

РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационен труд за придобиване на научната степен „доктор на науките“ в област на висше образование 5. Технически науки, професионално направление 5.12. Хранителни технологии, научна специалност „Технология на биологично активните вещества (вкл. ензими, хормони, белтъчини)“

Тема и автор на дисертационния труд: „Физична, химична и микробиологична характеристика на минерални, планински и изворни води от България, и биологични свойства на идентифицирани от тях микроорганизми“, от д-р инж. Недялка Нанева Вълчева.

Член на научното жури: проф. д-н Албена Стоянова Стоянова от УХТ – Пловдив, научна специалност „Технология на животинските и растителните мазнини, сапуните, етеричните масла и парфюмерийно-козметичните препарати“, Заповед на Председателя на Селскостопанска Академия – РД 05- 43/27.03.2023 г.

I. Кратко представяне на дисертанта

Д-р инж. Вълчева завършва ВИХВП (сега УХТ) през 1990 г. специалност „Технология на растителни, хранителни и вкусови продукти“. От 1990 г. до 2016 г. е преподавател в Професионална гимназия по химични и хранителни технологии „Проф. д-р Асен Златаров“ гр. Димитровград.

През годините повишава своята квалификация чрез успешно обучение по различни следдипломни специализации в няколко висши училища в страната, във ВМЕИ – Габрово (по педагогика), в Тракийски Университет – Стара Загора (по педагогика и психология на обучението по микробиология), в СУ „Св. Климент Охридски – София (по съвременни теоретични и технологични проблеми на обучението по химия).

През 2014 г. защитава дисертация на тема „Микрофлора на лечебни и изворни води в Хасковска и Старозагорска област“ в УХТ и придобива ОНС „доктор“.

От 2016 г. до момента работи като старши експерт, организатор в катедра „Биохимия, Микробиология, Физика“ в Тракийски Университет – Стара Загора.

II. Обща характеристика на дисертацията и автореферата – обем и структура

Дисертационният труд е написан на 345 стр., като експерименталните данни са представени на 124 таблици и осем фигури, и са онагледени със 187 снимки. Възприетите

раздели добре структурират дисертационния труд и дават пълна възможност за задълбочено представяне и интерпретиране на получените резултати в изпълнение на една ясно поставена изследователска цел, съпроводена от осигуряващи нейното изпълнение основни задачи.

Авторефератът вярно и пълно описва целта и задачите, материалите и методите на работа, получените опитни данни и тяхната дискусия, изводите и приносите от дисертацията, публикациите. Неговото оформление е според изискванията на Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и за заемане на академични длъжности в Селскостопанска Академия.

III. Актуалност на проблема

Нашата страна е богата на различни видове води – минерални, изворни, речни. Тези естествени водоизточници намират широко приложение в живота на хората още от древността, като се използват както за питейни, така и за технически и лечебни цели. При попадане на отпадъчни води в тези естествени водоеми обаче могат да се развият и някои патогенни и сапрофитни микроорганизми, които са опасни за здравето на хората. Поради това основната задача при изследване на питейната вода е определяне на нейните физични, химични и микробиологични показатели, с цел осигуряване запазване здравето на хората.

Считам, че темата на представената за рецензиране дисертация е изключително актуална, тъй като са изследвани различни видове води от много и разнообразни водоизточници в цялата страна, разположени на територията на 11 области. Направен е сравнителен анализ на получените резултати, потърсени са евентуалните източници за завишената контаминация при някои от водоемите.

IV. Литературна осведоменост и теоретична подготовка на кандидата

Литературният обзор е много изчерпателен, като подробно са описани ползите от водата за развитието на живота на Земята, различните видове изворни и минерални води по света и в нашата страна, както и микроорганизмите, които ги населяват и съвременните методи за тяхната идентификация.

Налице е много задълбочено познаване на научната литературата, като са цитирани 548 източника, от които 13 на кирилица и 535 – на латиница, а 87,23% от използваните източници са след 2000 г.

Разделът завършва с изводи, което позволява на д-р Вълчева правилно да формулира целта и произтичащите от нея задачи.

V. Методичен подход

Считам, че избраните методики на изследване позволяват постигане на поставената цел и задачите, формулирани в дисертационния труд. Те са много подробно описани, цитирани са съответните литературни източници и при желание от други автори могат да бъдат повторени.

Извършени са изключително голям брой експерименти. В продължение на седем години са анализирани минерални, планински и изворни води от 90 водоизточника, разположени в 11 области в страната – Хасково, Стара Загора, Ямбол, Сливен, Бургас, Варна, Пловдив, Пазарджик, София, Ловеч и Благоевград. За първи път е проведено молекулярно-генетично идентифициране на 91 микроорганизми, изолирани от гореописаните водоизточници. Определени са различни биологични активности – ензимна, антимикробна спрямо широк спектър от тест-микроорганизми. За първи път е изследвана и адхезионна способност към човешки клетки на някои от идентифицираните бактерии.

Проведени са изследвания за обработване на водите с метални йони/Evodrop, електромагнитни вълни или зеолит с цел намаляване на тяхната контаминация и понижаване на някои физични и химични показатели.

Определена е връзката между биологично активни субстанции – екстракт от водна леща (*Lemna minuta* L.), розово масло (*Rosa damascena* Mill.) и цвят от силивряк (*Haberlea rhodopensis* Friv.) към водата и образуването на водни кълстери.

Всички изследвания са проведени в трикратни повторения, като представените резултати са средноаритметични, което прави получените данни достоверни.

VI. Значимост и убедителност на получените резултати, интерпретации и изводи

Трите извода напълно съответстват на поставените задачи и правилно отразяват извършената работа в отделните части на раздел Резултати и обсъждания.

Дисертационната разработка се характеризира с лек, обработен стил, улесняващ възприемането на авторовата мисъл. Оформлението е на високо ниво. Д-р Вълчева използва безгрешно особено богат и разнообразен физичен, химичен и биологичен понятиен механизъм, наименования на различни видове микроорганизми. Това

безспорно е резултат на едно безупречно овладяване и прецизност. Върху дисертационния труд е работено изключително съзнателно и отговорно.

VII. Приноси на дисертационния труд

Приемам приносите, приложени към документите на кандидата.

За първи път е проведено толкова мащабно изследване на минерални, планински и изворни води от 90 водоизточника, разположени в 11 области от страната.

Считам, че дисертацията съдържа в себе си приноси от теоретично и теоретико-приложно естество, които могат да се обобщят, както следва:

1. Научни: Идентифициране и селектиране на 21 щамове бактерии от осем рода.

- От хипертермални минерални извори са установени екстремофили от род *Bacillus* – *B. subtilis*, *B. cereus* group, *B. vallismortis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. megaterium*, *B. simplex*, от вида *Pseudomonas fluorescens*, от вида *Geobacillus stearothermophilus* и от вида *Stenotrophomonas maltophila*.

- Представители на родове *Bacillus*, *Pseudomonas* и *Stenotrophomonas* са доказани в хипертермален лечебен извор „Рупи 2“ с температура на водата 74,3°C, и родове *Bacillus* и *Pseudomonas* – хипертермален лечебен извор „Рупи 1“ с температура на водата 73,5°C, област Благоевград.

- Най-голям е броят на факултативния термофил *Bacillus licheniformis* – 15, последван от мезофилите *B. subtilis* – 12, *B. amyloliquefaciens* – 11, *B. vallismortis* и *B. cereus* group – 9.

- Установено е като закономерност, че щамове *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens* и *B. vallismortis* могат да живеят заедно в хипертермални води.

2. Научно-приложни: На този критерий най-добре отговарят изследванията за биологичната активност на някои щамове от род *Bacillus*.

- Щамове *Bacillus subtilis* 0-2 и *B. thuringiensis* B62, които се отличават с най-силно инхибиране на продукцията на цитокина IL-8 (pg/cm³) и индуциране синтеза на трансформиращ растежен фактор бета TGF-beta (pg/cm³), са потенциално перспективни като пробиотици, самостоятелно или в съвкупност с млечнокиселите бактерии за да засилят пробиотичната активност, противовъзпалителните свойства, както и да се използват в биотехнологичното производство.

- С адхезивна активност към човешки клетки, с перспектива за приложение като пробиотици, се открояват – с умерена щам *Bacillus subtilis* 0-2 (10/10), с умерено слаба –

щам Н. Вълчева § И. Игнатов *B. subtilis* 2-2-2 (10/7), а със слаба – щамове Н. Вълчева *B. thuringiensis* B62 (10/5) и Н. Вълчева *Geobacillus stearothermophilus* (10/4).

3. Приложни: Създадени са сериозни предпоставки за използване на изследваните води и идентифицираните от тях щамове бактерии в различни приложни направления.

1. Установено е, че водите на 88 от изследваните 90 термални и нетермални минерални, планински и изворни води в 11 области от страната, са предимно с алкално и неутрално рН, което ги прави благоприятна среда за развитие на бактерии, които могат да синтезират различни биологично активни вещества и притежават антимикробни и други биологични свойства.

2. Подбрани са представители от родове *Bacillus*, *Aeromonas* и *Geobacillus* с висока протеолитична, амилалитична и липолитична активност, което ги прави перспективни като продуценти на различни ензими с цел приложение в биотехнологичното производство.

3. Подбрани са представители от род *Bacillus* с изявена антимикробна активност, което ги определя като перспективни продуценти на бактериоцини, използвани самостоятелно или като съставка на препарати за растителна защита срещу растителните патогенни плесенни гъби *Fusarium moniliforme* и *F. oxysporium*, *Penicillium* sp., *Aspergillus awamori*, *A. niger* и *A. flavus*, и Gram-отрицателната бактерия *Pseudomonas aeruginosa*.

VIII. Публикационна активност и оценка на качеството на научните публикации

Представени са 17 научни публикации, пет от които са реферирани в база данни Scopus, като една е в Q1, две – Q3 и две – Q4, като останалите 12 научни статии са публикувани в международни списания. Изследванията от дисертацията са включени във всички представени научни публикации. В пет от тях д-р Вълчева е на първо място, две са самостоятелни, в пет е на второ място, а в останалите пет – на следващи места. Всичко това ми дава основание да считам, че при тяхното оформление нейният принос е съществен.

Общият брой точки, получен от представените публикации е 143,34. По този показател д-р Вълчева напълно отговаря на наукометричните изисквания на Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и за заемане на академични длъжности в ССА.

Признанието и значимостта на научните, научно-приложните и приложните приноси, съдържащи се в публикуваните материали на д-р Вълчева, се потвърждава от представените 20 цитати, пет от които са в списания, реферирани в база данни Scopus, а останалите 15 – в международни списания.

IX. Критични бележки, въпроси и препоръки към кандидата

Нямам критични бележки по съществото на дисертационния труд, тъй като д-р Вълчева изцяло се е съобразила с направените от мен препоръки и забележки след вътрешната защита.

Познавам д-р Вълчева и личните ми впечатления са, че тя е изключително работлив, ерудиран, коректен и отговорен научен работник.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

Въз основа на използваните различни физични, химични и биологични методи на изследването, правилно изведените експерименти, направените обобщения и изводи считам, че представеният дисертационен труд отговаря на изискванията на ЗРАСРБ и Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и за заемане на академични длъжности в ССА, което ми дава основание да го оценя **ПОЛОЖИТЕЛНО**.

Кандидатът напълно покрива наукометричните изисквания, разработеният от нея дисертационен труд съдържа оригинални научни и научно-приложни приноси.

Във основа на гореизложеното предлагам да се присъди на д-р инж. Недялка Нанева Вълчева научната степен „доктор на науките“ в област на висше образование 5. Технически науки, професионално направление 5.12 Хранителни технологии, научна специалност „Технология на биологично активните вещества (вкл. ензими, хормони, белтъчини)“.

05 май 2023 г.

РЕЦЕНЗЕНТ:

/проф. д-тн Албена Стоянова Стоянова/

REVIEW

on a dissertation for acquiring the scientific degree "Doctor of Sciences"
by scientific field 5. Technical sciences, professional direction 5.12. Food technologies
scientific speciality "Technology of biologically active substances
(incl. enzymes, hormones, proteins)"

Topic and author of the dissertation: "Physical, chemical, and microbiological characteristics of mineral, mountain, and spring waters from Bulgaria, and biological properties of identified microorganisms", Dipl. Eng. Nedyalka Naneva Valcheva, Ph.D.

Member of the scientific jury: Professor Albena Stoyanova Stoyanova, D.Sc., scientific speciality "Technology of animal and vegetable fats, soaps, essential oils, perfumery and cosmetics", Order of Director of the Agricultural Academy No RD 05-43/27.03.2023.

I. Brief presentation of the author of the dissertation

Dipl. Eng. Nedyalka Valcheva, Ph.D. graduated in 1990 from Higher Institute of Food and Flavour Industries – Plovdiv (in this moment University of Food Technologies), Master's degree program of "Technology of vegetable, food and flavor products".

From 1990 to 2016, she is a lecturer at the Vocational High School of Chemical and Food Technologies "Prof. Asen Zlatarov, PhD., town Dimitrovgrad.

Over the years, it has increased its qualification through successful training in various postgraduate specializations in several higher education institutions in the country, including the Technical University – Gabrovo (in pedagogy), Trakia University – Stara Zagora (in pedagogy and psychology of microbiology education), in Sofia University "St. Kliment Ohridski" (on modern theoretical and technological problems of chemistry education).

In 2014 she defended her dissertation on "Microflora of healing and spring waters in the Haskovo and Stara Zagora regions" at UFT and acquired a Ph.D.

Since 2016 she has been working as a senior expert, organizer in Department of Biochemistry, Microbiology and Physics in Trakia University – Stara Zagora.

II. General characteristics of the dissertation and the author's summary of a dissertation – volume and structure

The dissertation is written on 345 pages, and the experimental data are presented in 124 tables and eight figures, illustrated with 187 photos. The adopted sections well structure the

dissertation work and provide a full opportunity for a thorough presentation and interpretation of the results obtained in pursuance of a clearly defined research objective, accompanied by key tasks ensuring its implementation.

The author's summary of a dissertation thesis faithfully and fully describes the purpose and tasks, the materials and methods of work, the obtained experimental data and their discussion, the conclusions and contributions of the dissertation thesis, and publications. Its layout is under the requirements of the Regulations of the Agricultural Academy on the Implementation of the Act on the Development of the Academic Staff in the Republic of Bulgaria.

III. Relevance of the studied problem

Our country is rich in different types of water – mineral, mountain, and spring. These natural water sources have been widely used in people's lives since ancient times, being used for both drinking and technical and medicinal purposes. However, when sewage enters these natural reservoirs, some pathogenic and saprophytic microorganisms can also develop, which are dangerous to human health. Therefore, the main task of the drinking water study is to determine its physical, chemical and microbiological indicators in order to ensure the preservation of human health.

In my opinion, the topic of the thesis submitted for review is highly topical, as different types of water from many and diverse water sources have been studied throughout the country, located on the territory of 11 districts. A comparative analysis of the results was made, and the possible sources of increased contamination in some of the reservoirs were sought.

IV. Literary knowledge and theoretical competence of the candidate

The literature review is very comprehensive, detailing the benefits of water for the development of life on Earth, the different types of spring and mineral waters around the world and in our country, as well as the microorganisms that inhabit them and modern methods for their identification.

There is a thorough knowledge of the scientific literature, with 548 literature sources cited, of which 13 are in Cyrillic and 535 in Latin, with 87.23% of the sources used after 2000.

The section ends with conclusions, which allowed Valcheva, Ph.D. to formulate the goal and the resulting tasks.

V. Methodical approach

I think the selected research methodologies allow for achieving the set goal and the tasks formulated in the dissertation work. They are very detailed, and the relevant literature sources are cited and can be repeated if other authors consider.

An extremely large number of experiments were performed. For seven years, mineral, mountain and spring waters from 90 water sources located in 11 districts in the country have been analyzed – Haskovo, Stara Zagora, Yambol, Sliven, Burgas, Varna, Plovdiv, Pazardzhik, Sofia, Lovech, and Blagoevgrad. For the first time, molecular genetic identification of 91 microorganisms isolated from the above water sources was carried out. Different biological activities have been determined - enzymatic and antimicrobial to various test microorganisms. The adhesion ability of some of the identified bacteria to human cells was also investigated for the first time.

Studies have been conducted to treat water with metal ions / Evodrop, electromagnetic waves or zeolite in order to reduce their contamination and some physical and chemical indicators.

The relationship between biologically active substances – common duckweed extract (*Lemna minuta* Kunth.) extract, rose oil (*Rosa damascena* Mill.) and silivrea flower (*Haberlea rhodopensis* Friv.) to water and the formation of water clusters was determined.

All studies were conducted in triplicate repetitions, the results being the arithmetic mean, making the data reliable.

VI. Significance and persuasiveness of the results obtained, interpretations and conclusions

The three conclusions fully correspond to the tasks set and correctly reflect the work done in the different parts of the Results and Discussions section.

Dissertation work is characterized by a lightweight, processed style, facilitating the perception of the author's thoughts. The layout is at a high level. Valcheva, Ph.D. infallibly uses a vibrant and diverse physical, chemical and biological conceptual mechanism, names of different types of microorganisms. This is undoubtedly the result of impeccable mastery and precision. The dissertation was worked on very consciously and responsibly.

VII. Contributions of the dissertation

I generally accept the contributions suggested in the candidate's documents.

For the first time, such a large-scale study of mineral, mountain and spring waters was conducted from 90 water sources located in 11 districts of the country.

The dissertation contains contributions of a theoretical and theoretical-applied nature. The contributions of the dissertation work can be summarized as follows:

1. Scientific: Identification and selection of 21 strains of bacteria of eight genera. Twenty-one bacterial strains from eight genera – *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Geobacillus*, *Aeromonas*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, and *Staphylococcus* – were identified and selected.

- Extremophiles from *Bacillus subtilis*, *B. cereus* group, *B. vallismortis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. megaterium*, *B. simplex*, *Pseudomonas fluorescens*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Stenotrophomonas maltophilia* were found from hyperthermal mineral springs.

- Representatives of the genera *Bacillus*, *Pseudomonas*, and *Stenotrophomonas* have been identified in the "Rupi 2" hyperthermal healing spring with a water temperature of 74.3°C, and the *Bacillus* and *Pseudomonas* genera – In the "Rupi 1" hyperthermal healing spring with a water temperature of 73.5°C, Blagoevgrad region.

- The number of the facultative thermophile *Bacillus licheniformis* was the highest – 15, followed by mesophiles *B. subtilis* – 12, *B. amyloliquefaciens* – 11, *B. vallismortis* and *B. cereus* group – 9.

- It has been established as a regularity that strains of *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, and *B. vallismortis* can live together in hyperthermal waters.

2. Scientifically applied: This criterion is best suited to studies on the biological activity of certain strains of the genus *Bacillus*.

- *Bacillus subtilis* 0-2 and *B. thuringiensis* B62 strains, which are distinguished by the strongest inhibition of the production of the cytokine IL-8 (pg/cm³) and induction of the synthesis of transforming growth factor beta TGF-beta (pg/cm³), are potentially promising as probiotics alone or in combination with lactic acid bacteria to enhance probiotic activity, anti-inflammatory properties, and to be used in biotechnological production.

- With adhesion activity to human cells, with a perspective for application as probiotics, were found the following strains – with moderate strain *Bacillus subtilis* 0-2 (10/10), with moderately weak – strain N. Valcheva § I. Ignatov *Bacillus subtilis* 2-2-2 (10/7), and with weak – strains N. Valcheva *Bacillus thuringiensis* B62 (10/5) and N. Valcheva *Geobacillus stearothermophilus* (10/4).

3. Applied: Serious prerequisites have been created for using the studied waters and the strains of they identified bacteria in different applied directions.

- It was established that the water samples of 88 of the 90 investigated thermal and non-thermal mineral, mountain, and spring waters in 11 regions of the country - Haskovo, Stara Zagora, Yambol, Sliven, Burgas, Varna, Plovdiv, Pazardzhik, Sofia, Lovech, and Blagoevgrad, are primarily with alkaline and neutral pH, which makes them a favorable environment for the development of bacteria that can synthesize various biologically active substances and possess antimicrobial and other biological properties.

- Representatives of the genera *Bacillus*, *Aeromonas*, and *Geobacillus* with high proteolytic, amylolytic and lipolytic activity were used, making them potential producers of various enzymes with application in biotechnological production.

- Representatives of the genus *Bacillus* with pronounced antimicrobial activity were used, which defines them as promising producers of bacteriocins, used alone or as a component of plant protection preparations against plant pathogenic molds *Fusarium moniliforme*, *Penicillium* sp., *Aspergillus awamori*, *A. niger*, and *A. flavus*, and *Fusarium oxysporium* and the Gram-negative bacterium *Pseudomonas aeruginosa*.

VIII. Publication activity and evaluation of the quality of scientific publications

Seventeen scientific publications are presented, five of which are referenced in the Scopus database, one with Q1, two with Q3, and two with Q4, and the remaining 12 are published in international journals. The research from the dissertation is included in all submitted scientific publications. In five of them, Valcheva Ph.D. is in the first place, two are independent, in five, she is in second place, and in the other five – in the following places. All this gives me a reason to believe its contribution is essential to their layout.

The total number of points obtained from the presented publications is 143.34. According to this indicator, the Valcheva Ph.D. fully meets the scientometric requirements of the Regulations of the Agricultural Academy on the Implementation of the Act on the Development of the Academic Staff in the Republic of Bulgaria.

The recognition and significance of the scientific, scientific, applied and applied contributions contained in the published materials of Valcheva Ph.D. is confirmed by the presented 20 citations, five of which are in journals referenced in the Scopus database and the remaining 15 – in international journals.

IX. Critical remarks, questions and recommendations to the candidate

I have no critical comments on the substance of the dissertation thesis since the Valcheva, Ph.D. fully complied with the recommendations and remarks I made after the internal defense.

I have known Valcheva Ph.D. and my personal impressions are that she is a hard-working, erudite, upright, and responsible researcher.

CONCLUSION:

Based on the various physical, chemical, and biological methods of the study, the correctly derived experiments, and the generalizations and conclusions made, I believe that the dissertation presented meets the requirements of the Law on Acquisition of Scientific Degrees and the Regulations for acquiring academic degrees and occupying academic positions in the Agricultural Academy, which gives me a reason to evaluate it **POSITIVELY**.

The candidate fully meets the scientific requirements, and the dissertation developed by her contains original scientific and applied scientific contributions.

Therefore, I positively assess the presented thesis and propose an award for Nedyalka Naneva Valcheva, Ph.D. the educational and scientific degree "Doctor of Sciences" in the Higher education area: 5. Technical sciences, Professional field: 5.12 Food technologies, scientific speciality "Technology of biologically active substances (incl. enzymes, hormones, proteins)".



05 May 2023

REVIEWER: 

/Prof. D.Sc. Albena Stoyanova Stoyanova/