

## РЕЦЕНЗИЯ

от проф. д-р Евгени Ананиев, Катедра по физиология на растенията при БФ на

СУ „Св. Кл. Охридски”

на дисертационен труд изготвен от **Камелия Димитрова Миладинова - Георгиева**

**Тема:** „Растеж и акумулационен потенциал на две линии PAWLOVNIA, отглеждани на замърсена с тежки метали почва”

Представеният дисертационен труд има за предмет физиологичния, биохимичен и агрохимичен анализ на хибридите на два дървесни видове на р. Paulownia като възможни фиторемедиатори срещу замърсавания на почви с йоните на тежките метали  $Cd^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ . Темата е актуална и с ясна изразена екологична насоченост. Използването на отделни дървесни видове и техни хибриди за фиторемедиация намира все по-голямо приложение в практиката. Дървесните видове /главно топола, отделни видове от сем. Salicaceae (Върбови) са отдавна известни като ефикасни фиторемедиатори поради мощната коренова система, бързо вегетативно развитие и натрупване на голяма биомаса, способна да акумулира по-високи концентрации на токсичните метали. Дървесният вид Paulownia, който е обект на изследването, притежава всички тези качества, както и технически ценна дървесина. В допълнение трябва да се изтъкне голямата корона на вида с едри влакнести листа, които могат да пречистват и въздуха от прах, серни и азотни окиси в него. **Поради това изборът на обекта на изследване е актуален и напълно съответства на поставената основната цел.**

Дисертацията е написана по установения образец с общ обем 137 стр. като съдържа и Приложение от 10 стр., включващо 20 фотографии и 2 таблици.

Литературният обзор /33 стр./ анализира подробно данните за развитието на процеса фиторемедиация в исторически план като го разглежда в неговата технологична съвкупност, съставен от фитоекстракция, фитодеградация, волатация, фитостабилизация и фитофилтрация. Разгледани са и критериите за селекция на подходящи за фиторемедиация растителни видове. Представена е подробна информация за молекулните механизми за натрупването на йоните на

тежки метали / $Cd^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Mo$ ,  $Zn^{2+}$ /, както и на  $Hg$  и  $As$  във вакуолата на клетката с участието на специфични мембранни преносители от типа на симпортери и антипортери. К. Миладинова разглежда и участието на специфични клетъчни компоненти /фитохелатини, металотионеини/ в процеса на свързване и неутрализиране на токсичния ефект на металните йони. Специално внимание се обръща на окислителния стрес като основна причина за токсичния ефект на металните йони. Разглеждат се подробно ензимните /каталаза, пероксидаза, супероксид дисмутаза, глутатион оксидаза и глутатион редуктаза/ и неензимни компоненти /токоферол, аскорбат, глутатион/ в неутрализацията на активните кислородни форми (ROS). Представена е и подробна информация относно обекта на изследването – дървесния вид *Paulownia* и неговите хибридни форми *P. elongata x fortunei* и *P. tomentosa x fortunei* като кандидати за фиторемедиация. Направен е преглед на географското разпространение на този рядък дървесен вид, неговото приложение като енергийна суровина, за залесяване и фураж. Надлежно се указва основния източник на *Paulownia* в настоящата разработка – фирмата БИОТРИИ ООД – София.

Разделът „Методи и материали” /9 стр./ включва описанието на богат набор от методи, усвоени от дисертантката. Дадена е подробна информация за физиологичната част на опитите, която се основава на получаване на растителен материал от изходни експлантати чрез тяхното размножаване в *in vitro* условия и последващото извеждането на опити с течни хранителни среди и върху почва, последните съдържащи йони на изследваните токсични метали. Определянето на съдържанието на металните йони в почвата и в отделните растителни органи е осъществено с помощта на газохроматографски анализ след киселинна хидролиза.

Като положителен акцент трябва да се изтъкне използването на естествени замърсени с тежки метали почви от района на Кремиковци, както и определянето чрез съвременни физикохимични методи на баланса в съдържанието на изследваните токсични йони в изходната почва, в отделни части на растението преди и след експеримента.

Разделът „Резултати и обсъждани” / 48 стр./ съдържа 26 фигури и 19 таблици. Дисертационният труд завършва с „Заключение” /7стр./, в което дисертантката обобщава най-важните резултати в трите основни направления на работата – биоаккумуляцията на йоните на тежките метали и тяхното увреждащото действие, „чистия” физиологичния ефект на хелатиращите агенти ЕДТА и лимонена киселина върху растението и резултатите от тяхното използване на фона на йонния стрес.

Считам, че на основата на получените данни от комплексния изследователски подход могат да се очертаят и основните научно-приложни приноси:

1. Установена е висока степен на биоаккумуляция на  $Cd^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  и в двата изследвани хибрида на *Paulownia*, като при *P. elongata x fortunei* акумулирането на  $Cd^{2+}$  е с 50% по-високо. Както при повечето растения, йоните на тежките метали се натрупват главно в корените, т.е. тук е налице стабилизиращ механизъм на задържане на токсичните метални йони в корените.
2. В сравнение с лимонената киселина, хелатният агент ЕДТА е по-ефективен в извличането на йоните на тежки метали от почвата в растението. Оптимална от физиологична гледна точка се явява комбинацията от ЕДТА и цитрат, при която са отчетени най-високи стойности на обща листна маса, количество на Chl “a” и Chl “b”, отношение редуциран/окислен глутатион, както и активности на ензимите от тройствения ензимен комплекс.
3. Показано е, че и двата хибридни клона от *Paulownia* са относително резистентни по редица физиологични показатели спрямо приложения стрес, като *P. tomentosa x fortunei* е значително по-устойчив към действието на йоните на тежките метали.

**Всичко това дава основание да се приеме твърдението на дисертантката, че наистина тези дървесни видове могат да бъдат използвани като ефективни акумулатори на йонни на тежки метали от почвата в корените, т.е. като потенциални фиторемедиатори в практиката.**

При внимателния прочит и на окончателния вариант на дисертационния труд, все още възникват някои въпроси. По направлението „Увреждащо действие на металните йони”, в т.ч. процеса фотосинтеза, се откриват някои противоречиви

данни, които се нуждаят от допълнително изясняване, още повече, че тези резултати не са публикувани :

1. При хибрида с *P. elongata* нетната ФС не се променя, а при хибрида с *P. tomentosa* тя даже нараства с увеличаване концентрациите на Cd, Pb и Zn /Фиг. 1/. Обратно, площта на листата силно намалява /между 50 и 70%/ при максималната концентрация на металните йони и при двата хибрида /Табл. 3 и Табл. 4/. Паралелно с това съдържанието на зелените пигменти или не се променя или нараства с около 30% /в случая на хл"а" при максималната концентрация на Zn с хибрида *P. elongata*/Фиг.2/. Снимковият материал на двата хибрида и специално на този с *P. elongata* /Фотографии 5, 6 и 7/ показват, че за 10 дни третиране с токсичните метални йони, паралелно с потискането на растежа /площ на листата/, се наблюдават и предполагаеми признаци на хлороза. Освен това, инхибиторният ефект на металните йони се проявява и чрез близо 4-кратно намаление на устичната проводимост и транспирацията /Фиг. 1/. Тези данни, както и факта, че всички неензимни показатели на стреса /MDA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, редуциран и окислен глутатион, феноли, флавоноиди/, и ензимите от защитния комплекс, нарастват след стреса. Относно съдържанието на зелените пигменти - по принцип при различни видове абиотичен стрес /каквото е и стреса от тежките метали/, рязко намалява съдържанието на Chl «a» и относително нараства Chl «b» – от там намалява и отношението Chl a/Chl b. Обаче, данните показват, че отношението Chl a/Chl b или остава постоянно или даже неочаквано нараства с 30% в случая с най-високата концентрация на Zn /30 мг/гр св. т./ при хибрида с *P. elongata*. При запазени стойности на зелените пигменти (Chl „a” + Chl. „b”) /Фиг. 2/, това означава, че при металния стрес се увеличава само съдържанието на Chl. „a”, което само по себе си е трудно обяснимо. В тази връзка е целесъобразно да се представят абсолютните стойности на двата хлорофила, а в предвид намалената площ на листа и възможна негова по-голяма плътност, съдържанието на пигменти би трябвало да се определя не само на свежо тегло, но и чрез

друг знаменател /напр. на сухо вещество/, както и да се сравни със стойностите на единица площ /см<sup>2</sup>/.

Най-общо, тези интригуващи резултати се различават от други, получени по-рано в литературата (Baszynski et al., 1980; Nikolic et al., 2008) и поради това заслужават за в бъдеще по-сериозно внимание. Заслужава внимание и изясняването на предположението, че проявената резистентност може да е следствие от ювенилната фаза на изследваните растения. Нормално за дървесните видове ювенилния период продължава много дълго време /до 25 г./. Желателно е основните резултати да бъдат потвърдени и на зрели възрастни дървесни растения. Впредвид началната фаза на фотосинтетичните изследвания, желателно е да се приложат и други методи за изследване на състоянието на фотосинтетичния апарат – напр. флуоресценция на хлорофила като мярка за активността на ФСII, а така също и данни за структурата на хлоропластите /светлинни и електроно-микроскопски снимки/, както и много други методи с по-висока разрешителна способност.

Възникналите въпроси и направените забележки не са свързани с основните приноси на дисертацията изказани по-горе. Тези бележки не намаляват нейната стойност, но могат да се приемат като база за следващи по-сериозни научни разработки.

По дисертационния труд има публикувани 4 публикации. Три от тях са в сборници от международни симпозиуми и конференции /2 в сборник конференция „Ecology – interdisciplinary science and practice”, Sofia, 25-26 October, 2012 и 1 - в сборник от симпозиум “Human – environmental interactions and ecology of mountain ecosystems”, Измир, Турция, 2013. Четвъртата публикация е приета за печат в сп. **J. Environ. Biol., (Turkey) с IF 0.614**. В първите две публикации дисертантката е първи автор, а в последните две – втори.

**Заклучение:** Представен е в много голям обем и в дълбочина на изследване достатъчно експериментален материал. Поради пионерното естество на обекта на изследване с по-малкия брой физиологични разработки, получените от дисертантката резултати с *Paulownia* са нови и имат ясно изразен приносен характер. В приложно-екологичен аспект те са получени за първи път. За първи

път е експериментално доказано, че *Paulownia* представена от двата изследвани хибрида може да послужи като дървесен вид, приложим за целите на фиторемедиацията. В тази връзка, една от силните положителни страни на труда представляват опитите с оригинална почва от места, силно замърсени с йони на тежки метали. От физиологична гледна точка, получените резултати са главно с потвърдителен характер, т.е те разширяват с нови методи вече известни закономерности за действието на тежките метали върху физиологичните процеси в растенията. **Всичко това ми дава основание да препоръчам на членовете на уважаваното Научно жури да оцени високо дисертационния труд на свободен докторант Камелия Димитрова Миладинова – Георгиева и да гласува с „ДА” за присъжданеното ѝ на образователната и научна степен „ДОКТОР” във факултетния съвет на БФ на СУ “Св. Кл. Охридски”.**

София, 20. 01. 2014 г.

Изготвил:

/проф. Е. Ананиев/