

РЕЗЮМЕТА НА НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ**на гл. ас. д-р Йоана Красиминова Кижева**

представени за участие в конкурс за заемане на академична длъжност „доцент”

по професионално направление **4.3. Биологически науки (Микробиология – Обща микробиология и фитопатогенни бактерии)**,
обявен в ДВ брой 55 от 28.06.2024 г.**ПУБЛИКАЦИИ В РЕФЕРИРАНИ СПИСАНИЯ И ИНДЕКСИРАНИ В СВЕТОВНОИЗВЕСТНИ БАЗИ ДАННИ С
НАУЧНА ИНФОРМАЦИЯ
(WEB OF SCIENCE И SCOPUS)**

1. **Kizheva, Y., Pandova, M., Dimitrova, M., Gladicheva, Y., Garkova, M., Pirnareva, D., Donchev, D., Moncheva, P., Hristova, P. 2024.** First Report of *Curtobacterium flaccumfaciens* in Bulgaria. *Pathogens*, 13:483. ISSN:20760817. <https://doi.org/10.3390/pathogens13060483>.
IF₂₀₂₃ = 3.3; SJR₂₀₂₃ = 0.843 (Q2)

Резюме

Изследването има за цел идентифицирането и характеризирането на пет актинобактериални щамове с предполагаема принадлежност към вида *Curtobacterium flaccumfaciens*, изолирани от домати и пипер, и установяване на потенциалната роля на двете растения като естествени резервоари на този фитопатоген. Идентификацията на видовете е извършена чрез MALDI-TOF MS, 16S rDNA секвениране и PCR. Щамовете са Грам-положителни с коринеформни клетки с жълто/оранжеви пигментирани колонии; положителни за каталаза и хидролиза на ескулин, нишесте и казеин; отрицателни за оксидаза, уреаза, индол и нитрат-редукция и са строго аероби. Всички изолати произвеждат антимикробни вещества срещу различни фитопатогенни бактерии. Доматени и пиперени растения бяха изкуствено заразени с новоизолираните щамове, за да се установи ролята им на естествени резервоари на бактериите. Морфологични изменения се наблюдават само при доматиените растения, изразяващи се в обезлистване на първите два до четири листа на 28-ия ден след заразяването. Жизнеспособни коринеформни бактериални изолати (n = 73) бяха успешно повторно изолирани от стъблата на заразените растения. Сходството между повторните изолати и съответните първоначални изолати беше потвърдено фенотипно и генотипно чрез RAPD-PCR, което показва, че доматиите могат да се разглеждат и приемат като резервоари на *C. flaccumfaciens*. Това е първото съобщение за откриването на *C. flaccumfaciens* в България.

Abstract

This study aims at the identification and characterization of five actinobacterial strains with presumed belonging to the species *Curtobacterium flaccumfaciens* isolated from tomato and pepper plants, and establishing the potential role of both plants as natural reservoirs of this phytopathogen. Species identification was performed via MALDI-ToF MS, 16S rDNA sequencing and PCR. The strains were Gram-positive with a coryneform cell shape having yellow/orange pigmented colonies; positive for catalase and esculin, and starch and casein hydrolysis; oxidase-, urease-, indole- and nitrate-reduction-negative and were strictly aerobic. All isolates produced antimicrobial substances against various phytopathogenic bacteria. Tomato and pepper plants were artificially infected with newly isolated strains in order to establish their role as natural reservoirs of the bacteria. Morphological alterations were observed only in the tomato

plants, with defoliation of the first two to four leaves at the 28th day. Then, viable coryneform bacterial isolates (n = 73) were successfully re-isolated only from the stems of the infected plants. The similarity between the reisolates and the respective initial isolates was confirmed phenotypically and genotypically by RAPD-PCR, confirming that solanaceous vegetables can act as reservoirs of *C. flaccumfaciens*. This is the first report of *C. flaccumfaciens* in Bulgaria.

2. Brankova, L., Shopova, E., Ivanov, S., **Kizheva, Y.**, Urshev, Z., Rasheva, I. Aleksandrov, V., Dimitrova, L., Dimitrova, M., Hristova, P. **2024**. Involvement of oxidative stress in localization of bacterial spot infection in pepper plants. *Journal of Biosciences*, 49:2. ISSN:02505991 <https://doi.org/10.1007/s12038-023-00390-y>.
IF₂₀₂₃ = 2.1; SJR₂₀₂₃ = 0.583 (Q1).

Резюме

Xanthomonas euvesicatoria е основен причинител на бактериално струпяване по различни култури. Настоящото изследване беше фокусирано върху патосистемата пипер (*Capsicum annuum* L.) - *X. euvesicatoria* 269p (див щам). Инфекциозният процес е изследван с помощта на няколко различни режима на *in vivo* инокулация при контролирани условия. Разпространението на патогена в различни части на растенията беше наблюдавано чрез нова qPCR процедура, разработена за откриване на *X. euvesicatoria*, както и чрез повторно изолиране на жизнеспособни бактериални клетки. Изследвани са фотосинтезата, броят на жизнеспособните патогени, маркерите на оксидативния стрес, активността на основните антиоксидантни ензими и нивата на неензимни антиоксиданти в новата еднолистна моделна система. Най-важното наблюдение е, че инвазията на патогена причинява локална инфекция и разпространението на бактерии в здравите части на гостоприемника е блокирано. Растенията ограничават бактериалната колонизация около входните точки. Окислителен взрив и промени в антиоксидантната защита се откриват при инфекциозни лезии на листата. Локализираното свръхпроизводство на ROS наподобява реакция на свръхчувствителност, но могат да се наблюдават няколко разлики. Ние предположихме, че растенията пипер са по-склонни да проявят междинен фенотип, подобен на лезии, симулиращи заболяване или петна по листата. Чрез локализиране на инфекцията, вероятно включваща оксидативен стрес, растението оцелява. Същото обаче важи и за бактериите. Патогенът се размножава в инфекциозните петна и се предава на други растения. Нашето заключение е, че междинният фенотип в изследваната патосистема е пример за дълга и успешна съвместна еволюция и за двата вида.

Abstract

Xanthomonas euvesicatoria is a major cause of bacterial spot disease in various crops. The present study was focused on the pathosystem pepper (*Capsicum annuum* L.) - *X. euvesicatoria* 269p (wild strain). The infectious process was studied using several different modes of *in vivo* inoculation under controlled conditions. The spread of the pathogen in different parts of the plants was monitored by a new qPCR procedure developed for the detection of *X. euvesicatoria*, as well as by re-isolation of viable bacterial cells. Photosynthesis, the number of viable pathogens, oxidative stress markers, activities of the main antioxidant enzymes, and levels of nonenzymatic antioxidants in the novel single-leaf model system were studied. The most important observation is that the invasion of the pathogen causes local infection and the dissemination of bacteria to the healthy parts of the host is blocked. The plants limit bacterial colonization around the entry points. Oxidative burst and alterations in antioxidant defenses are detected in infectious leaf lesions. Localized ROS overproduction resembles a hypersensitive response, but several differences can be observed. We assumed that pepper plants are more likely to manifest an intermediate phenotype, similar to lesions simulating disease or leaf flecking. By localizing the infection, possibly involving oxidative stress, the plant survives. However, the same applies to bacteria. The pathogen multiplies at the infection spots

and is transmitted to other plants. Our conclusion is that the intermediate phenotype in the studied pathosystem is an example of long and successful co-evolution for both species.

3. Marinova-Yordanova, V.Y., Kizheva, Y.K., Rasheva, I.K., Hristova, P.K. 2024. Traditional Bulgarian Fermented Foods as a Source of Beneficial Lactic Acid Bacteria. *Frontiers in Bioscience* (Elite Ed), 16(1):7. ISSN:19450494, 19450508. [doi: 10.31083/j.fbe1601007](https://doi.org/10.31083/j.fbe1601007). SJR₂₀₂₃ = 0.412 (Q3)

Резюме

Традиционните български ферментирани храни се отличават с уникалността на местните съставки, методите на производство и ендемичните микробни видове. Настоящото изследване изследва разнообразието и полезния биологичен потенциал на млечнокисели бактерии (МКБ), изолирани от различни видове уникални български ферментирани храни. Идентификацията на видовете е извършена чрез 16S rDNA секвениране. Биологичната активност е оценена чрез определяне на антибактериалната активност (по метода на дифузия в агар, чрез използване на ямки), производството на H₂O₂, спектрофотометрично определена авто- и ко-агрегация, микробна адхезия към въглеводород и образуване на биофилм. Биобезопасността на изолираните млечнокисели бактерии е установена въз основа на хемолитична активност и фенотипна и генотипна чувствителност към антибиотици. Четиридесет и пет щамове са изолирани от ферментирани храни (кисело зеле, ферментирани зелени домати, ферментирани краставици, кефир, бяло сирене и извара). Открити са пет вида МКБ: *Lactiplantibacillus plantarum*, *Levilactobacillus koreensis*, *Levilactobacillus brevis*, *Lactobacillus helveticus* и *Levilactobacillus yonginensis*. Най-значително е представен видът *L. plantarum* - 47%. За първи път в това изследване се съобщава за *L. koreensis* и *L. yonginensis*, изолирани от уникални български ферментирани храни. Оценен е антибактериалният ефект на безклетъчните супернатанти. Наблюдава се антагонистичен ефект срещу *Escherichia coli* (57%) и *Salmonella enterica* subsp. *enterica* серотип Enteritidis (19%) за няколко щамове *L. plantarum*. Само един щам *L. brevis* (кисело зеле, S15) показва активност срещу *E. coli*. Най-добрата способност за автоагрегиране на 4-ия час се наблюдава за *L. koreensis* (ферментирани краставици, FC4) (48%) и *L. brevis* S2 (44%). Най-високият процент на коагрегация с *Candida albicans*, на час 4 в експериментите, се наблюдава за щамове *L. koreensis* (ферментиран зелен домат, FGT1) (70%), *L. plantarum* щамове S2 (54%), S13 (51 %) и S6 (50%), докато на 24-ия час за щамове *L. koreensis* FGT1 (95%), *L. brevis* (кефир, K7) (89%), *L. plantarum* S2 (72%) и *L. koreensis* FC2 (70%). Седем от изолираните щамове МКБ показват хидрофобност над 40%. Нашите резултати показваха, че способността за образуване на биофилм е щамовозависима. Не е открита хемолитична активност. Фенотипно и генотипно е изследвана антибиотичната резистентност към 10 антибиотици от различни групи. Не са наблюдавани продукти на амплификация в нито един щам, което потвърждава, че изолатите не носят гени за резистентност към антибиотици.

Abstract

Traditional Bulgarian fermented foods are prominent for their uniqueness of local ingredients, production methods, and endemic microbial species. The present research investigated the diversity and beneficial biological potential of lactic acid bacteria (LAB) isolated from various types of unique Bulgarian fermented foods. Species identification was performed via 16S rDNA sequencing. Biological activity was evaluated by determining antibacterial activity (via agar well diffusion assay), H₂O₂ production, spectrophotometrically determined auto- and co-aggregation, microbial adhesion to hydrocarbon, and biofilm formation. The biosafety of the isolated lactic acid bacteria was established based on hemolytic activity and phenotypic and genotypic antibiotic susceptibility. Forty-five strains were isolated from fermented foods (sauerkraut, fermented green tomatoes, fermented cucumbers, kefir, white cheese, and Izvara (curdled milk)). Five species were detected: *Lactiplantibacillus plantarum*, *Levilactobacillus*

koreensis, *Levilactobacillus brevis*, *Lactobacillus helveticus*, and *Levilactobacillus yonginensis*. The most prominent species was *L. plantarum*, at 47%. For the first time, *L. koreensis* and *L. yonginensis*, isolated from unique Bulgarian fermented foods, are reported in this study. The antibacterial effect of the cell-free supernatants was evaluated. An antagonistic effect was observed against *Escherichia coli* (57%) and *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype Enteritidis (19%) for several *L. plantarum* strains. Only one *L. brevis* (Sauerkraut, S15) strain showed activity against *E. coli*. The best autoaggregation ability at hour 4 was observed for *L. koreensis* (fermented cucumbers, FC4) (48%) and *L. brevis* S2 (44%). The highest percentage of co-aggregation with *Candida albicans*, at hour 4 in the experiments, was observed for strains *L. koreensis* (fermented green tomato, FGT1) (70%), *L. plantarum* strains S2 (54%), S13 (51%), and S6 (50%), while at hour 24 for strains *L. koreensis* FGT1 (95%), *L. brevis* (Kefir, K7) (89%), *L. plantarum* S2 (72%), and *L. koreensis* FC2 (70%). Seven of the isolated LAB strains showed hydrophobicity above 40%. Our results showed that the ability of biofilm formation is strain-dependent. No hemolytic activity was detected. The antibiotic resistance to 10 antibiotics from different groups was tested phenotypically and genotypically. No amplification products were observed in any strains, confirming that the isolates did not carry antibiotic-resistance genes.

4. Pandova, M., Kizheva, Y., Tsenova, M., Rusinova, M., Borisova, T., Hristova, P. 2024. Pathogenic Potential and Antibiotic Susceptibility: A Comprehensive Study of Enterococci from Different Ecological Settings. *Pathogens*, 13(1):36. ISSN:20760817. [doi: 10.3390/pathogens13010036](https://doi.org/10.3390/pathogens13010036).
IF₂₀₂₃ = 3.3; SJR₂₀₂₃ = 0.843 (Q2)

Резюме

Пътят и начинът на живот на известните видове ентерококи са твърде сложни. Целта на настоящото изследване е да се проследи пътя на патогенността на ентерококите, изолирани от седем местообитания (от интестинума на *Cornu aspersum*; българско кисело мляко; козе и краве фета сирене – съответно зряло и младо; арабска улична храна – дюнер; краве мляко; и човешка кърма) чрез сравняване на техния патогенен потенциал. Общо 72 ентерококови щама бяха изолирани и идентифицирани чрез MALDI-TOF, секвениране и PCR. Хемолитичната и желатиназната активност бяха определени биохимично. PCR беше проведен за откриване на вирулентни фактори (*cylB*, *esp*, *gls24*, *nucl*, *psaA*, *agg*, *gelE* и *ace*) и антибиотична резистентност (*erm*, *ermB*, *blaZ*, *vanA*, *aphA*, *mefA*, *gyrA*, *catpIP501* и *aac6'-aph2''*). Фенотипната антибиотична резистентност е определена според EUCAST. Идентифицирани са 11 представители на род *Enterococcus*: *E. mundtii*, *E. casseliflavus*, *E. gilvus*, *E. pseudoavium*, *E. pallens*, *E. malodoratus*, *E. devriesei*, *E. gallinarum*, *E. durans*, *E. faecium* и *E. faecalis*. Двадесет и два щама показва α -хемолиза. Тринадесет щама имат ген *cylB*. Само два щама експресират α -хемолиза и притежават гена *cylB* едновременно. Положителна амплификация за *gelE* се открива в 35% от изолатите, но фенотипна желатиназна активност се наблюдава само в три щама. Всички изолати показват различна антибиотична резистентност. Само *E. faecalis* BM15 показва множествена резистентност (AMP-HLSR-RP). Корелация между генотипна и фенотипна резистентност към макролиди беше открита за два щама *E. faecalis*.

Abstract

The pathway and the lifestyle of known enterococcus species are too complicated. The aim of the present study is to trace the path of pathogenicity of enterococci isolated from seven habitats (*Cornu aspersum* intestine; Bulgarian yoghurt; goat and cow feta cheese—mature and young, respectively; Arabian street food—doner kebab; cow milk; and human breast milk) by comparing their pathogenic potential. In total, 72 enterococcal strains were isolated and identified by MALDI-TOF, sequencing, and PCR. Hemolytic and gelatinase activity were biochemically determined. PCR was carried out for detection of virulence factors (*cylB*, *esp*, *gls24*, *nucl*, *psaA*, *agg*, *gelE*, and *ace*) and antibiotic resistance (*erm*, *ermB*, *blaZ*, *vanA*, *aphA*, *mefA*, *gyrA*, *catpIP501*, and *aac6'-aph2''*). Phenotypic antibiotic resistance

was assigned according to EUCAST. Eleven representatives of the genus *Enterococcus* were identified: *E. mundtii*, *E. casseliflavus*, *E. gilvus*, *E. pseudoavium*, *E. pallens*, *E. malodoratus*, *E. devriesei*, *E. gallinarum*, *E. durans*, *E. faecium*, and *E. faecalis*. Twenty-two strains expressed α -hemolysis. Thirteen strains had the *cylB* gene. Only two strains expressed α -hemolysis and possessed the *cylB* gene simultaneously. Positive amplification for *gelE* was found in 35% of the isolates, but phenotypic gelatinase activity was observed only in three strains. All isolates showed varying antibiotic resistance. Only *E. faecalis* BM15 showed multiple resistance (AMP-HLSR-RP). Correlation between genotypic and phenotypic macrolide resistance was revealed for two *E. faecalis* strains.

**5. Kizheva, Y., Pandova, M., Hristova, P. 2024. Phage therapy and phage biocontrol – between science, real application and regulation. *Acta Microbiologica Bulgarica*, 40(2): 164-180 ISSN:02048809, 26033755.
SJR₂₀₂₃ = 0.136 (Q4)**

Резюме

Нарастващият брой на резистентни на антибиотици бактерии се счита за „тиха епидемия“, в световен мащаб, и изисква спешни действия в разработването на нови ефективни лечения на тежките бактериални заболявания. В тази връзка, един от най-обещаващите подходи, който печели все по – голяма популярност както в научната общност, така и в реалния свят на приложната медицина, е използването на бактериофаги, като добавки или заместители на традиционните терапии на бактериалните заболявания. Възможните начини за приложение на фагите в борбата с резистентните бактерии са доста разнообразни: като интегрирани стратегии за растителна защита в селското стопанство и като заместители на химическите пестициди, в безопасността на храните, във водните системи и в здравеопазването на животните и хората. Съществуват обаче определени предизвикателства, които могат да бъдат подчертани по отношение на напредъка в проучванията на потенциала на фагите, както и по отношение на регулаторната рамка, контролираща производството и прилагането на продукти, базирани на фаги. Освен това, общото разбиране за употребата на бактериофаги като антибактериални агенти се нуждае от допълнително разясняване сред обществеността. Поради това е от решаващо значение да се насърчават изследванията върху фагите, особено в страни с малък или никакъв опит в проучванията на фаги като терапевтични средства. В тази връзка, в светлината на новите възможности в борбата с мултирезистентните бактерии, този обзор има за цел да хвърли поглед към фагите, естествените убийци на бактериите.

Abstract

The increasing emergence of antibiotic resistant bacteria is considered a “silent epidemic”, globally, and requires urgent action in the development of new effective treatments of the severe bacterial diseases. Regarding this, one of the most promising approaches, that is gaining favour both in the scientific community and in the real world of applied medicine is the use of phages, the naturally occurring killers of bacteria, as supplements or substitutes for traditional disease therapies. The possible ways of application of phages in the combat with resistant bacteria is quite diverse: as integrated plant protection strategies in agriculture and as substitutes of chemical pesticides, in food safety, in aquatic systems and in animal and human healthcare. However, there are certain challenges that shall be highlighted in terms of the advancement of studies on the potential of phages, as well as the regulatory framework controlling the manufacture and implementation of phage-based products. Moreover, the general understanding of the use of bacteriophages as antibacterial agents needs further clarification among the public. Thus, it is crucial to promote phage research, particularly in nations with little or no experience with phage studies as therapeutic agents. In this regard, in light of the new opportunities in the fight with the multidrug resistant bacteria, this review aims to take a look at the phages, the natural killers of bacteria.

6. **Kizheva, Y., Urshev, Z., Ivanov, S., Dimova, T., Dimitrova, M., Pandova, M. Gladicheva, Y., Hristova, P. 2024.** Evaluation of the stability of synthetic plasmids in *Xanthomonas euvesicatoria* cells. *Acta Microbiologica Bulgarica*, 40(2): 213-227
ISSN:02048809, 26033755.
SJR₂₀₂₃ = 0.136 (Q4)

Резюме

Целта на настоящото изследване е да се проучи възможността за получаване на стабилни трансформирани култури от див щам на *Xanthomonas euvesicatoria* (269p). Стабилността на два търговски синтетични плазида, pBbB13k-GFP и pWVR5, и един рекомбинантен плазмид, конструиран за целите на това изследване (pWG5), беше оценена в клетки на този фитопатоген. Плазмидът pWG5 беше получен след лигаза-независимо сглобяване на амплифицирани участъци на плазмидите pBbB13k-GFP и pWVR5. Трансформациите бяха извършвани чрез електропорация и термичен шок. За идентифициране на видовете и на плазмидите бяха използвани методите на PCR и RFLP. Няколко двойки праймери бяха конструирани с цел амплификация на гени, кодиращи GFP и резистентност към гентамицин и за получаване на амплифицирани участъци от двата търговски плазида. Трансформацията чрез електропорация на щам 269p с pBbB13k – GFP беше неуспешна. Положителна трансформация беше отчетена с pWVR5, но се наблюдаваше ниска стабилност на плазида и загуба на способност за растеж върху антибиотичната среда. Рекомбинантният плазмид pWG5 успя да трансформира дивия щам. Въпреки това се наблюдаваше бърза загуба на способност за растеж на среда с гентамицин след няколко пасажа, което показва, че получените трансформанти са нестабилни. Трансформацията на *E. coli* с pWG5 също беше успешна. Генетичните детерминанти за резистентност към GFP и гентамицин бяха открити в набогатена среда с трансформирана култура на *E. coli*, но появата на спонтанно резистентни мутанти върху агаровата среда предотвратява изолирането на истински трансформанти. Общите резултати показват, че *X. euvesicatoria* 269p няма capacitatea да задържа изследваните плаزمиди. Необходима е допълнителна фина настройка на характеристиките на синтетичния плазмид (произход на репликация, селективен маркер и репортерни гени).

Abstract

The aim of the present study was to investigate the possibility of obtaining stable transformed cultures of a wild strain of *Xanthomonas euvesicatoria* (269p). The stability of two commercial synthetic plasmids, pBbB13k-GFP and pWVR5, and one recombinant plasmid constructed in this study (pWG5) was evaluated in the cell of this phytopathogen. Plasmid pWG5 was obtained after ligase-independent assembly of amplified regions of pBbB13k-GFP and pWVR5. The transformations were carried out via electroporation and heat shock. PCR and RFLP were used for plasmid and species identification. Primer-pairs were designed for amplification of genes encoding GFP and gentamicin resistance and for obtaining amplified parts of both commercial plasmids. Transformation by electroporation of strain 269p with pBbB13k – GFP failed. Positive transformation was achieved with pWVR5 but low plasmid stability and loss of ability to grow on antibiotic media was observed. The recombinant plasmid pWG5 was able to transform the wild strain. However, a rapid loss of the gentamicin resistance trait was observed after several passages, indicating that the obtained transformants were instable. The transformation of *E. coli* with pWG5 was also successful. The genetic determinants for GFP and gentamicin resistance were detectable in the broth enriched transformed culture of *E. coli*, but an outgrowth of spontaneously resistant mutants on agar media prevented the isolation of true transformants. The overall results showed that *X. euvesicatoria* 269p has not the capacity to maintain the studied plasmids. Further finetuning of the synthetic plasmid features (origin of replication, selective marker and reporter genes) is needed.

7. Shopova, E., Brankova, L., Ivanov, S., Urshev, Z., Dimitrova, L., Dimitrova, M., Hristova, P., **Kizheva, Y. 2023.** *Xanthomonas euvesicatoria*-Specific Bacteriophage BsXeu269p/3 Reduces the Spread of Bacterial Spot Disease in Pepper Plants. *Plants* (Basel), 12(19):3348. ISSN: 22237747. doi: [10.3390/plants12193348](https://doi.org/10.3390/plants12193348).
IF₂₀₂₃ = 4.0; SJR₂₀₂₃ = 0.795 (Q1)

Резюме

Настоящото изследване е фокусирано върху патосистемата растение - пипер (*Capsicum annuum* L.) – фитопатогенна бактерия *X. euvesicatoria* (див щам 269p) - бактериофаг BsXeu269p/3 и възможността за биоконтрол на заболяването, медиран от бактериофаг. Постороеени са две нови моделни системи за наблюдение на ефекта от лечението с фаг върху инфекциозния процес *in vivo*. Разпространението на бактериофага и патогена се наблюдава чрез qPCR. Конструирани са нови двойки праймери за откриване на фаги чрез qPCR, както и сонди за TaqMan qPCR. Епифитната бактериална популация и потенциалният бактериолитичен ефект на BsXeu269p/3 *in vivo* е наблюдаван чрез SEM. Аерозолно медирана моделна система на предаване показва, че третирането с BsXeu269p/3 намалява 5 пъти количеството на *X. euvesicatoria* върху повърхността на листата. Моделната система с убождане с игла показва значително намаляване на количеството на патогена в инфекциозни лезии, третирани с BsXeu269p/3 (ср. 59,7%), в сравнение с нетретираната контрола. Ние открихме, че фаговият титър е 10-кратно по-висок в инфекциозните лезии, но все още беше откриваем дори при отсъствието на специфичния гостоприемник в листата. Това е първият доклад за *in vivo* оценка на потенциала на локално изолирани фаги за биоконтрол на *X. euvesicatoria* - причинителя на бактериалното струпяване (bacterial spot - BS) в България.

Abstract

The present study was focused on the pathosystem pepper plants (*Capsicum annuum* L.)-phytopathogenic bacterium *X. euvesicatoria* (wild strain 269p)-bacteriophage BsXeu269p/3 and the possibility of bacteriophage-mediated biocontrol of the disease. Two new model systems were designed for the monitoring of the effect of the phage treatment on the infectious process *in vivo*. The spread of the bacteriophage and the pathogen was monitored by qPCR. A new pair of primers for phage detection via qPCR was designed, as well as probes for TaqMan qPCR. The epiphytic bacterial population and the potential bacteriolytic effect of BsXeu269p/3 *in vivo* was observed by SEM. An aerosol-mediated transmission model system demonstrated that treatment with BsXeu269p/3 reduced the amount of *X. euvesicatoria* on the leaf surface five-fold. The needle-pricking model system showed a significant reduction of the amount of the pathogen in infectious lesions treated with BsXeu269p/3 (av. 59.7%), compared to the untreated control. We found that the phage titer is 10-fold higher in the infection lesions but it was still discoverable even in the absence of the specific host in the leaves. This is the first report of *in vivo* assessment of the biocontrol potential of locally isolated phages against BS pathogen *X. euvesicatoria* in Bulgaria.

8. Kizheva, Y., Urshev, Z., Dimitrova, M., Bogatzevska, N., Moncheva, P., Hristova, P. 2023. Phenotypic and Genotypic Characterization of Newly Isolated *Xanthomonas euvesicatoria*-Specific Bacteriophages and Evaluation of Their Biocontrol Potential. *Plants* (Basel), 12(4):947. ISSN: 22237747. doi: [10.3390/plants12040947](https://doi.org/10.3390/plants12040947).
IF₂₀₂₃ = 4.0; SJR₂₀₂₃ = 0.795 (Q1)

Резюме

Бактериофагите силно ангажираха вниманието на учените по света поради непрекъснато нарастващата резистентност на фитопатогенните бактерии към комерсиално използвани химически пестициди. Въпреки това, знанията относно фагите са все още много недостатъчни и трябва непрекъснато да се разширяват. Тази статия представя резултатите от изолирането, характеризирането и оценката на потенциала на 11 фагови изолати като естествени хищници на фитопатогенната бактерия - *Xanthomonas euvesicatoria*. Фагите са изолирани от ризосферата на домати растения със симптоми на бактериално струпяване (bacterial spot). Морфологията на плаките на всички изолати се определя върху тънък слой *X. euvesicatoria* чрез анализ на плаки. Три от изолатите бяха отнесени да принадлежат към семейство *Myoviridae* въз основа на ТЕМ микрографии. Всички фаги показват добра дългосрочна жизнеспособност, когато се съхраняват при температури 4 °C и -20 °C. Три от фаговите изолати притежават висока стабилност при много ниски стойности на рН. За фаговия изолат BsXeu269p/3 беше открита петдесет и петдневна персистентност в почвена проба без присъствието на специфичния гостоприемник и липса на литична активност върху полезни ризосферни бактерии. Пълният геном на същия изолат беше секвениран и анализиран и за първи път в това пручване докладваме кръгово представяне на линеен, но кръгово пермутиран фагов геном сред известните за *X. euvesicatoria*.

Abstract

Bacteriophages have greatly engaged the attention of scientists worldwide due to the continuously increasing resistance of phytopathogenic bacteria to commercially used chemical pesticides. However, the knowledge regarding phages is still very insufficient and must be continuously expanded. This paper presents the results of the isolation, characterization, and evaluation of the potential of 11 phage isolates as natural predators of a severe phytopathogenic bacterium—*Xanthomonas euvesicatoria*. Phages were isolated from the rhizosphere of tomato plants with symptoms of bacterial spot. The plaque morphology of all isolates was determined on a *X. euvesicatoria* lawn via a plaque assay. Three of the isolates were attributed to the family *Myoviridae* based on TEM micrographs. All phages showed good long-term viability when stored at 4 °C and -20 °C. Three of the phage isolates possessed high stability at very low pH values. Fifty-five-day persistence in a soil sample without the presence of the specific host and a lack of lytic activity on beneficial rhizosphere bacteria were found for the phage isolate BsXeu269p/3. The complete genome of the same isolate was sequenced and analyzed, and, for the first time in this paper, we report a circular representation of a linear but circularly permuted phage genome among known *X. euvesicatoria*.

9. Kizheva, Y., Georgiev, G., Donchev, D., Dimitrova, M., Pandova, M., Rasheva, I., Hristova, P. 2022. Cross-Over Pathogenic Bacteria Detected in Infected Tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.) and Peppers (*Capsicum annuum* L.) in Bulgaria. *Pathogens*, 11(12):1507. ISSN: 20760817. doi: [10.3390/pathogens11121507](https://doi.org/10.3390/pathogens11121507).
IF₂₀₂₂ = 3.7; SJR₂₀₂₂ = 0.807 (Q2)

Резюме

Способността на някои човешки патогени да се адаптират към растенията, без да загубят вирулентността си спрямо хората, днес е основен проблем. Целта на настоящата работа беше изследване на наличието на кръстосани патогенни бактерии в заразени растения от домати и пипер. Обект на изследване са 21 проби от седем различни части на растенията и три от ризосферата на домати. Бяха изолирани общо 26 щама, идентифицирани чрез MALDI-TOF и фенотипно характеризирани. PCR амплификацията на гена *rpoB* беше приложена като подход за бързо откриване на кръстосани патогени в растителни проби. Беше разкрито голямо бактериално разнообразие от проби от домати, тъй като бяха идентифицирани девет вида (*Leclercia adecarboxylata*, *Pseudeshcherichia vulneris*, *Enterobacter cancerogenus*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter bugandensis*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Pantoea agglomerans*, *Pantoea ananatis* и *Pectobacterium carotovorum*). Полимикробни замърсявания са наблюдавани в проби T2 (цвят от домати) и T10 (плод от домати). Пет вида са идентифицирани от проби от пипер (*P. agglomerans*, *L. adecarboxylata*, *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas putida* и *Enterococcus* sp.). Антибиотична резистентност беше определена в съответствие с препоръките на EFSA. Всички изолати показват различна резистентност към тестваните антибиотици. Генетичната основа за фенотипната антибиотична резистентност не е разкрита. Сред популацията не са открити гени за факторите на вирулентност. Доколкото ни е известно, това е първото цялостно изследване на кръстосани патогенни бактериални популации на домати и пипер в България.

Abstract

The ability of certain human pathogens to adapt to plants without losing their virulence toward people is a major concern today. Thus, the aim of the present work was the investigation of the presence of cross-over pathogenic bacteria in infected tomato and pepper plants. The objects of the study were 21 samples from seven different parts of the plants and three from tomato rhizosphere. In total, 26 strains were isolated, identified by MALDI-TOF, and phenotypically characterized. The PCR amplification of the *rpoB* gene was applied as an approach for the rapid detection of cross-over pathogens in plant samples. A great bacterial diversity was revealed from tomato samples as nine species were identified (*Leclercia adecarboxylata*, *Pseudeshcherichia vulneris*, *Enterobacter cancerogenus*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter bugandensis*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Pantoea agglomerans*, *Pantoea ananatis*, and *Pectobacterium carotovorum*). Polymicrobial contaminations were observed in samples T2 (tomato flower) and T10 (tomato fruit). Five species were identified from pepper samples (*P. agglomerans*, *L. adecarboxylata*, *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas putida*, and *Enterococcus* sp.). Antibiotic resistance patterns were assigned in accordance with EFSA recommendations. All isolates showed varying resistance to the tested antibiotics. The genetic basis for the phenotypic antibiotic resistance was not revealed. No genes for the virulence factors were found among the population. To our knowledge, this is the first overall investigation of tomato and pepper cross-over pathogenic bacterial populations in Bulgaria.

10. Kizheva, Y., Eftimova, M., Rangelov, R., Micheva, N., Urshev, Z., Rasheva, I., Hristova, P. 2021. Broad host range bacteriophages found in rhizosphere soil of a healthy tomato plant in Bulgaria. *Heliyon*, 7(5): e07084. ISSN: 2405-8440.

<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07084>.

IF₂₀₂₁ = 3.776; SJR₂₀₂₁ = 0.55 (Q1)

Резюме

Спешната необходимост от изследване на нови подходи за контрол на бактериални заболявания по икономически важни култури, фокусира вниманието ни върху бактериофагите като алтернативни агенти за биоконтрол. Целта на тази статия е да представи изолирането и първоначалното характеризиране на три бактериофага (SfXv124t/1, 2 и 3), изолирани от ризосферна почва на здраво доматино растение в България, които са способни да лизират три фитопатогенни бактерии. Първоначалното характеризиране включва определяне на техния обхват на гостоприемници, морфология на плака, оптимална температура на съхранение на чисти фагови лизати, тяхната чувствителност към UV светлина, термична инактивация, оптимална множественост на инфекцията (MOI) и морфология на вириона. Получените резултати показват, че един от фаговите изолати е способен да лизира диви щамове от три фитопатогенни бактериални вида: *Xanthomonas vesicatoria*, *Xanthomonas euvesicatoria* и *Xanthomonas gardneri*, а останалите два фага са активни срещу *X. vesicatoria* и *X. euvesicatoria*. Върху тънък слой от *X. vesicatoria* фагите образуват едни и същи видове плаки, които се различават само по своя размер. Съхранението при 4 °C в продължение на 26 дни не доведе до намаляване на фаговия титър за разлика от съхранението при 28 °C, последвано от намаление в различна степен и за трите фага. Резултатите, получени след излагане на фаговите лизати на слънчева светлина (UVA + B) и UVC светлина в отделни експерименти показват, че UVC има мощен фагоциден ефект, тъй като след 50 минути излагане в пробите няма жизнеспособни фаги. UVA и UVB показва фагоциден ефект при два от фаговите изолати и абсолютно никакъв летален ефект за третия, тъй като след 50 минутно излагане на слънчева светлина първоначалният титър на фагите остана непроменен. Фаговите изолати бяха тествани за термична инактивация след инкубиране на чисти фагови лизати при три различни температури: 55 °C, 75 °C и 95 °C за период от 10 и 30 минути. С най-високо летално действие се оказва температура от 95 °C, тъй като след 10 минути в пробите нямаше жизнеспособни фаги. Фаговият изолат SfXv124t/1 е най-чувствителен, тъй като титърът му намалява с 1 lg след 10 минути инкубация при 55 °C и с още 1 lg след 30 минути. Термично най-устойчивият изолат беше SfXv124t/3, тъй като титърът му остана стабилен след 30 минутна инкубация при 55 °C и намален само с 1 lg след инкубация при 75 °C за 10 минути. Оптималният MOI за SfXv124t/3 е 0,01 (тестван диапазон 0,01–100) с максимален фагов титър, отчетен на 24-ия час от инкубацията. TEM микрографии на същите изолати разкриват, тяхната принадлежност към семейство *Podoviridae*.

Abstract

The urgent need of research of new approaches to control bacterial disease on economical important crops, focuses our attention on bacteriophages as alternative biocontrol agents. Thus, the purpose of this paper is to present the isolation and initial characterization of three bacteriophages (SfXv124t/1, 2 and 3) isolated from rhizosphere soil of a healthy tomato plant in Bulgaria that are capable to lyse three phytopathogenic bacteria. The initial characterization includes determination of: their host range, plaque morphology, optimal storage temperature of pure phage lysates, their sensitivity to UV light, thermal inactivation, optimal multiplicity of infection (MOI) and virion morphology. The obtained results showed that one of the phage isolates was capable to lyse wild strains from three phytopathogenic bacterial species: *Xanthomonas vesicatoria*, *Xanthomonas euvesicatoria* and *Xanthomonas gardneri*, and the two remaining phages were active against *X. vesicatoria* and *X. euvesicatoria*. On *X. vesicatoria* lawn, the

phages produced the same plaque types that differed only in their size. Storage at 4 °C for 26 days did not lead to decrease in phage titer as opposed to storage at 28 °C followed by decrease to varying degree for all three phages. The results obtained after exposure of the phage lysates to sunlight (UVA + B) and UVC light in separate experiments showed that UVC had a potent phagocidal effect as after 50 min of exposure there were no viable phages in the samples. UVA and UVB had lethal effect for two of the phage isolates and absolutely no lethal effect for the third one as after 50 min of exposure to sunlight there was no decrease in the initial phage titer. Phage isolates were tested for their thermal inactivation after incubation of pure phage lysates at three different temperatures: 55 °C, 75 °C and 95 °C for a period of 10 and 30 min. The most lethal temperature turned out to be 95 °C as after 10 min there were no viable phages in the samples. Phage isolate SfXv124t/1 was the most susceptible as its titer decreased by 1 lg after 10 min of incubation at 55 °C and by another 1 lg after 30 min. The most thermally resistant isolate was SfXv124t/3 as its titer remained stable after 30 min of incubation at 55 °C and decreased only by 1 lg after incubation at 75 °C for 10 min. The optimal MOI for SfXv124t/3 was 0,01 (tested range 0,01–100) with maximal phage titer, reported at the 24th hour of incubation. TEM micrographs of the same isolates reveals that it belongs to family *Podoviridae*.

11. Bogatzevska, N., Vancheva-Ebben, T., Vasileva, K., Kizheva, Y., Moncheva, P. 2021. An overview of the diversity of pathogens causing bacterial spot on tomato and pepper in Bulgaria. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 27(1):137–146. ISSN:13100351. IF₂₀₂₁ = 0.79; SJR₂₀₂₁ = 0.25 (Q3)

Резюме

Бактериалното бактериалното струпяване (bacterial spot -BS) е разрушително заболяване, засягащо домати и пипер. Голямото разнообразие на патогените, причиняващи това заболяване, ги прави сериозна заплаха за производството на тези култури в световен мащаб, включително и в България, където болестта се превърна в основен проблем. Досега в България са установени три бактериални вида, които заразяват домати (*X. vesicatoria*, *X. euvesicatoria* и *X. gardneri*), и два вида, които заразяват пипера (*X. vesicatoria* и *X. euvesicatoria*). Въпреки изследванията и публикуваните данни, липсва обща информация за причинителите на BS по домати и пипер в България по отношение на патотипове, раси и динамика на патогенните популации през годините. В това изследване за първи път анализирахме и обобщихме данните за видовата, патотипната и расовата структура на патогенната популация за периода 1999-2016 г. Установихме, че BS по домати се причинява от три вида (*X. vesicatoria*, *X. gardneri* и *X. euvesicatoria*), а по пипера – от два вида (*X. euvesicatoria* и *X. vesicatoria*). Бактерията *X. vesicatoria* е открита и идентифицирана в началото на изследвания период. Този вид е доминиращ патоген при домати, докато при пипера доминира видът *X. euvesicatoria*. Открихме значително расово разнообразие, особено за РТ щамовете на *X. vesicatoria* и РТ и Р щамовете на *X. euvesicatoria*. Регистрирана е поява на нови раси през последните години, заменящи установените в началото на наблюдавания период. Това показва, че патогенната популация, отговорна за BS при домати и пипер, е динамична и трябва да бъде редовно наблюдавана и изследвана, което е важно за контрола на болестта.

Abstract

Bacterial spot (BS) is a destructive disease affecting tomato and pepper plants. A wide diversity among the pathogens causing this disease makes them a serious threat for the tomato and pepper production worldwide, including Bulgaria, where the disease has become a major problem. To date in Bulgaria three species have been identified that infect tomato (*X. vesicatoria*, *X. euvesicatoria* and *X. gardneri*), and two that infect pepper (*X. vesicatoria* and *X. euvesicatoria*). Despite the research and published data, there is no general information about the BS agents on tomato and pepper in Bulgaria in respect to pathotypes, races, and the dynamics of pathogenic populations during the years. In this study we analyzed and

summarized for the first time the data on the species, pathotype and race structure of the pathogenic population during the period 1999-2016. BS on tomato is caused by three species (*X. vesicatoria*, *X. gardneri* and *X. euvesicatoria*), and on pepper – by two species (*X. euvesicatoria* and *X. vesicatoria*). *X. vesicatoria* was detected and identified at the beginning of this period. This species is a dominant pathogen on tomato, whereas on pepper dominates the *X. euvesicatoria* species. We found a significant race diversity especially for the PT strains of *X. vesicatoria* and PT and P strains of *X. euvesicatoria*. The occurrence of new races over the past years has been registered, replacing those established at the beginning of the observed period. This indicates that the pathogenic population responsible for BS on tomato and pepper is dynamic and needs to be regularly monitored and studied, which is important to control the disease.

12. Kizheva, Y., Таца Vancheva-Ebben, T., Hristova, P., Bogatzevska, N., Moncheva, P. **2020.** First report of *Xanthomonas euvesicatoria* on tomato in Bulgaria. *Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences*, 73(1), 140-146. ISSN:13101331.

IF₂₀₂₀₋₂₀₂₁ = 0.378; SJR₂₀₂₀ = 0.244 (Q2)

Резюме

Бактериалното струпяване (bacterial spot - BS) е едно от най-сериозните заболявания по домати (*Solanum lycopersicum* L.) и пипера (*Capsicum annuum* L.) в световен мащаб. Към днешна дата четири патогена са определени като причинители на BS. До 2015 г. от домати насаждения в България са изолирани само видовете *X. vesicatoria* и *X. gardneri*. В това изследване за първи път докладваме *X. euvesicatoria* като причинител на BS по домати в България. Двадесет и седем щамове бяха изолирани от различни региони, идентифицирани чрез видово-специфична PCR амплификация и биохимично характеризирани със системата BIOLOG. Видът е представен от два патотипа – домати (Т) и пипер-домати (РТ). РТ патотипът е доминиращ и типичен за 63% от щамовете. Сред Т щамовете са определени три раси – Т1, Т2 и Т3 с преобладаване на Т2 раса, докато сред РТ щамовете са идентифицирани пет раси (Р0Т1, Р0Т2, Р1Т2, Р4Т1 и Р4Т2). Расата Р4Т2 е характерна за 41% от всички изолирани и идентифицирани щамове на вида.

Abstract

Bacterial spot (BS) is one of the most serious diseases of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and pepper (*Capsicum annuum* L.) worldwide. To date, four pathogens have been defined as causative agents of BS. Until 2015, only the species *X. vesicatoria* and *X. gardneri* have been isolated from tomato fields in Bulgaria. In this study, for the first time, we report *X. euvesicatoria* as BS pathogen on tomato in Bulgaria. Twenty-seven strains were isolated from different regions, identified by species-specific PCR amplification and biochemically characterized by BIOLOG. The species was presented by two pathotypes – tomato (T) and pepper-tomato (PT). PT pathotype was dominant and typical for 63% of the strains. Among the T strains three races were determined – T1, T2 and T3 with prevalence of T2 race, while among PT strains five races were identified (P0T1, P0T2, P1T2, P4T1, and P4T2). The race P4T2 was characteristic for the largest number of strains – 41% of all.

13. Marinova, V.Y., Rasheva, I. K., Kizheva, K.Y., Dermenzhieva, Y.D., Hristova, P. K. 2019. Microbiological quality of probiotic dietary supplements. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 33(1): 834–841. ISSN: 1310-2818 (Print) 1314-3530. <https://doi.org/10.1080/13102818.2019.1621208>.
IF₂₀₁₉₋₂₀₂₀ = 1.186; SJR₂₀₁₉ = 0.376 (Q3)

Резюме

Днес хората се фокусират върху здравословния начин на живот. Добре известно е, че пробиотиците имат редица полезни ефекти върху здравето на хората. Те играят важна роля в защитата на гостоприемника срещу вредни микроорганизми, намаляват метаболитните нарушения и поддържат имунните функции. В настоящото проучване изследвахме 26 пробиотични продукта: 16 налични в търговската мрежа и 10 от местен производител. Нито един от търговските продукти не съдържа всички етикетирани млечнокисели бактерии (МКБ), а някои от тях съдържат неприемливи микроорганизми. От 890 изолирани щама само 420 отговарят на критериите за МКБ. Деветдесет и седем щама са изследвани чрез фенотипни и генотипни методи. 16S–23S rDNA амплификация беше извършена за всички изолати с предполагаема принадлежност към МКБ. Петдесет и седем пръчковидни бактерии са отнесени към род *Lactobacillus* и 16 коковидни бактерии към род *Weissella*. Двуетапна мултиплексна PCR идентифицира пръчковидните щамове като принадлежащи към четири вида: *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (три щама), *Lactobacillus acidophilus* (четири щама), *Lactobacillus casei* (три щама), *Lactobacillus rhamnosus* (два щама), *Lactobacillus reuteri* (четири щама) и *Lactobacillus plantarum* (един щам). Изследвана е транзитната толерантност на изолираните бактерии към *in vitro* симулиран стомашен сок (pH 2). Само четири щама оцеляха след 90 минутна инкубация. Беше изследвана антимикробната активност на нативните супернатанти на изолатите и 10 от тях показаха слаба активност срещу три патогенни бактерии. Нашите резултати показват, че само прясно произведени продукти притежават очаквания брой жизнеспособни клетки. Данните разкриват, че един от най-честите проблеми е по-ниската концентрация на жизнеспособни клетки, погрешната идентификация и наличието на нежелана микрофлора.

Abstract

Today people focus on healthy lifestyle. It is well known that probiotics have a number of beneficial health effects in humans. They play an important role in protecting the host against harmful microorganisms, reduce metabolic disorders and support immune functions. In the present study, we investigated 26 probiotic products: 16 commercially available ones and 10 from a local manufacturer. None of the commercial products contained all labelled LAB and some of them contained unacceptable microorganisms. Of 890 isolated strains only 420 met the criteria for LAB. Ninety-seven strains were investigated by phenotypic and genotypic methods. 16S–23S rDNA amplification was performed for all putative LAB isolates. Fifty-seven rod-shaped bacteria referred to genus *Lactobacillus* and 16 coccus bacteria, to genus *Weissella*. Two-step multiplex PCR identified the rod-shaped strains to belong to four species: *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (three strains), *Lactobacillus acidophilus* (four strains), *Lactobacillus casei* (three strains), *Lactobacillus rhamnosus* (two strains), *Lactobacillus reuteri* (four strains) and *Lactobacillus plantarum* (one strain). The transit tolerance of the isolated bacteria to *in vitro* simulated gastric juice (pH 2) was examined. Only four strains survived after 90 min of incubation. The antimicrobial activity of the native supernatants of the isolates was tested and 10 of them showed slight activity against three pathogenic bacteria. Our results demonstrated that only freshly produced products possessed the expected number of viable cells. The data revealed that one of the most common problems is the lower concentration of viable cells, misidentification and the presence of undesired microflora.

14. Kizheva, Y. K., Rasheva, I. K., Petrova, M.N., Milosheva-Ivanova, A. V., Velkova, L., Dolashka, P.A., Dolashki, A.K., Hristova, P. K. 2019. Antibacterial activity of crab haemocyanin against clinical pathogens. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 33(1): 873–880. ISSN: 1310-2818 (Print) 1314-3530. <https://doi.org/10.1080/13102818.2019.1626283>.
IF₂₀₁₉₋₂₀₂₀ = 1.186; SJR₂₀₁₉ = 0.376 (Q3)

Резюме

Нарастващата резистентност към антибиотици сред патогенните бактерии е предизвикателство, което стимулира разработването на нови антибактериални вещества. Морските обитатели са отлични източници на антимикробни протеини и се считат за обещаващи кандидати за лечение на микробни инфекции. В настоящото изследване получихме хемоцианин от *Eriphia verrucosa* и проучихме потенциала му да потиска растежа на някои патогенни бактерии и дрожди. Предполагаемите антибактериални молекули бяха изолирани от хемолимфата чрез хроматография, подходяща за производство на нативен хемоцианин (EvH) и неговите пет структурни единици (SU). Резултатите показват, че EvH няма антимикробна активност за разлика от своите гликозилирани SU. Всички хемоцианинови SU показват различна антибактериална активност в зависимост от тяхната степен на гликозилиране. Най-силната антимикробна активност на структурна единица SU1 (с най-високо съдържание на въглехидрати) е срещу *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis*. Най-малко гликозилираните структурни единици SU3 и SU4 показват най-ниска антимикробна активност срещу всички щамове. Фракцията SU1 има потенциал да се прилага като заместител на някои често използвани антибиотици. Беше демонстрирано, че степента на гликозилиране на хемоцианин играе важна роля за неговите функционални антибактериални свойства.

Abstract

The increasing antibiotic resistance among pathogenic bacteria is a challenge that drives the development of new antibacterial substances. Marine inhabitants are excellent sources of antimicrobial proteins and considered as promising candidates for the treatment of microbial infections. In the present study, we obtained haemocyanin from *Eriphia verrucosa* and studied its potential to suppress the growth of some pathogenic bacteria and yeasts. The putative antibacterial molecules were isolated from the haemolymph by chromatography appropriate for producing the native haemocyanin (EvH) and its five structural units (SUs). The results showed that EvH had no antimicrobial activity unlike its glycosylated SUs. All haemocyanin SUs exhibited differential antibacterial activity depending on their grade of glycosylation. The strongest antimicrobial activity of SU1 (with highest carbohydrate content) was against *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. The least glycosylated SU3 and SU4 exhibited the lowest antimicrobial activity against all strains. The fraction SU1 has the potential to be applied as a substitute for some commonly used antibiotics. It was demonstrated that the grade of haemocyanin glycosylation plays an important role in its functional antibacterial properties.

15. Kizheva, Y., Urshev, Z., Rasheva, I., Vancheva, T., Hristova, P., Bogatzevska, N., Moncheva, P. 2018. PFGE: a tool for examination of heterogeneity between the bacterial spot-causing xanthomonads of tomato plants in Bulgaria. *Zeitschrift fur Naturforschung C J Biosciences*, 73(7-8):257-264. ISSN: 09395075; 18657125. [doi: 10.1515/znc-2016-0205](https://doi.org/10.1515/znc-2016-0205).
IF₂₀₁₈ = 1.0; SJR₂₀₁₈ = 0.246 (Q3)

Резюме

Пулсовата гел-електрофореза (PFGE) е силно дискриминиращ метод за молекулярно типизиране, който се използва за епидемиологични изследвания и изследване на огнища, причинени от различни патогени, включително фитопатогенни видове от род *Xanthomonas*. Бактериалното струпяване

(bacterial spot – BS) е най-разпространената и една от най-разрушителните болести по домати и пипера в България. Известно е, че няколко вида на род *Xanthomonas* причиняват BS, но глобалното разпространение и генетичното разнообразие на тези видове не са добре проучени. Колекция от 100 щамове, причиняващи BS, изолирани през периода 1985-2012 г. от различни сортове домати и плевели, свързани с райони за производство на домати от 11 географски региона в България, бяха скринирани за генетично разнообразие чрез рестрикционен анализ на геномна ДНК с рядко-режещи ендонуклеази (*Xba*I и *Spe*I), впоследствие разделени чрез PFGE. Открити са два хаплотипа за *Xanthomonas vesicatoria* и един хаплотип за щамове на вида *Xanthomonas gardneri*.

Abstract

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) is a highly discriminative molecular typing method that is used for epidemiological studies and investigation of outbreaks caused by different pathogens, including phytopathogenic *Xanthomonas* species. Bacterial spot (BS) is the most common and one of the most destructive diseases of tomato and pepper plants in Bulgaria. Several *Xanthomonas* species are known to cause BS, but the global distribution and genetic diversity of these species are not well understood. A collection of 100 BS-causing strains, isolated during the period of 1985-2012 from different tomato cultivars and weeds associated with tomato production areas from 11 geographic regions in Bulgaria, were screened for genetic diversity by genomic DNA restriction with rare-cutting endonucleases (*Xba*I and *Spe*I) subsequently resolved by PFGE. Two haplotypes for *Xanthomonas vesicatoria* and one haplotype for *Xanthomonas gardneri* strains were found.

16. Kizheva, Y., Vancheva, T., Stoyanova, M., Bogatzevska, N., Moncheva, P., Hristova, P. 2016. 16S-23S ITS rDNA PCR-RFLP Approach as a tool for identification and differentiation of bacterial spot-causing *Xanthomonas*. *Journal of Plant Pathology*, 98(3):645-649. ISSN 1125-4653. DOI: [10.4454/JPP.V98I3.041](https://doi.org/10.4454/JPP.V98I3.041).
IF₂₀₁₆ = 1.267; SJR₂₀₁₆ = 0.271 (Q3)

Резюме

Бактериалното струпяване (bacterial spot – BS) е болест по пипера и домати, която е едно от най-важните причини, ограничаващи добивите от тези култури в България и Македония. Ето защо ранното идентифициране на патогените, причинители на тази бактериоза е важно условие за контрол и профилактика на заболяването. За да се изследва приложимостта на 16S-23S ITS rDNA PCR-RFLP като подход за идентификация и диференциация на причинителите на BS са използвани 262 български и македонски щамове, патогенни за пипер и домати. Щамове преди това са идентифицирани като *Xanthomonas euvesicatoria* (132 щамове), *Xanthomonas vesicatoria* (115 щамове) и *Xanthomonas gardneri* (15 щамове). Всеки рестрикционен анализ доведе до два профила, които групираха изследваните щамове. Рестрикцията с ендонуклеаза *Alu*I диференцира изолатите на *X. vesicatoria* от другите три вида. Ензимът *Hpa*II разделя щамове *X. euvesicatoria*. Комбинация от три рестрикционни ендонуклеази (*Alu*I, *Mbo*I, *Hpa*II) успешно диференцира четирите вида, описани като причинители на BS.

Abstract

Bacterial spot of pepper and tomato plants is one of the most important constraints limiting crops yield in Bulgaria and Macedonia. Therefore, early identification of the pathogen is necessary for the control and prevention of the disease. In order to explore the strength of 16S-23S ITS rDNA PCR-RFLP as an approach for identification and differentiation of the causative agents of bacterial spot 262 Bulgarian and Macedonian strains pathogenic of pepper and tomato plants were used. The strains were previously identified as *Xanthomonas euvesicatoria* (132 strains), *Xanthomonas vesicatoria* (115 strains), and *Xanthomonas gardneri* (15 strains). Each restriction analysis resulted in two profiles that grouped the used strains. The

restriction with *AluI* endonuclease differentiated *X. vesicatoria* isolates from the other three species. The enzyme *HpaII* separated the *X. euvesicatoria* strains. A combination of three restriction endonucleases (*AluI*, *MboI*, *HpaII*) successfully differentiated the four species described as causative agents of bacterial spot.

17. Ganchev, I., Koleva, Z., Kizheva, I., Moncheva, P., Hristova, P. 2014. Lactic acid bacteria from spontaneously fermented rye sourdough. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 20(Suppl):69-73. ISSN 1310-0351.
IF₂₀₁₄ = 0.22; SJR₂₀₁₄ = 0.197 (Q3)

Резюме

Квасът (закваска) представлява сложна биологична система, в която млечнокисели бактерии и дрожди съществуват в симбиотични взаимоотношения. Промените, които настъпват в параметрите на околната среда, засягащи микробните асоциации, водят до развитието на специфични и характерни асоциации на видове за всеки отделен случай. Целта на настоящото изследване е да характеризира състава и динамиката на растежа на микрофлората на проби от ръжен квас от района на Стара Загора, приготвена чрез смесване на вода и брашно в съотношение 1:1. Ферментацията се провежда при 30°C в продължение на 72 часа. По време на ферментацията популацията на лактобацилите показва най-висока скорост на растеж (0.12.h⁻¹) на 48 h в сравнение с растежа на популациите от стрептококи и дрожди. След 72 часа се установява намаляване на броя на всички микробни групи. Чрез фенотипни и молекулярни методи в състава на микробиота на ръжена закваска от района на Стара Загора са установени видовете *Lactobacillus spicheri*, *Lactobacillus paralimentarius*, *Lactobacillus kimchii*, *Lactobacillus sanfranciscensis*. Това е първото съобщение за тези бактерии от ръжената закваска в България.

Abstract

Sourdough represents a complex biological system in which lactic acid bacteria and yeasts exist in symbiotic relationships. Changes that occur in the environment parameters affecting microbial associations lead to the development of specific and characteristic associations of species of each particular case. The aim of this study is to characterize the composition and the growth dynamics of the microflora of rye sourdough samples from the region of Stara Zagora, prepared by mixing of water and flour in the ratio 1:1. The fermentation was carried out at 30°C for 72 hours. During the fermentation the population of the lactobacilli displayed highest growth rate (0.12.h⁻¹) at 48 h compared with the growth of streptococci and yeast populations. After 72 hours a reduction of the number of all microbial groups was determined. In the composition of rye sourdough microbiota from the region of Stara Zagora the species of *Lactobacillus spicheri*, *Lactobacillus paralimentarius*, *Lactobacillus kimchii*, *Lactobacillus sanfranciscensis* were detected by phenotypic and molecular methods. This is the first report of these bacteria from the rye sourdough in Bulgaria.

18. Koleva, Z., Dedov, I., Kizheva, I., Lipovanska, R., Moncheva, P., Hristova, P. 2014. Lactic acid microflora of the gut of snail *Cornu aspersum*. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 28(4):627-634. ISSN:1310-2818 [doi:10.1080/13102818.2014.947071](https://doi.org/10.1080/13102818.2014.947071).
IF₂₀₁₅ = 0.300; SJR₂₀₁₄ = 0.173 (Q4)

Резюме

Чревната млечнокисела микрофлора на ядливия охлюв *Cornu aspersum* е изследвана чрез културални методи и е фенотипно и молекулярно характеризирана. Изследвана е антибактериалната активност на изолатите на млечнокисели бактерии (МКБ). Охлюви в различни стадии на развитие са събрани от ферми, разположени в няколко региона на България. Сто двадесет

и два изолата, принадлежащи към групата на МКБ, са характеризирани морфологично и са разделени в четири групи. Представителни изолати от всеки морфологичен тип бяха подложени на фенотипна характеристика и молекулярна идентификация. Млечнокиселата микрофлора на храносмилателния тракт на охлювите е съставена от представители на родовете *Enterococcus* (17 изолата), *Lactococcus* (12 изолата), *Leuconostoc* (7 изолата), *Lactobacillus* (18 изолата) и *Weissella* (1 изолат). Видовата принадлежност на изолати към видовете *Lactococcus lactis* (12), *Leuconostoc mesenteroides* (4) и *Lactobacillus plantarum* (2) беше потвърдена чрез видовоспецифична PCR. Изолатите от род *Lactobacillus* бяха идентифицирани чрез анализ на последователността на 16S rDNA като *Lactobacillus brevis* (12), *Lactobacillus plantarum* (2), *Lactobacillus graminis* (1) и *Lactobacillus curvatus* (3). Видовете *L. brevis*, *L. graminis* и *L. curvatus* са открити в охлюви във фаза на хибернация, докато *L. plantarum* е идентифициран както в активна фаза, така и във фаза на хибернация. Антибактериална активност (бактериоцин-подобна) е показана само от един щам на *L. mesenteroides* P4/8 срещу вида *Propionibacterium acnes*. Настоящото проучване показва, че МКБ са компонент на микробните общности в храносмилателната система на охлювите. Това е първият доклад за щамове, принадлежащи към род *Lactobacillus*, открити в червата на *C. aspersum*.

Abstract

The intestinal lactic acid microflora of the edible snail *Cornu aspersum* was studied by culture-based methods and was phenotypically and molecularly characterized. The antibacterial activity of lactic acid bacteria (LAB) isolates was investigated. Snails in different stages of development were collected from farms located in several regions of Bulgaria. One hundred twenty-two isolates, belonging to the group of LAB, were characterized morphologically and were divided into four groups. Representative isolates from each morphological type were subjected to phenotypic characterization and molecular identification. The snail gut lactic acid microflora was composed by *Enterococcus* (17 isolates), *Lactococcus* (12 isolates), *Leuconostoc* (7 isolates), *Lactobacillus* (18 isolates) and *Weissella* (1 isolate). The species affiliation of *Lactococcus lactis* (12), *Leuconostoc mesenteroides* (4) and *Lactobacillus plantarum* (2) was confirmed by species-specific primers. The *Lactobacillus* isolates were identified by sequence analysis of 16S rDNA as *Lactobacillus brevis* (12), *L. plantarum* (2), *Lactobacillus graminis* (1) and *Lactobacillus curvatus* (3). The species *L. brevis*, *L. graminis* and *L. curvatus* were found in snails in a phase of hibernation, whereas *L. plantarum* was identified both in active and hibernation phases. Antibacterial activity (bacteriocine-like) was shown only by one strain of *L. mesenteroides* P4/8 against *Propionibacterium acnes*. The present study showed that the LAB are component of the microbial communities in the snail digestive system. This is the first report on *Lactobacillus* strains detected in the gut of *C. aspersum*.

Дата: 05.08.2024 г.

Подпис.....

/гл.ас. д-р Йоана Кижева/