

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ „ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ“

ВАРНА

ФАКУЛТЕТ ПО ФАРМАЦИЯ

КАТЕДРА ХИМИЯ

ЗЛАТИНА ВЕСЕЛИНОВА ПЕТЕВА

**БЕЗОПАСНОСТ И РИСК ЗА ЗДРАВЕТО НА ЧОВЕКА
ОТ ИЗПОЛЗВАНЕТО НА ЧЕРНОМОРСКА МИДА
КАТО ХРАНИТЕЛЕН РЕСУРС**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация за присъждане на образователна и научна степен

„ДОКТОР“

по научна специалност „Биоорганична химия, химия на природните и
физиологично активни вещества“

Научен ръководител:

проф. Мона Станчева, дхн

ВАРНА, 2020

Дисертационният труд се състои от 188 страници, включващи 63 фигури, 18 таблици, Приложение. Цитирани са 257 литературни източника, 252 от които на латиница и 5 на кирилица.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 30.01.2020 г.
от ч. в.....аудитория на Медицински Университет
“Проф. Д-р Параскев Стоянов” - Варна.

СЪДЪРЖАНИЕ

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ.....	1
ВЪВЕДЕНИЕ.....	2
I. Обща характеристика на морските биотоксини	5
II. Експериментална част	10
3. Екстракция на морски биотоксини	13
3.1. Екстракция на морски биотоксини от проби миди.....	13
3.2. Екстракция на морски биотоксини от проби планктон	14
III. Резултати и дискусия.....	21
1. Съдържание на морски биотоксини в планктон	21
2. Съдържание на морски биотоксини в миди.....	27
2.1. Съдържание на морски биотоксини в проби култивирани миди.....	29
2.2. Съдържание на морски биотоксини в проби диви миди	32
2.3. Динамика на нивата на морски биотоксини в проби планктон по сезони и райони	35
2.4. Динамика на нивата на морски биотоксини в проби миди по сезони.....	36
2.5. Разпределение на морските биотоксини в миди по район на улов	39
2.6. Съдържанието на морски биотоксини по видове миди.....	42
2.7. Съдържанието на повече от един токсин в проби миди.....	43
2.8. Обобщение за съдържанието на морски биотоксини в планктон и миди	44
IV. Оценка на безопасността на мидите като храна.....	45
1. Оценка на безопасността на мидите като храна чрез сравняване с максимално допустимите норми	47
2. Оценка на експозицията при консумация на миди, съдържащи морски биотоксини	47
2.1. Остра експозиция	49
2.2. Хронична експозиция	52
2.3. Коефициентът на опасност	54
2.4. Обобщение за оценка на безопасността на мидите като храна	54
V. Изводи.....	56
VI. Приноси	60
Списък на публикациите.....	61
Списък на участия в научни форуми.....	61

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

PSP - paralytic shellfish poisoning toxins, паралитични токсини
ASP – amnesic shellfish poisoning toxins, амнезиеви токсини
DSP- diarrhetic shellfish poisoning toxins, диарийни токсини
AZA – azaspiracids, азаспирациди
PTX- pectenotoxins, пектенотоксини
YTX – yessotoxins, йесотоксини
STX - сакситоксин
neoSTX – неосакситоксин
GTX – гониаутоксин
dc – декарбамоилов
DA – ДК, домоена киселина
OA- окадаена киселина
DTX – динофизистоксини
AZP – азаспирацидно отравяне
АОАС - Международната асоциация на аналитичните общества
LC-fluorescence detection (FLD) - течна хроматография с флуоресцентна детекция
LC- ultraviolet detection (UV) - течна хроматография с ултравиолетова детекция
GCB – активен въглен
ESI - електроспрей йонизация
LC-MS - течна хроматография с мас детекция
SPE - твърдофазна екстракция
SPE-SAX - твърдофазна екстракция със силна анионна обмяна
UPLC-MS - свръх високоефективна течна хроматография-мас спектрометрия
ЕС – Европейски съюз
SM – мидена тъкан
hp- хепатопанкреас, храносмилателна жлеза
bw- телесно тегло
ЕАБХ (EFSA) – Европейска агенция по безопасност на храните
TEF - коефициент на токсична еквивалентност
FAO/IOC/WHO – Организация за храни и земеделие на Обединените нации/ Международна океанографска комисия/ Световна здравна организация
CONTAM - Панел за замърсители в хранителната верига
ARfD - Acute Reference Dose, остра референтна доза
TDI - Tolerable Daily Intake, допустим дневен прием
HQ - коефициент на опасност
ИАРА- Изпълнителна агенция по рибарство и аквакултури
НСИ- Национален статистически институт

ВЪВЕДЕНИЕ

Океаните и моретата са ценен източник на хранителни ресурси – риба, черупчести мекотели и др. През последните години се налага мнението, че здравословният хранителен режим трябва да е богат на морски храни поради високото им съдържание на протеини, ненаситени мастни киселини, мастно разтворими витамини, есенциални елементи и ниско съдържание на холестерол. Изследванията показват, че Черноморската мида *Mytilus galloprovincialis* съдържа високи концентрации на витамини А, Е и D3, както и п3 и п6 (омега 3 и 6) ненаситени мастни киселини. Високата хранителна стойност на двучерупчестите мекотели, нарастващите нужди от храна в световен мащаб води до повишен интерес към отглеждането на мидите като аквакултури и до увеличен улов на диви видове, включително и в България. Освен това мидите са предпочитани от консуматорите и поради вкусовите си качества и по-ниска цена в сравнение с другите двучерупчести.

През последните години се обръща внимание не само на ползите, но се прави анализ и на рисковете за здравето на човека при консумацията на морска храна.

През последните десет години в България са извършени множество изследвания на съдържанието на замърсителите в морските храни във връзка с оценка на безопасността им като храна. Изследвания върху антропогенното замърсяване показват безопасни концентрации на хлороорганични замърсители напр. на полихлорирани бифенили, ДДТ и метаболити, хексахлоробензен и хексахлоробутадиен в миди от Черно море.

Наличието на тежки метали в храната над определена концентрация също има отрицателен ефект върху здравето. Изследвания върху концентрациите на токсични метали в миди от Черно море показват, че всички изследвани елементи са под пределно допустимите нива.

Отрицателен ефект върху развитието на аквакултурите и дивите видове може да има и биогенен произход. Мидите филтрират морската вода като натрупват в тялото си планктона. Обикновено цъфтежът на планктона благоприятства развитието на филтриращите го видове, но определени фитопланктонни видове (диатоми и динофлагелати) продуцират морски биотоксини.

Морските биотоксини се акумулират в мидите и по хранителната верига могат да достигнат до човека. В мидите токсините се натрупват в хепатопанкреаса (храносмилателна жлеза), без да предизвикат каквато и да е външна промяна в мидата. Те са относително стабилни, не се разпадат, а дори значително повишават концентрацията си при кулинарна обработка. Откриването на токсини в морската храна е трудно без специализирана апаратура и нито производителите на миди, нито потребителите могат да определят дали мидите са безопасни за консумация или не.

Установено е, че морските биотоксини могат да причинят отравяне при консумация на контаминирани миди. В зависимост от вида на токсините, причинили отравянето, симптомите могат да бъдат гадене, повръщане, световъртеж, дезориентация, изтръпване на крайниците и пръстите, загуба на паметта, а в редки случаи дори и смърт.

Поради здравните препоръки относно консумацията на морски храни, е важно да се определи приносът на морските биотоксини чрез хранителен прием на двучерупчести мекотели като мидите. По този начин може да се направи оценка на безопасността и риска от консумация на миди.

Целта на дисертационната работа е определяне съдържанието на морски биотоксини в планктон и миди от Черно море и оценка на безопасността на мидите като храна.

Задачите за постигане на тази цел са:

1. Пробонабиране на култивирани, диви миди и планктон от Черно море
2. Прилагане на аналитична процедура, разработена за морски биотоксини в миди и планктон
3. Определяне концентрациите на морски биотоксини в миди и планктон от Черно море
4. Използване на резултатите за оценка на безопасността на мидите като храна. За целта да бъдат изчислени различни показатели – остра и хронична експозиция, както и коефициент на опасност.

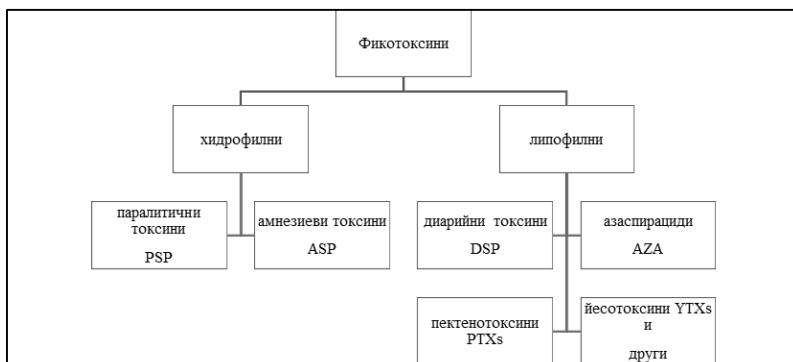
I. Обща характеристика на морските биотоксини

Морските биотоксини се продуцират от определени фитопланктонни видове и по хранителната верига преминават в двучерупчестите мекотели, например миди. При консумацията на миди, съдържащи морски биотоксини над определени нива, при човека могат да настъпят различни здравни проблеми.

Класификация на фикотоксините може да се направи въз основа на разтворимостта им във вода, както и въз основа на симптоматиката, която предизвиква отравянето с тях.

Според химичната си природа фикотоксините се класифицират като липофилни и хидрофилни. Според симптомите, които предизвикват при отравяне, те се разделят на паралитични, амнезиеви и диарийни токсини. Двете класификации са обединени и представени на Фигура 1.

В отделна група се обособяват т.нар. новооткрити токсини (emerging toxins, появяващите се/нови токсини). Тук спадат наскоро идентифицирани токсини или нови аналози на познати токсини, както и известни токсини, които се определени в области, където те не са били регистрирани по-рано и т.н. (Diogene, *et al.*, 2013) (Фигура 1).



Паралитичните и амнезиевите токсини са хидрофилни по химична природа. В групата на липофилните токсини се включват както диарийните токсини, така и други токсини, които са в процес на

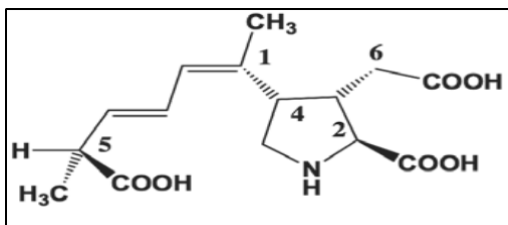
изследване на ефекта им върху човешкия организъм (азаспирациди, йесотоксини, пектенотоксини и др.). Новооткрити токсини като гимнодимини, спирилиди и др. също са липофилни по химична структура.

Паралитичните токсини (PSP) се продуцират от множество микроводорасли, основно токсични морски динофлагелати от видовете *Alexandrium* (Lewis, *et al.*, 2018a; Vershinin, *et al.*, 2006), *Gymnodinium* (Duran-Riveroll, *et al.*, 2017; Costa, *et al.*, 2015) и др.

Паралитичните токсини са група тетрахидропуринови производни, разпределени в няколко подгрупи. Подгрупите имат различна токсичност като карбамоиловите производни (сакситоксин – STX, гониаутоксини (GTX1/4, GTX2/3) са най-токсични, следват декарбамоиловите (dcSTX, dcneoSTX), които са със средна токсичност и N – сулфокарбамоиловите аналози (B1/2, C1/4), които са с най-ниска токсичност (Vale, *et al.*, 2008a,b).

Симптомите на отравяне с паралитични токсини зависят от нивото на експозиция и могат да бъдат животозастрашаващи. Докладвани са следните симптоми: парализа, гадене, мускулна слабост и парестезия на устата и крайниците с фатален изход, главно поради дихателна парализа (García, *et al.*, 2004; Andrinolo *et al.*, 1999; Stafford & Hines, 1995).

Към групата на **амнезиевите токсини** спадат домоена киселина (ДК, DA) (фигура 2) и изомерите ѝ – изодомоена киселина А, В, С, D и др. Амнезиевите токсини (ASP) се продуцират от диатомеи *Pseudo-nitzschia* spp (Bates, *et al.*, 1989).



Фигура 2. Химична структура на домоена киселина (Botana, *et al.*, 2013)

Домоената киселина е кристална водоразтворима аминокиселина и спада към групата на каиновата киселина. Острото отравяне с домоена киселина причинява заболяване известно като амнезийно отравяне. То се характеризира с гастроинтестинално нарушение, объркване, дезориентация, гърчове, загуба на паметта и смърт в някои случаи (EFSA, 2009a; Perl, *et al.*, 1990).

Липофилните токсини могат да се класифицират на две основни групи:

1. Киселинни липофилни токсини – тук се включват DSP токсините - оокадена киселина (OA) и производните ѝ – динофизистоксини (DTXs) (Murata, *et al.*, 1982) (Kumagi, *et al.*, 1986) (Hu, *et al.*, 1992), азаспирациди (AZAs) (Ofuji, *et al.*, 1999) (James, *et al.*, 2002) и сулфатни съединения, наречени йесотоксини (YTXs) и производните им и други ;

2. Неутрални липофилни токсини – полиетерни лактони от групата на пектенотоксините (PTXs) (Yasumoto, *et al.*, 1985) и други.

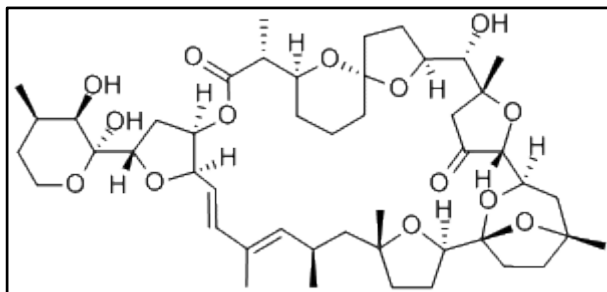
Диарийните токсини (DSP) предизвикват отравяне при консумация на черупчести, съдържащи **оокадена киселина (OA)** и производните ѝ – **динофизистоксини (DTX1, DTX2)**, техните диолови естери (DTX4 and DTX5) и ацилови производни (DTX3) (оокадати) (Domínguez, *et al.*, 2010; Yasumoto, *et al.*, 1985). OA и DTX2 се различават единствено в позицията на една метилова група в молекулата си. DTX1 има още една допълнителна метилова група.

Фитопланктонът, отговорен за синтеза на DSP включва род *Prorocentrum* и множество видове от род *Dinophysis* (Reguera, *et al.*, 2014; Morton, *et al.*, 2009; Yasumoto, *et al.*, 1980).

Въпреки че няма данни за смъртни случаи при хора, причинени от остра интоксикация с DSP, разпространението на DSP се е превърнало в сериозна заплаха за производството на двучерупчестите организми и общественото здраве поради високата заболяемост и разпространението в световен мащаб (Wang, *et al.*, 2012; Valdíglesias, *et al.*, 2011b; Domínguez, *et al.*, 2010). Потенциалът на OA да причинява образуването на тумор е докладван в няколко модела на двуетапна

карциногенеза (Rossini, *et al.*, 2001; Milczarek, *et al.*, 1999; Suganuma, *et al.*, 1988).

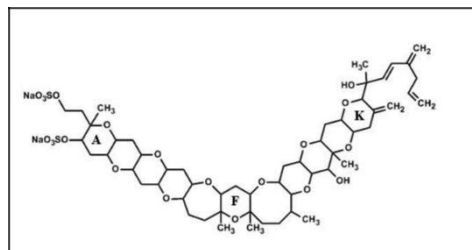
Пектенотоксините (PTX) са циклични полиетерни лактони (фигура 3). Производат се от видовете от род *Dinophysis* (Draisci, *et al.*, 1996). Някои видове от род *Dinophysis* синтезират едновременно ОА и РТХs, като токсичният им потенциал се определя от съотношението между тях (Fernández-Puente, *et al.*, 2004).



Фигура 3. Структура на пектенотоксин-2

Оралното приложение на РТХ2 води до хистопатологични промени в черния дроб и стомаха на експериментални животни (Miles, *et al.*, 2004a). Все още не са регистрирани интоксикации при хора, дължащи се на отравяне с РТХ2.

Йесотоксините са липофилни, сярасъдържащи полиетерни токсини (Фигура 4). До сега са идентифицирани около 90 аналози на УТХ (Miles, *et al.*, 2005a,b). Най-често срещаните токсини в черупчестите са УТХ и метаболитите 45-хидрокси-УТХ, карбокси-УТХ и др. (Aasen, *et al.*, 2005).



Фигура 4. Структура на йесотоксин (Botana, *et al.*, 2013)

Йесотоксинът е изолиран преди повече от 30 години от миди *Patinopecten yessoensis*, откъдето идва и названието му (Murata, *et al.*, 1987). Откриването на първичните продуценти на йесотоксините е отнело повече от 10 години. Оказва се, че те са екзотоксини, т.е. след като бъдат синтезирани, те много бързо биват отделяни в околната среда и затова е било трудно да се детектира токсичността на предполагаемите продуценти (Hess & Aasen, 2007).

Съвременните изследвания показват, че динофлагелатите *Proceratium reticulatum*, *Lingulodinium polyedrum* (Loader, *et al.*, 2007; Bowden, 2006) и *Gonyaulax spinifera* (Rhodes, *et al.*, 2006) са основните продуценти на йесотоксини.

Йесотоксин (YTX), хомойесотоксин и 45-ОН-хомойесотоксин са летални след интраперитонеално инжектиране на мишки. Таргетният орган изглежда са сърдечно-мускулните клетки, където тези токсини индуцират ултраструктурни промени. От друга страна, производно на YTX засяга черния дроб и панкреаса, където предизвиква мастна дегенерация. Няма данни за краткотрайна и хронична токсичност.

Не са регистрирани данни за отравяне на хора, предизвикано от йесотоксини, въпреки че съдържащи YTXs двучерупчести са докладвани в световен мащаб, понякога при високи концентрации (Munday, *et al.*, 2008; Paz, *et al.*, 2008b).

Морските биотоксини са широко разпространени в Европейските морски басейни и често се откриват и потвърждават нови производни. Те са определени не само в организмите, които ги продуцират- различни фитопланктонни видове, но и в други организми по хранителната верига- миди, стриди и др. В България няма изследвания за наличие на морските биотоксини в планктона, въпреки данните за появяващите се нови потенциално токсични видове. Извършени са само няколко изследвания за определяне съдържанието на парализиращи и амнезиеви токсини в малък брой проби култивирани миди. Въпреки доказани неблагоприятен ефект върху човешкото здраве и увеличаващата се консумация, както на контролирано отглеждани, така и на диви видове миди, до сега в България не са направени достатъчно изследвания и оценка на безопасността на мидите като храна.

Тези факти потвърждават необходимостта от провеждането на задълбочено систематично изследване, с което да се определят нивата на морските биотоксини както в диви и култивирани миди, така и в продуцентите им- фитопланктона. Затова целта на дисертационната работа е да се определи съдържанието на морски биотоксини в проби миди и планктон и резултатите да се използват за оценка на риска и безопасността на мидите като храна. Данните за съдържанието на морските биотоксини са важни, тъй като могат да се използват, за да се направи оценка на безопасността на мидите като храна чрез изчисляване на определени параметри като остра, хронична експозиция и коефициент на опасност.

II. Експериментална част

Морски биотоксини (алготоксини, фикотоксини), продуцирани от определени фитопланктонни видове, се акумулират в двучерупчести мекотели като мидите. Попадайки в човешкия организъм фикотоксините могат да причинят сериозни здравословни проблеми.

Обект на изследване в настоящата работа са планктон, диви и култивирани миди от Българското Черноморие.

Черноморските миди са обект на любителски, стопански улов и отглеждане в България. Черноморската мида е двучерупчесто мекотело. Обикновено живее в приливни зони, прикрепена към субстрата. Черната морска мида е естествен биофилтър – при 17°C температура на морската вода, възрастната мида филтрира до 3 литра на час, като задържа фитопланктон, детрит и едноклетъчни организми. Задържайки планктонните видове в организма си мидите могат да акумулират (обикновено в хепатопанкреаса) токсините, продуцирани от микроводораслите. По тази причина анализът на мидите дава по-обобщена информация за токсините, които са били продуцирани в района на улов.

Пробонабирани са диви и култивирани миди, за да може да се изследва по-голям район, а и защото и двата вида са предпочитани за консумация.

Обект на изследване е и планктона. Около 2% (60-80 вида) от познатите 3400-4000 фитопланктонни видове са токсични. Още повече,

списъкът на токсиногенните видове в световен мащаб нараства бързо (Van Dolah, 2000). Появата и развитието на тези видове може да бъде спорадично, периодично и обикновено трудно може да се предскаже. Спонтанното повишаване на числеността на популацията на токсичния фитопланктон е изключително събитие, наречено „цъфтеж“ (harmful algal bloom- HAB) (Maso & Garcés, 2006). Известно е, че дори и ниските концентрации на микроводорасли могат да доведат до поява на токсичност във филтриращите ги организми (Reguera, et al., 1993). Анализът на токсиновия профил на планктона е ситуационен, тъй като дава информация за наличните токсини в момента на пробонабиране, както и за очаквана поява на определените токсини във филтриращите организми-мидите.

В настоящата работа е използвана аналитична процедура, разработена в катедра Химия на Медицински университет – Варна като тя е модифицирана за определяне на морски биотоксини в планктон и миди.

Аналитичната процедура включва следните етапи:

1. Пробонабиране от райони на улов, транспортиране и съхранение на пробите
2. Изготвяне на средна лабораторна проба и подготовка на аналитична проба
3. Екстракция на морски токсини
4. Качествено и количествено определяне на морски биотоксини чрез течнохроматографски метод с мас детекция
5. Статистическа обработка на резултатите

1. Пробонабиране от райони на улов, транспортиране и съхранение на пробите

Пробонабирането на планктон и миди е извършено в периода 2016-2018 г. през сезони на годината, в които се извършва улов на миди с цел търговия и консумация. За осъществяване на задачите на настоящото проучване са взети

- проби **култивирани миди** – пробите култивирани миди (~1.5 kg) се набират директно от въжетата, на които се отглеждат,

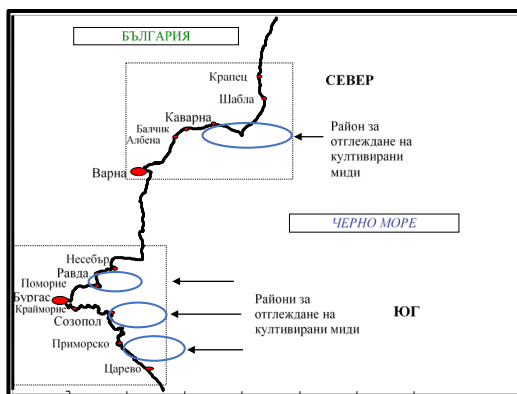
прибират се в плик и се съхраняват в хладилна кутия. Част от пробите са от рибни пазари, като за идентичността на пробите, търговците са показали сертификата за произход.

- Проби **миди от диви местонахождения** (~ 1.5 kg) - чрез гагам или нож дивите мидите се изстъргват от субстрата, на който са израснали, прибират се в плик и се съхраняват в хладилна кутия.

- Проби **планктон** от районите на мидените ферми и дивите местонахождения на мидите - планктонът се улавя с конична планктонна мрежа (КС Denmark AC, диаметър 40 cm, дължина 1m, големина на порите 20 μ m) като се концентрира в съд, прикрепен за мрежата. Мрежата се спуска вертикално, еднократно на дълбочина от 1 до 5 m, в зависимост от условията на мястото на пробонабиране. Концентратът се събира в 50 ml центрофужна спруветка и се съхранява в хладилна кутия.

Всички проби се транспортират до 3 часа след пробовземаването.

Пробонабирането е извършено в два района на Черноморско крайбрежие на България. Това са район Север (Каварна, Балчик/Албена, Варна) и район Юг (Поморие, Равда, Бургас, Созопол, Царево/Приморско) (Фигура 5). За периода 2016 -2018 г са събрани общо 47 проби диви, 78 проби култивирани миди и 66 проби планктон от двата района на пробонабиране.

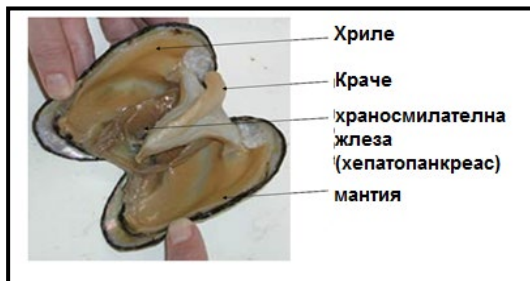


Фигура 5. Карта на районите на пробонабиране

2. Изготвяне на средна лабораторна проба и подготовка на аналитична проба

Средната лабораторна проба **миди** (1 кг миди с черупки). Тя се измива с дестилирана вода за отстраняване на остатъци от пясък и водорасли, след което се отстраняват черупките.

Мидената тъкан на пробите от пролет 2016 е обработена по следния начин: мидената тъкан се хомогенизира, събира се в стерилен контейнер и се съхранява във фризер при -18°C . Мидената тъкан на пробите от другите изследвани сезони е обработена по следния начин: чрез скалпел от мидената тъкан се отделя хепатопанкреаса (храносмилателна жлеза) (Фигура 6), органът в който се акумулират морските биотоксини. Храносмилателните жлези се хомогенизират. За хомогенизиране се използва диспергиращо устройство POLYMIX®PT 1200E, KINEMATICA AG, Germany. Хомогенатите (аналитични проби) се събират в стерилни контейнери и се съхраняват във фризер при -18°C .



Фигура 6. Анатомично устройство на Черна морска мида

Пробата **планктон** се изготвя от концентрата, получен от планктонната мрежа, събран в центрофужна епруветка от 50 ml. Концентратът се центрофугира. Утайката (аналитична проба) се замразява до следващата обработка.

3. Екстракция на морски биотоксини

3.1. Екстракция на морски биотоксини от проби миди

От подготвените аналитични проби се претеглят 4 g на аналитична везна в центрофужна епруветка. Към пробата се добавя 5 ml

90% метанол, диспергира се с апарат Политрон (POLYTRON®PT 1200E, KINEMATIKA AG, Germany) за 10 мин. Получената суспензия се центрофугира при 4000 x g за 15 мин. Горният слой се отделя и се декантира в 50 ml центрофужна епруветка. Утайката се диспергира още 2 пъти с 2,5 ml 80% метанол. След всяко диспергиране, суспензиите се центрофугират. Горните органични слоеве се обединяват.

Полученият екстракт се подлага на процедура за отделяне на липидите. Тя е следната: към екстракта се добавя 7,5 ml хексан и се диспергира 2 мин. Получената емулсия се центрофугира при 4000 x g. Горната хексанова фаза се отпипетира и се изхвърля. Към долната фаза се добавя отново 7,5 ml хексан и се диспергира 2 мин. Получената емулсия се центрофугира при 4000 x g. Тази процедура се повтаря още един път.

От пречистения екстракт се отпипетира 1 ml, който се филтрува през сириндж-филтър (Minisart, Sartorius, Germany, големина на порите 0.45 µm, Ø 25 mm). Филтратът се съхранява в хроматографско шишенце (виалка) от 2 ml във фризер при -18°C.

3.2. Екстракция на морски биотоксини от проби планктон

Към подготвената аналитична проба се добавя 1 ml 100% метанол. Получената суспензия се подлага на обработка в ултразвукова вана (Branson 3800, Ultrasonic SA) при 40 Hz за 15 min. След това суспензията се центрофугира при 4000 x g за 10 min. 1 ml от горния слой се филтрува през сириндж-филтър (Minisart, Sartorius, Germany, големина на порите 0.45 µm, Ø 25 mm). Филтратът се съхранява в хроматографско шишенце (виалка) от 2 ml във фризер при -18°C.

Всички съдове, необходими за провеждане на анализа са получени в стерилни опаковки. Всички реактиви са с HPLC чистота, гарантирана от производителя (Merck Millipore, Germany).

4. Качествено и количествено определяне на морски биотоксини чрез течнохроматографски метод с мас детекция

За определяне на морски биотоксини в мидена тъкан и планктон е приложен метод, разработен от (Krock, et al., 2008). Използвана е хроматографска система - течен хроматограф Agilent 1100 LC

(Waldbronn, Germany), който включва резервоар за разтворители, дегазер (G1379A), бинарна помпа (G1311A), аутосамплер (G1329A/G1330B) и пещ за контрол на температурата на колоната (G1316A). Маспектрални експерименти са извършени на маспектрометър (линеен йон трап) AB-SCIEX-4000 Q Trap (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) с троен квадрупол, свързан с TurboSpray® интерфейс. Хроматографското разделяне се извършва на обратнофазова колона C8 (50 x 2mm), свързана с предколонка (3- μ m Hypersil BDS 120 Å (Phenomenex, Aschaffenburg, Germany), работещи при 20°C. Скоростта на потока е 0.2 mL/min, обем на инжектиране 5 μ L. Градиентното елуиране е извършено с два елуента, елуент А – вода, елуент В – ацетонитрил/вода (95:5 v/v), като и двата елуента съдържат 2.0 mmol/L амониев формиат и 50 mmol/L мравчена киселина. Градиентното елуиране се извършва по следната схема: 12 min кондициониране на колоната с 5% В, 10 min линеен градиент до 100% В и изократно елуиране до 15 min със 100% В. След това системата се връща до първоначалните условия до 30 min (общо времетраене на хроматографския ход: 30 min).

Хроматографското определяне е разделено на три етапа:

1. етап. За определяне на домоена киселина (0-8.75 min)
2. етап. За определяне на спиролиди (8.75-11.20 min)
3. етап. За определяне на окадаена киселина, динофизистоксини, пектенотоксини и йесотоксини (11.20-30 min).

Идентификацията на анализите се основава не само на времената на задържане (RT, *retention time*) на всеки компонент, но и на уникалния вторичен маспектър на характерните резултатни йони (Product ions), за да се подsigури разпознаването на анализите в сложната матрица на мидената тъкан. В таблица 1 са представени данни за посочените параметри, както и за енергиите на разпад (CID) и молекулното тегло (MW).

За идентифицирането на анализите и количествена обработка на резултатите от хроматограмите и маспектрите е използван софтуер Analyst® Software SCIEX.

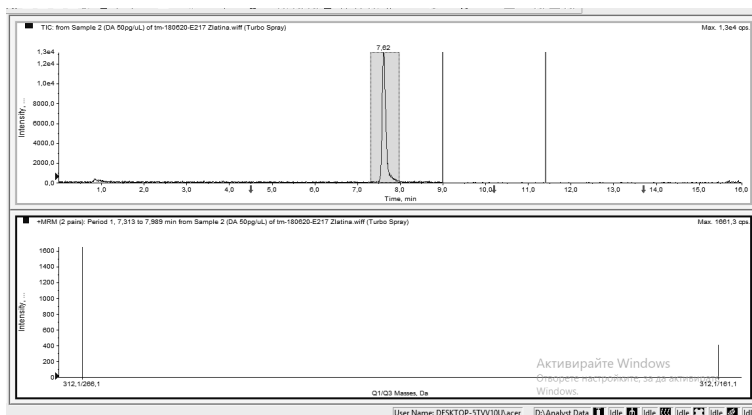
Таблица 1. Параметри на маспектрометъра

Компонент	RT, min	Parent ion (m/z)	Product ions (m/z)	CID voltage, eV	MW
Домоена киселина	7.62	312	266	20	311.3
Спиририд 1	10.34	692	164	55	692.0
Окадаена киселина	11.86	822	223	55	805.0
Динофизистоксин-1	12.81	836	237	55	819.0
Динофизистоксин-2	12.18	822	223	55	805.0
Йесотоксин	14.68	1160	965	55	1143.4
Пектенотоксин-2	12.39	876	213	55	859.1

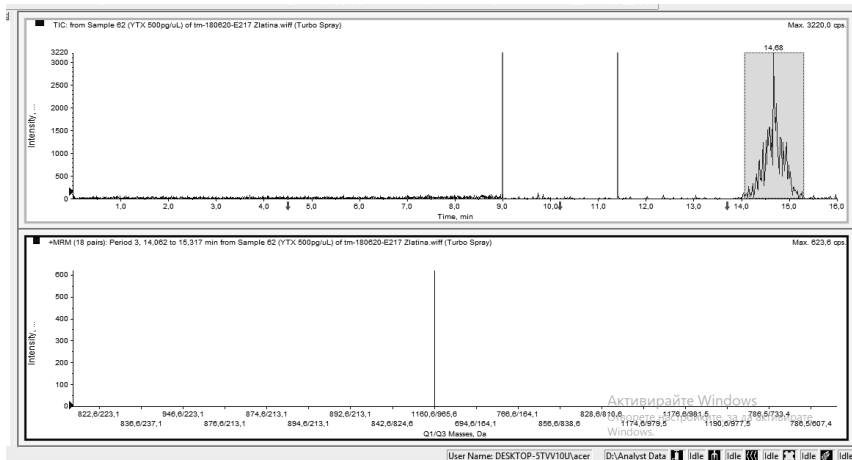
Идентифицирани са следните морски биотоксини:

- Домоена киселина (DA)
- Йесотоксин (YTX)
- Пектенотоксин-2 (PTX2)

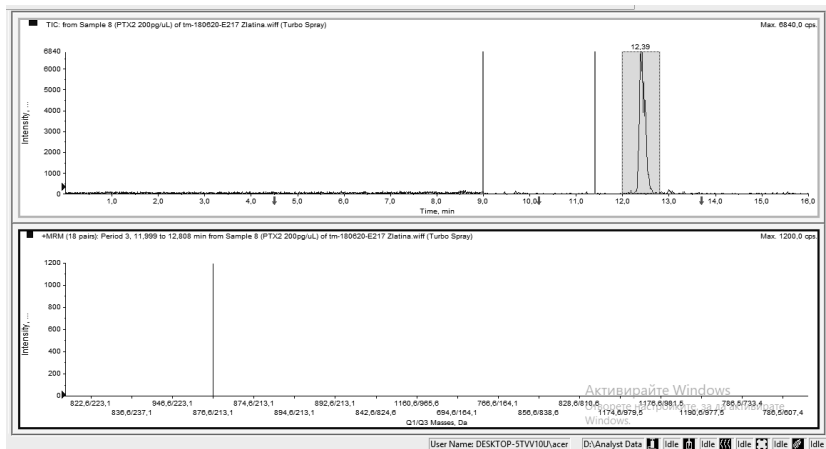
На Фигури 7, 8 и 9 са представени хроматограми и маспектри на стандартни разтвори на определените морски биотоксини.



Фигура 7. Хроматограма и маспектър на стандартен разтвор на DA (50 µg/µl)



Фигура 8. Хроматограма и маспектър на стандартен разтвор на YTX (500 µg/µl)



Фигура 9. Хроматограма и маспектър на стандартен разтвор на PTX2 (200 µg/µl)

Калибрирането е извършено по метода на абсолютната калибровка чрез интегриране на площите на хроматографските пикове. За изчисление площта на анализа е използван метода на единичния

стандарт. Използвани се стандартни разтвори с концентрация, близка до очакваната в пробите. На всеки 10 проби се измерват стандартни разтвори и празна проба.

Всички стандартни разтвори са закупени от Walter Institute for Marine Biosciences, National Research Council, Halifax, Nova Scotia, Канада и притежават сертификат за качество.

За изчисление на концентрацията на анализа се използва средно аритметичната стойност от площите на измерените стандартни разтвори (уравнение 1):

Уравнение 1.

$$C_{tox} = \frac{C_{st}}{P_{st}} \times P_{tox}$$

Където :

C_{tox} – концентрация на анализа в пречистения екстракт, $\text{pg}/\mu\text{l}$

C_{st} – концентрация на стандартен разтвор, $\text{pg}/\mu\text{l}$

P_{tox} – площ на пика на анализа

P_{st} – площ на пика на анализа в стандартния разтвор

Краиният резултат за определения аналит в пробите миди е изчислен по следната формула (уравнение 2):

Уравнение 2.

$$C_{an} = \frac{C_{tox}}{m} \times V_{ex}$$

Където:

C_{an} - концентрация на анализа в пробата, $\text{ng}/\text{g hr}$

C_{tox} - концентрация на анализа в пречистения екстракт, $\text{ng}/\mu\text{l}$

V_{ex} - краен обем на пречистения екстракт, μl

m - маса на пробата, g hr

Крайният резултат за определения аналит в пробите планктон е изчислен по следната формула (уравнение 3):

Уравнение 3.

$$C_{an} = \frac{C_{tox}}{h} \times V_{ex}$$

Където:

C_{an} - концентрация на аналита в пробата, ng/m

h - дълбочина на спускане на мрежата, m

Границата на откриване на метода (LOD) (Таблица 2) се определя при всяко хроматографско измерване на серия от проби. Измерени са общо 206 проби в 3 серии по приблизително 68-70 проби. LOD се определя от съотношението сигнал/шум 3:1.

Таблица 2. Граници на откриване (LOD) на аналитичния метод

Анализирани морски биотоксини	LOD, планктон, ng/m	LOD, миди, ng/g hp
DA	0.467	0.290
YTX	0.001	0.004
PTX2	0.111	0.246
OA	0.004	0.008
DTX1	0.010	0.022
DTX2	0.001	0.002
SPX-1	0.667	0.500

5. Статистическа обработка на резултатите

За статистическа обработка и анализ на резултатите е използвана програма SPSS 16.

Приложени са:

I. Описателен статистически анализ /дескриптивна статистика/ с приложен табличен и графичен метод, средни величини, величини на

разпределение и др. Чрез функцията дескриптивна статистика на MS Excel 2016, като с бар е посочено стандартното отклонение (в абсолютна стойност) в рамките на всяка група.

II. Проверка на статистически хипотези (t-test)– за установяване на съществуване на статистически значима разлика между средните стойности на токсините по вид проби в зависимост от района и сезона на пробонабиране. Резултатите са докладвани чрез p-величините. Със * са означени групите, за които доказахме статистически значима разлика с $p \leq 0,05$.

III. Корелационният анализ за изследване на връзката средно ниво на токсин/сезон на пробонабиране и средно ниво на токсин/район на пробонабиране. Резултатите са докладвани чрез непараметричният корелационен коефициент на Спирман (r).

Проверката за статистическа значимост на получения корелационен коефициент r е извършена чрез сравнение на възприето еталонно равнище на значимост (риск за грешка α) и изчислено гранично равнище на значимост (Sig). При $\text{Sig} < \alpha = 0,01$, коефициентът може да бъде приет за статистически надежден.

III. Резултати и дискусия

Изследвани са 66 проби планктон , 47 проби диви и 78 проби култивирани миди от район Север и район Юг за периода 2016 -2018 г. за наличие на фикотоксините-домоена киселина, окадаена киселина, динофизистоксин-1, динофизистоксин-2, пектенотоксин-2, йесотоксин, спиролид-1.

Резултатите от направеното проучване са обобщени по: райони на улов и сезони на улов.

Измерените концентрации в мидите са представени на база тегло хепатопанкреас (ng/g hepatopancreas (hp) или на база тегло на цяла мидена тъкан (mg/kg или µg/kg sm). При сравняване на резултатите с нивата на токсините, установени в други изследвания, нормативните стойности в ЕС (здравна норма, остра референтна доза, допустим дневен прием) резултатите представени на база тегло хепатопанкреас са преизчислени на база тегло цяла мидена тъкан. За целта се използва универсален фактор на превръщане – 5, предложен от EFSA.

Измерените концентрации в планктона са представени на база дълбочина на спускане на планктонната мрежа (ng/m), форма удобна за сравняване с данни от други изследвания.

1. Съдържание на морски биотоксини в планктон

По Българския бряг на Черно море са регистрирани множество потенциално токсични микроводорасли (Dzembekova & Moncheva, 2014), за които има данни, че продуцират паралитични, диарийни токсини, домоена киселина, йесотоксини и пектенотоксини както в Черно море, така и в други морета.

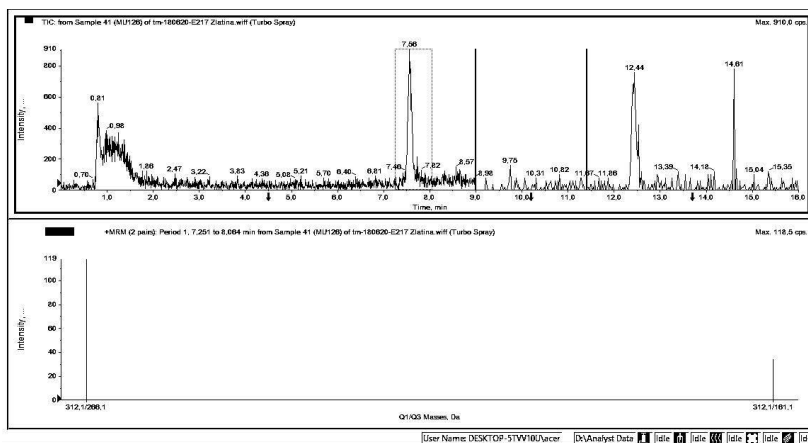
Проби планктон за периода 2016-2018 г. са анализирани за домоена киселина, диарийни токсини, йесотоксини и пектенотоксин-2, както и за вид новопоявяващи се токсини- спиролиди. Изследвани са общо 66 проби планктон , пробонабрани в различни райони и сезони (Таблица 3). В пробите, посочени в таблица 3, са определени морските биотоксини– **домоена киселина, РТХ2 и УТХ.**

Таблица 3. Брой изследвани проби планктон по сезони и райони

Сезон	Северно Черноморие	Южно Черноморие	Общо
Есен 2016	7	-	7
Пролет 2017	7	5	12
Лято 2017	12	3	15
Зима-пролет 2018	15	17	32
Общо	41	25	66

1.1. Съдържание на **домоена киселина** в проби планктон

В двадесет от пробите планктон (33 %) е определена домоена киселина. Концентрацията ѝ варира в широки граници – 0.5 – 1219.4 ng/m както в рамките на един сезон, така и в района на улов. Хроматограма и маспектър на проба планктон от район Север от пролет 2017, съдържаща домоена киселина са представени на Фигура 10.



Фигура 10. Хроматограма и маспектър на проба планктон от Каварна от пролет 2017

Домоена киселина е регистрирана в пробите от есен 2016, пролет 2017 и зима-пролет 2018. Резултатите показват, че през есен 2016 DA е

определена в 4 от изследвани 7 проби, а през пролет 2017 в 11 от 12 изследвани проби. В пробите от есен 2016 DA е в концентрационен диапазон - 8.9 – 20.7 ng/m и достига значително по-високи концентрации в пробите от пролет 2017 (16.7 - 1219.4 ng/m) (фигура 11).



Фигура 11. Концентрация на домоена киселина в проби планктон от пролет 2017

Значително по-ниска е концентрацията на домоена киселина в пробите от **зима-пролет 2018** (0.5 – 1.4 ng/m) в сравнение с нивата, регистрирани през пролет 2017. През зима-пролет 2018 DA се регистрира само в 6 от общо изследвани 32 проби. От лято 2017 са изследвани общо 15 проби- домоена киселина не е определена в пробите от този сезон.

В пробите от пролет 2017, домоената киселина е регистрирана в 6 от изследвани общо 7 проби от Северното Черноморие и в 5 изследвани проби от Южното Черноморие. В пробите от зима-пролет 2018 домоената киселина е регистрирана в 4 от изследвани общо 13 проби от Северното Черноморие и в 2 от общо изследвани 17 проби от Южното Черноморие. Разликата в нивата на домоената киселина (пролет 2017) в двата района на изследване, както и малкия брой положителни проби в останалите сезони могат да се обяснят както с промяната на температурата на морската вода, така и с наличието на

определени хранителни вещества, напр, силикати, фосфати, нитрати и др (Lema, *et al.*, 2017). Вероятна причина за тези резултати би могла да се търси в природата на продуцента на домоена киселина - *Pseudo-nitzschia*, за който факторите на средата са лимитиращи за неговото развитие и производството на токсини (Delegrange, *et al.*, 2018; Trick, *et al.*, 2018; Lema, *et al.*, 2017).

Krock, *et al.* (2013) изследват нивата на фикотоксини в проби планктон от Германския и Датския бряг на Северно море и установяват наличие на домоена киселина в малък брой проби. Установените нива (1.2-6.8 ng/NH*) са сравними с установените стойности в пробите от зима-пролет 2018 в настоящото изследване. Сравними със нивата на домоена киселина в пробите от пролет 2017, но и единични значително по-високи нива на домоена киселина са регистрирани в проби планктон от Аржентинско море (96-5041 ng/NT) (Almandoz *et al.*, 2017).

1.2. Съдържание на йесотоксини и пектенотоксин-2 в проби планктон

Йесотоксини (YTX) са регистрирани само в 4 проби (5%), единствено от Северното Черноморие от есен 2016 и пролет 2017. Концентрационния диапазон е много голям – 0.001 – 1.959 ng/m. Малкият брой положителни проби, най-вероятно се дължи на факта, че йесотоксините са екзотоксини. След като бъдат синтезирани, те много бързо биват отделяни в околната среда и затова е трудно да се определят в проби планктон (Hess & Aasen, 2007). Например Krock, *et al.* (2013) също изследват нивата на липофилни токсини по Германския и Датския бряг, но йесотоксини не са определени. Изследвания в други морета (Pizarro, *et al.*, 2018), включително и Черно море (Morton, *et al.*, 2009) не установяват йесотоксини в проби планктон.

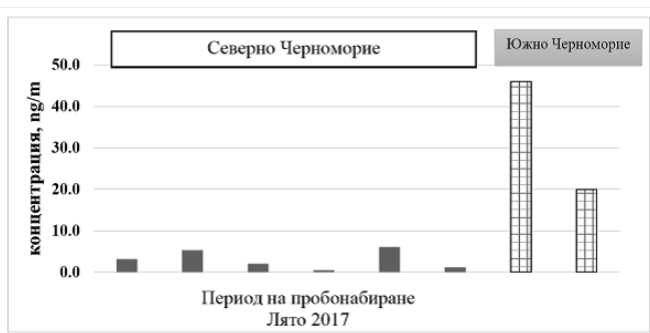
Пектенотоксин-2 (PTX2) е регистриран в 27 проби планктон (41%) от всички изследвани сезони. Концентрацията на токсина варира в широки граници – 0.3 – 563.8 ng/m. Тези големи вариации са характерни, както за целия период на изследване, така и за всеки сезон поотделно.

Резултатите показват, че PTX2 се открива в 6 проби от **есен 2016** в концентрационен диапазон – 1.2 – 563.8 ng/m. Само 5 от пробите от **пролет 2017** са положителни за PTX2 като максималната концентрация

е значително по-ниска, а концентрационния диапазон е по-малък - 0.3 – 0.9 ng/m.

В пробите от пролет 2017, РТХ2 е регистриран в 3 проби от Северното Черноморие и в 2 проби от Южното Черноморие. При сравнение на данните от двата изследвани района в този сезон не се регистрира значителна разлика в концентрациите на РТХ2.

В 8 проби от **лято-есен 2017** се открива РТХ2 отново с широк концентрационен диапазон 0.5 – 46.0 ng/m (Фигура 12). РТХ2 е регистриран в 8 проби от **зима-пролет 2018**. Максималната регистрирана концентрация през периода февруари-май 2018 е 10.6 ng/m, а минималната – 3.0 ng/m.



Фигура 12. Концентрация на РТХ2 в проби планктон от лято-есен 2017

Токсинът РТХ2 е регистриран през пролет 2017, лято 2017, зима-пролет 2018 и в двата изследвани района. Положителните проби от Северното Черноморие общо за тези сезони са 14 от общо анализирани 34 (41 %) , а от Южното – 7 от общо 25 (28%). Повечето положителни проби и от двата района са от места със слаба циркулация на морската вода – Каварненски залив, Варненски залив, Бургаски залив. Съществуват научни проучвания, в които се изследва възможната връзка между циркулацията на водните маси и динамиката в числеността на РТХ2 – продуциращите видове *Dinophysis* (Batifoulier, *et al.*, 2013; Pitcher, *et al.*, 2010). Авторите доказват, че при слаба циркулация на водата (например в заливи) РТХ2 – продуциращите видове засилват синтеза на токсина. Това би могло да бъде обяснението

и за регистрирането на РТХ2 в пробите планктон от изследваните райони.

Фитопланктонните видове *Dinophysis* обикновено се свързват със синтеза на диарийните токсини – окадаена киселина и динофизистоксини-1 и 2. В анализираниите проби не бяха определени окадаена киселина и динофизистоксини. Този резултат показва, че е възможно при условията на Черно море *Dinophysis* да синтезира само РТХ2. Подобни резултати са докладвани и от други автори (Fux, *et al.*, 2011) и показват, че географските изолати от един и същи вид могат да произвеждат различни фикотоксини при различни условия на средата.

Пробите планктон бяха анализирани и за наличието на спиролиди (SPX), тъй като видът отговорен за техния синтез – *Alexandrium* spp. също е регистриран в изследваните райони. Този вид токсини също не бяха определени в пробите.

В литературата няма данни за откриването както на домоена киселина, така и на йесотоксин и пектенотоксин-2 в проби планктон от Българското Черноморие.

1.3 Проби планктон, съдържащи повече от един токсин

Проследено е едновременното присъствие на няколко токсина в пробите планктон. В 14 (41%) от общо 34 положителни проби са определени няколко токсина в една и съща проба. В две от пробите са регистрирани едновременно трите определени токсина, в една проба – едновременно УТХ и РТХ2, а в 11 от пробите са регистрирани домоена киселина и РТХ2 в различно процентно съотношение .

В 8 от пробите значителна част от токсиновото съдържание се дължи на домоената киселина, а в 6 – на РТХ2. В 8 от положителните проби се съдържа само домоена киселина, а 13 проби – само РТХ2.

Тези данни показват, че продуцентите на определените морски биотоксини могат да съществуват както самостоятелно, така и едновременно, при което тяхната токсиногенност се запазва. Този извод е важен, тъй като това дава възможност няколко токсина да се акумулират едновременно в двучерупчестите мекотели.

2. Съдържание на морски биотоксини в миди

Мидите са двучерупчести мекотели, които филтрирайки морската вода, задържат фитопланктона в тъканите си и по този начин могат да акумулират образуванията от него фикотоксини.

Наличието на морски биотоксини в анализираният проби планктон е индикация за откриването им и в пробите миди. В мидите фикотоксините се акумулират в храносмилателната жлеза (хепатопанкреас). В този орган те се задържат дълго време и са устойчиви, както на промените в условията на средата, така и при кулинарна обработка (O'Driscoll, *et al.*, 2014; Mafra, *et al.*, 2010; MacKenzie, *et al.*, 2002).

Пробонабирането на диви и култивирани миди е съобразено със сезоните, в които се събират миди с цел търговия и лична консумация. То е извършено през пролет и есен 2016, пролет 2017, лято и есен 2017, зима и пролет 2018 (Таблица 4). Вземите проби са анализирани за домоена киселина, диарийни токсини (окадаена киселина, динофизистоксин-1, динофизистоксин-2), йесотоксини, пектенотоксин-2 и спиролиди. Изборът на фикотоксини за анализ е направен въз основа на:

- данни за наличие на потенциално токсични фитопланктонни видове, които е възможно да синтезират токсините в условията на Черно море;
- значение на токсините за здравето на човека;

Таблица 4. Брой изследвани проби миди по сезони и райони

Сезон	Северно Черноморие		Южно Черноморие		Общо
	Култ. миди	Диви миди	Култ. миди	Диви миди	
Пролет, есен 2016	5	6	-	-	11
Пролет 2017	13	11	16	5	45
Лято-есен 2017	15	15	14	5	49
Зима- Пролет 2018	7	4	11	4	26
Общо	40	36	41	14	131

Стандартната аналитична процедура включва екстракция на морските биотоксини от хомогенат от цялата мидена тъкан (ЕС 2013; ЕС 2004). По тази причина предварителният анализ за наличие на фикотоксини е извършен на екстракти от цяла мидена тъкан. Чрез LC-MS/MS са анализирани общо 6 проби от Северното Черноморие (култивирани миди, N=3; диви миди, N=3) от пролет 2016 за домоена киселина, окадаена киселина, динофизистоксин-1, динофизистоксин-2, йесотоксини, пектенотоксин-2 и спиролиди. Всички проби са отрицателни (Peteva, *et al.*, 2018).

Тъй като анализираният брой проби е малък (N = 6), не може да се направи категоричен извод за разпространението на фикотоксините по Българското Черноморие.

По тази причина, а и поради факта, че потенциално токсични фитопланктонни видове са регистрирани по Българското Черноморие (BAS-Ю 2016-2018), се предприе по-интензивно пробонабиране, което да обхваща няколко последователни сезона. В аналитичната процедура екстракцията на цялата мидена тъкан е заменена с екстракция на хомогенат от храносмилателните жлези на мидите от пробата, тъй като морските биотоксини се акумулират и задържат дълго време в този орган на двучерупчестите мекотели.

Пробонабирането е подновено през **есента на 2016 г.** Пробонабрани са 5 броя проби миди (2 проби култивирани и 3 проби диви миди) от Северното Черноморие. Във всяка проба са отделени храносмилателните жлези на мидите. След хомогенизиране, хомогенатът е екстрахиран. Екстрактът е подложен на LC-MS/MS анализ за наличие на домоена киселина, окадаена киселина, динофизистоксин-1, динофизистоксин-2, йесотоксини, пектенотоксин-2 и спиролиди.

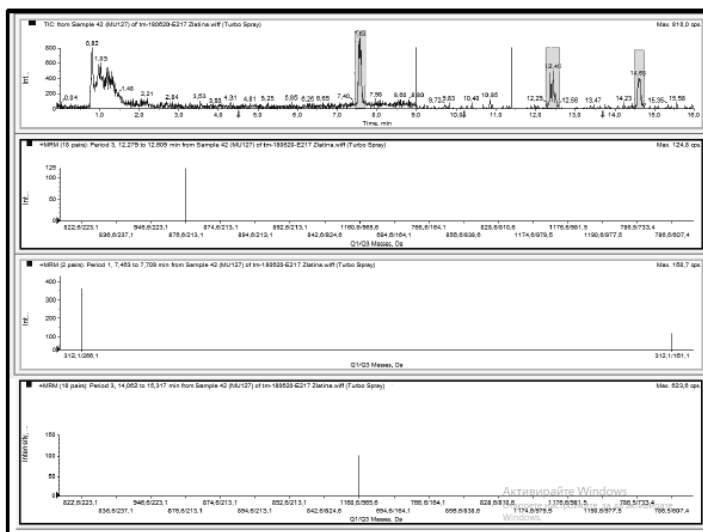
Резултатите показват наличие на домоена киселина в една проба култивирани миди с концентрация 525.0 ng/g hr. В една проба култивирани миди и една проба диви миди е определен йесотоксин, съответно с концентрации 1.1 и 0.3 ng/g hr. Окадаена киселина, динофизистоксин-1, динофизистоксин-2, пектенотоксин-2 и спиролиди не са определени в пробите от есен 2016.

Независимо от малкия брой положителни проби, качествено и количествено определянето на фикотоксини в екстрактите от хепатопанкреас показва, че вероятно промяната в аналитичната процедура довежда до други резултати. По тази причина при пробите от останалите сезони се анализира екстракт от храносмилателните жлези на мидите.

2.1. Съдържание на морски биотоксини в проби култивирани миди

През пролет 2017 е извършено пробонабиране на 29 проби култивирани миди от Северното (N = 13) и Южното Черноморие (N=16).

LC-MS/MS анализът на пробите култивирани миди от пролет 2017 показва наличие на домоена киселина в 17 проби (108.3 -1373.3 ng/g hp), йсотоксин в 13 проби (0.004 – 24.559 ng/g hp) и пектенотоксин-2 в 4 проби (0.3- 1.8 ng/g hp). Хроматограма на проба, съдържаща домоена киселина, йсотоксин и пектенотоксин-2 е представена на фигура 13.



Фигура 13. Хроматограма и масспектър на проба култивирани миди от Каварна, пролет 2017

Разпределението на определените токсини показва, че доминиращият алготоксин по Северното Черноморие през пролет 2017 е домоена киселина, следван от йесотоксин като положителните проби за домоена киселина са 2 пъти повече от тези за йесотоксин. Пектенотоскин-2 се съдържа в най-малък брой проби, който е около 4 пъти по-малък от пробите съдържащи домоена киселина.

По Южното Черноморие в пробите от пролет 2017 преобладават йесотоксин и домоена киселина, с незначителен превес на йесотоксина. Пектенотоскин-2 се съдържа в приблизително 5 пъти по-малко проби в сравнение с йесотоксина.

Сравнението на съдържанието на **домоена киселина** в пробите култивирани миди от Северното и Южното Черноморие показва, че максималната регистрирана концентрация в пробите от Север (1374.3 ng/g hr) е близо 2 пъти по-висока от максималната регистрирана концентрация на токсина в пробите от Юг (618.9 ng/g hr). Също така, въпреки че пробонабирането от Юг започва по-късно в сравнение с пробонабирането от Север, прави впечатление, че максимумът в концентрацията на домоена киселина на Север настъпва по-късно в сравнение с максимумът в концентрация на токсина в пробите от Юг. Домоена киселина не се открива в пробите от края на пролетта (месец май), докато в същия период токсинът все още се регистрира в пробите от Север.

Значителна е разликата в наличието на **йесотоксин** в пробите от двата изследвани района, съответно в 31% от пробите от Север (0.004-8.137 ng/g hr) и в 63 % от пробите от Юг (0.009-24.559 ng/g hr) . Най-високата стойност в район Север - 8.137 ng/g hr е определена в проба от 5/3/17 от Каварна, а най-високата от район Юг -24.559 ng/g hr, е измерена през месец май в проба от Равда.

Пектенотоксин-2 е определен в малък брой проби от изследвания сезон (4 от общо анализирани 29 проби) – концентрационен диапазон на положителните проби 0.3- 1.8 ng/g hr. Максималната регистрирана концентрация е в проба от 7/4/2017 от района на Кавази – 1.8 ng/g hr.

Малкият брой положителни проби може да се обясни както с факта, че РТХ2 е регистриран и в малък брой проби планктон (5 проби

от анализирани общо 12 проби), както и с метаболитните превръщания, които може да претърпи токсинът в организма на мидите и съотв. да се превърне в нетоксични аналози (Amzil, *et al.*, 2007; Blanco, *et al.*, 2007), които не са обект на изследване в настоящата работа.

През периода **лято-есен 2017** е извършено пробонабиране на 29 проби култивирани миди Северното (N =15) и Южното Черноморие (N=14).

LC-MS/MS анализът на пробите показва наличие на **йесотоксин** в 15 проби - 8 проби от Север (0.843- 13.038 ng/g hr) и 7 проби от Юг (1.606 – 14.806 ng/g hr). Окадаена киселина, динофизистоксин-1, динофизистоксин-2, домоена киселина, пектенотоксин-2 и спиролиди не бяха определени в пробите.

Максималната концентрация на йесотоксин - 15.732 ng/g hr е регистрирана в проба от Север (Каварна) от края на месец юли. Тази стойност е близка до максималната регистрирана концентрация в пробите от Юг (Созопол) - 14.806 ng/g hr, която е регистрирана също през месец юли. Анализът на данните показва, че високи концентрацията на токсина в пробите от Северното Черноморие са регистрирани от началото на месец юли до края на месец септември, докато в пробите от Юг - от месец юни до края на месец юли.

През периода **зима-пролет 2018** е извършено пробонабиране на 18 проби култивирани миди от Северното (N =7) и Южното Черноморие (N=11).

LC-MS/MS анализът на пробите показва наличие на домоена киселина в 4 проби, йесотоксин в 1 проба и пектенотоксин-2 в 2 проби. Окадаена киселина, динофизистоксин-1, динофизистоксин-2 и спиролиди не бяха определени в пробите.

Домоена киселина е определена в три проби от Север (0.6- 1.9 ng/g hr) и в една проба от Юг – 0.3 ng/g hr. Максималната концентрация на DA – 1.9 ng/g hr е регистрирана в проба от Север (Каварна) от началото на месец март. Тази стойност е над 3 пъти висока от концентрацията на домоената киселина, регистрирана в проба от Юг (Созопол) – 0.3 ng/g hr, измерена през месец май.

Йесотоксин е определен в една проба от Север (Каварна) от началото на месец март. Измерената концентрация е – 1.9 ng/g hr.

Пектенотоксин-2 е определен в две проби от Север с близка концентрация – 0.6 и 0.3 ng/g hp, съответно от месец март и април.

Резултатите от статистическата обработка при изследването на корелационната връзка ниво на определен токсин в проби култивирани миди/сезон на пробонабиране показва, че непараметричният корелационен коефициент на Спирман установява наличие и може да бъде приет за статистически надежден само за домоена киселина. Установява се значителна обратна връзка ($r = -0,487$) между концентрацията на DA и сезон на пробонабиране. Коефициентът може да бъде приет за статистически надежден ($\text{Sig}=0,000$ и $\text{Sig}=0,000 < \alpha=0,01$), предвид това, че изчисленото гранично равнище на заетост Significance е по – малко от възприетият риск за грешка 1 %. Може да се направи заключение, че:

С напредване на сезона, концентрацията на токсина домоена киселина (ng /g) при пробите култивирани намалява значително .

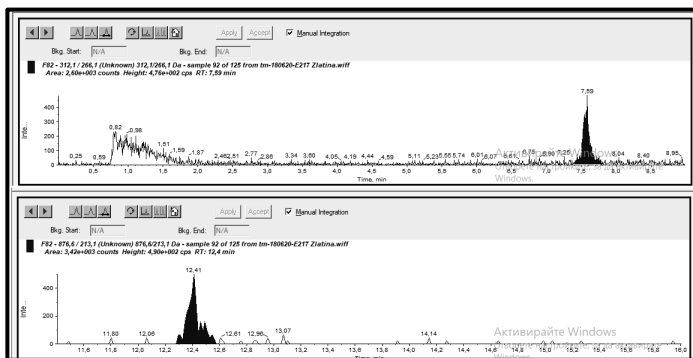
Изследвана е и корелационната връзка ниво на определен токсин (DA, YTX, PTX2) в проби култивирани миди/район на пробонабиране, но изчисленият непараметричният корелационен коефициент на Спирман не може да бъде приет за статистически надежден.

2.2. Съдържание на морски биотоксини в проби диви миди

Анализирани са общо 44 проби диви миди от двата района на изследване. Определени са домоена киселина (0.40 -918.96 ng/g hp) и йесотоксин (0.64 – 17.58 ng/g hp) и пектенотоксин-2 (0.42 - 59.79 ng/g hp). Установените нива на фикотоксините са значително по-ниски от докладваните стойности например в проби диви миди от Адриатическото море (Buratti, *et al.*, 2013) и от южния бряг на Чили (García, *et al.*, 2012), но сравними с данни от Черно море (Morton, *et al.*, 2007).

През **пролетта на 2017** е извършено пробонабиране на 16 проби диви миди Северното (N=11) и Южното Черноморие (N=5). LC-MS/MS анализът на пробите показва наличие на домоена киселина в 10 проби (247.36 – 918.96 ng/g hp) , йесотоксин в 6 проби (0.64 – 4.88 ng/g hp) и

пектенотоксин-2 в 5 проби (0.42-59.79 ng/g hr) . На фигура 14 е представена хроматограма на проба от Южното Черноморие, съдържаща домоена киселина и пектенотоксин-2.



Фигура 14. Хроматограма на проба диви миди от Бургас, пролет 2017

Окадаена киселина, динофизистоксин-1, динофизистоксин-2, и спиролиди не бяха определени в пробите. Това разпределение на съдържанието на фикотоксини в пробите показва, че доминиращият токсин в пробите диви миди от пролет 2017 е домоена киселина.

Домоена киселина е определена в 5 проби от Север (N=11) и във всички проби от Юг (N=5). Концентрационният диапазон на положителните проби в двата района е съответно 493.84 – 918.96 ng/g hr и 247.36-576.04 ng/g hr. Максималната концентрация - 918.96 ng/g hr е регистрирана в проба от Север (Крапец) от края на месец април. Тази стойност е около два пъти по-висока от максималната регистрирана концентрация в пробите от Юг (Несебър) (576.04 ng/g hr).

Йесотоксин е определен в 6 проби от Север (N=11) (0.64-4.88 ng/g hr). Всички проби от Юг (N=5) са отрицателни. Максималната концентрация - 4.88 ng/g hr е регистрирана в проба от Каварна от началото на месец май.

Пектенотоксин-2 е определен в 2 проби от Север (N=11) (0.42 и 6.67 ng/g hr) и 3 проби от Юг (N=5) (1.85- 59.79 ng/g hr). Максималната концентрация - 59.79 ng/g hr, регистрирана в проба от Юг (Бургас, 11/5/17) от месец май е около 10 пъти по-висока от максималната концентрация в пробите от Север (Балчик, 12/4/17) – 6.67 ng/g hr.

През периода **лято-есен 201** е извършено пробонабиране на 20 проби диви миди от Северното (N =15) и Южното Черноморие (N=5).

LC-MS/MS анализът на пробите показва наличие на **йесотоксин** в 5 проби - 3 проби от Север (N=15) (8.50-17.58 ng/g hr) и 2 проби от Юг (N=5) (1.60 и 3.93 ng/g hr) . Окадаена киселина, динофизистоксин-1, динофизистоксин-2, домоена киселина, пектенотоксин-2 и спиролиди не бяха определени в пробите.

Максималната концентрация на йесотоксин - 17.58 ng/g hr е регистрирана в проба от Север (Балчик, 27/7/17) от края на месец юли. Тази стойност е над 4 пъти по-висока от максималната регистрирана концентрация в пробите от Юг (Бургас, 24/6/17) - 3.93 ng/g hr, която е регистрирана през месец юни.

През **зима-пролет 2018** е извършено пробонабиране на 8 проби диви миди от Северното (N =4) и Южното Черноморие (N=4).

LC-MS/MS анализът на пробите показва наличие на **домоена киселина** в една проба с концентрация 0.40 ng/g hr (Варна). Окадаена киселина, динофизистоксин-1, динофизистоксин-2, пектенотоксин-2, йесотоксин и спиролиди не бяха определени в пробите.

Изследването на корелационната връзка ниво на определен токсин в проби диви миди/сезон на пробонабиране показва, че могат да се направят следните заключения:

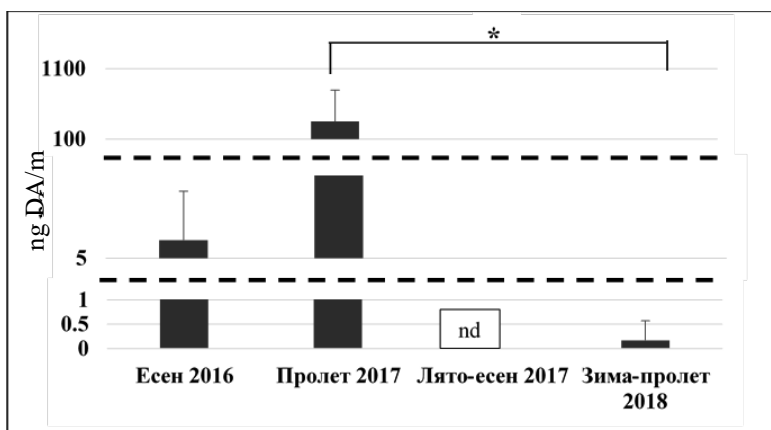
С напредване на сезона, концентрацията на токсините домоена киселина (ng /g) и PTX2 (ng /g) при пробите диви миди намаляват умерено.

При изследването на корелационната връзка ниво на определен токсин (DA, YTX, PTX2) в проби диви миди/район на пробонабиране се забелязва, че непараметричният корелационен коефициент на Спирман не може да бъде възприет за статистически надежден.

Сравнението на съдържанието на морски биотоксини с литературните данни показва, че единствено домоена киселина е била открита в проби култивирани миди от Българското Черноморие (Пенева и др., 2011). В литературата няма данни за откриването на йесотоксин и пектенотоксин-2 в проби култивирани миди, както и за анализирането за морски биотоксини в проби диви миди от Българското Черноморие.

2.3. Динамика на нивата на морски биотоксини в проби планктон по сезони и райони

Домоена киселина е регистрирана в пробите планктон от пролет 2017, есен 2016 и зима-пролет 2018 като нивата на токсина в този ред значително се понижават. Това се потвърждава и от статистическата обработка на резултатите - установена е статистически значима разлика между средните концентрации на пробите планктон от пролет 2017 (351.8 ± 445.1 ng/m) и зима-пролет 2018 (0.18 ± 0.4 ng/m) - $p = 0.000 < 0.05$. През лято 2017 токсинът не е регистриран в пробите (Фигура 15).

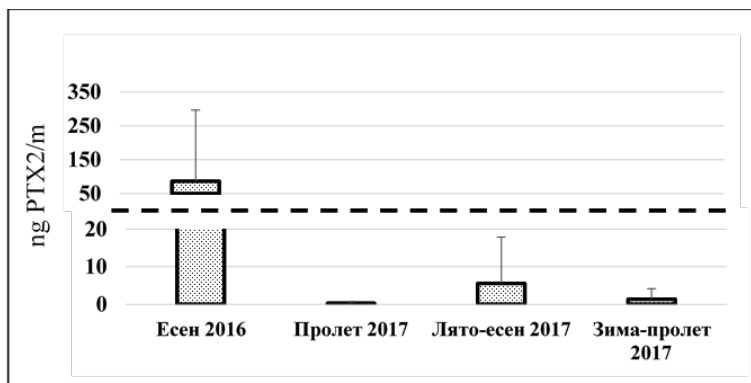


Фигура 15. Средни стойности на домоена киселина, ng/m hr в проби планктон по сезон на пробонабиране (nd – not detected, токсинът не е открит; * $p \leq 0,05$)

Нивата на домоена киселина в пробите планктон от Юг (47.9 ± 193.1 ng/m), са по-ниски отколкото в пробите планктон от район Север (75.2 ± 249.0 ng/m), но тъй като $p = 0.641 > \alpha = 0.05$ може да се направи извод, че средните стойности не се различават съществено (не съществува статистически значима разлика по средна стойност на концентрацията на токсина домоена киселина).

Йесотоксин е регистриран в малък брой проби планктон само от Северното Черноморие, което не позволява изследване на динамиката на този токсин в пробите планктон.

Пектенотоксин-2 е регистриран в проби планктон от всички изследвани сезони, както в пробите от Юг, така и от Север. След есен 2016 средната концентрация на токсина в пробите планктон рязко намалява (фигура 16), но не е установена статистически значима разлика например между средните концентрации в пробите от есен 2016 (86.6 ± 210.6 ng/m) и лято-есен 2017 (5.6 ± 12.3 ng/m).



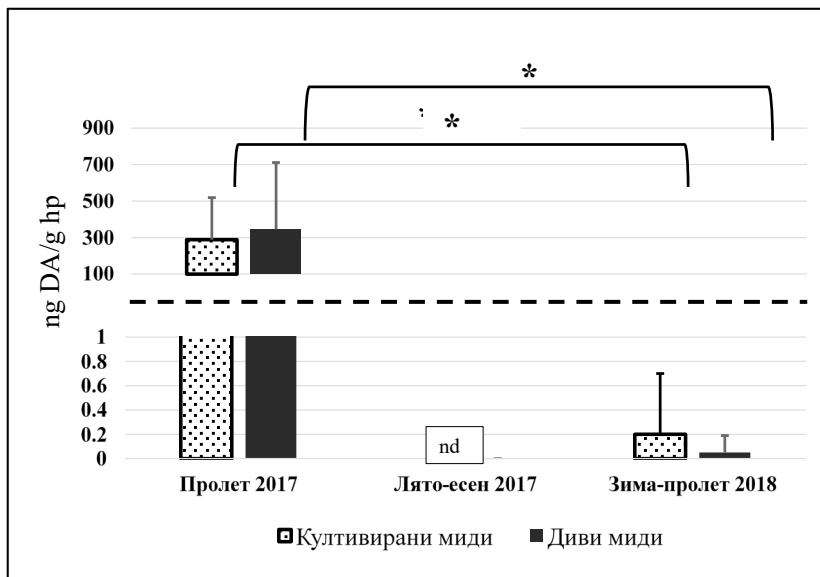
Фигура 16. Средни стойности на пектенотоксин-2, ng/m hr в проби планктон по сезон на пробонабиране

Резултатите от статистическия анализ показват, че средната стойност на концентрацията на токсина РТХ2 в анализираниите проби от Северното Черноморие (15.99 ± 87.80 ng/m) е по-висока от средната концентрация на токсина в пробите от Южното Черноморие (3.34 ± 9.86 ng/m). Но тъй като $p=0.477 > \alpha=0,05$, следователно не съществува статистически значима разлика между средните стойности на концентрацията на токсина РТХ2 в пробите от Север и Юг.

2.4. Динамика на нивата на морски биотоксини в проби миди по сезони

Наличието на морски биотоксини в мидите се дължи на експозицията на тези организми на токсичен фитопланктон. Следователно при мидите може да се очакват зависимости подобни на тези при планктона.

На Фигура 17 са представени данни за **средните концентрации на домоена киселина по видове проби миди за сезоните**, в които пробонабирането е извършено едновременно и в двата района - пролет 2017, лято-есен 2017, зима-пролет 2018.



Фигура 17. Средни стойности на домоена киселина, ng/g hp в проби култивирани и диви миди по сезон на пробонабиране (nd – not detected, токсинът не е открит; * $p \leq 0.05$)

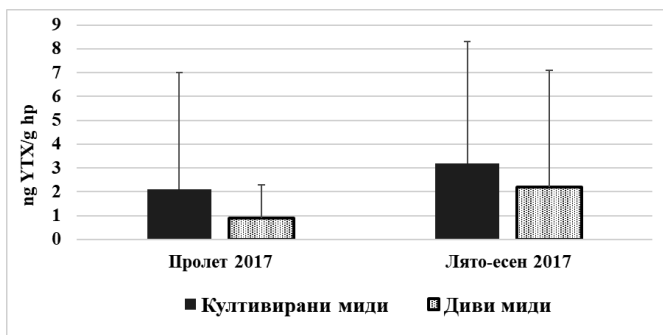
При проследяване динамиката в нивата на домоена киселина в пробите миди по сезони се наблюдават резки промени през изследвания период. Данните показват, че през пролет 2017 средната концентрацията на домоена киселина в пробите е най-висока. В следващия изследван сезон – лято- есен 2017 токсинът не е определен в пробите. През зима-пролет 2018 нивата на домоена киселина са значително по-ниски от регистрираните в пробите от пролет 2017. Това се потвърждава и от установената статистически значима разлика например между средните концентрации в пробите култивирани миди от пролет 2017 (289.2 ± 352.0 ng/g hp) и зима-пролет 2018 (0.2 ± 0.5 ng/g hp) – $p = 0.001 < 0.05$, както и между средните концентрации в пробите диви миди от пролет 2017

(345.0 ± 366.3 ng/g hp) и зима-пролет 2018 (0.05 ± 0.14 ng/g hp) – $p = 0.007 < 0.05$. Подобни колебания в нивата на домоена киселина са добре познати и описани и в други изследвания. Например Ujević, *et al.* (2010) изследват нивата на домоена киселина в различни двучерупчести мекотели, вкл. миди от Адриатическото крайбрежие за период от три години и установяват значителни разлики в нивата на токсина както в районите, така и в периода на пробонабиране. Агенцията по безопасност на храните на Ирландия (2016) проследява нивата на домоена киселина в двучерупчести мекотели от производствените райони за периода 2011-2013 г. и установява както различен процент на положителните проби в различните години, така и значителни колебания в нивата на токсина, сходни с установените в настоящото изследване.

Установените колебания в концентрацията на домоена киселина в мидите съответстват с колебанията в нивата му и в пробите планктон.

Йесотоксин е определен в пробите от двата района през пролет 2017. Установените средни нива на йесотоксин са: култивирани миди – 2.1 ± 4.9 ng/g hp, диви миди – 0.9 ± 1.4 ng/g hp.

В пробите от лято-есен 2017 изчислената средни концентрации са: култивирани миди е 3.2 ± 5.1 ng/g hp, а за диви миди – 2.2 ± 4.9 ng/g hp. На Фигура 18 са **сравнени средните концентрации на йесотоксин по видове проби миди в сезоните**, в които токсинът е определен в пробите и в двата района -пролет 2017 и лято-есен 2017.



Фигура 18. Средни стойности на йесотоксин, ng/g hp в проби култивирани и диви миди по сезон на пробонабиране

Както може да се очаква, не се установява статистически значима разлика между средните концентрации в двата сезона както при култивираниите ($p=0.443>0.05$), така и при дивите миди. Установените колебания в концентрацията на йесотоксин в мидите не съответстват с колебанията в нивата му и в пробите планктон. Йесотоксини са регистрирани в малък брой проби, единствено от Северното Черноморие от есен 2016 и пролет 2017. Може да се предположи, че това несъответствие се дължи на природата на йесотоксините. Тези морски биотоксини са екзотоксини - след като бъдат синтезирани, те много бързо биват отделяни в околната среда и затова е трудно да се определят в проби планктон (Hess & Aasen, 2007).

Пектенотоксин-2 е открит в малък брой проби миди от сезоните, включени в изследването, което не позволява изследване на динамиката на този токсин.

Важно е да се отбележи, че въпреки малкия брой положителни проби миди, наличието на пектенотоксин-2 в пробите миди корелира със съдържанието му в пробите планктон, където той е определен в значителен брой проби (41%).

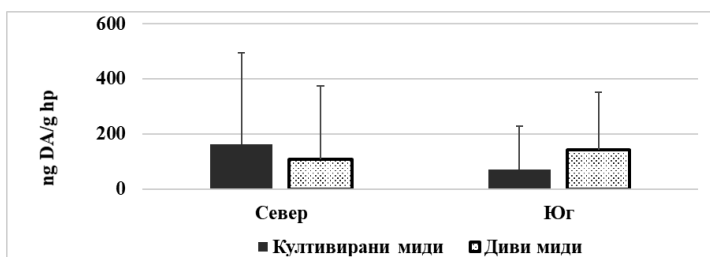
2.5. Разпределение на морските биотоксини в миди по район на улов

Изследвано е разпределението на съдържанието на морски биотоксини в проби диви и култивирани миди от два района на улов – Северно Черноморие (Север) и Южно Черноморие (Юг). Изчислени са средните концентрации на определените токсини в двата вида проби миди за всеки от районите на улов.

Резултатите показват, че средната стойност на концентрацията на токсина домоена киселина в анализираниите проби култивирани миди от Северното Черноморие (162.16 ± 333.64 ng/g hp) е по-висока от тази в пробите от Южното Черноморие (71.09 ± 156.70 ng/g hp) (Фигура 19). Но тъй като $p=0.121 > \alpha=0,05$, следователно не съществува статистически значима разлика между средните стойности на

концентрацията на токсина домоена киселина в пробите култивирани миди от Север и Юг.

Определените средни стойности на концентрацията на токсина домоена киселина в анализираниите проби диви миди от Северното и Южното Черноморие са близки, съответно – 107.18 ± 266.92 ng/g hr и 141.73 ± 208.19 ng/g hr (Фигура 19). Както може да се очаква, $p=0.669 > \alpha=0,05$, следователно не съществува статистически значима разлика между средните стойности на концентрацията на токсина домоена киселина в пробите диви миди от Север и Юг.



Фигура 19. Средни стойности на домоена киселина (DA) в проби култивирани и диви миди по район на улов

Резултатите от анализа на съдържанието на йесотоксин в пробите показват, че средната стойност на концентрацията на токсина в анализираниите проби култивирани миди от Северното и Южното Черноморие са близки, съответно – 2.47 ± 4.35 ng/g hr и 2.13 ± 4.68 ng/g hr. Тъй като $p=0.745 > \alpha=0,05$, следователно не съществува статистически значима разлика между средните стойности на концентрацията на токсина йесотоксин в пробите култивирани миди от Север и Юг.

Определената средната стойност на концентрацията на йесотоксин в анализираниите проби диви миди от Северното Черноморие е по-висока от тази в пробите от Южното Черноморие е съответно – 1.58 ± 3.90 ng/g hr и 0.40 ± 1.10 ng/g hr. Но тъй като $p=0.272 > \alpha=0,05$, следователно не съществува статистически значима разлика между средните стойности на концентрацията на токсина йесотоксин в пробите диви миди от Север и Юг.

Данните за **пектенотоксин-2** показват, че средната стойност на концентрацията на токсина пектенотоксин-2 в анализираниите проби култивирани миди от Северното и Южното Черноморие са близки, съответно – 0.06 ± 0.20 ng/g hr и 0.06 ± 0.30 ng/g hr. Това се потвърждава и от статистическите данни - $p=0.987 > \alpha=0,05$, следователно не съществува статистически значима разлика между средните стойности на концентрацията на пектенотоксин-2 в пробите култивирани миди от Север и Юг.

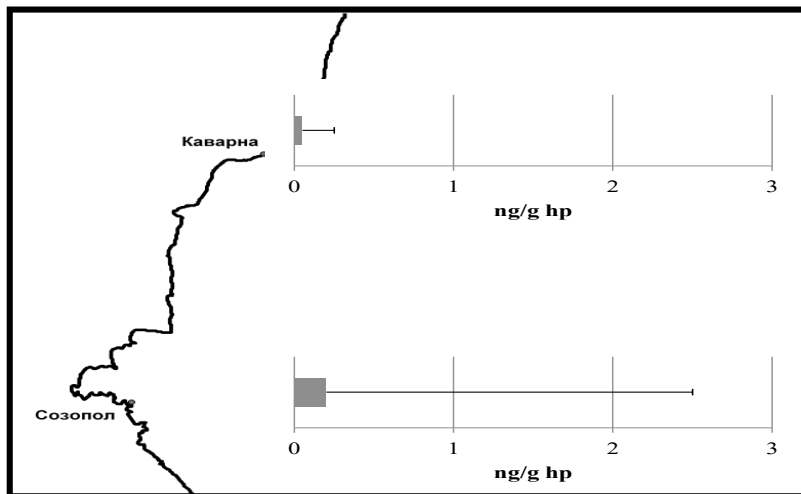
Определената средната стойност на концентрацията на токсина пектенотоксин-2 в анализираниите проби диви миди от Северното (0.2 ± 1.2 ng/g hr) е по-ниска от средната концентрация в пробите от Южното Черноморие (6.3 ± 16.0 ng/g hr). Но статистическите резултати показват, че $p=0.074 > \alpha=0,05$, следователно не съществува статистически значима разлика между средните стойности на концентрацията на пектенотоксин-2 в пробите диви миди от Север и Юг.

С цел да се изследва разпределението на определените морски биотоксини в пробите миди е направено и сравнение на средните концентрации по места на пробонабиране.

Домоена киселина е определена в няколко проби в районите на Каварна, Равда, Созопол и Приморско/Царево за целия период на изследване (Фигура 45). Данните показват, че средната концентрация в пробите от Созопол - 35.3 ± 97.1 ng/g hr е по-ниска от средните концентрации, определени в пробите от Каварна (159.8 ± 325.4 ng/g hr), Равда (121.7 ± 235.8 ng/g hr) и Приморско/Царево (162.8 ± 162.1 ng/g hr). Като цяло не се забелязва значителна разлика в концентрациите от Север на Юг.

Йесотоксин е определен в проби в районите на Каварна, Балчик/Албена, Равда, Созопол и Приморско/Царево за целия период на изследване (Фигура 46). Данните показват, близки стойности на средната положителна концентрация в пробите (Каварна – 2.3 ± 4.2 ng/g hr; Албена/Балчик – 2.2 ± 5.1 ng/g hr, Созопол – 1.2 ± 3.4 ng/g hr; Приморско/Царево – 1.3 ± 2.3 ng/g hr). По-висока е изчислената средна концентрация в пробите от Равда – 5.1 ± 2.2 ng/g hr. Като цяло не се забелязва значителна разлика в концентрациите от Север на Юг.

Пектенотоксин-2 е регистриран основно в проби от районите на Каварна и Созопол за целия период на изследване (Фигура 20). Статистическите данни не показват, значителна разлика в средната концентрация на пробите ($p=0.2>0.05$). Средното ниво на токсина в пробите от Созопол е 0.2 ± 2.3 ng/g hp, а в пробите от Каварна - 0.05 ± 0.2 ng/g hp.



Фигура 20. Средни стойности на пектенотоксин-2 по места на улов за целия период на изследване

2.6. Съдържание на морски биотоксини по видове миди

Резултатите от статистическия анализ *t-тест* показват, че средната стойност на концентрацията на токсина **домоена киселина** в анализираниите проби култивирани и диви миди за целия период на изследване е съответно – 114.98 ± 258.64 ng/g hp и 117.47 ± 249.13 ng/g hp.

Средната стойност на концентрацията на **йесотоксин** в анализираниите проби култивирани и диви миди за целия период на изследване е съответно – 2.29 ± 4.50 ng/g hp и 1.23 ± 3.35 ng/g hp. Определената средната стойност на концентрацията на токсина пектенотоксин-2 в анализираниите проби култивирани и диви миди е съответно – 1.58 ± 3.90 ng/g hp и 0.40 ± 1.10 ng/g hp.

Определената средната стойност на концентрацията на токсина пектентоксин-2 в анализираниите проби култивирани и диви миди е съответно – 1.58 ± 3.90 ng/g hr и 0.40 ± 1.10 ng/g hr.

Резултатите от статистическата обработка показват, че не съществува статистически значима разлика между средните стойности на концентрациите и за трите токсина.

2.7. Съдържание на повече от един токсин в проби миди

Проследено е едновременното присъствие на няколко токсина в пробите миди.

В 16 (25 %) от общо 65 положителни проби са определени няколко токсина в една и съща проба. В 5 от тях са регистрирани едновременно трите определени токсина, в 5 проби – едновременно DA и YTX, а в 6 от пробите са регистрирани домоена киселина и PTX2 в различно процентно съотношение. В 15 от пробите значителна част от токсиновото съдържание се дължи на домоената киселина, а в една проба – на YTX. Преобладаващата част от пробите с мултитоксиново съдържание са от пролет 2017 (14 проби), а две проби са от пролет 2018. Данните показват, че при съпоставянето на двата района на пробонабиране, броят на пробите е близък (9 проби от Север и 7 проби от Юг).

MacKenzie, *et al.* (2002) докладва, че токсиновия профил на миди от Нова Зеландия, съдържа определените от нас токсини (и някои други), но процентното съдържание на токсините, значително се различава от установеното от нас (DA> PTX2>YTX) и намалява в реда YTX> PTX2> DA. Ciminiello, *et al* (2010) изследват миди от Адриатическо море и установяват едновременно наличие на YTX и PTX2 (и някои други токсини), но домоена киселина не е определена в нито една проба.

Не се наблюдава значителна разлика в мултитоксиновото съдържание на пробите миди в сравнение с пробите планктон. И в двата вида проби се срещат комбинациите DA/YTX/PTX2, както и DA/PTX2. Комбинацията YTX/PTX2 се среща само при пробите планктон (1 проба), а DA/YTX само при пробите миди (6 проби).

Направеното предположение, че наличието на няколко токсина в пробите планктон е предпоставка за откриване на мултитоксинови смеси и в пробите миди, е потвърдено от приведените тук данни. Този извод е важен, тъй като това показва, че няколко токсина могат да преминат едновременно по хранителната верига, достигайки до крайния консуматор – човека и той ще бъде изложен едновременно на експозицията на няколко токсина.

2.8. Обобщение за съдържанието на морски биотоксини в планктон и миди

В анализираните проби миди и планктон са определени морските биотоксини- домоена киселина, йсотоксин и пектенотоксин-2. Стойностите на определените токсини в пробите планктон са в интервала 0.5 – 1219.4 ng/m за домоена киселина, 0.001 – 1.959 ng/m за йсотоксин и 0.3 – 563.8 ng/m. Тези големи вариации са характерни както за целия период, така и за всеки сезон и район на изследване. Сравнението на получените данни с резултати от проучвания от Северно море на други автори показва, че нивата на определените токсини по Българското Черноморско крайбрежие са сравними. Подобни големи колебания в нивата на токсините също се регистрират и в други морета, например Северно, Аржентинско море, но значително по-малки са колебанията в проби от Западното Крайбрежие на Европа и Средиземно море.

Домоена киселина (0.3 -1373.3 ng/g hp) и йсотоксин (0.004 - 24.559 ng/g hp) в голям концентрационен диапазон и пектенотоксин-2 (0.3 - 1.8 ng/g hp) в малък концентрационен диапазон са определени в 81 проби култивирани миди. Установяват се статистически значими разлики между средните сезонни концентрации само на токсина домоена киселина. Установените нива са сравними с данни от други морета в Европа. Нивата на домоена киселина са сравними с резултати от други български изследвания.

Токсиновият профил на пробите диви миди от двата района на изследване също съдържа домоена киселина (0.03 -918.96 ng/g hp) и йсотоксин (0.64 – 17.58 ng/g hp) и пектенотоксин-2 (0.42 - 59.79 ng/g hp). Установените нива на фикотоксините са значително по-ниски от

докладваните стойности например в проби диви миди от Адриатическото море (Buratti, *et al.*, 2013) и от южния бряг на Чили (Garcia, *et al.*, 2012), но сравними с данни от Черно море (Morton, *et al.*, 2007). Нивата на определените фикотоксини в диви миди, подобно на култивираните миди, силно варират между изследваните сезони, но не се установява статистически значими разлики. Не се наблюдават значителни разлики между средните концентрации по райони, което е подкрепено и от статистическите данни.

Сравнението на токсиновите профили на култивираните и дивите миди показва наличие и на трите определени токсина- домоена киселина, йесотоксин и пектенотоскин-2 и в двата вида проби. Не съществува значима разлика между концентрациите на трите токсина в пробите диви и култивирани миди.

IV. Оценка на безопасността на мидите като храна

Морските биотоксини, продуцирани от различни фитопланктонни видове, се акумулират в двучерупчестите мекотели, например мидите. Консумация на миди, съдържащи фикотоксини над определени нива, може да предизвика сериозна интоксикация с характерна симптоматика.

Оценка на безопасността свързана с наличието на морски биотоксини в морските храни (миди, стриди и др.) може да се направи въз основа на сравнение на експерименталните резултати с максимално допустимите граници (норми), определени в ЕС за всеки токсин в мидите.

Друг аспект на оценката на безопасността е свързан с изчисляване на индивидуалната експозицията на дадена група консуматори, напр. популацията на една държава, честите консуматори и пр. В този случай безопасността на мидите като храна може да се оцени и чрез изчисляване на остра експозиция, хронична експозиция и коефициент на опасност на съответния фикотоксин.

Доказано е, че храносмилателната жлеза съдържа течности, които остават свързани с тъканите, дори при измиване на тъканта (Hess, *et al.*, 2005). По тази причина, хепатопанкреасът е предпочитана в някои

изследвания за определяне съдържанието на токсини в организмите (Aasen, *et al.*, 2005; Edebo, *et al.*, 1988).

Обикновено се консумира цялото мидено месо и следователно данните за концентрацията на фикотоксини трябва да бъдат изразени за цяло месо от миди. Това преизчисляване за цяла мидена тъкан е необходимо, за да се получи стойност, която е сравнима със нормативните граници, напр. европейска норма, остра референтна доза (acute reference dose, ARfD), допустим дневен прием (tolerable daily intake, TDI) и коефициент на опасност (hazard quotient HQ).

Ако се анализира хепатопанкреас, обикновено се използва коефициент 5 (предложен от EFSA), за да се превърне стойността за цялото месо от миди. Този фактор, макар и да не представлява точно всички отделни мекотели, се счита за добро приближение (EFSA, 2009a,b,c,d; EFSA, 2008a,b).

Това преизчисляване за цяла мидена тъкан е необходимо, за да се получи стойност, която е сравнима със нормативните граници, напр. европейска норма, остра референтна доза (acute reference dose, ARfD), допустим дневен прием (tolerable daily intake, TDI) и коефициент на опасност (hazard quotient HQ).

За сравнение с нормативните граници се използват

- средните положителни концентрации на определените токсини, преизчислени за цяла мидена тъкан – тъй като човек не консумира едно и също количество миди на всяко хранене;
- най-високите стойности на определените токсини, преизчислени за цяла мидена тъкан.

По този начин се съставя т.нар. сценарий на най-лошия случай (worst case scenario), т.е. разглежда се експозицията в случай, че всяка порция миди съдържа морски биотоксини и в случай на най-високи нива на контаминиране.

1. Оценка на безопасността на мидите като храна чрез сравняване с максимално допустимите норми

В ЕС максимално допустимите норми на морски биотоксини са постановени в Регламент No 853/2004 (ЕС, 2004) и No 786/2013 (ЕС, 2013).

В Таблица 5 са представени изчислените стойности за максимална концентрация на определените токсини в диви и култивирани миди от двата района за целия период на изследване. Сравнението на данните показва, че най-висока е концентрацията на домоена киселина, но и тя, както и останалите стойности са под здравната норма, определена в ЕС.

Таблица 5. Изчислени концентрации на морски биотоксини за цяла мидена тъкан за диви и култивирани миди

Токсин	средна положителна концентрация	максимална концентрация	Норма
DA (mg/kg)	0.14 mg/kg	0.27 mg/kg	20 mg/kg
YTX (mg/kg)	0.00254 mg/kg	0.00491 mg/kg	3.75 mg/kg
PTX2 (μ g OA eq/kg)	4.61 μ g OA eq/kg	11.20 μ g OA eq/kg	160 μ g OA eq/kg

2. Оценка на експозицията при консумация на миди, съдържащи морски биотоксини

Морските биотоксини се акумулират в двучеручестите мекотели, които са били изложени на токсичен фитопланктон. Значителното увеличаване на консумацията на тези морски храни през последните години, заедно с глобализацията на търговията с морски дарове, повиши потенциалната експозиция на тези агенти. Морските токсини предизвикват неврологични, стомашно-чревни и сърдечно-съдови синдроми, някои от които водят до висока смъртност и дългосрочна

заболеваемост. Няма рутинни клинични диагностични тестове за тези токсини; диагнозата се основава на клиничната картина и историята на консумацията на морски дарове през предходните 24 часа (Sobel & Painter, 2005). По тази причина важен аспект в оценката на безопасността на храните е изчислението на експозиция на консуматорите на съответните храни.

Оценката на хранителната експозиция е свързана както с нивата на токсичните вещества, налични в храните, телесното тегло на консуматорите, така и с данните за консумационните параметри (размер на порцията, честота на консумация на храната и др.). Получената оценка на експозицията след това се сравнява със съответната токсикологична или хранителна референтна стойност за химичното вещество в храната (WHO, 2015).

За оценка на експозицията на морски биотоксини са използвани следните данни:

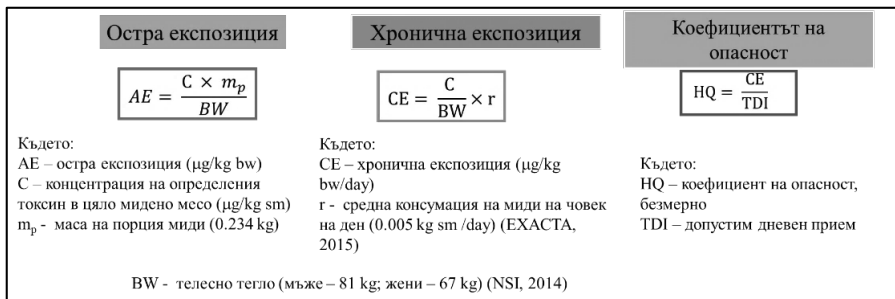
- Средна и максимална концентрация на определените токсини, изчислени за цяла мидена тъкан. В резултат се получават стойности на съотв. средна и максимална експозиция. Определените по този начин експозиции са част от сценария на най-лошия случай (worst case scenario) - експозиция в случай, че всяка порция миди съдържа морски биотоксини и в случай на най-високи нива на контаминиране

- Средно телесно тегло на българското население по данни от Европейско здравно интервю, проведено сред българското население. Според резултатите от това проучване средното телесно тегло при жените е 67 kg, а при мъжете – 81 kg.

- Консумацията на миди на българското население от Доклад за годишното потребление на риба и аквакултури (ИАРА, 2013).

- Данни за средния размер на порция миди

За изчисление на остра и хронична експозиция, както и коефициент на опасност са използвани формулите и данните, приведени на фигура 21.



Фигура 21. Изчисление на остра и хронична експозиция, и коефициент на опасност

2.1. Остра експозиция

Острата експозиция съответства на еднократно излагане на вредно съединение при висока доза (Picot, *et al.*, 2013). Острата експозиция на **домоена киселина** при консумация напр. на миди предизвиква различни нарушения при надвишаване на определената от ЕАБХ норма за наличие на домоена киселина в консумираните миди - 30 µg/kg bw (EFSA, 2009a). Появяват се симптоми като стомашно-чревни нарушения, объркване, дезориентация, загуба на паметта, кома и др., обединени под названието амнезиено отравяне (amnesic shellfish poisoning (ASP) (Lefebvre & Robertson, 2010). На Фигура 22 е представено сравнение на изчислената остра експозиция на **домоена киселина** на българското население в случай на консумация на култивирани и диви миди от Българското Черноморие от пролет 2017. От този сезон са обработени 45 проби миди. Домоена киселина е определена в 17 проби култивирани миди (8 проби от Север и 9 проби от Юг) и 10 проби диви миди (5 проби от Север и 5 проби от Юг).

Данните показват, че най-висока е средната експозиция в случай на консумация на диви миди, а максимална е експозицията при консумация на култивирани миди. И в двата случая експозицията е значително по-ниска от предложената на ЕАБХ норма- ARfD 30 µg/kg bw (EFSA, 2009a).

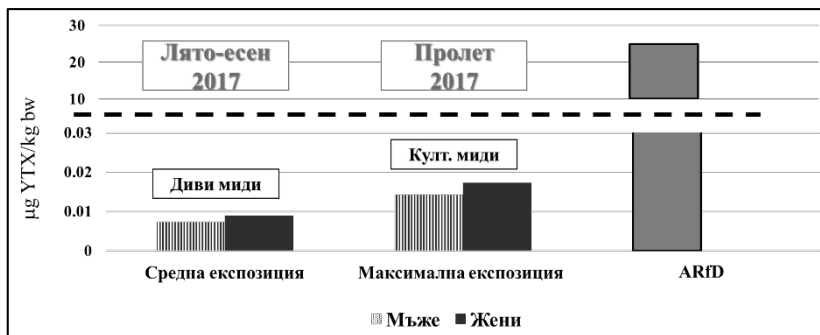


Фигура 22. Сравнение на средни и максимални стойности на остра експозиция на домоена киселина в случай на консумация на миди от пролет 2017

При консумация на миди. В човешкия организъм могат да попаднат и **йесотоксини**. Острата експозиция с йесотоксин се свързва с нарушаване на клетките на сърдечния мускул. От друга страна тези токсини засягат черния дроб и панкреаса, където предизвикват мастна дегенерация (Tubaro, et al., 2010).

На Фигура 23 е представено сравнение на изчислената остра експозиция на **йесотоксин** на българското население в случай на консумация на култивирани и диви миди от Българското Черноморие от пролет 2017 и лято-есен 2017. От пролет 2017 са обработени 45 проби миди. Йесотоксин е определен в 13 проби култивирани миди (4 проби от Север и 9 проби от Юг) и 6 проби диви миди от Север. От лято-есен 2017 са обработени 49 проби миди. Йесотоксин е определен в 15 проби култивирани миди (8 проби от Север и 7 проби от Юг) и 5 проби диви миди (3 проби от Север и 2 проби от Юг). В пробите от останалите сезони токсинът е определен в малък брой проби, по тази причина за тези сезони не е изчислена средна експозиция.

Данните показват, че най-висока е средната експозиция в случай на консумация на диви миди от лято-есен 2017, а максимална е експозицията при консумация на култивирани миди от пролет 2017. И в двата случая експозицията е значително по-ниска от предложената на ЕАБХ норма- ARfD 25 $\mu\text{g}/\text{kg bw}$ (EFSA, 2009d).

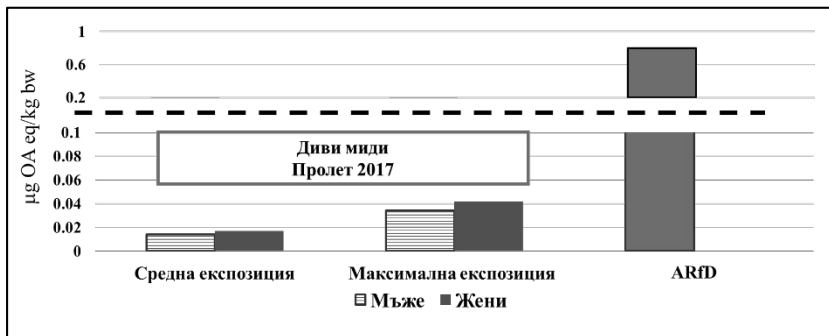


Фигура 23. Сравнение на средни и максимални стойности на остра експозиция на йесотоксин

Въпреки липсата на данни за интоксикация при хора в следствие на прием на **пектенотоксин-2**, поради високата токсичност, която показва RTX2 при експериментални животни, ЕАБХ определя норма за остра референтна доза от 0.8 $\mu\text{g}/\text{kg bw}$ (EFSA, 2009b).

На Фигура 23 е представено сравнение на изчислената остра експозиция на **пектенотоксин-2** на българското население в случай на консумация на култивирани и диви миди от Българското Черноморие от пролет 2017 и пролет 2018. От пролет 2017 са обработени 45 проби миди. Пектенотоксин-2 е определен в 4 проби култивирани миди (2 проби от Север и 2 проби от Юг) и 5 проби диви миди (2 проби от Север и 3 проби от Юг). От пролет 2018 са обработени 26 проби миди. RTX2 е определен в 2 проби култивирани миди от Север. В пробите от останалите сезони RTX2 не е открит, по тази причина за тези сезони не е изчислена експозиция.

Данните показват, че най-високи са средната и максимална експозиция в случай на консумация на диви миди от пролет 2017. И в двата случая експозицията е значително по-ниска от предложената на ЕАБХ норма- ARfD 0.8 $\mu\text{g}/\text{kg bw}$ (EFSA, 2009b)



Фигура 23. Сравнение на средни и максимални стойности на остра експозиция на пектенотоскин-2

При сравнение на експозицията и на трите токсина между половете се установява, че е незначително по-висока при жените във всички сезони и при всички видове миди. Причината е по-ниското средно телесно тегло при жените.

2.2. Хронична експозиция

Хроничната експозиция е многократно излагане на ниски или много ниски дози от определен токсин за дълго време. Оценката за хронична експозиция съответства на нивото на експозиция след дневна консумация например на миди (Andjelkovic, *et al.*, 2012). Тя може да бъде изчислена спрямо средната и максималната концентрация на определените токсини в мидите.

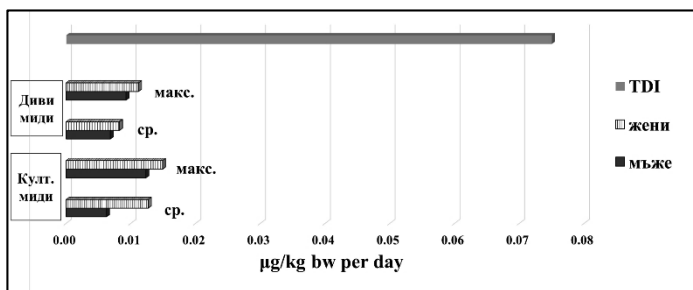
Оценката на хроничната експозиция е приложима само за DA, тъй като за RTX-2, и YTX няма данни за хроничните им ефекти при животни, така че не се установява допустим дневен прием (TDI). TDI за DA е 0.075 µg / kg bw/day (EFSA, 2009a).

Съвременните изследвания на DA върху човешкия организъм включват влиянието ѝ върху болестта на Паркинсон (Radad, *et al.*, 2018), както и нейните устойчиви невро-поведенчески ефекти от повтарящи се пренатални орални експозиции при ниски дози при мишки (Shiotani, *et al.*, 2017). Освен това се съобщава, че хроничното ниско ниво на

експозиция на DA причинява значителни нарушения на обучението и хиперактивност при мишки (Lefebvre, *et al.*, 2017). Следователно, оценката на хроничната експозиция е също важна във връзка с безопасността на мидите като храна.

През пролет 2017 от изследваните общо 45 проби миди. Домоена киселина е определена в 17 проби култивирани миди и 10 проби диви миди. В този сезон процентът на положителни проби за домоена киселина (60%) е най-голям като той е близък по стойност и за двата района на изследване. Това означава, че в този сезон консуматорите са имали потенциална възможност за хронична експозиция.

На Фигура 24 са представени данни за изчислените нива на средна и максимална хронична експозиция на домоена киселина за целия район на изследване от пролет 2017. Данните показват незначителна разлика както в средната хронична експозиция, така и в максималната хронична експозиция при консумация на култивирани и диви миди. И тук експозицията на домоена киселина при жените е по-висока отколкото при мъжете.



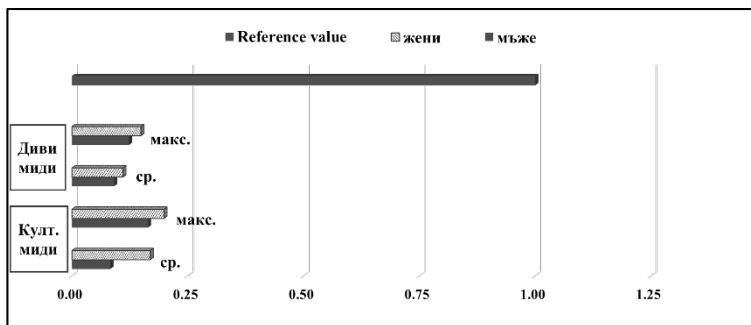
Фигура 24. Сравнение на средните и максимални стойности на хронична експозиция на домоена киселина

Данните показват незначителна разлика както в средната хронична експозиция, така и в максималната хронична експозиция при консумация на култивирани и диви миди. И тук експозицията на домоена киселина при жените е по-висока отколкото при мъжете. Максималната изчислена експозиция – $0.015 \mu\text{g} / \text{kg bw/day}$ е около 5 пъти по-ниска от определена от ЕАБХ норма – $0.075 \mu\text{g} / \text{kg bw/day}$ (EFSA, 2009a).

2.3. Коефициентът на опасност

Коефициентът на опасност (Hazard quotient, HQ) се прилага за изчисление на потенциалната експозиция на даден токсин, при която не се наблюдават нежелани ефекти. HQ представлява съотношението между средната хронична експозиция на даден токсин (CE) и възпитания допустим дневен прием (TDI) за същия токсин.

На Фигура 25 са представени данни за изчислените средни и максимални стойности на HQ за целия район на изследване от пролет 2017. Данните показват незначителна разлика както в средните, така и в максималните стойности на HQ при консумация на култивирани и диви миди. И тук експозицията на домоена киселина при жените е по-висока отколкото при мъжете. Максималният изчислен HQ – 0.02 (култивирани миди, жени) е около 5 пъти по-нисък от възприета референтна стойност (Reference value) – 1. Тъй като тази стойност е по-малка от 1, може да се направи извод, че не се очакват нежелани ефекти при консумацията на изследваните миди.



Фигура 25. Сравнение на средните и максимални стойности на коефициент на опасност на домоена киселина

2.4. Обобщение за оценка на безопасността на мидите като храна

Получените резултати за съдържанието на морски биотоксини са използвани за оценка на безопасността на мидите като храна. Замърсяването на мидите е оценено чрез сравнение с европейските норми, определени в европейските регламенти. За оценка на

безопасността изчислените остра, хронична експозиция и коефициент на опасност са сравнени със съответните здравни норми, предложени от ЕАБХ.

Резултатите за съдържанието на морски биотоксини в диви и култивирани миди показват, че замърсяването е под максимално допустимите граници за Европейския съюз.

Изчислената остра експозиция на определените токсини-домоена киселина, йстотоксин и пектентоксин-2 показва, че тя е значително по-ниска от референтните стойности (остра референтна доза), предложени от ЕАБХ. Следователно не се очаква риск за здравето на консуматорите.

Сравнението на изчислената хронична експозиция на домоена киселина с референтната стойност (допустим дневен прием), предложена от ЕАБХ, показва, че не може да се очаква риск за здравето на консуматорите.

Резултатите за коефициент на опасност на домоена киселина са значително по-ниски от единица. Това показва, че консумацията на миди не представлява риск за човешкото здраве.

V. Изводи

1. Обобщени и систематизирани са голяма част от европейските изследвания, както и тези за Черно море, за морски биотоксини в планктон и миди. Данните са използвани за сравнение с получените резултати от настоящото изследване.

2. За качествено и количествено определяне на морски биотоксини е приложена аналитична процедура, включваща течнoхроматографски метод с мас детекция, разработена за едновременно определяне на домоена киселина и липофилни токсини с цел спестяване на време и скъпи реактиви.

3. Изследвани са проби планктон, култивирани миди и диви миди за периода 2016-2018г. В трите вида проби са определени токсините – домоена киселина, йесотоксин и пектенотоксин-2. В трите вида проби са определени токсините – домоена киселина, йесотоксин и пектенотоксин-2. Резултатите са обобщени и сравнени:

- За планктон, диви и култивирани миди
- По сезони
- По райони на улов

4. В изследваните 66 проби планктон са определени токсините – домоена киселина, йесотоксин и пектенотоксин-2. Сравнение на количествените резултати показва:

- по сезони - наблюдава се значителна разлика между средната концентрацията на домоена киселина в различните сезони на изследване. При пектенотоксин-2 не се регитрират значителни колебания в средните нива на токсина.

- по райони - не се наблюдава статистически значима разлика между средна стойност на концентрацията на токсина домоена киселина в пробите от двата района (Север 75.2 ± 249.0 ng/g hp и Юг 47.9 ± 193.1 ng/g hp), както и между средната стойност на концентрацията на пектенотоксин-2 (Север 16.0 ± 87.8 ng/g hp и Юг 3.3 ± 9.9 ng/g hp).

5. В изследваните 81 проби култивирани миди са определени токсините – домоена киселина, йесотоксин и пектенотоксин-2. Сравнението на количествените резултати показва:

- по сезони - наблюдава се статистически значима разлика в средните нива на токсините домоена киселина и малки разлики в нивата на йесотоксин и пектенотоксин-2 за сезоните, в които са определени.

- по райони - не се наблюдава статистически значима разлика между средните стойности на концентрацията на токсина домоена киселина в пробите от двата района (Север 162.16 ± 333.64 ng/g hp и Юг 71.09 ± 156.70 ng/g hp), както и между средните стойности на концентрацията на пектенотоксин-2 (Север 0.06 ± 0.20 ng/g hp; Юг 0.06 ± 0.30 ng/g hp) и йесотоксин (Север 2.47 ± 4.35 ng/g hp и Юг 2.13 ± 4.68 ng/g hp).

6. В изследваните 50 проби диви миди са определени токсините – домоена киселина, йесотоксин и пектенотоксин-2. Сравнение на количествените резултати показва:

- по сезони - наблюдава се статистически значима разлика в нивата на токсините домоена киселина и малки разлики в нивата на йесотоксина.

- по райони - не се наблюдава статистически значима разлика между средните стойности на концентрацията на токсина домоена киселина в пробите от двата района (Север 107.18 ± 266.92 ng/g hp и Юг 141.73 ± 208.19 ng/g hp), както и между средните стойности на концентрацията на пектенотоксин-2 (Север 0.2 ± 1.2 ng/g hp; Юг (6.3 ± 16.0) ng/g hp) и йесотоксин (Север 1.6 ± 3.9 ng/g hp; Юг 0.4 ± 1.1 ng/g hp).

7. Сравнението на резултатите за диви и култивирани миди за целия период на изследване показва, че:

- йесотоксин е най-често срещаният токсин в пробите култивирани миди (38%).

- домоена киселина и йесотоксин са най-често срещаните токсини в дивите миди (и двата токсина в 30% от пробите).

- нивата на домоена киселина и пектенотоксин-2 са по-високи при дивите миди в сравнение с култивираните миди, докато при УТХ се наблюдава обратната зависимост.

8. Сравнението на резултатите за диви, култивирани миди и планктон по сезони показва, че:

- във всички видове проби се наблюдава значителна разлика между нивата на *домоена киселина* като най-високи са концентрациите в пробите от пролет 2017. Установените промени в концентрацията на *домоена киселина* в мидите съответстват с промените в нивата му и в пробите планктон.

- не се наблюдават значими разлики в средната концентрация на *йесотоксин* както при диви, така и при култивирани миди. Установените промени в концентрацията на *йесотоксин* в мидите не съответстват с тези при планктона.

- *пектенотоксин-2* се открива в малък брой проби миди. Наличието на *пектенотоксин-2* в пробите миди корелира със съдържанието му в пробите планктон.

9. Сравнението на съдържанието на морски биотоксини за всички проби миди по райони показва, че:

- средната концентрация на домоена киселина е близка в двата района на изследване.

- не се наблюдава значителна разлика между средните нива на йесотоксин в двата района на изследване.

10. Съдържанието на определените морски биотоксини в пробите миди и планктон е сравнимо с данните от други изследвания.

11. Резултатите за съдържанието на морски биотоксини в миди са използвани за изчисление на остра и хронична експозиция, както и за коефициент на опасност.

12. Направена е оценка на риска и безопасността на мидите като храна по следните показатели: сравнение на експерименталните резултати с максимално допустимите граници (норми) в ЕС, сравнение с остра референтна доза и допустим дневен прием. Резултатите показват, че съдържанието на определените морски биотоксини - домоена киселина, йестотоксин и пектенотоксин-2 в диви и култивирани миди е значително под възприетит максимално допустимите граници за Европейския съюз. Следователно не се очаква риск за здравето на консуматорите.

VI. Приноси

1. Направено е систематично изследване за наличие на морски биотоксини в проби планктон, диви и култивирани миди за периода 2016-2018 г. Определена е концентрацията на следните морски биотоксини- домоена киселина, йесотоксин, пектенотоксин-2. Направено е сравнение по видове проби, район на улов и сезон. Резултатите са сравнени с литературни данни за морски биотоксини от други морета.

Това е първото у нас изследване за морски биотоксини в морски организми.

2. Йесотоксин и пектенотоксин-2 се откриват за първи път по Българското Черноморие в планктон и миди, а домоена киселина – в планктон.

3. Резултатите за съдържанието на морски биотоксини са използвани за изчисление на остра и хронична експозиция, както и на коефициент на опасност.

4. Направена е оценка на безопасността и риска на мидите като храна чрез сравнение на резултатите с приетите норми в ЕС, както и като са използвани изчислените остра и хронична експозиция и коефициент на опасност.

5. Резултатите от изследването на морски биотоксини в планктон, диви и култивирани миди обогатяват данните за Черно море, които до този момент са много малко в сравнение с изследвания в други морета.

6. Резултатите за съдържанието на морски биотоксини могат да се включат в база данни за устойчиви органични замърсители, токсични метали и биотоксини в морски храни.

Списък на публикациите

1. Peteva Z, Krock B, Georgieva St, Stancheva M (2018) Occurance and variability of marine biotoxins in mussel (*Mytilus galloprovincialis*) and in plankton samples from Bulgarian coast in Spring 2017, SSRG – IJAES, 5 (4): 1-11 IF=1,47

2. Peteva Z, Georgieva St, Stancheva M (2019) Detected marine toxins in different trophic levels – study from Bulgarian South coast of the Black Sea, Annual of Sofia University “St. Kliment Ohridski”, Faculty of Biology, Book 4, 104: 189-198

3. Stancheva M, Peteva Z, Krock B (2019) Study on risk of exposure of seafood consumers in Bulgaria to hydrophilic marine toxins, Scripta Scientifica Medica, 5: 24-31

Списък на участия в научни форуми

1. 6thInternational Symposium Marine and Freshwater Toxins Analysis, 22-25 October 2017, Baiona, Spain. Presentation : First observation of domoic acid in plankton net samples and associated toxicity of shells *Mytilus galloprovincialis* from the Black Sea, Bulgaria; Peteva, Z.V., Georgieva, St., Krock B., Stancheva M., Makedonski, L.

2. 10th Congress of Toxicology in developing countries, April 18-21, 2018, Belgrade , Serbia. Georgieva, St., Peteva, Zl., Krock, B., Gerasimova, A., Stancheva, M. One-year study on exposure assessment to marine biotoxins via consumption of shellfish from the Black Sea, Bulgaria

3. ICCE 2019, 16.06-20.06.2019, Thessaloniki, Greece, Poster: Detection of domoic acid and lipophilic toxins in plankton and mussel

samples from Bulgarian north coast in 2017. Human exposure to marine toxins;

4. IMAB 2018, Varna, Bulgaria, 13-16 May, 2018. Peteva, Z., Georgieva, St., Gerasimova, A., Stancheva, M., Makedonski, L. Assessing the presence of marine toxins in bivalve mollusks in relation to human health

5. International Conference on Emerging Contaminants (EMCON), Oslo, Norway, 25-28th of June 2018. Mona Stancheva, Zlatina Peteva, Bernd Krock, Stanislava Georgieva, Anelia Gerassimova, Lubomir Makedonski, Evidence of emerging marine biotoxins on the Bulgarian Black Sea coast,

6. 130 ГОДИНИ СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ "СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ" КЛИМЕНТОВИ ДНИ 2018 БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ, София, България, 8-9.11.2018. ZLATINA PETEVA, M. Stancheva, S. Georgieva. FOOD CHAIN TRANSFER OF MARINE TOXINS

7. International Conference New Trends in Applied Chemistry, May, 24-26, 2018, Constanta, Romania, Zl.Peteva, A.Gerasimova, B.Krock, St.Georgieva, M.Stancheva, L.Makedonski. Summer profile of lipophilic toxins in shellfish from Bulgaria

Благодарности

Изказвам дълбокото си уважение и благодарност към научния си ръководител проф. дхн Мона Станчева за професионализма, ясните и целенасочени напътствия, както и за търпението, и неоченимата подкрепата през целия период на работа. Благодарности се поднасят и на ръководителя на катедрата „Химия“, както и на колегите, подкрепили тази научна работа.

Специална благодарност изказвам на д-р Бернд Крок за приноса му в изработването на научните експерименти, включени в настоящия труд.