

РЕЦЕНЗИЯ

Върху дисертационен труд за придобиване на образователна и научна степен „доктор“ по професионално направление 4.3 „Биологически науки“, научна специалност „Биофизика“

Автор на дисертационния труд: Георги Димитров Рашков, ИБФБМИ, БАН

Тема на дисертационния труд: „Възможности за приложение на фотосинтетичните мембрани като биорецептор за регистрация на пестициди“

Рецензент: доц. д-р Виржиния Радославова Долчинкова, Софийски Университет „Св. Климент Охридски“, Биологически факултет, катедра „Биофизика и Радиобиология“

Георги Рашков е завършил висшето си образование през 2000 г. във Физическия факултет на Софийски Университет „Св. Климент Охридски“, където се дипломира като Магистър по „Ядрена техника и енергетика“. Георги Рашков е назначен като специалист физик за периода от 2006-2008 г., а от 2014 – до този момент изпълнява същата длъжност към ИБФБМИ-БАН. През 2014 г. Георги Рашков е зачислен като докторант на самостоятелна подготовка към секция „Фотовъзбудими мембрани“, Институт по Биофизика и биомедицинско инженерство (ИБФБМИ), БАН. От 2008 - 2011 г. Георги Рашков работи като научен сътрудник III ст., а от 2011 – 2014 г. е асистент към ИБФБМИ-БАН.

Докторантът е представил всички необходими документи, в съответствие с Правилника за приложение на ЗРАСРБ в ИБФБМИ-БАН, за да бъде допуснат до защита на дисертационния си труд.

Обща характеристика на дисертационния труд

Дисертационният труд е написан на 114 страници, структуриран е според изискванията за такъв труд и включва разделите: увод 2 стр., литературен обзор 37 стр., цел и задачи 1 стр., материал и методи 6 стр., резултати и обсъждане 38 стр., изводи 2 стр., приноси 1 стр. и цитирана литература 26 стр.. Използваната литература включва 252 източника, от които всички са на латиница, като 13.9 % от тях са публикувани след 2010 година, а в периода от 2000 – 2009 г. са цитирани 32.9 % от източниците. В дисертационния труд са включени 32 фигури и 9 таблици.

Актуалност на разработвания в дисертационния труд проблем

Способността на кислородотделящите организми да осъществяват процеса на фотолиза на водата, отделяйки молекулен кислород, поддържа живота на всички аеробни организми на Земята. Отделянето на кислорода при фотосинтезата се извършва в хлоропластите, като този процес се задвижва чрез последователните действия на реакционните центрове на фотосистема II и фотосистема I чрез „Z” схемата на електронния транспорт. Установени са пигмент-протеиновите комплекси и на двете фотосистеми при цианобактерии, водорасли и растения, чиито тилакоидни мембрани са добре изучени.

Замърсяването на околната среда е изключително актуален проблем и Г. Рашков е посветил изследванията си за опазването на тази „зелена среда“, замърсена с пестициди. Избрани са подходящи моделни системи – тилакоидни мембрани от грах (*Pisum sativum* L.) като първокачествен модел от висши растения и клетки от зеленото водорасло *Chlorella vulgaris*, чиито проби са взети от вулканичния остров Ливингстън, антарктическият архипелаг Южни Шетландски острови.

Направена е иновативна модификация за имобилизиране на тилакоидни мембрани, което ги прави използвани като биорецептор за регистрация на пестициди. Така се откриват нови възможности за приложение на фотосинтетичните мембрани и техните компоненти и функционирането им като важен елемент в Тилакоидна Мембрана-биохибридният Комплекс.

В настоящия дисертационен труд докторантът Георги Рашков се стреми да изясни съвременните приложения на фотосинтетичните мембрани като биорецептор за регистрация на пестициди, като се фокусира върху идентифициране на сходствата и различията на моделните биосистеми със специфични електростатични повърхности, имобилизационната стратегия и екзогенното третиране на биологичната система.

Дисертационният труд, в цялост, доказва една по-успешна модификация за имобилизация на тилакоидните мембрани, вследствие на което се увеличава чувствителността на фотосинтетичния апарат и запазването му при продължително съхранение. Този факт, сам по себе си, представлява голям успех за докторанта. Така получените имобилизирани тилакоидни мембрани могат да ни служат като нов, поддържащ източник за биорегистрация на пестициди. Така дисертационният труд се стреми да изясни един важен проблем с научно и научно-приложно значение.

Анализ на дисертационния труд

Литературният обзор е изчерпателен, като включва добре структурирано описание на тилакоидната мембрана и нейните основни функции. Подробно са разгледани съвременните представи за пигментния състав, пигмент-белтъчните комплекси и фотосистемите. Направен е задълбочен анализ на влиянието на пестицидите върху фотосинтетичните

процеси. Обстойно са разгледани действията на хербицидите върху фотосинтетичния апарат, както и действието на медните йони върху фотосинтезата. Изложението в литературния обзор е илюстрирано с 5 фигури и 2 таблици. Описанието на биосензорите в последната глава на литературния обзор е стегнато и информативно, като показва огромното приложение на биосензорни системи за мониторинг на фотосинтетични хербициди.

Целта и задачите са формулирани ясно и точно. Основната цел на настоящата дисертация е да се оценят възможностите за приложение на фотосинтетичните мембрани на ниво тилакоидни мембрани от растителен вид *Pisum sativum* L. и клетки от *Chlorella vulgaris* като биорецептор за регистрация на пестициди при продължително съхранение и да бъде оценена чувствителността на фотосинтетичния апарат към хербициди и медни йони. За постигането на тази цел са формулирани 6 основни задачи. Обектите на изследване са подходящо избрани, като се различават по електростатичните си характеристики и най-вече по възможността да взаимодействат с медни йони и хербициди.

За осъществяването на поставените задачи са използвани съвременни биофизични и биохимични **методи**, които включват спектрофотометрично определяне на пигментното съдържание, полярографски метод за измерване на кислородното отделяне, измерване на светкавичните кислородни добиви с помощта на скоростен кислороден електрод, импулсно-модулирана хлорофилна флуоресценция. Методите са описани подробно и ясно.

Избрана е подходяща статистическа програма за обработка на получените данни и това се вижда в ниската дисперсия на получените резултати и говори за голяма точност при направените изводи. В раздел „Материали и методи” се описват техники, чието прецизно изпълнение се вижда в представените графики и таблици като следствие от успешното усвояване на методите. Очевидно е, че докторантът Георги Рашков има значим научно-изследователски опит, който е високо оценен от международните научните среди.

Представяне и обсъждане на получените резултати. Раздел „Резултати и дискусия” е структуриран в две части, в които са описани изследванията върху чувствителността на фотосинтетичния апарат към атразин и DCMU и към действието на медни йони. Като моделни системи са използвани тилакоидни мембрани от *Pisum sativum* L. и клетки от *Chlorella vulgaris* и е проследено влиянието на пестицидите върху кислородното отделяне (светкавичните кислородни добиви и кислородното отделяне при непрекъснато осветяване) и хлорофилната флуоресценция на неимобилизирани и имобилизирани моделни системи.

Резултатите могат да се обобщят както следва:

- 1) Анализ на действието на хербицидите атразин и DCMU върху кислородното отделяне и хлорофилната флуоресценция на тилакоидни мембрани от грах (*Pisum sativum* L.) и клетки от *Chlorella vulgaris*. Роля на имобилизацията.

Установена е най-голяма чувствителност към атразин на светкавичните кислородни добиви, а най-малка на първичната фотохимия на ФС2 (F_v/F_m) при неимобилизирани **тилакоидни мембрани**. Процесът на имобилизация намалява кислородното отделяне в сравнение с

първоначалната активност на тилакоидите. Установена е оптималната среда и начин на имобилизация в BGA-GA (говежди серумен албумин/глутаралдехид) матрица, при които са установени параметрите на фотосинтетичното кислородно отделяне на тилакоидни мембрани с помощта на полярографски кислороден електрод.

Въз основа на параметрите на РАМ хлорофилната флуоресценция е показана стабилизация на тилакоидните мембрани при имобилизация. Установено е, че активността на неимобилизираните мембрани след имобилизация се запазва до 25 дни. Така се стига до извода, че имобилизацията може да съхрани функционалната активност на по-голям брой кислород-отделящи центрове за по-дълъг период от време. Следователно, докторантът Г. Рашков успява да направи такава успешна модификация на средата на имобилизация като използва скоростен кислороден полярографски електрод при регистрация на хербициди и доказва възможността за използване на тилакоидите за по-дълъг период от време (около 1 месец) в сравнение с други изследвания, където е използван Кларков електрод и определянето е в присъствие на външен акцептор. Авторът на дисертационния труд доказва, че предлаганата имобилизация на тилакоидни мембрани в BGA-GA матрица се прави с цел разработването на биосензори.

Установена е най-ниската концентрация от 0.1 μM атразин, която може да се регистрира чрез параметъра F_v/F_o на РАМ хлорофилната флуоресценция на тилакоидните мембрани. Продължителното им съхранение от 10 дни води до трикратно увеличаване на светкавичните кислородни добиви в сравнение с чувствителността на мембраните веднага след имобилизацията им. Въведен е параметъра RS50, показващ по-добрата чувствителност към атразин при използване на скоростен полярографски електрод, за разлика от Кларковия електрод за измерване на кислородното отделяне в присъствие на външен екцептор.

Анализът на флуоресцентните параметри на *клетки от Chlorella vulgaris* след третиране с хербициди показва, че третирането с атразин и DCMU влияе върху минималния и максимален флуоресцентен добив в тъмнинно адаптирано състояние. Въз основа на експерименталните резултати се вижда, че ефектът на DCMU върху параметрите на хлорофилната флуоресценция е по-голям от този на атразина, по-силно е повлияно и отношението F_v/F_o .

В изследванията на докторанта Георги Рашков хербицидите са използвани като химични агенти, които играят роля на индикатори за настъпили функционални изменения, дължащи се на модификации в структурата на компонентите на външната повърхност на клетъчната стена на *Chlorella vulgaris*. Хербицидите атразин и DCMU инхибират кислородния добив при непрекъснато осветяване. Инхибирането нараства с увеличаване на концентрацията на хербицида, което означава, че първоначалното бурно кислородно отделяне намалява. Следователно, взаимодействието на хербицидите с фотосинтетичния апарат води до намаляване на общото количество на функционално активни ФС2 центрове, като атразинът и DCMU повлияват бързите и бавни центрове на ФС2. Регистрирана е по-ниска концентрация на DCMU от тази на атразин и е определен RS50 на амплитудата на първоначалното кислородно отделяне при непрекъснато осветяване, чиято стойност е по-ниска в сравнение с данните от други автори, използващи зелени водорасли за регистрация

на хербициди. Необходимо е да се отбележи, че е определена стойността на RS50, която показва концентрацията на хербицида, водеща до 50% намаляване на стойността на светкавичните кислородни добиви преди третирането. Изчислено е, че скоростната константа на възбудените Si състояния на водорасловите клетки намалява след третирането им с хербициди за разлика от стойността на нетретираните клетки. Следователно, докторантът прави извода, че Q_v – свързващите хербициди увеличават времето за превъртане на кислород отделящите центрове. Така регистрираната по-висока чувствителност на клетките от *Chlorella vulgaris* за разлика от тилакоидите от грах (*Pisum sativum* L.) се явява като резултат от намаляване на блокираните кислород отделящи центрове във фотосинтетичния апарат. Установено е, че количеството на блокираните центрове S_b на клетки от *Chlorella vulgaris* е много по-малко от това на изолирани тилакоидни мембрани.

- 2) Анализ на действието на медните йони върху кислородното отделяне и хлорофилната флуоресценция на тилакоидни мембрани от грах (*Pisum sativum* L.) и клетки от *Chlorella vulgaris*.

Третирането на **тилакоидните мембрани** с CuSO_4 предизвиква инхибиране на кислородното отделяне при непрекъснато осветяване и кислородното отделяне при въздействие със светкавици. Показана е по-висока чувствителност на светкавичните кислородни добиви към медните йони в сравнение с кислородното отделяне при непрекъснато осветяване, което представлява доказателство за преобладаващото инхибиране на PSII центровете, т.е. бързите центрове, разположени в граналните участъци. Степента на инхибиране на кислородното отделяне нараства с увеличаване на концентрацията на медни йони, а при концентрации по-високи от 0.2 mM CuSO_4 бележи значителна промяна.

Третирането на тилакоидните мембрани с CuSO_4 води до силно инхибиране на първичната фотохимия на PSII (F_v/F_m) в резултат на намаляване на отношението на фотохимичните към нефотохимични процеси (F_v/F_o). Хлорофилната флуоресценция е по-силно повлияна в сравнение с кислородното отделяне на тилакоидите след третиране с CuSO_4 .

При третиране на **клетки на *Chlorella vulgaris*** с медни йони е установено по-слабо влияние върху фотохимията на PSII в тъмнинно адаптирано състояние (F_v/F_m) за разлика от (F_v/F_o). Зеленото водорасло *Chlorella vulgaris* е адаптирано за живот на вулканичен остров* и се очаква, че протеин-протеиновите взаимодействия в мембраните им да бъдат екранирани от двувалентните йони в по-голяма степен в сравнение с повлияването на повърхностните характеристики на тилакоидните мембрани от висши растения (Barber, 1980; Harrison and Allen, 1992; Kirchhoff et al., 2004). (**Chlorella vulgaris* е подложена на въздействието на редица вулканични минерали на посочения вулканичен остров Ливингстън, откъдето са взети почвените проби; в това число спада и посочения метал на въздействие – мед). Считам, че клетките на *Chlorella vulgaris*, подложени на схемата на експеримента при изследване влиянието на медните йони върху кислородното отделяне и хлорофилната им флуоресценция представлява уникална контрола/проба. Тя включва адаптация на биосистемата в хода на еволюцията на вулканичния остров Ливингстън, и комбинирано

въздействие на медните йони върху клетки на *Chlorella vulgaris* в стандартната суспензионна среда на отглеждане на водораслите, където, предполагам, че концентрацията на $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ е 0.623 mg L^{-1} (Георгиев и сътр., 1978; Василева, И.А., 2019). Авторът прави заключението, че клетките на *Chlorella vulgaris* (от остров Ливингстън) не са подходящ биорецептор за регистрация на тежки метали. Третирането с CuSO_4 на клетки от *Chlorella vulgaris* показва по-голямата чувствителност на светкавичните кислородни добиви в сравнение с хлорофилната флуоресценция.

В раздел „**Заключение**” е предложен експериментален подход за комплексна оценка на ефекта на пестициди върху ФС2, базиращ се на анализ на кислородното отделяне, определен със скоростен полярографски електрод (Жолио тип) и луминесцентните характеристики на тилакоидните мембрани и клетки от *Chlorella vulgaris* в присъствие на два хербицида – атразин и DCMU и медни йони, различаващи се по начина на взаимодействието им с мембраната и повлияващи повърхностните им свойства. Изпъква приложението на водораслите, отглеждани в среда с повишено съдържание на тежки метали, като биорецептори на хербициди.

Докторската работа на Георги Рашков насочва изследователите към бъдещи изследвания, които биха могли да бъдат извършени с помощта на имобилизирани и стабилизиращи клетки на водорасли с цел оптимизирането им като биорецептори за регистрация на хербициди или други химични съединения с по-висока чувствителност. Това неминуемо ще доведе до важното приложение на представените изследвания за регистрация на вредните за живота на човека химични агенти, представляващи замърсители на околната среда.

Резултатите от проведените изследвания са обобщени в 6 извода, които са коректно формулирани и съответстват на получените резултати и на задачите, поставени в дисертационния труд.

Приемам посочените научни приноси, които имат оригинален характер.

Авторефератът е оформен съгласно изискванията и отразява основните раздели и резултати от дисертационния труд, както и използваната литература.

Въпрос извън дисертационния труд:

Правени ли са изследвания на параметрите на кислородното отделяне, определени със скоростен полярографски електрод (Жолио тип) на други водорасли или на цианобактерии, които да подчертаят отново възможността за използването им като биосензори след установяване на тяхната биорецепция към Q_w – свързващи хербициди?

Преценка на публикациите по дисертационния труд

Представената за защита дисертационна работа представлява задълбочено и умело проведено изследване, което издига докторанта Георги Рашков на нивото на перспективен научен изследовател. Извършена е напълно достатъчна по обем експериментална работа и са получени съответните резултати, които вече представляват оригинален принос в науката. Умелото използване на литературата по изследвания проблем предполага отличната

методична подготовка на Г. Рашков и изключително добър научно-изследователски опит, който улеснява докторанта да интерпретира коректно получените експериментални резултати.

Представените научни изследвания на докторанта Георги Рашков покриват в максимална степен осъществяването на основната цел на дисертационния труд – да се оценят новите възможности за приложение на фотосинтетичните мембрани, като биорецептор, за регистрация на хербицидите атразин и DCMU, и на медни йони.

Като член на Научното жури (Заповед № 219/19.04.2019 г. на ИБФБМИ-БАН) гласувам напълно убедена с **висока положителна оценка** и препоръчвам на уважаемите членове на Научното жури да присъдят образователната и научна степен „доктор” на Георги Димитров Рашков в професионално направление 4.3 Биологически науки и научна специалност „Биофизика” (шифър 01.06.08).

06.06.2019 г.

Рецензент:

(доц. д-р Виржиния Долчинкова)