Utjecaj pH i temperature na sadržaj domoične kiseline u brbavicama Venus verrucosa (Linnaeus, 1758)

Šeparović, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split / Sveučilište u Splitu**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:226:643212

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of University Department of Marine Studies

SVEUČILIŠTE U SPLITU
SVEUČILIŠNI ODJEL ZA STUDIJE MORA
DIPLOMSKI STUDIJ MORSKO RIBARSTVO

Ana Šeparović

UTJECAJ PH I TEMPERATURE NA SADRŽAJ DOMOIČNE KISELINE U BRBAVICAMA *VENUS VERRUCOSA* (LINNAEUS, 1758)

Diplomski rad

Split, ožujak 2018.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
SVEUČILIŠNI ODJEL ZA STUDIJE MORA
DIPLOMSKI STUDIJ MORSKO RIBARSTVO

UTJECAJ PH I TEMPERATURE NA SADRŽAJ DOMOIČNE KISELINE U BRBAVICAMA *VENUS VERRUCOSA* (LINNAEUS, 1758)

Diplomski rad

Predmet: Toksičnost školjkaša

Mentor:
Izv.prof. dr. sc. Ivana Ujević

Student:
Ana Šeparović

Split, ožujak 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Splitu
Sveučilišni odjel za studije mora
Diplomski studij Morsko ribarstvo

Diplomski rad

UTJECAJ PH I TEMPERATURE NA SADRŽAJ DOMOIČNE KISELINE U BRBAVICAMA *Venus verrucosa* (Linnaeus, 1758)

Ana Šeparović

Sažetak

Domoična kiselina (DK) je neurotoksin i uzročnik je ASP (Amnesic Shellfish Poisoning) otrovanja ljudi. Kvantitativno određivanje domoične kiseline u školjkašima je važno u prevenciji trovanja ASP-om koje bi moglo nastati nakon konzumacije toksičnih školjkaša. U ovom istraživanju ispitana je stabilnost domoične kiseline u ekstraktu brbavica *(Venus verrucosa)* pri vrijednostima pH od približno 1 i 3 te temperaturama od 37^{o}C i 90^{o}C. Domoična kiselina je određivana metodom tekućinske kromatografije i masene spektrometrije (LC-MS/MS) u metanolskom ekstraktu ukupnog jestivog mekog tkiva brbavica. Rezultati su ukazali da temperatura ekstrahiranja domoične kiseline ne utječe značajno na stabilnost domoične kiseline, dok vrijednost pH utječe. Naime, ustanovljen je utjecaj nižeg pH (1,09 – 1,50) pri kojem srednja vrijednost iskorištenja domoične kiseline iznosi 72,1 %, dok pri pH 3 (3,01 – 3,35) iznosi 99,6 % .

(33 stranica, 18 slika, 7 tablica, 34 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: Domoična kiselina, ASP, tekućinski kromatograf, temperatura, pH.

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Ivana Ujević

Komentor:

Ocjenjivači: 1. Izv. prof. dr. sc. Ivana Ujević
2. Doc. dr. sc. Vida Šimat
3. Doc. dr. sc. Jure Brčić

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Split
Department of Marine Studies
Graduate study Marine Fishery

MSc Thesis

PH AND TEMPERATURE INFLUENCE ON THE CONTENT OF DOMOIC ACID IN WARTY VENUS *Venus verrucosa* (Linnaeus 1758)

Ana Šeparović

Abstract

Domoic acid (DA) is a neurotoxin that causes ASP poisoning (Amnesic Shellfish Poisoning). Quantitative determination of domoic acid in shellfish is important in the prevention of ASP poisoning that could occur after the consumption of toxic bivalve molluscs. In this study, the stability of domoic acid in clams (*Venus verrucosa*) extract was tested at pH values of approximately 1 and 3 and at 37^{o}C and 90^{o}C. Domoic acid was determined by liquid chromatography and mass spectrometry (LC-MS/MS) in a methanol extract of total edible shellfish soft tissue. Domoic acid extraction temperature does not significantly affect the stability of the domoic acid while the pH is affected. The effect of lower pH (1.09 - 1.50) was established at which the mean value of domoic acid recovery was 72.1%.

(33 pages, 18 figures, 7 tabels, 34 references, original in: Croatian)

Keywords: Domoic acid, ASP, LC-MS/MS, temperature, pH.

Supervisor: Ivana Ujević, PhD / Associate Professor
Co-supervisor:

Reviewers: 1. Ivana Ujević, PhD / Associate Professor
2. Vida Šimat, PhD / Assistant Professor
3. Jure Brčić, PhD / Assistant Professor

SADRŽAJ:

1. UVOD 1
1.1. Brbavica (*Venus verrucosa*) 1
1.2. Dijatomeje 2
1.3. Domoična kiselina 3
1.4. Zakonska regulativa 5
1.5. Prijašnja istraživanja 6
1.6. Utjecaj temperature i pH na toksine 7
1.7. Svrha i ciljevi rada 9
2. MATERIJALI I METODE 10
2.1. Područje istraživanja 10
2.2. Materijali 11
2.3. Obrada uzorka 11
2.4. Uvjeti rada na tekućinskom kromatogramu 17
2.5. Postupak analiziranja na LC-MS/MS 18
3. REZULTATI 20
3.1. DK u brbavicama nakon dodavanja standardne otopine DK, kontrolna skupina 20
3.2. Utjecaj temperature na stabilnost DK 21
3.3. Utjecaj pH (pH, 3) na stabilnost DK 22
3.4. Utjecaj pH (pH, 1) na stabilnost DK 24
3.5. Iskorištenje DK 26
4. RASPRAVA 27
5. ZAKLJUČAK 29
6. LITERATURA 30

1.UVOD

1.1.Brbavica (*Venus verrucosa*)

Brbavica (*Venus verrucosa*) je školjkaš iz koljena Mollusca, razreda Bivalvia i porodice Veneridae (Slika 1).



Slika 1. *Venus verrucosa* (izvor: https://www.google.hr/search?q=venus+verrucosa&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwi2ic6x6dbVAhUBlhQKHZ8IC9UQ_AUICigB&biw=1366&bih=672#imgrc=udn9Lsehfrj87M:).

Ljuštura brbavice je rebrasta, sivkaste boje, što omogućava lakše ukopavanje u sediment (Slika 1) i obranu od predatora. Ljuštura je podijeljena simetrično u dva jednaka okruglasta dijela. Rasprostranjena je u istočnom Atlantiku i Mediteranu. Obitava u cijelom Jadranu, posebice na pješčanom i muljevitom dnu. Hrani se planktonom i uglavnom živi ukopana u pijesku. Najčešći predator im je puž volak. Konzumna je vrsta i meso joj je dosta cijenjeno. Stručnjaci Razvojno-istraživačkog centra za marikulturu na Bistrini u Malostonskom zaljevu, prvi su u svijetu uspješno izmrijestili ovog školjkaša, što se smatra povijesnim uspjehom u istraživačkom radu centra (Anonimus, 2013). Brbavice se izlovljavaju tijekom cijele godine uglavnom uz pomoć autonomne ronilačke opreme ili obale, ili dredžama

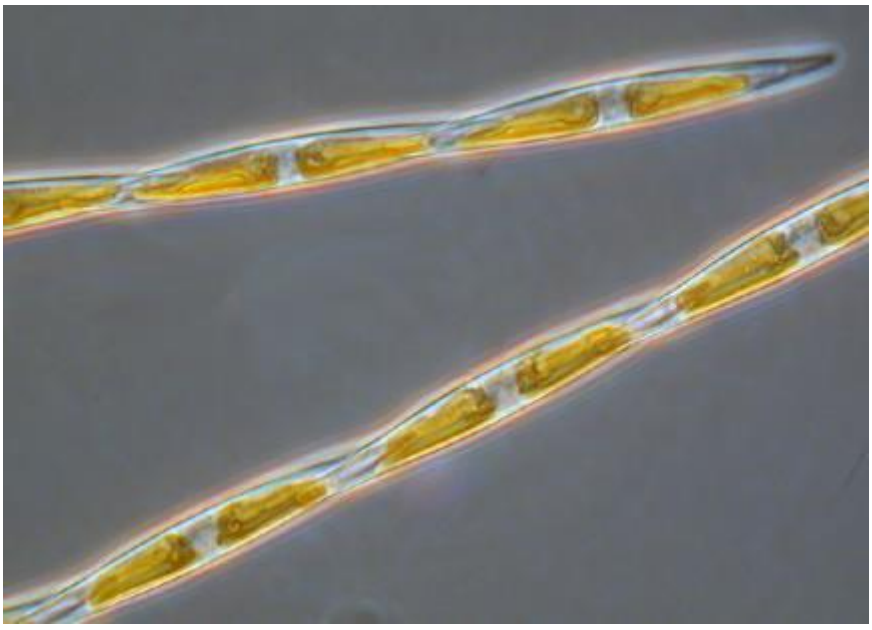
(Peharda i sur. 2010). Pretpostavlja se da stvarni ulov brbavica u Hrvatskoj može biti i do nekoliko puta viši od stvarnih podataka zbog neprijavljivanja ulova (Vrgoč i sur. 2009).

Školjkaši se hrane filtracijom morske vode, pri čemu im je najčešća hrana fitoplankton, ali filtriraju i druge organizme poput zooplanktona i bakterija kao i čestice detritusa. Školjkaši filtriraju velike količine morske vode te mogu akumulirati značajnu količinu toksina kojeg proizvede fitoplanktonske toksične vrste, koje se zatim akumuliraju u mekom tkivu školjkaša. Koncentracija biotoksina u jestivom dijelu školjkaša ovisi o abundanciji toksičnih fitoplanktonskih vrsta u morskoj vodi (Gosling, 2003; Huss i sur., 2004). Najintenzivnija akumulacija toksina događa se tijekom pojave „cvatnje“ mora kada toksični fitoplanktoni proizvode najveću količinu toksina. Ova pojava se javlja zbog velike količine hranjivih tvari u moru, najčešće u proljeće. Tijekom „cvatnje“ mora, značajno se povećava brojnost toksičnih ili netoksičnih fitoplantkonskih vrsta, što dovodi do povećane proizvodnje kisika. Ukoliko se proizvodnja kisika znatno poveća u poluzatvorenim zaljevima u razdoblju s iznimno slabom cirkulacijom, slabim mješanjem slojeva vodenog stupca i znatno smanjenom izmjenom morske vode s otvorenim morem, postoji mogućnost formiranja sloja kisika u vodenom stupcu koji spriječava izmjenu plinova između vodenog stupca i atmosfere. Trošenje kisika u vodenom stupcu ispod tog sloja može izazvati ugibanje riba i drugih morskih organizama zbog nedostatka kisika. Nadalje, značajno razmnožavanje toksičnih fitoplanktonskih vrsta može izazvati otrovanje riba, ptica i ljudi nakon konzumacije toksičnih školjkaša. Postoji više vrsta toksičnosti, a to su PSP (Paralitičko trovanje školjkašima), NSP (neurotoksično trovanje školjkašima), DSP (dijareično trovanje školjkašima), CTX (trovanje ciguaterom), VSP (Venerupin trovanje školjkašima) i AZA (azaspiracids trovanje). Pojava ASP (Amnezijsko trovanje školjkašima) posljedica je cvatnje toksičnih dijatomeja, kao što su *Pseudo-nitzschia pungens, P. australis, i P. seriata* koje sintetiziraju domoičnu kiselinu, neurotoksin koji se akumulira u školjkašima filtratorima. U roku od 24 sata nakon konzumacije javljaju se glavobolja, smetenost, gubitak pamćenja, mučnina, povraćanje, te dolazi do oštećenja neurona u hipotalamusu. Zabilježeni su i slučajevi ugibanja ptica koje su se otrovale konzumacijom riba koje su akumulirale određenu količinu toksičnih alga (Novelli i sur., 1993).

1.2. Dijatomeje

Dijatomeje spadaju u skupinu protista. Jednostanični su i autotrofni organizmi koji

žive u kolonijama. Postoje planktonski oblici i oni koji žive na supstratu ili su za njega pričvršćeni. Hrane se autotrofno. Sadrže pigmente klorofil a i c, karotenoid i ksantofil (fukoksantin). Dijatomeje nemaju bičeve, lebde u vodi i u potpunosti ovise o horizontalnom i vertikalnom gibanju vodenih masa. Razmnožavaju se spolno i vegetativno. U nepovoljnim uvjetima dijatomeje mogu stvarati trajne ciste (spore) s tvrdom silificiranom ljušturicom koja ima karakteristične nastavke kod različitih vrsta. Trajne spore padnu na dno gdje mogu preživjeti nepovoljnu godišnju sezonu i ponovno se aktivirati kada nastupe povoljni uvjeti. Neki od toksičnih rodova dijatomeja su: Halamphora, *Nitzschia navis* i *Pseudo-nitzschia* spp. (Hasle i sur., 1996). *Pseudo-nitzschia* spp. (Slika 2) je prisutna u fitoplanktonu sjevernog Jadrana tijekom čitave godine, te često dostiže visoku abundanciju (> 10^5 stanica L^{-1}) (Jasprica i Car, 2003). Obično se javlja nekoliko cvjetanja godišnje za koja se pretpostavlja da su uzorkovana različitim vrstama. Točan sastav vrsta još nije poznat, što otvara brojna pitanja, kao i potrebu za daljnjim istraživanjima koja treba poduprijeti novim modernim metodama detekcije (Marić Pfannkuchen, 2013).

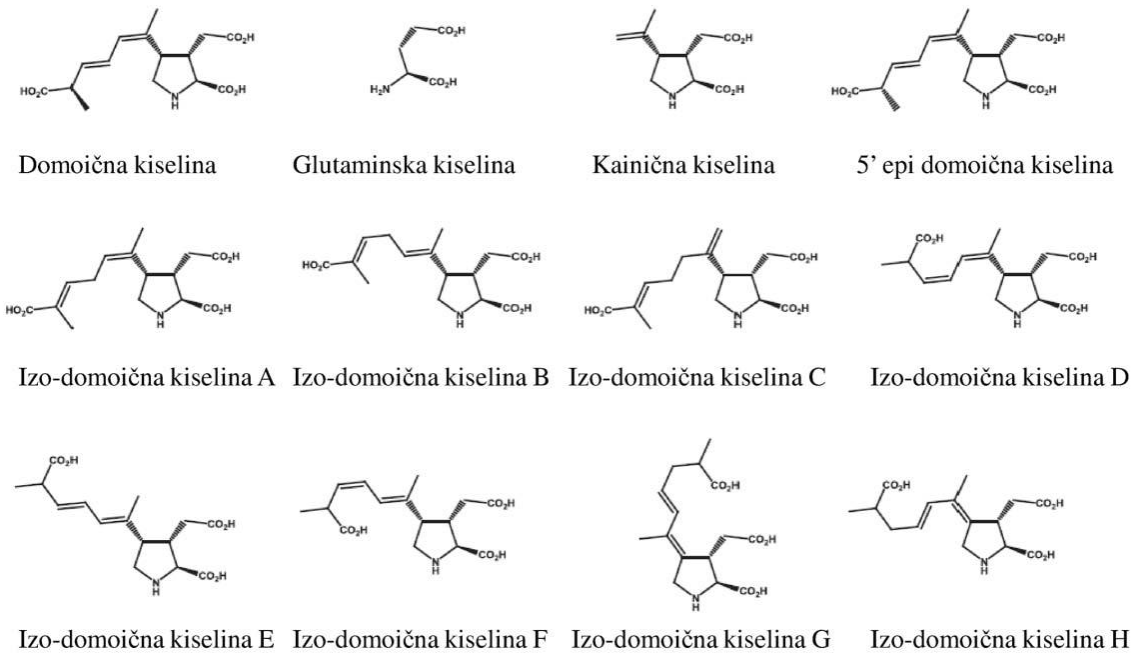


Slika 2. *Pseudo-nitzschia* spp.(izvor: https://en.wikipedia.org/wiki/Pseudo-nitzschia).

1.3.Domoična kiselina

Domoična kiselina (DK) je neurotoksin koji spada u skupinu aminokiselina koje se nazivaju kanoidi. DK je ciklična aminokiselina koja sadrži tri karboksilne skupine i ima

nekoliko strukturalnih izomera (Slika 3). U tkivu školjkaša ovaj neurotoksin se najviše akumulira u probavnoj žlijezdi, zatim u bubregu i škrgama. Nije toksična za školjkaše. U ljudskom organizmu DK se slabo resorbira iz probavnog trakta, sporo se širi organizmom, a potom vrlo sporo pinocitozom prelazi hematoencefalnu barijeru i prodire u mozak (Botana, 2014). DK se veže na vezno mjesto glutaminske kiseline na N-metil-Daspartat (NMDA) receptoru sa svake strane sinapse. Tako dovodi do otvaranja natrijevih kanala, ulaska natrija u stanicu i depolarizacije neurona te otvaranja kalcijevih kanala i povećanja intracelularnog kalcija. Zbog povećane količine kalcija dolazi do trajne aktivacije o njemu ovisnih enzima što trošenjem energije dovodi do odumiranja stanica. Lezije se najviše nalaze u hipokampusu, dijelu mozga odgovornom za pamćenje (Mos, 2000; Rossini i Hess, 2010; van Apeldoorn i sur., 1999).



Slika 3. Struktura molekula domoične kiseline i njenih izomera. Preuzeto iz Lelong i sur., 2012.

Domoičnu kiselinu u uzorku određujemo tekućinskim kromatografom s masenom spekrometrijom (LC-MS). Trovanje DK očituje se u ljudi gastrointestinalnim i neurološkim simptomima. U ranoj fazi, do 24 sata od konzumacije, dolazi do povraćanja, abdominalnih grčeva, proljeva i mučnine. U ozbiljnim slučajevima, unutar 48 sati od konzumacije, dolazi do

neuroloških simptoma: glavobolja, vrtoglavica, facijalna paraliza, napadaji, kratkotrajna amnezija, poteškoće u disanju i koma. Neurološki simptomi mogu trajati mjesecima pa čak dovesti i do smrti (Rossini i Hess, 2010; Moeller, 2000).

1.4. Zakonska regulativa

Najvažniji čimbenik kod određivanja kakvoće školjkaša je njegova zdravstvena, odnosno mikrobiološka ispravnost. Svaka zemlja donosi zakone vezane za stavljanje školjkaša na tržište, vodeći se standardima opisanima u Codex Alimentariusu izdanog od strane *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) i *World Health Organization* (WHO), čija je svrha zaštititi zdravlje potrošača i sigurnu proizvodnju hrane (FAO, 2016).

Prema Zakonu o veterinarstvu (NN 82/2013) propisane su najviše dopuštene količine biotoksina u živim školjkašima. Za biotoksin koji uzrokuje gubitak pamćenja (*Amnesic Shellfish Poison* – ASP) to iznosi 20 miligrama domoične kiseline na kilogram mokre mase tkiva školjkaša. Prema dokumentu Uprave za veterinarstvo, Ministarstva poljoprivrede pod nazivom „Plan praćenja kakvoće mora i školjkaša na proizvodnim područjima i područjima za ponovno polaganje živih školjkaša“ (NN 13/2013) predviđeno je tjedno uzrokovanje školjkaša na prisustvo DK, saksitoksina i njegovih derivata, lipofilnih toksina i azaspiracida. Ukoliko količina toksina prelazi najvišu dopuštenu razinu potrebno je obavijestiti veterinarsku inspekciju te zabraniti izlov na tom području. Ponovno izlovljavanje započinje tek nakon dva uzastopna zdravstveno ispravna nalaza na biotoksine. Cilj ovog nadzora je neprekidna kontrola određenih čimbenika koji mogu uzrokovati zdravstvenu neispravnosti školjkaša pa tako i koncentracije biotoksina u mekom tkivu školjkaša. Od ukupnog izlova za uzorak uzima se 4 kg, odnosno 2 kg školjkaša za kromatografske analize. Školjkaši se pakiraju u mrežice sitnog oka, a potom u plastične vrećice. Način pakiranja mora biti takav da uzorak osigura od vanjske kontaminacije. Uzorak treba označiti jednoznačnom, neobrisivom oznakom te ga smjestiti u prijenosni hladnjak i u najkraćem mogućem roku dopremiti do laboratorija (NN 13/2013). Metoda kojom se utvrđuje prisutnost biotoksina ASP je HPLC metoda (*high performance liquid chromatography* – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti), a alternativna joj je tekućinska kromatografija s masenom spektrometrijom (LC-MS/MS, *liquid chromatography-tandem mass spectrometry*).

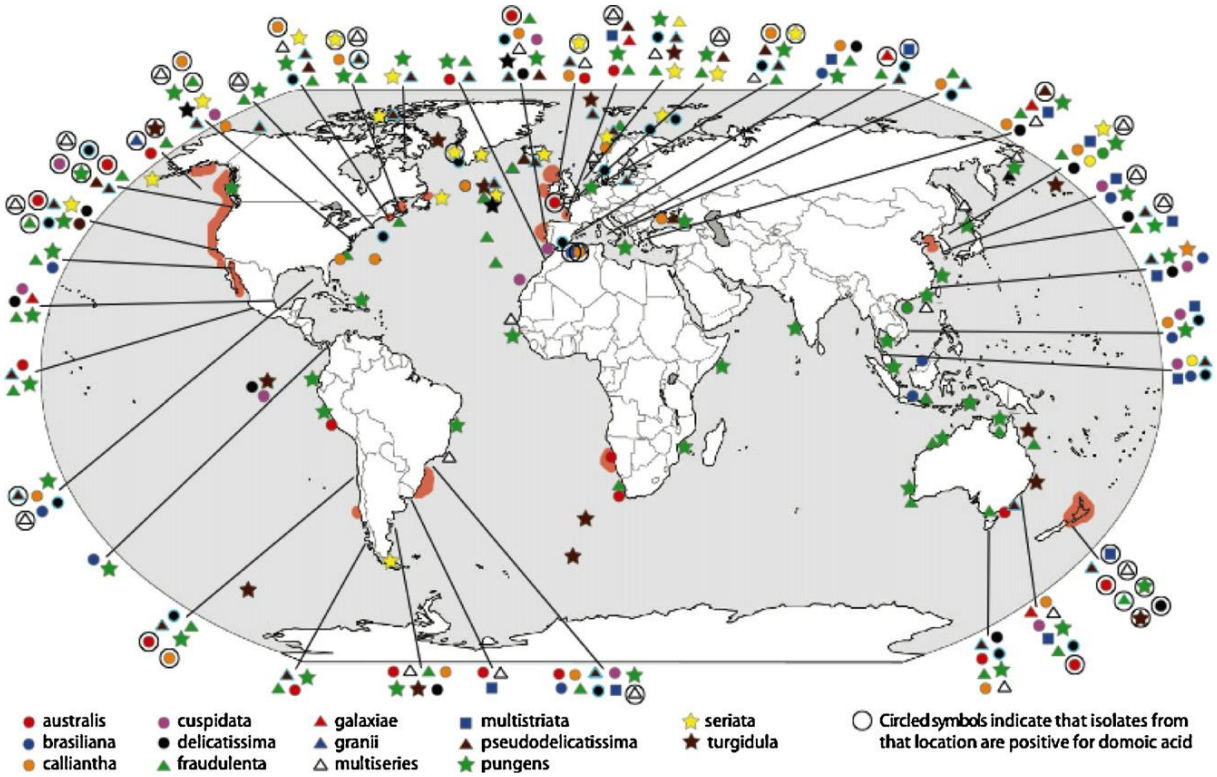
Na proizvodnim područjima i područjima za ponovno polaganje školjkaša zakonom je propisana obaveza praćenja 15 različitih parametara kakvoće mora i školjkaša.

1.5. Dosadašnja istraživanja

DK je prvi puta otkrivena 1958. godine u Japanu. Pronađena je u tkivu makroalge *Chondria armata* gdje se u malim količinama koristila kao lijek za crijevne bolesti (Costa i sur., 2004).

Značajnija istraživanja započela su nakon 1987. godine, kada je zabilježen prvi slučaj amnezijskog trovanja školjkašima kod ljudi (ASP) uzrokovan konzumacijom dagnji *(Mytilus edulis)* koje su sadržavale DK (Lelong i sur., 2012). Konzumacija dagnji koje su uzgajane u akvatoriju otoka Prince Edward u Kanadi izazvala je smetnje kod više od 100 ljudi, a tri starije osobe su preminule. Simptomi trovanja kod većine ljudi bili su povraćanje, grčevi, dijareja, glavobolja, vrtoglavica, dezorijentacija i gubitak kratkoročnog pamćenja (Žure, 2010). Uzrok trovanja povezan je sa sintezom domoične kiseline u dijatomejama vrste *Pseudo-nitzschia pungens multiseries* (Hasle, 1996). Ona se u školjkašima akumulira kao sekundarni metabolit. Osim školjkaša, otkriveno je da i ribe mogu biti vektori DK,. Četiri godine kasnije, nakon slučaja trovanja DK u Kanadi, pronađen je velik broj uginulih komorana i smeđih pelikana na zapadnoj obali Sjeverne Amerike, zbog trovanja domoičnom kiselinom koju je uzrokovala *Pseudo-nitzschia australis Frenguelli*. Također, nakon provedenih istraživanja u danskim vodama utvrđeno je da dijatomeja *Pseudo-nitzschia seriata Peragallo,* koja je široko rasprostranjena u hladnim područjima sjeverne hemisfere, sintetizira domoičnu kiselinu u koncentracijama sličnim onima nađenim u *Pseudo-nitzschia-pungens multiseries* (Hasle, 1996) u Kanadi. To je bio prvi dokaz da je DK prisutna u fitoplanktonu izvan Sjeverne Amerike i da ima potencijalno ozbiljne posljedice za konzumaciju školjkaša (Lundholm i sur., 1994). Toksične *Pseudo-nitzschia* vrste prisutne su u gotovo svim svjetskim morima (Slika 4).

Ubrzo nakon slučaja masovnog trovanja ljudi u Kanadi, kanadske vlasti su donijele odredbu o maksimalnoj dozvoljenoj količina (MDK) DK u tkivu školjkaša. MDK je izvedena iz procijenjene količine DK u tkivu školjkaša koje su uzrokovale trovanje i iznosi 20 µg DK/g tkiva. Maksimalno dozvoljena koncentracija domoične kiseline u tkivu školjkaša od 20 µg/g, propisana je zakonskim odredbama i u drugim zemljama (Žure, 2010).



Slika 4. Toksične Pseudo-nitzschia vrste. Simboli onih vrsta za koje je dokazano da proizvode domoičnu kiselinu u kulturi su zaokružene i prikazane su na područjima iz kojih su izolirane. Područja na obalama označena crvenom bojom su mjesta na kojima je bio zabranjen izlov školjkaša zbog povišene razine domoične kiseline (> 20 mg DK kg^{-1} mokre mase tkiva školjaka) ili zbog ugibanja morskih organizama uslijed otrovanja domoičnom kiselinom. Preuzeto iz: Thessen, A.E., 2007. Taxonomy and ecophysiology of *Pseudo-nitzschia* in the Chesapeake Bay. Doktorska disertacija, Sveučilište Maryland, College Park, MD. str. 231.

1.6. Utjecaj temperature i pH na toksine

Toksini se prema svojoj strukturi dijele na osam glavnih skupina: skupina azaspiracida (AZA), skupina brevetoksina (BTX), skupina cikličkih imina, skupina domoične kiseline (DA), skupina okadaične kiseline (OA), skupina pektentoksina (PTX), skupina saksitoksina (STX) i skupina jesotoksina (YTX) (Toyofuku, 2006). Kod ljudi se kao posljedica trovanja različitim toksinima konzumiranjem školjkaša javljaju sindromi ASP, PSP, DSP, AZP i NSP kao što je već opisano u poglavlju 1.

ASP trovanje uzrokuje DK. Provođeni su razni pokusi smanjenja DK u mesu kontaminiranih školjkaša. Tako je utvrđeno da se prilikom kuhanja mala količina DK gubi. Ova pojava objašnjena je gubitkom hidrosolubilne DK u okolnoj vodi (Mccarron i Hess, 2005; Reboreda i sur., 2009). Utvrđeno je da se određena količina DK gubi i prilikom konzerviranja, međutim veća količina prelazi u ambalažu te i na taj način predstavlja prijetnju potrošačima (Vieites i Cabado, 2008).

Prilikom uobičajenih postupaka pripreme školjkaša za ljudsku prehranu kuhanjem, tkivo školjkaša i eventualno prisutni toksini kao što je domoična kiselina izloženi su termičkom djelovanju. Dosadašnja istraživanja pokazala su da termička obrada prilikom kuhanja može imati utjecaj na sadržaj i raspodjelu različitih grupa biotoksina u tkivima mekušaca i rakova. Lawrence i sur. (1994) su istraživanjem sadržaja PSP toksina u hepatopankreasu jastoga dokazali da se sadržaj PSP toksina u hepatopankreasu smanjio za 65 % nakon kuhanja u vodi. Ovo relativno veliko smanjenje sadržaja može se objasniti prijelazom toksina iz tkiva jastoga u vodenu otopinu zbog hidrofilnosti PSP toksina. Također, dokazano je da kuhanje (cca 100 ^{o}C) kunjke *Acanthocardia tuberculatum* (Berenguer i sur., 1993) i dagnje (*Mytilus galloprovincialis*) (Vieites i sur., 1999) smanjuje sadržaj PSP toksina. Utjecaj procesa industrijskog konzerviranja kuhanjem rakova u slanoj vodi procijenili su Leira i sur. (1998). Pokazali su da je koncentracija DK u probavilu rakova smanjena za 67-71 %, dok je u drugim tkivima DK evidentirana, iako u njima nije bila prisutna prije kuhanja, što ukazuje na difuziju (prijenos) DK kroz različita tkiva tijekom kuhanja.

Paralitičko trovanje školjkašima ili poznatije PSP, uzrokovano je saksitoksinima koje najviše proizvode dinoflagelati, ali utvrđena je proizvodnja i kod manje vrste cijanobakterija. Svi saksitoksini su hidrosolubilni i termostabilni. Najtoksičniji i najstabilniji je saksitoksin (STX) dok se u tkivu školjkaša najčešće pronalaze neosaksitoksin i gonyautotoksin (Kodama i Sato, 2008). Saksitoksini onemogućavaju djelovanje naponom reguliranih natrijevih kanala na stjenci neurona što dovodi do nemogućnosti provođenja akcijskog potencijala. Time ne dolazi do provođenja živčanog impulsa i nastupa paraliza. Postoji tehnika detoksikacije zagađenih školjkaša s niskom koncentracijom toksina. Tako se konzerviranjem mogu reducirati određene količine toksina.

Otrovanje školjkašima koje uzrokuje dijareju ili DSP uzrokovano je dinoflagelatima. Postoje tri toksina koja uzrokuju DSP, a to su okadaična kiselina (OA), pectenotoksini (PTX) i yessotoksini (YTX) (Anonymus, 2004). Najviša količina biotoksina koji uzrokuju diareju u jestivim dijelovima školjkaša ne smije prelaziti 160 μg okadaične kiseline, dinophysitoksina i

pectenotoksina na 1000 g mesa školjkaša, odnosno 3,75 mg yessotoksina na 1000 g mesa školjkaša (NN 13/2013). Istraživanjima je dokazano da se postupcima zamrzavanja i odmrzavanja nije promijenila količina okadaične kiseline u tkivu školjkaša, no unatoč svojoj termostabilnosti dokazano je da se dužim periodom kuhanja na visokim temperaturama okadaična kiselina i njeni derivati razgrađuju.

Neurotoksično trovanje školjkašima uzrokuje određena vrsta dinoflagelata, *Karenia brevis.* Toksini nisu samo toksični za ljude već i za morske sisavce, ptice i ribe. Toksini koji uzrokuju ovo trovanje nazivaju se brevetoksini (BTX). Termostabilni su, liposoubilni i stabilni pri svim uvjetima pH, što znači da se ne mogu ukloniti iz tkiva školjkaša nijednim postupkom (Anonymus, 2004).

Azaspariciđno trovanje školjkašima uzrokuje toksin azaspariciđ. Istraživanjima je ustanovljeno da je dinoflagelat *Protoperidinium crassipes* potencijalni proizvođač (Twiner i sur., 2007). Ovaj toksin je termostabilan i kuhanjem je dokazano da se njegova koncentracija samo povećava.

1.7. Svrha i ciljevi rada

Prilikom obrade ili pripreme školjkaša za konzumaciju potrebno je ustanoviti mijenja li se maseni udio toksina u tkivu školjkaša. U ovom radu istraživati će se DK. Naime, sadržaj DK u tkivu školjkaša se može smanjiti ili povećati iznad najviše dopuštene granice ovisno o ponašanju pojedinog izomera domoične kiseline u procesu obrade školjkaša za konzumaciju.

Svrha ovog rada je odrediti utjecaj temperature i pH na toksičnost DK.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Područje istraživanja

Područje na kojem su sakupljeni uzorci brbavica naziva se Mlinice, smješteno je u zapadnom dijelu Kaštelanskog zaljeva između Trogira i Splita (Slika 5). Kaštelanski zaljev je poluzatvoreni zaljev na istočnoj obali Jadrana, ukupne površine od 61 km^2 i srednje dubine od oko 23 m (Slika 5). Sa susjednim Splitskim kanalom komunicira kroz 1,8 km široka vrata koja su ujedno i najdublji dio zaljeva. Kaštelanski je zaljev područje s relativno visokom primarnom proizvodnjom. Tom obilježju pridonose antropogeni i prirodni utjecaji. U istočni dio Kaštelanskog zaljeva ulijeva se rijeka Jadro, na sjevernoj strani smješteno je Kaštelansko polje, a s južne strane šuma na splitskom poluotoku sa kojih se, posebno s oborinama donose hranjive tvari u zaljev. Zaljev se nalazi u urbaniziranom i poljoprivrednom te nekada industrijskom području s prisutnim ispuštanjem otpadnih (komunalnih) voda, poljoprivrednog otjecanja i nekada industrijskog otpada. U području uzorkovanja brbavica (Mlinice) nalazi se čak 12 malih izvora koji formiraju jezero, a sve u prostranoj morskoj laguni. Iz jezera ističe 1 km duga rijeka zvana Rika koja se ulijeva u more stvarajući pješčanu lagunu (Anonimus, 2016). Brbavice su uzorkovane 19.4.2017.



Slika 5. Područje istraživanja, Kaštelanski zaljev, Mlinice.

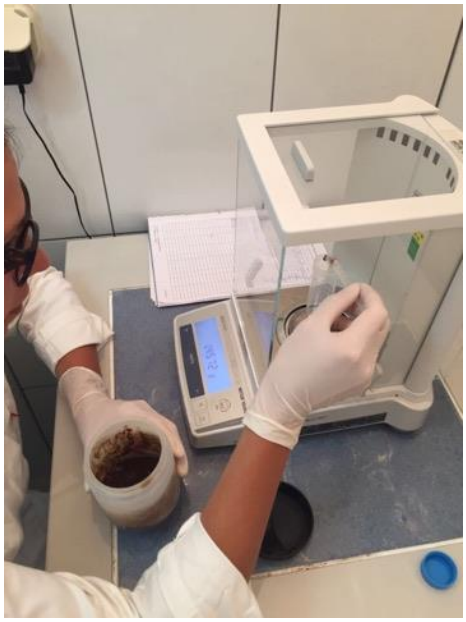
2.2. Materijali

Za potrebe ovog istraživanja korištena je slijedeća oprema:

- 100 g homogeniziranog tkiva brbavica (*Venus verrucosa)*
- Laboratorijska vaga
- Koncentrirana otopina metanola, 99,9 %
- Viali volumena 1,5 mL
- Epruvete
- Centrifuga 10 min pri 3000 okretaja u minuti
- pH metar
- tekućinski kromatograf s masenim spektrometrom, LC-MS/MS
- otopina HCl, 01 mol L^{-1}

2.3. Obrada uzorka

Za pripremu uzorka tkiva školjkaša prvo treba odvojiti tkivo od ljušture te 100 g tkiva homogenizirati u mikseru 3 min pri brzini do 22000 okretaja u minuti. Takvo homogenizirano tkivo može se čuvati nekoliko tjedana na temperaturi od -10^{o}C. Za dobivanje ekstrakta lipofilnih i ASP toksina prvo se odvaže 2,0000 ± 0,0500 g homogeniziranog mekog tkiva brbavica u epruvetama (Slika 6). U odvagano tkivo se dodaje 9 mL otopine metanola kojom se estrahiraju lipofilni i ASP toksini iz tkiva školjkaša (Slika 7).

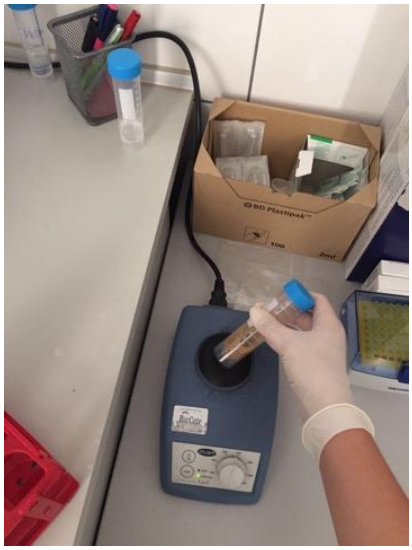


Slika 6. Vaganje homogeniziranog mekog tkiva brbavica



Slika 7. Dodavanje otopine metanola u homogenizirano tkivo brbavica

Obzirom da su lipofilni toksini topivi u mastima korišten je metanol koji je organsko otapalo. Sadržaj epruvete se zatim vorteksira 2 minute (Slika 8), nakon čega se prenese u centrifugu na 10 min pri 3000 okretaja u minuti (Slika 9).

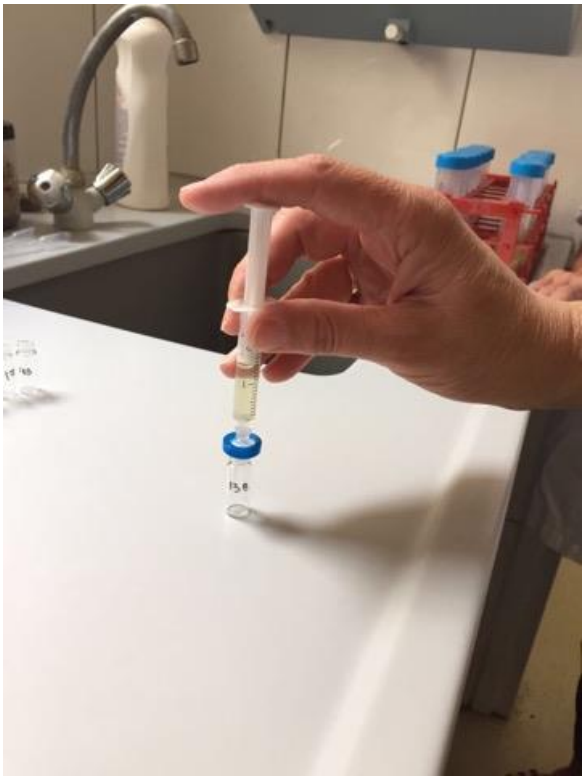


Slika 8. Vorteksiranje uzoraka.



Slika 9. Centrifugiranje 10 min pri 3000 okr/min.

Nakon centrifugiranja, odlije se otopina iznad taloga u plastične posude volumena 50 mL. Ekstrakcija metanolom se ponovi još jednom kao i vorteksiranje te centrifugiranje, a otopina iznad taloga se doda metanolskom ekstraktu koji je dobiven nakon prve ekstrakcije. Konačni volumen od 20 mL korigira se dodatkom metanola. Zatim filtriramo otopine u viale volumena 2,0 mL (Slika 10). Viali se postavljaju u tekućinski kromatograf s masenim spektrometrom. Potrebno je mjeriti standarde DK.



Slika 10. Filtriranje otopine u vial volumena 1,5 mL.

Nakon mjerenja standarda mjeri se DK u uzorcima koji su pripremljeni prema podacima navedenim u Tablici 1. U odvagani homogenizirani uzorak svježeg tkiva brbavica doda se određeni volumen standardne otopine domoične kiseline za koju nam je poznata masena koncentracija. Iz navedenih podataka izračuna se očekivani, odnosno konačni maseni udio domoične kiseline u uzorku. Svaki uzorak je mjeren četiri puta, nakon čega je izračunata srednja vrijednost.

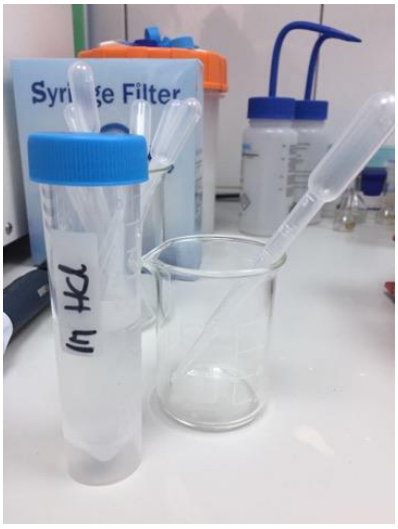
Tablica 1. Priprema uzorka tkiva brbavica za mjerenje DK u metanolskim ekstraktima nakon dodatka standardne otopine DK pri različitim pH.

Standardna otopina DK maseni udio (µg/mL)	**m uzorka (g)**	**V otopine standarda DK (µL)**	**maseni udio DK u uzorku (µg/g)**	**masa brbavica (g)**	**Oznaka uzoraka**		
					pH 6	pH 3	pH 1
103,3	2	290	15	2,0166	B13	B25	B31
103,3	2	387	20	2,0461	B14	B26	B32
103,3	2	484	25	2,0791	B15	B27	B33
103,3	2	581	30	2,0205	B16	B28	B34
103,3	2	290	15	2,0108	B17	B29	B35
103,3	2	387	20	2,0314	B18	B30	B36

Prva 4 uzorka ostavljena su na sobnoj temperaturi od 23^{o}C (B13 – B16), dok su zadnja dva (B17 i B18) stavljena u vodenu kupelj na 90^{o}C (Tablica 1). Svim uzorcima izmjeren je pH (Slika 11). Da bi dobili pH koji nam je potreban, dodavali smo otopinu HCl (Slika 12). Potrebno je postići pH vrijednost koja odgovara vrijednostima pH u želucu čovjeka, a iznosi između 1,5 (B31 – B36) i 3 (B25 – B30). Nakon postizanja te vrijednosti, uzorci su pohranjeni 30 minuta na 37^{o}C.



Slika 11. Mjerenje pH pomoću pH metra.



Slika 12. Otopina HCl.

2.4. Uvjeti rada na tekućinskom kromatogramu

Tekućinski kromatograf je instrument u kojem se analiziraju polarni analiti u tekućim uzorcima. Dakle, tekućinska kromatografija je analitička tehnika koja se primjenjuje za separaciju otopljenih tvari, odnosno analita. Separacija tvari pa i analita iz otopine se odvija između nepokretne (kromatografska kolona) i pokretne (tekuće) faze. Razdvajanje je moguće zbog različitog vremena zadržavanja pojedinih tvari iz otopine (uzorka) zbog različite interakcije s pokretnom i nepokretnom fazom. Interakcija ovisi o adsorpciji, ionskoj izmjeni ili nekoj drugoj interakciji koja utječe na vrijeme zadržavanja.

Dijelovi tekućinskog kromatografa koji je korišten u ovom radu su: odzračivač - Degasser 1200, kvaterna pumpa - Quaternary Pump 1200, automatski uzorkivač - Auto sampler 1290, termostat za kolonu i termostatirano kućište kolone - Thermostatted Column Compartment 1290 (Slika 13).

Uvjeti rada na tekućinskom kromatografu su:

- C18 kolona za kromatografiju na reverznoj fazi 50 x 2,1 mm, veličine čestica 2,7 μm, (Poroshell C18)
- temperatura kolone: 30^{o}C
- brzina protoka: 0,3 mL/min
- volumen injektiratiranja: 5 μL (pozitivan polaritet)
- volumni udjeli mobilnih faza za mjerenja u MS pozitivnom modu navedeni su u Tablici 2.

Tablica 2. Udjeli mobilnih faza A i B u kromatografskom sustavu vezanom na maseni spektrometar tijekom mjerenja lipofilnih toksina i domoične kiseline u MS pozitivnom modu

Udio A	Udio B	vrijeme
90 %	10 %	0 min
20 %	80 %	4 min
20 %	80 %	6 min
90 %	10 %	6,5 min
90 %	10 %	11 min



Slika 13. Vezani sustav tekućinski kromatograf i maseni spektrometar, Agillent Technologies: trostruki kvadrupol - Triple Quad 6410, odzračivač - Degasser 1200, kvaterna pumpa - Quaternary Pump 1200, automatski uzorkivač - Auto sampler 1290 i termostatirano kučište za kolonu - Thermostatted Column Compartment 1290.

2.5. Postupak analiziranja na LC-MS/MS

Za analizu složenih smjesa maseni se spektrometar izravno povezuje s plinskim ili tekućinskim kromatografom, u kojem se sastojci smjese prije analize prvo razdvajaju temeljem različitih vremena zadržavanja na koloni.

Nakon separacije na koloni u tekućinskom kromatografu razdvojene tvari i analit u protoku mobilnih faza ulaze u maseni spektrometar. U masenom spektrometru atomi molekula se ioniziraju, tj. prelaze u negativne ili pozitivne ione, obično bombardiranjem atoma i molekula elektronima. Tako nastali molekulski ioni se fragmentiraju (dijele) na dva ili više fragmenata. Odvajanje i detekcija se odvija temeljem molekulske mase. Maseni spektrometar se sastoji od 4 osnovna dijela (Slika 13):

- sustava za unošenje uzorka (iz tekućinskog kromatografa)
- ionskog izvora koji stvara ione i u električnom ih polju ubrzava

- analizatora (najčešće magnetsko polje) koji savija putanje različitih iona i tako ih razdvaja ovisno o omjeru njihove mase i naboja (*m*/*z*)
- detektora u kojem se razdvojeni ioni skupljaju i karakteriziraju.

Mijenjanjem jakosti magnetskog polja mogu se redom registrirati ioni različitih masa, čime nastaje maseni spektar karakterističan za određeni kemijski spoj. Masena spektrometrija primjenjuje se za točno određivanje relativnih atomskih i relativnih molekularnih masa, elementarnoga sastava i bruto-formule kemijskih spojeva, izotopnoga sastava i strukture njihovih molekula, tragova primjesa i dr. Uvjeti rada masenog spektrometra pri mjerenju domoične kiseline navedeni su u Tablici 3.

Tablica 3. Parametri mjerenja u masenom spektrometru: prekursor ioni, produkt ioni, polaritet, vrijednosti fragmentora i energije kolizije za DK.

analit	prekursor ion	produkt ion	polaritet	fragmentor	Energija kolizije
Domoična kiselina	312,0	266 248	poz.	110	12 14

Redoslijed mjerenja otopina u vezanom sustavu tekućinski kromatograf s masenim spektrometrom je :

- Otopine standarda: 6 koncentracija
- Ekstrakti uzoraka dobiveni nakon ekstrakcije metanolom
- Standardni referentni materijal ili materijal PT testa
- Izračunati γ pojedinog ASP i lipofilnog toksina u svakom uzorku prema sljedećoj formuli:

  $\gamma\ (\mu g/kg) = (A_u - a\ /b)/m \times V_t \times R$

  A_u – površina pika izmjerena za toksin u uzorku

  b – nagib kalibracijskog pravca

  a – odsječak na osi x

  m – masa uzorka (cca 2 g)

  V_t – Ukupni volumen metanolskog ekstrakta (20 mL)

  R – faktor razrijeđenja, ako je metanolski ekstrakt razrijeđen

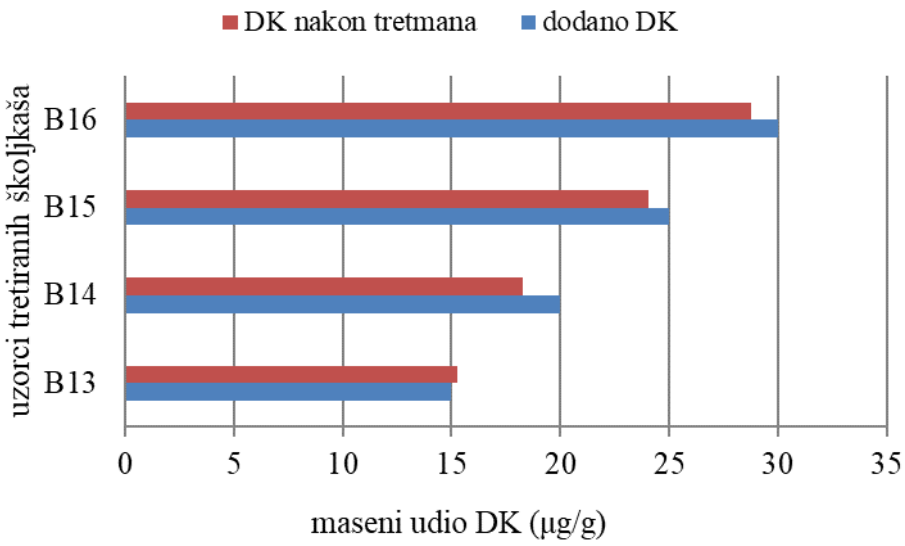
3. REZULTATI

3.1. DK u brbavicama nakon dodavanja standardne otopine DK, kontrolna skupina

U meko tkivo brbavica za kontrolnu skupinu, koje je prethodno homogenizirano i izvagano (opisano 2.2. Obrada uzorka) dodan je određen volumen standardne otopine domoične kiseline (Tablica 1) kako bi maseni udjeli iznosili 15, 20, 25 i 30 μg/g. Uzorci kontrolne skupine su analizirani na LC-MS/MS sustavu i rezultati mjerenja su navedeni u tablici 4, a grafički prikazani na slici 13. Iskorištenje (I) je udio (%) koji nam pokazuje koliko je od dodane količine DK dobiveno nakon mjerenja. Razlike u dodanom i dobivenom masenom udjelu DK pokazuju stabilnost odnosno nestabilnost DK tijekom izvođenja eksperimenta te pouzdanost i preciznost metode pripreme i mjerenja na instrumentu. U ovom eksperimentu mjerenja kontrolne skupine pokazuju stabilnost domoične kiseline u metanolskom ekstraktu prije termičke obrade i promijene pH. Vrijednosti iskorištenja su se kretale od 91,4 % - 101,6 %, sa srednjom vrijednošću od 96,3 %.

Tablica 4. Kontrolna skupina uzoraka tretiranih s standardnom otopinom domoične kiseline.

Oznaka uzorka	**dodano DK (μg/g)**	**DK nakon dodavanja (μg/g)**	**pH**	**I (%)**
B13	15	15,24	6,24	101,6
B14	20	18,28	6,24	91,4
B15	25	24,03	6,43	96,1
B16	30	28,79	6,42	96,0



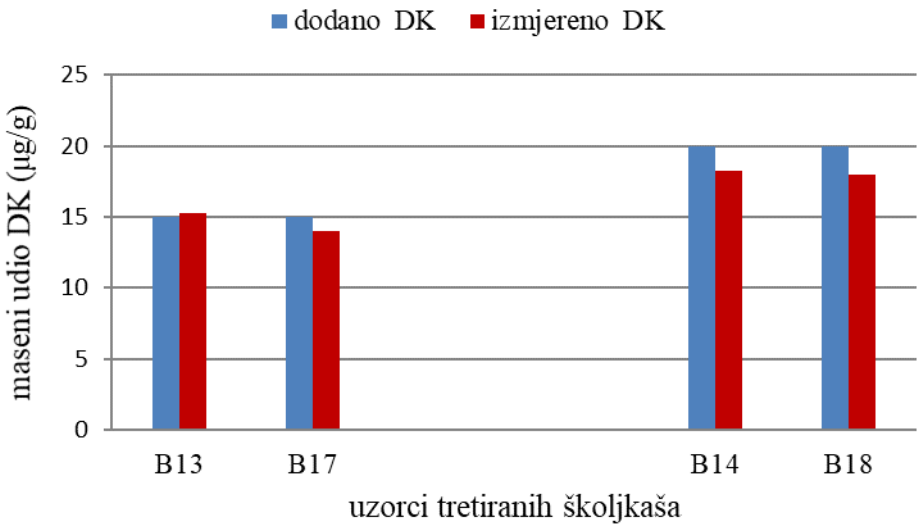
Slika 14. Domoična kiselina (µg/g) u uzorcima brbavica kontrolne skupine.

3.2. Utjecaj temperature na stabilnost DK

Obrađeni uzorci u koje je dodan određeni volumen standardne otopine DK, tretirani su na temperaturi od 23 i 90 °C. Rezultati su navedeni u tablici 5 i grafički prikazani na slici 15. Navedeni rezultati pokazuju da je stabilnost DK vrlo visoka s obzirom na promjenu temperature. Maseni udjeli DK u uzorcima su nešto niži nakon tretiranja na temperaturi od 90 °C u odnosu na uzorke pri temperaturi od 23 °C. Razlika u iskorištenju za uzorke početnog masenog udjela 15 µg/g DK iznosi 8,3 %, a za uzorke početnog masenog udjela 20 µg/g DK iznosi 1,6 %.

Tablica 5. Maseni udjeli DK u uzorcima brbavica nakon 30 min na 23 i 90°C.

oznaka	Temp. (°C)	dodano DK (µg/g)	izmjereno DK (µg/g)	pH	I (%)
B13	23	15	15,24	6,24	101,6
B17	90	15	14,00	6,35	93,3
B14	23	20	18,28	6,24	91,4
B18	90	20	17,97	4,56	89,8



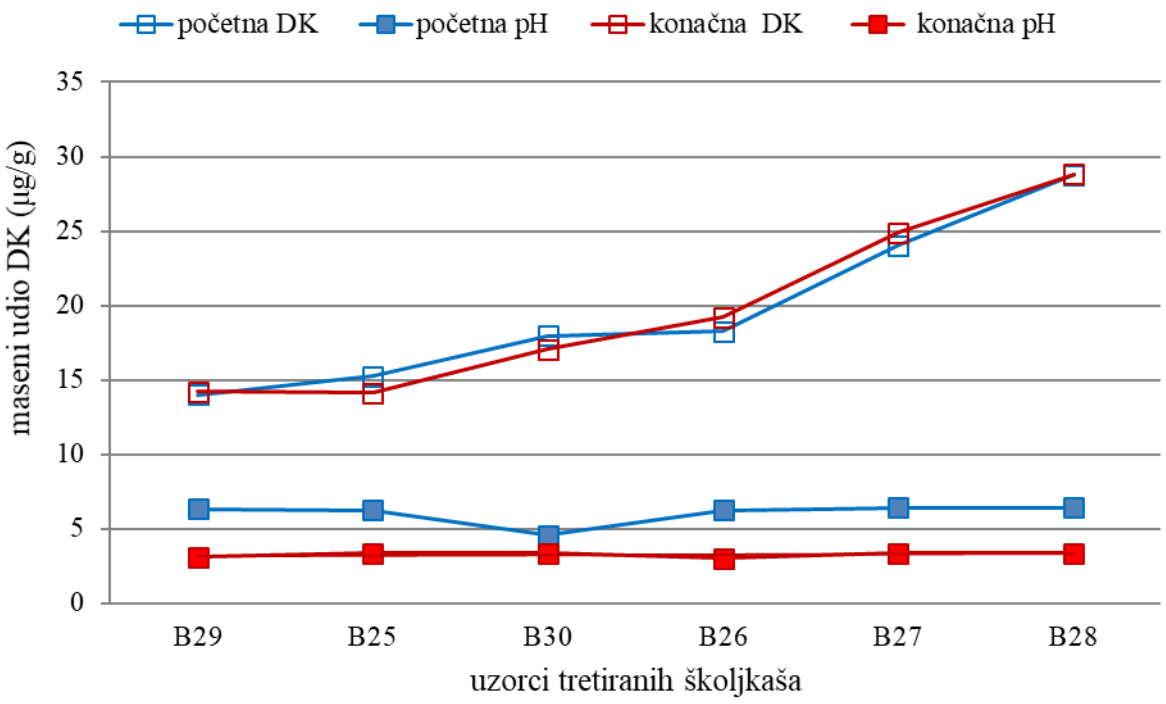
Slika 15. Domoična kiselina (µg/g) u brbavicama prije i nakon dodavanja DK na 23 °C (B13 i B14) i na 90 °C (B17 i B18).

3.3. Utjecaj pH (pH~ 3) na stabilnost DK

Uzorci prethodno pripremljeni na određenim temperaturama (Tablice 4 i 5) podvrgnuti su snižavanju početne pH vrijednosti do približno 3. Da bi se pH vrijednost snizila potrebno je u uzorke dodati određeni volumen HCl. U Tablici 6 i na Slici 16 prikazani su rezultati mjerenja DK u uzorcima tkiva brbavica pri pH ~ 6 i pH ~ 3 U prikazanim rezultatima može se vidjeti da je stabilnost DK vrlo visoka, odnosno da se maseni udjeli ne mijenjaju značajno pri pH vrijednosti 3. Iskorištenje je od 92,6 % – 105,0 %, a srednja vrijednost je 99,6 %.

Tablica 6. Maseni udjeli DK i pH u uzorcima brbavica i prije i nakon 30 min na 37°C i pH~3

Oznaka uzorka	Nova oznaka uzorka	početni DK(µg/g)	početna pH	konačni DK (µg/g)	konačan pH	I (%)
B13	B25	15,24	6,24	14,11	3,35	92,6
B14	B26	18,28	6,24	19,19	3,01	105,0
B15	B27	24,03	6,43	24,89	3,35	103,6
B16	B28	28,79	6,42	28,82	3,35	100,1
B17	B29	14,00	6,35	14,21	3,11	101,5
B18	B30	17,97	4,56	17,05	3,35	94,9



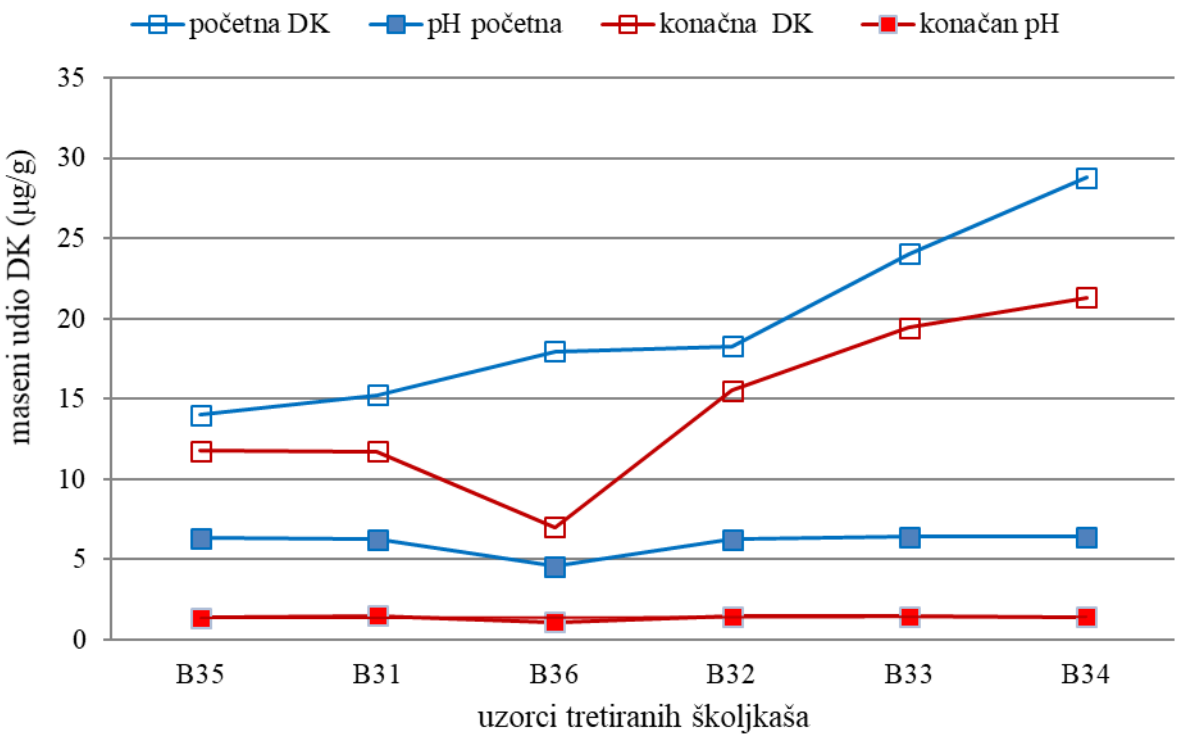
Slika 16. Utjecaj pH 3 na stabilnost domoične kiseline.

3.4. Utjecaj pH (pH~1) na stabilnost DK

U posljednjem dijelu eksperimentalnog rada uzorcima tkiva brbavica još je jednom je snižena vrijednost pH do približno 1, a rezultati mjerenja DK prikazi su u tablici 7 i na slici 17. Maseni udjeli DK niži su u odnosu na početna mjerenja, što znači da se snižavanjem pH vrijednosti na 1 utječe na stabilnost domoične kiseline. Iskorištenje je od 39,1 % – 84,9 %, a srednja vrijednost je 72,1 %.

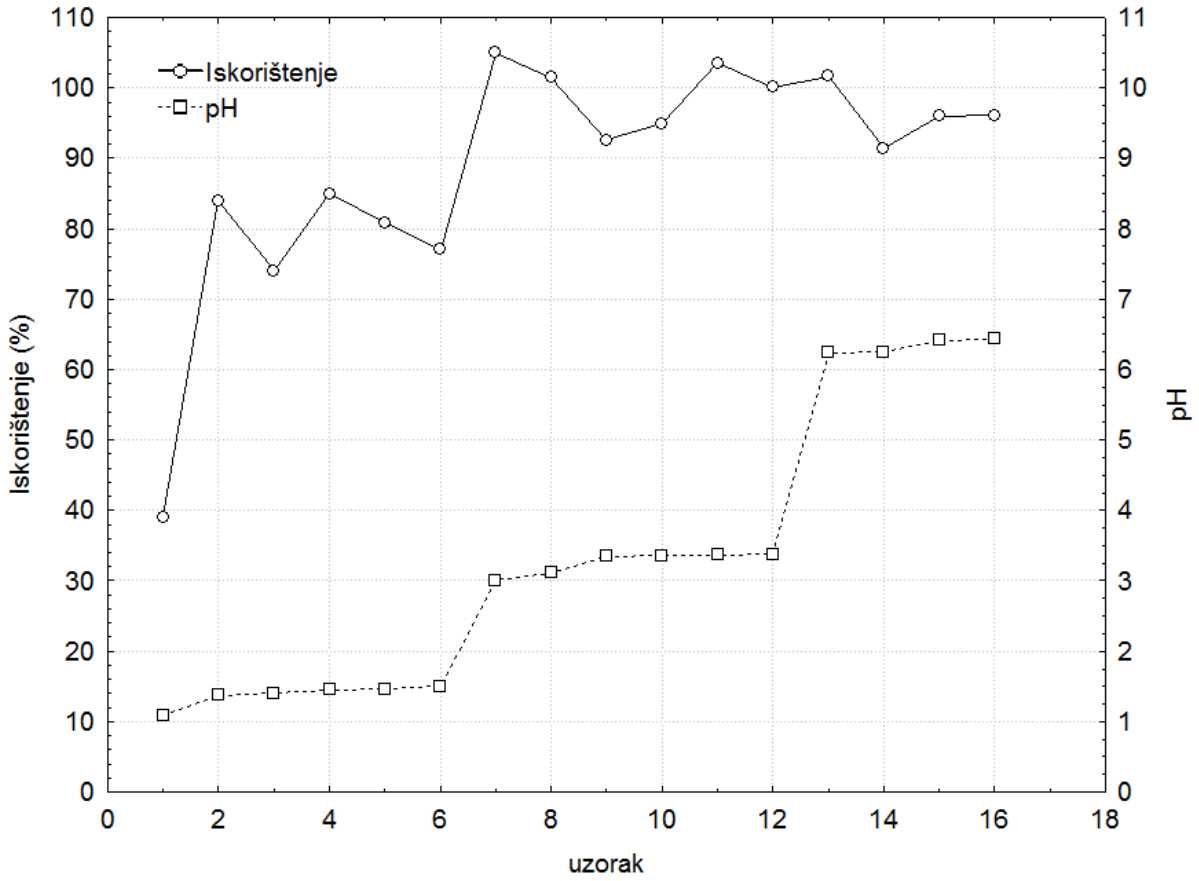
Tablica 7. Maseni udjeli DK i pH u uzorcima brbavica nakon 30 min na 37^{o}C i pH~1

Oznaka uzorka	**Nova oznaka uzorka**	**početni DK(µg/g)**	**početna pH (µg/g)**	**konačni DK**	**konačan pH**	**I (%)**
B25	B31	15,24	6,24	11,74	1,5	77,0
B26	B32	18,28	6,24	15,53	1,45	84,9
B27	B33	24,03	6,43	19,44	1,46	80,9
B28	B34	28,79	6,42	21,31	1,4	74,0
B29	B35	14,00	6,35	11,76	1,37	84,0
B30	B36	17,97	4,56	7,02	1,09	31,9



Slika 17. Utjecaj pH 1 na stabilnost domoične kiseline.

3.5. Iskorištenje DK



Slika 18. Iskorištenje (I) domoične kiseline u metanolskim ekstraktima tkiva brbavica pri pH ~1, 3 i 6. Lijeva ordinata prikazuje skalu za iskorištenje (%), a desna ordinata prikazuje skalu za pH.

Utjecaj pH otopine metanola za ekstrakciju DK na udio iskorištenja DK prikazan je na slici 18. Iskorištenje se smanjuje u otopini pH~1, dok u otopinama pri pH ~3 i pH~6 nema utjecaja. Dakle, domoična kiselina je stabilna u otopinama metanola pri pH ~3 i pH~6, a u otopini pH ~1 nije.

4. RASPRAVA

U ovom radu provedena su istraživanja utjecaja temperature i pH na stabilnost domoične kiseline. Uzorci homogeniziranog tkiva brbavica, odvage ~ 2,0000 g, tretirani su sa standardnom otopinom DK na način da je DK dodana u količini koja je rezultirala masenim udjelima 15, 20, 25 i 30 μg DK/g tkiva brbavice. Odabrani maseni udjeli čine 75%, 100%, 125% i 150% od maksimalne dozvoljene količine DK u jestivom tkivu školjkaša (NN 82/2013). Dakle, navedeni maseni udjeli su teoretski, dok se mjerenjima na LC-MS/MS instrumentu pokazalo da je srednja vrijednost iskorištenja tako pripremljenih uzoraka 96,3 %, i to za kontrolnu skupinu prije promjene temperature i pH. Visoki udio iskorištenja DK za kontrolnu skupinu, dokaz je efikasnosti metode određivanja DK, pripreme uzorka i uvjeta mjerenje na LC-MS/MS instrumentu. Uzorci brbavica kojima je dodana DK do konačnih masenih udjela 15 i 20 μg/g (teoretski maseni udjeli), a nakon dodavanja otopine za ekstrakciju DK, su ostavljeni na sobnoj temperaturi od 23 ^{o}C i zagrijavani na 90 ^{o}C. Povišenje temperature na 90 ^{o}C nije utjecalo na stabilnosti domične kiseline. Srednja vrijednost iskorištenja u kontrolnoj skupini uzoraka bila je 96,3 %, a u uzorcima koji su zagrijavani na 90 ^{o}C bila je 91,6 %. Razlika u iskorištenju za uzorke teoretskog masenog udjela 15 μg/g prije i nakon zagrijavanja je 8,3 %, a za uzorke teoretskog masenog udjela 20 μg/g je 1,6 %. Razlika je vjerojatno rezultat preciznijeg mjerenja u području viših masenih udjela DK. Prilikom zagrijavanjana moguće je isparavanje otopine u kojoj su uzorci brbavica pripremljeni što može utjecati na rezultat mjerenja (McCarron i Hess, 2005)

McCarron i Hess (2005) su ispitivali utjecaj temperature (*Mytilus edulis*) na udio domoične kiseline u jestivom tkivu dagnje primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC). Maseni udjeli DK u cijelom tijelu, hepatopankreasu i ostatku tkiva mjereni su u svježem i kuhanom uzorku. Relativna smanjenja masenih udjela DK, kao i tekućine tkiva nakon toplinske obrade cijelog uzorka bila su slična, što je rezultiralo približno jednakim masenim udjelima DK prije i poslije kuhanja. Maseni udjeli DK smanjeni su u hepatopankreasu, a povećani u ostatku tkiva što upućuje na različitu promjenu organa dagnji tijekom toplinske obrade. Rezultati istraživanja koje su proveli McCarron i Hess (2005) slažu se s rezultatima ovog rada i pokazuju da toplinska obrada kuhanjem školjkaša nije prikladna tehnika za smanjenje DK u dagnjama a ni u brbavicama. Međutim, autori Lawrence i sur. (1994) su dokazali utjecaj povišene temperature prilikom kuhanja na smanjenje PSP toksina. Dakle, sadržaj PSP toksina u tkivu jastoga tijekom kuhanja smanjio se za 65 %. Kako su PSP

toksini izrazito hidrofilni, ovako značajno smanjenje PSP toksina je rezultat prijelaza PSP toksina tijekom kuhanja u vodenu otopinu u kojoj se jastog kuha.

U ovom istraživanju, a nakon tretiranja na određenim temperaturama, uzorcima je snižena pH vrijednost sa otopinom HCl. Vrijednost je snižena na približno 3, a temperatura na kojoj su tretirani je bila 37°C. Rezultati pokazuju da se maseni udjeli domoične kiseline nisu značajno promijenili. Srednja vrijednost iskorištenja u kontrolnoj skupini uzoraka bila je 96,3 %, a u uzorcima kojima je pH snižen na približno 3 i temperatura održavana na 37°C bila je 99,6 % (Slika 18). pH kontrolne skupine bio je približno 6.

Zadnje tretiranje uzoraka bilo je snižavanje pH vrijednosti sa 3 na 1 i održavanje temperature na 37 °C. Prilikom ovog tretiranja uzoraka iz rezultata je vidljiv utjecaj snižavanja pH na približno 1 na stabilnost domoične kiseline. Maseni udjeli DK znatno su se smanjili (Slika 17). Srednja vrijednost iskorištenja u kontrolnoj skupini uzoraka bila je 96,3 % (pH ~ 6), u uzorcima kojima je pH snižen na približno 3 i temperatura održavana na 37°C bila je 99,6 %, dok je u uzorcima kojima je pH snižen na približno 1, a temperatura i dalje održavana na 37°C bila 72,1 %. U rezultatima je najniže iskorištenje za DK (31,9 %) određeno za uzorak u kojem je pH iznosio 1,09; što je za 0,44 niža pH vrijednost od ostalih uzoraka u ovoj grupi (Slika 18).

Toksini koji se nalaze u tkivima školjkaša su termostabilni i većina ih je stabilna pri promjenama pH. Promjena pH vrijednosti utječe na stabilnost domoične kiseline što je dokazano u ovom radu. Ljudska konzumacija školjkaša bi se trebala bazirati samo na higijenski i zdrastveno ispravnim školjkašima jer se iskuhavanjem ne mijenja količina toksina u tkivu. Svako konzerviranje ili kuhanje istraživanjima je pokazalo raspodjelu toksina kroz različita tkiva i prelazak u tekućinu, odnosno medij u kojem se tkivo nalazilo (Leira i sur., 1998). Unatoč tome pokazalo se da se konzumacijom takvih tkiva svakako unosi određena količina toksina, bez obzira na tretiranje.

4. ZAKLJUČAK

Domoična kiselina je aminokiselina koja uzrokuje ASP toksičnost školjkaša. Maseni udjeli viši od MDK u jestivom tkivu školjkaša uzrokuju kod ljudi trovanje koje se očituje u gastrointestinalnim i neurološkim simptomima. Određenim postupcima istraživana je stabilnost domoične kiseline. Promjena temperature ne utječe znatno na masene udjele domoične kiseline što znači da kuhanje ne utječe na toksičnost domoične kiseline, ona ostaje stabilna. Snižavanje pH vrijednosti na 1 i niže utječe na stabilnost domoične kiseline.

Školjkaši su izrazito zdravi za ljudsku prehranu, no mogu uzrokovati otrovanje biotoksinima. Domoična kiselina kao i drugi morski toksini koje školjkaši akumuliraju, su termostabilni i nije ih moguće ukloniti kuhanjem, zbog toga je vrlo važno kontinuirano praćenje morskih toksina u školjkašima.

5. LITERATURA

Anonimus 2004. FAO Food And Nutrition Paper 80. Marine biotoxins. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Rim, 173 str.

Anonimus 2013. Brbavica. Dostupno sa: https://hr.wikipedia.org/wiki/Brbavica, pristupljeno: srpanj, 2017.

Anonimus 2016. Trogir-Mlinice Pantan. Dostupno sa: http://www.dalmatia.hr/ hr/prirodne-ljepote/trogir-mlinice-pantan. pristupljeno: srpanj, 2017.

Berenguer JA, Gonzalez L, Jimenez I, Legarda TM, Olmedo JB, Burdaspal PA. 1993. The effect of commercial processing on the paralytic shellfish poison (PSP) content of naturally contaminated *Acanthocardia tuberculatum* L. Food Additives & Contaminants, 10: 217–230.

Botana LM. 2014. Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology, and Detection, Third Edition, CRC Press Taylor and Francis Group, Boca Raton, 875 str.

Costa PR, Garrido S. 2004. Domoic acid accumulation in the sardine *Sardina pilchardus* and its relationship to *Pseudo-nitzschia* diatom ingestion. Marine Ecology Progress Series, 284: 261-268.

FAO 2016. Codex alimentarius. Dostupno sa: http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/about-codex/en/, pristupljeno: kolovoz 2017.

Gosling E. 2003. Bivalve Moluscs - biology, ecology and culture. Fishing News Books, Blackwell Publishing, Oxford, 443 str.

Hasle RG, Syvertsen EE, Steidinger AK, Tangen K, Tomas RC. 1996. Identifying marine diatoms and dinoflagellates. Academic Press Inc. San Diego, California, 385 str.

Huss HH, Ababouch L, Gram L. 2004. Assessment and management of seafood safety and quality. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Rim, 444 str.

Jasprica N, Car A. 2003.Toxic and potentially toxic phytoplankton species in the Mali Ston Bay (Eastern Adriatic). Naše more, 50: 68-71.

Kodama M, Sato S. 2008. Metabolism of paralytic shellfish toxin incorporated into bivalves. Seafood and Freshwater toxins. CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Raton. London. New York, 1215 str.

Lawrence JF, Maher M, Watson-Wright W, 1994. Effect of cooking on the concentration of toxins associated with paralytic shellfish poison in lobster hepatopancreas. Toxicon, 32: 57–64.

Leira FJ, Vieites JM, Botana LM, Vyeites LM. 1998. Domoic acid levels of naturally contaminated scallops as affected by canning. Journal of Food Science, 63 (6): 1081–1083.

Lelong A, Hégaret H, Soudant P, Bates SS. 2012. *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) species, domoic acid and amnesic shellfish poisoning: Revisiting previous paradigms. Phycologia, 51 (2): 168–216.

Lundholm N, Skoy J, Pocklington R, Moestrup Ø. 1994. Domoic acid, the toxic amino acid responsible for amnesic shellfish poisoning, now in *Pseudonitzschia seriata* (Bacillariophyceae) in Europe. Phycology, 33 (6): 475-478.

McCarron P, Hess P. 2005. Tissue distribution and eff ects of heat treatments on the content of domoic acid in blue mussels, *Mytilus edulis*. Toxicon, 47: 473–479.

Marić Pfannkuchen D. 2013. Potencijalno toksične dijatomeje roda Pseudo-nitzschia u sjevernom Jadranu: ekološke, taksonomske i molekularne značajke. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, 195 str.

Moeller PDR. 2000. Shellfish Toxins. Marine & freshwater products handbook. Technomic Publishing CO., INC. Lancaster. Basel, 2000. 964 str.

Mos L. 2000. Domoic acid: a fascinating marine toxin. Environmental Toxicology and Pharmacology 9: 79-85.

NN 13/2013. Plan praćenja kakvoće mora i školjkaša na proizvodnim područjima i područjima za ponovno polaganje živih školjkaša. 2013. Narodne novine 13, Zagreb.

NN 82/2013. Zakon o veterinarstvu. 2013. Narodne novine 82, Zagreb.

Novelli A, Fernandez-Sanchez T, Tereblanca A. 1993. Neurotoxicity by domoic acid and ocadaic acid. Harmful Algae News, 6: 3-4.

Peharda M, Ezgeta-Balić D, Vrgoč N, Isajlović I, Bogner D. 2010. Description of bivalve community structure in the Croatian part of the Adriatic Sea – hydraulic dredge survey. Acta Adriat, 51: 141-158.

Reboreda A, Alfonso A, Botana LM, Lago J, Cabado AG, Chapela M, Vieites JM. 2009. Decrease of marine toxin content in bivalves by industrial processes. Toxicon, 55. 235–243.

Rossini GP, Hess P. 2010. Phycotoxins: chemistry, mechanisms of action and shell- fish poisoning. Molecular, Clinical and Environmental Toxicology. Volume 2: Clinical Toxicology, 100: 65-122.

Thessen AE. 2007. Taxonomy and ecophysiology of Pseudo-nitzschia in the Chesapeake Bay. Ph.D. Thesis. University of Maryland, College Park, MD. 231 str.

Toyofuku H. 2006. Joint FAO/WHO/IOC activities to provide scientific advice on marine biotoxins (research report). Marine Pollution Bulletin, 52: 1735-1745.

Twiner MJ, Doucette GJ, Hess P, Rehmann N. 2007. Azaspiracid Shellfi sh Poisoning: A Review on the Chemistry, Ecology, and Toxicology with an Emphasis on Human Health Impacts. Marine Drugs, 6. 39-72.

van Apeldoorn ME, van Egmond HP, Speijers GJA. 1999. Amnesic Shellfish Poisoning: A Review. National institute of Public Health and the Enviroment, Nizozemska, 53 str.

Vieites JM, Botana LM, Vieytes MR, Leira FJ. 1999. Canning process that diminishes paralytic shellfish poison in naturally contaminated mussels (*Mytilus galloprovincialis*). Journal of Food Protection, 62: 515–519.

Vieites JM, Cabado AG. 2008. Incidence of Marine toxins on Industrial Activity, In seafood and fresh water toxins, Pharmacology, Physiology and Detection. Botana, L. M., Ed. CRC Press, Taylor and Francis group, Boca Raton, FL. 899-917.

Vrgoč N, Peharda Uljević M, Krstulović-Šifner S. 2009. Assessment of demersal fish and shellfish stocks commercially exploited in Croatia – Final Output of the European

Union’s PHARE 2005 Project: EuropeAid/123624/D/SER/HR program. Report, Institut oceanografije i ribarstva. Split, 172 str.

Žure M. 2010. Određivanje domoične kiseline u školjkašima *Callista chione* (Linnaeus, 1758) i *Acanthocardia tuberculata* (Linnaeus, 1758). Diplomski rad, Sveučilište u Splitu, 30 str.