

# Молекулярни методи за мониторинг на токсигенни видове морски фитопланктон

Проф. д-р Йордан Гогов,  
Гл.ас. д-р Гергана Крумова-Вълчева

# ВЪВЕДЕНИЕ



- Морският фитопланктон има способността да образува и отделя в околната среда токсични вещества, наречени **Морски биотоксини**
- Микроскопичните планктонни алги са важен елемент от филтърното хранене на двучерупчестите мекотели (стриди, миди, пектени), обект на интензивна търговия в целия свят.
- От съществуващите около 5000 морски алги, 300 се оценяват като рискови по отношение продукцията на различни токсични субстанции.

# ВЪВЕДЕНИЕ



- Във връзка с това при производството и търговията с двучерупчести мекотели в световен мащаб са въведени строги мерки, гарантиращи здравната безопасност на консуматора.
- Част от тези мерки включват системен мониторинг на токсичния фикопланктон във водите от производствените райони, както и мониторинг на живите двучерупчести мекотели за съдържание на морски биотоксини

# ТОКСИЧНИЯТ ФИТОПЛАНКТОН В ЕВРОПЕЙСКОТО ЗАКОНОДАТЕЛСТВО



- Регламент (ЕО) № 853/2004 предвижда максималните допустими стойности за морските биотоксини;
- Регламент (ЕО) № 2019/627 установява планове за мониторинг и вземане на проби в зоните на производство на живи двучерупчести мекотели.

02019R0627 — EN — 09.01.2023 — 003.001 — 1

This text is meant purely as a documentation tool and has no legal effect. The Union's institutions do not assume any liability for its contents. The authentic versions of the relevant acts, including their preambles, are those published in the Official Journal of the European Union and available in EUR-Lex. Those official texts are directly accessible through the links embedded in this document

► **B** COMMISSION IMPLEMENTING REGULATION (EU) 2019/627  
of 15 March 2019

laying down uniform practical arrangements for the performance of official controls on products of animal origin intended for human consumption in accordance with Regulation (EU) 2017/625 of the European Parliament and of the Council and amending Commission Regulation (EC) No 2074/2005 as regards official controls

(Text with EEA relevance)

(OJ L 131, 17.5.2019, p. 51)

Amended by:

| Official Journal |                                                                        |  |  |  |  |       |      |            |  |
|------------------|------------------------------------------------------------------------|--|--|--|--|-------|------|------------|--|
|                  |                                                                        |  |  |  |  | No    | page | date       |  |
| ► <b>M1</b>      | Commission Implementing Regulation (EU) 2020/2108 of 16 December 2020  |  |  |  |  | L 427 | 1    | 17.12.2020 |  |
| ► <b>M2</b>      | Commission Implementing Regulation (EU) 2021/1709 of 23 September 2021 |  |  |  |  | L 339 | 84   | 24.9.2021  |  |
| ► <b>M3</b>      | Commission Implementing Regulation (EU) 2022/2503 of 19 December 2022  |  |  |  |  | L 325 | 58   | 20.12.2022 |  |

Corrected by:



# ТОКСИЧНИЯТ ФИТОПЛАНКТОН В ЕВРОПЕЙСКОТО ЗАКОНОДАТЕЛСТВО



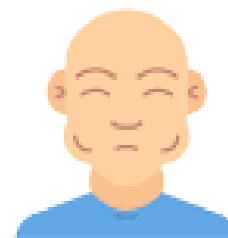
- Съгласно Регламент (ЕО) № 2019/627 е необходимо да се извършва периодично вземане на проби за откриване на изменения в състава на токсичния фитопланктон и неговото разпространение в производствените райони.
- При резултати, които сочат за наличие на токсини в месото на живите двучерупчести мекотели, се извършва последващо интензивно вземане на проби;



# ТОКСИЧНИЯТ ФИТОПЛАНКТОН В ЕВРОПЕЙСКОТО ЗАКОНОДАТЕЛСТВО



- Мониторинг на биотоксини в двучерупчестите мекотели и въздействие им върху здравето на консуматорите са важни задачи в контрола на морските храни, тъй като морските биотоксини могат да причинят сериозни заболявания при хората.



# ОСНОВНИ НЕБЛАГОПРИЯТНИ ЕФЕКТИ ВЪРХУ ЧОВЕШКИЯ ОРГАНИЗЪМ



| Морски<br>биотоксини | Група | Източник                                                                                         | Сипмтоматика                                                                                                            |
|----------------------|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Сакситоксини         | PSP   | <i>Alexandrium</i> spp.<br><i>Gymnodinium catenatum</i><br><i>Pyrodinium bahamens</i>            | Стомашно-чревни симптоми<br>Паралитичен феномен<br>Възстановяване или смъртен изход                                     |
| Домоена киселина     | ASP   | <i>Pseudo-nitzschia</i> spp.<br><i>Nitzschia</i> spp.                                            | Стомашно-чревни и<br>неврологични симптоми;<br>Сърдечни и респираторни<br>проблеми;<br>Възстановяване или смъртен изход |
| Окадаена киселина    |       | <i>Prorocentrum lima</i><br><i>Dinophysis</i> spp.                                               | Стомашно-чревни симптоми<br>Възстановяване за 3 дни                                                                     |
| Пектенотоксини       | DSP   | <i>Dinophysis</i> spp                                                                            | Стомашно-чревни симптоми                                                                                                |
| Йесотоксини          |       | <i>Protoceratium reticulatum</i><br><i>Lingulodinium polyedrum</i><br><i>Gonyaulax spinifera</i> | Липса на данни за<br>въздействие при хората                                                                             |
| Азаспирациди         |       | <i>Amphidoma languida</i><br><i>Azadinium spinosum</i>                                           | Стомашно-чревни симптоми                                                                                                |

# Видове фитопланктон, предизвикващ паралитично отравяне (PSP)

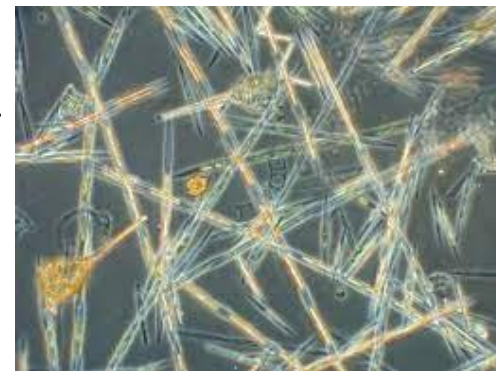
- Основните продуценти на PSP токсини са динофлагелати от рода *Alexandrium*
- Срещат се предимно в района на Атлантическия и Тихия океан;
- В Средиземно море, се срещат други видове като *Gymnodinium catenatum*, които също са отговорни за продуцирането на PSP-токсини





# Видове фитопланктон, предизвикващ амнезиево отравяне (ASP)

- Основните продуценти на амнезиеви токсини (домоена киселина) са морски диатоми от род *Pseudo-nitzschia*
- Срещат се предимно в Северна Америка;
- До този момент не са докладвани случаи на заболяване при хора в нито една европейска страна или регион





# Видове фитопланктон, предизвикващ диаричен синдром (DSP)

- DSP-токсините са полиетерни съединения с характерни химични структури с разнообразна биологична активност;
- DSP-токсините се разделят в 4 групи: **окадаена киселина, пектенотоксини, йесотоксини и азаспирациди.**

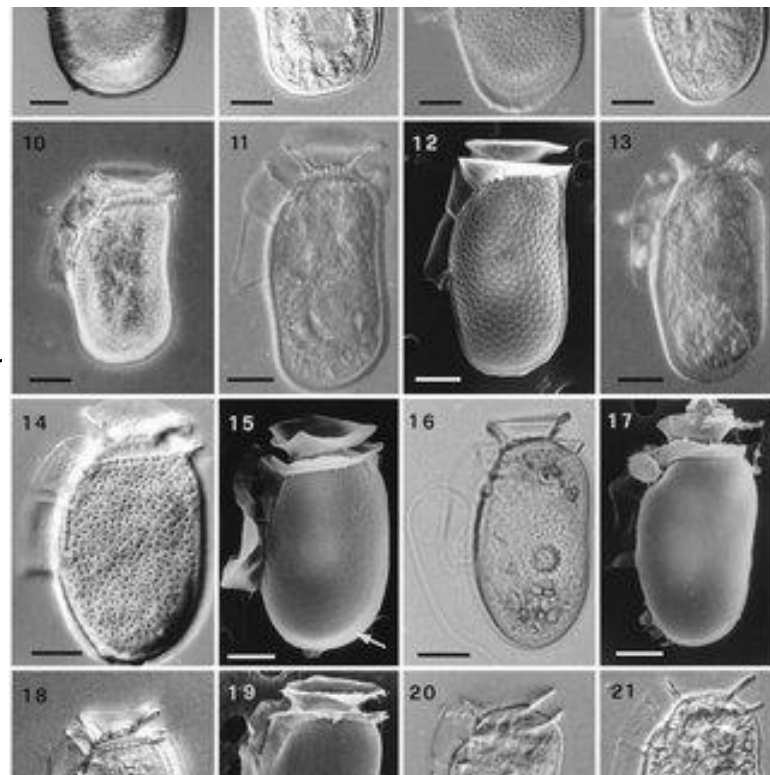
# Окадаена киселина (ОА)

- Основните продуценти на окадаена киселина са динофлагелатите от родовете *Dinophysis* и *Prorocentrum*



# Пектенотоксини

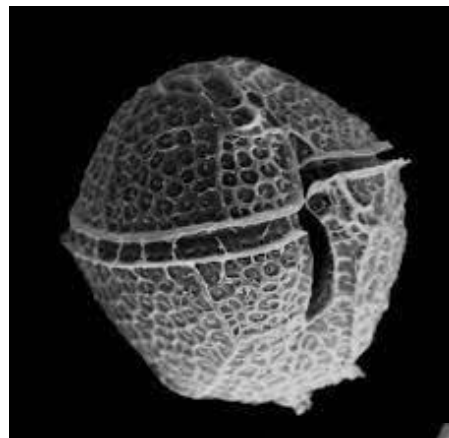
- Пектенотоксините са циклични полиетери с морски произход
- Основните продуценти на пектенотоксините са *D. acuta*, *D. fortii*, *D. acuminata* и *D. caudata*.





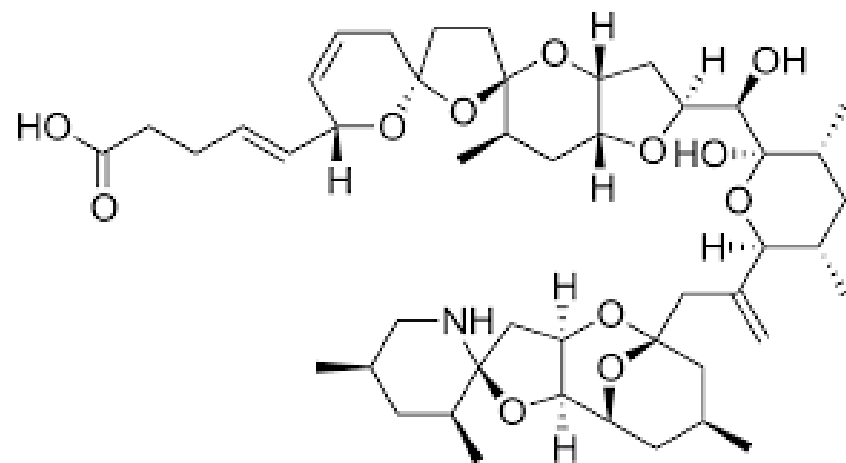
# Йесотоксини

- Йесотоксинът и неговите аналози се произвеждат от динофлагелатите *Protoceratium reticulatum*, *Lingulodinium polyedrum* и *Gonyaulax spinifera*



# Азаспирациди

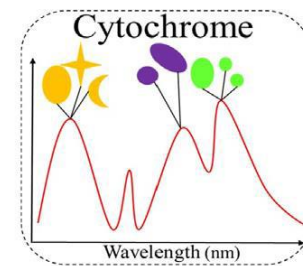
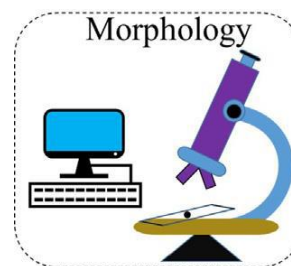
- Азаспирацидите са азотсъдържащи полиетерни токсини, които също се продуцират от представители на р. *Dinophysis*.



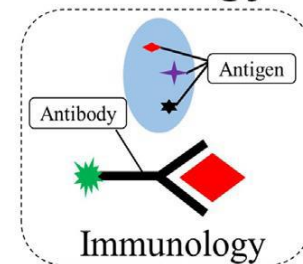
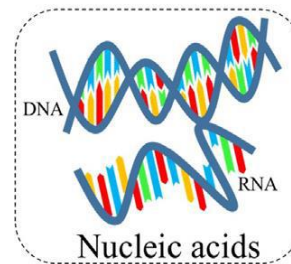
# МЕТОДИ ЗА ДОКАЗВАНЕ НА ФИТОПЛАНКТОН В МОРСКА ВОДА



- Прилагането на съвременни методи за откриване на токсините е важно условие за контрол на установените граници в европейското законодателство.
- Традиционно мониторингът на токсино-продуциращите микроалги се основава на методите за откриване, базирани на тяхната морфологична структура.



## Detection Technology



# Техника за микроскопско изследване



- Международно признат метод за идентификация за микроводораслите;
- Извършва се определяне на вида според морфологичните характеристики на клетките.



# Техника за микроскопско изследване



## ➤ Предимства:

- ✓ Международно признат метод;
- ✓ Дава възможност за откриване на характеристиките на морфологията и вътрешната структура на микроводораслите;
- ✓ Сравнително точен метод

## ➤ Недостатъци:

- ✗ За да се проведе метода е необходим персонал с добри познания върху фитопланктонната таксономия;
- ✗ Слабо ефективен метод, който не може да отговори на изискванията за бърз и навременен анализ на пробите, особено когато пробите са многобройни;
- ✗ Някои токсични микроалги са твърде микроскопични, за да бъдат идентифицирани без помощта на електронен микроскоп;
- ✗ Някои алги са без или с много тънки клетъчни стени, които може да бъдат деформирани по време на фиксирането и съхранението на пробата, което от своя страна може да повлияе на резултатите от идентификацията.



# Съвременни методи за доказване на токсичен фитопланктон



- През 2017 г. за първи път е валидиран TaqMan метод за откриване на *Azadum spinosum* (фитопланктон, продуциращ азаспирациди) в морска вода;
- През 2022 г. е създадена работна група за валидиране на real-time PCR метод за доказване на *Alexandrium* spp. и въвеждането му в рутинната диагностика.

# Техника за откриване на нуклеинови киселини



- Технологията за откриване на нуклеинови киселини се основава на разнообразието от нуклеиновите последователности и постига целта за специфична идентификация на търсените видове;
- Технологията за откриване на нуклеинови киселини е по-ценна за ранната диагностика от другите технологии за откриване;
- Характеризира се с високата чувствителност и точност.

# Видове техники за откриване на нуклеинови киселини

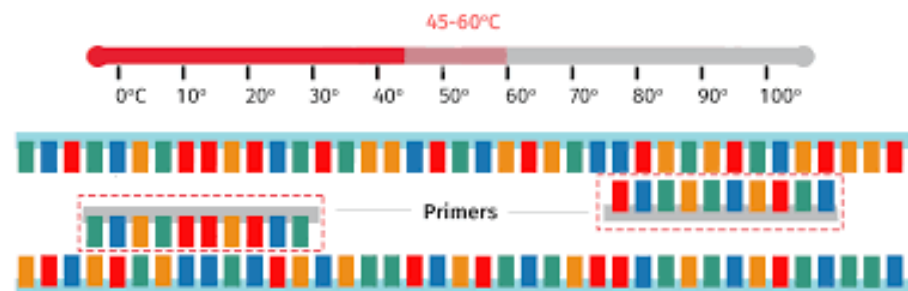


- Флуоресцентна хибридизация *in situ*
- Хибридизационен анализ тип сандвич
- Полимеразна верижна реакция (PCR)
- Технология на изотермична амплификация
- Генно чипиране

# ПОЛИМЕРАЗНА ВЕРИЖНА РЕАКЦИЯ (PCR)



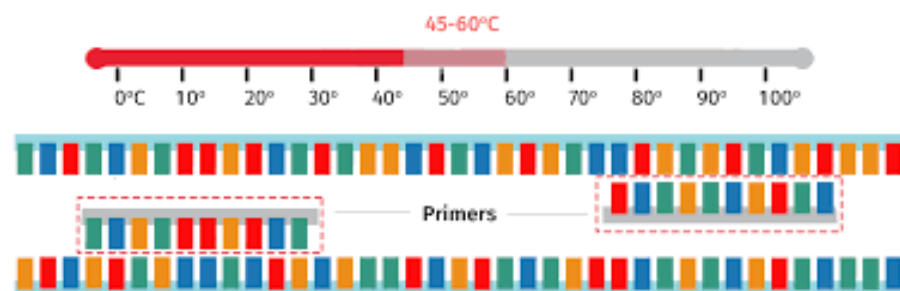
- Същността на PCR метода се състои в имитиране на естествения процес на репликация на ДНК *in vitro*, т.е. конкретен фрагмент се размножава с помощта на специфични праймерни двойки, след което се извършва качествен и количествен анализ.



# ПОЛИМЕРАЗНО-ВЕРИЖНА РЕАКЦИЯ (PCR)

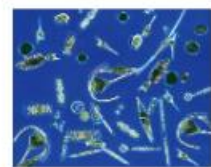


- Широко използвани за откриване на токсичен фитопланктон са количествения PCR (qPCR) и мултиплексния PCR (mPCR)





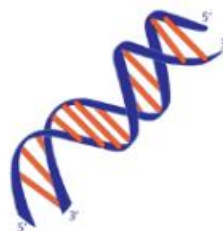
# Диаграма на процеса



токсичен  
фитопланктон



ДНК екстракция



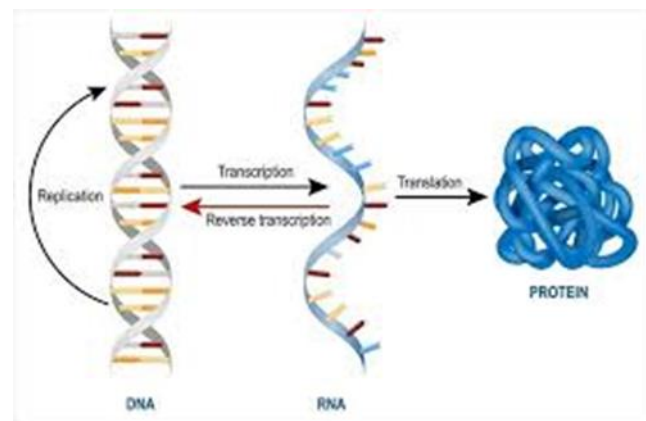
ДНК матрица



инструмент за  
qPCR

# Таргетни последователности

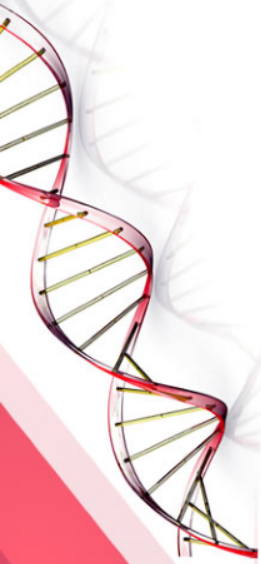
- Рибозомалните ДНК области от генома се използват като таргетни за откриване на различни токсични динофлагелати в морската вода;
- Изборът на конкретен регион като цел се основава най-вече на степента на изменчивост на всеки регион в рамките на определен вид



# Таргетни последователности

- Идентифицирането на гени, участващи в производството на сакситоксин (STX) в морски еукариотни фитопланктони, позволи разработването на тестове за откриване и количествено определяне на потенциала за производство на STX в проби от морската среда.



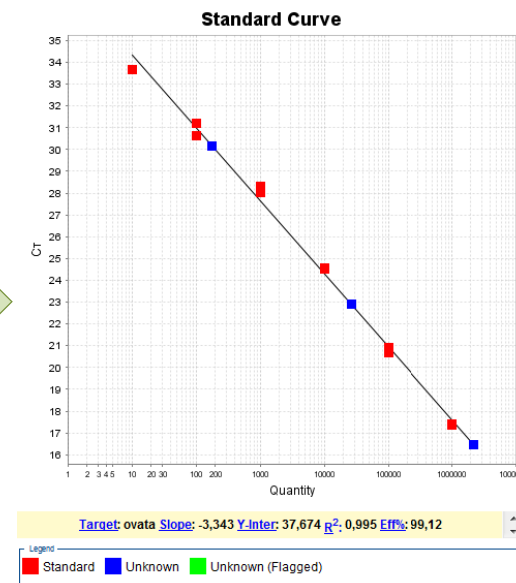
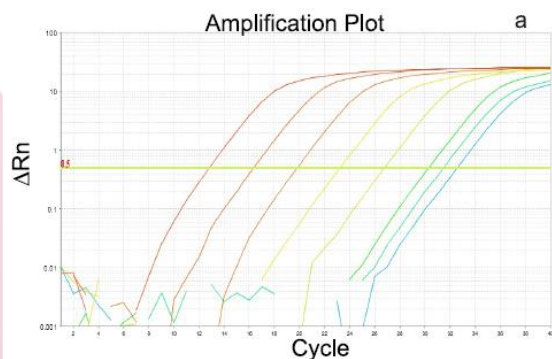


# Екстракция на нуклеиновите киселини

- Съществуват няколко метода за екстракция на ДНК, които водят до получаването на добре пречистени нуклеинови киселини от морски водорасли
- За да се избегне инхибиторният ефект на реакцията на РСР-амплификация, клетъчните лизати, съдържащи ДНК, може да бъдат разреждани.

# Амплификация на таргетните гени

- Оптимизирани са множество real-time PCR протоколи за количествено определяне, които използват различни стандартни криви, получени от 10-кратни разреждания на специфична матрица (ДНК, екстрахирана от клетки или таргетни плазмидни копия на ДНК)







# Амплификация на таргетните гени

- Трябва да се има предвид, че определянето на броя копия ДНК осигурява само груба корелация с числеността на клетките, тъй като не взема предвид потенциалната вътревидова вариабилност в броя на генните копия или ефекта на фазата на растеж.

# ПРИЛОЖЕНИЕ НА КОЛИЧЕСТВЕН real-time PCR (real-time qPCR)



- Откриване и количествено определяне на различни групи токсичен фитопланктон в морската среда;
- Подходящ е за доказването на *Alexandrium* spp., *Pseudo-nitzschia* spp., *Dinophysis* spp. и *Ostreopsis* spp.
- Подходящ за проби морска вода, в които клетките са в долната граница на откриване на оптичната микроскопия ( $<12$  клетки  $L^{-1}$ ).

# ПРИЛОЖЕНИЕ НА multiplex real-time PCR

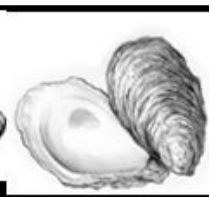
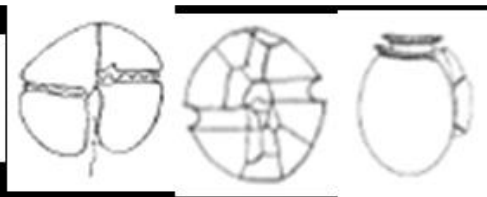


- Позволява откриването на различни таргетни гени в рамките на една PCR-реакция;
- Използва се като качествен анализ за определяне наличието едновременно на няколко вида токсичен фитопланктон

# ПРИЛОЖЕНИЕ НА МОЛЕКУЛЯРНИТЕ МЕТОДИ



- За изследване на
  - ❖ водни проби;
  - ❖ филтрирани, обработени или центрофугирани екстракти;
  - ❖ проби от седимента;
- В рутинни програми за мониторинг - за видово потвърждаване или като допълнителен анализ;
- В изследователски програми - за разрешаване на таксономични, филогенетични и токсигенни въпроси
- Когато се изисква бързо получаване на резултати



# ЗАЩО ДА ИЗПОЛЗВАМЕ МОЛЕКУЛЯРНИТЕ МЕТОДИ - *ПРЕДИМСТВА*



- ✓ Изследванията са бързи и с голяма чувствителност, специфичност, производителност и приложимост към проби от околната среда;
- ✓ Може да се постигне разграничаване на различни щамове от един и същи вид;
- ✓ Разграничаване на различни видове, които са морфологично еднакви;
- ✓ Диференциране на токсичните от нетоксичните видове;
- ✓ За определяне на състава на смесените популации;
- ✓ Може да се определи количеството на клетките или ДНК копията;

# ЗАЩО ДА ИЗПОЛЗВАМЕ МОЛЕКУЛЯРНИТЕ МЕТОДИ - *НЕДОСТАТЪЦИ*



- ✗ Специфичността и дизайна на изследването трябва непрекъснато да се преоценяват с оглед появата на нови видове и щамове;
- ✗ Невинаги е възможно да се разработи специфична сонда ;
- ✗ В пробата (полеви проби от вода/седимент), може да се съдържат вещества, които да инхибират флуоресценцията и да доведат до фалшиво отрицателни резултати;
- ✗ Потенциални загуби на ДНК по време на екстракцията



# ТОКСИЧЕН ФИТОПЛАНКТОН В БЪЛГАРИЯ



- Съществуват ограничени данни, получени на базата на микроскопското изследване;
- В периода 2014-2017 са доказани присъствието на 14 таксономични класа фитопланктон във водите на българската акватория на Черно море без да е намерена връзка с токсинопродукциране;

141

---

*Bulgarian Journal of Agricultural Science, 25 (Suppl. 3) 2019  
Agricultural Academy*

## **Phytoplankton quantitative development and species diversity in the Bulgarian Black Sea waters during 2014-2017**

**Daniela Klisarova<sup>1\*</sup>, Dimitar Gerdzhikov<sup>1</sup>, Gergana Kostadinova<sup>2</sup>, Diyana Dermendzhieva<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Institute of Fish Resources, Primorski Blvd. 4, 9000 Varna, Bulgaria*

<sup>2</sup>*Trakia University, Faculty of Agriculture, Department of Applied Ecology and Animal Hygiene, 6000 Stara Zagora, Bulgaria*

*\*Corresponding author: danielaklisarova1@abv.bg*

# ТОКСИЧЕН ФИТОПЛАНКТОН В БЪЛГАРИЯ



- Проучване, проведено през 2017 г. отново доказва за наличието на 49 вида фитопланктон, принадлежащи към 8 класа (Kalcheva et al. 2021);
- Установява се наличие на *Gonyaulax* sp. и *Nitzschia* sp., които имат потенциал за продуциране на ТОКСИНИ

## ECOLOGIA BALKANICA

2021, Vol. 13, Issue 2

December 2021

pp. 37-45

### *Phytoplankton Study in Pomorie Lake, Black Sea (Bulgaria)*

*Silvia E. Kalcheva<sup>1\*</sup>, Daniela P. Klisarova<sup>2,3</sup>,  
Dimitar B. Gerdzhikov<sup>3</sup>, Dian M. Georgiev<sup>1</sup>*

1 - Trakia University, Faculty of Agriculture, Department of  
Biology and aquaculture, Stara Zagora 6000, BULGARIA

2 - Medical University – Pleven, Faculty of Medicine, Department of Anatomy,  
Histology, Cytology and Biology, Pleven, 5800, BULGARIA

3 - Institute of Fish Resources, Agricultural Academy, Varna 9000, BULGARIA

\*Corresponding author: silviya\_kalcheva@abv.bg

# ТОКСИЧЕН ФИТОПЛАНКТОН В БЪЛГАРИЯ



- Последните данни за наличието на токсичен фитопланктон са докладвани през 2022 г. (Dzhembekova et al. 2022);
- Потенциално токсичните видове *Dinophysis* sp. са доказани с използването на микроскопския метод;
- Прилагането на техниката NGS обаче открива и присъствието на два токсинообразуващи вида, принадлежащи към родовете *Alexandrium* и *Pseudo-nitzschia*



Article

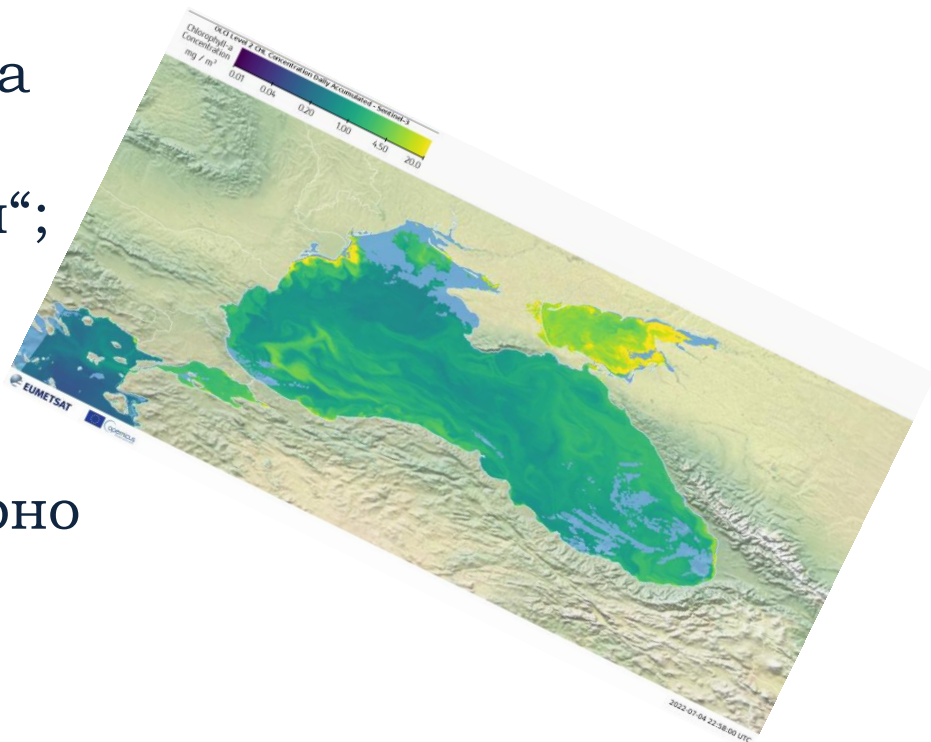
## New Knowledge on Distribution and Abundance of Toxic Microalgal Species and Related Toxins in the Northwestern Black Sea

Nina Dzhembekova <sup>1,\*</sup>, Snejana Moncheva <sup>1</sup>, Nataliya Slabakova <sup>1</sup>, Ivelina Zlateva <sup>1</sup>, Satoshi Nagai <sup>2</sup>, Stephan Wietkamp <sup>3</sup>, Marvin Wellkamp <sup>3</sup>, Urban Tillmann <sup>3</sup> and Bernd Krock <sup>3,\*</sup>

# ТОКСИЧЕН ФИТОПЛАНКТОН В БЪЛГАРИЯ



- Появата на токсичен фитопланктон във водите на Черно море се свързва с повишаване на температурата на водата през пролетните месеци и появата на „цъфтежи“;
- Въпреки доказаните ниските нива на фикотоксини, наличието на потенциално токсичен фитопланктон в Черно море не бива да изключва опасността от хронично токсично излагане и възникване на хранителни отравяния при хората.



# ЗАКЛЮЧЕНИЕ



- Поради високата си специфичност и чувствителност, изследванията с метода на real-time qPCR представляват ефективен инструмент за откриване на фитопланктонни клетки в периода преди цъфтежа.
- Ранното откриване на потенциално токсични видовете фитопланктон е необходимо, за да се осигури ранно предупреждение за опазване на човешкото здраве и аквакултурите;
- Въпреки това се налага широкообхватно валидиране на методите поради възможната променливост в нуклеотидната последователност на различните фитопланктони в рамките на един и същ вид

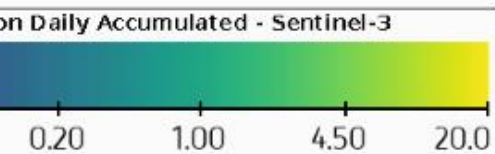


# ЗАКЛЮЧЕНИЕ



- Ефикасността на оценката на риска от морски биотоксини силно зависи от мониторинга на токсичния фитопланктон във водата;
- Ефективните стратегии за мониторинг чрез комбиниране на молекулярни и химични методи биха могли да играят основна роля в предотвратяването и управлението на здравните и икономическите рискове, свързани с цъфтежа на токсичен фитопланктон в крайбрежните зони и производствените райони.





БЛАГОДАРЯ ЗА  
ВНИМАНИЕТО!