

**БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ**

**Институт по Биоразнообразие и Екосистемни  
Изследвания**

**Лъчезар Петров Якимов**

**Оценка на оксидативния стрес и  
индикаторния потенциал на биологичния  
отговор на черноморската мида *Mytilus  
galloprovincialis* Lam. като общ показател за  
функционалното състояние на  
крайбрежните екосистеми**

**АВТОРЕФЕРАТ**

на дисертация за присъждане на образователната и научна степен  
„Доктор”

Научна специалност 02.22.01. ”Екология и опазване на  
екосистемите”

**Научен ръководител:** проф. д-р Нешо Хайнрих Чипев, ИБЕИ – БАН

**Научен консултант:** доц. д-р Венцислав Карамфилов, ИБЕИ – БАН

София, декември 2019 г.

Дисертационният труд съдържа 122 страници, 17 фигури и 11 таблици.

Списъкът с цитираната литература съдържа 183 заглавия, 17 от които на кирилица и 169 на латиница.

Дисертацията е разработена в рамките на редовна докторантура в Института по биоразнообразие и екосистемни изследвания при БАН в периода 01. 01. 2016 г. – 31. 01. 2018 г.

Дисертационният труд е обсъден и насочен към защита на разширено заседание на Отдел "Екосистемни изследвания, екологичен риск и консервационна биология" на Института по биоразнообразие и екосистемни изследвания при БАН, състояло се на 12.12.2019 г.

Основните експериментални и полеви изследвания в този дисертационен труд са финансирани по договори ДМ 11/5 и КП-06-Н21/7 с Фонд Научни Изследвания.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 26.03.2020 г. от 14 ч. в заседателната зала на База 1 на ИБЕИ-БАН, София, ул. „Майор Юрий Гагарин“ № 2, на открито заседание на научно жури, назначено със заповед на Директора на ИБЕИ-БАН № 1/08.01.2020 г. в състав:

- Проф. д-р Румяна Мечева (ИБЕИ, БАН) – председател, рецензент
- Проф. д-р Нешо Чипев (ИБЕИ, БАН)
- Проф. д-р Мариела Оджакова (БФ, СУ) - рецензент
- Проф. д-р Пламен Митов (БФ, СУ)
- Доц. д-р Албена Йорданова (МФ, СУ)

Материалите по защитата са на разположение на интересуващите се в библиотеката на Института по биоразнообразие и екосистемни изследвания, София, ул. „Майор Юрий Гагарин“ № 2.

## 1. Увод

С въвеждането на Рамковата директива за водите на ЕС (РДВ, WFD, 2000/60/ЕС), по-късно и на Рамковата директива за морска стратегия на ЕС (РДМС, 2008) се създаде нова ера в оценката на риска за околната среда. В допълнение към включването на изискване за съответствия със стандарти за химичните вещества, основната цел на РДВ е общата защита на водната среда в нейната цялост, а РДМС поставя приоритет на интегрирания (екосистемен) подход и постигане „добро“ състояние на морската среда. Тези нови подходи подчертават необходимостта от интегрирана оценка на риска за околната среда и предлагат развитието на потенциал за включване на мерки за биологично въздействие, включително използването на биомаркери в този процес (Nagger et al., 2006).

При така създадените се условия, класическата екотоксикология навлиза в преходен период и се очаква да поеме нова роля. В тази връзка, се използват различни термини, които описват нарушения на околната среда (вкл. морската) и техните ефекти. Така например, замърсяването на средата е резултат от внасянето на вещества с антропогенен произход, но се приема, че замърсяване има тогава, когато замърсителят действително има ефект върху някаква биологична променлива. Реакцията на дадена биологична единица (индивид, популация, съобщество и др.) на натиск (т.е. стресор), представлява това, което се обозначава като „стрес“. Тази ситуация е отражение на нарастващата тенденция за интегриране на екотоксикологията със съответни части на екологията, което е в основата на ново направление, което се обозначава като „стрес екология“ (stress ecology) (Straalen, 2003). Въпреки че, самата дефиниция на „стрес“ все още се дебатира, вече се приема, че има разлика между „стресор“ (външен фактор), „стрес“ (вътрешно състояние, вследствие въздействието на стресор) и „стрес-реакция“ (каскада от вътрешни промени, отключени от стрес). Независимо, че концепцията за стреса може да се дефинира на различни нива на екологична интеграция, стресът най-често се изучава в контекста на отделния организъм, докато стрес-реакцията (отговорът) се изучава на клетъчно и биохимично ниво.

Черно море е вътрешно-континентален, полузатворен басейн със специфични хидро-химични и хидрологични особености, който е подложен на нарастващо антропогенно натоварване, което формира стресови условия. Особеностите и ответните реакции на биотата по отношение на различните стресори в българската черноморска акватория все още не са добре проучени. Настоящият дисертационен труд представя първи опит за изследване на стресовата екология на черноморската мида *Mytilus galloprovincialis* Lam. у нас.

## 2. Литературен обзор

Представено е кратко описание на Черно море като местообитание, както и на основните антропогенни натиски (заплахи) върху неговите екосистеми. Разгледано е разпространението на средиземноморската мида *M. galloprovincialis*, нейната продукция и икономическо използване. Направен е обстоен преглед на историческите изследвания върху акумулационния капацитет на индикаторния вид и използването му за мониторинг на състоянието на морската среда. Разгледан е биотичния отговор на *M. galloprovincialis* към промени в околната среда и най-широко използваните биомаркери на мидите за целите на екотоксикологичния мониторинг. Представен е обстоен преглед на предложени индекси, базирани на маркери за

оксидативен стрес в двучерупчести индикаторни видове и използването им за характеристика на качества на морската среда.

### **3. Цел и задачи**

#### **3.1. Цел**

Целта на настоящето изследване е да бъдат оценени промените в оксидативния статус в тъкани на *Mytilus galloprovincialis* Lam. и неговата пространствена и времева динамика, както и потенциала на този биологичен отговор на вида като биомаркер за състоянието на морската среда и екосистемите.

#### **3.2. Хипотеза**

Работната хипотеза, която настоящата научна разработка тества е, че балансът на прооксидантните и антиоксидантните процеси в черноморските миди се променя под действие на екологични и антропогенни фактори, предизвикващи риск от оксидативен стрес. Така, установяването и оценката на редокс баланса и нивото на оксидативен стрес в мидите от вида *M. galloprovincialis* представлява чувствителен биомаркер за доброто екологичното състояние на морската околна среда и на екосистемите.

#### **3.3. Задачи**

За постигане на целта бяха поставени следните основни задачи:

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

### **4. Материали и методи**

#### **4.1. Район на изследване и пробонабиране**

##### **4.1.1. Черно море и изследвани местообитания**

Черно море е малко вътрешно море с площ от 420 000 km<sup>2</sup>. Бреговата ивица формира множество носове, полуострови и заливи, като най-големите заливи в Българския сектор са Варненския и Бургаския. Брегова ивица на Черно море е 4,838.1 km и се разделя между шест държави - България, Румъния, Турция, Украйна, Русия и Грузия. Водосборната площ на Черно море е пет пъти по-голяма от неговата собствена площ. Според биогеографското райониране на страната, изследваните в дисертационния труд обекти, са компонент на екосистемите от типа „Сублиторални скали и друг твърд субстрат“, които попадат в морския Черноморски биогеографски район. Всички повърхностни водни тела, в които са осъществени измервания и пробонабиране са от

категорията крайбрежни води. Извадките от черни миди са събирани от местообитанието тип „Медиолиторални скали“ (по РДМС, 2008), съответстващо на местообитание 1170 „Рифове“ (Анекс I на Директивата за Местообитанията на ЕС) и национален подтип местообитания (биотоп) 2 - Долен медиолиторал с *Mytilaster lineatus* и *Mytilus galloprovincialis*.

#### **4.1.2. Избор на представителни пунктове за пробонабиране**

За целите на настоящата разработка бяха избрани представителни пунктове за пробонабиране от райони по българското черноморско крайбрежие с различен режим на ползване и съответно подложени на различен по вид и интензитет антропогенен натиск, както и с различни характеристики на абиотични условия на средата (климатични особености, геоложки строеж, тип седимент, изложеност на вълново въздействие и др.). Разпределението на районите и пунктовете на пробонабиране са представени на Фиг. 1.

При възприетата в това изследване схема, пробонабирането беше извършено полу-стратифицирано от места, определени от разпространението на моделния вид, популационната му структура и от наличието на дългосрочни данни и информация за качеството на морската среда и антропогенното въздействие. Това наложи търсенето на ко-локация с пунктове за мониторинг на крайбрежните води от Националната Система за Мониторинг на Околната Среда (НСМОС).

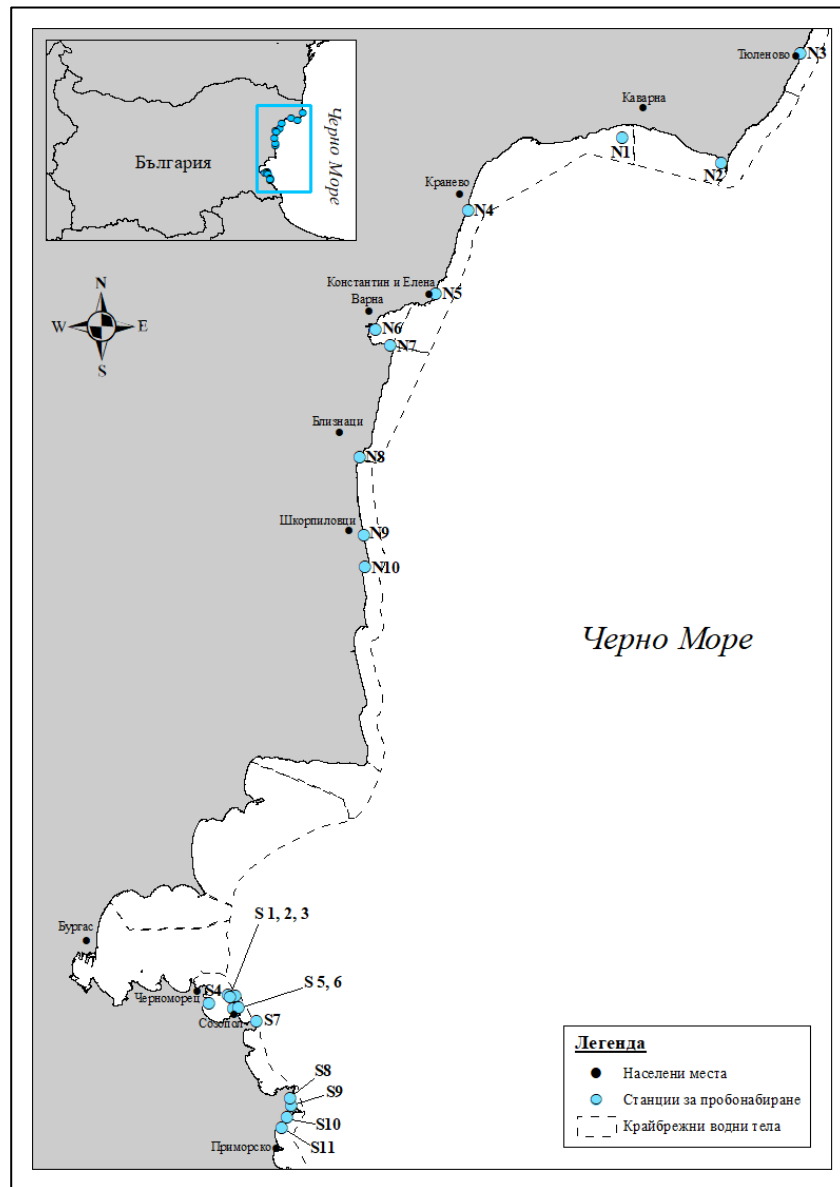
С цел верифициране на референтни условия, респективно състояние на индикаторните организми, са набрани миди както от природни популации, така и от аквакултури, в обхвата на референтни пунктове за мониторинг на качеството на крайбрежните морски води, идентифицирани на територията на БДЧР (Тодорова, Мончева, 2013; ПУРБ, 2016-2021), както и в силно повлияните местообитания, в т.ч. пристанищата на градовете Варна и Созопол.

Част от опробваните райони са разположени също така и в обхвата на сайтове от Националната мрежа за дългосрочни екосистемни изследвания (LTER-BG, <http://www.lter-bulgaria.net/>), което позволява получените резултати да бъдат интегрирани в глобалната научноизследователска I LTER инфраструктура.

#### **4.1.3. Биоиндикаторен обект и пробонабиране**

Биологичният обект на изследване бяха възрастни черноморски миди от вида *Mytilus galloprovincialis* Lam. (дължина на черупката от 30 до 65 mm). Пробонабирането за целите на настоящето изследване беше извършено в два условни сезона – пролетен (юни-юли) и есенен (септември-октомври) в две последователни години - 2017 и 2018 от определените райони на Северното (на север от нос Емине) и Южното черноморско крайбрежие (на юг от нос Емине) (Фигура 1). Бяха събирани и култивирани миди, които бяха набавяни директно от садките на мидени ферми. Мидите от другите изследвани местообитания бяха набавени ръчно и полуколичествено посредством уред за изстъргване (традиционен “гагам”). Размерът на извадката беше определян от количеството на материала, необходим за анализ, с известен резерв, и беше приблизително 2 кг миди на пробовземане. Мидите бяха събирани от дълбочина от 0 до 6 м и на отстояние от брега до 30 м, от подходящи вертикални скални субстрати, така че в извадката да не попада седимент. Мидите от някои силно повлияни местообитания (пристанища) бяха събирани от изкуствени твърди субстрати, или други, по които се прикрепват миди.

Тъй като определянето на възрастта на мидите по кръговете на нарастване на черупката с методите на склерохронологията е неприложимо на терен, размерът на събраните за анализи образци беше определен като 70–80% от максималния размер, достигнат в конкретната популация. Според някои автори (Lobel et al. 1991; Moncheva et al., 2004), подборът на миди с близки до потенциалните им максимални размери гарантира, че такива екземпляри имат ниски темпове на растеж и сходни метаболитни процеси с тези от други популации.



**Фиг. 1.** Райони и пунктове на изследване (N пунктове на север от н. Емине; S – пунктове на юг от н. Емине) (N1 – ферма гр. Каварна, N2 – нос Калиакра, N3 – с. Тюленово, N4 - с. Кранево, N5 – кк Св. Св. Константин и Елена, N6 – пристанище гр. Варна, N7 – нос Галата, N8 - кк Камчия, N9 – с. Шкорпиловци, N10 – нос Кара Борун, S1 – ферма о-в Св. Иван, S2 – о-в Св. Иван, S3 – о-в Св. Петър, S4 – гр. Черноморец, S5 – крайбрежни скали гр. Созопол, S6 - пристанище гр. Созопол, S7 – нос Колокита, S8 – залив Св. Параскева, S9 – залив Зигра, S10 – нос Маслен нос, S11 – гр. Приморско)

#### **4.1.4. Водни проби и общи физико-химични показатели**

При всяко пробонабиране, от повърхностния воден слой (50-100 cm) на всяко местообитание бяха взети две водни проби от по 500 mL за извършване на анализи в лабораторни условия. В момента на пробовзimanето бяха отчитани температура, киселинна реакция и соленост на морската вода с използване на комерсиални китове за анализ и преносима апаратура (Windaus Labortechnik; WTW PhotoFlex).

Допълнителни лабораторни анализи на водните проби от южната крайбрежна зона бяха извършени в ЛМЕ на ИБЕИ-БАН. Концентрациите на амониев ( $N - NH_4$ ), нитритен ( $N - NO_2$ ), нитратен ( $N - NO_3$ ) и общ азот (TN), фосфатен ( $P - PO_4$ ) и общ фосфор (TP) бяха измерени от служителите на ЛМЕ по стандартни методики (Grasshoff, 1976).

Данните за параметрите на морската среда в районите на изследването бяха допълнени с достъпни дългосрочни данни от мониторинг по РДВ от Националния център за океанографски данни на Института по Океанология „проф. Фритъф Нансен“ към БАН (<http://www.bgodc.io-bas.bg/>), дисертации и публикации (Беров, 2013; Клайн, 2019; Klayn, Karamfilov, 2018), както и предоставени непубликувани данни от други проучвания в района.

## **4.2. Предварителна обработка, транспорт и съхранение на пробите**

Първоначално, още на терен, мидите бяха почиствани от обрастватели и промивани обилно с морска вода от местообитанието им. На място беше направена е биологична характеристика на цялата проба. Определяни бяха представителите на изследвания вид *M. galloprovincialis*, посредством основни таксономични характеристики – форма на черупката, вдлъбнатината върху черупката за прикрепяне на сухожилието на аддукторният мускул и др.

Посредством шублер с двоен нониус (точност: 0,02 mm) бяха измерени основните размери на мидите - дължината, ширината и дебелината на черупката и за всяка станция бяха изготвени сборни проби от екземпляри в добро състояние от размерните класове близки до максималните в популацията (Lobel et al., 1991).

Мидите от всяка извадка бяха поставяни в полиетиленови мрежи и транспортирани в морска вода. Последващата обработка беше извършвана в рамките на деня - в Лабораторията по морска екология на ИБЕИ-БАН в гр. Созопол за южните райони и в Университетската ботаническа градина (Екопарк) в гр. Варна за северните. Водните проби бяха съхранявани и транспортирани на тъмно в термоустойчив контейнер. До провеждане на анализа на общите физико-химични показатели водите бяха съхранявани дълбоко замразени, а пробите за определяне на металното съдържание бяха съхранявани при температура от 4°C.

## **4.3. Лабораторна обработка и изследване**

### **4.3.1. Определяне наличието на метални замърсители в органите на миди и морската вода**

За целите на настоящето проучване бяха анализирани концентрациите на приоритетните метали кадмий (Cd), олово (Pb) и никел (Ni), както и тези на специфичните замърсители мед (Cu) и цинк (Zn) в хрилете, храносмилателната жлеза, крака и черупките на мидите, както и във водната среда на местообитанията им.

Екземплярите от *M. galloprovincialis*, използвани за анализа, бяха съхранявани минимум 48 часа живи в морска вода, която се сменяше перидично. Този период се приема за достатъчен за мидите да прочистят храносмилателната си система, чието неусвоено съдържание би могло да повлияе на резултатите от анализа (Topping, 1983).

По 40 бр. миди от всяка проба бяха дисектирани с хирургически инструменти от неръждаема стомана. Отпрепарирани бяха хрилете, храносмилателната жлеза, крака и черупката на мидите. Препаратите се промиваха с дестилирана вода, подсушаваха се с филтърна хартия и бяха доведени до въздушно сухо състояние. Въздушно-сухите биологични препарати се хомогенизираха чрез стриване в лабораторен хапан.

Пробите от черупки, след довеждане до въздушно сухо състояние, се стриваха в хапан и пресяваха през сито с големина на отвора 0.2 mm, като за анализ се вземаше проба от фракцията с големина на частиците <0.2 mm.

Химичната подготовка и определянето на съдържанието на изследваните елементи бяха извършени в съответствие с нормите, методите и приетите стандарти, по които се работи в Лабораторията по атомноабсорбционна спектроскопия при ИБЕИ-БАН.

*Начин на обработка:* От така подготвените проби се претегля около 1 g, прехвърля се в колба за йодно число, омокря се с 1-2 mL бидестилирана вода и се прибавят 10 mL концентрирана Азотна киселина (HNO<sub>3</sub>) и 5 mL концентрирана Перхлорна киселина (HClO<sub>4</sub>). Така подготвените проби се оставят за едно денонощие на хладно за започване процеса на разграждане на студено. След 24 часа се нагриват на пясъчна баня и изпаряват до влажен остатък. Този влажен остатък се прехвърля количествено с 1N HNO<sub>3</sub> в епруветка до краен обем 10 mL при биологични проби.

Пробите от седименти/черупки се прехвърлят количествено с 1N HNO<sub>3</sub> като се филтруват през филтър „бяла лента“ и довеждат до краен обем 50 mL.

Химическата подготовка на водните проби изисква филтруване през филтър „бяла лента“, след което 100 mL се поставят в колба за йодно число и изпаряват на пясъчна баня до влажен остатък. Влажният остатък се прехвърля количествено в епруветка с 1N HNO<sub>3</sub> до краен обем 20 mL.

По същата методика се изготвя и празна “нулева” проба с бидестилирана вода, 10 mL к. HNO<sub>3</sub> и 5 mL к. HClO<sub>4</sub>. Крайният й обем е съответно 10, 20 или 50 mL, според анализиранияте проби.

Така получените разтвори са анализирани посредством оптично емисионен спектрометър с индуктивно свързана плазма Perkin Elmer Optima 7000 DV/ICP-OES, за съдържание на елементите мед, олово, кадмий, цинк и никел.

Получените данни от апарата са в mg/L. За биологичните проби и пробите от черупки/седименти, резултатите са преизчислени до mg/kg по следната формула:

$$C = (C_x - C_0) V_{кр.} / G, \text{ където:}$$

C – mg/kg въздушно суха проба;

C<sub>x</sub> – отчетената от апарата концентрация в пробата;

C<sub>0</sub> – отчетената от апарата концентрация в нулевата проба;

V<sub>кр.</sub> – краен обем;

G – тегло (gr) на изследвания материал.



#### 4.3.2. Определяне на биохимични маркери за оксидативен стрес

Изолираните и замразени хриле, храносмилателна жлеза и крак от всяка мида (общо по 10 миди от всяка проба) бяха размразени и хомогенизирани в стъклен хомогенизатор с тefлонов пестик (Potter-Elvehjem Tissue Homogenizer) в охладен 0,15 M KCl-10 mM K-PO<sub>4</sub> буфер (pH 7.4). Получените хомогенати бяха центрофугирани за 12 мин. при 3000 обор./мин. при температура 4°C. Част от получената безядрена фракция беше използвана за определяне на нивата на липидна пероксидация и общ глутатион (GSH), а другата част беше центрофугирана за 20 мин. при 12 000 обор./мин. и температура 4°C за получаване на цитозолна фракция, в която бяха определени активностите на антиоксидантните ензими: каталаза (CAT, EC 1.11.1.6), супероксид дисмутаза (SOD, EC 1.15.1.1), глутатион пероксидаза (GPX, EC 1.11.1.9), глутатион редуктаза (GR, EC 1.8.1.7), глюкозо-6-фосфат дехидрогеназа (G6PDH, EC 1.1.1.49) и глутатион-S-трансфераза (GST, EC 2.5.1.18). Количеството белтък в пробите беше определяно по метода на Lowry et al. (1951). За определяне на маркерите за оксидативен стрес бяха приложени следните методи:

- Липидната пероксидация беше определяна по метода на Hunter et al. (1963);
- Количеството общ глутатион беше определяно по метода на Tietze (1969);
- Активността на супероксид дисмутаза (SOD, EC 1.15.1.1) беше определяна по метода на C. Beauchamp, I. Fridovich (1971);
- Активността на каталазата (CAT, EC 1.11.1.6) беше измервана чрез метода на Aebi (1984);
- Активността на глутатион пероксидазата (GPX, EC 1.11.1.9) беше определяна по метода на Günzler et al. (1972);
- Активността на глутатион редуктазата (GR, EC 1.8.1.7) беше определяна чрез метода на Pinto, Bartley (1969);
- Активността на глюкозо-6-фосфат дехидрогеназа (G6PD, EC 1.1.1.49) беше определяна по метода на Cartier et al. (1967);
- Активността на глутатион-S-трансферазата (GST, EC 2.5.1.18) беше определяна по метода на Taniguchi et al. (2000).

#### 4.3.3. Индекси за оценка на оксидативния стрес и неговата динамика

В настоящата разработка за пръв път беше използван Специфичен индекс на оксидативен стрес (SOS) за диагностика на интегрираното въздействие върху морската среда в изследваните местообитания (Yakimov et al., 2018).

За целта, от резултатите от биохимичните анализа бяха пресметнати средно аритметичните стойности и стандартните отклонения за всеки изследван показател за оксидативен стрес в отделните органи (крак, хриле и храносмилателна жлеза) на мидите от всяка проба. Получените стойности за всеки показател, орган и място бяха стандартизирани и от тях са изчислени съответните z-стойности, използвани за конструирането на 3 индекса, описващи оксидативния статус:

- **Про-оксидантен индекс**

Водните организми, и в частност мидите *M. galloprovincialis*, при стрес от околната среда реагират с експоненциално увеличаване на LPO и реципрочно понижаване на нивата на GSH. Тези два показателя се използват за диагностика на стресови условия *per se* (Viarengo et al., 2007). В настоящата разработка е изчислен Индекс на про-оксидантните процеси (PrO), на базата на промените в

концентрациите на MDA (маркер за LPO) и GSH (Yakimov et al., 2018). Индексът се пресмята на базата на стандартизирани стойности на LPO и GSH, както следва:

$$\text{PrO} = (z\text{LPO} - z\text{GSH}) / 2$$

Положителни стойности на индекса показват повишени нива на оксидативен стрес в мидите, респективно значимостта на нарушението в местообитанието. При изчисляването на PrO индекса, могат да бъдат включени и други показатели на прооксидантните процеси (окислителни промени в молекулите на белтъците, ДНК или РНК).

- **Индекс на антиоксидантната ензимна защита**

Индексът на антиоксидантната ензимна система (АОЕ) интегрира в себе си промените в активността на антиоксидантните ензими както следва:

$$\text{АОЕ} = (z\text{SOD} + z\text{CAT} + z\text{GP} + z\text{GR} + z\text{G6PD} + z\text{GST}) / 6$$

Стойностите на активностите на антиоксидантните ензими са стандартизирани. Положителни стойности на АОЕ индекса индикират активиране на ензимната защита, а отрицателните нейното инхибиране.

- **Индекс на Специфичен оксидативен стрес**

Специфичният индекс на оксидативен стрес (SOS) интегрира PrO и абсолютната стойност на АОЕ, както следва:

$$\text{SOS} = \text{PrO} + |\text{АОЕ}|$$

И при трите предложени индекса, стойностите близки до „0“ индикират състояние близко до средното ( $z=0$ ), т.е. ниско ниво на ОС, а значими положителни или отрицателни стойности индикират отклонение от средното за изследваните извадки (като чувствителност към ОС).

#### 4.4. Генетичен анализ

Пробите за генотоксичен анализ бяха обработени в Лабораторията по молекулярна генетика на дрожди (ИМБ „Румен Цанев“, БАН). Направен беше алкален кометен анализ (Georgieva et al., 2015) в суспензия от единични клетки от хрилете на моделните обекти. Скъсванията във веригите на ДНК бяха отчетени количествено посредством параметъра Средна интензивност на кометната опашка (Tail Mean Intensity).

#### 4.5. Статистическа обработка

Всички статистически анализи бяха проведени с помощта на пакета Statistica 10.0 (StatSoft, Inc). За да проверка на достоверността на разликите между данните от различните измервания използвахме преимуществено непараметрични тестове (тест на Wilcoxon). За определяне на съвместни ефекти, факторни анализи и връзки между множество компоненти беше прилагана двупосочна ANOVA и компонентен анализ (PCA). Корелационните зависимости се изчисляваха на основата на корелационния коефициент на Пирсън.

## 5. Резултати

### 5.1. Съдържание на основни метални елементи в тъкани на *M. galloprovincialis* от различни райони и водната среда

Анализът на съдържанието на металите мед, олово, цинк, кадмий и никел в изследваните миди показва, че 69.1% от натрупаните метали са разпределени в меките тъкани. При това, общото количество на натрупани метали в изследваните органи е разпределено в следния ред: Хриле > Храносмилателна жлеза > Крак > Черупка.

Резултатите от статистическия анализ (Таблица 1) показваха, че количественото съотношение на акумулираните метали в органите, непосредствено контактуващи с водната среда (крака и хриле), следва сходен модел и намалява в следния ред: Zn > Cu > Pb > Cd > Ni. Кракът на мидите се различаваше от хрилете по значително по-ниското си метално съдържание, в т.ч. по-ниски концентрации на мед, кадмий и никел в сравнение с храносмилателната жлеза, по-малко олово и повече кадмий и цинк в сравнение с черупките.

Максималните концентрации на мед, олово, цинк и кадмий бяха установени в тъканта на хрилете, като средните количества на всички натрупани в тях метали бяха достоверно по-високи от тези в крака. Акумулираният в хрилете никел беше значително по-малко от този в жлезата, съдържанието на цинк и кадмий беше по-ниско, а това на оловото по-високо в сравнение с черупките. Разпределението на натрупаните метали в храносмилателната жлеза (Zn > Cu > Pb > Ni > Cd) не следваше същия модел като този при другите изследвани органи. В храносмилателната жлеза бяха измерени максималните концентрации на никел, значително по-високи от тези в другите органи и черупките. Установеното средно съдържание на мед и кадмий в храносмилателната жлеза беше значително по-високо от това в тъканите на крака и подобно на тях, съдържанието на олово беше по-ниско, а това на кадмий и цинк по-високо в сравнение с черупките

**Таблица 1.** Средни количества ( $\pm$  ст. грешка) на изследваните метални елементи и достоверност ( $p \leq 0.05$ ) на разликите в изследваните органи и черупките на мидите

Орган \ Метал	Мед [mg/kg]	Олово [mg/kg]	Цинк [mg/kg]	Кадмий [mg/kg]	Никел [mg/kg]
Крак	12.57 ( $\pm 2.3$ )	5.23 ( $\pm 1.3$ )	102.11 ( $\pm 15.1$ )	1.41 ( $\pm 0.34$ )	0.71 ( $\pm 0.14$ )
Хриле	35.60 ( $\pm 14.3$ )*	10.35 ( $\pm 4.9$ )*	207.56 ( $\pm 29.9$ )*	2.81 ( $\pm 0.45$ )*	1.49 ( $\pm 0.35$ )*
Храносмилателна жлеза	21.35 ( $\pm 7.33$ )*	7.65 ( $\pm 3.1$ )	143.93 ( $\pm 18.1$ )	2.21 ( $\pm 0.30$ )*	3.50 ( $\pm 0.58$ )*
Черупка	11.28 ( $\pm 0.79$ )	11.96 ( $\pm 1.32$ )*	57.21 ( $\pm 14.1$ )*	0.76 ( $\pm 0.26$ )*	0.91 ( $\pm 0.22$ )*

\* - достоверни различия от крака; \*\* - достоверни различия от хепатопанкреаса; \*\*\* - достоверни различия от всички други изследвани тъкани.

Съотношението на количествата на микроелементите, измерени в черупките в низходящ ред беше следното: Zn > Pb > Cu > Ni > Cd.

Биоминералният състав на черупките, достоверно се различаваше от меките тъкани по високото съдържание на олово и ниско съдържание на цинк и кадмий, както и сравнително ниските концентрации на никел, значително по-ниски от тези в храносмилателната жлеза.

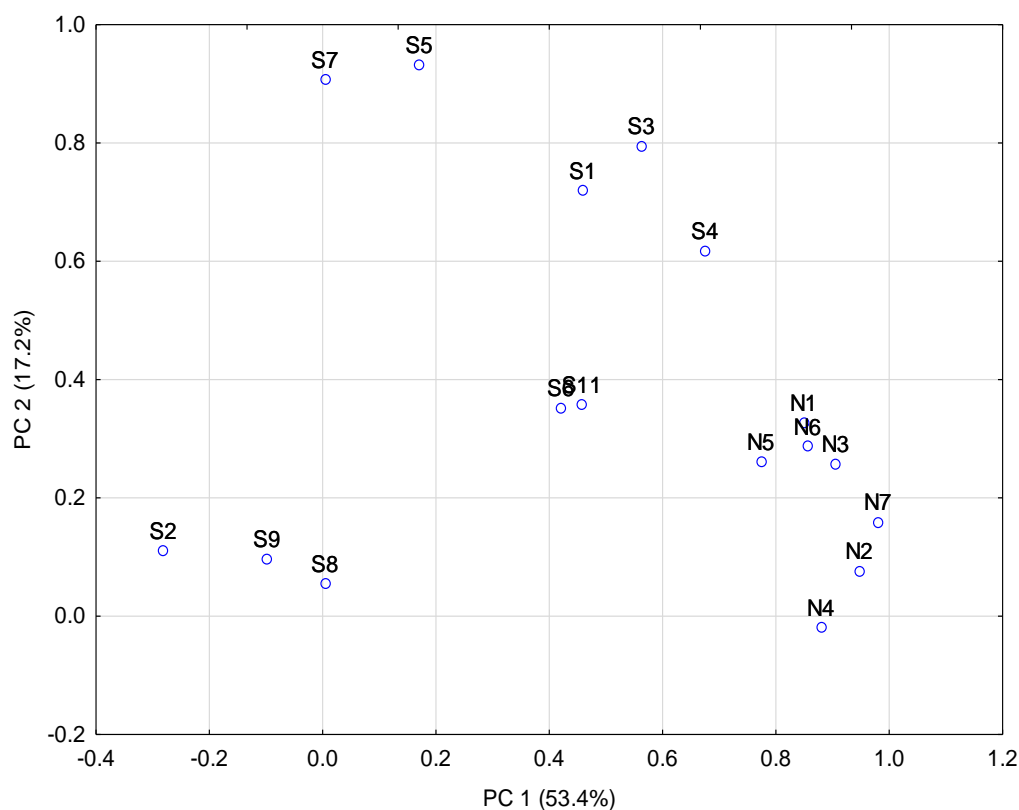
Най-високите концентрации на мед, олово и никел бяха отчетени в тъканите на миди, събрани от Созополското пристанище (S6). С най-високо съдържание на цинк бяха охарактеризирани мидите от крайбрежните местообитанията пред нос Колокита (S7). С най-високо съдържание на кадмий се отличаваха пробите от о-в Св. Петър (S3), в които бяха измерени също така най-ниските концентрации на олово. Най-малко количество на натрупани в тъканите цинк, никел, мед и кадмий бяха регистрирани в мидите от северните станции - Кранево (N4), Калиакра (N2), Св. Константин и Елена (N5).

За проучване на сходствата и различията в съдържанието на метални елементи в тъканите на мидите от различни райони, беше приложен мултипараметричен анализ на главните компоненти (PCA) върху данните за средните количества на металите, измерени в тях. Резултатите от анализа (Фигура 2) добре разграничават изследваните райони в двуизмерното пространство, определено от първите два главни компонента (PC1 и PC2), обясняващи 70.6% от общата вариация на данните. По първия главен компонент добре се разделят южните от северните станции. Данните от Созополското пристанище (S6) и Приморско (S11) не корелираха значимо с нито един от двата главни компонента и локализацията им в пространството на първите два главни компонента се определя от различно, в сравнение с другите пунктове, съотношение на металните микроелементи.

Полученият модел беше допълнително проверен чрез сравняване на общото количество акумулирани метали в мидите между отделните станции по двойки с непараметричен тест на Wilcoxon.

Мидите, събрани от буната пред с. Кранево (N4), демонстрираха значимо по-ниски концентрации на есенциалните елементи мед и цинк и средни нива на олово, кадмий и никел в сравнение с екземплярите от района на нос Калиакра (N2) и южната част на Варненския залив - пристанището (N6) и нос Галата (N7). Допълнително, мидите от нос Галата (N7) показаха значително по-ниско съдържание на олово и по-високи нива на мед, цинк, кадмий и никел в сравнение с тези от Тюленово (N3) и курортен комплекс (кк) Св.св. Константин и Елена (N5). В изследваните органи на мидите от фермата край о-в Св. Иван (S1) се установиха средни нива на съдържание на олово и значително по-ниски нива на съдържание на останалите изследвани микроелементи, в сравнение с дивите екземпляри от същия широк район (скалите на носа на стария град Созопол (S2) и тези от нос Колокита (S7)).

Мидите, събрани от крайбрежните скали на гр Созопол (S5), в сравнение с тези от залива Зигра (S9) и Приморско (S11) на юг, както и с култивираниите (N1) и диви екземпляри от защитените зони Калиакра (N2) и Галата (N7) на север, показаха значително по-малко натрупана мед. Бяха установени също така междинни нива на цинк, кадмий и никел, и сравнително ниско съдържание на олово. С по-ниско съдържание на олово се отличаваха само пробите от Галата (N7). Концентрациите на олово в тях бяха по-ниски дори от тези в пробите от залива Св. Параскева (S8), в сравнение с които, тези от Галата (N7) съдържаха значително повече мед, цинк, кадмий и никел.



**Фигура 2.** Анализ на главните компоненти (PCA) на данните за акумулираните метали в тъкани на миди, събрани от изследваните райони (N1 – ферма гр. Каварна, N2 – нос Калиакра, N3 – с. Тюленово, N4 - с. Кранево, N5 – кк Св. Св. Константин и Елена, N6 – пристанище гр. Варна, N7 – нос Галата, S1 – ферма о-в Св. Иван, S2 – о-в Св. Иван, S3 – о-в Св. Петър, S4 – гр. Черноморец, S5 – крайбрежни скали гр. Созопол, S6 - пристанище гр. Созопол, S7 – нос Колокита, S8 – залив Св. Параскева, S9 – залив Зигра, S11 – гр. Приморско)

В сравнение с мидите от N7 (Галата), пробите от най-южната опробвана станция S11 (Приморско), съдържаха значително повече олово и кадмий и по-малко мед, цинк и никел. Анализът на данните за металното съдържание в мидите от Приморско (S11), от своя страна, показва значително повече кадмий и по-ниски нива на останалите изследвани микроелементи в сравнение с нос Калиакра (N2), както и с близко разположения залив Зигра (S9), където количеството на измерения никел в пробите беше по-високо.

За проучване на степента на биоаккумуляция на изследваните метали в отделните райони, в настоящето изследване беше приложен установения в практиката (Sijm, Hermes, 2000; Никаноров и сътр., 1985) коефициент на биоаккумуляция (КБ). Тук, КБ беше изчислен за представителни станции като съотношение между концентрациите на съответния елемент мидите и тези в морската вода:

$$КБ = M_T / M_B,$$

където  $M_T$  е количеството на съответния метал в тъканите на изследваните органи (крак, хриле и храносмилателна жлеза) на мидите, изразени в mg/kg, а  $M_B$  е концентрацията на метала в морската вода (mg/l).

Наличие на висока биоаккумуляция беше установена за всички изследвани метали в черните миди, като най-високата стойност на КБ достигна до 63950 спрямо измереното ниво на съответния метал във водата, а 10.6 беше най-ниската изчислена стойност. Според класификацията на Никаноров (1985), индикаторният вид *M. galloprovincialis* може да бъде класифициран като

макроконцентратор по отношение на изследваните метални замърсители. При това, КБ на тъканите на мидите за мед, олово и никел беше най-висок в Созополското пристанище (S6), а този за цинка при нос Колокита (S7). Максималната степен на биоаккумуляция на кадмий беше установена в черупките на мидите от нос Галата (N7).

**Таблица 2.** Коефициент на биоцентрация на изследваните метални елементи в тъкани и черупки на миди по станции (пролетно-летен сезон)

Метал	Мед		Олово		Цинк		Кадмий		Никел	
	Т*	Ч	Т	Ч	Т	Ч	Т	Ч	Т	Ч
<b>N2</b>	3092	3144.6	79.8	227.7	8521.3	21825.7	142.5	1269.3	21.7	275.2
<b>N3</b>	2266.7	738.5	149.2	65.8	2956.5	17296.7	562.5	873.5	155.6	297
<b>N4</b>	2630	1418.6	31.3	88.8	1028.8	7191.7	255	620	174.8	122.4
<b>N6</b>	3298	1975.4	57.1	126.8	10843.1	14199.4	692.5	430.5	197.6	295.9
<b>N7</b>	14480	18306	26.2	360.2	5737.8	19811.8	845	2418	209.4	266.8
<b>S1</b>	2314	1740	48.2	175.9	8896.8	850.5	220	27.5	30.6	21.2
<b>S2</b>	3032.5	2940	45.2	190.2	9247.5	843	620	30	92.5	18.8
<b>S3</b>	5805	4060	7.2	48.7	10381.5	629.6	1442.5	68.5	154.1	24.2
<b>S4</b>	3776.7	4120	108.6	190	7913.3	858.3	670	24.25	189.4	6.1
<b>S5</b>	4125	6170	59.7	196.3	5867.8	981.7	615	35	67.6	16.5
<b>S6</b>	63950	2853.3	905.2	198.1	8173.8	722.4	225	22.5	300.6	10
<b>S7</b>	5326.7	3826.7	99.4	194.6	25422.7	1137.6	550	25	77.1	14.3
<b>S8</b>	2140	3130.2	47.4	332.2	1797.2	1824.5	157.5	96.5	73.3	18.9
<b>S9</b>	4260	2538.2	200.6	329.6	7853.9	1693.4	745	78.25	135.3	21.3
<b>S11</b>	3263.3	3910	76.1	218.7	4349.6	949.6	877.5	35	112.2	10.6
*Т – тъканни проби от изследваните органи на мидите; Ч – черупки.										

Най-ниските стойности на КБ на олово бяха изчислени за тъканите на дивите миди от о-в Св. Петър (S3), а за мед, цинк, кадмий и никел за черупките на мидите от Тюленово (N3), о-в Св. Петър (S3), Созополското пристанище (S6) и Черноморец (S4). Стойностите на КБ, изчислени за черупките бяха по-ниски и хомогенни от тези, получени за тъканите. В сравнение с изследваните органи, КБ на черупките показаха обратна тенденция в модела на биоаккумуляция между изследваните райони. Най-високите и разнообразни стойности на КБ на черупките (особено по отношение на цинк, кадмий и никел) бяха изчислени за северните станции (от 65,8 при курорта Св. Константин и Елена - S5, до 21825,7 при нос Калиакра - N2). В сравнение с тях, южните станции показаха по-ниски и сходни стойности на КБ (от 6,1 във фермата край о-в Св. Иван (S1) до 6170 при Созополските скали (S5)).

## 5.2. Оценка на оксидативния статус на индикаторния вид *M. galloprovincialis* от различни райони на българското черноморско крайбрежие и различни сезони

За да се анализира общия модел на взаимозависимост между изследваните маркери за ОС и степента на проявата им в изследваните органи на моделния обект, беше използван дисперсионен анализ (ANOVA) (Таблица 3).

**Таблица 3.** Дисперсионен анализ ANOVA на данните за общата активност на изследваните биомаркери в органите на *M. galloprovincialis* (SS – сума от квадратите; *n* – степени на свобода; MS – средна сума на квадратите; F – статистика на Фишер; *p* – достоверност)

Ефект	SS	N	MS	F	p
Коефициент	41754748	1	41754748	603.9837	0.000000
ОС маркер	205171586	7	29310227	423.9733	0.000000
Орган	4004508	2	2002254	28.9627	0.000000
Маркер*Орган	22294026	14	1592430	23.0346	0.000000
Грешка	252885763	3658	69132		

Резултатите показаха, че и двата тествани фактора (вид ОС маркер и орган) имат достоверен ефект както поотделно, така и в комбинация. Налице са значими различия в интензитета на отделните ОС маркери по органи, от една страна, и различното им съотношение във всеки орган, от друга. Това дава основание да се приеме, с голяма достоверност, че про-/антиоксидантните процеси в мидите притежават индивидуални специфики за конкретния целеви орган и тип биомаркер.

За да се сравни интензитета и посоката на про-/антиоксидантните процеси в изследваните органи, бяха сравнени средните стойности на индикаторите за ОС измерени в тях, посредством *t*-критерия на Стюдънт ( $p \leq 0.05$ ) (Таблица 4).

Резултатите от анализа не показаха значими различия в активността на глутатион редуктазата в изследваните органи. По отношение на останалите показатели, крака на мидите демонстрира достоверно най-ниските нива на малондиалдехид и максимална концентрация на глутатион в сравнение с другите изследвани органи.

**Таблица 4.** Средни стойности ( $\pm$  ст. грешка) на изследваните показатели за оксидативен стрес и достоверност на техните различия в органите на мидите ( $p \leq 0.05$ )

Орган \ Показател	Крак	Хриле	Хепатопанкреас
<b>LPO</b> nmoles MDA/mg protein	1.63 $\pm$ 0,06	5.31 $\pm$ 0.17*	3.44 $\pm$ 0.12*/**
<b>GSH</b> ng/mg protein	1477.15 $\pm$ 87.73	836.73 $\pm$ 62.16*	406.91 $\pm$ 22.1*/**
<b>SOD</b> U/mg protein	18.95 $\pm$ 0.93	18.06 $\pm$ 0.85	5.59 $\pm$ 0.41*/**
<b>CAT</b> U/mg protein	0.57 $\pm$ 0.08	1.4 $\pm$ 0.25*	2.67 $\pm$ 0.38*/**
<b>GPX</b> U/mg protein	10.83 $\pm$ 0.95	10.52 $\pm$ 1.49*	6.80 $\pm$ 0.40*/**
<b>GR</b> U/mg protein	11.38 $\pm$ 1.57	15.43 $\pm$ 2.83	12.64 $\pm$ 1.55
<b>GST</b> U/mg protein	87.69 $\pm$ 9.18	80.53 $\pm$ 6.49	40.61 $\pm$ 3.55*/**
<b>G6PD</b> U/mg protein	20.17 $\pm$ 0.89	43.55 $\pm$ 0.12*	21.01 $\pm$ 0.77**

\* - значими различия от реакцията на крака; \*\* - значими различия от реакцията на хрилете

Антиоксидантната ензимна защита на крака се характеризира с минимална активност на каталазата и максимална на глутатион пероксидазата. Активностите на супероксид дисмутазата и глутатион-S-трансферазата в крака бяха близки до отчетените в хрилете и значимо по-високи от тези в храносмилателната жлеза. Реципрочно, активността на глюкозо-6-фосфат дехидрогеназата беше сходна с тази в храносмилателната жлеза и по-ниска от тази в хрилете.

В сравнение с другите органи, хрилете показаха максимални нива на липидна пероксидация и активност на ензима глюкозо-6-фосфат дехидрогеназа, в комбинация с междинни нива на глутатион и активност на ензима глутатион пероксидаза, значимо по-ниски от тези в крака, но по-високи от храносмилателната жлеза. Също така, в сравнение с храносмилателната жлеза, в хриле беше отчетена значимо по-висока активност на супероксид дисмутаза и

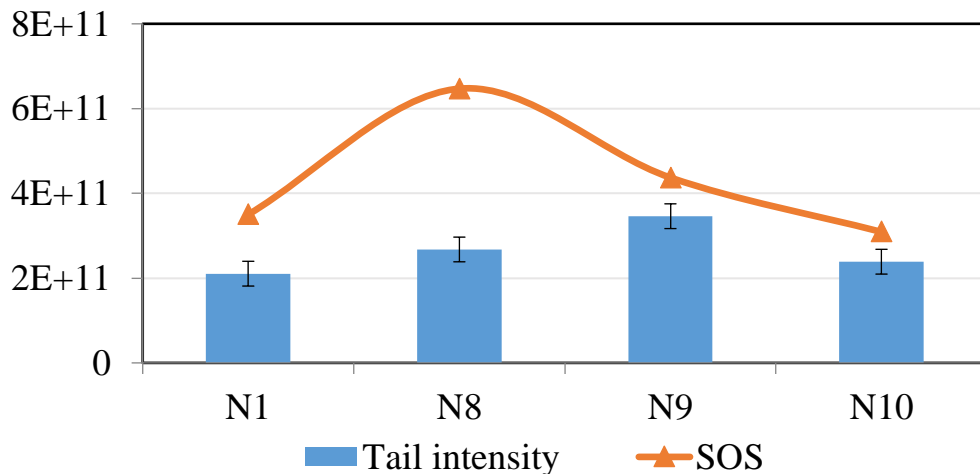


глутатион-S-трансфераза, както и по-ниска каталазна активност. Последната, обаче, превишаваше значимо измерената в тъканите на крака.

Хепатопанкреасът се отличава от другите изследвани органи с най-ниски концентрации на глутатион и междинни нива на липидна пероксидация, значимо по-ниски от тези в хрилете, но по-високи от крака. В хепатопанкреаса е отчетена минималната активност на супероксид дисмутаза, глутатион пероксидаза и глутатион-S-трансфераза, а най-висока средна активност е измерена за каталазата. Активността на глюкозо-6-фосфат дехидрогеназата в хепатопанкреаса е по-ниска от тази на хрилете, но не се различава статистически достоверно от тази, измерена в крака.

### 5.3. Предварителна еко-генотоксична оценка на *M. galloprovincialis* от крайбрежни местообитания

В настоящата работа беше направена пилотна оценка на уврежданията в ДНК на изследвания биоиндикаторен вид от представителни местообитания по северното и южното крайбрежие. Резултатите за средната „интензивност на опашката“ са представени на Фигури 3 и 4.

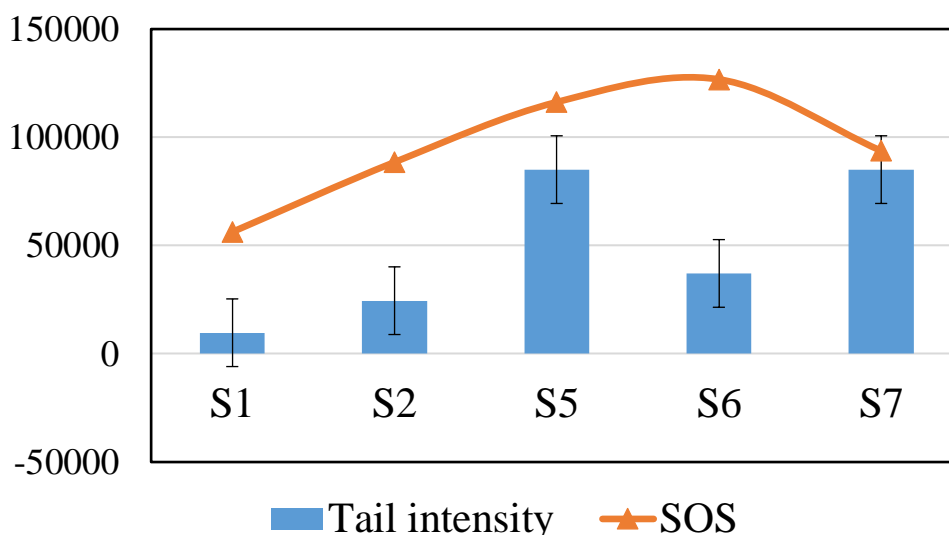


**Фигура 3.** Средна интензивност на опашката от кометния тест на *M. galloprovincialis* от станции по северното крайбрежие и съответствие със специфичен оксидативен стрес индекс (SOS) (N1 – ферма гр. Каварна; N8 - кк Камчия; N9 – с. Шкорпиловци; N10 – нос Кара Борун)

Получените резултати показаха, че интензивността на генотоксичните ефекти в *M. galloprovincialis* са различни в зависимост от мястото на обитаване на мидите и следователно от състоянието на средата.

Данните за четирите станции от северното крайбрежие показаха най-малки генотоксични ефекти при мидите от фермата гр. Каварна (N1) (Фиг. 3). Съществено по-големи увреждане има при мидите от кк Камчия (N8) и с. Шкорпиловци (N9).

По отношение на южното крайбрежие, най-нисък генотоксичен ефект също се отчита при мидената ферма (S1), както и на скалистите местообитания на о-в Св. Иван (S2). Значително по-високи генотоксични ефекти се проявяват при мидите от станции S5 (крайбрежни скали гр. Созопол), S6 (пристанище гр. Созопол) и S7 (нос Колокита) (Фиг. 4).



**Фигура 4.** Средна интензивност на опашката от кометния тест на *M. galloprovincialis* от станции по южното крайбрежие (S1 – ферма о-в Св. Иван; S2 – о-в Св. Иван; S5 – крайбрежни скали гр. Созопол; S6 - пристанище гр. Созопол; S7 – нос Колокита)

Резултатите от кометния анализ подсказват, че наблюдаваните генотоксични ефекти при мидите са свързани пряко със състоянието на средата им на обитаване. За да проверим тази зависимост, приложихме множествен регресионен анализ на интензивността на опашката при кометния тест и съдържанието на тежки метали в органите на мидите (Таблица 5).

**Таблица 5.** Коефициенти на значимост и достоверността им ( $p < 0.05$ ) в множествената регресия на индикатор а интензивност на опашката на кометния тест и метално съдържание (b – регресионен коефициент; Std.Err. – стандартна грешка; t – критерий; p – достоверност)

	<b>b</b>	<b>Std.Err.</b>	<b>t(1)</b>	<b>p</b>
<b>Intercept</b>	5127.87	5.635584	909.91	0.000700
<b>Pb</b>	39.02	0.009571	4077.48	0.000156
<b>Cu</b>	-51.62	0.027706	-1863.27	0.000342
<b>Zn</b>	-902.80	0.715987	-1260.91	0.000505
<b>Ni</b>	-1287.87	2.328918	-552.99	0.001151

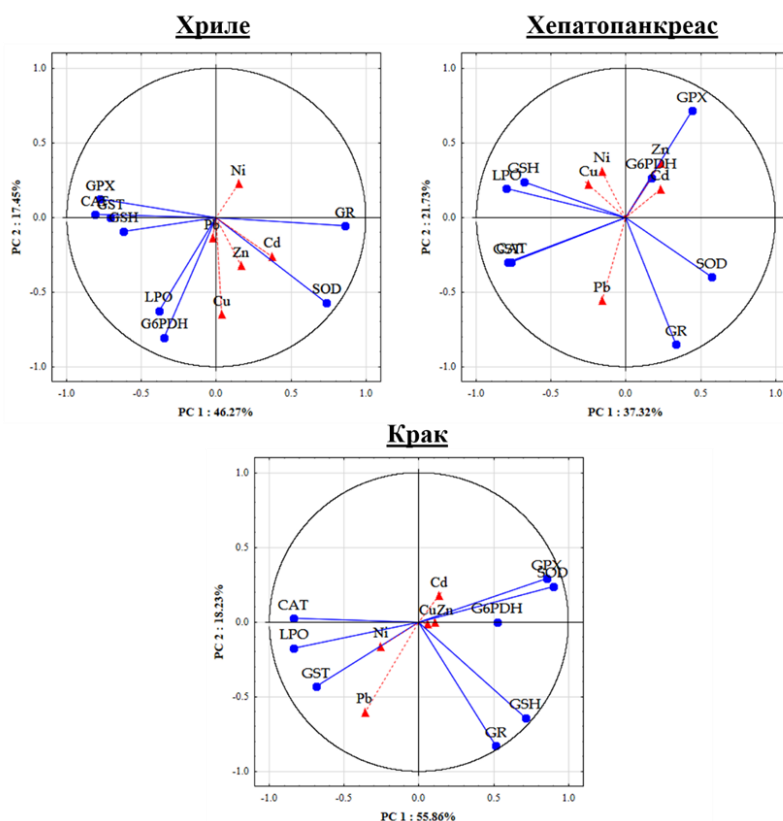
Установеният от нас капацитет на средата на крайбрежните местообитания да индуцират увреждания в генома на черноморските *M. galloprovincialis* (и вероятно в другите организми) представлява риск както за екосистемното „здраве“, така и за човешкото здраве.

#### 5.4. Оценка на връзката между съдържанието на основни метали в органите върху динамиката на маркерите на оксидативен стрес в *M. galloprovincialis*

За да се провери наличието на статистически значими връзки между показателите на ОС и съдържанието на металите мед, олово, цинк, кадмий и никел в съответните органи беше приложен едномерен корелационен анализ върху данните от лабораторните проучвания.

Резултатите показаха, че съдържанието на Cu в хрилете е положително и значимо свързано с нивата на LPO ( $r = 0,57$ ) и активността на SOD ( $r = 0,53$ ). В храносмилателната жлеза беше установена значима, макар и не висока, връзка между натрупаните количества Cu и нивото на GSH ( $r = 0,47$ ). В крака Cu корелира значимо с активността на G6PDH ( $r = 0,51$ ).

Тъканното съдържание на Pb показва значими положителни връзки с нивото на LPO ( $r = 0,58$ ) и активността на GST ( $r = 0,67$ ) в крака и негативна корелация с активността на GPX ( $r = -0,72$ ) в храносмилателната жлеза. За концентрациите на Cd бяха установени значими корелации само с активността на GR ( $r = 0,52$ ) в хрилете на мидите. По отношение на натрупаните в целевите органи Zn и Ni не беше установена значима връзка с изследваните биомаркери на ОС.



**Фигура 5.** Проекции на изследваните биомаркери по органи и съдържание на метали върху факторната равнина на първите два главни компонента (● - маркер за ОС; ▲ - метално съдържание като допълнителна променлива)

За да може да се проучи по-детайлно връзката между комплексните взаимодействия на показателите на ОС в целевите тъкани и металното им съдържание, беше приложен многомерен анализ на главните компоненти (PCA) върху корелационните матрици, като всеки орган беше анализиран индивидуално. Резултатите от анализа са представени в двуизмерни графики (Фигура 5), където основните променливи са разположени в съответствие с тяхната корелация с двата главни компонента (PC), а концентрациите на металите бяха използвани като допълващи променливи и също бяха визуализирани във факторната равнина.

Анализът на главните компоненти за данните от хрилете показва, че първите два извлечени компонента (PC) обясняват 63,72% от общата дисперсия. PC1 обяснява 46,27% от общото вариране и показва наличието на основен

градиент от значими негативни корелации с активностите на SOD, CAT, GPX и GR, към положителни връзки с активността на GR и до известна степен на SOD. Вторият главен компонент (PC2) отговаря за 17,45% от дисперсията и е свързан с нивата на LPO, активността на G6PDH и съдържанието на Cu. Натрупаният Cd е свързан до известна степен с активността на SOD, докато съдържанието на Ni не показва значими корелации с измененията на нито един от маркерите на ОС и съответно се разполага отделно в положителната част на диаграмата.

PCA анализът на данните за биомаркери на ОС в панкреаса показва, че първите два главни компонента обясняват малка част от общата дисперсия – 59,05%, като PC1 обяснява 37,32% от дисперсията и показва градиент както от нивата на GSH и LPO, така и от активността на CAT (отрицателни връзки) към SOD, въпреки че зависимостта с този показател е сравнително слаба. PC2 обяснява 21,73% и се характеризира с градиент от сравнително слаби корелации с активностите на GR към G6PDH. Сравнително ниският процент от общата дисперсия, който обясняват първите два главни компонента, показва, че върху маркерите за ОС в храносмилателната жлеза вероятно въздействат повече фактори, но всеки с нисък индивидуален ефект.

По отношение на крака, първите два главни компонента, извлечени от данните, обясняват 74,09% от разсейването. PC1 обяснява 55,86% от общата дисперсия и показва градиент на показателите за ОС - от CAT, LPO, GST (негативно свързани) към SOD, GPX и G6PDH (с положителни корелации). Активността на GST показва сходни и сравнително слаби връзки и с двата главни компонента. PC2 обяснява 18,23% от общата дисперсия и се характеризира с относително слаби корелации с активностите на GSH и GR. Съдържанието на Pb показва значими връзки и с двата главни компонента, с превес на тези към PC2 и съответно с GSH и GR.

## **5.5. Определяне и оценка на общото ниво на оксидативен стрес на *M. galloprovincialis* и неговата динамика**

### **5.5.1. Оценка на биоиндикаторния потенциал на про/антиоксидантните системи на *M. galloprovincialis***

В настоящата работа беше използван нов алгоритъм, предложен от нас (Yakimov et al., 2018), който използва Z-стойности (брой стандартни отклонения, с които изследваната стойност се различава от средната стойност) за интерпретация на биомаркерите и изчисляване на индекс на оксидативен стрес (ОС). Изчисляват се два съпътстващи индикатора: 1) Прооксидативен (PrO) и 2) Антиоксидативен ензимен (АОЕ). Първият, отразява промените в нивата на LPO и свързаните с тях промени в концентрацията на GSH. Оценката на АОЕ интегрира промените в активността на ензимите на антиоксидантната защита в организма. На базата на двата индикатора се изчислява специфичен индекс на оксидативния стрес (SOS).

Резултатите от изчислените PrO и АОЕ индикатори за изследваните органи на миди от различните станции са представени на Таблица 6.

Изчислените прооксидантни (PrO) индикатори показват отрицателни стойности за пробите от тъкан на крак от северните станции на пробонабиране с изключение на N6 и N7, като стойността за N6 е много висока (PrO=3.11). N6 е пристанищният комплекс в гр. Варна, който е с интензивно натоварване, оказващо въздействие върху про/антиоксидантния баланс в изследваните обекти. N7 е в акваторията на нос Галата, която е в непосредствена близост с пристанищния комплекс и канала. За пробите от N7 е изчислен отрицателен

АОЕ индекс с междинна стойност, което показва, че въздействието, предизвикващо ОС, инхибира антиоксидантните ензими. Повечето АОЕ индекси за северните райони са отрицателни с изключение на N5 и N10. Може да се допусне, че поради слаби прооксидантни въздействия ( $PrO < 0$ ) антиоксидантната защита не е активирана. В пробите от N1, N5 и N8 АОЕ индексите са близки до 0, т.е. сходни с измерените средни за цялата изследвана акватория. За всички проби от тъкани на крак от южните райони са изчислени положителни стойности на PrO индекса, като най-високи са тези за станции S5, S6, и S8. Станция S6 е пристанищният комплекс в гр. Созопол, а станция S5 е в същия район и това са крайбрежните скали на носа на стария град. Също така прави впечатление, че изчислените стойности за АОЕ в повечето случаи също са положителни с изключение на S1, S8 и S11. Такова съчетание на положителни PrO и АОЕ индекси за една станция най-вероятно отразява наличието на хронично въздействие, придружено с активиране на антиоксидантната защита на мидите, която обаче се оказва недостатъчно ефективна за овладяване на прооксидативните процеси. Обратното, в пробите от станции S1, S8 и S11 АОЕ индексите са отрицателни, което индикира наличие на въздействия, които инхибират антиоксидантните ензими.

Наблюдаваните закономерности в изменението на PrO индекса за хрилете са подобни на тези за крака. PrO индексите за всички проби от северното крайбрежие са с отрицателни стойности, докато тези за южните (с изключение на S1 – мидена ферма) са положителни. Макар и отрицателен PrO индексът за N6 показва най-висока стойност и доближава средните стойности за изследваната акватория ( $PrO = -0.09$ ).

**Таблица 6.** Стойности на PrO и АОЕ индексите за изследваните органи на мидите от различните станции

Орган	Крак		Хриле		Храносмилателна жлеза	
	PrO	АОЕ	PrO	АОЕ	PrO	АОЕ
N1*	-1.23	-0.09	-0.62	-0.29	0.15	0.23
N2	-2.19	-0.65	-0.74	-0.32	0.33	-0.35
N3	-2.53	0.06	-0.64	0.53	-0.32	-0.09
N4	-2.18	-0.35	-0.68	-0.18	0.65	-0.27
N5	-2.36	-0.57	-1	0.23	-0.14	-0.14
N6	3.11	-0.14	-0.09	0.48	1.22	-0.41
N7	1.14	-0.56	-0.19	0	0.83	-0.83
N8	-3.08	-0.02	-1.72	-0.28	-0.07	-0.09
N9	-1.72	-0.38	-0.46	-0.32	0.29	0.19
N10	-0.86	0.39	-0.69	0.11	0.44	0.52
S1	1.56	-0.61	-0.98	-0.56	-0.82	-0.19

<b>S2</b>	1.05	0.62	1.17	0.82	-0.84	0.72
<b>S3</b>	1.22	0.5	1.1	0.85	-1.12	1.12
<b>S4</b>	0.67	1.13	0.93	0.79	-0.28	0.95
<b>S5</b>	1.6	1.67	1.45	0.96	0.72	1.26
<b>S6</b>	1.81	0.67	1.69	-0.18	1.36	-0.26
<b>S7</b>	0.85	0.92	1.06	0.44	-0.57	1.06
<b>S8</b>	1.84	-0.84	0.05	-0.61	-1.41	-1.36
<b>S11</b>	1.3	-0.36	0.36	-0.6	-0.42	-0.75

\*N1 – ферма гр. Каварна; N2 – нос Калиакра; N3 – с. Тюленово; N4 - с. Кранево; N5 – кк Св.Св. Константин и Елена; N6 – пристанище гр. Варна; N7 – нос Галата; N8 - кк Камчия; N9 – с. Шкорпиловци; N10 – нос Кара Борун; S1 – ферма о-в Св. Иван; S2 – о-в Св. Иван; S3 – о-в Св. Петър; S4 – гр. Черноморец; S5 – крайбрежни скали гр. Созопол; S6 - пристанище гр. Созопол; S7 – нос Колокита; S8 – залив Св. Параскева; S11 – гр. Приморско.

При южните станции, подобно на пробите от крака на мидите, PrO индексите за S5 и S6 са най-високи. Сравнявайки PrO индексите за пробите от хриле от северните райони, с тези от крака се вижда, че с малки изключения (N6 и N7) първите имат по-високи стойности. При пробите от южното крайбрежие се наблюдава подобно увеличение (за S2, S4, S7) спрямо стойностите за крак. АОЕ индексите за пробите от хриле от N3, N5 и N6 са положителни, което индикира по-скоро умерено въздействие на средата, при което се е активирала антиоксидантната защита. АОЕ индексите на пробите от южните райони са преобладаващо с положителни стойности. За пробите от станция S6, за разлика от крака, АОЕ индексът е с отрицателна стойност, което вероятно е свързано с продължително неблагоприятно въздействие на средата, което предизвиква изчерпване на антиоксидантите.

По отношение на храносмилателната жлеза PrO индексите показват най-високи положителни стойности за мидите от двата пристанищни комплекса N6 (PrO=1.22) и S6 (PrO=1.36) (Таблица 5.3.1). В изследваните райони от южното крайбрежие (с изключение на пробите от пристанищния комплекс на гр. Созопол S6 и близките до него скали на Стария град S5), PrO индексите в храносмилателната жлеза имат отрицателни стойности. В пробите от мидите от северни райони обаче, преобладават положителни PrO индекси (N1, N2, N4, N6, N7, N9, N10), като само за две станции (N3 и N5) индексите са с отрицателни стойности, а в станция N8 стойността е близка до 0, т.е. до средната за всички изследвани станции. По отношение на АОЕ индекса, в станциите от северното крайбрежие преобладават проби от миди с отрицателни стойности на индекса, с изключение на N1, N9 и N10. Както за PrO, така и за АОЕ в пробите от станция N8 (кк Камчия) стойността е близка до 0. В изследваните проби от мидите от южното крайбрежие, обратно, преобладават пробите с положителни стойности. За тези станции може да се допусне активирание на антиоксидантната система, вследствие предходни прооксидантни събития. В станциите, където се наблюдават отрицателни стойности за PrO, заедно с отрицателни стойности за АОЕ, вероятно натискът на средата (прооксидантните въздействия) са по-слаби

от средното за всички изследвани райони и съответно антиоксидантната защита е по-слабо активирана.

### 5.5.2. **Индекс на специфичен оксидативен стрес (SOS) и оценка на екологичното състояние на крайбрежните черноморски екосистеми**

В настоящата работа за първи път е използван специфичен индекс на оксидативния стрес (SOS), въведен от нас (Yakimov et al., 2018), за диагностика на наличието на въздействия върху морската среда и оценка на състоянието на крайбрежните екосистеми. Индексът е все още в процес на верификация, като в този труд са представени първите сравнителни резултати.

За разлика от други (стандартни) подходи оценката с индекса SOS не се основава на отклонения на про- и антиоксидантните маркери от тези на някакви „референтни“ (т.е. чисти или неповлияни) места, а на стандартизирани отклонения от усреднените стойности на ОС маркерите ( $Z$ -стойности) за всички изследвани станции, тъй като индикаторният вид *M. galloprovincialis* съществува при даденото разнообразие от условия на морската среда от всички крайбрежни местообитания. Това означава, че изборът на референтно място би бил много относителен и субективен.

Така,  $Z$ -оценките стандартизират получените данни по отделните ОС маркери и се оценява отклонението от средната от всички изследвани станции. Следователно стойности, които са близки до средната (т.е. до 0) показват, че нивото на съответния маркер не се отклонява значимо от средното състояние, докато резултатите с положителна или отрицателна стойност показват доколко съответния ОС маркер се отклонява над или под средното, съответно.

Получените данни за SOS индексите заедно с изчислените (средно по органите на мидите) PrO и AOE индекси за изследвани места и райони на българското черноморско крайбрежие са представени на Фигура 6.

При сравнение на изчислените PrO индекси по изследваните станции се вижда, че те са най-високи и положителни в пристанищните комплекси Варна (N6) и Созопол (S6) и станциите, разположени в близост на тези райони, съответно Галата (N7) и скалите на Стария град Созопол (S5), източно от пристанището.

За всички останали станции от северното крайбрежие PrO индексите са отрицателни, а за станциите от южните – положителни. Индексите AOE са отрицателни за станциите от северното крайбрежие (с изключение на N3 и N10), докато за станциите от южното крайбрежие са положителни (с изключение на S1, S8 и S11).

Разликата в изчислените индекси между северните (на север от н. Емине) и южните (на юг от н. Емине) райони е добре изразена. За разлика от станциите по северното крайбрежие, южните райони показват наличие на въздействия от средата, които водят до индуциране на прооксидантни процеси в мидите (в степен по-висока от средната за цялата изследвана акватория), които, от своя страна, активират и антиоксидантната защита. Въздействие на околната среда с по-голяма сила и продължителност е най-вероятно налице при някои от станциите по южното крайбрежие, а именно S1, S8 и S11, където антиоксидантните ензими са инхибирани.

Станциите от северното крайбрежие имат като цяло наличие на по-слаби неблагоприятни въздействия ( $PrO < 0$ ), което съответно не води до активиране на антиоксидантната защита. Изключение представлява пристанищният комплекс

Варна (N6) и нос Галата (N7), където прооксидантното въздействие е достатъчно голямо, за да инхибира антиоксидантните ензими.

Данните показват, че всички южни станции на пробонабиране, а от северните само станция N6 (пристанище Варна) и N7 (нос Галата) имат SOS индекси с високи и положителни стойности. Това характеризира тези места, като такива със стойности на оксидативния им статус, по-големи от средните за изследваната акватория.

Много високи положителни SOS индекси бяха установени за станции S5 (крайбрежни скали Созопол) и S6 (пристанище Созопол). Това очевидно се дължи на високите прооксидантни (PrO) нива и слабо активиране на антиоксидантната (АОЕ) система. Пристанищният комплекс на гр. Созопол (S6) е известен район, подложен на замърсяване (Todorova et al., 2014), включително и с установените в настоящето изследване високи концентрации на Pb.

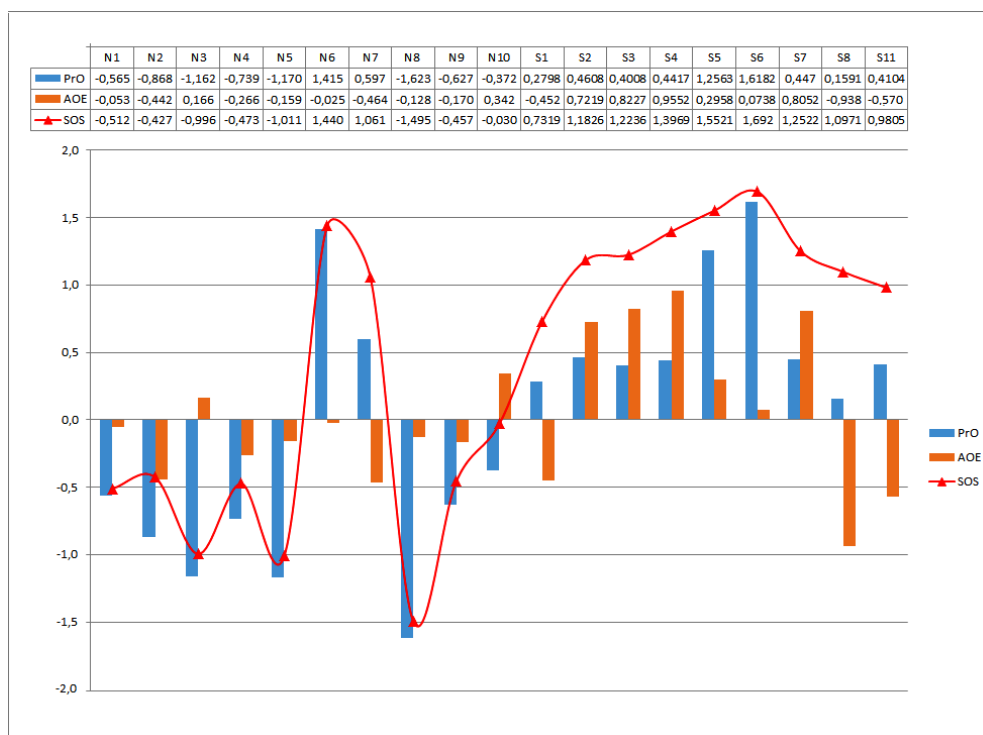
Специално за тежките метали (т.е. Hg, Pb, Cu) е добре известно, че може да са пряка причина за висок ОС в *M. galloprovincialis* (Mejdoub et al., 2017). В условията на силно въздействие, отразено във високи стойности на PrO, антиоксидантната защита на мидите от пристанищния комплекс се подтиска и нивото на ОС е значимо.

По подобен начин, за мидите от крайбрежните скали на гр. Созопол (S5), индексът SOS е също висок и положителен, и въпреки че антиоксидантната защита се включва (АОЕ = + 0.296), тя не може да компенсира прооксидантните процеси (PrO = + 1.256), което води до ОС. От друга страна, пунктовете N7, S1, S8 и S11 също имат положителни SOS индекси, което в този случай може да бъде резултат от инхибирането на ензимната антиоксидантна система (съответно, АОЕ = - 0.464, АОЕ = - 0.452, АОЕ = - 0.938 и АОЕ = - 0.571) вероятно поради повишен натиск на ксенобиотици в средата, които пряко увреждат ензимите. Наличието на положителни и относително високи стойности на SOS индекса за станции S2 (о-в Св. Иван), S3 (о-в Св. Петър), S4 (с. Черноморец) и S7 (нос Колокита) могат да се тълкуват като наличие на увеличен ОС в изследваните миди, поради прооксидантен натиск, но придружен с активиране на антиоксидантните ензими (положителни АОЕ стойности). Това определено говори за наличието на стресори в околната среда, чието въздействие обаче има тенденция да бъде овладяно поради завишени АОЕ стойности и съответно липса на повишен ОС.

Изследваните станции от северното крайбрежие като цяло имат SOS индекси с отрицателни стойности. В тези райони прооксидантното въздействие е под средното, т.е. морската среда не индуцира значителен ОС в мидите. Изключение представляват станции N6 (пристанище Варна) и N7 (нос Галата), където има положително и повишено ниво на SOS индекса и следователно повишено ниво на ОС в обитаващите там миди.

Накрая, бяха установени станции, на които SOS индексите бяха близки до нула, като с най-ниска стойност е станция N10 (нос Караборун – SOS = -0.03). Това отразява про/антиоксидантно състояние, което е много близко до средното за целия изследван крайбрежен район, което означава липсата на повишен импакт на средата върху про/антиоксидантния баланс в мидите, т.е. добро екологично състояние на екосистемата (екосистемно „здраве“).





**Фигура 6.** Индекс на специфичен оксидативен стрес в миди от изследваните станции, заедно със стойностите на прооксидантния и антиоксидантния индекс (PrO - прооксидантен индекс; AOE - антиоксидантен ензимен индекс; SOS - специфичен оксидативен стрес индекс); (N1 – ферма гр. Каварна, N2 – нос Калиакра, N3 – с. Тюленово, N4 - с. Кранево, N5 – кк Св. Св. Константин и Елена, N6 – пристанище гр. Варна, N7 – нос Галата, N8 - кк Камчия, N9 – с. Шкорпиловци, N10 – нос Кара Борун, S1 – ферма о-в Св. Иван, S2 – о-в Св. Иван, S3 – о-в Св. Петър, S4 – гр. Черноморец, S5 – крайбрежни скали гр. Созопол, S6 - пристанище гр. Созопол, S7 – нос Колокита, S8 – залив Св. Параскева, S11 – гр. Приморско).

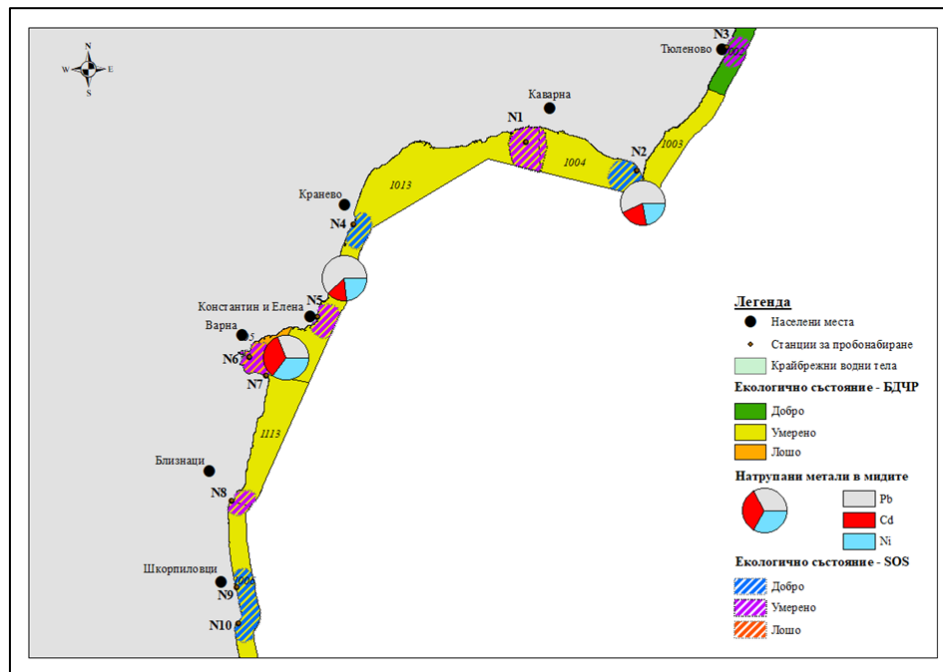
Описаната методология и предложените индекси на ОС за оценка на нивата на риск и наличие на оксидативен стрес в *M. galloprovincialis* от различни местообитания могат, според нас, да намерят приложение като перспективни биомаркери в мониторингови програми.

Във връзка с това беше разработена оценъчна скала на екологичното състояние на крайбрежната черноморска зона по специфичния индекс на оксидативен стрес (SOS) в *M. galloprovincialis*, както следва:

SOS стойност	Екологично Състояние
-0.50 ÷ +0.50	Добро (ниска стресогенност)
±0.50 ÷ ±1.50	Средно (умерена стресогенност)
< -1.50; > +1.50	Лошо (висока стресогенност)

На базата на посочената скала беше направена оценка на екологичното състояние на крайбрежните местообитания (екосистеми) с използването на SOS, като биомаркер (Фиг. 7 и Фиг. 8).

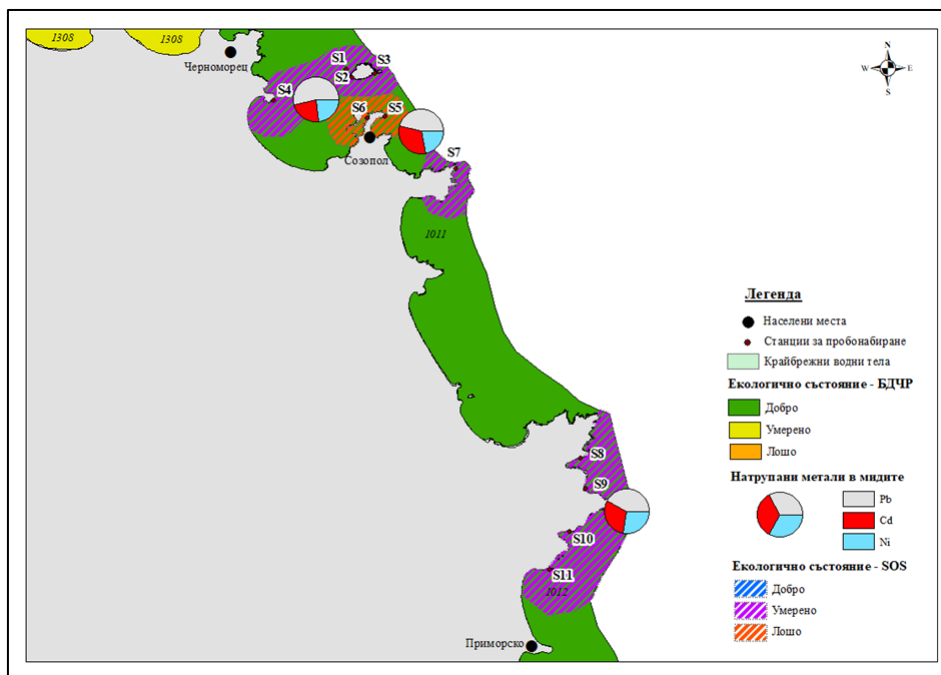
Както може да се види на картните схеми, станциите за изследването на черни миди за целите на настоящата разработка бяха разпределени в рамките на крайбрежните водни тела (ВТ) в Черноморския район за басейново управление (ЧРБУ). Въз основа на резултатите от провеждания рутинен мониторинг по РДВ и РДМС, крайбрежните води северно от н. Емине са оценени в умерено екологично състояние с изключение на ВТ “от н. Шабла до н. Камен бряг” (код BG2BS000C002) и “Варненски залив” (код BG2BS000C005), определени съответно в добро и лошо състояние. Водите на юг от н. Емине, съгласно ПУРБ 2016 – 2021 г. са определени в добро екологично състояние с изключение единствено на ВТ “Южен Бургаски залив <30м” (код BG2BS000C1308). Обратно, направената от нас оценка, базирана на интегрирания индивидуален отговор на индикаторния вид *M. galloprovincialis*, показва добро и умерено състояние за местообитанията в северния сектор и умерено или дори лошо за тези в южния.



**Фигура 7.** Сравнителна оценка на състоянието (стресогенност) на средата с използването на SOS индекса и съдържание на метали в тъканите на мидите, в сравнение със състоянието на морската околна среда на водните тела по ЧРБУ на северното черноморско крайбрежие

На север, ВТ “от н. Шабла до н. Камен бряг” през 2017 г. постига добро състояние по физикохимични и биологични елементи за качество, според Оценката на актуалното състояние на водите в ЧРБУ. Въпреки това, специфичният стрес индекс на станция N3 (Тюленово), показва умерено състояние със занижени стойности в сравнение с N2 (Калиакра), N4 (Кранево), N9 (Шкорпиловци) и N10 (н. Кара Борун), оценени в добро състояние, независимо, че се намират във водни тела, от години поддържащи умерено екологично състояние. Наблюдаваното активизиране на антиоксидантните ензими (АОЕ = +0.17) в комбинация с ниски нива на прооксидантно въздействие (PrO = - 1.16) при екземплярите от N3, вероятно показва наличие на натиск, с които антиоксидантната им защитна система успява да се справи, но това индикира

потенциален риск при евентуална промяна в интензитета и/или продължителността на натиска.



**Фигура 8.** Сравнителна оценка на състоянието (стресогенност) на средата с използването на SOS индекса и съдържание на метали в тъканите на мидите, в сравнение със състоянието на морската околна среда на водните тела по ЧРБУ на южното черноморско крайбрежие

Варненският залив е традиционно сред най-проблемните ВТ в крайбрежната ни зона. Районът е силно урбанизиран и подложен на дългогодишно локално комплексно натоварване, което през годините поддържа стабилно лошо екологично състояние. Това се отразява в умерените стойности на оксидативния статус на мидите от местните и околни популации, събрани от станции N5, N6 и N7 (кк Св. Св. Константин и Елена, Варненското пристанище и н. Галата). Заливът се характеризира с не голяма дълбочина и неограничен водообмен с морето в източна посока, докато в западния си край е свързан посредством два канала със системата Белославско-Варненско езеро, която още от 70-те години на миналия век представлява каскада, въвеждаща замърсители от химическата индустрия и електропроизводството, селското стопанство, пречиствателните станции и пристанища (Konsulova, 1992). Самият пристанищен комплекс на гр. Варна се характеризира с високи нива на натиск от петролни и метални замърсители (Balashov et al., 1998), а също така и от хронично замърсяване с петрогенни и пиролитни въглеводороди (Gorinstein et al. 2003; Moncheva et al. 2004), рефлектиращи в максималните за цялото северно крайбрежие стойности на SOS-индекса при станция N6. Дългогодишният антропогенен градиент в посока запад - изток е оказал дълготраен ефект върху екологичната обстановка и биоразнообразието в района, с особено негативно влияние върху макрозообентосните съобщества (Todorova and Konsulova, 2000). Тази тенденция се потвърждава и от изчисления от нас SOS на мидите от н. Галата (N7), чиито стойности са по-ниски от пристанището (N6), но все още са много над средните за цялата крайбрежна зона. За разлика от станциите в южната част на Варненски залив, при кк Св. Св. Константин и Елена (N5) в

северната част, стойностите на SOS вече падат под средното ниво, показвайки подобряване в условията на средата.

Подобно несъответствие в оценките на екологичното качество се наблюдава и в района южно от н. Емине. Там всички изследвани от нас местообитания на *M. galloprovincialis* попадат в рамките на крайбрежно водно тяло „от н. Акин до н. Маслен нос“ (код BG2BS000C1011) и северната част на ВТ „н. Корака – до устието на р. Резовска >30м“ (код BG2BS000C1012). Вследствие на взетите мерки през последните години, ВТ „от н. Акин до н. Маслен нос“ отбелязва значително подобрение на състоянието, определено по физико-химични и биологични елементи за качество и към 2017 г. е оценено в „добро“ екологично състояние (ПУРБ 2016 – 2021 г.). Въпреки това, специфичният стрес индекс на станциите за пробонабиране, разположени в широкия Созополски залив, показва зона на лошо състояние и повишена „стресогенност“ на средата в района на гр. Созопол (пристанището (S6) и близкоразположените крайбрежни скали (S5)), заобиколена от зони в умерено състояние на север (S1, S2, S3 и S4) и на юг (S7) от града.

Сравнително високи стойности на SOS, респективно умерено състояние, показваха и мидите от залва Св. Параскева (S8), разположен в южния край на водното тяло, както и тези от станция S11 (гр. Приморско), локализирана в северната част на ВТ „н. Корака – до устието на р. Резовска > 30м“, традиционно оценявано в добро екологично състояние.

## 6. Обсъждане

В българските крайбрежни води на Черно море е доказано съществуването на риск от повишено замърсяване с тежки метали, като видът *M. galloprovincialis*, както и други двучерупчести мекотели, служи като утвърден индикаторен организъм в редица мониторингови програми (Goldberg et al., 1978; Phillips, 1976, 1977; Phillips, Rainbow, 1988,1994; Bricker et al., 2014). Плитката крайбрежна зона е особено уязвима, в резултат на което в последните години се наблюдава съществена деградация на крайбрежните морски екосистеми на глобално ниво.

Проведеното от нас изследване включва оценката на съдържанието на някои метали в органите на *M. galloprovincialis* от различни станции (райони) както от северното, така и от южното черноморие. Наличието на метали в тъканите има пряка връзка с оксидативните процеси, протичащи в организма на мидите. Затова, получените резултати бяха използвани за оценка на степента на стреса от морската среда и съответно интензивността на оксидативните промени в организма на изследвания вид.

Получените в това изследване данни показваха наличието на значими разлики в съдържанието на метали в органите на мидите. Установения от нас модел на натрупване на метални микроелементи в изследваните органи е в реда: Хриле > Храносмилателна жлеза > Крак > Черупка. Подобно разпределение за органи на *M. galloprovincialis* е показано и от други изследователи (Vlahogianni et al., 2007; Körfezi, Yozukmaz, 2015). Установените от нас различия в разпределението на медта и цинка в органите на мидите, и респективно на оловото, кадмия и никела в черупките, може да се обясни с факта, че биоакмулирането на микроелементи от околната среда в двучерупчестите мекотели се осъществява главно чрез вътреклетъчно асимилиране в меките тъкани, а в черупката чрез биоминерализация в карбонатната матрица, което определя и различията в съдържанието им (Demina, Budko, 2014).

Количествата на замърсителите, измерени в тъканите на различни индикаторните видове миди, обикновено са силно променливи и до голяма степен отразяват специфичните характеристики и състоянието на средата на районите, които обитават. В частност, за плитководните крайбрежни зони на Черно море, които са обект на настоящето изследване, е доказана пряка връзка между съдържанието на тежки метали в тъканите на мидите *M. galloprovincialis* и съдържанието им в средата, която обитават (Jitar et al, 2015; Yakimov et al., 2017).

От друга страна отделните изследвани тъкани на мидите притежават различен капацитет за натрупване на микроелементи. Нашите данни показаха, че храносмилателната жлеза се отличава със специфичен модел на биоаккумуляция на различни метали в сравнение с другите изследвани органи, което е установено и в предишни изследвания (Soldatov et al., 2007).

В настоящето изследване беше оценена степента на биоаккумуляция на метални микроелементи чрез изчисляване на коефициент на биоаккумуляция (КБ) (Никаноров и сътр., 1985; Sijm, Hermes, 2000). Нивата на биоаккумуляция в органите на мидите значимо се различаваха между отделните изследвани станции, отразявайки до голяма степен концентрацията на метали във водната среда. Нашите данни определено показаха, че в традиционно натоварените със замърсители райони, беше отчетено, като цяло, по-висок КБ на изследваните метали в меките тъкани на мидите в сравнение с условно чисти райони.

Получените от нас резултати убедително показаха, че по отношение на изследваните метали, черните миди се проявяват като макроконцентратори с висок капацитет за натрупване. При това, степента на акумулация, оценена чрез КБ, съществено се различава между отделните изследвани райони и съответно биотопи на българското черноморско крайбрежие, отразявайки динамиката на наличните метали в морската околна среда. В традиционно разпознаваните като антропогенно натоварени райони беше отчетена съществено по-висока биоаккумуляция на метали в органите на мидите, в сравнение с условно чистите райони. Това е изцяло в подкрепа на надеждността на използването на *M. galloprovincialis* като индикатор за мониторинг на металното замърсяване на крайбрежните води. Получените резултати могат да послужат при избора на таргетни органи за бъдещи екотоксикологични изследвания или мониторинг в Черно море с използването на *M. galloprovincialis* като индикатор.

Изследваните органи на мидите се оказаха по-ефективни биоаккумулятори на изследваните метали отколкото черупките. Стойностите на коефициента на биоконцентрация (КБ), изчислени за черупките бяха по-ниски и хомогенни от тези, получени за тъканите. В сравнение с изследваните органи, КБ на черупките показаха различна тенденция в модела на биоаккумуляция между изследваните райони. Като цяло, най-високите и разнообразни стойности на КБ на черупките (особено по отношение на цинк, кадмий и никел) бяха изчислени за изследваните северни станции, с най-висока стойност при нос Калиакра. В сравнение с тях, южните станции показаха по-ниски и с по-малък диапазон на вариране стойности на КБ (най-малки в мидената фермата край о-в Св. Иван, а най-високи при скалите на стария град Созопол). Тези резултати показват, че системни изследвания върху натрупването на метали в черупките на *M. galloprovincialis* биха могли да послужат за анализ на по-дългосрочното замърсяване на морската среда с метали.

Нашето измерване на съдържанието на тежки метали в повърхностната морска вода от изследваните станции, въпреки че не е било систематично, показа

концентрации на олово и кадмий над допустимите стойности, посочени в съответните националните и европейски регламенти. Получените данни определено показват повишени концентрации на олово и кадмий в повърхностните води на всички изследвани станции. Отчетените концентрации на олово превишават до 6,6 пъти стойностите регламентирани в Националната нормативна уредба (Наредба № 8, 2001), а концентрациите на кадмий надвишават 8 пъти нормите за качество на крайбрежните морски води, обитавани от черупкови организми (Наредба № 4, 2000).

Като цяло, беше установено, че съдържанието на тежки метали в ядливите тъкани на *M. galloprovincialis* надвишава стандартите за безопасност на храните в повечето изследвани райони от черноморското крайбрежие. Според допустимото съдържание на микроелементи в храни (Регламент на ЕО № 1881/2006), в нашите проби бяха регистрирани превишения на нормата по отношение на олово и кадмий в мидите от почти всички изследвани станции. Превишения на нормите бяха установени и по отношение на съдържанието на мед и цинк.

Следователно, консумирането на диви черни миди от някои райони на българското черноморско крайбрежие крие потенциален риск за човешкото здраве.

В настоящата работа се представят резултати от първото комплексно изследване на стресовата екология на черноморската мида *M. galloprovincialis* в крайбрежните екосистеми в България. Анализирани са биомаркери на оксидативния статус в извадки от миди от представителни станции (райони) на българското черноморско крайбрежие. Тези биомаркери представляват подклас на биомаркери за въздействие, които напоследък се използват широко в екологични изследвания. Промените в оксидативния статус на морските организми в отговор на различни видове натиск, особено антропогенния, върху морската среда се очаква да допринесат за по-детайлна и обективна оценка на екосистемното „здраве“, както и да служат за ранно предупреждение за предстоящи екологични проблеми, свързани с морската околна среда (Constantini et al. 2010).

Получените резултати от проведеното изследване показаха, че като цяло, нивото на изследваните биомаркери значително варират в различни тъкани (органи) на *M. galloprovincialis*, а също така имат характерни за българското черноморско крайбрежие пространствени (по райони и биотопи) и времеви (сезонни) различия.

В храносмилателната жлеза на мидите беше установено специфика в нивата на различните оксидативни биомаркери и на редокс баланса. Храносмилателната жлеза е основният орган, в тъканите на който се извършва обезвреждането и метаболизирането на приетите с храната ксенобиотици. Във връзка с това протичат множество окислителни реакции и каскадно генериране на активни форми на кислорода (АФК) от биотрансформационните системи на организма. Поради това в клетките на тъканите на този орган постоянно се генерира голямо количество свободни радикали и се поддържат сравнително високи нива на прооксидантните процеси. В допълнение, антиоксидантният защитен комплекс на храносмилателната жлеза силно се влияе от вътрешни за организма фактори – възраст, полова зрялост и др.

В хрилете на мидите беше установено ниво на оксидативни биомаркери, различно от това на храносмилателната жлеза. Хрилете на мидите се оказват почувствителни към условията на средата от останалите изследвани органи (Cossu

et al., 1997; Soldatov et al., 2007). Например, при полеви и лабораторни експерименти с експозиция на метали е установено, че интензитета на антиоксидантния отговор в храносмилателната жлеза на миди *M. galloprovincialis* слабо се променя и дори намалява, докато при хрилете значимо нараства по градиента на натоваарването (Regoli, Principato, 1995). Основната функция на ктенидиите при мидите е газообмен. Това предполага висок потенциал за образуване на супероксидни радикали в клетките им, което обяснява сравнително високата активност на SOD, отчитана в тъканите на този орган (Vlahogianni et al., 2007). Хрилете имат изключително фин епител и са в директен контакт с морската вода, поради което пряко се влияят от нейното състояние. Установеното от нас относително повишено ниво на LPO в хрилете, е в подтвърждение на предишни изследвания, при които са установени високи нива на LPO в обратно-пропорционална зависимост с антиоксидантната активност в клетките им (Fernández et al., 2010; Vlahogianni et al., 2007; Soldatov et al., 2007).

Получените от нас резултати показаха, че в най-общ план, нивото на оксидативните биомаркери в крака на мидите се различава значимо от нивото им в храносмилателната жлеза и се доближава до това на хрилете. Кракът при видовете миди от род *Mytilus, spp.* за мониторинг, е сравнително слабо изследван орган от гледна точка на биоиндикация. Поради прикрепения начин на живот при *Mitilidae spp.*, кракът има слаба двигателна роля и основните му функции са свързани с тези на бисусната жлеза, разположена в основата му. Поради това, някои автори свързват процеса на резорбция при оборота на бисусните нишки на мидите с установената висока активност на SOD в мускулната тъкан на крака. Съчетанието с ниска активност на CAT, кара някои изследователи да предположат, че SOD в клетките на крака действа като прооксидант, генериращ  $O_2^-$  и  $\cdot OH$ , необходими за деполимеризацията на хиалуроновата киселина, формирана при разграждането на колагена в повредените нишки (Soldatov et al., 2007).

Като един от най-информативните маркери за оксидативен стрес се приема липидната пероксидация (LPO), тъй като полиненаситените мастни киселини с техните двойни връзки са силно податливи на окислителни промени. Получените от нас резултати показаха определена зависимост на общото ниво на LPO в *M. galloprovincialis* от състоянието на морската среда, която обитават мидите.

Промените в LPO са демонстрирани като отговор на морските двучерупчести организми на експозицията им на широк спектър от замърсители, включително тежки метали (Geret et al. 2002, Vlachogianni, Valvanidis, 2007; Belcheva et al. 2015, Yakimov et al. 2018), полициклични ароматни въглеводороди (Sureda et al. 2013), хербициди (Wenning et al. 1988), а напоследък все по-интензивно се тестват и ефектите от микропластици (Revel et al. 2019). Ролята на металите с променлива валентност в реакциите на ОС (реакция на Фентон) е добре известна (Vlachogianni, Valvanidis 2007; Krivoruchko, Storey 2010).

Наблюдаваният модел на вариация на LPO в нашето изследване потвърждава неговата пригодност като възможен биоиндикатор за екологичен стрес.

От друга страна обаче, установените от нас значителни вариации в биомаркерите на оксидативния статус на *M. galloprovincialis*, показват недостатъчната точност и ограниченост от използването само на отделни индикатори на оксидативни процеси за оценка на редокс баланса, като сред

реакция (Aarab et al., 2004; Dagnino et al., 2007; Hagger et al., 2006). Това определя необходимостта да се използва набор от коплементарни биомаркери за оценка на оксидативния статус на такива двучерупчести видове в Черно море, които могат да се ползват за биоиндикация.

Като общ резултат от наблюдаваните при настоящето изследване промени в про- и антиоксидантните процеси в биомаркарния вид *M. galloprovincialis* от различни станции и крайбрежните биотопи, се налага изводът, че промените в условията на околната среда в различните типове крайбрежни морски местообитания са свързани с риск от нарушение на редокс баланса и оксидативен стрес в организма. Например, морската среда варира значително в топлинните си характеристики, парциално налягане на кислорода, степента на замърсяване и осветеност, като всичко това може да повлияе на степента на окислителни увреждания, преживяни от даден индивид, и много морски организми адаптират своите антиоксидантни системи в отговор на такива вариации на околната среда за поддържане на стабилен редокс статус (Lesser 2006; Buttemer, Adele & Costantini 2010). Още повече, че в рамките на вида, популационната плътност варира съобразно местообитанието и поне част от това вариране е свързана с оксидативни увреждания (Joynner-Matos et al. 2007).

Приема се, че ензимната антиоксидантна система на организмите се активира като адаптивна реакция, което им позволява да преодолеят напълно или частично ОС (Livingstone, 2003; Vlachogianni, Valvanidis, 2007). От друга страна обаче, едни и същи стойности на ензимната активност могат да отразяват както активирането преди достигане на максимум, така и инхибирането след преминаването му (хормезис; Mattson, Calabrese, 2010). В резултат на това, както остро, така и хронично излагане на неблагоприятни условия на околната среда може да доведе до инхибиране на антиоксидантните ензими, което показва, че антиоксидантните ензимни биомаркери не реагират еднозначно на прооксидативно въздействие (Winston, Di Giulio, 1991; Regoli et al., 2003; Marigomez et al., 2013).

Фактът, че кой биомаркер сам по себе си, не може да се валидира като универсален инструмент за оценка на реакцията срещу и откриване на специфични експозиции и ефекти на замърсители, е добре известен и се отнася в пълна степен и до маркерите на оксидативния стрес. Биологичните отговори на организмите, изложени на въздействие на ксенобиотици, могат да бъдат много различни поради разнообразието, с което стресорите могат да присъстват в околната среда. Това води до търсенето на определен набор от биомаркери, който да бъде ефективно приложим за оценка и биомониторинг. В тази посока са и усилията за търсене на биомаркерни индекси, които биха могли да опростят и обхванат в един общ индикатор оценката на сложни биологични промени, измервани от множество биомаркери поотделно (Beliaeff, Burgeot, 2002; Aarab et al., 2004; Broeg et al., 2005; Hagger et al., 2006; Dagnino et al., 2007; Schettino et al., 2012; Sanchez et al., 2012). Напоследък са предложени вече и интегрирани биомаркери за оценка на токсичността на метално-базирани наночастици (Devin et al., 2017). Въпреки, че всеки от предложените в литературата индекси има определени предимства и приложна стойност, общото за тях е, че те са базирани и оценяват отклонения от предефинирани „референтни“ стойности на замърсители или на определени състояния на морската околна среда.

В опит да обединим различни измерени биомаркери на оксидативния статус с цел да се получи обща (интегрална) оценка на редокс баланса, ние изведохме три индекса, отразяващи активността на про- и антиоксидантните



процеси, както и техния баланс в организма на изследваните миди от различните изследвани крайбрежни морски местообитания.

Индексът PrO отразява нивото на прооксидантен натиск от различни фактори върху организма. Антиоксидантният (ензимен) индекс (АОЕ) оценява нивото на активиране на антиоксидантната защита в организма на мидите.

Много морски организми коригират своите антиоксидантни системи в отговор на промени в морската околна среда, за да поддържат стабилно редокс състояние (Lesser 2006; Buttemer, Adele & Costantini 2010; Livingstone, 2003; Vlachogianni, Valvanidis, 2007). Поради хормезисния ефект, острото или хронично излагане на неблагоприятни условия на околната среда не винаги активира ответна антиоксидантна реакция (Winston, Di Giulio, 1991; Regoli et al., 2003). Следователно е трудно да се направи оценка на условията на околната среда, използвайки само вариациите в активността на антиоксидантните ензими. Предложеният от нас АОЕ индекс отразява тези характеристики на ензимната антиоксидантна реакция.

В опит да отчетем характерните зависимости в динамиката на про- и антиоксидантните процеси под въздействието на измененията в състоянието на морската околна среда (съответно екосистемното „здраве“), предложихме „специфичен оксидативен стрес“ (SOS) индекс, който интегрира PrO и АОЕ индексите. Индексът има две характерни особености: 1) В него могат да се включват различни биомаркери, като компоненти на PrO и АОЕ индексите; 2) индексът може да оценява както отклонения от предефинирани „референтни“ състояния, така и рискът от наличните изменения на общото моментно състояние на средата. Това са част от основанията индексът да бъде наречен „специфичен“.

В нашето изследване SOS добре отчита отклоненията на всяка станция от средното състояние на редокс баланса в мидите от всички изследвани станции на крайбрежието, а не отклонения от предефинирани референтни условия (т.е. „чисти“ места или „благоприятни“ условия). Следователно, SOS индексът не оценява нивото на оксидативен стрес „per se“, а по-скоро е показател за нивото на стресовия синдром в организма и съответно представлява инструмент за оценяване на „стресогенност“ на дадените условия на морската среда, което всъщност отразява и „здравословното“ състояние на екосистемата.

Най-общо, получените резултати от приложението на SOS индекса в това изследване показва, първо, наличието на пространствени и времеви различия в състоянието на морската околна среда между северното и южното крайбрежие. В частност, завишено стресогенно състояние, оценено чрез SOS, беше установено за станциите от южното крайбрежие. Като цяло, на тези станции и стойностите на PrO и АОЕ индексите бяха положителни и по-високи (с много малко изключения, напр. мидена ферма при о-в Св. Иван), показващи условия, които активират антиоксидантната система. Второ, SOS индексът позволи оценка с по-голяма резолюция от направената с официално използваната методика, което се изразява във факта, че в отделни изследвани станции и райони беше установена повишена стресогенност на морската среда, което се отличава от оценката на състоянието на морската околна среда за съответния район, отразена в официални доклади на БДЧР (напр. Фиг. 5.3.3 и Фиг. 5.3.4.). По този начин, измененията в редокс балансът на индикаторния вид *M. galloporvincialis* отразяват биотичния отговор на организма на стреса от околната среда, като предложените индекси допълват и детайлизират, но и увеличават разделителната способност на т.нар. оценки за „добро“ екологично

състояние на морската околна среда по Рамковата директива за морска стратегия на ЕС (РДМС 2008/56/ЕО). Без съмнение, биомаркерите на оксидативен стрес могат да предоставят далеч по-пълна и обективна оценка на екосистемното „здраве“.

Очевидно, предложените индекси се нуждаят от допълнителни изследвания и верификация, за да бъдат използвани в мониторингови програми..

В настоящата труд са представени допълнително резултати от едно предварително изследване на наличието на генотоксичните ефекти в *M. galloprovincialis* от няколко представителни станции от северното и южното крайбрежие.

Технологията гел-електрофореза на единични клетки - Кометен анализ (КА) е широко използван като бърз и чувствителен метод за количествено измерване на уврежданията в молекулата на ДНК във водни организми. КА детектира едно и двойно-верижни скъсвания, фотодимери, образуване на ковалентни връзки между двете вериги на ДНК, както и между ДНК и протеин, алкално-лабилни места, получени вследствие на мутации и др. (Olive, Banath, 2006; Anderson et al., 2013; Driessens et al., 2009; Fairbairn et al., 1995; Speit and Hartmann, 2005).

Получените от нас резултати от проведения КА показваха наличието на генотоксични ефекти в *M. galloprovincialis*, дължащи се на условията на морската среда в изследваните станции по българското черноморско крайбрежие.

С използването на КА е установено увеличаване на скъсванията в ДНК в клетки от храносмилателна жлеза на мидата *Mytilus edulis* (Mitchelmore et al., 1998) при експозиция на различни нитроароматни съединения и бензо [a] пирен. Показано е, че увреждането на ДНК намалява при добавяне на антиоксиданти към средата, което потвърждава, че ОС е механизъм за отговор на организмите към токсичните агенти от околната среда (Villarini et al., 1998). Новите разработки и варианти при използването на метода КА дават възможност за по-прецизно установяване на вида генотоксин, който е предизвикал уврежданията, както и на съдбата на клетките увредени от генотоксично въздействие. Доказано е, че така могат да се различат едно- от двойно-верижните скъсвания в ДНК, както и дали клетките загиват от апоптоза или некроза (Georgieva et al., 2015). Напоследък за установяване на антропогенен натиск се използват изследвания на епигенетичните промени. Метилационният профил на ДНК вече се включва в стандартния набор от техники, отчитащи отговора на организма към замърсявания на околната среда. Увеличаването на метилирането на ДНК в определени локуси е указание за репресия на гените, локализирани там и е чувствителен маркер за промени в околната среда. Промените в генома, свързани с ДНК метилирането са много важни и поради друга причина. Те са указание за промени, които могат да се предадат в следващите поколения и да се отразят негативно на съществуването на самата популация (Ruiz-Hernandez et al., 2015) .

Нашите данни определено показаха, че интензивността на установените генотоксичните ефекти е различна в зависимост от мястото на обитаване на мидите и следователно от състоянието на морската околна среда. Най-малки генотоксични ефекти бяха отчетени при мидите от двете ферми (гр. Каварна и о-в Св-Иван). Значително по-големи генотоксични ефекти бяха отчетени за южните станции, особено при мидите от замърсените райони на пристанището на гр. Созопол и крайбрежни скали на стария град. Тези резултати се съгласуваха

много добре с тези, получени при използване на оксидативните биомаркери и индекси.

Като интересен факт беше установено, че геномът на мидите от някои условно по-замърсените места (напр. пристанище) показва тенденция да е относително по-устойчив на нарушения под натиска от околната среда, отколкото геномът на мидите от условно по-чисти места. Това най-вероятно е резултат от активиране на механизмите за възстановяване на ДНК, като опит за адаптация към стрес, подобно на включването на антиоксидантната защита на организма при въздействия на средата. Подобни ефекти са съобщавани от други автори (Emmanouil et al., 2007).

Ролята на металите като агенти, превдизвикващи генотоксични ефекти е известна отдавна. В нашето изследване също установихме пряка корелация между съдържанието на метали в органите на *M. galloprovincialis* и интензитета на кометната опашка, като параметър на КА. Екотоксикологични тестове, проведени в експериментални условия и *in situ* с използване на миди, установяват, че медта и живакът увеличават едновременните скъсвания в молекулата на ДНК и броя на микроядрата (Bolognesi et al., 1999). ДНК на мидите е подложена на значителни оксидативни увреждания, които се отчитат по нивата на 8-OHdG, 8-oxodG и др., и като цяло са по-високи от тези наблюдавани в бозайници (de Almeida et al., 2003).

Общият резултат от поведеното изследване е, че изследваните биомаркери за стрес на *M. galloprovincialis*, като сентинелен организъм, могат да се използват широко в различни програми за оценка и биомониторинг на Черно море. Тяхното приложение за оценка на риска както за самите организми, така и съответно за околната им среда обаче, изисква по-нататъшни изследвания за разработване на ефективен капацитет за интерпретация.

## 7. Заключение

### 7.1. Обобщение и изводи

Настоящите изследвания върху стресовата екология на индикаторния вид *M. galloprovincialis* от плитката крайбрежна зона на българския сектор на Черно море позволяват да бъдат формулирани следните обобщения и изводи:

- Видът *M. galloprovincialis* се проявява като макроконцентратор по отношение на металите мед, олово, цинк, кадмий и никел в крайбрежните черноморски екосистеми, натрупващ в органите си многократно по-големи количества, отколкото е моментното съдържание на металите във водата.
- Съдържанието на акумулираните метали в тъканите на мидите се различава значимо между отделните станции (райони) на изследване, като отразява пространствената динамика на замърсяването с металите във водната среда на местообитанията.
- Изчислените коефициенти на биоконцентрация определят меките (ядивни) тъкани на мидите като акумулиращи значително по-голямо количество метални замърсители отколкото биоминералните черупки.
- Получените при това изследване резултати за акумулацията на метали в тъканите на мидите са изцяло в подкрепа на пригодността на *M. galloprovincialis* за биоиндикация на замърсяване на крайбрежните екосистеми с метали.

- Черноморските миди от вида *M. galloprovincialis* са чувствителни към оксидативен стрес. Различните органи проявяват различна реакция към въздействията на околната среда, проявена чрез различен отговор на биомаркерите за оксидативен стрес. Като най-чувствителен орган се проявяват хрилете, вероятно поради прекия си контакт с външната среда и интензивния обмен на кислород.
- Индивидуалните реакции на биомаркерите за оксидативен стрес са достоверно корелирани (с изключение на каталазната активност) със съдържанието на мед, олово и кадмий в тъканите на мидите, което определя високият им индикаторен потенциал за целите на екотоксикологичния мониторинг.
- Редокс балансът на *M. galloprovincialis* е чувствителен към сезонни промени, като в миди, събрани през есенния период се отчитат завишени нива на оксидативен стрес в сравнение с тези, събрани през пролетния период.
- Налице е добре установена разлика в редокс баланса на мидите от северните (на север от н. Емине) спрямо южните (на юг от н. Емине) крайбрежни райони на Българската акватория на Черно море. Високи нива на прооксидантния натиск се регистрират в южните райони и такива, които се характеризират със значителни нива на замърсяване (пристанищни комплекси).
- Установен е тъканно-специфичен модел на динамика на маркерите за оксидативен статус, свързан с биоаккумуляцията на метални замърсители в *M. galloprovincialis* и общите условия на средата, предоставя възможности за биоиндикация, с различна биоаналитичност, на здравословното състояние на екосистемите. При тези оценки е необходимо да се вземат предвид естествената тъканна и сезонна динамика на биомаркерите.
- Получените резултати от оценката на здравословното състояние на крайбрежните екосистеми с използване на разработения оригинален SOS индекс показват, че биотичния отговор на *M. galloprovincialis*, като биоиндикатор на стресогенност на морската среда, може да прецизира и детайлизира оценката на състоянието на морската околна среда.

## 7.2. Приноси

### *Приноси с оригинален характер*

- За пръв път е проведено системно изследване и са получени първите данни за стрес екологията на индикаторния вид *M. galloprovincialis* в крайбрежните екосистеми на българската акватория на Черно море.
- За първи път са получени подробни данни за нивото на акумулация на тежки метали в различни органи и черупката на *M. galloprovincialis* от различни райони на българското черноморско крайбрежие.
- За първи път са получени данни за оксидативния статус и динамиката на биомаркерите на оксидативен стрес в *M. galloprovincialis* от българското черноморско крайбрежие, които еднозначно показват неговата зависимост от условията на средата в крайбрежните райони, както и сезонни зависимости.

- Проведено е първото у нас еко-генотоксично изследване на *M. galloprovincialis* от характерни крайбрежни райони и са получени оригинални резултати, показващи зависимост между степента на ДНК уврежданията и условията на средата на обитаване на мидите по българското черноморско крайбрежие.
- Въведени са оригинални индекси за оценка на оксидативен стрес в морски организми и е направена първата оценка на стресогенния потенциал на средата на обитаване на *M. galloprovincialis*, като индикатор на екологичното състояние на екосистемите на българското черноморско крайбрежие. Установени са значими различия в стресогенността на морската среда и състоянието на екосистемите в различните крайбрежни райони.

***Приноси с потвърдителен характер***

- Потвърдена е чувствителността на *M. galloprovincialis* към оксидативен стрес и възможността биомаркерите за оксидативен стрес да се използват за оценка на състоянието на морската среда.
- Потвърдена е зависимостта между съдържанието на металите в тъканите на *M. galloprovincialis* и оксидативния им статус.
- Потвърдено е наличието на зависимост между съдържанието на тежки метали в органите на мидите и степента на предизвиканите ДНК уврежданията в тях.

### Научни публикации по темата на дисертационния труд

**Yakimov L.**, E. Tsvetanova, A. Georgieva, L. Petrov, A. Alexandrova. Assessment of the oxidative status of Black Sea mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lamark, 1819) from Bulgarian coastal areas with introduction of specific oxidative stress index. *Journal of Environmental Protection and Ecology*, 19, 4, SciBulCom Ltd., 2018, ISSN:1311-5065, 1614-1622. Q3, IF (2018) = 0.634

**Yakimov L.**, Tsvetanova E., Georgieva A., Chipev N., Alexandrova A. Individual variations in antioxidant defense response of the black Black Sea mussel *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819. *Ecologia Balkanica*, Union of Scientists in Bulgaria – Plovdiv and the University of Plovdiv Publishing House. Q4, SJR 0,1, приета за печат: 04.12.2019 г.

**Yakimov L.**, Alexandrova A., Tsvetanova E., Georgieva A., Chipev N. Accumulated heavy metals and oxidative status in tissues of the Black Sea mussel (*Mytilus galloprovincialis* Lamark, 1819). *Proceedings of National conference with international participation Seminar of Ecology 2017*, 10, FARAGO, 2018, ISBN:979-853-476-132-4.

### Публикувани резюмета от постери и доклади

**Yakimov L.**, Chipev N. Can the oxidative status of the mussel *M. galloprovincialis* serve as an integral indicator of the Black Sea ecosystems condition? In: “Mapping and assessment of ecosystem services – Science in action”, София, България (06 - 07.02.2017 г.)

**Yakimov L.**, Alexandrova A., Tsvetanova E., Georgieva A., Chipev N. Accumulated heavy metals and oxidative status in tissues of the Black Sea mussel (*Mytilus galloprovincialis* Lamark, 1819). В 10-ти Юбилеен Семинар по екология с международно участие, София, България (27 - 28.04.2017 г.).

Vasileva B., **Yakimov L.**, Kukurina B., Georgieva M., Miloshev G., Chipev N. Comet assay as a sensitive tool for genotoxicity assessment of environmental stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Bulgarian Black Sea coast. In: “World BioDiscovery Congress 2017”, Sofia, Bulgaria (17 - 19.07.2017 г.).

**Yakimov L.**, Isheva T., Georgieva A., Tsvetanova E. Ecological characteristics of some coastal zones of the Bulgarian Black Sea aquatory. В: XXVIII Международна научна конференция “Българското европредседателство – иновации и просперитет”, Стара Загора, България (31.05.2018 - 01.06.2018 г.).

**Yakimov L.**, Kukurina B., Georgieva M., Miloshev G. Assessment of the damages caused by anthropogenic pollution in the genome of the Black Sea mussel. In: “Second young scientists seminar on genetics with international participation”, Sofia, Bulgaria (03 - 05.10.2018 г.).

Tsvetanova E., **Yakimov L.**, Georgieva A., Nenkova G., Alexandrova A., Chipev N. Seasonal changes in the antioxidant defense system of Black Sea mussels *Mytilus galloprovincialis* Lam. В: Международна научна конференция “Климентови дни 2018”, София, България (08 - 09.11.2018 г.).

**Yakimov L.**, Nenkova G., Kalchev K., Tsvetanova E., Alexandrova A., Chipev N. Variations of glutathione and glutathione transferases in *Mytilus galloprovincialis* Lam. as response to different environmental conditions in the northern Bulgarian Black Sea aquatory. В: 6-та Международна конференция “Екологично инженерство и опазване на околната среда”, посветена на 150-та

годишнина на Българската академия на науките, Бургас, България (05 - 07.06.2019 г.).

**Yakimov L.**, Tsvetanova E., Georgieva A., Chipev N., Alexandrova A. Individual variations in the antioxidant defense responses in tissues of the common Black Sea mussel. В: Осма Международна конференция “Съвременни тенденции в науката”, ЮЗУ “Неофит Рилски“, Природо-математически Факултет, Благоевград, България (26 - 30.06.2019 г.).

Gocheva K., **Yakimov L.**, Tsvetanova E., Petrov L., Alexandrova A., Bratanova-Doncheva S., Chipev N., Fikova R. Whole system diagnostics: a new diagnostic approach to combining the Bulgarian mapping and assessment, validation and monitoring through bioindication. In: International Long Term Ecological Research Network 2nd Open Science Meeting 2019, Leipzig, Germany (02 - 06.09.2019).

**Yakimov L.**, Chipev N. Trace metal content and bioaccumulation capacity in tissues of *Mytilus galloprovincialis* Lam. from the Black Sea (Bulgaria). В: XVII Национална конференция с международно участие „Природни науки 2019“, ШУ "Епископ Константин Преславски" (04 - 06.10.2019).

Tsvetanova E., Georgieva A., Stoyanova T., Alexandrova A., **Yakimov L.** Oxidative damage of biomolecules in soft tissues of *Mytilus galloprovincialis* Lam from different sites of Bulgarian Black sea aquatory. В: XVII Национална конференция с международно участие „Природни науки 2019“, ШУ "Епископ Константин Преславски" (04 - 06.10.2019).

Ivanov P., Vasileva B., **Yakimov L.**, Chipev N., Georgieva M., Miloshev G. Genotoxicological analysis of mussel *Mytilus galloprovincialis* populations of the Bulgarian Black Sea coast. В: XVII Национална конференция с международно участие „Природни науки 2019“, ШУ "Епископ Константин Преславски" (04 - 06.10.2019).