

MIROSŁAW M. MICHALSKI

## **BIOTOKSYNY MORSKIE - WYSTĘPOWANIE I METODY ANALIZY**

### Streszczenie

W pracy scharakteryzowano 5 grup biotoksyn morskich występujących w małżach blaszkoskrzelnych (dwuskorupkowych) mogących być przyczyną zatrucia po ich spożyciu. Należą do nich toksyny paraliżujące -PSP, wywołujące biegunkę - DSP i AZP, zaburzenia nerwowe - NSP i zaburzenia pamięci - ASP. Spożywanie małż, ostryg i omułek staje się w Polsce coraz popularniejsze, a więc i prawdopodobieństwo zatrucia po spożyciu małż wzrasta. Wskazano źródła toksyn morskich, metody ich wykrywania oraz podstawowe akty prawne związane z hodowlą, dystrybucją i nadzorem nad małżami przeznaczonymi do konsumpcji przez ludzi.

**Słowa kluczowe:** małże dwuskorupkowe, plankton, toksyny morskie, zatrucia

### **Wprowadzenie**

Mikroskopijne algi (plankton) są w oceanach podstawowym źródłem pożywienia dla mięczaków, takich jak: ostrygi, małże, przegrzebki czy też omułki oraz dla larw skorupiaków. Wśród około 5000 istniejących gatunków alg morskich około 300 może występować w bardzo dużej ilości, powodując tzw. kwitnienie wody połączone ze zmianą zabarwienia powierzchni wód i to zarówno słonych, jak i słodkich. Kwitnienie wód nosi również nazwę "red tides" czyli czerwony przypyływ, chociaż nie zawsze wody zabarwiają się na czerwono. Wody zabarwiają się również na kolor żółty, zielony, brązowy lub niebieski w zależności od rodzaju planktonu, jego ilości i głębokości na jakiej występuje. Plankton może wytworzyć związki toksyczne dla ludzi, zwłaszcza w czasie tzw. "kwitnienia wód" wytwarza się szczególnie dużo różnorodnych toksyn [7, 10]. W ostatnich latach częstotliwość występowania kwitnienia alg znacznie się zwiększyła. Przyczyny tej ekspansji nie są do końca poznane. Wydaje się, że wpływ zanieczyszczenia środowiska substancjami mineralnymi, ścieki przemysłowe, podniesienie się temperatury wód przybrzeżnych

wpływa znacznie na okresowy i gwałtowny rozwój jednokomórkowców. Również zmiany klimatyczne i zakłócenia hydrograficzne mają wpływ na ich rozwój. Jednak okresów i miejsc występowania nadmiernych ilości planktonu nie można dzisiaj przewidzieć [1, 14].

Termin „morskie biotoksyny” oznacza substancje toksyczne odkładające się w żywych małżach, zwłaszcza wskutek spożycia przez nie planktonu zawierającego toksyny. Substancje toksyczne przedostają się do organizmu mięczaków poprzez plankton jako ich pożywienie i kumulowane są w mięśniach i wątrobotrzustce. Biotoksyny morskie wytwarzane są przez glony planktonowe, gdy wystąpią korzystne warunki do ich rozwoju tj. dostępność substancji organicznej, dostępność mikroelementów,  $O_2/CO_2$ , obecność światła, odpowiednia temperatura wody czy też zmiana zasolenia spowodowana prądami morskimi. Glony przenoszone są przez prądy morskie do miejsc bogatych w substancje odżywcze i w kierunku powierzchni, do światła.

Coraz większą popularnością w naszym kraju cieszą się tzw. „owoce morza”, w tym małże blaszkoskrzelne (mięczaki). W krajach, takich jak: Hiszpania, Francja, Portugalia, USA czy Japonia owoce morza są spożywane bardzo powszechnie, co wiąże się ze zwiększonym ryzykiem zatrucia po spożyciu małż zawierających biotoksyny. Aby uniknąć przedostania się „skażonych” małż do obrotu stosuje się szereg procedur zabezpieczających, począwszy od nadzoru nad obszarami produkcyjnymi po gotowy produkt.

Nadzór nad obszarem produkcji polega na monitorowaniu obecności glonów na różnych głębokościach, określaniu gatunku i ilości fitoplanktonu/glonów oraz obecności składników odżywczych (azotany(V), azotany(III), amoniak, fosforany(V), krzemiany) w środowisku. Monitorowaniu podlega również woda, którą bada się na obecność metali, pestycydów, związków chloroorganicznych, dokonuje się pomiaru temperatury i stopnia zasolenia, pH, oznacza się zawartość tlenu rozpuszczonego w wodzie, jej przejrzystość itd. Kolejnymi etapami nadzoru jest oznaczanie obecności biotoksyn w glonach, biotoksyn w mięczakach i badania mikrobiologiczne obszaru produkcyjnego. Otrzymane dane pozwalają dokonać klasyfikacji obszarów produkcyjnych, tzn. dopuszczenie do zbioru małż i przekazanie do handlu lub do zakładów oczyszczania, gdzie toksyny są wmywane z małż blaszkoskrzelnych (dwuskorupkowych) czystą wodą. Proces wmywania w zależności od rodzaju małży i toksyny trwa od kilku dni do kilkunastu tygodni.

### **Charakterystyka biotoksyn morskich**

Główne biotoksyny spotykane w mięczakach (*shellfish marine biotoxins*) to: PSP – paraliżujące, NSP – neurotoksyny, ASP – anamnesticzne, DSP - wywołująca biegunki oraz AZA (kwas azaspirowy) wywołujący biegunki.

*Toksyna paralityczna - PSP – (Paralytic Shellfish Poisoning)*

Toksyny paralityczne są najbardziej niebezpieczne dla człowieka i stanowią duży problem w krajach, gdzie spożywanie małż jest powszechne. I to zarówno tych pochodzących z hodowli, jak i zbieranych indywidualnie na wybrzeżu morza. Aktywną toksyną jest saksytoksyna (STX) oraz jej 21 izomerów (pochodne tetrahydropuryn, SXT's). W 1975 r. po raz pierwszy uzyskano krystaliczną syntetyczną pochodną saksytoksyny i zbadano jej strukturę [4]. Minimalna dawka saksytoksyny powodująca zatrucie to 20 µg/kg masy ciała. Dawka śmiertelna dla człowieka to 150 µg/kg masy ciała. Dopuszczalna zawartość PSP wynosi 80 µg/100 g mięsa mięczaków. Pierwsze udokumentowane zatrucie wystąpiło w 1948 r. w Japonii, a w USA w połowie lat 60. XX w. W Europie notowane są zatrucia od wczesnych lat 80. Pod koniec 1987 r. w Wielkiej Brytanii wiele osób zatrulo się PSP, a 3 osoby zmarły. Pierwotnym źródłem SXT's są glony z rodzaju *Alexandrium*, a więc np. *A. catenella*, *A. tamarensis*, *A. minutum*, *A. fundyense* i *A. cohorticula*. Również źródłem STX's są *Pyrodinium bahamense* i *Gymnodinium catenatum* [12]. Podczas zakwitów *Pyrodinium* w 1987 r. w Gwatemali, w wyniku spożycia toksycznych małż, 187 osób było hospitalizowanych, a 26 osób zmarło. Również kraby, ślimaki morskie i krewetki mogą zawierać PSP. Objawy zatrucia saksytoksyną to: drętwienia języka, brak czucia, porażenie mięśni oddechowych i układu motorycznego, porażenie układu sercowo-naczyniowego, drżenie rąk i palców u nóg, bełkotliwa mowa, ślinienie się i kłopoty z oddychaniem. Śmiertelność wynosi około 10%. Do metod wykrywania należy test na myszach (MBA) (metoda referencyjna) lub na szczurach (RBA) i metody alternatywne tj. Elisa (immunoassay), HPLC, LC-MS, LC, chromatografia jonowymienna, elektroforeza, określenie stopnia blokowania kanałów sodowych (mouse *in vitro*) czy też techniki elektroforetyczne.

*Toksyny wywołujące biegunkę – DSP (Diarrhetic Shellfish Poisoning) i AZP (Azaspiracid Shellfish Poisoning)*

DSP należą do toksyn lipofilnych, gromadzących się w tkance tłuszczowej mięczaków. Toksyny są termostabilne. Minimalna dawka toksyny powodująca biegunkę to 40 µg. Objawami zatrucia są uporczywe biegunki, wymioty, nudności i skurcze żołądka. Objawy są już widoczne nawet po 30 min od spożycia. Z reguły objawy zanikają po 3 - 4 dniach. Przy chronicznych zatruciach jest możliwa indukcja raka żołądka czy też przewodu pokarmowego [5]. W 1984 r., we Francji, około 10 000 osób zatrulo się po spożyciu skażonych mięczaków [6]. Do grupy toksyn DSP zalicza się kwas okadaikowy (OA) i jego pochodne - dinofysistoksyny (DTX1, DTX2, DTX3), pektenotoksyny (PTX1, PTX2) oraz yessotoksyny (YTX's). Dinofysistoksyny uszkadzają również wątrobę. Źródłem toksyn DSP są glony

*Dinophysis spp.* oraz *Prorocentrum*. Metody wykrywania toksyn to MBA [15], HPLC (fluorometric detector), TLC, LC, LC-MS, LC-ion-spray MS, Elisa, testy fosfatazowe (np. PP2A, Biosense) czy też testy cytotoksyczne. Badania międzylaboratoryjne LC-MS wskazują na tę metodę jako referencyjną przy oznaczaniu toksyn ASP i DSP [8].

AZP jest oddzielną, nowo sklasyfikowaną grupą toksyn, w której substancją toksyczną jest kwas azaspirowy (AZA) i jego pochodne. Toksyna ta ma również swoje izomery, AZA2 do AZA5. Objawy przy zatruciu AZA są podobne do zatrucia DSP, a więc uporczywe biegunki, wymioty, nudności i skurcze żołądka. W listopadzie 1995 r. w Holandii 8 osób zachorowało po spożyciu hodowlanych omułek (*Mytilus edulis*) pochodzących z Irlandii, z Killary Harbour [11]. Następne zatrucie AZA wystąpiło w następnym roku w Irlandii, również po spożyciu omułek. Przypuszcza się, że plankton (brudnica) *Protoceratum crissipes* produkuje kwas azaspirowy [13]. Jak dotychczas AZA's znajdowano jedynie w omułkach i ostrygach [9]. Do metod wykrywania toksyn AZP można zaliczyć: RBA, MBA, LC-MS, LC-MS-MS, HPLC z detektorem fluorometrycznym, ELISA czy też testy czynnościowe [10].

#### *Toksyna powodująca amnezję – ASP (Amnestic Shellfish Poisoning)*

Głównym związkiem toksycznym jest kwas domoikowy i jego izomery. Po raz pierwszy zdiagnozowano zatrucie kwasem domoikowym w Kanadzie w 1987 r. w wyniku spożycia omułek (blue mussels). Omułki zawierały do 790 ug DA/g (cały omulek). W wyniku tego zatrucia 105 osób było hospitalizowanych, a 3 osoby zmarły. Okrzemek *Pseudonitzschia* jest głównym jednokomórkowcem wytwarzającym kwas domoikowy (DA) [2, 7]. Dopuszczalna zawartość DA w mięśniach małży to 20 µg/100 g mięsa. Objawy zatrucia występują po 24 godz. od spożycia przy łagodnym zatruciu i od 0,5 do 6 godz. przy ostrym zatruciu. Objawy po spożyciu są podobne do choroby Alzheimerera. Następuje krótkotrwała utrata pamięci (short term memory). Po inhalacji aerozolu w postaci „mgiełki z wody morskiej”, podczas spaceru brzegiem morza, gdy woda „kwitnie” może wystąpić dodatkowo skurcz oskrzeli. Przy lekkim zatruciu i u konsumentów niemających problemów z nerkami następuje całkowite wyzdrowienie już po kilku dniach. Przy ostrym zatruciu, gdy organizm nie jest w stanie szybko usunąć toksyny (DA), może wystąpić dodatkowo poważne, trwałe uszkodzenie mózgu. Metody wykrywania ASP w „owocach morza” to HPLC (metoda referencyjna), MBA, Elisa, TLC, GC-MS, LC-MS czy też elektroforeza kapilarna. Test na myszach należy do metod AOAC (1990). Toksynę amnestyczną stwierdzano również we wnętrzościach krabów (do 90 ug/g), małży żyletkowych (razor clams) czy też sardynkach.

### *Toksyny powodujące zaburzenia nerwowe – NSP (Neurotic Shellfish Poisoning)*

Aktywną neurotoksyną jest brewetoksyna i jej izomery. Objawy zatrucia to podwójne widzenie, trudności w przełykaniu, dreszcze, mdłości, biegunka, odrętwienie, suchość w ustach czy też uporczywy kaszel przy wdychaniu mgiełki morskiej zawierającej brewetoksynę (objawy astmopodobne). Zatrucia neurotoksyną po spożyciu mięczaków najczęściej występują w Zatoce Meksykańskiej, Nowej Zelandii i na wschodnim wybrzeżu Florydy. W Europie nie stwierdzono zatruc po spożyciu małż skażonych brewetoksyną. Jednak w Niemczech, Francji, Grecji, Holandii, Portugalii i Hiszpanii wykryto obecność planktonu wytwarzającego tę toksynę. Za obecność NSP's odpowiadają brudnice (dinoflagellate), a szczególnie glon *Gymnodinium breve* (*Karenia brevis*) [7]. Brewetoksyna jest toksyczna również dla ryb. Jest to toksyna bezsmakowa, bezzapachowa, ciepłooporna, kwasooporna oraz rozpuszczalna w tłuszczach (lipofilna) [3]. Brewetoksynę wykrywa się testem MBA, testami biologicznymi na rybach *Gambusia affinis* (FBA), Elisa, TLC, LC-MS czy też metodami radioimmunologicznymi.

### **Akty prawne dotyczące gospodarki małżami**

Zasady wprowadzania do handlu małż są ściśle określone prawem unijnym, szczegółowo regulującym wszystkie etapy produkcji, od środowiska hodowlanego, hodowlę, oczyszczanie aż do limitów pozostałości w tkankach małż przeznaczonych do bezpośredniego spożycia, jak i do przetwórstwa.

Aktem prawnym regulującym bezpieczeństwo żywnościowe w odniesieniu do małż jest Decyzja Komisji z dnia 15 marca 2002 r. (2002/225) ustanawiająca szczegółowe zasady wykonania dyrektywy Rady 91/492/EWG w zakresie najwyższego dopuszczalnego poziomu zawartości i metod analizy niektórych morskich biotoksyn w małżach, szkarłupniach, osłonnicach i ślimakach morskich. Sekcja VII w Rozporządzeniu (WE) nr 853/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 29 kwietnia 2004 r. ustanawia szczególne przepisy dotyczące higieny w odniesieniu do żywności pochodzenia zwierzęcego. Decyzja Komisji z 14 listopada 2003 r. (2003/804/EC) dotyczy warunków zdrowotnych i wymagań certyfikacyjnych przy imporcie małż, ich jaj, gamet przeznaczonych do rozmnażania, hodowli, tuczenia z przeznaczeniem do spożycia przez ludzi. Decyzja Komisji z dnia 15 marca 2002 r. (2002/226) ustanawia specjalne kontrole zdrowotne dotyczące zbierania i przetwarzania określonych małż dwuskorupowych o poziomie toksyny ASP (*Amnesic Shellfish Poison*) przekraczającym limity określone w dyrektywie Rady 91/492/EWG (notyfikowana jako dokument nr C(2002) 1009). Decyzja Komisji z dnia 18 stycznia 1996 r. (96/77/EC) ustanawia warunki zbioru i przetwórstwa pewnych małż dwuskorupowych pochodzących z obszarów, w których poziom PSP przekracza

dopuszczalne limity określone dyrektywą 91/492. Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 15 lipca 2005 r. określa szczegółowe wymagania weterynaryjne dot. umieszczania na rynku zwierząt i produktów akwakultury (Dz. U. 2005 r. Nr 138 poz. 1158).

### Podsumowanie

Coraz większą popularnością w naszym kraju cieszą się tzw. „owoce morza”, w tym małże blaszkoskrzelne (mięczaki). Jednak po spożyciu mogą one być przyczyną zatrucia z uwagi na możliwość wystąpienia w nich biotoksyn morskich. Aby uniknąć przedostania się „skażonych” małż do obrotu w wielu krajach zachodnich stosuje się szereg procedur zabezpieczających, począwszy od nadzoru nad obszarami produkcyjnymi po gotowy produkt. Gospodarka małżami w UE odbywa się według procedur określonych przepisami prawnymi. W Polsce jest to problematyka nieznaną na szerszą skalę, dlatego dokonano przeglądu informacji dotyczących pięciu grup toksyn. Scharakteryzowano toksyny paraliżujące – PSP, wywołujące biegunkę – DSP i AZP, zaburzenia nerwowe – NSP i zaburzenia pamięci – ASP oraz dokonano przeglądu metod ich analizy. Zacytowano także akty prawne obowiązujące w UE, a dotyczące szeroko rozumianego bezpieczeństwa zdrowotnego w odniesieniu do małż. Przedstawione zagadnienia wymagają szerszego upowszechniania ze względu na ich wagę dla zdrowia konsumenta.

### Literatura

- [1] Anderson D.M.: Red Tides. Scientific American, 1994, **271**, 62-68.
- [2] 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.: 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., 1989, **46**, 1203-1215.
- [3] Benson J.M., Tischler D.L., Baden D.G.: Uptake, distribution, and excretion of breve toxin 3 administered to rats by intratracheal instillation. J.Toxicol. Environ. Health Part A, 1999, **56**, 345-355.
- [4] Bower D.J., Hart, R.J., Matthews, P.A., Howden M.E.H.: Nonprotein neurotoxins. Clin. Toxicol., 1981, **18**, 813-843.
- [5] 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., 1996, **34** (8), 923-935.
- [6] Durborow R.M.: Health and safety concerns in fisheries and aquaculture. Occup. Med: State of the Art Reviews. 1999, **14** (2), 373-406.
- [7] Hallegraeff G.M.: 1.Harmful algal blooms: a global overview. In Hallegraeff G.M. et al. Eds. Manual on Harmful Marine Microalgae. 1995, pp. 1-22. IOC Manuals and Guides No. 33. UNESCO.

- [8] Holland P., McNabb P.: Inter-laboratory Study of an LC-MS Method for ASP & DSP Toxins in Shellfish. Cawthron Report No.790, 2003, Nelson, New Zealand, Cawthron Institute.
- [9] James K.J., Furey A., Satake M., Yasumoto T.: Azaspiracid Poisoning (AZP): A new shellfish toxic syndrome in Europe. Abstract for the 9th Int. Conf. on Algal Blooms, 2000. Tasmania, Australia
- [10] Lindahl O.: Occurrence and Monitoring of harmful algae in the marine environment. In Miraglia M., van Egmond H., Brera C.J., Gilbert. Eds. 1998. Mycotoxins and phycotoxins – developments in chemistry, toxicology and food safety. Proc. of the IX Int. IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. 1998, pp. 409-423.
- [11] McMahon T., Silke J.: Winter toxicity of unknown aetiology in mussels. Harmful Algae News, 1996, **14**, 2-5.
- [12] Mons M.N., van Egmond H.P., Speijers G.J.A.: Paralytic shellfish poisoning: A Review RIVM Report No.388802 005, June 1998.
- [13] Peperzak L., Bouma H., Peletier H., Sandee, B.: Rapport RIKZ/OS/2002.045.Jaarrapport Monisnel, 2001.
- [14] Van Egmond H.P., Speijers G.J.A.: Natural Toxins II. Phycotoxins. In: van der Heijden K. et al. Eds. Int. Food Safety Handbook. Science, International Regulation and Control. 1999, pp. 357-368.
- [15] Yasumoto T., Murata M., Oshima Y., Matsumoto G.K., Clardy J.: Diarrhetic shellfish poisoning. ACS Symposium Series No. 262. In Ragelis E.P. ed. Seafood Toxins. 1984 pp. 207-214.

## MARINE BIOTOXINS - OCCURENCE AND METHOD OF ANALYSIS

### S u m m a r y

In the paper group of five marine biotoxins occurring in bivalve molluscs were described. Marine biotoxins may occur intoxication after consuming toxic molluscs. There are PSP – Paralytic Shellfish Poisoning, DSP – Diarrhetic Shellfish Poisoning, AZP – Azaspiracid Shellfish Poisoning, NSP – Neurotic Shellfish Poisoning and ASP – Amnestic Shell fish Poisoning. Eating bivalve molluscs, mussels and oysters became more popular in Poland so possibility of intoxication consumers is higher. In article the source of marine biotoxins is indicated, methods of detection and law regulations concerning production and distribution of bivalve molluscs as a food.

**Key words:** bivalve molluscs, dinoflagellate algae, marine biotoxins, intoxications 