

СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ „СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ“

Факултет по химия и фармация

Катедра „Аналитична химия“

Измерване и интерпретация на данни за екоотоксичност на пестициди и химично замърсяване в обекти от околната среда

Станислав Георгиев Захов

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд представен за присъждане на образователна и научна степен

„Доктор“

по професионално направление 4.2. Химически науки (Аналитична химия)

София, 2014г.

Дисертационният труд съдържа 121 страници, 12 таблици, 41 фигури и 155 цитирани източници.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от катедрен съвет на катедра „Аналитична химия“ при Факултет по химия и фармация на СУ „Св. Климент Охридски“.

Публичната защитата на дисертационния труд ще се състои на 2014г. от часа в Заседателната зала на Факултета по химия и фармация на СУ „Св. Климент Охридски“. Материалите по защитата са на разположение на интересуващите се в канцеларията на Факултета по химия и фармация на СУ „Св. Климент Охридски“.

Съдържание

Списък на използваните съкращенията	стр. 2
1. Въведение	стр. 3
2. Цели на дисертационния труд	
3. Методични подходи на изследванията	стр. 5
3.1. Тест на Еймс	стр. 5
3.2. NR метод	стр. 7
3.3. EROD метод	стр. 14
3.4. Microtox метод	стр. 18
3.5. Екометрични методи за анализ	стр. 20
3.6. Химичен анализ на PCDD/Fs в пестициди	стр. 28
3.7. Пробоподготовка на почвени екстракти	стр. 34
4. Резултати и дискусия	стр. 62
4.1. Определяне на токсичност в пестициди	стр. 62
4.2. Определяне на токсичност в почви	стр. 87
4.3. Хемометрична оценка на обекти от околната среда	стр. 98
5. Основни приноси на дисертационния труд	стр. 110
Списък на публикациите, включени в дисертационния труд	стр. 125

Списък на използваните съкращения

АГК	анализ на главни компоненти
DMCO	диметил сулфоксид
иРНК	информационна РНК
2,3,4,6-TeCP	2,3,4,6-тетрахлорофенол
2,3,7,8-TCDD	2,3,7,8-тетрахлородибензо- <i>p</i> -диоксин
2,4,5-Т	2,4,5-трихлорофеноксиоцетна киселина
2,4,6-ТСР	2,3,4-трихлорофенол
2,4-D	2,4-дихлорофеноксиоцетна киселина
AhR	ароматен въглеродороден рецептор (Aryl hydrocarbon receptor)
ARNT	транслокатор на AhR (Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator)
CNP	хлорнитрофен
CPs	хлорфеноли
CYP1A	Цитохром P4501A подсемейство на Цитохром P450
CYP450	Цитохром P450 суперсемейство
DRE	диоксин-отговорни елементи
EC ₅₀	ефективна концентрация на веществото, при която се наблюдава 50% от даден ефект при дадена популация (екотоксичност)
FAD – ФАД	флавин аденин динуклеотид
FAU	единици за мътност на формазин (formazin attenuation units)
FMN – ФМН	флавин мононуклеотид
H ₆ CDD	хексахлородибензо- <i>p</i> -диоксин
H ₇ CDD	хептахлородибензо- <i>p</i> -диоксин
HCB	хексахлоробензен
HSP90	белтък на топлинния шок
<i>in vitro</i>	процеси, които протичат в условията на изкуствена среда
<i>in vivo</i>	процеси, които протичат в условията на естествена среда
kb	килобаза, съставлява 1000 базови двойки в ДНК и РНК
LC ₅₀	концентрация на веществото, която предизвиква смъртност при 50% от изследвания вид
LOEC	най-ниската концентрация, при която се наблюдава даден ефект
NADP	никотин amid динуклеотид фосфат
NADPH – НАДФ.Н	никотинамид аденин динуклеотид фосфат (редуциран)
NOEC	концентрация, при която не се наблюдава даден ефект
OCDD	октахлородибензо- <i>p</i> -диоксин
OD ₅₉₅	оптична плътност при 595nm
P ₅ CDD	пентахлородибензо- <i>p</i> -диоксин
PAHs	полиароматни въглеродороди
PCBs	полихлорирани бифенили
PCDD/Fs	полихлорирани дибензодиоксини и фурани
PCDFEs	полихлорирани дифенилетери
PCNB	пентахлоронитробензен
PCP	пентахлорофенол
PCPP	полихлорирани феноксифеноли
PNAH	полихалогенирани ароматни въглеродороди
PVC	поливинил хлорид
TEF	фактор на токсичния еквивалент
TEQ	коефициент на токсичния еквивалент

1. Въведение

Всяко съзнателно или инцидентно освобождаване на химични вещества в околната среда води до химично замърсяване, което влияе върху състоянието на екосистемите. Изначалната ролята на химичните вещества в обществото е да се материализират в съзнателен човешки продукт, който да изпълнява своите функции в света на потреблението. Тяхното приложение, за съжаление, не винаги притежава само положителен аспект. Широкото навлизане на препарати в модерното общество, в т.ч. и в селското стопанство оставя своя отпечатък върху екосистемите. Значим проблем в екоотксикологията се явява оценяването на ефекта от употребата на пестициди върху биоразнообразието и ползите за екосистемите. Малко засегнат аспект представляват онечистванията в търговските препарати, в които се откриват съединения с токсично действие и устойчивост равностойни или дори по-високи от тези на активните субстанции. Неоценен проблем представлява присъствието на диоксини и фурани в селскостопанските продукти, за които липсват данни за влиянието им и токсичния ефект върху екосистемите. В резултат на голямата им персистентност и като съпътстващ страничен продукт в препаратите за растителна защита, диоксините и фураните представляват вторични източници на замърсяване.

Екоотксикологичните изследвания могат да бъдат съвместна част от физикохимичните методи за анализ и да послужат като параметър за оценяване на връзката между токсичност и химично замърсяване в обкръжавашата среда. Динамичният характер на екологичните обекти, както и комплексният вид на матриците за анализ обуславят необходимостта от коректно интерпретиране на резултатите, което налага приложението на екометрични подходи за моделиране и оценка на риска от замърсяване на екосистемите. Разумното прилагане екометричните модели позволява екологичната система и взаимодействията между всички обекти и променливи да бъдат пълноценно описани.

За настоящето изследване бе избрана тематика, която има пряко отношение към прилагането на методи за определяне на екоотксичност съвместно екометрична оценка на обекти.

2. Цели на дисертационния труд

Основна цел на дисертационния труд е приложението на методи за определяне на екоотксичност съвместно със съвременни физикохимични методи за анализ при изследването на обекти от околната среда и обекти, които пряко влияят върху състоянието и качеството на различни екосистеми.

В дисертационната работа основната цел може да се представи нагледно под формата на три задачи, формиращи основната идея.

Задача I – Изследване на свойствата и оценка на влиянието на пестициди и онечистванията в търговските продукти върху околната среда и предизвиканите екоотксикологични ефекти. Оценяване на необходимостта от мониторинг върху търговските химични продукти чрез система от биотестове и приложението им като съпътстващи изследвания при изучаване на въздействието им върху околната среда;

Задача II – Придобиване на представа за екоотксичността на почви въз основа на представените резултати от приложени изследвания с оригинални методи за определяне на различни видове механизми на токсичност, в частност разглеждане на адсорбционните и токсикологични свойства на обгорени и необгорени почви;

Задача III – Оценяване на екоотксичността на повърхностни, подпочвени води и води в седименти с използването на химични методи за анализ и мониторинг на води и

седименти, и методи за определяне на екоотоксичност, както и екометрично моделиране на получените данни от проведения мониторинг.

3. Методични подходи на изследванията

3.1. Тест на Еймс

Микрозомният *Salmonella typhimurium* тест (*Salmonella* тест или тест на Еймс), който е въведен преди повече от 35 години, е все още най-широко прилаганият метод за оценяване на мутагенна активност в лекарства, индустриални продукти и проби от околната среда. Тестът използва набор от предварително мутирани щамове на *Salmonella typhimurium*, които не позволяват на бактерията да синтезира необходимата за растежа ѝ аминокиселина хистидин и по този начин прави невъзможно развитието ѝ и образуването на колонии (хистидин-зависима бактерия). Появата на нови мутации на мястото на вече съществуващите мутации или на гените близо до тях могат да възстановят правилното функциониране на гените и да позволят на клетките да продуцират хистидин (хистидин-независими). По този начин новомутиралите клетки достигат изначалното си състояние на хистидин-независима бактерия и могат да се възпроизведат, и да образуват колонии в отсъствието на хистидин. Включените в теста щамове на *Salmonella* имат различни, изкуствено въведени мутации в хистидиновия оперон, като всяка от тези мутации е създадена така, че да бъде отговорна за вещества с различен механизъм на действие. Също така, за да бъдат щамовете по-чувствителни към широк спектър от ксенобиотици допълнителни мутации са въведени в генома на бактерията. Използваните в изследването щамове на *Salmonella* са съответно TA100 и TA98. Техният генотип и специфичност на действие са дадени в табл.1. Всички щамове са хистидин-зависими, вследствие на мутация в хистидиновия оперон. Допълнителните промени, въведени в щамовете включват мутации в участъка за *uvrB*, мутации в липополизахардиния слой и въвеждане на допълнителен плазмид в клетката.

Табл. 1. Генотип и специфичност на действие в ДНК последователността на използваните в изследването щамове на *Salmonella typhimurium*.

алел/щам	$\Delta(gal\ bio\ uvrB)$	ЛПЗ дефект	плазмид	ДНК мишена	мутация
<i>hisG46/TA100</i>	мутация чрез изрязване	<i>rfa</i>	pKM101	-G-G-G-	base-pair
<i>hisD3052/TA98</i>	мутация чрез изрязване	<i>rfa</i>	pKM101	-C-G-C-G-C- G-C-G-	frameshift

Някои вещества предизвикват единични промени в базите (мутации чрез заместване на базовите двойки, base-pair), докато други предизвикват добавянето или изключването на повече от една базови двойки (мутации с изместване на рамката на четене, frameshift)

В табл. 1 са дадени ДНК последователността на целеви мутации в използваните щамове на *Salmonella*. Алелът „*hisG46*“ в TA100 отговаря за замяната на аминокиселината левцин (GAG/CTC) с пролин (GGG/CCC). В случая става дума за точкова мутация, където един нуклеотид се замества с друг. Тази мутация се отнася до възвръщане към основно, първоначално състояние на бактерията, предизвиквано от замяна на базова двойка (base-pair мутация), главно в някоя от GC двойките. Мутацията *hisD3052*, която се наблюдава при щам TA98 представлява -1 мутация с изместване на

рамката на четене (frameshift - мутация), която засяга рамката за четене близо до повтарящата се –C–G–C–G–C–G–C–G– последователност.

Съществуват канцерогенни вещества, като ароматните амини, полициклените ароматни въглеводороди и полихлорираните дибензодиоксини и фурани, които са биологично активни, само когато биват метаболизирани до активните им форми. При животните и човека моноксигеназната система цитохром Р450, намираща се предимно в черния дроб и в по-малка степен в бъбреците, белите дробове и др. органи има способността да метаболизира подобни вещества в ДНК-активни, електрофилни форми. Някои от тях могат да имат свойствата на мощни мутиращи агенти. Тъй като бактерията не притежава подобна метаболизираща активност, за да се доближат условията до тези при бозайниците е необходимо включването на външна активизираща система съвместно с изследвания компонент. За тази цел се внася метаболизираща система добита от гризачи. Тя представлява супернатантна фракция от хомогенат на черен дроб на плъх при 9000 g, наричана S9-микрозомна фракция.

Когато мутагенният *Salmonella* тест е извършен в лаборатории, придържачи се към съответните стандартизационни процедури, тяхната повторемост и възпроизводимост достига до 84-87%. В настоящата дисертация се използва, т.нар. „Ames fluctuation“ метод (Флукуационен тест на Еймс). Той е съпоставим с традиционния по отношение на точност, като има няколко предимства, позволявайки да се работи с по-големи количества проба, по-лесно отчитане на положителните резултати в сравнение с броенето на колонии върху агарова среда, повишена чувствителност и по-добро приложение спрямо замърсители от околната среда с ниски концентрации.

Изпитваните вещества и проби се изследват в течна среда в 384-ямкови плаки. Бактерията е култивирана за една нощ в хранителен бульон и ампицилин 50 µg/mL при 37°C ± 1°C на клатачна машина (150 грm) с водна баня за не повече от 10 часа. Плътноста на инокулума се пресмята в единици за мътност на формазин (FAU – formazine attenuation units), като за щам TA98 са необходими 1800 FAU единици, докато за щам TA100 – 450 FAU единици. Измерва се абсорбцията при 595nm (OD₅₉₅) и се преизчислява необходимото количество от инокулума, което се разрежда със среда, съдържаща минимално количество хистидин (6,45 µM). Изследваните проби се разреждат в 24-ямкови плаки с диметилсулфоксид (ДМСО) и инкубират с разтвора на бактерията за 90 мин. при 37°C ± 1°C на клатачна машина при 150 грm, през което време бактерията започва да се размножава. Като празна проба се използва ДМСО, а като положителна проба се използват различни реактиви (табл. 2) в зависимост от вида на бактерията и употребата на ензим активизираща система (S9 mix). Инкубираната проба се разрежда 6 пъти с разтвор на индикатор (бромкрезол пурпур) и от всяка ямка на плаката се прехвърлят по 2,4 mL (аликвотни части от 50µL) в 48 гнезда от 384-ямкова плака. Така прехвърлените проби се оставят на тъмно в инкубатор за 48 часа при 37°C ± 1°C. Това време позволява, в случай че в изследваната проба има съединение с мутагенно действие, бактерията да мутира в първоначално състояние, което се изразява в синтезиране на хистидин, понижаване на рН на средата и преминаване на цвета на индикатора в жълт (pKa = 6,3).

Табл. 2. Контролни вещества, които се използват в зависимост от щама на използваната бактерия и добавянето на активизираща система.

Щам на <i>Salmonella typhimurium</i>	Присъствие на активизираща система S9-mix	Контролно вещество
TA98	-	4-нитро- <i>o</i> -фенилендиамин (4-NOPD)
TA100	-	нитрофурантоин (NF)

TA98	+	2-аминоантрацен (2-АА)
TA100	+	2-аминоантрацен (2-АА)

Критерий за валидност – тестът е валиден в следните случаи:

- средният брой на положителни резултати за празна проба (ДМСО) е > 0 и ≤ 5 за TA98 във всичките 48 гнезда и > 0 и ≤ 10 за TA100;
- средният брой на положителни резултати за контролните съединения е ≥ 25 във всичките 48 гнезда за двата вида щама (TA98 и TA100), независимо от присъствието или не на активиращата система (S9 mix).

3.2. Метод за определяне на цитотоксичност чрез поглъщане на багрилото неутрално червено (NR метод)

Взаимодействието на различни антропогенни вещества с организмите на първо място се осъществява на клетъчно ниво, правейки клетъчния отговор не само първата проява на токсичност, но и подходящ инструмент за ранно откриване на химическа експозиция. Клетките, които се използват в NR теста представляват фибробластподобна клетъчна линия RTL-W1, получена от черен дроб на дъгова пъстърва (*Oncorhynchus mykiss*). NR методът се основава на способността на багрилото „неутрално червено“ (N⁸,N⁸,3-trimethyl-2,8-phenazinediamine hydrochloride 1:1) да прониква в лизозомите на жизнеспособните клетки и да ги оцветява. Нейонизираната форма на багрилото преминава чрез дифузия през клетъчната мембрана и се свързва с части от лизозомния матрикс. Ксенобиотици, които увреждат плазмата или лизозомната мембрана намаляват проникването и задържането на багрилото, като резултат от това, мъртвите и увредени клетки не могат да задържат багрилото и след измиване на третираните клетки, то може да бъде определено спектрофотометрично. Съществува линейна зависимост между количеството на погълнатото багрило и броя на клетките.

Токсичността на изследваната проба се сравнява с тази на контролната проба и се определя концентрацията на пробата (изследваното вещество), която води до намаляване на 50% от абсорбцията на багрилото (NR₅₀). За всеки експеримент се осъществяват най-малко три повторения в различен ден, като всяка концентрация на пробата се разработва между шест и осем пъти.

NR методът се прилага за определяне на остра цитотоксичност на различни видове индустриални вещества като: метали, органометални съединения, различни фармацевтични препарати и проби от околната среда. Сред предимствата на метода се открояват неговата лесна употреба, бързина, възпроизводимост на резултатите, ниска цена и чувствителност.

Клетките се отглеждат в 75cm² съдове в среда на Лайбовиц (L15), с добавка от 10% ембрионален телешки серум и 1% разтвор на пеницилин/стрептомицин (10 000µg/mL и 1 000 mg/mL респективно в 0,9% NaCl), при 20°C. Преди да бъдат използвани в експеримента, клетките предварително се обработват с трипсин, използвайки разтвор на трипсин 0,5 g/L в 0,2 g/L разтвор на ЕДТА, еднократно се промиват с L15 среда и двукратно с PBS фосфатен буфер с рН 7,4. Ролята на трипсина е да спомогне за разкъсването и отделянето на клетките от стените на съда. Действието на трипсина се преустановява с добавянето на няколко милилитра среда на Лайбовиц (L15), която съдържа двузаредени йони (Ca²⁺), които инхибират действието на ензима. След промиване с PBS буфер, клетъчната култура е готова за прилагане в експеримента.

Острата цитотоксичност в изследваните проби се извършва чрез прилагането на метода на задържане на неутрално червено. Пробите се разреждат така, че да се достигне до концентрация на ДМСО, която е по-ниска от концентрацията, при която не се наблюдава ефект на цитотоксичност (NOEC) в RTL-W1 клетките. Тази стойност за ДМСО е 1%. Всеки екстракт от изследваните проби се поставя в 96-ямкова плака и се извършва 6-кратно разреждане със среда L15. Така разредените проби се инкубират в 96-ямкова плака с RTL-W1 клетки при 20°C за 48 часа. Като положителен стандарт се използва разтвор на 3,4-дихлорофенол с крайна концентрация в теста от 40 mg/L, докато като празна проба се използва чиста среда (L15) с добавка от пеницилин/стрептомицин и ембрионален телешки серум. След изтичане на времето за експозиция на клетките с екстрактите на пробите (48h), средата се изхвърля и клетките се инкубират с разтвор на неутрално червено (NR – 2-метил-3-амино-7-диметиламинофеназин) за 3 часа. Това време е достатъчно да позволи на багрилото да премине през клетъчната мембрана и да обагри здравите, незасегнати клетки. Плаките с пробите се изплакват двукратно с PBS буфер и се добавя екстрахиращ разтвор на оцетна киселина (10g/L в 50% етанол), който извлича в продължение на 30мин. багрилото от лизозомите на здравите клетки. Острата токсичност върху клетките се определя фотометрично като степен на поглъщане на неутрално червено от живите, незасегнати клетки при 540 nm. Жизнеспособността на клетките се изразява като процент от контролните проби и данните получени от измерването на пробите при съпоставянето им в сигмоидална крива от типа доза-отговор, използвайки софтуер – Prism 5.0. Цитотоксичността на пробите се изразява като NR₅₀ (концентрацията на пробата, която предизвиква 50% смъртност на клетките след 48-часово излагане на клетките под действието на екстрактите от изследваните проби). С цел изследване на сублетални процеси в клетките, по-нататък се определя и NR₈₀ стойностите на пробите. Резултатите от NR метода служат за определяне на подходящи разреждания на пробите за други *in vitro* изследвания, като напр. EROD метод. За да се разграничи цитотоксичността от други специфични ефекти, стойностите за NR₈₀ се използват като най-високи концентрации в изследванията на EROD активността.

3.3. 7-етоксирезорифин-*o*-деетилазна активност (EROD метод)

Веществата, които предизвикват токсичен ефект, сходен с този от 2,3,7,8-тетрахлородибензо-*p*-диоксин (TCDD), представляват интерес за токсикологията, т.к. при ниски концентрации оказват многостранни и разнопосочни действия върху широк спектър от животински видове. Сред ефектите, които предизвикват са: хепатотоксичност, ембриотоксичност, тератогенност, имунотоксичност, канцерогенност и висока остра токсичност. Част от биохимичните и токсични процеси на диоксиноподобните вещества се осъществяват чрез участието на ароматния въглеродороден рецептор (AhR) – белтък, който се намира в цитоплазмата и представлява лиганд-зависим фактор. Лигандите за AhR биват хидрофобни ароматни съединения с равнинна структура и размер, които позволяват свързването на веществата към определени места в рецептора. Тези диоксиноподобни или AhR-активни вещества включват хомолози от полихлорирани дибензодиоксини (PCDDs), полихлорирани дибензофурани (PCDFs), полихлорирани бифенили (PCBs), някои полиароматни въглеродороди (PAHs), полихалогенирани ароматни въглеродороди (PHAHs), полибромирани дифенилетири (PBDEs) и полохлорирани нафталени. Те могат да се свързват с AhR и да го активират, което води до промяна в генната експресия на някои от гените в ДНК молекулата. Един от процесите, който се регулира от ароматния рецептор е активирането на гена за цитохром P450-1A.

В повечето случаи диоксиноподобните съединения представляват смес от различни хомолози, във връзка с това е създадена система за категоризиране на веществата в зависимост от тяхната структура и степен на токсичност. Основна цел на системата е управление на данните, получени от хроматограмите и обединяване на индивидуалните концентрации в една единна стойност, наречена коефициент на токсичния еквивалент (TEQ). Чрез него получените от биотестовите резултати могат да бъдат сравнявани с тези, получени от инструменталните анализи (chemTEQ). Коефициентите на токсичния еквивалент (bioTEQ) свързват потенциала на активиране на AhR от дадена проба с потенциала на референтното вещество, т.е. 2,3,7,8-TCDD. На различните диоксиноподобни вещества са приписани различни фактори на токсичен еквивалент (TEF) спрямо TCDD, който се счита за най-токсичен от всички сходни представители и притежава токсичен еквивалентен фактор със стойност 1,0 (TEF=1,0). Приема се, че диоксиноподобните вещества оказват адитивен ефект и по този начин TEQ стойността на цялата проба може да бъде определена чрез сумиране на всички TEQ стойности за съответните съединения и крайният TEQ да бъде използван при оценката на риска от експозицията на веществата.

Броят на диоксиноподобните вещества е твърде голям, за да бъде оценен чрез *in vivo* изследвания върху цели организми. Два химични класа от съществено значение за екотоксикологията представляват полихлорираните бифенили, които се състоят от 209 хомолози и полиароматните въглеводороди, които включват няколко стотин представителя. Тъй като използването на *in vitro* тестове позволява бърза и надеждна оценка на факторите на токсичен еквивалент, няколко различни системи въз основа на клетки на риби са разработени, за да бъде оценена способността за активиране на цитохром P450 системата. Най-голям набор от диоксиноподобни съединения са били изследвани посредством клетъчната линия (RTL-W1) от черен дроб на дъгова пъстърва (*Oncorhynchus mykiss*), като данните са съпоставени с въздействието им върху цели организми.

Съществуват 75 хомолога на полихлорирани дибензодиоксини и 135 възможни хомолога на полихлорирани дибензофурани. Въпреки това само вещества със странично заместени хлорни атоми в позиция 2, 3, 7, и 8 са специфично токсични, т.к. другите представители не се свързват с активния център на ароматния въглеводороден рецептор и/или метаболизират по-бързо отколкото 2,3,7,8 – хомолозите. Всяко допълнително заместване с хлорни атоми, по-голямо от четирите места (2,3,7 и 8), води до намаляване на активността, като проявените токсични ефекти остават непроменени.

Ароматният въглеводороден рецептор в неактивно състояние се намира в цитоплазмата под формата на белтъчен комплекс с други белтъци, които стабилизират рецептора в конформация, която не позволява проникването му в ядрото на клетката, но е оптимална за свързването с лигандите. След захващането на лиганд, образуваният комплекс променя формата си и преминава в ядрото. Там, комплексът се разпада и AhR образува хетеродимер с белтъка, наречен ARNT (транслокатор на AhR). Димерът AhR/ARNT се свързва с ДНК на места, които се наричат диоксин-отговорни елементи (DRE), разположени в близост до гените, носещи информация за CYP1A1. Промоторите в ДНК молекулата присъединяват ензима РНК-полимераза и започва транскрипцията на гените, носещи информацията за активирането на монооксигеназната система. Синтезираната иРНК напуска ядрото и преминава в цитоплазмата на клетката, където с помощта на рибозомите образува комплекс и се осъществява транслация на информацията, в резултат на което се синтезира белтъчният комплекс цитохром P450 (CYP1A1). Към активираната системата се добавя 7-етоксирезорурфин, играещ ролята на външен субстрат. За инициране на реакцията се добавя НАДФН (NADPH), който участва с отдаването на електрон на

монооксигеназната система CYP1A1 и спомага за деетилирането на субстрата. Извършва се окислително дезалкилиране, което засяга α -въглеродния атом в етоксигрупата, една от най-характерните реакции за цитохром P450 ензимите. Полученото съединение резорурфин се определя флуориметрично при дължина на вълната на възбуждане $\lambda 544\text{nm}$ и дължина на емисия $\lambda 590\text{nm}$. Успоредно с определянето на активността на цитохром P450 се измерва и общото количество белтък, използвайки флуорескамин при дължина на вълната на възбуждане $\lambda 355\text{nm}$ и дължина на емисия $\lambda 590\text{nm}$. Крайната активност на ензима се изразява в образуваното количество резорурфин ($\text{pmol resorufin mg protein}^{-1} \text{ min}^{-1}$). Границата на откриване за TCDD в RTL-W1 клетки е 1pM TCDD в среда от 1% DMSO; EC50 около 5-15pM и линеен диапазон 2-25pM.

Клетките, които ще се използват за анализа предварително се обработват с PBS буфер, трипсин и L15 среда. Така получената суспензия от клетки се разпределя в 96-ямкови плаки и се инкубират за 72h на тъмно, при 20°C . Това време позволява на клетките да се прикрепят към основата на плаката и да започнат да се възпроизвеждат. След инкубирането, клетките се подлагат за 72h (на тъмно, при 20°C) под въздействието на серия от разреждания на изследваните екстракти (от 1:1 до 1:128), въз основа на NR₈₀ стойностите, получени от теста за цитотоксичност, които представляват най-високата концентрация на всяка една от пробите. Като положителен стандарт се използва разтвор на TCDD с начална концентрация 100pM, който се разрежда в серия от разтвори в концентрационен интервал от 3,125pM до 100pM. Като празна проба се прилага L15 среда. Въздействието на пробите върху клетките се прекратява след 72h, като средата се изхвърля от плаките и се поставят при -80°C . При тази температура клетките освобождават ензимите. Замразяването трае минимум един час. След размразяване, в празните гнезда на плаките се построява калибрационна крива от стандартни разтвори на белтъци (в концентрационен интервал $1,25 \div 10 \text{ mg/mL}$), серия от разреждания на резорурфин и разтвор на буфер (EROD буфер). Към всяка ямка от плаката, в която се намират RTL-W1 клетки се добавя разтвор на 7-етоксирезорурфин ($1,2\mu\text{M}$), след което плаките се оставят на тъмно за 10 мин. През това време протича реакцията с образуване на ензим-субстратен комплекс (комплекс между 7-етоксирезорурфин и цитохром P450). След точно 10 мин. се добавя във всички ямки от плаката разтвор на НАДФ.Н ($65,7\mu\text{M}$), като отново плаките се оставят на тъмно за 10 мин. НАДФ.Н в своята редуцирана форма отдава електрон на монооксигеназната система и протичат реакциите от цикъла на цитохром P450, където се извършва окисляване и деетилиране на субстрата. След изтичане на времето във всички ямки се добавя разтвор на флуорескамин ($0,54\text{mM}$) в ацетонитрил, който спира реакцията. След още 15 мин. се измерва флуориметрично EROD активността, при дължина на вълната на възбуждане $\lambda 544 \text{ nm}$ и на емисия $\lambda 590\text{nm}$. Количеството на общия белтък се определя по метода на образуване на флуорофор от вложения в плаките флуорескамин при дължина на вълната на възбуждане $\lambda 355\text{nm}$ и на емисия $\lambda 590\text{nm}$. Като модел концентрационните криви за активиране на 7-етоксирезорурфин деетилаза в RTL-W1 клетки се построяват чрез нелинейна регресия (GraphPad Prism 5) посредством уравнението на сигмоидална крива. Получените стойности за EC₂₅ на пробите и TCDD служат за определянето на bio-TEQs коефициентите по уравнението:

$$\text{Bio - TEQ} = \frac{\text{TCDD EC}_{25} \text{ (pg/mL)}}{\text{Sample extract EC}_{25\text{TCDD}} \text{ (g/mL)}}$$

3.4. Метод за определяне на остра токсичност чрез Microtox

Microtox системата е сред първите биотестове (1979г.), появила се като следствие от необходимостта от бърз тест за оценване на остра токсичност в проби от

околната среда. Методът се базира на измерване на промяната на емитирана светлина от люминесцентната бактерия (*Vibrio fischeri*) под въздействието на токсични вещества, намиращи се в пробата. Токсичността се изразява като EC_{50} – ефективната концентрация на пробата, която предизвиква намаляване с 50% на интензитета на емисията от тестовите организми при контролирани експериментални условия (обичайно след 15 min и при 15 °C).

Както при другите биотестове, така и при Microtox системата зависимостта между времето на експозиция и биологичния отговор е различен в зависимост от естеството на веществото и пробата, като за някои вещества е необходимо по-дълго време на контакт. По този начин ефективната концентрация може да се представи като EC_{80} , EC_{50} , EC_{10} или EC_5 , която да служи за определяне на най-ниската концентрация, предизвикваща ефект (LOEC), или като EC_{50} (5 min), EC_{50} (15 min) за наблюдаване на ефекта в зависимост от времето на експозиция.

Въпреки че в литературата се дават данни както за EC_{50} (5 min), така и за EC_{50} (15 min), времето от 15 min се приема като стандартно време при измерване на токсичността.

Microtox тестът се осъществява съгласно стандарта ISO 11348-3, като лиофилизираната бактерия се рехидратираща с разтвор за хидратиране, като по-нататък се приготвя 11-кратно разреждане на бактериалната суспензия. Различни разреждания на пробата се добавят към бактериалната суспензия и след определеното време на контакт с бактерията се измерва люминесценцията. Измененията на емисията се съпоставят спрямо емисията на празна проба, отчитайки естествените флукутации във времето и разрежданията на пробите. От многобройно проведените междулабораторни изследвания като стандартни вещества за определяне на токсичността се прилагат разтвори на Zn^{2+} ($ZnSO_4$) и фенол при определянето на токсичност от тежки метали или органични замърсители. Стойностите на резултатите EC_{50} се определят спрямо логаритмичната зависимост на концентрацията (дозата) и намаляващата емисия (%) или т.нар. „гама“ стойности спрямо концентрацията („гама“ представлява корекция на отношението на намаляването на емисията при дадено време спрямо емисията при същото време за дадена концентрация на пробата)

$$R_t = \frac{I_t}{I_0}$$

$$G_t = \frac{R_t \times I_0}{I_t} - 1$$

където: R_t е корекционен фактор, който отчита емисията на празната проба (I_t) при време, t спрямо първоначалната емисия на празната проба на бактерията (I_0). G_t – гама стойност на дадена проба при определена концентрация.

Сред всички биотестове, Microtox тестът е най-широко прилаганият метод за определяне и ориентираща преценка на токсичността на химически субстанции, проби от околната среда (води, почви, седименти, въздух), отпадъци, отпадъчни води и др. Характеризира се с висока повторимост и възпроизводимост на получените резултати (коефициент на вариация между 10 – 20%), като в резултат на това е сред първите стандартизирани биотестове.

Microtox системата показва високи стойности на корелационния коефициент (r^2) при съпоставянето ѝ с други тестове за остра токсичност, като напр. средният корелационен коефициент спрямо теста за остра токсичност с дъгова пъстърва е 0,83. Едно от основните приложения на теста е ефективната му роля като скринингов метод при мониторинга на голям брой проби от околната среда, в условия на система за ранно

предупреждение за присъствието на токсични материали в природата преди да настъпят остри екологични последици.

3.5. Екометрични методи за анализ

Кластерен анализ

Кластерният анализ прави възможно изясняването на структурата на данните; факторите, определящи тази структура; кои обекти могат да участват във вътрешногруповия модел и кои характеристики описват адекватно изследваните обекти и явления. Целта на кластеритането е не само да подреди по определен начин данните, но и да открие известна структурност в тях, да намери параметрите, които водят до организирането на данните в различни структури. Основен принцип на кластерния анализ е, че колкото повече си приличат два обекта, толкова по-близко един до друг са разположени те в пространството на обектите. Това води до необходимостта от процедура, която да позволява измерването на разстоянието между обектите и групирането на обектите, които са разположени достатъчно близо един до друг. В резултат на това се прилага т.нар. агломеративен подход, при който всеки обект се разглежда като отделен кластер и отделните обекти първоначално образуват малки по размер кластери, които след обединяването им се получават по-големи.

За да може резултатите от различните видове експерименти, които имат обикновено различен количествен характер, изразен в различни скали, да бъдат сравнявани е необходимо преобразуване на всички измервания в една единна скала и елиминиране на ефекта от абсолютната големина на променливите. Една такава процедура на стандартизиране на стойностите е т.нар. z-трансформация или автоскалиране.

Преди да се започне с групирането на обектите е необходимо да се дефинира някаква мярка на подобие между тях. Всеки обект трябва да се сравни с всеки един от останалите и онези, които се окажат достатъчно подобни, ще се отнесат към един и същ кластер. Най-често като мярка за подобие в кластерния анализ се използва т.нар. Евклидово разстояние между обектите. То описва разстоянието между два или повече обекта (напр. А и В) със следната формула:

$$D_{AB} = \sqrt{\sum_{j=1}^n (x_{Aj} - x_{Bj})^2}$$

След избора на мярка за подобие, трябва да се избере алгоритъмът, по който ще се извърши кластерният анализ. В повечето случаи се подбира алгоритъм, чрез който се получава ясна за интерпретиране структура на данните. Прилаган в дисертацията алгоритъм при анализа на данни е т.нар. йерархичен подход. От своя страна йерархичното кластериране може да се проведе чрез агломерирание или чрез разделяне на кластери.

При агломеративните методи се започва от m обекта, при което на всеки етап двата обекта, които си приличат най-много се обединяват в един кластер. След $m-1$ етапа всички обекти принадлежат на един общ кластер. Като метод за агрегиране често се използва методът на най-близкия съсед (метод на единичната връзка), при който разстоянието между два кластера се взема за равно на най-малкото разстояние между два индивидуални обекта.

Броят на статистически значимите кластери се определя чрез построяване на графична зависимост на сумата от вътрешногруповите (кластерни) дисперсии спрямо

боя на кластерите. За статистически значими се определят кластерите, които са образувани от обекти при $1/3D_{\max}$ или $2/3D_{\max}$, където D_{\max} е максималното разстояние на подобие между обектите.

Анализ на главни компоненти

За интерпретирането на латентните и сложни отношения между характеристиките в набора от данни се прилага метод, нар. анализ на главни компоненти (АГК). Характеристиките, които имат сходен характер се обединяват и трансформират в нов вид характеристики – фактори като последните не корелират по между си.

Целта на факторния анализ е да раздели дисперсията в матрица от данни на една част, която се променя само с променливите и една част, която се променя с обектите. Параметрите, които се изменят с променливите се наричат факторни натоварвания, докато параметрите, изменящи се с обектите представляват факторни коефициенти (компоненти). Тези нови характеристики обясняват общата дисперсия на данните.

При АГК се извършва нормализиране по факторните натоварвания като се получават т.нар. собствени вектори, които съдържат ненормализираните коефициенти на факторните натоварвания. Тези факторни натоварвания имат смисъла на статистически тегла (със стойности $0 \div 1$) и отразяват участието на изходните характеристики в дадения фактор. Собствени вектори от своя страна се характеризират със стойности, които се наричат собствени стойности на корелационната матрица. Те са мярка за обяснената чрез факторите обща дисперсия на корелационната матрица.

Съществен етап във факторния анализ е определянето на боя на значимите фактори r , т.е. оценка на значимите произведения в модела и намирането на каква част от дисперсията е систематична и каква – случайна. При избора на фактори се използват следните четири правила:

1. Използват се толкова фактори, колкото е необходимо за описание на преобладаващата част от матрицата, обикновено до 90% от дисперсията \hat{y} ;
2. Използват се толкова фактори, така че остатъчният член да има дисперсия, съответстваща на познатата възпроизводимост на данните;
3. Използват се само фактори със собствена стойност по-голяма от 1, което означава, че факторът съдържа параметри от две променливи;
4. Използват се само фактори, които повишават прогностичната възможност на модела.

Участието на много изходни характеристики в един фактор прави невъзможно неговото интерпретиране. С цел опростяване на факторната структура се прилага ротация на координационната система на факторите като разположението на обектите един спрямо друг не се променя. Опростената факторна структура може да се постигне чрез неортогонална трансформация (Varimax rotation). В повечето екометрични изследвания новополучената факторна структура описва антропогенните и природни фактори, въздействащи върху изследваните обекти.

3.6. Химичен анализ на PCDD/Fs в пестициди

Полихлорирани динебзодиоксини и фурани в изследваните проби са извлечени чрез ускорена Сокслет екстракция с толуен за 8h. Полученият суров екстракт претърпява предварителна обработка с концентрирана сярна киселина. След това екстрактите се пречистват чрез Powerprep™ автоматизирана система (Fluid Management Systems, Waltman, MA, USA), където екстрактите преминават през многопластова колона с последователност от неутрален/кисел/основен силикагел/основен алуминиев оксид, първоначално с хексан, последван от

дихлорметан:хексан (2:98) и дихлорметан:хексан (50:50). Фракцията с дихлорметан:хексан (50:50) се прехвърля върху колона с активен въглен като първоначално се елуира с етил ацетат:толуен (50:50) в права посока и с толуен в обратна посока. Събират се извлеките с толуен и се концентрират. Така концентрираните екстракти се инжектират в газов хроматограф с високоразделителен масспектрометър (HRGC/HRMS). Хроматографският анализ е извършен на MAT95XL HRMS (ThermoFinnigan MAT GmbH, Bremen, Germany) масспектрометър и Agilent GC (Palo Alto, USA) газов хроматограф, снабден с автоматичен инжектор CTC. Използвана е капиллярна колона DB-5MS, при следната температурна програма: 100÷200°C при 40°C/min; 200÷235°C при 3°C/min и 235÷310°C при 5°C/min. Температурата на инжектора е 290°C. Като газ носител се използва хелий, със скорост на газовия поток 1,0 mL/min. Йонизационната камера в масспектрометъра работи при 240°C и при 70eV, като масспектрометърът е в режим на разделителна способност около 10 000.

PCDD/Fs са определени по метода на изотопното разреждане, използвайки вътрешен стандарт, който включва 15 ¹³C₁₂ 2,3,7,8-заместени PCDD/Fs (Wellington Laboratories, Ontario, Canada). За определянето на OCDF и 1,2,3,7,8,9-H₆CDD са използвани ¹³C₁₂ OCDD и средният отговор от белязаните аналози на други два стандарта на 2,3,7,8-H₆CDD.

Идентификацията и определянето на PCDD/Fs хомолози се извършва съгласно процедурите на методите 1613 и 8290a на U.S. EPA. За положително идентифициране и определяне са въведени следните критерии: време на задържане (RT) на 2,3,7,8-заместените хомолози в рамките на 2s от съответния белязан (¹³C₁₂) стандарт; съотношението на йоните в рамките на 15% от теоретичното отношение; по-голяма стойност на отношението сигнал:шум от 3:1; нива на индивидуалните PCDD/Fs хомолози в пробите 3 пъти по-големи от нивата на същите хомолози в празните проби, както и 25-150% аналитичен добив на белязаните стандарти. Аналитичният добив за всички проби е между 31% и 79%.

Токсичният еквивалент (TEQs) е определен съгласно най-актуалните стойности на TEFs спрямо Световната здравна организация (СЗО).

3.7. Пробоподготовка на почвени екстракти при определяне на токсичност

Почвите са взети на 25 см от повърхността на почвения слой и изсушени за 24 h при 80°C. След стриване в хаван почвите преминават през сито с размери под 100 µm (при експериментите с биотестове). Направени са три вида екстракти в зависимост от полярността на разтворителите, които се използват.

Екстракция с хексан и ацетон: при този вид екстракция се вземат 20g проба, която се подлага за 16 h на Соклет екстракция със смес от хексан и ацетон (1:1). Пробите се екстрахират и получените извлекци се изпарават до няколко милилитра (~2mL) на ротационен вакуум-изпарител. Пробата се прехвърля количествено и изпарява до сухо под поток от азот. Сухият екстракт се разтваря в 1 mL ДМСО, като се получава крайна концентрация на пробата – 20 g/mL.

Екстракция с метанол и вода: вземат се 20g проба и се екстрахират на клатачна машина при 20°C за 2 h със смес от метанол и вода (1:1). Пробите се центрофугират при 1900 оборота и 20°C. Течната фаза се филтрува през филтър синя лента и се екстрахира с дихлорметан. Получените извлекци се изпаряват на ротационен вакуум-изпарител до няколко милилитра (~2mL), прехвърлят се количествено и се изпаряват до сухо под поток от азот. Сухият екстракт се разтваря в 1 mL ДМСО, като се получава крайна концентрация на пробата – 20 g/mL.

Екстракция с хексан: екстракцията се осъществява по аналогичен начин на екстракцията с хексан и ацетон.

4. Резултати и дискусия

4.1. Определяне на токсичност на пестициди

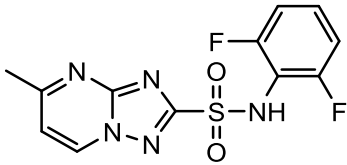
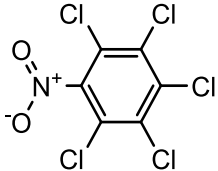
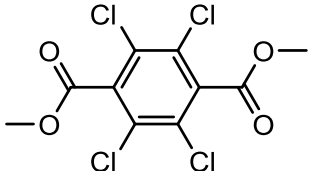
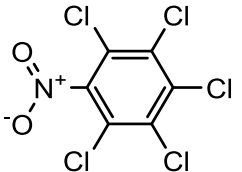
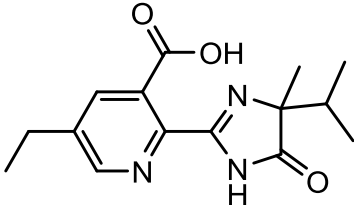
Онечистванията в пестицидите сами по себе си могат да притежават токсичност равностойна или дори по-висока от тази на основния компонент, както и да предизвикат изменение на токсичността чрез синергизъм, антагонизъм или друг вид действие (мутагенно, канцерогенно и др.). Разбирането на опасността за околната среда, произтичаща от употребата на технически чисти препарати от рода на пестицидите, както и изясняването на екотоксикологичните ефекти от онечистванията представляват основен интерес в настоящата част от дисертационната работа. За тази цел са избрани пет търговски достъпни препарата, въз основа на онечистванията от диоксини и фурани.

Избраните пестициди в настоящето изследване са :

1. Broadstrike – продукт на фирмата „Dow Agrosiences“;
2. Chloroturf DG и Quintozene 750 – „Barmac Industries Pty Ltd.“;
3. Dacthal 900 WG и Raptor – „Crop Care Australia Pty Ltd.“.

Имената, структурните формули на активните вещества, приложението им и чистотата на техническите продукти са дадени в **табл. 3**.

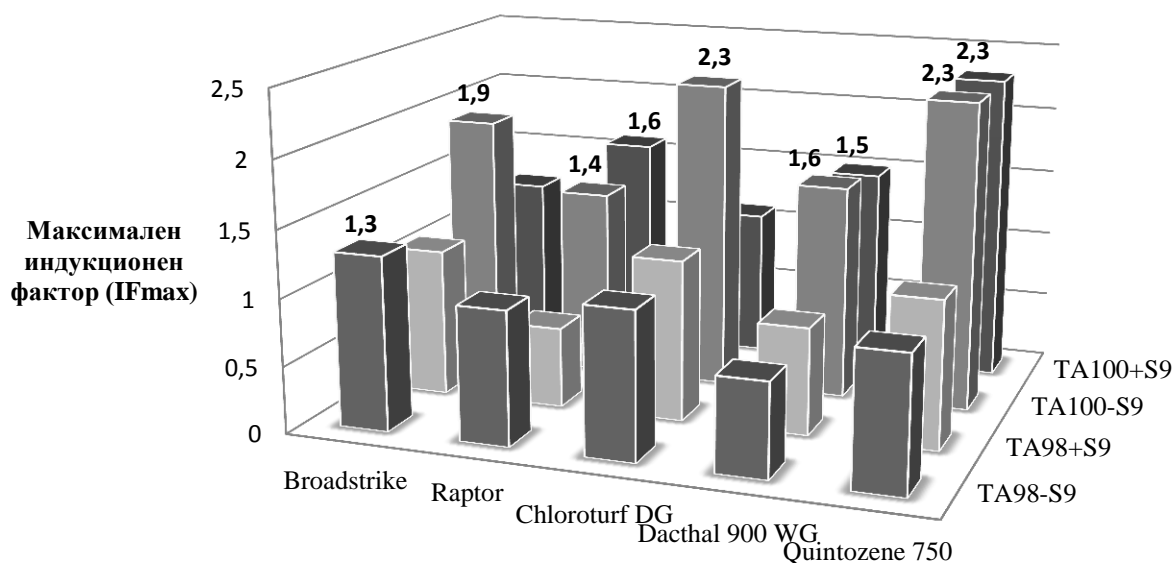
Табл. 3. Характеристика на изследваните пестициди

Пестицид	Активен компонент	Химична структура на активния компонент	Наименование по IUPAC	Чистота на техническия продукт, %	Приложение
Broadstrike	Flumetsulam		N-(2,6-difluorophenyl)-5-methyl-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidine-2-sulfonamide	800 g/kg	Хербицид
Chloroturf DG	Quintozene		Pentachloronitrobenzene	750 g/kg	Фунгицид
Dacthal 900WG	Chlorthaldimethyl		dimethyl 2,3,5,6-tetrachloroterephthalate	900 g/kg	Хербицид
Quintozene 750	Quintozene		Pentachloronitrobenzene	750 g/kg	Фунгицид
Raptor	Imazamox		2-(4,5-dihydro-4-methyl-4-(1-methylethyl)-5-oxo-1H-imidazol-2-yl)-5-ethyl-3-pyridinecarboxylic acid	700 g/kg	Хербицид

Флукуационен тест на Еймс

Първоначалната концентрация на всеки пестицид е около 5 mg/mL в ДМСО. Концентрационният интервал е от 16,7 µg/mL до 0,5 µg/mL при серия от пет разреждания при съотношение 1:1.

Потенциалът от възникване на мутации на изследваните пестициди, независимо от прилагането на външна езимна система (S9), е представен на **фиг. 1**. Всички изследвани вещества предизвикват генотоксични изменения. Най-високи нива на мутагенна активност се наблюдават в условията на TA100 без добавяне на метаболитна система, т.е. възникване на мутации вследствие на погрешно сдвояване на азотните бази от вещества с директно мутагенно действие. Стойностите на максималния индукционен коефициент за всеки изследван препарат, както и условията, при които е отчетен са дадени в **табл. 4**. Максимален индукционен коефициент се отчита при пестицидите Broadstrike (IF_{max} 1,9), Chloroturf DG (IF_{max} 2,3) и Quintozene 750 (IF_{max} 2,3). Интересно е да се отбележи, че Chloroturf DG не проявява генотоксично действие в присъствие на метаболитна система (S9), въпреки че активната субстанция в препарата е идентична с тази на Quintozene 750, докато при последния се наблюдават мутации с изместване на рамката на четене в условия на метаболизираща система и максимален индукционен коефициент от 2,3. В допълнение и двата пестицида проявяват генотоксично действие в условията на TA100 – S9 с еднакви стойности на индукционния коефициент (IF_{max} 2,3). Други два пестицида (Dacthal 900 WG и Raptor) показват по-ниски нива на генотоксичност. Предизвиканите мутации са от вида на погрешно сдвояване на базите, като имат близки по стойности индукционни коефициенти (**табл. 4**) както по отношение на вида мутации, така и по отношение на условията на експеримента, т.е. дали са проведени в присъствието на метаболизираща система или не.



Фиг. 1. Максимални индукционни фактори, получени от концентрационните криви на всички проби (при концентрации по-ниски от 16µg/mL), изследвани чрез теста на Еймс посредством два основни щама на бактерията *Salmonella typhimurium* (TA98 и TA100), в присъствието или не на външна ензимна система.

Табл. 4. Максимални стойности на индукционния фактор, получени при въздействието на изследваните пестициди върху TA98 и TA100 щамове на *Salmonella* в различни условия на присъствие на метаболизираща система (S9).

	Broadstrike	Raptor	Chloroturf DG	Dacthal 900 WG	Quintozene 750
TA98-S9	1,3	1,0	1,1	0,7	1,0
TA98+S9	1,1	0,6	1,2	0,8	1,1
TA100-S9	1,9	1,4	2,3	1,6	2,3
TA100+S9	1,2	1,6	1,1	1,5	2,3

Няколко изследвания показват, че въпреки доказаната канцерогенност на PCDD/Fs и в частност TCDD, тези вещества не са директно ДНК свързващи се молекули и участват чрез косвен механизъм, т.е. като промотори, в процеса на канцерогенеза (представяват т.нар. епигенетични канцерогени). Като доказателства на това заключение се приемат липсата на установени ДНК адукти, както и отрицателните резултати в повечето генотоксични изследвания въз основата на щамове на *Salmonella*. Това твърдение е в съответствие с наблюдаваните резултати, където във всички тествани пестициди е установено присъствието на диоксини и фурани.

В направените изследвания препаратите Quintozene 750 и Chloroturf DG не показват способност за предизвикване на мутации, засягащи рамката на четене, което е в съгласие с публикуваните данни за основния активен компонент, пентахлоронитробензен (PCNB), който няма мутагенна активност в условията на щам TA98. За разлика от резултатите, получени при щам TA98, резултатите, получени от въздействието на двата пестицида върху щам TA100 са на пръв поглед противоречиви. И двата препарата предизвикват мутации с промяна на вдвояването на азотните бази в отсъствието на метаболизираща система, както и в присъствието на системата по отношение на препарата Quintozene 750. В литературата активният компонент (PCNB) е описан предимно като вещество без мутагенни и генотоксични свойства при изследвания с щамове на *Salmonella*. Следователно получените резултати не могат да бъдат приписани на активния компонент, нито на присъстващите в пробите диоксини и фурани, които не са активни в теста на Еймс. Наблюдаваните ефекти могат да се дължат на присъствието на друг вид онечиствания, които обичайно се намират в техническите продукти, където PCNB е активна субстанция. Сред тези онечиствания най-често се откриват пентахлороанилин (PCA), хексахлоробензен (HCB) и пентахлоробензен (PeCB). Тези съединения се откриват и като метаболити от разпадането на активния компонент, като PCA и PeCB са основните метаболити, откриващи се в почвите, растенията и животните, докато метаболитите HCB, пентахлорофенол (PCP) и пентахлоротиоанизол присъстват в по-малки количества.

В случая с препарата Broadstrike, където активната субстанция е Flumetsulam и принадлежи към групата на сулфонамидните хербициди, високите стойности на индукционния фактор се наблюдават в резултат на възникване на двата вида мутации: промяна в рамката на четене, както и изменения при вдвояването на азотните бази. Тези мутации се причиняват от директното въздействие на препарата върху бактерията. Наблюдаваните мутации, които засягат рамката на четене могат да се обяснят с това, че молекулата на активния компонент представлява N-хетероциклено съединение, което се характеризира с мутационна активност, която се проявява при TA98 щама. Въпреки това в литературата се срещат и данни, че активното вещество (Flumetsulam) не проявява генотоксични свойства, както и че активното вещество не проявява генотоксичност по отношение на щам TA100.

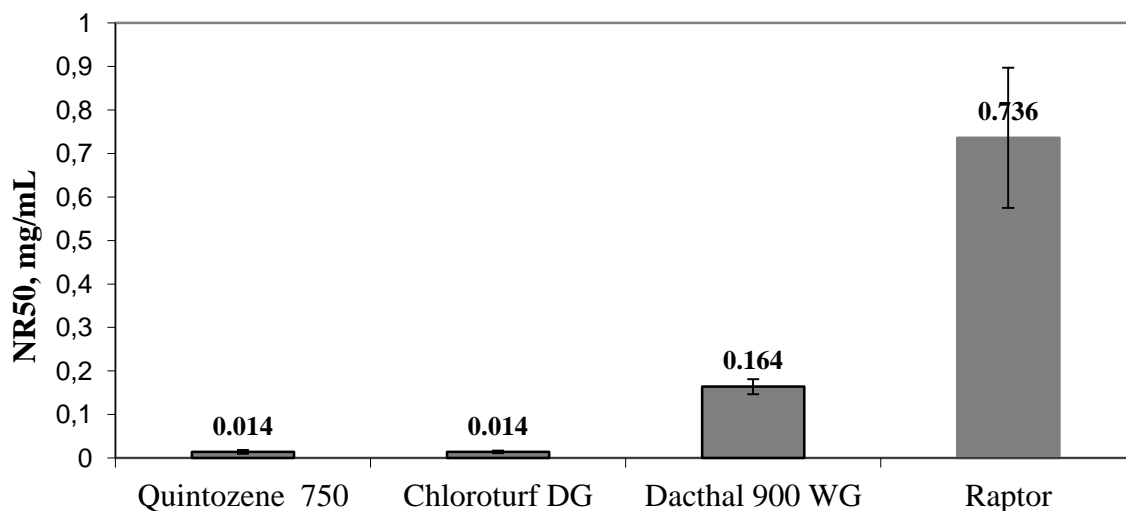
По отношение на препарата Raptor, който съдържа Imazamox като активен компонент, получените резултати са в съответствие с данните, които са публикувани и показват слаб до незначителен генотоксичен ефект при високи концентрации. Може да се

заклучи, че наблюдаваният генотоксичен отговор се дължи предимно на активната субстанция, отколкото на вероятни онечиствания в техническия препарат.

Другият изследван пестицид е Dacthal 900 WG, който предизвиква мутации с промяна при сдвояването на базите независимо от присъствието или не на метаболизираща система със стойности на IF_{max} 1,5 при TA100+S9 и IF_{max} 1,6 при TA100-S9 респективно. Информацията относно мутагенната активност на веществото чрез *Salmonella* теста до момента не е налична. То метаболизира в присъствието на метаболизиращата система до неговото монометил производно, 2,3,5,6-тетрахлоромонометилтерефталат. Получените резултати са в съгласие с данните в TOXNET базата данни, където активното вещество е оценено като положителен мутаген спрямо плъхове като тестови организми, но само при значителни приети дози.

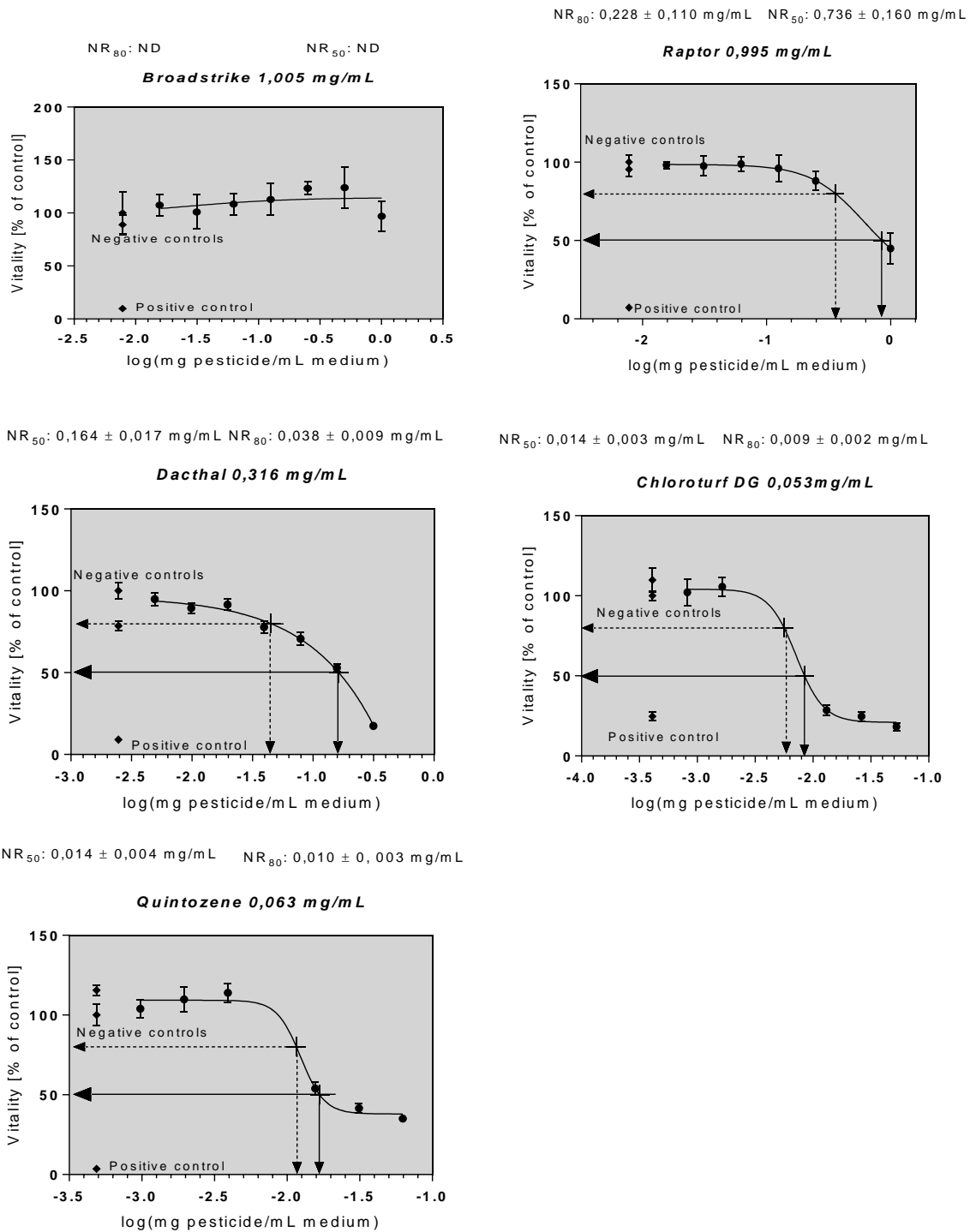
Определяне на цитотоксичност по метода на поглъщане на неутрално червено (NR метод)

Цитотоксичността на изследваните пестициди върху клетъчната култура (RTL-W1) е представена като концентрацията, която позволява на 50% от популацията преживяемост за времето на въздействие, 48h (NR_{50}) или 50% смъртност. На **фиг. 24** са съпоставени ефективните средни концентрации за всяка една от пробите. Концентрационните криви на всеки един от пестицидите са представени на **фиг. 25**. Почти всички изследвани проби предизвикват остра цитотоксичност, като се наблюдават значителни разлики в ефективните концентрации на различните вещества. Концентрационният интервал, при който първоначално са изследвани пестицидите е от 50,0 $\mu\text{g/mL}$ до 0,8 $\mu\text{g/mL}$. Най-силно токсичните представители са Chloroturf DG и Quintozene 750, където и в двете субстанции активното вещество е пентахлоронитробензен (PCNB). Изчислените концентрации, предизвикващи остра цитотоксичност добре корелират помежду си, като получените концентрации са: NR_{50} 0,014 \pm 0,003 mg/mL за Chloroturf DG и NR_{50} 0,014 \pm 0,004 mg/mL за Quintozene 750. Това може да се обясни с цитотоксичното действие на активния компонент в търговските продукти. В съответствие с получените резултати са и данните за остра токсичност в USEPA базата данни, където пентахлоронитробензенът има от средна до висока остра токсичност. Междинна стойност за цитотоксичност се наблюдава по отношение на препарата Dacthal 900WG (NR_{50} 0,164 \pm 0,02 mg/mL), докато Raptor (NR_{50} 0,736 \pm 0,160 mg/mL) показва най-ниска цитотоксичност при сравняване с предизвиканата токсичност от останалите тестовани пестициди, с изключение на препарата Broadstrike, при който не се наблюдава цитотоксично действие дори при концентрации 1000 $\mu\text{g/mL}$. Слабата токсичност на Raptor се илюстрира и с голямо стандартно отклонение и разсеяност на получените данни. Последните два препарата (Broadstrike и Raptor), които представляват хербициди се характеризират със сравнително ниски нива на токсичност спрямо бозайници и други видове животни и поради тази причина намират голямо приложение.



Фиг. 2. Цитотоксичност, определена чрез RTL-W1 клетки на разтвори на пестициди по метода на поглъщане на неутрално червено. Данните са дадени като средна стойност на NR₅₀ (mg/mL, ефективна концентрация на всяка проба, разрежена със среда L15, която предизвиква смъртност на 50% от тествните клетки) от три експеримента (всеки с шест повторения). С нарастване на цитотоксичността, концентрацията, която предизвиква ефекта намалява.

Силният цитотоксичен ефект от някои от субстанциите подчертава практическото значение от използването на тестови организми с цел оценяване на въздействието на околната среда от различни химични съединения. Въпреки това, клетъчната култура, използвана в това изследване измерва токсичност, която се изразява в нарушение на целостта на клетъчната мембрана. По абсолютни стойности острата цитотоксичност на клетъчната култура (както и на повечето *in vitro* методи) и ефективната концентрация са с един-два порядъка по-високи (по-ниска чувствителност) в сравнение с острата токсичност при цели организми. Бионаличността на изследваните вещества е по-ниска, както и останалите начини на въздействие върху организмите са пренебрегнати в условията на клетъчните култури. Въз основа на проведените експерименти може да се обобщи, че изследваните пестициди могат да окажат вероятен негативен ефект върху водни организми в случаите на инфилтриране на пестицидите във водни екосистеми.



Фиг. 3. Концентрационни криви на изследваните вещества: NC – празна проба (L15 среда); PC – стандарт на дихлорофенол; NR₅₀ – концентрация на съответното вещество, която предизвиква смъртност на 50% от изследваните клетки; NR₈₀ – концентрация на изследвания пестицид, при която 80% от клетките остават непроменени.

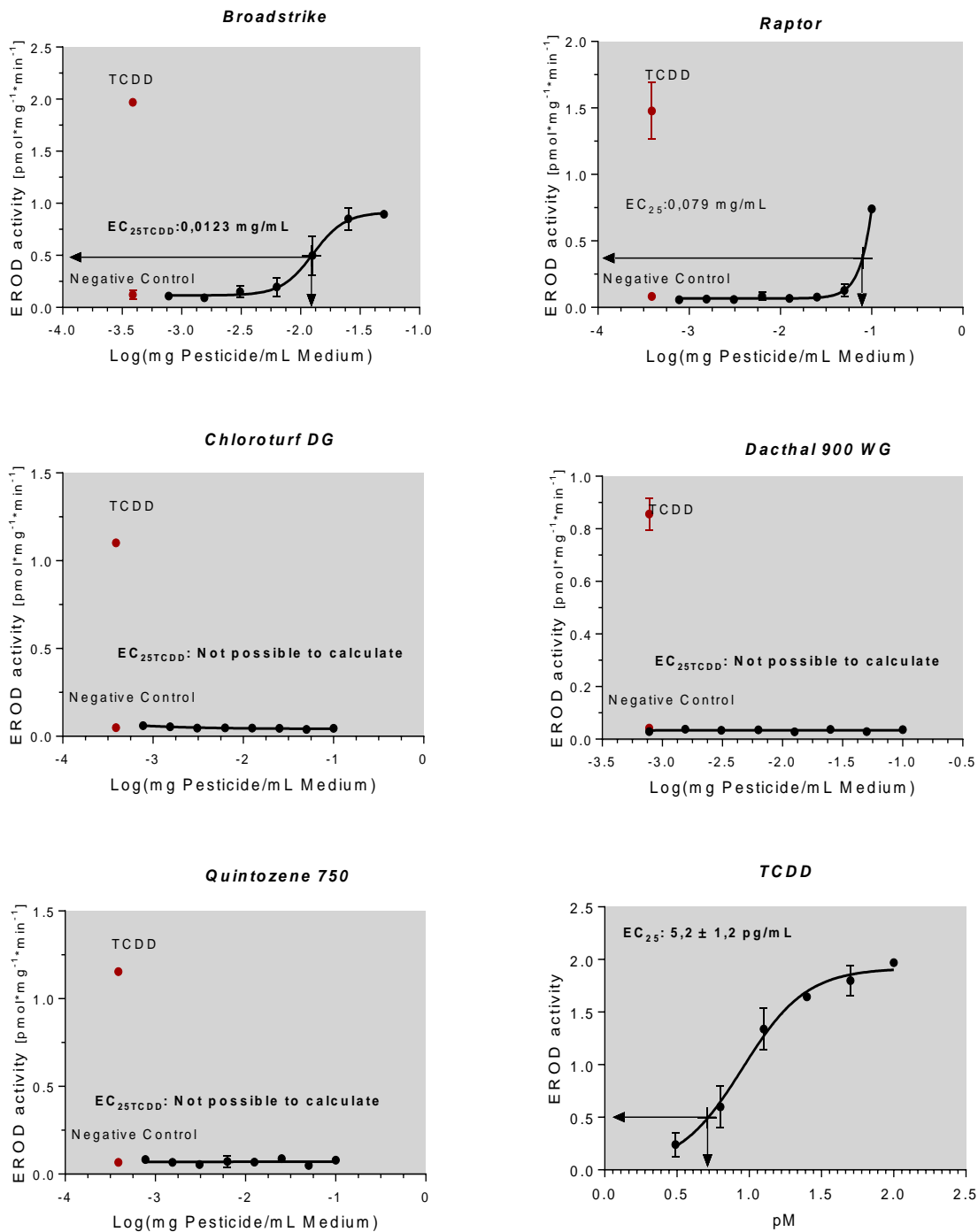
7-етоксирезорифин-*o*-деетилазна (EROD) активност

Способността на петте анализирани пестицида да предизвикват активирането на цитохром P450 от съдържащите се в тях под формата на онечиствания диоксиноподобни

вещества е изследвана посредством използването на клетъчната култура RTL-W1 в различни концентрационни нива, които не поражда цитотоксичен ефект. На **фиг. 4** са представени концентрационните криви, за всеки един от пестицидите. Степента на активиране на монооксигеназната система е изразена като коефициент на токсичния еквивалент (TEQs) спрямо TCDD (EC_{25} $5,1 \pm 1,2$ pg/mL от 15 независими измервания). Резултатите от химичния анализ, стойностите на токсичния еквивалент за откритите в пробите диоксини и фурани (PCDD/F-TEQs), стойностите на токсичния еквивалент, получени от теста и съпоставени с референтната стойност на TCDD (Bio-TEQs), както и съпоставяне на PCDD/F-TEQs са дадени в **табл. 5** и **фиг. 4**.

Способността да се инициира EROD активност при три от пестицидите е особено ниска (Chloroturf DG, Quintozene 750 and Dacthal 900 WG). За тези проби не са отчетени стойности, различаващи се от шума на измерването и по този начин не е измерена активност, дължаща се на диоксиноподобни вещества. Това е в противоречие с резултатите от химичния анализ, където са отчетени най-високите нива на онечиствания с диоксини и фурани в пестициди, съдържащи пентахлоронитробензен (PCNB) като активен компонент. Изчислени са най-високите стойности на токсичен еквивалент: $2,78 \text{ ng.g}^{-1}$ за препарата Quintozene 750 и $1,58 \text{ ng.g}^{-1}$ в препарата Chloroturf DG (**табл. 5**). Това показва, че при относително високи концентрации на пентахлоронитробензен (и/или допълнителни онечиствания) основният механизъм в метода EROD не функционира.

Другите два пестицида показват активност в EROD системата както следва: Broadstrike (EC_{25TCDD} $0,012 \text{ mg/mL}$) и Raptor (EC_{25TCDD} $0,079 \text{ mg/mL}$). Противно на очакванията, наблюдават се изключително високи стойности на токсичния еквивалент от теста, съпоставени спрямо тези на референтната стойност (Raptor – $64,6 \text{ ng Bio-TEQ/g}$ и Broadstrike $414,5 \text{ ng Bio-TEQ/g}$). Тези резултати не могат да бъдат тълкувани с измерените нива на PCDD/Fs, както и с токсичния еквивалент, изчислен от химичния анализ, който е под $0,03 \text{ ng/g}$. Разликите между получените стойности на токсичния еквивалент, изчислен на база химически анализ и прилагането на EROD метода показват, че в пробите има наличие на други онечистващи вещества, които притежават способност да активират ароматния въглеродороден рецептор (AhR).



Фиг 4. Активиране на ензимната система посредством предизвикана EROD дейност от изследваните пестициди в RTL-W1 клетки. Резултатите са изразени като средна стойност на $\text{EC}_{25\text{TCDD}}$, получени от шест независими изследвания. $\text{EC}_{25\text{TCDD}}$ представлява концентрацията на всяка проба, която предизвиква 25% от максималната EROD активност на TCDD. Линиите в кривите на диаграмите при Broadstrike и Raptor показват пресичането на иницирирана EROD активност (в $\text{pmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) и концентрацията на дадения пестицид (в log от mg пестицид/ mL среда), съответстваща на стойността на $\text{EC}_{25\text{TCDD}}$.

Табл. 5. Данни от химическия анализ (HRGC/HRMS), REPs, Bio-TEQs и PCDD/F-TEQs стойности. Концентрациите на PCDD/Fs са изразени в ng.g^{-1} . TEFs – фактор на токсичния еквивалент (способността на PCDD/Fs да активират ензимната активност чрез EROD метода при съпоставяне с TCDD); REP – относителен еквивалентен потенциал (представлява производението от всеки PCDD/Fs и неговия TEF); Bio-TEQs – биологичен токсичен еквивалент; PCDD/F-TEQs – токсични еквиваленти на PCDD/Fs (представляват сума от всички REPs стойности).

PCDD/PCDFs	TEF	Dacthal 900 WG		Chloroturf DG		Quitozene 750		Raptor		Broadstrike	
		ng/g	REP ng/g	ng/g	REP ng/g	ng/g	REP ng/g	ng/g	REP ng/g	ng/g	REP ng/g
2,3,7,8-TCDD	1	0,00175	0,00175	NQ	-	NQ	-	0,00257	0,00257	<0.00048	-
1,2,3,7,8-PeCDD	1	<0.00037	-	<0.21	-	<0.26	-	<0.00085	-	<0.00072	-
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	<0.000195	-	0,04271	0,00427	<0.35	-	0,00143	0,00014	<0.00054	-
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	<0.00026	-	0,20923	0,02092	0,65052	0,06505	0,00128	0,00013	<0.00019	-
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	<0.000345	-	0,10206	0,01021	0,31568	0,03157	<0.0018	-	<0.00069	-
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	0,00239	0,00002	19,63255	0,19633	35,64120	0,35641	0,02352	0,00024	<0.0015	-
OCDD	0,0001	<0.03195	-	585,29664	0,05853	811,85873	0,08119	0,46228	0,00005	0,02547	2,55E-06
2,3,7,8-TCDF	0,1	<0.00057	-	NQ	-	NQ	-	<0.00052	-	0,02652	0,00265
1,2,3,7,8-PeCDF	0,05	<0.00047	-	<0.44	-	0,01472	0,00074	<0.0001	-	<0.0020	-
2,3,4,7,8-PeCDF	0,5	<0.00019	-	<0.14	-	<2.2	-	<0.0001	-	<0.0021	-
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	0,00505	0,00051	<33	-	<2.3	-	0,00020	0,00002	<0.00067	-
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	0,06711	0,00671	7,67329	0,76733	14,10116	1,41012	0,00020	0,00002	<0.00097	-
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	0,03689	0,00369	<0.32	-	0,10168	0,01017	0,00024	0,00002	<0.0011	-
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	<0.0001	-	<0.47	-	<0.026	-	<0.00016	-	<0.00075	-
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01	1,29013	0,01290	50,94904	0,50949	81,05439	0,81054	0,00202	0,00002	0,00261	2,61E-05
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01	0,18981	0,00190	0,73726	0,00737	0,98702	0,00987	0,00054	0,00001	<0.0012	-
OCDF	0,0001	1,26091	0,00013	19,02931	0,00190	35,07683	0,00351	0,00243	0,00000	0,00302	3,02E-07
SUM		2,8540	0,0276	683,6721	1,5764	979,8019	2,7792	0,4967	0,0032	0,0576	0,0027
Bio-TEQs (pg/g)		-	-	-	-	-	-	-	64,557	-	414,634
PCDD/F-TEQs (pg/g)		-	27,6	-	1576,4	-	2779,2	-	3,2	-	2,7
Percentage		-	-	-	-	-	-	-	4,98	-	0,65

Моноксигеназната цитохром P450 система и в частност семейството CYP1A1 се активира от вещества имащи определена структура. Съществуват три основни групи, които имат отношение към активирането на CYP1A1:

1. Вещества, които имат поне два ароматни пръстена в една равнина с ниска степен на конформационна мобилност. Точно такъв вид съединение е TCDD, който е типичен представител на лиганд, свързващ се с ароматния въглеродороден рецептор;
2. Молекули с конформационна мобилност, т.е. молекули, при които има няколко конформера и ниска енергия на преминаване от една форма в друга. Такива вещества се класифицират като вещества с нисък афинитет към свързване с AhR и ниска степен на активиране на ензима;
3. Вещества, имащи поне два ароматни пръстена, които са свързани с въглероден атом, намиращ се в sp^3 хибридизация. В резултат на стерични пречения при въглеродния атом от този тип вероятността за постигане на планарна структура на двете ароматни ядра е малка, вследствие на енергетично неизгодната структура и такива вещества не могат да предизвикват активиране на ензимната система посредством свързване с ароматния въглеродороден рецептор.

Активните вещества в пестицидите, които предизвикват активиране на ензимната система (Brodstrike и Raptor) притежават ароматни структурни елементи (табл. 3), но въпреки това ароматните пръстени трудно могат да заемат равнинна позиция и по този начин тези веществата спадат към третата категория съединения. Това води до заключението, че не може да се очаква активиране на CYP1A1 ензимната система от активните съединения в търговските продукти и че получените резултати се дължат на онечиствания в препаратите.

За разлика от активните субстанции, за които има данни за екотоксикологичния им ефект и може да се определи до някаква степен токсичността им, то по отношение на онечистванията, оценяване на общия им екотоксикологичен ефект за момента не е осъществяван. Направените първоначални изследвания на избраните пестициди показват, че онечистванията допринасят към процеса на активиране на ензимната система, както и че притежават мутагенност, която не може да бъде обяснена с токсичността на активните съставки. Аналогично на единствената до момента публикация върху способността на онечистванията да предизвикват активиране на метаболитната система чрез EROD, при две от петте изследвани субстанции, получените данни за нивата на PCDD/Fs (chemTEQs) не могат да обяснят измерените чрез теста (ERDO) стойности (Bio-TEQs). От това може да се обобщи, че други диоксиноподобни вещества се съдържат в търговските продукти. Противно на очакванията за висока активност на системата при двата най-силно замърсени с диоксини и фурани пестицида, може да се допусне, че причината за наблюдаваните резултати е високото натоварване на клетъчната система с хлорирани ароматни съединения, което възпрепятства ензимната активност. Следователно, за определянето на въздействието на диоксиноподобните вещества е необходимо допълнително проучване с биотестове (EROD, CALUX), като се преодолеят условията на претоварване на системата от високите нива на пестициди, които най-вероятно оказват влияние върху механизма на активиране на ензимната система, както и необходимостта от провеждане на допълнителни изследвания върху неочиствания в продуктите.

Изследваните в дисертацията пестициди понастоящем са регистрирани за употреба в САЩ, Европа, Австралия, Африка. При синтеза на Quintozene е доказано, че се образуват аналози на TCDD, въпреки това, данни за съдържанието на PCDD/Fs като онечиствания в препаратите Flumetsulam, Chlorthal и Imazamox не са публикувани до момента с изключение на публикацията на E. Holt 2010, където нивата на PCDD/Fs ($0,054 \div 62 \text{ ng } \Sigma\text{PCDD/Fs g}^{-1}$) са сравними с тези пестициди, за които е доказано съдържанието на диоксини и фурани. Въпреки че TEQ стойностите в изследваните препарати са сравнително ниски, до момента не са били оценявани като източник на PCDD/Fs и липсва информация, която да се отнася до този проблем.

Резултатите от изследванията показват, че пестицидите притежават от силна до слаба цитотоксичност, както и мутагенност. Генотоксичният потенциал на пробите може да се приеме като резултат от въздействието на активната субстанция върху щамовете на бактерията при пестицида Dacthal 900 WG, докато при Quintozene 750 и Chloroturf DG изследванията ясно доказват генотоксичност, дължаща се на онечистванията в препаратите. В случая с Broadstike резултати до известна степен са противоречиви, особено късаещите влиянието на пробата върху щам TA98. В литературата активното вещество се описва и като мутаген, и като немутаген по отношение на щам TA98, като не може ясно да се твърди (въз основа на тези изследвания), че мутагенността се дължи на активната субстанция или онечистванията. По отношение на активността на пестицида спрямо щам TA100 може да се заключи, че онечистванията в продукта са веществата, които причиняват наблюдаваните мутации. Що се отнася до пестицида Raptor, при него се наблюдава слаб генотоксичен ефект, който по-вероятно се дължи на активното вещество, т.к. то принадлежи към групата на имидазолоните, за които има данни, че притежават известна генотоксичност при изследване с други биотестове. Това показва необходимостта от допълнителни експерименти, доказващи точния генотоксичен потенциал и механизъм.

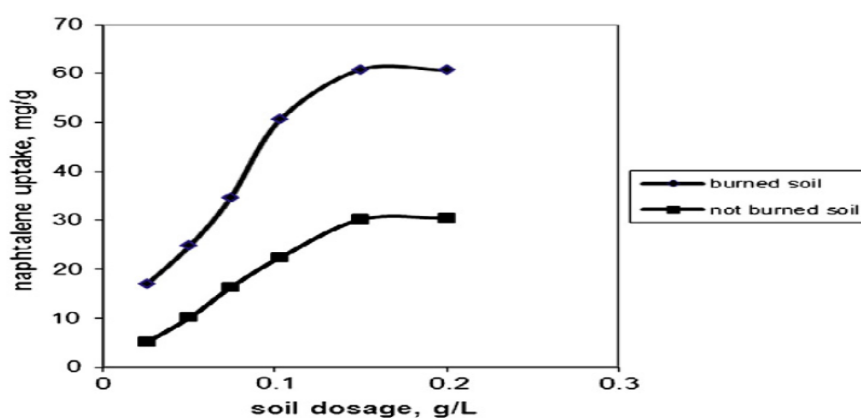
Изложеното дотук показва, че онечистванията в техническите продукти представляват съществен фактор в приноса им към общата токсичност на препаратите, която до голяма степен погрешно се приема като резултат от въздействието на активната субстанция. Това налага и прилагането на допълнителни екоотоксикологични изследвания, като напр. развиването на бактерии от различни биотестове с различни механизми на действие (като токсичност от диоксиноподобни вещества, мутагенност, токсичност от вещества, засягащи ендокринната система и др.), които да бъдат в допълнение към химичния анализ на пробите.

4.2. Определяне на токсичност в почви

За оценяване на ефекта от обгаряне на почви след изгаряне на стърнища са изследвани проби, взети от южната част на Румъния (община Дорубанту, район Кълъраш). Направените изследвания включват определяне на токсичност (тест на Еймс, тест за остра цитотоксичност и т.нар. EROD метод за определяне на активност на ензимната система цитохром P450 от диоксиноподобни вещества) и сорбционна способност на полиароматни въглеводороди (нафтаген). За съпоставяне на резултатите са използвани два типа почви – почви, които са били подложени на обгаряне и почви, останали незасегнати при изгарянето на ожънати площи. При изгарянето на стърнища се получават сажди, отличаващи се с висока адсорбционна способност. Това се дължи на образуването на частици с нано размери с високо развита повърхност, по-голяма спрямо масата на частиците. Така образуваните сажди имат изявена адсорбционна способност, което води до задържане и натрупване на много органични замърсители (полиароматни въглеводороди, пестициди, PCBs, PCDD/Fs). По време на изгарянето могат да се образуват и PCDD/Fs, когато почвите са били предварително третираны с

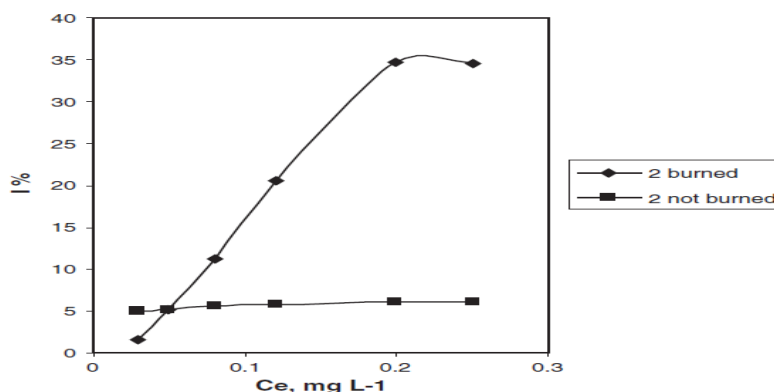
пестициди. Формирането на диоксини и фурани в тези случаи зависи от редица фактори и условия, като концентрацията на прекурсорите, тяхната сорбционна способност към почвата, миграцията и т.н.

Взети са проби от почви, намиращи се в селскостопански полета на дълбочина 25 см. от повърхността, при които изгарянето на стърнищата се прилага като метод за почивстване на обработваемите площи. Пробите (обгорени и необгорени почви) са приведени във вид на суспензия (количеството на почвата в суспензията е около 1,5-7,5 g/L), която е филтрувана и изсушена, при което се събират фракции с частици, имащи размери по-малки от 100 nm. При адсорбцията на органични молекули (полиароматни въглеводороди) възникват водородни връзки между кислород съдържащите се функционални групи (като карбоксилни групи), намиращи се в обгорената почва и органичните молекули, като основно се формират π - π електронни взаимодействия. В направеното изследване на сорбционната активност се показва, че адсорбирането на нафтален нараства от 5 до 35% при необгорена и съответно при обгорена почва (фиг. 6).



Фиг. 6. Ефект на сорбиране на нафтален в различни видове и количества (1,25÷7,5 g/L) на почви, при 25°C и време за контакт – 60 min.

Значителният адсорбционен капацитет на обгорената почва може да се отнесе като следствие на увеличената повърхност, която води и до по-голям брой активни центрове на задържане. От адсорбционните изотерми (фиг. 7) се вижда, че количеството (mg/g) на адсорбиран нафтален нараства при обгорени почви в сравнение с необгорени. Това най-вероятно се дължи на въглеродни наноструктури в саждите, характеризиращи се с по-голяма порьозност и по-голяма повърхност спрямо необгорените почви. С намаляването на размера на частиците, нивата на сорбиране нарастват и като се има предвид, че органичната материя при обгорените почви е значително по-малка може да се приеме, че повишената адсорбция на нафтален се дължи на присъствието на наночастици, образувани по време на изгарянето.



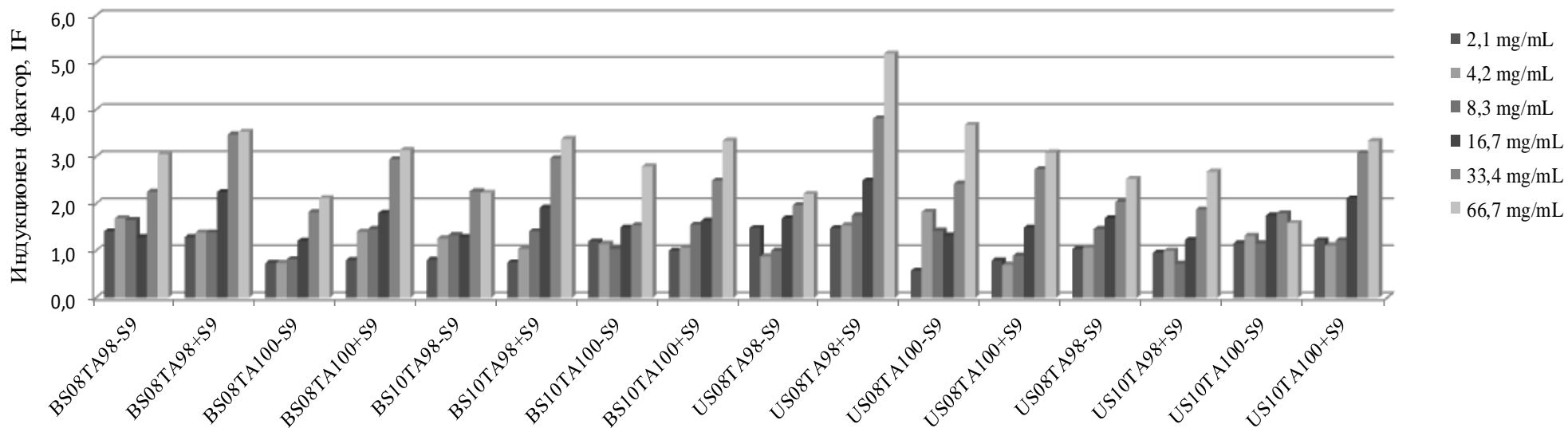
Фиг. 7. Адсорбционни изотерми на разтвор на нафтаден при обгорени (сажди) и необгорени почви (време на контакт 60 min., количество на почвата – 5 g/L, T 25°C, pH 7). I% - процент на адсорбцията на нафтаден, Се – концентрация на разтвора при равновесие, mg/L.

По отношение на методите за токсичност не се наблюдава изявено различие между обгорени и необгорени почви. Разработени са три вида екстракти от почви въз основа на полярността на използваните разтворители, като крайната концентрация на екстрактите е 20 g/mL в ДМСО. На **фиг. 8-10 и табл. 5** са показани концентрационните графики на различните екстракти спрямо индукционния фактор и максималният индукционен фактор при теста на Еймс. По отношение на екстрактите с хексан:ацетон се наблюдават по-високи нива (до 2 пъти) на индукционния фактор, при които тестът на Еймс е проведен в присъствието на метаболизираща система, т.е. отчита се мутагенност, която се поражда от метаболити на ензимната система от съдържащите се в екстракта вещества. При пробите, извлечени с хексан:ацетон се отчитат най-високите индукционни фактори. Като най-вероятна причина за това е екстракционната способност на сместа от два разтворителя с различна полярност. При тези екстракти се наблюдава ясна зависимост между индукционния фактор и концентрацията на екстракта (концентрационен интервал $2,1 \div 66,7$ mg/mL). При резултатите от другите два вида екстракти не се забелява подобна зависимост, като средното ниво на индукционния фактор възлиза на около 45% от мутагенността, предизвикана при хексан:ацетон екстрактите. Въпреки това резултатите не могат да бъдат тълкувани като доказателство за изявен мутагенен ефект, когато средният максимален индукционен фактор е около $1,3 - 1,4 \pm 0,3$ по отношение на екстракти вода:метанол и хексан, и концентрационен интервал 10-67 mg/mL. При екстрактите, извлечени с хексан:ацетон средният индукционен фактор е $3,0 \pm 0,8$ (при концентрации 67 mg/mL), което може да се дължи на екстракционната способност на сместа от разтворители. При обгарянето на почвите се образуват полиароматни въглеводороди, които имат изявен мутагенен и канцерогенен ефект в условия на метаболитна активация, образувайки се епоксиди, които има способността да взаимодействат с нуклеофилните части (азотните бази) в ДНК молекулите, но не може да се приеме, че възникналите в щамовете мутации се дължат на тях, т.к. ясно разграничение между двата вида почви не се наблюдава.

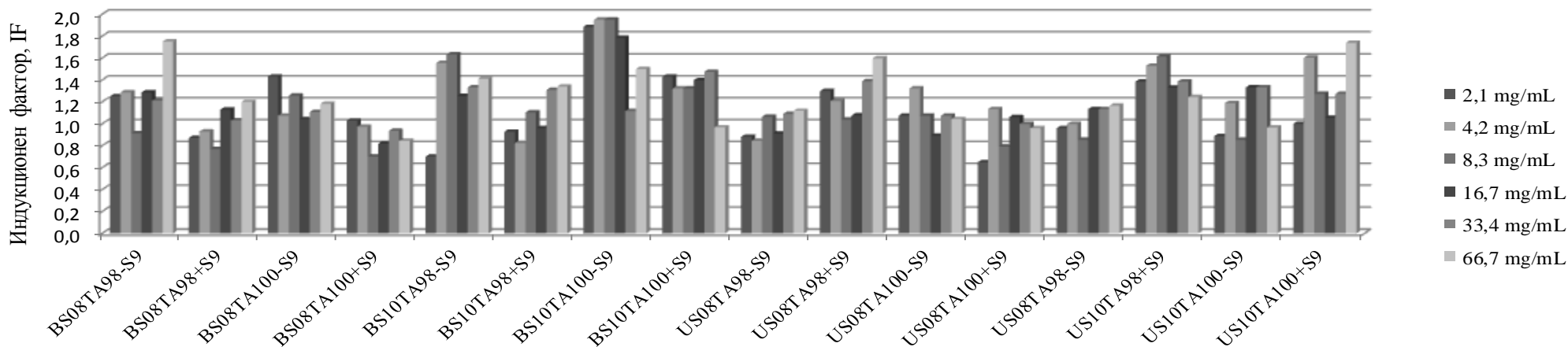
На **табл. 6 и фиг. 11** са представени стойности на NR₅₀ за различните екстракти при определяне на цитотоксичност по метода на поглъщане на неутрално червено. За всички проби, екстрахирани с хексан и половината – екстрахирани с метанол:вода не се наблюдава цитотоксичност, докато при останалите проби стойностите на цитотоксичност са много високи и практически нямат токсичен ефект. Средната концентрация, причиняваща измиране на RTL-W1 клетките е около 185 ± 23 mg/mL. На **табл. 6 и фиг. 11** се наблюдава, че почвите, които са били подложени на обгаряне проявяват по-силен цитотоксичен ефект, но това не може да се приеме като доказателство за по-силна токсичност на този вид почви, т.к. стандартното отклонение на резултатите се припокрива с резултатите от другите почви. Вероятно може да има евентуална тенденция за по-силна токсичност, но допълнителни изследвания са необходими, за да бъде потвърдена.

По време на горенето на стърнищата наред с полиароматните въглеводороди могат да се образуват диоксини и фурани, когато почвите са били обработени с пестициди, в които има прекурсори или онечиствания от подобни вещества. PCDD/Fs се образуват и при излагането на подобни прекурсори под въздействието на слънчева светлина. В такъв случай за очакване е образуването и натрупването на диоксини и фурани в почви, подложени на обгаряне, където се образуват наночастици от сажди с развита адсорбционна повърхност. От проведения експеримент за определяне на

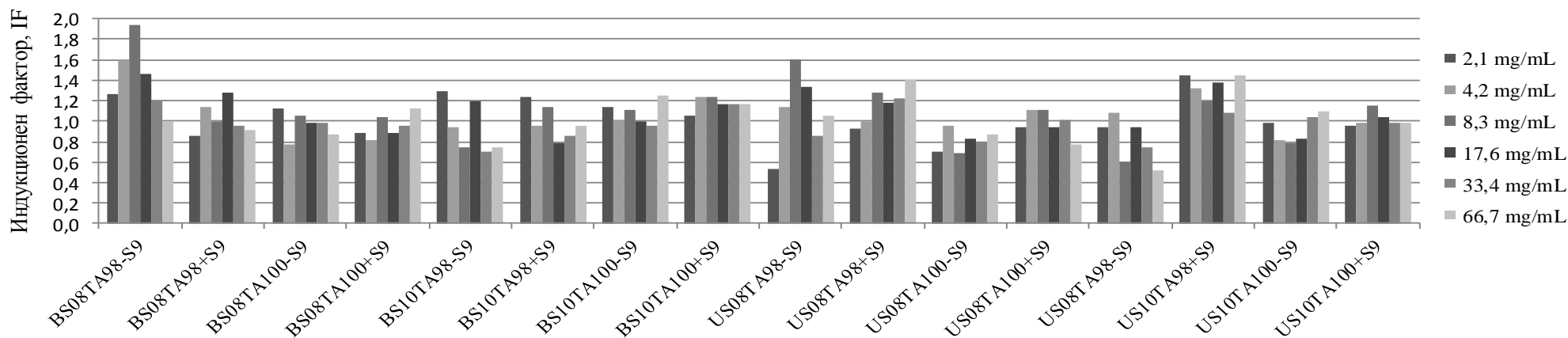
въздействието на диоксиноподобни вещества върху активирането на ензимната монооксигеназна система по метода EROD се наблюдават резултати, които не показват подобна зависимост. На табл. 7 и фиг. 12-16 са представени средните стойности, стандартните отклонения и концентрационните криви на активността на диоксиноподобните вещества, измерени чрез EROD метода. При почвите, които са пробовзети през м. Август се наблюдава по-висока активност на ензимната система при обгорените почви в сравнение с необгорените, което е и очаквана зависимост, докато при пробите от м. Октомври се наблюдават близки стойности, в превес на необгорените почви. Вероятно причините в разликите могат да се дължат на сезонност, както и на времето с третиране на пестициди и обработване на земята.



Фиг. 8. Концентрационна графика на почви при изследване за мутагенност (тест на Еймс), екстрахирани с хексан:ацетон (1:1)



Фиг. 9. Концентрационна графика на почви при изследване за мутагенност (тест на Еймс), екстрахирани с метанол:вода (1:1)



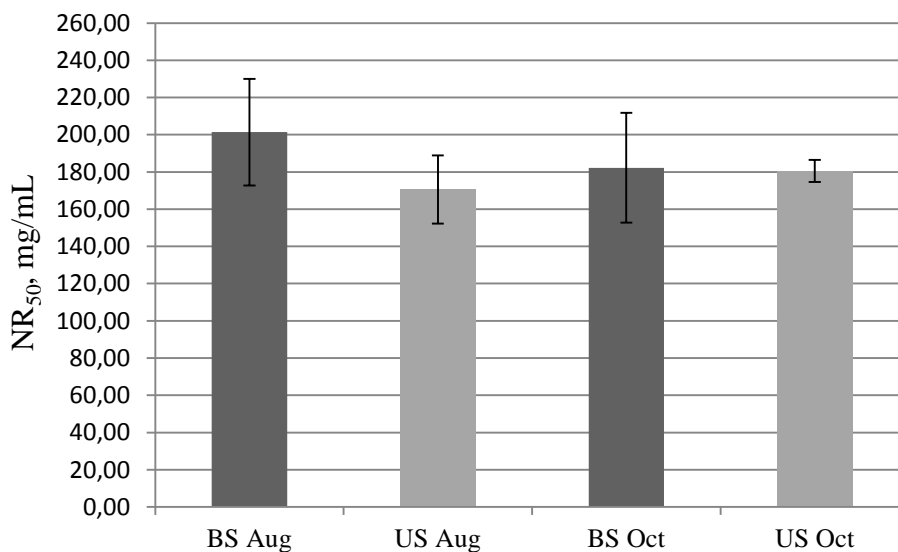
Фиг. 10. Концентрационна графика на почви при изследване за мутагенност (тест на Еймс), екстрахирани с хексан

Табл. 5. Максимални стойности на индукционния фактор, получени при въздействието на почвени екстракти (разделени по вид на разтворителя) върху TA98 и TA100 щамове на *Salmonella* при различни условия на метаболизираща система (S9) и при концентрации 10-67 mg/mL. BS Aug – обгорена почва (пробовзета през м. Август); BS Oct – обгорена почва (м. Октомври); US Aug – необгорена почва (м. Август); US Oct – необгорена почва (м. Октомври).

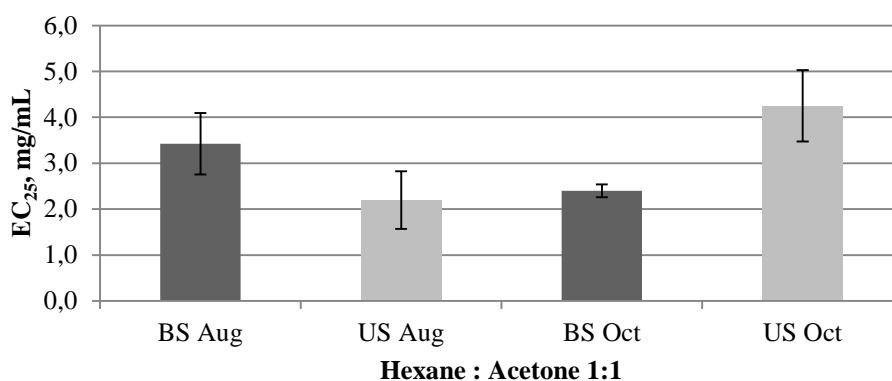
	Hexane : Acetone (1:1)				Methanol : Water (1:1)				Hexane			
	BS Aug	BS Oct	US Aug	US Oct	BS Aug	BS Oct	US Aug	US Oct	BS Aug	BS Oct	US Aug	US Oct
TA98-S9	3,0	2,3	2,2	2,5	1,8	1,6	1,1	1,2	1,9	1,3	1,6	1,1
TA98+S9	3,5	3,4	5,2	2,7	1,2	1,3	1,6	1,6	1,3	1,2	1,4	1,5
TA100-S9	2,1	2,8	3,7	1,8	1,4	2,0	1,3	1,3	1,1	1,3	1,0	1,1
TA100+S9	3,1	3,3	3,1	3,3	1,0	1,5	1,1	1,7	1,1	1,2	1,1	1,2

Табл. 6. Средни стойности на NR₅₀, mg/mL при определяне на цитотоксичност за различни почвени екстракти. ND – non detected.

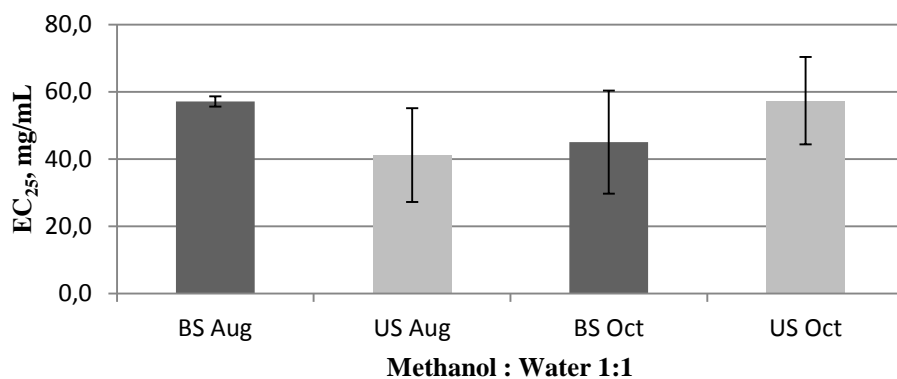
NR50	Hexane : Acetone (1:1)		Methanol : Water (1:1)		Hexane	
	Mean	STD	Mean	STD	Mean	STD
BS Aug	201,40	28,62	ND	ND	ND	ND
US Aug	170,56	18,27	182,01	12,72	ND	ND
BS Oct	182,23	29,50	165,30	17,08	ND	ND
US Oct	180,48	5,92	ND	ND	ND	ND



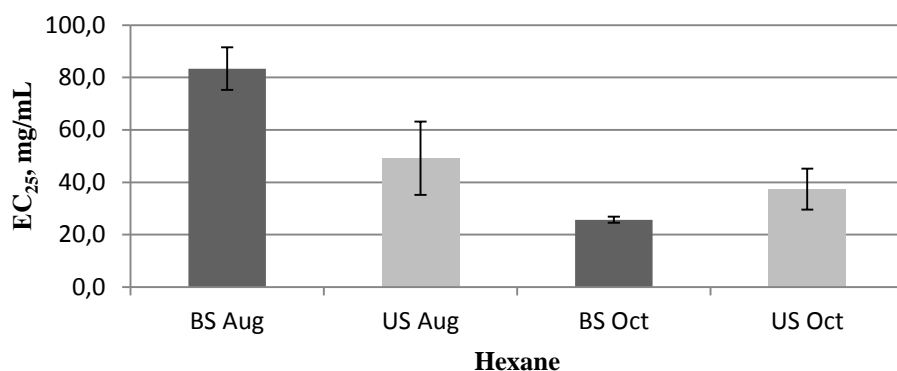
Фиг. 11. Средна концентрация на почвени екстракти (хексан:ацетон, 1:1), предизвикващи цитотоксичност.



Фиг. 12. Средни стойности (EC₂₅) и стандартно отклонение на активността на диоксиноподобни вещества в различни видове почви, подложени на Соклет екстракция с хексан:ацетон.



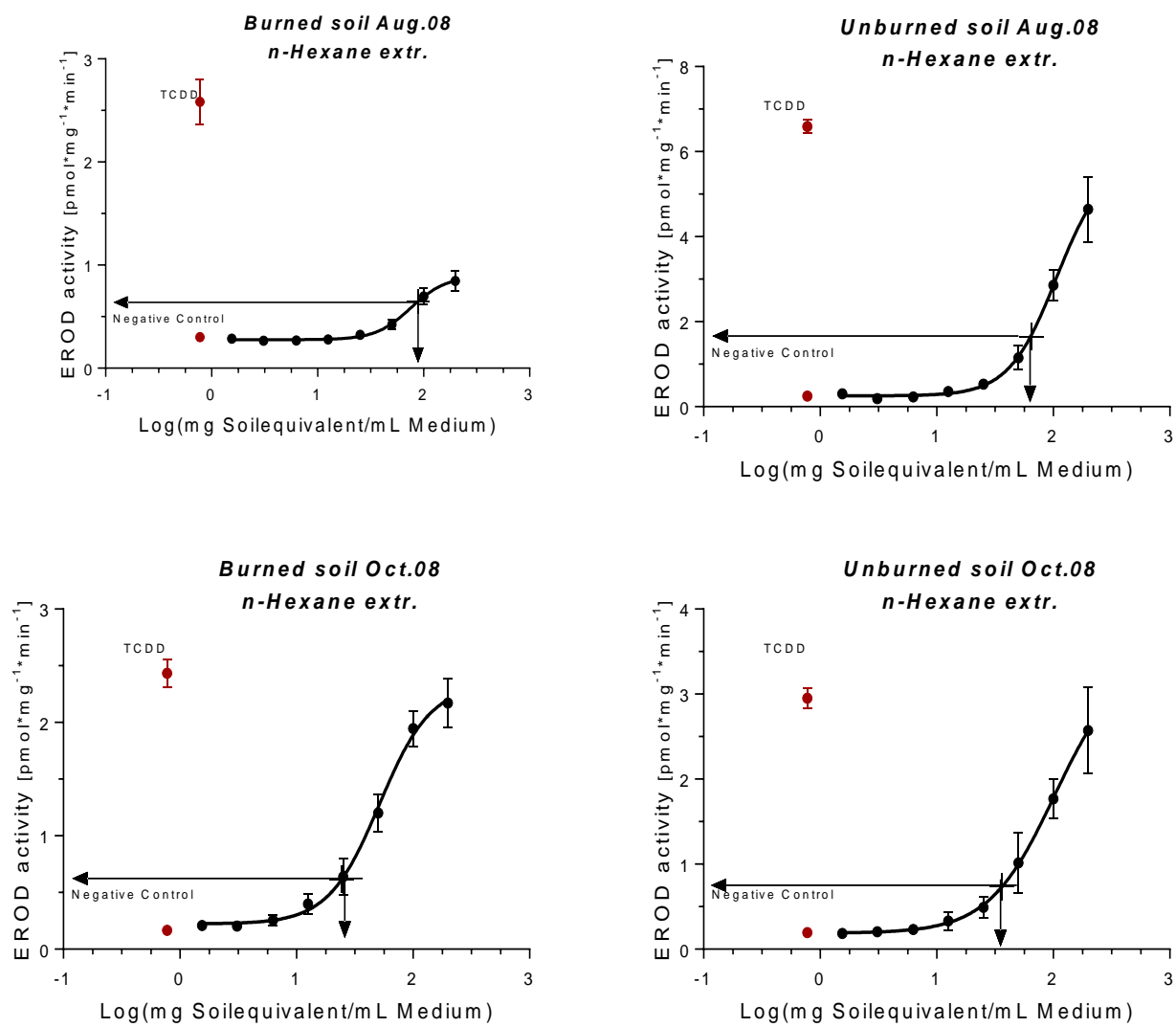
Фиг. 13. Средни стойности (EC₂₅) и стандартно отклонение на активността на диоксиноподобни вещества в различни видове почви, подложени на екстракция с метанол:вода.



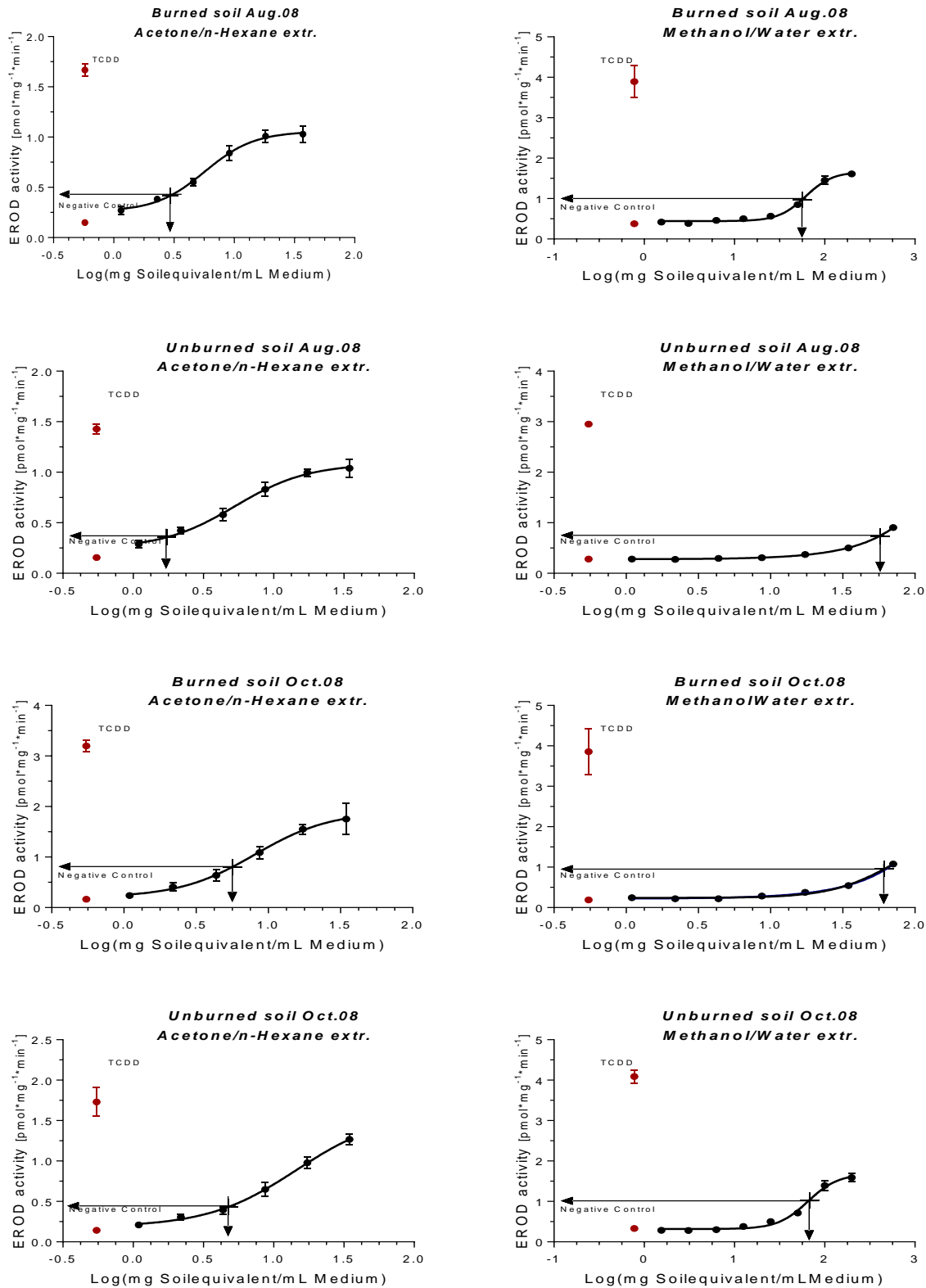
Фиг. 14. Средни стойности (EC₂₅) и стандартно отклонение на активността на диоксиноподобни вещества в различни видове почви, подложени на Сокслет екстракция с хексан.

Табл. 7. Средни стойности (EC₂₅) от три измервания (18 повторения) и стандартно отклонение на трите вида почвени екстракти (хексан:ацетон; метанол:вода; хексан)

	Xn:Acetone		MeOH:Water		Xn	
	Mean	STD	Mean	STD	Mean	STD
BS Aug	3,4	0,7	57,1	1,6	83,4	8,1
US Aug	2,2	0,6	41,2	14,0	49,2	14,0
BS Oct	2,4	0,1	45,0	15,3	25,7	1,2
US Oct	4,3	0,8	57,3	13,0	37,4	7,8



Фиг. 15. Концентрационни криви на почвени екстракти при хексан



Фиг. 16. Концентрационни криви на почвени екстракти при хексан:ацетон (1:1) и метнол:вода (1:1)

От направените изследвания не може да се намери ясно доказателство за по-висока токсичност на почвите, които са претърпели обгаряне при изгарянето на стърнища. Тъй като няма статистически значима разлика в резултатите от *in vitro* експериментите между обгорени и необгорени почви, изгарянето показва, че само по себе си не допринася към токсичността, измерена със съответните биотестове, но повишава адсорбционния капацитет от образуваните с нано размери сажди. В литературата липсват данни за провеждани експерименти в тази насока, като определяне на токсичността на обгорени почви, както и изследване на диоксиноподобни вещества за активност на ензимната система цитохром P450. Вероятна тенденция към по-висока токсичност в резултат на високи сорбционни свойства и задържане на органични замърсители, както и образуване на диоксини и фурани при употребата на конкретни пестициди е възможна и по-задълбочени изследвания в тази насока биха разкрили потенциални източници на замърсяване на околната среда.

4.3. Хемометрична оценка на природни води и води в седименти чрез екотоксични методи и физикохимични параметри

Изследвани са проби (повърхностни води, подпочвени води и води в седименти) от язовира Турава, Полша, където в 154 проби са анализирани 33 физикохимични показатели, както и показатели за остра и хронична токсичност. Данните са анализирани както поотделно (данни от физикохимичен и токсикологичен анализ), така и съвместно с цел да се открият източниците на замърсяване, състоянието на съответните системи (повърхностни води, подпочвени води и седименти) и наличието на корелация между химичните и токсикологичните резултати.

Изследваните 154 проби се подразделят на 62 проби от повърхностни води, 58 – подпочвени води и 34 проби от седименти, в които водната фаза е отделена от твърдата и изследвана аналогично с останалите проби. Изследвани са 33 физикохимични показатели, които включват както класически параметри за качеството на водата, така и тежки метали и някои органични компоненти (рН, електропроводимост, разтворен O_2 , БПК₅, ХПК, хлориди, сулфати, разтворен силиций, азот (NH_4^+), азот (NO_3^-), азот (NO_2^-), азот (Келдал), феноли, анионни детергенти, общо желязо, живак, олово, мед, никел, цинк, кадмий, манган, общ хром, хром (VI), магнезий, натрий, калий, калций, алкалност, обща твърдост, мътност, общи разтворени вещества, неразтворени вещества). Използвани са аналитични методи като потенциометрия, титриметрия, атомна абсорбционна спектроскопия и течна хроматография.

За определянето на остра токсичност на пробите е използвана системата Microtox, въз основа на биолуминесцентната бактерия *Vibrio fischeri*, съгласно изискванията на стандарта EN ISO 11348-3/1998. В допълнение, при определянето на острата токсичност е приложен и т.нар. *Daphnia magna* тест (Daphtoxkit F Magna), докато оценяването на хроничната токсичност е извършено спрямо ISO 10706 стандарта. При оценяването на хроничната токсичност при седиментите е използван Ostracodtoxkit F в присъствието на ракообразни организми.

При статистическата оценка на данните е използван програмен софтуер, STATISTICA 6,0.

Хемометрична оценка въз основа на физикохимичните параметри

Входящите данни, получени от мониторинга на различните системи първоначално са разгледани поотделно: повърхностни води, подпочвени води, води от седименти. Прилагането на анализа на главни компоненти (АГК) с Varimax ротация

спрямо трите набора от данни цели разпознаването на латентните фактори, обуславящи структурата от данни и вероятните източници. В табл. 8-10 са покзани факторните натоварвания за всеки вид проба.

Табл. 8. Факторни натоварвания на проби от повърхностни води (всички значими натоварвания са отбелязани)

Параметър	PC 1	PC 2	PC 3	PC 4	PC 5
pH	0.124	-0.095	0.092	-0.817	0.190
COND	0.861	0.495	0.009	0.045	0.038
BOD	0.094	0.635	0.322	-0.294	0.100
COD	-0.027	0.197	0.886	-0.146	0.052
Cl ⁻	0.169	0.872	0.068	0.026	-0.043
SO ₄ ²⁻	0.899	0.039	0.049	-0.112	0.137
DIS_Si	0.046	0.148	-0.010	0.863	0.179
NH ₄ ⁺ _N	0.227	0.864	0.053	0.228	-0.001
NO ₃ ⁻ _N	0.284	-0.183	-0.145	0.012	0.811
NO ₂ ⁻ _N	-0.122	0.156	0.116	-0.083	0.838
KJEL_N	0.251	0.855	0.203	0.180	0.015
TOT_Fe	-0.038	0.047	0.795	0.542	-0.019
Mn	0.006	0.303	0.424	0.713	-0.128
Mg ²⁺	0.312	0.750	0.053	-0.038	-0.035
Na ⁺	0.172	0.881	0.016	0.233	-0.108
K ⁺	-0.078	0.836	-0.106	0.205	0.108
Ca ²⁺	0.967	0.101	0.032	-0.061	-0.020
ALKAL	0.896	0.295	0.067	0.046	-0.168
TOT_HARD	0.981	0.073	0.055	-0.038	0.001
TURB	0.055	0.092	0.836	-0.097	0.103
TDS	0.910	0.272	0.063	0.062	0.182
SUSP_MAT	0.205	-0.065	0.905	0.168	-0.055
Expl. var (%)	25.1	24.3	15.2	11.7	7.2

АГК на повърхностни води: от направения анализ се образуват пет скрити фактора, които обясняват 83,5% от общата вариация на системата (62 проби са описани от 22 променливи):

PC1 (обяснява 25,1 % от вариацията) включва следните силно корелирани променливи: електропроводимост (COND), сулфати (SO₄²⁻), калиций (Ca²⁺), алкалност (ALK), обща твърдост (THARD), общи разтворени вещества (TDS);

PC2 (обяснява 24,3 % от вариацията) включва следните силно корелирани променливи: азот (NH₄⁺), азот по Келдал (N_KJEL), магнезий (Mg²⁺), натрий (Na⁺), калий (K⁺), БПК₅ (BOD), хлориди (Cl⁻);

PC3 (обяснява 15,2 % от вариацията) включва следните силно корелирани променливи: ХПК (COD), общо желязо (TOT Fe), мътност (TURB), неразтворени вещества (SUSP);

PC4 (обяснява 11,7 % от вариацията) включва следните силно корелирани променливи: рН, разтворен силиций (Dis Si), манган (Mn);

PC5 (обяснява 7,2 % от вариацията) включва следните силно корелирани променливи: азот (NO₃⁻), азот (NO₂⁻).

В първия латентен фактор преимуществено са включени компоненти, отговорни за образуването на твърдостта на водата с високи факторни натоварвания. Допуска се, че този фактор има основно влияние върху качеството на системата и условно е

наречен „твърдост на водата“. Значимостта на факторните натоварвания за параметрите, отнасящи се до биологичните процеси на повърхността на водата в PC2 позволяват допускането, че този фактор е „биологичен“ фактор. Следващият, трети фактор може да се нарече „мътност на водата“, вследствие на силната корелация между параметрите мътност, неразтворени вещества и общо количество желязо. Четвъртият латентен фактор е условно наречен „киселинен“ и последният – „антропогенен“. Най-общо, естествените фактори, които се отнасят до качеството на водата са факторите: PC1 и PC3, докато другите три отчитат антропогенно влияние. Ниските и постоянни нива на тежките метали не позволяват да бъдат използвани като маркери за по-специфичен вид замърсяване.

Табл. 9. Факторни натоварвания на проби от води в седименти (всички значими натоварвания са отбелязани)

Параметър	PC 1	PC 2	PC 3	PC 5	PC 4	PC 6	PC 7
pH	-0.177	0.067	-0.546	-0.013	-0.138	0.639	0.098
COND	0.200	0.872	0.062	0.069	0.336	0.050	-0.123
BOD	0.378	0.347	0.687	0.043	0.241	-0.159	0.145
COD	0.882	-0.059	0.040	0.127	0.030	0.087	0.236
Cl ⁻	0.162	-0.022	0.129	-0.043	0.871	-0.018	-0.079
SO ₄ ²⁻	-0.139	0.806	-0.170	0.030	-0.333	0.214	-0.117
DIS_Si	0.180	-0.169	-0.017	0.096	-0.058	0.063	0.885
NH ₄ ⁺ _N	0.823	0.174	0.204	-0.008	0.351	0.044	-0.015
NO ₃ ⁻ _N	0.597	-0.077	0.636	0.104	-0.019	0.023	-0.185
NO ₂ ⁻ _N	0.936	0.015	-0.025	-0.047	-0.052	-0.084	-0.061
KJEL_N	0.905	-0.129	0.115	0.052	0.054	0.036	0.133
PHEN	0.280	-0.446	0.152	0.266	-0.080	0.079	-0.166
TOT_Fe	0.163	-0.006	0.753	-0.393	0.197	-0.110	0.107
Pb	0.869	0.142	0.361	-0.038	0.034	0.008	0.009
Cu	0.758	0.081	0.173	-0.398	-0.063	0.030	0.313
Ni	0.121	-0.101	0.048	-0.913	-0.086	0.012	0.043
Zn	0.693	0.489	0.250	0.048	-0.006	0.129	-0.007
Cd	-0.071	0.020	-0.079	0.099	-0.028	-0.879	0.043
Mn	-0.012	0.018	0.048	-0.898	0.101	0.109	-0.068
Mg ²⁺	0.162	0.906	0.025	0.018	0.181	-0.043	-0.179

Продължение на табл. 9.

Na⁺	0.019	0.146	-0.076	-0.072	0.912	0.080	-0.040
K⁺	0.580	0.366	-0.007	0.147	0.386	-0.197	-0.138
Ca²⁺	0.892	0.121	0.128	-0.285	0.054	-0.175	0.075
ALK	-0.053	0.412	0.177	0.124	0.674	-0.168	0.057
TOT_HARD	0.723	0.160	0.050	-0.230	0.079	-0.505	0.153
TURB	0.241	-0.188	0.181	-0.500	-0.090	-0.318	0.661
TDS	0.339	0.791	0.162	0.097	0.206	-0.172	-0.018
SUSP_MAT	0.070	-0.039	0.862	-0.010	-0.060	0.091	0.015
Expl.var(%)	27.1	14.1	10.6	9.0	10.0	6.5	5.8

АГК на води в седименти: от направения анализ се образуват седем скрити фактора, които обясняват 85,1% от общата вариация на системата (34 проби са описани от 27 променливи):

PC1 (обяснява 27,1 % от вариацията) включва следните силно корелирани променливи: ХПК (COD), азот (NH₄⁺), азот (NO₃⁻), азот (NO₂⁻), азот по Келдал (N_KJEL), калий (K⁺), олово (Pb), мед (Cu), цинк (Zn), калиций (Ca²⁺), обща твърдост (THARD). Тълкуването на този латентен фактор не е лесно, т.к. включва много променливи с високи стойности на факторното натоварване. Видно е, че за него допринася антропогенен фактор (Pb, Cu, Zn, NO₃⁻, NO₂⁻), примесен с биологичен (NH₄⁺, N_KJEL), както и фактор с естествен произход (Ca²⁺, THARD). Условното му наименование е „смесен“ фактор.

PC2 (обяснява 14,1 % от вариацията) включва следните силно корелирани променливи: електропроводимост (COND), сулфати (SO₄²⁻), магнезий (Mg²⁺) и феноли (PHEN). Интересно е да се отбележи, че в случая с фенолите, високата стойност на факторното му натоварване е с отрицателен знак, като концентрацията на феноли контрастира на тази на останалите три променливи. Това вероятно се дължи на различния механизъм на адсорбция на органичните молекули спрямо неорганичните в седиментите. Този фактор условно е наименован „органичен и неорганичен соли“ фактор.

PC3 (обяснява 10,6 % от вариацията) включва следните силно корелирани променливи: общо желязо (TOT Fe), БПК₅ (BOD), неразтворени вещества (SUSP);

PC4 (обяснява 10,0 % от вариацията) включва следните силно корелирани променливи: натрий (Na⁺), хлориди (Cl⁻), алкалност (ALK).

PC5 (обяснява 9,0 % от вариацията) включва следните силно корелирани променливи: манган (Mn) и никел (Ni).

За тълкуването на последните три фактора (PC3, PC4, PC5) е необходимо да бъдат обединени, т.к. ясно се показва влиянието на самите седименти като основен състав (главни компоненти са Fe, Mn, Ni) и вероятно влияние на соли фактор (Na⁺, Cl⁻). В допълнение факторното натоварване на параметъра „общо желязо“ е също относително високо. Ето защо тази група от латентни фактори може да се счита за един общ източник за определяне на качеството на седиментите и условно се наименова

„седиментен“ фактор. В подкрепа на това допускане са близките стойности на обяснената вариация от всеки един от факторите в групата.

PC6 (обяснява 6,5 % от вариацията) включва следните силно корелирани променливи: рН и кадмий (Cd).

PC7 (обяснява 5,8 % от вариацията) включва следните силно корелирани променливи: разтворен силиций (Dis Si) и мътност (TURB).

Тези два фактора описват малка част от общата вариация, но все още са значими при тълкуването и следователно е необходимо да се вземат в предвид. Показват приноса на киселинността и мътността към качеството на водите в седиментите и условно се наричат : „киселинен“ фактор и фактор „мътност“.

Табл. 10. Факторни натоварвания на проби от подпочвени води (всички значими натоварвания са отбелязани)

Параметър	PC 1	PC 2	PC 3	PC 4	PC 5	PC 5
COND	0.277	0.938	0.051	0.005	0.087	-0.017
BOD	0.821	0.196	0.372	-0.081	0.019	0.177
COD	0.925	0.104	0.276	0.109	-0.013	0.019
Cl ⁻	0.048	0.848	0.040	0.051	0.157	0.169
SO ₄ ²⁻	0.085	0.786	0.221	0.063	-0.061	-0.274
DIS_Si	-0.221	0.090	-0.207	<i>0.464</i>	0.236	-0.561
NH ₄ ⁺ _N	0.289	0.471	0.051	<i>0.456</i>	-0.149	0.164
NO ₃ ⁻ _N	0.010	0.140	-0.113	-0.856	-0.017	0.009
NO ₂ ⁻ _N	-0.017	0.092	0.772	0.179	-0.059	0.095
KJEL_N	0.951	0.128	0.173	0.084	-0.027	0.015
PHEN	0.704	-0.036	0.074	0.015	-0.076	<i>0.553</i>
TOT_Fe	<i>0.649</i>	0.081	0.666	-0.131	0.165	-0.010
Pb	0.169	0.033	0.814	-0.074	-0.015	-0.011
Zn	0.088	0.027	-0.004	0.134	0.928	-0.005
Mn	0.586	0.113	<i>0.430</i>	-0.351	0.063	-0.052
Mg ²⁺	0.264	0.859	0.007	-0.140	0.060	-0.099
Na ⁺	0.032	0.850	-0.049	-0.016	0.111	0.117
K ⁺	-0.032	0.366	-0.030	-0.159	0.703	0.123
Ca ²⁺	0.927	0.180	0.085	0.071	0.079	0.048
ALK	0.258	0.523	-0.140	<i>0.389</i>	0.036	0.035
TOT_HARD	0.052	0.018	0.013	0.094	0.171	0.819
TURB	0.459	0.040	0.847	-0.005	-0.057	0.053
TDS	-0.188	0.828	0.236	-0.155	0.094	-0.086
SUSP_MAT	0.484	0.069	0.831	0.023	0.025	0.018
Expl.var (%)	22.6	21.5	15.6	6.7	6.6	6.3

АГК на подпочвени води: от направения анализ се образуват шест скрити фактора, които обясняват 79,0 % от общата вариация на системата (58 проби са описани от 25 променливи):

PC1 (обяснява 22,6 % от вариацията) включва следните силно корелирани променливи: БПК₅ (BOD), ХПК (COD), азот по Келдал (N_KJEL), феноли (PHEN), калций (Ca²⁺) и манган (Mn);

PC2 (обяснява 21,5 % от вариацията) включва следните силно корелирани променливи: електропроводимост (COND), азот (NH₄⁺), магнезий (Mg²⁺), натрий (Na⁺), хлориди (Cl⁻); сулфати (SO₄²⁻), алкалност (ALK), общи разтворени вещества (TDS);

PC3 (обяснява 15,6 % от вариацията) включва следните силно корелирани променливи: общо желязо (TOT Fe), мътност (TURB), неразтворени вещества (SUSP), олово (Pb) и азот (NO_2^-);

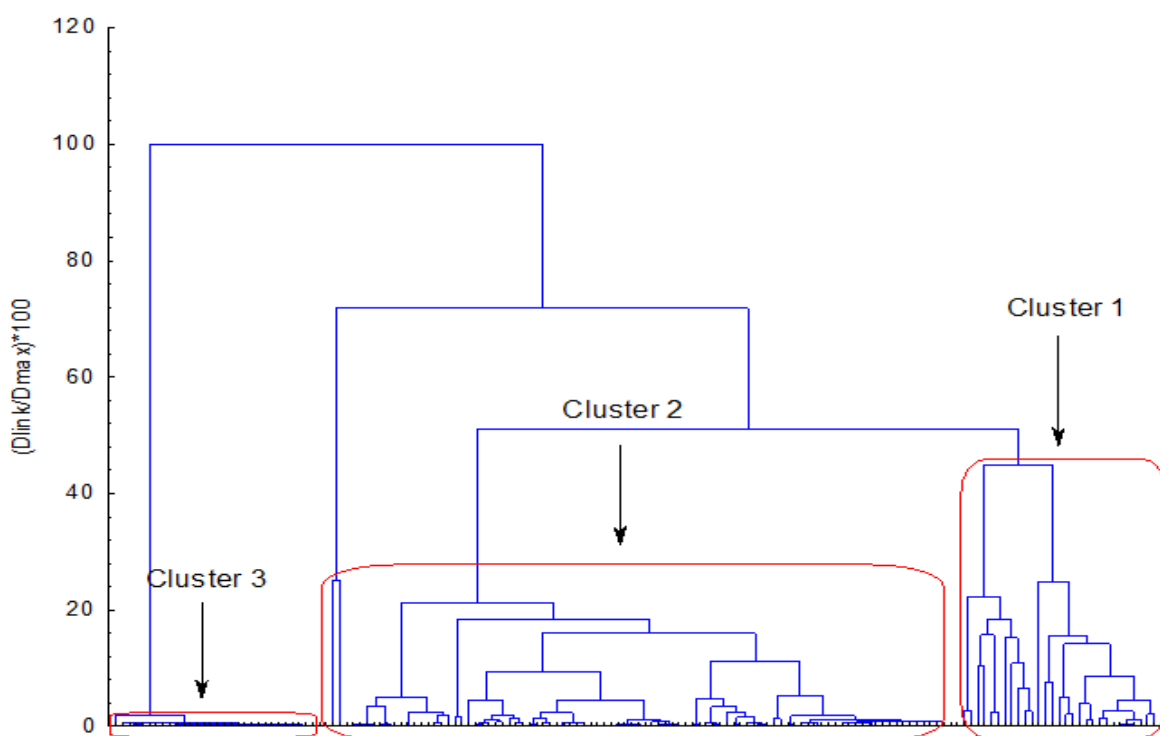
PC4 (обяснява 6,7 % от вариацията) включва променливата: азот (NO_3^-);

PC5 (обяснява 6,6 % от вариацията) включва следните силно корелирани променливи: цинк (Zn) и калий (K^+);

PC6 (обяснява 6,3 % от вариацията) включва следните силно корелирани променливи: обща твърдост (THARD) и разтворен силиций (Dis Si).

При този случай на анализ на главни компоненти се срещат някои трудности. От една страна обяснената вариация на системата дори с шест фактора е относително ниска, което е указание за комплексния характер на пробите, от друга страна отношението между броя на проби и броя на променливи затруднява хеометричната оценка. Условно факторите могат да бъдат наименовани (според нивата на факторните натварвания) : „биологичен“, „почвен“, „мътност“, „хранителен“, „солеви“ и „обща твърдост“.

Видно е, че трите отделни фази (повърхностни води, подпочвени води и води от седименти) показват различни начини на проявяване на факторите, отговорни за структурата на данните. Това допълнително се подкрепя от проведения кластерен анализ, при който е използван метода на Ward (и квадрата на Евклидовото разстояние по отношение на измерване на подобност между обектите) за директното определяне на подобие между всичките 154 проби (обекти на кластериране) от различните водни фази. Получената дендрограма (фиг. 41) ясно показва образуването на три обособени кластера (групи на подобие).



Фиг. 17. Йерархична дендрограма на всички проби, изследвани от Turawskie регион

Кластер 1 съдържа предимно пробите от повърхностни води, кластер 2 – пробите от води в седименти и кластер 3 – пробите от подпочвени води. Това ясно разграничаване на водните фази по отношение на качеството на водата потвърждава резултатите от прилагането на АГК. В допълнение се очаква, че резултатите от

токсикологичния анализ могат да представят допълнителна информация за качеството на водата по отношение на трите различни фази, които представят.

Заклучителна част от хеометричното изследване на качеството на водата включва процедура на пропорциониране, която да покаже приноса на всеки един от латентните фактори към общата концентрация на всеки от физикохимичните параметри. Процедурата по разпределение се извършва съгласно подхода на Thurston – Spengler. Резултатите (принос на всеки фактор, %) за избраните параметри за всяка фаза са представени в табл. 11 (*s* – surface water; *c* – core sediment water; *u* – underground water).

Табл. 11. Разпределение (в %) на някои параметри, характеризиращи пробите

	COND	SO ₄ ²⁻	Fe	K ⁺	Ca ²⁺	ALK	TURB	THARD
PC1(s)	67.2	80.9	-	-	65.4	70.2	69.1	94.3
PC2(s)	21.4	-	-	61.4	21.2	13.7	14.5	-
PC3(s)	-	-	49.3	-	-	-	-	-
PC4(s)	-	-	40.7	13.8	-	-	-	-
PC5(s)	-	7.5	-	17.1	-	-	9.2	-
<i>Intcpt</i>	11.4	11.6	10.0	7.7	13.4	16.1	7.2	5.7
PC1(c)	10.8	-	10.4	34.6	69.1	-	4.4	56.6
PC2(c)	54.1	68.9	-	50.3	12.9	7.8	5.3	21.2
PC3(c)	-	-	53.2	-	-	10.1	6.1	-
PC4(c)	12.6	-	-	10.2	8.4	57.3	-	9.7
PC5(c)	-	-	9.8	-	7.1	6.7	4.9	6.4
PC6(c)	-	13.7	-	-	-	-	5.7	-
PC7(c)	-	-	8.9	-	-	-	55.3	-
<i>Intcpt</i>	22.5	17.4	17.7	4.9	2.5	18.1	18.3	6.1
PC1(u)	10.2	-	44.3	-	59.8	12.6	10.7	-
PC2(u)	81.6	74.4	-	21.1	23.2,	57.3	-	-
PC3(u)	-	16.7	46.1	-	-	-	64.5	-
PC4(u)	-	-	-	-	-	19.1	-	-
PC5(u)	-	-	4.2	65.6	-	-	-	19.5
PC6(u)	-	-	-	6.2	-	-	-	67.7
<i>Intcpt</i>	8.2	8.9	5.4	7.1	16.8	11.0	24.8	12.8

Регресионните модели показват много добра корелация между „измерените“ и „изчислени“ по модела резултати ($r^2 > 0,75$). Необяснената част от общата концентрация за даден параметър е показана като стойност на регресионния отрез. Видимо от табл. 12 е, че общата концентрация на калций в повърхностни води се описва предимно от приноса на факторите „твърдост на водата“ (65,4 %) и „биологичен“ фактор (21,2 %), като необяснената част е 13,4 %. Приносът за същия параметър при води в седименти има смесен характер – „смесен“ фактор (който включва поредица от параметри, характеризиращи общата твърдост), „органичен и неорганичен соли“ фактор, „седиментен“ фактор (отчитайки соли параметър и основните компоненти на седиментите). По отношение на третата фаза – подпочвени води – „биологичният“ и „почвен“ фактор определят резултатите (59,8 % и 23,2 %). Отново различни съчетания от въздействие оформят общата концентрация на калций в подпочвените води. По същия начин се интерпретират и останалите параметри.

Оценка въз основа на физикохимичните и токсикологични параметри

Една от основните цели на изследването бе да се намери връзка между хеометричните резултати от физикохимичните параметри и данните от биотестовите.

При много от изследваните проби токсичността е или еднаква, или липсва токсичен ефект, в резултат на което броят на обектите в матрицата от данни значително намалява и това води до недостатъчен набор от данни, при който реална мултивариационна статистическа обработка не може да бъде направена.

При определяне на остра токсичност посредством бактерията *Vibrio fischeri* за целия набор от проби се наблюдава корелация предимно между токсичността и параметрите рН, електропроводимост, азот (NH_4^+), азот (Келдал), анионни детергенти и някои метали (Pb, Cu, Zn и Mn), като напр. „киселинния“, „биологичен“ и „антропогенен“ фактор, определени чрез АГК. Видимо тези фактори предизвикват повишаване на острата токсичност по време на изследвания период.

Повишени нива на корелация се наблюдават между параметрите рН, електропроводимост, хлориди, феноли, алкалност, натрий, калий и магнезий и острата токсичност при *Daphnia magna*. В този случай влиянието на латентните фактори като „киселинност“, „органичен“ и „солеви“ фактор допринасят към ефекта на инхибиране на възпроизвеждането. Повишените нива на химичните параметри за наблюдавания период при условията на повишена токсичност показват тяхната роля в образуването на нов вид параметър, характеризиращ остра токсичност. На пръв поглед концентрационните нива на параметрите са в допустимите граници, но най-вероятно тяхното взаимно влияние води до синергично въздействие, водещо до токсичен ефект при *Daphnia magna*.

Оценката на хроничната токсичност в пробите се оказва по-трудна задача и слаба положителна корелация се наблюдава между стойностите за хронична токсичност и някои от параметрите. Корелация се забелязва между показателите хлориди, феноли и анионни детергенти. Тези вещества представляват характерни замърсители за водните екосистеми и вероятно в условията на дългосрочно въздействие може да се проявят като агенти на хронична токсичност, въпреки ниските нивата, в които се наблюдават.

Оценяването на качеството на водите посредством прилагането на многовариационни статистически методи показва, че наблюдаваните данни трябва да бъдат оценявани разностранно, с цел да се разкрие реалното състояние на дадена екологична система или фаза. По този начин токсичните ефекти (остра, хронична и друг вид токсичност) могат да бъдат тълкувани не само посредством традиционното въздействие на химичните замърсители, но също така и като резултат от специфични процеси или феномени в конкретната среда. Очевидно, информацията за всички възможни взаимодействия в една комплексна система може да бъде получена само в условията на многовариационно оценяване.

5. Основни приноси на дисертационния труд

1. Направена е екотоксикологична оценка на изследваните пестициди, което потвърждава необходимостта от изучаване на онечистванията в индустриални продукти каквито се пестицидите. С изключение на публикацията на Nuwe et al. (2003) до момента не са публикувани други изследвания върху онечистванията. Осъществена е оригинална екотоксикологична оценка спрямо общия екотоксикологичен ефект и по-специално изследване на ензимната цитохром P450 активност чрез EROD системата при пестициди и съпътстващите ги онечиствания;
2. За първи път са извършени изследвания върху адсорбционните и екотоксикологични характеристики на обгорени и необгорени почви, като е потърсена връзка между наблюдаваните параметри адсорбционна способност и токсичност;
3. Създадена е моделна оценка за връзката между химични замърсители и екотоксичността на една слабо изучена система, като речните седименти, доказвайки необходимостта от екометрични подходи за откриване на „скрити“ параметри (антропогенни и естествени) при характеризиране на екосистеми с физикохимични и екотоксикологични показатели.

Списък на публикациите включени в дисертационния труд

1. Ion A.C., Bley S., Ion I., Culetu A., **Zahov S.**, Hollert H., Seiler T., Investigation of the contaminant sorption of treated Romanian soils using “batch” and biological toxicity assays, *Catena*, 2012, 101, 205-211.
2. Kuczynska A., Wolska L., Simeonov V., Tsakovski S., **Zahov S.**, Namiesnik J., Chemometric estimation of natural water and sediment using toxicity tests and physicochemical parameters, *Journal of Balkan Ecology*, 2006, 9, 3.