

# Profil fiktoksina u plodovima mora iz akvatorija istarskog poluotoka i procjena izloženosti hrvatskih potrošača

---

Kvrgić, Kristina

Doctoral thesis / Doktorski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:536000>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](#)/[Imenovanje-Nekomercijalno-Dijeli pod istim uvjetima 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-12**

REPOZITORIJ

PTFS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar  
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

**Kristina Kvirgić**

**PROFIL FIKOTOKSINA U PLODOVIMA MORA IZ  
AKVATORIJA ISTARSKOG POLUOTOKA I PROCJENA  
IZLOŽENOSTI  
HRVATSKIH POTROŠAČA**

**DOKTORSKI RAD**

Osijek, listopad, 2023.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DOKTORSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek  
Doktorski studij Prehrambena tehnologija i nutricionizam  
Smjer: Prehrambena tehnologija

Zavod za

Katedra za

Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska

UDK: 613.2 : 637.56:639.4 (497.57)(262.3)(043.3)

613.2 : 346.548(497.57)(262.3)(043.3)

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

**Znanstvena grana:** Sigurnost i kvaliteta hrane

**Tema rada** je prihvaćena na IX. sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 27. lipnja 2019.

**Mentor:** *prof. dr. sc. Jelka Pleadin*

**Komentor:**

### PROFIL FIKOTOKSINA U PLODOVIMA MORA IZ AKVATORIJA ISTARSKOG POLUOTOKA I PROCJENA IZLOŽENOSTI HRVATSKIH POTROŠAČA

*Kristina Kvrđić, 0113141153*

Sažetak:

Plodovi mora važan su dio uravnotežene prehrane zbog velike nutritivne vrijednosti i dobrobiti za zdravlje. Neki od njih, poput školjkaša i mješčičnica, zbog specifičnog načina hranidbe i filtracije velikih količina vode u svom tkivu mogu nakupljati različite kontaminante, poput fikotoksina, te na taj način postaju njihovi vektori u prehrambenom lancu. U ovom istraživanju validirane su LC-MS/MS metode za određivanje domoične kiseline u tragovima i lipofilnih toksina, uključujući slabo istražene cikličke imine i LC-FLD metoda za određivanje paralitičkih toksina, te su primijenjene za ispitivanje profila ovih skupina fikotoksina u uzorcima dagnji (n = 416), kamenica (n = 104), kapica (n = 52) i mješčičnica (n = 104). Od ukupnog broja uzoraka, u njih šest kvantificirani su fikotoksini u koncentraciji većoj od NDK. U najvećem broju uzoraka kvantificirani su SPX1 i GYM, zatim YTX, DA, OA, PnTX-G, AZA2, GTX2,3, GTX1,4, AZA1 i PTX2, uglavnom u niskim koncentracijama. Temeljem utvrđenih koncentracija i prehrambenih navika utvrđeno je da potrošači nisu izloženi akutnom toksičnom učinku većine fikotoksina obuhvaćenih istraživanjem, no utvrđena je izloženost akutnom štetnom djelovanju okadaične kiseline i paralitičkim toksinima. Utvrđena je statistički značajna ( $p < 0,05$ ) sezonska pojavnost fikotoksina, utjecaj lokaliteta, kao i razlika u pojavnosti među vrstama izloženim jednakim okolišnim utjecajima.

**Ključne riječi:** plodovi mora, Jadran, kromatografija, fikotoksini, izloženost

**Rad sadrži:** 175 stranica  
16 slika  
43 tablice  
11 priloga  
572 literaturne reference

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za obranu:**

- |  |               |
|--|---------------|
| 1. izv. prof. dr. sc. <i>Ivana Flanjak</i> | predsjednik   |
| 2. doc. dr. sc. <i>Krunoslav Aladić</i>    | član          |
| 3. dr. sc. <i>Tanja Bogdanović</i>         | član          |
| 4. prof. dr. sc. <i>Stela Jokić</i>        | zamjena člana |
| 5. prof. dr. sc. <i>Drago Šubarić</i>      | zamjena člana |

**Datum obrane:** 25. listopada 2023.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u** Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Rektoratu sveučilišta u Osijeku, Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu te samo u elektroničkom obliku u Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici u Osijeku

**BASIC DOCUMENTATION CARD**

PHD (DOCTORAL) THESIS

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek**  
**Faculty of Food Technology Osijek**  
**Doctoral Study Food Technology and Nutrition**  
**Department of**  
**Subdepartment of**

Franje Kuhača 18, HR-31000 Osijek, Croatia  
**UDC:** 613.2 : 637.56:639.4 (497.57)(262.3)(043.3)

613.2 : 346.548(497.57)(262.3)(043.3)

**Scientific area:** Biotechnical sciences  
**Scientific field:** Food technology

**Thesis subject** was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology at its session no. IX held on June 27, 2019.

**Mentor:** *Jelka Pleadin*, PhD, Full Professor  
**Co-mentor:**

**PROFILE OF PHYCOTOXINS IN SEAFOOD FROM THE ISTRIAN PENINSULA WATERS AND EXPOSURE ASSESSMENT FOR CROATIAN CONSUMERS**

*Kristina Kvrđić*, 0113141153

**Summary:**

Due to its high nutritional value and health benefits, seafood is an important part of a healthy diet. Due to their specific way of feeding, bivalve mollusks and ascidians filter large amounts of water and may accumulate many contaminants in their tissues, such as phycotoxins, thus becoming their vectors in the food chain. In the framework of this dissertation, LC-MS/MS methods for the determination of domoic acid traces, lipophilic toxins, including insufficiently studied cyclic imines, and LC-FLD method for the determination of paralytic shellfish toxins were validated and applied to determine the profile of these phycotoxins in mussels (n = 416), oysters (n = 104), scallops (n = 52) and ascidians (n = 104). Phycotoxins were quantified in 6 samples in concentrations higher than the MPL. SPX1 and GYM were the most frequent, followed by YTX, DA, OA, PnTX-G, AZA2, GTX2,3, GTX1,4, AZA1, and PTX2, present mostly in low concentrations. Based on the established concentrations and dietary habits of consumers in Croatia, an exposure assessment of consumers to phycotoxins was done. Consumers were not exposed to the acute toxic effect of most of the phycotoxins included in this research, but they were exposed to the acute harmful effect of okadaic acid and paralytic shellfish toxins. Statistically significant seasonality ( $p < 0,05$ ) and influence of geographical region on the occurrence of phycotoxins were observed, as well as the interspecies differences in their accumulation in samples collected from the same region, exposed to the same environmental influence.

**Key words:** seafood, Adriatic, chromatography, phycotoxins, exposure

**Thesis contains:** 175 pages  
16 figures  
43 tables  
11 supplements  
572 references

**Original in:** Croatian

**Defense committee:**

- |   |              |
|---|--------------|
| 1. <i>Ivana Flanjak</i> , PhD, associate prof.    | chair person |
| 2. <i>Krunoslav Aladić</i> , PhD, assistant prof. | member       |
| 3. <i>Tanja Bogdanović</i> , PhD                  | member       |
| 4. <i>Stela Jokić</i> , PhD, full prof.           | stand-in     |
| 5. <i>Drago Šubarić</i> , PhD, full prof.         | stand-in     |

**Defense date:** October 25, 2023.

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of the Faculty of Food Technology Osijek, University of Osijek; President's office, University Library in Zagreb and only in electronic version in University Library in Osijek

*Velika hvala cijenjenoj i dragoj mentorici prof. dr. sc. Jelki Pleadin na strpljenju, savjetima, podršci i vjeri u mene. Velika si pokretačka snaga i uzor koji su me vodili kroz ovo djelo.*

*Hvala dr. sc. Tini Lešić i dr. sc. Brigiti Hengl na pomoći pri obradi podataka. Hvala mom nećaku Dariu na pomoći oko tehničkih pitanja.*

*Zahvaljujem predstojnici Veterinarskog zavoda Rijeka dr. sc. Nataliji Džafić na pruženoj prilici da se pridružim znanstvenoj zajednici, kao i dragim kolegicama iz laboratorija R-3 na pomoći i ohrabrenju.*

*Hvala mojim sinovima Gabrielu i Gregoru, mojim anđelima, ovaj rad rastao je zajedno s vama i bio dio i vašeg života. Nadam se da ćete jednom spoznati njegovu vrijednost i oprostiti mi za propuštene igre.*

*Hvala mojoj dragoj majci i dragom bratu na svemu što ste činili za mene, nemjerljivo je kao i moja ljubav prema vama.*

*I hvala tebi dragi tata, znam da bi bio ponosan. Ovaj rad posvećujem tebi i mami, najboljim roditeljima.*

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>4</b>
<b>2.1. ZNAČAJ PLODOVA MORA U PREHRANI</b> .....	<b>5</b>
<b>2.2. FIKOTOKSINI</b> .....	<b>6</b>
2.2.1. Domoična kiselina .....	7
2.2.2. Akutna toksičnost domoične kiseline .....	9
2.2.3. Kronična toksičnost domoične kiseline.....	10
2.2.4. Akumulacija domoične kiseline u školjkašima .....	11
2.2.5. Toksini koji uzrokuju paralitičko trovanje (PST).....	12
2.2.6. Akutna toksičnost PST.....	15
2.2.7. Kronična toksičnost PST.....	17
2.2.8. Kumulacija PST u školjkašima .....	17
2.2.9. Lipofilni fikotoksini.....	18
2.2.10. Okadaična skupina .....	19
2.2.11. Pektenotoksini .....	22
2.2.12. Jesotoksini.....	24
2.2.13. Azaspiracidi .....	26
2.2.14. Ciklički imini .....	28
2.2.15. Spirolidi.....	29
2.2.16. Gimnodimini.....	30
2.2.17. Pinatoksini .....	31
2.2.18. Toksično djelovanje cikličkih imina.....	32
<b>2.3. METODE ODREĐIVANJA FIKOTOKSINA</b> .....	<b>34</b>
<b>2.4. PROCJENA IZLOŽENOSTI</b> .....	<b>35</b>
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>39</b>
<b>3.1. ZADATAK</b> .....	<b>40</b>
<b>3.2. MATERIJAL I METODE</b> .....	<b>41</b>
3.2.1. Uzorci .....	41
3.2.2. Geografsko područje i lokaliteti izlova plodova mora.....	44
3.2.3. Reagensi i analitički standardi .....	46
3.2.4. Laboratorijska oprema i analitički instrumenti.....	47
3.2.5. Priprema uzoraka za ekstrakciju .....	47
3.2.6. Metoda za određivanje domoične kiseline .....	48
3.2.7. Metoda za određivanje paralitičkih toksina.....	52
3.2.8. Metoda za određivanje lipofilnih toksina.....	56
3.2.9. Procjena izloženosti potrošača .....	60

3.2.10. Statistička obrada podataka.....	61
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>62</b>
<b>4.1. VALIDACIJA METODA ZA ODREĐIVANJE DA, PST I LT.....</b>	<b>63</b>
4.1.1. Specifičnost.....	63
4.1.2. Utjecaj matriksa.....	63
4.1.3. Linearnost kalibracijskog pravca.....	65
4.1.4. Granica detekcije i granica kvantifikacije.....	65
4.1.5. Ponovljivost i unutarlaboratorijska obnovljivost.....	68
4.1.6. Mjerna nesigurnost.....	72
<b>4.2. ANALIZA PRIKUPLJENIH UZORAKA.....</b>	<b>72</b>
<b>4.3. PROCJENA IZLOŽENOSTI POTROŠAČA.....</b>	<b>82</b>
<b>5. RASPRAVA.....</b>	<b>86</b>
5.1. VALIDACIJA METODA.....	87
5.2. PROFIL FIKOTOKSINA U ŠKOLJKAŠIMA I MJEŠČIĆNICAMA.....	92
5.3. POJAVNOST I KUMULACIJA FIKOTOKSINA.....	92
5.4. SUPOJAVNOST FIKOTOKSINA.....	102
5.5. RAZLIKA U PROFILU FIKOTOKSINA MEĐU VRSTAMA.....	103
5.6. SEZONSKA POJAVNOST FIKOTOKSINA.....	110
5.7. UTJECAJ LOKALITETA NA POJAVNOST FIKOTOKSINA.....	113
5.8. PROCJENA IZLOŽENOSTI POTROŠAČA.....	114
<b>6. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>119</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>122</b>
<b>8. PRILOZI.....</b>	<b>165</b>



## Popis oznaka, kratica i simbola

ACh	acetilkolin
ACN	acetonitril
AMPA	alfa-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol propionska kiselina
ANOVA	analiza varijance (engl. <i>Analysis of Variance</i> )
AOAC	udruženje službenih analitičkih kemičara (engl. <i>Association of Official Analytical Chemists</i> )
ARfD	akutna referentna doza (engl. <i>Acute Reference Dose</i> )
ASP	amnezijско trovanje školjkašima (engl. <i>Amnesic Shellfish Poisoning</i> )
AZA	azaspiracid
AZP	azaspiracidno trovanje školjkašima (engl. <i>Azaspracide Shellfish Poisoning</i> )
<i>b</i>	nagib kalibracijskog pravca
BTX	brevetoksin
C	koncentracija
C	N-sulfokarbamoil goniatoksin
CAC	Komisija Codex Alimentarius
CDC	Centar za kontrolu i prevenciju bolesti (engl. <i>Centers for Disease Control and Prevention</i> )
Cefas	Centar za znanost o okolišu, ribarstvu i akvakulturi (engl. <i>Centre for Environment, Fisheries &amp; Aquaculture Science</i> )
CI	ciklički imin
CONTAM	Panel za kontaminante u lancu ishrane (engl. <i>Panel on Contaminants in the FoodChain</i> )
CRM	certificirani referentni materijal
CTX	ciguatoksin
CV	koeficijent varijacije (engl. <i>Coefficient of Variation</i> )
DA	domoična kiselina (engl. <i>Domoic Acid</i> )
dcNEO	dekarbamoil neosaksitoksin
dcSTX	dekarbamoil saksitoksin
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>Deoxyribonucleic Acid</i> )
DNS-Cl	danzil klorid

DNS-DA	derivat danzil klorida i domoične kiseline
DSP	trovanje školjkašima koje uzrokuje proljev (engl. <i>Diarrheic Shellfish Poisoning</i> )
DTX	dinofizistoksin
DZS	Državni zavod za statistiku
EFSA	Europska agencija za sigurnost hrane (engl. <i>European Food Safety Authority</i> )
ekv.	ekvivalent
ELISA	enzimski imunisorbentni test (engl. <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> )
ESI	ionizacija elektroraspršenjem (engl. <i>Electrospray Ionization</i> )
EURLMB	Europski referentni laboratorij za morske biotoksine (engl. <i>European Union Reference Laboratory for Monitoring of Marine Biotoxins</i> )
FAO	Organizacija za hranu i poljoprivredu (engl. <i>Food and Agriculture Organization</i> )
FDMT	liofilizirano tkivo dagnji (engl. <i>Freeze-dried Mussel Tissue</i> )
FLD	fluorescencijski detektor (engl. <i>Fluorescence Detector</i> )
FSAI	Irska uprava za sigurnost hrane (engl. <i>Food Safety Authority of Ireland</i> )
GTX	goniautoksin
GYM	gimnodimin
HAB	štetno cvjetanje algi (engl. <i>Harmful Algal Bloom</i> )
HAPIH	Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu (ranije Hrvatska agencija za hranu - HAH)
hERG	kalijev naponsko ovisan kanal (engl. <i>the human Ether-à-go-go Related Gene</i> )
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. <i>High-Performance Liquid Chromatography</i> )
HRMS	spektrometrija masa visoke razlučivosti (engl. <i>High-resolution mass spectrometry</i> )
ICHA	Međunarodna konferencija o štetnim algama (engl. <i>International Conference on Harmful Algae</i> )
i.p.	intraperitonealna aplikacija
ISSHA	Međunarodno udruženje za proučavanje štetnih algi (engl. <i>International Society for the Study of Harmful Algae</i> )
KA	kainska kiselina (engl. <i>Kainic Acid</i> )
LC-MS/MS	tekućinska kromatografija sa tandemskom spektrometrijom masa (engl. <i>Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry</i> )

LFIA	imunotest lateralnog protoka (engl. <i>Lateral Flow Immunoassay</i> )
LOAEL	najniža doza kod koje je uočen štetni učinak (engl. <i>Lowest Observed Adverse Effect Level</i> )
LOD	granica detekcije (engl. <i>Limit of Detection</i> )
LOQ	granica kvantifikacije (engl. <i>Limit of Quantification</i> )
LT	lipofilni toksini
M	C-11 hidroksil metabolit paralitičkih toksina
<i>M</i>	molarna masa
<i>m/z</i>	omjer mase i naboja
mAChR	muskarinski acetilkolinski receptor
Max.	maksimum
ME	utjecaj matriksa (engl. <i>Matrix Effect</i> )
MeOH	metanol
Min.	minimum
MM	modifikator matriksa (engl. <i>Matrix Modifier</i> )
MP	Ministarstvo poljoprivrede
MRM	praćenje višestrukih reakcija (engl. <i>Multiple Reaction Monitoring</i> )
n	broj uzoraka
nAChR	nikotinski acetilkolinski receptor
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NDK	najveća dopuštena količina
NEO	neosaksitoksin
NMDA	N–metil–D–aspartat
NOAEL	najveća doza koja ne uzrokuje štetni učinak ( <i>No-Observed-Effect Level</i> )
n.p.	nije primjenjivo
OA	okadaična kiselina (engl. <i>Okadaic Acid</i> )
OPCW	Organizacija za zabranu kemijskog oružja (engl. <i>Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons</i> )
PICES	Sjevernopacifička organizacija za znanost mora (engl. <i>The North Pacific Marine Science Organization</i> )
PLTX	palitoksin
PnTX	pinatoksin

PP	protein fosfataza
PSP	paralitičko trovanje školjkašima (engl. <i>Paralytic Shellfish Poisoning</i> )
PST	paralitički toksini ( <i>Paralytic Shellfish Toxins</i> )
PTFE	politetrafluoretilen
PTX	pektenotoksin
PTX2SA	pektenotoksin-2-seko kiselina
PUFA	višestruko nezasićene masne kiseline (engl. <i>Polyunsaturated Fatty Acids</i> )
QqQ	trostruki kvadrupol analizator masa (engl. <i>Triple Quadrupole Mass Spectrometer</i> )
R	funkcionalna skupina
$R^2$	koeficijent determinacije (engl. <i>Coefficient of Determination</i> )
RC	Iskorištenje (engl. <i>Recovery</i> )
RH	Republika Hrvatska
RT	vrijeme zadržavanja analita (engl. <i>Retention Time</i> )
S/N	omjer signala i šuma (engl. <i>Signal/Noise</i> )
SD	standardna devijacija
SPE	ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. <i>Solid Phase Extraction</i> )
SPX	spiroolid
SSE	supresija/pojačanje signala (engl. <i>Signal suppression/enhancement</i> )
STX	saksitoksin
STXdiHCl	saksitoksin dihidroklorid
SŽŠ	središnji živčani sustav
TIC	kromatogram ukupnih iona (engl. <i>Total Ion Chromatogram</i> )
TDI	prihvatljiv dnevni unos (engl. <i>Tolerable Daily Intake</i> )
TEF	faktor ekvivalentne toksičnosti (engl. <i>Toxicity equivalency factor</i> )
t.m.	tjelesna masa
<i>U</i>	proširena mjerna nesigurnost
UDPGT	glukuronozil transferaza
UHPLC	tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (engl. <i>Ultra High-Performance Liquid Chromatography</i> )
UNESCO	Organizacija Ujedinjenih naroda za obrazovanje, znanost i kulturu (engl. <i>United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization</i> )

UV/VIS	ultraljubičasto/vidljivo (engl. <i>Ultraviolet/Visible</i> )
YTX	jesotoksin
ZOI	zapadna obala Istre

## **1. UVOD**

Plodovi mora čine važan dio uravnotežene prehrane zbog brojnih pozitivnih učinaka na zdravlje. Karakterizira ih veliki udio lako probavljivih bjelančevina, te niski udio kolesterola i masti. Značajan su izvor polinezasićenih masnih kiselina te mnogih drugih mikronutrijenata, poput vitamina i minerala (Dong, 2009.; Oehlenschläger, 2012.). Zbog velike nutritivne vrijednosti i svjesnosti potrošača o njihovoj dobrobiti za zdravlje, sve je veća potražnja za poznatim vrstama, poput školjkaša, ali i manje poznatim jestivim vrstama, kao što su mješćićnice (razred plaštenjaka). Mješćićnice odlikuje veliki udio bjelančevina i mala kalorijska vrijednost, naročito *Microcosmus* vrste, a bogati su vitaminima, mineralima i jodom (Meenakshi, 2012.; Lambert i sur., 2016.). Zbog specifičnog načina hranidbe (filtracije velikih količina vode), ukoliko školjkaši i mješćićnice rastu u moru u kojem su prisutne vrste fitoplanktona koji produciraju toksine (morske biotoksine ili fikotoksine), ove vrste u svom tkivu nakupljaju fikotoksine, te mogu postati njihovi vektori i izazvati intoksikacije u ljudi ili životinja koji se njima hrane (Costa i sur., 2017.).

Fikotoksine najčešće proizvode dinoflagelati roda *Alexandrium*, *Gymnodinium* i *Dinophysis*, te dijatomeje roda *Pseudo-nitzschia*. Ukoliko uslijed okolišnih i klimatskih uvjeta dođe do njihove proliferacije i nakupljanja, mogu imati štetan učinak na okoliš i zdravlje ljudi. Vrsta i intenzitet simptoma akutne intoksikacije fikotoksinima ovisi o vrsti i količini unešenog toksina te osjetljivosti organizma (Visciano i sur., 2016.). Simptomi su često slični onima koje uzrokuju mikrobiološki kontaminanti i ne prepoznaju se kao intoksikacije fikotoksinima, što uz neobvezno prijavljivanje epidemiološkim službama doprinosi podcjenjivanju broja intoksikacija (O'Mahony, 2018.).

Fikotoksini su termostabilne molekule koje se prema sindromima koje uzrokuju dijele u nekoliko skupina. Domoična kiselina i njeni analozi hidrofilni su neurotoksini, uzrokuju sindrom čiji glavni simptom je gubitak kratkoročnog pamćenja, po čemu je ovo trovanje i dobilo naziv – engl. *Amnesic shellfish poisoning* (ASP) (Farabegoli i sur., 2018.). Trovanje školjkašima koje uzrokuje paralizu (PSP) uzrokuje skupina hidrofilnih neurotoksina, koju čine saksitoksin (STX) i njegovi analozi. STX je jedan od najpotentnijih poznatih neproteinskih toksina (Thottumkara i sur., 2014.). Simptomi trovanja mogu biti blagi, ali u težim slučajevima mogu uzrokovati smrt (Wiese i sur., 2010.). Skupinu koja uzrokuje probavne smetnje - engl. *Diarrhetic shellfish poisoning* (DSP), čine lipofilni spojevi - okadaična kiselina i njeni derivati dinofizistoksini, te njihovi esterificirani oblici. Još su se dvije skupine poliesterskih spojeva ranije svrstavale u DSP skupinu: pektenotoksini (PTX) i jesotoksini (YTX) zbog česte supojavnosti, zajedničke ekstrakcije u lipofilnoj frakciji uzoraka i istovremenom određivanju biološkim pokusom, međutim, danas je poznato da imaju različite biološke učinke (Reguera i Pizzaro, 2008.), te nisu zabilježeni podaci o akutnom toksičnom djelovanju na ljude (Farabegoli i sur., 2018.). Azaspiracidno trovanje školjkašima (AZP) po simptomima nalikuje

na DSP, a uzrokuju ga azaspiracidi (AZA) koje sačinjava oko 30 analoga. Mehanizam djelovanja je još uvijek nepoznat, međutim, dokazana je kardiotoksičnost i citotoksičnost (Farabegoli i sur., 2018.). Ciklički imini (CI) su skupina biotoksina za koju je karakteristično da sadrže imino skupinu. Otkriveni su među posljednjima te još nema podataka o njihovim negativnim učincima na zdravlje ljudi i za njih još uvijek nije utvrđena najveća dopuštena količina (NDK). Međutim, poznato je da predstavljaju brzo djelujuće neurotoksine koji izazivaju smrt pokusnih životinja vrlo brzo nakon intraperitonealne (i.p.) aplikacije lipofilnog ekstrakta (EFSA, 2010.). Uslijed globalnih klimatskih promjena i antropogenog utjecaja, učestalost i rasprostranjenost štetnog cvjetanja algi se mijenja (Van Dolah, 2000.; Farabegoli i sur., 2018.), što za posljedicu ima veću pojavnost i veći broj vrsta fiktoksina u morskim organizmima, čak i u područjima u kojima do sada nisu bili prisutni (Bates i sur., 2018.; Braga i sur., 2023.). Profil fiktoksina ovisi o vrsti prisutnog fitoplanktona, vrsti školjkaša i specifičnostima lokaliteta, a podložan je promjenama uslijed različite raspoloživosti hranjivih tvari tijekom godišnjih doba, klimatskih i antropogenih utjecaja (Bacchiocchi i sur., 2015.; Bazzoni i sur., 2016.).

Akumulacija fiktoksina u plodovima mora predstavlja rizik za potrošače, te je stoga ispitivanje njihove pojavnosti i kumulacije u ovim organizmima, kao i ispitivanje izloženosti potrošača, neophodno za karakterizaciju rizika koji predstavljaju. U tu svrhu potrebno je primjenjivati pouzdane, precizne i suvremene analitičke metode sa što nižim granicama detekcije (LOD) i kvantifikacije (LOQ), te uključiti u istraživanje što veći broj analoga. Također su važna istraživanja supojavnosti fiktoksina zbog njihovog mogućeg sinergističkog ili aditivnog učinka u organizmu, ispitivanje utjecaja lokaliteta i godišnjih doba na pojavnost, te utvrđivanje razlika u pojavnosti među različitim vrstama.

S obzirom na malobrojna istraživanja pojavnosti hidrofilnih i lipofilnih fiktoksina (LT) u školjkašima i mješćnicama podrijetlom iz hrvatskog dijela sjevernog Jadrana, kao jednog od značajnih uzgojnih područja u RH, ujedno tijekom dužeg vremenskog razdoblja koje obuhvaća sva godišnja doba, kao i na činjenicu da do sada nema objavljenih podataka o procjeni izloženosti potrošača fiktoksinima u RH, ovo istraživanje predstavlja značajan znanstveni doprinos na području sigurnosti hrane i zaštite potrošača. Rijetka su istraživanja profila fiktoksina školjkaša s ovog područja uključivala posljednje otkrivene CI te će stoga ovo istraživanje dati uvid u njihovu geografsku rasprostranjenost, kao i mogućnosti kumulacije u različitim vrstama. Također, malobrojna su istraživanja u kojima se uspoređuje profil fiktoksina među različitim vrstama koje potječu s istog područja u prirodnom okruženju, za razliku od laboratorijskih istraživanja koja ne mogu oponašati složene prirodne uvjete, utječući pritom značajno na pojavnost i kumulaciju fiktoksina u školjkašima.



## **2. TEORIJSKI DIO**

### 2.1. ZNAČAJ PLODOVA MORA U PREHRANI

Riba i plodovi mora poput rakova, glavonožaca, školjkaša, bodljikaša, plaštenjaka i drugih jestivih morskih organizama, osim što su ukusna delicija, čine važan dio uravnotežene prehrane zbog brojnih pozitivnih učinaka na zdravlje. Karakterizira ih veliki udio bjelančevina sa esencijalnim aminokiselinama koje su lako probavljive zbog malo vezivnog tkiva i mali udio masti sa povoljnim sastavom masnih kiselina. Značajan su izvor višestruko nezasićenih masnih kiselina (PUFA), naročito vrste koje imaju veći udio masti. Siromašni su kolesterolom i sadrže biljne sterole i stanole koji smanjuju njegovu apsorpciju (Dong, 2009.; FAO, 2016.; Phillips i sur., 2012.; Rittenschober i sur., 2013.) te mnoge mikronutrijente poput vitamina A, D, E, B12, taurina, selena, joda, kalija, cinka, bakra i željeza (Dong, 2009.; Oehlenschläger, 2012.). Osim što su izvor visokovrijednih nutrijenata i bioaktivnih molekula, konzumiranjem plodova mora umanjuje se unos manje zdravih namirnica, te zbog toga imaju dvojako povoljno djelovanje na zdravlje (Larsen i sur., 2011.). Mnoge vrste sadrže na tisuće različitih bioaktivnih komponenti i sekundarnih metabolita koje iskazuju antibiotsko, antiviralno, antiparazitsko, protuupalno, antifibrotično i antikancerogeno djelovanje, te se koriste u proizvodnji funkcionalne hrane i dodataka prehrani. Jedan su od značajnijih izvora hrane koja može doprinijeti liječenju različitih bolesti (Grienke, 2014.; Suleria, 2015.). Zbog velike nutritivne vrijednosti plodova mora i svjesnosti potrošača o njihovoj dobrobiti za zdravlje, sve je veća potražnja za dobro poznatim vrstama poput školjkaša, ali i manje poznatim jestivim vrstama kao što su mješćićnice (razred plaštenjaka). Mješćićnice su pridneni beskralježnjaci široko rasprostranjeni u Mediteranu, a koriste se kao hrana još od antičkog doba (Vafidis i sur., 2008.). Odlikuje ih veliki udio bjelančevina i mala kalorijska vrijednost, naročito *Microcosmus* vrste, bogati su vitaminima, mineralima i jodom (Lambert i sur., 2016.; Meenakshi 2012.). Poput školjkaša, konzumiraju se sirovi ili minimalno procesuirani, bez aditiva, što također doprinosi velikoj nutritivnoj vrijednosti ovih vrsta.

Osim navedenih hranjivih vrijednosti, važan je i ekonomski aspekt uzgoja i izlova morskih plodova u priobalnim područjima, kao lako dostupnog i jeftinog izvora hrane, te upotpunjavanja turističke ponude proizvodima marikulture tradicionalnim za to područje. Zbog povoljnih geomorfoloških i meteoroloških uvjeta na Jadranu (Šarušić, 2000.), marikultura je jedna od važnijih gospodarskih grana u Hrvatskoj, a dagnje (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819) i kamenice (*Ostrea edulis* Linnaeus, 1758) najviše uzgajane vrste školjkaša (Matić-Skoko i sur. 2017.). S obzirom na veliki broj uzgajališta u Republici Hrvatskoj, školjkaši su namirnica dostupna potrošačima. Ukoliko se uzgajaju u čistom moru, te izlovljavaju i stavljaju na tržište u skladu sa dobrom proizvođačkom praksom, poželjni su kao dio uravnotežene prehrane.

### 2.2. FIKOTOKSINI

Dvoljušturni školjkaši i mješčičnice zbog specifičnog načina hranidbe mogu biti uzročnici bolesti koje se prenose hranom. Filtrirajući velike količine vode, u njihovom mesu mogu se nakupljati anorganske tvari, biokontaminanti poput bakterija, virusa, parazita, te morski biotoksini (fikotoksini) ukoliko rastu u moru u kojem su prisutne toksične vrste mikroalgi (Oliveira i sur., 2011.; Costa i sur., 2017.; O'Mahony, 2018.). Na taj način postaju njihov vektor u prehrambenom lancu i mogu izazvati intoksikacije u ljudi i životinja koji se njima hrane (Costa i sur., 2017.). Postoje dokazi da kronično izlaganje školjkaša subletalnim koncentracijama toksičnih vrsta fitoplanktona može imati negativni utjecaj na njihovo razmnožavanje, rast i brzinu procesa eliminacije fikotoksina, no u ovim organizmima fikotoksini ne izazivaju vidljive promjene na temelju kojih bi potrošači mogli posumnjati u njihovu zdravstvenu ispravnost (Brown i sur., 2020.).

Većina algi prisutnih u morskoj i slatkoj vodi neophodne su u održavanju života u vodenim ekosistemima jer čine temelj prehrambenog lanca, proizvode kisik i sudjeluju u regulaciji atmosferskog ugljičnog dioksida (Glibert i sur., 2018.). Od ukupnog broja poznatih vrsta mikroalgi potencijalno je toksično oko njih 140 (Zingone i sur., 2021.). Fikotoksini su sekundarni metaboliti mikroalgi koji imaju ulogu obrambenog mehanizma od suparničkih vrsta i predatorskih organizama (Pradhan i sur., 2022.). Ukoliko zbog okolišnih i klimatskih uvjeta dođe do proliferacije toksičnih mikroalgi i njihovog nakupljanja (tzv. štetno cvjetanje algi – HAB, engl. *Harmful algal blooms*), fikotoksini mogu imati štetan učinak na okoliš i zdravlje ljudi, te izazvati ekonomsku štetu u sektoru ribarstva, akvakulture i obalnog turizma (Van Dolah, 2000.; Nicolas i sur., 2017.; Díaz i sur., 2019.; Anderson i sur., 2021.), a pojedine vrste iskazuju snažno toksično djelovanje čak i kada su prisutne u manjim koncentracijama (Glibert i sur., 2018.). Štetno cvjetanje algi prirodna je pojava zabilježena i u povijesnim zapisima. Jedan od prvih koji govori o trovanju ljudi fikotoksinima uslijed konzumacije školjkaša datira iz 1793. god., a nagađa se da je pojava „krvave“ rijeke u Egiptu opisana u Bibliji bila posljedica štetnog cvjetanja algi (Hallegraeff, 1993.). Štetno cvjetanje algi je nepredvidiva globalna pojava na koju utječu prirodni čimbenici, poput klimatskih i hidrografskih uvjeta (promjene meteoroloških uvjeta, temperature, prozirnosti, turbulencije i saliniteta vode, te koncentracije nutrijenata), ali i antropogeni čimbenici, poput prijenosa mikroalgi s jednog područja na drugo putem balastnih voda plovila (Smayda, 2007.), povećanja populacije, industrijalizacije i poljoprivrede u priobalnom području (Ferreira i sur., 2011.).

S obzirom na štetno djelovanje, mikroalge se mogu podijeliti u tri skupine. Netoksične vrste koje promjenom boje, pojavom pjene i smanjivanjem udjela otopljenog kisika u vodi uzrokuju

povećanje mortaliteta riba i negativno utječu na rekreacijsku vrijednost u priobalnim područjima, vrste koje uzrokuju fizička oštećenja i toksičnost u riba, ali ne i ljudi, te vrste koje proizvode toksine koji u ljudi i životinja mogu uzrokovati različite sindrome uslijed konzumacije plodova mora koji ih sadrže (Díaz i sur., 2019.), a neki od njih su među najsnažnijim poznatim toksinima (Glibert i sur., 2018.). Pored akutne toksičnosti, pojedini fiktoksini već u malim koncentracijama pokazuju mutageno i toksično djelovanje u organizmu, dok su neki i tumor promotori (Manerio i sur., 2008.; Kumar i sur., 2009.; Saeed i sur., 2017.; Farabegoli i sur., 2018.).

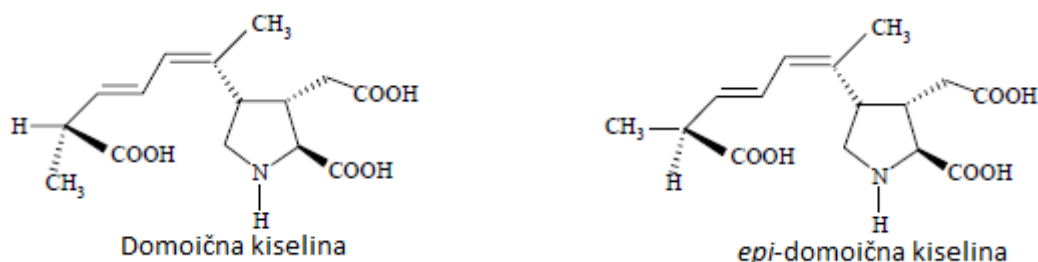
Fiktoksine najčešće proizvode dinoflagelati roda *Alexandrium*, *Gymnodinium*, *Dinophysis*, *Protoperdinium*, *Protoceratium*, *Karenia*, *Gambierdiscus*, *Ostreopsis* te dijatomeje roda *Pseudo-nitzschia* (Ciminiello i sur., 2009.). Fiktoksini su termostabilne, uglavnom neproteinske molekule, malih do vrlo velikih molekulskih masa, raspona od otprilike 300 do 3500 Da. Čine ih različite kemijske komponente, poput alkaloida, cikličkih peptida, polietera, imina, te heterocikličkih aminokiselina (Sharma i sur., 2014.). Prema topljivosti dijele se na one topljive u vodi i na one topljive u mastima. Prema kemijskoj strukturi dijele se u više skupina: azaspiracidi (AZA), okadaična kiselina (OA) i dinofizistoksini (DTX), pektenotoksini (PTX), jesotoksini (YTX), ciklički imini (CI), domoična kiselina (DA), paralitički toksini (PST) i brevetoksini (BTX) (Ciminiello i sur., 2009.; Farabegoli i sur., 2018.). Za razliku od prethodno navedenih, ciguatoksini (CTX) i palitoksini (PITX) su skupina fiktoksina čiji vektor nisu organizmi koji se hrane filtracijom, već najčešće ribe i rakovi (Ciminiello i sur., 2009.; Tubaro i sur., 2011.; Farabegoli i sur., 2018.), te stoga nisu uključeni u ovo istraživanje, kao ni BTXs, čija je pojavnost ograničena uglavnom na područje Floride, Meksičkog zaljeva i Novog Zelanda (Amzil i sur., 2021.).

### 2.2.1. Domoična kiselina

Domoična kiselina izolirana je prvi put 1958. god. iz crvene alge *Chondria armata* (Takemoto i Daigo, 1958.), koja se u Japanu tradicionalno koristila za liječenje lišajeva i kao insekticid (Higa i Kuniyoshi, 2000.; La Barre i sur., 2014.). Prouzročila je amnezijsko trovanje školjkašima (ASP) nakon konzumacije dagnji 1987. god. u kanadskoj pokrajini Prince Edward Island, od kojeg je umrlo četvero, a oboljelo više od stotinu ljudi (Tasker, 2021.).

Domoična kiselina je hidrofilna aminokiselina (Tasker, 2021.). Njenu strukturu čine 2,3,4 trisupstituirani pirolidinski prsten sa imino skupinom, tri karboksilne skupine zahvaljujući kojima molekula ima veliki ionizacijski potencijal i topivost, te elektronski bogata konjugirana dvostruka veza koja je ključna za njenu biološku aktivnost. Do sada je otkriveno i opisano osam izomera (izodomoična kiselina A – H), C5`epimer (*epi*-domoična kiselina) (**Slika 1**) i dva laktone (La Barre i sur., 2014.). Domoična kiselina je umjereno termostabilna molekula

te se ne uništava kuhanjem, već prelazi u C5`epimer koji je jednako toksičan, dok izlaganjem UV zračenju dolazi do fotodegradacije u manje toksične izomere i dekarboksilirane derivate (Quilliam, 2003.a; Bouillon i sur., 2008.).



**Slika 1** Struktura molekule DA i njenog epimera (FAO, 2004.)

Domoičnu kiselinu i većinu njenih izomera proizvode crvene alge (*Rhodophyta*). Izolirani su iz algi vrsta *Chondria armata* (Maeda i sur., 1986.; Zaman i sur., 1997.), *Chondria baileyana* (Laycock i sur., 1989.), *Alsidium corallinum* (Impellizzeri i sur., 1975.), *Amansia glomerata*, *Digenea simplex* i *Vidalia obtusiloba* (Sato i sur., 1996.). Značajan izvor također čine dijatomeje - alge kremenjašice. To su jednostanične, eukariotske alge za koje je svojstveno da im je ljušturica koja se sastoji iz dva dijela (valve) izgrađena od silicijevog dioksida. Sadrže pigmente i većina vrsta je fotosintetska, te osim što su važan dio hranidbenog lanca, značajnu ulogu imaju u kruženju ugljika u prirodi. Razmnožavaju se vegetativno i spolno, a u nepovoljnim uvjetima stvaraju ciste koje padaju na dno i mogu se ponovno aktivirati u povoljnim uvjetima (Jones, 2013.). Nalazimo ih u svim vodama (Cameron, 2013.), u oceanima i morima prisutne su od polarnih do tropskih područja, no najbrojnije su u hladnim do umjerenim morima (Jones, 2013.). Većina vrsta je planktonska (Tan i sur., 2016.), nalaze se u bentosu, mulju, te pričvršćene za različite supstrate u priobalju (Jones, 2013.). DA proizvode dijatomeje roda *Pseudo-nitzschia* od kojih je najmanje 26 vrsta toksično (Bates i sur., 2018.), ali i *Nitzschia* vrste (Kotaki i sur., 2000.; Tan i sur., 2016.). Prethodno spomenuto, prvo zabilježeno trovanje DA prouzročila je toksična vrsta *Pseudo-nitzschia multiseries* (Bates i sur., 1989.). Na pojavnost DA utječu različiti biotički i okolišni čimbenici, od kojih su značajniji stadij razvojnog ciklusa dijatomeja (Fehling i sur., 2004.; Trainer i sur., 2009.), temperatura i salinitet vode (Bates, 1998.; Zhu i sur., 2017.), izloženost sunčevom zračenju (Bates 1998., Pan i sur., 1998.; Thorel i sur., 2014.), prisustvo određenih bakterija (Kodama i sur. 2006.; Kobayashi i sur., 2009.) te sadržaj nutrijenata (Anderson i sur., 2008.; Lelong i sur., 2012.).

### 2.2.2. Akutna toksičnost domoične kiseline

Domoična kiselina pripada skupini kainoida - neurološki aktivnih neproteinogenih aminokiselina čiji predstavnik je neurotoksin kainska kiselina (KA). Obje su analozi glutaminske kiseline, važnog ekscitatornog neurotransmitera u središnjem živčanom sustavu sisavaca. Zbog strukturne sličnosti vežu se na slične vrste receptora u mozgu - glutamatne receptore (Tasker, 2016.). Izomeri DA pokazuju značajno manju toksičnost od same DA i njenog epimera, no Sawant i sur. (2008.) su u istraživanju potencijala izomera na glodavcima ustanovili da DA Iso-A ima približno jednak potencijal kada se ubrizga direktno u hipokampus.

Pretpostavka je da je neurotoksični učinak DA posljedica djelovanja na ionotropne AMPA (alfa-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol propionska kiselina) i kainatne receptore, te u većim dozama indirektno na NMDA (N-metil-D-aspartat) receptore (Costa i sur., 2014.). Posljedica djelovanja DA na navedene glutamatne receptore je oslobađanje endogenog glutamata, koji uzrokuje povećanje koncentracije intracelularnog  $Ca^{2+}$  u neuronima, što dovodi do njihovog oštećenja i neurotoksičnosti (Pulido, 2008.). Degeneracija neurona izazvana djelovanjem DA ovisi o dozi (Giordano i sur., 2007.), a osim na neurone, DA utječe i na funkciju drugih vrsta stanica u SŽS (Ross i sur., 2000.).

Budući se u mozgu i hipokampusu nalazi velik broj glutamatnih receptora, neurotoksično djelovanje DA očituje se izazivanjem neuroloških napada i kognitivnom disfunkcijom (Pulido, 2008.). Izaziva oštećenja određenih regija hipokampusa i talamusa koje se dovode u vezu s pamćenjem, što za posljedicu ima gubitak kratkoročnog pamćenja, karakterističan simptom po kojem je trovanje DA dobilo ime *Amnesic shellfish poisoning (ASP)*. Osim za SŽS, DA je toksična i za periferni živčani sustav, a uz neurološke javljaju se i simptomi od strane probavnog sustava. Uz gubitak pamćenja, trovanje DA izaziva simptome poput glavobolje, konvulzija, dezorijentiranosti, zbunjenosti, promjena u ponašanju, mučnine, povraćanja, grčeva u probavnom sustavu, proljeva, gastrointestinalnog krvarenja, aritmije, nestabilnosti krvnog tlaka i oštećenja oka (Todd, 1993.). U težim slučajevima trovanja javljaju se konvulzije i koma, a moguć je i smrtni ishod (Perl i sur., 1990.).

Temeljem podataka prikupljenih nakon trovanja više od stotinu ljudi DA 1987. god. u Kanadi, utvrđeno je da vrsta i težina simptoma ovise o količini unešenog fiktoksina te o osjetljivosti organizma. Većina oboljelih bili su stariji muškarci s postojećim komorbiditetima. Osobe koje su konzumacijom školjkaša unijele veću količinu DA imale su teže simptome. Proljev u mlađih osoba i gubitak pamćenja kod starijih osoba su simptomi povezani s dobi oboljelih. Od najtežih bolesnika većina ih je bila starija od 65 godina s kroničnim bolestima poput hipertenzije, šećerne bolesti i kronične bubrežne bolesti. Pretpostavlja se da osim doze, dobi

i osjetljivosti organizma na apsorpciju, izlučivanje i prolazak kroz krvno-moždanu barijeru do receptora, na toksični učinak utječe i vrsta hrane konzumirane zajedno sa kontaminiranim školjkašima (Todd, 1993.). Utvrđeno je da je integritet krvno-moždane barijere i funkcionalnost bubrega smanjena u vrlo mladih i vrlo starih životinjskih organizama, što može objasniti veći broj slučajeva u starijih ljudi, ujedno s težim simptomima (Kerr i sur., 2002.).

Istraživanja toksičnosti DA na nečovjekolikim primatima i glodavcima pokazala su slične patohistološke učinke i učinke na ponašanje neovisno o putu ulaska u organizam. U ljudi se unos DA odvija isključivo oralnim putem (Costa i sur., 2014.). Apсорpcija iz probavnog trakta je slaba, a bioraspoloživost iznosi tek oko 10%. Ne postoje podaci o biotransformaciji DA u bilo kojoj vrsti (Doucette i Tasker, 2008.). S obzirom na hidrofilnost molekule i ionizacijsko stanje (tri negativna i jedan pozitivan naboj) pri fiziološkom pH od 7,4 (Walter i sur., 1992.), vezanje na proteine plazme je zanemarivo (Jing i sur., 2018.), kao i transcelularna permeabilnost (Kimura i sur., 2011.), te se DA najčešće iz tijela izlučuje nepromijenjena. Apсорbirana DA vrlo brzo se uklanja iz seruma bubrežnim klirensom, prvenstveno glomerularnom filtracijom (Costa i sur., 2014.), što objašnjava zašto su osobe sa smanjenom bubrežnom funkcijom osjetljivije na njeno toksično djelovanje. Krvno-moždana barijera slabo je propusna za DA, ali u pojedinim strukturama SŽS kao što je area postrema u produljenoj moždini, ta barijera nedostaje, te je ulazak puno lakši. Budući se area postrema povezuje s kontrolom refleksa povraćanja, povraćanje kao jedan od češćih simptoma trovanja DA može se objasniti oštećenjem ovog dijela SŽS. Domoična kiselina može izazvati oštećenje fetusa budući prolazi placentarnu barijeru. Istraživanjem na štakorima pronađena je u mozgu fetusa i amnionskoj tekućini (Maucher-Fuquay i sur., 2012.). Posebno zabrinjavajuće je da je eliminacija iz fetalne plazme dvostruko sporija nego iz majčine, te da dolazi do recirkulacije između fetusa i amnionske tekućine (Maucher-Fuquay i sur., 2012.b; Shum i sur., 2020.). Također, DA se izlučuje majčinim mlijekom.

### 2.2.3. Kronična toksičnost domoične kiseline

Domoična kiselina osim u ljudi, izaziva trovanje i u drugih životinjskih vrsta poput morskih ptica i morskih lavova, ukoliko se hrane sitnom ribom ili drugim morskim organizmima koji sadrže DA. Osjetljivost na toksično djelovanje DA različito je među vrstama. Ljudi su osjetljiviji od glodavaca na toksični učinak DA unešene oralnim putem, dok se procjenjuje približno jednaka osjetljivost u odnosu na morske lavove. Stoga oni predstavljaju prikladnu vrstu za ispitivanje toksičnog učinka ovog fiktoksina u ljudi. Zbog slabe apсорpcije i brze eliminacije DA se ne kumulira u organizmu, no ipak postoji zabrinutost zbog kumulativne toksičnosti uslijed dužeg izlaganja niskim koncentracijama (Costa i sur., 2014.). Upravo su

istraživanja na morskim lavovima, uginulih od posljedica dugotrajnog izlaganja DA, vrlo važna za procjenu rizika i mogućeg kroničnog toksičnog učinka u ljudi. Istraživanje kliničkog učinka subletalne kronične izloženosti morskih lavova DA u prirodnom okruženju rezultiralo je pojavom simptoma poput neuroloških napada, letargije, gubitka apetita, trzanja mišića, blefarospazma te promjenama u ponašanju (Goldstein i sur., 2008.). Od histoloških promjena uočavaju se lezije u hipokampusu i parahipokampalnom girusu te atrofija. Navedene promjene češće se primjećuju u mlađih jedinki, što govori u prilog tome da je nezreli SŽS osjetljiviji na toksični učinak DA. Grattan i sur. (2018.) u istraživanju ponašanja nativnih Amerikanaca koji tradicionalno učestalo konzumiraju britvaste školjke, ustanovili su povezanost problema u svakodnevnoj memoriji i čestog konzumiranja školjkaša koji su sadržavali nisku koncentraciju DA, dok Levin i sur. (2010.) u istraživanju provedenom na morskim lavovima i morskim vidrama ukazuju na moguće imunomodulatorsko djelovanje DA, zbog čega organizam postaje osjetljiviji na oportunističke infekcije nakon izlaganja subletalnim dozama.

### 2.2.4. Akumulacija domoične kiseline u školjkašima

Dvoljušturni školjkaši i mješčičnice kumuliraju DA u svom tkivu direktno, filtracijom morske vode u kojoj se nalazi fitoplankton koji ju proizvodi (FAO, 2004.). Bioakumulacija u ovim organizmima je primarni vektor intoksikacije ljudi s DA (Tasker, 2016.). Najčešći proučavani vektori su školjkaši poput dagnji, britvastih školjaka, češljača, kamenica (Amzil i sur., 2001.; Vale i Sampayo, 2001.; James i sur., 2005.; Farabegoli i sur., 2018.), no DA je detektirana i u drugim morskim organizmima poput rakova, sitne plave ribe (EFSA, 2009.a), hobotnica, sipa (Lopes i sur., 2013.), planktonskih rakova, planktivorne ribe (Saeed i sur., 2017.) i mješčičnica (López-Rivera i sur., 2009.; Kvrđić i sur., 2022.). Najvećim dijelom kumulira se u probavnoj žlijezdi školjkaša, u kojima ne izaziva akutne toksične učinke kao u sisavaca, za što još uvijek ne postoji znanstveno objašnjenje. Pretpostavlja se da bi razlog mogla biti razlika u strukturi kationnih receptora na koje se DA veže, u odnosu na one u sisavaca ili to što se u školjkašima DA ne apsorbira iz probanog trakta (Doucette i Tasker, 2008.). Razlog bi mogao biti i nepostojanje transportnih proteina za DA budući da je ona zbog tri karboksilne skupine *cviter* ion, te ne može slobodno proći kroz staničnu membranu (Mauriz i Blanco, 2010.). Iako se čini da DA nije toksična za školjkaše, ipak iskazuje određene štetne učinke u dagnjama, češljačama i kamenicama, poput oštećenja DNA (Dizer i sur., 2001.), disfunkcije mitohondrija, oksidativnog stresa (Ventoso i sur., 2019.), promjena u hemolimfi, acidoze, hipoksije, zatvaranja ljuštore (Jones i sur., 1995.a), promjena hemocita (Jones i sur., 1995.b), negativnog učinka na razvoj larvi (Liu i sur., 2007.) i odraslih jedinki, te na njihovo preživljavanje (Liu i sur., 2008.).



Među vrstama školjkaša koji kumuliraju DA postoje razlike u pojavnosti i koncentraciji ovog fiktoksina u njihovom tkivu, čak i kada rastu na istom području i izložene su istim okolišnim uvjetima (Takata i sur., 2009.; Picot i sur., 2012.; Bouchouicha-Smida i sur., 2015.; Ujević i sur., 2019.), što se može objasniti različitom apsorpcijom i brzinom depuracije DA (Blanco i sur., 2021.). Pojedine vrste školjkaša, poput dagnji (Novaczek i sur., 1992.; Blanco i sur., 2002.), koritnica (Álvarez i sur., 2015.) i češljača (Álvarez i sur., 2020.) eliminiraju DA brzo iz svog tkiva, dok se u drugim vrstama dugo zadržava i sporo eliminira iz tkiva, kao npr. u velikim kapicama (Blanco i sur., 2002.) i britvastim školjkama (Trainer i Bill, 2004.).

Rasprostranjenost toksičnih *Pseudo-nitzschia* vrsta u morima je globalna. Nakon prve izolacije iz crvenih algi u Japanu 1958. (Takemoto i Daigo, 1958.) i prvog zabilježenog trovanja ljudi s DA u Kanadi 1987. god. (Tasker, 2021.) te uvođenja monitoringa, DA je detektirana u školjkašima izlovljenim u mnogim svjetskim morima. Pronađena je u Sjedinjenim Američkim Državama (Walz i sur., 1994.), Novom Zelandu (Rhodes i sur., 1998.), Australiji (Malhi i sur., 2014.), Maleziji (Suriyanti i Usup, 2015.), Africi (Blanco i sur., 2010.; Kelchner i sur., 2021.), Irskoj (James i sur., 2005.), Škotskoj (Hess i sur., 2001.), Portugalu i Francuskoj (Vale i sur., 2001.), Španjolskoj (Blanco i sur., 2021.b), na Mediteranu (Amzil i sur., 2001.; Ciminiello i sur., 2005.; Kaniou-Grigoriadou i sur., 2005.; Rijal Leblad, 2013.; Dursun, 2021.). U Jadranskom moru pojavila se 2000. god. na talijanskoj obali sjevernog Jadrana (Ciminiello i sur., 2005.). U hrvatskom dijelu prvi put je detektirana 2005. god., također u sjevernom Jadranu (Ljubešić i sur., 2011.), zatim 2006. god. u srednjem Jadranu, te 2007. i 2008. god. ponovno u sjevernom dijelu (Ujević i sur., 2010.). Od tada se u Jadranskom moru pojavljivala sporadično, u koncentracijama značajno manjim od najveće dopuštene količine (Pistocchi i sur., 2012.; Ujević i sur., 2019.; Kvirgić i sur., 2022.).

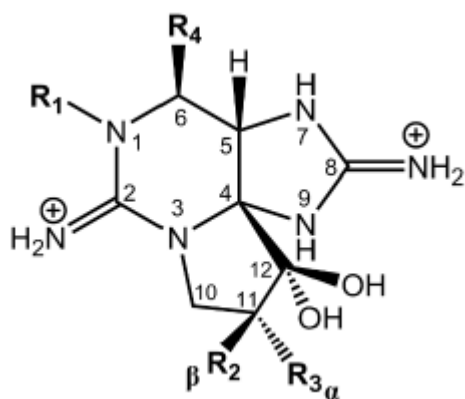
### 2.2.5. Toksini koji uzrokuju paralitičko trovanje (PST)

PST su skupina globalno rasprostranjenih hidrofilnih, potentnih neurotoksina koji uslijed konzumacije plodova mora koji ih sadrže uzrokuju paralitičko trovanje - PSP (engl. *Paralytic shellfish poisoning*) riba, ptica, sisavaca i ljudi, koje je često i smrtonosno (Halstead i Schantz, 1984.). Prvi identificirani PST otkriven je u školjkašu *Saxidomus giganteus* 1957. god. (Schantz i sur., 1957.) prema kojoj je dobio ime saksitoksin (STX), a cijela skupina PST u pošlosti je nazivana skupinom saksitoksina. STX je jedan od najpotentnijih poznatih neproteinskih toksina (Thottumkara i sur., 2014.), koji je kao potencijalni bojni otrov naveden u listi Organizacije za zabranu kemijskog oružja (OPCW) (Wang, 2008.). Već je doza od otprilike 1 mg unesena oralno smrtonosna za ljude (Wiese i sur., 2010.). Tijekom stoljeća, u medicinskoj literaturi postoje pisani tragovi o njegovom toksičnom učinku. Prvo trovanje PST zabilježeno je 1798. god. nakon konzumacije školjkaša na području kanadske obale

Britanske kolumbije, a iz tog doba postoje i zapisi o sezonskoj toksičnosti školjkaša u priobalnom području Aljaske (Thottumkara i sur., 2014.). U posljednjih nekoliko desetljeća PST proširili se na mnoga nova područja, a veliki problem predstavlja činjenica da se trovanja ovim fiktoksinom pojavljuju sporadično i nepredvidivo (Van Dolah, 2000.; Anderson i sur., 2002; Vale, 2022.).

Posebnost ove skupine toksina je pojavnost u slanim, ali i slatkim vodama. U slatkim vodama proizvodi ih nekoliko rodova cijanobakterija (Wiese i sur., 2010.), dok ih u morima proizvode dinoflagelati (Cusick i Saylor, 2013.). Dinoflagelati su jednostanični protisti koji imaju značajnu ekološku ulogu u slatkovodnim i morskim staništima. Poznato je oko 2000 vrsta od kojih se većina nalazi u morima (Orr i sur., 2013.). PST proizvodi otprilike desetak toksičnih *Alexandrium* vrsta, najčešće *A. tamarense*, *A. fundyense* i *A. catanella* te vrste *Gymnodinium catenatum* i *Pyrodinium baharense* (Shumway, 1990.; Shumway, 1995.). Niti jedna vrsta dinoflagelata koja proizvodi PST ne proizvodi sve derivate STX, a na profil toksina u njima (vrstu i koncentraciju) utječu geografski položaj i okolišni uvjeti (Anderson i sur., 1994.). Pojavnost ove skupine fiktoksina zabilježena je u mnogim vrstama morskih organizama čak i u slučaju odsutnosti dinoflagelata, što uz podatak o njihovoj širokoj rasprostranjenosti ukazuje na moguće postojanje i drugih proizvođača PST, poput pojedinih vrsta bakterija koje su prisutne u morima (Sakamoto i sur., 1992.).

Saksitoksin je alkaloid koji u svojoj molekuli sadrži tetrahidropurinski prsten (Raposo i sur., 2020.). Poznato je najmanje 58 strukturno sličnih spojeva koji pripadaju skupini PST, od kojih je više od 30 analoga STX (Wiese i sur., 2010.; Wu i sur., 2019.). Svim PST zajednički je tetrahidropurinski prsten sa supstituentima R1-R4 na C6, C11 i N1 položaju (Raposo i sur., 2020.) (**Slika 2**).



**Slika 2** Opća struktura molekule PST (Raposo i sur., 2020).

Zbog dvije gvanidinske skupine u strukturi, ovi spojevi su izrazito polarni. U kiselim uvjetima su stabilni, dok u alkalnim uvjetima lako oksidiraju (Wu i sur., 2019.). Izuzetak su analozi N-sulfokarbamoil podskupine koji pri visokoj temperaturi i u kiselom mediju ( $\text{pH} < 4$ ) podliježu hidrolizi i prelaze u odgovarajuće analoge iz skupine karbamata (Van Egmond i sur., 2004.). Promjene pH i temperature mogu potaknuti interkonverziju među analogima, što za posljedicu može imati povećanje ili smanjenje toksičnosti (Leal i Cristiano, 2022.a). U organizmu, PST se apsorbiraju u različitim organima različitim intenzitetom, no najviše u probavnim organima, nakon čega slijedi distribucija u ostale organe i tkiva (Andres i sur., 2019.; García i sur., 2004.). Nakon apsorpcije, PST su podložni reakcijama biokonverzije koje se razlikuju među vrstama (Shimizu i Yoshioka, 1981.; Bricelj i sur., 1991.; Gessner i sur., 1997.; Bricelj i Shumway, 1998.; Ding i sur., 2017.; Oyaneder-Terrazas i sur., 2022.). Osim promjene toksičnosti, moguće je nastajanje novih analoga PST uslijed biokonverzije, koji ne mogu nastati u organizmima koji ih inače proizvode (Raposo i sur., 2020.).

Apsorpcija, biokonverzija i eliminacija PST u pojedinim vrstama ovise o mnogim čimbenicima, od kojih su najznačajniji specifičnost metabolizma vrste i molekularna struktura toksina. Poznato je više od četrdeset različitih reakcija biokonverzije od kojih se najveći broj odvija u školjkašima, manje u dinoflagelatima koji ih proizvode, te u ljudi (Leal i Cristiano, 2022.a). Najčešće su to reakcije epimerizacije, hidrolize, eliminacije, redukcije, oksidacije, sulfacije, desulfacije, hidroksilacije i glukuronidacije (Smith i sur., 2001.; Choi i sur., 2003.; Yu i sur., 2007.; García i sur., 2010.; Li i sur., 2012.a; Bricelj i sur., 2014.; Quilliam i sur., 2017.; Leal i Cristiano, 2022.a). Većina ih je posredovana enzimima poput karbamoilaza (Medina-Elizalde i sur., 2018.), sulfokarbamoilaza (Cho i sur., 2008.), sulfotransferaza (Yoshida i sur., 2002.), UDPGT i NADPH oksidazama (García i sur., 2009.; García i sur., 2010.), glutationom kao reducensom (Sakamoto i sur., 2000.), ali i enzimatskom aktivnošću koja potječe od pojedinih vrsta bakterija (Smith i sur., 2001.; Donovan i sur., 2008.).

S obzirom na supstitucijsku skupinu R4, dijele se u više podskupina koje se razlikuju po toksičnosti (navedeni prema padajućoj vrijednosti) (**Tablica 1**): karbamoil, dekarbamoil i N-sulfokarbamoil toksine (EFSA, 2009.b). Također su identificirani i opisani analozi s hidrobenzoatom, sulfatiranim benzoatom i acetatom kao R4 supstitucijskom skupinom, no njihova pojavnost je rjeđa, a toksičnost je utvrđena samo za neke od njih (Raposo i sur., 2020.). Među posljednje otkrivenima su M analozi koji pripadaju karbamoil i N-sulfokarbamoil podskupinama, a razlikuju se od ostalih po prisutnosti jedne ili dvije hidroksilne skupine na C11 položaju (Leal i Cristiano, 2022.a). Uz dekarbamoil M analoge do sada je opisano dvanaest M analoga (M1-M12) (Dell'Aversano i sur., 2008.; Li i sur., 2012.a; Ding i sur., 2017.; Quilliam i sur., 2017.; Qiu i sur., 2018.).

### 2.2.6. Akutna toksičnost PST

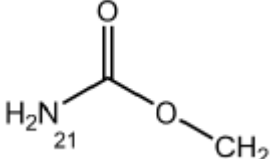
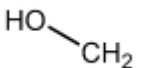
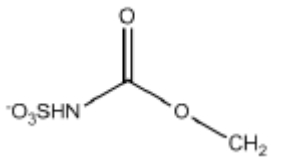
Toksično djelovanje STX i njegovih analoga očituje se u reverzibilnoj opstrukciji naponsko reguliranih natrijevih kanala na membrani neurona (Choudhary i sur., 2002.). Opstrukcija kanala sprječava ulazak  $\text{Na}^+$  iona u stanicu i širenje akcijskog potencijala kroz membrane stanica živčanog sustava i mišićnih stanica, što dovodi do neuro-muskularne paralize (Durán-Riveroll i Cembella, 2017.; Leal i Cristiano, 2022.a). Iako je opisana interakcija STX i sa  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{K}^+$  naponsko reguliranim kanalima, najznačajnija je njegova interakcija sa  $\text{Na}^+$  ionskim kanalima (Su i sur., 2003.; Wang i sur., 2003.; Leal i Cristiano, 2022.a). Interakcija ostalih toksina iz skupine PST sa naponsko reguliranim natrijevim kanalima je ista, ali se razlikuje prema afinitetu za ionske kanale (Kao i Walker, 1982.).

S obzirom na različit toksični potencijal analoga, sama kvantifikacija pojedinih analoga nije dovoljna da bi se utvrdila sukladnost analiziranih školjkaša sa zakonodavstvom propisanim najvećim dopuštenim količinama. Potrebno je znati relativnu toksičnost analoga u odnosu na referentni toksin skupine, tzv. faktor ekvivalentne toksičnosti (TEF, engl. *Toxicity Equivalency Factor*), koji je definiran kao omjer toksičnosti komponente neke kemijske skupine s istim načinom djelovanja, u odnosu na referentni toksin iste skupine (Botana i sur., 2010.). U **Tablici 1** prikazani su PST uključeni u ovo istraživanje, s pripadajućim supstitucijskim skupinama i utvrđenim faktorom ekvivalentne toksičnosti (TEF). Trenutno referentne, vrijednosti TEF navedene u **Tablici 1**, predložene od strane CONTAM (engl. *Contaminants in the Food Chain*) panela (EFSA, 2009.b), temelje se uglavnom na podacima o akutnoj toksičnosti dobivenim biopokusom na miševima nakon intraperitonealne aplikacije. Međutim, budući da je prirodni put intoksikacije kod ljudi oralni put, potrebno je u procjeni toksičnosti uzeti u obzir podatke o toksičnosti nakon oralne ingestije. Posljednja revizija TEF-a analoga iz skupine PST provedena od strane Organizacije za hranu i poljoprivredu (FAO) i Svjetske zdravstvene organizacije (WHO), uz prethodno spomenute, uključuje prvenstveno podatke prikupljene u slučajevima trovanja ljudi, ali i *in vitro* podatke (FAO i WHO, 2016.), čime su određene objektivnije vrijednosti.

**Tablica 1** PST s karakterističnim supstitucijskim skupinama i faktorom ekvivalentne toksičnosti (modificirano iz Raposo i sur., 2020.)

Toksin	R1	R2	R3	R4	TEF
STX	H	H	H	-OCONH <sub>2</sub> (karbamoil)	1,0
NEO	OH	H	H		1,0
GTX1	OH	H	-OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>		1,0
GTX2	H	-OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H		0,4
GTX3	H	H	-OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>		0,6
GTX4	OH	-OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H		0,7

## 2. Teorijski dio

					
dcSTX	H	H	H	-OH	1,0
dcGTX2	H	-OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H		0,2
dcGTX3	H	H	-OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>		0,4
C1 (GTX8)	H	-OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	-OCONHSO <sub>3</sub>	0,1
C2 (epiGTX8)	H	H	-OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>		
GTX5 (B1)	H	H	H		0,1

Toksini iz skupine PST uzrokuju paralitičko trovanje školjkašima – PSP (*Paralytic shellfish poisoning*). Vrsta i težina simptoma ovisi o količini unešenog toksina, a simptomi se javljaju u kratkom vremenu od intoksikacije, najčešće unutar 30 minuta. U blagim slučajevima trovanja simptomi započinju parestezijom u području usne šupljine, koja se može širiti prema vratu i rukama, te prema nogama i stopalima. Javljaju se glavobolja, mučnina i povraćanje. U slučaju teže intoksikacije parestezija prelazi u obamrlost, što dovodi do otežanog izvođenja voljnih pokreta, opće slabosti, osjećaja lebdenja, tahikardije, poteškoća u disanju i govoru. U najtežim slučajevima dolazi do mišićne paralize i gušenja, a smrt nastupa zbog gušenja uslijed respiratorne paralize i kolapsa srčanožilnog sustava, najčešće unutar dvanaest sati (Prakash i sur., 1971.). Antidota nema, liječenje je simptomatsko, te se potiče što brža eliminacija toksina davanjem tekućine, a u težim slučajevima pruža se respiratorna potpora. Ukoliko oboljeli preživi osamnaest sati, moguć je potpuni oporavak (FAO, 2004.).

Nakon apsorpcije iz probavnog trakta, PST se distribuiraju krvlju (Llewellyn i sur., 2002.) u ostale organe i tkiva. *Post-mortem* pregledom žrtava detektirani su u organima probavnog sustava, bubrezima, srcu, plućima, štitnjači, nadbubrežnoj žlijezdi, mozgu i cerebrospinalnoj tekućini (García i sur., 2004.). Kao što je ranije navedeno, u organizmu PST prolaze biotransformaciju u različitim tkivima, a pretpostavlja se da ona započinje već u crijevima. Izlučuju se iz tijela najvećim dijelom mokraćom (Llewellyn i sur., 2002.), ali i stolicom (García i sur., 2004.). Biokonverzija je također značajna za detoksifikaciju. Npr. glukuronidacijom toksina nastaju hidrofilni glukuronidi koji se mogu, u odnosu na njihovu slobodnu formu, lakše izlučiti iz organizma (García i sur., 2009.). Količina PST koja je toksična ili smrtonosna

za ljude individualno je vrlo različita i ovisi o osjetljivosti organizma (FAO, 2004.), a djeca su osjetljivija od odraslih (Rodrigue i sur., 1990.).

### 2.2.7. Kronična toksičnost PST

Nema mnogo istraživanja kronične toksičnosti PST, naročito u ljudi (Vilariño i sur., 2018.). Iako objavljena istraživanja ne ukazuju na postojanje ozbiljnijih posljedica izlaganja sisavaca subletalnim dozama (Zepeda i sur., 2014.), uočene su određene promjene koje ti toksini uzrokuju, poput umanjene učinkovitosti mehanizama obrane od oksidativnog stresa (Hong i sur., 2003.; Ramos i sur., 2014.), oštećenja DNA koja upućuju na apoptozu (da Silva i sur., 2011.), promjena enzima uključenih u metaboliziranje toksina (Hong i sur., 2003.) te štetnih promjena ponašanja (Diehl i sur., 2016.). U istraživanju provedenom na ribama, Costa i sur. (2012.) uočili su moguću genotoksičnost PST. Iako navedena istraživanja ukazuju na potencijalnu kroničnu toksičnost, moguće je i da prethodna izloženost ovim fiktotoksinima umanjuje osjetljivost na njihovo akutno toksično djelovanje tijekom kasnije izloženosti (Prakash i sur., 1971.; EFSA, 2009.b).

### 2.2.8. Kumulacija PST u školjkašima

Bioakumulacija PST u školjkašima i drugim morskim organizmima uzrok je nekoliko tisuća slučajeva PSP godišnje, naročito u siromašnim priobalnim područjima (Benjamin i Suarez, 2016.). Najčešći vektori su dvoljuštarni školjkaši, no detektirani su i u drugim morskim organizmima, kao što su plaštenjaci (Roje-Busato i Ujević, 2014.; Ben-Gigirey i sur., 2020.), bodljikaši (Silva i sur., 2018.), rakovi (Llewellyn i sur., 2002.), puževi (Choi i sur., 2006.; Silva i sur., 2018.) i ribe (Cembella i sur., 2002.; Costa i sur., 2010.), s time da su od navedenih vrsta školjkaši i puževi najčešće kontaminirani (Oyaneder Terrazas i sur., 2017.). Unos i brzina depuracije ovih fiktotoksina razlikuju se među vrstama. U nekim vrstama PST zadržavaju se danima (npr. *Mytilus* vrste), dok su u nekima prisutni mjesecima (npr. *Placopecten magellanicus* i *Spondylus squamosus*), a primijećena je i razlika u brzini depuracije među analogima ove skupine u istoj vrsti školjkaša (Bricelj i Shumway, 1998.; Li i sur., 2005.; Kwong i sur., 2006.; Montojo i sur., 2006.; Turner i sur., 2014.). Nakon apsorpcije, PST se distribuiraju u ostala tkiva. Zastupljenost u tkivima također ovisi o vrsti, no općenito kod školjkaša najveći udio nalazi se u probavnim organima (Oyaneder Terrazas i sur., 2017.).

Iako PST izazivaju određene štetne učinke u školjkaša (Hégaret i sur., 2012.; Astuya i sur., 2015.; Castrec i sur., 2020.), ti učinci su značajno manji u odnosu na toksično djelovanje koje izazivaju u sisavaca. Jedan od mogućih razloga je nalaz da se neuromuskularni impulsi u školjkaša provode najvećim dijelom putem naponsko ovisnih Ca<sup>2+</sup> kanala, za koje se PST

vežu manjim afinitetom u odnosu na Na<sup>+</sup> kanale (Kao, 1993.; Leal i Cristiano, 2022.a). Drugi mogući razlog je mutacija reziduuma aminokiselina u strukturi Na<sup>+</sup> ionskih kanala pojedinih vrsta školjkaša, što umanjuje mogućnost vezivanja PST na receptore (Bricelj i sur., 2005.). Među vrstama školjkaša postoje velike razlike u osjetljivosti prema PST. Vrste koje nisu osjetljive na njihov toksični učinak mogu u kratkom vremenskom razdoblju kumulirati vrlo visoke koncentracije toksina. Uočena je i genetska adaptacija pojedinih vrsta na PST kao posljedica opetovane izloženosti. Nasuprot njima, pojedine osjetljive vrste posjeduju mehanizme kojima se zaustavlja ingestija toksičnog fitoplanktona, poput zatvaranja ljuštura, te stoga kumuliraju manje količine toksina (Shumway i Cucci, 1987.; Bricelj i sur., 1990.; MacQuarrie i Bricelj, 2008.; Navarro i sur., 2011.; Tan i Ransangan, 2015.).

Pojavnost PST je globalna, detektirani su u morima diljem svijeta, uključujući područje južne (García i sur., 2004.), srednje (Callejas i sur., 2015.) i sjeverne Amerike, Afrike (CDC, 2011.; Popkiss i sur., 1979.), Oceanije (Ching i sur., 2015.), Europe (Rodrigues i sur, 2012.; Silva i sur., 2013.; Karlson i sur., 2021.; Rodríguez-Cabo i sur., 2021.) i Mediterana (Vale i sur., 2008.; Kacem i sur., 2015.), uz pojavu brojnih slučajeva PSP, dijelom i s letalnim ishodom. U Jadranskom moru, PST su detektirani prvi put 1993. god. u školjkašima prikupljenim iz uzgajališta talijanske regije Emilia-Romagna, smještene na sjevernom dijelu zapadne obale Jadrana (Ciminiello i sur., 1995.). U hrvatskom dijelu Jadrana, od uvođenja monitoringa fiktoksina 2000. god., prvi put su detektirani 2009. god. u školjkašima uzgojenim u sjeveroistočnom Jadranu (Medulinski zaljev) (Ujević i sur., 2012.). U školjkašima Jadranskog mora najčešće su prisutni u niskim koncentracijama, no više puta su detektirani u koncentracijama blizu ili iznad NDK (Ciminiello i sur., 1995.; Honsell i sur., 1996.; Ujević i sur., 2012.; Roje-Busatto i Ujević, 2014.). Pojavnost u niskim koncentracijama zabilježena je i na području srednjeg i južnog Jadrana (Pavela-Vrančić i Marasović, 2004.; Ujević i sur., 2012.; Ujević i sur., 2019.).

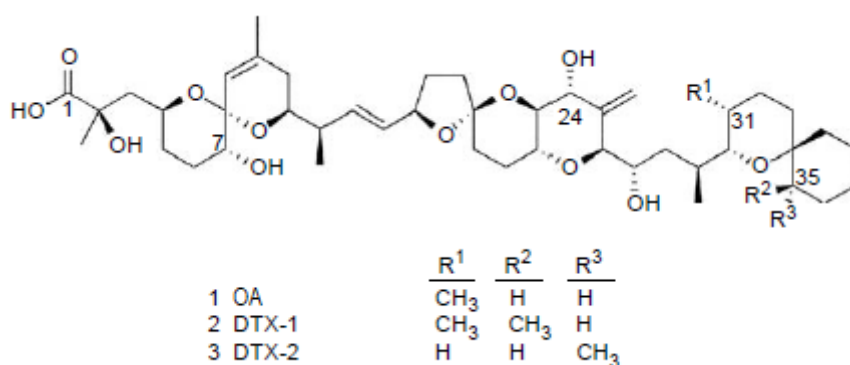
### 2.2.9. Lipofilni fiktoksini

Lipofilni toksini (LT) lako su topivi u organskim otapalima poput metanola i kloroforma, te su na temelju zajedničke ekstrakcije u organskoj fazi svrstani u navedenu skupinu. Međutim, različitih su kemijskih struktura i posjeduju različite funkcionalne skupine, zbog čega imaju različite kemijske karakteristike, mehanizme djelovanja i toksične učinke (Quilliam, 2003.b). Temeljem tih karakteristika svrstani su u više skupina: okadaična kiselina (OA) i njeni derivati dinofizistoksini (DTX), pektenotoksini (PTX), azaspiracidi (AZA), jesotoksini (YTX), spirolidi (SPX), gimnodimini (GYM), pinatoksini (PnTX), te palitoksini (PLTX), brevetoksini (BTX) i ciguatoksini (CTX). Posljednje tri skupine nisu predmet istraživanja doktorske disertacije, te stoga nisu detaljnije opisane.

### 2.2.10. Okadaična skupina

Ovu skupinu čine okadaična kiselina (OA), dinofizistoksini (DTX1, DTX2), njihovi diol ester prekursori (DTX4 i DTX5 skupine), te acilirani derivati (DTX3 skupina) (Reguera i sur., 2014.). Okadaična kiselina je policiklička, polieterska karboksilna kiselina, molekulske formule  $C_{44}H_{68}O_{13}$  (**Slika 3**) i glavni je predstavnik ove skupine. Derivat je C38 masne kiseline (Caruana i Amzil, 2018.). Prvi put je izolirana iz dvije vrste morskih spužvi - *Halichondria okadai* po kojoj je i dobila ime, potom iz spužve *Halichondria melanodocia* (Tachibana i sur., 1981.), međutim, kasnije je ustanovljeno da potječe od dinoflagelata rodova *Prorocentrum*, *Phalacroma* i *Dinophysis* (Sosa i Tubaro, 2016.; Stonik i Stonik, 2016.). Fikotoksini ove skupine su termostabilni, ne uništavaju se kuhanjem, a stabilni su i na niskim temperaturama (McCarron i sur., 2007.). Do sada je opisano više od pedeset toksina ove skupine (Orellana Mancilla, 2016.).

Strukturno i po kemijskim svojstvima, vrlo bliski OA su DTX1 i DTX2 koji su analozi OA, a međusobno se razlikuju po broju metilnih skupina na položaju C31 i C35 (Quilliam, 2003.b; Sosa i Tubaro, 2016.) (**Slika 3**). U školjkašima, ovi analozi mogu se na položaju C7 hidroksi skupine esterificirati dugolančanim zasićenim i nezasićenim masnim kiselinama. Skupina nastalih derivata nazivaju se DTX3 toksini (McNabb, 2008.). Liposolubilnost DTX3 je veća u odnosu na neesterificirane oblike, a budući da su podložni kemijskoj ili enzimatskoj hidrolizi, mehanizam djelovanja i toksičnost jednaka je matičnom fikotoksinu (Sosa i Tubaro, 2016.). Drugu skupinu čine C1 esterificirani toksini nazvani DTX4 i DTX5 toksini, a za razliku od DTX3 nastaju u algama (McNabb, 2008.)



**Slika 3** Kemijska struktura OA, DTX1 i 2 (McNabb, 2008.)

OA je inhibitor serin/treonin protein fosfataza koje sudjeluju u defosforilaciji niza supstrata u organizmu sisavaca i imaju važnu ulogu u regulaciji esencijalnih procesa u stanici poput održavanja strukture citoskeleta, rasta, diobe i smrti stanice (Sosa i Tubaro, 2016.). OA dovodi do povećanja fosforilacije na način da se veže na hidrofobni utor u blizini aktivnog



mjesta enzima, ulazi u interakciju sa aktivnim mjestom i na taj način inhibira njegovu aktivnost. Karboksilna skupina na položaju C1 ključna je za inhibiciju aktivnosti protein fosfataza, uz hidroksi skupine na C2, C7, C24 i C27 položaju koje također ulaze u interakciju sa enzimom (Dawson i Holmes, 1999.). Najvećim afinitetom veže se na PP2A enzime, zatim na PP1, PP4 i PP5, a najslabije na PP2B, PP3 i PP6 enzime (Louzao i sur., 2003.). Analozii OA vežu se na navedene enzime na isti način, ali s različitim afinitetom.

Nakon ingestije, fiktoksini ove skupine zadržavaju se uglavnom u probavnom traktu (Louzao i sur., 2021.). Iako molekularni mehanizam djelovanja ove skupine fiktoksina nije u potpunosti objašnjen (Campos i sur., 2020.), pretpostavlja se da povećanje fosforiliranih proteina u epitelu crijeva dovodi do narušavanja njegove barijerne uloge i povećanja paracelularne propusnosti, što utječe na transport iona i nutrijenata u tankom crijevu, kao i na apsorpciju vode (Louzao i sur., 2003.). OA iskazuje citotoksično djelovanje, inhibira rast i izaziva apoptozu različitih vrsta stanica (Valdiglesias i sur., 2011.). Uočeno je i njeno genotoksično (Carvalho i sur., 2006.), embriotoksično (Jiao i sur., 2017.), imunotoksično (del Campo i sur., 2017.), ali i neurotoksično (Tapia i sur., 1999.) djelovanje.

Proteomske analize ukazuju na kompleksno djelovanje OA u gastrointestinalnom traktu na različite proteinske molekule i biološke procese (Wang i sur., 2012.), što dovodi do pojave proljeva kao karakterističnog simptoma trovanja za ovu skupinu fiktoksina (Solter i Beasley, 2013.), tzv. *Diarrheic Shellfish Poisoning* (DSP). Simptomi DSP su vrlo nespecifični i često se zamijene za trovanje koje uzrokuju bakterije, naročito *Vibrio parahaemolyticus* (Taylor i Harrison, 2002.), a nastaju već 30 minuta do nekoliko sati nakon konzumiranja kontaminiranih školjkaša. Javljaju se mučnina, povraćanje, proljev, grčevi, ponekad vrućica, groznica i glavobolja. Simptomi traju u prosjeku tri dana (EFSA, 2008.a), mogu biti iscrpljujući, ali nemaju smrtni ishod. Ne postoji protuotrov, liječenje je simptomatsko (Tubaro i sur., 2008.). Dokazano je da OA prolazi placentarnu barijeru (Matias i Creppy, 1996.). Rezultati pokusa na miševima ukazuju na enterohepatički ciklus OA nakon oralnog unosa, nakupljanje u crijevima gdje iskazuju akutni toksični učinak, a izlučuju se stolicom i mokraćom. Detektirana je i u ostalim tkivima no u manjoj koncentraciji (Matias i sur., 1999.).

Izloženost OA dovodi se u vezu s češćom pojavnošću karcinoma probavnog sustava (Manerio i sur., 2008.). Kronična izloženost nižim dozama može imati negativne posljedice na zdravlje izazivajući disbiozu crijevne flore, što dovodi do osjetljivosti prema bakterijskim infekcijama (Emery i sur., 2021.), a često može biti i podloga mnogim drugim bolestima (Litvak i sur., 2018.). OA, ali i DTX1, mogu djelovati kao tumor promotori budući da već pri nižim koncentracijama u organizmu izazivaju nastajanje upalnih molekula i kancerogenih signala, s time da je DTX1 toksičniji (del Campo i sur., 2017.). Toksični učinak koji OA, DTX1 i DTX2 iskazuju nije isti. CONTAM panel je temeljem podataka o relativnoj inhibiciji PP2A

enzima i akutne intraperitonealne toksičnosti u miševa utvrdio jednaku toksičnost za OA i DTX1 (TEF 1), te manju za DTX2 (TEF 0,6). Međutim, Abal i sur. (2018.) su temeljem istraživanja koje se baziralo na akutnoj oralnoj toksičnosti utvrdili najveću toksičnost DTX1, zatim OA, te najmanju DTX2.

Vektori toksina okadaične skupine u prehrani ljudi najvećim dijelom su školjkaši, no mogu biti i ribe, rakovi, puževi (Costa i sur., 2017.; Vilarinño i sur., 2018.; Murk i sur., 2019.). Kontaminacija i kumulacija u školjkašima ovise o više čimbenika poput selektivne ingestije fitoplanktona, ravnoteže između unosa i eliminacije, apsorpcije, enzimatske transformacije, alometrije, a razlikuju se među različitim vrstama školjkaša (Reguera i sur., 2014.). Nakon ingestije fitoplanktona, dolazi do njihove probave uz djelovanje probavnih enzima koji potječu od školjkaša, ali i od razgradnje samog fitoplanktona. U probavnoj žlijezdi uslijed djelovanja transferaza, dolazi do niza transformacija toksina koje ovise o strukturi molekule. Do transformacije dolazi i unutar stanica probavne žlijezde gdje dolazi do esterifikacije OA, DTX1, DTX2 i diol estera s masnim kiselinama. Aciliranje je neophodno u detoksifikaciji gotovo svih vrsta školjkaša (Konoki i sur., 2013.; Reguera i sur., 2014.). U većini vrsta, više od 90% toksina iz okadaične skupine prisutno je u esterificiranom obliku, no pojedine vrste, poput dagnji, rijetko sadrže esterificirane toksine u udjelu većem od 50% (McNabb, 2008., Torgersen i sur., 2008.). Pretpostavlja se da je esterifikacija obrambeni mehanizam školjkaša budući da je toksičnost aciliranih derivata manja u odnosu na matične toksine od kojih nastaju. Uočeno je također da neke vrste esterificirane toksine eliminiraju brže, npr. *D. trunculus* (Vale, 2006.), dok je kod nekih vrsta brža eliminacija neesterificiranih toksina, npr. *M. edulis* i *Ostrea edulis* (Torgersen, 2008.). Apsorpcija okadaične skupine u samim školjkašima je mala (2-12%), a toksini se u većini vrsta kumuliraju najvećim dijelom u probavnom sustavu (Suzuki i sur., 2005.a; García i sur., 2015.).

Prvi zabilježeni slučajevi DSP dogodili su se u Japanu 1976. i 1977. god. (Yasumoto i sur., 1978.). Od tada su se toksini okadaične skupine proširili diljem svijeta, te se mogu naći u morima na području sjeverne i južne Amerike, Tajlanda, Australije, Novog Zelanda, no najveću pojavnost imaju u Europi i Japanu (Sosa i Tubaro, 2016.). Zbog učestale pojavnosti na nekim područjima predstavljaju značajan socio-ekonomski i zdravstveni problem (Gestal Otero, 2008.). Okadaična skupina detektirana je u školjkašima izlovljenim u morima mnogih europskih država (Nizozemska, Norveška, Švedska, Danska, Njemačka, Francuska, Španjolska, Portugal, Irska, Velika Britanija, Italija, Hrvatska, Grčka), ponekad i u koncentracijama koje prelaze zakonodavstvom utvrđene NDK (EFSA, 2008.; Louppis i sur., 2011.; Ciminiello i sur., 2014.; Arapov, 2013.). U školjkašima podrijetlom iz Europskih mora najčešće se pronalazi OA, dok su DTX češće prisutni u školjkašima podrijetlom iz sjeverne Amerike i Japana (Stonik i Stonik, 2016.). Prvo zabilježeno trovanje OA u sjevernom dijelu

Jadrana dogodilo se 1989. god. u Italiji. Od početka 90-tih godina prošlog stoljeća, kada je i započelo istraživanje profila fiktoksina u ovom dijelu Jadrana, u školjkašima podrijetlom s tog područja, sve do sredine 90-tih dominirali su DTX i OA (Ciminiello i sur., 2010.a). U hrvatskom dijelu Jadrana, OA i DTX1 prvi put su detektirani 1994. god. u dagnjama izlovljenim u srednjem Jadranu (Orhanović i sur., 1996.), dok je DTX2 detektiran 1997. god. (Pavela-Vrančić i sur., 2002.). Od uspostave monitoringa fiktoksina u Hrvatskoj, povremena pojavnost OA zabilježena je u školjkašima podrijetlom iz južnog (Ninčević-Gladan i sur., 2010.) i srednjeg dijela Jadrana (Bogdanović i sur., 2022.), kao i u onima podrijetlom i iz sjevernog Jadrana (akvatorij istarskog poluotoka), u kojima je više puta utvrđena koncentracija OA iznad NDK (Ninčević-Gladan i sur., 2008.; 2010.; 2011.).

### 2.2.11. Pektenotoksini

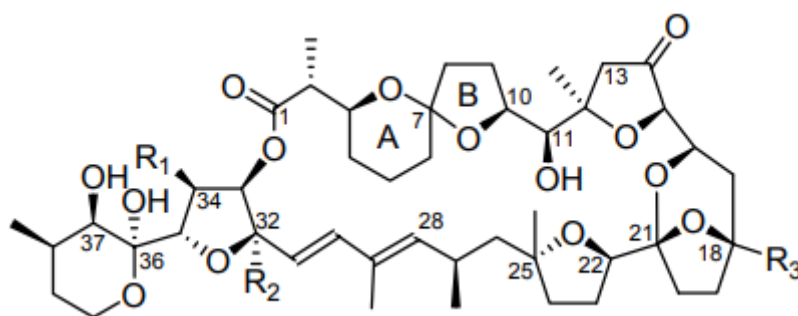
Pektenotoksini (PTX) su termostabilni lipofilni makrociklički polieterski spojevi, strukturno slični OA zbog prisustva cikličkih etera u molekuli, te karboksilne skupine koja se u PTX nalazi u obliku makrocikličkog laktona (Ciminiello i sur., 2009.). Poznato je 20 analoga ove skupine (Boundy i sur., 2020.). Prvotno su izolirani iz Japanske kapice (*Patinopecten yessoensis*) (Yasumoto i sur., 1985.). Kao i okadaičnu skupinu, proizvode ih *Dinophysis* vrste. *Dinophysis* vrste proizvode samo jedan od toksina ove dvije skupine ili istovremeno mogu proizvoditi toksine iz obje skupine, u različitim udjelima koji ovise ne samo o soju dinoflagelata već i o njihovom geografskom podrijetlu (Reguera i Pizzaro, 2008.). Jedan dio PTX ne proizvode dinoflagelati već nastaju metaboliziranjem PTX2 u školjkašima, kao npr. pektenotoksin-2-sekokiselina (PTX2SA), 7-*epi*-PTX2SA (Suzuki i sur., 2001.) i njihovi esteri (Wilkins i sur., 2006.) te PTX6 (Matsushima i sur., 2015.). Glavni metabolički put PTX2 u mnogim školjkašima je konverzija u PTX2SA (Vale i Sampayo, 2002.; MacKenzie i sur., 2002; Miles i sur., 2004.a), a budući je njena citotoksičnost manja u odnosu na PTX2, pretpostavlja se da je to mogući način dekontaminacije školjkaša (Daiguji i sur., 1998.). Matične molekule od kojih metaboliziranjem u školjkašima nastaju novi analozi uz PTX2 su još i PTX11, 12 i 13 (Miles i sur., 2004.b; Miles i sur., 2006.a; Suzuki i sur., 2006.) U jako bazičnom mediju PTX se lako razaraju, a nestabilni su i u kiselom mediju kada dolazi do njihove pretvorbe u sekokiseline (EFSA, 2009.c).

PTX djeluju na aktinski citoskelet različitih vrsta stanica (Spector i sur., 1999.; Leira i sur., 2002.; Ares i sur., 2005.), pri čemu ključnu ulogu u vezivanju na aktin ima prstenasti dio molekule PTX (Allingham i sur., 2007.). Posljedica je narušavanje staničnih funkcija koje ovise o citoskeletonu, uslijed depolimerizacije F-aktina (Ares i sur., 2007.; Espiña i sur., 2008.). Aktivnost analoga PTX prema F-aktinu nije jednaka, stoga se međusobno razlikuju po toksičnosti. Osim učinka na F-aktin, PTX1 izaziva smanjenje mikrotubula u plazmi što

mijenja njihov radijalni raspored (Zhou i sur., 1994.). Uočeno je citotoksično djelovanje PTX na mnoge vrste stanica, a uočeno je da PTX1 i PTX2 izazivaju apoptozu stanice (Chae i sur., 2005.).

Smatra se da su PTX hepatotoksični. Nakon intraperitonealne aplikacije PTX1 uočena je nekroza hepatocita (Terao i sur., 1986.), dok je PTX2 izazvao povećanje koncentracije serumskih enzima koji ukazuju na oštećenje jetre (Yoon i sur., 1997.).

Do sada nema zabilježenih slučajeva trovanja ljudi toksinima iz ove skupine (EFSA, 2009.c), a mnoga istraživanja na životinjama ukazuju da nakon oralnog unosa PTX ne izazivaju proljev (Hamano i sur., 1986.; Suzuki i sur., 2006.; Ito i sur., 2008.), te da su neopravdano bili svrstani u skupinu toksina DSP zbog koekstrakcije u organskim otapalima, zajedničkog podrijetla (*Dinophysis* vrste) i česte supojavnosti s OA. Iako su pojedina istraživanja ukazala na određene toksične učinke (Ishige i sur., 1988.; Ito i sur., 2008.), toksičnost nakon oralnog unosa značajno je manja u odnosu na toksičnost nakon intraperitonealne aplikacije (EFSA, 2009.c). Intraperitonealno aplicirani, najveću toksičnost iskazuju PTX1, PTX2, PTX3 i PTX11 (Boundy i sur., 2020.) (**Slika 4**), te je uz PTX4 i PTX6 za njih CONTAM panel predložio privremenu TEF vrijednost 1, s obzirom da ne postoji dovoljno podataka na temelju kojih bi se pouzdano utvrdila njihova relativna toksičnost (EFSA, 2009.c). Simptomi trovanja nastupaju vrlo brzo nakon intraperitonealne aplikacije PTX pokusnim životinjama, pri čemu se javlja pogrbljenost, letargičnost, ataksija, otežano disanje i cijanoza (Munday, 2008.a).



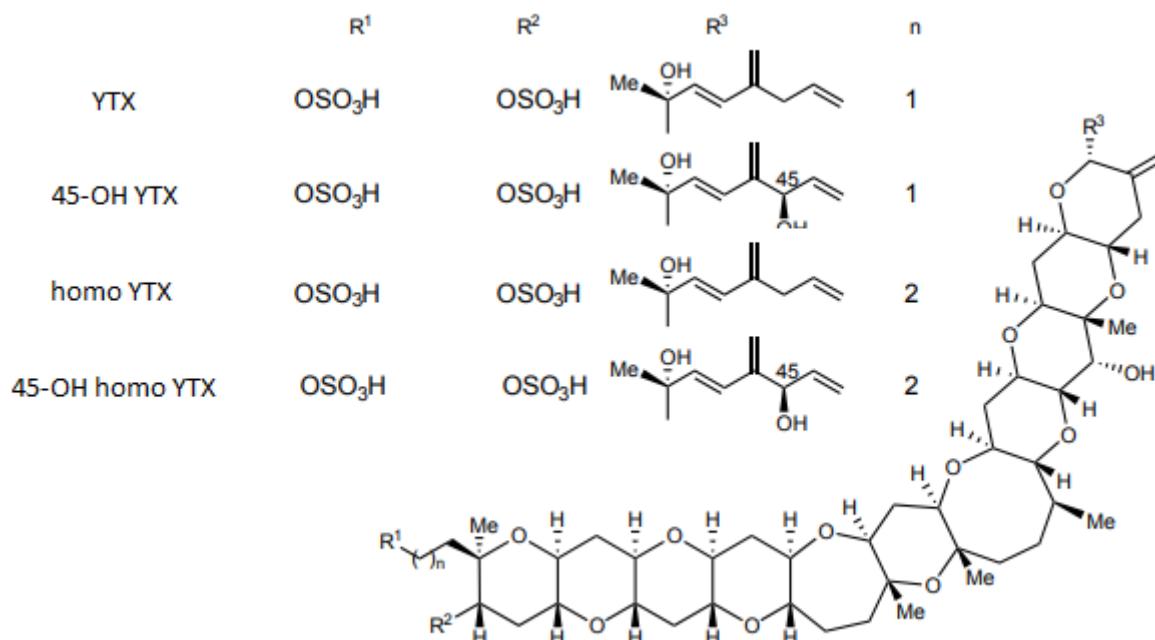
	C7	R1	R2	R3
PTX1	R	H	H	CH <sub>2</sub> OH
PTX2	R	H	H	CH <sub>3</sub>
PTX3	R	H	H	CHO
PTX11	R	OH	H	CH <sub>3</sub>

**Slika 4** Kemijska struktura najtoksičnijih predstavnika skupine PTX (modificirano iz Suzuki, 2008.)

PTX se mogu pronaći u školjkašima diljem svijeta, uključujući Australiju (Burgess, 2003.), Japan (Suzuki i sur., 2005.b), Novi Zeland (MacKenzie i sur., 2002), južnu Ameriku (Alcántara-Rubira i sur., 2018.; Díaz i sur., 2020.) i Europu (Draisci i sur., 1999.; Morris i sur., 2004.; Puente i sur., 2004.; Vale i sur., 2008.; Lindegarth i sur., 2009.). U Jadranskom moru, prvi put su detektirani 1994. god. u fitoplanktonu *Dinophisys fortii* iz sjeverozapadnog Jadrana (Draisci i sur., 1996.), a 1995. god. u dagnjama podrijetlom iz srednjeg Jadrana (Pavela-Vrančić i sur., 2006.). Od tada se povremeno pronalaze u školjkašima u Jadranu u niskim koncentracijama (Ninčević-Gladan i sur., 2010.; 2011.; Bogdanović i sur., 2022.).

### 2.2.12. Jesotoksini

Još jedna skupina fiktoksina koji su bili svrstavani u skupinu DSP zbog lipofilnih svojstava i koekstrakcije s okadaičnom skupinom, su jesotoksini. To su policiklički eterski spojevi (Ferrari i sur., 2004.) koje proizvode dinoflagelati *Protoceratium reticulatum* (Satake i sur., 1997.; Paz i sur., 2004.), *Lingulodinium polyedra* (Paz i sur., 2004.) i *Gonyaulax spinifera* (Rhodes i sur., 2006.). Prvi put su izolirani 1986. god. u kopicama *Patinopecten yessoensis* i to analog 45-OH YTX. Od tada je otkriveno preko devedeset analoga, ali samo za dio njih struktura molekule u potpunosti je identificirana (Miles i sur., 2005.; Miles i sur., 2006.b; Ciminiello i sur., 2007.; EFSA, 2009.d; Rubini i sur., 2021.). Jedan dio analoga nastaje u dinoflagelatima, dok neki od njih nastaju metaboliziranjem u školjkašima (Paz i sur., 2008.). YTX je disulfatirani polieter izgrađen od 11 etera različitih veličina, poredanih u karakterističnu strukturu poput ljestava i terminalnog acikličkog nezasićenog lanca s devet ugljikovih atoma (Ciminiello i Fattorusso, 2008.) (**Slika 5**). Molekula YTX je liposolubilna, a zbog dvije sulfatne skupine ima amfotermna svojstva (Paz i sur., 2008.).



**Slika 5** Kemijska struktura jesotoksina uključenih u ovo istraživanje (modificirano iz Ciminiello i Fatturoso, 2008.)

Unatoč brojnim istraživanjima, mehanizam djelovanja YTX još uvijek nije u potpunosti razjašnjen (Dominguez i sur., 2010.; Farabegoli i sur., 2018.). Dosadašnja *in vitro* istraživanja ukazuju na citotoksičnost YTX uslijed djelovanja na unutarstaničnu homeostazu Ca<sup>2+</sup> iona, cikličkog adenozin monofosfata, modifikacije citoskeleta, aktivacije kaspaza i otvaranja mitohondrijskih prijelaznih pora (Tubaro i sur., 2010.).

Slučajevi trovanja ljudi fiktotoksinima iz ove skupine nisu zabilježeni (Munday i sur., 2008.), međutim, toksičnost nakon intraperitonealne aplikacije na pokusnim životinjama je velika (Ogino i sur., 1997.). Simptomi nastupaju unutar nekoliko sati, prethodi im nekoordiniranost pokreta i skakanje (Franchini i sur., 2004.a), potom iscrpljenost, a smrt nastupa u kratkom vremenu uslijed dispneje. Elektronskom mikroskopijom uočavaju se oštećenja srčanog mišića (Tubaro i sur., 2003.; Suárez Korsnes i sur., 2006.), jetre, gušterače (Terao i sur., 1990.), te Purkinje neurona u mozgu (Franchini i sur., 2004.a). Rezultati pokusa na miševima ukazuju da je toksičnost nakon oralnog unosa znatno manja. Unešeni oralnim putem, YTX slabo se resorbiraju, najvećim dijelom se zadržavaju u crijevima, a izlučuju stolicom (Munday i sur., 2008.). Čak i pri izloženosti većim dozama, nisu uočena oštećenja probavnog sustava, već samo manje, prolazne promjene u ponašanju (Ogino i sur., 1997.) i neznatne promjene stanica srčanog mišićnog tkiva (Aune i sur., 2002.). Uočen je utjecaj letalnih, ali i subletalnih doza na timus i imunostni sustav (Franchini i sur., 2004.b).

S obzirom na nedostatak podataka o toksičnom učinku na ljude i nisku toksičnost nakon oralnog unosa, temeljem podataka o toksičnosti nakon intraperitonealne aplikacije pokusnim životinjama, utvrđene su vrijednosti TEF 1 za YTX, homo YTX, 45-OH YTX, dok za 45-OH homo YTX iznosi 0,5. Dokaza o njihovoj kroničnoj toksičnosti i karcinogenosti nema (EFSA, 2009.d).

Usporedbom profila fiktoksina ove skupine u dinoflagelatima s onim u školjkašima, zaključeno je da dolazi do strukturnih promjena YTX i homo YTX, uslijed čega nastaju novi analozi. Intenzitet metaboliziranja i struktura novonastalih analoga ovisi o vrsti školjkaša (Ciminiello i Fatturoso, 2008.). Od analoga, u dinoflagelatima dominiraju YTX i homo YTX (Paz i sur., 2007.), dok se u školjkašima najčešće nalaze 45-OH YTX i karboksi YTX (COOH-YTX) (Samdal i sur., 2005.). U školjkašima, YTX najvećim dijelom se nakupljaju u probavnim žlijezdama i imunocitima (Franchini i sur., 2003.).

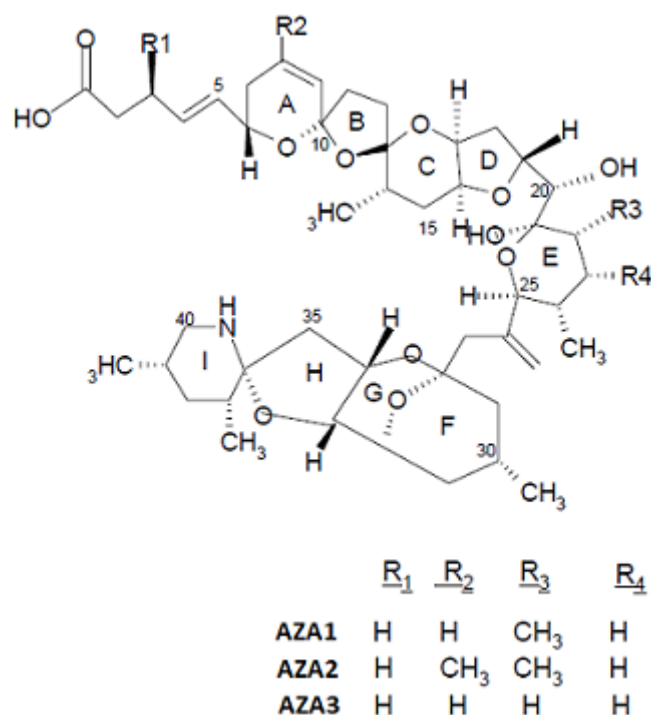
Jesotoksini se često pronalaze u plodovima mora diljem svijeta. Nakon otkrivanja i identifikacije u Japanu (Munday i sur., 2008.), detektirani su u Koreji (Lee i sur., 2012.), Africi (Pitcher i sur., 2019.), Južnoj Americi i Novom Zelandu (Yasumoto i Takizawa, 1997.), Europi (Vale i sur., 2008.; EFSA, 2009.d; Rodríguez i sur., 2015.; FSAI, 2016.). Od sredine devedesetih godina prošlog stoljeća, YTX, homo YTX i njihovi analozi postaju najzastupljeniji fiktoksini u školjkašima iz Jadranskog mora (Ciminiello i sur., 2010.a). YTX i njegovi analozi COOH-YTX, 45-OH YTX i homo YTX prvi put su detektirani 2004. god. u dagnjama prikupljenim iz hrvatskog dijela Jadrana (sjeverni Jadran) (Ninčević Gladan i sur., 2008.). Od tada se javljaju također i u školjkašima iz srednjeg i južnog Jadrana, uglavnom u koncentracijama nižim od NDK (Čustović i sur., 2009.; Ninčević Gladan i sur., 2010.; Bogdanović i sur., 2022.).

### 2.2.13. Azaspiracidi

Azaspiracidi (AZA) su skupina fiktoksina otkrivena 1995. god. nakon slučajeva trovanja uslijed konzumacije dagnji irskog podrijetla u Nizozemskoj. Zabilježeni su simptomi isti kao i u slučaju DSP, međutim, kasnije je ustanovljeno da uzrok nisu toksini okadaične skupine, već azaspiracidi (Satake i sur., 1998.). Nakon ovog incidenta, slučajevi azaspiracidnog trovanja školjkašima (AZP - *Azaspiracid shellfish poisoning*) zabilježeni su u Irskoj, Velikoj Britaniji, Italiji, Francuskoj, Norveškoj i Španjolskoj, a velik dio povezan je s školjkašima uvezenima iz Irske (Ryan i sur., 2008.).

Azaspiracide proizvode dinoflagelati roda *Azadinium* i *Amphidoma* (Krock i sur., 2009.a; Krock i sur., 2012.; Tillmann i sur., 2014.). Njihovu strukturu čini polieterska okosnica karakteristična za mnoge toksine koje proizvode dinoflagelati, ali sa jedinstvenim strukturnim

karakteristikama. Molekula sadži tri spiro spoja, heterocikličku amino skupinu i terminalno smještenu alifatsku karboksilnu skupinu (**Slika 6**) (Satake i sur., 1998.; Nicolaou i sur., 2006.a; Nicolaou i sur., 2006.b). Skupinu čini najmanje 30 analoga identificiranih u fitoplanktonu i školjkašima, no trenutno su zakonodavstvom regulirane NDK samo za AZA1, AZA2 i AZA3 (Hess i sur., 2016.). Od svih analoga samo oni se pojavljuju u koncentracijama koje mogu ugroziti ljudsko zdravlje (EFSA, 2008.b), međutim, utvrđeno je da analozi AZA17 i AZA19 tijekom termičke obrade prelaze u toksičnije AZA3 i AZA6, te se predlaže i njihovo uključivanje u zakonodavstvo (McCarron i sur., 2008.).



**Slika 6** Kemijska struktura azaspiracida 1, 2 i 3 (modificirano iz EFSA, 2008.b)

AZP najčešće je bilo uzrokovano kontaminiranim dagnjama (Furey i sur., 2010.), međutim, mogu se nakupljati i u drugim vrstama školjkaša poput kamenica i kapica (Hess i sur., 2003.). Kumulacija azaspiracida u tkivu školjkaša razlikuje se u odnosu na ostale polieterske fiktokisne. Toksičnost nije uvijek ograničena na probavnu žlijezdu, a tijekom produljene izloženosti visokim koncentracijama azaspiracida uočen je prijenos toksina u druga tkiva (Magdalena i sur., 2003.a), a uočena je i biokonverzija (Rehmann i sur., 2008; McCarron i sur., 2009; O'Driscoll i sur., 2011).

Iako mehanizam djelovanja azaspiracida nije u potpunosti poznat, *in vitro* istraživanja na različitim kulturama stanica ukazuju na njihovu citotoksičnost i utjecaj na više staničnih procesa (EFSA, 2008.b; Botana i sur., 2014.). Izazivaju opsežne morfološke promjene i promjene citoskeletona, mijenjaju raspored i smanjuju koncentraciju F-aktina (Román i sur., 2002.; Twiner i sur., 2005.; Twiner i sur., 2012.a), utječu na koncentraciju cikličkog adenozin



monofosfata i  $\text{Ca}^{2+}$  iona u citosolu, homeostazu protona (Román i sur., 2002.; Alfonso i sur., 2006.), te izazivaju hiperpolarizaciju neuronske membrane (Vale i sur., 2010.). Inhibiraju hERG (engl. *the human Ether-à-go-go Related Gene*), specifične kalijeve naponsko ovisne kanale važne za provodljivost impulsa u srcu (Twiner i sur., 2012.b). Svi analozi nemaju jednake učinke na navedene mehanizme, što Alfonso i sur. (2006.) objašnjavaju razlikama u strukturi.

Konзумiranje plodova mora kontaminiranih azaspiracidima uzrokuje sindrom AZP. Unutar nekoliko sati od konzumacije javljaju se gastrointestinalni simptomi i to mučnina, povraćanje, grčevi i proljev, koji u potpunosti nestaju nakon 2-3 dana (McMahon i Silke, 1996.). Nakon oralne aplikacije glodavcima, uočena su oštećenja organa probavnog trakta – crijevnog epitela, *lamina propria* i crijevnih resica (Ito i sur., 2002.). Nakon intraperitonealne aplikacije, javljaju se neurološki simptomi, uključujući tromost, poteškoće s disanjem, grčeve, paralizu i smrt unutar 90 minuta (Twiner i sur., 2008.). Ne postoje podaci o mutagenosti i genotoksičnosti, dok istraživanja o tumorskom potencijalu ove skupine toksina nisu potvrdila njihovu karcinogenost i tumorogenost (Hess i sur., 2016.). Temeljem podataka o akutnim letalnim dozama analoga AZA1 do AZA5 nakon intraperitonealne aplikacije miševima, utvrđene su vrijednosti TEF za AZA1 = 1; AZA2 = 1,8; AZA3 = 1,4 (EFSA, 2008.b).

Osim u Europi (Magdalena i sur. 2003.b; EFSA, 2008.b; Blanco i sur., 2017.), azaspiracidi su detektirani u sjevernoj i južnoj Americi (Twiner i sur., 2008.; López-Rivera i sur., 2010.), Africi (Taleb i sur., 2006.), Japanu (Ueoka i sur., 2009.) i Kini (Yao i sur., 2010.). U Jadranskom moru pojavljuju se rijetko i u niskim koncentracijama. Prvi put su detektirani u školjkašima na području sjevernog dijela srednjeg Jadrana 2012. god. (Bacchiocchi i sur., 2015.), a u školjkašima podrijetlom iz južnog Jadrana detektirani su 2017. god. (Talić i sur., 2020.).

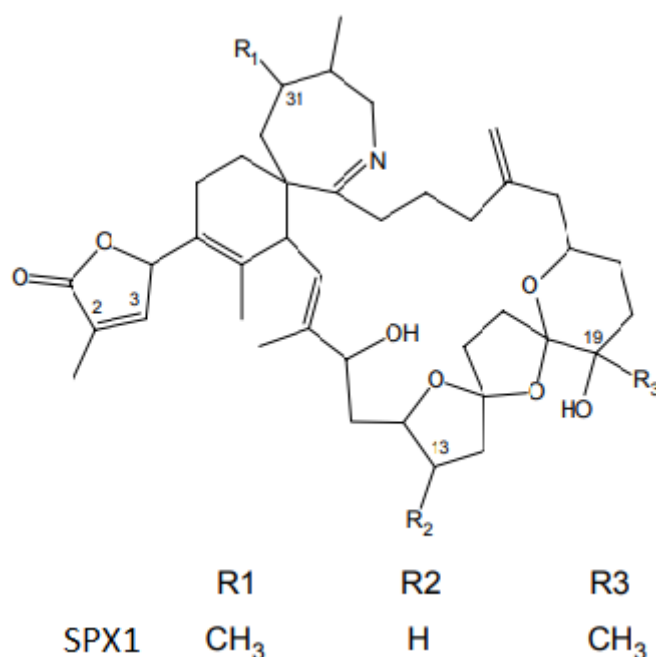
### 2.2.14. Ciklički imini

Ciklički imini su skupina lipofilnih fiktoksina za koju je karakteristično da sadrže spiro-spoj eterskih dijelova molekule te imino-skupinu za koju se smatra da je odgovorna za njihovu akutnu neurotoksičnost. U CI spadaju spiroolidi (SPX), gimnodimini (GYM), pinatoksini (PnTX) i pteriatoksini (PtTX), te prorocentrolidi i spiro-prorocentrimini (Cembella i Krock, 2008.). Struktura im je sačinjena od makrocikličkog kostura koji se sastoji od 14 do 27 ugljikovih atoma, te posjeduju dva karakteristična dijela molekule - ciklički imin i spiroketalni sustav prstena (Molgó i sur., 2017.). Osim zbog strukturne sličnosti, svrstani su u istu skupinu na temelju akutne neurotoksičnosti. Nakon intraperitonealne aplikacije uzrokuju smrt pokusnih miševa u vrlo kratkom roku (EFSA, 2010.). Otkriveni su među posljednjima i iako nisu zabilježeni slučajevi trovanja ovim fiktoksinima, ne postoji dovoljno podataka na temelju

kojih bi se utvrdio rizik za potrošače (EFSA, 2010.; Cembella i Krock, 2008.). Detaljnije će biti opisane podskupine CI koje su predmet ovog istraživanja.

### 2.2.15. Spirolidi

Spirolidi (SPX) predstavljaju najveću i najistraženiju podskupinu CI. Do sada je poznato 16 analoga koji se prema strukturi mogu grupirati u četiri podskupine, a međusobno se razlikuju po strukturi spiroimina, spiroketalnih prstena, broju metilnih i hidroksilnih skupina i zasićenosti na položaju 2,3 laktonskog prstena. Prvu skupinu spiroolida čine SPX A-D i njihovi dezmetil analozi čije molekule sadrže karakteristični 6-5-5 spiroketalni sustav prstena (Molgó i sur., 2016.). Ovoj skupini pripada i 13-dezmetil spiroolid C (SPX1) (**Slika 7**), koji se u odnosu na ostale analoge u školjkašima pojavljuje najčešće i u najvećim koncentracijama (EFSA, 2010.), te je uz SPX C i 20-metil SPX G najtoksičniji nakon intraperitonealne aplikacije pokusnim životinjama (Munday, 2008.b). Drugu skupinu čine biološki inaktivni SPX E i F koji umjesto cikličkog imina sadrže aciklički aminoketon. U trećoj skupini su SPX G i 20-metil SPX G sa 6,6,5 spiroketalnim prstenom, dok četvrtu čine SPX H i I koji su strukturno identični SPX C i D, osim što imaju 6,5 spiroketalni prsten (Molgó i sur., 2016.). Svi spiroolidi topljivi su u metanolu i kloroformu (Cembella i Krock, 2008.).



**Slika 7** Kemijska struktura 13-dezmetil spiroolida C (modificirano iz Cembella i Krock, 2008.)

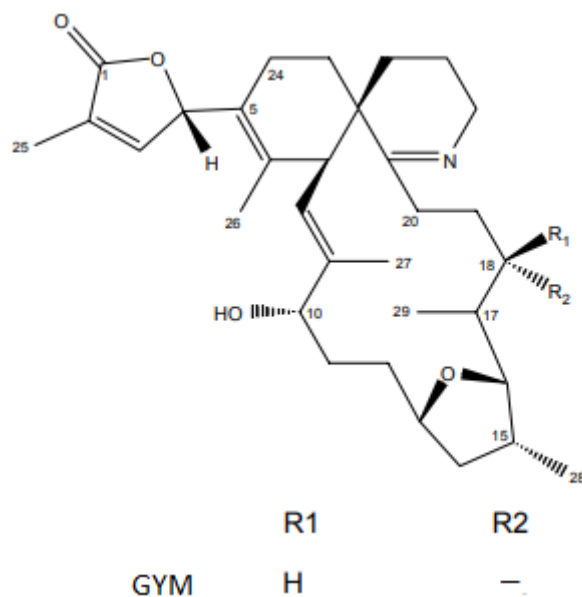
Spirolidi su metaboliti globalno rasprostranjenih dinoflagelata *Alexandrium* vrsta (*Alexandrium ostenfeldii* i *Alexandrium peruvianum*) (Molgó i sur., 2014). Školjkaši su otporni na značajniji toksični učinak spiroolida te ih mogu nakupljati u velikim količinama u svom tkivu.

Nakon kontaminacije, većina toksina zadržava se u njihovim probavnim žlijezdama (Medhioub i sur., 2012.). Školjkaši su sposobni transformirati spirolide u netoksične molekule hidroliziranjem spiroimina, međutim, tu postoji razlika među analozima – oni koji sadrže dvije metilne skupine u spiroiminu kemijski su otporniji (Hu i sur., 2001.). Također, podložni su i esterifikaciji u školjkašima (Aasen i sur., 2006.).

Nakon pojave i identifikacije u Kanadi 1990.-tih godina u dagnjama (*M. edulis*) i kopicama (*P. magellanicus*), spirolidi su se proširili po cijelom svijetu (Cembella i Krock, 2008.). Identificirani su u mnogim vrstama školjkaša ili gore navedenim dinoflagelatima u Južnoj Americi (Guinder i sur., 2018.), Novom Zelandu (Otero i sur., 2020.), Japanu (Hu i sur., 1995.), Danskoj (MacKinnon i sur., 2006.), Norveškoj (Aasen i sur., 2005.), Španjolskoj (Otero i sur., 2019.), Francuskoj (Amzil i sur., 2007.) i Italiji (Ciminiello i sur., 2010.b). U Jadranskom moru prva pojava spirolida zabilježena je 2003. god. u školjkašima prikupljenima na području sjevero-zapadnog Jadrana (Ciminiello i sur., 2010.a) i od tada se sporadično pojavljuju u školjkašima u niskim koncentracijama (Pistocchi i sur., 2012.; Ujević i sur., 2019.; Kvirgić i sur., 2021.). U hrvatskom dijelu Jadrana, prvi put su detektirani 2006. god. u školjkašima izlovljenima na području zapadne obale Istre (Ninčević Gladan i sur., 2011.).

### 2.2.16. Gimnodimini

Gimnodimine proizvode dinoflagelati *Karenia selliformis* (Miles i sur., 2000.) i pojedini sojevi *Alexandrium ostenfeldii* (Martens i sur., 2017.) i *Alexandrium peruvianum* (Van Wagoner i sur., 2011.) koji proizvode i spirolide. Prvi put su izolirani iz kamenica *Tiostrea chilensis* (gimnodimin A) podrijetlom iz tjesnaca Foveaux u Novom Zelandu (Seki i sur., 1995.). Strukturno su vrlo slični spirolidima (Zurhelle i sur., 2018.). Gimnodimini su šesteročlani ciklički imini bez metilnih skupina u iminskom prstenu, s nezasićenim laktonom i tetrahidrofuranskim prstenom (**Slika 8**). Do sada je identificirana struktura osam analoga (Zurhelle i sur., 2018.).



**Slika 8** Kemijska struktura gimnodimina (modificirano iz Cembella i Krock, 2008.)

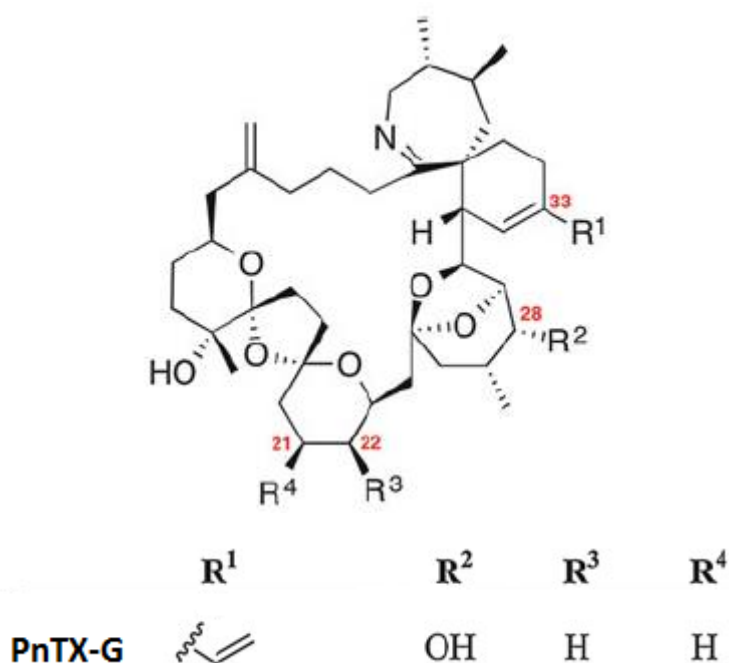
U školjkašima se dugo zadržavaju nakon kontaminacije toksičnim vrstama dinoflagelata (MacKenzie i sur., 2002.), a kao i spiroolidi, podložni su esterifikaciji (de la Iglesia i sur., 2013.). Od svih CI, gimnodimini su najmanje toksični, neovisno o načinu ulaska u organizam, a u ovoj podskupini GYM A je najtoksičniji (Molgó i sur., 2014.). Gimnodimini iskazuju ihtiotoksično djelovanje (Seki i sur., 1995.), dok GYM osim što doprinosi smanjivanju broja neurona, čini ih osjetljivijima na apoptotičko djelovanje OA, koju također proizvodi dinoflagelat *Karenia selliformis* (Dragunow i sur., 2005.).

Osim u Novom Zelandu, gimnodimini su pronađeni diljem svijeta u mnogim vrstama školjkaša i to u dagnjama, kamenicama, kopicama, kućicama, morskim puževima, priljepcima i endemičnim školjkašima u Novom Zelandu i Australiji, Tunisu, Južnoj Africi, Kini i Mediteranskom moru (Biré i sur., 2002.; Takahashi i sur., 2007.; Krock i sur., 2009.b; Wu i sur., 2015.; Farabegolli i sur., 2018.; Hassoun i sur., 2021.). U školjkašima podrijetlom iz hrvatskog dijela sjevernog Jadrana, gimnodimini su prvi put detektirani 2006. god. (Ninčević Gladan i sur., 2011.). U tom, te u ostalim dijelovima Jadrana pojavljivali su se u školjkašima u niskim koncentracijama (Ujević i sur., 2014.; Ujević i sur., 2019.; Kvrgić i sur., 2021.).

### 2.2.17. Pinatoksini

Pinatoksini (PnTX) su prvi put izolirani iz školjkaša *Pinna muricata* u Japanu (Uemura i sur., 1995.). Dinoflagelat koji proizvodi pinatoksine otkriven je 2010. god. u Novom Zelandu (Rhodes i sur., 2010.), te je kasnije identificiran kao *Vulcanodinium rugosum* (Nézan i Chomérat, 2011.). Do sada je identificirano osam analoga (PnTX A-H). Struktura PnTX vrlo je slična strukturi spirovida. Molekula PnTX sadrži sedmeročlani ciklički imin s dva metilna

supstituenta, 6,5,6 spiroketalni prsten i biciklički eter u makroprstenu. Supstituent na C33 može biti karboksil (PnTX-A), vinil (PnTX-G, PnTX-H), glicinil (PnTX-B i PnTX-C), butirolakton (PnTX-F), ketobutirična kiselina (PnTX-D) i hidroksibutirična kiselina (PnTX-E). Analizi se razlikuju i po supstituentima na polazajima C21, C22, C28 (hidroksilna ili metilna skupina) (Molgó i sur., 2016.). **Slika 9** prikazuje kemijsku strukturu PnTX-G. Pretpostavlja se da su PnTX-G i F prekursori od kojih metaboličkim i hidrolitičkim transformacijama u školjkašima nastaju ostali analozi. Od ostalih CI, PnTX se razlikuju po izrazitoj kemijskoj stabilnosti pri niskoj pH vrijednosti (Selwood i sur., 2010.).



**Slika 9** Kemijska struktura PnTX (modificirano iz Molgó i sur., 2016.)

Pinatoksini su detektirani u manjim koncentracijama u raznim vrstama školjkaša, poput dagnji, kamenica i koritnica, i to u mnogim morima. Osim u Japanu i Novom Zelandu, gdje su i otkriveni (Uemura i sur., 1995.; Rhodes i sur., 2010.), pojavljuju se u Australiji (Rhodes i sur., 2011.), Kanadi (McCarron i sur., 2012.), Europi (Miles i sur., 2010.; Hess i sur., 2013.; García-Altare i sur., 2014.; McCarthy i sur., 2015.) i Jadranskom moru (Rambla-Alegre i sur., 2018.; Kvirgić i sur., 2021.). Moguće je da je jedan od razloga njihove globalne rasprostranjenosti sposobnost preživljavanja *V. rugosum*, kao i mnogih drugih vrsta mikroalgi, u balastnim vodama brodova koji ih mogu transportirati u različita područja (Garrett i sur., 2014.).

### 2.2.18. Toksično djelovanje cikličkih imina

CI spadaju u skupinu brzodjelujućih neurotoksina budući da simptomi nastaju naglo po njihovoj izloženosti, a smrt nastupa unutar nekoliko minuta od intraperitonealne aplikacije

pokusnim životinjama. Nakon oralne aplikacije simptomi se javljaju nešto kasnije, no za ovu skupinu fiktoksina karakteristično je da ili izazivaju smrt pokusnih životinja, ili se one u potpunosti oporave bez dugoročnih posljedica. Svi CI izazivaju iste simptome, neovisno o načinu ulaska u organizam (Molgó i sur., 2014.). Neurološki simptomi uključuju hiperaktivnost, nakostriješenost dlake, hiperekstenziju leđa, ukrućivanje i izvijanje repa prema glavi, paralizu stražnjih nogu, drhtanje, poteškoće s disanjem i prestanak disanja (Munday i sur., 2004.; Kharrat i sur., 2008.; Selwood i sur., 2010.; Munday i sur., 2012.a; Otero i sur., 2012.; Munday i sur., 2012.b; Molgó i sur., 2016.; Sosa i sur., 2020.). Sistemska toksičnost u pokusnih miševa nakon oralne aplikacije ukazuje na to da se spirolidi resorbiraju iz probavnog trakta sisavaca. Dokazano je njihovo prisustvo u krvi, urinu i stolici unutar jednog sata od aplikacije, ali i brza eliminacija iz organizma (Otero i sur., 2012.).

Mehanizam djelovanja CI je inhibicija različitih podtipova nikotinskih acetilkolin receptora (nAChR) u centralnom i perifernom živčanom sustavu. Acetilkolin (ACh) je endogeni agonist navedenih receptora i posrednik prijenosa podražaja u sinapsama. CI se kao antagonisti ACh vežu na  $\alpha$  podjedinicu receptora, pri čemu ključnu ulogu ima šestero ili sedmeročlani ciklički imin. Na afinitet vezivanja utječu rezidue aminokiselina ostalih podjedinica receptora, ali i broj i položaj metilnih skupina u analozima (Molgó i sur., 2014.; Molgó i sur., 2016.). Vežu se i na muskarinske receptore (mAChR), no s manjim afinitetom u odnosu na nAChR (Molgó i sur., 2014.). Afinitet vezivanja razlikuje se među analozima podskupina CI, npr. vezanje SPX1, 13,19-didezmetil SPX C i 20-metil SPX G na receptore je izrazito dugotrajno (Bourne i sur., 2010.), za razliku od vezanja GYM i PnTX A čiji je antagonizam za nAChR kratkotrajan, a iz čega proizlaze i razlike u toksičnosti među analozima (Molgó i sur., 2017.).

Toksičnost CI nakon oralne aplikacije značajno je manja u odnosu na toksičnost nakon i.p. aplikacije, osim za PnTX. Oralna toksičnost analoga PnTX-F, G i H je samo 1,6 do 9,3 puta manja od i.p. toksičnosti (Richard i sur., 2001.; Molgó i sur., 2016.). Prema podacima istraživanja, nakon i.p. aplikacije pokusnim miševima najtoksičniji CI su SPX1, SPX C, 20-metil SPX G i PnTX-F (Selwood i sur., 2010.; Munday i sur., 2012.a; Munday i sur., 2012.b).

Dosad nije zabilježen niti jedan slučaj trovanja toksinima ove skupine, no nema dovoljno toksikoloških podataka koji bi dokazali da nisu toksični za ljude (Molgó i sur., 2014.), naročito zbog istraživanja koja ukazuju da imaju jednak toksični učinak na AChR koji potječu od različitih vrsta (Molgó i sur., 2016.). Budući se resorbiraju iz probavnog trakta sisavaca, njihovo toksično djelovanje u organizmu je moguće (Otero i sur., 2012.). Za PnTX je dokazano da osim instestinalne, prolaze krvno-moždanu i placentarnu barijeru (Servent i sur., 2021.). Iako nisu potvrđeni slučajevi trovanja ljudi, zabilježena je navodna pojava želučanih tegoba i tahikardije u potrošača nakon konzumacije školjkaša kontaminiranih CI u

Kanadi (Richard i sur., 2001.), te dermatitisa kod kupača izloženih dinoflagelatu *V. rugosum* na Kubi (Moreira-González i sur., 2021.).

### 2.3. METODE ODREĐIVANJA FIKOTOKSINA

Nakupljanje fikotoksina u plodovima mora može prouzročiti velike ekonomske gubitke zbog zatvaranja uzgajališta školjkaša, a što je još značajnije, moguće je trovanje potrošača koje može završiti i letalnim ishodom. Da bi se osigurala njihova sigurnost, zakonodavstvom su utvrđene NDK pojedinih skupina fikotoksina u školjkašima, kao i analitičke metode (referentne metode) za njihovu detekciju i kvantifikaciju (Rodríguez i sur., 2017.). Osim referentnih, postoji niz drugih metoda kojima se mogu detektirati ili kvantificirati fikotoksini. Ovisno o karakteristikama, mogu biti potvrdne metode kojima se pojedini fikotoksini detektiraju i precizno kvantificiraju, a mogu biti i brze metode probira ili one koje će omogućiti otkrivanje još nepoznatih fikotoksina. Općenito se dijele na ne-analitičke i analitičke metode (Louzao i sur., 2022.).

Prva ne-analitička metoda primijenjena u ovom području u svrhu ispitivanja sigurnosti hrane bila je *in vivo* proba iz 18. stoljeća, kada su se životinjama na brodu davali mali komadići riba ili školjkaša prije nego što su ih konzumirali članovi posade (Louzao i sur., 2022.). Prva formalna metoda detekcije i kvantifikacije fikotoksina je biološki pokus na miševima koji se bazira na i.p. aplikaciji ekstrakta školjkaša i promatranja uginuća životinje, kao i vremena proteklog od aplikacije do uginuća (Gerssen i Klijnstra, 2017.). Mnogo godina ova metoda bila je referentna za određivanje pojedinih skupina fikotoksina (DSP, PSP), no zbog tehničkih i etičkih razloga zamijenjena je drugim ne-analitičkim i analitičkim metodama. Međutim, još uvijek je korisna u ispitivanju novih, nepoznatih fikotoksina. Ne-analitičke metode koje mjere interakciju molekule toksina sa specifičnim proteinima su npr. imunološki ELISA test (engl. *enzyme linked immunosorbent assay*) (Garthwaite i sur., 2001.) kao i LFIA test (engl. *lateral flow immunoassays*) (Anfossi i sur., 2013.). Imunološki testovi su jednostavni za primjenu, ali nedostatak im je nespecifičnost. Razvijeni su i testovi na kulturama stanica od kojih je najupotrebljavaniji test održivosti koji se temelji na brojanju zdravih stanica izloženih uzorku nakon određenog razdoblja inkubacije. U ovu skupinu spadaju i elektrofiziološki test i fluorimetrijsko određivanje promjene membranskog potencijala. Nedostatak ovih metoda je nespecifičnost i nepraktičnost (Ledreux i sur., 2012.; Manger i sur., 2014.; Louzao i sur., 2022.).

Za razliku od prethodno navedenih, analitičke metode su osjetljive, precizne i omogućuju identifikaciju i kvantifikaciju pojedinačnih analoga ukoliko su za njih dostupni analitički standardi. Većina njih se temelji na separaciji analita tekućinskom kromatografijom, te

detekcijom nekim od detektora – spektrometrom masa, fluorescencijskim (FLD) ili detektorom apsorbancije svjetlosti u ultraljubičastom i vidljivom području (UV/VIS). Najčešće se koriste tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC, engl. *High Performance Liquid Chromatography*) i tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (UHPLC, engl. *Ultra-High Performance Liquid Chromatography*) na obrnutim fazama (stacionarna faza je nepolarna, mobilna faza je polarna). Prve validirane analitičke metode za analizu fiktoksina bile su HPLC-UV metoda za detekciju DA i HPLC-FLD metoda s prekromatskom oksidacijom za detekciju skupine PST (Louzao i sur., 2022.). U rutinskim analizama lipofilnih toksina najveću primjenu ima tekućinska kromatografija u sprezi sa spektrometrijom masa (LC-MS/MS) primjenom trostrukog kvadrupolnog analizatora masa (QqQ), koji omogućuje praćenje višestrukih reakcija (engl. *Multiple Reaction Monitoring* - MRM) tj. istovremeno praćenje više tranzicija iona (Louzao i sur., 2022.). Ova tehnika se sve više upotrebljava i u analizi hidrofilnih fiktoksina (EURLMB, 2010.; Thomas i sur., 2017.; Rodríguez i sur., 2018.). Za razliku od navedenih ciljanih analitičkih metoda, masena spektrometrija visoke rezolucije (HRMS) primjenjuje se u identifikaciji i karakterizaciji novootkrivenih fiktoksina, budući da omogućava analitičke podatke potrebne za identifikaciju nepoznatih molekula (Zendong i sur., 2015.).

Nedostatak kromatografskih metoda u odnosu na biološke metode je to što su ciljane i što zahtijevaju analitičke standarde za svaki analog koji se kvantificira. Za mnoge analoge nije utvrđena vrijednost TEF te se neovisno o kvantifikaciji ne može odrediti njihova toksičnost. Jedan od većih nedostataka, naročito metoda sa spektrometrijom masa, je utjecaj matriksa na kvantifikaciju analita, koji može biti vrlo specifičan za svaki analog (Botana, 2014.).

Neovisno kojoj skupini metoda pripada, neophodno je dokazati prikladnost za identifikaciju i kvantifikaciju fiktoksina koji se ispituje (Rodríguez i sur., 2017.). Provođenjem validacijske studije i određivanjem validacijskih parametara poput granice detekcije (LOD), granice kvantifikacije (LOQ), linearnosti, iskorištenja i preciznosti procjenjuje se prikladnost metoda za kvalitativno i kvantitativno određivanje analita u različitim matriksima. Budući da metode za određivanje fiktoksina zakonodavstvom nije propisan način provođenja validacije, kao ni uvjeti prihvatljivosti, validaciju je moguće provesti u skladu s Odlukom Komisije od 12. kolovoza 2002. o primjeni Direktive Vijeća 96/23/EZ o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata (2002/657/EZ) (EU, 2002.).

### 2.4. PROCJENA IZLOŽENOSTI

Procjena izloženosti je uz identifikaciju i karakterizaciju opasnosti odnosno rizika, neophodan element u kvantifikaciji rizika (WHO, 2009.). Identifikacija opasnosti odnosi se na



prepoznavanje vrste i prirode štetnog učinka biološkog, kemijskog ili fizikalnog čimbenika na organizam, sustav ili (pod)populaciju. Karakterizacija opasnosti odnosi se na razmatranje prirode, relevantnosti i mehanizma djelovanja štetnog čimbenika, uključujući kvantitativnu procjenu doza-odgovor učinka. Doza-odgovor pokusima na životinjama moguće je utvrditi razinu bez uočenog štetnog učinka (engl. *No Observable Adverse Effect Level* – NOAEL) te najveću ispitivanu dozu pri kojoj nije uočen štetni učinak. Vrijednost NOAEL može se ekstrapolirati primjenom sigurnosnog faktora na utvrđenu vrijednost najmanje razine pri kojoj će vjerovatno biti uočen štetni učinak (engl. *Lowest Observed Adverse Effect Level* - LOAEL). Veličina sigurnosnog faktora ovisi o podacima na temelju kojih je LOAEL procijenjen. Ukoliko je procijenjen temeljem podataka o toksičnim učincima na ljude, uzimajući u obzir individualne razlike, faktor uobičajeno ima vrijednost 10. Ako se NOAEL izvodi temeljem eksperimentalnih podataka na pokusnim životinjama, ovisno o prirodi i težini štetnog učinka te ostalim nesigurnostima, sigurnosni faktor iznosi 100 ili 1000. Pomoću parametra NOAEL mogu se utvrditi akutna referentna doza (engl. *Acute Reference Dose* - ARfD) i podnošljivi dnevni unos (engl. *Tolerable Daily Intake* – TDI). ARfD predstavlja količinu tvari koja se može unijeti hranom u jednom danu ili jednom obroku bez štetnih posljedica i štiti od trenutnog štetnog učinka, za razliku od TDI koji je definiran kao količina kontaminanta koji se može svakodnevno tijekom života unositi hranom, bez mjerljivog štetnog učinka, te štiti od kroničnog učinka (FAO, 2011.).

Komisija *Codex Alimentarius* (CAC) definira procjenu izloženosti kao kvalitativnu i/ili kvantitativnu vjerojatnost unosa biološkog, kemijskog ili fizikalnog čimbenika putem hrane i ostalih relevantnih izvora. Procjena unosa (procjena prehrambene izloženosti) objedinjuje podatke o unosu hrane i koncentracije navedenih čimbenika u hrani. Procijenjeni unos se može usporediti sa toksikološki referentnim vrijednostima kao dio karakterizacije rizika. Procjena se može odnositi na akutnu (do 24 sata) i dugoročnu, odnosno kroničnu izloženost (svakodnevna izloženost tijekom života) (WHO, 2009.).

Karakterizacija rizika objedinjuje identifikaciju i karakterizaciju opasnosti te procjenu izloženosti, s ciljem utvrđivanja stupnja rizika od štetnosti nekog kontaminanta, kao i procjene razine koja neće izazvati štetan učinak (Munday, 2013.).

Zbog mogućeg akutnog štetnog učinka fiktoksina na zdravlje, s ciljem zaštite potrošača zakonodavstvom su određeni program praćenja kao i najveće dopuštene količine fiktoksina u školjkašima, bodljikašima, plaštenjacima i morskim puževima (EZ 853/2004; EU 786/2013). Ujedno, neki od novo otkrivenih, poput Cl, nisu uključeni u programe monitoringa, niti je za njih zakonodavstvom određena NDK. Iako za YTX i PTX nema dokaza da uzrokuju toksične učinke kod ljudi, zakonodavstvom su određene NDK za YTX, dok je Europska Komisija Uredbom 2021/1374 uputila na brisanje do tada važećih NDK za PTX (EU, 2021.), temeljem

mišljenja EFSA (2009.c) o pogrešnom zajedničkom grupiranju sa okadaičnom skupinom u analitičkom i toksikološkom smislu. PTX imaju različit mehanizam djelovanja i nisu zabilježeni slučajevi trovanja ljudi ovom skupinom toksina.

Za pojedine skupine fiktoksina ARfD utvrđene su temeljem toksikoloških podataka prikupljenih nakon slučajeva trovanja ljudi. Za ostale, ARfD utvrđene su uglavnom temeljem podataka o akutnoj toksičnosti u pokusnih životinja. Temeljem podataka o akutnom toksičnom djelovanju DA prikupljenim tijekom trovanja ljudi, CONTAM panel utvrdio je LOAEL vrijednost koja je korigirana sigurnosnim faktorom 3, te faktorom 10 zbog individualnih razlika među ljudima da bi se odredila ARfD (odnosi se na sumu DA i *epi*-DA) (EFSA, 2009.a). Za skupinu AZA, LOAEL je utvrđen temeljem podataka jedinog slučaja trovanja ljudi. Primijenjen je sigurnosni faktor 3 zbog blagog i reverzibilnog toksičnog učinka, a uobičajeni faktor 10 uslijed individualnih razlika nije primijenjen zbog toga što je do trovanja došlo među osjetljivim pojedincima, no zbog malog broja osoba (nedostatni toksikološki podaci) primijenjen je dodatni faktor 3 (EFSA, 2008.b). Toksikološki podaci na osnovu kojih je određena ARfD za okadaičnu skupinu prikupljeni su tijekom slučajeva trovanja velikog broja ljudi iz različitih zemalja, te se pretpostavljalo da uključuju i osjetljive pojedince. Stoga je za utvrđivanje NOAEL i ARfD primijenjen samo sigurnosni faktor 3 (EFSA, 2008.a). Za PST također je temeljem podatka prikupljenih tijekom brojnih slučajeva intoksikacija ljudi utvrđen NOAEL primjenom sigurnosnog faktora 3, i jednak je ARfD (EFSA, 2009.b).

U slučaju PTX, ARfD utvrđena je na osnovu LOAEL dobivenog ispitivanjem akutne intestinalne toksičnosti na miševima. Zbog reverzibilnih i blagih toksičnih učinaka, primijenjen je ukupni sigurnosni faktor 300 (EFSA, 2009.c). S obzirom da nema podataka o toksičnim učincima YTX na ljude, ARfD je kao i u slučaju pektenotoksina, utvrđena temeljem podataka o akutnoj oralnoj toksičnosti u miševa. Uz eksperimentalno utvrđen NOAEL, primijenjen je ukupni sigurnosni faktor 200 (EFSA, 2009.d).

CONTAM panel zaključio je da se pri procjeni rizika treba koristiti veličina porcije od 400 g mesa školjkaša, da bi se zaštitio dio potrošača koji konzumira velike porcije (EFSA, 2009.e). Budući da ne postoje podaci o kroničnom učinku navedenih skupina fiktoksina, CONTAM panel nije mogao utvrditi TDI (EFSA, 2008.a, 2008.b, 2009.a, 2009.b, 2009.c, 2009.d).

**Tablica 2** prikazuje NDK zakonodavstvom reguliranih skupina fiktoksina, kao i utvrđene LOAEL, NOAEL i ARfD vrijednosti.

**Tablica 2** NDK zakonodavstvom reguliranih fiktoksina i vrijednosti dobivene karakterizacijom opasnosti (EFSA, 2008.a; 2008.b; 2009.a; 2009.b; 2009.c; 2009.d; EZ 853/2004; EU 786/2013).

Skupina	NDK	LOAEL	NOAEL	ARfD
---------	-----	-------	-------	------

## 2. Teorijski dio

fikotoksina				
DA	20 mgkg <sup>-1</sup>	0,9 mgkg <sup>-1</sup> t.m.	0,3 mgkg <sup>-1</sup> t.m.	30 µgkg <sup>-1</sup> t.m.
AZA	160 µg AZA ekv.kg <sup>-1</sup>	1,9 µg AZA ekv.kg <sup>-1</sup> t.m.	0,6 µg AZA ekv.kg <sup>-1</sup> t.m.	0,2 µg AZA ekv.kg <sup>-1</sup> t.m.
OA	160 µg OA ekv.kg <sup>-1</sup>	0,8 µg OA ekv.kg <sup>-1</sup> t.m.	0,3 µg OA ekv.kg <sup>-1</sup> t.m.	0,3 µg OA ekv.kg <sup>-1</sup> t.m.
PTX	n.p.	250 µg PTX2 ekv.kg <sup>-1</sup> t.m.	83 µg PTX2 ekv.kg <sup>-1</sup> t.m.	0,8 µg PTX2 ekv.kg <sup>-1</sup> t.m.
YTX	3,75 mg YTX ekv.kg <sup>-1</sup>	7,5 mg YTX ekv.kg <sup>-1</sup> t.m.	5,0 mg YTX ekv.kg <sup>-1</sup> t.m.	25,0 µg YTX ekv.kg <sup>-1</sup> t.m.
PST	800 µg STX ekv.kg <sup>-1</sup>	1,5 µg STX ekv.kg <sup>-1</sup> t.m.	0,5 µg STX ekv.kg <sup>-1</sup> t.m.	0,5 µg STX ekv.kg <sup>-1</sup> t.m.

n.p. nije primjenjivo

Za skupinu CI ne postoji dovoljno toksikoloških podataka na temelju kojih bi se mogla odrediti ARfD i provesti procjena rizika za potrošače. Prema mišljenju EFSA, ukoliko bi bilo moguće, procjena rizika trebala bi se provesti zasebno za svaku podskupinu CI. Za skupinu CI nisu utvrđene NDK, međutim Europski referentni laboratorij za morske biotoksine predložio je za spirolide najveću preporučenu količinu od 400 µgkg<sup>-1</sup> (EFSA, 2010.).

Ne postoji način da se spriječi nakupljanje fikotoksina u školjkašima, niti da ih se ukloni nakon njihova izlova. U svakoj skupini postoji mogo analoga, dok se analitičkim metodama određuje samo manji dio. Ujedno, s vremenom se otkrivaju i novi analozi. Neki od fikotoksina su u školjkašima i predatorima podložni biotransformaciji, pri čemu nastaju nove, potencijalno opasne molekule. U cilju što učinkovitije procjene rizika potrebno je znati doprinos svakog analoga ukupnoj toksičnosti, međutim, TEF je određen samo za dio analoga. Također je u školjkašima moguće istovremeno nakupljanje fikotoksina iz različitih skupina, te je potrebno uzeti u obzir utjecaj jedne skupine na toksičnost druge (Munday, 2013.). Stoga je procjena rizika koji fikotoksini predstavljaju izuzetno teška i složena.

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. ZADATAK

Zadatak ovog istraživanja bio je:

1. Validirati i procijeniti prikladnost instrumentalnih analitičkih metoda za određivanje hidrofилnih i lipofilnih fiktoksina u školjkašima (dagnjama, kamenicama, kopicama) i mješčičnicama:
  - LC-MS/MS metode za određivanje DA primjenom alternativnog postupka za određivanje niskih koncentracija (Beach i sur., 2015.);
  - LC metode za određivanje PST primjenom pretkromatske oksidacije i fluorescencijske detekcije (AOAC, 2005.);
  - LC-MS/MS metode za određivanje LT uključujući CI primjenom SOP EURLMB (EURLMB, 2015.).
2. Ispitati pojavnost i kumulaciju DA, PST i LT u dagnjama (n = 416), kamenicama (n = 104), kopicama (n = 52) i mješčičnicama (n = 104) prikupljenim u razdoblju od travnja 2018. do ožujka 2019. god. iz osam uzgojnih (L1-L8) i jednog izlovnog područja (L9) smještenih u akvatoriju istarskog poluotoka, dinamikom prikupljanja jednom tjedno.
  - Ispitati profil fiktoksina u školjkašima i mješčičnicama (koji analozi su prisutni i u kojim koncentracijama);
  - Utvrditi prisutnost i udio esterificiranih oblika fiktoksina okadaične skupine u školjkašima i mješčičnicama;
  - U školjkašima i mješčičnicama utvrditi ukupnu toksičnost prisutnih analoga pojedine skupine s obzirom na TEF;
  - Ispitati supojavnost hidrofилnih i lipofilnih fiktoksina u školjkašima i mješčičnicama;
  - Ispitati postoje li razlike u pojavnosti i kumulaciji DA, PST i LT među različitim vrstama;
  - Ispitati utjecaj sezona na pojavnost i kumulaciju DA, PST i LT u školjkašima i mješčičnicama;
  - Ispitati utjecaj lokaliteta na pojavnost i kumulaciju DA, PST i LT u školjkašima i mješčičnicama.
3. Temeljem podataka o prehrambenim navikama koje se odnose na konzumaciju školjkaša u RH prikupljenim od strane HAH tijekom 2011. i 2012. god., procijeniti

izloženost potrošača skupinama fiktoksinima za koje su utvrđene NDK Uredbama EZ 853/2004 i EU 786/2013:

- Procijeniti izloženost u slučaju konzumacije prosječne i najveće porcije u RH, te velike porcije od 400 g (EFSA, 2009.e) temeljem podataka o koncentracijama fiktoksina utvrđenim u ovom istraživanju u školjkašima i mješčincama, uzimajući u obzir prosječnu tjelesnu težinu konzumenata u RH;
- Procijeniti izloženost u slučaju konzumacije prosječne i najveće porcije u RH, te velike porcije od 400 g (EFSA, 2009.e) u slučaju koncentracija fiktoksina koje su jednake NDK, uzimajući u obzir prosječnu tjelesnu težinu konzumenata u RH;
- Izvršiti korekciju veličine porcije koja će se koristiti prilikom procjene izloženosti za LT, zbog gubitka vode i koncentriranja uslijed termičke obrade.

## 3.2. MATERIJAL I METODE

### 3.2.1. Uzorci

Istraživanje profila fiktoksina u plodovima mora iz akvatorija Istarskog poluotoka obuhvatilo je ekonomski značajne vrste školjkaša dagnje (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819) i kamenice (*Ostrea edulis* Linnaeus, 1758), manje značajnu vrstu - kapice (*Aequipecten opercularis*, Linnaeus, 1758), te manje poznate i iskorištavane vrste filtratorskih organizama - mješčincice (*Microcosmus* spp.) (**Slika 10**). Uzorci su prikupljeni neposredno od uzgajivača, nakon izlova školjkaša i mješčincica koji su bili namijenjeni tržištu. Prikupljeni su u razdoblju od travnja 2018. do kraja ožujka 2019. god., dinamikom jednom tjedno. Ukupno je analizirano 416 uzoraka dagnji, 104 uzorka kamenica, 52 uzorka kapica i 104 uzorka mješčincica, što ukupno čini 676 uzoraka.



**Slika 10** Dagnje (a), kamenice (b), kapice (c) i mješčičnice (d) (vlastita fotografija)

Dagnje uzgojene na vertikalnim linijama (pergolarima) (**Slika 11**) prikupljene su sa tri razine. Kamenice iz uzgojnih područja koje se uzgajaju ispod pontona i u košarama (**Slika 12**) prikupljene su sa različitih položaja u košari. Prirodno prisutne vrste školjkaša koje obitavaju na morskom dnu (kamenice i kapice) te mješčičnice u izlovnom području zapadne obale Istre (ZOI), izlovljene su horizontalnim povlačenjem alata drežda-rampon po morskom dnu.

### 3. Eksperimentalni dio

Na ovaj način dobiveni su reprezentativni uzorci koji su sadržavali najmanje 2 kg školjkaša ili mješćinica, pakiranih u mrežice i plastične vrećice, te su vozilima s rashladnim uređajima na temperaturi  $< 15\text{ }^{\circ}\text{C}$  u najkraćem roku dostavljeni na analizu.



**Slika 11** Uzgoj dagnji na pergolarima (vlastita fotografija)



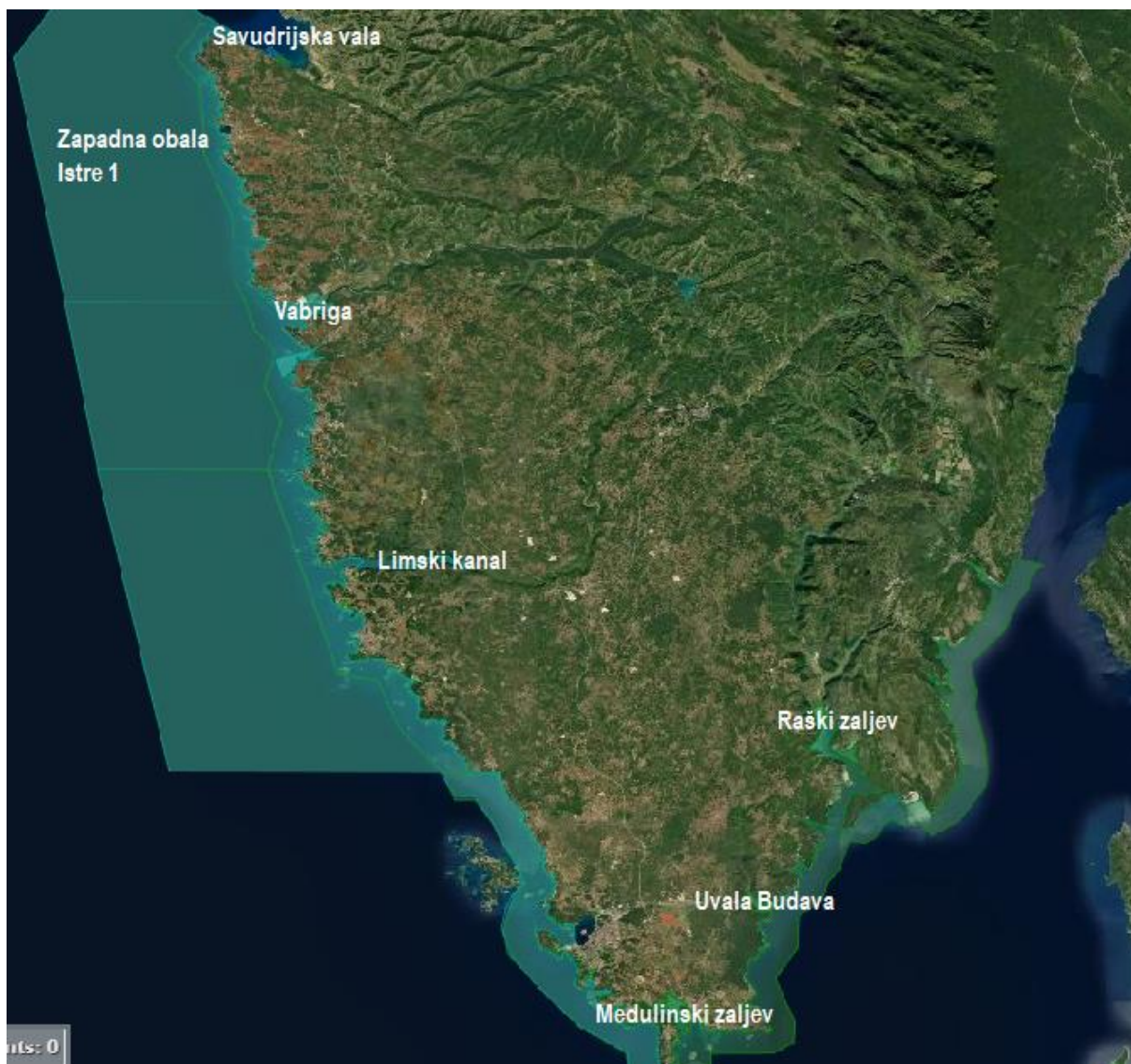
**Slika 12** Uzgoj kamenica u košarama (vlastita fotografija)



### **3.2.2. Geografsko područje i lokaliteti izlova plodova mora**

Uzorci su prikupljeni iz proizvodnih i izlovnih područja za uzgoj živih školjkaša koja se nalaze u akvatoriju istarskog poluotoka, smještenog na istočnoj obali sjevernog Jadrana. Sjeverni Jadran kao najsjeverniji dio Mediteranskog mora je poluzatvoreno, plitko područje najveće izmjerene dubine od 35 m i s najvećim riječnim dotocima u bazenu (Kraus i Supić, 2011.; Kraus i sur., 2019.). Rijeka Po, najveća talijanska rijeka, ima značajan utjecaj na raspodjelu nutrijeneta, produktivnost i cirkulaciju u istočnom dijelu sjevernog Jadrana, uz sjeveroistočni vjetar - buru. More u ovom području je uglavnom oligotrofno zbog utjecaja istočne mediteranske struje i oligotrofnih krških rijeka (Viličić i sur., 2009.).

Područja za uzgoj i izlov školjkaša iz kojih su uzorci prikupljeni smještena su duž istočne i zapadne obale Istre. Na istočnoj obali nalaze se uzgojna područja Raški zaljev i uvala Budava, dok su Savudrijska vala, Vabriga i Limski zaljev na zapadnoj obali poluotoka, kao i izlovno područje ZOI. Na južnom dijelu poluotoka nalazi se uzgojno područje Medulinski zaljev. Geografski položaj uzgojnih i izlovnih područja prikazani su na **Slici 13**. Iz navedenih područja uzorci su prikupljeni sa devet različitih lokaliteta, označenih simbolima L1 do L9. Vrsta i broj uzoraka prikupljenih s pojedinačnih lokaliteta prikazani su u **Tablici 3**.



**Slika 13** Geografski položaj uzgojnih i izlovnih područja smještenih u istarskom akvatoriju (<https://www.caps2.eu/caps2/>)

**Tablica 3** Broj i vrsta školjkaša prema lokacijama uzorkovanja

Lokalitet	Kategorizacija Područja	Prikupljena vrsta	Broj uzoraka
L1	Proizvodno	Dagnje	52
L2		Dagnje	52
L3		Dagnje	52
L4		Dagnje	52
		Kamenice	52
L5		Dagnje	52
L6		Dagnje	52
L7		Dagnje	52
L8		Dagnje	52
L9	Izlovno	Kamenice	52

		Kapice	52
		Mješčićnice	104

### 3.2.3. Reagensi i analitički standardi

U provedbi ispitivanja korištena su organska otapala LC-MS čistoće i reagensi najmanje čistoće za analizu (*pro analysi*) i/ili veće: acetonitril (ACN), n-heksan, mravlja kiselina, periodna kiselina, amonijev formijat, vodikov peroksid, dinatrijev hidrogenfosfat (Honeywell, Njemačka), metanol (MeOH) (Honeywell, Francuska), klorovodična kiselina (Honeywell, Austrija), natrijev hidroksid (Honeywell, Švedska), natrijev klorid (Honeywell, Danska), amonijev acetat (Honeywell, Nizozemska), ledena octena kiselina (J.T. Baker, Njemačka), dinatrijev tetraborat (Merck, Njemačka) i danzil klorid (Sigma-Aldrich, Švicarska). Za pripremu otopina korištena je ultračista voda (uređaj Millipore Direct -Q<sup>®</sup> 5 UV, Francuska). Za ekstrakciju na čvrstoj fazi (SPE) korištene su SAX (Resprep, SAD), Strata<sup>®</sup> C18-E i Strata<sup>®</sup> WCX (Phenomenex, SAD) kolone. Za filtriranje ekstrakata i uzoraka prije instrumentalne analize korišteni su filteri s najlonskom membranom, veličine pora 0,45 µm, promjera 25 mm (Restek, Kina), te filteri s politetrafluoretilen (PTFE) membranom, veličine pora 0,22 µm i promjera 13 mm (Restek, Kina).

Svi certificirani analitički standardi korišteni u ovom ispitivanju nabavljeni su od *National Research Council Canada – Conseil national de recherches Canada* (NRC-CNRC), osim certificiranog referentnog materijala (CRM) koji sadrži paralitičke toksine (PO PST CRM 1101), nabavljen od *Centre for Environment, Fisheries & Aquaculture Science* (Cefas), UK. Korišteni su analitički standardi: CRM-DA-g ( $331,9 \pm 8,0 \mu\text{molL}^{-1}$ ), CRM-STX-f ( $66,3 \pm 1,4 \mu\text{molL}^{-1}$ ), CRM-NEO-d ( $65,1 \pm 2,1 \mu\text{molL}^{-1}$ ), CRM-GTX1&4-c ( $80,0 \pm 2,2 \mu\text{molL}^{-1}$ ), CRM-GTX2&3-c ( $157,6 \pm 7,7 \mu\text{molL}^{-1}$ ), CRM-dcSTX-b ( $65,0 \pm 1,8 \mu\text{molL}^{-1}$ ), CRM-dcGTX2&3-b ( $142,0 \pm 5,0 \mu\text{molL}^{-1}$ ), CRM-C1&2-b (C1  $113,4 \pm 3,6 \mu\text{molL}^{-1}$ ; C2  $33,9 \pm 2,8 \mu\text{molL}^{-1}$ ), CRM-GTX5-c ( $55,7 \pm 2,0 \mu\text{molL}^{-1}$ ), CRM-OA-d ( $10,4 \pm 0,5 \mu\text{molL}^{-1}$ ), CRM-DTX1-b ( $10,4 \pm 0,8 \mu\text{molL}^{-1}$ ), CRM-DTX2-b ( $4,7 \pm 0,3 \mu\text{molL}^{-1}$ ), CRM-PTX2-b ( $5,13 \pm 0,15 \mu\text{molL}^{-1}$ ), CRM-AZA1-b ( $1,54 \pm 0,08 \mu\text{molL}^{-1}$ ), CRM-AZA2-b ( $1,43 \pm 0,07 \mu\text{molL}^{-1}$ ), CRM-AZA3-b ( $1,43 \pm 0,06 \mu\text{molL}^{-1}$ ), CRM-YTX-c ( $4,3 \pm 0,2 \mu\text{molL}^{-1}$ ), CRM-hYTX ( $5,0 \pm 0,3 \mu\text{molL}^{-1}$ ), SPX1 ( $10,2 \pm 0,5 \mu\text{molL}^{-1}$ ), GYM-b ( $4,93 \pm 0,26 \mu\text{molL}^{-1}$ ), PnTX-G ( $2,77 \pm 0,13 \mu\text{molL}^{-1}$ ). Za provjeru iskorištenja ekstrakcije korišteni su tkivo dagnji CRM-DSP-Mus-c sa certificiranom koncentracijom OA ( $1,07 \pm 0,08 \text{mgkg}^{-1}$ ), DTX1 ( $1,07 \pm 0,11 \text{mgkg}^{-1}$ ), DTX2 ( $0,86 \pm 0,08 \text{mgkg}^{-1}$ ); FDMT1 sa certificiranim koncentracijama (u odnosu na masu liofiliziranog praha) OA ( $1,59 \pm 0,18 \text{mgkg}^{-1}$ ), DTX1 ( $0,68 \pm 0,07 \text{mgkg}^{-1}$ ), DTX2 ( $3,57 \pm 0,33 \text{mgkg}^{-1}$ ), AZA1 ( $4,10 \pm 0,40 \text{mgkg}^{-1}$ ), AZA2 ( $1,13 \pm 0,10 \text{mgkg}^{-1}$ ), AZA3 ( $0,96 \pm 0,10 \text{mgkg}^{-1}$ ), YTX ( $2,49 \pm 0,28 \text{mgkg}^{-1}$ ), PTX2 ( $0,66 \pm 0,06 \text{mgkg}^{-1}$ ), SPX1 ( $2,70 \pm 0,26 \text{mgkg}^{-1}$ ), i DA i *epi*-DA ( $126 \pm 10$

mgkg<sup>-1</sup>), te tkivo kamenica PO PST CRM 1101 sa certificiranim koncentracijama STX (0,22 ± 0,02 μmolkg<sup>-1</sup>, GTX1 i 4 (0,41 ± 0,05 i 0,33 ± 0,05 μmolkg<sup>-1</sup>), GTX2 i 3 (0,20 ± 0,02 i 0,23 ± 0,02 μmolkg<sup>-1</sup>), NEO (0,64 ± 0,09 μmolkg<sup>-1</sup>), C1 i 2 (0,66 ± 0,15 i 0,74 ± 0,09 μmolkg<sup>-1</sup>). Korišten je i CRM Zero-Mus (NRC-CNRC, Kanada), tkivo dagnji prikladno kao slijepi matriks (matriks bez analita) u ispitivanju PST, DA, OA, DTX, AZA, YTX, PTX i GYM.

#### 3.2.4. Laboratorijska oprema i analitički instrumenti

U pripremi uzoraka za ispitivanje fikotoksina korišteni su: analitička vaga (XP205 Delta Range Mettler Toledo, Švicarska), precizna vaga (BB 240 Mettler Toledo, Švicarska), laboratorijski homogenizator (Warring 8011EG, SAD), *wortex* homogenizator (Velp Scientifica, Europska unija), rotaciona tresilica (BioSan MultiRS 60, Latvija), centrifuga (Hettich Rotina 420 R, Njemačka), magnetska miješalica s grijanjem (IKA RET basic, Njemačka), sušionik (Memmert UN110, Njemačka), uparivač u struji dušika (N-EVAP 111 Organomation 5085, SAD), vakuum pumpa (WP6122050 Millipore, SAD) i pH-metar s mikroelektrodom (Inlab MicroPro ISM Mettler Toledo, Švicarska).

Za detekciju i određivanje koncentracije DA i lipofilnih fikotoksina korišten je analitički instrument UHPLC (Agilent Technologies 1290, Singapur) u sprezi sa trostrukim kvadrupolnim analizatorom masa (Agilent Technologies G6460, Njemačka) i računalnim programima MassHunter Workstation LC/MS Data Acquisition Version 10.1 B.10.1.67 i MassHunter Workstation Quantitative Analyses verzija 10.2 B.10.2.7338 (Agilent Technologies, Njemačka). Za kromatografsku separaciju DA korištene su kolona Zorbax SB-C18 RRHT 2,1 x 50 mm, 1,8 μm s pretkolonom Zorbax SB-C18 2,1 x 5 mm, 1,8 μm (Agilent Technologies, SAD), te kolona Zorbax SB-C8 RRHD 2,1 x 50 mm, 1,8 μm s pretkolonom Zorbax SB-C8 2,1 x 5 mm, 1,8 μm (Agilent Technologies, SAD) za detekciju LT. Paralitički toksini detektirani su i kvantificirani primjenom HPLC instrumenta u sprezi sa fluorescencijskim detektorom (Agilent Technologies 1200, Švicarska) i primjenom računalnog programa ChemStation Rev.B.04.03-SP1 (Agilent Technologies, Njemačka), dok je za kromatografsku separaciju korištena kolona Supelcosil LC-18 15 cm x 4,6 mm, 5 μm s pretkolonom Supelguard LC-18 2 cm x 4 mm (Supelco, SAD).

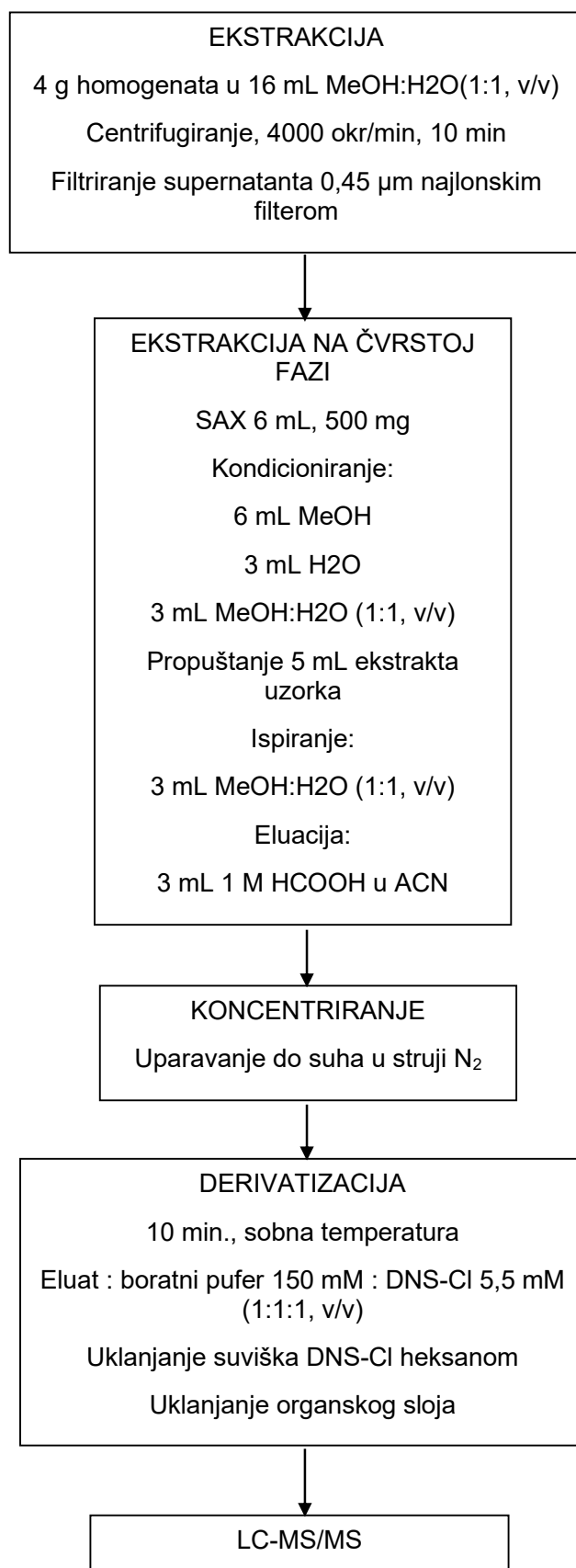
#### 3.2.5. Priprema uzoraka za ekstrakciju

Za određivanje fikotoksina svih skupina priprema uzoraka za ekstrakciju provedena je na isti način. Od 2 kg uzorka izdvojeno je toliko jedinki školjkaša ili mješčičnica, koliko je potrebno da nakon odvajanja ljuštore ili plašta ostane približno 100 g mekog tkiva. Prije otvaranja školjkaši i mješčičnice su isprane mlazom hladne vode, kao i meko tkivo nakon odvajanja od ljuštore i plašta. Nakon odvajanja, tkivo je ostavljeno da se cijedi 5 minuta, te je

homogenizirano u laboratorijskom homogenizatoru (Waring 8011 EG, SAD) na 22000 okr/min do potpune homogenizacije.

#### **3.2.6. Metoda za određivanje domoične kiseline**

Određivanje domoične kiseline provedeno je prema metodi koju su objavili Beach i sur. (2015.), primjenom alternativnog postupka za određivanje niskih koncentracija. Temelji se na ekstrakciji 50%-tnom vodenom otopinom MeOH nakon koje slijedi ekstrakcija na čvrstoj fazi (SAX), te derivatizacija DA danzil kloridom (DNS-Cl), pri čemu nastaje derivat danzila i DA (DNS-DA). Detaljan postupak pripreme uzorka za instrumentalnu analizu prikazan je na **Slici 14.**



**Slika 14** Hodogram pripreme uzorka za određivanje DA LC-MS/MS tehnikom

Postupku validacije metode te instrumentalnoj analizi uzoraka prethodilo je optimiranje LC-MS/MS analitičkog instrumenta. Optimirani su parametri trostrukog kvadrupolnog analizatora masa injektiranjem certificirane otopine za kalibraciju, kao i parametri izvora iona. Evaluacijom prikupljenih podataka, te usporedbom s literaturnim podacima, odabrani su molekularni (prekursor) ion te produkt ioni analita. Odabrane su optimalne vrijednosti kolizijske energije, napona na izvoru iona, temperature i protoka plina za raspršivanje, tj. uvjeti pri kojima se postiže najjači odziv. Od odabranih produkt iona, onaj s jačim odzivom koristio se za kvantifikaciju, dok su se dva produkt iona sa slabijim odzivom koristili za potvrdu analita. Vrijednost  $m/z$  (omjer mase i naboja) molekularnog iona iznosio je 545, dok su  $m/z$  produkt iona za kvantifikaciju, te dva iona za potvrdu, iznosili 170, 499 i 453. Analiti su ionizirani u pozitivnom polaritetu. Ostali MS/MS parametri bili su: napon na kapilari 2,5 kV, napon fragmentora 150 V, temperatura plina ( $N_2$ ) 300 °C, protok plina 11 L/min, tlak raspršivača 35 psi, temperatura raspršivanja 350 °C, protok plina za raspršivanje 11 L/min. Primijenjeni kromatografski uvjeti preuzeti su iz metode gore spomenutih autora uz manje promjene. Primijenjeno je izokratno eluiranje u trajanju od 15 minuta, s temperaturom kolone 40 °C i volumenom injektiranja 5  $\mu$ L. Udio organskog dijela mobilne faze kojeg je činila 0,2% (v/v) otopina mravlje kiseline u ACN iznosio je 30%, dok je vodeni dio sačinjavala 0,2% (v/v) otopina mravlje kiseline.

Uz prisustvo dva produkt iona u svrhu identifikacije, vrijeme zadržavanja analita (RT) na kromatografskoj koloni u uzorku moralo je odgovarati RT analita u certificiranoj otopini za kalibraciju, uz prihvatljivo odstupanje od 2,5% unutar iste serije analiziranih uzoraka. Tolerancija odstupanja omjera odziva potvrdnog i kvantifikacijskog iona iznosila je  $\pm$  30% čime su bili zadovoljeni uvjeti Odluke komisije 2002/657/EZ (EU, 2002.) U svrhu kontrole kvalitete metode analizirani su slijepi matriks i matriks obogaćen standardom. Za provjeru učinkovitosti ekstrakcije korišten je CRM FDMT1. Za kvantifikaciju DA korišten je eksterni kalibracijski pravac u ekstraktu matriksa, koncentracijskog raspona od 1 do 1500  $\mu$ gkg<sup>-1</sup>. Za svaku od vrsta školjkaša i mješćinica koristio se kalibracijski pravac pripremljen razrjeđivanjem analitičkih standarda u slijepom matriksu ispitivane vrste koji su podvrgnuti derivatizaciji DNS-Cl na isti način kao i uzorci. Utvrđene koncentracije DA korigirane su iskorištenjem dobivenim validacijom.

Validacija metoda provela se u skladu s Odlukom komisije 2002/657/EZ (EU, 2002.). Za svaki analit određena je specifičnost, utjecaj matriksa (ME, engl. *Matrix Effect*), linearnost kalibracijskog pravca, granica detekcije (LOD, engl. *Limit of Detection*), granica kvantifikacije (LOQ, engl. *Limit of Quantification*), preciznost (ponovljivost, unutarlaboratorijska obnovljivost) i mjerna nesigurnost.

Specifičnost je određena usporedbom kromatograma derivatiziranog slijepog matriksa ( $n = 20$ ) i matriksa obogaćenog domoičnom kiselinom ( $n = 20$ ).

Utjecaj matriksa ispitan je usporedbom vrijednosti nagiba kalibracijskog pravca derivatiziranih analitičkih standarda u otapalu (ACN:H<sub>2</sub>O, 1:1, v/v) sa onima u ekstraktu pojedinačnih matriksa. Kreirana su po tri kalibracijska pravca u otapalu te u svakom od matriksa, sa šest koncentracijskih razina, u rasponu od 1 do 1500 µgkg<sup>-1</sup>. Srednja vrijednost nagiba pravaca u otapalu uspoređena je sa srednjim vrijednostima nagiba pravaca u matriksu. Utjecaj matriksa (SSE, engl. *signal suppression/enhancement*) izračunat je iz omjera nagiba kalibracijskog pravca u matriksu i nagiba pravca u otapalu prema formuli (1):

$$SSE = 100 \cdot \frac{b_{\text{matriks}}}{b_{\text{otapalo}}} \quad (1)$$

gdje je:  $SSE$  - utjecaj matriksa [%],  
 $b_{\text{matriks}}$  - nagib kalibracijskog pravca u matriksu ,  
 $b_{\text{otapalo}}$  - nagib kalibracijskog pravca u otapalu.

Također su uspoređene vrijednosti nagiba kalibracijskih pravaca matriksa školjkaša i mješćićnica međusobno.

Lineariziranjem kalibracijskih pravaca i određivanjem koeficijenta determinacije  $R^2$ , određena je linearnost kalibracijskih pravaca za svaki matriks pojedinačno, uz uvjet prihvatljivosti da vrijednost  $R^2$  bude  $\geq 0,98$ .

LOD i LOQ određeni su za svaku vrstu školjkaša i mješćićnice analizom uzoraka slijepog matriksa na način koji su opisali Wenzl i sur. (2016.). Pomoću standardne devijacije odziva u očekivanom RT DA deset analiziranih slijepih uzoraka, te nagiba kalibracijskog pravca u koncentracijskom području očekivane vrijednosti LOD, granica detekcije izračunata je za svaki matriks prema formuli (2):

$$LOD = 3,9 \cdot \frac{SD_b}{b} \quad (2)$$

gdje je:  $LOD$  - granica detekcije,  
 $SD_b$  - standardna devijacija odziva slijepih uzoraka,  
 $b$  - nagib kalibracijske krivulje.

Granica kvantifikacije izračunata je prema formuli (3):



$$LOQ = 3,3 \cdot LOD \quad (3)$$

gdje je:  $LOQ$  - granica kvantifikacije,  
 $LOD$  - granica detekcije.

Plan i izračun parametara ponovljivosti i unutarlaboratorijske obnovljivosti proveden je primjenom programa InterVAL Plus Software Version 3.4.0.4 (quo data, Gesellschaft für Qualitätsmanagement und Statistik GmbH, Njemačka). Ponovljivost i unutarlaboratorijska obnovljivost određene su ispitivanjem 128 slijepih uzoraka obogaćenih DA na četiri koncentracijske razine, među kojima su uzorci tri vrste školjkaša i mješćićnica bili jednako zastupljeni. Koncentracija DA u obogaćenim uzorcima iznosila je 50, 250, 500 i 1000  $\mu\text{gkg}^{-1}$ . Za procjenu učinkovitosti metode za parametre ponovljivosti i unutarlaboratorijske obnovljivosti odabrane su vrijednosti koeficijenta varijacije (CV) navedene u Odluci komisije 2002/657/EZ (EU, 2002.), koje ne smiju biti veće od vrijednosti izračunate Horwitzovom jednadžbom (4) koja glasi:

$$CV = 2^{(1-0,5/\log C)} \quad (4)$$

gdje je:  $CV$  - koeficijent varijacije,  
 $C$  - maseni udio izražen kao eksponent s bazom 10.

Unutarlaboratorijski CV ponovljivosti ne bi trebao biti veći od dvije trećine vrijednosti CV obnovljivosti izračunate jednadžbom (4). CV obnovljivosti analita za koje je utvrđena NDK treba biti manji od CV za maseni udio koji odgovara 1/2 NDK.

Proširena mjerna nesigurnost ( $U$ ) određena je primjenom istog programa uz faktor pokrivanja  $k = 2$ , uz kojeg povećana nesigurnost određuje interval s razinom povjerenja od približno 95%. Sastavnice mjerne nesigurnosti uzete u obzir su nesigurnost matriksa, pojedinačnih kromatografskih analiza, ponovljivosti i korekcije iskorištenjem.

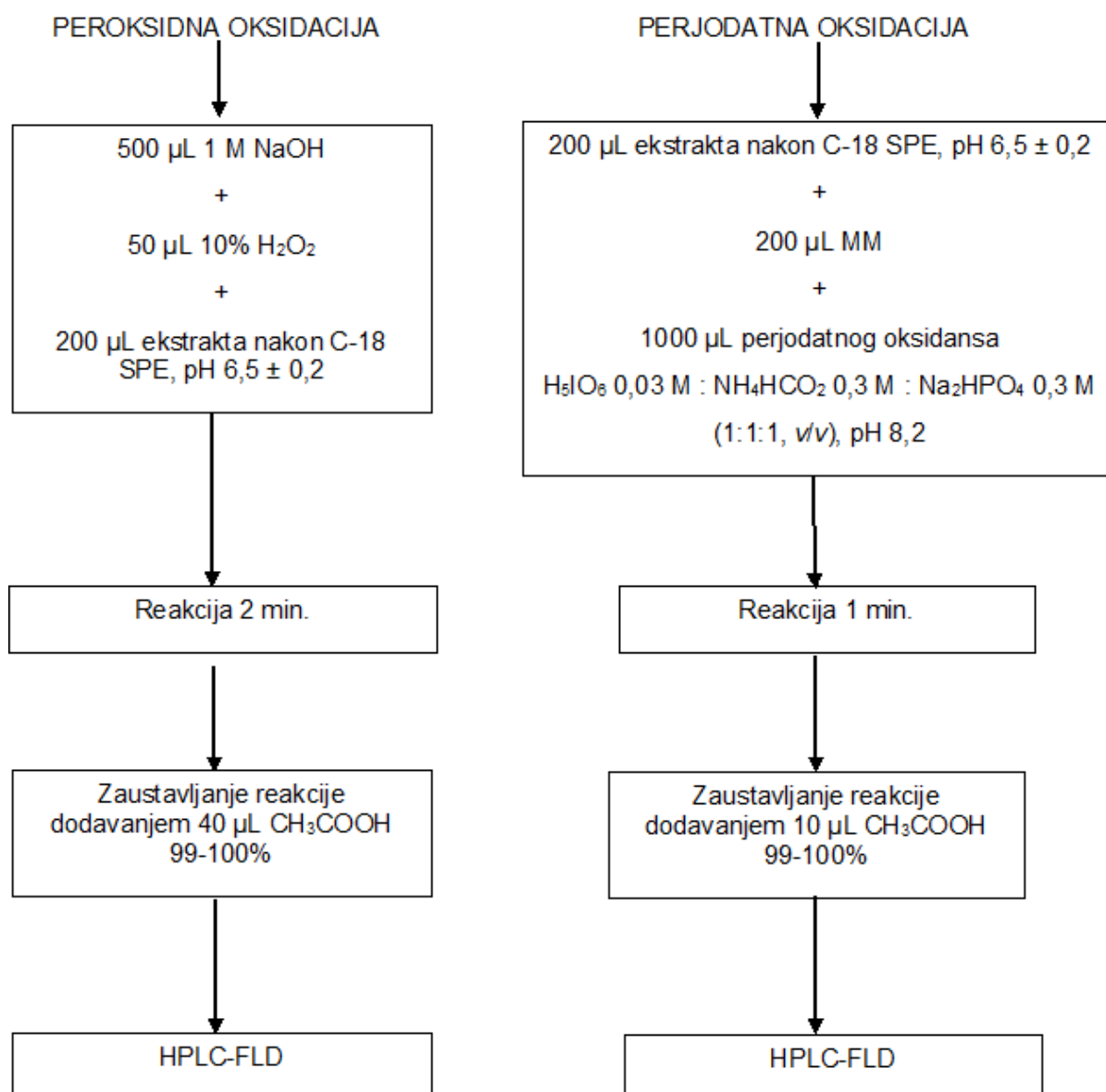
### 3.2.7. Metoda za određivanje paralitičkih toksina

Određivanje PST provedeno je metodom tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti, primjenom pretkromatske oksidacije i fluorescencijske detekcije (AOAC, 2005.). Metoda se temelji na ekstrakciji octenom kiselinom, te oksidaciji ekstrakata pročišćenih ekstrakcijom na čvrstoj fazi (C-18 kolonice) i frakcioniranih na kationskim kolonicama (COOH), perjodatom ( $\text{IO}_4^-$ ) i vodikovim peroksidom ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), pri čemu nastaju fluorescirajući produkti koji se detektiraju i kvantificiraju primjenom FLD. Produkti nehidroksiliranih PST ( $\text{R}_1=\text{H}$ ) su vrlo intenzivne fluorescencije nakon peroksidne oksidacije, za razliku od hidroksiliranih PST ( $\text{R}_1=\text{OH}$ , od ispitivanih PST u ovom istraživanju NEO i GTX1,4) koji ne stvaraju

fluorescirajuće produkte nakon oksidacije vodikovim peroksidom. Hidroksilirani i nehidroksilirani PST razlikuju se u broju oksidacijskih produkata. Nehidroksilirani toksini STX, GTX2,3, C1,2 i GTX5 stvaraju jedan produkt nakon obje oksidacije, dekarbamoil toksini dcGTX2,3 i dcSTX stvaraju dva oksidacijska produkta, dok oksidacijom hidroksiliranih toksina perjodatom nastaju tri produkta.

PST ekstrahirani su kuhanjem 5 g homogenata u 3 mL 1% vodene otopine octene kiseline (v/v), nakon čega se ekstrakt ohladio do sobne temperature, centrifugirao 10 min na 4000 okr./min., te izdvojio supernatant u kivetu od 15 mL. Ekstrakcija taloga ponovljena je na isti način, supernatanti su združeni i volumen nadopunjen vodom do 10 mL. Ekstrakti su podvrgnuti SPE na C-18 kolonicama (3 mL, 500 mg) koje su kondicionirane sa 6 mL MeOH i 6 mL vode. Nakon kondicioniranja propušten je 1 mL profiltriranog ekstrakta (0,45 µm filter s najlonskom membranom) te je kolonica isprana s 2 mL vode. Ekstrakt i voda prikupljeni su u istu kivetu, te je pomoću 1 M i 0,2 M NaOH pH prilagođen na  $6,5 \pm 0,2$ , a ukupan volumen nadopunjen vodom do 4 mL. Nakon ove faze provedena je oksidacija pročišćenih ekstrakata vodikovim peroksidom, što je omogućilo detekciju i kvantifikaciju nehidroksiliranih toksina.

Dodatno, frakcioniranje analita na čvrstoj fazi primjenom kationskih kolonica (COOH) prije oksidacije, provelo se u svrhu kvantificiranja hidroksiliranih toksina, budući perjodatnom oksidacijom NEO i GTX6 te GTX1,4 i C3,4 nastaju isti oksidacijski produkti. Kationske kolonice (500 mg, 3 mL) kondicionirane su sa 10 mL 0,01 M amonijevog acetata. Nakon kondicioniranja propušteno je 2 mL ekstrakta pročišćenog na C-18 kolonicama i prilagođenog pH, te potom 4 mL vode. Propušteni ekstrakt i voda prikupljeni su u istu, prvu kivetu, a volumen je nadopunjen vodom do 6 mL. Ova frakcija (1) sadrži C toksine. Kroz kolonicu se zatim propuštalo i prikupljalo u drugu kivetu 4 mL 0,05 M NaCl te je volumen nadopunjen do 4 mL vodom. Ova frakcija (2) sadrži GTX toksine i dcGTX2,3. Treća frakcija (3) sadrži NEO, STX i dcSTX koji se iz SPE kolonice eluiraju propuštanjem 5 mL 0,3 M NaCl. Budući su nehidroksilirani toksini kvantificirani nakon oksidacije vodikovim peroksidom odmah nakon SPE na C-18 kolonicama, za kvantifikaciju hidroksiliranih GTX1,4 i NEO, frakcije 2 i 3 podvrgnute su perjodatnoj oksidaciji. Da bi se povećala učinkovitost perjodatne oksidacije hidroksiliranih toksina, koristio se modifikator matriksa (engl. *matrix modifier*, MM) koji je dobiven ekstrakcijom i SPE na C-18 kolonicama kamenica koje nisu sadržavale PST, na isti način kao što su uzorci pripremljeni za oksidaciju. Detaljan postupak obje oksidacije prikazan je na **Slici 15**.



**Slika 15** Hodogram oksidacije pročišćenih ekstrakata u metodi za određivanje PST

PST detektirani su i kvantificirali primjenom HPLC uređaja u sprezi sa fluorescencijskim detektorom, s valnom duljinom ekscitacije 340 nm i emisije 395 nm. Kao mobilna faza A korištena je 0,1 M vodena otopina amonijevog formijata, dok je mobilnu fazu B činila vodena otopina 0,1 M amonijevog formijata s 5% ACN, obje prilagođenog pH na  $6,0 \pm 0,1$ . Primijenjeno je gradijentno eluiranje (**Prilog 1**). Temperatura kromatografske kolone bila je 30 °C, volumen injektiranja ekstrakata podvrgnutih peroksidnoj oksidaciji 25 µL, dok je volumen za ekstrakte nakon perjodatne oksidacije iznosio 100 µL. PST su identificirani usporedbom RT kromatografskog pika oksidacijskih produkata sa RT produkata oksidacije analita u certificiranoj otopini za kalibraciju, uz prihvatljivo odstupanje od 2,5% unutar iste serije analiziranih uzoraka i uz omjer signala i šuma (S/N) pika  $\geq 3$ . Za identifikaciju toksina sa više oksidacijskih produkata potrebna je detekcija i ostalih produkata. U uzorcima u

kojima je identificiran neki od PST, provjerena je prisutnost prirodno fluorescirajućih spojeva koji bi mogli interferirati sa analitima, na način da su pročišćeni ekstrakti analizirani bez prethodne oksidacije.

Za kvantifikaciju korišten je kalibracijski pravac u otapalu raspona od 40 do 400  $\mu\text{gkg}^{-1}$  za GTX2,3, dcGTX2,3 i GTX5, od 50 do 500  $\mu\text{gkg}^{-1}$  za STX i dcSTX, od 100 do 1400  $\mu\text{gkg}^{-1}$  za C1,2, te od 100 do 2000  $\mu\text{gkg}^{-1}$  za NEO i GTX1,4. Ukoliko je utvrđena koncentracija nekog od toksina u uzorku bila veća od koncentracije najveće kalibracijske razine, oksidiran je manji volumen ekstrakta uzorka. Certificirane otopine standarda podvrgnute su peroksidnoj i perjodatnoj oksidaciji na isti način kao i ekstrakti uzoraka. Za kvantifikaciju dcGTX2,3 i dcSTX oksidacijom kojih nastaju dva produkta, koristio se kromatografski pik većeg intenziteta, dok se za kvantifikaciju GTX1,4 i NEO koji daju tri produkta, koristio produkt koji eluira drugi po redu. Uvjet za kvantifikaciju je bio omjer S/N pika  $\geq 10$ . PST su pojedinačno kvantificirani interpolacijom površine pika naspram kalibracijskog pravca, uzimajući u obzir odvagu i faktor razrjeđenja uzorka, s obzirom na vrstu oksidacije i frakcioniranje. Koncentracije kvantificiranih toksina korigirane su iskorištenjem dobivenim validacijom. S ciljem utvrđivanja toksičnosti, primjenom formule (5) koncentracija pojedinačnih toksina izražena je kao ekvivalent STXdiHCl:

$$C = \frac{C_x \cdot M_{\text{STXdiHCl}}}{M_x} \cdot \text{TEF} \quad (5)$$

gdje je:  $C$  - koncentracija pojedinačnog toksina [ $\mu\text{g STXdiHCl ekv.kg}^{-1}$ ],

$C_x$  - koncentracija pojedinačnog toksina [ $\mu\text{gkg}^{-1}$ ]

$M_{\text{STXdiHCl}}$  - molarna masa STXdiHCl,

$M_x$  - molarna masa pojedinačnog toksina

$\text{TEF}$  - faktor ekvivalentne toksičnosti.

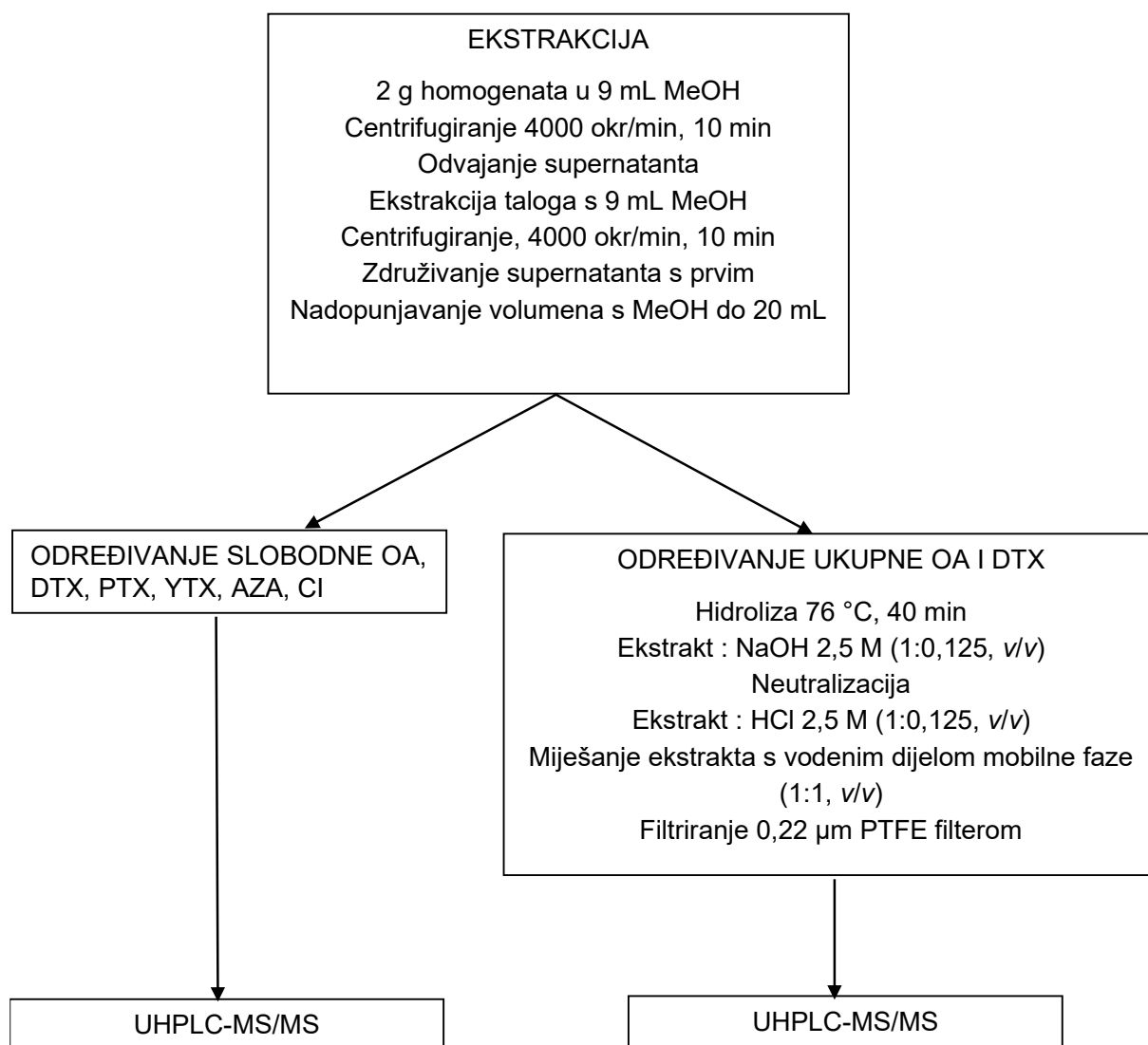
Ukupna toksičnost PST izračunata je zbrajanjem  $\mu\text{g}$  ekvivalenta STXdiHCl svih toksina sa koncentracijama većim od LOQ i izražena je kao  $\mu\text{g}$  ekvivalenta STXdiHCl po kg tkiva školjkaša ( $\mu\text{g STXdiHCl ekv.kg}^{-1}$ ). Epimerni parovi GTX1,4, GTX2,3, dcGTX2,3 i C1,2 koji nakon oksidacije daju iste produkte, kvantificirani su kao jedan toksin, a za pretvorbu u ekvivalent STXdiHCl primijenjena je veća vrijednost TEF-a svakog para, ukoliko su se razlikovale. U svrhu kontrole kvalitete metode analizirani su slijepi matriks i PO PST CRM 1101CRM koji sadrži paralitičke toksine.

Validacija metoda provedena je u skladu s Odlukom komisije 2002/657/EZ (EU, 2002.). Za svaki analit određeni su isti parametri kao i pri validaciji metode za određivanje DA, osim utjecaja matriksa.

Specifičnost je određena usporedbom kromatograma oksidiranog slijepog matriksa ( $n = 20$ ) i matriksa obogaćenog PST ( $n = 20$ ). U svrhu ispitivanja linearnosti, peroksidnom oksidacijom certificiranih otopina analitičkih standarda nehidroksiliranih PST kreirana su po tri kalibracijska pravca sa pet koncentracijskih razina u rasponu od 40 do 800  $\mu\text{gkg}^{-1}$  za dcGTX2,3, dcSTX, GTX2,3, GTX5 i STX, od 100 do 2000  $\mu\text{gkg}^{-1}$  za C1,2, te perjodatnom oksidacijom hidroksiliranih toksina GTX1,4 i NEO u rasponu od 100 do 2000  $\mu\text{gkg}^{-1}$ . Lineariziranjem i određivanjem koeficijenta determinacije  $R^2$  određena je linearnost kalibracijskih pravaca za svaki PST pojedinačno, uz uvjet prihvatljivosti da vrijednost  $R^2$  bude  $\geq 0,98$ . LOD i LOQ određeni su za svaku vrstu školjkaša i mješčičnica analizom uzoraka slijepog matriksa na isti način kao i kod metode za određivanje DA, primjenom formula **(2)** i **(3)**. Plan i izračun parametara ponovljivosti i unutarlaboratorijske obnovljivosti proveden je primjenom programa InterVAL Plus Software Version 3.4.0.4 (quo data, Gesellschaft für Qualitätsmanagement und Statistik GmbH, Njemačka). Ponovljivost i unutarlaboratorijska obnovljivost određene su ispitivanjem 128 slijepih uzoraka obogaćenih PST na tri koncentracijske razine za sve toksine osim za GTX1,4 za koji se ispitala još jedna, veća koncentracijska razina. Među uzorcima, tri vrste školjkaša i mješčičnica bile su jednako zastupljene. Koncentracija pojedinačnih PST u obogaćenim uzorcima iznosila je 120, 180 i 240  $\mu\text{gkg}^{-1}$ , dok je za GTX1,4 još uključena i koncentracija od 500  $\mu\text{gkg}^{-1}$ . Za procjenu učinkovitosti metode za parametar unutarlaboratorijske obnovljivosti odabrane su vrijednosti koeficijenta varijacije (CV) navedene u Odluci komisije 2002/657/EZ (EU, 2002.).

#### 3.2.8. Metoda za određivanje lipofilnih toksina

Određivanje LT provedeno je prema standardnoj operativnoj proceduri Europskog referentnog laboratorija za morske biotoksine (EURLMB, 2015.), uz manje izmjene. Metoda je temeljena na ekstrakciji metanolom, te kvantifikaciji slobodne OA i DTX, PTX, YTX, AZA i CI direktno iz ekstrakta, primjenom LC-MS/MS tehnike. U svrhu određivanja ukupne OA i DTX, provedena je alkalna hidroliza ekstrakata, čime su iz aciliranih estera oslobođeni vezani OA, DTX1 i DTX2. Detaljan postupak ekstrakcije i alkalne hidrolize prikazan je na **Slici 16**.



**Slika 16** Hodogram pripreme uzoraka za određivanje lipofilnih fiktoksina

Primijenjeni su sljedeći MS/MS parametri: napon na kapilari 4,5 kV, temperatura plina (N<sub>2</sub>) 200 °C, protok plina 7 L/min, tlak raspršivača 25 psi, temperatura raspršivanja 350 °C i protok plina za raspršivanje 11 L/min. Vrijednosti *m/z* molekuskog i produkt iona, napon fragmentora i polaritet ionizacije pojedinih analita prikazani su u **Tablici 4**. Primijenjeno je gradijentno eluiranje u trajanju od 15 minuta (**Prilog 2**), s temperaturom kolone 40 °C i volumenom injektiranja 5 µL. Organski dio mobilne faze činila je otopina ACN s 5% vode, 10 mM amonijevog formijata i 53 mM mravlje kiseline, dok je vodeni dio činila 10 mM otopina amonijevog formijata i 53 mM mravlje kiseline.

**Tablica 4** Fragmentacijski uvjeti primijenjeni u određivanju LT

Analit	Molekulski ion <i>m/z</i>	Produkt ioni <i>m/z</i>	Napon fragmentora/V	Polaritet ionizacije
OA	827,4	723,3 <sup>a</sup>	300	+

### 3. Eksperimentalni dio

		809,3		
DTX1	841,4	737,4 <sup>a</sup> 823,5	290	+
DTX2	827,4	723,3 <sup>a</sup> 809,6	260	+
PTX1	892,7	213,0 <sup>a</sup> 821,4	170	+
PTX2	876,4	213,1 <sup>a</sup> 194,9	130	+
YTX	1141,4	1061,3 <sup>a</sup> 855,4	260	-
Homo YTX	1155,4	1075,6 <sup>a</sup> 869	260	-
45-OH YTX	1157,5	1077,5 <sup>a</sup> 871,5	260	-
45-OH homo YTX	1171,8	1091,5 <sup>a</sup> 869,4	260	-
AZA1	842,4	824,4 <sup>a</sup> 806,5	260	+
AZA2	856,5	838,6 <sup>a</sup> 820,4	270	+
AZA3	828,4	810,5 <sup>a</sup> 792,5	240	+
SPX1	692,6	674,5 <sup>a</sup> 444,4	170	+
GYM	508,1	490,1 <sup>a</sup> 392	130	+
PnTX-G	694,4	164,1 <sup>a</sup> 676,4 458,2	140	+

<sup>a</sup> produkt ioni korišteni za kvantifikaciju LT

Lipofilni toksini identificirani su temeljem prisustva dva produkt iona (PnTX-G temeljem tri iona), uz uvjet da je omjer S/N produkt iona manjeg intenziteta  $\geq 3$ . Odstupanje omjera odziva potvrdnog i kvantifikacijskog iona moralo je biti u rasponu  $\pm 30\%$ , čime su bili zadovoljeni uvjeti Odluke komisije 2002/657/EZ (EU, 2002.). Vrijeme zadržavanja analita na kromatografskoj koloni u uzorku je moralo odgovarati RT analita u certificiranoj otopini za kalibraciju, uz prihvatljivo odstupanje od 3% unutar iste serije analiziranih uzoraka. Rezolucija kromatografskih pikova analoga OA i DTX2 mora biti  $>1$ , budući se ovi izomeri ne mogu razlikovati spektrometrijom masa. U svrhu kontrole kvalitete metode analizirani su slijepi matriks, CRM-DSP-Mus-c i CRM FDMT1. Za kvantifikaciju LT korišten je eksterni kalibracijski pravac u matriksu, pripremljen razrjeđivanjem analitičkih standarda otopinom metanolnog ekstrakta slijepog matriksa i vodenog dijela mobilne faze (1:1, v/v), koncentracijskog raspona od 30 do 600  $\mu\text{gkg}^{-1}$  za okadaičnu skupinu i pektenotoksine, 75 do 1500  $\mu\text{gkg}^{-1}$  za jesotoksine, 3 do 300  $\mu\text{gkg}^{-1}$  za azaspiracide, 0,05 do 300  $\mu\text{gkg}^{-1}$  za GYM i

PnTX-G, te 3 do 300  $\mu\text{gkg}^{-1}$  za SPX1. Toksini za koje nisu dostupne otopine za kalibraciju (PTX1, 45-OH YTX i 45-OH homo YTX) kvantificiraju se pomoću kalibracijskog pravca predstavnika skupine. Ukoliko je koncentracija nekog od toksina u uzorku bila veća od koncentracije najveće kalibracijske razine, ekstrakt uzorka razrijeđen je mješavinom ekstrakta slijepog uzorka i vodenog dijela mobilne faze (1:1, v/v), u omjeru potrebnom da koncentracija bude u rasponu kalibracijske krivulje. U izračunu koncentracija u obzir je uzet faktor razrjeđenja. Utvrđene koncentracije LT korigirane su iskorištenjem dobivenim validacijom. S ciljem utvrđivanja toksičnosti, nakon izračuna koncentracija pojedinačnih analoga, dobivene koncentracije pomnožene su vrijednošću TEF kvantificiranog analoga, a ukupna toksičnost izražena kao suma  $\mu\text{g}$  ekvivalenata pojedine skupine LT po kg školjkaša, kao što je prikazano u **Tablici 2**. Koncentracije cikličkih imina prikazane su pojedinačno, budući da za njih nije utvrđen TEF.

Validacija metode provedena je u skladu s Odlukom komisije 2002/657/EZ (EU, 2002.) i uključivala je ranije navedene parametre, uključujući i utjecaj matriksa.

Specifičnost je određena usporedbom kromatograma slijepog matriksa ( $n = 20$ ) i matriksa obogaćenog LT ( $n = 20$ ). Utjecaj matriksa određen je usporedbom vrijednosti nagiba kalibracijske krivulje analitičkih standarda u otapalu (MeOH) sa onima u ekstraktu pojedinačnih matriksa. Kreirana su po tri kalibracijska pravca u otapalu te u svakom od matriksa, sa pet koncentracijskih razina u rasponu od 6 do 600  $\mu\text{gkg}^{-1}$  za okadaičnu skupinu i pektenotoksine, 3 do 300  $\mu\text{gkg}^{-1}$  za azaspiracide i cikličke imine, te 75 do 1500  $\mu\text{gkg}^{-1}$  za jesotoksine. Srednja vrijednost nagiba pravaca u otapalu uspoređena je sa srednjim vrijednostima pravaca u matriksu. SSE izračunat je iz omjera nagiba kalibracijskog pravca u matriksu i nagiba pravca u otapalu prema formuli **(1)**. Također su uspoređene vrijednosti nagiba pravaca matriksa školjkaša i mješćićnica međusobno. Lineariziranjem i određivanjem koeficijenta determinacije  $R^2$ , određena je linearnost kalibracijskih pravaca za svaki LT pojedinačno, uz uvjet prihvatljivosti da vrijednost  $R^2$  bude  $\geq 0,98$ . LOD i LOQ određeni su za svaku vrstu školjkaša i mješćićnica analizom uzoraka slijepog ili pseudo-slijepog matriksa (prirodno kontaminiran niskim koncentracijama analita) na isti način kao i kod prethodno opisanih metoda, primjenom formula **(2)** i **(3)**. Plan i izračun parametara ponovljivosti i unutarlaboratorijske obnovljivosti proveden je primjenom programa InterVAL Plus Software Version 3.4.0.4 (quo data, Gesellschaft für Qualitätsmanagement und Statistik GmbH, Njemačka). Ponovljivost i unutarlaboratorijska obnovljivost određene su ispitivanjem 128 slijepih uzoraka obogaćenih LT, na tri koncentracijske razine za sve toksine, osim za OA i CI za koje se ispitala jedna razina više. Koncentracija DTX1, DTX2 i PTX u obogaćenim uzorcima iznosila je 45, 68 i 90  $\mu\text{gkg}^{-1}$ , dok je za OA validacijom još uključena koncentracija od 500  $\mu\text{gkg}^{-1}$ . Koncentracija analoga skupine jesotoksina u obogaćenim uzorcima iznosila je



0,94, 1,9 i 2,8 mgkg<sup>-1</sup>, analoga azaspiracida 40, 60 i 80 µgkg<sup>-1</sup>, te cikličkih imina 25, 100, 200 i 300 µgkg<sup>-1</sup>. Među uzorcima, tri vrste školjkaša i mješčičnica bile su jednako zastupljene. Učinkovitost metode procijenjena je na isti način kao i metode za određivanje DA i PST.

#### 3.2.9. Procjena izloženosti potrošača

Temeljem podataka o prehrambenim navikama koje se odnose na konzumaciju školjkaša u RH (**Tablica 5**), a koji su prikupljeni u istraživanju koje je provela Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu (ranije Hrvatska agencija za hranu) tijekom 2011. i 2012. god., na nacionalnom reprezentativnom uzorku (HAH, 2011.-2012.), te utvrđenih koncentracija fiktoksina u ovom istraživanju za koje su legislativom propisane NDK, utvrđena je stvarna izloženost potrošača u razdoblju u kojem je ono provedeno. Podaci o potrošnji hrane po dobi, spolu i regiji, predstavljajući reprezentativni uzorak, prikupljeni su istraživanjem koje je obuhvatilo 2002 ispitanika u dobi od 18 do 64 godina (HAH, 2011.-2012.) i prikazani su u **Prilogu 3**.

Uzimajući u obzir prosječnu masu konzumenata u RH, utvrđena je veličina porcije u odnosu na tjelesnu masu u slučaju konzumacije prosječne i najveće porcije u RH, te velike porcije koja prema mišljenju EFSA iznosi 400 g (EFSA, 2009.e). Prema podacima EFSA (2009.f) tijekom termičke obrade školjkaša dolazi do povećanja koncentracije LT uslijed gubitka vode, te se smatra da je navedeno potrebno uzeti u obzir prilikom službenih kontrola. Stoga je temeljem mišljenja agencije EFSA, veličina konzumirane porcije u slučaju LT korigirana faktorom 1,5, a koji predstavlja gubitak vode tijekom kuhanja. Faktor je određen uzimajući u obzir prosječni gubitak vode od 39,21% uslijed više načina termičke obrade (kuhanjem u zatvorenoj i otvorenoj posudi, dimljenjem i obradom mikrovalova srednje i visoke energije) (Marinopoulou i Petridis, 2022.), te prosječni udio vode od 85,46% utvrđen u dagnjama prikupljenim iz uzgajališta smještenih na području poluotoka Istra tijekom 2018. god. (Krešić i sur., 2020.).

Izloženost je procijenjena pri konzumaciji prosječne i najveće veličine porcije u RH, te u slučaju konzumacije velike porcije od 400 g, temeljem koncentracija fiktoksina utvrđenih u ovom istraživanju. Također je procijenjena teoretska najveća izloženost potrošača u slučaju konzumacije školjkaša koji sadrže koncentracije jednake NDK za tri navedene veličine porcije. Izloženost je uspoređena sa ARfD utvrđenim od strane EFSA (**Tablica 2**) za svaku reguliranu skupinu, s ciljem utvrđivanja broja slučajeva u kojima je unešena količina fiktoksina bila veća od ARfD.

Budući su podaci o prehrabnim navikama potrošača u RH dostupni samo za dagnje, isti su također primijenjeni za izloženost potrošača fiktotoksinima prisutnim u ostalim vrstama, kao i faktor korekcije 1,5.

**Tablica 5** Konzumacija školjkaša u RH tijekom 2011.-2012. god.

Prosječna porcija/g	Najveća porcija/g	Velika porcija <sup>a</sup> /g	Broj konzumacija	Broj konzumenata	Prosječna masa konzumenata/kg
34,40	87,27	400,00	14	13	81,69

<sup>a</sup>velika porcija prema mišljenju EFSA (EFSA, 2009. f)

### 3.2.10. Statistička obrada podataka

Za statističku obradu podataka korišteni su statistički programski paketi SPSS Statistics 22.0 (IBM, SAD), a za procjenu izloženosti Microsoft Excel 2019 MSO, Version 2301 Build 16.0.16026.2002 (Microsoft, SAD).

Statistička obrada u programu SPSS Statistics provedena je sa razinom značajnosti  $p = 0,05$ . Provjera distribucije podataka rađena je Kolmogorov-Smirnov testom, te je proveden t-test, ANOVA ili neparametrijska verzija Krushkal Wallis testa. U slučaju ANOVA, varijanca je testirana Levene testom te je ovisno o varijanci rađen Scheffe ili Tamhane post hoc test. Statistička obrada napravljena je samo za uzorke s koncentracijama fiktotoksina  $\geq$  LOQ. Također, za fiktotoksine koji su kvantificirani u samo nekoliko uzoraka, statističku obradu nije bilo moguće provesti navedenim programom, te su rezultati tumačeni temeljem pojavnosti. U svrhu interpretacije sezonske pojavnosti, godišnja doba proljeće, ljeto, jesen i zima obuhvaćaju tromjesečna razdoblja navedena istim redosljedom: ožujak-svibanj, lipanj-kolovoz, rujanj-studeni i prosinac-veljača.

## **4. REZULTATI**

## 4.1. VALIDACIJA METODA ZA ODREĐIVANJE DA, PST I LT

Validacija metoda provedena je ispitivanjem parametara selektivnosti, linearnosti, granice detekcije, granice kvantifikacije, mjerne preciznosti - ponovljivosti i unutarlaboratorijske obnovljivosti, te mjerne nesigurnosti za sve metode koje su se primjenjivale u određivanju hidrofilnih i lipofilnih fiktoksina ispitivanih u ovom istraživanju. Za metode koje su uključivale spektrometriju masa ispitan je i utjecaj matriksa.

### 4.1.1. Specifičnost

Specifičnost metoda utvrđena je analizom i usporedbom kromatograma slijepih uzoraka ( $n = 20$ ) i slijepih uzoraka obogaćenih analitima ( $n = 20$ ). Analizirane vrste bile su zastupljene u jednakom udjelu. Pregledom kromatograma utvrđena je odsutnost kromatografskog signala u očekivanom RT pojedinog analita u slijepim uzorcima, te zadanih tranzicija kod metoda za određivanje DA i LT, dok su na kromatogramima slijepih uzoraka obogaćenih analitima uočeni kromatografski signali u očekivanom RT (**Prilozi 4-8**).

### 4.1.2. Utjecaj matriksa

Utjecaj matriksa ispitan je za metode za određivanje DA i LT kod kojih se za detekciju i kvantifikaciju koristila spektrometrija masa.

Uvrštavanjem podataka dobivenih validacijom metode za određivanje DA u formulu za izračun SSE (**1**), dobiveni su rezultati prikazani u **Tablici 6**.

**Tablica 6** SSE vrijednosti za pojedine matrikse u odnosu na otapalo, te međusobno usporedbom matriksa

Matriks	SSE/% <sup>a</sup>	SSE/% <sup>b</sup>	SSE/% <sup>c</sup>	SSE/% <sup>d</sup>
dagnje	64	/	/	/
kamenice	61	96	/	/
kapice	66	104	108	/
mješčićnice	73	115	120	111

<sup>a</sup>SSE u odnosu na otapalo

<sup>b</sup>SSE u odnosu na ekstrakt dagnji

<sup>c</sup>SSE u odnosu na ekstrakt kamenica

<sup>d</sup>SSE u odnosu na ekstrakt kapica

Uvrštavanjem podataka dobivenih validacijom metode za određivanje LT u formulu za izračun SSE (**1**), dobiveni su rezultati prikazani u **Tablici 7**.

Tablica 7 SSE vrijednosti za pojedinačne LT u različitim matriksima

Matriks	SSE	OA	DTX1	DTX2	PTX2	AZA1	AZA2	AZA3	YTX	Homo YTX	GYM	SPX1	PnTX-G
dagnje	SSE <sup>a</sup> /%	118	87	123	78	83	83	70	85	83	79	86	83
kamenice	SSE <sup>a</sup> /%	120	91	117	82	88	87	70	86	83	72	87	86
	SSE <sup>b</sup> /%	102	104	94	106	106	105	100	101	100	91	102	104
kapice	SSE <sup>a</sup> /%	123	92	114	84	78	80	68	86	85	83	87	82
	SSE <sup>b</sup> /%	104	106	92	108	94	96	98	101	103	105	102	100
	SSE <sup>c</sup> /%	102	101	98	102	89	92	98	100	102	115	100	106
mješčičnice	SSE <sup>a</sup> /%	65	38	65	84	83	83	74	86	83	79	81	87
	SSE <sup>b</sup> /%	55	43	53	108	100	100	106	100	100	99	94	106
	SSE <sup>c</sup> /%	54	42	56	102	95	96	107	99	100	109	93	102
	SSE <sup>d</sup> /%	53	41	57	100	106	104	109	100	98	94	93	106

<sup>a</sup>SSE u odnosu na otapalo<sup>b</sup>SSE u odnosu na ekstrakt dagnji<sup>c</sup>SSE u odnosu na ekstrakt kamenica<sup>d</sup>SSE u odnosu na ekstrakt kapica

### 4.1.3. Linearnost kalibracijskog pravca

Linearnost je ispitana lineariziranjem kalibracijskih pravaca pojedinačnih fiktoksina i određivanjem koeficijenta determinacije  $R^2$ . Za metode određivanja DA i LT linearnost je ispitana u svakom od matriksa, dok je za metodu za određivanje PST ispitana linearnost kalibracije pripremljene oksidacijom analitičkih standarda u otapalu. Jednadžbe pravaca i koeficijenti determinacije prikazani su u **Tablicama 8-10**.

### 4.1.4. Granica detekcije i granica kvantifikacije

LOD i LOQ ispitane su za pojedinačne fiktoksine u svakom od matriksa. Uvrštavanjem podataka dobivenih validacijom u formulu za izračun LOD (**2**) i LOQ (**3**), dobiveni su rezultati koji prikazani u **Tablicama 8-10**.

**Tablica 8** Linearnost kalibracijske krivulje, LOD i LOQ DA u ispitanim matriksima

Analit	Matriks	Jednadžba	$R^2$	LOD/ $\mu\text{gkg}^{-1}$	LOQ/ $\mu\text{gkg}^{-1}$
DA	dagnje	$y = 6657,1x - 196427$	0,9964	0,30	0,99
	kamenice	$y = 6317,4x - 52007$	0,9996	0,31	1,02
	kapice	$y = 6897,2x - 124102$	0,9991	0,30	0,99
	mješćinice	$y = 7642,2x + 18386$	0,9979	0,30	1,00

**Tablica 9** Linearnost kalibracijske krivulje u otapalu, LOD i LOQ PST u ispitanim matriksima

Analit	Jednadžba	$R^2$	Matriks	LOD/ $\mu\text{gkg}^{-1}$	LOQ/ $\mu\text{gkg}^{-1}$	LOD/ $\mu\text{g}$ STXdiHCL ekv.kg $^{-1}$	LOQ/ $\mu\text{g}$ STXdiHCL ekv.kg $^{-1}$
STX	$y = 0,0732x - 2,4327$	0,9981	dagnje	11,45	37,79	11,45	37,79
			kamenice	10,30	33,98	10,30	33,98
			kapice	13,71	45,24	13,71	45,24
			mješčićnice	6,39	21,10	6,39	21,10
dcGTX2,3	$y = 0,0317x - 0,3654$	0,9997	dagnje	10,85	35,79	4,59	15,12
			kamenice	9,56	31,54	4,04	13,33
			kapice	7,51	24,78	3,17	10,47
			mješčićnice	10,09	33,30	4,26	14,07
dcSTX	$y = 0,1103x - 4,0644$	0,9984	dagnje	5,95	19,63	6,73	22,19
			kamenice	6,98	23,02	7,89	26,03
			kapice	14,30	47,18	16,17	53,34
			mješčićnice	3,32	10,97	3,75	12,40
GTX2,3	$y = 0,0675x - 1,9918$	0,9981	dagnje	10,57	34,90	5,97	19,71
			kamenice	10,16	33,52	5,74	18,93
			kapice	8,34	27,52	4,71	15,54
			mješčićnice	9,30	30,69	5,25	17,33
GTX5	$y = 0,0304x - 0,9188$	0,9981	dagnje	11,27	37,20	1,11	3,65
			kamenice	10,35	34,16	1,02	3,35
			kapice	10,59	34,69	1,04	3,40
			mješčićnice	7,26	23,96	0,71	2,35
C1,2	$y = 0,0295x - 0,649$	0,9975	dagnje	17,80	58,74	1,39	4,60
			kamenice	18,66	61,57	1,46	4,82
			kapice	13,78	45,48	1,08	3,56
			mješčićnice	16,62	54,84	1,30	4,29
GTX1,4	$y = 0,012x - 0,0796$	0,9998	dagnje	21,23	70,04	19,21	63,37
			kamenice	17,10	56,43	15,47	51,05
			kapice	22,41	73,94	20,27	66,89
			mješčićnice	20,70	68,31	18,73	61,80
NEO	$y = 0,0255x - 1,2675$	0,9986	dagnje	24,77	81,73	29,26	96,54
			kamenice	23,12	76,31	27,31	90,14
			kapice	17,91	59,12	21,16	69,83
			mješčićnice	22,52	74,30	26,60	87,76

**Tablica 10** Linearnost kalibracijskih pravaca, LOD i LOQ LT u ispitanim matriksima

Analit	Jednadžba	$R^2$	Matriks	LOD/ $\mu\text{gkg}^{-1}$	LOQ/ $\mu\text{gkg}^{-1}$	LOD	LOQ
OA	$y = 6078,3x - 986,94$	0,9980	dagnje	5,17	17,08	5,17 <sup>a</sup>	17,08 <sup>a</sup>

#### 4. Rezultati

	$y = 6217,8x - 2801,6$	0,9986	kamenice	7,99	26,35	7,99 <sup>a</sup>	26,35 <sup>a</sup>
	$y = 6336,3x + 477,69$	0,9993	kapice	6,74	22,24	6,74 <sup>a</sup>	22,24 <sup>a</sup>
	$y = 3354,3x + 661,66$	0,9985	mješčićnice	2,83	9,34	2,83 <sup>a</sup>	9,34 <sup>a</sup>
DTX1	$y = 3994,3x - 1222,9$	0,9991	dagnje	5,63	18,57	5,63 <sup>a</sup>	18,57 <sup>a</sup>
	$y = 4172,8x - 4817,8$	0,9936	kamenice	4,79	15,81	4,79 <sup>a</sup>	15,81 <sup>a</sup>
	$y = 4215,8x - 1484,3$	0,9993	kapice	2,42	7,99	2,42 <sup>a</sup>	7,99 <sup>a</sup>
	$y = 1735,2x - 577,74$	0,9995	mješčićnice	3,78	12,47	3,78 <sup>a</sup>	12,47 <sup>a</sup>
DTX2	$y = 10014x - 3538,4$	0,9978	dagnje	2,63	8,67	1,58 <sup>a</sup>	5,20 <sup>a</sup>
	$y = 9461x - 6369,4$	0,9979	kamenice	1,61	5,31	0,97 <sup>a</sup>	3,19 <sup>a</sup>
	$y = 9247,4x - 286,78$	0,9992	kapice	8,37	27,66	5,02 <sup>a</sup>	16,60 <sup>a</sup>
	$y = 5261,2x - 729,01$	0,9991	mješčićnice	8,93	29,47	5,36 <sup>a</sup>	17,68 <sup>a</sup>
PTX2	$y = 6857,5x - 2456,3$	0,9981	dagnje	1,79	5,92	1,79 <sup>b</sup>	5,92 <sup>b</sup>
	$y = 7239,6x - 8306,5$	0,9892	kamenice	2,37	7,83	2,37 <sup>b</sup>	7,83 <sup>b</sup>
	$y = 7406,9x - 1663,8$	0,9984	kapice	0,43	1,41	0,43 <sup>b</sup>	1,41 <sup>b</sup>
	$y = 7381,8x - 1471,9$	0,9996	mješčićnice	1,33	4,38	1,33 <sup>b</sup>	4,38 <sup>b</sup>
AZA1	$y = 302000x - 51941$	0,9986	dagnje	0,53	1,75	0,53 <sup>c</sup>	1,75 <sup>c</sup>
	$y = 320626x - 153681$	0,9944	kamenice	1,03	3,41	1,03 <sup>c</sup>	3,41 <sup>c</sup>
	$y = 284875x - 38298$	0,9982	kapice	0,44	1,44	0,44 <sup>c</sup>	1,44 <sup>c</sup>
	$y = 303880x - 53800$	0,9997	mješčićnice	0,52	1,71	0,51 <sup>c</sup>	1,71 <sup>c</sup>
AZA2	$y = 248814x - 27463$	0,9992	dagnje	0,83	2,73	1,49 <sup>c</sup>	4,91 <sup>c</sup>
	$y = 260629x - 134078$	0,9939	kamenice	1,30	4,30	2,34 <sup>c</sup>	7,74 <sup>c</sup>
	$y = 238914x - 48993$	0,9986	kapice	0,56	1,86	1,01 <sup>c</sup>	3,35 <sup>c</sup>
	$y = 249394x - 68193$	0,9986	mješčićnice	0,50	1,65	0,90 <sup>c</sup>	2,97 <sup>c</sup>
AZA3	$y = 241951x - 46529$	0,9986	dagnje	0,71	2,36	0,99 <sup>c</sup>	3,30 <sup>c</sup>
	$y = 241777x - 138145$	0,9936	kamenice	1,71	5,63	2,39 <sup>c</sup>	7,88 <sup>c</sup>
	$y = 236460x - 35955$	0,9966	kapice	0,42	1,37	0,59 <sup>c</sup>	1,92 <sup>c</sup>
	$y = 257507x - 60244$	0,9994	mješčićnice	0,45	1,47	0,63 <sup>c</sup>	2,06 <sup>c</sup>
YTX	$y = 183,11x - 339,68$	0,9938	dagnje	14,27	47,09	14,27 <sup>d</sup>	47,09 <sup>d</sup>
	$y = 184,81x - 341,31$	0,9990	kamenice	11,13	36,73	11,13 <sup>d</sup>	36,73 <sup>d</sup>
	$y = 184,1x + 68,773$	0,9990	kapice	16,93	55,88	16,93 <sup>d</sup>	55,88 <sup>d</sup>
	$y = 183,65x - 336,86$	0,9987	mješčićnice	7,97	26,30	7,97 <sup>d</sup>	26,30 <sup>d</sup>
homo YTX	$y = 181,3x - 400,7$	0,9956	dagnje	9,32	30,76	9,32 <sup>d</sup>	30,76 <sup>d</sup>
	$y = 182,02x - 468,89$	0,9984	kamenice	6,05	19,96	6,05 <sup>d</sup>	19,96 <sup>d</sup>
	$y = 185,84x - 402,37$	0,9996	kapice	12,14	40,05	12,14 <sup>d</sup>	40,05 <sup>d</sup>
	$y = 182,04x - 381,54$	0,9973	mješčićnice	5,04	16,65	5,04 <sup>d</sup>	16,65 <sup>d</sup>
SPX1	$y = 58148x - 1271,9$	0,9987	dagnje	0,45	1,49	n.p.	n.p.
	$y = 59274x - 9783,7$	0,9983	kamenice	0,60	1,97	n.p.	n.p.
	$y = 59111x + 3095,3$	0,9980	kapice	0,99	3,28	n.p.	n.p.
	$y = 54922x - 1316,2$	0,9985	mješčićnice	0,23	0,76	n.p.	n.p.
GYM	$y = 328175x - 51665$	0,9961	dagnje	0,10	0,32	n.p.	n.p.
	$y = 299339x + 121977$	0,9952	kamenice	0,58	1,93	n.p.	n.p.
	$y = 345441x - 34599$	0,9986	kapice	0,12	0,40	n.p.	n.p.
	$y = 325093x + 42840$	0,9995	mješčićnice	0,88	2,90	n.p.	n.p.



PnTX-G	$y = 58350x - 9909,2$	0,9977	dagnje	0,11	0,36	n.p.	n.p.
	$y = 60501x - 14478$	0,9990	kamenice	0,45	1,49	n.p.	n.p.
	$y = 58219x - 111,97$	0,9997	kapice	0,11	0,35	n.p.	n.p.
	$y = 61652x - 2146,6$	0,9995	mješčićnice	0,63	2,07	n.p.	n.p.

n.p. nije primjenjivo

<sup>a</sup>µg OA ekv.kg<sup>-1</sup><sup>b</sup>µg PTX2 ekv.kg<sup>-1</sup><sup>c</sup>µg AZA ekv.kg<sup>-1</sup><sup>d</sup>µg YTX ekv.kg<sup>-1</sup>

#### 4.1.5. Ponovljivost i unutarlaboratorijska obnovljivost

Ponovljivost i unutarlaboratorijska obnovljivost određene su ispitivanjem slijepih uzoraka obogaćenih analitima na tri odnosno četiri koncentracijske razine, ovisno o fiktotoksinu. Izračun parametara ponovljivosti i unutarlaboratorijske obnovljivosti na različitim koncentracijskim razinama proveden je primjenom programa InterVAL Plus Software. Dobivene vrijednosti CV i iskorištenja prikazani su u Tablicama 11-16. Kromatogrami slijepih uzoraka obogaćenih analitima prikazani su u Prilozima 4-7.

**Tablica 11** CV ponovljivosti, CV unutarlaboratorijske obnovljivosti i RC za metodu određivanja DA

W	CVpon/%	CVobn/%	RC/%
50,0	10,1	11,8	93,3
64,6	9,3	10,7	93,4
79,1	8,8	10,1	93,4
150,0	8,2	9,1	93,5
250,0	8,0	8,7	93,5
375,0	7,9	8,5	93,5
500,0	7,9	8,4	93,5
750,0	7,9	8,3	93,5
1000,0	7,9	8,3	93,5

W koncentracijska razina/µgkg<sup>-1</sup>; pon ponovljivost; obn unutarlaboratorijska obnovljivost

Tablica 12 CV ponovljivosti, CV unutarlaboratorijske obnovljivosti i RC za metodu određivanja PST

STX				dcGTX2,3				dcSTX				GTX2,3			
W	CVpon/%	CVobn/%	RC/%	W	CVpon/%	CVobn/%	RC/%	W	CVpon/%	CVobn/%	RC/%	W	CVpon/%	CVobn/%	RC/%
120,0	6,7	8,5	92,1	120,0	9,7	10,1	89,1	120,0	6,9	7,9	97,7	120,0	8,2	10,0	94,7
144,0	6,7	7,8	93,0	150,0	8,5	9,8	89,2	148,3	7,1	7,7	94,7	150,0	6,7	8,0	92,4
150,0	6,7	7,7	93,2	150,1	8,5	9,8	89,2	150,0	7,1	7,7	94,5	153,9	6,6	7,8	92,2
164,4	6,6	7,6	93,5	180,0	7,8	10,2	89,3	173,8	7,2	7,7	92,8	176,5	5,8	6,8	91,0
180,0	6,6	7,7	93,9	181,2	7,7	10,3	89,3	180,0	7,3	7,7	92,4	180,0	5,7	6,6	90,9
210,0	6,6	8,2	94,4	210,0	7,3	10,8	89,3	210,0	7,4	7,9	90,9	210,0	4,9	5,8	89,7
240,0	6,5	8,9	94,7	240,0	7,0	11,3	89,4	240,0	7,5	8,1	89,8	240,0	4,4	5,2	88,9
GTX5				C1,2				GTX1,4				NEO			
W	CVpon/%	CVobn/%	RC/%	W	CVpon/%	CVobn/%	RC/%	W	CVpon/%	CVobn/%	RC/%	W	CVpon/%	CVobn/%	RC/%
120,0	5,4	9,7	97,0	120,0	13,7	17,3	86,9	120,0	7,6	12,6	92,3	120,0	10,6	18,0	83,6
149,9	5,5	8,0	96,3	150,0	13,6	16,0	87,7	150,0	7,6	11,4	92,6	150,0	8,4	14,6	86,5
150,0	5,5	8,0	96,3	169,5	13,6	15,5	88,0	180,0	7,6	10,6	92,8	165,3	7,7	13,5	87,5
171,8	5,5	7,2	95,9	180,0	13,5	15,3	88,2	210,0	7,6	10,1	93,0	180,0	7,1	12,7	88,4
180,0	5,5	7,1	95,8	210,0	13,5	14,7	88,6	240,0	7,6	9,7	93,1	201,8	6,4	11,7	89,5
210,0	5,5	6,7	95,5	222,5	13,5	14,6	88,7	370,0	7,6	9,3	93,4	210,0	6,2	11,4	89,8
240,0	5,5	6,5	95,3	240,0	13,4	14,4	88,8	500,0	7,5	9,1	93,5	240,0	5,5	10,5	90,8

W koncentracijska razina/ $\mu\text{gkg}^{-1}$ ; pon ponovljivost; obn unutarlaboratorijska obnovljivost

**Tablica 13** CV ponovljivosti, CV unutarlaboratorijske obnovljivosti i RC za okadaičnu skupinu LT

OA				DTX1				DTX2				PTX2			
W	CVpon/%	CVobn/%	RC/%	W	CVpon/%	CVobn/%	RC/%	W	CVpon/%	CVobn/%	RC/%	W	CVpon/%	CVobn/%	RC/%
45,0	8,0	10,9	91,8	45,0	6,1	7,5	95,1	45,0	6,2	7,1	96,4	45,0	12,8	16,6	99,7
56,5	7,0	8,6	92,4	55,0	6,0	6,8	92,3	52,7	6,2	6,8	96,9	56,5	13,2	15,9	96,3
68,0	6,5	7,4	92,8	56,5	6,0	6,8	91,9	56,5	6,1	6,7	97,1	67,4	13,5	15,5	94,1
79,0	6,1	6,7	93,1	63,1	5,9	6,6	90,7	59,1	6,1	6,6	97,2	68,0	13,6	15,5	94,0
90,0	5,9	6,3	93,4	68,0	5,9	6,5	89,9	68,0	6,1	6,4	97,6	79,0	13,8	15,3	92,5
295,0	5,0	6,8	94,5	79,0	5,8	6,4	88,4	79,0	6,1	6,6	97,9	90,0	14,0	15,1	91,3
500,0	5,0	7,2	94,7	90,0	5,8	6,5	87,4	90,0	6,1	6,8	98,1				

W koncentracijska razina/ $\mu\text{gkg}^{-1}$ ; pon ponovljivost; obn unutarlaboratorijska obnovljivost**Tablica 14** CV ponovljivosti, CV unutarlaboratorijske obnovljivosti i R za azaspiracide

AZA1				AZA2				AZA3			
W	CVpon/%	CVobn/%	RC/%	W	CVpon/%	CVobn/%	RC/%	W	CVpon/%	CVobn/%	RC/%
40,0	5,5	10,8	106,8	40,0	5,4	6,6	100,8	40,0	7,3	8,7	97,1
50,0	4,7	8,3	101,9	47,3	5,1	6,7	99,4	50,0	7,6	8,5	94,0
53,8	4,5	7,8	100,5	50,0	5,0	6,8	99,0	50,4	7,6	8,5	93,9
60,0	4,2	7,4	98,6	54,0	4,9	6,9	98,4	60,0	7,7	8,8	91,9
63,4	4,0	7,4	97,7	60,0	4,8	7,1	97,8	60,5	7,7	8,8	91,8
70,0	3,8	7,4	96,3	70,0	4,7	7,5	96,9	70,0	7,9	9,2	90,4
80,0	3,5	7,9	94,5	80,0	4,6	7,8	96,2	80,0	8,0	9,7	89,3

W koncentracijska razina/ $\mu\text{gkg}^{-1}$ ; pon ponovljivost; obn unutarlaboratorijska obnovljivost

**Tablica 15** CV ponovljivosti, CV unutarlaboratorijske obnovljivosti i R za jesotoksine

YTX				homo YTX			
W	CVpon/%	CVobn/%	RC/%	W	CVpon/%	CVobn/%	RC/%
937,5	6,9	9,2	101,6	937,50	7,2	9,9	103,0
1187,9	7,1	8,7	98,7	1219,31	7,5	9,2	98,6
1406,3	7,3	8,4	96,9	1406,25	7,6	9,0	96,7
1412,1	7,3	8,4	96,9	1476,54	7,7	8,9	96,1
1875,0	7,4	8,1	94,5	1875,00	7,9	8,7	93,6
2344,0	7,6	8,2	93,1	2344,00	8,1	8,6	91,7
2813,0	7,6	8,2	92,2	2813,00	8,2	8,6	90,4

W koncentracijska razina/ $\mu\text{gkg}^{-1}$ ; pon ponovljivost; obn unutarlaboratorijska obnovljivost

**Tablica 16** CV ponovljivosti, CV unutarlaboratorijske obnovljivosti i R za cikličke imine

SPX1				GYM				PnTX-G			
W	CVpon/%	CVobn/%	RC/%	W	CVpon/%	CVobn/%	RC/%	W	CVpon/%	CVobn/%	RC/%
25,0	6,2	13,7	87,5	25,0	4,4	7,9	92,1	25,0	11,2	14,6	85,4
34,0	6,3	10,5	86,1	29,7	4,0	6,8	92,5	33,5	8,5	12,2	86,8
41,2	6,3	9,2	85,4	34,2	3,7	6,2	92,8	41,4	7,1	11,2	87,6
62,5	6,4	7,7	84,2	62,5	3,0	4,4	93,6	62,5	5,2	10,3	88,7
100,0	6,5	7,2	83,4	100,0	2,8	3,7	94,0	100,0	4,1	10,1	89,6
150,0	6,5	7,4	83,0	150,0	2,7	3,4	94,2	150,0	3,6	10,1	90,0
200,0	6,5	7,5	82,7	200,0	2,7	3,3	94,4	200,0	3,4	10,2	90,3
250,0	6,6	7,6	82,6	250,0	2,7	3,2	94,4	250,0	3,4	10,2	90,4
300,0	6,6	7,7	82,5	300,0	2,6	3,2	94,5	300,0	3,3	10,3	90,5

W koncentracijska razina/ $\mu\text{gkg}^{-1}$ ; pon ponovljivost; obn unutarlaboratorijska obnovljivost

#### 4.1.6. Mjerna nesigurnost

Rezultati određivanja proširene mjerne nesigurnosti za sve fikotoksine obuhvaćene ovim istraživanjem na različitim koncentracijskim razinama, prikazani su u **Prilozima 9-11**.

### 4.2. ANALIZA PRIKUPLJENIH UZORAKA

Određivanjem pojavnosti i koncentracija hidrofилnih i lipofilnih fikotoksina u školjkašima i mješčićnicama, provedenim metodama opisanim pod 3.2.6.-3.2.8., utvrđeno je njihovo prisustvo u svim vrstama tijekom cijelog razdoblja istraživanja. Od ukupno 676 ispitanih uzoraka, u 452 (67%) utvrđena je koncentracija jednog ili više fikotoksina  $\geq$  LOD. Od ukupnog broja analiziranih uzoraka, fikotoksini su kvantificirani u 281 od 416 uzoraka dagnji (68%), u 102 od 104 uzoraka kamenica (98%), u 39 od 52 uzoraka kapica (75%), te u 30 od 104 uzorka mješčićnica (29%). Vrsta fikotoksina, učestalost pojavnosti (frekvencija), prosječna, te najmanja i najveća utvrđena koncentracija pojedinačnih fikotoksina u ispitanim vrstama, prikazani su u **Tablicama 17 i 31**. Od ukupno 24 analizirana fikotoksina, detektirana su i kvantificirana tri hidrofилna i osam lipofilnih.

**Tablica 17** Pojavnost fikotoksina u ispitanim uzorcima dagnji i kamenica sa svih lokaliteta

Analit	Dagnje		Kamenice	
	F/% (n)	Prosječna C $\pm$ SD (min.-maks. konc.)/ $\mu\text{gkg}^{-1}$	F/% (n)	Prosječna C $\pm$ SD (min.-maks. konc.)/ $\mu\text{gkg}^{-1}$
DA	3,6 (15)	10,80 $\pm$ 11,57 (1,64-37,95)	16,3 (17)	101,77 $\pm$ 190,80 (1,41-809,35)
GTX2,3	2,4 (10)	145,66 $\pm$ 123,66 (49,09-457,68)	0,2 (1)	50,68*
GTX1,4	0,7 (3)	1027,93 $\pm$ 618,22 (597,16-1736,29)	<LOQ	< LOQ
OA	16,1 (67)	67,15 $\pm$ 67,79 (30,05-347,78)	1,9 (2)	49,79 $\pm$ 0,55 (49,40-50,17)
PTX2	0,2 (1)	30,07*	< LOQ	< LOQ
AZA1	0,5 (2)	4,97 $\pm$ 0,05 (4,93-5,00)	< LOQ	< LOQ
AZA2	5,3 (22)	4,03 $\pm$ 0,75 (3,00-5,27)	< LOQ	< LOQ
YTX	15,4 (64)	190,28 $\pm$ 132,26 (76,95-668,10)	1 (1)	112,16*
SPX1	35,3 (147)	5,92 $\pm$ 2,63 (3,46-16,02)	60,6 (63)	8,65 $\pm$ 5,95 (3,44-36,45)
GYM	24,5 (102)	4,43 $\pm$ 2,87 (0,64-17,20)	89,4 (93)	9,75 $\pm$ 5,89 (2,68-39,85)
PnTX-G	13 (54)	2,70 $\pm$ 1,59 (0,60-6,87)	1 (1)	3,59*

F udio uzoraka u kojima su kvantificirani fikotoksini u odnosu na broj ispitanih uzoraka te vrste; \*jedini uzorak sa koncentracijom  $\geq$  LOQ

U 230 uzoraka kvantificiran je jedan od analiziranih fikotoksina, dok je u njih 222 utvrđena istovremena pojavnost kombinacije dva do pet različitih fikotoksina, što je prikazano u **Tablici 18**. Kao najučestalija utvrđena je kombinacija dva fikotoksina u 159 uzoraka, dok je 49 uzoraka sadržavalo kombinaciju od tri fikotoksina, devet uzoraka kombinaciju od četiri, te je u pet uzoraka utvrđena kombinacija pet različitih fikotoksina.

Tablica 18 Broj uzoraka sa utvrđenim različitim kombinacijama fiktoksina

Kombinacija fiktoksina	Dagnje	Kamenice	Kapice	Kombinacija fiktoksina	Dagnje	Kamenice	Kapice
SPX1 + YTX	5	n.p.	n.p.	SPX1 + GYM + YTX	6	n.p.	n.p.
SPX1 + OA	14	n.p.	n.p.	SPX1 + GYM + AZA2	3	n.p.	n.p.
SPX1 + PnTX-G	16	n.p.	n.p.	SPX1 + GYM + OA	2	1	n.p.
SPX1 + GYM	9	44	1	SPX1 + GYM + DA	n.p.	10	n.p.
SPX1 + GTX2,3	1	n.p.	n.p.	PnTX-G + OA + AZA2	1	n.p.	n.p.
SPX1 + DA	1	n.p.	n.p.	GYM + AZA2 + OA	1	n.p.	n.p.
GYM + OA	2	n.p.	n.p.	GYM + AZA2 + YTX	1	n.p.	n.p.
GYM + YTX	16	1	n.p.	GYM + AZA2 + DA	1	n.p.	n.p.
GYM + AZA2	6	n.p.	n.p.	PnTX-G + OA + YTX	1	n.p.	n.p.
GYM + PnTX-G	9	n.p.	n.p.	GYM + OA + YTX	2	n.p.	n.p.
GYM + DA	n.p.	4	2	GYM + YTX + DA	1	n.p.	n.p.
OA + GTX2,3	1	n.p.	n.p.	GYM + DA + GTX2,3	n.p.	1	n.p.
OA + PTX2	1	n.p.	n.p.	AZA1 + AZA2 + OA	1	n.p.	n.p.
OA + PnTX-G	1	n.p.	n.p.	AZA2 + YTX + DA	n.p.	n.p.	2
OA + YTX	2	n.p.	n.p.	SPX1 + GYM + PnTX-G + GTX2,3	1	n.p.	n.p.
OA + AZA2	1	n.p.	n.p.	SPX1 + AZA2 + OA + YTX	1	n.p.	n.p.
OA + DA	1	n.p.	n.p.	SPX1 + PnTX-G + OA + GTX2,3	1	n.p.	n.p.
GTX2,3 + GTX1,4	2	n.p.	n.p.	SPX1 + GYM + OA + YTX	1	n.p.	n.p.
AZA2 + DA	1	n.p.	1	SPX1 + OA + YTX + GTX2,3	1	n.p.	n.p.
AZA2 + YTX	1	n.p.	n.p.	SPX1 + AZA1 + AZA2 + OA	1	n.p.	n.p.
PnTX-G + YTX	2	n.p.	n.p.	SPX1 + PnTX-G + GTX2,3 + GTX1,4	1	n.p.	n.p.
YTX + DA	n.p.	n.p.	14	SPX1 + GYM + OA + DA	n.p.	1	n.p.
SPX1 + OA + YTX	8	n.p.	n.p.	GYM + PnTX-G + OA + YTX	1	n.p.	n.p.
SPX1 + OA + PnTX-G	1	n.p.	n.p.	SPX1 + PnTX-G + OA + YTX + GTX2,3	2	n.p.	n.p.
SPX1 + PnTX-G + GYM	6	n.p.	n.p.	SPX1 + GYM + PnTX-G + OA + YTX	3	n.p.	n.p.

n.p. nije primjenjivo

U **Tablicama 19-29** prikazane su pojavnost i koncentracija fikotoksina u dagnjama prikupljenim sa osam različitih lokaliteta. Lokaliteti na kojima u niti jednom uzorku nije detektiran navedeni toksin nisu uključeni u tablični prikaz rezultata, a oni na kojima su fikotoksini kvantificirani u manje od tri uzorka nisu uključeni u statističku obradu. Analizom podataka utvrđena je statistički značajna razlika u pojavnosti na različitim lokalitetima za OA ( $p < 0,001$ ), SPX1 ( $p = 0,049$ ), GYM ( $p < 0,001$ ) i PnTX-G ( $p = 0,001$ ), dok nije utvrđena za DA ( $p = 0,581$ ), AZA2 ( $p = 0,682$ ) i YTX ( $p = 0,332$ ).

**Tablica 19** Pojavnost DA u dagnjama prikupljenim sa osam lokaliteta

Lokalitet	% $\geq$ LOQ (n)	Prosječna C $\pm$ SD/ $\mu\text{gkg}^{-1}$	Min./ $\mu\text{gkg}^{-1}$	Maks./ $\mu\text{gkg}^{-1}$
L3	1,9 (1)	4,24*	n.p.	n.p.
L4	3,8 (2)	5,06 $\pm$ 3,56	2,54	7,58
L6	11,5 (6)	11,45 $\pm$ 13,45	1,64	37,95
L7	7,7 (4)	17,38 $\pm$ 14,06	5,28	37,67
L8	3,8 (2)	4,74 $\pm$ 2,29	3,12	6,36

\*jedina izmjerena koncentracija; n.p. nije primjenjivo; među vrijednostima nije utvrđena statistički značajna razlika ( $p > 0,05$ )

**Tablica 20** Pojavnost GTX2,3 u dagnjama prikupljenim sa osam lokaliteta

Lokalitet	% $\geq$ LOQ (n)	Prosječna C $\pm$ SD/ $\mu\text{gkg}^{-1}$	Min./ $\mu\text{gkg}^{-1}$	Maks./ $\mu\text{gkg}^{-1}$
L4	15,4 (8)	169,65 $\pm$ 127,95	66,90	457,68
L5	1,9 (1)	49,09*	n.p.	n.p.
L6	1,9 (1)	50,34*	n.p.	n.p.

\*jedina izmjerena koncentracija; n.p. nije primjenjivo

**Tablica 21** Pojavnost GTX1,4 u dagnjama prikupljenim sa osam lokaliteta

Lokalitet	% $\geq$ LOQ (n)	Prosječna C $\pm$ SD/ $\mu\text{gkg}^{-1}$	Min./ $\mu\text{gkg}^{-1}$	Maks./ $\mu\text{gkg}^{-1}$
L4	5,8 (3)	1027,93 $\pm$ 618,22	597,16	1736,29

**Tablica 22** Pojavnost OA u dagnjama prikupljenim sa osam lokaliteta

Lokalitet	% $\geq$ LOQ (n)	Prosječna C $\pm$ SD/ $\mu\text{gkg}^{-1}$	Min./ $\mu\text{gkg}^{-1}$	Maks./ $\mu\text{gkg}^{-1}$
L1	32,7 (17)	64,03 <sup>ab</sup> $\pm$ 75,89	30,05	347,78
L2	32,7 (17)	47,20 <sup>b</sup> $\pm$ 23,42	30,24	113,23
L3	13,5 (7)	54,50 <sup>ab</sup> $\pm$ 22,99	33,05	101,63
L4	13,5 (7)	42,46 <sup>b</sup> $\pm$ 14,29	30,22	71,93
L5	9,6 (5)	174,20 <sup>a</sup> $\pm$ 116,29	45,93	338,21
L6	9,6 (5)	148,93 <sup>ab</sup> $\pm$ 88,38	76,41	257,33
L7	7,7 (4)	37,98 <sup>ab</sup> $\pm$ 5,93	30,58	45,02

#### 4. Rezultati

L8	9,6 (5)	32,40 <sup>b</sup> ± 3,72	30,08	38,99
----	---------	---------------------------	-------	-------

razlike vrijednosti unutar stupca označene različitim slovom (<sup>a</sup>, <sup>b</sup>) statistički su značajne ( $p < 0,05$ )

**Tablica 23** Pojavnost PTX2 u dagnjama prikupljenim sa osam lokaliteta

Lokalitet	% ≥ LOQ (n)	Prosječna C ± SD/μgkg <sup>-1</sup>	Min./μgkg <sup>-1</sup>	Maks./μgkg <sup>-1</sup>
L3	1,9 (1)	30,07*	n.p.	n.p.

\*jedina izmjerena koncentracija; n.p. nije primjenjivo

**Tablica 24** Pojavnost AZA1 u dagnjama prikupljenim sa osam lokaliteta

Lokalitet	% ≥ LOQ (n)	Prosječna C ± SD/μgkg <sup>-1</sup>	Min./μgkg <sup>-1</sup>	Maks./μgkg <sup>-1</sup>
L1	1,9 (1)	5,00*	n.p.	n.p.
L2	1,9 (1)	4,93*	n.p.	n.p.

\*jedina izmjerena koncentracija; n.p. nije primjenjivo

**Tablica 25** Pojavnost AZA2 u dagnjama prikupljenim sa osam lokaliteta

Lokalitet	% ≥ LOQ (n)	Prosječna C ± SD/μgkg <sup>-1</sup>	Min./μgkg <sup>-1</sup>	Maks./μgkg <sup>-1</sup>
L1	9,6 (5)	4,14 ± 0,95	3,21	5,27
L2	7,7 (4)	4,18 ± 0,83	3,37	4,97
L3	5,8 (3)	3,49 ± 0,47	3,00	3,93
L5	3,8 (2)	4,16 ± 1,20	3,31	5,01
L6	7,7 (4)	3,95 ± 0,72	3,14	4,87
L7	1,9 (1)	4,54*	n.p.	n.p.
L8	5,8 (3)	4,02 ± 0,85	3,19	4,90

\*jedina izmjerena koncentracija; n.p. nije primjenjivo; među vrijednostima nije utvrđena statistički značajna razlika ( $p > 0,05$ )

**Tablica 26** Pojavnost YTX u dagnjama prikupljenim sa osam lokaliteta

Lokalitet	% ≥ LOQ (n)	Prosječna C ± SD/μgkg <sup>-1</sup>	Min./μgkg <sup>-1</sup>	Maks./μgkg <sup>-1</sup>
L1	9,6 (5)	147,34 ± 42,03	85,42	191,59
L2	7,7 (4)	123,85 ± 30,56	82,60	156,32
L3	28,8 (15)	258,73 ± 164,63	106,05	654,44
L4	3,8 (2)	164,94 ± 86,36	103,88	226,00
L5	19,2 (10)	206,38 ± 176,37	77,53	668,10
L6	11,5 (6)	122,40 ± 51,28	76,95	199,06
L7	9,6 (5)	141,90 ± 58,24	84,92	232,72
L8	32,7 (17)	189,83 ± 127,03	77,52	561,86

među vrijednostina nije utvrđena statistički značajna razlika ( $p > 0,05$ )

**Tablica 27** Pojavnost SPX1 u dagnjama prikupljenim sa osam lokaliteta



Lokalitet	% ≥ LOQ (n)	Prosječna C ± SD/μgkg <sup>-1</sup>	Min./μgkg <sup>-1</sup>	Maks./μgkg <sup>-1</sup>
L1	42,3 (22)	5,45 <sup>b</sup> ± 1,66	3,46	10,90
L2	44,2 (23)	6,47 <sup>b</sup> ± 2,76	3,51	11,93
L3	48,1 (25)	5,04 <sup>b</sup> ± 1,68	3,62	10,62
L4	59,6 (31)	6,70 <sup>b</sup> ± 2,74	3,53	13,51
L5	40,4 (21)	5,96 <sup>ab</sup> ± 3,18	3,46	16,02
L6	34,6 (18)	6,43 <sup>ab</sup> ± 3,48	3,74	15,79
L7	11,5 (6)	3,86 <sup>a</sup> ± 0,23	3,52	4,11
L8	1,9 (1)	3,81 <sup>*</sup>	n.p.	n.p.

n.p. nije primjenjivo; razlike vrijednosti unutar stupca označene različitim slovom (a, b) statistički su značajne (p < 0,05)

**Tablica 28** Pojavnost GYM u dagnjama prikupljenim sa osam lokaliteta

Lokalitet	% ≥ LOQ (n)	Prosječna C ± SD/μgkg <sup>-1</sup>	Min./μgkg <sup>-1</sup>	Maks./μgkg <sup>-1</sup>
L1	19,2 (10)	3,79 <sup>ab</sup> ± 1,37	1,44	6,97
L2	21,2 (11)	3,36 <sup>ab</sup> ± 1,31	1,01	5,21
L3	38,5 (20)	4,78 <sup>a</sup> ± 1,18	2,92	7,92
L4	28,8 (15)	7,12 <sup>ab</sup> ± 4,96	0,93	15,64
L5	36,5 (19)	4,27 <sup>ab</sup> ± 1,48	1,37	7,57
L6	7,7 (4)	6,41 <sup>ab</sup> ± 7,33	0,92	17,20
L7	17,3 (9)	2,88 <sup>b</sup> ± 1,27	0,64	4,53
L8	26,9 (14)	2,96 <sup>b</sup> ± 1,08	0,73	4,73

razlike vrijednosti unutar stupca označene različitim slovom (a, b) statistički su značajne (p < 0,05)

**Tablica 29** Pojavnost PnTX-G u dagnjama prikupljenim sa osam lokaliteta

Lokalitet	% ≥ LOQ (n)	Prosječna C ± SD/μgkg <sup>-1</sup>	Min./μgkg <sup>-1</sup>	Maks./μgkg <sup>-1</sup>
L1	3,8 (2)	2,34 ± 2,33	0,69	3,99
L2	5,8 (3)	0,75 <sup>ab</sup> ± 0,15	0,60	0,90
L3	9,6 (5)	1,16 <sup>b</sup> ± 0,29	0,84	1,52
L4	69,2 (36)	3,36 <sup>a</sup> ± 1,34	1,74	6,87
L5	3,8 (2)	1,83 ± 1,29	0,91	2,74
L6	5,7 (3)	1,51 <sup>b</sup> ± 0,43	1,05	1,92
L7	1,9 (1)	1,51 <sup>*</sup>	n.p.	n.p.
L8	3,8 (2)	1,05 ± 0,64	0,60	1,50

\*jedina izmjerena koncentracija; n.p. nije primjenjivo; razlike vrijednosti unutar stupca označene različitim slovom (a, b) statistički su značajne (p < 0,05)

Pojavnost i koncentracije fiktoksina u dagnjama i kamenicama prikupljenim s lokaliteta L4 prikazane su u **Tablici 30**, dok su pojava i koncentracije fiktoksina u različitim vrstama prikupljenim s lokaliteta L9 prikazane u **Tablici 31**.

**Tablica 30** Pojavnost fikotoksina u dagnjama i kamenicama prikupljenim sa lokaliteta L4

Dagnje			Kamenice		
Analit	% ≥ LOQ (n)	Prosječna C ± SD/μgkg <sup>-1</sup> (Min.-Max.)/μgkg <sup>-1</sup>	Analit	% ≥ LOQ (n)	Prosječna C ± SD/μgkg <sup>-1</sup> (Min.-Max.)/μgkg <sup>-1</sup>
DA	(3,8) 2	5,06 <sup>a</sup> ± 3,56 (2,54-7,58)	DA	13,5 (7)	49,20 <sup>b</sup> ± 41,23 (10,06-122,17)
OA	13,5(7)	42,46 ± 14,29 (30,22-71,93)	OA	3,8 (2)	49,79 ± 0,55 (49,40-50,17)
SPX1	59,6 (31)	6,70 ± 2,74 (3,53-13,51)	SPX1	55,8 (29)	7,87 ± 3,83 (3,61-19,98)
GYM	28,8 (15)	7,12 <sup>a</sup> ± 4,96 (0,93-15,64)	GYM	88,5 (46)	12,82 <sup>b</sup> ± 6,93 (5,09-39,85)
PnTX-G	69,2 (36)	3,36 ± 1,34 (1,74-6,87)	PnTX-G	1,9 (1)	3,59*
YTX	3,8 (2)	164,94 ± 86,36 (103,88-226,00)			
GTX2,3	15,4 (8)	169,65 ± 127,95 (66,90-457,68)			
GTX1,4	5,8 (3)	1027,93 ± 618,22 (597,16-1736,29)			

\*jedina izmjerena koncentracija; razlike vrijednosti unutar retka označene različitim slovom (<sup>a</sup>, <sup>b</sup>) statistički su značajne (p < 0,05)

**Tablica 31** Pojavnost fikotoksina u kamenicama, kopicama i mješćnicama prikupljenim sa lokaliteta L9

Kamenice			Kopice			Mješćnice		
Analit	% $\geq$ LOQ (n)	A C $\pm$ SD (Min.-Max.)/ $\mu\text{gkg}^{-1}$	Analit	% $\geq$ LOQ (n)	A C $\pm$ SD (Min.-Max.)/ $\mu\text{gkg}^{-1}$	Analit	% $\geq$ LOQ (n)	A C $\pm$ SD (Min.-Max.)/ $\mu\text{gkg}^{-1}$
DA	19,2 (10)	138,56 <sup>ab</sup> $\pm$ 244,81 (1,41-809,35)	DA	51,9 (27)	166,26 <sup>a</sup> $\pm$ 243,09 (1,66-809,54)	DA	26,9 (28)	5,80 <sup>b</sup> $\pm$ 6,78 (1,26-24,33)
GYM	90,4 (47)	6,74 <sup>a</sup> $\pm$ 1,96 (2,68-10,97)	GYM	5,8 (3)	4,23 <sup>b</sup> $\pm$ 2,97 (1,59-7,44)	GYM	1 (1)	4,73*
SPX1	65,4 (34)	9,31 $\pm$ 7,29 (3,44-36,45)	SPX1	1,9 (1)	5,57*	SPX1	1 (1)	3,69*
YTX	1,9 (1)	112,16*	YTX	48,1 (25)	140,38 $\pm$ 48,62 (78,74-272,36)	n.p.	n.p.	n.p.
GTX2,3	1,9 (1)	50,68*	AZA2	9,6 (5)	3,82 $\pm$ 0,90 (3,19-5,40)	n.p.	n.p.	n.p.

A C prosječna koncentracija; \*jedina izmjerena koncentracija; n.p. nije primjenjivo; razlike vrijednosti unutar retka označene različitim slovom (<sup>a</sup>, <sup>b</sup>) statistički su značajne (p < 0,05)

Sezonska pojavnost fiktoksina u analiziranim vrstama prikupljenim sa svih lokacija, prikazana je po sezonama u **Tablicama 32-35**. Sezone u kojima nije utvrđen niti jedan od fiktoksina izostavljene su iz tabličnog prikaza podataka, a one u kojima su fiktoksini kvantificirani u manje od tri uzorka nisu uključene u statističku obradu.

Za dagnje (**Tablica 32**) je utvrđena statistički značajna razlika u prosječnim koncentracijama OA u proljetnoj sezoni u odnosu na jesen i zimu ( $p < 0,001$ ). Kod YTX utvrđena je razlika u pojavnosti između ljeta i jeseni ( $p = 0,025$ ), dok se pojavnost GYM u jesen razlikuje u odnosu na ostale sezone ( $p = 0,038$ ). Značajna je razlika u pojavnosti SPX1 u ljetnoj i jesenskoj sezoni u odnosu na zimsku i proljetnu ( $p < 0,001$ ), dok je za PnTX-G utvrđena značajna razlika između jesenske sezone u odnosu na zimu i proljeće ( $p = 0,023$ ). Statistički značajna razlika nije utvrđena u sezonskoj pojavnosti DA ( $p = 0,775$ ) i AZA2 ( $p = 0,668$ ) u dagnjama.

Statistički značajna razlika utvrđena je kod kamenica (**Tablica 33**) u sezonskoj pojavnosti GYM u ljetnim mjesecima u odnosu na proljeće i zimu ( $p = 0,005$ ), te za SPX1, čija se pojavnost u proljeće razlikuje u odnosu na ljeto i zimu ( $p = 0,017$ ). Statistički značajna razlika među sezonama nije utvrđena za DA ( $p = 0,888$ ).

Kod kapica nije utvrđena statistički značajna razlika u sezonskoj pojavnosti DA ( $p = 0,067$ ) i YTX ( $p = 0,384$ ) (**Tablica 34**).

Za mješćnice je uvrđena značajna razlika u pojavnosti DA, koja se razlikuje u jesenskim mjesecima od ostalih sezona ( $p < 0,001$ ) (**Tablica 35**).

**Tablica 32** Sezonska pojavnost fiktoksina u dagnjama u razdoblju od travnja 2018. do ožujka 2019. god.

Sezona	n	% $\geq$ LOQ (n $\geq$ LOQ)	A C $\pm$ SD/ $\mu\text{gkg}^{-1}$	Min./ $\mu\text{gkg}^{-1}$	Maks./ $\mu\text{gkg}^{-1}$
DA					
jesen	104	9,6 (10)	10,17 $\pm$ 10,65	1,64	37,95
zima	104	4,8 (5)	12,08 $\pm$ 14,50	2,54	37,67
GTX2,3					
proljeće	104	6,7 (7)	171,14 $\pm$ 142,41	49,09	457,68
zima	104	2,9 (3)	86,20 $\pm$ 19,77	66,90	106,40
GTX1,4					
proljeće	104	1,0 (1)	1736,29*	n.p.	n.p.
zima	104	1,9 (2)	673,75 $\pm$ 108,31	597,16	750,34
OA					
proljeće	104	24 (25)	103,99 <sup>a</sup> $\pm$ 97,71	30,87	347,78
ljeto	104	15,4 (16)	53,49 <sup>ab</sup> $\pm$ 31,97	30,24	141,25
jesen	104	11,5 (12)	35,23 <sup>b</sup> $\pm$ 4,68	30,08	45,00
zima	104	13,5 (14)	44,35 <sup>b</sup> $\pm$ 13,01	30,05	66,31
PTX2					
zima	104	1,0 (1)	30,07*	n.p.	n.p.

#### 4. Rezultati

AZA1					
ljeto	104	1,9 (2)	4,97 ± 0,05	4,93	5,00
AZA2					
proljeće	104	1,9 (2)	3,88 ± 0,20	3,74	4,03
ljeto	104	9,6 (10)	4,00 ± 0,74	3,23	5,27
jesen	104	9,6 (10)	4,08 ± 0,87	3,00	5,01
YTX					
proljeće	104	20,2 (21)	168,31 <sup>ab</sup> ± 93,72	77,53	468,92
ljeto	104	26,9 (28)	236,06 <sup>a</sup> ± 169,15	76,25	668,10
jesen	104	12,5 (13)	135,13 <sup>b</sup> ± 53,55	77,52	288,68
zima	104	1,9 (2)	138,43 ± 75,19	85,27	191,59
SPX1					
proljeće	104	63,5 (66)	6,85 <sup>a</sup> ± 3,29	3,46	16,02
ljeto	104	40,4 (42)	4,74 <sup>b</sup> ± 1,13	3,46	7,71
jesen	104	2,9 (3)	4,26 <sup>b</sup> ± 0,14	4,11	4,40
zima	104	34,6 (36)	5,73 <sup>a</sup> ± 1,92	3,66	12,32
GYM					
proljeće	104	3,8 (4)	3,66 <sup>a</sup> ± 2,91	1,07	6,67
ljeto	104	57,7 (60)	3,86 <sup>a</sup> ± 2,32	0,64	13,47
jesen	104	35,6 (37)	5,46 <sup>b</sup> ± 3,43	3,28	17,20
zima	104	1,0 (1)	3,52 <sup>*</sup>	n.p.	n.p.
PnTX-G					
proljeće	104	14,4 (15)	1,99 <sup>a</sup> ± 0,59	1,42	3,81
ljeto	104	23,1 (24)	2,69 <sup>ab</sup> ± 1,89	0,60	6,87
jesen	104	11,5 (12)	3,72 <sup>b</sup> ± 1,16	1,51	5,75
zima	104	2,9 (3)	2,17 <sup>a</sup> ± 0,29	1,84	2,38

A C prosječna koncentracija; \*jedina izmjerena koncentracija; n.p. nije primjenjivo; razlike vrijednosti unutar stupca označene različitim slovom (<sup>a</sup>, <sup>b</sup>) statistički su značajne (p < 0,05); među neoznačenim vrijednostima unutar stupca uključenim u statističku obradu nije utvrđena statistički značajna razlika (p > 0,05)

**Tablica 33** Sezonska pojavnost fiktoksina u kamenicama u razdoblju od travnja 2018. do ožujka 2019. god.

Sezona	n	% ≥ LOQ (n ≥ LOQ)	A C ± SD/μgkg <sup>-1</sup>	Min./μgkg <sup>-1</sup>	Maks./μgkg <sup>-1</sup>
DA					
proljeće	26	23,1 (6)	77,69 ± 77,20	10,06	212,37
ljeto	26	3,9 (1)	17,58 <sup>*</sup>	n.p.	n.p.
jesen	26	7,7 (2)	57,97 ± 63,73	12,90	103,03
zima	26	30,8 (8)	141,30 ± 273,00	1,41	809,35
GTX2,3					
ljeto	26	3,9 (1)	50,68 <sup>*</sup>	n.p.	n.p.
OA					
proljeće	26	3,9 (1)	49,4 <sup>*</sup>	n.p.	n.p.
zima	26	3,9 (1)	50,17 <sup>*</sup>	n.p.	n.p.
YTX					
jesen	26	3,9 (1)	112,16 <sup>*</sup>	n.p.	n.p.
SPX1					

#### 4. Rezultati

proljeće	26	92,3 (24)	10,10 <sup>a</sup> ± 4,67	3,61	19,98
ljeto	26	65,4 (17)	10,67 <sup>b</sup> ± 8,96	3,86	36,45
jesen	26	23,1 (6)	4,49 <sup>ab</sup> ± 0,87	3,44	6,06
zima	26	61,5 (16)	5,88 <sup>b</sup> ± 2,00	3,46	9,46
GYM					
proljeće	26	80,8 (21)	7,55 <sup>a</sup> ± 2,24	3,59	12,35
ljeto	26	96,2 (25)	13,15 <sup>b</sup> ± 9,02	2,68	39,85
jesen	26	84,6 (22)	9,28 <sup>ab</sup> ± 4,89	4,08	23,82
zima	26	96,2 (25)	8,62 <sup>a</sup> ± 2,95	5,47	17,16
PnTX-G					
jesen	26	3,9 (1)	3,59*	n.p.	n.p.

A C prosječna koncentracija; \*jedina izmjerena koncentracija; n.p. nije primjenjivo; razlike vrijednosti unutar stupca označene različitim slovom (<sup>a</sup>, <sup>b</sup>) statistički su značajne ( $p < 0,05$ ); među neoznačenim vrijednostima unutar stupca uključenim u statističku obradu nije utvrđena statistički značajna razlika ( $p > 0,05$ )

**Tablica 34** Sezonska pojavnost fiktoksina u kapicama u razdoblju od travnja 2018. do ožujka 2019. god.

Sezona	n	% ≥ LOQ (n ≥ LOQ)	A C ± SD/μgkg <sup>-1</sup>	Min./μgkg <sup>-1</sup>	Maks./μgkg <sup>-1</sup>
DA					
proljeće	13	46,2 (6)	26,97 ± 22,68	3,01	55,12
ljeto	13	23,1 (3)	29,94 ± 25,59	2,97	53,89
jesen	13	76,9 (10)	155,05 ± 259,30	1,66	710,04
zima	13	61,5 (8)	335,86 ± 273,56	92,18	809,54
AZA2					
ljeto	13	15,4 (2)	3,58 ± 0,08	3,52	3,64
jesen	13	15,4 (2)	4,30 ± 1,56	3,19	5,40
zima	13	7,7 (1)	3,36*	n.p.	n.p.
YTX					
proljeće	13	38,5 (5)	171,83 ± 43,00	126,24	230,30
ljeto	13	38,5 (5)	143,86 ± 78,44	78,74	272,36
jesen	13	61,5 (8)	123,49 ± 26,15	86,68	159,96
zima	13	53,9 (7)	134,72 ± 45,49	86,12	202,73
SPX1					
jesen	13	7,7 (1)	5,57*	n.p.	n.p.
GYM					
proljeće	13	7,7 (1)	1,59*	n.p.	n.p.
ljeto	13	7,7 (1)	3,66*	n.p.	n.p.
zima	13	7,7 (1)	7,44*	n.p.	n.p.

A C prosječna koncentracija; \*jedina izmjerena koncentracija; n.p. nije primjenjivo; među neoznačenim vrijednostima unutar stupca uključenim u statističku obradu nije utvrđena statistički značajna razlika ( $p > 0,05$ )

**Tablica 35** Sezonska pojavnost fiktoksina u mješčincicama u razdoblju od travnja 2018. do ožujka 2019. god.

Sezona	n	% ≥ LOQ (n ≥ LOQ)	A C ± SD/μgkg <sup>-1</sup>	Min./μgkg <sup>-1</sup>	Maks./μgkg <sup>-1</sup>
DA					
proljeće	26	11,5 (3)	2,24 <sup>a</sup> ± 0,25	1,98	2,48
ljetno	26	3,8 (1)	1,44 <sup>*</sup>	n.p.	n.p.
jesen	26	19,2 (5)	17,44 <sup>b</sup> ± 9,57	1,26	24,33
zima	26	73,1 (19)	3,53 <sup>a</sup> ± 1,54	1,58	6,67
SPX1					
jesen	26	3,8 (1)	3,69 <sup>*</sup>	n.p.	n.p.
GYM					
ljetno	26	3,8 (1)	4,73 <sup>*</sup>	n.p.	n.p.

A C prosječna koncentracija; \*jedina izmjerena koncentracija; n.p. nije primjenjivo; razlike vrijednosti unutar stupca označene različitim slovom (<sup>a</sup>, <sup>b</sup>) statistički su značajne (p < 0,05)

### 4.3. PROCJENA IZLOŽENOSTI POTROŠAČA

Uzimajući u obzir prosječnu masu konzumenata u RH, utvrđena je veličina porcije u odnosu na tjelesnu masu u slučaju konzumacije prosječne i najveće porcije u RH, te velike porcije koja prema mišljenju EFSA iznosi 400 g (EFSA, 2009.e). U slučaju konzumacije školjkaša koji sadrže LT, veličina konzumirane porcije korigirana je zbog njihovog koncentriranja uslijed gubitka vode tijekom kuhanja. Veličine porcija po kg tjelesne mase prikazane su u **Tablici 36**.

**Tablica 36** Veličina porcije u odnosu na tjelesnu masu

Veličina porcije	Masa porcije u odnosu na tjelesnu masu/gkg <sup>-1</sup> t.m.
prosječna porcija u odnosu na tjelesnu masu	0,42
najveća porcija u odnosu na tjelesnu masu	1,07
korigirana prosječna porcija u odnosu na tjelesnu masu <sup>a</sup>	0,63
korigirana najveća porcija u odnosu na tjelesnu masu <sup>a</sup>	1,60
velika porcija <sup>b</sup> u odnosu na tjelesnu masu	4,90
korigirana velika porcija <sup>b</sup> u odnosu na tjelesnu masu <sup>a</sup>	7,34

<sup>a</sup>Odnosi se na LT; <sup>b</sup>porcija od 400 g

**Tablice 37-42** prikazuju izloženost potrošača u RH fiktoksinima za koje su legislativom utvrđene NDK (uključujući i PTX čije su NDK ukinute Uredbom Europske Komisije 2021/1374), tijekom 2018. i 2019. god., a koja se temelji na prehranbenim navikama potrošača (**Tablica 5**) i koncentracijama fiktoksina utvrđenim u uzorcima školjkaša prikupljenim tijekom ovog istraživanja. Udio u ARfD utvrđen je u slučaju konzumacije prosječne i najveće porcije u RH, kao i u slučaju konzumacije velike porcije od 400 g (EFSA,

2009.e). Prikazan je broj uzoraka u kojima su utvrđene koncentracije  $\geq$  LOQ, te u odnosu na njihov broj udio uzoraka čijom bi se konzumacijom premašila ARfD u slučaju konzumacije prosječne i najveće porcije, te velike porcije, uzimajući u obzir prosječnu tjelesnu masu konzumenata u RH. Prilikom utvrđivanja izloženosti potrošača LT u izračun su uzete nekorigirane i korigirane porcije zbog koncentriranja LT uslijed termičke obrade (EFSA, 2009.f).

U **Tablici 43** prikazana je teoretska izloženost potrošača pri konzumaciji prosječne veličine porcije i najveće veličine porcije u RH, te velike porcije od 400 g. Izloženost se odnosi na koncentracije fiktoksina u školjkašima jednake NDK i prikazana je u odnosu na prosječnu tjelesnu masu potrošača u RH (**Tablica 5**), te je utvrđen njen udio u ARfD.

**Tablica 37** Izloženost potrošača DA u RH tijekom 2018.-2019. god.

N > LOQ	Izloženost	Prosječna porcija u RH	Najveća porcija u RH	Velika porcija <sup>a</sup>
87	% > ARfD (n)	n.p.	n.p.	n.p.
	Min.-Max. % ARfD	0,002-1,14	0,005-2,88	0,02-13,21
	Min.-Max. izloženost/ $\mu\text{gkg}^{-1}$ t.m.	0,001-0,34	0,001-0,87	0,01-3,96

N broj uzoraka sa koncentracijama većim od LOQ; n broj uzoraka čijom konzumacijom bi se premašila ARfD; n.p. nije primjenjivo; <sup>a</sup>porcija od 400 g

**Tablica 38** Izloženost potrošača PST u RH tijekom 2018.-2019. god.

N > LOQ	Izloženost	Prosječna porcija u RH	Najveća porcija u RH	Velika porcija <sup>a</sup>
11	% > ARfD (n)	9,09 (1)	27,3 (3)	45,45 (5)
	Min.-Max. % ARfD	2,34-154,08	5,92-390,83	27,15-1791,45
	Min.-Max. izloženost/ $\mu\text{gkg}^{-1}$ t.m.	0,01-0,77	0,03-1,95	0,14-8,96

N broj uzoraka sa koncentracijama većim od LOQ; n broj uzoraka čijom konzumacijom bi se premašila ARfD; <sup>a</sup>porcija od 400 g

**Tablica 39** Izloženost potrošača OA u RH tijekom 2018.-2019. god.

N > LOQ	Izloženost	Prosječna porcija u RH	Najveća porcija u RH	Velika porcija <sup>a</sup>
69	% > ARfD (n)	n.p.	2,90 (2)	24,64 (17)
	Min.-Max. % ARfD	4,22-48,82	10,70-123,83	49,05-567,62
	Min.-Max. izloženost/ $\mu\text{gkg}^{-1}$ t.m.	0,01-0,15	0,03-0,37	0,15-1,70
	Izloženost s korekcijom porcije za LT <sup>b</sup>			
	% > ARfD (n)	n.p.	7,25 (5)	55,07 (38)
	Min.-Max. % ARfD	6,33-73,23	16,05-185,75	73,58-851,43
	Min.-Max. izloženost/ $\mu\text{gkg}^{-1}$ t.m.	0,02-0,22	0,05-0,56	0,22-2,55

N broj uzoraka sa koncentracijama većim od LOQ; n broj uzoraka čijom konzumacijom bi se premašila ARfD; n.p. nije primjenjivo; <sup>a</sup>porcija od 400 g; <sup>b</sup>korigirana porcija u odnosu na t.m.



**Tablica 40** Izloženost potrošača PTX u RH tijekom 2018.-2019. god.

N > LOQ	Izloženost	Prosječna porcija u RH	Najveća porcija u RH	Velika porcija <sup>a</sup>
1	% > ARfD (n)	n.p.	n.p.	n.p.
	Min.-Max. % ARfD	1,58*	4,02*	18,40*
	Min.-Max. izloženost/ $\mu\text{gkg}^{-1}$ t.m.	0,01*	0,03*	0,15*
	Izloženost s korekcijom porcije za LT <sup>b</sup>			
	% > ARfD (n)	n.p.	n.p.	n.p.
	Min.-Max. % ARfD	2,37*	6,02*	27,61*
	Min.-Max. izloženost/ $\mu\text{gkg}^{-1}$ t.m.	0,02*	0,05*	0,22*

N broj uzoraka sa koncentracijama većim od LOQ; n broj uzoraka čijom konzumacijom bi se premašila ARfD; n.p. nije primjenjivo; <sup>a</sup>porcija od 400 g; <sup>b</sup>korigirana porcija u odnosu na t.m.; \*jedina utvrđena vrijednost

**Tablica 41** Izloženost potrošača AZA u RH tijekom 2018.-2019. god.

N > LOQ	Izloženost	Prosječna porcija u RH	Najveća porcija u RH	Velika porcija <sup>a</sup>
27	% > ARfD (n)	n.p.	n.p.	n.p.
	Min.-Max. % ARfD	1,14-2,92	2,88-7,41	13,20-33,97
	Min.-Max. izloženost/ $\mu\text{gkg}^{-1}$ t.m.	0,002-0,006	0,006-0,015	0,03-0,07
	Izloženost s korekcijom porcije za LT <sup>b</sup>			
	% > ARfD (n)	n.p.	n.p.	n.p.
	Min.-Max. % ARfD	1,70-4,38	4,32-11,12	19,80-50,95
	Min.-Max. izloženost/ $\mu\text{gkg}^{-1}$ t.m.	0,003-0,01	0,01-0,02	0,04-0,10

N broj uzoraka sa koncentracijama većim od LOQ; n broj uzoraka čijom konzumacijom bi se premašila ARfD; n.p. nije primjenjivo; <sup>a</sup>porcija od 400 g; <sup>b</sup>korigirana porcija u odnosu na t.m.

**Tablica 42** Izloženost potrošača YTX u RH tijekom 2018.-2019. god.

N > LOQ	Izloženost	Prosječna porcija u RH	Najveća porcija u RH	Velika porcija <sup>a</sup>
90	% > ARfD (n)	n.p.	n.p.	n.p.
	Min.-Max. % ARfD	0,13-1,13	0,33-2,85	1,51-13,09
	Min.-Max. izloženost/ $\mu\text{gkg}^{-1}$ t.m.	0,03-0,28	0,08-0,71	0,38-3,27
	Izloženost s korekcijom porcije za LT <sup>b</sup>			
	% > ARfD (n)	n.p.	n.p.	n.p.
	Min.-Max. % ARfD	0,19-1,69	0,49-4,28	2,26-19,63
	Min.-Max. izloženost/ $\mu\text{gkg}^{-1}$ t.m.	0,05-0,42	0,12-1,07	0,57-4,91

N broj uzoraka sa koncentracijama većim od LOQ; n broj uzoraka čijom konzumacijom bi se premašila ARfD; n.p. nije primjenjivo; <sup>a</sup>porcija od 400 g; <sup>b</sup>korigirana porcija u odnosu na t.m.

**Tablica 43** Izloženost potrošača u slučaju koncentracija fikotoksina jednakih NDK

Skupina fikotoksina	Izloženost temeljena na veličini porcije u RH								Velika porcija <sup>a</sup>			
	prosječna porcija				najveća porcija				izloženost/ $\mu\text{gkg}^{-1}$ t.m.		% ARfD	
	izloženost/ $\mu\text{gkg}^{-1}$ t.m.		% ARfD		izloženost/ $\mu\text{gkg}^{-1}$ t.m.		% ARfD					
DA	8,42		28,08		21,36		71,21		97,93		326,43	
PST	0,34		67,38		0,85		170,92		3,92		783,43	
OA	0,07	0,10 <sup>b</sup>	22,46	33,69 <sup>b</sup>	0,17	0,26 <sup>b</sup>	56,97	85,46 <sup>b</sup>	0,78	1,18 <sup>b</sup>	261,14	391,71 <sup>b</sup>
PTX	0,07	0,10 <sup>b</sup>	8,42	12,63 <sup>b</sup>	0,17	0,26 <sup>b</sup>	21,36	32,05 <sup>b</sup>	0,78	1,18 <sup>b</sup>	97,93	146,89 <sup>b</sup>
AZA	0,07	0,10 <sup>b</sup>	33,69	50,54 <sup>b</sup>	0,17	0,26 <sup>b</sup>	85,46	128,19 <sup>b</sup>	0,78	1,18 <sup>b</sup>	391,71	587,57 <sup>b</sup>
YTX	1,58	2,37 <sup>b</sup>	6,32	9,48 <sup>b</sup>	4,01	6,01 <sup>b</sup>	16,02	24,04 <sup>b</sup>	18,36	27,54 <sup>b</sup>	73,45	110,17 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>porcija od 400 g; <sup>b</sup>korigirana porcija u odnosu na t.m. zbog koncentriranja LT uslijed termičke obrade

## **5. RASPRAVA**

## 5.1. VALIDACIJA METODA

Usporedbom rezultata validacijske studije sa zahtjevima zakonodavstva može se donijeti zaključak o prihvatljivosti analiziranih parametara za pojedine analite, odnosno potvrda da su metode prikladne za kvantitativno određivanje fiktoksina u školjkašima i mješčincama.

Kromatogrami slijepih uzoraka (**Prilozi 4c, 5c, 6b, 7c**) pokazuju da nema interferencija koje potječu od matriksa u RT analita, što ukazuje na specifičnost metoda.

Kod metoda tekućinske kromatografije u sprezi sa spektrometrijom masa, koeluirajuće komponente iz matriksa utječu na učinkovitost ionizacije i određivanja analita, naročito kod LC-MS sustava koji koriste ionizaciju elektroraspršenjem (ESI). Spomenute komponente negativno utječu na osjetljivost, selektivnost, preciznost, ponovljivost i linearnost metode, čime je važno u postupku validacije metode ispitati utjecaj matriksa (Trufelli i sur., 2010.; Cortese i sur., 2020.). Utjecaj matriksa na ionizaciju očituje se kao smanjenje ili pojačanje signala analita, što može dovesti do pogrešne kvantifikacije analita (Matuszewski i sur., 2003.; Zhou i sur., 2017.; Cortese i sur., 2020.). Ukoliko se ME procjenjuje usporedbom nagiba kalibracijskih pravaca u ekstraktu matriksa i otapalu, manja vrijednost nagiba kalibracijskog pravca u ekstraktu matriksa u odnosu na otapalo ukazuje na supresiju iona, dok veća vrijednost ukazuje na pojačanje ionizacije (Zhou i sur., 2017.). Ukoliko je SSE veći od 10% smatra se da je utjecaj matriksa značajan (NATA, 2012.). Iz vrijednosti SSE za metodu određivanja DA, prikazanih u **Tablici 6**, razvidno je da je utjecaj matriksa značajan u svih analiziranih vrsta školjkaša i mješčincama. Kod svih je prisutna supresija iona, a najveća razlika u vrijednosti nagiba kalibracijskog pravca uočava se kod kamenica, a najmanja kod mješčincica. Supresija iona česta je u primjeni LC-MS/MS instrumentale tehnike, naročito pri primjeni ionizacije u pozitivnom polaritetu (Panuwet i sur., 2016.), koja je korištena u ovoj metodi. Usporedbom nagiba kalibracijskog pravca u ekstraktima matriksa međusobno, značajna razlika primijećena je kod mješčincica u odnosu na nagib pravca u ekstraktu dagnji, kamenica i kapica, dok između navedena tri matriksa školjkaša nema značajne razlike, dakle, ne iznosi više od 10% (NATA, 2012.). Iako je SPE jedan od načina za smanjenje ME (Gerssen i sur., 2009.; Qiu i sur., 2020.), u ekstraktima podvrgnutim SAX ekstrakciji ME je i dalje bio prisutan. Stoga se za kvantifikaciju DA u ispitanim uzorcima primijenio kalibracijski pravac u ekstraktu matriksa vrste koja se ispituje, te na taj način umanjio njegov utjecaj. Budući da se vrijednost SSE među vrstama školjkaša nije značajno razlikovala, za kvantifikaciju DA u dagnjama, kamenicama i kamicama moguće je primijeniti kalibracijski pravac u ekstraktu bilo kojeg od navedenih školjkaša.

Ispitivanjem utjecaja matriksa u metodi za određivanje LT, uočena je supresija iona kod svih matriksa i analita, osim OA i DTX2 u dagnjama, kamenicama i kamicama, kod kojih je

prisutno pojačanje ionizacije (**Tablica 7**). Određena je vrijednost SSE > 10% za sve analite i matrikse, osim za DTX1 u kamenicama i kopicama, što ukazuje na značajan utjecaj matriksa na ionizaciju. Pojačanje ionizacije OA iznosilo je od 18% (dagnje) do 23% (kapice), dok je u slučaju DTX2 iznosilo od 14% (kapice) do 23% (dagnje). Supresija iona u ekstraktu mješčičnica iznosila je za oba analita 35%, dok je za DTX1 iznosila 62%, što je ujedno i najveća uočena supresija. Za PTX2 najveća supresija zamijećena je kod dagnji (22%), a najmanja kod kapica i mješčičnica (16%). Približno ista supresija uočena je za AZA1 i AZA2, a najveća je bila u matriksu kapica (22 i 20%), najmanja u kamenica (12 i 13%), dok je za AZA3 bila veća (od 32% u kamenica do 26% u mješčičnica). Za skupinu YTX zamijećena je slična supresija kod svih matriksa (14 do 17%). U skupini CI najveća supresija uočena je za GYM, 17% u kopicama do 28% u kamenicama. Za SPX1 i PnTX-G dobivene su slične vrijednosti kod svih matriksa, od 13 do 19%. Navedeni rezultati ukazuju da na ME utječu analit i vrsta matriksa, što je u skladu s prethodnim istraživanjima više skupina autora. Gerssen i sur. (2009.) u istraživanju o utjecaju SPE na smanjenje ME kod više vrsta školjkaša došli su do zaključka da su svi LT podložni utjecaju matriksa, ali u različitoj mjeri. Primjenom iste metode za određivanje LT koja je korištena u ovom istraživanju, uočili su najveći ME kod OA (pojačanje signala 103% u kopicama) i PTX2 (pojačanje signala 40% u kamenicama), dok je u ekstraktu dagnji pod istim uvjetima uočena supresija OA od 39%. Kod YTX uočili su pojačanje signala, najveće kod dagnji (25%), za razliku od ovog istraživanja gdje je kod svih ispitivanih vrsta uočena supresija ionizacije YTX. Supresiju su uočili i za AZA1, od 16% kod dagnji do 40% kod kapica. Različit utjecaj matriksa na pojedine LT u različitim vrstama školjkaša i ježincima uočili su i García-Altare i sur. (2013.) u validacijskoj studiji metode za određivanje LT u tri vrste školjkaša (dagnje, kamenice, ladinke) i ježincima. Također su uočili pojačanje signala OA u svim matriksima, najveće u ekstraktu dagnji i kamenica (65 i 54%). AZA1, SPX1 i GYM bili su podložni supresiji u svim matriksima, PTX2 u većini njih, kao i YTX. Kao i u ovom, u istraživanju pojavnosti fiktoksina na Mediteranu, skupina autora Mattarozzi i sur. (2019.) uočili su supresivni učinak matriksa dagnji na ionizaciju cikličkih imina (GYM i SPX1), no većeg intenziteta (35 i 30%).

Nešto manji utjecaj matriksa u ovom istraživanju mogao bi se objasniti razrjeđivanjem ekstrakata vodenim dijelom mobilne faze prije instrumentalne analize (s ciljem sprječavanja stvaranja precipitata u LC uređaju), što se pokazalo jednim od načina za smanjenje utjecaja matriksa (Qiu i sur., 2020.). Spomenuti autori su ispitivanjem utjecaja matriksa u ekstraktima dagnji, kamenica, kapica te ladinke došli do zaključka da ME ovisi o toksinu. Uočili su izrazitu supresiju OA u ekstraktima svih vrsta (od 55 do 76%), te pojačanje ionizacije za PTX2, što je u suprotnosti s ovim istraživanjem. Iako je uočena supresija kod DTX1, u istraživanju ovih autora bila je znatno izraženija. Supresija CI nešto je manja u odnosu na ovo istraživanje,

dok je za PnTX-G zabilježeno pojačanje ionizacije u kamenicama, YTX u dagnjama, kao i PTX2 u većini matriksa.

Temeljem vrijednosti SSE iz ovog istraživanja, može se zaključiti da su svi analiti u određenoj mjeri podložni ME. Stoga je za kvantifikaciju LT moguće primijeniti kalibracijski pravac u ekstraktu matriksa kao jedan od načina za njegovo umanjivanje. Međutim, ukoliko se istovremeno analiziraju uzorci više vrsta školjkaša, kalibracija u ekstraktu matriksa postaje nepraktična, s obzirom da su uočene razlike u intenzitetu ME i među različitim vrstama. Usporedbom vrijednosti SSE u ekstraktima dagnji, kamenica, kapica i mješćićnica međusobno (**Tablica 7**), kod skupina AZA i YTX, te SPX1 i PnTX-G nije uočen značajni ME, osim kod okadaične skupine za koju je zamijećena vrlo velika supresija kod ekstrakta mješćićnica, te za GYM kod kojeg je uočeno pojačanje ionizacije u ekstraktu kapica u odnosu na ekstrakt kamenica. Stoga je za sve ispitivane LT moguće koristiti ekstrakt dagnji, budući da za ovu vrstu nisu uočene razlike nagiba kalibracijskog pravca  $> 10\%$  u odnosu na ostale vrste, osim za mješćićnice, kod kojih je uočena značajna supresija okadaične skupine u odnosu na ekstrakt dagnji.

Linearnost je ispitana linearizacijom kalibracijskih pravaca pojedinih fiktoksina određivanjem koeficijenta determinacije  $R^2$ , pri čemu se uobičajeno teži postizanju vrijednosti što bližoj vrijednosti 1. Budući da se za kvantifikaciju DA i LT koristio kalibracijski pravac u ekstraktu matriksa, linearnost pojedinačnih fiktoksina ispitana je za svaki matriks zasebno. Utvrđene vrijednosti  $R^2 > 0,99$  (**Tablice 8-10**) za gotovo sve fiktoksine, u svim matriksima, ukazuju na prihvatljivu linearnost za sve analite u analiziranom koncentracijskom području.

Granica detekcije i kvantifikacije određena je na isti način za sve analizirane fiktoksine u svim matriksima. Vrijednosti LOD dobivene validacijom metode za određivanje DA u ovom istraživanju (**Tablica 8**) od približno  $0,3 \mu\text{gkg}^{-1}$ , te LOQ od  $1,0 \mu\text{gkg}^{-1}$  u svim vrstama školjkaša i mješćićnicama prihvatljive su, budući da je jedan od ciljeva istraživanja validacija i primjena metode s nižim vrijednostima LOD i LOQ u odnosu na trenutno referentnu LC-UV raspona LOD od  $0,02$  do  $1,0 \text{mgkg}^{-1}$ . Osjetljivost metode validirane u ovom istraživanju također je višestruko niža i od LC-MS/MS metoda za određivanje DA (Beach i sur., 2015.). Derivatizacijom DA povećala se učinkovitost ionizacije i umanjio utjecaj kemijskih interferencija u području nižih vrijednosti  $m/z$ , s obzirom na veći  $m/z$  molekulskog iona DNS-DA (545) u odnosu na DA (312 i 334) (Beach i sur., 2015.). Primjena visokoosjetljive metode omogućila je detekciju i kvantifikaciju DA u školjkašima i mješćićnicama u tragovima.

Validacijom metode za određivanje PST prekromatskom oksidacijom, dobivene vrijednosti LOD i LOQ prikazane su u **Tablici 9** kao koncentracija pojedinačnih analoga izražena u  $\mu\text{gkg}^{-1}$ , te u  $\mu\text{g STXdiHCl ekv.kg}^{-1}$  zbog usporedbe s literaturnim podacima. Vrijednosti LOD u

rasponu su od 0,71  $\mu\text{g STXdiHCl ekv.kg}^{-1}$  (LOQ 2,35  $\mu\text{g STXdiHCl ekv.kg}^{-1}$ ) u mješćnicama za GTX5, do 29,26  $\mu\text{g STXdiHCl ekv.kg}^{-1}$  (LOQ 96,54  $\mu\text{g STXdiHCl ekv.kg}^{-1}$ ) za NEO u dagnjama. Vrijednosti LOD i LOQ za većinu analita u različitim matriksima manje su od 16, odnosno 40  $\mu\text{g STXdiHCl ekv.kg}^{-1}$ , što je uvjet prihvatljivosti EURLMB (2020.), dok su za GTX1,4 i NEO utvrđene više vrijednosti. Najveća vrijednost LOD i LOQ za GTX1,4 utvrđena je u kopicama (20,27 i 66,89  $\mu\text{g STXdiHCl ekv.kg}^{-1}$ ), te za NEO u dagnjama (29,26 i 96,54  $\mu\text{g STXdiHCl ekv.kg}^{-1}$ ). Više LOD i LOQ za hidroksilirane u odnosu na nehidroksilirane PST, utvrđene su i u mnogim objavljenim validacijskim studijama. Autori Leal i Cristiano (2022.b) navode LOD za GTX1,4 i NEO oko 120 i 150  $\mu\text{g STXdiHCl ekv.kg}^{-1}$ , te LOQ oko 300 i više od 400  $\mu\text{g STXdiHCl ekv.kg}^{-1}$ . Također navode veće vrijednosti u odnosu na ovo istraživanje za STX, dcSTX, GTX2,3 i GTX5. Rodríguez-Cabo i sur. (2021.) u istraživanju pojavnosti PST i Cl u dagnjama navode LOQ za GTX1,4 i NEO 144  $\mu\text{g STXdiHCl ekv.kg}^{-1}$  za oba toksina, te manje vrijednosti za STX, dcSTX i GTX5 u odnosu na ovo istraživanje. Turner i sur. (2009.) u unutarlaboratorijskoj validaciji AOAC 2005.06 metode navode LOD za GTX1,4 i NEO u dagnjama 160 i 68  $\mu\text{g STXdiHCl ekv.kg}^{-1}$ , te visoke vrijednosti za GTX2,3 i dcGTX2,3 (87 i 53  $\mu\text{g STXdiHCl ekv.kg}^{-1}$ ). Također, kao rezultat unutarlaboratorijske validacije iste metode u školjkašima podrijetlom iz Ujedinjenog Kraljevstva, Turner i sur. (2010.) navode LOD za iste toksine u kamenicama 160 i 150  $\mu\text{g STXdiHCl ekv.kg}^{-1}$  za GTX1,4 i NEO, 100  $\mu\text{g STXdiHCl ekv.kg}^{-1}$  za GTX2,3 i 37  $\mu\text{g STXdiHCl ekv.kg}^{-1}$  za dcGTX2,3. S obzirom na NDK PST u školjkašima od 800  $\mu\text{g STXdiHCl ekv.kg}^{-1}$  i navedene rezultate sličnih istraživanja, vrijednosti LOD i LOQ dobivene validacijom metode za određivanje PST u ovom istraživanju smatraju se prihvatljivima.

Vrijednosti LOD i LOQ LT (**Tablica 10**), dobivene validacijom EURLMB metode za određivanje LT, kreću su se od 0,1 i 0,32  $\mu\text{gkg}^{-1}$  za GYM u dagnjama, do 16,93 i 55,88  $\mu\text{gkg}^{-1}$  za YTX u kopicama. Najniže vrijednosti imaju skupine Cl i AZA, te PTX2. Toksini okadaične skupine imaju nešto više vrijednosti od prethodno navedenih fikotoksina. Uspoređujući ove vrijednosti sa već objavljenim rezultatima validacijskih studija iste metode, različiti autori navode vrijednosti niže i više u odnosu na ovo istraživanje. Rossignoli i sur. (2021.) utvrdili su u različitim vrstama školjkaša LOQ za OA od 10  $\mu\text{gkg}^{-1}$ . Od svih vrsta koje su analizirali, García-Altare i sur. (2013.) najveću LOQ vrijednost za OA od 15,2  $\mu\text{gkg}^{-1}$  utvrdili su u kamenicama. Veću LOQ vrijednost (40  $\mu\text{gkg}^{-1}$ ) utvrdili su Schirone i sur. (2018.) u različitim matriksima, dok Zendong i sur. (2015.) te Qiu i sur. (2020.) navode vrijednosti LOD za OA 14,3 i 9,2  $\mu\text{gkg}^{-1}$  u dagnjama. Slično je i sa PTX2, budući da Zendong i sur. (2015.) navode vrlo nisku LOD vrijednost od 1  $\mu\text{gkg}^{-1}$  u dagnjama, dok su Villar-González i sur. (2011.) utvrdili znatno veću LOQ vrijednost od 50  $\mu\text{gkg}^{-1}$  u raznim matriksima. Najveće vrijednosti LOD i LOQ u ovom istraživanju utvrđene su za skupinu YTX (**Tablica 10**), no za tu skupinu

zakonodavstvom su utvrđene i najviše NDK u odnosu na ostale, te je udio LOQ manji od 2% u odnosu na NDK. Autori García-Altare i sur. (2013.) navode najveće vrijednosti LOQ upravo za skupinu YTX, od 377,1  $\mu\text{gkg}^{-1}$  YTX u dagnjama. Također, u istraživanjima koja su uključivala CI, više autora za ovu skupinu navodi niske LOD i LOQ, kao i za azaspiracide (Cefas, 2011.; Villar-González i sur., 2011.; Zendong i sur., 2015.; Schirone i sur., 2018.; Moreiras i sur., 2020.; Qiu i sur., 2020.; Rossignoli i sur., 2021.). Od svih LT za koje su utvrđene NDK, a analizirani su u ovom istraživanju, najviše vrijednosti LOQ u odnosu na NDK ima OA u matriksu kamenica (16% od NDK), što ukazuje da se primjenom validirane metode svi analiti mogu pouzdano kvantificirati pri koncentracijama znatno nižima od NDK.

Vrijednosti iskorištenja za sve tri metode i analite na svim koncentracijskim razinama, unutar su raspona od -20% do +10% za koncentracije analita  $\geq 10 \mu\text{gkg}^{-1}$  utvrđenog Odlukom komisije 2002/657/EZ (EU, 2002.). U slijepim uzorcima obogaćenim DA, prosječna vrijednost RC podjednaka je na svim koncentracijskim razinama i iznosi 93,5% (**Tablica 11**). Slično prosječno iskorištenje od 91% utvrđeno za istu metodu navode Beach i sur. (2015.). Vrijednosti CV ponovljivosti veće su pri nižim koncentracijskim razinama i kreću se od 7,9 do 10,1%. Isto se uočava i kod CV obnovljivosti, čije se vrijednosti kreću od 8,3 do 11,8%.

Rezultati ispitivanja preciznosti metode za određivanje PST prikazani su u **Tablici 12**. Prosječna vrijednost RC za PST iznosi 91,6%. Najmanje prosječno iskorištenje utvrđeno je za NEO (88,0%) i C1,2 (88,1%), a najviše za GTX5 (96,0%). Najmanji prosječni CV ponovljivosti utvrđen je za GTX5 (5,5%), najveći za C1,2 (13,5%), dok su najmanji i najveći prosječni CV obnovljivosti utvrđeni za GTX2,3 (7,2%) i C1,2 (15,4%). Prema rezultatima preciznosti međulaboratorijske studije objavljene u EURLMB SOP za određivanje PST prekolumskom oksidacijom (EURLMB, 2020.), kao i u ovom istraživanju, najveći CV utvrđen je za C1,2 toksine kvantificirane nakon SPE na C18 kolonicama (31,7% za prosječnu koncentraciju od 169  $\mu\text{gkg}^{-1}$ ). Slična vrijednost utvrđena je za GTX5 u dagnjama, a za ostale PST ranije utvrđene vrijednosti bile su veće u odnosu na rezultate ovog istraživanja.

Rezultati preciznosti metode za određivanje LT prikazani su u **Tablicama 13-16**. Prosječno iskorištenje za ovu skupinu fiktoksina iznosi 93,4%, s najnižom vrijednošću od 82,5% za SPX1, te najvećom za AZA1 od 106,8%. Prosječni CV ponovljivosti kreću se u rasponu od 3,2% za GYM do 13,5% za PTX2, dok su vrijednosti CV obnovljivosti u rasponu od 4,7% za GYM do 15,7% za PTX2. Slična vrijednost prosječnog iskorištenja metoda za određivanje LT u različitim vrstama školjkaša od 93% navedena je u izvješću o validaciji metode od strane agencije Cefas (2011.). Za većinu fiktoksina utvrdili su manju vrijednost RC, dok je za YTX utvrđeno približno jednako iskorištenje (96%). CV obnovljivosti navode u rasponu od 3,1% (GYM) do 21,2% (YTX). Bacchiocchi i sur. (2020.) navode slično iskorištenje za GYM u dagnjama (94%), no veće za SPX1 (92%). Schirone i sur. (2018.) objavili su slične prosječne



vrijednosti iskorištenja u dagnjama za DTX2, PTX2 i AZA1, veće za DTX1 (98,4%), te manje za OA (90,5%), AZA1 (89,3%), YTX (90,6%) i homo YTX (91,4%).

Navedene vrijednosti CV utvrđene validacijom metoda za određivanje DA, PST i LT prihvatljive su, budući da ispunjavaju uvjete propisane Odlukom komisije 2002/657/EZ (EU, 2002.) u pogledu uvjeta preciznosti. Svi utvrđeni CV obnovljivosti manji su od razine izračunate Horwitzovom jednadžbom (4) za odgovarajući maseni udio, vrijednosti CV ponovljivosti za sve analite manje su od CV obnovljivosti i nalazi se u rasponu od 1/2 do 2/3 vrijednosti izračunate jednadžbom (4). CV obnovljivosti analita za koje je utvrđena NDK manji je od CV za maseni udio koji odgovara 1/2 NDK.

## **5.2. PROFIL FIKOTOKSINA U ŠKOLJKAŠIMA I MJEŠČIČNICAMA**

Rezultati prikazani u poglavlju 4.2 ukazuju na pojavnost fikotoksina u svim vrstama obuhvaćenim ovim istraživanjem. U dvije trećine uzoraka detektiran je i kvantificiran jedan ili više fikotoksina. Najmanja pojavnost im je u mješčičnicama (29%), značajno veća u dagnjama (68%) i kopicama (75%), dok su kvantificirani u gotovo svim uzorcima kamenica (98%). Više od polovine fikotoksina uključenih u ovo istraživanje nije detektirano u uzorcima. Od hidrofilnih fikotoksina, kvantificirani su DA, GTX2,3 i GTX1,4, te od lipofilnih toksina OA, PTX2, AZA1 i 2, YTX i sva tri ciklička imina (**Tablice 17 i 31**). Najveću pojavnost u odnosu na ukupni broj uzoraka imali su SPX1 i GYM, koji su detektirani u 31% i 29% uzoraka, YTX i DA detektirani su u 13% uzoraka, OA i PnTX-G u 10 i 8%, AZA2 u 4%, GTX2,3 u 2%, GTX1,4 i AZA1 u manje od 1% uzoraka, dok je PTX2 detektiran u samo jednom uzorku. Pojavnost fikotoksina razlikuje se među analiziranim vrstama. U uzorcima dagnji prisutni su svi prethodno navedeni fikotoksini, u kamenicama DA, GTX2,3, OA, YTX i sva tri CI (**Tablica 17**), u kopicama DA, AZA2, YTX, SPX1 i GYM, dok je u mješčičnicama prisutna uglavnom samo DA (**Tablica 31**). Također, utvrđena je razlika u pojavnosti fikotoksina između različitih lokaliteta, kao i među sezonama.

## **5.3. POJAVNOST I KUMULACIJA FIKOTOKSINA**

Najveća pojavnost utvrđena je za CI, od kojih je SPX1 detektiran u 61% kamenica i 35% uzoraka dagnji, dok mu je pojavnost u kopicama i mješčičnicama zanemariva, sa po jednim uzorkom u kojem je koncentracija  $\geq$ LOQ. Za GYM je utvrđena najčešća pojavnost u kamenicama (89%), te manja u dagnjama (25%). U kopicama je prisutan u 6% uzoraka, te u jednom uzorku mješčičnica. PnTX-G nije detektiran u mješčičnicama, u kamenicama je kvantificiran u svega jednom uzorku, dok mu pojavnost u dagnjama iznosi 13% (**Tablice 17 i 31**). Češća pojavnost spirovida u školjkašima u odnosu na ostale CI obuhvaćene ovim

istraživanjem u skladu je sa objavljenim istraživanjima mnogih autora. Amzil i sur. (2007.), EFSA (2010.), Rundberget i sur. (2011.), Garcia-Altare i sur. (2014.), Otero i sur. (2019.) u istraživanjima pojavnosti CI u školjkašima prikupljenim iz uzgojnih područja i tržišta na području Europe, također su utvrdili veću pojavnost spirovida u odnosu na ostale CI.

Nekoliko godina nakon prve pojave GYM u školjkašima na Mediteranu (Biré i sur., 2002.), CI se pojavljuju u školjkašima podrijetlom iz Europskih mora uglavnom u niskim koncentracijama, što je u skladu s rezultatima ovog istraživanja u kojem najveće utvrđene koncentracije u uzorcima iznose  $36,45 \mu\text{gkg}^{-1}$  SPX1,  $39,85 \mu\text{gkg}^{-1}$  GYM i  $6,87 \mu\text{gkg}^{-1}$  PnTX-G (**Tablica 17**), dok su prosječne koncentracije navedenih CI  $6,72 \mu\text{gkg}^{-1}$ ,  $6,91 \mu\text{gkg}^{-1}$  i  $2,71 \mu\text{gkg}^{-1}$ . Villar-González i sur. (2006.) u dagnjama (*M. galloprovincialis*) iz Španjolske utvrdili su koncentracije SPX1 do  $20 \mu\text{gkg}^{-1}$ , dok Amzil i sur. (2007.) za kamenice (*C. gigas*) podrijetlom iz Francuske navode koncentraciju od  $47 \mu\text{gkg}^{-1}$ . U talijanskim dagnjama Pigozzi i sur. (2008.) navode koncentraciju istog fiktoksina od  $13 \mu\text{gkg}^{-1}$ , a Bacchiocchi i sur. (2020.)  $29,2 \mu\text{gkg}^{-1}$  SPX (suma prisutnih analoga), te  $12,1 \mu\text{gkg}^{-1}$  GYM. Nešto veće koncentracije utvrdili su Rundberget i sur. (2011.) koji su u norveškim dagnjama (*M. edulis*) kvantificirali do  $226 \mu\text{gkg}^{-1}$  SPX1 i  $115 \mu\text{gkg}^{-1}$  PnTX-G. Nakon što je 2003. god. prvi put utvrđena prisutnost CI u školjkašima iz Jadranskog mora (Pigozzi i sur., 2008.), provedena su brojna istraživanja pojavnosti LT, međutim, mnoga od njih nisu uključivala ovu skupinu fiktoksina ili neke od CI uključenih u ovo istraživanje. Stoga nema mnogo podataka o njihovoj pojavnosti u školjkašima i ostalim vrstama morskih organizama podrijetlom s područja istočne obale Jadrana. Autori Ninčević-Gladan i sur. (2011.) u istraživanju profila LT u dagnjama prikupljenim na području zapadne obale Istre, detektirali su GYM i SPX1 u koncentracijama  $< \text{LOQ}$  ( $12 \mu\text{gkg}^{-1}$ ), međutim, PnTX-G nije bio uključen u istraživanje. Slične koncentracije GYM i SPX1 navode autori Ujević i sur. (2015.) za dagnje prikupljene iz uzgajališta na južnom Jadranu. Ujević i sur. (2019.) u istraživanju profila fiktoksina u prugastim kapicama (*A. tuberculata*) i rumenkama (*C. chione*) navode najveće koncentracije GYM od  $15,77 \mu\text{gkg}^{-1}$  te SPX1 od  $5,90 \mu\text{gkg}^{-1}$ .

I u ostalim svjetskim morima zabilježena je pojavnost CI u niskim koncentracijama, pa su tako autori Krock i sur. (2018.) te Álvarez i sur. (2010.) detektirali SPX1 u školjkašima iz Argentine i Čilea, ali ih nisu kvantificirali. Jiang i sur. (2017.) i Chen i sur. (2021.) detektirali su GYM u školjkašima u Kini s najvećim koncentracijama od  $2,64 \mu\text{gkg}^{-1}$  odnosno  $19 \mu\text{gkg}^{-1}$ , a posljednje navedeni autori i SPX1 u koncentracijama do  $9 \mu\text{gkg}^{-1}$ . PnTX-G detektiran je u školjkašima u Kanadi i Mozambiku s najvećim koncentracijama od  $83 \mu\text{gkg}^{-1}$  odnosno  $7,7 \mu\text{gkg}^{-1}$  (u nehidroliziranim ekstraktima) (McCarron i sur., 2012.; Tamele i sur., 2022.). Iako se CI u školjkašima diljem svijeta najčešće pojavljuju u niskim koncentracijama, na nekim područjima zabilježene koncentracije značajno su veće. Stirling i sur. (2001.) u istraživanju

LT u različitim vrstama školjkaša krajem 20. stoljeća u Novom Zelandu, navode koncentracije GYM do čak  $23,4 \text{ mgkg}^{-1}$ , dok su Hess i sur. (2013.) u školjkašima podrijetlom iz Francuske utvrdili koncentraciju PnTX-G od  $1,2 \text{ mgkg}^{-1}$ .

Manju pojavnost u odnosu na CI u uzorcima ovog istraživanja imaju LT YTX i OA (**Tablice 17 i 31**). YTX je najčešće detektiran u kopicama (48%), s prosječnom koncentracijom od  $140,38 \text{ } \mu\text{gkg}^{-1}$  (**Tablica 31**). U dagnjama je prisutan u 15% uzoraka, s nešto većom prosječnom koncentracijom od  $190,28 \text{ } \mu\text{gkg}^{-1}$ , dok je pojavnost u samo jednom uzorku kamenica zanemariva. OA je detektirana uglavnom u dagnjama, u 16% uzoraka s prosječnom koncentracijom  $67,15 \text{ } \mu\text{gkg}^{-1}$ , dok je u nešto manjoj koncentraciji detektirana u samo dva uzorka kamenica (**Tablica 17**). Najveća koncentracija YTX utvrđena je u dagnjama i značajno je manja od NDK za ovu skupinu fikotoksina, dok je najveća koncentracija OA utvrđena također u dagnjama i više je nego dvostruko veća od NDK za okadaičnu skupinu. Od ukupnog broja ispitanih uzoraka njih pet je sadržavalo OA u koncentracijama većima od NDK.

Jesotoksini su prvi put detektirani u Jadranskom moru 1995. god. u dagnjama prikupljenim na području zapadne obale sjevernog Jadrana (Italija), a uz njih utvrđeno je i prisustvo OA (Ciminiello i sur., 1997.). Na području istočne hrvatske obale, YTX i njegovi analozi prvi put su detektirani 2004. god. u školjkašima podrijetlom iz sjevernog i srednjeg Jadrana, također uz OA (Ninčević-Gladan i sur., 2008.). U biopokusom pozitivnim DSP uzorcima, autori su utvrdili od svih analoga YTX u najvećoj koncentraciji (do  $0,203 \text{ mgkg}^{-1}$ ), dok je OA imala najveću koncentraciju od  $185 \text{ } \mu\text{gkg}^{-1}$ . Nedugo nakon toga su 2004. i 2005. god. Čustović i sur. (2014.) kvantificirali YTX i OA u dagnjama iz srednjeg Jadrana u koncentracijama do  $468 \text{ } \mu\text{gkg}^{-1}$ , odnosno  $41,31 \text{ } \mu\text{gkg}^{-1}$ , te 2006. god., također u školjkašima iz srednjeg Jadrana, YTX u hepatopankreasu dagnji u koncentraciji od  $1870 \text{ } \mu\text{gkg}^{-1}$  (Čustović i sur., 2009.). U DSP pozitivnim uzorcima dagnji iz sjevernog i srednjeg Jadrana prikupljenim 2007. godine, Ninčević i sur. (2010.) su ponovno utvrdili prisustvo YTX i njegovih analoga u četiri od devet uzoraka školjkaša (LC-MS/MS metodom) u koncentracijama do  $794 \text{ } \mu\text{gkg}^{-1}$  (karboksi homo YTX), te OA u tri od devet uzoraka, s najvećom koncentracijom od  $1041 \text{ } \mu\text{gkg}^{-1}$  (slobodna i esterificirana OA). Arapov i sur. (2015.) također u DSP pozitivnim uzorcima dagnji podrijetlom s istočne obale Jadrana navode najveću pojavnost YTX u koncentracijama od 122 do  $479 \text{ } \mu\text{gkg}^{-1}$ , ali manju pojavnost OA, s najvećom koncentracijom od  $291 \text{ } \mu\text{gkg}^{-1}$ . Vršne koncentracije oba fikotoksina određene su u uzorcima iz sjevernog Jadrana. Autori ovih, ali i novijih istraživanja, navode jesotoksine kao najčešće fikotoksine u Jadranskom moru. Navedeno potvrđuje i istraživanje autora Talić i sur. (2020.) o pojavnosti LT u dagnjama prikupljenih tijekom 2017. god. u srednjem Jadranu, pri čemu je utvrđena pojavnost YTX s najvećom koncentracijom od  $37,8 \text{ } \mu\text{gkg}^{-1}$ , te kao i prethodna istraživanja, povremenu

prisutnost OA uglavnom u niskim koncentracijama, do najviše 44,7  $\mu\text{gkg}^{-1}$ . Dodatno, novije istraživanje pojavnosti LT u dagnjama i rumenkama iz srednjeg Jadrana u razdoblju od 2016. do 2019. god. ukazuje na YTX kao najčešće fiktoksine u školjkašima Jadranskog mora (Bogdanović i sur., 2022.). Utvrđeni su u koncentracijama od 0,03  $\text{mgkg}^{-1}$  u rumenkama do 1,375  $\text{mgkg}^{-1}$  u dagnjama. Isti autori navode pojavnost OA u manje od 1% ispitanih uzoraka s najvećom utvrđenom koncentracijom ukupne OA od 77  $\mu\text{gkg}^{-1}$ .

Najveća koncentracija YTX utvrđena u uzorcima školjkaša u ovom istraživanju, kao i u prethodno navedenima, manja je od zakonodavstvom utvrđene NDK za skupinu jesotoksina, međutim, za razliku od spomenutih istraživanja, u ovom nije utvrđena češća pojavnost YTX u odnosu na ostale skupine fiktoksina. U navedenim istraživanjima, većina autora ili ne navodi LOQ korištenih metoda ili istraživanja ne uključuju CI, što onemogućuje usporedbu. Jedan od mogućih razloga manje pojavnosti YTX u ovom istraživanju je to što su za skupinu YTX utvrđene znatno veće vrijednosti LOQ metode u odnosu na LOQ CI u ovom istraživanju (30 i više puta veće), za koje je utvrđena najveća pojavnost. Međutim, čak i ukoliko se uzmu u obzir uzorci u kojima YTX nisu kvantificirani, ali su detektirani u koncentracijama  $> \text{LOD}$ , CI i dalje dominiraju svojom pojavnošću. Osim ovog, pojedina istraživanja na školjkašima iz srednjeg i južnog Jadrana također ukazuju da YTX nisu najčešći fiktoksini u školjkašima iz hrvatskog dijela Jadrana (Ujević i sur., 2015.; 2019.).

U školjkašima iz Jadranskog, ali i iz drugih mora, YTX su detektirani i u većim koncentracijama. Rubini i sur. (2021.) navode više desetaka uzoraka školjkaša podrijetlom iz talijanskog dijela sjevernog Jadrana u razdoblju od 2012. do 2020. god. u kojima je koncentracija YTX bila veća od NDK. Liu i sur. (2016.) utvrdili su YTX u dagnjama podrijetlom iz Kine u koncentracijama do 3,9  $\text{mgkg}^{-1}$ , dok autori Liu i sur. (2017.) u hepatopankreasu japanskih kapica navode najveću koncentraciju 5,67  $\text{mgkg}^{-1}$ .

Jedini detektirani analog okadaične skupine u ovom istraživanju je OA, čija je češća pojavnost u odnosu na ostale toksine skupine, u skladu s ranije navedenim istraživanjima školjkaša iz Jadranskog mora. Također je jedini LT čija je koncentracija premašila NDK tijekom ovog istraživanja (**Prilog 7**). Po pitanju utvrđenih koncentracija OA, u skladu su s dosad objavljenim istraživanjima u školjkašima Jadrana u kojima se navodi odsutnost OA (Ujević i sur., 2015.; Ujević i sur., 2019.), te raspon od niskih i srednjih koncentracija (Orhanović i sur., 1996.; Čustović i sur., 2014.; Talić i sur., 2020.; Bogdanović i sur., 2022.) pa sve do koncentracija većih od NDK (Ninčević-Gladan i sur., 2008.; Ninčević-Gladan i sur., 2010.; Arapov i sur., 2015.). Rezultati ovog i navedenih istraživanja ukazuju na to da iako je OA uglavnom prisutna u niskim koncentracijama, školjkaši mogu kumulirati ovaj fiktoksin u velikim koncentracijama koje mogu ugroziti zdravlje ljudi, što se povremeno na području sjevernog Jadrana i događa. Slična pojavnost zabilježena je i u drugim morima. Pregledom

rezultata srodnih istraživanja u Europi i svijetu, može se uočiti da su koncentracije toksina okadaične skupine bile manje od LOD ili da je utvrđena pojavnost u malim koncentracijama (Goya i sur., 2022.; Jiang i sur., 2017.; Chen i sur., 2021.; Leyva-Valencia i sur., 2021.; Tamele i sur., 2022.), koncentracijama većim od NDK (Amzil i sur., 2007.; Deeds i sur., 2010.; Taylor i sur., 2013.; Ben Haddouch i sur., 2017.; García-Altare i sur., 2016.; Otero i sur., 2019.), pa sve do izuzetno velikih koncentracija utvrđenih u školjkašima iz Kine (oko 3,5 mgkg<sup>-1</sup>) (Li i sur., 2012.b), Irske (7,8 mgkg<sup>-1</sup>) (Salas i Clarke, 2019.), Argentine (11,8 mgkg<sup>-1</sup>) (Turner i sur., 2015.) te iz Grčke (do oko 50 mgkg<sup>-1</sup>) (Prassopoulou i sur., 2009.).

Aciliranjem toksina okadaične skupine uz pomoć enzima, u školjkašima nastaju njihovi acilirani derivati (DTX3), što se smatra važnim korakom u procesu njihove depuracije (Rossignoli i sur., 2011.). Iako je toksičnost esterificiranih oblika manja, suprotan proces - enzimaska hidroliza DTX3, odvija se u ljudskom organizmu tijekom probave, pri čemu nastaju toksičnije roditeljske molekule OA, DTX1 i DTX2 (Manita i sur., 2017.). Smatra se da je bioraspodivnost DTX3 manja od slobodnih, neesterificiranih oblika, te da bi u procjeni rizika koje ova skupina fiktoksina predstavlja trebalo uzeti u obzir udio DTX3, da ne bi došlo do precjenjivanja izloženosti (Braga i sur., 2016.). U dostupnim literaturnim podacima navode se različiti udjeli esterificiranih oblika u različitim vrstama školjkaša. Mnogi autori navode dagnje kao vrstu s najvećim udjelom slobodnog oblika okadaične skupine. Naime, istraživanja govore da dagnje u odnosu na ostale vrste imaju manju sposobnost esterifikacije (Rossignoli i sur., 2011.; Braga i sur., 2016.; Manita i sur., 2017.; Alves i sur., 2019.), a posljedica je njihova sporija depuracija (Rossignoli i sur., 2011.). To potvrđuju i rezultati autora Vale i Sampayo (2002.) koji su u istraživanju udjela estera toksina okadaične skupine u različitim vrstama školjkaša ustanovili da udio estera OA u dagnjama nije veći od 50%, dok je u ostalim vrstama taj udio najčešće veći od 95%. Što se tiče udjela esterificirane OA u uzorcima ovog istraživanja, dobiveni rezultati nisu u skladu sa spomenutim istraživanjima. Budući da je OA kvantificirana gotovo isključivo u dagnjama, usporedba među vrstama nije moguća. Međutim, u 86% uzoraka u kojima je utvrđena, OA je bila u potpunosti esterificirana. Od preostalih 14% uzoraka samo dva su imala udio esterificirane OA manji od 50%, dok se u ostalim uzorcima taj udio kretao od 60 do 78%. U dva uzorka kamenica u kojima je detektirana, OA je bila u potpunosti esterificirana. Različiti profil OA skupine može se objasniti genetskom različitosti školjkaša (Prassopoulou i sur., 2008.), a podložan je i promjenama (Vale i Sampayo, 1999.) na koje utječu vrsta fitoplanktona, lokalitet i godišnje doba (Alves i sur., 2019.).

Supojavnost PTX2 i OA pojašnjava se činjenicom da ove fiktoksine proizvodi ista vrsta fitoplanktona (Reguera i Pizzaro, 2008.; Alarcán i sur. 2018.). Međutim, u ovom istraživanju PTX2 je detektiran u samo jednom uzorku dagnji u koncentraciji od 30,07 µgkg<sup>-1</sup> (**Tablica**

17), dok PTX1 nije uopće detektiran. PTX2 se u školjkašima Jadranskog mora rijetko pronalazi i to u tragovima ili manjim koncentracijama, međutim, češće su detektirani njegovi metaboliti PTX2SA i 7-*epi*-PTX2SA (Pavela-Vrančić i sur., 2001.; 2006.; Ninčević-Gladan i sur., 2010.; 2011.; Bogdanović i sur., 2022.). Pretpostavlja se da je pojavnost PTX2 manja zbog toga što u školjkašima brzo dolazi do njegovog metaboliziranja u PTX2SA koja izomerizira u 7-*epi*-PTX2SA, a česta je i njihova esterifikacija (Wilkins i sur., 2006.; Blanco i sur., 2019.).

Azaspircidi su također kvantificirani u niskoj koncentraciji u malom broju uzoraka ( $n = 27$ ) (Tablice 17 i 31). U većini uzoraka prisutan je AZA2, dok je AZA1 utvrđen u samo dva uzorka, a AZA3 nije uopće detektiran. Pronađeni su isključivo u dagnjama i kopicama, s time da je pojavnost u kopicama (u odnosu na broj ispitanih uzoraka pojedine vrste) otprilike dvostruko veća od one u dagnjama. Koncentracije AZA2 kreću se od 3,00 do 5,40  $\mu\text{gkg}^{-1}$  (5,40 do 9,72  $\mu\text{g AZA ekv.kg}^{-1}$ ). U dva uzorka u kojima je detektiran AZA1, prisutan je i AZA2 u približno istoj koncentraciji, te je u njima utvrđena najveća ukupna koncentracija AZA u ovom istraživanju od 13,60 i 13,88  $\mu\text{g AZA ekv.kg}^{-1}$ . Iako je u odnosu na većinu fikotoksina iz ovog istraživanja pojavnost azaspircida znatno manja, AZA su detektirani u 4% uzoraka, što se razlikuje od rezultata većine istraživanja LT u školjkašima prikupljenih s područja istočne obale Jadrana. U istraživanju profila LT u školjkašima hrvatskog dijela Jadrana prikupljenim tijekom 2007. god. (Ninčević-Gladan i sur., 2010.), 2008. god. (Arapov i sur., 2015.), 2009./2010. god. (Ujević i sur., 2019.) te 2016.-2019. god. (Bogdanović i sur., 2022.) AZA u školjkašima nisu uopće detektirani. AZA2 je detektiran u četiri uzorka dagnji prikupljenim 2017. god. na području južnog Jadrana (RH i BiH), s najvećom koncentracijom 3,80  $\mu\text{gkg}^{-1}$  (Talić i sur., 2020.). Češća pojavnost AZA2 utvrđena u ovom istraživanju u odnosu na ostale analoge, u skladu je s rezultatima istraživanja LT u dagnjama podrijetlom iz sjevernog dijela srednjeg Jadrana (talijanska obala) tijekom 2012. i 2014. god., u kojem je također utvrđena dominacija istog analoga, ali s manjom vršnom koncentracijom od 7,1  $\mu\text{g AZA ekv.kg}^{-1}$ , s time da je AZA1 detektiran u tragovima u uzorcima s najvećom koncentracijom AZA2, dok AZA3 nije detektiran (Bacchiocchi i sur., 2015.). Dominaciju AZA2 utvrdili su i Taleb i sur. (2006.) u dagnjama prikupljenim u Maroku tijekom 2004. i 2005. god., Vale i sur. (2008.) u različitim vrstama školjkaša prikupljenim tijekom 2006. god. u Portugalu, kao i Goya i sur. (2022.) u patagonijskim kopicama (*Zygochlamys patagonica*) prikupljenim u Argentini u razoblju od 2012. do 2017. god. Profil i koncentracija analoga azaspircida mogu se razlikovati, što potvrđuju istraživanja njihove pojavnosti u školjkašima prikupljenih s drugih područja. AZA1 kao dominantan analog navode James i sur. (2002.) u dagnjama iz Norveške, Ujedinjenog Kraljevstva i Irske, s najvećom ukupnom koncentracijom azaspircida u cijelom tkivu od 4,2  $\text{mgkg}^{-1}$ . Isti analog prevladava među azaspircidima u dagnjama (*M.*

*galloprovincialis*) iz Španjolske i velikim kapicama (*P. maximus*) iz Francuske (Magdalena i sur., 2003.b), dok Chen i sur. (2021.) kao dominantan analog u različitim vrstama školjkaša podrijetlom iz Kine navode AZA3, detektiran u manjim koncentracijama (do 2  $\mu\text{gkg}^{-1}$ ). Iako je u ovom istraživanju prosječna koncentracija azaspiracida u školjkašima značajno manja od NDK, navedeni podaci ukazuju na njihovu kumulaciju u školjkašima i potencijalnu opasnost za potrošače, naročito stoga što je u školjkašima sjevernog Jadrana najzastupljeniji najtoksičniji analog.

Od hidrofilnih fiktoksina u uzorcima ovog istraživanja detektirani su DA te GTX1,4 i GTX2,3 iz skupine PST. DA utvrđena je u 13% uzoraka u svim vrstama školjkaša i mješćnicama, u odnosu na NDK od 20  $\text{mgkg}^{-1}$  u vrlo niskim koncentracijama (**Tablice 17 i 31**). Prisutna je najčešće u kapicama (52%) u kojima je utvrđena i najveća koncentracija DA u istraživanju (809,54  $\mu\text{gkg}^{-1}$ ). Sa gotovo jednakom vršnom koncentracijom kvantificirana je u 16% kamenica. DA je jedini fiktoksin ovog istraživanja koji je imao značajnu pojavnost u mješćnicama. Pronađena je u 27% mješćnica, no u značajno nižim koncentracijama u odnosu na kapice i kamenice. Najmanja pojavnost DA utvrđena je u dagnjama u kojima je detektirana u svega 4% uzoraka, s najvećom koncentracijom od 37,95  $\mu\text{gkg}^{-1}$ . Najniža utvrđena koncentracija u svim vrstama, nalazi se u koncentracijskom području blizu LOQ. Kumulacija DA u niskim koncentracijama u ovom istraživanju u skladu je s rezultatima srodnih istraživanja provedenih u Jadranskom moru, no pojavnost joj je znatno češća. Kvantificirana je u školjkašima i mješćnicama tijekom svih sezona, za razliku od do sada zabilježene povremene pojave u školjkašima iz Jadranskog mora. Prvi put je detektirana u dagnjama podrijetlom iz talijanskog dijela sjevernog Jadrana u razdoblju od 2000. do 2004. god., s najvećom koncentracijom 2,5  $\text{mgkg}^{-1}$  (Ciminiello i sur., 2005.). Od tada, u nekoliko navrata pronadna je u školjkašima i iz drugih područja Jadranskog mora, ali uvijek u koncentracijama značajno manjima od NDK (Arapov, 2013.). U školjkašima iz hrvatskog dijela Jadrana, prvi put je pronadna u dagnjama prikupljenim iz uzgajališta smještenog na zapadnoj strani istarskog poluotoka tijekom 2005. god., u najvećoj koncentraciji od 872,1  $\mu\text{gkg}^{-1}$  (Ljubešić i sur., 2011.). U razdoblju od 2006. do 2008. god. detektirana je u različitim vrstama školjkaša uzgojenim i izlovljenim na području srednjeg i sjevernog Jadrana, s time da je najveća utvrđena koncentracija DA u školjkašima srednjeg Jadrana (6549  $\mu\text{gkg}^{-1}$ ) bila nekoliko puta veća od one utvrđene u školjkašima podrijetlom iz sjevernog dijela (1657  $\mu\text{gkg}^{-1}$ ) (Ujević i sur., 2010.). U istraživanju profila fiktoksina školjkaša prikupljenih iz srednjeg Jadrana tijekom 2009. i početkom 2010. god., DA je također detektirana u niskim koncentracijama, do najviše 770  $\mu\text{gkg}^{-1}$  (Ujević i sur., 2019.). U još dva istraživanja pojavnosti DA u više vrsta školjkaša srednjeg Jadrana tijekom 2011. i 2012., te krajem 2015. i početkom

2016. god., utvrđene su koncentracije od 200  $\mu\text{gkg}^{-1}$  (Arapov i sur., 2016.) i do 3240  $\mu\text{gkg}^{-1}$  (Arapov i sur., 2017.).

Pojavnost DA u školjkašima u niskim koncentracijama detektirana je i na Mediteranu. Autori Rijal Leblad i sur. (2013.) navode koncentraciju do 4900  $\mu\text{gkg}^{-1}$  u rumenkama (*C. Chione*) izlovljenim u mediteranskom dijelu Maroka, dok su Bouchouicha-Smida i sur. (2015.) u kamenicama (*O. edulis*) iz Tunisa utvrdili koncentracije do 1040  $\mu\text{gkg}^{-1}$ . Međutim, na nekim područjima zabilježena je pojava u koncentracijama većim od NDK. U Portugalu, autori Vale i Sampayo (2001.) navode ekstremnu toksičnost dagnji (*M. edulis*) zabilježenu u proljeće 2000. god., s koncentracijom DA u cijelom tkivu od 90  $\text{mgkg}^{-1}$ . Nešto kasnije u proljeće iste godine u školjkašima (*Donax trunculus*) izlovljenima na području atlantske obale u Francuskoj, uvrđena je najveća koncentracija od 53  $\text{mgkg}^{-1}$ , dok je godinu ranije na istom području pojava bila u niskim koncentracijama, do 3,2  $\text{mgkg}^{-1}$  (Amzil i sur., 2001.). Tijekom monitoringa fiktoksina u školjkašima prikupljenim na mediteranskoj obali Španjolske u razdoblju od 2008. do 2011. god., DA je pronađena u 24% uzoraka gotovo svih vrsta analiziranih školjkaša, tijekom svih sezona i na svim lokalitetima (Giménez Papiol i sur., 2013.). Autori navode da je 0,3% uzoraka sadržavalo DA u koncentraciji većoj od NDK, do najviše 27,4  $\text{mgkg}^{-1}$ . Također, ističu pojava DA u školjkašima podrijetlom iz spomenute regije, u kojoj se do 2008. god. nije pojavljivala, a kao objašnjenje navode promjenu u metodi za određivanje ovog fiktoksina, čime su postigli znatno nižu LOQ, što je kao i u ovom istraživanju, dalo sasvim novi uvid u pojava DA na tom području.

Od osam analoga PST u ovom istraživanju detektirani su samo GTX2,3 u deset uzoraka dagnji i jednom uzorku kamenica, te GTX1,4 u tri uzorka dagnji. Iako je GTX1,4 jedan od fiktoksina s najrjeđom pojavnošću u ovom istraživanju, njegova prosječna koncentracija u uzorcima veća je od NDK od 800  $\mu\text{g STXdiHCl ekv.kg}^{-1}$  (**Tablica 17**). U sva tri uzorka u kojima je kvantificiran, prisutan je i GTX2,3, koji doprinosi povećanju ukupne toksičnosti koja se kreće u rasponu od 27,73 do 1829,34  $\mu\text{g STXdiHCl ekv.kg}^{-1}$ . Oba analoga pripadaju podskupini najtoksičnijih PST – karbamatima. Mali broj kvantificiranih analoga ove skupine fiktoksina moguće je objasniti relativno visokim vrijednostima LOQ u odnosu na fiktoksine drugih skupina ovog istraživanja, s obzirom na primijenjenu instrumentalnu tehniku (LC-FLD). Primjerice, primjenom spektrometrije masa kao alternative u identifikaciji i detekciji PST, moguća je separacija i kvantifikacija epimernih parova, detekcija analoga u nižim koncentracijama i njihovih metabolita (Ding i sur., 2017.; Rodríguez-Cabo i sur., 2021.; Lage i sur., 2022.).

Kao u ovom istraživanju, Ding i sur. (2017.) po provedenoj studiji profila i metaboliziranja PST u dagnjama (*M. galloprovincialis*) podrijetlom iz Kine, navode GTX1,4 i GTX2,3 kao dominantne analoge, ali uz pojava novih metabolita PST u molarnom udjelu od otprilike



28%. Utvrdili su najveću ukupnu toksičnost od 10,76 mg STXdiHCl ekv.kg<sup>-1</sup>, no nije uključivala metabolite budući da je njihova toksičnost nepoznata. Rodríguez-Cabo i sur. (2021.) također su ustanovili pojavnost GTX1,4 i GTX2,3 u dagnjama (*M. galloprovincialis*) prikupljenim tijekom 2018. i 2019. god. iz Kantabrije i Baskije, ali istovremeno uz STX. Koncentracija u uzorcima kretala se od 170 do 983 µg STXdiHCl ekv.kg<sup>-1</sup>, a molarni udio pojedinih analoga razlikovao se u odnosu na lokacije s koje su školjkaši prikupljeni te su utvrđene i razlike s obzirom na godinu uzorkovanja. Lage i sur. (2022.) navode kompleksan profil PST u dagnjama (*M. galloprovincialis*) izloženim cvatu dinoflagelata *Gymnodinium catenatum* u Portugalu. Najveći molarni udjeli utvrđeni su za GTX6, dcSTX i C1, detektirani su i dcGTX 1 - 4, C 2 - 4, GTX4, GTX5, dcNEO, STX i M toksini, a najveća ukupna toksičnost iznosila je 33,67 mg STXdiHCl ekv.kg<sup>-1</sup>. U školjkašima *Anadara tuberculosa*, koji su bili vektor PST u slučajevima trovanja ljudi u Nikaragvi 2005. god., dominantan je bio STX s još većom ukupnom toksičnošću do čak 41,38 mg STXdiHCl ekv.kg<sup>-1</sup>, što je više od 50 puta veća vrijednost u odnosu na NDK. U školjkašima podrijetlom iz drugih područja autori također navode pojavnost PST, u koncentracijama koje ne prelaze NDK. Tako su autori Alves i sur. (2022.) u kamenicama (*C. gasar*) iz Brazila, utvrdili koncentraciju PST u rasponu od 0,32 do 421 µg STXdiHCl ekv.kg<sup>-1</sup>, a profilom dominiraju GTX2,3, STX i dcSTX, dok su Peteva i sur. (2019.) u dagnjama iz Bugarske detektirali samo GTX2, u koncentracijama do 1,6 µg STXdiHCl ekv.kg<sup>-1</sup>.

U Jadranskom moru PST su detektirani uglavnom u sjevernom dijelu, rjeđe na području srednjeg i južnog Jadrana (Ciminiello i sur., 1995.; Ujević i sur., 2012.; 2019.; Roje-Busatto i Ujević, 2014.). Profil PST koje su navedeni autori utvrdili u školjkašima razlikuju se u odnosu na ovo istraživanje, iako su neka od istraživanja uključivala školjkaše prikupljene s istih područja. Ciminiello i sur. (1995.) u hepatopankreasu dagnji prikupljenih iz uzgajališta smještenih na zapadnoj obali sjevernog Jadrana detektirali su samo GTX 2 i 3, u niskim koncentracijama. Autori Ujević i sur. (2012.) istraživali su profil PST u školjkašima prikupljenim s područja istočne obale Jadrana, u kojima su tijekom 2009. god. biopokusom utvrđeni PST. U uzorcima dagnji iz uzgajališta smještenog na jugu istarskog poluotoka, navode STX kao dominantan analog uz GTX2,3 i dcSTX, sa najvećom toksičnošću do 1550,49 µg STXdiHCl ekv.kg<sup>-1</sup>. Uzorci iz uzgajališta na zapadnoj obali Istre, te oni iz južnog Jadrana, sadržavali su samo dcSTX u niskim koncentracijama.

Školjkaši u kojima je utvrđena koncentracija PST veća ili blizu NDK u ovom istraživanju, prikupljeni su iz uzgajališta smještenog na istom području južnog dijela poluotoka kao i u prethodno spomenutom istraživanju, te iako je najveća ukupna toksičnost slična, najveći doprinos toksičnosti ima GTX1,4, a koji u istraživanju autora Ujević i sur. (2012.) nije uopće detektiran. Istraživanjem profila fikotoksina u školjkašima izlovljenim u srednjem Jadranu,

Ujević i sur. (2019.) od PST kvantificirali su GTX<sub>2,3</sub> i STX u rumenkama u nižim koncentracijama, dok su prugaste kapice sadržavale STX kao dominantan analog u koncentraciji do 98,04  $\mu\text{gkg}^{-1}$ , uz GTX<sub>5</sub>, GTX<sub>2,3</sub> i dcSTX. U još jednom istraživanju profila PST, u mješćnicama izlovljenim na području zapadne obale Istre sa tri lokacije nakon slučajeva trovanja ljudi PST uslijed konzumacije mješćnica krajem 2008. god., Roje-Busatto i Ujević (2014.) detektirali su ove fiktoksine u svim pretraženim uzorcima. Profil PST razlikovao se u odnosu na lokacije, međutim, na svim lokacijama dominantni su bili GTX<sub>2,3</sub> i STX u koncentracijama do 655,72 i 653,17  $\mu\text{gkg}^{-1}$ . Uzorci sa lokacije koja geografskim položajem odgovara onoj sa koje su prikupljeni uzorci mješćnica i kamenica iz ovog istraživanja imali su kompleksniji profil u odnosu na ostale lokacije. Uz spomenute analoge detektirani su još dcGTX<sub>2,3</sub>, dcSTX, GTX<sub>5</sub> i C<sub>1,2</sub>, a najveća ukupna toksičnost iznosila je 806,95  $\mu\text{g STXdiHCl ekv.kg}^{-1}$ . U mješćnicama iz ovog istraživanja nisu detektirani PST, a u samo jednom uzorku kamenica detektiran je GTX<sub>2,3</sub>.

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da se fiktoksini nakupljaju u školjkašima i mješćnicama, ponekad u koncentracijama većima od NDK. Profil fiktoksina razlikuje se među vrstama, a navedeni literaturni podaci ukazuju na razlike s obzirom na područja s kojih školjkaši potječu, kao i vremensko razdoblje u kojem su prikupljeni ili izlovljeni. Narocit rizik za potrošače predstavlja povremena, iznenadna pojava fiktoksina u visokim koncentracijama, kao što je slučaj u ovom istraživanju sa PST, koji se smatraju jednim od najopasnijih prirodnih toksina budući da već 1 mg može biti smrtonosan u vrlo kratkom vremenu (Wiese i sur., 2010.; Leal i Cristiano, 2022.a). Osim njih, uočava se pojavnost toksina okadaične skupine, također povremeno u koncentracijama većim od NDK. Iako za razliku od hidrofilnih PST i DA, akutna toksičnost lipofilnih toksina ne izaziva životnu ugrozu, potrebno je uzeti u obzir moguće štetne posljedice po zdravlje uslijed kronične izloženosti nižim, opetovanim koncentracijama fiktoksina, čija je pojavnost u ovom istraživanju utvrđena, kao i novootkrivenih fiktoksina poput CI o čijoj toksičnosti ima malo podataka. Navedeno se primarno odnosi na OA za koju je utvrđeno da osim štetnog djelovanja na probavni sustav djeluje i kao tumorski promotor (Manerio i sur., 2008.; del Campo i sur., 2017.; Emery i sur., 2021.), te DA i PST koji izazivaju oštećenja SŽS (Goldstein 2008.; Costa i sur., 2014.), oštećenja DNA, umanjuju obrambene mehanizme organizma, a imaju i genotoksični potencijal (Hong i sur., 2003.; Costa i sur., 2012.). Poseban rizik predstavljaju za djecu, starije i osobe s kroničnim bolestima koji su osjetljiviji na njihov toksični učinak (Petroff i sur., 2021.).

## 5.4. SUPOJAVNOST FIKOTOKSINA

Iz rezultata prikazanih u **Tablici 18** razvidno je da su u školjkašima analiziranim u ovom istraživanju fiktoksini često istovremeno prisutni u raznim kombinacijama. Od ukupnog broja uzoraka u kojima su fiktoksini kvantificirani, u 49% istovremeno je prisutno dva ili više fiktoksina, s time da su najčešće istovremeno prisutna dva (u 35% uzoraka), a najrjeđe istovremeno pet različitih toksina (u 1% uzoraka).

Supojavnost fiktoksina u školjkašima je česta. Iako su za većinu fiktoksina uglavnom poznati mehanizmi djelovanja i intenzitet toksičnog učinka, o učinku kombinacija fiktoksina malo se zna, no objavljena su istraživanja koja ukazuju na njihovo sinergističko, aditivno ili antagonističko djelovanje. Alarcón i sur. (2018.) u preglednom radu o supojavnosti LT, navode OA kao najčešće prisutni fiktoksin u kombinaciji sa ostalim LT. Iako je u skoro petini uzoraka iz ovog istraživanja utvrđena OA, SPX1 osim što ima pojavnost u najvećem broju uzoraka, najčešće je prisutan u kombinaciji s drugim fiktoksinima. Ovaj rezultat je u skladu sa zaključkom autora spomenutog preglednog rada o prostornoj ovisnosti pojave kombinacija fiktoksina i češćoj pojavnosti SPX1 u kombinacijama u školjkašima (naročito u dagnjama) na području Europe. Također, autori navode supojavnost hidrofilnih i LT, što je zapaženo i u ovom istraživanju.

Istraživanja o mogućem međudjelovanju fiktoksina su rijetka, a opaženi učinci u *in vitro* istraživanjima za iste kombinacije fiktoksina su sinergija, aditivnost i antagonizam, ovisno o njihovim molarnim udjelima (Ferron i sur., 2016.). Ispitivanje sinergističkog učinka OA i ostalih LT na ljudskim stanicama neuroblastoma ukazalo je na povećanje toksičnog djelovanja OA u prisustvu DTX2 ili YTX, ujedno ovisno o koncentraciji i trajanju međudjelovanja (Rodríguez i sur., 2015.). Budući desetina uzoraka iz ovog istraživanja u kojima je prisutno više od jednog fiktoksina istovremeno sadrži OA i YTX, uzimajući u obzir rezultate prethodno spomenutog istraživanja, moguće je da je njihova toksičnost veća od očekivane za utvrđenu koncentracijsku razinu. U ispitivanju učinka OA na ljudske Caco-2 stanice u kombinaciji sa PTX2, SPX1 ili YTX, Alarcón i sur. (2019.) uočili su antagonističko djelovanje ovih fiktoksina u kombinaciji s OA pri nižim koncentracijama, no pri većim koncentracijama toksični učinak bio je veći, što ukazuje na njihovo moguće aditivno ili sinergističko djelovanje. Također, Dragunow i sur. (2005.) uočili su senzibilizaciju stanica neuroblastoma, prethodno izloženih GYM i njegovim analogima, na apoptotičko djelovanje OA. Malobrojne *in vivo* studije dale su drugačije rezultate. U istraživanju kombinirane oralne toksičnosti YTX i AZA1 na miševima, nisu utvrđene patološke promjene unutarnjih organa, kao ni povećana apsorpcija i toksičnost YTX u prisustvu subletalnih doza AZA1 (Aasen i sur., 2011.). Slično su utvrdili i Aune i sur. (2012.) u istraživanju međudjelovanja OA i AZA1 nakon

oralne administracije pokusnim miševima. Nije uočen aditivni niti sinergistički učinak što se tiče smrtnosti, kao ni veći patološki učinak. Apsorpcija iz probavnog trakta bila je slaba, a u kombinaciji toksina još više reducirana. Rezultati istraživanja oralne toksičnosti OA i YTX na miševima pokazuju da se u kombinaciji njihov toksični učinak ne razlikuje od toksičnog učinka pojedinačnih toksina (Sosa i sur., 2013.).

Alarcan i sur. (2018.) ističu potrebu za istraživanjima izloženosti potrošača kombinacijama fiktoksina poput ovog, s ciljem planiranja *in vitro* i *in vivo* istraživanja, naročito zbog ograničenih količina dostupnih standardnih otopina fiktoksina i visokih troškova istraživanja. Malobrojna istraživanja bave se toksičnim učinkom kombinacije dvaju fiktoksina, no iz rezultata ovog istraživanja razvidno je da je česta istovremena pojavnost i više njih. Međudjelovanje i utjecaj na ukupnu toksičnost kombinacije više fiktoksina potpuno je nepoznato. Daljnja istraživanja najčešćih kombinacija fiktoksina i njihovih međusobnih omjera u različitim vrstama školjkaša, doprinijeti će spoznajama o njihovim sinergističkim učincima na ljude i izloženosti njihovom toksičnom učinku. S obzirom na navedeno i činjenicu da je objavljeno vrlo malo istraživanja pojavnosti koja istovremeno uključuju hidrofilne i LT, a još rjeđe CI, kroz duži vremenski period koji obuhvaća različite sezone, ovo istraživanje pruža korisne podatke koji mogu doprinijeti istraživanjima toksičnog učinka fiktoksina.

## **5.5. RAZLIKA U PROFILU FIKOTOKSINA MEĐU VRSTAMA**

Razlika u profilu fiktoksina među različitim vrstama školjkaša i mješćnicama ispitana je usporedbom učestalosti njihove pojavnosti i utvrđenih koncentracija u uzorcima kamenica i dagnji prikupljenih s lokaliteta L4 (**Tablica 30**), te kamenica, kapica i mješćnica izlovljenih s lokaliteta L9 (**Tablica 31**). Budući da prikupljeni uzorci uspoređivanih vrsta potječu s istog područja, tijekom rasta bili su izloženi jednakim uvjetima. Podaci prikazani u **Tablici 30** ukazuju na kumulaciju više vrsta fiktoksina u dagnjama u odnosu na kamenice. Obje vrste kumulirale su DA, OA i sve CI, međutim, isključivo u dagnjama detektirani su YTX, te GTX2,3 i GTX1,4. U dagnjama dominiraju CI s najčešćom pojavnošću PnTX-G u 69% uzoraka, ali s najmanjom prosječnom koncentracijom u odnosu na druga dva CI. Nešto manja je pojavnost SPX1, u 60% uzoraka, dok je od CI GYM utvrđen u najmanjem broju uzoraka (29%), oba s približno jednakim prosječnim koncentracijama. U najmanjem broju uzoraka dagnji utvrđeni su DA i YTX (4%), s prosječnim koncentracijama od 5,06 i 164,94  $\mu\text{gkg}^{-1}$ .

Usporedbom koncentracija pojedinačnih fiktoksina u ove dvije vrste školjkaša, utvrđena je statistički značajna razlika u kumulaciji DA ( $p = 0,030$ ) i GYM ( $p = 0,001$ ). DA u kamenicama detektirana je oko četiri puta češće i s približno deset puta većom prosječnom

koncentracijom u odnosu na dagnje. GYM je detektiran u tri puta više uzoraka kamenica, s približno dvostruko većom prosječnom koncentracijom. Stirling (2001.) navodi sličnu pojavnost GYM utvrđenu u 32% ispitanih uzoraka dagnji (*M. galloprovincialis*), te u svim uzorcima kamenica (*T. chilensis*) prikupljenih na Novom Zelandu.

Prosječna koncentracija SPX1 određena u ovom istraživanju u obje vrste statistički se značajno ne razlikuje ( $p = 0,180$ ), kao ni koncentracija OA ( $p = 0,224$ ). Utvrđena podjednaka kumulacija OA u dagnjama i kamenicama prikupljenim s lokaliteta L4 razlikuje se od mnogih istraživanja provedenih na dagnjama i kamenicama, u kojima je utvrđena kumulacija OA u znatno većim koncentracijama u dagnjama (Lindegarth i sur., 2009.; Kacem i sur., 2010.; Li i sur., 2015.; Mafra i sur., 2015.; Salas i sur., 2019.). Međutim, iako je ovim istraživanjem utvrđena podjednaka prosječna koncentracija u ovim vrstama, OA je bila prisutna u oko četiri puta više uzoraka dagnji na spomenutom lokalitetu, s najvećom koncentracijom utvrđenom tijekom ovog istraživanja upravo u ovoj vrsti školjkaša.

Iz podataka prikazanih u **Tablici 30** također je razvidno da postoji značajna razlika u pojavnosti PnTX-G među ovim vrstama, budući da je navedeni fiktoksin gotovo isključivo utvrđen u dagnjama, dok je u kamenicama prisutan samo u jednom uzorku. Navedeni rezultati u skladu su s istraživanjem pojavnosti CI autora Hess i sur., (2013.) i García-Altare i sur. (2014.) koji su utvrdili češću pojavnost i veću kumulaciju PnTX-G u dagnjama (*M. galloprovincialis*) u odnosu na vongole (*V. decussata*) i kamenice (*C. gigas*), kao i autora Lamas i sur. (2019.) koji navode veću koncentraciju PnTX-G u dagnjama (*M. galloprovincialis*) u odnosu na ostale vrste školjkaša uključene u istraživanje. Tamele i sur. (2022.) u istraživanju pojavnosti LT u četiri vrste školjkaša (*Atrina vexillum*, *Pinctada imbricata*, *Anadara antiquata* i *Saccostrea cucculata*) samo u tropskoj kamenici (*S. cucculata*) nisu detektirali PnTX-G, što je u skladu s njegovom rijetkom pojavnošću u kamenicama utvrđenoj i u ovom istraživanju. Isti autori utvrdili su i razliku u kumulaciji među vrstama. Rambla-Alegre i sur. (2018.) također navode razliku u kumulaciji CI u različitim vrstama te češću pojavnost PnTX-G u dagnjama u odnosu na druge vrste, te otprilike podjednaku pojavnost SPX1 u kamenicama i dagnjama.

Od PST pronađenih samo u dagnjama, GTX2,3 je češće prisutan, ali sa značajno manjom prosječnom koncentracijom u odnosu na GTX1,4, koji je ujedno toksin prisutan u najvećoj koncentraciji utvrđenoj u ovom istraživanju ( $1736,29 \mu\text{gkg}^{-1}$ ). Čak i kada je koncentracija PST u dagnjama bila više nego dvostruko veća od NDK, u kamenicama s istog lokaliteta ovi fiktoksini uopće nisu detektirani. Navedeno ukazuje na razlike u pojavnosti i kumulaciji hidrofilnih i LT fiktoksina u različitim vrstama, na što utječe više čimbenika.

Razlika u kumulaciji među vrstama utvrđena je tijekom mnogih istraživanja, no kao i u ovom, mnoga su potvrdila da su dagnje dobra indikatorska vrsta za PST, budući da ih kumuliraju vrlo brzo nakon izloženosti i u velikim koncentracijama (Navarro i sur., 2011.), kao i da se depuracija u dagnji brže odvija u odnosu na vrste poput kopita (*S. squamosus*), periski (*Atrina vexillum*) i kapica (*P. magellanicus*) (Bricelj i Shumway, 1998.; Montojo i sur., 2006.). Kod vrsta koje se brzo detoksificiraju, koncentracija PST značajno se smanjuje tijekom nekoliko tjedana, dok se u vrstama kod kojih je detoksifikacija spora mogu zadržati i po nekoliko mjeseci i godina od prestanka izloženosti (Bricelj i Shumway, 1998.). Iznenađujuća pojava visokih koncentracija GTX1,4 i GTX2,3 u dagnjama iz ovog istraživanja, te depuracija do koncentracija manjih od LOD u svega nekoliko tjedana, u skladu je s navedenim literaturnim podacima. Problem je što vrlo brza kumulacija PST u dagnjama može uzrokovati neopaženu i ujedno visoku toksičnost ovih školjkaša (Rourke i sur., 2021.).

U ranije spomenutim istraživanjima školjkaša istovremeno prikupljenih s istih područja, Ujević i sur. (2019.) navode razliku u profilu i kumulaciji PST u rumenkama i prugastim kopicama, dok Roje-Busatto i Ujević (2014.) u kopicama (*F. proteus*), jakovljevim kopicama i kamenicama istovremeno izlovljenim sa istog područja nisu detektirali PST, dok u mješčincama (*Microcosmus vulgaris*) jesu. U njima je utvrđeno više analoga PST u koncentracijama do 806,95  $\mu\text{gkg}^{-1}$ . Oyaneder-Terrazas i sur. (2017.) u istraživanju pojavnosti, varijabilnosti i bioakumulacije PST u različitim vrstama morskih organizama, uočili su značajne razlike među vrstama, kao i različitu kumulaciju u različitim tkivima iste vrste. Školjkaše navode kao vrstu koja najviše kumulira PST, nakon čega slijede puževi, plaštenjaci, bodljikaši, glavonošci i ribe kao vrsta u kojoj se ovi fikotoksini najmanje kumuliraju. Zbog složenih procesa biotransformacije i metaboliziranja PST u školjkašima, njihov profil najčešće se razlikuje od onog u fitoplanktonu koji ih proizvodi (Ding i sur., 2017.). Uočeno je povećanje toksičnosti u školjkašima uslijed biokonverzije u termostabilnije, toksičnije analoge, npr. C1 i 2 u GTX2 i 3, GTX4 u GTX1, GTX3 u GTX2, GTX1 i 4 u NEO, GTX2 i 3 u STX (Oyaneder-Terrazas i sur., 2022.), ali i obrnuti proces konverzije toksičnijih u manje toksične analoge (Andres i sur., 2019.). Kapacitet transformacije PST razlikuje se među vrstama (Bricelj i Shumway, 1998.). Također, moguće su i razlike profila iste vrste fitoplanktona uslijed djelovanja različitih faktora, poput geografske lokacije, okolišnih uvjeta (Negri i sur., 2007), dostupnosti nutrijenata (Granéli i Flynn, 2006.) i stadija životnog ciklusa (Silva i sur., 2015.), čime je temeljem prisustva pojedine vrste fitoplanktona teško predvidjeti profil PST i potencijalnu toksičnost školjkaša. Razlike u profilu PST i njihovoj kumulaciji proizlaze iz razlika u unosu, raspodjeli među tkivima, metabolizmu i izlučivanju u različitim vrstama (Cembella i sur., 1994.; Bricelj i Shumway, 1998.; Donovan i sur., 2008.). Također, profil PST u školjkašima mijenja se od trenutka unosa do depuracije, zbog selektivnog

zadržavanja pojedinih analoga ili zbog enzimatske transformacije tijekom metaboliziranja toksina (Andres i sur., 2019.), no i to je ovisno o vrsti. Općenito, vrste koje su neosjetljive na djelovanje PST, poput dagnji, kumuliraju ove toksine u visokim koncentracijama, za razliku od osjetljivih vrsta koje u prisustvu toksičnog fitoplanktona aktiviraju određene fiziološke mehanizme kojima sprječavaju ili umanjuju njihov unos (Gainey i Shumway, 1988.).

**Tablica 31** prikazuje pojavnost fiktoksina u kamenicama, kopicama i mješčincama izlovljenim s lokaliteta L9. Kamenice i kopice kumulirale su i hidrofilne i LT, dok su mješčincice kumulirale uglavnom hidrofilni toksin DA, te su u samo po jednom uzorku utvrđeni GYM i SPX1. U jednom uzorku kamenica utvrđen je GTX2,3 koji nije detektiran u kopicama, dok je u kopicama za razliku od kamenica prisutan AZA2. López-Rivera i sur. (2010.) također navode razliku u pojavnosti azaspiracida među vrstama. Utvrdili su značajno veću pojavnost AZA2 u kopicama (*A. purpuratus*) uz manji udio AZA1 u odnosu na dagnje (*M. chilensis*), u kojima je dominirao AZA1, ujedno u manjim koncentracijama. U monitoringu fiktoksina u razdoblju od 2003. do 2010. god. u Irskoj, azaspiracidi su pronađeni u mnogim vrstama školjkaša. Od 14 vrsta obuhvaćenih istraživanjem kumulacija u dagnjama (*M. edulis*) i pacifičkim kamenicama (*C. gigas*) bila je najveća, a utvrđene koncentracije AZA prelazile su NDK (Salas i sur. 2011.).

U ovom istraživanju YTX je utvrđen u jednom uzorku kamenica, za razliku od kopica u kojima je ovaj fiktoksin određen u skoro polovini uzoraka s prosječnom koncentracijom od 140,38  $\mu\text{gkg}^{-1}$ . Češća kumulacija YTX u kopicama u odnosu na ostale vrste, kao što je utvrđeno u ovom istraživanju, u skladu je s rezultatima ranijih istraživanja. Turner i sur. (2015.) su u ispitivanju profila LT, među različitim vrstama školjkaša YTX pronašli samo u kopicama *Z. patagonica* i *Aequipecten tehuelchus*. Dhanji-Rapkova i sur. (2011.) navode dagnje, ali i kopice, kao jedine vrste u kojima su detektirani jesotoksini tijekom višegodišnjeg monitoringa LT u školjkašima u Velikoj Britaniji. Uočene razlike u kumulaciji YTX u ovim vrstama objašnjavaju različitom brzinom depuracije, koja je tri puta veća kod dagnji, kao i mogućim različitim mehanizmima ovog procesa.

Od CI kamenice iz ovog istraživanja su kumulirale GYM i SPX1, dok je u kopicama detektiran GYM, te u samo jednom uzorku SPX1. PnTX-G nije detektiran u niti jednoj od tri vrste na lokalitetu L9. Statistički značajna razlika utvrđena je u kumulaciji GYM između kamenica i kopica ( $p = 0,041$ ). Više od 90% kamenica kumuliralo je ovaj fiktoksin, za razliku od oko 6% kopica, u kojima je prisutan i s manjom prosječnom koncentracijom. Kao i na ovom lokalitetu, u kamenicama s lokaliteta L4 GYM je također detektiran u najvećem broju uzoraka (**Tablica 30**). Ovi rezultati u skladu su s istraživanjem autora Jiang i sur. (2017.) koji od svih LT navode GYM s najčešćom pojavnošću u portugalskim kamenicama (*Crassostrea angulata*). Češću pojavnost i kumulaciju u većim koncentracijama GYM u kamenicama (*C.*

*gigas*) u odnosu na dagnje (*M. galloprovincialis*) navode i Li i sur. (2015.). U istraživanju esterifikacije GYM u školjkašima Ji i sur. (2020.) uočili su razliku među vrstama u koncentraciji i profilu GYM i njegovih estera. Za razliku od kamenica (*Crassostrea* spp.) u kojima su utvrdili samo prisustvo GYM, u školjkašima *Antigona lamellaris*, periskama (*A. Pectinata*) i dagnjama (*M. galloprovincialis*) detektirali su GYM i njegove estere u vrlo visokom udjelu (> 90%). Razlika u esterifikaciji u različitim vrstama mogla bi biti uzrok češće pojavnosti i značajne razlike u koncentraciji GYM u kamenicama u odnosu na dagnje i kapice utvrđene u ovom istraživanju. Ukoliko dolazi do njegove esterifikacije u dagnjama i kopicama, esteri GYM nisu mogli biti detektirani budući da nisu ispitivani tijekom ovog istraživanja, a koncentracija GYM posljedično je bila manja.

Mnogi autori navode dagnje kao vrstu s najvećim potencijalom kumulacije LT, ali i kapice (Suzuki i sur., 2001.; Blanco i sur., 2019.; Liu i sur., 2019.; Zheng i sur., 2021.). U ovom istraživanju upravo u dagnjama detektiran je najveći broj različitih analoga LT, kao i najveće koncentracije nekih od njih. Rezultati ukazuju da postoji razlika u pojavnosti i kumulaciji LT među ispitanim vrstama, a specifična je za svaki od analoga. Te razlike proizlaze iz različitosti u složenim procesima vezanim uz kumulaciju toksina, kao što su unos toksina, probava, biotransformacija, kompartmentalizacija i uklanjanje toksina (Blanco, 2018). Najveća stopa filtracije u kamenica manja je od one u dagnjama (Comeau i sur., 2008.; McFarland i sur., 2013.), što bi mogao biti jedan od razloga češće pojavnosti OA u dagnjama u odnosu na kamenice utvrđene u ovom istraživanju. Efikasnost apsorpcije ovisi i o ukupnoj količini unešenih čestica i prisustvu drugih vrsta fitoplanktona (Navarro i Iglesias, 1993; Guéguen i sur., 2008). Sidari i sur. (1998.) ukazuju na mogući selektivni unos dinoflagelata u suspenziji sa diatomejama, naročito vrsta *Dinophysis* u dagnjama. Tijekom probave, unešeni fitoplankton podložan je djelovanju enzima školjkaša, ali i autolitičkih enzima samog fitoplanktona (Blanco, 2018.). Dagnje su otporne na citotoksično djelovanje OA, što je vjerojatno povezano s pohranom u lizosomalnom sustavu (Svensson i sur., 2003.), čime je moguća njena kumulacija u visokim koncentracijama. Brzina depuracije LT iz školjkaša također ovisi o samom toksinu (Blanco, 2018.). Pojedini autori kao jedan od mogućih uzroka razlika među vrstama navode i razlike u fiziološkom statusu školjkaša koji se sezonski mijenja ovisno o njihovom reproduktivnom ciklusu (Svensson i Förlin, 2004.).

DA detektirana je u ovom istraživanju u svim vrstama s lokaliteta L9, ali s najčešćom pojavnošću i najvećom prosječnom koncentracijom u kopicama. Koncentracija u kopicama statistički se značajno razlikuje u odnosu na mješćićnice ( $p = 0,006$ ) u kojima je detektirana približno dvostruko rjeđe u odnosu na broj uzoraka svake od navedenih vrsta i sa značajno manjom prosječnom koncentracijom. Udio uzoraka kamenica koje sadržavaju DA je najmanji u odnosu na kapice i mješćićnice, no prosječna koncentracija nešto je manja u odnosu na



kapice. Kao što je već ranije navedeno, utvrđena je značajna razlika u kumulaciji DA u kamenicama i dagnjama s lokaliteta L4 (**Tablica 30**), gdje je DA detektirana češće i s većom prosječnom koncentracijom u kamenicama. Ovi rezultati su u skladu s istraživanjima pojavnosti DA u školjkašima različitih vrsta izloženim jednakim okolišnim uvjetima, u kojima je također utvrđena razlika u pojavnosti i kumulaciji među vrstama. Ujević i sur. (2019.) navode češću pojavnost i veću koncentraciju DA u prugastoj kapici u odnosu na rumenku, dok Takata i sur. (2009.) *S. squamosus* navode kao vrstu u kojoj je kumulacija DA veća u odnosu na ostale vrste prikupljene s istog područja (*Perna viridis*, *Anadara antiquata*, *Chama iostoma*, *Chama lazarus*, *Atrina vexillum*, *Placuna sella*, *Hyotissa hyotis*). Kao i u ovom, u ranije spomenutom istraživanju Bouchouicha-Smida i sur. (2015.) utvrdili su kumulaciju DA u većim koncentracijama u kamenicama u odnosu na dagnje. Isto navode i autori Picot i sur. (2012.) koji su dokazali da je *Cerastoderma edule* dominantan vektor DA, dok su manju koncentraciju odredili u kućicama (*Ruditapes* spp.), šljancima i škljencima (*Ensis* spp., *Solen* spp.) te kamenicama (*C. gigas*), a najmanju u dagnjama (*M. edulis*). Rourke i sur., (2021.) navode najveću i najdužu kumulaciju DA u kapticama (*P. magellanicus*), značajno manju u dagnjama (*M. edulis*), te gotovo zanemarivu pojavnost u kamenicama (*C. virginica*).

Kod pojedinih vrsta, poput dagnji (*M. edulis*, *M. galoprovincialis*), koritnica (*Mesodesma donacium*) i češljača (*A. purpuratus*), depuracija DA je brza, za razliku od vrsta kao što su britvasta školjka (*Siliqua patula*) i velika kapica (*P. maximus*) kod kojih je depuracija znatno sporija (Novaczek i sur., 1992.; Blanco i sur., 2002.a; 2002.b; Trainer i sur., 2004.; Álvarez i sur., 2015.; 2020.). Razlika u kumulaciji DA među vrstama pripisuje se različitoj brzini unosa i eliminacije (Blanco i sur., 2002.a; 2002.b; Mafra i sur., 2009.; Mafra i sur., 2010.a; Mafra i sur., 2010.b; Blanco i sur., 2021.), apsorpciji iz probavne žlijezde (Blanco i sur., 2021.; Blanco i sur., 2020.), distribuciji među različitim tkivima (Blanco i sur., 2002.b; Álvarez i sur., 2015.; 2020.) te okolišnim uvjetima (Blanco i sur., 2006.). Manja pojavnost i manja kumulacija u kamenicama u odnosu na kapice prikupljene s istog lokaliteta u ovom istraživanju mogla bi se objasniti i manjim unosom DA zbog niskog intenziteta pročišćavanja kod kamenica (engl. *clearance rate*) i sposobnosti selektivnog odbacivanja stanica diatoma *Pseudo-nitzschia pseudofecesom* (Mafra i sur., 2009.). Jedno od mogućih objašnjenja značajno manje pojavnosti i kumulacije DA u dagnjama u odnosu na ostale vrste je potencijalno prisustvo bakterija koje razgrađuju DA u probavnom sustavu dagnji. Prema istraživanju autora Stewart i sur. (1998.), u probavnom sustavu vrsta *M. edulis* i *Mya arenaria*, u kojima je eliminacija DA brza, pronađene su bakterije koje biodegradiraju DA, dok se u vrstama poput kapice *P. magellanicus*, koja dugo zadržava DA, takve bakterije rijetko pronalaze. Također, u kapticama se DA uglavnom kumulira u probavnoj žlijezdi te je nedostupna djelovanju tih bakterija. Manja kumulacija DA u kamenicama i mješćenicama u

odnosu na kapice može biti posljedica nedostatka mehanizama selekcije čestica tijekom filtracije (Armsworthy i sur., 2001), te smanjenog unosa hrane kada se hrane detritusom bogatim anorganskim česticama (Robbins i sur., 1985.). Određena svojstva mikroalgi poput biomineralizirane stijenke diatomeja mogu ih zaštititi od toga da budu uhvaćene (Jacobi i sur., 2021.), a tome u prilog govori i istraživanje autora Barillé i Cognie (2000.) koji su u fecesu i pseudofecesu kamenica (*C. gigas*) pronašli značajan broj diatomeja koje su preživjele ekstracelularnu probavu. Među vrstama postoje razlike u akumulaciji DA i na molekularnom nivou. Dugo zadržavanje DA u velikoj kapici (*P. maximus*) Mauriz i Blanco (2010.) objašnjavaju nedostatkom membranskog transportera neophodnog da se ovaj fiktoksin elimira iz stanica, dok Trainer i Bill (2004.) pretpostavljaju postojanje glutamatnih receptora za koje se DA dugotrajno veže i na taj način sprječava intoksikacija britvaste školjke (*S. Patula*).

Dagnje koje se najčešće koriste u praćenju fiktoksina u školjkašima, prema rezultatima ovog istraživanja nisu vrsta u kojoj DA ima najveću pojavnost i kumulaciju. Iako je zabilježena kumulacija DA u mješćinicama u koncentracijama koje mogu predstavljati opasnost za potrošače (López-Rivera i sur., 2009.), u ovom istraživanju one su vrsta koja kumulira DA u manjoj koncentraciji od kamenica i kapica. Zbog dužeg zadržavanja, kumulacije većih koncentracija i češće pojavnosti, kapice se mogu smatrati prikladnijom vrstom za monitoring DA u odnosu na dagnje.

U Hrvatskoj se tijekom godine provodi planirano, kontinuirano praćenje pojavnosti fiktoksina u školjkašima, s ciljem zaštite potrošača od njihovog akutnog toksičnog učinka. Prema Planu praćenja kakvoće mora i školjkaša na proizvodnim područjima i područjima za ponovno polaganje živih školjkaša (Nacionalni plan) kojeg donosi MP (MP, 2023), u izlovnim i proizvodnim područjima na kojima se uzgaja više različitih vrsta školjkaša, određena je samo jedna referentna vrsta za praćenje pojavnosti fiktoksina, prema kojoj se procjenjuje njihova pojavnost u svim ostalim vrstama. Međutim, temeljem rezultata ovog istraživanja razvidno je da se pojavnost i kumulacija pojedinih fiktoksina značajno razlikuju među vrstama. Iako se dagnje najčešće koriste kao sentinel vrsta, one su prikladne za praćenje pojavnosti PST i pojedinih LT, no ne i za DA koja se češće i u većim koncentracijama kumulira u kopicama. Kapice su prikladne za praćenje YTX, dok su kamenice prikladna sentinel vrsta za GYM. Stoga bi za praćenje pojavnosti fiktoksina, na područjima na kojima se uzgaja ili izlovljava više različitih vrsta, bilo prikladno uključiti više njih istovremeno. Osim navedenog, praćenjem pojavnosti u više vrsta u slučaju povećanih koncentracija fiktoksina zbog kojih dolazi do zatvaranja uzgajališta ili obustave izlova, smanjili bi se ekonomski gubici. Prema trenutno važećim propisima, u svim uzgajalištima na području u kojem se utvrdi koncentracija fiktoksina veća od NDK u referentnoj vrsti, zabranjuje se izlov svih vrsta školjkaša.

Međutim, rezultati ovog istraživanja pokazuju da kada je u dagnjama prikupljenim sa lokaliteta L4 utvrđena visoka toksičnost uslijed kumulacije PST, istovremeno prikupljene kamenice s istog lokaliteta bile su sigurne za konzumaciju i mogle su se eksploatirati.

## 5.6. SEZONSKA POJAVNOST FIKOTOKSINA

S ciljem eliminacije utjecaja vrste na analizu sezonske pojavnosti fikotoksina, usporedba je provedena zasebno za svaku vrstu. Za neke od njih uočena je značajna razlika među sezonama. Najveće koncentracije OA u dagnjama zabilježene su u toplijem dijelu godine, u proljeće tijekom travnja te početkom ljeta u lipnju, dok su najmanje zabilježene u jesenskim mjesecima, u studenom (**Tablica 32**). U kamenicama je OA kvantificirana u samo dva uzorka, u travnju i siječnju (**Tablica 33**), dok u kapicama i mješćnicama nije detektirana. Jedini uzorak dagnji u kojem je uz OA bio prisutan i PTX2 uzorkovan je u prosincu (**Tablica 32**).

Najveće koncentracije YTX u dagnjama zabilježene su također u toplijim mjesecima, u svibnju i srpnju, dok se tijekom jesenskih i zimskih mjeseci prosječna koncentracija smanjivala do veljače, kada u niti jednom uzorku nije utvrđen YTX, uz iznimku siječnja u kojem je zabilježena veća koncentracija u odnosu na ostale zimske mjesece (**Tablica 32**). U kapicama prosječne sezonske koncentracije nisu se značajno razlikovale, no zabilježena su tri pika s najvećim koncentracijama slično kao kod dagnji, u travnju, srpnju i siječnju (**Tablica 34**). U kamenicama samo je jedan uzorak u listopadu sadržavao YTX iznad LOQ (**Tablica 33**). Pojavnost azaspiracida u odnosu na ostale fikotoksine u ovom istraživanju je rijetka i prosječne koncentracije ne razlikuju se značajno među sezonama, no češće su detektirani tijekom toplijeg dijela godine (**Tablice 32 i 34**).

Prosječne koncentracije GYM u dagnjama bile su najviše u jesenskim mjesecima s najvećim vrijednostima u rujnu, a najmanje u zimskim mjesecima, s time da u siječnju i veljači nije uopće detektiran (**Tablica 32**). U kamenicama je GYM prisutan tijekom svih mjeseci, a najveće koncentracije zabilježene su u ljetnim mjesecima s maksimumom u kolovozu (**Tablica 33**). U kapicama je ovaj fikotoksin utvrđen u svega tri uzorka u kolovozu, veljači i ožujku (**Tablica 34**). SPX1 u dagnjama u najvećim koncentracijama kumulirao se u travnju, dok mu je pojava bila najmanja u jesen te u rujnu i studenom nije detektiran (**Tablica 32**). U kamenicama najmanje koncentracije SPX1 zabilježene su u jesen i tijekom zimskih mjeseci, u proljeće su bile veće, dok su tijekom tri ljetna mjeseca koncentracije jako varirale. U kolovozu je kvantificiran samo u jednom uzorku, ali u visokoj koncentraciji (**Tablica 33**). Od srpnja do listopada zabilježene su najveće prosječne koncentracije PnTX-G u dagnjama, tijekom zime i proljeća bile su najniže, s time

da u siječnju nisu detektirani (**Tablica 32**). U samo jednom uzorku kamenica PnTX-G je utvrđen u listopadu (**Tablica 33**).

Za razliku od sezonske pojavnosti PnTX-G u ovom istraživanju, u pojedinim ranijim istraživanjima dagnji (*M. edulis*) prikupljenim u Kanadi nije uočena sezonska pojavnost ovog fiktoksina (McCarron i sur., 2012.), dok pojedina navode najveće koncentracije u različitim vrstama školjkaša prikupljenim tijekom dvogodišnjeg istraživanja na području atlantske i obale Kantabrijskog mora Španjolske u zimskom periodu (Lamas i sur., 2019.). Ujedno, Hess i sur. (2013.) su tijekom četverogodišnjeg istraživanja uočili češću pojavnost PnTX-G u dagnjama (*M. galloprovincialis*) podrijetlom iz mediteranskog dijela Francuske tijekom ljetnih mjeseci. Kao i u ovom istraživanju, sličnu sezonsku pojavnost GYM i SPX1 u školjkašima iz srednjeg Jadrana navode Ujević i sur. (2019.). Najveće koncentracije GYM i SPX1 u prugastoj kapici utvrdili su tijekom toplijeg dijela godine, u rumenkama u travnju, te u slučaju GYM još i u studenom. Bacchiocchi i sur. (2020.) utvrdili su kumulaciju SPX u dagnjama iz sjevernog dijela srednjeg Jadrana (zapadna obala) u najvećim koncentracijama krajem zime i početkom proljeća, dok je prema kraju godine koncentracija padala, uz iznimku jednog lokaliteta, gdje je najveća koncentracija utvrđena u kasnu jesen. Najveće koncentracije GYM utvrdili su u ljetnim mjesecima.

U dagnjama u kojima su biopokusom dokazani DSP toksini iz sjevernog i južnog Jadrana, GYM je detektiran tijekom ljetne sezone (Arapov i sur., 2015.). U istom istraživanju, u sjevernom Jadranu utvrđena je pojavnost YTX i OA u razdoblju od svibnja do rujna, dakle u toplijem dijelu godine, kao i u ovom istraživanju. Ninčević Gladan i sur. (2008.) također navode pojavnost OA i skupine YTX u toplijim mjesecima, u razdoblju od travnja do listopada, a u petogodišnjem istraživanju uočavaju razlike u pojavnosti po godinama. U još dva istraživanja utvrdili su pojavnost istih skupina toksina u razdoblju od kolovoza do listopada (Ninčević Gladan i sur., 2011.), te od travnja do listopada (Ninčević Gladan i sur., 2010.). Čustović i sur. (2014.) detektirali su OA u travnju, dok je YTX detektiran prve godine istraživanja u razdoblju od veljače do kolovoza, a iduće godine od travnja do prosinca. Pojavnost AZA u školjkašima Jadrana, također tijekom toplijeg dijela godine, kao i u ovom istraživanju, navode Talić i sur. (2020.) te Bacchiocchi i sur. (2015.), koji uz najveće koncentracije u ljetnoj sezoni navode veće koncentracije i tijekom jeseni i zime.

Sezonska pojavnost DA utvrđena u ovom istraživanju statistički značajno se razlikuje samo kod mješćinica. U jesen su zabilježene najveće koncentracije, dok su najmanje utvrđene u ljeto i proljeće (**Tablica 35**). Slična pojavnost utvrđena je u kamicama (**Tablica 34**). U dagnjama najveće koncentracije bile su utvrđene također u jesen, nešto manje tijekom zime, dok u proljeće i ljeto DA nije detektirana (**Tablica 32**). U kamenicama je najmanja pojavnost također zabilježena tijekom ljetnih mjeseci, dok u razdoblju od srpnja do listopada DA uopće

nije detektirana (**Tablica 33**). Rezultati ovog istraživanja razlikuju se od dosadašnjih istraživanja školjkaša prikupljenih iz sjevernog Jadrana, u kojima je zabilježena pojavnost DA u toplijem dijelu godine. Ljubešić i sur. (2011.) utvrdili su DA u dagnjama u razdoblju od travnja do listopada 2005. god., dok su Ujević i sur. (2010.) utvrdili pojavnost DA u dagnjama, kamenicama, jakovljevim kopicama i kopicama *Flexopecten proteus* u razdoblju od srpnja do studenog tijekom tri uzastopne godine. Isti autori navode pojavnost ovog fiktoksina u dagnjama iz središnjeg Jadrana u hladnijem dijelu godine, s najvećom koncentracijom utvrđenom u veljači 2006. god., kada su zabilježene najniže temperature mora u osmogodišnjem razdoblju, što ukazuje na to da se cvat *Pseudo-nitzschia* može dogoditi i u hladnijem dijelu godine. Također, utvrdili su ne samo sezonsku, već i različitu godišnju pojavnost ovih dijatomeja. U još jednom istraživanju školjkaša iz ovog dijela Jadrana, DA je detektirana u razdoblju od travnja do srpnja (Ujević i sur., 2019.).

Paralitički toksini pojavili su se u dagnjama u dva navrata, u proljeće i zimi, s time da su u travnju i siječnju zabilježene koncentracije veće ili vrlo blizu NDK (**Tablica 32**). Slično, pojavnost PST tijekom zimskih mjeseci i ranog proljeća u mješćenicama (*Microcosmus vulgaris*) iz sjevernog Jadrana zabilježili su autori Roje-Busatto i Ujević (2014.), s najvećim koncentracijama u veljači i travnju 2009. god. Također u tom periodu, u dagnjama iz sjevernog Jadrana detektirani su PST u visokim koncentracijama (Ujević i sur., 2012.), dok Taleb i sur. (2001.) navode sezonsku kontaminaciju pojedinih vrsta školjkaša PST na Mediteranu upravo u razdoblju od siječnja do travnja. Braga i sur., (2023.) su tijekom monitoringa fiktoksina u Portugalu, uočili iznenadnu, sporadičnu pojavu PST u školjkašima. Zabilježena su razdoblja kada uopće nisu bili detektirani, međutim, kada bi se pojavljivali, najveće koncentracije i učestalost zabilježene su u jesen i zimi.

Sezonska pojavnost većine LT ovog istraživanja u skladu je sa dinamikom pojavnosti fitoplanktona u Jadranu. U proljeće i početkom ljeta dolazi do njihove proliferacije uslijed povećanog sunčevog zračenja, termičke stratifikacije mora i dostupnosti hranjivih tvari, te u jesen kao posljedica dotoka većih količina slatke vode bogate hranjivim tvarima, najvećim dijelom iz rijeke Po u Italiji (Revelante i sur., 1992.; Bernardi Aubry i sur., 2004.; Bacchiocchi i sur., 2015.). Odstupanja pojavnosti pojedinih fiktoksina od ovog trenda Bacchiocchi i sur. (2020.) objašnjavaju ekofiziološkim razlikama fitoplanktona koji ih proizvode. Ujević i sur. (2010.) navode pojavnost dijatomeja *Pseudo-nitzschia* tijekom cijele godine u Jadranskom moru, s porastom biomase najčešće u rano proljeće i jesen. Ninčević Gladan i sur. (2020.) klasificirali su dvije karakteristične populacije *Pseudo-nitzschia* u sjevernom Jadranu, od čega jednu koja se javlja u toplijem i drugu koja se javlja u hladnijem dijelu godine. Moguće je da je toksičnost školjkaša zabilježena tijekom zimskih mjeseci posljedica pojačanog miješanja i resuspenzije organske tvari iz bentosa, koja predstavlja izvor hranjivih tvari za

fitoplankton u zimskom periodu (Roje-Busatto i sur., 2014.). Zbog složenosti biodinamike fitoplanktona dolazi do varijacije u njihovoj pojavnosti tijekom različitih vremenskih perioda, pa je tako zabilježena i različita toksičnost školjkaša u različitim godinama istraživanja (Karlson i sur., 2007.; Ninčević Gladan i sur., 2008.; Blanco i sur., 2019.; Zheng i sur., 2021.; Goya i sur. 2022.; Patrício i sur., 2022.).

Do proliferacije fitoplanktona može doći u bilo koje vrijeme i na bilo kojem lokalitetu ukoliko za to postoje uvjeti. Mehanizmi HAB su izuzetno složeni i pod utjecajem meteoroloških, fizikalnih, kemijskih i bioloških čimbenika. Uočene su dugoročne promjene u pojavnosti i intenzitetu HAB, pri čemu su najznačajniji utjecaj imale eutrofikacija i klimatske promjene (Zhang i sur., 2022.). Promjene u vodenim sustavima izazvane klimatskim promjenama, za posljedicu imaju intenziviranje cvjetanja algi, između ostalog i toksičnih vrsta, što negativno utječe na sigurnost hrane, zdravlje ljudi te na ekonomiju (Gobler i sur., 2020.; Dai i sur., 2023).

## **5.7. UTJECAJ LOKALITETA NA POJAVNOST FIKOTOKSINA**

Ispitivanje utjecaja lokaliteta na profil fikotoksina provedeno je usporedbom profila u dagnjama prikupljenim iz uzgajališta smještenih na različitim dijelovima istarskog poluotoka. Da se umanjuje utjecaj vrste na profil, odabrana je samo jedna vrsta koja se uzgaja na najviše različitih lokaliteta. Pojavnost fikotoksina u dagnjama sa različitih lokaliteta prikazana je u **Tablicama 19-29**. Rezultati ukazuju na različitu pojavnost kvantificiranih fikotoksina. OA, YTX i CI prisutni su u uzorcima dagnji prikupljenim sa svih lokaliteta, no među njima uočene su razlike u prosječnim koncentracijama (**Tablice 22, 26-29**), osim u slučaju YTX. Lokalitet koji se ističe najvećom raznolikošću detektiranih fikotoksina je L5, sa kojeg su uz lokalitet L4 prikupljeni uzorci dagnji u kojima su utvrđene najveće prosječne koncentracije GYM, PnTX-G, GTX1,4 i OA u ovom istraživanju. Oba lokaliteta nalaze se u istom zaljevu smještenom na jugu istarskog poluotoka. Za razliku od njih, lokalitet na kojem je učestalost pojavnosti fikotoksina u prikupljenim uzorcima bila manja, kao i prosječne koncentracije, je L8, smješten na sjevernom dijelu zapadne obale poluotoka (**Slika 13**).

Literaturni podaci govore da je dinamika fitoplanktona vrlo kompleksna, a produkcija fikotoksina u ovisnosti o nizu okolišnih i antropogenih čimbenika koji su jedinstveni na određenom geografskom položaju u vrijeme uzorkovanja (Peteva i sur., 2018.). Također, pozicija obitavališta morskih organizama utječe na njihove fiziološke procese poput reproduktivnog ciklusa, koji pak ima utjecaj na fiziološki status organizama, što uz razlike u metaboliziranju fikotoksina, okolišne uvjete i produkciju fikotoksina u fitoplanktonima, utječe

na njihovu pojavnost i kumulaciju (Li i sur., 2009.a; 2009.b; Raijman Nagar i sur., 2016.; Tong i sur., 2018.; He i sur., 2022.).

Lokalitet L8 iz ovog istraživanja, s utvrđenom najmanjom pojavnošću fiktoksina i njihovim najmanjim prosječnim koncentracijama, nalazi se u plitkom zaljevu najveće dubine 19 m i pod utjecajem je dotoka svježje vode iz rijeke Dragonje (Ninčević i sur., 2020.). Također, lokaliteti L4 i L5 nalaze se u plitkom zaljevu s najvećom dubinom otprilike 8 m i ograničenim dotokom svježje vode s kopna. Zbog plitkosti hidrografski parametri su nestabilni i uvelike ovise o vremenskim uvjetima (Skejić i sur., 2017.). Osim navedenog, u odnosu na ostala područja, u zaljevu u kojem se nalaze lokaliteti L4 i L5 izražen je antropogeni utjecaj, budući da se u njemu sidre manja plovila, a i gustoća naseljenosti je veća, naročito u ljetnoj sezoni kada poraste i do 469% (HGK, 2018). Budući tijekom ovog istraživanja nisu bilježeni hidrografski i meteorološki podaci na lokalitetima sa kojih su uzorci prikupljeni, ne može se procijeniti njihov utjecaj na različitu pojavnost fiktoksina među njima. Stoga, mogući razlog pojavnosti više različitih vrsta fiktoksina i kumulacije nekih od njih u koncentracijama većima u odnosu na ostala područja, predstavlja značajan antropogeni utjecaj.

## **5.8. PROCJENA IZLOŽENOSTI POTROŠAČA**

Prema podacima Hrvatske agencije za poljoprivredu i hranu (ranije Hrvatska agencija za hranu), u istraživanju prehrambenih navika koje se odnose na konzumaciju školjkaša tijekom 2011. i 2012. god. u RH, zabilježeno je 14 konzumacija od strane 13 konzumenata, s prosječnom veličinom porcije od 34,40 g, te najvećom porcijom od 87,27 g, što ukazuje na rijetku konzumaciju školjkaša u RH (0,65% od ukupnog broja ispitanika istraživanja) (**Tablica 5**). Budući izloženost fiktoksinima nastaje kao posljedica povremene konzumacije školjkaša i pojavnost fiktoksina u njima je sporadična, nije mogao biti utvrđen TDI (EFSA, 2008.a, 2008.b, 2009.a, 2009.b, 2009.c, 2009.d). S obzirom na dokazan akutni toksični učinak fiktoksina, za razliku od kroničnog o kojem nema dovoljno podataka, za procjenu izloženosti značajnija je jednokratna konzumacija velikih porcija. Školjkaši mogu kumulirati fiktoksine u velikim koncentracijama, te samo jedan obrok može uzrokovati bolest ili čak smrt. Budući da se dostupni toksikološki podaci odnose na akutnu toksičnost, izloženost potrošača u ovom istraživanju procijenjena je u odnosu na ARfD.

U **Tablicama 37-42** prikazana je izloženost potrošača koncentracijama fiktoksina utvrđenim u školjkašima tijekom 2018. i 2019. god. u slučaju konzumacije različitih veličina porcija - prosječne i najveće u RH, te velike od 400 g procijenjene od strane EFSA (2009.e).

Iz prikazanih rezultata razvidno je da se udio u ARfD i izloženost fiktoksinima u odnosu na prosječnu tjelesnu masu potrošača razlikuje među pojedinim skupinama fiktoksina.

Procijenjeni unos DA školjkašima izloženim tijekom ovog razdoblja značajno je manji od ARfD u slučaju konzumacije svih ispitanih veličina porcija (**Tablica 37**). Udio u ARfD kreće se od 0,002% do 13%, dok se izloženost kreće u rasponu od 0,001 do 3,96  $\mu\text{gkg}^{-1}$  t.m., što je otprilike osam puta manje od ARfD, te više od 200 puta manje od LOAEL (**Tablica 2**). Čak i u slučaju konzumacije školjkaša koji sadrže koncentraciju DA jednaku NDK (20  $\text{mgkg}^{-1}$ ), konzumacijom srednje i najveće porcije u RH, izloženost ne prelazi ARfD. Međutim, ukoliko se konzumira velika porcija od 400 g, izloženost potrošača prosječne tjelesne mase u RH biti će 97,93  $\mu\text{g}$  DA po kg t.m., što je 326% ARfD, ali otprilike devet puta manje od LOAEL (**Tablica 43**). Budući da je procijenjena izloženost manja od LOAEL, potrošači neće biti izloženi akutnom toksičnom djelovanju DA.

Iako je pojavnost PST (2%) rjeđa u odnosu na ostale kvantificirane fiktoksine u ovom istraživanju, utvrđena koncentracija u nekoliko uzoraka vrlo je blizu NDK, a u jednom uzorku je više nego dvostruko veća. U slučaju konzumacije prosječne porcije, 9% uzoraka u kojima su PST kvantificirani sadrži ove fiktoksine u koncentraciji koja bi rezultirala izloženošću većom od ARfD. Pri konzumaciji najveće porcije taj udio iznosi 27%, dok pri konzumaciji velike porcije od 400 g udio uzoraka koji premašuju ARfD iznosi 45% (**Tablica 38**). Međutim, zbog utvrđene NDK od 800  $\mu\text{g}$  STX diHCl ekv. $\text{kg}^{-1}$ , uzorak s najvećom utvrđenom koncentracijom od 1829,34  $\mu\text{g}$  STX diHCl ekv. $\text{kg}^{-1}$  ne bi dospio na tržište, no ipak bi konzumacija 18 i 36% uzoraka rezultirala izloženošću većom od ARfD u slučaju konzumacije najveće porcije u RH, te velike porcije od 400 g. U slučaju koncentracija PST u školjkašima jednakih NDK, konzumacijom najveće porcije u RH i velike porcije od 400 g izloženost je veća od ARfD, a prilikom konzumacije velike porcije, izloženost prelazi vrijednost LOAEL više nego dvostruko (**Tablica 43**). Također, ukoliko se izuzme uzorak u kojem je utvrđena koncentracija PST veća od NDK, konzumacija velike porcije od 400 g 18% uzoraka u kojima je tijekom ovog istraživanja utvrđena koncentracija >LOQ rezultirala bi izloženošću većom od LOAEL u, što bi u potrošača moglo izazvati akutni štetni učinak. Navedeno ukazuje da rizik od štetnog djelovanja akutne izloženosti PST u školjkašima u RH postoji.

U 10% uzoraka ovog istraživanja kvantificirana je OA. Od tog broja je u 7% utvrđena koncentracija veća od NDK koja iznosi 160  $\mu\text{g}$  OA ekv. $\text{kg}^{-1}$ . U slučaju najveće veličine porcije u RH, izloženost OA bila bi veća od ARfD konzumacijom dva od pet uzoraka u kojima je utvrđena koncentracija > NDK, dok bi u slučaju konzumacije iste porcije korigirane zbog koncentriranja LT, izloženost bila veća konzumacijom svih uzoraka s koncentracijom > NDK. U slučaju konzumacije velike porcije od 400 g konzumacija ukupno 25% uzoraka rezultirala bi izloženošću većom od ARfD, a ukoliko se primijeni korekcija iste porcije, taj udio iznosio bi 55% (**Tablica 39**). Međutim, ukoliko pretpostavimo da niti jedan uzorak s koncentracijom OA > NDK neće biti konzumiran od strane potrošača, do izloženosti veće od ARfD došlo bi pri



konzumaciji 17% uzoraka s veličinom porcije 400 g, odnosno 48% uzoraka u slučaju korekcije velike porcije. Također, do izloženosti veće od ARfD došlo bi u slučaju konzumacije velike porcije od 400 g ukoliko bi koncentracija okadaične skupine bila jednaka NDK, ali i do izloženosti veće od LOAEL konzumacijom korigirane, te izloženosti blizu LOAEL konzumacijom nekorigirane velike porcije (**Tablica 43**), te bi se tada mogli očekivati štetni akutni učinci ove skupine fiktoksina. Izloženost veća od LOAEL utvrđena je u slučaju konzumacije korigirane velike porcije uzoraka u kojima je u ovom istraživanju utvrđena koncentracija > NDK.

Pojavnost PTX u ovom istraživanju vrlo je mala, < 1%, kao i kumulacija u školjkašima. U slučaju konzumacije niti jedne od ispitivanih veličina porcija izloženost nije veća od ARfD (**Tablica 40**). Međutim, konzumacijom velike porcije od 400 g i koncentracije PTX jednake NDK, te uzimajući u obzir prosječnu tjelesnu masu potrošača u RH, izloženost bi u ovom slučaju bila veća od ARfD, no više od 200 puta manja od LOAEL za korigiranu veličinu porcije, te vrlo blizu ARfD konzumacijom nekorigirane velike porcije (**Tablica 43**).

U odnosu na PTX, u ovom istraživanju utvrđena je nešto veća pojavnost AZA (4%), no u koncentracijama značajno manjima od NDK, koja iznosi 160 µg AZA ekv.kg<sup>-1</sup>. Također ni za AZA nije utvrđena izloženost veća od ARfD uslijed konzumacije prosječne i najveće porcije u RH, kao ni velike porcije od 400 g (**Tablica 41**). Međutim, konzumacijom porcije od 400 g i korigirane najveće porcije u RH, u slučaju koncentracije AZA jednake NDK, izloženost bi bila veća od ARfD (**Tablica 43**), u slučaju najveće porcije neznatno, dok bi u slučaju konzumacije velike porcije bila oko četiri puta veća od ARfD za nekorigiranu te oko šest puta veća za korigiranu porciju, no još uvijek manja od LOAEL. Stoga se može zaključiti da potrošači neće biti izloženi štetnom akutnom djelovanju AZA i PTX.

Koncentracije YTX utvrđene u ovom istraživanju, u odnosu na NDK od 3,75 mg YTX ekv.kg<sup>-1</sup> vrlo su niske, iako im je pojavnost češća u odnosu na ostale regulirane LT. Konzumacijom školjkaša s koncentracijama YTX utvrđenim u ovom istraživanju, neovisno o veličini porcije, izloženost nije veća od ARfD (**Tablica 42**). Jedino bi konzumacijom korigirane velike porcije od 400 g školjkaša koji sadrže ovaj fiktoksin u koncentraciji jednakoj NDK, izloženost bila nešto veća od ARfD (**Tablica 43**), no još uvijek oko 300 puta manja od LOAEL, što ukazuje na nizak rizik od akutnog štetnog djelovanja YTX.

Izloženost potrošača fiktoksinima je funkcija količine konzumiranih školjkaša i koncentracija u kojima su u njima prisutni (Munday i Reeve, 2013.). S obzirom na prehrambene navike potrošača u RH, prosječnu tjelesnu masu, različite veličine konzumirane porcije i utvrđene koncentracije fiktoksina u školjkašima tijekom ovog istraživanja, može se smatrati da potrošači u RH nisu izloženi riziku od akutne toksičnosti većine fiktoksina obuhvaćenih

istraživanjem. Međutim, utvrđen je rizik od štetnog akutnog djelovanja OA kao i skupine PST koji su jedni od najopasnijih prirodnih toksina. Rezultati istraživanja također ukazuju da konzumacija velike porcije od 400 g u slučaju koncentracija OA i PST jednakih NDK, uzimajući u obzir prosječnu tjelesnu masu potrošača u RH, rezultira izloženošću većom od ARfD i LOAEL, što znači da utvrđene NDK ne štite potrošače koji konzumiraju velike porcije od mogućeg akutnog toksičnog učinka ovih fikotoksina.

Rezultati ovog istraživanja ukazuju na pojavnost više skupina fikotoksina u školjkašima i mješćenicama, od kojih su se neki kumulirali u koncentracijama koje mogu ugroziti zdravlje potrošača uslijed akutnog toksičnog učinka. Također, pojedini fikotoksini poput DA, OA, YTX i CI, iako u malim koncentracijama, prisutni su u školjkašima gotovo tijekom svih sezona. Za neke od njih se pretpostavlja mogući štetni učinak uslijed kronične izloženosti subletalnim dozama. Za skupinu CI nisu utvrđene NDK zbog nedostatka dokaza o akutnoj toksičnosti za ljude iako je toksičnost dokazana na pokusnim životinjama. To znači da će potrošači biti izloženi CI, bez obzira u kojoj koncentraciji su prisutni u školjkašima.

Sve navedeno ukazuje da postoji određen rizik za konzumente školjkaša, koji je potrebno okarakterizirati temeljem podataka o izloženosti, identifikacije i karakterizacije opasnosti. Zbog specifičnosti pojavnosti fikotoksina u školjkašima karakterizacija rizika koju predstavljaju je izuzetno složena. Svaka od skupina fikotoksina obuhvaća više analoga, za većinu od njih toksični učinak nije u potpunosti poznat, a s vremenom se otkrivaju i novi analozi zahvaljujući novim i osjetljivijim analitičkim metodama. Kao što je uočeno tijekom ovog istraživanja, često je u školjkašima istovremeno prisutno više toksina različitih skupina, što također može utjecati na njihovu toksičnost. Međutim, sinergistički učinci različitih fikotoksina, ujedno i fikotoksina s drugim toksičnim tvarima koje mogu biti unesene u ljudski organizam, također nisu istražene. Ujedno, pojedini fikotoksini prolaze složene procese biotransformacije tijekom metaboliziranja ili termičke obrade i mijenja im se toksičnost. Pojavnost fikotoksina mijenja se tijekom sezona poput pojavnosti okadaične skupine, ali i tijekom dužeg niza godina. Godine u kojima se pojedini fikotoksini češće pojavljuju izmjenjuju se s dužim razdobljima njihove odsutnosti. To se naročito odnosi na PST čija je pojavnost nepredvidiva i kod kojih je uočena dekadalna pojavnost, koju pojedini autori povezuju sa utjecajem jedanaestogodišnjeg solarnog ciklusa (Vale i sur., 2022.), što je također potrebno uzeti u razmatranje prilikom karakterizacije rizika.

Jedan od načina umanjivanja rizika kojeg fikotoksini predstavljaju je kontinuirani monitoring njihovih koncentracija u školjkašima na uzgojnim i izlovnim područjima, uz praćenje koncentracija toksičnog fitoplanktona u moru, te zabrana njihova izlova u slučaju prekoračenja NDK (Fernandes-Salvador i sur., 2021.). Unatoč tim mjerama u prvih petnaest godina 21. stoljeća zabilježeno je na tisuće slučajeva trovanja fikotoksinima diljem svijeta.

Najčešća su trovanja ciguatera toksinom i okadaičnom skupinom, dok su najsmrtonosniji tetradotoksin i PST. Na području Europe prevladava trovanje okadaičnom skupinom (Nicolas i sur., 2017.). Prema podacima EFSA-e tijekom 2018. i 2019. god. prijavljeno je 266, odnosno 214 slučajeva trovanja fikotoksinima, te je uočeno povećanje broja slučajeva u odnosu na prethodne godine (EFSA 2019; 2021). Smatra se da je broj slučajeva podcijenjen zbog sličnosti simptoma trovanja koje fikotoksini uzrokuju s bakterijskim i virusnim infekcijama i alergijama, te nedostatka svjesnosti liječnika o postojanju ovih sindroma (Nicolas i sur., 2017.; Carvalho i sur., 2019.), ali i nepoznavanja njihove potencijalne opasnosti i simptoma trovanja od strane potrošača (Milin i Jovanović, 2022.) Stoga su edukacija i podizanje svjesnosti o problemu koji fikotoksini predstavljaju neophodni među zdravstvenim djelatnicima, ali i među potrošačima školjkaša.

Problem predstavlja i rekreacijsko prikupljanje školjkaša iz područja koja nisu klasificirana za uzgoj ili izlov školjkaša u svrhu konzumacije, te svjesno i nesvjesno kršenje zabrana o izlovljavanju u slučaju povišenih koncentracija fikotoksina na nekom području (Turnbull i sur., 2013.). Iako provođenje monitoringa u brojnim zemljama umanjuje rizik od štetnog akutnog učinka fikotoksina, ne može ga u potpunosti ukloniti. Čak i na područjima s uspostavljenim kontinuiranim monitoringom može doći neopaženo do kumulacije fikotoksina u školjkašima u koncentracijama većima od NDK. Razlog je što se ispitivanje koncentracija fikotoksina u školjkašima provodi najčešće jednom tjedno, no ponekad dolazi do rapidne kumulacije fikotoksina (Fernández i sur., 2019.; Vale, 2020.) u vremenu kraćem od razdoblja između dva uzorkovanja, te školjkaši s povišenim koncentracijama ovih toksina time ipak mogu doći do potrošača.

Prema podacima Hrvatske agencije za poljoprivredu i hranu (2011-2012) konzumacija školjkaša u RH je mala i od svih eksploatiranih vrsta uključuje samo dagnje. Međutim, istraživanje je provedeno na malom broju ispitanika, njih 2002, što čini samo 0,05% ispitanika u odnosu na ukupni broj stanovnika RH prema popisu stanovništva iz 2011 god. (DZS, 2013.), što bi značilo da je samo 0,65% stanovnika konzumiralo školjkaše tijekom dvije godine istraživanja prehrambenih navika. Moguće je da je udio potrošača školjkaša veći i da nije homogeno raspoređen među županijama. Za pretpostaviti je da će u priobalnim područjima gdje su školjkaši dostupniji i gdje se stanovništvo bavi eksploatacijom plodova mora i turizmom, i njihova konzumacija biti učestalija. Stoga će u tim područjima potrošači u većoj mjeri biti izloženi riziku od toksičnog učinka fikotoksina.

## **6. ZAKLJUČCI**

Na osnovi rezultata istraživanja provedenih u ovom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Validirane su LC-MS/MS metode za određivanje DA i LT te LC/FLD metoda za određivanje PST u dagnjama, kamenicama, kopicama i mješćinicama. Rezultati validacijskih studija ukazuju na prikladnost metoda za namjenu, s obzirom da vrijednosti validacijskih parametara zadovoljavaju postavljene kriterije prihvatljivosti utvrđene zakonodavstvom
2. Validacijom LC-MS/MS metode za određivanje DA dobivene su niže vrijednosti LOD i LOQ od trenutno referentne LC-UV metode, što pruža mogućnost primjene ove metode u daljnjim istraživanjima s ciljem čim učinkovitije detekcije i kvantifikacije koncentracija DA u tragovima.
3. Validacija LC-MS/MS metode za određivanje LT uključivala je CI koji nisu obuhvaćeni SOP-om Europskog referentnog laboratorija za morske biotoksine i njihovom interlaboratorijskom validacijskom studijom (EURLMB, 2015.) te je utvrđena prikladnost metode za detekciju i kvantifikaciju cikličkih imina SPX1, GYM i PnTX-G.
4. Validacijom LC-MS/MS metoda za određivanje DA i LT utvrđen je značajan utjecaj svih matriksa na ionizaciju analita u odnosu na otapalo. Za kvantifikaciju DA u dagnjama, kamenicama i kopicama moguće je koristiti kalibracijski pravac pripremljen dodavanjem standardnih otopina u ekstrakt slijepog matriksa jedne od ovih vrsta školjkaša, dok je za mješćinice potrebno koristiti isključivo njihov ekstrakt. Za kvantifikaciju LT u školjkašima iz ovog istraživanja moguće je koristiti kalibracijski pravac pripremljen dodavanjem standardnih otopina u ekstrakt slijepog matriksa dagnji. Za kvantifikaciju LT u mješćinicama potrebno je koristiti kalibraciju u matriksu ove vrste.
5. U svim istraživanim vrstama školjkaša i mješćinicama utvrđena je prisutnost fiktoksina. Utvrđeni su hidrofilni toksini DA i PST (GTX2,3 i GTX1,4), te lipofilni OA, PTX2, AZA1 i 2, YTX, SPX1, GYM i PnTX-G. Pojavnost u najvećem broju uzoraka imali su SPX1 i GYM, zatim padajućim redoslijedom YTX, DA, OA, PnTX-G, AZA2, GTX2,3, GTX1,4, AZA1 i PTX2.
6. Rezultati ukazuju da se utvrđen profil fiktoksina školjkaša hrvatskog dijela sjevernog Jadrana razlikuje od većine ranije objavljenih istraživanja, prema kojima su YTX i OA najčešći fiktoksini u školjkašima Jadrana. Profil fiktoksina kompleksniji je od očekivanog. Navedeni fiktoksini prisutni su u školjkašima i mješćinicama u koncentracijama znatno nižim od legislativom propisanih NDK, osim OA i PST koji su kvantificirani u koncentracijama većim od NDK u približno 1% uzoraka.

7. Skoro polovina uzoraka u kojima su fiktoksini kvantificirani sadrži kombinaciju dva ili više toksina. S obzirom na malobrojna istraživanja o njihovom međudjelovanju odnosno sinergističkim učincima, podaci o kombinacijama fiktoksina u različitim vrstama mogu poslužiti u planiranju budućih istraživanja ove vrste.
8. Usporedbom profila fiktoksina među različitim vrstama koje potječu s istog lokaliteta, uočene su razlike u pojavnosti i kumulaciji. U odnosu na kamenice, dagnje kumuliraju više različitih fiktoksina i prikladna su vrsta za praćenje pojavnosti PST. Kapice su prikladna vrsta za praćenje YTX i DA. Kumulacija GYM veća je u kamenicama u odnosu na kapice i dagnje, dok je kumulacija PnTX-G značajno veća u dagnjama. U mješćanicama je utvrđena gotovo isključivo DA. Temeljem pojavnosti fiktoksina u jednoj vrsti ne može se procijeniti pojavnost u ostalim vrstama koje se uzgajaju na istom području.
9. Utvrđena je sezonska pojavnost fiktoksina, kao i utjecaj lokaliteta na njihovu pojavnost. Češća pojavnost i veće koncentracije LT zabilježene su uglavnom tijekom toplijeg dijela godine, uz određene razlike među vrstama, dok je u istom razdoblju utvrđena najmanja pojavnost DA. PST utvrđeni su u nekoliko navrata u proljeće i zimi, s time da su travnju i siječnju zabilježene koncentracije veće ili vrlo blizu NDK. U istraživanjima pojavnosti fiktoksina potrebno je sagledati i mogući utjecaj sve izraženijih klimatskih promjena na sezonsku pojavnost ovih tvari.
10. Najveće prosječne koncentracije fiktoksina utvrđene su u školjkašima prikupljenim iz uzgajališta na južnom dijelu, dok su najmanje koncentracije utvrđene u školjkašima iz sjeverozapadnog dijela istarskog poluotoka, čime je utvrđen i utjecaj lokaliteta na njihovu pojavnost.
11. S obzirom na prehrambene navike potrošača u RH i utvrđene koncentracije fiktoksina u školjkašima tijekom ovog istraživanja, potrošači nisu izloženi akutnom toksičnom učinku većine fiktoksina obuhvaćenih istraživanjem. Međutim, utvrđena je izloženost štetnom akutnom djelovanju OA i PST. Budući za skupinu CI nisu utvrđene NDK, a SPX1 i GYM su najčešće detektirani u ispitanim uzorcima, potrošači su izloženi svim prisutnim količinama ovih fiktoksina u školjkašima. S obzirom da njihova toksičnost nije dovoljno istražena, fiktoksini općenito predstavljaju potencijalnu prijetnju za potrošače.

## **7. LITERATURA**

- Aasen J, MacKinnon SL, LeBlanc P, Walter JA, Hovgaard P, Aune T, Quilliam MA: Detection and identification of spirolides in Norwegian shellfish and plankton. *Chemical research in toxicology* 18(3):509-515, 2005.
- Aasen JA, Hardstaff W, Aune T, Quilliam MA: Discovery of fatty acid ester metabolites of spirolide toxins in mussels from Norway using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 20(10):1531-1537, 2006.
- Aasen JA, Espenes A, Miles CO, Samdal IA, Hess P, Aune T: Combined oral toxicity of azaspiracid-1 and yessotoxin in female NMRI mice. *Toxicol* 57(6):909-917. 2011.
- Abal P, Louzao MC, Suzuki T, Watanabe R, Vilariño N, Carrera C, Botana AM, Vieytes MR, Botana LM: Toxic action reevaluation of okadaic acid, dinophysistoxin-1 and dinophysistoxin-2: Toxicity equivalency factors based on the oral toxicity study. *Cellular Physiology and Biochemistry* 49(2):743-757, 2018.
- Alarcan J, Biré R, Le Hégarat L, Fessard V: Mixtures of Lipophilic Phycotoxins: Exposure Data and Toxicological Assessment. *Marine Drugs* 16(2):46, 2018.
- Alarcan J, Barbé S, Kopp B, Hessel-Pras S, Braeuning A, Lampen A, Le Hégarat L, Fessard V: Combined effects of okadaic acid and pectenotoxin-2, 13-desmethylspirolide C or yessotoxin in human intestinal Caco-2 cells. *Chemosphere* 228:139-148, 2019.
- Alcántara-Rubira A, Bárcena-Martínez V, Reyes-Paulino M, Medina-Acaro K, Valiente-Terrones L, Rodríguez-Velásquez A, Estrada-Jiménez R, Flores-Salmón O: First report of okadaic acid and pectenotoxins in individual cells of *dinophysis* and in scallops *Argopecten purpuratus* from Peru. *Toxins* 10(12):490, 2018.
- Alfonso A, Vieytes MR, Ofuji K, Satake M, Nicolaou KC, Frederick MO, Botana LM: Azaspiracids modulate intracellular pH levels in human lymphocytes. *Biochemical and biophysical research communications* 346(3):1091-1099, 2006.
- Allingham JS, Miles CO, Rayment I: A structural basis for regulation of actin polymerization by pectenotoxins. *Journal of molecular biology* 371(4):959-970, 2007.
- Álvarez G, Uribe E, Avalos P, Mariño C, Blanco J: First identification of azaspiracid and spirolides in *Mesodesma donacium* and *Mulinia edulis* from Northern Chile. *Toxicol* 55(2-3):638-641, 2010.
- Álvarez G, Uribe E, Regueiro J, Martín H, Gajardo T, Jara L, Blanco J: Depuration and anatomical distribution of domoic acid in the surf clam *Mesodesma donacium*. *Toxicol* 102:1-7, 2015.
- Álvarez G, Rengel J, Araya M, Álvarez F, Pino R, Uribe E, Díaz PA, Rossignoli AE, López-Rivera A, Blanco J: Rapid domoic acid depuration in the scallop *Argopecten purpuratus* and its transfer from the digestive gland to other organs. *Toxins* 12(11):698, 2020.
- Alves RN, Rambla-Alegre M, Braga AC, Maulvault AL, Barbosa V, Campàs M, Reverté L, Flores C, Caixach J, Kilcoyne J, Costa PR, Diogène J, Marques A: Bioaccessibility of lipophilic and hydrophilic marine biotoxins in seafood: An in vitro digestion approach. *Food and Chemical Toxicology* 129:153-161, 2019.
- Alves FADS, de Sousa EB, Martins MP, da Silva Rocha CC, Faustino SMM, Mendes RA, de



- Oliveira Lima M, Schneider MPC: Evaluation of Paralytic Shellfish Toxins in Marine Oyster Farming and Microalgae in the Atlantic Amazon Evidences Safety but Highlights Potential Risks of Shellfish Poisoning. *Toxins* 14(10):654, 2022.
- Amzil Z, Fresnel J, Le Gal D, Billard C: Domoic acid accumulation in French shellfish in relation to toxic species of *Pseudo-nitzschia multiseriata* and *P. pseudodelicatissima*. *Toxicon* 39(8):1245-1251, 2001.
- Amzil Z, Sibat M, Royer F, Masson N, Abadie E: Report on the first detection of pectenotoxin-2, spirolide-A and their derivatives in French shellfish. *Marine drugs* 5(4):168-179, 2007.
- Amzil Z, Derrien A, Terre Terrillon A, Duval A, Connes C, Marco-Miralles F, Nézan E, Mertens KN: Monitoring the Emergence of Algal Toxins in Shellfish: First Report on Detection of Brevetoxins in French Mediterranean Mussels. *Marine Drugs* 19(7):393, 2021.
- Anderson DM, Kulis DM, Doucette GJ, Gallagher JC, Balech E: Biogeography of toxic dinoflagellates in the genus *Alexandrium* from the northeastern United States and Canada. *Marine Biology* 120:467-478, 1994.
- Anderson DM, Glibert PM, Burkholder JM: Harmful algal blooms and eutrophication: nutrient sources, composition, and consequences. *Estuaries* 25:704-726, 2002.
- Anderson DM, Burkholder JM, Cochlan WP, Glibert PM, Gobler CJ, Heil CA, Kudela RM, Parsons ML, Rensel JEJ, Townsend DW, Trainer VL, Vargo GA: Harmful algal blooms and eutrophication: examining linkages from selected coastal regions of the United States. *Harmful Algae* 8: 39-53, 2008.
- Anderson DM, Fensin E, Gobler CJ, Hoeglund AE, Hubbard KA, Kulis DM, Landsberg JH, Lefebvre KA, Provoost P, Richlen ML, Smith JL, Solow AR, Trainer VL: Marine harmful algal blooms (HABs) in the United States: History, current status and future trends. *Harmful Algae* 102:101975, 2021.
- Andres JK, Yñiguez AT, Maister JM, Turner AD, Olano DE, Mendoza J, Salvador-Reyes L, Azanza RV: Paralytic shellfish toxin uptake, assimilation, depuration, and transformation in the Southeast Asian green-lipped mussel (*Perna viridis*). *Toxins* 11(8):468, 2019.
- Anfossi L, Baggiani C, Giovannoli C, D'Arco G, Giraudi G: Lateral-flow immunoassays for mycotoxins and phycotoxins: a review. *Analytical and bioanalytical chemistry* 405:467-480, 2013.
- Arapov J: A review of shellfish phycotoxin profile and toxic phytoplankton species along Croatian coast of the Adriatic Sea. *Acta Adriatica* 54(2):283-298, 2013.
- Arapov J, Ujević I, Gladan ŽN, Skejić S, Ceredi A, Milandri A, Pigozzi S, Riccardi E, Vilar-González A, Rodríguez-Velasco ML, Nazlić N: Shellfish lipophilic toxin profile and toxic phytoplankton species along eastern Adriatic coast. *Fresenius Environmental Bulletin* 24(12c):4799-4806, 2015.
- Arapov J, Ujević I, Pfannkuchen DM, Godrijan J, Bakrač A, Gladan ŽN, Marasović I: Domoic acid in phytoplankton net samples and shellfish from the Krka River estuary in the Central Adriatic Sea. *Mediterranean Marine Science* 17(2):340-350, 2016.

- Arapov J, Skejić S, Bužančić M, Bakrač A, Vidjak O, Bojanić N, Ujević I, Gladan ŽN: Taxonomical diversity of *Pseudo-nitzschia* from the Central Adriatic Sea. *Phycological Research* 65(4):280-290, 2017.
- Ares IR, Louzao MC, Vieytes MR, Yasumoto T, Botana LM: Actin cytoskeleton of rabbit intestinal cells is a target for potent marine phycotoxins. *Journal of experimental biology* 208(22):4345-4354, 2005.
- Ares I, Louzao C, Espiña B, Vieytes M, Miles C, Yasumoto T, Botana L: Lactone ring of pectenotoxins: a key factor for their activity on cytoskeletal dynamics. *Cellular Physiology and Biochemistry* 19(5-6):283-292, 2007.
- Armsworthy SL, MacDonald BA, Ward JE: Feeding activity, absorption efficiency and suspension feeding processes in the ascidian, *Halocynthia pyriformis* (*Stolidobranchia: Ascidiacea*): responses to variations in diet quantity and quality. *Journal of experimental marine biology and ecology* 260(1):41-69, 2001.
- Association of Official Analytical Chemists International: Paralytic Shellfish Poisoning Toxins in Shellfish, Prechromatographic Oxidation and Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. AOAC Official Method 2005.06. *Journal of AOAC International* 88: 1714-1732, 2005.
- Astuya A, Carrera C, Ulloa V, Aballay A, Núñez-Acuña G, Hégaret H, Gallardo-Escárate C: Saxitoxin modulates immunological parameters and gene transcription in *Mytilus chilensis* hemocytes. *International journal of molecular sciences* 16(7):15235-15250, 2015.
- Aune T, Sørby R, Yasumoto T, Ramstad H, Landsverk T: Comparison of oral and intraperitoneal toxicity of yessotoxin towards mice. *Toxicon* 40, 77-82, 2002.
- Aune T, Espenes A, Aasen JA, Quilliam MA, Hess P, Larsen S: Study of possible combined toxic effects of azaspiracid-1 and okadaic acid in mice via the oral route. *Toxicon* 60(5):895-906, 2012.
- Bacchiocchi S, Siracusa M, Ruzzi A, Gorbi S, Ercolessi M, Cosentino MA, Ammazalorso P, Orletti R: Two-year study of lipophilic marine toxin profile in mussels of the North-central Adriatic Sea: First report of azaspiracids in Mediterranean seafood. *Toxicon* 108:115-125. 2015.
- Barillé L, Cognie B: Revival capacity of diatoms in bivalve pseudofaeces and faeces. *Diatom Research* 15(1):11-17, 2000.
- Bates S, Bird CJ, de Freitas ASW, Foxall R, Gilgan M, Hanic LA, Johnson GR, McCulloch AW, Odense P, Pocklington R, Quilliam MA, Sim PG, Smith JC, Subba Rao DV, Todd ECD, Walter JA, Wright JLC: Pennate Diatom *Nitzschia pungens* as the Primary Source of Domoic Acid, a Toxin in Shellfish from Eastern Prince Edward Island, Canada. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 46:1203-1215, 1989.
- Bates SS: Ecophysiology and metabolism of ASP toxin production. In *Physiological ecology of harmful algal blooms*. Springer-Verlag, Heidelberg, 405-426, 1998.
- Bates SS, Hubbard KA, Lundholm N, Montresor M, Leaw CP: *Pseudo-nitzschia*, *Nitzschia*, and domoic acid: New research since 2011. *Harmful Algae* 79:3-43, 2018.
- Bazzoni AM, Mudadu AG, Lorenzoni G, Arras I, Lugliè A, Vivaldi B, Cicotelli V, Sanna G,

- 
- Tedde G, Ledda S, Alesso E, Marongiu E, Virgilio S: Occurrence of Harmful Algal Species and Shellfish Toxicity in Sardinia (Italy). *Italian Journal of Food Safety* 5(4):6095, 2016.
- Beach DG, Liu H, Quilliam MA: Sensitive determination of domoic acid in mussel tissue using dansyl chloride derivatization and liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical methods* 7(3):1000-1007, 2015.
- Ben-Gigirey B, Rossignoli AE, Riobó P, Rodríguez F: First Report of Paralytic Shellfish Toxins in Marine Invertebrates and Fish in Spain. *Toxins* 12(11):723, 2020.
- Ben Haddouch A, Amanhi R, Amzil Z, Taleb H, Rovillon GA, Adly F, Loutfi M: Lipophilic toxin profile in *Mytilus galloprovincialis* from the North Atlantic coast of Morocco: LC-MS/MS and mouse bioassay analyses. *International Journal of Science and Research* 6(2), 2017.
- Benjamin A, Suarez-Isla: Saxitoxin and Other Paralytic Toxins: Toxicological Profile. In *Marine and Freshwater Toxins, Toxinology*. Springer, Dordrecht, 23-41, 2016.
- Bernardi Aubry F, Berton A, Bastianini M, Socal G, Acri F: Phytoplankton succession in a coastal area of the NW Adriatic, over a 10-year sampling period (1990–1999). *Continental shelf research* 24(1):97-115, 2004.
- Biré R, Krys S, Frémy JM, Dragacci S, Stirling D, Kharrat R: First evidence on occurrence of gymnodimine in clams from Tunisia. *Journal of Natural Toxins*, 11(4):269–275, 2002.
- Blanco J, Arévalo F, Salgado C, Moroño Á: Depuration of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) contaminated with domoic acid. *Aquatic Living Resources* 15(1):53-60, 2002.a.
- Blanco J, Acosta CP, De La Puente MB, Salgado C: Depuration and anatomical distribution of the amnesic shellfish poisoning (ASP) toxin domoic acid in the king scallop *Pecten maximus*. *Aquatic Toxicology* 60(1-2):111-121, 2002.b.
- Blanco J, Acosta CP, Mariño C, Muñiz S, Martín H, Moroño Á, Correa J, Arévalo F, Salgado C: Depuration of domoic acid from different body compartments of the king scallop *Pecten maximus* grown in raft culture and natural bed. *Aquatic Living Resources* 19(3):257-265, 2006.
- Blanco J, Livramento F, Rangel IM: Amnesic shellfish poisoning (ASP) toxins in plankton and molluscs from Luanda Bay, Angola. *Toxicon* 55(2-3):541-546, 2010.
- Blanco J, Arévalo F, Moroño Á, Correa J, Muñiz S, Mariño C, Martín H: Presence of azaspiracids in bivalve molluscs from Northern Spain. *Toxicon* 137:135-143, 2017.
- Blanco J: Accumulation of *Dinophysis* toxins in bivalve molluscs. *Toxins* 10(11):453, 2018.
- Blanco J, Arévalo F, Correa J, Moroño Á: Lipophilic toxins in Galicia (NW Spain) between 2014 and 2017: Incidence on the main molluscan species and analysis of the monitoring efficiency. *Toxins* 11(10):612, 2019.
- Blanco J, Mauríz A, Álvarez G: Distribution of Domoic Acid in the Digestive Gland of the King Scallop *Pecten maximus*. *Toxins* 12(6):371, 2020.
- Blanco J, Mariño C, Martín H, Álvarez G, Rossignoli AE: Characterization of the Domoic Acid Uptake Mechanism of the Mussel (*Mytilus galloprovincialis*) Digestive Gland. *Toxins*
-

- 13(7):458, 2021.a.
- Blanco J, Morono Á, Arévalo F, Correa J, Salgado C, Rossignoli AE, Lamas JP: Twenty-Five Years of Domoic Acid Monitoring in Galicia (NW Spain): Spatial, Temporal and Interspecific Variations. *Toxins* 13(11):756, 2021.b.
- Bogdanović T, Di Giacinto F, Berti M, Visciano P, Petričević S, Rogošić M, Rogić Z, Mascilongo G, Di Renzo L, Ferri N, Schirone M: Surveillance Plan of Lipophilic Marine Biotoxins in Molluscs from the Croatian Coast. *Exposure and Health* 14(1):129-138, 2022.
- Bognár A: *Tables on weight yield of food and retention factors of food constituents for the calculation of nutrient composition of cooked foods (dishes)*. Bundesforschungsanstalt für Ernährung, Karlsruhe, 2002.
- Botana LM, Vilarino N, Alfonso A, Vale C, Louzao C, Elliott CT, Botana AM: The problem of toxicity equivalent factors in developing alternative methods to animal bioassays for marine-toxin detection. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 29(11):1316-1325, 2010.
- Botana LM: Guide to Phycotoxin Monitoring of Bivalve Mollusk-Harvesting Areas. In *Seafood and Freshwater Toxins, pharmacology, physiology, and detection*. CRC Press, Boca Raton, 39-56, 2014.
- Botana LM, Alfonso A, Vale C, Vilariño N, Rubiolo J, Alonso E, Cagide E: The mechanistic complexities of phycotoxins: Toxicology of azaspiracids and yessotoxins. In *Advances in molecular toxicology*, Volume 8, Elsevier, Amsterdam, 1-33, 2014.
- Bouchouicha-Smida D, Lundholm N, Sahraoui I, Lambert C, Mabrouk HH, Hlaili AS: Detection of domoic acid in *Mytilus galloprovincialis* and *Ostrea edulis* linked to the presence of *Nitzschia bizertensis* in Bizerte Lagoon (SW Mediterranean). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 165:270-278, 2015.
- Bouillon RC, Kieber RJ, Skrabal SA, Wright JLC: Photochemistry and identification of photodegradation products of the marine toxin domoic acid. *Marine Chemistry* 110:18-27, 2008.
- Boundy MJ, Harwood DT, Kiermeier A, McLeod C, Nicolas J, Finch S: Risk assessment of pectenotoxins in New Zealand bivalve molluscan shellfish, 2009–2019. *Toxins* 12(12):776, 2020.
- Bourne Y, Radić Z, Aráoz R, Talley TT, Benoit E, Servent D, Taylor P, Molgó J, Marchot P: Structural determinants in phycotoxins and AChBP conferring high affinity binding and nicotinic AChR antagonism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(13):6076-6081, 2010.
- Braga AC, Alves RN, Maulvault AL, Barbosa V, Marques A, Costa PR: In vitro bioaccessibility of the marine biotoxin okadaic acid in shellfish. *Food and Chemical Toxicology* 89:54-59, 2016.
- Braga AC, Rodrigues SM, Lourenço HM, Costa PR, Pedro S: Bivalve Shellfish Safety in Portugal: Variability of Faecal Levels, Metal Contaminants and Marine Biotoxins during the Last Decade (2011-2020). *Toxins* 15(2):91, 2023.
- Bricelj VM, Lee JH, Cembella AD, Anderson DM: Uptake kinetics of paralytic shellfish toxins from the dinoflagellate *Alexandrium fundyense* in the mussel *Mytilus edulis*. *Marine*

- 
- Ecology Progress Series* 63:177-188, 1990.
- Bricelj VM, Lee JH, Cembella AD: Influence of dinoflagellate cell toxicity on uptake and loss of paralytic shellfish toxins in the northern quahog *Mercenaria mercenaria*. *Marine Ecology Progress Series* 74(1):33-46, 1991.
- Bricelj VM, Shumway SE: Paralytic shellfish toxins in bivalve molluscs: occurrence, transfer kinetics, and biotransformation. *Reviews in Fisheries Science* 6(4):315-383, 1998.
- Bricelj VM, Connell L, Konoki K, MacQuarrie SP, Scheuer T, Catterall WA, Trainer VL: Sodium channel mutation leading to saxitoxin resistance in clams increases risk of PSP. *Nature* 434(7034):763-767, 2005.
- Bricelj VM, Cembella AD, Laby D: Temperature effects on kinetics of paralytic shellfish toxin elimination in Atlantic surfclams, *Spisula solidissima*. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 103:308-317, 2014.
- Brown AR, Lilley M, Shutler J, Lowe C, Artioli Y, Torres R, Berdalet E, Tyler CR: Assessing risks and mitigating impacts of harmful algal blooms on mariculture and marine fisheries. *Reviews in Aquaculture* 12(3):1663-1688, 2020.
- Burgess VA: Toxicology Investigations With The Pectenotoxin-2 Seco Acids. *Thesis (PhD Doctorate)*. Griffith University, Queensland, 2003.
- Callejas L, Darce AC, Amador JJ, Conklin L, Gaffga N, Schurz Rogers H, DeGrasse S, Hall S, Earley M, Mei J, Rubin C, Aldighieri S, Backer LC, Azziz-Baumgartner E: Paralytic shellfish poisonings resulting from an algal bloom in Nicaragua. *BioMed Central Research Notes* 8:74, 2015.
- Cameron NG: Diatoms. In *Encyclopedia of Quaternary Science*. Elsevier, Amsterdam, 522-525, 2013.
- Campos A, Freitas M, de Almeida AM, Martins JC, Domínguez-Pérez D, Osório H, Vasconcelos V, Reis Costa P: OMICs approaches in diarrhetic shellfish toxins research. *Toxins* 12(8):493, 2020.
- Caruana AMN, Amzil Z: Microalgae and Toxins. In *Microalgae in Health and Disease Prevention*. Academic Press, London, 263-305, 2018.
- Carvalho PS, Catia R, Moukha S, Matias WG, Creppy EE: Comparative study of Domoic Acid and Okadaic Acid induced-chromosomal abnormalities in the Caco-2 cell line. *International journal of environmental research and public health* 3(1):4-10, 2006.
- Castrec J, Hégaret H, Huber M, Le Grand J, Huvet A, Tallec K, Boulais M, Soudant P, Fabioux C: The toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* impairs the performance of oyster embryos and larvae. *Harmful Algae* 92:101744, 2020.
- Cembella AD, Shumway SE, Larocque R: Sequestering and putative biotransformation of paralytic shellfish toxins by the sea scallop *Placopecten magellanicus*: seasonal and spatial scales in natural populations. *Journal of experimental marine biology and ecology* 180(1):1-22, 1994.
- Cembella AD, Quilliam MA, Lewis NI, Bauder AG, Dell'Aversano C, Thomasa K, Jellett J, Cusack RR: The toxigenic marine dinoflagellate *Alexandrium tamarense* as the probable cause of mortality of caged salmon in Nova Scotia. *Harmful Algae* 1:313–
-

---

325, 2002.

- Cembella A, Krock B: Cyclic Imine Toxins: Chemistry, Biogeography, Biosynthesis, and Pharmacology. In *Seafood and Freshwater Toxins, Pharmacology, Physiology and Detection*. CRC Press, Boca Raton, 561-594, 2008.
- Centers for Disease Control and Prevention: *Paralytic shellfish poisoning — southeast Alaska, May–June 2011. Morbidity and mortality weekly report* 60(45), CDC, Atlanta, 2011.
- Centre for Environment, Fisheries & Aquaculture Science Cefas: *In-house validation of an LC-MS/MS method for the determination of lipophilic toxins in shellfish species typically tested in the United Kingdom*. Cefas, Lowestoft, 2011.
- Chae HD, Choi TS, Kim BM, Jung JH, Bang YJ, Shin DY: Oocyte-based screening of cytokinesis inhibitors and identification of pectenotoxin-2 that induces Bim/Bax-mediated apoptosis in p53-deficient tumors. *Oncogene* 24(30):4813-4819, 2005.
- Chen X, Huang B, Zhao Q, Wang Z, Liu W, Zhang J, Zhou Y, Sun Q, Huang H, Huang X, Jiang T, Liu J: Shellfish contamination with lipophilic toxins and dietary exposure assessments from consumption of shellfish products in Shenzhen, China. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 221:112446, 2021.
- Ching PK, Ramos RA, de los Reyes VC, Sualdito MN, Tayag E: Lethal paralytic shellfish poisoning from consumption of green mussel broth, Western Samar, Philippines, August 2013. *Western Pacific Surveillance and Response Journal* 6(2):22-26, 2015.
- Cho Y, Ogawa N, Takahashi M, Lin HP, Oshima Y: Purification and characterization of paralytic shellfish toxin-transforming enzyme, sulfocarbamoylase I, from the Japanese bivalve *Peronidia venulosa*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* 1784(9):1277-1285, 2008.
- Choi MC, Hsieh DPH, Lam PK, Wang WX: Field depuration and biotransformation of paralytic shellfish toxins in scallop *Chlamys nobilis* and green-lipped mussel *Perna viridis*. *Marine Biology* 143:927-934, 2003.
- Choi MC, Peter KN, Hsieh DP, Lam PK: Trophic transfer of paralytic shellfish toxins from clams (*Ruditapes philippinarum*) to gastropods (*Nassarius festivus*). *Chemosphere* 64(10):1642-1649, 2006.
- Choudhary G, Shang L, Li X, Dudley SC: Energetic localization of saxitoxin in its channel binding site. *Biophysical Journal* 83(2):912-919, 2002.
- Ciminiello P, Fattorusso E, Magno S, Oshima Y, Poletti R, Viviani R, Yasumoto T: Determination of PSP toxins in mussels from the Adriatic Sea. *Marine pollution bulletin* 30(11):733-735, 1995.
- Ciminiello P, Fattorusso E, Forino M, Magno S, Poletti R, Satake M, Viviani R, Yasumoto T: Yessotoxin in mussels of the northern Adriatic Sea. *Toxicon* 35(2):177-183, 1997.
- Ciminiello P, Dell'Aversano C, Fattorusso E, Forino M, Magno GS, Tartaglione L, Quilliam MA, Tubaro A, Poletti R: Hydrophilic interaction liquid chromatography/mass spectrometry for determination of domoic acid in Adriatic shellfish. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 19(14):2030-2038, 2005.

- Ciminiello P, Dell'aversano C, Fattorusso E, Forino M, Grauso L, Magno SG, Poletti R, Tartaglione L: Desulfoyoessotoxins from Adriatic mussels: a new problem for seafood safety control. *Chemical Research in Toxicology* 20(1):95-98, 2007.
- Ciminiello P, Fattorusso E: Chemistry, Metabolism, and Chemical Analysis. In *Seafood and Freshwater Toxins, Pharmacology, Physiology and Detection*. CRC Press, Boca Raton, 287-314, 2008.
- Ciminiello P, Dell'Aversano C, Fattorusso E, Forino M: Recent developments in Mediterranean harmful algal events. In *Advances in molecular toxicology*, volumen 3, Elsevier, Amsterdam, 1-41, 2009.
- Ciminiello P, Dell'Aversano C, Fattorusso E, Forino M, Tartaglione L, Boschetti L, Rubini S, Cangini M, Pigozzi S, Poletti R: Complex toxin profile of *Mytilus galloprovincialis* from the Adriatic sea revealed by LC-MS. *Toxicon* 55(2-3):280-288, 2010.a.
- Ciminiello P, Dell'Aversano C, Iacovo ED, Fattorusso E, Forino M, Grauso L, Tartaglione L, Guerrini F, Pezzolesi L, Pistocchi R: Characterization of 27-hydroxy-13-desmethyl spirolide C and 27-oxo-13, 19-didesmethyl spirolide C. Further insights into the complex Adriatic *Alexandrium ostenfeldii* toxin profile. *Toxicon* 56(8):1327-1333, 2010.b.
- Ciminiello P, Dell'Aversano C, Forino M, Tartaglione L: Marine toxins in Italy: the more you look, the more you find. *European Journal of Organic Chemistry* 7:1357-1369, 2014.
- Comeau LA, Pernet F, Tremblay R, Bates SS, LeBlanc A: Comparison of eastern oyster (*Crassostrea virginica*) and blue mussel (*Mytilus edulis*) filtration rates at low temperatures. *Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences* 2810:1-7, 2008.
- Cortese M, Gigliobianco MR, Magnoni F, Censi R, Di Martino P: Compensate for or minimize matrix effects? Strategies for overcoming matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry technique: a tutorial review. *Molecules* 25(13):3047, 2020.
- Costa PR, Botelho MJ, Lefebvre KA: Characterization of paralytic shellfish toxins in seawater and sardines (*Sardina pilchardus*) during blooms of *Gymnodinium catenatum*. *Hydrobiologia* 655:89-97, 2010.
- Costa PR, Pereira P, Guilherme S, Barata M, Nicolau L, Santos MA, Pacheco M, Pousão-Ferreira P: Biotransformation modulation and genotoxicity in white seabream upon exposure to paralytic shellfish toxins produced by *Gymnodinium catenatum*. *Aquatic Toxicology* 106-107:42-47, 2012.
- Costa LG, Giordano G, Aschner M: Domoic Acid. In *Encyclopedia of the Neurological Sciences*. Academic Press, Cambridge, 1016-1017, 2014.
- Costa PR, Costa S T, Braga A C, Rodrigues S M, Vale P: Relevance and challenges in monitoring marine biotoxins in non-bivalve vectors. *Food Control* 76:24-33, 2017.
- Cusick KD, Saylor GS: An overview on the marine neurotoxin, saxitoxin: genetics, molecular targets, methods of detection and ecological functions. *Marine Drugs* 11(4):991-1018, 2013.
- Čustović S, Orhanovic S, Ninčević Gladan Ž, Josipović T, Pavela-Vrančić M: Occurrence of

- yessotoxin (YTX) in the coastal waters of the eastern-mid Adriatic Sea (Croatia). *Fresenius Environmental Bulletin* 18:1452-1455, 2009.
- Čustović S, Orhanović S, Skejić S, Pavela-Vrančić M: The predominant occurrence of YTX in the Eastern-mid Adriatic sea (Vranjic basin, Croatia). *Fresenius Environmental Bulletin* 23(12c):3453-3458, 2014.
- da Silva CA, Oba ET, Ramsdorf WA, Magalhães VF, Cestari MM, Oliveira Ribeiro CA, Silva de Assis HC: First report about saxitoxins in freshwater fish *Hoplias malabaricus* through trophic exposure. *Toxicon* 57(1):141-147, 2011.
- Dai Y, Yang S, Zhao D, Hu C, Xu W, Anderson DM, Li Y, Song XP, Boyce DG, Gibson L, Zheng C, Feng L: Coastal phytoplankton blooms expand and intensify in the 21st century. *Nature* 615(7951):280-284, 2023.
- Daiguji M, Satake M, James KJ, Bishop A, Mackenzie L, Naoki H, Yasumoto T: Structures of new pectenotoxin analogs, pectenotoxin-2 seco acid and 7-epi-pectenotoxin- 2 seco acid, isolated from a dinoflagellate and Greenshell mussels. *Chemistry Letters* 7:653–654, 1998.
- Dawson JF, Holmes CF: Molecular mechanisms underlying inhibition of protein phosphatases by marine toxins. *Frontiers in Bioscience-Landmark* 4(4):646-658, 1999.
- de Carvalho IL, Pelerito A, Ribeiro I, Cordeiro R, Nuncio MS, Vale P: Paralytic shellfish poisoning due to ingestion of contaminated mussels: A 2018 case report in Caparica (Portugal). *Toxicon: X* 4:100017, 2019.
- De la Iglesia P, McCarron P, Diogène J, Quilliam MA: Discovery of gymnodimine fatty acid ester metabolites in shellfish using liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 27(5):643-653, 2013.
- Deeds JR, Wiles K, Heideman GB 6th, White KD, Abraham A: First U.S. report of shellfish harvesting closures due to confirmed okadaic acid in Texas Gulf coast oysters. *Toxicon* 55(6):1138-1146, 2010.
- Del Campo M, Zhong TY, Tampe R, García L, Lagos N: Sublethal doses of dinophysistoxin-1 and okadaic acid stimulate secretion of inflammatory factors on innate immune cells: Negative health consequences. *Toxicon* 126:23-31, 2017.
- Dell'Aversano C, Walter JA, Burton IW, Stirling DJ, Fattorusso E, Quilliam MA: Isolation and structure elucidation of new and unusual saxitoxin analogues from mussels. *Journal of natural products* 71(9):1518-1523, 2008.
- Dhanji-Rapkova M, O'Neill A, Maskrey BH, Coates L, Swan SC, Teixeira Alves M, Kelly RJ, Hatfield RG, Rowland-Pilgrim SJ, Lewis AM, Turner A: Variability and profiles of lipophilic toxins in bivalves from Great Britain during five and a half years of monitoring: azaspiracids and yessotoxins. *Harmful Algae* 87:101629, 2019.
- Díaz PA, Álvarez G, Varela D, Pérez-Santos I, Díaz M, Molinet C, Seguel M, Aguilera-Belmonte A, Guzmán L, Uribe E, Rengel J, Hernández C, Segura C, Figueroa RI: Impacts of harmful algal blooms on the aquaculture industry: Chile as a case study. *Perspectives in Phycology* 6(1-2):39-50, 2019.
- Díaz PA, Álvarez G, Seguel M, Marín A, Krock B: First detection of pectenotoxin-2 in



- shellfish associated with an intense spring bloom of *Dinophysis acuminata* on the central Chilean coast. *Marine Pollution Bulletin* 158:111414, 2020.
- Diehl F, Ramos PB, Santos JM, Barros DM, Yunes JS: Behavioral alterations induced by repeated saxitoxin exposure in drinking water. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 22(18), 2016.
- Ding L, Qiu J, Li A: Proposed Biotransformation Pathways for New Metabolites of Paralytic Shellfish Toxins Based on Field and Experimental Mussel Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65(27):5494-5502, 2017.
- Dizer H, Fischer B, Harabawy AS, Hennion MC, Hansen PD: Toxicity of domoic acid in the marine mussel *Mytilus edulis*. *Aquatic toxicology* 55(3-4):149-156, 2001.
- Dominguez HJ, Paz B, Daranas AH, Norte M, Franco JM, Fernández JJ: Dinoflagellate polyether within the yessotoxin, pectenotoxin and okadaic acid toxin groups: Characterization, analysis and human health implications. *Toxicon* 56(2):191-217, 2010.
- Dong FM: *The nutritional value of shellfish in fisheries, aquaculture and seafood*. Washington Sea Grant, 2009. <https://wsq.washington.edu/wordpress/wp-content/uploads/publications/Nutritional-Value-of-Shellfish.pdf> [29.7.2018].
- Donovan CJ, Ku JC, Quilliam MA, Gill TA: Bacterial degradation of paralytic shellfish toxins. *Toxicon* 52(1):91-100, 2008.
- Doucette TA, Tasker RA: Domoic Acid: Detection Methods, Pharmacology, and Toxicology. In *Seafood and Freshwater Toxins, Pharmacology, Physiology and Detection*. CRC Press, Boca Raton, 397-429, 2008.
- Dragunow M, Trzoss M, Brimble M. A, Camerona R, Beuzenberg V, Holland P, Mountfort D: Investigations into the cellular actions of the shellfish toxin gymnodimine and analogues. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 20:305-312, 2005.
- Draisci R, Lucentini L, Giannetti L, Boria P, Poletti R: First report of pectenotoxin-2 (PTX-2) in algae (*Dinophysis fortii*) related to seafood poisoning in Europe. *Toxicon* 34(8):923-935, 1996.
- Draisci R, Palleschi L, Giannetti L, Lucentini L, James KJ, Bishop AG, Satake M, Yasumoto T: New approach to the direct detection of known and new diarrhoeic shellfish toxins in mussels and phytoplankton by liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of chromatography A* 847(1-2):213-221, 1999.
- Državni zavod za statistiku Republike Hrvatske: *Popis stanovništva, kućanstva i stanova 2011. Stanovništvo prema spolu i starosti*. DZS, 2013. [https://web.dzs.hr/Hrv\\_Eng/publication/2012/SI-1468.pdf](https://web.dzs.hr/Hrv_Eng/publication/2012/SI-1468.pdf) [15.2.2021]
- Durán-Riveroll LM, Cembella AD: Guanidinium toxins and their interactions with voltage-gated sodium ion channels. *Marine Drugs* 15(10):303, 2017.
- Dursun F: Occurrence and Variability of Domoic Acid in Mussel (*Mytilus galloprovincialis*) Samples from the Golden Horn Estuary, Sea of Marmara (Turkey). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 106(2):318-326, 2021.
- Emery H, Traves W, Rowley AF, Coates CJ: The diarrhetic shellfish-poisoning toxin, okadaic acid, provokes gastropathy, dysbiosis and susceptibility to bacterial infection in a non-

- 
- rodent bioassay, *Galleria mellonella*. *Archives of Toxicology* 95(10):3361-3376, 2021.
- Espiña B, Louzao MC, Ares IR, Cagide E, Vieytes MR, Vega FV, Rubiolo JA, Miles CO, Suzuki T, Yasumoto T, Botana LM: Cytoskeletal toxicity of pectenotoxins in hepatic cells. *British Journal of Pharmacology* 155(6):934-944, 2008.
- European Food Safety Authority: Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish - okadaic acid and analogues, *The EFSA Journal* 589:1-62, 2008.a.
- European Food Safety Authority: Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish – azaspiracids. *The EFSA Journal* 723, 1-52, 2008.b.
- European Food Safety Authority: Marine biotoxins in shellfish–Domoic acid, Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. *The EFSA Journal* 7(7), 1181, 2009.a.
- European Food Safety Authority: Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on Marine Biotoxins in Shellfish – Saxitoxin Group. *The EFSA Journal* 1019, 1-76, 2009.b.
- European Food Safety Authority: Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish – pectenotoxin group. *The EFSA Journal* 1109, 1–47, 2009.c.
- European Food Safety Authority: Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish – yessotoxin group. *The EFSA Journal* 907, 1-62, 2009.d.
- European Food Safety Authority: Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on Marine Biotoxins in Shellfish – Summary on regulated marine biotoxins. *The EFSA Journal* 1306, 1-23, 2009.e.
- European Food Safety Authority: Statement of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on the Influence of processing on the levels of lipophilic marine biotoxins in bivalve molluscs. *The EFSA Journal* 1016, 1-10, 2009.f.
- European Food Safety Authority, Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM): Scientific Opinion on marine biotoxins in shellfish – Cyclic imines (spirolides, gymnodimines, pinnatoxins and pteriatoxins). *EFSA Journal* 8(6):1628, 2010.
- European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control: The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. *EFSA Journal* 17(12):5926, 276, 2019.
- European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control: The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. *EFSA Journal* 19(2):6406, 286, 2021.
- European Union Reference Laboratory for Marine Biotoxins: *Standard Operating Procedure for Determination of Domoic Acid (ASP Toxins) in Molluscs by UPLC-MS*. EURLMB,
-

---

Vigo, 2010.

European Union Reference Laboratory for Marine Biotoxins: *EU harmonised standard operating procedure for determination of lipophilic marine biotoxins in molluscs by LC-MS/MS, Version 5*. EURLMB, Vigo, 2015.

European Union Reference Laboratory for Marine Biotoxins: *Standard operating procedure for the Analysis of Paralytic Shellfish Toxins (PST) by Precolumn HPLC-FLD According to OMA AOAC 2005.06.*, EURLMB, Vigo, 2020. [https://www.aesan.gob.es/en/CRLMB/docs/docs/metodos\\_analiticos\\_de\\_desarrollo/PST\\_OMA-AOAC2\\_005-06\\_HPLC-FLD\\_EURLMB.pdf](https://www.aesan.gob.es/en/CRLMB/docs/docs/metodos_analiticos_de_desarrollo/PST_OMA-AOAC2_005-06_HPLC-FLD_EURLMB.pdf) [18.7.2021]

Europska unija: *Odluka komisije od 12. kolovoza 2002. o primjeni Direktive Vijeća 96/23/EZ o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata (priopćena pod brojem dokumenta C(2002) 3044) (Tekst značajan za EGP) (2002/657/EZ)*. Službeni list EU L 221/8, 2002.

Europska unija: *Uredba (EZ) br. 853/2004 Europskog parlamenta i vijeća od 29. travnja 2004. o utvrđivanju određenih higijenskih pravila za hranu životinjskog podrijetla*. Službeni list EU L 139/55, 2004.

Europska unija: *Uredba Komisije (EU) br. 786/2013 od 16. kolovoza 2013. o izmjeni Priloga III. Uredbi (EZ) br. 853/2004 Europskog parlamenta i Vijeća u pogledu dopuštenih granica yesotoksina u živim školjkama*. Službeni list EU L 220/14, 2013.

Europska unija: *Delegirana uredba Komisije (EU) 2021/1374 od 12. travnja 2021. o izmjeni Priloga III. Uredbi (EZ) br. 853/2004 Europskog parlamenta i Vijeća o posebnim higijenskim zahtjevima za hranu životinjskog podrijetla*. Službeni list EU L 297/1, 2021.

Farabegoli F, Blanco L, Rodríguez LP, Vieites JM, Cabado AG: Phycotoxins in marine shellfish: Origin, occurrence and effects on humans. *Marine drugs* 16(6):188, 2018.

Fehling J, Davidson K, Bolch CJ, Bates SS: Growth and domoic acid production by *Pseudo-nitzschia seriata* (bacillariophyceae) under phosphate and silicate limitation. *Journal of Phycology* 40:674-683, 2004.

Fernandes-Salvador JA, Davidson K, Sourisseau M, Revilla M, Schmidt W, Clarke D, Miller PI, Arce P, Fernández R, Maman L, Silva A, Whyte C, Mateo M, Neira P, Mateus M, Ruiz-Villarreal M, Ferrer L, Silke J: Current Status of Forecasting Toxic Harmful Algae for the North-East Atlantic Shellfish Aquaculture Industry. *Frontiers in Marine Science* 8:666583, 2021.

Fernández R, Mamán L, Jaén D, Fernández Fuentes L, Ocaña MA, Gordillo MM: Dinophysis Species and Diarrhetic Shellfish Toxins: 20 Years of Monitoring Program in Andalusia, South of Spain. *Toxins* 11(4):189, 2019.

Ferrari S, Ciminiello P, Dell'Aversano C, Forino M, Malaguti C, Tubaro A, Poletti R, Yasumoto T, Fattorusso E, Rossini GP: Structure- activity relationships of yessotoxins in cultured cells. *Chemical research in toxicology* 17(9):1251-1257, 2004.

Ferreira JG, Andersen JH, Borja A, Bricker SB, Camp J, Da Silva MC, Garcés E, Heiskanen AS, Humborg C, Ignatiades L, Lancelot C, Menesguen A, Tett P, Hoepffner N, Claussen U: Overview of eutrophication indicators to assess environmental status within the European Marine Strategy Framework Directive. *Estuarine, Coastal and*

- 
- Shelf Science* 93(2):117-131, 2011.
- Ferron PJ, Dumazeau K, Beaulieu JF, Le Hégarat L, Fessard V: Combined Effects of Lipophilic Phycotoxins (Okadaic Acid, Azaspiracid-1 and Yessotoxin) on Human Intestinal Cells Models. *Toxins* 8(2):50, 2016.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations: *Marine biotoxins*. FAO, Rim, 2004.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization: *Principles and Methods for the Risk Assessment of Chemicals in Food*. WHO, Ženeva, 2009.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations: *Assessment and management of biotoxin risks in bivalve molluscs*. FAO, Rome, 2011.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations: *FAO/INFOODS global food composition database for fish and shellfish Version 1.0 - uFiSh1.0*. FAO, 2016. <https://www.fao.org/infoods/infoods/tables-and-databases/faoinfoods-databases/en/> [7.9.2019].
- Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization: *Toxicity equivalence factors for marine biotoxins associated with bivalve molluscs*. FAO i WHO, Rome, 2016.
- Food Safety Authority of Ireland: *The Occurrence of Marine Biotoxins and Risk of Exposure to Seafood Consumers in Ireland*. FSAI, Dublin, 2016.
- Franchini A, Milandri A, Poletti R, Ottaviani E: Immunolocalization of yessotoxins in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicon* 41(8):967-970, 2003.
- Franchini A, Marchesini E, Poletti R, Ottaviani E: Acute toxic effect of the algal yessotoxin on Purkinje cells from the cerebellum of Swiss CD1 mice. *Toxicon* 43(3):347-352, 2004.a.
- Franchini A, Marchesini E, Poletti R, Ottaviani E: Lethal and sub-lethal yessotoxin dose-induced morpho-functional alterations in intraperitoneal injected Swiss CD1 mice. *Toxicon* 44(1):83-90, 2004.b.
- Furey A, O'Doherty S, O'Callaghan K, Lehane M, James KJ: Azaspiracid poisoning (AZP) toxins in shellfish: Toxicological and health considerations. *Toxicon* 56(2):173-190, 2010.
- Gainey LFJr, Shumway SE: A compendium of the responses of bivalve molluscs to toxic dinoflagellates. *Journal of Shellfish Research* 7(4):623-628, 1988.
- García-Altres M, Diogène J, De la Iglesia P: The implementation of liquid chromatography tandem mass spectrometry for the official control of lipophilic toxins in seafood: Single-laboratory validation under four chromatographic conditions. *Journal of Chromatography A* 1275:48-60, 2013.
- García-Altres M, Casanova A, Bane V, Diogène J, Furey A, de la Iglesia P: Confirmation of pinnatoxins and spirolides in shellfish and passive samplers from Catalonia (Spain) by liquid chromatography coupled with triple quadrupole and high-resolution hybrid tandem mass spectrometry. *Marine Drugs* 12(6):3706-3732, 2014.
-

- García-Altres M, Casanova A, Fernández-Tejedor M, Diogène J, De La Iglesia P: Bloom of *Dinophysis* spp. dominated by *D. sacculus* and its related diarrhetic shellfish poisoning (DSP) outbreak in Alfacs Bay (Catalonia, NW Mediterranean Sea): Identification of DSP toxins in phytoplankton, shellfish and passive samplers. *Regional Studies in Marine Science* 6:19-28, 2016.
- García C, del Carmen Bravo M, Lagos M, Lagos N: Paralytic shellfish poisoning: post-mortem analysis of tissue and body fluid samples from human victims in the Patagonia fjords. *Toxicon* 43(2):149-158, 2004.
- García C, Rodríguez-Navarro A, Díaz JC, Torres R, Lagos N: Evidence of in vitro glucuronidation and enzymatic transformation of paralytic shellfish toxins by healthy human liver microsomes fraction. *Toxicon* 53(2):206-213, 2009.
- García C, Barriga A, Díaz JC, Lagos M, Lagos N: Route of metabolization and detoxication of paralytic shellfish toxins in humans. *Toxicon* 55(1):135-144, 2010.
- García C, Pérez F, Contreras C, Figueroa D, Barriga A, López-Rivera A, Araneda OF, Contreras HR: Saxitoxins and okadaic acid group: accumulation and distribution in invertebrate marine vectors from Southern Chile. *Food Additives & Contaminants: Part A* 32(6):984-1002, 2015.
- Garrett MJ, Puchulutegui C, Selwood AI, Wolny JL: Identification of the harmful dinoflagellate *Vulcanodinium rugosum* recovered from a ballast tank of a globally traveled ship in Port Tampa Bay, Florida, USA. *Harmful Algae* 39:202–209, 2014.
- Garthwaite I, Ross KM, Miles CO, Briggs LR, Towers NR, Borrell T, Busby P: Integrated enzyme-linked immunosorbent assay screening system for amnesic, neurotoxic, diarrhetic, and paralytic shellfish poisoning toxins found in New Zealand. *Journal of AOAC International* 84(5):1643-1648, 2001.
- Gerssen A, McElhinney MA, Mulder PP, Bire R, Hess P, de Boer J: Solid phase extraction for removal of matrix effects in lipophilic marine toxin analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 394(4):1213-1226, 2009.
- Gerssen A, Klijnsstra MD: The Determination of marine biotoxins in seafood. In *Analysis of Food Toxins and Toxicants*. Wiley-Blackwell, Hoboken, 321-362, 2017.
- Gessner BD, Bell P, Doucette GJ, Moczydlowski E, Poli MA, Van Dolah F, Hall S: Hypertension and identification of toxin in human urine and serum following a cluster of mussel-associated paralytic shellfish poisoning outbreaks. *Toxicon* 35(5):711-722, 1997.
- Gestal Otero JJ: Epidemiological Impact of Diarrhetic Toxins. In *Seafood and freshwater toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*. CRC Press, Boca Raton, 54-75, 2008.
- Giménez Papiol G, Casanova A, Fernández-Tejedor M, de la Iglesia P, Diogène J: Management of domoic acid monitoring in shellfish from the Catalan coast. *Environmental Monitoring and Assessment* 185(8):6653-6666, 2013.
- Giordano G, White CC, Mohar I, Kavanagh TJ, Costa LG: Glutathione Levels Modulate Domoic Acid-Induced Apoptosis in Mouse Cerebellar Granule Cells. *Toxicological*

- 
- Sciences* 100(2):433-444, 2007.
- Glibert PM, Berdalet E, Burford MA, Pitcher GC, Zhou M: Harmful algal blooms and the importance of understanding their ecology and oceanography. In *Global ecology and oceanography of harmful algal blooms*. Springer Cham, New York, 9-25, 2018.
- Gobler CJ: Climate change and harmful algal blooms: insights and perspective. *Harmful algae* 91:101731, 2020
- Goldstein T, Mazet JA, Zabka TS, Langlois G, Colegrove KM, Silver M, Bargu S, Van Dolah F, Leighfield T, Conrad PA, Barakos J, Williams DC, Dennison S, Haulena M, Gulland FM: Novel symptomatology and changing epidemiology of domoic acid toxicosis in California sea lions (*Zalophus californianus*): an increasing risk to marine mammal health. *Proceedings of the Royal Society B* 275(1632):267-276, 2008.
- Goya AB, Baqer D, Alexander RP, Stubbs P, Dean K, Lewis AM, Coates L, Maskrey BH, Turner AD: Marine Biotoxins in Whole and Processed Scallops from the Argentine Sea. *Marine Drugs* 20(10):634, 2022.
- Granéli E, Flynn K: Chemical and physical factors influencing toxin content. In *Ecology of Harmful Algae*. Springer, Heidelberg, 229-241, 2006.
- Grattan LM, Boushey CJ, Liang Y, Lefebvre KA, Castellon LJ, Roberts KA, Toben AC, Morris JG: Repeated Dietary Exposure to Low Levels of Domoic Acid and Problems with Everyday Memory: Research to Public Health Outreach. *Toxins* 10(3):103, 2018.
- Grienke U, Silke J, Tasdemir D: Bioactive compounds from marine mussels and their effects on human health. *Food Chemistry* 142:48-60, 2014.
- Guéguen M, Lassus P, Laabir M, Bardouil M, Baron R, Séche, V, Truque P, Amzil Z, Barillé L: Gut passage times in two bivalve molluscs fed toxic microalgae: *Alexandrium minutum*, *A. catenella* and *Pseudo-nitzschia calliantha*. *Aquatic Living Resources* 21:21-29, 2008.
- Guinder VA, Tillmann U, Krock B, Delgado AL, Krohn T, Garzon Cardona JE, Metfies K, López Abbate C, Silva R, Lara R: Plankton multiproxy analyses in the Northern Patagonian Shelf, Argentina: Community structure, phycotoxins, and characterization of toxic *Alexandrium* strains. *Frontiers in Marine Science* 5,394, 2018.
- Hallegraeff GM: A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia* 32(2):79-99, 1993.
- Halstead BW, Schantz EJ: *Paralytic shellfish poisoning*. WHO, Geneva, 1984.
- Hamano Y, Kinoshita Y, Yasumoto T: Enteropathogenicity of diarrhetic shellfish toxins in intestinal models, *Journal of the Food Hygienic Society of Japan* 27(4):375-379, 1986.
- Hassoun AER, Ujević I, Mahfouz C, Fakhri M, Roje-Busatto R, Jemaa S, Nazlić N: Occurrence of domoic acid and cyclic imines in marine biota from Lebanon-Eastern Mediterranean Sea. *Science of The Total Environment* 755(Pt 1):142542, 2021.
- He, X, Chen J, Wang J, Sun X, Xin M, Wang B, Liang S: Spatial variation of lipophilic marine algal toxins and its relationship with physicochemical parameters in spring in Laizhou Bay, China. *Journal of Oceanology and Limnology* 1-14, 2022.
-

- Hégaret H, Brokordt KB, Gaymer CF, Lohrmann KB, García C, Varela D: Effects of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* on histopathological and escape responses of the Northern scallop *Argopecten purpuratus*. *Harmful Algae* 1874–83, 2012.
- Hess P, Gallacher S, Bates LA, Brown N, Quilliam MA: Determination and confirmation of the amnesic shellfish poisoning toxin, domoic acid, in shellfish from Scotland by liquid chromatography and mass spectrometry. *Journal of AOAC International* 84(5):1657-1667, 2001.
- Hess P, McMahon T, Slattery D, Swords D, Dowling G, McCarron M, Clarke D, Gobbons W, Silke J, O’Cinneide M: Use of LC-MS testing to identify lipophilic toxins, to establish local trends and interspecies differences and to test the comparability of LC-MS testing with the mouse bioassay: An example from the Irish biotoxin monitoring programme 2001. In *Molluscan Shellfish Safety*. Springer, Rotterdam, 57–66, 2003.
- Hess P, Abadie E, Hervé F, Berteaux T, Séchet V, Araújo R, Molgó J, Zakarian A, Sibat M, Rundberget T, Miles CO, Amzil Z: Pinnatoxin G is responsible for atypical toxicity in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and clams (*Venerupis decussata*) from Ingril, a French Mediterranean lagoon. *Toxicon* 75:16-26, 2013.
- Hess P, Twiner MJ, Kilcoyne J, Sosa S: Azaspiracid toxins: toxicological profile. In *Marine and Freshwater Toxin, Toxinology*. Springer, Dordrecht, 170-191, 2016.
- Higa T, Kuniyoshi M: Toxins Associated with Medicinal and Edible Seaweeds. *Toxin Reviews* 19(2): 119-137, 2000.
- Hong HZ, Lam PK, Hsieh DP: Interactions of paralytic shellfish toxins with xenobiotic-metabolizing and antioxidant enzymes in rodents. *Toxicon* 42:425-431, 2003.
- Honsell G, Poletti R, Pompei M, Sidari L, Milandri A, Casadei C, Viviani R: *Alexandrium minutum* Halim and PSP Contamination in the Northern Adriatic Sea (Mediterranean Sea). In *Harmful and Toxic Algal Blooms* 77-80. UNESCO, Paris, 1996.
- Hrvatska agencija za hranu: *Nacionalno istraživanje o prehranbenim navikama*. HAH, Osijek, 2011-2012.
- Hrvatska gospodarska komora: *Procjena povećanja broja stanovnika u turističkoj sezoni*. HGK, 2018. <http://hrturizam.hr/wp-content/uploads/2018/08/HGKanaliza-Procjena-pove%C4%87anja-broja-stanovnika-u-turisti%C4%8Dkoj-sezoni.pdf> [5.1.2019]
- Hu T, Curtis JM, Oshima Y, Quilliam MA, Walter JA, Watson-Wright WM, Wright JLC: Spirolides B and D, two novel macrocycles isolated from the digestive glands of shellfish. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* 20:2159-2161, 1995.
- Hu T, Burton IW, Cembella AD, Curtis JM, Quilliam MA, Walter JA, Wright JL: Characterization of spirolides A, C, and 13-desmethyl C, new marine toxins isolated from toxic plankton and contaminated shellfish. *Journal of natural products* 64(3):308-312, 2001.
- Impellizzeri G, Mangiafico S, Oriente G, Piattelli M, Sciuto S, Fattorusso E, Magno S, Santacroce C, Sica D: Amino acids and low-molecular-weight carbohydrates of some marine red algae. *Phytochemistry* 14(7):1549-1557, 1975.



- Ishige, M: Pathological studies on the mice administrated with the causative agent of diarrhetic shellfish poisoning (okadaic acid and pectenotoxin-2). *Bulletin Hokkaido Institute Public Health* 38:15-19, 1988.
- Ito E, Satake M, Ofuji K, Higashi M, Harigaya K, McMahon T, Yasumoto T: Chronic effects in mice caused by oral administration of sublethal doses of azaspiracid, a new marine toxin isolated from mussels. *Toxicon* 40(2):193-203, 2002.
- Ito E, Suzuki T, Oshima Y, Yasumoto T: Studies of diarrhetic activity on pectenotoxin-6 in the mouse and rat. *Toxicon* 51(4):707-716, 2008.
- Jacobi Y, Shenkar N, Ward JE, Rosa M, Ramon GZ, Shavit U, Yahel G: Evasive plankton: Size-independent particle capture by ascidians. *Limnology and Oceanography* 66:1009-1020, 2021.
- James KJ, Furey A, Lehane M, Ramstad H, Aune T, Hovgaard P, Morris S, Higman W, Satake M, Yasumoto T: First evidence of an extensive northern European distribution of azaspiracid poisoning (AZP) toxins in shellfish. *Toxicon* 40(7):909-915, 2002.
- James KJ, Gillman M, Amandi MF, López-Rivera A, Puente PF, Lehane M, Mitrovic S, Furey A: Amnesic shellfish poisoning toxins in bivalve molluscs in Ireland. *Toxicon* 46(8):852-858, 2005.
- Ji Y, Che Y, Wright EJ, McCarron P, Hess P, Li A: Fatty acid ester metabolites of gymnodimine in shellfish collected from China and in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) exposed to *Karenia selliformis*. *Harmful Algae* 92:101774, 2020.
- Jiang T, Liu L, Li Y, Zhang J, Tan Z, Wu H, Jiang T, Lu S: Occurrence of marine algal toxins in oyster and phytoplankton samples in Daya Bay, South China Sea. *Chemosphere* 183:80-88, 2017.
- Jiao YH, Dou M, Wang G, Li HY, Liu JS, Yang X, Yang WD: Exposure of okadaic acid alters the angiogenesis in developing chick embryos. *Toxicon* 133:74-81, 2017.
- Jing J, Petroff R, Shum S, Crouthamel B, Topletz AR, Grant KS, Burbacher TM, Isoherranen N: Toxicokinetics and Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling of the Shellfish Toxin Domoic Acid in Nonhuman Primates. *Drug Metabolism and Disposition* 46(2):155-165, 2018.
- Jones TO, Whyte JNC, Townsend LD, Ginther NG, Iwama GK: Effects of domoic acid on haemolymph pH, PCO<sub>2</sub>, and PO<sub>2</sub> in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* and the California mussel, *Mytilus californianus*. *Aquatic Toxicology* 31:43-55, 1995.a.
- Jones TO, Whyte JN, Ginther NG, Townsend LD, Iwama GK: Haemocyte changes in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, caused by exposure to domoic acid in the diatom *Pseudonitzschia pungens* f. *multiseries*. *Toxicon* 33(3):347-353, 1995.b.
- Jones VJ: Diatom Introduction. In *Encyclopedia of Quaternary Science*. Elsevier, Amsterdam, 471-480, 2013.
- Kacem I, Bouaïcha N, Hajjem B: Comparison of okadaic acid profiles in mussels and oysters collected in Mediterranean lagoon, Tunisia. *International Journal of Biology* 2(2):238-245, 2010.
- Kacem I, Giménez Papiol G, de la Iglesia P, Diogène J, Hajjem B, Bouaïcha N. Comparative



- toxicity and paralytic shellfish poisoning toxin profiles in the mussel *Mytilus galloprovincialis* and the oyster *Crassostrea gigas* collected from a Mediterranean lagoon in Tunisia: a food safety concern. *International Journal of Food Properties* 18(5):1075-1085, 2015.
- Kaniou-Grigoriadou I, Mouratidou T, Katikou P: Investigation on the presence of domoic acid in Greek shellfish. *Harmful algae* 4(4):717-723, 2005.
- Kao CY, Walker SE: Active Groups of Saxitoxin and Tetrodotoxin as Deduced From Actions of Saxitoxin Analogues on Frog Muscle and Squid Axon. *The Journal of Physiology* 323:619–637, 1982.
- Kao CY: Paralytic Shellfish Poisoning. In *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*. Academic Press, San Diego, 75–86, 1993.
- Karlson B, Andersen P, Arneborg L, Cembella A, Eikrem W, John U, West JJ, Klemm K, Kobos J, Lehtinen S, Lundholm N, Mazur-Marzec H, Naustvoll L, Poelman M, Provoost P, De Rijcke M, Suikkanen S: Harmful algal blooms and their effects in coastal seas of Northern Europe. *Harmful Algae* 102:101989, 2021.
- Kelchner H, Reeve-Arnold KE, Schreiner KM, Bargu S, Roques KG, Errera RM: Domoic Acid and *Pseudo-nitzschia* spp. Connected to Coastal Upwelling along Coastal Inhambane Province, Mozambique: A New Area of Concern. *Toxins* 13(12):903, 2021.
- Kerr DS, Razak A, Crawford N: Age-related changes in tolerance to the marine algal excitotoxin domoic acid. *Neuropharmacology* 43(3):357-366, 2002.
- Kharrat R, Servent D, Girard E, Ouanounou G, Amar M, Marrouchi R, Benoit E, Molgó J: The marine phycotoxin gymnodimine targets muscular and neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes with high affinity. *Journal of Neurochemistry* 107(4):952-963, 2008.
- Kimura O, Kotaki Y, Hamaue N, Haraguchi K, Endo T: Transcellular transport of domoic acid across intestinal Caco-2 cell monolayers. *Food and Chemical Toxicology* 49(9):2167-2171, 2011.
- Kobayashi K, Takata Y, Kodama M: Direct contact between *Pseudo-nitzschia multiseriata* and bacteria is necessary for the diatom to produce a high level of domoic acid. *Fisheries Science* 75:771-776, 2009.
- Kodama M, Doucette GJ, Green DH: Relationships between bacteria and harmful algae. In *Ecology of harmful algae* Springer Berlin, Heidelberg, 243-255, 2006.
- Konoki K, Onoda T, Watanabe R, Cho Y, Kaga S, Suzuki T, Yotsu-Yamashita M: In vitro acylation of okadaic acid in the presence of various bivalves' extracts. *Marine Drugs* 11(2):300-315, 2013.
- Kotaki Y, Koike K, Yoshida M, Thuoc CV, Huyen NTM, Hoi NC, Fukuyo Y, Kodama M: Domoic acid production in *Nitzschia* sp. (*Bacillariophyceae*) isolated from a shrimp culture pond in Do Son, Vietnam. *Journal of Phycology* 36: 1057-1060, 2000.
- Krešić G, Pleadin J, Kvirgić K, Lešić T, Džafić N, Zrnčić S, Vulić A, Bogdanović T, Oraić D, Vahčić, N: Seasonal and geographical variations in chemical composition and fatty acid profile of Mediterranean mussels. *Journal of Food & Nutrition Research* 59(2),

---

2020.

- Krock B, Tillmann U, John U, Cembella AD: Characterization of azaspiracids in plankton size fractions and isolation of an azaspiracid-producing dinoflagellate from the North Sea. *Harmful Algae* 8:254-263, 2009.a.
- Krock B, Pitcher GC, Ntuli J, Cembella AD: Confirmed identification of gymnodimine in oysters from the west coast of South Africa by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *African Journal of Marine Science* 31(1):113-118, 2009.b.
- Krock B, Tillmann U, Voß D, Koch BP, Salas R, Witt M, Potvin E, Jeong HJ: New azaspiracids in *Amphidomataceae* (*Dinophyceae*). *Toxicon* 60(5):830-839, 2012.
- Krock B, Ferrario ME, Akselman R, Montoya NG: Occurrence of marine biotoxins and shellfish poisoning events and their causative organisms in Argentine marine waters. *Oceanography* 31(4):132-144, 2018.
- Kumar KP, Kumar SP, Nair GA: Risk assessment of the amnesic shellfish poison, domoic acid, on animals and humans. *Journal of Environmental Biology* 30(3):319-325, 2009.
- Kvrgić K, Lešić T, Aysal AI, Džafić N, Pleadin J: Cyclic imines in shellfish and ascidians in the northern Adriatic Sea. *Food Additives and Contaminants Part B Surveillance* 14(1):12-22, 2021.
- Kvrgić K, Lešić T, Džafić N, Pleadin J: Occurrence and Seasonal Monitoring of Domoic Acid in Three Shellfish Species from the Northern Adriatic Sea. *Toxins* 14(1):33, 2022.
- Kwong RW, Wang WX, Lam PK, Yu PK: The uptake, distribution and elimination of paralytic shellfish toxins in mussels and fish exposed to toxic dinoflagellates. *Aquatic Toxicology* 80(1):82-91, 2006.
- La Barre S, Bates SS, Quilliam MA: Domoic acid. In *Outstanding Marine Molecules: Chemistry, Biology, Analysis*. Wiley-VCH GmbH, Berlin, 189-215, 2014.
- Lage S, Costa PR, Canário AVM, Da Silva JP: LC-HRMS Profiling of Paralytic Shellfish Toxins in *Mytilus galloprovincialis* after a *Gymnodinium catenatum* Bloom. *Marine Drugs* 20(11):680, 2022.
- Lamas JP, Arévalo F, Moroño Á, Correa J, Muñiz S, Blanco J: Detection and Spatio-Temporal Distribution of Pinnatoxins in Shellfish from the Atlantic and Cantabrian Coasts of Spain. *Toxins* 11(6):340, 2019.
- Lambert G, Karney R C, Rhee WY, Carman MR: Wild and cultured edible tunicates: a review. *Management of Biological Invasions* 7(1):59-66, 2016.
- Larsen R, Eilertsen KE, Elvevoll EO: Health benefits of marine foods and ingredients. *Biotechnology Advances* 29(5):508-518, 2011.
- Laycock MV, de Freitas ASW, Wright JLC: Glutamate agonists from marine algae. *Journal of Applied Phycology* 1: 113-122, 1989.
- Leal JF, Cristiano ML: Marine paralytic shellfish toxins: chemical properties, mode of action, newer analogues, and structure–toxicity relationship. *Natural Product Reports* 39(1):33-57, 2022.a.

- Leal JF, Cristiano ML: Revisiting the HPLC-FLD Method to Quantify Paralytic Shellfish Toxins: C3, 4 Quantification and the First Steps towards Validation. *Toxins* 14(3):179, 2022.b.
- Ledreux A, Sérandour AL, Morin B, Derick S, Lanceleur R, Hamlaoui S, Furger C, Biré R, Krys S, Fessard V, Troussellier M, Bernard C: Collaborative study for the detection of toxic compounds in shellfish extracts using cell-based assays. Part II: application to shellfish extracts spiked with lipophilic marine toxins. *Analytical And Bioanalytical Chemistry* 403(7):1995-2007, 2012.
- Lee KJ, Mok JS, Song KC, Yu H, Lee DS, Jung JH, Kim JH: First detection and seasonal variation of lipophilic toxins okadaic acid, dinophysistoxin-1, and yessotoxin in Korean gastropods. *Journal of Food Protection* 75(11):2000-2006, 2012.
- Leira F, Cabado AG, Vieytes MR, Roman Y, Alfonso A, Botana LM, Yasumoto T, Malaguti C, Rossini GP: Characterization of F-actin depolymerization as a major toxic event induced by pectenotoxin-6 in neuroblastoma cells. *Biochemical Pharmacology* 63(11):1979-1988, 2002.
- Lelong A, Hégaret H, Soudant P, Bates SS: *Pseudo-nitzschia (Bacillariophyceae)* species, domoic acid and amnesic shellfish poisoning: revisiting previous paradigms. *Phycology*, 51(2):168-216, 2012.
- Levin M, Joshi D, Draghi A II, Gulland FM, Jessup D, De Guise S: Immunomodulatory effects upon in vitro exposure of california sea lion and southern sea otter peripheral blood leukocytes to domoic acid. *Journal of Wildlife Diseases* 46(2):541-550, 2010.
- Leyva-Valencia I, Hernández-Castro JE, Band-Schmidt CJ, Turner AD, O'Neill A, Núñez-Vázquez EJ, López-Cortés DJ, Bustillos-Guzmán JJ, Hernández-Sandoval FE: Lipophilic Toxins in Wild Bivalves from the Southern Gulf of California, Mexico. *Marine Drugs* 19(2):99, 2021.
- Li A, Ma J, Cao J, Wang Q, Yu R, Thomas K, Quilliam MA: Analysis of paralytic shellfish toxins and their metabolites in shellfish from the North Yellow Sea of China. *Food Additives and Contaminants Part A* 29(9):1455-1464, 2012.a.
- Li A, Ma J, Cao J, McCarron P: Toxins in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) associated with diarrhetic shellfish poisoning episodes in China. *Toxicon* 60(3):420-425, 2012.b.
- Li A, Sun G, Qiu J, Fan : Lipophilic shellfish toxins in *Dinophysis caudata* picked cells and in shellfish from the East China Sea. *Environmental Science and Pollution Research* 22(4):3116-3126, 2015.
- Li AM, Yu PK, Hsieh D, Wang WX, Wu RS, Lam PK: Uptake and depuration of paralytic shellfish toxins in the green-lipped mussel, *Perna viridis*: a dynamic model. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24(1):129-135, 2005.
- Li Y, Qin JG, Abbott CA, Li X, Benkendorff K: Spawning-dependent stress response to food deprivation in Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 286:309–317, 2009.a.
- Li Y, Qin JG, Abbott CA, Li X, Benkendorff K: Monthly variation of condition index, energy reserves and antibacterial activity in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in Stansbury (South Australia). *Aquaculture* 286:64–71, 2009.b.
- Lindegarh S, Torgersen T, Lundve B, Sandvik M: Differential Retention of Okadaic Acid

- (OA) Group Toxins and Pectenotoxins (PTX) in the Blue Mussel, *Mytilus edulis* (L.), and European Flat Oyster, *Ostrea edulis* (L.). *Journal of Shellfish Research* 28(2):313–323, 2009.
- Litvak Y, Byndloss MX, Baumler AJ: Colonocyte metabolism shapes the gut microbiota. *Science* 362(6418), 2018.
- Liu H, Kelly MS, Campbell DA, Dong SL, Zhu JX, Wang SF. Exposure to domoic acid affects larval development of king scallop *Pecten maximus* (Linnaeus, 1758). *Aquatic Toxicology* 81(2):152-158, 2007.
- Liu, H, Kelly MS, Campbell DA, Fang J, Zhu J: Accumulation of domoic acid and its effect on juvenile king scallop *Pecten maximus* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture* 284:224–230, 2008.
- Liu L, Wei N, Gou Y, Li D, Liang Y, Xu D, Liu R, Sui S, Jiang T: Seasonal variability of *Protoceratium reticulatum* and yessotoxins in Japanese scallop *Patinopecten yessoensis* in northern Yellow Sea of China. *Toxicon* 139:31-40, 2017.
- Liu R, Liu L, Xu Y, Yang L, Liang Y, Li D, Wei N, Yang D, Cong Y: The production, distribution, and fate of yessotoxins, taking the northern yellow sea of China for example. *Environment and Ecology Research* 4:322-345, 2016.
- Liu Y, Yu RC, Kong FZ, Li C, Dai L, Chen ZF, Geng HX, Zhou MJ: Contamination status of lipophilic marine toxins in shellfish samples from the Bohai Sea, China. *Environmental Pollution* 249:171-180, 2019.
- Llewellyn LE, Dodd MJ, Robertson A, Ericson G, de Koning C, Negri AP: Post-mortem analysis of samples from a human victim of a fatal poisoning caused by the xanthid crab, *Zosimus aeneus*. *Toxicon* 40(10):1463-1469, 2002.
- Lopes VM, Lopes AR, Costa P, Rosa R: Cephalopods as Vectors of Harmful Algal Bloom Toxins in Marine Food Webs. *Maine Drugs* 11:3381-3409, 2013.
- López-Rivera A, Pinto M, Insinilla A, Suárez Isla B, Uribe E, Alvarez G, Lehane M, Furey A, James KJ: The occurrence of domoic acid linked to a toxic diatom bloom in a new potential vector: the tunicate *Pyura chilensis* (piure). *Toxicon* 54(6):754-762. 2009.
- López-Rivera A, O'Callaghan K, Moriarty M, O'Driscoll D, Hamilton B, Lehane M, James KJ, Furey A: First evidence of azaspiracids (AZAs): A family of lipophilic polyether marine toxins in scallops (*Argopecten purpuratus*) and mussels (*Mytilus chilensis*) collected in two regions of Chile. *Toxicon* 55(4):692-701, 2010.
- Louppis AP, Badeka AV, Katikou P, Georgantelis D, Paleologos EK, Kontominas MG: Okadaic acid, dinophysistoxin-1 and related esters in Greek mussels (*Mytilus galloprovincialis*): Determination and decontamination using ozonation. In *Food Process Engineering in a Changing World*, 1209-1210. ICEF, Athens, 2011.
- Louzao MC, Vieytes MR, Fontal O, Botana LM: Glucose uptake in enterocytes: a test for molecular targets of okadaic acid. *Journal of Receptors and Signal Transduction* 23(2-3):211-224, 2003.
- Louzao MC, Costas C, Abal P, Suzuki T, Watanabe R, Vilariño N, Carrera C, Boente-Juncal A, Vale C, Vieytes MR, Botana LM. Serotonin involvement in okadaic acid-induced

- diarrhoea in vivo *Archives of Toxicology* 95(8):2797-2813, 2021.
- Louzao MC, Vilariño N, Vale C, Costas C, Cao A, Raposo-Garcia S, Vieytes MR, Botana LM: Current Trends and New Challenges in Marine Phycotoxins. *Marine Drugs* 20(3):198, 2022.
- Ljubešić Z, Bosak S, Viličić D, Borojević, KK, Marić D, Godrijan J, Ujević I, Peharec P, Đakovac T: Ecology and taxonomy of potentially toxic *Pseudo-nitzschia* species in Lim Bay (north-eastern Adriatic Sea). *Harmful Algae* 10(6):713-722, 2011.
- MacKenzie L, Holland P, McNabb P, Beuzenberg V, Selwood A, Suzuki T: Complex toxin profiles in phytoplankton and Greenshell mussels (*Perna canaliculus*), revealed by LC-MS/MS analysis. *Toxicon* 40:1321, 2002.
- MacKinnon SL, Walter JA, Quilliam MA, Cembella AD, Leblanc P, Burton IW, Hardstaff WR, Lewis NI: Spirolides isolated from Danish strains of the toxigenic dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii*. *Journal of Natural Products* 69(7):983-987, 2006.
- MacQuarrie SP, Bricelj VM: Behavioral and physiological responses to PSP toxins in *Mya arenaria* populations in relation to previous exposure to red tides. *Marine Ecology Progress Series* 366:59-74, 2008.
- Maeda M, Kodama T, Tanaka T, Yoshizumi H, Takemoto T, Nomoto K, Fujita T: Structures of isodomoic acids a, b and c, novel insecticidal amino acids from the red alga *Chondria armata*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 34(11):4892-4895, 1986.
- Mafra LL Jr, Bricelj M, Ward JE: Mechanisms contributing to low domoic acid uptake by oysters feeding on *Pseudo-nitzschia* cells. II. Selective rejection. *Aquatic Biology* 6:213-226, 2009.
- Mafra LL Jr, Bricelj M, Ouellette C, Bates SS: Feeding mechanics as the basis for differential uptake of the neurotoxin domoic acid by oysters, *Crassostrea virginica*, and mussels, *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology* 97:160-171, 2010a.
- Mafra LL Jr, Bricelj VM, Fennel K: Domoic acid uptake and elimination kinetics in oysters and mussels in relation to body size and anatomical distribution of toxin. *Aquatic Toxicology* 100:17-29, 2010.b.
- Mafra LL, Ribas T, Alves TP, Proença LA, Schramm MA, Uchida H, Suzuki T: Differential okadaic acid accumulation and detoxification by oysters and mussels during natural and simulated *Dinophysis* blooms. *Fisheries science* 81:749-762, 2015.
- Magdalena AB, Lehane M, Moroney C, Furey A, James KJ: Food safety implications of the distribution of azaspiracids in the tissue compartments of scallops (*Pecten maximus*). *Food Additives & Contaminants* 20(2):154-160, 2003.a.
- Magdalena AB, Lehane M, Krys S, Fernández ML, Furey A, James KJ: The first identification of azaspiracids in shellfish from France and Spain. *Toxicon* 42(1):105-108, 2003.b.
- Malhi N, Turnbull A, Tan J, Kiermeier A, Nimmagadda R, McLeod C: A national survey of marine biotoxins in wild-caught abalone in Australia. *Journal Of Food Protection* 77(11):1960-1967, 2014.
- Manerio E, Rodas VL, Costas E, Hernandez JM: Shellfish consumption: A major risk factor

- for colorectal cancer. *Medical Hypotheses* 70:409–412, 2008.
- Manger R, Woodle D, Berger A, Dickey RW, Jester E, Yasumoto T, Lewis R, Hawryluk T, Hungerford J: Flow cytometric-membrane potential detection of sodium channel active marine toxins: application to ciguatoxins in fish muscle and feasibility of automating saxitoxin detection. *Journal of AOAC International* 97(2):299-306, 2014.
- Manita D, Alves RN, Braga AC, Fogaça FHS, Marques A, Costa PR: In vitro bioaccessibility of the marine biotoxins okadaic acid, dinophysistoxin-2 and their 7-O-acyl fatty acid ester derivatives in raw and steamed shellfish. *Food and Chemical Toxicology* 101:121-127, 2017.
- Marinopoulou A, Petridis D: A comparative study of the effect of different cooking methods on the quality and shucking of mussels. *Journal of Food Processing and Preservation* 46(10):15875, 2022.
- Martens H, Tillmann U, Harju K, Dell'Aversano C, Tartaglione L, Krock B: Toxin Variability Estimations of 68 *Alexandrium ostenfeldii* (*Dinophyceae*) Strains from The Netherlands Reveal a Novel Abundant *Gymnodimine*. *Microorganisms* 5(2):29, 2017.
- Matias WG, Creppy EE: Transplacental passage of [<sup>3</sup>H]-okadaic acid in pregnant mice measured by radioactivity and high-performance liquid chromatography. *Human & Experimental Toxicology* 15(3):226-230, 1996 .
- Matias WG, Traore A, Creppy EE: Variations in the distribution of okadaic acid in organs and biological fluids of mice related to diarrhoeic syndrome. *Human & Experimental Toxicology* 18:345, 1999.
- Matić-Skoko S, Ikica Z, Vrdoljak D, Peharda M, Tutman P, Dragičević B, Joksimović A, Dulčić J, Đurović M, Mandić M, Marković O, Stagličić N, Pešić A: A comparative approach to the Croatian and Montenegrin small-scale fisheries (SSF) in the coastal eastern Adriatic Sea: fishing gears and target species. *Acta Adriatica* 58(3):459–480, 2017.
- Matsushima R, Uchida H, Nagai S, Watanabe R, Kamio M, Nagai H, Kaneniwa M, Suzuki T: Assimilation, Accumulation, and Metabolism of Dinophysistoxins (DTXs) and Pectenotoxins (PTXs) in the Several Tissues of Japanese Scallop *Patinopecten yessoensis*. *Toxins* 7(12):5141-5154, 2015.
- Mattarozzi M, Cavazza A, Calfapietra A, Cangini M, Pigozzi S, Bianchi F, Careri M: Analytical screening of marine algal toxins for seafood safety assessment in a protected Mediterranean shallow water environment. *Food Additives and Contaminants Part A-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment* 36(4):612–624, 2019.
- Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM: Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Analytical Chemistry* 75(13):3019-3030, 2003.
- Maucher-Fuquay J, Muha N, Wang Z, Ramsdell JS: Toxicokinetics of domoic acid in the fetal rat. *Toxicology* 294(1):36–41, 2012.
- Mauriz A, Blanco J: Distribution and linkage of domoic acid (amnesic shellfish poisoning toxins) in subcellular fractions of the digestive gland of the scallop *Pecten maximus*. *Toxicon* 55:606–611, 2010.

- McCarron P, Emteborg H, Hess P: Freeze-drying for the stabilisation of shellfish toxins in mussel tissue (*Mytilus edulis*) reference materials. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387(7):2475-2486, 2007.
- McCarron P, Kilcoyne J, Hess P: Effects of cooking and heat treatment on concentration and tissue distribution of okadaic acid and dinophysistoxin-2 in mussels (*Mytilus edulis*). *Toxicon* 51(6):1081-1089, 2008.
- McCarron P, Kilcoyne J, Miles CO, Hess P: Formation of azaspiracids-3,-4,-6, and-9 via decarboxylation of carboxyazaspiracid metabolites from shellfish. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(1):160-169, 2009.
- McCarron P, Rourke WA, Hardstaff W, Pooley B, Quilliam MA: Identification of pinnatoxins and discovery of their fatty acid ester metabolites in mussels (*Mytilus edulis*) from Eastern Canada. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60:1437-1446, 2012.
- McCarthy M, Bane V, García-Altare M, van Pelt FN, Furey A, O'Halloran J: Assessment of emerging biotoxins (pinnatoxin G and spirolides) at Europe's first marine reserve: Lough Hyne. *Toxicon* 108:202-209, 2015.
- McFarland K, Donaghy L, Volety AK: Effect of acute salinity changes on hemolymph osmolality and clearance rate of the non-native mussel, *Perna viridis*, and the native oyster, *Crassostrea virginica*, in Southwest Florida. *Aquatic Invasions* 8:299–310, 2013.
- McMahon T, Silke J: Winter toxicity of unknown aetiology in mussels. *Harmful Algae News* 14:2, 1996.
- McNabb P: Chemistry, Metabolism, and Chemical Analysis of Okadaic Acid Group Toxins. In *Seafood and freshwater Toxins, Pharmacology, Physiology and Detection*. CRC Press, Boca Raton, 209-228, 2008.
- Medhioub W, Lassus P, Truquet P, Bardouil M, Amzil Z, Sechet V, Sibat M, Soudant P: Spirolide uptake and detoxification by *Crassostrea gigas* exposed to the toxic dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii*. *Aquaculture* 358:108-115, 2012.
- Medina-Elizalde J, García-Mendoza E, Turner AD, Sánchez-Bravo YA, Murillo-Martínez R: Transformation and Depuration of Paralytic Shellfish Toxins in the Geoduck Clam *Panopea Globosa* From the Northern Gulf of California. *Frontiers in Marine Science* 5(335), 2018.
- Meenakshi VK, Gomathy S, Senthamarai S, Paripooranaselvi M, Chamundeswari KP: Analysis of vitamins by HPLC and phenolic compounds, flavonoids by HPTLC in *Microcosmus Exasperatus*. *European Journal of Zoological Research* 1(4):105-110, 2012.
- Miles CO, Wilkins AL, Stirling DJ, MacKenzie AL: New analogue of gymnodimine from a Gymnodinium species. *Journal of agricultural and food chemistry* 48(4):1373-1376, 2000.
- Miles CO, Wilkins AL, Samdal IA, Sandvik M, Petersen D, Quilliam MA, Naustvoll LJ, Rundberget T, Torgersen T, Hovgaard P, Jensen DJ, Cooney JM: A novel pectenotoxin, PTX-12, in *Dinophysis* spp. and shellfish from Norway. *Chemical Research in Toxicology* 17(11):1423-1433, 2004.a.

- Miles CO, Wilkins AL, Munday R, Dines MH, Hawkes AD, Briggs LR, Sandvik M, Jensen DJ, Cooney JM, Holland PT, Quilliam MA, MacKenzie AL, Beuzenberg V, Towers NR. Isolation of pectenotoxin-2 from *Dinophysis acuta* and its conversion to pectenotoxin-2 seco acid, and preliminary assessment of their acute toxicities: *Toxicon* 43(1):1-9, 2004.b.
- Miles CO, Samdal IA, Aasen JA, Jensen DJ, Quilliam MA, Petersen D, Briggs LM, Wilkins AL, Rise F, Cooney JM, MacKenzie AL: Evidence for numerous analogs of yessotoxin in *Protoceratium reticulatum*. *Harmful Algae* 4(6):1075-1091, 2005.
- Miles CO, Wilkins AL, Hawkes AD, Jensen DJ, Selwood AI, Beuzenberg V, Mackenzie AL, Cooney JM, Holland PT: Isolation and identification of pectenotoxins-13 and -14 from *Dinophysis acuta* in New Zealand. *Toxicon* 48(2):152-159, 2006.a.
- Miles CO, Wilkins AL, Hawkes AD, Selwood AI, Jensen DJ, Cooney JM, Beuzenberg V, MacKenzie AL: Identification of 45-hydroxy-46,47-dinoryessotoxin, 44-oxo-45,46,47-trinoryessotoxin, and 9-methyl-42,43,44,45,46,47,55-heptanor-38-en-41-oxoyessotoxin, and partial characterization of some minor yessotoxins, from *Protoceratium reticulatum*. *Toxicon* 47(2):229-240, 2006.b.
- Miles CO, Rundberget T, Sandvik M, Aasen JAB, Selwood AI: *The Presence of Pinnatoxins in Norwegian Mussels*. National Veterinary Institute, Oslo, 2010.
- Milin T, Jovanović Ž: Znanje, stavovi i zastupljenost školjaka u prehrani u Republici Hrvatskoj. *Medica Jadertina* 52(1):57-68, 2022.
- Ministarstvo poljoprivrede: *Plan praćenja kakvoće mora i školjkaša na proizvodnim područjima i područjima za ponovno polaganje živih školjkaša u 2023. godini*. MP, 2023. <http://www.veterinarstvo.hr/UserDocsImages/HranaZivPod/2023-01-04.monitoring.skoljkasi.2023.pdf> [30.1.2023]
- Molgó J, Aráoz R, Benoit E, Iorga BI: Cyclic imine toxins: chemistry, origin, metabolism, pharmacology, toxicology, and detection. In *Seafood and freshwater toxins, Pharmacology physiology and detection*. CRC Press, Boca Raton, 951–990, 2014.
- Molgó J, Benoit E, Aráoz R, Zakarian A, Iorga B: Spirolides and Cyclic Imines: Toxicological Profile. In *Marine and Freshwater Toxins, Toxinology*. Springer, Dordrecht, 193-217, 2016.
- Molgó J, Marchot P, Aráoz R, Benoit E, Iorga BI, Zakarian A, Taylor P, Bourne Y, Servent D: Cyclic imine toxins from dinoflagellates: a growing family of potent antagonists of the nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of Neurochemistry* 142(Suppl 2):41-51, 2017.
- Montojo UM, Sakamoto S, Cayme MF, Gatdula NC, Furio EF, Relox JR Jr, Shigeru Sato, Fukuyo Y, Kodama M: Remarkable difference in accumulation of paralytic shellfish poisoning toxins among bivalve species exposed to *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* bloom in Masinloc Bay, Philippines. *Toxicon* 48(1):85-92, 2006.
- Moreira-González AR, Comas-González A, Valle-Pombrol A, Seisdedo-Losa M, Hernández-Leyva O, Fernandes LF, Chomérat N, Bilien G, Hervé F, Rovillon GA, Hess P, Alonso-Hernández CM, Mafra LL Jr: Summer bloom of *Vulcanodinium rugosum* in Cienfuegos Bay (Cuba) associated to dermatitis in swimmers. *Science of the Total Environment* 757:143782, 2021.



- Moreiras G, Leão JM, Gago-Martínez A: Analysis of cyclic imines in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from Galicia (NW Spain) by LC-MS/MS. *International journal of environmental research and public health* 17(1):281, 2020.
- Morris S, Stubbs B, Cook A, Milligan S, Quilliam MA: *The first report of the co-occurrence of pectenotoxins, okadaic acid and dinophysistoxin-2 in shellfish from England*. Cefas, Weymouth, 2004. <https://www.cefas.co.uk/publications/posters/30830web.pdf> [2.6.2018]
- Munday R, Towers NR, Mackenzie L, Beuzenberg V, Holland PT, Miles CO: Acute toxicity of gymnodimine to mice. *Toxicon* 44(2):173-178 2004.
- Munday R, Aune T, Rossini GP: Toxicology of the Yessotoxins. In *Seafood and Freshwater toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*. CRC Press, Boca Raton, 329-339, 2008.
- Munday R: Toxicology of the pectenotoxins. In *Seafood and Freshwater toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*. CRC Press, Boca Raton, 371-380, 2008.a.
- Munday R: Toxicology of Cyclic Imines: Gymnodimine, Spirolides, Pinnatoxins, Pteriatoxins, Prorocentrolide, Spiro-Prorocentrimine, and Symbioimines. In *Seafood and Freshwater Toxins, Pharmacology, Physiology and Detection*. CRC Press, Boca Raton, 581-594, 2008.b.
- Munday R, Quilliam MA, LeBlanc P, Lewis N, Gallant P, Sperker SA, Ewart HS, MacKinnon SL: Investigations into the toxicology of spirolides, a group of marine phycotoxins. *Toxins* 4(1):1-14, 2012.a.
- Munday R, Selwood AI, Rhodes L: Acute toxicity of pinnatoxins E, F and G to mice. *Toxicon* 60(6):995-999, 2012.b.
- Munday R, Reeve J: Risk assessment of shellfish toxins. *Toxins* 5(11):2109-2137, 2013.
- Murk AJ, Nicolas J, Smulders FJ, Bürk C, Gerssen A: Marine biotoxins: Types of poisoning, underlying mechanisms of action and risk management programmes. U *ECVPH Food Safety Assurance*, Wageningen Academic Publishers, Wageningen, 207–239, 2019.
- National Association of Testing Authorities: *Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative test methods*. NATA, Rhodes, 2012.
- Navarro E, Iglesias JIP: Infaunal Filter-Feeding Bivalves and the Physiological Response to Short-Term Fluctuations in Food Availability and Composition. U *Bivalve Filter Feeders*. Springer, Berlin, 25-56, 1993.
- Navarro JM, Aguila BL, Machmar F, Chaparro OR, Contreras AM: Dynamic of intoxication and detoxification in juveniles of *Mytilus chilensis* (*Bivalvia: Mytilidae*) exposed to paralytic shellfish toxins. *Aquatic living resources* 24(1):93-98, 2011.
- Negri AP, Bolch CJS, Geier S, Green DH, Park T, Blackburn SI: Widespread presence of hydrophobic paralytic shellfish toxins in *Gymnodinium catenatum*. *Harmful Algae* 6(6):774–780, 2007.
- Nézan E, Chomérat N: *Vulcanodinium rugosum* gen. et sp. nov. (*Dinophyceae*), un nouveau dinoflagellé marin de la côte méditerranéenne française. *Cryptogamie, Algologie*

---

32(1):3-18. 2011.

- Nicolaou KC, Koftis TV, Vyskocil S, Petrovic G, Tang W, Frederick MO, Chen DY, Li Y, Ling T, Yamada YM: Total synthesis and structural elucidation of azaspiracid-1. Final assignment and total synthesis of the correct structure of azaspiracid-1. *Journal of the American Chemical Society* 128(9):2859-2872, 2006.a.
- Nicolaou KC, Frederick MO, Petrovic G, Cole KP, Loizidou EZ: Total synthesis and confirmation of the revised structures of azaspiracid-2 and azaspiracid-3. *Angewandte Chemie-International Edition in English* 45(16):2609-2615, 2006.b.
- Nicolas J, Hoogenboom RL, Hendriksen PJ, Boderio M, Bovee TF, Rietjens IM, Gerssen A: Marine biotoxins and associated outbreaks following seafood consumption: Prevention and surveillance in the 21st century. *Global Food Security* 15:11-21, 2017.
- Ninčević Gladan Ž, Skejić S, Bužančić M, Marasović I, Arapov J, Ujević I, Bojanić N, Grbec B, Kušpilić G, Vidjak O: Seasonal variability in *Dinophysis* spp. abundances and diarrhetic shellfish poisoning outbreaks along the eastern Adriatic coast. *Botanica Marina* 51:449-463, 2008.
- Ninčević Gladan Ž, Ujević I, Milandri A, Marasović I, Ceredi A, Pigozzi S, Arapov J, Skejić S, Orhanović S, Isajlović I: Is yessotoxin the main phycotoxin in Croatian waters? *Marine Drugs* 8(3):460-470, 2010.
- Ninčević Gladan Ž, Ujević I, Milandri A, Marasović I, Ceredi A, Pigozzi S, Arapov J, Skejić S: Lipophilic toxin profile in *Mytilus galloprovincialis* during episodes of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) in the N.E. Adriatic Sea in 2006. *Molecules* 16(1):888-899, 2011.
- Ninčević Gladan Ž, Matić F, Arapov J, Skejić S, Bužančić M, Bakrač A, Straka M, Dekneudt Q, Grbec B, Garber R, Nazlić N: The relationship between toxic phytoplankton species occurrence and environmental and meteorological factors along the Eastern Adriatic coast. *Harmful Algae* 92:101745, 2020.
- Novaczek I, Madhyastka MS, Ablett RF, Donald A, Johnson G, Nijjar MS, Sims DE: Depuration of domoic acid from live blue mussels (*Mytilus edulis*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 49:312–318, 1992.
- O'Driscoll D, Skrabáková Z, O'Halloran J, van Pelt FN, James KJ: Mussels increase xenobiotic (azaspiracid) toxicity using a unique bioconversion mechanism. *Environmental Science & Technology* 45(7):3102-3108, 2011.
- Oehlenschläger J: Seafood: nutritional benefits and risk aspects. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* 82(3):168-176, 2012.
- Ogino, H, Kumagai M, Yasumoto T: Toxicologic evaluation of yessotoxin. *Natural Toxins* 5(6):255-259, 1997.
- Oliveira J, Cunha A, Castilho F, Romalde JL, Pereira MJ: Microbial contamination and purification of bivalve shellfish: Crucial aspects in monitoring and future perspectives—A mini-review. *Food Control* 22(6):805-816, 2011.
- O'Mahony M: EU Regulatory Risk Management of Marine Biotoxins in the Marine Bivalve Mollusc Food-Chain. *Toxins* 10(3):118, 2018.

- 
- Orellana Mancilla G: *Metabolization and Transfer of Marine Toxins From Algae to Molluscs*. PhD thesis. Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, 2016.
- Orhanović S, Ninčević Ž, Marasović I, Pavela-Vrančić M: Phytoplankton toxins in the central Adriatic Sea, *Croatica chemica acta* 69(1):291-303, 1996.
- Orr RJ, Stüken A, Murray SA, Jakobsen KS: Evolutionary acquisition and loss of saxitoxin biosynthesis in dinoflagellates: the second "core" gene, sxtG. *Applied and Environmental Microbiology* 79(7):2128-2136, 2013.
- Otero P, Alfonso A, Rodríguez P, Rubiolo JA, Cifuentes JM, Bermúdez R, Vieytes MR, Botana LM: Pharmacokinetic and toxicological data of spirolides after oral and intraperitoneal administration. *Food and Chemical Toxicology* 50(2):232-237, 2012.
- Otero P, Miguéns N, Rodríguez I, Botana LM: LC-MS/MS Analysis of the Emerging Toxin Pinnatoxin-G and High Levels of Esterified OA Group Toxins in Galician Commercial Mussels. *Toxins* 11(7):394, 2019.
- Otero P, Vale C, Boente-Juncal A, Costas C, Louzao MC, Botana LM: Detection of Cyclic Imine Toxins in Dietary Supplements of Green Lipped Mussels (*Perna canaliculus*) and in Shellfish *Mytilus chilensis*. *Toxins* 12(10):613, 2020.
- Oyaneder-Terrazas J, Contreras HR, García C: Prevalence, Variability and Bioconcentration of Saxitoxin-Group in Different Marine Species Present in the Food Chain. *Toxins* 9:190, 2017.
- Oyaneder-Terrazas J, Figueroa D, Araneda OF, García C: Saxitoxin Group Toxins Accumulation Induces Antioxidant Responses in Tissues of *Mytilus chilensis*, *Ameghinomya antiqua*, and *Concholepas concholepas* during a Bloom of *Alexandrium pacificum*. *Antioxidants* 11(2):392, 2022.
- Pan Y, Bates SS, Cembella AD: Environmental stress and domoic acid production by *Pseudo-nitzschia*: a physiological perspective. *Natural Toxins* 6:127-135, 1998.
- Panuwet P, Hunter RE Jr, D'Souza PE, Chen X, Radford SA, Cohen JR, Marder ME, Kartavenka K, Bary RP, Boyd BD: Biological matrix effects in quantitative tandem mass spectrometry-based analytical methods: advancing biomonitoring. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 46(2):93-105, 2016.
- Patrício A, Lopes MB, Costa PR, Costa RS, Henriques R, Vinga S: Time-Lagged Correlation Analysis of Shellfish Toxicity Reveals Predictive Links to Adjacent Areas, Species, and Environmental Conditions. *Toxins* 14(10):679, 2022.
- Pavela-Vrančić M, Meštrović V, Marasović I, Gillman M, Furey A, James KK: The occurrence of 7-epi-pectenotoxin-2 seco acid in the coastal waters of the central Adriatic (Kastela Bay). *Toxicon* 39(6):771-779, 2001.
- Pavela-Vrančić M, Meštrović V, Marasović I, Gillman M, Furey A, James KJ: DSP toxin profile in the coastal waters of the central Adriatic Sea. *Toxicon* 40: 1601-1607 2002.
- Pavela-Vrančić M, Ivona Marasović: Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) in the Central Adriatic Sea. *Croatica chemica acta* 77(4):627-631, 2004.
- Pavela-Vrančić M, Ujević I, Ninčević- Gladan Ž, Furey A. Accumulation of phycotoxins in the mussel *Mytilus galloprovincialis* from the central Adriatic Sea. *Croatica Chemica Acta*
-

- 79:291-297, 2006.
- Paz B, Riobó P, Fernández ML, Fraga S, Franco JM: Production and release of yessotoxins by the dinoflagellates *Protoceratium reticulatum* and *Lingulodinium polyedrum* in culture. *Toxicon* 44(3):251-258, 2004.
- Paz B, Riobó P, Ramilo I, Franco JM: Yessotoxins profile in strains of *Protoceratium reticulatum* from Spain and USA. *Toxicon* 50:1–17, 2007.
- Paz B, Daranas AH, Norte M, Riobó P, Franco JM, Fernández JJ: Yessotoxins, a group of marine polyether toxins: an overview. *Marine Drugs* 6(2):73-102, 2008.
- Perl TM, Lucie Bédard, Kosatsky T, Hockin JC, Todd ECD, Remis RS: An outbreak of toxic encephalopathy caused by eating mussels contaminated with domoic acid. *The New England Journal of Medicine* 322(25):1775-1780, 1990.
- Peteva Z, Krock B, Georgiev, Stancheva M: Occurrence and variability of marine biotoxins in mussel (*Mytilus galloprovincialis*) and in plankton samples from Bulgarian coast in spring 2017. *International Journal of Agriculture & Environmental Science* 5(4):1-11, 2018.
- Peteva Z, Kaliniova G, Krock B, Stancheva M, Georgieva S: Evaluation of paralytic shellfish poisoning toxin profile of mussels from Bulgarian North Black Sea coast by HPLC-FID with post and pre-column derivatization. *Bulgarian Chemical Communications* 51(D):233-240, 2019.
- Petroff R, Hendrix A, Shum S, Grant KS, Lefebvre KA, Burbacher TM: Public health risks associated with chronic, low-level domoic acid exposure: A review of the evidence. *Pharmacology and Therapeutics* 227:107865, 2021.
- Phillips KM, Ruggio DM, Exler J, Patterson KY: Sterol composition of shellfish species commonly consumed in the United States. *Food & Nutrition Research* 56:18931, 2012.
- Picot C, Limon G, Durand G, Wesolek N, Parent-Massin D, Roudot AC: Domoic Acid, Okadaic Acid and Spirolides: Inter-Species Variability in Contamination and Cooking Effects. *Food Public Health* 2:50-57, 2012.
- Pigozzi S, Bianchi L, Boschetti L, Cangini M, Ceredi A, Magnani F, Milandri A, Montanari S, Pompei M, Riccardi E, Rubini S: First evidence of spirolide accumulation in northwestern Adriatic shellfish. U *Proceedings of the 12<sup>th</sup> International Conference on Harmful Algae*, 319–322. International Society for the Study of Harmful Algae and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Copenhagen, 2008.
- Pistocchi R, Guerrini F, Pezzolesi L, Riccardi M, Vanucci S, Ciminiello P, Dell'Aversano C, Forino M, Fattorusso E, Tartaglione L, Milandri A, Pompei M, Cangini M, Pigozzi S, Riccardi E: Toxin levels and profiles in microalgae from the north-Western Adriatic Sea-15 years of studies on cultured species. *Marine Drugs* 10(1):140-162, 2012.
- Pitcher GC, Foord CJ, Macey BM, Mansfield L, Mouton A, Smith ME, Osmond SJ, van der Molen L: Devastating farmed abalone mortalities attributed to yessotoxin-producing dinoflagellates. *Harmful Algae* 81:30-41, 2019.
- Popkiss ME, Horstman DA, Harpur D: Paralytic shellfish poisoning. A report of 17 cases in

- 
- Cape Town. *South African Medical Journal* 55(25):1017-1023, 1979.
- Pradhan B, Kim H, Abassi S, Ki JS: Toxic Effects and Tumor Promotion Activity of Marine Phytoplankton Toxins: A Review. *Toxins* 14(6):397, 2022.
- Prakash A, Medcof JC, Tennant AD: Paralytic shellfish poisoning in eastern Canada. *Fisheries Research Board of Canada* 177:1–87, 1971.
- Prassopoulou E, Katikou P, Georgantelis D, Kyritsakis A: Detection of okadaic acid and related esters in mussels during diarrhetic shellfish poisoning (DSP) episodes in Greece using the mouse bioassay, the PP2A inhibition assay and HPLC with fluorimetric detection. *Toxicon* 53(2):214-227, 2009.
- Puente PF, Sáez MJF, Hamilton B, Furey A, James KJ: Studies of polyether toxins in the marine phytoplankton, *Dinophysis acuta*, in Ireland using multiple tandem mass spectrometry. *Toxicon* 44(8):919-926, 2004.
- Pulido OM: Domoic Acid Toxicologic Pathology: A Review. *Marine Drugs* 6:180-219, 2008.
- Qiu J, Meng F, Ding L, Che Y, McCarron P, Beach DG, Li A: Dynamics of paralytic shellfish toxins and their metabolites during timecourse exposure of scallops *Chlamys farreri* and mussels *Mytilus galloprovincialis* to *Alexandrium pacificum*. *Aquatic Toxicology* 200:233-240, 2018.
- Qiu J, Chen H, Ji Y, Li T, Li A: Evaluation of different strategies to minimize the matrix effects on LC-MS/MS analysis of multiple lipophilic shellfish toxins in both acidic and alkaline chromatographic conditions. *Toxicon* 188:16-26, 2020.
- Quilliam MA: Chemical methods for domoic acid, the amnesic shellfish poisoning (ASP) toxin. In *Manual on Harmful Marine Microalgae, Monographs on Oceanographic Methodology*, Volumen 11. UNESCO Publishing, Pariz. 247-266, 2003.a.
- Quilliam MA: Chemical methods for lipophilic shellfish toxins. In *Manual on Harmful Marine Microalgae, Monographs on Oceanographic Methodology*, Volumen 11. UNESCO Publishing, Pariz. 210-245, 2003.b
- Quilliam MA, Li A, Lewis N, McCarron P, Thomas K, Walter JA: Biotransformation and chemical degradation of paralytic shellfish toxins in mussels. In *Marine and Fresh-Water Harmful Algae, Proceedings of the 17th International Conference On Harmful Algae*, 118-121. ISSHA, Kopenhagen, 2017.
- Rajman Nagar L, Shenkar N: From Tropical to Sub-Tropical: Prolonged Reproductive Activity of the Invasive Ascidian Frontiers in Ecology and Evolution in the Eastern Mediterranean. *Frontiers in Ecology and Evolution* 4:102, 2016.
- Rambla-Alegre M, Miles CO, de la Iglesia P, Fernandez-Tejedor M, Jacobs S, Sioen I, Verbeke W, Samdal IA, Sandvik M, Barbosa V, Tediosi A, Madorran E, Granby K, Kotterman M, Calis T, Diogene J: Occurrence of cyclic imines in European commercial seafood and consumers risk assessment. *Environmental Research* 161:392-398, 2018.
- Ramos PB, Diehl F, dos Santo JM, Monserrat JM, Yunes JS: Oxidative stress in rats induced by consumption of saxitoxin contaminated drink water. *Harmful Algae* 37:68–74, 2014.

- 
- Raposo MIC, Gomes MTSR, Botelho MJ, Rudnitskaya A: Paralytic Shellfish Toxins (PST)-Transforming Enzymes: A Review. *Toxins* 12(5):344, 2020.
- Reguera B, Pizarro G: Planktonic Dinoflagellates That Contain Polyether Toxins of the Old “DSP Complex”. U *Seafood and Freshwater Toxins, Pharmacology, Physiology and Detection*. CRC Press, Boca Raton, 257-284, 2008.
- Reguera B, Riobó P, Rodríguez F, Díaz PA, Pizarro G, Paz B, Franco JM, Blanco J: Dinophysis toxins: causative organisms, distribution and fate in shellfish. *Marine Drugs* 12(1):394-461, 2014.
- Rehmann N, Hess P, Quilliam MA:). Discovery of new analogs of the marine biotoxin azaspiracid in blue mussels (*Mytilus edulis*) by ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 22(4):549–558, 2008.
- Revelante N, Gilmartin M: The lateral advection of particulate organic matter from the Po delta region during summer stratification, and its implications for the northern Adriatic. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 35(2):191–212, 1992.
- Rhodes L, Scholin C, Garthwaite I: Pseudo-nitzschia in New Zealand and the role of DNA probes and immunoassays in refining marine biotoxin monitoring programmes. *Natural toxins* 6(3-4):105-111, 1998.
- Rhodes L, McNabb P, De Salas M, Briggs L, Beuzenberg V, Gladstone M: Yessotoxin production by *Gonyaulax spinifera*. *Harmful Algae* 5(2):148-155. 2006.
- Rhodes L, Smith K, Selwood A, McNabb P, Van Ginkel R, Holland P, Munday R: Production of pinnatoxins by a peridinoid dinoflagellate isolated from Northland, New Zealand. *Harmful Algae* 9(4):384-389, 2010.
- Rhodes L, Smith K, Selwood A, McNabb P, Molenaar S, Munday R, Wilkinson C, Hallegraef G. Production of pinnatoxins E, F and G by scrippsielloid dinoflagellates isolated from Franklin Harbour, South Australia. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 45(4):703-709, 2011.
- Richard D, Arsenault E, Cembella A, Quilliam M: Investigations into the toxicology and pharmacology of spirolides, a novel group of shellfish toxins. U *Proceedings of the Ninth International Conference on Harmful Algal Blooms*, 383-386. UNESCO, Hobart, 2001.
- Rijal Leblad B, Lundholm N, Goux D, Veron B, Sagou R, Taleb H, Nhhala H, Er-Raioui H: *Pseudo-nitzschia Peragallo* (*Bacillariophyceae*) diversity and domoic acid accumulation in tuberculate cockles and sweet clams in M'diq Bay, Morocco. *Acta Botanica Croatica* 72(1):35-47, 2013.
- Rittenschober D, Nowak V, Charrondiere R: Review of availability of food composition data for fish and shellfish. *Food Chemistry* 141:4303–4310, 2013.
- Robbins IJ: Food Passage and Defaecation an *Ciona intestinalis* (L.); The Effects of Suspension Quantity and Quality. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 89:241–254, 1985.
- Rodrigue DC, Etzel RA, Hall S, de Porras E, Velasquez OH, Tauxe RV, Kilbourne EM, Blake PA: Lethal paralytic shellfish poisoning in Guatemala. *American Journal of Tropical*
-

---

*Medicine and Hygiene* 42(3):267–271, 1990.

- Rodrigues SM, de Carvalho M, Mestre T, Ferreira JJ, Coelho M, Peralta R, Vale P: Paralytic shellfish poisoning due to ingestion of *Gymnodinium catenatum* contaminated cockles--application of the AOAC HPLC official method. *Toxicon* 59(5):558-566, 2012.
- Rodríguez I, Vieytes MR, Alfonso A: Analytical challenges for regulated marine toxins. Detection methods. *Current Opinion in Food Science* 18:29-36, 2017.
- Rodríguez I, Alfonso A, González-Jartín JM, Vieytes MR, Botana LM: A single run UPLC-MS/MS method for detection of all EU-regulated marine toxins. *Talanta* 189:622-628, 2018.
- Rodríguez LP, González V, Martínez A, Paz B, Lago J, Cordeiro V, Blanco L, Vieites JM, Cabado AG: Occurrence of lipophilic marine toxins in shellfish from Galicia (NW of Spain) and synergies among them. *Marine Drugs* 13(4):1666-1687, 2015.
- Rodríguez-Cabo T, Moroño Á, Arévalo F, Correa J, Lamas JP, Rossignoli AE, Blanco J: Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) in Mussels from the Eastern Cantabrian Sea: Toxicity, Toxin Profile, and Co-Occurrence with Cyclic Imines. *Toxins* 13(11):761, 2021.
- Roje-Busatto R, Ujević I: PSP toxins profile in ascidian *Microcosmus vulgaris* (Heller, 1877) after human poisoning in Croatia (Adriatic Sea). *Toxicon* 79:28-36, 2014.
- Román Y, Alfonso A, Louzao MC, de la Rosa LA, Leira F, Vieites JM, Vieytes MR, Ofuji K, Satake M, Yasumoto T, Botana LM: Azaspiracid-1, a potent, nonapoptotic new phycotoxin with several cell targets. *Cellular Signalling* 14(8):703-716, 2002.
- Ross LA, Johnson W, Sapienza PP, Kim CS: Effects of the seafood toxin domoic acid on glutamate uptake by rat astrocytes. *Food and Chemical Toxicology* 38: 1005-1011, 2000.
- Rossignoli AE, Fernández D, Regueiro J, Mariño C, Blanco J: Esterification of okadaic acid in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicon* 57(5):712-720, 2011.
- Rossignoli AE, Mariño C, Martín H, Blanco J: Development of a Fast Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry Method (LC-MS/MS) to Determine Fourteen Lipophilic Shellfish Toxins Based on Fused-Core Technology: In-House Validation. *Marine drugs* 19(11), 603. 2021.
- Rourke WA, Justason A, Martin JL, Murphy CJ: Shellfish Toxin Uptake and Depuration in Multiple Atlantic Canadian Molluscan Species: Application to Selection of Sentinel Species in Monitoring Programs. *Toxins* 13(2):168, 2021.
- Rubini S, Albonetti S, Menotta S, Cervo A, Callegari E, Cangini M, Dall'Ara S, Baldini E, Vertuani S, Manfredini S: New Trends in the Occurrence of Yessotoxins in the Northwestern Adriatic Sea. *Toxin*, 13:634, 2021.
- Rundberget T, Aasen JAB, Selwood AI, Miles CO: Pinnatoxins and spirolides in Norwegian blue mussels and seawater. *Toxicon* 58(8):700-711, 2011.
- Ryan G, Cunningham K, Ryan MP: Pharmacology and Epidemiological Impact of Azaspiracids. U *Seafood and Freshwater toxins: Pharmacology, Physiology and*

- Detection*. CRC Press, Boca Raton, 755-761, 2008.
- Saeed AF, Awan SA, Ling S, Wang R, Wang S: Domoic acid: Attributes, exposure risks, innovative detection techniques and therapeutics. *Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts* 24:97–110. 2017.
- Sakamoto S, Ogata T, Sato S, Kodama M, Takeuchi T: Causative organism of paralytic shellfish toxins other than toxic dinoflagellates. *Marine Ecology Progress Series* 89:229-235, 1992.
- Sakamoto S, Sato S, Ogata T, Kodama M: Formation of intermediate conjugates in the reductive transformation of gonyautoxins to saxitoxins by thiol compounds. *Fisheries Science* 66:136–141, 2000.
- Salas R, Tillmann U, John U, Kilcoyne J, Burson A, Cantwell C, Hess P, Jauffrais T, Silke, J: The role of *Azadinium spinosum* (*Dinophyceae*) in the production of azaspiracid shellfish poisoning in mussels. *Harmful Algae* 10(6):774-783, 2011.
- Salas R, Clarke D: Review of DSP Toxicity in Ireland: Long-Term Trend Impacts, Biodiversity and Toxin Profiles from a Monitoring Perspective. *Toxins* 11(2):61, 2019.
- Samdal IA, Aasen JA, Briggs LR, Dahl E, Miles CO: Comparison of ELISA and LC-MS analyses for yessotoxins in blue mussels (*Mytilus edulis*). *Toxicon* 46(1):7-15, 2005.
- Satake M, MacKenzie L, Yasumoto T: Identification of *Protoceratium reticulatum* as the biogenetic origin of yessotoxin. *Natural Toxins* 5(4):164-167, 1997.
- Satake M, Ofuji K, Naoki H, Jame, KJ, Furey A, McMahon T, Silke J, Yasumoto T: Azaspiracid, a New Marine Toxin Having Unique Spiro Ring Assemblies, Isolated from Irish Mussels, *Mytilus edulis*. *Journal of the American Chemical Society* 120(38):9967–9968 1998.
- Sato M, Nakano T, Takeuch M, Kanno N, Nagahisa E, Sato Y: Distribution of neuroexcitatory amino acids in marine algae. *Phytochemistry* 42(6):1595-1597, 1996.
- Sawant PM, Holland PT, Mountfort DO, Kerr DS: In vivo seizure induction and pharmacological preconditioning by domoic acid and isodomoic acids A, B and C. *Neuropharmacology* 55:1412-1418, 2008.
- Schantz EJ, Mold JD, Stranger DW, Shavel J, Riel FJ, Bowden JP, Lynch JM, Wyler RS, Riegel B, Sommer H: Paralytic Shellfish Poison VI. A Procedure for the Isolation and Purification of the Poison from Toxic Clam and Mussel Tissues. *Journal of The American Chemical Society* 79:5230–5235, 1957.
- Schirone M, Berti M, Visciano P, Chiumiento F, Migliorati G, Tofalo R, Suzzi G, Di Giacinto F, Ferri N: Determination of Lipophilic Marine Biotoxins in Mussels Harvested from the Adriatic Sea by LC-MS/MS. *Frontiers In Microbiology* 9:152, 2018.
- Seki T, Satake M, Mackenzie L, Kaspar HF, Yasumoto T: Gymnodimine, a new marine toxin of unprecedented structure isolated from New Zealand oysters and the dinoflagellate, *Gymnodinium* sp. *Tetrahedron letters* 36(39):7093-7096, 1995.
- Selwood AI, Miles CO, Wilkins AL, van Ginkel R, Munday R, Rise F, McNabb P: Isolation, structural determination and acute toxicity of pinnatoxins E, F and G. *Journal of*



- 
- Agricultural and Food Chemistry* 58(10):6532-6542, 2010.
- Servent D, Malgorn C, Bernes M, Gil S, Simasotchi C, Hérard AS, Delzescaux T, Thai R, Barbe P, Keck M, Beau F, Zakarian A, Dive V, Molgó J: First evidence that emerging pinnatoxin-G, a contaminant of shellfish, reaches the brain and crosses the placental barrier. *Science Of The Total Environment* 790:148125, 2021.
- Sharma A, Gautam S, Kumar S: Phycotoxins. In *Encyclopedia of Food Microbiology*, Volumen 3, Elsevier, Amsterdam, 25-29, 2014.
- Shimizu Y, Yoshioka M: Transformation of paralytic shellfish toxin as demonstrated in scallop homogenates. *Science* 212(4494):547-9, 1981.
- Shum S, Jing J, Petroff R, Crouthamel B, Grant KS, Burbacher TM, Isoherranen N: Maternal-fetal disposition of domoic acid following repeated oral dosing during pregnancy in nonhuman primate. *Toxicology and Applied Pharmacology* 398, 115027, 2020.
- Shumway SE, Cucci TL: The effects of the toxic dinoflagellate *Protogonyaulax tamarensis* on the feeding and behaviour of bivalve molluscs. *Aquatic Toxicology* 1(10):9- 27, 1987.
- Shumway SE: A review of the effects of algal blooms on shellfish and aquaculture. *Journal Of The World Aquaculture Society* 21:65-104, 1990.
- Shumway SE: Phycotoxin-related shellfish poisoning: bivalve molluscs are not the only vectors. *Reviews In Fisheries Science* 3:1-31, 1995.
- Sidari L, Nichetto P, Cok S, Sosa S, Tubaro A, Honsell G, DellaLoggia R: Phytoplankton selection by mussels, and diarrhetic shellfish poisoning. *Marine Biology* 131:103-111, 1998.
- Silva M, Barreiro A, Rodriguez Paula, Otero P, Azevedo J, Alfonso A, Botana LM, Vasconcelos V: New Invertebrate Vectors for PST, Spirolides and Okadaic Acid in the North Atlantic. *Marine drugs* 11: 1936-1960, 2013.
- Silva M, Rey V, Barreiro A, Kaufmann M, Neto AI, Hassouani M, Sabour B, Botana A, Botana LM, Vasconcelos V: Paralytic Shellfish Toxins Occurrence in Non-Traditional Invertebrate Vectors from North Atlantic Waters (Azores, Madeira, and Morocco). *Toxins* 10(9):362, 2018.
- Silva T, Caeiro MF, Costa PR, Amorim A: *Gymnodinium catenatum* Graham isolated from the Portuguese coast: toxin content and genetic characterization. *Harmful Algae* 48:94–104, 2015.
- Skejić S, Ana CAR, Marasović I, Jozić S, Bužančić M, Arapov J, Ninčević Gladan Ž, Bakrač A, Kušpilić G, Vidjak O, Larsen J: Morphology and ecology of the poorly known dinoflagellate *Prorocentrum arcuatum* (Dinophyceae) from the Medulin Bay (eastern Adriatic Sea). *Acta Adriatica* 58(1):41-52, 2017.
- Smayda TJ: Reflections on the ballast water dispersal—harmful algal bloom paradigm. *Harmful algae* 6(4):601-622, 2007.
- Smith EA, Grant F, Ferguson CM, Gallacher S: Biotransformations of paralytic shellfish toxins by bacteria isolated from bivalve molluscs. *Applied and environmental microbiology* 67(5):2345-2353, 2001.

- 
- Solter PF, Beasley VR: Phycotoxins. In *Haschek and Rousseaux's handbook of toxicologic pathology*. Academic Press, Cambridge, 1155-1186, 2013.
- Sosa S, Ardizzone M, Beltramo D, Vita F, Dell'Ovo V, Barreras A, Yasumoto T, Tubaro A: Repeated oral co-exposure to yessotoxin and okadaic acid: a short term toxicity study in mice. *Toxicon* 76:94-102, 2013.
- Sosa S, Tubaro A: Okadaic Acid and Other Diarrhetic Toxins: Toxicological Profile. In *Marine and Freshwater Toxins, Toxinology*. Springer, Dordrecht, 147-168, 2016.
- Sosa S, Pelin M, Cavion F, Hervé F, Hess P, Tubaro A: Acute Oral Toxicity of Pinnatoxin G in Mice. *Toxins* 12(2):87, 2020.
- Spector I, Braet F, Shochet NR, Bubb MR: New anti-actin drugs in the study of the organization and function of the actin cytoskeleton. *Microscopy Research And Technique* 47:18–37, 1999.
- Stewart JE, Marks LJ, Gilgan MW, Pfeiffer E, Zwicke BM: Microbial utilization of the neurotoxin domoic acid: Blue mussels (*Mytilus edulis*) and soft shell clams (*Mya arenaria*) as sources of the microorganisms. *Canadian Journal Of Microbiology* 44: 456–464, 1998.
- Stirling DJ: Survey of historical New Zealand shellfish samples for accumulation of gymnodimine. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 35(4):851-857, 2001.
- Stonik VA, Stonik IV: Toxins Produced by Marine Microorganisms: A Short Review. *Marine and Freshwater Toxins, Toxinology*. Springer, Dordrecht, 3-21, 2016.
- Su Z, Sheets M, Ishida H, Li F, Barry WH: Saxitoxin Blocks L-Type ICa. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 308(1):324–329, 2003.
- Suárez Korsnes M, Hetland DL, Espenes A, Tranulis MA, Aune T: Apoptotic events induced by yessotoxin in myoblast cell lines from rat and mouse. *Toxicology in Vitro* 20(7):1077-1087, 2006.
- Suriyanti SNP, Usup G: First report of the toxigenic *Nitzschia navis-varingica* (*Bacillariophyceae*) isolated from Tebrau Straits, Johor, Malaysia. *Toxicon* 108:257-263, 2015.
- Suzuki T, Mackenzie L, Stirling D, Adamson J: Conversion of pectenotoxin2 to pectenotoxin2 seco acid in the New Zealand scallop, *Pecten novaezelandiae*. *Fisheries science* 67(3):506-510 2001.
- Suzuki T, Igarashi T, Ichimi K, Watai M, Suzuki M, Ogiso E, Yasumoto T: Kinetics of diarrhetic shellfish poisoning toxins, okadaic acid, dinophysistoxin-1, pectenotoxin-6 and yessotoxin in scallops *Patinopecten yessoensis*. *Fisheries Science* 71:948–955, 2005.a.
- Suzuki T, Jin T, Shiota Y, Mitsuya T, Okumura Y, Kamiyama T: Quantification of lipophilic toxins associated with diarrhetic shellfish poisoning in Japanese bivalves by liquid chromatography-mass spectrometry and comparison with mouse bioassay. *Fisheries Science* 71:1370-1378, 2005.b.
- Suzuki T, Walter JA, LeBlanc P, MacKinnon S, Miles CO, Wilkins AL, Munday R,
-

- Beuzenberg V, MacKenzie AL, Jensen DJ, Cooney JM, Quilliam MA: Identification of pectenotoxin-11 as 34S-hydroxypectenotoxin-2, a new pectenotoxin analogue in the toxic dinoflagellate *Dinophysis acuta* from New Zealand. *Chemical Research in Toxicology* 19(2):310-318, 2006.
- Suzuki T: Chemistry, Metabolism, and Chemical Detection Methods of Pectenotoxins. U *Seafood and Freshwater toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*. CRC Press, Boca Raton, 343-359, 2008.
- Svensson S, Särngren A, Förlin L: Mussel blood cells, resistant to the cytotoxic effects of okadaic acid, do not express cell membrane p-glycoprotein activity (multixenobiotic resistance). *Aquatic toxicology* 65(1):27-37, 2003.
- Svensson S, Förlin L: Analysis of the importance of lipid breakdown for elimination of okadaic acid (diarrhetic shellfish toxin) in mussels. *Mytilus edulis*: results from a field study and a laboratory experiment. *Aquatic Toxicology* 66: 405– 418, 2004.
- Swedish Meteorological and Hydrological Institute: *Temporal and spatial distribution of diarrhetic shellfish toxins in blue mussels, Mytilus edulis (L.), on the Swedish west coast, NE Atlantic, 1988-2005*. SMHI, Norrköping, 2007.
- Šarušić G: Mariculture on Croatian islands. *Croatian Journal of Fisheries* 58(3):111-118, 2000.
- Tachibana K, Scheuer PJ, Tsukitani Y, Kikushi H, Engen DV, Clardy J, Gopichand Y, Schmitz FJ: Okadaic acid, a cytotoxic polyether from the marine sponges of the genus *Halichondria*. *Journal of the American Chemical Society* 103:2469–2471, 1981.
- Takahashi E, Yu Q, Eaglesham G, Connell DW, McBroom J, Costanzo S, Shaw GR: Occurrence and seasonal variations of algal toxins in water, phytoplankton and shellfish from North Stradbroke Island, Queensland, Australia. *Marine Environmental Research* 64(4):429-442, 2007.
- Takata Y, Sato S, Viet Ha D, Montojo UM, Lirdwitayaprasit T, Kamolsiripichaiporn S, Kotak Y, Fukuyo Y, Kodama M: Occurrence of domoic acid in tropical bivalves. *Fisheries Science* 75:473–480 2009.
- Takemoto T, Daigo K: Constituents of *Chondria armata*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 6(5):578–580, 1958.
- Taleb H, Vale P, Jaime E, Blaghen M: Study of paralytic shellfish poisoning toxin profile in shellfish from the Mediterranean shore of Morocco. *Toxicon* 39(12):1855-1861, 2001.
- Taleb H, Vale P, Amanhir R, Benhadouch A, Sagou R, Chafik A: First detection of azaspiracids in mussels in north west Africa. *Journal of Shellfish Research* 25(3):1067-1070, 2006.
- Talić S, Škobić D, Dedić A, Nazlić N, Ujević I, Ivanković A, Pavela-Vrančić M: The occurrence of lipophilic toxins in shellfish from the Middle Adriatic Sea. *Toxicon* 186:19–25, 2020.
- Tamele IJ, Timba I, Vasconcelos V. Costa PR: First Report of Pinnatoxins in Bivalve Molluscs from Inhaca Island (South of Mozambique)—South of the Indian Ocean. *Journal of Marine Science and Engineering* 10(9):1215, 2022.

- Tan KS, Ransangan J: Factors influencing the toxicity, detoxification and biotransformation of paralytic shellfish toxins. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 235:1-25, 2015.
- Tan SN, Teng ST, Lim HC, Kotaki Y, Bates SS, Leaw CP, Lim PT: Diatom *Nitzschia navis-varingica* (Bacillariophyceae) and its domoic acid production from the mangrove environments of Malaysia. *Harmful Algae* 60:139-149, 2016.
- Tapia R, Peña F, Arias C: Neurotoxic and synaptic effects of okadaic acid, an inhibitor of protein phosphatases. *Neurochemical Research* 24:1423–1430, 1999.
- Tasker RA: Domoic Acid and Other Amnesic Toxins: Toxicological Profile. In *Marine and Freshwater Toxins, Toxinology*. Springer, Dordrecht, 93-112, 2016.
- Tasker RA: Domoic acid. In *Advances in Neurotoxicology*, volumen 6. Elsevier, Amsterdam, 49-88, 2021.
- Taylor FJR, Harrison PJ: Harmful algal blooms in western Canadian coastal waters. In *Harmful Algal Blooms in the PICES Region of the North Pacific*. PICES, Sydney, Canada, 2002.
- Taylor M, McIntyre L, Ritson M, Stone J, Bronson R, Bitzikos O, Rourke W, Galanis E: Outbreak Investigation Team. Outbreak of Diarrhetic Shellfish Poisoning associated with mussels, British Columbia, Canada. *Marine Drugs* 11(5):1669-1676, 2013.
- Terao K, Ito E, Yanagi T, Yasumoto T: Histopathological studies on experimental marine toxin poisoning. I. Ultrastructural changes in the small intestine and liver of suckling mice induced by dinophysistoxin-1 and pectenotoxin-1. *Toxicon* 24(11-12):1141-1151, 1986.
- Terao K, Ito E, Oarada M, Murata M, Yasumoto T: Histopathological studies on experimental marine toxin poisoning--5. The effects in mice of yessotoxin isolated from *Patinopecten yessoensis* and of a desulfated derivative. *Toxicon* 28(9):1095-1104, 1990.
- Thomas KM, Beach DG, Reeves KL, Gibbs RS, Kerrin ES, McCarron P, Quilliam MA: Hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry for quantitation of paralytic shellfish toxins: Validation and application to reference materials. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 409:5675-5687, 2017.
- Thorel M, Fauchot J, Morelle J, Raimbault V, Le Roy B, Miossec C, Kientz-Bouchart V, Claquin P: Interactive effects of irradiance and temperature on growth and domoic acid production of the toxic diatom *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae). *Harmful Algae* 39:232-241, 2014.
- Thottumkara AP, Parsons WH, Du Bois J: Saxitoxin. *Angewandte Chemie International Edition* 53(23):5760-5784, 2014.
- Tillmann U, Salas R, Jauffrais T, Hess P, Silke J: AZA: the producing organisms – biology and trophic transfer. In *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology, and detection*. CRC Press, Boca Raton, 773–798, 2014.
- Todd ECD: Domoic Acid and Amnesic Shellfish Poisoning - A Review. *Journal of Food Protection* 56(1): 69-83, 1993.

- Tong TTV, Le THH, Tu BM, Le DC: Spatial and seasonal variation of diarrheic shellfish poisoning (DSP) toxins in bivalve mollusks from some coastal regions of Vietnam and assessment of potential health risks. *Marine Pollution Bulletin* 133:911-919, 2018.
- Torgersen T, Sandvik M, Lundve B, Lindegarth S: Profiles and levels of fatty acid esters of okadaic acid group toxins and pectenotoxins during toxin depuration. Part II: Blue mussels (*Mytilus edulis*) and flat oyster (*Ostrea edulis*). *Toxicon* 52:418-427, 2008.
- Trainer VL, Bil, BD: Characterization of a domoic acid binding site from Pacific razor clam. *Aquatic Toxicology* 69:125-132, 2004.
- Trainer VL, Wells ML, Cochlan WP, Trick CG, Bill BD, Baugh KA, Beall BF, Herndon J, Lundholm N: An ecological study of a massive bloom of toxicogenic *Pseudo-nitzschia cuspidata* off the Washington State coast. *Limnology and Oceanography* 54:1461-1474, 2009.
- Trufelli H, Palma P, Famigliani G, Cappiello A: An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* 30(3):491-509, 2010.
- Tubaro A, Sosa S, Carbonatto M, Altinier G, Vita F, Melato M, Satake M, Yasumoto T: Oral and intraperitoneal acute toxicity studies of yessotoxin and homoyessotoxins in mice. *Toxicon* 41(7):783-792, 2003.
- Tubaro A, Sosa S, Bornancin A, Hungerford J: Pharmacology and toxicology of diarrheic shellfish toxins. In *Seafood and Freshwater toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*. CRC Press, Boca Raton, 229-253, 2008.
- Tubaro A, Dell'Ovo V, Sosa S, Florio C: Yessotoxins: A toxicological overview. *Toxicon* 56(2):163-172, 2010.
- Tubaro A, Durando P, Del Favero G, Ansaldi F, Icardi G, Deeds JR, Sosa S: Case definitions for human poisonings postulated to palytoxins exposure. *Toxicon* 57(3):478-495, 2011.
- Turnbull A, Harrison R, McKeown S: Paralytic shellfish poisoning in south eastern Tasmania. *Communicable Diseases Intelligence* 37(1):E52-54, 2013.
- Turner AD, Norton DM, Hatfield RG, Morris S, Reese AR, Algoet M, Lees DN: Refinement and extension of AOAC method 2005.06 to include additional toxins in mussels: single-laboratory validation. *Journal of AOAC International* 92(1):190-207, 2009.
- Turner AD, Hatfield RG, Rapkova-Dhanji M, Norton DM, Algoet M, Lees DN: Single-laboratory validation of a refined AOAC HPLC method 2005.06 for oysters, cockles, and clams in UK shellfish. *Journal of AOAC International* 93(5):1482-1493, 2010.
- Turner AD, Stubbs B, Coates L, Dhanji-Rapkova M, Hatfield RG, Lewis AM, Rowland-Pilgrim S, O'Neil A, Stubbs P, Ross S, Baker C, Algoet M: Variability of paralytic shellfish toxin occurrence and profiles in bivalve molluscs from Great Britain from official control monitoring as determined by pre-column oxidation liquid chromatography and implications for applying immunochemical tests. *Harmful Algae* 31:87-99, 2014.
- Turner AD, Goya AB: Occurrence and profiles of lipophilic toxins in shellfish harvested from Argentina. *Toxicon* 102:32-42, 2015.

- Twiner MJ, Hess P, Dechraoui MY, McMahon T, Samons MS, Satake M, Yasumoto T, Ramsdell JS, Doucette GJ: Cytotoxic and cytoskeletal effects of azaspiracid-1 on mammalian cell lines. *Toxicon* 45(7):891-900, 2005.
- Twiner MJ, Rehmann N, Hess P, Doucette GJ: Azaspiracid shellfish poisoning: a review on the chemistry, ecology, and toxicology with an emphasis on human health impacts. *Marine drugs* 6(2):39-72, 2008.
- Twiner MJ, El-Ladki R, Kilcoyne J, Doucette GJ: Comparative effects of the marine algal toxins azaspiracid-1, -2, and -3 on Jurkat T lymphocyte cells. *Chemical Research In Toxicology* 25:747–754. 2012.a.
- Twiner MJ, Doucette GJ, Rasky A, Huang XP, Roth BL, Sanguinetti MC: Marine algal toxin azaspiracid is an open-state blocker of hERG potassium channels. *Chemical Research In Toxicology* 25(9):1975-1984, 2012.b.
- Uemura D, Chou T, Haino T, Nagatsu A, Fukuzawa S, Zheng SZ, Chen HS: Pinnatoxin A: a toxic amphoteric macrocycle from the Okinawan bivalve *Pinna muricata*. *Journal of the American Chemical Society* 117(3):1155-1156, 1995.
- Ueoka R, Ito A, Izumikawa M, Maeda S, Takagi M, Shin-Ya K, Yoshida M, van Soest RW, Matsunaga S: Isolation of azaspiracid-2 from a marine sponge *Echinoclathria* sp. as a potent cytotoxin. *Toxicon* 53(6):680-684, 2009.
- Ujević I, Ninčević-Gladan Ž, Roje R, Skejić S, Arapov J, Marasović I: Domoic Acid—A New Toxin in the Croatian Adriatic Shellfish Toxin Profile. *Molecules* 15:6835–6849, 2010.
- Ujević I, R Roje, Ninčević-Gladan Ž, Marasović I: First report of Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) in mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from eastern Adriatic Sea (Croatia). *Food control* 25:285-291, 2012.
- Ujević I, Nazlić N, Ninčević-Gladan Ž, Marasović I: Gymnodimine and spirolide in shellfish during DSP toxicity in central and southern Adriatic Sea. In *Proceedings of the 16th International Conference on Harmful Algae*, 176-176, ICHA, 2014.
- Ujević I, Vuletić N, Lušić J, Nazlić N, Kušpilić G: Bioaccumulation of trace metals in mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from Mali Ston Bay during DSP toxicity episodes. *Molecules* 20(7):13031-13040, 2015.
- Ujević I, Roje-Busatto R, Ezgeta-Balić D: Comparison of amnesic, paralytic and lipophilic toxins profiles in cockle (*Acanthocardia tuberculata*) and smooth clam (*Callista chione*) from the central Adriatic Sea (Croatia). *Toxicon* 159:32-37, 2019.
- Vafidis D, Antoniadou C, Chintiroglou C: Population dynamics, allometric relationships and reproductive status of *Microcosmus sabatieri* (Tunicata: ascidiacea) in the Aegean Sea. *Journal of the Marine Biological Association UK* 88(5):1043–1051, 2008.
- Valdiglesias V, Laffon B, Pásaro E, Méndez J: Okadaic acid induces morphological changes, apoptosis and cell cycle alterations in different human cell types. *Journal Of Environmental Monitoring* 13:1831–1840, 2011.
- Vale C, Nicolaou KC, Frederick MO, Gómez-Limia B, Alfonso A, Vieytes MR, Botana LM: Effects of Azaspiracid-1, A Potent Cytotoxic Agent, on Primary Neuronal Cultures. A Structure– Activity Relationship Study. *Journal of medicinal chemistry* 50(2):356-363,

- 2007.
- Vale P, Sampayo MA: Esters of okadaic acid and dinophysistoxin-2 in Portuguese bivalves related to human poisonings. *Toxicon* 37(8):1109-1121, 1999.
- Vale P, Sampayo MAM: Domoic acid in Portuguese shellfish and fish. *Toxicon* 39:893–904, 2001.
- Vale P, Sampayo MA: Pectenotoxin-2 seco acid, 7-epi-pectenotoxin-2 seco acid and pectenotoxin- 2 in shellsh and plankton from Portugal. *Toxicon* 40:979, 2002.
- Vale P: Differential dynamics of dinophysistoxins and pectenotoxins, Part II: Offshore bivalve species. *Toxicon* 47:163–173, 2006.
- Vale P, Botelho MJ, Rodrigues SM, Gomes SS, Sampayo MA: Two decades of marine biotoxin monitoring in bivalves from Portugal (1986–2006): A review of exposure assessment. *Harmful Algae* 7(1):11-25, 2008.
- Vale P: Cycles of marine biotoxins in bivalves and their spatial distribution along the continental Portuguese coast: are trends related to global change already discernible? *Regional Environmental Change* 22(4):116, 2022.
- Van Dolah FM: Marine algal toxins: Origins, health effects, and their increased occurrence. *Environmental Health Perspectives* 108:133–141, 2000.
- Van Egmond HP, Jonker KM, Poelman M, Scherpenisse P, Stern AG, Wezenbeek P, Bergwerff AA, Van den Top HJ: Proficiency studies on the determination of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish. *Food Additives and Contaminants* 21(4):331–340, 2004.
- Van Wagoner RM, Misner I, Tomas CR, Wright JL: Occurrence of 12-methylgymnodimine in a spirolide-producing dinoflagellate *Alexandrium peruvianum* and the biogenetic implications. *Tetrahedron Letters* 52(33):4243-4246, 2011.
- Ventoso P, Pazos AJ, Pérez-Parallé ML, Blanco J, Triviño JC, Sánchez JL: RNA-Seq Transcriptome Profiling of the Queen Scallop (*Aequipecten opercularis*) Digestive Gland after Exposure to Domoic Acid-Producing *Pseudo-nitzschia*. *Toxins* 11:97, 2019.
- Vilariño N, Louzao MC, Abal P, Cagide E, Carrera C, Vieytes MR, Botana LM: Human Poisoning from Marine Toxins: Unknowns for Optimal Consumer Protection. *Toxins* 10(8):324, 2018.
- Villar-González A, Rodríguez-Velasco ML, Ben-Gigirey B, Botana LM: First evidence of spirolides in Spanish shellfish. *Toxicon* 48(8):1068–1074, 2006.
- Villar-González A, Rodríguez-Velasco ML, Gagoo-Martínez A: Determination of lipophilic toxins by LC/MS/MS: Single-laboratory validation. *Journal of AOAC International* 94(3):909-922, 2011.
- Visciano P, Schirone M, Berti M, Milandri A, Tofalo R, Suzzi G: Marine Biotoxins: Occurrence, Toxicity, Regulatory Limits and Reference Methods. *Front Microbiol* 7:1051, 2016.
- Walter JA, Leek DM, Falk M: NMR study of the protonation of domoic acid. *Canadian Journal*

- of Chemistry* 70(4):1156-1161, 1992.
- Walz PM, DL Garrison, WM Graham, MA Cattey, RS Tjeerdema, MW Silver: Domoic Acid-Producing Diatom Blooms in Monterey Bay, California: 1991 -1993. *Natural Toxins* 2:271-279, 1994.
- Wang D: Neurotoxins from marine dinoflagellates: a brief review. *Marine Drugs* 6:349–371, 2008.
- Wang J, Salata JJ, Bennett PB: Saxitoxin is a gating modifier of HERG K<sup>+</sup> channels. *The Journal of General Physiology* 121:583–598, 2003.
- Wang J, Wang YY, Lin L, Gao Y, Hong HS, Wang DZ: Quantitative proteomic analysis of okadaic acid treated mouse small intestines reveals differentially expressed proteins involved in diarrhetic shellfish poisoning. *Journal of Proteomics* 75(7):2038-2052, 2012.
- Wenzl T, Haedrich J, Schaechtele A, Robouch P, Stroka J: *Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food*. Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2016.
- Wiese M, D'Agostino PM, Mihali TK: Neurotoxic alkaloids: saxitoxin and its analogs. *Marine Drugs* 8(7):2185–2211, 2010.
- Wilkins A, Rehmann N, Torgersen T, Rundberget T, Keogh M, Petersen D, Hess P, Rise F, Miles CO: Identification of fatty acid esters of pectenotoxin-2 seco acid in blue mussels (*Mytilus edulis*) from Ireland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:5672–5678, 2006.
- Wu H, Yao J, Guo M, Tan Z, Zhou D, Zhai Y: Distribution of marine lipophilic toxins in shellfish products collected from the Chinese market. *Marine Drugs* 13(7):4281-4295, 2015.
- Wu X, Hou L, Lin X, Xie Z: Application of novel nanomaterials for chemo-and biosensing of algal toxins in shellfish and water. In *Novel Nanomaterials for Biomedical, Environmental and Energy Applications*. Elsevier, Amsterdam, 353-414, 2019.
- Yao J, Tan Z, Zhou D, Guo M, Xing L, Yang S: Determination of azaspiracid-1 in shellfishes by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Se pu= Chinese Journal of Chromatography* 28(4):363-367, 2010.
- Yasumoto T, Oshima Y, Yamaguchi M: Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the Tohoku district. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish* 44:1249–1255, 1978.
- Yasumoto T, Murata M, Oshima Y, Sano M, Matsumoto GK, Clardy J: Diarrhetic shellfish toxins. *Tetrahedron* 41(6):1019-1025, 1985.
- Yasumoto T, Takizawa A: Fluorometric measurement of yessotoxins in shellfish by high-pressure liquid chromatography. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 61(10):1775-1777, 1997.
- Yoon MY, Kim YZ: Acute toxicity of pectenotoxin 2 and its effects on hepatic metabolizing enzyme system in mice. *Korean Journal of Toxicology* 13(3);183-186, 1997.



- Yoshida T, Sako Y, Uchida A, Kakutani T, Arakawa O, Noguchi T, Ishida Y: Purification and characterization of sulfotransferase specific to O-22 of 11-hydroxy saxitoxin from the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (dinophyceae). *Fisheries science* 68(3):634-642, 2002.
- Yu KN, Kwong RW, Wang WX, Lam PK: Biokinetics of paralytic shellfish toxins in the green-lipped mussel, *Perna viridis*. *Marine pollution bulletin* 54(7):1068-1071. 2007.
- Zaman L, Arakawa O, Shimosu A, Yoshio O, Nishio S, Shida Y, Noguchi T: Two new isomers of domoic acid from a red alga, *Chondria armata*. *Toxicon* 35(2):205-212, 1997.
- Zendong Z, McCarron P, Herrenknecht C, Sibat M, Amzil Z, Cole RB, Hess P: High resolution mass spectrometry for quantitative analysis and untargeted screening of algal toxins in mussels and passive samplers. *Journal of Chromatography A* 1416:10-21, 2015.
- Zepeda RJ, Candiracci M, Lobos, N, Lux S, Miranda HF: Chronic toxicity study of neosaxitoxin in rats. *Marine Drugs* 12:5055–5071, 2014.
- Zhang C: Interannual and Decadal Changes in Harmful Algal Blooms in the Coastal Waters of Fujian, China. *Toxins* 14(9):578, 2022.
- Zheng R, Lin S, Yang Y, Fu W: Variability and profiles of lipophilic marine toxins in shellfish from southeastern China in 2017-2020. *Toxicon* 201:37-45, 2021.
- Zhou W, Yang S, Wang PG: Matrix effects and application of matrix effect factor. *Bioanalysis* 9(23):1839-1844, 2017.
- Zhou ZH, Komiyama M, Terao K, Shimada Y: Effects of pectenotoxin-1 on liver cells in vitro. *Natural Toxins* 2(3):132-135, 1994.
- Zhu Z, Qu P, Fu F, Tennenbaum N, Tatters AO, Hutchins DA: Understanding the blob bloom: Warming increases toxicity and abundance of the harmful bloom diatom *Pseudo-nitzschia* in California coastal waters. *Harmful Algae* 67:36-43, 2017.
- Zingone A, Escalera L, Aligizaki K, Fernández-Tejedor M, Ismael A, Montresor M, Mozetič P, Taş S, Totti C: Toxic marine microalgae and noxious blooms in the Mediterranean Sea: A contribution to the Global HAB Status Report. *Harmful Algae* 102:101843, 2021.
- Zurhelle C, Nieva J, Tillmann U, Harder T, Krock B, Tebben J: Identification of novel gymnodimines and spirolides from the marine dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii*. *Marine drugs* 16(11):446, 2018.

## **8. PRILOZI**

**Prilog 1** Gradijent eluiranja LC-FLD metode za određivanje PST

Vrijeme/Min.	Udio mobilne faze B/%
0,0	0
5,0	5
9,0	70
11,0	5
15,0	0

**Prilog 2** Gradijent eluiranja LC-MS/MS metode za određivanje LT

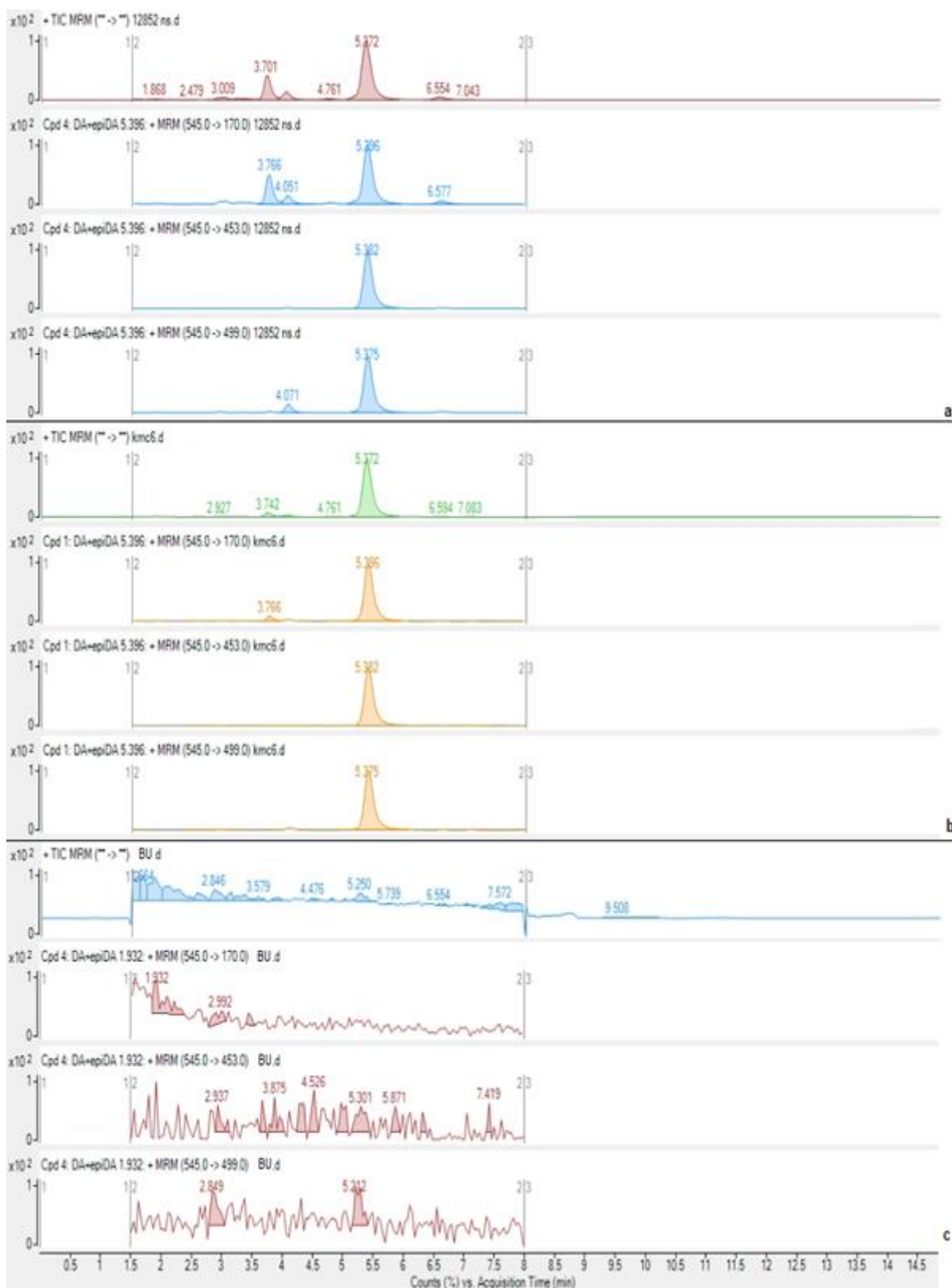
Vrijeme/Min.	Udio mobilne faze B/%
0,0	30
0,5	30
8,0	90
10,0	90
10,1	100
12,1	100
13,0	30
15,0	30

**Prilog 3** Podaci o prehrambenim navikama koji se odnose na konzumaciju školjkaša u RH u 2011. i 2012. godini (HAH, 2011.-2012.)

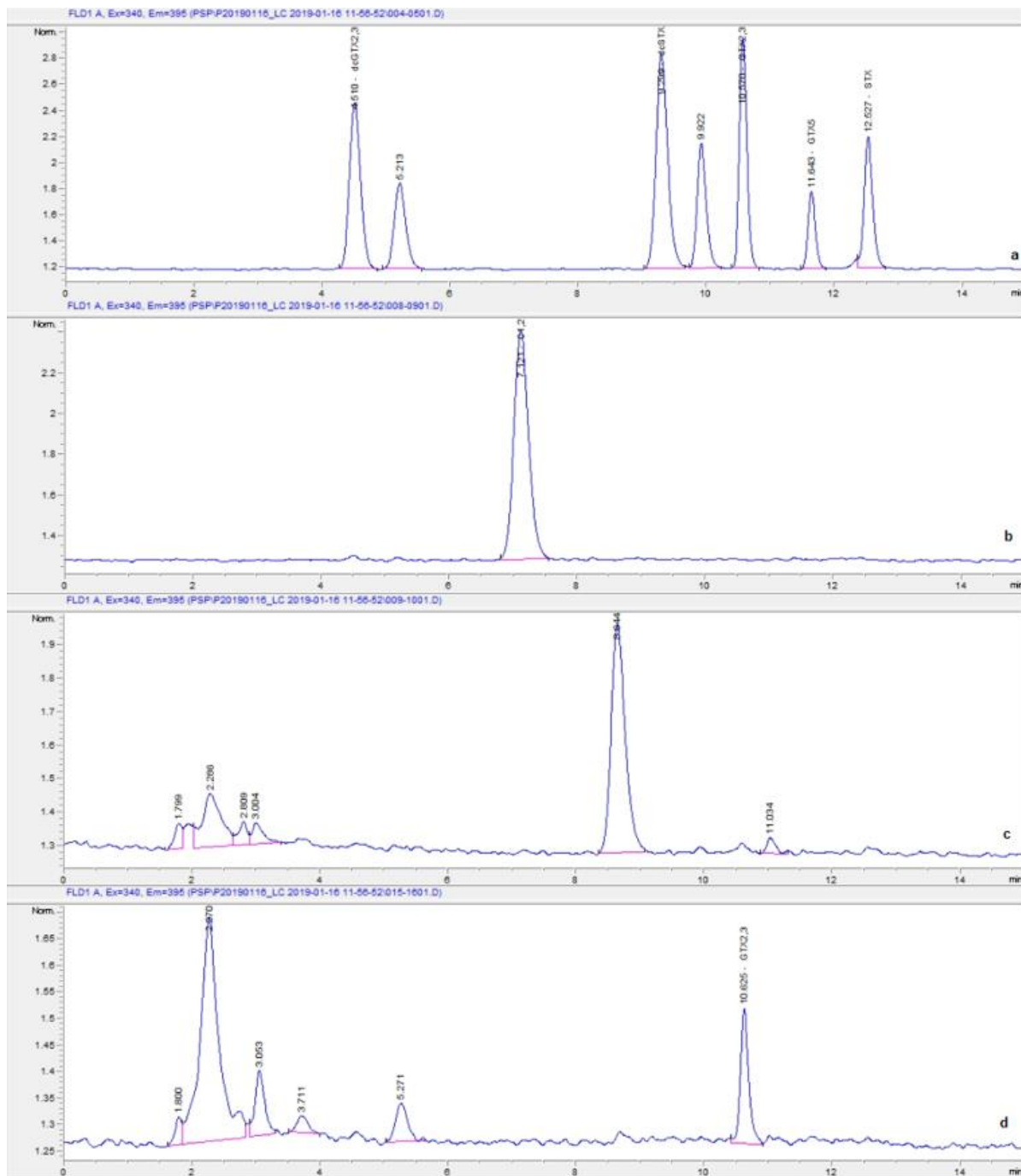
Godina istraživanja	Opis obroka	Količina u kuhanom jelu <sup>a</sup> /g	t.m./kg
2012.	Dagnje u umaku	87,27	n.p.
2012.	Rižoto od dagnji	32,49	71
2012.	Dagnje u umaku	29,09	94
2012.	Rižoto s plodovima mora	11,06	70
2012.	Rižoto s plodovima mora	15,85	75
2012.	Dagnje s vinom	77,01	89
2012.	Dagnje s vinom	64,17	80
2012.	Rižoto s plodovima mora	12,90	98
2011.	Rižoto s plodovima mora	9,22	100
2011.	Rižoto s plodovima mora	16,59	87
2011.	Rižoto s plodovima mora	3,69	90
2012.	Plodovi mora dinstani	16,61	60
2012.	Rižoto s plodovima mora	18,43	60
2012.	Dagnje u umaku	87,27	88

n.p. nije primjenjivo; <sup>a</sup>Količina termički obrađenih školjkaša odgovara količini sirovih školjkaša, očišćenih od ljuštore (Bognár, 2002).

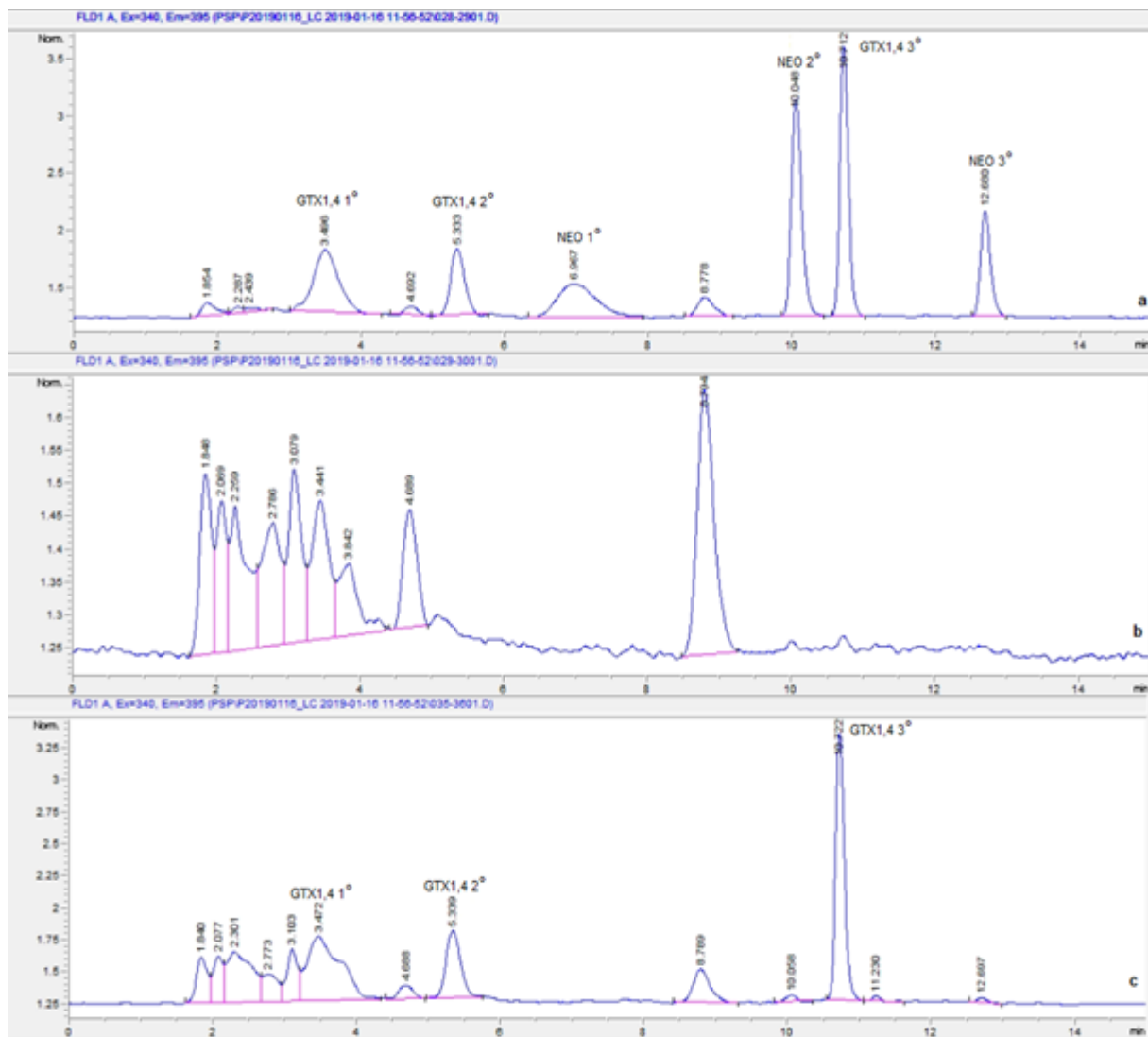
**Prilog 4** TIC uzorka kapica koji sadrži 809,35  $\mu\text{gkg}^{-1}$  DA (a); slijepog uzorka obogaćenog DA u koncentraciji od 800  $\mu\text{gkg}^{-1}$ (b); slijepog uzorka (c); RT DA + *epi*-DA = 5,3 min



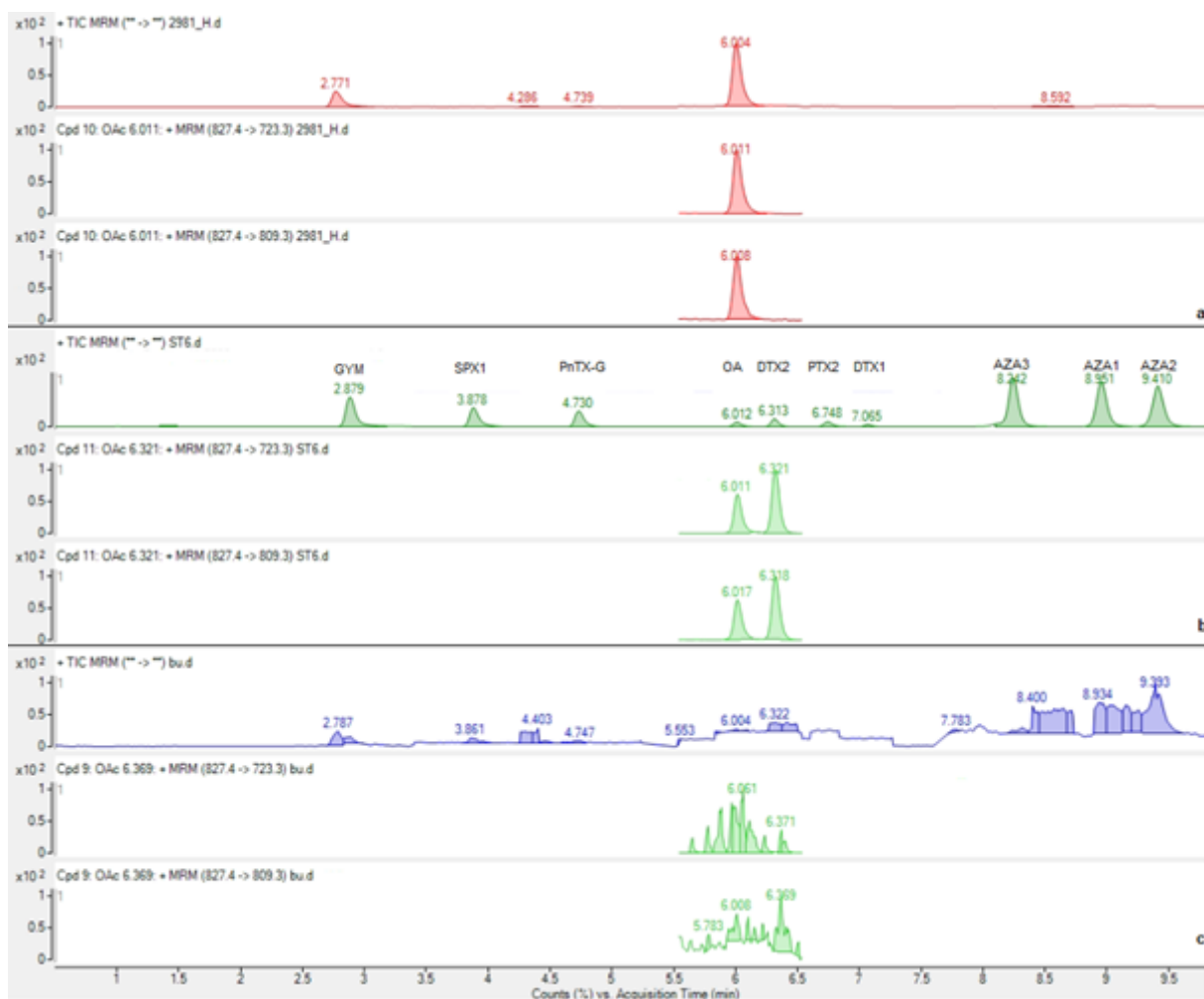
**Prilog 5** Kromatogrami nakon peroksidne oksidacije otopine za kalibraciju koja sadrži nehidroksilirane PST (GTX2,3, dcGTX2,3, GTX5 400  $\mu\text{gkg}^{-1}$ , STX, dcSTX 500  $\mu\text{gkg}^{-1}$ , C1,2 1400  $\mu\text{gkg}^{-1}$ ) (a i b); slijepog uzorka kamenica (c); uzorka dagnji koji sadrži 106,40  $\mu\text{gkg}^{-1}$  GTX2,3 (d)

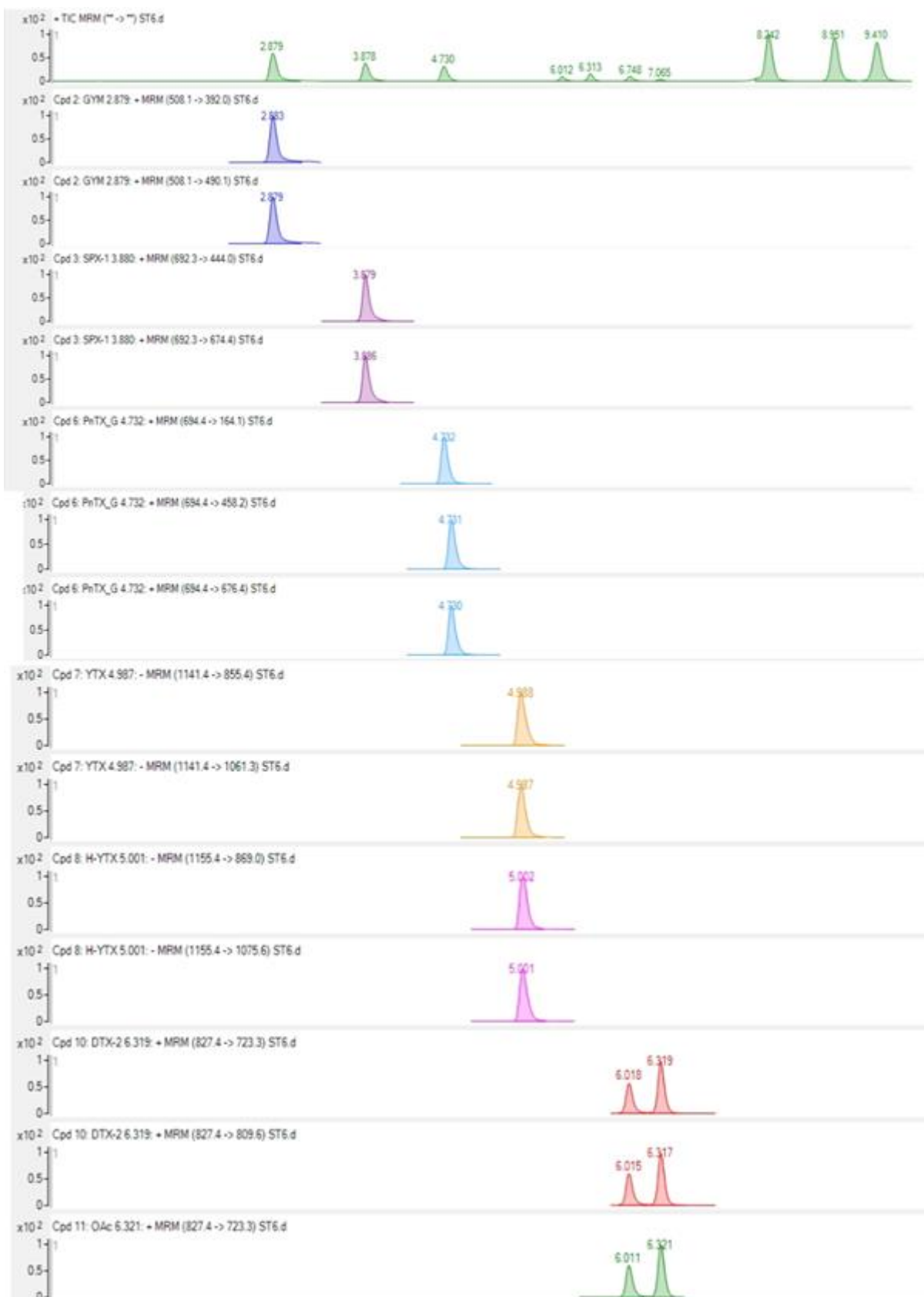


**Prilog 6** Kromatogrami nakon perjodatne oksidacije otopine za kalibraciju koja sadrži hidroksilirane PST (GTX1,4, NEO 2 mgkg<sup>-1</sup>) (a); slijepog uzorka kamenica (b); uzorka dagnji koji sadrži 750,34 µgkg<sup>-1</sup> GTX1,4 nakon pročišćavanja na C18 kolonicama (c); 1° primarni oksidacijski produkt; 2° sekundarni oksidacijski produkt; 3° tercijarni oksidacijski produkt

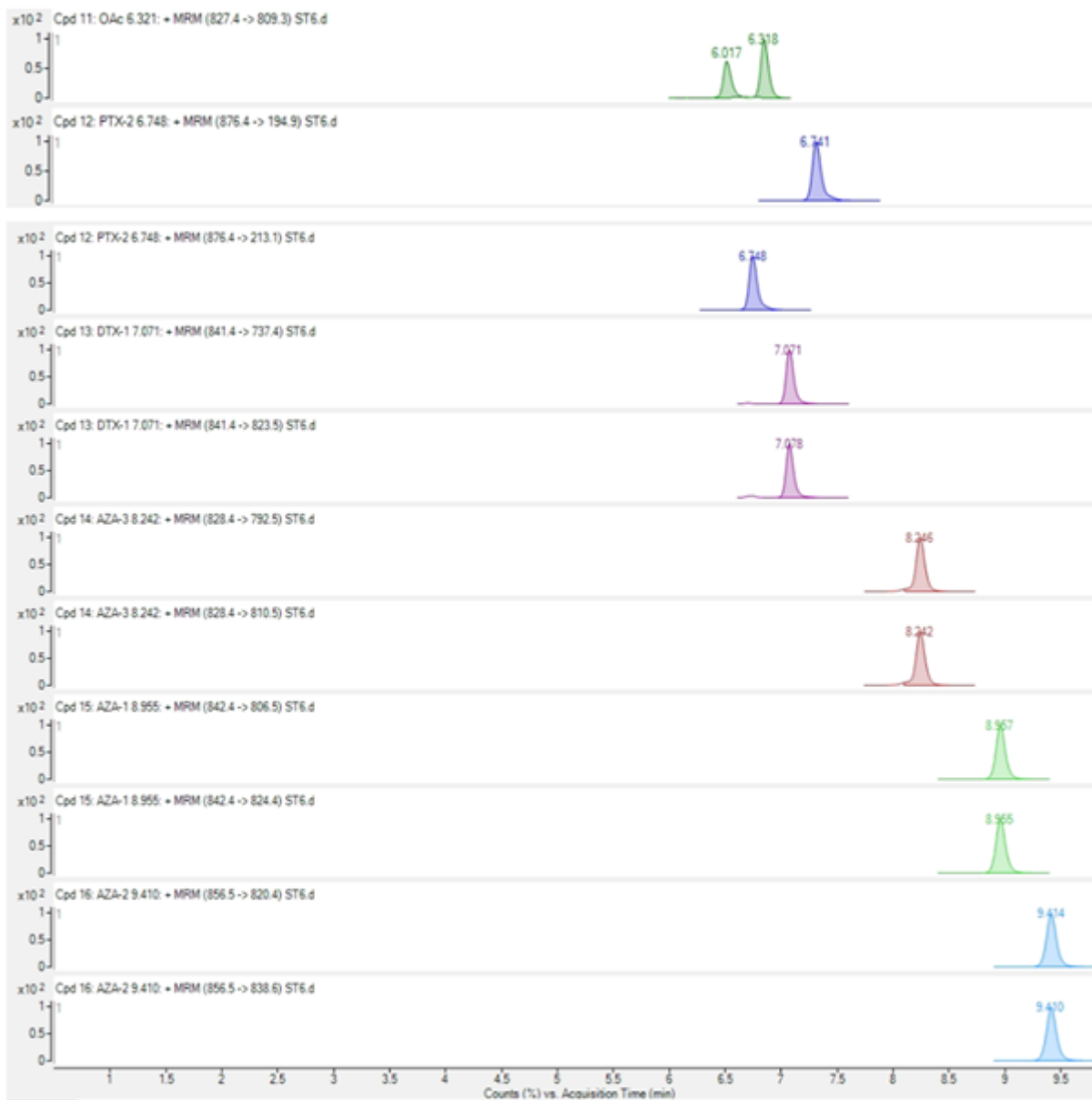


**Prilog 7** TIC uzorka dagnji koji sadrži 347,78  $\mu\text{gkg}^{-1}$  OA (a); kalibracijskog standarda u matriksu sa koncentracijom OA skupine od 600  $\mu\text{gkg}^{-1}$  (b); slijepog uzorka dagnji (c); RT OA = 6,0 min.



**Prilog 8** TIC kalibracijskog standarda u matriksu sa koncentracijom OA skupine od  $600 \mu\text{gkg}^{-1}$ , AZA i CI  $300 \mu\text{gkg}^{-1}$ , YTX  $1,5 \text{ mgkg}^{-1}$ 





### Prilog 9 Proširena mjerna nesigurnost metode za određivanje DA

Analit	Koncentracijska razina/ $\mu\text{gkg}^{-1}$	<i>U</i> %
DA	50,0	23,9
	150,0	18,2
	250,0	17,4
	375,0	17,0
	500,0	16,9
	750,0	16,7
	1000,0	16,7

**Prilog 10** Proširena mjerna nesigurnost metode za određivanje PST

Analit	Koncentracijska razina/ $\mu\text{gkg}^{-1}$	<i>U</i> /%
STX	120,0	17,2
	150,0	15,5
	180,0	15,4
	210,0	16,6
	240,0	18,0
dcGTX2,3	120,0	20,6
	150,0	19,8
	180,0	20,6
	210,0	21,8
	240,0	22,8
dcSTX	120,0	16,1
	150,0	15,4
	180,0	15,5
	210,0	15,9
	240,0	16,4
GTX2,3	120,0	20,2
	150,0	16,1
	180,0	13,3
	210,0	11,6
	240,0	10,5
GTX5	120,0	19,6
	150,0	16,1
	180,0	14,2
	210,0	13,4
	240,0	13,2
C1,2	120,0	35,1
	150,0	32,2
	180,0	30,8
	210,0	29,7
	240,0	29,1
GTX1,4	120,0	25,4
	150,0	22,8
	180,0	21,2
	210,0	20,2
	240,0	19,6
	370,0	18,7
	500,0	18,4
NEO	120,0	36,1
	150,0	29,4
	180,0	25,4

	210,0	22,8
	240,0	21,0

**Prilog 11** Proširena mjerna nesigurnost metode za određivanje LT

Analit	Koncentracijska razina/ $\mu\text{gkg}^{-1}$	<i>U</i> %
OA	45,0	21,8
	56,5	17,3
	68,0	14,8
	79,0	13,4
	90,0	12,7
	295,0	13,6
	500,0	14,5
DTX1	45,0	15,1
	56,5	13,6
	68,0	13,2
	79,0	13,0
	90,0	13,2
DTX2	45,0	14,4
	56,5	13,4
	68,0	13,0
	79,0	13,2
	90,0	13,7
PTX2	45,0	33,8
	56,5	32,1
	68,0	31,2
	79,0	30,8
	90,0	30,6
YTX	937,5	18,7
	1406,3	17,0
	1875,0	16,4
	2344,0	16,5
	2813,0	16,6
Homo YTX	937,5	20,0
	1406,3	18,2
	1875,0	17,5
	2344,0	17,4
	2813,0	17,4
AZA1	40,0	21,7
	50,0	16,7
	60,0	14,9
	70,0	14,9
	80,0	15,9

**8. Prilozi**

AZA2	40,0	13,5
	50,0	13,6
	60,0	14,3
	70,0	15,0
	80,0	15,6
AZA3	40,0	17,7
	50,0	17,2
	60,0	17,7
	70,0	18,6
	80,0	19,5
SPX1	25,0	27,4
	62,5	15,4
	100,0	14,4
	150,0	14,8
	200,0	15,1
	250,0	15,3
	300,0	15,5
GYM	25,0	15,8
	62,5	8,8
	100,0	7,4
	150,0	6,8
	200,0	6,5
	250,0	6,4
	300,0	6,3
PnTX-G	25,0	29,4
	62,5	20,5
	100,0	20,2
	150,0	20,3
	200,0	20,4
	250,0	20,5
	300,0	20,6