

Вх. № 227/НО-05-06/11.03.2020г.

РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационен труд
на **Лъчезар Петров Якимов**

на тема: **„Оценка на оксидативния стрес и индикаторния потенциал на биологичния отговор на черноморската мида *Mytilus galloprovincialis* Lam. като общ показател за функционалното състояние на крайбрежни черноморски екосистеми“**

с научен ръководител проф. д-р Нешо Хайнрих Чипев и научен консултант доц. д-р Венцислав Карамфилов, ИБЕИ – БАН
за получаване на образователна и научна степен “Доктор“ в област: 4. Природни науки, математика и информатика; по специалност „Екология и опазване на природната среда“ (шифър 02.22.01)

Рецензент: проф. д-р Румяна Мечева

Със заповед № 1/08.01.2020 на директора на Института по биоразнообразие и екосистемни изследвания съм определена за председател на научното жури по процедура за защита на дисертационния труд на Лъчезар Петров Якимов. Представеният комплект материали на хартиен носител е в съответствие с чл. 8 (7) от Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени на ИБЕИ и включва следните документи: опис на документите; дисертация, автореферат, справка за приносите на дисертационния труд, списък с публикации по темата на дисертацията и техни копия, списък на участия в научни форуми с доклади и постери, списък на цитиранията на трудове по темата на дисертацията, научна автобиография в европейски формат, заверено копие от дипломата за придобита магистърска степен, протокол от заседанието на отдела, насочило дисертацията за защита, протокол №8/12.12.2019 г. от заседание на НС на ИБЕИ.

Рецензията на разглеждания дисертационен труд е съобразена с изискванията на ЗАКОНА ЗА РАЗВИТИЕТО НА АКАДЕМИЧНИЯ СЪСТАВ В РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ (ЗРАСРБ) и с ПРАВИЛНИКА за условията и реда за придобиване на научни степени и за заемане на академични длъжности в ИБЕИ при БАН и е извършена в следствие на заповед № 1/08.01.2020 на Директора на ИБЕИ, БАН.

Обща характеристика на дисертационния труд –

Актуалност – Проблематиката на която е посветен дисертационния труд е екоотоксикологията, която се разработва и утвърждава като „класическа“ след 70-те години на 20-ти век и се основава главно на зависимостите „доза-ефект“. С развитието на по-ефективни инструменти за мониторинг на околната среда, се налага необходимостта от разработването на нови характеристики, които да осигурят и обяснят ефектите от натиска на замърсителите замърсяването в околната среда върху биологичните структури, определен като „стрес“. Така се създава ново направление „стрес-екология“. Настоящият труд представлява първи опит за изследване на стресовата екология на черноморската мида *Mytilus galloprovincialis*.

Текстът на дисертационното изследване е в обем от 122 страници, от които 102 страници основен текст и 16 страници цитирана литература. Дисертационният труд е структуриран в 7. глави – Увод (2 страници), Литературен обзор (22 страници), Цел и задачи (1 страница), Материал и методи (16 страници), Резултати (41 страници), Обсъждане (11 страници), Заключение (2 страници), Цитирана литература (16 страници). Дисертационният труд включва 19 фигури и 12 таблици.

Докторантът демонстрира добро познаване на научната литература по изследвания проблем. Литературният списък включва 186 литературни източника (18 на кирилица и 168 на латиница). Литературният обзор е структуриран спрямо направлението на изследването и демонстрира теоретичната подготовка на докторанта по изследвания от него научен проблем и представлява добра основа за формулиране на целите на научното изследване.

Целта и задачите на изследването са ясно и добре формулирани и напълно отговарят на поставената тема:

- Оценка на промените в оксидативния статус в тъкани на черноморската мида *Mytilus galloprovincialis* и неговата пространствена и времева динамика;
- Оценка на потенциала на този вид като биомаркер за състоянието на морската среда и екосистема.

Формулирана е **хипотеза**, че балансът на перооксидантните и антиоксидантните процеси в черноморските миди се променя под действие на екологични и антропогенни фактори, предизвикващи риск от оксидативен стрес и че и оценката на редокс-баланса и нивото на оксидативен стрес в мидите от вида *M. galloprovincialis* представлява чувствителен биомаркер за доброто екологичното състояние на морската околна среда и екосистема.

За потвърждаване или отхвърляне на хипотезата са формулирани пет основни задачи:

- Разработване и прилагане на аналитична процедура за определяне и оценка на подходящи маркери на оксидативен стрес и други биомаркери на *M. galloprovincialis*;
- Оценка на оксидативния статус на екземпляри на черна мида, събрани от различни райони на българското черноморско крайбрежие в различни сезони, включително и от марикултури;
- Определяне на съдържанието на тежки метали в тъкани на *M. galloprovincialis* и водната среда, както и акумулационния им капацитет;
- Анализ и интерпретиране на получените данни за оценка на нивото на оксидативния стрес в *M. galloprovincialis* с прилагането на специфични индекси;
- Оценка на екологичното състояние на морската околна среда и крайбрежните екосистеми в характерни райони на българското черноморско крайбрежие.

Актуалността и многообразността на поставените задачи за разрешаване в дисертационния труд би могла да се обвърже със съвременните предизвикателства в съвременната екотоксикология и подобни направления като генотоксикологията за изясняване на степента на замърсяване на крайбрежната зона на Черно море с използването на черноморската мида като биоиндикатор в естествените ѝ местообитания.

Литературна осведоменост и теоретична подготовка на кандидата;

На основата на извършеният преглед на представените литературни източници в най-общ вид са разгледани съвременните изследвания в областта на биологичния мониторинг, замърсяването на морската среда, както и биологичните отговори на изследваните организми.

Извършеният преглед показва че, докторантът се е запознал в дълбочина с литературата по основния проблем, който следва да бъде разрешен в дисертационното задание и удачно се е насочил към малко проучени въпроси, с оглед постигане на основната цел на настоящия труд.

Обектът на изследване е мониторингът на вида *M. galloprovincialis*, който е подбран изключително удачно предвид ролята, която черната мида заема в морската екосистема, включително и като ресурсен вид и масово разпространена аквакултура.

Методичен подход

В раздела „Материал и методи“ прави впечатление огромният брой изследвани проби от различни референтни и импактни зони. Те се разпределят по 10 пункта на север и по 11 пункта на юг от н. Емине, като практически е обхванато цялото Черноморско крайбрежие. Освен това, част от опробваните райони са разположени в обхвата на защитени зони от Националната мрежа за дългосрочни екосистемни изследвания, което позволява получените резултати да бъдат интегрирани в глобалната научноизследователска I L T E R инфраструктура.

Доброто, професионално описание на методичния подход е представено в 5 аспекта:

- Полеви методи и пробонабиране
- Лабораторна обработка
- Определяне на биохимични маркери за оксидативен стрес
- Генетичен анализ
- Статистическа обработка

Значимост и убедителност на получените резултати, интерпретациите и изводите;

Високо оценявам проведените изследвания отнасящи се до биоаккумуляцията на тежки метали в черноморската мида. Освен, че са изследвани отделни органи и черупки по отношение на биоаккумуляцията на мед, олово, цинк, кадмий и никел е установен и реда в който те са натрупват - Хриле > Храносмилателна жлеза > Крак > Черупка и е показана е и биоаккумуляцията на отделните елементи в низходящ ред $Zn > Cu > Pb > Cd > Ni$ за хрилете, като е направено и подробно сравнение с прилагане на мултипараметричен анализ на главните компоненти върху данните за средните съдържания на елементите мед, олово, цинк, кадмий и никел, измерени в тях, както и между отделните пунктове на пробосъбиране.

В резултат на разработването на дисертационния труд са получени актуални данни за екологичното състояние българското Черноморско крайбрежие по отношение на токсичните елементи, като за всеки от изследваните пунктове е направен анализ на повърхностните води на всички изследвани местообитания.

За установяване на степента биоаккумуляция на изследваните метали в отделните райони е приложен вече установения в практиката коефициент на биоконцентрация, с което се доказва че *M. galloprovincialis* може да бъде класифициран като макроконцентратор по отношение на изследваните метални замърсители, което го прави отличен биоиндикатор.

Добра представа за степента на биоаккумуляция на изследваните метали в отделните райони, дава изчисленият коефициент на биоконцентрация.

Най-висока степен на биоконцентрация на мед, олово и никел е установена в тъканите на мидите около гр. Созопол, а тази за цинк при нос Колокита. Максималната степен на биоаккумуляция на кадмий е установена в черупките на мидите от нос Галата. Най-ниските стойности на биоконцентрация на олово са били установени за тъканите на дивите миди от о-в Св. Петър, а за мед, цинк, кадмий и никел за черупките на мидите около Тюленово, о-в Св. Петър, Созополското пристанище и Черноморец. Установено е, че стойностите на биоконцентрация за черупките са по-ниски и хомогенни в сравнение с тъканите.

Интересни резултати са получени от изследване на промените в оксидативния статус на индикаторния вид в зависимост от условията на средата на местата на пробовзимане. Сравнено е сходството между стрес реакцията на мидата от различните изследвани пунктове и е извършен клъстерен анализ на количеството на биомаркерите за оксидативен стрес. Този анализ ясно се разграничава северния от южния района на изследване, като показва и разликите между дивите и култивирани миди. Трябва непременно да се спомене, че сравненията са направени в два сезона: пролетно-летния (юни-юли) и есенния (септември-октомври).

За пръв път беше използван „специфичен индекс на оксидативен стрес“ за диагностика на интегрираното въздействие върху морската среда в изследваните местообитания, вече публикуван от дисертанта.

Изчислен е индексът на про-оксидантните процеси, на базата на промените в концентрациите на малондиалдехид и нивата на редуциания глутатион, също публикувани от дисертанта.

Положителни стойности на индекса показват повишени нива на оксидативен стрес в мидите, респективно и значимостта на нарушението в местообитанието.

Извършен е генетичен и кометен анализ с цел оценка на геномните увреждания установени вследствие на антропогенните въздействия в морската крайбрежна екосистема. Най- голяма степен на увреждане при мидите е регистрирана при кк Камчия и с. Шкорпиловци от северното и около гр. Созопол за южното крайбрежие.

Резултати са много сходни с тези, получени от интегрираната оценка на оксидативния стрес и потвърждават работната хипотеза.

В дисертационния труд за първи път е изработен, използван и публикуван специфичен индекс на оксидативен стрес за диагностика на наличие на въздействия върху морската среда и оценка на състоянието на крайбрежните екосистеми. Въпреки, че индексът е все още в процес на верификация, са представени първите сравнителни резултати.

Описаната методология и предложените индекси за оценка на нивата на риск и наличие на оксидативен стрес в *M. galloprovincialis* от различни местообитания успешно могат да бъдат приложени като перспективни биомаркери в различни мониторингови програми.

Разработена е и оценъчна скала на екологичното състояние, като „стресогенност“ на средата в крайбрежната черноморска зона по специфичния индекс на оксидативен стрес при черноморската мида. В дисертационият труд се представят резултати от първото комплексно изследване на стресовата екология на черноморската мида от крайбрежните екосистеми на България.

Получените резултати са добра научна основа за решаване на регионални проблеми на биоразнообразието и биоиндикаторната оценка на качеството на природната среда в прибрежната зона на Черно море. Те обогатяват познанията ни за стрес-екологията и генотоксикологията.

Критични бележки към дисертационния труд

Рецензираният дисертационен труд не съдържа съществени недостатъци или пропуски по отношение на неговата структура и оформление. Написан е на добър научен език и стил. Въпреки това имам следните бележки:

- В настоящата работа никъде не е представено стандартното отклонение от средната стойност на даден показател, въпреки, че е използван т-тест на Стюдънт за доказване на статистическа значимост. Стандартното отклонение би трябвало да е използвано при приложения и предложен от дисертанта нов алгоритъм, на използваните Z-стойности (брой стандартни отклонения, с които изследваната стойност се различава от средната стойност) за интерпретация на биомаркерите и изчисляване на индекс на оксидативен стрес.
- Добре би било биометричните измервания на отделните индивиди от съответните пунктове да бъдат представени в таблица поне като средни стойности.
- Имам препоръка към озаглавяването на същите таблици – изписването на „изследваните метални елементи“ звучи непрофесионално и е по-добре да се замени с „изследваните токсични елементи“ и по-нататък „в тъканите на мидите, черупките повърхностния воден слой“ е изпуснато едно „и“, за да стане „в тъканите на мидите, черупките и повърхностния воден слой“.
- Във всички таблици от 5.1.1.- до 5.1.3. озаглавени по горописания начин да бъде означен броят на изследваните индивиди или ако е използвана сборна проба, то това да бъде указано.

Увеличаването на броя на показателите и многото станции за пробонабиране затруднява представянето, обобщаването и интерпретирането на данните. Отделено е повече внимание на представяне на резултатите от типа „тука повече, тука по-малко“, отколкото на свързването и интерпретирането на отделните показатели в цялостно обобщение.

Неточности –

Тук съм отбелязала някои несъответствия между цитираната литература в текста и в Списъка на цитираната литература. Например: авторите Ray et al. 2012; Metcalfe &

Alonso-Alvarez, 2010; Manduzio et al., 2005, Regoli et al., 2003; Driessens et al., 2009 и други липсват в списъка на цитираната литература.

Costantini, 2008; и Constantini et al. 2010 – и двамата автори липсват в списъка, освен това не е ясно дали става дума за един и същ автор или е техническа грешка?

Дори собствената публикация на автора „Yakimov et al., 2018“ се разминава годината на публикуване в текста, като в Списъка на цитираната литература е изписано 2019

При цитиране не са изписани правилно:

Buttemer, Adele & Costantini, 2010 – при трима и повече автори е възприето да са изписва името само на първия автор, като се добави et al., или и др. и годината на публикуване.

В текста е цитиран Gorinstein et al. 2003, докато в Списъка на цитираната литература е изписано

-Gorinstein S, Arancibia-avila P, Moncheva S, Toledo F, Trakhtenberg S, Gorinstein A, **et al. 2006a.**

-Gorinstein S, Moncheva S, Toledo F, Arancibia-avila P, Trakhtenberg S, Gorinstein A, **et al. 2006b**

Въпреки, че авторският колектив сигурно е голям, библиографията трябва да се изпише пълно, както и не става ясно в конкретния абзац се цитира **2006a** или **2006b** Има и други подобни примери.

Трябва да се уеднакви и начина на изписване при двама автори в текста: на места е изписано с „&“ (Buttemer, Adele & Costantini 2010), на други с „and“ (Speit and Hartmann, 2005), на трети авторите са **отделени само със запетая**, както в случая Phillips, Rainbow, 1988; Vlachogianni, Valvanidis, 2007 и др.

Авторът трябва да обърне сериозно внимание на тези редакторски забележки, защото при следващо публикуване това се явява съществен недостатък, още повече, че всяко списание има свои изисквания към тази част от работата.

Критичните бележки не намаляват високата оценка на дисертационния труд и целят единствено да послужат като препоръка при бъдещи научни изследвания.

Характер на научните приноси

Дисертационният труд определено има приносен характер, защото описва перспективна методология и предлага биомаркерни индекси за оценка на нивата на риск и наличие на оксидативен стрес при черната мида от различни местообитания и това може се приложи пряко в различни мониторингови програми. Във връзка с това е разработена оценъчна скала на екологичното състояние, като „стресогенност“ на средата в крайбрежната черноморска зона по специфичния индекс на оксидативен стрес. и е направена оценка на състоянието на крайбрежните местообитания. За пръв път е проведено системно изследване и са получени подробни и значими резултати за стрес екологията на черната мида в крайбрежните екосистеми на българската акватория на Черно море, както и нивото на акумулация на токсични елементи в различни органи на мидата. Това е първото у нас еко-генотоксично изследване показващо зависимостта между степента на ДНК уврежданията и условията на средата.

Оценка на качеството на научните трудове, отразяващи изследванията по дисертацията;

По темата на дисертационния труд докторантът представя общо 3 научни труда, като наукометричната оценка на представения списък които една с IF (2018) = 0.634, една със SJR 0,1 – приета за печат и една публикувана в пълен размер в Сборник от конференции с международно участие. На всички тях Лъчезар Якимов е на първо място. Дисертантът активно е представял научните резултати по дисертацията, чрез презентирането им на научни форуми в България – 11 броя. и 1 форум в чужбина. Трябва да отбележа, че изследванията представени в дисертацията основно са лично дело на докторанта. Той самостоятелно е осъществил теренните проучвания, пробонабирането, предварителната обработка на огромното количество проби, статистическите анализи, интерпретацията на резултатите.

Автореферат

Авторефератът отразява пълно съдържанието на дисертацията и е изготвен съответстващо с изискванията на ИБЕИ, БАН съгласно Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени.

Въпроси:

- Тъй като тежките метали, в частност олово и кадмий се натрупват в организма по време на целия жизнения цикъл на черната мида, без да се детоксицират, то поради тази причина е важно да се знае за какъв период от време е протекла акумулацията. В Материал и методи е описано, че обект на изследване са били възрастни индивиди с дължина на черупката от 30 до 65 мм. Въпросът ми е, дали по-нататък те са били анализирани като една група или са били сортирани в отделни размерни групи, още повече, че измерванията са били направени с точност до 0.02 мм? Това е добре да се отбележи, заради интерпретацията на резултатите от сравненията, още повече, че култивираните миди нарастват от 3 до 4 пъти по-бързо и тежат близо 2,5 пъти повече от мидите в естествените им находища.
- Температурата на морската вода има съществено значение за интензивността на метаболитните процеси на мидата. При 17°C температура на водата, възрастна черна мида филтрира до 3 л/час, като задържа фитопланктон, детрит и едноклетъчни организми. При 0°C черната мида изпада в летаргия, не расте и не се храни. Най-интензивните периоди на растеж и хранене настъпват през пролетта и есента, когато и натрупването на токсиканти е най-съществено. Тъй като в работата се цели да се оцени наличието на сезонни изменения в отделните изследвани показатели, а в Материал и методи е описано, че са правени измервания на температурата на водата, защо тези измервания не са представени?

Заклучение

Настоящият дисертационен труд е изпълнен на добро научно ниво, с постижения в областта на екоотоксикологичния и генотоксикологичен зоомониторинг. Дисертантът е овладял съвременни методи и подходи на изследване. Той притежава теоретични

знания и професионални умения, постигнал е резултати с оригинален научен принос, разширил е периметъра на своите изследвания; намира логично обяснение на установените факти. Поставя екотоксикологията в съвременен аспект.

Всичко това отговаря напълно на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и съответния Правилник на ИБЕИ.

Поради тези основания препоръчвам на членовете на почитаемото Научно жури да присъди образователната и научна степен „доктор“ на Лъчезар Якимов по научната специалност „Екология и опазване на природната среда“.

Рецензент:

\проф. д-р Румяна Мечева\