

# Razine gimnodimina i spirovida u srednjem i južnom Jadranu tijekom 2016., 2017. i 2022. godine

---

Čilaš, Marta

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:226:153857>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository of University Department of Marine Studies](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**SVEUČILIŠNI ODJEL ZA STUDIJE MORA**  
**SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ EKOLOGIJA I ZAŠTITA MORA**

**Marta Čilaš**

**RAZINE GIMNODIMINA I SPIROLIDA U SREDNJEM I**  
**JUŽNOM JADRANU TIJEKOM 2016., 2017. I 2022.**  
**GODINE**

**Diplomski rad**

**Split, rujan 2024.**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**SVEUČILIŠNI ODJEL ZA STUDIJE MORA**  
**SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ EKOLOGIJA I ZAŠTITA MORA**

**RAZINE GIMNODIMINA I SPIROLIDA U SREDNJEM I  
JUŽNOM JADRANU TIJEKOM 2016., 2017. I 2022.  
GODINE**

**Diplomski rad**

**Predmet:** Toksičnost školjkaša

**Mentor:**

Dr. sc. Ivana Ujević

**Student:**

Marta Čilaš

**Split, rujan 2024.**

Sveučilište u Splitu  
Sveučilišni odjel za studije mora  
Sveučilišni diplomski studij Ekologija i zaštita mora

Diplomski rad

**RAZINE GIMNODIMINA I SPIROLIDA U SREDNJEM I JUŽNOM JADRANU  
TIJEKOM 2016., 2017. I 2022. GODINE**

**Marta Čilaš**

**Sažetak**

Rad prikazuje rezultate istraživanja toksina gimnodimina i spirovida u školjkašima srednjeg i južnog Jadrana s devet postaja tijekom 2016., 2017. i 2022. godine. Istraživanje se provodilo zbog praćenja masenih udjela gimnodimina i spirovida, prirodnih toksina, koji spadaju pod cikličke imine. Sakupljeni su primjerci dagnji, *Mytilus galloprovincialis* iz uzgajališta i brbavica, *Venus verrucosa* iz prirodnih populacija. Određivanje gimnodimina i spirovida obavljeno je u Laboratoriju za plankton i toksičnost školjkaša primjenom LC-MS/MS metode, a kvantifikacija primjenom MassHunter programa. Cilj diplomskog rada je prikazati vremensku i prostornu raspodjelu masenih udjela gimnodimina i spirovida u uzorkovanim školjkašima. Do danas nije utvrđen negativan utjecaj gimnodimina i spirovida na ljudsko zdravlje, međutim ustanovljeno je njihovo toksično djelovanje na eksperimentalne životinje, što je razlog za preporuke njihovog praćenja i uključivanja u monitoring aktivnosti.

(48 stranica, 28 slika, 26 tablica, 20 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

**Ključne riječi:** gimnodimini, spirovidi, LC-MS metoda, minimum, maksimum

**Mentor:** Dr. sc. Ivana Ujević

**Ocjenjivači:** 1. Doc. dr. sc. Frano Matić

2. Dr. sc. Ivana Ujević

3. Doc. dr. sc. Marin Ordulj

University of Split  
Department of Marine Studies  
Graduate university study Ecology and protection of sea

Thesis

**LEVELS OF GYMNODIMINES AND SPIROLIDES IN THE CENTRAL AND SOUTHERN ADRIATIC SEA IN 2016., 2017. AND 2022.**

**Marta Čilaš**

**Abstract**

This thesis presents the results of the investigation of gymnodimine and spirolide toxins in shellfish from the central and southern Adriatic Sea from nine stations in 2016, 2017 and 2022. The study was conducted to monitor the mass fractions of gymnodimine and spirolide, natural toxins belonging to cyclic imines. *Mytilus galloprovincialis* is collected from farms and *Venus verrucosa* from natural populations. The determination of gymnodimine and spirolide was carried out in the Plankton and Shellfish Toxicity using the LC-MS/MS method and the quantification was performed with the MassHunter program. The aim of the work is to show the temporal and spatial distribution of the mass fractions of gymnodimines and spirolides in the sampled mussels. To date, no negative effects of gymnodimines and spirolides on human health have been identified, but their toxic effect on laboratory animals has been demonstrated, which is the reason for recommendations to monitor them and to start surveillance measures.

(48 pages, 28 figures, 26 tables, 20 references, original language: Croatian)

**Keywords:** gymnodimines, spirolides, LC-MS method, minimum, maximum

**Supervisor:** Ivana Ujević, PhD

**Reviewers:** 1. PhD / Assistant Professor Frano Matić  
2. PhD Ivana Ujević  
3. PhD / Assistant Professor Marin Ordulj

## SADRŽAJ:

1. UVOD.....	1
1.1. Morski biotoksini .....	1
1.1.1. Hidrofilni toksini.....	3
1.1.2. Lipofilni toksini .....	4
1.2. Ciklični imini.....	4
1.2.1. Gimnodimini.....	5
1.2.2. Spirolidi.....	6
1.3. Dosadašnja istraživanja .....	7
1.3.1. Istočni Mediteran .....	7
1.3.2. Druga istraživanja .....	9
1.4. Biološki test miša .....	11
1.5. Svrha i ciljevi rada.....	11
2. MATERIJALI I METODE.....	13
2.1. Područje istraživanja .....	13
2.1.1. Malostonski zaljev .....	14
2.1.2. Kaštelanski zaljev .....	17
2.1.3. Marinski zaljev.....	18
2.1.4. Postupak pripreme uzoraka mekog tkiva školjkaša za određivanje gimnodimina i spirolida na LC-MS/MS .....	19
2.1.5. Uvjeti rada na tekućinskom kromatografu.....	20
2.2. LC-MS/MS metoda.....	20
2.2.1. Primjena i princip rada.....	20
2.2.2. Prednosti korištenja .....	21
2.2.3. Sustav klasifikacije .....	22
2.3. MassHunter program.....	23
3. REZULTATI.....	24
3.2. Gimnodimini .....	24
3.2.3. Raspodjela gimnodimina na postaji Banje u 2016., 2017. i 2022. godini .....	24

3.2.4.	Raspodjela gimnodimina na postaji Bistrina u 2016., 2017. i 2022. godini .....	25
3.2.5.	Raspodjela gimnodimina na postaji Brijesta u 2016., 2017. i 2022. godini .....	26
3.2.6.	Raspodjela gimnodimina na postaji Kanal Usko u 2016., 2017. i 2022. godini.....	27
3.2.7.	Raspodjela gimnodimina na postaji Mali Ston u 2016., 2017. i 2022. godini.....	28
3.2.8.	Raspodjela gimnodimina na postaji Mlinice u 2016., 2017. i 2022. godini .....	29
3.2.9.	Raspodjela gimnodimina na postaji Stipan Jaz u 2016., 2017. i 2022. godini .....	30
3.2.10.	Raspodjela gimnodimina na postaji Sutvid u 2016., 2017. i 2022. godini .....	31
3.2.11.	Raspodjela gimnodimina na postaji Škoj u 2016., 2017. i 2022. godini .....	32
3.3.	Spirolidi.....	33
3.3.3.	Raspodjela spirovida na području Malostonskog zaljeva u 2016., 2017. i 2022. godini	34
3.3.4.	Raspodjela spirovida na području Kaštelanskog zaljeva – Mlinice u 2016., 2017. i 2022. godini .....	37
3.3.5.	Raspodjela spirovida na području Marinskog zaljeva – Stipan Jaz u 2016., 2017. i 2022. godini .....	38
3.3.6.	Raspodjela spirovida na postaji Škoj u 2016., 2017. i 2022. godini.....	39
3.4.	Godišnja raspodjela gimnodimina po postajama .....	40
3.5.	Godišnja raspodjela spirovida po postajama.....	41
4.	RASPRAVA.....	44
5.	ZAKLJUČCI .....	46
6.	LITERATURA .....	47

# 1. UVOD

## 1.1. Morski biotoksini

Morski biotoksini nastaju u aktivnostima morskih organizama. U morskom okolišu ih mogu producirati neke vrste fitoplanktona kao sekundarni metaboliti u organizmima morskih životinja. Njihov naziv ukazuje na toksičnost i loše djelovanje na organizme, međutim nisu za sve organizme toksični. Školjkaši se hrane na "filter feeder" način pri čemu filtriraju mikroskopske čestice iz vode. Ovim načinom prehrane morski biotoksini dospiju u organizam, ali nemaju nikakav negativan učinak na njih. Fitoplankton je glavni proizvođač organskih spojeva u oceanu i ključan je za morski ekosustav, njegova proliferacija dodatno doprinosi ravnoteži ekosustava mora. Do sada je otkriveno oko 4000 vrsta fitoplanktona od kojih 300 djeluju štetno. U određenim ekološkim uvjetima može doći do cvjetanja vrsta, to jest do masovnog razmnožavanja algi, na primjer radi promjene temperature, slanosti, organskog otpada, utjecaja morskih struja, količine svjetlosti i to se uglavnom događa u ljetnom periodu. Tijekom cvjetanja toksičnog fitoplanktona školjkaši filtriraju veću količinu biotoksina te ih talože u svom organizmu, najviše u probavnoj žlijezdi. Konzumacije školjkaša u kojima je akumulirana određena količina biotoksina toksično djeluje na ptice, sisavce i ljude. Zbog toga za neke vrste biotoksina postoje utvrđene dozvoljene vrijednosti te se redovno mora pratiti kakvoća morske vode da bi se spriječilo trovanje ili smrtni ishod nakon konzumacije školjkaša. Također, toksičnost fitoplanktonske vrste može varirati u različitim geografskim područjima i u različitim uvjetima okoliša. Njihova termostabilnost je razlog zbog kojeg su školjkaši izvor trovanja prilikom konzumiranja kontaminiranih jedinki (Ujević i Roje-Busatto, 2020).

Razlikujemo nekoliko vrsta trovanja školjkašima:

- ASP (Amnesic shellfish poisoning)
- PSP (Paralytic shellfish poisoning)
- DSP (Diarrheic shellfish poisoning)
- NSP (Neurotoxic shellfish poisoning)
- AZP (Azaspiracid poisoning)



ASP trovanje uzrokuje toksin koji se naziva domoična kiselina (DA), a proizvode je alge kremenjašice, *Pseudo-nitzschia sp.* i *Nitzschia sp.* Za PSP trovanje su odgovorni saksitoksini (STX) koje proizvode dinoflagelati roda *Alexandrium*. DSP trovanje je uzrokovano različitim toksinima, najviše okadaičnom kiselinom (OA) i njenim derivatima dinofizistoksinima (DTX), pektenotoksinima (PTX) i jesotoksininima (YTX) (Ribarić i sur., 2012). NSP trovanje je prouzročeno brevetoksinima (BTX) koje stvaraju dinoflagelati vrste *Karenia brevis*. AZP trovanje uzrokuje toksin azaspiracid. Od simptoma svih ovih trovanja većinski se pojavljuju velika temperatura, znojenje, povraćanje, dijareja, kratkoročni gubitak pamćenja, treskavica, mantanje, gubitak svijesti, koma ili u najgorem slučaju smrt (Arapov, 2013). Navedeni toksini svrstavaju se u hidrofilne i lipofilne, ASP i PSP su hidrofilni, a DSP i AZP trovanje uzrokuju lipofilni toksini (Tablica 1) (Ribarić i sur., 2012). U lipofilne toksine spadaju ciklični imini pod koje se uvrštavaju gimnodimini i spiroolidi za koje još nije potvrđeno da su štetni za ljude no testovima na eksperimentalnim životinjama su pokazali toksično djelovanje jer su uzorkovali uginuće eksperimentalnih životinja nakon primjene niske razine toksina gimnodimina i spirovida (Munday i sur., 2008).

**Tablica 1.** Grupe toksina, vrsta trovanja i vrste fitoplanktonktona koji proizvode toksine simptoma (izvor: Arapov, 2013).

Grupa toksina	Vrsta trovanja	Vrsta uzročnika
<b>Saksitoksin (STX)</b>	Paralitičko trovanje školjkama (PSP)	Nekoliko vrsta: <i>Alexandrium</i> <i>Gymnodinium catenatum</i> <i>Pyrodinium bahamense</i>
<b>Domoična kiselina (DA)</b>	Amnezijsko trovanje školjkama (PSP)	<i>Pseudo-nitzschia</i> <i>Nitzschia navis varingica</i> <i>Halamphora coffeaeformis</i>
<b>Okadaična kiselina (OA), Dinofizistoksini (DTX-ovi)</b>	Dijaretično trovanje školjkama (DSP)	<i>Dinophysis</i> <i>Phalacroma</i> <i>Prorocentrum</i>
<b>Pektenotoksini (PTXs)</b>	/	<i>Dinophysis</i>
<b>Jesotoksini (YTXs)</b>	/	<i>Gonyaulax spinifera</i> <i>Lingulodinium polyedrum</i> <i>Protoceratium reticulatum</i>

<b>Azaspiracidi (AZAs)</b>	Azaspiracidno trovanje školjkama (AZA)	<i>Azadinium spinosum</i>
<b>Brevetoksini</b>	Neurotoksično trovanje školjkama (NSP)	<i>Karenia</i>
<b>Ciguatoksini (CTXs)</b>	Trovanje ribom Ciguatera	<i>Gambierdiscusa</i>
<b>Spirolidi (SPX)</b>	Brzdjelujući toksin	<i>Alexandrium</i>
<b>Gimnodimini (GYM)</b>		<i>ostenfeldii (SPXs), Karenia selliformis (GYM)</i>
<b>*Palitoksini (PLT)</b>	/	<i>Ostreopsis</i>

\*Palitoksini su velike molekule koje imaju hidrofilni i lipofilni dio

### 1.1.1. Hidrofilni toksini

U hidrofilne toksine spadaju toksini domoična kiselina i njeni derivati te saksitoksin i njegovi derivati, a koji uzrokuju amnezijsko, odnosno paralitičko trovanje. Trovanje ljudi može nastati konzumacijom kontaminirane morske hrane s toksinima. Domoičnu kiselinu mogu proizvoditi nekoliko vrsta dijatomejskih algi, najčešće iz roda *Pseudo-nitzschia*. Međutim neke vrste ne proizvode uvijek domoičnu kiselinu, nego u određenim okolišnim uvjetima pa te vrste spadaju u potencijalno toksične vrste. Uvjeti koji potiču prisutnost vrsta *Pseudo-nitzschia* iz podataka dobijenih provođenjem monitoringa su snižavanje temperature morske vode i fotoperioda, što je potvrđeno pojavom cvjetanja *Pseudo-nitzschie* u hladnijim dijelovima godine. Domoična kiselina uzrokuje gubitak pamćenja i oštećuje središnji živčani sustav. Blaži simptomi trovanja su zbunjenost, glavobolja i dezorijentiranost, a teži gubitak pamćenja i svijesti te stanja kome, a moguć je i smrtni ishod. Domoična kiselina je bila uzrok trovanja većeg broja ljudi na istočnoj obali otoka princ Edward (Kanada) 1987. godine. Paralitičko trovanje kod školjkaša poznato je već stoljećima i uzrokovano je skupinom toksina poznatom kao saksitoksini (STX). Najveća proizvodnja saksitoksina dolazi od dinoflagelata roda *Alexandrium*. Saksitoksini blokiraju funkciju naponom reguliranih natrijevih kanala na površini neurona, što sprječava prijenos akcijskog potencijala. Kao rezultat toga, živčani impulsi se ne prenose, što dovodi do paralize. Simptomi trovanja se pojavljuju 30 minuta od konzumacije. Simptomati trovanja su parestezija i trnjenje koje počinje s ustima, jezikom i licem pa prelaze na vrat, ruke i noge. Teži simptomi su

nemogućnost razgovjetnog govora, manjak koordinacije pokreta i opća slabost. Nakon toga se može javiti paraliza dišnog sustava koja može dovesti do smrti (Ujević i Roje-Busatto, 2020).

### 1.1.2. Lipofilni toksini

Lipofilni toksini su: okadaična kiselina, pektenotoksini, azaspiracidi, jesotoksini te gimnodimini i spiroolidi koji spadaju u cikličke imine. Navedeni toksini, osim gimnodimina i spirovida, se nakupljaju u masnom tkivu školjkaša, najviše u probavnoj žlijezdi. Brzo se apsorbiraju u probavnom traktu i odmah se šire kroz sva tjelesna tkiva. Toksini okadaične grupe uzrokuju DSP trovanje (dijaretično trovanje školjkašima) inhibiranjem enzima fosfataze 1 i 2A (PP1 i PP2A) pri čemu dolazi do dijareje nakon konzumacije školjkaša kontaminiranim toksinima iz ove grupe. Osim dijareje, simptomi dijaretičkog trovanja su mučnina, abdominalni grčevi i povraćanje. Nakon nekoliko dana (najčešće tri) simptomi nestaju i do sada nisu evidentirane dugotrajne posljedice niti smrtni slučajevi nakon trovanja toksinima ove grupe. DSP trovanja su opisana prvi put 70-ih godina prošlog stoljeća u Japanu i Nizozemskoj. U Nizozemskoj je 1995. godine prvi put evidentirano trovanje azaspiracidima. Azaspiracidno trovanje uzrokuju dinoflagelati iako postoje naznake da je to samo poveznik na bakterije i cijanobakterije. Simptomi AZP trovanja vrlo su slični DSP trovanju, to jest pojavljuju se abdominalni bolovi, mučnina, dijareja i povraćanje koji prolaze kroz nekoliko dana (Ujević i Roje-Busatto, 2020).

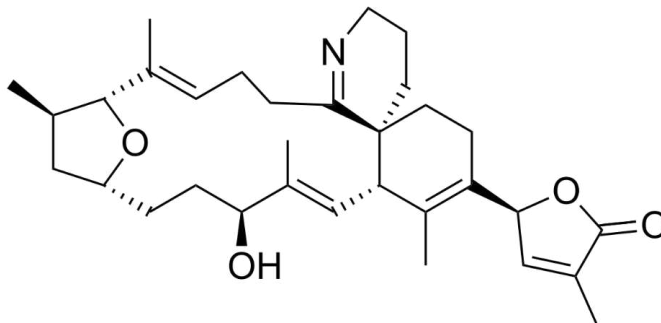
## 1.2. Ciklični imini

Ciklički imini (CI) su skupina morskih lipofilnih toksina koje proizvode fitoplanktonske vrste roda *Dinoflagellate*. U cikličke imine spadaju spiroolidi (SPX), gimnodimini (GYM), pinatoksini (PnTXs) i pteriatoksini (PtTXs) koji se pronalaze u školjkašima i algama. Osim ovih grupa postoji još nekoliko njih koji nisu često spomenuti, a to su prorocentrolidi, spiro-prorocentrimin, simbioimini i portimin. Ciklički imini su brzodjelujući toksini zbog svoje kemijske strukture (cikličkih prstena) i pokazuju brzo djelovanje kod miševa prilikom intraperitonealne primjene. Mogu se povezati sa cvjetanjem algi, kontaminacijom i neurotoksičnosti školjaka, na primjer *Karenia selliformis* i *Alexandrium ostenfeldii*/*Alexandrium*

*peruvianum*, koji su u korelaciji s biosintezom gimnodimina (GYM) i spirolida (SPX) (Bacchiocchi i sur., 2020).

### 1.2.1. Gimnodimini

Gimnodimini su ciklički imini koji predstavljaju brzo djelujuću toksičnu skupinu te je danas poznato osam spojeva: gimnodimin A, 12-Me-gimnodimin A, gimnodimin B, 12-Me-gimnodimin B, gimnodimin C, gimnodimin D, 16desMe gimnodimin D i gimnodimin E. Na Novom Zelandu su 1994. godine izolirani gimnodimin A, B i C iz kamenica te su povezani s prisutnošću *Karenia selliformis*. Gimnodimin 12 metil A, 12 metil B i D nastaju aktivnošću dinoflagelata *Alexandrium peruvianum*/*Alexandrium ostenfeldii*. Gimnodimini su molekularno među najmanjim članovima CI obitelji. Nesupstituirani šesteročlani ciklički imin jedna je od strukturnih razlika gimnodimina od drugih CI toksina. Do danas su opisana četiri člana (Slika 1). Gimnodimini kao i drugi ciklički imini imaju brzu toksičnost kod primjene biološkog testa na miševima za testiranje prisutnosti lipofilnih toksina. Naime, nakon intraperitonealnog injektiranja u organizam miša (kao i kod oralne primjene), oni uzrokuju početak neuroloških simptoma koji rezultiraju njihovom smrću nakon nekoliko minuta. Gimnodimin A kao 13 dimetil spirolid C ima visoki afinitet za acetilkolinske receptore, samo se razlikuju u tome što gimnodimin pokazuje reverzibilno djelovanje, a spirolid ireverzibilno. Iako su navedene skupine toksične, nemaju sve istu toksičnu razinu. Odnosno gimnodimin A pokazuje najveći toksični utjecaj pri intraperitonealnoj injekciji ( $LD_{50} 96 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) kod miševa, dok je dokazano da je manje toksično korištenje sonde ( $LD_{50} 755 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), a najmanje štetan pri unosu s hranom ( $LD_{50} 7500 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) (Lamas i sur., 2021). Kada su prisutni u školjkašima u povišenim vrijednostima izazivaju brzu smrt miševa i ometaju MBA (mouse bioassay) za druge lipofilne toksine. To je bio jedan od razloga što se primjena MBA zamijenila s LC-MS/MS kao referentnom metodom za analizu lipofilnih toksina u Europskoj Uniji (Naila i sur., 2012).

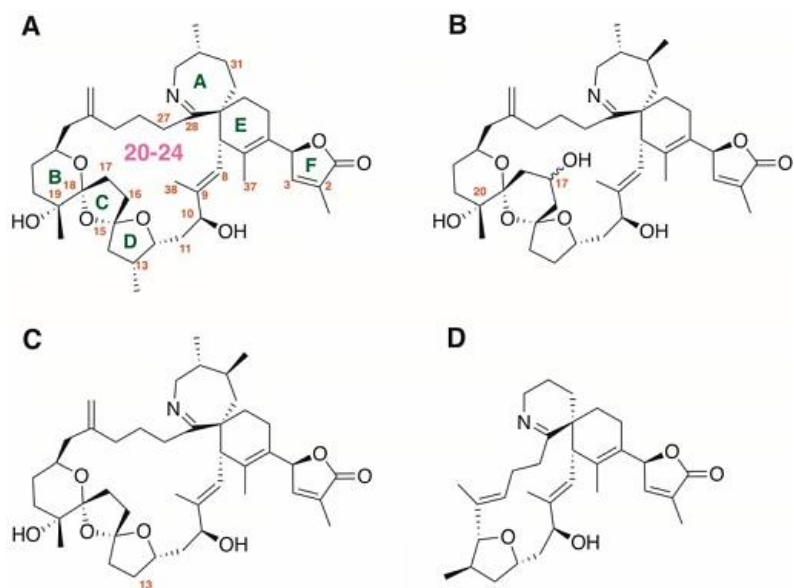


**Slika 1.** Struktura gymnodimina A (izvor:

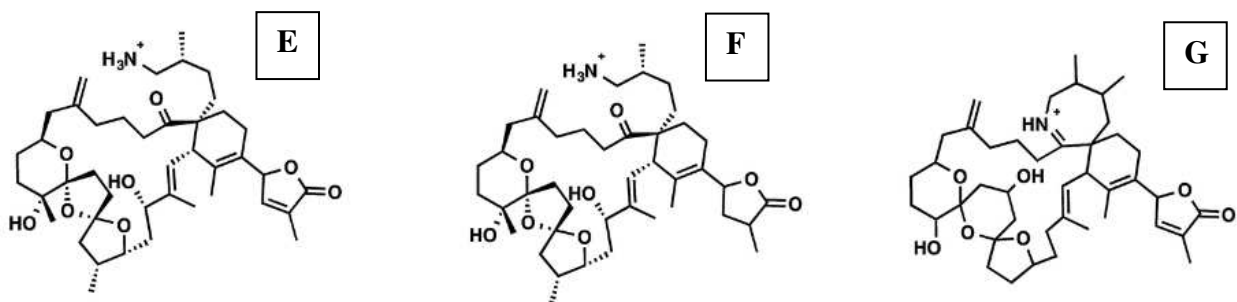
[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gymnodimine\\_A.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gymnodimine_A.svg)).

### 1.2.2. Spirolidi

Spirolidi su prvi put otkriveni 1995. godine u školjkama na atlantskoj obali u Novoj Škotskoj (Kanada) (Cembella i sur., 2000). Danas je poznato 18 različitih SPX analoga koji predstavljaju najveću skupinu cikličnih imina. Proizvođači spirovida su dinoflagelati globalno rasprostranjene vrste *Alexandrium ostenfeldii* i *Alexandrium peruvianum*. Brza pojava neuroloških simptoma dovodi do uginuća eksperimentalnih životinja ako se primjenjuju intraperitonealno, tj. biološkim testom na miševima. Snažni su neurotoksini, a dokazano je da se njihovo neurotoksično djelovanje temelji na inhibiciji nikotinskih i muskarinskih receptora acetilkolina u središnjem i perifernom živčanom sustavu na neuromuskularnom spoju (Bacchiocchi i sur., 2020). Spirolide dijelimo na osam velikih podgrupa SPX A, B, C, D, E, F, G i 20-Me-G s dva desmetilna derivata SPX 13-desMeC deriviranog od SPX C te SPX 13-desMeD deriviranog od SPX D (Slika 2 i 3) (Ciminiello i sur., 2006). Jedan dio sadrži 6,7 bicikličku spiroiminsku jedinicu koja predstavlja farmakofor, a druga jedinica sadrži spiroacetalnu ili bis spiroacetalnu skupinu (Gueret i Brimble, 2010). SPX koji sadrži dodatnu metilnu skupinu na iminskom prstenu rezistentni su u uvjetima enzimatske hidrolize u školjkašima i mogu predstavljati opasnost za potrošače (Christian i sur., 2008). Kako bi se procijenio rizik od cikličkih imina i predložilo okvirno ograničenje, Europska Agencija za sigurnost hrane (EFSA) zatražila je pribavljanje dodatnih podataka te je za spirovide i predložila najvišu dopuštenu razinu od  $400 \mu\text{g kg}^{-1}$  ukupnih spirovida u mesu školjkaša (Bacchiocchi i sur., 2020).



**Slika 2.** Struktura spirolida A, B, C i D (izvor: <https://www.mdpi.com/2072-6651/8/9/249>).



**Slika 3.** Struktura spirolida E, F i G (izvor: [https://www.google.com/search?sca\\_esv=ab02dd2696e7e4b9&q=spirolidi&tbm=isch&source=lms&prmd=ivbz&sa=X&ved=2ahUKEwjVx6KzuJKFAxUwcvEDHVpTA7MQ0pQJegQICxA&biw=1536&bih=695&dpr=1.25#imgrc=15gvNBKgMp-ZkM](https://www.google.com/search?sca_esv=ab02dd2696e7e4b9&q=spirolidi&tbm=isch&source=lms&prmd=ivbz&sa=X&ved=2ahUKEwjVx6KzuJKFAxUwcvEDHVpTA7MQ0pQJegQICxA&biw=1536&bih=695&dpr=1.25#imgrc=15gvNBKgMp-ZkM)).

### 1.3. Dosadašnja istraživanja

#### 1.3.1. Istočni Mediteran

Istraživanje morskih biotoksina provedeno je tijekom zime, od prosinca 2019. do veljače 2020., u tri obalna grada Libanona: Beirutu (glavni i najveći grad), Tripoliju (drugi najveći grad smješten na sjeveru) i Tyreu (grad na jugu s manjim antropogenim utjecajem). Uzorkovane su

četiri vrste morskih organizama: puž *Phorcus turbinatus*, dva školjkaša (*Patella rustica complex* i *Spondylus spinosus*) te riba *Siganus rivulatus*, koje su prikupljene iz morskog okoliša ili kupljene na tržnici. Fizikalno-kemijski parametri, poput temperature površine mora, koncentracija fosfata, nitrata, nitrita i klorofila-a, praćeni su svaki mjesec. Fitoplanktonski uzorci su prikupljeni nekoliko dana nakon uzorkovanja morskih organizama.

Lipofilni toksini (okadaična kiselina (OA), dinofizistoksin-1 i -2 (DTX 1, 2), pektenotoksin-1 i -2 (PTX-1, 2), jesotoksini (YTX), azaspiracidi (AZA), gimnodimin (GYM-b), spirolid (SPX), domoična kiselina (DA) i PSP) analizirani su u homogeniziranim mekim tkivima ispitivanih vrsta.

Istraživanje je pokazalo da su razine lipofilnih toksina (OA, DTX-1,2, PTX-1,2, YTXs, AZAs) i hidrofilnih PSP toksina bile ispod granice detekcije (LOD). Međutim, domoična kiselina (DA), gimnodimin (GYM-b) i spirolid (SPX) otkriveni su u koncentracijama iznad LOD u nekim vrstama i područjima.

Maseni udjeli gimnodimina bili su iznad granice detekcije (2,36 µg/kg) u 66% uzoraka, s koncentracijama koje su se kretale od 3,33 µg/kg u ribi *S. rivulatus* iz Tyrea do 102,9 µg/kg u školjkašu *S. spinosus* iz Tripolija. Svi uzorci puževa bili su ispod granice detekcije. Školjkaš *S. spinosus* imao je najviše razine gimnodimina, s prosjekom od  $56 \pm 27$  µg/kg u uzorcima iz Tripolija, što je 1,5 puta više od prosjeka uzoraka iz Tyrea ( $36 \pm 11$  µg/kg). Druga vrsta po kontaminaciji je školjkaš *P. rustica*, s najvišim prosječnim koncentracijama u Tyreu (26,9 µg/kg), Beirutu (26,8 µg/kg) i Tripoliju (8,7 µg/kg). Najniže koncentracije zabilježene su u tkivu ribe *S. rivulatus* iz Tyrea (3,33 µg/kg).

Spirolidi su pronađeni samo u školjkašu *S. spinosus*, s koncentracijama koje variraju od 2,18 do 15,07 µg/kg. Najveće razine spirolida zabilježene su u kamenicama iz Tyrea, gdje je 67% uzoraka bilo kontaminirano, dok je 27% uzoraka iz Tripolija pokazalo prisutnost ovog toksina. Prosječna koncentracija spirolida u uzorcima iz Tyrea bila je  $7,54 \pm 5$  µg/kg, što je gotovo dvostruko više u odnosu na uzorke iz Tripolija, gdje je prosječna koncentracija iznosila  $4,05 \pm 2$  µg/kg.

Od fizikalno-kemijskih parametara temperatura i salinitet su bili najviši u Beirutu, dok je najniža temperatura zabilježena u Tyreu. Salinitet u Tyreu i Tripoliju bio je gotovo isti. Koncentracije hranjivih tvari indicirale su da je ekološka kvaliteta u sva tri istraživana područja bila ocijenjena kao 'dobra'. Tripoli je imao najviše razine ortofosfata, a Tyre je imao najviše koncentracije nitrita, nitrata i pokazatelja primarne proizvodnje (klorofil-a i feopigment).

U istraživanom području prisutne su vrste fitoplanktona koje proizvode specifične morske biotoksine, poput domoične kiseline, gimnodimina i spirovida (*Pseudo-nitzschia spp.*, *Gymnodinium spp.* i *Alexandrium spp.*). Najveća abundancija *Gymnodinium spp.* i *Pseudo-nitzschia spp.* zabilježena je u Tripoliju, dok je *Alexandrium spp.* najčešći u Tyreu. Dinoflagelati su dominirali fitoplanktonom u Beirutu i Tripoliju, dok su dijatomeje bile najzastupljenije u Tyreu.

Libanonska obala je značajno urbanizirana i podložna antropogenim utjecajima kao što su kanalizacija i industrijske aktivnosti, što dovodi do fenomena poznatog kao 'cvjetanje mora'. U obalnim područjima živi iše od 70% stanovništva, a prisutnost lučkih postrojenja i ispuštanje otpadnih voda, naročito u blizini Tyrea i Tripolija, značajno opterećuju morski okoliš. Kao rezultat tih čimbenika, Libanon se suočava s višim razinama toksina i zauzima 90. mjesto od 163 zemlje prema Indeksu ekološkog učinka (EPI) (Marrouchi i sur., 2009).

### **1.3.2. Druga istraživanja**

U školjkašima iz Jonskog i Tirenskog mora evidentirane su male količine gimnodimina. U probavnim žlijezdama školjkaša prikupljenim na jugu Sredozemlja, na obali Tunisa (Gulf of Gabes-Tunisia) razine gimnodimina su bile veće za pet puta od vrijednosti ustanovljene tijekom istraživanja provedenog u Libanonu. Međutim, vrijednosti spirovida u uzorcima školjkaša i planktona iz Libanonu su više nego u uzorcima iz ostalih država Sredozemlja i Jadrana (Marrouchi i sur., 2009).



Gimnodimin A je nađen u Španjolskoj duž istočne i zapadne obale u razdoblju od 2017. do 2019. godine. Zabilježene su niske vrijednosti s medijanom 1,3  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , a najviša vrijednost je bila 23,93  $\mu\text{g kg}^{-1}$  i nije štetna za ljudsko zdravlje (Lamas i sur., 2021).

Istraživanje u Italiji 2014. i 2015. godine pokazalo je značajan trend pojave različitih vrste spirovida, i to u siječnju i ožujku s vrijednošću (29,2  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ). Opadanje slijedi prema ljetnim mjesecima, dok za gimnodimin A vrijedi suprotno, povećanje u ljetnim mjesecima kad su vrijednosti bile do 12,1  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (Bacchiocchi i sur., 2020).

Kvantitativno istraživanje primjenom HPLC metode provedeno je u Tunisu, za određivanje gimnodimina A i njegove potencijalne toksičnosti. Tunis ima obalu dugu 1300 km, a obalno područje je poznato po „cvjetanju mora“. U području Golf Gabesa, laguna Boughrara je evidentirano „cvjetanje mora“, a nastalo je uslijed znatnog povećanja broja stanica *Gimnodimin sp.* Školjkaši prikupljeni na tom području su pokazivali pozitivan test na trovanje s posljedicom pojave probavnih smetnji. Test je proveden na miševima na kojima su uočeni brzi toksični učinci. Daljnja istraživanja su pokazala da je gimnodimin A odgovoran za toksičnost tuniških školjkaša čiji je uzročnik dinoflagelat koji je kasnije identificiran kao *Karenia selliformis* (Tablica 2) (Marrouchi i sur., 2009).

**Tablica 2.** Vrijednosti gimnodimina i spirovida izmjerenih u europskim državama (izvor: Hassoun i sur., 2021).

			<b>Gimnodimini</b> <b>(<math>\mu\text{g/kg}</math>)</b>	<b>Spirolidi</b> <b>(<math>\mu\text{g/kg}</math>)</b>
<i>Acanthocardia tuberculata</i>	Hrvatska		2,65-15,77	0,98-5,90
<i>Callista chione</i>	Hrvatska		1,17-6,14	0,65-2,14
	Maroko		-	-
<i>Ruditapes decussatus</i>	Tunis	Zaljev Gabes	460-1290	-
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Hrvatska	Šibenski zaljev	< DL	-
		Dubrovnik	< DL	-
		Malostonski zaljev	< DL	-
	Španjolska	Zaljevi delta Ebre	-	-

		Galicija	-	1,2-6,9
		Katalonija	-	2,2-16
	Maroko	Jama Ouled Ganem	5,6	BDL
<i>Ostrea edulis</i>	Tunis	Laguna Bizerte	-	-
<i>Crassostrea gigas</i>	Španjolska	Katalonija	-	3,5-6,6
<i>Spondylus spinosus</i>	Libanon	Tripoli	22,64-102,9	2,18-7,48
		Tyre	25-51,9	2,38-11,79
<i>Flexopecten proteus</i>	Hrvatska		-	-
<i>Pecten jacobaeus</i>	Hrvatska	Šibenski zaljev	< DL -	-
<i>Phorcus turbinatus</i>	Libanon		< DL	< DL
<i>Patella rustica complex</i>	Libanon	Tripoli	8,7	< DL
		Beirut	26,78	< DL
		Tyre	26,93	< DL
<i>Siganus rivulatus</i>	Libanon	Beirut	< DL	< DL
		Tyre	3,33	< DL

#### 1.4. Biološki test miša

Biološki test na miševima se provodi zbog testiranja toksičnosti. Testira se na način da intraperitonealnim injektiranjem ubrizgajemo pripremljeni ekstrakt u tijelo miša. Nakon injektiranja dolazi do pojave simptoma toksičnosti: hiperaktivnost, skakanje, paralize stražnjih nogu, dispneje te vrlo brzo do ugibanja. Rezultati su pokazali da su gimnodimini topljivi u diklorometanu, ali ne i u dietil eteru. Gimnodimin je pokazao najveći toksični utjecaj pri intraperitonealnoj injekciji (LD50 96  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) kod miševa, a dokazan je manje toksični učinak pri korištenju sonde (LD50 755  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ). Znakovi toksičnosti nisu primijećeni kod miševa koji su dobrovoljno uzimali hranu koja je sadržavala gimnodimin u količini dovoljnoj da se postigne doza od 7500 mg/kg te je zbog toga najmanje štetan učinak pri unosu s hranom (LD50 7500  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) (Munday i sur., 2004).

#### 1.5. Svrha i ciljevi rada

Rad se temelji na rezultatima mjerenja gimnodimina i spirovida u školjkašima iz srednjeg i južnog Jadrana. Uzorci dagnji i brbavica sakupljeni su na devet postaja u Malostonskom,

Marinskom i Kaštelanskom zaljevu. Dagnje su prikupljene na uzgajalištima, dok su brbavice prirodne populacije iz Kaštelanskog zaljeva (postaja Mlinice). Uzorci su se uzimali tijekom tri godine: 2016., 2017. i 2022., s frekvencijom 3-5 uzorkovanja mjesečno na svakoj postaji.

Svrha istraživanja je:

- Prikazati količinu nastalih gimnodimina i spiorolida u dagnjama i brbavicama
- Prikazati prostornu i vremensku raspodjelu gimnodimina i spiorolida
- Usporediti prostornu raspodjelu gimnodimina i spiorolida
- Usporediti godišnje rezultate
- Prikazati laboratorijsku obradu i LC-MS/MS metodu

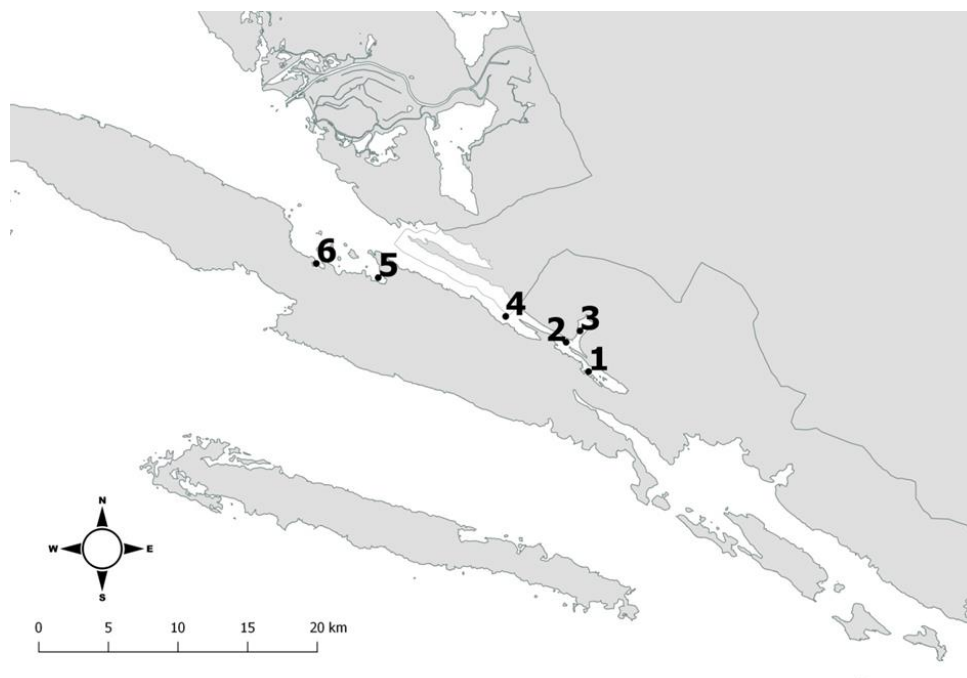
## 2. MATERIJALI I METODE

### 2.1. Područje istraživanja

Uzrokovanja su obavljena od 4. mjeseca 2016. godine do kraja te godine te tijekom čitave 2021. i 2022. godine na devet postaja srednjeg Jadrana (Tablica 3). Izlazak na teren je ovisio o vremenskim prilikama, ali uzorci su uzimani u dovoljnom broju puta, to jest 3-5 puta mjesečno. Školjkaši kojima su provjerene razine toksina u tkivu su iz uzgajališta u području Malostonskog zaljeva: Banja, Bistrina, Brijesta, Kanal Usko, Mali Ston i Sutvid, području Kaštelanskog zaljeva - Mlinice, Marinskog zaljeva - Stipan Jaz i području ušća rijeke Neretve - Škoj (Slika 4). Za mjerenje masenih udjela toksina uzete su dagnje koje su pričvršćene na pergolarima na svim područjima, osim u Mlinicama gdje su izlovljene brbavice koje žive ukopane u pijesak. Uzorci s pergolara su prikupljeni s tri razine i uzeto je oko 2 kg školjkaša.

**Tablica 3.** Područja istraživanja po kontrolnim točkama.

Točka uzorkovanja	Naziv mjesta
1	Mali Ston
2	Banja
3	Bistrina
4	Kanal Usko
5	Brijesta
6	Sutvid



**Slika 4.** Područja istraživanja po kontrolnim točkama u Malostonskom zaljevu.

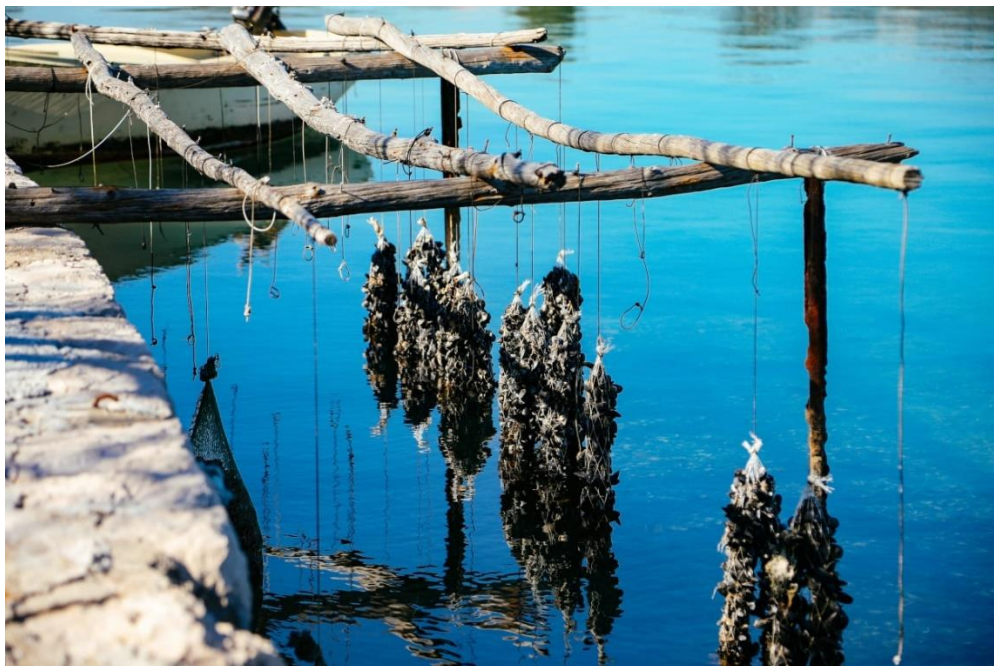
### 2.1.1. Malostonski zaljev

Malostonski zaljev je smješten u južnom dijelu Jadranskog mora, kraj Pelješca i nastavlja se na Neretvanski kanal. Dužina zaljeva iznosi 28 km, s prosječnom dubinom od 15 m i najvećom 29 m te najveće širine 6,1 km (Slika 5) (Anonimus, 2023). Zaštićen je od utjecaja valova te je zbog blizine rijeke Neretve, voda bočata. Utjecaj slatkovodne rijeke Neretve na vanjski i srednji dio zaljeva jači je nego na unutarnji dio, osobito tijekom razdoblja s većim riječnim vodostajem i snažnijim zapadnim vjetrovima. Također, brojne slatkovodne rijeke ponornice izvire u zaljevu, što utječe na ekološke i hidrofizičke uvjete unutar zaljeva. Iz tog razloga se u ovom zaljevu uzgajaju najkvalitetniji školjkaši u Hrvatskoj poput dagnji i kamenica (Slika 6) (Anonimus, 2013). Proizvodno područje ovog zaljeva podijeljeno je na 12 zona za dagnje i 6 zona za kamenice. Na temelju koncentracije hranjivih soli i količine fitoplanktona, zaljev se može opisati kao prirodno umjereno eutrofiziran ekosustav. Malostonski zaljev 1983. godine je zaštićen kao poseban rezervat prirode. Vrijednosti temperature mora zabilježene u višegodišnjem monitoringu bile su u rasponu od 12 do 29 °C, a primijećeno je formiranje termokline u ljetnim mjesecima (lipanj, srpanj i kolovoz). Najniže srednje vrijednosti slanosti su izmjerene u uvalama Bistrina i Kuta zbog

postojanja izvora slatke vode. U proljeće je naglašen utjecaj rijeke Neretve. Praćenje koncentracije hranjivih soli u Malostonskom zaljevu pokazalo je varijacije, s najvišim koncentracijama zabilježenim u godinama 2012., 2015. i 2016. U suprotnosti, niže koncentracije su zabilježene u godinama 2011., 2014., 2017. i 2018. Posebno treba napomenuti da su u 2012. i 2015. godini također zabilježeni smanjeni saliniteti, što sugerira povećani dotok hranjivih tvari kroz rijeku Neretvu, vrulje ili oborinsko ispiranje strmih obala Malostonskog zaljev (Ministarstvo gospodarstva i održivog razvoja, 2022).



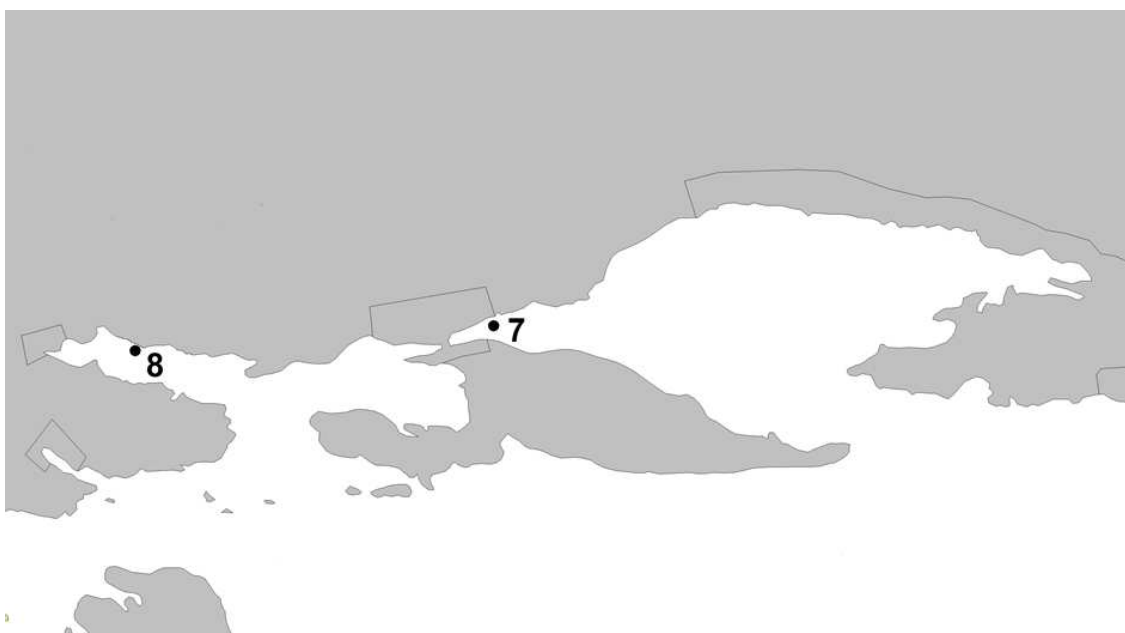
**Slika 5.** Malostonski zaljev (izvor: <https://www.morski.hr/krece-izrada-plana-upravljanja-za-podrucje-malostonskog-kanala/>).



**Slika 6.** Uzgoj dagnji na pergolaru (izvor: <https://www.juzni.hr/tag/malostonski-zaljev.html>).

**Tablica 4.** Područja istraživanja u Kaštelanskom i Marinskom zaljevu.

Točka uzorkovanja	Naziv mjesta
7	Mlinice
8	Stipan Jaz



**Slika 7.** Područje istraživanja po kontrolnim točkama u Kaštelanskom i Marinskom zaljevu.

### 2.1.2. Kaštelanski zaljev

Kaštelanski zaljev je najveći poluzatvoreni zaljev na srednjem dijelu Jadrana. Sa sjeverne strane mu se nalazi sedam Kaštela, Split na istočnoj, Trogir na zapadnoj i Čiovo na južnoj strani (Slika 8). Ukupna površina zaljeva je 61 km<sup>2</sup>, dužina 14,8 km, širina 6,6 km a srednja dubina oko 23 m (najveća 56m). Dubina se povećava od sjeverne obale prema jugu; u središnjem dijelu zaljeva prosječna dubina je između 30 i 50 m, dok maksimalna dubina iznosi 56 m. Dno Kaštelanskog zaljeva karakterizira blago nagnute ili ravne površine, prekrivene muljem i sitnim pijeskom (Anonimus, 2020). Kaštelanski zaljev je potopljena depresija koja je nastala u slojevima flišnih lapora i pješćenjaca (Anonimus, 2013). Zaljev se također nalazi u području koje je prošlo kroz urbanizaciju, poljoprivrednu djelatnost i nekadašnju industrijsku aktivnost, s prisutnim ispuštanjem komunalnih otpadnih voda, otjecanjem iz poljoprivrede i ostatkom nekadašnjeg industrijskog otpada. Postaja Mlinice sadrži 12 izvora koji formiraju jezero iz kojeg istječe rijeka Rika koja se ulijeva u more oblikujući pješćanu lagunu. Osim Mlinica uzorkovano područje zahvaća i Stipan Jaz (Marinski zaljev) (Tablica 4 i Slika 7). Najviše temperature površine mora prevladavaju u kolovozu, a maksimalne temperature u dubini u listopadu. Za vrijeme zime more se zaleđuje, naročito istočni dio zaljeva, gdje je slanoća mora manja. Maksimalni salinitet površinskog sloja vode u kolovozu iznosi 38,19 ‰, dok minimalni salinitet u prosincu i siječnju može pasti na 28,17 ‰. Salinitet se znatno mijenja, a zimi je najslanija voda u sredini zaljeva. U blizini Kaštelanske obale i sjeverne obale otoka Čiova, voda je manje slana. Rijeka Jadro te podmorski i drugi izvori značajno utječu na salinitet ovog dijela zaljeva. U sredini zaljeva, nasuprot mjestima Arbanija i Slatina, dvije podmorske vrulje ispuštaju slatku vodu, čije djelovanje ljeti nije primjetno, kada je salinitet u zaljevu najviši. Uz sjevernu obalu poluotoka Marjana nalaze se izvori bočate vode, koja sadrži sumporovodik i sumporne bakterije (Anonimus, 2020).





Slika 8. Kaštelanski zaljev (izvor: <https://www.portal.hr/kastela/map>).

### 2.1.3. Marinski zaljev

Marinski zaljev je smješten na zapadu Splitsko-dalmatinske županije (Slika 9). Najveće mjesto na obali je Marina po kojoj je zaljev dobio ime. U blizini se nalaze naselja Seget Vranjica i Poljica, smještena na sjevernoj obali zaljeva. Dužina zaljeva je 5,5 km, a najveća širina mu je 1,36 km. Marinski zaljev nema otoka, a od najvećih uvala je poznato uzgojno područje Stipan Jaz. Najveća dubina iznosi 33 m, prosječna 23 m, a površina iznosi 200×300 m. Područje je konstantno opskrbljeno slatkom vodom iz mnogih vrulja tijekom cijele godine, a u njemu se uzgajaju dagnje. Prema postojećem prostornom planu, ovo područje je predviđeno za marikulturu. Veće uvale uključuju: Stipan-Jaz, Poljica, Prališće, Velika Borovica, Bakakarac, a manje uvale su Fangara, Mala Borovica i Sv. Luka (Anonimus, 2016).



Slika 9. Marinski zaljev (izvor:

[https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2008\\_08\\_91\\_2907.html](https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2008_08_91_2907.html)).

#### 2.1.4. Postupak pripreme uzoraka mekog tkiva školjkaša za određivanje gimnodimina i spirovida na LC-MS/MS

Meko tkivo školjkaša odvoji se od ljušture i ukloni se međuljušturna tekućina. Odvaži se 100 g mekog tkiva i homogenizira u mikseru tri minute na brzini do 22000 o./min. Homogenizirano tkivo može se čuvati nekoliko tjedana na temperaturi od  $-10^{\circ}\text{C}$ .

Odvaži se  $2,0000 \pm 0,05$  g homogeniziranog mekog tkiva školjkaša. Otopinom metanola ekstrahiraju se gimnodimini i spirovidi iz tkiva školjkaša, tako da se doda 9 mL metanola. Nakon 2 minute vorteksiranja pri maksimalnoj brzini uzorak se centrifugira 10 min pri 4500 o./min. Otopina se odvoji od taloga u plastičnu posudu volumena 50 mL. Ekstrakcija s 9 mL metanola ponovi se još jednom. Nakon dodatka 9 mL otopine metanola na talog, uzorak se homogenizira ultraturaksom te centrifugira 10 min pri 4500 o./min. Otopina se dodaje metanolskom ekstraktu koji je izoliran nakon prve ekstrakcije. Za postizanje konačnog volumena od 20 mL dodaje se metanol. Za mjerenja gimnodimina i spirovida potrebno je filtrirati metanolski ekstrakt (metanol kompatibilan filter promjera pora  $0,2 \mu\text{m}$ ) u vijalicu.

### 2.1.5. Uvjeti rada na tekućinskom kromatografu

- C18 kolona za kromatografiju na reverznoj fazi 50 x 2,1 mm, veličine čestica 2,7 µm, (npr. Poroshell C18)
- temperatura kolone: 30°C
- brzina protoka mobilnih faza: 0,3 mL/min
- volumen injektiranja: 2 µL
- volumni udjeli mobilnih faza za mjerenja u pozitivnom modu:

Udio A	Udio B	Vrijeme (min)
90 %	10 %	0
20 %	80 %	4
20 %	80 %	6
90 %	10 %	6,5
90 %	10 %	11

## 2.2. LC-M/MS metoda

LC-MS/MS metoda (liquid chromatography - mass spectrometry), u prijevodu tekućinska kromatografija - spektrometrija mase, gdje je LC dio naziva koji označuje instrument kojim se odjeljuju molekule primjenom tekućinske kromatografije, a MS dio naziva koji označava instrument koji generira ione. LC-MS je instrument koji razdvaja i detektira ione u plinovitom stanju na temelju omjera mase i naboja (Slika 10). Ovaj uređaj koristi tekućinsku kromatografiju za odvajanje uzoraka i spektrometriju mase za njihovu detekciju, kombinirajući visoku sposobnost razdvajanja tekućinskom kromatografijom s velikom osjetljivošću spektrometrije mase (Zeng Ying, 2022).

### 2.2.1. Primjena i princip rada

U LC-MS sustavu, nakon što uzorak napusti kromatografski dio, odvaja se od mobilne faze i podliježe ionizaciji. Zatim se ionski fragmenti razdvajaju prema masenim brojevima pomoću analizatora mase, a rezultati se bilježe na detektoru. LC-MS koristi prednosti obje metode:

kromatografsku i masenu, spajajući izvanrednu sposobnost kromatografske metode za razdvajanje složenih uzoraka s visokom selektivnošću masene spektrometrije. LC-MS također pruža podatke o relativnoj molekulskoj masi i strukturi molekula. Ova metoda se koristi u farmaceutskim analizama, analizama hrane i ispitivanjima okoliša. Nakon što se uzorak razdvaja tekućinskom kromatografijom, svaka komponenta se ionizira u izvoru iona, stvarajući ione s određenim nabojem i različitim masenim brojevima, koji zatim ulaze u detektor masenog spektrometra. Spektri mase se generiraju prema omjeru mase i naboja, a kvalitativni i kvantitativni rezultati uzorka mogu se dobiti analizom masenih spektara (Zeng Ying, 2022).

### **2.2.2. Prednosti korištenja**

Osim što omogućuje analizu vrlo polarnih i termički nestabilnih spojeva koji nisu pogodni za analizu plinskom kromatografijom - masenom spektrometrijom (GC-MS), LC-MS nudi i sljedeće prednosti:

- a) MS omogućuje detekciju gotovo svih spojeva, što olakšava analizu spojeva koji su termički nestabilni.
- b) Iako smjesa možda nije potpuno razdvojena na kromatogramu, MS pruža izuzetnu sposobnost odvajanja i može generirati kromatograme za obje, kvalitativnu i kvantitativnu analizu.
- c) Kvalitativna analiza pruža pouzdane rezultate, pri čemu se istovremeno dobivaju podaci o molekulskoj masi i strukturi svake komponente.
- d) Granica detekcije je vrlo niska, MS se odlikuje visokom osjetljivošću, a sposobnost detekcije može se značajno poboljšati korištenjem metode detekcije odabranih iona (SIM).
- e) Analize se provode brzo zbog korištenja kolone uskog promjera u tekućinskoj kromatografiji, što skraćuje vrijeme analize i poboljšava učinkovitost odvajanja
- f) Visoka razina automatizacije (Zeng Ying, 2022).



**Slika 10.** LC-MS instrument.

### 2.2.3. Sustav klasifikacije

Tekućinska kromatografija-masena spektrometrija obično se klasificira prema dva glavna sustava: jedan se temelji na vrsti ionskog izvora spektrometra mase, dok se drugi usredotočuje na vrstu analizatora mase u spektrometru mase (Tablica 5) (Zeng Ying, 2022).

**Tablica 5.** Vrste sustava LC-MS metode (izvor: <https://antiteck.com/hr/%C5%A1to-je-lc-ms/#htoc-what-is-lc-ms>).

<b>Klasifikacijska perspektiva</b>	<b>LC - MS naziv</b>
<b>Izvor iona</b>	Ionizacija elektrosprejom (ESI) Kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku (APCI) Fotoionizacija pri atmosferskom tlaku (APPI)
<b>Analizator mase</b>	Matrična laserska desorpcija s ionizacijom (MALDI) Kvadrupolni tekućinski kromatograf - spektrometar mase

---

Tekućinska kromatografija s ionskim trapom -  
spektrometar mase  
Tečaj vremena tekućinske kromatografije -  
spektrometar mase (TOF)  
Fourierova transformacija u masenoj  
spektrometriji

---

### 2.3. MassHunter program

Kvantifikaciju LC-MS/MS mjerenja sam radila uz pomoć programa MassHunter koji je namijenjen za funkcioniranje LC-MS/MS instrumenta čiji je proizvođač Agilent Technologies. Program sadrži tri dijela:

1. Agilent MassHunter Workstation Data Acquisition, obavlja prikupljanje podataka koji nastaju tijekom mjerenja u LC-MS/MS sustavu, rukovodi i kontrolira rad sastavnica sustava: autouzorkivač, kvaterna pumpa, termostatirani odjeljak za kolonu i maseni spektrometar,
2. Agilent MassHunter Qualitative Analysis, obavlja kvalitativnu analizu podataka prikupljenih tijekom mjerenja u Agilent MassHunter Workstation Data Acquisition
3. Agilent MassHunter Quantitative Analysis, obavlja kvantitativnu analizu podataka prikupljenih tijekom mjerenja u Agilent MassHunter Workstation Data Acquisition.

Ostali potrebni podaci su: „data file“ odnosno broj uzoraka, finalna koncentracija, ukupni volumen (koji je uvijek 20 mL), masa (g), maseni udjeli - ug/kg (dobiveno iz formule: finalna koncentracija x konačni volumen/masa uzorka). Dobiveni maseni udjeli GYM i SPX pojasniti će sezonsku raspodjelu razina GYM i SPX i prostornu raspodjelu u istraživanim područjima (Zeng Ying, 2022).

### 3. REZULTATI

Uzorci su uzeti s devet postaja iz Malostonskog, Marinskog i Kaštelanskog zaljeva kako bi se ustanovile razine toksina gimnodimina i spirolida u populacijama dagnja i brbavica (Mlinice). Prikupljanja školjkaša obavljena su 3 - 5 puta mjesečno na način da se s pergolara skidaju dagnje s tri razine u količini oko 2 kg školjkaša. Školjkaši bi se oprali nakon vađenja iz mora te su doneseni na laboratorijsku obradu. Određivanje GYM i SPX obavljeno je LC-MS/MS metodom i MassHunter program za grafički prikaz podataka.

Podaci iz MassHuntera su uneseni u excel program na način da stupci u excel programu prikazuju devet postaja u tri godine: 2016., 2017. i 2022. godini po danima i mjesecima, finalnu koncentraciju (ng/mL), konačni volumen (mL) i masu uzorka (g). Iz formule finalna koncentracija \* volumen / masa dobivamo  $\mu\text{g}/\text{kg}$  koji predstavlja maseni udio toksina u uzorku (Tablica 6).

$$\mu\text{g}/\text{kg} = \text{ng}/\text{mL} * \text{ml}/\text{g}$$

#### 3.2. Gimnodimini

U Tablici 6. su navedeni podaci iz MassHunter programa koji su korišteni za izračun masenih udjela gimnodimina u analiziranim uzorcima školjkaša.

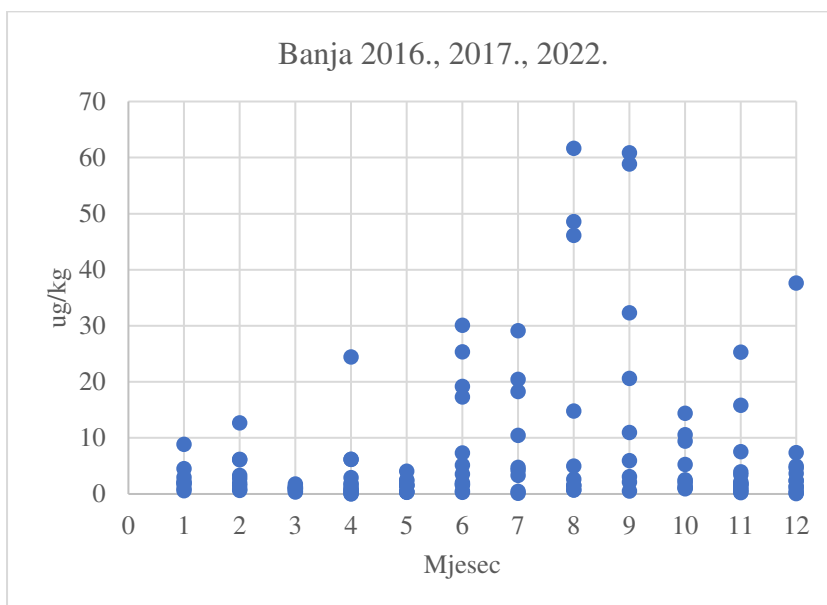
**Tablica 6.** Skraćeni tablični prikaz u excel programu za gimnodimine (GYM).

	<b>Data File</b>	<b>final conc.</b>	<b>volumen</b>	<b>masa</b>	<b>m.udio</b>	<b>datum</b>
		<b>ng/mL</b>	<b>mL</b>	<b>g</b>	<b><math>\mu\text{g}/\text{kg}</math></b>	
Stipan Jaz B1	134-16.d	0,2217	20	2,0019	2,2145	7.4.2016.
Stipan Jaz B1	001-17-r001.d	0,6965	20	2,002	6,9579	4.1.2017.
Kanal Usko B1	001.d	0,4577	20	2,003	4,5701	5.1.2022.

#### 3.2.3. Raspodjela gimnodimina na postaji Banje u 2016., 2017. i 2022. godini

Gimnodimini su mjereni na postaji Banja, na području Malostonskog zaljeva koji se nalazi u južnom dijelu Jadrana. U 2016. godini mjerenja su se provodila od 4. mjeseca do kraja te godine.

Uzorkovanja u vrijeme 2017. godine su se provodila tijekom cijele godine, svih 12 mjeseci, dok u razdoblju 2022. godine mjerenja za rujan nisu rađena radi loših vremenskih uvjeta. Iz rezultata za tri godine uočava se skok vrijednosti tijekom ljetnih mjeseci, posebice osmog i devetog mjeseca. Niže vrijednosti prevladavaju tijekom zimskih mjeseci (Slika 11). Najniža vrijednost gimnodimina promatrajući 2016., 2017. i 2022. godinu dobivena je u 4. mjesecu 2016. godine dok je najviša vrijednost dobivena u 8. mjesecu 2016., a srednja vrijednost iznosi 7,2118  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Tablica 7).



**Slika 11.** Raspodjela vrijednosti gimnodimina tijekom tri godine u 12 mjeseci na postaji Banja.

**Tablica 7.** Vrijednosti gimnodimina na postaji Banja za 2016., 2017. i 2022. godinu.

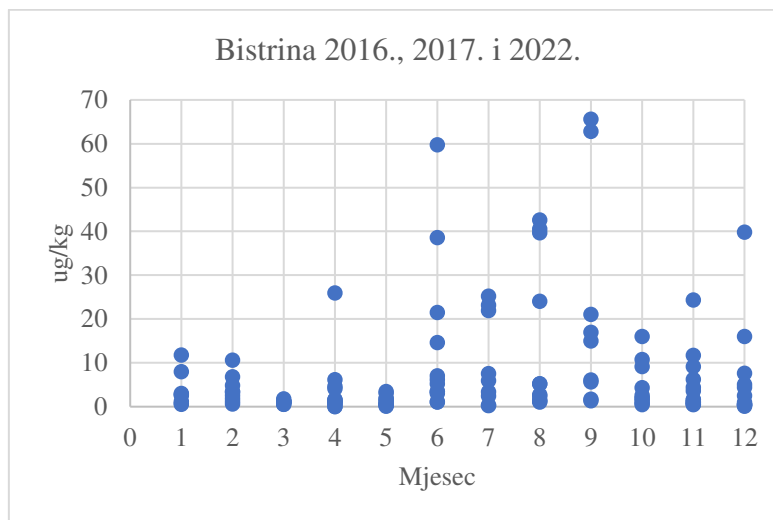
Najniži maseni udio	Najviši maseni udio	Srednja vrijednost
0,0136 $\mu\text{g}/\text{kg}$	61,6615 $\mu\text{g}/\text{kg}$	7,2118 $\mu\text{g}/\text{kg}$

### 3.2.4. Raspodjela gimnodimina na postaji Bistrina u 2016., 2017. i 2022. godini

Bistrina je postaja unutar Malostonskog zaljeva, smještena u blizini postaje Banja. Mjerenja su obavljena kroz cijele tri godine, to jest 3 - 5 puta u mjesecu. Uzorkovanje je obavljeno kako je navedeno za postaju Banje. Mjerenja pokazuju, kao i za postaju Banja, porast vrijednosti u ljetnim mjesecima (Slika 12). U Bistrini povišene vrijednosti su zabilježene u 6. mjesecu i traju do 9.



mjeseca, odnosno do početka jeseni. Najniža, najviša srednja vrijednost za tri godine su iznosile približno vrijednostima kao i za Banju (Tablica 8). Najniže vrijednosti prevladavaju u 4. mjesecu 2022. godine, najviše u 9. mjesecu 2016. godine.



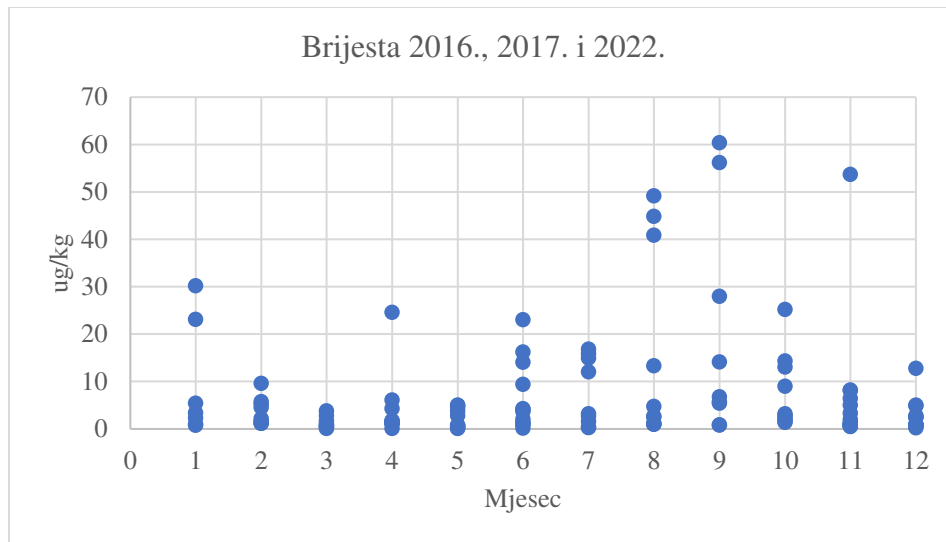
**Slika 12.** Raspodjela vrijednosti gimnodimina tijekom tri godine u 12 mjeseci na postaji Bistrina.

**Tablica 8.** Vrijednosti gimnodimina na postaji Bistrine 2016., 2017. i 2022. godinu.

Najniži maseni udio	Najviši maseni udio	Srednja vrijednost
0,0394 $\mu\text{g/kg}$	65,6159 $\mu\text{g/kg}$	7,5367 $\mu\text{g/kg}$

### 3.2.5. Raspodjela gimnodimina na postaji Brijesta u 2016., 2017. i 2022. godini

Brijesta je smještena u sjeverozapadnom dijelu Malostonskog zaljeva i udaljena je od Banje i Bistrine. Uzorkovanje školjkaša je prema istom obrascu kao i za prethodne dvije postaje. Povišenje vrijednosti zabilježeno je u 6. mjesecu s najvišim vrijednostima u 9 mjesecu. Niže vrijednosti zabilježene su u 3. mjesecu (Slika 13). Uspoređujući godine najniži maseni udjeli prevladavaju u 4. mjesecu 2016. godine, a najviši u 9. mjesecu 2016. godine (Tablica 9).



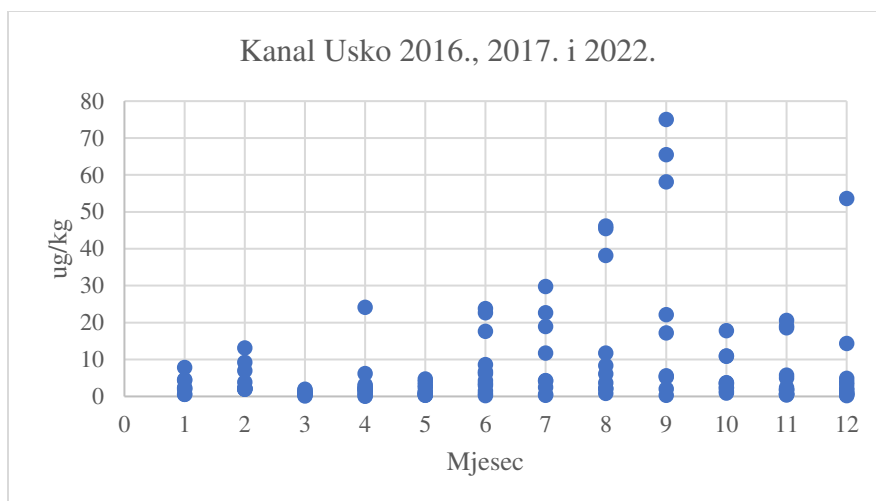
**Slika 13.** Raspodjela vrijednosti gimnodimina tijekom tri godine u 12 mjeseci na postaji Brijesta.

**Tablica 9.** Vrijednosti gimnodimina na postaji Brijesta 2016., 2017. i 2022. godinu.

Najniži maseni udio	Najviši maseni udio	Srednja vrijednost
0,0793 µg/kg	60,3750 µg/kg	6,9925 µg/kg

### 3.2.6. Raspodjela gimnodimina na postaji Kanal Usko u 2016., 2017. i 2022. godini

Kanal Usko je dobio ime po svome položaju u Malostonskom zaljevu, to jest nalazi se u uskom prolazu među postajama Banje, Bistrine i Malog Stona. Vrijednosti mjerene u ovom kanalu ne razlikuju se od prethodno opisanih postaja. Odnosno, viši maseni udjeli su u toplijim razdobljima godina, vrhunac je u 9. mjesecu, a niži maseni udjeli u hladnijim dobima (Slika 14). Srednja vrijednost iznosi 7,8121 µg/kg, najniži maseni udio je 0,0841 i najviši 75,0102 µg/kg (Tablica 10).



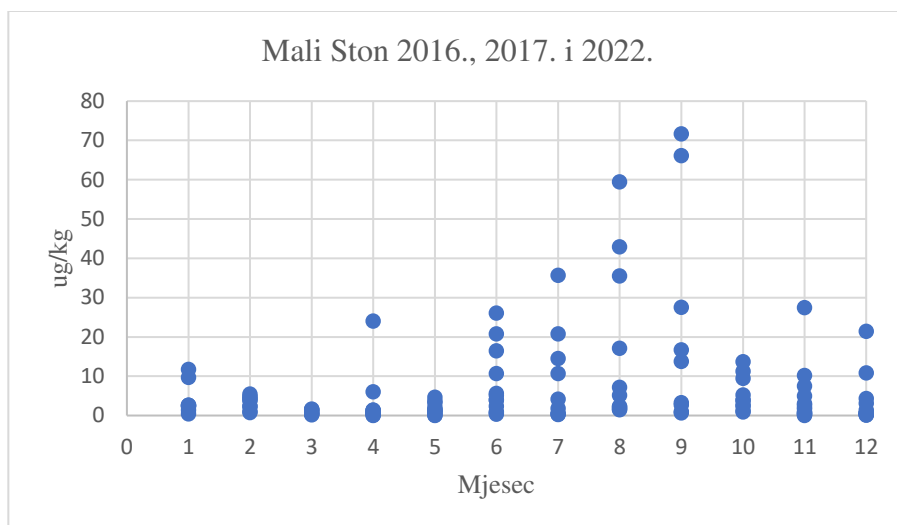
**Slika 14.** Raspodjela vrijednosti gimnodimina tijekom tri godine u 12 mjeseci na postaji Kanal Usko.

**Tablica 10.** Vrijednosti gimnodimina na postaji Kanal Usko 2016., 2017. i 2022. godinu.

Najniži maseni udio	Najviši maseni udio	Srednja vrijednost
0,0841 $\mu\text{g}/\text{kg}$	75,0102 $\mu\text{g}/\text{kg}$	7,8121 $\mu\text{g}/\text{kg}$

### 3.2.7. Raspodjela gimnodimina na postaji Mali Ston u 2016., 2017. i 2022. godini

Mali Ston je dobio ime po Malostonskom zaljevu u kojem se prostire u jugoistočnom dijelu . Analiza gimnodimina pokazuje istu raspodjelu kao i u ostalim dijelovima Malostonskog zaljeva. U zimskim mjesecima maseni udjeli ne prelaze 28  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , a u ljetnim mjesecima vrhunac dolazi u 9. mjesecu (Slika 15). Usporedba po godinama pokazuje da je najniža vrijednost zabilježena u 5. mjesecu 2017. godine, a najviša u 9. mjesecu 2016. godine. Srednja vrijednost svih godina iznosi 6,7882  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Tablica 11).



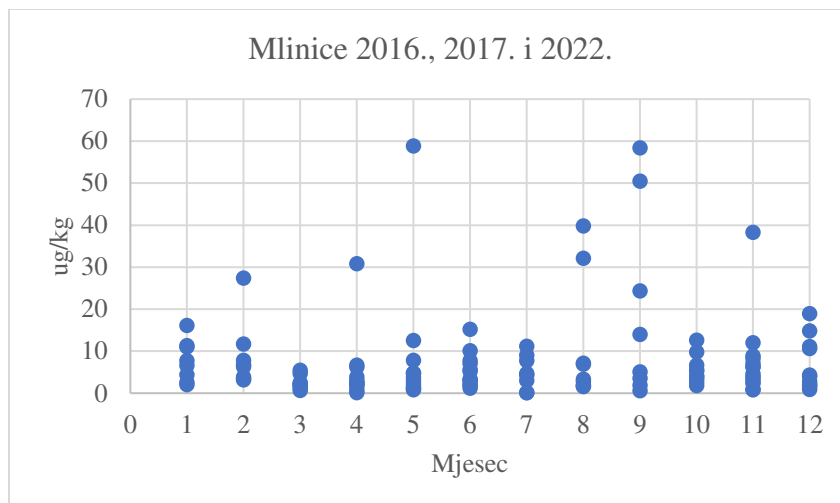
**Slika 15.** Raspodjela vrijednosti gimnodimina tijekom tri godine u 12 mjeseci na postaji Malog Stona.

**Tablica 11.** Vrijednosti gimnodimina na postaji Malog Stona 2016., 2017. i 2022. godinu.

Najniži maseni udio	Najviši maseni udio	Srednja vrijednost
0,0435 µg/kg	71,7076 µg/kg	6,7882 µg/kg

### 3.2.8. Raspodjela gimnodimina na postaji Mlinice u 2016., 2017. i 2022. godini

Područje Mlinice nalazi se u Kaštelanskom zaljevu, koji je u srednjem Jadranu te je jedino područje u kojem se prikupljaju brbavice umjesto dagnji. Mlinice su jedino područje koje se razlikuje od drugih postaja uzorkovanja jer tijekom cijele godine ne pokazuje velike razlike u mjerenjima. U 8. i 9. mjesecu pokazuju, kao i podaci za ostale, povišene vrijednosti (Slika 16). Najviši maseni udio iznosi 58,8327 µg/kg. Najniži maseni udio zabilježen je 4. mjesecu 2022. godine (Tablica 12).



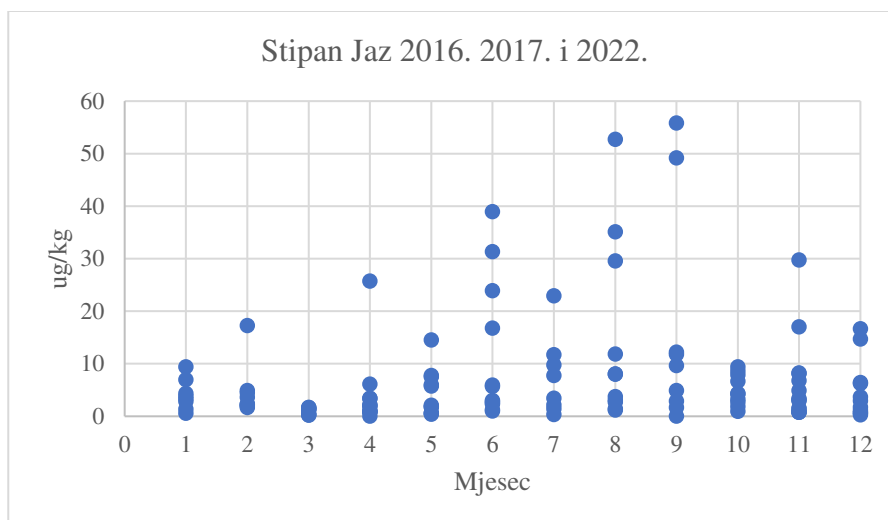
**Slika 16.** Raspodjela vrijednosti gimnodimina tijekom tri godine u 12 mjeseci na postaji Mlinice.

**Tablica 12.** Vrijednosti gimnodimina na postaji Mlinica 2016., 2017. i 2022. godinu.

Najniži maseni udio	Najviši maseni udio	Srednja vrijednost
0,1096 $\mu\text{g}/\text{kg}$	58,8327 $\mu\text{g}/\text{kg}$	7,6665 $\mu\text{g}/\text{kg}$

### 3.2.9. Raspodjela gimnodimina na postaji Stipan Jaz u 2016., 2017. i 2022. godini

Stipan Jaz pripada području Marinskog zaljeva, također u srednjem dijelu Jadrana, kao i postaja Mlinice. Rezultati mjerenja pokazuju visoke masene udjele u 6., 8. i 9. mjesecu. U 6. mjesecu maseni udjeli su do 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , a u 8. i 9. mjesecu preko 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Slika 17). Najviši maseni udio zabilježen je u 9. mjesecu 2016. godine (Tablica 13).



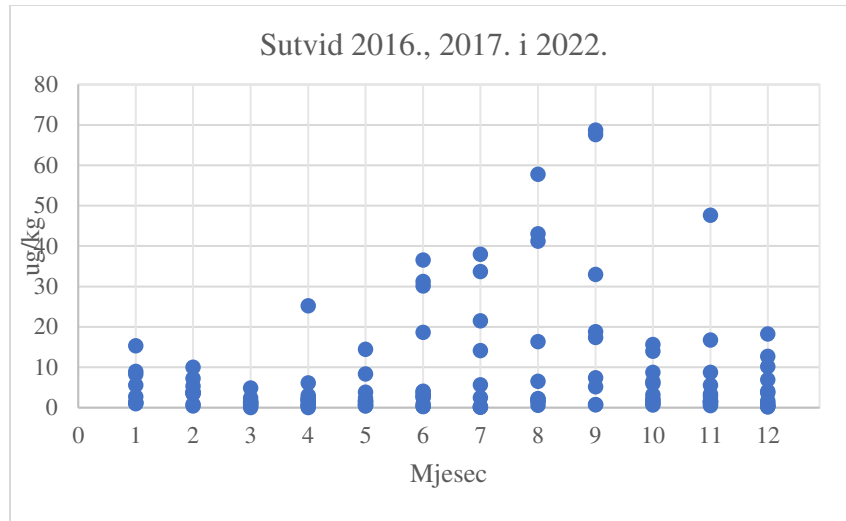
**Slika 17.** Raspodjela vrijednosti gimnodimina tijekom tri godine u 12 mjeseci na postaji Stipan Jaz.

**Tablica 13.** Vrijednosti gimnodimina na postaji Stipan Jaz 2016., 2017. i 2022. godinu.

Najniži maseni udio	Najviši maseni udio	Srednja vrijednost
0,0315 µg/kg	55,8081 µg/kg	7,1152 µg/kg

### 3.2.10. Raspodjela gimnodimina na postaji Sutvid u 2016., 2017. i 2022. godini

U sjeverozapadnom dijelu Malostonskog zaljeva nalazi se uzgajalište Sutvid. Rast masenih udjela gimnodimina donosi toplije vrijeme, a posebno u 9. mjesecu 2016. godine, kada su izmjereni najviši maseni udjeli (Slika 18), dok u zimskim periodima prevladavaju niži maseni udjeli gimnodimina te je najniži maseni udio zabilježen u 4. mjesecu 2022. godine. Niži maseni udjeli zabilježeni su u 3. mjesecu dok su najviši u 9. mjesecu (Tablica 14).



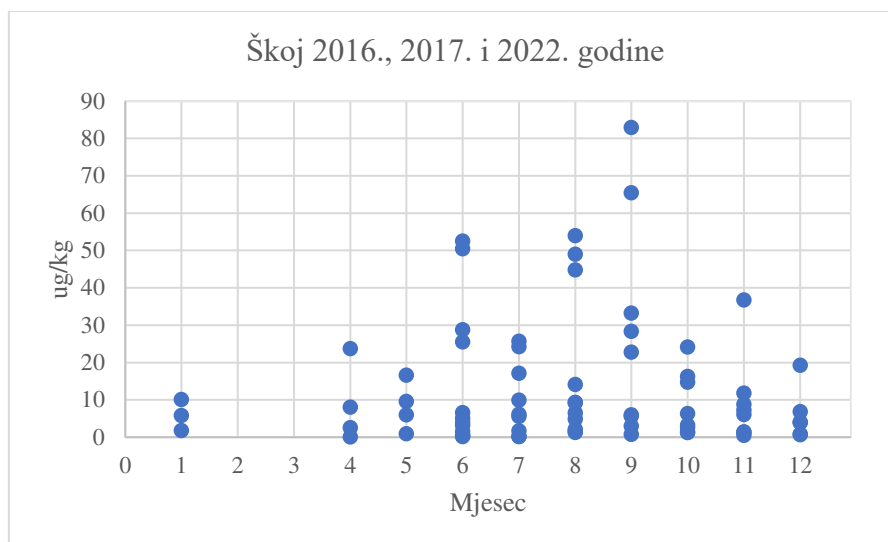
**Slika 18.** Raspodjela vrijednosti gimnodimina tijekom tri godine u 12 mjeseci na postaji Sutvid.

**Tablica 14.** Vrijednosti gimnodimina na postaji Sutvid 2016., 2017. i 2022. godinu.

Najniži maseni udio	Najviši maseni udio	Srednja vrijednost
0,0097 $\mu\text{g}/\text{kg}$	68,6811 $\mu\text{g}/\text{kg}$	8,3408 $\mu\text{g}/\text{kg}$

### 3.2.11. Raspodjela gimnodimina na postaji Škoj u 2016., 2017. i 2022. godini

U području ušća rijeke Neretve se nalazi postaja Škoj. Na postaji Škoj uzorkovanja su rađena u razdoblju 4.-12. mjeseca 2016. godine, u 2017. godini izostaju mjerenja 2., 3. i 4. mjeseca, a u 2022. godini je uzorkovano tijekom 6., 7. i 8. mjeseca (Slika 19). Od 6. do 9. mjeseca prevladavaju viši maseni udjeli. Najniži maseni udio je zabilježen u 4. mjesecu 2016. godine, a najviši, nešto viši nego u ostalim područjima, iznosi 82,9446  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , prikazan na slici u 9. mjesecu (Tablica 15).



**Slika 19.** Raspodjela vrijednosti gimnodimina tijekom tri godine u 12 mjeseci na postaji Škoj.

**Tablica 15.** Vrijednosti gimnodimina na postaji Škoj 2016., 2017. i 2022. godinu.

Najniži maseni udio	Najviši maseni udio	Srednja vrijednost
0,0631 $\mu\text{g/kg}$	82,9446 $\mu\text{g/kg}$	13,2453 $\mu\text{g/kg}$

### 3.3. Spirolidi

U Tablici 16. su navedeni podaci iz MassHunter programa koji su korišteni za izračun masenih udjela spirolida u analiziranim uzorcima školjkaša.

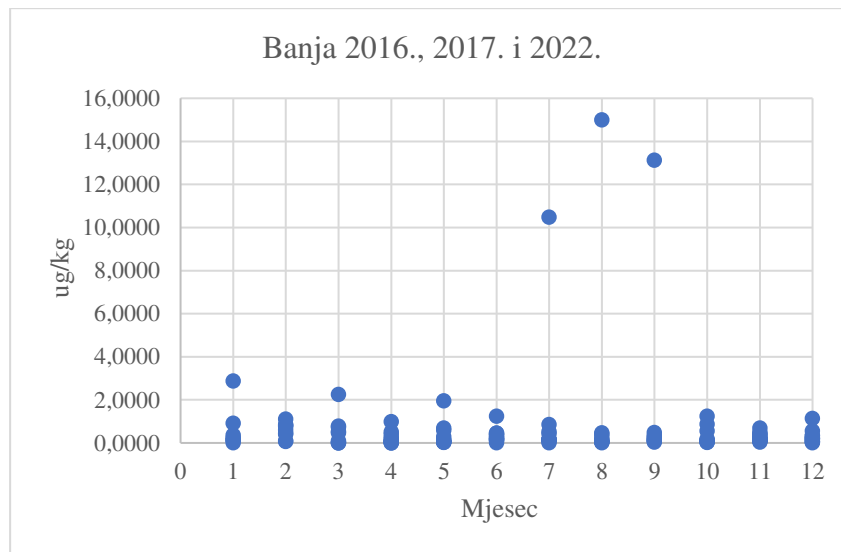
**Tablica 16.** Skraćeni tablični prikaz u excel programu za spirolide (SPX).

	Final Conc.	volumen mL	masa g	$\mu\text{g/kg}$	datum
Stipan Jaz B1	0,0287	20	2,0019	0,2867	7.4.2016.
Mlinice B1	0,0428	20	2,0037	0,4270	7.4.2016.
Škoj B1	0,0016	20	2,0016	0,0155	7.4.2016.

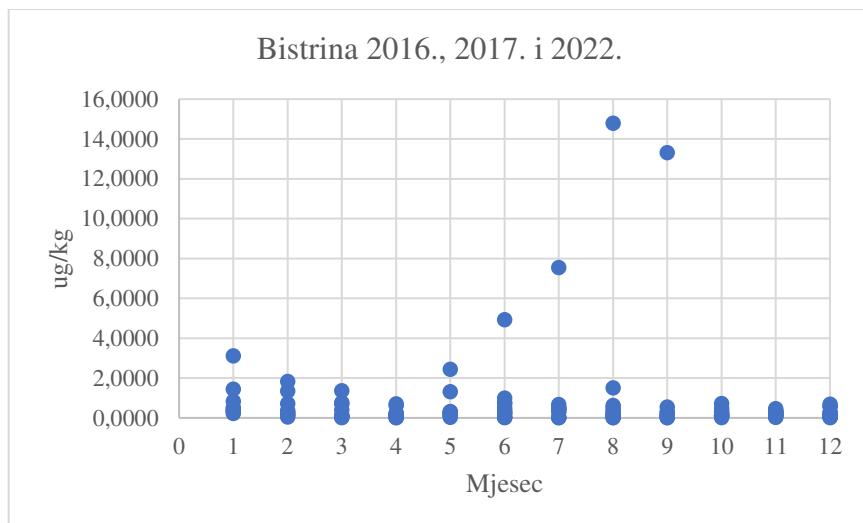


### 3.3.3. Raspodjela spirolida na području Malostonskog zaljeva u 2016., 2017. i 2022. godini

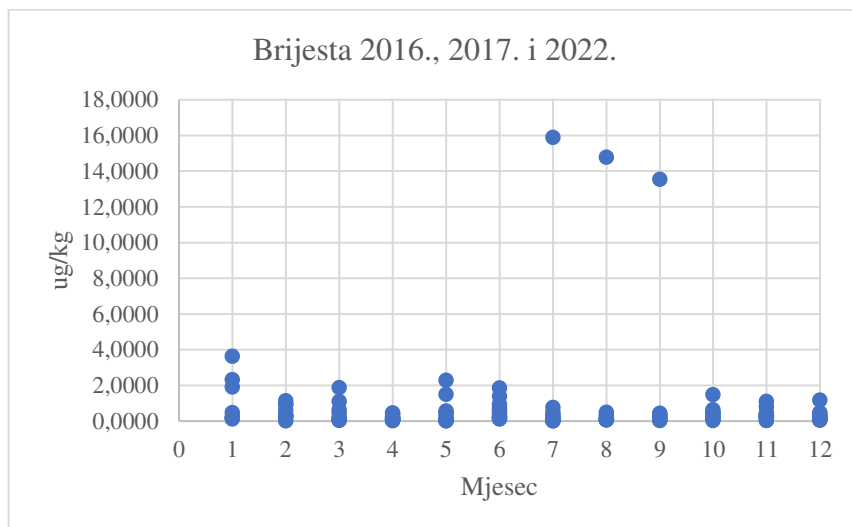
Područje Malostonskog zaljeva obuhvaća područja - uzgajališta: Banja, Bistrina, Brijesta, Kanal Usko, Mali Ston i Sutvid. Sva navedena područja smještena su u južnom dijelu Jadrana, u Dubrovačko - neretvanskoj županiji. Mjerenja su se obavljena za uzorke dagnji prikupljenih od 4. mjeseca 2016. godine, tijekom 2017. godinu te u 2022. godini nema mjerenja za 9. mjesec. U svim područjima se uzgajaju dagnje koje pokazuju tijekom 2016., 2017. i 2022. godine približno jednake vrijednosti mjerenja masenih udjela spirolida u tkivu školjkaša. Naspram gimnodimina koji pokazuju više vrijednosti u toplijim mjesecima, spirolidi su za sva istraživana područja ujednačenih masenih udjela, uz povišene masene udjele u 7., 8. i 9. mjesecu. (slika 20, 21, 22, 23, 24 i 25). Postaja Brijesta pokazuje najvišu vrijednost spirolida u 7. mjesecu 2016. godine, a najnižu postaja Sutvid. Srednji maseni udjeli spirolida su najviši na području Brijeste, a najniži u Banji (Tablica 17).



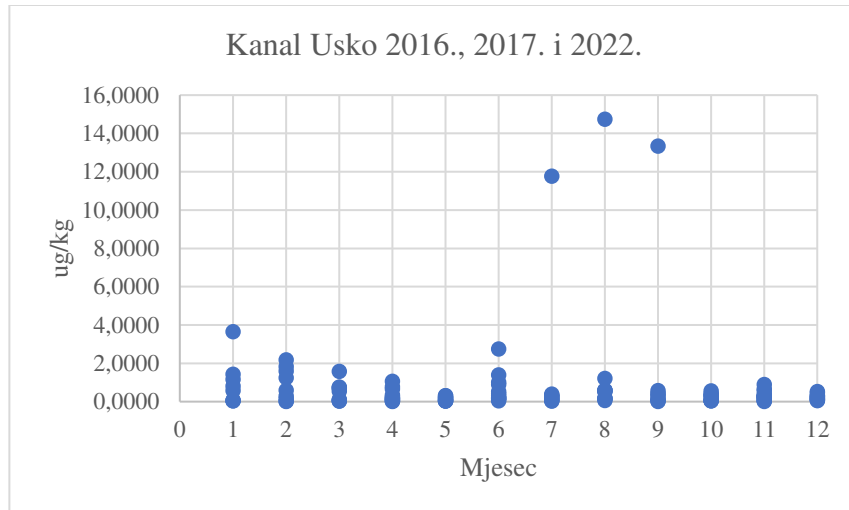
**Slika 20.** Raspodjela vrijednosti spirolida tijekom tri godine u 12 mjeseci na postaji Banja.



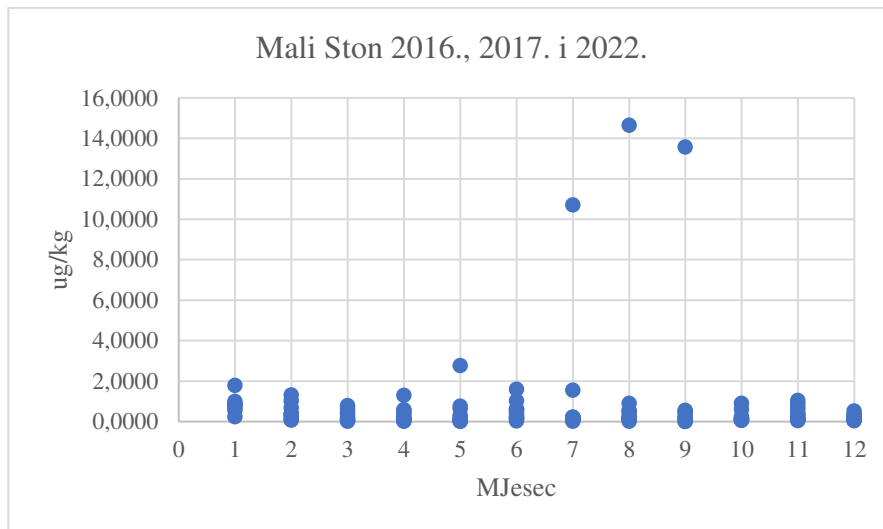
**Slika 21.** Raspodjela vrijednosti spirolida tijekom tri godine u 12 mjeseci na postaji Bistrina.



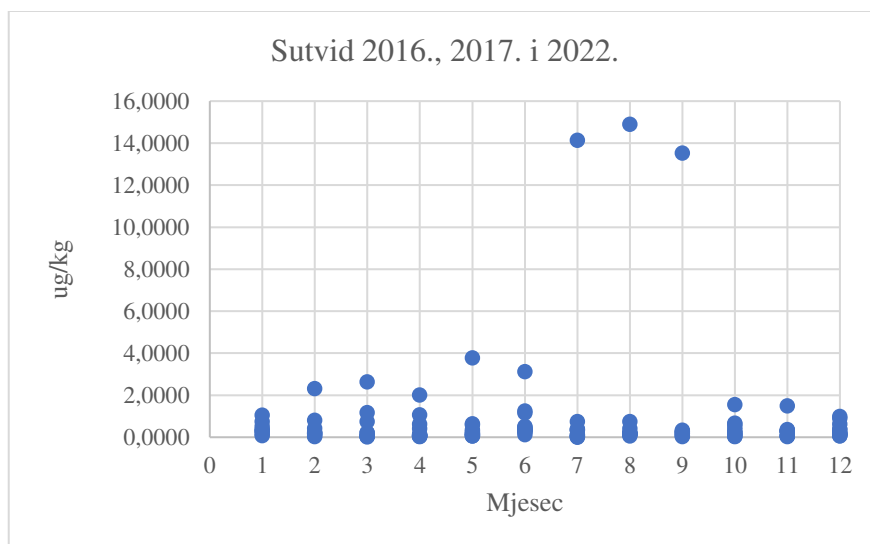
**Slika 22.** Raspodjela vrijednosti spirolida tijekom tri godine u 12 mjeseci na postaji Brijesta.



**Slika 23.** Raspodjela vrijednosti spiorolida tijekom tri godine u 12 mjeseci na postaji Kanal Usko.



**Slika 24.** Raspodjela vrijednosti spiorolida tijekom tri godine u 12 mjeseci na postaji Mali Ston.



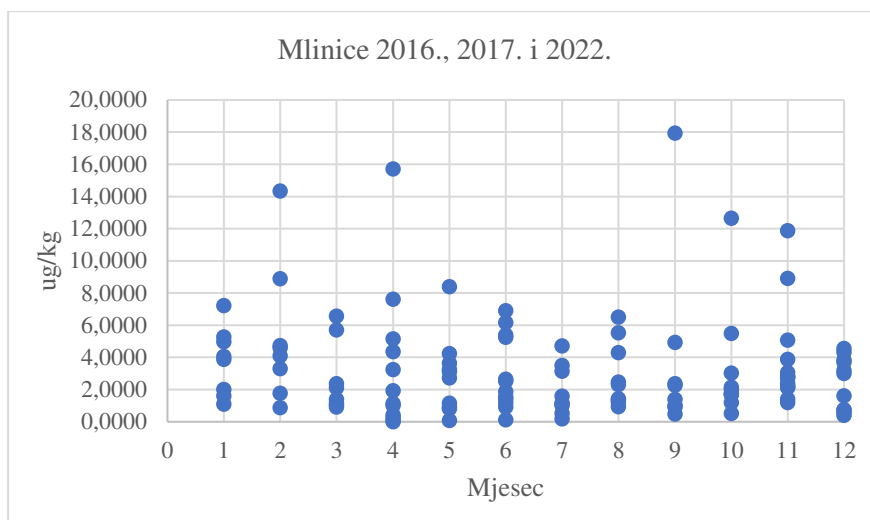
**Slika 25.** Raspodjela vrijednosti spirolida tijekom tri godine u 12 mjeseci na postaji Sutvid.

**Tablica 17.** Najniži, najviši maseni udio i srednja vrijednost spirolida ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) za 2016., 2017. i 2022. godinu na postajama Malostonskog zaljeva.

	Banja	Bistrina	Brijesta	Kanal Usko	Mali Ston	Sutvid
Najniži maseni udio	0,0041	0,0083	0,0140	0,0040	0,0029	0,0000
Najviši maseni udio	15,0014	14,7834	15,8911	14,7429	14,6520	14,9032
Srednja vrijednost	0,6441	0,6703	0,7548	0,7195	0,6804	0,7529

### 3.3.4. Raspodjela spirolida na području Kaštelanskog zaljeva – Mlinice u 2016., 2017. i 2022. godini

Mlinice su postaja u Kaštelanskom zaljevu (srednja Dalmacija) i jedina je postaja u kojoj su se za uzorke uzimale brbavice, a ne dagnje kao u ostalim područjima. Mlinice pokazuju drukčije masene udjele od zabilježenih na ostalim postajama. Druga uzgajališta prikazuju jednoliku raspodjelu vrijednosti spirolida, dok Mlinice pokazuju povišene masene udjele tijekom cijele godine (Slika 26). Najviši maseni udio je zabilježen u 9. mjesecu 2016. godine, a najniži u 4. mjesecu 2022. godine (Tablica 18).



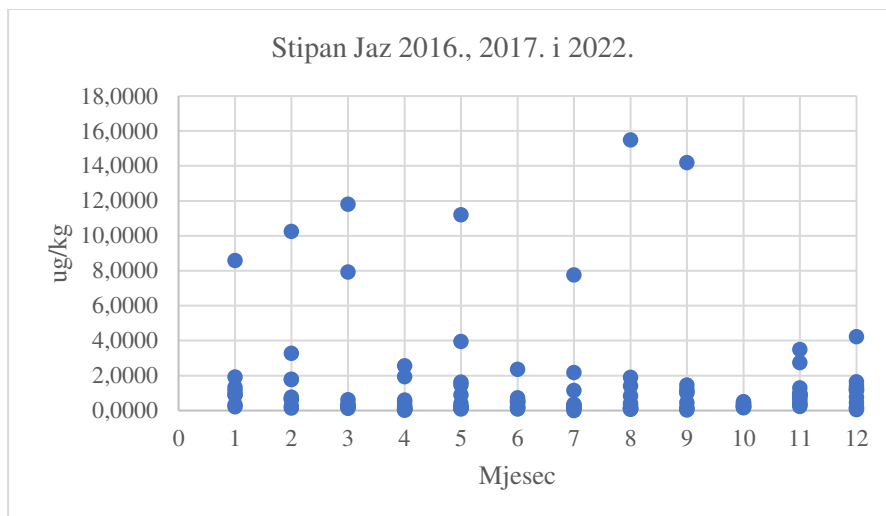
**Slika 26.** Raspodjela vrijednosti spiroolida tijekom tri godine u 12 mjeseci na postaji Mlinice.

**Tablica 18.** Vrijednosti spiroolida na postaji Mlinice 2016., 2017. i 2022. godinu

Najniži maseni udio	Najviši maseni udio	Srednja vrijednost
0,0073 µg/kg	17,9537 µg/kg	3,2430 µg/kg

### 3.3.5. Raspodjela spiroolida na području Marinskog zaljeva – Stipan Jaz u 2016., 2017. i 2022. godini

Stipan Jaz je postaja smještena u Marinskom zaljevu koji je u srednjem dijelu Jadrana. Mjerenja spiroolida pokazuju niže masene udjele tijekom cijele godine s pojedinim izuzecima (Slika 27). Nekoliko masenih udjela je više i zabilježeni su u 1., 2., 3., 5., 6., 7., 8. i 9. mjesecu. Najviši maseni udio je zabilježen u 8. mjesecu, a najniži u 7. mjesecu. (Tablica 19).



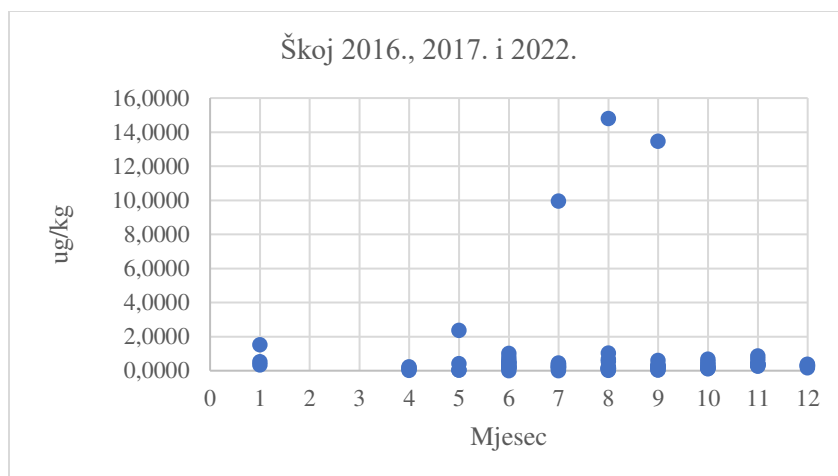
**Slika 27.** Raspodjela vrijednosti spirolida tijekom tri godine u 12 mjeseci na postaji Stipan Jaz.

**Tablica 19.** Vrijednosti spirolida na postaji Stipan Jaz 2016., 2017. i 2022. godinu.

Najniži maseni udio	Najviši maseni udio	Srednja vrijednost
0,0053 µg/kg	15,4931 µg/kg	1,3976 µg/kg

### 3.3.6. Raspodjela spirolida na postaji Škoj u 2016., 2017. i 2022. godini

Škoj se nalazi u području ušća rijeke Neretve te je jedina postaja koja se nalazi na tom području. Dagnje su prikupljene od 4. mjeseca 2016. godine, u 2017. izostaju uzorci za 2., 3. i 4. mjesec, dok u 2022. postoje samo za 6., 7. i 8. mjesec. Količine spirolida su vrlo niske s ponekim višim vrijednostima. Raspodjela spirolida je tijekom cijele godine jednolična osim u 7., 8. i 9. mjesecu gdje je zabilježena poneka viša vrijednost (Slika 28). Najniži maseni udio je zabilježen u 7. mjesecu 2017. godine, a najviši u 8. mjesecu 2016. godine (Tablica 20).



**Slika 28.** Raspodjela vrijednosti spirovida tijekom tri godine u 12 mjeseci na postaji Škoj.

**Tablica 20.** Vrijednosti spirovida na postaji Škoj 2016., 2017. i 2022. godinu.

Najniži maseni udio	Najviši maseni udio	Srednja vrijednost
0,0042 µg/kg	14,7942 µg/kg	0,8616 µg/kg

### 3.4. Godišnja raspodjela gimnodimina po postajama

Uspoređujući 2016., 2017. i 2022. godinu najniže vrijednosti masenih udjela GYM po godini, su u uzorcima različitih postaja uzorkovanja (Tablice 21 – 23). Tako je za 2016. godinu najniži maseni udio izmjeren u uzorku s postaje Banja (Tablica 21), 2017. godine u Malom Stonu (Tablica 22) te u 2022. godini u Sutvidu (Tablica 23). Maksimum razine gimnodimina se primjetno razlikuju povezujući 2016., 2017. i 2022. godinu. Maksimum je tako pronađen 2016. godine u postaji Škoj gdje je iznosio 82,9447 µg/kg (Tablica 21), dok je 2017. godine najviša vrijednost evidentirana u Mlinicama (Tablica 22), a 2022. godine u Kanal Uskom (Tablica 23). Promatrajući srednje vrijednost u tablici vidimo da je najviša bila u 2016. godini (Tablica 21), a u 2017. i 2022. godini se nisu bitno razlikovale (Tablica 22 i 23). Srednje vrijednosti za 2016. g. bile su u rasponu 15,7025 - 23,7773 µg/kg, što je za 5 - 7 puta više od srednjih vrijednosti za 2017. g. (2,5293 - 4,3204 µg/kg) i za 2022. g. (2,1216 - 4,3155 µg/kg).

**Tablica 21.** Prikaz najniže, najviše i srednje vrijednosti gimnodimina u 2016. godini po postajama (podebljane najniža i najviša vrijednost).

<b>2016.</b>	Banja	Bistrina	Brijesta	Kanal Usko	Mali Ston	Mlinice	Stipan Jaz	Sutvid	Škoj
Najniža vrijednost (µg/kg)	<b>0,0136</b>	0,0480	1,1769	0,0841	0,0707	0,6350	0,0315	0,6018	0,0631
Najviša vrijednost (µg/kg)	61,6615	65,6159	60,3750	75,0102	71,7076	58,8327	55,8081	68,6811	<b>82,9447</b>
Srednja vrijednost (µg/kg)	18,600	19,4054	17,4255	19,7540	17,8312	15,7025	16,2453	21,3404	23,7773

**Tablica 22.** Prikaz najniže, najviše i srednje vrijednosti gimnodimina u 2017. godini po postajama (podebljane najniža i najviša vrijednost).

<b>2017.</b>	Banja	Bistrina	Brijesta	Kanal Usko	Mali Ston	Mlinice	Stipan Jaz	Sutvid	Škoj
Najniža vrijednost (µg/kg)	0,1040	0,2324	0,1020	0,0890	<b>0,0435</b>	0,1266	0,2936	0,1116	0,2073
Najviša vrijednost (µg/kg)	12,7259	11,7640	30,2248	13,1343	11,7611	<b>27,4227</b>	17,2483	15,3013	10,1201
Srednja vrijednost (µg/kg)	2,6397	2,7670	3,3283	2,7800	2,5293	4,3204	3,1592	3,0381	2,8817

**Tablica 23.** Prikaz najniže, najviše i srednje vrijednosti gimnodimina u 2022. godini po postajama (podebljane najniža i najviša vrijednost).

<b>2022.</b>	Banja	Bistrina	Brijesta	Kanal Usko	Mali Ston	Mlinice	Stipan Jaz	Sutvid	Škoj
Najniža vrijednost (ug/kg)	0,0938	0,0394	0,0793	0,1987	0,0478	0,1096	0,0505	<b>0,0097</b>	0,1810
Najviša vrijednost (ug/kg)	37,6259	39,8288	12,8018	<b>53,5787</b>	21,4243	14,8056	17,0031	18,2780	9,3505
Srednja vrijednost (ug/kg)	2,9541	2,8156	2,1216	3,6317	2,1820	4,3155	3,5564	3,0053	4,5113

### 3.5. Godišnja raspodjela spirolida po postajama

Najniži maseni udjeli spirolida 2016. godini je izmjeren u uzorku iz Malog Stona (Tablica 24), 2022. godine iz Mlinica (Tablica 26), a 2017. godine iz Sutvida (Tablica 25) gdje je su evidentirane vrijednosti SPX ispod LOD µg/kg. Najviši maseni udjeli se nisu mnogo razlikovali



među postajama (Tablica 24, 25, 26), a najviši za sve tri godine su za postaju Mlinice, na kojoj su sakupljani uzorci brbavica (*V. verrucosa*) iz prirodnih populacija. Srednje vrijednosti su također, bile vrlo slične za sve postaje osim za Mlinice, gdje su evidentirane najviše srednje vrijednosti SPX za sve istraživane godine te ukazuje na značajniju akumulaciju SPX u brbavicama u odnosu na akumulaciju u dagnjama. Srednje vrijednosti za 2016. godinu bez rezultata za Mlinice (2016.; 3,2948 µg/kg, 2017.; 2,4729 µg/kg i 2022.; 3,8446 µg/kg) su bile u rasponu 1,3239 - 1,9066 µg/kg, što je za 4 - 9 puta više od srednjih vrijednosti za 2017. godinu (0,1470 - 0,4817 µg/kg) i za 2022. godinu (0,5379-0,7576 µg/kg). Raspodjela spirovida po godinama na svim postajama odgovara raspodjeli gimnodimina, osim za uzorke s postaje Mlinice. Prema rezultatima mjerenja prirodne populacije brbavica značajnije akumuliraju spirovide od populacija dagnji iz uzgoja.

**Tablica 24.** Prikaz najniže, najviše i srednje vrijednosti spirovida u 2016. godini po postajama (podebljane najniže i najviša vrijednost).

<b>2016.</b>	Banja	Bistrina	Brijesta	Kanal Usko	Mali Ston	Mlinice	Stipan Jaz	Sutvid	Škoj
Najniža vrijednost (µg/kg)	0,0539	0,0149	0,0451	0,0204	<b>0,0029</b>	0,4270	0,0280	0,0489	0,0155
Najviša vrijednost (µg/kg)	15,0014	14,7834	15,8911	14,7429	14,6520	<b>17,9537</b>	15,4931	14,9032	14,7942
srednja vrijednost (µg/kg)	1,3239	1,4394	1,5548	1,4103	1,4498	3,5948	1,9066	1,6614	1,3777

**Tablica 25.** Prikaz najniže, najviše i srednje vrijednosti spirovida u 2017. godini po postajama (podebljane najniže i najviša vrijednost).

<b>2017.</b>	Banja	Bistrina	Brijesta	Kanal Usko	Mali Ston	Mlinice	Stipan Jaz	Sutvid	Škoj
Najniža vrijednost (µg/kg)	0,0041	0,0083	0,0140	0,0040	0,0189	0,0800	0,0053	<b>0,0000</b>	0,0042
Najviša vrijednost (µg/kg)	0,6137	0,5470	2,3110	1,4202	1,0041	<b>15,7237</b>	3,2704	1,0522	1,5241
srednja vrijednost (µg/kg)	0,1569	0,1470	0,2253	0,1934	0,2139	2,4729	0,4817	0,1659	0,3213

**Tablica 26.** Prikaz najniže, najviše i srednje vrijednosti spirovida u 2022. godini po postajama (podebljane najniže i najviša vrijednost).

<b>2022.</b>	Banja	Bistrina	Brijesta	Kanal Usko	Mali Ston	Mlinice	Stipan Jaz	Sutvid	Škoj
Najniža vrijednost ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	0,0221	0,0097	0,0149	0,0158	0,0449	<b>0,0073</b>	0,0173	0,0555	0,1600
Najviša vrijednost ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	2,8874	3,1182	3,6352	3,6563	1,7968	<b>12,6494</b>	11,8109	2,6413	1,0285
srednja vrijednost ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	0,6461	0,6216	0,6742	0,7576	0,5651	3,8446	2,0387	0,6526	0,5379

## 4. RASPRAVA

Gimnodimini i spiroolidi spadaju u cikličke imine (morski lipofilni toksini) koje proizvode fitoplanktonske vrste roda *Dinoflagelate*. Gimnodimine proizvode vrste *Karenia selliformis*, *Alexandrium peruvianum* i *Alexandrium ostenfeldii*. Spirolide produciraju vrste *Alexandrium ostenfeldii* i *Alexandrium peruvianum* (Cembella, 2008). Sve navedene vrste su povezane sa cvjetanjem mora, fenomenom koji obuhvaća masovno razmnožavanje algi ili cijanobakterija. Povećan unos hranjivih tvari, posebno fosfata, uzrokuje rast potrošnje kisika, što može dovesti do smrti sisavaca. Cvjetanje mora se najčešće događa ljeti i početkom jeseni, najčešće zbog povećane eutrofikacije. Zbog toga rezultati uzorkovanja u ljetnim mjesecima 2016., 2017. i 2022. godine prikazuju više razine gimnodimina i spiroolida. Također viši skok vrijednosti opisanih toksina može biti i zbog životnog ciklusa dagnji i brbavica. Poznato je da se dagnje (*Mytilus galloprovincialis*) mrijeste dva puta godišnje, u jesen i proljeće. *M. Galloprovincialis* raste brzo te doseže svoju prosječnu veličinu već u ovoj godini, brbavica (*Venus verrucosa*) se mrijesti u proljeće i ljeto te joj treba da dostigne komercijalnu veličinu najmanje dvi godine (Anonimus, 2012). Veličina dagnji i brbavica koje su se u radu koristile kao uzorkovane vrste također je djelovala na ishode rezultata. Odnosno ovisno o tome koja je veličina jedinke bila u zadanom trenutku ovisio je i maseni udio toksina gimnodimina i spiroolida.

Svrha ovog rada je bila prikazati raspodjelu masenih udjela gimnodimina i spiroolida u srednjem i južnom Jadranu u devet određenih postaja unutar tri godine, 3 - 5 puta tjedno. Istraživanje je pokazalo porast vrijednosti gimnodimina i spiroolida u ljetnim mjesecima naspram zimskih mjeseci. Na postaji Mlinice se sakupljala brbavica kao eksperimentalni organizam dok se u ostalim postajama koristila dagnja. Vrijednosti gimnodimina su u 2016., 2017. i 2022. godini pokazale porast u ljetnim mjesecima što može biti zbog povećanja broj morskih algi koje proizvode gimnodimine. Uočava se isti trend opadanja i porasta vrijednosti, ali uspoređujući godine jasno je da se pojavljuju neke razlike u visini vrijednosti. Najviši maksimum je dosegao vrijednost 82,9447 µg/kg u 2016. godini na postaji Škoj (Slika 19) koja se nalazi u blizini ušća rijeke Neretve. Prikazujući 2017. i 2022. godinu rezultati pokazuju niži maksimum - 27,4227 µg/kg u 2017. (Tablica 22) godini i u 2022. - 53,5787 µg/kg (Tablica 23). Što se tiče minimuma, svoju vrijednost je dosegao u 2022. godini s vrijednošću 0,0097 µg/kg u postaji Sutvid (Tablica 23). U 2016. i 2017. godini najniže vrijednosti su izmjerene na postajama Banja i Mali Ston (Tablica 21 i 22).

Srednje vrijednosti su bile najviše u 2016. godini, a u ostale dvije godine za 5-7 puta niže, i to za 2017. g. (2,5293 - 4,3204  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) te za 2022. g. (2,1216 - 4,3155  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) (Tablice 21, 22 i 23). Istraživanje je pokazalo da su vrijednosti gimnodimina bile najviše u 2016. godini, a najniže u 2022. godini. S druge strane vrijednosti spirovida su pokazale niže masene udjele u uzorcima nego što su bile vrijednosti gimnodimina. U uzgajalištima Malostonskog zaljeva i ušća rijeke Neretve, to jest postajama Banja, Bistrina, Brijesta, Kanal Usko, Mali Ston, Sutvid i Škoj u sve tri istraživane godine vrijednosti spirovida su niže od vrijednosti gimnodimina, uz pojedinačne povišene vrijednosti, zabilježene uglavnom u 7., 8. i 9. mjesecu (Slika 20, 21, 22, 23, 24, 25 i 28). Na postajama Mlinice i Stipan Jaz su izmjereni viši maseni udjeli nego u uzorcima iz Malostonskog zaljeva (Slika 26 i 27). Maksimum je u 2016. godini kao što je to evidentirano i za gimnodimine. Maksimum je zabilježen u Mlinicama u Kaštelanskom zaljevu s vrijednošću od 17,9537  $\mu\text{g}/\text{kg}$  u 2016. godini, ali isto tako i u 2017. i 2022. godini (Tablica 24, 25 i 26). Minimum je najviši u 2017. godini u postaji Sutvid gdje je bio ispod granice detekcije (Tablica 25). U 2016. i 2022. godini je iznosio iznad granice detekcije u postajama Mali Ston i Mlinice (Tablica 24 i 26). Srednja vrijednost za sve tri godine je bila približno jednaka. Svi ovi rezultati mjerenja toksina mogu se objasniti iz više razloga koji dovode do pojave nastanka toksina: onečišćenje mora prirodnim putem, to jest morskim cvjetanjem, ljudskim djelovanjem, unos kemikalija u vodu, mijenjanjem temperature vode, vrste korištenih eksperimentalnih organizama koja imaju različitu koncentraciju toksina u sebi, različitu veličinu korištenih organizama i položaj uzgajališta.

Iako nije dokazano da su gimnodimini i spirovidi toksični za ljude Europska Agencija za sigurnost hrane (EFSA) zatražila je pribavljanje dodatnih podataka te je za spirovide predložila najvišu dopuštenu razinu od 400  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  ukupnih spirovida u mesu školjkaša (Bacchiocchi i sur., 2020). Rezultati istraživanja nisu pokazali visoke vrijednosti gimnodimina i spirovida niti štetni utjecaj na ljudsko zdravlje.

## 5. ZAKLJUČCI

Gimnodimini i spiroolidi su ciklični imini koji spadaju u toksine nastale od dinoflagelata (Ujević i sur., 2020). Pripadaju grupi brzodjelujućih toksina koji unutar nekoliko minuta uzrokuju ugibanje eksperimentalnih miševa. Istraživanje se provodilo u devet postaja u srednjem i južnom Jadranu tijekom 2016., 2017. i 2022. godine na način da su sakupljene dagnje i brbavice te je praćena količina gimnodimina i spiroolida. Uzorkovani organizmi su se laboratorijski obrađivali metodom LC-MS/MS kojom su dobiveni maseni udijeli gimnodimina i spiroolida u uzorku. Zaključci su sljedeći:

- Maseni udjeli gimnodimina (raspon srednjih vrijednosti 2,126 - 23,7773  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) su viši od spiroolida (raspon srednjih vrijednosti < LOD - 3,8446  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).
- Maseni udjeli gimnodimina su 5 - 7 puta viši u uzorcima dagnji iz uzgajališta i prirodnih populacija brbavica iz 2016. g. od masenih udjela u uzorcima iz 2017. i 2022.
- Dagnje iz uzgajališta i brbavice iz prirodnih populacija akumuliraju slične razine gimnodimina.
- Razine gimnodimina u dagnjama iz različitih područja (Malostonski zaljev, Marinski zaljev i ušće rijeke Neretve) su slične.
- Maseni udjeli spiroolida su 4 - 9 puta viši u uzorcima iz 2016. g. od masenih udjela u uzorcima iz 2017. i 2022., osim za uzorke brbavica iz Mlinica (Kaštelanski zaljev).
- Dagnje iz uzgajališta akumuliraju niže razine spiroolida od brbavica iz prirodnih populacija (Mlinice, Kaštelanski zaljev).
- Razine spiroolida u dagnjama iz područja Malostonskog zaljeva (raspon srednjih vrijednosti 0,1470 - 1,6614  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) i ušća rijeke Neretve (raspon srednjih vrijednosti 0,3213 - 1,3777)  $\mu\text{g}/\text{kg}$  su slične, dok su u dagnjama iz Marinskog zaljeva povišene (raspon srednjih vrijednosti 0,4817 - 2,0387  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

## 6. LITERATURA

Anonimus 2013. Kaštelanski zaljev. Dostupno sa:

<https://www.enciklopedija.hr/clanak/kastelanski-zaljev>, pristupljeno: lipanj, 2024.

Anonimus 2020. Kaštelanski zaljev. Dostupno sa: <https://pomorska.lzmk.hr/Natuknica?id=3265>., pristupljeno: lipanj, 2024.

Anonimus 2013. Malostonski zaljev. Dostupno sa:

<https://dubrovnikdigest.com/priroda/malostonski-zaljev>, pristupljeno: lipanj, 2024.

Anonimus 2023. Malostonski zaljev. Dostupno sa: <https://www.ston.hr/?u=malostonski-zaljev/eng/st/463/150>, pristupljeno: lipanj, 2024.

Anonimus 2016. Marinski zaljev. Dostupno sa: <https://www.marina.hr/project/marina/>, pristupljeno: lipanj, 2024.

Anonimus 2012. Prnjavica. Dostupno sa: <https://divlje-domace-zivotinje.blogspot.com/2012/12/prnjavica.html>, pristupljeno: lipanj, 2024.

Arapov J. 2013. A review of shellfish phycotoxin profile and toxic phytoplankton species along Croatian coast of the Adriatic Sea. Institute of Oceanography and Fisheries, Laboratory of plankton and shellfish toxicity, 54: 2.

Bacchiocchi S, Siracusa M, Campacci D, Ciriacci M, Dubbini A, Tavoloni T, Stramenga A, Gorbi S, Piersanti A. 2020. Cyclic Imines (CIs) in Mussels from North-Central Adriatic Sea: First Evidence of Gymnodimine A in Italy. *Toxins*, 12 (6): 370.

Cembella A, Lewis N, Quilliam MA. 2000. The marine dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) as the causative organism of spirolide shellfish toxins. *ResearchGate*, 39 (1): 67-74.

Ciminiello P, Dell'Aversano C, Fattorusso E, Magno S, Tartaglione L, Cangini M, Pompei M, Guerrini F, Boni L, Pistocchi R. 2006. Toxin profile of *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) from the Northern Adriatic Sea revealed by liquid chromatography-mass spectrometry. *Toxicon* 47: 597-604.

Hassoun AER, Ujević I, Mahfouz C, Fakhri M, Roje-Busatto R, Jemaa S, Nazlić N. 2021. Occurrence of domoic acid and cyclic imines in marine biota from Lebanon-Eastern Mediterranean Sea. *Science of The Total Environment*, 755 (1).

- Lamas JP, Arévalo F, Moroño A, Correa J, Rossignoli AE, Blanco J. 2021. Gymnodimine A in mollusks from the North Atlantic Coast of Spain: prevalence, concentration, and relationship with spirolides. *Environmental Pollution*, 279.
- Marrouchi R, Dziri F, Belayouni N, Hamza A, Benoit E, Molgó J, Kharrat R. 2009. Quantitative Determination of Gymnodimine-A by High Performance Liquid Chromatography in Contaminated Clams from Tunisia Coastline. *Marine Biotechnology*, 12: 579-585.
- Ministarstvo gospodarstva i održivog razvoja. 2022. Plan upravljanja zaštićenim područjem i područjem ekološke mreže (6146): Malostonski zaljev. Verzija 2.
- Munday R, Holland PT, McNabb P, Selwood AI, Rhodes LL. 2008. Comparative toxicity to mice of domoic acid and isodomoic acids A, B and C. *Toxicon*, 52: 954-956.
- Munday R, Towersa NR, Mackenzieb L, Beuzenbergb V, Hollandb PT, Miles CO. 2004. Acute toxicity of gymnodimine to mice. *Toxicon*, 44: 173-178.
- Naila IB, Hamza A, Gdoura R, Diogène J, De la Iglesia P. 2012. Prevalence and persistence of gymnodimines in clams from the Gulf of Gabes 19 (Tunisia) studied by mouse bioassay and LC-MS/MS. *ScienceDirect*, 18: 56-64.
- Ribarić B, Kozačinski L, Njari B, Fleck ŽC. 2012. Toksini školjkaša. *Veterinarski fakultet, Zavod za higijenu, tehnologiju i sigurnost hrane*, 14: 2.
- Ujević I, Roje-Busatto R. 2020. Prirodni toksini u Jadranu. *Institut za oceanografiju i ribarstvo - 90 godina otkrivanja tajni Jadrana*, 129-134.
- Zeng Ying. 2022. Što je LC-MS/MS? AntiTeck Life Sciences Limited. Dostupno sa: <https://antiteck.com/hr/%C5%A1to-je-lc-ms/#htoc-what-is-lc-ms>. Pristupljeno: lipanj, 2024.