

РЕЦЕНЗИЯ

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

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

Член на научното жури: проф. дсн Гюрга Стефанова Михайлова, Тракийски университет - Стара Загора (пенсионер), 5. Технически науки, 5.12 Хранителни технологии, научна специалност: Технология на млякото и млечните продукти, определена за член на научното жури със заповед № РД-05-43/ 27.03.2023 г. от Председателя на ССА - София.

I. Кратко представяне на докторанта

Д-р Недялка Нанева Вълчева е родена 1966 г. в с. Ябълково, обл. Хасково. През 1990 г. завършва висше образование в Университет по хранителни технологии - гр. Пловдив в ОКС „магистър” по специалност „Технология на растителни, хранителни и вкусови продукти” с професионална квалификация инженер-технолог. През 2015 г. защитава дисертация в Технологичен факултет на УХТ - Пловдив за ОНС „доктор” на тема: „Микрофлора на лечебни и изворни води в Хасковска и Старозагорска област“ в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3 Биологически науки (Микробиология).

През периода 1990-2016 г. инж. Вълчева работи като учител в Професионална гимназия по химични и хранителни технологии „Проф. д-р Асен Златаров“ - гр. Димитровград. През 2016 г. започва работа като експерт в Аграрен факултет на Тракийски университет - Стара Загора, където работи и до настоящия момент.

Компетенциите, които магистър Недялка Вълчева посочва в автобиографичната справка, че притежава са: отлично владение на руски език и добро на английски, умения за работа със специфично оборудване (микроскопи, автоклави, спектрофотометри, биореактори, системи за мембранна филтрация и др.), компютърни умения, способност за работа в екип, комуникативност и добри организационни качества. Има проведени с различна продължителност курсове и следдипломно обучение по: базови и специфични компютърни умения; съвременни теоретични и технологични проблеми на обучението по химия; педагогика и психология на обучението по микробиология. От представените материали се вижда, че по време на професионалното си развитие е преминала през различни етапи на подготовка, при което е придобила теоретични знания и практически умения в областите на професионалната си дейност.

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

Представеният дисертационен труд е оформен на 345 стр. в т. ч. 124 таблици, 8 фигури и 187 снимки. Съгласно възприетите стандарти той е структуриран правилно по отношение на основните раздели необходими за дисертационен труд и по форма

отговаря на изискванията за този вид научни трудове. Дисертационният труд включва следните глави: въведение, литературен обзор, цел и задачи, материали и методи, резултати и обсъждане, изводи, литературни източници, приноси и публикации във връзка с дисертацията, което е в съответствие със специфичните изисквания на ССА. Спазвайки нормативните изисквания и чл. 63 от ПРАСССА дисертационният труд на д-р Вълчева е подготвен самостоятелно и не повтаря съдържанието на представения от автора труд за придобиване на ОНС „доктор“, съдържа теоретично обобщение и решение на научно-приложен проблем свързан с качеството на водата от естествени водоизточници и нейното приложение за различни цели в бита и сфери на производство.

Литературният обзор е балансиран, съдържа основните аспекти по темата и е представен в 4 раздела, систематизирани на 25 стр. Първият от тях е Водата - среда за развитие на живота на земята; втория – Изворни и минерални води в България и микроорганизми; следващия – Съвременни методи за идентификация на микроорганизми и последния – Свойства на микроорганизмите. Анализът на литературата позволява да се открият обективни предпоставки за провеждане на предвидените изследвания.

Целта кореспондира на заглавието, кратко и ясно е дефинирана. Посочени са 3 основни задачи за нейното реализиране, като 1-ва и 3-та задачи имат по 3 подзадачи. За изпълнение на поставените задачи е използвана широка палитра от подходящи методи на изследване. Реализирането на поставената цел е съпроводено с: анализ на води от различни източници (физикохимични и микробиологични изследвания); третиране на води с метални йони, електромагнитни вълни и зеолит; изследване влиянието на растителни екстракти (водна леща, розово масло и цвят от силивряк) върху качеството на водите; изолиране и идентифициране на микроорганизми; изследване на изолираните щамове по отношение на ензимна и антимикробна активност, и адхезивната способност към човешки епителни клетки.

Авторефератът е структуриран на 47 стр. и отразява основните резултати от дисертационния труд, илюстрирани чрез 18 таблици, 4 фигури и 14 снимки, като в скоби е посочен номера, на който съответстват в дисертацията.

III. Актуалност на проблема

Представеният дисертационен труд съдържа комплексни проучвания с широк обхват на изследвани показатели, влияещи върху качеството на води с различен произход. Научната разработка е насочена от една страна към физикохимична и микробиологична характеристика на води от различни водоизточници и райони на България, и от друга – към изследване на биологични свойства на идентифицирани от проучваните води микроорганизми. Формулираната цел е продиктувана от един изключително важен въпрос – съществената роля на водата за жизнената дейност на живите организми и осигуряване на доброкачествена вода за нуждите на хората.

У нас законовата уредба за водите е свързана с мониторинга на качеството на водите използвани за питейно-битови цели, на водите за къпане и на минералните води използвани за лечение, профилактика, питейно-битови цели, бутилиране, хигиенни цели, спорт и отдих, регламентирана със съответни наредби. Практиката показва, че не при всички минерални и изворни води на територията на страната се прилага необходимия контрол. От друга страна редица научни изследвания показват наличие не само на ценни микро- и макроеlementи и биологично активни вещества във водите, но и на микроорганизми с полезни свойства. Това определя темата като съвременна и актуална, с научно-приложно значение. Отчитайки важността на водата в живота на човека

настоящата разработка придобива още по-голямо значение, а изолирането на микроорганизми, тяхното идентифициране и охарактеризиране е предпоставка за прилагането им в редица сфери. Считаю, че дисертацията има научна и теоретична стойност, като дава информация и на възможности за бъдещи изследвания.

IV. Литературна осведоменост и теоретична подготовка на кандидата

В литературният списък са включени 548 литературни източници (научни публикации, книги и учебници, нормативни документи, патенти и др.), от които 13 на кирилица, обхващащи периода 1983-2022 г., като около 50% от заглавията са след 2010 г., а д-р Вълчева е автор/съавтор на 4 от тях (в т.ч. дисертация за ОНС „доктор“). Повечето литературни източници са в областта на темата и във връзка с изследването, и са предпоставка за получаване на оригинални резултати. Постигната е необходимата информираност по разработваните задачи, последвани от извършването на необходимите анализи. Представеният литературен преглед показва, че автора на дисертацията е компетентен по темата и познава състоянието на проблема, което е дало възможност за ясно формулиране на задачите и търсене на отговор на поставената работна хипотеза. Големият брой литературни източници са добър атестат за литературната осведоменост и теоретичната подготовка на д-р Вълчева.

Намирам за положително завършването на прегледа с обобщение, където се акцентира в резюме какво е направено и какво предстои да се изпълни с оглед получаване на нови данни и осъществяване целта на изследването. Прави впечатление, че в обобщението на литературния преглед се акцентира основно на хранително-вкусовата промишленост и мястото на водите в бита на хората, което съвпада с професионалното направление на настоящия дисертационен труд.

V. Методичен подход

Един от най-важните раздели за научните разработки, който дава информация за опитната постановка и доколко тя е издържана – Материали и методи, е структуриран на 10 стр. От описаното в раздела се добива реална представа за извършения значителен обем научноизследователска работа. Посочено е, че експерименталната работа е проведена в научноизследователски лаборатории на Аграрен факултет при Тракийски университет - Ст. Загора; РЗИ - Хасково и ЕЛ БИ Булгарикум - София. Към Материали е посочено, че са изследвани минерални, планински и изворни води (общо 90 водоизточника) от 11 области в страната (Хасково, Стара Загора, Сливен, Ямбол, Пловдив, Пазарджик, Бургас, Варна, София, Ловеч и Благоевград) през периода 2015-2021 г. Представена е кратка информация за използваните микроорганизми, хранителни среди и реактиви. Тъй като темата е интердисциплинарна е използван голям набор от класически и съвременни методи за оценка и анализ – физикохимични, биохимични, микробиологични, генетични, маспектроскопски, статистически методи за обработка на данните от извършените лабораторни изследвания. Представени са процедурите по изолиране, идентифициране и изследване свойствата на микроорганизмите. Избраната методика съответства на комплексния характер на изследването, използвани са подходящи класически и съвременни методи на анализ, които са добре описани и съобразени с целите на проучването.

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

Разглежданите въпроси са представени в необходимата последователност и са в логическа връзка с поставените за изпълнение задачи. Получените резултати са обобщени в табличен вид, на фигури или със снимков материал, добре онагледени и

лесни за възприемане, данните са обработени статистически. Разделът Резултати и обсъждане заема много голям дял в структурата на дисертацията – представен е на 240 стр., което е почти 70% от общия обем на дисертацията, и е доказателство за огромния обем извършена експериментална работа. Всички подраздели завършват с обобщение във вид на изводи, което прави много добро впечатление.

Резултатите и тяхната дискусия са представени в 3 раздела, които съответстват на поставените за изпълнение задачи, а в отделните подраздели има богата информация от данни за описаните 91 водоизточника, от които 43 термални извора, 30 хипотермални, 10 хипертермални, 4 изотермални и 4 субтермални. От представеният материал в първия раздел се вижда, че е извършен анализ на води от минерални и лечебни извори – определени са 20 физикохимични и 7 микробиологични показатели. Посочени са и данни на химични показатели за контролирани от РЗИ водоизточници за питейни води. В резултат на извършените изследвания е установено, че по физикохимични показатели водите от 26 водоизточника отговарят по всички контролирани параметри на нормативните изисквания, а по микробиологични – от 17 водоизточника не отговарят. Представени са резултати от третиране на води с метални йони, електромагнитни вълни и зеолит. Извършен е микробиологичен анализ на вода, третирана с метални йони на сребро, мед, цинк и силиций в различни комбинации. Изследвана е промяната в някои физични и химични параметри при пречистване на питейна и дъждовна вода с EVOdrop система. Представено е влиянието на електромагнитни вълни върху развитието на микроорганизми. При тези изследвания е показано, че метални йони, електромагнитни вълни, технологията EVOdrop или зеолит могат да се използват при очистване на замърсени с бактерии питейни води. Изследвано е влиянието на растителни екстракти (водна леща, розово масло и цвят от силивряк) върху качеството на водите – антимикробната активност на екстракт (с етанол и метанол) от водна леща (*L. minuta Kunth.*), действието на 1% разтвор на розово масло в дейнозирана вода, и разпределението на водните молекули в 1% разтвор на екстракт от силивряк във филтрирана с EVOdrop вода, наситена с водород.

В следващия раздел, Изолиране и идентифициране на микроорганизми, е извършена колониална и морфологична характеристика на щамовете, изолирани от водите от проучваните области. Проследен е растежа на щамовете в течна хранителна среда за 24-48 h при температури 3-50 °C. Определена е видовата принадлежност на щамовете, изолирани от водите в изследваните области. За област Хасково е показано и усвояването на въглеродни източници от щамовете, изолирани от водите, също е направено и сравнение на секвенциите на гените за 16S рПНК на двата щам. Показано е видовото разпределение на идентифицираните микроорганизми по области и са посочени най-често срещаните щамове по области. Сравнителният анализ на обобщените данни по области показва, че от 71 водоизточника са изолирани 88 щам.

В последния раздел е извършено изследване на изолираните щамове по отношение на ензимна и антимикробна активност, както и адхезивна способност към човешки епителни клетки. Показано е, че по-голямата част от изолираните щамове микроорганизми проявяват ясно изразена амилалитична, протеолитична и липолитична активност, а най-висока такава имат 7 щам. По отношение на антимикробната активност са представени резултатите само на тези с най-силно изразено инхибиращо действие срещу патогенни микроорганизми. Получените резултати са показали висока антимикробна активност на щамовете *Bacillus* срещу използваните плесени от род *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* и *Mucor*. За изследване адхезивната способност на

микроорганизмите върху човешка карциномна епителната клетъчна линия HT-29 са подбрани 12 бактерии от род *Bacillus* и род *Geobacillus*. Представени са данни за имуномодулиращи свойства на изследваните щамове.

В резултат на проведените изследвания са направени 3 основни извода, като 1-ви и 3-ти са с подизводи.

VII. Приноси на дисертационния труд

Дисертационния труд на д-р Вълчева има характер на оригинална научно-приложна разработка, с която се усъвършенстват знанията за влиянието на физикохимичните параметри и наличието на микроорганизми върху качествените характеристики на изворни води и надграждат знанията за състава и свойствата на водата и изолиране и идентифициране на щамове микроорганизми от нея с полезни за здравето на хората биологични свойства. Значителна част от резултатите са свързани с получаване на знания в изследването на нови щамове микроорганизми налични в изворни води. Авторът е оформил справка с 6 приноса, като първия е с 4 подприноса, характеризирани с научно, научно-приложно и приложно значение, които приемам като ги систематизирам по следния начин:

Научни приноси

Извършено е комплексно физикохимично и микробиологично изследване на изворни води от 91 водоизточника от 11 района на България – Хасково (4 бр.), Стара Загора (16 бр.), Ямбол (3 бр.), Сливен (5 бр.), Бургас (6 бр.), Варна (5 бр.), Пловдив (30 бр.), Пазарджик (13 бр.), София (4 бр.), Ловеч (3 бр.) и Благоевград (2 бр.), при което е получена база от данни за физикохимични и микробиологични показатели на проучваните води.

В резултат на проведено молекулярно-генетично изследване от проучваните изворни води са изолирани и идентифицирани 21 щамове микроорганизми, които са причислени към 8 рода.

Научно-приложни приноси

Проследена е ензимната активност на изолираните щамове микроорганизми, при което е намерено, че 7 щамове се отличават с висока амилолитична, протеолитична и липолитична активност, което дава възможност за приложението им в биотехнологичното производство.

Установена е висока антимикубна активност на щамове на род *Bacillus* спрямо плесенни гъби, което създава предпоставки за използването им в растениевъдството.

Проведени са изпитвания по отношение на адхезивната способност на изследваните щамове към човешки епителни клетки, при което са открити щамове с умерена, умерено слаба и слаба адхезивна активност към човешки клетки, с потенциал за използването им като пробиотици.

Извършен е подбор на щамове бактерии с противвъзпалителен имуномодулиращ ефект и пробиотичен потенциал.

Приложни приноси

Установено е, че по анализирания физикохимични показатели изследваните води от 26 водоизточника в 8 района, съответно в Стара Загора (9 извора), Сливен (2 бр.), Ямбол (2 бр.), Бургас (2 бр.), Варна (2 бр.), Пловдив (3 бр.), Пазарджик (4 бр.) и София (2 бр.), отговарят на нормативната уредба за качеството на водата за питейни цели, а в 3 области (Хасково, Ловеч и Благоевград) изследваните води не отговарят.

В резултат на микробиологичния анализ е показано, че водите от 17 източника, намиращи се в област Стара Загора (7 извора), Сливен (1 бр.), Ямбол (1 бр.), Бургас (1

бр.), Варна (1 бр.), Пловдив (2 бр.), Пазарджик (3 бр.) и Благоевград (1 бр.), не отговарят по всички изследвани микробиологични показатели на нормативната база за качеството на водата, предназначена за питейни цели.

Проучено е влиянието на метални йони в различни комбинации, електромагнитни вълни и зеолит при третиране на води със завишено съдържание на микроорганизми, при което е установено че метални йони, електромагнитни вълни, технологията EVOdrop или зеолит могат да се използват при почистване на замърсени с бактерии питейни води.

Установена е връзката на екстракти от водна леща (*Lemna minuta* L.), розово масло (*Rosa damascena* Mill.) и цвят от силивряк (*Haberlea rhodopensis* Friv.) и качеството на водата, при което е показано благоприятното въздействие на биологично активните им вещества към показателите на питейните води.

Научните приноси са свързани с обогатяване на науката с нови знания, а научно-приложните – с подбор на щамове с изразена ензимна и антимикробна активност, и имуномодулиращи свойства. Полученият обем от данни може да бъде използван за бъдещи изследвания свързани с оценката на изворни води с оглед здравето на хората.

VIII. Публикационна активност и оценка на качеството на научните публикации

Във връзка с дисертационния труд са представени 17 научни публикации, 9 от които в списания реферирани и индексирани в световноизвестни бази данни с научна информация (Scopus и Web of Science), като 5 от публикациите са в бази с Q (Q1, Q3 и Q4). Останалите 8 публикации са в списания с научно рецензиране или в редактирани колективни томове. На 2 публикации автора е единствен, в 5 бр. е първи автор, в 5 бр. – втори и в останалите 5 бр. – следващ. Представените публикации са отпечатани в периода 2018-2022 г. Една публикация (Г-5) е под печат, но същата е налична on line. Всички научни трудове са публикувани на английски език в специализирани издания, което потвърждава актуалността и значимостта на темата. Спектърът на научните издания е широк: Uttar Pradesh Journal of Zoology (4 бр.), Plant Science Today (2 бр.), Journal of Advances in Microbiology (2 бр.), и по 1 бр. в: Plants, Journal of the Turkish Chemical Society, Fresenius Environmental Bulletin, Journal of Medicine, Physiology and Biophysics, European Journal of Medicine, Journal of Advances in Microbiology, Chemical Science International Journal, Journal of Materials Science Research and Reviews и International Journal of Pathogen Research.

Представеното от д-р Вълчева напълно покрива и превишава минималните национални изисквания съгласно ЗРАСРБ и Правилника за неговото прилагане, както и Правилника на ССА за развитие на академичния състав и за придобиване на научната степен „доктор на науките“. Попълнената справка показва, че с представените публикации в група Г се покриват необходимите точки, заложи в националните изисквания за научната степен „доктор на науките“ – 56.66 т. от реферирани в световни бази данни публикации (Г7-1 до Г7-4) и 86.68 т. от рецензирани (Г8-1 до Г8-8), т.е. общо 143.44 т. при необходими 100 т. Авторът е представил, съгласно допълнителните изисквания на ССА, и 5 публикации (Г-1 до Г-5), свързани с дисертационния труд, които са отпечатани в списания индексирани в световноизвестни бази данни, но не са използвани за формиране на точките в група Г (Г7 и Г8) и имат обща сума 24.92 т.

Представените научни трудове отразяват проведеното изследване, доказателство за което е и факта, че една част от резултатите от научните проучвания, свързани с дисертационния труд, са станали достояние сред научните среди у нас и чужбина.

Наличен е списък с цитиранията по темата – представени са общо 20 цитирания, от които 9 бр. в Scopus и/или Web of Science, а останалите 11 бр. – в нереферирани списания с научно рецензиране, с което се надхвърлят необходимите минимални 100 т. като се формират общо 112 т. Справката показва, че д-р Н. Вълчева има по данни от Scopus h-index 3.

IX. Критични бележки, въпроси и препоръки към кандидата

Към представеният дисертационен труд нямам съществени бележки и препоръки, тъй като направените предложения за промени при предварителното разглеждане са взети под внимание от д-р Вълчева. Имам бележки от технически характер, които се отнасят до следното: Наблюдава се разминаване в подредбата на таблиците, например табл. 67 е отразена преди табл. 64, табл. 71 преди табл. 68, табл. 75 преди табл. 72 и др. При изследваните води по отношение на изворите в текста се среща различен начин на описание, например за област Хасково на стр. 40 първите три извора са посочени като термален минерален, а на стр. 151 и табл. 54 само първия извор е термален минерален; за област Стара Загора на стр. 45 е посочен термален минерален извор сондаж № Сз-8 Павел баня, а на стр. 165 същия е термален лечебен извор; за обл. Бургас на стр. 65 – хипертермален лечебен извор с. Шиварово, а на стр. 186 е термален лечебен извор; при област София – стр. 114 и стр. 217, съответно термален лечебен КЕИ „София-Център“ и хипертермален извор, за област Ловеч – стр. 119 и стр. 221, съответно хипотермален сондаж № L-2 Шипково и изотермален. Среща се разминаване в текста на Резултатите и в направените изводи по отношение на физикохимичните показатели, напр. за обл. Бургас на стр. 66 има 2 извора отговарящи по физикохимични показатели, за обл. Варна на стр. 71 също 2 извора отговарят, за обл. София на стр. 115 отново 2 извора отговарят, докато за тези области в изводите на стр. 280-281 е посочено, че по 1 извор отговарят.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Въз основа на приложените, от докторантката, различни методи на изследване, правилно изведените експерименти, направените обобщения и изводи считам, че представеният дисертационен труд отговаря на изискванията на ЗРАСРБ и Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и за заемане на академични длъжности в ССА, което ми дава основание да го оценя **положително**. Справката за изпълнение на минималните национални изисквания за присъждане на НС „доктор на науките“ в област 5. Технически науки показва, че кандидата покрива необходимите 50 т. от група А, свързани с ОНС „доктор“, а от публикационна дейност – 17 публикации в група показатели Г, автора формира обща сума 168.26 т.

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

Дата: 18.05.2023 г.
гр. Стара Загора

ИЗГОТВИЛ РЕЦЕНЗИЯТА:
(проф. дсн Гюрга Михайлова)

REVIEW

on a dissertation work for obtaining the scientific degree "Doctor of Sciences" in the field of higher education 5. Technical sciences, professional area 5.12 Food technologies, scientific specialty "Technology of biologically active substances (incl. enzymes, hormones, proteins)"

Topic and author of the dissertation: "Physical, chemical and microbiological characteristics of mineral, mountain and spring waters from Bulgaria, and biological properties of identified microorganisms", developed by Nedyalka Naneva Valcheva, PhD

Member of the scientific jury: Prof. Gyurga Stefanova Mihaylova, DSc, Trakia University - Stara Zagora (retired), 5. Technical sciences, 5.12 Food technologies, scientific specialty: Technology of milk and dairy products, appointed as a member of the scientific jury by order № RD-05-43/ 27.03.2023 by the Chairman of the AA - Sofia

I. Brief presentation of the doctoral student

Nedyalka Naneva Valcheva, PhD was born in 1966 in the village of Yabalkovo, region Haskovo. In 1990, she completed higher education at the University of Food Technology – Plovdiv, Master's educational and qualification degree in the specialty "Technology of vegetable, food and taste products", engineer-technologist qualification. In 2015, she defended a dissertation at the Faculty of Technology of UFT - Plovdiv for the educational and scientific degree "doctor" on the topic: "Microflora of medicinal and spring waters in Haskovo and Stara Zagora regions" in the field of higher education 4. Natural sciences, mathematics and informatics, professional field 4.3 Biological Sciences (Microbiology).

During the period 1990-2016, eng. Valcheva worked as a teacher at the Professional High School of Chemical and Food Technologies, "Prof. Asen Zlatarov" - Dimitrovgrad. In 2016, she started working as an expert at the Faculty of Agriculture of Trakia University - Stara Zagora, where she works until now.

The competencies that Nedyalka Valcheva, master's degree indicates in her autobiographical reference are: excellent command of the Russian language and good English, skills for working with specific equipment (microscopes, autoclaves, spectrophotometers, bioreactors, membrane filtration systems, etc.), computer skills, and ability to work in a team, communication and good organizational qualities. Courses and post-graduate training of different duration have been held in: basic and specific computer skills; contemporary theoretical and technological problems of chemistry education; pedagogy and psychology of microbiology education. From the presented materials, it can be seen that during her professional development she has gone through various stages of preparation, during which she acquired theoretical knowledge and practical skills in the areas of her professional activity.

II. General characteristics of the dissertation and abstract - volume and structure

The presented dissertation consists of 345 pages, including 124 tables, 8 figures and 187 photographs. According to the accepted standards, it is structured correctly in terms of the main sections necessary for a dissertation work and in terms of form it meets the requirements for this type of scientific work. The dissertation includes the following chapters: introduction, literature review, aim and tasks, materials and methods, results and discussion, conclusions, literature sources, contributions and publications in connection with the dissertation, which is

in accordance with the specific requirements of the AA. Complying with the regulatory requirements and Art. 63 of RDASAA, the dissertation work of Valcheva, PhD was prepared independently and does not repeat the content of the work presented by the author for the acquisition of the educational and scientific degree "doctor", it contains a theoretical summary and a solution to a scientific-applied problem related to the quality of water from natural water sources and its application for various purposes in the household and production spheres.

The literature review is balanced, contains the main aspects of the subject and is presented in 4 sections, systematized on 25 pages. The first of them is Water - an environment for the development of life on earth; the second - Spring and mineral waters in Bulgaria and microorganisms; the next - Modern methods of identification of microorganisms and the last - Properties of microorganisms. The analysis of the literature makes it possible to highlight objective prerequisites for conducting the planned research.

The purpose corresponds to the title, it is short and clearly defined. There are 3 main tasks for its realization, such as tasks 1 and 3 having 3 subtasks each. For performance of the tasks set a wide range of appropriate research methods was used. The realization of the set goal is accompanied by: analysis of water from various sources (physicochemical and microbiological studies); water treatment with metal ions, electromagnetic waves and zeolite; study of the influence of plant extracts (common duckweed, rose oil and silivrea flower) on water quality; isolation and identification of microorganisms; study of the isolated strains in terms of enzymatic and antimicrobial activity, and the adhesive ability to human epithelial cells.

The abstract is structured on 47 pages and reflects the main results of the dissertation work, illustrated by 18 tables, 4 figures and 14 photographs, with the number in parentheses to which they correspond in the dissertation.

III. Relevance of the problem

The presented dissertation contains complex studies with a wide range of investigated indicators affecting the quality of waters of different origins. The scientific development is directed, on one side, to the physicochemical and microbiological characteristics of waters from various water sources and regions of Bulgaria, and on the other, to the study of biological properties of microorganisms identified from the investigated waters. The formulated goal is dictated by an extremely important issue - the essential role of water for the vital activity of living organisms and the provision of good quality water for people's needs.

In our country, the legal regulations for water are related to the monitoring of the quality of water used for drinking and household purposes, of water for bathing and of mineral water used for treatment, prevention, drinking and domestic purposes, bottling, hygiene purposes, sports and recreation, regulated with relevant regulations. Practice shows that not all mineral and spring waters on the territory of the country are subject to the necessary control. On the other side, a number of scientific studies show the presence not only of valuable micro and macro elements and biologically active substances in the waters, but also of microorganisms with beneficial properties. This defines the topic like contemporary and relevant, with scientific and applied importance. Considering the importance of water in human life, the present development acquires even greater importance, and the isolation of microorganisms, their identification and characterization is a prerequisite for their application in a number of spheres. I believe that the dissertation has scientific and theoretical value, providing information and opportunities for future research.

IV. Literary awareness and theoretical preparation of the candidate

In the literature list are included 548 literary sources (scientific publications, books and textbooks, regulatory documents, patents, etc.), of which 13 are in Cyrillic, covering the period 1983-2022, and about 50% of the titles are after 2010, and Valcheva, PhD is the author/co-author of 4 of them (including a dissertation for ESD "doctor"). Most literature sources are in the field of the subject and in relation to the research, and are a prerequisite for obtaining original results. The necessary awareness of the developed tasks was achieved, followed by the necessary analyses. The presented literature review shows that the author of the dissertation is competent on the subject and knows the state of the problem, which made it possible to clearly formulate the tasks and search for an answer to the working hypothesis. The large number of literary sources is a good certificate for literary awareness and theoretical training of Valcheva, PhD.

I find it positive that the review ends with a summary, where it is emphasized in a summary what has been done and what remains to be done with a view to obtaining new data and realizing the purpose of the research. It makes an impression that the summary of the literature review focuses mainly on the food industry and the place of water in people's lives, which coincides with the professional direction of the current dissertation work.

V. Methodical approach

One of the most important sections for scientific developments, which provide information on the experimental set-up and how well it has been carried out - Materials and methods, is structured on 10 pages. From what is described in the section, one gets a real idea of the significant amount of scientific research work that has been carried out. It is indicated that the experimental work was carried out in scientific research laboratories of the Faculty of Agriculture at Trakia University - St. Zagora; RHI - Haskovo and EL BI Bulgarikum - Sofia. In Materials, it is indicated that mineral, mountain and spring waters (a total of 90 water sources) from 11 regions in the country (Haskovo, Stara Zagora, Sliven, Yambol, Plovdiv, Pazardzhik, Burgas, Varna, Sofia, Lovech and Blagoevgrad) were studied during the period 2015-2021. Brief information on the microorganisms, nutritional environments and reagents used is presented. Since the topic is interdisciplinary, a large set of classic and contemporary methods of assessment and analysis were used - physicochemical, biochemical, microbiological, genetic, mass spectroscopic, statistical methods for processing data from the laboratory tests performed. The procedures for isolation, identification and investigation of the properties of microorganisms are presented. The chosen methodology corresponds to the complex character of the research, appropriate classical and modern methods of analysis are used, which are well described and consistent with the objectives of the study.

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

The questions discussed are presented in the necessary sequence and are logically related to the tasks set for implementation. The obtained results are summarized in tabular form, in figures or with photographic material, well illustrated and easy to understand, the data are processed statistically. The section Results and discussion occupies a very large share in the structure of the dissertation - it is presented on 240 pages, which is almost 70% of the total volume of the dissertation, and is a proof of the enormous amount of experimental work performed. All subsections end with a summary in the form of conclusions, which makes a very good impression.

The results and their discussion are presented in 3 sections that correspond to the tasks set for implementation, and in the individual subsections there is a wealth of information from

data on the described 91 water sources, of which 43 are thermal springs, 30 hypothermal, 10 hyperthermal, 4 isothermal and 4 subthermal. From the material presented in the first section, it can be seen that an analysis of waters from mineral and medicinal springs was carried out - 20 physicochemical and 7 microbiological indicators were determined. Data on chemical indicators for water sources for drinking water controlled by RHI are also indicated. As a result of the research carried out, it was established that according to physicochemical indicators, the waters from 26 water sources meet all the controlled parameters of the regulatory requirements, and according to microbiological indicators, from 17 water sources they do not. Results of water treatment with metal ions, electromagnetic waves and zeolite are presented. Microbiological analysis of water treated with metal ions of silver, copper, zinc and silicon in different combinations was carried out. The change in some physical and chemical parameters during the purification of drinking and rainwater with the EVOdrop system was investigated. The influence of electromagnetic waves on the development of microorganisms is presented. In these studies, it has been shown that metal ions, electromagnetic waves, EVOdrop technology or zeolite can be used to treat bacteria-contaminated drinking water. The influence of plant extracts (common duckweed, rose oil and silivrea flower) on water quality was investigated - the antimicrobial activity of an extract (with ethanol and methanol) of water common duckweed (*L. minuta* Kunth.), the effect of a 1% solution of rose oil in deionized water and the distribution of water molecules in a 1% solution of silivrea flower extract in EVOdrop-filtered hydrogen-saturated water.

In the next section, Isolation and identification of microorganisms, a colonial and morphological characterization of the strains isolated from the waters of the study areas was performed. The growth of the strains in a liquid nutrient medium was monitored for 24-48 h at temperatures of 3-50 °C. The species affiliation of the strains isolated from the waters in the studied areas was determined. For the region of Haskovo, the assimilation of carbon sources by the strains isolated from the waters is also shown, as is a comparison of the sequences of the 16S rRNA genes of the two strains. The species distribution of the identified microorganisms by region is shown, and the most common strains by region are indicated. The comparative analysis of the aggregated data by area shows that 88 strains were isolated from 71 water sources.

In the last section, a study of the isolated strains was performed in terms of enzymatic and antimicrobial activity, and the adhesive ability to human epithelial cells. It has been shown that the majority of the isolated strains of microorganisms exhibit pronounced amylolytic, proteolytic and lipolytic activity, and 7 strains have the highest activity. Regarding the antimicrobial activity, the results of only those with the most pronounced inhibitory action against pathogenic microorganisms are presented. The obtained results showed a high antimicrobial activity of the *Bacillus* strains against the used molds of the genus *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* and *Mucor*. To study the adhesive ability of microorganisms on the human carcinoma epithelial cell line HT-29, 12 bacteria from the genus *Bacillus* and the genus *Geobacillus* were selected. Data on immunomodulatory properties of the studied strains are presented.

As a result of the conducted research, 3 main conclusions have been made, the 1st and 3rd with sub-conclusions.

VII. Contributions of the dissertation

The dissertation work of Valcheva, PhD has the character of an original scientific and applied development, with which the knowledge about the influence of the physicochemical parameters and the presence of microorganisms on the quality characteristics of spring water is

improved and the knowledge about the composition and properties of water is improved and the isolation and identification of strains of microorganisms from it with biological properties useful for human health. A significant part of the results is related to obtaining knowledge in the study of new strains of microorganisms present in spring waters. The author has compiled a reference with 6 contributions, the first of which is with 4 sub-contributions, characterized by scientific, scientific-applied and applied meaning, which I accept by systematizing them in the following way:

Scientific contributions

A complex physicochemical and microbiological study of spring waters from 91 water sources from 11 regions of Bulgaria was carried out - Haskovo (4 pcs.), Stara Zagora (16 pcs.), Yambol (3 pcs.), Sliven (5 pcs.), Burgas (6 pcs.), Varna (5 pcs.), Plovdiv (30 pcs.), Pazardzhik (13 pcs.), Sofia (4 pcs.), Lovech (3 pcs.) and Blagoevgrad (2 pcs.), where it was obtained database of physicochemical and microbiological indicators of the studied waters.

As a result of a molecular genetic study, 21 strains of microorganisms were isolated and identified from the studied spring waters, which were assigned to 8 genera.

Scientific and applied contributions

The enzymatic activity of the isolated strains of microorganisms was monitored, where it was found that 7 strains were characterized by high amylolytic, proteolytic and lipolytic activity, which enables their application in biotechnological production.

A high antimicrobial activity of strains of the *Bacillus* genus against mold fungi has been established, which creates prerequisites for their use in crop production.

Tests were conducted regarding the adhesiveness of the investigated strains to human epithelial cells, in which strains with moderate, moderately weak and weak adhesive activity to human cells were singled out, with the potential for their use as probiotics.

A selection of bacteria strains with anti-inflammatory immunomodulatory effect and probiotic potential was carried out.

Applied contributions

It was established that according to the analyzed physicochemical indicators, the investigated waters from 26 water sources in 8 regions, respectively in Stara Zagora (9 spring water), Sliven (2 pcs.), Yambol (2 pcs.), Burgas (2 pcs.), Varna (2 pcs.), Plovdiv (3 pcs.), Pazardzhik (4 pcs.) and Sofia (2 pcs.), comply with the regulations on the quality of water for drinking purposes, and in 3 districts (Haskovo, Lovech and Blagoevgrad) the tested waters do not meet the requirements.

As a result of the microbiological analysis, it was shown that the waters from 17 sources located in the Stara Zagora region (7 spring water), Sliven (1 pc.), Yambol (1 pc.), Burgas (1 pc.), Varna (1 pc.), Plovdiv (2 pcs.), Pazardzhik (3 pcs.) and Blagoevgrad (1 pc.), do not meet the regulatory framework for the quality of water intended for drinking purposes by all microbiological indicators examined.

The influence of metal ions in different combinations, electromagnetic waves and zeolite in the treatment of waters with an increased content of microorganisms was studied, in which it was found that metal ions, electromagnetic waves, the EVOdrop technology or zeolite can be used in the purification of drinking water contaminated with bacteria.

The relationship between extracts of common duckweed (*Lemna minuta* L.), rose oil (*Rosa damascena* Mill.) and silivrea flower (*Haberlea rhodopensis* Friv.) and water quality was established, showing the beneficial effect of their biologically active substances on indicators of drinking water.

Scientific contributions are related to the enrichment of science with new knowledge, and scientific-applied ones - to the selection of strains with pronounced enzymatic and antimicrobial activity, and immunomodulatory properties. The volume of data obtained can be used for future research related to the assessment of spring water in terms of human health.

VIII. Publication activity and quality assessment of scientific publications

In connection with the dissertation work, 17 scientific publications are presented, 9 of which are referenced in journals and indexed in world-famous databases with scientific information (Scopus and Web of Science), and 5 of the publications are in databases with Q (Q1, Q3 and Q4). The remaining 8 publications are in peer-reviewed journals or edited collective volumes. In 2 publications the author is the only one, in 5 pcs. is the first author, in 5 pcs. - second and in the remaining 5 pcs. - next. The presented publications were printed in the period 2018-2022. One publication (D-5) is in print, but the same is available online. All scientific works are published in English in specialized publications, which confirm the topicality and importance of the topic. The range of scientific publications is wide: Uttar Pradesh Journal of Zoology (4 pcs.), Plant Science Today (2 pcs.), Journal of Advances in Microbiology (2 pcs.), and 1 piece each in: Plants, Journal of the Turkish Chemical Society, Fresenius Environmental Bulletin, Journal of Medicine, Physiology and Biophysics, European Journal of Medicine, Journal of Advances in Microbiology, Chemical Science International Journal, Journal of Materials Science Research and Reviews and International Journal of Pathogen Research.

The presented by Valcheva, PhD fully covers and exceeds the minimum national requirements according to the LDASRB and the Regulations for its implementation, as well as the Regulations of the AA for the development of the academic staff for the acquisition of the scientific degree "doctor of sciences". The completed report shows that the publications presented in group D cover the necessary points set in the national requirements for the scientific degree "doctor of sciences" - 56.66 points from publications referenced in worldwide databases (D7-1 to D7-4) and 86.68 points of peer-reviewed (D8-1 to D8-8), i.e. a total of 143.44 points out of the required 100 points. The author has submitted, according to the additional requirements of the AA, 5 publications (D-1 to D-5) related to the dissertation work, which were printed in journals indexed in world-renowned databases, but not were used to form the points in group D (D7 and D8) and have a total amount of 24.92 points.

The presented scientific works reflect the conducted research, evidence of which is also the fact that the results of the scientific studies related to the dissertation work have become known among the scientific communities in our country and abroad. A list of citations on the subject is available - a total of 20 citations are presented, of which 9 pcs. in Scopus and/or Web of Science, and the remaining 11 pcs. - in non-refereed journals with scientific review, which exceeds the required minimum 100 points, forming a total of 112 points. The reference shows that N. Valcheva, PhD has according to data from Scopus h-index 3.

IX. Critical remarks, questions and recommendations to the candidate

I have no significant notes and recommendations for the presented dissertation work, since the proposed changes during the preliminary examination were taken into consideration by Valcheva, PhD. I have notes of a technical character, which refer to the following: There is a discrepancy in the arrangement of the tables, for example table 67 is reflected before table 64, table 71 before table 68, table 75 before table 72 and others. Regarding the studied waters, in relation to the springs, a different way of description is found in the text, for example, for Haskovo region on page 40 the first three springs waters are indicated as thermal mineral, and on page 151 and table 54 only the first spring waters is thermal mineral; for the Stara Zagora

region on page 45 is a thermal mineral spring waters borehole No. Sz-8 Pavel Banya, and on page 165 is a thermal healing spring waters; for the region Burgas on page 65 is a hyperthermal healing spring in the village of Shivarovo, and on page 186 is a thermal healing spring waters; for the Sofia region - p. 114 and p. 217, respectively thermal healing KEI "Sofia-Center" and hyperthermal spring, for the Lovech region - p. 119 and p. 221, respectively hypothermal borehole No. L-2 Shipkovo and isothermal. There is a discrepancy in the text of the Results and in the conclusions made regarding the physicochemical indicators, for example for the region Burgas, on page 66, has 2 water sources corresponding to physicochemical indicators, for the region Varna on page 71 also 2 water sources are responsible for the region Sofia on page 115 again 2 water sources are responsible, while for these areas in the conclusions on pages 280-281 it is stated that 1 water source each corresponds.

CONCLUSION

Based on the various research methods applied by the doctoral student, the correctly performed experiments, the generalizations and conclusions made, I believe that the presented dissertation meets the requirements of the LDASRB and the Regulations for the terms and conditions for acquiring scientific degrees and for holding academic positions in AA, which gives me reason to evaluate it **positively**. The reference for the implementation of the minimum national requirements for awarding the SD "doctor of science" in the field 5. Technical sciences shows that the candidate covers the necessary 50 points from group A, related to the educational and scientific degree "doctor", and from publication activity - 17 publications in group of indicators D, the author forms a total amount of 168.26 points.

Based on the above, I propose to award Nedyalka Naneva Valcheva, PhD the scientific degree "doctor of sciences" in the field of higher education 5. Technical sciences, professional field 5.12 Food technologies, scientific specialty "Technology of biologically active substances (incl. enzymes, hormones, proteins)".

Date: 18.05.2023
Stara Zagora

PREPARED THE REVIEW:
(Prof. Gyurga Mihaylova, DSc)