



РЕЦЕНЗИЯ

От: Професор д-р Даринка Неделчева Илиева, д-р - научна специалност „Епизоотология, инфекциозни болести и профилактика на заразните заболявания по животните“, НДНВМИ, гр. София, член на Научно жури със Заповед № ЗПС-370/05.07.2023 г. на Ректора на ЛТУ.

Върху дисертационен труд на тема: „Антимикробно действие и биологични ефекти на електрохимично активирани водни разтвори“, автор маг.Тошка Евгениева Петрова, докторант в редовна форма на обучение, към катедра „Инфекциозна патология, Хигиена, технология и контрол на храните от животински произход“, зачислена със Заповед № ЗСД-21/24.01.2020 г. на Ректора на ЛТУ, за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“, област на висше образование б. Аграрни науки и ветеринарна медицина, професионално направление 6.4. Ветеринарна медицина, научна специалност “Епизоотология, инфекциозни болести и профилактика на заразните заболявания по животните”.

Научен ръководител: проф. д-р Теодора Попова, д-р ФВМ, ЛТУ-София

1. Кратко представяне на докторанта.

Тошка Евгениева Петрова е родена 1980 г. в гр.Ямбол. Завършва математическа гимназия в гр.Ямбол с интензивно обучение на английски език. Дипломира се през 2007 г. с ОКС „Магистър“, специалност ветеринарна медицина с отличен успех от държавните изпити-ФВМ, ЛТУ-София. През 2008 г. постъпва на работа в катедра „Инфекциозна патология, Хигиена, технология и контрол на храните от животински произход“ като асистент по дисциплините „Държавна ветеринарна медицина и обществено здраве“, „Ветеринарномедицинско законодателство и съдебна ветеринарна медицина“. През 2009 г. поради структурни промени във ФВМ е асистент в катедра „Хирургия, Анестезиология, Рентгенология, Държавна ветеринарна медицина и обществено здраве“ по същите дисциплини. От 2015 г. отново поради структурни промени е асистент към катедра „Животновъдни науки“. За периода 2008-2016 г. заема академичната длъжност асистент на основен трудов договор. От м.01.2017 г. е хоноруван асистент на трудов договор към катедра „Животновъдни науки“, като Организатор на учебната дейност в катедрата и асистент на хонорар до настоящия момент. Владее английски език-/самостоятелно ниво-V1/V2/ и работи с компютър. От представено удостоверение изд. от ФВМ-177/21.04.2023 г. за положени изпити от докторантския минимум е видно, че докторантката е положила 3 изпита през 2020 г.; по дисциплината „Обща епидемиология и превантивна медицина“, изпита е издържан с отличен успех; по дисциплините „Инфекциозни бактериални заболявания по домашните животни“ и „Методически основи на научните изследвания“ тя се е представила с мн.добър успех. Докторантката е отчислена с право на защита, съгласно Заповед № ЗСД-128/24.04.2023 г., считано от 14.03.2023 г. На 22.05.2023 г. д-р Петрова е представила в катедрата проект на дисертация и всички материали изискуеми във връзка с чл.32, ал.5 на ПРАС в ЛТУ. В катедрата е депозиран и доклад от научния ръководител на докторантката проф. д-р Т. Попова, д-р с положителна оценка и мнение, че дисертантката е готова за предварителна защита на докторската и дисертация. С решение на катедрата-Протокол №191/08.06.2023г. е разкрита процедура за предварително обсъждане на дисертацията на Т.Петрова и представянето и на Разширен катедрен съвет /РКС/ на 22.06.2023 г., Зап. ЗПС №327/16.06.2023 на Ректора на ЛТУ. На РКС е взето е положително решение за защита на дисертацията на д-р Петрова, предложен е състав на научно жури и дата /30.11.2023 г./ за заключителното заседание на научното жури. С Протокол №192/22.06.2023 г. на катедра „Инфекциозна патология, Хигиена, технология и контрол на храните от животински произход“ е открита процедура и даден ход за официална защита на дисертацията за придобиване на ОНС „Доктор“. Научното жури е назначено по Заповед №ЗПС-370/05.07.2023 г. на Ректора на ЛТУ.

2. Актуалност на разработвания проблем.

В дисертационният труд разработен от Тошка Евгениева Петрова са представени данни за антимикробното действие и биологичните ефекти на електрохимично активирани водни разтвори (ЕХАВР). При обработка на водата с електрически ток се получават електро- или електрохимично активирани водни разтвори (католити и анолити) с променени кинетични и електрохимични свойства. В достъпната литературата се срещат научни съобщения за експерименти с електролизирани водни разтвори (ЕВР) започнали в началото на ХХ век първоначално в Япония, Русия, Китай, а на по-късен етап и в други страни в т.ч и в България.

Разработките и проучванията с ЕВР през миналия век са били свързани с военно-промишлената индустрия и по тази причина някои данни са били засекретени и се публикуват десетки години по-късно, както и в началото на новото столетие. Електролизираните водни разтвори са по-добре проучени в медицината за лечение на хора с възникнали заболявания от различно естество, в т.ч. при терапия на инфекции причинени от микробни агенти (бактериални, вирусни и микотични). Характерно за ЕВР, че те проявяват гермицидно и дезинфекционно действие при третиране на устойчиви микроорганизми. На ниво Европейски съюз са оценени и одобрени за употреба като биоциди, които са безвредни и екологично чисти за хората, животните и околната среда. ЕВР намират широко приложение в различни сфери на икономиката и затова на настоящия етап апаратите за производство на активирана вода т.нар. електролизатори продължават да се усъвършенстват от търговските производители. Техният принцип на действие е един и същ и се базира на физико-химичните закони за електролизата на водата. Електролизаторите имат електроди /катод и анод/, мембрана и камери. Биологичните ефекти на активираната вода се дължат на уникалните и физико-химични свойства, които не могат да се получат по друг начин. Анолитът притежава понижена електронна активност със свойства на окислител (оксидант) с кисели рН стойности и качества на биоцид, действа антимикубно и се прилага за третиране на възпалени раневи повърхности. Католитът е с повишена електронна активност, алкални рН показатели и според изследванията на различни автори оказва благоприятно влияние върху живите организми и растенията. Електрохимичната активация може да замести обемисти химични производства и използването на традиционни химични реагенти чрез метастабилността на активираната вода, при което тя преминава в междинно енергийно състояние. Ето защо активираните водни разтвори окислителни или редуктори след определен период от време по естествен път се неутрализират до неутрална вода и е изключително важно да се детерминира срока на тяхната активност. Измерените рН стойности и окислително-редукционният потенциал (ОРП) при католита и анолита от момента на активиране на водата се променят по различен начин. Католитът запазва високата си алкалност $\text{pH} > 9$ около 1 седмица, но окислително-редукционният му потенциал бързо се променя и след втория ден практически се свежда до нула. За разлика от него при анолита рН стойностите и ОРП се променят незначително (около 10%) до 1 година. От изложените по-горе данни и факти следва, че електрохимичната активация на водните разтвори е високоефективна технология за пречистване и превръщане на водата в подходящо средство за дезинфекция за най-различни технологични цели.

Научните изследвания свързани с проучване на ЕВР във ветеринарномедицинската практика и тяхното дезинфекционно действие върху изолирани в клинични условия патогенни бактериални щамове, за терапия на инфекциозни болестни процеси при животни, както и биологичните им ефекти след орален прием от бозайници и птици все още не са добре проучени. В този аспект считам, че разработения дисертационен труд на редовния докторант Тошка Евгениева Петрова е иновативен и оригинален.

3. Структура и съдържание на представения дисертационен труд.

Представеният ми за рецензиране дисертационен труд е написан на 210 страници, включва 38 таблици и 58 фигури. Литературният указател съдържа 348 авторски заглавия, от които 34 на кирилица и 314 на латиница, подредени по азбучен ред.

Дисертационният труд включва необходимите раздели, съгласно общоприетите изисквания и е структуриран по схемата: Титулна страница – 1 стр.; Съдържание и Използвани съкращения – 4 стр.; Въведение – 2 стр.; Литературен обзор – 45 стр.; Заключение – 2 стр.; Цел и задачи – 1 стр.; Материали и методи – 18 стр.; Резултати – 65 стр.; Обсъждане – 25 стр.; Изводи – 2 стр.; Препоръки за практиката – 1 стр.; Научни приноси – 2 стр.; Публикации във връзка с дисертационния труд и Благодарности – 2 стр.; Резюмета на дисертацията на български език и на английски език – 4 стр.; Литературен указател – 36 стр.

Литературният обзор представя исторически данни и факти за електролизираните водни разтвори. В него са разгледани видове апарати за производство на ЕАВР и ЕХАВР, принципното им устройство и процесите за получаване на анолити и католити чрез електролизери. Представени са данни от световната литература, че ЕВР са безвредни и са добра алтернатива на много химични средства, могат успешно да се използват за дезинфекция, профилактика и терапия на инфекциозни процеси и заболявания при живите организми, тъй като към тях микробите не развиват резистентност. Докторантката е проучила добре достъпната научна литература. Литературният преглед е правилно структуриран и тясно свързан с разработваната докторска теза.

Целта на докторската теза е формулирана мотивирано: провеждане на изследвания за проучване на антимикуробното действие и биологичните ефекти на ЕВР. Във връзка с целта докторантката е изпълнила планираните 5 научни задачи, а именно: изследван е антимикуробния ефект на ЕВР (анолити и католити) в лабораторни условия „*in vitro*“ спрямо патогенни микроорганизми от различни групи и е проследен ефекта им за различен период при съхранение на стайна T° и на тъмно; изследван е антимикуробния ефект на ЕХАВР при обработка на естествено наситени с бактерии материали получени от утайка на градска пречиствателна станция; изследван е антимикуробния ефект на анолита като дезинфекционно и антисептично средство върху различни повърхности и материали; проследен е биологичния ефект на католит приложен *per os* в експерименти с патета; проучен е ефекта на анолити и католити за терапия на пациенти „*in vivo*“ при бактериални, микотични и асоциирани с различни микробни агенти кожни инфекции, някои от които упорити и трудно поддаващи се на лечение с конвенционални антибиотични и химиотерапевтични средства поради проявена полимикробна резистентност.

4. Оценка на използваните материали и методи на изследване.

Експериментите са проведени методично правилно при наличие на съответни контроли. В раздел „Материали и Методи“ подробно са описани използваните теренни и еталонни щамове, апаратура (видове електролизери), оборудване, диагностични тестове, опитни животни, дезинфектанти и електролизираните водни разтвори /ЕВР/. В лабораторни условия докторантката е изпитала 17 вида ЕВР; 4-електроактивирани (анолити и католити) и 13-електрохимичноактивирани: 5 вида католити и 8 вида анолити-приложени в 4-ри различни концентрации, съответно (100%, 50%, 25% и 12,5%). Действието на различните видове анолити и католити е проучено „*in vitro*“ по класическите микробиологични методи, чрез изолиране и култивиране на отделни бактериални видове при подходящи условия върху течни и твърди селективни хранителни среди, подходящи за съответните бактериални видове. Антимикуробният ефект на различни ЕВР е проследен спрямо тест-микроорганизми, а именно при 4 вида Грам /-/ и Грам /+/ патогенни бактерии, известни с по-голямата си устойчивост при инактивиране с дезинфектанти и общо 7 различни щам-референтни и теренни, изолирани от пациенти на Университетската клиника за дребни животни, ФВМ, ЛТУ-София. Проследен е периода на запазване на антимикуробния ефект на изследваните анолити и католити (след съхранението им на тъмно при стайна T° за 7, 21, 28 и 29 дни). При „*in vitro*“ изследвания са измервани следните физични параметри на ЕВР; рН, окислително-редукционен потенциал (ORP/mV), $T^{\circ}C$; При „*in vitro*“ опитите е използван (Mc Farland standart), оптичен метод за получаване на работни суспензии от чисти бактериални култури с определена концентрация. Използван е суспензионен метод, като количественото определяне на микроорганизмите е извършено по класическия метод в серийни десетократно нарастващи разреждания. За идентификация на изолираните микроорганизми са провеждани микроскопски, културални и биохимични изследвания. Изследвано е действието им върху органични и неорганични материали при сравнение с бактерицидното и антисептично действие на 3 вида широкоспектърни дезинфектанти.

При „*in vivo*“ проучването са използвани общо 66 броя животни, от които 20 броя птици от вида Пекинска бяла патица. При тях е проследено теловното развитие и растеж чрез периодично измерване на жива маса и второстепенни селекционни параметри на патици от опитната и контролната група; определяно е усвояването на хранителните вещества чрез изчисляване на разхода за фураж, суров протеин и енергия. При прием на католит като единствена вода за пиене при патици са вземани двукратно кръвни проби на 12-ия и 30-ия ден от експерименталната група, с оглед оценка на динамиката и промените в стойностите на серумните биохимични показатели на кръвта като са подбрани следните параметри; аланин аминотрансфераза (ALAT), аспартат аминотрансфераза (ASAT) и алкална фосфатаза (ALP) за изследване на чернодробната активност; за състоянието на белтъците в кръвта - общ протеин (TP) и албумин (ALB); за бъбречната функция - креатинин (CREAT) и урея (UREA) и за минералния и електролитен профил калций (Ca), фосфор (P) и калий (K) за птиците от опитната и контролната група. При „*in vivo*“ изследванията 21 броя кучета от различна порода и възраст за антисептика на лапите са третирани с анолит, както и 25 броя животни с клинични инфекции с бактериални (конюнктивити и отити); инфектирани кожни рани и абсцес; дерматомикози - трихофития; микроспория; микроспория усложнена с вторична бактериална инфекция с *Ps.fluorescens* и със смесена кожна инфекция от *C.albicans* и *E.coli*. Идентификацията на изолираните патогенни бактериални щамове е с MALDI Biotyper Identification – Bruker. Биохимичните изследвания са направени с Polymicrotest - Staphy Test 24 и посредством автоматизирана система за идентификация на микроорганизми и патогенни гъбички MD Phoenix™ M50. Чувствителността на изолираните бактерии към антимикробните средства е извършено по класическия агар-гел дифузионен метод на (Bauer et al., 1966) и чрез MD Phoenix™ M50. При кучета с дерматомикози диагнозата е поставена по клинични признаци, след микроскопиране на космени проби, взети от засегнатите зони и културално изследване върху селективни хранителни среди (Endo agar, Sabouraud agar).

Намирам, че изследваните материали и опитни животни са разнообразни и достатъчни за събиране на голям обем от данни. Експериментите са проведени благодарение на новите иновативни технологии на компаниите, които с иновативна мисъл и умения продължават да усъвършенстват апаратите за получаване на ЕВР.

5. Онагледяване и представяне на получените резултати .

Получените данни са представени текстово, в табличен вид и са демонстрирани с цветни фигури. От раздел „Резултати“ може да се заключи, че докторантката е изпълнила успешно поставените задачи като е постигнала задоволителни резултати. Данните са оформени статистически и показват, че ЕАВР и ЕХАВР-анолити и католити имат антимикробно действие „*in vitro*“ спрямо патогенни бактерии. В изследването са използвани суспензии от чисти култури на теренен щам на *E.coli* O45, 3 теренни щама *Ps.aeruginosa* (№318 и №450) и *Ps.aeruginosa* изолиран от кон, два референтни щама *S. aureus* (ATCC 3350 и Cowan) и реф.щам на *S.enterica* (ATCC 1304). Те са приготвяни в стерилен физиологичен разтвор по Mc Farland standart за получаване на изходна суспензия с концентрация 10^7 кл./ml и 10^9 кл./ml, при което е постигната крайна работна концентрация 10^6 кл./ml и 10^8 кл./ml при съответни контроли. Експериментите с анолит и католити „*in vitro*“ и тяхното антимикробно действие към тест-микроорганизмите са проведени при сравнение с дезинфектанта *Virkon S*, който е биоцид и отговаря на критериите за широко приложение, безопасен е за здравето на животните и хората и е безвреден за околната среда. Разтворите на *Virkon S* инактивират микроорганизмите чрез окислителното си действие и ниски рН стойности. *Virkon S* се препоръчва за употреба в протиепизоотичната дезинфекционна практика. Докторантката също така изследва антимикробния ефект на ЕХАВР след 4 седмично съхранение на стайна Т° и на тъмно. В дисертационният труд е установено дезинфекционното действие на анолит, съдържащ Cl⁻, получен чрез електрохимична активация на стерилна дестилирана вода с 3% NaCl спрямо утайка от градска пречиствателна станция за отпадни води.

В дисертацията е проучен антимикробния ефект на анолит при третиране на различни повърхности и материали от неорганична и органична материя. При изследване на дезинфекционното действие на анолит върху лабораторни повърхности (мивки, работни плотове и маси) след 10 min експозиция анолита е показал антимикробен ефект подобно на контролния дезинфекционен препарат (хлорхексидин).

Дисертантката изследва кожни повърхности и антисептиката на лапи на кучета след разходка, третирани с кисел анолит, чийто инактивиращо действие е било подобно на дезинфектант на спиртна основа предлаган за употреба във ветеринарната практика във връзка с пандемията от Covid-19 със широк бактерициден спектър на действие до 99,9%. Получени са обнадеждаващи резултати във връзка с изследванията за определяне терапевтичния ефект на католит и анолит „*in vivo*“, приложени самостоятелно или в комбинация при пациенти с възпалителни реакции в организма - бактериални конюнктивити; полибактериални отити; инфектирани кожни рани, дерматомикози и асоциирани инфекции клинично проявени на базата на бактериални и микотични агенти.

На настоящият етап развитието на редица болести се свързва с разрушителното действие на оксидантите-свободни радикали (ROS - reactive oxygen species), чийто мишена са клетките, техните структури, ДНК и др., в резултат на което се развиват различни патологични процеси. Алкалните ЕВР се препоръчват за овладяване на негативните последици от оксидативния стрес и възпаление. Известно е, че католита е физиологично функционална вода, притежава антиоксидантни и имуностимулиращи свойства. В дисертацията са представени данни от експерименти относно биостимулиращия ефект на електроактивирана алкална вода /католит/ приемана *per os* „*ad libitum*“, като единствена вода за подобряване продуктивността и растежните показатели на патици от породата Бяла пекинска патица от 8-седмична възраст в продължение на 1 месец, при стойности на серумните биохимични показатели на кръвта запазени в рамките на физиологичния диапазон за двете групи /опитна и контролна/.

Представените резултати в дисертационния труд са получени от изследване на подходящи материали чрез изпълнение на широк набор от методи и считам, че са лично дело на докторантката.

6. Раздел „Дискусия“

От обсъждането личи литературната осведоменост на докторантката, умението и да анализира и да обобщава информацията при сравнение с постигнатите резултати от други изследователи, което е предпоставка за оформянето на коректни изводи, препоръки и приноси.

7. Изводи, препоръки и приноси

Във връзка с предстоящата защита на дисертацията „Антимикробно действие и биологични ефекти на електрохимично активирани водни разтвори“ маг. Тошка Евгениева Петрова, е подписала декларация за авторство за придобиване на ОНС “Доктор“.

В дисертацията са формулирани 9 извода, 5 препоръки и 12 оригинални приноси с насоченост към ветеринарната практиката, които отразяват получените резултати и следва да се приемат.

Бележки във връзка с дисертацията.

Докторантката в значителна степен се е съобразила с някои бележки и насоки, които и бяха дадени по време на аprobация на дисертацията. В проекто-дисертационния труд на д-р Петрова имаше правописни и технически грешки, които тя трябваше да коригира преди публичната защита на дисертацията. Липсват корекции на стр.126 и на стр.129, където две различни фигури са означени с №38. На стр.130 и стр.132 също две различни фигури са означени с №44. Препоръчвам на дисертантката да изготви корекционен лист преди дисертацията да се депозира в НАЦИД.

Направените бележки и препоръки не касаят съществени части от дисертацията, а имат за цел да подобрят нейното оформяне и визия.

Публикации във връзка с дисертацията

Дисертантката има общо 4-ри колективни научни статии на английски език през периода 2016-2022 г., 3 публикации в сп. Tradition and Modernity in Veterinary Medicine, FVM, UF, Sofia и 1 публикация в сп. Bulgarian Journal of Soil Science, Agrochemistry and Ecology, с които тя е изпълнила Минималните национални изисквания за придобиване на ОНС „Доктор“, област на висше образование 6. Аграрни науки и ветеринарна медицина, професионално направление 6.4. Ветеринарна медицина.

Докторантката е участвала в научни форуми и е представила - 3 сертификата от онлайн срещи във връзка с международната научна конференция „Tradition and Modernity in Veterinary Medicine“ през 2021 и 2022 г.; сертификат от участие в колективна разработка на 5-та Източно европейска регионална ветеринарна конференция, Словения, 2022 г.; сертификат от колективно участие в два постера на XV Конгрес на микробиолозите в България с международно участие, 2022; сертификат от участие на международен конгрес в Истанбул, 2022. Няма представени числови показатели- цитати, импакт фактор и др.

Автореферат

Авторефератът е неразделна част от дисертацията, изготвен е според изискванията и в синтезиран вид отразява последователността на проведените изследвания, постигнатите резултати, направените изводи, препоръки за ветеринарната практика и изведените оригинални приноси.

Заклучение:

Дисертацията е актуална, съдържа оригинални приноси с насоченост към ветеринарно-медицинската наука и практика. Поставените задачи са изпълнени в резултат, на което целта е постигната. За първи път в областта на ветеринарната медицина в страната при експерименти проведени „*in vitro*“ и „*in vivo*“ са проучени електро- или електрохимично активирани водни разтвори (анолити и католити), получени чрез модерен подход и иновативна технология посредством електролизери. Авторът на дисертацията маг.Тошка Петрова е установила, че ЕВР оказват гермицидно и дезинфекционно действие при третиране на устойчиви тест-микроорганизми Грам (+) и Грам (-) патогенни бактерии, както и при теренни и еталонни щамове. За първи път докторантката е проучила терапевтичния ефект на католит и анолит „*in vivo*“, приложени самостоятелно или в комбинация при пациенти с възпалителни реакции в организма - бактериални конюнктивити; полибактериални отити; инфектирани кожни рани, дерматомикози и асоциирани инфекции клинично проявени на базата на бактериални и микотични агенти. Доказан е биостимулиращия ефект върху организма на католит приеман *per os* „*ad libitum*“ даван като единствена вода за пиене в продължение на един месец, което е подобрило продуктивността и растежните показатели при породата Пекинска бяла патица.

Докторантката е изпълнила минималните национални изисквания, съгласно ЗРАСРБ, ПРАСРБ и ПРАС в ЛТУ, гр.София. Това ми дава основание да оценя положително в рецензията си дисертационния труд на тема „**Антимикробно действие и биологични ефекти на електрохимично активирани водни разтвори**“ и да препоръчам на почитаемото научно жури да присъди на маг. Тошка Евгениева Петрова, редовен докторант към катедра „Инфекциозна патология, хигиена, технология и контрол на храните от животински произход“ ОНС „Доктор“, в област 6. Аграрни науки и ветеринарна медицина, професионално направление 6.4. Ветеринарна медицина, научна специалност „Епизоотология, инфекциозни болести и профилактика на заразните заболявания по животните“.

21.09.2023 г.
гр.София

РЕЦЕНЗЕНТ:

(Проф. д-р Даринка Илиева, двм)