

„НАУЧНИ ДОКЛАДИ
ОТ 14-ТА НАУЧНА КОНФЕРЕНЦИЯ“
„Устойчива наука за безопасна храна“

SCIENTIFIC REPORTS
FROM THE 14TH SCIENTIFIC CONFERENCE

‘Sustainable science for safety food’





СБОРНИК ДОКЛАДИ

ОТ

14-ТА НАУЧНА КОНФЕРЕНЦИЯ

„УСТОЙЧИВА НАУКА ЗА БЕЗОПАСНА ХРАНА“

27 ОКТОМВРИ 2021 Г.

Обща редакция

Център за оценка на риска по хранителната верига,
Български контактен център на EFSA

Дизайн и предпечат:

В. Евтимова

© Център за оценка на риска по хранителната верига,
Български контактен център на EFSA

София, 2021г.

ISBN 978-619-7509-09-0



СЪДЪРЖАНИЕ

- Q-PCR МЕТОДИ ЗА ДЕТЕКЦИЯ НА АЛЕРГЕНИ В ХРАНИ.....5
- ДИРЕКТИВА 2019/904 И ЗАДЪЛЖЕНИЯТА НА БЪЛГАРИЯ ОТНОСНО БУТИЛКИТЕ ОТ ПЕТ.....26
- NON-THERMAL PROCESSING OF MILK AND DAIRY PRODUCTS.....36
- LEGUME PROTEINS: AN ALTERNATIVE SOURCE IN CAKE PRODUCTION43
- ИЗСЛЕДВАНЕ НА ЕСТЕСТВЕНАТА РАДИОАКТИВНОСТ НА БЪЛГАРСКИ МИНЕРАЛНИ ВОДИ.....49
- ДИГИТАЛЕН РЕГИСТЪР НА РАСТИТЕЛНИТЕ ГЕНЕТИЧНИ РЕСУРСИ В БЪЛГАРИЯ.....65
- ПОЗНАНИЯ НА ПОТРЕБИТЕЛИТЕ ОТНОСНО БИОЛОГИЧНИ ХРАНИ И ТЕХНИЯ КОНТРОЛ В ОБЛАСТ ДОБРИЧ.....77
- PATHOGENICITY OF YERSINIA ENTEROCOLITICA ISOLATED FROM RETAIL FOODS.....83
- ВЪЗМОЖНОСТИ ЗА ПРЕДВАРИТЕЛНО РАЗМНОЖАВАНЕ НА БАЗИСЕН ПОСАДЪЧЕН МАТЕРИАЛ ОТ МЕДИЦИНСКИЯТ ВИД *RUTA GRAVEOLENS L.* ЧРЕЗ ПРИЛАГАНЕ НА ВЕГЕТАТИВНИ МЕТОДИ.....93
- ПРОУЧВАНЕ НА МЕСТНИ ГЕНОТИПОВЕ ОТ РОД *ZEA* В ЮЖНА БЪЛГАРИЯ.....99
- НАСЕКОМИТЕ - АЛТЕРНАТИВЕН ХРАНИТЕЛЕН ИЗТОЧНИК..... 110
- ХАРАКТЕРИСТИКА НА ОБРАЗЦИ ДИВ ЕДНОЗЪРНЕСТ ЛИМЕЦ *TRITICUM VOEOTICUM BOISS*.....126
- РОЛЯТА НА ПРЕЧИСТВАНЕТО И ТОПЛИННАТА ОБРАБОТКА НА ДВУЧЕРУПЧЕСТИТЕ МЕКОТЕЛИ ЗА ЕЛИМИНИРАНЕ НА БИОЛОГИЧНИЯ РИСК.....143



Q- PCR МЕТОДИ ЗА ДЕТЕКЦИЯ НА АЛЕРГЕНИ В ХРАНИ

Q- PCR METHODS FOR DETECTION OF FOOD ALLERGENS

Станимира Арсова, Красимира Василева, Елена Кузова,
Цвета Георгиева

Национален център по опазване на общественото
здраве и анализи

гр. София, България

Stanimira Arsova, Krassimira Vasileva, Elena Kuzova, Tsveta
Georgieva

National Center for Public Health and Analysis Sofia, Bulgaria

email: st.arsova@ncpha.government.bg; kr.vasileva@ncpha.government.bg;
e.kuzova@ncpha.government.bg;
tzv.georgiewa@ncpha.government.bg

РЕЗИЮМЕ

През последните години се отбелязва значителен ръст на алергичните болести, включително и на хранителните алергии. Средната честота на хранителната алергия е 4%, а при децата до 3-годишна възраст е по-висока и достига до 6%. Наблюдава значителен напредък в разбирането на механизмите на алергичните реакции, в частност – на обусловените от храни алергични реакции. Много от храните са изучени на молекулярно ниво, което помага и за точното определяне на имунологичните механизми на алергичните реакции. Ето защо стриктният контрол върху храните и качествената лабораторна дейност са водещ фактор за опазването на човешкото здраве.

В тази насока Регламент (ЕС) № 1169/2011 дава обширна информация относно 14 групи хранителни вещества и продукти от тях, които най-често причиняват алергии и се налага задължително етикетиране на съответните хранителни продукти. Следва се принципът „нулев толеранс,,- т.е. изобщо да не присъстват.

Обект на настоящата експериментална работа е верифициране и въвеждане в рутинната аналитична практика за контрол на qPCR анализ, при който са изследвани храни, съдържащи едни от най-

разпространените алергенни съставки: глутен, фъстъци, лешници и горчица. Общите аспекти, засягащи ДНК анализа на алергени, са описани в БДС EN 15634-1:2020. qPCR тестовете са насочени към специфична последователност на ДНК на алергенната хранителна съставка. qPCR е силно специфичен метод, който позволява елиминиране на кръстосаната реактивност, при която други методи се оказват неефективни.

Получените резултати от анализа категорично доказват наличието на алергенните съставки в изследваните хранителни матрици. PCR анализа за качествено определяне на алергени се откроява като точен, бърз и ефективен метод. ДНК е изключително стабилна молекула, която остава незасегната по време на процеса на обработката на храни.

Ключови думи: хранителни алергии, алергени, контрол, qPCR , ДНК

SUMMARY

In recent years, there has been a significant increase in allergic diseases, including food allergies. The average frequency of food allergies is 4%, and in children under 3 years of age it is higher and reaches 6%. There has been significant progress in understanding the mechanisms of allergic reactions, in particular food-related allergic reactions. Many foods have been studied at the molecular level, which also helps to more accurately determine the immunological mechanisms of allergic reactions. That is why strict control over food and quality laboratory activity are a leading factor in the protection of human health.

In this regard, Regulation (EU) № 1169/2011 provides extensive information on the 14 groups of nutrients and their products that most commonly cause allergies and that mandatory labeling of the foodstuffs concerned is mandatory. The principle „zero tolerance“ is followed - ie. not to be present at all.

The object of the present experimental work is verification and introduction in the routine analytical practice for control of qPCR analysis, which examined foods containing some of the most common allergenic ingredients: gluten, peanuts, hazelnuts and mustard. The general aspects concerning the DNA analysis of allergens are described in BDS EN 15634-1: 2020. qPCR assays target a specific DNA sequence of an allergenic food ingredient. qPCR is a highly specific method that allows the elimination of cross-reactivity, in which other methods prove ineffective.

The results of the analysis categorically prove the presence of allergenic ingredients in the studied food matrices. PCR analysis for qualitative determination of allergens stands out as an accurate, fast and effective method. DNA is an extremely stable molecule that remains intact during the food processing process.

Key words: food allergies, allergens, control, qPCR, DNA

ВЪВЕДЕНИЕ

През последните години се отбелязва значителен ръст на алергичните болести, включително и на хранителните алергии. Те представляват специфична имунна реакция на организма към определен компонент на храната, обикновено протеин. Тялото произвежда антитела срещу хранителния протеин, което причинява отделянето на хистамин и други химични субстанции, водещи до алергична реакция [3].

Средната честота на хранителната алергия е 4%, а при децата до 3-годишна възраст е по-висока и достига до 6%. Този ръст се наблюдава както в развитите, така и в развиващите се страни. При сенсibiliзиран индивид дори приемът на малки количества от даден алерген може да провокира храносмилателни разстройства, дихателни и кожни реакции. За някои алергични лица контактът с определен хранителен алерген може дори да предизвика животозастрашаващи реакции (анафилаксия).

Тъй като към днешна дата няма налични лекове за пациенти с алергия, хората с алергия трябва стриктно да избягват конкретните алергени в диетата си. Пълното избягване понякога е трудно, тъй като преработената храна обикновено съдържа голямо разнообразие от съставки, включително потенциални алергени. Чувствителните индивиди могат също да бъдат неволно изложени на алергенни протеини чрез консумация на хранителни продукти, за които се предполага, че не съдържат определен алерген. Това се дължи на факта, че дадена храна може да бъде замърсена с 'чужди' хранителни съставки по време на транспортирането и съхранението, по време на преработката, напр. чрез пренасяне поради неадекватно почистване на споделеното оборудване за преработка или чрез повторна употреба на продукти, съдържащи алерген Huggett, A.C. and Hischenhuber, C., 1998.

Непрекъснато увеличаващият се брой хора, страдащи от хранителни алергии в световен мащаб, довежда до необходимостта от актуализиране на Регламент 1169 от 25 октомври 2011 г., който влиза на територията на Европейския съюз от 13 декември 2014 г. Регламентът има доста обширен и разнообразен обхват, като специално място намира въпроса за присъствието на алергени в храните, системата за тяхното управление и информирането на потребителя [5].

В Приложение II на Регламента, са посочени 14 групи храни, вещества или продукти от тях, които най-често причиняват алергии или непоносимост и следва да се наблюдават и контролират. Задължителни елементи от етикета на един хранителен продукт са всички съставки или спомагателни вещества, изброени в приложение II, или получени от вещество или продукт, посочени в приложение II, причиняващи алергии или непоносимост, които се използват за производство или приготвяне на храна и все още присъстват в крайния продукт, дори и в изменен вид. Спазва се принципът „ нулев толеранс,,- т.е. изобщо да не присъства.

Според основните изисквания за етикетиране на храните, алергените трябва да бъдат отбелязани с удебелен шрифт, големи букви или друг стил на писане, за да се различават от останалите съставки. При липса на списък със съставки за отбелязване на алергените се включва следното изречение: „ Съдържа орехи, фъстъци и други ядки“. Изписването на алергените не е задължително, когато от наименованието на продукта се разбира, че той съдържа алергизиращи съставки. В някои страни съществуват ограничения, като например в Швейцария, където допустимата граница е 1000 ppm.

Докато законодателството за етикетиране гарантира информирането на потребителите, безопасността на храните се покрива от отделно законодателство (Регламент (ЕО) 178/2002) [3]. Това законодателство установява европейската система за бързо предупреждение за информиране на държавите-членки по въпросите на безопасността на храните. Системата за бързо предупреждение за храни и фуражи (RASFF) има стандартна оперативна процедура и изброява случаи, при които държавите-членки смятат, че рискът може да изисква бърза реакция. Храна, в която се открива неволно присъствие на алергенно вещество, което не е споменато на етикета, е в този списък. Преди информирането на RASFF трябва да се извърши

оценка на риска. Следователно всеки резултат от измерванията, използван за защита на потребителите, трябва да се изрази в единици, подходящи за количествена оценка на риска. Това е мг. от общия протеин на алергена на кг. хранителен продукт [12].

Тъй като хранителните алергени представляват непрекъснат риск за хората с алергии, за производителите на храни е изключително важно да провеждат рутинни тестове за потенциални замърсявания с алергени в техните продукти [15]. Разработени са аналитични методи за откриване и количествено определяне на алергени, за да се гарантира безопасността на храните и съответствието на етикетите. В момента има няколко технически възможности за откриване на потенциални алергени в хранителните продукти. Използваните методи са насочени към самия алерген (протеин) или маркер, който показва наличието на алергенната съставка в храната. Като маркери за присъствието на потенциално алергенни хранителни продукти или съставки се посочват специфични протеини или ДНК фрагменти. Тези методи се базират най-вече на имуносорелентен анализ, мас-спектрометрия и ДНК анализ. Има и анализи, които разчитат на човешки серумен *igE*. Те обаче се оказват трудни за стандартизиране и могат да се обработват само в специализирани (клинични) лаборатории. Следователно методите, основани на човешки серуми, не са подходящи за рутинни анализи на храни [7].

Целта на настоящата научна разработка е да се въведат точни, бързи и високо специфични методи за откриване и количествено определяне на глутен и за откриване на фъстъци и горчица чрез Real-time PCR. За постигане на целта си поставихме следните задачи:

1. Подбор на подходящи пакетирани храни от търговската мрежа, в чийто състав е посочено, че съдържат търсените от нас алергенни съставки.

2. Подбор и оптимизиране на подходящ метод за подготовка на пробите (изолиране на ДНК) от хранителни матрици.

3. Подбор и оптимизиране на ДНК методи за откриване на алергени в хранителни проби чрез полимеразна верижна реакция в реално време (Real-time PCR).

Общите аспекти на ДНК анализа на алергени са описани в БДС EN 15634-1:2020.

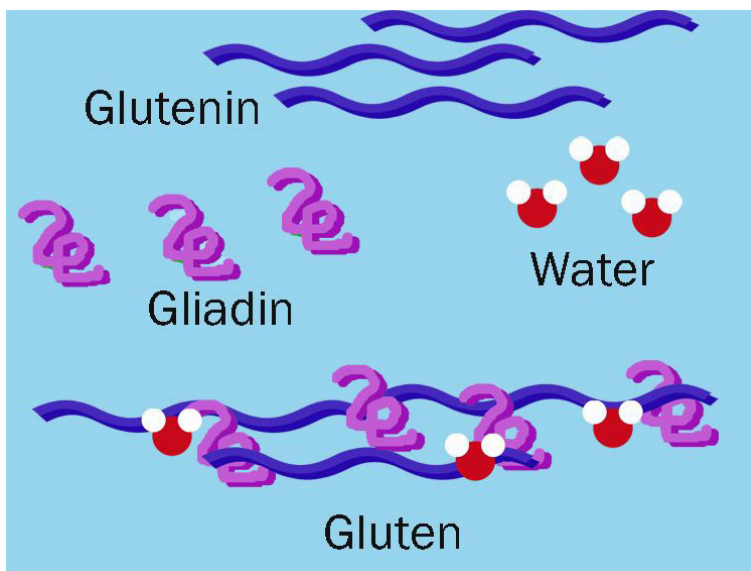
Характеристика на глутен, фъстъци и горчица

Глутен

Глутенът представлява съвкупност от няколко водонеразтворими белтъци, които се срещат основно в житните култури, като пшеницата и ечемикът. Името глутен произлиза от латинската дума “gluten”, която буквално означава “лепило”. Установено е, че до половината от световното население страда от повишена чувствителност към глутена в точно специфична субгрупа зърна – пшеница, ръж, и ечемик. Глутен има и в други зърнени храни, като булгур, семолина, спелта и кускус. В пекарството, именно глутенът е веществото, което придава еластичност на тестото и допринася за запазване на неговата формата по време на втасване. Колкото по-голямо е процентното съдържание на глутен в зърнените култури, толкова по-високо е качеството на брашното и съответно качеството на продукта, приготвен от това брашно. Например, за направата на пшеничен хляб, процентното съдържание на глутен в пшеницата трябва да бъде поне 25 – 30%.

Водонеразтворимите белтъци глиадин и глутенин съставят около 80 % от белтъчното съдържание в ендосперма на житното зърно (Фиг.1). От медицинска гледна точка те се приемат за главните причинители на целиакия, глутенова непоносимост и пшенична алергия . Препоръчително е хора, които страдат от една или друга форма на глутенова непоносимост, да избягват консумацията на храни, съдържащи тези глутенови белтъци, както и храни, съдържащи белтъците хордеин (ечемик) и секалин (ръж).

Фиг. 1: Белтъчна структура на глутен



Рискове, свързани с консумацията на глутен

Повечето хора понасят глутена без неблагоприятни ефекти за тяхното здраве. Има обаче и случаи, при които се появяват неблагоприятни здравословни състояния като целиакия, непоносимост към глутен, алергия към пшеница и някои други заболявания.

Целиакия

Целиакията е автоимунна ентеропатия, причинена от генетични фактори и фактори на околната среда, с оценено разпространение в световен мащаб от около 1% [8]. Представлява автоимунно разстройство, при което тялото третира глутена като чужд нашественик. Иммунната система атакува глутена, както и лигавицата на червата. Това уврежда чревната стена и може да причини недостиг на хранителни вещества, анемия, тежки проблеми с храносмилането и повишен риск от много заболявания. Най-честите симптоми на целиакия са: храносмилателен дискомфорт, увреждане на тъканите в тънките черва, подуване на корема, главоболие, кожни обриви, депресия, необяснима загуба на тегло [15].

Алергия към пшеница и глутенова непоносимост- същност и съпоставка

Алергията към пшеница е реакция към протеините, открити в пшеницата, предизвикана от иммунната система и обикновено се

проявява в рамките на секунди или минути след ядене. Хранителните алергии се случват, когато имунната система на организма реагира много бързо на даден алерген. Малки количества могат да причинят потенциално животозастрашаващи реакции.

Хранителните алергии като цяло обикновено се появяват в детска възраст и могат да бъдат диагностицирани с кожни тестове или чрез RAST- кръвен тест, който идентифицира специфични антитела и по този начин показва дали някое вещество причинява (или не) алергия у индивида. Хранителната непоносимост има тенденция да се проявява при по-големи деца или като възрастни и, подобно на алергията, това е необратимо състояние [14]. Освен това, докато алергията е по-рядък проблем (обикновено свързан със семейната история на човек), непоносимостта към глутен е по-често срещана.

Ако човек е алергичен към пшеница например, тялото вижда храната като нахлуващ агент, което причинява симптоми като сърбеж по кожата, очите и гърлото. В случай на непоносимост към глутен, от друга страна, реакциите обикновено се проявяват повече в стомашно-чревния тракт (например с подуване на корема и коремна болка).

Трябва да се отбележи, че алергията към пшеницата не винаги е свързана със самия глутен, тъй като е възможно човек да е алергичен към друго вещество, присъстващо в храната. Въпреки това в повечето случаи глиадинът (глутеновият компонент) е причината за алергията. Ето защо е много важно да се правят тестове за правилно идентифициране на алергена - тоест веществото, присъстващо в пшеницата, което причинява алергия.

Алергията към пшеница се приема за по-сериозен проблем от непоносимостта към глутен . Ако човекът е алергичен и влезе в контакт с пшеница, симптомите могат да бъдат много сериозни: сърбеж по кожата, очите, дразнене в гърлото, копривна треска и в по-тежки случаи дори анафилактични шокове, които могат да доведат до фатален край [2].

Безглутенови зърна

Съществуват няколко вида зърна и семена, които са естествено без глутен и включват: ориз, овес, киноа, лен, просо, сорго, тапиока, елда, амарант. Интересен факт за овеса е, че от биохимична гледна точка овесените ядки не съдържат глутенови протеини, които биха довели до алергична реакция. От друга страна обаче овесът често бива отглеждан или обработван в непосредствена близост до пшеница,

ечемик или ръж. Това води до неговото „замърсяване“ с глютенени протеини (глиадини) и го прави неподходящ за консумация в случаите на глютенена непоносимост.

Фъстъци

Фъстъчената алергия е една от най-тежките и широко разпространени хранителни алергии, която обикновено се отключва в детска възраст и не бива надрасната. [6]. Фъстъчено-алергичните реакции засягат неблагоприятно кожата, дихателните пътища и стомашно-чревния тракт. Честите симптоми включват остра уртикария, остро повръщане, оток на ларинкса, хипотония и дисритмия. Алергията към фъстъци е много опасна, тъй като поглъщането на дори следи от фъстъци може да предизвика животозастрашаващи реакции в рамките на минути. Фъстъците, заедно с дървесните ядки, причиняват повечето фатални или почти фатални анафилаксии, свързани с храната, а алергията към фъстъци води до 100–200 смъртни случая всяка година в САЩ. Нещо повече, алергията към фъстъци обикновено е през целия живот, като само 10% от децата с алергия към фъстъци го надрастват. Не на последно място, поради повсеместното използване на фъстъци в хранително-вкусовата промишленост, е почти невъзможно за пациент с алергия към фъстъци да избегне напълно фъстъка, дори ако той/тя стриктно се подчинява на указанията на лекаря. Проучванията показват, че до 75% от хората с известна алергия към фъстъци изпитват реакции, причинени от случайно излагане. По този начин алергията към фъстъци оказва огромен натиск върху пациентите и техните семейства и силно влошава качеството им на живот.

Към днешна дата Подкомитетът по номенклатура на алергените на СЗО/ IUIS признава 16 фъстъчени алергена, като за основни причинители на алергии се приемат *Ara h1*, *Ara h2* и *Ara h3* [1]. Установено е, че за европейските държави най-висока честота има алергията към протеина *Ara h2*. Този протеин изпълнява резервна функция в семената на фъстъците и именно той е избран за настоящия анализ.

Горчица

Горчицата се използва широко в различни храни/хранителни продукти за подобряване на вкуса и хранителната стойност, които впоследствие повишават риска от реакции на свръхчувствителност.

Тази алергия изглежда засяга деца преди тригодишна възраст [10]. Тъй като последиците могат да застрашат живота, етикетването на храни, които имат горчица като съставка, е задължително.

Синапените семена идват от растение от семейство *Brassicaceae*, което включва също броколи, карфиол, зеле и брюкселско зеле. Има два основни вида синапено семе: бяло (*Sinapis alba L* или жълта горчица) и кафяво (*Brassica juncea L* или ориенталска горчица) Черни семена (черен горчица) също се предлагат на пазара . Синапис алба, известен като жълта горчица, обикновено се консумира като горчичен сос и се добавя като скрита подправка в много сосове и дресинги за салати в Европа [4–9]. Заедно с целина, сусам, лупина и миди, горчицата е една от най-честите подправки, причиняващи IgE-медирана тежка анафилаксия.

Горчицата съдържа дразнещи молекули (изотиоцианати и капсаицин), които затрудняват диагностицирането на алергия към горчица. Те могат да причинят неимунни реакции при някои индивиди, подобни на IgE-медирана алергия. Смята се, че тези реакции са отговорни за някои фалшиво положителни резултати, получени при кожни алергични тестове към горчица [11]. Поради висок риск от къстосан контакт, хората алергични към горчица, трябва да избягват консумацията на сухи билки и подправки.

Основните алергени в горчицата са *Sin a 1* (жълта горчица) и *Bra j 1* (индийска горчица). Двата протеина имат подобна структура 1. *Sin a 1* е устойчив на топлина и ензимно разграждане. Проучване, публикувано през 2005 г., показва корелирана алергия към горчица и сенсibiliзация към пращец от гъби (89%) и акари (68,4%) [16]. Изследователите също така установяват, че всички участници, алергични към горчица, са чувствителни към други растения от семейство *Brassicaceae*.

Контролът на зачестилите алергични реакции налага потребителите стриктно да прочитат етикетите на хранителните продукти и да избягват такива, съдържащи алергенната съставка. Много полезно за хората с хранителни алергии е да приемат на храносмилателния ензим папаин, срещащ се в зрелите плодове на папаята. Има данни, че този ензим намалява автоимунната реакция при консумацията на съдържащи алергени храни, в случаите когато алергените са протеини или пептиди.

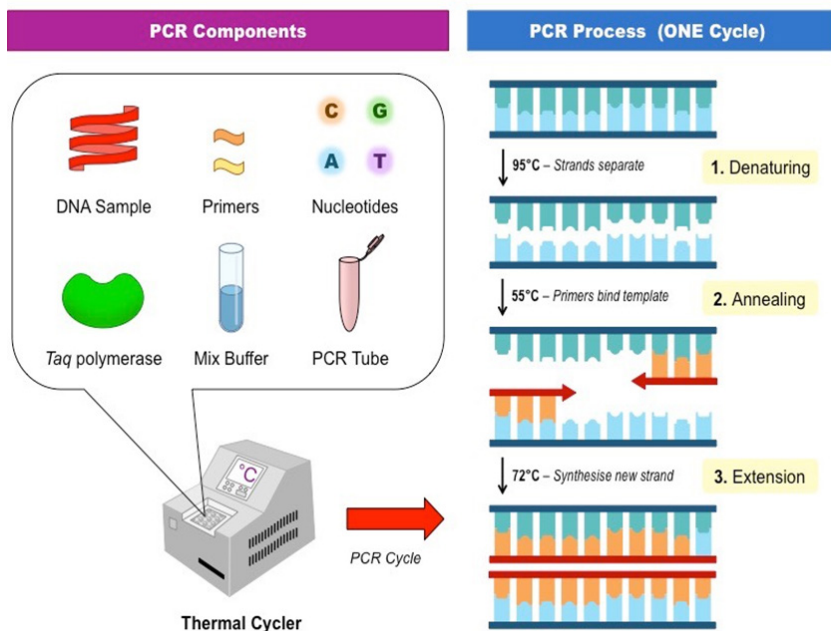
МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Обект на изследване на настоящия анализ са следните проби: 1 проба глутеново брашно (междулабораторно), една проба снакс с фъстъци, една проба бисквити с фъстъци, една проба печени белени фъстъци и една проба едрозърнеста горчица. Извършена е екстракция с използването на NucleoSpin Food кит и по две повторения от всяка проба. Качеството на екстрахираната ДНК е доказано на база спектрофотометричен анализ и гел-електрофореза. Добивът на ДНК при Ratio 260/280 nm е в диапазона 50 ng/μl- 100 ng/μl, а качеството на изолираната ДНК е между 1,7 и 2. Тези данни показват, че екстрахираната ДНК е с достатъчна концентрация и чистота за последващ PCR анализ.

Полимеразна верижна реакция (PCR)

Полимеразната верижна реакция (Polymerase Chain Reaction) е експериментален метод от молекулярната биология, генното инженерство и молекулната диагностика. Това е техника за създаване на много копия на един ДНК регион инвитро, извършва се амплификация. PCR тестовете на алергени не са насочени към протеин, а към специфична нуклетидна последователност на ДНК на алергенната съставка. По този начин те се открояват като силно специфични и могат да се използват за използват за идентификация едновременно на няколко вида алергени в обработени проби от храна.

Фиг. 2: Същност на PCR реакцията



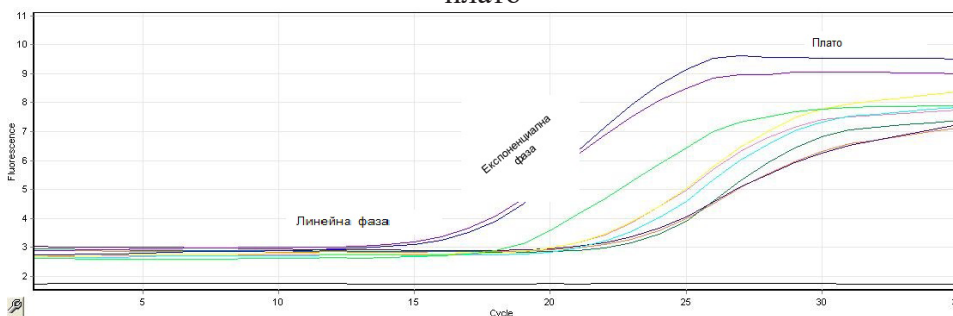
Предимства на метода:

- ДНК анализа може да се използва за проверка или изясняване на резултатите от ELISA и също за откриването на потенциално алергенни продукти, за които в момента няма тест ELISA.
- Този метод може да бъде много подходящ за хранителни продукти, съдържащи хидролизирани протеини, или в случаите на ниско ниво на замърсяване с алергени.
- ДНК е изключително стабилна молекула, която остава незасегната от стандартната обработка на храни.
- PCR реакцията се характеризира с много висока точност, което означава, че е в състояние да преодолее всеки проблем с кръстосаната реактивност, при който други методи се оказват неефективни.

За целите на настоящия анализ е използван PCR в реално време (Real-time PCR- ABI 7300). Методът позволява да наблюдаваме

промяната на флуоресценцията при всеки цикъл в реално време. Сигналят (флуоресценцията) е пропорционален на умножените ДНК вериги. Апаратът, с който се работи, е с изключително висока чувствителност по отношение на дори много малки промени във флуоресценцията. Важна характеристика на анализа е праговият цикъл. Праговият цикъл (Ct) е PCR цикълът, при който флуоресценцията преминава праговото ниво и може да се използва за определяне на началния размер на ДНК в пробата на базата на стандартната крива (въз основа на проби с известна концентрация) (Kurmaye *et al.* 2003). Стойността Ct се определя от цикъла, в който PCR апарат отчита значителна промяна на флуоресценцията. Ct е обратно пропорционална с количеството на ДНК като изходното количество ДНК обикновено е 25ng/ μ l.

Фиг. 3: Фази на ПВР в реално време- линейна, експоненциална и плато



Характеристика на Real-time PCR:

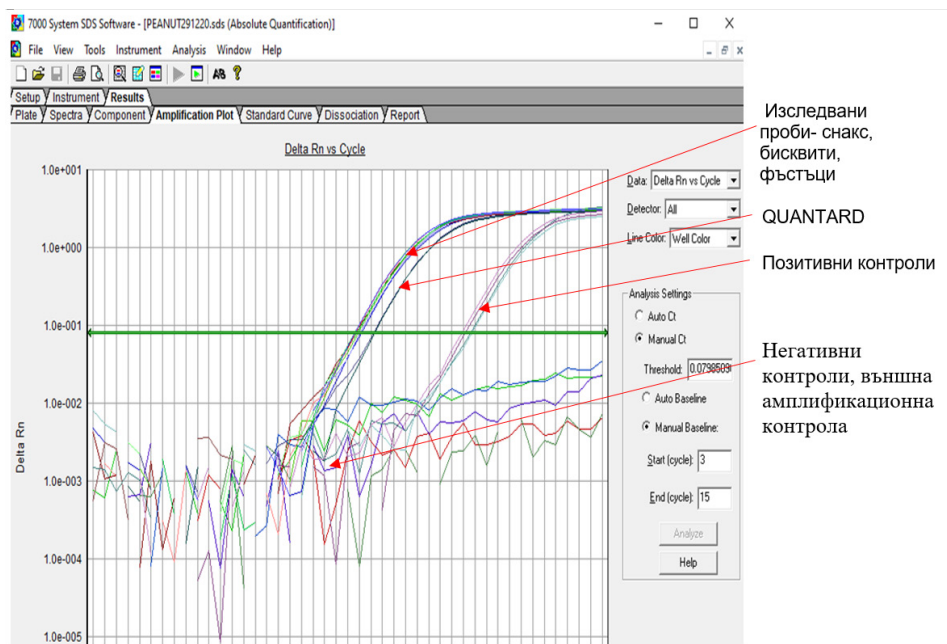
- Бърз (около 1ч) и лесен за изпълнение метод;
- Отчитане на амплификацията на всеки цикъл от PCR-а;
- PCR апарат способен да измерва много малки нива на промяна на флуоресценция;
- Няма нужда от тестване на PCR- а на агарозни или други гелове;
- Възможност за извършване на различни анализи.

Идентификацията и определянето на алергените в избраните хранителни проби е извършено чрез PCR в реално време и са използвани следните стандарти: БДС 15634-4; БДС 15634-5. Глутенът е анализиран чрез стриктното спазване на указанията, посочени в работния кит.

РЕЗУЛТАТИ

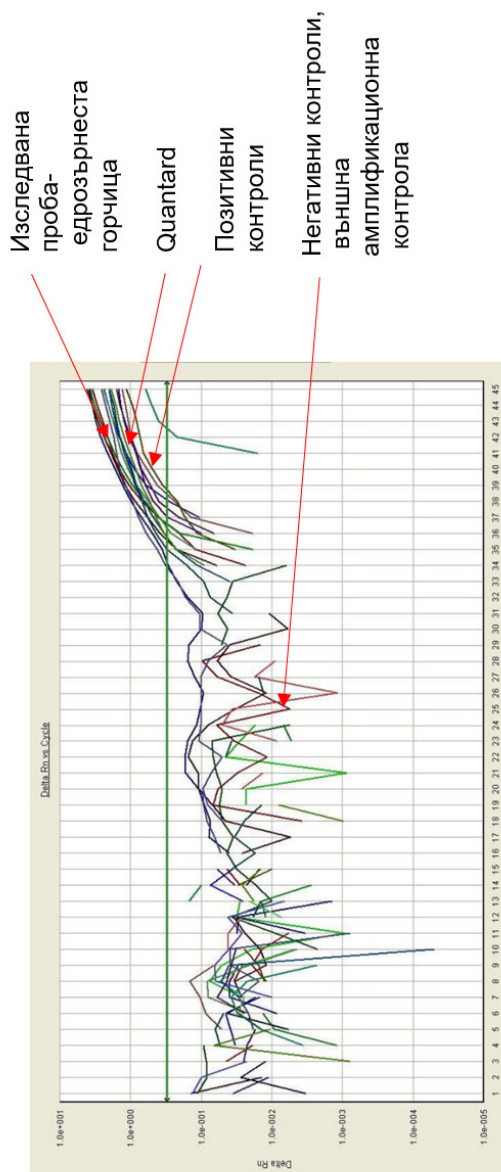
Фъстъци : качествен анализ (Ara h2)

Фиг. 4: Графична зависимост на флуоресценцията от броя цикли (времето) на три вида от изследваните проби- снакс, бисквити, фъстъци



Горчица : качествен анализ (Sin a1)

Фиг. 5: Графична зависимост на флуоресценцията от броя цикли (времето) на изследвана проба от едрозърнеста горчица



Well	Sample Nam	Detector	Task	Ct	StdDev Ct	Qty	Mean Qty	StdDev Qty	Filtered	Trm
A1	NTC	Gluten	NTC	Undet.						
A1	NTC	IAC	NTC	Undet.						
A2	NTC	Gluten	NTC	Undet.						
A2	NTC	IAC	NTC	41.96						
A3	T1	Gluten	Unknown	17.15	0.065	884857.06	847536.96	36550.457		
A3	T1	IAC	Unknown	Undet.	0.012					
B1	POS control	Gluten	Unknown	28.52	0.129	379.55	403.82	34.313		
B1	POS control	IAC	Unknown	Undet.						
B2	POS control	Gluten	Unknown	28.73	0.129	428.08	403.82	34.313		
B2	POS control	IAC	Unknown	40.20						
B3	T1	Gluten	Unknown	17.28	0.065	811808.13	847536.96	36550.457		
B3	T1	IAC	Unknown	35.21	0.012					
C1	POS quantard	Gluten	Unknown	26.33	0.628	2081.67	1620.75	651.845		
C1	POS quantard	IAC	Unknown	31.81	1.002					
C2	POS quantard	Gluten	Unknown	27.22	0.628	1159.82	1620.75	651.845		
C2	POS quantard	IAC	Unknown	33.23	1.002					
C3	T1	Gluten	Unknown	17.22	0.065	845945.69	847536.96	36550.457		
C3	T1	IAC	Unknown	35.22	0.012					
D1	S1	Gluten	Standard	21.31	0.135	50000.00				
D1	S1	IAC	Unknown	32.71	0.063					
D2	S1	Gluten	Standard	21.50	0.135	50000.00				
D2	S1	IAC	Unknown	32.80	0.063					
D3	T2	IAC	Unknown	34.35	0.134					
D3	T2	Gluten	Unknown	16.33	0.087	1.52e+006	1.62e+006	92123.147		
E1	S2	Gluten	Standard	24.76	0.401	5000.00				
E1	S2	IAC	Unknown	32.19	0.104					
E2	S2	Gluten	Standard	25.32	0.401	5000.00				
E2	S2	IAC	Unknown	32.05	0.104					
E3	T2	IAC	Unknown	34.30	0.134					
E3	T2	Gluten	Unknown	16.17	0.087	1.69e+006	1.62e+006	92123.147		
F1	S3	Gluten	Standard	28.59	0.217	500.00				
F1	S3	IAC	Unknown	31.37	0.092					
F2	S3	Gluten	Standard	26.90	0.217	500.00				
F2	S3	IAC	Unknown	31.50	0.092					
F3	T2	IAC	Unknown	34.10	0.134					
F3	T2	Gluten	Unknown	16.19	0.087	1.66e+006	1.62e+006	92123.147		
G1	S4	Gluten	Standard	31.74	0.111	50.00				
G1	S4	IAC	Unknown	31.36	0.103					
G2	S4	Gluten	Standard	31.89	0.111	50.00				
G2	S4	IAC	Unknown	31.21	0.103					

Табл. 1: Обобщен доклад на пробите T1 и T2, използвани за количествен анализ на глютен

For a final calculation of mg allergenic substance / kg food sample follo

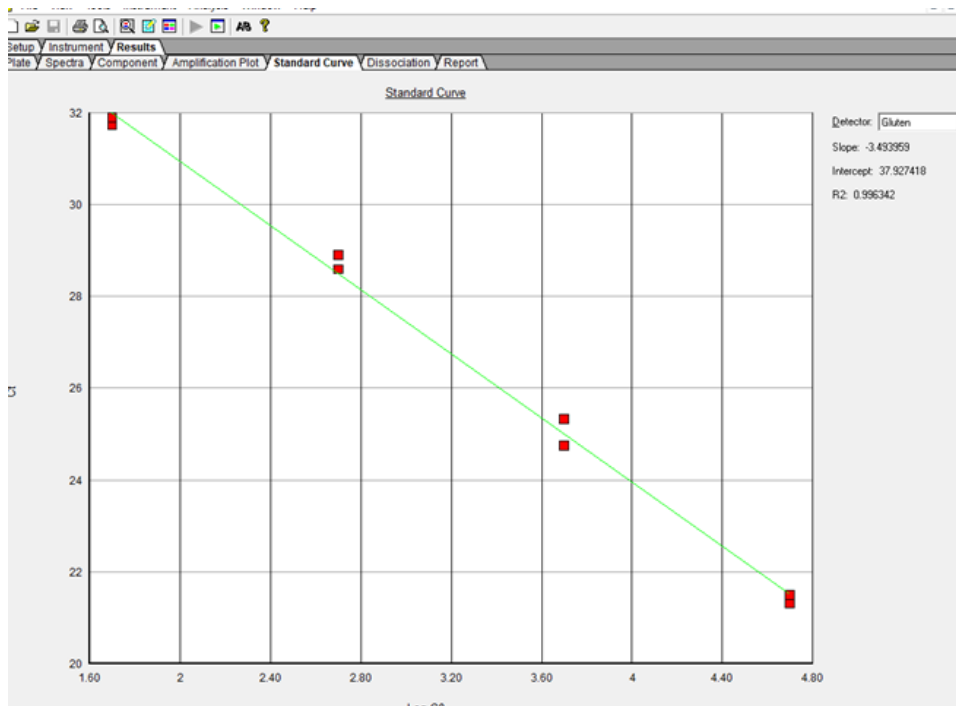
$$X \left[\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right] = \frac{10 \left(\frac{C_p \text{ sample}}{s} \right)}{10 \left(\frac{C_p \text{ QUANTARD}}{s} \right)} * c \text{ QUANTARD}$$

s = slope
c = concn
Cp QUANTAR

T1 = 53,87 mg/kg (МСИ) = 58,3 mg/kg

T2 = 63,27 mg/kg

Фиг. 6: Стандартна крива на глютен



ОБСЪЖДАНЕ

Извършена е екстракция на ДНК с NucleoSpin® Food кит с измерено количество от всяка една хомогенизирана проба около 0,200 гр. Методът е утвърден като един от най-предпочитаните за работа с обработени хранителни матрици, даващ високо концентрирани добиви ДНК. Това се доказва след отчитане на концентрацията и чистотата на екстрахираната ДНК чрез спектрофотометрично изследване. Получените концентрации на ДНК са в диапазона 45 ng/ μ l – 178 ng/ μ l. На базата на това е проведен качествен анализ с Real-time PCR при следните температурни условия: табл.2.

Табл. 2 : Температурни условия на зададената PCR програмата

Етапи	Глутен	Фъстъци
Initial Denaturation (HOLD)-	5 min 95°C	10 min 95°C
Cycles-	45	45
Denaturation	15 sec 95°C	30 sec 95°C
Annealing/Extension (CYCLE)-	30 sec 60°C	60 sec 62°C
Temperature Transition Rate –	Maximum	Maximum

За всяка PCR реакция са използвани две повторения от ДНК и няколко вида контроли, съответно контрола за конкретния ДНК таргет, PCR инхибиционна контрола, амплификационна контрола, празна екстракционна контрола, позитивна екстракционна контрола. Набора от контроли е необходим, за да се демонстрира как би изглеждал позитивния резултат на тестовата проба. Съответно резултата от анализа ще бъде позитивен, ако специфичният PCR продукт е открит и всички контроли дават очакваните резултати, или съответно негативен ако не е открит търсения продукт при точни резултати на контролите.

В случая е отчетена амплификация на ДНК сигнала при всяка една от изследваните проби, което потвърждава наличието на търсените алергенни съставки, *Ara h2* и *Sin a1*. Амплификационните криви варират, между $Ct = 22^{pm}$ цикъли $Ct = 38^{mm}$ цикъл. В негативните контроли не се установява сигнал. Методът е верифициран в две повторения в различни дни и с различни екстракции на всички изследвани проби и позитивни контроли. Получените резултатите са идентични.

Проведеният количествен анализ на глутен е в рамките на междулабораторно сравнително изпитване (МСИ). Количественото определяне е извършено на базата на зададения референтен материал Sure Food® Quantard, включващ голям набор от най-разпространените

хранителни алергени с концентрация 40 mg алергична субстанция на кг. проба. Получените стойности C_t на пробите са в диапазона между 18-30, а стандартната крива се характеризира със $\text{slope} = -3,312$ и $R^2 = 0,996$, което се явяват много добри характеристики (допустими граници: $\text{slope} = -3,1 - -3,6$, $R^2 > 0,098$) (фиг.11). Обобщеният доклад от всички C_t стойности ($C_t = C_p$) позволява да се направи точна количествена оценка на глютеното съдържание в анализираната проба (табл.7). За тази цел се използва конкретна формула, взимаща под внимание C_t на съответните повторения от пробата, C_t на използвания стандарт, slope на стандартната крива и концентрацията на стандарта, която за конкретния анализ е 40 ng/ μ l. Границите на детекция и количествено определяне са дефинирани спрямо работния кит и са съответно $\text{LOD} \leq 0,4$ mg/kg и $\text{LOQ} = 1$ mg/kg.

$T_1 = 53,87$ mg/kg $T_2 = 63,27$ mg/kg S (междулабораторно) = 58,3 mg/kg.

Полученият количествен резултат показва незначителни разлики от реалният такъв и може да бъде приет като доказателство за извършения прецизен и точен анализ.

В заключение:

През последните години с бурното развитие на инструментите на молекулярната биология, ДНК методите намират все по-широко приложение при оценката на риска за здравето на човека. Проведеният анализ на алергени с използването на Real-time PCR е новаторство за България. Това е високо специфичен метод, изискващ добра компетентност и стриктно изпълнение на всяка една стъпка от анализа. Добивът на ДНК от изследваната хранителна матрица е ключов за протичането на PCR в реално време. Ето защо изборът на метод за екстракция трябва да бъде с голяма точност съпоставен спрямо спецификите на изследваната хранителна матрица. Така се гарантира ефективността на цялостният проведен анализ и се свежда до минимум риска от подаването на фалшиво положителен или отрицателен резултат.

ИЗВОДИ

- 1) Оптимизираният протокол на ДНК екстракция с NucleoSpin Food кит води до изолирането на ДНК със

задоволителен добив и чистота.

2) Последващият анализ с Real-time PCR дава ясен амплификационен сигнал за всяка една от изследваните проби и отчита присъствието на алергенната съставка.

3) Количественото определяне на съдържанието на глутен показва значително сходство с реалното процентно съдържание.

4) Въведени са точни, бързи и високо специфични методи за откриване и околичествяване на глутен и за откриване на фъстъци и горчица чрез Real-time PCR, което е новаторство за България.

5) Това може да бъде прието като бъдеща предпоставка за разработване на PCR анализа като един надежден заместител на ELISA методите и комерсиализирането му в рутинната лабораторна практика, с цел засилен контрол по хранително-вкусовата верига и опазване здравето на потребителя.

ЛИТЕРАТУРА

1. Allergen Nomenclature
2. Cianferoni A. [Wheat allergy: diagnosis and management](#). J Asthma Allergy. 2016;9:13-25. doi:10.2147/JAA.S81550
3. Department of Primary industries, Food Authority, Allergen Survey Report, January 2018.
4. Figueroa, J. et coll. (2005). Mustard allergy confirmed by double-blind placebo-controlled food challenges: clinical features and cross-reactivity with mugwort pollen and plant-derived foods. Allergy, 60:48-55. DOI 10.1111/j.1398-9995.2005.00644.x
5. Girdhari M.Sharma et al- Detection of allergen Markers in Food, Analytical Methods Food Safety: Innovative Analytical Tools, | DOI: 10.1002 / 9781119160588, Copyright © 2017 Scrivener Publishing LLC. All rights reserved.
6. Hourihane JO, Kilburn SA, Dean P, Warner JO. Clinical characteristics of peanut allergy. *Clin Exp Allergy* 1997;27(6):634-9. [[PubMed](#)]
7. Poms, R.E., Klein, C.L. and Anklam, E., Methods for allergen analysis in food: a review Food Addit Contam., 2004 Jan; 21 (1): 1-31. doi: 10.1080

/ 02652030310001620423.

8. Jasmin Kraus, Product Manager Romer Labs, „International Food & Meat Topics“, Volume 28 Number 4 (2017)

9. Kanny G, Fremont S, Talhouarne G, Nicolas JP, Moneret-Vautrin DA. Anaphylaxis to mustard as a masked allergen in “chicken dips” Ann Allergy Asthma Immunol. 1995;75:340–2 [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

10. Rancé, F., Dutau, G. et Abbal, M. (2000). Mustard allergy in children. Allergy, 55:496-500. DOI : 10.1034/j.1398-9995.2000.00383.x

11. Rancé, F. (2003). Mustard allergy as a new food allergy. Allergy, 58:287-288. DOI 10.1034/j.1398-9995.2003.00109.x

12. Regulation (EU) № 1169/2011 of the European Parliament and of the Council of 25 October 2011 on the provision of food information to consumers, amending Regulations (EC) № 1924/2006 and (EC) № 1925/2006 European Parliament and of the Council and repealing Commission Directive 87/250 / EEC, Council Directive 90/496 / EEC, Commission Directive 1999/10 / EC, Directive 2000/13 / EC of the European Parliament and of the Council, Directives 2002/67 / EC and 2008/5 / EC of the Commission and Regulation (EC) № 608/2004

13. Regulation (EU) № 178/2002 of the European Parliament and of the Council of 28 January 2002 laying down the general principles and requirements of food law, establishing a European Food Safety Authority and laying down procedures for food safety

14. Review article: the diagnosis and management of food allergy and food intolerances. Aliment Pharmacol Ther. 2015 Jan41(1):3-25. doi: 10.1111/apt.12984. Epub 2014 Oct 14.

15. Rostom A, Murray JA, Kagnoff MF. American Gastroenterological Association (AGA) Institute technical review on the diagnosis and management of celiac disease. Gastroenterology 2006;131:1981–2002. - [PubMed](#)

16. Vidal C, Díaz C, Sáez A, Rodriguez M, Iglesias A. Anaphylaxis to mustard. Postgrad Med J. 1991;67:404. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

.....

ДИРЕКТИВА 2019/904 И ЗАДЪЛЖЕНИЯТА НА БЪЛГАРИЯ ОТНОСНО БУТИЛКИТЕ ОТ PET

DIRECTIVE (EU) 2019/904 AND ENGAQEMENTS OF BULGARIA FOR SINGLE-USE PET BOTTLES

инж. Майя Стойчева, Изпитвателен център АЛМИ ТЕСТ
1113 София, ул. Акад. Г. Бончев, бл. 24,
Dipl. Enj. Maya Stoycheva, Testing Centre ALMI TEST
1113 Sofia, Akad. Bonchev str., 24

E-mail: office@almitest.com, www.almitest.com

ДИРЕКТИВА (ЕС) 2019/904 относно намаляването на въздействието на определени пластмасови продукти върху околната среда – какво засяга тя?

Това са пластмасовите продукти за еднократна употреба, на които няма да се спирам, тъй като има разработена Наредба, която е в процес на обществено обсъждане.

В настоящия доклад акцентът е върху еднократните бутилки от полиетилентерефталат (PET).

Съгласно ДИРЕКТИВА (ЕС) 2019/904 се предвижда от 2025 г. бутилките за напитки, които са произведени от полиетилентерефталат като основен компонент („бутилки от PET“), да съдържат най-малко 25 %, а от 2030 година най- малко 30 % рециклирана пластмаса, изчислени като средна стойност за всички бутилки от PET. Това означава, че в производство и употреба ще бъдат пуснати бутилки както с различен процент съдържание на рециклиран материал, така и бутилки, произведени изцяло от рециклат.

Т.е. можем да ги разглеждаме като нови материали, при които към известните (класически) вещества се добавят нови в резултат на рециклирането, които могат да мигрират в опакованата храна.

Това усложнява ситуацията при използването на рециклиран материал. При него освен характерните за PET мигриращи вещества се присъединяват и нови – от рециклата.

Изследвания на рециклиран PET са доказали наличието на

limonene, γ -terpinene и p-cimene, които се използват като ароматизатори за безалкохолните напитки. Тези вещества не само се абсорбират по повърхността на опаковката, но е установено, че се намират дори в материала и преминават непроменени в регранулата, получен по традиционния начин- механичното рециклиране и дори променят органолептиката на опакованата храна. Това важи и за всякакви вещества от други стоки, които са били опаковани в опаковки от PET – в т.ч. пестициди, шампоани, детергенти, смазочни материали, греси, остатъци от храни и др, когато използваните им опаковки са попаднали в потока вторични суровини. Отсъствието на такива вещества в регранулата или опаковката, произведена от него, е доказателство за ефикасността на почистващия процес при рециклирането. Доказано е и наличието на бензен, етанол, ацеталдехид, 2-метил-1,3-диоксолан, етиленгликол и др.

При пластмасите има 2 вида рециклиране:

-обикновено/механично, което включва сортиране, смилане, измиване, сушене и регранулиране чрез екструзия. Обикновено така се рециклират полиолефините – полиетилен и полипропилен, а вече и PET.

-,супер почистване“, при което към механичното рециклиране се включват допълнителни етапи на дълбоко почистване чрез разграждане и повторна поликондензация/полимеризация. Това се отнася главно за полиетилентерефталата.

При всички случаи ефикасността на рециклиращия процес и безопасността на получаваните рециклирани материали трябва да бъдат доказвани с подходящи специфични анализи.

Какво казва EFSA в своите документи по този въпрос?

1. На първо място има ли микробиологично замърсяване? В случая рискът от микробиологично замърсяване се приема за нищожен и не се взема предвид поради високата температура при преработката на пластмасите.

2. Безопасността на рециклираните пластмаси при контакт с храни се определя преди всичко от:

- възможността **замърсителите от употребените вече опаковки** да се абсорбират върху рециклирания материал и по-късно да мигрират от него в храната. Не трябва да се забравя, че говорим и за опаковки от нехранителни стоки – напр. пестициди, детергенти, машинни масла,

греси и др, които обикновено са включени в партидите материали, подготвени за рециклиране при неефикасно разделяне, инцидентно замърсяване от опаковки за храни, в които са били държани химикали (което е характерно за нас) и не на последно място – продукти от разлагането на пластмасата при преработката ѝ;

-вещества от други материали, различни от PET – PE, PP, PA, ПВХ, лепила, етикети и др. Те се появяват също в резултат на неефикасното разделяне на потоците и могат да деструктират в резултат на високите температури и да образуват потенциални опасни вещества;

-вещества, които се използват в рециклиращия процес – детергенти и алкали, използвани за измиване на т.н. флейки;

В тази връзка е основополагащо становището на панела на EFSA „Материали за контакт с храни, ензими, ароматизиращи и технологични добавки“ (CFE) по отношение на рециклирания PET, за да бъде допуснат до пряк контакт с храни. Приемат се следните изходни тези:

1. Входящите за рециклиране използвани опаковки от PET трябва да са били произведени от материали, които отговарят на европейското законодателство за материали и изделия, предназначени за контакт с храни – т.е. на Регламент 10/2011;

2. В PET, предназначен за рециклиране, материалът, който произлиза от опаковки на нехранителни стоки, не трябва да бъде повече от 5%;

3. Всъответствие с добрата производствена практика се препоръчва периодично да се проверява дали източниците на вторичния материал са били произведени в съответствие с европейското законодателство за материали и изделия, предназначени за контакт с храни;

4. Критичните параметри на процесите трябва да бъдат под непрекъснат контрол;

5. Деконтаминиращата ефикасност на рециклиращия процес се определя чрез специални тестове, при които се използват изкуствени замърсители, които допълнително се влагат в материала, който ще бъде рециклиран;

Правилата за използването на рециклирани материали и предмети от пластмаси са описани в Регламент (ЕС) 282/2008 относно материалите и предметите от рециклирана пластмаса, предназначени за контакт с храни. (която очаква актуализация). Съгласно регламента безопасността на материалите и предметите

от рециклирана пластмаса се гарантира единствено от съчетаването на следните фактори:

- **характеристиките на използваните суровини,**
- **ефикасността на процеса на сортиране и**
- **ефективността на рециклиращия процес за намаляване на замърсяванията.**

Всички тези фактори могат да се оценят единствено в своята съвкупност чрез индивидуални оценки на процесите на рециклиране, последвани от индивидуални разрешителни процедури на EFSA. И не на последно място, но може би на първо по значимост - безопасността на рециклираната пластмаса може да се гарантира само ако може да се осигури възпроизводимо качество на рециклата.

И това са изискванията в Регламент 282:

1. Материалите и предметите от рециклирана пластмаса могат да се пускат на пазара, ако съдържат рециклирана пластмаса, получена само чрез процес за рециклиране, разрешен в съответствие с Регламент 282.

2. Качеството на пластмасовите суровини трябва да бъде определено и контролирано съгласно предварително установени критерии, които гарантират, че крайните материали и предмети от рециклирана пластмаса съответстват на изискванията, посочени в Регламент (ЕО) № 1935/2004;

3. Пластмасовите суровини трябва да произхождат от материали и предмети от пластмаса, които са произведени единствено в съответствие със законодателството на ЕС относно материали и предмети от пластмаса, предназначени за контакт с храни и Регламент 10/2011.

4. Пластмасовите суровини трябва да произхождат от един цикъл на продукти, които са част от затворена и контролирана верига, което гарантира използването само на материали и предмети, предназначени да влязат в контакт с храни, и изключването на всякакво замърсяване;

5. Трябва да се доказва чрез изпитвателни тестове или чрез други подходящи научни доказателства, че процесът може да намали всякакво замърсяване на пластмасовите суровини до размер, който не представлява риск за човешкото здраве;

6. Разрешеният процес за рециклиране се управлява чрез подходяща система за осигуряване на качеството, която гарантира,

че рециклираната пластмаса съответства на изискванията, посочени в разрешението. Тази система за осигуряване на качеството следва да съответства на подробните правила, установени в приложението към Регламент (ЕО) № 2023/2006.

КАКВО НИ КАЗВАТ ТЕЗИ ИЗИСКВАНИЯ?

Хипотетично: Имаме предприятие, което преработва използвани опаковки от PET по одобрен от EFSA процес, в резултат на който произвежда регранулат, който се предлага на клиентите като годен за контакт с храни. Това предприятие се сертифицира по БДС EN ISO 9001 и дори по серията стандарти за хранителната промишленост? Трябва да е ясно, че сертифицирането на Системата по качество на едно предприятие за вторична преработка на пластмаси по БДС EN ISO 9001 , за което в сертификата пише, че има система по качество за производството на регранулат, разрешен за контакт с храни, съвсем не значи, че този сертификат разрешава предлагането на регранулата за контакт с храни. Този сертификат само доказва, че предприятието има съответната система за качество!

Със съжаление мога да кажа, че доколкото имаме информация, сертифициращите фирми изискват от тези предприятия протоколи само за обща миграция в разрез с изискванията на Регламенти 10/2011 и 282/2008. При това без да се обръща внимание на условията на реалната употреба и синхронизирането им с условията на подготовка на пробите – условията на пробоподготовка/експозиция - вид на моделните среди, време и температура. Това е предпоставка за получаването на грешни или непълни резултати. Те не са достатъчни за оценяване на съответствието/риска и са основа за грешна оценка. В резултат на тези занижени изисквания ние може би ще тровим хората поне с бензола, който се намира в рециклатите на PET.

Изключително важно е да подчертая, че предлагането на опаковки за контакт с храни/напитки с включен рециклиран PET трябва да бъде на базата на резултати от изпитване на **специфичната миграция на не само на характерните за PET вещества, които мигрират от свежия материал, но и на тези, които мигрират от рециклата!**

Т.е пригодността и химическата безопасност на произвеждания рециклат и изделията, в които се влага, трябва да бъдат доказвани със съответните акредитирани аналитични методи и контролирани

перманентно!

Тези изпитвания трябва да бъдат провеждани в пълния им обем в АКРЕДИТИРАНИ лаборатории в съответствие с изискванията на Регламент 10/2011 !

Не е достатъчно да се представи протокол от изследване на общата миграция.

ЗАЩО?

Съгласно Регламент 10/2011 основни са изпитванията за специфична миграция.

Границата на обща миграция за всички видове опаковъчни материали за контакт с храни е 60 mg/kg, а това са всички вещества, които биха били извлечени от опакованата храна при съхранението ѝ в опаковката.

Друго е положението с границите на специфичната миграция. Тези граници са различни за всяко вещество, което мигрира от съответния опаковъчен материал (а те са различни) и се движат от около 0,1 до 0.001 mg/kg. Както се вижда, разликата е очевадна и затова общата миграция не е мерило за безопасността на опаковката.

Съгласно Регламент 10/2011, съгласно т. 2.2.1. Заместване на специфичната миграция с общата миграция с цел само скрининг на специфичната миграция на нелетливи вещества може да се прилага определяне само на обща миграция при условия на изпитване, които са най-малко толкова стриктни, колкото за специфична миграция.“

Т.е. при изпитванията за скрининг общата миграция трябва да се провежда при по-висока с 20°C температура.“

За съжаление това изискване все още не се разбира от всички заинтересовани страни – производители и вносители на материали и опаковки, ползватели на опаковките и опаковъчните материали, контролни органи и т.н.

Какво е положението в България?

Има огромен проблем – внася се вторичен полиетилен терефталат, който се предлага като първичен материал. Някои фирми се опариха, тъй като явно не се провежда входящ контрол на суровините.

В страната вече няколко години работят предприятия за рециклиране на PET. Изследванията ни в АЛМИ ТЕСТ показват, че в хроматограмите на материалите се намират пикове на изходните суровини за получаването на полимера PET и разпадните му продукти,

което говори за тежка деструкция на полимера. Тези разпадни вещества водят до промени в цвета, мириса и рН на опакования продукт.

Прилага се и друг трик – изнасят се т.н. „флейки” (flakes) – механично нарязани използвани бутилки от PET (вторични суровини) естествено без контрол на използваните опаковки дали са били първоначално произведени за контакт с храни, които след това влизат в страната като първичен материал. Тъй като отново! не се провежда входящ контрол, не се знае дали суровината отговаря на изискванията за контакт с храни, а се разчита на придружаващите партидата документи.

Във връзка с всичко казано до тук бих искала да ви запозная с две от най-важните стъпки за проверка на опаковките и опаковъчните материали, предназначени за контакт с храни.

Проследимостта е едно от най-важните изисквания. Съгласно Закона за храните, Регламент 1935/2004 и всички останали европейски и национални документи в тази област „проследимост“ е способността за проследяване и следване на материала или предмета през всички етапи на производство, преработка и предлагане в търговската мрежа;

Какво означава това изискване?

Страните, които участват в процеса на производство, транспорт, продажба и консумация на храни, трябва да бъдат предпазени и запознати с възможно замърсяване на храната от химична миграция и начините за нейното намаляване. Това означава, че:

-Материалите и изделията трябва да бъдат идентифицирани в документите толкова пълно (вкл. и в протоколите от изпитване), че при установяване на проблеми дефектните количества да бъдат изтеглени от търговската мрежа, производителите и потребителите. Трябва да има необходимите конкретни данни за изпитвания материал или изделие – вид, марка и производител на суровините и производител на крайния материал/артикул, има ли рециклиран материал в рецептурата на материала на опаковката и колко.

-Тази проследимост трябва да се гарантира на всички етапи, за да се улеснят контрола, изземването от потребителите на дефектните продукти, информацията за потребителите и поемането на отговорността.

Фирмите- потребители на опаковки също са изключително заинтересовани да имат информация от какви материали са произведени опаковките, които ползват, за да знаят какво да заявяват

и за кои материали се отнасят изпитванията, които доказват, че опаковката е безопасна. Това позволява сключването на компетентни договори за доставка на безопасни суровини, опаковъчни материали и опаковки. За съжаление все още има предприятия, и то големи, които отказват да декларират марките и производителите на суровините, с които работят под претекст, че е търговска тайна. Това им позволява теоретично! да подменят изпитаните материали с такива, които не са изпитани и те евентуално да не отговарят на изискванията за контакт с храни.

3. Изпитвания за обща и специфична миграция

За да бъдат получени сравними резултати при проверката на съответствието с границата на специфична и обща миграция, е необходимо да се правят изпитвания при стандартизирани условия на изпитване, в това число продължителност на изпитването, температура и среда на изпитване (моделен разтвор), които да отговарят на най-лошите предвидими условия на употреба на материала – вид на храната, за която е предназначена опаковката, температура и време на контакт/годност. Всички изпитвания трябва да бъдат провеждани при условията, определени в Регламент 10/2011 като съответни на реалните условия на употреба и това е изключително важно за валидността на получените резултати.

Този въпрос е важен и за производителите и потребителите на опаковки и опаковъчни материали при вземането на решение за закупуване. Кой е критерият за обявяването им за безопасни, ако имаме само резултата от общата миграция?

Съгласно Регламент 1935 и Закона за храните от опаковката не трябва да преминават към храната нискомолекулни вещества в количества, които могат да предизвикат неблагоприятни промени в състава на храната или в органолептичните ѝ характеристики. Това включва и промени в опалесценцията/утайка или промяна в цвета на моделните среди след експозицията.

С какви законови действия ние в България отговаряме на това изискване? Съгласно Наредба № 2/2008 за пластмасите (която не се знае как ще бъде променена при актуализацията ѝ) първата стъпка при изпитването/оценяване на съответствието е дали опаковката променя органолептиката на моделните среди и разрешената промяна е 1 бал, независимо дали във вкуса или мириса. При по-голяма промяна опаковката не се разрешава за контакт с храна. Освен

това ако моделните среди след експозицията/пробоподготовката са оцветени, опаковката също не се разрешава за контакт с храни. Няма обаче яснота какво да се прави, когато в моделната среда има утайка, ръжда или опалесценция.

И тъй като влагането на рециклиран РЕТ в бутилки, предназначени за опаковане на напитки, е належащо, бих искала да обърна внимание на някои нерешени проблеми:

1. В публичния списък на фирмите, които произвеждат материали и предмети от пластмаси/РЕТ, предназначени за контакт с храни, да се обхванат:

- фирмите, които произвеждат рециклиран материал за контакт с храни,

- преформи за раздуване на бутилки и

- фирмите, които произвеждат безалкохолни напитки и бира, тъй като те сами произвеждат бутилките си.

Това е необходимо, за да влязат в системата за контрол.

2. Да се изясни дали има предприятия в страната, които рециклират без одобрени от EFSA процеси и предлагат своята продукция за опаковки на храни.

(Случай от нашата практика: Фирма заявява анализи и декларира марката на китайски материал и твърди, че е първичен. Но в Интернет тази марка е на рециклат!!!)

3. Оказва се, че у нас не е достатъчно европейските регламенти да станат национално законодателство. Изискванията им масово не се спазват. Затова при актуализирането на НАРЕДБА № 2 ОТ 23 ЯНУАРИ 2008 Г. ЗА МАТЕРИАЛИТЕ И ПРЕДМЕТИТЕ ОТ ПЛАСТМАСИ, ПРЕДНАЗНАЧЕНИ ЗА КОНТАКТ С ХРАНИ е необходимо да се включат и следните изисквания:

3.1. За да се осигури изпълняването на изискването за проследимост съгласно Закона за храните, особено когато се включва рециклиран вторичен материал при изпитванията на материалите и предметите от РЕТ е необходимо да се декларира влагането на такъв скрап в тях и той да бъде включен в описанието на изделието. Необходимо е доказването на безопасността на опаковъчния материал в този му състав чрез определяне на специфичната миграция на веществата, които са характерни не само за свеж/първичен материал, но и след

влагането на рециклат.

3.2. Да се включи изискването производителите на опаковки и материали да декларират влагането на рециклат в конкретното изделие и неговото количество?

3.3. В съответствие с Регламенти 10/2011 и 282/2008 и на Ръководството за оценка на безопасността на рециклиращите процеси, т. 4 и 5 да се включи изискването за пълно охарактеризиране на получаваните рециклати – за какви условия на контакт с опакованата храна се предлагат - време и температура, съотношение обем/повърхност, за еднократна или многократна употреба, видове храни/моделни среди при определяне на миграцията на веществата, които мигрират както от свежия материал, така и от рециклата в съответствие с изискванията на Регламент 10/2011. Така при изпълнението на това изискване потребителите на рециклата ще бъдат сигурни, че тяхното производство няма да бъде компрометирано и потребителите няма да бъдат изложени на вредни вещества.

4. Провеждане на широка кампания от мероприятия за запознаване на заинтересованите страни с новите изисквания, включително сертифициращите организации.

.....

NON-THERMAL PROCESSING OF MILK AND DAIRY PRODUCTS

Tansu Taspinar*, Mehmet Guven
Cukurova University, Faculty of Agriculture, Food Engineering
Department, 01330 Adana, Turkey

E-mail: ttaspinar@cu.edu.tr

ABSTRACT

Milk and dairy products are among the most nutritious food products and splendid culture mediums for microorganisms. Thermal treatments are preponderantly used for the pasteurization and sterilization of milk and dairy products as effective methods for ensuring product safety and improving shelf-life. However, thermal treatments have some drawbacks like loss of vitamins, undesirable protein denaturation, freezing point depression, non-enzymatic browning, loss of volatile compounds, and flavor changes. In this respect, the use of non-thermal processing techniques in food applications especially in milk and dairy products gaining popularity since these techniques are claimed to be promising and sustainable alternatives to conventional thermal treatments. Ultrasound technology, high-pressure processing, cold plasma processing, supercritical carbon dioxide technology, irradiation, and pulsed electric field processing are non-thermal technologies that can inactivate pathogenic microorganisms without significant loss of the nutritional and organoleptic properties of food products. On the other hand, the major problems of non-thermal technologies are the high cost and the small volume of the treated sample. To sum up, non-thermal processing techniques have come into prominence in recent years as novel technologies and it is possible obtaining a product with better organoleptic properties, greater shelf-life, and minimal changes in nutritional and quality parameters.

Keywords: Non-thermal processing, milk, dairy products, food safety, sustainability

1. Introduction

Nowadays, consumer expectation is increasing towards sustainable food processing technologies. Renewed expectations from processing technologies not only ensure microbiological safety but also not cause a decrease in nutritional value. Moreover, processing technologies should be capable of meeting the ever-increasing needs in relation to the global population (Soni et al., 2021). Consumers crave for food which produced using green technology, has high nutritional quality, and microbiologically secure (Barba et al., 2016).

Thermal processing technologies like pasteurization and sterilization are the major food processing technologies in the food industry especially for milk and dairy processing due to their efficacy to inactivate microorganisms and enzymes (Soria & Villamiel, 2010). Nevertheless, thermal processing has some drawbacks like loss of vitamins, undesirable protein denaturation, freezing point depression, non-enzymatic browning, loss of volatile compounds, flavor changes, high energy consumption, and more pollution emissions. Therefore there is an increasing trend to replace conventional thermal processing with non-thermal technologies. It is aimed that preserving the nutritional, sensory, and physicochemical properties of food products while ensuring microbiological safety with novel technologies (Hati et al., 2018). From a dairy product perspective; milk and dairy products are splendid culture mediums for microorganisms so they are perishable products. New developments and changes for processing techniques are closely related to this sector (Abbas Syed et al., 2021). Ultrasound technology (US), high-pressure processing (HPP), cold plasma processing, supercritical carbon dioxide (SC-CO₂) technology, irradiation, and pulsed electric field (PEF) processing are briefly examined as non-thermal novel technologies.

2. Ultrasound Technology (US)

Ultrasound is a novel technology that while preserving food quality and increasing shelf-life, also maintains nutritional value during processing (Akdeniz & Akalın, 2019). The advantages of ultrasound technology are limited changes in the food product, energy efficiency, environment friendly, low running cost. On the other hand, the technology has some limitations like challenges in industrial-scale processing and developing physicochemical defects and off-flavors in some food products (Akdeniz & Akalın, 2019; Arvanitoyannis et al., 2017).

Ultrasound technology stimulates acid production thus fermentation time decreases, improves the nutritional quality and sensory properties of fermented dairy products (Huang et al., 2019). In yogurt production, fat globule size reduces, viscosity improves, syneresis decreases and texture improves with ultrasound processing (Akdeniz & Akalin, 2019). Moreover, ultrasound accelerates lactase release so lactose hydrolysis enhances and probiotic cultures viability improves. Ultrasound also can reduce the time need to for the ripening of cheese (Guimarães et al., 2019). It has been reported that ultrasound technology improves textural and sensory properties of ice cream and solubility of casein, whey protein concentrates, and isolates. Ultrasound can also be used for the production of paraprobiotics and postbiotics (Akdeniz & Akalin, 2019).

3. High-Pressure Processing (HPP)

High-pressure processing is the most commonly used method as non-thermal novel technologies, inactivate most of the microorganisms and some enzymes while causing minimal changes in nutritional and organoleptic properties of food products (Yordanov & Angelova, 2010). High-pressure processing is a promising technique due to being suitable for both particulate and liquid foods, flexible system, clean technology, improves texture and shelf-life, preserves nutritional value and freshness in flavor, and ensures microbial safety. However, inactive microorganism spores need thermal treatment, there are challenges in industrial-scale processing, initial investment and maintenance costs are high (Voigt et al., 2015).

When high-pressure processing is applied to milk; reduces the microbial load and undesirable volatile compounds and maintains the nutritional value, to yogurt; increases consistency and shelf-life and decreases syneresis, to cheese; increasing shelf-life, affecting ripening period and decreasing post contamination, to ice cream; creating a smooth texture and improving aroma, to cream; increasing shelf-life and improving foam stability, to butter; increasing shelf-life, improving consistency and fat aggregation, to probiotic dairy products; improves growth and maintains the viability of probiotic strains (Ravash et al., 2020).

4. Cold Plasma Processing

Cold plasma processing is one of the promising novel technologies. Cold plasma is also used as non-thermal plasma in different sources (Segat

et al., 2016). Cold plasma is a promising technology due to its capability of inactivating microorganisms consequentially bacteria spores and biofilms. Also, cold plasma is a fast process, green technology, no damage to the nutritional, sensory, and structural quality of the food products. On the other hand, cold plasma needs high cost, food properties like shape and size affect the treatment so there are some difficulties treatment of irregular surface food products (Coutinho et al., 2018).

5. Supercritical Carbon Dioxide (SC-CO₂) Technology

Supercritical carbon dioxide technology has different applications due to carbon dioxide being a safe, easily available, high soluble, fireproof, non-corrosive, inert, nontoxic, moderately spreadable, and low price supercritical fluid. Moreover, easy removal of residual carbon dioxide is an advantage rather than other supercritical fluids. Supercritical carbon dioxide technology prevents oxidation because there is no oxygen in the system, has a short processing time, doesn't cause any thermal degradation, has increased penetration features, and green technology. However, there are changes in the phase diagram and it is complicated to predict processing conditions, technology has difficulties for real-time control, requires high initial investment and trained staff (Amaral et al., 2017).

The effect of supercritical carbon dioxide technology on milk is not completely understood and needs further research. It is claimed that sCO₂ can be used production of low-fat dairy products, cheese manufacture, precipitating casein, and fractionating whey proteins (Guo, 2011).

6. Irradiation

Radiation-based technologies ensure microbial safety without causing any defects in food quality and structure. Even if irradiation inclusively researched and beneficial aspects have been revealed, still there is a negative perception and not accepted by consumers. In this respect, radiation-applied foods must be marked with the “radura” symbol and it should be clearly indicated on the product label. Irradiation is an effective technology for microbial safety, it is a green technology and cold process that extends shelf-life, and can be used even for packed foods. Apart from negative consumer perception, irradiation requires a high initial investment, all foods are not suitable for this technology and there will be some loss of nutrients especially vitamins and minerals (Ehlermann, 2016; Roberts, 2016).

According to some studies when milk and dairy products radiated, off-flavors come out but in recent years oppositely of these findings, effective irradiation results were reported. It is determined that ultraviolet irradiation improves the characteristics and structural configuration of milk proteins. In this respect, treatment dose and time affect variations in the structure of proteins (Odueke et al., 2016).

7. Pulsed Electric Field (PEF) Processing

Pulsed electric field technology is a promising novel technology both ensures nutritional quality and microbiological safety. Because PEF temperature parameters are usually below conventional pasteurization temperature, PEF treatment can be considered non-thermal technology. PEF processing applies to both batch or continuous processes, treatment time usually is not long, no chemical reactions, improved mass transfer, and green technology. However, PEF processing requires a high initial investment, is not applicable for all food types, low effectiveness against enzymes and spores (Wang et al., 2018).

According to studies, PEF treatment is applicable for effectively eliminating microorganisms in milk. PEF treatment is also efficient on immunoglobulins and bioactive peptides (Soni et al., 2021).

Ultra-high-pressure homogenization (UHPH), microwave-assisted thermal sterilization (MATS), pressure-assisted thermal sterilization (PATS), light-based technologies like Blue LED are also novel technologies that gaining interest (Soni et al., 2021).

8. Conclusion

Consumer acceptability and safety are two major criteria for a food product. In this respect, increasing the acceptability of the product, protecting the nutritional value, and ensuring microbial safety is of vital importance. With increasing consumer awareness, novel non-thermal technologies gained interest and began to replace thermal processing especially for milk and dairy products. Even if there are still some unresolved issues, non-thermal processing technologies are promising and continue to grow. Overall, feasibility studies of the process to enable the implementation of novel technologies at an industrial scale are also welcome and compulsory.

References

Abbas Syed, Q., Hassan, A., Sharif, S., Ishaq, A., Saeed, F., Afzaal,

M., Hussain, M., & Anjum, F. M., Structural and functional properties of milk proteins as affected by heating, high pressure, Gamma and ultraviolet irradiation: a review, *International Journal of Food Properties*-2021, 24, 1, 871–884.

Akdeniz, V., & Akalin, A. S., New approach for yoghurt and ice cream production: High-intensity ultrasound, *Trends in Food Science and Technology*-2019, 86, 392–398.

Amaral, G. V., Silva, E. K., Cavalcanti, R. N., Cappato, L. P., Guimaraes, J. T., Alvarenga, V. O., Esmerino, E. A., Portela, J. B., Sant'Ana, A. S., Freitas, M. Q., Silva, M. C., Raices, R. S. L., Meireles, M. A. A., & Cruz, A. G., Dairy processing using supercritical carbon dioxide technology: Theoretical fundamentals, quality and safety aspects, *Trends in Food Science and Technology*-2017, 64, 94–101.

Arvanitoyannis, I. S., Kotsanopoulos, K. V., & Savva, A. G., Use of ultrasounds in the food industry—Methods and effects on quality, safety, and organoleptic characteristics of foods: A review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*-2017, 57, 1, 109–128.

Barba, F. J., Zhu, Z., Koubaa, M., Sant'Ana, A. S., & Orlie, V., Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review. *Trends in Food Science and Technology*-2016, 49, 96–109.

Coutinho, N. M., Silveira, M. R., Rocha, R. S., Moraes, J., Ferreira, M. V. S., Pimentel, T. C., Freitas, M. Q., Silva, M. C., Raices, R. S. L., Ranadheera, C. S., Borges, F. O., Mathias, S. P., Fernandes, F. A. N., Rodrigues, S., & Cruz, A. G., Cold plasma processing of milk and dairy products. *Trends in Food Science and Technology*-2018, 74, 56–68.

Ehlermann, D. A. E., Particular applications of food irradiation: Meat, fish and others. *Radiation Physics and Chemistry*-2016, 129, 53–57.

Guimarães, J. T., Balthazar, C. F., Scudino, H., Pimentel, T. C., Esmerino, E. A., Ashokkumar, M., Freitas, M. Q., & Cruz, A. G., High-intensity ultrasound: A novel technology for the development of probiotic and prebiotic dairy products. *Ultrasonics Sonochemistry*-2019, 57, 12–21.

Guo, M., *Liquid Milk Products: Liquid Milk Products: Modified Milks. Encyclopedia of Dairy Sciences: Second Edition*-2011, 297–300.

Hati, S., Patel, M., & Yadav, D., Food bioprocessing by non-thermal plasma technology. *Current Opinion in Food Science*-2018, 19, 85–91.

Huang, G., Chen, S., Tang, Y., Dai, C., Sun, L., Ma, H., & He, R., Stimulation of low intensity ultrasound on fermentation of skim milk medium

for yield of yoghurt peptides by *Lactobacillus paracasei*. *Ultrasonics Sonochemistry*-2019, 51, 315–324.

Odueke, O. B., Farag, K. W., Baines, R. N., & Chadd, S. A., *Irradiation Applications in Dairy Products: a Review*. *Food and Bioprocess Technology*-2016, 9, 5, 751–767.

Ravash, N., Peighambardoust, S. H., Soltanzadeh, M., Pateiro, M., & Lorenzo, J. M., *Impact of high-pressure treatment on casein micelles, whey proteins, fat globules and enzymes activity in dairy products: a review*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*-2020, 1–21.

Roberts, P. B., *Food irradiation: Standards, regulations and world-wide trade*. *Radiation Physics and Chemistry*-2016, 129, 30–34.

Segat, A., Misra, N. N., Cullen, P. J., & Innocente, N., *Effect of atmospheric pressure cold plasma (ACP) on activity and structure of alkaline phosphatase*. *Food and Bioprocess Technology*-2016, 98, 181–188.

Soni, A., Samuelsson, L. M., Loveday, S. M., & Gupta, T. B., *Applications of novel processing technologies to enhance the safety and bioactivity of milk*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*-2021, 20, 5, 4652–4677.

Soria, A. C., & Villamiel, M., *Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: A review*. *Trends in Food Science and Technology*-2010, 21, 7, 323–331.

Voigt, D. D., Kelly, A. L., & Huppertz, T., *High-Pressure Processing of Milk and Dairy Products*. *Emerging Dairy Processing Technologies: Opportunities for the Dairy Industry*-2015, 71–92.

Wang, M. S., Wang, L. H., Bekhit, A. E. D. A., Yang, J., Hou, Z. P., Wang, Y. Z., Dai, Q. Z., & Zeng, X. A., *A review of sublethal effects of pulsed electric field on cells in food processing*. *Journal of Food Engineering*-2018, 223, 32–41.

Yordanov, D. G., & Angelova, G. V., *High pressure processing for foods preserving*. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*-2010, 24, 3, 1940–1945.

.....

LEGUME PROTEINS: AN ALTERNATIVE SOURCE IN CAKE PRODUCTION

Gamze Nil Yazici*, Mehmet Sertac Ozer

Department of Food Engineering, Faculty of Agriculture, Cukurova University,
01330, Adana, Turkey

E-mail: *gnboran@cu.edu.tr, msozer@cu.edu.tr

ABSTRACT

The high growth of world population, climate change, and the factors related to environmental and economic lead the scientist to focus on plant-based proteins, particularly legumes, to ensure food safety regarding nutritious, sufficient, and safe food. The concentrates or isolates forms of legume proteins were generally used for not only enrichment of the food composition, but also replacement or reduction of the amount of egg, fat, and milk in cake recipes by using alone or combining with different food additives and/or compounds. In this regard, the most commonly used legume protein is soy protein followed by pea and also lupin, lentil, cowpea, and white bean proteins, in cake production.

Keywords: sustainability, soy protein, pea protein, cake, enrichment, replacement

1. Introduction

Legume is belong to the family Leguminosae or Fabaceae, and the term “legume” attributes to the plants whose fruit is enclosed in a pod. Pulses, in other words, grain-legumes, also called Leguminosae which are grown for their edible seed. They are rich in macro-and micronutrients which is the association between human health and well-being. They require less water and fertilizer, high ability the adapt to harsh conditions, and contribute to soil biodiversity as a natural, renewable and sustainable source (Boukid et al., 2019). Therefore, the United Nations has declared 2016 as the “International Year of Pulses” to increase the awareness of their role in meeting the nutrition insecurity (Aqarwal et al., 2017).

In addition to these, the consumers are aware of not only environmental-friendly sources but also consider animal welfare. Moreover, the number of people who prefer different dietary choices like vegetarianism and veganism is also increasing, day by day (Gravel and Doyen, 2020). Taking into account all of these, legume proteins could be a good source for bakery products. In this regard, the most commonly used legume protein is soy protein followed by pea protein. The concentrates or isolates forms of soy proteins, namely SPC and SPI respectively, were generally used alone or combined with different compounds for not only fortification the composition (Meng and Kim, 2020; Bravo- Núñez et al., 2020; Assad Bustillos et al., 2020; Sahagún et al., 2018; Ronda et al., 2011; Sung et al., 2006), but also the replacement or reduction the amount of egg (Shah et al., 2019; Lin et al., 2017a; Lin et al., 2017b; Julianti et al., 2016; Matos et al., 2014), fat (Azmoon et al., 2021; Akesowan, 2010), and milk (de Souza and Schmiele, 2021), in cake production. The modified legume proteins as hydrophobically-modified pea protein (Shah et al., 2019), glycosylated and thermally-modified cowpea protein (Campbell et al., 2016), were also utilized in cake formulations.

2. The role and influence of legume proteins in cake production

In the literature, the studies in the scope of cake formulations enriched with legume proteins were generally focused on influence on batter properties and cake quality parameters, as seen in Table 1. Therefore, there is a limited study that is centered upon the nutritional value of end-products. In this regard, half of the vegetable oil in the formulation of chiffon cake was replaced by combined of konjac flour (0.5 and 1.0%) and SPI (5 and 10%) with different concentrations. The fat content and total energy value were decreased, as expected, but the content of protein and ash was increased compared to control cake without both konjac flour and SPI. The fat content of fat-reduced cakes was nearly 11-12% whereas about 19% in control samples. However, there were no significant ($p>0.05$) differences between fat-reduced cakes. On the other side, the increase in protein value was attributed to SPI which consists of 90% protein content. In this regard, the cakes including a higher amount of SPI (10%) were assumed as most nutritious (Akesowan, 2010).

In another study, the pound cakes with low carbohydrate content were produced by using custard apple-puree (CAP), fructooligosaccharides (FOS), and soy protein hydrolysate (SPH), instead of wheat flour, sugar, and

milk, respectively. Although the content of protein and fat did not change, starch and sugar including both reducing- and non-reducing- decreased, as aimed. Therefore, the total caloric value is also decreased by nearly 21%. On the other side, the total dietary fiber content was increased nearly 10-fold compared to the control sample, and this was related to the addition of CAP and FOS. The replacement of the main cake ingredients led to a significant reduction in ($p < 0.05$) the digestible carbohydrates, glycemic index, and also glycemic load. This was referred to the high fiber content of low carb pound cakes which modulate digestive enzyme activity and thus the glucose levels in the blood (de Souza and Schmiele, 2021).

The egg replacement was conducted by utilizing SPI combined with maize starch and xanthan gum. Both gluten-free cakes (GF) and gluten-free egg-free cakes (GFEF) did not show significant differences with control cakes, about their moisture contents. Moreover, no significant differences were determined in GF, and, GFEF about crude fiber although the highest dietary fiber value was obtained in GFEF (Julianti et al., 2016).

2.1. Enrichment

2.1.1. Enrichment of cakes with soy protein

The sponge cake was enriched with soy protein concentrate (SPC) at 8 different levels (3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, and 24%) by adding to wheat flour. According to the results, the values of specific volume and volume index decreased with the increasing amount of SPC. This was explained by negative correlations with alkaline water retention capacity (-0.971) and protein content ($r = -0.979$), while the positive correlation between sedimentation values ($r = 0.924$). Moreover, the center height values were also decreased when using more than 9% SPC. However, the uniformity index did not change significantly which indicates no shrinkage was observed in the sides of the cakes. On the other side, the weight values increased and were interpreted as an decrease in baking loss. The L values of the crust part which indicates lightness in color significantly increased when the amount of SPC is more than 12% in blend, whereas the a values were decreased. However, there were no significant differences determined in b values in crust parts of cakes. Although there were little or no significant differences were observed in springiness and cohesiveness values, respectively, the values of hardness and chewiness were increased in accordance with the increasing amount of SPC, according to textural

analysis (Sung et al., 2006).

The soy-based proteins were also utilized in the production of gluten-free cakes (Ronda et al., 2011; Meng and Kim, 2020). According to the hypothesis of Meng and Kim (2020), different protein sources could influence positively the viscoelastic properties of rice batter, the quality parameters, and the shelf-life of fermented rice cakes, because of having high water binding capacity and also causing starch-protein interactions. In this regard, the soy protein isolate (SPI) were utilized at three different ratios as, 0.5, 1.0, and 1.5% and compared with two different protein sources as whey protein concentrate (0.5, 1.0, and 1.5%) and marine fish collagen (1, 2, and 3%), in terms of batter rheological properties and quality of end-product during storage. Dynamic rheological properties were determined by using a rheometer in oscillation mode. According to the results, the G' values were higher than those of the G'' values in all cakes which points out that the elastic properties are dominant over viscous properties. Compared to control, the values of viscosity and elasticity of batters when using SPI in high concentrations (1.5%) were higher, which attributed to the presence of glycinin in SPI which could make heat-induced thermoset gel. The $\tan \delta$ values were also increased but were not affected by the increasing levels of SPI. The addition of the low amount of SPI (0.5%) did not change significantly the values of porosity and specific volumes. The incorporation of SPI resulted in a reduction in L^* values in crust whereas an increment in b^* values. There were no significant differences in the hardness of cakes with the addition of SPI. The hardness values were increased in all samples during 3 days of storage. In addition, the lowest predicted shelf-life was obtained in cakes including 1.5% SPI, followed by WPC at the same concentration ratio. The rice cakes including SPI increased taste acceptability, however the highest sensory attributes (odor, color, softness, and porosity) even compared to the control sample, were belong to cakes enriched with marine fish collagen (Meng and Kim, 2020).

In another study, some rheological properties (behavior of flow and viscoelastic) were also defined in gluten-free layer cake batter made from three different starch sources, as corn, rice, and potato including SPI at two different ratios (10 and 20%) and compared with wheat wheat protein (WP), as well. According to the results of flow behavior, all the cake batters showed pseudoplastic and slightly thixotropic behavior. Moreover, the flow behavior index (n) did not change in terms of different types and ratios of starch and protein sources. However, the increase in batter consistency (K)

was more remarkable in batters including SPI than WP and more noticeable when increasing the concentration. This was attributed to its higher water absorption capacity which results decreasing in the amount of available free water and thus limits the movement of particles in cake batters and then increase apparent viscosity. In addition, the SPI-added batters at high concentrations (20%) with rice starch had similar consistency with wheat flour-based cake batters. According to the results of viscoelastic behavior, G'' values were higher than G' , which resulted in $\tan\delta$ being greater than 1 which is characterized by soft gel structure. The incorporation of protein to cake formulation reduced $\tan\delta$ values which is more remarkable in SPI-added batters. On the other side, the density of batter was reduced by nearly 10% percentage in presence of SPI with all starch sources which related to an increase in apparent viscosity of batter. The volume of the end-product was affected according to starch sources when using together with SPI. In this regard, using SPI together with potato starch improved, while corn affects negatively values of cake volume (Ronda et al., 2011).

2.1.2. Enrichment of cakes with pea protein

The pea protein was used in the gluten-free layer cake recipe including two different animal based-protein sources (whey and egg white) by using mixture design and the effects on batter and end-product were defined. The animal-based protein sources decreased the batter density which indicates better aeration which is related to their good foaming capacity, whereas pea proteins increased the density of batter which attributed to their lower emulsifying capacity and stability. Similarly, it also made an increment in batter viscosity which negatively influence the specific volume of cakes. However, there are promising results in terms of hardness, when using pea protein in combination with whey which had no significant differences with the control sample. Moreover, more acceptable cakes were obtained with the incorporation of high percentages of pea proteins with a relatively low percentage of whey proteins compared to using pea protein alone (Bravo- Núñez et al., 2020).

In another study, different protein sources as plant-based (rica and pea) and animal-based (egg white, whey) were utilized individually for producing gluten-free layer cakes. Controversy to study of Bravo- Núñez et al. (2020), pea protein did not affect batter density in gluten-free layer cakes, but the highest viscosity values were obtained. Moreover, the batters including pea protein had a smaller but greater number of bubbles than

the control sample. Similarly, the reduction of specific volume was more prominent in highest percentage (45%) pea-protein enriched cakes and was related to high batter viscosity. On the other side, the baking loss values were lowest in cakes with egg white at high concentrations. Any type of protein source reduced L^* values, which means resulted in a darker crust than control, but the significant differences were observed in caked added with a high amount of pea protein and also animal proteins. According to results of textural characteristics, hardness is increased addition of pea protein at high concentrations (30 and 45%) when compared to control. In addition, these values were generally higher than cakes enriched with rice protein whereas lower than cakes including egg white. All sensory attributes (appearance, taste, odor, texture, overall acceptability) were lower in pea-enriched gluten-free layer cakes. However, the scores of overall acceptability are higher than the cakes consisting of egg white or rice protein (Sahagún et al., 2018).

.....



ИЗСЛЕДВАНЕ НА ЕСТЕСТВЕНАТА РАДИОАКТИВНОСТ НА БЪЛГАРСКИ МИНЕРАЛНИ ВОДИ

INVESTIGATION OF NATURAL RADIOACTIVITY OF BULGARIAN MINERAL WATER

**Елена Гелева, Димитър Тонев, Христо Протохристов, Ангел
Демерджиев**

**Институт за ядрени изследвания и ядрена енергетика, Българска
Академия на науките**

бул. Цариградско шосе 72, 1784, София

Elena Geleva, Dimitar Tonev, Hristo Protohristov, Angel Demerdjiev

**Institute for Nuclear Research and Nuclear Energy, Bulgarian
Academy of Sciences**

72, Tsarigradsko chaussee Blvd., 1784 Sofia, Bulgaria

E-mail: elenag@inrne.bas.bg

РЕЗЮМЕ

В настоящото изследване чрез използване на прецизни ядрено-физични и радиохимични методи са проведени изследвания на специфичната активност на природни радионуклиди в минерални води от интензивно използвани извори в Южна България. Изследването включва анализ на съдържанието на радий-226 (^{226}Ra), олово-210 (^{210}Pb), естествен уран (ест. U), обща алфа-активност и обща-бета активност. Резултатите варират от 13 до 168 mBq/L за ^{226}Ra , от ≤ 1.8 до 104 mBq/L за ^{210}Pb , от ≤ 3 до 21 $\mu\text{g/L}$ за ест. U, от ≤ 0.003 до 1.79 Bq/L за обща алфа-активност и от 0.034 Bq/L до 1.84 Bq/L за обща-бета активност.

Направена е оценка на очакваните годишни ефективни дози за възрастни индивиди, при допускане, че средно годишната консумация на минерална вода е 730 литра. За всички изследвани води

стойностите на годишната ефективна доза са по-ниски от максимално установената доза 100 $\mu\text{Sv}/\text{y}$, съгласно предписанията на Световната здравна организация.

Получените нови резултати се използват за оценка на радиационния статус на изследваните води. Те ще подкрепят навременните и адекватни мерки за намаляване на вредното въздействие на йонизиращите лъчения върху населението в случай на повишена радиоактивност в тези води.

Ключови думи: Естествена радиоактивност, обща индикативна доза, минерална вода.

ABSTRACT:

The activity of naturally occurring radionuclides in mineral waters from certain most frequently used sources in Southern Bulgaria has been measured with high precision by means of nuclear and radiochemical methods. Concentration levels of radium-226 (^{226}Ra), lead-210 (^{210}Pb), natural uranium (nat. U), gross alpha and beta activity were determined in the water to evaluate annual effective dose due to the ingestion of the mineral water. The results obtained for the water samples varied in the interval 13-168 mBq/L for ^{226}Ra , ≤ 1.8 - 104 mBq/L for ^{210}Pb , ≤ 3 -21 $\mu\text{g}/\text{L}$ for nat. U, ≤ 0.003 -1.79 Bq/L for gross alpha activity and 0.034 Bq/L-1.84 Bq/L for gross beta activity.

The annual effective doses were calculated for all investigated waters for adult inhabitants assuming yearly consumption of 730 litres. The results have shown that all values of the annual effective dose of the investigated mineral waters were below the individual dose criterion of 100 $\mu\text{Sv}/\text{y}$ reported by World Health Organization.

The obtained new results are used to assess the radiation status of the investigated water. They will support timely and adequate measures to reduce the harmful impact of ionizing radiation on the population in cases of increased radioactivity.

Key words: Natural radioactivity, total indicative dose, mineral water.

ВЪВЕДЕНИЕ

Многобройните минерални извори са едни от най ценните природни богатства на България. На сравнително неголямата ѝ територия се намират над 225 хидроминерални находища, които имат различна температура, минерален състав и радиоактивност (Shishmanova, 2014). Радиоактивността няма цвят, вкус и мирис и използването на вода с наднормено съдържание на радионуклиди в нея може да доведе до влошаване на здравния статус на населението (Kamenova-Totzeva et al., 2013).

Най-често прилаган подход за защита здравето на хората от неблагоприятните ефекти на радиоактивното замърсяване на водите е провеждането на постоянен мониторинг на качествените показатели на питейната вода. Постоянното измерване на радиоактивността на водите позволява осигуряване на нива на радиоактивност под нормативно установените граници за питейни води, защото тези води са важен фактор за увеличаване на общото облъчване на населението, в резултат на поглъщане на естествени радионуклиди с тях (Marović et al., 1997).

Радиоактивността на водите зависи от техния произход и химичен състав. Най-често срещаните естествени радионуклиди в минерални води са от уран-радиевия и ториевия редове и техните разпадни продукти, както и ^{40}K . В подземните води радионуклидите попадат чрез процеси на ерозия и разтваряне от скали и минерали, формиранивъвводоносния хоризонт или чрез инфилтриранесвалезите (Votzatu et al., 2001). Минната дейност, производството и употребата на минерални торове и пясъци, може да допринесе за техногенното увеличаване на съдържанието на естествени радионуклиди във водите (Alomari et al., 2019). От всички радионуклиди, присъстващи в минералните води, изотопите на радия, оловото и урана са най-важните източници на радиоактивност за човешкото тяло, поради тяхната висока токсичност и радиотоксичност.

^{226}Ra , е естествен радионуклид с период на полуразпадане 1 600 г. ($T_{1/2}=1.6 \times 10^3$ у). Той е дъщерен продукт в уран-радиевото семейство с родоначалник ^{238}U и се образува при алфа-разпадането на атомните ядра на ^{230}Th . ^{226}Ra се разпада до ^{222}Rn чрез излъчване на алфа- частица. Подобно на майчиния си радионуклид ^{238}U има висока мобилност и слабо изразена зависимост от геоложката структура на района (Nuccetelli et al., 2012). Попаднал във водна среда, той

може да бъде пренесен на значителни разстояния. Постъпвайки в човешкото тяло, ^{226}Ra достига до кръвта като в основната си част се отлага в костите. По този начин той облъчва непрекъснато човешкия скелет в продължение на много години и може да индуцира костна саркома. Като алфа-лъчител и остеотропен радионуклид, ^{226}Ra може да причини биологични промени при формирането на кръвни тъкани. Поради високата му радиотоксичност, неговото присъствие във водите изисква повишено внимание.

^{210}Pb , е естествен радионуклид с период на полуразпадане 22.2 г. ($T_{1/2}=22.2$ у). Той е дъщерен продукт в уран-радиевото семейство с родоначалник ^{238}U . Разпада се до ^{210}Bi чрез излъчване на бета-частица. Разпространява се във всички компоненти на екосферата, благодарение на майчиния радионуклид – радон, а също и поради сравнително големия си период на полуразпадане. Натрупва се в различни субстанции, участва в хранителните вериги и дава значително облъчване на биотата. Естествено повишени съдържания на ^{210}Pb се наблюдават във водите в районите на уранови находища (Германия, Чехия, България и др (Василев, 2005).

Уранът (U) е естествен, повсеместно разпространен радиоактивен метал, който присъства в почти всички минерали, скали, пясъци и почви. Състои се от три алфа- излъчващи радионуклиди: ^{234}U , ^{235}U и ^{238}U с различна атомна маса, които имат различно разпределение в природата и различен период на полуразпадане. Повече от 99 процента от открития в природата U е ^{238}U (Virk, 2016). Водата е най-важния вектор за транспортиране на U в околната среда (Sparovek et al, 2001). U е нефротоксичен метал, който се нормира по неговата химическа токсичност. Максимално допустимата стойност в питейните води съгласно българското и европейско законодателство е $30\ \mu\text{g/L}$ ($750\ \text{mBq/L}$) (WHO, 2011). При продължителна консумация на питейни води съдържащи ест. U с концентрация, по-висока от максималната, могат да настъпят неблагоприятни за здравето на човека промени, които да доведат до увреждане на бъбреците. Поради тази причина е наложително да се следи концентрацията на уран в питейните води, включително минерални.

Целта на настоящата работа е да се представи актуална информация за съдържанието на ^{226}Ra , ^{210}Pb , ест. U, както и обща алфа-активност и обща бета-активност в минерални води от интензивно използвани източници в Южна България, за да бъдат взети адекватни

мерки при превишаване на нормативно установените граници.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Пробовземане. Пробовземането на минералните води е извършено от 7 находища на минерални води в 3 области, като точките на пробовземане са показани на фиг. 1. Изследвани са минерални води от Девин, Михалково, Леново, Ракитово, Брацигово, Велинград и Белово, находящи се в областите Смолян, Пловдив и Пазарджик. Минералните води са взети при спазване на всички изисквания за представително пробовземане на водни проби (Попов и Кулев, 2007). Пробите са представителни и хомогенни. При тяхното пробовземане, транспортиране и съхранение са осигурени всички условия те да не бъдат замърсени или да бъде променен техния състав. Пробите са събрани в полиетиленови бутилки, а за определяне на съдържанието на ^{226}Ra в стъклени бутилки.



Фиг. 1. Карта на България с точките на пробовземане

Подготовка на пробите за анализ. Специфичната активност на ^{226}Ra във водните проби е определена чрез течна екстракция на

дъщерния му продукт ^{222}Rn ($T_{1/2} = 3.8 \text{ d}$) и течносцинтилационно измерване на последния след достигане на радиоактивно равновесие $^{226}\text{Ra}/^{222}\text{Rn}$. Радиохимичното изолиране се основава на разликите в разтворимостите на двата радионуклида в органични разтворители като толуол - за разлика от Ra, Rn се разтваря в тях. Използват се хидрофобни сцинтилационни коктейли, които при смесване с вода образуват двуфазна проба. В такава проба дъщерния радионуклид ^{222}Rn се екстрахира от водата и се разтваря в органичната фаза, т.к. коефициентът му на разтворимост в органични разтворители е 50 пъти по-висок от този във вода (Geleva, 2019).

Измерванията са извършени с **течносцинтилационен спектрометър** Packard TRI-CARB 2770 TR/SL. Калибрирането на спектрометъра се осъществява, чрез определяне на ефективността на регистрацията и фона за ^{226}Ra .

Разделянето и изолирането на ^{210}Pb от водната матрица се извършва посредством екстракционна хроматография. За определяне на радиохимичния добив към пробата се добавя Pb – носител (от сертифициран разтвор на стабилно олово). Използвана е високоселективна йонообменна смола на фирма Eichrom Sr spec. Оловото се елюира с 6M HCl и се измерва с течносцинтилационен спектрометър след достигане на равновесие с ^{210}Bi (Rožmarić et al., 2012; Slavchev et al., 2020).

Естественият U в изследваните минерални води е определен чрез ICP-MS. Анализите са извършени със спектрометър ICP-MS Perkin Elmer DRC-e6100 чрез измерване на аликвота от 50 ml от водната проба, предварително подкислена с к. HNO_3 . Апаратът е калибриран с мултиелементен стандартен разтвор (Geleva et al., 2021). За определяне на обща алфа- и бета- активност в минералните води е използвана методика, която се основава на течносцинтилационна спектрометрия. Водните проби с обем 0.3 l се преконцентрират до влажни соли, при температура: $T < 80^\circ\text{C}$. Солите се разтварят с 5 ml 0.1M HNO_3 и се прехвърлят количествено в полиетиленова сцинтилационна кювета от 20 ml, след което се смесват с 15 ml сцинтилационен коктейл Packard ULTIMA GOLD AB. Така получения коктейл се охлажда и се измерва с течно-сцинтилационен спектрометър. Ефективността на регистрацията е определена, чрез измерване на вторични стандартни разтвори, съдържащи ^{241}Am и ^{90}Sr (Palomo et al., 2011).

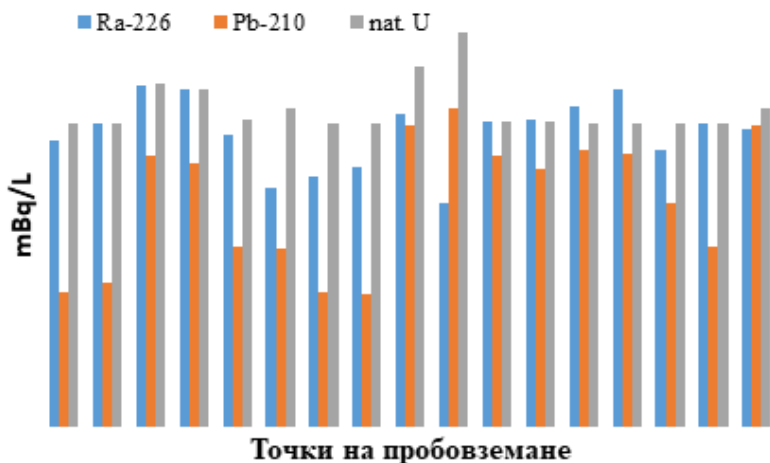
Изчисляване на общата индикативна доза. Общата индикативна доза (TID) е изчислена за възрастни индивиди при допускането, че средно годишната консумация на вода е 730 l.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИИ

В таблица 1 и на фигури 2 - 5 са представени получените резултати за съдържанието на ^{226}Ra , ^{210}Pb ест. U, обща алфа-активност и обща бета-активност в изследваните минерални води. За сравнение с данните за ^{226}Ra и ^{210}Pb , концентрацията на ест. U в $\mu\text{g/L}$ е превърната в специфична активност в mBq/L (25.28 mBq U съответстват на $1 \mu\text{g}$).

Таблица 1 Статистически резултати за ^{226}Ra , ^{210}Pb , ест. U, обща алфа-активност, обща бета-активност и обща индикативна доза за изследваните минерални води

Параметър	Минимум	Максимум	Средна стойност	Медиана	Стандартно отклонение
^{226}Ra [mBq/L]	13	168	75	74	48
^{210}Pb [mBq/L]	< 1.8	104	29	27	30
ест. U [mBq/L]	< 75	525	126	78	114
Обща алфа-активност [Bq/L]	< 0.003	1.79	0.29	0.06	0.48
Обща бета-активност [Bq/L]	0.034	1.84	0.34	0.104	0.56
Обща индикативна доза [$\mu\text{Sv/y}$]	8.12	72.3	34.1	32.8	21.4



Фиг. 2. Съдържание на ^{226}Ra , ^{210}Pb , ест. U в изследваните минерални води

Изследване на съдържанието на ^{226}Ra в минерални води

Получените експериментални резултати от течносцинтилационното определяне на ^{226}Ra в проби от минералните води са показани в таблица 1 и на фиг.2. При анализ на резултатите, получени за изследваните минерални води, се установяват значителни вариации в специфичната активност на ^{226}Ra от 13 mBq/l до 168 mBq/l, със средна стойност 75 mBq/l.

Във всички анализирани проби концентрацията на ^{226}Ra е по-ниска от 500 mBq/L (максимална стойност за ^{226}Ra съгласно националното и европейско законодателство – Директива 2013/51/Евратом от 22.10.2013 г. и Наредба № 9 от 16.03.2001 г. за качеството на водата, предназначена за питейно - битови цели).

Най-високи стойности за специфичната активност на ^{226}Ra (> 150 mBq/L, максимална стойност за ^{226}Ra съгласно Наредба № 9 до 04.01.2011 г.) са регистрирани в пробите от находище на минерална вода „Михалково”, сондаж № 1aВП и сондаж № ВКП (168 ± 18 mBq/L и 152 ± 15 mBq/L), точки 3 и 4 и находище на минерална вода „Велинград-Лъджене”, извор „Вельова баня” (155 ± 19 mBq/L), точка 14.

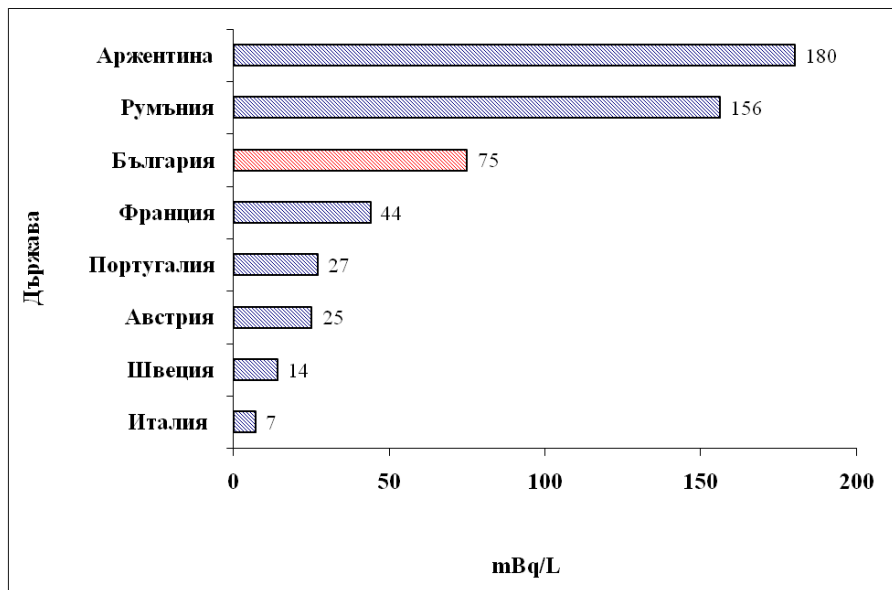
^{226}Ra може да се съдържа в подземните води в резултат на

взаимодействието му с различни природни материали, съдържащи радий, като скали, почви, минерали и др. Концентрацията му зависи и от механизмите на транспорт между скалите и водата (абсорбция - десорбция, утаяване - разтваряне, образуване на химични комплекси, йонообмен и др.). Тези процеси са свързани с химичния състав на подпочвените води. Предполага се, че радиоактивния колектор възниква някъде във водопроводящата зона, най-вече в тектонските пукнатини, запълнени с глинести минерали или с химически утайки, съдържащи радиеви соли (Щерев, 1964). Съдържанието на ^{226}Ra в минералните находища зависи не само от потенциален източник на радиоактивност, но и от температурата, скоростта и дебита на водата, разтворените във водата соли, киселинност и др.

Високата специфична активност на радионуклида в пробите от находището на минерална вода „Михалково” (област Смолян) се свързва с високата минерализация на водата. Известно е, че повишената минерализация обикновено е съпроводена с по-високо съдържание на естествени радиоактивни изотопи на елементи като радий, уран, полоний и калий (Botezatu et al., 2001; Kralik et al., 2003; Chau et al., 2009). *Находище “Михалково”, сондаж № 1ВКП е* с дълбочина 76 m. Общата минерализация на водата (3041.30 mg/L) я характеризира като високо минерализирана, хипотермална, въглекисела, хидрокарбонатна калциево-натриева и силициева вода, съдържаща флуорид. Колектор на минералната вода са мраморите и гнайсите, залягащи на дълбочина от 60 до над 500 m под земната повърхност. Характерно за тези води е високата газонаситеност. При излизането си на земната повърхност обикновено се губи част от въглената киселина с отделяне на CO_2 , което води до утаяване от водата на карбонатите на калция.

Водата от находището на минерална вода „Велинград-Лъджене” (област Пазарджик) се формира в Западнородопски гранитоиден батолит. Колектор на минералната вода са гранитите, залягащи на дълбочина 1200–1900 m. под земната повърхност. Магматогенните скали от типа на гранити са потенциален източник на ^{226}Ra (Щерев, 1964).

Установено е, че средната стойност на концентрацията на ^{226}Ra в изследваните от нас води в България е по-висока в сравнение с тези в Италия, Швеция, Австрия, Португалия и Франция и по-ниска от средните стойности на водите в Румъния и Аржентина (фиг. 3.).



Фиг. 3. Сравнение на средното съдържание на ^{226}Ra в минерални води от различни страни

Изследване на съдържанието на ^{210}Pb в минерални води

Съдържанието на ^{210}Pb в минералните води, които са обект на изследване е представено на фиг. 2. и в таблица 1. Получените резултати са в границите от < 1.8 до 104 mBq/L . Средната стойност е 29 mBq/L . Всички изследвани минерални води, са с концентрация по-ниска от максимално допустимата стойност от 200 mBq/L . Получените стойности за специфичната активност на ^{210}Pb не се различават съществено от данните, съобщени за други страни. Установените стойности за ^{210}Pb в минерални води от Хърватия са в интервала $0.7\text{--}7.6 \text{ mBq/L}$ (Rozmarić et al., 2012). Между < 4.9 и 85 mBq/L варират концентрациите за ^{210}Pb в минерални води от Бразилия (Oliveira et al., 2001). В Португалия са получени стойности в интервала от 2 до 392 mBq/L със средна стойност 18 mBq/L (Bettencourt et al., 1988).

От направеното сравнение произтича заключението, че в изследваните минерални води в България се откриват по-високи максимални стойности за съдържанието на ^{210}Pb от тези в Хърватия и Бразилия и по-ниско максимално съдържание на ^{210}Pb в сравнение с Португалия.

Изследване на съдържанието на естествен U в минерални води
Получените резултати за концентрацията на ест. U в минералните води варират в широки граници от < 75 mBq/L до 525 mBq/L със средна стойност 126 mBq/L. Най-високата стойност е регистрирана в „Брацигово”, сондаж № 5, т. 10 (таблица 1, фиг. 2). Във всички изследвани води стойностите за ест. U са под максималната граница от 750 mBq/L (30 μ g/L). В 47 % от пробите се регистрират стойности, по-ниски от границата на откриване (75 mBq/L). Широкият концентрационен диапазон на ест. U в минералните води се обуславя от различните геоложки условия (геоложки строеж, литоложки състав на скалите и тектонски структури), динамика и режим на подземните води в районите на съответните находища.

Изследване на обща алфа-активност и обща бета-активност в минерални води

Обща алфа-активност

Общата алфа-активност във водите основно се дължи на изотопите на урана и радия, поради ниската разтворимост на ториевите съединения. Параметърът обща алфа-активност е показател за общата активност на всички, присъстващи във водата алфа-излъчващи радионуклиди. Получените експериментални резултати са показани на фиг.4. и в таблица 1. Данните варират от стойности, които са под границата на регистриране (0.003 Bq/L) до 1.79 Bq/L (находище на минерална вода „Брацигово“, сондаж 2, точка 9). Съгласно изискванията на Наредба № 9 за качеството на водата, предназначена за питейно-битови цели, нормата за обща алфа-активност е 0.1 Bq/L. Установено бе, че общата алфа-активност в 35 % от изследваните води е над максималната стойност от 0.1 Bq/L, а в 6 % от водите, общата алфа-активност е по-голяма от 1 Bq/L. 47 % от резултатите са от 0.1 до 0.003 Bq/L. Причината за този сравнително голям процент минерални води със специфични активности по-високи от 0.1 Bq/L е хидро-геоложката характеристика на съответните райони, включително залежите от уранова руда, въглища и др.



Фиг. 4. Обща алфа-активност в изследваните минерални води

Изследваните води се намират в родопския масив, който е изграден от високо кристалинни метаморфни скали (гнайси, кристалинни шисти и отчасти мрамори) от най-старата за нашите земи протерозойска възраст. Тези скали са разкъсани на огромни площи от палеозойски гранитни плутони, играещи изключително важна роля за формирането и натрупването на термоминерални води в тази област (Щерев, 1964).

Обща бета-активност

Естествените радионуклиди ^{40}K , ^{14}C , ^{238}U , ^{226}Ra , както и техногенните ^{90}Sr и ^{137}Cs са бета-емитерите с най-голям дял в сумарната бета-активност на проби от околната среда. Резултатите за обща бета-активност в минералните води са представени графично на фиг. 5 и в таблица 1. Общата бета-активност в изследваните минерални води е в граници от 0.034 Bq/L (находище на минерална вода „Девин”, сондаж № 5, точка 2) до 1.84 Bq/L (находище на минерална вода Михалково, сондаж № ВКП, точка 4) със средна стойност 0.34 Bq/L. Само в 12 % от изследваните води (находище на минерална вода „Михалково”, сондаж № 1аВП и сондаж № ВКП) се регистрира съдържание на обща бета-активност по-висока от 1 Bq/L, максимална допустима стойност,

съгласно българското законодателство (фиг.5). Високите стойности на обща бета-активност в пробите от Михалково се дължат на високата минерализация на водата.

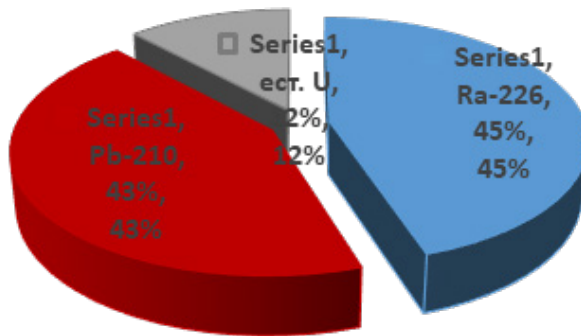


Фиг. 5. Обща бета-активност в изследваните минерални води
В 47 % от изследваните води се регистрират много ниски стойности за обща бета-активност, което предполага и много ниски активности на бета-излъчващи радионуклиди в минералните води, включително и ^{40}K .

Оценка на общата индикативна доза

Резултатите за индикативната доза са изчислени с приноса на ^{226}Ra , ^{210}Pb и ест. U. Стойностите за общата индикативната доза, получена от консумацията на минералните води са в диапазона от $8.12 \mu\text{Sv/y}$ до $72.3 \mu\text{Sv/y}$ със средна стойност $34.1 \mu\text{Sv/y}$ (таблица 1). Всички минерални води отговарят на изискванията на нормативните документи ($100 \mu\text{Sv/y}$) и получените резултати за общата индикативна доза са много по-ниски от годишната ефективна доза за населението (1mSv) и от годишната ефективна доза от естествения радиационен фон (2.3mSv) (Наредба за радиационна защита, 2018). На фиг. 6 е представено процентно разпределение на приноса на ^{226}Ra , ^{210}Pb и ест.

U към общата индикативна доза.



Фиг. 6. Процентно разпределение на приноса на ^{226}Ra , ^{210}Pb и ест. U към общата индикативна доза

От графиката се вижда, че основният принос във формирането на общата индикативна доза се дължи на ^{226}Ra (45 %). Най-малък е приносът на ест. U (12 %).

Изводи:

Проведените изследвания дават информация за радиологичния статус на минералните води с цел безопасното им използване от населението. Получените резултати позволяват да се направят следните изводи:

1. Съдържанието на естествени радионуклиди в минералните води варира в широки граници и е зависимо главно от хидро-геоложката структура на водоносните хоризонти.
2. Във всички анализирани проби съдържанието на ^{226}Ra е по-ниско от 500 mBq/L. В 18 % от минералните води, специфичните активности на ^{226}Ra са над 150 mBq/L, каквато беше установената с Наредбата за качеството на водите за питейно-битови цели максимална стойност преди 04.01.2011 г.
3. Във всички изследвани води стойностите за ^{210}Pb са под максималната граница от 200 mBq/L.
4. Съдържание на ест. U е ниско и всички стойностите са под максимално допустимата.
5. 35 % от изследваните води надвишават максималната граница

от 0.1 Bq/L по показателя обща алфа-активност.

6. Само в 12 % от изследваните минерални води общата бета-активност е по-висока от максималната граница от 1 Bq/L.
7. За всички изследвани води получените резултати за индикативната доза са много по-ниски от годишната ефективна доза за населението (1 mSv) и от годишната ефективна доза от естествения радиационен фон (2.3 mSv). Установено е, че основен принос при формирането на общата индикативна доза има ^{226}Ra .

Благодарности. Това изследване е извършено с финансовата подкрепа на Фонд научни изследвания, договор No. КП-06-Н44/1, 27.11.2020 и Национална научна програма „Млади учени и постдокторанти” финансирана от МОН.

Литература:

1. Василев, Г. Радиоекология. Тита Консулт, 2005.
2. Наредба за радиационна защита, АЯР, София, 2018, <http://www.bnsa.bas.bg/>.
3. Попов, Л., И. Кулев. Техногенни радионуклиди в околната среда. Сиела, 2007.
4. Щерев, К. Минералните води на България. Наука и изкуство, София, 1964.
5. Alomari, A., H. Saleh, M. A. Hashim, S. Alsayaheen, A. I. Abdeldin, R. B. Khalaf. Measurement of Gross Alpha and Beta Activity Concentration in Ground Water of Jordan: Ground water Quality, Annual Effective Dose and Lifetime Risk Assessment. J Water Health, 2019. 17(6), 957-970.
6. Bettencourt, A.O., M. Teixeira, M.C. Faisca, I.A. Vieira, G.C. Ferrador. Natural Radioactivity in Portuguese Mineral Waters. Radiat. Prot. Dosim., 1988, 24 (1-4), 139.
7. Botezatu E., O. Iacob, A. Aflorei, G. Elisei, O. Căpitanu. Natural radioactivity of some mineral waters and population doses. J. Prevent. Medicine, 2001, 1(9), 3-14.
8. Geleva E., D. Tonev, N. Goutev, N. Nikolova, H. Protohristov, V. Bashev, E. Salkova. Natural radioactivity in certain Bulgarian mineral waters. C. R. Acad. Bulg. Sci., 2019, 72(12), 1641–1649.
9. Geleva, E., D. Tonev, H. Protohristov, B. Slavchev, S. Genchev.

- Determination of Uranium, ^{226}Ra and ^{210}Pb in Mineral water from Southwest Bulgaria. *C. R. Acad. Bulg. Sci.*, 2021, 74(8), 1128–1135.
10. Kamenova-Totzeva R., R. Kotova, J. Tenev, G. Ivanova, V. Badulin. Natural radioactivity levels in different mineral waters from Bulgaria. *Rad. Prot. J.*, 2013, 1, 35-41.
 11. Marovic, G., J. Sencar, Z. Franic. ^{226}Ra in Tap and Mineral Water and Related Health Risk in the Republic of Croatia. *Environ. Monit. Assess.*, 1997, 46, 233-339.
 12. Nuccetelli C., R. Rusconi, M. Forte, Radioactivity in drinking water: regulations, monitoring results and radiation protection issues. *Ann Ist Super Sanità*, 2012, 4(48), 362–373.
 13. Oliveira, J., B. P. Mazzilli, P. da Costa, P. A. Tanigava. Natural radioactivity in Brazilian bottled mineral waters and consequent doses. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 249 (1), 2001, 173.
 14. Palomo, M., M. Villa, N. Casacuberta, A. Penalver, F. Borrull, C. Aguilar. Evaluation of Different Factors Affecting the Liquid Scintillation Spectrometry Measurement of Gross Alpha and Beta Index in Water Samples. *Appl. Radiat. Isot.*, 2011, 69, 1274-1281.
 15. Rožmarić M., M. Rogić, L. Benedik, M. Štrok, Natural radionuclides in bottled drinking waters produced in Croatia and their contribution to radiation dose. *Sci. Total Environ.*, 2012, 437, 53–60.
 16. Shishmanova, M. Tourism, Environment and Ecology in the Mediterranean Region. Chapter Five Balneotourism in Bulgaria, Cambridge Scholars Publishing, 2014, 65-81.
 17. Slavchev B, E. Geleva, H. Protohristov, L. Dobrev, D. Dimitrova, D. Tonev. Investigation of Natural Radionuclides in Drinking and Mineral Waters and Related Dose Assessment. *C. R. Acad. Bulg. Sci.*, 6(73), 791-799.
 18. Sparovek, R., J. Fleckenstein, E. Schung. Issues of Uranium and Radioactivity in Natural Mineral Waters. *Landbauforschung Völkenrode*, 2001, 51(4), 149.
 19. Virk, H. Measurement of Concentration of Natural Uranium in Ground Waters of Bathinda District (S. Punjab) for the Assessment of Annual Effective Dose. *Global J. Human-Social Sci.: B Geography, Geo-Sciences. Environmental Science & Disaster Management*, 2016, 16(5), 31-36.
 20. WHO, Guidelines for drinking-water quality (4th ed.), Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2011.

ДИГИТАЛЕН РЕГИСТЪР НА РАСТИТЕЛНИТЕ ГЕНЕТИЧНИ РЕСУРСИ В БЪЛГАРИЯ

DIGITAL REGISTER OF PLANT GENETIC RESOURCES IN BULGARIA

Николая Велчева, Симона Чеперигова
Селскостопанска Академия
Институт по растителни генетични ресурси „К.Малков” – гр.
Садово

Nikolaya Velcheva, Simona Cheperigova
Agricultural Academy
Institute of Plant Genetic Resources “K. Malkov” –
Sadovo, Bulgaria
E-mail: nikolaya_velcheva@abv.bg

РЕЗЮМЕ

Световната тенденция за намаляване на агробиоразнообразието е заплаха за устойчивостта на земеделското производство, съответно и за хранителната верига. Задълбочаването на проблема води до изключително сериозни негативни последствия върху устойчивостта на растенията към болести и неприятели, както и за тяхната адаптивна способност в условията на климатични промени. Растителните генетични ресурси обхващат разнообразието от културна и дива флора, местни популации и форми, стари, традиционни и подобрени сортове. Устойчивото им съхранение е залегнало в глобалния план на ФАО за опазване на генофонда за настоящите и бъдещи поколения. Достъпът до генетичното разнообразие осигурява мощен инструмент за адаптиране на културите към климатичните промени. В ролята си на Национален координатор на растителните генетични ресурси в България, ИРГР Садово поддържа дигитален регистър за семенните образци, заведени във фонда на Националната генбанка. Информационните дейности гарантират достъпа до растителния генофонд и съдействат за устойчивото му използване във връзка с постигането на глобалната цел – продоволствена сигурност, живот в чиста и здравословна среда.

Ключови думи: растителна зародишна плазма, дескриптор, бази данни, достъп, споделяне на ползи.

ABSTRACT

The global trend of declining agrobiodiversity is a threat to the sustainability of agricultural production, and therefore to the food chain. The deepening of the problem leads to extremely serious negative consequences on the resistance of plants to diseases and pests, as well as on their adaptive capacity in the conditions of climate change. Plant genetic resources include the diversity of cultivated and wild flora, local populations and forms, old, traditional and improved varieties. Their sustainable conservation is enshrined in FAO's global plan to protect the gene pool for present and future generations. Access to genetic diversity provides a powerful tool for adapting crops to climate change. In its role of National Coordinator of Plant Genetic Resources in Bulgaria, IPGR Sadovo maintains a digital register of seed accessions registered in the fund of the National Genebank. The information activities guarantee the access to the plant gene pool and promote its sustainable use in connection with the achievement of the global goal - food security, living in a clean and healthy environment.

Key words: plant germplasm, descriptor, data bases, access, benefit sharing.

ВЪВЕДЕНИЕ

Идентифицирането на връзката между изменението на климата, биологичното разнообразие и продоволствената сигурност е обект на всестранно проучване. Опасенията за изчезването на видовете са оправдани, тъй като те осигуряват храна за всички форми на живот и първична здравна помощ за повече от 60–80% от хората в световен мащаб (Muluneh, 2021).

Глобалната тенденция за намаляване на агробиоразнообразието е заплаха за устойчивостта на земеделското производство, съответно и за хранителната верига. Задълбочаването на проблема води до изключително сериозни негативни последици върху устойчивостта на растенията към болести и неприятели, както и за тяхната адаптивна способност в условията на климатични промени (Villanueva et al., 2017). За да посрещне това предизвикателство, растителната селекция, подкрепена и от други области на науката, разчита на разнообразието от полезни гени, съхранени в семенните колекции от растителни

генетични ресурси. Растителният генофонд е ресурс за създаване на иновации и намиране на нови приложения на съществуващи култури и за разработване на подобрени сортове, които да осигуряват храни, фуражи, горива, лекарства и други суровини за световната икономика (Mattana et al., 2021). Дивите родственици се оценяват като потенциални източници на полезни признаци за адаптацията на културните растения към променящите се условия. Генетичната вариация в местните популации, породена от специфичните фактори на средата, формира растителното разнообразие (Bellon et al., 2015).

Растителните генетични ресурси обхващат разнообразието на културна и дива флора, местни популации и форми, стари, традиционни и подобрени сортове. Устойчивото им съхранение е залегнало в глобалния план на ФАО за опазване на генофонда за настоящите и бъдещи поколения (FAO, 1992). Основната цел на събирането на растителен генетичен материал е създаването на колекции, които представят възможно най-широкото разнообразие на генофонда (Dostatny et al., 2021). Управлението на *ex situ* колекциите включва дейности като събиране, проучване, оценка, документация и съхранение на растителна зародишна плазма, за запазване на разнообразието от видове, целесъобразно използване на генетичния им потенциал в селекцията, възстановяване в практиката, пълноправен достъп и обмен (Engels and Visser, 2008; CBD, 2011; FAO, 2014).

Фундаменталните и приложни научни изследвания в областта на растениевъдството в публични, частни и организации с нестопанска цел на национално и международно ниво имат за цел да намалят понататъшната загуба на биологично разнообразие и да отговорят на продоволствената нужда при сценарии на изменение на климата. Постигането на тази приоритетна задача е възможно чрез ефективното използване на генетичните ресурси и традиционните екологични познания за тях. Стимулиращ фактор се явява осигуряването на пълноправен свободен достъп до съхранения в генбанките генофонд, което дава и една мощна дългосрочна перспектива за ефективността на глобалната система за опазване на растителното биоразнообразие. (Engels and Ebert, 2021; Louafi et al., 2021).

Разработването на дигитален каталог за растителните генетични ресурси в България цели да отрази обогатяването на *ex situ* колекциите в генбанката, с поставен акцент върху местния генофонд, за гарантиране на свободен достъп и устойчиво

използване на генетичния им потенциал във връзка с новите предизвикателства, породени от изменението на климата.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Център по информация и документация на растителни генетични ресурси

Центърът по информация и документация е създаден през 1982 г. в Институт по растителни генетични ресурси – Садово и е обновен през 2021 г. по проект BG PlantNet „Създаване на **Национална информационна мрежа „Генбанка – растителни генетични ресурси”**”, финансиран от ФНИ. Центърът е отговорен за документацията на семенните образци, постъпващи в Националната генбанка за съхранение и устойчиво използване.

Електронна база данни

Всички растителни образци са заведени в електронна база данни, съгласно утвърден международен дескриптор на FAO/Bioversity (2017). Паспортната информация включва: каталожен номер, таксономично описание, име на образеца, дата на регистрация в колекцията, биологичен статус, донор на образеца и еколого-географски произход. Таксономичното описание на културите е под номенклатурата на системата GRIN (2015). Структурата на базата данни позволява разработването на компактен дигитален регистър, който осигурява възможност за сортиране и извършване на анализ на обогатяването по групи култури, година на придобиване и др.

Международни информационни мрежи

Европейската програма по растителни генетични ресурси (ECPGR) налага уеднаквена структура за изграждане на базите данни във връзка с участието на образци от националните колекции в международни каталози. Свободният достъп до растителните генетични ресурси е гарантиран чрез участие на информация за образците от Националната колекция в международни бази данни, следващи стандарта на Европейския електронен каталог EURISCO (Weise et al., 2017).

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Статус и документация на съхранения растителния генофонд

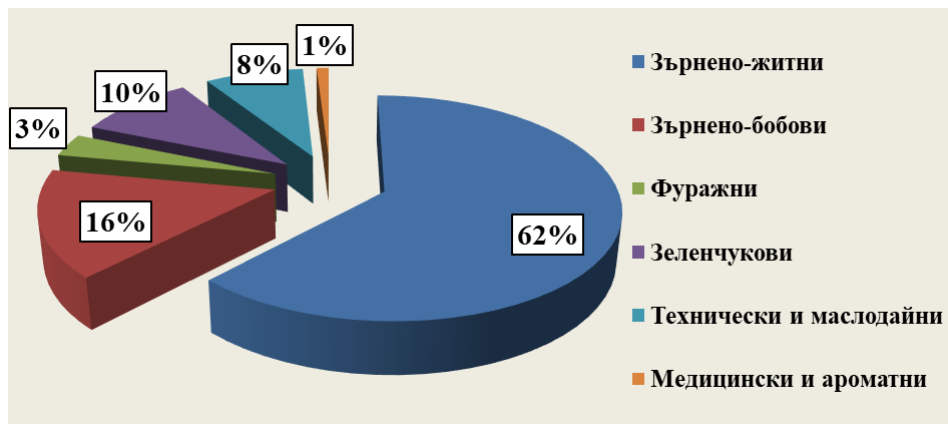
Образците, заведени в колекциите растителни генетични ресурси, са придобити чрез експедиции, проведени в селски райони главно у нас, чрез международен безвалутен обмен или са предадени за съхранение от селекционните институти в страната. Статусът на генофонда е представени в таблица 1.

Таблица 1. Статус на образците, включени в дигиталния регистър за документация на растителните генетични ресурси в България

Период на колекциониране	Начин на придобиване	Произход	Брой образци
1954-2021 г.	Интродукция	чужд	36 716
1957-2021 г.	Експедиции	местен/ български	9 725
		местен/чужд	1 052
1978-2021 г.	Селекция	български	6 048
Общо			53 541

В резултат на обогатяването са създадени *ex situ* колекции с ценни местни образци от зърнено-житни, зърнено-бобови, фуражни, технически и маслодайни, зеленчукови, медицински и ароматни култури (фиг. 1).

Оптимизирането и систематизирането на документацията на съхранените колекции е един от най-значимите проблеми за подобряване на ефективността на опазването на растителните генетични ресурси. Интегрирането на съвременните технологии и комуникационни решения в системата на генбанките е най-ефективна в рамките на единен стандарт за документация, обслужващ изследователските процеси и разбираем за потребителите. Основно предназначение на специализираната базата данни е обслужване и улесняване управлението на съхранените *ex situ* растителни генетични ресурси в България.



Фиг. 1. Разпределение на растителния генофонд по групи култури

Обогатяване на *ex situ* колекциите с местни сортове и популации

Местните образци, съхранени в *ex situ* колекциите на генбанките, са резултат от директно събиране на семена, дарени от фермери като специфична популация, принадлежаща към определена местност и отглеждани за традиционна употреба. Събрана и обработена е информация за поддържане *on farm* на стари и забравени сортове в различни географски райони на страната. Маркирани и обследвани са находища за *in situ* поддържане на диворастващи видове в района на местообитание.

През периода 1957-2021 г. са колекционирани чрез експедиции 10 777 образци – местни сортове и популации, от лични градини и дребни земеделски стопанства, както и диви родственици на културните растения от естествените им хабитати. Описаната в регистъра еколого-географска характеристика на събраните образци дава възможност за възвръщането на традиционните стари сортове в районите на произход чрез размножаване на съхранените в генбанката семенни ресурси.

Най-голямо разнообразие от стари сортове и местни форми е установено при зърнено-бобовите и зеленчуковите култури. Събрана е информация по разработен въпросник за стопаните, поддържащи местни сортове растителни генетични ресурси в България. Установено е, че в домашните градини на посетените села все още се отглежда

голямо видово разнообразие от зеленчуци, зърнено-бобови култури, лечебни растения, цветя и подправки. Структурата на стопанствата, от които са колекционирани семена от местни сортове са различни в зависимост от спецификата на района, но като цяло са дребни, насочени към задоволяване нуждите на конкретното домакинство. Използват се главно наследствени семена, които се поддържат от дълги години в семейството. Опазването във времето на тези стари сортове е много тясно свързано с традиционната им употреба, навиците на местните общности, семейни традиции, фестивали и др. Това уникално наследство позволява на всяко село и район да придаде своите специфични качества и вкус на родната продукция. Наред с отглеждането на широка гама от местни сортове, стопаните прилагат екологични практики при отглеждането им и грижи за събирането на качествени семена за поддържането на тези специфични форми.

Първото направление на експедиционната дейност е събирането на културни форми от полски и зеленчукови култури. В личните дворове и градини са открити традиционни образци домати, пипер, краставици, тикви, пъпеша, дини, лукови, листни, картофи, приспособени отлично към конкретните агроекологични условия, притежаващи ценни качества и свойства, като ранозрялост, устойчивост на биотичен и абиотичен стрес, високо съдържание на биологично активни вещества (Knüpfer, 2002; Kehlenbeck et al., 2007; Ulian et al., 2020).

При зърнено-житните и зърнено-бобовите култури вниманието е насочено към колекциониране на древните примитивни пшеници, стари и местни популации от царевица, фасул, вигна, леща, бакла и др.

Особен интерес представлява видовото разнообразие от някои слабо разпространени или забравени подправни и медицински растения, преоткрити днес за целите на диетичното и здравословно хранене, прилагани при терапии за алтернативно лечение на редица заболявания.

Друго направление на експедиционна дейност е опазването на дивото, полукултурно разнообразие и дивите родственици на културните растения.

Високата урбанизация, развитата транспортна инфраструктура и екологичните заплахи поставят под огромен риск голям брой диворастящи видове от различни ботанически семейства. От една

страна, опазването им има значение за биоразнообразието, а от друга – те притежават ценни за селекцията качества, като източници на високо съдържание на протеин, скорбяла, закрепители на фертилност, устойчивост на гъбни, бактериални и вирусни болести, висока адаптивна способност във връзка с глобалното затопляне и изменение на климата (Dempewolf et al., 2014).

Друго направление е издирването на сортове и видове, подходящи за отглеждане в полупланински, планински райони, слабопродуктивни земи, за райони с характерни засушавания, както и за системите на биологичното земеделие.

В резултат на обогатяването и организираната база данни с паспортно описание на образците са създадени условия за картиране и райониране на местния генофонд. Съществуват обосновани предпоставки за разширяване на експедиционната дейност в конкретни райони на страната, богати на ценни растителни ресурси - народна селекция, насочена главно към отбор по вкус, едрина на плода, устойчивост на болести.

Научни мрежи и международни бази данни

Големият напредък, постигнат в областта на документацията на растителните генетични ресурси през последното десетилетие се дължи на използването на съвременни информационни технологии. Регионалните и глобални инициативи са съсредоточени върху събирането и стандартизирането на информация, за да се улесни достъпността до данните чрез интелигентни мрежи. Настоящите предизвикателства в глобалния обмен на информация за зародишната плазма варират от оперативната съвместимост на големите масиви от данни до повишаване на тяхното качество, идентифициране на дубликати и задоволяване на нуждите на крайните потребители.

Значението на електронните портали, онлайн бази данни и платформи за опазване, популяризиране и използване на агробиоразнообразието се подчертава, както от доставчиците на данни, така и от потребителите. Съществуващите информационни системи и портали като EURISCO са основните градивни елементи за създаване на глобална рамка за достъп до генетични ресурси. Каталогът на EURISCO (<http://eurisco.ecpgr.org>) осигурява входна точка за паспортна информация в рамките на Европейската кооперативна програма за генетични ресурси на растенията (ECPGR)

като се насърчава интернационализацията на научните изследвания.

Съгласно EURISCO страната ни притежава най-богатата колекция от растителен генофонд, съхраняван в генбанка в Югоизточна Европа. Общият размер на колекцията (*BGR National Inventory*) включва паспортна информация за 69 684 образци, описани по дескриптора на FAO/Bioversity (2017). Българската колекция е седмата по обхват на съхранени растителни генетични ресурси в Европа и заема дял от 3,5 %, след Великобритания, Русия, Германия, Украйна, Полша и Испания. По отношение на таксономичния си състав съхранените образци принадлежат към 532 рода и 1 927 растителни вида. С най-висок дял образци се характеризират родовете *Triticum*, *Hordeum*, *Zea*, *Phaseolus*, *Avena*, *Capsicum*, *Pisum*, *Linum*, *Arachis* (табл. 2).

Таблица 2. Растителни видове с най-голям брой в Националната колекцията

Таксономично описание	Брой образци	С български произход
<i>Triticum aestivum</i>	13175	2909
<i>Hordeum vulgare</i>	6365	303
<i>Zea mays</i>	4827	1939
<i>Phaseolus vulgaris</i>	3488	1698
<i>Avena sativa</i>	2476	149
<i>Triticum durum</i>	2370	1193
<i>Capsicum annuum</i>	1885	1408
<i>Pisum sativum</i>	1744	241
<i>Triticosecale</i>	1461	532
<i>Linum usitatissimum</i>	1461	77
<i>Arachis hypogaea</i>	1373	444
<i>Lycopersicon esculentum</i>	1371	534
<i>Secale cereale</i>	1300	827
<i>Cucumis sativus</i>	1031	95

Българската колекция от растителни генетични ресурси се състои от образци с разнообразен биологичен статут, като те се разпределят в различни категории – диви родственици, традиционни

и съвременни сортове, с висок дял са селекционните материали, представени в разнообразните си подкатегории (линии, синтетични популации, хибриди и др.).

Българската колекция участва в изграждането на т. н. „виртуална“ Европейска обединена система на генбанките AEGIS (<http://aegis.cgiar.org>). В рамките на EURISCO съществуват и други бази данни като централизираните бази данни по култури към работните групи към ECPGR и електронна система EVA за подобряване достъпа и използването на съхранените колекции, включваща оценъчна и характеризираща информация. Чрез EURISCO информация за българската колекция е трансферирана и към други международни мрежи като WIEWS (FAO, 2020) и онлайн платформата за растителни генетични ресурси за прехрана и земеделие, съхранени в генбанките по целия свят GENESYS (2015).

ИЗВОДИ

Опазването на растителните генетични ресурси, като част от културното наследство на България, е приоритет, който дава на бъдещите поколения шанс за създаване на генетична плазма по изискванията на новите климатични условия и в синхрон с изискванията на потлебителя.

Националната генбанка в Садово поддържа една от най-големите *ex situ* колекции в Европа и най-богатото запазено растително разнообразие под формата на семена в Югоизточна Европа.

Големият напредък, постигнат в областта на документацията на растителните генетични ресурси през последното десетилетие, се дължи на използването на съвременни информационни технологии.

Създаденият дигитален регистър на растителния генофонд в България е стандартизиран и гарантира устойчивото управление на всички процеси, свързани с устойчивото използване на генофонда.

Настоящите предизвикателства в глобалния обмен на информация за *dijrje.kd* зародишна плазма варират от оперативната съвместимост на големите масиви от данни до повишаване на тяхното качество, идентифициране на дубликати и задоволяване в най-висока степен нуждите на селекционери и други потребители.

Литература

Bellon M. R., Gotor E., Caracciolo F. (2015) Conserving landraces and improving livelihoods: how to assess the success of *on-farm* conservation projects? *International Journal of Agricultural Sustainability*, 13(2), 167-182, DOI: 10.1080/14735903.2014.986363.

CBD (2011) Nagoya protocol on access to genetic resources and the fair and equitable sharing of benefits arising from their utilisation to the Convention on Biological Diversity. United Nations Environmental Programme.

Dempewolf H., Eastwood R., Guarino L., Khoury C., Müller J., J. Toll (2014) Adapting agriculture to climate change: a global initiative to collect, conserve, and use crop wild relatives. *Agroecology and Sustainable Food Systems*, 38 (4), 369-377.

Dostatny D. F., Korzeniewska A., Bartoszewski G., Rawski R., Kaźmińska K., Gelvonauskis B. (2021) The Evaluation and Conservation of Plant Genetic Resources Collected in Lithuania. *Agronomy*, 11 (8): 1586. <https://doi.org/10.3390/agronomy11081586>.

Engels J., Ebert, A. (2021) A Critical Review of the Current Global *Ex Situ* Conservation System for Plant Agrobiodiversity. I. History of the Development of the Global System in the Context of the Political/Legal Framework and Its Major Conservation Components. *Plants*, 10, no. 8: 1557. <https://doi.org/10.3390/plants10081557>.

Engels J., Visser L. (2008) A guide to effective management of germplasm collections. IPGR Handbooks for Genebanks № 6. Rome. Italy.

FAO (1992) Convention on biological diversity. Rome. Italy.

FAO (2014) Genebank standards for plant genetic resources for food and agriculture. Rome. Italy.

FAO (2020) World Information and Early Warning System on Plant Genetic Resources for Food and Agriculture (WIEWS), <http://www.fao.org/wiews/data/>.

FAO/Bioversity (2017) Multi-Crop Passport Descriptors. Rome. Italy.

GENESYS (2015) The Global Gateway to Genetic Resources. <https://www.genesys-pgr.org/>.

GRIN (2015) Genetic Resources Information Network, Taxonomy for Plants. USDA.

Kehlenbeck K., Arifin H. S., Maass B. L. (2007) Plant diversity in home gardens in a socio-economic and agro-ecological context. In: Tschardtke, T., Leuschner, C., Zeller, M., Guhardja, E., Bidin, A. (eds), *Stability of Tropical Rainforest Margins*, Environmental Science and Engineering

(Environmental Science), Springer, Berlin, Heidelberg, Stability of Tropical Rainforest Margins, pp. 295-317.

Knüpffer H. (2002) Documentation of plant genetic resources in home gardens. In: Watson, J. W.; Eyzaguirre, P. B. Home gardens and *in situ* conservation of plant genetic resources in farming systems. IPGRI, Rome, Italy, pp. 19-26.

Louafi S., Thomas M., Berthet E. T., Pélissier F., Vaing K., Jankowski F., Bazile D., Pham J.-L., Leclercq M. (2021) Crop Diversity Management System Commons: Revisiting the Role of Genebanks in the Network of Crop Diversity Actors. *Agronomy*, 11(9): 1893. <https://doi.org/10.3390/agronomy11091893>.

Mattana E., Ulian T., Pritchard H. W. (2021) Seeds as natural capital. *Trends in Plant Science*, ISSN 1360-1385, <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.08.008>.

Muluneh, M. G. (2021) Impact of climate change on biodiversity and food security: a global perspective - a review article. *Agric & Food Secur.* 10, 36. <https://doi.org/10.1186/s40066-021-00318-5>.

Ulian, T., Diazgranados, M., Pironon, S., Padulosi, S., Liu, U., Davies, L., Howes, M.-J.R., Borrell, J., Ondo, I., Pérez-Escobar, O. A., Sharrock, S., Ryan, P., Hunter, D., Lee, M. A., Barstow, C., Łuczaj, Ł., Pieroni, A., Cámara-Leret, R., Noorani, A., Mba, C., Womdim, R. N., Muminjanov, H., Antonelli, A., Pritchard, H. W., Mattana, E. (2020) Unlocking plant resources to support food security and promote sustainable agriculture. *People Plants Planet* 2 (5) p. 421-445 ISSN: 2572-2611 DOI: 10.1002/ppp3.10145.

Villanueva A. B., Halewood M., Noriega I. L. (2017) Agricultural Biodiversity in Climate Change Adaptation Planning. *European Journal of Sustainable Development*. 6. 2. 1-8. ISSN: 2239-5938.

Weise S., M. Oppermann, L. Maggioni, T. van Hintum, H. Knüpffer (2017) EURISCO: The European search catalogue for plant genetic resources. *Nucleic Acids Research*. 45 (Database issue). D1003-D1008.

.....

ПОЗНАНИЯ НА ПОТРЕБИТЕЛИТЕ ОТНОСНО БИОЛОГИЧНИ ХРАНИ И ТЕХНИЯ КОНТРОЛ В ОБЛАСТ ДОБРИЧ

KNOWLEDGE OF CONSUMERS ABOUT ORGANIC FOODS AND THEIR CONTROL IN DOBRICH DISTRICT

Розалина Брайкова, Дарина Найденова, Албена Тонева, МУ -
Варна „Проф. д-р П. Стоянов”, Варна 9002, България

Rozalina Braykova, Darina Naydenova, Albena Toneva, Medical
University of Varna Prof. Dr. Paraskev Stoyanov, Varna 9002,
Bulgaria

E-mail; Rozalina.Braykova@mu-varna.bg

РЕЗЮМЕ

Въведение: Много хора възприемат биологичното производство и продукти като по-добри за околната среда, по-добри за здравето от традиционно произведената храна (Teisl, 2011).

Цел: да се оцени информираността на населението от област Добрич относно биологичните храни.

Материали и методи: В проучване от ноември 2020г. - април 2021г., 150 лица от област Добрич са анкетирани за познанията им за биохраните. Данните са обработени статистически с помощта на SPSS Statistics®, версия 20.

Резултати: Преобладаващата част потребители (70,7%) асоциират биохраните с храни, чисти от ГМО и химични замърсители; 64,7% с храни с естествен произход; 58% с храни, полезни за здравето. Само 0,7% имат негативно отношение. Информация за биохраните се получава от: интернет - 61,3%; приятели, колеги, роднини - 46,7%. Установена е статистическа зависимост ($p\text{-value} = 0.007 < \alpha = 0.05$) между фактора, влияещ на решението за покупка и компетентния орган. БАБХ (Българска агенция по безопасност на храните) е посочена от 70,7% от респондентите, като отговорна институция за подаване на сигнали.

Обсъждане: Преобладаващата част от респондентите в проучването

имат положителна нагласа към биологичните храни.

Заклучение: Информираността на потребителите за биопродуктите и резултатите от контрола, биха повлияли възприемането им и вземането на решения за покупка.

Ключови думи: биологични храни, информираност на потребителите, БАБХ

ABSTRACT

Background: Many people perceive organic production and products as better for the environment, better for health than traditionally produced food (Teisl, 2011).

Aim: to assess the awareness of the population of Dobrich district about organic foods.

Materials and methods: In a study from November 2020. - April 2021, 150 people of Dobrich district were interviewed for their knowledge of organic food. Data were statistically processed using SPSS Statistics®, version 20.

Results: The majority of consumers (70.7%) associate organic food with foods free of GMOs and chemical contaminants; 64.7% with foods of natural origin; 58% with foods good for health. Only 0.7% have a negative attitude. Information about organic food is obtained from: Internet - 61.3%; friends, colleagues, relatives - 46.7%.

A statistical relationship ($p\text{-value} = 0.007 < \alpha = 0.05$) was found between the factor influencing the purchase decision and the competent authority. BFSA (Bulgarian Food Safety Agency) is indicated by 70.7% of respondents as the responsible institution for reporting

Discussion: The majority of respondents in the survey have a positive attitude towards organic foods.

Conclusion: Consumer awareness of organic products and control results would affect their perception and purchasing decisions.

Key words: organic food, consumer awareness, BFSA

ВЪВЕДЕНИЕ:

Понастоящем производството на биологични храни е един от най-бързо развиващите се сегменти на пазара на храни (Liang, 2016). В научната литература, много хора възприемат биологичното производство и продукти като по-добри за околната среда, по-добри

за здравето от традиционно произведената храна (Teisl, 2011).

Стандарти на Европейския съюз (ЕС) за биологичното производство на храни имат за цел устойчиво земеделие и преработка на храни за защита на природните екосистеми и здравето на почвата, водата, растенията и животните, както и производството на висококачествени хранителни храни, които предотвратяват увреждането на човешкото здраве (ЕС, 2007).

Потребителите имат ключова роля за постигане на устойчива хранителна система (Grunert, 2011) и чрез повишаване на информираността им относно екологичните хранителни практики и механизмите за контрол върху биологичните храни, ще допринесат за промяна на тяхното търсене и насърчат разработването на политики за подобряване на тяхното предлагане.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ:

За целите на научното изследване е извършено анонимно анкетно проучване на информираността и нагласата на населението от област Добрич. Включени са 150 пълнолетни лица, чието участие е на случаен принцип и напълно доброволно, след подписване на декларация за информирано съгласие.

Изследването е одобрено от Комисията по етика на научните изследвания на МУ-Варна и е проведено в периода м. ноември 2020г. – м. април 2021г.

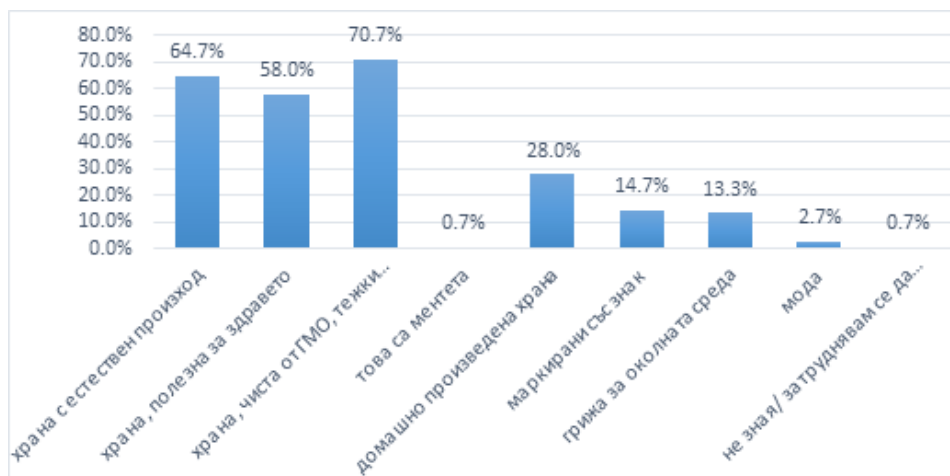
При анализа на резултатите от анкетното проучване използваните статистически методи са: дескриптивен метод - вариационен анализ на количествени данни – средни стойности, стандартно отклонение, минимални и максимални стойности; метод на статистическо оценяване - с помощта на IBM SPSS Statistics®, версия 20 бяха извършени статистическите анализи. Асоциациите между категориите променливи бяха анализирани посредством непараметричен метод с определяне на критерий χ^2 (Хи-квадрат). Статистическата значимост беше зададена на $\alpha = 0,05$.

РЕЗУЛТАТИ:

Общо 150 респонденти са участвали в проучването, от които преобладаващата част са от женски пол - 65,3%, спрямо 34,7% от мъжки пол. Най-висок е относителният дял на анкетираните на възраст 51-60 години - 30,6%. Възрастовата група от 18-30 г. е 20,7%

от извадката. Участниците от възрастовите категории 31-40г., 41-50г. и над 61 години съответно са: 14,7%, 20% и 14%. Около 2/3 от включените в проучването лица са с висше образование (68,6% с бакалавърска или магистърска степен).

По отношение на познанията на анкетираните за биологичните храни, 70,7% от тях **ги асоциират с храни, чисти от ГМО, тежки метали, пестициди, химични торове и антибиотици, хормони консерванти и оцветители**; 64,7% с храни с естествен произход; 58% с храни, полезни за здравето; 28% с домашно произведени храни и 14,7% с храни, маркирани със знак. Само 0,7% от участниците в проучването отбелязват негативно отношение към биологичните храни – „храни ментета“ (Фиг. 1).

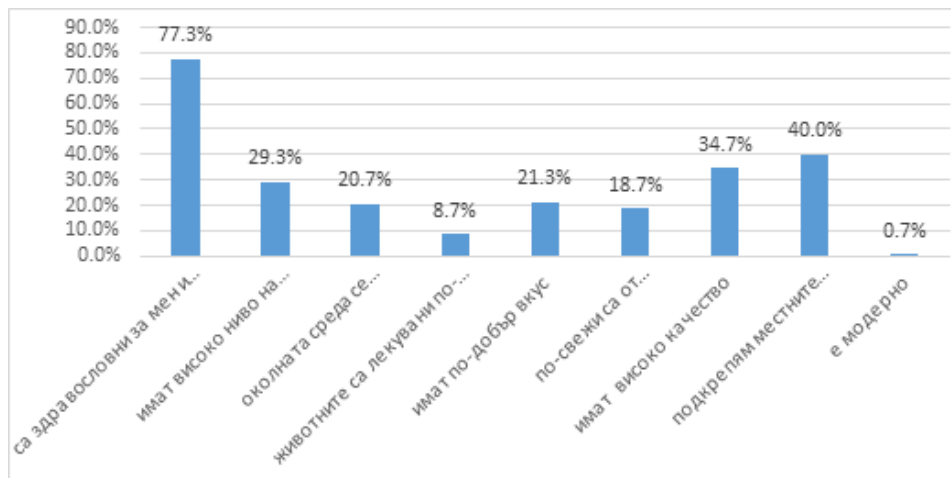


Фиг. 1 Относителен дял (%) на познанията на анкетираните лица от област Добрич за биологичните храни

Различни са източниците, които осигуряват информация на анкетираните по темата за биологичните храни: интернет портали или специализирани уебсайтове - 61,3%; приятели, колеги, роднини - 46,7%; магазини - 24,7%; телевизионни предавания - 33,3%; телевизионни и радио реклами - 14%; от пресата (вестници, списания) - 13,3%.

Важните фактори, които влияят върху възприятията на потребителите

и техните решения за покупка на биохрани са: здравословни са за тях и семейството им - 77,3%; подкрепа на местните производители - 40%; високо качество - 34,7%; високо ниво на безопасност, което е гарантирано и контролирано – 29,3 % (Фиг. 2). Установена е статистическа зависимост ($p\text{-value} = 0.007 < \alpha = 0.05$) на последния фактор с променливата, свързана със знанието, кой извършва контрол при съмнение, че дадена храна предлагана като «биологична» не е такава. БАБХ е посочена от 70,7% от респондентите, като отговорна институция, към която може да бъде подаден сигнал.



Фиг. 2 Относителен дял (%) на факторите, които влияят върху възприятията и решенията за покупка на биохрани на потребителите от област Добрич

Същевременно 80,7% от всички анкетирани са категорични, че потребителите не получават достатъчна и достоверна информация относно резултатите от извършената контролна дейност при търговията с биологични храни.

ОБСЪЖДАНЕ:

Преобладаващата част от респондентите, взели участие в проучването имат положителна нагласа към биологичните храни, съответстваща на концепцията за биологично производство.

Интернет порталите или специализираните уебсайтове са най-често използваните и достъпни източници, от които анкетираните черпят информация по темата за биологично произведените храни.

Независимо, че относителният дял на анкетираните, запознати с институциите, отговорни за спазване на нормативните изисквания при търговията с биологични храни е значителен (70,7%), нагласата за покупка, свързана с обективни признаци, се отнася само за около 1/5 от потребителите.

ИЗВОДИ:

Всички информационни средства са важни в осигуряване на повече знания по темата за биологичните храни.

Образованието и информирането на потребителите за характеристиките на биологичните продукти и резултатите от контролната дейност на отговорните институции, биха могли да бъдат значими за потребителите в процеса на възприемане на тези продукти и вземане на решения за покупка. Същевременно се създава благоприятна основа за повишаване доверието на потребителите към компетентните органи.

Това проучване не е спонсорирано от трети институции извън структурата на Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна.

Авторите не декларират наличие на конфликт на интереси.

Литература:

1. EU (European Union), 2007. Council Regulation (EC) No 834/2007 of 28 June 2007 on organic production and labelling of organic products and repealing. Regulation (EEC) No 2092/91. Off. J. Eur. Union. L 189, 20 July 2007, Volume 50. Brussels: EU. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX%3A32007R0834>.
2. Grunert, K.G. Sustainability in the food sector: A consumer behaviour perspective. *Int. J. Food Syst. Dyn.* 2011, 2, 207–218.
3. Liang, R., 2016. Predicting intentions to purchase organic food: the moderating effects of organic food prices. *Brit. Food J.* 118 (1), 183e199.
4. Teisl, M.F., 2011. Environmental concern in food consumption. In: Lusk, J.L., Roosen, J., Shogren, J.F. (Eds.), *The Oxford Handbook of Economics of Food Consumption and Policy*. Oxford University Press, U.K., pp. 843e868

PATHOGENICITY OF *YERSINIA ENTEROCOLITICA* ISOLATED FROM RETAIL FOODS

Margarita Terentjeva^{1,2}, Irēna Meistere¹, Tatjana Kiseļova¹, Laura Alksne¹, Silva Gradovska¹, Juris Kibilds¹, Madara Streikiša¹, Jevgēnija Ošmjana¹, Olga Valciņa¹

¹Institute of Food safety, Animal health and Environment “BIOR”, Rīga, Latvia;

²Faculty of Veterinary Medicine, Latvia University of Life Sciences and Technologies, Jelgava, Latvia;

Corresponding author Dr. Margarita Terentjeva, Margarita.Terentjeva@bior.lv

SUMMARY

Yersinia enterocolitica is an important foodborne pathogen with pork and fresh produce were shown to be contaminated. The prevalence and pathogenicity of *Y. enterocolitica* was studied at retail level in Latvia. A total of 180 samples including 150 of raw pork and 30 of fresh salad and vegetables were sampled between 2015 and 2021 from retail outlets in Latvia. Samples were cultured according to ISO 10273, isolates were identified with matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF) and the pathogenicity was confirmed with Real-Time PCR (qPCR). Out of 39 *Y. enterocolitica* positive pork samples, *ail*-gene was confirmed in six isolates with Ct cycles range from 16.27 to 39.29. *Y. enterocolitica* was isolated from 3 (10%) of fresh produce samples while all isolates were considered as non-pathogenic (*ail*-gene negative). The present study confirms that the pork may serve as a source of pathogenic yersiniae to consumers.

Keywords: pork, *ail* gene, pathogenic and non-pathogenic yersiniae

INTRODUCTION

Yersinia enterocolitica is a zoonotic foodborne pathogen which cause yersiniosis in humans. Yersiniosis characterized with gastrointestinal disorders and the extraintestinal postinfection sequelae as arthritis and

erythema nodosum may occur (Bottone, 2015). Yersiniosis is one of the most common bacterial foodborne zoonotic infection in the EU and the yersiniosis cases were reported in Latvia with the incidence of 4.6 cases per 100 000 inhabitants in 2020 (SPKC, 2021).

Yersinia spp. were isolated from different foods and animals, however, the majority of the isolated stains were non-pathogenic. The domestic pigs were found to be the main carriers of pathogenic *Y. enterocolitica* and the pathogen may enter the food chain via the cross-contamination during slaughter (Laukkanen-Ninios et al., 2014). Genetic similarity of *Y. enterocolitica* isolates from domestic pigs and human isolates and the ability of the porcine strains to induce clinical yersiniosis in human (Kuehni-Boghenbor et al., 2006). This shows that with pathogenic *Yersinia* spp. contaminated pork may be present at the retail and pose the public health hazards. Consumption of undercooked pork was described as a significant factor in case of sporadic yersiniosis (Rosner et al., 2012).

Outbreaks of yersiniosis are rare and mostly were describe in Northern hemisphere which were associated with fresh produce contamination with pathogenic *Yersinia* spp. (MacDonald et al., 2014, Karlsson et al., 2021). Studies of the prevalence and virulence of *Y. enterocolitica* in vegetables and fruits are needed to understand the epidemiology of yersiniosis (Verbikova et al., 2018).

Since non-pathogenic *Yersinia* spp. were frequently isolated from different sources, the pathogenicity of the isolates should be assessed. Both chromosomal and plasmid-mediated virulence genes needed for full virulence of *Y. enterocolitica*. The attachment and invasion locus (*ail*) gene is present in pathogenic strains and widely accepted for testing of *Y. enterocolitica* virulence. *ail* encodes the outer membrane protein Ail responsible for invasion and attachment to the cell and serum resistance (Bancerz-Kisiel et al., 2018). Considering the presence of *ail*-gene in some non-pathogenic *Y. enterocolitica* and *Yersinia* spp. isolates, the detection of *ail* alone cannot provide sufficient information on pathogenicity of *Y. enterocolitica* (Sihvonen et al., 2011). Therefore, the detection of virulence genes other than *ail* in *Y. enterocolitica* isolates from foods is needed to assess its pathogenicity for consumers.

The aim of the present study was to study the prevalence of *Y. enterocolitica* in retailed pork and fresh produce in Latvia and to detect the major virulence determinants of isolates.

MATERIALS AND METHODS

Samples

A total amount of 180 samples were collected from the retail outlets in Latvia between 2015 and 2021. Samples included 150 raw pork and 30 fresh produce samples. For sampling of pork, shoulder cuts, centre loin and sirloin, rib and leg cuts and pork braising cubes were purchased. For fresh produce sampling, ready-to-eat (RTE) carrots (n=2), herbs (n=2), beetroot (n=1), leafy greens mix (n=25) were collected.

Microbiological testing of the samples

Samples were investigated in accordance with ISO 10273:2017. Colonies resembling *Yersinia* spp. on Cefsulodine-Irgasan-Novibiocine (CIN, Biolife, Italy) agar were screened for urease production and biochemical reactions in Triple Sugar Iron (TSI) and Lysine Decarboxylase Broth (Biolife, Italy). Bacterial colonies with biochemical reactions typical for *Yersinia* spp. were subjected for further confirmation with matrix-assisted laser desorption ionization-time of mass spectrometry (MALDI-TOF, Bruker, Germany). Only *Y. enterocolitica* isolates were selected for detection of the virulence genes.

Detection of the virulence genes in PCR

Extraction of DNA of *Y. enterocolitica* isolates was done in accordance with the manufacturer instruction with NucleoSpin Tissue kit (Macherey-Nagel, Germany). *ail* gene was detected with qPCR (Mäde et al., 2008). Identification of *ystA* and *ystB* was done with accordance to Thoerner et al., 2003 and results were analyzed with capillary electrophoresis (QIAxcel Advanced, Qiagen, Germany). Oligonucleotides sequence of primers and probes is shown in Table 1.

Oligonucleotides used in the present study

Primer	Sequence	Size of amplicon, bp	GenBank reference	Reference
ye-ail-F2	5'-GGTTATGCACAAAGCCATGTAAA-3'	93	KP288671	Mäde et al., 2008
ye-ail-R2	5'-AAACGAACCTATTACTCCCCAGTT-3'			
Probe ye-ail-tmp	5'-FAM-AACCTGAAGTACCGTTATGAACTCGATGA-DQ-3'	-		
ystA-F	5'-ATCGACACCAATAACCGCTGAG-3'	79	X65999	Thoerner et al., 2003
ystA-R	5'-CCAATCACTACTGACTTCGGCT-3'		U09235	
ystB-F	5'-GTACATTAGGCCAAGAGACG-3'	146	D88145	
ystB-R	5'-GCAACATACCTCACAACACC-3'			

Data analysis

Chi-square test (χ^2) was used for calculation of differences between the prevalence of *Y. enterocolitica* in different food categories.

Results

Y. enterocolitica was isolated from 32 pork samples and the identified prevalence was 21% (Table 2). The *ail* gene was confirmed in six (4%) of *Y. enterocolitica* isolates from pork and the identified cycle threshold (Ct) ranged from 16.27 to 39.29.

In fresh produce, *Y. enterocolitica* was found in three samples with the prevalence of 10%. All positive samples were leafy green unwashed vegetables and all samples were *ail* negative. The results on the prevalence of *Y. enterocolitica* in pork and fresh produce samples are shown in Table 2.

Table 2

Prevalence of *Yersinia enterocolitica* in raw pork and fresh produce in Latvia

Sample category	No. of samples	No. of <i>Y. enterocolitica</i> positive (%)	No. of <i>ail</i> positive (%)	<i>ail</i> Ct
Pork ^a	150	32 (21)	6 (4)	16.27 – 39.29
Fresh produce	30	3 (10)	0 (0)	-

^a-prevalence of *Y. enterocolitica* was significantly higher in pork than in fresh produce isolates ($p < 0.05$)

Differences between the prevalence of *Y. enterocolitica* in food categories were significant and the prevalence of *Y. enterocolitica* in pork was significantly higher than in fresh produce ($p < 0.05$).

Among *ail* positive *Y. enterocolitica* strains isolated from pork, two revealed the presence of *ystA* and absence of *ystB* genes while other pork *Y. enterocolitica* isolates were *ystA* negative but *ystB* positive. *ystA* gene was identified in isolates with low Ct cycle values of 16.27 and 17.31, while strains with high Ct cycle values of 37.02 to 39.02 were *ystB* positive. All isolated from fresh produce were *ail* and *ystA* negative, but *ystB* positive. Presence and distribution of virulence genes in *Y. enterocolitica* isolates in pork and fresh produce is shown in Table 3.

Table 3

Presence of virulence genes in *Yersinia enterocolitica* isolates from pork and fresh produce samples

Origin of isolates	Virulence gene		
	<i>ail</i> Ct	<i>ystA</i>	<i>ystB</i>
Pork chop	38.28	-	+
Pork	39.17	-	+
Pork	39.29	-	+
Pork	37.02	-	+
Pork shoulder	17.31	+	-
Pork	16.27	+	-

Leafy green mix	-	-	+
Rucola	-	-	+
Leafy green mix	-	-	+

(-) – negative results; (+) – positive results

DISCUSSION

Y. enterocolitica was identified in pork and fresh produce at the retail level in Latvia. Our recorded prevalence of *Y. enterocolitica* of 21% was higher than 15.2% reported in pork in Italy (Bonardi et al., 2010). The of prevalence *Y. enterocolitica* in poultry raw meat, pork meat and minced pork and beef in study in Poland was 3.1%, 5.0% and 5.5%, respectively, that was higher than the prevalence found in the present study (Zadernowska, Chajęcka-Wierzchiwska, 2017).

In fresh produce, the identified prevalence of *Y. enterocolitica* in the present study of 10% was higher than 0.6% in fresh leafy vegetables found in Italy (Losio et al., 2015) and 5.8% reported vegetables and fruits in Czechia (Verbikova et al., 2018). Our results indicate that the prevalence of *Y. enterocolitica* in retailed pork and fresh produce in Latvia is high.

Pork, vegetables and fruits are considered to be an important source of *Y. enterocolitica* to consumers (Bari et al., 2011, Losio et al., 2015) but the pathogenic yersiniae were rarely recovered from the food in comparison with non-pathogenic *Yersinia* spp. Low recovery rates of pathogenic *Yersinia* spp. are linked to low sensibility of standard culturing methods (Fredriksson-Ahomaa, Korkeala, 2003). *Ail* positive *Y. enterocolitica* were identified in retailed pork samples and the prevalence varied from 3.7% in Italy detected with culture method and confirmation of *ail* gene with PCR to 17.2% in minced meat identified with qPCR in study in Czechia (Bonardi et al., 2010, Lorencova, Slany, 2016). The identified prevalence of *Y. enterocolitica* of 4% (6/150) in the present study was higher than 2% for *ail* positive *Y. enterocolitica* identified in Latvia in 2013 (Terentjeva, Bērziņš, 2013).

Similarly, the identified prevalence of *Y. enterocolitica* in vegetables and fruits varied depending on the methods were applied. Culturing of fruits and vegetables samples revealed the prevalence of 0.3% for *ail*-positive *Y. enterocolitica* while direct qPCR showed the prevalence of 6.7% (Verbikova et al., 2018).

Non-pathogenic yersiniae are widely distributed in the environment so the evaluation of the virulence properties is needed to differentiate them from pathogenic *Yersinia* spp. Pathogenic bioserovars of *Y. enterocolitica* were reported to harbour *ail* and *ystA* virulence genes which are absent in non-pathogenic bioserovars of *Y. enterocolitica* (Bancerz-Kisiel et al., 2018). *ystA* and *ystB* genes encoded heat-stable enterotoxins and *ystA* associated with enteropathogenic strains which may induce diarrhea while *ystB* type enterotoxin is produced mainly by non-pathogenic *Y. enterocolitica* biotype 1A (Ramamurthy et al., 1997).

Y. enterocolitica sharing the pathogenic genes (*ail*, *ystA*) was isolated from foods with lower prevalence, and only two out of 22 of *Y. enterocolitica* isolates in study of Bonardi et al., 2010 revealed the presence of virulence genes while other isolates of *Y. enterocolitica* belonged to non-pathogenic 1A biovar. A major part of non-pathogenic strains of *Y. enterocolitica* missed virulence genes with exception of *ystB* which was present in 90% of *Y. enterocolitica* isolates (Bonardi et al., 2010). Also all *Y. enterocolitica* isolates in study of Zadernowska, Chajęcka-Wierzchiwska, 2017 were members of non-pathogenic biotype 1A and were *ail* negative and *ystA* negative, while five out of seven isolates contained *ystB* gene. The *ystB* gene was strongly associated with non-pathogenic biotype 1A in clinical samples (Hunter et al., 2019). In our study of pork samples, two *ystA* positive isolates represented high Ct values of *ail* gene and isolates with low Ct values (>35) of *ail* gene revealed the presence of *ystB* assuming isolates belong to non-pathogenic *Y. enterocolitica* biotype. For public health risk assessment of it would be important to characterize these strains in details – analyze biotype and other virulence genes to understand the pathogenicity potential of weak positive *ail* strains.

In the present study of fresh produce, all isolated *Y. enterocolitica* strains were *ail*- and *ystA* negative and *ystB* positive that are typical characteristics of non-pathogenic 1A *Y. enterocolitica* biotype. The low prevalence of pathogenic *Y. enterocolitica* in fresh produce was in agreement with previous studies (Lorio et al., 2015, Verbikova et al., 2018).

In conclusion, the present study shows that contamination of retail food with pathogenic *Y. enterocolitica* may represent public health hazard with pork shares higher contamination in comparison with fresh produce.

Acknowledgements

The present study was supported by the Latvian Council of Science,

project No. lzp-2020/2-0418 “Epidemiology and genetic characterization of *Yersinia* spp. within the food chain”.

Literature

Bancerz-Kisiel A., Pieczywek M., Łada P., Szweda W. 2018. The most important virulence markers of *Yersinia enterocolitica* and their role during infection. *Genes*, 9(5), 235.

Bari M.L., Hossain M.A., Isshiki K., Ukuku D. 2011. Behavior of *Yersinia enterocolitica* in foods. *Journal of Pathogens*, 420732.

Bonardi S., Paris A., Bassi L., Salmi F., Bacci C., Riboldi E., Boni E., D’Incau M., Tagliabue S., Brindani F. 2010. Detection, semiquantitative enumeration, and antimicrobial susceptibility of *Yersinia enterocolitica* in pork and chicken meats in Italy. *Journal of Food Protection*, 73(10), 1785-1792.

Bottone E.J. 2015. *Yersinia enterocolitica*: Revisitation of an enduring human pathogen. *Clinical Microbiology Newsletter*, 37(1), 1-8.

Centre for Disease Prevention and Control. 2021. Epidemioloģijas biļetens. Infekcijas slimības Latvijā 2020. gada janvārī-decembrī. Nr.13(1723) (in Latvian). Available online <https://www.spkc.gov.lv/lv/epidemiologijas-bileteni> (assessed 4.11.2021.)

Hunter E., Greig D.R., Schaefer U., Wright M.J., Dallman T.J., McNally A., Jenkins C. 2019. Identification and typing of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* isolated from human clinical specimens in England between 2004 and 2018. *Journal of Medical Microbiology*, 68, 538-548.

Fredriksson-Ahomaa M, Korkeala H. 2003. Low occurrence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in clinical, food, and environmental samples: a methodological problem. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(2), 220-229. International Organisation of Standardization. ISO 10273:2017. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica*, p.40.

International Organisation of Standardization ISO/TS 18867:2015. Microbiology of the food chain – Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens – Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. p.30.

Karlsson P.A., Tano E., Jernberg C., Hickman R.A., Guy L., Järhult J.D., Wang H. 2021. Molecular characterization of multidrug-resistant *Yersinia enterocolitica* from foodborne outbreaks in Sweden. *Frontiers in*

Microbiology, 12, 943.

Kuehni-Boghenbor K., On S.L.W., Kokotovic B., Baumgartner A., Wassenaar T.M., Wittwer M., Bissig-Choisat B., Frey J. 2006. Genotyping of human and porcine *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia intermedia*, and *Yersinia bercovieri* strains from Switzerland by amplified fragment length polymorphism analysis. Applied and Environmental Microbiology, 6, 4061–4066.

Laukkanen-Ninios R, Fredriksson-Ahomaa M, Korkeala H. 2014. Enteropathogenic *Yersinia* in the pork production chain: Challenges for control. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 13, 1165–1191.

Lorencova A., Slany M. 2016. Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in minced meat, pig tongues and hearts at the retail level in the Czech Republic detected by real time PCR. Potravinarstvo, 10(1), 282-286.

Losio M.N., Pavoni E., Bilei S., Bertasi B., Bove D., Capuano F., Farneti S., Blasi G., Comin D., Cardamone C., Decastelli L., Delibato E., De Santis P., Di Pasquale S., Gattuso A., Goffredo E., Fadda A., Pisanu M., De Medici D. 2015. Microbiological survey of raw and ready-to-eat leafy green vegetables marketed in Italy. International Journal of Food Microbiology 210, 88-91.

MacDonald E., Einöder-Moreno M., Borgen K., Thorstensen Brandal L., Diab L., Fossli Ø., Guzman Herrador B., Hassan A.A., Johannessen G.S., Johansen E. J., Jørgensen Kimo R., Lier T., Paulsen B. L., Popescu R., Tokle Schytte C., Sæbø Pettersen K., Vold L., Ørmen Ø., Wester A.L., Wiklund M., Nygård K. 2016. National outbreak of *Yersinia enterocolitica* infections in military and civilian populations associated with consumption of mixed salad, Norway, 2014 Eurosurveillance, 21, 30321.

Mäde D., Reiting R., Strauch E., Ketteritzsch K., Wicke A. 2008. A real-time PCR for detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in food combined with an universal internal amplification control system. Journal of Consumer Protection and Food Safety, 3, 141-151.

Ramamurthy T., Yoshino K., Huang X., Balakrish Nair G., Carniel E., Maruyama T., Fukushima H., Takeda T. 1997. The novel heat-stable enterotoxin subtype gene (*ystB*) of *Yersinia enterocolitica*: nucleotide sequence and distribution of the *yst* genes. Microbial Pathogenesis, 23, 189-200.

Rosner B.M., Stark K., Höhle M., Werber D. 2012. Risk factors for sporadic

Yersinia enterocolitica infections, Germany 2009-2010. *Epidemiology and Infection*, 140(10), 1738-1747.

Sihvonen L.M., Hallanvuoto S., Haukka K., Skurnik M., Siitonen A. 2011. The *ail* gene is present in some *Yersinia enterocolitica* biotype 1A strains. *Foodborne Pathogens and Disease*, Vol.8(3), 455-457.

Terentjeva M., Bērziņš A. 2013. Prevalence of *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 in raw pork at retail market in Latvia. *Journal of Food Safety and Food Quality*, 65(5), 125-156.

Thoerner P., Bin Kingombe C. I., Bogli-Stuber K., Bissig-Choisat B., Wassenaar T. M.,

Frey J., Jemmi T. 2003. PCR detection of virulence genes in *Yersinia enterocolitica* and

Yersinia pseudotuberculosis and investigation of virulence gene distribution. *Applied and*

Environmental Microbiology. 69(3), 1810–1816.

Zadernowska A., Chajęcka-Wierzchiwska W. 2017. Prevalence, biofilm formation and virulence markers of *Salmonella* sp. and *Yersinia enterocolitica* in food of animal origin in Poland. *LWT – Food Science and Technology*, 75, 552-556.

Verbikova V., Borilova G., Babak V., Moravkova M. 2018. Prevalence, characterization and antimicrobial susceptibility of *Yersinia enterocolitica* and other *Yersinia* species found in fruits and vegetables from the European Union. *Food Control*, 85, 161-167.

.....

ВЪЗМОЖНОСТИ ЗА ПРЕДВАРИТЕЛНО РАЗМНОЖАВАНЕ НА БАЗИСЕН ПОСАДЪЧЕН МАТЕРИАЛ ОТ МЕДИЦИНСКИЯТ ВИД *RUTA GRAVEOLENS L.* ЧРЕЗ ПРИЛАГАНЕ НА ВЕГЕТАТИВНИ МЕТОДИ

Станислава Статева

Институт по растителни генетични ресурси, бул. „Дружба” №2,,
4122 Садово, България

E-mail: stanislava.stateva@gmail.com

РЕЗЮМЕ

Българската флора е източник на растителни видове, богати на голям набор химически компоненти – конкретни вещества или групи съединения, които са в ограничени популации. През последните години на нашият век учените алармират, че нараства загубата на биоразнообразието. Видът *Ruta graveolens L.* е в Червената книга на България е със статут „застрашен“. Прилагането на конвенционалният метод на размножение на вида е ограничено поради трудното покълване на семената. Проучени са факторите, влияещи върху отглеждането на *Ruta graveolens L.* в контролирани условия на съхраняване. Основната хранителна среда е Murashige and Skoog (1962) с добавени растежни регулатори са Zeatin, BAP, IAA и NAA в концентрации от 0.2, 0.5 и 1.0 mg/ l. Действието BAP се отчита с елиминиране на апикалното доминиране, като по този начин предизвиква развитието на странични пъпки и започва процеса на пролиферация на новите експланти. Със завишаване на концентрацията на IAA се отчита по-висок процент вкоренени експланти с по-голям брой на кореновата система, но с ниска дължина.

Ключови думи: *Ruta graveolens L.*, in vitro, микроразмножение

SUMMARY

The Bulgarian flora is a source of plant species, rich in a large set of chemical components - specific substances or groups of compounds that are in limited populations. In the last years of our century, scientists have warned that the loss of biodiversity is increasing. The species *Ruta graveolens L.* is in the Red Book of Bulgaria has the status of „endangered“

The application of the conventional method of propagation of the species is limited due to the difficult germination of the seeds. Factors influencing the cultivation of *Ruta graveolens* L. under controlled storage conditions have been studied. The main nutrient medium is Murashige and Skoog (1962) with added growth regulators are Zeatin, BAP, IAA and NAA in concentrations of 0.2, 0.5 and 1.0 mg / l. The action of BAP is accounted for by the elimination of apical dominance, thus causing the development of lateral buds and beginning the process of proliferation of new explants. As the IAA concentration increases, a higher percentage of rooted explants is reported with a larger number of root systems, but with a shorter length.

Key words: *Ruta graveolens* L., in vitro, micropropagation

УВОД

Българската флора е източник на растителни видове, богати на голям набор химически компоненти – конкретни вещества или групи съединения, които са в ограничени популации. През последните години на нашият век учените алармират, че нараства загубата на биоразнообразието. Това налага събирането и съхраняване на растителните видове.

Видът *Ruta graveolens* L. е в Червената книга на България е със статут „застрашен“. Намира приложение във фармацевтиката и парфюмерията (Baumert et al, 1991; Vitkova, 1998).

Прилагането на конвенционалният метод на размножение на вида е ограничено поради трудното покълване на семената. Навлизането на растителните биотехнологии, в т. ч. и метода *in vitro*, създават предпоставка за ускорено производство на автентичен посадъчен материал.

Проучени са факторите, влияещи върху отглеждането на *Ruta graveolens* L. в контролирани условия и съхраняване от Massot et al (2000). Установили са, че основната хранителна среда за развитие на вида в контролирани условия е Murashige & Skoog (1962). Установени са растежните регулатори необходими на максимално бързото мултиплициране с цел практическа насоченост на вида *Ruta graveolens* L. (Bohidar et al., 2008; et al., Diwan et al., 2008).

Целта е проучване и максимално мултиплициране на вида *Ruta graveolens* L. в контролирани условия чрез прилагане на вегетативни методи на размножение.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Изследванията са проведени в Лабораторията по тъканни култури при Института по растителни и генетични ресурси "Константин Малков" – град Садово. За въвеждане в култура *in vitro* като изходен материал са използвани семена от *Ruta graveolens* L. с произход близо до находище в резерват „Калиакра“.

Растителният материал е заложен в индивидуални епруветки с вместимост 20 ml на среда Murashige and Skoog (1962). Експлантите се пренасят 30 дни след първото култивиране в нова, свежа хранителна среда, съдържаща MS.

Основната хранителна среда е Murashige and Skoog (1962) с добавени растежни регулатори са Zeatin, BAP, IAA и NAA в концентрации от 0.2, 0.5 и 1.0 mg/l.

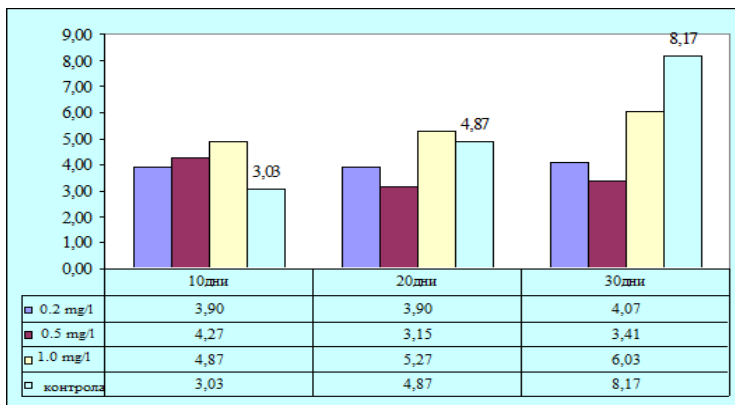
Като въглехидратен източник за основната хранителна среда Murashige and Skoog (1962) е използвана захароза (30 g/l) и агар (7.0 g/l) с рН на средата 5.6. Стерилизацията се извършва за 20 min при 120° C и налягане 0.9 atm. Растенията са поставени във фитостатна камера при 20±22°С и фотопериод 16/8.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

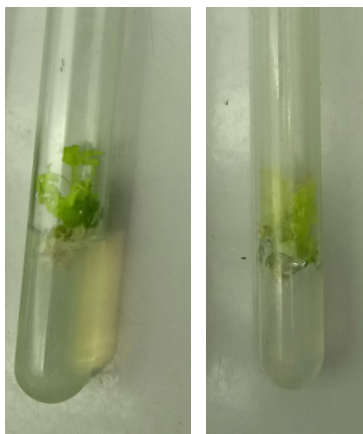
При отчитане на биометричните показатели измерването на ефектът от действието на BAP върху мултипликационния процес при вида *Ruta graveolens* L. се наблюдава след 20-я ден от залагане на опита. Действието BAP се отчита с елиминиране на апикалното доминиране, като по този начин предизвиква развитието на странични пъпки и започва процеса на пролиферация на новите експлантите. Броят на образуваните издънки зависи от вида и концентрацията на прилаганият цитокин. Много добър отговор на вида се наблюдава при вариант с участието на 0.5 mg/l BAP с 85% издънки. Брой издънки от експлант е 3.49 бр. в сравнение с контролата 1.44 бр. Данните показват, че честотата на мултиплициране не затихва за проучвания период. Прилагането на ниски концентрации BAP водят до максимално мултиплициране на вида със стойности превишаващи контролният вариант.

В сравнение с BAP влиянието на Zeatin в концентрации от 0.2, 0.5 и 1.0 mg/l дава оптимална възможност на вида *Ruta graveolens* L. да реализира максималният си потенциал на развитие в контролирани условия. В развитието на експлантите на 10-я ден от наблюдението се

отчита по-голямо листообразуване в концентрация от 1.0 mg/l Zeatin с 4.87 броя, а за контролата тази стойност е значително по-ниска с 3.03 бр. (Фиг.1). От трите проучвани концентрации на цитокинина на 20-я ден в 1.0 mg/l Zeatin се отчитат показатели, надминаващи контролния вариант със стойност 5.27 бр. листа (Фиг.2).



Фиг. 1. Влияние Zeatin в концентрации 0.2, 0.5 и 1.0 mg/l в сравнение с контролния вариант



Фиг. 2. Вариант с участието на 1.0 mg/l Zeatin и контролен вариант

Култивирането на експлантите хранителна среда Murashige and Skoog (1962) участието на IAA оказва благоприятно въздействие на развитие в сравнение с контролния вариант, без отклонение от нормалното им развитие. Добавянето на IAA в минимално количество (0.2 mg/l) се наблюдава разрастване на недиференцирана калусна тъкан, а при

повишаване на концентрацията на този ауксин (1.0 mg/l) се появяват корени сред калуса. Най-голям процент вкоренени растения- 100% с голям брой образували се корени се отчита във вариант с участието на 1.0 mg/l IAA, за разлика от контролният вариант с 50% . **Със завишаване на концентрацията на IAA се отчита по-висок процент вкоренени експланти с по-голям брой на кореновата система, но с ниска дължина.**

Наличие на коренова система започва след 10-я ден от развитието им в хранителната среда Murashige and Skoog (1962) с добавен NAA. Експлантите образуват повече корени и се развиват много по-добре спрямо контролният вариант. От проведените наблюдения на 30-я ден върху развитието на експлантите се откроява вариант с участието на 0.2 mg/l NAA (Фиг.3). След проучване реакцията на вида, към ауксина NAA, се открие концентрация от 0.2 mg/l, с най-високи показатели за развитие.



Фиг. 3. Вариант с участието на 0.2 mg/l NAA и контролен вариант

ИЗВОДИ

От извършеното наблюдение се установи, че ниските концентрации ВАР и NAA водят до максимално мултиплициране на медицинският вид *Ruta graveolens* L.

Литература

1. Bohidar S. M Thirunavoukkarasu, 2008, Effect of Plant Growth Regulators On In Vitro Micropropagation of 'Garden Rue' (*Ruta graveolens* L.), International Journal of Integrative Biology, Vol. 3,

No. 1, 37

2. Baumert A. D., D. Maier, W. Schuman and D. Groger, 1991. Increased accumulation of acridone alkaloids by cell suspension cultures of *Ruta graveolens* in response to elicitors. *J. Plant Physiol.* 139: 223-228
3. Diwan R., N. Malpathak , 2008. Novel technique for scaling up of micropropagated *Ruta graveolens* shoots using liquid culture systems: a step towards commercialization. *New Biotechnol* 25:85–91
4. Massot, B., S. Millesi, E. Goutier, F. Bourgand and A. Gucker, 2000. Optimized culture conditions for the production of furanocoumarins by micropropagated shoots of *Ruta graveolens*, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 62:11-19
5. Vitkova Anna, 1998. Ecological and phytochemical studies of, Dissertation, Sofia, Bulgaria, 1998



ПРОУЧВАНЕ НА МЕСТНИ ГЕНОТИПОВЕ ОТ РОД *ZEA* В ЮЖНА БЪЛГАРИЯ

STUDY OF LOCAL GENOTYPES OF THE GENUS *ZEA* IN SOUTHERN BULGARIA

Албена Пенчева
Институт по растителни генетични ресурси “Константин
Малков”
гр. Садово, България

Albena Pencheva
Institute of plant genetic resources “Konstantin Malkov”
Sadovo town, Bulgaria
E-mail: albena_1172@abv.bg

АБСТРАКТ

Настоящото проучване е изведено в периода 2018-2020 г. в района на град Садово, Южна България. Образците са от групата на средно-ранните царевици (400-500 по ФАО). Изпитването е проведено в рандомизирани полски опити, в две повторения, при големина на опитната парцелка 10 m². Опитът е заложен върху ливадно-канелена смолница, след предшественик пшеница. Проучена е колекция от 14 местни образци царевица с различен географски произход, събрани посредством експедиции в различни райони на България. Направени са биометрични измервания върху някои елементи на добива. Местни образци В0Е0168, В0Е0143 и А9Е0399 се отличават с най-висока стойност (363 g, 330 g и 315 g) на масата на 1000 зърна, а А9Е0399 се откроява и с най-голяма дължина на кочана (22,1cm). Дължината на зърното при три от генотиповете достига до 11 mm. С най-нисък хабитус са растенията на В0Е0168 (162,2 cm). Чрез настоящото проучване бяха установени генотипове с ценни икономически характеристики.

Ключови думи: Генотипове, колекция царевица, експедиции, местни материали

ABSTRACT

The present study was conducted during the period 2018-2020 in the area of the town of Sadovo, Southern Bulgaria. The accessions are from the group of medium-early maize (400-500 according to FAO). The study was performed in randomized field experiments, in duplicate, with a plot size of 10 m². The experiment is based on meadow-cinnamon resinous soil, after its predecessor wheat. A collection of 14 local maize accessions of different geographical origin, collected through expeditions in different regions of Bulgaria, w

as studied. Biometric measurements were made on some elements of the yield. Local accessions B0E0168, B0E0143 and A9E0399 have the highest value (363 g, 330 g and 315 g) of the mass per 1000 grains, and A9E0399 stands out with the largest kernel length (22.1 cm). The grain length in three of the genotypes reaches 11 mm. The plants of B0E0168 (162.2 cm) have the lowest habit. Genotypes with valuable economic characteristics were identified in the present study.

Key words: Genotypes, maize collection, expeditions, local materials

ВЪВЕДЕНИЕ

В нашата страна царевичата е третата по значимост култура след пшеницата и слънчогледа и е предназначена основно за храна на животните под формата на зърно и силаж (Славова, 2015). През последните години се наблюдава значителен интерес към царевичата сред зърнопроизводителите, което се дължи на високия производителен потенциал на културата, спрямо другите зърнени култури, както и на благоприятните маркетингови условия в света.

Предвид нарастващата нужда от хранителни суровини за хора и животни, както и общата тенденция за намаляване на свободната обработваема земя в световен план, от съществено значение е създаването на нови сортове и хибриди фуражни култури, които имат стабилни добиви и същевременно състав с високи хранителни стойности (Ангелов и др., 2009; Böhm et al., 2014). Освен това тенденцията за постепенно повишаване на средногодишните температури налага използването на по-устойчиви на засушаване култури (Иванова и др., 2011).). Необходимостта от отглеждане на стабилни и високодобивни култури, вкл. и царевича е все по-неотложна поради наблюдаваното напоследък изменение на климата, както и ограничените природни ресурси (Anđelković et al., 2014; Peter et al., 2009a, 2009b; Rodrigues et

al., 2010; Romay et al., 2010; Ferro et al., 2007 г.).

Царевицата се нарежда сред фуражните култури с високи добиви и същевременно с ценни качества на зърното - около 9,74% суров протеин; 4,85% сурови мазнини; 9,44% фибри и 71,97% нишесте. Грубите фуражи съдържат около 74,67% фибри; 28,80% целулоза; 40,18% сухо вещество; 26,85% сурови фибри; 10,35% суров протеин и 9,09% влага (Ali et al., 2014b, c; Saif-ul-malook et al., 2014a, b, c).

Освен че е фуражна култура, царевицата има редица ползи за здравето на хората. Царевичното зърно съдържа витамини, особено тиамин и ниацин, и антиоксиданти (витамини С и Е). Царевицата е богата на магнезий, манган, цинк, желязо, мед и селен. Царевичното нишесте се използва като съставка в различни козметични продукти, а високото му съдържание на фибри спомага за контролиране на храносмилането.

Целта на настоящото проучване е да се направи характеристика и подбор на ценни генотипове царевица, отглеждани в условията на Южна България.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Проучването е проведено през периода 2018-2020 г., на територията на община Садово, в централната част на Тракийската низина, на 141 m надморска височина и географски координати: 42°07' северна ширина и 24°56' източна дължина по Гринуич (фиг. 1). Почвеният тип е ливадно-канелена смолница. Образците са заложени в рандомизирани полски опити, по блоков метод и възприета методика за отглеждане на царевица след предшественик пшеница.

Изследователската работа е основана върху Международния класификатор на ВИР (1984 г.), допълнен с показатели от класификатора на UPOV и CIMMYT/IBPGR (www.cimmyt.org).

Характеризирането на фенотипните особености, морфологичните и биологичните признаци е базирано на извършените фенологични наблюдения във фазите: „поникване“, „изметляване“ и „цъфтеж на кочана“. Биометричните измервания са извършени върху 30 растения от всеки образец, а във фаза „стопанска зрелост“ – върху 50 кочана от средната проба. Оценката на добива е извършена при 14%

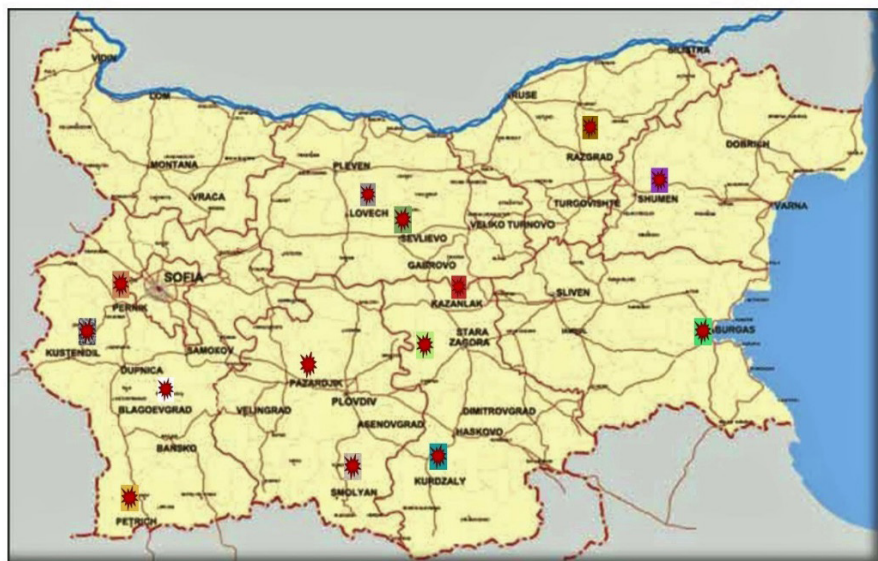
влага (Савченко, 1978).



Фигура 1. Местоположение на гр. Садово в Южна България

РЕЗУЛТАТИ

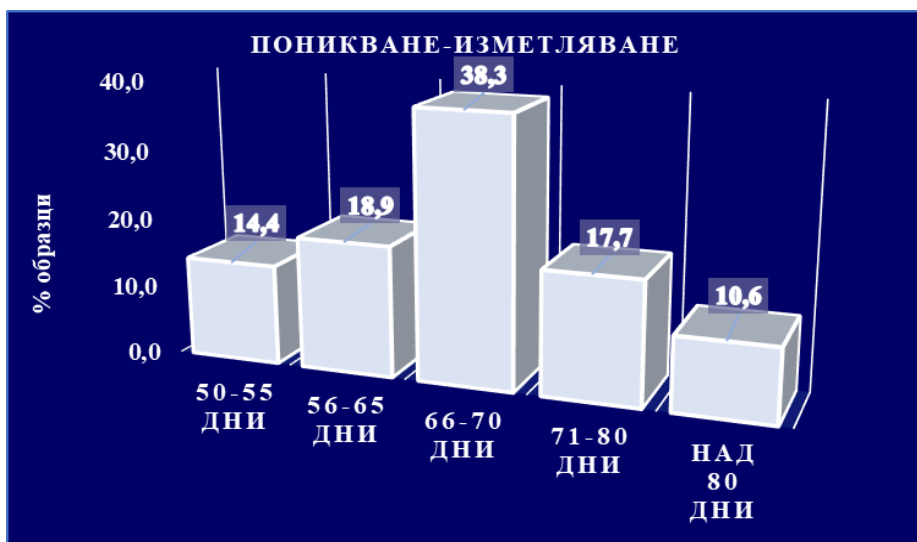
Проучените местни образци царевица са с произход от България и представляват оригинална зародишна плазма. Колекцията, съхранявана в генбанката в ИРГР-Садово се характеризира с голямо разнообразие от местни популации царевица (676 броя). Посредством експедиции са обследвани райони на страната, в които се отглеждат стари сортове, а материалите са предоставени от стопаните за научни изследвания (фиг. 2).



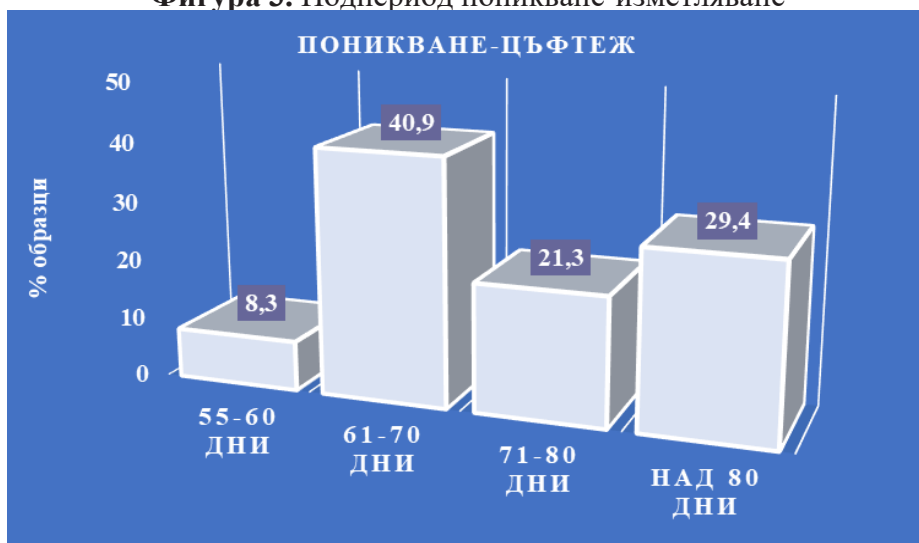
Фигура 2. Райони в България с местни образци царица

Биологичната характеристика е базирана на извършените фенологични наблюдения на междуфазните периоди: „поникване-изметляване” и „поникване-цъфтеж на кочана” (фиг. 3-4). Най-голям процент от образците (38,3%) формираха метлици между 66-70 ден от поникването. Най-ранни са 14,4%, а 10,6% от образците изметлиха след 80-тия ден от поникването. По отношение на подпериод „поникване-цъфтеж на метлицата“ беше установено, че 60,5% от генотиповете отвориха прашец между 60-тия и 80-тия ден от поникването, а 28,9% - след 80-тия ден от поникване.

При подпериод „поникване-цъфтеж на кочана“ беше отчетено, че 40,9% от образците формираха свила до 70-тия ден след поникване. Много малък процент (8,3%) формираха свила между 55-тия и 60 ден от поникване, а 10,6% - след 80-тия ден.



Фигура 3. Подпериод поникване-изметляване



Фигура 4. Подпериод поникване-цъфтеж на кочана

На таблица 1 са представени средните стойности на някои морфологични и стопански признаци при 14 образци царевица. Добивът от единица площ е най-важният количествен показател, който определя продуктивността на растението. От таблицата е видно, че местният образец с каталожен номер А9Е0674 е с най-висок добив (631,70 kg/da). Към групата на този генотип по сходство и с други от изследваните признаци (височина на растението, брой кочани на 1 растение,

дължина и ширина на прикочанния лист) се отнасят също: А9Е0802, А9Е0371 и В0Е0170. Най-голямата група от така изследваните образци включва седем броя, които показват добив средно 451,49 kg/da.

Следващата група включва 4 от образците, формирали най-нисък добив (средно 343,35 kg/da), по отношение на предходните две. Образците в тази група обаче са с високи стойности на признаците дължина на кочана и маса на 1000 зърна. Признакът „маса на 1000 зърна“, в сравнение с предходните 2 групи е с най-висока стойност (средно 291,08 g).

Образец с каталожен номер В0Е0168 се характеризира с най-малка височина на растението (162,2 cm), но с най-висока стойност на признака маса на 1000 зърна (363,0 g). Неголямата височина на растението, съчетана с високи стойности на масата на 1000 зърна определя този образец като ценен генетичен ресурс за селекцията.

Таблица 1. Средни стойности на добив и някои морфологични признаци при местни генотипове царевица за периода 2018/2020 г.

Каталожен №	Височина на растение, cm	Брой кочани на 1 растение	Дължина на лист, cm	Ширина на лист, cm	Дължина на кочан, cm	Брой редове в 1 кочан	Дължина на зърно, mm	Маса на 1000 зърна, g	Добив, kg/da
А9Е0674	181,5	1,2	73,0	9,4	17,8	15,0	8,0	264,3	631,7
В0Е0170	192,8	1,4	67,2	9,7	19,6	12,7	10,0	241,0	565,8
А9Е0802	173,7	1,3	73,0	10,6	17,9	14,7	9,0	231,7	563,7
А9Е0371	175,7	1,2	68,0	10,7	19,3	14,0	10,0	272,3	550,9
А9Е0257	195,8	1,3	68,6	10,0	18,6	12,7	9,0	263,7	473,0
В0Е0143	164,8	1,2	73,9	11,4	18,4	13,3	8,0	314,7	458,1
А9Е0660	171,9	1,2	70,8	9,8	18,9	14,7	11,0	277,3	442,6
74Е3296	171,8	1,3	72,0	10,5	17,8	12,7	11,0	223,7	441,7
74Е3334	194,8	1,3	75,4	9,5	18,5	12,0	10,0	215,0	405,3
А9Е0733	183,3	1,1	67,8	10,4	20,1	11,3	10,0	306,7	380,5
А9Е0744	181,2	1,3	66,4	9,3	19,3	12,0	10,0	246,3	356,0
А8Е0512	163,9	1,1	66,9	9,1	16,3	12,0	11,0	281,3	322,3
А9Е0399	181,7	1,0	68,5	10,2	22,1	11,3	10,0	330,0	314,6
В0Е0168	162,2	1,1	67,9	9,1	16,8	11,3	10,0	363,0	229,7

ОБСЪЖДАНЕ

Генофондът при колекцията от местни образци царевица се характеризира с голямо генетично разнообразие, което се определя от различните райони на произход и биологичен статус на зародишната плазма.

Според ФАО групата и направените фенологични наблюдения върху различните подпериоди, генотиповете царевица бяха определени като средно-ранни (ФАО 400-500).

При местните образци се наблюдава голямо разнообразие, по отношение на цвят и едрина на кочана, цвят и форма на зърното и т.н. Различия се установяват също и по хабитус на растението: височина, брой заложени кочани, параметри на листа (табл. 1) (фиг. 5).

От направеният анализ на база средни стойности на образците е установено, че основният стопански показател е „добив от единица площ“.

По отношение на „признака маса на 1000“ зърна, образците от колекцията се характеризират с висока средна стойност - 269,45 g (табл. 1).

Признакът „дължина на зърното“ също е много важен в стопанско отношение и в проучената извадка показва висока средна стойност (10 mm).



Фигура 5. Местни генотипове царевица – морфологични особености

ИЗВОДИ

Генофондът при царевицата, поддържан в генбанката на ИРГР-Садово се характеризира с голямо генетично разнообразие, по отношение на произход и биологичен статус на зародишната плазма. Оригиналната зародишна плазма е потенциален ресурс за селекционно-подобрителна работа с оглед на ограничаването на генетичната ерозия и промените в климата. Местните образци са ценен ресурс за възвръщане на някои обичаи и традиции в районите на отглеждане и за развитието на биологично земеделие.

Дейностите по обогатяване и поддържане на генофонда са в съответствие с Глобалната стратегия за опазване на растенията 2020 и Конвенцията за биологичното разнообразие.

Литература

1. Ангелов К., С. Вълчинков. 2009. Проучване върху някои стопански качества на хибриди царевица от различни групи по вегетация. II. Продуктивност на хибридите. Растениевъдни науки, 46: 408-411.
2. Иванова М. и кол. 2011. Базово обучение по проблеми на околната среда в земеделието. АИ на ВУАРР, Пловдив. 3-9.
3. Савченко В. 1978. Генетика, № 5, том XIV. Наука, Москва. 793-804.
4. Славова Г. 2015. Производство на царевица в Европа, България и света, възможности и тенденции на развитие. СУ-Варна. 57-64.
5. Ali Q. et al. 2014b. Combining ability analysis for various physiological, grain yield and quality traits of Zea mays L. Life Science Journal 11(8s): 540 – 551.
6. Ali Q. et al. 2014c. Gene action for various grain and fodder quality traits in Zea Mays. Journal of Food and Nutrition Research 2(10): 704 – 717.
7. Anđelković, V., Vančetović, J., Ignjatović-Micić, D., Kravić, N., Obradović, A. and Stanković, S. 2014. V Congress of the Serbian Genetic Society . Book of Papers. Kladovo – Belgrade, Serbia. 28 September-02 October.
8. Böhm J., W. Schopprack, V. Mirdita, H. Friedrich Utz, A.

- Melchinger. 2014. Breeding potential of European flint maize landraces evaluated by their testcross performance. *Crop sci. USA* 54: 1665-1672.
9. Ferro, R.A., I. Bricchette, G. Evgenidis, C. Karamaligkas, and J. Moreno-Gonzalez. 2007. Variability in European maize (*Zea mays* L.) landraces under high and low nitrogen inputs. *Genet. Resour. Crop Evol.* 54: 295-308.
 10. Peter, R., T.W. Eschholz, P. Stamp, and M. Liedgens. 2009a. Early growth of flint maize landraces under cool conditions. *Crop Sci.* 49:169-178 .
 11. Peter, R., T.W. Eschholz, P. Stamp, and M. Liedgens. 2009b. Swiss flint maize landraces – A rich pool of variability for early vigour in cool environments *F. crop. Res.* 110: 157-166.
 12. Rodriguez, V.M., M.C. Romay, A. Ordas, and P. Revilla. 2010. Evaluation of European maize (*Zea mays* L.) germplasm under cold conditions. *Genet. Resour. Crop Evol.* 57:329-335.
 13. Romai, M.C., R.A. Malvar, L. Campo, A. Alvarez, J. Moreno-Gonzalez, A. Ordas, and P. Revilla. 2010. Climatic and genotypic effects for grain yield in maize under stress conditions. *Crop Sci.* 50:51-58.
 14. Saif-ul-malook, Ahsan M., Ali Q. & Mumtaz A. 2014a. Genetic variability of maize genotypes under water stress and normal conditions. *Researcher* 6: 31 – 37.
 15. Saif-ul-malook, Ahsan M., Ali Q. & Mumtaz A. 2014b. Inheritance of yield Related traits in maize under normal and drought condition. *Nature and Science* 12:36–49.
 16. Saif-ul-malook, Ali Q., Muhammad A., Aamer M. & Muhammad S. 2014c. An overview of conventional breeding for drought tolerance in *Zea mays*. *Nature and Science* 12: 7 – 22.



НАСЕКОМИТЕ - АЛТЕРНАТИВЕН ХРАНИТЕЛЕН ИЗТОЧНИК

д-р Иван Генчев*, проф. д-р Тодор Стоянчев, д.в.м.**

*Българска агенция по безопасност на храните, бул., Пенчо Славейков“ № 15А, гр. София, България

**Тракийски университет, Ветеринарномедицински факултет, Студентски град 6015, гр. Стара Загора, България
E-mail: drgenchev@gmail.com; todor.stoyanchev@trakia-uni.bg

РЕЗЮМЕ

Използването на насекомите като алтернативен хранителен източник може да се третира като „храната на бъдещето“ в Европа, въпреки че консумацията на повече от 1900 вида годни за консумация насекоми е залегнала в националните кухни на редица държави по света. Производството им има висока ефективност в сравнение с традиционните източници на протеини. Те са добри източници на микроелементи и витамини. Хранителната стойност на насекомите годни за човешка консумация е много разнообразна главно поради големия брой и разнообразие на видовете. Тя може да варира значително в зависимост от етапа на метаморфоза, произхода на насекомото и диетата му и се променя в зависимост от подготовката и преработката преди консумация. Храненето с насекоми може да представлява определени рискове, които трябва да се вземат предвид: микроорганизми, паразити, остатъци от пестициди и алергени. Въпреки това те могат да се използват успешно при производството на месни продукти, но проучванията в тази насока продължават. Ключови думи: Насекоми, протеин, храна, риск, месни продукти.

SUMMARY

The use of insects as an alternative food source can be treated as „the food of future“ in Europe, although the consumption of more than 1,900 species of edible insects is embedded in the national cuisines of many countries around the world. Their production is highly efficient compared to traditional sources of protein. They are good sources of micro elements and

vitamins. The nutritional value of insects suitable for human consumption is very diverse mainly due to the large number and diversity of species. It can vary considerably depending on the stage of metamorphosis, the origin of the insect and its diet and changes depending on the preparation and processing before consumption. Insects as a food can pose certain risks that need to be considered: microorganisms, parasites, pesticide residues and allergens. However, they can be used successfully in the meat products production, but research in this area continues.

Key words: Insects, protein, food, risk, meat products.

ВЪВЕДЕНИЕ

Хранителните загуби и хранителните отпадъци се признават за сериозна заплаха за продоволствената сигурност, икономиката и околната среда. По данни на FAO приблизително една трета от цялата храна, произведена за консумация от човека (1,3 милиарда тона годни за консумация храни), се губи и пропилява през цялата верига на доставки всяка година. Паричната стойност на генерираните загуби се изчислява на около 936 милиарда долара, независимо от социалните и екологичните разходи за отпадъци, които се плащат от обществото като цяло. Количеството на хранителните загуби и хранителните отпадъци е достатъчно за облекчаване на една осма от световното население от недохранване и справяне с глобалното предизвикателство за задоволяване на нарасналото търсене на храни, което може да достигне около 150–170% от настоящото търсене до 2050 г. (Ishangulyyev, R. et al., 2019)

Една от водещите алтернативи за задоволяване на нарасналото търсене на храни е използването на насекоми. Насекомите за човешка консумация съдържат висококачествени протеини, витамини и аминокиселини за хората. Те имат висок процент на продуктивност, например щурците се нуждаят от шест пъти по-малко фураж от говедата, четири пъти по-малко от овцете и два пъти по-малко от прасетата и пилетата бройлери, за да произведат същото количество протеин. Насекомите могат да се отглеждат върху органични отпадъци, отделяйки по-малко парникови газове и амоняк от продуктивните животни. Следователно те са потенциален източник на протеини за директна консумация от човека или косвено като добавка в храните (извлечен протеин от насекоми). (FAO et al., 2020)

Производството на насекоми за човешка консумация е все

още проходящ отрасъл в държавите членки на Европейския съюз (ЕС) и е пряко свързано с прилагането на Регламент (ЕС) 2015/2283 на Европейския парламент и на Съвета от 25 ноември 2015 година относно новите храни, за изменение на Регламент (ЕС) № 1169/2011 на Европейския парламент и на Съвета и за отмяна на Регламент (ЕО) № 258/97 на Европейския парламент и на Съвета и на Регламент (ЕО) № 1852/2001 на Комисията (Регламент (ЕС) 2015/2283). До момента по предложение на Европейската комисия (ЕК) за човешка консумация е одобрена само ларвната форма на брашнените бръмбари, известна още като брашнен червей. Това е първата стъпка към развитието на отглеждането на насекоми, които могат да се третират като „храната на бъдещето“ в Европа, въпреки че консумацията на повече от 1900 вида годни за консумация насекоми е залегнала в националните кухни на редица държави по света.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Преимущества на насекомите годни за човешка консумация

Производството на насекоми годни за човешка консумация има висока ефективност при използването на площи за отглеждане в сравнение с традиционните източници на протеини. Всъщност са необходими два до десет пъти по-малко земеделска земя, за да се произведе един килограм годен за консумация протеин от насекоми в сравнение с един килограм протеин от прасета или говеда. Друга причина, която определя насекомите за устойчив източник на протеини е факта, че те могат да се отглеждат през цялата година, по-голямата част от тялото им е годна за консумация, имат висока плодовитост и темпове на растеж и ефективно превръщат субстратите си в телесна маса. Изчислено е, че до 80 % от тялото на щурец е годно за консумация в сравнение с 55 % от това на пиле или прасе и 40 % на крава. Проучванията показват, че щурците са два пъти по-ефективни от домашните птици при превръщането на фуражите в протеини и те са четири пъти по-ефективни от свинете и дванадесет пъти по-ефективни говедата. Освен това насекомите могат да се отглеждат в малки пространства, което ги прави универсални по отношение на условия за отглеждане, независимо дали това се извършва в селска или градска среда.

Установено е, че насекомите са богати на протеини (сухо вещество), диетични фибри и полезни мастни киселини. Те са

добри източници на микроелементи като желязо, магнезий, манган, фосфор, селен и цинк, но все още няма достатъчно информация за бионаличността на тези микроелементи. В тях се съдържат витамините рибофлавин (B2), пантотенова киселина (B5), биотин (B7) и в някои случаи фолиева киселина (B9). Хранителният състав на различните видове насекоми годни за човешка консумация е много разнообразен. Той зависи от различни фактори като качеството на техните субстрати, етапа на развитие и факторите на околната среда. Освен хранителното съдържание, важно значение има и качеството на хранителните вещества, присъстващи в насекомите. (FAO et al., 2021)

В контекста на нарастващия интерес към насекомите годни за човешка консумация на европейския пазар е обърнато внимание на политиките на ЕС в тази насока. Очакванията са много видове насекоми да бъдат включени в Регламент (ЕС) № 2015/2283 след като преминат процедурата по разрешение преди пускането им на пазара. Това се подпомага от нарастващото търсене на високо протеинови храни за спортисти, диетични храни или хранителни добавки и създава допълнителни възможности за сектора. Насекомите предоставят много възможности и могат да бъдат включени в храните директно като сварени, пържени или изсушени, преработени в гранулиран прах или паста за увеличаване на хранителната стойност. За тази цел към хранителните продукти могат да се добавят съставки, получени от насекоми, като протеин на прах и екстракти. Понастоящем най-високият пазарен дял е представен от цели насекоми (близо 1/4 от продуктите на пазара), последвани от протеинови барове, снаксове, специални хранителни съставки и тестени изделия. Очакванията са до 2025 г. специалните хранителни съставки да покрият близо 1/5 от пазара, като снаксовете и протеиновите барове остават на 2-ро и 3-то място по отношение на пазарния дял. Благодарение на високия темп на растеж (2020 срещу 2025 г.), месните продукти и функционалните храни (храни осигуряващи допълнителни хранителни вещества - витамини и минерали, сравнени с конвенционалните храни) ще заемат 4-то и 5-то място по пазарен дял през 2025 г., въпреки че представляват малък дял от настоящия пазар и ще имат най-висок темп на растеж (Таблица № 1):

Таблица № 1

Растеж на пазарния дял на различни храни до 2025 г.

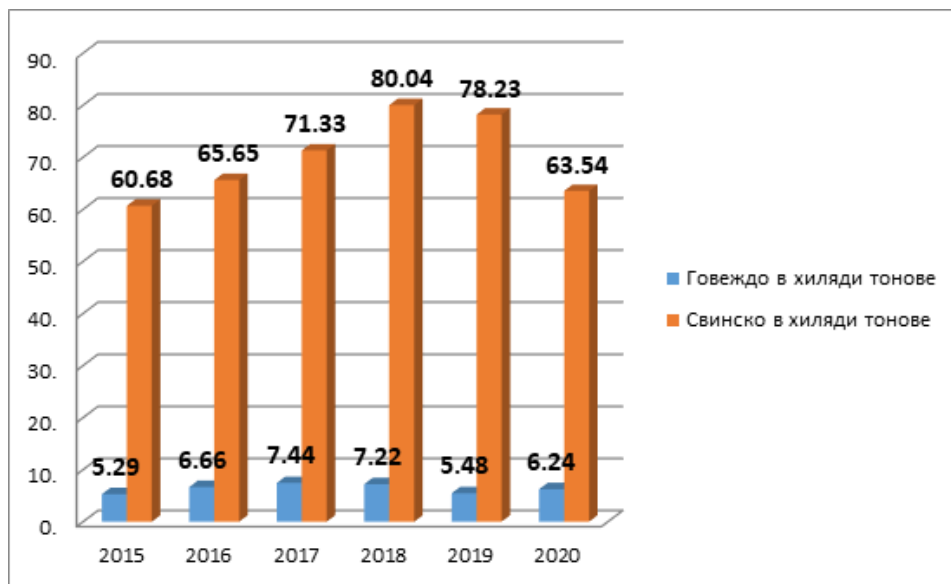
Вид храна	Пазарен дял до 2025 г.
Прясно месо и морска храна	83 %
Функционални храни	75 %
Печива	55 %
Месни продукти	46 %

Този бърз растеж ще увеличи пазарния дял на тези четири категории, взети заедно достигайки повече от една трета до 2025 г. (от около 17% през 2020 г.). Прогнозата за потенциална промяна в представянето на продуктите до 2025 г. се дължи на приемането от потребителите, промяната в социокултурните аспекти (т.е. нарастващото търсене на аналози на месо) и търсенето на продукти. Новите разрешения за храни ще играят конструктивна роля при формирането на пазара, улеснявайки достъпа до продукти на базата на насекоми в страни, където търсенето на функционална храна, тестени изделия или аналози на месо като цяло е голямо. (IPIFF et al., 2020)

Тенденцията за увеличаване на производството на месо от говеда и свине се наблюдава и на българския пазар. При направен анализ на публикуваните данни от Eurostat за периода от 2015 г. до 2020 г. се наблюдава запазване на добива с лек спад през 2019 г. и 2020 г., което може да се дължи на ограничаване на производството и преработката поради разрастването на COVID 19 кризата (Фигура № 1).

Фигура № 1

Добив на говеждо и свинско месо в Република България за периода от 2015 г. до 2020 г.



За периода 2015-2020 г. в ЕС са добити 41227,7 хиляди тона говеждо месо и 136035,7 хиляди тона свинско месо. В Република България за същия период са добити 38,33 хиляди тона говеждо месо и 419,47 хиляди тона свинско месо. Съпоставяйки данните за България с добитите количества в ЕС се установява, че пазарният дял на българско говеждо месо е 0,09 %, а на българско свинско месо е 0,31 %. Тези показатели показват, че производството на свинско и говеждо месо в Република България нараства с бавни темпове и те не са достатъчни, за да бъдат достигнати средните нива за ЕС. Въпреки това увеличаващият се интерес в Европа към насекомите годни за човешка консумация може да спомогне за стартирането на нова пазарна ниша. Използването на малка площ за отглеждане и последващото им преработване за добиване на годен за консумация протеин е много добър показател за развитието на този отрасъл в България. Високата ефективност на насекомите да превръщат субстратите си в телесна маса изхранвайки се отпадъци от храни, в

повечето случаи от растителен произход, ще спомогне бързо да бъдат достигнати средните нива на развитие на компаниите в бранша и възможността им да бъдат конкурентни на европейския пазар.

Хранителен състав на насекомите годни за човешка консумация

Хранителната стойност на насекомите годни за човешка консумация е много разнообразна главно поради големия брой и разнообразие на видовете. Тя може да варира значително в зависимост от етапа на метаморфоза, произхода на насекомото и диетата му. Хранителната стойност се променя и в зависимост от подготовката и преработката преди консумация (сушене, готвене, пържене и др.). Хранителните стойности на някои насекоми (щурци, брашнен червей и др.) са значително по-здравословни в сравнение с говеждо и пилешко месо. Повечето насекоми годни за човешка консумация осигуряват достатъчен прием на енергия и протеини в диетата на консуматорите и не на последно място задоволяват приема на аминокиселини. При тях се наблюдава високо съдържание на моно- и полиненаситени мастни киселини и богато съдържание на микроелементи и витамини.

Енергийната стойност на годни за консумация насекоми зависи от техния състав, главно от съдържанието на мазнини. Ларвите или какавидите обикновено са по-богати на енергия в сравнение с възрастните. Обратно, високопротеиновите насекоми имат по-ниско енергийно съдържание. (Kouřimská, L. et al., 2016)

Интересен факт е, че при изхранването на ларвата на черната войнишка муха (Black soldier fly; *Hermetia illucens*) (BSFL) с отпадъци от зеленчуци не се наблюдава значително повлияване на профилиите на мастните киселини в получената от нея храна. Ефектите не винаги са линейни, например експеримент, използващ смеси от хранителни отпадъци с известен протеинов/мастен състав, установява, че използването на повече протеини води до по-протеинови BSFL, но процентът на мазнини в субстрата не корелира с процентите на ларвни мазнини. Тук може да се отбележи, че корекцията за наличието на хитин, може да повлияе на отчитането на резултатите, намалява се процента на протеините с 2–5%.

Въпреки това разнообразие, всички стойности последователно сочат BSFL като добър източник на протеини и липиди, средно $40,8 \pm 3,8\%$ протеини и $28,6 \pm 8,6\%$ мазнини (Таблица № 2).

Таблица № 2

Среден % суров протеин (не коригиран с хитин) и % мазнина (екстракт от етер) на сухо тегло на брашно от BSFL, като се използват средни стойности.

Диета или източник	% Протеини	% Мазнини
Странични животински продукти отпаднали при производството на храни	38-46	21-35
Растителни отпадъци	39,9	37,1

Констатациите запазват позицията на BSFL сред другите насекоми като възможен алтернативен източник на протеини. Интересен е факта, че обезмасленото брашно от BSFL може да има нива на суров протеин над 60% в сравнение с други храни от насекоми, а по-ниските проценти на мазнини намалява опасенията за наличието на наситени мазнини. Технологиата, необходима за частично обезмасляване, може да бъде толкова проста, колкото механичното пресоване на ларвите преди смилането им и това я прави достъпна за развиващите се световни икономики. (Wang, Y. et al., 2017)

Рискове при насекомите годни за човешка консумация

Храненето с насекоми може да представлява определени рискове, които трябва да се вземат предвид. Голямото разнообразие от насекоми в дивата природа може да създаде сериозна намеса за ландшафтната екосистема. Поради това се препоръчва да се консумират насекоми, отглеждани във ферми в контролирани и определени условия. Следователно последващата здравна безопасност на годни за консумация насекоми се гарантира чрез избора на подходящ и безопасен фураж. Резултатите от анализите показват възможни рискове от ядене на насекоми, например хранени с трици, съдържащи по-висока концентрация на тежки метали. Някои насекоми могат да съдържат и естествено присъстващи токсични вещества като цианогенни гликозиди. Други възможни рискове от консумацията на годни за консумация насекоми са яденето на неподходящи етапи на развитие на насекомите, лошото боравене и

кулинарната обработка. Консумацията на скакалци без премахване на краката им може да доведе до запушване на червата, което от своя страна да доведе фатални последици. Яденето на насекоми също може да причини алергии. Днес, поради липсата на храна, съдържаща хитин, има дефицит на ензима хитиназа, който разцепва хитина. Някои хора имат толкова малко количество от този ензим, че консумацията на насекоми може да предизвика алергична реакция при тях. Най-застрашени са хората, които са алергични към морски дарове, като скариди. (Kouřimská, L. et al., 2016)

Няколко бактериални вида са свързани с годни за консумация насекоми. Те включват видове от родовете *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Lactobacillus*, *Erwinia*, *Clostridium* и *Acinetobacter*, както и членове на семейство *Enterobacteriaceae*. Някои членове на тези родове и семейство са не само патогенни и опортюнистични бактерии, но те също могат да бъдат отговорни за намаляване на срока на годност на годни за консумация насекоми.

Наличието на ендоспорообразуващи бактерии в годни за консумация насекоми е друг основен проблем за безопасността на храните, тъй като спорите са устойчиви на топлина и могат да издържат на общите методи за обработка, като сушене, варене и пържене в дълбочина. Спорообразуващи бактерии като *Bacillus cereus sensu stricto (s.s.)*, *B. cytotoxicus*, *B. weihenstephanensis* и *Clostridium thermopalmarium* са открити в преработени годни за консумация жълти брашнени червеи, скакалци и домашни шурци. Някои *B. cereus* включват и психротрофни шамове. Следователно, неправилното охлаждане след термична обработка на насекомите може да улесни условията за покълване на спорите, което позволява на *B. cereus* да се размножава и да произвежда токсини. Други смъртоносни токсини, образуващи спори бактерии като *Clostridium sordellii* също са идентифицирани при годни за консумация насекоми. (FAO et al., 2021)

Тъй като повечето изследвания са фокусирани върху въпросите за развитието и потреблението на BSFL се знае малко за тяхната безопасност или сигурност като храна. Въпреки че малко насекоми изглеждат вредни, когато се консумират, като се оставят алергени настрана. Отбелязано е, че BSFL намалява микробното натоварване на субстратите, като преработените компости показват

по-ниски концентрации на бактериофаги и бактерии като *Salmonella enteritidis* и *Enterococcus coli*. Самите ларви обаче могат да се заразят с тези бактерии, ако се държат върху замърсен субстрат твърде дълго. Данните за други насекоми, хранещи се с растения, предполагат, че *Enterobacteriaceae* са проблем със сурови насекоми и има данни за смърт причинена от *Clostridium botulinum* поради неправилно съхранение на термити в Кения. Дезактивацията на евентуално наличие на микроорганизми в събрани BSFL трябва да бъде включена във всеки план за производствено съоръжение в промишлен мащаб. Смилането на насекомите и последващото им нагриване, изсушаване, UV обработка, високоенергийно микровълново облъчване, пастьоризиране или подкиселяване ги предпазва срещу микроби, паразити и бактериални спори и намалява вероятността от микробно замърсяване спрямо целите, непреработени такива. (Wang, Y. et al., 2017)

Досега доказаните рискове, свързани с вирусите, пренасяни с храна, като хепатит А, хепатит Е и норовирус от консумацията на годни за консумация насекоми са ниски. Те потенциално могат да служат като репликативни вектори за вируси, които заразяват гръбначни животни. Необходими са допълнителни проучвания, за да се проучи възможната поява и предаване на арбовируси, пренасяни от членестоноги, които могат да причинят редица болести при човека чрез годни за консумация насекоми.

Различните видове насекоми, годни за човешка консумация, могат да бъдат вектори за паразити и тази опасност трябва да бъде взета под внимание. Паразитните рискове, които могат да засегнат хората, са слабо документирани, но въз основа на данни, събрани от аутопсии на хора и анализи на насекоми, традиционно консумирани в Югоизточна Азия, се предполага възможното предаване на чревни метили. Документирани са случаи на предаване и на някои видове протозои като *Entamoeba histolytica*, *Balantidium spp.*, *Iso spor a spp.*, *Giardia lamblia*, *Toxoplasma spp.* и *Sarcocystis spp.* Наблюдавани са случаи на чревни миази при хора, които са консумирали ларви на BSFL, отглеждани на зрели и немити плодове. Насекомите годни за човешка консумация също могат да бъдат потенциални вектори за *Cryptosporidium spp.* и *Trypanosoma cruzi*.

Пестицидите използвани за селскостопанска продукция, могат да се натрупват в насекоми, които се отглеждат върху третирани

растителни отпадъци. Изследванията за хранене показват, че жълтите брашнени червеи могат да натрупват, разграждат, енантиомеризират и отделят няколко хирални фунгициди като металаксил, миклобутанил, диниконазол, епоксиконазол и беналаксил. Хлорпирифос е идентифициран в проби от домашни мухи, макар и на нива, които не представляват риск за потребителите. (FAO et al., 2021)

Откриването на алергени от BSFL е проблем за безопасността на потребителите и това е проблем, който трябва да бъде взет под внимание и напълно проучен. Към момента има данни за случаи на алергични реакции при поглъщане на обикновения хранителен оцветител на базата на насекоми, карминово багрило (E 120), получено от Кохинил (*Dactylopius coccus Costa*). В Китай, където яденето на какавиди от копринена буба е нормална хранителна практика, има съобщения за случаи на алергични реакции при консумация на какавиди с вариации в тежестта на реакциите. При контролирани кожни тестове за чувствителност, протеинови екстракти, изолирани от седем вида насекоми, показват, че 30% от преди това алергичните пациенти и 25% от неалергичните пациенти са показали чувствителност към поне един екстракт. Пациентите в това проучване не са били консуматори на насекоми и се предполага, че чувствителността на пациентите е в резултат на предишно излагане на вдишване, физически контакт с алергени от насекоми или чрез случайна консумация. Тропомиозинът е основният пан алерген, идентифициран при BSFL и ракообразните, което показва повишена вероятност потребителите, които са алергични към тропомиозин при ракообразните, да изпитат алергии при консумация на BSFL. Друг пан алерген, разпространен при много видове насекоми, е аргинин киназата, която е открита в много разновидности скариди и в брашнения червей (*Alphitobius diaperinus*), щурец (*Gryllus bimaculatus*), ларви на копринена буба (*Bombyx mori*), немската хлебарка (*Blattella germanica*) и индийският брашнен молец (*Plodia interpunctella*). Проучванията са доказали, че аргинин киназата не е идентифицирана като основен пан алерген в BSFL, но е установено наличието и в протеинов екстракт. Поради тази причина пациентите, за които има риск от алергия трябва да консумират продуктите с BSFL с повишено внимание.

Няколко проучвания показват, че някои алергенни протеини са устойчиви на топлинна обработка или смилане, докато други са лесно инактивирани. В някои случаи топлинната обработка може да

засили алергенността на някои протеини. При нагряване на екстракти от хлебарки не се елиминират алергичните реакции и протеините все още показват положителни реакции при тестовете за чувствителност на кожата. Извършването на термична обработка на брашнени червеи води до намаляване на алергичните реакции. Това се наблюдава и при хидролиза на протеини от щурци. Не на последно място трябва да се обърне внимание, че клиничният ефект при хора, които са консумирали хитин все още изисква допълнителни изследвания. (Bessa, L. et al., 2020)

Приложение на насекомите годни за човешка консумация при производството на месни продукти

При производството на месни продукти се търсят различни подходи за да се подобрят хранителните им стойности и вкусовите им качества. Алтернатива на използваните като добавка в храните традиционни животински протеини е влагането на насекоми годни за човешка консумация. Пример за това е производството на бургери с използването на различен процент от насекоми, но понастоящем няма изследвания за използването на ларви от BSFL в емулгирани месни продукти. Направени са проучвания, с които се доказва, че в емулгирани месни продукти може да бъде добавено брашно от щурци като частичен заместител на месо. Притеснението при използването на ларви на BSFL като алтернативен източник на протеин във Виенска наденица, е потенциалният отрицателен ефект върху текстурата поради липсата на месни протеини и сравнението с традиционното свинско месо. Установено е, че наденичките с BSFL нямат всички характеристики на свинските колбаси, но се наблюдава добро сравнение по отношение на съдържанието на протеини и възприеманата от потребителите консистенция. По отношение на срока на годност все още има необходимост от допълнителни проучвания, но с течение на времето това би допринесло за използването на BSFL като алтернатива на месото. (Bessa, L. et al., 2019)

РЕЗУЛТАТИ

Процентното съдържание на суров протеин варира в зависимост от разреда, семейството и от стадия на развитие на насекомите. При разред Бръмбари (*Cleoptera*) по данни на FAO обхваща на протеините може да варира от 23 % до 66 % (FAO et al., 2013). Проучванията

показват, че изчисленото средно количество протеин в сухото вещество е 40,69 % (Rumpold, B. et al. 2015). Разликите в протеинното съдържание при различни видове от разред Бръмбари (*Cleoptera*) може да се види при направената сравнителна характеристика (Таблица № 3).

Таблица № 3

Сравнителна характеристика на съдържанието на протеин при различни видове от разред Бръмбари (*Cleoptera*)

Вид	Стадий на развитие	% протеини	Справка
Разред Бръмбари (<i>Coleoptera</i>)		40,69	Rumpold, B. et al. 2015
<i>Tenebrio molitor</i>	Ларва	46,44	Ravzanaadii, N. et al. 2012
<i>Tenebrio molitor</i>	Имаго	63,34	Ravzanaadii, N. et al. 2012
<i>Heteroligus meles</i>		38,10	Jonathan, A. et al. 2012
<i>Rhynchophorus phoenicis</i>		50,01	Jonathan, A. et al. 2012
<i>Allomyrina dichotoma</i>	Ларва	54,18	Ghosha, S. et al. 2017
<i>Protaetia brevitarsis</i>	Ларва	44,23	Ghosha, S. et al. 2017
<i>Analeptes trifasciata</i>		29,62	Banjo, A. et al. 2005
<i>Oryctes boas</i>		26,00	Banjo, A. et al. 2005

Същите показатели се наблюдават и при разред Правокрили (*Orthoptera*). При тях по данни на FAO обхвата на протеините може да варира от 23 % до 65 %. (FAO et al., 2013), а изчисленото средно количество протеин в сухото вещество е 61,32 %. (Rumpold, B. et al. 2015). Разликите в протеинното съдържание при различни видове от разред Правокрили (*Orthoptera*) може да се види при направената сравнителна характеристика (Таблица № 4).

Таблица № 4

Сравнителна характеристика на съдържанието на протеин при различни видове от разред Правокрили (*Orthoptera*)

Вид	Стадий на развитие	% протеини	Справка
Разред Правокрили (<i>Orthoptera</i>)		61,32	Rumpold, B. et al. 2015
<i>Teleogryllus emma</i>	Имаго	55,65	Ghosh, S. et al. 2017
<i>Gryllus bimaculatus</i>	Имаго	58,32	Ghosh, S. et al. 2017
<i>Brachytrypes spp.</i>		6,25	Banjo, A. et al. 2005
<i>Zonocerus variegatus</i>		26,8	Banjo, A. et al. 2005

Сравнявайки средните данни за разред Бръмбари (*Cleoptera*) и средните данни за разред Правокрили (*Orthoptera*) може да се направи извода, че разред Правокрили са по-ефективен източник на протеини. Въпреки това не трябва да бъдат пренебрегвани стойностите при различните видове. Пример за това е съществената разлика в процента на протеините при *Tenebrio molitor* и *Brachytrypes spp.*

ОБСЪЖДАНЕ

Насекомите са много добър източник на протеини и са алтернатива на конвенционалните храни. Добива им е значително по-екологичен в сравнение с продуктивните животни, поради бързото им развитие и малкото пространство необходимо за тяхното отглеждане. Въпреки това консумацията им представлява известен риск за определена група от консуматорите поради факта, че са алерген. Проучванията са доказали и други възможни опасности като: развитието на патогенни микроорганизми, откриване на остатъци от пестициди, евентуално развитие на паразити и др.

В Европа се търсят все повече алтернативи за използването на насекомите годни за човешка консумация като добавка в храните, замествайки традиционните животински протеини, въпреки че нивото на суров протеин варира в зависимост от разреда, семейството и от

стадия им на развитие. Това се доказва и с направените сравнителни анализи.

ИЗВОДИ

При използването на насекомите за човешка консумация като алтернативен хранителен източник се дава възможност за подкрепа на държавните решения насочени към икономика основана на знанието и конкурентоспособна биоикономика с оползотворяване на алтернативните протеинни източници и доказване на приложимостта на енергийните източници на продукти от безотпадни технологии в България. Високата им ефективност да превръщат субстратите си в телесна маса изхранвайки се отпадъци от храни, в повечето случаи от растителен произход, ще спомогне бързо да бъдат достигнати средните нива на развитие на компаниите в бранша и възможността им да бъдат конкурентни на европейския пазар.

Литература

1. Banjo, A.; Lawall, O.; Songonuga, E.; 2006. The nutritional value of fourteen species of edible insects in southwestern Nigeria. *African Journal of Biotechnology Vol. 5 (3), 298-301*;
2. Bessa, L.; Pieterse, E.; Marais, J.; Hoffman, L.; 2020. Why for feed and not for human consumption? The black soldier fly larvae. *Compr Rev Food Sci Food Saf., 2747-2763*;
3. Bessa, L.; Pieterse, E.; Sigge, G.; Hoffman, L.; 2019. An exploratory study into the use of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae in the production of a Vienna-style sausage. *Meat and Muscle Biology, 3(1): 289-298*;
4. FAO. 2013. Edible insects: future prospects for food and feed security. *1-187*;
5. FAO; 2021. Looking at edible insects from a food safety perspective. Challenges and opportunities for the sector. <https://doi.org/10.4060/cb4094en>. *1-90*;
6. Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2020. Insects for food and feed. <http://www.fao.org/edible-insects/en/>;
7. Ghosha, S.; Leeb, S.; Jungb, C.; Meyer-Rochowc, V.B.; 2017.

Nutritional composition of five commercial edible insects in South Korea. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 20 686–694;

8. IPIFF; 2020. Edible insects on the European market. <https://ipiff.org/wp-content/uploads/2020/06/10-06-2020-IPIFF-edible-insects-market-factsheet.pdf>;
9. Ishangulyyev,R.; Kim, S.;Lee, S.; 2019. Understanding food loss and waste—Why are we losing and wasting food? *Foods* 8(8):297. 1-23;
10. Jonathan, A.; 2012. Proximate and anti-nutritional composition of two common edible insects: yam beetle (*Heteroligus meles*) and palm weevil (*Rhynchophorus phoenicis*). *Adesina Adeolu Jonathan/ Elixir Food Science* 49, 9782-9786;
11. Kouřimská, L.;Adámková, A.; 2016. Nutritional and sensory quality of edible insects. *NFS Journal* 4, 22–26;
12. Ravzanaadii, N.; Kim, S.; Choi, W.; Hong, S.; Kim, N.; 2012. Nutritional Value of Mealworm, *Tenebrio molitor* as Food Source. *International Journal of Industrial Entomology*, Vol. 25, 93-98;
13. Rumpold, B.; Schlüter, O.; 2015. Insect-based protein sources and their potential for human consumption: Nutritional composition and processing. *Animal Frontiers*, 20-24;
14. Wang,Y.; Shelomi, M.; 2017. Review of Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) as animal feed and human food. *Foods*,1-23;

.....

ХАРАКТЕРИСТИКА НА ОБРАЗЦИ ДИВ ЕДНОЗЪРНЕСТ ЛИМЕЦ *TRITICUM BOEOTICUM BOISS*

CHARACTERISTICS OF ACCESSIONS OF WILD EINKORN WHEAT *TRITICUM BOEOTICUM BOISS*

Божидар Къосев, Евгения Вълчинова, Гергана Дешева
Институт по Растителни Генетични Ресурси, 4122 Садово, ул.
Дружба 2

Bozhidar Kyosev, Evgeniya Valchinova, Gergana Desheva
Institute of Plant Genetic Resources, 4122 Sadovo, 2 Druzhba str.
E-mail b_kyosev@abv.bg

РЕЗЮМЕ

Целта на изследването е да се оценят морфологичните, биологичните и агрономически характеристики на оригинална зародишна плазма от див еднозърнест лемец (*Triticum boeoticum* Boiss.), поддържана в *ex situ* колекцията на Националната генбанка на България. Четиридесет и шест образци са проучени в експерименталното поле на ИРГР - гр. Садово, през периода 2016-2018. Образците са засявани ръчно по блокова схема в 3 повторения с големина на опитната парцела от 1 m² и посевна норма от 450 к.с./m². Морфологичната характеристика на образците е извършена чрез използване на Международен класификатор за род *Triticum*. Извършени са биометрични измервания по 10 показателя определящи структурните елементи на добива, както и наблюдения за установяване настъпването на основните фенофази от развитието на растенията. Анализираният номера от див еднозърнест лемец се различават съществено по морфологичните показатели свързани с положението на флаговият лист, положението на класа и степента на окосменост на класа. Дължината на вегетационният период изчислена от 1 януари до фаза пълно изкласяване на растенията варира от 138 до 149 дни. Най-раннозрял е образец В6Е0404А, а с най-дълъг вегетационен период е образец В6Е0418А. Установено е, че относително най-вариабилен показател е добивът на зърно от 1 m², следван от брой класове от 1 m², тегло на класове от растение, тегло на централен клас и тегло на

зърната от централен клас. С най-висок добивен потенциал от 1 m² се характеризират В6Е0390, В6Е0391, В6Е0382 (*Triticum boeoticum* Boiss.). Създадена е база данни с морфологична и агробиологична оценка на проучваните образци.

Ключови думи: див еднозърнест лимец, морфологична, биологична, агрономическа характеристика, *Triticum boeoticum* Boiss.

ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate the morphological, biological and agronomic characteristics of original germplasm from wild einkorn wheat (*Triticum boeoticum* Boiss.), maintained in the *ex situ* collection of the National Genbank of Bulgaria. Forty-six accessions were studied in the experimental field of IPGR - Sadovo, in the period 2016-2018. The accessions were sown manually according to a block scheme in 3 repetitions with the size of the experimental plot of 1 m² and sowing rate of 450 germination seeds / m². The morphological characteristics of the accessions were taken using the International Descriptor for the genus *Triticum*. Biometric measurements were performed on 10 characters determining the structural elements of the yield, as well as observations to establish the occurrence of the main phenophases of plants development. The analyzed accessions of wild einkorn wheat differ significantly in morphological traits related to the flag leaf attitude, the spike attitude and the glumes-pubescence. The length of the vegetation period, calculated from 1 January to the heading phase, varied from 138 to 149 days. The earliest is the В6Е0404А, and the longest was В6Е0418А. It was found, that the relatively most variable character was the grain yield per 1 m², followed by the number of productive spikes per 1 m², weight of the spikes per plant, weight of central spike and weight of the grains per central spike. В6Е0390, В6Е0391, В6Е0382 (*Triticum boeoticum* Boiss.) were characterized with the highest yield potential in 1 m². A database with morphological and agrobiological assessment of the studied accessions has been created.

Keywords: wild einkorn wheat, morphological, biological, agronomical characteristic, *Triticum boeoticum* Boiss.

ВЪВЕДЕНИЕ

Промените в климатичните и екологичните условия представляват значителна заплаха за културните видове за адаптирането им към променящите се условия на средата. Поради основни

проблеми свързани със замърсяване на въздуха и почвата, изчерпване на озоновия слой и глобалното затопляне, е неизбежно съвременните сортове да не могат да се справят с тези предизвикателства в близко бъдеще (Karagoz et al., 2006). Следователно една от основните нужди за подобряване на пшеницата е оценката на разнообразието при дивите им родственици (Moradkhani et al., 2012), които се явяват все по-важен генетичен ресурс за подобряване на селскостопанското производство и поддържане на устойчиви агроecosистеми.

Три вида, включващи *Triticum monococcum* L., *Triticum boeoticum* Boiss. и *Triticum urartu* Thumanjan ex Gandilyan принадлежат към групата на еднозърнестите лемеци (Mizumoto et al., 2002). Те са диплоидни и самоопрашващи се видове ($2n = 2X = 14$), известни като близки диви родственици на обикновената и твърдата пшеници (Kilian et al., 2007b). *Triticum boeoticum* Boiss. и *Triticum urartu* Thumanjan ex Gandilyan се различават слабо по морфология на растенията (Dorofeev et al., 1979), биохимични и молекулни маркери (Kilian et al., 2007a, 2007b). Широко признато е, че *Triticum monococcum* L. е сред първите култури, опитомени в плодородния полумесец, започвайки от дивия прародител *Triticum boeoticum* Boiss. (Heun et al., 1997).

У нас Странски, (1929, 1934), който е проучвал лемеца в страната, открива четири диви и единадесет културни разновидности, между които и някои ендемични (*var. bulgaricum*, *var. sofianum*), като посочва твърде голямо разнообразие от вариетети. През 2017-2018 г. Вълчинова и колектив (2020) потвърждават за все още наличие на естествени находищата от див еднозърнест лемец (*Triticum boeoticum* Boiss.) в региона на Хасковска, Кърджалийска, Старозагорска и Ямболска области. Най-голяма концентрация на див еднозърнест лемец е установено в Кърджалийска и Хасковска области. Регистрирани са пет находища в Бургаска и две в Кюстендилска области. Посочва се, че голямото богатство на диви и културни разновидности и форми от този вид у нас е указание, че нашата страна най-вероятно се намира в един от първичните или вторични центрове на формообразуването му. Същевременно това е важно доказателство за древността в познанието на еднозърнестия лемец в България, една от страните от които се е разпространил в Европа (Попов и Димитров, 1979).

Ефективното използване на лемецът изисква подробно познаване на неговите генетични, цитогенетични, морфологични, биологични и агрономически характеристики. Следователно целта

на това изследване е да се оценят морфологичните, биологичните и агрономически характеристики на оригинална зародишна плазма от див еднозърнест лимец (*Triticum boeoticum* Boiss.), поддържана в *ex situ* колекцията на Националната генбанка на България.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

През периода 2016-2018 година в експерименталното поле на ИРГР Садово са проучени 46 образци еднозърнест лимец, поддържани в *ex situ* колекцията на Националната генбанка на България. Сеитбите и през двете експериментални години (2016-2017 и 2017-2018) са извършени в края на месец декември в опитното поле на ИРГР-Садово, в местността „Долусене” на почвен тип ливадно-канелена смолницоподобна почва, след предшественик грах. Образците са засявани ръчно по блокова схема в 3 повторения с големина на опитната парцела от 1 m² и посевна норма от 450 к.с./m². През вегетациите са извършвани необходимите агротехнически мероприятия, осигуряващи развитието на растенията при еднакви условия. Биометрични измервания са правени на 10 растения от всяко повторение от образец, взети от средата на опитната парцелка при трите повторения.

Морфологичната характеристика на образците е извършена чрез използване на Международен класификатор за род *Triticum* (1984). Оценени са следните признаци: розетка - форма (във фаза братене); флагов лист - положение (във фаза начало на изкласяване), окосменост; лигула - наличие или отсъствие; ушички - размер; клас - форма, положение (в пълна зрялост), цвят, окосменост и осилестост; осили - окраска.

През вегетацията са извършени наблюдения за установяване настъпването на основните фенофази от развитието на растенията (по дати и брой дни): поникване (масово), братене (начало), вретенене (масово), изкласяване (масово), цъфтеж (масов) и зрелост (млечна, восъчна и пълна). Продължителността на вегетационния период е определена по приета методика на СУММУТ за отчитане дължината на вегетационния период - в дни от 1 януари до изкласяване.

През периода на изследването са извършени биометрични измервания по 10 показателя определящи структурните елементи на добива: височина на растението (cm), брой продуктивни братя на 1 m², дължина на класа с осилите (cm), дължина на класа без осилите

(cm), брой класчета в клас, брой зърна в клас, тегло на централен клас (g), тегло на зърната в централен клас (g), маса на 1000 зърна (g) и добив от 1 m².

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

На таблица 1 и таблица 2 са представени средните месечни температури на въздуха в С° и средните месечни суми на валежите в l/m² за района на ИРГР, гр. Садово.

Климата в района е преходно континентален със слабо средиземноморско влияние. Районът се характеризира с топла и продължителна есен, мека и по-често снежна зима. Пролетта е къса с почти рязко преминаване към летни температури. От съществено негативно значение за презимуването на есенните култури са ниските температури през януари и февруари при безснежни зими, а за нормалното наливане на зърното високите температури през юни в съчетание със суховеи (Дешева, 2009).

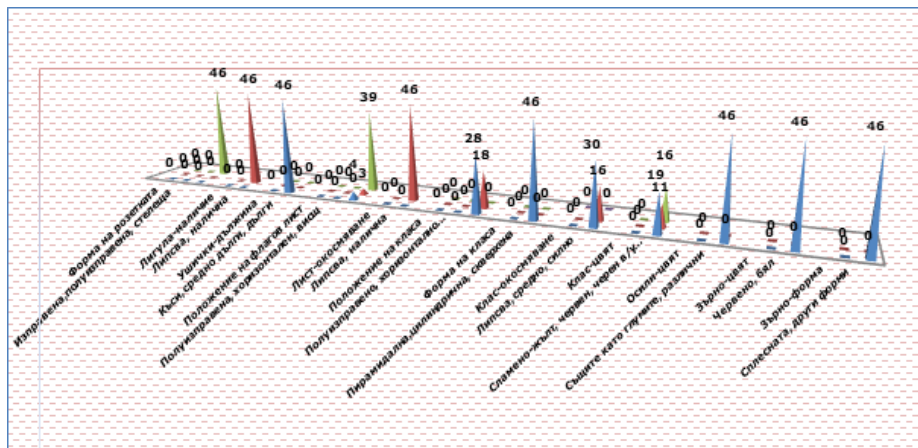
Средномесечната температура на въздуха при условията на ИРГР Садово се характеризира с минимум през януари и максимум през юли (Таблица 1).

През периода 2016-2018 г., вегетационната година: 2017/2018 се очерта най-топла, като температурната сума бе с 28,01 С° по-висока от средната за 105 годишен период. Вегетационната година 2016/2017 не се отличаваеше съществено по отношение на средната температурна сума за периода 1896-2001. Най-студена бе зимата на 2016/2017. Месец януари 2017 г. бе с 3,54 С° по-студен от нормалното за периода, докато през декември 2017 г., средната месечна температура бе с 6,28 С° по-висока от нормалната (Таблица 1).

Сумата на валежите средно за периода от 105 години (1896-2001) е 346,65 l/m². През вегетационните години: 2016/2017 и 2017/2018 сумите на валежите са съответно: 318,5 l/m² и 421,8 l/m². Сравнявайки годините по този показател може да кажем, че през вегетационната година (2017/2018) падналите валежи са с 75,15 l/m² повече отколкото 105 годишния период, а за 2016/2017 те са с 28,15 под средната стойност (Таблица 2).

Направения преглед на метеорологичните условия на годините, през които са изведени опитите показва, че те са различни и обхващат до голяма степен така обичайното вариране при този район.

Таблица 1. Средна месечна температура на въздуха в С° за района на ИРГР, гр. Садово



Година	Месеци										Обща сума
	X	XI	XII	I	II	III	IV	V	VI		
2016/2017	12,61	6,16	1,18	- 4,4	1,1	9,77	12,73	17,89	23,71	80,75	
1896-2001	13,02	6,23	1,92	0,86	2,67	6,51	12,08	17,06	21,26	81,61	
±МС	- 0,41	- 0,07	- 0,74	- 3,54	-1,57	+ 3,26	+ 0,65	+ 0,83	+ 2,45	- 0,86	
2017/2018	18,92	11,51	8,2	2,34	3,2	7,25	16,16	19,14	23,0	109,62	
1896-2001	13,02	6,23	1,92	0,86	2,67	6,51	12,08	17,06	21,26	81,61	
±МС	+ 5,9	+ 5,28	+ 6,28	+ 1,48	+0,53	+ 0,74	+ 4,08	+ 2,08	+ 1,71	+28,01	

±МС-разлика спрямо многогодишните стойности

Таблица 2. Средна месечна сума на валежите в l/m² за пункта в гр.

Година	Месеци									Обща сума
	X	XI	XII	I	II	III	IV	V	VI	
2016/2017	21,4	30,9	11,0	103,1	16,7	43,7	25,3	54,7	11,7	318,5
1896-2001	30,37	44,71	38,02	28,69	23,83	37,67	44,45	51,44	47,47	346,65
± MC	-8,97	-13,81	-27,02	+74,41	-7,13	+6,03	-19,15	+3,26	-35,77	-28,15
2017/2018	84,6	50,1	28,8	21,6	51,7	32,8	9,3	48,0	94,9	421,8
1896-2001	30,37	44,71	38,02	28,69	23,83	37,67	44,45	51,44	47,47	346,65
± MC	+54,23	+ 5,39	-9,22	-7,09	+22,87	-4,87	-35,15	-3,44	+47,43	+75,15

±MC-разлика спрямо многогодишните стойности

Морфологична характеристика

На фиг. 1 са представени резултатите от извършената морфологична оценка на проучваните образци от див еднозърнест лимец.

Проучените 46 образци се характеризират със стелеща форма на розетката ($>70^{\circ}$) (фиг.1). Положението на флаговият лист при 4 от образците е $< 45^{\circ}$, а при 3 е между $46-90^{\circ}$. Тридесет и девет номера имат от 91 до 135 градуса наклон. При всички образци е установено наличие на лигула, малък размер на ушичките и овласяване на листната петура. Формата на класа е пирамидална, като при 30 от образците липсва окосмяване. Деветнадесет от образците са със сламено жълти класове, единадесет с червен, а при шестнадесет черен върху червен фон. Зърното е червено със сплесната форма (бал 8), силно сплескано от страни и с доста тясна, но дълбоко врязана бразда на коремната страна (Фиг. 1).

Фиг.1 Морфологична оценка на образци див еднозърнест лимец (*T. boeoticum* Boiss.)

Биологична характеристика

На таблица 3 са представени резултати от протичането на отделните междуфазни периоди при проучваните образци див еднозърнест лимец.

Поникването е фаза, която започва с появата на колеоптила. Продължителността на поникването зависи от съдържанието на влага в почвата. Образците поникват средно за 22 дни. Само при

пет от изпитваните образци В6Е0390, В6Е0392, В6Е0407, В6Е0418В и В6Е0421 периодът е по-дълъг. Средната продължителност на междуфазния период поникване-братене е 44,40 дни. Той протича за 32 дни при образец В6Е0404С и до 64,50 дни при В6Е0390 (Таблица 3). Братене-вретене е междуфазен период, който е от решаващо значение за формиране на добива. Етапите на онтогенетичното развитие, през които се формират дължината на класа и броя на класчетата в клас, протичат в края на братенето и начало на вретене. През периода на проучване средната продължителност на този междуфазен период варира от 81,50 дни за В6Е0401 В до 109 дни за В6Е0404 С (Таблица 3).

Таблица 3. Продължителност на междуфазни периоди при 46 образци див еднозърнест лимец (*T. boeoticum* Boiss.), средно за периода 2016-2018 г.

Номер на образец	Брой дни								
	С-П	П-Б	Б-В	В-И	И-Ц	Ц-МЗ	МЗ-ВЗ	ВЗ-ПЗ	ДВП
В6Е0378	21,5	49	90	28	3,5	10,5	11	18	146,5
В6Е0379	21,5	45,5	89,5	30,5	4,5	13,5	10,5	15	145
В6Е0380	22	47	89	24,5	4,5	14	11	18	142
В6Е0381	22	47	96,5	19,5	5,5	13	10,5	17	143,5
В6Е0382	22	41	101	21	4	11,5	11	18	143,5
В6Е0383	22	41	99,5	22,5	5	18	9,5	14	143,5
В6Е0384	22	41	99,5	22	7	12	10,5	17	143
В6Е0385	22	41	103,5	17	6,5	13	8,5	18	142
В6Е0386	22	41	95	27	4,5	14,5	10,5	18,5	143,5
В6Е0387	22,5	40,5	91,5	29	6	14,5	10,5	18	142
В6Е0388	21,5	41,5	105	20,5	4	13	8	17,5	146,5
В6Е0389	22,5	41	99,5	25	5,5	10,5	10,5	19	146,5
В6Е0390	24,5	64,5	90	27,5	3	19,5	8,5	18	145
В6Е0391	21,5	41	99,5	21,5	3,5	16	7,5	18	143
В6Е0392	27	62,5	98	20	3	13	10,5	18	144,5
В6Е0397	22	45,5	101	18	3,5	12,5	10,5	18	145,5
В6Е0398	22	44	98,5	23	3	16,5	7,5	16,5	146,5
В6Е0399	22	40,5	98,5	26	5,5	13	8	16,5	145,5

B6E0400	22	44,5	95	23	5,5	14,5	7	16	145,5
B6E0401A	22	44,5	97,5	23,5	4,5	9	10,5	18	146
B6E0401B	22	44,5	97,5	21,5	3	17,5	8,5	19	144
B6E0402A	22	44,5	93,5	25	3	15,5	10,5	17	143,5
B6E0402B	22	56,5	81,5	31	3,5	19	8	14,5	145
B6E0404A	22	41	91,5	25	5	18	10,5	17	138
B6E0404B	22	36,5	105	19	5	15,5	10,5	17	140,5
B6E0404C	22	32,0	109	25,5	7	10,5	8	16	147
B6E0405	22	44,5	94	28	7,5	6,5	10,5	17	147
B6E0406	22,5	44	100	22	5	9	10,5	17	147
B6E0407	25	39,5	105	19,5	4,5	10	10,5	16,5	147
B6E0409	22	44,5	100,5	22,5	5	13	10,5	13,5	147
B6E0410	22,5	48	96,5	23	3,5	11,5	10,5	17,5	147,5
B6E0411	21,5	45	100	20	3	18	9,5	17	145
B6E0412A	22,5	46,5	96	19,5	4,5	19,5	10,5	14	143
B6E0412B	22,5	44,5	97	23	7	6,5	11	18	145
B6E0413	22	49,5	95,5	21,5	7	9	10,5	17,5	147
B6E0414	21,5	41	98,5	25,5	3,5	13	10,5	17,5	145
B6E0415	22	43,5	101,5	22	4,5	9,5	10,5	17	147,5
B6E0417	22	38,5	104	16,5	3	16	10,5	16,5	143,5
B6E0418A	22	40,5	97,5	30	4,5	7,5	18	14	149
B6E0418B	25	43	101,5	19,5	5,5	9	10,5	17	147
B6E0419	22	48,5	94	21	4	13	10,5	18	144
B6E0420	22	43,5	95,5	21	4,5	16	10,5	17	140,5
B6E0421	25	48,5	96	19,5	5,5	16	8	12	147
B6E0422	22	46	101,5	19,5	5,5	19	8	9	147,5
B6E0423	21,5	44	93,5	28,5	5,5	9,5	10,5	17,5	146
B6E0004	22,5	41	92	32	7	9,5	10,5	19	146
Mean	22,36	44,40	97,29	23,26	4,75	13,24	10	16,74	144,9
Std. Error of Mean	0,16	0,84	0,76	0,57	0,19	0,52	0,25	0,28	0,33
Std. Deviation	1,11	5,66	5,12	3,87	1,29	3,55	1,68	1,92	2,23

Variance	1,24	32,08	26,25	15	1,68	12,6	2,83	3,69	4,96
Minimum	21,5	32,00	81,5	16,5	3	6,5	7	9	138
Maximum	27	64,50	109	32	7,5	19,5	18	19	149
CV,%	4,98	12,76	5,27	16,65	40	26,81	16,83	11,47	1,54

С-П-сеитба-поникване, П-Б- поникване-братене, Б-В-братене-вретенене, В-И-вретенене-изкласяване, И-Ц- изкласяване-цъфтеж, Ц-МЗ-цъфтеж-млечна зрелост, МЗ-ВЗ-млечна зрелост-въсърчна зрелост, ВЗ-ПЗ-въсърчна зрелост-пълна зрелост, ДВП- Дължина на вегетационен период (от 1 януари до край на изкласяване), CV,%-вариационен коефициент

Вретененето настъпва с появата на първото коляно върху централният брат. Междуфазният период вретенене-изкласяване настъпва от 16 до 32 дни. Фенофазата изкласяване-цъфтеж е най-кратка и е с продължителност минимум 3 и максимум 7,50 дни (Таблица 3).

Цъфтеж-млечна зрелост е междуфазен период, който е критичен по отношение на добива. През тази фаза се осъществява наливането на зърното и проявата на продуктивния потенциал. Фазата настъпва средно за 13,24 дни, като при образец за В6Е0390 протича средно за 19,50 дни. Междуфазният период млечна-въсърчна зрелост е продължение на предходната по отношение критичността на периода. Този период протича средно за около 10 дни (Таблица 3).

Восърчна-пълна зрелост е фаза, при която семената навлизат във фазата за прибиране. Тя протича средно за 16,74 дни. Дължината на вегетационният период изчислена от 1 януари до изкласяване варира от 138 до 149 дни. Най-раннозрял е образец В6Е0404А, а с най-дълъг вегетационен период е образец В6Е0418А (Таблица 3).

Агрономическа характеристика

На таблица 4 са представени средни данни от биометричните анализи на анализиранияте показатели както и параметрите на основните дескриптивни характеристики: средна аритметична стойност (Mean), грешка на средната аритметична стойност (Std. Error of Mean), средно квадратно отклонение (Std. Deviation), дисперсия (Variance), минимална стойност (Minimum), максимална стойност (Maximum), и коефициент на вариране (CV,%) общо за всички образци. Стойностите на вариационния коефициент се движат

между 5,32% и 30,25%. Анализът показва, че относително най-вариабилен е показателят добив зърно от 1 m² (CV=30,25%), следван от брой класове от 1 m² (CV=19,38%), тегло на класове от растение (CV=17,22%), тегло на централен клас (CV=18,92%) и тегло на зърната от централен клас (CV=14,93%). Стойностите потвърждават, че тези показатели са по-податливи на изменение под действието на различни фактори. Относително най-слабо вариабилен е показателят височина на растението (CV=5,32%), следван от брой класчета в клас (CV= 5,41%).

За установяване на достоверността на разликите между средният стандарт от опита и изследваните образци по отношение на проучваните стопански признаци е използван еднофакторен дисперсионен анализ (Лидански, 1988). Нивата на статическа значимост при дисперсионния анализ са изчислени при вероятност $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$ и $p \leq 0,1$. Резултатите от приложеният анализ са представени на таблица 4.

Брой класове на 1 m² (брой)

Анализът на резултатите показва, че средния брой на продуктивните класове на 1 m² при проучените 46 образци е 812,62. Осемнадесет образца са с доказано по-високи стойности от средният стандарт в опита. При осем образци е в границите на средния стандарт от опита (B6E0385, B6E0397, B6E0400, B6E0401A, B6E0404B, B6E0409, B6E0420 и B6E0423) (Таблица 4).

Височина на растението (cm)

Показателят височина на растението варира от 140,60 до 176,90 cm, при средна стойност за стандарта от 162,20 cm. Най-високостъблени са B6E0387, B6E0410, B6E0421 и B6E0386, превишаващ стандарта съответно с 14,7 cm, 12,50 cm, 11,43 cm и 10,20 cm. Образците с доказано по-ниска височина на растението съставляват 21,74% от общия брой на проучваните образци. В групата на най-ниско стъблените се отнасят: B6E0379 (140,6 cm), B6E0378 (141 cm), B6E0380 (143,8 cm) и B6E0388 (148,7 cm) (Таблица 4).

Дължина на класа с осили (cm)

Средната стойност на показателя дължина на класа с осили е 18,58 cm. Двадесет образца са с по-високи стойности от средният стандарт в опита по този показател, но само при десет разликата е

статистически доказана при нива на значимост $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$ и $p \leq 0.1$ (Таблица 9).

Дължина на класа без осили (cm)

Показателят дължина на класа без осилите при проучваните образци варира от 10,00 до 15,05 cm, при средна стойност за стандарта от 11,81 cm. С доказано най-дълъг клас са В6Е0404С и В6Е0418А (превишаващи стандарта съответно с 3,23 и 2,54 cm). Образците с по-къс клас съставляват 56,52% (26 бр.) от общия брой на проучваните образци но само при два от тях има установени доказани разлики (Таблица 4).

Брой класчета в централен клас (бр.)

Анализът на резултатите показва, че средният брой на класчетата в централен клас е 34,93. Пет номера са с доказано по-високи стойности от тези на средният стандарт в опита- В6Е0386 (37,4 бр.), В6Е0387 (37,5 бр.), В6Е0401А (38,1 бр.), В6Е0412А (40,1 бр.) и В6Е0418А (37,19 бр.) (Таблица 4).

Брой зърна от централен клас (бр.)

Средният брой зърна от централен клас е 45,99 бр. Двадесет и един образеца превишават стандарта. При петнадесет от тях разликите са доказани, като при пет установените разлики са най-високи - В6Е0390 (54,2 бр.), В6Е0389 (52,83 бр.), В6Е0378 (52,63 бр.), В6Е0418А (52,46 бр.) и В6Е0405 (52,33 бр.) превишаващи стандарта с 8,21 бр., 6,44 бр., 6,64 бр., 6,47 бр. и 6,34 бр. (Таблица 4).

Тегло на централен клас (g)

Средното тегло на централен клас е 1,19 g. Двадесет и четири от образците са с по-тежък клас, но само при тринадесет от тях разликите са статистически доказани при ниво на статистическа значимост $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$ и $p \leq 0,1$. Тринадесет са образците с доказано по-ниско тегло на класа. С най-тежък централен клас се характеризира образецът В6Е0389 (1,61 g) (Таблица 4).

Тегло на зърна в централен клас (g)

Показателят тегло на зърна в централен клас варира от 0,44 до 0,78 g, при средна стойност за стандарта от 0,61 g. С доказано най-големи тегла на зърната в централният клас са В6Е0390 (0,75 g),

В6Е0401А (0,76 g), В6Е0405 (0,78 g), и В6Е0386 (0,78 g). Образците с доказано по-малко тегло на зърната съставляват 17,39% (8 бр.) от общия брой на проучваните образци (Таблица 4).

Маса на 1000 семена (g)

Средната маса на 1000 семена е 21,34 g. Осемнадесет от образците превишават стандарта по този показател. С най-едро зърно се характеризират образците В6Е0405 (26,87 g), В6Е0402В (26,31 g), В6Е0389 (24,30 g) и В6Е0386 (24,06 g) (Таблица 4).

Добив зърно от 1 m² (g)

Показателят добив зърно от 1 m² варира от 70,50 до 243,83 g, при средна стойност за стандарта от 131,99 g. Доказано най-висок добив зърно от 1 m² е получено от образците В6Е0390 (243,83 g), В6Е0391 (232,5 g) и В6Е0382 (217,5 g). Образците с доказано най-нисък добив съставляват 54,35% (25 бр.) от общия брой на проучваните образци (Таблица 4).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установено е, че за периодът на проучване относително най-вариабилен показател при проучваните образци див еднозърнестият лимец е добив зърно от 1 m², следван от брой класове от 1 m², тегло на класове от растение, тегло на централен клас и тегло на зърната от централен клас.

В резултат на двугодишното проучване като най-перспективни форми се открояват:

- Образци с номера: В6Е0379, В6Е0378, В6Е0380 характеризиращи се с най-ниско стъбло;
- С най-висока продуктивна братимост се характеризират В6Е0405, В6Е0402В, В6Е0417,;
- С най-голям брой класчета в централен клас и най-дълъг клас са: В6Е0386 и В6Е0401А;
- Образците В6Е0386, В6Е0405, В6Е0418А и В6Е0390 се отличават с най-голямо тегло на зърна от централен клас и най-едро зърно (маса на 1000 зърна);

- С най-висок добивен потенциал от 1 m² се характеризират В6Е0390, В6Е0391, В6Е0382;
- Образци с номера: В6Е0404А, В6Е0385 и В6Е0387 се характеризират като най-ранозрели.

Създадена е база данни с морфологична и агробиологична оценка на проучваните образци, която ще бъде съхранена в Националната генбанка.

Таблица 4. Средни стойности на проучваните стопански показатели при 46 образци еднозърнест лимец, (2016-2018)

Номер на образец	Брой класове на 1 м ² , бр.	Височина на растението, cm	Дължина на класа с осили, cm	Дължина на класа без осилите, cm	Брой класчета в клас, бр.	Брой зърна в клас, бр.	Тегло на централен клас, g	Тегло на зърната от централен клас, g	Масата на 1000 семена, g	Добив от 1 м ² , g
St	812,62	162,20	18,58	11,81	34,93	45,99	1,19	0,61	21,34	131,99
B6E0378	413,6---	141---	19,55	12,05	36,50	52,63+++	1,40+++	0,65	17,89---	141,50
B6E0379	492,8---	140,6---	17,90	11,80	33,70	45,17	1,14	0,46---	20,55--	172+++
B6E0380	960,7+++	143,8---	17,95	11,70	33,40	47,42	1,19	0,65	19,76---	103,17---
B6E0381	710,2---	158,70	18,95	11,65	34,60	47,08	1,07-	0,51-	18,30---	112,17--
B6E0382	768,9---	161,70	19,50	12,35	33,80	33,25---	0,89---	0,54	22,74+++	217,5+++
B6E0383	845,7+++	156,20	17,80	11,00	33,90	45,67	0,86---	0,47--	19,19---	174+++
B6E0384	850,9+++	166,70	17,3-	11,55	35,50	50,67+++	1,07-	0,74++	21,80	100---
B6E0385	814,45	160,70	17,70	11,15	35,30	49,58+++	1,21	0,62	19,89---	173+++
B6E0386	861,5+++	172,4+++	17,95	12,10	37,4+	50,33+++	1,42+++	0,78+++	24,06+++	184+++
B6E0387	914,6---	176,9+++	17--	11,35	37,5+	51,17+++	1,28	0,70+	21,86+	164+++
B6E0388	620,77---	148,7---	16,6--	11,00	36,00	51,75+++	1,23	0,65	20,88	123,83
B6E0389	937,42+++	163,50	16,2---	11,45	36,30	52,83+++	1,61+++	0,56	24,30+++	107,33---
B6E0390	846,6+++	169+	19,20	12,85	36,60	54,2+++	1,45+++	0,75+++	22,15++	243,83+++
B6E0391	995,87+++	152,1--	17,60	10,90	34,00	46,65	1,08-	0,58	21,32	232,5+++
B6E0392	714,8---	162,00	17,1-	11,30	35,70	42,75---	1,00---	0,53	18,27---	70,5---
B6E0397	825,73	157,40	16,9--	11,00	35,20	50,22+++	1,24	0,68	17---	111,67--
B6E0398	868,83+++	155,1-	17,2-	10,25-	34,40	37,68---	1,14	0,60	22,07++	110,17---
B6E0399	723,53---	155,4-	17,2-	11,10	31,80--	32,53---	0,66---	0,44---	19,93---	130,83
B6E0400	825,88	171,4++	18,90	11,20	35,20	45,72	1,11	0,56	20,65--	116,67-
B6E0401A	798,38	152,8--	19,25	12,50	38,1++	42,83---	1,3+	0,76+++	20,95	184,83+++
B6E0401B	642,08---	159,90	17,70	12,00	35,80	44,02-	1,37+++	0,60	22,92+++	148,67++
B6E0402A	758,35---	164,90	18,20	11,70	36,30	45,22	0,84---	0,49--	18,83---	146,33+
B6E0402B	1140,93+++	166,60	21,4+++	13,30	35,00	46,12	1,50+++	0,68	26,31+++	85---
B6E0404A	614,58---	168,5+	21,1+++	13,00	35,80	45,53	1,34++	0,66	23,43+++	115--
B6E0404B	823,87	170,8++	20,9+++	12,45	35,10	45,93	1,29	0,60	22,84+++	100,5---
B6E0404C	1034,97+++	169,9+	20+	15,05+++	34,20	47,50	1,40+++	0,60	23,62+++	115--
B6E0405	1154,53+++	163,60	20,1+	11,90	32,80	52,33+++	1,44+++	0,78+++	26,87+++	78---
B6E0406	927,2+++	162,10	18,90	10,85	33,90	44,43	1,24	0,54	21,38	107---
B6E0407	990,77+++	160,90	18,55	10,95	34,60	40,83---	1,21	0,50-	17,87---	79,67---

B6E0409	820,02	166,20	17,70	10-	34,70	45,47	0,90---	0,55	19,82---	104,83---
B6E0410	781,35---	174,7+++	20,44++	12,90	35,80	41,35---	1,18	0,45---	21,02	132,00
B6E0411	760,2---	166,40	16,93--	11,10	32,80	43,93-	1,18	0,56	20,63--	113,33--
B6E0412A	661,58---	162,80	19,01	12,27	40,1+++	49,68+++	1,09	0,57	18,06---	113,67--
B6E0412B	537,5---	146,6---	17,43	10,91	36,05	41,83---	1,09	0,56	20,08---	85,5---
B6E0413	669,77---	171,8++	19,41	10,68	28,6---	33,28---	0,73---	0,47--	19,95---	125,00
B6E0414	666,58---	160,73	18,40	10,79	33,23	45,43	1,07-	0,61	19,68---	109,56---
B6E0415	750,65---	160,23	17,82	10,74	33,83	38,91---	0,96---	0,52-	21,43	116,63-
B6E0417	1147,17+++	155,63-	18,32	10,87	33,50	46,33	1,12	0,58	22,08++	80,39---
B6E0418A	961,57+++	162,54	18,44	14,36++	37,19+	52,46+++	1,37++	0,72++	23,61+++	108,57---
B6E0418B	973,83+++	163,32	18,89	12,71	35,99	45,70	1,27	0,57	22,14++	105,11---
B6E0419	744,11---	170,63++	20,04+	13,10	35,82	48,72++	1,36++	0,67	23,18+++	113--
B6E0420	805,80	166,80	20,07+	13,18	36,09	48,98+++	1,27	0,64	20,77-	134,63
B6E0421	692,68---	173,63+++	19,92+	12,95	36,11	50,09+++	1,53+++	0,74++	22,08++	174,95+++
B6E0422	849,58+++	166,66	20,3++	12,44	32,4-	44,23-	1,25	0,59	21,16	182,45+++
B6E0423	805,60	172,08++	17,78	11,22	34,02	43,73--	1,02--	0,61	22,03++	150,33++
B6E0004	857,45+++	167,07	18,92	11,22	31,95--	44,64	1,21	0,68	21,70	130,50
LSD 5%	16,40	6,01	1,17	1,52	2,13	1,62	0,11	0,08	0,50	12,11
LSD 1%	21,65	7,94	1,54	2,00	2,81	2,14	0,14	0,11	0,66	15,99
LSD 0,1%	27,81	10,20	1,98	2,57	3,61	2,75	0,18	0,14	0,85	20,54
Mean	812,62	162,20	18,58	11,81	34,93	45,99	1,19	0,61	21,34	131,99
Std, Error of Mean	22,97	1,26	0,18	0,15	0,28	0,73	0,03	0,01	0,30	5,82
Std, Deviation	157,45	8,62	1,27	1,03	1,89	5,01	0,20	0,09	2,09	39,92
Variance	24791,72	74,34	1,61	1,07	3,58	25,13	0,04	0,01	4,36	1593,75
Minimum	413,60	140,60	16,20	10,00	28,60	32,53	0,66	0,44	17,00	70,50
Maximum	1154,53	176,90	21,40	15,05	40,10	54,20	1,61	0,78	26,87	243,83
CV,%	19,38	5,32	6,82	8,74	5,41	10,90	17,22	14,93	9,79	30,25

Статистическа значимост на разликите спрямо средният стандарт от опита: +,- доказана разлика при $p \leq 0,05$, ++,-- доказана разлика при $p \leq 0,01$, +++,-,- доказана разлика при $p \leq 0,001$

Литература

- Вълчинова, Е., Г. Дешева, Б. Кьосев. 2020. Разнообразието от видове лимец на територията на Република България. 2020. Младежки Форум „Наука, Технологии, Иновации, Бизнес“, 28 - 29 май 2020 година Дом на науката и техниката – Пловдив, 110-115.
- Попов, П., Д. Димитров. 1979. Пшеницата в България, Глава IV – Систематика на род *Triticum* L. – видове и разновидности в България, 31- 41.
- Странски, И. 1929. За лимеца в България. Издателство На Българското Ботаническо Дружество, том 3.
- Странски, И. 1934. Бележки върху еднозърнестият лимец в България. Списание на БАН, книга 16, 24.
- Dorofeev VF, Filatenko AA, Migushova EF, Udaczin RA, Jakubziner MM. 1979. Wheat. vol. 1. In: Dorofeev VF, Korovina ON, Ed. Flora of Cultivated Plants. Leningrad, Russia, 346 p.
- Heun M., R. Schaefer-Pregl, D. Klawan, R. Castagna, M. Accerbi, B. Borghi and F. Salamini. 1997. Site of einkorn wheat domestication identified by DNA fingerprinting. *Science* 278:1312-1314.
- Karagoz A., N. P<lanali, T. Polat. 2006. Agro-Morphological Characterization of Some Wild Wheat (*Aegilops* L. and *Triticum* L.) Species. *Turk J Agric For* 30, 387-398.
- Kilian B., H. Özkan, A. Walther, J. Kohl, T. Dagan, F. Salamini, W. Martin. 2007a. Molecular diversity at 18 loci in 321 wild and 92 domesticate lines reveal no reduction of nucleotide diversity during *Triticum monococcum* (einkorn) domestication: implications for the origin of agriculture. *Molecular Biology and Evolution*; 24:2657–2668.
- Kilian B, H. Özkan, O. Deusch, S. Effgen, A. Brandolini, J. Kohl, W. Martin, F. Salamini. 2007b. Independent wheat B and G genome origins in outcrossing *Aegilops* progenitor haplotypes. *Molecular Biology of Evolution*; 24:217–227.
- Mizumoto K., S. Hirosawa, C. Nakamura, S. Takumi. 2002. Nuclear and chloroplast genome genetic diversity in the wild wheat, *Triticum urartu*, revealed by AFLP and SSL analysis. *Hereditas* 137, 208-214.
- Moradkhani H., P. Aboughadareh AR, AA. Mehrabi, AA Etminan. 2012. Evaluation of genetic relationships of *Triticum-Aegilops* species possessing D genome in different ploidy levels using microsatellites. *International Journal of Agricultural and Crop Sciences* 23, 1746-1751.

РОЛЯТА НА ПРЕЧИСТВАНЕТО И ТОПЛИННАТА ОБРАБОТКА НА ДВУЧЕРУПЧЕСТИТЕ МЕКОТЕЛИ ЗА ЕЛИМИНИРАНЕ НА БИЛОГИЧНИЯ РИСК

THE ROLE OF PURIFICATION AND HEAT TREATMENT OF BIVALVE MOLLUSCS FOR ELIMINATION OF BIOLOGICAL RISK

**Проф. д-р Йордан Гогов, гл.ас. д-р Гергана Крумова-Вълчева
Национален диагностичен научноизследователски
ветеринарномедицински институт, гр. София, България**

**Yordan Gogov, Gergana Krumova-Valcheva
National Diagnostic and Research Veterinary Medicine Institute,
Sofia, Bulgaria**

e-mail: dr.krumova_valcheva@abv.bg

РЕЗИЮМЕ

От гледна точка на епидемиологията и здравната безопасност за консуматора двучерупчестите мекотели (миди и стриди) най-често се разглеждат като морски хидробионти с повишен биологичен риск. Причината за това е техния специфичен начин на филтърно хранене, при който в организма им често се натрупват значителни количества биологични замърсители (бактерии, вируси, биотоксини). Във връзка с това в европейското законодателство са въведени строги хигиенни изисквания при отглеждането, пречистването, трансфера и топлинната обработка на живи двучерупчести мекотели в териториите на държавите членки в ЕС. Важно място сред тези изисквания заемат разпоредбите относно пречистването на моллюските в пречиствателните центрове и в трансферните зони. Изяснена е тяхната роля за редуциране и елиминиране на биологичното замърсяване с цел постигане на установените микробиологични критерии в Регламент (ЕО) №2073/2005. Разгледани са и начините за топлинно третиране на живите двучерупчести мекотели, които не са преминали период на пречистване или трансфер чрез някои от регламентираните методи: стерилизация в херметически затворени съдове или чрез топлинно

третиране (във вряща вода, варене или на водна пара) при определена температура и време. Обсъдена е необходимостта от въвеждане на процедури основани на принципите на HACCP за верификация на топлинните режими.

Ключови думи: двучерупчести молюски, биологичен риск, пречистване, топлинно третиране.

ABSTRACT

In terms of epidemiology and health safety for the consumer, bivalve mollusks (mussels and oysters) are most often considered sea hydrobionts with high biological risk. The reason for this is their specific filter feeding, in which their body accumulates significant amounts of biological contaminants (bacteria, viruses, biotoxins). In this context, European legislation laying down strict hygiene requirements for cultivation, collecting, purification, transfer and heat treatment of live bivalve molluscs in the EU Member States. The rules on purification of molluscs in treatment centers and in transfer zones occupy an important place among these requirements. Their role in reducing and eliminating biological pollution in order to microbiological criteria laying down by Regulation (EC) №2073/2005 has been clarified. The methods for heat treatment of live bivalve molluscs, that have not undergone a period of purification or transfer by some of the regulated methods, are also considered: sterilization in hermetically sealed containers or by heat treatment (in boiling water, boiling or steam) at a certain temperature and time. The need to introduce procedures based on HACCP for verification of thermal regimes was discussed. Under discussion is the need to introduce procedures based on HACCP principles to verify heat conditions.

Keywords: bivalve mollusks, biological risk, purification, heat treatment

Двучерупчестите мекотели са ценен биологичен ресурс при добива на нерибни хидробионти в световен мащаб. Поради пълноценният си хранителен, минерален и витаминен състав те са в основата на различни диети в областта на здравословното хранене. Двучерупчестите мекотели са хидробионти с филтърно хранене, при което в организма им може да се натрупат различни биологични и химически замърсители, създаващи определен здравен риск за потребителите. Във връзка с това в европейското законодателство са въведени специфични хигиенни правила при производството

и пускането на пазара на живи двучерупчести мекотели. Регламентираните методи и топлинни режими в глава II, раздел VII от приложение III към Регламент № 853/2004 (4) за обработка на живи двучерупчести мекотели от производствени зони – клас В и С, които не са били подложени на пречистване или повторно полагане, са доказали своята ефективност за успешно обезвреждане на молюските от биологични контаминанти. Съгласно Регламент № 2019/627 (2) компетентният орган определя местоположението и границите на класифицираните райони в 3 класа (А, В и С) в зависимост от степента на фекално замърсяване с *E. coli* (сн.1).



Снимка 1. Производствен район за живи двучерупчести мекотели в Черно море.

У нас компетентен орган за официален контрол е Българската агенция по безопасност на храните със съответните областни дирекции. Живи двучерупчести мекотели, добити в производствени райони от клас А може да се предлагат за директна консумация, ако отговарят на хигиенните изисквания в Регламент за изпълнение

(ЕС) № 2019/627, на здравните стандарти в Регламент (ЕО) № 853/2004 и на микробиологичните критерии в Регламент (ЕО) № 2073/2005 (1). От производствените райони – клас В се извършва добив на живи двучерупчести мекотели, които след това подлежат на задължителна обработка в център за пречистване или в район за повторно полагане до постигане на определените микробиологични критерии за безопасност. Живите двучерупчести мекотели добити в производствени райони от клас С се предлагат за човешка консумация след задължително поставяне в район за повторно полагане, но за по-дълъг период от време с цел да се постигне изпълнение на определените микробиологични критерии.

Пречистването на живите двучерупчести мекотели преди пускането им на пазара е един от най-съществените технологични етапи за осигуряване на здравната безопасност на потребителите.

Съгласно европейското законодателство в центровете за пречистване на живите двучерупчести мекотели се прилагат специални изисквания. Използваните резервоари и контейнери трябва да са с гладки стени, водонепропускливи и лесни за почистване. Входящият отвор за чиста вода и отточните отвори за отпадната вода следва да се разполагат по начин, който не допуска замърсяване на мекотелите. Преди това живите хидробионти се измиват с чиста вода за отстраняване на повърхностните механични замърсявания с тиня, кал и водорасли. Важно изискване към пречиствателната система е осигуряване на бързо възстановяване на естественото хранене на мекотелите чрез филтриране на водата. За целта количеството на поставените за пречистване живи двучерупчести мекотели не трябва да превишава определения капацитет на системата. Необходимо е да се определи период на непрекъснато пречистване, който да бъде достатъчен за постигане на съответните микробиологични критерии. При пречистването мекотелите следва да се поставят в мрежести торби, които осигуряват свободен приток на чиста морска вода (сн.2).



Снимка 2. Мрежести торби, които осигуряват свободен приток на чиста морска вода.

Живите двучерупчести мекотели следва да се разполагат на пластове с дебелина, която позволява нормално отваряне на черупките им по време на пречистването. Процесът на пречистване не трябва да създава условия за вторично замърсяване и увреждане жизненото състояние на мекотелите. Преди експедирането им те се измиват обилно с чиста вода. Здравните изисквания към живите двучерупчести мекотели включват освен микробиологичен контрол, наличие на морски биотоксини и оценка на показателите: преснота, запазени жизнени функции, адекватна реакция при удар и нормално количество междучерупкова течност.

Когато пречистването на живите двучерупчести мекотели се извършва в район за повторно полагане в морска вода, е необходимо да се създадат условия за повторно полагане, които да гарантират оптимални възможности за тяхното пречистване. Периодът на пречистване в чиста морска вода зависи от температурата на водата. Обикновено този период е не по-малко от два месеца. Допуска се по преценка на компетентния орган този срок да бъде съкратен, при условие, че са представени доказателства за извършен анализ на риска от лицата, които извършват повторното полагане на мекотелите. За повторно полагане се използват само райони, които предварително

са одобрени от компетентия орган. Границите на тези райони трябва да са трайно обозначени с шамандури и пилони. Между отделните райони за повторно полагане в морска вода, както и между тях и производствените райони, е необходимо да се осигури достатъчно разстояние с оглед да се гарантира минимален риск от замърсяване на хидробионтите.

Според микробиологичните критерии в Регламент (ЕО) № 2073/2005 пречистените живи двучерупчести мекотели, пуснати на пазара в срока им на годност не трябва да съдържат салмонели в 25 g при 5 изследвани проби, както и повече от 230 MPN *E. coli* в 100 g месо и междучерупкова течност. От 5 проби само в 1 се допуска наличие на не повече от 700 MPN *E. coli* в 100 g месо и междучерупкова течност.

В съответствие с разпоредбите на Регламент (ЕО) № 853/2004 се разрешава живите двучерупчести мекотели от производствените райони клас В и С, които не са преминали през период на пречистване, да бъдат изпратени в преработвателно предприятие за топлинно третиране, с цел елиминиране на биологичния риск. В тези случаи може да се прилага стерилизация в херметически затворени съдове или топлинна обработка чрез потапяне на мекотелите в кипяща вода за необходимото време, с цел повишаване вътрешната температура на месото им най-малко до 90°C, както и поддържане на тази температура най-малко за 90 s. Друг разрешен метод за топлинно третиране е варене от 3 до 5 min в оградено пространство, където температурата е между 120 и 160 С, а налягането е между 2 и 5 kg/cm², последвано от отстраняване на черупките и замразяване на месото до базисна температура от (-) 20 С.

Може да се приложи и обработка на мекотелите с водна пара под налягане в оградено пространство, с цел повишаване на вътрешната температура на месото им най-малко до 90°C, както и поддържане на тази температура минимум 90 s. Топлинно обработените двучерупчести мекотели пуснати на пазара в срока им на годност не трябва да съдържат салмонели в 25 g при всичките 5 изследвани проби.

Сред биологичните замърсители в двучерупчестите мекотели доминират психрофилни и психротрофни видове от родовете *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Enterococcus*, *Salmonella*, *Bacillus*, *Clostridium* и др.

Важен проблем представлява и присъствието на някои вируси

в моллюските като норовирусите и причинителя на вирусния хепатит А. За анализа на риска в ЕС е използвана информация през последните години за възникналите хранителни взривове (с вероятни причинители норовируси) във Франция, Ирландия и Великобритания, както и постъпили нотификации за насочване на вниманието от системата за бързо предупреждение за храни и фуражи (RASFF) (5). Установено е, че най-важните вирусни опасности, свързани с консумацията на двучерупчести мекотели (стриди и миди) са *норовируси* и вируса на хепатит А (HAV), произхождащи замърсени с човешки фекалии води, в които се отглеждат мекотелите. Провеждат се системни научни изследвания относно методите за тяхното елиминиране. Според насоките на *Codex Alimentarius* (3), ефекта от топлинната обработка за елиминиране на вирусите в храните, се определя не само от прилагания температурен режим, но зависи **и от специфичните особености на съответния вирус, хранителнителната среда и първоначалното ниво на вирусният агент**. Регламентираните методи и топлинни режими в глава II, раздел VII от приложение III към Регламент (ЕО) № 853/2004 за обработка на живи двучерупчести мекотели от производствени зони – клас В и С, които не са били подложени на пречистване или повторно полагане, са доказали своята ефективност за успешното обзвръждане на моллюските от биологични контаминанти. Независимо от това бизнес-операторите, които прилагат различни методи за топлинно третиране на живите моллюски е необходимо да ги валидират, както и да извършат верификация съгласно принципите на HACCP за правилното разпределение на температурата при термичната обработка на моллюските (5).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пречистването на живите двучерупчести мекотели преди пускането им на пазара е един от най-съществените технологични етапи за осигуряване на здравната безопасност на потребителите. Важно изискване към пречиствателната система е осигуряване на бързо възстановяване на естественото хранене на мекотелите чрез филтриране на водата. Количеството на поставените за пречистване живи двучерупчести мекотели не трябва да превишава определения капацитет на системата. Необходимо е да се определи оптимален период за непрекъснато пречистване, който да бъде достатъчен за постигане на съответните микробиологични критерии. Процесът на

ПОСТЕРНА СЕСИЯ



**ИНФОРМАЦИЯ ЗА ПРЕДСТАВЕНИТЕ ПОСТЕРИ
МОЖЕ ДА НАМЕРИТЕ НА СЛЕДНИЯ ЛИНК:**

<https://bit.ly/32jy04x>

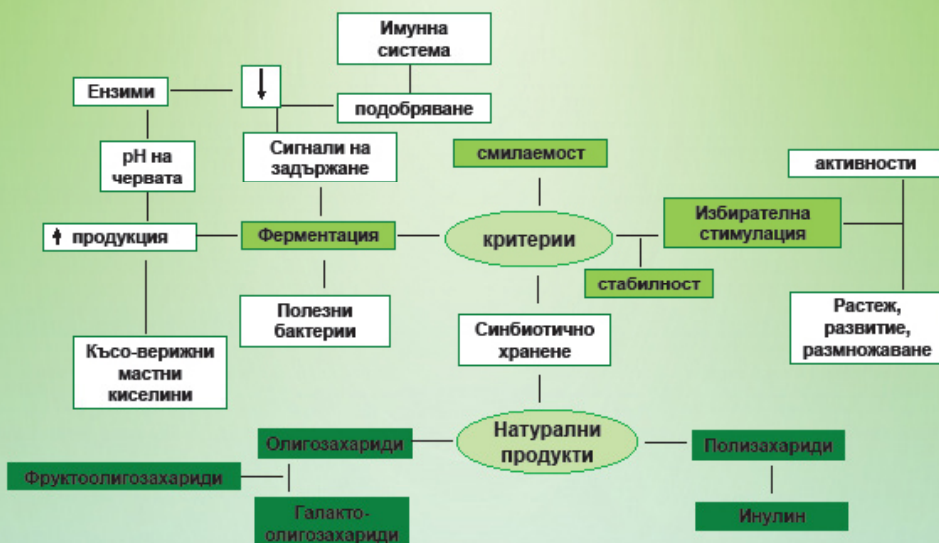


Връзка между синбиотичното хранене и експресия на ключови гени при мъжки агнета

Relationship between synbiotic nutrition and key gene expression in male lambs

Десислава Абаджиева*, Маузе Кюмерт Ачар**
 *Институт по биология и имунология на размножаването, БАН
 **Университет Еге, Турция

- В животновъдството, ефектите от диетичните модификации са изследвани най-вече по отношение на тяхното влияние върху поколенията или производствените характеристики на животните.



- Доказано е, че подхранването с добавки през въздействието на метаболитните хормони, насърчава секрецията на гонадотропин и води до по-ранното начало на гаметогенезата. При зрели кочове промените в приема на фуражи изглеждат предизвикват дълбоки промени в производството на сперматозиди (Martin et al., 2010). Съществуват две обяснения - ефектът може да се дължи на увеличаване прием на протеин или на повишена метаболитизираща енергия. Допълнителното хранене, се отразяват на секрецията на LH, която обаче скоро след това намалява. Вторият отговор е този на FSH, който обикновено се открива от 1-2 седмица след прием на добавката.

- Няколко експериментални проучвания правят връзка между консумацията на хранителни вещества с качеството на гаметите и се предполага, че прилагането на здравословна диета може да подобри репродуктивните параметри на животните, през повлияване на таргетни гени. Тези резултати потвърждават хипотезата за преференциално разпределение на хранителните вещества от диетата към репродуктивната система.



Устойчиво развитие на екосистемите чрез внедряване на методи за мониторинг и биологичен контрол Sustainable ecosystem management through implementation of monitoring and biological control methods

Инициатори на устойчиво земеделие ДООД по Проект: BG06RDNP001-1.6.001-0021 "Устойчиво развитие на екосистемите чрез внедряване на методи за мониторинг и биологичен контрол" по договор БР30-44/21.12.2020. Важен партньор на проекта Овора Чалча България СООД

д-р. ас. **Д-р Цветанка Дичева**, Институт по селекционна култура "Марина", Пловдив, България
Asst. Prof. Tsvetanka Dicheva, PhD, Marina Vegetable Crops Research Institute, Plovdiv, Bulgaria

д-р. ас. **Д-р Теодора Шлева**, Висше училище по агробизнес и развитие на регионите, Пловдив, България
Asst. Prof. Teodora Sheva, PhD, University of Agribusiness and Rural Development, Plovdiv, Bulgaria

Оптимизиране управлението на вредителите чрез екологични подходи и екосистемни услуги, намаляване на употребата на пестициди, опазване на биоразнообразието и производство на безопасни храни без остатъци от пестициди. Интродуцирането на конкретни биоагенти в земеделски екосистеми ще доведе до увеличаване на биоразнообразието, създаване на биологични условия за опазване на екосистемни услуги, намаляване на разходи от вредители на растителността и интегрирани стратегии прилагани на различни етапи, растително опазвателни вещества и продукти, опазване на полето от замърсители с пестициди и интродуциране на раста от отглеждане на малки екосистеми.

Ключови думи: екологични подходи, безопасни храни, биоагенти

Optimizing the management of pests through environmental approaches and ecosystem services, reducing the use of pesticides, protecting biodiversity and producing safe food without pesticide residues. The introduction of specific bioagents in agricultural holdings will lead to an increase in biodiversity, creation of favorable conditions for the use of ecosystem services, reduction of the risk of development of resistance in pests to plant protection products, reduction of pesticides and residues in production, protection of water from pesticide residues and minimization of the risk of poisoning of bee colonies.

Key words: ecological approaches, safe foods, bioagents



Опазване на биологичното разнообразие	Придобиване устойчивостта на вредителите и пролонгиране на чисти селекционирани продукти
Намаляване на замърсяването на околната среда	Намаляване вреда от вредители и опазване екосистемите
Биологични методи за растителна защита	

Деятности по проекта :

- ▶ интродуциране на конкретни биоагенти в земеделските стопанства,
- ▶ създаване на нови модела култури за мониторинг и внедряване в практиката за мониторинг и борба с вредителите,
- ▶ разработване на мобилно приложение каталог за идентифициране, мониторинг и управление на най-често срещаните зоономически вредители по съответните култури с биоагенти средства.

В резултат от тази дейност ще бъдат създадени два нови продукта:

- нов модел светлинен календар за вредители и вредители (разряд *Lepidoptera*, *Diptera*)
- нов модел ултраваквумна карта за вредители и вредители (разряд *Hymenoptera*, *Diptera*, *Homoptera*, *Thysanoptera*)

Календари и ултраваквумна карта ще използват за мониторинг и борба с вредителите при почти всички култури:

- плодове и зеленчуци (видове от разрядите *Lepidoptera*, *Diptera*, *Hymenoptera*, *Homoptera*, *Thysanoptera*),
- дова (шири проволочни мотки, *Lobesia botrana*),
- лещици (разряд *Thysanoptera*),
- теснолистни, настолни и дваровителни растения (разряд *Thysanoptera*), както и
- в горското стопанство (среди частков мотки *Acanthia hippocritani*, бели амарилски пилеци *Camuraria orbicella* и други). Календари и ултраваквумна карта ще бъдат тествани в стопанствата и фермите в практиката, като така ще се осигурят възможности за изграждане и систематичен мониторинг на вредителите, както и за директна борба. Ефективността на календари ще се огледа по броя условия изпитани за адхезива време, а при липсващите площи по броя условия изпитани на към.

Ще бъде разработана уеб базирани платформа и мобилно приложение каталог с две основни цели: идентифициране и управление на най-често срещаните вредители по съответните култури, което ще бъде от помощ на земеделските стопанства в изграждането на систематичен мониторинг и борба с вредителите.

За контакти: Инж. Агроним „Агрозоология и Растителна защита“ Мария Николова – Експерт програми и проекти : 0878 100 954, e-mail: ekometo2020@gmail.com

АБСТРАКТ

Киселото зеле е сред най-старите функционални храни, получавани на базата на спонтанна ферментация. В България заемат сик не е изследван от гледна точка биоразнообразно на млечно-кисели бактерии (МКБ) и дивните за него все още са окисдени. Затова настоящите изследвания си към него при добра ферментирала проби от български сорт „Кюесо“, отглеждани в Западна България. Отчетена е висока виталност на МКБ както в пробата ферментирала с високо съдържание на соев (Z131), така и в тази с високо съдържание (Z132). Макро и микроморфологичната характеристика показа богато биоразнообразие, с изразено доминироване на млечнокисели представители. Идентифицирани са представители на род *Lactiplantibacillus* и на вида *L. plantarum*. С помощта на RAPD-PCR бе илюстрирана висока генетична хетерогенност в рамките на вида/рода, което се потвърди и от резултата на 16S rDNA секвенционната анализа за част от изолатите. Представителите на род *Lactiplantibacillus* са допълнително идентифицирани, съгласно новата таксономична класификация на МКБ. Новоизоланите изследователи показаха обилна антагонистична активност към и срещу уроптегани, в комбинация с добри технологични характеристики.

Представителите на род *Lactiplantibacillus* са идентифицирани на базата на спонтанно ферментирала продукция на млечната основа

SUMMARY

Sauerkraut is one of the oldest functional foods obtained on the basis of spontaneous non-dairy fermentation. Despite recent interest, in Bulgaria, cabbage juice has not been studied in terms of biodiversity of lactic acid bacteria (LAB). With this aim we selected well-fermented samples of the Bulgarian variety of cabbage „Kyoso“, grown in Western Bulgaria. High vitality of LABs microbiota was assessed in both, the sample fermented with low salt content (LSC11) and in the one with high content (HSC12). Macro and Micro-morphological characteristics showed rich biodiversity, with a pronounced dominance of lactobacilli. Representatives of the genus *Lactiplantibacillus* and the species *L. plantarum* have been identified. High genetic heterogeneity within the species was illustrated by RAPD-PCR, which was also confirmed by 16S rDNA sequence data, for some of the isolates. Further identification, however is needed, according to the new LAB taxonomic classification. The newly isolated strains showed promising antagonistic activity including against uropathogenic *Escherichia coli*, in combination with good technological characteristics. The estimation of their probiotic potential is forthcoming, as a basis for enrichment the range of traditional non-dairy functional foods.

Материали и методи

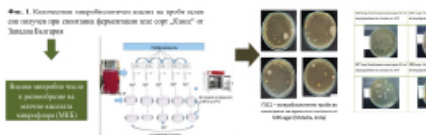
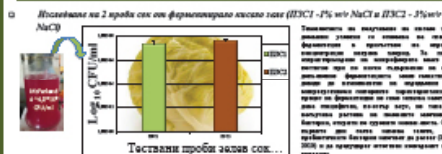


Общието си с изследване и етапа на изследвателската работа

Заклучение: Новоизоланите изследователи показаха обилна антагонистична активност към и срещу уроптегани, в комбинация с добри технологични характеристики. Представителите на род *Lactiplantibacillus* са идентифицирани на базата на спонтанно ферментирала продукция на млечната основа.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

1.1. ЗЕЛЕВИЯТ СОК И КИСЕЛОТО ЗЕЛЕ КАТО ФУНКЦИОНАЛНА ХРАНА



Фиг. 1. Количеството жизнеспособни единици на пробата със соев при спонтанно ферментация със сорт „Кюесо“ в Западна България

Фиг. 2. Получаване на единични клонони на спонтанни срези за МКБ (MRS и M17) и микроморфологична характеристика

Чистите МКБ култури, показват изразено разцвет на MRS буван и образуват обемно утвърдяване

Фиг. 3. Получаване на чисти култури МКБ – Грам (+), пръчицивидни, покълнали и окисдени (-) по мезофилни – Лактобацили

ФЕНОТИПНАТА ХАРАКТЕРИСТИКА НА НОВОИЗОЛИРАНОТЕ МКБ ДОКАЗА ДОМИНИРАНЕ НА ПРЪЧИКОВИДА ФОРМИ, С ВЪРХОВНО ДОКАЗАНО ИДЕНТИФИЦИРАНЕ НА ЛАКТОБАЦИЛИ ОТ РОД *Lactiplantibacillus*



Характеристики на част от новоизоланите лактобацили с 16S rDNA секвенционна анализа, чрез BLAST търсене

Фиг. 4. Микроморфологична характеристика на новоизоланите лактобацили от пробата със соев, изследвана при спонтанно ферментация в домашно зелев сок и в саур

Фиг. 5. RAPD – PCR профил на новоизоланите щамове от вида/рода и на ферментирала със соев и домашно, в пробата ферментирала със соев



Проверка на изолатите с изолатите на референтния щам *Lactiplantibacillus plantarum* (штам 1024) на базата на проф. С. Данава

- Проверка на изолатите с изолатите на референтния щам *Lactiplantibacillus plantarum* (штам 1024) на базата на проф. С. Данава
- Използване на изолатите за изследване на антагонистична активност на пробата със соев и домашно, в пробата ферментирала със соев
- Използване на изолатите за изследване на антагонистична активност на пробата със соев и домашно, в пробата ферментирала със соев

ИН ВИТРО ДОКАЗАНО НА ИДЕНТИФИЦИРАНЕТО НА ЛАКТОБАЦИЛИТЕ ОТ РОДА *Lactiplantibacillus*



Използване на изолатите за изследване на антагонистична активност на пробата със соев и домашно, в пробата ферментирала със соев

14-та научна конференция на Българския контактен център на EFSA „Устойчива наука за безопасна храна“ 27-30.10.2021 г.



AGENT

ПРОЕКТ AGENT - ГЛОБАЛНА МРЕЖА ОТ ГЕНБАНКИ, ЗА УСТОЙЧИВО ГЕНЕТИЧНО РАЗНООБРАЗИЕ НА КУЛТУРИТЕ ЗА БЪДЕЩЕТО ПОКОЛЕНИЕ

Гергана Дешева, Евгения Вълчинова, Катя Узунджикова, Божидар Кюсев

gergana_deshewa@abv.bg



AGENT

• Проектът AGENT - „Activated GeneBank Network“ стартира официално през май 2020 г. Той се финансира от европейската програма HORIZON 2020 / SFS-28-2018-2019-2020-Генетични ресурси и общности за предварително размножаване / H2020-SFS-2019 - 2 - Добавяне на стойност към генетичните ресурси на растенията.

AGENT

• Проектът AGENT (2020-2025) има за цел да развърне пълният потенциал на биологичния материал от пшеница и ечемик, съхраняван в генбанките по целия свят, като използва международните стандарти за данни FAIR („Навременно - Достъпно - Интерактивно съвместимо - Многократно използваемо“) за подобряване на управлението и въздействието на новия и вече съществуващи данни за селекционни цели и съхранение;

AGENT

• Проектът се координира от Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant, Gatersleben (Germany) в сътрудничество с 19 партньори, представляващи 16 държави: Русия, Полша, България, Чехия, Израел, Унгария, Испания, Нидерландия, Румъния, Словакия, Италия, Германия, Китай, Франция, Швейцария и Обединеното кралство.

ЦЕЛИ на AGENT

- > Създаване на мрежа от генни банки, които си сътрудничат активно, събират нови данни и работят по договорените стандарти и протоколи за използване на данни съхраняваната информация и прилагането на принципите на FAIR („Навременно - Достъпно - Интерактивно съвместимо - Многократно използваемо“) за подобряване на управлението и въздействието на новия и вече съществуващи данни за селекционни цели и съхранение;
- > Генериране на нова генетична информация за европейските колекции от пшеница и ечемик, за да се провърват път за асобираване глобален атлас за биоразнообразието на пшеница и ечемик и да се използва тази обширна генетична информация за оценка на качеството и редуциране на съществуващите колекции от генетични ресурси като основа за нова подходи за контрол и управление;
- > Получаване на нова и историческа генетична и фенотипна информация за стимулиране на откриване на гени, признаци и знания за бъдещи изследвания;
- > Създаване на мрежа от заинтересовани страни от селекционери, земеделски производители и неправителствени организации, които да работят по фенотипната оценка на генетичните ресурси в AGENT, за да се увеличи лъчността на данните за колекциите и да се разпространи общественото въздействие на генетичните ресурси.

ПРИНОСИ на AGENT



ПРИНОСИ на ИРГР-Садово

RP2

• Създаване на европейски атлас за биоразнообразието от РГР от пшеница и ечемик.

RP3

• Създаване на европейски атлас за фенотипна информация за РГР.

RP7

• Инновативно управление-насърчаване на използването на РГР, споделяне на ресурси, изграждане на капацитет и комуникация и разпространение на резултати.



PRELIMINARY DATA ON *ESCHERICHIA COLI*, *YERSINIA ENTEROCOLIITICA* AND OTHER BACTERIAL SPECIES IN THE INTESTINAL MICROBIOTA OF WILD RODENTS FROM RILA MOUNTAIN

Yana Dieva¹, Maya M. Zaharieva¹, Lyudmila Dimitrova¹, Mila Kaleva¹, Mihaela Belcheva², Iliana Aleksieva², Hristo Najdenski¹

¹ Department of Infectious Microbiology, The Stefan Angeloff Institute of Microbiology, Bulgarian Academy of Sciences, 26, Acad. Georgi Bonchev str., 1113, Sofia, Bulgaria;

² Department of Ecosystems Research, Environmental Risk Assessment and Conservation Biology, Institute of Biodiversity and Ecosystem Research, Bulgarian Academy of Sciences, 2 Gagarin str., 1113, Sofia, Bulgaria

Introduction

- Wild rodents are carriers of foodborne pathogenic bacteria like *Escherichia coli* and *Salmonella* spp.
- Rodents could contribute to the spread of antimicrobial (antibiotic) resistance (AMR) if their intestinal bacteria carry genes for AMR and are able to exchange them with other bacteria through horizontal gene transfer.
- Small mammals like rodents have a significant biological reaction to the human-caused environmental changes which could influence their gut microbiota.

All of this determines the importance of the research of the intestinal microflora of wild small rodents.

Materials and Methods

Animal collections

- summer of 2019
- Rila Mountain (locality Skakavtsite, 1500 m a.s.l.)
- live-bait and snap traps
- All collected animals were dissected to remove the intestinal tract and fecal matter was taken from the rectum.

2 ♂ forest voles
(*Clethrionomys glareolus*)

7 yellow-necked mice
(*Apodemus flavicollis*)
(2 ♀ and 5 ♂)



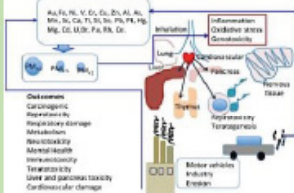
herbivorous



omnivorous



Area of field lab village



Small mammals like rodents were also selected due to:

- large population number
- wide distribution area

Results

- 52 pure cultures were isolated from single bacterial colonies.
- They were identified morphologically or biochemically as *E. coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Y. kristensenii*, *Hafnia alvei*, *Serratia marcescens*, *Serratia liquefaciens*, *Pantoea agglomerans*, *Klebsiella pneumoniae* sp. *ozaenae*, *Enterobacter cloacae*, *Bacillus thuringiensis*, *Enterococcus faecium* and *E. faecalis*.



Isolates identified as *Y. enterocolitica* by BD Phoenix™ (isolates 13, 14 and 16)

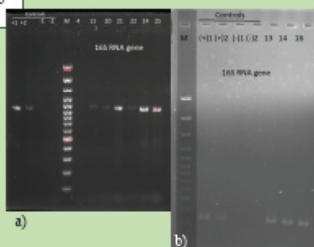
- The antimicrobial susceptibility and resistance of 16 bacterial species was elucidated by BD Phoenix™
- The strains most resistant to antibiotics turned out to be *E. faecalis*, *Y. enterocolitica* and *H. alvei*

An example of Antimicrobial susceptibility of an isolate (*Y. enterocolitica*, sample13)

Antimicrobial (antibiotic)	MIC (µg/mL)	
Amikacin	<=4	S
Amoxicillin	>=8/2	R
Clavulante (f)		
Ampicillin	>8	R
Aztreonam	<=1	S
Cefazolin	>=4	R
Cefoxime	<=0.5	S
Cefazidime	1	S
Cefuroxime	8	R
Cephalexin	16	R
Ciprofloxacin	<=0.125	S
Colistin	<=1	X
Fosfomycin	32	S
w/GGP		
Gentamicin	2	S
Meropenem	<=1	S
Nitrofurantoin	32	S
Piperacillin	<=4/4	S
Tazobactam		
Tobramycin	<=1	S
Trimethoprim	<=1	S
Trimethoprim-Sulfamethoxazole	<=1/19	S

MIC – Minimal inhibitory concentration
R – Resistant
S – Susceptible
X – Cannot give an interpretation

7 of the colonies were confirmed as *E. coli* and 3 of them were confirmed as *Y. enterocolitica* by PCR.



PCR confirmation of 7 strains of *E. coli* (a) and 3 strains of *Y. enterocolitica* (b)

The *ail* pathogenicity and virulence gene was not found in the yersinias using traditional and ddPCR.

Classic microbiological methods - the method of serial dilutions, bacterial culturing on differential media, Gram stain, microscopic slide examination by light microscopy, etc.



Identification of bacteria
Biochemical: BD Phoenix™
Automated Identification and Susceptibility Testing – used also for antimicrobial resistance elucidation



Identification of bacteria
Molecular-biology methods: conventional PCR, digital droplet PCR

Conclusions

52 bacterial species were isolated from single colonies from the gut microflora of small wild rodents in Bulgaria. Opportunistic pathogens were identified: 7 and 3 of them were confirmed as *E. coli* and *Y. enterocolitica*, resp. by PCR. This study is a platform for future biomonitoring, ecological and ecotoxicological research and for studying the spread of (non-)pathogenic bacteria and zoonoses among wild rodents and the fauna in general in Bulgaria.

Acknowledgments: The study was supported by the National Program "Young Scientists and Postdoctoral candidates" of Ministry of Education and Science

Pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* isolates from retail foods

 Margarita Terentjeva^{1,2}, Irina Mlobereva¹, Laura Allone¹, Silke Gradovska¹, Julia Šibillo¹, Madara Števklika¹, Jevgenija Osmjana¹, Olga Velcova¹
¹Institute of Food safety, Animal health and Environment "BIOR", Riga, Latvia;

²Faculty of Veterinary Medicine, Latvia University of Life Sciences and Technologies, Jelgava, Latvia;

Corresponding author Dr. Margarita Terentjeva, Margarita.Terentjeva@lu.lv

INTRODUCTION

- *Yersinia enterocolitica* is the 4th the most frequently reported foodborne zoonotic infection within the European Union.
- Consumption of undercooked pork was identified as the most significant factor for sporadic yersiniosis.
- Vegetables – lettuce, carrots – were involved in foodborne outbreaks of yersiniosis within the EU.
- Identification of virulence factors is important for understanding of the epidemiology of *Yersinia enterocolitica* within the food chain.

THE AIM OF THE STUDY



The aim of the present study was to detect the prevalence and characterize virulence of *Yersinia enterocolitica* isolated from retail and vegetables

MATERIALS AND METHODS

Investigation of samples

- A total of 180 samples including raw pork and 30 or fresh salad and vegetables were sampled in Latvia between 2015 and 2021
- Samples were investigated in accordance to ISO 10273:2017 «Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica*»
- Isolates were confirmed with matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TDF MS).

MATERIALS AND METHODS

Confirmation of pathogenicity of *Y. enterocolitica* isolates

- *Y. enterocolitica* isolates were screened with PCR for pathogenicity by targeting:
 - *ail* - adhesion and invasion locus
 - *yst* - *Yersinia* stable heat-stable enterotoxin
 - *ystA*
 - *ystB*

Table 1

 Oligonucleotides used in the present study for detection of virulence of *Yersinia enterocolitica* isolates

Primer	Sequence	Length of the amplicon, bp	Gene bank ref.No.	Reference
ye-ai-F2	5'-GGTTGTGACAAAGCGATGAA-3'	93	KF289671	ISO, 2015
ye-ai-R2	5'-AAGGAACTACTACTCCCGAGTT-3'	93	KF289671	ISO, 2015
ystA-F	5'-ATGCGACCAAGACAGCGCTGAG-3'	79	X25999	Thoenner et al., 2003
ystA-R	5'-CCATCACTACTGACTGTGGCT-3'	79	U09235	Thoenner et al., 2003
ystB-F	5'-GTACGTAGGCCAAGAGAGG-3'	146	D88145	Rusak et al., 2018
ystB-R	5'-GCACATKCCCTCAACACC-3'	146	D88145	Rusak et al., 2018

RESULTS

Yersinia enterocolitica in raw pork

- The identified prevalence of *Y. enterocolitica* in raw meats – 26 %
- The presence of *ail*-gene was confirmed in 6 Isolates – 4%
- *ail*-gene Ct range was from 16.27 to 39.28

Yersinia enterocolitica in fresh salads and vegetables

- *Y. enterocolitica* was isolated from 3 fresh produce samples
- All isolates were *ail*-negative

Virulence properties of *Yersinia enterocolitica* isolates

 Table 2
Virulence characteristics of *Yersinia enterocolitica* isolates in fresh meat

Pathogenicity	No. of isolates	Virulence characteristics		
		<i>ail</i> Ct range	<i>ystA</i>	<i>ystB</i>
High <i>ail</i> Ct values	3	16.27-17.31	+	-
Low <i>ail</i> Ct values	3	28.15-39.28	-	+

 Table 3
Virulence characteristics of *Yersinia enterocolitica* isolates in fresh produce

Pathogenicity	No. of isolates	Virulence characteristics		
		<i>ail</i>	<i>ystA</i>	<i>ystB</i>
Non-pathogenic	3	-	+	-

CONCLUSIONS

- Retail meats and vegetables were found to be contaminated with *Yersinia enterocolitica*
- Contamination of raw pork with human pathogenic *Y. enterocolitica* (*ail* – positive, *ystA* – positive, *ystB* – positive) was found
- Pork may serve as a source of pathogen for consumer

 Acknowledgements: The present study was funded by the Latvian Council of Science, project No. lrp-2020/2-0418 "Epidemiology and genetic characterization of *Yersinia* spp. within the food chain".

Възможности за предварително размножаване на базисен посадъчен материал от медицинският вид *Ruta graveolens* L. чрез прилагане на вегетативни методи

Станислава Статева

Институт по растителни генетични ресурси, бул. „Дружба“ №2, 4122 Садово, България, e-mail: stanislava.stateva@gmail.com

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Изследванията са проведени в лабораторията по тъканни култури при Института по растителни и генетични ресурси “Константин Малков” – град Садово. За въвеждане в култура *in vitro* като изходен материал са използвани семена от вида *R. graveolens* L. с произход блико до находище в резерват „Каликара“.

Обеззаразване на семената от изходния растителен материал е проведено с 50 % СДНСОН за 3 min последвано от 20 % Белина (сдържаша 5 % активен хлор) за 15 min.

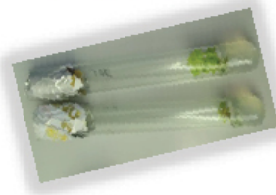
Растителните материали е заложени в индивидуални епруветки с вместимост 20 ml на среда Murashige and Skoog (1962). Използваните растителни регулатори са Zeatin и ВАР в концентрации от 0.2, 0.5 и 1.0 mg/l.

Експлантите са взорнени на хранителна среда MS, с добавени растителните регулатори IAA и NAA в три различни комбинации (0.2, 0.5 и 1.0 mg/l).

За контрола е приложена хранителна среда Murashige and Skoog (1962), без добавени растителни регулатори.

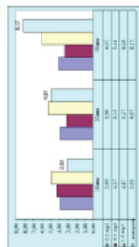
РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

При отчитане на биометричните показатели измерването на ефекта от действието на ВАР върху мултипликационния процес при вида *Ruta graveolens* L. се наблюдава месец след залагане на растенията върху хранителната среда. Действието ВАР се отчита с елиминиране на апикалното доминиране, като по този начин предизвиква развитието на странични пъпки и започва процеса на пролиферация на новите експланти.

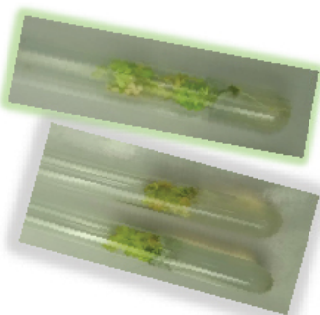


ИЗВОДИ

1. От извършеното наблюдение се установи, че ниските концентрации ВАР водят до максимално мултиплициране на вида *Ruta graveolens* L. със стойности превишаващи контролния вариант. Прилагането на високи концентрации от 1.0 mg/l Zeatin водят до максимално мултиплициране на вида със стойности превишаващи контролния вариант.
2. Реакцията на вида *Ruta graveolens* L. към добавени ауксини в хранителната среда се отвори от 0.2 mg/l NAA, с най-високи показатели за растеж и развитие.



Фиг. 1. Влияние Zeatin върху показателя брой листа на експлантите от *R. graveolens*



Добавянето на IAA в минимално количество (0.2 mg/l) се наблюдава разрастване на недиференцирана калусна тъкан, а при повишаване на концентрацията на този ауксин (1.0 mg/l) се появяват корени сред калуса. Най-голям процент вкоренени растения- 100% с голям брой образували се корени се отчита във вариант с участието на 1.0 mg/l IAA, за разлика от контролния вариант с 50%.

От проведените наблюдения върху развитието на експлантите отчитане максимална стойност на 30-я ден в 0.2 mg/l NAA.

Развитието на кореновата система през последния период на измерване в 0.2 mg/l е с най-високи показатели на развитие. С увеличаване периода на наблюдение на микрорастенията, коренообразуването е с високи показатели на отчитане.

Сравняйки проучаваните показатели, установяваме, че няма статистически значима разлика между тях и контролния вариант при статистическа грешка $\alpha = 0.1\%$. Оказва се, че има статистически значима разлика между броя на корените и контролния вариант при статистическа грешка $\alpha = 5\%$.

Табл. 1. Влияние на IAA в хранителната среда Murashige and Skoog (1962) при *Ruta graveolens*

Вид ауксин	Брой корени от експлант	Дължина от кореновата система	на % вкоренени експланти
контрол	1.2050.00	1.3450.115	50
0.2 mg/l IAA	2.2150.24	2.3550.295	50
0.5 mg/l IAA	3.7750.325	2.0050.195	5
1.0 mg/l IAA	3.3050.325	1.8050.115	100



*Център за оценка на риска по хранителната верига не носи отговорност за допуснати фактически и технически грешки в публикуваните материали на външни автори

*Risk assessment center on food chain is not responsible for any factual or technical errors in the published materials of external authors



**EFSA КОНТАКТЕН ЦЕНТЪР
БЪЛГАРИЯ**

Български контактен център,
Център за оценка на риска по хранителната верига
EFSAfocalpoint@mzh.government.bg
<http://focalpointbg.com>



EFSA КОНТАКТЕН ЦЕНТЪР
БЪЛГАРИЯ

**БЪЛГАРСКИ КОНТАКТЕН
ЦЕНТЪР НА EFSA –
ЦЕНТЪР ЗА ОЦЕНКА НА
РИСКА ПО
ХРАНИТЕЛНАТА ВЕРИГА**

**BULGARIAN FOCAL POINT
OF EFSA-
RISK ASSESSMENT CENTER
ON FOOD CHAIN**



<http://focalpointbg.com>



<http://corhv.government.bg>

