



СЕЛСКОСТОПАНСКА АКАДЕМИЯ



ИНСТИТУТ ПО КРИОБИОЛОГИЯ И ХРАНИТЕЛНИ ТЕХНОЛОГИИ

д-р инж. Недялка Нанева Вълчева

**ФИЗИЧНА, ХИМИЧНА И МИКРОБИОЛОГИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА НА
МИНЕРАЛНИ, ПЛАНИНСКИ И ИЗВОРНИ ВОДИ ОТ БЪЛГАРИЯ,
И БИОЛОГИЧНИ СВОЙСТВА НА ИДЕНТИФИЦИРАНИ
ОТ ТЯХ МИКРООРГАНИЗМИ**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД

**за придобиване на научна степен „доктор на науките”
по научна област 5. Технически науки,
професионално направление 5.12. Хранителни технологии
научна специалност „Технология на биологично активните вещества
(вкл. ензими, хормони, белтъчини)”**

София, 2023 г.

Дисертационният труд е написан на 345 страници и включва 124 таблици, 8 фигури и 187 снимки. Библиографията съдържа 548 литературни източника, от които 13 на кирилица и 535 на латиница.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 2023 г. от часа в....., съгласно Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и академични длъжности в ССА пред Научно жури в състав:

ВЪВЕДЕНИЕ

Въздействието на различните микроорганизми върху околната среда и човека е обект на множество проучвания. Промените обаче в заобикалящата ни среда се отразяват върху степента и характера на взаимодействие между хората и външния свят. Стремехът на науката и практиката е насочен към създаване на оптимални възможности за ограничаване на неблагоприятното влияние на жизнената среда и по-пълното и рационално използване на естествените фактори за оздравяване. В това отношение санитарната микробиология, изучава не само микрофлората на околната среда и нейното влияние върху човека, но и ролята на отделните микроорганизми в самоочистването от органично и химично замърсяване, биодegradацията и биотрансформацията на различните вещества.

Водата играе съществена роля в жизнената дейност на човека. Естествените водоизточници все по-широко се използват за питейно и техническо водоснабдяване, както и за лечебни цели. Тя представлява естествена среда за обитаване на различни микроорганизми, които образуват сложни биоценози, обуславящи биологичното равновесие. Интензивното водоползване и непрекъснато увеличаващото се количество на отпадъчни води, могат да изчерпят самоочистителните възможности, да нарушат естественото равновесие във водата и да превърнат водният баланс в непригоден за използване. Заедно с отпадъчните води нерядко попадат и патогенни микроорганизми, които създават потенциална епидемична ситуация, вследствие на което водата играе съществена роля в разпространението на бактериални и вирусни инфекции.

Основна задача при изследване на питейна вода (от централно и нецентрално водоснабдяване) е осигуряване на доброкачествена вода за населението, което се осъществява чрез ефективен контрол. Основна задача при изследване на водата от изворите е осигуряване не само на доброкачествена вода за пиене, а и за лечение чрез ефективен и постоянен физикохимичен и микробиологичен контрол. Независимо, че водата е неблагоприятна среда за развитието на микроорганизми, в лечебните и изворни води се открива патогенна и сапрофитна микрофлора.

I. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

От направения литературен обзор могат да се обобщят следните изводи:

- Водата е среда за възникване на живот, която учените търсят и на други планети освен Земята, независимо от различните условия – температура, налягане, съдържание на атмосферата.

- Водата, която се използва за пиене, в предприятията на хранително-вкусовата промишленост, трябва да отговаря на изискванията за питейна вода. В нея се определя общият брой на бактериите, броят на колибактериите и на патогенните бактерии, като последните се контролират от хигиенно-епидемиологичните лаборатории.

- В България има много минерални лечебни и изворни води, които не се подлагат на физикохимичен и микробиологичен контрол, но са най-използваните извори за питейни нужди от населението. Подобни водоизточници са разположени на територията на почти всички области в страната.

- В много минерални, хипертермални, термални и нетермални изворни води по света и в нашата страна са открити микроорганизми с ценни свойства и биологично-активни вещества. Това разкрива една нова възможност пред изследователите за изолиране и идентифициране на нови микроорганизми, които могат да намерят приложение в бита на хората.

- Данните за биологичната активност на изолираните от различни водоизточници микроорганизми са много оскъдни. Определянето на ензимни, антимикробни и други биологични свойства на тези микроорганизми е изключително перспективно направление за биотехнологията, хранително-вкусовата промишленост, медицината, селското стопанство и други сфери от живота на хората.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящата дисертационна работа е физична, химична и микробиологична характеристика на минерални, планински и изворни води от България, и биохимичен анализ на идентифицираните от тях микроорганизми.

За постигането на тази цел са поставени следните задачи:

1. Физична, химична и микробиологична характеристика на минерални, планински и изворни води от различни области на страната.

1.1. Анализ на води от различни източници.

1.2. Регулатори на показателите на водите.

1.3. Нови източници на биологично активни субстанции и тяхното отнасяне към питейните води.

2. Молекулярно-генетично идентифициране на изолираните от водите микроорганизми.

3. Определяне на биологични свойства на идентифицираните щамове микроорганизми.

3.1. Ензимна активност.

3.2. Антимикробно действие.

3.3. Адхезивна способност към човешки епителни клетки.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

3.1. МАТЕРИАЛИ

3.1.1. Води

В продължение на седем години (от 2015 до 2021 г.) са изледвани минерални, планински и изворни води от 11 области в страната – Хасково, Стара Загора, Сливен, Ямбол, Пловдив, Пазарджик, Бургас, Варна, София, Ловеч и Благоевград.

3.1.2. Микроорганизми

Използвани са референтни щамове бактерии, дрожди и плесенни гъби, предоставени от НБПМКК, София, както и микроорганизми от колекцията на катедра „Биологически науки“ към Аграрен Факултет на Тракийски университет, Стара Загора.

3.1.3. Хранителни среди

Използвани са различни хранителни среди.

3.1.4. Реактиви

Използвани са различни реактиви.

3.2. МЕТОДИ

3.2.1. Физични, химични и биологични анализи: Цвят по Рубльовска скала; Мирис; Плътност; pH; Окисляемост; Съдържание на хлориди; Съдържание на нитрати – ВЛМ-NO₃; Съдържание на нитрити – ВЛМ-NO₂; Съдържание на амониеви йони – ВЛМ-NH₄; Обща твърдост; Съдържание на сулфати – ВЛМ-SO₄; Съдържание на калций; Съдържание на магнезий; Съдържание на фосфати – ВЛМ-PO₄; Съдържание на манган – ВЛМ-Mn; Съдържание на желязо – ВЛМ-Fe; Съдържание на флуориди – ВЛМ-F; Определяне на електропроводимост; Получаване на разтвори на метални йони.

Получаване на сухи екстракти. Растителният вид *L. minuta* Kunth. е екстрахиран в продължение на 24 h с два екстрагента – 96 % етанол и метанол при хидромодул 1:4. Следва филтруване на получените извлекци и изпаряване на екстрагентите на ротационен вакуум изпарител при температура на водата 55°C.

Определяне на биохимичен профил. Използвани са системите API 50 CHB и API 20 E (BioMerieux SA, France) за идентификация на изолираните видове бактерии въз основа на консумацията на 49 въглеродни източника. Получените резултати са обработени с Apiweb® идентификационен софтуер.

Изследване профила на ензимната активност. Използва се системата API ZYM (BioMerieux, France) за полуколичествено определяне на ензимния профил на изследваните щамове.

Определяне на адхезията на микроорганизмите. Епителната клетъчна линия HT-29 е закупена от Американската колекция за култури (ATCC), като се поддържа съгласно нейните инструкции.

Определяне на имуномодулацията на микроорганизмите. Епителната клетъчна линия CaCo-2 се култивира като монослой в среда DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco, UK), обезпечена с 10 % фетален говежди серум.

3.2.2. Микробиологични анализи

Прилагани са методите за определяне на микробиологични показатели, съгласно Наредба № 9/2001 г., ДВ бр. 30 и постановление № 178/23.07.2004 г. за качеството на водата, предназначена за питейни цели: определяне на *Escherichia coli* и колиформи бактерии; определяне на ентерококи; определяне на спори сулфитредуциращи анаероби; определяне на общ брой аеробни и факултативно анаеробни бактерии; определяне на *Pseudomonas aeruginosa*.

Определяне на коли-титър по бродилен (ферментационен) метод – метод на Гинчев.

Определяне на антимикробната активност спрямо сапрофитни и патогенни микроорганизми чрез агар – гел дифузионен метод в ямки ($d = 6 \text{ mm}$) стерилни зони около ямките. Определят се диаметрите на стерилните зони в mm.

Изолиране на тотална ДНК-PCR реакции и визуализация; 16S rDNA амплификация; Секвениране на гена на пречистена 16S рРНК.

Всички опити в дисертацията са проведени в трикратна повтораемост, като данните в таблиците и графиките са средно аритметични.

Данните, представени на фигурите, са обработени с програма Microcal Origin на Micro Soft, като са използвани статистическите функции за определяне на стандартното отклонение и максимална грешка на оценката при нива на значимост $\alpha < 0,05$.

IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЯ

4.1. ФИЗИЧНА, ХИМИЧНА И МИКРОБИОЛОГИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА НА МИНЕРАЛНИ, ПЛАНИНСКИ И ИЗВОРНИ ВОДИ ОТ РАЗЛИЧНИ ОБЛАСТИ НА СТРАНАТА

4.1.1. Анализ на води от различни източници

➤ област Хасково

Изследвани са води от следните източници:

1. Термален минерален извор „Сондаж № 2ВП“
2. Термален минерален извор „Сондаж № 3ВП“
3. Термален минерален извор „Сондаж № 4ВП“
4. Термален лечебен извор „КЕИ № 5“

Резултатите от проведения физичен и химичен анализ показват, че изследваните води се различават по стойностите на изследваните показатели, обяснимо с техния произход. С най-ниска температура са тези от термален минерален извор „Сондаж № 3ВП“ (53,5°C), а с най-висока – от термален лечебен извор „КЕИ № 5“ (58,6°C). Водите от термален минерален извор „Сондаж № 2ВП“ са с най-високо рН (7,99).

Стойностите на хлоридите са по-ниски от максимално допустимите, но тези на сулфати, калций и флуориди са по-високи. Стойностите за обща минерализация са съпоставими.

Съдържанието на изследваните микрокомпоненти и стойностите на радиологичните показатели (след извършена експертна оценка на общата индикативна доза) са в границите на нормите за минерални води.

Резултатите от проведения микробиологичен анализ показват, че изследваните води отговарят по показатели на нормите, като общият брой микроорганизми, развиващи се при 22°C и 37°C е от четири до пет пъти по-нисък.

Заклучение: Изследваните води от област Хасково

- отговарят на Наредба № 14 за курортните ресурси, курортните местности и курортите (ДВ, бр. 79 от 1987 г., поел. изм. бр. 70 от 2004 г.).

- отговарят по всички контролирани физикохимични параметри на Наредба № 9/2001 г., ДВ бр. 30 и постановление № 178/23.07.2004 г. за качеството на водата, предназначена за питейни цели.

- отговарят по всички контролирани микробиологични параметри на Наредба № 9/2001 г., ДВ бр. 30 и постановление № 178/23.07.2004 г. за качеството на водата, предназначена за питейни цели.

➤ **област Стара Загора**

Изследвани са води от следните източници:

1. Термален лечебен извор „Сондаж № Сз-7“, Павел баня
2. Термален минерален извор „Сондаж № Сз-8“, Павел баня
3. Термален лечебен извор „Сондаж № Х-19“, Павел баня
4. Хипертермален лечебен извор „Сондаж № 3“, Павел баня
5. Хипертермален лечебен извор „Сондаж I К-3“, в с. Овощник
6. Термален лечебен извор „Сондаж I Сз-37“ в с. Ягода
7. Хипотермален извор в с. Тракия
8. Хипотермален извор „Св. Николай Чудотворец“
9. Хипотермален извор „Св. Богородица“ в община Мъглиж
10. Хипотермален извор „Център“ в община Мъглиж
11. Хипотермален извор с. Копринка в община Мъглиж
12. Хипотермален извор в град Казанлък
13. Хипотермален извор в с. Крън
14. Хипотермален извор в град Енина
15. Хипотермален извор „Аязмо“
16. Хипотермален извор „Трите чучура“

Резултатите от проведения физичен и химичен анализ показват, че изследваните води се различават по стойностите на изследваните показатели, обяснимо с техния произход. С най-ниска температура са тези от всички хипотермални извори (20 – 21°C), а с най-висока от хипертермален лечебен извор „Сондаж № К-3“ в с. Овощник (78,2°C). С най-високо рН (8,68) е водата от термален лечебен извор „Сондаж № Сз-37“ в с. Ягода.

Водите от шест източника – термален лечебен извор „Сондаж № Сз-7“; Павел баня; термален минерален извор „Сондаж № Сз-8“, Павел баня; термален лечебен извор „Сондаж № Х-19“, Павел баня; хипертермален лечебен извор „Сондаж № 3“, Павел баня; хипертермален лечебен извор „Сондаж I К-3“, в с. Овощник и термален лечебен извор „Сондаж I Сз-37“ в с. Ягода са с неприемлив мирис, поради наличие на сероводород. Водите от тези шест източника са и със завишено съдържание на флуориди, което многократно е по-високо от максимално допустимите стойности, като от хипертермален лечебен извор „Сондаж № К-3“ в с. Овощник е най-високо в България (24,50 mg/dm³).

Водите от хипотермален извор в с. Тракия са с високо съдържание на нитрати, а това на манган и желязо надвишават максимално допустимите концентрации.

Стойностите за обща минерализация са много различни, като най-ниски са за водите от хипотермален извор „Св. Николай Чудотворец“.

Съдържанието на изследваните микрокомпоненти и стойностите на радиологичните показатели (след извършена експертна оценка на общата индикативна доза) са в границите на нормите за минерални води.

Резултатите от проведения микробиологичен анализ показват, че изследваните води отговарят по показатели на нормите, с изключение на тези от хипотермалните извори. В тях е завишено съдържанието на колиформи и на Gram-отрицателната бактерия *Escherichia coli*.

Заклучение: изследваните води от област Стара Загора

- отговарят на Наредба № 14 за курортните ресурси, курортните местности и курортите (ДВ, бр. 79 от 1987 г., поел. изм. бр. 70 от 2004 г.).

- отговарят по всички контролирани физикохимични параметри на Наредба № 9/2001 г., ДВ бр. 30 и постановление № 178/23.07.2004 г. за качеството на водата, предназначена за питейни цели, с изключение на водите с високо съдържание на флуориди, нитрати, манган и желязо.

- отговарят по всички контролирани микробиологични параметри на Наредба № 9/2001 г., ДВ бр. 30 и постановление № 178/23.07.2004 г. за качеството на водата, предназначена за питейни цели, с изключение на хипотермалните извори.

➤ **област Ямбол**

Изследвани са води от следните източници:

1. Хипотермален извор в с. Окоп
2. Хипотермален извор в с. Каравелово
3. Хипотермален лечебен извор „Сондаж Я №-33“ в с. Стефан Караджово

Резултатите от проведения физичен и химичен анализ показват, че изследваните води се различават по стойностите на изследваните показатели, обяснимо с техния произход. Температурата на водите (20 – 21,3°C) и pH (6,65 – 7,4) са съпоставими.

Водата от хипотермален лечебен извор „Сондаж Я №-33“ в с. Стефан Караджово е с неприемлив мирис, поради наличие на сероводород. Тези води са и с два пъти по-високо съдържание на хлориди, в сравнение с останалите две, като стойностите на трите води са значително по-ниски в сравнение с максимално допустимите концентрации. Съдържанието на калций в тях надвишава стойностите в сравнение с останалите две води, както и максимално допустимите.

Стойностите за обща минерализация на водите от хипотермален извор в с. Окоп и хипотермален извор в с. Каравелово са съпоставими, но са пет пъти по-ниски в сравнение с тези от хипотермален лечебен извор „Сондаж Я №-33“ в с. Стефан Караджово.

Съдържанието на изследваните микрокомпоненти и стойностите на радиологичните показатели (след извършена експертна оценка на общата индикативна доза) са в границите на нормите за минерални води.

Резултатите от проведения микробиологичен анализ показват, че изследваните води отговарят по показатели на нормите, с изключение на тези от хипотермален извор с. Окоп и от хипотермален лечебен извор „Сондаж Я №-33“ в с. Стефан Караджово. В тях са установени завишени норми на колиформи, Gram-отрицателната бактерия *Escherichia coli* и ентерококи, както и на общ брой микроорганизми, развиващи се при 22°C и 37°C.

Заклучение: Изследваните води от област Ямбол

- отговаря на Наредба № 14 за курортните ресурси, курортните местности и курортите (ДВ, бр. 79 от 1987 г., поел. изм. бр. 70 от 2004 г.), с изключение на тези от хипотермален лечебен извор „Сондаж Я №-33“ в с. Стефан Караджово.

- отговарят по всички контролирани физикохимични параметри на Наредба № 9/2001 г., ДВ бр. 30 и постановление № 178/23.07.2004 г. за качеството на водата, предназначена за питейни цели, с изключение на тези от хипотермален извор в с. Окоп и от хипотермален извор в „Сондаж Я № 33“ в с. Стефан Караджово.

- отговарят по всички контролирани микробиологични параметри на Наредба № 9/2001 г., ДВ бр. 30 и постановление № 178/23.07.2004 г. за качеството на водата, предназначена за питейни цели, с изключение на тези от хипотермален извор в с. Окоп и от хипотермален лечебен извор „Сондаж Я №-33“ в с. Стефан Караджово).

➤ **област Сливен**

Изследвани са води от следните източници:

1. Термален лечебен извор „Сондаж 22“, Сливенски минерални бани
2. Термален лечебен извор в с. Баня
3. Хипотермален лечебен извор КЕИ „Хаджи Димитър“, местност „Топлата вода“ град Шивачево

4. Хипотермален лечебен извор „Гунчов извор“
5. Хипотермален извор в Нова Загора

Резултатите от проведения физичен и химичен анализ показват, че изследваните води се различават по стойностите на изследваните показатели, обяснимо с техния произход. С най-ниска температура са тези от хипотермален лечебен извор „Гунчов извор“ (21,5°C) и от хипотермален извор в Нова Загора (21°C), а с най-висока – от термален лечебен извор в с. Баня (57°C). Водите от хипотермален извор в Нова Загора са с най-високо pH (8,12).

С почти два пъти повече, в сравнение с максимално допустимите стойности, е количеството на сулфати във водата от термален лечебен извор „Сондаж 22“, от Сливенски минерални бани.

Със завишено съдържание на флуориди са тези от термален лечебен извор „Сондаж 22“, от Сливенски минерални бани, от термален лечебен извор в с. Баня и от хипотермален извор в Нова Загора.

Съдържанието на изследваните микрокомпоненти и стойностите на радиологичните показатели (след извършена експертна оценка на общата индикативна доза) са в границите на нормите за минерални води.

Резултатите от проведения микробиологичен анализ показват, че всички изследвани води отговарят по микробиологични показатели на нормите, с изключение на хипотермален лечебен извор „Гунчов извор“, при който е завишено съдържанието на колиформи и Gram-отрицателната бактерия *Escherichia coli*.

Заклучение: Изследваните води от област Сливен

- отговарят на Наредба № 14 за курортните ресурси, курортните местности и курортите (ДВ, бр. 79 от 1987 г., поел. изм. бр. 70 от 2004 г.).

- не отговарят по всички контролирани физикохимични параметри на Наредба № 9/2001 г., ДВ бр. 30 и постановление № 178/23.07.2004 г. за качеството на водата, предназначена за питейни цели, с изключение на тези от термален лечебен извор „Сондаж 22“, Сливенски минерални бани, относно сулфати и флуориди, термален лечебен извор в с. Баня и хипотермален извор в Нова Загора, относно флуориди.

- отговарят по всички контролирани микробиологични параметри на Наредба № 9/2001 г., ДВ бр. 30 и постановление № 178/23.07.2004 г. за качеството на водата, предназначена за питейни цели, с изключение на тези от хипотермален лечебен извор „Гунчов извор“.

➤ **област Бургас**

Изследвани са води от следните източници:

1. Термален лечебен извор Бургаски минерални бани
2. Хипертермален лечебен извор в с. Шиварово
3. Термален лечебен извор в с. Поляново
4. Хипотермален лечебен извор „Сондаж Б-12“ в с. Съдиево
5. Термален лечебен извор „Сондаж Б-№ 73 Медово“
6. Хипотермален лечебен извор „Сондаж Б-№ 53 Каменар“

Резултатите от проведения физичен и химичен анализ показват, че изследваните води се различават по стойностите на изследваните показатели, обяснимо с техния произход. С най-ниска температура са тези от хипотермален лечебен извор „Сондаж Б-№ 53 Каменар“ (21,3°C), а с най-висока – от термален лечебен извор в с. Поляново (51°C). Стойностите на pH при водите от термален лечебен извор Бургаски минерални бани (9,95), от хипотермален лечебен извор „Сондаж Б-12“ в с. Съдиево (9,71), от

термален лечебен извор „Сондаж Б-№ 73 Медово“ (9,77) и от хипотермален лечебен извор „Сондаж Б-№ 53 Каменар“ (9,66) превишават максимално допустимите.

С най-ниско количество на калций са водите от термален лечебен извор „Сондаж Б-№ 73 Медово“ и от хипотермален лечебен извор „Сондаж Б-№ 53 Каменар“, като стойностите са около 90 пъти по-ниски в сравнение с максимално допустимите.

Всички води са със завишено съдържание на флуориди, с изключение на тези от хипертермален лечебен извор в с. Шиварово.

Съдържанието на изследваните микрокомпоненти и стойностите на радиологичните показатели (след извършена експертна оценка на общата индикативна доза) са в границите на нормите за минерални води.

Резултатите от проведения микробиологичен анализ показват, че изследваните води, с изключение на хипотермален лечебен извор „Сондаж Б-12“ в с. Съдиево, отговарят по показатели на нормите.

Заклучение: Изследваните води от област Бургас

- отговарят на Наредба № 14 за курортните ресурси, курортните местности и курортите (ДВ, бр. 79 от 1987 г., поел. изм. бр. 70 от 2004 г.).

- не отговарят по всички контролирани физикохимични параметри на Наредба № 9/2001 г., ДВ бр. 30 и постановление № 178/23.07.2004 г. за качеството на водата, предназначена за питейни цели, с изключение на тези от хипертермален лечебен извор „Шиварово“ и от хипертермален лечебен извор „Поляново“.

- отговарят по всички контролирани микробиологични параметри на Наредба № 9/2001 г., ДВ бр. 30 и постановление № 178/23.07.2004 г. за качеството на водата, предназначена за питейни цели, с изключение на хипотермален лечебен извор „Сондаж Б-12“ в с. Съдиево.

➤ **област Варна**

Изследвани са води от следните източници:

1. Термален лечебен извор (сондаж № Р-83х КК „Св. Константин и Елена“
2. Термален лечебен извор (Р-1х „Аквариума“)
3. Термален лечебен извор Р-106 х „Дом Младост“
4. Термален лечебен извор Р-161 х при басейн „Приморски“
5. Термален лечебен извор „Лековита вода“ с. Горен Чифлик

Резултатите от проведения физичен и химичен анализ показват, че изследваните води се различават по стойностите на изследваните показатели, обяснимо с техния произход. С най-ниска температура са тези от термален лечебен извор Р-106 х „Дом Младост“ (40°C), а с най-висока – термален лечебен извор Р-161 х при басейн „Приморски“ (50°C). С най-високи стойности на рН са водите от термален лечебен извор Р-106 х „Дом Младост“ (9,48) и от термален лечебен извор Р-161 х при басейн „Приморски“ (9,46).

Водите от термален лечебен извор (сондаж № Р-83х КК „Св. Константин и Елена“ и термален лечебен извор (Р-1х „Аквариума“) са с неприемлив мирис, поради наличие на сероводород.

Стойностите на останалите показатели са по-ниски в сравнение с максимално допустимите. Изключение има при тези от термален лечебен извор Р-106 х „Дом Младост“ и термален лечебен извор Р-161 х при басейн „Приморски“, в които съдържанието на желязо и амониеви йони, е съответно два пъти над максимално допустимите стойности.

Съдържанието на изследваните микрокомпоненти и стойностите на радиологичните показатели (след извършена експертна оценка на общата индикативна доза) са в границите на нормите за минерални води.

Резултатите от проведения микробиологичен анализ показват, че изследваните води отговарят по показатели на нормите, с изключение на термален лечебен извор „Лековита вода“ с. Горен Чифлик. В тях са установени завишени норми на колиформи,

Gram-отрицателната бактерия *Escherichia coli* и ентерококи, както и на общ брой микроорганизми, развиващи се при 22°C и 37°C за 48 h.

Заклучение: Изследваните води от област Варна

- отговарят на Наредба № 14 за курортните ресурси, курортните местности и курортите (ДВ, бр. 79 от 1987 г., поел. изм. бр. 70 от 2004 г.).

- отговарят по всички контролирани физикохимични параметри на Наредба № 9/2001 г., ДВ бр. 30 и постановление № 178/23.07.2004 г. за качеството на водата, предназначена за питейни цели, с изключение на тези от от термален лечебен извор (сондаж №Р-83х КК „Св. Константин и Елена“ и термален лечебен извор (Р-1х „Аквариума“), относно мирис на сероводород, който е неприемлив и термален лечебен извор Р-161-х при басейн „Приморски“, относно амониеви йони.

- отговарят по всички контролирани микробиологични параметри на Наредба № 9/2001 г., ДВ бр. 30 и постановление № 178/23.07.2004 г. за качеството на водата, предназначена за питейни цели, с изключение на термален лечебен извор „Лековита вода“ с. Горен Чифлик.

➤ **област Пловдив**

Изследвани са води от следните източници:

1. Термален лечебен извор „КЕИ Момина баня“ в град Хисаря: разположен е в регулационните граници на град Хисаря, на левия бряг на Текедере

2. Термален лечебен извор „КЕИ Момина сълза“ в град Хисаря: разположен е в регулационните граници на град Хисаря, между останките на римска крепост

3. Субтермален извор „КЕИ Стублата“ в град Хисаря

4. Термален лечебен извор „КЕИ Топлицата“ в град Хисаря

5. Термален лечебен извор „Свежест“ в град Хисаря

6. Термален лечебен извор „Бистрица“ в град Хисаря

7. Термален лечебен извор „Банчето Миромир“ в град Хисаря

8. Термален лечебен извор „Чобан чешма“ в град Хисаря

9. Термален лечебен извор „Чаир баня“ в град Хисаря

10. Термален лечебен извор „Сондаж № 1“ в град Хисаря

11. Хипотермален лечебен извор „Старо Железаре - Сондаж № 2“ в град Хисаря

12. Термален лечебен извор „Сондаж № 3“ в град Хисаря

13. Хипотермален лечебен извор „Сондаж 4“ в град Хисаря

14. Термален лечебен извор „Сондаж № 5“ в град Хисаря

15. Термален лечебен извор „Сондаж № 6“ в град Хисаря

16. Термален лечебен извор „Сондаж № 7“ в град Хисаря

17. Термален лечебен извор „Парилките“ в град Хисаря

18. Термален лечебен извор Сондаж „Българска Роза“ в град Баня

19. Термален лечебен извор КЕИ „Централен каптаж“ в град Баня

20. Изотермален лечебен извор КЕИ „Мъжко банче“ в град Баня

21. Изотермален лечебен извор КЕИ „Женско банче“ в град Баня

22. Термален лечебен извор „Сондаж 1 - Кокалче“ в град Баня

23. Субтермален лечебен извор „Сондаж № 8“ в с. Драгойново

24. Хипотермален лечебен извор „Сондаж № 9“ в с. Драгойново

25. Термален лечебен извор „Сондаж 16-Леново“ в с. Леново

26. Хипотермален лечебен извор „Сондаж 1-Асеновград“ в град Асеновград

27. Хипотермален лечебен извор „КЕИ – Бански каптаж“ в с. Нареченски бани

28. Хипотермален лечебен извор „Солено изворче“ в с. Нареченски бани

29. Хипотермален лечебен извор „Очно изворче“ в с. Нареченски бани

30. Хипотермален извор „Баджова вода“ в с. Бачково

Резултатите от проведения физичен и химичен анализ показват, че изследваните води се различават по стойностите на изследваните показатели, обяснимо с техния произход. С най-ниска температура са тези от субтермален лечебен извор „Сондаж №

8° в с. Драгойново (18,3°С), а с най-висока – от термален лечебен извор „Сондаж № 6“ в град Хисаря (50,9°С) и от термален лечебен извор „КЕИ Топлицата“ в град Хисаря (51°С). С най-високи стойности на рН са водите от термален лечебен извор „Сондаж 16-Леново“ в с. Леново (9,53), което е над максимално допустимите стойности.

Водите от термален лечебен извор Сондаж „Българска Роза“ в град Баня, термален лечебен извор КЕИ „Централен каптаж“ в град Баня, изотермален лечебен извор КЕИ „Мъжко банче“ в град Баня, изотермален лечебен извор КЕИ „Женско банче“ в град Баня, термален лечебен извор „Сондаж 1-Кокалче“ в град Баня и субтермален лечебен извор „Сондаж № 8“ в с. Драгойново са с неприемлив мирис, поради наличие на сероводород.

Водите от източниците в град Хисаря и град Баня, от термален лечебен извор „Сондаж 16-Леново“ в с. Леново и от хипотермален лечебен извор „КЕИ-Бански каптаж“ в с. Нареченски бани са със завишени концентрации на флуориди, които многократно превишават максимално допустимите стойности.

Водите от източниците в с. Нареченски бани са с два пъти по-високо съдържание на сулфати в сравнение с максимално допустимите стойности. Същите води имат и най-висока обща минерализация.

Съдържанието на изследваните микрокомпоненти и стойностите на радиологичните показатели (след извършена експертна оценка на общата индикативна доза) са в границите на нормите за минерални води.

Резултатите от проведения микробиологичен анализ показват, че изследваните води отговарят по показатели на нормите, с изключение на хипертермална лечебна вода „Парилките“ в град Хисаря и изотермална лечебна вода „КЕИ Мъжко банче“ в град Баня. В тях е завишено съдържанието на колиформи, Gram-отрицателната бактерия *Escherichia coli* и ентенококи.

Заклучение: Изследваните води от област Пловдив

- отговарят на Наредба № 14 за курортните ресурси, курортните местности и курортите (ДВ, бр. 79 от 1987 г., поел. изм. бр. 70 от 2004 г.).

- не отговарят по всички контролирани физикохимични параметри на Наредба № 9/2001 г., ДВ бр. 30 и постановление № 178/23.07.2004 г. за качеството на водата, предназначена за питейни цели, с изключение на лечебен извор „Сондаж № 9“ с. Драгойново, лечебен извор „Сондаж 1 - Асеновград“ град Асеновград и извор „Баджова вода“ с. Бачково.

- отговарят по всички контролирани микробиологични параметри на Наредба № 9/2001 г., ДВ бр. 30 и постановление № 178/23.07.2004 г. за качеството на водата, предназначена за питейни цели, с изключение на тези от хипертермална лечебна вода „Парилките“ в град Хисаря и изотермална лечебна вода „КЕИ Мъжко банче“ в град Баня.

➤ **област Пазарджик**

Изследвани са води от следните източници:

1. Хипертермален лечебен извор „Сондаж № 3-Варвара“ в с. Варвара
2. Хипертермален лечебен извор „Сондаж № 5-Варвара“ в с. Варвара
3. Хипертермален лечебен извор „Сондаж № 6-Варвара“ в с. Варвара
4. Термален лечебен извор КЕИ №2 „Ветрен дол“ в с. Варвара
5. Изотермален лечебен извор КЕИ № 1 „Банчето“ в с. Баня
6. Термален лечебен извор сондаж № 2 „Наклонен“ в с. Баня
7. Субтермален извор в град Оборище
8. Субтермален извор в Оборище – Панагюрище
9. Хипотермален извор Панагюрище – Бъта
10. Термален лечебен извор „Стрелча“
11. Хипертермален извор сондаж № 5 „Сярна баня-Велинград“
12. Хипертермален лечебен извор сондаж № 3 „Мизинка-Велинград“

13. Термален лечебен извор „Сондаж № 7КГ „Вельова баня-Велинград“

Резултатите от проведения физичен и химичен анализ показват, че изследваните води се различават по стойностите на изследваните показатели, обяснимо с техния произход. С най-ниска температура е субтермален извор в град Оборище – Панагюрище (18°C), а с най-висока – от хипертермален лечебен извор „Сондаж № 3 „Мизинка-Велинград“ (87,7°C). С най-високи стойности на рН е водата от хипертермален извор сондаж № 5 „Сярна баня-Велинград“ (9,35).

Водите от Варвара термален лечебен извор „Стрелча“ са с неприемлив мирис, поради наличие на сероводород.

Водите от хипертермален лечебен извор „Сондаж № 3-Варвара“ в с. Варвара и хипертермален лечебен извор „Сондаж № 6-Варвара“ в с. Варвара са с по-високо съдържание на сулфати в сравнение с максимално допустимите стойности.

Всички води, с изключение на тези от източниците в град Панагюрище, са със завишени концентрации на флуориди, които многократно превишават максимално допустимите стойности.

С най-висока обща минерализация са водите от хипертермалните лечебни извори в с. Варвара.

Съдържанието на изследваните микрокомпоненти и стойностите на радиологичните показатели (след извършена експертна оценка на общата индикативна доза) са в границите на нормите за минерални води.

Резултатите от проведения микробиологичен анализ показват, че изследваните води отговарят по показатели на нормите, с изключение на тези от субтермален извор в град Оборище, субтермален извор в Оборище – Панагюрище, хипотермален извор Панагюрище – Бъта. В тях е завишено съдържанието на колиформи, Gram-отрицателната бактерия *Escherichia coli* и ентерококи.

Заклучение: Изследваните води от област Пазарджик

- отговарят на Наредба № 14 за курортните ресурси, курортните местности и курортите (ДВ, бр. 79 от 1987 г., поел. изм. бр. 70 от 2004 г.).

- не отговарят по всички контролирани физикохимични параметри на Наредба № 9/2001 г., ДВ бр. 30 и постановление № 178/23.07.2004 г. за качеството на водата, предназначена за питейни цели, поради завишеното съдържание на сулфати и флуориди, с изключение на субтермален извор в град Оборище, субтермален извор в Оборище - Панагюрище и хипотермален извор Панагюрище – Бъта.

- отговарят по всички контролирани микробиологични параметри на Наредба № 9/2001 г., ДВ бр. 30 и постановление № 178/23.07.2004 г. за качеството на водата, предназначена за питейни цели, с изключение на тези от субтермален извор в град Оборище, субтермален извор в Оборище – Панагюрище, хипотермален извор Панагюрище – Бъта, относно колиформи, Gram-отрицателната бактерия *Escherichia coli* и ентерококи.

➤ област София

Изследвани са води от следните източници:

1. Хипотермален лечебен извор „Сондаж ТК № 1 Иваняне“, град Баня
2. Изотермален лечебен извор „Сондаж № 3-Горна Баня“
3. Хипертермален лечебен извор КЕИ „Пчелински бани“
4. Термален лечебен извор КЕИ „София-Център“

Резултатите от проведения физичен и химичен анализ показват, че изследваните води се различават по стойностите на изследваните показатели, обяснимо с техния произход. С най-ниска температура са водите от хипотермален лечебен извор „Сондаж ТК № 1 Иваняне“, град Баня (27°C), а с най-висока – от хипертермален лечебен извор КЕИ „Пчелински бани“ (79°C). С най-високи стойности на рН са тези от изотермален

лечебен извор „Сондаж № 3-Горна Баня“ (9,79), които се доближават до рН 10, а това са естествени католити, с антиоксидантно действие.

Водата от КЕИ „Пчелински бани“ е с неприемлив мирис, поради наличие на сероводород. При същата стойностите на хлориди и калций са по-високи от тези на останалите води, а концентрацията на сулфати и флуориди са съответно два и шест пъти завишени в сравнение с максимално допустимите. Водите от този източник са и с най-високи стойности на обща минерализация.

Съдържанието на изследваните микрокомпоненти и стойностите на радиологичните показатели (след извършена експертна оценка на общата индикативна доза) са в границите на нормите за минерални води.

Резултатите от проведения микробиологичен анализ показват, че изследваните води отговарят по показатели на нормите, като общият брой микроорганизми, развиващи се при 22°C и 37°C е от три до десет пъти по-нисък.

Заклучение: Изследваните води от област София

- отговарят на Наредба № 14 за курортните ресурси, курортните местности и курортите (ДВ, бр. 79 от 1987 г., поел. изм. бр. 70 от 2004 г.).

- отговарят по всички контролирани физикохимични параметри на Наредба № 9/2001 г., ДВ бр. 30 и постановление № 178/23.07.2004 г. за качеството на водата, предназначена за питейни цели, с изключение на тези от КЕИ „Пчелински бани“ и изотермален лечебен извор „Сондаж № 3-Горна Баня“.

- отговарят по всички контролирани микробиологични параметри на Наредба № 9/2001 г., ДВ бр. 30 и постановление № 178/23.07.2004 г. за качеството на водата, предназначена за питейни цели.

➤ област Ловеч

Изследвани са води от следните източници:

1. Термален лечебен извор „Сондаж № Р-1хг-Крушуна“

2. Хипотермален лечебен „Сондаж № L-2-Шипково“

3. Термален лечебен извор „Сондаж № Р-1хг“

Резултатите от проведения физичен и химичен анализ показват, че изследваните води се различават по стойностите на изследваните показатели, обяснимо с техния произход. С най-ниска температура е водата от хипотермален лечебен „Сондаж № L-2-Шипково“ (31,7°C), а с най-висока – от термален лечебен извор „Сондаж № Р-1хг-Крушуна“ (58°C). Стойностите на рН са най-високи при водите от термален лечебен извор „Сондаж № Р3-1хг-Чифлик“ (8,22).

Всички води са с неприемлив мирис, поради наличие на сероводород.

Водите от термален лечебен извор „Сондаж № Р-1хг-Крушуна“ са с изключително много завишени стойности на хлориди, суфати, калций и флуориди в сравнение с максимално допустимите, което определя и най-високата им обща минерализация – 10 892 mg/dm³ в България.

Съдържанието на изследваните микрокомпоненти и стойностите на радиологичните показатели (след извършена експертна оценка на общата индикативна доза) са в границите на нормите за минерални води.

Резултатите от проведения микробиологичен анализ показват, че изследваните води отговарят по показатели на нормите, като общият брой микроорганизми, развиващи се при 22°C и 37°C е многократно по-нисък.

Заклучение: Изследваните води от област Ловеч

- отговарят на Наредба № 14 за курортните ресурси, курортните местности и курортите (ДВ, бр. 79 от 1987 г., поел. изм. бр. 70 от 2004 г.).

- не отговарят по всички контролирани физикохимични параметри на Наредба № 9/2001 г., ДВ бр. 30 и постановление № 178/23.07.2004 г. за качеството на водата,

предназначена за питейни цели. Всички планински лечебни извори имат мирис на сярна.

- отговарят по всички контролирани микробиологични параметри на Наредба № 9/2001 г., ДВ бр. 30 и постановление № 178/23.07.2004 г. за качеството на водата, предназначена за питейни цели.

➤ **област Благоевград**

Изследвани са води от следните източници:

1. Хипертермален лечебен извор „Рупи 1“
2. Хипертермален лечебен извор „Рупи 2“

Резултатите от проведения физичен и химичен анализ показват, че изследваните води се различават по стойностите на изследваните показатели, обяснимо с техния произход. Водите са със съпоставими стойности на температура (73,5°C и 74,3°C) и pH (6,97 и 7,06).

Мирисът на изследваните води е неприемлив, поради наличие на сероводород.

Количествата на флуоридите и при двете води са по-високи от максимално допустимите, а тези на останалите соли са по-ниски.

Съдържанието на изследваните микрокомпоненти и стойностите на радиологичните показатели (след извършена експертна оценка на общата индикативна доза) са в границите на нормите за минерални води.

Резултатите от проведения микробиологичен анализ показват, че изследваните минерални геотермални хипертермални извори не отговарят по показател – общ брой микроорганизми при 37°C, като техният брой е над допустимите стойности за питейна вода. Установено е и наличие на колиформи и Gram-отрицателната бактерия *Escherichia coli*.

Заклучение: Изследваните води от област Благоевград

- отговарят на Наредба № 14 за курортните ресурси, курортните местности и курортите (ДВ, бр. 79 от 1987 г., поел. изм. бр. 70 от 2004 г.).

- не отговарят по всички контролирани физикохимични параметри на Наредба № 9/2001 г., ДВ бр. 30 и постановление № 178/23.07.2004 г. за качеството на водата, предназначена за питейни цели.

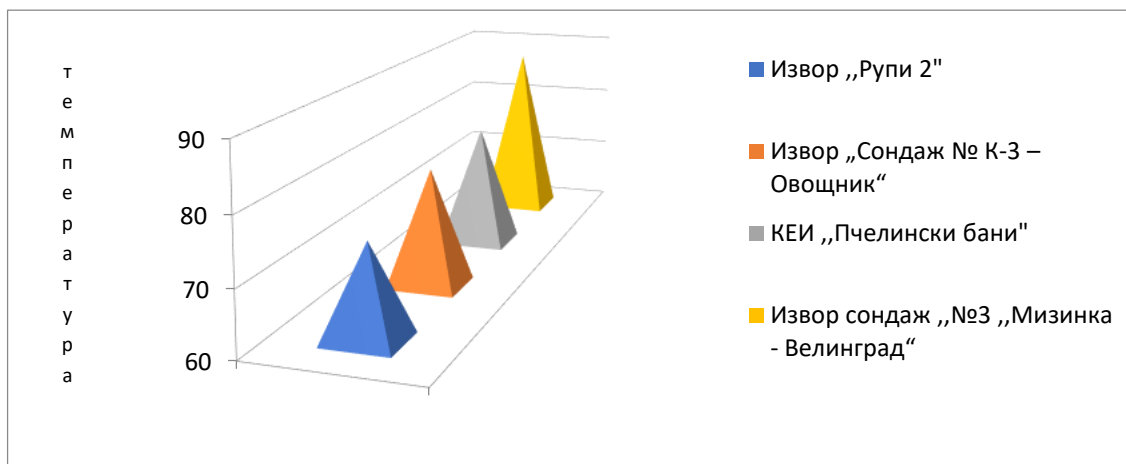
- отговарят по всички контролирани микробиологични параметри на Наредба № 9/2001 г., ДВ бр. 30 и постановление № 178/23.07.2004 г. за качеството на водата, предназначена за питейни цели, с изключение хипертермален лечебен извор „Рупи 2“, относно колиформи, Gram-отрицателната бактерия *Escherichia coli* и общ брой микроорганизми при 37°C.

Сравнителният анализ на физичните и химичните параметри, които са важни за разнообразието на микроорганизмите и синтеза на биологично активни вещества от тях е обобщен на табл. 1.

Най-голямо значение за биоразнообразието на идентифицираните микроорганизми и синтеза на биологично активни вещества има температурата, pH на средата, солите (видовия състав на катиони и аниони) и газовете във водоизточниците.

➤ **температура:** Според квалификацията на ЕС водите се класифицират на студени, топли и горещи. Студени води са тези, чиято температура на водата е по-ниска от 37°C, топли с температура от 37°C до 60°C и горещи с температура на водата на извора равна или по-висока от 60°C. Съгласно температура изследваните извори в най-голямо количество са: топли – 44 броя, студени – 36 броя и най-малко са горещите – 10 броя. Топла вода от изследваните извори има в 10 области, с изключение на Благоевград. Студена вода от изследваните извори има в седем области, с изключение на четири – Хасково, Варна, Пазарджик и Благоевград. Гореща вода от изследваните извори има само в четири от изследваните области – Стара Загора, Пазарджик, София и Благоевград.

Най-висока температура от изследваните (фиг. 1), имат минералните извори в областите Пазарджик – 87,7°C „Мизинка“, София – 79°C КЕИ „Пчелински бани“, Стара Загора – 78,8°C „Овощник“ и Благоевград, където се намира гейзерът с най-висока температура в Европа „Сепарева баня“ – 101,2°C и „Рупи 2“, в геотермална зона с 74,3°C. Тези четири извора са хипертермални и идентифицираните в тях микроорганизми издържат на екстремални условия, което е много важно за тяхното евентуално приложение в хранително-вкусовата промишленост, медицина, селското стопанство, биотехнология и др.



Фигура 1 (1*). Най-високи стойности на температурата на водата в изследваните води в България.

* номерът в скобите съответства на дисертацията

➤ **pH:** Изворните води се считат за неутрални, когато концентрацията на водородните катиони е от 6,8 до 7,2. При pH е по-ниско от 6,8 те са кисели, при pH по-високо от 7,2 – алкални, при pH 7 – неутрални. Изследваните обикновени планински минерални изворни води са в най-голямо количество алкални, на второ място са неутралните и има само две с кисела реакция в области Ямбол и Стара Загора. Неутрални и алкални води има в пет области – Хасково, Стара Загора, Ямбол, Сливен и Бургас. Алкални води има в области Варна, Пазарджик, София и Ловеч. Само неутрални води има в област Благоевград – Рупите. На фиг. 2 са обобщени най-високите и най-ниските стойности на pH в изследваните води. Най-благоприятни за развитието на бактериите и за синтеза на биологично активни вещества са неутралните и алкалните води. Способността да се приспособяват към високи или ниски стойности на температура, pH, концентрация на соли, газове, които са екстремални условия за бактериите е много важна. Алкалните води имат антиоксидантно действие, а киселите – бактерицидно. Част от изследваните извори са естествени католити, анолиты, тъй като pH на средата е около 10 или около 6,5. При такива екстремални условия, основно се развиват и размножават спорообразуващите бактерии от род *Bacillus*.

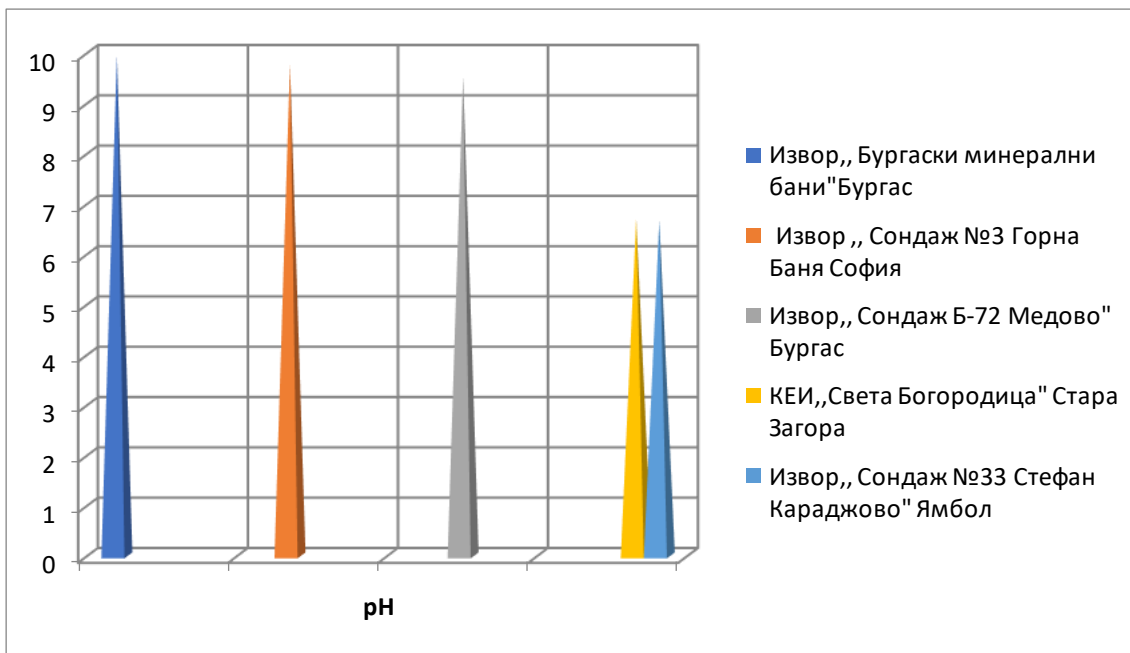
➤ **съдържание на соли и газове:** В изследваните 90 обикновени планински и минерални извора от 11 области няма с еднакъв физикохимичен състав по контролираните параметри. Всички области са уникални по съдържание на соли и газове. Топлата неутрална и алкална изворна вода, голямото разнообразие на соли и газове в изследваните извори, води до голямото биоразнообразие на микроорганизми и синтеза на разнообразни, жизнено важни биологично активни вещества, установено в изследванията на редица автори, описани в литературата.

Таблица 1 (43). Сравнителна характеристика на изследваните води в България.

Област	Температура, °C	pH	Обща мине- рализация, mg/dm ³	Електропро- водимост, µS/ cm	Ca ²⁺ , mg/dm ³	Na ⁺ , mg/dm ³	Mg ²⁺ , mg/dm ³	SO ₄ ²⁻ , mg/dm ³	Cl ⁻ , mg/dm ³	HCO ₃ ⁻ , mg/dm ³	H ₂ SiO ₃ , mg/ dm ³	F ⁻ , mg/ dm ³	Газове, H ₂ S/CO ₂ mg/ dm ³ Ra Bq/1
Хасково	53,50- 58,60	7,23- 7,94	1667,00- 1668,00	2030- 2066	176,35- 180,36	317,30- 328,00	3,00- 4,05	839,87- 868,27	60,80- 63,82	73,22- 136,48	74,70- 88,41	3,96- 4,05	H ₂ S 265,88- 336,26 CO ₂ 20,68- 22,90
Стара Загора	20,00- 78,20	6,70- 8,73	467,32- 652,00	180- 668	2,20- 140,00	112,00- 156,33	0,12- 29,16	17,69- 144,00	2,25- 22,68	109,70- 352,89	85,34- 94,38	0,01- 24,50	-
Ямбол	20,00- 21,00	6,65- 7,40	1392	841- 1604	30,00- 193,11	873,00	57,76	21,00- 73,11	20,00- 2,67	873,48	25,98	0,10- 0,85	H ₂ S 0,55 CO ₂ 493
Сливен	21,00- 57,00	6,91- 8,12	392,00- 1978,41	21- 450	510,10- 110,00	5,30- 386,00	24,32- 37,21	16,05- 475,28	3,55- 45,70	254,24	35,40	0,40- 4,53	CH ₄
Бургас	21,30- 51,00	6,91- 9,95	316,15- 526,00	422- 633	1,24- 120,00	82,73- 149,40	0,12- 67,00	19,55- 37,00	78,001 8,00	72,00- 73,65	42,00- 52,69	0,40- 7,73	H ₂ S <1,4 Ra 36,56
Варна	40,00- 50,00	7,40- 9,48	596,00	350- 768	41,00- 120,00	49,24- 53,56	21,00- 68,00	36,21- 77,00	64,41- 100,00	297,00- 328,00	25,55- 30,32	0,43- 0,71	CH ₄ , J ₂
Плов- див	18,30- 51,00	7,22- 9,53	249,00- 419,00	25,00- 1882	3,01- 82,16	59,91- 300,35	<0,12- 46,00	7,317- 540,00	7,80- 55,67	65,90- 457,64	56,59- 123,50	0,24- 5,50	H ₂ S<0,05 Ra 100-1200
Пазард- жик	59,00- 87,70	7,90- 9,39	655,00- 768,00	827- 1035	11,50- 53,11	132,15- 171,49	0,12- 15,86	24,00- 309,24	18,30- 5,17	79,32- 130,58	54,10- 105,0	3,82- 10,58	H ₂ S 0,87

Продължение на табл. 1 (43).

София	27,00-79,00	8,15-9,79	142,85-915,00	169	1,4-30,86	29,24-223,05	< 0,97	19,75-440,51	2,66-18,79	78,30	37,67 - 102,77	0,16-9,48	H ₂ S 7,30 CO ₂ 32,07
Ловеч	31,70-58,00	7,40-8,22	335-10892	8,26-916	24,05-741,48	8,26-2729	27,36-231,04	33,54-2133,60	3,72 - 4680	32,99-219,66	18,49-44,21	1,38-3,49	CO ₂ 15,48 H ₂ S 15,48
Благоевград	73,50-74,30	6,97-7,06	2296	2160-2230	31,06-80,24	509,50	13,38-14,35	80,24 - 92,59	36,173-6,45	1495 - 1526	79,74 - 83,00	5,99-6,09	CO ₂ < 89,16 H ₂ S 0,53 Ra 2,62



Фигура 2 (2). Най-високи и ниски стойности на рН на водата в изследваните води в България.

Таблица 2 (44). Сравнително разглеждане на вида на изследваните води в зависимост от физичните и химичните показатели по области.

Област	Вид на изследваните водата според физикохимичната характеристика
Хасково	- термална сулфатно-калциево-натриева, силициева вода, съдържаща флуорид, сероводород, въглероден диоксид;
Стара Загора	- хипотермална, термална и хипертермална, хидрокарбонатно-натриева, флуорна и силициева вода с ниски концентрации на сероводород и въглероден диоксид; - термална, хидрокарбонатно-сулфатна, натриева, флуоридна и силициева вода.
Ямбол	- хипотермална, хидрокарбонатно-калциево-магнезиева вода, съдържаща сероводород и въглероден диоксид.
Сливен	- термална, хидрокарбонатно-сулфатна, натриево-калциева вода, съдържаща флуорид;
Бургас	- термална, хлоридно-хидрокарбонатна, натриева, силициева вода, съдържаща флуорид и сероводород; - субтермална, хидрокарбонатна, натриева, съдържаща флуорид; - хипотермална, хидрокарбонатна, натриева, силициева, съдържаща флуорид.
Варна	- термална, минерализирана, хидрокарбонатна, калциева, натриева и магнезиева, някои съдържат метан.
Пазарджик	- хипертермална, сулфатно-натриева и силициева вода, съдържаща флуорид и сероводород; - хипертермална, хидрокарбонатно-сулфатна, натриева, силициева вода, съдържаща флуорид и сероводород; - изотермална, минерализирана, сулфатно-натриево-калциева, съдържаща флуорид и сероводород; - хипотермална, сулфатно-хидокарбонатна-натриева, силициева вода, съдържаща флуорид и сероводород.

Продължение на табл. 2 (44).	
Пловдив	- термална, хидрокарбонатна-сулфатна-натриева и силициева, съдържаща флуорид и сероводород; - термална, сулфатно-хидрокарбонатна, натриева, силициева и флуорна вода, съдържаща сероводород; - хипотермална, хидрокарбонатна натриево-калциева и силициева вода, съдържаща сероводород.
София	- хипертермална, хлоридно-сулфатна, натриево-калциево-магнезиева, силициева вода, съдържаща флуорид, сероводород и въглероден диоксид; - хипотермална, изотермална, хидрокарбонатно-сулфатна, натриева вода, съдържаща сероводород и въглероден диоксид.
Ловеч	- хипотермална минерализирана, сулфатно хидрокарбонатно-калциево-магнезиева, съдържаща сероводород и въглероден диоксид.
Благоевград	- хипертермална, слабо минерализирана, хидрокарбонатна натриево-калциева и магнезиева вода, съдържаща сероводород и въглероден диоксид.

В условията на благоприятна епидемиологична обстановка, храните в това число и водата, се изследват основно за *Salmonella* и *Staphylococcus aureus*. За останалите микроорганизми се съди по т. нар. хигиенно-показателни (индикаторни) микроорганизми. Причинителите на хранителни токсико-инфекции и токсикози имат чревен произход и попадат в храносмилателния тракт от фекални маси. Като хигиенно-показателни микроорганизми за фекално замърсяване се използва групата на колиформите и групата на фекалните ентенококи.

Колиформите са Gram-отрицателни, пръчковидни, неспорообразуващи, подвижни, факултативно анаеробни микроорганизми. Те се развиват при температури от 30, 35 и 37°C и усвояват лактозата с образуване на газ. Обхващат четири рода: *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* и от последния род е отделен нов род *Raoultella* (атакува белите дробове и причинява пневмония). Всички тези родове имат еднакви морфологични, културални свойства, но се различават по биохимични, серологични и биологични свойства. От тях с най-важно значение са *Escherichia coli*. Разделянето на тези четири рода става по биохимичен път като се използва комплекса IMVIC (ИМАЦ): (И – реакция за индол; М – реакция с метилрот; А – образуване на ацетоин от глюкоза (реакция на Фогес – Проскауер); Ц – усвояване на цитрати).

Фекалните ентенококи са Gram-положителни коковидни неспорообразуващи, неподвижни, факултативно анаеробни микроорганизми. Те не растат във всички среди. Развиват се при температури от 10°C до 45°C, рН 9,6, при 6,5 % NaCl, издържат на 40 % жлъчни соли. Унищожават се при температура 60°C за повече от 30 min.

Обобщените опитни данни, представени на табл. 3, показват, че коли-титърът е по-малък от 100 в 14 от изследваните 90 извора.

Съдържанието на колибактерии във водите, е указател за наличие на източник на фекално замърсяване.

Таблица 3 (45). Определяне наличието на колиформи в изследваните води върху среда на Ендо.

Водоизточник	Колиформи
Термален минерален извор „Сондаж № 2ВП“, област Хасково	—
Термален лечебен извор „Сондаж № 3ВП“, област Хасково	—
Термален лечебен извор на „КЕИ № 5“, област Хасково	—
Термален лечебен извор „Сондаж № Сз-7“ Павел баня, област Стара Загора	—
Термален лечебен извор „Сондаж № Сз-8 Павел баня, област Стара Загора	—

<i>Продължение на табл. 3 (45).</i>	
Термален лечебен извор „Сондаж № Х-19“ Павел баня, област Стара Загора	—
Хипертермален лечебен извор „Сондаж № 3-Павел баня, област Стара Загора	—
Хипертермален лечебен извор „Сондаж № К-3-Овощник“, област Стара Загора	—
Термален лечебен извор „Сондаж № Сз-37-Ягода“, област Стара Загора	—
Хипотермален извор в с. Тракия, област Стара Загора	+
Хипотермален извор „Свети Николай Чудотворец“, област Стара Загора	+
Хипотермален извор „Света Богородица“ в община Мъглиж, област Стара Загора	+
Хипотермален извор „Център“ в община Мъглиж, област Стара Загора	—
Хипотермален извор с. Копринка в община Мъглиж, област Стара Загора	+
Хипотермален извор в град Казанлък в община Мъглиж, област Стара Загора	—
Хипотермален извор в Крън – Енина, област Стара Загора	—
Хипотермален извор в град Енина, област Стара Загора	+
Хипотермален извор „Аязмо“, област Стара Загора	—
Хипотермален извор „Трите чучура“, област Стара Загора	—
Хипотермален извор в с. Окоп, област Ямбол	+
Хипотермален извор в с. Каравелово, област Ямбол	—
Хипотермален лечебен извор „Сондаж Я №-33 с. Стефан Караджово“, област Ямбол	—
Термален лечебен извор „Сондаж 22- Сливенски минерални бани, област Сливен	—
Термален лечебен извор с. Баня, област Сливен	—
Хипотермален лечебен извор КЕИ „Хаджи Димитър“, местност „Топлата вода“ град Шивачево, област Сливен	—
Хипотермален лечебен извор „Гунчов извор“, област Сливен	+
Хипотермален извор в Нова Загора, област Сливен	—
Термален лечебен извор Бургаски минерални бани, област Бургас	—
Хипертермален лечебен извор с. Шиварово, област Бургас	—
Термален лечебен извор с. Поляново, област Бургас	—
Хипотермален лечебен извор „Сондаж Б-12“ в с. Съдиево, област Бургас	+
Термален лечебен извор „Сондаж Б-№ 73 Медово“, област Бургас	—
Хипотермален лечебен извор „Сондаж Б-№ 53 Каменар“, област Бургас	—
Термален лечебен извор сондаж № Р-83х КК „Св. Константин и Елена“, област Варна	—
Термален лечебен извор Р-1х „Аквариума“, област Варна	—
Термален лечебен извор „Р-106 х „Дом Младост“, област Варна	—
Термален лечебен извор „Р-161х Варна при басейн „Приморски“, област Варна	—
Термален лечебен извор „Лековита вода“ с. Горен Чифлик, област Варна	+
Термален лечебен извор „КЕИ Момина баня“ в град Хисаря, област Пловдив	—
Термален лечебен извор „КЕИ Момина сълза“ в град Хисаря, област Пловдив	—
Субтермален извор „КЕИ Стублата“ в град Хисаря, област Пловдив	—
Термален лечебен извор „КЕИ Топлицата“ в град Хисаря, област Пловдив	—
Термален лечебен извор „Свежест“ в град Хисаря, област Пловдив	—
Термален лечебен извор „Бистрица“ в град Хисаря, област Пловдив	—
Термален лечебен извор „Банчето Миромир“ в град Хисаря, област Пловдив	—

<i>Продължение на табл. 3 (45).</i>	
Термален лечебен извор „Чобан чешма“ в град Хисаря, област Пловдив	—
Термален лечебен извор „Чаир баня“ в град Хисаря, област Пловдив	—
Термален лечебен извор „Сондаж № 1“ в град Хисаря, област Пловдив	—
Хипотермален лечебен извор „Старо Железаре-сондаж № 2“ в град Хисаря, област Пловдив	—
Термален лечебен извор „Сондаж № 3“ в град Хисаря, област Пловдив	—
Хипотермален лечебен извор „Старо Железаре-сондаж 4“ в град Хисаря, област Пловдив	—
Термален лечебен извор „Сондаж № 5“ в град Хисаря, област Пловдив	—
Термален лечебен извор „Сондаж № 6“ в град Хисаря, област Пловдив	—
Термален лечебен извор „Сондаж № 7“ в град Хисаря, област Пловдив	—
Термален лечебен извор „Парилките“ в град Хисаря, област Пловдив	—
Термален лечебен извор сондаж „Българска Роза“ в град Баня, област Пловдив	—
Термален лечебен извор КЕИ „Централен каптаж“ град Баня, област Пловдив	—
Изотермален лечебен извор КЕИ „Мъжко банче“ град Баня, област Пловдив	+
Термален лечебен извор КЕИ „Женско банче“ град Баня, област Пловдив	—
Термален лечебен извор „Сондаж 1-Кокалче“ в град Баня, област Пловдив	—
Субтермален лечебен извор „Сондаж № 8“ в с. Драгойново, област Пловдив	—
Хипотермален лечебен извор „Сондаж № 9“ в с. Драгойново, област Пловдив	—
Термален лечебен извор „Сондаж 16- еново“ в с. Леново, област Пловдив	—
Хипотермален лечебен извор „Сондаж 1-Асеновград“ в град Асеновград, област Пловдив	—
Хипотермален лечебен извор „КЕИ-Бански каптаж“ в с. Нареченски бани, област Пловдив	—
Хипотермален лечебен извор „КЕИ-Бански каптаж“ в с. Нареченски бани, област Пловдив	—
Хипотермален лечебен извор „Солено изворче“ в с. Нареченски бани, област Пловдив	—
Хипотермален извор „Баджова вода“ в с. Бачково, област Пловдив	—
Хипертермален лечебен извор „Сондаж № 3-Варвара“ в с. Варвара, област Пазарджик	—
Хипертермален лечебен извор „Сондаж № 5-Варвара“ в с. Варвара, област Пазарджик	—
Хипертермален лечебен извор „Сондаж № 6-Варвара“ в с. Варвара, област Пазарджик	—
Термален лечебен извор КЕИ № 2 „Ветрен дол“ в с. Варвара, област Пазарджик	—
Изотермален лечебен извор КЕИ № 1 „Банчето“ в с. Баня, област Пазарджик	—
Термален лечебен извор сондаж № 2 „Наклонен“ в с. Баня, област Пазарджик	—
Субтермален извор в град Оборище, област Пазарджик	+
Субтермален термален извор в Оборище – Панагюрище, област Пазарджик	+
Хипотермален извор Панагюрище - Бъта, област Пазарджик	+
Термален лечебен извор „Стрелча“, област Пазарджик	—
Хипертермален извор сондаж № 5 „Сярна баня-Велинград“, област Пазарджик	—

Хипертермален лечебен извор сондаж „№ 3 „Мизинка-Велинград“, област Пазарджик	—
Термален лечебен извор „Сондаж № 7КГ“ „Вельова баня-Велинград“, област Пазарджик	—
Хипотермален лечебен извор „Сондаж ТК № 1 Иваняне“ град Баня, област София	—
Изотермален лечебен извор „Сондаж № 3-Горна Баня“, област София	—
Хипертермален лечебен извор КЕИ „Пчелински бани“, област София	—
Термален лечебен извор КЕИ „София-Център“, област София	—
Термален лечебен извор „Сондаж № Р-1хг-Крушуна“, област Ловеч	—
Хипотермален лечебен извор „Сондаж №L-2-Шипково“, област Ловеч	—
Термален лечебен извор „Сондаж № Р-1хг-Чифлик“, област Ловеч	—
Хипертермален лечебен извор „Рупи 1“, област Благоевград	—
Хипертермален лечебен извор „Рупи 2“, област Благоевград	+

+ присъствие на коли-бактерии; — отсъствие на коли-бактерии.

Всички показатели, характеризиращи минералните, планинските и изворните води са проведени чрез мембранна филтрация и е определено най-малкото количество от водите, в които не се откриват патогенните бактерии.

Заклучение:

От прорасналите колонии от 90 минерални, планински и изворни води на територията на 11 области – Стара Загора, Ямбол, Сливен, Бургас, Варна, Пловдив, Пазарджик, София, Ловеч и Благоевград, след микробиологичен анализ са изолирани 91 неизвестни видове микроорганизми, които са подложени на идентификация, съгласно съвременни конвенционални и молекулярно-генетични методи.

4.1.2. Регулатори на позателите на водите

Изследвано е влиянието на различни регулатори на показателите на водите. Получените опитни резултати са в потвърждение на данните от литературата, че метални йони/Evodrop, електромагнитни вълни и зеолит могат да се използват при регулиране на показателите на водите.

4.1.3. Нови източници на биологичноактивни субстанции и тяхното отнасяне към питейните води

Интердисциплинарният подход може да бъде основа за бъдещи разработки на нови търговски продукти, включващи изследваните биологично активни субстанции – екстракт от водна леща (*L. minuta*), розово масло (*R. damascena* Mill.) и цвят от силивряк (*H. rhodopensis* Friv.) и тяхното отнасяне към водата.

4.2. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНО ИДЕНТИФИЦИРАНЕ НА ИЗОЛИРАНИ ОТ ВОДИТЕ МИКРООРГАНИЗМИ

При изолиране на неизвестен вид от природата, трябва да се проведат физиолого-биохимични и молекулярни изследвания, за да се разкрият неговите свойства, които са необходими за определяне на вида. Резултатите, които се получават при тези проучвания, се сравняват със свойствата на референтните щамове при идентифицирането на неизвесния щам.

Само за област Хасково идентификацията на щамове е извършена чрез физиолого-биохимични тестове и молекулярно-генетични методи.

За щамове, изолирани от води в останалите 10 области е използван VITEK® MS /Масспектрометрична система за микробна идентификация/.

➤ **област Хасково**

Идентифицирани са четири щам микрорганізми, изолирани от следните източника:

- Термален минерален извор „Сондаж № 2ВГ”
- Термален лечебен извор „Сондаж № 3ВГ”
- Термален лечебен извор на „КЕИ 5”
- Термален лечебен извор Хасковски минерални бани

Резултатите показват, че щамовете са със съпоставими показатели; всички са Gram-положителни; два от тях са факултативни анаероби, един – облигатен аероб и един – аероб.

Способността на микроорганизмите да усвояват въглерод е представена на табл.

4.

Таблица 4 (57). Усвояване на въглеродни източници от щамовете, изолирани от води в област Хасково.

Източници на въглерод	Щам Н. Вълчева Р1	Щам Н. Вълчева Р2	Щам Н. Вълчева Я1	Щам Н. Вълчева Я2
Glycerol	+ (90 – 100 %)	+ (50 %)	+ (50 %)	+ (50 %)
Erythritol	-	-	-	-
D-arabinose	-	-	-	-
L-arabinose	+ (90 – 100 %)	-	-	-
Ribose	+ (90 – 100 %)	+ (90 – 100 %)	+ (90 – 100 %)	+ (90 – 100 %)
D-xylose	-	-	-	-
L-xylose	-	-	-	-
Adonitol	-	-	-	-
β -methyl-D-xyloside	-	-	-	-
Galactose	-	-	-	-
D-glucose	+ (90 – 100 %)	+ (90 – 100 %)	+ (90 – 100 %)	+ (90 – 100 %)
D-fructose	+ (90 – 100 %)	+ (90 – 100 %)	+ (90 – 100 %)	+ (90 – 100 %)
D-mannose	+ (90 – 100 %)	-	-	-
L-sorbose	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-
Inositol	+ (90 – 100 %)	-	-	-
Manitol	+ (90 – 100 %)	-	-	-
Sorbitol	+ (90 – 100 %)	-	-	-
α -methyl-D-mannoside	-	-	-	-
α -methyl-D-glucoside	+ (90 – 100 %)	-	-	-
N-acetyl-glucosamine	-	+ (90 – 100 %)	+ (90 – 100 %)	+ (90 – 100 %)
Amigdalinal	-	+ (50 %)	-	-
Arbutin	+ (90 – 100 %)	+ (90 – 100 %)	+ (90 – 100 %)	+ (90 – 100 %)
Esculin	+ (90 – 100 %)	+ (90 – 100 %)	+ (90 – 100 %)	+ (90 – 100 %)
Salicin	+ (90 – 100 %)	+ (90 – 100 %)	+ (90 – 100 %)	+ (90 – 100 %)
Cellobiose	+ (90 – 100 %)	+ (50 %)	+ (50 %)	+ (50 %)
Maltose	+ (90 – 100 %)	+ (90 – 100 %)	+ (90 – 100 %)	+ (90 – 100 %)
Lactose	+ (90 – 100 %)	-	-	-
Melibiose	+ (90 – 100 %)	-	-	-
Saccharose	+ (90 – 100 %)	+ (90 – 100 %)	+ (90 – 100 %)	+ (90 – 100 %)
Trehalose	+ (90 – 100 %)	+ (90 – 100 %)	+ (90 – 100 %)	+ (90 – 100 %)
Inulin	-	-	-	-

Продължение на табл. 4 (57)				
Melezitose	-	-	-	-
D-raffinose	+ (90 – 100 %)	-	-	-
Amidon	+ (90 – 100 %)	+ (90 – 100 %)	+ (90 – 100 %)	+ (90 – 100 %)
Glycogen	+ (90 – 100 %)	+ (90 – 100 %)	+ (90 – 100 %)	+ (90 – 100 %)
Xylitol	-	-	-	-
β -gentiobiose	-	-	-	-
D-turanose	-	-	-	-
D-lyxose	-	-	-	-
D-tagarose	-	-	-	-
D-fructose	-	-	-	-
L-fructose	-	-	-	-
D-arabitol	-	-	-	-
L-arabitol	-	-	-	-
Gluconate	-	-	-	-
2-keto-gluconate	-	-	-	-
5-keto-gluconate	-	-	-	-
Идентификация	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens</i>	<i>Bacillus cereus</i> S74	<i>Bacillus thuringiensis</i> B62	<i>Bacillus subtilis</i> 0-2
Достоверност, %	99,8	99	99	99

Видовата принадлежност на щамовете е представена на табл. 5. Данните показват много висок процент на достоверност при тяхната идентификация.

Таблица 5 (58). Видова принадлежност на щамовете, изолирани от води в област Хасково.

Щам	Видова принадлежност (Референтен щам)	Достоверност, %
Н. Вълчева P1	<i>Bacillus methylotrophicus</i> PY	99,9
Н. Вълчева P2	<i>Bacillus cereus</i> S74	99,9
Н. Вълчева Я1	<i>Bacillus thuringiensis</i> B62	99,9
Н. Вълчева Я2	<i>Bacillus subtilis</i> 0-2	99,9

➤ област Стара Загора

Идентифицирани са 16 щам микрорганізми, изолирани от следните източника:

- Термален лечебен извор сондаж № Сз-7 Павел баня.
- Термален лечебен извор сондаж № Сз-8 Павел баня
- Термален лечебен извор сондаж № Х-19 Павел баня
- Хипертермален лечебен извор сондаж № 3 Павел баня
- Хипертермален лечебен извор „Сондаж № К-3-Овощник“
- Термален лечебен извор „Сондаж № Сз-37-Ягода“
- Хипотермален извор в с. Тракия
- Хипотермален извор „Свети Николай Чудотворец“
- Хипотермален извор „Света Богородица“ в община Мъглиж
- Хипотермален извор „Център“ в община
- Хипотермален извор с. Копринка в община Мъглиж
- Хипотермален извор в град Казанлък в община Мъглиж
- Хипотермален извор в Крън – Енина
- Хипотермален извор в град Енина
- Хипотермален извор „Аязмо“
- Хипотермален извор „Трите чучура“

Резултатите показват, че щамовете са със съпоставими показатели; всички са Gram-положителни; шест от тях са факултативни аенароби, а останалите 10 – аероби.

Видовата принадлежност на щамовете е представена на табл. 6. Данните показват много висок процент на достоверност при тяхната идентификация.

Таблица 6 (63). Видова принадлежност на щамове, изолирани от води в област Стара Загора.

Щам	Видова принадлежност (Референтен щам)	Достоверност, %
Н. Вълчева BTh	<i>Bacillus thuringiensis</i> B62	99,9
Н. Вълчева BV 2-1-2	<i>Bacillus vallismortis</i>	99,9
Н. Вълчева BA 2-1-3	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99,9
Н. Вълчева BL 3-1	<i>Bacillus licheniformis</i>	100
Н. Вълчева BAP 4-1	<i>Bacillus altitudinis/pumilus</i>	99,9
Н. Вълчева BS 2-1-1	<i>Bacillus subtilis</i>	99,9
Н. Вълчева BV 2-1-2	<i>Bacillus vallismortis</i>	99,9
Н. Вълчева BS 2-1-1	6 (<i>Bacillus subtilis</i>)	99,9
Н. Вълчева BL 3-1	<i>Bacillus vallismortis</i>	99,9
Н. Вълчева BA 2-1-3	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99,9
Н. Вълчева BTh	<i>Bacillus thuringiensis</i> B62	99,9
Н. Вълчева BV 2-1-2	<i>Bacillus vallismortis</i>	99,9
Н. Вълчева BA 2-1-3	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99,9
Н. Вълчева BCG 1-1	<i>Bacillus cereus</i> group	99,9
Н. Вълчева BAP 4-1	<i>Bacillus altitudinis/pumilus</i>	99,9
Н. Вълчева BCG 1-1	<i>Bacillus cereus</i> group	99,9

➤ **област Ямбол**

Идентифицирани са четири щамове микроорганизми, изолирани от следните източника:

- Хипотермален извор в с. Окоп
- Хипотермален извор в с. Каравелово

Резултатите показват, че щамове са със съпоставими показатели; всички са Gram-положителни; три от тях са факултативни анаероби, а един – аероб.

Видовата принадлежност на щамове е представена на табл. 7. Данните показват много висок процент на достоверност при тяхната идентификация.

Таблица 7 (67). Видова принадлежност на щамове, изолирани от води в област Ямбол.

Щам	Видова принадлежност (Референтен щам)	Достоверност, %
Н. Вълчева BTh	<i>Bacillus thuringiensis</i> B62	99,9
Н. Вълчева BCG 25-1	<i>Bacillus cereus</i> group	99,9
Н. Вълчева BA 22-1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99,9
Н. Вълчева BCG 12-1	<i>Bacillus cereus</i> group	100

➤ **Област Сливен**

Идентифицирани са четири щамове микроорганизми, изолирани от следните източника:

- Термален лечебен извор „Сондаж 22-Сливенски минерални бани“
- Термален лечебен извор с. Баня
- Хипотермален лечебен извор КЕИ „Хаджи Димитър“, местност „Топлата вода“ град Шивачево
- Хипотермален лечебен извор „Гунчов извор“
- Хипотермален извор в Нова Загора

Резултатите показват, че щамове са със съпоставими показатели; всички са Gram-положителни; два от тях са факултативни анаероби, а три – аероби.

Видовата принадлежност на щамове е представена на табл. 8. Данните показват много висок процент на достоверност при тяхната идентификация.

Таблица 8 (71). Видова принадлежност на щамовете, изолирани от води в област Сливен.

Щам	Видова принадлежност (Референтен щам)	Достоверност, %
Н. Вълчева BS 17-1	<i>Bacillus subtilis</i>	99,9
Н. Вълчева BV 17-1	<i>Bacillus vallismortis</i>	99,9
Н. Вълчева BA 17-1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99,9
Н. Вълчева BL 15-1	<i>Bacillus licheniformis</i>	100
Н. Вълчева BL 15-	<i>Bacillus licheniformis</i>	99,9

➤ **област Бургас**

Идентифицирани са шест щам микрорганізми, изолирани от следните източника:

- Термален лечебен извор Бургаски минерални бани
- Термален лечебен извор с. Шиварово
- Термален лечебен извор с. Поляново
- Хипотермален лечебен извор „Сондаж Б-12“ в с. Съдиево
- Термален лечебен извор „Сондаж Б-№ 73 Медово “
- Хипотермален лечебен извор „Сондаж Б-№ 53 Каменар “

Резултатите показват, че щамовете са със съпоставими показатели; един е Gram-отрицателен, а останалите пет – Gram-положителни; четири от тях са факултативни анаероби, един – облигатен аероб и един – аероб.

Видовата принадлежност на щамовете е представена на табл. 9. Данните показват много висок процент на достоверност при тяхната идентификация.

Таблица 9 (75). Видова принадлежност на щамовете, изолирани от води в област Бургас.

Щам	Видова принадлежност (Референтен щам)	Достоверност, %
Н. Вълчева BL 14-1	<i>Bacillus licheniformis</i>	99,9
Н. Вълчева BCG 12-1	<i>Bacillus cereus group</i>	99,9
Н. Вълчева BrB 24-1	<i>Brevibacillus sp.</i>	99,9
Н. Вълчева PsA 10-1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100
Н. Вълчева BL 14-1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99,9
Н. Вълчева BCG 12-1	<i>Bacillus subtilis</i>	99,9

➤ **област Варна**

Идентифицирани са четири щам микрорганізми, изолирани от следните източника:

- Термален лечебен извор (сондаж № P-83x KK „Св. Константин и Елена“)
- Термален лечебен извор (P-1x „Аквариума“)
- Термален лечебен извор P-106 x „Дом Младост“
- Термален лечебен извор P-161x Варна при басейн „Приморски“

Резултатите показват, че щамовете са със съпоставими показатели; всички са Gram-положителни; три от тях са факултативни анаероби, а един – аероб.

Видовата принадлежност на щамовете е представена на табл. 10. Данните показват много висок процент на достоверност при тяхната идентификация.

Таблица 10 (79). Видова принадлежност на щамовете, изолирани от води в област Варна.

Щам	Видова принадлежност (Референтен щам)	Достоверност, %
Н. Вълчева BL 7-1	<i>Bacillus licheniformis</i>	99
Н. Вълчева BS 5-1-1	<i>Bacillus subtilis</i>	99
Н. Вълчева BV 5-1-2	<i>Bacillus vallismortis</i>	98
Н. Вълчева BA 5-1-3	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	98

➤ **област Пловдив**

Идентифицирани са 13 щамове микроорганизми, изолирани от следните източника:

- Термален лечебен извор „КЕИ Момина баня“ в град Хисаря
- Термален лечебен извор „КЕИ Момина сълза“ в град Хисаря
- Хипотермален лечебен извор „КЕИ Стублата“ в град Хисаря
- Термален лечебен извор „КЕИ Централен каптаж“ в град Баня
- Термален лечебен извор „Сондаж 1 - Кокалче“ в град Баня
- Термален лечебен извор „Сондаж - Българска Роза“ в град Баня
- Изотермален лечебен извор „КЕИ Мъжко банче“ в град Баня
- Изотермален лечебен извор „КЕИ Женско банче“ в град Баня
- Хипотермален лечебен извор „Бански извор“ в с. Нареченски бани
- Хипотермален лечебен извор „Бански извор“ в с. Нареченски бани
- Хипотермален лечебен извор „Солен извор“ в с. Нареченски бани
- Лечебен извор „Очно изворче“ в с. Нареченски бани
- Извор „Баджова вода“ в с. Бачково

Резултатите показват, че щамовете са със съпоставими показатели; три от тях са Gram-отрицателни, а останалите 10 – Gram-положителни; пет от тях са факултативни анаероби, а останалите осем – аероби.

Видовата принадлежност на щамовете е представена на табл. 10. Данните показват много висок процент на достоверност при тяхната идентификация.

Таблица 10 (83). Видова принадлежност на щамовете, изолирани от води в област Пловдив.

Щам	Видова принадлежност (Референтен щам)	Достоверност, %
Н. Вълчева BS 2-1-1	<i>Bacillus subtilis</i>	99
Н. Вълчева BC 16-1	<i>Bacillus cereus group</i>	99
Н. Вълчева BAP 13-1	<i>Bacillus altitudinis/pumilus</i>	99
Н. Вълчева BL 3-1	<i>Bacillus licheniformis</i>	100
Н. Вълчева BS 2-1-1	<i>Bacillus subtilis</i>	99
Н. Вълчева BV 2-1-2	<i>Bacillus vallismortis</i>	98
Н. Вълчева BA 2-1-3	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	93
Н. Вълчева BA 2-1-3	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	98
Н. Вълчева BIAS hs-1	<i>Aeromonas sobria</i> hs-1	97
Н. Вълчева BIKO LF-1	<i>Klebsiella oxytoca</i> LF-1	99
Н. Вълчева BIBASP SDF004	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> SDF004	99
Н. Вълчева SIBT KU4	<i>Bacillus thuringiensis</i> KU4	100
Н. Вълчева BVBC S72	<i>Bacillus cereus</i> S72	99

➤ **област Пазарджик**

Идентифицирани са 13 щамове микроорганизми, изолирани от следните източника:

- Хипертермален лечебен извор „Сондаж №3-Варвара“ в с. Варвара
- Хипертермален лечебен извор „Сондаж № 5-Варвара“ в с. Варвара
- Хипертермален лечебен извор „Сондаж № 6-Варвара“ в с. Варвара
- Термален лечебен извор КЕИ № 2 „Ветрен дол“ в с. Варвара
- Изотермален лечебен извор КЕИ №1 „Банчето“ в с. Баня
- Термален лечебен извор сондаж № 2 „Наклонен“ в с. Баня
- Субтермален извор в град Оборище
- Субтермален извор в Оборище – Панагюрище
- Хипотермален извор Панагюрище – Бъта
- Термален лечебен извор „Стрелча“
- Хипертермален извор сондаж № 5 „Сярна баня-Велинград“
- Хипертермален лечебен извор сондаж № 3 „Мизинка-Велинград“

- Термален лечебен извор сондаж № 7КГ „Вельова баня-Велинград“

Резултатите показват, че щамове са със съпоставими показатели; 12 от тях са Gram-положителни, а един – Gram-отрицателен; седем от тях са факултативни анаероби, а шест – аероби.

Видовата принадлежност на щамове е представена на табл. 11. Данните показват много висок процент на достоверност при тяхната идентификация.

Таблица 11 (87). Видова принадлежност на щамове, изолирани от води в област Пазарджик.

Щам	Видова принадлежност (Референтен щам)	Достоверност, %
Н. Вълчева BS 2-1-2	<i>Bacillus subtilis</i>	99,9
Н. Вълчева BS 8-1-1	<i>Bacillus subtilis</i>	99,9
Н. Вълчева BL 7-1	<i>Bacillus licheniformis</i>	99,9
Н. Вълчева BL 7-1	<i>Bacillus licheniformis</i>	100
Н. Вълчева BA 8-1-3	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99,9
Н. Вълчева BV 8-1-2	<i>Bacillus vallismortis</i>	98,9
Н. Вълчева BCG 10-1	<i>Bacillus cereus group</i>	99,9
Н. Вълчева StX 14-2	<i>Staphylococcus xylosus</i>	99,9
Н. Вълчева StX 14-2	<i>Staphylococcus xylosus</i>	99,9
Н. Вълчева BL 7-1	<i>Bacillus licheniformis</i>	99,9
Н. Вълчева GBSTh	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	99,9
Н. Вълчева GBSTh	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	100
Н. Вълчева BL 7-1	<i>Bacillus licheniformis</i>	99,9

➤ област София

Идентифицирани са три щамове микроорганизми, изолирани от следните източника:

- Изотермален лечебен извор „Сондаж № 3-Горна Баня“
- Хипертермален лечебен извор КЕИ „Пчелински бани“
- Хипертермален лечебен извор КЕИ „София-Център“

Резултатите показват, че щамове са със съпоставими показатели; всички са Gram-положителни; един от тях е факултативен анаероб, а два – аероби.

Видовата принадлежност на щамове е представена на табл. 12. Данните показват много висок процент на достоверност при тяхната идентификация.

Таблица 12 (91). Видова принадлежност на щамове, изолирани от води в област София.

Щам	Видова принадлежност (Референтен щам)	Достоверност, %
Н. Вълчева BL 30-1	<i>Bacillus licheniformis</i>	99,9
Н. Вълчева GbSt	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	99,9
Н. Вълчева BS 2-1-1	<i>Bacillus subtilis</i>	99,9

➤ област Ловеч

Идентифицирани са три щамове микроорганизми, изолирани от следните източника:

- Термален лечебен извор „Сондаж № P-1хг-Крушуна“
- Изотермален лечебен извор „Сондаж № L-2-Шипково“
- Термален лечебен извор „Сондаж № P-1хг-Чифлик“

Резултатите показват, че щамове са със съпоставими показатели; всички са Gram-положителни; един от тях е факултативен анаероб, а останалите два – аероби.

Видовата принадлежност на щамове е представена на табл. 13. Данните показват много висок процент на достоверност при тяхната идентификация.

Таблица 13 (95). Видова принадлежност на щамовете, изолирани от води в област Ловеч.

Щам	Видова принадлежност (Референтен щам)	Достоверност, %
Н. Вълчева BL 8-1	<i>Bacillus licheniformis</i>	99,9
Н. Вълчева BA 2-1-3	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99,9
Н. Вълчева BS 6-1-1	<i>Bacillus subtilis</i>	99,9

➤ **област Благоевград**

Идентифицирани са 16 щам микрорганізми, изолирани от следните източника:

- Хипертермален лечебен извор „Рупи 1“ – девет щам
- Хипертермален лечебен извор „Рупи-2“ – седем щам

Резултатите показват, че щамовете са със съпоставими показатели; четири от тях са Грам-отрицателни, а останалите 12 – Грам-положителни; два от тях са факултативни анаероби, два – облигатни аероби и останалите 12 – аероби.

Видовата принадлежност на щамовете е представена на табл. 14. Данните показват много висок процент на достоверност при тяхната идентификация.

Таблица 14 (99). Видова принадлежност на щамовете, изолирани от води в област Благоевград.

Щам	Видова принадлежност (Референтен щам)	Достоверност, %
Н. Вълчева BCG 25-1	<i>Bacillus cereus group</i>	99,9
Н. Вълчева BV 3-2-1	<i>Bacillus vallismortis</i>	99,9
Н. Вълчева BS 2-2-2	<i>Bacillus licheniformis</i>	99,9
Н. Вълчева BA 3-2-3	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99,9
Н. Вълчева BM 2-3	<i>Bacillus megaterium</i>	99,9
Н. Вълчева BsX 2-6	<i>Bacillus simplex</i>	99,9
Н. Вълчева PsFI 3-8	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99,9
Н. Вълчева GBSTt	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	99,9
Н. Вълчева BL 6-1	<i>Bacillus licheniformis</i>	99,9
Игнатов § Вълчева GBSSt	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	99,9
Игнатов § Вълчева StMalt 1-1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99,9
Игнатов § Вълчева BV 3-2-1	<i>Bacillus vallismortis</i>	99,9
Игнатов § Вълчева BS 2-2-2	<i>Bacillus subtilis</i>	99,9
Игнатов § Вълчева BA 3-2-3	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99,9
Игнатов § Вълчева BM 2-3	<i>Bacillus megaterium</i>	99,9
Игнатов § Вълчева BsX 2-6	<i>Bacillus simplex</i>	99,9
Игнатов § Вълчева PsF 3-8	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99,9

Сравнителният анализ показва, че са идентифицирани 21 различни вида микрорганізми, обобщени в табл. 15.

Таблица 15 (100). Идентифицирани микрорганізми от води в различни области на страната.

Област	Видова принадлежност (Референтен щам)	Брой различни видове	Брой извори
Хасково	<i>Bacillus methylotrophicus</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus thuringiensis</i> <i>Bacillus subtilis</i>	4	3
Стара Загора	<i>Bacillus cereus group</i> <i>Bacillus thuringiensis</i>	7	16

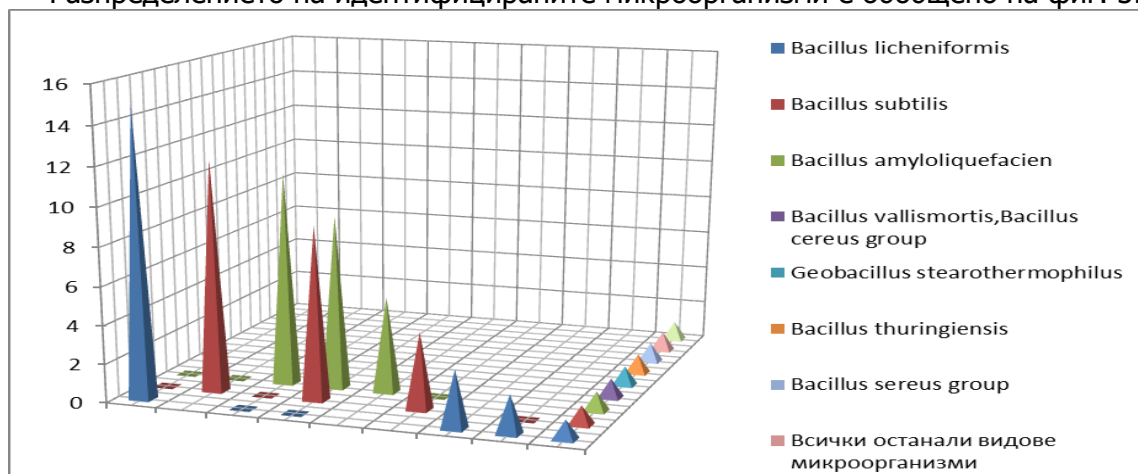
Продължение на табл. 15 (100).			
	<i>Bacillus vallismortis</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus altitudinis/pumilus</i> <i>Bacillus subtilis</i>		
Ямбол	<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>Bacillus cereus group</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	3	3
Сливен	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus vallismortis</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Bacillus licheniformis</i>	4	5
Бургас	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus cereus group</i> <i>Brevibacillus sp.</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Bacillus subtilis</i>	5	6
Варна	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus vallismortis</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	4	5
Пловдив	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus cereus group</i> <i>Bacillus altitudinis/pumilus</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus vallismortis</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Aeromonas sobria</i>	8	30
Пазарджик	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Bacillus vallismortis</i> <i>Bacillus cereus group</i> <i>Staphylococcus xylosus</i> <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	7	12
София	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Geobacillus stearothermophilus</i> <i>Bacillus subtilis</i>	3	4
Ловеч	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Bacillus subtilis</i>	3	3
Благоевград	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus cereus group</i> <i>Bacillus vallismortis</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Bacillus megaterium</i> <i>Bacillus simplex</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Geobacillus stearothermophilus</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	10	2

Видовото разпределение на идентифицираните микроорганизми по области е представено на табл. 16.

Таблица 16 (101). Разпределение на идентифицираните микроорганизми по области.

Вид микроорганизъм	Област	Брой области
<i>Bacillus methylophilus</i>	Хасково	1
<i>Bacillus cereus</i>	Хасково	1
<i>Bacillus cereus group</i>	Стара Загора, Ямбол, Бургас, Пловдив, Пазарджик, Благоевград	6
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Хасково, Стара Загора, Ямбол	3
<i>Bacillus subtilis</i>	Хасково, Стара Загора, Сливен, Бургас, Варна, Пловдив, Пазарджик, София, Ловеч, Благоевград	10
<i>Bacillus vallismortis</i>	Стара Загора, Сливен, Варна, Пловдив, Пазарджик, Благоевград	6
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Стара Загора, Ямбол, Сливен, Бургас, Варна, Пловдив, Пазарджик, София, Ловеч, Благоевград	10
<i>Bacillus licheniformis</i>	Стара Загора, Сливен, Бургас, Варна, Пловдив, Пазарджик, София, Ловеч, Благоевград	9
<i>Bacillus altitudinis/pumilus</i>	Стара Загора, Пловдив	2
<i>Brevibacillus sp.</i>	Бургас	1
<i>Staphylococcus xylophilus</i>	Пазарджик	1
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	Пазарджик, София, Благоевград	3
<i>Bacillus megaterium</i>	Благоевград	1
<i>Bacillus simplex</i>	Благоевград	1
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Благоевград	1
<i>Bacillus amyloliquefaciens subsp. plantarum</i>	Пловдив	1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Пловдив	1
<i>Aeromonas sobria</i>	Пловдив	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Бургас	1
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Благоевград	1

Разпределението на идентифицираните микроорганизми е обобщено на фиг. 3.



Фигура 3 (6). Най-голям брой микроорганизми по вид в изследваните води в България.

Установяването на различни представители от род *Bacillus* в изследваните от нас водоизточници не противоречи на данните от литературата, тъй като е известна тяхната устойчивост на по-високи температури на водата.

Като закономерност се установява, че във всички изследвани хипертермални извори на България, мезофилните спробразуващи бактерии *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* и *Bacillus vallismortis*, живеят винаги заедно. Навярно взаимно подпомагат своето развитие, размножаване, приспособяване чрез отделяните вторични метаболити извън клетката в борбата за оцеляване срещу термалните и хипертермалните организми.

В изследваните водоизточници най-често срещани са щамовете *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus* и *Bacillus methylotrophicus*.

Видът *Bacillus cereus* е Gram-положителен, факултативен анаероб, и подобно на други представители на рода може да произвежда защитни ендоспори. Неговите вирулентни фактори включват церолизин и фосфолипаза С.

В голяма част от изследваните изворни води е идентифициран и видът *Bacillus thuringiensis*. Той е Gram-положителна, обитаваща почвата бактерия. Освен това, редица екстрацелуларни съединения, произвеждани от вида *Bacillus thuringiensis*, включително фосфолипази, хитинази, протеази, δ -екзотоксини, се използват като инсектицидни протеини и антибиотични съединения с противогъбична активност

Другият идентифициран микроорганизъм от рода е *Bacillus subtilis*. Той е Gram-положителна, каталазо-положителна, аеробна, пръчковидна бактерия, имаща способността да образува ендоспора, позволяваща ѝ да преживява при екстремни условия на околната среда. Видът е общопризнат като безопасен, независимо че има някои щамове които са в тясна връзка с патогенните *Bacillus cereus* и *Bacillus thuringiensis*.

Видът *Bacillus methylotrophicus* е Gram-положителна бактерия, която се среща в почва и други източници. Тя е с доказани антимикробни, цитотоксични и инсектицидни свойства, обяснимо със синтезираните липопептиди и други биологично активни вещества.

Заклучение:

- броят на различните видове микроорганизми, не зависи от броя изследвани извори, а от температура, рН, различните видове разтворени соли (катиони и аниони), разтворени газове в изследваната изворна вода.

- най-широко разпространени са *Bacillus subtilis* и *Bacillus amyloliquefaciens*, идентифицирани в 10 от 11 изследвани области, последвани от *Bacillus licheniformis* в девет области и *Bacillus vallismortis* в шест области. Щамовете *Bacillus thuringiensis* и *Geobacillus stearothermophilus* са в три области. Всички видове микроорганизми са в различна комбинация по области, като няма такива с еднаква комбинация идентифицирани бактерии. Синтезът на биологично активни вещества зависи от вида на микроорганизма, а не зависи от областта на изолиране на щама.

- Идентифицираните единични видове микроорганизми са разпределени в три области – Бургас (*Brevibacillus* sp., *Pseudomonas aeruginosa*), Пловдив (*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*, *Klebsiella oxytoca*, *Aeromonas sobria*) и Благоевград (*Bacillus megaterium*, *Bacillus simplex*, *Pseudomonas fluorescens*, *Stenotrophomonas maltophilia*).

- Всички микроорганизми имат специфични изисквания към хранителна среда, температурен диапазон и оптимална температура, рН диапазон, оптимално рН на развитие и биосинтез, затова видът и разпределението им по области, с различен физикохимичен състав, температура и рН на изворите е строго специфично.

- Най-голям е броят на факултативния термофил *Bacillus licheniformis* – 15, последван от мезофилите *Bacillus subtilis* – 12, *Bacillus amyloliquefaciens* – 11, *Bacillus vallismortis* и *Bacillus cereus* group – 9, това се дължи на широкия им температурен и рН диапазон и непретензиозност, относно хранителни вещества.

- Отчита се като закономерност – щамове *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* и *Bacillus vallismortis* да живеят винаги съвместно в хипертермални води, което най-вероятно се дължи с цел защита от неблагоприятните условия, освен способността им на спорулират. Другите щамове са по два, три, четири, или по единично, което е указание за тяхната висока специфичност и изисквания относно условия и хранителна среда на развитие.

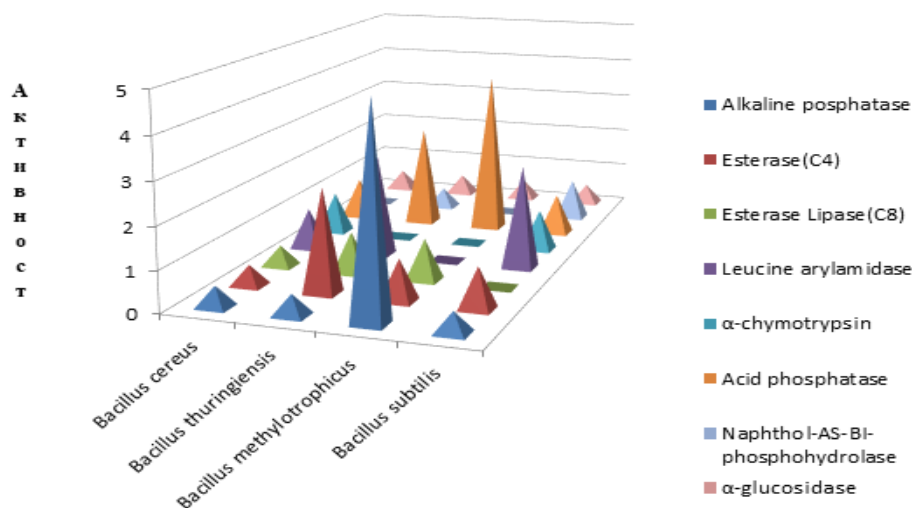
4.3.ОПРЕДЕЛЯНЕ НА БИОЛОГИЧНИ СВОЙСТВА НА ИДЕНТИФИЦИРАНИТЕ ЩАМОВЕ

4.3.1. Ензимна активност

Обобщението на данните показва, че най-висока ензимна активност (амилолитична, протеолитична и липолитична) проявяват следните изолирани щамове бактерии:

1. *Bacillus thuringiensis* - Н. Вълчева BTh B62 – амилолитична активност 25 mm, протеолитична активност 26,5 mm;
2. *Bacillus methylotrophicus* - Н. Вълчева BMTh PY4 – амилолитична активност 24 mm, протеолетична активност 20 mm;
3. *Bacillus subtilis* - Н. Вълчева BS 17 -1, Н. Вълчева BS 2-1-1, Н. Вълчева BS 2-2- 2 – амилолитична активност 26 mm, протеолитична активност 27 mm;
4. *Bacillus amyloliquefaciens* - Н. Вълчева BA 22-1 – амилолитична активност 26 mm, протеолетична активност 27 mm, липолитична активност 22 mm;
5. *Bacillus licheniformis* - Н. Вълчева BL 3–1, Н. Вълчева BL 30-1, Н. Вълчева BL 7-1– амилолитична активност 26 mm, протеолитична активност 27 mm, липолитична активност 24 mm;
6. *Geobacillus stearothermophilus* - Н. Вълчева GbSt област Пазарджик, София и Благоевград – амилолитична активност 25 mm, протеолитична активност 27 mm, липолитична активност 24 mm;
7. *Bacillus cereus group* - Н. Вълчева BCG 25-1 – амилолитична активност 24 mm, протеолитична активност 26 mm, липолитична активност 23 mm.

Проведените изследвания по определяне на ензимната активност на изолираните щамове показват, че всяка култура се характеризира със специфичен ензимен набор (фиг. 4).



Фигура 4 (7). Ензимен профил на щамове, изолирани от води в област Хасково – *Bacillus cereus* (P1), *Bacillus thuringiensis* (P2), *Bacillus methylotrophicus* (Я1), *Bacillus subtilis* (Я2).

* ензимната активност се определя по цветна скала от 0 (липса на ензимна активност) до 5 (максимална ензимна активност)

Щамове *Bacillus cereus* (P1), *Bacillus thuringiensis* (P2), *Bacillus methylotrophicus* (Я1), *Bacillus subtilis* (Я2) се характеризират с алкално фосфатазна, липазна (C4), липазна (C8), кисело фосфатазна и α -глюкозидазна активност.

Щам *Bacillus thuringiensis* (P2), за разлика от другите четири, притежава левцинова ариламидазна и нафтол – AS – BI – фосфохидролазна активност.

Данните за амилазната активност на щамове *Bacillus licheniformis* BL 3-1, BL 30-1 и BL 7-1 не противоречат на данните от литературата.

Данните за ензимна активност на изследвания щам *Geobacillus stearothermophilus* - Н. Вълчева GbSt от водоизточници в област Варна, Бургас и Благоевград не противоречат на данните от литературата.

4.3.2. АНТИМИКРОБНО ДЕЙСТВИЕ

Използваните тест-микроорганизми в проучването са едни от най-често срещаните патогенни микроорганизми. Плесените гъби (най-вече *Penicillium* sp.) и дрождите са познати като организми, които са отговорни за развалата на храните. Някои плесенни гъби (*Fusarium* sp., *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*) са важни растителни патогени и отделяните от тях микотоксини причиняват отравяния при хората и домашните животни.

Представени са резултатите само с най-силно изразено инхибиращо действие срещу патогенни токсигенни микроорганизми.

➤ *Bacillus cereus*

Резултатите за антимикробната активност на щам Н. Вълчева BCG 25-1 /област Ямбол/ показват, че той няма активност спрямо плесенните гъби от род *Mucor*, проявява изразено инхибиращо действие спрямо *Aspergillus oryzae* и *A. niger*, спрямо *A. awamori*, *Fusarium moliniforme* и *Penicillium* sp. – има висока антимикробна активност, а към *Rhizopus* sp. – притежава добре изразена активност; спрямо *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterococcus faecalis* активността е слаба, а тест-културата *Escherichia coli* е резистентна.

➤ *Bacillus thuringiensis*

Резултатите за антимикробната активност на щам Н. Вълчева BTh B62 /област Стара Загора/ показват, че той проявява изразено инхибиращо действие спрямо плесенните гъби *Penicillium* sp., *Fusarium moliniforme* и от род *Aspergillus*, спрямо *Mucor* sp. – ефектът е слаб, а *Rhizopus* sp. е резистентен; активността спрямо *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterococcus faecalis* е слаба, а тест-културата *Escherichia coli* е резистентна; спрямо изследваните дрожди *Saccharomyces cerevisiae* активността е слаба, а тест-културата *Candida utilis* е резистентна.

➤ *Bacillus subtilis*

Резултатите за антимикробната активност на щамове Н. Вълчева BS 17-1, Н. Вълчева BS 18, Н. Вълчева BS 22-1 /области Сливен, София и Благоевград/ показват, че и трите щамове проявяват изразено инхибиращо действие спрямо плесенните гъби *Penicillium* sp. и *Fusarium moliniforme*, спрямо *Rhizopus* sp. – ефектът е слаб. Спрямо тест-културите от род *Mucor* те не проявяват антимикробен ефект, с изключение само при клетъчната суспензия и културалната среда спрямо *Mucor* sp. Спрямо представителите на род *Aspergillus* щамове показват силно изразено инхибиращо действие; спрямо бактерията *Enterococcus faecalis* те проявяват твърде слабо антимикробно действие, а тест-културите *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa* са резистентни; спрямо дрождите – не е установена инхибираща активност.

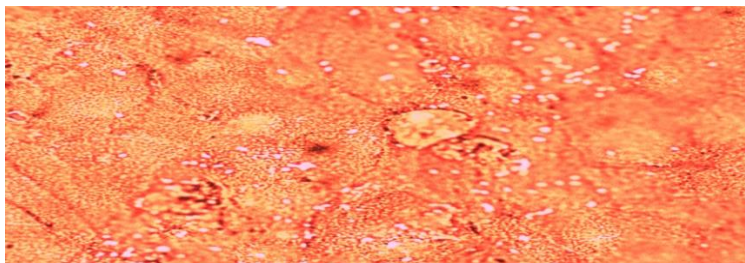
➤ *Bacillus methylotrophicus*

Резултатите за антимикробната активност на щам Н. Вълчева BMTTh PY5 /област Хасково/ показват, че той проявява изразено инхибиращо действие спрямо плесенните гъби *Penicillium* sp., *Fusarium moliniforme*, *Mucor mucedo* и от род *Aspergillus*, а ефектът спрямо *Rhizopus* sp. по-слаб; спрямо бактериите – тест-културите са резистентни; спрямо дрождите – се установява стимулиране на растежа.

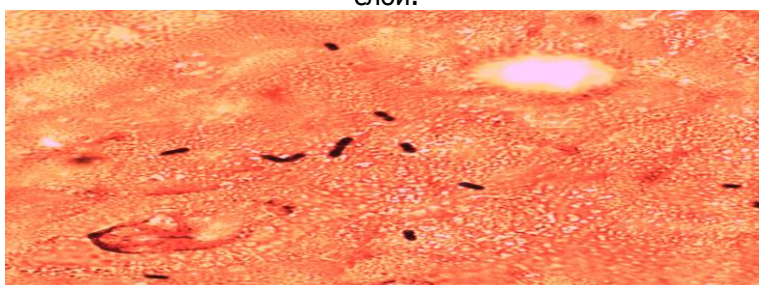
4.3.3. АДХЕЗИВНАТА СПОСОБНОСТ КЪМ ЧОВЕШКИ ЕПИТЕЛНИ КЛЕТКИ

При изследванията за адхезия върху човешка карциномна епителната клетъчна линия HT-29 са подбрани 12 бактерии от род *Bacillus* и род *Geobacillus*, идентифицирани в обикновени, планински и минерални води от различни области на страната и условия на развитие.

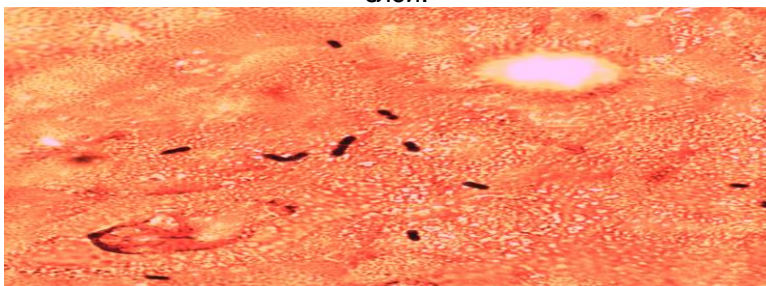
Резултатите от направения анализ за адхезията на бактерии от род *Bacillus* и род *Geobacillus* са представени на табл. 17 и снимки 1-14.



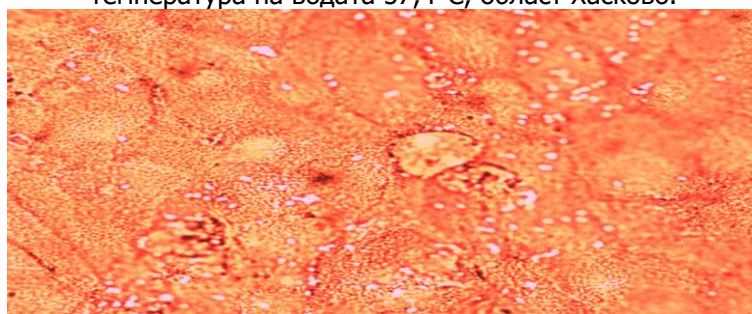
Снимка 1 (174). Контролна снимка за липса на адхезия на бактерии върху човешки епителен слой.



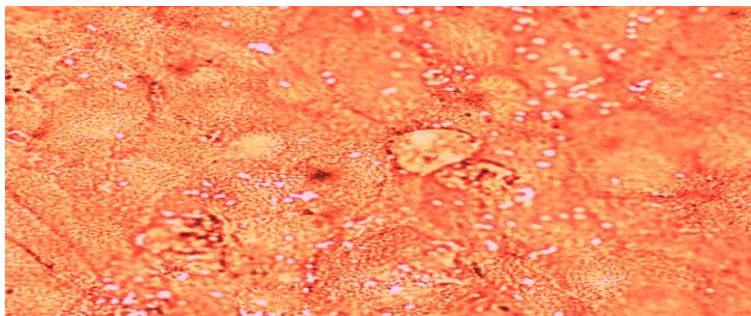
Снимка 2 (175). Контролна снимка за умерена адхезия на бактерии върху човешки епителен слой.



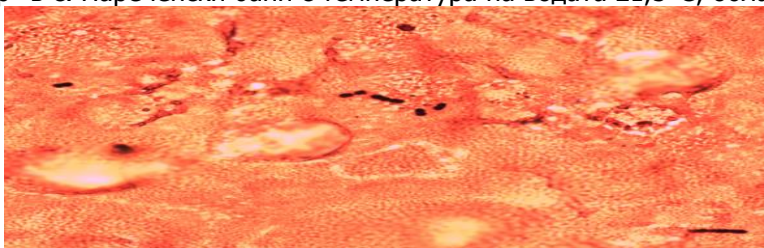
Снимка 3 (176). Умерена адхезия на бактерии върху човешки епителен слой на щам Н. Вълчева *Bacillus subtilis* 0-2 от термален лечебен извор „Хасковски минерални бани“ с температура на водата 57,4°C, област Хасково.



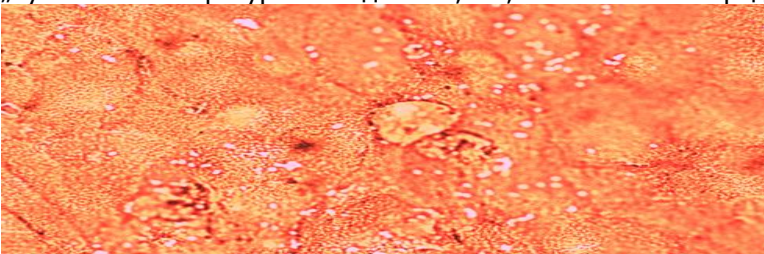
Снимка 4 (176). Липса на адхезия на бактерии върху човешки епителен слой на щам Н. Вълчева *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* SDF004 от хипотермален лечебен извор „Солен извор“ в с. Нареченски бани с температура на водата 21,5°C, област Пловдив.



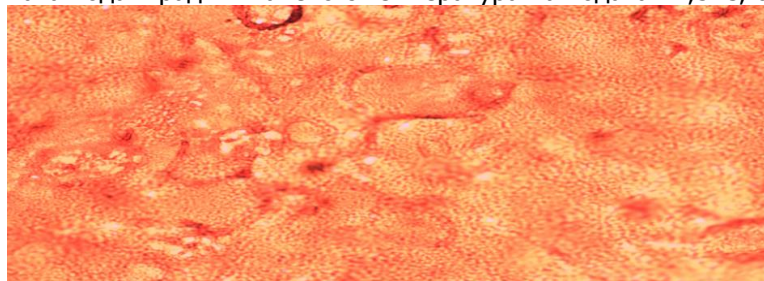
Снимка 4 (177). Липса на адхезия на бактерии върху човешки епителен слой на щам Н. Вълчева *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* SDF004 от хипотермален лечебен извор „Солен извор“ в с. Нареченски бани с температура на водата 21,5°C, област Пловдив.



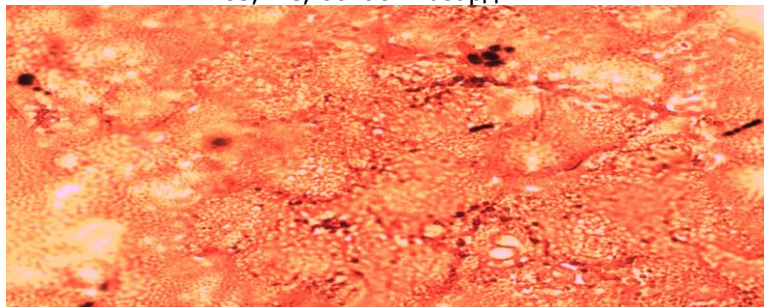
Снимка 5 (178). Умерено слаба адхезия на бактерии върху човешки епителен слой на щам *Bacillus subtilis* Н. Вълчева § И. Игнатов *Bacillus subtilis* 3-2-2 от хипертермален лечебен извор „Рупи 2“ с температура на водата 74,3°C, област Благоевград.



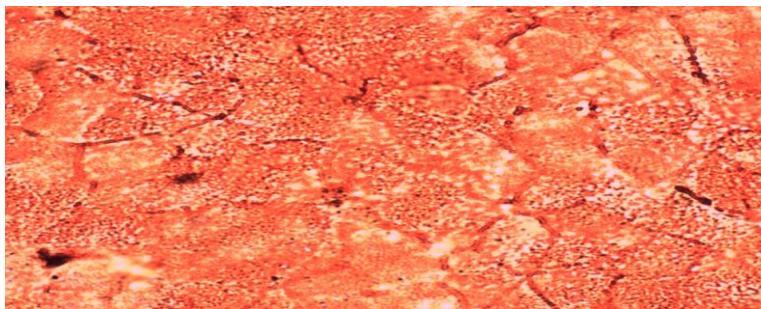
Снимка 6 (179). Липса на адхезия на бактерии върху човешки епителен слой на щам Н. Вълчева *Bacillus vallismortis* 17-1 от хипотермален лечебен извор КЕИ „Хаджи Димитър“, местност „Топлата вода“ град Шивачево с температура на водата 22,5°C, област Сливен.



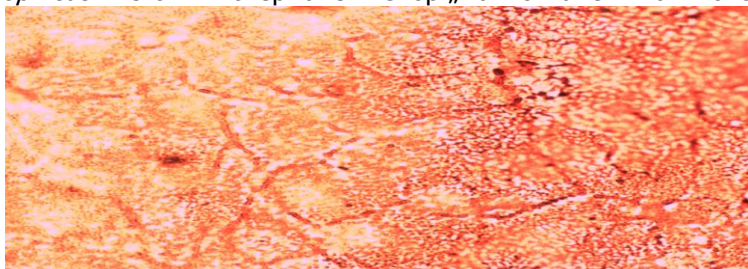
Снимка 7 (180). Липса на адхезия на бактерии върху човешки епителен слой на щам Н. Вълчева BS + BV + BA (*Bacillus subtilis* + *Bacillus vallismortis* + *Bacillus amyloliquefaciens*) 8-1 от хипертермален лечебен извор „Сондаж № 5-Варвара“ в с. Варвара с температура на водата 83,7°C, област Пазарджик.



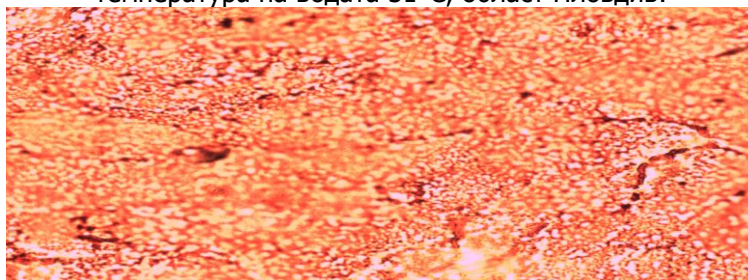
Снимка 8 (181). Слаба адхезия на бактерии върху човешки епителен слой на щам Н. Вълчева *Bacillus thuringiensis* B62 от термален лечебен извор „Сондаж № Сз-7 Павел баня с температура на водата 48,50°C, област Стара Загора.



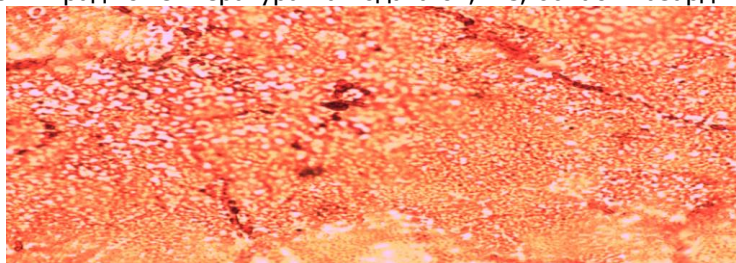
Снимка 9 (182). Много слаба адхезия върху човешки епителен слой на щам Н. Вълчева *Bacillus methylotrophicus* PY5 от хипотермален извор „Наньо Нанев“ Ябълково, област Хасково.



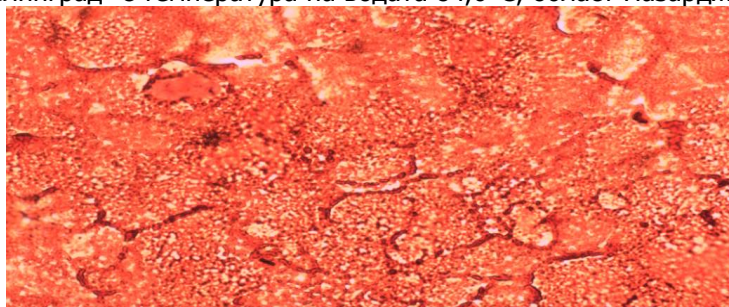
Снимка 10 (183). Много слаба адхезия върху човешки епителен слой на щам Н. Вълчева *Bacillus altitudinis/pumilus* 13-1 от хипотермален лечебен извор „КЕИ Стублата“ град Хисаря с температура на водата 31°C, област Пловдив.



Снимка 11 (184). Много слаба адхезия върху човешки епителен слой на щам Н. Вълчева *Geobacillus stearothermophilus* Варвара от хипертермален лечебен извор сондаж № 3 „Мизинка - Велинград“ с температура на водата 87,7°C, област Пазарджик.



Снимка 12 (185). Много слаба адхезия върху човешки епителен слой на щам Н. Вълчева *Geobacillus stearothermophilus* Варвара, хипертермален извор сондаж № 5 „Сярна баня-Велинград“ с температура на водата 84,6°C, област Пазарджик.



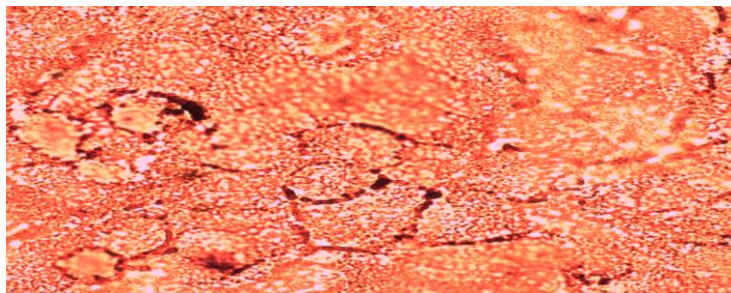
Снимка 13 (186). Слаба адхезия върху човешки епителен слой на щам Н. Вълчева *Geobacillus stearothermophilus* Хипертермален лечебен извор „Рупи 1“ с температура на водата 73,5°C, област Благоевград.

Таблица 17 (123). Адхезия на бактерии от род *Bacillus* и род *Geobacillus* върху човешката епителна клетъчна линия HT-29.

№	Кластер	Щам	Бактерии/10 епителни клетки	Степен на адхезия
1.	I-1	Н. Вълчева <i>Bacillus subtilis</i> 0-2 от термален лечебен извор „Хасковски минерални бани“ с температура на водата 57,4°C, област Хасково	10	умерена
2.	I-2	Н. Вълчева § И. Игнатов <i>Bacillus subtilis</i> 3-2-2 от хипертермален лечебен извор „Рупи 2“ с температура на водата 74,3°C, област Благоевград	7	умерено слаба
3.	I-3	Н. Вълчева <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> SDF004 от хипотермален лечебен извор „Солен извор“ в с. Нареченски бани с температура на водата 21,5°C, област Пловдив	0	нулева
4.	I-4	Н. Вълчева <i>Bacillus vallismortis</i> 17-1 хипотермален лечебен извор КЕИ „Хаджи Димитър“, местност „Топлата вода“ град Шивачево, с температура на водата 22,5°C, област Сливен	0	нулева
5.	I-5	Н. Вълчева BS + BV + BA (<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Bacillus vallismortis</i> + <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>) 8-1 от хипертермален лечебен извор „Сондаж № 5 - Варвара“ в с. Варвара с температура на водата 83,7°C, област Пазарджик	0	нулева
6.	I-6	Н. Вълчева <i>Bacillus thuringiensis</i> B62 от термален лечебен извор „Сондаж № Сз-7 Павел баня с температура на водата 48,50°C, област Стара Загора	5	слаба

Продължение на табл. 17 (123).				
7.	II-1	Н. Вълчева <i>Bacillus methylophilus</i> PY5 от хипотермален извор „Наньо Нанев“ Ябълково, област Хасково	2	много слаба
8.	II-2	Н. Вълчева <i>Bacillus altitudinis</i> / <i>Bacillus pumilus</i> 13-1 хипотермален лечебен извор „КЕИ Стублата“ град Хисаря с температура на водата 31°C, област Пловдив	1	много слаба
9.	II-3	Н. Вълчева <i>Geobacillus stearothermophilus</i> Варвара от хипертермален лечебен извор сондаж № 3 „Мизинка-Велинград“ с температура на водата 87,7°C, област Пазарджик	2	много слаба
10.	II-4	Н. Вълчева <i>Geobacillus stearothermophilus</i> от хипертермален извор сондаж № 5 „Сярна баня-Велинград“ с температура на водата 84,6°C, област Пазарджик	1	много слаба
11.	II-5	Н. Вълчева <i>Geobacillus stearothermophilus</i> от хипертермален лечебен извор „Рупи 2“ с температура на водата 74,3°C, област Благоевград	4	слаба
12.	II-6	Н. Вълчева <i>Geobacillus stearothermophilus</i> от хипертермален лечебен извор КЕИ „Пчелински бани“ с температура на водата 79°C, област София	3	много слаба

Брой адхезирали бактерии на 10 епителни клетки: 0-3 – много слаба; 4-6 – слаба; 7-9 – умерено слаба; 10-20 – умерена; 20-30 – умерено силна; 30-50 – силна; > 50 – много силна



Снимка 14 (187). Много слаба адхезия върху човешки епителен слой на щам Н. Вълчева *Geobacillus stearothermophilus* от хипертермален лечебен извор КЕИ „Пчелински бани“ с температура на водата 79°C, област София.

Резултатите показват, че най-силно адхезиращ щам, от изследваните бактерии от род *Bacillus* и род *Geobacillus*, е щам Н. Вълчева *Bacillus subtilis* 0-2, идентифициран от термален лечебен извор „Хасковски минерални бани“ с температура на водата 57,4°C, област Хасково, който проявява умерена адхезия с 10 броя адхезирали бактерии върху 10 епителни клетки.

Адхезионната способност на микроорганизмите не зависи от местонахождението на изолиране, а вероятната причина за това може да бъде различният афинитет на адхезионните сайтове на бактериите върху епителните клетки.

Умерената индукция на трансформиращ растежен фактор бета TGF-beta е благоприятна за противовъзпалителен ефект. Имуномодулиращите свойства на изследваните щамове са представени на табл. 18. Данните показват, че всичките 12 щамове увеличават синтеза на трансформиращ растежен фактор бета TGF-beta на база на контролата, която е от клетъчна линия без наличие на бактерии.

Таблица 18 (124). Имуномодулиращи свойства на изследваните щамове.

№	Щам	TGF-beta, pg/cm ³	IL-8, pg/cm ³
1.	Н. Вълчева <i>Bacillus subtilis</i> 0-2 от термален лечебен извор „Хасковски минерални бани“, област Хасково	1546	110
2.	Н. Вълчева § И. Игнатов <i>Bacillus subtilis</i> 2-2-2 хипертермален лечебен извор „Рупи 2“, област Благоевград	1187	134
3.	Н. Вълчева <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>Plantarum</i> SDF004 от хипотермален лечебен извор „Солен извор“ в с. Нареченски бани, област Пловдив	1294	127
4.	Н. Вълчева <i>Bacillus vallismortis</i> 17-1 хипотермален лечебен извор КЕИ „Хаджи Димитър“, местност „Топлата вода“ град Шивачево, област Сливен	1297	139
5.	Н. Вълчева BS + BV + BA 8-1 от хипертермален лечебен извор „Сондаж № 5-Варвара“, област Пазарджик	1716	119
6.	Н. Вълчева <i>Bacillus thuringiensis</i> B62 термален лечебен извор „Сондаж № Сз-7 Павел баня, област Стара Загора	1801	112
7.	Н. Вълчева <i>Bacillus methylotrophicus</i> PY5 хипотермален извор „Наньо Нанев“ Ябълково, област Хасково	1431	136
8.	Н. Вълчева <i>Bacillus altitudinis/pumilus</i> 13-1 от хипотермален лечебен извор „КЕИ Стублата“ град Хисаря, област Пловдив	1279	154
9.	Н. Вълчева <i>Geobacillus stearothermophilus</i> Варвара от хипертермален лечебен извор сондаж № 3 „Мизинка – Велинград“, област Пазарджик	1469	138

Продължение на табл. 18 (124).			
10.	Н. Вълчева <i>Geobacillus stearothermophilus</i> от хипертермален извор сондаж № 5 „Сярна баня-Велинград“, област Пазарджик	1413	131
11.	Н. Вълчева <i>Geobacillus stearothermophilus</i> от хипертермален лечебен извор „Рупи 1“, област Благоевград	1407	126
12.	Н. Вълчева <i>Geobacillus stearothermophilus</i> от хипертермален лечебен извор КЕИ „Пчелински бани“, област София	1410	136
13.	Контрола	938	157

TGF-beta – трансформиращ растежен фактор бета /проинфламаторен цитокин/, pg/cm³

IL-8 – интерлевкин 8/проинфламаторен цитокин/, pg/cm³.

Щамовете с най-значима индукция на трансформиращ растежен фактор бета TGF-beta са: *Bacillus thuringiensis* B62, комбинацията BS + BV + BA (*Bacillus subtilis* + *Bacillus vallismortis* + *Bacillus amyloliquefaciens*) 8-1, *Bacillus subtilis* 0-2. Степента на индукция от тези щамове не е така силна колкото при специално подбрани интесцинални пробиотични щамове, но все пак, увеличението на синтеза на трансформиращ растежен фактор бета TGF-beta от гореспоменатите два щамове и комбинацията е знак за умерен антиинфламаторен ефект.

По отношение на цитокина IL-8 нито един от изследваните 12 щамове не увеличава концентрацията му, в сравнение с контролата (клетъчна линия без бактерии). Двата щамове с най-силно инхибиране на продукцията на цитокина IL-8 са: *Bacillus subtilis* 0-2 и *Bacillus thuringiensis* B62. И двата щамове освен, че потискат синтеза на цитокина IL-8, индуцират синтеза на трансформиращ растежен фактор бета TGF-beta. Тоест, тези два щамове са с най-значими противовъзпалителни имуномодулиращи свойства. Отново трябва да се подчертае, че силата на противовъзпалителните ефекти на гореспоменатите два щамове не може да се сравни с по-значими противовъзпалителни ефекти на подбрани пробиотици като конкретни щамове *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* и др. В случая при двата щамове *Bacillus subtilis* 0-2 и *Bacillus thuringiensis* B62 може да се твърди за умерен (не силен) противовъзпалителен имуномодулиращ ефект.

Заклучение: Изследваните щамове притежават следните биологични свойства

- амилалитична, протеолитична и липолитична ензимна активност.
- антимикробна активност спрямо различни бактерии, дрожди и плесенни гъби.
- адхезивна способност към човешки епителни клетки.
- противвъзпалителен имуномодулиращ ефект.

V. ИЗВОДИ

Проведените изследвания и получените резултати позволяват да се направят следните изводи:

1. Извършена е физична, химична и микробиологична характеристика на 90 минерални, планински и изворни води от 11 области в страната – Хасково, Стара Загора, Ямбол, Сливен, Бургас, Варна, Пловдив, Пазарджик, София, Ловеч и Благоевград.

1.1. По физични и химични показатели водите само от 24 водоизточника отговарят по всички контролирани параметри на Наредба № 9/2001 г., ДВ бр. 30 и постановление № 178/ 23.07.2004 г. за качеството на водата:

- област Стара Загора: хипотермален извор в с. Тракия с температура на водата 20°C, хипотермален извор „Света Богородица“ в община Мъглиж с температура на водата 21°C, хипотермален извор „Център“ в община Мъглиж с температура на водата 21°C, хипотермален извор в с. Копринка в община Мъглиж с температура на водата

21°C, хипотермален извор в град Казанлък в община Мъглиж с температура на водата 20°C, хипотермален извор в Крън – Енина с температура на водата 20°C, хипотермален извор в град Енина с температура на водата 20°C, хипотермален извор „Аязмо“ с температура на водата 20°C, хипотермален извор „Трите чучура“ с температура на водата 20 °C.

- област Ямбол: хипотермален извор в с. Окоп с температура на водата 20°C, хипотермален извор в с. Каравелово с температура на водата 21°C.

- област Сливен: хипотермален лечебен извор КЕИ „Хаджи Димитър“, местност „Топлата вода“ град Шивачево с температура на водата 22,5°C, хипотермален лечебен извор „Гунчов извор“ с температура на водата 21,5°C.

- област Бургас: хипертермален лечебен извор с. Поляново с температура на водата 51°C.

- област Варна: хипертермален лечебен извор „Лековита вода“ с. Горен Чифлик, с температура на водата 40°C, област Варна,

- област Пловдив: хипотермален лечебен извор „Сондаж № 9“ в с. Драгойново с температура на водата 20°C, хипотермален лечебен извор „Сондаж 1-Асеновград“ в град Асеновград с температура на водата 21°C, хипотермален извор „Баджова вода“ в с. Бачково с температура на водата 20°C.

- област Пазарджик: хипертермален лечебен извор „Сондаж № 5-Варвара“ в с. Варвара с температура на водата 83,7°C, хипотермален извор в град Оборище с температура на водата 19°C, хипотермален извор в Оборище – Панагюрище с температура на водата 18°C, хипотермален извор Панагюрище - Бъта с температура на водата 20°C.

- област София: хипотермален лечебен извор сондаж ТК № 1 „Иваняне“ град Баня с температура на водата 27°C .

1.2. По микробиологични показатели водите от 15 водоизточника не отговарят по всички контролирани микробиологични параметри на Наредба № 9/2001 г., ДВ бр. 30 и постановление № 178/23.07.2004 г. за качеството на водата, предназначена за питейни цели.

- област Стара Загора: изворна вода в с. Тракия, в изворна вода в „Свети Николай Чудотворец“ град Мъглиж, изворна вода в „Света Богородица“ град Мъглиж, изворна вода в с. Копринка, изворна вода в град Енина.

- област Ямбол: изворна вода в с. Окоп.

- област Сливен: изворна вода в „Гунчов извор“.

- област Бургас: изворна вода в с. Съдиево.

- област Варна: в изворна вода в „Лековита вода“ с. Горен Чифлик.

- област Пловдив: изворна вода в КЕИ „Мъжко банче“ град Баня.

- област Панагюрище: изворна вода в град Оборище, изворна вода в Оборище – Панагюрище, в изворна вода в Панагюрище – Бъта.

- област Благоевград: изворна вода в „Рупи 1“ и в изворна вода „Рупи 2“.

1.3. Установено е драстично намаляване на показателите водите чрез обработката им с метални йони/Evodrop, електромагнитни вълни или зеолит.

1.4. 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.

2. За първи път е проведено молекулярно-генетично идентифициране на 91 изолирани микроорганизми от 90 минерални, планински и изворни води от 11 области в страната – Хасково, Стара Загора, Ямбол, Сливен, Бургас, Варна, Пловдив, Пазарджик, София, Ловеч и Благоевград. Те се причисляват към следните осем рода:

- род *Bacillus*: *B. subtilis*, *B. cereus* group, *B. altitudinis/pumilis*, *B. licheniformis*, *B. vallismortis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. methylothrophicus*, *B. thuringiensis*, *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*, *B. megaterium*, *B. simplex*.

- род *Brevibacillus*: *Brevibacillus* sp.

- род *Geobacillus*: *G. stearothermophilus*.

- род *Aeromonas*: *A. hydrophila*, *A. sobria*.
- род *Klebsiella*: *K. oxytoca*.
- род *Pseudomonas*: *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*.
- род *Staphylococcus*: *S. xylosus*.
- род *Stenotrophomonas*: *S. maltophilia*.

3. Определени са биологични свойства на идентифицираните микроорганизми.

3.1. С най-висока ензимна активност са щамове:

- *Bacillus thuringiensis* - Н. Вълчева BTh B62 – амилалитична активност 25 mm, протеолитична активност 26,5 mm;
- *Bacillus methylotrophicus* - Н. Вълчева BMTh PY4 – амилалитична активност 24 mm, протеолитична активност 20 mm;
- *Bacillus subtilis* - Н. Вълчева BS 17-1, Н. Вълчева BS 2-1-1, Н. Вълчева BS 2-2-2 – амилалитична активност 26 mm, протеолитична активност 27 mm;
- *Bacillus amyloliquefaciens* - Н. Вълчева BA 22-1 – амилалитична активност 26 mm, протеолитична активност 27 mm, липолитична активност 22 mm;
- *Bacillus licheniformis* - Н. Вълчева BL 3-1, Н. Вълчева BL 30-1, Н. Вълчева BL 7-1 – амилалитична активност 26 mm, протеолитична активност 27 mm, липолитична активност 24 mm;
- *Geobacillus stearothermophilus* - Н. Вълчева GbSt област Пазарджик, София и Благоевград – амилалитична активност 25 mm, протеолитична активност 27 mm, липолитична активност 24 mm;
- *Bacillus cereus group* - Н. Вълчева BCG 25-1 – амилалитична активност 24 mm, протеолитична активност 26 mm, липолитична активност 23 mm.

3.2. Установена е антимикробна активност на щамове на *Bacillus* sp., срещу сапрофитните и патогенните микроорганизми: *Penicillium* sp., *Fusarium moliniforme*, *Rhizopus* sp., *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus awamori*, *Mucor* sp. и *Enterococcus faecalis*. Най-активни щамове са *Bacillus methylotrophicus* Н. Вълчева BMTh /област Хасково/, *Bacillus cereus* Н. Вълчева BCG 25-1 /област Ямбол/, *Bacillus subtilis* Н. Вълчева BS 17 -1 /област Сливен/, *Bacillus subtilis* Н. Вълчева BS 18 /област София/, *Bacillus subtilis* Н. Вълчева BS 22-1 /област Благоевград/ и *Bacillus thuringiensis* Н. Вълчева BTh /област Стара Загора/.

3.3. За първи път е определена е адхезивната способност към човешки епителни клетки.

- С умерен ефект от 10 броя адхезирали бактерии върху 10 епителни клетки се характеризира щам Н. Вълчева *Bacillus subtilis* 0-2, идентифициран от термален лечебен извор „Хасковски минерални бани“ с температура на водата 57,4°C.

- С умерено слаба адхезия е щам Н. Вълчева § И. Игнатов *Bacillus subtilis* 2-2-2 от хипертермален лечебен извор „Рупи 2“ с температура на водата 74,3°C /област Благоевград/ със седем адхезирали бактерии върху 10 епителни клетки.

- Със слаба адхезия са щамове Н. Вълчева *Bacillus thuringiensis* B62 термален лечебен извор „Сондаж № Сз-7“ Павел баня с температура на водата 48,50°C /област Стара Загора/ и Н. Вълчева *Geobacillus stearothermophilus* от хипертермален лечебен извор „Рупи 1“ с температура на водата 73,5°C /област Благоевград/, със съответно пет и четири адхезирали бактерии върху 10 епителни клетки.

- С много слаба или нулева адхезия са всички останалите щамове.

- С най-значими противовъзпалителни имуномодулиращи свойства, т.е. 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 щамове *Bacillus subtilis* 0-2 и *Bacillus thuringiensis* B62.

VII. ПУБЛИКАЦИИТЕ ПО ДИСЕРТАЦИЯТА

1. Ignatov I., F. Huether, N. Neshev, Y. Kiselova-Kaneva, T. Popova, R. Bankova, **N. Valcheva**, A. Ignatov, M. Angelcheva, I. Angushev. (2022). Research of water molecules cluster structuring during *Haberlea rhodopensis* Friv. Hydration. Plants, v. 11, 2655 (Scopus, Q1).

2. Ignatov I., N. Neshev, T. Popova, Y. Kiselova-Kaneva, C. Drossinakis, R. Bankova, R. Toshkova, G. Gluhchev, **N. Valcheva**, M. Angelcheva, G. Dinkov, I. Angushev, T. Todorova, V. Balabanski, S. Baiti, F. Huether, A. Ignatov. (2022). Theoretical analysis of hydrogen bonds, energy distribution, and Information in a 1% *Rosa damascena* Mill. oil solution. *Plant Science Today*, v. 9(3), 760-765. (*Scopus*, Q3).
3. Huether F., I. Ignatov, Y. Kiselova-Kaneva, T. Popova, R. Bankova, N. Neshev, G. Glunchev, S. Karadzhov, **N. Valcheva**, P. Vassileva, A. Ignatov, I. Angushev, T. Todorova, M. Angelcheva. (2023). Results obtained with EVOagri technology to improve yield filtered water in Africa, Tibet, Italy and Bulgaria. *Plant Science Today*, v. 10(2), под печат (*Scopus*, Q3).
4. Popova T., I. Ignatov, **N. Valcheva**, A. Ignatov. (2022). The effects on some parameters of microbiological and physicochemical research of zeolite and zeolite filtered water from Rhodope mountains, Bulgaria, *Journal of the Turkish Chemical Society, Section A, Chemistry*, v. 9(3), 901-908. (*Scopus*, Q4).
5. Velichkova K., I. Sirakov, N. Rusenova, G. Beev, S. Denev, **N. Valcheva**, T. Dinev. (2018). *In vitro* antimicrobial activity on *Lemna minuta*, *Chlorella vulgaris* and *Spirulina* sp. extracts. *Fresenius Environmental Bulletin*, v. 27(8), 5736-5741. (*Scopus*, Q4).
6. **Valcheva N.**, I. Ignatov. (2022). Microbiological effects of combinations of colloidal silver (Ag), copper (Cu), silicon (Si) and zinc (Zn) nanoparticles. *Uttar Pradesh Journal of Zoology*, v. 43(11), 45-50.
7. Ignatov I., **N. Valcheva**, T. Popova, N. Neshev, F. Huether, A. Ignatov. (2022). Physicochemical and microbiological results from hot mineral water in the village of Varvara, district of Pazardzhik, Bulgaria. *Uttar Pradesh Journal of Zoology*, v. 43(9), 31-40.
8. Ignatov I., **N. Valcheva**. (2021). Physiological and molecular characteristics of *Bacillus* spp. isolated from warm mineral waters in Varna, Bulgaria as model system for origin of life. *Uttar Pradesh Journal of Zoology*, v. 42(1), 51-58.
9. Ignatov I., **N. Valcheva**, S. Mihaylova, S. Dinkov. (2021). Physicochemical and microbiological results of hyperthermal (Hot) mineral water in Rupite, Bulgaria as model system for origin of life. *Uttar Pradesh Journal of Zoology*, v. 41(24), 16-22.
10. **Valcheva N.**, I. Ignatov. (2019). Physicochemical and microbiological characteristics of thermal healing spring waters in the district of Varna. *Journal of Medicine, Physiology and Biophysics*, v. 59, 10-16.
11. **Valcheva N.** (2019). Physicochemical and microbiological characteristics of thermal healing spring waters in the district of Burgas. *European Reviews of Chemical Research*, v. 6(2), 68-74.
12. **Valcheva N.** (2019). Physicochemical and microbiological characteristics of thermal healing spring waters in the districts of Varna and Burgas, Black Sea Region, Bulgaria. *European Journal of Medicine*, v. 7(2), 120-130.
13. **Valcheva N.**, I. Ignatov, G. Dinkov. (2020). Microbiological and physicochemical research of thermal spring and mountain spring waters in the district of Sliven, Bulgaria. *Journal of Advances in Microbiology*, v. 20(2), 9-17.
14. Ignatov I., **N. Valcheva**. (2020). Microbiological and physicochemical research of mountain spring waters in Vasiliovka mountain, municipality of Teteven, Bulgaria. *American Chemical Science International Journal*, v. 29(3), 16-23.
15. **Valcheva N.**, I. Ignatov, F. Huether. (2020). Microbiological research of the effects of EVODROP silver nanoparticle on *Escherichia coli*, *Enterococci* and coliforms. *Journal of Advances in Microbiology*, v. 20(11), 22-31.
16. Ignatov I., **N. Valcheva**, F. Huether. (2020). Nano and microbiological effects of EVODROP silver and copper nanoparticle. *Journal of Materials Science Research and Reviews*, v. 6 (4), 63-71.
17. **Valcheva N.**, I. Ignatov, S. Mihaylova. (2020). Physiological and molecular – genetic characteristic of bacteria strains, isolated from mountain spring and mineral waters in Plovdiv region, Bulgaria. *International Journal of Pathogen Research*, v. 4(1), 44-55.

ЦИТАТИ НА ПУБЛИКАЦИИТЕ ПО ДИСЕРТАЦИЯТА

Velichkova K., I. Sirakov, N. Rusenova, G. Beev, S. Denev, **N. Valcheva**, T. Dinev. (2018). *In vitro* antimicrobial activity on *Lemna minuta*, *Chlorella vulgaris* and *Spirulina* sp. extracts. Fresenius Environmental Bulletin, v. 27(8), 5736-5741.

1. Koshinski R. (2020) . Effect of *Taraxacum officinale* Weber ex Wiggers extract on growth performance, biochemical blood parameters and meat quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* W.), cultivated in a recirculating system. AACL Bioflux, v. 13(1), 109-117. (*Scopus/Web of Science*).
2. Ignatov I. (2020). Microbiological research of mineral and mountain spring waters in Bulgaria. Microbiology Research Journal International, v. 30(10), 79-84.
3. Martelli E., M. Cirilini, C. Lazzi, E. Neviani, V. Bernini. (2020). Edible seaweeds and *Spirulina* extracts for food application: *In vitro* and in situ evaluation of antimicrobial activity towards foodborne pathogenic bacteria. Foods, v. 9, 1442. (*Scopus/Web of Science*)
4. Ignatov I., T. Popova. (2021). Applications of *Moringa oleifera* Lam., *Urtica dioica* L., *Malva sylvestris* L. and *Plantago major* L. containing potassium for recovery. Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology Journal, Article ID: 2021/PCBMB/8625 (*Scopus*)
5. Karadzhov S., I. Ignatov, H. Najdenski, T. Popova, W. Luepcke, G. Gluhchev, N. Kolev, S. Balabanov. (2019). Distribution trends of african swine fever virus (ASFV) through water. European Journal of Molecular Biotechnology, v. 7(2), 123-125.
6. Ignatov I. (2020). Physicochemical research of mineral and mountain spring waters in Bulgaria. Asian Journal of Applied Chemistry Research, v. 7(2), 40-46.
7. Ignatov I. (2021). Standards for the research and registration of drinking mineral and mountain spring waters in Bulgaria. Asian Journal of Chemical Sciences, v. 9(1), 12-18.
8. Ignatov I. (2021). Origin of life and living matter in hot mineral water and properties of polar molecules in the primary hydrosphere and hydrothermal ponds. Uttar Pradesh Journal of Zoology, v. 42(6), 37-52. (*Web of Science*)
9. Ignatov I., A. Ignatov, M. Angelcheva, I. Angushev. (2022). The international event "Days of mountain water", Teteven, Bulgaria. Microbiological and physicochemical research of mountain spring water. Uttar Pradesh Journal of Zoology, v. 43(12), 16-29 (*Web of Science*).

Valcheva N., I. Ignatov. (2019). Physicochemical and microbiological characteristics of thermal healing spring waters in the district of Varna. Journal of Medicine, Physiology and Biophysics, v. 59, 10-16.

1. Ahsan W., H. R. Ahmad, Z. Ur Rahman Farooqi, M. Sabir, M. A. Ayub, M. Rizwan, P. Ilic. (2021). Surface water quality assessment of Skardu springs using water quality index. Environmental Science and Pollution Research, v. 28, 20537-20548. (*Scopus*)

Valcheva N. (2019). Physicochemical and microbiological characteristics of thermal healing spring waters in the district of Burgas. European Reviews of Chemical Research, v. 6(2), 68-74.

1. Ignatov I. (2020). Microbiological research of mineral and mountain spring waters in Bulgaria. Microbiology Research Journal International, v. 30(10), 79-84.
2. Ignatov I. (2020). Physicochemical research of mineral and mountain spring waters in Bulgaria. Asian Journal of Applied Chemistry Research, v. 7(2), 40-46.
3. Ignatov I. (2021). Standards for the research and registration of drinking mineral and mountain spring waters in Bulgaria. Asian Journal of Chemical Sciences, v. 9(1), 12-18.
4. Ignatov I., A. Ignatov, M. Angelcheva, I. Angushev. (2022). The international event "Days of mountain water", Teteven, Bulgaria. Microbiological and physicochemical research of mountain spring water. Uttar Pradesh Journal of Zoology, v. 43(12), 16-29 (*Web of Science*).

Valcheva N. (2019). Physicochemical and microbiological characteristics of thermal healing spring waters in the districts of Varna and Burgas, Black Sea region. Bulgaria. European Journal of Medicine, v. 7(2), 120-130.

1. Ignatov I. (2020). Microbiological research of mineral and mountain spring waters in Bulgaria. Microbiology Research Journal International, v. 30(10), 79-84.
2. Ignatov I. (2020). Physicochemical research of mineral and mountain spring waters in Bulgaria. Asian Journal of Applied Chemistry Research, v. 7(2), 40-46.
3. Ignatov I. (2021). Standards for the research and registration of drinking mineral and mountain spring waters in Bulgaria. Asian Journal of Chemical Sciences, v. 9(1), 12-18.
4. Ignatov I., A. Ignatov, M. Angelcheva, I. Angushev. (2022). The international event "Days of mountain water", Teteven, Bulgaria. Microbiological and physicochemical research of mountain spring water. Uttar Pradesh Journal of Zoology, v. 43(12), 16-29 (*Web of Science*).

Valcheva N., I. Ignatov, G. Dinkov. (2020). Microbiological and physicochemical research of thermal spring and mountain spring waters in the district of Sliven, Bulgaria. Journal of Advances in Microbiology, v. 20(2), 9-17.

1. Turetken P., G. Altug, M. Cardak, A. Kalkan. (2021). The effect of global climate change on the distribution of bacterial antibiotic resistance in the Turkish seas. 91-106. In: Climate changes and natural resources (Eds. C. Mine, P. Yildirim). ISBN 978-625-8048-23-0. Pub. Rights 51372/Holistence Publications, Canakkale, Turkey.

Valcheva N., I. Ignatov, S. Mihaylova. (2020). Physiological and molecular – genetic characteristic of bacteria strains, isolated from mountain spring and mineral waters in Plovdiv region, Bulgaria. International Journal of Pathogen Research, v. 4(1), 44-55.

1. Zgonik V., J. Mulec, T. Eleršek, N. Ogrinc, P. Jamnik, N. Poklar Ulrih. (2021). Extremophilic Microorganisms in Central Europe. Microorganisms, v. 9, 2326. doi: 10.3390/microorganisms9112326 (*Scopus*)

VIII. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИЯТА

Научни

1. Идентифицирани и селектирани са 21 щамове бактерии от осем рода – *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Geobacillus*, *Aeromonas*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* и *Staphylococcus*, изолирани от 90 минерални, планински и изворни в 11 области от страната.

1.1. От хипертермални минерални извори са установени екстремофили от *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* group, *Bacillus vallismortis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus simplex*, *Pseudomonas fluorescens*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Stenotrophomonas maltophilia*.

1.2. 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.

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

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

Научно-приложни

1. 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.

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

Приложни

1. Установено е, че водите на 88 от изследваните 90 термални и нетермални минерални, планински и изворни води в 11 области от страната – Хасково, Стара Загора, Ямбол, Сливен, Бургас, Варна, Пловдив, Пазарджик, София, Ловеч и Благоевград, 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*, *Aspergillus awamori*, *Penicillium* sp., *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* и *Fusarium oxysporium* и Gram-отрицателната бактерия *Pseudomonas aeruginosa*.