

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ „ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ“

ВАРНА

ФАКУЛТЕТ ПО ФАРМАЦИЯ

КАТЕДРА ХИМИЯ

СТАНИСЛАВА КАТЕЛИЕВА ГЕОРГИЕВА

ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ОСТАТЪЧНИ ХЛОРОРГАНИЧНИ

ЗАМЪРСИТЕЛИ В ЧЕРНОМОРСКИ РИБИ

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация за присъждане на образователна и научна степен „ДОКТОР“

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

Научен ръководител:

доц. Мона Станчева, дхн

ВАРНА, 2013

Дисертационният труд се състои от 146 страници, включващи 43 фигури, 18 таблици, Приложение. Цитирани са 201 литературни източника, 187 от които на латиница и 14 на кирилица.

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

Материалът на дисертацията е представен по следния начин:

СЪДЪРЖАНИЕ

Използвани съкращения.....	4
ВЪВЕДЕНИЕ.....	5
I. Обща характеристика на хлорорганични замърсители	7
II. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ЧАСТ.....	11
II.1. Пробонабиране.....	11
II.2. Изготвяне на средна лабораторна проба.....	13
II.3. Екстракция на липидите и определяне на общо липидно съдържание.....	13
II.4. Пречистване на липидния екстракт.....	14
II.5. Газхроматографски метод с масдетекция за качествено и количествено определяне	16
II.6. Валидиране на метода и контрол на качеството на анализите.....	20
II.7. Статистическа обработка и анализ на резултатите.....	22
III. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ.....	25
III.1. ДДТ и метаболити в черноморски риби	25
III.1.1. Биометрични характеристики и липидно съдържание на рибните видове	25
III.1.2. Съдържание на ДДТ и метаболити.....	26
III.1.3. Разпределение на ДДТ и метаболити по райони на улов.....	32
III.1.4. Динамика на замърсяването с ДДТ и метаболити по години.....	33
III.1.5. Сезонна динамика на замърсяването с ДДТ и метаболити.....	35
III.1.6. Съдържание на ДДТ и метаболити по видове риби.....	35
III.1.7. Съотношение ДДЕ/ДДТ.....	37
III.1.8. Съдържание на ДДТ и метаболити в миди и рапани.....	39
III.1.9. Резултати за съдържание на ДДТ и метаболити в сладководни риби.....	41
III.1.10. Обобщение за съдържанието на ДДТ и метаболити в риби.....	42
III.2. Оценка на безопасността на черноморските риби като храна.....	43
III.2.1. Оценка на безопасност свързана със замърсяването с ДДТ и метаболити....	43
III.2.2. Оценка на безопасност свързана със замърсяването с ПХБ.....	46
III.2.3. Обобщение за безопасност на черноморски риби	53
IV. ИЗВОДИ.....	54
V. ПРИНОСИ.....	56
Списък на публикации и участия в научни форуми.....	57
Списък на участия в научни форуми.....	57

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ:

ДДТ- 1,1,1-трихлор-2,2-бис (4-хлорофенил) етан, (Дихлордифенилтрихлоретан)

ДДЕ - 1,1-дихлоро-2,2-бис (4-хлорофенил) етилен

ДДД - 1,1 -- дихлоро-2,2-бис (4-хлорофенил) етан

ОХП- органохлорни пестициди

ОХС – органохлорни съединения

ПБДЕ (PBDEs)- полибромирани дифенил етери

ПХБ (PCB) – полихлорирани бифенили

ПХДД / ДФ (PCDD/DFs) – полихлорирани дибензодиоксини / дибензо фурани

ХХЦХ (HCH) - хексахлорциклохексан

ХХБ (HCB) - хексахлорбензен

УОЗ – устойчиви органични замърсители

DI - дневен прием

ECD - детектор с улавяне на електрони

GC-MS – газова хроматография с мас детектор

GPL – гел проникваща хроматография

HPLC – високоефективна течна хроматография

HRMS - мас спектрометрия с висока резолюция

IT-MS/MS - спектрометрична система с йонен капан тандем мас

RQ - коефициент на риск

SPE - твърдофазна екстракция

SPME - твърдофазна микроекстракция

TEQ – токсична еквивалентна концентрация

USEPA - Агенцията по околната среда на САЩ

ВЪВЕДЕНИЕ

Програмата за околна среда (UNEP) към Организацията на обединените нации е определила 12 хлорсъдържащи органични съединения като опасни замърсители поради тяхното отрицателно въздействие върху човешкото здраве и околната среда. Сред тях са някои хлорорганични пестициди, полихлорирани бифенили, диоксини и фурани.

Разпространението на хлорорганични пестициди (като ДДТ и метаболити), полихлорирани бифенили (ПХБ) и диоксиноподобни съединения в околната среда постепенно намалява след края на 70-те години на XX век, поради тяхното ограничение и забрана. Но основните проблеми като замърсяването на екосистемите, безопасността на храните и потенциалните вредни ефекти за здравето на хората от експозицията на тази група вещества остават. Поради устойчивостта им в околната среда и способността им да биоакумулират, хлорорганичните замърсители се натрупват по хранителната верига в организмите, по-специално в животинските мазнини, млечните продукти и рибите.

Сред хлорорганичните замърсители са ДДТ и неговите метаболити, които въздействат неблагоприятно върху централната и периферната нервна система, гастроинтестиналния тракт, черния дроб, предизвикват кожно дразнене и алергични реакции. Отрицателните здравни ефекти се изразяват в увреждане на черния дроб и щитовидната жлеза, имуноксичност, невроповеденчески отклонения, намаляване телесната маса на новородени, репродуктивна токсичност.

Проблемът за замърсяване на морските екосистеми с устойчиви органични замърсители (УОЗ) и влиянието им върху биоразнообразието продължава да бъде предмет на научните изследвания. През последните години броят на изследванията за определяне концентрациите на пестициди, полихлорирани бифенили, полихлорирани дибензо-р-диоксини и дибензофурани и други устойчиви органични замърсители в проби от околната среда, животинските и растителните организми непрекъснато нараства. Научните изследвания са насочени към определяне нивата на замърсители във водни животински видове, защото липофилните хлорорганични съединения биоакумулират в техните тъкани в концентрации по-високи от тези във водната среда, която обитават. Затова рибите и други водни организми се използват като биоиндикатор за замърсяването на водните екосистеми.

Въздействието на хлорорганичните пестициди и ПХБ върху човека може да се осъществи по различни начини: чрез замърсен въздух, дермален или чрез храната. Хранителния прием на хлорорганични съединения представлява 90% от дневната експозиция. Хранителни продукти от животински произход и особено риба и морски продукти са основният източник за попадането им в човешкия организъм.

От друга страна рибите са ценна храна за хората, защото съдържат висококачествени протеини, витамини и други есенциални нутриенти, ниски нива на наситени мазнини, както и големи количества омега - 3 полиненаситени мастни киселини, които имат защитен ефект в превенцията на коронарната болест на сърцето. Поради здравните препоръки относно консумацията на риба, е важно да се определи приносът на хлорорганични замърсители като пестициди и ПХБ чрез хранителен прием на риба и други морски организми. По този начин може да се направи оценка на безопасността и риска от консумация на риба и рибни продукти.

Целта на дисертационната работа е изследване в динамика съдържанието на остатъчни хлорорганични пестициди (ДДТ и негови метаболити) в черноморски риби и оценка на безопасността на рибите като храна.

Задачите за постигане на тази цел са:

1. Пробонабиране на различни видове черноморски риби от различни райони.
2. Модифициране на аналитична процедура, разработена за ПХБ в храни от животински произход, с цел едновременно определяне на ДДТ и метаболити и полихлорирани бифенили в рибна тъкан.
3. Определяне концентрациите на ДДТ и метаболити в черноморски риби, миди, рапани и сладководни риби.
4. Резултатите да се използват за оценка на безопасността на черноморските риби като храна. За целта да бъдат изчислени различни показатели - дневен хранителен прием, коефициент на риска (RQ) и токсични еквивалентни концентрации (TEQ).

I. Обща характеристика на хлорорганични замърсители

Хлорорганичните замърсители са устойчиви на фотохимични, биологични и химични процеси в околната среда. Те причиняват екологични щети като се натрупват чрез хранителната верига и оказват влияние върху човешкото здраве. Програмата за околна среда UNEP е определила 12 хлорсъдържащи органични съединения като приоритетни замърсители с оглед на отрицателното им въздействие върху човешкото здраве и околната среда. Като устойчиви органични замърсители (УОЗ) са определени следните съединения:

Хлорорганични пестициди - Дихлордифенилтрихлороетан (ДДТ), Алдрин, Хлордан, Диелдрин, Ендрин, Хептахлор, Мирекс, Токсафен, Хексахлорбензен (ХХБ)

Индустриални химикали - Полихлорирани бифенили (ПХБ)

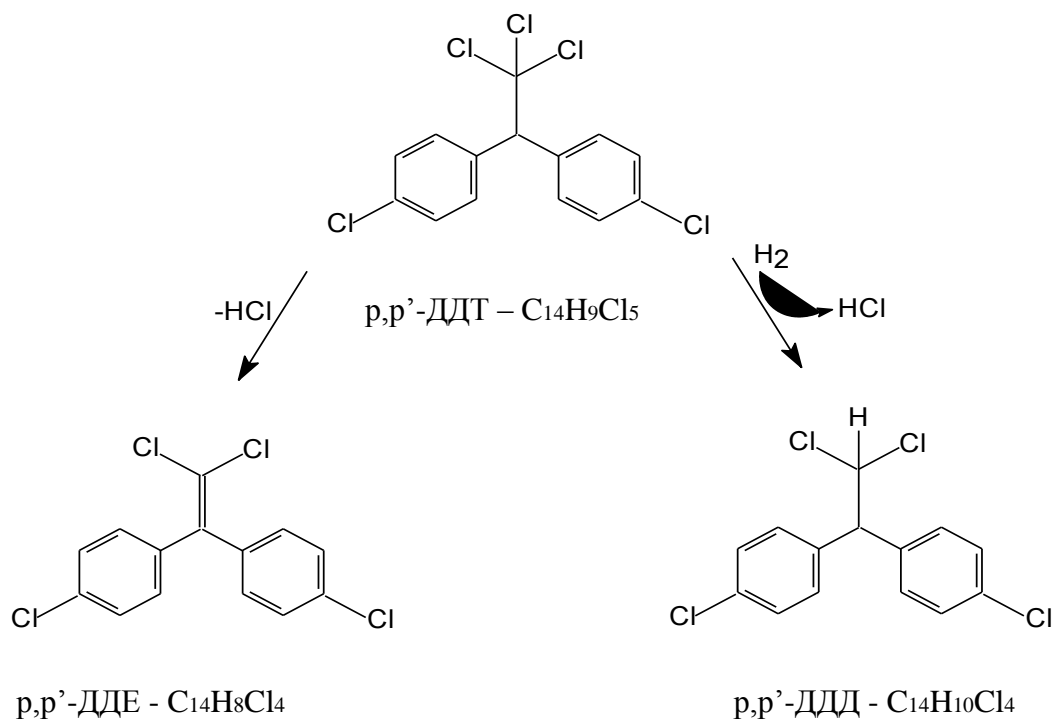
Непреднамерено образувани странични продукти - Полихлорирани бифенили, Хексахлорбензен, Полихлорирани дибензо-р-диоксини (ПХДД, диоксини), Полихлорирани дибензо-р-фурани (ПХДФ, фурани).

Устойчивите органични замърсители са токсични химични вещества, които трудно се разграждат, натрупват се в организмите и хранителната верига, пренасят се по въздуха, водата и чрез мигриращите биологични видове през международните граници се отлагат далече от мястото на тяхното изпускане и с голяма вероятност могат да предизвикат неблагоприятни последици за човешкото здраве и околната среда близо и далече от техните източници.

Съгласно член 3 на Стокхолмската конвенция от 2001 г всяка европейска страна трябва да предприеме мерки за намаляване или предотвратяване на изпусканията при преднамерено производство и употреба на УОЗ като забрани и предприеме законови и административни мерки за прекратяване на производството, износа, вноса и употребата на химичните вещества и препарати определени като УОЗ.

ДДТ е използван през Втората световна война за борба с насекоми, разпространяващи болести като малария, треска и тифус. По-късно намира широко приложение в селското стопанство за борба с вредители по различни селскостопански култури. ДДТ е практически неразтворим във вода, но се разтваря в повечето органични разтворители. Той е полуетлив и би могъл да постъпи в атмосферата. ДДТ се характеризира и с висока устойчивост в почвата и има време на полуразграждане до 15 години. ДДТ се характеризира с високи фактори на биоконцентрация - от порядъка на

50000 за риби и 500000 за двукрили. В околната среда и в организма на морските видове р,р-ДДТ бавно метаболизира до 1,1 – дихлоро - 2,2 - бис (4 - хлорофенил) етан (р,р-ДДД) и 1,1 – дихлоро - 2, 2 - бис (4-хлорофенил) етен (р,р-ДДЕ) (Фигура 1) като при отделните видове се наблюдават разлики в степента на биотрансформация.



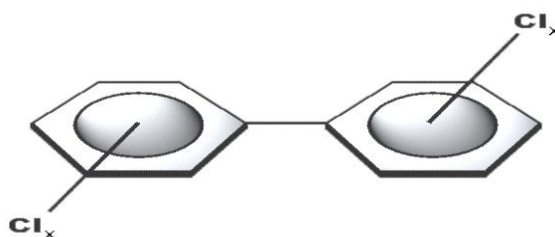
Фигура 1. р,р'-ДДТ и метаболитите р,р'-ДДД, р,р'-ДДЕ

Периодът на полуразпад на ДДТ във водната среда е около 5 години и 10-20 години в организмите на двучерупкови мекотели (миди, стриди), изчислен от изследвания. ДДЕ, който е най-често срещания метаболит на ДДТ е много бавно разграждащо се съединение и също има негативно въздействие върху живите организми. ДДТ, ДДЕ и ДДД се класифицират от Международната агенция по изследване на рака (IARC) като възможен канцероген за човека (Група 2В).

Поради токсичните ефекти на органохлорните съединения при хора и водни организми, използването и продажбата на органохлорни пестициди е забранено или ограничено в много европейски страни от средата на 1970. Въпреки това остатъчни количества се откриват в много екосистеми в различни райони по света, особено в индустриални зони. ДДТ все още се използва за контрол на маларийните комари в много страни на света под контрола на Световната здравна организация.

От края на 70^{те} години на миналия век ДДТ и други хлорорганични пестициди са забранени за употреба и в България. В повечето страни около Черно море, използването на тези пестициди също е ограничено или забранено.

Друга група хлорорганични замърсители с висока устойчивост в околната среда са полихлорираните бифенили. ПХБ представляват синтетични органични химични вещества, които до голяма степен са химически инертни. Отделните ароматни съединения, наречени конгенери, са получени по такъв начин, че водородните атоми на бифенилната молекула (два бензенови пръстена, свързани с проста въглерод-въглерод връзка) могат да бъдат заменени с до десет хлорни атома.



Фигура 2 Структурна формула на ПХБ

Теоретично съществуват 209 изомери (конгенери) на полихлорирани бифенили, но само около 130 от тях се произвеждат като търговски продукти. Търговските ПХБ представляват смеси от около 50 и повече сродни ПХБ. ПХБ са били произвеждани повече от 50 години в индустриален мащаб и са изнасяни като химични вещества във всички страни. Те са химически устойчиви съединения, топлинно устойчиви, много трудно запалими, с ниска диелектрична проницаемост, което обуславя и тяхното широко използване в индустрията най-вече като охладители и диелектрици във високо волтови трансформатори. ПХБ са течности или смоли в зависимост от степента на заместване, безцветни или жълто оцветени, с характерна миризма. Неразтворими са във вода, но лесно се разтварят в мазнини, въглеродороди и други органични съединения.

УОЗ се натрупват в низшите водни организми и рибите в концентрации по-високи от тези във водните екосистеми, които обитават. Поради това рибите и други морски организми могат да се използват като биоиндикатор за замърсяване на водните екосистеми. Съобщават се данни за наличие на органохлорни замърсители не само в Европа, Америка и Азия, но и в организми от отдалечени райони на Земята, където никога не е имало употреба на ДДТ и ПХБ – Тибетското плато, Северния полюс и Антарктика.

В България не се извършва мониторинг на хлорорганични замърсители в морски риби, въпреки доказаният неблагоприятен ефект на остатъците от хлорорганичните пестициди и ПХБ върху околната среда и човешкото здраве. Извършени са само няколко изследвания за определяне съдържанието на остатъчни количества ДДТ и метаболити в черноморски риби за кратък период от време. Сравнително малко са изследванията, за да се направи цялостна оценка на степента на замърсяване на рибите в Черно море по отношение на ДДТ и метаболити. Не е правена оценка на безопасността на рибите като храна чрез хранителен прием на ДДТ и ПХБ.

Тези факти потвърждават необходимостта от провеждането на задълбочено систематично изследване, с което да се определи нивото на замърсяване на черноморските риби с остатъци от ДДТ и метаболити. Затова целта на дисертационната работа е да се определи съдържанието на ДДТ и метаболити за по-дълъг период от време и резултатите да се използват за оценка на замърсяването и безопасността на рибите като храна.

Информация за нивата на хлорорганични замърсители е необходима и може да се използва за:

- Определяне на максимално допустими граници (хигиенни норми) за ДДТ в риба и храни от морски произход. Такива до настоящия момент не са определени в България.
- Да се направи оценка на безопасността на рибите като храна чрез изчисляване на хранителен прием, коефициент на риска и токсични еквивалентни концентрации на хлорорганични замърсители.

II. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ЧАСТ

В настоящата работа е използвана аналитична процедура, разработена в Катедра Химия на Медицински университет – Варна през 2003 г. Тази процедура е използвана за определяне на ПХБ в храни, но може да се приложи и за други хлорорганични замърсители като ДДТ и метаболити след известна модификация. Направени са някои модификации на етапа пречистване на екстрактите, за да се осъществи едновременно изолиране на ДДТ, метаболити и ПХБ.

Аналитичната процедура включва следните етапи:

1. Пробонабиране – проби за анализ и райони на улов
2. Изготвяне на средна лабораторна проба
3. Екстракция на липидите и определяне на общо липидно съдържание
4. Пречистване на липидния екстракт
5. Газхроматографски метод с масдетекция за качествено и количествено определяне
6. Валидиране на метода и контрол на качеството
7. Статистическа обработка и анализ на резултатите

II.1. Пробонабиране – проби за анализ и райони на улов

Пробонабирането на рибите е извършено в периода септември 2007 – ноември 2011 г. За осъществяване на задачите в настоящото проучване са закупени морски риби директно от рибари, рибни борси, както и от магазини за продажба на прясна риба. Част от пробите са уловени и доставени чрез кораб Несебър на “Институт по рибни ресурси”- Варна.

За целите на проучването са подбрани 10 рибни вида, които са широко разпространени по Черноморското ни крайбрежие, имат риболовно значение и са част от традиционната кухня на нашата страна: трицона (*Sprattus sprattus*), кая (*Neogobius melanostomus*), сафрид (*Trachurus mediterarneus ponticus*), лефер (*Pomatomus saltatrix*), карагъоз (*Alosa pontica*), паламуд (*Sarda sarda*), морски кефал (*Mugil cephalus*), черноморски калкан (*Psetta maxima*), зарган (*Belone belone*) и барбуна (*Mullus barbatus ponticus*). Анализирани са също черна мида (*Mytilus galloprovincialis*) и рапан (*Rapana venosa*) с цел да се сравнят резултатите за замърсители с тези в риби.

През 2009 и 2010 г са взети проби сладководни риби от два язовира в страната и от река Дунав при Силистра. Рибите са анализирани за остатъчни количества ДДТ и

метаболити, за да се сравнят нивата в сладководни риби със съдържанието на ДДТ в черноморски риби. Подбрани са видове с голямо стопанско значение за България – шаран (*Cyprinus carpio*), бяла риба (*Sander lucioperca*), толостолоб (*Hypophthalmichthys nobilis*), бял амур (*Stenopharyngodon idella*), сом (*Silurus glanis*).

Пробонабирането е извършено от три основни района на Черноморското крайбрежие на България (фигура 5):

Район Север – Крапец, Каварна, Зеленка, Балчик

Район Варна – Траката, Варна залив, Варненско езеро, Камчия, Бяла

Район Юг – Несебър, Бургас, Приморско



Фигура 5 Карта на Българското Черноморско крайбрежие – основни райони на улов

II.2. Изготвяне на средна лабораторна проба – определяне на биометрични характеристики, смилане, хомогенизиране

Средна лабораторна проба е изготвена на мястото на пробовземане като се подбират екземпляри с размери съответстващи на цялата партида – съгласно БДС 3419:1978 –Риба и рибни продукти. Правила за вземане на проби. и Наредба 31 на МЗ от 2003 г за норми за максимално допустими количества на остатъци от пестициди в храните. От едрите рибни видове са взети не по-малко от 5 екземпляра. От дребните рибни видове средната проба се съставя от не по-малко от 2 кг (от 20 до 50 екземпляра). Пробите са транспортирани до лабораторията в хладилна чанта. Рибите се анализират веднага или се замразяват и съхраняват във фризер при -18°C .

Преди анализа на всеки екземпляр от средната проба се измерват биометрични характеристики: размер в cm - от глава до опашка и тегло в g.

Средната проба риба (минимум 2 kg) се измива с дестилирана вода за отстраняване на остатъци от пясък, тиня и водорасли, след което се подсушава внимателно с филтърна хартия. След това се филетира – отделят се ядивните части, смила се и се хомогенизира. С изключение на пробите трикона, които са смлени цели. От така подготвената аналитична проба се претеглят 20 g на аналитична везна, стриват се в хаван с 100 g безв. Na_2SO_4 (накален при 400°C за 4 часа). Пробата престоява със сулфата 1 час. Към всяка проба се добавя вътрешен стандарт ПХБ 30 и ПХБ 204. Обработената със сулфат проба се прехвърля количествено в Сокслет екстрактор и се подлага на екстракция с органични разтворители.

II.3. Екстракция на липидите и определяне на общо липидно съдържание

Екстракцията се провежда в Сокслет апарат със 400 ml смес от органични разтворители хексан и дихлорметан в съотношение 3:1 в продължение на 16 часа. Получените екстракти се концентрират чрез ротационен вакуум-изпарител “BUCHI” при температура 40°C . Концентрираният екстракт се прехвърля в градуирана епруветка до точен обем – 10 ml. Един ml от този екстракт се прехвърля в тегловно стъкло, за да се определи липидното съдържание.

Определянето на общите екстрахирани липиди се извършва гравиметрично след сушене на рибното масло при 90°C в лабораторна сушилня до постоянно тегло – метод БДС 8549:1992 - Месо и месни продукти. Определяне на мазнини. Претеглянето на

изсушения рибен екстракт се извършва на сертифицирана електронна аналитична везна KERN ABJ 220 4M.

II.4. Пречистване на липидните екстракти

Използваната аналитична процедура е модифицирана на този етап като пречистването и изолирането на ДДТ и ПХБ се прави едновременно чрез една адсорбционна колонка, като се използват два елуента. Пречистване на екстрактите и едновременно изолиране на общо 18 съединения (ПХБ, ДДТ и метаболити) в една стъпка спестява време за анализ и скъпоструващи реактиви като разтворители и адсорбенти. Тази процедура използва предварително обработен силикагел с концентрирана H_2SO_4 като адсорбент за хроматографско пречистване.

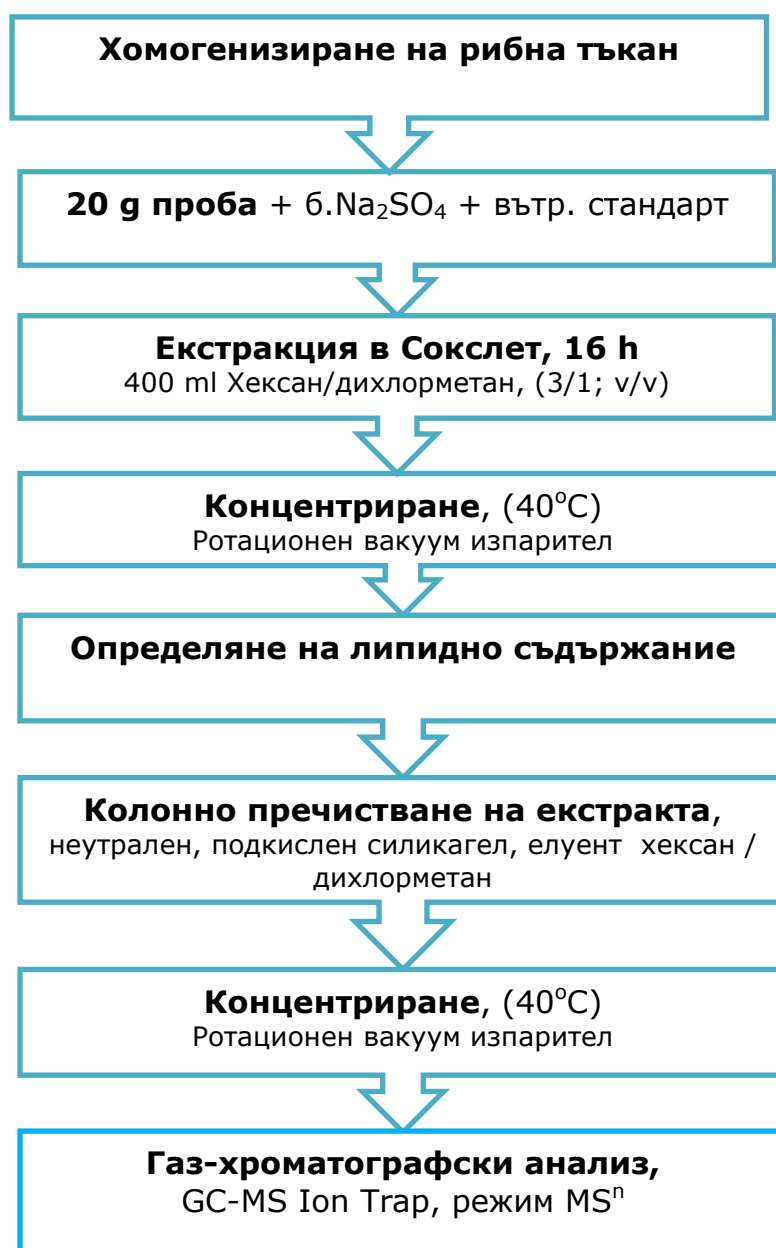
В настоящата разработка са подбрани адсорбент силикагел в комбинация с подкислен силикагел и елуиращи смеси от разтворители, с които е възможно едновременното определяне на ДДТ и ПХБ чрез една стъпка на пречистване на екстрактите - през една адсорбционна хроматографска колонка. Най-ефективно пречистване на екстрактите се постигна чрез използване на многослойна хроматографска колона с редуване на неутрален и предварително подкислен силикагел като адсорбент (към 60 g силикагел за колонна хроматография се прибавя бавно 40 g концентрирана H_2SO_4 при непрекъснато разклащане, в камина). Отворена стъклена колонка се напълва с n-хексан и адсорбент. Насипването на адсорбента в колонката става последователно от долу на горе – обезмаслена стъклена вата, 3 g безв. Na_2SO_4 , 2 g неутрален силикагел, 2 g подкислен с к. H_2SO_4 силикагел, 2 g неутрален силикагел и 4 g безв. Na_2SO_4 . Хроматографската колонка се промива с 50 ml хексан, след което аликвотна част от екстракта на рибна тъкан (не повече от 0,2 g екстрахирана мазнина) се пропуска през колонката със скорост 1 ml на минута.

Количеството на разтворителя, необходимо за елуиране на анализите е определено експериментално чрез изготвяне на елуационна крива. За целта през многослойна хроматографска колона е пропуснат стандартен разтвор на анализите 25 μ l от стандартен разтвор с концентрация 1 μ g/ml. Елуентите (n-хексан и смес хексан:дихлорметан) са подавани на порции от 10 ml. Всяка фракция елуат е събирана в отделен цилиндър, концентрирана и анализирана на газовия хроматограф при конкретните условия. От получените хроматограми е установено, че оптималното количество на елуента, при което се елуира напълно p,p-ДДЕ е 80 ml. В тази фракция се

съдържат и ПХБ. А за p,p-ДДТ и p,p-ДДД е необходимо използването на 50 ml смес от хексан и дихлорметан в съотношение 80:20.

Елуирането на анализите се осъществява чрез две последователни фракции – 80 ml хексан (за p,p-ДДЕ и ПХБ) и 50 ml смес хексан – дихлорметан в съотношение 80:20 (p,p-ДДД и p,p-ДДТ). Пречистеният екстракт се концентрира на вакуумротационен изпарител „ВУСНІ“ до 1-2 ml и след това под ток от чист азот до полусух остатък. Преди газхроматографското определяне екстрактът се разтваря в 500 µl хексан.

Принципна схема на аналитичния ход е представена на фигура 6.



Фигура 6. Принципна схема на аналитичния ход

II.5. Газхроматографски метод с масдетекция за качествено и количествено определяне

За определяне на хлорорганични пестициди и полихлорирани бифенили в рибна тъкан е използвана хроматографска система Газов хроматограф Thermo Scientific, USA модел Focus GC с масспектрометър Ion Trap Polaris Q. Хроматографското разделяне се извършва на капилярна колона Термо TR – 5ms (неподвижна фаза 5%-полифенил-95% метилсилоксан) с дължина 30 m, вътрешен диаметър 0.25 mm, дебелина на филма 0.25 μ m. Като носещ газ е използван хелий с чистота 99.999% при постоянен поток 1 ml/min. Инжектор AI 3000 е с автоматичен пробовземач, работи се в режим Splitless (без разделяне на потока), при температура 250 °C, обем на инжектиране – 1 μ l.

Масспектрометър – Ion Trap с температура на йонния източник 220 °C, електронна йонизация (EI) - 70 eV, филament - Current Emission 250 μ A. Температура на трансферната линия - 250 °C.

Пречистеният и концентриран екстракт се инжектира в хроматографа за разделяне, идентифициране и количествено определяне на анализирани компоненти. Хроматографските условия са оптимизирани със сертифицирани стандартни разтвори на ДДТ и метаболити и ПХБ.

Пълно разделяне на анализирани компоненти е постигнато при следните оптимални параметри на газхроматографската система:

- за ДДТ и метаболити е използван сертифициран многокомпонентен стандартен разтвор EPA 625/CLP Pesticides Mix, Supelco с концентрация 2000 μ g/ml за всеки компонент. Температурна програма на пещта: начална температура 50°C (задържане 1 min), 30°C/min до 160°C, 5°C/min до 260°C, 30°C/min до 280°C с крайно задържане за 3.0 min.

- за ПХБ е използван сертифициран стандартен многокомпонентен разтвор PCB mix 20, Dr Ehrenstorfer, Germany с концентрация на всеки анализ 10 μ g/ml . Температурна програма на пещта: начална температура 60°C (задържане 1 min), 30°C/min до 180°C, 2°C/min до 260°C, 30°C/min до 290°C с крайно задържане за 3.0 min.

За качествено идентифициране и количествена обработка на резултатите от хроматограмите и масспектрите е използван софтуер Finnigan Xcalibur и базата данни с масспектри към Газовия хроматограф.

Детекцията на анализите е извършена чрез масспектрометър POLARIS Q в режим MSⁿ . Инструменталните параметри за йон трап система IT-MS POLARIS Q в MSⁿ режим

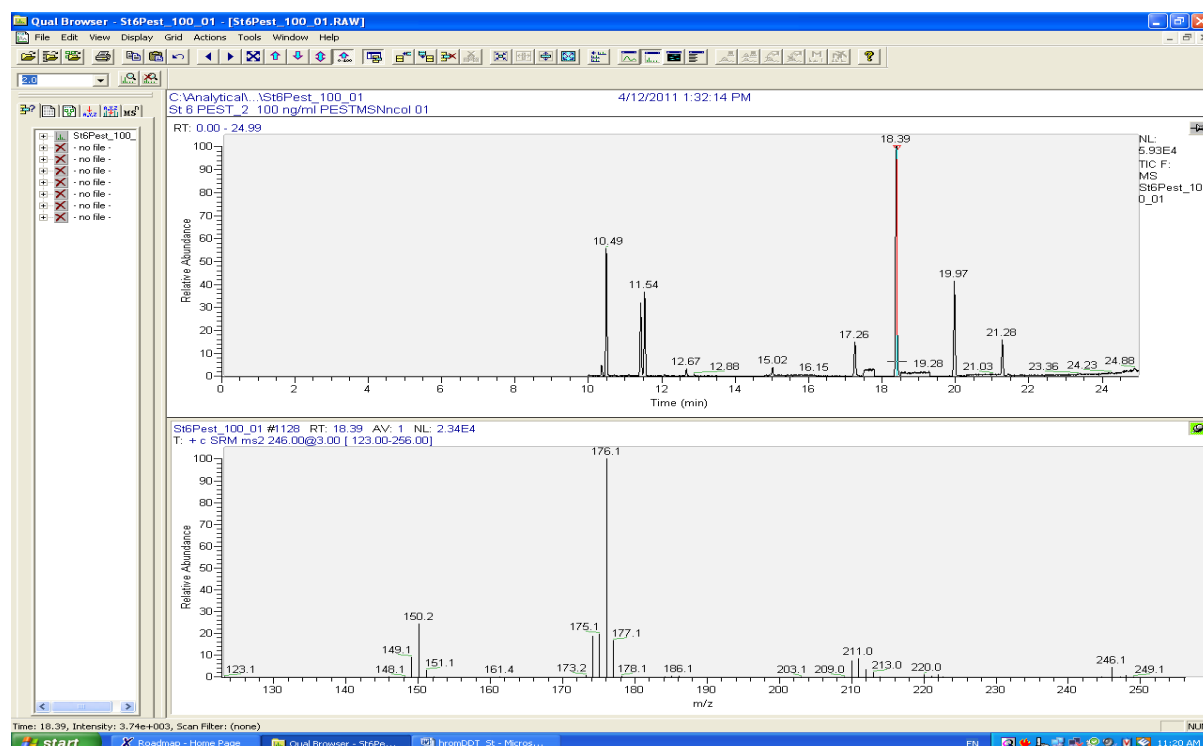
са определени като са подбрани подходящи йони - майки (Precursor Ion) за всеки аналит и съответни енергии за разлагането (CID) им до получаване на вторичен спектър при конкретни интервали от време. Този IT-MSⁿ режим осигурява висока надеждност в идентифицирането на ПХБ, ДДТ и метаболити. Идентификацията на аналитите се основава не само на времената на задържане на всеки компонент, но и на уникалния вторичен маспектър на Precursor Ion – предимство на този режим на маспектрометъра пред електронулавящия детектор, където разпознаването на компонентите се извършва само по време на задържане, което е несигурно при сложни матрици като рибните екстракти. Всички параметри на този режим на масдетектора са оптимизирани чрез вариране на условията на газхроматографската система.

В процеса на разработване аналитичните параметри за идентификация и калибриране са оптимизирани за постигане на максимална чувствителност и добро разделяне на компонентите чрез използване на стандартни разтвори и сертифицирани референтни материали. Определени са следните хлороганични съединения:

p,p-ДДТ – дихлордифенилтрихлороетан, 1,1,1 -трихлор - 2,2 - бис (4-хлорофенил) етан,

p,p-ДДД - 1,1 – дихлоро - 2,2 - бис (4-хлорофенил) етан и

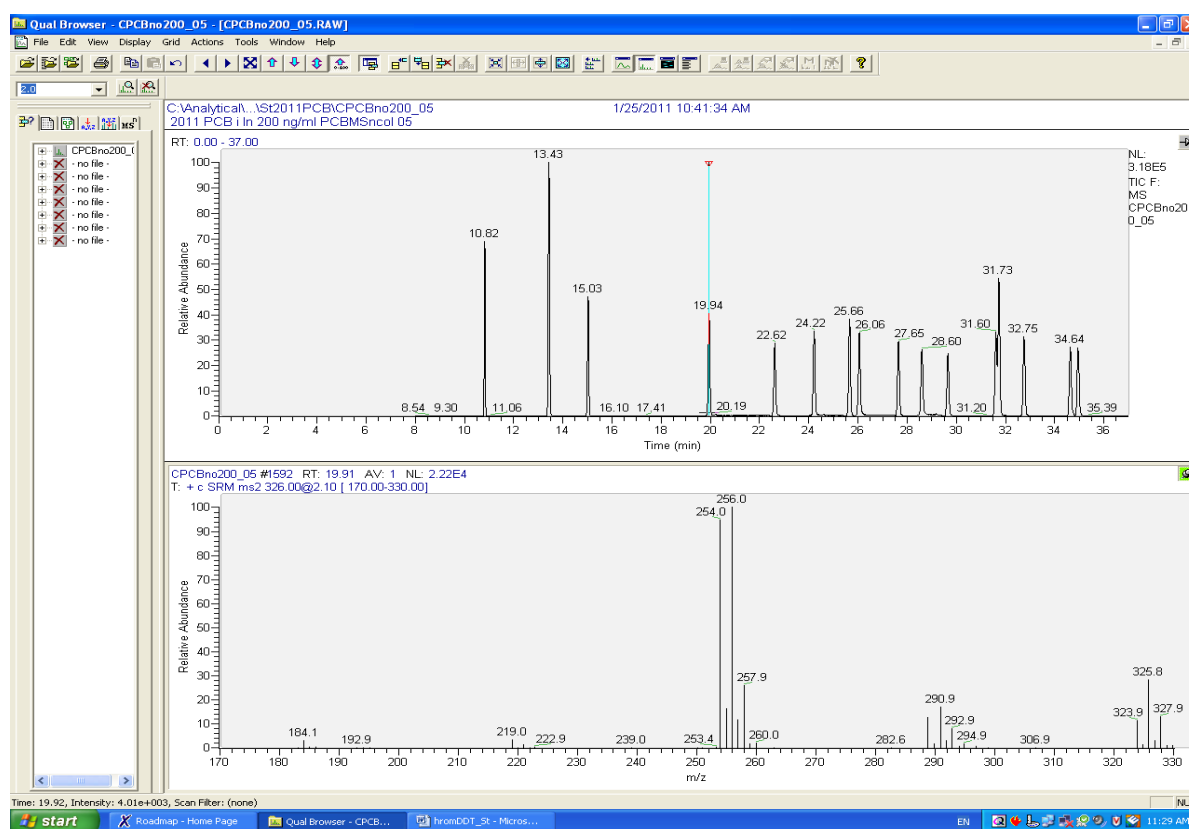
p,p-ДДЕ - 1,1 – дихлоро - 2,2 - бис (4-хлорофенил) етен



Фигура 7 Хроматограма и маспектър на стандартен разтвор на ДДТ и метаболити
-Pesticides Mix, 100 ng/ml

Сумата от p,p-ДДЕ, p,p-ДДД и p,p-ДДТ е означена по-нататък в раздел РЕЗУЛТАТИ като Σ ДДТ.

Определени са следните сродни съединения (конгенери) ПХБ: IUPAC №28, 31, 52, 77, 101, 105, 118, 126, 128, 138, 153, 156, 169, 170, 180. Сумата от всички сродни ПХБ е означена по-долу като Σ ПХБ. Шест от ПХБ: 28, 52, 101, 138, 153 и 180 са определени от Европейската комисия като Индикаторни – **и-ПХБ** (Commission EU, 1999). Сред определените ПХБ са и шест диоксиноподобни ПХБ - 77, 105, 118, 126, 156, 169 – **дп-ПХБ**, които имат сходна токсичност подобна на диоксините. На фигура 8 е представена хроматограма на Стандартен разтвор на ПХБ.



Фигура 8 Хроматограма и маспектър на Стандартен разтвор PCB mix 20, Dr Ehrenstorfer, Germany с концентрация на всеки анализ 200 ng/ml

При количествената обработка на резултатите от хроматограмите е използван софтуер Finnigan Хсалибур към Газовия хроматограф. Калибрирането е извършено по метода на абсолютната калибровка чрез интегриране на площите на хроматографските пикове.

Крайният резултат за определения аналит в пробите е изчислен по формула (1):

(1)

$$C_x = \frac{C_{ex} * V_{ex}}{m}$$

C_x - концентрация в пробата, ng/g ww (wet weight – свежо тегло),

C_{ex} - концентрация в пречистения екстракт, ng/ml, (от софтуера на апарата)

V_{ex} – краен обем на пречистения екстракт,

m – маса на пробата (взета за колонно пречистване), g

II.6. Валидиране на метода и контрол на качеството на анализите

Метод на стандартната добавка, метод вътрешен стандарт и анализ на сертифицирани референтни материали (СРМ) са използвани за контрол на качеството с цел правилно да се оцени точността и възпроизводимостта на метода използван в тази разработка.

Проверка на стабилността на стандартните прави е осъществена чрез инжектиране на стандартни разтвори от анализирания компоненти непосредствено преди всяка серия от анализи. В случай, че разликата между сигналите на стандартните разтвори е по-голяма от 10%, е направена нова калибровка на хроматографската система - стандартните прави са построявани отново. Всяка проба е анализирана най-малко двукратно. В случай, че има разлика между два паралелни резултата повече от 10%, пробата се анализира отново. На всяка серия от проби е разработвана и анализирана празна проба както и проба с добавка с цел контрол на използваните реактиви и проверка за съпътстващи замърсявания.

Съгласно изискванията на БДС EN ISO/IEC 17025:2005 за валидиране на метода са оценени следните параметри:

Линейност: калибровъчната права за масдетектора е получена чрез трикратно анализиране на стандартни разтвори в 5 концентрационни нива от 5 – 500 ng/ml за ДДТ и от 5-200 ng/ml за ПХБ.

Точност на метода е определена като повторяемост на данните (при $n = 6$) при три концентрационни нива, в рамките на един ден и между различни дни. В таблица 2 са

представени резултати от анализ на празни проби с добавка на стандартен разтвор на ДДТ и метаболити.

Към шест паралелни проби е прибавен 25 µl стандартен разтвор с концентрация 1 µg/ml. Пробите са анализирани през целия аналитичен ход като 2 ml екстракт са подложени на колонно пречистване (съответстващи на 4 g проба). В два ml екстракт количеството на анализите е 10 ng. Пречистеният екстракт е концентриран до полусух остатък. След което е разтворен в 500 µl хексан - краен обем на екстракта за газхроматографско определяне.

Таблица 2. Резултати при определяне на параметри на метода при концентрационно ниво 0.625 ng/g ww

Аналит	Теоретична концентрация, ng/g ww	Резултат Средна стойност, ng/g ww	SD ng/g ww	LOD ng/g ww	LOQ ng/g ww	Доверителен интервал ng/g ww	RSD, %	Добив, %
p,p-ДДЕ	0.625	0.623	0.062	0.186	0.621	±0.065	9.97	99.7
p,p-ДДД	0.625	0.617	0.058	0.173	0.576	±0.060	9.35	98.7
p,p-ДДТ	0.625	0.589	0.053	0.158	0.526	±0.055	8.94	94.2

Добивът е между 94.2% и 99.7% за отделните аналити.

Относителното стандартно отклонение (RSD), изчислено от резултати, получени при условия на повторемост е от 8.94 до 9.97%.

Граница на откриване (LOD): 0.16 – 0.19 ng/g ww за ДДТ и метаболити, от 0.14 – 0.31 ng/g ww за отделните ПХБ. Определена като 3 пъти стандартното отклонение на празна проба с добавка на стандартен разтвор от съответните аналити.

Граница на определяне (LOQ): от 0.53 – 0.62 ng/g ww за ДДТ и метаболити и от 0.45 – 0.93 ng/g ww за отделните ПХБ. Определена като 10 пъти стандартното отклонение на празна проба с добавка на стандартен разтвор.

Селективност: селективността на метода се основава на времето на задържане за всеки компонент както и на подбор на подходящ Precursor ion и детекция на неговия вторичен масспектър за идентифициране на всеки аналит чрез масспектрометрия в инструментален режим MS/MSⁿ.

Методът е валидиран и с два сертифицирани референтни материала (СРМ): от черен дроб на треска – ERM-BCR 598 Cod liver за ДДТ и метаболити и масло от съомга – ERM-BB 350 Fish oil – за ПХБ. Сертифицираните референтни материали са анализирани по целия аналитичен ход на метода. Разработени са шест проби от всеки референтен материал. Резултати от анализ на референтните материали са представени в таблица 3.

Таблица 3. Резултати от анализ на СРМ - сертифицирани и установени стойности

BCR 598 Cod liver oil	Сертифицирана стойност (mg/kg)	Резултат (mg/kg)
p,p-ДДЕ	0.61 ± 0.04	0.595 ±0.078
p,p-ДДД	0.40 ± 0.03	0.414 ±0.045
p,p-ДДТ	0.179 ± 0.018	0.153 ±0.024
BCR 349 Fish oil	Сертифицирана стойност (ng/g)	Резултат (ng/g)
ПХБ 28	21.3 ± 1	25.4 ± 2
ПХБ 52	37.4 ± 2	36.2 ± 2
ПХБ 101	111.0 ± 5	112.4 ± 12
ПХБ 118	84.0 ± 4	83.3 ± 9
ПХБ 153	220.0 ± 11	252.3 ± 25
ПХБ 105	25.8 ± 2	25.5 ± 2
ПХБ 138	137.0 ± 10	125.5 ± 15
ПХБ 180	67.0 ± 4	71.0 ± 8

Получените резултати от анализа на референтните материали са в съответствие със сертифицираните стойности на всеки анализиран компонент.

II.7. Статистическа обработка и анализ на резултатите

За статистическата обработка и анализ на резултатите е използвана програмата SPSS 16. За ниво на статистическа сигурност е прието 95% ($p < 0.05$).

Приложени са следните статистически тестове:

- на Колмогоров - Смирнов - за определяне вида на разпределението (хомогенността на извадката)
- на Стюдент – Фишер – за определяне на статистическите параметри и сравняване на сериите резултати, при статистическа сигурност 95%.

t-критерият на Стюдънт за независими извадки се прилага за проверка на нулевата хипотеза за сравняване на средни аритметични величини.

При подходите за статистическата обработка на данните, получени при аналитичното определяне, са използвани следните статистически величини: средна аритметична стойност, средно квадратично отклонение, относително стандартно отклонение и средна геометрична стойност. При статистическата обработка на данните е използвана средна геометрична стойност за охарактеризиране на съответните серии резултати. Това е направено в случай, че получените резултати не следват нормално гаусово разпределение и използваната средна аритметична стойност за сравнение на съответните серии резултати би довело до некоректни изводи от статистическа гледна точка.

III. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

III.1. Резултати за съдържание на ДДТ и метаболити

Изследвани са 94 проби от различни видове риба, събрани от трите района на улов. На всеки екземпляр от средната проба риба преди анализ са измерени биометрични характеристики: размер в cm - от глава до опашка и тегло в g.

III.1.1. Биометрични характеристики и липидно съдържание на изследваните рибни видове

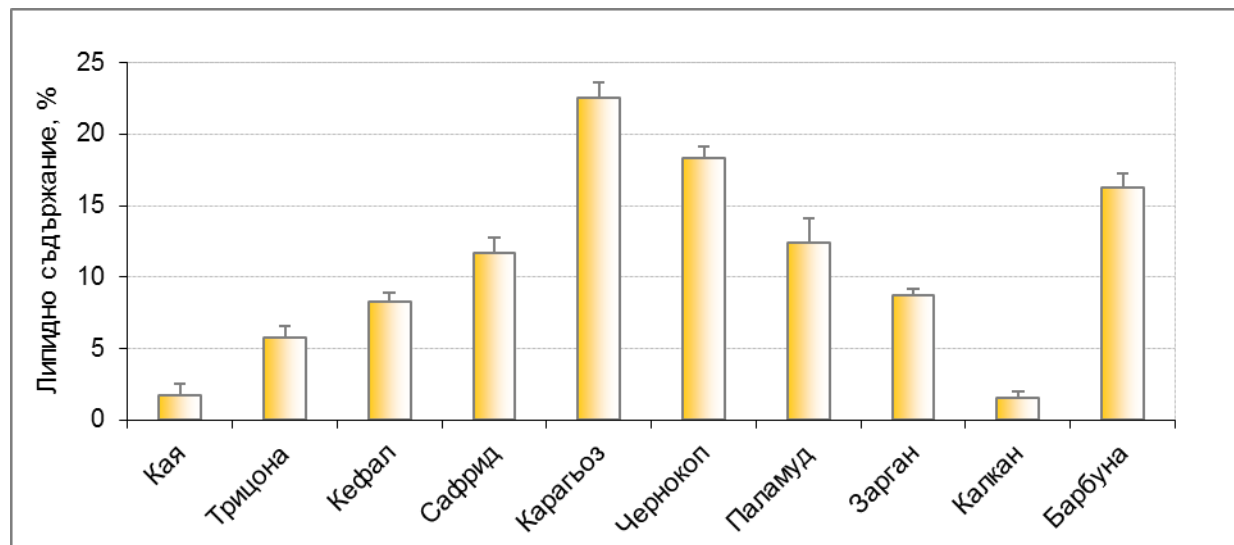
В таблица 4 са представени средните биометрични характеристики на анализиранияте видове риби.

Таблица 4. Средни биометрични характеристики

Вид риба	Английско (Латинско наименование)	N	Средна дължина, cm	Средно тегло, g
Кая	<i>goby (Neogobius melanostomus)</i>	18	16.0 ±2.3	60.3 ±17
Трицона	<i>european sprat (Sprattus sprattus)</i>	11	8.5 ±1.1	4.4 ±0.7
Сафрид	<i>scad (Trachurus mediterraneus ponticus)</i>	18	12.9 ±2.0	21.2 ±6.1
Кефал	<i>grey mullet (Mugil cephalus)</i>	12	32.0 ±2.5	351 ±9.6
Карагъоз	<i>shad (Alosa pontica pontica)</i>	12	27 ±4.4	217 ±49
Чернокоп	<i>bluefish (Pomatomus saltatrix)</i>	8	18.1 ±2.8	61.5 ±22
Паламуд	<i>bonito (Sarda sarda)</i>	4	38 ±2.6	566 ±89
Зарган	<i>garfish (Belone belone)</i>	4	36.9 ±2.6	67.6 ±17
Калкан	<i>turbot (Psetta maxima maeotica)</i>	4	50.3 ±6.4	1487 ±189
Барбуна	<i>red mullet (Mullus barbatus)</i>	3	12.1 ±2.0	23.2 ±5.9

N – брой проби

Определено е липидното съдържание на всички видове риби (фигура 13). От изследваните риби с най-високо липидно съдържание са карагъоз, чернокоп и барбуна (22.6%, 18.3% и 16.3% съответно). Съдържанието на общи липиди в кая (1.7%) и калкан (1.6%) е най-ниско.



Фигура 13. Средно липидно съдържание на изследваните рибни видове

Вътревидовите разлики в съдържанието на липиди може да се обясни с възраст, пол и репродуктивно състояние на рибите.

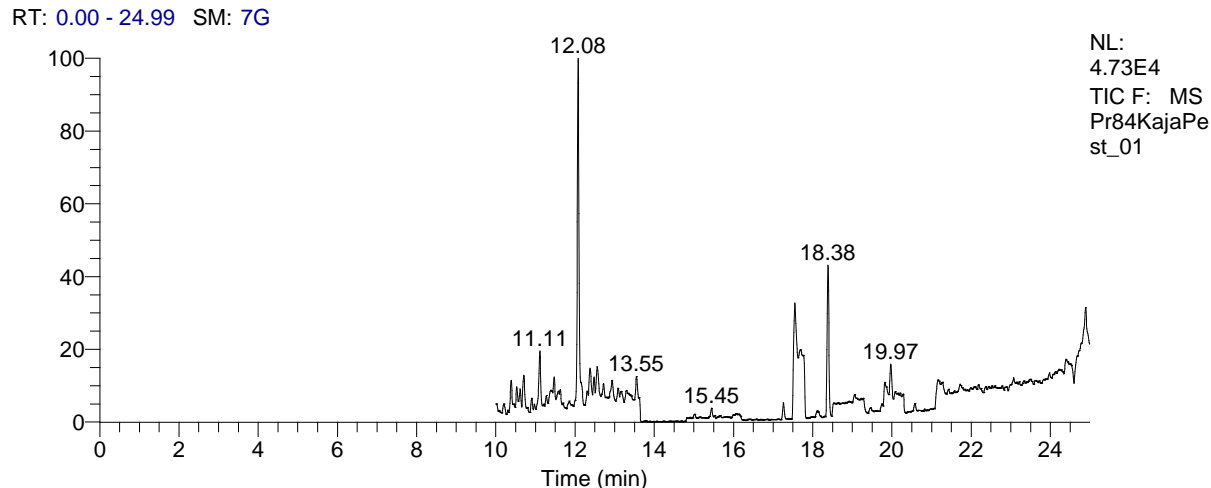
Редица автори установяват известна зависимост между липидното съдържание на изследваните риби и нивата на органохлорни замърсители. Високата липофилност на ДДТ и неговите метаболити предполага депонирането им в мастните тъкани на морските организми и натрупването на тези замърсители по хранителната верига. Тълкуването на данни, свързани с връзката на концентрациите на замърсителите с биологичните параметри е много трудна и сложна, защото такива фактори, като миграционното поведение и хранителните навици на различните видове както и възрастта на рибите трябва да бъдат взети под внимание.

III.1.2. Съдържание на ДДТ и метаболити

Резултатите от направеното проучване са обобщени по: райони на улов, години на изследване, сезони и видове риби. За оценяване на въздействието на ДДТ и метаболити върху човешкото здраве, свързано с консумацията на риба, стойностите на тези замърсители е подходящо да се сравняват на база свежо тегло (ng/g ww). При сравняване на резултатите с нивата на замърсяване, установени при други проучвания, концентрациите са представени и на база липидно тегло.

Концентрациите на ДДТ и метаболити варират в зависимост от вида на изследваните риби. Те акумулират в липидните фракции и затова риби с високо съдържание на мазнини предполагат по-високо замърсяване. Резултатите показват, че средната обща концентрация на ДДТ като сума от p,p-ДДЕ, p,p-ДДД и p,p-ДДТ (Σ ДДТ) варира от 20.8 ng/g ww до 208.5 ng/g ww при различните видове изследвани риби.

Каята е типична дънна риба, която обитава крайбрежната ивица и може да се използва като биоиндикатор за локални замърсявания. Хроматограма на проба кая е представена на фигура 14.



Фигура 14 Хроматограма на проба 84 Кая

В таблица 5 са представени резултати за съдържание на p,p-ДДЕ, p,p-ДДД и p,p-ДДТ в кая през целия период на проучване.

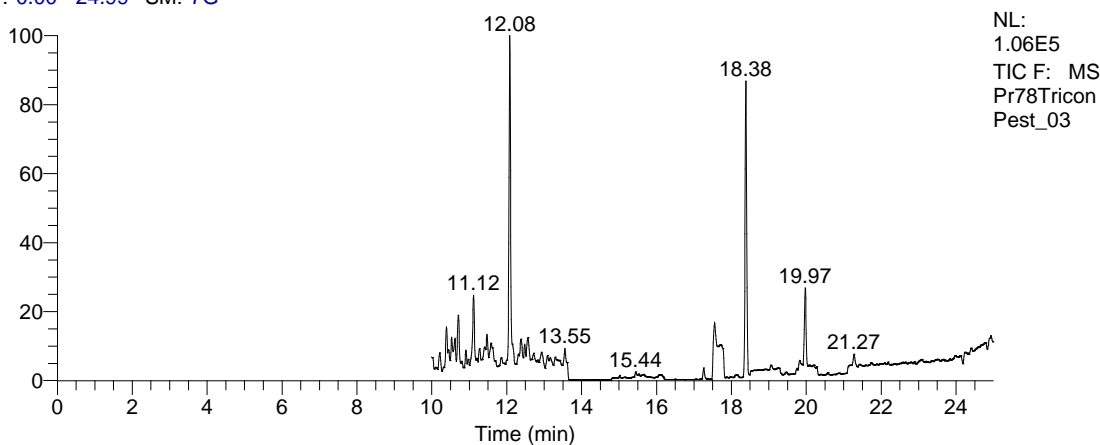
Таблица 5. Резултати за съдържание на р,р-ДДЕ, р,р-ДДД и р,р-ДДТ, ng/g ww в КАЯ през целия период на проучване.

№	Година	Място	Сезон	Липиди, %	р,р-ДДЕ, ng/g ww	р,р-ДДД, ng/g ww	р,р-ДДТ, ng/g ww	ΣДДТ, ng/g ww
15	2007	Траката	есен	3.56	18.45	6.20	< LOD	24.65
2	2007	Кранево	есен	3.94	24.09	1.81	< LOD	25.90
7	2007	Приморско	есен	1.31	6.82	1.99	< LOD	8.81
10	2007	Бяла	есен	3.45	18.55	7.02	11.92	37.49
25	2008	Каварна	есен	2.98	11.40	5.12	1.83	18.35
23	2008	Крапец	пролет	1.94	39.28	8.24	7.58	55.10
27	2008	Варна езеро	пролет	2.39	17.83	5.86	3.08	26.77
28	2008	Бяла	пролет	1.74	9.81	2.18	< LOD	11.99
36	2008	Поморие	есен	4.26	13.84	3.99	4.15	21.97
44	2009	Траката	пролет	1.71	10.78	6.66	4.85	22.30
45	2009	Варна езеро	пролет	1.06	10.92	6.02	5.02	21.96
49	2009	Бургас	есен	0.54	7.83	4.32	3.74	15.89
54	2009	Кранево	пролет	1.23	23.06	4.03	3.51	30.60
60	2009	Балчик	есен	0.67	10.95	3.04	1.82	15.82
84	2010	Траката	пролет	0.67	4.18	1.44	< LOD	5.62
89	2010	Крапец	пролет	1.45	16.54	4.63	0.99	22.16
111	2011	Варна	пролет	0.86	6.15	1.78	< LOD	7.94
114	2011	Крапец	есен	0.69	3.71	1.08	< LOD	4.78

Концентрациите на р,р-ДДТ в 38.8% от анализираниите проби кая са под или близки до границата на откриване на аналитичния метод. Във всички анализирани проби съдържанието на ДДТ и неговите метаболити намалява в реда ДДЕ > ДДД > ДДТ.

Хроматограма на проба трикона е представена на фигура 15.

RT: 0.00 - 24.99 SM: 7G



Фигура 15. Хроматограма на проба №78 трикона

Данните от изследване на ДДТ и метаболити в трициона са дадени в таблица 6.

Таблица 6. Резултати за съдържание на р,р-ДДЕ, р,р-ДДД и р,р-ДДТ, ng/g ww в ТРИЦОНА през целия период на проучване

№	Година	Място	Сезон	Липид и, %	р,р-ДДЕ, ng/g ww	р,р-ДДД, ng/g ww	р,р-ДДТ, ng/g ww	ΣДДТ, ng/g ww
14	2007	Несебър	есен	6.28	35.24	18.39	5.44	59.07
3	2007	Несебър	есен	6.29	51.16	28.87	7.79	87.82
9	2007	Крапец	есен	8.79	58.90	33.83	15.81	108.54
26	2008	Несебър	есен	8.55	25.77	12.61	5.94	44.31
31	2008	Траката	пролет	5.72	43.25	18.91	6.26	68.42
43	2009	Варна	пролет	8.03	55.67	35.21	17.19	108.07
48	2009	Несебър	есен	6.77	51.66	22.08	3.53	77.28
83	2010	Траката	пролет	4.52	20.29	8.31	2.60	31.19
78	2010	Несебър	пролет	3.17	54.50	25.50	8.63	88.63
85	2010	Зеленка	пролет	4.30	13.74	7.61	2.30	23.65
115	2011	Варна	есен	3.28	17.30	8.32	< LOD	25.62

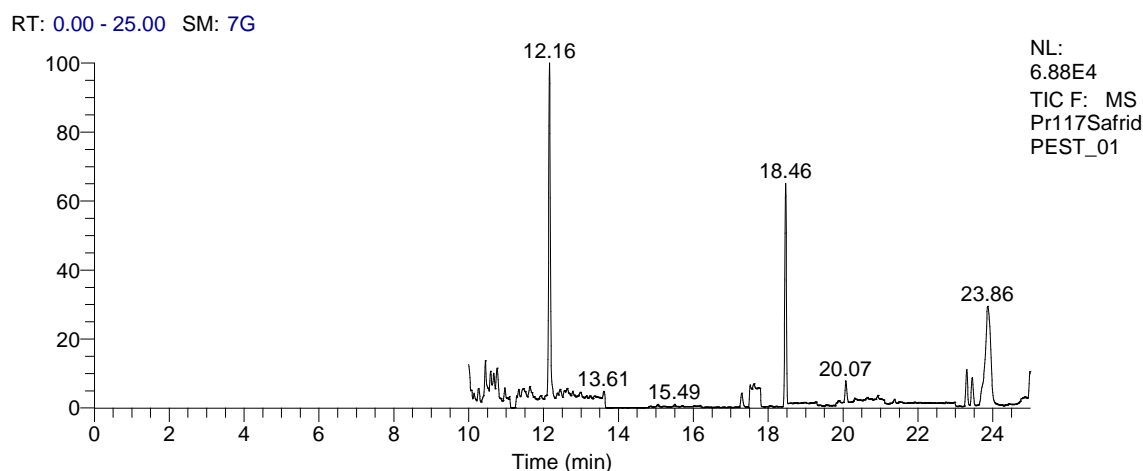
Общото съдържание на ДДТ при трициона варира от 23.65 до 108.54 ng/g ww.

При кефал общото съдържание на ДДТ като сума от р,р-ДДЕ, р,р-ДДД и р,р-ДДТ варира от 7.67 до 147.82 ng/g ww (Таблица 7). При трициона и кефал отново преобладава метаболитът ДДЕ.

Таблица 7. Резултати за съдържание на р,р-ДДЕ, р,р-ДДД и р,р-ДДТ, ng/g ww в КЕФАЛ през целия период на проучване

№	Година	Място	Сезон	Липиди, %	р,р-ДДЕ, ng/g ww	р,р-ДДД, ng/g ww	р,р-ДДТ, ng/g ww	ΣДДТ, ng/g ww
17	2007	Каварна	есен	9.07	37.97	22.98	12.36	73.31
5	2007	Несебър	есен	6.97	61.48	52.37	8.02	121.86
12	2007	Балчик	есен	12.38	18.38	17.87	< LOD	36.25
32	2008	Камчия	есен	9.68	65.92	76.79	5.11	147.82
37	2008	Бургас	есен	11.60	24.16	9.37	< LOD	33.53
51	2009	Каварна	есен	7.19	24.99	10.84	2.51	38.34
56	2009	Варна ез	пролет	2.03	19.95	4.35	5.70	30.01
57	2009	Несебър	есен	9.05	23.82	10.90	1.94	36.65
80	2010	Несебър	пролет	7.78	7.19	< LOD	< LOD	7.19
81	2010	Несебър	есен	10.61	27.97	15.41	5.17	48.54
90	2010	Варна ез	пролет	6.74	92.94	12.03	1.85	106.81
119	2011	Варна ез	пролет	7.03	24.80	11.55	< LOD	36.35

Резултати за съдържание на p,p-ДДЕ, p,p-ДДД и p,p-ДДТ в ng/g ww за сафрид са представени в таблица 8. Примерна хроматограма на проба сафрид – фигура 17.



Фигура 17. Хроматограма на проба 117 Сафрид

Таблица 8. Резултати за съдържание на p,p-ДДЕ, p,p-ДДД и p,p-ДДТ, ng/g ww в САФРИД през целия период на проучване.

№	Година	Място	Сезон	Липи ди,%	p,p-ДДЕ, ng/g ww	p,p-ДДД, ng/g ww	p,p-ДДТ, ng/g ww	ΣДДТ, ng/g ww
16	2007	Варна	есен	8.70	17.80	10.46	6.31	34.57
1	2007	Каварна	есен	13.89	32.20	15.02	9.68	56.89
8	2007	Несебър	есен	10.06	45.57	19.76	8.94	74.27
11	2007	Бяла	есен	10.42	18.14	9.00	< LOD	27.14
22	2008	Бяла	пролет	5.09	28.85	15.21	9.42	53.49
24	2008	Балчик	пролет	5.26	26.57	12.50	8.76	47.83
29	2008	Варна	пролет	6.34	25.11	12.21	< LOD	37.33
30	2008	Бяла	есен	12.75	18.93	11.91	< LOD	30.84
46	2009	Траката	пролет	7.97	43.54	30.95	9.72	84.20
50	2009	Каварна	есен	19.38	42.87	27.41	10.77	81.04
55	2009	Несебър	есен	23.17	56.42	41.60	8.89	106.91
61	2009	Крапец	есен	21.52	36.93	51.53	9.18	97.63
73	2010	Траката	есен	11.61	11.59	9.39	2.52	23.50
77	2010	Несебър	есен	12.05	13.89	6.60	3.35	23.84
79	2010	Балчик	есен	9.31	13.14	9.50	3.87	26.51
94	2010	Несебър	пролет	9.60	10.95	5.83	3.05	19.83
117	2011	Балчик	пролет	3.21	6.28	2.35	< LOD	8.64
118	2011	Варна	есен	2.06	18.95	10.08	< LOD	29.03

Общото съдържание на ДДТ като сума от р,р-ДДЕ, р,р-ДДД и р,р-ДДТ варира от 8.64 (Балчик 2011 г) до 106.91 ng/g ww (Несебър - есен 2009 г). По-високото съдържание на ДДТ и метаболити в пробите от 2009 г. може да се обясни с по-високото им общо липидно съдържание през тази година – средна стойност 18%. В 28% от анализираниите проби сафрид р,р-ДДТ е под LOD на метода.

Резултати за съдържание на р,р-ДДЕ, р,р-ДДД и р,р-ДДТ в ng/g ww за карагъоз през целия период на проучване са представени в таблица 9.

Таблица 9. Резултати за съдържание на р,р-ДДЕ, р,р-ДДД и р,р-ДДТ, ng/g ww в КАРАГЪОЗ

№	Година	Място	Сезон	Липи ди,%	р,р-ДДЕ, ng/g ww	р,р-ДДД, ng/g ww	р,р-ДДТ, ng/g ww	ΣДДТ, ng/g ww
19	2007	Балчик	есен	20.31	102.98	67.30	23.11	193.39
6	2007	Приморско	есен	19.08	191.28	102.63	31.35	325.26
13	2007	Каварна	есен	9.74	12.73	< LOD	< LOD	12.73
34	2008	Траката	есен	23.59	154.23	83.28	27.44	264.94
35	2008	Галата	есен	27.31	54.43	31.77	13.54	99.75
42	2009	Каварна	пролет	23.57	141.18	74.62	29.24	245.05
53	2009	Камчия	есен	32.16	177.03	91.55	42.80	311.38
58	2009	Поморие	есен	26.79	164.14	46.92	28.22	239.28
71	2010	Балчик	есен	17.56	118.07	34.40	16.71	169.18
91	2010	Балчик	пролет	15.15	166.81	75.01	19.59	261.41
82	2010	Траката	пролет	21.69	138.68	64.96	16.77	220.40
109	2011	Каварна	пролет	25.30	108.93	50.34	< LOD	159.27

Съдържанието на ДДТ и метаболити варира от 12.73 (Каварна 2007 г) до 325.26 ng/g ww (Приморско - 2007 г).

При карагъоз са установени по-високи концентрации на ДДТ и метаболити в сравнение с останалите изследвани видове, което може да се дължи на относително по-високото му средно липидно съдържание (22.6%), както и хищническия му начин на хранене, тъй като усвояването на храната е важен начин за постъпване на ДДТ в организмите. Известно влияние върху нивата на ДДТ и метаболити в пробите карагъоз може да оказва и навлизането му във водите на р. Дунав през размножителния период.

В таблица 10 са представени резултати за съдържание на р,р-ДДЕ, р,р-ДДД и р,р-ДДТ в ng/g ww за чернокоп през целия период на проучване.

Таблица 10. Резултати за съдържание на р,р-ДДЕ, р,р-ДДД и р,р-ДДТ, ng/g ww в ЧЕРНОКОП през целия период на проучване.

№	Година	Място	Сезон	Липиди, %	р,р-ДДЕ, ng/g ww	р,р-ДДД, ng/g ww	р,р-ДДТ, ng/g ww	ΣДДТ, ng/g ww
18	2007	Несебър	есен	12.9	46.07	30.79	23.59	100.45
33	2008	Ахтопол	есен	22.1	146.01	78.36	23.05	247.42
47	2009	Несебър	есен	19.1	120.60	71.07	30.54	222.20
52	2009	Варна	есен	21.9	168.73	88.03	32.00	288.75
62	2009	Несебър	есен	13.3	96.41	46.88	18.59	161.89
74	2010	Крапец	есен	20.7	68.97	28.36	12.14	109.48
92	2010	Несебър	есен	21.9	74.55	30.31	12.27	117.13
113	2011	Варна	есен	17.2	58.4	31.77	4.54	94.45

Високото липидно съдържание (средно 18.3%), хищният начин на хранене и миграционното му поведение предполагат наличие на високи концентрации на ДДТ и метаболити при този вид риба. Данните от проучването показват, че най-висока стойност за ΣДДТ е установена в проба чернокоп от район Варна през 2009 г. – 288.75 ng/g ww, а най-ниска – 94.45 ng/g ww в проба от Варна през 2011 г.

Определено е съдържанието на ДДТ и метаболити и в четири вида риба, които представляват интерес като деликатесна храна – паламуд, зарган, калкан, барбуна. Резултати за съдържание на р,р-ДДЕ, р,р-ДДД и р,р-ДДТ в ng/g ww за паламуд, зарган, калкан и барбуна през целия период на проучване са представени в таблица 11.

Концентрацията на ДДТ в проба паламуд от Несебър (2009 г) е с най-висока стойност 54.18 ng/g ww, а най-ниска стойност - < LOD е установена в проба от Поморие (2008 г). Общото съдържание на ДДТ като сума от р,р-ДДЕ, р,р-ДДД и р,р-ДДТ при зарган варира от 80.8 до 118.0 ng/g ww.

Преобладаващ метаболит във всички проби е р,р-ДДЕ.

Таблица 11. Резултати за съдържание на р,р-ДДЕ, р,р-ДДД и р,р-ДДТ, ng/g ww в паламуд, зарган, калкан, барбуна

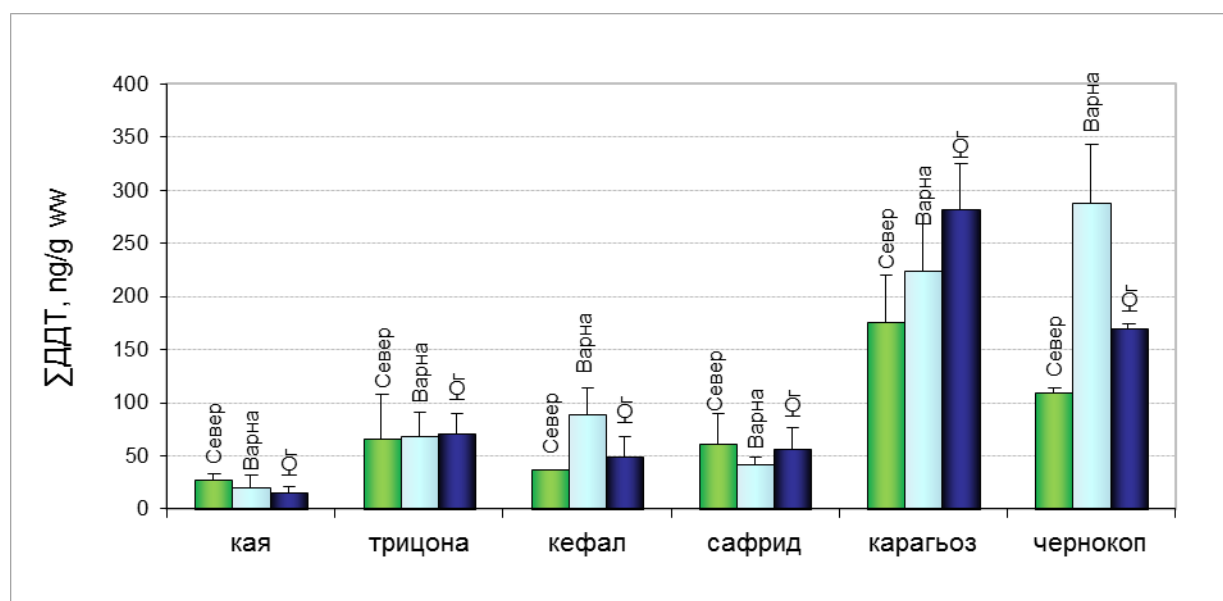
№	Година	Място	Сезон	Липиди, %	р,р-ДДЕ, ng/g ww	р,р-ДДД, ng/g ww	р,р-ДДТ, ng/g ww	ΣДДТ, ng/g ww
Паламуд								
20	2007	Несебър	есен	8.01	59.61	33.78	18.33	111.7
39	2008	Поморие	есен	9.93	3.03	< LOD	< LOD	3.0
59	2009	Несебър	есен	19.20	52.69	16.90	9.45	79.0
88	2010	Несебър	есен	13.50	47.99	27.59	10.14	85.7
Зарган								
4	2007	Галата	есен	10.47	69.09	36.38	12.57	118.0
38	2008	Каварна	есен	8.76	40.15	34.05	6.68	80.9
63	2009	Несебър	есен	7.15	56.18	30.10	3.34	89.61
112	2011	Варна	есен	8.67	56.66	24.11	< LOD	80.8
Барбуна								
68	2009	Несебър	есен	17.49	74.90	47.50	8.19	130.6
72	2010	Балчик	есен	14.29	53.28	22.20	3.13	78.6
111	2011	Варна	есен	16.98	46.89	20.76	< LOD	67.7
Калкан								
21	2007	Каварна	есен	2.21	33.32	13.03	3.17	49.5
40	2008	Балчик	про	0.89	6.40	2.16	< LOD	8.6
64	2009	Несебър	есен	1.72	10.52	3.28	2.04	15.8
110	2011	Варна	есен	1.53	7.57	1.76	< LOD	9.3

В настоящото проучване общото ДДТ замърсяване при барбуна е 92.3 ng/g ww. Данните от анализите показват, че най-висока стойност за ΣДДТ е измерена в проба калкан от Каварна през 2007 г. – 49.5 ng/g ww, а най-ниска – 8.6 ng/g ww в проба от Балчик през 2009 г. В пробите калкан съдържанието на р,р-ДДТ е най-ниско – не се открива или е близо до LOD.

III.1.3. Разпределение на ДДТ и метаболити в риби по район на улов

Замърсяването по мястото на улов може да се разглежда предимно за местни видове като трициона и кефал, както и за дънни риби, обитаващи крайбрежната ивица като кая. Мигриращите видове риба като сафрид, карагъоз, чернокоп, зарган и паламуд навлизат през летните месеци в Черно море от региона на Мраморно и Средиземно море. Поради това не могат да се правят коректни оценки за замърсяването на определен регион на база резултати за мигриращи видове риба, уловени от дадено място по нашето Черноморско крайбрежие. Данните от тези проучвания обаче могат да се използват за оценка на замърсяването на Черно море като екосистема.

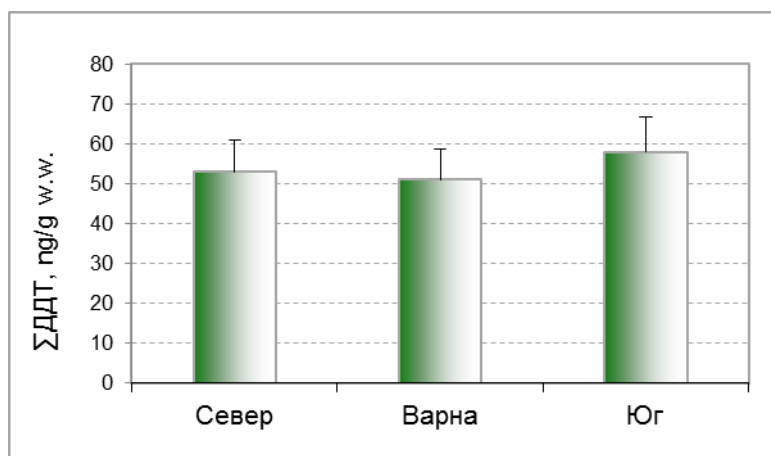
Обобщени резултати за средните стойности на Σ ДДТ, ng/g ww по райони на пробовземане са представени на фигура 29.



Фигура 29. Средни стойности на Σ ДДТ, ng/g ww по видове риби и по място на улов

В пробите кая от район Север се наблюдават по-високи стойности за Σ ДДТ. При кефал и чернокоп се наблюдават по-високи стойности в пробите риба от район Варна. За видовете трициона и сафрид не се наблюдават съществени различия в нивата на Σ ДДТ за трите района на пробовземане. Пробите карагъоз от район Юг показват наличие на по-високи количества Σ ДДТ. Остатъчните количества ДДТ в проби чернокоп от район Варна са по-високи.

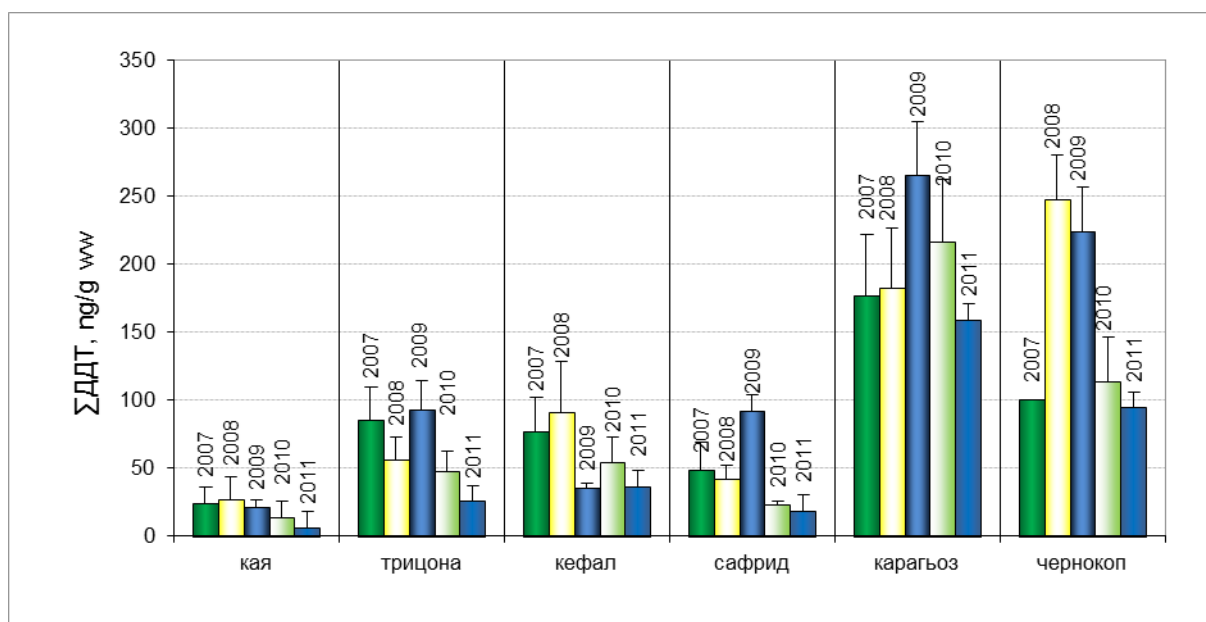
Статистическата обработка на обобщените данни за всички изследвани рибни видове показва, че няма достоверна разлика между резултатите за Σ ДДТ в пробите риби от трите района на пробовземане ($p > 0.05$) – Фигура 30.



Фигура 30. Средни стойности на Σ ДДТ, ng/g ww по райони на улов

III.1.4. Динамика на замърсяването с ДДТ и метаболити в изследваните риби по години

На **фигура 31** са сравнени средни стойности на Σ ДДТ (сума от p,p-ДДЕ, p,p-ДДД и p,p-ДДТ) на база свежо тегло (ng/g ww) по видове риби за периода 2007-2011 г.



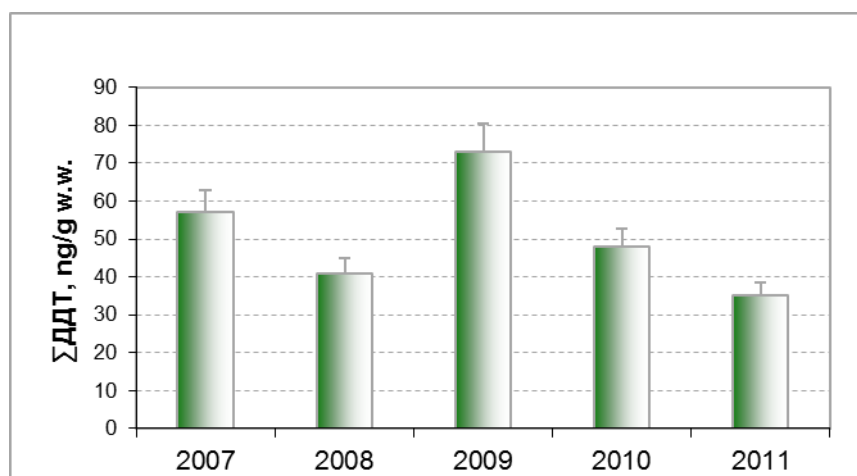
Фигура 31. Средни стойности на Σ ДДТ, ng/g ww по години и видове риби

През 2011 средната стойност на Σ ДДТ в пробите кая е най-ниска (6.36 ng/g ww). В пробите трикона през 2007 и 2009 г средните сумарни стойности на ДДТ са по-високи, а през 2011 г. стойността на Σ ДДТ е най-ниска 25.62 ng/g ww.

При кефал през 2008 г Σ ДДТ има най-висока стойност 90.68 ng/g ww. Най-ниската средна стойност за Σ ДДТ е измерена през 2009 и 2011 – съответно 35.00 и 36.4 ng/g ww. При сафрид стойностите на Σ ДДТ и неговите метаболити през 2010 и 2011 са най-ниски 23.42 и 18.83 ng/g ww, съответно.

Не се наблюдават резки колебания в остатъчните количества ДДТ в пробите карагъоз през изследвания период. През 2009 г стойността на Σ ДДТ е по-висока (265.24 ng/g ww), а през 2011 г. стойността на Σ ДДТ е най-ниска 159.3 ng/g ww. В изследваните проби чернокоп най-високи концентрации на Σ ДДТ са установени през 2008 г - 247.24 ng/g ww, а най-ниски през 2011 – 94.45 ng/g ww. При карагъоз и чернокоп средните стойности Σ ДДТ през целия период са значително по-високи от останалите видове риби, което може би се дължи на хищния им начин на хранене и миграция начин на живот.

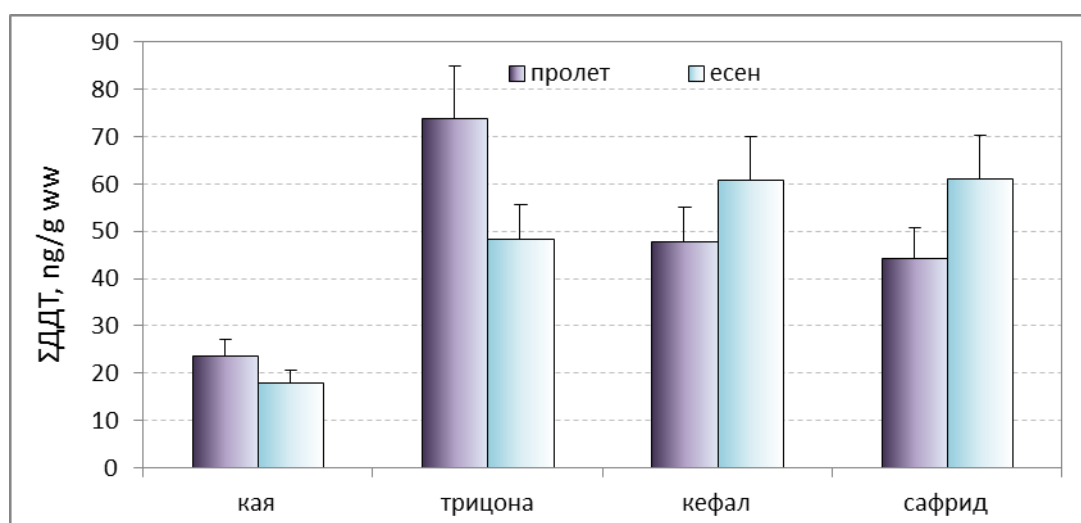
Статистическата обработка на обобщени данни за всички риби показва, че няма сатистически достоверна разлика между резултатите за Σ ДДТ (ng/g ww) по години през периода на проучването ($p > 0.05$) - фигура 32.



Фигура 32. Средни стойности на Σ ДДТ, ng/g ww по години

III.1.5. Сезонна динамика на замърсяването с ДДТ и метаболити

Проследена е динамиката в сезонните колебания на стойностите на Σ ДДТ за двусезонните видове риба. Сезонната динамика в нивата на замърсителите е трудно да бъде проследена, защото е свързана както с липидното съдържание така и с фактори като пол, промяна в начина на хранене, размножителен период, и др. Резултати за кая, трициона, кефал и сафрид са представени на Фигура 33.



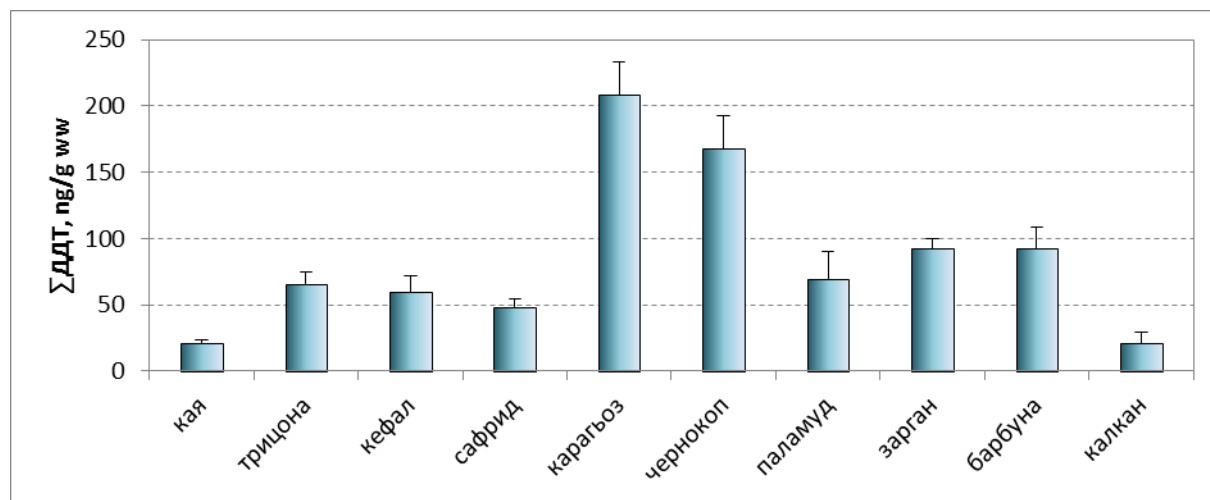
Фигура 33. Средни стойности на Σ ДДТ по сезони за двусезонни видове риба.

Установяваме, че стойностите на Σ ДДТ при кефал и сафрид са по-високи през есента в сравнение с пролетните проби, но статистически значима разлика не се наблюдава ($p > 0.05$). При трициона по-високи стойности се наблюдават през пролетния сезон. При кая разликата през двата сезона на пробовземане е незначителна.

III.1.6. Съдържание на ДДТ и метаболити по видове риби

Направено е сравнение на съдържанието на ДДТ и метаболити между отделните видове риби и резултатите са представени на Фигура 34. Когато се оценява въздействието на ДДТ и метаболити върху човешкото здраве, свързано с консумацията на риба, стойностите на тези замърсители е подходящо да се сравняват на база свежо тегло.

Рибите с по-ниско съдържание на мазнини като кая, трицона, сафрид, които стоят ниско в хранителната верига съдържат по-ниски стойности Σ ДДТ в сравнение с по-едри хищни риби с високо липидно съдържание.



Фигура 34. Средни стойности на Σ ДДТ, ng/g ww по видове риби за периода 2007-2011 г

Стойностите на Σ ДДТ са по-високи във видовете карагъз (208.5 ng/g ww) , чернокоп (167.7 ng/g ww), зарган (92.3 ng/g ww) – това са и видовете с по-високо липидно съдържание и хищен начин на хранене. В пробите кая и калкан, са измерени най-ниските стойности на ДДТ и метаболити (20.0 и 20.8 ng/g ww, съответно). Трицона, кефал и сафрид съдържат относително ниски концентрации на Σ ДДТ. При статистическата обработка на данните се установи, че съществува статистически достоверна разлика между резултатите за общо ДДТ по видове риби ($p < 0.01$).

В редица проучвания авторите също установяват, че рибни видове с хищен начин на хранене като щука, змиорки, скумрия натрупват по-големи количества липофилни замърсители.

Сравнение на получените резултати за ДДТ и метаболити с нивата на замърсяване в други райони на Черно море и съседни морски екосистеми, установени при други проучвания, е затруднено поради различния начин на представяне на измерените стойности от авторите – на база свежо тегло, на база липидно съдържание, на база сухо тегло.

Като цяло стойностите на Σ ДДТ, установени в настоящото изследване, са съизмерими или по-ниски от нивата на ДДТ и метаболити в риби от други части на Черно море и от други морски екосистеми.

III.1.7. Съотношение ДДЕ/ДДТ

При мониторинговите проучвания авторите използват съотношението ДДЕ/ДДТ, за да определят дали замърсяването с ДДТ е настъпило наскоро или в миналото. Тъй като р,р-ДДЕ е метаболит на р,р-ДДТ (и не присъства в техническия ДДТ), по-високо съотношение ДДЕ/ДДТ би означавало използване на технически ДДТ в миналото, а не текущо замърсяване. Редица автори използват също съотношението ДДЕ/ Σ ДДТ за оценка на хронологията на въвеждане на ДДТ в екосистемите. В таблица 12 е представено отношението р,р-ДДЕ / Σ ДДТ по видове риби и по години.

Таблица 12. Отношение р,р-ДДЕ/ Σ ДДТ по видове риби и по години

Година	Кая	Трицона	Кефал	Сафрид	Карагъоз
2007	0.74	0.57	0.51	0.59	0.58
2008	0.69	0.61	0.50	0.59	0.57
2009	0.60	0.58	0.65	0.49	0.61
2010	0.75	0.62	0.79	0.53	0.65
2011	0.77	0.68	0.68	0.67	0.68
2007-2011	0.71	0.61	0.63	0.57	0.62

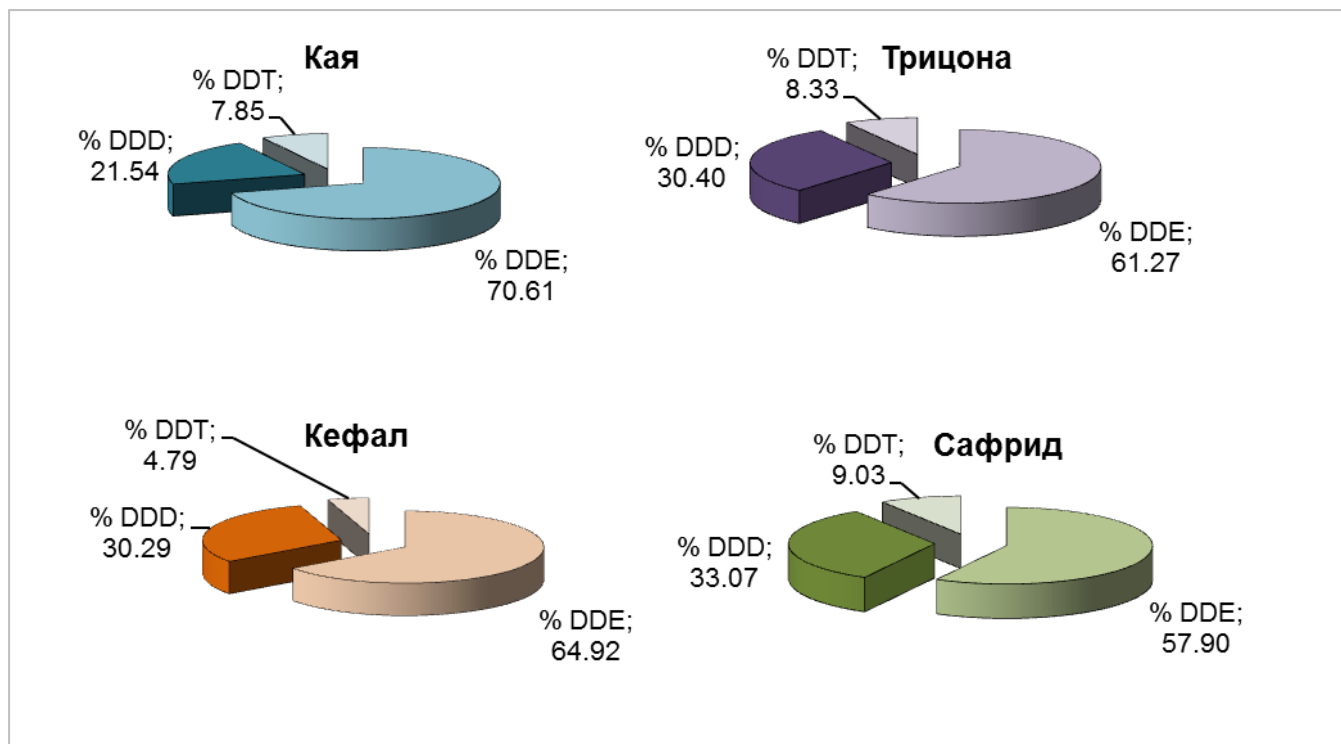
Най-високо ДДЕ/ Σ ДДТ съотношение установяваме при кая – средна стойност за целия период на проучване 0.71. При пробите сафрид в настоящата разработка е установено най-ниско отношение ДДЕ/ Σ ДДТ – 0.57.

Високото съотношение ДДЕ/ Σ ДДТ при кая (0.71), която е местен вид, обитаващ дънното на крайбрежните райони, предполага че в българския участък няма текущо замърсяване с ДДТ. 39% от пробите кая не съдържат р,р-ДДТ, а при останалите стойностите са близо до границата на количествено определяне на метода.

В настоящото проучване метаболитът р,р-ДДЕ преобладава в повече от 96% от изследваните проби, следван от р,р-ДДД и р,р-ДДТ. Подобни данни са получени при

проучвания за съдържание на остатъци от органохлорни пестициди в ракообразни, риби, бозайници и други морски организми от различни райони на Черно море.

Процентното съотношение на *p,p'*-ДДЕ спрямо Σ ДДТ при различните видове риба варира от 57.1% при сафрид до 70.6% при кая (Фигура 35).



Фигура 35. Процентно съотношение между *p,p'*-ДДТ, *p,p'*-ДДЕ и *p,p'*-ДДД

Високото процентно съдържание на метаболита ДДЕ при всички видове риба (над 58%) показва, че остатъчните количества ДДТ в рибите се дължат на употреба в миналото. При кефал процентното отношение на *p,p'*-ДДТ е най-ниско – 4.8%. Кефалът също може да се използва за биоиндикатор, защото се храни с дънни организми и биологични отлагания - ниско съдържание на замърсители в този вид риба може да предположи ниско ниво на замърсяване.

Съотношението $\text{ДДТ}/\Sigma\text{ДДТ}$ също може да бъде индикация за наличие или отсъствие на пряно замърсяване с ДДТ. Изчислени стойности за отношението $\text{ДДТ}/\Sigma\text{ДДТ}$ при местните видове риби са представени в таблица 13.

Таблица 13. Отношение ДДТ/ΣДДТ по видове риби

Година	Кая	Трициона	Кефал	Сафрид	Карагъоз
2007	0.12	0.11	0.09	0.13	0.10
2008	0.12	0.11	0.03	0.11	0.11
2009	0.18	0.11	0.10	0.10	0.13
2010	0.04	0.09	0.04	0.14	0.08
2011	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2007-2011	0.09	0.09	0.05	0.10	0.08

В настоящото проучване при всички изследвани видове риби отношението ДДТ/ΣДДТ е ниско - между 0.05 и 0.10, което предполага, че остатъчните количества ДДТ са в резултат на стари замърсявания.

III.1.8. Съдържание на ДДТ и метаболити в миди и рапани

Анализирани са няколко проби миди и рапани, за да се сравнят нивата на ДДТ и метаболити в тези морски мекотели със съдържанието на ДДТ в риби.

В **таблица 14.** са показани резултати за съдържание на р,р-ДДЕ, р,р-ДДД и р,р-ДДТ в анализираниите миди и рапани.

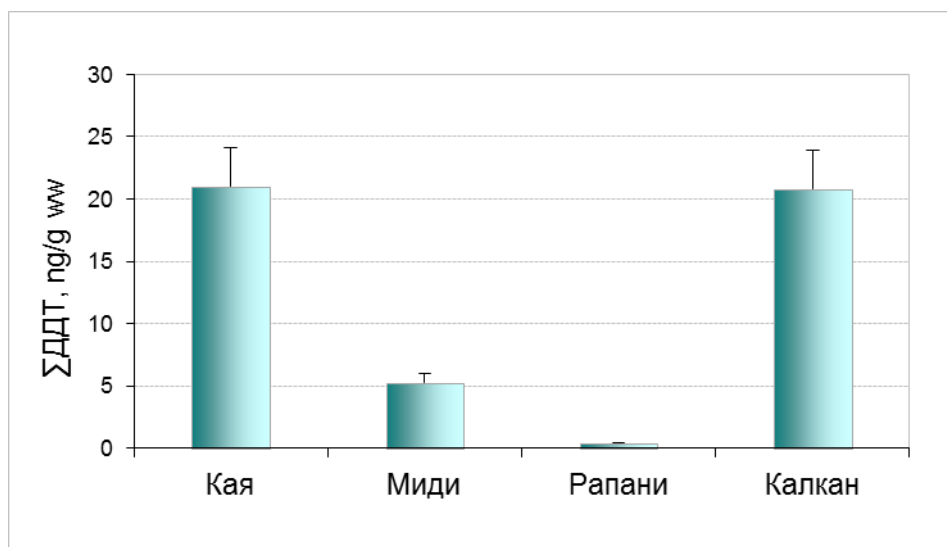
Таблица 14. Резултати за съдържание на р,р-ДДЕ, р,р-ДДД и р,р-ДДТ, ng/g ww в миди и рапани

№	Година	Място		Липиди, %	р,р-ДДЕ, ng/g ww	р,р-ДДД, ng/g ww	р,р-ДДТ, ng/g ww	ΣДДТ, ng/g ww
Миди								
95	2009	Галата	диви	3.8	2.98	2.07	< LOD	5.05
96	2010	Дълбока	ферма	3.6	3.81	1.62	< LOD	5.43
97	2011	Дълбока	ферма	3.4	3.92	2.73	< LOD	6.65
99	2011	Дълбока	ферма	3.5	2.76	1.97	< LOD	4.72
106	2011	Варна	диви	3.4	3.30	2.29	< LOD	5.58
107	2011	Кранево	ферма	2.3	2.84	1.13	< LOD	3.97
Рапани								
103	2011	Крапец	юни	0.39	< LOQ	< LOQ	< LOD	-
104	2011	Крапец	юли	0.27	< LOQ	< LOQ	< LOD	-
105	2011	Несебър	август	0.29	< LOQ	< LOQ	< LOD	-
120	2011	Варна	септ.	0.44	< LOD	< LOD	< LOD	-

Черната морска мида и рапана са широко разпространени по нашето крайбрежие и са двата вида мекотели, които имат най-голямо стопанско значение за България.

Подобно на рибите и в пробите миди се наблюдава преобладаване на метаболита р,р-ДДЕ. Данните от проучването показват, че най-висока стойност за Σ ДДТ е установена в проба миди от ферма Дълбока през 2011 г. – 6.65 ng/g ww, а най-ниска – 3.97 ng/g ww в проба от ферма Кранево. В пробите рапани установяваме, че стойностите на ДДТ и ДДД са под границата на количествено определяне, а р,р-ДДТ е под границата на откриване на аналитичния метод. Няма данни за проучвания в България на ДДТ и метаболити в рапани.

На фигура 38 са сравнени резултатите за Σ ДДТ в миди и рапани с тези в местните видове риба кая и калкан, които съдържат най-ниски концентрации на ДДТ и метаболити от черноморските риби.



Фигура 38. Сравнение на средни стойности на Σ ДДТ, ng/g ww в миди и рапани с тези в кая и калкан

Съдържанието на ДДТ и метаболити в миди и рапани от черноморското ни крайбрежие са по-ниски в сравнение с всички изследвани рибни видове. Средна стойност на Σ ДДТ в миди е 5.23 ng/g ww. Концентрациите на ДДТ и метаболити в рапани са близки до границите на количествено определяне на аналитичния метод.

Данните за миди и рапани биха могли да поставят начало на по-задълбочено изследване на съдържанието на хлорорганични замърсители в миди, рапани и други морски организми. Интерес представлява и сравнението на диви и култивирани миди.

III.1.9. Резултати за съдържание на ДДТ и метаболити в сладководни риби

Сладководни риби - шаран, бяла риба, толстолоб, бял амур и сом са анализирани за остатъчни количества ДДТ и метаболити. Резултатите са използвани за сравнение на съдържанието в сладководни риби с нивата на ДДТ в черноморски риби. Пробите са уловени от яз. Цонево, на 40 км от гр. Варна; яз. Пясъчник, на 50 км от гр. Пловдив и от р. Дунав – в района на гр. Силистра. Резултатите за съдържание на ДДТ и метаболити са представени в таблица 15.

Таблица 15. Съдържание на ДДТ и метаболити, ng/g ww в сладководни риби

Вид риба	Място	Липиди, %	p,p-ДДЕ, ng/g ww	p,p-ДДД, ng/g ww	p,p-ДДТ, ng/g ww	ΣДДТ, ng/g ww
Шаран	яз. Цонево	4.2	37.1	7.2	1.8	46.2
Бяла риба	яз. Цонево	0.8	9.7	1.9	< LOD	11.6
Толстолоб	яз. Цонево	1.4	15.6	2.4	0.9	19.0
Шаран	яз. Пясъчник	8.4	18.8	9.2	< LOD	28.0
Бял амур	яз. Пясъчник	3.2	7.5	3.3	< LOD	10.7
Толстолоб	яз. Пясъчник	1.7	20.4	3.0	< LOD	23.4
Шаран	р. Дунав, Силистра	1.9	16.8	2.4	< LOD	19.2
Сом	р. Дунав, Силистра	2.8	20.1	10.1	< LOD	30.3
Бяла риба	р. Дунав, Силистра	1.7	16.1	3.9	0.8	20.8

Резултатите показват, че в сладководните риби също преобладава метаболитът p,p-ДДЕ като процентното му съдържание спрямо ΣДДТ (от 70 до 87%) е по-високо в сравнение с черноморските риби. В голяма част от анализираните проби p,p-ДДТ почти не се открива и това предполага, че ДДТ не се използва в селското стопанство в България след забраната му.

Общото съдържание на ДДТ е по-ниско в сладководни (средно 23.2 ng/g ww) в сравнение с нивата в черноморските риби (средно 84.6 ng/g ww). Това е обяснимо с по-високото замърсяване на Черно море поради неговото географско местоположение и приток на води от големи европейски реки.

Получените резултати биха могли да послужат за начало на по-задълбочено изследване на съдържанието на хлорорганични замърсители в сладководни риби като се обхванат и аквакултури.

Ш.1.10. Обобщение за съдържанието на ДДТ и метаболити в риби

Стойностите на Σ ДДТ при различните видове риби за целия период са в интервала от 20.8 ng/g ww при калкан до 208.5 ng/g ww при карагьоз. Резултатите от настоящата работа показват, че остатъчните концентрации на ДДТ и неговите метаболити във всички изследвани видове риби намаляват в реда p,p -ДДЕ > p,p -ДДД > p,p -ДДТ. Остатъчни количества p,p -ДДТ са установени в много ниски концентрации за повечето анализирани видове.

Резултатите показват, че няма статистически достоверна разлика между стойностите на Σ ДДТ в пробите риби от трите района на пробовземане.

През периода на проучване при кая, трициона, кефал, сафрид се наблюдава понижение в стойностите на Σ ДДТ и метаболити.

Данните от проучването показват, че съществуват значителни междувидови разлики в нивата на замърсяване с ДДТ при изследваните видове риби.

Високото съотношение ДДЕ/ Σ ДДТ при видове като кая, трициона, кефал показва, че няма скорошна употреба на ДДТ в региона на Българското крайбрежие на Черно море.

Сравнението на получените данни с резултати от проучвания на други автори показва, че нивата на замърсяване с ДДТ и метаболити на рибите от българското черноморско крайбрежие са подобни или по-ниски, от нивата за същите видове риби от Черно море и съседните - Мраморно и Средиземно море.

Съдържанието на ДДТ и метаболити в миди (5.23 ng/g ww) и рапани от черноморското ни крайбрежие са по-ниски в сравнение с всички изследвани рибни видове.

Общото съдържание на ДДТ е много по-ниско в сладководни (средно 23.2 ng/g ww) в сравнение с нивата в черноморските риби (средно 84.6 ng/g ww).

III.2. ОЦЕНКА НА БЕЗОПАСНОСТТА НА ЧЕРНОМОРСКИТЕ РИБИ КАТО ХРАНА

Оценка на безопасността свързана със замърсяването с хлорорганични съединения може да се направи въз основа на сравнение на експерименталните резултати с максимално допустими граници (норми) за всеки замърсител в рибите. Безопасността на рибите като храна може да се оцени чрез изчисляване на дневен хранителен прием за съответния хлорорганичен замърсител.

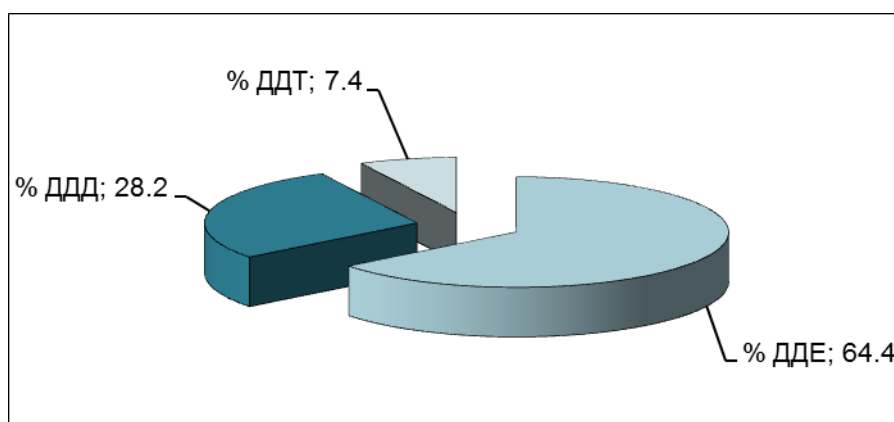
Въздействието на хлорорганичните замърсители върху човека може да се осъществи по различни начини: чрез замърсен въздух, дермален или чрез хранителен прием. Установено е, че хранителният прием представлява 90% от дневната експозиция. Хранителни продукти от животински произход и особено риба и морски продукти са основният източник за попадането им в човешкия организъм. От друга страна рибата е ценен хранителен източник на протеини, витамини и високи количества на омега – 3 полиненаситени мастни киселини. За да се преценят ползата и риска от консумацията на риба е важно да се изчисли дневният прием на хлорорганични замърсители свързан с употребата на рибите като храна.

III.2.1. Оценка на безопасност свързана със замърсяването с ДДТ и метаболити

В България няма норма за ДДТ и метаболити в риба и рибни продукти. Европейският съюз определя максимално допустимите граници (МДГ) за DDT и метаболити в някои храни от животински произход (месо, мляко и яйца), но все още няма МДГ за тези органични съединения в морски организми и по-конкретно в риби. Определените граници за животински продукти с липидно съдържание над 10% е 1000 ng/g на липидна основа (COUNCIL DIRECTIVE (86/363/ЕЕС). Получените резултати за ДДТ в риби с липидно съдържание над 10% не превишават тази норма. В случаите на храни със съдържание на мазнини по-малко от 10 % нормата се сравнява с концентрацията на база свежо тегло. В настоящата работа резултатите за риби с липидно съдържание под 10% също не превишават МДГ.

Замърсяването с ДДТ се оценява и въз основа на остатъчните количества от неговите метаболити ДДЕ и ДДД.

На фигура 39 са представени обобщени данни за процентното съотношение на ДДТ и неговите метаболити за всички видове риби.



Фигура 39. Съотношение между р,р-ДДЕ, р,р-ДДД и р,р-ДДТ като средни стойности за всички риби

При всички анализирани проби концентрациите на ДДТ и неговите метаболити намаляват в реда ДДЕ > ДДД > ДДТ. Концентрациите на р,р-ДДТ в над 30% от анализираните проби са под или близки до границата на откриване на аналитичния метод, най-вече при местните видове като кая, трициона, калкан. Ниският процент на ДДТ спрямо ДДЕ предполага, че остатъците установени в рибните видове по нашето Черноморско крайбрежие на този етап са в резултат на стари замърсявания.

Оценка на безопасността свързана с консумацията на риба се извършва въз основа на изчисляване на **дневен хранителен прием** на даден замърсител. Рискът от определени замърсители за човешкото здраве, свързани с консумацията на риба може да се определи чрез изчисляване на коефициент на риска (RQ), който е сравнение на експозицията с оралната референтна доза (RfD).

Нивото на експозиция чрез хранителен прием на определен замърсител може да се представи като среден дневен прием (DI – daily intake) и се изчислява по формулата:

$$DI = \frac{C * FC}{BW}$$

където DI е дневен прием, (ng/kg телесно тегло / дневно)

C е концентрацията на химически замърсител (ng/g ww);

BW (body weight) - средното телесно тегло на човек (прието 70 kg);

FC (fish consumption) – средна консумацията на риба от населението (g дневно).

По данни от 2010 на Националния статистически институт (НСИ) годишната консумация на риба в България е 4.8 кг на човек. Тази стойност включва сладководни, морски и култивирани рибни видове. Дневният прием се равнява на 13.2 грама риба. Ако приемем, че средно телесно тегло на възрастен човек е 70 кг, средната консумация става 0.19 g/kg телесно тегло / дневно.

Средната консумация заедно с измерената концентрация на замърсителя, са използвани за изчисляване на коефициент на риска RQ. RfD стойности приети в настоящото проучване са критериите на USEPA (Агенцията по околната среда на САЩ), които са оценка на експозицията - количеството на токсичното вещество, което при попадане в храна може да бъде поглъщано ежедневно през целия живот без риск за здравето. В таблица 16 са представени изчислените стойности за дневен прием и RQ по видове риби. RQ е изчислен по формулата:

$$RQ = \frac{\text{Дневен прием}}{RfD}$$

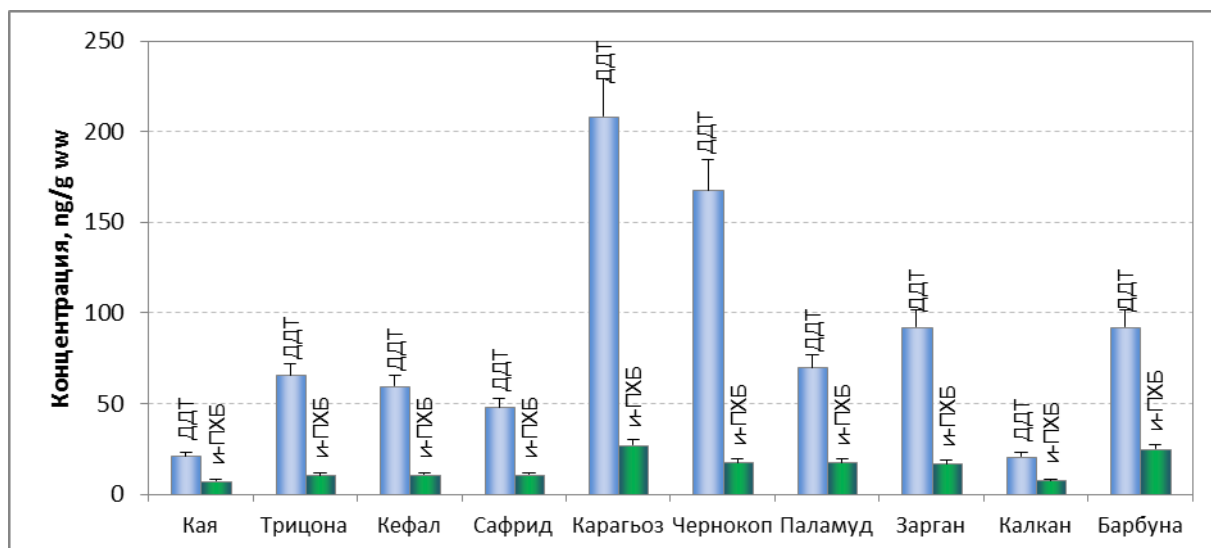
Таблица 16 Дневен прием на ДДТ и метаболити и коефициент на риска (RQ), свързан с консумацията на риба

Вид риба	ΣДДТ, ng/g _{ww}	Дневен прием, ng/kg телесно тегло / дневно	RfD from USEPA ng/kg телесно тегло /дневно	RQ
каля	21.0	4.0	500	0.008
трицона	65.7	12.4	500	0.025
кефал	59.7	11.3	500	0.023
сафрид	48.0	9.1	500	0.018
карагъоз	208.5	39.3	500	0.079
чернокоп	167.7	31.6	500	0.063
паламуд	69.9	13.2	500	0.026
зарган	92.3	17.4	500	0.035
калкан	20.8	3.9	500	0.008
барбуна	92.3	17.4	500	0.035

Дневният прием за ДДТ и метаболити варира от 3.9 (при калкан) до 39.3 ng/kg телесно тегло / дневно (при карагъоз). В настоящото проучване изчислената най-висока стойност на RQ за Σ ДДТ е при карагъоз - 0.079. Резултатите от оценката на безопасността по отношение на замърсяването с ДДТ показват, че консумацията на Черноморските риби не представлява риск за човешкото здраве.

III.2.2. Оценка на безопасност свързана със замърсяването с индикаторни и диоксиноподобни ПХБ

Определени са и концентрациите на полихлорирани бифенили (друг вид хлорорганичен замърсител) в десетте вида риби, за да се направи сравнение със съдържанието на ДДТ в рибите. Шест ПХБ 28, 52, 101, 138, 153 и 180 са определени от Европейската комисия като индикаторни (и-ПХБ) за оценяване степента на липофилно замърсяване. ПХБ 77, 105, 118, 126, 156, 169 имат сходна токсичност с тази на диоксините и са наречени диоксиноподобни. Диоксиноподобните ПХБ (дп-ПХБ) се използват за оценка на риска от консумацията на замърсени храни, включително риба. Сравнени са резултатите за ДДТ и съдържанието на индикаторни ПХБ – фигура 40.

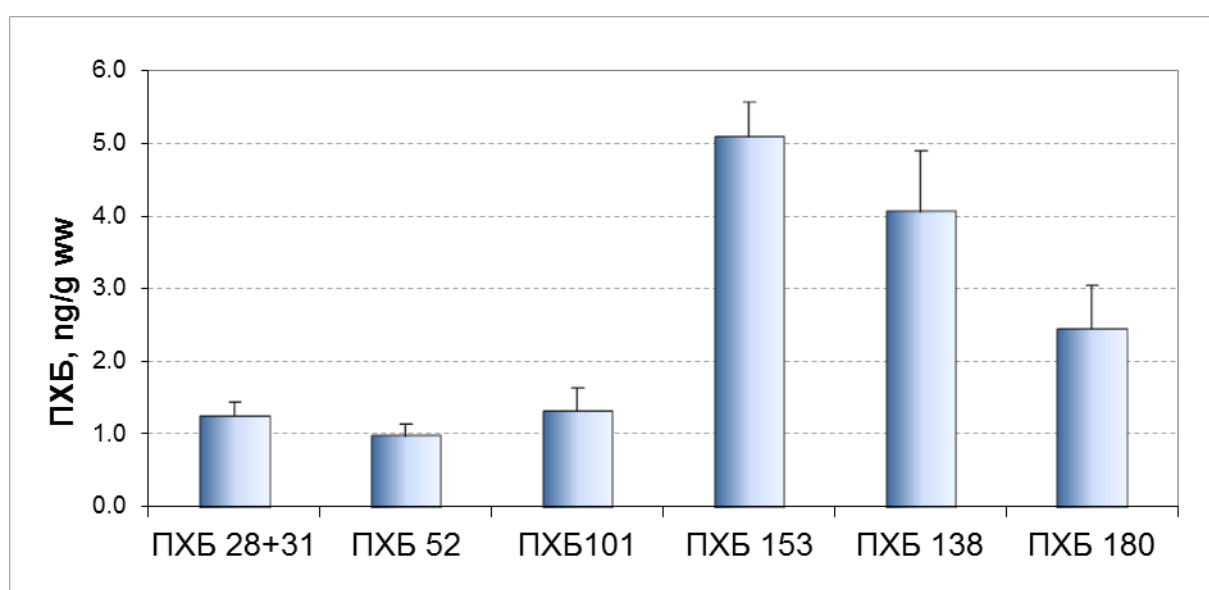


Фигура 40. Сравнение на съдържанието на ДДТ и индикаторни ПХБ по видове риби

Сравняването на резултатите показва, че ДДТ и метаболити са преобладаващи замърсители във всички видове риби. Съдържанието на ПХБ като сума от 6 индикаторни ПХБ (Σ и-ПХБ) варира от 7.2 ng/g ww при кая до 27.3 ng/g ww при карагъоз. Видовете с

по-високо съдържание на ДДТ (карагьоз, чернокоп и паламуд), показват и по-високи концентрации на ПХБ. Това може да се дължи на хищния им начин на хранене и на миграция начин на живот на тези видове риба. Установените концентрации за ПХБ са много по-ниски от тези на ДДТ и това е логично, защото в България не е имало производство и масова употреба на ПХБ.

В почти всички анализирани проби риба най-високи концентрации са установени за хексахлорираните изомери ПХБ 153 и ПХБ 138, следвани от ПХБ 118, 180, 101 и 52. На фигура 41 е представен обобщен профил на индикаторни ПХБ за всички изследвани видове риби.



Фигура 41. Обобщен профил на Индикаторни ПХБ, ng/g ww за всички риби

Доминирането на ПХБ 180, 153, 138 и 118 вероятно се дължи на тяхната висока липофилност, стабилност и устойчивост на техните молекулни структури, което определя натрупването им във водната екосистема. Това е една от причините те да присъстват в морските екосистеми и да бъдат откривани в значителни количества в морските организми и седименти.

Полученият профил на индикаторни ПХБ е в съответствие с разпределението на отделните ПХБ, установени за същите или сродни видове риби при изследвания от други автори. Преобладаването на хексахлорираните ПХБ 153 и 138 в рибни видове от различни крайбрежни зони в Средиземно море, Адриатическо море и други проучвания

се съобщава от редица автори. ПХБ 153 и 138 са преобладаващите конгенери и в риби от Мраморно море, изследвани за органохлорни замърсители.

Съгласно регламент No 1259/2011, в Европейският съюз са определени максимално допустими стойности за индикаторни ПХБ за мускулно месо от риба и рибни продукти 75 ng/g ww (за сума от 6 индикаторни ПХБ). В настоящото проучване при всички видове риба резултатите за индикаторни ПХБ са много по-ниски от тази стойност (Фигура 40).

За оценка на риска от консумация на риба се изчислява дневен прием на индикаторни ПХБ и коефициенти на риска (RQ) - получените стойности са представени в таблица 17. Използвани са RfD стойности на USEPA.

Таблица 17. Дневен прием и коефициент на риска (RQ) за индикаторни ПХБ, свързани с консумацията на риба

Вид риба	и-ПХБ, ng/g ww	Дневен прием, ng/kg телесно тегло / дневно	RfD, (USEPA) ng/kg/дневно	RQ
кая	7.2	1.4	20	0.07
трицона	10.6	2.0	20	0.10
кефал	10.7	2.0	20	0.10
сафрид	10.9	2.1	20	0.10
карагъоз	27.3	5.1	20	0.26
чернокоп	17.6	3.3	20	0.17
паламуд	17.5	3.3	20	0.17
зарган	16.9	3.2	20	0.16
калкан	7.7	1.5	20	0.07
барбуна	25.1	4.7	20	0.24

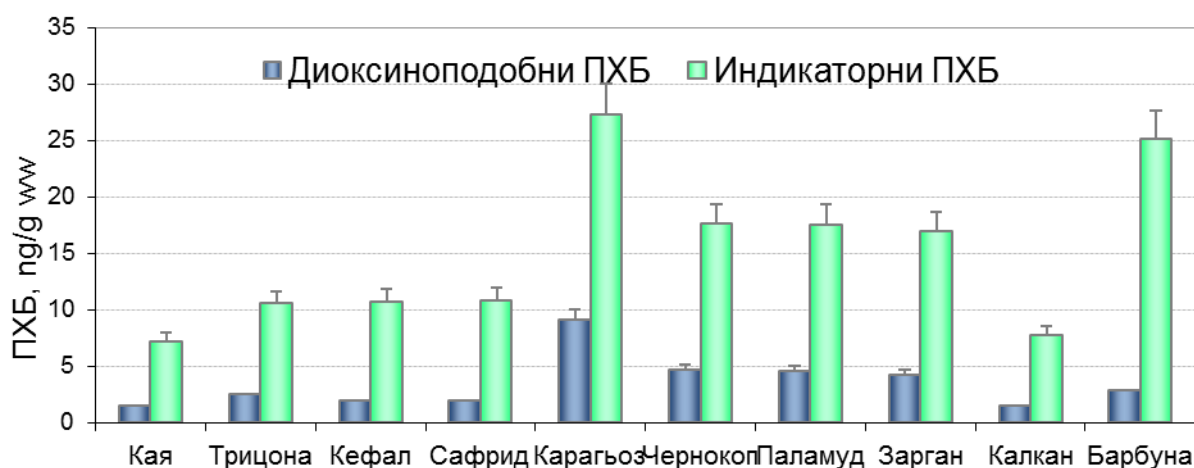
Най-висока стойност на RQ за индикаторните ПХБ е установена в карагъоз - 0.26. RQ за останалите видове изследвани риби варира от 0.07 (при кая и калкан) до 0.24 (при барбуна).

При всички видове риба изчислените RQ на индикаторните ПХБ са по-ниски от единица. Тези стойности показват, че консумацията на изследваните видове риби не представлява риск за човешкото здраве.

Диоксиноподобните ПХБ се използват за изчисляване на т. нар. токсични еквивалентни концентрации (ТЕQ) за оценка на безопасността на черноморските риби. Диоксиноподобните ПХБ се разделят на не-орто (ПХБ 77, 81, 126, 169), моно-орто (105, 114, 118, 123, 156, 157, 167, 189) и ди-орто (ПХБ 170 и 180) - заместени ПХБ. Те показват подобни на диоксините токсикологични свойства и са много стабилни и устойчиви на биоразграждане и метаболизиране.

Моно-орто заместените ПХБ 105, 118 и 156 имат най-голям принос към замърсяването с дп-ПХБ – от 44% до 66%. Най-токсичните дп-ПХБ – 77, 126 и 169 се откриват в малка част от анализираниите проби.

В настоящото изследване сме определили сумата на 6 диоксиноподобни ПХБ (УРАС № 77, 105, 118, 126, 156, 169 - Σ дп-ПХБ). Направено е сравнение на индикаторните и диоксиноподобните ПХБ, за да се прецени приносът на двете групи ПХБ към общото замърсяване. На фигура 42 са сравнени стойностите на индикаторни и диоксиноподобни ПХБ по видове риби.



Фигура 42. Сравнение на диоксиноподобни и индикаторни ПХБ в черноморски риби

Сравнението на двете групи ПХБ показва, че замърсяването на рибите с ПХБ се дължи предимно на индикаторните конгенери. Като цяло концентрациите на диоксиноподобни ПХБ в анализираниите рибни видове са много по-ниски като за някои ПХБ (77, 126 и 169) те са под границата на откриване на аналитичния метод.

Резултатите показват, че във видовете кая и калкан средното съдържание на диоксиноподобни ПХБ е най-ниско 1.4 ng/g ww, а при карагьоз най-високо 9.1 ng/g ww.

И при този вид замърсител установяваме, че рибните видове с по-високо липидно съдържание показват по-високи стойности на ПХБ.

Важно е да се отбележи, че видовете кая, трициона, кефал и калкан съдържат много ниски количества индикаторни и диоксиноподобни ПХБ, което свидетелства за ниско общо замърсяване с тези хлорорганични замърсители. Като цяло резултатите показват, че замърсяването с ПХБ на рибите от Черноморското крайбрежие на България е по-ниско в сравнение с данни за съдържание на ПХБ в същите видове риби от други региони на Черно море и съседните Мраморно, Средиземно и Адриатическо море. Тези резултати са обясними като се има в пред вид, че в България не е имало производство и широка употреба на технически смеси, съдържащи ПХБ.

Токсична еквивалентна концентрация на диоксиноподобни ПХБ

Всеки един от диоксиноподобните ПХБ проявява различна токсичност. Световната здравна организация (СЗО) въвежда понятието фактори за токсична еквивалентност (TEFs) за оценка на токсичността на всеки един от диоксиноподобните ПХБ и диоксините. През 1998 г СЗО предлага TEF, разработени въз основа на относителната токсичност на всеки ПХБ сравнена с 2,3,7,8-TCDD (2,3,7,8-тетрахлордибензодиоксин). За всеки диоксиноподобен ПХБ СЗО определя индивидуални TEF, на базата на които се изчисляват техните токсични еквивалентни концентрации (TEQ). По-късно през 2005 г тези коефициенти са преразгледани на база на актуални токсикологични проучвания и са заменени с нови TEF - WHO 2005.

Таблица 18. Токсични еквивалентни фактори (TEFs) за диоксиноподобни ПХБ

ПХБ УРАС №	TEF -WHO 1998	TEF -WHO 2005
Не-орто заместени ПХБ		
ПХБ 77	0.0001	0.0001
ПХБ 126	0.1	0.1
ПХБ 169	0.01	0.03
Моно-орто заместени ПХБ		
ПХБ 105	0.0001	0.00003
ПХБ 118	0.0001	0.00003
ПХБ 156	0.0005	0.00003
Ди-орто заместени ПХБ		
ПХБ 170	0.001	-
ПХБ 180	0.0001	-

В настоящото проучване за изчисляване на ТЕQ на диоксиноподобни ПХБ е приложена методология на СЗО, според която ТЕQ на всеки дп-ПХБ представлява произведение от концентрацията му в пробата и токсичния му еквивалентен фактор ТЕF.

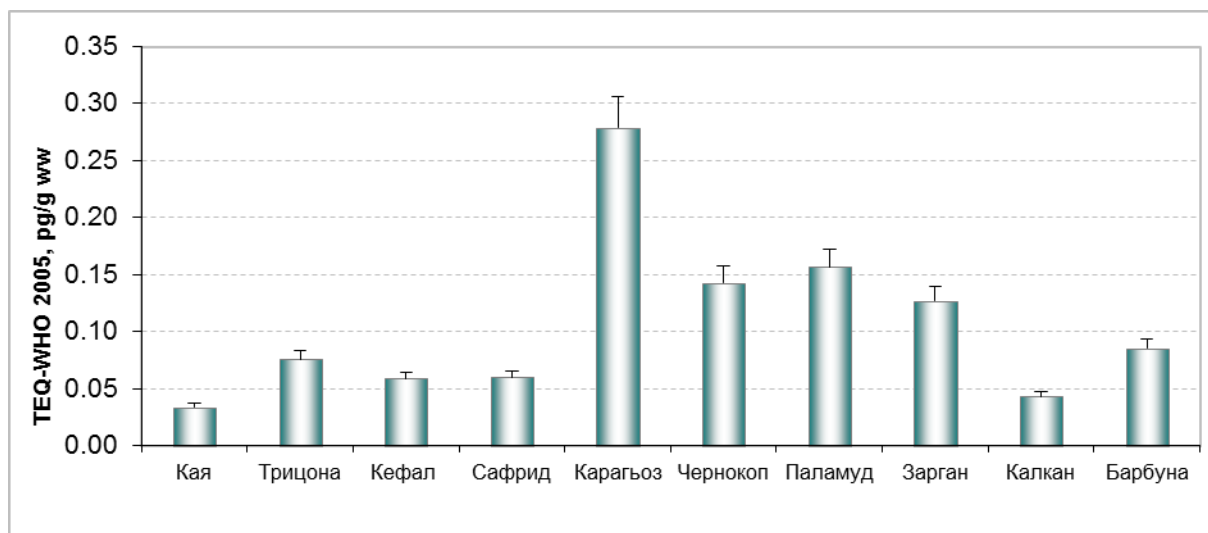
$$TEQ = \sum_i [ПХБ\ i \times TEF\ i]$$

където:

ПХБ – концентрация на всеки диоксиноподобен ПХБ

ТЕF – токсичен еквивалентен фактор на всеки диоксиноподобен ПХБ

На фигура 43 са представени изчислените токсични еквивалентни концентрации като ТЕQ-WHO 2005 на диоксиноподобните ПХБ в изследваните видове риби като средни стойности за целия период на изследването.



Фигура 43 Стойности на ТЕQ (pg/g ww) за диоксиноподобни ПХБ по видове риби

По-високи стойности на ТЕQ са установени във видовете карагъоз, чернокоп и паламуд. Най-висока ТЕQ стойност е установена в карагъоз (0.28 pg/g ww WHO-ТЕQ), а в кая изчислената ТЕQ е най-ниска - 0.03 pg/g ww WHO-ТЕQ.

В Регламент No 1259/2011 Европейският съюз определя максимално ниво за диоксини + диоксиноподобни ПХБ за риби и продукти от риба, предназначени за консумация от хора - 6.5 pg/g wet weight WHO-ТЕQ. За всички видове риби изчислените ТЕQ стойности са по-ниски от това максимално ниво.

Предложената от СЗО методология за изчисляване на ТЕQ е предназначена главно за оценяване на експозицията и риска за хората чрез поглъщане през устата

(например, чрез хранителен прием). Затова е важно да се изчисли дневен прием и на диоксиноподобни ПХБ.

За оценка на риска от хранителен прием на диоксиноподобни ПХБ е изчислен Дневен прием (DI) чрез умножаване на стойностите за средната дневна консумация на риба от населението (за България - 13.2 g) с концентрацията на дп-ПХБ (изразена като TEQ pg/g ww), измерени в настоящото проучване, ако се предположи, че средното телесно тегло на човек е 70 kg – по формулата за дневен прием по-горе.

В настоящото проучване DI е изчислен за диоксиноподобни ПХБ като са използвани техните TEQ, за да се сравни с нормите определени от СЗО. Резултатите са представени в Таблица 19.

Таблица 19. Дневен прием на дп-ПХБ, свързан с консумацията на риба

Вид риба	Сума от 6 дп-ПХБ, ng/g ww	pg TEQ-WHO 2005 / kg	Дневен прием (DI), pg TEQ / kg bw
Кая	1.44	0.03	0.006
Трициона	2.54	0.08	0.015
Кефал	1.96	0.06	0.011
Сафрид	2.01	0.06	0.011
Карагъоз	9.08	0.28	0.053
Чернокоп	4.67	0.14	0.027
Паламуд	4.57	0.16	0.030
Зарган	4.24	0.13	0.025
Калкан	1.44	0.04	0.008
Барбуна	2.84	0.09	0.017

Най-високи стойности са установени при карагъоз 0.053 pg TEQ / kg bw. Дневният прием на диоксиноподобни ПХБ при останалите видове е в интервала от 0.006 (при кая) до 0.030 pg TEQ / kg bw (при паламуд).

Изчисленият дневен прием на дп-ПХБ в това проучване за всички видове риби е по-нисък от допустимия дневен прием (TDI) от 1 - 4 pg TEQ kg⁻¹ bw (СЗО, 1998). Това показва, че установените стойности за диоксиноподобни ПХБ не представляват опасност за здравето на хората при консумация на черноморски риби.

III.2.3. Обобщение за безопасността на черноморските риби

Получените резултати за съдържание на ДДТ и ПХБ са използвани за оценка на безопасността на рибите като храна. Замяряването на черноморските риби е оценено чрез сравнение с допустими гранични стойности за ДДТ и ПХБ. За оценка на безопасността са изчислени дневен прием, коефициент на риска и токсични еквивалентни концентрации ТЕQ.

Резултатите за ДДТ показват, че замяряването при всички видове риби е под максимално допустимите граници за Европейския съюз.

Коефициентът на риск RQ за Σ ДДТ е в интервала от 0.008 (при кая и калкан) до 0.079 (при карагьоз). RQ е много по-нисък от единица и показва, че няма риск при консумацията на риба.

Резултатите показват, че замяряването с ПХБ се дължи предимно на индикаторни ПХБ, а съдържанието на диоксиноподобни ПХБ е много ниско.

В настоящото проучване при всички видове риба резултатите за индикаторни ПХБ са много по-ниски от максимално допустимите стойности за индикаторни ПХБ в мускулно месо от риба и рибни продукти - 75 ng/g ww определена в регламент 1259/2011 ЕС.

Коефициентите на риск на индикаторните ПХБ (RQ) са в интервала от 0.07 (при кая) до 0.26 (при карагьоз). При всички видове риба изчислените RQ на индикаторните ПХБ са по-ниски от единица. Тези стойности показват, че консумацията на тези риби не представлява риск за човешкото здраве.

Най-висока ТЕQ стойност е установена в карагьоз (0.28 pg/g ww WHO-ТЕQ), а в кая изчислената ТЕQ е най-ниска - 0.03 pg/g ww WHO-ТЕQ. Изчислените ТЕQ стойности на диоксиноподобни ПХБ за всички видове риби са по-ниски от максимално ниво от 6.5 pg/g ww WHO-ТЕQ, определено в ЕС.

Изчисленият дневен прием на диоксиноподобни ПХБ в това проучване за всички видове риби е по-нисък от допустимия дневен прием (TDI) от 1 - 4 pg ТЕQ kg⁻¹ bw.

В заключение можем да кажем, че няма опасност за здравето на хората при консумация на черноморски риби.

IV. ИЗВОДИ

1. Обобщени и систематизирани са голяма част от изследванията за хлорорганични замърсители в различни видове морски и сладководни риби. Данните са използвани за сравнение с получените резултати от настоящото изследване.

2. Модифицирана е аналитична процедура, разработена за определяне на ПХБ в храни от животински произход. Като целта е едновременно определяне на ПХБ, ДДТ и метаболити, което спестява време и скъпи реактиви.

3. За качествено и количествено определяне на ДДТ и метаболити е използван газхроматографски метод, който е валидиран със сертифицирани референтни материали.

4. Направено е систематично изследване на 10 вида черноморски риби за съдържание на ДДТ и метаболити за петгодишен период от 2007 до 2011 г. Данните са обобщени:

- По райони на улов - съществена разлика не се наблюдава между стойностите на Σ ДДТ в пробите риби от трите района на пробовземане.
- По години – наблюдава се известно намаляване на концентрациите за общо ДДТ през 2010 и 2011.
- По сезони – не се наблюдава значима разлика в концентрациите на ДДТ и метаболити в риби уловени през пролетния и есенния период.
- По видове риби – наблюдава се съществена разлика между различните видове риби като средните концентрации Σ ДДТ за целия период са в интервала от 20.8 ng/g ww до 208.5 ng/g ww.

5. Резултатите показват, че остатъчните концентрации на ДДТ и неговите метаболити при всички изследвани видове риби намаляват в реда p,p -ДДЕ > p,p -ДДД > p,p -ДДТ. ДДТ се открива в много ниски концентрации, което показва, че техническият p,p -ДДТ почти напълно е метаболизиран.

6. Съдържанието на ДДТ и метаболити в миди и рапани от черноморското ни крайбрежие е много по-ниско в сравнение с всички изследвани рибни видове.

7. Сравнението на получените данни с резултати от проучвания на други автори показва, че нивата на замърсяване с ДДТ и метаболити на рибите от българското черноморско крайбрежие са подобни или по-ниски, от нивата за същите видове риби от Черно море и съседните - Мраморно и Средиземно море.

8. За сравнение е направено изследване и на няколко вида сладководни риби. Съдържанието на ДДТ и метаболити е 23.2 ng/g ww (средна стойност), което е по-ниско в сравнение с това при черноморските риби (средна стойност 84.6 ng/g ww).

9. Определено е съдържанието и на ПХБ (друг вид УОЗ) в рибите като е направено сравнение със съдържанието на ДДТ и метаболити. При всички видове риби концентрациите на ДДТ и метаболити са по-високи от тези за ПХБ.

10. Замърсяването на черноморските риби с ПХБ се дължи предимно на индикаторните ПХБ (от 7.2 до 27.3 ng/g ww) като най-ниски са стойностите при кая, а най-високи при карагъоз. Силно токсичните диоксиноподобни ПХБ са в много ниски концентрации (от 1.4 до 9.1 ng/g ww).

11. При всички видове риба резултатите за индикаторни ПХБ са много по-ниски от максимално допустимите стойности за индикаторни ПХБ в мускулно месо от риба и рибни продукти - 75 ng/g ww.

12. Замърсяването с индикаторни ПХБ на черноморските риби е по-ниско в сравнение с данни за съдържание на ПХБ за риби от други региони на Черно море и съседните Мраморно, Средиземно и Адриатическо море. Това е обяснимо като се има в предвид, че в България не е имало производство на ПХБ и употребата им е била сравнително ограничена.

13. Резултатите за съдържание на ДДТ и метаболити и ПХБ са използвани за оценка на безопасността на рибите като храна. Изчислени са:

- Дневен прием за ДДТ и ПХБ
- Коефициент на риска (RQ) – при всички видове риба изчисления RQ за ДДТ и ПХБ е много по-нисък от единица и показва, че няма риск при консумацията на риба.
- Токсични еквивалентни концентрации (TEQ) – TEQ за диоксиноподобните ПХБ за всички видове риби са по-ниски от максимално ниво от 6.5 pg/g ww WHO-TEQ, определено в ЕС.

14. Оцеката на безопасност показва, че няма риск за здравето на хората при консумация на черноморски риби.

V. ПРИНОСИ

1. За първи път в България е направено систематично изследване за съдържанието на ДДТ и метаболитите ДДЕ и ДДД в различни видове морски и сладководни риби. Изследването обхваща периода 2007 – 2011 г като замърсяването е оценено по райони на улов, по години, по сезони и по видове риби.

2. Модифицирана е аналитична процедура, разработена за определяне на ПХБ в храни с цел едновременно определяне на ПХБ, ДДТ и метаболити.

3. Направена е оценка на безопасността на рибите като храна въз основа на изчислени дневен прием и коефициент на риска за ДДТ и ПХБ както и токсични еквивалентни концентрации (ТЕQ) на диоксиноподобни ПХБ. Подобна оценка на черноморските риби се прави за първи път у нас.

4. Изследването има мониторингов характер за оценка на замърсяването на нашия район на Черно море. Резултатите имат принос в обогатяване на данните за замърсяване на Черно море и сравняването им с други морски екосистеми.

Списък на публикации

1. M. Stancheva, T. Rizov, L. Makedonski, S. Georgieva, Organochlorine Pollutants in Bluefish (*Pomatomus Saltatrix*) from Bulgarian Black Sea Coast. Научни трудове 2010, Пловдивски университет “Паисий Хилендарски” VOL.37, BOOK5, 2010 - CHEMISTRY.
2. М. Станчева, С. Георгиева, Л. Македонски, Т. Ризов, Съдържание на полихлорирани бифенили и органохлорни пестициди в черноморски риби - паламуд и карагъз. Научни трудове 2010, том LVII, Свитък 2, Университет по хранителни технологии – Пловдив.
3. T. Rizov and S. Georgieva, Polychlorinated Biphenyls and Organochlorine Pesticides in Black mussel and Goby from Black sea, Bulgaria. Scripta Scientifica Medica, Medical University, Varna, volume 42 (4) 2010.
4. S. GEORGIEVA, M. STANCHEVA and L. MAKEDONSKI, Organochlorine pesticides and PCBs in marine fish, Ovidius University Annals of Chemistry, Vol. 23, Number 1, pp.92-98, 2012.
5. M. Stancheva, S. Georgieva, L. Makedonski. Organochlorine pollutants in fish from Bulgarian region of the Black Sea, Quality Assurance and Safety of Crops & Foods, 2012, приета за печат.

Списък на участия в научни форуми

1. 1st Southeast European Conference of Chemotherapy and Infection, 6-9 May 2010, Golden Sands, Bulgaria, M. Stancheva, T. Rizov, L. Makedonski, S. Georgieva, Organochlorine Pesticides and Polychlorinated Biphenyls in Black mussel and Goby from Black Sea, Bulgaria
2. 8th Science Conference on Chemistry, 18-19 June 2010, Koprivshitzza, Bulgaria, M. Stancheva, T. Rizov, L. Makedonski, S. Georgieva, Organochlorine Pollutants in Bluefish (*Pomatomus Saltatrix*) from Bulgarian Black Sea Coast
3. Научна конференция с международно участие, 15-16 октомври 2010, Университет по хранителни технологии – Пловдив, М. Станчева, С. Георгиева, Л. Македонски, Т. Ризов, Съдържание на полихлорирани бифенили и органохлорни пестициди в черноморски риби - паламуд и карагъз.

4. 31st BALKAN MEDICAL WEEK Athens-GREECE, 28-31 October 2010, M. Stancheva, S. Georgieva, L. Makedonski, T. Rizov Organochlorine Pollutants in European Sprat from Bulgarian Black Sea Coast.

5. Национална конференция с международно участие “40 ГОДИНИ ШУМЕНСКИ УНИВЕРСИТЕТ 1971 – 2011”, 13-14 септември 2011. М. Stancheva, S. Georgieva, L. Makedonski, Persistent Organochlorine Residues in freshwater fish.

6. 3rd MoniQA International Conference, 27-29 September 2011, Varna, Bulgaria, M. Stancheva, L. Makedonski, S. Georgieva, Organochlorine pollutants in fish from Bulgarian region of the Black Sea.

7. International Conference CHIMIA, 24-26 May 2012, Constanta, Romania, Stanislava GEORGIEVA, Mona STANCHEVA and Lubomir MAKEDONSKI, Organochlorine pesticides and PCBs in marine fish, Ovidius University.

8. 32nd BALKAN MEDICAL WEEK, 21-23 September 2012, Nis, Serbia, Mona Stancheva, Stanislava Georgieva, Lubomir Makedonski, ORGANOCHLORINE RESIDUES (DDTs AND PCBs) IN FISH FROM DANUBE RIVER.