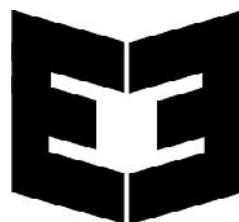


“TERRITORIAL ORGANIZATION
OF SCIENTIFIC AND TECHNICAL
UNIONS
AND HOUSE OF SCIENCE AND
TECHNIQUE –
PLOVDIV”



PROCEEDINGS

of

NATIONAL
SCIENTIFIC CONFERENCE
WITH
INTERNATIONAL
PARTICIPATION

**ECOLOGY AND
HEALTH**

13 - 14 2021

13 – 14 May 2021

Plovdiv

ISSN 2367- 9530

ISSN 2367- 9530

<http://hst.bg/bulgarian/conference.htm>

<http://hst.bg/bulgarian/conference.htm>

Published at:

ORGANIZING COMMITTEE

Chairmen:

Assoc. Prof. Eng. Svetozar Neykov,
PhD

Vice Chairmen:

Prof. Hristo Bozukov, PhD

Members:

Prof. DSc. Krasimir Ivanov
Prof. Zarya Rankova, PhD
Prof. Eng. Yordanka Alexieva, PhD
Prof. Miroslav Mihov, PhD
Prof. Eng. Pavlina Paraskova, PhD
Prof. Hriska Boteva, PhD
Prof. Eng. Tsvetko Prokopov, PhD
Assoc. Prof. Atanaska Teneva PhD
Assoc. Prof. Valentina Petkova, PhD
Assoc. Prof. Veselina Masheva, PhD
Assoc. Prof. Desislava Koleva –
Georgieva, PhD
Assoc. Prof. Petar Chavdarov , PhD
Assoc. Prof. Eng. Snezhana Ivanova,
PhD
Assoc. Prof. Stanislava Harizanovaq DM
Assoc. Prof. Todorka Petrova, PhD
Asoc. Prof. Eng. Hristo Spasov, PhD
Angel Djambov, Phd, DM

PROGRAM COMMITTEE

Chairman:

Prof. Mariana Murdjeva, PhD, DM, MHM

Members:

Prof. Eng. Georgi Somov, PhD
Prof. Mariana Ivanova, PhD
Prof. Eng. Ivan Yanchev, PhD
Assoc. Prof. DSc. Eng. Galin Ivanov

Organizational secretaries:

Master eng. Liliya Zhekova
Master eng. Atanas Kuyumdzhev
Master . Vanya Mladenova

I-

I.1.	EFFECT OF GAMMA IRRADIATION ON IN VITRO REGENERATION OF MELON (CUCUMIS MELO L.)	
	ZHANA IVANOVA, STANISLAVA GROZева	
	IN VITRO	
	(CUCUMIS MELO L.)	
	,
		7
I.2.		
	INFLUENCE OF BENEFICIAL MICROORGANISMS ON THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF SOIL AND WHEAT YIELD	
	VASILINA MANEVA, DINA ATANASOVA, MLADEN NAYDENOV	12
I.3.		
	INFLUENCE OF STIMAC AMINO ACID FERTILIZER ON SOIL AND YIELD FROM CEREALS	
	VASILINA MANEVA, DINA ATANASOVA, MLADEN NAYDENOV	20
I.4.		
	INFLUENCE OF SOWING DATES ON THE PRODUCTIVITY ON MALTING BARLEY IN ORGANIC FARMING	
	DINA ATANASOVA, VASILINA MANEVA	25
I.5.		
	INFLUENCE OF SOWING DATES ON THE PHYTOSANITARY STATUS ON BARLEY IN ORGANIC FARMING	
	DINA ATANASOVA, VASILINA MANEVA	30
I.6.		
	SPREAD AND DIAGNOSTICS OF WHEAT STREAK MOSAIC VIRUS ON WINTER WHEAT IN SOUTHEAST AND CENTRAL BULGARIA	
	DIMITRIYKA SAKALIEVA, LILYANA DRUMEVA	35
I.7.		
	ADAPTATION OF METHOD FOR DETERMINATION OF GLYCEROL IN TOBACCO	
	LILIYA STOYANOVA, DESISLAVA KIRKOVA, MARGARITA DOCHEVA, YOVCHO KOCHEV	40
I.8.		
	HEAVY METALS CONTENT IN ORIENTAL TOBACCO FROM DIFFERENT SUB- AND MICRO REGIONS OF NEVROKOP REGION	
	RADKA BOZHINOVA, VIOLETA NIKOLOVA, NIKOLAY NIKOLOV, SILVIA PEEVA	45

I.9.

PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERISTICS OF ROLL-YOUR-OWN TOBACCO BRANDS		
SILVIA PEEVA, NIKOLAY NIKOLOV, YOVKO DYULGERSKI		52

I.10.

“ “-		
CHARACTERISTICS OF TOBACCO BREEDING ACCESSIONS OF GROUP "BASMI"- COTYPE KRUMOVGRAD AND EAST BALKAN		
MARIA KASHEVA, VESELINA MASHEVA, VELICHKA SPASOVA – APOSTOLOVA		58

I.11.

COVID - 19		
E		
SUSTAINABILITY OF ANIMAL HUSBANDRY AFTER THE COVID - 19 PERIOD		
DESI SLAVA ABADJIEVA		65

II-**II.1.**

NACL		
QUALITY CHARACTERISTICS OF WHITE BRINE CHEESE BRINED IN SOLUTION WITH DIFFERENT CONCENTRATION OF SALT CONTENT		
TATYANA BALABANOVA		69

II.2.

SENSORY PROFILING AND QUALITY EVALUATION OF WHITE BRINED CHEESE		
TATYANA BALABANOVA, STANKO STANKOV		74

II.3.

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF BRINED CHEESES BY PHYSICOCHEMICAL AND ORGANOLEPTIC PARAMETERSAPERS		
PETYA BOYANOVA, TATYANA BALABANOVA		79

II.4.

TEST IN MANUFACTURING CONDITIONS OF ISOLATED AND SELECTED NEW WINE YEAST OF THE DORNFELDER VARIETY		
IVAYLA BAZHLEKOVA, HRISTO SPASOV, NADEZHDA BLAGOEVА, IAVOR TCHOBANOV		85

III-**III.1.**

ANTI-NEURONAL ANTIBODIES IN AUTOIMMUNE ENCEPHALITIS AND MULTIPLE SCLEROSIS		
MILEN HRISTOZOV, RALITSA YORDANOVA - KOZAREVA, MARGARITA PANова, FANI GALABOVA - PETROVA, IVAN IVANOV, GEORGI SLAVOV, PENKA ATANASOVA, MARIANNA MURDJEVA		90

III.2.	()	
NEW ASPECTS OF IMMUNOLOGICAL MONITORING OF MINIMAL RESIDUAL DISEASE IN CHILDHOOD ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA (ALL)	ALEXANDRA BALDZHIEVA, HASAN BURNUSUZOV, HRISTO TASKOV, TEODORA DIMCHEVA, MARIANA MURDJEVA	97
III.3.	,	,
	,	,
MODERN MICROBIOLOGICAL AND MOLECULAR-BIOPHYSICAL SCREENING OF GENITAL INFECTIONS IN SYMPTOMATIC NON-PREGNANT WOMEN	ELI Hristozova, Zoya Rachkovska, Tihamir Dernendzhiev, Marianna Murdjeva, Vida Georgieva, Ekaterina Uchikova, Kostadin Kostadinov	105
III.4.	,	,
	,	,
EVALUATION OF THE EFFECTS OF IONIZING RADIATION USED IN RADIOTHERAPY BY ANALYSIS OF STRUCTURAL CHROMOSOMAL ABERRATIONS	EKATERINA ZAYTSEVA, MARTA DEPERAS, GENNADY MITSYN, ALEXANDR MOLOKANOV, VICTOR GAEVSKY	111
III.5.	,	,
	,	,
INFLUENCE OF BODY WEIGHT ON CLINICAL - ANTHROPOMETRIC, METABOLIC AND HORMONAL PARAMETERS IN WOMEN WITH POLYCYSTIC OVARY SYNDROME	DANIELA KOLEVA-TYUTYUNDZHIEVA, PETIA KONSULOVA, MARIA ILIEVA-GEROVA, MARIA ORBETZOVA	118
III.6.	,	,
	,	,
THE ROLE OF NUTRITION IN DEVELOPING OVERWEIGHT AND OBESITY IN ADOLESCENCE	PETIA KONSULOVA, MARIA ORBETZOVA, DANIELA KOLEVA - TYUTYUNDZHIEVA, NARTZIS KALEVA - HODZHEVA, KIRIL SIMITchiev	126
III.7.	,	,
	,	,
PERSONALIZED NUTRITION AND METABOLIC SYNDROME - LESSONS LEARNED AND FUTURE PERSPECTIVES	MARGARITA TODOROVA, MARIA GORNAKOVA, STANISLAVA HARIZANOVA	133
III.8.	,	,
	,	,
SURVEY OF THE ROLE OF MASS MEDIA, SOCIAL NETWORKS AND LOCAL AUTHORITIES IN ENFORCING HEALTHY HEALTH BEHAVIORS AMONG ADOLESCENTS	NINA MUSURLIEVA, TANYA BOZHKOVA	139

III.9.**COVID-19****DIETARY HABITS AND BODY MASS INDEX OF MEDICAL STUDENTS BEFORE THE COVID-19 PANDEMIC**

MIHAELA HUBENOVA, ELKA TOSEVA, STANISLAVA HARIZANOVA 143

IV-**IV.1.****STUDYING AN ELECTROMAGNETIC HARVESTER WITH A MECHANICAL SYSTEM, CONSISTING OF A SPRING AND A PERMANENT MAGNET**

MARGARITA GEORGIEVA, NIKOLA GEORGIEV 147

IV.2.**STUDY OF PIEZOELECTRIC HARVESTERS**

MARGARITA GEORGIEVA, CONKA SPASOVA, NIKOLA GEORGIEV 151

IV.3.

:

MODULAR CONSTRUCTION FOR HIGH- RISE BUILDINGS: PROSPECTS FOR SUSTAINABLE DEVELOPMENT

RALITSA STAVREVA- PANCHEVA 156

EFFECT OF GAMMA IRRADIATION ON IN VITRO REGENERATION OF MELON (*CUCUMIS MELO* L.)

ZHANA IVANOVA, STANISLAVA GROZева

Maritsa Vegetable Crops Research Institute, 32 Brezovsko Shosse Str., 4003 Plovdiv,

jana-ivanova@abv.bg

Abstract: The main purpose of this study was to establish the most suitable irradiation dose that provides the best regeneration answer in melon cotyledon explants of two lines. Organogenesis and regeneration frequencies were evaluated after irradiation with 10, 20 and 30 Gy gamma rays ^{60}Co . Two melon genotypes were used for experimental work: BG14 - var. cantalupensis, gynoecious type of flowering, and K052 - var. makuwa, andromonoecious type of flowering. Irradiation with the lowest dose of 10 Gy gamma rays ^{60}Co produced the highest percentage of organogenic structures in both genotypes (BG14 – 38,33% and K052 – 31,67%). Similar results were received for the regeneration process, the highest regeneration frequency was reported when the explants were irradiated with the dose of 10 Gy – 18,33% (BG14) and 28,33% (K052). Irradiation with the applied doses did not lead to the death of the explants at an early stage, as in other crops, but rather inhibited the regeneration process. The dose of 30 Gy is lethal and, although it has a positive effect on organogenic processes, leads to the gradual death of callus tissue and formed organogenic structures.

Key words: gamma rays ^{60}Co , mutagenesis, explant, cotyledon, tissue culture

ЕФЕКТ НА ОБЛЪЧВАНЕТО С ГАМА ЛЪЧИ ВЪРХУ IN VITRO РЕГЕНЕРАЦИЯТА НА ПЪПЕШ (*CUCUMIS MELO* L.)

ЖАНА ИВАНОВА, СТАНИСЛАВА ГРОЗЕВА

Институт по Зеленчукови Култури „Марица“ – Пловдив, ул. Брезовско шосе 32,
4003

jana-ivanova@abv.bg

Резюме: Целта на настоящото изследване е да се установи подходящата доза на облъчване, осигуряваща най-добър регенерационен отговор при котиледонни експланти от две линии пъпеш. Отчетени са органогенния и регенерационен отговор след облъчване с дози от 10, 20 и 30 Gy гама лъчи ^{60}Co . За целите на експеримента са използвани две линии пъпеш BG14 - var. cantalupensis, gynoecious тип на цъфтеж и K052 - var. makuwa, andromonoecious тип на цъфтеж. Резултатите показват, че при облъчване с най-ниската доза от 10 Gy процентът на формирани органогенни структури е най-висок и при двата генотипа BG14 – 38,33% и K052 – 31,67%. Подобни са и получените резултати за регенерационната честота, най-висок процент реагирали с регенерация експланти е регистрирана при облъчване с доза от 10 Gy – 18,33% (BG14) и 28,33% (K052). Приложените дози на облъчване не доведоха до загиване на експланти в ранна фаза, както е при други култури, но се наблюдава инхибиране на регенерационния процес. Дозата от 30 Gy е летална, и въпреки че оказва известен стимулиращ ефект върху органогенезата, доведе до постепенно загиване на калусната тъкан и формираните органогенни структури.

Ключови думи: гама лъчи ^{60}Co , мутагенеза, експлант, котиледон, тъканни култури

1. Introduction

Melon is among the economically important vegetable crops, belongs to the *Cucurbitaceae* family. Its importance is defined by the nutritional and aromatic quality of the fruits, which are rich in carbohydrates, vitamins and minerals.

The availability of genetic diversity and genetic variation is the starting point of any breeding programme. The conventional breeding methods have contributed to the development of many varieties, but with the growing demands of consumers and producers, it is necessary to create new characteristics in a short time. The use of induced mutagenesis plays an important role in vegetable crops improvement such as potato, sugar beet, tomatoes etc. [Chai et al., 2004; Patade et al., 2008; He et al., 2009]. Application of *in vitro* techniques in mutation breeding leads to beneficial changes affection productivity, plant morphology and resistance to various abiotic and biotic stress factors [Suprasanna et al., 2012]. Also, treatment of individual plant parts *in vitro* with mutagenic factors leads to the appearance of new mutant genes, which is not observed in traditional mutagenesis and is most likely associated with tissue and cell culture [David-Schwartz et al., 2001].

Radiation, especially ^{60}Co γ -irradiation, is most suitable for *in vitro* cultures compared to chemical mutagens due to relatively easy treatment, precise dosimetry, high penetration of the mutagenic factor into plant tissues and good reproducibility of the experiment [Suprasanna et al., 2015; Ulukapi et al., 2015]. It is well known that radiation doses and their effects on plants are genotype-dependent. There are data in the literature that the optimal dose to induce a mutation depends on the type of treated plant tissue. Kantoglu et al., [2010] used five different doses of gamma rays ^{60}Co (10, 20, 30, 40 and 50 Gy) to analyze the radiosensitivity of the true leaf and cotyledons of the melon variety Yuva. Authors found that the dose of 25 Gy was semi-lethal for both explant types and can be used for the development of lines resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. In other studies, it was reported that the most suitable doses for irradiation of the explants should be in the same range of 10 to 20 Gy [Taner, 2002].

Physical and chemical mutagen treatments induce mutations for useful genetic changes in vegetative and reproductive traits of the melon plant have been found: variation of cotyledon colour, change in leaf shape, size, colour, plant height and flower morphology. Changes in the fruit shape and colour also have been found, as well as in the colour of the flesh [Tadmor et al., 2007; Dahmani-Mardas et al., 2010; Galpaz et al., 2013].

The objective of the current study was to establish the most suitable irradiation dose that provides the best regeneration answer in melon cotyledon explants.

1. Materials and methods

The investigation was carried out during the period 2019 - 2020 in a Tissue culture laboratory at Maritsa Vegetable Crops Research Institute, Plovdiv, Bulgaria. Two melon genotypes were used for experimental work: BG14 - var. *cantalupensis*, *gynoecious* type of flowering, and K052 - var. *makuwa*, derived from China, and produce more than one fruit, *andromonoecious* type of flowering.

Seeds of the two melon genotypes were surface sterilized in 5% calcium hypochlorite solution for one hour and rinsed three times with sterile dH₂O. After that, the seeds were sown on basal medium containing macro- and micro salts by Murashige and Skoog, [1962], vitamins by Gamborg et al., [1968], 2% sucrose, and 0,7% Agar for germination (MS0). The pH of the medium was adjusted to 5,8 before autoclaving. The seeds were cultivated on glass vessels containing 200 ml MS0 medium and incubated in a growth chamber in the following conditions:

- Day-time temperature $26^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$
- Night-time temperature $18^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$
- Photosynthetic photon flux density (PPFD) $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
- Photoperiod 14/10 h, day/night.

Aseptically *in vitro* grown 5-7 days old seedlings were used as a source of cotyledon explants ($0,5 \text{ cm}^2$). The cotyledon explants were cultivated on MS0 basal medium supplemented with $2,0 \text{ mgL}^{-1}$ 6-Benzylaminopurine (BA) + $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ Indole-3-acetic acid (IAA). The current nutritional medium was identified as the optimum medium that provided the best regeneration answer for the studied genotypes [Ivanova et al., 2017].

Gamma irradiation was performed at the National Center of Radiobiology and Radiation Protection – Sofia (NCRRP). Cotyledons were irradiated with 10, 20 and 30 Gy gamma rays ^{60}Co , and three days after irradiation the explants were cultivated on a fresh medium.

The experimental design for regeneration was: three replications with 20 explants of each, twice repeated, 120 explants per dose and genotype. The organogenesis and regeneration frequency (% explants with response) and a number of regenerants per explant (compared to reacted with organogenesis explants) were examined for a period of 90 days.

The results were presented as means and analysis of variance by Excel software. The decrease percentage (D%) was also calculated.

2. Results and discussion

The *in vitro* cultivation of plant tissues and organs creates new opportunities for induction of genetic variability in them, both through somaclonal variation and through the application of various mutagenic factors. In the current experiment, the cotyledon explants were gamma irradiated before callus formation to reduce the potential of somaclonal variation. As result, received regenerated plants are induced mainly from meristem buds, and the observed changes are in result of mutagenic factor [Jain and Maluszynski, 2004].

The data presented in Fig. 1 displayed the organogenic answer of the tested melon genotypes after gamma rays treatment. The results indicated induction of callusogenesis and formation of organogenic structures in all doses used (Fig. 2). Irradiation with the lowest dose of 10 Gy gamma rays ^{60}Co produced the highest percentage of organogenic structures in both genotypes (BG14 – 38,33% and K052 – 31,67%). The organogenic activity of line K052 varied slightly from 23,33% to 31,67% for 10 Gy to 30 Gy, values closed to those reported in the control variant (non-irradiated explants). The explants of line BG14 subjected to increasing doses of radiation showed a decrease in organogenic capacity to 6,67%. These results indicated that line K052 is more resistant to the effect of radiation compared to line BG14.

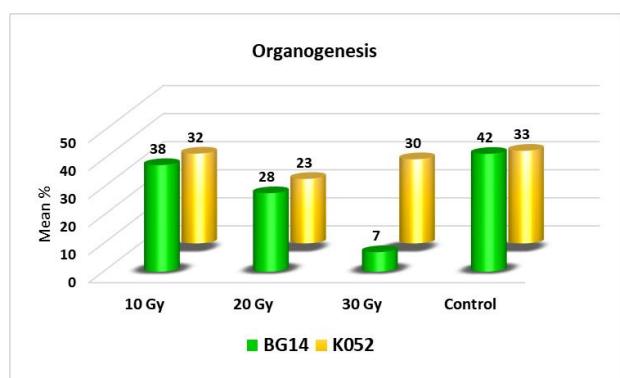


Fig. 1. Organogenetic answer of cotyledon explants after irradiation with different doses of gamma rays ^{60}Co

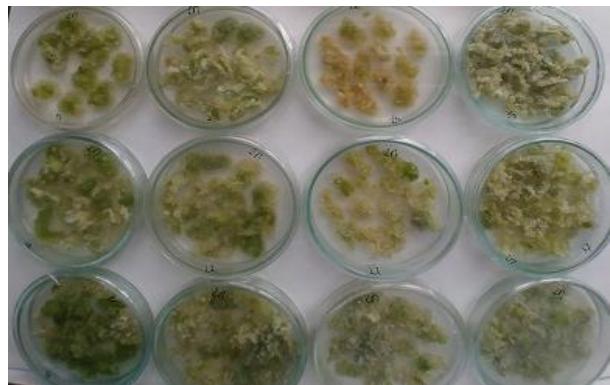


Fig. 2. Induction of callusogenesis

The obtained results indicate that organogenic structures did not develop into plant-regenerants only in line BG14 at a dose of 30 Gy (Table 1). The regeneration potential of line BG14 varied from 0,0% at the dose of 30 Gy to 40,0% in the control variant. The regeneration answer in line K052, was from 8,3% at the doses of 20 and 30 Gy to 28,3% at the dose of 10 Gy. In both studied genotypes, the highest regeneration frequency was reported when the explants were irradiated with the lowest dose of 10 Gy – 18,33% (BG14) and 28,33% (K052). A nonlinear dose dependence was observed in line K052, concerning the organogenetic and regenerative ability of the explants, lower values of the parameters at irradiation with 20 Gy compared to the higher dose of 30 Gy. This probably due to the weak stimulating effect of the higher dose in this genotype [Crino et al., 1994, Grozeva, 2005]. Also, the low dose of radiation significantly stimulates the growth of *in vitro* culture, as well as the organogenic and embryogenic potential of some recalcitrant to *in vitro* manipulation species [Jain and Maluszynski, 2004].

Table. 1 Regeneration of cotyledon explants after ^{60}Co irradiation

Variant	Regenerated explants %		
	Mean	SD	D
BG14 - 10 Gy	18,33	14,72	-21,67
BG14 - 20 Gy	10,00	10,95	-30,00
BG14 - 30 Gy	0,00	0,00	-40,00
BG14 - control	40,00	30,33	
K052 - 10 Gy	28,33	17,22	1,67
K052 - 20 Gy	8,33	7,53	-18,33
K052 - 30 Gy	8,33	11,69	-18,33
K052 - control	26,67	16,33	

C – control, $\pm\text{SD}$ – standard deviation

A higher number of plant-regenerants was obtained after treatment with a dose of 10 Gy for both melon genotypes included in the experiment (Table 2). Similar results were obtained by Abdulhafiz et al., [2018] in the treatment of banana explants (*Musa* spp. Cv. Tanduk) with different doses of 10 to 70 Gy gamma rays. Examining the effect of the applied doses, the authors found that

the highest number of regenerants was obtained after treatment with low doses of 10 and 20 Gy. Higher doses of radiation were restricted to a limited number of plants that more often resemble the original genotype. This is probably due to overcoming the effect of radiation in the obtained regenerants. When treated the explants with 10 Gy, the number of regenerants per explant was 0,18 for BG14, and 0,28 for K052. For line K052, the number of plants obtained after treatment with a dose of 10 Gy was similar to the control variant (0,25). This was consistent with the observed nonlinear dose-dependence in this genotype in terms of organogenesis and regeneration.

Table. 2 Received plant regenerants per explants after ^{60}Co irradiation

Plant regenerants %			
Variant	Mean	SD	D
BG14 - 10 Gy	0,18	0,15	-0,22
BG14 - 20 Gy	0,10	0,11	-0,30
BG14 - 30 Gy	0,00	0,00	-0,40
BG14 - control	0,40	0,30	
K052 - 10 Gy	0,28	0,17	0,03
K052 - 20 Gy	0,08	0,08	-0,17
K052 - 30 Gy	0,08	0,12	-0,17
K052 - control	0,25	0,18	

C – control, $\pm\text{SD}$ – standard deviation

An interesting reaction in melon was that irradiation with the applied doses did not lead to the death of the explants at an early stage, as in other crops, but rather inhibited the regeneration process. At doses above 30 Gy, gradual browning and death of callus tissue were observed after 30 days of irradiation (Fig. 3b).

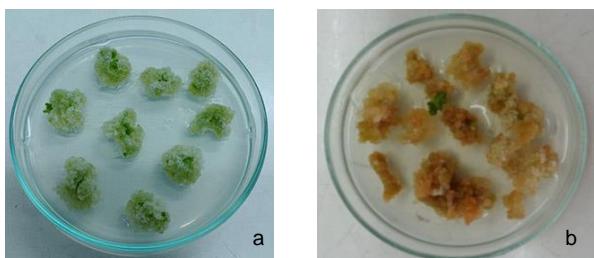


Fig. 3. *a* – explants after irradiated with 10 Gy, *b* – explants after irradiated with 30 Gy

Subsequent experiments showed that not all regenerated plants were suitable for adaptation and cultivation under greenhouse conditions. In some of the plants, abnormal structures, lack of rhizogenesis or the presence of leaves without a meristem-tip were observed (Fig 4.). This was most likely due to the radiation effect at a later stage of the plant development.



Fig. 4. Plant regenerants in result of mutagenesis, *a* – vitrified plants, lack of rhizogenesis, *b* - *d* - leaves without a meristem-tip

3. Conclusion

The results of the current study indicate differences in the radiosensitivity of the studied melon lines after treatment of explants with gamma rays ^{60}Co . Increasing the dose of treatment inhibits the processes of organogenesis and regeneration. The highest percentage of explants that reacted with organogenesis and regeneration, after irradiation *in vitro*, was observed at a dose of 10 Gy. The dose of 30 Gy is lethal and, although it has a positive effect on organogenic processes, leads to the gradual death of callus tissue.

REFERENCES

1. Chai, M., Ho, Y., W., Liew, K., W., Asif, J., M. Biotechnology and in vitro mutagenesis for banana improvement. In: Jain, S., M., Swennen, R., (eds). Banana Improvement: Cellular, Molecular Biology, and Induced Mutations, Leuven, Belgium, 2004, 59 - 77.
2. Patade, V., Y., Suprasanna, P. Radiation induced in vitro mutagenesis for sugarcane improvement, Sugar Tech, 2008, 10(1): 14 - 19.
3. He, S., Han, Y., Wang, Y., Zhai, H., Liu, Q. In vitro selection and identification of sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) plants tolerant to NaCl. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2009, 96(1): 69 - 74.
4. Suprasanna, P., Mirajkar, S., J., Patade, Y., V., Jain, S., M. In book: Plant mutation breeding and biotechnology, Chapter: Applications of in vitro Techniques in Mutation Breeding of Vegetatively Propagated Crops. Publisher: CABI International

Editors: Shu, Q., Y., Forster, B., P., Nakagawa, H., 2012.

5. David-Schwartz, R., Badani, H., Wninger, S., Levy, A., A., Galili, G., Kapulnik, Y. Identification of a novel genetically controlled step in mycorrhizal colonization: plant resistance to infection by fungal spores but not to extraradical hyphae, *Plant J*, 2001, 27: 561 - 569.
6. Suprasanna, P., Mirajkar, S., J., Bhagwat, S., G. Induced mutations and crop improvement. In: Bahadur, B., Venkat Rajam, M., Sahijram, L., Krishnamurthy, K., (eds), *Plant Biology and Biotechnology*, 2015, Springer, New Delhi.
7. Ulukapi, K., Özdemir, B., Onus, A., N. Determination of proper gamma radiation dose in mutation breeding in eggplant (*Solanum melongena* L.), *Advances in Environmental and Agricultural Science*, 2015, 149 - 153.
8. Kantoglu, Y., Seçer, E., Erzurum, K., Tutluer, İ., Kunter, B., Peşkircioğlu, H., Sağel Z. Improving tolerance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* in melon using tissue culture and mutation techniques. Book: *Mass Screening Techniques for Selecting Crops Resistant to Disease*, 2010, 235 - 243.
9. Taner, K., Y. Plant formation by somatic embryogenesis in melon (*Cucumis melo* L.). PhD thesis, Ankara University, Ankara, Turkey, 2002, 145.
10. Tadmor, Y., Katzir, N., Meir, A., Yaniv-Yaakov, A., Sa'ar, U., Baumkoler, F., Lavee, T., Lewinsohn, E., Schaffer, A., Burgera, J. Induced mutagenesis to augment the natural genetic variability of melon (*Cucumis melo* L.), *Israel Journal of Plant Sciences*, 2007, 55: 159 - 169.
11. Dahmani-Mardas, F., Troadec, C., Boualem, A., Lévéque, S., Abdullah, A., Alsadon, Abdullah A., Aldoss, Dogimont, C., Bendahmane, A., Engineering melon plants with improved fruit shelf life using the TILLING approach, *PLoS One*, 2010, 5(12).
12. Galpaz, N., Burger, Y., Lavee, T., et al. Genetic and chemical characterization of an EMS induced mutation in *Cucumis melo* CRTISO gene, *Arch. Biochem. Biophys*, 2013, 539: 117 - 125.
13. Murashige, T., Skoog T. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures, *Physiologia Plantarum*, 1962, 15(3): 473 - 497.
14. Gamborg, O., L., Miller, R., A., Ojima, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells, *Exp Cell Res*, 1968, 50: 148 - 151.
15. Ivanova, Zh., Gozeva, S., Velkov, N. Induction of callogenesis and organogenesis of different melon genotypes, *J BioSci Biotech*, 2017 6(2): 99-104.
16. Jain, S., M., Maluszynski, M. In vitro applications in crop improvement: Recent Progress. Chapter: Induced mutations and biotechnology on improving crops. Mujib, A., Cho, M., Predieri, S., Banerjee, S., (eds.) Publisher: IBH-Oxford, India. 2004.
17. Crino, P., Lai, A., Di Bonito, R., Veronese, P., Saccardo F. Genetic variability in tomato plants regenerated from irradiated cotyledons, *J. Genet. Breed.*, 1994, 48: 281 – 290.
18. Grozeva, S. Създаване и изследване на генплазма при домати (род *Lycopersicon*) чрез методите на биотехнологиите, Дисертация, 2005.
19. Abdulhafiz, F., Kayat, F., Zakaria, S. Gamma irradiation effect on the growth of *Musa* cv. *Tanduk* (AAB), *Asian J Agri and Biol*, 2018, 6(2): 135 - 142.

ВЛИЯНИЕ НА ВНЕСЕНИ ПОЛЕЗНИ МИКРООРГАНИЗМИ ВЪРХУ БИОЛОГИЧНАТА АКТИВНОСТ НА ПОЧВАТА И ДОБИВА ОТ ПШЕНИЦА

ВАСИЛИНА МАНЕВА¹, ДИНА АТАНАСОВА¹, МЛАДЕН НАЙДЕНОВ²

¹Институт по земеделие – Карнобат, ²Аграрен Университет – Пловдив

e-mail:maneva_ento@abv.bg

Резюме: През периода 2015 – 2017, в опитното поле на Институт по земеделие – Карнобат е заложен полски опит с внасяне на полезни микроорганизми, на площ от 1000 m². Опитът е разделен в два парцела от по 500 m². И в двата е оформено двуполно сеитбообразие - пшеница сорт Миряна и кoriандър за предшественик, но единия вариант е с внесени полезни микроорганизми (внасят се в парцела всяка година), а другия е без - за контрола. Внесените полезни микроорганизми са гъби от род *Trichoderma Pers.* (1801) и бактерии от род *Azotobacter Beijerinck*, 1901. От род *Trichoderma* са внесени гъбните изолати: 1- *T₁UKR*; 2 – *T₂TUR*; 3 – *T₄*; 4 – *T_{II}I*, а от род *Azotobacter* – 5 – *AzE* и *Az5*. В Аграрен Университет – Пловдив са изследвани почвени пробы за определяне влиянието на внесените полезни микроорганизми върху биологичната активност на почвата. Направени са следните тестове: β-глюкозидаза, pH, електропроводимост (EC), почвено дишане, определени са основни групи микроорганизми – бактерии, гъби и азотфиксиращи микроорганизми. След узряване и жътва на пшеницата е изчислен добива от двата варианта. Математическата обработка е извършена с програма BIO. Получените резултати показват, че: Добавянето на полезни микроорганизми в почвата - гъби от род *Trichoderma Pers.* (1801) и бактерии от род *Azotobacter Beijerinck*, 1901, се отразява благоприятно върху цялостната биологична активност на почвата. Определените количества гъби, бактерии и азотфиксиращи микроорганизми във варианти с внесени полезни микроорганизми надвишават тези от контролния вариант. Това се отразява положително на биологичната активност на почвата, определена чрез почвеното дишане и β-глюкозидазната активност и на съдържанието на усвоим фосфор. Средният добив от пшеница за трите години от варианта с приложени полезни микроорганизми, надвишава добива от нетретирания вариант с 3.71 %.

Ключови думи: полезни микроорганизми, *Trichoderma*, *Azotobacter*, биологична активност на почвата, пшеница, добив

INFLUENCE OF BENEFICIAL MICROORGANISMS ON THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF SOIL AND WHEAT YIELD

VASILINA MANEVA¹, DINA ATANASOVA¹, MLADEN NAYDENOV²

¹Institute of Agriculture - Karnobat, ²Agricultural University - Plovdiv

e-mail: maneva_ento@abv.bg

Abstract: In the period 2015 - 2017, in the experimental field of the Institute of Agriculture - Karnobat is set a field experience with the introduction of beneficial microorganisms on an area of 1000 m². The experience is divided into two plots of 500 m². In both of them there is a two-field crop rotation - wheat variety Miriana and coriander as a precursor, but one option is with imported microorganisms (imported into the plot every year), and the other is without - for control. The imported beneficial microorganisms are fungi of the genus *Trichoderma Pers.* (1801) and bacteria of the genus *Azotobacter Beijerinck*, 1901. The fungal isolates were imported from the genus *Trichoderma*: 1- *T₁UKR*; 2 - *T₂TUR*; 3 - *T₄*; 4 - *T_{II}I*, and of the genus *Azotobacter* - 5 - *AzE* and *Az5*. Soil samples were studied at the Agricultural University - Plovdiv to determine the influence of imported beneficial microorganisms on the biological activity of the soil. The following tests were performed: β-glucosidase, pH, electrical conductivity (EC), soil respiration, the main groups of microorganisms were determined - bacteria, fungi and nitrogen-fixing microorganisms. After ripening and harvesting the wheat, the yield of both options is calculated. The mathematical processing was performed with the BIO program. The results show that: The addition of beneficial microorganisms in the soil - fungi of the genus *Trichoderma Pers.* (1801) and bacteria of the genus *Azotobacter Beijerinck*, 1901, have a beneficial effect on the overall biological activity of the soil. The determined amounts of fungi, bacteria and nitrogen-fixing microorganisms in the variants with imported beneficial microorganisms

exceed those of the control variant. This has a positive effect on the biological activity of the soil, determined by soil respiration and β -glucosidase activity, and on the content of digestible phosphorus. The average yield of wheat for the three years of the variant with applied microorganisms exceeds the yield of the untreated variant by 3.71%.

Key words: beneficial microorganisms, *Trichoderma*, *Azotobacter*, biological soil activity, wheat, yield

1. Въведение

Селскостопанските проблеми, причинени от дългосрочната употреба на пестициди и торове стават все по-очевидни. Прекомерното внасяне на химически торове създава голяма заплаха за качеството на почвата и околната среда. Използването на почвени микроорганизми, стимулиращи растежа на растенията, се очертава като голяма перспектива за възстановяване на екосистемата [1, 2]. Честата употреба на химически торове може да има отрицателен ефект върху качеството на почвата и структурата на почвената микробна общност. Тя води до намаляване на почвените органични вещества и плодородието и ускорява подкисляването на почвата, което от своя страна намалява добива на реколта [2, 3, 4]. По тази причина е необходимо да се намери екологична стратегия за намаляване на прилагането на химически торове и увеличаване на добива на културите. Ризобактериите, стимулиращи растежа на растенията, са свободно живеещи почвени микроорганизми, които обитават ризосферата или корените на растенията по време на растежа и развитието на културите. Приложението на ризобактерии може както да стимулира растежа на растенията, така и да помогне за предотвратяване на инвазията на патогени и да подобри адаптивността на растенията към абиотичен и биотичен стрес [5, 6, 7]. Благоприятното въздействие на ризобактериите върху растенията може да се обясни с различни механизми, включително (1) фиксиране на азот [8]; (2) неорганична фосфатна солюбилизация и органична фосфатна минерализация [9]; (3) производство на регулятори на растежа на растенията или фитохормони като индол-3-оцетна киселина, цитокинини и гиберелини [10, 11]; (4) производство на сидерофори, 1-аминоцикличопропан-1-карбоксилат деаминаза и циановодород [12, 13]; (5) и биологичен контрол на фитопатогени и насекоми чрез синтезиране на антибиотици или фунгицидни съединения или конкуриране с вредни микроорганизми [14, 15].

Употребата на пестициди и торове не само замърсява селскостопанската продукция, но и причинява дисбаланс в пропорциите на различни хранителни вещества, разрушава органичните вещества в почвата и намалява структурната целост и свойства на инертните материали, което води до уплътняване на почвата, засоляване и нападение от болести. Почвените микроорганизми участват в различни биотични дейности на почвената екосистема, за да насырчат динамичния оборот и устойчивото производство на културите. По този начин ризобактериите и техните взаимодействия с растенията имат големи перспективи за приложение в биологичното и устойчиво земеделие. Съвместно инокулиране на памук с щамове *Azotobacter chroococcum* могат да повлияят положително на растежа на растенията и да намалят дозите на азотно торене с 50% [16].

Съществува много сложна система от взаимодействия между микроорганизмите и между микроорганизмите и растенията в почвата. При определени условия растенията набират полезни микроорганизми за колонизиране на ризосферата или кореновата тъкан чрез секретиране на метаболити в почвата [17]. Тези микроорганизми могат да подобрят адаптацията на растенията към биотичен и абиотичен стрес [18], да инхибират растежа на растителни патогени, като произвеждат антимикробни съединения или да се конкурират с патогени за хранителни вещества [19] и да активират хранителни вещества в почвата [20]. Анализиран е азотфиксацијата и Р / К-освобождаващ потенциал на бактериите, изолирани от ризосферата и корена на пшеницата. Нитрогеназната активност на *Azotobacter* е много по-висока от тази на други бактерии [2]. В допълнение към азота, фосфорът и калият са другите две основни хранителни вещества, ограничаващи растежа на растенията. Въпреки че калият и фосфорът са изобилни елементи в почвата, те се свързват предимно с други минерали. Приблизително 95–99% от фосфора и калия присъстват в нерастворима форма и следователно са недостъпни за растенията. Някои почвени микроорганизми

могат да разтворят иначе неразтворимия фосфат и калий. – Maliha et al. [21] изследва, че бактериите отделят органични киселини и намаляват pH на ризосферата, което води до разтваряне на минералния фосфат.

Според Etesami et al. [22] подобряването на растежа на растенията може да се отаде на азотната фиксация и разтварянето на фосфат / калий чрез ризобактериите, което осигурява повече храна за развитието им.

Според Wang et al. [2], комбинацията от бактерии, стимулиращи растежа с различни функции, ефективно подобрява усвояването на N / P / K и растежа на растенията в пшеницата. Тези бактериални изолати позволяват използването на по-ниски дози химически торове от традиционните стратегии за торене и имат по-голям потенциал за приложение в полето.

Trichoderma помага да се увеличат растителните хормони, който помага за увеличаване на растежа на кореновата система, което води до по-ефективно използване на азот, фосфор, калий и микроелементи и повишават кълняемостта и жизнеността на растенията [23, 24]. Harman et al. [25] установяват, че триходермите, когато присъстват в ризосферата увеличават имунната защита на растенията. Li et al. [26] констатират, че триходермите разтварят фосфати и някой микроелементи и те стават усвоими от растенията. Mahato et al. [24] описват увеличение на добива от пшеница при приложение на триходерма. Sharma et al. [27] са тествали на полето триходерма като биопестицид и стимулатор на растежа и получават положителни резултати. Behzad Hajieghrari et al. [28] установяват, че триходермите влияят положително върху развитието на пшеницата. Настоящето изследване, има за цел да установи влиянието на внесените полезни микроорганизми (гъби от род *Trichoderma* Pers. (1801) и бактерии от род *Azotobacter* Beijerinck, 1901) в полски условия, върху биологичната активност на почвата и добива от пшеница сорт Миряна.

2. Материал и методи

През периода 2015 – 2017, в опитното поле на Институт по земеделие – Карнобат е заложен полски опит с внасяне на полезни микроорганизми, на площ от 1000 m². Опитът е разделен в два парцела от по 500 m². И в двата е оформено двуполно сейтбообразщение – пшеница сорт Миряна и кориандър за предшественик, но единия вариант е с внесени полезни микроорганизми (внасят се в парцела

всяка година), а другия е без – за контрола. Внесените полезни микроорганизми са гъби от род *Trichoderma* Pers. (1801) и бактерии от род *Azotobacter* Beijerinck, 1901. От род *Trichoderma* са внесени гъбните изолати: 1 – T₁UKR; 2 – T₂TUR; 3 – T₄; 4 – T₁I, а от род *Azotobacter* – 5 – AzE и Az₅.

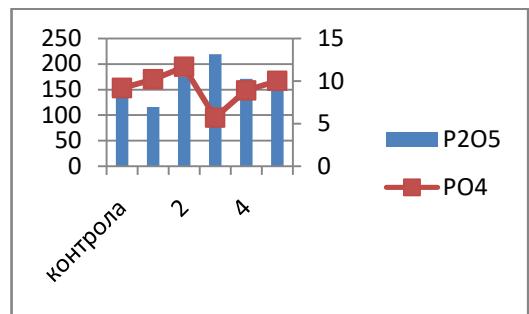
В Аграрен Университет – Пловдив са изследвани почвени пробы за определяне влиянието на внесените полезни микроорганизми върху биологичната активност на почвата. Направени са следните тестове: Активността на β-глюкозидазата е определяна по метода на Eivazi и Tabatabai [29]. Като субстрат за ензимна активност е използван p-нитрофенил глукопиранозид. В ерленмайерова колба от 50ml се поставя 1g предварително пресята почва (през сито 2mm). Добавят се разтвор на p-нитрофенил глукопиранозид с концентрация 25mmol/l. Пробите се инкубират в термостат при 37°C за 1h при pH 6, достигнато след прибавяне на модифициран универсален буфер (MUB). След инкубирането се добавят 1ml 0.5M CaCl₂ и 4 ml Tris буфер с pH 12 за екстракция на p-нитрофенола (PNP), отделен от субстрата в следствие на ензимната активност. Пробите се разбъркват интензивно и веднага се филтрират. Количество на отделеният p-нитрофенол се определя фотометрично при дължина на вълната 400nm на спектрофотометър Spectroquant® Pharo 300, Merck. Активността е изразена като µg PNP отделен от 1 g почва за 1h. Стойностите на pH са определени потенциометрично в екстракт с дестилирана вода, в съотношение почва:вода 1:5. pH се определя след енергично разбъркане в продължение на 5 минути и утаяване в продължение на 2h с WTW inoLab, модел multi 720. Електропроводимост (EC) е измерена в екстракт с дестилирана вода, в съотношение почва:вода 1:5 след разбъркане в продължение на 30min на орбитална клатачна машина с WTW inoLab, модел multi 720. Почвено дишане – определено е като 20 g почва се претегля в пластмасови чаши и се инкубуира на тъмно при 25 ° C за 24h. След това за 6h се улавя отделяният CO₂ в разтвор на KOH в херметично затворен съд и количеството му се определя посредством титруване на нереагираната основа. При индуцираното почвено дишане към почвата се добавя 1g суха глукоза. След добро хомогенизиране пробата се инкубуира при същите условия и условията в сборника с основа CO₂ се измерва чрез титруване със разтвор на HCl. На всеки 1ml изразходвана 1n HCl отговаря 22 mg отделен CO₂. Активност – µg CO₂/g почва/h. Определяни са основни групи

микроорганизми – бактерии, гъби и азотфиксирани микроорганизми. Определянето е извършено чрез посевка върху твърда хранителна среда – *Rose-Bengal Chloramphenicol Agar* (Merck Millipore 100467) за гъби, *Tryptic Soy Agar* и без азотна среда за азотфиксирани микроорганизми. След узряване и жътва на пшеницата е изчислен добива от двата варианта. Математическата обработка е извършена с програма BIO.

3. Резултати и обсъждане

Фосфорът (P) е второто ограничаващо хранително вещество, необходимо за растежа и развитието на растенията, участващо във важни метаболитни процеси, като усвоене на хранителни вещества, биологично окисление и енергиен метаболизъм [30]. Общият P в почвата представлява приблизително 0,04–0,1%. Само много малка част от P (разтворим $H_2PO_4^-$ или HPO_4^{2-}) може директно да се усвои от растенията [31], тъй като голямата част от P в почвите съществува в неорганична неразтворима форма [например $Ca_3(PO_4)_2$] и органично неразтворима / разтворима форма (например фитат и нуклеинова киселина) [32, 33]. Внасянето на P в почвата се извършва основно чрез торене главно с неорганични P минерали, така и с органични P съединения (напр. остатъци и отпадъци от животни, растения и микроби) се използват широко в селскостопанските екосистеми [34, 35, 36] и тези външно добавени P, включително неорганични P и органични P, се превръщат в соли и стават неразтворими чрез свързване с Ca, Al, Mg, Mn и Fe [32, 37]. Неразтворимият P, особено $Ca_3(PO_4)_2$, $AlPO_4$ и $FePO_4$, и неразтворими / разтворими фосфорни съединения – фитати, заемащ 80% от почвенния P, се нуждаят от фосфор-солюбилизиращи микроби (PSM), за да се трансформират в ортофосфат, който може да се абсорбира от растения и микроби [34, 36, 38]. Предишни изследвания описват, че неразтворимият P може да се разтвори от органични киселини с ниско молекулно тегло (например лимонена и глюконова киселини), произведени и освободени както от фосфорно-разтварящи бактерии (PSB), така и от гъбички [39, 40, 41], а фитатите могат да се усвоят от извънклетъчни ензими (напр. фосфатаза и фитаза), главно синтезирани и секретирани от микроби [33, 42]. Li et al. [26] установяват, че триходермите имат способността да разтварят фосфати и да ги превръщат от неусвоими в усвоими за растенията съединения. В нашето изследване само триходермите 1- T₁UKR; 2 –

T₂TUR показват по-високо количество на PO₄ (фиг. 1).

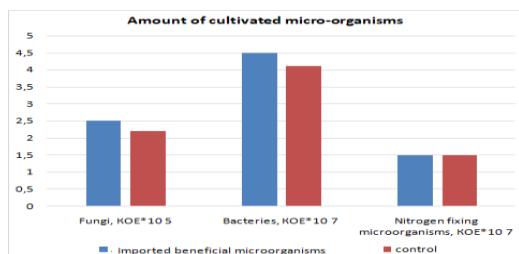


Фиг. 1. Влияние на внесените полезни микроорганизми върху фосфора в почвата

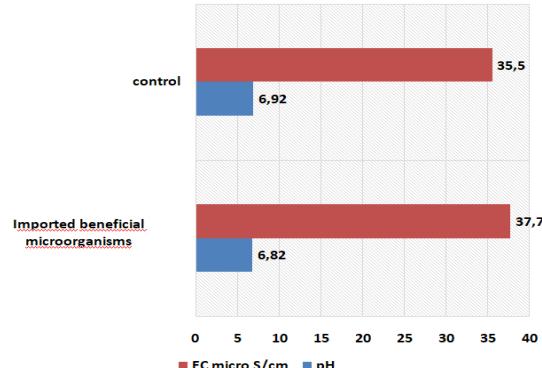
Определяни са основни групи микроорганизми – бактерии, гъби и азотфиксирани микроорганизми. Внесените полезни почвени микроорганизми увеличават общото съдържание на почнените гъби и бактерии, в сравнение с нетретираната с тях контрола (фиг. 2).

Солевата концентрация – EC е показател, отчитащ наличието на подвижни форми на минералните и органичните компоненти на почвата. Стойността му нараства с улеличаване на количеството на минерални йони в почвата. Отчита засоляването и метаболитната активност. Внесените полезни микроорганизми, увеличават EC на почвата с 2.2 micro S/cm и понижават pH с 0.1 (фиг. 3).

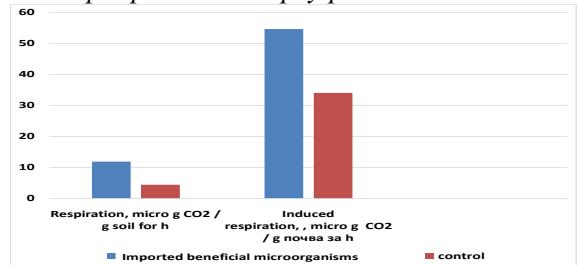
Почвеното дишане (отделяне на CO₂ от почвата в следствие на жизнената дейност на почвените микроорганизми) е показател, отчитащ количеството на активните микроорганизми в почвата. Зависи от живите микроорганизми в почвата и наличните хранителни вещества в нея. При наличие на живи микроорганизми този показател ще зависи от количеството на достъпни за тях хранителни вещества. Добавянето на бързо усвоим субстрат в почвата активира всичките живи микробни клетки, способни да го метаболизират и това води до увеличаване на отделяният CO₂. При индуцираното почвено дишане (отчетено след добавяне на глюкоза, в почвата), микроорганизмите за определен период от време имат достъп до хранителни ресурси. В този случай отделяният CO₂ ще съответства само на наличната в почвата жизнена микрофлора и няма да се влияе от количеството на хранителните вещества. Така този показател съответства на количеството на микробната биомаса в почвата. В нашето изследване почвеното дишане значително превишава контролата, което показва наличието на микроорганизми в нея (фиг. 4).



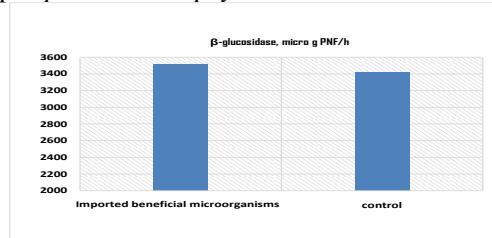
Фиг. 2. Влияние на внесените полезни микроорганизми върху общото количество почвени микроорганизми



Фиг. 3. Влияние на внесените полезни микроорганизми върху pH и EC на почвата



Фиг. 4 Влияние на внесените полезни микроорганизми върху почвеното дишане



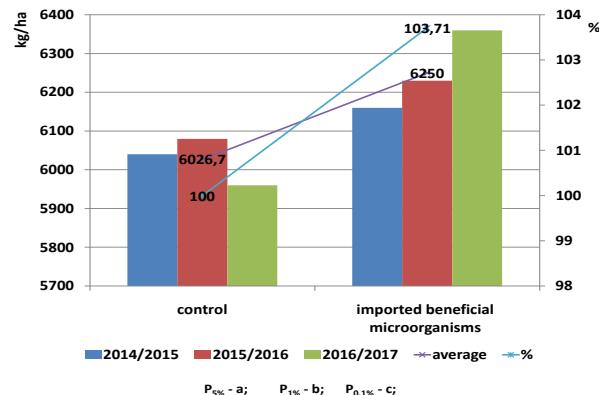
Фиг. 5. Влияние на внесените полезни микроорганизми върху почвената β -глюкозидаза

β -глюкозидаза е преобладаващ ензим в почвата [43]. Наименованието му произхожда от вида на връзка, която хидролизира. Този ензим играе важна роля в почвата, тъй като участва в катализа на хидролизата и биоразграждането на различни β -глюкозиди, присъстващи в растителните остатъци разграждани в екосистемата [43, 44, 45]. Нейният краен продукт е глюкоза, важен С

енергиен източник за живота на микроорганизмите в почвата [46].

β -глюкозидаза е характерен ензим, полезен както индикатор на качеството на почвите, отразяващ настояща и минала биологична дейност, капацитета на почвата за стабилизиране на почвената органична материя и може да се използва за установяване на ефекта от въздействие върху почвите [47]. След прилагането на полезните микроорганизми в почвата се отчита увеличение на β -глюкозидаза (фиг. 5).

И през трите години на проучването добива от пшеница от варианта с внесени полезни микроорганизми надвишава контролата – която е чиста без внасяне на микроорганизми в нея (фиг. 6, табл. 1), което кореспондира с резултатите на Wang et al. [2], Mahato et al. [24] и Behzad Hajieghrari et al. [28].



Фиг. 6. Добив от пшеница (2015 – 2017)

Дисперсионният анализ (Таблица 1) показва, варирането на добивите се обуславя в по-висока степен от добавянето на полезни микроорганизми (72.72 %), последвано от условията на годината (22.97 %).

Таблица 1. Резултати от дисперсионния анализ на добива от пшеница

Source of variation	SQ	DF	η^2 (%)
Total variation	1028.83	5	
Years	236.33	2	22.97
Beneficial microorganisms	748.17	1	72.72
Accidental factors	44.33	2	4.31

4. Изводи

Добавянето на полезни микроорганизми в почвата – гъби от род *Trichoderma* Pers. (1801) и бактерии от род *Azotobacter* Beijerinck, 1901, се отразява благоприятно върху цялостната биологична активност на почвата. Определените количества гъби, бактерии и азотфиксращи микроорганизми във

вариантите с внесени полезни микроорганизми надвишават тези от контролния вариант. Това се отразява положително на биологичната активност на почвата, определена чрез почвеното дишане и β -глюкозидазната активност и на съдържанието на усвоим фосфор.

Средният добив от пшеница за трите години от варианта с приложени полезни микроорганизми, надвишава добива от нетретирания вариант достоверно с 3.71 %.

ЛИТЕРАТУРА

- Ayten Namli, Ahmad Mahmood, Bahar Sevilir, Emre Özki. Effect of phosphorus solubilizing bacteria on some soil properties, wheat yield and nutrient contents. *Eurasian J Soil Sci* 2017; 6 (3) 249 – 258.
- Wang, J., Li, R., Zhang, H., Wei, G., & Li, Z.. Beneficial bacteria activate nutrients and promote wheat growth under conditions of reduced fertilizer application. *BMC Microbiol* 20, 38, 2020. doi:10.1186/s12866-020-1708-z
- Li XG, Jia B, Lv J, Ma Q, Kuzyakov Y, Li F. Nitrogen fertilization decreases the decomposition of soil organic matter and plant residues in planted soils. *Soil Biol Biochem*. 2017;112:47–55.
- Qiao C, Xu B, Han Y, Wang J, Wang X, Liu L, Liu W, Wang S, Tan H, Liu Y, Zhao X. Synthetic nitrogen fertilizers alter the soil chemistry, production and quality of tea. A meta-analysis. *Agron Sustain Dev*. 2018;38(1):10.
- Villarodriguez E, Parracota FI, Castrolongoria E, Lopezcervantes J, Santosvillalobos SD. *Bacillus subtilis* TE3: a promising biological control agent against Bipolaris sorokiniana, the causal agent of spot blotch in wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum*). *Biol Control*. 2019;132:135–43.
- Cordero I, Balaguer L, Rincon A, Pueyo JJ. Inoculation of tomato plants with selected PGPR represents a feasible alternative to chemical fertilization under salt stress. *J Plant Nutr Soil Sci*. 2018;181(5):694–703.
- Emami S, Alikhani HA, Pourbabaei AA, Etesami H, Sarmadian F, Motessharezadeh B. Effect of rhizospheric and endophytic bacteria with multiple plant growth promoting traits on wheat growth. *Environ Sci Pollut Res*. 2019;26(19):19804–13.
- Lin L, Li Z, Hu C, Zhang X, Chang S, Yang L, An Q. Plant growth-promoting nitrogen-fixing Enterobacteria are in association with sugarcane plants growing in Guangxi, China. *Microbes Environ*. 2012;27(4):391–8.
- Zaheer A, Malik A, Sher A, Qaisrani MM, Mahmood A, Khan SU, Ashraf MU, Mirza Z, Karim S, Rasool M. Isolation, characterization, and effect of phosphate-zinc-solubilizing bacterial strains on chickpea (*Cicer arietinum* L.) growth. *Saudi J Biol Sci*. 2019; 26(5):1061–7.
- Matsuda R, Handayani ML, Sasaki H, Takechi K, Takano H, Takio S. Production of indoleacetic acid by strains of the epiphytic bacteria *Neptunomonas* spp. isolated from the red alga *Pyropia yezoensis* and the seagrass *Zostera marina*. *Arch Microbiol*. 2018; 200(2):255–65.
- Cappellari LD, Santoro MV, Schmidt A, Gershenson J, Banchio E. Induction of essential oil production in *Mentha x piperita* by plant growth promoting bacteria was correlated with an increase in jasmonate and salicylate levels and a higher density of glandular trichomes. *Plant Physiol Bioch*. 2019; 141:142–53.
- Sulochana MB, Jayachandra SY, Kumar SA, Parameshwar A, Reddy KM, Dayanand A. Siderophore as a potential plant growth-promoting agent produced by *Pseudomonas aeruginosa* JAS-25. *Appl Biochem Biotech*. 2014;174(1):297–308.
- Glick BR. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiol Res*. 2014;169(1):30–9.
- Sun G, Yao T, Feng C, Chen L, Li J, Wang L. Identification and biocontrol potential of antagonistic bacteria strains against *Sclerotinia sclerotiorum* and their growth-promoting effects on *Brassica napus*. *Biol Control*. 2017;104:35–43.
- Etesami H, Emami S, Alikhani HA. Potassium solubilizing bacteria (KSB): mechanisms, promotion of plant growth, and future prospects a review. *J Soil Sci Plant Nut*. 2017;17(4):897–911.
- Romeroperdomo F, Abril J, Camelo M, Morenogalvan A, Pastrana I, Rojastapias DF, Bonilla R. *Azotobacter chroococcum* as a potentially useful bacterial biofertilizer for cotton (*Gossypium hirsutum*): effect in reducing N fertilization. *Rev Argent Microbiol*. 2017;49(4):377–83.
- Huang AC, Jiang T, Liu Y, Bai Y, Reed J, Qu B, Goossens A, Nutzmann H, Bai Y, Osbourn A. A specialized metabolic network selectively modulates *Arabidopsis* root microbiota. *Science*. 2019;364(6440):eaau6389.
- Ali S, Charles TC, Glick BR. Amelioration of high salinity stress damage by plant growth-promoting bacterial endophytes that contain ACC deaminase. *Plant Physiol Bioch*. 2014;80:160–7.
- Berendsen RL, Vismans G, Yu K, Song Y, De Jonge R, Burgman WP, Burmolle M, Herschend J, Bakker PAHM, Pieterse CMJ, Pieterse CM. Disease-induced assemblage of a plant-beneficial bacterial consortium. *ISME J*. 2018;12(6):1496–507.
- Nakayan P, Hameed A, Singh S, Young L, Hung M, Young C. Phosphate-solubilizing soil

- yeast *Meyerozyma guilliermondii* CC1 improves maize (*Zea mays* L.) productivity and minimizes requisite chemical fertilization. *Plant Soil.* 2013;373:301–15.
21. Maliha R, Samina K, Najma A, Sadia A, Farooq L. Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganisms under in vitro conditions. *Pak J Biol Sci.* 2004;7(2):187–96.
 22. Etesami H, Alikhani HA. Evaluation of gram-positive rhizosphere and endophytic bacteria for biological control of fungal rice (*Oryza sativa* L.) pathogens. *Eur J Plant Pathol.* 2017;147(1):7–14.
 23. Mastouri, F., Bjorkman, T., Harman, G.E.. Seed treatment with *Trichoderma harzianum* alleviates biotic, abiotic, and physiological stresses in germinating seeds and seedlings. 2010. *Phytopathology*, 100 (11), 1213-1221.
 24. Sanjay Mahato, Susmita Bhuju, Jiban Shrestha. Effect Of Trichoderma Viride As Biofertilizer On Growth And Yield Of Wheat. 2018. *Malaysian Journal of Sustainable Agriculture*, 2(2) : 01-05
 25. Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M.. *Trichoderma* species- opportunistic, avirulent plant symbionts. 2004. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 43-56.
 26. Li, R.X., Cai, F., Pang, G., Shen, Q.R., Li, R., Chen, W. Solubilisation of phosphate and micronutrients by *Trichoderma harzianum* and its relationship with the promotion of tomato plant growth. 2015. *PLoS One*, 10 (6), e0130081.
 27. Sharma, P., Nath Patel, A., Kumar Saini, M., & Deep, S. Field Demonstration of *Trichoderma harzianum* as a Plant Growth Promoter in Wheat (*Triticum aestivum* L.). 2012. *Journal of Agricultural Science*, 4(8). doi:10.5539/jas.v4n8p65
 28. Behzad Hajieghrari, Mohammadreza Mohammadi. Growth-promoting activity of indigenous *Trichoderma* isolates on wheat seed germination, seedling growth and yield. 2016. *Australian Journal of Crop Science*, Vol. 10, No. 9, Sep 2016: 1339-1347.
 29. Eivazi, F., Tabatabai, M. A. 1988. Glucosidases and galactosidases in soils. *Soil Biol. Biochem.* 20: 601–606.
 30. Nesme, T., Metson, G. S., and Bennett, E. M. Global P flows through agricultural trade. 2018. *Glob. Environ. Change* 50, 133–141. doi: 10.1016/j.gloenvcha.2018.04.004
 31. Chen, Z., Ma, S., and Liu, L.. Studies on phosphorus solubilizing activity of a strain of phosphobacteria isolated from chestnut type soil in China. 2008. *Bioresour. Technol.* 99, 6702–6707. doi: 10.1016/j.biortech.2007.03.064
 32. Liu, Z., Li, Y. C., Zhang, S., Fu, Y., Fan, X., Patel, J. S., et al.. Characterization of phosphate-solubilizing bacteria isolated from calcareous soils. 2015. *Appl. Soil Ecol.* 96, 217–224. doi: 10.1016/j.apsoil.2015.08.003
 33. Neal, A. L., Rossmann, M., Brearley, C., Akkari, E., Guyomar, C., Clark, I. M., et al.. Land-use influences phosphatase gene microdiversity in soils. 2017. *Environ. Microbiol.* 19, 2740–2753. doi: 10.1111/1462-2920.13778
 34. Lim, B. L., Yeung, P., Cheng, C., and Hill, J. E.. Distribution and diversity of phytate-mineralizing bacteria. 2007. *ISME J.* 1, 321–330. doi: 10.1038/ismej.2007.40
 35. Jorquera, M. A., Saavedra, N., Maruyama, F., Richardson, A. E., Crowley, D. E., del, C., et al.. Phytate addition to soil induces changes in the abundance and expression of *Bacillus* β-propeller phytase genes in the rhizosphere. 2013. *FEMS Microbiol. Ecol.* 83, 352–360. doi: 10.1111/j.1574-6941.2012.01480.x
 36. Fraser, T. D., Lynch, D. H., Bent, E., Entz, M. H., and Dunfield, K. E.. Soil bacterial *phoD* gene abundance and expression and long-term management. 2015. *Soil Biol. Biochem.* 88, 137–147. doi: 10.1016/j.soilbio.2015.04.014
 37. Reddy, C. S., Achary, V. M., Manna, M., Singh, J., Kaul, T., and Reddy, M. K. Isolation and molecular characterization of thermostable phytase from *Bacillus subtilis* (BSphyARRMK33). 2015. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 175, 3058–3067. doi: 10.1007/s12010-015-1487-4
 38. Liu, F. P., Liu, H. Q., Zhou, H. L., Dong, Z. G., Bai, X. H., Bai, P., et al. Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from betel nut (*Areca catechu*) and their effects on plant growth and phosphorus mobilization in tropical soils. 2014. *Bio. Fertil. Soils* 50, 927–937. doi: 10.1007/s00374-014-0913-z
 39. Sashidhar, B., and Podile, A. R. Transgenic expression of glucose dehydrogenase in *Azotobacter vinelandii* enhances mineral phosphate solubilization and growth of sorghum seedlings. 2009. *Microbial. Biotechnol.* 2, 521–529. doi: 10.1111/j.1751-7915.2009.00119.x
 40. Ogbo, F. C. Conversion of cassava wastes for biofertilizer production using phosphate solubilizing fungi. 2010. *Bioresour. Technol.* 101, 4120–4124. doi: 10.1016/j.biortech.2009.12.057
 41. Patel, D. K., Murawala, P., Archana, G., and Kumar, G. N. Repression of mineral phosphate solubilizing phenotype in the presence of weak organic acids in plant growth promoting fluorescent *Pseudomonads*. 2011. *Bioresour. Technol.* 102, 3055–3061. doi: 10.1016/j.biortech.2010.10.041
 42. Tan, H., Wu, X., Xie, L., Huang, Z., Peng, W., and Gan, B. Identification and characterization of a mesophilic phytase highly resilient to high-

- temperatures from fungus-garden associated metagenome. 2016. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 2225–2241. doi: 10.1007/s00253-015-7097-9
43. Tabatabai, M. A.. Soil enzymes. In: Weaver RW, Angle JS, Bottomley PS (eds) Methods of soil analysis, part 2. Microbiological and biochemical properties. 1994. SSSA Book Series No. 5. Soil Sci. Soc. Am. Madison, Wis., pp. 775-833.
44. Ajwa, H. A., Tabatabai, M. A.. Decomposition of different organic materials in soils. 1994. *Biol. Fert. Soils* 18: 175-182.
45. Martinez, C. E., Tabatabai, M. A.. Decomposition of biotechnology byproducts in soils. 1997. *J. Environ. Qual.* 26: 625-632.
46. Esen, A.. β -Glucosidases-Biochemistry and Molecular Biology, ACS Symposium Series, 533, 1993. American Chemical Society, Washington, D. C.
47. Bandick, A. K., Dick, R. P. Field management effects on soil enzyme activities. . 1999. *Soil Biol. Biochem.* 31:1471-1479.

ВЛИЯНИЕ НА АМИНОКИСЕЛИНЕН ТОР СТИМАК ВЪРХУ ПОЧВАТА И ДОБИВА ОТ ЗЪРНЕНО – ЖИТНИ КУЛТУРИ

ВАСИЛИНА МАНЕВА¹, ДИНА АТАНАСОВА¹, МЛАДЕН НАЙДЕНОВ²

¹Институт по земеделие – Карнобат, ²Аграрен Университет – Пловдив

e-mail:maneva_ent@abv.bg

Резюме: През периода 2015 – 2017, в опитното поле на Институт по земеделие – Карнобат е заложен полски опит с аминокиселинен тор СтимАК. При зърнено – житните култури – многореден ечемик сорт Ахелой 2, двуреден ечемик сорт Емон, пшеница сорт Миряна и ръж сорт Бул Милениум аминокиселинния тор е приложен в два варианта - чрез инкорпориране в почвата преди сейтба и чрез вегетационно пръскане, в доза 30 l/ha. От всички житни за контрола е оставен и нетретиран вариант. Големина на опитните парцели е 25 m² в четири повторения за всеки от трите варианта. След узряване и жътва на културите е изчислен добива от всеки вариант. Математическата обработка е извършена с програма BIO. В Аграрен Университет – Пловдив са изследвани почвени пробы за определяне влиянието на аминокиселинния тор СтимАК върху биологичната активност на почвата, взимани от вариантите с почвено инкорпориране на аминокиселинния тор и от нетретириания вариант – контрола. Направени са следните тестове: Активност на β-глюкозидазата, pH, електропроводимост (EC), почвеното дишане, определени са основни групи микроорганизми – бактерии, гъби и азотфиксирщи микроорганизми. От направеното проучване се установи, че добавянето на аминокиселинен тор се отразява благоприятно върху цялостната биологична активност на почвата. Броя на микроорганизмите, почвеното дишане и ензимна активност се повишават при третираните варианти. Количество на азотфиксирщи микроорганизми се повишава 2.75 пъти. Почвеното дишане и β-глюкозидазната активност нарастват при третираните варианти в сравнение с контролата. Аминокиселинният тор СтимАК оказва положително въздействие върху добива и при четирите култури, като по – високи добиви се отчитат при вегетационното му приложение.

Ключови думи: аминокиселинен тор, биологична активност на почвата, зърнено-житни култури, добив

INFLUENCE OF STIMAC AMINO ACID FERTILIZER ON SOIL AND YIELD FROM CEREALS

VASILINA MANEVA¹, DINA ATANASOVA¹, MLADEN NAYDENOV²

¹Institute of Agriculture - Karnobat, ²Agricultural University - Plovdiv

e-mail: maneva_ent@abv.bg

Abstract: : During the period 2015 - 2017, in the experimental field of the Institute of Agriculture - Karnobat, a field experiment with the amino acid fertilizer StimAK was set. In cereals - multi-row barley variety Aheloy 2, double-row barley variety Emon, wheat variety Mirjana and rye variety Bull Millennium amino acid fertilizer is applied in two versions - by incorporation into the soil before sowing and by vegetative spraying in a dose of 30 l/ ha. Of all the cereals, an untreated version is left for control. The size of the experimental plots is 25 m² in four repetitions for each of the three options. After ripening and harvesting the crops, the yield of each variant is calculated. The mathematical processing was performed with the BIO program. In the Agricultural University - Plovdiv soil samples were studied to determine the influence of the amino acid fertilizer StimAK on the biological activity of the soil, taken from the variants with soil incorporation of the amino acid fertilizer and from the untreated variant - control. The following tests were performed: β-glucosidase activity, pH, electrical conductivity (EC), soil respiration, the main groups of microorganisms were determined - bacteria, fungi and nitrogen-fixing microorganisms. The study found that the addition of amino acid fertilizer has a beneficial effect on the overall biological activity of the soil. The number of microorganisms, soil respiration and enzyme activity increase in the treated variants. The amount of nitrogen-fixing microorganisms increases 2.75 times. Soil respiration and β-glucosidase activity increased in the treated variants compared to the control. The amino acid fertilizer StimAK has a positive effect on the yield of all four crops, as higher yields are reported in its vegetation application.

Key words: amino acid fertilizer, biological soil activity, cereals, yield

1. Въведение

Разширяването на екологичните подходи за подобряване растежа на растенията и продуктивността на културите е от голямо значение за устойчивото земеделие. Проучванията показват, че високите нива на минерално торене водят до образуване на канцерогенни нитрозамини в почвената среда, до значителни промени в микробиоценозите и до намаляването на някои полезни микроорганизми [1]. Почвените микроорганизми се считат за чувствителен показател за здравето и качеството на почвата. В конвенционалното земеделие почвените микроорганизми са силно засегнати от интензивната агротехника, включително прилагането на торове [2]. Повечето изследвания показват, че органичните торове могат да смекчат отрицателното въздействие от минералното торене върху бактериалните съобщества [3] и да се подобри устойчивостта на отглеждане на културите. В различни проучвания е установено, че аминокиселинните биоторове могат значително да подобрят биологичната активност на почвата, да повишат микробната активност, броят на бактериите и нивата на колонизация на микориза в ризосфера на царевица [4], обикновена пшеница [5], а от там и повишаване на добива [6] и качество [7].

СтимАК е аминокиселинен тор, който се използва като биостимулатор за растенията, за да подпомогне техния растеж и устойчивост. Разработен е във фирма Биодинамика ООД, която е основана преди повече от 10 години от колектива на Лабораторията по микробиологични биотехнологии към Аграрен Университет Пловдив. СтимАК е първият продукт на фирмата, който притежава регистрация (със заповед №РД11-463 от 23.03.2016 г.) и се предлага свободно на българския пазар. Интересите на компанията са изцяло насочени към разработка и приложение на естествени и микробиологични продукти, предназначени за земеделието. В строежа и състава на всички живи същества задължително участват белтъчините, които, от своя страна, са изградени от аминокиселини. Белтъчините (протеините) могат да изпълняват различни функции в растителната клетка. Например, структурните протеини участват в изграждането на клетъчните стени, транспортните протеини служат за пренос на вещества в клетката, а други белтъчини образуват прости ензими и

ензимни комплекси или играят важна роля в хормоналния обмен на растенията. Въпреки че при хората, животните и растенията белтъчините са огромен брой, те са изградени само от 20 аминокиселини. Тези 20 аминокиселини могат да се свързват в различен ред и брой, като по този начин формират огромното разнообразие от протеини. Всяко растение има способността да си синтезира само аминокиселините, които са му необходими за формиране на белтъците. За да се случи тази биохимична реакция обаче, се изисква разход на голямо количество енергия, градивни материали и време. Разбира се, всяко растение може само да синтезира своите аминокиселини, но ако ги получи на готово, това се отразява положително на биохимичните процеси, които протичат в него и метаболизъмът му се ускорява значително.[8]. Целта на настоящото изследване е да се установи влиянието на аминокиселинния тор СтимАК върху почвата и добива от някой зърнено-житни култури.

2. Материал и методи

През периода 2015 – 2017, в опитното поле на Институт по земеделие – Карнобат е заложен полски опит с аминокиселинен тор СтимАК. При зърнено – житните култури – многореден ечемик сорт Ахелой 2, двуреден ечемик сорт Емон, пшеница сорт Миряна и ръж сорт Бул Милениум аминокиселинния тор е приложен в два варианта - чрез инкорпориране в почвата преди сейтба и чрез вегетационно пръскане, в доза 30 l/ha. От всички житни за контрола е оставен и нетретиран вариант. Големина на опитните парцели е 25 m² в четири повторения за всеки от трите варианта. След узряване и жътва на културите е изчислен добива от всеки вариант. Математическата обработка е извършена с програма BIO.

В Аграрен Университет – Пловдив са изследвани почвени проби за определяне влиянието на аминокиселинния тор СтимАК върху биологичната активност на почвата, взимани от вариантите с почвено инкорпориране на аминокиселинния тор и от нетретириания вариант – контрола. Направени са следните тестове:

Активността на β-глюказидазата е определяна по метода на Eivazi и Tabatabai [9]. Като субстрат за ензимна активност е използван р-нитрофенил глюкопиранозид. В ерленмайерова колба от 50ml се поставя 1g

предварително пресята почва (през сито 2mm). Добавят се разтвор на р-нитрофенил глюкопиранозид с концентрация 25mmol/l. Пробите се инкубират в термостат при 37°C за 1h при pH 6, достигнато след прибавяне на модифициран универсален буфер (MUB). След инкубирането се добавят 1ml 0.5M CaCl₂ и 4ml Tris буфер с pH 12 за екстракция на *p*-нитрофенола (PNP), отделен от субстрата в следствие на ензимната активност. Пробите се разбъркват интензивно и веднага се филтратват. Количество на отделяният *p*-нитрофенол се определя фотометрично при дължина на вълната 400nm на спектрофотометър Spectroquant® Pharo 300, Merck. Активността е изразена като µg PNP отделен от 1 g почва за 1h.

Стойностите на pH са определени потенциометрично в екстракт с дестилирана вода, в съотношение почва:вода 1:5. pH се определя след енергично разбъркане в продължение на 5 минути и утайване в продължение на 2h с WTW inoLab, модел multi 720.

Електропроводимост (EC) е измерена в екстракт с дестилирана вода, в съотношение почва:вода 1:5 след разбъркане в продължение на 30min на орбитална клатачна машина с WTW inoLab, модел multi 720.

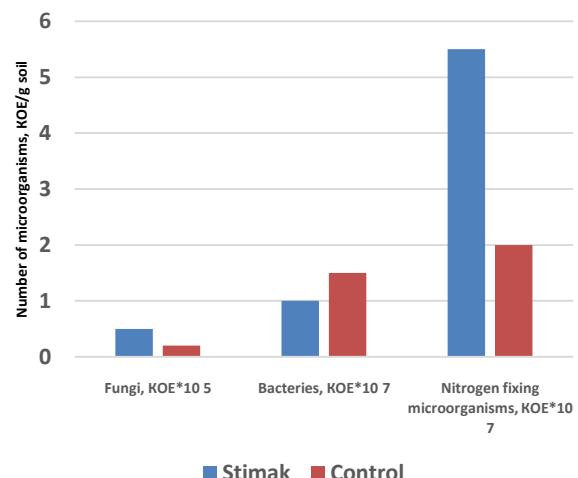
Почвено дишане - определено е като 20 g почва се претегля в пластмасови чаши и се инкубира на тъмно при 25 ° C за 24h. След това за 6h се улавя отделяният CO₂ в разтвор на KOH в херметично затворен съд и количеството му се определя посредством титруване на нереагираната основа. При индуцираното почвено дишане към почвата се добавя 1g суха глюкоза. След добро хомогенизиране пробата се инкубира при същите условия и условията в сборника с основа CO₂ се измерва чрез титруване със разтвор на HCl. На всеки 1ml изразходвана 1n HCl отговаря 22mg отделен CO₂. Активност - µg CO₂/g почва/ h.

Определяни са основни групи микроорганизми – бактерии, гъби и азотфиксирани микроорганизми.

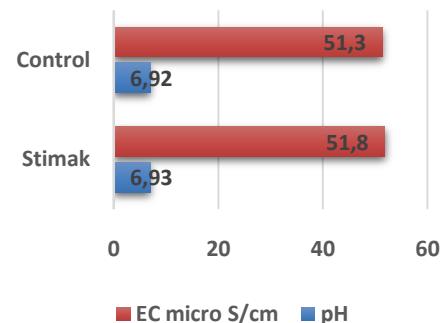
Определянето е извършено чрез посявка върху твърда хранителна среда - *Rose-Bengal Chloramphenicol Agar* (Merck Millipore100467) за гъби, *Tryptic Soy Agar* и без азотна среда за азотфиксирани микроорганизми.

3. Резултати и обсъждане

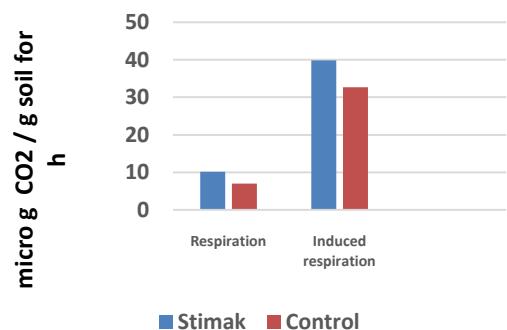
При почвено приложение на аминокиселинния тор СтимАК е отчетено влиянието му върху почвените микроорганизми (фиг.1). Установи се увеличаване на почвените гъби и азотфиксирани микроорганизми и намаляване на почвените бактерии. Тези резултати кореспондират с други изследвания [10, 11, 12], потвърждаващи действието на аминокиселинни торове върху микробната биомаса в почвата.



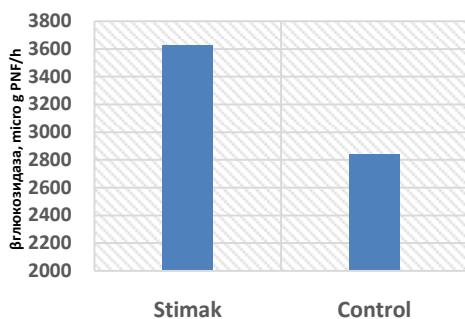
Фиг. 1. Влияние на добавения аминокиселинен тор СтимАК върху общото количество почвени микроорганизми



Фиг. 2. Влияние на добавения аминокиселинен тор СтимАК върху pH и EC на почвата



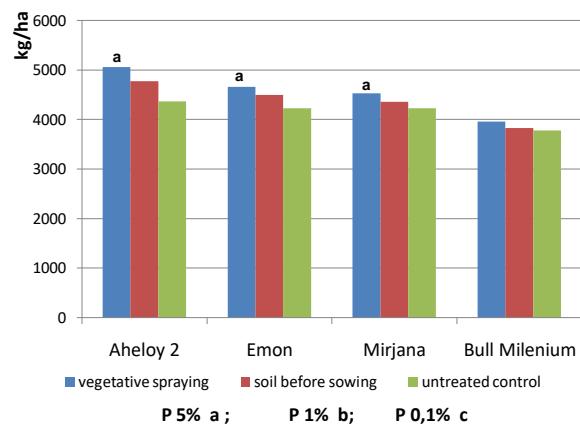
Фиг. 3. Влияние на добавения аминокиселинен тор СтимАК върху почвеното дишане



Фиг. 4. Влияние на добавения аминокиселинен тор СтимАК върху активността на β -глюкозидазата

Приложен почвено СтимАК увеличава несъществено pH и ЕС на почвата (фиг.2), но значително увеличава почвеното дишане и индуцираното почвено дишане (фиг. 3) и β -глюкозидазата (фиг.4), което потвърждава увеличената микробиологична активност на почвата.

Изследвано е и влиянието на аминокиселинния тор СтимАК върху добива от житни култури след различните му приложения – почвено и чрез вегетативно пръскане (фиг.5). Най – добри резултати се получават след вегетационното му приложение и при четирите култури – фуражен ечемик Ахелой 2, пивоварен ечемик Емон, пшеница Миряна и ръж Бул Милениум. Малко по – нисък добив, в сравнение с вегетационното му приложение се получава при почвеното такова, сравнено с нетретирана контрола. При ръжта разликата в добивите от третирани и нетретиран вариант са най – слаби, а при фуражния ечемик – най – големи. След направения дисперсионен анализ се установи, че основно влияние върху добива оказва годината (метеорологичните условия), а влиянието на аминокиселинния тор СтимАК е по – слабо – при Ахелой 2 – 7.15%, при Емон – 37.09%, при пшеница Миряна – 8.13% и при ръж – 1.83%. (таблица 1).



Фиг. 5. Влияние на аминокиселинен тор СтимАК върху добива от зърнено-житни култури.
Различните букви (a, b, c) на фигурата означават съществените разлики между сравняваните варианти.

Таблица 1. Резултати от дисперсионния анализ на добива от зърнено-житни култури

Source of variation	SQ	D F	η^2 (%)
Aheloy 2			
Total variation	6730 0.00	5	
Years	6.67 6201	1	9 2.15
Amino acid fertilizer StimAK	00 4809.	2	.15 .7
Accidental factors	3 474.3	2	.70 .0
Emon			
Total variation	5075. 33	5	
Years	00 2904.	1	5 7.22
Amino acid fertilizer StimAK	33 1882.	2	.3 7.09
Accidental factors	0 289.0	2	.5 .69
Mirjana			
Total variation	1113 8.83	5	
Years	8.17 1016	1	9 1.29
Amino acid fertilizer StimAK	3 905.3	2	.8 .13
Accidental factors	65.33	2	.0 .59
Rye			
Total variation	1977 4.00	5	
Years	6.67 1926	1	9 7.43
Amino acid fertilizer StimAK	0 361.0	2	.1 .83
Accidental factors	3 146.3	2	.0 .74

4. Изводи

Добавянето на аминокиселинен тор се отразява благоприятно върху цялостната биологична активност на почвата. Броя на микроорганизмите, почвеното дишане и ензимна активност се повишават при третираните варианти. Количество на азотфиксирани микроорганизми се повишава 2.75 пъти. Почвеното дишане и β-глюкозидазната активност нарастват при третираните варианти в сравнение с контролата.

Аминокиселинният тор СТИМАК оказва положително въздействие върху добива и при четирите култури, като по-високи добиви се отчитат при вегетационното му приложение.

ЛИТЕРАТУРА

1. Barabasz, W., D. Albinska, M. Jaskowska, J. Lipiec. Biological Effect of Mineral Nitrogen fertilization on Soil Microorganisms. *Pol. J. Environ. Stud.* 2002; 11(3):193-198. <http://www.pjoes.com/Biological-Effects-of-Mineral-Nitrogen-on-Fertilization-on-Soil-Microorganisms>,87441,0,2.html
2. Geisseler, B.A. Linquist, P. A. Lazicki. Effect of fertilization on soil microorganisms in paddy rice systems – A meta-analysis. *Soil Biology and Biochemistry*. 2017. 115: 452-460. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.09.018>
3. Lin Chen, F. Li, Q. Ning, J. Li, J. Zhang, D. Ma, C. Zhang. Organic amendment mitigates the negative impact of mineral fertilization on bacterial communities in Shajiang black soil. *Applied Soil Ecology*. 2020, 150. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.103457>
4. Gao, C.; El-Sawah, A.M.; Ali, D.F.I.; Alhaj Hamoud, Y.; Shaghaleh, H.; Sheteiwy, M.S. The Integration of Bio and Organic Fertilizers Improve Plant Growth, Grain Yield, Quality and Metabolism of Hybrid Maize (*Zea mays* L.). *Agronomy* 2020, 10, 319. <https://doi.org/10.3390/agronomy10030319>
5. Dal Cortivo C, Ferrari M, Visioli G, Lauro M, Fornasier F, Barion G, Panozzo A and Vamerali T (2020) Effects of Seed-Applied Biofertilizers on Rhizosphere Biodiversity and Growth of Common Wheat (*Triticum aestivum* L.) in the Field. *Front. Plant Sci.* 11:72. doi: 10.3389/fpls.2020.00072 <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2020.00072/full?report=reader>
6. Wang D, Deng X, Wang B, Zhang N, Zhu C, Jiao Z, et al. (2019) Effects of foliar application of amino acid liquid fertilizers, with or without *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9, on cowpea yield and leaf microbiota. *PLoS ONE* 14(9): e0222048. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222048>
7. V. De Luca, D.G. de Barreda, A. Lidon and C. Lull. Effect of Nitrogen-fixing Microorganisms and Amino Acid-based Biostimulants on Perennial Ryegrass. *American Society for Horticultural Science*. 2020, 30 (2): 280-291. <https://doi.org/10.21273/HORTTECH04236-19>
8. <https://stabilagro.com/bg/news/view/stabil-agro-treyd-predlaga-nov-produkt-aminokiselin-tor-stimak/>
9. Eivazi, F., Tabatabai, M. A. 1988. Glucosidases and galactosidases in soils. *Soil Biol. Biochem.* 20: 601–606.
10. Brassard, P., S. Godbout, V. Lévesque, Joahn n, H. Palacios, V. Raghavan, A. Ahmed, R. Hogue, T. Jeanne, M. Verma. Char and Carbon Materials Derived From Biomass 4 - Biochar for Soil Amendment, Carbon Materials Derived from Biomass (2019), pp. 109-146, [10.1016/B978-0-12-814893-8.00004-3](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814893-8.00004-3)
11. H.J. Xu, X.H. Wang, H. Li, H.Y. Yao, J.Q. Su, Y.G. Zhu. Biochar impacts soil microbial community composition and nitrogen cycling in an acidic soil planted with rape. *Environ. Sci. Technol.*, 48 (16) (2014), pp. 9391-9399, [10.1021/es5021058](https://doi.org/10.1021/es5021058)
12. Mengyu Gao, Jinfeng Yang, Chunmei Liu, Bowen Gu, Meng Han, Junwei Li, Na Li, Ning Liu, Ning An, Jian Dai, Xiaohua Liu, Xiaori Han. Effects of long-term biochar and biochar-based fertilizer application on brown earth soil bacterial communities, *Agriculture, Ecosystems & Environment*, Volume 309, 2021, 107285, ISSN 01678809, <https://doi.org/10.1016/j.agee.2020.107285>. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167880920304710>)

ВЛИЯНИЕ НА СРОКОВЕТЕ НА СЕЙТБА ВЪРХУ ФИТОСАНИТАРНОТО СЪСТОЯНИЕ НА ПИВОВАРЕН ЕЧЕМИК В БИОЛОГИЧНО ЗЕМЕДЕЛИЕ

ДИНА АТАНАСОВА¹, ВАСИЛИНА МАНЕВА¹

¹Институт по земеделие, Карнобат

E-mail: dinadadar@gmail.com

Резюме: Проучването е проведено през периода 2011-2014 г. в сертифицирано биологично поле в Институт по земеделие – Карнобат. За условията на биологично земеделие сеятбата след оптималните срокове на сортовете пивоварен ечемик (ноември и декември) способства намаляване на заплевеляването. При засяване в по-късните срокове (януари - февруари) конкурентността на културата намалява и се появява вторично заплевеляване. С най-ниско ниво на заплевеляване са сортовете Емон, Лардея, Ванеса и Вики, а с най-високо – Кристи и Каскадьор. Най-значим фактор за заплевеляването е условията на годината. При ечемика отглеждан в биологично земеделие са установени три вида листни въшки - *Sitobion avenae* (Fabricius, 1775), *Rhopalosiphum maidis* (Fitch, 1856) и *Rhopalosiphum padi* (Linnaeus, 1758), като най – разпространен е - *Sitobion avenae* (Fabricius, 1775). Най – висока плътност листните въшки достигат при късните срокове на сеятба – януари и февруари. Най – предпочитани в тези срокове са сортовете - Ванеса, Вики и Каскадьор.

Ключови думи: биологично земеделие, сеятбени норми, заплевеляване, неприятели, болести, сортове пивоварен ечемик

INFLUENCE OF SOWING DATES ON THE PHYTOSANITARY STATUS ON BARLEY IN ORGANIC FARMING

DINA ATANASOVA¹, VASILINA MANEVA¹

¹Institute of Agriculture - Karnobat

E-mail: dinadadar@gmail.com

Abstract: The study was conducted during the period 2011-2014 on a certified organical field at the Institute of Agriculture - Karnobat. For organic farming conditions, sowing after the optimal dates barley varieties (November and December) helps reduce weed infestation. When sowing at a later dates (January - February), competitiveness of the crop decreases and secondary weed infestation occurs. The lowest level of weed infestation were the varieties of Emon, Lardeya, Vanessa and Vicky, and the highest - Cristy and Kaskadior. The most significant factor for weed infestation was the conditions of the years. Organically grown barley have been identified as *Sitobion avenae* (Fabricius, 1775), *Rhopalosiphum maidis* (Fitch, 1856) and *Rhopalosiphum padi* (Linnaeus, 1758), the most common being *Sitobion avenae* (Fabricius, 1775). The highest density of aphids reaches the late sowing time - January and February. The most preferable in these sowing dates are the varieties - Vanessa, Vicky and Kaskadior.

Key words: organic farming, sowing dates, weed infestation, pests, diseases, barley varieties

1. Въведение

При биологично отглеждане на зърнено-житни култури един от най-съществените проблеми е борбата с плевели, неприятели и болести. Решението може да бъде намерено чрез редица предпазни и агротехнически мероприятия [1, 2, 3]. Едно от тях са сроковете на сеятба. При оптимизиране времето на сеятба,

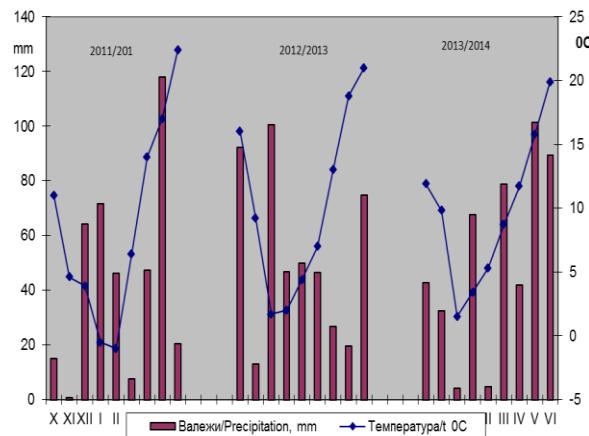
се подобрява продуктивността на културите [4, 5], променя се нивото на заплевеляване, нападението от неприятели и болести [6, 7, 8, 9]. Целта на изследването е да се проучи влиянието на сроковете на сеятба върху фитосанитарното състояние на сортовете пивоварен ечемик, отглеждан в условията на биологично земеделие.

2. Материал и методи

Проучването е проведено през периода 2012-2014 г. при полски условия върху излужени, средномощни песъчливо-глинисти до лекоглинисти смолници в Институт по земеделие - Карнобат, на сертифицирано поле за биологично земеделие. Опитът е изведен с пивоварен ечемик сортове Емон, Лардея, Ванесса, Вики, Крами и Каскадър, засяти в шест дати (I – край на септември, II – средата на октомври, III – началото на ноември, IV – началото на декември, V – началото на януари, VI – началото на февруари). Опитните парцели са с големина 10 m^2 , в три повторения.

В опитните парцели са отчетени видовия състав на плевелите [10] и плътността им (бр./m^2) в метровки 0.25 m^2 в 3 повторения. Във всеки вариант е проследена динамиката на листните въшки, като обследванията са правени през пролетния вегетационен период на еchemика, ежеседмично - на 10 места върху 10 еchemични стъбла [11]. Таксономичният анализ на видовете листни въшки е извършен по [12, 13, 14]. Определянето на нападението от болести е извършено чрез обхождане на парцелките по време на вегетация на културата, по маршрутният метод, чрез преглед на растения.

В Югоизточна България климатът е преходно-континентален със средни годишни валежи от 549 mm. Зимата е сравнително топла, пролетта е кратотрайна и хладна, лятото е горещо и сухо, есента е продължителна и топла. Агрометеорологичните условия през есента 2011 г. са изключително неблагоприятни. През август и септември са паднали 11.6 mm валежи, което е само 15 % от многогодишните данни. Поради тези причини през септември 2011 г. първата дата не бе засята. В началото на месец октомври са паднали първите валежи, след които почвата се обработи и се извърши сеитба. Това затрудни изключително много обработката и подготовката на почвата за сеитбата. Всичко това се отрази неблагоприятно върху растежа и развитието на зимния еchemик. Посевите останаха редки, а плътността на плевелите и свежата им биомаса е висока. Вегетационните 2012/2013 и 2013/2014 г. са с валежи над нормата, като през последната година те са разпределени неравномерно по месеци, но осигуряват влагата през критичните периоди и условията за зърнено-житните култури са благоприятни. Те се развиват добре и заплевеляването е значително по-ниско (Фиг. 1).



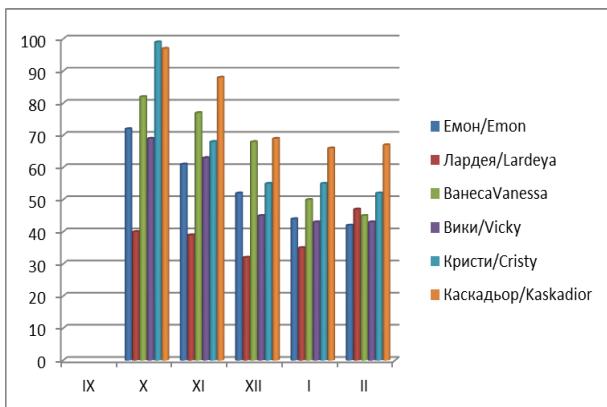
Фиг. 1. Температура на въздуха (°C) и разпределение на валежите (mm)

3. Резултати и обсъждане

Заплевеляването в опита е от смесен тип, като общото заплевеляване средно за периода варира в значителни граници, в зависимост от срока на сеитбата и условията на годината. Първата година се характеризира с високо ниво на заплевеляване - отчетени са фасулче (*Polygonum convolvulus* L.) до 52 бр./m^2 и видове кошрява (*Setaria spp.*) - до 87 бр./m^2 . През втората и третата година на изследване в площите преобладават фасулче и пача трева, но третата година се характеризира с единични плевели в парцелките.

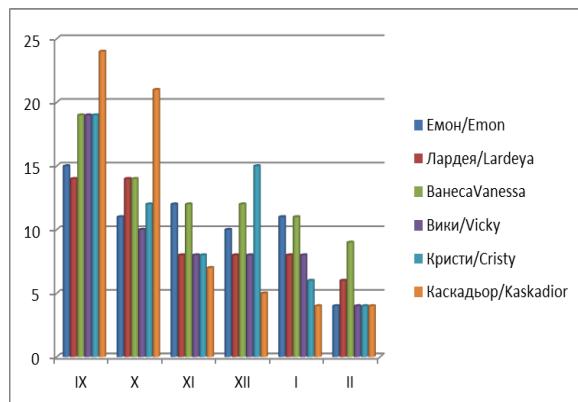
През 2011/2012 вегетационна година с най-ниско ниво на заплевеляване във всичките дати на сеитба е сорт Лардея. Заплевеляването варира от 30 бр./m^2 (декември) до 50 бр./m^2 през февруари. С най-високото ниво на заплевеляване са сортовете Кристи (97 бр./m^2) и Каскадър (95 бр./m^2), засяти през октомври. Това се подтвърждава и в изследванията на Cosser et al. [15] които установяват, че при ранната сеитба на пшеницата количеството на плевели се увеличава значително. При по-късни дати на сеитба, нивото на заплевеляване намалява, във връзка с увеличаване на предсеитбените обработки. Изключение е последната дата през февруари, когато растенията са по слаби, а плевелите с по-висока конкурентна способност ги подтикват (Фиг. 2).

През втората година на проучването, заплевеляването е значително по-ниско, като в отделните парцелки достига до 23 бр./m^2 . През първата дата на сеитба заплевеляването е най-високо при сорт Каскадър (23 бр./m^2), а най-ниско - при сорт Лардея (14 бр./m^2). В парцелките, засяти през октомври най-малък брой плевели са отчетени при сортовете Вики (9 бр./m^2) и Емон (11 бр./m^2).



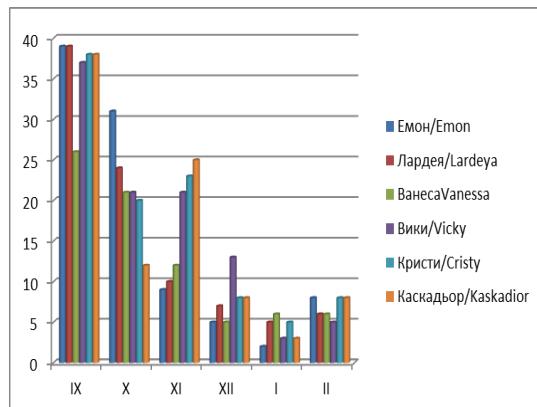
Фиг. 2. Заплевеляване на сортовете пивоварен ечемик през 2011/2012 г.
(бр./ m^2)

През 2012/2013 година най-ниското ниво на заплевеляване е в парцелките, засяти през февруари – 3-8 бр./ m^2 , което се обяснява с късните почвени обработки и със засушливите условия през пролетния период (Фиг. 3).



Фиг. 3. Заплевеляване на сортовете пивоварен ечемик през 2012/2013 г.
(бр./ m^2)

През последната година на изследването тенденцията се запазва – с най-малко плевели са вариантите, засяти през януари и февруари, а с най-много през септември. Това потвърждава изследванията на Rasmussen [6], която подчертава, че биомасата на плевелите през лятото е най-голяма в парцелите, засяти в оптималното време на сейтба, в сравнение със късната. В парцелките, засяти през септември, с добра конкурентна способност е сорт Ванеса. От тези засяти през октомври - Каскадьор, Емон, Вики и Ванеса, а през ноември и декември добра конкурентноспособност показват - Емон, Лардея и Ванеса. В парцелките, засяти през януари и февруари, поради по-слабата конкурентноспособност на културата, започва вторичното заплевеляване (Фигура 4).



Фиг. 4. Заплевеляване на сортовете пивоварен ечемик през 2013/2014 г.
(бр./ m^2)

Анализът на варианса от трите години на опита показват, че с най-голяма тежест в заплевеляването на посевите са условията на годината (80.43 %) и датите на сейтба (7.62 %). Сортовете ечемик не оказват съществено влияние (2.68 %), както и взаимодействието на двета фактора – сортове и дати на сейтба (0.80 %) (Таблица 1).

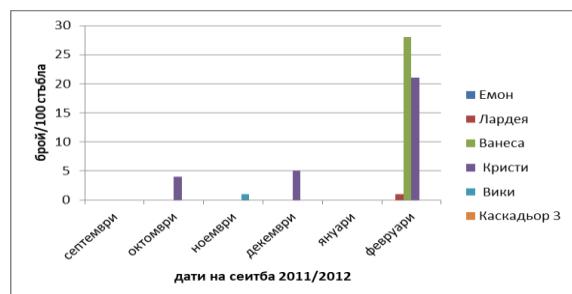
Таблица 1. Анализ на варианса на заплевеляване при сортовете пивоварен ечемик, засят в различни дати

Източник на вариране Source of variability	SQ	DF	$\eta^2(\%)$
Обща дисперсия Main effects	58824.10	89	
Условия на годината/Years	47311.80	2	80.43
F_1 – сортове/ Varieties	1574.63	5	2.68
F_2 – дати на сейтба/ Date of sowing	4480.93	4	7.62
Взаимодействие на фактори $F_1 \times F_2$	471.20	20	0.80
Случайни фактори/ Accidental	4985.53	58	8.48

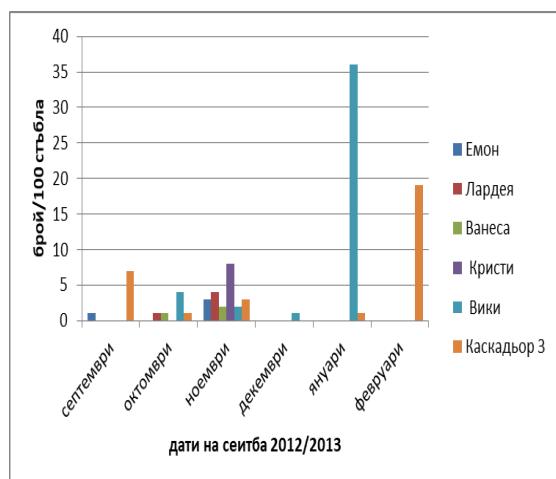
При биологичното отглеждане на ечемика, са установени три вида листни въшки - *Sitobion avenae* (Fabricius, 1775), *Rhopalosiphum maidis* (Fitch, 1856) и *Rhopalosiphum padi* (Linnaeus, 1758), като най – разпространен е - *Sitobion avenae* (Fabricius, 1775).

При обследване на ечемика през 2011/2012 година, най – висока плътност на листните въшки е констатирана при сорт Ванеса – 28 бр./100 стъбла във февруарската дата на сейтба, следвана от сорт Кристи – 21 бр./100 стъбла в късната дата на сейтба. През

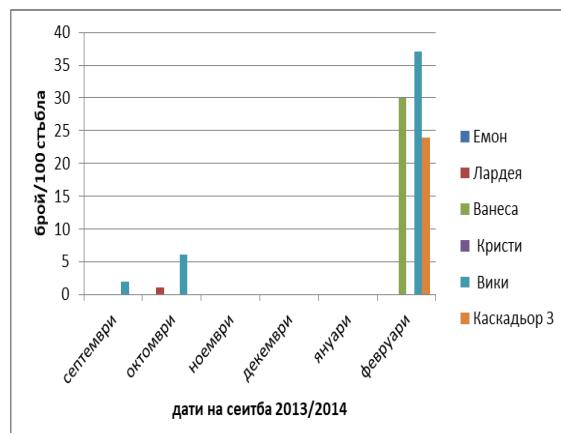
стопанската 2012/2013 година плътността на листните въшки е най – висока при сорт Вики – 36 бр./100 стъбла в януарска дата и сорт Каскадър – 19 бр./100 стъбла. През 2013/2014 година листните въшки се отчитат в най – висока плътност при сорт Вики - 37 бр./100 стъбла, следвани от ечемик сорт Ванеса и Каскадър – съответно 30 и 24 бр./100 стъбла в последният срок на сейтба (февруари) (Фиг. 5, 6 и 7).



Фиг. 5. Листни въшки по пивоварен ечемик в различни дати на сейтба 2011/2012



Фиг. 6. Листни въшки по пивоварен ечемик в различни дати на сейтба 2012/2013



Фиг. 7. Листни въшки по пивоварен ечемик в различни дати на сейтба 2013/2014

4. Заключение

За условията на биологично земеделие сейтбата след оптималните срокове на сортовете пивоварен ечемик (ноември и декември) способства намаляване на заплевеляването. При засяване в по-късните срокове (януари - февруари) културата е с по-малко братя, конкурентността и намалява и се появява вторично заплевеляване. Има значителна сортова конкурентност спрямо наличните плевели. С най-ниско ниво на заплевеляване са сортовете Емон, Лардея, Ванеса и Вики, а с най-високо – Кристи и Каскадър.

При ечемика отглеждан в биологично земеделие са установени да вредят три вида листни въшки - *Sitobion avenae* (Fabricius, 1775), *Rhopalosiphum maidis* (Fitch, 1856) и *Rhopalosiphum padi* (Linnaeus, 1758), като най – разпространен е - *Sitobion avenae* (Fabricius, 1775). Най – висока плътност листните въшки достигат при късните срокове на сейтба – януари и февруари. Най – предпочитани в тези срокове са сортовете - Ванеса, Вики и Каскадър.

ЛИТЕРАТУРА

- Atanasova, D., V. Maneva. Cultivation of cereal crops on a certified field for organic farming at the Institute of Agriculture in Karnobat, Bulgaria. Bulgarian Journal of Crop Science, 55 (5):3-7. 2018. https://cropscience-bg.org/page/bg/details.php?article_id=692
- Barberi, P. Weed management in organic agriculture: are we addressing the right issues? Weed Research. 2002. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3180.2002.00277.x>
- Cosser, N.D., M. J. Gooding, R. J. Froud-Williams. The impact of wheat cultivar, sowing date and grazing on the weed seedbank of an organic system. Aspects of Applied Biology, 1996, 47: 429-432
- Galav, A., R. Bharose. Effect of dates od sowing, varieties, irrigation schedule and agro meteorological indices on growth and yield attributes of barley varieties under Allahabad conditions.Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. 2017, 6 (5): 1363-1366. <https://www.phytojournal.com/archives/2017/vol6issue5/PartT/6-5-52-501.pdf>
- Schoppach, R., A. Soltani, T. R. Sinclair, W. Sadok. Yield comparison of simulated rainfed wheat and barley across Middle-East, Agricultural Systems, 2017, Vol. 153,

- pp 101-108. ISSN 0308-521X,
<https://doi.org/10.1016/j.agrsy.2016.12.017>.
6. Rasmussen, Ilse A. The effect of sowing date, stale seedbed, row width and mechanical weed control on weeds and yields of organic winter wheat. *Weed Research*, 2004, 44 (1), 12-20.
 7. Hansen, Preben Klarskov; Willas, Jakob and Kristensen, Kristian. A weed suppressive index for spring barley (*Hordeum vulgare L.*) varieties. *Weed Research Oxford*, 2008, 48, pp. 225-236.
 8. Атанасова, Д., В. Манева. Влияние на сроковете на сеитба върху заплевеляването и добива от фуражен ечемик в биологично земеделие. XXVI-та Международна Научна Конференция посветена на LV години от основаването на Съюз на учените - Стара Загора. 2016. www.sustz.com/journal/0/1620.pdf
 9. Gemedi, G., W. Sinebo and K. Belete. Sowing Date and Pesticide Application Effects on Barley grown in Central Ethiopia. *Journal of Natural Sciences Research*, 2020, vol. 10 (1): 37-42. ISSN 2225-0921.
 10. Делипавлов, Д., Ив. Чешмеджиев, М. Попова, Д. Терзийски, Ив. Ковачев. Определител на растенията в България. Пловдив, Аграрен университет. 2003.
 11. Dewar, A., Dean, G., Cannon, R. Assessment of methods for estimating the numbers of aphids (Hemiptera: Aphididae) in cereals. *Bull. ent. Res.* 1982, 72, 675 – 685.
 12. Emden, H. F. *Aphid technology*, London and New York, 1972, 107-110.
 13. Blackman, R., Eastop, V. *Aphids on the world's crop: an identification and information guide*. New York : John Wiley and Sons. 1984.
 14. Blackman, R., Eastop, V. *Aphids on the World's Herbaceous Plants and Shrubs*, 2 Volume Set, 972. 2006.
 15. Cosser, N.D., M.J. Cooding and R. J. Froud-Williams. The impact of wheat cultivar, sowing date and grazing on the weed seedbank of an organic farming system. *Aspects of Applied Biology* 47, Rotation and cropping systems. 1996, 429-432.

ВЛИЯНИЕ НА СРОКОВЕТЕ НА СЕЙТБА ВЪРХУ ПРОДУКТИВНОСТТА НА ПИВОВАРЕН ЕЧЕМИК В БИОЛОГИЧНО ЗЕМЕДЕЛИЕ

ДИНА АТАНАСОВА¹, ВАСИЛИНА МАНЕВА¹

¹Институт по земеделие, Карнобат

E-mail: dinadadar@gmail.com

Резюме: В сертифицирано поле за биологичното земеделие в Институт по земеделие – Карнобат е изведен полеви експеримент със сортовете пивоварен ечемик Емон, Лардея, Ванеса, Вики, Крами и Каскадър. Целта на експеримента е да се оцени влиянието на датата на сейтба върху продуктивността на ечемика. Експериментът е проведен през 2011-2014. Пивоварен ечемик е засяван в шест дати. Най-високи добиви са получени при сейтба със сортове през първата и втората дата (през септември и октомври). Когато сейтбата е извършена в по-късните дати, добивът намалява и се влияе от метеорологичните условия на годината.

Ключови думи: биологично земеделие, сортове пивоварен ечемик, продуктивността, срок на сейтба

INFLUENCE OF SOWING DATES ON THE PRODUCTIVITY ON MALTING BARLEY IN ORGANIC FARMING

DINA ATANASOVA¹, VASILINA MANEVA¹

¹Institute of Agriculture - Karnobat

E-mail: dinadadar@gmail.com

Abstract: In a certified field for organic farming at the Institute of Agriculture - Karnobat, a field experiment was conducted with the varieties of malting barley Emon, Lardeya, Vanessa, Vicky, Krami and Kaskadior. The aim of the experiment was to evaluate the influence of the date of sowing on the productivity of barley. The experiment was conducted in 2011-2014. Malting barley was sowing on six dates. The highest yields were obtained when sowing with varieties on the first and second date (September and October). When sowing was done at later dates, the yield decreases and was affected by the weather conditions of the year.

Key words: organic farming, malting barley varieties, productivity, sowing dates

1. Въведение

При биологично отглеждане на зърнено-житните култури, агротехническите мероприятия са едни от най-добрите възможности за повишаването на продуктивността и решаване на растителнозащитните проблеми [1, 2]. Правилно подбраните предшественици способстват за по-добро развитие на културите и фитосанитарно състояние на посева [3, 4, 5]. Сейтбените норми също играят значителна роля в намаляване на плътността на неприятелите и заплевеляването [6, 7]. При оптимизиране времето на сейтба, се увеличава продуктивността на културите, променя се нивото на заплевеляване и нападението от неприятели и болести [3, 8, 9, 10].

В конвенционалното земеделие ранните срокове на сейтба имат положителна корелация

с продуктивността на ечемика [11, 12, 13, 14,] а късните - отрицателна [15, 16].

Целта на изследването е да се проучи влиянието на сроковете на сейтба върху продуктивността на сортовете пивоварен ечемик, отглеждан в условията на биологично земеделие.

2. Материал и методи

Проучването е проведено на почвен тип смолница (Eutric Vertisols) [17] в сертифицирано поле за биологично земеделие, поддържано от Институт по земеделие – Карнобат. Полският експеримент е изведен през периода 2011 – 2014 г. Обект на проучването са сортовете пивоварен ечемик: Емон, Лардея, Ванеса, Вики, Крами и Каскадър, засявани в шест дати (I – край на септември, II – средата на октомври, III – началото на ноември, IV – началото на декември, V – януари, VI - февруари). Големината на опитната парцела е 10 m²., в три

повторения. След прибирането е отчетен добивът ($kg.da^{-1}$). Данните са обработени чрез дисперсионен анализ (програма BIO).

Агрометеорологичните условия през есента 2011 г. са изключително неблагоприятни. През август и септември са паднали 11.6 mm валежи, което е само 15 % от многогодишните данни. Това затрудни изключително много обработката и подготовката на почвата за сейта. Затова през септември първата дата не бе засята. В началото на месец октомври са паднали първите валежи, след които почвата се обработи и се извърши сейта. Всичко това се отрази неблагоприятно върху растежа и развитието на зимния ечемик. Посевите останаха редки, а плътността на плевелите и свежата им биомаса е висока. Вегетационните 2012/2013 и 2013/2014 г. са с валежи над нормата, като през последната година валежите са разпределени неравномерно по месеци, но осигуряват влагата през критичните периоди и условията за зърнено-житните култури са благоприятни (Таблица 1).

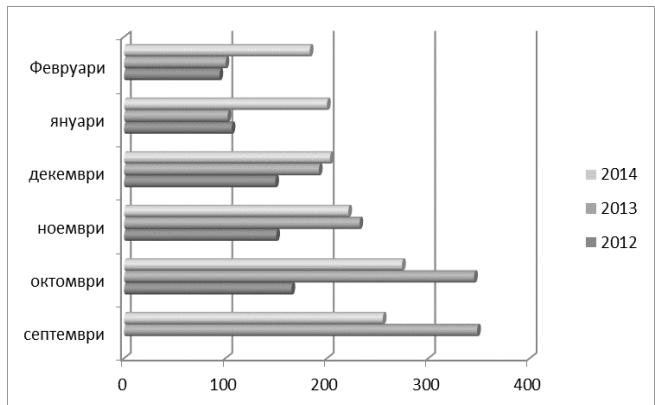
Таблица 1. Температура на въздуха ($^{\circ}C$) и разпределение на валежите (mm)

Валежи, mm	Температура, $^{\circ}C$								година чрез фебруари
	X	XI	XII	I	II	III	IV		
2011/2012	17.4	17.7	22.9	53	18.5	19.7	12.3	58.4	57.0
2012/2013	91.9	120.3	52.2	32.5	0.2	22.2	32.4	85.1	85.0
2013/2014	41	25.2	46.6	45	50.7	27.8	12.8	12.2	12.0
Темпера- тура, $^{\circ}C$	X	XI	XII	I	II	III	IV		
2011/2012	13.2	7.2	3.1	5.6	4.5	7	10.6	17.7	17.0
2012/2013	13.1	5.6	1.3	1.9	3.3	8.9	12.8	15.1	15.0
2013/2014	12.9	8.2	4.9	1.2	3.8	6.2	10.6	16.1	16.0

3. Резултати и обсъждане

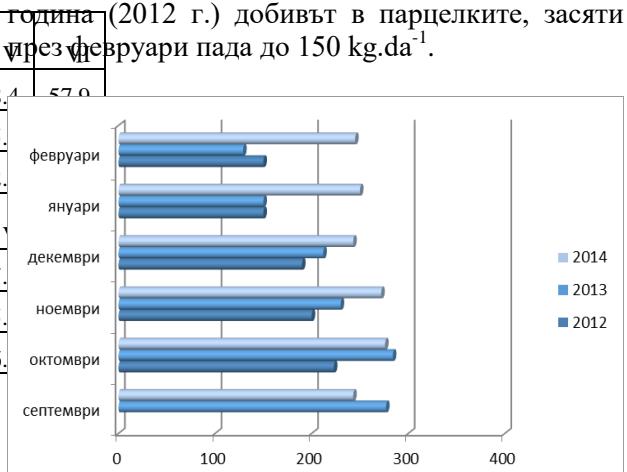
Срокът на сейта оказва значително влияние върху продуктивността на биологично отглежданите сортове ечемик. В зависимост от времето на сейта, условия на годината и сортът, добивът може да варира повече от 40 %.

При пивоварен ечемик Емон, добивите се движат от $94-100 kg.da^{-1}$ през февруари до $345-348 kg.da^{-1}$ през септември и октомври (Фиг. 1). За трите години на изпитването, най-добрите добиви са получени от парцелките, засяти през септември и октомври ($251 - 256 kg.da^{-1}$). Като през благоприятната 2014 г., добивите в различните дати не се различават съществено. Коефициентът на вариация на добива е 39,7 %.



Фиг. 1. Добив ($kg.da^{-1}$) при ечемик сорт Емон при различни срокове на сейта

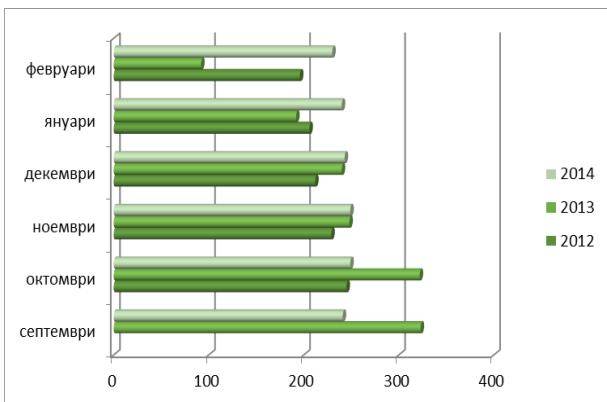
При зимен ечемик сорт Лардея тенденцията се запазва. Добивът през септември и октомври е по-нисък отколкото при сорт Емон, но е стабилен – $240 - 245 kg.da^{-1}$ (Фиг. 2). Коефициентът на вариация е 22,3 %. Добивът е по-стабилен и не се влияе от толкова, колкото при сорт Емон, от датите на сейта и метеорологичните условия в годините на проучването. Резултатите през 2014 показват много стабилен добив през всичките шест дати на сейта – от $276 kg.da^{-1}$ през октомври до $245 kg.da^{-1}$ през февруари. В неблагоприятната (2012 г.) добивът в парцелките, засяти



Фиг. 2. Добив ($kg.da^{-1}$) при еchemик сорт Лардея при различни срокове на сейта

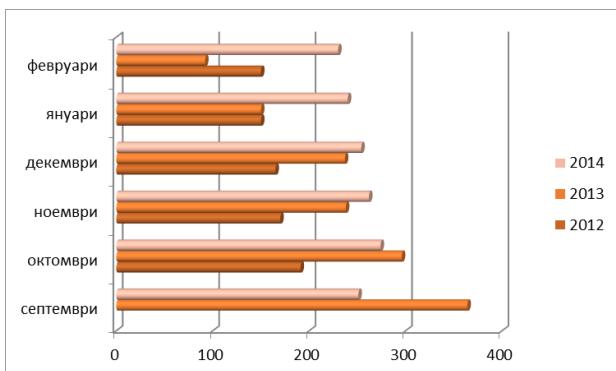
При сорт Ванеса добивът е най-висок при септемврийската и октомврийската дати на сейта, а при другите дати започва да намалява и е най-нисък е при сейтата през февруари (Фиг 3). Тенденцията от 2014 г. важи и за сорт Ванеса. Коефициентът на вариация е 27,2 %.

При сорт Кристи тенденцията се запазва. Добивът е най-висок при септемврийската сейта, в парцелките, засяти през октомври започва да намалява.



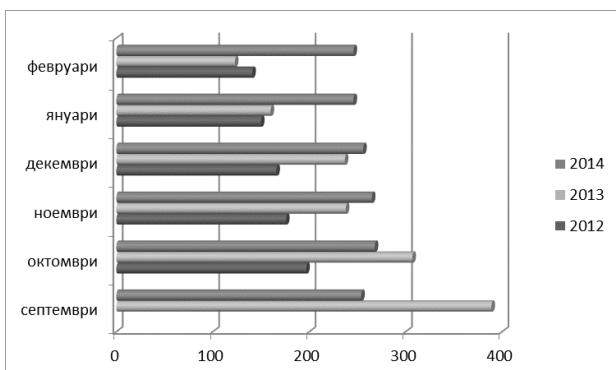
Фиг. 3. Добив (kg.da^{-1}) при ечемик сорт Ванеса при различни срокове на сейтба.

При сейтба през октомври и ноември е почти на едно ниво. През благоприятната 2014 г. добивът е почти на едно ниво в парцелките, засяти в различните дати (Фиг. 4). Коефициентът на вариация на добива е 30,6 %.



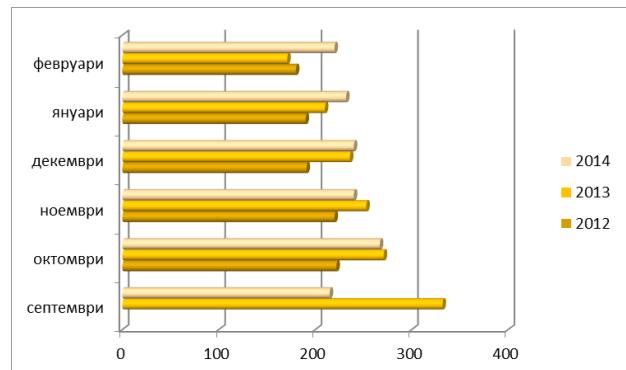
Фиг. 4. Добив (kg.da^{-1}) при еchemик сорт Кристи при различни срокове на сейтба

През годините на проучването, сортът Вики е с най-високи добиви – до 389 kg.da^{-1} в парцелите, засяти през септември до 307 kg.da^{-1} в парцелките, засяти през октомври 2013 г. Тенденцията се запазва – продуктивността се понижава със закъсняване на сейтбата (Фиг. 5). Коефициентът на вариация на добива е 30,3 %.



Фиг. 5. Добив (kg.da^{-1}) при еchemик сорт Вики при различни дати на сейтба

За периода на проучването, сортът Каскадър е с най-ниска продуктивност, в сравнение с останалите сортове. Тенденцията и тук се запазва. Прави впечатление по-ниския коефициент на вариация на добива – 17,0%, което говори за стабилната продуктивност на сорта по годините и датите на сейтба. Резултатите през 2014 показват много стабилен добив през всичките шест дати на сейтба – от 267 kg.da^{-1} през октомври до 200 kg.da^{-1} през февруари.



Фиг. 6. Добив (kg.da^{-1}) при еchemик сорт Каскадър при различни дати на сейтба

Анализа на варианса показва, че условията на годината са с най-малката тежест – 2.16 %. Продуктивността на еchemика, оптглеждан в биологично земеделие, зависи в много голяма степен от сортовете – 34.05 % и датите на сейтба – 36.25 %, както и от взаимодействието на тези два фактора. В изследването на Myali et al. [18], в двуфакторния опит, който цели проучването на реакцията на три сорта еchemик при три дати на засяване, сортът и датата на сейтба са със значими резултати. Това подтвърждава и нашето проучване. Резултатите показват, че със закъсняването на сейтба продуктивността на еchemика се понижава. С най-стабилна продуктивност са сортовете Лардея и Каскадър. С най-висока продуктивност в благоприятни години – сорт Вики (389 kg.da^{-1}). Тази тенденция се потвърждава и в другите изследвания [19, 20].

Таблица 2. Анализ на варианса на продуктивността при сортовете пивоварен еchemик, засят в различни дати

Източник на вариране Source of variability	SQ	DF	$\eta^2(\%)$
Обща дисперсия Main effects	271928.10	89	
Условия на годината/Years	5866.47	2	2.16

F ₁ – сортове/ Varieties	92584.10	5	34.05
F ₂ – дати на сейтба/ Date of sowing	98575.82	4	36.25
Взаимодействие на фактори F ₁ x F ₂	50667.51	20	18.63
Случайни фактори/ Accidental	24234.20	58	8.91

4. Заключение

За условияя на биологично земеделие най-високи добиви се получават при засяване на сортовете в първите срокове - през септември и октомври. Добивите в тези срокове са стабилни през годините и се движат от 277 до 334 kg.da⁻¹. При засяване в по-късни дати добивът намалява и се влияе съществено от метеорологичните условия на годината.

ЛИТЕРАТУРА

- Atanasova, D., V. Maneva. Cultivation of cereal crops on a certified field for organic farming at the Institute of Agriculture in Karnobat, Bulgaria. Bulgarian Journal of Crop Science, 2018, 55 (5):3-7. https://cropscience-bg.org/page/bg/details.php?article_id=692
- Arlauskienė, A., L. Šarūnaitė & Ž. Kadžiulienė. Agronomic practice and performance of organic farms in different environmental conditions in Lithuania, Biological Agriculture & Horticulture, 2020. DOI: [10.1080/01448765.2020.1850351](https://doi.org/10.1080/01448765.2020.1850351)
- Rasmussen, Ilse A. The effect of sowing date, stale seedbed, row width and mechanical weed control on weeds and yields of organic winter wheat. Weed Research, 2004, 44 (1), 12-20.
- Атанасова, Д., Б. Зарков, В. Манева. Влияние на предшествениците върху заплевеляването при зърнено-житните култури в биологично земеделие. Научни трудове на ИЗ -Карнобат. 2013. 2 (1): 279-286. ISSN 1314-961X.
- Атанасова, Д., В. Манева, Б. Зарков. Влияние на предшествениците върху продуктивността на ръж и тритикале в биологично земеделие. В сб: Национална конференция с международно участие „Биологични растениевъдство, животновъдство и храни“, 27-28 ноември 2014 г., Троян. 204-207. ISBN 978-954-8045-33-9.
- [http://www.agriacad.bg/images/novini/Site_2_2%20\(1\).pdf](http://www.agriacad.bg/images/novini/Site_2_2%20(1).pdf)
- Атанасова, Д., В. Котева, Е. Дачев. Влияние на посевната норма върху заплевеляването на биологично отглежданите зърнено-житни култури. Изследвания върху полските култури, 2011, VII (2), 377-381, ISSN 1312-3882.
- Манева, В., В. Котева, Д. Атанасова. Влияние на посевната норма върху нападението от листни въшки при пшеница сорт Енола, отглеждана в условията на биологично земеделие. Растениевъдни науки, 2012, 49, 31-35, ISSN 0568-465X. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=BG2012000420>
- Conry, M. J. Comparison of early, normal and late sowing at three rates of nitrogen on the yield, grain nitrogen and screenings content of Blenheim spring malting barley in Ireland. The Journal of Agricultural Science. 2009. Vol. 125, Issue 2, 183-188.
- Атанасова, Д., В. Манева. Влияние на сроковете на сейтба върху заплевеляването и добива от фуражен ечемик в биологично земеделие. XXVI-та Международна Научна Конференция посветена на LV години от основаването на Съюз на учените - Стара Загора. Science and Technologies, 2016, VI, (6):122-126. www.sustz.com/journal/0/1620.pdf
- Atanasova, D., V. Maneva. The influence in date and sowing rates over winter barley productivity in organic farming. 2nd International Balkan Agriculture Congress, 16-18 May 2017. Congress book, pp 368-373. ISBN 978-605-4265-49-7. 2017.
- Alam, M., Haider, S., & Paul, N. Yield and Yield Components of Barley (*Hordeum vulgare* L.) in Relation to Sowing Times. *Journal of Bio-Science*, 2007, 15, 139-145. <https://doi.org/10.3329/jbs.v15i0.2154>
- Kirby, E., M., Appleyard and G. Fellowes. Effect of sowing date and variety on main shoot leaf emergence and number of leaves of barley and wheat. *Agronomie*, 1985, 5 (2), 117-126.
- Chaudhary, A., Sewhag, M., Hoda, V., Singh, B., & Kumar, P. Effect of different dates of sowing on yield attributes, yield and quality of Barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars. *Journal of Applied and Natural*

- Science*, 2017, 9(1), 129-132.
<https://doi.org/10.31018/jans.v9i1.1160>
14. Pa, P., Pm, P., Jm, P., Ck, P., & Joshi. Response to date of sowing and nitrogen levels on growth, yield and yield attributes and economics of fodder barley (*Hordeum vulgare L.*) under north Gujarat condition. *International Journal of Chemical Studies*, 2020, 8, 1368-1371.
 15. Nass, H., H. Johnston, J. Macleod, J. Sterling. Effect of seeding date, seed treatment and foliar sprays on yield and other agronomic characters of wheat, oats and barley. *Canadian Journal of Plant Science*, 1975, 55(1): 41-47.
 16. Amarjeet, A.; Singh, B.; Kumar, J.; Kumar, M.; Sharma, R.; Kaushik, P. Effect of Sowing Date, Seed Rate and Row Spacing on Productivity and Profitability of Barley (*Hordeum vulgare*) in North India. *Preprints* 2020, 2020010380 (doi: 10.20944/preprints202001.0380.v1).
 17. Ninov, N. 2005. Taxonomic list of soils in Bulgaria according to the FAO world system (Bg).
<http://www.prokarstterra.bas.bg/geo21/2005/5-05/pp4-20.html>
 18. Myali, A.A.H., A.S. Hassoon and A. A. K. Alaameri. Effect of variety and planting date on growth and yield of barley (*Hordeum vulgare L.*). *Plant Archives*, vol. 20 (1): 355-358, 2020. E-ISSN:2581-6063.
 19. Wang, L., Gruber, S., Claurein, W. 2013. Effect of sowing date and variety on yield and weed populations in a lentil=barley mixture. *The Journal of Agricultural Science, Cambridge*, vol. 151, iss. 5:672-681.
 20. Moustafa ESA, El-Sobky E-SEA, Farag HIA, Yasin MAT, Attia A, Rady MOA, Awad MF, Mansour E. Sowing Date and Genotype Influence on Yield and Quality of Dual-Purpose Barley in a Salt-Affected Arid Region. *Agronomy*. 2021; 11(4):717. <https://doi.org/10.3390/agronomy11040717>

РАЗПРОСТРАНЕНИЕ И ДИАГНОСТИКА НА БОЛЕСТТА ПШЕНИЧЕНА ЩРИХОВА МОЗАЙКА ПО ЗИМНА ПШЕНИЦА В РАЙОНА НА ЮГОИЗТОЧНА И ЦЕНТРАЛНА БЪЛГАРИЯ

ДИМИТРИЙКА САКАЛИЕВА, ЛИЛЯНА ДРУМЕВА*

Аграрен университет- Пловдив, 4000, бул. Менделеев 12,
*lilyana_drumeva@abv.bg, +359 895 440 632

Резюме: Пшеничената щрихова мозайка (*Wheat Streak Mosaic Virus*) е една от широко разпространените и най-вредоносни вирусни болести по зърнено-житните култури. Гостоприемници на вируса са много растителни видове от семейство Poaceae, включително пшеница (*Triticum aestivum L.*), овес (*Avena sativa L.*), ечемик (*Hordeum vulgare L.*), царевица (*Zea mays L.*), просо (*Panicum sp.*) и много видове житни треви. В предвид потенциално опустошителното въздействие на пшеничената щрихова мозайка върху засегнатите зърнено-житни култури, появата и разпространението на тази болест при различни сортове зимна пшеница представлява сериозен проблем, поради загуби в реколтата, които могат да варират от минимални до пълна загуба на добива.

През пролетта на 2020 г. по голяма част от площите, засяти със зимна пшеница, бяха наблюдавани симптоми на вдъждужаване и жълти, хлоротични, надълъжни напетнявания по листата. Пшеничени растения с такава ясно изразена симптоматика бяха открити в много региони на Югоизточна и Централна България. Проби от тези растения бяха събрани и тествани за наличие на пшеничената щрихова мозайка. Идентифицирането и доказването на вируса се базира на резултатите, получени чрез метода DAS-ELISA. Вирусът на пшеничената щрихова мозайка беше идентифициран в голяма част от тестваните пробы.

Ключови думи: пшеница, вирусни болести, пшеничена щрихова мозайка, DAS-ELISA.

SPREAD AND DIAGNOSTICS OF WHEAT STREAK MOSAIC VIRUS ON WINTER WHEAT IN SOUTHEAST AND CENTRAL BULGARIA

DIMITRIYKA SAKALIEVA, LILYANA DRUMEVA*

Agrucultural University –Plovdiv, 4000, blvd Mendeleev 12
*lilyana_drumeva@abv.bg, +359 895 440 632

Abstract: *Wheat Streak Mosaic Virus (WSMV)* is one of the most widespread and most severe diseases infecting cereals. The virus is harmful for many plant species of the family Poaceae, including wheat (*Triticum aestivum L.*), oat (*Avena sativa L.*), barley (*Hordeum vulgare L.*), maize (*Zea mays L.*), millet (*Panicum sp.*) and many cereal grass species. Given the potentially devastating impact of WSMV on affected cereal crops, the occurrence and spread of this disease in winter wheat cultivars has been a cause for concern because losses can range from minimal to complete yield loss.

In the spring of 2020, many fields, sown with winter wheat, were observed to have dwarfism, chlorotic mottling and leaf yellowing streak symptoms. The diseased wheat plants with such pronounced symptoms were found in many regions of South-East and Central Bulgaria. Samples of such plants were collected and tested for the presence of WSMV. The identification of the virus was based on the results of DAS-ELISA. WSMV was detected in the main part of tested samples.

Key words: wheat diseases, Wheat Streak Mosaic Virus, DAS-ELISA.

1. ВЪВЕДЕНИЕ

През пролетта на 2020 година беше проведено обследване на площите, засети със зимна пшеница, в районите на Югоизточна и Централна България. Причина за извършеното проучване бяха постъпилите сигнали от земеделски производители, че за същия период на предходната селскостопанска година в блокове с пшеница в районите на Елхово и Сунгурларе, са били наблюдавани участъци с растения с вдужден вид и хлоротични надлъжни ивици по листата, а добива, реализиран от тези площи е бил с 60-80% понисък в сравнение със средните добиви за съответния район през 2019 година.

При извършеното визуално обследване на блоковете със зимна пшеница-масов посев в Югоизточна и Централна България през периода март-май на изминалата 2020 година също бяха отчетени големи участъци с растения, със силно забавен растеж и надлъжно хлоротично напетняване по листатата. Тази симптоматика е характерна за вирусно заболяване по пшеницата, познато като пшеничен щрихова мозайка.

Пшеничената щрихова мозайка заема първо място по вредоносност от регистрираните вирусни болести по житни култури в световен мащаб. Това заболяване е широко разпространено навсякъде по света и представлява сериозен проблем в регионите, в които се отглежда пшеница [Rabenstein et al., 2002; Hadi et al., 2011; Coutts et al., 2014]. В зависимост от климатичните условия и фенофазата на пшеничените растения, загубите в добива могат да достигнат до 60% и повече [Langham et al., 2001], като за Австралия са отчетени рекордните 83% [Lanoiselet et al., 2008].

Вирусът на пшеничената щрихова мозайка (WSMV) принадлежи към род *Tritimovirus*, семейството *Potyviridae* [Rabenstein et al., 2004]. Гостоприемници на патогена са много растителни видове от семейство *Poaceae* [Brakke, 1971; French R, Stenger D C., 2002], включително пшеница (*Triticum aestivum L.*), овес (*Avena sativa L.*), ечемик (*Hordeum vulgare L.*), царевица (*Zea mays L.*), просо (*Panicum sp.*) и много житни тревни видове. Симптоматика на болестта при зърнено-житните култури се проявява под формата на хлоротични, ивицисти участъци, разположени надлъжно по листата, като тези хлоротични петна с форма на щрихи, се виждат особено ясно при пшеницата [Vacke et al., 1986; Murray et al., 1998]. Хлорозата постепенно прогресира и обхваща цялото растение, като силно забавя растежа и

предизвиква вдуждане. В повечето случаи тези растения остават стерилни или образуват малко и спаружени семена [Ellis et al., 2000].

Вирусът се разпространява чрез ериофидни акари *Aceria tosichella* [Slykhuis, 1955; Orlob, 1966], които се разпръскват пасивно посредством въздушните течения [Slykhuis, 1955]. В много редки случаи вирусът се предава и чрез семена [Jones et al., 2005].

Първите сведения за болестта датират от 1922 г. за района на щата Небраска, Северна Америка [McKinney, 1937; Staples and Allington, 1956]. Оттогава данни за наличие на пшеничената щрихова мозайка са регистрирани в много региони по света, отглеждащи пшеница, включително Северна и Южна Америка, Европа, Средния Изток, Азия, Австралия и Нова Зеландия [Navia et al., 2013; Skoracka et al., 2014].

В България болестта е изследвана и документирана за първи път от Марков и колектив [Марков и др., 1974]. През 2004 г. наблюдения и диагностика върху разпространението на болестта са извършени и от Бакърджиева и колектив [Bakardjieva et al., 2004].

Настоящото проучване и лабораторно диагностициране се проведе, за да се установи и отчете разпространението на пшеничената щрихова мозайка в района на Югоизточна и Централна България през 2020 г.

2. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

2.1. Растителни пробы

Проби от пшеничени растения с характерните за болестта симптоми бяха събрани от общо 35 полета със зимна пшеница масов посев. Пробите бяха взети в две повторения от парцелки 20x20 см – една от края и една от средата на блока. Периодът на събиране на образците за тестиране беше март-април 2020 година, във фенофаза „Вретенене“ на културата. Пробите бяха взети от блокове в областите Бургас, Сливен, Нова Загора, Стара Загора, Пловдив и Велико Търново. Изследването беше проведено върху сортовете Авеню, Алхамбра, Ренан (Лимагрейн), Собел (Косад Семанс) и Екзотик (КВС), засети на съответните площи. Сортовете пшеница в настоящото проучване са избрани на случаен принцип.

2.2. DAS-ELISA

Взетите преби бяха изследвани за наличие на пшенична щрихова мозайка по метода DAS-ELISA [Clark and Adams, 1977] в две повторния с поликлонални антитела (Loewe Biochemica, Германия), специфични за изследвания вирус. За положителна преба е отчетена всяка преба, на която получените стойности на оптична пълтност (OD values) са три пъти по-високи, сравнени със съответните стойности на отрицателната контрола.

3. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

От направените 35 преби бяха отчетени 26 положителни преби. Високият процент (74%) на положителни преби се дължи на ранните срокове на сеитба, топлата и продължителна есен и задържането на необичайно високи температури почти до средата на декември, което благоприятства намножаването на вектора-преносител. Покачването на среднодневните температури през м. февруари 2020 година в обследваните райони, благоприятства по-ранното активизиране и увеличаване на популацията на акарите.

По отношение на териториалното разпространение на пшеничената щрихова мозайка положителни преби са диагностицирани във всички изследвани региони. (Таблица 1.) Могат да бъдат посочени няколко вероятни причини за това повсеместно разпространение на болестта. На първо място е големият брой житни треви от родовете *Avena*, *Bromus*, *Hordeum*, *Lolium* и др., които са гостоприемници на акара-вектор през летните месеци. Поради изключително малките си размери (170-250 микрона дължина) този акар не може да бъде обследван визуално на полето. Идентифицирането му е възможно само под микроскоп при 40Х оптично увеличение, което затруднява провеждането на мероприятия за ограничаване и намаляване на популацията на този вредител. При визуално обследване на посевите с пшеница за наличие на акари-вектори може да се съди само по надлъжните хлоротични ивици по листата на растенията. Тези жълти напетнявания се появяват при трайно затопляне и покачване на дневните температурни стойности над 23°C (обикновено през месеците април-май), когато вируса вече е проникнал в растението. Друг фактор, който сериозно лимитира съставянето на прогнозен модел за евентуалната миграция на акара, е начинът му на разпространение-чрез въздушните течения.

Таблица 1. Отчитане по райони

РАЙОН	Брой взети преби	Положителни	Отрицателни
Област Бургас	11	9	2
общ. Камено	5	3	2
с. Русокастро	4	2	2
с. Ливада	1	1	-
общ. Сунгурларе	6	6	-
с. Лозарево	1	1	-
с. Черница	3	3	-
с. Подвис	2	2	-
Област Ямбол	17	12	5
общ. Стралджа	4	4	-
с. Маленово	1	1	-
с. Палаузово	1	1	-
с. Недялско	1	1	-
с. Първенец	1	1	-
общ. Тунджа	9	6	3
с. Ханово	1	1	-
с. Крумово	2	1	1
с. Генерал Инджово	2	1	1
с. Каменец	2	1	1
с. Скалица	2	2	-
общ. Елхово	4	2	2
с. Жребино	2	1	1
гр. Болярово	2	1	1
Област Сливен	1	-	1
с. Радеци	1	-	1
Област Стара Загора	2	1	1
с. Трояново	2	1	1
Област Пловдив	2	2	-
с. Болярино	2	2	-
Област Велико Търново	2	2	-
общ. Лясковец	2	2	-
с. Драгижево	2	2	-

Добивите, реализирани от изследваните площи, сравнени със средните добиви за съответния район, са в пряка зависимост от периода на

сейтба. (Таблица 2). Седем от тестваните пробы, при които е отчетена огромна загуба в добива, са първи сейтби за съответния район и вирусната инфекция е придобита още през есента. Останалите три са засяти в непосредствена близост до площи с царевица, която служи като „зелен мост“ на вектора преносител.

Таблица 2. Загуби в добива, отчетени на база средния добив за съответния регион.

80% и повече	20-40%
10/35	20/35

По отношение на сортовата толерантност и устойчивост към това вирусно заболяване, положителни пробы бяха доказани за всички изследвани сортове. Отрицателни резултати бяха отчетени само в 9 от пробите, взети от блокове, предназначени за семенни участъци, което потвърждава хипотезата за изключително рядкото предаване на вирусната инфекция чрез посевен материал.

4. ЗАКЛЮЧЕНИЯ

Проведените визуални обследвания и лабораторното доказване на наличието на пшенична щрихова мозайка в площите с пшеница са много важни по отношение на опасността от разпространението на това заболяване в България. Необично дългите и топли есени и липсата на студени зими, които се редуват през последните няколко години, ще благоприятстват намножаването на този и на други вектори по площите с есенници.

Обследването на полетата и лабораторната диагностика са задължителни мероприятия, които трябва да станат неделима част от добрите земеделски практики. Това може да бъде от решаващо значение в бъдеще за прогнозиране на възможни огнища от вирусни заболявания по зърнено-житните култури.

5. ИЗПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА

1. Марков М. и др. 1974. Вирусни болести по растенията. ИРЗ София.
2. Bakardjieva N., Krasteva C., Habelkus A., Rabensteijn F. Detection of cereal viruses and study of aphid population in Bulgaria. // Bulgarian J. Agricultural Science. Nr. 10. 2004. P. 161–164.
3. Brakke M K. 1971. Wheat streak mosaic virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses. No. 48. Association of Applied Biologists, Wellesbourne, UK.
4. Clark M.F., Adams A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. Journal of General Virology 34: 475–483. DOI: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-34-3-475>
5. Coutts B A, Banovic M, Kehoe M A, Severtson D L, Jones R A C. 2014. Epidemiology of Wheat streak mosaic virus in wheat in a Mediterranean-type environment. European Journal of Plant Pathology, 140, 797–813.
6. Ellis M H, Rebetzke G J, Kelman W M, Moore C S, Hyles J E. 2004. Detection of Wheat streak mosaic virus in four pasture grass species in Australia. Plant Pathology, 53, 239
7. French R, Stenger D C. 2002. Wheat streak mosaic virus. CMI/ AAB Descriptions of Plant Viruses. No. 398. Association of Applied Biologists, Wellesbourne, UK.
8. Hadi B A R, Langham M A C, Osborne L, Tilmon K J. 2011. Wheat streak mosaic virus on wheat: Biology and management. Journal of Integrated Pest Management, 2, doi: 10.1603/IPM10017
9. Jones R A C, Coutts B A, Mackie A E, Dwyer G I. 2005. Seed transmission of Wheat streak mosaic virus shown unequivocally in wheat. Plant Disease, 89, 1048–1050.
10. Langham, M.A.C., D. C. Doxtader, S. D. Haley, S. Kalsbeck, R. S. Little, and A. M. Ibrahim. 2001a. Yield and growth reductions in winter wheat infected with Wheat streak mosaic virus. Phytopathology 91: S52
11. Lanoiselet V M, Hind-Lanoiselet T L, Murray G M. 2008. Studies on the seed transmission of Wheat streak mosaic virus. Australasian Plant Pathology, 37, 584–588.

12. McKinney, H.H. (1937) Mosaic Diseases of Wheat and Related Cereals US Department of Agriculture Circular No. 442, 1–23.
13. Murray T D, Parry D W, Cattlin N D. 1998. A Colour Handbook of Diseases of Small Grain Cereal Crops. Manson Publishing, London.
14. Navia D, de Mendonca R S, Skoracka A, Szydlo W, Knihinicki D, Hein G L, da Silva Pereira P R V, Truol G, Lau D. 2013. Wheat curl mite, *Aceria tosicella*, and transmitted viruses: An expanding pest complex affecting cereal crops. *Experimental and Applied Acarology*, 59, 95–143.
15. Orlob G. 1966. Feeding and transmission characteristics of *Aceria tulipae* Keifer as a vector of Wheat streak mosaic virus. *Phytopathol Zeitschrift*, 55, 218–238.
16. Rabenstein F, Seifers D L, Schubert J, French R, Stenger D C. 2002. Phylogenetic relationships, strain diversity and biogeography of tritmoviruses. *Journal of General Virology*, 83, 895–906.
17. Rabenstein F, Stenger D C, French R. 2004. Genus tritmovirus. In: Lapierre H, Signoret P A, eds., *Viruses and Virus Diseases of Poaceae (Gramineae)*. INRA, France. pp. 398–402.
18. Slykhuis J T. 1955. *Aceria tulipae keifer* (Acarina: Eriophyidae) in relation to the spread of wheat streak mosaic. *Phytopathology*, 45, 116–128.
19. Staples, R. and Allington, W.B. (1956) Streak Mosaic of Wheat in Nebraska and its Control, Research Bulletin No. 178. Lincoln, NE: University of Nebraska-Lincoln College of Agriculture, Agricultural Experiment Station.
20. Skoracka A, Rector B, Kuczyński L, Szydło W, Hein G, French R. 2014. Global spread of wheat curl mite by its most polyphagous and pestiferous lineages. *Annals of Applied Biology*, 165, 222–235
21. Vacke J, Zacha V, Jokeš M. 1986. Identification of virus in wheat new to Czechoslovakia. In: Proceedings of the X Czechoslovak Plant Protection Conference. 2–5 Sep., 1986, Brno. pp. 209–210

АДАПТИРАНЕ НА МЕТОД ЗА ОПРЕДЕЛЕЯНЕ НА ГЛИЦЕРОЛ В ТЮТЮН

ЛИЛИЯ СТОЯНОВА, ДЕСИСЛАВА КИРКОВА, МАРГАРИТА ДОЧЕВА, ЙОВЧО КОЧЕВ

Институт по тютюна и тютюневите изделия, с. Марково - 4108, България
liliqstoqnova@gmail.com, desislavaa894@gmail.com, margarita_1980@gmail.com

Резюме: Целта на изследването е адаптиране на метод за определяне на глицерол в тютюн. Установени са хроматографските условия за определяне на глицерол в тютюн чрез газова хроматография с пламъчно-ионизацияен детектор – тип колона, температура на пещта, температура на детектора, температура на инжектора и на колоната. Установена е селективността, обхвата, линейността, прецизността и устойчивостта на метода. Определено е съдържанието на глицерол в три проби тютюн. То варира между 0,14 % до 0,26 %. Проследено е изменението на съдържанието на глицерол в тютюн в продължение на няколко месеца. Установено е, че съдържанието на глицерол в тютюн не се променя поне 4 месеца, независимо съхраненото му като тютюнев прах или тютюнев лист.

Ключови думи: глицерол, газова хроматография, тютюн

ADAPTATION OF METHOD FOR DETERMINATION OF GLYCEROL IN TOBACCO

LILIYA STOYANOVA, DESISLAVA KIRKOVA, MARGARITA DOCHEVA, YOVCHO KOCHEV

Tobacco and Tobacco Products Institute, Markovo 4108, Plovdiv, Bulgaria
liliqstoqnova@gmail.com, desislavaa894@gmail.com, margarita_1980@gmail.com

Abstract: The aim of this study is to adapt the method for determination of glycerol in tobacco. The chromatographic conditions for determination of glycerol in tobacco by gas chromatography with flame-ionization detector - column type, oven temperature, temperature of detector, injector and column are established. The selectivity, range, linearity, precision and stability of the method are determined. The glycerol content of three tobacco samples is tested. The content of glycerol varied between 0.14% and 0.26%. The change in glycerol content in tobacco for several months is monitored. It is found that the content of glycerol in tobacco did not change for at least 4 months, regardless of its storage as tobacco powder or tobacco leaf.

Key words: glycerol, gas chromatography, tobacco

1. Въведение

Растенията продуцират огромен брой метаболити (между 200 000 и 1 милион метаболити), които изпълняват различни функции в растенията. Те се делят на първични и вторични метаболити. Първичните метаболити са тези, които са отговорни за растежа и развитието на растенията и без тях растителният организъм не би могъл да съществува. Такива са белтъци, въглехидрати и липиди. Вторичните

метаболити са свързани с адаптацията на растителните организми към условията на околната среда [Wang et al., 2019].

Липидите са голям клас първични метаболити, които се делят на следните групи: ацилглициероли (мазнини и масла), восъци, фосфолипиди и терпеноиди.

Ацилглициеролите (ацилглициридите) са естери на глицерол с мастни киселини. Изпълняват функциите на енергиен клетъчен

запас и се съдържат във всички растителни клетки. Те могат да бъдат моно- ди- и тризаместени в зависимост от броя на заместване на мастните киселини [Blanco 2017].

Ацилглициеролите претърпяват различни химични реакции. При реакции на хидролиза и естерификация се получават глицерол и съставящите ги мастни киселини. На Схема 1 е представен процесът на хидролиза на ацилглициеролите. Хидролизата протича при нагряване във водна среда. Температурата е различна и зависи от вида на ацилглициерола.

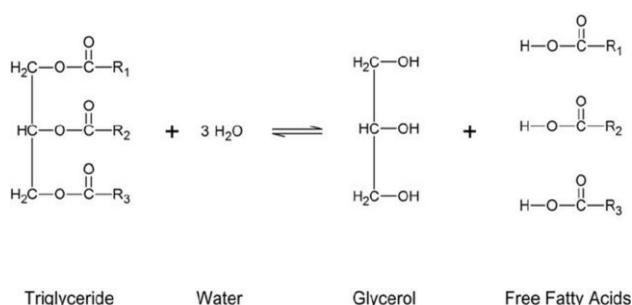


Схема 1. Хидролиза на триглициериди

Тютюнът е растение и като такова съдържа липиди и в частност ацилглициероли [Popov 2012]. Съдържанието на липиди в тютюна варира между 37,4 mg/g и 56,0 mg/g [Sheen S, 1983]. То зависи от типа тютюн, начина на отглеждане, сушене и ферментация [Гюзелев 1983].

Хидролизата на ацилглициероли може да протече дори при стайна температура [Blanco 2017]. По време на процесите на сушене и ферментация на тютюна се създават необходимите условия за протичане на процес на хидролиза – температура и наличие на вода, която естествено се съдържа в тютюневите листа [Къшева&Кочев 2014]. В резултат на хидролизата се образуват глицерол и мастни киселини (Схема 1). Процесът на хидролиза е различен при различните типове и сортове тютюни и зависи от вида ацилглициериди, остатъка от мастни киселини от които са изградени, както и от температурния режим при процесите на сушене и ферментация [Popov et al., 2012].

При моно- и диацилглициеролите протича пълна хидролиза, поради нуждата от по-ниска температура за хидролизата, а при триацилглициеролите е необходима по-висока температура [Blanko&Blanko 2017].

От 13.03.2020 г. чл. 12, ал. 1, т. 4 от 13.03.2020 г. от Закона за акцизите и данъчните складове (ЗАДС) е допълнен и гласи „Тютюн за пушене (за лула и цигари) е: изсушени, плоски с

неправилна форма, частично обезжилени тютюневи листа, преминали процес на изсушаване и контролирано овлажняване, които съдържат тегловно повече от 0,65 на сто глицерин и са годни за пушене след праста манипулация посредством смачкване или ръчно нарязване“ [Закон за акцизите и данъчните складове, 2006].

Целта на задачата е адаптиране на метод за определяне на глицерол в тютюн.

2. Материал и метод

2.1. Материали

Използвани са три пробы тютюн – проба А, проба В и проба С, отгледани при стандартни агротехнически условия и подложени на сушене и ферментация съгласно изискванията за определените типове тютюн. За извършване на анализа една част от всяка тютюнева прoba се смила на прах, а друга част от нея се съхранява под формата на листа.

2.2. Апаратура и консумативи

Анализите се извършват на газов хроматограф Agilent 7890 A с пламъчно-йонизационен детектор (FID детектор) и Innovax колона (30 m, ID 0.320 mm; 0.25 μm).

Използваните консумативи са с висока чистота: Glycerol, purity 99,5 % (Merk), 1,3 Butandiol, purity 99,0 % (Merk), Methanol (Merk).

2.3. Хроматографски условия

Разделянето на глицерола от останалите компоненти се извършва на газов хроматограф при следните хроматографски условия:

Детектор: Пламъчно-йонизационен (FID)

Температура – 300 °C

Поток H₂ – 40 ml/min

Поток въздух – 400 ml/min

Make up газ – 20 ml/min

Инжектор: Температура – 250 °C

Инжектиран обем прoba – 1 μl

Split – 5:1

Пещ:

Температурен режим:

0 мин до 6 мин – 160 °C

6 мин до 9 мин – 230 °C (стъпка от 25 °C)

9 мин до 11,2 мин – 230 °C

2.4. Приготвяне на основен стандартен разтвор и работни стандартни разтвори на глицерол

Приготвя се основен стандартен разтвор на глицерол с концентрация 100 mg/ml. От него чрез разреждане се приготвят серия от работни стандартни разтвори с концентрации от 0,04 mg/ml до 3,2 mg/ml.

2.5. Подготовка на пробата

Претеглят се 4 g тютнев прах и се заливат с 50 ml екстракционен разтвор, съдържащ метанол и вътрешен стандарт 1,3-бутандиол. Екстракцията се извършва на шутел в продължение на 60 минути. Аликовота част от пробата се подлага на газ-хроматографски анализ.

Параметри на валидиране на метода

За валидирането на метода са изследвани следните параметри: селективност/ специфичност, обхват, линейност, прецизност и устойчивост.

3. Резултати и обсъждания

До момента не са открити официални методи за определяне на глицерол в тютюн, но са описани 4 метода за определяне на глицерол, в тютюнев пълнеж от цигари:

SOP 06 – 2016 Standard operating procedure for determination of humectants in cigarette tobacco filler by GC/FID;

SOP 06 – 2016 Standard operating procedure for determination of humectants in cigarette tobacco filler by GC/MS;

CORESTA RECOMMENDED METHOD № 60 Determination of 1,2-propylene glycol and glycerol in tobacco products by gas chromatography;

CORESTA RECOMMENDED METHOD № 61 Determination of 1,2-propylene glycol, glycerol and sorbitol in tobacco and tobacco products by high performance liquid chromatography (HPLC).

За адаптирането на метода е използвана стандартна оперативна процедура SOP 06 – 2016.

В хода на анализа са проследени следните параметри на метода:

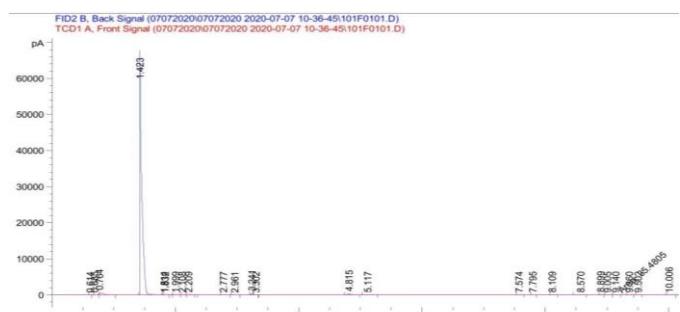
Селективност/специфичност

Селективността се установява чрез времената на задържане на определяните компоненти, а специфичността се доказва чрез разделянето на всеки компонент на аналита в пробата [Magnusson & Örnemark, 2014, Rao T., 2018].

Фиг. 1 Хроматограма на стандартен разтвор на глицерол 0,8 mg/ml $t_R = 9,139$; $t_R = 3,236 - 1,3$ -бутандиол

На Фиг. 1 е представена хроматограма на стандартен разтвор на глицерол с концентрация 0,8 mg/ml. На нея се виждат три основни пика, които отговарят на трите основни вещества в разтвора – метанол (екстрагент) - $t_R = 1,42$, 1,3-бутандиол (вътрешен стандарт) - $t_R = 3,236$ и глицерол - $t_R = 9,139$.

На фиг. 2 е представена хроматограма на тютюнева проба. Пиковете на глицерола и 1,3-бутандиола са симетрични и разделянето от другите пикове е повече от 1,0 което доказва добра разделителна способност.

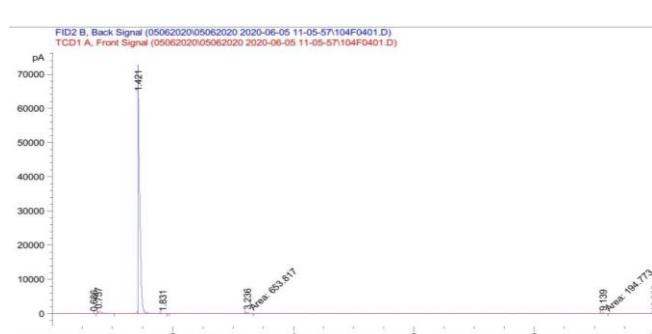


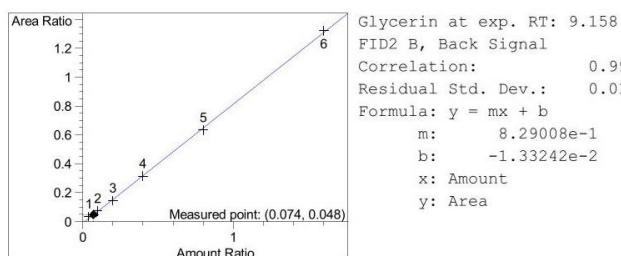
Фиг. 2 Хроматограма на тютюнева проба глицерол $t_R = 9,14$; $t_R = 3,241 - 1,3$ -бутандиол

Обхват

Линийният и работният обхват при определянето на глицерол в тютюна съвпадат. Долната и горната граница на обхвата на метода са съобразени с матрицата тютюн и ЗАДС. За най-ниска точка на обхвата е приета границата за количествено определяне – 0,04 mg/ml глицерол, която съответства на 0,05 % глицерол в тютюна. Горната граница на обхвата е концентрация 3,2 mg/ml глицерол, което отговаря на 4 % глицерол в тютюна. Горната граница на обхвата е доста по-висока като съдържание на глицерол в тютюна от изискуемите според ЗАДС 0,65 % [Закон за акцизите и данъчните складове, 2006].

Линейността показва връзката между концентрацията на аналита и площта на пика [Magnusson & Örnemark, 2014, Rao T., 2018]. За установяване на линейността са пригответи работни стандартни разтвори в различни концентрации - между 0,04 mg/ml и 3,2 mg/ml. Построена е калибрационна крива между площта на пика и концентрацията на аналита (Фиг. 3). Вижда се, че корелационният коефициент R^2 е 0,9997, което доказва една много добра линейност в посочените концентрации.





Фиг. 3 Линейност на стандартни разтвори на глицерол

Прецизността е определена чрез повтаряемост (извършване на анализа от един и същ аналитик) и междинна точност – провеждане на анализа от различни оператори в различни дни. Мярката за прецизността е относителното стандартно отклонение (RSD). RSD, % = стандартно отклонение на поредица от стойности/средната стойност на стойността*100 [Magnusson & Örnemark, 2014, Rao T., 2018].

Повтаряемостта на метода е определена чрез подготовкa на стандартни разтвори на глицерол в различни концентрации от един и същ аналитик в различни дни и изследването им чрез газова хроматография. Резултатите са представени в Табл. 1. Стойностите на концентрациите на стандартите, които са получени през различните дни варират в много тесен интервал, което показва високата прецизност на анализа. Това се доказва и от ниските стойности на относителното стандартно отклонение - RSD, което не надвишава 5 %.

Таблица 1. Повтаряемост на метод за определяне на глицерол в тютюн

№	Глицерол	Ден 1	Ден 2	RSD, %
1.	0,04	0,06	0,06	0
2.	0,08	0,10	0,1	0
3.	0,2	0,20	0,22	4,7
4.	0,4	0,40	0,37	5,1
5.	0,8	0,77	0,78	0,89
6.	1,6	1,62	1,58	1,25
7.	3,2	3,26	3,28	0,42

Междинната точност е установена чрез пригответяне на стандартни разтвори на глицерол в различни концентрации в различни дни от двама аналитика. От таблица 2 се виждат близките стойности на концентрациите на

разтворите, пригответи във различни дни от различни химици. Относителното стандартно отклонение не надвишава 5 %, което показва висока междинна точност на метода.

Таблица 2. Междинна точност на метод за определяне на глицерол в тютюн

№	Глицерол	Химик 1	Химик 2	RSD, %
	Заложена стойност на стандарт глицерол, mg/ml	Получена стойност на стандарт глицерол, mg/ml	Получена стойност на стандарт глицерол, mg/ml	
1.	0,04	0,05	0,07	4,3
2.	0,08	0,1	0,1	0
3.	0,2	0,20	0,20	0
4.	0,4	0,40	0,40	0
5.	0,8	0,77	0,83	5,0
6.	1,6	1,62	1,65	3,11
7.	3,2	3,26	3,32	1,21

Устойчивост на метода

За да се установи устойчивостта на метода се проследява стабилността на стандартните разтвори във времето. Установено е, че стандартните разтвори не се променят във времето до 3 месеца, като в този период се запазват заложените концентрации.

Анализ на глицерол в тютюн

Определено е съдържанието на глицерол в три проби тютюн – проба А, проба В и проба С. Резултатите са представени в Табл. 3. Вижда се, че съдържанието на глицерол варира от 0,14 % (Проба В) и 0,26 % (Проба С).

Таблица 3. Съдържание на глицерол в тютюн, съхранен под формата на тютюнев прах, %

Тютюн	Глицерол, %		
	м. юли	м. август	м. октомври
Проба А	0,19	0,19	0,21
Проба В	0,14	0,15	0,14
Проба С	0,26	0,21	0,22

Имайки предвид, че ферментационните процеси и процесите на преобразуване на химичните вещества в тютюна продължават при съхранение на тютюна, бе необходимо проследяването на изменението на съдържанието на глицерола в тютюна във времето [Къшева & Кочев, 2014]. За целта тютюневите преби А, В и С бяха съхранени в продължение на 4 месеца. Една част от тях се съхранява под формата на листа, а друга част – под формата на тютюнев прах.

Данните от Табл. 3 показват, че стойностите на глицерола остават постоянни най-малко 4 месеца и не се променят значително при съхранение на тютюна под формата на прах. Единствено при проба С се наблюдава леко занижаване на стойностите на глицерола от 0,26 % на 0,21 %.

В Табл. 4 е представено съдържанието на глицерол тютюневите преби, съхранени под формата на листа.

Таблица 4. Съдържание на глицерол в тютюн, съхранен под формата на листа, %

Тютюн	Глицерол, %	
	м. юли	м. октомври
Проба А	0,19	0,17
Проба В	0,14	0,13
Проба С	0,26	0,20

От таблицата се вижда, че стойностите на глицерола остават непроменени във времето. Единствено при проба С се наблюдава леко занижение на стойностите. Тази тенденция се установява и при съхранение на тютюна под формата на тютюнев прах – Табл. 3.

4. Заключение:

Установени са хроматографските условия за определяне на глицерол в тютюн чрез газова хроматография с пламъчно-ионизация детектор – тип колона, температура на пещта, температура на детектора, температура на инжектора и на колоната.

Установени са селективността, специфичността, обхвата, линейността, прецизността и устойчивостта на метода.

Определено е съдържанието на глицерол в три преби тютюн. То варира от 0,14 % до 0,26 %.

Проследено е изменението на съдържанието на глицерол в тютюн в продължение на няколко месеца, съхранен под формата на прах и листа.

Установено е, че съдържанието на глицерол в тютюн не се променя поне 4 месеца, независимо съхраненото му като тютюнев прах или тютюнев лист.

ЛИТЕРАТУРА

- Wang S., Alseekh S., Fernie A., Luo J. (2019). The Structure and Function of Major Plant Metabolite Modifications. Mol. Plant. 12, 899-919.
- Blanko A., G. Blanko (2017) Acylglycerol, Chapter 5 – Lipids, Medical Biochemistry, 99-119.

3. Popov V, O. Antipina, V. Pchelkin, V. Tsydendambaev (2012) Changes in the content and composition of lipid fatty acids in tobacco leaves and roots at low-temperature hardening, Russian Journal of Plant Physiology 59, 177-182.

4. Sheen S. (1983) Biomass and chemical composition of tobacco plants under high density grown, Beitrage zur Tabakforschung International 12, 1, 35-42.

5. SOP 06-2016 Standart operating procedure for determination of humectants in cigarette tobacco filer by GC/FID.

6. SOP 06-2016 Standart operating procedure for determination of humectants in cigarette tobacco filer by GC/MS.

7. CORESTA RECOMMENDED METHOD №60 Determination of 1,2 –propylene glycol and glycerol in tobacco products by gas chromatography.

8. CORESTA RECOMMENDED METHOD №61 Determination of 1,2 –propylene glycol, glycerol and sorbitol in tobacco and tobacco products by high performance liquid chromatography (HPLC).

9. Закон за акцизите и данъчните складове, 01.01.2006 г.

10. Magnusson B., U. Örnemark (2014) Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, second edition, 1-70. <http://www.eurachem.org>

11. Rao T. (2018) Calibration and Validation of Analytical Methods - A Sampling of Current Approaches: In Validation of Analytical Methods, <https://www.intechopen.com/books/calibration-and-validation-of-analytical-methods-a-sampling-of-current-approaches/validation-of-analytical-methods>

12. Гюзелев, Л. Стокознание на тютюна, Изд. „Христо Г. Данов“ Пловдив, 1983.

13. Къшева М., Й. Кочев (2014) Сравнително изследване върху съдържанието на основни химични вещества на тютюна при съхранение след естествена ферментация, Международна научно-практическа конференция „Храни, технологии и здраве - 2014“, Сборник доклади, ИИРХ-Пловдив, ISSN 23676213, 78-81.

СЪДЪРЖАНИЕ НА ТЕЖКИ МЕТАЛИ В ОРИЕНТАЛСКИ ТЮТЮН ОТ РАЗЛИЧНИ ПОДРАЙОНИ И МИКРОРАЙОНИ НА РАЙОН НЕВРОКОП

РАДКА БОЖИНОВА, ВИОЛЕТА НИКОЛОВА, НИКОЛАЙ НИКОЛОВ, СИЛВИЯ ПЕЕВА

Институт по тютюна и тютюневите изделия - Марково
rbojinova@yahoo.com, nikolova.v.ttsi@abv.bg, nikolay.ni.ttsi@abv.bg,
silviqpeeva8407_1982@abv.bg

Резюме: В изследване, проведено през 2020 г. е проучено влиянието на агроекологичните условия на два подрайона (яка и поле) и на десет микрорайона от район Неврокоп върху акумулирането на Pb, Cd, Ni, Mn, Zn и Cu в ориенталски тютюн от екотип Крумовград (сорт Крумовград 90). Атомно-абсорбционен спектрометър „Spectra AA 220“ (Varian, Australia) е използван за определяне на концентрацията на изследваните елементи в тютюна. Установено е, че съдържанието на микроелементите в тютюневите преби зависи по-силно от условията на конкретния микрорайон, докато влиянието на подрайоните е слабо. Концентрацията на олово и кадмий в тютюневите преби от район Неврокоп е по-ниска от критичните концентрации, валидни за тютюна. Концентрациите на никел, манган и цинк в тютюна са по-ниски от съобщените в други литературни източници. Съдържанието на мед в пробите от подрайон яка е доказано по-ниско от отчетеното за подрайон поле.

Ключови думи: ориенталски тютюн, район Неврокоп, Pb, Cd, Ni, Mn, Zn, Cu

HEAVY METALS CONTENT IN ORIENTAL TOBACCO FROM DIFFERENT SUB- AND MICRO REGIONS OF NEVROKOP REGION

RADKA BOZHINOVA, VIOLETA NIKOLOVA, NIKOLAY NIKOLOV, SILVIA PEEVA

Tobacco and Tobacco Products Institute - Markovo
rbojinova@yahoo.com, nikolova.v.ttsi@abv.bg, nikolay.ni.ttsi@abv.bg,
silviqpeeva8407_1982@abv.bg

Abstract: This research was carried out in 2020 to assess the effect of the two sub regions („yaka“ and „field“) and ten micro regions of Nevrokop region on the concentration of Pb, Cd, Ni, Mn, Zn and Cu in oriental tobacco from ecotype Krumovgrad (variety Krumovgrad 90). An atomic absorption spectrometer „Spectra AA 220“ (Varian, Australia) was used for determination of trace element content in the plant samples. It was found that the content of microelements in tobacco samples strongly depends on the agro-ecological conditions of the micro regions, while the influence of sub regions is lower. The content of lead and cadmium in tobacco samples from Nevrokop region was lower than the critical concentrations applicable to tobacco. The determined concentrations of nickel, manganese and zinc in tobacco were lower than those reported in other reference sources. The copper content in the samples from

the sub region „yaka“ was significantly lower than that established for the sub region „field“.

Key words: oriental tobacco, Nevrokop region, Pb, Cd, Ni, Mn, Zn, Cu

1. Въведение

Производството на ориенталски тютюни в България е съсредоточено в тютюнопроизводителни райони. Всеки един от тях се характеризира със специфични почвено-климатични и релефни условия, които имат решаващо въздействие върху формирането на химичния състав и технологичните свойства на тютюна.

В район Неврокоп преобладават площи с надморска височина 500-700 m, следвани от площи с надморска височина 700-1000 m [1]. Почвената покривка в долната на р. Места и притоците ѝ е представена основно от делувилно- и алувиално-ливадни почви. Тези почви заемат главно равнинните части на района. Ерозионните форми на релефа в южната част на район Неврокоп са заети от ерозирани в различна степен подтипове на канелените горски почви. Разпространени са и хумусно-карбонатни, както и преходни почви между канелените и кафявите горски почви [2]. Годишната сума на валежите е от 734 до 812 mm с максимум през декември и минимум през август. Сумата на валежите през вегетационния период (юни-септември) се колебае от 155 до 177 mm. Средната дневна температура през периода на узряване на листата е 20,2 °C [2].

Почвата е основен източник на макро и микроелементи за растенията. Важна роля за подвижността и усвоимостта им от тютюна оказват почвените характеристики – pH, съдържание на хумус, механичен състав и др. [3, 4]. Разнообразието в почвените и климатичните условия в район Неврокоп предполага различия в усвояването на елементите от растенията и акумулирането им в тютюна.

Високата концентрация на кадмий, олово, мед и цинк в почвите води до натрупване на големи количества от тези елементи в листата на тютюна, които са основен търговски продукт [4, 5]. Резултатите за съдържанието на тежките метали в тютюна са особено актуални поради нарастващите

екологични проблеми през нашето съвремие, в т.ч. по състоянието и опазването на почвеното плодородие и здравословността на земеделската продукция. Информацията за концентрацията на тежките метали в тютюна е толкова по-пълна и полезна, колкото поголяма мрежа от почвени типове са обхванати при наличното климатично разнообразие.

Целта на проучването беше да се изследва съдържанието на Pb, Cd, Ni, Mn, Zn и Cu в прости тютюн от екотип Крумовград от различни подрайони и микрорайони на район Неврокоп.

2. Материал и методи

Обект на проучване бяха прости тютюн от екотип Крумовград (сорт Крумовград 90), в които е отчетена концентрацията на микроелементите Pb, Cd, Ni, Mn, Zn и Cu. Тютюневите прости са взети от два подрайона (яка и поле) и няколко микрорайона на район Неврокоп. От подрайон поле са анализирани тютюневи прости от два микрорайона - Дебрен и Хвостяне, а от подрайон яка - от микрорайоните Фъргово, Абланица, Годешево, Слащен, Боголин, Корница, Жижево и Вълкосел.

Съдържанието на олово, кадмий, никел, мangan, цинк и мед в тютюна (mg/kg) е определено след сухо опепеляване на пробите в муфелна пещ при 500 °C за 5 часа и разтваряне на пепелта в 3 M HCl. Атомно-абсорбционен спектрометър "SpectrAA 220" (Varian, Australia) е използван за отчитане на концентрацията на изследваните елементи.

Обработката на данните е извършена с помощта на статистическия пакет PSPP for Windows. За определяне доказаността на разликите в елементите между отделните подрайони и микрорайони е приложен тест за многопосочно сравняване на резултатите по Duncan при ниво на вероятност 0.05.

3. Резултати и обсъждане

Съдържанието на Pb в ориенталския тютюн от сорт Крумовград 90 варира от 0,33

до 4,0 mg/kg (табл. 1). При всички случаи то е под критичната концентрация от 30 mg/kg, условно въведена от Божинова и др. [6]. Концентрацията на олово в тютюна от отделните микрорайони на подрайоните поле и яка е под и около долната граница от 3,1 mg/kg, посочена от Tsotsolis et al. [7]. Съдържанието на елемента не се променя закономерно по подрайони, т.е. отглеждането

на тютюна в полето или в яката не е решаващ фактор за натрупване на олово в тютюна. Вероятно характеристиката на почвата в конкретния микрорайон (съдържание на органично вещество, pH, съдържание на олово в почвата и др.) има по-силно влияние върху усвояването на Pb от растенията и акумулирането на елемента в сировината.

Таблица 1. Съдържание на олово в тютюн Крумовград 90 по подрайони и микрорайони.
Групиране на вариантите (Duncan's method)

Варианти	Homogenous groups Subset for $\alpha = 0.05$					
	1	2	3	4	5	6
Яка - Годешево	0,33					
Яка - Вълкосел	0,33					
Поле - Хвостяне	1,00	1,00				
Яка - Жижево	1,00	1,00				
Яка - Корница	1,33	1,33	1,33			
Яка - Боголин		2,00	2,00	2,00		
Поле - Дебрен			2,33	2,33		
Яка - Абланица				2,67	2,67	
Яка - Фъргово					3,67	3,67
Яка - Слащен						4,00
Significance	0,096	0,089	0,080	0,236	0,067	0,526

Концентрацията на кадмий е най-висока в тютюна от микрорайоните Фъргово

и Слащен, а най-ниска - в сировината от микрорайон Корница (табл. 2).

Таблица 2. Съдържание на кадмий в тютюн Крумовград 90 по подрайони и микрорайони.
Групиране на вариантите (Duncan's method)

Варианти	Homogenous groups Subset for $\alpha = 0.05$		
	1	2	3
Яка - Корница	0,10		
Поле - Дебрен	0,17	0,17	
Поле - Хвостяне	0,20	0,20	
Яка - Жижево	0,30	0,30	0,30
Яка - Вълкосел	0,30	0,30	0,30
Яка - Годешево	0,33	0,33	0,33
Яка - Боголин		0,43	0,43
Яка - Абланица			0,53
Яка - Фъргово			0,57
Яка - Слащен			0,57
Significance	0,109	0,069	0,072

Съдържанието на елемента в тютюна от микрорайоните Дебрен и Хвостяне (от

подрайон поле) не е съществено различно ($P>0.05$), поради което те попадат в една и

съща група, докато съдържанието на кадмий в тютюна от микрорайоните на подрайон яка се отнася към различни групи. Отчетените концентрации на Cd в тютюна от всички микрорайони е около или по-ниско от стойностите за ориенталския тютюн (0,5-3,0 mg/kg), посочени от Tsotsolis et al. [7] и под установеното от Zapryanova and Hristozova [8] съдържание от 2,3-2,76 mg/kg.

Съдържанието на Ni в тютюна варира от 0,07 до 2,07 mg/kg (табл. 3). Стойностите са

по-ниски от съобщените от Stojanović et al. [9], които са от 2,20 до 4,91 mg/kg. Концентрацията на елемента е сравнително висока в тютюна от двата микрорайона на подрайон поле, както и в този от Годешево (подрайон яка). Разликите в концентрацията на Ni между отделните микрорайони от подрайон яка често са значими ($P < 0,05$) и те попадат в различни групи.

Таблица 3. Съдържание на никел в тютюн Крумовград 90 по подрайони и микрорайони. Групиране на вариантите (Duncan's method)

Варианти	Homogenous groups Subset for $\alpha = 0,05$					
	1	2	3	4	5	6
Яка - Абланица	0,07					
Яка - Жижево	0,13	0,13				
Яка - Фъргово	0,17	0,17				
Яка - Корница		0,37	0,37			
Яка - Слащен			0,47			
Яка - Боголин				1,00		
Яка - Вълкосел					1,17	
Поле - Дебрен						1,50
Яка - Годешево						1,53
Поле - Хвостяне						2,07
Significance	0,431	0,073	0,404	0,171	0,779	1,00

Съдържанието на манган в тютюна (48,9-90,2 mg/kg) (табл. 4) е сравнително близко до отчетеното от Zapryanova and Hristozova [8], но то е много по-ниско от

посоченото от Апостолова [10], което е от 625 до 680 mg/kg за тютюна от II и III беритбен пояс при условия на кисела почва.

Таблица 4. Съдържание на манган в тютюн Крумовград 90 по подрайони и микрорайони. Групиране на вариантите (Duncan's method)

Варианти	Homogenous groups Subset for $\alpha = 0,05$					
	1	2	3	4	5	6
Яка - Вълкосел	48,9					
Яка - Годешево		51,6				
Поле - Дебрен		53,3	53,3			
Яка - Жижево			53,8			
Яка - Слащен			54,2			
Яка - Боголин			54,4			
Яка - Корница			54,5			
Яка - Абланица				64,7		
Поле - Хвостяне					87,0	
Яка - Фъргово						90,2
Significance	1,00	0,053	0,216	1,00	1,00	1,00

Концентрацията на елемента е по-ниска и от средните стойности (163-202 mg/kg), съобщени от Golia et al. [4] за ориенталския тютюн, отглеждан в централна Гърция. Мангановата концентрация в тютюна не показва ясна диференциация по подрайони, а по-скоро зависи силно от условията на конкретния микрорайон.

Концентрацията на цинк в тютюна е от 14,2 до 30,9 mg/kg (табл. 5). Стойностите са много по-ниски от установените от Апостолова [10] при условия на кисела (82-110 mg/kg) или алкална (76-206 mg/kg) почва. Tsotsolis et al. [7] съобщават също за по-високи концентрации на Zn в листата на ориенталския тютюн, които в зависимост от

района на отглеждане и годината се променят от 38 до 71 mg/kg. Zapryanova and Hristozova [8] отчитат високо съдържание на цинк във всички изследвани сортове, което обясняват с високото съдържание на подвижен цинк в почвата. Анализираните в предходно проучване почви от района на Неврокоп се характеризират с ниско и много ниско съдържание на подвижен цинк [11]. Слабата запасеност с подвижен цинк на почвите в района е вероятна причина за отчетените ниски стойности на елемента в тютюна. Съдържанието на Zn в пробите показва доказана зависимост от агрономичните условия на микрорайоните.

**Таблица 5. Съдържание на цинк в тютюн Крумовград 90 по подрайони и микрорайони.
Групиране на вариантите (Duncan's method)**

Варианти	Homogenous groups Subset for $\alpha = 0.05$						
	1	2	3	4	5	6	7
Яка - Годешево	14,2						
Яка - Вълкосел	15,2						
Яка - Корница		17,0					
Яка - Слащен		18,5	18,5				
Поле - Дебрен		18,7	18,7				
Яка - Жижево			20,2	20,2			
Яка - Абланица				21,1	21,1		
Поле - Хвостяне					22,1		
Яка - Боголин						24,0	
Яка - Фъргово							30,9
Significance	0,201	0,053	0,051	0,286	0,221	1,00	1,00

При дефицит на мед, тютюневите листа се обогатяват с общ и белтъчен азот и обедняват на захари [12]. Отчетените в изследването концентрации на мед в тютюна варират от 3,5 до 29,1 mg/kg (табл. 6). Стойностите за подрайон яка (3,5-8,8 mg/kg) са малко по-ниски или близки до концентрациите, съобщени от Zapryanova and Hristozova [8], които в зависимост от сорта са от 9,4 до 11,93 mg/kg. Съдържанието на Cu в тютюна от двата микрорайона (Дебрен и Хвостяне) на подрайон поле е по-високо от цитираните стойности, но съпоставимо със средните концентрации за Cu в ориенталския тютюн, съобщени от Golia et al. [4]. Въпреки

че предходните проучвания сочат, че тютюневите почви от район Неврокоп са добре запасени с подвижна мед [11], изследването не установи много високо съдържание на мед в тютюна в преобладаващата част от случаите. Може би тук трябва да се отчете влиянието на други фактори, които влияят върху постъпването на мед в растенията и съответно върху концентрацията на елемента в сировината. Съдържанието на мед в тютюна е доказано по-ниско в подрайон яка, където между някои микрорайони са налице достоверни разлики.

Таблица 6. Съдържание на мед в тютюн Крумовград 90 по подрайони и микрорайони.
Групиране на вариантите (Duncan's method)

Варианти	Homogenous groups Subset for $\alpha = 0.05$						
	1	2	3	4	5	6	7
Яка - Корница	3,5						
Яка - Фъргово		5,1					
Яка - Абланица		5,1					
Яка - Боголин		5,1					
Яка - Годешево		5,4	5,4				
Яка - Слащен			5,7				
Яка - Вълкосел				6,2			
Яка - Жижево					8,8		
Поле - Дебрен						17,1	
Поле - Хвостяне							29,1
Significance	1,00	0,072	0,079	1,00	1,00	1,00	1,00

4. Заключение

Отчетено е влиянието на агроекологичните условия на подрайоните и микрорайоните на район Неврокоп върху акумулирането на микроелементите Pb, Cd, Ni, Mn, Zn и Cu в ориенталски тютюн от екотип Крумовград (сорт Крумовград 90).

Установено е, че съдържанието на микроелементите в тютюневите пробы зависи по-силно от условията на конкретния микрорайон, докато влиянието на подрайоните е слабо.

ЛИТЕРАТУРА

1. Тимов, А., Веселинов, М., Атанасов, К., Димитров, Ц. Ориенталският тютюн в България, БАН, София, 1974.
2. Танов, Е., Милянчев, И. Райониране, концентрация и специализация на производството, обработката и преработката на тютюна в България, том I, ХГД, Пловдив, 1978.
3. Reichman, S. The responses of plants to metal toxicity: A review focusing on copper, manganese and zinc, Australian Minerals & Energy Environment Foundation, 1-54, 2002.
4. Golia, E., Dimirkou, A., Mitsios, I. Heavy metal concentration in tobacco leaves in relation to their available soil fractions, Communications in Soil Science and Plant Analysis, 40 (1-6), pp. 106-120, 2009.
5. Zapryanova, P., Dospatliev, L., Angelova, V., Ivanov, K. Correlation Between Soil Characteristics and Lead and Cadmium Content in the Aboveground Biomass of Virginia Tobacco, Environmental Monitoring, and Assessment, 163(1-4), pp.253-261, 2010.
6. Божинова, П., Чулджен, Х., Кръстева, В., Георгиев, Б. Състояние на замърсяването с тежки метали в региона на ОЦК-Кърджали и перспективи за земеползване. СУБ, Кърджали. Научна конференция, 3-10, 1995.

Съдържанието на олово и кадмий в тютюневите пробы от район Неврокоп е по-ниско от критичните концентрации, валидни за тютюна.

Концентрациите на никел, манган и цинк в тютюна са по-ниски от съобщените в други литературни източници.

Съдържанието на мед в пробите от подрайон яка е доказано по-ниско от отчетеното за подрайон поле.

7. Tsotsolis, N., Lazaridou, T., Matsu, Th., Bargiacchi, E., Miele, S., Barbayiannis, N., Kosmidou, O., Oliviero, O. Growth and heavy metal content of different tobacco types cultivated in Greece and in Italy, CORESTA Congress, New Orleans, U.S.A., September 22-27, 2002.
8. Zapryanova, P., Hristozova, G. Microelement content of oriental tobacco varieties grown under the same agro-ecological conditions, Agricultural sciences, 10, pp. 41-47, 2018.
9. Stojanović, D., Nikić, D., Lazarević, K. The level of nickel in smoker's blood and urine, Central European Journal of Public Health, 12(4), pp. 187-189, 2004.
10. Апостолова, Е. Влияние на почвената киселинност върху продуктивността и качеството на ориенталския тютюн, Български тютюн, 6, 26-31, 1985.
11. Zapryanova, P., Hristozova, G., Bozhinova, R. Agroecological Features of Tobacco Producing Regions in Southern Bulgaria, Tobacco, 66(7-12), pp. 61-71, 2016.
12. Tso, T. Physiology and Biochemistry of Tobacco Plants, Beltsville: Ideals, pp. 393, 1989.

ФИЗИКО-ХИМИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА НА ТЮТЮНЕВИ БЛЕНДОВЕ ЗА РЪЧНО СВИВАНЕ НА ЦИГАРИ

СИЛВИЯ ПЕЕВА, НИКОЛАЙ НИКОЛОВ, ЙОВКО ДЮЛГЕРСКИ

Институт по тютюна и тютюневите изделия, Марково

E-mail: silviqpeeva8407_1982@abv.bg

Резюме: Извършена е физико-химична характеристика на тютюневи блендове за ръчно свиване на цигари (RYO), разпространявани на българския пазар. Изследвани са пет марки тютюневи смеси, закупени от търговската мрежа. Проучваните тютюни за ръчно свиване на цигари представляват ароматизирани смеси, съставени преобладаващо от тютюневи влакна, нарязани непеработени тютюневи жили и тютюнево фолио. Съдържанието на влага в обектите е по-високо от 14 %, с изключение на проба ST1. Констатиран е висок процент I-ва фракция (дълги влакна) и ширина на влакната до 0,40 mm при всички изследвани преби. С най-ниско съдържание на никотин и редуциращи захари е проба ST4, докато останалите преби са с по-високи, несъществено различаващи се стойности по тези показатели. По отношение съдържанието на общ азот и пепел между изследваните тютюневи блендове не се констатират съществени различия.

Ключови думи: тютюни за ръчно свиване на цигари, физични показатели, химичен състав

PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERISTICS OF ROLL-YOUR-OWN TOBACCO BRANDS

SILVIA PEEVA, NIKOLAY NIKOLOV, YOVKO DYULGERSKI

Tobacco and Tobacco Products Institute, Markovo

E-mail: silviqpeeva8407_1982@abv.bg

Abstract: The current study presents the results from the physico-chemical assessment of roll-your-own (RYO) tobacco brands distributed on the Bulgarian market. Five different brands of RYO tobacco, all purchased from retail stores, were investigated. The respective RYO tobaccos represented top-flavored blends, comprised predominantly of cut tobacco, shredded unprocessed stems and reconstituted sheet. The moisture content of the blends exceeded 14%, with the single exception of sample ST1. All of the investigated fine-cut tobacco blends were characterized by a high share of the upper cut tobacco fractions (longer shreds) and cut width below 0.40 mm. The content of nicotine and reducing sugars was the lowest in sample ST4, while the rest of the tobacco blends were with higher and nearly equal contents. No significant variations between the investigated blends were found in terms of total nitrogen and ash contents.

Key words: roll-your-own (RYO) tobacco, physical characteristics, chemical composition

1. Въведение

Повишената консумация на тютюн за ръчно свиване на цигари (RYO) в последните години и факторите, които я обуславят са обект на проучване от редица изследователи [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7]. Счита се, че атрактивността на тези изделия за пушене, особено сред младите хора, се дължи основно на използваните аромати, непознатите рискове от тяхната консумация и по-ниската цена в сравнение с конвенционалните цигари [4, 8, 9, 10, 11]. В потвърждение на това е изследването на Young D. et al. [2012], в което се посочва, че

промяната в навиците на консумация на тютюневи изделия и значителното увеличение употребата на RYO тютюни освен на посочените фактори се дължи и на възможността по-лесно да се контролира количеството тютюн, използвано при свиване на по-тънки цигари и респ. на погрешното убеждение, че те са по-малко вредни. Друга причина според De Granda-Orive J. and Jimenez-Ruiz C. [2011] е по-ниското съдържание на добавки в състава на RYO тютюните в сравнение с фабрично произведените цигари. Проучвайки

разпространението и характеристиките на пушачите на тютюневи изделия в световен мащаб, Rosenberry Z. et al. [2013] прогнозират, че прилагането на цялостно законодателство за контрол на тютюнопушенето и особено големите увеличения на данъка върху цигарите, ще допринесат за намаляване на тяхната консумация при използване на по-евтини алтернативи. В тази връзка, Ayo-Yusuf O. and Olutol B. [2013] констатират, че трябва да се вземат предвид евентуалните проблеми, свързани с потенциалното използване на RYO тютюн особено сред населението с по-нисък социален статус. Извършеният преглед и анализ на специализирана информация с данни показват, че младите хора, които се насочват към търсене на „по-малко вредни“ и „по-евтини“ алтернативи на фабрично произведените цигари са най-уязвими по отношение на непознатите рискове от консумацията на т. нар. „други тютюневи изделия“.

С приемането на Директива 2014/40/EU (в сила от 2016 г.) и в съответствие с изискванията на Световната здравна организация, научните изследвания се насочват приоритетно към изделия за пущене, различни от цигарите, които са покрили значителен пазарен дял и потребление (пури, пурети, тютюн за ръчно свиване на цигари, тютюн за лула, тютюн за водна лула, електронни цигари и др.), но за които все още няма законодателно обезпеченено регулиране, на база международни стандарти, като обект на специално внимание са вредните последици за здравето, особено на младите хора. В последните години, независимо от увеличената консумация на тютюни за ръчно свиване на цигари у нас, изследванията са периодични и върху ограничен брой търговски марки, което обосновава необходимостта от провеждане на настоящото проучване.

Цел

Физико-химична характеристика на тютюневи блендове за ръчно свиване на

3. Резултати и обсъждане

Визуална оценка - външен вид и структурни елементи

цигари, разпространявани на българския пазар.

2. Материал и методи

Обект на изследване са пет марки (потребителски опаковки) тютюневи смеси за ръчно свиване на цигари, закупени от търговската мрежа, условно означени:

- ST1 - Тютюнев бленд 1 (виржински - blue);
- ST2 - Тютюнев бленд 2 (виржински - orange);
- ST3 - Тютюнев бленд 3 (виржински - cappuccino);
- ST4 - Тютюнев бленд 4 (виржински - gold);
- ST5 - Тютюнев бленд 5 (yellow).

Обектите са анализирани по следните показатели:

- ❖ **Визуална (органолептична) оценка** - външен вид и структурни елементи;
- ❖ **Съдържание на влага, %** - БДС 8025:1984 „Тютюн и тютюневи изделия. Методи за определяне съдържанието на влага“ [14];
- ❖ **Фракционен състав на рязан тютюн** - БДС 8026:1988 „Тютюневи изделия. Определяне на фракционен състав“ [15];
- ❖ **Ширина на тютюневите влакна** - БДС 12973: 1975 „Тютюневи изделия. Методи за определяне широчината на тютюневите влакна“ [16];
- ❖ **Химичен състав на тютюна (%):**
 - общи алкалоиди (като никотин) - ISO 15152:2003 [17];
 - редуциращи захари - ISO 15154:2003 [18];
 - общ азот - БДС 15836-88 [19];
 - минерален състав (пепел) - ISO 2817:1999 [20].

Анализите за определяне физичните показатели са извършени в три повторения като са представени средните стойности, химичният състав - в съответствие с посочените стандарти.

Тютюневите блендове, обозначени условно като проби ST1, ST2, ST3, ST4 и

ST5, са опаковани в уплътнени полиетиленови пликове, като само при проба ST4 пликът е тип „джъмпер“. Върху потребителските опаковки е налична информация за вредата от тютюнопушенето, нето тегло - 30 g (при 4 от тях) и 40 g (при една опаковка), и производител. Всички преби съдържат ароматизирани смеси, съставени преобладаващо от тютюневи влакна, нарязани непреработени тютюневи жили и тютюнево фолио (възстановен тютюн).

Физични показатели

Резултатите за съдържанието на влага (%) в изследваните тютюневи блендове са представени на фиг. 1.

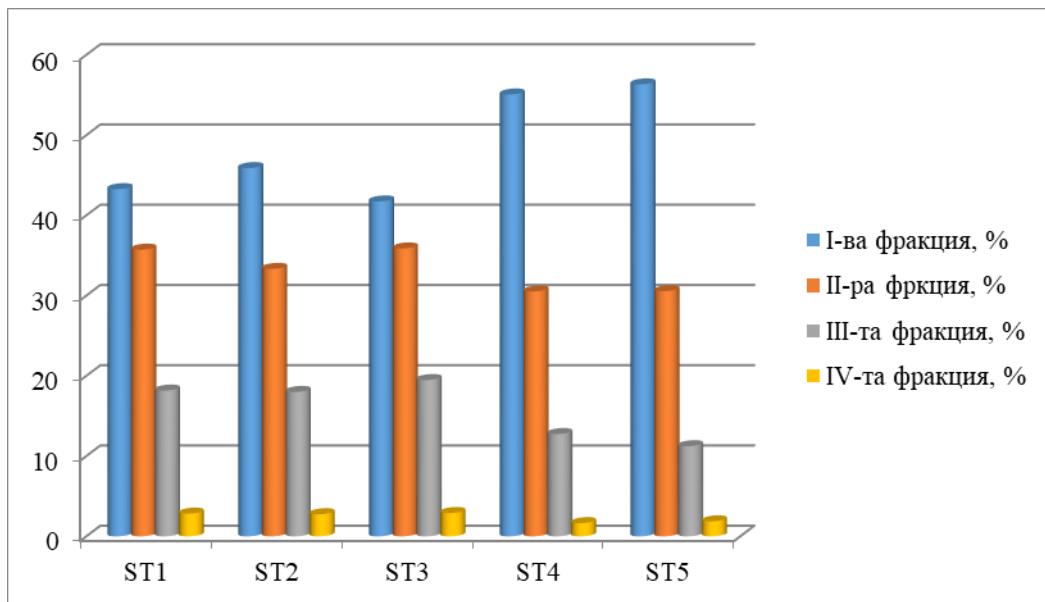
Видно от фиг. 1 съдържанието на влага в тютюневите смеси се изменя в границите от 13,60 % при проба ST1 до 15,18 % при ST4, като при четири от пробите същото надхвърля нормативния интервал за съдържание на влага в цигарите - от 11,00 % до 14,00 %.



Фиг. 1. Съдържание на влага (%) в изследваните тютюневи смеси за ръчно свиване на цигари

На фиг. 2 са представени резултатите за фракционния състав на тютюневи блендове - ST1, ST2, ST3, ST4 и ST5. Резултатите показват висок процент на I-ва фракция (дълги влакна) при всички изследвани преби, като варирането на същия е в интервал от 41,74 % при ST3 до

56,33 % при ST5. Значителен дял от съдържанието на пробите заемат и средните влакна (II-ра фракция), като изменението е в много тесен диапазон - от 30,52 % при ST4 до 35,88 % при ST3. Късите влакна заемат по-малко от 20,00 % от материала, а фракцията „прах“ - до 3,00 %.



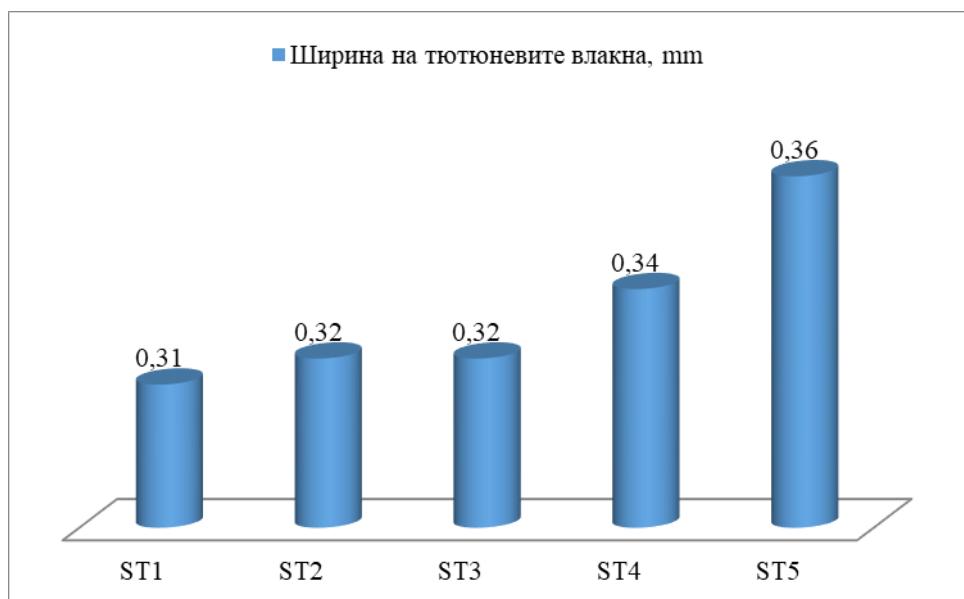
Фиг. 2. Фракционен състав на изследваните тютюневи смеси

На следващата фигура са представени данни за ширината на тютюневите влакна (mm) при изследваните пробы. Видно от фиг. 3 между изследваните пробы няма съществени различия по отношение на този показател, като

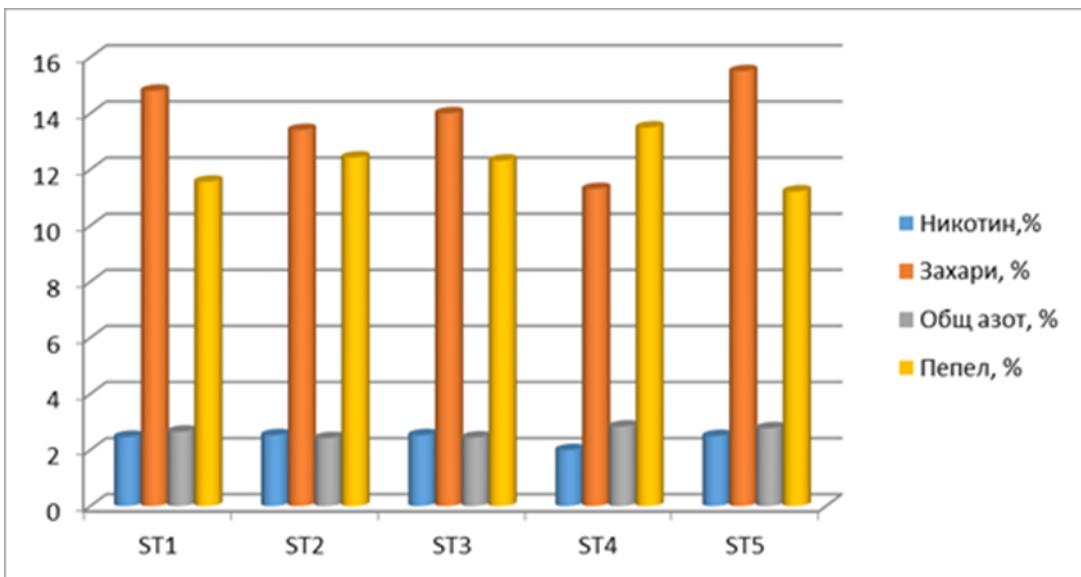
ширината на влакната е до 0,40 mm - тютюневите смеси са с много фин ряз.

Химичен състав

Резултатите за химичния състав на изследваните блендове са представени на фиг. 4.



Фиг. 3. Ширина на тютюневите влакна, mm



Фиг. 4. Основни показатели от химичния състав на изследваните тютюневи смеси

Резултатите показват най-ниско съдържание на никотин при проба ST4 - 1,99 %, докато останалите са с високо, много близко съдържание - 2,50 %. Съдържанието на редуциращи захари се изменя в диапазона от 11,30 % при проба ST4 до 15,50 % при ST5. По отношение

съдържането на общ азот и пепел между изследваните тютюни не се констатират съществени различия.

4. Заключение

На базата на получените резултати могат да бъдат направени следните изводи:

1. Всички преби съдържат ароматизирани смеси, съставени преобладаващо от тютюневи влакна, нарязани непреработени тютюневи жили и тютюнево фолио.
2. Влагосъдържанието на изследваните RYO тютюни е по-високо от 14,00 % с изключение на проба ST1.
3. Констатира се висок процент I-ва фракция (дълги влакна) при всички изследвани преби.

ЛИТЕРАТУРА

1. Breslin, E., Hanafin, J., Clancy, L. It's not all about price: factors associated with roll-your-own tobacco use among young people - a qualitative study, BMC Public Health, 18, № 991, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12889-018-5921-8>
2. Agaku, I., Alpert, H. Trends in annual sales and current use of cigarettes,

4. Установява се, че между изследваните преби няма съществени различия по отношение ширината на тютюневите влакна (до 0,40 mm).
5. Констатира се най-ниско съдържание на никотин при преба ST4 - 1,99 %, докато останалите са с високо, много близко съдържание - 2,50 %. Съдържанието на редуциращи захари се изменя в диапазона от 11,30 % при преба ST4 до 15,50 % при ST5. По отношение съдържането на общ азот и пепел между изследваните смеси не се констатират съществени различия.

cigars, roll-your-own tobacco, pipes, and smokeless tobacco among US adults, 2002 - 2012, Tobacco Control, 25 (4): pp. 451-457, 2016.

3. Gilmore, A., Tavakoly, B., Hiscock, R., Taylor, G. Smoking patterns in Great Britain: the rise of cheap cigarette brands and roll your own (RYO) tobacco, Journal of Public Health, 37

- (1): pp. 78-88, 2015. <https://doi.org/10.1093/pubmed/fdu048>
4. Rosenberry, Z., Strasses, A., Canlas, L., Potts, J., Pickwort, W. Make your own cigarettes: characteristics of the product and the consumer, Nicotine&Tobacco Research, 15 (8): pp. 1453 - 1457, 2013.
 5. Lidón-Moyano, Cr., Martín-Sánchez, J., Saliba, P., Graffelman, J., Martínez-Sánchez, J. Correlation between tobacco control policies, consumption of rolled tobacco and e-cigarettes, and intention to quit conventional tobacco, in Europe, Tobacco Control, 26 (2): pp. 149-152, 2017.
 6. Киркова, С. Пушателни свойства на RYO тютюн разпространяван по интернет, Юбилейна Международна научна конференция „70 години Институт по тютюна и тютюневите изделия“, ISBN 978-954-702-103-7, 2014.
 7. Киркова, С. Традиция от източа, Български тютюн, (3): стр. 31-32, 2009.
 8. Gallus, S., Lugo, Al., Liu, X., Behrakis, P., Boffi, R., Bosetti, Cr., Carreras, G. et all. Who smokes in Europe? Data from 12 European Countries in the Tack SHS Survey (2017-2018), Journal of Epidemiology, 31 (2): pp. 145-151, 2021. doi: [10.2188/jea.JE20190344](https://doi.org/10.2188/jea.JE20190344)
 9. De Granda-Orive, J., Jimenez-Ruiz, C. Some thoughts on hand-rolled cigarette, Journal: Archivos de Bronconeumologia, 47 (9): pp. 425-426, 2011.
 10. Marcilla, A., Beltran, M., Gomez-Siurana, A., Berenguer, D., Martinez-Castellanos, I. Comparison between the mainstream smoke of eleven RYO tobacco brands and the reference tobacco 3R4F, Toxicology Reports (1): pp. 122–136, 2014.
 11. Edwards, R. Roll your own cigarettes are less natural and at least as harmful as factory rolled tobacco, BMJ, 348, 2014. doi: <https://doi.org/10.1136/bmj.f7616>
 12. Young, D., Yong, H., Borland, R., Shahab, L., Hammond, D., Cummings, K., Wilson, N. Trends in roll-your-own smoking: findings from the ITC four-country survey (2002–2008), Journal Environmental and Public Health, 2012. (article ID: 406283).
 13. Ayo-Yusuf, O., Olutol, B. Roll-your-own” cigarette smoking in South Africa between 2007 and 2010, BMC Public Health, (13): pp. 597-603, 2013.
 14. БДС 8025:1984 „Тютюн и тютюневи изделия. Методи за определяне съдържанието на влага”.
 15. БДС 8026:1988 „Тютюневи изделия. Определяне на фракционен състав”.
 16. БДС 12973: 1975 „Тютюневи изделия. Методи за определяне широчината на тютюневите влакна”.
 17. ISO 15152:2003 „Tobacco - Determination of the content of total alkaloids as nicotine - Continuous - flow analysis method”.
 18. ISO 15154:2003 „Tobacco - Determination of the content of reducing carbohydrates - Continuous - flow analysis method”.
 19. БДС 15836-88 „Тютюн и тютюневи изделия. Методи за определяне на общия азот”.
 20. ISO 2817:1999 „Tobacco and tobacco products - Determination of silicate residues in soluble in hydrochloric acid”.

ХАРАКТЕРИСТИКА НА СЕЛЕКЦИОННИ ОБРАЗЦИ ТЮТЮН ОТ СОРТОВА ГРУПА „БАСМИ“- ЕКОТИП КРУМОВГРАД И ИЗТОЧЕН БАЛКАН

МАРИЯ КЪШЕВА¹, ВЕСЕЛИНА МАШЕВА^{1*}, ВЕЛИЧКА СПАСОВА-
АПОСТОЛОВА²

Институт по тютюна и тютюневите изделия^{1,2}

Институт по растителни генетични ресурси

„К. Малков“ – Садово^{1}*

itti_markovo@abv.bg¹, vesi_masheva@yahoo.com^{1*}, vilispasova-apostolova@abv.bg²

Резюме: За постигне на оптимален резултат в селекционните програми при тютюна е необходима комплексна оценка на морфологични, стопански и химични показатели. В изследването са включени 9 новоселекционирани линии ориенталски тютюн с контролни сортове Крумовград 988 и Еленски 817. Полският експеримент е проведен в Опитно поле (ОП) - с. Марково и ОП - с. Козарско през 2017 г.- 2019 г. Целта на изследването е оценка на основни морфологични, качествени и химични показатели на селекционни образци тютюни от сортова група „Басми“ – екотип Крумовград и Източен Балкан отгледани в различни условия. Резултатите показват, че изследваните линии ориенталски тютюн са много добре изравнени. Основните им морфологични признаки са типични за екотип Крумовград и Източен Балкан. Формират по-голям брой листа, по-висок добив сух тютюн и процент втора класа. Стойностите на химичните показатели за периода 2017 г.- 2019 г, показват силно вариране с ниски нива на никотин и високи на разтворими захари. Най-близко до оптималното съотношение на захари/никотин е отчетен при вариант 4.

Ключови думи: ориенталски тютюн, морфологични признаки, качествени и химични показатели

CHARACTERISTICS OF TOBACCO BREEDING ACCESSIONS OF GROUP "BASMI"- ECOTYPE KRUMOVGRAD AND EAST BALKAN

MARIA KASHEVA¹, VESELINA MASHEVA^{1*}, VELICHKA SPASOVA-
APOSTOLOVA²

Tobacco and Tobacco Products Institute^{1,2}

Institute for Plant Genetic Resources “Konstantin Malkov”- Sadovo^{1}*

itti_markovo@abv.bg¹, vesi_masheva@yahoo.com^{1*}, vilispasova-apostolova@abv.bg²

Abstract: To achieve an optimal results in the tobacco breeding programs, it's necessary a complex evaluation of morphological, economic and chemical indicators. In the study includes nine newly breeding oriental tobacco lines with control variety Krumovgrad 988 and Elenski 817. The field experiment was conducted of Experimental field (EF) - Markovo and Experimental field (EF) - Kozarsko in 2017-2019. The target of the study is to assess the main morphological, qualitative and chemical indicators of tobacco breeding accessions from the "Basmī" group variety - ecotype Krumovgrad and Eastern Balkans grown in a different conditions. The results show, that the studied oriental tobacco lines are very well aligned. Their main morphological indicators are typical for the Krumovgrad and Eastern Balkan ecotype. They form a larger number of leaves, a higher yield of dry tobacco and a percentage second class. The values of the chemical indicators for the period 2017-2019 show strongly variation with low levels of nicotine and high levels of soluble sugars. Closest to the optimal range in soluble sugar/nicotine ratio were reported in variant 4.

Key words: oriental tobacco, morphological traits, quality and chemical indicators

1. Въведение

Тютюнът е вкусово – ароматичен продукт и като стока се реализира на базата на формиранието в листата специфични консуматорски качества, зависещи от реализацията на генетичния потенциал на сорта и условията на отглеждане [1,2]. Потребителските свойства се променят под влиянието на екологичните и метеорологични условия, независимо от прилаганата агротехниката [3].

Варирането на количествените признания в различни условия на околната среда е в зависимост от индивидуалните характеристики на генотипа [4].

В последните години с най-голям пазарен дял от изкупуваните ориенталски тютюни са тези от екотип „Крумовград“ сортова група Басми. Това наложи отглеждането им в условия различни от районите, за които са селекционирани.

Сортът е най-динамичният компонент, отговорен за качеството на получаваната сировина и равнището на добива и проявяват изключителна пластичност към условията на средата. Това налага от една страна оценка, както на морфологичните признания характеризиращи екотипа, а така също и на основните показатели определящи добива и качеството на тютюневата сировина получена от различните екологични условия.

2. Цел:

Оценка на основни морфологични, качествени и химични показатели на селекционни образци тютюни от сортова група „Басми“ – Екотип Крумовград и Екотип Източен Балкан отгледани в различни условия.

3. Материал и метод

Изследването е проведено в периода 2017 – 2019 г. с девет новоселекционирани линии

ориенталски тютюн от екотип Крумовград и Източен Балкан. Изведени са два полски експеримента в ОП - с. Марково и ОП - с. Козарско.

Почвата в опитния участък на ОП – с. Марково е хумусно-карбонатна, със следните почвени характеристики: съдържание на хумус от 2,94 %, общ азот (N) 0,163%, фосфор (P_2O_5) 2,61mg/100g и pH - 8,08.

Почвата в опитния участък на ОП – с. Козарско хумус – 1,00%, общ азот - 0,064%, подвижен фосфор – 7,9 mg./100g почва, pH-7,92.

За оптимално развитие на тютюневите растения и получаване на качествена сировина, на база резултатите от почвения анализ е определено количеството на необходимите минералните торове. Внесени с първото окопаване 7 – 10 дни след разсаждане на тютюна.

Рассаждането на полските опити и в двете опитни полета през тригодишния период е извършвано в периода от 15 май до 24 май. Тютюна е разсаждан при междуредово разстояние 50 см. и вътрередово разстояние 8 – 10 см. Опитът е залаган в две повторения по 4 реда, с големина на опитната парцела 12 m^2 . Изпитани се общо девет линии. Като контрола са залагани сортове Крумовград 988 и Еленски 817.

На табл. 1 и 2 са представени средномесечните температури и валежи през вегетационния период на тютюна за двата пункта на експеримента. От тях се вижда, че отклонението от средните температури за районите не е съществено и е в диапазона от 2-3°C. Количество на падналите валежи, особено през 2018 и 2019 г през месец юни и началото на юли превишават значително средните за района.

От една страна това се отрази благоприятно върху общото развитие на тютюна, но от друга страна забави узряването на първите листа и навлизането на растенията в генеративна фаза.

Таблица 1. Средномесечна температура и валежи- ОП Марково – 2017-2019 г.

месец	Норма t, C°	температура, C°			Норма мм	Валежи, mm		
		2017	2018	2019 г		2017	2018	2019
май	17,5	20,5	20,1	21,5	43,0	58,0	48,5	69,0
юни	20,9	23,8	23,0	23,5	63,0	15,0	139,9	142,3
юли	23,2	25,0	24,7	24,2	49,0	65,0	82,7	40,0
август	22,7	25,3	24,8	25,3	31,0	9,0	45,6	7,0
Септември	19,0	19,5	20,5	21,0	24,0	10,0	18,0	4,0

Таблица 2. Средномесечна температура и валежи- ОП Козарско – 2017-2019 г.

месец	Норма t, C°	температура, C°			Норма мм	Валежи, mm		
		2017	2018	2019 г		2017	2018	2019
май	17,5	17,6	21,5	21,5	43,0	62,2	56,1	69,0
юни	20,9	23,6	23,5	23,5	63,0	27,1	121,7	142,3
юли	23,2	25,0	24,2	24,2	49,0	16,8	68,1	40,0
август	22,7	25,2	25,3	25,3	31,0	7,9	17,7	7,0
Септември	19,0	21,3	21,0	21,0	24,0	8,6	0,0	4,0

За месеците август и септември за тригодишния период и в двете опитни полета, количеството на падналите валежи е малко, което спомага за по-бързото сушене и изпускане на водата и се отрази благоприятно на качеството на тютюневата сировина.

Манипулацията на сухия тютюн е извършвана в края на месец октомври. Установен е среден добив и качество на тютюна по варианти.

През време на вегетациите са направени биометрични измервания и фенологични наблюдения при следните съществуващи показатели:

- морфологична и вегетативна изравненост;
- фенологични наблюдения – фази на растеж в разсадна фаза;
- биометрични измервания - височина на растенията /см/, брой листа, размери на листа /см/ (14-ти , 21-ви лист);
- биологични особености – дължина на вегетационния период в дни от разсаждането до масов цъфтеж;
- качествени показатели – добив и класи.

На представителни пробы от изследваните образци е извършен химичен анализ – на показателите:

- общ азот;
- никотин;
- разтворими захари и съотношение на разтворими захари/никотин.

Математическата обработка е направена с програмен пакет за дисперсионен анализ Biostat, версия 5.1[5].

Химичните анализи са извършени по (ISO) международен стандартизиран метод в

акредитиран лабораторен комплекс за изпитване (ЛКИ) в ИТТИ – с. Марково.

4. Резултати и обсъждане

Резултатите за морфологичните показатели (табл. 3) сочат, че по отношение на показателите – височина на растенията и брой листа стойностите са в рамките за ориенталския тютюн и характерни за екотипа. За признака височина на растенията и в двете полета варианти 1, 2 и 6 са доказани разлики спрямо контролните сортове.

Височината им е в границите от 130,16 см до 153,05 см. При контролните сортове тя е 116,05 см за сорт Крумовград 988 и 120,85 см за сорт Еленски 817. По отношение на признака брой листа варианти 2, 6 и 8 са с по-голям брой листа и доказани при различни нива на значимост. Те са в диапазона 31,17 до 36,95 броя. Контролните сортове формират около 30 броя технически годни листа (Таблица 3).

По отношение на признака размери на листата, изпитваните варианти са със стойности близки на тези за контролните сортове. За дълчината на 14-ти лист се запазва тенденцията по-голяма част от линиите да са с размери в границите на контролните с изключение на варианти 1 и 8, където листата са с по-голям размер (в двете опитни полета) и варианти 3 и 7 в ОП Марково, където се наблюдават доказани разлики по този показател (Таблица 3).

За признака ширината на листата от средния пояс само при вариант 1 в ОП Козарско е установена доказана разлика. 21-ви лист е с доказано по - широки листа при вариант 1 в ОП – с. Марково. При този беритбен пояс варирането на признаките дължина и ширина е най-малко (Таблица 3).

Таблица 3 Биометрични показатели 2017 – 2019 г.

№	височина см.	брой листа	14 лист		21 лист	
			Дължина см.	Ширина см.	Дължина см.	Ширина см.
ОП Марково						
1	141,61**	32,43	28,30**	12,78	19,95	12,57*
2	153,05***	35,25***	23,22	12,72	19,51	10,69
3	114,00	24,10	28,51**	13,39	19,24	11,03
4	98,66	26,14	22,64	12,29	17,50	8,97
5	102,38	28,88	20,82	12,22	17,86	9,51
6	143,47**	36,95***	26,45	16,25	22,64	12,69
7	126,38	32,93**	27,04**	15,80	23,02	12,24
8	106,97	31,02*	30,32***	15,49	23,23	12,03
9	116,50	28,58	24,57	13,10	22,31	11,52
Кр. 988	117,95	30,13	28,30	12,78	19,95	12,57
Ел. 817	119,71	30,25	25,22	12,72	19,51	11,69
ОП Козарско						
1	136,85**	33,16**	28,25**	14,50**	20,25	13,50
2	138,50**	34,00*	24,75	13,00	20,75	12,00
3	118,50	27,16	26,25	13,00	21,50	12,25
4	94,66	25,83	22,75-	12,50	20,50	10,50-
5	105,75	32,00	22,75	12,00	19,50	11,50
6	120,06*	34,41***	26,20	13,00	21,25	11,75
7	130,16**	34,67	26,75	12,75	21,50	11,50
8	110,92	31,17**	28,25**	13,00	20,75	10,75
9	115,17	30,00	24,75	12,50	20,75	11,25
Кр. 988	115,50	30,00	28,00	13,00	19,50	12,50
Ел. 817	122,00	31,00	25,25	12,50	20,00	12,00

$GD\ 5\%-9,74$ $GD\ 5\% - 1,35$ $GD\ 5\%-1,53$ $GD\ 5\%-1,42$ $GD\ 5\% - 1,84$ $GD\ 5\%- 1,32$
 $GD1\% - 13,52$ $GD1\%-2,95$ $GD1\%-2,24$ $GD1\%-2,01$ $GD1\%-2,48$ $GD1\%-2,78$
 $GD0,1\%20,21$ $GD0,1\%-3,86$ $GD0,1\%-3,21$ $GD0,1\%-3,91$ $GD0,1\%-3,18$ $GD0,1\%-3,2$

В таблица 4 са представени резултатите за добив/дка и съотношението на класите след направената манипулация през трите години на експеримента.

Варианти 1, 3 и 8 са с доказани разлики и в двете опитни полета. Вариант 1 формира среден добив от 181,5 и 170,0 кг. при 163 кг/дка за контролните сортове. Независимо от не подходящите климатични условия – високите валежи през месец юли, през две от опитните години, при формиране и узряване на листата от първи беритбен пояс, разпределението по класи е добро.

Някои автори установяват корелационни зависимости между биометричните, качествените, химичните показатели и условията

на средата при тютюни от трите сортови групи Ориенталски, Виржиния и Бърлей [1,6]. В получените от нас резултати вариант 1 се отличава с по-голяма дължина на 14-ти лист и има висок добив и в двете опитни полета.

Данните от разпределението на класите показват преобладаваща втора класа при всички изследвани варианти. Новоселекционираните линии формират около 20 % първа и много силна II-ра класа-75-80%. Нисък е процента трета класа особено при варианти 1 и 6 независимо от високия добив (Таблица 4). Получените резултати потвърждават установената и от други автори положителна връзка между размерите на листата, добива и процентното разпределение по класите [6].

Таблица 4. Качествени показатели – добив/дка и класи- 2017 – 2019 г.

Варианти	Класи, %			Добив кг/дка
	I-ва	II-ра	III-та	
ОП Марково				
1.	20	74	6	181,50**
2.	15	70	15	153,33
3.	8	77	15	176,50*
4.	10	80	10	120,75
5.	10	70	20	114,59
6.	27	68	5	168,59
7.	15	77	8	155,00
8.	12	78	10	173,88*
9.	5	70	25	173,71*
Крумовград 988	20	74	6	160,50
Еленски 817	15	70	15	160,59
ОП Козарско				
1.	20	75	5	179,00*
2.	10	75	15	158,35
3.	20	70	10	176,75*
4.	15	75	10	150,50
5.	10	70	20	168,55
6.	15	75	5	170,50
7.	18	75	7	175,50*
8.	20	70	10	175,00*
9.	10	75	15	175,50*
Крумовград 988	18	80	2	165,50
Еленски 817	25	70	5	168,25

GD 5% 9,5713

GD 1% 16,7231

GD 0,1% 25,8835

Комплексната оценка на сировината от ориенталския тютюн включва освен добив сух тютюн, качество изразено с относителния дял на класите, а така също и химическия състав на тютюна [7, 8].

Никотинът е химичният компонент, който е най-типичният алкалоид в тютюневото растение. Той определя физиологичната сила на пушенето, проявяваща се, когато съдържанието на никотин е в определени граници. Типичните стойности за качествения ориенталски тютюн са: разтворими захари 10% - 20%, никотин - 0,4% - 1,7% [9].

От изследваните варианти със стойности до оптималните са варианти 1,3, 4 и 5.

В изследваните варианти стойностите на никотин варират в оптимални граници. Единствено при вариант 2 е отчетено по-ниско съдържание на никотин от 0,3 % (Фиг. 1).

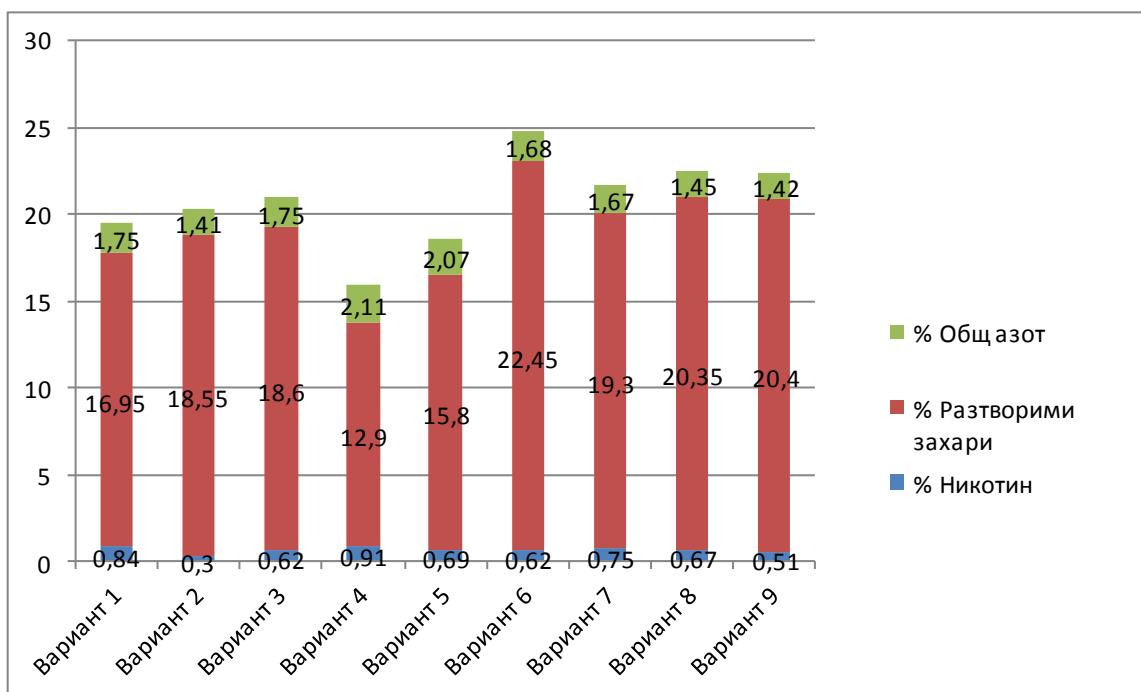
Количеството на никотин е сортов белег, но той значително варира от екологичните

условия и начина на сушене на сировия тютюн. Определяне на техническата зрялост на тютюна преди процеса сушене е основен фактор за правилното протичане на физичните и биохимичните процеси в зеления тютюнев лист при сушенето с цел разкриване на основните качествени признаки формирани през неговата вегетация.

За голяма част от изследваните варианти разтворимите захари са в диапазона от 16 % до 20 % само при вариант 6 стойността е над 20 %. При варианти 4 и 5 разтворимите захари са пониски от 16 % (Фиг. 1).

Отчетените стойности на процентите общ азот варират от 1,41 % при вариант 2 до 2,11 % при вариант 4 (Фиг. 1).

Резултатите от химичния анализ показват вариране в зависимост от климатичните условия и агротехниката.



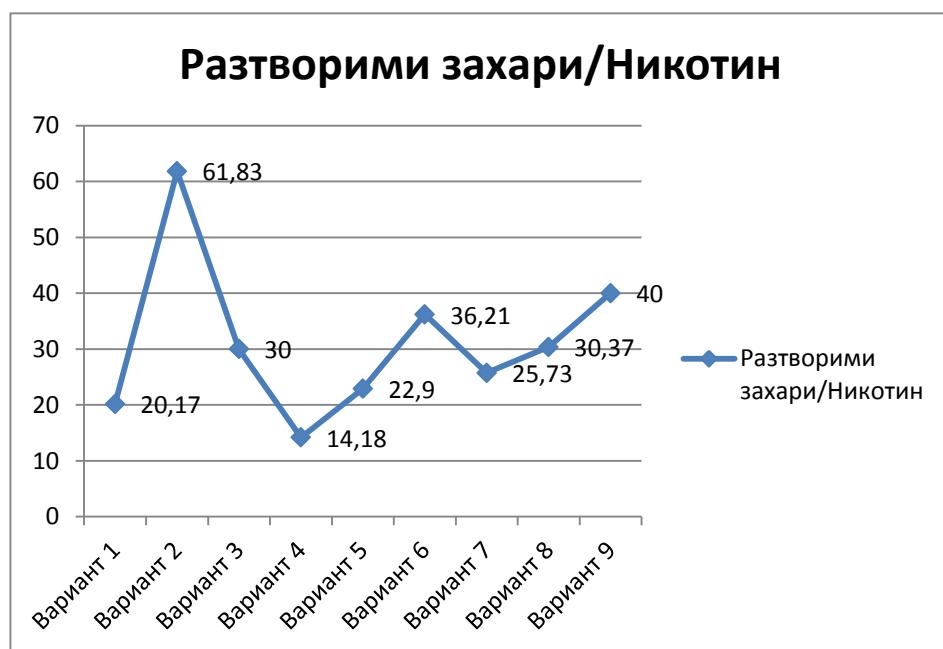
Фиг. 1 Средноаритметични стойности на химичните показатели.

В изследвания от 2019 г. на биометричните, качествените и химични показатели на български ориенталски сортове тютюн интродуцирани в условията на Виетнам е доказано, че химичното съдържание на никотин е по-високо в резултат на кършено на цветната китка, а съдържанието на въглехидрати е пониско [10].

Съотношението между разтворимите

захари и никотина дава представа за пълнота и гладкота на вкуса, за проявление на парене и острота. Оптималните стойности между разтворимите захари и никотин са в диапазона между 6 и 10 [9].

На фиг. 2 са представени съотношенията разтворими захари/никотин на изследваните хибридни комбинации. Единствено при вариант 4 са отчетени стойности близки до оптималните.



Фиг. 2 Съотношение разтворими захари/никотин

За всички останали варианти съотношението разтворими захари / никотин е по-високо, поради високите стойности на

разтворимите въглехидрати (Фиг. 2). Това води до сладък, едностраничив и с лека физиологична сила вкус при пушене.

5. Заключение

Изследваните линии ориенталски тютюн включени в проучването са много добре изравнени. Основните им морфологични признания са типични за екотип Крумовград и Източен Балкан. Формират по-голям брой листа, по-висок добив сух тютюн и процент втора класа.

Стойностите на химичните показатели за периода, показват силно вариране с ниски нива на никотин и високи на разтворими захари. Най-близко до оптималното съотношение на захари/никотин е отчетен при вариант 4.

*** Изказваме специални благодарности на проф. д-р Димитър Диманов за любезно предоставените материали.**

ЛИТЕРАТУРА

1. Стаматов, И. Стопански показатели на сортове ориенталски тютюн от екотип Крумовград създадени в Опитна станция по тютюна – Хасково, Растениевъдни науки, 2019, 56:4, 48-54.
2. Dimanov, D., Kasheva, M., Masheva, V. Phenotypic expression of the quality parameters in Oriental Tobacco hybrids and varieties as a result of different climatic conditions, Anniversary scientific conference with foreign participation „Science and education – traditions and future”, Kardzhali, 2014, 421-427.
3. Dratchev, D. Qualitative Characteristics of the Bulgarian Oriental Tobaccos, Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2000, 14:1, 87-94.
4. Masheva, V., Kasheva, M. Inheritance of Main Morphological Traits and Chemical Parameters' Analysis of Oriental Tobacco, Journal of Agricultural Science and Technology, 2016, DOI:10.17265/2161-6256/2016.06.007.
5. Пенчев Е., Оценка на продуктивността и показателите на качество при пшеницата с математически модули, 1998, Дисертация, София.
6. Дюлгерски Й., Радукова, Ц. Корелации между морфологични и стопански параметри при тютюн Бърлей, Agricultural Science and Technology (Селскостопанска наука и технологии) том. 6, 2014, 2, 197 – 198.
7. Къщева, М., Диманов, Д. Машева, В., Оценка на качествените и химични показатели при ориенталски тютюни от различни сортови групи в зависимост от екологичните условия. Научни трудове на Съюз на учените в България, Пловдив, Серия Б, Том XVI,,Техники и технологии“ 2014, 34-38.
8. Drachev, D., Nikolova, V. Technological study on the quality of tobacco varieties Dzhebel K 81 and Krumovgrad 90 grown in Unconventional Regions, UDC 633.71 Tutun/Tobacco, Institut za tutun - Prilep, R. Makedonija, 2006, 56:(7-8), 149-158.
9. Guzelev, L. 1983. "Curing Process and Chemical Constituents." In Tobacco Technology. Sofia: Zemisdat, 9-67. (in Bulgarian).
10. Бозуков, Х, Къщева, М., Кочев, Й. Резултати от интродуциране на български сортове ориенталски тютюн в Република Виетнам, Научни трудове на Съюз на учените в България, Пловдив, Серия В. Техника и технологии, Том XVIII, 2020, 27-31.

УСТОЙЧИВОСТ НА ЖИВОТНОВЪДСТВОТО СЛЕД ПЕРИОДА COVID-19

ДЕСИСЛАВА АБАДЖИЕВА

*Институт по биология и имунология на размножаването, Българска академия на науките
1113 София, бул. Цариградско шосе 73
e-mail: dessi_1@abv.bg*

Резюме: Рестриктивните мерки, наложени за справяне със здравословните проблеми, причинени от пандемията COVID-19 (поява на нов щам на коронавирус SARS-CoV-2), се отрази негативно на глобалната икономика през 2020 г. Животновъдството и свързаните с него индустрии са сред по-засегнатите сектори. Това се дължи на ограниченията на движението на хора и стоки, което доведе до намаляване наличността на производствените ресурси. Други фактори, влияещи върху устойчивостта на животновъдството, са по-строгите санитарни правила в пандемичния период относно грижите и хуманното отношение към животните. Настоящият преглед има за цел да анализира устойчивостта на животновъдството и в частност хуманното отношение към тях след периода COVID-19, с влияние към устойчивостта на хранителната верига.

Ключови думи: животновъдство, хуманно отношение към животните, COVID-19, продоволствена сигурност

SUSTAINABILITY OF ANIMAL HUSBANDRY AFTER THE COVID-19 PERIOD

DESI SLAVA ABADIEVA

*Institute of biology and immunology of reproduction, Bulgarian academy of sciences
1113 Sofia, bul. Tzarigradsko shosse 73
correspond. e-mail: desi_1@abv.bg*

Abstract: The restrictive measures to cope with the health issues caused by COVID-19 pandemic (emergence of a new strain of coronavirus SARS-CoV-2) negatively affected the global economy during 2020. The animal husbandry and its related industries are among more impacted sectors. This is ascribed to the limitations of movement of people and goods leads to the decrease of production inputs' availability. Other factors affecting the sustainability of the animal husbandry were stricter sanitary rules in a pandemic period on animal care and welfare. The current review aim is to analyze sustainability of animal husbandry and welfare after the COVID-19 period with an impact on the food chain sustainability.

Key words: animal husbandry, animal welfare, COVID-19, food security

1. Въведение

Респираторният синдром коронавирус (SARS-CoV) парализира целия свят в края на 2019 г. Предполага се, че генотипът му е тясно свързан с типичния коронавирус при прилепи, въпреки че не е идентичен на него [1], но се смята че е резултат от прекомерната експлоатация на дивата природа. Продукти като месо, кости, люспи, кръв, рога, коса и други, идващи от

бракониерство на застрашени видове или свободно отглеждани се доставят както до неофициални, така и официални пазари на храни и/или се употребяват неконтролирано за народна медицина. В рамките на няколко месеца този вирус се разпространи по целия свят, като причини повече от 138 милиона заразени в 192 страни и повече от 2 975 000 смъртни случая към април, 2021 година [2]. Това доведе до прилагането на строги

санитарни мерки в много страни с цел контролиране на разпространението на вируса, включително карантини и социално дистанциране, блокиране движението на хора, затваряне на транспортни средства, ограничаване на дейността внос-износ, затихване на промишлени и селскостопански дейности. Тези внезапни промени в социално-икономическия статус са причина за нарушаване на социалната и човешката дейност, следователно се увеличава рисъкът от несигурност на храните. Въпреки че е все още рано да се отбележи пълното въздействие на COVID-19 върху краткосрочната и дългосрочната продоволствена сигурност, настоящият преглед цели да обобщи устойчивостта на животновъдството след периода COVID-19.

2. Изложение

Селскостопанските животни, играят съществена роля за поддържане на продоволствената устойчивост, осигурявайки около 13% от калориите и 28% от протеина в световен мащаб, чрез месо, мляко, яйца и допълнителен принос в растениевъдството [3]. Новата глобална прогноза за храните от 2020 г. предвижда спад до 1,7% в производство на месо в световен мащаб (говеда, овце, прасета и птици), поради болести по животните и смущенията на пазара. Най-засегнат дял е секторът за производство на свинско месо, с очакван спад от около 8,0%, докато секторът на производството на говеждо месо се очаква да спадне с около 1% [4]. По-специално свиневъдството, а и птицевъдството са интензивни и интегрирани сектори на животновъдството, с малка или никаква гъвкавост в производствената система. Когато животните не могат да напуснат фермата към обичайната кланица в определния момент, се създава напрежение в системата, тъй като „производството“ продължава непроверено. При свинете методите за намаляване на темповете на растеж предвиждат отстраняване на стимулатори на растежа, преминаване към по-ниско енергийни диети, намаляване наличността на храната и други,

подтикращи апетита [5]. Всичко това обаче, може да доведе до изпитване на глад у животните, т.е. отрицателно афективно състояние [6] свързано със стрес, което е в разрез с хуманното отношение към животните [7]. Бройлерите пристигат във фермата като еднодневни пилета и са готови да тръгнат към кланицата 6-7 седмици по-късно. Техният феноменален темп на растеж може да причини проблеми по отношение на липсата на пространство, което е около 15 птици / m^2 на 6 седмична възраст (т.е. около 2,5 kg / птица) съгласно изискванията на ЕС за хуманно отношение.

Следователно, пренаселеността по легална дефиниция се случва в рамките на 1–7 дни. От гледна точка на благосъстоянието на животните, високата плътност на отглеждане може да доведе до намалена способност за ходене, влошено здраве, повищена смъртност, намалени качества на околната среда [8].

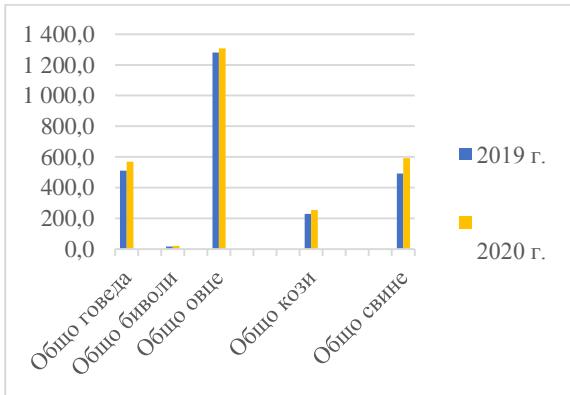
При животните с по-дълга бременност и по-бавни темпове на растеж, секторът е под по-малък непосредствен натиск. В някои случаи има капацитет за допълнително клане или възможност за насочване към други преработвателни предприятия, но това може да увеличи времето за транспорт и разстоянието, излагайки животните и птиците на повишен стрес [9].

Без релаксация в сектора, фермерите рискуват стандартите, следователно благосъстоянието на животните. Такъв вид облекчения в условия на пандемия, би осигурило по-добро качество на производствените методи, свързано с хуманното отношение към животните и безопасността на храните.

Както при свинете, така и броят на домашните птици евтаназирани поради COVID-19, понастоящем е неизвестен, но има съобщения за бракуване на около 10 милиона пилета само в САЩ [10]. Потенциалното отрицателно въздействие на масовото обезлюдяване върху хуманното отношение към животни и птици вероятно е огромен. Едни от основните фактори, влияещи върху хуманното отношение към животните по време на процеса на обезлюдяване се явяват рисъкът от замърсяване и запазване

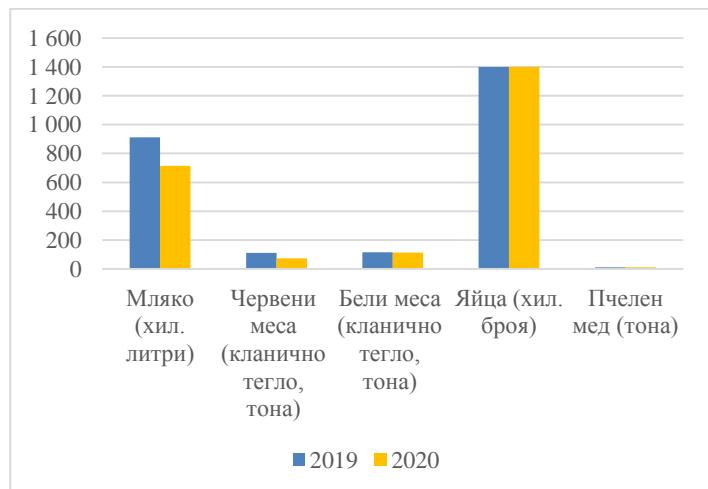
на биосигурността, породени от компостиране на трупове около фермите, засягащо благосъстоянието на диви животни, риби, птици и насекоми. Регламентите на ЕС за страничните животински продукти от 2014 г. описват изискванията [11]. Неблагоприятен фактор също може да бъде наличието на кълстери от случаи на COVID-19 в производствения процес, за което се съобщава в редица европейски държави [12]. Такива масови огнища са регистрирани по цялата верига на производството „от фермата до вилицата“ и са по-опасни от установените случаи из нехранителната индустрия [13].

Държавната политика у нас в областта на животновъдството е насочена към създаване на условия за устойчиво развитие на сектора и защита интересите на земеделските стопани. Въпреки това, се забелязва тенденция към намаляване на броя на стопанствата, отглеждащи селскостопански животни за периода 2019-2020 г. [14]. Процесът на окрупняване на сектора би внесъл по-голямата устойчивост, но ограничителните мерки за разпространението на заболяването водят до временно спиране на разнопосочни дейности в отрасъла. Към края на 2019 г. при почти всички основни видове селскостопански животни е налице намаление на броя спрямо предходен период: говеда – с 3%, овце – с 5,1%, кози – с 15,9%, свине – с 24,9% [14], като тази статистика търпи незначителни промени през 2020 година (фиг. 1.).



Фиг. 1. Общ брой животни през 2019 г. и 2020 г.

Общото производство на суворо мляко в страната през 2019 г. е в размер до 912 хил. литра, което е с 8,4% по-малко спрямо предходната година, а за 2020 г. спада до 713,6 хил. литра в резултат на редуцирания брой млечни животни като цяло, а и колебанията в различните пазарни сегменти, резултат от пандемията. Производството на червено месо се увеличава с 2% на годишна база през 2019 г. и достига до 111,9 хил. тона, поради нарастващо добива в стопанствата. Година по-късно обаче, то значително намалява до 72,86 хил. тона. Секторите на говеждото и телешкото месо са силно зависими от заведенията за обществено хранене и затварянето им като рестригираща мярка, вероятно довежда до спада и в потреблението с цели 35%, а цените в ЕС рязко намаляха под средното равнище за периода 2017—2019 г. [15]. Общий добив на бяло месо през 2019 г. е 116 хил. тона – с 2% по-малко спрямо предходната. Наблюдаваният спад продължава и през 2020 г. – 112,7 хил. тона, рефлектирали както на промишленото производство, така и на добива в стопанствата. Въздействието се очаква да бъде подобно, съдейки по месечните данни в началото на 2021 г. Нуждата от рестартиране и стабилизиране на дейностите в сектора е налице.



Фиг. 2. Производство по дейности в България през 2019 г. и 2020 г.

Наблюдава се стабилизация на пазара по отношение на яйцепроизводството, вероятно продуктувана от застоя на консуматорите в домашни условия и запазване в цената на продукта.

3. Заключение

Кризата с COVID-19 създаде големи рискове в световен мащаб, свързани със смущания в производството, доставки и пазари. Тя продължава да е проблем за животновъдството, което за разлика от много други сектори на икономиката не е в състояние да коригира производствените разходи в низходяща посока в отговор на сътресенията в търсенето. Животните все още трябва да бъдат хранени, а стандартите за хуманно отношение към тях – спазвани. С цел минимизиране ефекта от пандемичната обстановка - овладяване на разпространението на заболяванията и преодоляване на негативното им влияние, са предприети адекватни действия в краткосрочен и дългосрочен план за повишаване на устойчивостта на животновъдството и биосигурността в стопанствата. Осигуряването на благоприятна нормативна и икономическа среда ще позволи по-ефективно управление на фермите, подобряване на рентабилността на производството, повишаване безопасността и качеството на продукцията. Следователно, очаква се в бъдещ момент ускоряване на икономическия растеж и стабилизиране в сектора. Процесът ще изгради устойчивост по хранителната верига и вероятно ще повиши благополучието на животните, независимо дали предизвикателството е свързано с настоящата или друга пандемия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Zhu N., Zhang D., Wang W., Li W., Yang B., Song B., Zhao X., Huang B., Shi W., Lu R., Niu P. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine*. 2020;382:727–733.
2. Coronavirus Resource Center (2020). Available online at: <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>
3. Food and Agriculture Organization (FAO) World Livestock 2011–Livestock in Food Security. Rome: FAO; (2011). Available online at: <http://www.fao.org/docrep/014/i2373e/i2373e00.htm>
4. Food and Agriculture Organization (FAO) Food Outlook–Biannual Report on Global Food Markets. Food Outlook, 1. Rome: (2020). Available online at: 10.4060/ca9509en
5. Whitney M. Options for Slowing Down Growth in Pigs. (2020). Available online at: <https://formafeed.com/slowing-down-growth-pigs/>
6. Fraser D, Duncan IJ. ‘Pleasures’, ‘pains’ and animal welfare: toward a natural history of affect. *Anim Welfare*. (1998) 7:383–96.
7. Johnson JS. Heat stress: impact on livestock well-being and productivity and mitigation strategies to alleviate the negative effects. *Anim Prod Sci*. (2018) 58:1404–13. 10.1071/AN17725.
8. De Jong I, Berg C, Butterworth A, Estevéz I., 2012. Scientific Report Updating the EFSA Opinions on the Welfare of Broilers and Broiler Breeders. Supporting Publications, p. EN-295.
9. Grandin, T. Foreword: strategies to improve farm animal welfare and reduce long distance transport of livestock going to slaughter. In: Appleby MC,Cussen C, Garcés L, Lambert LA, Turner J, editors. Long Distance Transport and Welfare of Farm Animals. Wallingford: CABI Publishing (2008). p. ix–xv.
10. Kevany S. Millions of U.S. Farm Animals to be Culled by Suffocation, Drowning and Shooting. (2020). Available online at: <https://www.theguardian.com/environment/2020/may/19/millions-of-us-farm-animals-to-be-culled-by-suffocation-drowning-and-shooting-coronavirus>
11. https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/cff_animal_emergency_measures_grant-application-guidelines.pdf
12. Connolly K. Meat Plant Must Be Held to Account for Covid-19 Outbreak, Says German Minister. Available online at: <https://www.theguardian.com/world/2020/jun/22/meat-plant-must-be-held-to-account-covid-19-outbreakgermany>.
13. Newman KL, Leon JS, Newman LS. Estimating occupational illness, injury and mortality in food production in the United States: a farm to table analysis. *J Occup Environ Med*. (2015) 57:718–25.
14. https://www.mzh.government.bg/media/filer_public/2020/12/03/agd_2020_web.pdf
15. <https://data.consilium.europa.eu/doc/document/ST-12708-2020-ADD-1-REV-2/bg/pdf>

КАЧЕСТВЕНА ХАРАКТЕРИСТИКА НА БЯЛО САЛАМУРЕНО СИРЕНЕ ОСОЛЕНО В САЛАМУРА С РАЗЛИЧНА КОНЦЕНТРАЦИЯ НА NaCl

ТАТЯНА БАЛАБАНОВА

Университет по хранителни технологии, Катедра „Технология на млякото и млечните продукти“
t_balabanova@abv.bg

Резюме: В настоящата статия е изследвано изменението на физикохимичните и микробиологични показатели на преби бяло саламурено сирене. За целите на изследването е произведено в полупромишлени условия сирене, което е осолено в саламура с различни концентрации на сол (12, 16 и 22 % NaCl). В динамика са проследени процеса на осоляване и са установени статистически значими разлики между отделните експериментални преби. От проведенния физикохимичен анализ през периода на зреене се установява, че върху правилния ход за протичане на процесите и динамиката на осоляване влияние оказват комплекс от фактори (температура на осоляване и зреене, водно съдържание, състав и свойства на сиренината), които трябва умело и правилно да се ръководят през всички етапи. Установено, е че повишаването или понижаването на концентрацията на сол в саламурата може да регулира водното съдържание, чрез овладяване интензивността на протичане на микробиологичните и биохимичните процеси в сиренето, с цел получаване на типичен и висококачествен краен продукт.

Ключови думи: солов разтвор, качество на сирене, зреене

QUALITY CHARACTERISTICS OF WHITE BRINE CHEESE BRINED IN SOLUTION WITH DIFFERENT CONCENTRATION OF SALT CONTENT

TATYANA BALABANOVA

University of Food Technologies, Department "Technology of milk and milk products"
t_balabanova@abv.bg

Abstract: The change of physicochemical and microbiological parameters of white brined cheese samples were study. The aim of the investigation was producing of cheese in semi-industrial conditions, which were salting in brine solution consist different concentrations of NaCl (12, 16 and 22% NaCl). The dynamics of salting process was monitored and it was found significant differences between the individual experimental samples. From the physicochemical analysis during the ripening period, it is established that the correct direction of the processes and the dynamics of salting are influenced by a complex of factors (salting and ripening temperature, water content, composition and properties of the cheese). It has been found that increasing or decreasing the salt concentration in brine may regulate the water content by controlling the intensity of the microbiological and biochemical processes in the cheese, in order to obtain a typical and high-quality end product.

Key words: brine solution, cheese quality, ripening

1. Въведение

Бялото саламурено сирене е традиционен продукт, който се произвежда в

средиземноморските страни и Балканите. Производството на тази група сирене се извършва в продължение на векове, но през последното десетилетия на 20 век станахме

свидетели в развитието на мащабни, механизирани и стандартизириани производства на бели саламурени сирена. Те се отличават от останалите видове сирене със специфичния физикохимичен, микробиологичен и органолептичен профил [1]. Характерна тяхна особеност, е че процесите зреене и съхранение протичат в анаеробни условия в солов разтвор (саламура), с определена концентрация на NaCl. Ето защо тези сирена притежават изразен млечнокисел и солен вкусът, гладка разрезна повърхност с порцеланов лом, без или с единични шупли [2]. Концентрацията на соловия разтвор до голяма степен регулира протичането на сложните физикохимични и микробиологични процеси, които настъпват в сиренето през процеса зреене [3]. Установено, е че съдържанието на сол при видовете бели саламурени сирена може да варира в широки граници от 1,0 – 15 g/100ml⁻¹ [4]. Съдържанието на сол в сиренето влияе върху химичният състав и структурните му свойства, които параметри определят качеството на зрелия продукт [5,6,7].

Целта на това проучване е да се определят качествените характеристики на бяло саламурено сирене, осолено в саламура с различна концентрация на сол (12, 16 и 24 %).

2. Материал и методи

2.1. Материали

Изследваните преби бяло саламурено сирене от краве мляко са произведени по класическа технология [8] при полу-промишлени условия в учебно – производствен комплекс към катедра „Технология на млякото и млечните продукти“ при Университет по хранителни технологии, град Пловдив.

За целите на експеримента произведеното бялото саламурено сирене е разделено на три партиди, след което е поставено за осоляване в саламура с различна концентрация на NaCl:

- **A** – бяло саламурено сирене от краве мляко осолено в саламура с концентрация 12 % NaCl;

- **B** – бяло саламурено сирене от краве мляко осолено в саламура с концентрация 16 % NaCl;

- **C** – бяло саламурено сирене от краве мляко осолено в саламура с концентрация 22 % NaCl;

Опитните преби сирене са анализирани на 1ви, 15ти, 30ти и 45ти ден от процеса зреене.

2.2. Методи за анализ

Пребите са изследвани по следните физикохимични показатели:

- Титруема киселинност – по метода на Тъорнер [9];

- Водно съдържание – съгласно БДС 1109-89 [10];
- Съдържание на натриев хлорид – по метода на Мор [11];
- Съдържание на маслена материя – по метода на Гербер [12];
- Съдържание на протеин – по метода на Келдал [13].

Определяне на общия брой млечнокисели бактерии се извършва чрез посевки върху селективни синтетични хранителни среди на M17 и MRS агар. Следва се методологичния ход описан в [14]. Подготовката на пробите се провежда съгласно [15].

Направен е статистически анализ на средните стойности от трикратните повторения. Проведен е анализ на променливите (one-way ANOVA) с ниво на значимост $P \leq 0,05$ [16]. Всички статистически процедури са проведени с помощта на софтуер Microsoft Excel 10.

3. Резултати и обсъждане

На таблица 1 са представени резултати за изменението на водното и солно съдържание на прясното сирене в процеса на осоляване в солов разтвор с различна концентрация на NaCl. Процесът водно осоляване протича в продължение на 12 часа при температура между 15-18 °C. От получените резултати е видно, че в началото на процеса осоляване водно съдържание на сиренето при трите преби е около 65,5 %. През изследвания период се наблюдава постоянна тенденция към понижаване на водното съдържание и увеличаване на количеството поета сол от сиренето.

Таблица 1.

Осоляване на бяло саламурено сирене

Показатели	Период на осоляване			
	0 h	6 h	12h	
A	NaCl, %	0	1,8±0,2	2,6±0,1
	BC, %	65,6±0,08	65,0±0,05	65,0±0,07
B	NaCl, %	0	2,0±0,1	2,5±0,1
	BC, %	65,5±0,04	64,5±0,05	63,5±0,04
C	NaCl, %	0	2,1±0,2	2,3±0,2
	BC, %	65,2±0,02	64,0±0,05	62,5±0,03

*Средна стойност ±SD ($n=3$); BC^l-водно съдържание

Според Litopoulou - Tzanetaki and Nikolaos Tzanetakis [17] солта в сиренето прониква във вид на разтвор и остава разтворена във водната му фаза, а продължителността на

осоляване зависи от количеството поета сол. В края на процеса осоляване (12 h) се установява, че проба А има високо водно съдържание и количество поета сол, за разлика от проби В и С. Това вероятно може да се обясни с факта, че ниската концентрация на сол в саламурата не позволява нормален ход на протичане на физикохимичните и биохимичните процеси в сиренето. Проба А се характеризира водно съдържание по-високо от стандартните за класическа технология на бяло саламурено сирене. Според Guinee et al., [18] концентрацията на сол в сиренето е определящ фактор за водната активност, биохимичните изменения, времето и степента на зреене и формиране структурата на сиренето. Според Bintsis and Papademas [19] сирене зреещо при ниска концентрация на сол в саламурата се характеризира с по-високо водно съдържание, по-висок процент сол в сиренната маса и оттам по-висок добив.

На таблица 2, 3 и 4 са представени резултати за изменението на физикохимичните показателите на проби сирене през периода на зреене.

Таблица 2.

Физикохимични показатели на проба А през процеса зреене

Показатели	Проба А			
	1	15	30	45
ВС, %	65±0,12	62±0,25	59±0,17	57±0,21
П, %	15±0,1	16±0,2	17±0,1	19±0,1
NaCl, %	2,6±0,1	3,4±0,2	3,5±0,1	3,6±0,2
Мом, %	18±0,02	18±0,01	19±0,01	20±0,02
TK, °T	165±0,1	198±0,1	242±0,2	284±0,1

*Средна стойност ±SD (n=3); ВС-водно съдържание; Мом-масленост в общата маса; П-съдържане на протеин; TK- титруема киселинност

Таблица 3.

Физикохимични показатели на проба В през процеса зреене

Показатели	Проба В			
	1д	15д	30д	45д
ВС, %	63,5±0,31	62±0,28	58±0,32	56±0,31
П, %	15±0,2	16±0,2	18±0,1	19±0,2
NaCl, %	2,5±0,1	3,2±0,1	3,3±0,2	3,3±0,1
Мом, %	18±0,2	19±0,2	20±0,2	21±0,2
TK, °T	170±0,1	200±0,1	262±0,1	292±0,1

*Средна стойност ±SD (n=3); ВС-водно съдържание; Мом-масленост в общата маса; П-съдържане на протеин; TK- титруема киселинност

Установено, е че процеса осоляване със саламура, съдържаща различна концентрация NaCl оказва значително влияние върху хода и

интензивността на процесите, които протичат през периода на зреене. По-плавно изменение се наблюдава във изменението на водното съдържание за проби В и С, в сравнение с проба А.

Таблица 4.

Физикохимични показатели на проба С през процеса зреене

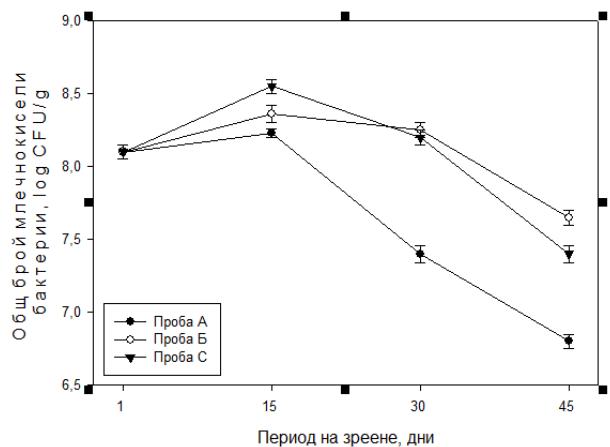
Показатели	Проба С			
	1д	15д	30д	45д
ВС ¹ , %	62,5±0,10	61,5±0,18	57±0,15	55±0,19
П, %	16±0,1	16±0,2	18±0,1	20±0,1
NaCl, %	2,3±0,1	3,2±0,1	3,2±0,1	3,3±0,1
Мом ² , %	19±0,2	19±0,2	20±0,1	21,5±0,1
TK ³ , °T	174±0,1	205±0,1	260±0,1	302±0,1

*Средна стойност ±SD (n=3); ВС-водно съдържание; Мом-масленост в общата маса; П-съдържане на протеин; TK- титруема киселинност

Белтъчното съдържание се изменя в зависимост от водното съдържание, подобна тенденция следва и изменението на показателя масленост в общата маса на сиренето. Динамиката и активността на млечнокиселия процес по време на зреене обяснява изменението на този показател. Водното съдържание на пробите В и С достигат стойности от 55,0 % до 45 ден от зреенето, а за проба А стойност от 57,0 %. Установено, е че между 1ви и 45и ден показателя титруема киселинност се повишава от 170 до над 300 °T. Най-слабо киселинообразуване се наблюдава при проба А, следователно концентрацията на сол в сиренето определя скоростта на ферментационните процеси. Получените резултати са в противоречие с тези публикувани от Madadloua et al., [20]. Тези автори установяват, че зреенето на иранско сирене в солов разтвор с концентрация над 17 %, предопределя получаване на твърдо сирене, с ниско водно съдържание, по-високи стойности на pH и по-високо солно съдържание. Активните дифузионни процеси в сиренето създават условие за сравнително бързо изравняване на солното съдържание в различните пластове на сиренето до 15 ден, вследствие на което след 15-то денонощие от зреенето, разликата в солното съдържание се изменя в незначителна степен и остава постоянна към края на процеса зреене. Видно е, че понижаването на концентрацията на сол под 16 % не позволява нормално протичане на процеса осоляване, а пробите бяло саламурено сирене в края на зреенето, имат стойности на количество NaCl от над 3,6 %. При концентрация на сол в соловия разтвор над 16 % интензивността на процеса осоляване е най-висока до 15-ия ден на зреене.

След 30-ия ден количеството на солта в пробите остава почти непроменено. Тази солна концентрация позволява умерен темп на осоляване, с което се благоприятства и правилното протичане на микробиологичните процеси.

Резултатите от направените микробиологични анализи (Фиг. 1) показват, че броят на млечнокиселите бактерии търпи съществени изменения в процеса на зреене.



Фиг. 1. Изменение на общия брой млечнокисели бактерии в преба бяло саламурено сирене от краве мляко

Общий брой млечнокисели бактерии се повишава значително през първите 15 дни на зреене, след което се наблюдава тенденция в понижаване на тяхната численост. При проба А се наблюдава по-високо процентно съдържание на сол и съответно забавяне на активността на микроорганизмите, следствие на което се забавят ферментационните процеси (има по-ниска титруема киселинност и по-високо водно съдържание) през периода на зреене. При преби В и С се наблюдава по-висок процент на млечнокисели бактерии, следствие на по-ниското солно съдържание, което оказва влияние върху жизнедеятельността на стартерната култура. Явно, е че по-ниските концентрации на сол в сиренето, действат стимулиращо върху цялостната микробна биомаса в сиренето. Аналогично е след 30ия ден количеството млечнокисели бактерии да се понижи в двете преби. Плавният темп в понижаване т.е. автолизата на бактериалните клетки е предпоставка за умерен биохимичен процес в сиренето. Регулираното намножаване с последващо умиране на микробната популация е предпоставка за контролирано изменение в химичния състав, физикохимичните свойства и скоростта на биохимичните процеси в сиренето.

Подобни резултати са констатирани от Guven et al., [21], според които в сирене, осолявано с ниска концентрация на сол в саламурата не протичат правилно процесите на протеолиза и сиренето получава нетипична органолептична характеристика.

4. Заключение

Върху динамиката на осоляване влияние оказват комплекс от фактори (температура на осоляване, водно съдържание, състав и свойства на сиренината), които трябва умело и правилно да се ръководят през всички етапи от технологичния процес. Повишаването или понижаването на концентрацията на сол в саламурата може да регулира водното съдържание, чрез овладяване интензивността на протичане на микробиологичните и биохимичните процеси в сиренето, с цел получаване на типичен и висококачествен краен продукт.

ЛИТЕРАТУРА

1. Moatsou G., A. Govaris. A diachronic exploitation of small ruminants of milk in Greece. *Small Ruminant Research*, 2011, 101: 113-121.
2. Kutryanska M., A. Bosakova-Ardenska, Application of image processing with statistical region merging (SRM) for analysis of the structure of Bulgarian white sheep cheese in brine, "Science, Technology, Innovation, Business - 2020", ISSN 2367-8569, pp. 7-12
3. Bakirci Ihsan, Arzu Kavaz and Emine Macit. Effect of different brine concentrations and ripening period on some quality properties of Turkish white pickled cheese. *African Journal of Biotechnology*, 2011, 10 (56): 11925-11931.
4. Pastorino A. J., C. L. Hansen, and D. J. McMahon. Effect of pH on the Chemical Composition and Structure-Function Relationships of Cheddar Cheese. *J. Dairy Sci.* 2003, 86: 2751-2760.
5. Murtaza M.A., S.U. Rehman, F.M. Anjum, N. Huma, O.M. Tarar, G. Mueen-ud-Din Organic acids contents of buffalo milk Cheddar cheese as influenced by accelerated ripening and sodium salt. *J. Food Biochem.*, 2012, 36: 99-106.
6. Murtaza M.A., N. Huma, A. Sameen, M. S. Murtaza, S. Mahmood, G. Mueen-ud-Din, A. Meraj Texture, flavor, and sensory quality of buffalo milk Cheddar cheese as influenced by reducing sodium salt content.

- Journal of Dairy Science*, 2014, 97(11): 6700-67075.
7. Rulikowska A., K.N. Kilcawley, I.A. Doolan, M. Alonso-Gomez, A.B. Nongonierma, J.A. Hannon, M.G. Wilkinson The impact of reduced sodium chloride content on Cheddar cheese quality *Int. Dairy J.*, 2013, 28: 45-55.
 8. Едгарян М., П. Панайотов. Технология на видовете сирене, 2011, Интелекспект-94, Пловдив.
 9. БДС 1111-80. Мляко и млечни продукти. Метод за определяне на титруемата киселинност.
 10. БДС 1109-89. Мляко и млечни продукти. Методи за определяне на водното съдържание и сухото вещество.
 11. БДС 8274-82. Мляко и млечни продукти. Метод за определяне на натриев хлорид в сирене.
 12. ISO 3433:2008. Мляко и млечни продукти. Определяне на масленото съдържание-Метод на Гербер-Ван Гулик.
 13. БДС EN ISO 8968-1, 2001. Мляко и млечни продукти. Определяне на белтъчно съдържание. Част 1: Метод на Келдал.
 14. IDF Standard 117B:1997. Yogurt — Enumeration of characteristic microorganisms — Colony-count technique at 37 degrees C.
 15. IDF Standart 122C:1996. Milk and Milk Products – Preparations of Samples and dilutions for microbiological examination, IDF 122C:1996. International Dairy Federation, Brussels, Belgium.
 16. Draper A., E. Smith. Nutrition policies in developed countries encyclopedia of human nutrition (Second Edition), 1998, pp.1326–1333.
 17. Litopoulou-Tzanetaki, Nikolaos Tzanetakis. Microbiological characteristics of Greek traditional cheeses. *Small Ruminant Research*, 2011, 101 (1–3): 17-32.
 18. Guinee T., M. Auty, C. Mullins, M. Corcoran, E. MulHolland. Preliminary observation on effects of fat content and degree of fat emulsification on the structure-functional relationship of Cheddar-type cheese. *Journal of Texture Study*, 2000, 31 (6): 645–663.
 19. Bintsis T, P. Papademas. Microbiological quality of white-brined cheeses: a review. *International Journal of Dairy Technology*, 2006, 55 (3):113–120.
 20. Madadloua M. E. Mousavib, A. Khosrowshahi aslaZahra Emam-Djomeb Mahtab Zargaranc. Effect of cream homogenization on textural characteristics of low-fat Iranian White cheese. *International Dairy Journal*, 2007, 17 (5): 547-554.
 21. Guven M., C. Cadun, O. Karaca, A. Hayaloglu. Influence of rennet concentrarion on ripening characteristics of hallumi cheese. *Journal of Food Biochemistry*, 2008, 32 (5): 615-627.

СЕНЗОРНО ПРОФИЛИРАНЕ И КАЧЕСТВЕНА ОЦЕНКА НА БЯЛО САЛАМУРЕНО СИРЕНЕ

ТАТЯНА БАЛАБАНОВА^{1*}, СТАНКО СТАНКОВ²

¹УХТ, Катедра "Технология на млякото и млечните продукти"

²УХТ, Катедра „Хранене и туризъм“

t_balabanova@abv.bg *; docstankov@gmail.com

Резюме: Изследвано е изменението на органолептичните показатели на бяло саламурено сирене от краве мляко. Пробите са осолявани в солови разтвори с концентрация 12, 16 и 22 %. От получените резултати е установено, че процеса на осоляване в саламура оказва съществено влияние върху вкусово-ароматичния профил на зрялото саламурено сирене, като най-значими изменения са отчетени при показателите вкус и аромат, консистенция и външен вид. След проведенния анализ за цветовите характеристики посредством CIELab се наблюдава тенденция към нарастване на яркостта (L^*) и понижаване стойностите на жълтата (b^*) компонента в сиренето.

Ключови думи: бяло саламурено сирене, солов разтвор за осоляване, сензорни показатели

SENSORY PROFILING AND QUALITY EVALUATION OF WHITE BRINED CHEESE

TATYANA BALABANOVA^{1*}, STANKO STANKOV²

¹UFT, Department "Technology of milk and milk products"

²UFT, Department "Catering and Tourism"

t_balabanova@abv.bg*; docstankov@gmail.com

Abstract: The changes in the organoleptic characteristics of white brined cheese from cow's milk was studied. The cheese samples were salted in brine solution with concentration of NaCl from 12, 16 and 22 %. From the obtained results it was found that a brine solution with different NaCl content has a significant impact on the flavor and aroma compound of the cheese, with the significant changes at the parameters of consistence and appearance. Color data for the monitored cheeses samples were analyzed calorimetrically and expressed by CIELAB. It was found that with increasing salt concentration in brine there is a tendency to increase the brightness (L^*) and decrease the yellow (b^*) component.

Key words: white brined cheese, brine solution, sensory profiling

1. Въведение

Бялото саламурено сирене се класифицира към групата на полуутвърдите сирена зреещи и съхранявани в солов разтвор - саламура [1]. От технологична гледна точка процеса зреене за тази група сирене е от изключително значение предвид микробиологичните и биохимичните промени, които настъпват в продукта, влияещи върху органолептичните и текстурални характеристики на крайния продукт [2]. Повисокото съдържание на сол при тези сирена допринася за специфични продуктови характеристики [3].

Саламурата е подходяща среда за съхранение на бяло саламурено сирене, а процеса осоляване подпомага регулирането на водното съдържание [4] и селекцията на определени щамови култури. Съдържанието на сол при отделните представители на белите саламурени сирена варира в широки граници и зависи основно от метода на осоляване [4]. Производство на сирена включва три основни технологични фактора, оказващи влияние върху качеството на сиренето през периода на неговото зреене. Първият фактор е активната киселинност (pH) на сиренината по време на синерезис, рефлектиращо върху минералното съдържание на продукта. Вторият фактор е

количеството сол във водната фаза на сиренето, определяща активността на остатъчните количества сирищен ензим. Третият технологичен фактор е водното съдържание на сиренето, благоприятстващо развитието редица желани микробиологични процеси [5]. Всички тези фактори могат да варираят в различни количествени съотношения, отразяващи се върху вкусово-ароматичния профил на сиренето [6].

Целта на това изследване е да се проследи изменението на органолептичните показатели на бяло саламурено сирене от краве мляко, осолявано в солов разтвор с различни концентрации на NaCl.

2. Материали и методи

Изследваните преби бяло саламурено сирене от краве мляко са произведени по класическа технология [7]. За целите на експеримента произведеното бялото саламурено сирене е разделено на три партиди, след което е проведено водно осоляване в продължение на 12-16 часа в саламура с различна концентрация на NaCl:

- **A** – бяло саламурено сирене от краве мляко осолявано в саламура с концентрация 12 % NaCl;

- **B** – бяло саламурено сирене от краве мляко осолявано в саламура с концентрация 16 % NaCl;

- **C** – бяло саламурено сирене от краве мляко осолявано в саламура с концентрация 22 % NaCl;

Получените преби са изследвани на 45-ти ден от процеса зреене по следните физикохимични показатели:

- Титруема киселинност – по метода на Тьорнер [8].

- Водно съдържание, съгласно БДС 1109-80 [9].

- Съдържание на натриев хлорид – по метода на Мор [10].

Цветовите характеристики на сиренето се измерват с колориметър CM 410 [12] с тип C осветление и се изразява чрез правоъгълна цветова гама CIELAB като се отчитат три параметъра - L *, a *, b *. В пространството CIELAB L * изразява стойностите на яркостта, координатите на цветността са червена (a*) и жълта (b *) компонента.

Органолептичен анализ на пробите е извършен на 30-ти и 45-ти ден от процеса зреене, съгласно БДС 15612-89 [11].

Направен е статистическия анализ на средните стойности от трикратните повторения. Проведен е анализ на променливите (one-way

ANOVA) с ниво на значимост $P \leq 0,05$ [13]. Всички статистически процедури са проведени с помощта на софтуер Microsoft Excel 10.

3. Резултати и обсъждане

На таблица 1 са представени резултати за водното съдържание, титруема киселинност и съдържание на сол в сиренето след периода на зреене.

Таблица 1.

Физикохимични показатели на бяло саламурено сирене от краве мляко в края на процеса зреене

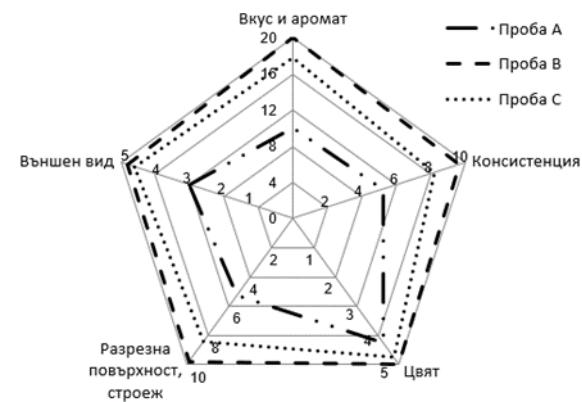
Показатели	Преби		
	A	B	C
	45 ден		
BC ¹ , %	57,00±0,80	56,0±0,50	55,0±0,40
NaCl, %	3,60±0,03	3,30±0,01	3,30±0,02
TK ² , °T	284,00±0,50	292,00±0,50	302,00±0,40

*Средна стойност ±SD (n=3); BC¹-водно съдържание, TK²-титруема киселинност

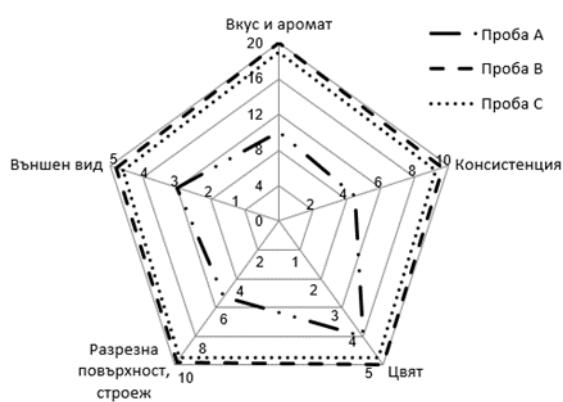
Получените резултати потвърждават благоприятното въздействие на по-високото съдържание на сол в саламурата и правилната посока за развитие на дифузионните процеси през периода на осоляване и зреене. Установено, е че в проба A количеството на поетата от сиренето сол е 3,6 %, по-високо от това установено при преби B и C - 3,3 %. Това би могло да се обясни с по-високото водно съдържание на проба A, за разлика от преби B и C. Показателят киселинност е главен фактор, който предопределя активността на физикохимичните и биохимични изменения, които настъпват през периода на зреене на сиренето. От получените резултати е видно, че проба A има по-високо водното съдържание от останалите две преби. Динамиката и активността на млечнокиселия процес по време на зреене обяснява изменението на водното съдържание в експерименталните преби. Това се обяснява с по-ниско установената стойност на показателя титруема киселинност при проба A, което корелира и с по-високо установените стойности на водно съдържание и количество сол в зрелия продукт. Подобни резултати са докладвани от други автори [14], които установяват, че ниската концентрация на сол в саламурата предопределя по-бърз процес на осоляване, свързан с разширяването на белтъчната матрица, а осоленото сирени е по-

меко, с по-високо съдържание на сол и по-ниско pH.

Проследено е изменението на органолептичните характеристики на бяло саламурено сирене от краве мляко по време на зреене. Резултатите от органолептичната оценка на изследваните преби след 30-ия и 45-ия ден от зреенето са представени на фиг. 1 a и b.



a)



b)

фиг. 1. Органолептична оценка на бяло саламурено сирене на 30-ти (a) и 45-ти (b) ден от процеса зреене.

Установено, е че преби В и С имат по-добри вкусово-ароматни показатели, специфични за съответния вид сирене, а по-ниска органолептична оценка получава преба А. След проведенния анализ е установено, че преба А проявява осезаемо размекване и леко слепване между отделните парчетата. Външният вид при преби В и С се характеризира с добра формоустойчивост на отделните сиренни парчета, които са с правилна квадратна основа и стандартни размери. Съответно тези преби получават по-висока оценка по този показател. При оценката на разрезната повърхност и строеж се установява различие между преби С и В, в сравнение с преба А.

Преба А получава най-ниска оценка, предвид установената нееднородност на цвета в различните пластове и недобра спойка на сиренната маса. Подобни резултати са констатирани от Prentice [15], които установяват, че сирене с по-високо водно съдържание притежава мека и ронлива консистенция. Пребите В и С зрели в продължение, съответно на 30 и 45 дни се характеризират с добра адхезионна сила в отделните пластове и наличие на единични бактериални шупли. Консистенцията им е умерено твърда и еластична, което свидетелства за завършен процес на зреене. При тези преби (В и С) се установява гладка разрезна повърхност с видим гланц на лома, без открояване на пластовете, затова получават по-висока обща органолептична оценка.

Нашите резултати са в съответствие с тези докладвани от Prasad [16], според които от концентрацията на поетата сол в сиренето зависят физикохимичните показатели – водно съдържание, степен на хидратация на казеиновата матрица, pH и консистенция на сиренето. Установено, е че преба А се характеризират с неизразен вкус и аромат, наличие на лек страничен привкус и по-солен вкус. Пребите В и С притежават по-изразен и приятен млечнокисел и солен вкус. От получените резултати е видно, че най-големи изменения в процеса на зреене претърпяват показателите вкус и аромат, консистенция и външен вид. По-незначителни промени се установяват при показателите разрезна повърхност, строеж и цвят.

Резултатите, получени от изследването на инструменталните цветови характеристики на пребите по системата CIELAB са представени на табл. 2.

Таблица 2.

Инструментални цветови характеристики на преби бяло саламурено сирене от краве мляко

Преба	Показатели		
	L *	a *	b *
A	84,71±0,04	- 2,70±0,02	18,19±3,01
B	85,20±0,02	-2,40±0,01	17,21±2,03
C	86,03±0,02	-2,52±0,02	16,78±2,07

*Средна стойност ±SD (n=3)

Тези показатели характеризират промените в цвета на сиренето по отношение на яркост (L *), червена (a *) и жълта (b *) компонента. От получените резултати е видно, че осоляването на сирене в саламура с различна концентрация на сол оказва влияние върху яркостта (L *) и жълтия компонент (b *) в системата. При преба

А се установява най-ниска стойност за показателя яркост (L^*). Паралелно с това жълтата компонента (b^*) измерена при тази проба има сравнително високи стойности, $(18,19 \pm 0,30)$. Това вероятно се дължи на спецификата във физикохимичните и микробиологичните процеси в сирената през периода на зреенето. Според някои автори [17] при редица гръцки сирена се установява, че цвета на сиренето зависи от вида на използваното мляко и съдържанието на мазнини, а стойностите на параметъра L^* варират в граници от 79,87 - 94,08. Високото водно съдържание на проба А неминуемо оказва влияние върху нейния цвят. Получените резултати показват, че сиренето с по-високо водно съдържание се характеризира с по-интензивен жълт цвят. Стойностите на компонентата (L^*) за преби В и С са съответно $85,20 \pm 0,02$ и $86,03 \pm 0,02$. При същите преби стойностите на жълтата компонента са $17,21 \pm 2$ и $16,78 \pm 2$. Според други автори [18] по време на узряването на сиренето стойностите L^* , a^* и b^* не се променят значително. Установено, е че с повишаване концентрацията на сол в саламурата се наблюдава тенденция към нарастване на яркостта и намаляване на жълтата компонента. Вероятно тези различия в цветовите характеристики на пробите се обуславят от разликите във стойностите на водното съдържание и титруемата киселинност. Нашите резултати са в съответствие с тези установени от други изследователи по-рано [19].

3. Заключение

Процесът на осоляване при бялото саламурено сирене от краве мляко в солов разтвор с ниско съдържание на NaCl не позволява формирането на типична органолептична база в периода на зреене и е предпоставка за появата на редица сензорни и технологични недостатъци (в неговия вкус, аромат, консистенция, разрезна повърхност и строеж). По време на зреенето се установява, че пробите сирене осолявани в солов разтвор с концентрация на NaCl над 16 % формират подобър органолептичен профил, спрямо останалите.

ЛИТЕРАТУРА

- Alichanidis E., A. Polychroniadou. Characteristics of major traditional regional cheese varieties of East-different bacterial culture systems for the production of reduced-fat Mediterranean countries: A review. *Dairy Sci. Technol.*, 2008, vol. 88, pp. 495-510.
- Pachova E., L. Zavadilova, J. Solkner. Genetic evaluation of the length of productive life in Holstein cattle in the Czech Republic. *Czech J. Anim. Sci.*, 2005, vol. 50, issue 11, pp. 493–498
- Anifantakis E.M., G. Moatsou. Brained cheeses, Blackwell Publ. Ltd., UK (2006).
- Pastorino A.J., C.L. Hansen, and D.J. McMahon. Effect of pH on the Chemical Composition and Structure-Function Relationships of Cheddar Cheese. *J. Dairy Sci.* 2003, vol. 86, pp. 2751–2760.
- Lawrance R., L. Creamer, J. Gilles. Texture development during cheese ripening. Symposium: Cheese Ripening Technology. *J. Dairy Sci.*, 1987, vol. 70, pp. 1748-1760.
- Ganchovska V., A. Bosakova-Ardenska, P. Panayotov, L. Kostadinova-Georgieva, A. Danev, I. Krasteva, Blue cheese cut surface evaluation by images analysis, CompSysTech'2019, Ruse, pp 169 - 174.
- Едгарян М., П. Панайотов. Технология на видовете сирене, „Интелексперт - 94“ ООД, 2011, Пловдив;
- БДС 1111-80. Мляко и млечни продукти. Методи за определяне на киселинността.
- БДС 1109-80. Мляко и млечни продукти. Методи за определяне на водното съдържание и сухо вещество.
- БДС 8274-82. Мляко и млечни продукти. Методи за определяне на натриев хлорид.
- БДС 15612-89. Продукти млечни. Органолептична оценка.
- Konica Minolta. Accurate Comm. Color, Konica Minolta Sensing, Inc. (Transl. for Pragolab: Jan Všianský), 2006, vol. 62 (in Czech).
- Draper A., E. Smith (1998). Nutrition policies in developed countries encyclopedia of human nutrition (Second Edition), pp. 1326–1333.
- McMahon D.J., M.M. Motawee, W.R. McManus. Influence of brine concentration and temperature on composition, microstructure, and yield of feta cheese. *J. Dairy Sci.*, 2009, vol. 92, pp. 4169–4179.
- Prentice, J.H. Cheese rheology. Pages 299–344 in *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, 1987, vol. 1. Elsevier Appl. Sci., New York, NY.
- Prasad N., V. Alvarez. Effect of Salt and Chymosin on the Physico-Chemical Properties of Feta Cheese During Ripening. *J. Dairy Sci.*, 1999, vol. 82, pp. 1061–1067.

17. Kasapian M., Z. Dičáková, E. Dudriková, P. Bystrický. Physical and physico-chemical parameters of Greek cheeses. *Bulg. Chem. Commun.*, 2014, vol. 46, Special issue B, pp. 68 – 72.
18. Niro S., A. Fratianni, P. Tremonte, E. Sorrentino, L. Tipaldi, G. Pamfilu, R. Coppola. *J. Dairy Sci.*, 2014, vol. 97, issue 3, pp. 1296.
19. Dičáková Z., E. Dudriková, P. Bystrický. Supplementum: Proc. Lect. Posters Conf. School – Sci. – Pract. I., Košice, 240 (2009). ISBN 978-80-8077-143-0. (in Slovak).

СРАВНИТЕЛНА ХАРАКТЕРИСТИКА НА САЛАМУРЕНИ СИРЕНА ПО ФИЗИКОХИМИЧНИ И ОРГАНОЛЕПТИЧНИ ПОКАЗАТЕЛИ

ПЕТЯ БОЯНОВА¹, ТАТЯНА БАЛАБАНОВА^{1*}

¹Университет по хранителни технологии, катедра „Технология на млякото и млечните продукти“
petyaboyanova@gmail.com; t_balabanova@abv.bg*

Резюме: В настоящата статия е проведена сравнителна оценка на саламурени сирена по физикохимични и органолептични показатели. Изследвани са четири пробы (марки) саламурени сирена, подбрани въз основа на специфични разлики в производствената им технология. От проведенния физикохимичен анализ се установява, че съществува значителна разлика в стойностите на показателите - титруема киселинност ($^{\circ}T$), съдържание на мазнини (%), водно съдържание (%) и съдържание на NaCl (%). С най - висока органолептична оценка (75 точки) се характеризира пробата сирене, получено по класическа технология, следвано от сиренето, произведено по механизиран метод на производство (71 точки) и това, получено с висока температурна обработка на млякото (62 точки). Имитиращият продукт се отличава с нетипични за саламурените сирена органолептични показатели.

Ключови думи: бяло саламурено сирене, качество, органолептика.

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF BRINED CHEESES BY PHYSICOCHEMICAL AND ORGANOLEPTIC PARAMETERSAPERS

PETYA BOYANOVA¹, TATYANA BALABANOVA^{1*}

University of Food Technologies, Department: Technology of milk and milk products
petyaboyanova@gmail.com; t_balabanova@abv.bg *

Abstract: Comparative study by physicochemical and organoleptic properties of brined cheeses was established. Four samples (brands) of brined cheeses were selected, according the basis of the specifics of their production technology. It was established that physicochemical analysis in the tested cheese samples have a significant difference in the values of the indicators - titratable acidity ($^{\circ}T$), fat (%), water and salt content (%). Highest organoleptic evaluation (75 points) is characterized by cheese obtained by classical technology, followed by cheese produced by a mechanized production method (71 points), and cheese obtained by high heat treatment of milk is rated lower (62 points). Atypical organoleptic have the imitation cheese product, as this production technology does not allow the formation of typical organoleptic, and is accompanied by the appearance of a number of defects

Key words: white brined cheese, quality, organoleptic characteristics.

1. Въведение

Саламурени сирена са се утвърдили като национален млечен продукт за страните от Балканския полуостров, Кавказ и Средна Азия. Саламурените сирена се отличават с млечнокисел вкус и аромат, умерено твърда консистенция, компактна структура, без наличие на бактериални шупли по разрезната

повърхност, както и с висока хранителна, енергийна и биологична стойност [1]. Характерна технологична особеност при тази група сирена е, че се произвеждат от различните видове мляко (краве, овче, козе, биволско), получени са чрез ензимна коагулация на мляко с влагане на млекокоагулиращ ензим и стартерна култура. Отличават се със специфична

органолептична, физикохимична и микробиологична характеристика [2]. Притежават гладка разрезна повърхност, плътна и компактна консистенция. Цветът може да варира от снежнобял до леко кремав, в зависимост от вида на млякото, от което се произвеждат [3,4].

По-високото съдържание на сол при тази група сирена допринася за формирането на специфичните им органолептични характеристики и за възстановяването на загубите на соли при дехидратация на хора с активно ежедневие. Класификацията на саламурените видове сирена се основава на различни методи за производство, консистенция, страна и район на производство [5]; външен вид, физикохимични показатели [6,7]; микробиологични характеристики [8]; вид на използваната сировина [9], както и технологията за производство [10].

Безопасността и качеството на полученото сирене пряко зависят от прилаганите технологични обработки, качеството на сировината и хигиенните условия на производство. През периода на утвърждаване, технологията за производство на саламурени сирена претърпява редица изменения, изразяващи се основно в етапите на обработката на сиренината. Понастоящем съществуват следните производствени технологии – класическа; модифицирана (с използване на по-висока температура на пастьоризация $\geq 80^{\circ}\text{C}$), механизирана и чрез прилагане на ултрафилтрация на млякото. Едно сравнително ново направление в сиренарската промишленост е производството на т. нар. имитиращи продукти, при които се заменя частично или цялостно млечната мазнина с хидрогенирани мазнини от растителен произход.

Целта на това изследване е да се направи сравнителна оценка на основните физикохимични и органолептични характеристики на проби саламурено сирене, предлагано в търговската верига.

2. Материали и методи

2.1. Материали

Изследвани са четири марки саламурено сирене, закупени от търговската верига. Съгласно информация от фирмата производител, изследваните сирена се различават по технология на производство, а именно:

- **Проба №1** – Саламурено сирене, произведено по класическа технология;
- **Проба №2** – Саламурено сирене, произведено по механизирана линия;
- **Проба №3** – Саламурено сирене, произведено с висока температура на пастьоризация ($> 80^{\circ}\text{C}$) на млякото;
- **Проба №4** - Имитиращ продукт с участие на хидрогенирани мазнини.

За целите на изследването е направена сравнителна оценка на физикохимичните и органолептични показатели на пробите саламурени сирена.

2.2. Методи за анализ

Физикохимични анализи - Определяне на титруема киселинност - БДС 1111:1980 [11]; определяне на масленото съдържание по метода на Гербер [12]; определяне на водното съдържание - с помощта на влагомерна везна, модел XM50 (Kern, Germany) с халогенен нагревател; определяне съдържанието на NaCl по метода на Мор, съгласно БДС 8274-82[13].

Органолептична оценка - Направена е оценка на органолептичните показатели: вкус и мирис, консистенция, разрезна повърхност и строеж, съгласно БДС 15612:1983[14].

Направен е статистически анализ на средните стойности от трикратните повторения. Проведен е анализ на променливите (one-way ANOVA) с ниво на значимост $P \leq 0,05$ [15]. Всички статистически процедури са проведени с помощта на софтуер Microsoft Excel 10.

3. Резултати и обсъждане

Анализирането и интерпретирането на резултатите от органолептичната оценка е подкрепено от определянето на физикохимичните характеристики на сирената (таблица 1).

От получените данни се установява, че технологията за производство на саламурено сирене има пряко влияние върху физикохимичния състав на изследваните проби. Известно е, че дифузионните процеси в сирената матрица са пряко зависими от киселинообразуването. Титруемата киселинност на проби №1, №2 и №3 е в границите на нормалните стойности, но е ниска за проба №4. Според действащите нормативни документи е посочено, че този показател трябва да бъде в стойности над 200°T .

Таблица 1.

Физикохимични показатели на пробите саламурено сирене

Проба, №	Физикохимични показатели				
	TK, °T	M, %	ВС, %	NaCl, %	МСВ
1	286,0±1,41	23,5±0,71	45,1±0,19	3,5±0,08	42,8±0,81
2	254,0±1,41	22,0±0,70	48,3±0,15	2,7±0,04	42,5±0,72
3	256,0±1,41	19,5±1,2	58,3±0,69	2,6±0,01	46,8±0,71
4	50,0±1,41	43,0±0,71	51,5±0,33	2,8±0,02	88,6±0,74

*Средна стойност ±SD (n=3); TK-титруема киселинност; M-маслено съдържание; ВС-водно съдържание; МСВ-масленост в сухото вещество.

Стойностите на измерените показатели масленост в общата маса на сиренето, респ. масленост в сухите вещества отново показват разлика между пробите. Тази разлика се дължи именно по по-високите дози растителна мазнина, която е добавена към млечната смес, предназначена за производство на имитация продукт. Подобно заключение е констатирано от Dabevska-Kostoska et. al., [16], които установяват, че степента на зрелост в комбинация от високата масленост са факторите отговорни за качеството на сиренето. При нормални други условия тези показатели се движат в граници между 17 - 23 %, ето защо преби № 1, № 2 и № 3 са със стандартни стойности, при които няма установено отклонение в този показател. Количество на NaCl в преби № 2, № 3 и № 4 е сравнително ниско, в сравнение с преба № 1. За производството на бяло саламурено сирене се изиска този показател да достигне стойност в зрелия продукт до над 3,5 - 4,0 %. Отчетените резултати са близки до тези установени от Beev et al., [17] според които сухо вещество в сиренето варира от 33,5 % до 38,5 %, съдържанието на мазнини – от 13,3 % до 16,4 %, и съдържанието на сол (от 4,1 % до 5,8 %). Според авторите тези стойности са в съответствие с приетите стандарти за производство на бяло саламурено сирене.

В зависимост от използваната технология за производство се наблюдава и разлика в стойностите на показателя водно съдържание. Най - висок е показателя при преба № 3, която е произведена при висока температура на пастьоризация (>80 °C) на млякото. При тази технология се позволява да се включват в подсирката сироватъчните белтъци от млякото, с което се и постига от една страна повишение на

водното съдържание, а от друга и по-висок добив на сирене. Повишението на натрупаните количество млечна киселина водят до повишаване на титруемата киселинност в сиренето и до ускоряване на процесите на синерезис. На това се дължи наблюданото понижение на водното съдържание на преба № 1, в сравнение с останалите преби.

Резултатите от проведените органолептичен анализ са представени на табл. 2. От получените данни се вижда, че преба № 1 притежава типични вкусово-ароматични свойства, специфични за съответния вид сирене и технология на производство. По-ниска органолептична оценка получават пребите № 2, № 3 и № 4, предвид отклоненията, които са констатирани при всеки един от показателите при оценката (табл. 2). Външния вид на парчетата при преба № 1 е добър, тя притежават правилна квадратна основа и стандартни размери. За разлика от нея преби № 2, № 3 и № 4 притежават деформиран и нетипичен външен вид.

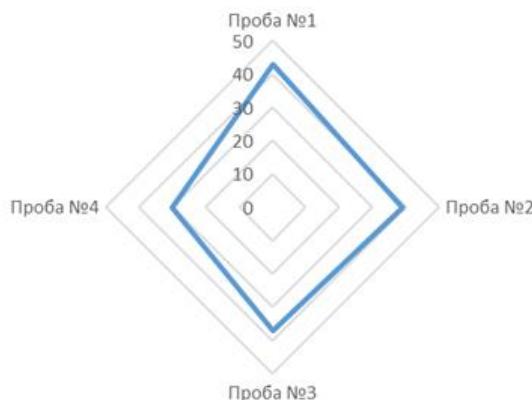
Показателят вкус, мирис и аромат, е най-ниско оценен при преба № 4, за което е установен нетипичен вкус и аромат, в сравнение с останалите преби (фиг. 1.). Преба № 3 има изразен млечнокисел вкус, преба № 1 се характеризира с умерено солен, а преба № 2 е с несолен, неспецифичен, легко сладникав вкус и неизразен аромат. Консистенцията при преба № 1 и № 2 е умерено твърда и слабо зърnestа, което предполага и по-високата оценка по този показател (фиг. 2.). При преба № 3 е установена умерено твърда консистенция и силно изразена зърнистост, което корелира със специфичната технология на производство при тази разновидност на сиренето. Вероятно, в резултат на по-високата пастьоризация на млякото (>85 °C), довела до включването на сироватъчните

Таблица 2.
Органолептичен анализ на преби бяло саламурено сирене

Проба, №	Органолептични показатели			
	Вкус, мириз и аромат	Външен вид	Консистенция	Разрезна повърхност, строеж и цвят
1	Умерено солен вкус	Добър	Твърда, установяване на лека зърнистост	Наличие на малък брой технически шупли с големи размери, добре изразен порцеланов лом
2	Несолен, неспецифичен, лека сладникавост	Леко деформиран	Умерено твърда, слаба зърнистост	Наличие на средни по размер технически шупли, наличие на локален порцеланов лом
3	Млечнокисел	Деформирано	Умерено твърда, силна изразена зърнистост	Хомогенна със слабо изразен порцеланов лом
4	Нетичично	Деформиран външен вид	Мека, без спойка на сиренината	Без наличие на порцеланов лом

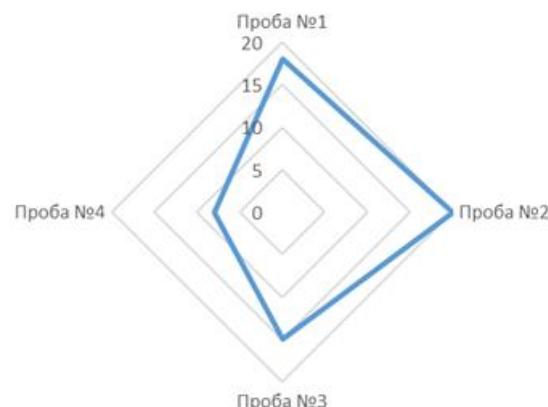
протеини в структурата на сиренината (изразена хидрофилна природа на тази белтъчна група) и увеличените дози на CaCl_2 и стартерна култура, с цел уплътняване на коагулума и подпомагане на синерезиса са създали възможност за калциево-термична преципитация на протеините, водеща до зърnestа структура. При проба № 4 се установява сравнително мека консистенция, без спойка на сиренината, предвид по-високите установени стойности на показателя масленост, ето защо тази проба получава най-ниска обща оценка. Комбинацията от високо водно съдържание и по-висока масленост допринася за наличието на мека консистенция (табл. 2).

Вкус, мириз и аромат



Фиг. 1. Органолептична оценка по показатели вкус, мириз и аромат.

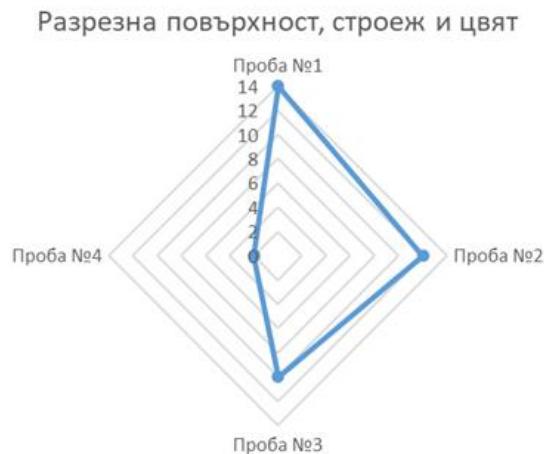
Консистенция



Фиг. 2. Органолептична оценка по показател консистенция.

При формирането на оценката на разрезната повърхност и строежа на саламурените сирена се оценява и наличието на порцеланов лом. Наличието на порцеланов лом, както и неговия строеж е важен индикатор за качеството на сиренето, начина на обработка на сиренината и технологията, по която е произведено сиренето. Проведени са изследвания на саламурени сирена за обективна оценка на разрезната повърхност и порцелановия лом чрез компютърно зрение [18,19,20]. Този вид компютърна обработка на изображения може да се прилага в подкрепа на органолептичната оценка на тези показатели от експерти. За показателят разрезна повърхност,

строеж и цвят отново се установява различие между пробите (фиг. 3.).



Фиг. 3. Органолептична оценка по показател разрезна повърхност, строеж и цвят.

При проба № 1 се наблюдава хомогенна разрезна повърхност и ясно изразен порцеланов лом (фиг. 3), което обяснява максималния брой точки, които тя е получила по показател разрезна повърхност и строеж. Проба № 4 получава най-ниска оценка предвид установената нееднородност на цвета, недобрата спойка и отсъствието на специфичен порцеланов лом. За разлика от проба № 4, проба № 3 притежава хомогенен строеж, еднороден цвят, но със слабо изразен порцеланов лом. За проба № 2 се установява наличие на средни по размер технически шупли, наличие на локален порцеланов лом, еднороден цвят и строеж в цялата маса на сиренето.

4. Заключение

Проведеният сравнителен анализ показва, че технологията на производство пряко влияе върху качествените показатели на изследваните видове сирене. Сиренето, произведено по интензифицирания метод се характеризира със специфична консистенция, вкус, и разрезна повърхност, а това получено по механизирания способ притежава органолептични характеристики близки до тези с класическата технология. Незадоволителна оценка е поставена на имитиращия продукт, т.к. тази технология не позволява формирането на типичната органолептика, и се съпровожда с появата на редица недостатъци.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гергана Славова. Производство на различни видове сиреве в ЕС и света – устойчиво развитие на млечните продукти през годините. Управление и устойчиво развитие, 5/2014 (48).
2. Moatsou G., A. Govaris. A diachronic exploitation of small ruminants of milk in Greece. *Small Ruminant Research*, 2011, 101: 113-121.
3. Fox P., P. McSweeney. Cheese: an overview, *Cheese: chemistry, physics and microbiology, Book*, 2004, 1: 1–18.
4. Alichanidis E., A. Polychroniadou. Characteristics of major traditional regional cheese varieties of East-different bacterial culture systems for the production of reduced-fat Mediterranean countries: A review. *Dairy Science and Technology*, 2008, 88: 495-510.
5. Pearl, A., Cuttle, C. and Deskins, B. Completely Cheese. Johnathan David Publishers, New York, 1978.
6. Caprino, S., Acree, T., Barbano, D. M., Licita, G., Siebert, K. Chemometric analysis of Ragusano cheese flavor. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2002, 50 (5):1143-1149.
7. Salles, C., Sommerer, N., Septier, C., Issanchou, S., Chabanet, C., Garem, A., Le Quere, J. Goat cheese flavor: sensory evaluation of branched-chain fatty acids and small peptides. *Journal of Food Science*, 2002, 67 (2): 835-84.
8. Davis, J.G. Cheese. American Elsevier Publishing Company, New York, 1965.
9. National Dairy Council. Newer Knowledge of Cheese and Other Cheese Products. 3rd Ed. Rosemont, IL, 9886.
10. Patrick F. Fox Timothy P. Guinee Timothy M. Cogan Paul L. H. McSweeney. Factors that Affect Cheese Quality. *Fundamentals of Cheese Science*, 2016, 1: 533-542.
11. БДС 1111-80. Мляко и млечни продукти. Определяне на титруемата киселинност.
12. БДС EN ISO 2446:2008 и ISO 3433:2008 (IDF 222:2008). Мляко и млечни продукти. Определяне на масленото съдържание.
13. БДС 8274:1982. Мляко и млечни продукти. Методи за определяне съдържанието на натриев хлорид.
14. БДС 15612:1983. Продукти млечни. Органолептична оценка.
15. Draper A., E. Smith. Nutrition policies in developed countries encyclopedia of human nutrition (Second Edition), 1998, 22: 1326–1333.
16. Dabevska-Kostoska M., E. Velickova, S. Kuzmanova, E. Winkelhausen Traditional white brined cheese as a delivery vehicle

- for probiotic bacterium *Lactobacillus casei*. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 2015, 34 (2): 343–350.
17. Beev G., T. Kolev, N. Naydenova, T. Dinev, M. Tzanova, G. Mihaylova. Physicochemical, sanitary and safety indicators changes during the ripening of Bulgarian white brined cheese from local farms. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 2019, 25 (Suppl. 3):109-119.
18. Danev A., A. Bosakova-Ardenska, M. Kutryanska, Iv. Ivanov, Vl. Karparov, Application of arithmetic and logic operations for objects extraction in Image. VIII International Conference of Young Scientists – ICYS 2020, Scientific Works of the Union of Scientists Plovdiv, Series B. Natural Sciences and the Humanities, Vol. XX, pp. 32-35.
19. Ганчовска Вл., А. Босакова-Арденска, Л. Костадинова-Георгиева. Метод за окачествяване на храни чрез обработка на бинаризирани изображения. Научни трудове СУБ Пловдив, Серия В. Техника и технологии, том X, 2013, pp 24-28. Дни на науката, СУБ Пловдив, 2012.
20. Босакова-Арденска А., А. Данев, Л. Костадинова-Георгиева. Приложение на компютърното зрение при определяне качеството на сирене. Научни трудове СУБ Пловдив, Серия В. Техника и технологии, том XVII, стр. 68-75. Дни на науката, СУБ Пловдив, 2019.

ИЗПИТВАНЕ В ПРОМИШЛЕНИ УСЛОВИЯ НА ИЗОЛИРАНИ И СЕЛЕКТИРАНИ НОВИ ВИНЕНИ ДРОЖДИ ОТ СОРТА ДОРНФЕЛДЕР

ИВАЙЛА БАЗЛЕКОВА, ХРИСТО СПАСОВ, НАДЕЖДА БЛАГОЕВА, ЯВОР ЧОБАНОВ

Университет по хранителни технологии – гр. Пловдив, Катедра „Технология на виното и пивото“

ivayla.bazhlekova@gmail.com, spassovh@abv.bg, blagoeval@yahoo.com,
iavor20lite@gmail.com

Резюме: Извършено е изпитване в промишлени условия на новоизолиран и селектиран на трето ниво щам дрожди от сорта Дорнфелдер от местностите Меразите и Н. Герово, като е използван и контролен търговски щам дрожди вложен като сух препарат. Новоизолираният щам провежда активна и завършина алкохолна ферментация, като полученото вино има подходящ физико-химичен състав и сензорен профил, подчертаващ сорта Дорнфелдер. Щам D 162 усвоява по-ефективно субстрата, образува 5 % повече етанол, запазва багрилната материя и подобрява екстракцията. Полученото вино е с интензивен зрял плодов аромат, пътно тяло и мек финал. Препоръчан е за производство на регионални вина от сорта Дорнфелдер.

Ключови думи: изолация, дрожди, сорт Дорнфелдер, регионални червени вина, грозде

TEST IN MANUFACTURING CONDITIONS OF ISOLATED AND SELECTED NEW WINE YEAST OF THE DORNFELDER VARIETY

IVAYLA BAZHLEKOVA, HRISTO SPASOV, NADEZHDA BLAGOEVA, IAVOR TCHOBANOV

University of food technologies – Plovdiv, Bulgaria

ivayla.bazhlekova@gmail.com, spassovh@abv.bg, blagoeval@yahoo.com,
iavor20lite@gmail.com

Abstract: An industrial test of a newly isolated and selected at the third level strain of yeast of the Dornfelder variety from the localities of Merazite and N. Gerovo was performed, using a control commercial strain of yeast used as a dry preparation. The newly isolated strain was carried out active and complete alcoholic fermentation, and the resulting wine was had a suitable physico-chemical composition and sensory profile, emphasizing the Dornfelder variety. Strain D 162 absorbs the substrate more efficiently, forms 5% more ethanol, retains the dye and improves the extraction. The resulting wine has an intense ripe fruity aroma, dense body and soft finish. It is recommended for the production of regional wines of the Dornfelder variety.

Key words: isolation, yeast, Dornfelder variety, regional red wines, grape

1. Въведение

Особеностите на сорта грозде, степента на зрялост и района на отглеждане определят състава на ферментиращата мъст или каша, от които зависи развитието и метаболизма на дрождите.

Някои автори посочват, че дрождите са един от факторите, от който зависи правилното протичане на ферментацията и качеството на виното, като от съществено значение е

селекцията на нови щамове, свързана с района, сорта грозде и технологията на преработка. Основните критерии за оценка на дрождите са размножителна способност, ферментационна активност и органолептичен профил на получените вина, но не винаги щамове с висока активност дават вина с високо качество [1, 2, 3].

Селекционираниите щамове дрожди имат специфични технологични характеристики, въз основа на които се обосновава изборът им в

зависимост от конкретната цел – производство на бели (с интензивен аромат), или червени вина (с наситен цвят), от определен сорт грозде или от даден район.

За червените вина от особено значение е процентът на ципите, тъй като в тях се съдържа основната част от багрилни и ароматични вещества на гроздето. Съотношението ципи/месеста част се намалява с увеличаване размера на зърната и при еднаква концентрация на тези вещества, мъстта и вината получени от дребни зърна ще съдържат по-висок процент от тях [4].

Червеният винен сорт Дорнфелдер се използва за получаването на много интензивно оцветени червени вина, които са много популярни в неговата родина Германия. Първоначално е бил получен, за да служи за подобряване цвета на по-бледите червени вина. Той е ранно зреещ сорт, който има висок добив, особено ако е отглеждан на плодородни почви, като получените вина имат потенциал за стареене в дъбови бъчви. Сортът се отличава със дебели ципи, които го предпазват от заболявания, каквито са гъбичните инфекции и по-специално ботритис. Освен това тези ципи са богати на фенолни съединения, като даже количеството им надминава това при Каберне Совиньон. Получените вина от този сорт са с кадифена текстура, с лек флорален аромат, като често показват нотки на сливи, къпини или череши, а понякога загатват и за сладост [5, 6, 7].

В настоящия момент във винопроизводството се използват много широко чистите култури селекционирани дрожди. Те имат редица предимства: осигуряват контролирана алкохолна ферментация, завършваща докрай; получените метаболити са в количества и съотношения, влияещи положително върху органолептичния профил на вината. Към селекциониранны дрожди се предявяват редица изисквания в зависимост от типа произвеждано вино. На пазара се предлагат промишлени препарати сухи активни дрожди, притежаващи много добри технологични свойства. Тяхното приложение в различни региони обаче, води до известно унифициране на вината и в определена степен загуба на специфичност [5, 8, 9].

До голяма степен спецификата и в частност качествените характеристики на виното се придават от естествената микрофлора на гроздето от конкретния лозарски район. В последните 10-15 години в световен мащаб се работи усилено по селекция на местни щамове дрожди за производство на регионални вина, за

да се запази и подчертава спецификата на вината от определен район и микрорайон. В някои случаи, освен за района, се държи сметка и за преработвания сорт, като се селектират най-подходящите за даден сорт дрождени щамове [8, 10].

Дрождени култури с добри характеристики получени след селекция, могат да се използват успешно при производството на вино. По този начин може да се подобри биофонда на дрожди от даден район, както и биологичното наследство, което е от високо значение за производството на вина с контролиран произход, с типичен вкус и аромат.

Целта на настоящето проучване е да се проведе ферментация с новоизолиран и преминал през тристепенна селекция щам дрожди в промишлени условия и да бъде сравнен с контролен търговски щам.

2. Материали и методи

По време на гроздоберна кампания 2020 г. беше проведен опит в промишлени условия във ВИ „New Bloom Winery“ – гр. Съединение с подбрания на трето ниво щам Д 162. Използван беше и контролен щам *Saccharomyces cerevisiae* Rubino Extra 2B Fermcontrol, приложен като сух препарат. Промишленият експеримент беше осъществен в обем от 5000 килограма гроздова каша за всеки от двата варианта с показатели, които са посочени в Таблица 1.

Таблица 1. Физико-химичен състав на грозде от сорт Дорнфелдер, реколта 2020 г.

Показател на гроздовата каша	Редуциращи захари, в g/dm^3	Титруеми киселини, в g/dm^3	pH
	217.5	4.26	3.66

Партидите гроздова каша са с добавени ензим Lafase HE Grand Cru в количество 3 g/100 kg, танин VR Supra – 15 g/hl и 0.5 g/dm³ винена киселина. Засяването с щам Д 162 е в количество на посевната култура от 4.5 %, а на Rubino Extra 2B Fermcontrol – 27 g/hl.

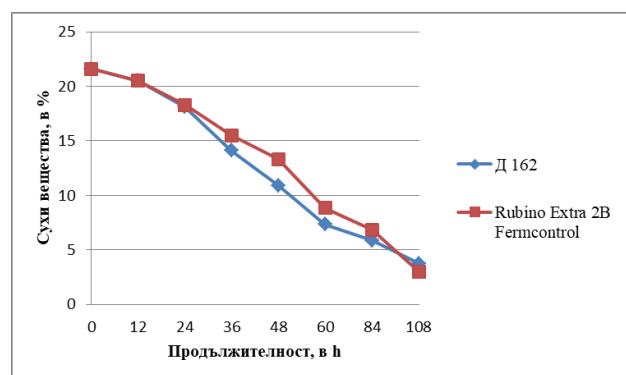
Алкохолната ферментация беше осъществена във метални винификатори с периодично извършване на рециркулация на течната фаза при температура от 20-21 °C. Бяха добавяни на два пъти ДАФ и танин VR Color в количества от 15 g/hl след извършен делестаж с последващо рециркулиране. Пробите бяха засяти с чиста култура млечнокисели бактерии VP41 Lallemand с цел протичане на ЯМКФ. Ходът беше следен чрез хартиена хроматография. В готовите вина бяха определени алкохолното съдържание,

редуциращи захари, титруеми и летливи киселини, общи феноли, антоциани, цветови характеристики (интензитет на цвета IC' [абс. ед.], нюанс на цвета T, dA %, % жълт цвят, % червен цвят, % син цвят), летливи компоненти (общи естери, алдехиди, висши алкохоли). Определени бяха и някои отделни летливи представители газхроматографски.

Получените опитни вина при промишлени условия бяха оценени органолептично по 100-бална система и метода на основните характеристики от професионална дегустационна комисия от 7 енолози (Проданова Н., 2008; Родина, Т.Г., 2004). Изгответи са спайдер-диаграми.

3. Резултати и обсъждане

На Фиг. 1. е представена графиката на динамиката на протеклата алкохолна ферментация при промишлени условия на вина от сорта Дорнфелдер, произведени със селектирания на трето ниво щам D 162 и използвания контролен щам Rubino Extra 2B Fermcontrol от ВИ New Bloom Winery.



Фиг. 1. Динамика на алкохолната ферментация на опитни варианти вина от сорта Дорнфелдер, реколта 2020 година, в промишлени условия

От графиката се вижда, че алкохолната ферментация е протекла сходно и при двата опитни варианта – динамично и докрай, с малко предимство за новоизолирания щам в периода 24-48-ми час. Това показва ясно, че D 162 се справя добре в реални условия и потвърждава резултатите получени от лабораторните тестове. Прави впечатление високата скорост на алкохолната ферментация, което е свързано с динамично синтезиране на ензимите, необходими за нейното провеждане, интензивното усвояване на субстрата и достигането до нива сухо вино практически за 6-7 дни.

На Таблица 2 са представени резултатите от физико-химичния състав на получените варианти опитни вина.

Таблица 2. Физико-химичен състав на опитни вина след ЯМКФ, реколта 2020 г.

№	Показател	Д 162	Rubino Extra 2B Fermcontrol
1	Редуциращи захари, в g/dm^3	3.56	3.42
2	Алкохол, в об. %	13.5	12.9
3	Титруеми киселини, в g/dm^3	6.86	6.75
4	Летливи киселини, в g/dm^3	0.231	0.256
5	Общ екстракт, в g/dm^3	31	29
6	pH	3.56	3.54
7	Общи фенолни съединения, в g/dm^3	2.84	2.33
8	Антоциани, в g/dm^3	0.569	0.533
9	Висши алкохоли, в mg/dm^3	249	245
10	Алдехиди, в mg/dm^3	18	15
11	Естери, в mg/dm^3	349	330
12	IC, в абс. ед.	38.5	30.5
13	T	0.45	0.45
14	dA %, в %	68	68
15	DO ₄₂₀ , в %	27	27
16	DO ₅₂₀ , в %	61	61
17	DO ₆₂₀ , в %	12	12

Стойностите на показателите са сходни и при двата щама, като говорят за протекла чисто и до край алкохолна ферментация, натрупване на високи концентрации алкохол, мощно обагряне и отлична фенолна запасеност, даваща възможност за стареене.

Стойността на получния алкохол с новоизолирания щам D 162 е с около 5% по-висока от колкото при контролния щам. Реално полученият коефициент на превръщаемост на захарите в алкохол е 0.635 за D 162, при 0.607 за контролния щам Rubino Extra 2B Fermcontrol. Това дава основание да се твърди, че новоизолирания щам по-ефективно усвоява субстрата, използва по-голяма част от него за синтез на етанол. Титруемата киселинност на опитната и контролната проби са практически еднакви, което дава основание да се твърди, че метаболизма на киселините при двата щама е сходен. Ниската стойност на летливата киселинност и то при протекла ЯМКФ, потвърждава подходящия метаболизъм на селектирания щам.

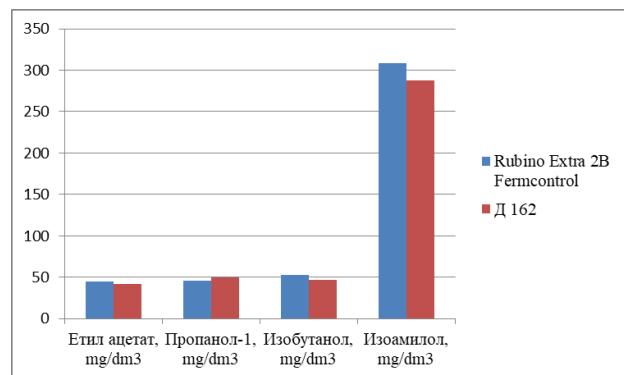
Концентрацията на общите фенолни съединения (ОФС) в двете пробы съответстват

на добре запасени, подходящи за умерено страреене вина. Виното, получено с опитния щам Д 162 има с около $0,5 \text{ g/dm}^3$ повече ОФС спрямо контролния комерсиален щам. Заедно с това прави впечатление и по-високата стойност на цветния интензитет IC на опитната проба, с около 8 абсорбционни единици. Двата факта дават основание да се твърди, че опитния щам спомага екстракцията на фенолни съединения, запазва ги по-добре от окисление, вероятно има по-ниска β -глюкозидазна активност и по-слабо атакува багрилната материя. И при двете преби отчитаме отлично съотношение на съставките на цвета с подчертана доминация на червената – 61%, като стойностите и при двете опитни вина са напълно еднакви. Тези стойности, заедно с ниските еднакви стойности на нюанса T (0.45) и високите идентични стойности на показателя dA% (68%) характеризират цвета и на двета опитни варианта като жив, искрящ, интензивен рубинено червен, голяма част от антоцианите са във flavилиева форма и имат висока багреща способност. За това спомага предпазването от мощно окисление в хода на ферментацията и по-високата киселинност.

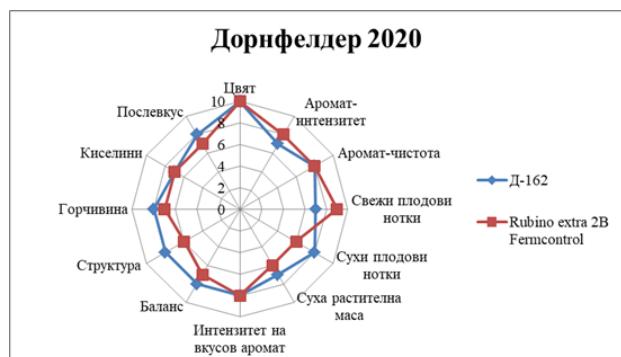
Опитните вина бяха анализирани за общи групи летливи компоненти. Концентрациите на алдехидите са в ниски стойности, което създава условия за чистота и ефирност на аромата и потвърждава установеното при анализа на багрилните вещества, че в хода на ферментацията не е допуснато окисление. Склонността на щам Д 162 да образува алдехиди е ниска, което оценяваме строго положително.

Висшите алкохоли са в ниска концентрация, а естерите в средна, което в комбинация намалява ферментационните нотки, а засилва и подчертава плодовите нюанси в аромата. Това е положително за виното и подчертава типичността на сорта.

На Фиг. 2 е представено съдържанието на отделни представители на летливите компоненти – етилацетат, пропанол-1, изобутанол и изоамилов алкохол в опитната и контролната преби. Стойностите са практически еднакви в двете опитни вина и остават в нормални граници. Синтезът на изоамилов преобладава над останалите висши алкохоли.



Фиг. 2. Съдържание на летливи примеси в опитните вина от сорта Дорнфелдер, реколта 2020



Фиг. 3. Органолептичен профил на вина от сорта Дорнфелдер 2020 – промишлен вариант на D 162 и Rubino Extra 2B Fermcontrol

Сензорният профил, представен на Фиг. 3, визуализира органолептичните специфики на опитните вина. И двета варианта напълно се съгласуват с установените стойности на анализираните показатели. Вариантът с D 162 се характеризира с наситен интензивен рубинен цвят с виолетови нотки, аромата е по-зрял – растително-плодов, с елементи на арония, сух плод, ванилови нотки, сметана и вишна. Вкусово е по-балансиран, добре структуриран, с усещане за по-плътно и заоблено тяло и по-комплексен характер, омекотен, подходящ за стареене. Вариантът с Rubino Extra 2B Fermcontrol е също с наситен интензивен рубинен цвят, аромата е игрив, усещат се свежи плодове, вкусово е по-лек, доста свеж, добре балансиран, подходящ за бърза реализация.

Физико-химичният и сензорен профил на промишленото вино от сорта Дорнфелдер потвърждава, че селектирания местен щам винени дрожди D 162 провежда интензивна, чиста, доведена до край алкохолна ферментация, с него се получават вина, подчертаващи типичността на сорта – наситен цвят, наситен плодово-растителен аромат, плътно тяло,

потенциал за стареене, потенциални танини. Този щам се препоръчва да бъде прилаган за производство на качествени регионални вина от района на Съединение.

4. Заключение

На базата на получените резултати при условията на проведенния експеримент може да се обобщи, че произведената промишлено партида вино от сорта Дорнфелдер има физико-химичен състав и сензорен профил потвърждаващи, че селектирания местен щам винени дрожди Д 162 провежда интензивна, чиста, доведена до край алкохолна ферментация. Той успява да работи изключително добре в реални промишлени условия, устойчив е на реалната среда и потвърждава изводите от лабораторните опити. С него се получават вина, подчертаващи типичността на сорта – наситен цвят, наситен плодово-растителен аромат, пълно тяло, потенциал за стареене и се препоръчва да бъде прилаган за производство на качествени регионални вина от района на Съединение.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бамбалов Г., Х. Спасов, О. Цветанов, К. Бамбалов, 1996, Нови щамове дрожди за производство на червени вина. Лозарство и винарство, 5, 22-26.
2. Fleet G. H., 2008, Wineyeasts for the future, FEMS Yeast Res 8 (2008) 979–995.
3. Del Mónaco S. M., Y. Curilen, R. Del Carmen Maturano, S. M. E. Bravo, A. B. Simes and A. C. Caballero, 2016, The Use of Indigenous Yeast to Develop High-Quality Patagonian Wines, Grape and Wine Biotechnology, Antonio Morata and Iris Loira, IntechOpen, DOI: 10.5772/64750.
4. Ribereau-Gayon P., D. Dubourdieu, B. Doneche, A. Lonvaud, 2006, Handbook of Enology, Volume 1, The Microbiology of Wine and Vinifications, 2nd Edition, John Wiley & Sons Ltd.
5. Antocea A. O., 2008, Sensory and composition profile of Dornfelder and Regent wines obtained in Romania, Conference Paper - June 2008.
6. Robinson J., Harding J. and Vouillamoz J., 2012, Wine Grapes: A complete guide to 1,368 vine varieties, including their origins and flavours, pgs 307-308 Allen Lane 2012.
7. Antocea A. O. and Cojocaru G. A., 2015, Technological approaches to the vinification of Dornfelder grape variety cultivated in Romania, BIO Web of Conferences 5, 02009 (2015), published by EDP Sciences, 2015.
8. Спасов Х., Ф. Илиева, Е. Гаргова, Н. Благоева, Н. Стоянов1, П. Митев, Я. Чобанов - Проучване на новоизолирани щамове дрожди за производство на вина от района на Демир Капия, Македония, Научни трудове на УХТ Том LIX – 2012 „Хранителна наука, техника и технологии“.
9. Efstratios Nikolaou, Evangelos H. Soufleros, Elizabeth Bouloumpasi, Nikolaos Tzanetakis – Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains according to their oenological characteristics and vinification results, Food Microbiology 23 (2006) 205–211.
10. Спасов Х., Чобанов Я., Запрянова П., Райчевска Ж., Дянкова К. – Изолиране, проучване и селекция на щамове винени дрожди за производството на регионални вина от сорта Мавруд, Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2017, 20 (4), 95-106.

АНТИНЕВРОНАЛНИТЕ АНТИТЕЛА ПРИ АВТОИМУННИ ЕНЦЕФАЛИТИ И МНОЖЕСТВЕНА СКЛЕРОЗА

МИЛЕН ХРИСТОЗОВ^{1,2,3}, РАЛИЦА ЙОРДАНОВА-КОЗАРЕВА⁴, МАРГАРИТА ПАНОВА^{4,5},
ФАНИ ГЪЛЪБОВА-ПЕТРОВА⁵, ИВАН ИВАНОВ^{2,4,5}, ГЕОРГИ СЛАВОВ^{6,7}, ПЕНКА
АТАНАСОВА^{6,7}, МАРИАНА МУРДЖЕВА^{1,2,3}

¹Медицински Университет – Пловдив, Фармацевтичен Факултет, Катедра по Микробиология и Клинична Имунология

²Научно-изследователски институт към Медицински Университет – Пловдив

³УМБАЛ „Св. Георги“ ЕАД, гр. Пловдив, Лаборатория по Клинична Имунология

⁴Медицински Университет – Пловдив, Медицински Факултет, Катедра по педиатрия и медицинска генетика

⁵УМБАЛ „Св. Георги“ ЕАД, гр. Пловдив, Клиника по детски болести

⁶Медицински Университет – Пловдив, Медицински Факултет, Катедра по нервни болести

⁷УМБАЛ „Св. Георги“ ЕАД, гр. Пловдив, Клиника по нервни болести

milen.hristozov@mu-plovdiv.bg, ralitsa_iordanova@yahoo.com, panova_marg@mail.bg, fanita_g@abv.bg,
ivanovist@gmail.com, georgi.slavov15130@gmail.com, p_a7@abv.bg, mmurdjeva@yahoo.com

Резюме: Целта на изследването е проучване на честотата на антиневроналните антитела при пациенти с автоимунни енцефалити и множествена склероза и корелацията им с тежестта на клиничната картина на тези заболявания. Изследвани са серумни и ликворни преби на 12 хоспитализирани пациенти с диагноза автоимунен енцефалит и 27 хоспитализирани пациенти с диагноза множествена склероза, както и серумни преби на 3 амбулаторни пациенти с неустановена диагноза и 8 пациенти от контролна група здрави индивиди. Използвана е индиректна имунофлуоресценция за определяне на антиневронални антитела, асоциирани с повърхностно-клетъчни антитела и имуноблот за определяне на антиневронални антитела, асоциирани с интрацелуларни антитела. От 27 пациенти с диагноза множествена склероза при 5 от тях бяха установени антиневронални антитела, асоциирани с интрацелуларни антитела. Един пациент е положителен за anti-LGII антитела, друг-за anti-AMPAR, при трети се детектират едновременно anti-AMPAR и anti-LGII антитела, един пациент е положителен едновременно за anti-AMPAR, anti-LGII и anti-GABA_AR антитела, а при друг се откриват anti-SOX1 антитела. От 12 пациенти с диагноза автоимунен енцефалит и тежко клинично протичане при двама от тях са установени anti-NMDAR антитела. При един от трима амбулаторни пациенти са доказани anti-GAD65 антитела. Всички изследвани от контролната група здрави индивиди са отрицателни за антиневронални антитела. Доказана е високата диагностична специфичност на антиневроналните антитела, като anti-NMDAR антителата се откриват по-често при автоимунен енцефалит и корелират с тежко общо състояние на пациентите, докато anti-AMPAR, anti-LGII, anti-GABA_AR и anti-SOX1 антителата имат диагностична стойност при множествена склероза и се наблюдават при пациенти в пристъпно-ремитентна форма на заболяването.

Ключови думи: антиневронални антитела, автоимунни енцефалити, множествена склероза

ANTI-NEURONAL ANTIBODIES IN AUTOIMMUNE ENCEPHALITIS AND MULTIPLE SCLEROSIS

MILEN HRISTOZOV^{1,2,3}, RALITSA YORDANOVA-KOZAREVA⁴, MARGARITA PANOVА^{4,5},
FANI GALABOVA-PETROVA⁵, IVAN IVANOV^{2,4,5}, GEORGI SLAVOV^{6,7}, PENKA
ATANASOVA^{6,7}, MARIANNA MURDJEVA^{1,2,3}

¹Medical University – Plovdiv, Faculty of Pharmacy, Department of Microbiology and Clinical Immunology

²Research Institute of Medical University – Plovdiv

³“St. George” University Hospital Plovdiv, Laboratory of Clinical Immunology

⁴Medical University – Plovdiv, Faculty of Medicine, Department of Pediatrics and Medical Genetics

⁵“St. George” University Hospital Plovdiv, Pediatric Clinic

⁶Medical University – Plovdiv, Faculty of Medicine, Department of Neurology

⁷“St. George” University Hospital Plovdiv, Neurology Clinic

milen.hristozov@mu-plovdiv.bg, ralitsa_iordanova@yahoo.com,

panova_marg@mail.bg, fanita_g@abv.bg, ivanovist@gmail.com,

georgi.slavov15130@gmail.com, p_a7@abv.bg, mmurdjeva@yahoo.com

Abstract: The aim of this investigation was to study the frequency of antineuronal antibodies in patients with autoimmune encephalitis and multiple sclerosis and their correlation with the severity of the clinical course of these diseases. Serum and cerebrospinal fluid samples from 12 hospitalized patients diagnosed with autoimmune encephalitis and 27 hospitalized patients diagnosed with multiple sclerosis, as well as serum samples from 3 outpatients with unidentified diagnosis and 8 patients from the control group of healthy individuals were studied. Indirect immunofluorescence was used for determining antineuronal antibodies associated with cell-surface antigens and immunoblot - for determining antineuronal antibodies associated with intracellular antigens. Of the 27 patients diagnosed with multiple sclerosis, 5 had antineuronal antibodies. One patient was positive for anti-LGII antibodies, another patient - for anti-AMPAR antibodies, in one patient both anti-AMPAR and anti-LGII antibodies were detected, one patient was positive for anti-AMPAR, anti-LGII and anti-GABA_BR antibodies and in another patient - anti-SOX1 antibodies were found. Of the 12 patients diagnosed with autoimmune encephalitis and severe clinical course, 2 had anti-NMDAR antibodies. Of the 3 outpatients, anti-GAD65 antibodies were detected in one of them. From the control group of healthy individuals, all tested were negative for antineuronal antibodies. In conclusion, antineuronal antibodies have high diagnostic specificity. Anti-NMDAR antibodies were detected mainly in autoimmune encephalitis and correlated with severe medical condition of the patients, whereas anti-AMPAR, anti-LGII, anti-GABA_BR and anti-SOX1 antibodies had diagnostic value in multiple sclerosis and they were observed in patients in relapsing-remitting form of the disease.

Key words: antineuronal antibodies, autoimmune encephalitis, multiple sclerosis

1. Въведение

Напредъкът в изследванията върху автоимунния енцефалит и множествената склероза направи възможно идентифицирането на нови биомаркери и предложи перспектива за включване на

антиневроналните антитела в диагностичния панел при тези заболявания. Антиневроналните антитела се разделят на две групи: 1) насочени срещу вътреклетъчни антигени (anti-Hu, anti-Yo, anti-Ri, anti-Tr, anti-amphiphysin, anti-CRMP5, anti-recoverin, anti-GAD65 и anti-Ma2) и 2) насочени срещу

повърхностно-клетъчни антигени (anti-NMDAR, anti-AMPAR, anti-LGI1, anti-CASPR2, anti-DPPX, anti-VGKC, anti-VGCC, anti-mGluR5 и anti-GABA_BR) [1, 2, 3, 4]. Автоантителата срещу интрацелуларни антигени са асоциирани с класическите паранеопластични синдроми [5, 6]. Те са свързани с развитието на тумори и включват Т-клетъчни отговори, таргетиращи невроните. Прогнозата при класическите паранеопластични разстройства е неблагоприятна, поради не обратимата загуба на неврони, тежката клинична картина на асоциираните тумори и проблеми с имунния контрол [5, 6]. Тези антитела са полезни туморни биомаркери. Втората група антитела е свързана с по-благоприятна прогноза [3]. Смята се, че те са директно патогенни, причинявайки обратими ефекти върху синаптичната функция при неврони с относително малка невронална смърт.

2. Материал и методи

Изследвани са серумни и ликворни преби на 27 пациенти с диагноза множествена склероза и 12 пациенти с диагноза автоимунен енцефалит, както и серумни преби на 3 амбулаторни пациенти с неустановена диагноза и 8 пациенти от контролна група здрави индивиди. Всички пациенти доброволно се включиха в изследванията по проекта чрез подписване на карта за информирано съгласие.

За детекция на антиневроналните антитела са използвани методите на индиректна имунофлуоресценция и имуноблот.

Антителата, насочени към повърхностно-клетъчни антигени и определени чрез индиректна имунофлуоресценция (IFA), са: anti - NMDAR (N-methyl-D-aspartate receptor), anti - CASPR2 (contactin associated protein 2), anti - AMPAR (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid), anti - LGI1 (leucin-rich glioma-inactivated protein 1), anti - DPPX (dipeptidyl aminopeptidase-like

protein 6) и anti - GABA_BR (γ -aminobutyric acid). Използван е кит Autoimmune Encephalitis Mosaic 6 (EUROIMMUN, Lubeck, Germany).

Антителата, насочени към интрацелуларни антигени и доказани чрез имуноблот (IB), са: anti - Amphiphysin, anti - CV2, anti - Ma2/Ta, anti - Ri, anti - Yo, anti - Hu, anti - Recoverin, anti - SOX1, anti - Titin, anti - Zic4, anti - Tr и anti - GAD65 антитела (антитела срещу глутамат декарбоксилаза). Използван е кит Paraneoplastic Neurologic Syndromes - 12 Ag (amphiphysin, CV2, PNMA2, Ma-2/Ta, Ri, Yo, Hu, recoverin, SOX1, titin, Zic4, GAD65, Tr (DNER) (EUROIMMUN, Lubeck, Germany).

3. Резултати и обсъждане

Бяха селектирани следните 50 пациенти:

1. Пациенти с автоимунен енцефалит (дванадесет) – 24%;
 2. Пациенти с множествена склероза (двадесет и седем) – 54%;
 3. Контролна група здрави индивиди (осем) – 16%;
 4. Амбулаторни пациенти (трима) – 6%
- Изследваха се пациенти и от двата пола в широк възрастов диапазон (от 10 мес. до 73 г.). Средната възраст беше 35 години.
Критерии за селекция на пациенти с диагноза множествена склероза:
- включващи - пристъпно-ремитентна форма на множествена склероза
- изключващи - други заболявания (автоимунни и инфекциозни).

Пациентите с диагноза „Автоимунен енцефалит“ бяха лежащи болни от Клиниката по детски болести към УМБАЛ „Св. Георги“ ЕАД, гр. Пловдив, както и от софийски болници (МБАЛ-НКБ, „Специализирана болница за активно лечение по детски болести-проф. д-р Иван Митев“ ЕАД-София). Пациентите с диагноза „Множествена склероза“ бяха лежащи болни от Клиниката по нервни болести към УМБАЛ „Св. Георги“ ЕАД, гр. Пловдив.

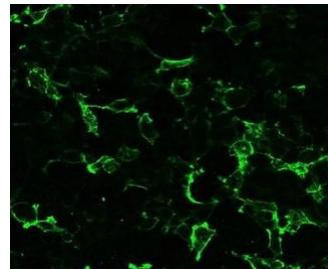
От антиневроналните антитела, асоциирани с интрацелуларни антигени, бяха установени anti-SOX1 и anti-GAD65.

Anti-SOX1 антителата се установиха при един пациент с диагноза множествена склероза. Тези автоантитела обикновено се асоциират със stiff – person syndrome, церебеларна атаксия и автоимуен енцефалит.

Anti-GAD65 антителата се установиха при един амбулаторен пациент с неуточнени неврологични оплаквания. Тези автоантитела обикновено се асоциират със stiff – person syndrome, церебеларна атаксия и автоимуен енцефалит.

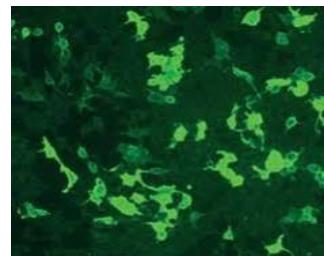
От антиневроналните антитела, насочени срещу повърхностно-клетъчни антигени, бяха установени anti-NMDAR, anti-AMPAR, anti-LGI1 и anti-GABA_bR.

Anti-LGI1 антителата се детектираха при трима пациенти с диагноза множествена склероза (Фигура 1). Тези автоантитела обикновено се асоциират със автоимуен енцефалит и автоимунни каналопатии, засягащи волтаж– зависимите калиеви канали (VGKC). Заболяването при тези пациенти беше в пристъпно-ремитентна форма и общото в неврологичния им статус беше наличието на квадрипирамиден и дискоординационен синдром. Единият от тях имаше придружаващо заболяване ХСБ, другите двама нямаха придружаващи заболявания. Отклоненията в лабораторните показатели са: от пълната кръвна картина – левкоцитоза и повишен MPV, от изследването на ликвора – повишена концентрация на IgG и на общ белтък и понижена концентрация на левкоцити в ликвор.



Фиг. 1. Anti-LGI1 антитела чрез IFA

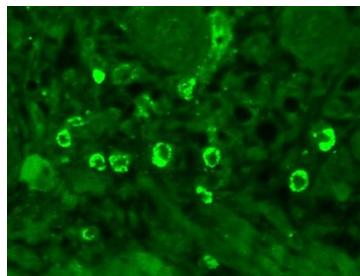
Anti-AMPAR антителата се установиха също при трима пациенти с диагноза множествена склероза (Фигура 2). Тези автоантитела обикновено се асоциират със автоимуен енцефалит, засягащ хипокамп и орбитофронтален кортекс. Заболяването при тримата беше в пристъпно-ремитентна форма и общото в неврологичния им статус беше наличието на квадрипирамиден и дискоординационен синдром. Единият от тях имаше придружаващо заболяване ХСБ, другите двама нямаха придружаващи заболявания. Отклоненията в лабораторните показатели са: от пълната кръвна картина – левкоцитоза и повишен MPV, от изследването на ликвора – повишена концентрация на IgG и на общ белтък и понижена концентрация на левкоцити в ликвор.



Фиг. 2. Anti-AMPAR антитела чрез IFA

Anti-GABA_bR антителата се установиха при един пациент с диагноза множествена склероза (Фигура 3). Тези автоантитела обикновено се асоциират със автоимуен енцефалит и автоимунни каналопатии, засягащи VGKC. Този пациент беше в пристъпно-ремитентна форма на заболяването с наличие на квадрипирамиден и дискоординационен синдром от

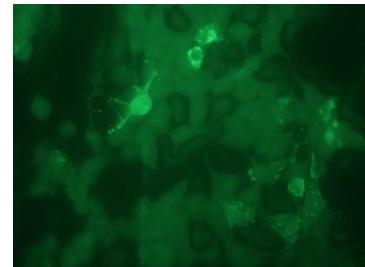
неврологичния статус. Лабораторните му показатели бяха в референтни граници.



Фиг. 3. Anti-GABA_bR антитела чрез IFA

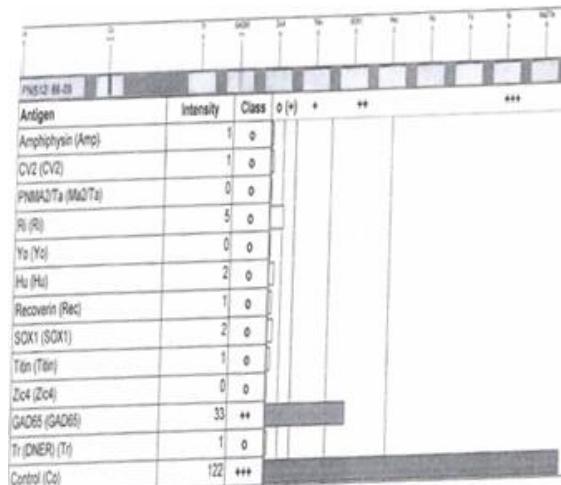
Общото при пациентите с множествена склероза, положителни за anti-LGI1, anti-AMPAR и anti-GABA_bR антитела е, че всичките бяха в пристъпно-ремитентна форма на заболяването.

Anti-NMDAR антителата се установиха при двама пациенти с диагноза автоимунен енцефалит, като и двамата пациенти бяха в тежко общо състояние (Фигура 4). Единият от тези пациенти беше с генерализирана мускулна хипотония, деснострранна хемипареза, гърчове, екстрапирамиден синдром, дезорганизирана основна активност от ЕЕГ и при него се установиха следните отклонения в лабораторните показатели: повишени общи антинуклеарни антитела (ANA), както и отклонения в ликвора (повищена концентрация на IgG, общ белтък и на глюкоза и понижена концентрация на калий), в биохимичните показатели (повищена концентрация на глюкоза, йонизиран калций, лактат дехидрогеназа (ЛДХ), гамаглутамил трансфераза (ГГТ), общ белтък и D-dimer и понижена концентрация на натрий и на урея), отклонения в пълната кръвна картина (повищена концентрация на среден обем на еритроцита (MCV), ширина на еритроцитното разпределение (RDW) и левкоцитоза).



Фиг. 4. Anti-NMDAR антитела чрез IFA

От пациентите, диагностицирани с множествена склероза, петима са положителни за антиневронални антитела (19%), двадесет и двама са отрицателни – (81%). От тези петима пациенти, anti-AMPAR антитела и anti-LGI1 антитела се установиха при трима пациенти (60%), а anti-GABA_bR антитела и anti-SOX1 антитела се доказваха при един пациент (20%). От пациентите с диагноза автоимунен енцефалит, двама са положителни за антиневронални антитела (17%), а десет са отрицателни – (83%). От тези двама пациенти anti-NMDAR антитела се установиха и при двамата (100%). От контролната група здрави индивиди всички са отрицателни за антиневронални антитела. От амбулаторните пациенти, един е положителен за антиневронални антитела – anti-GAD65 (33%), а двама са отрицателни (67%) (Фигура 5).



Фиг. 5. Anti-GAD65 антитела чрез IB

В литературните източници има малко данни за използване на панели от

антиневронални антитела като диагностичен тест при пациенти с множествена склероза. При пациентите с автоимунен енцефалит и множествена склероза най-често детектираният антитела са anti-AMPAR, anti-LGI1 и anti-NMDAR, което се потвърждава и от изследванията на други автори [7, 8, 9, 10]. Anti-NMDAR антителата се установиха при двама пациенти с автоимунни енцефалити в тежко общо състояние и с множество отклонения в лабораторните показатели. В литературата са описани данни за пациенти с автоимунен енцефалит с нарушен съзнателен, при които автоимунната патогенеза може да бъде показвана чрез определяне на автоантитела към невронални таргетни антигени (напр. глутаматни рецептори) [4]. Това се потвърждава и в нашето проучване с детекцията на anti-NMDAR антитела, които са таргетирани срещу глутаматни рецептори при двамата пациенти с автоимунен енцефалит. Изследователи доказват, че почти половината от пациентите с множествена склероза имат антиневронални антитела срещу VGKC (волтаж-зависимите калиеви канали), асоциирани със странични ефекти върху нервната тъкан [10]. IgG антитела към KIR4.1 субединицата на тези VGKC се появяват при 47 % от почти 400 пациенти с множествена склероза, сравнено с по-малко от 1 % пациенти с други неврологични състояния и нито един от групата на здрави индивиди [10]. Това се потвърждава и от направените от нас изследвания чрез детекцията на anti-LGI1 антитела, принадлежащи към волтаж-зависимите калиеви канали при трима пациенти с диагноза множествена склероза (60% от тестваните пациенти).

4. Заключение

Разработен е нов подход за определяне на антиневронални антитела при пациенти с множествена склероза и автоимунни енцефалити чрез използването на панели от антитела, насочени срещу интрацелуларни антигени и срещу повърхностно-клетъчни

антигени. При автоимунния енцефалит anti-NMDAR антителата имат добра диагностична стойност и корелират с тежко общо състояние на пациентите. При множествената склероза диагностична стойност имат anti-AMPAR, anti-LGI1, anti-GABA_AR и anti-SOX1 антителата и те се наблюдават при пациенти в пристъпно-ремитентна форма на заболяването. Детекцията на тези антиневронални антитела може да се използва като диагностичен биомаркер при пациенти с диагноза множествена склероза и автоимунен енцефалит.

Благодарности

Извършените изследвания са подпомогнати от вътреуниверситетски проект на МУ- Пловдив ДПДП-5/2019 г. „Антиневронални антитела – проучване на възможностите им като диагностичен и прогностичен биомаркер при автоимунни енцефалити и множествена склероза“ и проект „Национален Университетски комплекс за биомедицински приложни изследвания, обвързан с участие в BBMRI-ERIC“ (НУКБПИ-BBMRI.BG), Договори D01-285/17.12.2019 и D01-395/18.12.2020, в рамките на Националната пътна карта на научна инфраструктура (2020-2027).

Литература

1. Lee, S.K., Lee, S.T. The Laboratory Diagnosis of Autoimmune Encephalitis, Journal of Epilepsy Research, 2016, 6, 2, 45-52.
2. Plantone, D., Renna, R., Koudriavtseva, T. Neurological diseases associated with autoantibodies targeting the voltage-gated potassium channel complex: immunobiology and clinical characteristics, Neuroimmunology Neuroinflammation, 2016, 3, 69-78.
3. Lai, M., Huijbers, M., Lancaster, E., Graus, F., Bataller, L., Balice-Gordon, R., Cowell, J. K., Dalmau, J. Investigation of LGI1 as the antigen in limbic encephalitis previously attributed to potassium channels: a case series, The Lancet Neurology, 2010, 9, 8, 776–785.

4. Wandinger, K., Leypoldt, F., Junker, R. Autoantibody-mediated encephalitis—differential diagnosis in patients with impaired consciousness of unclear origin, Deutsches Arzteblatt International, 2018, 115, 666–673.
5. Dalmau, J., Rosenfeld, M. Autoimmune encephalitis update, Neuro-Oncology, 2014, 16, 6, 771–778.
6. Budhram, A., Nicolle, M., Yang, L. The Positive Predictive Value of Onconeural Antibody Testing:A Retrospective Review, Canadian Journal of Neurological Sciences, 2018, 45, 5, 577-579.
7. Uzawa, A., Mori, M., Takahashi, Y., Ogawa, Y., Uchiyama, T., Kuwabara, S. Anti-N-methyl D-aspartate-type glutamate receptor antibody-positive limbic encephalitis in a patient with multiple sclerosis, Clinical Neurology and Neurosurgery, 2012, 114, 4, 402–404.
8. Motoyama, R., Shiraishi, K., Tanaka, K., Kinoshita, M., Tanaka, M. Anti-NMDA receptor antibody encephalitis with recurrent optic neuritis and epilepsy, RinshoShinkeigaku, 2010, 50, 8, 585–588.
9. Stich, O., Murek, C., Rasiah, C., Rauer, S. Screening for well-characterized paraneoplastic anti-neuronal antibodies in multiple sclerosis, International Journal of Neuroscience, 2011, 121, 8, 477-479.
10. Bankhead, C., Writer, S. MS-Specific Antibody Isolated, <https://www.medpagetoday.com/> [Accessed on July 12, 2012].

НОВИ АСПЕКТИ ПРИ ИМУНОЛОГИЧНИЯ МОНИТОРИНГ НА МИНИМАЛНА РЕЗИДУАЛНА БОЛЕСТ ПРИ ДЕТСКИ ОСТРИ ЛИМФОБЛАСТНИ ЛЕВКЕМИИ (ОЛЛ)“

АЛЕКСАНДРА БАЛДЖИЕВА¹, ХАСАН БУРНУСУЗОВ², ХРИСТО ТАСКОВ³, ТЕОДОРА
ДИМЧЕВА⁴, МАРИАНА МУРДЖЕВА⁵

*Катедра по Микробиология и имунология, Фармацевтичен факултет, МУ-
Пловдив, бул. „Васил Априлов“ 15А, 4002 гр. Пловдив, България^{1,3}*

*Катедра по Педиатрия и медицинска генетика, Медицински факултет, МУ-
Пловдив, бул. „Васил Априлов“ 15А, 4002 гр. Пловдив, България²*

*Катедра по медицинска информатика, биостатистика и ел. обучение, ФОЗ,
МУ - Пловдив, бул. „Васил Априлов“ 15А, 4002 гр. Пловдив, България⁴*

*Ръководител на Катедра по Микробиология и имунология, Фармацевтичен
факултет, МУ-Пловдив, бул. „Васил Априлов“ 15А, 4002 гр. Пловдив,
България⁵*

Центрър за компетентност

„Персонализирана иновативна медицина“ (ПЕРИМЕД)⁵

*Научно-изследователски институт на МУ-Пловдив, бул. „Васил Априлов“
15А, 4002 гр. Пловдив, България^{1,2,3}*

*Alexandra.Baldzhieva@mu-plovdiv.bg¹, Hasan.Burnusuzov@mu-plovdiv.bg²,
Hristo.Taskov@mu-plovdiv.bg³, Teodora.Dimcheva@mu-plovdiv.bg⁴,
Mariana.Murdzheva@mu-plovdiv.bg⁵*

Въведение: При острата лимфобластна левкемия (ОЛЛ) оценката както на ранния, така и на късния терапевтичен отговор става чрез мониторинг на минималната резидуална болест (МРБ). МРБ представлява популация от левкемични клетки в костния мозък и кръвта, които показват резистентност към химиотерапия / лъчетерапия в хода на лечението и могат да довеждат до рецидив на заболяването. Установяването на МРБ е от решаващо значение както за прогнозата на заболяването, така и за избиране на оптималната терапевтична стратегия. Понастоящем за прогностични нива се приемат стойностите на резидуалните клетки от 0,01% до 0,001% (от 1×10^{-4} до 1×10^{-5} кл.). Стремежът е МРБ да се открие възможно най-рано чрез прилагането на по-чувствителни, високо специфични и възпроизведими подходи. Ето защо усилията са насочени към развитието на многопараметърна флуоцитометрия (МП ФЦМ).

Цел: Съобщаване на резултатите от повече от 10-годишния ни опит с проследяване на деца с ОЛЛ посредством 8-цветен панел и предложение за осъвременяването му с разработен от нас 14-цветен панел за МП ФЦМ.

Материали и методи: За периода 2011-2021г. МРБ е проспективно проследена при 63-ма пациенти от един детски онкохематологичен център със стандартизирана методика по време на интензивното лечение. Системно е изследвано нивото на резидуални клетки в костния мозък в дните с доказано важно прогностично значение на 15-я и 33-я ден, както и през 8-я ден в периферна венозна кръв, съгласно терапевтичен протокол BFM-ALL-тип.

Резултати: За 10-годишния период на проследяване се установи, че 58,7% от случаите на деца с ОЛЛ попадат във възрастта между 12 месеца и 6 години. Преобладава В-клетъчната остра лимфобластна левкемия с 82,54% от всички случаи на ОЛЛ, а едва 17,46% са случаите с Т-клетъчна ОЛЛ. Постигната е чувствителност на методиката за откриване на МРБ между 1×10^{-4} и 1×10^{-5} кл.

Заключение: Установяването на МРБ чрез стандартизирана 8-цветна флуоцитометрия спомага за подобряване на мониторинга на заболяването, което води до по-добри терапевтични резултати. Очаква се въвеждането на 14-цветен панел да се

отрази благоприятно на ефективността на методиката чрез повишаване на чувствителността и специфичността за детекция на резидуални клетки от порядъка на 1×10^{-5} до 1×10^{-6} кл.

Ключови думи: флуоцитометрия, левкемия, минимална резидуална болест

NEW ASPECTS OF IMMUNOLOGICAL MONITORING OF MINIMAL RESIDUAL DISEASE IN CHILDHOOD ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA (ALL)

ALEXANDRA BALDZHIEVA¹, HASAN BURNUSUZOV², HRISTO TASKOV³, TEODORA DIMCHEVA⁴, MARIANA MURDJЕVA⁵

*Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Pharmacy, MU-Plovdiv,
15A, Vasil Aprilov Blvd., 4002 Plovdiv, Bulgaria^{1,3}*

*Department of Pediatrics and Medical Genetics, Faculty of Medicine, MU-Plovdiv,
15A, Vasil Aprilov Blvd., 4002 Plovdiv, Bulgaria²*

*Department of Medical Informatics, Biostatistics and E-Learning, Faculty of Public
Health, MU - Plovdiv, 15A, Vasil Aprilov Blvd., 4002 Plovdiv, Bulgaria⁴*

*Head of Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Pharmacy, MU-
Plovdiv, 15A, Vasil Aprilov Blvd., 4002 Plovdiv, Bulgaria⁵*

*Center of Competence - Personalized Innovative Medicine (PERIMED)⁵
Research Institute at MU-Plovdiv, 15A, Vasil Aprilov Blvd., 4002 Plovdiv,
Bulgaria^{1,2,3}*

*Alexandra.Baldzhieva@mu-plovdiv.bg¹, Hasan.Burnusuzov@mu-plovdiv.bg²,
Hristo.Taskov@mu-plovdiv.bg³, Teodora.Dimcheva@mu-plovdiv.bg⁴,
Mariana.Murdzheva@mu-plovdiv.bg⁵*

Introduction: In childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL), both early and late therapeutic response is assessed by monitoring of minimal residual disease (MRD). MRD is a population of leukemic cells in the bone marrow and the blood that shows resistance to chemotherapy / radiation therapy during treatment and may lead to a relapse. The assessment of MRD is crucial both for the prognosis of the disease and for choosing the optimal treatment strategy. Currently, levels of residual cells from 0.01% to 0.001% (from 1×10^{-4} to 1×10^{-5} cells) are accepted as having a prognostic significance. The aim is to detect the MRD as early as possible through the application of more sensitive, highly specific and reproducible approaches. Therefore, efforts are focused on the development of multiparameter flow cytometry (MP FCM).

Aim: To report the results of more than 10 years of experience in follow-up of children with ALL from a single pediatric oncohematology center through an 8-color panel and to propose an update with a 14-color panel MP FCM, developed by us.

Patients and methods: Between 2011 and 2021 MRD was prospectively followed up in 63 patients with standardized methodology during intensive polychemotherapeutic treatment. All of them were systematically assessed for the level of residual cells in bone marrow on days with proven prognostic significance: day 15 and day 33, as well as day 8 in peripheral venous blood, according to a BFM-ALL treatment protocol.

Results: For the 10-year period we found that 58.7% of cases were between the ages of 12 months and 6 years. B-cell acute lymphoblastic leukemia predominated with 82.54% of all ALL cases and only 17.46% of cases were T-cell ALL. A level of sensitivity for the detection of MRD between 1×10^{-4} and 1×10^{-5} cells was achieved.

Conclusion: The detection of MRD by a standardized 8-color flow cytometry helps to improve the monitoring of the disease, which leads to better therapeutic results. It is expected that the introduction of a 14-color panel will have a favorable effect

on the effectiveness of the methodology by increasing the sensitivity and specificity for detection of residual cells in the range of 1×10^{-5} to 1×10^{-6} cells.

Key words: flowcytometry, leukemia, minimal residual disease

1. Въведение

Острата лимфобластна левкемия (ОЛЛ) е най-честото злокачествено заболяване при децата, с пикове между 2 и 5 годишна възраст. При ОЛЛ оценката както на ранния, така и на късния терапевтичен отговор става чрез мониторинг на минималната резидуална болест (МРБ). МРБ представлява популация от левкемични клетки в костния мозък и кръвта, които показват резистентност към химиотерапия/лъчетерапия, в хода на лечението, и могат да довеждат до рецидив на заболяването [1, 2]. Чрез измерване на стойностите на МРБ в различни времеви точки по време на терапията, може да се направи преоценка на прилаганите лекарства и да се подбере най-оптималната стратегия за лечение [3-7]. Понастоящем за прогностични нива се приемат стойности на резидуалните клетки от 0,01% до 0,001% (1×10^{-4} до 1×10^{-5}). Клиничното значение на тази гранична стойност се определя от факта, че ако пациентът има резидуални клетки $\geq 0,01\%$ в ключов ден от индукционната терапия, този пациент има значително по-висок риск от рецидив, в сравнение с нива под 0,01% [8-10]. Понастоящем са налични различни техники за откриване на МРБ при детската ОЛЛ (дОЛЛ), като всяка от тях показва предимства и ограничения [11]. Най-висока чувствителност (1×10^{-6} кл.) показва RT-PCR (Real Time PCR). Този метод обаче има и редица недостатъци: труден за изпълнение, бавен, скъп и приложим при около 75% от пациентите. Ето защо усилията са насочени към усъвършенстване на многопараметърната флуоцитометрия (МП ФЦМ). Първостепенна задача при МП ФЦМ е съставянето на панели от левкоцитни маркери за детайлно характеризиране на клетките от лимфоцитния ред в норма и патология. Във

връзка с това, едно от най-големите предизвикателства за надеждно откриване на МРБ чрез МП ФЦМ е изготвянето на добре подбран панел от левкоцитни маркери и обучени експерти в интерпретацията на данни [12]. Стандартните тестове за МРБ с четири до осемцветна ФЦМ рутинно постигат чувствителност от 0,01% до 0,001% при придобиване на приблизително 500 000 - 1 000 000 събития [13-18] и показват 80% до 95% съпоставимост с PCR-методиката [19-21]. Понастоящем се разработват методи за 10-цветна ФЦМ, които могат да измерват нива на МРБ от порядъка на 0,001% или по-малко клетки. Очаква се чрез поетапно преминаване към 12-параметърна ФЦМ да се достигне по-висока чувствителност [22, 23]. Поради това ФЦМ с 10 и повече параметри вече се нарича „Следващо поколение флуоцитометрия“. Конвенционалните подходи за анализ и интерпретация на данни от МП ФЦМ имат някои недостатъци. Ето защо се правят опити за внедряване на биоинформационни методи, които изискват ограничено участие на оператора [24, 25].

2. Пациенти и методи

За периода 2011-2021г. МРБ е проспективно проследена при 63-ма пациенти с левкемия-асоцииран имунофенотип (В-клетъчен или Т-клетъчен) от детския онкохематологичен център на УМБАЛ „Св. Георги“, гр. Пловдив. Използвана е стандартизирана методика за 8-цветна ФЦМ по време на интензивното лечение. Системно е изследвано нивото на резидуални клетки в костния мозък в дните с доказано важно прогностично значение на 15-я и 33-я ден, както и през 8-я ден в периферна венозна кръв, съгласно BFM-ALL-тип терапевтичен протокол. Включващи критерии за участие в

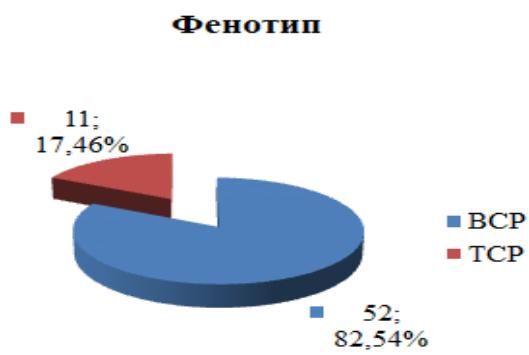
проучването са: 1) Деца на възраст между 1 и 18 години с остра лимфобластна левкемия; 2) Установени чрез МП ФЦМ левкемия-асоциирани имунофенотипни (ЛАИФ) характеристики на бластните клетки при поставяне на диагнозата. Флуоцитометричното изследване е извършено в Научно-изследователския институт на МУ-Пловдив.

Възрастта на пациентите при изява на левкемията варира от 12 месеца до 18 години. Средната възраст на участниците е 6г. и 3м. На Таблица 1 е представено разпределението на децата спрямо възрастта като клиничен прогностичен белег.

Таблица 1. Възрастови прогностични групи по I-BFM-SG.

Възрастова група	12м.- 6г.	$\geq 6\text{г.}$
Пациенти	37 (58.7%)	26 (41.3%)

Съотношението спрямо фенотипа е: с В-прекурсорна ОЛЛ са 52 деца (82,54%). С Т-фенотип са 11 деца (17,46%) – **Фигура 1.**



Фигура 1. Фенотипно разпределение.

Минималната резидуална болест се мониторира секвенциално в преби от костен мозък или периферна кръв в няколко момента по време на лечението на деца с ОЛЛ (по BFM-тип протокол). При поставяне на диагнозата за флуоцитометрично изследване от всеки пациент се взимат костномозъчен аспират и

периферна венозна кръв. За проучването се считат задължителни изследванията на МРБ в КМ при диагнозата и на ден 15 и ден 33, както и на ден 8 в ПК. ЛАИФ характеристиките са установени и анализирани чрез 8-цветен многопараметричен флуоцитометър BD FACS Canto II (BD Biosciences, USA) с BD FACS Diva v. 6.1.3 софтуер. ВСР-панелът се състои от следните флуорохромно конюгирали антитела: SYTO41 Pacific Blue/ CD45 Pacific Orange/ CD58 FITC/ CD10 PE/ CD34 PerCP-Cy5.5/ CD38 PE-Cy7/ CD19 APC/ CD20 APC-Cy7. За първично отдиференциране и добиване само на представляващи интерес цели нуклеарни клетки в пробите, съдържащи МРБ-популацията, се използват разсейващи светлината свойства на клетките (ПРС/CPC) и специфично витално оцветяване за ДНК и РНК – SYTO41, конюгирано с Pacific Blue – флуорохром. SYTO 41 се добавя към пробата непосредствено преди отчитането й, за да се изключат остатъчните безядрени клетки- еритроцити, тромбоцити, или артефакти. Всички преби са обработени в рамките на 24 до 48 часа след взимане на материала. При диагноза и на ден 8-ми се събират общо 100 000 SYTO41+ събития. На ден 15, за да бъде постигната чувствителност от поне 1×10^{-4} добивът е увеличен до 300 000 SYTO41+ събития, а на ден 33 - един милион SYTO41+ събития. При всяко изследване се извършва текущ контрол на показателите за моментното състояние на апаратата.

2.1. Нови аспекти на имунологичния мониторинг на МРБ

Групите моноклонални антитела, които са използвани за създаване на комбинация с 14 оцветявания, са изведени по литературни данни от мащабни предходящи проучвания, както и на база дългогодишния опит с 8-цветна ФЦМ. По-ранните проучвания предполагат, че CD73 има прогностична стойност при детската ОЛЛ. Смята се, че това е свързано с ефекта на 6-

меркатопурина. Настоящи детайлни проучвания обаче показват, че дългосрочният EFS не зависи от нивото на експресия на CD73. CD45 е ключов панлевкоцитен маркер с различни нива на експресия върху лимфоцити, моноцити, неутрофили и предшественици. CD44 се експресира изключително върху бласти (+++). CD86 може да свързва отрицателно регулиращата молекула CTLA4 и така води до активиране на Т-клетъчния отговор или анергия. CD99 е маркер, използван в диагностиката на MRD T-ALL. Представлява повърхностноклетъчен антиген върху повечето нормални човешки лимфоцити с подчертано по-висока експресия при В-прекурсорите. Малигнените лимфобласти пре-В-ОЛЛ, за разлика от зряла В-ОЛЛ, имат висока експресия на CD99. Поради това включването на CD99 в панелите за МП ФЦМ подпомага проследяването на МРБ във времевите интервали без регенерация на нормални лимфоцити. Нормалните периферни Т-лимфоцити показват ниска експресия на CD99. Ролята на CD58 е обусловена от факта, че се експресира в над 99% от В-ОЛЛ. Тя се запазва стабилна и не се подлага на значима терапевтична модулация. Поради това CD58 е важен маркер в комбинациите от антитела при флуоцитометричното определяне на МРБ при В-ОЛЛ, особено в етапите на масивна регенерация на нормални млади В-лимфоцити. CD123 се експресира рано върху хемопоетичните предшественици. CD123 присъства в различните етапи при остри лимфобластни или миелоидни левкемии и по този начин се счита за добър кандидат за таргетна терапия. CD34 е маркер за незрелост на клетките. Спомага за идентификацията на плурипотентните хемопоетични стволови клетки. CD10 е ектопептидаза, присъстваща върху нормални зрели неутрофили и В-лимфоцити, рано по време на тяхното съзряване, както и абакантно при левкемичните бласти. Основен маркер в

диагностиката на ОЛЛ е CD19, пан-В антиген. Появява се много рано и остава на клетъчната повърхност през целия живот на В-лимфоцита. CD22 действа като регулатор на активацията на В-клетките. CD20 е интегрална трансмембрана молекула, експресира се на по-късен етап от зреенето на В-клетките и остава върху тях до превъръщането им в плазматични клетки. CD38 се открива върху активирани Т-клетки, както и върху бласти от всякакъв вид левкемия. Некласифицирани ОЛЛ и фенотипно незрели ОЛЛ често експресират CD13 и CD33, понякога и CD14. CD13 и/или CD33 са свързани в значителен процент от случаите с наличието на хромозомната аномалия t (9;22).

Таблица 2. Примерен 14-цветен панел за извършване на ФЦМ от „ново поколение“

14-ЦВЕТЕН ПАНЕЛ ЗА МП ФЦМ		
Флуорохром	Антитяло	Клон
Виолетов лазер 405 nm		
BV421	CD73	AD2
BV480	CD45	2D1
BV605	CD13+33	
BV650	CD44	L178
BV711	CD86	2331 (FUN-1)
BV768	CD99	Tü12
Син лазер 488 nm		
FITC	CD58	1C3
PE	CD123	9F5
PE-CF594	CD34	8G12
PERCP-CY5.5	CD10	HI10A
PE-CY7	CD19	SJ25C1
Червен лазер 635 nm		
APC	CD22	S-HCL-1
APC-R700	CD38	HB7
APC-H7	CD20	2H7

3. Резултати и обсъждане

Установиха се следните данни: Средният левкоцитен брой на ден 0 за изследваната група пациенти е $80.74 \times 10^9/l$. Левкоцити под $<20 \times 10^9/l$ са установени при 39 от децата (61,9%). При 24 деца левкоцитите надвишават $20 \times 10^9/l$ (38,1%). ХСМ се наблюдава при 59 от случаите (93,7%), медиастинално ангажиране при 3 (4,8%), а ЦНС-ангажиране – при 6 случая (9,5%). Ремисия на ден 33 се наблюдава при 57 деца (90,5%). Според настоящия лечебен

протокол (ALL IC-BFM-тип) първоначалната редукция на бластите в костния мозък се оценява на 15-ия ден от стартиране на терапията. Флуоцитометричните резултати за МРБ могат да категоризират пациентите в 3 рискови групи: с нисък риск (бласти <0.1%), със среден риск (бласти >0.1% и под 10%) и високорискови (бласти >10%). Комбинация от оценката на отговора към терапия в периферна кръв на ден 8, в костен мозък на ден 15 и в костен мозък на ден 33 може да осигури правилен подход за регулиране на интензитета на лечението. Разпределението на флуоцитометричните резултати от ден 15 е както следва: високорискови са 27% от случаите, със среден риск са 44% и с нисък риск - 29%. На ден 33 < 0,1% бласти се установяват при 67% от децата, > 0,1% при 24% и напълно липсват при 9%. Тези резултати определят следното клинично разпределение на пациентите: високорискови са 29%, със стандартен риск са 17% и с интермедиерен риск са 54%.

Анализираните показатели са включени в голяма част от съвременните проучвания върху МРБ [26-28]. Повечето автори анализират взаимовръзките между МРБ в КМ на ден 15 и последващите контроли (ден 33 и след това) с отношението им към прогнозата. Динамиката на бластната популация, проследена в нашето проучването, показва сходна тенденция [29-31]. През 2019г. Tembhare и сътр. публикуват данни от най-обширното проучване по темата до момента, което демонстрира прилагането на високочувствителен ФЦМ-МРБ тест при В-ОЛЛ. Авторите установяват лесно възпроизведим 10-цветен ФЦ-МРБ панел с висока чувствителност от 0,0002% или 2 резидуални клетки на 1×10^6 клетки. Панелът позволява откриване на ниски стойности на МРБ в проби, които биха могли да бъдат отчетени като отрицателни чрез стандартна флуоцитометрия [32].

4. Заключение

Изследването на МРБ по време на индукционното лечение чрез стандартизирана 8-цветна ФЦМ подпомага мониторинга на заболяването, което води до по-добри терапевтични резултати. Включването на 14-цветна МП ФЦМ може значително да подобри изследването на МРБ, а оттук и прогнозата на пациентите с ОЛЛ.

Благодарности

Извършените изследвания са подпомогнати от вътрешуниверситетски проект на МУ-Пловдив ДПДП-03/2020 г. „Разработване и въвеждане на многопараметърна проточна цитометрия с мултидименсионален компютърен анализ за изследване на минимална резидуална болест при детски остри лимфобластни левкемии“ и проект „Национален Университетски комплекс за биомедицински приложни изследвания, обвързан с участие в BBMRI-ERIC“ (НУКБПИ-BBMRI.BG), Договори D01-285/17.12.2019 и D01-395/18.12.2020, в рамките на Националната пътна карта на научна инфраструктура (2020-2027).

Литература

1. Tomasz Szczepanski M, Marja J. Willemse, Willem A. Kamps, Elisabeth R. van Wering, Anton W. Langerak, and Jacques J.M. van Dongen. Molecular discrimination between relapsed and secondary acute lymphoblastic leukemia proposal for an easy strategy. Medical and Pediatric Oncology. 2001;36:352-358.
2. Rosenberg AS, Brunson A, Paulus JK, Tuscano J, Wun T, Keegan THM, et al. Secondary acute lymphoblastic leukemia is a distinct clinical entity with prognostic significance. Blood Cancer Journal. 2017;7(9):e605.
3. Hourigan CS, Gale RP, Gormley NJ, Ossenkoppele GJ, Walter RB. Measurable residual disease testing in acute myeloid leukaemia. Leukemia. 2017;31(7):1482-1490.

4. Smith BD, Roberts AW, Roboz GJ, DeWitte M, Ferguson A, Garrett L, et al. Minimal Residual Disease (MRD) As Exploratory Endpoint in a Phase 1 Study of the Anti-CD123 Mab CSL362 Given As Post-Remission Therapy in Adult Acute Myeloid Leukemia (AML). *Blood*. 2015;126(23):3819.
5. Prebet T, Bertoli S, Delaunay J, Pigneux A, Delabesse E, Mozziconacci MJ, et al. Anthracycline dose intensification improves molecular response and outcome of patients treated for core binding factor acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2014;99(10):e185-e187.
6. Lambert J, Lambert J, Nibourel O, Pautas C, Hayette S, Cayuela J-M, et al. MRD assessed by WT1 and NPM1 transcript levels identifies distinct outcomes in AML patients and is influenced by gemtuzumab ozogamicin. *Oncotarget*. 2014;5(15):6280-6288.
7. Cavé H, van der Werff ten Bosch J, Suciu S, Guidal C, Waterkeyn C, Otten J, et al. Clinical Significance of Minimal Residual Disease in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 1998;339(9):591-598.
8. Coustan-Smith E, Behm FG, Sanchez J, Boyett JM, Hancock ML, Raimondi SC, et al. Immunological detection of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet*. 1998;351(9102):550-554.
9. van Dongen JJM, Seriu T, Panzer-Grümayer ER, Biondi A, Pongers-Willemse MJ, Corral L, et al. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *The Lancet*. 1998;352(9142):1731-1738.
10. Brüggemann M, Kotrova M. Minimal residual disease in adult ALL: technical aspects and implications for correct clinical interpretation. *Hematology*. 2017;2017(1):13-21.
11. Rolf N, Smolen KK, Kariminia A, Velenosi A, Fidanza M, Strahlendorf C, et al. Absolute lymphocyte counts at end of induction correlate with distinct immune cell compartments in pediatric B cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Immunol Immunother*. 2018;67(2):225-236.
12. Chen X, Wood BL. Monitoring minimal residual disease in acute leukemia: Technical challenges and interpretive complexities. *Blood Reviews*. 2017;31(2):63-75.
13. Dworzak MN, Gaipa G, Ratei R, Veltroni M, Schumich A, Maglia O, et al. Standardization of flow cytometric minimal residual disease evaluation in acute lymphoblastic leukemia: Multicentric assessment is feasible. *Cytometry B Clin Cytom*. 2008;74(6):331-340.
14. Wood BL. Principles of minimal residual disease detection for hematopoietic neoplasms by flow cytometry. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*. 2016;90(1):47-53.
15. Teachey DT, Hunger SP. Predicting relapse risk in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology*. 2013;162(5):606-620.
16. Fossat C, Roussel M, Arnoux I, Asnafi V, Brouzes C, Garnache-Ottou F, et al. Methodological aspects of minimal residual disease assessment by flow cytometry in acute lymphoblastic leukemia: A french multicenter study. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*. 2015;88(1):21-29.
17. Sarmiento Palao H TF, Martirena F, Barragan E, Such E, Sempere A, et al. . A reproducible strategy for analysis of minimal residual disease measured by standardized multiparametric flow cytometry in b acute lymphoblastic leukemia. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 2019;96:12-15.
18. Irving J, Jesson J, Virgo P, Case M, Minto L, Eyre L, et al. Establishment and validation of a standard protocol for the detection of minimal residual disease in B lineage childhood acute lymphoblastic leukemia by flow cytometry in a multi-center setting. *Haematologica*. 2009;94(6):870-874.
19. Garand R, Beldjord K, Cavé H, Fossat C, Arnoux I, Asnafi V, et al. Flow cytometry and Ig/TCR quantitative PCR for minimal residual disease quantitation in acute lymphoblastic leukemia: a French multicenter prospective

- study on behalf of the FRALLE, EORTC and GRAALL. *Leukemia*. 2013;27(2):370-376.
20. Thörn I, Forestier E, Botling J, Thuresson B, Wasslavik C, Björklund E, et al. Minimal residual disease assessment in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a Swedish multi-centre study comparing real-time polymerase chain reaction and multicolour flow cytometry. *British Journal of Haematology*. 2011;152(6):743-753.
 21. Gaipa G, Cazzaniga G, Valsecchi MG, Panzer-Grumayer R, Buldini B, Silvestri D, et al. Time point-dependent concordance of flow cytometry and real-time quantitative polymerase chain reaction for minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2012;97(10):1582-1593.
 22. Theunissen P, Mejstrikova E, Sedek L, van der Sluijs-Gelling AJ, Gaipa G, Bartels M, et al. Standardized flow cytometry for highly sensitive MRD measurements in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2017;129(3):347-357.
 23. Borowitz MJ, Pullen DJ, Winick N, Martin PL, Bowman WP, Camitta B. Comparison of diagnostic and relapse flow cytometry phenotypes in childhood acute lymphoblastic leukemia: Implications for residual disease detection: A report from the children's oncology group. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*. 2005;68B(1):18-24.
 24. Aghaeepour N, Nikolic R, Hoos HH, Brinkman RR. Rapid cell population identification in flow cytometry data. *Cytometry Part A*. 2011;79A(1):6-13.
 25. Qian Y, Wei C, Eun-Hyung Lee F, Campbell J, Halliley J, Lee JA, et al. Elucidation of seventeen human peripheral blood B-cell subsets and quantification of the tetanus response using a density-based method for the automated identification of cell populations in multidimensional flow cytometry data. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*. 2010;78(1):69-82.
 26. Béné MC, Kaeda JS. How and why minimal residual disease studies are necessary in leukemia: a review from WP10 and WP12 of the European LeukaemiaNet. *Haematologica* 2009; 94 (8): 1135-1150.
 27. Campana D. Minimal residual disease monitoring in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Curr Opin Hematol*. 2012; 19(4):313-8
 28. Gaipa G, et al. Prednisone induces immunophenotypic modulation of CD10 and CD34 in non-apoptotic B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia cells. *Cytometry B Clin Cytom*. 2008; 74, 150-155.
 29. Coustan-Smith E, Sancho J, Behm F, Hancock M, Razzouk B, et al. Prognostic importance of measuring early clearance of leukemic cells by flow cytometry in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002; 100: 52-58.
 30. Dworzak MN, Fröschl G, Printz D, Mann G, Pötschger U, Mühlbacher N, Fritsch G, Gadner H. Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002; 99 (6): 1952-8.
 31. Dworzak MN, Gaipa G, Schumich A, Maglia O, Ratei R, et al. Modulation of antigen expression in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia during induction therapy is partly transient: Evidence for a drug-induced regulatory phenomenon. Results of the AIEOP-BFM-ALL-FLOW-MRD-Study Group. *Cytometry Part B* 2010; 78 B: 147-153.
 32. Tembhare PR, Subramanian Pg PG, Ghogale S, Chatterjee G, Patkar NV, Gupta A, et al. A High-Sensitivity 10-Color Flow Cytometric Minimal Residual Disease Assay in B-Lymphoblastic Leukemia/Lymphoma Can Easily Achieve the Sensitivity of 2-in-10(6) and Is Superior to Standard Minimal Residual Disease Assay: A Study of 622 Patients. *Cytometry B Clin Cytom*. 2020;98(1):57-67.

СЪВРЕМЕНЕН МИКРОБИОЛОГИЧЕН И МОЛЕКУЛНО-БИОЛОГИЧЕН СКРИНИНГ НА ГЕНИТАЛНИ ИНФЕКЦИИ ПРИ СИМПТОМАТИЧНИ НЕБРЕМЕННИ ЖЕНИ

ЕЛИ ХРИСТОЗОВА¹, ЗОЯ РАЧКОВСКА², ТИХОМИР ДЕРМЕНДЖИЕВ³,
МАРИАНА МУРДЖЕВА⁴, ВИДА ГЕОРГИЕВА⁵, ЕКАТЕРИНА УЧИКОВА⁶,
КОСТАДИН КОСТАДИНОВ⁷

*Катедра по микробиология и имунология, Фармацевтичен факултет, МУ-Пловдив,
бул. „Васил Априлов“ 15A, 4002 гр. Пловдив, България^{1,2,3}*

*Научно-изследователски институт на МУ-Пловдив, бул. „Васил Априлов“ 15A, 4002
гр. Пловдив, България⁴*

*Лаборатория по микробиология, УМБАЛ „Св. Георги“-Пловдив, бул. „Васил
Априлов“ 15A, 4002 гр. Пловдив, България⁵*

*Катедра по акушерство и гинекология, МУ-Пловдив бул. „Пещерско шосе“ 66, 4001
гр. Пловдив, България⁶*

*Катедра по социална медицина и обществено здраве, Факултет по обществено
здраве, МУ-Пловдив, бул. „Васил Априлов“ 15A, 4002
гр. Пловдив, България⁷*

*eli.hristozova@mu-plovdiv.bg¹, zoya.rachkovska@mu-plovdiv.bg², tihomir.dermendzhiev@mu-plovdiv.bg³,
mariana.murdjeva@mu-plovdiv.bg⁴, vida_georgieva@abv.bg⁵, ekaterina.uchikova@mu-plovdiv.bg⁶,
kostadin.kostadinov@mu-plovdiv.bg⁷*

Резюме: Цел: Да се направи количествена и качествена оценка на гениталния микробиом с RT-PCR и конвенционални методи и съпостави обективната находка с клинико-лабораторната диагноза.

Задачи: Анализ на гениталния микробиом чрез апробиране на комбинация от съвременни молекулно-биологични и конвенционални методи.

Материали и методи: Изследвани са вагинални и цервикални секрети от 60 небременни симптоматични жени. Използвани са микроскопски и културелни методи за количествена оценка на растежните характеристики на изолираните микроорганизми, RT-PCR Femoflor Screen® и автоматизирана система за идентификация MALDI-TOF MS. Получените количествени и качествени данни са анализирани чрез теста Хи-квадрат (Chi-square test) за установяване на асоциация и тест на Фишер (Fisher's exact test) за съпоставка на пропорции.

Резултати: Изследваните 60 жени са разделни и оценени в две възрастови групи – до 30- и над 30-годишна възраст. Количествените обективни находки на лактобацилите, определени чрез RT-PCR в микробно число са квалифицирани като абсолютна нормоценоза, умерена и тежка дисбиоза. Използвани са 5 параметра на клинико-лабораторна диагноза – цитолитичен вагинит, вагинална лактобацилоза, аеробен вагинит, вулво-вагинална кандидоза и бактериална вагиноза. 62.5% от пациентките до 30 г. са с тежка дисбиоза, докато тези над 30 г. са с умерена дисбиоза – 63.2% и нормоценоза – 56.7%. Водеща причина за тежка дисбиоза е бактериалната вагиноза – 57.1%. Установена е зависимост между обективната умерена и тежка дисбиоза и клинико-лабораторна диагноза (OR 5,24, 95% CI 1,06-28,7, p=0.04).

Заключение: Комбинацията от използваните микробиологични и молекулно-биологични методи за скрининг на генитални инфекции разширява познанието за ролята на микробиома за гениталното здраве и налага необходимостта от въвеждането им в рутинната практика.

Ключови думи: генитален микробиом, RT-PCR, скрининг, небременни жени

MODERN MICROBIOLOGICAL AND MOLECULAR-BIOLOGICAL SCREENING OF GENITAL INFECTIONS IN SYMPTOMATIC NON-PREGNANT WOMEN

ELI HRISTOZOVA¹, ZOYA RACHKOVSKA², TIHOMIR DERMENDZHIEV³,
MARIANNA MURDJEVA⁴, VIDA GEORGIEVA⁵, EKATERINA UCHIKOVA⁶,
KOSTADIN KOSTADINOV⁷

*Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Pharmacy, MU-Plovdiv, 15A
Vasil Aprilov Blvd., 4002 Plovdiv, Bulgaria^{1,2,3}*

Research Institute at MU-Plovdiv, 15A, Vasil Aprilov Blvd., 4002 Plovdiv, Bulgaria⁴

*Laboratory of Microbiology, University hospital "St. George"-Plovdiv, 15A, Vasil Aprilov
Blvd., 4002 Plovdiv, Bulgaria⁵*

*Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, MU-Plovdiv, 66,
Peshtersko shose, 4001, Plovdiv, Bulgaria⁶*

*Department of Social Medicine and Public Health, Faculty of Public Health, MU-Plovdiv,
15A Vasil Aprilov Blvd., 4002 Plovdiv, Bulgaria⁷*

*eli.hristozova@mu-plovdiv.bg¹, zoya.rachkovska@mu-plovdiv.bg², tihomir.dermendzhiev@mu-plovdiv.bg³,
mariana.murdjeva@mu-plovdiv.bg⁴, vida_georgieva@abv.bg⁵, ekaterina.uchikova@mu-plovdiv.bg⁶,
kostadin.kostadinov@mu-plovdiv.bg⁷*

Abstract: Aim: To perform a quantitative and qualitative assessment of the genital microbiome using RT-PCR and conventional methods and to compare the findings with the clinical and laboratory diagnosis.

Objectives: Analysis of the genital microbiome by testing a combination of modern molecular biological and conventional methods.

Materials and methods: The study included 60 vaginal and cervical swabs from non-pregnant symptomatic women. Microscopic and cultural methods were used to quantify the growth characteristics of the isolated microorganisms in addition to RT-PCR Femoflor Screen® and an automated identification system MALDI-TOF MS. The obtained quantitative and qualitative data were analyzed by the Chi-square test for association and the Fisher's exact test for comparison of proportions.

Results: The studied 60 women were evaluated in two age groups - up to 30 and over 30 years of age. Quantitative objective findings of lactobacilli determined by RT-PCR in microbial count are classified as absolute normocenosis, moderate and severe dysbiosis. 5 parameters of clinical and laboratory diagnosis were used - cytolytic vaginitis, vaginal lactobacillus, aerobic vaginitis, vulvo-vaginal candidiasis and bacterial vaginosis. 62.5% of patients under 30 years of age have severe dysbiosis, while those over 30 years of age have moderate dysbiosis - 63.2% and normocenosis - 56.7%. The leading cause of severe dysbiosis is bacterial vaginosis - 57.1%. A relationship was found between objective moderate and severe dysbiosis and clinical and laboratory diagnosis (OR 5.24, 95% CI 1.06-28.7, p = 0.04).

Conclusion: The combination of the used microbiological and molecular-biological methods for screening for genital infections expands the knowledge about the role of the microbiome for genital health and imposes the need for their introduction into routine practice.

Key words: genital microbiome, RT-PCR, screening, non-pregnant women.

1. Въведение

Човешкото тяло е своеобразен дом за различни микробни съобщества от коменсални, симбиотични и патогенни микроорганизми, обобщени като микробиом, който обитава кожата и лигавиците и често бива подложен на въздействията на околната среда [1]. Гениталният микробиом включва всички микробни видове, намиращи се върху

вагиналния епител. Този биотоп има важно значение за сексуалното здраве, метаболитната хомеостаза, репродуктивните способности, локалния имунитет и защитата от патогенни микроорганизми [2]. Нарушаването на микробиома, наречено дисбиоза, е клиничен синдром с полимикробна етиология, резултат от динамичните взаимоотношения между микроорганизмите и е свързано с висок риск от

урогенитални инфекции и репродуктивни нарушения. Оценката на състоянието на гениталния микробиом се базира на следните основни индикатори: количество на лактобацили, количество на опортунистични микроорганизми и съотношението между тях, както и от наличието на патогенни микроорганизми в изследвания материал [3].

Целта на настоящето проучване е да се направи количествена и качествена оценка на гениталния микробиом на симптоматични небременни жени с помощта на RT-PCR и конвенционални методи и да се съпостави обективната находка с резултатите от клиниколабораторната диагноза.

2. Материали и методи

Изследвани са вагинални и цервикални секрети от 60 небременни симптоматични жени. В проучването са включвани пациентки с един или повече клинични симптоми като влагалищен флуор, пруритус, диспареуния, дизурия, цервикален флуор, хиперемия на цервика, оток на цервикса, веруказни образувания и болка в хипогастроума. Изследването се провежда 24-48 часа след колпоскопия, интравагинална сонография, 2 седмици след прием на антибиотици, про- или евубиотици, 24-72 часа след прием на PCR-инхибитори (ултразвуков гел, хепарин, хлорхексидин), 48-72 часа след непротектиран и 24 часа след протектиран полов контакт. Вагиналните секрети се взимат от задна или задно-латерална стена на влагалището, а ендоцервикалните - от дълбочина 1,5-2 см. За PCR диагностика се използват сухи тампони в стерилни контейнери или течна транспортна среда на Амиес. За културелно изследване се използва вагинален и цервикален секрет, транспортиран в среда Амиес или Стюарт с гел. В допълнение, две предметни стъклa с натривки от влагалището за директна микроскопия са използвани за оценка на гениталната микрофлора по количествени методи. Материалите се доставят в лабораторията до 24 ч от взимането им.

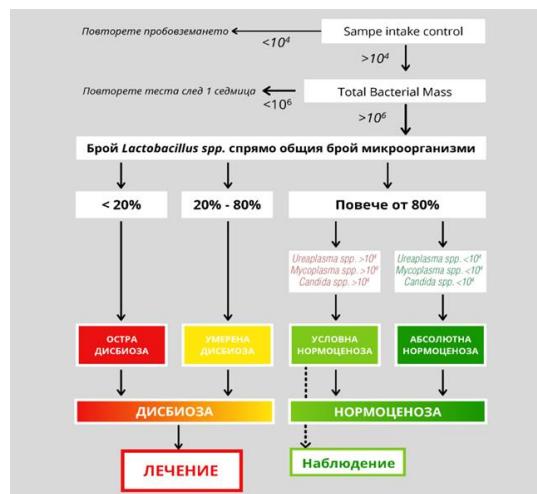
Лабораторните техники за оценка на гениталния микробиом от влагалищен и цервикален секрет включват директна микроскопия, култивиране на хранителни среди и молекулярни методи, базирани на полимеразна верижна реакция.

Чрез директна микроскопия на влагалищни натривки, оцветени по Грам и с метиленово синьо по Лъофлер, се извършва количествена оценка по оригинална скорова

система на Nugent [4,5] за бактериална вагиноза (БВ) и адаптирана система по Donders [6-8] за аеробен вагинит (АВ). За доказване на цитолитична вагиноза (ЦВ) и влагалищна лактобацилоза (ВЛБ) се използват критериите на Cibley&Cibley и на Horowitz [9,10]. За диагностика на атрофичен вагинит (АТВ) служат клинични, патоморфологични и микробиологични критерии и показатели [11]. За диагностика на вагинална кандидоза (ВК) се използва комплексна точкова клинико-микробиологична система [12].

За първична изолация и презумптивна идентификация на аеробни и факултативно-анаеробни микроорганизми се използва 5% кръвенagar с овнешка кръв (Diamed (BD), EMB agar (Diamed (BD), CHROMagar *Candida* (Liofilchem, Italy) и тиогликолатна среда (BulBio-НЦЗПБ, София). Автоматизираната система MALDI-TOF MS извършва високоскоростна идентификация на протеомни отпечатъци на над 2000 вида Грам-положителни и Грам-отрицателни бактерии и гъбички.

С помощта на RT-PCR Femoflor Screen® се извърши количествен и качествен анализ на микробните общества в долните отдели на гениталния тракт на пациентките. Методът предлага контрол за количеството взет материал, общ брой бактерии, общ брой лактобацили, анаеробни микроорганизми (*Prevotella bivia*, *Prophyromonas spp*, *Gardnerella vaginalis*, доказване на 4 вида микоплазми (*U. urealyticum*, *U. parvum*, *M. hominis*, *M. genitalium*), на гъбички от род *Candida* и облигатни патогени (*T. vaginalis*, *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *H. simplex virus 1,2* и *Cytomegalovirus*).

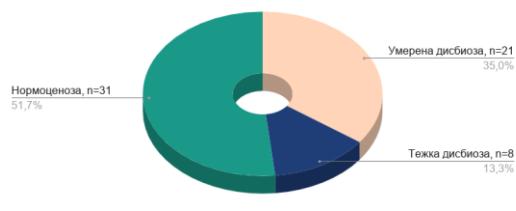


Фиг. 1. Алгоритъм за интерпретация на резултатите за състоянието на гениталния микробиом при изследваните пациентки с помощта на RT-PCR Femoflor Screen®.

Статистически методи: Получените количествени и качествени данни са анализирани чрез теста Хи-квадрат (Chi-square test) за установяване на асоциация и тест на Фишер (Fisher's exact test) за съпоставка на пропорции. Използвана е също бинарна логистична регресия за определяне на съотношението на шансовете (OR) за установяване на умерена и тежка дисбиоза при всяка от изследваните клинико-лабораторни диагнози. Резултатите са обработени с помощта на специализиран статистически софтуер SPSS v.26.

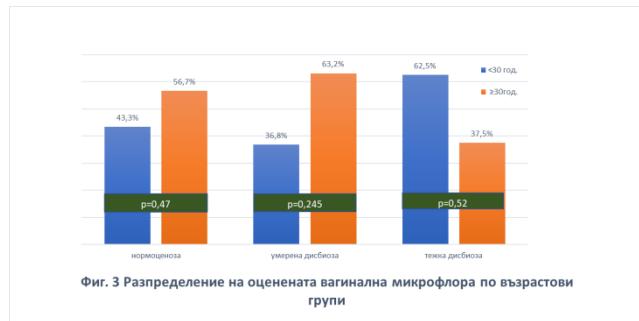
3. Резултати и обсъждане

Изследваните жени ($n=60$) са групирани и оценени в две възрастови групи: до 30-години ($n=26$) и над 30-години ($n=34$). Средната възраст на пациентките е 31.7 години. Количествените обективни находки на лактобацилите, определени чрез RT-PCR Femoflor Screen® в микробно число се квалифицират като абсолютна нормоценоза, умерена и тежка дисбиоза (Фиг.2). Случаите с нормоценоза са 31 (51.7%), а тези с умерена и тежка дисбиоза съставляват общо 29 (48.3%).



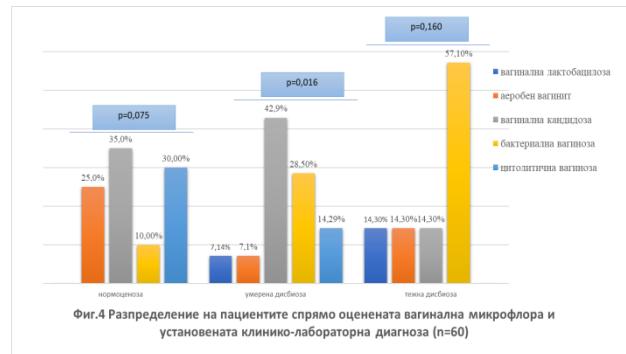
Фиг. 2 Разпределение на оценената вагинална микрофлора при изследваните жени ($n=60$)

Разпределението на случаите с нормоценоза, умерена и тежка дисбиоза по възрастови групи се вижда от Фигура 3.



При почти 2/3 от пациентките до 30 г. (62.5%) се открива тежка дисбиоза. Случаите с

нормоценоза във възрастовата група над 30 години (56.7%) са повече от тези във възрастовата група под 30 години (43.3%). Жените с умерена дисбиоза над 30 години са 63.2%, а тези до 30 години – 36.8%. Въпреки наблюдаваните различия, не се установява статистическа значима разлика между двете възрастови групи по отношение на качествено оценената вагинална микрофлора.



Фиг.4 Разпределение на пациентите спрямо оценената вагинална микрофлора и установената клинико-лабораторна диагноза ($n=60$)

В проведеното изследване са проучени 5 типа клинико-лабораторни диагнози, като израз на влагалищна абнормна патология – бактериална вагиноза, аеробен вагинит, вагинална кандидоза, цитолитична вагиноза и вагинална лактобацилоза (Фиг.4). Вагиналната кандидоза е водеща клинико-лабораторна форма при жени с нормоценоза (35%) и умерена дисбиоза (42.9%). Това се дължи на колонизацията на *Candida* в присъствие на все още голям брой лактобацили - над 80% за нормоценоза и между 20 и 80% за умерена дисбиоза, където се установява статистическа значимост ($\chi^2 = 11.78$; $df=4$; $p=0.04$). Наличието на *Candida* във влагалището, при отсъствие на имуносупресия или на увредена мукоза, обикновено не се проявява със субективни оплаквания и клинична симптоматика. Тези случаи трябва да се приемат за вагинална гъбична колонизация.

Според Sobel, за разлика от асимптоматичната колонизация, ВК се определя като сбор от субективни оплаквания и/или обективна клинична симптоматика, белези на възпаление на вулвовагиналните повърхности и наличие на *Candida spp.* във влагалищния секрет (ВС), при липса на друга причина за инфекциозна етиология. Това определение обаче не включва случаите със смесена ВИ и се отнася само за тези с ВК катоmonoинфекция [13-17].

Според някои изследователи до 50% от симптоматичните пациенти с позитивна култура за *Candida* имат отрицателна микроскопска находка, което прави използването на Femoflor Screen® необходимо [13,17].

При жените с тежко изразена дисбиоза водеща е бактериалната вагиноза (57.1%), причината за което е редуцираният (под 20%) брой на лактобацилите, съгласно интерпретацията на Femoflor Screen® софтуеър.

В допълнение се оцени и асоциацията между доказаната вагинална микрофлора и клинико-лабораторната диагноза. Бинарната логистична регресия установява сигнификатно по-висок шанс на пациентите с бактериална вагиноза за наличие на умерена и тежка дисбиоза ($OR=5,24$; 95% CI 1,06-28,70; $p=0,04$).

В настоящето проучване се използват класически и съвременни методи за идентификация на гениталния микробиом. Директната микроскопия е класически бърз метод, който определя състоянието на влагалищната микрофлора и възпалителната клетъчна реакция, но при него липсва качествена детерминация, има субективност и не разпознава малки по своя размер бактерии като хламидия, микоплазма, атопобиум. Културелните методи са „златен стандарт“ за изолиране и видово идентифициране, с възможност за определяне на антибиотична чувствителност, но при тях има субективност в интерпретацията, като влияние на транспорт и съхранение, времеемкост на отчитането (2-5 дни) и понякога наличието на трудно култивирами бактерии (анаероби, гонококи, микоплазма, хламидия), което затруднява обективната находка. PCR-базираните техники дават качествена оценка на всички налични микроорганизми в долния генитален тракт, количество и процент на лактобацилите, както и пропорцията между опортунистични микроорганизми към лактобацили за определяне степента на дисбиозата. За сметка на това, обаче тя не може да докаже наличието, респективно липсата на възпаление, вида и броя на клетките, участващи във възпалителната реакция и наличие или липса на атрофия на влагалищната лигавица, което е възможно само с

микроскопските техники. Комплексната оценка, прилагана в нашето проучване, използва силните страни на предложените методи, което в съчетание с опитната интерпретация на лабораторния персонал, прави уникално самото изследване.

4. Изводи

1. Преобладават случаите с нормоценоза при изследваните 60 пациентки.
2. Тежка дисбиоза се наблюдава при жени под 30 години.
3. При жени с нормоценоза и умерена дисбиоза се открива вагинална кандидоза.
4. Водеща причина за тежка дисбиоза е бактериалната вагиноза – 57.1%.
5. Проучването установява зависимост между обективната умерена и тежка дисбиоза и клинико-лабораторна диагноза ($OR = 5,24$, 95% CI 1,06-28,7, $p=0,04$).
6. Класическите и съвременните методи за скрининг на генитални инфекции взаимно се допълват поради недостатъците на всеки един от тях и необходимостта от комплексен подход в интерпретацията.

5. Заключение

Комплексното използване на микробиологични и молекулно-биологични методи за скрининг на генитални инфекции при жени разширява и обогатява познанията ни за гениталното здраве, както и за ролята на отделните представители на влагалищния и цервикалния микробиом в норма и патология. Това налага необходимостта от въвеждането на тези съвременни методи за цялостна оценка в рутинната диагностична практика и бъдещи проучвания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Marchesi JR, Ravel J, The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome*. 2015; (3):31.
2. Relman DA, The Human Microbiome and the Future Practice of Medicine, *JAMA*. 2015 Sep 5; 314(11):1127-8.
3. Atashili J., Poole C., Ndumbe P. M., et al, Bacterial vaginosis and HIV acquisition: a meta-analysis of published studies, *AIDS*, 2008; 22 (12):1493-501.

4. Nugent RD., et all, Reliability of Diagnosing Bacterial vaginosis is improved by a standardised method of Gram stain interpretation, *Journal of Clinical Microbiology*, 1991, 297-301.
5. Eriksson K., Bacterial Vaginosis: Diagnosis, Prevalence and Treatment. Linköping University Medical Dissertations No. 1246 Linköping, 2011.
6. Donders, GGG, Definition and classification of abnormal vaginal flora, *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 2007; 21(3):355–373.
7. Donders, GGG, G Bellen, D Rezeberga, Aerobic vaginitis in pregnancy, *BJOG*, 2011, 118(10):1163-70. doi:10.1111/j.1471-0528.2011.03020x www.bjog.org 16.
8. Donders G, Vereecken A, Bosmans E et. al, Definition of a type of abnormal vaginal flora that is distinct from bacterial vaginosis: aerobic vaginitis, *BJOG*, 2002, 109:34-43.
9. Cibley LJ, Cibley LJ, Cytolytic vaginosis, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 1991, 165:1245-49.
10. Horowitz BJ, Mardh PA, Nagy E, Rank EL, Vaginal lactobacillosis, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 1994, 170:857-61.
11. Lee,A, et all, Therapeutic Approaches to Atrophic Vaginitis in Postmenopausal Women: A Systematic Review with a Network Meta-analysis of Randomized Controlled Trials, *Journal of Menopausal Medicine*, 2018, 24(1): 1–10.
12. Dermendzhiev T. Studies on Etiology and Epidemiology of the Infectious Vaginitides and Vaginoses. Dissertation, 9173 MU-Plovdiv, 2015. [In Bulgarian]
13. Eckert LO, Hawes SE, Stevens, CE, Kontsky LA, Eschenbach DA, Holmes KK, Vulvovaginal candidiasis: clinical manifestations, risk factors, management algorithm, *Obstetrics and Gynecology*, 1998; 92(5):757-65.
14. Fidel PL, History and new insights into host defense against vaginal candidiasis, *Trends in Microbiology*, 2004, 12:220–227.
15. Achkar MJ, Fries BC, Candida infections of the genitourinary tract, *Clinical Microbiological reviews* April 2010; 23 (2):253-273.
16. Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK Jr, Calandra TF, Edwards JE Jr, Filler SG, Fisher JF, Kullberg BJ, Ostrosky-Zeichner L, Reboli AC, Rex JH, Walsh TJ, Sobel JD, Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America, *Clinical Infectious Diseases*, 48:503-535.
17. Sobel JD, Vulvovaginal candidosis, *Lancet* 2007, 369:1961-1971.

ОЦЕНКА НА ЕФЕКТИ НА ЙОНИЗИРАЩИ ЛЪЧЕНИЯ, ИЗПОЛЗВАНИ В ЛЪЧЕТЕРАПИЯТА, ЧРЕЗ АНАЛИЗ НА СТРУКТУРНИ ХРОМОЗОМНИ АБЕРАЦИИ

ЕКАТЕРИНА ЗАЙЦЕВА¹, МАРТА ДЕПЕРАС², ГЕННАДИЙ МИЦЫН³,
АЛЕКСАНДР МОЛОКАНОВ³, ВИКТОР ГАЕВСКИЙ³

¹Медицински Университет – Пловдив, Фармацевтичен факултет, катедра

„Медицинска физика и Биофизика”, Пловдив, България,

²Институт за майка и дете, Варшава, Полша,

³Обединен институт за ядрени изследвания, Лаборатория на ядрени проблеми,
Дубна, Русия.

Ekaterina.Zaytseva@mu-plovdiv.bg

Резюме: Надежден подход за оценка на въздействието на йонизиращ лъчение (високи и ниски дози) е количественият анализ на структурни хромозомни нарушения в кръвни Т-лимфоцити. Настоящата работа представя изследване върху нестабилни хромозомни аберации в човешки лимфоцити от клинично здрави доброволци след *in vitro* облъчване с γ -лъчи (^{60}Co) и с терапевтичен поток протони с изходна енергия 170 MeV и в областта на пик на Брег. Облъчванията отговарят на погълнатата доза в диапазон 1-5 Gy. Резултатите свидетелстват, че броят на аберантните клетки нараства линейно с увеличаване на дозата йонизиращо лъчение, докато общият брой аберации нараства в степенна зависимост. Относителната биологична ефективност на протони с енергия 170 MeV е 1, на протони в областта на пик на Брег – 1,2. Радиочувствителността на клетките от различни донори е индивидуално вариабилна. Радиочувствителността на клетките от един донор към въздействие с фотонно и корпусуларно йонизиращо лъчение е различна.

Ключови думи: γ -лъчи, протони, човешки лимфоцити, структурни хромозомни аберации.

EVALUATION OF THE EFFECTS OF IONIZING RADIATION USED IN RADIOTHERAPY BY ANALYSIS OF STRUCTURAL CHROMOSOMAL ABERRATIONS

EKATERINA ZAYTSEVA¹, MARTA DEPERAS², GENNADY MITSYN³,
ALEXANDR MOLOKANOV³, VICTOR GAEVSKY³

¹Medical University - Plovdiv, Faculty of Pharmacy, Department of Medical Physics and Biophysics.

²Institute of Mother and Child, Warsaw, Poland.

³Joint Institute for Nuclear Research, Dubna, Russia.

Ekaterina.Zaytseva@mu-plovdiv.bg

Abstract: A reliable approach to assess the impact of ionizing radiation (high and low doses) is the quantitative analysis of structural chromosomal abnormalities in blood T-lymphocytes. The present work presents a study on unstable chromosomal aberrations in human lymphocytes from clinically healthy volunteers after *in vitro* irradiation with γ -rays (^{60}Co) and with a therapeutic proton beam with an output energy of 170 MeV and in the Bragg peak region. The irradiations correspond to the absorbed dose in the range of 1-5 Gy. The results show that the number of aberrant cells increases linearly with increasing dose of ionizing radiation, while the total number of aberrations increases according to degree dependence. The relative biological efficiency of protons with energy 170 MeV is 1, of protons in the Bragg peak region - 1.2. The radiosensitivity of cells from different donors

is individually variable. The radiosensitivity of cells from one donor to exposure to photonic and corpuscular ionizing radiation is different.

Key words: γ -rays, protons, lymphocytes, structural chromosomal aberrations.

1. Въведение

Човешкият организъм е непрекъснато изложен на въздействието на йонизиращи лъчение. Естественият радиационен фон в различните географски региони варира. На територията на България той е незначителен, средно 0,06 - 0,40 $\mu\text{Sv}\cdot\text{h}$. Но за последните десетилетия рязко се увеличило използването на изкуствени източници на йонизиращи лъчения и дозите от техногенните източници може да превишават тези от естествено облучване стотици, дори хиляди пъти. Най-значимият принос към това имат някои медицински процедури: рентгенова диагностика и методи на ядрената медицина (въвеждане на радиофармацевтични препарати, както с лечебни, так и с диагностични цели) и лъчетерапия - средно до 30% от общата доза получена годишно.

Големината на радиобиологичния ефект зависи от вида и физиологичното състояние на облучените клетки и тъкани.

Йонизирайки директно и/или индиректно, йонизиращите лъчения причиняват нарушаване целостта на веригите в макромолекулите. Известно е, че ДНК е най-радиочувствителната структура на клетката. Йонизиращите лъчения причиняват „комплексни“ увреждания – в една клетка може да бъдат индуцирани едно или няколко такива увреждания като: двойни разкъсвания на ДНК-верига, единични разкъсвания на ДНК, увреждания на нуклеотиди или бази. Репарационната система на клетката (специфична ферментативна система) се стреми да възстанови структурата на ДНК молекулата (нарушена по време на нормална биосинтеза на ДНК или в резултат на излагане на физически или химически фактори) [1]. Този процес обаче не винаги приключва успешно – нерепарирано двойноверижно разкъсване е причина за отделяне на част от основната ДНК молекула и образуване на фрагмент. Грешно свързване на двуверижни разкъсвания е причина за появя на обменни хромозомни аберации [2, 3, 4]. Видимата под микроскоп част от широк спектър на ДНК-промени, генериирани от различни репарационни механизми на двойно-верижни разкъсвания в ДНК, се наричат структурни хромозомни аберации (нестабилни).

Увеличението на честотата на структурните аберации, показано в многообразни проучвания на въздействие на различни вредни фактори (радиация, химични агенти), ни позволява да ги разглеждаме като възможен маркер за оценката на здравословното състояние на хората в екологично неблагоприятни условия [5, 6].

Тест-системата за цитогенетичен анализ на човешки хромозоми в лимфоцити от периферна кръв се препоръчва от Международната агенция по ядрена енергия (IAEA) за индивидуална оценка на пораженията, предизвикани от йонизиращо лъчение (в дози 0,2-20 Gy) която може да се прилага като допълнителен метод към физическата дозиметрия или когато последната не може да се изпълнява [7]. Изследването на биомаркери за увреждане на хромозомите е важно, тъй като за разлика от физическото измерване на дозата, се вземат предвид и индивидуалните вариации в чувствителността.

Същевременно, въпросът на нормирането на лъчевото натоварване на пациентите по време на провеждане на лъчетерапия остава много актуален. Целта на представеното изследване е количествен и качествен анализ на структурни хромозомни аберации в човешки лимфоцити индуцирани *in vitro* от гама-лъчи ^{60}Co и от протони с различна енергия (и LPE) – изходна и в областта на Брег-пик.

2. Материал и методи

В експериментите бе използвана кръв от 12 здрави доброволци (мъже и жени) на възраст 25-45 години.

Пробите, поставени в пластмасови епруветки ($d \sim 2\text{cm}$), бяха облучени в дозовия диапазон от 1 Gy до 5 Gy. Гама-облучването (^{60}Co) на лимфоцитите беше извършено на апарат за дистанционна лъчева терапия ROKUS-M, при мощност на дозата 0,9 Gy/min. Облучването с протони беше проведено на терапевтичен протонен поток в медико-технически комплекс, разработващ методология за лъчева терапия на пациенти (Лаборатория по ядрени проблеми, Обединен институт за ядрени изследвания, Дубна, Русия). Протонният поток се формира в резултат на забавяне на 660 MeV протони, генериирани от ускорителя във въглеродни блокове до средна енергия от 170

MeV [8, 9]. Размерът на полето е 7×7 см (при 90% изодоза). Средната стойност на линейното предаване на енергия (LET) е 0.49 keV / μm , а мощността на дозата - 0.7 Gy / min.

При забавяне и намаляване на движението и намаляване на остатъчната енергия на частиците се увеличава йонизационната плътност, тя е максимална в края на пробега – пик на Брег. Разпределението на енергията на забавени протони в областта на пика на Брег е спектър до ~ 100 keV / μm , като процентен принос към погълнатата доза за частици с нисък LET - 67%, със среден LET (25-50 keV / μm) - 23% и с висок LET (50-100 keV / μm) - 10%. Мощност на доза на протони в област на Брег-пик беше 1,3 Gy / min.

Обълчените кръвни пробы (0,5 ml) се прехвърлят в епруетки с 4,5 ml хранителна среда. За стимулиране на деленето на лимфоцитите към средата се добавят 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ фитохемаглутинин (РНА-М) [10]. Клетките бяха фиксираны с метанол и оцетна киселина (3:1) 48-50 часа след обльчването[11]. По време на култивирането се добавя бромодезоксиуридин ($20\mu\text{M}$ BrdU), необходимо за последващо оцветяване на хромозомите по FPG-метод [12]. Два часа преди фиксирането на клетките, към супензията се добавя 0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ колцемид.

За анализ на G₂-радиочувствителност, стимулираните за деление лимфоцити бяха обльчвани 2 часа преди фиксацията [13]. Освен това, за изследване по метода РСС (premature chromosome condensation assay), в някои от

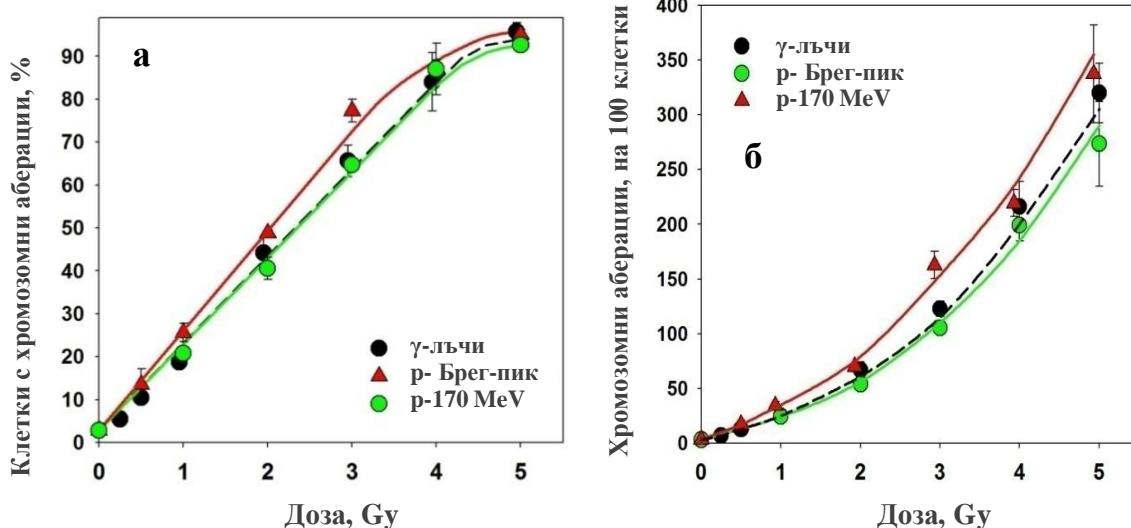
пробите бе добавян каликулин-А (50 μM) 1,5 часа преди фиксиране [14].

Препаратите се приготвяха чрез накапване на лимфоцитна супензия върху предметни стъклa. Клетките се оцветяваха по FPG-техника (флуоресценция + gimsa) за да е възможно идентифициране на първите митози след обльчването. Анализът на структурата на хромозомите се извършваше по време на митоза, съгласно общоприетата класификация [15]. Отчитаха се всички видове нестабилни хромозомни аберации: хроматидни фрагменти, ацентрични хромозомни фрагменти, интерстициални делеции, дицентрици, полицеентрици, центрнични и ацентрични пръстени.

3. Резултати и дискусия

Изследването показва, че протоните и γ -льчи имат значителен увреждащ ефект върху хромозомния апарат на човешките лимфоцити. Честотата на поява на клетки с хромозомни аберации (фиг. 1а) нараства линейно в дозовия диапазон до около 4 Gy при въздействие с γ -льчи и с протони с енергия 170 MeV, и до 3 Gy при обльчване с протони в областта на пика на Брег, т.е. до ниво около 90% от увредените клетки. Като при доза 5 Gy от протони в областта на Брег-пик, в 99% от клетките се наблюдават структурни хромозомни увреждания.

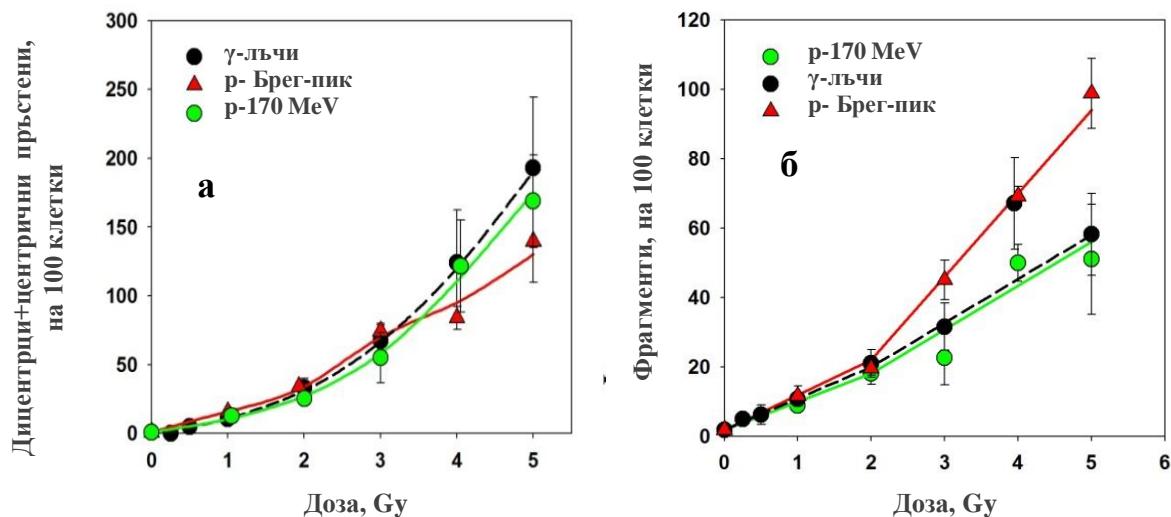
Данните, представени на фиг. 1б свидетелстват за висока честота на хромозомните аберации в клетките индуцирани от фотонен и от корпускулярен тип йонизиращо лъчение. Общийят брой на хромозомните



Фиг. 1. Зависимост на честотата на поява на лимфоцити с хромозомни аберации (а) и общият брой на с хромозомни аберации (б) от дозата на протони в областта на пика на Брег (червено), протони с енергия 170 MeV (зелено) и γ -льчи (черен пунктир).

аберации (от всички видове) нараства в степенна зависимост (близо до линейно-квадратична) от дозата, което е по-изразено при облъчване с протони в област на Брег-пик.

Цитогенетичните тестове не установиха разлики при въздействие с γ -лъчение и протонен поток с първоначална енергия 170 MeV: относителна биологична ефективност (сравняване на дози от изследваното йонизиращо лъчение и стандартно, причиняващи еднакъв биологичен ефект) равна 1 ± 0.1 за γ -лъчение и 1.2 ± 0.1 за протоните в област на Браг-пик.



Фиг. 2. Зависимост на честотата на образуване на дицентрици+центрични пръстени (а) и хромозомни+хроматидни фрагменти (б) от дозата на протони в областта на пика на Брег (червено), протони с енергия 170 MeV (зелено) и γ -лъчи (черен пунктир).

Анализът на различни видове хромозомни аберации в лимфоцити показва високо ниво на аберации на хромозомите от обменния тип ($\sim 70\%$). Честотата на образуване на такъв вид аберации се увеличава с нарастване

на дозата (степенна зависимост). По-високото им ниво се наблюдава при облъчване с протони в област на пик на Брег.

Сред обменните аберации преобладават дицентричните хромозоми - около 40%. Фигура 2а показва, че не е имало значителни разлики в честотата на възникването им при действието на различни видове лъчения. При високи дози протонно облъчване в областа на пика на Брег ефектът е дори по-нисък, отколкото при излагане на 170 MeV протони и γ -лъчи. Това вероятно се дължи на забавяне на навлизането в митоза на клетките с дицентрици, което е

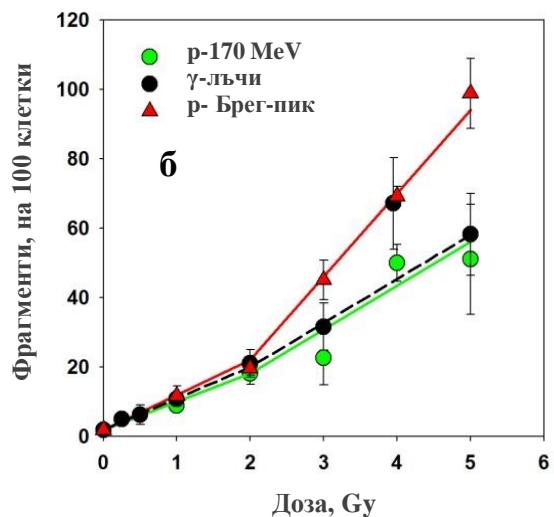


Таблица 1. Коефициенти на вариабилност за различни цитогенетични маркери, изследвани в лимфоцити на седемте донори

Вид на Йонизиращото лъчение (LPE)	Аберации индуцирани в G ₀ -фаза на клетъчен цикъл		Аберации индуцирани в G ₂ -фаза на клетъчен цикъл	
	Дицентрици + центрични пръстени	PCC - фрагменти	Хроматидни разкъсвания	PCC - фрагменти
γ -лъчи (~ 0.3 keV/ μ m)	31 %	19 %	34 %	17 %
Протони (0.5-100 keV/ μ m)	24 %	21 %	32 %	15 %

отбелоязано от други изследователи [16, 17].

Дялът на общия брой хроматидни и хромозомни фрагменти бе определен на 35%. Наблюдаван бе двуфазен характер на доза-ефект кривите: при високи дози 3-5 Gy броят на

фрагменти се увеличава значително. Това увеличение е изразено по-силно при лимфоцитите, облъчени с протони в област на Брег-пик.

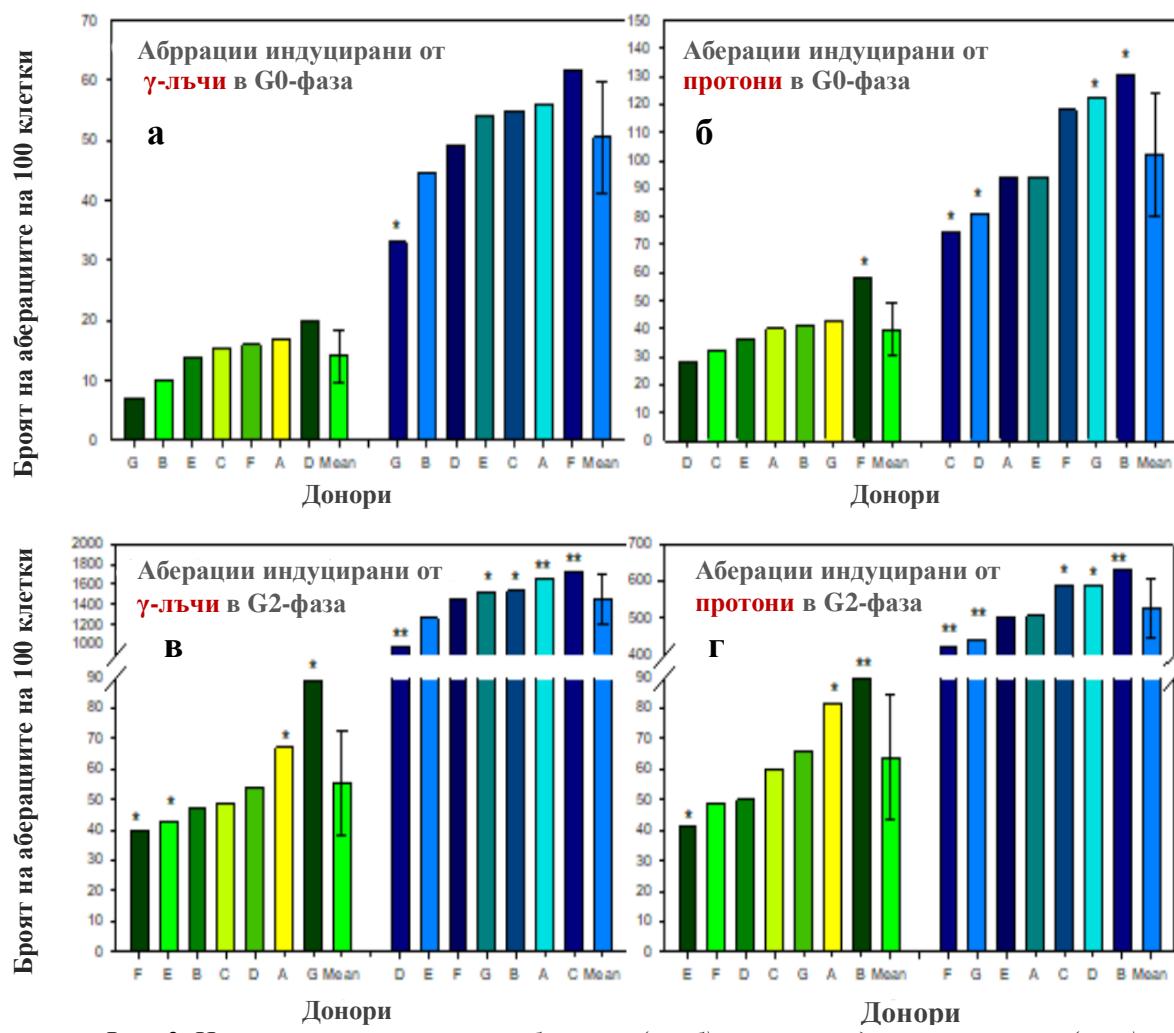
Анализът на данните показва, че изразеността на изследваните цитогенетични ефекти в лимфоцитите от различни донори е индивидуално вариабилна. За по-задълбочено проучване на този въпрос разглеждахме честота на дицентрици и центрични пръстени (сумарно) индуцирани в лимфоцити на 7 донори от γ -льчи и протони в областта на Брег-пик при еднаква погълната доза от 2 Gy.

За оценка на индивидуалната радиочувствителност бяха изследвани и други цитогенетични маркери: PCC-фрагменти в клетките, подложени на химическа преждевременна кондензация на хроматина (PCC) - метод позволяващ изследване на тежко увредени клетки, които не се регистрират при

стандартен метофазен метод. Лимфоцити на същите донори бяха облъчени в G₂-фаза на клетъчен цикъл с доза 0,5 Gy и анализирани според стандартен метафазен и PCC метод. За да се улесни сравнителният анализ, общият брой хроматидни обменни аберации и фрагменти беше преизчислен, отнесен към брой на хроматидните разкъсвания.

Големината на междуиндивидуалните разлики между изследваните цитогенетични ефекти беше изразена като коефициент на вариация ($CV = (SD / Средно) \times 100\%$). Стойностите на CV в резултатите от PCC изследването в сравнение с данните, получени чрез метофазния метод показва по-ниски стойности при излагане и на двата вида лъчения (таблица 1).

Проведена бе оценка на корелацията между резултатите, получени с двата метода, чрез коефициентите на корелация на Spearman



Фиг. 3. Честоти на хромозомни аберации (а и б) и хроматидни разкъсвания (в и г) в лимфоцити на 7 донора. Стълбовете в зелен спектър индицират хромозомни нарушения установени в клетки в митоза; стълбовете в син спектър: хромозомни нарушения, установени в PCC-клетките. Представени са стандартните отклонения от средните стойности (на всички донори за всеки експеримент). * / **: статистически достоверни стойности, при значимост $p < 0,05 / p < 0,001$.

(таблица 2). Честотите на хромозомни аберации, индуцирани (в G₀-фаза на клетъчен цикъл) от γ -лъчи, не корелират с тези, предизвикани от протони (открити с двете техники). Анализът на хроматидните аберации (индуцирани в G₂-фаза) показва висока корелация между чувствителността към γ -лъчи и протони в нормални митотични клетки, докато в клетки с

въздействието на корпускулярно и на фотонно лъчение, като тя корелира за структурните хромозомни аберации индуцирани в G₂-фаза на клетъчен цикъл (метафазния метод). G₂-радиочувствителността на човешки лимфоцити се различава от тяхната G₀-чувствителност както при въздействието на фотонно, така и корпускулярно йонизиращо лъчение.

Таблица 2. Обобщени резултати от корелации между резултатите за различни цитогенетични маркери, индуцирани в G₀ и G₂ фази на клетъчен цикъл от γ -лъчи и протони в лимфоцити на седем донори.* - корелацията е статистически достоверна за $p < 0,05$.

Вид на корелация		Коефициент на корелация (r)	Коефициент на Спирман (P-values of Spearman rank's corelation)
γ -лъчи / протони	G0/G0 метафазна техника	-0,464	0,255
	G0/G0 PCC техника	-0,429	0,297
	G2/G2 метафазна техника	0,821*	0,0145
	G2/G2 PCC техника	0,143	0,720
γ -лъчи	G/G2 метафазна техника	-0,107	0,781
	G0/G2 (PCC техника)	0,393	0,341
протони	G/G2 метафазна техника	0,179	0,660
	G0/G2 PCC техника	-0,179	0,660

преждевременна кондензация на хроматина не бе открита корелация. Не се наблюдава корелация между G₂ и G₀ радиочувствителност както след γ , така и след протонното облъчване.

4. Заключение

Биологична ефективност на протони с изходна енергия 170 MeV (LET = 0.49 keV/ μ m) и на γ -лъчи от ⁶⁰Co не се различава, ОБЕ е 1 ± 0.1 . Биологичната ефективност на протони в област на Брег-пик (LET в спектър до ~ 100 keV/ μ m) е по-висока, ОБЕ $\sim 1.2 \pm 0.1$. Не се наблюдава съществена разлика в индуцирането на различни видове хромозомни аберации от γ - и протонно йонизиращо лъчение.

Радиочувствителността на човешки лимфоцити е индивидуална по отношение

ЛИТЕРАТУРА

1. Mladenov, E., Magin, S., Soni, A., Iliakis, G. DNA double-strand break repair as determinant of cellular radiosensitivity to killing and target in radiation therapy. Front Oncol 3, 2013, P. 113.
2. Ward, JF. DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: Identities, mechanisms of formation and repairability. Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol. 35, 198, P. 95-135.
3. Bryant, P. The signal model: a possible explanation for the conversion of DNA double-strand breaks into chromatid breaks. Int. J. Radiat. Biol. 73, 1998, P.243-251.

4. Cremer, C et al. Nuclear architecture and induction of chromosomal aberrations. *Mutat. Res.* 366, 1996, P. 97-116.
5. Buckton, K.E., Hamilton, G.E., Paton, L., Langlands, A.G. Chromosome aberrations in irradiated ankylosing spondylitis patients. In: *Mutagen-Induced Chromosome Damage in Man*. Eds. by H. Evans and D. Lloyd. Edinburgh University Press. 1978. P. 142-150.
6. Воробцова, И.Е., Семенов, А.В. Комплексная цитогенетическая характеристика лиц, пострадавших в результате аварии на Чернобыльской АЭС. Радиац. биология. Радиоэкология, 2006, Т. 46, № 2. С, стр. 140–151.
7. IAEA. 2011. Cytogenetic Dosimetry: applications in preparedness for and response to radiation emergencies.
8. Молоканов, А.Г. Формирование радиотерапевтического протонного пучка фазotronа ЛЯП ОИЯИ. Вопросы атомной науки и техники, 2008, №5 (50), стр. 146-149.
9. Агапов, А.В., Гаевский, В.Н., Гулидов, И.А., Иглин, А.В., Лучин, Е.И., Мицын, Г.В., Молоканов, А.Г., Цейтлина, М.А., Череватенко, Е.П., Швидкий, С.П. Методика трехмерной конформной протонной лучевой терапии. Письма в ЭЧАЯ, 2005, т. 2, № 6 (129), стр. 80-86
10. Moorhead, P.S., Nowell, P.C., Mellmann, W.J., Battips, D.M., Hungerford, D.A. Chromosome preparations of leukocytes cultured from peripheral blood. *Exptl. Cell Res.* 20, 1960, P. 613-616.
11. Hungerford, D.A. Leukocytes cultured from small inocula of whole blood and the preparation of metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KCl. *Stain Technol.* 40, 1965, P. 333-338.
12. Kulka, U., Huber, R., P Müller, P., Knehr, P., Bauchinger, M. Combined FISH painting and harlequin staining for cell cycle-controlled chromosome analysis in human lymphocytes. *Int J Radiat Biol.* 1995, Jul;68(1), P. 25-7
13. Lisowska, H. et al. International Journal of Radiation Oncology Biology and Physics, 66, 2006, P. 1245-1252.
14. Miura, T., Blakely, W.F. Optimization of calyculin A-induced premature chromosome condensation assay for chromosome aberration studies *Cytometry A*. 2011, Dec 79(12), P. 1016-22.
15. Savage, J.R.K. Classification and relationships of induced chromosomal structural changes. *Journal of Medical Genetics*, 1975, 12, P. 103-122.
16. Пяткин, Е.К., Нугис, В.Ю., Покровская, В.Н. Пролиферативная активность и частота aberrаций хромосом в первом митозе в 50-, 60- и 70-часовых культурах облученных лимфоцитов и смешанных культурах облученных и необлученных клеток. *Радиobiология*, 1984, Т. 24, Б. 3, стр. 310-314.
17. Lloyd, B.C., Dolphin, G.W., Purrott,R.G., Tipper, P.A. The effect of x-ray induced mitotic delay on chromosome aberration yields in human lymphocytes. *Mutat Res*, 1977, Mar 42(3), P. 401-12.

ВЛИЯНИЕ НА ТЕЛЕСНОТО ТЕГЛО ВЪРХУ КЛИНИКО-АНТРОПОМЕТРИЧНИ, МЕТАБОЛИТНИ И ХОРМОНАЛНИ ПОКАЗАТЕЛИ ПРИ ЖЕНИ СЪС СИНДРОМ НА ПОЛИКИСТОЗНИ ЯЙЧНИЦИ

ДАНИЕЛА КОЛЕВА-ТЮТЮНДЖИЕВА, ПЕТИЯ КОНСУЛОВА, МАРИЯ ИЛИЕВА-ГЕРОВА,
МАРИЯ ОРБЕЦОВА

*Медицински университет – гр. Пловдив, Медицински Факултет, Катедра по
Ендокринология
nelka_medicine@abv.bg, pkonsulova@abv.bg, mimilieva@yahoo.com,
morbetzova@abv.bg*

Резюме:

Въведение: През последните години интерес придобиват придрожаващите синдрома на поликистозни яйчници (PCOS) метаболитни нарушения – затлъстяване, инсулинова резистентност (ИР), дислипидемия и артериална хипертония (АХ), които значително увеличават риска от развитие на захарен диабет тип 2 (ЗД 2), хронично нискостепенно възпаление и атеросклероза.

Цел: да се проучи влиянието на телесното тегло върху клинико-антропометрични, метаболитни и хормонални показатели при жени с установен PCOS.

Материали и методи: Проучването обхваща 76 жени с PCOS, разделени съгласно индекса на телесна маса (ИТМ) на: жени с нормално тегло (ИТМ=18.5-24.9 кг/м²), жени с наднормено тегло (ИТМ=25.0-29.9 кг/м²) и жени с I^{ст} степен затлъстяване (ИТМ=30.0-34.9 кг/м²). Извършени са следните измервания и лабораторни изследвания: телесно тегло, ръст, обиколка на талия (OT) и ханч, базални серумни нива на кръвна захар (КЗ 0') и имунореактивен инсулин (ИРИ 0'), серумни концентрации на общ холестерол (OX), ХДЛ-холестерол (ХДЛ-X), триглицериди (ТГ), лептин и адипонектин; систолно (САН) и диастолно артериално налягане (ДАН). Изчислени са: ИТМ, съотношение талия/ханч (T/X) и индекс на инсулинова резистентност (HOMA-IR).

Резултати: Не се открива разлика в средната възраст между изследваните групи жени. Очаквано, при жените с I^{ст} степен затлъстяване се доказват същественни по-високи стойности на OT, T/X, КЗ 0', ИРИ 0', HOMA-IR, ТГ, САН и лептин, както и значимо по-ниски на ХДЛ-X и адипонектин в сравнение с тези при жените с нормално тегло. Серумните нива на лептин показват правопропорционална зависимост с телесното тегло, ИТМ, OT, T/X, КЗ 0', ИРИ 0' и HOMA-IR, OX и ТГ, като се установява, че теглото обяснява 54% от вариациите в нивата на лептина. В допълнение, намираме отрицателна взаимовръзка между нивата на адипонектин и стойностите на ИТМ, телесно тегло, OT, T/X, ИРИ 0', HOMA-IR и ТГ.

Изводи: При носителките на PCOS телесното тегло оказва ключова роля върху появата на въглехидратни и липидни нарушения, както и върху развитието на хронично нискореактивно възпаление с променени серумни нива на лептин и адипонектин.

Ключови думи: тегло, метаболитни нарушения, лептин, адипонектин, PCOS

INFLUENCE OF BODY WEIGHT ON CLINICAL- ANTHROPOMETRIC, METABOLIC AND HORMONAL PARAMETERS IN WOMEN WITH POLYCYSTIC OVARY SYNDROME

DANIELA KOLEVA-TYUTYUNDZHIEVA, PETIA KONSULOVA, MARIA ILIEVA-GEROVA,
MARIA ORBETZOVA

Abstract:

Introduction: Recently, the accompanying polycystic ovary syndrome (PCOS) metabolic disturbances - obesity, insulin resistance (IR), dyslipidemia and arterial hypertension (AH) which significantly increase the risk of type 2 diabetes mellitus (DM 2), chronic low-grade inflammation and atherosclerosis development, have been considered as issues of an intense research interest.

Aim: to assess the role of body weight on clinical-anthropometric, metabolic and hormonal parameters in women with PCOS.

Materials and methods: The study included 76 PCOS women divided according to their body mass index (BMI) into: women with normal weight ($BMI=18.5-24.9 \text{ kg/m}^2$), overweight women ($BMI=25.0-29.9 \text{ kg/m}^2$) and women with Ist degree of obesity ($BMI=30.0-34.9 \text{ kg/m}^2$). The following measurements and laboratory tests were conducted: body weight, height, waist (WC) and hip circumferences, basal glucose (GLU 0') and insulin (IRI 0') levels, serum concentrations of total cholesterol (TC), HDL-cholesterol (HDL-C), triglycerides (TG), leptin and adiponectin; systolic (SBP) and diastolic blood pressure (DBP). BMI, waist-to-hip ratio (WHR) and homeostasis model assessment IR index (HOMA-IR) were calculated.

Results: No difference in terms of mean age between the studied groups of women was found. Predictably, we established significantly higher values of WC, WHR, GLU 0', IRI 0', HOMA-IR, TG, SBP and leptin as well as lower HDL-C and adiponectin levels in the women with Ist degree of obesity compared to those in the women with normal weight. Serum leptin levels showed a positive relationship with body weight, BMI, WC, WHR, GLU 0', IRI 0', HOMA-IR, TC and TG as it was confirmed that weight explained 54% of the variations in leptin levels. Furthermore, we found a negative relationship between serum adiponectin levels and body weight, BMI, WC, WHR, IRI 0', HOMA-IR and TG.

Conclusions: In PCOS carriers body weight is proved to play a key role in the occurrence of carbohydrate and lipid metabolism disorders, as well as in the development of chronic low-grade inflammation characterized by altered serum leptin and adiponectin levels.

Key words: weight, metabolic disturbances, leptin, adiponectin, PCOS

1. Въведение

Затлъстяването е значим световно разпространен здравен проблем, чиято честота нараства драматично, а това категорично води до потенциално увеличаване на риска от развитие на сърдечно-съдови (ССЗ) и мозъчно-съдови заболявания, захарен диабет тип 2 (ЗД 2), ставни и дихателни заболявания, злокачествени новообразувания [1]. Наличието на андроидно затлъстяване, при което се натрупва мастна тъкан (МТ) около органите в коремната кухина, е основен рисков фактор за възникване на метаболитен синдром (МС). Висцерално натрупаната МТ, за разлика от подкожната, се възприема като модел на метаболитно активен орган - източник на биоактивни субстанции (адипоцитокини), които притежават проинфламаторно и проатерогенно действие. Множество проучвания доказват наличието на повишени плазмени нива на адипоцитокините лептин, резистин, TNF α , интерлевкин-6 (IL-6) при пациенти със затлъстяване и ЗД 2. Обратно - андроидното затлъстяване се характеризира с намаляване на плазмените нива на адипонектин,

представляващ специфичен хормон на МТ, чието действие е свързано с повишаване на инсулиновата чувствителност (ИЧ) [2, 3].

Синдромът на поликистозни яйчници (PCOS) се характеризира клинично с ановулация и хиперандрогенизъм. Понастоящем PCOS представлява една от най-дискутираните и широко обследвани области в репродуктивната медицина, тъй като той засяга до 10% от жените в репродуктивна възраст. През последните години интерес придобиват приджурявящите PCOS метаболитни нарушения – затлъстяване, инсулинова резистентност (ИР), дислипидемия и артериална хипертония (АХ), които значително увеличават риска от развитие на ЗД 2, хронично нискостепенно възпаление и атеросклероза [4]. Повечето жени-носителки на PCOS попадат под вниманието на клинициста, когато глюкозният им толеранс е все още нормален и сърдечно-съдовите (СС) увреди не са изявени. Затова скринингът за наличие на затлъстяване от висцерален тип и ИР би бил решаващ за идентифициране на тези индивиди с висок

метаболитен и СС риск с цел ранно изготвяне на подходящ терапевтичен план.

Целта на настоящото проучване е да се оцени влиянието на телесното тегло върху клинико-антропометрични, метаболитни и хормонални показатели при жени с установен PCOS.

2. Материали и методи

Настоящото проучване е проведено в Клиника по Ендокринология и болести на обмяната при УМБАЛ "Св. Георги", гр. Пловдив. В него са включени 76 жени с доказан PCOS, разделени съгласно изчисления индекс на телесна маса (ИТМ) на: жени с нормално тегло (ИТМ=18.5-24.9 кг/м²), жени с наднормено тегло (ИТМ=25.0-29.9 кг/м²) и жени с I^{ва} степен затлъстяване (ИТМ=30.0-34.9 кг/м²). Извършени са следните измервания и лабораторни изследвания: телесно тегло, ръст, обиколка на талия (OT) и ханш, базални serumни нива на кръвна захар (КЗ 0') и имунореактивен инсулин (ИРИ 0'), serumни концентрации на общ холестерол (ОХ), ХДЛ-холестерол (ХДЛ-Х), триглицериди (ТГ), лептин и адипонектин; систолно (САН) и диастолно артериално налягане (ДАН). Изчислени са: (ИТМ) = тегло(кг)/ръст(м)², съотношение талия/ханш (T/X) и хомеостазен модел на инсулинова резистентност (HOMA-IR) = (КЗ 0' x ИРИ 0')/22.5).

Диагнозата PCOS е поставяна съгласно Ротердамските критерии (Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored 2003), според които трябва да са налице 2 от следните 3 характеристики: олиго- и/или ановулация; клинична и/или биохимична хиперандрогения; ехографски установени поликистозни яйчници (наличие на ≥12 фоликули с диаметър 2–9 mm и/или обем >10 cm³).

Изследвани са редица хормони – лутеинизиращ хормон (ЛХ), фоликулостимулиращ хормон (ЛХ), естрадиол (Е2), общ тестостерон (Т), андростендион, дехидроепандростерон-сулфат (ДХЕА-С), пролактин (ПРЛ), ТСХ, св. Т4, serumен кортизол в 8ч и 22ч с цел диагностично уточняване или изключване на бременност и налична друга ендокринна патология.

Венозната кръв за лабораторните изследвания е вземана при стандартни условия – сутрин рано, след 12-часов период на нощно гладуване, във фоликуларна фаза на менструалния цикъл (2^{ри}-5^{ти} ден след спонтанно получен МЦ) или до 7^{ми} ден след индуцирано с гестаген отпадно кървене.

Венозните преби за определяне на КЗ 0', ИРИ 0', липидните показатели, стандартните хормонални параметри, лептин и адипонектин са изпращани в Централна Клинична Лаборатория към УМБАЛ „Св. Георги” – Пловдив.

Обиколката на талията е определяна в хоризонталната равнина по средата между долния ръб на 12-то ребро и горната част на илиачните гребени. Обиколката на ханша е измервана на мястото на най-широката част на бедрата по равнина, успоредна на пода.

Серумните нива на кръвната захар са измервани с помощта на стандартен ензимно-колориметричен (GOD-POD) метод с характеристики: линейност (dilution recovery) – до 20 ммол/л; inter assay variation, CV от 2.40 до 2.94%, intra assay variation, CV% < 1.2. Инсулинът е изследван чрез комерсиален кит за количествено определяне на имунореактивен инсулин на базата на микрочастичен имуноензимен анализ (MEIA) с помощта на AxSYM system (ABBOTT, USA) със следните характеристики: sensitivity ≤ 0.8 μIU/ml; inter assay variation, CV% < 2.9; intra assay variation, CV% < 5.3. Серумното ниво на общия холестерол е определяно чрез ChOD, PAP, на триглицеридите – чрез GPO, PAP, на HDL-холестерола – чрез MgSO₄-dextran SO₄ преципитация (Schneiders Analysers; Netherlands test; Delta Kone Autoanalyser). Анализът на serumните концентрации на лептин е осъществяван чрез имуноензимен Human ELISA метод със солидна фаза, използвайки комерсиален кит на фирма DRG, Germany. Специфични характеристики: sensitivity – 0.2 ng/ml; intra assay variation - CV% < 8.7%; inter assay variation - CV% < 5.4. Серумните нива на адипонектина са отчитани чрез ELISA метод (Human Adiponectin Elisa), използвайки комерсиален кит на BioVendor, Heidelberg, Germany с основни характеристики: sensitivity - 26 ng/ml; intra assay variation - CV% < 5.9; inter assay variation - CV% < 7.0. Хормоналните тестове са извършвани с комерсиални китове AxSYMTM System (Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL, USA).

Статистическият анализ на резултатите е проведен с помощта на SPSS, версия 21.0, за Windows. Извършен е сравнителен анализ на клиничните, антропометричните, метаболитните и хормонални показатели при изследваните групи жени. Резултатите се представят като средна аритметична ± стандартно отклонение (SD). За всички сравнения е избрано ниво на значимост P<0.05. Сравнителният анализ между

стойностите на САН и ДАН е осъществен с помощта на теста на Mann-Whitney поради тяхното неправилно разпределение, установено чрез теста на Kolmogorov-Smirnov. Използван е коефициент на Pearson (r) с цел оценка за наличие на сигнификантни корелации между изследваните показатели.

3. Резултати

В Таблица 1 са показани клинико-антропометричните характеристики на изследваните групи пациентки с PCOS, съответно: 40 жени с нормално тегло, 12 - с наднормено тегло и 24 - с I^{va} степен затлъстяване. Не се открива разлика в средната възраст между изследваните групи жени. Очаквано, при жените с наднормено тегло и с I^{va} степен затлъстяване се доказват сигнификантно по-високи стойности на ОТ и T/X в сравнение с тези при жените с нормално тегло. ОТ се оказва със значимо по-висока стойност и в групата на жените с I^{va} степен затлъстяване, сравнена с тази при групата с наднормено тегло (Табл. 1).

Отчитат се по-високи стойности на КЗ 0', ИРИ 0', HOMA-IR, ТГ, САН и лептин, както и значимо по-ниски на ХДЛ-Х и адипонектин при PCOS-носителките с I^{va} степен затлъстяване в сравнение с тези при пациентките с нормално тегло. Освен това се регистрира статистически значима разлика в ИРИ 0' и HOMA-IR между обезните жени и тези с наднормено тегло – по-високи стойности се установяват при жените със затлъстяване. Откриваме значимо по-високи лептинови нива и по-ниски серумни концентрации на ХДЛ-Х при жените с наднормено тегло, сравнени с тези при жените с нормално тегло (Табл. 2).

Серумните нива на лептин показват правопропорционална зависимост с телесното тегло ($r=0.732$, $P<0.001$, Фиг. 1), ИТМ ($r=0.694$, $P<0.001$), ОТ ($r=0.679$, $P<0.001$), Т/Х ($r=0.419$, $P<0.001$), КЗ 0' ($r=0.237$, $P=0.05$), ИРИ 0' ($r=0.433$, $P<0.001$), HOMA-IR ($r=0.409$, $P<0.001$, Фиг. 22), ОХ ($r=0.244$, $P=0.05$) и ТГ ($r=0.289$, $P=0.020$), като се установява, че теглото обяснява 54% от вариациите в нивата на лептина ($R=0.732$, $R^2=0.536$, $P<0.001$, $F=73.96$). В допълнение, намираме отрицателна взаимовръзка между нивата на адипонектин и стойностите на ИТМ, телесно тегло, ОТ, Т/Х, ИРИ 0', HOMA-IR и ТГ (Табл. 3).

Таблица 2. Клинико-антропометрични показатели при изследваните жени

Показатели	Групи жени с PCOS		
	Норм. тегло n=40	Наднорм. тегло n=12	I ^{va} степен затл. n=24
Възраст (години)	23.55±4.36	24.67±6.39	25.25±5.16 ^a
Тегло (кг)	58.89±8.81	79.57±5.91 ^{aaa}	91.11±6.79 ^{aaa/bbb}
ИТМ (кг/m²)	21.31±2.24	27.92±1.43 ^{aaa}	33.12±2.20 ^{aaa/bbb}
ОТ (см)	71.05±7.38	89.83±8.31 ^{aaa}	101.17±5.88 ^{aaa/bbb}
T/X	0.75±0.07	0.84±0.09 ^{aaa}	0.88±0.06 ^{aaa}

^a – значима разлика спрямо групата с нормално тегло – ^aP<0.05, ^{aaa}P<0.001;

^b – значима разлика между групата с наднормено тегло и групата с I^{va} степен затлъстяване – ^{bbb}P<0.001.

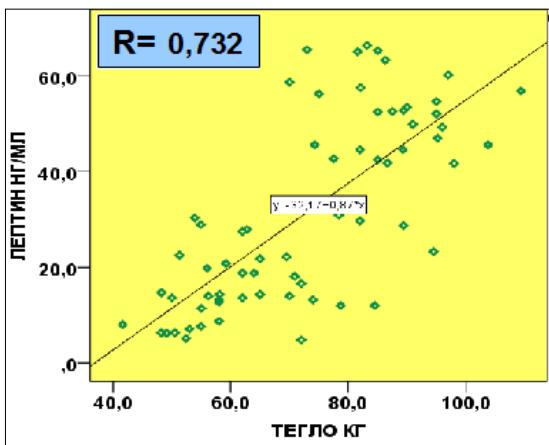
Таблица 2. Метаболитни и хормонални показатели, САН и ДАН при изследваните жени

Показатели	Групи жени с PCOS		
	Норм. тегло n=40	Наднорм. тегло n=12	I ^{va} степен затл. n=24
КЗ 0' (ммол/л)	4.68±0.47	4.84±0.70	5.20±0.70 ^{aa}
ИРИ 0' (μIU/ml)	6.56±2.98	9.49±3.93	13.40±6.94 ^{aaa/b}
HOMA	1.39±0.74	2.09±0.98	3.21±1.98 ^{aaa/b}
OX (ммол/л)	4.36±0.97	4.49±0.86	4.63±0.79
ХДЛ-Х (ммол/л)	1.45±0.49	1.12±0.20 ^a	1.19±0.27 ^a
ТГ (ммол/л)	0.78±0.35	1.02±0.44	1.29±0.57 ^{aaa}
ЛЕПТИН (нг/мл)	17.32±10.95	47.02±19.69 ^{aaa}	45.83±13.49 ^{aaa}
АДИПО-НЕКТИН (мкг/мл)	14,56±8,08	10,88±6,22	9,31±3,86 ^{aa}
САН (mmHg)	110.63±11.99	116.36±6.74	119.79±12.20 ^{aa Δ}
ДАН (mmHg)	71.13±8.59	73.64±5.52	75.63±12.20 ^Δ

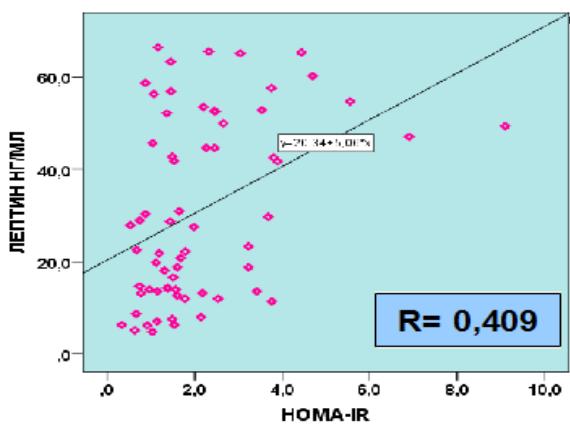
Δ - Mann-Whitney U-test

^a – значима разлика спрямо групата с нормално тегло – ^aP<0.05, ^{aa}P<0.01, ^{aaa}P<0.001;

^b – значима разлика между групата с наднормено тегло и групата с I^{va} степен затлъстяване – ^bP<0.05.



Фигура 1. Корелация между серумни нива на лептин и тегло



Фигура 2. Корелация между серумни нива на лептин и HOMA-IR

Таблица 3. Корелации между адипонектин и изследваните показатели

ПОКАЗАТЕЛИ	АДИПОНЕКТИН <i>r</i>
ТЕГЛО	-0.385 P=0.001
ИТМ	-0.361 P=0.003
ОТ	-0.411 P=0.001
T/X	-0.317 P=0.009
ИРИ 0'	-0.332 P=0.006
HOMA-IR	-0.308 P=0.012
ТГ	-0.409 P=0.001

4. Обсъждане

Извършеният сравнителен анализ, както и оценката на корелационните зависимости между изследваните показатели при жените с PCOS в настоящето проучване доказват наличието на връзка помежду им, идентична с тази, съществуваща при пациенти с установен МС.

Метаболитният синдром (МС) при жени и синдромът на поликистозни яйчници (PCOS) са две отделни състояния, които в действителност са много тясно свързани едно с друго. Пациентките с PCOS често имат клинични прояви, изпълващи критериите за МС, а жените с МС, от своя страна, могат да изявят репродуктивни и ендокринни нарушения характерни за PCOS. Установено е, че механизмите за развитие на МС са подобни на тези, отговорни за появата на PCOS. Счита се, че факторите на околната среда, генетичната предиспозиция, поведенческите фактори, както и взаимодействието между тях, са основни причини за развитие на МС и PCOS. Освен това, за развитието на ЗД 2 и ССЗ при двете състояния (МС и PCOS) се спрягат едни и същи патогенетични механизми, в основата на които стои ИР [5].

А. Гатева и сътр. от Клиника по Ендокринология при УМБАЛ „Александровска“ - София извършват ретроспективно проучване при 301 жени с PCOS, целящо охарактеризиране на някои от класическите и други (нови, потенциални) СС рискови фактори с оглед оценка на цялостния СС риск при жени с PCOS в репродуктивна възраст. Провежда се изследване на СС рискови фактори и оценка на СС риск като се използват следните показатели: ИЧ, липиден профил, артериално налягане, левкоцити, среден обем на тромбоцити (MPV), ширина на разпределение на еритроцити (RDW), N-терминален край на pro-BNP (мозъчен натриуретичен пептид), фетуин А, миелопероксидаза (MPO), миелоцит хемоатрактантен протеин-1 (MCP-1), съотношение T/X, отношение талия/ръст, индекс на висцерален адипозитет, витамин Д. Получените резултати водят до извода, че неблагоприятният кардио-метаболичен рисков профил при описания контингент от пациентки е свързан до голяма степен с наличието на затлъстяване, а не толкова с клиничната изява на PCOS. Отношението талия/ръст (WSR) > 0.5 и обиколка на талията > 80 см се описват като най-показателните антропометрични параметри за оценка на СС риск при жените с PCOS. Изследователският екип не успява да намери нови маркери за ранна СС патология вероятно

поради факта, че изследваните жени са млади (18-40 г.), а ССЗ достигат пик след менопаузата, съответно след отпадане на протективния ефект на естрогените [6].

Известни са проучвания, в това число и нашето, доказващи високи нива на лептин и ниски такива на адипонектин при жени с PCOS – концентрации, вариращи в зависимост от количеството МТ в организма [7]. Редица изследователи доказват, че жените с PCOS се характеризират с по-високи концентрации на лептин в сравнение с тези при съпоставими по ИТМ контроли. Други автори пък описват съпоставими серумни нива на лептин при жени с PCOS и контроли, неразличаващи се по отношение на телесно тегло и ИТМ [8].

Olszanecka-Glinianowicz и сътр. установяват съществено по-високи серумни нива на лептин при носителки на PCOS в сравнение с тези при съпоставими по възраст клинично здрави жени. Освен това, авторите описват по-високи лептинови концентрации при пациентките с PCOS и затлъстяване в сравнение с тези при PCOS и нормално телесно тегло и при контролите [9]. Има изследвания, които не регистрират съществен разлики по отношение на лептиновите нива между жени с PCOS и съпоставими по възраст и ИТМ контроли [8].

Връзката между лептин и ИР е тема, предизвикваща дискусии и голям научно-изследователски интерес. Все повече данни се събират в полза на директната взаимовръзка между лептин и нивата на КЗ, ИРИ, стойностите на HOMA-IR, липидните и атерогенните показатели, която е независима или само отчасти зависима от затлъстяването. M. Orbetzova и сътр. регистрират съществена положителна корелация между нивата на лептин и стойностите на телесното тегло, ИТМ, ОТ, % МТ, базалните нива на ИРИ и изчисления HOMA-IR. Установено е, че лептина корелира отрицателно със серумните концентрации на ХДЛ-X [10]. Резултатите от настоящото проучване съвпадат с гореописаните данни. Лептина показва съществена положителна зависимост с ИТМ, Т/Х, КЗ 0', ИРИ 0', HOMA-IR, ОХ и ТГ.

Друго проучване, представяющо резултати, които са в унисон с данните от нашата разработка, е това на Jalilian и сътр. [11]. Те откриват съществена положителна връзка между серумните нива на лептин и ИТМ при жени с PCOS, като подобна зависимост се потвърждава и от други проучвания в тази насока [12]. Тази взаимовръзка е ясна и логична, тъй като отдавна е известно, че лептина се

синтезира и секретира предимно от адипоцитите и увеличаването на телесното тегло води до по-голямо количество натрупана МТ и съответно повишена синтеза на лептин.

Javad Mohiti-Ardekani и сътр. [13] описват наличието на положителни корелации между серумни нива на свободен и общ лептин и HOMA-IR (като показател за ИР) при изследваните жени с PCOS ($r=0.78$ $P<0.001$, resp. $r=0.84$ $P=0.003$), както и при контролната група ($r=0.86$ $P<0.001$, resp. $r=0.69$ $P<0.001$). Подобни резултати се откриват както в нашето проучване, така и при извършените изследвания с PCOS носителки от Италия [14], Швеция [15], Турция [16]. Нашите резултатите, както и тези от посочените проучвания са безспорно доказателство за ролята на лептина в патогенезата на ИР.

Azhar Mohammad Nomair и сътр. изследват 40 жени с установен PCOS (ср. възраст 34.30 ± 2.08 г., ср. ИТМ 34.84 ± 4.77 кг/м²) и 16 нормално овулиращи съпоставими по ИТМ жени, служещи за контролна група (ср. възраст 28.10 ± 4.61 г., ср. ИТМ 33.59 ± 1.23 кг/м²). Целта на проучването е да се сравнят серумните нива на лептин между двете описаны групи жени и да се оцени връзката им с другите изследвани параметри – антропометрични показатели, полови хормони и показатели на ИР. Установяват се съществено по-високи серумни концентрации на лептин при PCOS в сравнение с тези при контролната група ($P=0.005$), като съществената разлика се открива и при вътрегруповия сравнителен анализ между инсулинорезистентните и неинсулинорезистентните жени с PCOS ($P=0.044$). При носителките на PCOS се регистрира правопропорционална съществена зависимост между лептин и ИТМ ($P=0.049$). Авторите изтъкват ролята на ИТМ и ИР като два основни фактора, повлияващи нивата на лептина [17].

Адипонектиновите концентрации се намират значимо по-ниски при PCOS жените със затлъстяване в сравнение с тези при жените с нормално тегло. При анализиране на зависимостите в групата на жените с PCOS се регистрира отрицателна такава между адипонектин и стойностите на телесно тегло, ИТМ, ОТ, Т/Х, ИРИ 0', HOMA-IR и ТГ.

Francesco Orio и сътр. извършват проучване, което цели определяне на серумните нива на адипонектин при 60 жени с PCOS (30 с нормално телесно тегло и 30 със затлъстяване) и 60 съпоставими по възраст и ИТМ клинично здрави жени. При всички участнички се изчислява HOMA-IR като показател за ИР.

Получените данни показват наличие на значимо по-ниски нива на адипонектин при изследваните жени със затлъстяване в сравнение с тези, които имат референтни стойности на ИТМ, както в групата с PCOS, така и в тази на контролите. Не се открива разлика по отношение нивата на адипонектин между PCOS и клинично здравите жени. И в двете групи жени нивата на адипонектин корелират отрицателно с ИТМ и стойностите на HOMA-IR. Авторите достигат до извода, че концентрациите на адипонектин варират в зависимост от количеството натрупана МТ в организма. Те предполагат, че ИЧ не играе ключова роля по отношение на адипонектиновите нива при жени с PCOS [18].

Плазмените нива на адипонектин се доказват понижени при инсулинорезистентни лица със затлъстяване, както и при пациенти със ЗД 2. PCOS се характеризира с наличие на ИР, която може да доведе до метаболитни нарушения, свързани с повишен рисък от развитие на ЗД 2 сред женската популация. Пациентките с PCOS често имат повищени базални нива на инсулин, най-вероятно причинени от повищена инсулинова секреция и съпътстващ потиснат чернодробен инсулинов клирънс, като при тях е налице и нарушена периферна инсулин-стимулирана глюкозна утилизация. Има доказателства, че тези отклонения са независими от състоянието на затлъстяване, но пък, ако го има - то упражнява адитивен влошаващ ефект върху ИЧ [19].

Ниските адипонектинови нива при затлъстяване най-вероятно се дължат на процеса на down-регулация, опосредстван от повишеното количество МТ. Установено е, че производството на адипонектин се потиска при състояния на ИР – ЗД 2 и затлъстяване. При изследване на голяма група индивиди от Япония и индианци-представители на племето Pima нивата на адипонектин се намират в отрицателна корелация с индексите, отразяващи ИР, дори след изключване на факторите възраст и ИТМ. Важно е да се отбележи, че при жени с PCOS и нормално тегло, но с инсулинова свръхсекреция, адипонектиновите нива се намират съпоставими с тези при контролите с нормален ИТМ. По този начин инсулиният се отхвърля като практически значим фактор, повлияващ нивата на адипонектин [20]. Нашите данни предполагат, че вариациите в адипонектиновите нива са резултат по-скоро на промени в количеството на МТ отколкото на изменението в инсулиновите концентрации и/или ИЧ.

5. Заключение

При носителките на PCOS телесното тегло оказва ключова роля върху появата на въглехидратни и липидни нарушения, както и върху развитието на хронично нискореактивно възпаление с променени серумни нива на адипокините лептин и адипонектин.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wajchenberg, BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome, *Endocr Rev*, 2000, 21, 697-738.
2. Trayhum, P., Woods, IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue, *Br J Nutr*, 2004, 92, 347-355.
3. Nells, JG., Olefsky, JM. Inflamed fat: what starts the fire?, *J Clin Invest*, 2006, 116, 33-35.
4. Ciampelli, M., Lanzone, A. Insulin and polycystic ovary syndrome – a new look at an old subject, *Gynecol Endocrinology*, 1998, 12(4), 277-292.
5. Ehrmann, DA., Barnes, RB., Rosenfield, RL., et al. Prevalence of impaired glucose tolerance and diabetes in women with polycystic ovary syndrome, *Diabetes Care*, 1999, 22, 141–146.
6. Гатева, А. Сърдечно-съдов рисък при синдром на поликистозните яйчници, Дисертация за присъждане на образователна и научна степен „доктор“, София, 2013.
7. Escobar-Morreale, FM., Villuendas, G., Botella-Carretero, JL., et al. Adiponectin and resistin in PCOS: a clinical, biochemical and molecular genetic study, *Hum Reprod*, 2006, 21(9), 2257-2265.
8. Bideci, A., Camurdan, MO., Yeşilkaya, E., et al. Serum ghrelin, leptin and resistin levels in adolescent girls with polycystic ovary syndrome, *J Obstet Gynaecol Res* 2008, 34(4), 578-584.
9. Olszanecka-Glinianowicz, M., Madej, P., Nylec, M., et al. Circulating apelin level in relation to nutritional status in polycystic ovary syndrome and its association with metabolic and hormonal disturbances, *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2013, 79, 238-242.
10. Orbetzova, M., Pehlivanov, B., Mitkov, M., et al. Effect of Short-Term Standard Therapeutic Regimens on Neuropeptide Y and Adipose Tissue Hormones in Overweight Insulinresistant Women with

- Polycystic Ovary Syndrome, *Folia Medica* 2011, 53(3), 15-24.
11. Jalilian, N., Haghnazari, L., Rasolinia, S. Leptin and body mass index in polycystic ovary syndrome, *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, 2016, 20(3), 324-328.
 12. Chakrabarti, J. Serum leptin level in women with polycystic ovary syndrome: Correlation with adiposity, insulin, and circulating testosterone, *Ann Med Health Sci Res*, 2013, 3, 191-196.
 13. Mohiti-Ardekani, J., Taarof, N. Comparison of leptin blood levels and correlation of leptin with LH and FSH in PCOS patients and normal individuals, *JSSU*, 2010, 17, 353-357.
 14. Carmina, E., Ferin, M., Gonzalez, F., et al. Evidence that insulin and androgens may participate in the regulation of serum leptin levels in women, *Fertility and Sterility* 1999, 72, 926-931.
 15. Gennarelli, G., Holte, J., Wide, L., et al. Is there a role for leptin in the endocrine and metabolic aberrations of polycystic ovary syndrome?, *Human Reproduction*, 1998, 13, 535-541.
 16. Telli, MH., Yildirim, M., Noyan, V. Serum leptin levels in patients with polycystic ovary syndrome, *Fertil Steril*, 2002, 77, 932-935.
 17. Nomair, AM., Aref, NK., Rizwan, F., et al. Serum leptin level in obese women with polycystic ovary syndrome, and its relation to insulin resistance, *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 2014, 3(4), 288-294.
 18. Orio, F., Palomba, S., Cascella, T., et al. Adiponectin Levels in Women with Polycystic Ovary Syndrome, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2003, 88(6), 2619 –2623.
 19. Yamauchi, T., Kamon, J., Minokoshi, Y., et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase, *Nat Med*, 2002, 8, 1288 –1295.
 20. Yamamoto, Y., Hirose, H., Saito, I., et al. Correlation of the adipocyte-derived protein adiponectin with insulin resistance index and serum high-density lipoprotein-cholesterol, independent of body mass index, in the Japanese population, *Clin Sci* 2002, 103, 137–142.

РОЛЯТА НА ХРАНЕНЕТО ЗА РАЗВИТИЕ НА НАДНОРМЕНО ТЕГЛО И ЗАТЛЪСТЯВАНЕ В ЮНОШЕСКА ВЪЗРАСТ

ПЕТЯ КОНСУЛОВА¹, МАРИЯ ОРБЕЦОВА¹, ДАНИЕЛА КОЛЕВА-ТЮТЮНДЖИЕВА¹,
НАРЦИС КАЛЕВА-ХОДЖЕВА², КИРИЛ СИМИТЧИЕВ³

1 – Медицински университет – Пловдив, Медицински факултет, Катедра по
ендокринология, 2 – Медицински университет – Пловдив, Медицински факултет,
Катедра по педиатрия и медицинска генетика, 3 – Пловдивски университет –
гр. Пловдив „Паисий Хиландарски“, Химически факултет, Катедра по аналитична и
компютърна химия
pkonsulova@abv.bg, morbetzova@abv.bg, nelka_medicine@abv.bg, narito@abv.bg

Резюме:

В съвременното общество покачването на телесното тегло се превръща в първостепенен социално и здравно значим проблем на населението от целия свят, засягащ и по-младите възрастови групи.

Цел – да се оцени ролята на начина на хранене в развитието на наднормено тегло и затълстяване в юношеска възраст.

Материал и методи: Обсервационно крос-секционно проучване върху рандомизирана извадка, обхващаща 633 ученици (343 момчета и 290 момичета) на възраст 16 – 19 г. от 4 гимназии в град Пловдив. Антропометричните измервания включват ръст, тегло, обиколка на талия и хани, биоимпедансен анализ на количество и процент мастна тъкан чрез професионален био-импедансен анализатор на телесен състав „ТАНИТА“ BC-420. Категориите наднормено тегло и затълстяване са определени спрямо индекса на телесна маса (ИТМ) по критериите на CЗО – ИТМ = 25,0 – 29,9 kg/m², resp. ИТМ ≥ 30 kg/m². Анкетите – оригинален образец на авторите, съдържат показатели, свързани със социално-икономическия, фамилия и здравословния статус, начина на хранене и физическата активност.

Резултати: Според ИТМ 534 ученици (84,4%) са с нормално телесно тегло, 67 (10,6%) – с наднормено тегло и 32 (5,1%) – със затълстяване. И при двата пола е налице сигнификантна положителна корелация между ИТМ и количеството приема на вода дневно и спазване на хипокалорийна диета, а при момчетата се установява и сигнификантна отрицателна корелация с приема на сутрешна закуска и консумацията на алкохол. При момчетата приемът на сутрешна закуска запазва отрицателната си корелация и с процента и количеството телесни мазнини. По отношение фактора брой хранения дневно само при мъжки пол е налице обратна корелация с показателя % телесни мазнини. По-високият прием на алкохол е обратно пропорционален на процента телесни мазнини и на количеството им в кг. При момчетата целенасоченото спазване на хипокалорийна диета е в права зависимост с количеството и процента телесни мазнини. Обиколката на талията корелира сигнификантно със спазване на хипокалорийна диета при момичета, а при момчета – с прием на вода (положителна), консумация на алкохол (отрицателна) и прием на сутрешна закуска (отрицателно). Приемът на сутрешна закуска е в обратна зависимост със съотношението талия:хани при момичетата. По отношение хранителните навици не установяваме очакваните статистически значими корелации между консумация на продукти „бързо хранене“, консумация на плодове и зеленчуци с ИТМ, телесни мазнини в % и телесни мазнини в кг, обиколка на талия, отношение талия/хани. Вегетарианството е относително слабо разпространено и не оказва значимо влияние върху теглото.

Заключение: В нашата представителна за град Пловдив рандомизирана извадка в юношеска възраст установяваме влияние върху теглото и телесните пропорции главно на режима на хранене, приема на вода и алкохол, спазването на хипокалорийна диета, като се очертават разлики между двата пола. Последствията от нездравословния начин на хранене вероятно се изявяват по-късно и се отразяват сигнификантно върху ИТМ и антропометричните показатели при приключване израстването на височина.

Ключови думи: наднормено тегло, затълстяване, юношеска възраст, хранене

THE ROLE OF NUTRITION IN DEVELOPING OVERWEIGHT AND OBESITY IN ADOLESCENCE

PETIA KONSULOVA¹, MARIA ORBETZOVA¹, DANIELA KOLEVA-TYUTYUNDZHIEVA¹,
NARTZIS KALEVA-HODZHEVA², KIRIL SIMITCHIEV³

1 – Medical University – Plovdiv, Faculty of Medicine, Department of Endocrinology,

2 – Medical University – Plovdiv, Faculty of Medicine, Department of Pediatrics and
Medical Genetics, 3 – “Paisii Hilendarski” Plovdiv University – Plovdiv, Faculty of
Chemistry, Department of Analytical Chemistry and Computer Chemistry

pkonsulova@abv.bg, morbetzova@abv.bg, nelka_medicine@abv.bg, narito@abv.bg

Summary:

In modern society the increase in body weight is becoming an issue of primary social and health significance for the population all over the world, which involves the younger age groups as well.

Aim: Evaluation of the role of dietary regimen in developing overweight and obesity in adolescence.

Materials and methods: Observational cross-sectional study of a randomized excerpt involving 633 pupils (343 boys and 290 girls), aged 16 to 19, from 4 high schools in Plovdiv. The anthropometric measurements included height, weight, waist and hip circumference, bio-impedance analysis of the quantity and percentage of adipose tissue by means of a professional TANITA BC-420 bio-impedance analyzer of body composition. The categories overweight and obesity were determined on the basis of body mass index (BMI) using the WHO criteria – BMI = 25.0 – 29.9 kg/m² and BMI ≥ 30 kg/m², respectively. The questionnaire – an original sample created by the authors – contained indices associated with the socio-economical, family and health status, dietary regimen and physical activity.

Results: According to BMI 534 pupils (84.4%) had normal body weight, 67 (10.6%) were overweight and 32 (5.1%) were obese. In both sexes a significant positive correlation was found between BMI and the quantity of water ingested daily and adherence to a low-calorie diet. In boys a significant negative correlation was found between BMI and having a morning meal and alcohol consumption. In boys having breakfast had a negative correlation with the percentage and quantity of body fats as well. As far as the factor “number of meals daily” is concerned, an inverse relationship with the percentage of body fats was found, once again only in boys. The higher alcohol consumption was inversely proportional to the percentage of body fats and to their quantity in kg. In girls the purposeful adherence to a low-calorie diet was directly proportional to the quantity and percentage of body fats. Waist circumference correlated significantly with the adherence to a low-calorie diet in girls (positively), whereas in boys it correlated with water intake (positively), alcohol consumption (negative) and with ingestion of a meal in the morning (negatively). Having a meal in the morning was inversely proportional on the waist:hip ratio in girls. Regarding dietary regimen, we did not observe the significant correlations we expected to find between consumption of fast food products or fruit and vegetable consumption on the one hand, and BMI, body fats in % and kg, waist circumference, and waist:hip ratio, on the other. Vegetarian dietary regimen, being relatively less popular, did not have a significant effect on weight.

Conclusion: Our study of a randomized excerpt involving adolescents and representative for the town of Plovdiv found that dietary regimen, water and alcohol intake, and adherence to a low-calorie diet had a predominant influence on weight and body proportions, with differences between the two sexes. The consequences of an unhealthy type of diet are likely to be manifested later in life, influencing significantly BMI and anthropomorphic indices when growth in height ceases.

Key words: overweight, obesity, adolescence, nutrition

1. Въведение

За развитието на наднормено тегло и затлъстяване роля играят различни групи фактори: наследствени, на околната среда (количество и състав на храната, ниво на физическа активност), физиологични (нарушения в обмяната на мастната тъкан, хормонални промени, центровете в мозъка, в частност в хипоталамуса, които контролират ситостта) и психологически (хранителни разстройства, прием на храна в отговор на стрес или депресия – т. нар. „емоционално хранене“). Основите на хранителните навици се поставят още в ранна детска възраст.

2. Цел

Да се оцени ролята на храненето в развитието на затлъстяване и метаболитен синдром в юношеска възраст.

3. Материали и методи

Обсервационно крос-секционно проучване върху рандомизирана извадка, обхващаща 633 ученици (343 момчета и 290 момичета) на възраст 16 – 19 г. от 4 гимназии в град Пловдив (Професионална гимназия по електротехника и електроника (ПГЕЕ), Национална търговска гимназия (НТГ), Езикова гимназия (ЕГ) „Пловдив“ и ЕГ „Иван Вазов“). Антропометричните измервания включват ръст, тегло, обиколка на талия и ханш, биоимпедансен анализ на количество и процент мастна тъкан чрез професионален био-импедансен анализатор на телесен състав „ТАНИТА“ BC-420. Категориите наднормено тегло и затлъстяване са определени спрямо индекса на телесна маса (ИТМ) по критериите на СЗО – ИТМ = 25.0 – 29.9 kg/m², resp. ИТМ ≥ 30 kg/m². Обиколката на талията е измервана по протокол на СЗО – по средата между горната граница на илиачната кост и долната граница на 10 ребро, в края на нормално спокойно издишване, с неразтеглив сантиметър до 0,1 см. Анкетите – оригинален образец на авторите, съдържат показатели, свързани със социално-икономическия, фамилния и здравословния статус, начина на хранене и физическата активност. Извършена е съпоставка на изследваните параметри от анкетите при двата пола при групите с нормално и наднормено тегло/затлъстяване, като са изследвани корелациите между антропометричните параметри и всички показатели, свързани с родно място, тютюнопушене, заболявания/лечението, фамилна обремененост за захарен диабет, затлъстяване, хипертония, ИБС, др. сърдечно заболяване, гуша; тегло при раждане, възраст на майката

при раждане, заболявания на майката по време на бременността, стресови ситуации по време на бременността; братя/сестри, социален статус на родителите; среден успех в училище; хранителен режим – брой хранения дневно, прием на сутрешна закуска, вегетарианство, консумация на плодове и зеленчуци, консумация на продукти „бързо хранене“ (fast food), консумация на алкохол – над 50 мл концентрат или еквивалент от др. алкохол; консумация на вода дневно; целенасочена хипокалорийна диета през последните 3 месеца; характеристика на нощния сън: продължителност; начало (преди или след 24 ч.); нарушения в съня: физическа активност – честота и продължителност; менархе, менструални нарушения, хирзутизъм, акне (при момичетата). Относно статистическите методи са приложени статистически хипотези с точно изчисляване на „p-value“. За приемане на нулевата хипотеза (H_0) е използван критерият „p-value“ > 0.05 (вероятността да се допусне грешка от първи род е под 5%), а за приемане на алтернативната хипотеза (H_1) е приложен критерият „p-value“ < 0.05 (вероятността за правилно решение е над 95%).

При провеждането на статистическия анализ е използван тестът на Shapiro-Wilk, за да се установи дали наборът от изследвани непрекъснати величини следва нормално разпределение (ИТМ, обиколка на талия, отношение Т/Х, телесна мазнина в kg и в %). За откриване на статистическа разлика между стойностите на даден параметър (ИТМ, обиколка на талия, отношение Т/Х, телесна мазнина в kg и в %), представляващ непрекъсната случайна величина, са използвани непараметричните тестовете на:

a) Mann-Whitney U (при сравнението на две дефинирани групи ученици)

b) Kruskal-Wallis (при търсенето на разлика между три или повече групи).

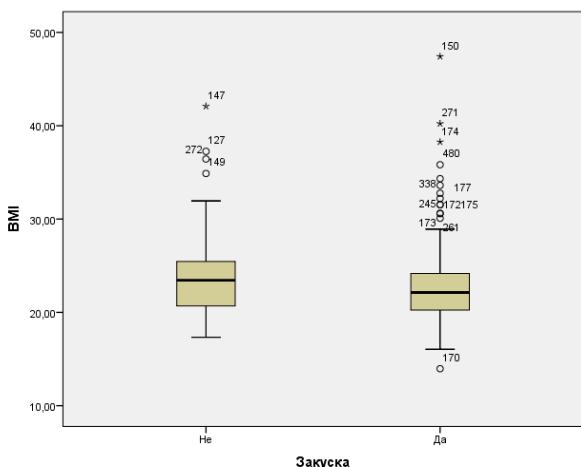
Във всички случаи е дефинирана нулева хипотеза (H_0) – стойностите на параметъра за сравняваните групи произлизат от една и съща генерална съвкупност и алтернативна хипотеза (H_1) – стойностите на параметъра за групите се различават статистически. За сравнения на променливи, заемащи дискретни значения е използван Fisher's Exact Test. За установяване наличието на корелация между две непрекъснати случайни величини или една непрекъсната и една дискретна величина, с градиращи значения е изчисляван непараметричният кофициент на корелация на Kendall's tau-b и е прилагана проверка на хипотезата за неговата статистическа различимост от нула.

За графично представяне на непрекъснатите променливи са използвани „boxplot“ диаграми, които визуализират 25-я, 50-я и 75-я персентил от съвкупността на данните, както и минималната и максималната стойност на изследвания параметър. Приложен е критерият 1.5 дължини на „boxplot“ за идентифициране на „бегълци“ и критерият 3 дължини на „boxplot“ за идентифициране на „екстремални стойности“. За дискретни променливи са представени „bar“ или „pie“ диаграми нормирани към 100% за представяне на процентния дял на дадена категория от данни. Изчисленията са направени с помощта на MS Excel 2010 и SPSS версия 17.0.

4. Резултати

Според ИТМ 534 ученици (84,4%) са с нормално телесно тегло, 67 (10,6%) – с наднормено тегло и 32 (5,1%) – със затлъстяване. При момчетата наднормено тегло се наблюдава в 6,17% ($n = 15$), а затлъстяване – в 4,48% ($n = 13$). При момчетата наднормено тегло се среща 2 пъти по-често – в 14,87% ($n = 51$), а затлъстяване – в 5,54% ($n = 19$). От 51 юноши с абдоминален тип наднормено тегло/затлъстяване според обиколката на талията, носители допълнително на още два компонента от задължителните критерии за поставяне на диагнозата метаболитен синдром са общо 33,3% – 41,2% момчета и 17,6% момичета.

Един от разгледаните фактори в нашето проучване е влиянието на правилното хранене с прием на сутрешна закуска върху телесното тегло. При момчетата се установява сигнификантна отрицателна корелация на ИТМ с приема на сутрешна закуска – тези, които не закусват сутрин, са с по-висок ИТМ, $p = 0.047$ (Фиг. 1).



Фиг. 1. Връзка между фактора закуска и ИТМ при момчета.

При тях приемът на сутрешна закуска запазва отрицателната си корелация с процента и количеството телесни мазнини ($p = 0.029$, resp., $p = 0.019$), като се явява такава и с обиколката на талията ($p = 0.01$). При момичетата не се установява сигнификантна корелация между приема на закуска с ИТМ и количеството и процента телесни мазнини, но е налице значима обратна връзка със съотношението талия:ханш ($p = 0.045$). При момчетата се открива и отрицателна корелация между процента телесни мазнини и броя на храненията ($p = 0.044$) – тези, които се хранят по-често са с по-нисък процент мастна тъкан.

И при двата пола не се установява статистически значима корелация между ИТМ и факторите: вегетарианство, брой хранения дневно, консумация на плодове и зеленчуци и консумация на продукти „бързо хранене“.

Изследвана е връзката между количеството приета вода, разделена на обем под 1 л, 1 – 2 л и над 2 л. И при двата пола се наблюдава статистически значима положителна корелация между приема на вода дневно и ИТМ (при момчета $p = 0.001$; при момичета $p = 0.004$) – лицата с ИТМ $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ декларират прием на по-голямо количество вода дневно. Тази положителна взаимовръзка се наблюдава и по отношение на процента (момчета $p = 0.028$; момичета $p = 0.019$) и количеството телесни мазнини в кг (момчета $p = 0.013$; момичета $p = 0.014$). В допълнение, при момчетата е налице и значима права корелация между дневната консумация на вода и обиколката на талията ($p = 0.009$). По отношение на съотношението талия/ханш и фактора прием на вода дневно липсва значима взаимовръзка и при двата пола.

При момчетата по-високият прием на алкохол (над 50 мл) е обратно пропорционален на обиколката на талията ($p = 0.001$), процента телесни мазнини ($p = 0.001$), ИТМ ($p = 0.021$) и количеството телесни мазнини в кг ($p = 0.002$).

Наблюдаваме положителна корелация между спазването на целенасочена хипокалорийна диета и ИТМ при двата пола – тези, които са се подложили на диета през последните 3 месеца са в подгрупата с ИТМ $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ ($p = 0.005$ при момчета и $p = 0.0002$ при момичета). Само при момичетата е налице и положителна корелация с процента и количеството телесни мазнини ($p = 0.001$) и обиколката на талията ($p = 0.007$) – т.e., тези, които са спазвали диета са с по-високо количество мастна тъкан с абдоминално отлагане. Не се регистрира значима взаимовръзка между фактора целенасочена хипокалорийна диета и съотношението талия/ханш и при двата пола.

5. Обсъждане

При учениците във възрастта 16 – 19 години в гр. Пловдив се очертава относително високо разпространение на наднормено тегло и затлъстяване – общо 15,49%, като момчетата са двукратно по-силно засегнати от момичетата (20,41% спрямо 10,65%). Към днешна дата се публикуват данни, че в нашата страна с наднормено тегло са около 30,2% от изследваните ученици, от които със затлъстяване – 12,7%. Получените от нас резултати са значително по-ниски. Предполагаме, че се дължи на факта, че е обхванат само възрастовия диапазон 16 – 19 г., докато проучванията, проведени не само в България, но и в света се отнасят най-често за целия обхват на детското-юношеската възраст (0 – 18 г.). Причините за все по-големия ръст в разпространението на наднормено тегло и затлъстяване сред населението на света са мултифакторни и се дължат до голяма степен на променените условия на живот – повишения калориен внос с храната, липса на или недостатъчна двигателна активност и др.) в комбинация с генетична предиспозиция [1, 2, 3].

При оценка честотата на наднормено тегло и затлъстяване е изключително важно да бъдат унифицирани методите за неговата оценка. В световната практика се прилагат два стандарта – на СЗО за ИТМ (от 2007 г.) и по Cole (от 2000 г.), за да има сравняемост между отделните проучвания и страни. При използване на двета стандарта, обаче, се установяват значителни различия в честотата за една и съща извадка, както за наднорменото тегло, така и за затлъстяването, особено в някои възрастови групи. Във връзка с това, че изследванията от нас контингент попада във възрастта 16 – 19 години сме приложили стандартите на СЗО за ИТМ, които са валидни за възрастни индивиди. ИТМ е показател и за здравословен риск. В многобройни проспективни и ретроспективни проучвания е открита връзката между по-висок ИТМ и различни заболявания [4].

Увеличеният хранителен прием е най-честата причина за затлъстяване. При децата това може да е следствие както на повишен апетит, така и на прехранване. Прехранването от най-ранна детска възраст може да доведе до пренагласа на апетита към прием на по-големи количества храна, отколкото е необходимо [5, 6, 7]. Като друга причина за наднормено тегло и затлъстяване може да се посочи *нередовното хранене*. Рядкото и нерегулирано приемане на храна изключително силно възбужда центъра на апетита, вследствие на което детето яде бързо и преяжда. Във фазата на пубертета често се стига

до нарушаване на създадените семейни хранителни ритуали. Дори при здравословно хранене в семейството, приоритет имат други фактори на околната среда – приятели, училище, медии, интернет и пр. [8, 9, 10]. В нашето проучване се наблюдава сигнификантна обратна корелация между телесни мазнини в % при момчета с броя хранения дневно, т.е. по-честият прием на храна е свързан с по-малък процент телесни мазнини. Това е важно и потвърждава предимствата на честото хранене с балансиран прием на храна, гарантиращ и по-равномерен енергоразход [11].

По отношение хранителните навици на изследваните от нас ученици, обаче, не установихме очакваните статистически значими корелации между консумация на продукти „бързо хранене“, консумация на плодове и зеленчуци, брой хранения дневно с ИТМ, обиколка на талия, отношение талия/ханш, телесни мазнини в % и телесни мазнини в кг. Може би за обяснение на този факт трябва да се вземат предвид неточностите на анкетния метод и начина на преценка на консумацията на посочените храни, вида и качеството им и пр.

По отношение фактора вегетарианство при мъжки пол бяха налице много малък брой случаи на такъв хранителен режим, поради което не можеше да се осъществи точно изчисление на влиянието му. При момичетата не се установява сигнификантно въздействие на вегетарианството върху ИТМ, обиколка на талия, отношение талия/ханш, телесни мазнини в % и телесни мазнини в кг. Поради това и с оглед на факта, че вегетарианство се практикува именно с цел редукция на тегло предимно от млади момичета, липсата на значима връзка с теглото в нашето проучване може да послужи като препоръка за избягване на ограничение в приема на животински мазнини и белтъчини при подрастващите, които съдържат жизнено необходими градивни материали в периода на растеж и развитие.

По отношение на фактора приложена целенасочена хипокалорийна диета през последните три месеца установихме статистически значима права корелация с ИТМ и при двета пола, а при момичета е налице права корелация и с обиколка на талия, телесни мазнини в кг и телесни мазнини в %. Предполагаме, че това са именно децата с наднормено тегло и затлъстяване, при които, както при повечето хора, подложили се на хипокалорийни диети е налице „rebound“ ефект с покачване на телесното тегло, понякога дори с повече килограми, отколкото са редуцирани. Нашите данни потвърждават препоръките да не

се спазват нисокалорийни диети при подрастващите, което дори може да доведе до обратен ефект.

Литературни данни показват, че недостатъчният прием на вода дневно се свързва със забавена обмяна на веществата, което е предпоставка за покачване на телесното тегло [12, 13, 14]. В нашето проучване и при двата пола се наблюдава статистически значима положителна корелация между ИТМ, абсолютно количество и % телесни мазнини с приема на вода дневно. Оказва се, че юношите с ИТМ ≥ 25 кг/м² и повече телесни мазнини приемат по-голямо количество вода дневно. В допълнение, при момчетата се установява и статистически значима права корелация с обиколката на талията. Това противоречие с общоприети данни от диетични режими може отново да се дължи на неточностите на анкетния метод или да се обясни с желанието на по-пълните юноши да пият повече вода с цел регулиране на теглото, точно поради горепосочените известни констатации.

Задълбочава се и проблемът с ранната и честата консумация на алкохол в юношеска възраст. Мотивация за прием на алкохол могат да бъдат културата, социалните контакти, личните убеждения, стресови ситуации и мн. др. При прекомерен прием алкохолът води до клетъчна смърт, същевременно доставя прекалено много енергия (7 ккал/г) при липсваща хранителна стойност [14, 15, 16]. В нашата извадка установяваме статистически значима обратна корелация на фактора прием на алкохол (над 50 мл) с ИТМ, обиколка на талия, телесни мазнини в % и телесни мазнини в кг, само при мъжки пол, където се среща и по-често. Тази обратна зависимост на приема на алкохол с телесното тегло и количеството мастна тъкан би могло да намери обяснение именно с нарушение в усвояването на хранителни вещества и заместване на хранене с прием на алкохол и непълноценни храни, което оказва неблагоприятно въздействие в подрастващия организъм с намаляване на мастна и мускулна тъкан. Тъй като при децата и юношите не всички органи функционират пълноценно и са много чувствителни на всякакви отровни вещества, трябва напълно да се избягва приемът на алкохол [16].

6. Заключение

В нашата представителна за град Пловдив рандомизирана извадка в юношеска възраст установяваме влияние върху теглото и телесните пропорции главно на режима на хранене, приема на вода и алкохол, спазването

на хипокалорийна диета, като се очертават разлики между двата пола. В тази преходна възраст основна роля играе фамилната обремененост за наднормено тегло/затъсяване, артериална хипертония, захарен диабет, щитовидна патология и до известна степен двигателната активност и някои социално-икономически фактори – семейство и училищна среда. Последствията от нездравословния начин на хранене вероятно се изявяват по-късно и се отразяват сигнификантно върху ИТМ и антропометричните показатели при приключване израстването на височина. Препоръчваме в задължителните измервания на тегло и телесни пропорции при подрастващите да се включат и измерване обиколка на талията и на ханша с изчисляване на съотношението талия/ханш, чрез които да се скринират рисковите за развитие на метаболитен синдром юноши, за да бъдат своевременно насочени към ендокринолог.

ЛИТЕРАТУРА

1. Константинова, М: Тенденции в разпространението на поднормено, наднормено тегло и затъсяване сред детското население в България през последните 40 години. Канд. Дис., 2015.
2. Трифонова, Л., Хранене на децата от 1 до 16 години, изд. Бестселър, 2002;11-15. Хигиена и екология под редакцията на проф. д-р Димитър Цветков, дмн, 1999, стр.153;187-195.
3. Bouchard C. Childhood obesity: are genetic differences involved? Am J Clin Nutr 2009; 89(5): 1494-1500.
4. Bohlen A., Der "Body Mass Index" – Eine bibliometrische Analyse, Dissertation 2010, Charite-Universitaetsmedizin, Berlin.
5. Mayatepek E. Ernährung. In: Pädiatrie.1. Auflage. Urban und Fischer Verlag, München, 2007.
6. Boynton-Jarrett R., Thomas TN, Peterson KE, Wiecha J., Sobol AM, Gortmaker SL. Impact of television viewing patterns on fruit and vegetable consumption among adolescents. Pediatrics. 2003; 112(6Pt 1): 1321-1326.
7. Eisterer C., Lifestyle und metabolisches Syndrom bei Kindern und Jugendlichen – Ernährungstherapeutische Massnahmen, Diplomarbeit, 2010, Wien.
8. Kimmons J E et al.: Associations between body mass index and the prevalence of low micronutrient levels among US adults; MedGenMed 2006; 8(4): 59.

9. Graf C, Holtz K. Körperliche Aktivität – Ernährungsspezifische Aspekte. Monatsschrift Kinderheilkunde 2008; 156: 33-38.
10. Hauner H, Buchholz G., Hamann A., Husemann B., Koletzko B, Liebermeister H., Wabitsch M., Westenhöfer J., Wirth A., Wolfram G., Evidenzbasierte Leitlinie, Prävention und Therapie der Adipositas, Deutsche Adipositas-Gesellschaft, Deutsche Diabetes-Gesellschaft, Deutsche Gesellschaft für Ernährung, Deutsche Gesellschaft für Ernährungsmedizin, Version 2007,29;6-9.
11. Schellong K., Geburtsgewicht und spaeteres Uebergewichtsrisiko – epidemiologische und tierexperimentelle Untersuchungen, Dissertation 2014, Charite-Universitätsmedizin, Berlin.
12. Holler A. Epidemie der Adipositas als Folge der Evolution-eine Geschichte der Ernährung, J. Ernährungsmed. 2-2002; 19.
13. Kobelt P., Die Regulation der Nahrungsaufnahme durch ausgewählte gastrointestinal Peptidhormone, Dissertation 2011.
14. Wabitsch M, Heberbrand J, Kiess W, Zwieauer K. Adipositas bei Kindern und Jugendlichen. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 2005.
15. Ford ES, Giles WH, Dietz WH. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. JAMA. 2002, 287:356–359.
16. Eidsdóttir SP, AL Kristjansson, ID Sigfusdóttir, et al: Secular trends in overweight and obesity among Icelandic adolescents: Do parental education levels and family structure plays apart. Scand. J Public Health 2013;41:384-391.

ПЕРСОНАЛИЗИРАНО ХРАНЕНЕ И МЕТАБОЛИТЕН СИНДРОМ - НАУЧЕНИ УРОЦИ И БЪДЕЩИ ПЕРСПЕКТИВИ

МАРГАРИТА ТОДОРОВА, МАРИЯ ГОРНАКОВА, СТАНИСЛАВА ХАРИЗАНОВА

Катедра "Хигиена", Факултет по обществено здраве, Медицински Университет - Пловдив
E-mail: margarita.todorova@mu-plovdiv.bg; maria.gornakova@mu-plovdiv.bg;
stanislava.harizanova@mu-plovdiv.bg

Резюме: Метаболитният синдром заема едно от първите места по заболевааемост и смъртност в света, включително и в България. Независимо от съществуването на известно разногласие относно дефиницията му, това е клинично състояние, което предразполага индивидите към увеличен рисък от сърдечно-съдови заболявания и развитие на диабет. Причините за възникване на метаболитен синдром са много, но безспорно водещо място се отрежда на комбинацията от генетични фактори, нездравословно хранене и стил на живот. Ранното диагностициране на предразположените лица към развитие на метаболитен синдром е ключово за навременен индивидуален подход в превенцията и лечението му. Първостепенно е разработването на персонализиран хранителен режим за конкретния пациент. Обичайните диети, прилагани към момента, рядко имат успех. Причината е, че различните индивиди реагират по различен начин на храните в резултат на генетичните им различия. В последното десетилетие науката за хранене и по-специално нейното ново направление - нутригеномика разкрива как нутриентите модулират гените и повлияват метаболизма на клетките с цел предвиждане и предотвратяване на заболявания, свързани с начина на живот. Поставихме си за цел да обобщим съществуващите литературни данни за връзката между хранене, гени и развитие на метаболитен синдром. Фокусът ни е върху въздействието на нутриентите върху генома, протеома и метаболома. Въпреки проведените задълбочени научни проучвания все още предстои изгответе на базирана на доказателства хранителна стратегия при метаболитен синдром. Нутригеномиката ще даде възможност за следване на персонализиран начин на хранене, базиран на особеностите на индивидуалните гени и за предотвратяване, лекуване или облекчаване на редица хронични заболявания, включително и метаболитен синдром.

Ключови думи: метаболитен синдром, гени, нутригеномика, персонализирано хранене

PERSONALIZED NUTRITION AND METABOLIC SYNDROME - LESSONS LEARNED AND FUTURE PERSPECTIVES

MARGARITA TODOROVA, MARIA GORNAKOVA, STANISLAVA HARIANOVA

Department of Hygiene, Faculty of Public Health, Medical University - Plovdiv
E-mail: margarita.todorova@mu-plovdiv.bg; maria.gornakova@mu-plovdiv.bg;
stanislava.harizanova@mu-plovdiv.bg

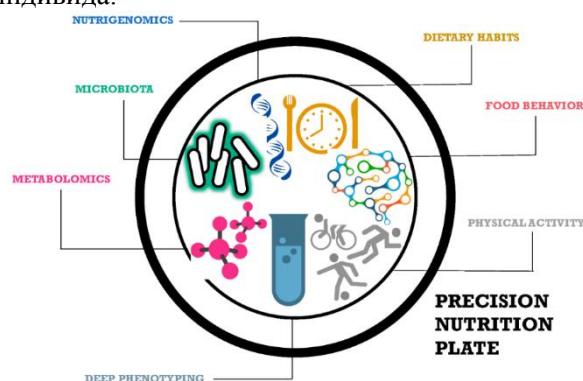
Abstract: Metabolic syndrome occupies one of the first places in terms of morbidity and mortality in the world, including Bulgaria. Despite some disagreement about its definition, it is a clinical condition that predisposes individuals to an increased risk of cardiovascular disease and the development of diabetes. The causes of metabolic syndrome are many, but undoubtedly the leading place is given to the combination of genetic factors, unhealthy diet, and lifestyle. Early diagnosis of predisposed individuals before the development of metabolic syndrome is key to a timely individual approach in its prevention and treatment. The development of a personalized diet for the specific patient is paramount. The common diets currently used are rarely successful. The reason is that every individual reacts differently to foods as a result of the genetic variability. In the last decade, the science of nutrition, and in particular its new direction, nutrigenomics, has revealed how nutrients

modulate genes and affect cell metabolism in order to predict and prevent lifestyle-related diseases. We aimed to summarize the existing literature on the relationship between nutrition, genes and the development of metabolic syndrome. Our focus is on the impact of nutrients on the genome, proteome and metabolite. Despite in-depth scientific studies, an evidence-based nutritional strategy for the treatment and management of metabolic syndrome remains to be developed. Nutrigenomics will give us the tools to follow a personalized diet based on the characteristics of individual genes and to prevent, treat or alleviate a number of chronic diseases, including metabolic syndrome.

Key words: metabolic syndrome, genes, nutrigenomics, personalized nutrition

1. Въведение

Краят на международния изследователски проект “Човешки геном” през 2003-та година постави основите на ново мултидисциплинарно направление в науката за хранене – нутригеномика. Фокусът е върху въздействието на нутриентите върху генома, протеома и метаболома. Създаде се перспектива за разработване и прилагане на научнообоснована индивидуализирана диета. Персонализираното хранене [1] разглежда генома в комбинация с редица ключови фактори като хранителни навици и поведение, физическа активност, микробиот и метаболом. [2], фиг. 1. Извършеният анализ на достъпната литература за последните 5 години показва, че профилирането на гените не е достатъчно за изготвянето на персонализиран хранителен режим. Генетичната информация трябва да се разглежда в контекста на комбинацията от фактори на заобикалящата среда. Проучени в дълбочина, тези фактори могат да ни предоставят необходимата основа, на която ще бъде възможно изготвянето на успешен индивидуален режим на хранене [3]. Задача, която би била обречена на неуспех, ако се фокусираме само върху ефикасността на определена диета или върху генома на индивида.



Фигура 1. Схематично представяне на основните фактори, които трябва да се вземат предвид при изготвяне на персонализиран хранителен режим (по Brennan and Roos)

2. Литературни данни

Метаболитният синдром заема едно от първите места по заболеваемост и смъртност в света, включително и в България. Честотата му нараства глобално, което налага своевременна диагноза и лечение. Независимо от съществуването на известно разногласие относно дефиницията на метаболитния синдром, за поставяне на диагноза е необходимо наличие на три от следните широко приети критерия¹ [4]:

- Плазмена глюкоза на гладно $\geq 5.6 \text{ mmol/l}$ (или терапия за хипергликемия)
- Артериално налягане $\geq 130/85 \text{ mmHg}$ (или терапия за хипертония)
- Триглицериди $\geq 1.7 \text{ mmol/l}$ (или терапия за хипертриглицеридемия)
- HDL-холестерол $< 1.03 \text{ mmol/l}$
- Обиколка талия $\geq 102 \text{ см}$ при мъже и $\geq 88 \text{ см}$ при жени за европейци.

Няма дефинирано лечение на метаболитния синдром, ето защо първостепенна е профилактиката на всички изграждащи го и развиващи се с времето у пациента фактори. А именно хипергликемия, артериална хипертония, затъстване, дислипидемия. Тези фактори биват силно повлияни от стила на живот на индивида, макар и често да са свързани с генетична предрасположеност.

Влияние на витамин K върху метаболния синдром

Вит. К е мастноразтворим витамин с две форми – филохинон и менахинон. Филохинонът (K1) се среща в зелените листни зеленчуци, а менахинонът (K2) в животинските продукти като месо, яйца и сирене.

Срезови и лонгитудинални проучвания

Според Dam и колектив [5] нивото на вит. К в организма, поради висок прием на менахинон, се свързва с по-нисък риск от

¹ Настоящите критерии за метаболитен синдром са възприети от няколко водещи организации, между които International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; International Association for the Study of Obesity.

метаболитен синдром както при срезови, така и при лонгитудинални проучвания. Установяват се по-ниски триглицеридни концентрации и по-ниска обиколка на талията.

Опти с експериментално индуциран метаболен синдром

Според Gancheva и сътр. [6] приемът на вит. К оказва благоприятни ефекти върху плъхове, при които експериментално се индуцира метаболитен синдром. Изследването е проведено върху плъхове, разделени в 4 групи – 2 контролни групи на стандартна лабораторна диета и 2 групи на диета с повишено съдържание на мазнини и въглехидрати. На една от всяка двойка групи се прилага вит. K2 перорално в доза 35мг/кг в продължение на 10 седмици. В края на експеримента телесните тегла на плъховете от 4-те групи не се различават. Но при животните с метаболитен синдром се наблюдава повишаване на индекса на мастната тъкан, кръвнозахарните нива на гладно, серумните нива на лептина, серумните триглицериди и LDL-холестерола в сравнение с контролата. Установено е, че приложението на вит. K2 на плъховете с индуциран метаболитен синдром се редуцира недостоверно обема на висцералната мастна тъкан, повишените глюкозни нива, повишените триглицериди, нивата на LDL- холестерола. Понижава се също атерогенния индекс холестерол/HDL-холестерол, а лептиновите нива се нормализират. Следователно приемът на вит. K може да бъде от полза при симптоми на метаболитен синдром, но точният механизъм, по който влияе върху въглехидратната и липидната обмяна все още не е изяснен. Възможно е остеокалцинът да има благоприятна роля. Установено е, че при мишки, лишени от остеокалцин, стойностите на кръвната захар са по-високи, глюкозо-индуцираната инсулинова секреция е намалена и се наблюдава нарушен глюкозен толеранс [7].

Влияние на топлинната обработка на храни

Проучване, проведено от Birlouez-Aragon и колектив [8] включва 64-ма доброволци, подложени на 2 различни диети, но с еднаква енергийна и хранителна стойност. При едната диета се използват конвенционални методи за приготвяне на храна като готвене на грил, пържене и печене, а при другата диета – храни в суров вид или такива пригответи на пара. Установено е, че при участниците, хранещи се с първата диета (конвенционалната), приемът на калории е с 10% по-висок в сравнение с останалите участници. По отношение на нивото на глюкозата на гладно не са установени

съществени разлики, но нивата на инсулин в кръвта са значително по-ниски при лицата, поставени на втората диета. Нивото на общия холестерол и на HDL- холестерола е с 10% по-ниско при участниците, консумиращи храна приготвена на пара в сравнение с останалите лица. Триглицеридите също са по-ниски с 9% при консумиращите втората диета. В нивата на LDL-холестерола няма значителни разлики. Съдържанието на CML (carboxymethyl-lysine) в плазмата на консумиращите първата диета е значително по-високо в сравнение с това при консумиращите храна с щадяща термична обработка. CML е един от най- често срещаните крайни продукти на гликирането (AGEs).

Майлард реакция

Майлард реакцията, взела името си от френския химик Луис Камил Майлърд, открил процеса в началото на 20-ти век, е набор от химични реакции между аминокиселините и редуциращите въглехидрати, които причиняват покарбонилиране на храните. Един от проблемите на тази реакция е, че тя води до образуване на нездравословни вещества като например акриламид.

Развитие на навици в областта на приготвяне на храната

В модерното ежедневие хората все повече възприемат нови методи и техники на приготвяне на храна. Въпреки че техниките с висока топлинна обработка са отдавна познати, поради данните за възможно токсично и канцерогенно въздействие на отделящите се вещества, те все по- често биват заменяни от консумация на храна, която е сварена или приготвена на пара. Високият прием на продукти от Майлард реакцията стимулира образуване на проинфламаторни цитокини като TNF- α , развитие на инсулинова резистентност и сърдечно-съдови заболявания при експериментални животни [9].

Влияние на крайните продукти на гликирането

Според публикация на д-р Гreta Грозева [10] крайните продукти на гликирането участват в патогенезата на хроничните усложнения при захарен диабет и сърдечно-съдови заболявания чрез възпаление, окислителен стрес и предизвикани липидни нарушения. Свързвайки се с рецепторите си, AGEs активират ендотелна дисфункция, която ускорява развитието на атеросклероза. AGEs водят до възпалителни и пролиферативни процеси, ускоряват макросъдовата болест, модифицират LDL, понижават техния клирънс и повишават погъщането им от макрофагите. AGEs се формират по време на топлинната обработка на

храната чрез същите реакции, чрез които се формират и ендогенно. Високата температура е най-важният фактор, повлияващ формирането на AGEs. Сред здрави хора диетата с високо ниво на CML води до спад в нивото на лептина, повишава проинфламаторните молекули IL-6, маркерите за ендотелна дисфункция като Е-селектин, ICAM-1, VCAM-1, TNF α и оксидативен стрес, измерени от TBARS или 8-изопростан [11]. Плазмените нива на AGEs са по-високи при пациенти с диабет в сравнение със здрави индивиди. Хроничното натрупване на CML в ендотела ускорява атеросклерозата, води до увреждане на бъбреците, ретината и до дифузна коронарна болест при хора с диабет и при експериментални животни. От това следва, че описаните процеси се наблюдават както при здрави лица, така и при пациенти с диабет. Когато обаче диетата при пациенти с диабет съдържа високо ниво AGEs, усложненията настъпват по-рано и прогресират по-бързо.

**Цели на персонализираното хранене.
Защо диетите не са ефективни на популационно ниво?**

В резултат от урбанизацията, темпът на разпространение на метаболитния синдром продължава да нараства. Наложително е осъществяването на контрол чрез здравословен хранителен режим. За тази цел Европейската комисия за наука и знания предоставя научно обосновани препоръки за здравословно хранене: висок прием на плодове и зеленчуци, пълнозърнести продукти, риба, избягване приема на газирани напитки и захарни изделия. Въпреки широкото приложение на тези хранителни препоръки в Европа, заболеваемостта от диабет и сърдечно-съдови заболявания остава висока.

Пропускаме ли нещо? Настоящите диетични препоръки се прилагат на ниво популация. Често не се вземат предвид индивидуалните особености на всеки организъм на нива геном, протеом, метаболом и микробиота. Подценяват се факторите на средата и начина на живот. Именно тези особености водят до ключов момент: индивидуалният отговор на организма към хранителните компоненти дори при индивидите, които са част от една и съща популация. Широко прилагана, дадена диета се оказва неподходяща и неефективна при различни популации и лица [12]. В този обзор разглеждаме актуални проучвания, които подкрепят тази теза.

При изучаването на метаболитния синдром се наблюдава висока вариабилност в клиничните прояви. Причините: Всеки човек е

носител на специфична генетична информация. Освен това състоянието засяга организма на различни нива и прогресира по различни пътища. Именно разбирането на молекуларните пътища ще позволи разработването на персонализиран хранителен режим, ефективен за отделния пациент.

Инсулиновата резистентност се развива на различни органни нива в организма, а тежестта ѝ в отделни тъкани варира. Това довежда до създаване на концепцията за *тъканно-специфична инсулинова резистентност* [13]. Според рандомизираното проучване, the CORDIOPREV-DIAB, вече съществуват и доказателства, които подкрепят хипотезата, че при хората с мускулна инсулинова резистентност средиземноморската диета е по-ефективна, докато тази ефективност не се наблюдава при лица с чернодробна инсулинова резистентност. Приложението на нутригеномиката и метаболомиката постига значително в областта на тази концепция - установени са специфични фенотипи на инсулинова резистентност. Чрез проучването си Blaak и колегите му [14] демонстрират, че гените, участващи в екстрацелуларното ремоделиране са с повищена експресия при лица с чернодробна инсулинова резистентност, докато гени, свързани с възпалението, са експресирани в голям брой при лица с мускулна инсулинова резистентност. В едно от разгледаните проучвания [15] се посочва, че чернодробната инсулинова резистентност при жените е асоциирана с високи нива на плазмения триацилглицерол (TAG), диацилглицерол и с по-ниски нива на нечетна и много дълговерижна TAG. Тези отклонения в липидния профил обаче не се наблюдават при мъжете [16]. Също така, установено е, че при една група преддиабетни пациентиувреденият глюкозен толеранс е характерен и по-изразен в периферната мускулатура, докато при друга група – нарушеният глюкозен профил на гладно се характеризира с по-изразена чернодробна инсулинова резистентност [17]. Посочените в раздела резултати, ясно демонстрират че, за да бъде ефективна една диета, трябва да бъдат определени както молекуларните пътища, така и фенотипите на отделния пациент. Именно усилията в тази област ще заложат основите на персонализираното хранене. Все още предстои да бъде извърян дълъг път, преди да можем да отговорим акуратно на въпроса “Как трябва да се храним?”.

Достатъчни ли са гените, за да се изготви персонализиран хранителен режим?

Очаква се генетичните изследвания да се превърнат в „революцията“ на медицината. Нутригеномиката и нейните дъщерни“-омични” направления се разглеждат като разковничето за основаване на персонализирано хранене. Но генетичните изследвания съществуват и дори се лансират на пазара още преди изобщо да бъде уточнена идеята за персонализирана медицина. Пазарът за генетично тестване “директно към потребителя” (DTC - The direct to consumer) е иницииран през 2007г. Оттогава се забелязва значително разширяване и популяризиране на тези услуги. Успоредно с това, непрекъснато се провеждат изследвания на потенциал, полза и вреда от достъпните за потребителя генетични тестове. В България, стойността на тестването варира в диапазона от под 50 лв. до 1000 лв. и повече. Клиентите изпращат материал да извлечане на ДНК и няколко седмици по-късно, получават „персонализиран“ доклад, който ги информира за генетични предразположения към заболявания, непоносимост към дадени храни и др. Някои компании дори предлагат изготвяне на персонализиран хранителен режим на база генетичен тест. Тези услуги се извършват без да включват здравни грижи или консултация с медицински експерт. Няма и достатъчно научни доказателства за правотата на препоръките на тези изследвания [18]. За изготвяне на препоръки често се изследват само един или няколко гена, а това е потенциално подвеждащо. Необходимо е да се изследва комбинация от гени в контекста на факторите на околната среда и начина на живот.

Втора често допусканая грешка е вярването, че ако е даден индивид е носител на ген, предразполагащ към определено заболяване или състояние, то носителството на гена предвижда проявата им напред във времето. Същото важи и за носителството на гените, които прогнозират дадена реакция на организма спрямо определена храна или макронутриент. Проведено е Канадско проучване [19], чиято цел е да разработи оценка за генетичния риск (GRS). В продължение на шест седмици 208 участници приемат добавка омега-3 мастна киселина (n-3 FA). Като ефект от добавката се очаква нивото на концентрацията на триглицериди (TG) в серума да намалее. Познаването на генетичния риск на участниците ни позволява да определим с голяма точност кои от тях ще се повлият от шест седмичния прием на омега-3 мастна киселина и кои не. Участниците в проучването са разделени на две групи: „отговорящи“, чиито концентрации на триглицериди намаляват след 6-седмичен прием на омега-3 мастна киселина и „неотговорящи“,

чиито концентрации на триглицериди не се променят, или се увеличават, въпреки приема на добавката. Конкретно тук генетичен риск е огледало на вероятността даден участник да се повлияе от добавката омега-3 мастна киселина (т.е. да бъде „отговорящ“). Резултатът е почти перфектна дискриминационна способност (area under the receiver operator curve=0.94). Същият GRS е използван в европейското проучване FINGEN (т.е. в друга популация), в което 312 участници приемат добавката в 12-седмичен период. Резултатите са съвършено различни. GRS обяснява само 3.7% от вариацията в отговора на TG и не позволява идентифициране кои от участниците ще отговорят положително на добавката (area under the receiver operator curve=0.64). Сравнението между тези две проучвания показва, че генетичният тест може да е приложим за една популация, но не непременно и за друга. Факторите като възраст, пол, произход, диета и др. също оказват влияние. Тези проучвания ни насочват към следното: Генотипът може да окаже влияние върху отговора към даден нутриент, но носителството на генетична информация не предсказва с точност какъв ще бъде този отговор. Следователно генетичните тестове не са достатъчни сами по себе си, за да се изготви персонализирана диета. Както вече споменахме, трябва да се разгледа цялата палитра от информация за индивида, включително факторите на средата и стила на живот.

3. Заключение

Въпреки проведените задълбочени научни проучвания в областта на персонализираното хранене и ранното откриване на метаболитния синдром, все още предстои изготвяне на базирана на доказателства хранителна стратегия. Бъдещето в тази сфера ще се основава на нутригеномиката, на познанията за микро- и макронутриентите, модулиращи гените и протеиновата експресия и повлияващи метаболизма на клетките и дори специфичното въздействие на отделни вещества, отделящи се при приготвянето на храната. Следването на персонализиран начин хранене при метаболитен синдром ще даде възможност за възстановяване и контрол на здравето чрез промяна на експресията и/или структурата на индивидуалния генетичен профил.

4. Благодарности

Настоящото проучване е подкрепено по Национална програма „Млади учени и постдокторанти“ на Министерство на образованието и науката. Публикацията не

отразява непременно мнението или позицията на финансиращия орган. Отговорност за съдържанието на публикацията носят единствено авторите.

ЛИТЕРАТУРА

1. Brennan, L., de Roos, B. Nutrigenomics: lessons learned and future perspectives. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2021, 113(3), 503-516.
2. Toro-Martín, J., Arsenault, B.J., Després, J.P., Vohl, M.C. Precision Nutrition: A Review of Personalized Nutritional Approaches for the Prevention and Management of Metabolic Syndrome. *Nutrients*, 2017, 9(8), 913.
3. Betts, J.A., Gonzalez, J.T. Personalised nutrition: What makes you so special? *Nutrition Bulletin*, 2016, 41(4), 353-359. Online: <https://doi.org/10.1111/nbu.12238>
4. Каменова, П. Метформин и метаболитен синдром. *Наука Ендокринология*, 2012, 4, 149-154.
5. Dam, V., Dalmeijer, G.W., Vermeer, C., et al. Association Between Vitamin K and the Metabolic Syndrome: A 10-Year Follow-Up Study in Adults. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2015, 100(6), 2472-2479.
6. Gancheva, S., Galunska, B., Savova, M. Ефекти на витамин K2 при плъхове с модел на метаболитен синдром. *Scientific researches from the Jubilee Conference "Audacity and youth in pharmacology," dedicated to the 70th anniversary of the Department of Pharmacology at the Medical University of Plovdiv and 100 years since the birth of prof. Peycho Peychev – fondat*, 2017, 89 – 96.
7. Lee, N.K., Sowa, H., Hinoi, E., et al. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell*, 2007, 130(3), 456-469.
8. Birlouez-Aragon, I., Saavedra, G., Tessier, F.J., et al. A diet based on high-heat-treated foods promotes risk factors for diabetes mellitus and cardiovascular diseases. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2010, 91(5), 1220-1226.
9. Lin, R.Y., Choudhury, R.P., Cai, W., et al. Dietary glycotoxins promote diabetic atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis*, 2003, 168(2), 213-220.
10. Грозева, Г. Клинично приложение на определянето на крайните продукти на гликирането при пациенти със захарен диабет. *Наука Ендокринология*, 2010, 1, 10-13.
11. Jara, N., Leal, M., Bunout, D., et al. Dietary intake increases serum levels of carboxymethyl-lysine (CML) in diabetic patients. *Nutrición hospitalaria: organo oficial de la Sociedad Española de Nutrición Parenteral y Enteral*. 2012, 27, 1272-1278.
12. Wang, D. Improvements In US Diet Helped Reduce Disease Burden And Lower Premature Deaths, 1999-2012; Overall Diet Remains Poor. *Health affairs (Project Hope)*, 2015, 34(11), 1916-1922.
13. Blanco-Rojo, R., Alcalá-Díaz, J.F., Wopereis, S., et al. The insulin resistance phenotype (muscle or liver) interacts with the type of diet to determine changes in disposition index after 2 years of intervention: the CORDIOPREV-DIAB randomised clinical trial. *Diabetologia*, 2016, 59(1), 67-76.
14. Blaak, E. Current metabolic perspective on malnutrition in obesity: towards more subgroup-based nutritional approaches? *Proceedings of Nutrition Society*, 2020, 79(3), 331-337.
15. Kolk, B., Vogelzangs, N., Jocken, J., et al. Plasma lipid profiling of tissue-specific insulin resistance in human obesity. *International Journal of Obesity*, 2018, 43, 989–998.
16. Kolk, B., Kalafati, M., Adriaens, M., et al. Subcutaneous Adipose Tissue and Systemic Inflammation Are Associated With Peripheral but Not Hepatic Insulin Resistance in Humans. *Diabetes*, 2018, 68(12), 2247-2258.
17. Stefan, N., Fritzsche, A., Schick, F., et al. Phenotypes of prediabetes and stratification of cardiometabolic risk. *Lancet Diabetes Endocrinology*, 2016, 4(9), 789-798.
18. Loos, R.J.F. From nutrigenomics to personalizing diets: are we ready for precision medicine? *American Journal of Clinical Nutrition*, 2019, 109(1), 1-2. Online: <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqy364>
19. Vallée Marcotte, B., Guénard, F., Lemieux, S., et al. Fine mapping of genome-wide association study signals to identify genetic markers of the plasma triglyceride response to an omega-3 fatty acid supplementation. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2019, 109(1), 176-185.

ПРОУЧВАНЕ РОЛЯТА НА МАСМЕДИИ, СОЦИАЛНИ МРЕЖИ И МЕСТНИ ВЛАСТИ ЗА НАЛАГАНЕ НА ЗДРАВОСЛОВНО ЗДРАВНО ПОВЕДЕНИЕ СРЕД ПОДРАСТВАЩИТЕ

НИНА МУСУРЛИЕВА¹, ТАНЯ БОЖКОВА²

к-ра „Социална медицина и обществено здраве“, ФОЗ, Медицински университет – Пловдив 1,
к-ра „Протетична дентална медицина“, ФДМ, Медицински университет – Пловдив 2

nina_mussurlieva@abv.bg, dr.tanq.bojkova@gmail.com

Резюме: Целта на настоящото проучване е да се изследва ролята на масмеди, социални мрежи и местни власти за налагане на здравословно здравно поведение сред подрастващите. За постигане на целта е проведено проучване на територията на гр. Пловдив в периода септември-февруари 2020 г. Техническа единица на наблюдението са: Целодневна детска градина „Буратино“, Целодневна детска градина „Люляк“, Целодневна детска градина „Мир“, Целодневна детска градина „Малкия принц“, Целодневна детска градина „Майчина грижка“ – Пловдив. Логическа единица: родителите на деца от изброените детски градини, както и преподавателския и помощен състав, работещ в тях. В проучването участват 214 родители и 124 учители. Използван е анкетен метод – пряка индивидуална анкета. Събраната информация е проверена и кодирана в електронна база данни за статистическа обработка на резултатите. При обработката и анализа на резултатите се използваха следните статистически методи: дескриптивна статистика и непараметричен анализ χ^2 -тест (критерий на Пирсън) - за статистическа проверка на хипотези ($p \leq 0.05$). Статистическата обработка на данните е извършена с помощта на програма за статистическа обработка SPSS (SPSS Inc., IBM SPSS Statistics) версия 19.0. За съжаление повече от половината респонденти (63.7±2.37%) считат, че обществените власти и публичните средства за телекомуникация не изпълняват достатъчно добре тази си роля. Това може да се очертава като основен проблем за реализирането на промоцията на детското орално здраве, защото качествено новия модел за стратегия в образоването на пациентта е търсеното на връзка между здравната информираност за правилно здравно поведение и създаване на навици.

Ключови думи: здравно поведение, масмеди, социални мрежи, подрастващи

SURVEY OF THE ROLE OF MASS MEDIA, SOCIAL NETWORKS AND LOCAL AUTHORITIES IN ENFORCING HEALTHY HEALTH BEHAVIORS AMONG ADOLESCENTS

NINA MUSURLIEVA¹, TANYA BOZHKOVA²

Department Social Medicine and Public Health, Faculty of Public Health. Medical University of Plovdiv 1, Department Prosthetic Dental Medicine, Faculty of Dental Medicine, Medical University of Plovdiv 2

nina_mussurlieva@abv.bg, dr.tanq.bojkova@gmail.com

Abstract: The aim of this study is to examine the role of mass media, social networks and local authorities in enforcing healthy health behaviors among adolescents. To achieve this goal, a study was conducted on the territory of Plovdiv in the period September-February 2020. The technical unit of observation are: three all-day kindergartens in Plovdiv. Logical unit: the parents of children from the listed kindergartens, as well as the teaching and support staff working in them. The study involved 214 parents and 124 teachers. A sociological method was used - a direct individual interview. The following statistical methods were used in the processing and

analysis of the results: descriptive statistics and nonparametric analysis χ^2 - test (Pearson's criterion) - for statistical testing of hypotheses ($p \leq 0.05$).

Unfortunately, more than half ($63.7 \pm 2.37\%$) believe that public authorities and public telecommunications do not perform this role well enough. This can be outlined as a major problem for the implementation of the promotion of children's oral health, because the qualitatively new model of strategy in patient education is the search for a link between health awareness for proper health behavior and habit development.

Key words: *health behaviors, media, social networks, local authorities, adolescents*

Въведение

Едно от основните средства на здравната промоция е здравната просвета [1-5]. В нея са заложени следните принципи: социална насоченост, масовост, популярност, актуалност, емоционалност, системност, конкретност и др. Формирането на здравната култура на индивида е сложен и продължителен процес, за който се изиска непрекъснато въздействие с всички средства на здравната просвета [1,4,5]. Методите на здравната информираност се свеждат до следните групи – методи с преобладаване на устното слово, с преобладаване на печатното слово, методи с преобладаване на нагледни елементи и комбинирани методи. Денните в литературата показват, че в съвременното общество много често се използва интернет, за да се допълни информираността, особено родителите, които се отнасят към „Х“ поколението (1965-1982 г.).

Целта на настоящото проучване е да се изследва ролята на масмедиите, социални мрежи и местни власти за налагане на здравословно здравно поведение сред подрастващите.

Материал и методи

Обект на проучването е ролята на масмедиите, социални мрежи и местни власти за налагане на здравословно здравно поведение сред подрастващите.

Единици на наблюдение:

- Техническа единица: Целодневна детска градина „Буратино“, Целодневна детска градина „Люляк“, Целодневна детска градина „Мир“, Целодневна детска градина „Малкия принц“, Целодневна детска градина „Майчина грижа“ – Пловдив.

- Логическа единица: родителите на деца от изброените детски градини, както и преподавателския и помощен състав.

От съществено значение за достоверността на резултатите от проучването е определяне на необходимия брой единици на наблюдение. За изчисляването им е използван двуетапният метод на Щейн. В първия етап, с помощта на извадка от 50 родители е определено стандартното отклонение и

стандартната грешка. Във втория етап е приложена формулата за изчисляване на необходимият брой единици при $P(u)=0.95$, $Sx=6.35$ и максимално допустима грешка 1 г. Изчисленият необходим брой единици за родителите е 155. В проучването участват 214 родители.

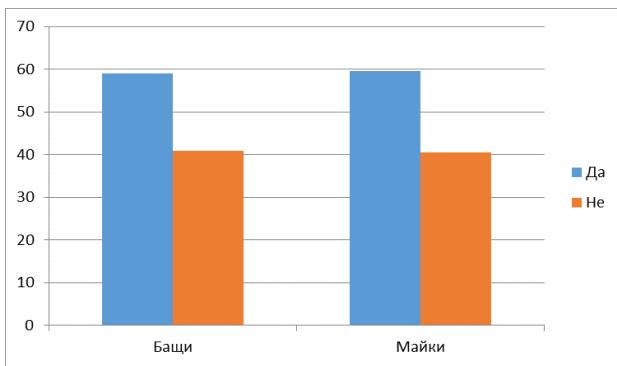
За учителите и помощния персонал ($n=40$) при $P(u)=0.95$, $Sx=6.20$ и максимално допустима грешка 1.5 г. са определени 66 единици на наблюдение. В настоящото проучване участват 124 учители и помощен персонал.

Мнението на родителите, учителите и помощния персонал е проучена чрез специално разработени въпросници. Въпросниците са разпространени на хартиен носител и са раздадени лично на родителите и персонала от изброените детски градини. За целта на проучването е използван анкетен метод – пряка индивидуална анкета. Събраната информация е проверена и кодирана в електронна база данни за статистическа обработка на резултатите. При обработката и анализа на резултатите се използва следните статистически методи: дескриптивна статистика и непараметричен анализ χ^2 - тест (критерий на Пирсън) - за статистическа проверка на хипотези ($p \leq 0.05$). Статистическата обработка на данните е извършена с помощта на програма за статистическа обработка **SPSS (SPSS Inc., IBM SPSS Statistics)** версия 19.0.

За графично представяне и визуализиране на резултатите е използван **Microsoft Office Excel 2010**.

Резултати и обсъждане

За да се оцени желанието на респондентите да бъдат (само) информирани им беше зададен въпросът „Ползвате ли интернет, за да получите информация за оралното здраве на вашите деца?“. Получените данни са представени на Фиг. 1.

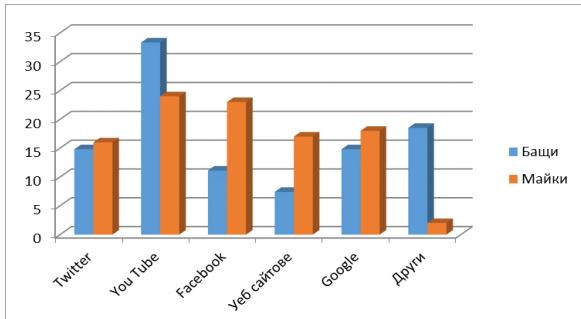


Фиг. 1. Разпределение на отговорите на въпроса „Ползвате ли интернет, за да получите информация за оралното здраве на вашите деца?“

Почти идентични са отговорите за мъжете ($59.09\pm7.41\%$) и жените ($59.52\pm3.79\%$) по отношение ползването на интернет. Не се наблюдава съществено различие в отговорите на двата пола по отношение на осведомеността им при интернет достъп, $P=0.96$ ($\chi^2=0.03$, $df=1$).

Въпреки, че няма единна система за класификация на социалните мрежи, съществуват безспорни предпочтения от страна на потребителите. Най-популярните от всички подобни са Facebook и Twitter. Социалните мрежи позволяват на хората да обменят снимки, текстове, съобщения, както да общуват в реално време чрез чат или видеовръзка. Те не само се информират за приятели, роднини, непознати, а също имат достъп до различни факти, дейности и възможности. Това, което обединява всички тези сайтове е, че потребителите могат да си сътрудничат, да споделят линкове, да правят коментари и да обменят информация.

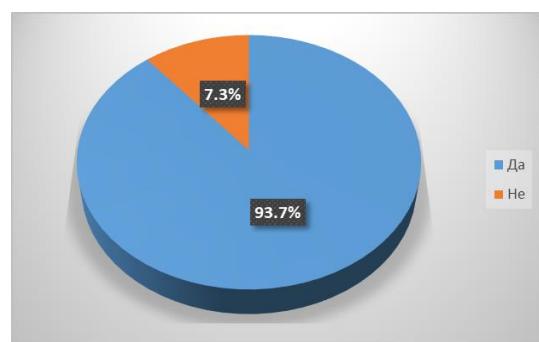
Предвид тези обстоятелства в съвременното общуване, бе поставена задача на респондентите да оценят по-известните социални мрежи, ползвани за подобряване на информираността им. Данните са представени графично на Фиг. 2.



Фиг. 2. Избор на социална мрежа за подобряване информираността на родителите

При обсъждане на резултатите прави впечатление високите относителни дялове и за двата пола на родителите, които ползват YouTube. Данните, получени през YouTube са предпочитан начин за информираност от бащите ($33.33\pm9.07\%$), в сравнение с майките ($16.00\pm3.67\%$). За въпросите, свързани с оралното здраве, майките ($23.00\pm4.21\%$) намират по-подробна информация във Facebook, отколкото бащите ($11.11\pm6.05\%$). Информацията, потърсена от Google е в полза за ($14.81\pm6.84\%$) от бащите и за ($18.00\pm3.84\%$) от майките. По-слаб е интересът към уеб сайтове и други места в интернет. Известно е, че в интернет очертанията между половете се размиват, вследствие на прекомерната и споделена информираност. В настоящата извадка, това твърдение не се потвърждава поради особеностите на различните социални форми на виртуално общуване, които са представени на фигура 2. При анализа на този въпрос се установява съществено различие в избора на социална мрежа $P=0.027$ ($\chi^2=14.23, df=6$).

Възможно е информацията в медийното пространство да е неточна, заблуждаваща или неподходяща. Предполага се, че отговорните специалисти трябва да осигурят точната и правилна информация по проблемите на оралното здраве. Затова на родителите е зададен въпросът „Вие бихте ли участвали в обучителни лекции за изграждане на правилни орално-хигиенни навици?“ (Фиг. 3.).

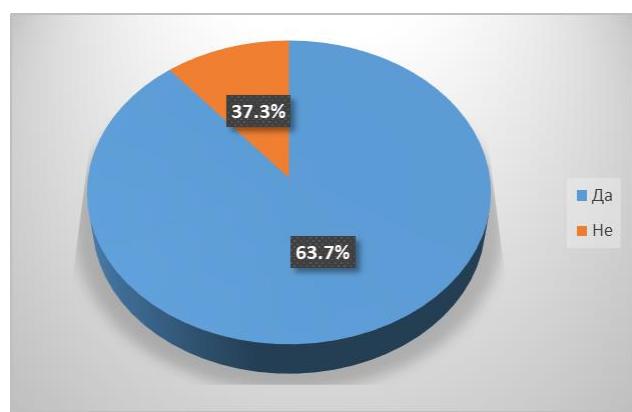


Фиг. 3. Разпределение на отговорите на въпроса „Вие бихте ли участвали в обучителни лекции за изграждане на правилни орално-хигиенни навици?“

Почти всички родители ($93.7\pm0.01\%$) заявяват своята готовност да участват в обучения за повишаване на познанията им за орално-хигиенните навици. Този резултат е показателен за готовността и желанието на родителите да участват в процеса на промоция на детското орално здраве, осигурявайки

възпитателната роля на семейството. Здравното възпитание трябва да започне в семейството още от най-ранна възраст като от особено значение е примерът за подражание и поощрение при формиране на личните хигиенни навици на детето [1,5].

Позитивното здравно поведение трябва да е задача на цялото общество. Единствено при осигуряване на системност, непрекъснатост и последователност на този процес, както и въздействие на всички средства за здравна просвета, резултатите биха били устойчиви във времето. Родителите са разпитани за ролята на местните власти и масмедиите във формирането на правилно орално здравно поведение на техните деца.



Фиг. 4. Разпределение на отговорите на въпроса „Смятате ли, че местните власти, масмедиите, въздействат достатъчно за формиране на правилно орално здравно поведение?“

Фигура 4 представя разпределението на отговорите на респондентите. За съжаление повече от половината ($63.7 \pm 2.37\%$) считат, че обществените власти и публичните средства за телекомуникация не изпълняват достатъчно добре тази си роля. Това може да се очертае като основен проблем за реализирането на промоцията на детското орално здраве, защото качествено новия модел за стратегия в образованието на пациента е търсеното на

връзка между здравната информираност за правилно здравно поведение и създаване на навици.

Заключение

Местната власт и масмедиите трябва да засилят ролята си в промотиращи оралното здраве дейности, защото основно разбиране на концепцията за промоция на здравето е, че здравето е споделена отговорност и добри резултати биха се получили само, ако индивидите, общността, държавата, неправителствените организации работят съвместно за постигане на общи здравни цели. Работата в партньорство между учители и родители е комплексна, динамична и не винаги е лесна. За изграждане на успешно партньорство в училище е необходимо да са на лице редица условия: обща визия за проблемите и начините за справяне с тях, обща цел, осъзната нужда от съвместна работа за постигане на целта, споделени задължения и отговорности, допълващи се компетентности, добра колаборация, взаимно уважение и други .

ЛИТЕРАТУРА

1. Wind M, Kremers S, Thijs C, Brug J. Toothbrushing at school: effects on tooth brushing behaviour, cognitions and habit strength, Health education 2005; 105(1): 53-61.
2. World Health Organization. Health promotion and oral health, 2014. Available at: http://www.who.int/oral_health/strategies/hp/en/
3. World Health Organization. Information Series On School Health, Document Eleven. Oral Health Promotion: An Essential Element of a Health-Promoting School. Geneva: WHO, 2003.
4. Zhu L, Petersen E, Wang Y, Bian Y, Zhang X. Oral Health knowledge, attitudes and behaviour of children and adolescents in China. Int Dent J 2003; 53(5): 289-98.
5. Watt G. Strategies and approaches in oral disease prevention and health promotion. Bulletin of the World Health Organization 2005; 83(9): 711-8.

ХРАНИТЕЛНИ НАВИЦИ И ИНДЕКС НА ТЕЛЕСНА МАСА ПРИ СТУДЕНТИ ПО МЕДИЦИНА ПРЕДИ ОБЯВЯВАНЕ НА ПАНДЕМИЯТА ОТ COVID-19

МИХАЕЛА ХУБЕНОВА, ЕЛКА ТОСЕВА, СТАНИСЛАВА ХАРИЗАНОВА

*Катедра „Хигиена“, Факултет по обществено здраве, Медицински университет-
Пловдив*

E-mail: mihaela.hubenova@mu-plovdiv.bg; elka.toseva@mu-plovdiv.bg
stanislava.harizanova@mu-plovdiv.bg

Резюме: Създаването на правилни хранителни навици от ранна възраст и тяхното прилагане впоследствие е важен фактор за превенцията на социалнозначимите заболявания, водещи до висока инвалидност и смъртност.

Целта на настоящото проучване е да се оценят хранителните навици и индекса на телесна маса (ИТМ) при студенти по медицина преди пандемията от COVID-19.

Материал и методи. През м. февруари 2020 г. е проведено анкетно проучване сред 236 студенти от Медицински университет-Пловдив, обучавани на български ($n=134$) и английски ($n=102$) език. Данните са въведени и обработени статистически с помощта на SPSS v. 19.0.

Резултати. Средната възраст на анкетираните студенти е 22.29 ± 2.76 години ($mean \pm SD$), като 111 (47.0%) са мъже и 125 (53.0%) са жени. Преобладаващият брой анкетирани студенти ($n=177$, 75.0%) са със стойности на ИТМ под 25 ($\chi^2=9.53$, $df=1$, $p=0.002$). Не е установена зависимост между честотата на основните хранения и ИТМ ($\chi^2=9.96$, $df=2$, $p=0.228$); между пропускането на сутрешната закуска и нарастване на ИТМ ($\chi^2=0.039$; $d=1$; $p=0.844$). Не е открита статистически значима разлика между честотата на консумация на плодове и зеленчуци спрямо пол ($\chi^2=5.49$; $d=4$; $p=0.240$), възраст ($\chi^2=0.62$; $d=4$; $p=0.961$) и националност ($\chi^2=5.72$; $d=4$; $p=0.221$). Според честотата на прием на домашно приготвена храна, се установява статистически значима разлика с високо ниво на достоверност, като най-многобройна е групата студентите ($n=100$, 42.4%), които приемат домашна храна поне веднъж дневно ($\chi^2=11.42$, $df=4$, $p=0.024$). Печенето като кулинарна обработка на храната е предпочитан вариант при българските ($n=112$, 62.9%) спрямо чуждестранните студенти ($n=66$, 37.1%), ($\chi^2=11.13$; $d=1$; $p=0.001$).

Заключение. Не се установяват категорични данни за нездравословни хранителни навици при изследваните студенти. Преобладаващата част от студентите по медицина се хранят във втората половина на деня. Предпочитанията им спрямо кулинарната обработка на храните се различава по пол и националност. Не се установи зависимост между индекса на телесна маса и кратност на хранителен прием, пропускането на закуска и обем на приемата храна.

Ключови думи: индекс на телесна маса, хранителни навици, студенти по медицина

DIETARY HABITS AND BODY MASS INDEX OF MEDICAL STUDENTS BEFORE THE COVID-19 PANDEMIC

MIHAELA HUBENOVA, ELKA TOSEVA, STANISLAVA HARIZANOVA

*Department of Hygiene, Faculty of Public Health, Medical University-Plovdiv
E-mail: mihaela.hubenova@mu-plovdiv.bg; elka.toseva@mu-plovdiv.bg
stanislava.harizanova@mu-plovdiv.bg*

Abstract: Creating proper nutritional habits from an early age and their subsequent application is an important factor in the prevention of non-communicable diseases leading

to high disability and mortality. The aim of the current study is to assess dietary habits and body mass index (BMI) in medical students prior to the COVID-19 pandemic.

Material and methods. In February 2020, a questionnaire survey was conducted among 236 students from the Medical University of Plovdiv, educated in Bulgarian ($n=134$) and English ($n=102$). Data were collected and statistically processed using SPSS v. 19.0.

Results. The average age of the surveyed students is 22.29 ± 2.76 years (mean \pm SD), as 111 (47.0%) are men and 125 (53.0%) are women. The prevalent number of surveyed students ($n=177$, 75.0%) have BMI values below 25 ($\chi^2=9.53$, df = 1, p = 0.002). No relation is found between the frequency of main meals and BMI ($\chi^2=9.96$, df=2, p=0.228). No statistically significant difference is found between skipping breakfast and the change in BMI ($\chi^2=0.039$; d=1; p=0.844). Statistically significant difference is not found between the frequency of fruit and vegetable consumption by gender ($\chi^2=5.49$; d=4; p=0.240), age ($\chi^2=0.62$; d=4; p=0.961) and nationality ($\chi^2=5.72$; d=4; p=0.221). According to the frequency of intake of home-cooked food, there is a statistically significant difference with a high level of reliability, with the largest group of students ($n=100$, 42.4%) who eat home-cooked food at least once a day ($\chi^2=11.42$, df=4, p=0.024). Baking as a culinary food processing method is a preferred option for Bulgarian ($n=112$, 62.9%) compared to foreign students ($n=66$, 37.1%), ($\chi^2=11.13$; d=1; p=0.001).

Conclusion. There are no definite data on unhealthy dietary habits of the students, took part in the survey. The majority of medical students eat in the afternoon. Their preferences for culinary food processing differ by gender and nationality. No relationship is found between body mass index and frequency of food intake, skipping breakfast and volume of food intake.

Key words: body mass index, dietary habits, medical students

1. Въведение

Здравословното хранене е един от модифициращите фактори в превенцията на социалнозначимите заболявания водещи до висока смъртност [1]. Създаването на правилни хранителни навици от ранна възраст и тяхното прилагане впоследствие е важно, но познанията в тази област не винаги гарантират здравословно поведение. Проучвания сочат, че това се отнася и за студенти по медицина [2-4]. Целта на това проучване е да се оценят хранителните навици и индекса на телесна маса (ИТМ) при студенти по медицина преди пандемията от COVID-19.

2. Материал и методи

През м. февруари 2020г. е проведено анкетно проучване по авторски въпросник сред 236 студенти от Медицински университет - Пловдив, обучавани на български ($n=134$) и английски ($n=102$) език. Въпросникът съдържа демографски данни (възраст, пол и националност), антропометрични данни (ръст и тегло), на базата на които е изчислен ИТМ, честота на хранителен прием, часови диапазони на основните хранения и предпочитани храни и напитки. Данните са въведени и обработени статистически с помощта на SPSS v. 19.0 чрез дескриптивен анализ, непараметричен анализ за съпоставка на резултатите при двумерни разпределения, алтернативен и вариационен анализи. Различията в резултатите са интерпретирани като значими при $p < 0.05$.

3. Резултати

Средната възраст на анкетираните студенти е 22.29 ± 2.76 години (mean \pm SD), като 111 (47.0%) са мъже и 125 (53.0%) са жени. Според националността 134 (56.8%) са българи, 102 (43.2) са чужденци. Не се установи статистически значима разлика в разпределението по пол и националност ($\chi^2=3.42$; d=1; p=0.064).

Преобладаващият брой анкетирани студенти ($n=177$, 75.0%) са със стойности на ИТМ под 25 ($\chi^2=9.53$, df=1, p=0.002), фиг. 1. Средно изчислен, ИТМ е 22.65 ± 3.51 (mean \pm SD), като минималната стойност е 16.85, а максималната 35.43. При жените ($n=104$, 58.76%) преобладават тези с поднормени и нормални стойности на ИТМ в сравнение с мъжете ($n=73$, 41.24%); ($t=3.346$, p<0.001).



Фиг. 1. Разпределение на студентите според индекса на телесна маса

Хранителният прием на преобладаващата група студенти е трикратен (n=90, 38.1%) и четирикратен (n=71, 30.1%), ($\chi^2=7.85$, df=3, p=0.049). Няма статистически значима разлика между честотата на основните хранения и ИТМ ($\chi^2=9.96$, df=2, p=0.228). Установи се вариация в приема на храна нощем с много високо ниво на достоверност ($\chi^2=12.6$, df=2, p=0.002), като преобладава групата студенти, които нямат нощи хранения (n=120, 50.8%). Сред тази група респонденти преобладават жените (n=77, 64.2%).

Най-често пропусканото хранене е закуската. По-рядко от 3 пъти седмично или никога не закусват 31.2% (n=76). Ежедневно закусват 36.4% (n=86). Не се установи статистически значима разлика между пропускането на сутрешната закуска и висок ИТМ ($\chi^2=0.039$; d=1; p=0.844). За разлика от закуската, вечерята не се пропуска при 82.6% (n=195) от участниците; ежедневно обядват 75.8% (n=179). Най-обилното хранене е обядът за 53.4% (n=126), следван от вечерята – 44.9% (n=106) като 1.3% от студентите (n=3) се хранят най-обилно на закуска. По отношение на междинната закуска се установи статистически значима разлика в приема на различни видове продукти при българските студенти от двата пола – жените предпочитат консумацията на зеленчуци и плодове (n=78, 66.7%), ($\chi^2=5.49$; d=1; p=0.019) и се ограничават в приема на тестени изделия (n=116, 49.3%), ($\chi^2=4.31$; d=1; p=0.038) за разлика от мъжете студенти. Чувство на тежест след нахранване редовно изпитват 4.7% от анкетираните (n=11), като най-голям е делът на тези, които пресяждат по-рядко от 3 пъти седмично (60.2%, n=142).

Според честотата на прием на домашно пригответа храна най-многобройна е групата студенти (n=100, 42.4%), които приемат домашна храна поне веднъж дневно ($\chi^2=11.42$, df=4, p=0.024). Жените студенти консумират по-често домашно пригответа храна в сравнение с мъжете студенти ($\chi^2=10.30$, df=3, p=0.016).

Според предпочтенията за кулинарна обработка на храната, преобладаващата част от студентите (n=180, 76.3%) не предпочитат консумацията на храни в сыръв вид ($\chi^2=6.54$, df=1, p=0.011), като това е по-изразено при мъжете (n=93, 51.7% от групата). В зависимост от възрастта 136 студенти на възраст до 22г. (78.6% от групата) не предпочитат задушена или готова на пара храна в сравнение с групата на възраст над 22г. ($\chi^2=4.51$; d=1; p=0.034). Печенето като кулинарна обработка на храната е предпочитан вариант при българските (n=112,

62.9%) спрямо чуждестранните студенти (n=66, 37.1%), ($\chi^2=11.13$; d=1; p=0.001).

Не се откри статистически значима разлика между честотата на консумация на плодове и зеленчуци спрямо пол ($\chi^2=5.49$; d=4; p=0.240), възраст ($\chi^2=0.62$; d=4; p=0.961) и националност ($\chi^2=5.72$; d=4; p=0.221).

4. Обсъждане

Установената от нас кратност на приема на хранене съвпада с тази на студентите по медицина от Гърция, включително и това, че по-обилните хранения са през втората половина на деня [3]. При нашите студенти се установи значително по-нисък дял на тези с наднормено тегло и затъстване (25%) спрямо гръцките студенти (38%), като се потвърди статистически значимата разлика в ИТМ спрямо разпределението по пол [3].

В проучване през 2012г. в четири европейски страни – Германия, Дания, Полша и България е установено, че българските студенти в сравнение с проучваните от другите страни консумират по-често зеленчуци, включително салати, като преобладават студентите от женски пол, което съвпада с резултатите от настоящото проучване [5].

При проведено във Великобритания проучване на хранителните навици [6] на студенти на възраст 21.5 ± 2.63 години (mean \pm SD) е установено, че 76.8% от тях са с нормално или поднормено тегло. В същото проучване е установено, че по-възрастните студенти предпочитат по-здравословен начин на хранене, което съвпада с резултатите ни по отношение на задушена/готвената на пара храна.

Нашите резултати не съвпадат с наблюденията на Kahleova и съавтори по отношение на връзката между ИТМ и честотата и обем на сутрешната закуска [7], но съвпадат с други проучвания, при които не се установява връзка между приема/липсата на сутрешна закуска и нарастването на ИТМ [8,9].

Ограничение при нашето проучване е ретроспективният подход при събиране на данни - от участниците се изискваше да си припомнят информация, свързана с техния хранителен прием преди периода на събиране на данни. Липсват също и данни за физическата активност на студентите преди и в периода на самото проучване.

5. Заключение

Не се установяват категорични данни за нездравословни хранителни навици. Преобладаващата част от студентите по медицина се хранят във втората половина на

дения. Предпочитанията им спрямо кулинарната обработка на храните се различават по пол и националност. Не се установи зависимост между индекса на телесна маса и кратност на хранителен прием, пропускането на закуска и обем на приетата храна.

6. Благодарности

Настоящото проучване е подкрепено по Национална програма „Млади учени и постдокторанти“ на Министерство на образованието и науката. Публикацията не отразява непременно мнението или позицията на финансиращия орган. Отговорност за съдържанието на публикацията носят единствено авторите.

ЛИТЕРАТУРА

1. World health statistics 2020: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. Online: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/332070/9789240005105-eng.pdf>
2. Betancourt-Nuñez, A., Márquez-Sandoval, F., González-Zapata, L.I., Babio, N., Vizmanos, B. Unhealthy dietary patterns among healthcare professionals and students in Mexico., BMC Public Health, 2018, 18(1), 1–14.
3. Chourdakis, M., Tzellos, T., Papazisis, G., Toulis, K., Kouvelas, D. Eating habits, health attitudes and obesity indices among medical students in northern Greece, Appetite, 2010, 55(3), 722–725.
4. Skemienė, L., Ustinavicienė, R., Piesinė, L., Radisauskas, R. Peculiarities of medical students' nutrition. Medicina (Kaunas), 2007, 43(2), 145-152.
5. El Ansari, W., Stock, C., Mikolajczyk, R.T. Relationships between food consumption and living arrangements among university students in four European countries - A cross-sectional study, Nutrition Journal, 2012, 11(1), 1–7.
6. Sprake, E.F., Russell, J.M., Cecil, J.E., Cooper, R.J., Grabowski, P., Pourshahidi, L.K., Barker, M.E. Dietary patterns of university students in the UK: a cross-sectional study. Nutrition Journal, 2018, 17(1), 90.
7. Kahleova, H., Lloren, J.I., Mashchak, A., Hill, M., Fraser, G.E. Meal frequency and timing are associatedwith changes in body mass index in Adventist Health Study 2, The Journal of Nutrition, 2017, 147(9), 1722–1728.
8. Тосева, Е., Тосева, И., Бакова, Д. Хранителни навици и здравен статус на студентите по медицина, Научни трудове на Съюза на учените в България–Пловдив, том 25, Серия Г, „Медицина, фармация и дентална медицина“, 2020, стр. 186-189.
9. Szajewska, H., Ruszczynski, M. Systematic Review Demonstrating that Breakfast Consumption Influences Body Weight Outcomes in Children and Adolescents in Europe, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2010, 5(2), 113-119.

ИЗСЛЕДВАНЕ НА ЕЛЕКТРОМАГНИТЕН ПРЕОБРАЗУВАТЕЛ С МЕХАНИЧНА СИСТЕМА ПРУЖИНА И ПОСТОЯНЕН МАГНИТ

МАРГАРИТА ГЕОРГИЕВА, НИКОЛА ГЕОРГИЕВ

ПГ "Цар Иван Асен II" Асеновград, Технически университет София, филиал Пловдив
openbg@abv.bg, geotek@abv.bg

Резюме: В статията е представена нова конструкция на електромагнитен преобразувател състоящ се от се от неподвижно закрепена в долния си край пружина с постоянен магнит в горния и ` край и бобина над магнита. Моделирано е магнитното поле на електромагнитния *harvester* с помощта на *Femm 4.2*, като е определено индуцираното му електродвижение напрежение. Направено е и моделиране със *Simulink* в *MATLAB* среда на електромагнитния преобразувател. Извършени са експериментални изследвания, с които е проверен направения модел.

Ключови думи: преобразувател, магнити, постоянни, пружина

STUDYING AN ELECTROMAGNETIC HARVESTER WITH A MECHANICAL SYSTEM, CONSISTING OF A SPRING AND A PERMANENT MAGNET

MARGARITA GEORGIEVA, NIKOLA GEORGIEV

PG "Tsar Ivan Asen II" Asenovgrad, Technical University of Sofia, Plovdiv Branch
openbg@abv.bg, geotek@abv.bg

Abstract: An electromagnetic harvester, consisting of a rigidly fixed at its lower end spring, a permanent magnet, attached to its upper end, and a coil above the magnet, has been considered in this paper. The magnetic field of the electromagnetic harvester has been modeled by means of Femm 4.2 and its induced e.m.f. has been determined. Modeling of the electromagnetic harvester with Simulink in MATLAB environment has also been accomplished. Experimental studies for validating the developed model have been carried out during which the calculated powers at direct current have been compared to the measured ones.

Key words: harvester, magnets, permanent, spring

1. Въведение

През последните 30 години нараства интересът от преобразуватели на механична енергия в електрическа, които са алтернатива на батериите захранващи сензори и електронни устройства [1-4]. В почти всички електромагнитни преобразуватели бобината е неподвижна, а постоянния магнит е закрепен към прът или пружина [5-9]. При повечето електромагнитни преобразуватели използвати пружина движението на механичната система

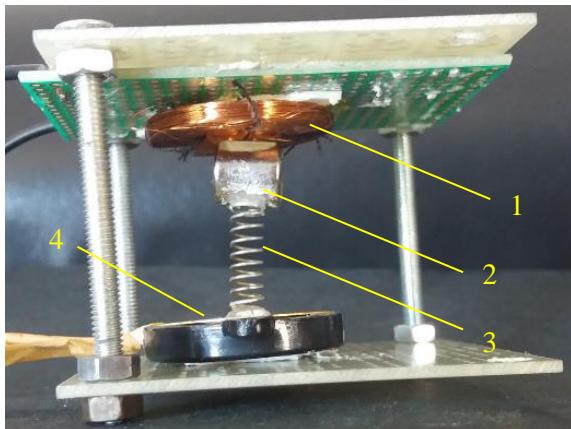
магнит-пружина е вертикално [5, 6, 7]. Обикновено има два типа движение на магнита спрямо бобината. В първия случай магнита се придвижва успоредно на бобината [8], а във втория вертикално спрямо нея, като често се намира във въздушната и ` междина [10].

В настоящата работа се изследва електромагнитен преобразувател състоящ се от неподвижна закрепена в долния край пружина със съредоточена маса – редкоземен магнит в горния си край. В предлаганият

електромагнитен преобразувател траекторията на магнита е дъга, като така се получава нелинейна механична трептяща система от магнит закрепен върху пружина. С помощта на Femm 4.2 е моделирано магнитното поле на електромагнитния преобразувател. Така са определени средните максимални магнитни индукции и са изчислени магнитни потоци през намотката, както и индуцираното електродвижещо напрежение в намотката на преобразувателя. Направено е и моделиране и със Simulink в MATLAB среда и е получено електродвижещо напрежение. Извършени са експериментални изследвания, с които е проверен направения модел.

2. Изложение на доклада

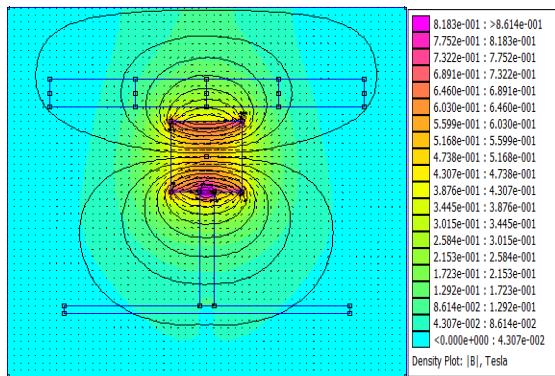
На Фиг. 1 е представен предлаганият електромагнитен преобразувател.



Фиг. 1. Електромагнитен преобразувател с означени: 1-намотка; 2-постоянен магнит; 3-стоманена пружина; 4-месингова основа

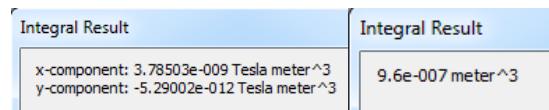
При прилагане на принудителна сила механичната система съсредоточена маса (постоянен магнит) и пружина започва да извършва колебателно движение. По този начин магнитния поток преминава по различен начин през бобината и създава променливо магнитно поле, при което се индуцира променливо електродвижещо напрежение.

С помощта на Femm 4.2 е получено разпределението на магнитното поле в електромагнитния преобразувател. На Фиг. 2 е представено разпределението на магнитната индукция, когато системата пружина – съсредоточена маса е в равновесно положение, т.е., при ъгъл на отклонение от равновесното положение $\alpha=0^\circ$.



Фиг. 2.

На Фиг. 3 са представени интегралната магнитна индукция за m^3 - B_c , а така също и интегралните магнитни индукции по хоризонтала x - B_{cx} и по вертикалa y - B_{cy} , както и обема на намотка V_c . С помощта на B_{cy} и V_c се изчислява магнитната индукция по у за бобината B_{cy}' , при равновесно положение $\alpha=0^\circ$.



Фиг. 3.

$$B_{cy}'' = \frac{B_{cy}}{V_c} = 0,0312, T \quad (1)$$

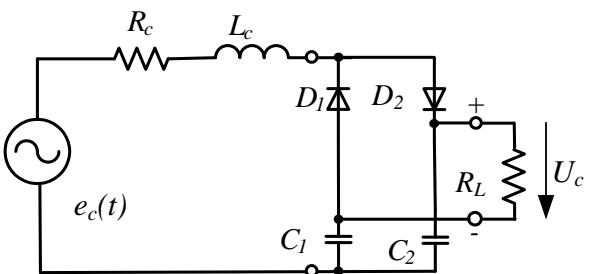
Така може да се определи амплитудната стойност на магнитната индукция през намотката на електромагнитния преобразувател

$$B_{ampl} = B_{cy}'' - B_{cy}' = 0,0312, T. \quad (2)$$

Амплитудите на индуцираните електродвижещи напрежения E_m в намотките са във функция от амплитудата на колебателната скорост ωX_m [11].

$$E_m = N \Delta B D_c \omega X_m. \quad (3)$$

На Фиг. 4. е показана еквивалентната схема на електромагнитния преобразувател с удвоител на напрежение при активен товар. В нея с R_c и L_c са означени активното съпротивление и индуктивността на намотката на електромагнитния преобразувател, с $e_c(t)$ индуцираното електродвижещо напрежение, а с R_L активното товарно съпротивление. С U_c е означено напрежението върху товарното съпротивление.



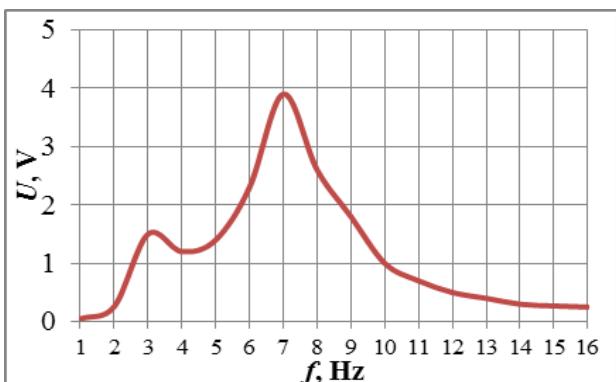
Фиг. 4. Еквивалентна схема на електромагнитния преобразувател с удвоител на напрежение

Активната мощност при постояннотоков режим се изчислява с помощта на амплитуда на електродвижещо напрежение E_{cm} , напрежението върху германиевия диод U_D и параметрите на еквивалентната схема [11].

$$P_{cm} = \left(\frac{(1,4E_{cm} - U_D)R_L}{\sqrt{(R_c + R_L)^2 + (\omega L_c)^2}} \right)^2 \cdot \frac{1}{R_L} . \quad (4)$$

3. Експериментални изследвания

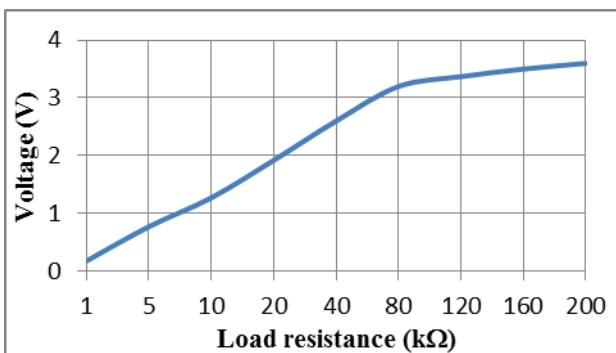
Амплитудно честотната характеристика е показана на Фиг. 5, като резонансната честота е 7 Hz. Всички измервания и симулации са правени за резонансната честота, тъй като при нея изходните електрически величини са с максимални стойности.



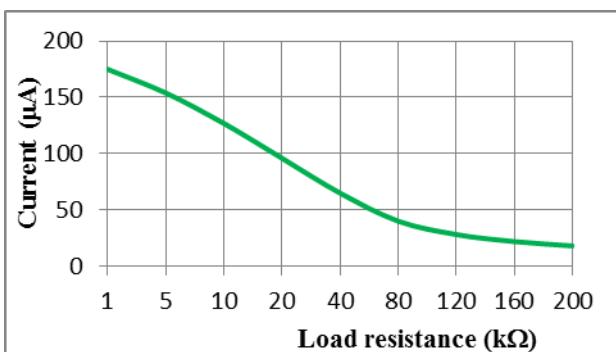
Фиг. 5. Хоризонтално отклонение на пиезопластината за еднопружинен преобразувател

Измерените напрежения и токове са представени на Фиг. 6 и Фиг. 7, за активни товари от 1 до 200 килоома.

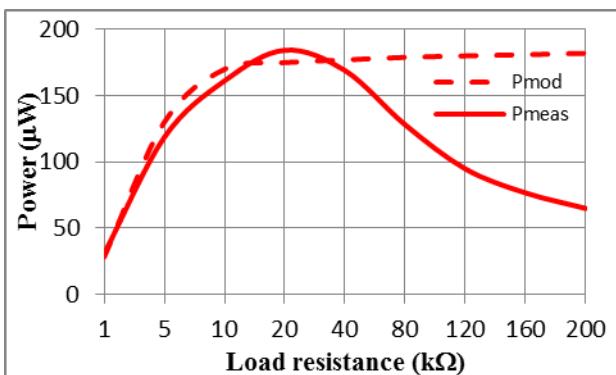
На Фиг. 8 са представени измерените и получените при симулацията активните мощности. Максималната измерена активната мощност е $183 \mu\text{W}$, при товар от 20 килоома.



Фиг. 6. Напрежение във функция на товарното съпротивление



Фиг. 7. Ток във функция на товарното съпротивление



Фиг. 8.

Максималната относителна грешка между получените с модела и измерените мощностите е $\delta_{max}=10,1\%$.

4. Заключение

Предлаганият електромагнитен преобразувател трябва да работи в резонансен режим, тъй като тогава се получават най-добри изходни електрически параметри.

С увеличаване на товарното съпротивление нараства изходното напрежение и намалява токът, почти по линеен закон. Максималните

напрежения и ток са съответно 3,6 V и 175 μ A, които са достатъчно големи за този тип преобразуватели.

Максималната измерена мощност е 183 μ W, при товар от 20 килоома и работна честота на изследвания електромагнитен преобразувател от $f=7$ Hz, е достатъчна за захранване на сензори и електронни устройства за малка консумация.

Моделът достатъчно точно описва процесите в разглеждания преобразувател, което се потвърждава от проведените експериментални изследвания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Williams C., Shearwood M., Mellor P. Development of an electromagnetic micro-generator, IEE Proc. Circuits Devices Systems, vol 148, 2001, pp 337-342.
2. Buren, T. Body-Worn Inertial Electromagnetic Micro-Generators Ph.D thesis, Swiss Federal Institute of Technology Zurich, 2006.
3. Stephen, N. Energy harvesting from ambient vibration, Journal of Sound and Vibration, vol 293, 2006, pp 409-525.
4. Saha C., O'Donnell, T. Electromagnetic generator for harvesting energy from human motion, Sensors and Actuators -A: Physical, Volume 147, Issue1, 2008.
5. Kwon, S., Park, J., Law, K. Electromagnetic energy harvester with repulsively stacked multilayer magnets for low frequency vibrations, IOP - Smart Materials and Structures, Volume 22, Issue 5, 2013.
6. Wang, H., Tang, L., Guo, Y., Shan, X., Xie, T. A 2DOF hybrid energy harvester based on combined piezoelectric and electromagnetic conversion mechanisms. Journal of Zhejiang University-SCIENCE A (Applied Physics & Engineering), 2014.
7. Xu, Z., Shan, X., Chen, D., Xie, T., A Novel Tunable Multi-Frequency Hybrid Vibration Energy Harvester Using Piezoelectric and Electromagnetic Conversion Mechanisms. Applied Sciences, pp. 6, 2016.
8. Saha, C. Modelling Theory and Applications of the Electromagnetic Vibrational Generator. Score Project, School of Electrical & Electronic Engineering University of Nottingham, NG7 2RD UK, 2011.
9. Apo, D. Low Frequency Microscale Energy Harvesting. Dissertation submitted to the faculty of the Virginia Polytechnic Institute, 2014.
10. Zhu, D. Vibration Energy Harvesting: Machinery Vibration, Human Movement and Flow Induced Vibration. Sustainable Energy Harvesting Technologies - Past, Present and Future. INTECH, pp. 25-54, 2011.
11. Georgiev, N., Raychev, R. Study of a Linear Generator, Converting Sea Wave Energy into Electricity. 21st International Symposium on Electrical Apparatus & Technologies ("SIELA 2020", Bourgas), DOI: 10.1109/SIELA49118.2020.9167118, Electronic ISBN: 978-1-7281-4346-0, USB ISBN: 978-1-7281-4345-3, pp. 1-4, 2020.

ИЗСЛЕДВАНЕ НА ПИЕЗОЕЛЕКТРИЧНИ ПРЕОБРАЗУВАТЕЛИ

МАРГАРИТА ГЕОРГИЕВА, ЦОНКА СПАСОВА, НИКОЛА ГЕОРГИЕВ

ПГ "Цар Иван Асен II" Асеновград, ПГ "Цар Иван Асен II" Асеновград

Технически университет София, филиал Пловдив

openbg@abv.bg, coni_b@abv.bg, geotek@abv.bg

Резюме: В статията са изследвани три пружинни, пиезоелектрични преобразуватели с цел да се определи конструкцията, при която се получават най-добри електрически параметри. Разглежданите преобразуватели представляват пиезопластици залепени върху месингови основи със закрепени към тях пружини и съсредоточени маси. Направено е моделиране с ANSYS, като са получени хоризонталните отклонения на механичните системи и е изчислен зарядът, върху електродите на пиезопластините и от там на напрежението. С проведените експериментални изследвания е проверен направленият модел.

Ключови думи: ANSYS, пиеzo, пружини, преобразувател

STUDY OF PIEZOELECTRIC HARVESTERS

MARGARITA GEORGIEVA, CONKA SPASOVA, NIKOLA GEORGIEV

PG "Tsar Ivan Asen II" Asenovgrad, PG "Tsar Ivan Asen II" Asenovgrad

Technical University of Sofia, Plovdiv Branch

openbg@abv.bg, coni_b@abv.bg, geotek@abv.bg

Abstract: The paper considers three piezoelectric harvesters, consisting of one or two springs, attached to a piezoelectric transformer, and having a common concentrated mass. Modeling has been done by means of ANSYS, whereas the horizontal deviation of the mechanical system has been obtained, and the charge, accumulated on the electrodes of the piezo plate has been calculated. An equivalent circuit has been drawn and experimental studies have been conducted in order to validate the developed model.

Key words: ANSYS, piezo, springs, harvesters

1. Въведение

Все по-често в практиката се намират приложение източниците преобразуващи механичната енергия в електрическа за захранване сензори и електронни устройства с малка консумация [1-3]. Основното предимство на тези устройства е, че не изискват поддръжка и могат да се монтират на трудно достъпни места. Пиезоелектричните преобразуватели са често използвани, тъй като имат сравнително големи изходните напрежения, като резонансните им честоти са по-високи от тези при електромагнитните преобразуватели.

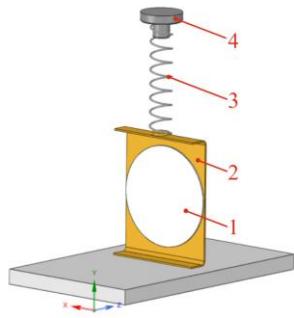
В настоящата статия се изследват и моделират, три пиезоелектрични преобразувателя, с цел да се определи оптималната конструкция, при която се получават по-добри електрически параметри. Разглежданите преобразуватели се състоят от дискообразна пиезопластина залепена върху

месинговата основа, която е захваната неподвижно в долния си край, а към горния им край са закрепени една или две пружини със съсредоточени маси. Направено е моделиране с ANSYS R19.1 на и са извършени експериментални изследвания, с които е проверено моделирането.

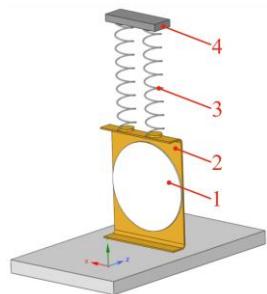
2. Изложение на доклада

На Фиг. 1, Фиг. 2 и Фиг. 3 са представени пиезоелектричните пружинни преобразуватели, в които са означени с: 1 - пиезопластина; 2-месингова основа; 3-пружина; 4-съсредоточена маса. Пиезопластините са от пиезокерамика PZT 5A с размери диаметър $D_p=20$ mm и дебелина $T_p=0,3$ mm, месинговата основа е с размери 28x20x0,3 mm, тънките пружини са с диаметър на тела $d_s=0,63$ mm, диаметър на пружината $D_s=4,63$ mm и дължина $l_s=20$ mm, а дебелите с диаметър на тела $d_s=0,8$

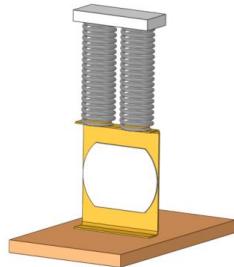
mm, диаметър на пружината $D_s=7,2$ mm и дължина $l_s=25$ mm. Съредоточените маси са от стомана и при еднопружинния преобразувател са с тегло 1, 2 или 3 грама, а при двупружинните с тънки пружини - 2, 4 или 6 грама, а за двупружинния с дебели пружини - 3,5 , 7 и 10 грама.



Фиг. 1. Пиеzоелектричен еднопружинен преобразувател



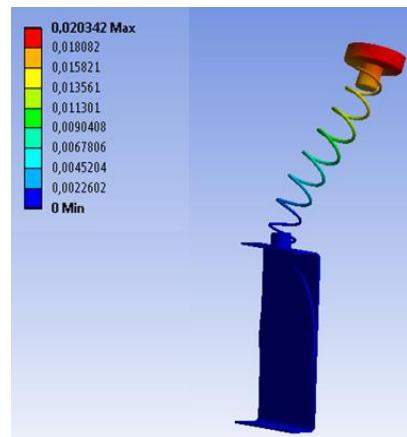
Фиг. 2. Пиеzоелектричен двупружинен преобразувател с тънки пружини



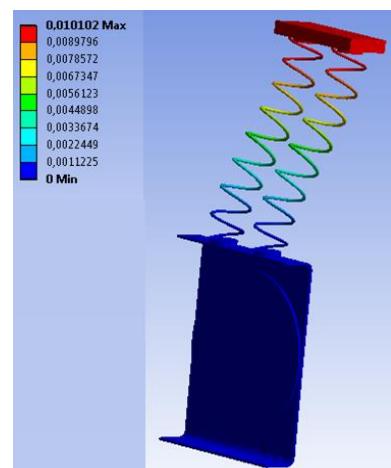
Фиг. 3. Пиеzоелектричен двупружинен преобразувател с дебели пружини

При моделирането с ANSYS са изчислени хоризонталните отклонения y_m на механичната система съсредоточена маса – пружина или пружини - залепена пиезопластина върху месингова подложка, Фиг. 4, Фиг. 5, и Фиг. 6. Хоризонталните отклонения на пиезопластините получени при симулацията са показани на Фиг. 7, Фиг. 8 и Фиг. 9. Средните хоризонтални отклонения на пиезопластината

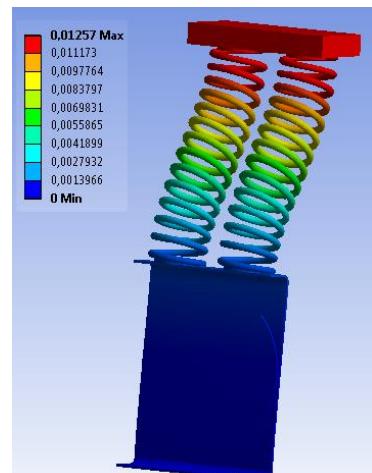
изчислени с ANSYS са представени на Фиг. 10, Фиг. 11 и Фиг. 12.



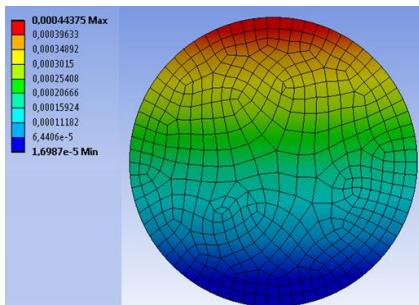
Фиг. 4. Симулация на механичното отклонение на еднопружинния преоразувател в ANSYS



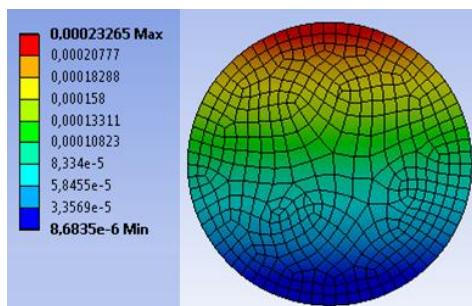
Фиг. 5. Симулация на механичното отклонение на еднопружинния преоразувател с тънки пружини в ANSYS



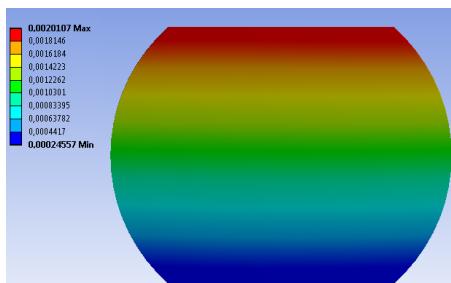
Фиг. 6. Симулация на механичното отклонение на еднопружинния преоразувател с дебели пружини в ANSYS



Фиг. 7. Хоризонтално отклонение на пиеzопластината за еднопружинен преобразувател



Фиг. 8. Хоризонтално отклонение на пиеzопластината за двупружинен преобразувател с тънки пружини



Фиг. 9. Хоризонтално отклонение на пиеzопластината за двупружинен преобразувател с дебели пружини

Tabular Data				
Time [s]	<input checked="" type="checkbox"/> Minimum [m]	<input checked="" type="checkbox"/> Maximum [m]	<input checked="" type="checkbox"/> Average [m]	
1, 1,	1,6987e-005	4,4375e-004	2,0182e-004	

Фиг. 10. Хоризонтални отклонения на пиеzопластината за еднопружинен преобразувател

Tabular Data				
Time [s]	<input checked="" type="checkbox"/> Minimum [m]	<input checked="" type="checkbox"/> Maximum [m]	<input checked="" type="checkbox"/> Average [m]	
1, 1,	8,6835e-006	2,3265e-004	1,0633e-004	

Фиг. 11. Хоризонтални отклонения на пиеzопластината за двупружинен преобразувател с тънки пружини

Tabular Data				
Time [s]	<input checked="" type="checkbox"/> Minimum [m]	<input checked="" type="checkbox"/> Maximum [m]	<input checked="" type="checkbox"/> Average [m]	
1, 1,	2,4557e-004	2,0107e-003	1,1098e-003	

Фиг. 12. Хоризонтални отклонения на пиеzопластината за двупружинен преобразувател с дебели пружини

Силите действащи в средата на пиеzопластините са пропорционални на средните хоризонтални отклонения $x_{avr}(t)$, изчислени с ANSYS, където d_p са диаметъра на пиеzопластината, модулът на Юнг Y и инерчния момент J [4]

$$(1) \quad F(t) = \frac{3YJ}{(0,5 d_p)^3} x_{avr}(t) .$$

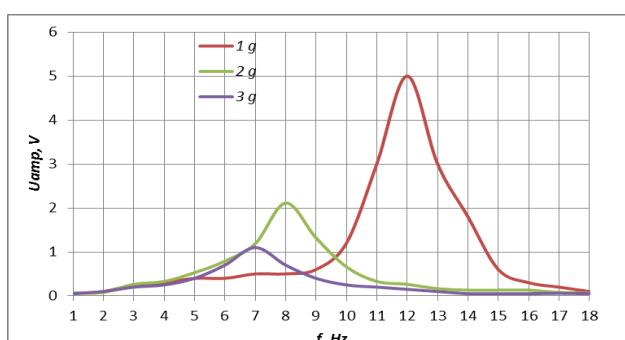
Максималното ефективно напрежение върху пиеzопластината при активен товар R_L е равно на (2), а максималната ефективна активна мощност (3).

$$(2) \quad U = \frac{\omega Q_m R_L}{\sqrt{2} \sqrt{1 + (\omega C R_L)^2}} ,$$

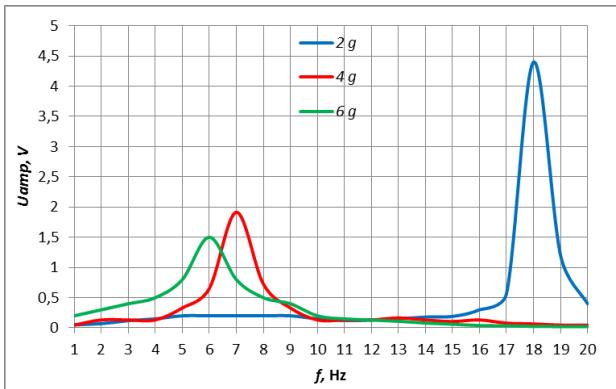
$$(3) \quad P = \frac{U^2}{R_L} .$$

3. Експериментални изследвания

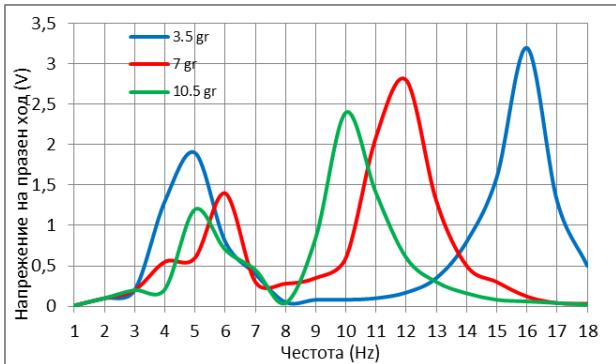
На Фиг. 13, Фиг. 14 и Фиг. 15 са представени амплитудно-частотни характеристики за трите преобразувателя, за 9 съсредоточени маси, като с U_{amp} са означени ефективни напрежения на празен ход. От характеристиките се вижда, че с увеличаване на съсредоточената маса резонансните честоти на трите преобразувателя намаляват. При нарастване на честотата нарастват ефективни напрежения на празен ход. Най-високо е напрежението на еднопружинният преобразувател със съсредоточена маса от 1 грам.



Фиг. 13. Амплитудно-честотни характеристики на еднопружинния преобразувател за трите съсредоточени маси

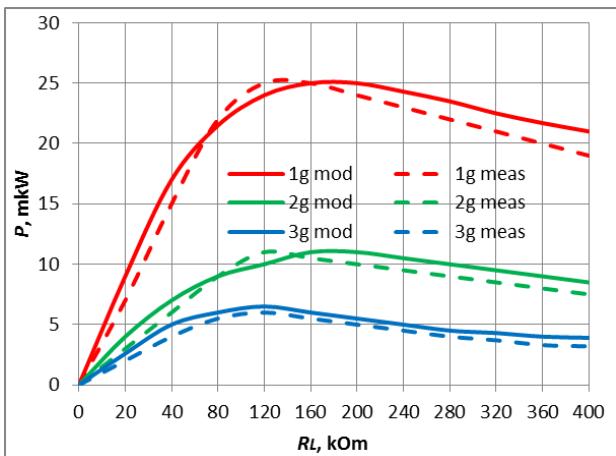


Фиг. 14. Амплитудно-честотни характеристики на двупружинния преобразувател с тънки пружини

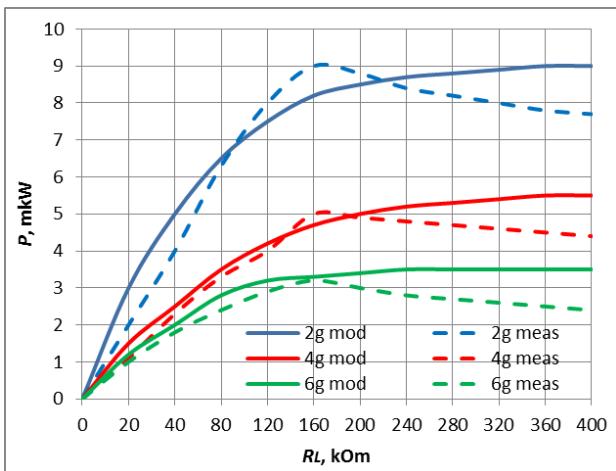


Фиг. 15. Амплитудно-честотни характеристики на двупружинния преобразувател с дебели пружини

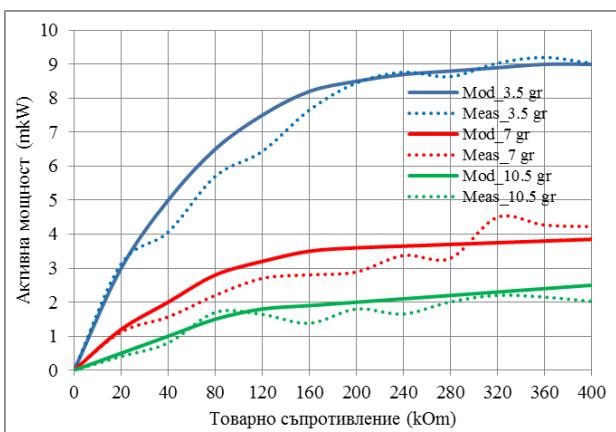
На Фиг.16, Фиг. 17 и Фиг. 18 са показани характеристиките на измерените и получените при моделирането ефективни, изходни мощности за трите преобразувателя. От тях се вижда, че с увеличаване на съсредоточената маса измерените и получени при моделирането изходни ефективни мощности намаляват и при трите преобразувателя.



Фиг. 16. Характеристики на измерените и получените при моделирането изходни мощности за еднопружинния преобразувател



Фиг. 17. Характеристики на измерените и получените при моделирането изходни мощности за двупружинния преобразувател с тънки пружини



Фиг. 18. Характеристики на измерените и получените при моделирането изходни мощности за двупружинния преобразувател с дебели пружини

Таблица 1. Измерени резонансни честоти, максимални напрежения и мощности, както и Relative Errors за трите типа преобразувател.

№	m g	f Hz	U_{max} V	P_{max} μW	P_{max}/m $\mu W/g$	$K\delta$ %	δ_{max} %
1	1	12	4,91	25,2	25,2	0,83	9,81
	2	8	1,92	11,1	5,55	0,37	16,67
	3	7	0,95	6,2	2,07	0,21	22,15
2	2	18	4,09	9,14	4,57	0,31	16,57
	4	7	1,78	5,21	1,3	0,17	22,2
	6	6	1,41	3,11	0,52	0,1	35,21
3	3,5	16	1,91	9,57	2,73	0,32	15,4
	7	12	1,32	4,49	0,64	0,15	16,7
	10,5	10	0,91	2,21	0,21	0,07	29,2

В Таблица 1 са дадени съсредоточените маси, резонансните честоти, максималните измерени напрежения и мощности, съотношението максимална мощност – съсредоточена маса, коефициента на полезно действие и максималните относителни грешки за трите преобразувателя. Максималните относителни грешки при моделирането нарастват при увеличаване на съсредоточената маса и за трите преобразувателя.

С увеличаване на съсредоточената масата измерените и получени при моделирането резонансни честоти и мощности намаляват и за трите преобразувателя. Максималните мощностите при еднопружинния преобразувател са от 100 до 150% по-големи от тези при двупружинните съсредоточени съсредоточени пружини.

4. Заключение

От амплитудно честотните характеристики се вижда, че с увеличаване на съсредоточената маса резонансните честоти на преобразувателите намаляват, като намаляват и максималните ефективни напрежения на празен ход. Измерените и получените при моделирането изходни мощности намаляват с увеличаване на съсредоточената маса и за трите изследвани преобразувателя.

Максималните относителни грешки при моделирането нарастват с увеличаване на съсредоточената маса. Недостатък на еднопружинния преобразувател е, че при вибрациите съсредоточената маса може да се движи не само в основното направление и така се получават колебания с други честоти, които се наслагват към основната. Този недостатък не се проявява при двупружинните преобразуватели. Дебелината пружините не влияе съществено върху изходните електрически параметри и двата двупружинните преобразувателя имат сходни електрически характеристики.

Измерваните мощностите при еднопружинния преобразувател са значително по-големи от тези при двупружинните, следователно еднопружинния преобразувател е с по-оптимална конструкция, при която се получават по-добри електрически характеристики. Двупружинните преобразуватели също биха намерили приложение, ако се увеличат коефициента на еластичност на пружините му и съсредоточената маса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kubba, C., Jiang, K. Efficiency Enhancement of a Cantilever-Based Vibration Energy Преобразувател. Sensors 2014, 2014, pp.188-211.
2. Lu, F., Lee, H., Lim, S. Modeling and analysis of micro piezoelectric power generators for micro-electromechanical-systems applications. Smart Mater. Struct. 13, 2004, pp. 57–63.
3. Dhakara, L., Liua, H., Tayb, F. A new energy преобразувател design for high power output at lowfrequencies. Sensors and Actuators A 199, 2013, pp. 344– 352.
4. www.fs.vsb.cz/export/sites/fs/330/.content/files/technical_vibration_1.pdf
5. Zizys, D. Investigation and optimization of autonomous energy sources operating in higher transverse vibration modes. Doctoral Thesis Engineering Sciences, Mechanical Engineering. Kaunas university of technology, 2018, pp.51-53.

МОДУЛНА КОНСТРУКЦИЯ ЗА ИЗГРАЖДАНЕ НА ВИСОКИ СГРАДИ: ПЕРСПЕКТИВИ ЗА УСТОЙЧИВО РАЗВИТИЕ

РАЛИЦА СТАВРЕВА- ПАНЧЕВА

Лесотехнически университет- София
rgstavreva@gmail.com

Резюме: С масовата урбанизация нараства нуждата от достъпни и налични жилища в цял свят. По прогнозни данни на Организацията на обединените нации (ОН) до 2050 г. около 69% от населението на света ще живее в градските райони. Световната банка изчислява, че 300 милиона жилищни единици ще са необходими до 2030 г. за настаняване на приблизително 3 милиарда души, които ще се нуждаят от ново жилище и основна инфраструктура. В контекста на тези тревожни прогнози страни като Сингапур, Великобритания, Съединени Американски щати (САЩ) и др., започнаха да разглеждат модулната концепция като възможност за справяне с кризата с достъпни и налични жилища, приоритизирайки ползите от приложението ѝ. Модулната конструкция отдавна се използва при проектиране на жилищни и обществени сгради като възможност за по- бърз и ефективен метод на изграждане. Доскоро използвана под формата на единични модули или нискоетажни постройки, днес все по- често тя е търсен похват за изпълнение на високи сгради в отговор на редица демографски, икономически и екологични проблеми. Настоящето проучване има за цел да оцени текущото състояние, ползите и перспективите за растеж на високи модулни сгради. На фокус е развитието на високата модулна конструкция като инструмент за справяне с множество глобални предизвикателства и постигане на бъдеща устойчивост на градовете.

Ключови думи: урбанизация, модулна конструкция, високи сгради, малки жилища, устойчиво развитие

MODULAR CONSTRUCTION FOR HIGH- RISE BUILDINGS: PROSPECTS FOR SUSTAINABLE DEVELOPMENT

RALITSA STAVREVA- PANCHEVA

University of Forestry- Sofia
rgstavreva@gmail.com

Abstract: With mass urbanization the need for affordable and available housing around the world is growing. According to United Nations (UN) estimates by 2050, about 69% of the world's population will live in urban areas. The World Bank estimates that 300 million housing units will be necessary by 2030 to accommodate approximately 3 billion people who will need new housing and basic infrastructure. In the context of these alarming forecasts, countries such as Singapore, the United Kingdom, the United States (USA) and others, have begun to consider the modular concept as an opportunity to deal with the affordable and available housing crisis, prioritizing the benefits of its application. Modular construction has long been used in the design of residential and public buildings as an opportunity for a faster and more efficient method of construction. Until recently used in the form of single modules or low- rise buildings, today it is increasingly used for high- rise buildings in response to a number of demographic, economic and environmental problems. The present study aims to evaluate the current state, benefits and development prospects of high- rise modular buildings. The focus is on the progress of high modular construction as a tool for dealing with many global challenges and achievement of future sustainability of cities.

Key words: urbanization, modular construction, high- rise buildings, small dwellings, sustainable development.

1. Въведение

Днес, човечеството е изправено пред сериозни предизвикателства свързани с глобални демографски промени и екологични проблеми. Урбанизацията е една от доминиращите демографски тенденции на 21 век заедно с нарастване на населението, застаряване и миграция. Всяка година над 50 млн. души мигрират в градовете като се очаква до 2050г. броят им да надхвърли 1.6 млрд. Понастоящем в градските райони живеят над 4.2 млрд. души или ок. 55% от глобалното население спрямо 30% през 1950г., а по прогнози на ООН коефициента на урбанизация ще нарастне до 69% до 2050г. [1]. Градския растеж, обаче поражда редица проблеми, които застрашават устойчивостта на градовете като пре-населеност, повишено потребление на енергия, замърсяване на въздух, вода и шум, промишлени и битови отпадъци, изчерпване на ресурси, неефективно управление на градската инфраструктура, недостиг на жилища и лоши условия на живот и труд, наситени транспортни мрежи и др., които засягат всяко живо същество и бъдещето ни. С прогнозираното увеличаване на градското население и разрастването на градовете и мегаполисите, чийто брой се очаква до 2030г. да достигне 662 града с население поне 1 млн. души включително 41 града с население над 10 млн., тревожността във връзка с качеството на околната среда нараства с внимание към непланираното или неадекватно управляваното разширяване на градовете, което в комбинация с неустойчиви модели на производство и потребление ще компроментира бъдещата им устойчивост. Важно е да се отбележи, че въпреки че са разположени на едва 5% от земната повърхност, градовете използват около 80% от ресурсите и са отговорни за близо 80% от глобалните емисии на CO₂ [2], а сградите в тях консумират 32% от глобалната енергия и произвеждат 19% от емисиите на парникови газове като се очаква повишаване на тези нива в следващите няколко десетилетия, подхранвано от урбанизацията в развиващия се свят. В този контекст Световната здравна организация (СЗО) и ООН подчертават нуждата от приемане на комплексни мерки за постигане на цел №11 за устойчиви градове и общности и цел №3 за здраве и благополучие за всички на всички възрасти [3]. Вниманието се насочва към връзката на урбанизацията с трите измерения на устойчиво развитие: икономическо, обществено и екологично като е важно тя да бъде добре управлявана, информирана чрез разбиране на тенденциите в населението в дългосрочен аспект, планирана и адекватна за да може да помогне да се максимизират ползите от агломерациите като същевременно се сведе до

минимум деградацията на околната среда и други потенциални неблагоприятни въздействия от нарастващия брой жители на градовете. Ето защо начина, по който ще бъдат застроени градските райони е от съществено значение за устойчивото им развитие. Внедряването на иновативни и технологични методи като модулна конструкция за изграждане на високи сгради може да бъде сериозен инструмент за справяне с бъдещите предизвикателства.

2. Материали и методи

Модулната конструкция се използва от десетилетия за изграждане на бързи и евтини самостоятелни или нискоетажни жилищни и обществени сгради. Технологията, обаче е сравнително нова когато става дума за високи сгради като се предоставя ограничена наличност на примери за завършени или сгради в процес на изграждане. Проучването е фокусирано върху преглед на литературата и анализ на избрани проекти на високи модулно изградени сгради с повече от 10 етажа по целия свят, завършени в периода 2007- 2021г. и изложени в хронологичен ред. Подбранныте примери демонстрират широкия кръг преимущества от прилагането на модулна конструкция при изграждане на високи сгради. Информацията е събрана от множество източници, включително уеб сайтове, научни статии и изследвания, доклади от конференции, индустриално- търговски групи и експерти като е търсена изчерпателност по темата. Въз основа на прегледа на литературата и анализираните примери са оценени представата на модулната конструкция спрямо традиционните строителни методи като се подчертават ползите от внедряването и при изграждане на високи сгради, нейните възможности и перспективи за устойчиво развитие.

2.1. Модулна конструкция- дефиниция

Докато конвенционалното изграждане на сгради се отнася до подходи за конструиране на компоненти и системи на строителната площадка, то модулната концепцията по същество се базира на строителен подход, при който компонентите на сградата се произвеждат извън обекта в контролирана заводска среда. Статията възприема термина "модулна конструкция" за да дифинира иновативен метод на изграждане на сгради, при който отделни предварително произведени и сглобени обемни единици- модули се конструират извън обекта, транспортират се до площадката и след това се инсталират като техни носещи градивни елементи. Модулите са до голяма степен завършени преди доставка между 60% до 90%, напълно оборудвани включително

водопроводни, електрически инсталации и др. Типичният модул е с вътрешни размери от 3,3м. до 3,6м. широчина и дължина от 6м. до 9м. Вариации в размерите се наблюдават в зависимост от регламентите за транспорт на съответния регион. С площ между 25- 35кв.м., един модул често се използва за настаняване на един човек, а посредством конфигурация от няколко се създават по- големи интериорни пространства. При използване на модулна конструкция, строителните дейности на обекта са сведени до минимум. В повечето случаи това са изграждане на бетонна основа и ядро около което се групират модулите както и някои довършителни работи. Модулно изградената сграда трябва да отговаря на същите строителни норми и изисквания както традиционно построена [4].

2.2. Модулна конструкция- исторически преглед

Съществуват доказателства от 1670г., които свидетелстват за първите примери на сглобяеми сгради, транспортирани по вода от Англия до Северна Америка. По- късно през 1800г., когато страната се разширява на запад, модулните къщи започват да стават все по-широко търсени. По време на Златната треска от 1849г. стотици предварително сглобени домове са изпратени от фабрики в Ню Йорк до различни дестинации в Калифорния [5].

Считан за един от най- ранните примери за сглобяване в архитектурата и предшественик на модулното- фабрично производство на сгради, Кристалният дворец (*Crystal Palace*), изграден в Лондонския Хайд Парк по повод провеждане на голямото изложение през 1851г. е бил построен за няколко месеца с помощта на серия от сглобяеми части. След 6 месечния период на изложението сградата е демонтирана и преместена в Южен Лондон, където е разширена и отново е официално открита [6].

По- късно в САЩ, *Sears Roebuck Company* започва да предлага модулни домове чрез програмата си за поръчки по пощата, наречена *Modern Homes* 1908-1940г. През същия период *Kullman Dining Car Company* основана 1927г. по- късно преименувана на *Kullman Building Corporation* произвежда предварително изградени модули за жилищна и обществена употреба, които използва за да построи първото сглобяемо посолството на САЩ в Гвинея Бисау, Африка.

Масовото производство на модулните единици се въвежда за първи път по време на Втората световна война когато през 1941г. строителната компания *George Fuller* доставя модули *Quonset* за американската армия, които могли лесно да бъдат сглобени без нуждата от квали-

фицирана работна ръка. По- късно този подход е използван от европейци и японци за бързо възстановяване на опустошените от войната райони [6].

През 40- те години индустрията започва да се разраства с основаването на гиганти като *Williams- Scotsman*, днес *WillScot, Maryland* и *ATCO* [7], а през 60-те и 70-те години на миналия век се появяват първите високо- бетонни модулни конструкции. Хотел *Hilton Palacio del Rio* е сред първите примери за изграждането на който е използван този иновативен подход. Построен в Сан Антонио, Тексас през 1968г., хотелът разполага с 496 стаи и забележителните 21 етажа, които го нареждат на първо място по височина в света. Проектиран е за световното изложение през 1968г.- *Hemis Fair '68* от *Cerna & Garza Architects*. За изграждането му *Zachry Construction* използва модулни техники, тъй като традиционните строителни методи не позволявали хотела да бъде завършен в кратките срокове преди откриването на панаира. Всички стаи на хотела са предварително произведени от лек структурен бетон, конструирани в близост до обекта като напълно обурудвани, обзаведени и декорирани включително с произведения на изкуството модулни единици. Инсталирани са за 46 дни. С използването на този модулен подход проектът е завършен за 202 работни дни, а хотела е отворен 5 дни по- рано [6,7]. В този период са създадени и други емблематични за времето си сгради, като бетонните модули на *Moshe Sadie's* вградени в популярния и до днес проект *Habitat 67, Montreal* (фиг.1) и *Nakagin capsule Tower, Tokyo* по проект на *Kisho Kurokawa*, завършен само за 30 дни през 1972г.



Фиг. 1. Habitat 67, Montreal

2.3. Модулна конструкция- високи сгради: съвременни примери

Модулната конструкция се е използвала и продължава да се използва за изграждането на различни по предназначение сгради. Характерната самостоятелна или нискоетажна форма през последните десетилетия започва да отстъпва място на високото модулно изграждане. Бързите темпове на растеж на градското население

и концентрирането му на определени места по света, придружени с липсата на достатъчно земя за застрояване и демографски изменения водят до нарастване на стремежа от страна на правителства, инвеститори, архитекти, инженери и дизайнери към търсене и внедряване на иновативни подходи в отговор на предизвикателствата на 21 век. Освен това екологичните промени, пред които света е изправен определят нови стандарти при проектиране, изграждане и обзавеждане. През последните десетилетия са построени десетки многоетажни сгради посредством модулна конструкция, а Обединеното Кралство се превърна в световен лидер.

2.3.1. Paragon, Brentford, UK- 2007г.

Проекта включва 5 жилищни блока с височина в диапазона от 4 до 17 етажа. Създаден е по поръчка на *Berkeley First* и *Thames Valley University*, днес *University of West London* в отговор на нарастващото търсене на студенстски жилища във Великобритания. За изграждането на сградите, изпълнителя *Caledonian modular* използва 1060 модула за да предостави широка гама от помещения за настаняване: 839 самостоятелни студенстки стаи и общи кухни, 114 студия, 44 апартамента с една спалня, конструирани с помощта на два модула и 63 апартамента с две спални, конструирани с помощта на три. Всеки модул е с площ между 35кв.м. и 55кв.м. След доставката им, предварително оборудвани модули, завършени с прозорци, врати, облицовки и обзавеждане са инсталирани върху изградената на място бетонна основа и са свързани към бетонните ядра, които включват стълби и асансьорни шахти. От началото на строителството, изграждането на комплекса е отнел 22 месеца или 12 по- малко от това, което би било необходимо за традиционното такова [4,6,8].

2.3.2. Victoria Hall, Wolverhampton, UK- 2009г.

Жилищен комплекс за студенско настаняване, който включва три сгради с височина в диапазона 8- 25 етажа. Най- високата сграда- блок А е особено забележителна, тъй като със 25-те си етажа тя е най- високата модулно изградена сграда в света за своето време. Проекта се състои от 824 модула и осигурява над 700 студия и апартаменти. Всеки модул е напълно оборудван преди транспортиране. Теглото му е между 10 и 25 тона в зависимост площта му като средната е 21кв.м., а максималната 37кв.м. Всеки модул има своя собствена структурна стоманена рамка, проектирана да носи товара на модула над нея, бетонен под, гипсокартонени стени, тавани и огнеупорна изолация. Доставени са

на обекта с кораб от Корк, Ирландия. Инсталирането им започва след завършване на традиционно изградената бетонна основа, а изграждането на бетонното ядро към блок А се извършва паралелно с поставянето на модулите на блок В и С. След монтажа на модулите са свързани предварително инсталираните електрически и водопроводни компоненти. Проекта е завършен за 59 седмици, а 824-те модула са монтирани за 32 от 8 работника и 2 ръководителя. Екипа изчислява, че времето за изграждане на комплекса с модулен подход е намалено с над 50 седмици или повече от 45% спестено време за строителство. Освен това производителността е увеличена с около 80%, а 43% от производствените отпадъци са рециклирани [4,5,6,9].

2.3.3. Victoria Hall, Wembley, UK- 2011г.

Разделена на три крила около централна спираловидна кула 19 етажната сграда предлага 435 студенстки стаи и общи помещения. За първи път са използвани значително по- големи модулни единици със стоманена рамка с дължина около 16м. и ширна 3.8м., които дават възможност да се доставят две напълно оборудвани спални помещения със самостоятелна душ кабина във всеки край и двойни коридори в средната част като по този начин работата на обекта се свежда до минимум. Монтирането на модулите е извършено успоредно с изграждането на ядрото, което позволява икономия на време. Екипа изчислява, че с инсталирането на модулите за 15 седмици от 6 человека и завършването му за 60 са спестили около 6 месеца. Освен това значително са намалени работниците на обекта, отпадъците на място са редуцирани с 90%, а транспортните доставки с над 70% [5,6,10].

2.3.4. Felda House, Wembley, UK- 2015г.

Изградена по проект на *HTA architects*, проектирали над 7000 модулни жилища само за последното десетилетие в Лондон, тази 19-етажна сграда включва три спираловидни кули. 529 модула осигуряват 450 студенстки жилищни единици и множество общи пространства. Предварително оборудвани, модулите са инсталирани върху традиционната стоманобетонна основа за 12 седмици. През 2016г., същия екип реализира комплекс *Grand Felda house, Wembley, UK*, състоящ се от 2 сгради с височина 17 и 8 етажа, за който са използвани 896 модула, инсталирани за 26 седмици [5,11,12].

2.3.5. Apex house, Wembley, UK- 2017г.

HTA architects, Tide construction development и Vision modular system, завършват своята 29 етажна студенческа резиденция *Apex house* за

30 месеца, от който 12 месеца работа на обекта. Сградата предоставя 558 студенчески стаи и множество общи пространства, за които са използвани 679 напълно обурудвани модула, инсталирани по класическия начин [5,11,13].

2.3.6. 11 Mapleton Crescent, Wandsworth, UK- 2018г.

Проектирана от архитектите *Metropolitan Workshop* тази стилна 27 етажна сграда печели неедна награда. Като част от програмата *Pocket homes*, финансирана от кмета на Лондон, тя осигурява 53 достъпни жилища с една спалня и 36 с две и три спални [14,15].

2.3.7. Clement Canopy, Singapore- 2019г.

През 2019г. са завършени двете най-високи модулно изградени сгради в света, разположени на *Clementi avenue* (Фиг.2). С височина 140м. те разполагат с 40 етажа и предоставят 505 жилищни единици. За изграждането им *Dragages Singapore*- дъщерно дружество на *Bouygues Bâtiment International* използва 1899 предварително сглобени и завършени до 85% модула, отляти от бетон в Сенай- Малайзия, след което оборудвани във фабрика в Туас- западен Сингапур. Бетонните модули са с тегло между 26- 31 тона. Пристигат с монтирани рамки за прозорци, врати, повечето вътрешни и външни облицовки, мебели и обзавеждане, включително електрически и водопроводни инсталации. След доставянето им на обекта модулите са инсталирани върху многоетажен паркинг, сутеренен и първи етаж, изградени на място по конвенционалния метод.



Фиг. 2. Clement Canopy, Singapore

Екипът изчислява, че използвайки модулен строителен подход за етаж от 2 до 40 е успял да намали отпадъците на място с 70%, да редуцира времето за строителство с 50% и да намали работата на обекта с 30%. *Clement Canopy* е реализиран по проект на *ADDP architects*, многократно награждавани с престижната награда *BCI Asia awards*, събитие чиято цел е да насърчи създаването на социално отговорна архитектура с екологична насоченост [5,16,17,18].

2.3.8. George street, Croydon, UK- 2020г.

На второ място по височина в света, този модулно изграден жилищен комплекс е с височина 135 метра, включва 2 корпуса съответно с 38 и 44 етажа, предоставящи 546 напълно обурудвани апартамента (Фиг.3). За изграждането на сградите *Tide construction* използва 1526 модула, предварително конструирани извън обекта в контролирана фабрична среда. Модулите са доставени от лидера в модулното производство- *Vision Modular Systems Uk, Ltd.* Проекта, дело на *HTA architects* е завършен за 26 месеца, половината на времето, което би отнело традиционното строителство. Отличен е с *Building Research Establishment Environmental Assessment Method (BREEAM)* - водещ световен метод за оценка на устойчивостта за генерално планиране на проекти, инфраструктура и сгради. Екипа изчислява, че с използванятия модулен подход са намалени емисиите на въглерод с 50%, с 80% са редуцирани транспортните доставки на обекта, с 80% строителните отпадъци, а 96,6% от производствените са рециклирани (5,11,19,20).



Фиг. 3. 101 George street, Croydon, UK

2.3.9. Pacific Park Brooklyn, B2-2016г., 461 Dean street, NY, USA

На трето място по височина в света се нарежда 32 етажната модулно изградена жилищна сграда- B2. Тя е част от мащабен проект *Pacific Park Brooklyn* за преустройство на 22 акра в центъра на Бруклин. Включва 363 жилищни единици с различни размери, 50% от които са определени да отговорят на неотложните нужди за достъпни жилища на Ню Йорк. За изграждането на B2, *Forest city Ratner* използва 930 предварително конструирани, напълно обурудвани модула със стоманена рамка, чито размери са ограничени от наредбите за транспорт. Сградата е проектирана за получаване на сертификат *Leadership in Energy and Environmental Design (LEED) Silver*. С приключване на *Pacific Park Brooklyn* се очаква да бъдат изградени 6430 жилищни единици, от които 2250 достъпни. При изпълнение на проекта според първоначалните намерения той ще бъде най- мащабния модулно изграден в света [21].

Съществуват десетки примери за високи модулно изградени сгради с повече от 10 етажа,

най- високите от които понастоящем се намират в Сингапур, САЩ и Великобритания. Някои от проектите бяха детайлно разгледани в това проучване, но не могат да бъдат подминати и други като: *Phoenix court, Bristol, UK; Olympic Way, Wembley, UK; Soho Apartment, Darwin, Australia; Chapter Lewisham, London, UK; Citizen M Shoreditch, London, UK; Highbury II, Holloway Road, UK; Greenford Quay, Greenford, UK; AC NoMad hotel by Mariott, NY, USA; Gagnan Road Social Housing, China.*

3. Резултати и дискусия

Въз основа на проведеното изследване и целите на настоящето проучване са изведени резултати във връзка с ползите и предимствата от внедряване на модулната конструкция при изграждане на високи сгради. Докато конвенционалните строителни методи са натоварени с редица недостатъци като по- ниска ефективност, по- голямо потребление на ресурси, по- голям въглероден отпечатък и др., то модулната конструкция има потенциала да сведе до минимум тези недостатъци като предоставя възможности за бъдещо устойчиво развитие на градовете и за справяне с глобални икономически, демографски и екологични проблеми.

Едно от най- големите предимства на модулната конструкция е възможността значително да се намали времето за строителство с до 50%. Модулните компоненти се произвеждат по- бързо и по- ефективно в контролирана производствена среда, а работата на обекта често се извършва паралелно или в някои случаи по- рано, което също допринася за по- бързото завършване на проекта.

От икономическа гледна точка съкращаването на времето за изпълнение на проекта позволява да се намали риска от пазарни промени и да се отговори по- ефективно на нарастващото търсене. Ускорените графици свързани с модуларизацията са фактор за спестяване на разходи за труд, за наеми на строителни машини и съоражения и други разходи свързани със строителния процес от една страна, а от друга са предпоставка за по- бърза възвръщаемост на инвестициите. Освен това модулния подход дава възможност да се изготви цялостно планиране и ранно координиране на изпълнението на проекта като по този начин се предотвратяват промени и закъснения в графика, което също допринася за икономия на разходите. В същото време се спестяват между 7- 10% от предварителните разходи свързани с управление, съоражения на площадката, складови разходи и пр., налични при конвенционалния строителен подход. Изчислено е, че производството извън обекта

води до най- малко 15% икономия на материали, предвид че разходите за тях са ок. 30% от общите за сградата, това е еквивалент на около 4% спестени строителни разходи. Следователно ползите за производителността са значителни като може да се заключи, че разходите за труд в производството се намаляват с поне 30% спрямо работата на обекта, където броя на работниците е редуциран с над 70%. Следователно общата производителност се увеличава с поне 50% спрямо традиционното строителство [22].

По отношение на ползите за околната среда, внедряването на модулния подход в индустрията значително може да намали производствените и строителни отпадъци, които от 10- 15% при конвенционалното строителство намаляват под 5% при модулното. Около 80% от отпадъците при традиционното строителство се генерираят на обекта от процеса на бетониране и свързаните с него мокри процеси, които при модулното изграждане са сведени до минимум. Освен това при конвенционалните строителни методи почти няма рециклиране на отпадъци, докато при модулните повече от 43% се рециклират. Важно е да се отбележи, че според Световната банка при запазване на настоящите тенденции до 2050г. ще се генерираят милиарди тона отпадъци годишно, което ще представлява увеличение от 70% върху текущите обеми. Сред съществените предимства на модулно изградените сгради спрямо традиционните са: 70- 80% по- малко посещенията и доставки на обекта с транспортни средства; 80% от трудовата дейност се извършва извън обекта в контролирана заводска среда, в резултат на което се увеличава безопасността и се подобряват условията на труд; 30- 50% намаляване на шумовото замърсяване; значително по- ниско замърсяване на водата и въздуха; 50% по- малко използвана енергия; повищена херметичност, топлинни характеристики, акустични и изолационни свойства на модулно изградената сграда, които се дължат до голяма степен на допълнителните материали използвани в конструкцията на модула, между 10- 25% повече спрямо тези използвани при конвенционалното строителство.

Всички гореизброени предимства на модулната конструкция за изграждане на високи сгради са предпоставка за получаване на сертификат *LEED*. Отличените с него сгради произвеждат 50% по- малко отпадъци и 34% по- ниски емисии на CO₂, консумират 25% по- малко енергия и 11% по- малко вода. Енергийно ефективните сгради допринасят за намаляване на замърсяването и подобряват качеството на въздуха в урбанизираните райони. Важно е да се отбележи, че по места вече се предприемат неза-

бавни мерки. В Лондон всички или почти всички 3,5 млн. жилища до 2050г. ще имат направени енергийноефективни подобрения, а ново изградените ще бъдат проектирани като такива.

Освен високата икономическа ефективност и ползите за околната среда, работата извън обекта, основен прийом на модулната концепция и внедряването и в изграждането на високи сгради, предоставя възможност за много по-качествено изграждане както на сградата така и на модулните единици. Освен това модулно изградените сгради могат да бъдат демонтирани и използвани повторно като по този начин поддържат стойността на активите си. И не на последно място, модулната конструкция предоставя възможност за по- бързо и по- ефективно изграждане на жилища на достъпни цени като се подчертават възможностите и за справяне с кризата с достъпни и налични жилища. Независимо, че днес едва 2- 4% от строителната индустрия използва модулни подходи, експертите вярват че технологията ще достигне 20- 25% годишен ръст през следващите години като се отбелязва, че някои страни като Сингапур насырчават модулното изграждане, а за Великобритания това е единствения възможен начин за справяне с жилищната криза.

4. Заключение

От проведеното изследване може да се заключи, че съвременната модулна конструкция е направила бързи и уверени крачки за подобре-
ние на своя продукт и умножаване на ползите от прилагането му. Някога използвана за самостоителни или нискоетажни постройки, днес модулно изградените сгради бележат сериозен тех-
нологичен напредък, предлагайки решения за справяне с предизвикателствата на 21 век и перспективи за устойчиво развитие на градо-
вете.

ЛИТЕРАТУРА

1. UN. World urbanization prospects: The 2018 Revision. Department of Economic and Social affairs, NY2019, pp.1-3.
2. Carreon, J., Worrell, E. Urban energy systems within the transition to sustainable development. A research agenda for urban metabolism, Journal: Resources, conservation & Recycling 132, 2018. pp.258-266.
3. UN. The Sustainable Development Goals Report, 2020. pp.0-64.
4. Lawson, R., Ogden, R., Bergin, R., M. ASCE. Application of modular construction in high- rise building. Journal of architectural engineering, 2012. pp.148- 154.
5. Doermann, J., Finzel, K., Barrot, J. High-rise modular construction: A review of the regulatory Landscape and considerations for growth, 2020. pp.2- 31.
6. Velmati, S. Feasibility, benefits and challenges of modular construction in high-rise development in the United States: A developer's perspective. Massachusetts institute of technology, 2012. pp.3-102.
7. 2020_isn't a new untested method for construction? Online: <https://www.modular.org/HtmlPage.aspx?name=faq>
8. 2020_Caledonian Modular Paragon Project Online: <https://www.theconstructionindex.co.uk/assets/pdf/caledonian.pdf>
9. 2020_Victoria Hall, Wolverhampton and Off-Site Modular Construction. Online: <http://ciria.org/buildoffsite/pdf/090506%20BERR%20Off%20Site%20Presentation.pdf>
10. 2020_Online:http://www.modular.org/HtmlPage.aspx?name=19_Story_Dorm_UK
11. HTA design LLP. Modular manufactured Housing, 2019. pp.24-32;42-46; 52-56.
12. 2020_Felda house. Online: <http://bmce.ie/portfolio/felda-house-wembley/>
13. 2020_Apex house. Online: <https://tideconstruction.co.uk/projects/apex-house-wembley/>
14. 2020_Mapleton Crescent Online: <https://metwork.co.uk/work/mapleton-crescent/>
15. 2020_Mapleton Crescent SW18. Online: <https://www.pocketliving.com/projects/development/24>
16. 2020_Clement Canopy. Online: <https://www.bouygues-construction.com/en/our-achievements/clement-canopy>
17. 2020_Clement Canopy. Online: <https://addp.sg/project/the-clement-canopy/>
18. 2020_World's tallest modular tower complete in Singapore. Online: <https://www.pbctoday.co.uk/news/mmc-news/clement-canopy/60142/>
19. 2020_101 George Street. Online: <https://nla.london/projects/101-george-street>
20. 2020_101 George Street, Croydon. Online: <https://tideconstruction.co.uk/projects/george-street-croydon/#gallery-3>
21. 2020_Dean 461. Online: https://pacificparkbrooklyn.com/wp-content/uploads/2017/01/PPB_Fact_Sheet_PacificPark_04_161228.pdf
22. Lawsson, R. M. Sustainability and process benefits of modular construction. Proceedings TG57- Special Track- 18th CIB World Building Congress, pp.38- 51, United Kingdom, 2010.