-generation supercapacitor applications.

Резюме:

Суперкондензаторите са съвременни устройства за съхранение на енергия, известни с бързото си доставяне на енергия и дългия си експлоатационен живот, което ги прави незаменими в различни индустрии. Тяхното значение нарасна през последните години поради използването на екологично чисти материали. Един такъв материал е бактериалната наноцелулоза (BNC), произведена изцяло от микробни източници, която предлага устойчивост и синтез, основан на биопроцеси. В това изследване BNC е синтезирана с помощта на симбиотична микробна общност. След производството и пречистването, девствени мембрани от BNC със средна дебелина 80 микрона бяха импрегнирани с алкално-алкохолен разтвор на мета-полибензимидазол (PBI). При този процес се получи хибридни BNC/PBI мембрани с подобрени йонно-транспортни свойства. След това BNC мембраните бяха легирани с 6 М разтвор на KOH, за да се подобри OH- проводимостта, и бяха охарактеризирани с помощта на оптична микроскопия, ATR FT-IR, XRD, CVT, BET анализ и импедансна спектроскопия. Както BNC, така и BNC/PBI мембраните са тествани като сепаратори в лабораторни симетрични суперкондензаторни клетки, като ефективността им е сравнена с търговския сепаратор Viledon®. Суперкондензаторите, използващи мембрани BNC, показаха висок специфичен капацитет и отлична циклична стабилност, запазвайки ефективността си в продължение на 10 000 цикъла на заряд/разряд. Тези констатации подчертават потенциала на мембраните BNC/KOH за следващо поколение суперкондензаторни приложения.

17. Kambourova, M., Tomova, I., **Boyadzhieva, I.**, Radchenkova, N., Vasileva-Tonkova, E. Unusually High Archaeal Diversity in a Crystallizer Pond, Pomorie Salterns, Bulgaria, Revealed by Phylogenetic Analysis. Archaea, 2016, Article ID 7459679

Abstract

Investigations on the archaeal community composition in P18, the biggest crystallizer pond in Pomorie salterns (PS) (34% salinity), demonstrated unusually high number of presented taxa in hypersaline environment. Archaeal clones were grouped in 26 different operational taxonomic units (OTUs) assigned to 15 different genera from two orders, *Halobacteriales* and *Haloferacales*. All retrieved sequences were related to culturable halophiles or unculturable clones from saline (mostly hypersaline) niches. New sequences represented 53.9% of archaeal OTUs. Some of them formed separate branches with 90% similarity to the closest neighbor. Present results significantly differed from the previous investigations in regard to the number of presented genera, the domination of some genera not reported before in such extreme niche, and the identification of previously undiscovered 16S rRNA sequences.

Резюме:

Проведени са изследвания относно археалното съобщество, обитаващо P18, най-голямото солено езеро в Поморийските солници, което, демонстрира необичайно голям брой на представените таксони в хеперсолена среда. Археалните клонове са групирани в 26 различни таксономични единици, отнесени към 15 различни рода от два разряда, *Halobacteriales* и *Haloferacales*. Всички секвенции са свързани с култивируеми халофили или некултивируеми клонове от солени (предимно хиперсолени) ниши. Новите секвенции представляват 53.9% от археалното OTUs. Някои от тях формират отделни клонове с 90% степен на подобие с най-близкородствените им. Настоящото проучване значително се различава от предишни изследвания по отношение броя на представените родове, доминирането на някои от тях не е докладвано за тези екстремни ниши, както и идентифицирането на неоткрити 16S рРНК секвенции.

18. Radchenkova N, **Boyadzhieva I**, Atanasova N, Poli A, Finore I, Di Donato P, Nicolaus B., Panchev I, Kunchева M, Kambourova M. Extracellular polymer substance

synthesized by a halophilic bacterium *Chromohalobacter canadensis* 28. Appl Microbiol Biotechnol., 102, 11, 2018

Abstract

Halophilic microorganisms are producers of a lot of new compounds whose properties suggest promising perspectives for their biotechnological exploration. Moderate halophilic bacterium *Chromohalobacter canadensis* 28 was isolated from Pomorie salterns as an extracellular polymer substance (EP) producer. The best carbon source for extracellular polymer production was found to be lactose, a sugar received as a by-product from the dairy industry. After optimization of the culture medium and physicochemical conditions for cultivation, polymer biosynthesis increased more than 2-fold. The highest level of extracellular polymer synthesis by *C. canadensis* 28 was observed in an unusually high NaCl concentration (15% w/v). Chemical analysis of the purified polymer revealed the presence of an exopolysaccharide (EPS) fraction (14.3% w/w) and protein fraction (72% w/w). HPLC analysis of the protein fraction showed the main presence of polyglutamic acid (PGA) (75.7% w/w). EPS fraction analysis revealed the following sugar composition (% w/w): glucosamine 36.7, glucose 32.3, rhamnose 25.4, xylose 1.7, and not identified sugar 3.9. The hydrogel formed by PGA and EPS fractions showed high swelling behavior, very good emulsifying and stabilizing properties, and good foaming ability. This is the first report for halophilic bacterium able to synthesize a polymer containing PGA fraction. The synthesized biopolymer shows an extremely high hydrophilicity, due to the simultaneous presence of PGA and EPS. The analysis of its functional properties and the presence of glucosamine in the highest proportion in EPS fraction clearly determine the potential of EP synthesized by *C. canadensis* 28 for application in the cosmetics industry.

Резюме:

Халофилните микроорганизми са продуценти на много нови съединения, чиито свойства предлагат обещаваща перспектива за тяхната биотехнологична експлоатация. Умерено халофилната бактерия *Chromohalobacter canadensis* 28 е изолирана от Поморийски солници като продуцент на извънклетъчна полимерна

субстанция. Най-добър въглероден източник за полимерна синтеза е лактозата, захар получена като страничен продукт в млечната индустрия. След оптимизиране на културалната среда и физикохимичните условия за култивиране биосинтезата на полимер е увеличена повече от 2 пъти. Максималната синтеза на извънклетъчен полимер от *Chromohalobacter canadensis* 28 е установена при необичайно висока концентрация на NaCl (15%). Химичните анализи на пречистения ЕП показват присъствие на екзополизахаридна фракция (14.3%) и белтъчна фракция (72%). HPLC анализите на белтъчната фракция показват присъствие основно на полиглутаминова киселина (PGA) (75.7%). Анализираната фракция на ЕП показва следния монозахариден състав (%): глюкоза 36.7, рамноза 25.4, ксилоза 1.7 и неиндентифицирани 3.9. Хидрогелът формиран от полиглутаминовата киселина и екзополизахаридната фракция показва добра набухваща способност, много добри емулгиращи и стабилизиращи свойства, както и пенообразуване. Това е първо съобщение за халофилна бактерия, синтезираща полимер, съдържащ PGA. Синтезираният полимер е с екстремно висока хидрофилност в присъствието едновременно на полиглутаминова киселина и полизахарид. Анализите на функционалните свойства в присъствието на глюкозамин в голяма част в ЕПЗ фракция, ясно очертава потенциала на ЕП от *Chromohalobacter canadensis* 28 като приложим в козметичната индустрия.

19. Krumov, N., Atanasova, N., **Boyadzhieva, I.**, Paunova-Krasteva, T., Berberov, K., Petrov, K., Petrova, P. New Halophilic Community Degrades Plastics: A Metagenomic Study. *Fermentation*, 11(4), 2025

Abstract

Biodegradation is an advanced method for reducing plastic waste in the environment, involving the participation of microbial communities with plastic-degrading properties. Our study presents a novel halophilic community isolated from the plasticcontaminated region in Burgas Lake, Bulgaria. In a medium containing 15% sodium chloride, the community can degrade a significant amount of polycaprolactone (PCL) as a sole carbon source, as well as the plastics polystyrene (PS) and polypropylene (PP), albeit to a lesser

extent. The community showed high hydrophobicity and the ability to form a biofilm on PCL beads, as well as high esterase activity and significant biodegradation capacity, as demonstrated by measuring the weight of the PCL material after cultivation for 4 and 8 weeks. Moreover, a scanning electron microscopy (SEM) analysis revealed visible cracks, craters, and holes in the surface of the polymer particles. The metagenomic study revealed that *Halomonas profundus* dominated the community with a proportion of 95.13%, followed by *Alloalcanivorax venustensis* (2.73%), *Chromohalobacter marismortui* (0.72%), and *Halomonas caseinilytica* (0.78%). However, most of the species in the community were not previously known as PCL-degrading. Thus, studying the diversity of the halophile community can significantly improve our fundamental understanding and clarify their potential applications for environmental and water–plastic remediation.

Резюме:

Биодеградацията е съвременен метод за намаляване на пластмасовите отпадъци в околната среда, включващ участието на микробни съобщества с разграждащи пластмасата свойства. Нашето изследване представя ново халофилно съобщество, изолирано от замърсен с пластмаса район в Бургаското езеро, България. В среда, съдържаща 15% натриев хлорид, съобществото може да разгражда значително количество поликапролактон (ПКЛ) като единствен източник на въглерод, както и пластмасите полистирен (ПС) и полипропилен (ПП), макар и в по-малка степен. Общността показва висока хидрофобност и способност да образува биофилм върху ПКЛ топчета, както и висока естеразна активност и значителен капацитет за биоразграждане, както се вижда от измерването на теглото на ПКЛ материала след култивиране в продължение на 4 и 8 седмици. Освен това анализът със сканираща електронна микроскопия (SEM) разкри видими пукнатини, кратери и дупки в повърхността на полимерните частици. Метагеномното проучване разкри, че *Halomonas profundus* доминира в общността с дял от 95,13 %, следван от *Alloalcanivorax venustensis* (2,73 %), *Chromohalobacter marismortui* (0,72 %) и *Halomonas caseinilytica* (0,78 %). Въпреки това повечето видове в общността не са били известни преди това като разграждащи ПКЛ. По този начин изучаването на

разнообразието на халофилното съобщество може значително да подобри фундаменталните ни познания и да изясни потенциалните им приложения за възстановяване на околната среда и водите от пластмаси.

20. Berberov, K., Atanasova, N., Teodosiu-Beleuță, G., **Boyadzieva, I.** Prospecting the biotechnological potential of culturable halophilic bacteria isolated from Provadia salt deposit (Bulgaria) near the oldest salt production and urban complex in Europe. *Extremophiles*, 29(2), 1-19, 2025

Abstract

Halophilic bacteria are recognized as a promising source of novel enzymes and biopolymers with various applications in biotechnology and the industry. In comparison with their mesophilic analogues, halophilic metabolites are stable under extreme conditions typically encountered in the industrial processes. In this study, the biotechnological potential of twenty strains of halophilic bacteria isolated from the Provadia salt deposit, Bulgaria was investigated for the first time. The strains were identified based on the sequencing of the 16S rRNA gene and were assigned to 13 different species falling in the *Bacillota* and *Pseudomonadota* phyla. The majority (90%) of them showed single or combined hydrolytic enzyme activity. Half of the strains (55%) were able to produce between three and eight extracellular hydrolytic enzymes—arabinase, cellulase, gelatinase, glucanase, L-glutaminase, pectinase, and xylanase. Ten strains were able to synthesise exopolysaccharides (EPS) in concentration between 32 and 227 µg/ml. The optimal EPS production kinetics (1.6 ± 0.15 g/l) by *Virgibacillus halodenitrificans* PSZ-34 was systematically investigated for the first time. Three strains also exhibited antimicrobial activity. The present study involved culture-dependant isolation of halophilic bacteria from the Provadia salt deposit and shed more light on their capability to synthesise hydrolytic enzymes and EPS with potential industrial exploitation.

Резюме:

Халофилните бактерии са признати за обещаващ източник на нови ензими и биополимери с различни приложения в биотехнологиите и промишлеността. В сравнение с техните мезофилни аналози, халофилните метаболити са стабилни при екстремните условия, които обикновено се срещат в промишлените процеси. В това изследване е изследван биотехнологичният потенциал на двадесет щамове халофилни бактерии, изолирани от солното находище Провадия, България, е изследван за първи път. Щамовете бяха идентифицирани въз основа на секвенирането на 16S рРНК гена и бяха причислени към 13 различни вида, попадащи в *Bacillota* и *Pseudomonadota*. По-голямата част (90%) от тях показва единична или комбинирана хидролитична ензимна активност. Половината от щамовете (55 %) са в състояние да произвеждат между три и осем извънклетъчни хидролитични ензими - арабиназа, целулаза, желатиназа, глюканаза, L-глутаминаза, пектиназа и ксиланаза. Десет щам са в състояние да синтезират екзополisahариди (ЕПЗ) в концентрация между 32 и 227 µg/ml. Оптималната кинетика на производство на ЕПЗ ($1,6 \pm 0,15$ g/l) от *Virgibacillus halodenitrificans* PSZ-34 е систематично изследвана за първи път. Три щам също проявиха антимикробна активност. Настоящото изследване включва изолиране на халофилни бактерии от солни находища в Провадия в зависимост от културата и хвърля повече светлина върху способността им да синтезират хидролитични ензими и ЕПЗ с потенциална промишлена употреба.

21. Boteva, N., Radchenkova, N., **Bojadzieva, I.**, Stoilova-Disheva, M., Ljutskanova, D., Vasileva-Tonkova, E., Kambourova, M. Diversity and biotechnological potential of extremophiles from Bulgarian extreme niches. The jubilee book “70th anniversary of the Stephan Angeloff Institute of Microbiology, BAS”, 2017, ISBN:978-954-92882-2-3, 129-140

Abstract

Scientists from Laboratory of Extremophilic Bacteria in collaboration with scientists from the sections Microbial Genetics and Microbial Biochemistry in last five years concentrated their efforts on the investigation of several types of extremophiles, including

thermophilic microorganisms inhabiting hot springs in Bulgaria, psychrophilic oligotrophs living in Magura cave, and halophiles from Bulgarian saline niches. Diversity of bacteria and archaea habituating Bulgarian extreme niches was studied and a large number of presented taxa belonging to about half of the recognized bacterial phyla was observed. Significant part of the retrieved 16S rRNA sequences from Bulgarian extreme niches referred as new, some of them showed more than 10% divergence from the closest phylogenetic neighbor, suggesting the existence of new taxa of at least genus level. Together with a characterization of bacterial and archaeal diversity by culture independent approach the experiments on cultivation of Archaea strains habituating Bulgarian hot springs. During last five year period study of exopolysaccharides from extremophiles was initiated. Good bacterial producers were isolated and unusual properties of the synthesized EPSs were established. The addition of the EPS in cosmetic cream results in increased foaming capacity and foam stability, enhanced mechanical hysteresis, higher viscosity of the creams and facilitated coating on skin.

Резюме:

През последните пет години учените от лаборатория Екстремофилни бактерии в сътрудничество с учени от секциите Микробна генетика и Микробна Биохимия са изследвали няколко вида екстремофили – термофилни микроорганизми, обитаващи горещи извори в България, психрофилни олиготрофи, обитаващи пещерата Магурата и халофили от български солени ниши. Установено беше значително разнообразие от бактерии и археи в българските екстремни ниши с голям брой представени таксони, принадлежащи към половината от признатите бактериални типове. Значителна част от идентифицираните 16S рРНК секвенции от български екстремни ниши бяха определени като нови, като някои от тях показаха повече от 10% разлика с най-близкородствените секвенции, което предполага съществуването на нов таксон на ниво най-малко род. Едновременно с характеризирането на бактериалното и археално разнообразие чрез културално независими подходи бяха инициирани експерименти върху култивирането на археални щамове от български горещи извори. През последните пет години беше иницирано изследване на екзополisahариди от екстремофили. Изолирани бяха

добри бактериални продуценти и бяха установени необичайни свойства на синтезираните екзополимери. Добавянето на ЕПЗ в козметичен крем води до повишен капацитет на разпенване и стабилност на пяната, подобрен механичен хистерезис, по-висок вискозитет на кремове и улеснено покритие върху кожата.

22. Kambourova, M., Radchenkova, N., **Bojadzieva, I.**, Atanasova, N. Biotchnological significance of thermophilic and halophilic bacteria, isolated from Bulgarian extreme niches. The jubilee book 75th anniversary of the Stephan Angeloff institute of Microbiology Bulgarian Academy of Sciences, 22-32, 2022

Abstract

Extreme niches represent untapped reservoirs of microorganisms, enzymes, and bio molecules for different industrial applications. The impact of thermophilic and halophilic microorganisms to degrade different plastics was an object of the current work. The thermophilic community isolated from Marikostinovo hot spring was able to degrade 100% of polycaprolactone (PCL). The first bacilli representative, *Brevibacillus thermoruber* strain 7, was isolated from this community as an effective PCL degrader. Lye and water mud from Atanasovsko ezero, Burgas salterns were enriched for 2 weeks in a mineral salt medium provided with four synthetic plastics, polycaprolactone, polyvinyl alcohol (PVA), polystyrene (PS), and polypropylene (PP). Metagenomic analysis of a halophilic community cultivated in a medium with PCL showed lower phylogenetic diversity and a sharp rise of *Gammaproteobacteria* 16S rRNA sequences. Among the isolated producers of industrially important enzymes, the thermophilic bacterium *Anoxybacillus gonensis* strain 357 synthesized a high level of pectinase for only 48 h. The enzyme was active at high temperatures and alkalic pH. Optimization of agitation and aeration in a bioreactor for exopolymer production by *Chromohalobacter canadensis* 28 resulted in a several-fold yield increase. When this strain was cultivated in continuous cultures its productivity drastically increased and the degree of the polymer purity was higher. The emulsification activity of EP exceeded that of trade hydro colloids xanthan, guar gum, and cellulose. A good synergism between EP and commercial cellulose proved its potential exploration as an enhancer of emulsifying properties of trade emulsions.

Резюме:

Екстремните ниши представляват неизследвани резервоари от микроорганизми, ензими и биомолекули с потенциал за различни индустриални приложения. Настоящото изследване разглежда въздействието на термофилни и халофилни микроорганизми върху разграждането на различни видове пластмаси. Термофилното съобщество, изолирано от горещия извор в Марикостиново, разгражда 100% от поликапролактона (ПКЛ). Първият представител от рода на бацилите, *Brevibacillus thermoruber* щам 7, бе изолиран от това съобщество като способен да разгражда ПКЛ. Луга и кал от Атанасовско езеро, солниците в Бургас, бяха инкубирани в продължение на две седмици в минерална солна среда, обогатена с четири синтетични пластмаси – поликапролактон (ПКЛ), поливинилов алкохол (ПВА), полистирен (ПС) и полипропилен (ПП). Метагеномният анализ на халофилното съобщество, култивирано в среда с ПКЛ, показва по-ниско филогенетично разнообразие и рязко увеличение на 16S rRNA последователностите на *Gammaproteobacteria*. Сред изолираните продуценти на индустриално важни ензими, термофилната бактерия *Anoxybacillus gonensis* щам 357 синтезира високо количество пектиназа само за 48 часа. Ензимът бе активен при високи температури и алкално рН. Оптимизирането на разбъркването и аерацията в биореактор за продукцията на екзополимер от *Chromohalobacter canadensis* щам 28 доведе до многократно повишение на добива. При култивиране в непрекъснати култури продуктивността на щама рязко се увеличи, а степента на чистота на полимера бе по-висока. Емулгиращата активност на екзополимера надмина тази на търговски хидроколоиди като ксантан, гуарова гума и целулоза. Добрият синергизъм между екзополимера и търговската целулоза доказва потенциала му за използване като усилвател на емулгиращите свойства на търговски емулсии.

23. Kambourova, M, Radchenkova, N, Tomova, I, **Bojadjieva**. Thermophiles as a Promising Source of Exopolysaccharides with Interesting Properties. Biotechnology of

Abstract

Thermophilic niches offer diversity of prokaryotic microorganisms enormous part of which is still unknown. Thermophiles represent a vast natural resource of various bioactive compounds, among which exopolysaccharides (EPSs) attracted major interest and attention in last two decades due to the significant variety in their structural and functional properties despite of the limited knowledge in the field. Thermophilic EPS producers were isolated from both, *Bacteria* (*Thermotoga*, *Thermus*, *Bacillus*, *Geobacillus*, *Brevibacillus*, *Aeribacillus*) and *Archaea* (*Thermococcus*, *Sulfolobus*) domains. Advantages in using thermophilic processes for EPS production and potential use of the synthesized EPSs are discussed. Their biotechnologically interesting properties, like high molecular weight, stability of their molecules, good synergism with other hydrocolloids, biological activity against cytotoxic compounds, antiviral and immunostimulating activities determine their possible future applications.

Резюме:

Термофилните ниши предлагат разнообразие от прокариотни микроорганизми, огромна част от които все още е неизвестна. Термофилите представляват богат природен ресурс от различни биоактивни съединения, сред които екзополisahариди (ЕПЗ) привличат голям интерес и внимание през последните две десетилетия поради значителното разнообразие в техните структурни и функционални свойства, въпреки ограничените познания в областта. Термофилните продуценти на ЕПЗ бяха изолирани както от редица бактериални родове (*Thermotoga*, *Thermus*, *Bacillus*, *Geobacillus*, *Brevibacillus*, *Aeribacillus*), така и от археални (*Thermococcus*, *Sulfolobus*). Обсъдени бяха предимствата при използването на термофилни процеси за производство на ЕПЗ и потенциалното използване на синтезираните ЕПЗ. Техните биотехнологично интересни свойства, като високо молекулно тегло, стабилност на техните молекули, добър синергизъм с други хидроколоиди, биологична активност срещу цитотоксични съединения,

антивирусни и имуностимулиращи дейности определят възможните им бъдещи приложения.

