Списък с резюмета на български и английски език на научните публикации

на гл. ас. д-р Жени Георгиева Митева –Сталева

за участие в конкурс за доцент по направление 4.3. Биологически науки (микробиология – микология) за нуждите на лаборатория Биоразнообразие и молекулярна биология на микромицети, департамент Микология,

Институт по микробиология „Стефан Ангелов“ – БАН

Обявен в Държавен вестник бр.55 от 08.07.2025

Група от показатели В

1. Nikolov, A.; Dobreva, L.; Danova, S.; **Miteva-Staleva, J.**; Krumova, E.; Rashev, V.; Vilhelmova-Ilieva, N.; Tsvetanova, L.; Barbov, B. Antimicrobial geopolymer paints based on modified natural zeolite. *Case Stud. Constr. Mater.* **2023**, *19*, e02642. https://doi.org/10.1016/j.cscm.2023.e02642. IF (Web of Science):6.2 Q1, не оглавява ранглистата (Scopus)

Abstract. Many antimicrobial coatings deliver a peak release of antimicrobial agent at an early age, after which they lost antimicrobial activity over time. In the present study a novel geopolymer paints with long term antimicrobial activity were developed based on natural zeolite modified with silver and copper ions. The obtained geopolymer paints were applied by brushing on concrete, ceramic, gypsum paperboard and steel. The coating was characterized by excellent adhesive strength and hiding properties. The long-term antimicrobial effect was evaluated by accelerated aging in carbonation chamber. Microstructural changes were analyzed by powder X-ray diffraction and Fourier transformed infrared spectroscopy. Cytotoxicity, antibacterial, antifungal and virucidal properties were investigated on raw and carbonated geopolymer paints. Geopolymer paints based on modified natural zeolite seems promising antimicrobial coating material that can be implemented in the global fight against the spread of diseases and pathogens.

Резюме. Много антимикробни покрития осигуряват освобождаване на антимикробен агент в ранен етап, след което с течение на времето губят активността си. В настоящото изследване са разработени нови геополимерни бои с дълготрайна антимикробна активност на базата на естествен зеолит, модифициран със сребърни и медни йони. Получените геополимерни бои са нанесени чрез четка върху бетон, керамика, гипсов картон и стомана. Покритието се характеризира с отлична адхезионна здравина и покривност. Дългосрочният антимикробен ефект беше оценен чрез ускорено стареене в карбонизационна камера. Микроструктурните промени бяха анализирани чрез прахова рентгенова дифракция и инфрачервена спектроскопия с Фурие трансформация. Цитотоксичността, антибактериалните, противогъбните и антивирусните свойства бяха изследвани върху

необработени и карбонизирани геополимерни бои. Геополимерните покрития, базирани на модифициран природен зеолит, се очертават като обещаващ антимикробен материал с потенциал за приложение в глобалната борба срещу разпространението на болести и патогени.

2. Abrashev, R.; Krumova, E.; Petrova, P.; Eneva, R.; Dishliyska, V.; Gocheva, Y.; Engibarov, S.; **Miteva-Staleva, J.**; Spasova, B.; Kolyovska, V.; Angelova, M. Glucose catabolite repression participates in the regulation of sialidase biosynthesis by Antarctic strain *Penicillium griseofulvum* P29. *J. Fungi* **2024**, *10*, 241. https://doi.org/10.3390/jof10040241., JCR-IF (Web of Science):4.2 Q1, не оглавява ранглистата (Scopus)

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 (невроаминидази) катализират отстраняването на крайните остатъци на сиалова киселина от гликопротеините. Новите ензими, изолирани от неклинични източници, представляват все по-голям интерес по отношение на приложението им в хранителната и фармацевтичната промишленост. Целта на настоящото изследване е да се оцени участието на въглеродната катаболитна репресия в регулацията на биосинтезата на температурно-чувствителна сиалидаза от психотолерантния щам *Penicillium griseofulvum* P29, изолиран от Антарктида. Наличието на глюкоза инхибира сиалидазната активност в растящи и нерастящи мицети по дозозависим и времезависим начин. Подобен репресивен ефект бе установен и при добавяне на малтоза и захароза. Заместването на глюкоза с глюкозо-6-фосфат също индуцира катаболитна репресия. Добавянето на цАМФ доведе до частично потискане на синтеза на сиалидаза. Катаболитната репресия при психотолерантния щам *P. griseofulvum* P29 не показа зависимост от температурата. Сиалидазата беше подложена на глюкозна репресия както при 10 °C, така и при 25 °C. Флуоресцентният анализ с 4MU-Neu5Ac за определяне на ензимната активност при нарастващи концентрации на глюкоза, доказа, че катаболитната репресия може да има регулаторна роля в производството на сиалидаза. Експериментите с RT-PCR в реално време

показаха, че генът за сиалидаза е подложен на глюкозна репресия. Доколкото ни е известно, това е първият доклад, в който се изследва ефектът на катаболитната репресия върху температурно-чувствителна сиалидаза, продуцирана от антарктически щам.

3. Yovchevska, L.; **Miteva-Staleva, J.**; Dishliyska, V.; Stoyancheva, G.; Gocheva, Y.; Abrashev, R.; Spasova, B.; Angelova, M.; Krumova, E. Response to salt stress of the halotolerant filamentous fungus *Penicillium chrysogenum* P13. *Molecules* **2025**, *30*, 61196. https://doi.org/10.3390/molecules30061196. SJR (Scopus):0.74, JCR-IF (Web of Science):4.2 Q2 (Scopus)

Abstract. In recent years, there has been increasing interest in the study of extremophilic microorganisms, which include halophiles and halotolerants. These microorganisms, able to survive and thrive optimally in a wide range of environmental extremes, are polyextremophiles. In this context, one of the main reasons for studying them is to understand their adaptative mechanisms to stress caused by extreme living conditions. In this paper, a fungal strain Penicillium chrysogenum P13, isolated from saline soils around Pomorie Lake, Bulgaria, was used. The effect of elevated concentrations of sodium chloride on the growth and morphology as well as on the physiology of the model strain was investigated. P. chrysogenum P13 demonstrated high tolerance to NaCl, showing remarkable growth in liquid and agar media. In order to establish the relationship between salt- and oxidative stress, changes in the cell biomarkers of oxidative stress, such as oxidatively damaged proteins, lipid peroxidation, and levels of reserve carbohydrates of the studied strain were evaluated. The involvement of antioxidant enzyme defense in the adaptive strategy of the halotolerant strain against elevated NaCl concentrations was investigated.

Резюме. През последните години се наблюдава нарастващ интерес към изследването на екстремофилни микроорганизми, включително халофилни и халотолерантни видове. Тези микроорганизми, способни да оцеляват и да се развиват оптимално в широк диапазон от екстремни условия на околната среда, се определят като полиекстремофили. В този контекст една от основните причини за изучаването им е да се разберат адаптивните механизми към стрес, причинен от екстремни условия на живот. В настоящото проучване беше включен щамът *Penicillium chrysogenum* P13, изолиран от засолени почви около Поморийско езеро, България. Изследван е ефектът на повишените концентрации на натриев хлорид върху растежа, морфологията и физиологичните характеристики на моделния щам. *P. chrysogenum* P13 демонстрира висока толерантност към NaCl, като запази интензивен растеж в течна и твърда агарова среда. С цел да се установи връзката между солевия и оксидативния стрес, бяха анализирани промените в биомаркерите на оксидативен стрес (оксидативно увредени протеини, липидна пероксидация и нива на резервни въглехидрати). Изследвано беше участието на антиоксидантната ензимна защита в адаптивната стратегия на халотолерантния щам срещу повишените концентрации на NaCl.

4. Koleva, Z.; Abrashev, R.; Angelova, M.; Stoyancheva, G.; Spassova, B.; Yovchevska, L.; Dishliyska, V.; **Miteva-Staleva, J.**; Krumova, E. A novel extracellular catalase produced by the Antarctic filamentous fungus *Penicillium rubens* III11-2. *Fermentation* **2024**, *10*, 1., JCR-IF (Web of Science):3.7 Q2 (Scopus)

Abstract. Catalase (CAT) is an enzyme involved in the first line of cellular antioxidant defense. It plays a key role in the protection of a wide range of Antarctic organisms against cold stress. Extracellular catalase is very rare and data on it are extremely scarce. The aim of the present study was to select an efficient producer of extracellular catalase from amongst Antarctic filamentous fungi. Sixty-two Antarctic filamentous fungal strains were investigated for their potential ability to synthesize intracellular and extracellular CAT. The Antarctic strain Penicillium rubens III11-2 was selected as the best producer of extracellular catalase. New information on the involvement of the extracellular antioxidant enzymes superoxide dismutase and CAT in the response of filamentous fungi against low-temperature stress was obtained. An efficient scheme for the purification of CAT from culture fluid was developed. An enzyme preparation with high specific activity (513 U/mg protein) was obtained with a yield of 19.97% and a purification rate of 98.4-fold. The purified enzyme exhibited maximal enzymatic activity in the temperature range of 5–40 °C and temperature stability between 0 and 30 °C, therefore being characterized as temperature sensitive. To our knowledge, this is the first purified extracellular cold active catalase preparation from Antarctic filamentous fungi.

Резюме. Каталазата (КАТ) е ензим, участващ в първата линия на клетъчната антиоксидантна защита. Играе ключова роля в защитата на широк спектър от антарктически организми срещу нискотемпературен стрес. Извънклетъчната каталаза се среща много рядко, а наличните данни за нея са крайно оскъдни. Целта на настоящото изследване беше да се селектира ефективен продуцент на извънклетъчна каталаза сред антарктическите филаментозни гъби. Шестдесет и два щама антарктически филаментозни гъби бяха изследвани за потенциалната им способност да синтезират вътреклетъчна и извънклетъчна каталаза. Антарктическият щам *Penicillium rubens* III11-2 беше избран като най-добър продуцент на извънклетъчна каталаза. Получена беше нова информация за участието на извънклетъчните антиоксидантни ензими супероксиддисмутаза и КАТ в клетъчния отговор на филаментозните гъби срещу нискотемпературен стрес. Разработена е ефективна схема за пречистване на КАТ от културална течност. Получен е ензимен препарат с висока специфична активност (513 U/mg протеин) с добив от 19,97% и степен на пречистване 98,4 пъти. Пречистеният ензим проявява максимална каталитична активност в температурния диапазон 5-40 °C и температурна стабилност между 0 и 30 °C, поради което се характеризира като температурно-чувствителен. Доколкото ни е известно, това е първият пречистен извънклетъчен температурно-чувствителен каталазен препарат от антарктически филаментозни гъби.

5. Benkova, D.; Dishliyska, V.; **Miteva-Staleva, J.**; Kostadinova, A.; Staneva, G.; El-Sayed, K.; Elshoky, H.A.; Krumova, E. CS and ZnO nanoparticles as fungicides against potato fungal pathogens *Alternaria solani* and *Fusarium solani*. Mechanism underlining their antifungal activity. *Proc. Bulg. Acad. Sci.* **2024**, *77*, 986–996. https://doi.org/10.7546/CRABS.2024.07.05. JCR-IF (Web of Science):0.3 Q3 (Scopus)

Abstract. Fusarium solani (F. solani) and Alternaria solani (A. solani) are among the most destructive pathogenic fungi affecting potatoes, causing significant crop losses in both field and post-harvest conditions. Current control relies heavily on synthetic fungicides which pose serious environmental and health risks. Therefore, there is a growing need to find efficient and environmentally friendly alternatives to combat fungal infections in potatoes. This study offers chitosan (CS) and zinc oxide (ZnO) nanoparticles (NPs) as potential fungicides against A. solani and F. solani. We evaluated their antifungal properties and elucidated the mechanism underlining their activity. Our results revealed that both CS and ZnO NPs exhibited pronounced antifungal activity against the two pathogenic strains by effectively inhibiting the mycelium growth. Furthermore, we discovered that the activity of the NPs involved the induction of oxidative stress in fungal cells and changes in the molecular organization of their membranes.

Резюме. *Fusarium solani* (*F. solani*) и *Alternaria solani* (*A. solani*) са сред най-разрушителните патогенни гъби, засягащи картофите, като причиняват значителни загуби на реколта както на полето, така и след прибиране. Настоящите методи за контрол се основават в голяма степен на синтетични фунгициди, които представляват сериозен риск за околната среда и човешкото здраве. Това обуславя необходимостта от намиране на ефикасни и екологосъобразни алтернативи за борба с гъбните инфекции по картофите. В настоящото изследване се предлага използването на наночастици от хитозан (CS) и цинков оксид (ZnO) като потенциални фунгициди срещу *A. solani* и *F. solani*. Оценени са техните противогъбни свойства и е изяснен механизмът, който е в основата на тяхната активност. Получените резултати показаха, че както хитозан, така и ZnO наночастици проявяват изразена противогъбна активност срещу двата патогенни щама, като ефективно потискат растежа на мицела. Допълнително беше установено, че активността на наночастиците е свързана с индукция на оксидативен стрес в гъбните клетки и промени в молекулярната организация на клетъчните им мембрани.

6. Miteva-Staleva, J.; Eneva, R.; Hubenov, V. Fungi and their potential for biofuels production (review). *Bulgar. J. Agric. Sci.* **2022**, *28*, 265–270.IF 0.5 JR (Scopus):0.25 Q3

Abstract. World production of wheat, rice, sugar cane, vegetables and corn has reached approximately 62 billion tons per year. Over 3,48 billion tons per year agricultural wastes are accumulated. Improper disposal of agricultural waste is one of the causes of environmental pollution. Biodegradation of plant residues for biofuel production has become a modern alternative

for the treatment of agricultural waste. Fungi producing lignocellulolytic enzymes include species of Ascomycetes, Basidiomycetes, and several anaerobic species that break down cellulose in the gastrointestinal tract of ruminants and some halophilic fungi. Anaerobic gut fungi have attracted huge interest as the most active cellulose degraders in nature. Some industrial production processes are carried out in the presence of high concentrations of NaCl. In such conditions, halophilic fungi with cellulase activity are already reported to be used in direct production of ethanol and butanol.

Резюме. Световното производство на пшеница, ориз, захарна тръстика, зеленчуци и царевица достига приблизително 62 милиарда тона годишно. В резултат на това се натрупват над 3,48 милиарда тона земеделски отпадъци годишно. Неправилното обезвреждане на растителните отпадъци е една от причините за замърсяването на околната среда. Биодеградацията на растителна биомаса с цел производство на биогорива се превърна в съвременна алтернатива за третиране на селскостопански отпадъци. Гъбите, продуциращи лигноцелулозни ензими, включват представители на Ascomycetes, Basidiomycetes, както и няколко анаеробни вида, които разграждат целулозата в стомашно-чревния тракт на преживни животни, както и някои халофилни гъби. Анаеробните гъби от храносмилателния тракт предизвикват голям интерес като най-активно разграждащи целулоза в природата. Някои индустриални производствени процеси протичат в присъствието на високи концентрации на NaCl. При такива условия вече се съобщава за прилагане на халофилни гъби с целулазна активност за директно производство на етанол и бутанол.

Група от показатели Г

7. Krumova, E.; Benkova, D.; Stoyancheva, G.; Dishliyska, V.; **Miteva-Staleva, J.**; Kostadinova, A.; Ivanov, K.; El-Sayed, K.; Staneva, G.; Elshoky, H.A. Exploring the mechanism underlying the antifungal activity of chitosan-based ZnO, CuO, and SiO_2 nanocomposites as nanopesticides against *Fusarium solani* and *Alternaria solani*. *Int. J. Biol. Macromol.* **2024**, *268*, 1., JCR-IF (Web of Science):8.2

Abstract. Chitosan-based nanocomposites (CS NCs) are gaining considerable attention as multifaceted antifungal agents. This study investigated the antifungal activity of NCs against two phytopathogenic strains: Fusarium solani (F. solani) and Alternaria solani (A. solani). Moreover, it sheds light on their underlying mechanisms of action. The NCs, CS-ZnO, CS-CuO, and CS-SiO2, were characterized using advanced methods. Dynamic and electrophoretic light scattering techniques revealed their size range (60–170 nm) and cationic nature, as indicated by the positive zeta potential values (from +16 to +22 mV). Transmission electron microscopy revealed the morphology of the NCs as agglomerates formed between the chitosan and oxide components. X-ray diffraction patterns confirmed crystalline structures with specific peaks indicating their

constituents. Antifungal assessments using the agar diffusion technique demonstrated significant inhibitory effects of the NCs on both fungal strains (1.5 to 4-fold), surpassing the performance of the positive control, nystatin. Notably, the NCs exhibited superior antifungal potency, with CS-ZnO NCs being the most effective. A. solani was the most sensitive strain to the studied agents. Furthermore, the tested NCs induced oxidative stress in fungal cells, which elevated stress biomarker levels, such as superoxide dismutase (SOD) activity and protein carbonyl content (PCC), 2.5 and 6-fold for the most active CS-CuO in F. solani respectively. Additionally, they triggered membrane lipid peroxidation up to 3-fold higher compared to control, a process that potentially compromises membrane integrity. Laurdan fluorescence spectroscopy highlighted alterations in the molecular organization of fungal cell membranes induced by the NCs. CS-CuO NCs induced a membrane rigidifying effect, while CS-SiO2 and CS-ZnO could rigidify membranes in A. solani and fluidize them in F. solani. In summary, this study provides an in-depth understanding of the interactions of CS-based NCs with two fungal strains, showing their antifungal activity and offering insights into their mechanisms of action. These findings emphasize the potential of these NCs as effective and versatile antifungal agents.

Резюме. Нанокомпозитите на основата на хитозан привличат научен интерес като многофункционални антифунгални средства. В настоящото изследване е оценена противогъбната активност на нанокомпозитите срещу два фитопатогенни щама: *Fusarium solani (F. solani)* и *Alternaria solani (A. solani*), като са изяснени основните механизми на тяхното действие. Чрез съвременни аналитични методи са изследвани нанокомпозитите CS-ZnO, CS-CuO и CS-SiO2. Техниките за динамично и електрофоретично разсейване на светлината разкриха техния размер в диапазона 60-170 nm и катионната им природа, като показаха положителните стойности на дзета-потенциала (от +16 до +22 mV). Трансмисионната електронна микроскопия разкри морфологията на нанокомпозитите като агломерати, образувани между компонентите хитозан и метален оксид. Рентгеновата дифракция потвърди кристалната структура на нанокомпозитите чрез характерни пикове, съответстващи на съставните компоненти. Оценката на противогъбните свойства с помощта на агар-дифузионната техника показа значителен инхибиращ ефект на нанокомпозитите върху двата щама (1,5 до 4 пъти), надхвърляйки ефективността на положителната контрола - нистатин. Забележително е, че нанокомпозитите показаха по-добра противогъбна активност, като CS-ZnO NCs бяха най-ефективни. *A. solani* се оказа най-чувствителният щам към изследваните агенти. Тестваните нанокомпозити индуцираха оксидативен стрес в гъбните клетки, което повиши нивата на стрес биомаркерите, като например активността на супероксиддисмутазата (СОД) и съдържанието на карбонилни групи в протеините, съответно 2,5 и 6 пъти за най-активния CS-CuO при *F. solani*. Установено е също индуциране на 3 пъти по-висока липидна пероксидация на мембраните в сравнение с контролата - процес, който потенциално нарушава целостта на мембраните. Лаурдан флуоресцентната спектроскопия подчерта промените в молекулната организация на клетъчните мембрани на гъбите. CS-CuO NCs предизвикват втвърдяване на мембраните, докато CS-SiO_2 и CS-ZnO проявяват различна динамика: втвърдяване при *A. solani* и втечняване при *F. solani*. В заключение, това изследване предоставя задълбочено разбиране

за взаимодействията между нанокомпозити на базата на хитозан и два фитопатогенни гъбни щама, като доказва тяхната ефективна противогъбна активност и разкрива механизмите на тяхното действие. Резултатите подчертават потенциала на тези нанокомпозити като ефективни и многообещаващи противогъбни средства**.**

8. Stoyancheva, G.; Dishliyska, V.; **Miteva-Staleva, J.**; Kostadinova, N.; Abrashev, R.; Angelova, M.; Krumova, E. Sequencing and gene expression analysis of catalase genes in Antarctic fungal strain *Penicillium griseofulvum* P29. *Polar Biol.* **2022**. https://doi.org/10.1007/s00300-021-03001-4., JCR-IF (Web of Science):2.31 Q1, не оглавява ранглистата (Scopus)

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

Резюме. Каталазите са ключови антиоксидантни ензими в аеробните организми, включително гъбите, които играят съществена роля в неутрализирането на оксидативния стрес чрез детоксикация на клетъчния водороден пероксид. Филаментозните гъби притежават голям брой каталази, които са обект на нарастващ научен интерес. Въпреки многобройните изследвания върху каталазните ензими, данните за температурно-чувствителните каталази са изключително оскъдни. Антарктическият щам *Penicillium griseofulvum* беше определен като продуцент на температурно-чувствителна каталаза. Култивирането при температура, по-ниска от оптималната, доведе до засилен синтез на ензима като отговор на индуцирания от ниска температура оксидативен стрес. Целта на настоящото изследване беше да се открият и секвенират гените, кодиращи ензима каталаза, в *P. griseofulvum* P29, и да се определи тяхната роля в оцеляването на клетките при ниски температури. Освен това беше анализирано нивото на експресия на всеки от тези гени при нискотемпературен стрес. С помощта на PCR и секвениране беше потвърдено наличието на пет каталазни гена. Нивата на експресия бяха количествено определени с обратна

транскрипция на количествен PCR в реално време (RT-PCR). Резултатите показаха, че четири от гените се индуцират при ниска температура като отговор на оксидативен стрес. Най-силно беше изразена експресията на гена cat1, кодиращ ензима каталаза-пероксидаза. Настоящите данни показват, че тези четири гена и главно cat1 участват активно в адаптивния отговор на клетката към студов стрес

9. Krumova, E.; Abrashev, R.; **Miteva-Staleva, J.**; Pashova, S.; Angelova, M. Regulation of superoxide dismutase synthesis in *Humicola lutea* cells under Cu^{2+} stress conditions. *Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci.* **2013**, *66*, 525–532., JCR-IF (Web of Science):0.3 Q2 (Scopus)

Abstract. The superoxide dismutase (SOD) is the first enzyme to respond against oxygen radicals and to offer the greatest response to oxidative stress. The great interest in SODs is a result of their important physiological role and therapeutic potential. The fungal strain Humicola lutea 103 has been selected as an effective producer of Cu/Zn-SOD exhibiting protective effect against influenza virus infection and myeloid Graffi tumour. The present paper studies the role of control mechanisms induction and catabolite repression on SOD synthesis under copper stress conditions. Cu ions cause rapid and profound induction of enzyme activity by dose- and time-dependent manner. The deinduction experiments also demonstrate the induction model of SOD synthesis. The results suggest that SOD synthesis in the fungal strain H. lutea 103 treated with Cu ions is a subject to catabolite repression.

Резюме. Супероксид дисмутазата (СОД) е първият ензим, който реагира срещу кислородните радикали и осигурява най-голяма клетъчна защита срещу оксидативен стрес. Повишеният научен интерес към СОД ензимите се дължи на тяхната съществена физиологична роля и потенциал за терапевтична употреба. Щам *Humicola lutea* 103 е избран като ефективен продуцент на ензима Cu/Zn-СОД, проявяващ защитен ефект срещу инфекция с грипен вирус и миелоиден тумор от тип Графи. Настоящото изследване разглежда ролята на индукционните контролни механизми и катаболитната репресия върху синтеза на СОД при условия на Cu^{2+} стрес. Установено е, че медните йони предизвикват бърза индукция на ензимната активност по дозо- и времезависим начин. Експериментите за деиндукция също подкрепят модела на индукционно регулиране на синтеза на СОД. Резултатите показват, че синтезът на СОД в щам *H. lutea* 103, третиран с Cu^{2+}, е обект на катаболитна репресия.

10. Yovchevska, L.; Gocheva, Y.; Stoyancheva, G.; **Miteva-Staleva, J.**; Dishliyska, V.; Abrashev, R.; Stamenova, T.; Angelova, M.; Krumova, E. Halophilic fungi—features and potential

applications. *Microorganisms* **2025**, *13*, 175. https://doi.org/10.3390/microorganisms13010175.., SJR (Scopus):0.94, JCR-IF (Web of Science):4.1 Q2 (Scopus)

Abstract. Extremophiles are of significant scientific interest due to their unique adaptation to harsh environmental conditions and their potential for diverse biotechnological applications. Among these extremophiles, filamentous fungi adapted to high-salt environments represent a new and valuable source of enzymes, biomolecules, and biomaterials. While most studies on halophiles have focused on bacteria, reports on filamentous fungi remain limited. This review compiles information about salt-adapted fungi and details their distribution, adaptation mechanisms, and potential applications in various societal areas. Understanding the adaptive mechanisms of halophilic fungi not only sheds light on the biology of extremophilic fungi but also leads to promising biotechnological applications, including the development of salt-tolerant enzymes and strategies for bioremediation of saline habitats. To fully realize this potential, a comprehensive understanding of their ecology, diversity and physiology is crucial. In addition, understanding their survival mechanisms in saline environments is important for the development of astrobiology. The significant potential of applications of halophilic fungi is highlighted.

Резюме. Екстремофилите представляват обект на значителен научен интерес, поради уникалните си механизми на адаптация към суровите условия на околната среда и широкия си потенциал за разнообразни биотехнологични приложения. Сред екстремофилните микроорганизми филаментозните гъби, адаптирани към среда с високо съдържание на NaCl, се очертават като нов и ценен източник на ензими, биомолекули и биоматериали. Въпреки че по-голямата част от изследванията върху халофилни организми са фокусирани върху бактерии, данните за филаментозни гъби остават ограничени. Настоящият обзор обобщава наличната информация за халофилните гъби, като разглежда тяхното разпространение, механизми на адаптация и потенциални приложения в различни обществени области. Разбирането на молекулните и физиологични механизми, стоящи в основата на адаптацията към хиперсолени условия, не само разкрива нови аспекти от биологията на екстремофилните гъби, но и отваря възможности за перспективни биотехнологични приложения, включително разработване на солеустойчиви ензими и стратегии за биоремедиация на засолени местообитания. Освен това Разкриването на механизмите им за оцеляване в солени среди е важно за развитието на астробиологията. Подчертан е значителният потенциал на приложенията на халофилните гъби.

11. 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. Structural and functional characterization of cold-active sialidase isolated from Antarctic fungus *Penicillium griseofulvum* P29. *Biochem. Biophys. Rep.* **2024**. https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2023.101610., SJR (Scopus):0.55, JCR-IF (Web of Science):4.1 Q2 (Scopus

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 α(2 → 3) sialyl linkages than those containing α(2 → 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. Гъбният щам *Penicillium griseofulvum* P29, изолиран от почвена проба, събрана от залива Terra Nova Bay, Антарктида, беше идентифициран като ефективен продуцент на сиалидаза. Настоящото изследване е фокусирано върху пречистването и структурната характеристика на ензима. Чрез анионобменна хроматография на Q-Sepharose и последваща високоефективна течна хроматография (FPLC) върху колона Mono Q ензимът P29 беше пречистен. Определената молекулна маса на пречистения ензим е 40 kDa според SDS-PAGE **и** 39 924,40 Da според MALDI-TOF масспектрометричен анализ, като тези стойности корелират добре с теоретичната молекулна маса **(**39 903,75 Da**)** изчислена от аминокиселинната последователност на ензима. Сиалидазата P29 демонстрира температурен оптимум от 37 °C и стабилност при ниски температури, което потвърди нейната температурно чувствителна природа Ензимът показа по-висока активност към α(2→3)-свързани сиалови остатъци в сравнение с α(2→6)-свързаните. Въз основа на определената аминокиселинна последователност и 3D структурното моделиране е представен 3D модел на сиалидаза P29 и са обяснени свойствата на ензима. Приложена е флуоресцентна спектроскопия за проследяване на конформационната стабилност на ензима, като 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. Пречистеният температурно-чувствителен ензим е единствената сиалидаза, продуцирана от антарктически гъби и характеризирана до момента.

12. Krumova, E.; Andreyinski, N.; Abrashev, R.; Stoyancheva, G.; Kostadinova, N.; **Miteva-Staleva, J.**; Dishliyska, V.; Spasova, B.; Angelova, M. Comparison of the oxidative stress

response of two *Aspergillus fumigatus* strains isolated from polluted soils against combined heavy metal toxicity. *Geomicrobiol. J.* **2021**. https://doi.org/10.1080/01490451.2021.1897712., SJR (Scopus):0.57, JCR-IF (Web of Science):2.308 Q2 (Scopus)

Abstract. Heavy metal polluted soils are major sources of fungi exhibiting high tolerance toward metal toxicity. These fungi use various defense mechanisms to survive under extreme conditions. But, a little is known about the role of antioxidant response in the fungal tolerance to varied concentrations of mixture of metal ions. The aim of present study was to compare the cell response of two Aspergillus fumigatus strains, isolated from heavily polluted soils, against multi-metal (Cd, Cu, Ni, and Zn ions) treatment. Both strains demonstrated high tolerance to increasing concentrations of multi-metal systems. The data confirmed a relationship between oxidative stress and heavy metal toxicity. The treatment with multi-metal mixture declined fungal growth, glucose uptake and extracellular protein synthesis in a dose-dependent manner. Combination of heavy metal ions in diverse concentrations induced an increase in the levels of carbonylated-damaged proteins and changes in glycogen and trehalose content. Our results showed a distinct profile of antioxidant enzymes. While the SOD activity was stimulated by metal containing solutions, CAT activity tended to decrease. Comparison between both strains revealed that A. fumigatus G showed higher tolerance than A. fumigatus 3-2 with increasing concentrations of multi-metal systems due to more active antioxidant defence.

Резюме. Замърсените с тежки метали почви са основен източник на гъби, проявяващи висока толерантност към токсичността на тежки метали. Гъбите използват разнообразни защитни механизми, за да оцелеят при екстремни условия. Малко се знае за ролята на антиоксидантния отговор в адаптацията на гъбите към различни концентрации метални йони. Целта на настоящото изследване беше да се сравни клетъчният отговор на два щама *Aspergillus fumigatus*, изолирани от силно замърсени с метали почви, при третиране с тежки метали (Cd, Cu, Ni и Zn). И двата щама демонстрираха висока толерантност към нарастващите концентрации на многокомпонентните метални системи. Получените данни потвърдиха съществуването на връзка между оксидативния стрес и токсичността на тежките метали. Третирането с метални йони доведе до редуциране на гъбния растеж, понижи усвояването на глюкоза и синтеза на извънклетъчни протеини по дозозависим начин. Комбинацията от тежки метали в различни концентрации предизвика повишаване на нивата на карбонилирани протеини и промени в съдържанието на гликоген и трехалоза. Наблюдавани бяха разлики в профила на антиоксидантните ензими- активността на СОД беше стимулирана от разтвори, съдържащи метали, докато активността на КАТ показа тенденция към намаляване. Сравнителният анализ между двата щама показа, че *A. fumigatus* G притежава по-висока толерантност от *A. fumigatus* 3-2у което се обуславя от по-активната антиоксидантна защита.

13. Miteva-Staleva, J.; Stefanova, T.; Krumova, E.; Angelova, M. Growth-phase-related changes in reactive oxygen species generation as a cold stress response in Antarctic *Penicillium* strains. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **2011**, *25*, 4., ISI IF:0.43 Q3 (Web of Science

Abstract. The Free Radical/Oxidative Stress Theory of Aging postulated that the accumulation of damage caused by reactive oxygen species (ROS) was the underlying mechanism by which organisms age. Our previous studies reported that the growth at low temperature caused oxidative stress events in Antarctic strains, including enhanced ROS generation. However, there is no data about age-related differences in cold stress-induced ROS accumulation in microorganisms living permanently in cold environments. The aim of the present paper was to evaluate the growth-phase-related changes in ROS level in two Antarctic strains belonging to different thermal classes, psychrotolerant (Penicillium olsonii p14) and mesophilic (Penicillium waksmanii m12) and the role of cold adaptation in this process. Intact cells and mitochondrial fractions from the middle exponential phase or stationary phase at optimal temperature were exposure to temperature of 6°C and 15°C, respectively. The results demonstrated that the temperature downshift led to a significant induction in the superoxide and H2O2 level in a dose- and growth-phase-dependent manner. Additionally, cold-stress response is not dependent on cold-adaptation of the model strains.

Резюме. Теорията за свободните радикали и оксидативния стрес при стареене постулира, че натрупването на увреждания, причинени от свободни радикали (СР), е основният механизъм, чрез който организмите стареят. Предходни изследвания на нашия екип показаха, че растежът при ниски температури предизвиква оксидативен стрес в антарктически щамове, включително засилено генериране на СР. В литературата липсват данни относно възрастово-обусловените разлики в натрупване на СР, индуцирано от нискотемпературен стрес при микроорганизми, обитаващи перманентно студени среди. Целта на настоящото изследване беше да се оценят промените в нивата на СР в различни фази на растеж при два антарктически щама, принадлежащи към различни термални класове - психотолерантен (*Penicillium olsonii* p14) и мезофилен (*Penicillium waksmanii* m12), както и ролята на температурната адаптация в този процес. Интактни клетки и митохондриални фракции от средната експоненциална фаза и стационарната фаза при оптимална температура бяха изложени на температури съответно 6°C и 15°C. Резултатите показаха, че понижаването на температурата води до значителна индукция в нивото на супероксиден анион и водороден пероксид, като ефекта беше дозо- и фазо зависим спрямо растежната фаза. Допълнително беше установено, че отговорът на нискотемпературен стрес не е пряко зависим от степента на температурна адаптация на моделните щамове.

14. Dishliyska, V.; Stoyancheva, G.; Abrashev, R.; **Miteva-Staleva, J.**; Spasova, B.; Angelova, M.; Krumova, E. Catalase from the Antarctic fungus *Aspergillus fumigatus* I-9—biosynthesis and gene characterization. *Indian J. Microbiol.* **2023**, 1–8. JCR-IF (Web of Science):3 Q3 (Scopus)

Abstract. Extremely cold habitats are a serious challenge for the existing there organisms. Inhabitants of these conditions are mostly microorganisms and lower mycetae. The mechanisms of microbial adaptation to extreme conditions are still unclear. Low temperatures cause significant physiological and biochemical changes in cells. Recently, there has been increasing interest in the relationship between low-temperature exposure and oxidative stress events, as well as the importance of antioxidant enzymes for survival in such conditions. The catalase is involved in the first line of the cells' antioxidant defense. Published information supports the concept of a key role for catalase in antioxidant defense against cold stress in a wide range of organisms isolated from the Antarctic. Data on representatives of micCPcopic fungi, however, are rarely found. There is scarce information on the characterization of catalase synthesized by adapted to cold stress organisms. Overall, this study aimed to observe the role of catalase in the survival strategy of filamentous fungi in extremely cold habitats and to identify the gene encoded catalase enzyme. Our results clearly showed that catalase is the main part of antioxidant enzyme defense in fungal cells against oxidative stress caused by low temperature exposure.

Резюме. Изключително студените местообитания представляват сериозно предизвикателство за обитаващите ги организми. Основни представители са микроорганизмите и нисшите гъби. Въпреки значителния напредък, механизмите на микробна адаптация към екстремни условия все още не са напълно изяснени. Ниските температури предизвикват значителни физиологични и биохимични промени в клетките. През последните години се наблюдава нарастващ интерес към връзката между излагането на ниски температури и индуцирания оксидативен стрес, както ролята на антиоксидантните ензими за преживяемостта на гъбите в такива условия. Каталазата е ключов компонент от първа линия на антиоксидантна защита в клетките. Публикуваните данни подкрепят концепцията за ключовата роля на каталазата в антиоксидантната защита срещу нискотемпературен стрес при широк спектър от организми, изолирани от Антарктида. Същевременно, наличната информация относно каталаза, синтезирана от психрофилни или психротолерантни щамове**,** е крайно оскъдна**.** Настоящото изследване имаше за цел да изясни ролята на ензима каталаза в стратегията за преживяемост на филаментозните гъби в изключително студени местообитания и да се идентифицира генът, кодиращ ензима. Получените резултати убедително показват, че каталазата е основен компонент на антиоксидантната ензимна защита в гъбните клетки срещу оксидативен стрес, причинен от излагане на ниски температури.

15. Mutafova, B.; Krumova, E.; Stoyancheva, G.; Kostadinova, N.; **Miteva-Staleva, J.**; Dishliyska, V.; Nikolova, M.; Angelova, M.; Berkov, S. Microbial transformation of lycorine by *Talaromyces pinophilus* isolated from the rhizosphere of *Leucojum aestivum* L. *Proc. Bulg. Acad. Sci.* **2023**, *76*, 698–706.. JCR-IF (Web of Science):0.329 Q3 (Scopus)

Abstract. In the present study we report on the isolation of 12 strains of filamentous fungi from the rhizosphere of Leucojum aestivum L. (Amaryllidaceae). They were screened for ability to transform the Amaryllidaceae alkaloid lycorine. Gas chromatography-mass spectrometry was applied to analyze the samples. The Talaromyces pinophilus S120 strain was found to transform 19% of lycorine into its 2-oxo-derivative. To the best of our knowledge, this is the first report on transformation of lycorine by a filamentous fungus.

Резюме. В настоящото изследване се съобщава за изолиране на 12 щама филаментозни гъби от ризосферата на *Leucojum aestivum* L. (*Amaryllidaceae*). Изолираните щамове бяха подложени на скрининг за способността им да трансформират алкалоида ликорин от *Amaryllidaceae*. За анализ на пробите беше приложена газова хроматография-свързана с масспектрометрия. Установено бше, че щамът *Talaromyces pinophilus* S120 трансформира 19 % от ликорина в неговия 2-оксо- производен дериват. Доколкото ни е известно, това е първият доклад за трансформация на ликорин от филаментозна гъба.

16. Krumova, E.; Abrashev, R.; Dishliyska, V.; Stoyancheva, G.; Kostadinova, N.; **Miteva-Staleva, J.**; Spasova, B.; Angelova, M. Cold-active catalase from the psychrotolerant fungus *Penicillium griseofulvum*. *J. Basic Microbiol.* **2021**, *61*, 782–794., JCR-IF (Web of Science):2.281 Q3 (Scopus)

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

Резюме. Температурно-чувствителният ензим каталаза (КАТ) предизвиква значителен интерес поради своя широк потенциал за приложение в медицината, индустрията и биотехнологиите. Настоящото изследване разглежда продукцията на температурно-чувствителна КАТ от щама *Penicillium griseofulvum* P29, изолиран от антарктически почви. Оптимизацията на хранителната среда и условията на култивиране повишиха синтезата на ензима. Максималната каталазна активност беше отчетена при ниско съдържание на глюкоза (2%), 10% размер на инокулума, температура 20°C и концентрация на разтворен кислород (РК) 40%. Разработена беше ефективна лабораторна технология, основаваща се

на промяна на нивото на оксидативен стрес чрез увеличаване на РК в биореактора. Използваната стратегия доведе до 1,7-кратно повишаване на общата ензимна активност и 1,4-кратно повишение на максималната ензимна продуктивност. Ензимът беше пречистен и характеризиран. КАТ от *P. griseofulvum* P29 демонстрира максимална активност при приблизително 20 °C и pH 6,0. Термостабилността му се очерта в диапазона между 5°C и 40°C.

17. Dimitrova, L.; Philipov, S.; Zaharieva, M. M.; **Miteva-Staleva, J.**; Popova, M.; Tserovska, L.; Krumova, E.; Zhelezova, G.; Bankova, V.; Najdenski, H. In vivo assessment of acute and subacute toxicity of ethyl acetate extract from aerial parts of *Geum urbanum* L. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **2020**, *35*, 61–73. https://doi.org/10.1080/13102818.2020.1848461.. SJR (Scopus):0.38, JCR-IF (Web of Science):1.632 Q3 (Scopus)

Abstract. Geum urbanum L. is a medicinal plant used from ancient time against gastro-intestinal disorders, bleeding and inflammation of mucous membranes, gums (gingivitis), etc. In our previous works, we demonstrated the antibacterial and antioxidant properties of ethyl acetate (EtOAc) extracts in vitro. The aim of this study was to evaluate the possibility of the EtOAc fraction from aerial parts to provoke acute and subacute toxicity by its internal daily administration (per os) in healthy H- albino male and female mice. We used three concentrations of treatment according to their biological activity potential of application − 20, 70 and 210 mg/kg. All animals were observed and recorded periodically for clinical signs, mortality and changes in their behavior (incl. hypo-activity, aggression, etc.). The body weight was measured at every 5 days up to the end of the experiment (a total 28 days). We studied the biochemical parameters (superoxide anion radical, hydrogen peroxide, superoxide dismutase, lipid peroxidation and damaged proteins in blood plasma and brain) and complete hematological parameters, and the histopathological findings in mouse spleens and Payer's patches. The investigated extract did not show any signs of significant acute and subacute toxicity at the highest applied test-concentration, and therefore, we encouraged its possible application as food additive for various infectious diseases.

Резюме. Geum urbanum L. е лечебно растение, използвано от древността срещу стомашно-чревни разстройства, кървене и възпаление на лигавиците, венците (гингивит) и др. В предходни наши изследвания демонстрирахме in vitro антибактериалните и антиоксидантните свойства на екстракти от етилов ацетат (EtOAc) от растението. Целта на настоящото проучване беше да се оцени възможността EtOAc фракцията от надземни части да предизвика остра и подостра токсичност чрез вътрешното ѝ дневно приложение при здрави мъжки и женски мишки Н-албиноси. Бяха използвани три концентрации на третиране в съответствие с потенциала им за биологична активност на приложение - 20, 70 и 210 mg/kg. Всички животни бяха наблюдавани и периодично записвани за клинични

признаци, смъртност и поведенчески промени (вкл. хипоактивност, агресия и др.). Телесното тегло беше проследявано на всеки 5 дни до края на експерименталния период (общо 28 дни). Анализирани бяха биохимичните параметри (супероксиден анионен радикал, водороден пероксид, супероксид дисмутаза, липидна пероксидация и увредени протеини в кръвната плазма и мозъка) и пълните хематологични параметри, както и хистопатологичните находки в слезката на мишките и плаки на Пейър. Получените резултати показаха, че изследваният екстракт не проявява признаци на значителна остра и подостра токсичност при най-високата приложена тестова концентрация, поради което насърчаваме възможното му приложение като хранителна добавка при различни инфекциозни заболявания.

18. Berkov, S.; Krumova, E.; Stoyancheva, G.; **Miteva-Staleva, J.**; Dishliyska, V.; Kostadinova, N.; Georgieva, L.; Sidjimova, B.; Nikolova, M.; Angelova, M.; Mutafova, B. Amaryllidaceae alkaloids inhibit the growth of endophytic fungi. *Acta Microbiol. Bulg.* **2023**, *39*, 51–58. . SJR (Scopus):0.13 Q4 (Scopus)

Abstract. The chemoecological role of the Amaryllidaceae alkaloids, accumulated in plants from the Amaryllidoideae subfamily (Amaryllidaceae), is poorly studied. These alkaloids are known for their potent pharmacological activities, including anti-acetylcholinesterase (AChE), anti-tumoral, anti-microbial, anti-viral and cytotoxic. In the present work, the ability of some Amaryllidaceae alklaloids to inhibit the growth of endophytic fungi was studied. A total of 115 endophytic fungal strains were isolated from Leucojum aestivum L. growing in geographycally distinct locations. Sixty-five stains, able to grow in laboratory conditions, were identified and classified into 31 species belonging to 11 phylogenetically diverse genera. The fungal species of genera Fusarium, Trichoderma and Talaromyces were predominant. The endophyte species and genera patterns were found to be different among the L. aestivum L. populations and plant organs. Galanthamine, epi - norgalanthamine and lycorine, as well as alkaloid fractions and extracts consisting of homolycorine-, haemanthamine-, tazettine- and Sceletium -type alkaloids as main components exhibited different growth inhibitory effects depending on fungal strain. An extract from Narcissus cv. Hawera, consisting of Sceletium -type alkaloids, showed the most effective and broad-spectrum inhibitory activity against the tested endophytic strains. The results indicate that the Amaryllidaceae alkaloids may play a role in the plant-endophyte interactions.

Резюме. Хемоекологичната роля на алкалоидите от Amaryllidaceae, акумулирани в растения от подсемейство *Amaryllidoideae* (*Amaryllidaceae*), остава слабо проучена. Тези алкалоиди са известни с мощните си фармакологични свойства, включително анти-ацетилхолинестеразни (AChE), антитуморни, антимикробни, антивирусни и цитотоксични. В настоящото изследване е анализирана способността на някои алкалоиди от сем. *Amaryllidaceae* да инхибират растежа на ендофитни гъби. Общо 115 щама ендофитни гъби бяха изолирани от *Leucojum aestivum* L., събирани от различни географски райони. Шестдесет и пет щама, способни да се култивират в лабораторни условия, бяха идентифицирани и класифицирани в 31 вида, принадлежащи към 11 филогенетично

разнообразни рода. Установено беше, че видовете и родовете ендофити се различават в популациите и растителните органи на *L. aestivum* L. Галантаминът, епи-норгалантаминът и ликоринът, както и алкалоидните фракции и екстракти, състоящи се от алкалоиди от хомоликоринов, хемантаминов, тазетинов и скелетиев тип като основни компоненти, проявяваха различни инхибиращи растежа ефекти в зависимост от гъбния щам. Екстрактът от *Narcissus* cv. Hawera, състоящ се от алкалоиди от типа Sceletium, показа най-ефективна и широкоспектърна инхибиторна активност срещу тестваните ендофитни щамове. Получените резултати показаха, че алкалоидите от *Amaryllidaceae* могат да играят роля във взаимодействията между растенията и ендофитите.

19. Nikolov, A.; Dobreva, L.; Danova, S.; **Miteva-Staleva, J.**; Krumova, E.; Rashev, V.; Vilhelmova-Ilieva, N. Natural and modified zeolite clinoptilolite with antimicrobial properties: a review. *Acta Microbiol. Bulg.* **2023**, *39*, 147–161. SJR (Scopus):0.132 Q4 (Scopus)

Abstract. The present review summarizes research on the antimicrobial properties of modified natural zeolite clinoptilolite. The modification of the clinoptilolite is based on its ion exchange features with silver, copper, zinc, or other ions in order to obtain antimicrobial properties. The review includes recent data on pretreatment and preconditioning to increase the effectiveness of ion exchange procedures and obtain a functionalized zeolite. The review covers antibacterial, antifungal, antiviral properties on natural zeolite clinoptilolite.

Резюме. Настоящият обзор обобщава научни данни относно антимикробните свойства на модифициран природен зеолит клиноптилолит. Модификацията на клиноптилолита се основава на йонообменните му свойства със сребърни, медни, цинкови или други йони с цел постигане на антимикробна активност. Обзорът включва последни данни за предварителната обработка и предварителното кондициониране с цел повишаване на ефективността на процедурите за йонообмен и получаване на функционален зеолитен материал. Обхванати са антибактериални, противогъбни и антивирусни свойства на природния зеолит клиноптилолит след модификация, което подчертава неговия потенциал като широкоспектърен антимикробен агент за приложения в медицината, биотехнологиите и екологичната защита.

20. Abrashev, R.; Krumova, E.; Kostadinova, N.; **Miteva-Staleva, J.**; Spasova, B.; Angelova, M. Improvement of superoxide dismutase production by heat shock treatment of *Aspergillus niger* 26. *Comptes Rendus de l'Acad. Bulg. Sci.* **2015**, *68*, 1379–1386.ISI IF:0.284 Q4 (Scopus)

Abstract. The fungal strain Aspergillus niger 26 is an effective producer of the superoxide dismutase (SOD), mainly Cu/Zn-SOD. An improved laboratory technology in 3 L bioreactors was developed. An effective fermentative strategy for SOD synthesis was offered on the basis of the

relationship between heat shock treatment and antioxidant enzyme defense. Transient temperature shock applied for 6 h in the exponential growth phase and subsequent recovery of the optimum temperature resulted in above 2-fold increase in specific SOD activity. Comparison of the kinetic relations (substrate consumption and product formation parameters) for both cultivation methods proved the higher efficiency of this with temperature treatment. The novel fermentative strategy led to a significant optimization of the process and simultaneous enhancement of the total SOD activity, yield coefficient and SOD productivity (1.6-, 1.7- and 1.3-fold, respectively) in comparison to the control. The produced Cu/Zn-SOD retained its temperature optimum enabling its medical and pharmaceutical application. Key words: fungi, SOD production, heat shock, fermentative strategy

Резюме. Щамът *Aspergillus niger* 26 е ефективен продуцент на супероксид дисмутаза (СОД), главно от типа Cu/Zn-СОД. Разработена е подобрена лабораторна технология за култивиране в 3-литрови биореактори. Предложена е ефективна ферментационна стратегия за синтеза на СОД, базирана на връзката между термичната шокова обработка и антиоксидантната ензимна защита. Прилагането на 6 часов температурен шок в експоненциалната фаза на растеж, и последващо възстановяване на оптималната температура доведе до над 2-кратно повишаване на специфичната СОД активност. Сравнението на кинетичните параметри (усвояване на глюкоза и образуване на продукт) за двата метода на култивиране доказа по-високата ефективност на процеса с прилагане на температурна обработка. Новата ферментационна стратегия доведе до значителна оптимизация на процеса и едновременно повишаване на общата СОД активност, коефициента на добив и производителността на СОД (съответно 1,6-, 1,7- и 1,3-кратно) в сравнение с контролата. Полученият ензим Cu/Zn-СОД запази температурния си оптимум, което позволява неговото медицинско и фармацевтично приложение.

21. Miteva-Staleva, J.; Krumova, E.; Spasova, B.; Angelova, M. Age-related changes in protease activity as cold stress response by *Penicillium* strains from different temperature classes. *Pol. Polar Res.* **2024**, *45*, 67–79. https://doi.org/10.24425/ppr.2023.148181., JCR-IF (Web of Science):1.3 Q3 (Scopus)

Abstract. Proteases play a key role in cell defense mechanisms to cold-induced oxidative stress. Data on the relationship between cold stress, growth phase, and temperature preferences of the fungal strains isolated from different habitats are very scarce. Here, we report changes in the intra- and extracellular protease activity of three fungal Penicillium strains (two Antarctic and one temperate) under transient temperature downshift during exponential- and stationary growth phases. The results indicated enhanced enzyme levels in both growth phases depending on the degree of stress and strain thermal class. In order to explain the obtained data, we compared them with our previous results on the protein carbonyl content, accumulation of oxidative-stress biomarkers, and antioxidant enzyme defense in the same three fungal strains. The cell response

was affected by the temperature preference of the strain, but not by the climatic distance between the locations of isolation.

Резюме. Протеазите играят ключова роля в механизмите за защита на клетките от оксидативен стрес, индуциран от ниски температури. Данните за връзката между нискотемпературен стрес, фаза на растеж и температурна принадлежност на гъбните щамове, изолирани от различни местообитания, са много оскъдни. В настоящото изследване са представени промените в интра- и екстрацелуларната протеазна активност на три щама *Penicillium* (два изолирани от Антарктида и един от почви с умерения климат) при преходно понижение на температурата по време на експоненциална и стационарна фаза на растеж. Резултатите показаха повишени нива на ензимите и в двете фази на растеж в зависимост от степента на стрес и температурната принадлежност на щама. За да се обяснят наблюдаваните промени, резултатите са сравнени с предходни данни за съдържанието на карбонилни групи в протеините, натрупването на биомаркери на оксидативен стрес и антиоксидантната ензимна защита в същите три щама. Клетъчният отговор беше повлиян от температурните предпочитания на трите щама, но не и от климатичната разлика между местата на изолиране.

22. Miteva-Staleva, J.; Kostadinova, N.; Hubenov, V. Aging in ligninolytic fungi in space conditions. *J. Sci. Appl. Res.* **2019**, *17*, 30–35.Международно академично издателство (EBSCO)

Abstract. Aging is considered in the context of various abiotic stresses, such as water deficit, high temperature, salinity, cold, heavy metals, mechanical wounding, UV radiation, etc. It is well known that the extreme level of these factors can be reflected in sharply increased production of reactive oxygen species. Reactive oxygen species interact with cellular biomolecules, such as lipids, proteins and DNA and can play an important role in cell injury. At the same time, fungi are an appropriate model system in different research areas, including aging. Testing of ligninolytic fungi in space conditions is forthcoming. However, it is unknown how the conditions of microgravity would affect fungal cell aging and enzyme production. Determination of the long-term physiological responses and adaptation to the space environment is of great importance for fungal enzyme production as well.

Резюме. Стареенето се разглежда в контекста на различни абиотични стресови фактори, като недостиг на вода, висока температура, соленост, студ, тежки метали, механични наранявания, ултравиолетова радиация и др. Добре известно е, че екстремните нива на тези фактори водят до рязко повишаване продукцията на свободни окси радикали (СОР). СОР взаимодействат с клетъчни макроомолекули, като липиди, протеини и НК и играят важна роля в увреждането на клетките. В същото време гъбите са подходяща моделна система в

различни области на научните изследвания, включително стареенето. Предстои провеждането на експерименти с лигнинолитични гъби в космически условия. Все още не е известно как микрогравитацията влияе на стареенето на гъбните клетки и на ензимната продукция. Установяването на дългосрочните физиологични реакции и адаптацията към космическата среда е от голямо значение и за производството на гъбни ензими в космическата биотехнология.

23. Miteva-Staleva, J.; Krumova, E.; Stoyancheva, G.; Kostadinova, N.; Grozdanov, P.; Spassova, B.; Angelova, M. Isolation, identification and proteolytic activity of filamentous fungi from Alaska. *Acta Microbiol. Bulg.* **2022**, *38*, 26–30.. SJR (Scopus):0.115 Q4

Abstract. From two soil samples taken in the Denali National Park and Preserve, Alaska, 28 filamentous fungi were isolated on selective media. A total of 28 fungal isolates were identified. The most widespread fungal species belonged to the genera Aspergillus, Mucor, Tolypocladium, Daldinia, and Pseudogymnoascus. A phylogenetic tree was constructed with the neighbour-joining method using the Kimura two-parameter model included in the MEGA 4 software. The linear growth of the fungal isolates was measured after 10 days of conidiospore cultivation on agar plates at temperatures of 4, 10, and 25°C. The majority of the fungal strains identified in this study were mesophiles. All isolated strains were screened for proteolytic activity. Among them, seven strains showed high protease activity. These findings expand our knowledge about fungal biodiversity in harsh cold environments as well as the enzyme production by extremophilic fungi. Keywords: fungal biodiversity; Alaska; phylogenetic tree; proteolytic activity

Резюме. От почвени проби, събрани в Национален парк и резерват Денали, Аляска са изолирани 28 щама филаментозни гъби, които са идентифицирани по молекулярно-биологичен метод. Всички изолати бяха идентифицирани, като най-разпространените видове беше определено да принадлежат към родовете *Aspergillus, Mucor, Tolypocladium, Daldinia* и *Pseudogymnoascus.* На базата на „neighbour-joining method“ и чрез използването на MEGA 4 софтуер беше конструирано филогенетично дърво. Линейният растеж на единичните колонии беше измерен след 10 дневна инкубация върху твърда агарова среда при температури от 4, 10 и 25°C. По-голямата част от идентифицираните гъби бяха определени като мезофили. Беше анализирана протеолитичната активност на всички изолирани щамове, като при 7 от тях беше установена значима ензимна активност. Получените резултати допринасят за разширяване на познанията относно биоразнообразието на гъбите в студените местообитания, както и потенциала на екстремофилните гъби като ензимни продуценти.

24. Gocheva, Y.; Stoyancheva, G.; **Miteva-Staleva, J.**; Abrashev, R.; Dishliyska, V.; Yovchevska, L.; Angelova, M.; Krumova, E. Fungal phytases as useful tools in agricultural practices. *Agronomy* **2024**, *14*, 3029. https://doi.org/10.3390/agronomy14123029.JCR-IF (Web of Science):3.3 Q1, не оглавява ранглистата

Abstract. In order to meet the ever-growing needs of society, modern agriculture must develop sustainable farming and livestock production. Crops need phosphorus, a macronutrient found in soils, but they are only able to utilize small quantities of it. Chemical phosphate fertilizers are ineffective and environmentally harmful. The use of microorganisms (bacteria, yeast, filamentous fungi, and microalgae) that synthesize phytases is a promising and environmentally friendly alternative to chemical fertilizers. Phytases are also needed as feed additives in animal husbandry to overcome phosphorus deficiency for animal growth and development. Phytases are phosphatases that catalyze the release of phosphorus from phytate by stepwise hydrolysis. The broad substrate specificity, optimal pH range, higher thermal stability, and specific efficiency of fungal phytases make them interesting enzymes for agricultural applications. They improve and stimulate the growth and development of plants and animals by releasing inorganic phosphorus and producing siderophores, organic acids, hydrogen cyanide, ammonia, and phytohormones. Phytases are crucial for enhancing phosphorus use in farming and decreasing phosphorus waste's environmental effects. This paper addresses key challenges in modern farming, such as the inefficient utilization of phosphorus from soil and the environmental harm caused by chemical fertilizers, and provides a comprehensive overview of recent advances in the research of fungal phytases. Available scientific data have been synthesized to highlight the potential of phytase use in agriculture. This review outlines key areas for future research, including the development of phytase variants with improved functionality. The potential integration of fungal phytases into sustainable agricultural practices is underlined, in contrast to previously published work focused primarily on their biochemical properties. The review offers new insight into the possible applications of micromycete phytases as a critical factor for sustainable agriculture in the future.

Резюме. С цел да отговори на постоянно нарастващите нужди на обществото, съвременното земеделие е изправено пред необходимостта да развива устойчиви практики в земеделието и животновъдството. Фосфорът е жизненоважен макроелемент за растежа на растенията, но наличният в почвата фосфор е в ограничени количества и в труднодостъпна за усвояване форма. Химическите фосфатни торове са неефективни и нанасят щети на околната среда. Използването на микроорганизми (бактерии, дрожди, филаментозни гъби и микроводорасли), които синтезират фитази, е обещаваща и екологично чиста алтернатива на химическите торове. Фитазите са необходими и като фуражни добавки в животновъдството, за да се преодолее недостигът на фосфор за растежа и развитието на животните. Фитазите са фосфатази, които катализират освобождаването на фосфор от фитат чрез поетапна хидролиза. Широката субстратна специфичност, оптималният pH диапазон, по-високата температурна стабилност и специфичната ефективност на гъбните фитази ги правят интересни ензими за приложение в селското стопанство. Те подобряват и

стимулират растежа и развитието на растенията и животните чрез освобождаване на неорганичен фосфор и производство на сидерофори, органични киселини, циановодород, амоняк и фитохормони. Фитазите са от решаващо значение за подобряване на използването на фосфор в селското стопанство и намаляване на въздействието на фосфатните отпадъци върху околната среда. Настоящият обзор разглежда ключови предизвикателства в съвременното селско стопанство, като неефективното усвояване на фосфор от почвата и вредата за околната среда, причинена от химическите торове, като предоставя изчерпателен преглед на последните постижения в изследванията на гъбните фитази. Наличните научни данни са синтезирани, за да се подчертае потенциалът на използването на фитази в селското стопанство. В този обзор са очертани ключови области за бъдещи изследвания, включително разработването на варианти на фитази с подобрена функционалност. Подчертава се потенциалната интеграция на гъбните фитази в устойчивите селскостопански практики, за разлика от предишни публикации, фокусирани предимно върху техните биохимични свойства. Предлага се нова перспектива за възможните приложения на фитазите от микромицети като критичен фактор за устойчиво земеделие в бъдеще.

25. Krumova, E.; Abrashev, R.; Kostadinova, N.; **Miteva-Staleva, J.**; Spasova, B.; Angelova, M. Growth phase-dependent antioxidant enzyme defense of *Humicola lutea* against copper stress. *Acta Microbiol. Bulg.* **2017**, *33*, 3–9.

Abstract. Copper is an essential element for the growth and development of the full range of living organisms, including filamentous fungi. At the same time, it is toxic for organisms when present in excess. The present study was conducted to assess the role of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) on the tolerance strategy of the fungal strain Humicola lutea 103 at different growth phases under enhanced Cu ions concentrations. We examined the changes in the growth, intracellular protein content and levels of antioxidant enzyme defense. The results revealed that the presence of Cu ions affected the duration of growth phases in a dose-dependent manner. The effect of Cu treatment (150 µg/ml Cu ions) depends on the age of the treated culture. The spores and cells from the stationary growth phase demonstrated higher resistance compared to the corresponding control due to the enhancement of SOD and CAT activity. The increased total SOD activity was largely due to the Cu/Zn-SOD isoform. The non-growing cells taken from cultures of different growth phases demonstrated also up-regulation of both antioxidant enzymes in response to oxidative stress imposed by the ROS- generating heavy metal. During the stationary-phase, H. lutea cells demonstrated higher resistance to Cu-induced oxidative stress compared with the exponential phase cells.

Резюме. Медта е основен микроелемент за растежа и развитието на всички живи организми, включително филаментозните гъби. В същото време обаче, тя е токсична за организмите,

когато е в излишък. Настоящото изследване беше проведено, за да се оцени ролята на антиоксидантните ензими супероксид дисмутаза (СОД) и каталаза (КАТ) върху стратегията за толерантност на гъбния щам *Humicola lutea* 103 в различни фази на растеж при повишени концентрации на медни йони. Проучени бяха промените в растежа, съдържанието на вътреклетъчни протеини и нивата на антиоксидантната ензимна защита. Резултатите показаха, че наличието на медни йони влияе върху продължителността на фазите на растеж по дозозависим начин. Ефектът от третирането с медни йони (150 μg/ml Cu йони) зависи от възрастта на третираната култура. Спорите и клетките от стационарната фаза на растеж показаха по-висока резистентност в сравнение с контролната група поради повишената активност на СОД и КАТ. Завишената обща СОД активност се дължеше до голяма степен на изоензима Cu/Zn-СОД. Нерастящите клетки, взети от култури в различни фази на растеж, демонстрираха също така повишена регулация на двата антиоксидантни ензима в отговор на оксидативния стрес, наложен от тежкия метал, генериращ СОР. По време на стационарната фаза, клетките на *H. lutea* демонстрираха по-висока резистентност към Cu-индуцирания оксидативен стрес в сравнение с клетките в експоненциалната фаза.