

Авторска справка за приносите на научните трудове

на гл. ас. д-р Галина Ивайлова Йотова

във връзка с конкурс за заемане на академична длъжност „доцент“
(професионално направление 4.2. Химически науки (Аналитична химия),
обявен в Държавен вестник, бр. 103 от 12.12.2023 г.

Гл. ас. д-р Галина Йотова е съавтор в 19 научни публикации, публикувани в научни списания, реферирани и индексирани в световни бази данни с научна информация (Web of Science и Scopus), от които 16 публикации в списания с импакт фактор (14 публикации – Q1; 2 публикации – Q2) и 3 публикации в списание без импакт фактор. В настоящия конкурс, кандидатът участва с 15 научни публикации. Номерацията на научните трудове следва реда от списъка на публикациите, представени за участие в конкурса (*файл 10B.SelectedPublicationsList*). Към момента са забелязани 157 цитирания (с изключени автоцитати на всички автори) в научни издания, реферирани и индексирани в световноизвестната база данни с научна информация Scopus, а индексът на Хирш е 7. Научните резултати са представени чрез устни доклади и постерни съобщения на 9 научни форума, от които 7 международни, като едно от участията е отличено с награда за най-добър постер.

Научноизследователската работа на кандидата и свързаните с нея научни приноси се състоят главно в многовариационен анализ на данни от околна среда (води, почви, седименти), лекарствени смеси и хранителни опаковки, чрез класически и усъвършенствани хемометрични подходи, както и в прилагането и тълкуването на резултати от екотоксикологични анализи. Хемометричните и екотоксикологични методи за анализ, в използваните за участие в настоящия конкурс публикации, могат да се обобщят, както следва:

1. Хемометрични подходи:

- 1) корелационен анализ (correlation analysis) – установява наличието на зависимост между параметрите, като силата и посоката ѝ се оценяват чрез изчисляване на корелационен коефициент [5, 9];
- 2) вариационен анализ (analysis of variance – ANOVA) – метод, за изследване на съвкупност от резултати, получени при различни експериментални условия, чиято цел е да оцени влиянието на един или повече контролируеми фактора върху аналитичните резултати [6, 8, 12];
- 3) клъстерен анализ (cluster analysis – CA) – разкрива и визуализира структурата на изследваните данни, като открива групи на подобие между обектите (пробовземателни пунктове), описани от набор от променливи (индикатори за качество на води, почви и т.н.) и обратно [3, 5, 8, 9, 15];
- 4) анализ на главните компоненти (principal component analysis – PCA) – метод за редукция на данните, който открива скритите връзки между параметрите и формира нови ортогонални променливи (фактори), които по-добре описват вариацията на системата [2, 3, 4, 14];
- 5) вариационен анализ с разлагане по главни компоненти (analysis of variance simultaneous component analysis – ASCA) – комбинира ANOVA и PCA, за да оцени и интерпретира вариацията, предизвикана от експерименталните фактори и е подходящ метод за работа с многовариационен набор от данни, получени чрез експериментален дизайн [11];

6) метод за идентифициране на компоненти (multivariate curve resolution – MCR) – намалява размерността на данните като формира нови неортогонални променливи (източници), като дава възможност за използване на ограничение, при което членовете на матриците на факторните резултати и на факторните натоварвания са само положителни [2];

7) метод на частично най-малките квадрати с дискриминантен анализ (partial least squares-discriminant analysis – PLS-DA) – целта на метода е да разпознае произхода на пробата на база анализирания параметри, като създаде модел, който да разграничи пробите и да определи параметрите със значима роля за класификационния модел [1,4];

8) самоорганизиращи се карти на Кохонен (SOM) – невронна мрежа, използвана за визуализация и интерпретация на големи масиви от данни, която може да се разглежда като техника за картиране, откриваща групи на подобие, без да използва допускането за нормално разпределение, характерно за традиционните статистически методи [3, 9];

2. Екотоксикологични тестове:

1) Microtox® – система за анализ, която регистрира забавянето на метаболизма на бактериите *Vibrio fischeri* като измерва намаляването на интензитета на биолуминисценцията им, вследствие на 30-минутно излагане на токсични вещества [1, 5, 6, 7, 8, 11, 13];

2) Phytotoxkit F™ – измерва промяната (в сравнение с контролна проба) в покълването на семената и растежа на корените на три вида висши растения *Sorghum saccharatum*, *Lepidium sativum* и *Sinapis alba*, 72 часа след като са посяти в анализиранияте проби [1, 4, 12, 13, 14];

3) Daphtoxkit F™ – дава оценка за токсичността на пробите, чрез отчитане на броя на мъртвите и обездвижени новородени на ракообразния вид *Daphnia magna* в анализиранията водна проба след инкубационен период от 48 часа [1, 12, 13];

4) Ostracodtoxkit F™ – измерва инхибирането на растежа (GRINH) и смъртността (MORT) на ракообразния вид *Heterocypris incongruens* вследствие на 6-дневен контакт с анализиранията проба [4];

5) XenoScreen YES/YAS® – използва генетично модифицирани дрожди *Saccharomyces cerevisiae*, които поради генетично въведените андрогенни (YAS) и естрогенни (YES) рецептори са чувствителни (инкубационен период от 48 часа) към присъствието на вещества с хормонални свойства, което позволява оценка на агонистичните и антагонистичните свойства на химикалите, присъстващи в пробата [5, 7, 8, 11].

Научните приноси на научните трудове, представени за участие в конкурса могат да бъдат обобщени в три основни категории:

1. Екометрична и екотоксикологична оценка на водни проби [1-4, 12, 13, 15];
2. Екометрична и екотоксикологична оценка на почвени проби и седименти [9, 10, 14];
3. Хемометричен анализ на данни за токсичността на лекарствени смеси и опаковъчни материали [5-8, 11].

1. Екометрична и екотоксикологична оценка на водни проби

Основен дял от научноизследователската ми работа до момента е свързан с екометрична оценка и екотоксикологични изследвания на повърхностни и отпадъчни води. Обект на изследванията са пречиствателните станции за отпадъчни води (ПСОВ) и по-конкретно – анализ на преработените от ПСОВ отпадъчни води и въздействието им върху повърхностните водни тела, в които заустват [1, 2, 4]. Предмет на отделни проучвания са водите в реките Места [3], Огоста [12] и Марица [13]. В допълнение, една от публикациите е свързана с разпределението на алуминий във водопреносната мрежа на гр. София [15].

Реките имат много съществена и важна роля в човешкото общество, защото осигуряват вода за домакинствата, селското стопанство, промишлеността и транспорта. Качеството на водите в реките може да бъде повлияно както от естествени, така и от антропогенни източници. Човешкото въздействие върху повърхностните води може да доведе до промени в режима на водния отток и в качеството на повърхностните води поради изхвърляне на замърсители на определени места (точкови източници) като ПСОВ или чрез повърхностни/подпочвени потоци (дифузни източници).

Проведена е оценка на отпадъчните води от ПСОВ като са използвани данни за 2017 г. от задължителния мониторинг, в съответствие с Наредба №6/09.11.2000 г. за емисионни норми за допустимото съдържание на вредни и опасни вещества в отпадъчните води, зауствани във водни обекти, за показателите химична потребност от кислород (ХПК), биологична потребност от кислород (БПК), общ азот (N), общ фосфор (P) и неразтворени вещества (НВ) [2]. Установено е, че средните концентрации в отпадъчните води на изследваните ПСОВ са по-ниски от съответните граници, определени в Наредба №6 за всички задължителни параметри във всички изследвани ПСОВ. Това показва адекватно пречистване, независимо от наличието на случайни превишения. Делът на наблюдаваните по-високи концентрации от определените в наредбата са както следва: ХПК (1.9%), БПК (3.2%), N (12.8%), P (12.0%) и НВ (2.4%). Превишения спрямо всички показатели в две от анализирания ПСОВ показват необходимостта от реконструкцията и модернизацията им. Неадекватно пречистване и следователно повишени концентрации на биогенни елементи (N и P) се установяват в ПСОВ без стъпала за отстраняване на азот и фосфор. Диапазоните на изчислените товари спрямо еквивалент жители за петте показателя за качество на водите са в съответствие с данни от други подобни изследвания за отпадъчни води. Чрез провеждане на хеометричен анализ (РСА, МСР) са идентифицирани три фактора (източници), отговорни за структурата на данните: „разтворими биогенни елементи“ – разкрива връзката между разтворимата част от товарите на биогенните елементи (N, P) и потреблението на кислород (ХПК, БПК); „трудно окисляеми вещества“ – отразява връзката между бионеразградимата част от N, P и НВ; „неразтворени вещества“ – показва връзката между товарите на НВ и потреблението на кислород (ХПК, БПК).

Извършеното пропорциониране разкри средния принос на идентифицираните източници към товарите на качествените показатели от отработените отпадъчни води от ПСОВ. Идентифицирани са групи на подобие между ПСОВ чрез пропорциониране на товарите на качествените показатели спрямо получените източници за всяка от изследваните станции, което очерта различията в технологичните им профили. Профилите на товарите на всяка ПСОВ дават специфична информация относно състава на заустваните отпадъчни води, която може да се използва за управление на процесите по пречистване на отпадъчните води и анализ на

въздействието на ПСОВ върху приемащите водни обекти. Доколкото е известно на авторите, предложената многовариационна статистическа оценка на отпадъчните води от ПСОВ, включваща пропорциониране на идентифицираните източници, се прилага за първи път в това проучване [2].

За да се оцени влиянието на ПСОВ върху приемащите водни тела, са проведени 2 пробовземателни кампании – през м. август 2018 г. [1] и през м. август 2020 г. [4]. През първата кампания е проведено пробовземане от 3 точки за 21 ПСОВ – една на изхода на ПСОВ и две от реката – преди и след зоната на смесване на зауствените отработени отпадъчни води [1]. Във водните проби са анализирани (от съавтори) 20 химични и физикохимични показатели за качество на водите – рН, електропроводимост (ЕС), ХПК, НВ, общ N, общ P, Cl⁻, SO₄²⁻, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Se, V, Zn. Към традиционните инструментални изследвания, използвани за мониторинг, са добавени екотоксикологични и хемотрични методи за анализ при оценка на ефективността и въздействието на ПСОВ върху повърхностните води. За оценка на екотоксичността на водните проби е използвана батерия от подобрени биотестове, в които тестовите видове са от различни трофични нива – редуценти *Vibrio fisheri* (Microtox[®]), консументи *Daphnia magna* (Daphtoxkit F[™]) и продуценти *Sorghum saccharatum*, *Lepidium sativum*, *Sinapis alba* (Phytotoxkit F[™]).

Извършеното многовариационно статистическо моделиране посредством PLS-DA определи значимите за класификацията индикатори за качество на водите. Установи се, че отпадъчните води се характеризират с по-висока ЕС и по-високи концентрации на P, N, Cl⁻, Zn и Se, чиито основен източник са човешките отпадъци, перилни препарати, шампоани, сапуни. В повърхностните води се наблюдават по-високи нива на НВ и Fe спрямо ефлуентите, при които твърдите частици са отстранени при процесите на пречистване на неотработените отпадъчни води. Друг важен резултат от PLS-DA е определянето на индикатори за качество на водите, които могат да се използват като отпечатък за влиянието, което оказват ПСОВ върху приемащите водни тела. Това са Mn, Cl⁻, Zn, Se и рН, като повърхностните води след заустването, в сравнение с водите преди заустването на ПСОВ, се характеризират с по-високи стойности на Cl⁻, Zn, Se и рН, и по-ниско съдържание на Mn, в резултат на отделения в реката ефлуент. Резултатите показват, че по-значимо влияние върху класификацията на пробите от повърхностни и отпадъчни води оказва екотоксикологичният тест Phytotoxkit F[™], в сравнение с Microtox[®] и Daphtoxkit F[™], като най-значимият екотоксикологичен показател е дължината на корените на *Sinapis alba*, която в отработените отпадъчни води е по-висока (поради по-виокото съдържание на N и P в ефлуента) спрямо повърхностните води.

Прилагането на екотоксикологични и екометрични методи за анализ осигурява качествено нова информация за състоянието на водните тела, която може да се използва за управление на процесите по пречистване на отпадъчните води и управлението на водните ресурси в България.

През втората пробовземателна кампания са взети по 4 проби за 11 ПСОВ – по една на вход и изход на ПСОВ и две от реката – преди и след зоната на смесване на зауствените отработени отпадъчни води [4]. В получените 44 проби са анализирани 26 химични и физикохимични показатели (от съавтори): рН, ЕС, ХПК, НВ, общ органичен въглерод, обща твърдост, общ N, общ P, NO₃⁻, Cl⁻, SO₄²⁻, Al, As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Se, U_{nat}, V и Zn. За екотоксикологичен анализ е използван най-значимият от анализиране в предишното проучване индикатор [1] –

промяна в растежа на корените на растителния вид *Sinapis alba* (SA-RG). Проведен е и допълнителен екотоксикологичен тест (от съавтори) с помощта на Ostracodtoxkit F™, който измерва инхибирането на растежа (GRINH) и смъртността (MORT) на ракообразния вид *Heterocypris incongruens*. Хемометричният анализ на получените данни включва прилагането на PCA и PLS-DA.

Проведеният PCA (4 главни компонента обясняват близо 55% от общата вариация на системата) разкрива връзката на изследваните екотоксикогични индикатори с химичните и физикохимични индикатори за качеството на водата, а именно: първият латентен фактор (PC1) показва положителна корелация на показателите, свързани с *Heterocypris incongruens* (MORT, GRINH) с ЕС, общата твърдост и някои потенциално токсични елементи (ПТЕ); PC2 разкрива силна корелация на всички екотоксикологични параметри с ХПК, хранителни вещества (N и P), HВ, Al, Fe и Cd; PC3 представя различното поведение на индикаторите на двата екотоксикологични теста – SA-RG има положителна корелация с NO₃⁻ и някои ПТЕ (с Zn като основен представител), докато MORT и GRINH са силно свързани с рН; PC4 показва силна корелация на GRINH с рН, Cl⁻ и някои ПТЕ като Cr, Co, Ni и Cu. Графичното съпоставяне на факторните резултати на определените главни компоненти показва, че спрямо PC2 (значими положителни факторни натоварвания на ХПК, N, P, HВ, Al, Fe, Cd, MORT, GRINH и SA-RG) се наблюдава ясно разграничаване на неотработените отпадъчни води от останалите проби, а спрямо PC3 (значими положителни факторни натоварвания на SA-RG, NO₃⁻ и някои ПТЕ (главно Zn), и отрицателни на MORT, GRINH и рН) се наблюдава относително добро разделяне на отработените отпадъчни води от останалите проби, което разкрива, че отработените отпадъчни води се отличават с по-ниски стойности на рН и по-високи концентрации на Zn. Липсата на разделяне на повърхностните проби спрямо мястото на заустване на ПСОВ показва, че заустването на отработените отпадъчни води не води до значителни промени в изследваните физикохимични и екотоксикологични параметри в приемащите водни тела.

С цел по-подробно изследване на променливите, отговорни за гореспоменатото групиране на пробите е проведен и PLS-DA. Анализът показва, че неотработените отпадъчни води се характеризират с по-високи стойности на рН, ХПК, N, HВ, Al, Fe, Cd, MORT и GRINH, а в отработените отпадъчни води се наблюдават по-високи нива на NO₃⁻ и Cr. Наблюдаваните смъртност и инхибиране на растежа на ракообразния вид *Heterocypris incongruens* се обясняват с общите физикохимични параметри (като ХПК, HВ, рН), тъй като остракодите са най-високо разположени в трофичната верига (сред изследваните организми) и имат напълно развит стомашно-чревен тракт, където се случва смилането на суспендирани твърди вещества, които са важен източник на метали и органични замърсители. Проведен е PLS-DA за разграничаване на пробите отработени отпадъчни води от повърхностните води. Значими за класификацията са променливите рН, ЕС, NO₃⁻, N, P, Cl⁻, Ni, Cu, Zn, Se и GRINH, като по-голямата част от тях потвърждават резултатите от предишното изследване [1]. Отработените отпадъчни води се характеризират с по-високи стойности на всички значими индикатори за качество на водите, с изключение на рН. Важен резултат от настоящия анализ е ниската стойност на инхибирането на растежа на *Heterocypris incongruens* за водните проби от изхода на ПСОВ. Това наблюдение може да се обясни с повишените концентрации на биогенните елементи и намаленото съдържание на неразтворени вещества, които са значим източник на замърсяване. Очевидно, инхибирането на растежа на *Heterocypris incongruens* е най-чувствителният екотоксикологичен параметър сред проведените екотоксикологични тестове.

За да се получи качествено нова информация за оценка на отработените отпадъчни води и повърхностните води е необходимо към традиционните инструментални изследвания да се добавят екотоксикологични и хеометрични методи за анализ. Тестовите с водорасли, бактерии и растения са най-често използваните екотоксикологични тестове при такъв мониторинг, но те се характеризират със специфични ограничения, поради острата токсичност, която оценяват и използването най-често на организми от по-ниско трофично ниво. От направеното проучване се оказва, че биотестът, използващ *Heterocypris incongruens*, въпреки че е предназначен за оценка на токсичността на твърди проби, е приложим за свръхчувствителна оценка на нивата на токсичност на течни проби, когато съответните модификации са въведени и валидирани за тази цел.

В допълнение на описаните изследвания, е проведено проучване за влиянието на ПСОВ по поречието на река Марица на територията на България [13]. Използвани са мониторингови данни за ефлуентите на три от четирите ПСОВ по поречието на реката, както и данни от собствен мониторинг на пробовземателни точки от реката преди и след заустване, както и от изхода на трите ПСОВ. Представени са приносите на заустваните товари, оценени чрез основните физикохимични параметри (ХПК, БПК, общ N и общ P), към общите товари на река Марица. Общите натоварвания на замърсителите, потребяващи кислород (изразени чрез ХПК и БПК) са по-ниски от 10%, докато общите натоварвания на хранителните вещества (N и P) са съответно 21.2% и 42.5%. Основната част от товарите от ПСОВ, очаквано произлизат от сравнително големите ПСОВ на Пазарджик и Пловдив, които не използват в технологичните си схеми стъпала за отстраняване на азот и фосфор. Във водосборния басейн на река Марица се наблюдават големи разлики в стойностите на речния отток в различните пробовземателни места, което предполага, че значителна част от увеличението на товарите се дължи на множество други точкови и неточкови източници като вливащите се в нея притоци. Всички изследвани (от съавтори) физикохимични параметри (с изключение на Cu, Al) показват увеличение на концентрацията във водите след последната ПСОВ (Свиленград) спрямо водите преди заустването на първата ПСОВ (Пазарджик). Екотоксичността на пробите от повърхностни води, оценена чрез екотоксикологичните тестове Microtox[®], Daphtoxkit F[™] и Phytotoxkit F[™] е ниска и не се наблюдава тенденция по течението на реката.

За оценка качеството на повърхностните води в река Огоста и язовир Огоста и влиянието което оказва ПСОВ-Монтана, са проведени 4 пробовземателни кампании през 2019 г., като са взети проби от 3 точки от реката, 1 от язовира и по една от входа и изхода на ПСОВ [12]. Анализирани са основните химични и физикохимични показатели (от съавтори) и са проведени екотоксикологични тестове посредством *Daphnia magna*, *Sinapis alba* и *Sorghum saccharatum*. Средногодишните концентрации на Al, Cr (III), Cr (VI) и U в пробите от язовир Огоста и река Огоста са по-ниски от максимално допустимите концентрации, определени в Рамковата директива за водите. Концентрацията на As във всички проби надвишава максимално допустимата концентрация, което е резултат от минна дейност и разлив на хвостохранилище през 60-те години на миналия век. Всички измерени стойности на химичните и физикохимични показатели в пробите от изхода на ПСОВ-Монтана са по-ниски от ограниченията, определени в Наредба №6 и в комплексното разрешително. Процесът на обработка намалява значително съдържанието на ХПК, БПК, НВ, Cd и Pb, приблизително четири пъти намалява съдържанието на P и Mn и умерено до никакво намаление се наблюдава за Cl⁻, SO₄²⁻, As, Cr, Cu, Fe, Ni и Zn.

Резултатите от класическия подход се потвърждават и от екотоксикологичните анализи, които показват ниска екоотоксичност на всички изследвани проби.

Отново се доказва, че един от най-широко използваните биотестове за анализ на водни проби – Daphtoxkit F™ – не е достатъчно индикативен и чувствителен за незамърсени проби. Биотестът Phytotoxkit F™ е стандартизиран само за почвени проби и няма утвърден протокол за водни проби (към момента на публикуване на изследването). Въпреки това, описаната в други публикации пробоподготовка включва филтруване чрез стерилни 25 mm PES спринцовки, като се използват филтри с размер на порите 0.2 µm. Липсата на достатъчно данни за анализ на водни проби с Phytotoxkit F™, както и естествените условия в екосистемите, провокират интереса към анализ на влиянието на филтруването на пробите върху резултатите от екотоксикологичния тест. През една от проведените кампании, за всяка една от пробите е извършено филтруване през филтри с различен размер на порите – 0.2, 0.45 и 1.5 µm. Проведен е екотоксикологичен анализ с растителните видове *Sinapis alba* и *Sorghum saccharatum* на получените филтрата, както и на нефилтруваните проби. Резултатите от проведения ANOVA показват, че няма статистически значима разлика в екотоксикологичния ефект, причинен от различния размер на порите на филтрите, използвани при предварителната обработка на пробите. Този резултат обаче е получен върху малък набор от данни на проби с ниско съдържание на НВ. Интересно е да се отбележи, че към настоящия момент фирмата производител на Phytotoxkit F™ разработи и вариант на биотеста за водни проби, който не включва филтруване на повърхностните води.

Особен интерес представлява предложеният метод за оценка на качеството на водите в речен водосбор чрез съвместното използване на комбинирания индекс за качество на водите (WQI) на Канадския съвет на министрите на околната среда и самоорганизиращи се карти на Кохонен (SOM) [3]. Това е и най-цитираната публикация, от списъка, представен от кандидата за участие в настоящия конкурс (43 цитата). В проучването са включени мониторингови данни за 10 пробвземателни пункта от водосбора на река Места в периода 2008–2018 г., които са оценени с 9 физикохимични индикатора за качество на водите. Изчислен е WQI, който е базиран на 3 фактора (диапазон, честота и амплитуда). Предложеният нов подход, предоставя по-подробна информация за качеството на повърхностните води на изследвания речен водосбор като комбинира многовариационния подход SOM и WQI. Използването на 3-те фактора, получени при изчисляването на WQI, като променливи при прилагането на SOM дава възможност за (i) намиране на подобни групи от пробвземателни ситуации в изследвания речен басейн; (ii) разкриване на конкретни WQI профили за различните групи обекти. По този начин могат да бъдат очертани различни профили на WQI, представящи конкретни ситуации, свързани с качеството на водите. Освен това могат да бъдат открити времеви промени в качеството на водата и сходство между пробвземателните пунктове в речния водосбор. Получените резултати потвърждават, че комбинирането на многовариационен подход като SOM с факторите, използвани при изчисляване на WQI, е удачна стратегия за оценка на качеството на водите в речния басейн и има потенциал да подпомогне институциите, отговорни за околната среда в дейностите по управление на речния басейн. Предложеният подход предлага редица възможности за по-нататъшни подобрения, а именно: (i) гъвкавост по отношение на включването на допълнителни показатели за качество на водата (приоритетни замърсители, хидрологични, биологични показатели), които биха могли да доведат до количествена химична и/или екологична оценка на изследваните водни тела; (ii) използване на количествена оценка за анализ на антропогенния натиск и тяхното въздействие

върху водните тела и (iii) избор на водни тела, повлияни от антропогенна дейност, за проучвателен мониторинг.

Много проучвания описват връзката между алуминия, на който е изложен човешкият организъм и появата и прогресирането на болестта на Алцхаймер. Поради това в световен мащаб са разработени стандарти за качество на питейната вода, включващи различни допустими концентрации на Al. През последните няколко години бяха открити повишени концентрации на Al в повърхностните води, идващи от яз. Искър и постъпващи в пречиствателните станции за питейни води (ПСПВ) Бистрица и Панчарево, които са основните съоръжения в системата за питейно-битово водоснабдяване на гр. София. Анализирани са съдържанието на Al на изхода на двете ПСПВ, както и в 17 пробоземателни пункта във водоснабдителната мрежа на гр. София (от съавтори). Установено е, че концентрацията на Al на изхода на двете ПСПВ следва тенденцията на концентрациите на Al на входа, което показва пряката връзка между постъпващата в ПСПВ вода и качеството на пречистената вода. Многовариационният статистически анализ (СА) на концентрациите на Al, показва сходство между водата от ПСПВ и повечето от пробоземателните пунктове, което е индикация за смесения произход на пречистената вода във водоснабдителната мрежа. Попадането в един клъстер на най-близката и най-отдалечената от ПСПВ точки показва, че разпределението на Al не се влияе от разстоянието между пречиствателните станции и пробоземателните пунктове. Клъстерният анализ откроява водата в един от кварталите на гр. София в отделен кластер. Анализ на материалите, използвани за тръбопровода на анализирани квартали, показва, че отличаващият се квартал е единственият, в който водопроводът е изцяло от азбестоциментови тръби. Направеното проучване показва, че промяната на концентрацията на Al в чешмяната вода зависи от качеството на водата и съотношението ѝ от различните ПСПВ, както и от потенциалното отделяне на метала от азбестовите и чугунените тръби. Необходимо е по-подробно изследване на потенциалното количество на отделения в питейната вода Al, в зависимост от материала на тръбопровода. Независимо от това е необходимо постепенна подмяна на тръбите във водопредавателната мрежа, за да се избегнат подобни рискове.

2. Екометрична и екотоксикологична оценка на почвени проби и седименти

Почвата е жизненоважен невъзобновяем ресурс, който може да събира и задържа множество замърсители на околната среда. Замърсяването на повърхностния почвен слой с потенциално токсични елементи (ПТЕ) е значителен екологичен проблем поради интензивната антропогенна дейност като индустриализация, урбанизация и селско стопанство. Концентрацията на ПТЕ в почвите е въпрос, към който се подхожда с голямо внимание, поради свойствата им на акумулиране и невъзможност за разлагане, което може да доведе до токсични нива в екосистемата. В геохимията на околната среда геохимичният фон и праговите стойности се използват за идентифицирането на пробоземателните места с необичайно високи концентрации на ПТЕ. Високите концентрации на елементи в почвата може да се дължат на природни явления като минерализация, необичайни видове скали и т.н. или могат да бъдат причинени от човешка дейност.

Фоновата концентрация включва както концентрация с геоложки произход, така и антропогенно дифузно замърсяване. Следователно, основната цел на праговите стойности, базирани на фоновите концентрации е да се определят регионите с необичайно високи стойности на ПТЕ, причинени от локално замърсяване или геоложки аномалии.

Проведеният задълбочен литературен обзор на методите за изчисляване на геохимичния фон доведе до използването на серия от аналитични, графични и математически подходи, чрез които да се установят фоновите и праговите стойности на ПТЕ в повърхностния почвен слой в България [10]. Използвани са данни за съдържанието на 8 ПТЕ (As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb и Zn) в 348 пробоземателни точки от националната мрежа за почвен мониторинг (ортогонална мрежа със сечение 16 км на територията на цялата страна) на дълбочина 0–20 cm, в периода 2004–2005 г., като 74.7% са обработваеми земи, а 25.3% са постоянни тревни площи. Съвместното прилагане на статистически методи и информация за специфичното съдържание на ПТЕ по региони, доведе до отстраняване от базата данни на екстремните резултати. За всеки елемент е направена проверка за степента на симетрия на разпределението и при необходимост е извършена логаритмична трансформация на данните. Праговите стойности за ПТЕ в националната мрежа за почвен мониторинг са изчислени чрез методите: „медиана+2MAD (абсолютно отклонение на медианата)“; „TIF (Tukey inner fence)“, базиран на бокс-плот диаграмата; както и най-често използваните проценти (персенти) – 90^{-ти}, 95^{-ти} и 98^{-ми}. Очаквано, методът TIF осигурява по-високи прагови стойности от „медиана+2MAD“, който е по-консервативен. Сравнението на двата статистически метода за изчисляване на геохимичния праг показва, че за повечето от ПТЕ, праговите стойности, изчислени чрез „медиана+2MAD“ са близки до 90^{-тия} персентил, докато TIF-подходът води до по-високи прагови стойности – между 95^{-тия} и 98^{-мия} персентил или дори над този диапазон. Получените резултати са сравнени и с публикуваните през 2002 г. фонове концентрации, които са залегнали и в Наредба №3/01.08.2008 г. за нормите за допустимо съдържание на вредни вещества в почвите и се базират на определения 90^{-ти} персентил. Забелязва се, че стойностите за 90^{-тия} персентил, получени в това изследване, са по-високи от фоновите концентрации в Наредба №3, с изключение на тези за Cd и Zn. Най-голямата разлика (един порядък) се наблюдава при Hg. Причината за това несъответствие може да се намери в използването на различни набори от геохимични данни. За определянето на фоновите концентрации, заложи в наредбата, са докладвани данни само от необработваеми региони, които не представят адекватно всички видове почви в България. В допълнение, данните съдържат малко записи за As, Cd и особено за Hg.

Геохимичните прагови стойности, получени чрез различни статистически методи, позволяват управлението на почвата да се извършва диференцирано. Сравнението на изчислените национални геохимични прагови стойности с приетите в други страни, разкрива ниско антропогенно въздействие върху българските почви, с изключение на Hg. В допълнение е извършено геохимично картографиране (от съавтори), което ясно очертава регионите с високи концентрации на ПТЕ, дължащи се на естествени процеси, като рудни залежи и състав на матерната скала, както и локалните източници на замърсяване с ПТЕ, главно от минно дело, производството на метали и ТЕЦ Марица изток.

Комбинирането на установените прагови стойности на ПТЕ с геохимично картографиране идентифицира местоположенията на приоритетните зони за по-нататъшна оценка. Регионите, в които се наблюдават превишения на геохимичните прагови стойности за 3 или повече ПТЕ, се намират на места, засегнати главно от минно дело и производството на метали. В тези зони трябва

да се извърши специфична оценка на риска за околната среда въз основа на екотоксикологични анализи. Трябва да се проведат и допълнителни изследвания за установяване на специфичните прагови концентрации, особено за Hg.

С оглед на значимостта за животновъдството, бе проведен специфичен мониторинг (от съавтори) на почвени и растителни проби от района на Средногорието (Златица-Пирдоп) и изследване на преноса на ПТЕ в трева, растяща в района. Целта на изследването [9] е да се направи оценка на замърсяването на почвите в района на трите медни мини: Елаците, Челопеч и Асарел-Медет, както и на медодобивния завод, разположен между градовете Златица и Пирдоп. Като основни замърсители в почвените проби се проявяват As и Cu. Докато съдържанието на Cd, Cr, Mn, Ni, Pb и Zn в тревата е в нормалните за растенията граници, As и Cu ги надхвърлят. Сериозен риск за хранителната верига може да представлява пренасянето на замърсители от полепналия върху тревата фин почвен прах с високо съдържание на As и Cu.

Оценена е биодостъпността на потенциално токсичните елементи As, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Zn от замърсените почви в растяща при естествени условия в района трева (*Cynodon dactylon*) с помощта на два фактора: фактор на пренос – отношение на концентрацията на даден елемент в растението към тоталното му съдържание в почвата (извлек с царска вода) и фактор на биодостъпност – отношение на концентрацията на даден елемент в растението към концентрацията му в почвения извлек с ЕДТА (от съавтори). Чрез многовариационни статистически методи (CA и SOM) е открита връзка между стойностите на двата фактора за As, Cd, Cu, Ni, Pb, Zn, но не и за Cr и Mn. Връзката между двата фактора и основните характеристики на почвата разкрива факторите, контролиращи преноса на ПТЕ в изследвания регион. До известна степен рН на почвата, общо съдържание на органични вещества и CaCO₃ са свързани с биодостъпността на As, Cd и Cu, докато за Zn и Pb са свързани със съдържанието на Fe и Al в почвата.

Важен резултат от проведеното проучване са регистрираните статистически значими зависимости между i) тоталното почвено съдържание (извлек с царска вода) и почвен извлек с ЕДТА за As, Cd, Cu, Pb, Zn ii) съдържанието на микроелементи в надпочвената част на тревата корелира значимо със съдържанията им в почвения извлек с ЕДТА за As, Cd, Cr, Cu, Mn и Pb. Тези резултати провокират по-нататъшни задълбочени изследвания относно възможността продължителните процедури с агресивни реактиви при нагряване (извлек с царска вода) да бъдат заменени с бързата и щадяща процедура с ЕДТА, при провеждане на изследвания, свързани с екологична оценка.

Подходът, използван в това изследване (опростяване на процедурата за извличане на метали и интелигентен анализ на данни), предлага нов начин за оценка на биодостъпността и процесите на пренос в сложната система почва/растение. Освен това той разкрива възможности за надеждна оценка на риска и управление на замърсяването в регион, засегнат от промишлена дейност. Въз основа на резултатите от това проучване трябва да се предложи прилагането на бърза и надеждна процедура за екстракция на почвата с ЕДТА за оценка на биодостъпната почвена фракция за всички изследвани ПТЕ, с изключение на Ni и Zn. Това ще бъде от съществена помощ при оценката на риска за околната среда и човека.

През 2020 г. е проведено пробовземане на седиментни ядки в 3 пробовземателни пункта на язовир „Пчелина“ [14]. Пункт 1 се намира при вливането на р. Струма в яз. Пчелина, пункт 2

се намира при вливането на р. Светля в яз. Пчелина. Точката на пробовземане в яз. Пчелина – при с. Радибош (пункт 3) – е избрана като референтна точка между притоците на двете реки – р. Струма (антропогенно повлияна от индустриална дейност в района на гр. Перник) и р. Светля (антропогенно неповлияна). Въз основа на измерването на гама активността на ^{137}Cs е установено (от съавтори) натрупване на средно 15 cm седимент за 34 години, при скорост на утаяване от средно 0.44 cm/година. Представено е разпределението на концентрациите на химичните елементи в седиментите от трите пробовземателни точки. Проведеният РСА разкрива три главни компонента, които описват близо 80% от вариацията на данните. Първият главен компонент (41.53% от вариацията) съдържа значими факторни натоварвания за Mn, Fe, Cr, Ni, Cu, Mo, Sn, Sb и Co. Факторните резултати показват, че концентрациите на тези елементи намаляват в реда Пчелина > Струма > Светля. Те проявяват нарастваща времева тенденция в седиментната ядка на р. Струма, което е индикация, че по-голямата част от елементите в язовира постъпват именно през реката, която е антропогенно засегната. Вторият главен компонент (22.16%) се формира от Ce, Gd, La, Th и Ti, които значително намаляват с времето в р. Светля и р. Струма. Третият главен компонент (15,44%) се формира от Zn, Pb, Cd, Bi и U_{nat} . Факторните резултати на слоевете в седиментните ядки показват добре изразена положителна тенденция във времето, което води до формирането на две групи и разкрива динамиката на антропогенното въздействие. Първата група, обхващаща началото на изследвания период, е със съдържание, сравнимо със седиментната ядка на р. Светля, докато съдържанието на елементите от втората група е най-висока спрямо и трите изследвани седиментни ядки. Факторните резултати на слоевете в седиментната ядка от р. Струма се намират между двете описани групи от яз. Пчелина.

За да се разграничи антропогенното замърсяване от естественото съдържание на елементи в седимента, са изчислени коефициентите на обогатяване (от съавтори), при което е използвана концентрацията на Fe като консервативен елемент. Значително обогатяване се наблюдава само в референтната точка (Пчелина), за Zn (7.6) и Cd (7.5). По отношение на Cd обогатяването в Светля е умерено. Коефициентът на обогатяване на Струма е 1.8, което показва значително замърсяване с този метал в целия язоeir. С изключение на описаните елементи, умерено обогатяване се наблюдава за Cu, Pb, Ce и Th само в Пчелина, както и за Tl и U_{nat} в Светля и Пчелина.

За повечето елементи изчисленият индекс на геоакумулация (от съавтори) съответства на незамърсена проба. Проведен е екоотоксикологичен анализ на седиментите от яз. Пчелина чрез измерване на промяната в покълването на семената и растежа на корените на растителния вид *Sinapis alba* спрямо референтна почва. Като предварителна стъпка е определен водният капацитет на изследваните седименти. Резултатите от екоотоксикологичния тест Phytotoxkit FTM показват ниска екоотоксичност на повърхностните седименти на яз. Пчелина по отношение и на двата показателя, което е в съответствие и с изчислените индекси на геоакумулация.

3. Хемометричен анализ на данни за токсичността на лекарствени смеси и опаковъчни материали

Съвместната работа с колегите от Политехническият университет в гр. Гданск, Полша, даде възможност за обогатяване на набора от екоотоксикологични анализи, както и на многовариационните подходи за анализ на данни от различни по вид проби – лекарствени смеси и опаковъчни материали [5-8, 11].

Хормоните и фармацевтичните продукти са съвременните замърсители на околната среда, чиито нива в екосистемите е наложително да се следят, особено поради взаимодействията, възникващи между тях при абиотичните фактори на околната среда. Това поражда необходимостта от определянето на смесения екотоксикологичен ефект на комбинация от две лекарства, което се оказва сложна задача. Съединения, които имат подобно действие, се държат като смеси, докато тези, които действат различно, предизвикват независим токсичен отговор. Ако съществува взаимодействие между веществата в сместа, то може да бъде синергично или антагонистично. В случай на липса на взаимодействие – комбинираният ефект може да бъде предвиден от очаквания ефект на всеки компонент в сместа според начина му на действие.

Обект на анализ в част от представените публикации [5,7] са лекарствени смеси. Извършена е екотоксикологична оценка чрез биотестовите Microtox® и Xenoscreen YES/YAS® (от съавтори) на 9 лекарства (диклофенак (натриева сол), окситетрациклин хидрохлорид, флуоксетин хидрохлорид, хлорамфеникол, кетопрофен, прогестерон, естрон, андростендион и гемфиброзил), присъстващи в околната среда при специфични концентрационни нива, и техните взаимни комбинации по двойки. За да се оцени количествено екотоксичността на лекарствените смеси и взаимното въздействие на лекарствата в сместа са използвани два подхода. Първият е фундаментален при анализ на експериментални данни и това е избор на модел, който най-добре ги описва. В представеното изследване [5] за данните с теста Microtox® е използвана Гаусова функция от експоненциален тип. Параметърът, описващ височината на функцията, служи като мярка за въздействието на едно лекарство върху друго в лекарствените смеси. Сравнението на тези параметри позволява, според предположенията на авторите, да се разграничат независими, антагонистични или синергични ефекти в лекарствената смес. Коефициентът на корелация е използван като оценка за адекватността на модела. За втория биотест (Xenoscreen YES/YAS®) е използван корелационен анализ на експерименталните данни за всяка лекарствена смес, приемайки, че стойността и знакът на корелационния коефициент могат да бъдат относителна мярка за независимо или зависимо действие. В допълнение е проведен клъстерен анализ за намиране на прилики и разлики между лекарствените смеси, описани от корелационния анализ. Вторият подход е добре описан в множество токсикологични проучвания. Основава се на изчисляването на концентрационно-адитивен модел (CA) – приема подобен начин на действие на лекарствата в сместа, и модел на независимо действие (IA) – приема различен начин на действие на лекарствата. Следва изчисляване на коефициента на отклонение на моделите (MDR) спрямо експериментално получените резултати.

Повечето от изследваните лекарствени смеси показват независим начин на действие и много малко от тях – антагонистично или синергично действие. Резултатите от моделите, използващи екотоксикологичния тест Microtox® разкриват, че лекарствата в смес с хормони показват главно антагонистични или синергични действия, например кетопрофен в смес с андростендион и естрон имат синергичен характер, гемфиброзил проявява синергизъм с прогестерон и антагонизъм с естрон, както и диклофенак проявява синергични свойства с прогестерон и антагонистични с естрон. Данните от моделите за Xenoscreen YES/YAS®, показват че окситетрациклинът в смес с хлорамфеникол, гемфиброзил и флуоксетин проявява синергични свойства, докато с хлорамфеникол и гемфиброзил – антагонистични. Резултатите, получени чрез MDR, показват антагонистичното действие в повечето смеси от диклофенак, гемфиброзил, флуоксетин, окситетрациклин, прогестерон, кетопрофен и хлорамфеникол. Въпреки че е много различен по своята същност, подходът за използване на най-адекватния модел откри като цяло

едни и същи резултати – 75% от тестваните смеси показват възможно независимо действие, а останалите 25% – възможно антагонистично или синергично действие. Друг важен резултат е, че различните тестове за токсичност могат да покажат различен начин на действие за една и съща двойка лекарства (XenoScreen YES/YAS®). Представеното изследване не претендира да изясни механизма на комбинирана токсичност на лекарствена смес, но може да послужи като полезно емпирично ръководство за избор на екотоксикологични тестове за оценка на възможно взаимодействие между компонентите в бинарни лекарствени смеси.

Второто проучване в тази област [7] изследва токсичността (от съавтори) на отделните съединения като се вземат предвид и факторите на околната среда. Това е постигнато чрез оценка на въздействието на съвместно съществуващите неорганични йони и промените в рН върху токсичността на 10 избрани фармацевтични продукта (към описаните по-горе е добавен и диазепам) като са използвани същите екотоксикологични тестове. Използвани са концентрационно-адитивен модел (CA) и модел на независимо действие (IA) и е изчислен коефициентът на отклонение на моделите (MDR) спрямо експериментално получените резултати. Тестът Microtox® дава най-категоричните резултати по отношение на определянето на типа взаимодействие между лекарствата и химичните видове. Доказан е синергизъм за почти всички лекарства и химични видове и са открити само два случая на антагонизъм. Рядко се наблюдават значими взаимодействия лекарство/рН.

При изследването на естрогенни и андрогенни агонистични ефекти (съответно YES+ и YAS+) чрез XenoScreen YES/YAS®, са открити много случаи на добре изразен синергизъм за всички неорганични йони с ограничен брой лекарства (дiazepam, флуоксетин, естрон, хлорамфеникол за теста YES+; и diazepam, прогестерон, андростендион и естрон за теста YAS+). Доказан е и антагонизъм за теста YES+, особено за диклофенак и андростендион, при взаимодействието с катиони. От друга страна, тестовете YES- и YAS- (съответно естрогенни и андрогенни антагонистични ефекти) не показват случаи на синергично взаимодействие с изключение на двойките Вg⁻/дiazepam и NH₄⁺/кетопрофен. Антагонистични взаимодействия лекарство/йон са открити само при диклофенак и флуоксетин. Интересно е да се отбележи, че добре изразените (антагонизъм или синергизъм) взаимодействия лекарство/рН са редки.

Установено е, че и двата биотеста са приложими при извършване на проучвания за въздействието на флукуациите на йони/рН върху токсичността на лекарствените смеси, потвърждавайки, в повечето случаи, синергичното въздействие на изследваните параметри върху токсичността. Подходът, предложен в тази публикация, изглежда като надеждно средство при оценката на въздействието на абиотичните фактори върху токсичността и ендокринния потенциал на сложни смеси от фармацевтични продукти.

Обект на изследвания в друга част от публикациите [6,8,11], съвместно с колегите от Политехническият университет в гр. Гданск, са хранителните опаковки. Изследвани са влиянието на температурата и времето за контакт между консервните кутии (с вътрешен слой от епоксидна смола) и средата, симулираща съхраняваната в консервите храна, а именно: дестилирана вода, 3%-ен разтвор на оцетна киселина, 5%-ен разтвор на етанол (стандартно използвани като симулираща среда) и в допълнение на изброените – диметилсулфоксид (DMSO) [6]. Токсичността на изследваните екстракти е оценена с помощта на екотоксикологичния тест Microtox® (от съавтори). Извършен е хеометричен анализ на получените резултати, за да се оцени влиянието на експерименталните параметри върху токсикологичния отговор. Резултатите, потвърждават, че

водната екстракция при най-ниската температура (25°C) и време за контакт (12 часа) създава благоприятни условия за освобождаване на малки молекули, използвани като метаболитни субстрати от бактериите. Екстракцията с етанол води до най-високите стойности на инхибиране на биолуминесценцията (токсичността се е увеличила) след 48 часа при 65°C и показва, че токсичните съставки от опаковката мигрират в екстрактите. Използването на 336 часа екстракция при 121°C води до условия, благоприятни за бактериален растеж и до намаляване на инхибирането на биолуминесценцията. Резултатите за екстрактите с DMSO показват, че продължителното време на контакт е придружено от увеличаване на острата токсичност, вероятно поради миграцията на токсични вещества от опаковката; но повишаването на температурата води до намаляване на токсичността им. Резултатите за екстрактите с оцетна киселина показват значителна миграция на токсични съединения с повишаване на времето и температурата по време на екстракцията, затвърждавайки хипотезата, че хранителните продукти с ниски стойности на рН (като тези, обичайно съхранявани в консервни кутии) причиняват значителна повреда на смолистата облицовка в кутиите и водят до увеличена миграция на опаковъчния материал в храната.

В следващите проучвания процедурите са разширени, за да се въведат нови екотоксикологични тестове [8,11] като правдоподобни инструменти за оценка на токсичността/ендокринната заплаха на опаковките, влизащи в контакт с храни и техните екстракти при симулирани условия. Направен е опит за идентифициране на веществата, които може да са отговорни за повишената токсичност, като една от стъпките по пътя към търсене на нови материали, които да намерят приложение при подобряване на опаковките на някои хранителни продукти. Освен консервни кутии, на анализ са подложени и картонени чаши и многослойни композитни материали, каквито са опаковките на пряното мляко, например. Токсичността на изследваните екстракти е оценена (от съавтори) чрез Microtox® и XenoScreen YES/YAS®, а като допълнителна симулираща среда е добавена изкуствена слюнка [8,11]. Материалите, използвани в опаковките са анализирани и с помощта на инфрачервена спектроскопия с преобразуване на Фурие (от съавтори). Подбран е специфичен експериментален дизайн [8], с който да се оцени въздействието на различни експериментални условия (наподобяващи действителните условия, на които са изложени различните опаковъчни материали), като температура, време за екстракция и концентрация, влияещи върху екотоксикологичния отговор. Получените модели (полиноми) са проверени за хомогенност на вариацията, значимост на регресионните коефициенти и валидност. Сравнението на резултатите от инструменталните и биологичните изследвания потвърждава предположенията, че екотоксикологичните тестове могат да служат като ценен и валидиран метод за оценка на стабилността и въздействието на опаковките върху стоките, съхранявани както за кратки, така и за дълги периоди от време. В някои случаи е доказано, че екотоксикологичните тестове са почувствителни и надеждни от ИЧ-изследванията, особено когато проучванията се занимават с оценка на въздействието на киселинни или алкохол-съдържащи симулиращи среди.

В допълнително проучване е извършен и анализ за определяне на нивата на бисфенол А диглицидилов етер (BADGE), бисфенол F диглицидилов етер (смес от изомери, BFDGE), тример на новолак глицидилов етер (тример NOGE) и техните производни чрез течна хроматография-тандемна маспектрометрия (от съавтори) [11]. Хемометричният анализ на получения многовариационен набор от данни е извършен с ASCA. Представеното проучване предоставя холистичен подход за обяснение на наблюдаваната остра токсичност и ендокринния потенциал

според измерените следи от органични вещества, които присъстват в екстракти, изложени на различни симулационни среди при различни условия. Във всички проведени анализи времето, температурата и техните взаимодействия са значими за всички модели, кето температурата и комбинираното въздействие като цяло доминират. Съществува и обща тенденция на повишена миграция на изследваните съединения с повишаване на температурата, въпреки че този модел също зависи от експерименталните условия. Този подход ясно демонстрира взаимодействията и групирането на различните фактори, за да подчертае онези от тях, които допринасят за влошаване на качеството и потенциалната токсичност на хранителните продукти. Според авторите, проведеното проучване има значителен принос, като се има предвид нарастващата обществена осведоменост за потенциалните рискове за тяхното здраве от опаковките поради явления, възникващи при контактът им с храните. Следователно са необходими по-сложни и стандартизирани методи за осигуряване и оценка на качеството извън традиционния инструментален анализ на едно ниво. Резултатите от проучването могат да служат като полезна справка за разбиране на явленията, свързани с въздействието на материалите за хранителни опаковки върху качеството за дългосрочно и краткосрочно съхранение, като демонстрират и стойността на използването на холистичен подход и предлагат допълнителни насоки за приемане на такава методология.

05.02.2024 г.
гр. София