

Akumulacija biotoksina u školjkašima (Mollusca, Bivalvia)

Sabolić, Iva

Undergraduate thesis / Završni rad

2012

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:074345>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-17**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Akumulacija biotoksina u školjkašima
(Mollusca, Bivalvia)

Accumulation of biotoxins in bivalves
(Mollusca, Bivalvia)

SEMINARSKI RAD

Iva Sabolić

Preddiplomski studij Znanosti o okolišu

Undergraduate study of Environmental sciences

Mentor: doc. dr. sc. Jasna Lajtner

Zagreb, 2012.

Sadržaj:

1. Uvod	2
2. Okadaična kiselina	4
2.1 Organizmi koji produciraju okadaičnu kiselinu	4
2.2 Akumulacija okadaične kiseline u školjkašima	5
2.3 Dijareično trovanje školjkašima - DSP	5
3. Saxitoksini	6
3.1 Organizmi koji produciraju saxitoksine	6
3.2 Akumulacija saxitoksina u školjkašima.....	7
3.3 Paralizirajuće trovanje školjkašima - PSP	7
4. Domoična kiselina	9
4.1 Organizmi koji produciraju domoičnu kiselinu	9
4.2 Akumulacija domoične kiseline u školjkašima	10
4.3 Trovanje školjkašima s posljedičnim gubitkom pamćenja - ASP	10
5. Brevetoksini	12
5.1 Organizmi koji produciraju brevetoksine	12
5.2 Akumulacija brevetoksina u školjkašima	13
5.3 Neurotoksično trovanje školjkašima - NSP	13
6. Metode detekcije biotoksina u školjkašima	14
6.1 Testovi na miševima	14
6.2 ELISA test	15
6.3 Tekućinska kromatografija	16
7. Akumulacija biotoksina u školjkašima u Hrvatskoj.....	17
8. Literatura	19
9. Sažetak.....	21
10. Summary	22

1. Uvod

Mikroskopske planktonske alge su primarni proizvođači u hranidbenim mrežama u moru i slatkovodnim vodama. One predstavljaju glavni izvor hrane za školjkaše koji ih filtriraju iz okolne vode. No, u nekim slučajevima, velike količine planktonskih algi mogu imati negativne učinke koji izazivaju velike probleme u okolišu i ostavljaju ozbiljne posljedice na ljudsko zdravlje. Među sekundarnim metabolitima alga, identificirani su neki koji su snažni toksini. Od 5000 vrsta danas poznatih planktonskih algi oko 40 ih ima sposobnost producirati toksine koji mogu ozbiljno ugroziti ljudsko zdravlje (Apeldoorn, 1999). Biotoksini povezani sa slučajevima otrovanja ljudi produkt su nekih od vrsta dinoflagelata, dijatomeja i modrozelenih algi.

Kada dođe do cvjetanja algi, biotoksini se nakupe u velikim količinama te ih školjkaši, zajedno sa algama filtriraju kao hranu. Mnogo vrsta školjkaša koje ljudi koriste za prehranu, kao što su dagnje i kamenice, akumuliraju te biotoksine u svojim tkivima. Na same školjkaše toksini većinom nemaju nikakvog utjecaja, iako u jednom školjkašu ponekad može biti akumulirano dovoljno toksina da izazove smrt čovjeka koji ga konzumira. Toksična hrana ne izgleda, niti ima drugačiji okus od nekontaminirane, a kuhanje i ostale metode obrade hrane ne uništavaju toksine.

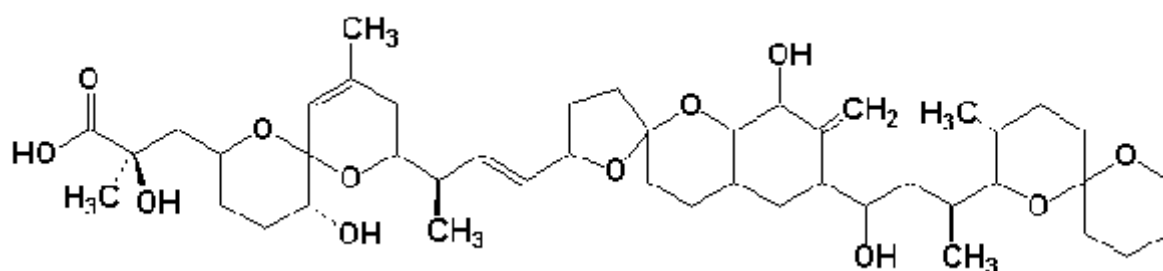
Konzumacijom školjkaša sa velikom koncentracijom akumuliranih biotoksina u ljudi dolazi do različitih simptoma na temelju kojih razlikujemo četiri vrste oboljenja. To su dijareično trovanje školjkašima (DSP), paralizirajuće trovanje školjkašima (PSP), trovanje školjkašima s posljedičnim gubitkom pamćenja (ASP) i neurotoksično trovanje školjkašima (NSP). Biotoksini odgovorni za pojavu ovih oboljenja u ljudi su skupine kemijskih spojeva različitih kemijskih i fizikalnih obilježja. Osim ASP-a, ove bolesti su uzrokovane biotoksinima koje sintetizira nekoliko vrsta dinoflagelata (Van Egmond, 2004).

Zbog mogućega ozbiljnog utjecaja na ljudsko zdravlje, ekonomiju i okoliš, u većini zemalja se provodi kontinuirani monitoring nad količinom opasnog fitoplanktona u područjima sa razvijenom marikulturom. Ako dođe do povećanja koncentracije vrsta za koje se zna da sintetiziraju biotoksine, provode se testovi za detekciju akumuliranih biotoksina u školjkašima. U slučajevima gdje su utvrđene koncentracije toksina koje mogu imati negativan utjecaj na ljudsko zdravlje, uzgajališta se privremeno zatvaraju kako bi se školjkaši pročistili (Garthwaite, 2000).

Tijekom zadnjih nekoliko desetaka godina sve učestalija su izvješća o cvjetanju potencijalno toksičnih algi i pojavi oboljenja u ljudi. To bi se moglo pripisati razvitku sve veće svijesti javnosti i pažnji medija te zanimanju znanstvenika za razumijevanje i rješavanje ovog problema. Međutim, iako je teško dati nedvojbene dokaze, čini se da dolazi do povećanja koncentracije i distribucije toksičnih algi te da je glavni uzročnik ove pojave povećana antropološka eutrofikacija vodenih sustava. Kako su u prošlosti bila ugrožena samo neka staništa u međusobno udaljenim područjima, a danas je gotovo svaka obala u opasnosti od povećane koncentracije toksičnih algi, čini se da je problem njihovog širenja stvaran. Porastom broja različitih istraživanja i razvitkom novih metoda za detekciju toksina u komercijalno iskorištavanim vrstama školjkaša, pokušava se zaštititi ljudsko zdravlje i okoliš (Van Egmond, 2004).

2. Okadaična kiselina

Prvi slučaj trovanja ljudi okadaičnom kiselinom dogodio se u Japanu u 70-im godinama 20. stoljeća. Kao uzročnik bolesti identificiran je dinoflagelat *Dinophysis fortii* i njegov toksični produkt, okadaična kiselina (Slika 1). Danas ovaj toksin i njegovi derivati uzrokuju redovita trovanja školjkašima u Europi i Japanu, iako su rašireni i u Južnoj Americi, južnoj Africi, Australiji, na Novom Zelandu i Tajlandu (Van Dolah, 2000).



Slika 1. Strukturni prikaz molekule okadaične kiseline
(<http://www.hah.hr/index.php?id=594>)

2.1 Organizmi koji produciraju okadaičnu kiselinu

Okadaičnu kiselinu i njezine derivate stvaraju dinoflagelati rodova *Dinophysis* i *Prorocentrum*. Za 7 vrsta iz roda *Dinophysis* (*D. fortii*, *D. acuminata*, *D. acuta*, *D. norvegica*, *D. mitra*, *D. rotundata* i *D. tripos*) i tri vrste bentičkih dinoflagelata roda *Prorocentrum* (*P. lima*, *P. concavum*, *P. redfieldi*) potvrđeno je da produciraju toksične supstance (Van Egmond, 2004). Ove vrste mogu, u povoljnim uvjetima okoliša, razviti velike kolonije i dovesti do cvjetanja algi te se na taj način akumuliraju u školjkašima koji ih u tim uvjetima koriste kao hranu. Rodovi *Dinophysis* i *Prorocentrum* su primarno rasprostranjeni u Europi i Japanu, ali su sve češći i slučajevi trovanja okadaičnom kiselinom na novim područjima te se čini da se područje rasprostranjenosti ovih vrsta širi.

2.2 Akumulacija okadaične kiseline u školjkašima

Vrste školjkaša koje najčešće uzrokuju trovanje okadaičnom kiselinom su plava dagnja (*Mytilus edulis*), *Mytilus coruscum*, japanska kapica (*Patinopecten yessoensis*), *Chlamys nipponesis akazara*, *Tapes japonica*, *Gomphina melaegis* i nekoliko vrsta roda *Ostrea*. Okadaična kiselina i njezini derivati akumuliraju se najviše u masnim tkivima školjkaša. Detoksikacija je ovisna o mjestu akumulacije toksina. Tako se toksini iz probavnog sustava izlučuju puno brže od onih apsorbiranih u tkivima. Uklanjanje toksina iz tijela životinje ovisi i o vrsti, stopi filtracije školjkaša, temperaturi, salinitetu i koncentraciji netoksičnih alga u okolišu. U prosjeku, toksini se iz školjkaša odstranjuju u vremenskom rasponu od jednog tjedna do šest mjeseci (Van Egmond, 2004).

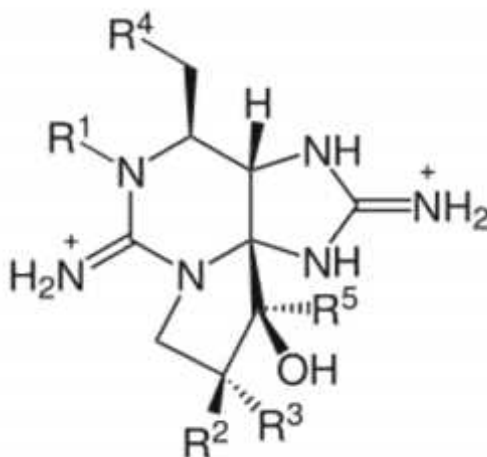
2.3 Dijareično trovanje školjkašima - DSP

Konзумacijom okadaične kiseline kod ljudi dolazi do bolesti poznate kao dijareično trovanje školjkašima (DSP). Okadaična kiselina i njezini derivati su inhibitori enzima protein fosfataze koji je bitan za regulaciju velikog broja staničnih procesa koji sudjeluju u metabolizmu, ionskoj ravnoteži, neurotransmisiji i regulaciji staničnog ciklusa. Toksini se vežu za enzim te dovode do povećane fosforilacije što dovodi do gubitka vode iz stanica. Taj proces dovodi do glavnog simptoma bolesti - dijareje (Van Dolah, 2000). Ostali simptomi uključuju mučninu, povraćanje, i bol u abdomenu, a svi počinju 30 minuta do nekoliko sati nakon konzumacije toksične hrane. Potpuni oporavak nastupa unutar tri dana od otrovanja (Van Egmond, 2004).

Međutim, okadaična kiselina i njezini derivati su se pokazali kao promotori tumora i imunosupresivi u istraživanjima provedenim na životinjama, te je ponavljajuće izlaganje toksinima potencijalno opasno za ljude (Whittle, 2000).

3. Saxitoksini

Slučajevi trovanja saxitoksinima poznati su već dug niz godina. Prvo objašnjenje za pojave trovanja ovim biotoksinima nakon konzumacije školjkaša objavljeno je 1937. godine, kada je uočen velik broj jedinki vrste *Alexandrium catanella* kraj uzgajališta dagnji uz obale Kalifornije, gdje je bila učestala pojava toksičnih oboljenja (Etheridge, 2010). Spoj saxitoksin je prvi puta izoliran iz toksičnog školjkaša *Saxidomus gigantea* 1972. godine, nakon masovnog slučaja trovanja ovim biotoksinom u Massachusettsu (SAD) (Deeds, 2008). Do danas je nađeno dvadesetak spojeva veoma sličnih saxitoksinu te oni skupa čine grupu neurotoksina poznatih kao saxitoksini (Van Egmond, 2004) (Slika 2). Danas su saxitoksini rasprostranjeni u cijelom svijetu, a akumuliraju se u velikom broju vrsta školjkaša koji se tradicionalno koriste u ljudskoj prehrani.



Slika 2. Strukturni prikaz osnovne molekule saxitoksina
(<http://de.wikipedia.org/wiki/Saxitoxin>)

3.1 Organizmi koji produciraju saxitoksine

Najbrojniji izvori saxitoksina u svijetu su morski dinoflagelati iz rodova *Alexandrium*, *Gymnodinium* i *Pyrodinium*. Vrste koje su odgovorne za većinu slučajeva trovanja saxitoksinima su *A. tamarense*, *A. fundyense*, *A. catanella*, *G. catenatum* i *P. bahamense*, a nalazimo ih rasprostranjene u svim svjetskim morima. Postoje također i brojni podaci o produkciji saxitoksina od strane nekih slatkovodnih modrozelenih algi i modrozelenih algi bočatih voda te nekih vapnenačkih crvenih algi (Etheridge, 2010).

3.2 Akumulacija saxitoksina u školjkašima

Za mnogo komercijalnih vrsta školjkaša je zabilježeno da akumuliraju saxitoksine. Distribucija i metabolizam toksina u školjkašima varira ovisno o karakteristikama filtriranih alga, uvjetima u okolišu, prijašnjoj izloženosti toksinu, otpornosti vrste i same jedinke na toksin, dinamici prehrane i mehanizmima detoksifikacije, tkivima u kojima je toksin akumuliran te razlici u samoj toksičnosti dinoflagelata (Deeds, 2008). Saxitoksini se najviše akumuliraju u probavnoj žlijezdi, plaštu, gonadama i škrgama dok mišić zatvarač ne akumulira toksine te ih čak i inaktivira ako su prisutni (Van Egmond, 2004). Većina vrsta može odstraniti saxitoksine unutar nekoliko tjedana, dok vrste kao što su *Saxidomus gigantea*, *Placopecten magellanicus* i *Spisula solidissima* mogu zadržati toksine u tijelu od nekoliko mjeseci pa i do pet godina nakon prehrane toksičnim dinoflagelatima (Deeds, 2008).

Nakon ulaska u tijelo školjkaša, saxitoksini mogu biti podložni transformaciji. Stoga manje toksični spojevi mogu, tijekom probave, biti transformirani u toksičnije oblike te na taj način predstavljati još veću prijetnju ljudima (Etheridge, 2010). Nasuprot tome, neke od vrsta školjkaša koje akumuliraju saxitoksine su pokazale sposobnost da toksične supstance procesima biotransformacije pretvore u netoksične (Deeds, 2008).

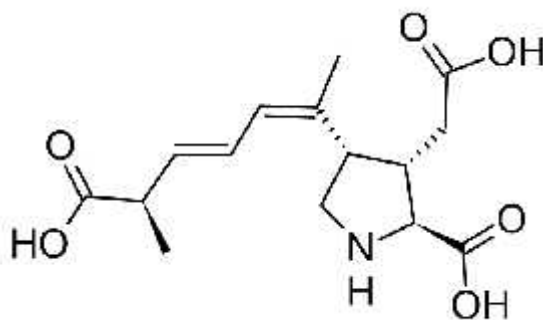
3.3 Paralizirajuće trovanje školjkašima - PSP

Bolest ljudi izazvana trovanjem saxitoksinima naziva se paralizirajuće trovanje školjkašima (PSP). Ovi neurotoksini se vežu na receptore na naponski reguliranim kanalima za natrij u stanici te blokiraju protok natrija u stanicu. Simptomi koji su rezultat takve poremećene stanične ravnoteže su trnci u usnicama, ustima i na jeziku, utrnulost udova, parestezije, slabost, mučnina, otežano disanje, ošamućenost, povraćanje, glavobolja i otežano gutanje. U teškim slučajevima zbog gušenja dolazi do smrti. Simptomi se obično javljaju oko 30 minuta nakon konzumacije toksične hrane, ali se mogu pojaviti i do par minuta nakon jela ako su koncentracije neurotoksina dovoljno velike. U nekim slučajevima do smrti je došlo već nakon 3 do 4 sata nakon konzumacije školjkaša. Za pacijente koji prežive 24 sata nakon izlaganja toksinu, prognoza je dobra te se očekuje brzo i potpuno ozdravljenje (Etheridge, 2010).

Koncentracija toksina kod koje se javlja otrovanje varira zbog individualne razlike u osjetljivosti na toksin. Blagi simptomi se kod ljudi javljaju kod koncentracije toksina između 144 do 1660 µg saxitoksina po osobi, dok su teži slučajevi prijavljeni kod koncentracije toksina između 456 do 12400 µg saxitoksina po osobi (Van Egmond, 2004).

4. Domoična kiselina

Domoična kiselina je prvi puta izolirana 1958. godine u Japanu iz makroalge *Chondria armata* te je i dobila naziv po japanskoj riječi za algu, "domoi" (Slika 3). Prvi zabilježeni slučaj trovanja domoičnom kiselinom dogodio se 1987. godine kada je troje ljudi umrlo, a preko 100 oboljelo nakon konzumacije dagnji sa Otoka Princa Edwarda u Kanadi. Dagnje iz restorana i prodavaonica su podvrgnute ispitivanju te je utvrđeno da sadrže velike količine neurotoksina domoične kiseline. Istraživanjem se pojava toksina povezala sa cvjetanjem dijatomeje *Pseudo-nitzschia multiseris* (Mos, 2001).



Slika 3. Strukturni prikaz molekule domoične kiseline
(http://en.wikipedia.org/wiki/File:Domoic_acid.png)

4.1 Organizmi koji produciraju domoičnu kiselinu

Uz algu *Chondria armata*, samo jedna vrsta makroalge je poznata da producira domoičnu kiselinu - crvena makroalga *Alsidium corallinum* iz Mediterana. Postoji i jedno izvješće da vrsta dijatomeje, *Amphora coffaeiformis* također producira taj neurotoksin (Apeldoorn, 1999). Međutim, glavnu opasnost od trovanja domoičnom kiselinom predstavljaju vrste roda *Pseudo-nitzschia*. Uz vrstu *P. multiseries*, koja je odgovorna za prvo zabilježeno trovanje domoičnom kiselinom, u svjetskim oceanima česte su vrste: *P. pseudodelicatissima*, uz istočne obale Kanade i zapadne obale SAD-a; *P. australis* uz zapadne obale SAD-a, u Španjolskoj te na Novom Zelandu; *P. delicatissima* u Norveškoj i na Novom Zelandu te *P. seriata* u Danskoj. Sama produkcija domoične kiseline od strane alge je genetski uvjetovana, ali nije poznata nikakva uloga toksina u obrani ili primarnom metabolizmu alge (Mos, 2001).

4.2 Akumulacija domoične kiseline u školjkašima

Školjkaši akumuliraju domoičnu kiselinu filtracijom dijatomeja, koje koriste kao hranu, ili filtracijom samog toksina koji je ispušten u stupac vode. Toksin se akumulira u probavnoj žlijezdi i bubrežima te izgleda da nema utjecaja na samu životinju (Mos, 2001). Stopa akumulacije toksina u školjkašima je karakteristična za pojedinu vrstu te je direktno povezana s brojem stanica dijatomeja koje su školjkašima na raspolaganju. Stopa eliminacije toksina iz tijela životinje varirira ovisno o godišnjem dobu i temperaturi vode te o mjestu akumulacije - toksini iz probavnog sustava se eliminiraju puno brže od toksina akumuliranih u tkivima (Apeldoorn, 1999).

Vrste za koje je poznato da akumuliraju domoičnu kiselinu su: plava dagnja (*Mytilus edulis*), bijela dagnja (*Modiolus modiolus*), kalifornijska dagnja (*Mytilus californianus*), *Mya arenaria*, britvasta školjka (*Siliqua patula*), zaljevska kapica (*Argopecten irradians*), morska kapica (*Placopecten magellanicus*), američka kamenica (*Crassostrea virginica*) i japanska kamenica (*Crassostrea gigas*) (Apeldoorn, 1999).

4.3 Trovanje školjkašima s posljedičnim gubitkom pamćenja - ASP

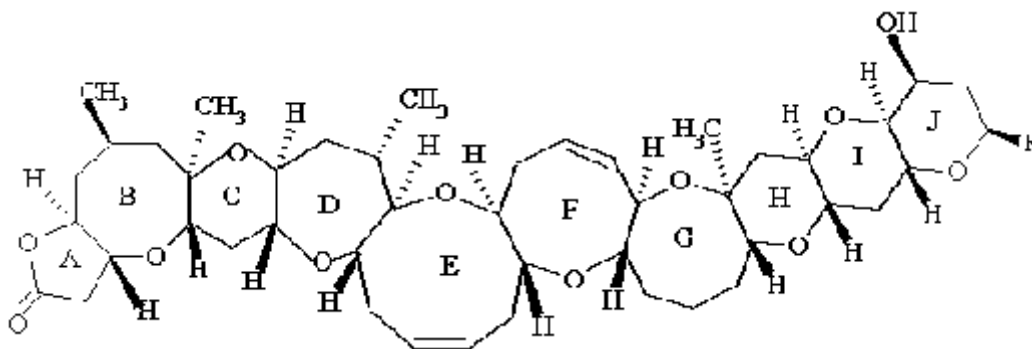
Kada ljudi pojedu školjkaša s akumuliranom velikom koncentracijom domoične kiseline, dolazi do oboljenja poznatog kao trovanje školjkašima s posljedičnim gubitkom pamćenja (ASP). Mehanizam toksičnosti domoične kiseline objašnjen je njegovom strukturalnom sličnosti sa neurotransmitterom glutaminskom kiselinom i njezinim analozima, te sa visokim afinitetom vezanja na receptor. Nakon izlaganja, domoična kiselina se veže za N-metil-D-aspartat receptore u središnjem živčanom sustavu, što uzrokuje depolarizaciju neurona. Posredno, unutarstanična koncentracija kalcija naglo poraste, što rezultira u povećanom trošenju energije, oticanju neurona te smrti dotičnih stanica. Stanice hipokampusa su najosjetljivije na utjecaj domoične kiseline što objašnjava glavni simptom trovanja domoičnom kiselinom - kratkotrajni gubitak pamćenja. Ostali simptomi uključuju zbunjenost, mučninu, povraćanje, grčeve i dijareju, i svi se javljaju unutar 24 sata nakon izlaganja toksinu. Neurološki problemi kao što su iscrpljenost, glavobolja, gubitak orijentacije, poteškoće u disanju i koma, javljaju se unutar 48 sati nakon konzumacije školjkaša (Mos, 2001). U slučaju iz 1987. godine trovanje se dogodilo kod koncentracije toksina u rasponu od 31 do 128 mg/100g u školjkašima (Lawrence, 2011). Nakon toga nije

zabilježen ni jedan slučaj otrovanja ljudi domoičnom kiselinom. S druge strane, domoična kiselina je utvrđena kao glavni uzrok smrti velikog broja jedinki pelikana i velikih vranaca iz 1991. te morskih lavova iz 1998. godine uz obale Kalifornije (Van Dolah, 2000).

5. Brevetoksini

Najraniji službeni zapis otrovanja zbog crvenih plima zabilježen je 1954. godine u Meksičkom zaljevu te je sadržavao neslužbena opažanja o smrtnosti životinja u tom području još iz 1844. godine. Godine 1947. kao uzročnik velikog pomora riba i ostale faune u području zaljeva, otkriven je dinoflagelat *Karenia brevis* i jedan od njegovih njegov produkata, brevetoksin (Baden, 1989) (Slika 4).

Pojava ovog dinoflagelata dugo je smatrana endemičnom za Meksički zaljev. Međutim, 1987. godine *K. brevis* se Golfskom strujom proširila do obala Sjeverne Karoline, gdje je 48 osoba oboljelo od posljedica trovanja brevetoksinima. Godine 1992. i 1993. zabilježena je i prva pojava trovanja na Novom Zelandu. Od tada se oboljenja vezana za trovanje brevetoksinom redovito javljaju u tim regijama (Lawrence, 2011).



Slika 4. Strukturni prikaz molekule brevetoksina A

(<http://www.fao.org/docrep/007/y5486e/y5486e0o.htm#TopOfPage>)

5.1 Organizmi koji produciraju brevetoksine

Brevetoksini su ciklički polieterski prirodni produkti koje stvaraju nekoliko vrsta morskih dinoflagelata roda *Karenia*, od kojih je najpoznatija vrsta *Karenia brevis*. No, prema novijim istraživanjima četiri vrste rafidofita - *Chattonella atiqua*, *Fibrocapsa japonica*, *Heterosigma akashiwo* i *Chatonella marina* također produciraju bravetoksinima slične toksine (Lawrence, 2011).

5.2 Akumulacija brevetoksina u školjkašima

Brevetoksini su zabilježeni u mnogim vrstama školjkaša, ali opasnost za ljudsko zdravlje predstavljaju oni koji se tradicionalno uzgajaju u svrhu prehrane, kao što su dagnje i kamenice. Sami školjkaši većinom ne pokazuju negativne posljedice akumulacije velike količine brevetoksina. Vrijeme pročišćavanja toksina iz školjkaša varira, ali je većinom unutar dva do osam tjedana, iako su zabilježeni i slučajevi zadržavanja toksina u tijelu životinje i do godinu dana nakon cvjetanja (Watkins, 2008).

Nedavnim istraživanjima utvrđeno je da školjkaši mijenjaju kemijski sastav brevetoksina, što doprinosi većoj toksičnosti jedinki, a sami mehanizmi se još uvijek intenzivno istražuju (Lawrence, 2011).

5.3 Neurotoksično trovanje školjkašima - NSP

Oboljenje izazvano trovanjem brevetoksinima naziva se neurotoksično trovanje školjkašima (NSP). Brevetoksini se vežu na naponski regulirane kanale za natrij te mijenjaju naponsku ravnotežu kanala, što rezultira u otvorenosti kanala za prolazak natrija u stanicu u uvjetima u kojima je kanal inače zatvoren (Van Dolah, 2000). Dotok velike količine iona natrija dovodi do povećanja podražljivosti živčanih stanica.

Simptomi trovanja brevetoksinima uključuju mučninu, povraćanje i dijareju, te utrnulost lica i ekstremiteta, parestezije, gubitak koordinacije i djelomičnu paralizu udova. Iako simptomi djeluju opasno, bolesnici se oporavljaju unutar dva do tri dana od otrovanja. Nema zabilježenih smrtnih slučajeva te ne postoje dugoročne posljedice trovanja brevetoksinima (Watkins, 2008).

6. Metode detekcije biotoksina u školjkašima

U mnogim se zemljama provodi monitoring koncentracija toksičnih algi kao prva metoda za upozorenje na mogućnost pojave trovanja školjkašima. Ovaj postupak se zasniva na dobrom poznavanju toksičnih vrsta, redovitom brojanju njihovih stanica u uzorcima vode te na korelaciji između prisutnosti toksičnih algi u okolišu i njihovoj akumulaciji u školjkašima. Kada je u okolišu utvrđena koncentracija toksičnih algi koja prelazi granicu dopuštene, zatvaraju se uzgajališta školjakaša i započinje se s testovima za detekciju biotoksina u školjkašima (Garthwaite, 2000).

Zbog opasnosti za ljudsko zdravlje, za detekciju biotoksina u školjkašima potrebne su brze i specifične metode koje su osjetljive na male koncentracije. Tradicionalno se koristi metoda testa na miševima, no zbog pritiska javnosti koja je protiv korištenja sisavaca u laboratorijskim istraživanjima te zbog nedostataka i ograničenja te metode, u novije vrijeme dolazi do razvitka suvremenijih biokemijskih i kemijskih metoda za detekciju biotoksina u školjkašima. Neke od tih metoda su i ELISA test te tekućinska kromatografija.

6.1 Testovi na miševima

Ova metoda je razvijena od strane japanskog Ministarstva zdravlja i socijalne skrbi 70-ih godina 20. stoljeća te je od tada jedna od glavnih metoda detekcije biotoksina u školjkašima. Toksini se ekstrahiraju iz tkiva školjakaša te se nakon pripreme uzorka ubrizgavaju u miševе težine oko 20 g. Mjeri se vrijeme potrebno da u miševa nastupi smrt te se pomoću njega i ubrizgane količine biotoksina izračunava toksičnost uzorka. Toksičnost se izražava u "jedinicama miševa" (mouse units, MU) gdje je jedan MU definiran kao minimalna količina toksina potrebna za smrt miša u određenom vremenu. Minimalne količine i vrijeme nastupa smrti ovise o tipu toksina na koji se radi detekcija (Van Egmond, 2004).

Nedostaci ove metode su manjak specifičnosti u detekciji pojedinih biotoksina i njihovih analoga, nelinearnost između koncentracije toksina i vremena nastupa smrti, mogućnost lažnog pozitivnog rezultata te žrtvovanje velikog broja životinja tijekom izvođenja analize (Van Egmond, 2004).

6.2 ELISA test

ELISA test je jedan od imunoloških testova za detekciju biotoksina u školjkašima. Temelji se na razvitku antigena koji prepoznaju pojedini biotoksin ili grupe toksina. Antigeni se, skupa sa uzorkom akumuliranog toksina i određenim dodatnim otopinama naciepljuju na filter ploče te se specifičnim metodama određuje količina antitijela vezanih za toksin. Posredno, dobiva se koncentracija biotoksisna akumuliranih u školjkašima (Van Egmond, 2004).

Prva antitijela za saxitoksine su pronađena 1964. godine, no tek su se u posljednje vrijeme razvili ovakvi imunološki testovi. Do sada su pronađena antitijela za sve ostale biotoksine te su komercijalni ELISA testovi razvijeni za sve četiri skupine toksina koji se akumuliraju u školjkašima (Garthwaite, 2000) (Slika 5). ELISA testovi su relativno jeftini i brzi te ih je moguće koristiti za velik broj uzoraka, što bi sa daljnjim razvojem u budućnosti moglo dovesti do upotrebe ove metode za rutinsku detekciju i određivanje koncentracije toksina u školjkašima.



Slika 5. Oprema za ELISA test za detekciju saxitoksina
(www.reagen20.en)

6.3 Tekućinska kromatografija

Kromatografske procedure su bile prve koje su se razvile kao alternativne metode testovima na miševima. Danas se toksini iz uzoraka razdvajaju i determiniraju pomoću tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC metoda). Iako je upotreba te metode dovela do velikog napretka u razumijevanju biotoksina, njihove produkcije, akumulacije i metabolizma (Garthwaite, 2000), za cijeli postupak je potrebna prevelika količina znanja, vremena i novaca da bi se mogao rutinski upotrebljavati (Van Egmond, 2004).

7. Akumulacija biotoksina u školjkašima u Hrvatskoj

Kontinuirano praćenje školjkaša i kvalitete mora duž hrvatske obale prema direktivama Europske unije započelo je u srpnju 2000. godine. U monitoring je uključeno 25 mjesta uzorkovanja - devet na poluotoku Istri, četiri kraj Zadra, četiri kraj Šibenika, jedno mjesto kraj Splita, sedam u Malostonskom zaljevu i na Mljetu (Ujević, 2012) (Slika 6). Pravilnikom o veterinarsko-zdravstvenim uvjetima za izlov, uzgoj, pročišćavanje i stavljanje u promet živih školjkaša (NN, 117/04) propisane su maksimalne dozvoljene vrijednosti za koncentraciju biotoksina u školjkašima kao i metode za njihovu detekciju. One iznose: 80 µg/100g školjkaša za saxitoksine, 2000 µg/100g školjkaša za domoičnu kiselinu, 16 µg/100g školjkaša za okadaičnu kiselinu i 80 µg/100g školjkaša za brevetoksine. Kod detekcije PSP toksina se koriste testovi na miševima te HPLC metoda, kod detekcije DSP toksina se koristi metoda testa na miševima, a kod detekcije ASP toksina HPLC metoda.

Prva pojava akumulacije okadaične kiseline u Jadranu je zabilježena 1996. godine u dagnjama iz obalnih područja sjeverne Italije (Pavela-Vrančić, 2002). Od onda je pojava DSP toksina česta u Jadranu, sa sezonskim pojavljivanjem koje je uobičajeno za sjeverni Jadran. Godine 2005. zabilježene su ekstremno visoke koncentracije okadaične kiseline i njezinih derivata uz zapadne obale Istre, no do sada nisu zabilježeni veliki slučajevi trovanja u Hrvatskoj (Ujević, 2012).

Vrste roda *Alexandrium* koje uzrokuju PSP zabilježene su u Jadranu još od 1976. godine, no prva pojava trovanja saxitoksinima dogodila se tek 1994. godine u sjevernom Jadranu uslijed cvjetanja vrste *Alexandrium minutum*. Tijekom 1995. i 1996. godine PSP toksini su detektirani u školjkašima, ali ne u koncentracijama opasnim za ljude. Od uvođenja programa monitoringa 2000. godine nisu zabilježene pojave akumulacije toksina u školjkašima u koncentracijama višim od dopuštenih (Ujević, 2012).

Domoična kiselina je detektirana u tek nekoliko uzoraka iz Jadrana i to u koncentracijama puno nižim od dopuštenih po pravilniku Europske unije (Ujević, 2012).

Brevetoksini i pojave neurotoksičnog trovanja školjkašima nisu zabilježeni u Jadranu.



Slika 6. Lokacije uključene u kontinuirani monitoring kvalitete vode i školjkaša
(obilježene zelenim krugovima)
(Ujević, 2012)

8. Literatura:

- Apeldoorn, M.E. van, Egmond, H.P. van, Speijers, G.J.A. (1999): Amnesic shellfish poisoning: a review, National Institute of Public Health and the Environment (RIVM), Nizozemska
- Baden, D.G. (1989): Brevetoxin: unique polyether dinoflagellate toxins, The FASEB Journal **3**, 1807 - 1817
- Deeds, J.R., Landsberg, J.H., Etheridge, S.M., Pitcher, G.C., Longan, S.W. (2008): Non-Traditional Vectors for Paralytic Shellfish Poisoning, Marine Drugs **6**, 308 - 348
- Dolah, F.M. van (2000): Marine Algal Toxins: Origins, Health Effects, and Their Increased Occurrence, Environmental Health Perspectives **108**, 133 - 141
- Egmond, H.P. van, Apeldoorn, M.E. van, Speijers, G.J.A., Werken, G. van de, Stephany, R.W., Groothuis, D.G., Belin, C. (2004): Marine biotoxins, Food and Nutrition Paper, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome
- Etheridge, S.M. (2010): Paralytic shellfish poisoning: Seafood safety and human health perspectives, Toxicon **53**, 108 - 122
- Garthwaite, I. (2000): Keeping shellfish safe to eat: a brief review of shellfish toxins, and methods for their detection, Trend in Food Science & Technology **11**, 235 - 244
- Lawrence, J., Loreal, H., Toyofuku, H., Hess, P., Iddya, K., Ababouch, L. (2011): Assessment and management of biotoxin risks in bivalve Molluscs, Fisheries and Aquaculture Technical Paper **551**, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome
- Mos, L. (2001): Domoic acid: a fascinating marine toxin, Environmental Toxicology and Pharmacology **9**, 79 - 85
- Pavela-Vrančić, M., Meštrović, V., Marasović, I., Gillman, M., Furey, A., James, K.J. (2002): DSP toxin profile in the coastal waters of the central Adriatic Sea, Toxicon **40**, 1601 - 1607
- Pravilnik o veterinarsko-zdravstvenim uvjetima za izlov, uzgoj, pročišćavanje i stavljanje u promet živih školjkaša (2004.): Narodne novine br. **117**
- Ujević, I., Roje, R., Ninčević-Gladan, Ž., Marasović, I. (2012): First report of Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from eastern Adriatic Sea (Croatia), Food Control **25**, 285 - 291
- Watkins, S.M., Reich, A., Fleming, L.E., Hammond, R. (2008): Neurotoxic Shellfish Poisoning, Marine Drugs **6**, 431 - 455

Whittle, K., Gallacher, S. (2000): Marine toxins, British Medical Bulletin **56**, 236 - 253

Internetski izvori:

<http://de.wikipedia.org/wiki/Saxitoxin>, pristupljeno 23.06.21012.

http://en.wikipedia.org/wiki/File:Domoic_acid.png, pristupljeno 28.06.2012.

<http://www.fao.org/docrep/007/y5486e/y5486e0o.htm#TopOfPage>, pristupljeno 28.06.2012.

<http://www.hah.hr/index.php?id=594>, pristupljeno 23.06.2012.

www.reagen20.en, pristupljeno 04.07.2012.

9. Sažetak

Mikroskopske planktonske alge predstavljaju glavni izvor hrane za školjkaše koji ih filtriraju iz okolne vode. No, među sekundarnim metabolitima alga, identificirani su neki koji su snažni toksini i koji mogu imati negativan učinak na ljudsko zdravlje i okoliš (okadaična kiselina, domoična kiselina, saxitoksini, brevetoksini). Biotoksini povezani sa slučajevima otrovanja ljudi produkt su nekih vrsta dinoflagelata, dijatomeja i modrozelenih algi. Mnogo vrsta školjkaša koje ljudi koriste za prehranu akumuliraju fitoplanktonske biotoksine u svojim tkivima. Konzumacijom školjkaša sa visokom koncentracijom akumuliranih biotoksina u ljudi dolazi do različitih simptoma na temelju kojih se razlikuju četiri vrste oboljenja. To su dijareično trovanje školjkašima (DSP), paralizirajuće trovanje školjkašima (PSP), trovanje školjkašima s posljedičnim gubitkom pamćenja (ASP) i neurotoksično trovanje školjkašima (NSP). Zbog mogućega ozbiljnog utjecaja na ljudsko zdravlje i okoliš, u većini zemalja se provodi kontinuirani monitoring i testovi za detekciju biotoksina akumuliranih u školjkašima. Tijekom zadnjih nekoliko desetaka godina sve su učestalija izvješća o cvjetanju potencijalno toksičnih algi i pojavi oboljenja u ljudi za što je glavni krivac povećana antropološka eutrofikacija vodenih sustava.

10. Summary

Microscopic planktonic algae are the main food source for filter-feeding bivalves. However, among the secondary algal metabolites, several have been identified as potent toxins that can have negative effects on human health and environment (okadaic acid, domoic acid, saxitoxins, brevetoxins). Biotoxins associated with human intoxication are product of several species of dinoflagellates, diatoms and blue-green algae. The variety of shellfish species used in human nutrition can accumulate phytotoxins in their edible tissue. By consumption of shellfish with high concentration of accumulated biotoxins, people can develop different symptoms of intoxication, based on which we distinguish four serious poisoning syndromes. These are diarrhetic shellfish poisoning (DSP), paralytic shellfish poisoning (PSP), amnesic shellfish poisoning (ASP) and neurotoxic shellfish poisoning (NSP). Because of possible serious effect on human health and environment, number of countries conducts continuous algal monitoring and assays for accumulated biotoxins detection in shellfish. Over the past few decades reports of blooms of potentially toxic algae and appearance of human intoxication have become more frequent, and it seems that the increase in anthropological eutrophication of water bodies is the main cause.