

## PRODHIMI DHE TOKSICITETI I ACIDIT DOMOIK NË MIDHJEN E BUTRINTIT

\*BREGAJ M.<sup>1</sup>, KONI M.<sup>2</sup>, PANARITI E.<sup>3</sup>, KONI E.<sup>1</sup>, DUMISHLLARI I.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituti i Sigurisë Ushqimore dhe Veterinarisë, Departamenti i Mikrobiologjisë Ushqimore

<sup>2</sup>Universiteti i Tiranës, Fakulteti i Shkencave të Natyrës, Departamenti i Biologjisë

<sup>3</sup>Ministria e Bujqësisë Zhvillimit Rural dhe Administrimit të Ujërave

e-mail: marsbregaj@yahoo.com

### Përmbledhje

Një nga sindromat më të mëdha të helmimit nga prodhimet e detit është helmimi amnezik bivalv. Në midhje, toksina përgjegjëse për këtë sindromë është acidi domoik DA, një aminoacid trikarboksilik. Ai prodhohet nga një diatome *Pseudonitzschia spp.* Ky studim është kryer gjatë 2012 në Lagunën e Butrintit, e lokalizuar në Jug të Shqipërisë dhe njihet për prodhimin e midhjes *M.galloprovincialis*. Kampionët janë marrë cdo dy javë në tre pika të Lagunës së Butrintit. Për të vecuar acidin domoik në 72 kampione *M. galloprovincialis* është përdorur metoda kimike me aparaturën HPLC DAD. LC system-Agilent technologies 1200, me kolonë Zorbax C<sub>18</sub> 5µm (25 x 4.6mm), pompë kuaternare, injektim automatik të lidhur me termostat +4 °C. Koha e retonionit të DA është e qëndrueshme dhe në mënyrë të vazhdueshme e riprodhueshme. Eshtë përgatitur një kurbë me standardet e DA në përqëndrimet 0.4-10µg/ml. Të dhënat për kurbën e kalibrimit janë paraqitur sipas analizës së regresionit linear. R<sup>2</sup> në çdo kurbë ka qenë >0.99. LOQ është 2 mg/kg. Rifitimi varion 95-108 %. Rezultatet laboratorike tregojnë se përqëndrimi i DA varion 0,2 mg/kg në 3.76 mg/kg. Përqëndrimi i *Pseudonitzschia spp.* analizuar në të njëjtën kohë shkon nga 120 qel/L në 13335276 qel/L.

### Abstract

One of the major seafood poisoning syndrome is Amnesic Shellfish Poisoning . The toxin in mussel responsible for this syndrome is domoic acid (DA), a tricarboxylic amino acid. It was produced by a diatome *Pseudo-nitzschia spp.* This study is done during 2012 in Butrinti Lagoon, which is located in South of Albania and it is known for mussel aquaculture (*M.galloprovincialis*) production. Samples were taken every two weeks in three points of Butrinti Lagoon. We have used the chemical method with HPLC-DAD to separate domoic acid in 72 samples of *M. galloprovincialis*. LC system-Agilent technologies 1200, fitted with Zorbax C<sub>18</sub> 5µm (25 x 4.6mm), quaternary pump, and injection with an automatic injector cooled with thermostat +4 °C. Retention time of DA is stable and consistently reproducible. A standard curve of DA is prepared in the range 0.4-10µg/ml. Data for the calibration curves is subjected to linear regression analysis. The correlation coefficient in every curve was >0.99. LOQ is 2 mg/kg. Recovery varies between 95-108 %. The laboratory results indicate that the concentration of domoic acid varies between 0,2 mg/kg to 3.76 mg/kg. The concentration of *Pseudonitzschia spp.* analyzing in the same time oscillates between 120 cell/L to 13335276 cell/L.

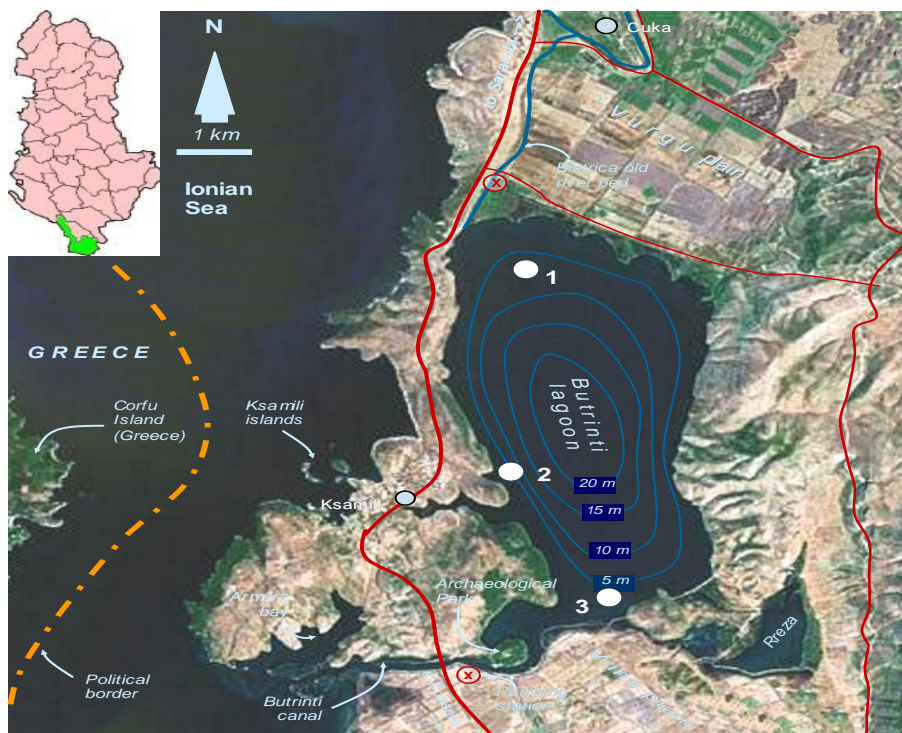
**Fjalëkyçe:** Acid domoik, *M.galloprovincialis*, *Pseudo-nitzschia spp.*, HPLC.

## Hyrje

Laguna e Butrintit (Fig.1) me një sipërfaqe 16 km<sup>2</sup>, thellësi maksimale 21.4 m dhe mesatare thellësie 14m, është karakterizuar si një liqen tipik meromitik; (Miho, 1994). Në Veri ai lidhet me lumin e Bisticës dhe në pjesën jugperëndimore lidhet me Detin Jon nëpërmjet kanalit të Vivarit. Liqeni i Butrintit ka një kapacitet prodhimi 4500 ton midhje/vit. Monitorimi i molusqeve dhe zonave ujore të rritjes së tyre për kriteret kimike, mikrobiologjike, biotoksinat dhe algat potencialisht toksike është një nga qëllimet e Institutit të Sigurisë Ushqimore dhe Veterinarisë (ISUV). Eksporti i midhjes kushtëzohet ndër të tjera nga pranina e toksinave algale si PSP (Paralytic Shellfish Poisoning), DSP (Diarrheic Shellfish Poisoning) si dhe ASP (Amnesic Shellfish Poisoning) në nivele me të ulëta se ato të vendosura në Rregulloren e BE Nr.853/2004.

Midhja që kultivohet në liqenin e Butrintit është midhja e Mesdheut *M. galloprovincialis*. Kjo midhje është një organizëm i fuqishëm filtrues. Rreth 300 lloje algash shkaktojnë ngjyrimet e ujit (*red tides*), kurse rreth 40 lloje prodhojnë helme, që nëpërmjet molusqeve dhe peshqve mund të kalojnë deri tek njeriu (Hallegraef *et al.* 1995).

Në Nëntor 1987 në Kanada u shfaqën 153 raste të intoksikimit akut që erdhi si rezultat i ngrënies së molusqeve toksik gjatë një lulëzimi të diatomeve. Sindromat përfshinin diare dhe vjellje dhe në disa raste shoqëroheshin me humbje kujtese, dizorientim dhe në rastet me ekstreme deri në koma. Doza letale 1-2 mg. Për këtë fenomen që ndodhi në molusqe u propozua termi Amnesic Shellfish Poisoning (Helmimi amnezik nga bivalvët). Më vonë u zbulua që kjo toksinë ishte acidi domoik një aminoacid neurotoksik. (Bates *et al.*, 1989), (Bates, 1998). Emri i acidit domoik vjen nga izolimi i tij për herë të parë në makroalgën e kuqe të Japonisë *Chondria armata domoi* (Ravn, 1995). Acidi domoik ka dhe izomerët e tij: acidi izodomoik E, acidi izodomoik D, acidi izodomoik F të cilët janë gjetur në *Chondria armata*. Hulumtimet mbi mekanizmin e veprimit të acidit domoik tregojnë se ky amino acid është analog me acidin glutamik dhe acidin kainik. Ai vepron mbi receptorët e acidit glutamik, një prej neurotransmetuesve më të mëdhenj të sistemit nervor qendror. Ky mekanizëm i veprimit në nivel sinapsesh shpjegon pjesërisht efektet neuro-toksike të acidit domoik. Mekanizmi i veprimit të acidit domoik është i njohur aktualisht në nivel të receptorëve të aminoacideve ngacmues dhe të transmetimit sinaptik. Simptomatologjia nga ASP nuk limitohet vetëm në sistemin nervor por ajo ndikon edhe në aparatit tretës. Në krahasim me toksinat PSP, acidi domoik



është një neurotoxin relativisht e butë (Todd ECD). Prodhuesja më e madhe e acidit domoik është diatomeja penate *Pseudo-nitzschia pungens* f. *multiseries* (= *Nitzschia pungens* f.

**Figura 1.** Harta e Lagunës së Butrintit, Sarandë me tre pikat e kampionimit (rrathët e bardhë 1-3), e modifikuar nga Google Earth, 2008

*multiseries*) (Hallegraeff, 1995). *Pseudo-nitzschia pungens* dhe *Pseudo-nitzschia multiseries* (syn. *P. Pungens* f. *multiseries*) tani konsiderohen specie të ndara për shkak të ndryshimeve të tyre gjenetike dhe morfologjike (Wright and Quilliam, 1995). Në Shqipëri ashtu si dhe në shtetet anëtare të BE vlera maksimale e lejuar për konsum të molusqeve bivalvë është 20 mg/kg ASP (Reg CEE 853/2004). Nëse kampionët përmbajnë më shumë se 20 mg DA/kg molusqet nuk duhen nxjerr në treg për konsum human dhe duhen eliminuar (EC, 2002b).

### Materiali dhe metodat

Ky studim është kryer gjatë vitit 2012. Kampionët e molusqeve janë marrë në tre stacione të ndryshme në lagunë (Fig.1), që përfaqësojnë mikromjedise të veçanta të saj, të përcaktuara paraprakisht në bazë të kushteve gjeomorfologjike të fundit të detit ose të lagunës, të burimeve të mundshme të ndotjeve dhe të korrenteve të ujit dhe të ndikimit të tyre.

Këto stacione janë:

stacioni BM1 Veri (V) - Manastiri Farm numër 9 me koordinata N 39° 48' 33.2'' E 20° 1' 0.88'';

stacioni BM1 Perëndim (P) - Pallavraqi i vogël Farm numër 38 me koordinata N 39° 46' 7.23'' E 20° 1' 0.34'';

stacioni BM1 Jug (J) - Butrinti Farm numër 60 me koordinata N 39°45' 4.08'' E 20° 1' 9.69''.

Gjatë kësaj periudhe janë kampionuar 72 kampione *M.galloprovincialis* për praninë e acidit domoik me një frekuencë 2 herë në muaj.

Për përcaktimin e biotoksinave merren rreth 4 kg molusk. Kampionët vendosen në bokset frigoriferike, që shërbejnë për transport. Temperatura e transportit është 4-8°C. Metoda e përdorur është metodë kimike me HPLC DAD (CEN. 2008-06) sipas rregullores së BE 2074/2005.

#### Përgatitja e kampionëve:

Peshohen 4 gr nga kampioni i homogjenizuar i midhjeve. I shtohen homogjenizantit 16 ml solucion metanol: ujë (50:50) dhe ekstrahohen në një homogjenizator me imersion për 3 min në 10.000 rrot/min. (CEN. 2008-06) Centrifugohet ekstrakti në 3000 rpm për 10 min. Merren nga faza e lëngshme rreth 2 ml dhe transferohen në njësin e filtrimit 0,45 um.

#### Kushtet kromatografike:

**Tabela 1.** Kushtet kromatografike të Acidit domoik

Kolona	Zorbax C <sub>18</sub> 5µm (25 x 4.6mm)
Fluksi	1 mL/min
Temperatura	40 °C
Volumi i injektimit	20 µL
Detektor DAD	242 nm

#### Rezultatet dhe diskutime

Prania e toksinave të grupit të DSP në Lagunën e Butrintit gjatë vitit 2012 është vlerësuar nga analizimi i 72 kampionëve *M. galloprovincialis* në të tre stacionet e lagunës.

Ndërtohet një kurbë kalibrimi të tipit  $y=ax+b$ , ku

$y$ =area e pikut të acidit domoik

$x$ =përqëndrimi i solucionit bazë të referimit në ug/ml

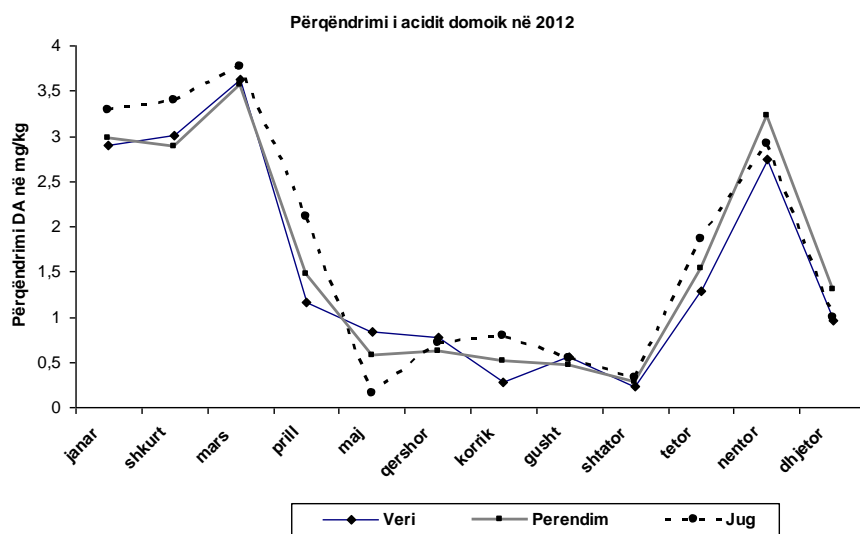
$a$ =koeficienti angolar

$b$ =ndërprerja në boshtin e  $y$

Përqëndrimi  $C$  i acidit domoik i shprehur në µg acid domoik për g tul, është llogaritur sipas ekuacionit të mëposhtëm:

$$C (\mu\text{g DA+EA/g}) = \frac{\mu\text{g DA+EA/ mL ekstrakt të injektuar} \times V_t (\text{mL}) \times D}{W (\text{g})}$$





**Figura 4.** Ecuria e acidit domoik gjatë vitit 2012 në tre stacionet e Lagunës së Butrintit.

Në figurën 4 është paraqitur në mënyrë grafike ecuria e acidit domoik (mg/kg) gjatë vitit 2012 për të tre stacionet (veri, perendim, jug). Sic duket dhe nga paraqitja grafike të tre stacionet kanë pothuajse ecuri të njëjtë ndërmjet tyre. Vlerat më të larta acidi domoik i ka kapur gjatë muajve Janar-Prill si dhe Tetor - Nëntor. Për stacionin e veriut vlerat variojnë nga 0.24 mg/kg në 3.63 mg/kg. Stacioni i perëndimit kap vlera nga 0.28 mg/kg në 3.56 mg/kg dhe për stacionin e jugut vlerat variojnë nga 0.16 në 3.76 mg/kg. Maksimumi i parë i përqëndrimit arrihet në Mars me 3.76 mg/kg në stacionin e Jugut, ndërsa maksimumi i dytë është arritur në nëntor me 3.23 mg/kg në stacionin e perëndimit.

Vlerat e *Pseudonitzchia spp* variojnë nga 120 qel/L në 13335276 qel/L. Pavarësisht vlerave të larta të *Pseudonitzchia spp* vlerat e acidit domoik nuk e kalojnë 5mg/kg DA. Nga të dhënat ndër vite në kampionët e analizuar në Lagunën e Butrintit nga 2002 në 2007 vlerat e DA kanë qenë në përqëndrime <2 mg/kg. Në shkurt të 2008 DA ka arritur përqëndrimin 11.75 mg/kg (Bregaj *et al.* 2008), Vlerat më të larta dhe mbi limitin ligjor DA i ka arritur në Mars të vitit 2009 (Bregaj *et al.* 2012), (Bush *et al.* 2010) duke rënë përsëri në vlera < 2mg/kg DA në 2010.

Nga të dhënat e marra nga studimet e kryera gjatë 1991-2002 në Evropë ka patur vlera nga më të ndryshmet të përqëndrimit të DA. Në shtete të tilla si Belgjika, Italia, Danimarka pavarësisht vlerave shumë të larta të algave potencialisht toksike, vlerat e acidit domoik qenë shumë të papërfillshme (EU-NRL 1996). Në Angli dy piqet e toksicitetit të kësaj toksine kanë qenë në qershor 1999 dhe në shtator të 2002 mjaft zona të peshkimit janë mbyllur si rezultat i vlerave të larta të acidit domoik, vlera këto që i kalojnë limitet e lejuara për këtë toksinë (Hinder *et al.* 2011). Nivele të larta të DA janë kapur

dhe në Irlandë në dhjetor 1996 vlera këto që arritën në 3000ug/g DA. Vlera rreth 27-50 ug/g DA janë kapur në molusqet e Francës në Maj 2000 (EU-NRL,2000).

Nga të gjitha këto të dhëna mund të themi se jo domosdoshmërisht vlerat e larta të *Pseudonitzchia spp.* shoqërohen me vlera të larta të DA dhe në raste të përqëndrimeve të larta të DA jo gjithmonë është vërejtur një numër i madh qel/L të *Pseudonitzchia spp.* Në Shqipëri deri më tani nuk ka patur raportime për raste të intoksikimit të njerëzve nga kjo toksinë.

### **Përfundime**

Gjatë vitit 2012 në Lagunën e Butrintit u analizuan gjithsej 72 kampione *Mytilus galloprovincialis* për praninë e acidit domoik.

Nga analizimi i kampioneve të *Mytilus galloprovincialis* në HPLC përqëndrimi i acidit domoik në të tre stacionet e lagunës pati dy maksimume të përqëndrimit të tij, njëri në Mars dhe tjetri në Nëntor.

Jo gjithmonë vlerat e larta të përqëndrimit të *Pseudonitzchia spp.* shoqërohen me vlera të larta të acidit domoik.

Gjithmonë në rastet pozitive (për vlera më të mëdha se 20 mg/kg acid domoik) duhet të bëhet njoftimi urgjent i autoriteteve përkatëse, në mënyrë që ata mund të miratojnë masa përkatëse si, mbyllja e zonës dhe moslejimi i daljes në treg të këtyre molusqeve.

### **Literatura**

Bates S.S. (1998): Ecophysiology and metabolism of ASP toxin production. Physiological ecology of harmful algal blooms. Heidelberg: Springer-Verlag 405-426

Bates S.S., Bird C.J., de Freitas A.S.W., Foxall, R., Gilgan M.W., Hanic L.A., Johnson G.E., McCulloch A.W., Odense P., Pocklington R.G., Quilliam M.A., Sim P.G., Smith J.C., Subba Rao D.V., Todd E.C.D., Walter J.A. & Wright J.L.C. (1989): Pennate diatom *Nitzschia pungens* as the primary source of domoic acid, a toxin in shellfish from Eastern Prince Edward Island, Canada. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 46: 1203-1215

Bregaj M., Koni M., Panariti E., Koni E., Bushati M., (2012): Relationship between toxin levels and abundance of possible causative phytoplankton species in Butrinti Lagoon. Proceedings në konferencën ndërkombëtare :International Conference of Ecosystem (ICE 2012) 195-201

Bregaj M., Koni E., Bushati M., (2008): Rritja e *Pseudonitzchia seriata* dhe prodhimi i acidit domoik në liqenin e Butrintit gjatë vitit 2002. Proceedings në konferencën ndërkombëtare me bord editorial: "Biological And Environmental Sciences, Fshn Tiranë (Albania) 2008, 45-51

Bushati M., Koni E., Miho A., Bregaj M. (2010): Temporal distribution of potentially toxic algae (dinoflagellates and diatoms) in Butrinti Lagoon. In Fourth International Symposium of Ecologists of Montenegro (ISEM4), Budva. ISSN 1800-7155 Natura Montenegrina, Podgorica. 9/2010, 9(3):307-319

CEN. 2008-06: Foodstuffs - Determination of domoic acid in mussels by RP- HPLC using UV detection. European Committee for Standardization (CEN)

EC. 2002b: Commission Decision of 15 March 2002. Establishing special health checks for the harvesting and processing of certain bivalve molluscs with a level of amnesic shellfish poison (ASP) exceeding the limit laid down by Council Directive 91/492/EEC. Off. J. Eur. Communities (2002./226/EC) L 75/65-66

EU-NRL 1996: Report of the 1<sup>st</sup> meeting of the EU National Reference Laboratories (EU-NRL) on marine biotoxins on analytical methods and toxicity criteria. 7-9 March 1996. Vigo, Spain

EU-NRL 2000: Minutes of the 3<sup>rd</sup> meeting of EU National Reference Laboratories (EU-NRL) on marine biotoxins. 15-17 March 2000. Vigo, Spain

Hallegraeff G. M. (Ed.) (1995) Manual on Harmful Marine Microalgae. IOC UNESCO

Hinder et al. (2011),: Environmental Health Toxic marine microalgae and shellfish poisoning in the British isles: history, review of epidemiology, and future implications. 10:54

Ravn H. (1995): HAB Publication series Volume 1. Amnesic Shellfish Poisoning (ASP). IOC Manuals and Guides 31. 15

Regulation (EC) 2074/2005 (2005): "Laying down implementing measures for certain products under Regulation No 853/2004, 854/2004, 882/2004, 852/2004". Off. J. Eur. Communities, L338, 27-59

Todd ECD. Domoic acid and amnesic shellfish poisoning; a review. J Food Prot 1993;56:69-83

Wright J.L.C. & Quilliam M.A. (1995): Methods for Domoic Acid, the Amnesic Shellfish Poisons. In Hallegraeff, G.M. et al. eds. Manual on Harmful Marine Microalgae. IOC Manuals and Guides No. 33. UNESCO. 113-133

Wright J.L.C., Boyd R.K., De Freitas A.S.W., Falk M., Foxall R.A., Jamieson W.D., Laycock M.V., McCulloch A.W., McInnes A.G., Odense P., Pathak V.P., Quilliam M.A., Ragan M.A., Sim P.G., Thibault P., Walter J.A., Gilgan M., Richard D.J. & Dewar D. (1989): Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino acid, in toxic mussels from eastern Prince Edward Island. Can. J. Chem. 67: 481-490