

ПЛОВДИВСКИ УНИВЕРСИТЕТ „ПАИСИЙ ХИЛЕНДАРСКИ“
PLOVDIV UNIVERSITY „PAISSII HILENDARSKI“

НАУЧНИ ТРУДОВЕ
TRAVAUX
SCIENTIFIQUES

ТОМ 41, КН. 6, 2011
VOL. 41, FASC. 6, 2011

БИОЛОГИЯ
BIOLOGIE
PLANTARUM

УНИВЕРСИТЕТСКО ИЗДАТЕЛСТВО
„ПАИСИЙ ХИЛЕНДАРСКИ“

UNIVERSITY OF PLOVDIV „PAISSII HILENDARSKI“
TRAVAUX SCIENTIFIQUES, VOL. 41, FASC. 6, 2011
BIOLOGIE–PLANTARUM

РЕДАКЦИОННА КОЛЕГИЯ:

Главен редактор:
Проф. дбн Мима Николова

Отговорен редактор:
Детелина Белкинова

ISSN 1312-062X

ИЗСЛЕДВАНЕ НА КАЧЕСТВЕНИЯ И КОЛИЧЕСТВЕН СЪСТАВ НА СИНЬО-ЗЕЛЕНИТЕ ВОДОРАСЛИ (СЬАНОПРОКАРЬОТА), СЪДЪРЖАНИЕТО НА ЦИАНОТОКСИНИ И ТЕЖКИ МЕТАЛИ В ЯЗОВИР СТУДЕН КЛАДЕНЕЦ

*Иванка Тенева¹, Дияна Башева², Детелина Белкинова¹,
Иванка Димитрова-Дюлгерова¹, Румен Младенов¹,
Балик Джамбазов²*

*¹ПУ „Паисий Хилендарски“, Биологически факултет,
Катедра „Ботаника и МОБ“*

*²ПУ „Паисий Хилендарски“, Биологически факултет,
Катедра „Биология на развитието“*

ABSTRACT

This study presents data for the phytoplankton structure of Studen Kladenets reservoir during the summer of 2008 and 2009 with emphasis on Cyanoprokaryota. Data demonstrate toxic potential for some of the established cyanoprokariotic species, which could be an environmental risk to the flora and fauna of this reservoir, as well as for the people using the water pool for recreation and fishing. Analysis of the water samples showed presence of cyanotoxins in samples collected from the „tail“ of the reservoir for the entire study period of 2008 and 2009 and increased

concentrations of zinc, lead and cadmium. In addition, these water samples showed cytotoxic effect on HeLa cells.

KEY WORDS: Cyanoprokaryota, cyanotoxins, phytoplankton, monitoring, heavy metals, Studen Kladenets reservoir.

ВЪВЕДЕНИЕ

Cyanoprokaryota (цианобактерии, синьо-зелени водорасли) са разнообразна група прокариотни фотосинтезиращи организми, които населяват широк спектър от водни и сухоземни хабитати и показват голямо морфологично разнообразие.

Те притежават белези, сходни както с еубактериите, така и с растенията. Подобно на бактериите, те имат твърда клетъчна стена, съдържаща муреин и се характеризират с липса на диференцирано клетъчно ядро. От друга страна, подобно на растенията, синьо-зелените водорасли извършват фотосинтеза, при която отделят свободен кислород. Това от своя страна определя значението им за развитието на по-висши организми на Земята.

Доминирането им над останалите видове в екосистемата е индикация, че те притежават някои специфични физиологични характеристики, които им дават възможност да се конкурират много ефективно.

Тези организми са широко разпространени в сладки и солени водни басейни по целия свят, където, в зависимост от условията на околната среда могат да се развият масово – състояние наречено цианопрокариотен „цъфтеж“ (Whitton & Potts, 2000). Публикациите показват, че 70 до 90 % от тези „цъфтежи“ са токсични.

Поради това, през последните 10 години присъствието на токсин-продуциращи видове *Cyanoprokaryota* в повърхностните води, които се използват като източници на питейна вода, риболов и/или отдих са обект на голямо внимание в световен мащаб (Kuiper-Goodman et al., 1999; Sivonen & Jones, 1999).

Cyanoprokaryota могат да произвеждат токсини и да ги отделят във водата (Mussagy et al., 2006), като по този начин се превръщат във важен проблем за качеството на водите в много страни, в които се съобщават токсични „цианопрокариотни цъфтежи“. Тези «цъфтежи» могат да станат причина за сериозно замърсяване на водите, а оттам да се

превърнат в обществена опасност за здравето на хората и животните. Цианотоксините предизвикат директна интоксикация на животни и хора при контакт с контаминирана вода или косвено отравяне поради консумация на замърсени хранителни продукти (Jochimsen et al., 1998; Falconer, 1999). Това обуславя необходимостта от бърза и коректна идентификация на цианопрокарриотните видове.

Много от водните басейни в България се използват като източник на питейна вода, вода за напояване и риболов. Това изисква непрекъснат мониторинг за качеството на водата и особено замърсяването ѝ с цианотоксини. Цианотоксините могат да предизвикат относително бързо остри ефекти като гастроентерити, алергични и болестни реакции, пневмония-имитиращи симптоми и хепатоентерити.

Данните за наличие на цианотоксини в сладководните басейни на България, включително и язовири са ограничени. Има данни за наличието на микроцистини във водни проби от 15 български язовира и езера (Pavlova et al., 2006). Данните показват, че концентрацията на микроцистини (MC-LR, MC-RR и MC-YR) в биомасата варира от 8 до 1070 $\mu\text{g/g}$ (d.w.). Проучвания на фитопланктона и контрола на цианотоксини в язовир Тракиец са показали наличието на сакситоксини (0.01 ng/mL), както и на микроцистини (0.18 $\mu\text{g/L}$) в събраните водни проби (Teneva et al., 2009).

Анатоксин-а, микроцистини и сакситоксини са детектирани във водни проби от язовир Боровица и язовир Въча (Teneva et al., 2010a; Teneva et al., 2010b), които се използват като източници на питейна вода.

Видовият състав, честотата на цъфтежите (брой годишно) и обилието на фитопланктона са основните нормативно дефинирани показатели, използвани при мониторинга и оценката качеството на водите. По отношение на видовия състав, акцент се поставя на съотношението между главните таксономични групи както и на относителния дял на синьо-зелените водорасли, а обилието се измерва с показателите биомаса, хлорофил-а и трофични индекси. Като резултат от определяне на фитопланктонния състав в даден воден басейн/и се изготвя списък на отделните таксони и се определя обилието на всеки вид индивидуално. На базата на тези данни за видово разнообразие и обилие може да се приложи метода на фитопланктонните функционални групи (Reynolds,

2002; Padisák et al., 2009) и да се изчислят някои индекси (например Q-индекса; Padisák et al., 2006; Catalan-индекс и др.), даващи информация за екологичния статус и потенциал на изследвания воден басейн.

В България този комплексен подход при оценка качеството на водите започна да се въвежда с пилотни изследвания на някои водни басейни през 2007-2008 година, когато се положи началото на отчитане на показателя обилие, отчитащ биомаса, хлорофил-а и трофични индекси. Отчитането на останалите показатели като видов състав на фитопланктона и честота на цъфтежите се въведе през 2009 година. До 2007 година от съществуващите в страната ни 120 язовира данни има само за 28 (Beshkova et al., 2007). Тази информация сама по себе си говори за необходимостта от работа в тази насока.

Сравнително изследване на фитопланктона във водни басейни с различен трофичен статус, както и изследвания върху фитопланктона на един воден басейн за определен период от време демонстрират как промяна в трофичния статус повлиява видовата композиция, сезонната сукцесия и продуктивността (Trifonova, 1989). Сравнителни изследвания на структурните параметри и количественото развитие на фитопланктона са рядкост за българските езера и язовири. Подобни изследвания са правени за езерото Сребърна (Stoyneva 1998a, b), за някои от езерата по крайбрежието на Черно море (Kalchev et al., 2002), за Рилските езера (Beshkova, 2000; Naidenow & Beshkova 2000; Kalchev et al., 2004) както и за някои язовири (Kalchev & Botev, 2005; Traykov, 2005; Belkinova et al., 2007, Beshkova & Salz, 2006; Teneva et al., 2009; Teneva et al., 2010a, b). Данните свързани с фитопланктона в българските язовирите са малко и се отнасят основно до видовата композиция и/или доминиращите видове (Beshkova et al., 2007).

Типологията на езерата по система-Б в България е в значителна степен по-слабо разработена в сравнение с тази на реките, поради недостатъчното биологични данни и доминирането на силно модифицирани водни басейни (язовири). Практически, повече от 90 % от всички езерни водни басейни представляват язовири (силно модифицирани или изкуствени водни басейни). Следователно, за България е от съществено значение определяне на екологичния потенциал за отделните типове изкуствени «езера», отколкото определяне на екологичен статус за малкия брой естествени езера (високо планински глациални

езера, няколко свлачищни езера и обикновено силно повлияните от човешка намеса черноморски и крайдунавски езера и блата).

Видовата композиция и сезонната вариация на фитопланктона се определят от взаимодействието между физичните и химични фактори на околната среда, като например температура, рН, електропроводимост, разтворен кислород, азотни съединения, общ азот, органофосфати, общ фосфор, прозрачност и мътност на водата, които също са обект на мониторинг и чиито стойности или отношения дават важна информация за екологичното състояние на водния басейн.

Частични изследвания, свързани с проследяване на тези показатели са правени за някои български язовири (Beshkova et. al., 2007; Kalchev & Botev, 2005), но те също са оскъдни на фона на информацията, необходима за покриване на изискванията на Рамковата директива за водите.

Настоящото изследване представя данни за структурата на фитопланктона на язовир Студен кладенец с акцент върху *Cyanoprokaryota* за летния период на 2008 и 2009 година и демонстрира наличие на токсичен потенциал на някои от цианопрокаримите видове, представляващи екологичен риск за флората, фауната и човека в този воден басейн.

Считаме, че връзката между структурата на фитопланктона на даден воден басейн, присъствието на цианотоксини и качеството на водите дава възможност да се създаде една добра система за мониторинг на фитопланктона и неговия токсичен потенциал, което и демонстрираме в настоящото изследване.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Описание на язовира и физико-химичен анализ на водата

Язовир Студен кладенец с координати 41°37'14"N и 25°38'18"E (Фиг. 1) е разположен по средното течение на река Арда и заедно с язовир Кърджали и язовир Ивайловград е един от трите язовира, които са част от каскадата „Долна Арда“. По данни на Stoyneva & Michev (2007), язовир Студен кладенец се намира в Източните Родопи между град Кърджали и село Студен кладенец на границата на териториите на община Кърджали и община Крумовград. Той е създаден на река Арда, чието

скалисто ждрело с отвесни скали и стръмните брегове е покрито с оскъдна растителност. Изграждането на язовира започва през 1955 г. и е продължило две години, а използването му започва през 1958 година. Със своите 25600 дка площ, Студен кладенец е вторият по големина язовир в България, след язовир Искър. Водосборният му район е 3752 км² със среден годишен отток 1600 млн. м³. Язовирната стена е висока 68 метра в най-високата си част, а дължината е 350 метра. В основата си стената е широка 61 метра, а в короната – 8 метра. Построена е върху десния скат на реката и на водохранилището с обем 489 млн. м³, което се простира общо на 29 км нагоре по течението.



Фигура 1. Схематична карта и местоположение на язовир Студен кладенец.

Главно предназначение на хидровъзела е регулирането на големия и силно вариращ сезонен отток на р. Арда, както и за напояване и производство на електроенергия чрез ВЕЦ. Освен за това, язовир Студен кладенец се използва за рибовъдство и водни спортове.

Физико-химичните параметри, включително температура на водата, рН, общото количество на азота и фосфор, са измерени с помощта на фотометър рНотоFlex® (WTW GmbH, Weilheim, Германия) на място (в момента на събиране на пробите) или в лабораторията.

2. Колекциониране на проби и анализ на фитопланктона

За качествен анализ на фитопланктона, пробите бяха събирани три пъти годишно (юли, август и септември) през 2008 г. и 2009 г. от повърхностния слой (0.5 м) с помощта на планктонна мрежа и съхра-

нявани в 4 % формалдехид. За количествен анализ на фитопланктона, пробите бяха събирани в Майерови шишета от 1 л. и запазени в Луголов разтвор. Фитопланктонните анализи са проведени както върху свежи, така и върху консервирани (в 4 % формалдехид) проби чрез инвертен микроскоп (PZO, Полша) съгласно методиката на Lund et al. (1958), като са използвани седиментационни камери за утаяване и определяне на фитопланктона и оценка на клетъчната плътност.

Водните проби за химически и токсикологични анализи бяха събрани по същото време и от едно и също място, както фитопланктонните проби.

3. *In vitro* тестове за цитотоксичност

За *in vitro* изследване на токсичния потенциал на водните проби беше използвана една комерсиална клетъчни линия от бозайници – HeLa (човешки цервикални епителни аденокарциномни клетки, ECACC 91100402).

HeLa клетките бяха култивирани при 37° C, висока влажност и 5 % CO₂ в 75 cm³ матрачета в DMEM среда (Gibco™, Paisley, Scotland, UK) допълнена с 10 % инактивиран чрез загряване телешки серум (FCS; PAA Laboratories GmbH, Linz, Austria), 100 U/ml пеницилин и 100 µg/ml стрептомицин (Sigma, Steinheim, Germany). Трипсинизирането и субкултивирането бяха проведени в съответствие с протоколи от Invitox (The Ergatt/Frame, 1990, 1992). Преди залагането на клетките в плаки жизнеността им бе отчетена с трипан блу-тест (Berg et al., 1972).

Преди третирането клетките бяха заложени в 96-гнездни плаки с гъстота 1.5x10⁴ в 200 µl DMEM среда с 10 % FCS. След 24 часа, към средата бе добавена водна проба (10 %). Към контролните клетки бе добавено еквивалентно количество йонизирана вода. Клетките бяха третирани в продължение на 24 и 48 часа, след което бе проведен МТТ тест за цитотоксичност.

МТТ изследването бе проведено в съответствие с метода, описан от Edmondson et al. (1988). Този метод се базира на способността на митохондриалната дехидрогеназа да превръща разтворимата жълта тетразолиева сол в неразтворим пурпурно-син формазанов продукт. След определеното време за третиране на клетките с водните проби (24 или 48 часа), във всяко гнездо бяха добавени директно 20 µl от 0.5 %-овия разтвор МТТ и плаката бе инкубирана за 3-4 часа на тъмно

при 37° С. След инкубирането средата заедно с неусвоеното багрило бе аспирирана. С цел да се улесни разтварянето на формазановия продукт, към всяко гнездо бяха добавени 100 µl DMSO. Плаката бе поставена за кратко на шейкър, след което бе измерена абсорбцията при 570 nm.

4. Анализ за наличие на цианотоксини чрез HPLC

HPLC хроматографията беше проведена с помощта на система АКТАpurifier® (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) и софтуер UNICORN V5.11. Използвана бе аналитична колона Discovery® C18 (5x4mm I.D. 5 µm) от Supelco (Bellafonte, PA, USA). Мобилната фаза бе смес от разтвор А (10 mM амониев ацетат, рН 5.5) и разтвор Б (10 mM амониев ацетат: ацетонитрил, 80:20, v/v) както следва: 0 % от Б в 0-ва мин, 100 % от Б от 45 до 65-та минута при използване на линеарен градиент. Скоростта бе 0.8 mL/min, а UV-детекцията бе проведена при 238 nm. Всички анализи бяха проведени при стайна температура. Колоната бе калибрирана между отделните анализи с 8 mL от разтвор А. Всеки стандарт бе анализиран самостоятелно (Nodularin 5 µg/ml, MC-LR 5 µg/ml, STX 40.5 pg/mL, 200 µl инжектиран обем), както и смес от всички стандарти със същата концентрация в 200 µl. Инжектираният обем от всяка проба за HPLC анализ бе 200 µl. Пиковите на пробите бяха сравнени с тези от стандартите на база времето на детекция на пика.

Използваният ацетонитрил и вода за HPLC анализ бяха закупени от MERCK KgaA (Darmstadt, Germany), а амониевия ацетат от Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany). Анатоксин-а (AnTx-a) бе закупен от Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany), микроцистин-LR (MC-LR) от BIOMOL GmbH (Hamburg, Germany) и сакситоксина (STX) – от R-Biopharm GmbH (Darmstadt, Germany).

5. Анализ за наличие на цианотоксини чрез ELISA

5.1. Сакситоксини

Пробите бяха анализирани чрез Ridascreen™ ELISA кит за детекция на сакситоксини (R-Biopharm, Darmstadt, Germany). Това е конкурентен ELISA метод за количествен анализ на сакситоксини. Дъното на микротитърната плака при този кит е покрито със слой антитела срещу сакситоксини. Към плаката бяха добавени стандарти, проби и ензим-

маркиран сакситоксин. Свободният и ензим-маркиран сакситоксин се конкурират за местата за свързване на антителата. Несвързаният ензим-маркиран сакситоксин беше отмит при една от работните стъпки. Доказателството за наличие на този вид токсин в пробите идва след добавяне на субстрат и хромоген. Свързаният ензим-конюгат превръща безцветния хромоген в цветен краен продукт. Фотометричното измерване бе извършено при 450 nm. Екстинкцията на разтвора е обратно пропорционална на концентрацията на токсина в пробата. Границата на детекция на кита е 0.010 ppb ($\mu\text{g/L}$).

5.2. Микроцистини и нодуларини

Анализът на водните проби за наличието на микроцистини и нодуларини беше осъществен с помощта на Microcystins ELISA кит (Abraxis LLC, Warminster, PA). Както и при ELISA кита за детекция на сакситоксини, това е конкурентна имуносорбентна ELISA за количествен анализ на микроцистини и нодуларини във водните проби. Границата на детекция на Microcystins ELISA кита е 0.10 ppb ($\mu\text{g/L}$).

6. Анализ за наличие на тежки метали

Колекциониранияте водни проби бяха тествани за наличие на някои тежки метали (цинк, олово, манган, мед и кадмий) използвайки съответните китове за детекция на тези метали, закупени от MERCK KgaA (Darmstadt, Germany) и фотометър pHotoFlex[®] (WTW GmbH, Weilheim, Германия). Измерванията бяха направени по предписанията на производителя (MERCK KgaA).

РЕЗУЛТАТИ

1. Физико-химични параметри

Физикохимичните параметри на изследвания язовир са представени в Таблица 1. През 2008 година температурата на водата на повърхността варираше от 24.5° C през август до 27° C през юли. pH стойностите бяха между 6.8 и 7.7. Концентрацията на азота и фосфора беше с вариабилни стойности. Концентрацията на общият азот (TN) варираше от 0 mg/L през юли и август до 0.6 mg/L през септември, а на фосфора (TP) – от 0 до 0.19 mg/L през септември. Съотношението

TN/TP през септември бе 5, което показва лимитиращи нива на азота в планктонното съобщество.

През 2009 г. температурата на повърхността на водата варираше от 26° С през септември до 29° С през август. рН стойностите бяха между 5.5 и 8. Концентрациите на общият азот (TN) в района на язовирната стена бе 0 mg/L и през трите летни месеца. В същото време, концентрациите на общият азот в района на опашката на язовира варираше от 5.8 mg/L през юли до 0 mg/L през август и септември. Концентрациите на общият фосфор (TP) бяха от 0.09 mg/L през август (язовирна опашка) до 0 mg/L през септември (язовирна опашка). Съотношението TN/TP през юли беше 145 (язовирна опашка), което показва лимитиращи нива на фосфора в района на опашката на язовира и лимитиращи нива на азота в района на стената на язовира.

Таблица 1. Физико-химични параметри на водата
в язовир Студен кладенец (2008 и 2009 г.)

Станция	Време на вземане на пробите	Температура (° C)		рН		TP (mg/L)		TN (mg/L)		N/P	
		2008	2009	2008	2009	2008	2009	2008	2009	2008	2009
1. стена	юли	27	27	7.6	7.1	≤0	0.03	≤0	≤0	-	-
2. стена	август	25	29	7.1	8	0.09	0.03	≤0	≤0	-	-
3. стена	септември	25.5	27	7.4	6.5	0.06	0.02	0.3	≤0	5	-
4. опашка	юли	26	28	7.4	7.1	≤0	0.04	≤0	5.8	-	145
5. опашка	август	24.5	29	7.7	6.5	0.08	0.09	0.2	≤0	2.5	-
6. опашка	септември	25	26	6.8	5.5	0.19	≤0	0.6	≤0	3.16	-

2. Таксономичен състав и структура на фитопланктона

В настоящето изследване бяха идентифицирани водорасли, принадлежащи към седем отдела (Cyanoprokaryota, Chlorophyta (включително и Zygnemaphyceae), Dinophyta, Euglenophyta, Bacillariophyta, Cryptophyta и Chrysophyta).

По време на първия изследователски период, който обхващаше месеците юли, август и септември на 2008 г., **Chlorophyta** представляваха 61 % през юли, 56 % през август и 38 % от общият фитопланктон през септември в опасната част на язовира и съответно 33 % през юли, 40 % през август и 24 % през септември при стената на язови-

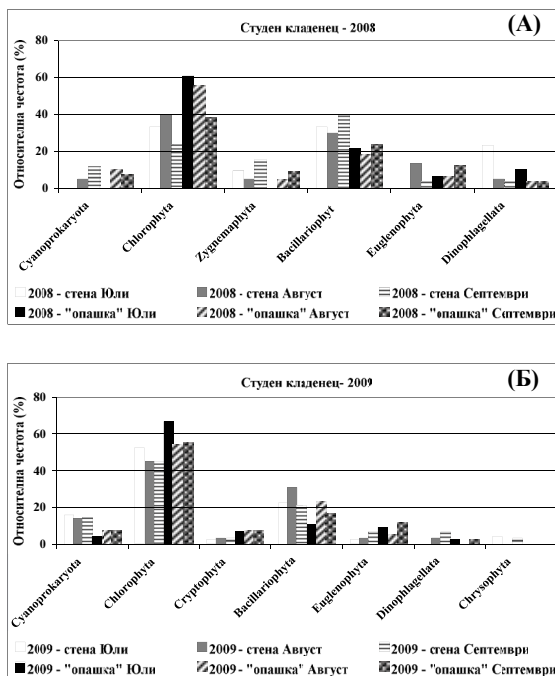
ра, следвани от **Bacillariophyta**, (22 % през юли, 19 % през август и 24 % през септември в опашката и 33 % през юли, 30 % през август и 40 % през септември при стената), **Dinophyta** (10 % през юли, 4 % през август и 4 % през септември в опашната част и 24 % през юли, 5 % през август и 4 % през септември при стената), **Cyanoprokaryota** (0 % през юли, 11 % през август и 7 % през септември в опашката и 0 % през юли, 5 % през август и 12 % през септември при стената), **Zygnemaphyceae** (0 % през юли, 5 % през август и 9 % през септември при опашката и 10 % през юли, 5 % през август и 16 % през септември при стената) и **Euglenophyta** (7 % през юли, 7 % през август и 13 % през септември в опашната част и 0 % през юли, 14 % през август и 4 % през септември при стената на язовира) (Фиг. 2А).

По време на втория изследователски период – юли, август и септември на 2009 г., **Chlorophyta** представляваха 67 % през юли, 54 % през август и 55 % от общият фитопланктон през септември в опашната част на язовира и съответно 52 % през юли, 45 % през август и 45 % през септември при стената на язовира, следвани от **Bacillariophyta**, (11 % през юли, 23 % през август и 17 % през септември в опашката и 23 % през юли, 31 % през август и 21 % през септември при стената), **Cyanoprokaryota** (4 % през юли, 8 % през август и 7 % през септември в опашката и 16 % през юли, 14 % през август и 14 % през септември при стената), **Euglenophyta** (9 % през юли, 5 % през август и 12 % през септември в опашната част и 2 % през юли, 3 % през август и 7 % през септември при стената на язовира), **Cryptophyta** (7 % през юли, 8 % през август и 7 % през септември в опашната част и 2 % през юли, 3 % през август и 3 % през септември при стената на язовира) и **Dinophyta** (2 % през юли, 0 % през август и 2 % през септември в опашната част и 0 % през юли, 3 % през август и 7 % през септември при стената). Отдел **Chrysophyta** бе представен само при язовирната стена през юли и септември съответно с 5 % и 3 % от фитопланктона (Фиг. 2Б).

През 2008 г. за разлика от 2009 г. не бяха установени видове от отделите Стуртоphyта и Chrysophyta (Фиг 2А. и Фиг. 2Б).

Нашите изследвания показаха, че язовир Студен кладенец има относително слабо разнообразие на фитопланктон и стабилен таксономичен състав. Прави впечатление разликата в таксономичния състав

при стената на язовира и в неговата опасна част. Зелените водорасли имат доминираща роля за летния фитопланктон, а групата на цианопрокариотите бе относително бедна по отношение на видов състав (5 %–12 % през 2008, Фиг. 2А и 4 %–16 % през 2009, Фиг. 2Б). През 2008 г. общата плътност на цианопрокариотите в опасната част на язовир Студен кладенец варираше в границите от 1.04×10^6 клетки/L през август до 0.60×10^6 клетки/L през септември, и обща биомаса от 0.19 mg/L през август до 0.1 mg/L през септември (Таблица 3а). При стената (Таблица 3б). стойностите на общата плътност бяха 0.07×10^6 клетки/L през август и 0.08×10^6 клетки/L през септември, а общата биомаса съответно 0.007 mg/L през август до 0.01 mg/L през септември, което е значително по-ниско от тези отчетени в опаската.



Фигура 2. Относителна честота на фитопланктона (%) в повърхностния слой на язовир Студен кладенец през 2008 г. (А) и 2009 г. (Б).

Изследване на качествения и количествен състав на
синьо-зелените водорасли (*Cyanoprokaryota*)...

Таблица 2. Видов състав и количествена характеристика
на *Cyanoprokaryota* в язовир Студен кладенец –
опашка (а) и стена (б) през 2008 г.

Месеци	Видове (2008 – опашка /а/)	Плътност (10 ⁶ кл/L)	Биомаса (mg/L)	Обща плътност (кл/L)	Обща биомаса (mg/L)
юли	-	-	-		
август	<i>Anabaena solitaria</i> Klebahn <i>Oscillatoria limnetica</i> Lemm. <i>Phormidium sp.</i>	880 500 110 000 54 000	0, 18 0,01 -	1 044 500	0, 19
септември	<i>Anabaena solitaria</i> Klebahn <i>Phormidium sp.</i>	460 500 115 800	0, 1 -	576 300	0, 1

Месеци	Видове (2008 – стена /б/)	Плътност (10 ⁶ кл/L)	Биомаса (mg/L)	Обща плътност (кл/L)	Обща биомаса (mg/L)
юли	-	-	-	-	-
август	<i>Oscillatoria mougeotii</i> (Kütz.) Forti	65 000	0,007	65 000	0,007
септември	<i>Anabaena sp.</i> <i>Chroococcus disperses</i> (Keissler) Lemmermann <i>Spirulina major</i> (Kützing) Gomont	34 000 21 600 24 800	0,005 0,002 0,003	80 400	0,01

През 2009 г. стойностите на общата плътност на цианопрокариотите в опашната част на язовир Студен кладенец варираше в границите от 1.21x10⁶ клетки/L през септември, 1.9x10⁶ клетки/L през август до

0.64x10⁶ клетки/L през юли, и обща биомаса от 0.094 mg/L през юли и 0.76 mg/L през август до 0.45 mg/L през септември (Таблица 3а). При стената (Таблица 3б) стойностите на общата плътност бяха 0.37x10⁶ клетки/L през юли, 0.009 x10⁶ клетки/L през август, и 0.06x10⁶ клетки/L през септември, а общата биомаса съответно 0.021 mg/L през юли, 0.011 mg/L през август и 0.033 mg/L през септември, което е значително по-ниско от тези, отчетени в опашката (Таблица 3а). И през 2008 и през 2009 година се отчитат по-високи стойности на двата показателя в опашната част на язовира в сравнение със стената.

Прави впечатление бедния видо-състав на отдел Cyanoprokaryota през летните месеци на 2008 година. В опашната част на язовира са установени 3 цианопрокаротионни вида (Таблица 2а, Таблица 4) – *Anabaena solitaria*, отнасяща се към функционална група Н1, *Oscillatoria limnetica* към S1 и *Phormidium sp.*, които са потенциално токсични видове. И през месец август и през месец септември *Anabaena solitaria* е с цъфтежна концентрация, съответно 0.18 mg/L и 0.1 mg/L.

Таблица 3. Видов състав и количествена характеристика на Cyanoprokaryota в язовир Студен кладанец – опашка (а) и стена (б) през 2009 г.

месеци	Видове (2009 – опашка /а/)	Плътност (10 ⁶ кл/L)	Биомаса (mg/L)	Обща плътност (кл/L)	Обща биомаса (mg/L)
юли	<i>Anabaena scheremetievi</i> Elenk.	222 525	0.089	640 485	0.094
	<i>Pseudanabaena catenata</i> Laut.	417 960	0.005		
август	<i>Anabaena scheremetievi</i> Elenk.	1 857 600	0.743	1 979 720	0.761
	<i>Anabaena variabilis</i> Kütz.	единични клетки	-		
	<i>Pseudanabaena catenata</i> Laut.	122 120	0.018		
септември	<i>Anabaena scheremetievi</i> Elenk.	1 083 600	0.433	1 219 050	0.453
	<i>Anabaena variabilis</i> Kütz.	единични клетки	-		
	<i>Pseudanabaena catenata</i> Laut.	135 450	0.020		

Изследване на качествения и количествен състав на
синьо-зелените водорасли (Cyanoprokaryota)...

месеци	Видове (2009 – стена /б/)	Плътност (10 ⁶ кл/Л)	Биомаса (mg/L)	Обща плътност (кл/Л)	Обща биомаса (mg/L)
юли	<i>Anabaena affinis</i> Lemm.	единични клетки	-	369 500	0.021
	<i>Chroococcus minutus</i> (Kütz.) Näg.	174 900	0.02		
	<i>Lyngbya hieronymusii</i> Lemm..	единични клетки	-		
	<i>Oscillatoria annae</i> van Goor	единични клетки	-		
	<i>Pseudanabaena catenata</i> Lauterb.	единични клетки	-		
	<i>Synechococcus elongatus</i> (Näg.) Näg.	78 000	-		
	<i>Synechocystis parvula</i> Perf.	116 600	0.001		
август	<i>Anabaena affinis</i> Lemm.	3 225	0.01	9 038	0.011
	<i>Chroococcus minutus</i> (Kütz.) Näg.	5 805	0.001		
	<i>Microcystis aeruginosa</i> (Kütz.) Kütz.	единични клетки	-		
	<i>Pseudanabaena catenata</i> Lauterb.	7 095	0.001		
септември	<i>Anabaena affinis</i> Lemm.	38 808	0.01	57 190	0.033
	<i>Anabaena scheremetievi</i> Elenk.	6 128	0.02		
	<i>Microcystis aeruginosa</i> (Kütz.) Kütz.	6 128	0.001		
	<i>Pseudanabaena catenata</i> Lauterb.	12 255	0.002		

Четири са представителите на Суанопрокариота установени във водните проби от стената на язовира за месеците август и септември на 2008 година (Таблица 2б, Таблица 4). Това са *Oscillatoria mougeotii*, *Anabaena sp.*, *Chroococcus disperses*, принадлежащ към функционална група L₀, и *Spirulina major*. Нито един от четирите вида не достига цъфтежна концентрация. Най-добре е представен установения единствено през август вид *Oscillatoria mougeotii* (0.007 mg/L). През септември най-застъпен е *Anabaena sp.* (0.005 mg/L). Въпреки че не достигат цъфтежна концентрация и двата вида са потенциални кандидати за продуценти на токсини.

През летния период на 2009 година отдел Суанопрокариота е представен с 10 вида принадлежащи на родовете *Anabaena*, *Pseudoanabaena*, *Lyngbya*, *Oscillatoria*, *Microcystis*, *Chroococcus* и *Synechococcus*.

В опасната част на язовира отделът е представен само с три вида: *Anabaena scheremetievi*, отнасяща се към функционална група K1, *Anabaena variabilis* и *Pseudoanabaena catenata* – функционална група MP. През август и септември *Anabaena scheremetievi* е в цъфтежна концентрация съответно 0.743 mg/L и 0.433mg/L, което я прави и потенциален продуцент на токсини. Запазва се наблюдаваната през 2008 година тенденция видовият състав отчетен при стената да е по-богат в сравнение с опасната част за сметка на плътността и биомасата. При стената на язовир Студен кладенец за целия изследователски период на 2009 година (юли, август и септември) бяха отчетени общо 7 цианопрокариотни вида (Таблица 3б). *Microcystis aeruginosa* (функционална група L_M) присъстваше през август и септември заедно с *Anabaena affinis* (функционална група H1) и *Pseudoanabaena catenata* (функционална група MP), както и *Anabaena scheremetievi* (функционална група K1) през септември. Тези три вида са също добри кандидати за производство на токсини. С относително високи стойности на плътност и биомаса за месец юли се отличават видовете *Chroococcus minutus* (функционална група -L₀) и *Synechocystis parvula*.

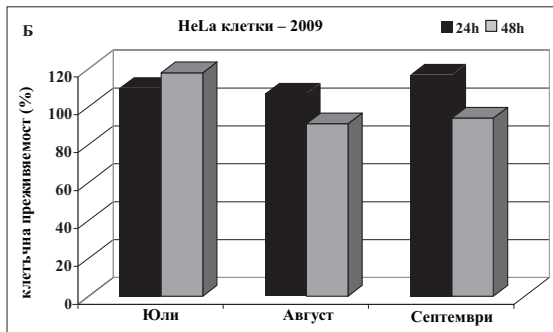
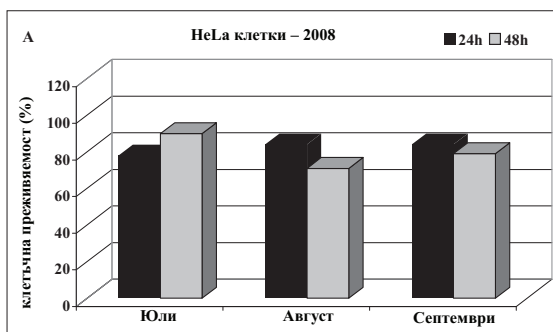
Повече подробности, свързани с видовия състав и количествените характеристики на Суанопрокариота са посочени в Таблицы 2, 3 и 4.

3. Токсичност на водните проби *in vitro*

За отчитане на цитотоксичната активност на водните проби, колекционирани през целия период на изследването, бе използвана човешка

цервикална епителна аденокарциномна клетъчна линия (HeLa). Клетките реагираха по различен начин на третирането с 10 % водни проби в зависимост от времето на експозиция и периода на пробовземането.

При пробите, колекционирани през **2008 година**, клетъчната преживяемост бе засегната още на 24 час след третирането на клетките. Отчетеният за целия период на изследване цитотоксичен ефект бе относително слаб, движещ се като стойности в границите 16 %–22 % (Фиг. 3А). Пряко пропорционална зависимост на токсичния ефект от времето на експозиция бе отчетен за месеците август и септември 2008 година, където клетъчната преживяемост бе понижена от 84 % (за 24 час) на 71 % (за 48 час) през август и от 84 % (за 24 час) на 79 % (за 48 час) за септември. Обратна бе зависимостта, отчетена през юли, когато на 48 час се наблюдава лек стимулиращ ефект на водните проби върху клетъч-



Фигура 3. Цитотоксичен ефект на водните проби (А – 2008 г., Б – 2009 г.) върху клетки *in vitro*.

ната преживяемост в рамките на 12 %. Токсичният ефект оказван от 10 % -ните водни проби върху HeLa клетките отчетен след 48 часова експозиция бе сравнително слаб и се движеше в рамките 10 % (юли) – 29 % (август).

Данните за **2009 година** (Фиг. 3Б) показват липса на токсичен ефект след 24 часова третиране на клетките с водна проба за целия изследователски период (юли, август и септември) като през

септември се отчита дори лек стимулиращ ефект (10 %). Тази тенденция се запазва и през юли при 48 часова експозиция на клетките. През август и септември обаче, след 48 часова експозиция, се отчита намалена клетъчна преживяемост и токсичен ефект на водните проби, чиито стойности са съответно 20 % за август и 15 % за септември.

4. Анализ на водните проби за присъствие на цианотоксини

Колекционираните водни проби бяха тествани за наличие на цианотоксини чрез използването на два метода – HPLC и ELISA.

4.1. HPLC метод

Анализът чрез HPLC показва наличие на различни изомерни форми на микроцистин във водните проби, колекционирани през целия изследователски период на 2008 година (юли, август и септември), както и в пробите събрани през юли, август и септември 2009 г. при стената на язовир Студен кладенец и пробата колекционирана в опасната част на язовира през септември на 2009 г. (Таблица 5). В останалите водни проби не бяха детектирани пикове, съответстващи на изследваните цианотоксини. Сакситоксини и нодуларини не бяха отчетени в нито една проба от 2008 година. Не така стоят нещата обаче за пробите колекционирани през 2009 година. При всички проби бяха отчетени нодуларини, а в тези от опасната част на язовира, събрани през юли и август, както и в проба от стената на Студен кладенец през септември HPLC – диаграмите показват и наличие на сакситоксини (Таблица 5 и Фиг. 4). На Фигура 4А е представена HPLC хроматограмата на стандартите, където са включени сакситоксини, нодуларини и микроцистин-LR. От установените през 2008 година цианопрокариотни видове през съответните периоди на колекциониране, най-вероятни продуценти на детектираните микроцистини са *Anabaena solitaria*, *Oscillatoria limnetica*, *Oscillatoria mougeotii* и *Phormidium* sp.

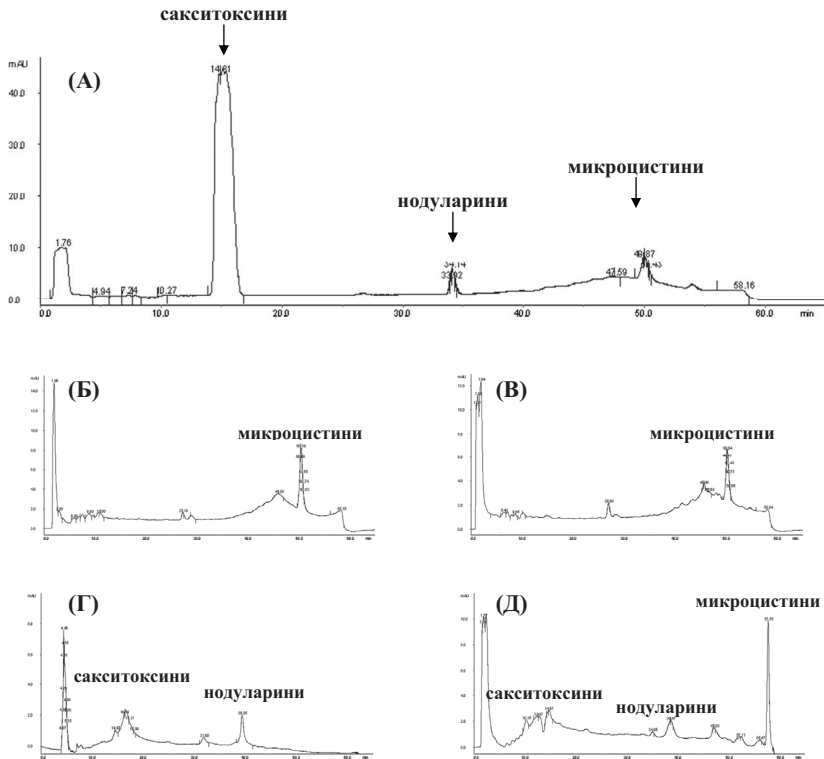
Таблица 5. *Наличие на микроцистини, нодуларини и сакситоксини във водните проби колекционирани през 2008 и 2009 година и тествани чрез HPLC*

<i>проба – 2008 г</i>	<i>сакситоксини</i>	<i>нодуларини</i>	<i>микроцистини</i>
юли – стена	-	-	+
юли – опашка	-	-	+
август – стена	-	-	+
август – опашка	-	-	+
септември – стена	-	-	+
септември – опашка	-	-	+
<i>проба – 2009 г</i>	<i>сакситоксини</i>	<i>нодуларини</i>	<i>микроцистини</i>
юли – стена	-	+	+
юли – опашка	+	+	-
август – стена	-	+	+
август – опашка	+	+	-
септември – стена	+	+	+
септември – опашка	-	+	+

С (+) означаваме наличие на съответната група токсини в пробата, а с (-) отсъствие на тези токсини в пробата

Детектираните пикове, съответстващи на микроцистини, нодуларини и сакситоксини във водните проба от опашката на язовира колекционирани през 2009 г. вероятно се дължат на присъствието на *Anabaena scheremetievi* (в цъфтежни концентрации през август и септември) и *Pseudoanabaena catenata* през този период.

Наличието на хепатотоксини в пробите от стената на язовира както и детектирания пик, съответстващ на сакситоксини в септемврийската проба се дължи на добре представените през 2009 година като количествено отношение цианопрокаримоти видове от родовете *Anabaena*, *Lyngbya*, *Oscillatoria*, *Pseudoanabaena* и многократно доказания като продуцент на цианотоксини *Microcystis aeruginosa*.

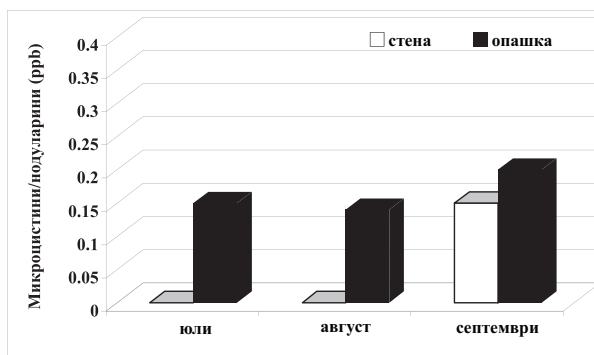


Фигура 4. HPLC хроматограма на (А) стандарти на цианотоксини, (Б) водна проба, колекционирана през август 2008 г. от опасната част на язовира, (В) водна проба, колекционирана през септември 2008 г. при стената на язовир Студен кладенец, (Г) водна проба, колекционирана през август 2009 г. от опасната част на язовира и (Д) водна проба, колекционирана през септември 2009 г. при стената на язовир Студен кладенец.

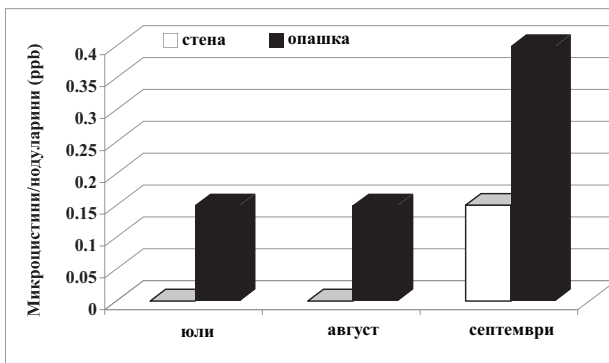
4.2. ELISA метод

Проведените ELISA тестове на колекционираните водни проби за наличие на микроцистини/нодуларини показаха присъствие на тези токсини в пробите, събрани в опасната част на язовира за целия из-

следователски период на 2008 и 2009, както и в пробите колекционирани при стената на Студен кладенец през септември на 2008 и 2009 г. (Фиг. 5 и Фиг. 6). Тези данни потвърждават отчетените нива на микроцистини и нодуларини в същите проби чрез HPLC метода. Чрез ELISA метода не бяха детектирани сакситоксини във водните проби от 2009 година, за които бяха отчетени малки пикове чрез HPLC метода, което може да бъде обяснено с това, че концентрацията им в тази проба е под границата на детекция на ELISA кита – 0.10 ppb.



Фигура 5. Наличие на микроцистини/нодуларини (ppb) във водните проби, колекционирани през 2008 г. и тествани чрез ELISA китове.

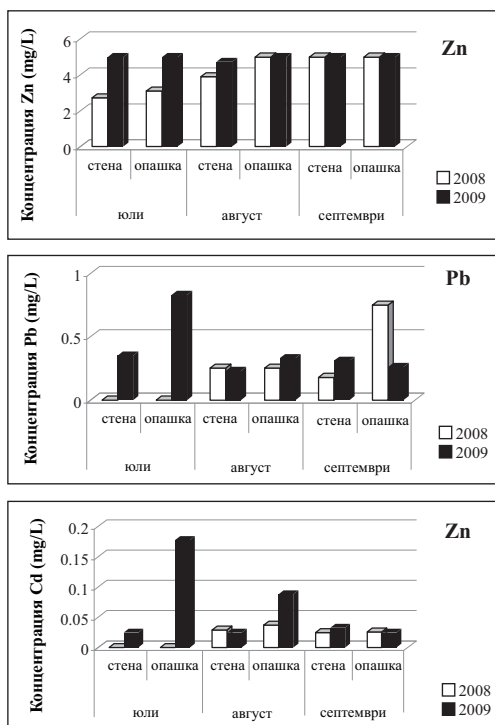


Фигура 6. Наличие на микроцистини/нодуларини (ppb) във водните проби, колекционирани през 2009 г. и тествани чрез ELISA китове.

5. Анализ на водните проби за присъствие на тежки метали

Замърсяването с тежки метали е важен аспект от повечето програми за оценяване и мониторинг качеството на водите. Глобалната мониторингова система (GEMS – Global Environment Monitoring System) включва 10 метали – Al, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Zn.

В настоящето изследване, водните проби, колекционирани от язовир Студен кладенец през 2008 и 2009 г. бяха тествани за съдържание на 5 от тези метали – цинк (Zn), олово (Pb), манган (Mn), мед (Cu) и кадмий (Cd). Резултатите са представени на Фиг.7.



Фигура 7. Съдържание на тежки метали (Zn, Pb, Cd) във водните проби, колекционирани през 2008 и 2009 г.

От фигурата се вижда, че в повърхностните води на язовир Студен кладенец, концентрациите на цинка са най-високи, като варират от 2.73 mg/L до максимума на детекция на кита – 5mg/L (през 2008 г.) и от 4.74 mg/L до 5mg/L (през 2009 г.). Съдържанието на олово варира в границите от 0.18-0.75 mg/L през 2008 година и от 0.26-0.83 mg/L през 2009 година, а кадмия от 0.025 mg/L (лимита на детекция на кита) до 0.037 mg/L през 2008 г. и достига до 0.178 mg/L през 2009 г.

При теста за наличие на мед (Cu) отчетените стойности за всички проби бяха под лимита на детекция на кита <0.04mg/L. Имайки предвид, че минимално допустимата стойност за питейна вода при

този метал е 2 mg/L приемаме така отчетените количества мед като нищожно малки и непредставляващи заплаха за флората, фауната и човека. По подобен начин стоят нещата и с концентрациите манган (Mn) отчетени във водните проби от повърхностните води на язовир Студен кладенец. Стойностите на този метал в различните водни проби варират между 0.02 mg/L и 0.17 mg/L, далеч под минимално допустима стойност на този метал за питейна вода 0.4 mg/L.

Въпреки, че няма определени максимално допустими норми за цинка (WHO, 2003b), тъй като токсикологичните данни са противоречиви, концентрации по-високи от 3 mg/L се смятат за рискови.

Според Директива 2006/44/ЕО на Европейския парламент и на Съвета относно качеството на сладките води които се нуждаят от опазване или подобряване с цел да бъдат годни за живот на рибите, допустимите норми за цинка са в границите 0.3 mg/L–2 mg/L, които стойности са доста под отчетените стойности на метала във водните проби от язовира.

Тревожни са данните за съдържание на олово във водата на язовир Студен кладенец. Детектираните количества (0.18–0.75 mg/L през 2008 година и от 0.26–0.83 mg/L през 2009 година) са в пъти над максимално допустимата концентрация от 0.02 mg/L определена с Наредба 11 от 25. 02. 2002 година за качество на водите за къпане, издадена от министъра на здравеопазването и министъра на околната среда и водите. Оловото обикновено се натрупва в костите, като основните рискови групи са бременните жени и децата до 6 години, а токсичните ефекти засягат най-вече нервната система. Освен това, този метал се акумулира в тъканите на живите организми, обитаващи съответните водни басейни и може да се предава по хранителната верига.

Отчетените от нас концентрации на кадмий от 0.025 mg/L (лимита на детекция на кита) до 0.037 mg/L през 2008 г., достигачи до 0.178 mg/L през 2009 година също в някои от пробите многократно надвишават максимално допустимата стойност от 0.005 mg/L, определена от Наредба 11 и Наредбата за стандарти за качество на околната среда от 09. 11. 2010 година.

Концентрациите на другите тествани тежки метали (манган и мед) са под съответните критични норми.

ОБСЪЖДАНЕ

В настоящата работа е изследван качествения и количествен състав на фитопланктона в язовир Студен кладенец, присъствието на цианотоксини и тежки метали, показатели, които са от изключително значение за качеството на водата. Въпреки, че токсичните водораслови видове са обект на интензивни изследвания в световен мащаб, микроводорасловата токсичност е все още слабо изследвана в България. Токсикогенни видове се срещат сред *Dynophyta*, *Chrysophyta* и най-вече *Cyanoprokaryota* (синьо-зелени водорасли). Представители на тези таксономични групи са често срещани в българските водоеми, включително тези, използвани за питейна вода. Освен това, в съответствие с изискванията на Европейския съюз (ЕС) трябва да се установи състоянието на различните водни басейни в рамките на Европейския съюз (ЕС, 2000).

Таксономичният състав, обилието и биомасата на фитопланктона са основните нормативно дефинирани показатели, използвани в мониторинга и оценката на качеството на водите. По отношение на таксономичния състав в настоящото изследване бе отчетено съотношението на главните таксономичните групи водорасли в язовир Студен кладенец за летния период на 2008 и 2009 година (Фиг. 5А и 5Б) и бе изготвен инвентаризационен списък на видовете *Cyanoprokaryota*, който бе използван за оценка на цианопрокариотното видово богатство (Таблица 2 и Таблица 3). Определени бяха потенциалните продуценти на токсини като едновременно с това се приложи концепцията на Reynolds (1997) за фитопланктонните функционални групи, които могат потенциално да доминират или съвместно да доминират в определена среда (Reynolds et al., 2002). В опасната част на язовира, идентифицираните 6 цианопрокариотни вида бяха отнесени към 4 функционални групи, а именно: N1, S1, K1 и MP. При стената на язовира, където видовото разнообразие бе по-голямо, представителите на *Cyanoprokaryota* (11 на брой) бяха отнесени към следните функционални групи: L₀, L_M, N1, MP и K1 (Таблица 4). Биомасата на фитопланктона е основния критерий за оценка на трофичното състояние на водоемите. Затова наред с качествения бе извършен и количествен

анализ на отдел *Cyanoprokaryota* в язовир Студен кладенец, което пък от своя страна ни позволи да определим „цъфтежите“ на фитопланктона. Те представляват свръхконцентрации на фитопланктона и са индикатор за екологичен дисбаланс във водоемите. По тази причина е важно да се регистрират тяхната честота, интензивност и продължителност. Цъфтеж на представители на отдел *Cyanoprokaryota* в изследвания язовир бе отчетен през месеците август и септември 2009 година. Цъфтежна концентрация в опасната част на язовир Студен кладенец през този период бе установена за потенциално токсичния вид *Anabaena scheremetievi*. Токсичността на този цианопрокариотен „цъфтеж“ в следствие бе потвърдена от отчетените през този период с ELISA метода завишени стойности на хепатотоксините микроцистини и нодуларини (0.2–0.4 ppb) (Фиг. 6), които бяха детектирани и с помощта на HPLC метода (Таблица 5 и Фиг. 4). При тези водни проби бе отчетен и 20 % цитотоксичен ефект върху HeLa клетки.

Като инструмент за бърза оценка на екологичното състояние и качеството на водите по фитопланктона напоследък в европейските страни бяха разработени редица екологични индекси (напр. TSI: Carlson, 1977; Barbe индекс: Philippe et al. 2003; Iga or Catalàn индекс: Agència Catalana de l'Aigua 2003; Brettum индекс: Dokulil et al., 2005; MedPTI: Marchetto et al., 2009 и др.).

В настоящата работа, на базата на усреднени за 2009 година физикохимични данни за прозрачност на водата (Секки диск), количеството общ хлорофил-*a* и обща биомаса, както и количествата отчетен общ азот (TN) и общ фосфор (TP) и тяхното отношение TN/TP, бе определен трофичния статус на язовир Студен кладенец и бе изчислен TSI индекса (Carlson, 1977) и Catalan индекса за летния период на 2009 година.

Стойностите на TSI индекса (50), количеството хлорофил (2.44 mg/L), общата биомаса (1.16) и съотношението TN/TP (66) и Catalan индекса (1.04) говорят за преход от мезотрофичност към еутрофичност на водния басейн и лимитиране на фосфора на ниво съобщества.

Като система за дългосрочни наблюдения на състоянието на езерата (язовирите), екологичният мониторинг се разглежда преди всичко като мониторинг на тяхната еутрофизация (Трифенова, 1988).

Екологичната значимост на фитопланктонното съобщество в системата на мониторинга се определя от това, че показателите за неговата продуктивност са едновременно показатели за трофичния статус на езерото (язовира). Измененията в езерните екосистеми, свързани с процеса на еутрофизация се отразяват първо на съобществото на автотрофните организми, които са началното звено в хранителната верига. По принцип, в езерата (язовирите) фитопланктонът е основен продуцент на органични вещества, а главният фактор, който определя еутрофизацията е повишаване нивото на биогенните елементи (Vollenweider & Kerekes, 1980).

Особено ярко процесите на еволюция към ускорена еутрофизация се наблюдават при изкуствените езера – язовирите. „Продължителността на живота“ на изкуствените езера е непосредствено свързана със степента на антропогенна намеса в жизнените процеси на езерната екосистема чрез регулирането на водните маси и качеството на заустваните води (Узунов & Ковачев, 2002).

Основната причина за поява на цианопрокариотни цъфтежи във водните басейни е еутрофикацията (Conley et al., 2009). Фитопланктонното разнообразие и биомасата са свързани със светлината, рН, температура, смесване и флукуационни колебания на водата, но най-вече зависят от концентрацията на хранителни вещества като общ азот и общ фосфор (Albay & Akcaalan, 2003; Sun et al., 2009).

Нашите данни показват някои различия между изследваните периоди по отношение на фитопланктонна плътност и биомаса (Таблицы 2 и 3), както и факторите на околната среда (Таблица 1). Температурата на повърхностните води на язовир Студен кладенец е с 1–1.5° С висока през месец юли в сравнение с останалите месеци. През 2008 година като цяло съотношението TN/TP се движеше в 2.5–5, което говори за лимитиране на азота, а през 2009 година то достигна стойност от 145 в опасната част на язовира през месец юли, което е признак за лимитиране на фосфора. Данните от физикохимичните изследвания, изследванията на структурата на фитопланктонния състав и токсикологичните изследвания проведени през месеците юли, август и септември на 2008 и 2009 година сочат, че опасната част на язовир „Студен кладенец“ е по-еутрофизирания пункт в сравнение със сте-

ната. Очевидно там има вливане на отпадни води, които натоварват пункта както с биогенни елементи, така и с органични вещества. С цел ограничаване на по-нататъчното органично и биогенно натоварване на опасната част на язовир „Студен кладенец“, е необходимо да се повиши контрола и изискванията към качеството на заустваните в този пункт води.

Въпреки, че детектираните концентрации на цианотоксините са по-ниски от допустимите нива (1 µg/L), налице е необходимостта от мониторингови програми на Суанорпрокагуота и продуцираните от тях токсини, особено във водни басейни, които се използват за питайна вода, отдих и/или рибовъдство.

Нормално, във всички сладководни басейни винаги присъстват следи от метали, които постъпват във водата чрез отмиване на скали и соли. Допълнителни източници на замърсяване на водните басейни с метали в развитите страни са индустриалните отпадни води, които могат да причинят сериозни екологични и здравни проблеми.

Наличието на някои метали в ниски концентрации (като манган, цинк, мед) е от изключително значение за физиологичните функции на живите организми, както и за регулиране на много биохимични процеси. Наличието на същите тези метали в повишени концентрации във водните басейни могат да имат сериозни токсикологични ефекти върху хората и водните екосистеми. Замърсяването на водите с тежки метали в резултат на различни човешки дейности предизвикват сериозни екологични проблеми в много райони на света, тъй като липсва естествен процес за елиминиране на тези метали и те могат да се трансферират по хранителните вериги. Токсичността на металите във водоемите зависи от степента на окисление на дадения метален йон, както и от формите, в които са представени (напълно разтворени, частично разтворени или колоидни).

Отчетените завишени концентрации на цинк, олово и кадмий във водата на язовир Студен кладенец представляват заплаха както за водната екосистема, така и за хората, избрали това място за почивка или риболов. Предполага се, че замърсяванията идват основно от „Олово-цинков комплекс“ гр. Кърджали, нерегламентирани сметища с битови и медицински отпадъци по коритата на реките, които се вливат в

язовира. Друг възможен източник на замърсяване с олово е масовото използване на този метал за нуждите на риболова като «тежести».

Всички тези данни, показват, че е необходим непрекъснат контрол и мониторинг на качеството на водите и своевременна информираност за възможните рискове, както за водните екосистеми, така и за здравето на човека.

След обобщаване на резултатите от проведеното изследване можем да направим няколко по-важни извода:

1. Язовир Студен кладанец има стабилен таксономичен състав и относително слабо разнообразие на фитопланктона.

2. Зелените водорасли имат доминираща роля за летния фитопланктон, а групата на цианопроکاریотите е относително бедна по отношение на видов състав.

3. Потенциално токсичните цианопроکاریотни видове *Anabaena solitaria*, *Phormidium sp.*, *Anabaena scheremetievi*, *Microcystis aeruginosa*, *Pseudoanabaena catenata* и представителите на род *Oscillatoria* представени във фитопланктона през целия период на изследването, са най-вероятните продуценти на отчетените чрез HPLC и ELISA хепатотоксини.

4. Детектираните количества цинк, олово и кадмий във водата на язовир Студен кладанец са много над максимално допустимите концентрации от Световната здравна организация и нормативните документи за качество на водите за къпане, отдих и риболов.

5. Изследването демонстрира необходимостта от мониторингови програми на Cyanoprokaryota и продуцираните от тях токсини, особено във водни басейни, които се използват за напояване, отдих и/или рибовъдство, както и своевременна информираност за възможните рискове за водните екосистеми и здравето на човека.

ЛИТЕРАТУРА

Директива 2006/44/ЕС НА ЕВРОПЕЙСКИЯ ПАРЛАМЕНТ И НА СЪВЕТА от 6 септември 2006 година относно качеството на сладките води, които се нуждаят от опазване или подобряване с цел да бъдат годни за живота на рибите, Официален вестник на европейския съюз, L264/20

НАРЕДБА № 11 от 25. 02. 2002 г. за качеството на водите за къпане издадена от министъра на здравеопазването и министъра на околната среда и водите, обн., ДВ, бр. 25 от 8. 03. 2002 г.

НАРЕДБА ЗА СТАНДАРТИ ЗА КАЧЕСТВО НА ОКОЛНАТА СРЕДА ЗА ПРИОРИТЕТНИ ВЕЩЕСТВА И НЯКОИ ДРУГИ ЗАМЪРСИТЕЛИ. В сила от 09. 11. 2010 г. Приета с ПМС № 256 от 01.11.2010 г. Обн. ДВ. бр. 88 от 9 Ноември 2010 г.

Трифорова И. С., Алябина Г. А., Воронцов Ф. Ф., Воронцова Н. К., Драбкова В. Г. 1988. Методическите аспекти лимнологического мониторинга. – Л.: Наука, 180 с.

Узунов Й. & С. Ковачев. 2002. Хидробиология. Pensoft, София-Москва, 342 с.

Agència Catalana de l'Aigua. 2003. Desenvolupament d'un índex integral de qualitat ecològica i regionalització ambiental dels sistemes loacustres de Catalunya. Generalitat de Catalunya, Departament de Medi Ambient i Habitatge.

Albay M. & R. Akcaalan. 2003. Factors influencing the phytoplankton steady state assemblages in a drinking-water reservoir (Ömerli reservoir, Istanbul), *Hydrobiologia*, 502: 85–95.

Belkinova D., Mladenov R., Dimitrova-Dyulgerova I., Cheshmezhiev S., Angelova I. 2007. Phytoplankton Research in Kurdzhali Reservoir. *Phytologia Balcanica* (Sofia), 13 (1): 47-52.

Berg T., Boman D., Selgen P. O. 1972. Induktion of tryptophan oxygenase in primary rat liver cell suspensions by glucocorticoid hormone. *Exp. Cell Res.* 72, 571–574.

Beshkova M. B. 2000. The Phytoplankton of the Glacial High Mountain Lakes Sedemte Rilski Ezera (the Rila Mountains, Bulgaria). In: Golemansky V., Naidenow W., eds. *Biodiversity and evolution of glacial water ecosystems in the Rila Mountains*. „Prof. Marin Drinov“ Academic Publishing House, Sofia: 105–124.

Beshkova M., Salz D., 2006. Phytoplankton of the Yasna Polyana Reservoir (Southeastern Bulgaria). *Phytologia Balcanica*, 12(1): 37–46.

Beshkova M. B., Kalchev R., Botev I. 2007. Bulgarian water reservoirs: Phytoplankton and related physical and chemical factors. *Journal of Balkan ecology*, 10: 13–28.

Carlson R. E. 1977. A trophic state index for lakes. *Limnol. and Oceanog.* 22(2): 36–369.

Conley D. J., Paerl H. W., Howarth R. W., Boesch D. F., Seitzinger S. P., Havens K. E., et al. 2009. Ecology. Controlling eutrophication: nitrogen and phosphorus, *Science*, 323: 1014–1015.

Dokulil M. T., Teubner K., Greisberger M. 2005. Typenspezifische Referenzbedingungen für die integrierende Bewertung des ökologischen Zustandes stehender Gewässer Österreichs gemäß der EU-Wasserrahmenrichtlinie. Modul 1: Die Bewertung der Phytoplanktonstruktur nach dem Brettum-Index. Projektstudie Phase 3, Abschlussbericht. Unpublished report, Bundesministerium für Landund Forstwirtschaft, Umwelt und Wasserwirtschaft, Wien.

EC. 2000. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy, Off. J. Eur. Communities, L375: 1–8.

Edmondson J. M., Armstrong L. S., Martinez A. O. 1988. A rapid and simple MTT-based spectrophotometric assay for determining drup sensitivity in monolayer cultures. *J. Tissue Cult. Meth.* 11: 15–17.

Falconer I. 1999. An Overview of problems caused by toxic blue-green algae (Cyanobacteria) in drinking and recreational water. *Environ. Toxicol.*, 14(1): 5-12.

Invitox: The Ergatt/Frame., 1990. The frame cytotoxicity test. Protocol 3b.

Invitox: The Ergatt/Frame., 1992. DataBank of *in vitro* techniques in toxicology. Protocol 46.

Jochimsen E. M., Carmichael W. W., An J. S., Cardo D. M., Cookson S. T., Holmes C. E., Antunes M.B., de Melo Filho D. A., Lyra T. M., Barreto V. S., Azevedo S. M., Jarvis W.R. 1998. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *N. Engl. J. Med.*, 338(13): 873–878.

Kalchev R. & I. Botev. 2005. Phosphorus and Nitrogen Limitation of Phytoplankton Related to Their Gradients in Water Reservoirs. *Journal of Balkan Ecology*, 8(1): 61–66.

Kalchev R. K., Botev I., Hristozova M., Naidenow W., Raikova-Petrova G., Stoyneva M., Temniskova-Topalova D., Trichkova T. 2004. Ecological Relations and Temporal Changes in the pelagial of the high Mountain Lakes in the Rila Mountains (Bulgaria). *Journal of Limnology*, 63 (1): 90–100.

Kalchev R. K., Pehlivanov L. Z., Beshkova M. B. 2002. Trophic relations in two lakes from the Bulgarian Black Sea coast and possibilities for their restoration. *Water Science and Technology*, 46(8): 1–8.

Kuiper-Goodman T., Falconer I., Fitzgerald J. 1999. Human health aspects. In *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring, and Management* (Chorus, I. & Bartram, J., eds), pp. 113.153. E & FN Spoon, London.

Lund J. W. G., Kipling C., Le Cren E.D. 1958. The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting, *Hydrobiologia*, 11: 143–170.

Marchetto M.C., Yeo G.W., Kainohana O., Marsala M., Gage F. H., Muotri A. R. 2009. Transcriptional signature and memory retention of human-induced pluripotent stem cells. *PLoS ONE* 4, pp: 70–76.

Mussagy A., Annadotter H., Cronberg G., 2006. An experimental study of toxin production in *Arthrospira fusiformis* (Cyanophyceae) isolated from African waters. *Toxicon* 48, 1027–1034.

Naidenow W. Beshkova M. 2000. Quantitative Development and Vertical Distribution of Plankton in Sedemte Ezera Lakes (the Rila Mountains, Bulgaria). In: Golemansky V, Naidenow W, eds. *Biodiversity and evolution of glacial water ecosystems in the Rila Mountains*, „Prof. Marin Drinov“ Academic Publishing House, Sofia: 137-154.

Padisák J., Borics G., Grigorszky I., Soróczki-Pintér É. 2006. Use of phytoplankton assemblages for monitoring ecological status of lakes within the Water Framework Directive: the assemblage index. *Hydrobiologia* 553: 1–14.

Padisák J., Crossetti L. O., Naselli-Flores L. 2009. Use and misuse in the application of the phytoplankton functional classification: a critical review with updates. *Hydrobiologia* 621: 1–19.

Pavlova V., Babica P., Todorova D., Bratanova Z., Marsalek B. 2006. Contamination of some reservoirs and lakes in Republic of Bulgaria by microcystins. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.*, 34: 437–441.

Philippe M., Vey V., Barbe J. 2003. *Actualisation de la méthode de diagnose rapide des plans d'eau. Analyse critique des indexes de qualité des lacs et propositions d'indexes de fonctionnement de l'écosystème lacustre*. Cemagref, Lyon: 106 pp.

Reynolds C. S. 1997. Vegetation process in the pelagic: a model for ecosystem theory. In Kinne O. (ed.), *Excellence in Ecology*. ECI, Oldendorf.

Reynolds C. S., Huszar V., Kruk C., Naselli-Flores L., Melo S., 2002. Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton, *J. Plankton Res.*, 24: 417–428.

Sivonen K. & G. Jones. 1999. Cyanobacterial toxins. In *Toxic Cyanobacteria in Water: (I. Chorus & J. Bartram, eds.)*: 41–111, Who and E & FN Spon, London.

Stoyneva M. P. 1998a. Development of the Phytoplankton of the Shallow Srebarna Lake (North- Eastern Bulgaria) Across the Trophic Gradient. In: Alvarez-Cobelas M, Reynolds CS, Sanchez-Castillo P, Kristiansen J, eds. *Phytoplankton and Trophic Gradients. Hydrobiologia*, 369/370: 259-367.

Stoyneva M. P. 1998b. Algae. In: Michev T, Georgiev B. B., Petrova A.V., Stoyneva M. P., eds., *Biodiversity of the Srebarna Biosphere Reserve. Checklist and bibliography*. Co-publ. Context & Pensoft, Sofia: 10–37.

Stoyneva M.P., Michev T.M. (comp.), 2007. Yazovir Stouden Kladenets. In: Michev T.M., Stoyneva M.P., eds. *Inventory of Bulgarian Wetlands and their Biodiversity. Part I: Non-Lotic Wetlands. IBW1763*, Publishing House Svetlostrouy, Sofia.

Sun L., Jin X. C., Zhong Y., Zhi Y. L., Li H., Zhou Q. X., et al. 2009. Seasonal dynamics of phytoplankton in relation to key aquatic habitat factors in a polluted urban small water body in Tianjin, China, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 82: 543–548.

Teneva I., Belkinova D., Dimitrova-Dyulgerova I., Mladenov R. 2009. Phytoplankton assemblages and monitoring of cyanotoxins in Trakiets reservoir. *Scientific Researches of the Union of Scientists in Bulgaria – Plovdiv, Series B. Natural Sciences and the Humanities, Vol. XII, 244–249. ISSN 1311-9192*

Teneva I., Belkinova D., Dimitrova-Dyulgerova I., Vlaknova M., Mladenov R. 2010a. Composition and toxic potential of Cyanoprokaryota in Vacha Dam (Bulgaria). – *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 24(2SE): 26–32.

Teneva I., Mladenov R., Belkinova D., Dimitrova-Dylgerova I., Dzhambazov B. 2010b. Phytoplankton community of the drinking water supply reservoir Borovitsa (South Bulgaria) with an emphasis on cyanotoxins and water quality. *Cent. Europ. J. Biol.*, 5: 231–239.

Traykov I. 2005. Factors influencing the trophic state of Kurdzhali Reservoir. Ph. D. Thesis, Sofia University „St. Kliment Ohridski“, Sofia (in Bulgarian).

Trifonova I. 1989. Changes in community structure and productivity of phytoplankton as indicators of lake and reservoir eutrophication. In: Talling J. F. et eds. *Proceedings of the International Conference on Reservoir Limnology and Water Quality*, 363–371.

Vollenweider R. A. & J. J. Kerekes. Draft. April, 1980. Synthesis Report. OECD Cooperative Programme On Monitoring Of Inland Waters, (Eutrophication Control). 290 p.

Whitton B. A. & M. Potts. 2000. Ecology of cyanobacteria: Their diversity in time and space. *Kluwer, Dordrecht, Netherlands*.

WHO. 2003b. Zinc in drinking-water. Background document for preparation of WHO Guidelines for drinking-water quality. Geneva, World Health Organization (WHO/SDE/WSH/03.04/17).

STUDY OF THE QUALITATIVE AND QUANTITATIVE COMPOSITION OF THE BLUE-GREEN ALGAE (CYANOPROKARYOTA), PRESENCE OF CYANOTOXINS AND HEAVY METALS IN STUDEN KLADENETS RESERVOIR

*Ivanka Teneva^{*1}, Diyana Basheva²,
Detelina Belkinova¹, Ivanka Dimitrova-Dyulgerova¹,
Rumen Mladenov¹, Balik Dzhabazov²*

*¹Plovdiv University „Paisii Hilendarski“,
Department of Botany*

*²Plovdiv University „Paisii Hilendarski“,
Department of Developmental biology*

**Corresponding author. E-mail: teneva@uni-plovdiv.bg*

Summary

Cyanoprokaryota (cyanobacteria, blue-green algae) are common organisms widely distributed in fresh and salt waters around the world, where, depending from the environmental conditions may develop a mass, leading to the formation of so-called cyanoprokaryotic „blooms“. Reports showed that 70 to 90% of these „blooms“ are toxic. Cyanotoxins can cause serious water pollution and thus become a public health hazard to humans and animals. Many water bodies in Bulgaria are used as a source of drinking water, water for irrigation and fishing. This requires a continuous monitoring of the water quality and pollution, especially for cyanotoxins. Data about the presence of cyanotoxins in the freshwater bodies in Bulgaria, including reservoirs, are limited.

Our study showed that Studen Kladenets reservoir has relatively low diversity of the phytoplankton and stable taxonomic composition. Green algae dominated in the summer phytoplankton and Cyanoprokaryota were relatively poor in terms of species composition. Potentially toxic cyanoprokaryotic species *Anabaena solitaria*, *Phormidium sp.*, *Anabaena scheremetievi*, *Microcystis aeruginosa*, *Pseudoanabaena catenata*, and representatives of the genus *Oscillatoria* found in the phytoplankton during the entire study period, are most likely producers of hepatotoxins detected by HPLC and ELISA. The values of the TSI index (50), the amount of chlorophyll (2.44 mg/L), total biomass (1.16), the ratio TN/TP (66) and the Catalan index (1.04) are indicators for the transition from mesotrophic to eutrophic conditions in the water basin and phosphorus limitation at the community level. Physicochemical data, the structure of the phytoplankton composition and toxicological analyses performed during July, August and September of 2008 and 2009 indicated that the „tail-station“ of the Studen Kladenets reservoir is more eutrophic than the „wall- station“ of the basin. Obviously, there is inflow of wastewater, which load this part with both nutrients and organic substances. Detected elevated concentrations of zinc, lead and cadmium in the water of Studen Kladenets reservoir is a threat to the aquatic ecosystem and the people who have chosen this place for recreation or fishing.