

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**Προσδιορισμός οκαδαϊκού οξέος και παραγώγων του σε αντιπροσωπευτικά δείγματα
μυδιών και εξυγίανσή τους**

Αρτέμης Λούππης

Χημικός

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2011

Ημερομηνία αίτησης του κ. Λούππη Αρτέμη.

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής Γ.Σ.Ε.Σ.: 697^Α/21-3-08.

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων:

Μιχαήλ Κοντομηνάς

Μέλη:

Μαρία Τασιούλα-Μάργαρη

Αθανάσιος Βλεσσίδης

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 728^Α/4-2-09

Θέμα: «Προσδιορισμός οκαθαϊκού οξέος και παραγώγων του σε αντιπροσωπευτικά δείγματα μυδιών και εξυγίανσή τους».

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ Γ.Σ.Ε.Σ.: 818^Α/27-6-11

1. Μ. Κοντομηνάς, Καθηγητής (Επιβλέπων)
2. Α. Βλεσσίδης, Αναπλ. Καθ. (Μέλος)
3. Μ. Τασιούλα-Μάργαρη, Επικ. Καθ. (Μέλος)
4. Α. Κουτίνας, Καθηγητής
5. Μ. Κανελλάκη, Καθηγήτρια
6. Κ. Σταλίκας, Αναπλ. Καθ.
7. Α. Μπαδέκα, Λέκτορας

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «Άριστα» στις 04-07-11

Η έγκριση της εργασίας της Διδακτορικής Διατριβής από το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει την αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα.

(Νόμος 5343/1932, άρθρο 202)

Στην αδελφή μου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πρόλογος	7
1.Εισαγωγή	9
2.Θεωρητικό Μέρος	11
2.1Επιβλαβείς Ανθήσεις Φυκών	11
2.2Τοξινώσεις από οστρακοειδή	12
2.3Κατάταξη DSP τοξινών	14
2.4Οργανισμοί που παράγουν τις DSP τοξίνες	17
2.5Ομάδα του οκαδαϊκού οξέος	20
2.6Φυσικο-χημικές ιδιότητες ΟΑ	21
2.7Συσσώρευση των DSP τοξινών στα μύδια	23
2.8Εξυγίανση μυδιών	24
2.8.1Ακτινοβολήση	26
2.8.1.1Τύποι και πηγές ακτινοβολίας	27
2.8.1.2Μονάδες μέτρησης δόσης ακτινοβολήσης	28
2.8.1.3Δόσεις ακτινοβολήσης ανάλογα με το επιδιωκόμενο αποτέλεσμα	28
2.8.1.4Εγκαταστάσεις και εξοπλισμός	29
2.8.1.5Έλεγχος της διαδικασίας της ακτινοβολήσης	29
2.8.1.6Προϊόντα ιχθυρών	30
2.8.1.7Περιορισμοί στη χρήση της ακτινοβολήσης	32
2.8.2Οζονισμός	32
2.8.2.1Παραγωγή όζοντος	34
2.8.2.2Αντιμικροβιακή δράση όζοντος	35
2.8.2.3Οξείδωση οργανικών και ανόργανων ενώσεων	35
2.8.2.4Χρήση του όζοντος στα τρόφιμα	36
2.8.2.5Τοξικότητα του όζοντος	36
2.9Τοξικές επιπτώσεις των DSP τοξινών στην υγεία των ζώων και του ανθρώπου	36
2.10Μέτρα Αντιμετώπισης και Νομοθεσία	41
2.11Μέθοδοι ανίχνευσης/προσδιορισμού οκαδαϊκού οξέος	44
2.11.1Δοκιμές in vivo	45
2.11.1.1Βιοδοκιμές Μυών	45
2.11.1.2Εκτίμηση τοξικότητας	47
2.11.1.3Βιοδοκιμή Νεαρών Μυών	49
2.11.1.4Βιοδοκιμή Επίμυων	50
2.11.2Δοκιμές in vitro	50
2.11.2.1Δοκιμή Αναστολής Φωσφατάσης	51
2.11.2.2Δοκιμή Κυτταροτοξικότητας	51
2.11.2.3Ανοσολογικές Δοκιμές	52
2.11.3Χημικές αναλυτικές μέθοδοι	53
2.11.3.1Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας	54
2.11.3.2Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης	55
2.11.3.3Υγρή Χρωματογραφία/Φασματοσκοπία Μαζών	57
2.11.3.4 Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση	58
2.11.4Συγκριτική αξιολόγηση μεθόδων	59
2.12Περιγραφή βιολογικού υλικού (μύδια)	61
2.12.1Μορφολογία και βιολογία του μυδιού	62
2.12.2Χημική σύσταση	63
2.12.3Ρυθμός διήθησης και διατροφή	64

2.12.4Αναπαραγωγή και ρυθμός ανάπτυξης	65
2.12.5Απεικριτική δραστηριότητα	66
2.12.6Μυδοκαλλιέργειες στην Ελλάδα	67
2.12.7Συστήματα εκτροφής μυδιών	69
2.12.8Οστρακοειδή-δείκτες DSP τοξινών	71
3.Αντικείμενο Έρευνας	73
4.Πειραματικό μέρος	75
4.1Συλλογή Δειγμάτων	75
4.2Επιλογή και προετοιμασία δειγμάτων	76
4.3Αντιδραστήρια	77
4.3.1Βιολογική δοκιμή	77
4.3.2Υγρή Χρωματογραφία	77
4.3.3Προσδιορισμός θειοβαρβιτουρικού οξέος	78
4.4Οργανολογία	78
4.4.1Βιολογική δοκιμή	78
4.4.2Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με φθορισμομετρικό ανιχνευτή	79
4.4.3Υγρή χρωματογραφία-φασματοσκοπία μαζών	79
4.4.4Ακτινοβόληση-Οζονισμός	79
4.4.5Φασματοφωτόμετρο	80
4.5Πειραματόζωα	80
4.6Πειραματικές διαδικασίες	81
4.6.1Βιολογική δοκιμή (MBA)-Α' Μέρος	81
4.6.2 HPLC-FLD	83
4.6.3Εκχύλιση των τοξινών για HPLC-FLD και LC-MS/MS	84
4.6.4Εστεροποίηση/Παραγωγοποίηση για HPLC-FLD	84
4.6.5Εκχύλιση Στερεάς Φάσης για HPLC-FLD	84
4.6.6Υδρόλυση των εστεροποιημένων μορφών των DSP τοξινών για LC-MS/MS	85
4.6.7Ανάλυση HPLC-FLD	85
4.6.8Ανάλυση LC-MS/MS	86
4.6.9Βιολογική δοκιμή (MBA)- Β' Μέρος	88
4.6.10Δοκιμή του θειοβαρβιτουρικού οξέος	89
4.6.11Οργανοληπτική αξιολόγηση	89
5.Αποτελέσματα-Συζήτηση	91
5.1 Α' Μέρος	91
5.1.1 Βιολογική Δοκιμή (MBA)	91
5.1.2 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με φθορισμομετρικό ανιχνευτή	98
5.1.3Υγρή χρωματογραφία-φασματοσκοπία μαζών	103
5.1.4Σύγκριση μεθόδων	108
5.2 Β' Μέρος	117
5.2.1Επεξεργασία δειγμάτων με γ-ακτινοβολία	117
5.2.2Οζονισμός	125
6. Συμπεράσματα	135
7.Περίληψη	137
8.Abstract	139
8.Βιβλιογραφία	141

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η μελέτη εκπονήθηκε στο Ερευνητικό Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Μ.Γ.Κοντομηνά τον οποίο ευχαριστώ θερμά για την πολύτιμη καθοδήγηση και διαρκή παρακολούθηση σε όλο το διάστημα της ερευνητικής μου πορείας. Επίσης, ευχαριστώ την κα. Μαρία Τασιούλα-Μάργαρη επίκουρη καθηγήτρια και κ. Αθανάσιο Βλεσσίδα αναπληρωτή καθηγητή μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής καθώς και τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής για τις εύστοχες παρατηρήσεις στο κείμενο.

Επιπλέον ευχαριστώ την Δρα. Κτηνίατρο Παναγιώτα Κατίκου, τον Δρα. Χημικό Δημήτριο Γεωργαντέλη, τον Δρα. Χημικό Ευάγγελο Παλαιολόγο, για την σημαντική συμβολή τους στην διεξαγωγή του πειράματος και τις χρήσιμες συμβουλές τους. Επίσης, ευχαριστώ τη Μονάδα Φασματοσκοπίας Μαζών του Δικτύου Εργαστηρίων Υποστήριξης Έρευνας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για τη χρήση του οργάνου LC-MS/MS καθώς και το προσωπικό των Κτηνιατρικών Υπηρεσιών και ειδικότερα το προσωπικό του Εθνικού Εργαστηρίου Αναφοράς Θαλάσσιων Βιοτοξινών στη Θεσσαλονίκη για την συλλογή των δειγμάτων και τη γενικότερη βοήθειά τους.

Τέλος, ευχαριστώ τους γονείς μου για την αμέριστη ηθική και οικονομική στήριξη καθ'όλη τη διάρκεια αυτών των χρόνων.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Μεταξύ των τοξικών ουσιών, οι οποίες υποβαθμίζουν τα αλιεύματα και τα καθιστούν ακατάλληλα και επικίνδυνα για κατανάλωση, συγκαταλέγονται και οι βιοτοξίνες. Πρόκειται για τοξικές ουσίες οι οποίες απαντώνται, είτε ως φυσικά συστατικά των ίδιων των αλιευμάτων (πχ. ισταμίνη), είτε ως συστατικά που προσλαμβάνονται από το περιβάλλον και βιοσυσσωρεύονται μέσω της τροφικής αλυσίδας.

Ορισμένες από τις τοξίνες αυτές παράγονται από το τοξικό φυτοπλαγκτόν (κυρίως δινομαστιγωτά και ορισμένα διάτομα) ή από τα βακτήρια. Ορισμένα είδη ψαριών εμπλέκονται σε ασθένειες σχετιζόμενες με τις τοξίνες αυτές, όπως η Ciguatera, η pufferfish τοξίνωση και η σκομβροτοξίνωση, (τοξίνωση ισταμίνης). Τα οστρακοειδή σχετίζονται με άλλες τοξινώσεις όπως η παραλυτική, διαρροϊκή, αμνησιακή και η νευροτοξίνωση.

Η κατανάλωση μολυσμένων αλιευμάτων μπορεί να οδηγήσει σε μια ευρεία ποικιλία συμπτωμάτων, αναλόγως με το είδος της τοξίνης, τη συγκέντρωσή της στο αλιεύμα και την καταναλισκόμενη ποσότητα. Η διάγνωση των τοξινώσεων στον άνθρωπο βασίζεται στην κλινική εικόνα, στο πρόσφατο διαιτολογικό ιστορικό και στις εργαστηριακές εξετάσεις των ύποπτων αλιευμάτων. Τοξικά όστρακα βρέθηκαν κατά τη χειμερινή και εαρινή περίοδο του 2004 στο Θερμαϊκό, το Μαλιακό και το Σαρωνικό Κόλπο, όπου είχε εμφανιστεί το τοξικό δινομαστιγωτό *Dinophysis acuminata*.

Οι βιοτοξίνες των οποίων η παραγωγή οφείλεται σε τοξικό φυτοπλαγκτόν, είναι θερμοανθεκτικές, δεν διακρίνονται οργανοληπτικά, ούτε υπάρχει αντίδοτο για την καταπολέμηση των δηλητηριάσεων που προκαλούν. Πρώτος στόχος της παρούσας έρευνας είναι ο προσδιορισμός του οκαδαϊκού οξέος, του παραγώγου του, δινοφυσιστοξίνης-1 και των εστέρων του με υγρή χρωματογραφία με φθορισμομετρικό ανιχνευτή, με υγρή χρωματογραφία με φασματογράφο μαζών και με την επίσημη μέθοδο της Ευρωπαϊκής Ένωσης, mouse bioassay, σε μολυσμένα μύδια της περιοχής του Θερμαϊκού Κόλπου (Θεσσαλονίκη, Πιερία, Ημαθία), του Μαλιακού Κόλπου (Φθιώτιδα) και του Σαρωνικού (Μέγαρα) καθώς και σε μικρό αριθμό δειγμάτων από την αγορά. Ένας

δεύτερος στόχος ήταν η προσπάθεια εξυγίανσης των μολυσμένων μυδιών χρησιμοποιώντας τις τεχνικές του οζονισμού και της ακτινοβολήσης.

2. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Επιβλαβείς Ανθήσεις Φυκών

Τα μικροφύκη (μικροσκοπικά πλαγκτονικά φύκη) είναι μονοκύτταροι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί οι οποίοι αναπαράγονται στη θάλασσα. Είναι η βασική τροφή για τα διηθηματοφάγα δίθυρα μαλάκια και τις προνύμφες των καρκινοειδών. Έχουν καταγραφεί περισσότερα από 5000 είδη θαλάσσιων μικροφύκων, τα οποία ανήκουν στις εξής 5 γενικές κατηγορίες (Hallegraef, 2003):

- 1) Χλωρόφυτα (πράσινα φύκη)
- 2) Χρυσόφυτα (χρυσό-καστανά, κίτρινα φύκη και διάτομα)
- 3) Πυρρόφυτα (δινωμαστιγωτά)
- 4) Ευγληνόφυτα
- 5) Κυανόφυτα (κυανοπράσινα φύκη)

Ορισμένα από αυτά τα είδη φυκών, είναι πιθανό, να πολλαπλασιαστούν ραγδαία (έως εκατομμύρια ανά λίτρο), κάτω από ορισμένες συνθήκες. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται άνθηση. Άλλες φορές αυτό είναι ευεργετικό για τις υδατοκαλλιέργειες και άλλες φορές βλαπτικό για την δημόσια υγεία, το περιβάλλον και την οικονομία των αλιείων. Η τελευταία κατάσταση αυτή είναι γνωστή ως επιβλαβής άνθηση φυκών (harmful algal bloom) και διακρίνεται σε τρεις διαφορετικούς τύπους αναλόγως με τα είδη των μικροφυκών που την προκαλούν:

- 1) Είδη που προκαλούν το φαινόμενο της ερυθράς ή φαιάς παλίρροιας (red/brown tide). Δηλαδή, τα είδη αυτά συνήθως προκαλούν αβλαβή χρωματισμό του νερού όμως υπάρχει πιθανότητα να υπάρξει έντονη άνθηση αυτών οπότε προκαλείται θάνατος των θαλάσσιων οργανισμών λόγω έλλειψης οξυγόνου,
- 2) Είδη που προκαλούν το θάνατο σε ψάρια και ασπόνδυλα (λόγω βλάβης στα βράγχια τους). Τα είδη αυτά δεν είναι τοξικά για τον άνθρωπο,
- 3) Τέλος, είδη (πάνω από 70) που παράγουν τοξίνες, οι οποίες φτάνουν στον άνθρωπο, μέσω της τροφικής αλυσίδας, και προκαλούν δηλητηριάσεις (Hallegraef, 2003).

Τα περισσότερα τοξικά μικροφύκη (κυρίως δινομαστιγωτά) σχηματίζουν κύστεις και παραμένουν στη μορφή αυτή στον πυθμένα των θαλασσών. Υπό κατάλληλες συνθήκες (θερμοκρασίας, φωτός, θρεπτικών συστατικών και αλατότητας) βλαστάνουν και παράγουν κύτταρα, τα οποία αναπαράγονται με απλή διαίρεση μέσα σε λίγες ημέρες (Anderson et al., 1995).

2.2 Τοξινώσεις από οστρακοειδή

Οι φυσικές τοξικές ουσίες που απαντώνται στα τρόφιμα διακρίνονται σε δύο κατηγορίες:

- 1) Τα φυσικά συστατικά (naturally occurring constituents), που περιέχονται σε τρόφιμα τόσο ζωϊκής όσο και σε τρόφιμα φυτικής προέλευσης.
- 2) Οι μολυντές (contaminants), που προσλαμβάνονται από το περιβάλλον και βιοσυσσωρεύονται μέσω της τροφικής αλυσίδας.

Οι φυσικές τοξικές ουσίες που παράγονται από τα φύκη ονομάζονται φυκοτοξίνες και βιοσυσσωρεύονται τόσο στα ψάρια όσο και στα οστρακοειδή. Μέσω της τροφικής αλυσίδας μπορούν να φτάσουν στα ανώτερα θηλαστικά, στον άνθρωπο, προκαλώντας διάφορες διαταραχές ακόμη και θάνατο. Η ταξινόμηση των δηλητηριάσεων από φυκοτοξίνες έχει πραγματοποιηθεί με βάση τα κυριότερα συμπτώματα στον άνθρωπο και είναι:

- 1) Παραλυτική δηλητηρίαση οστρακοειδών (Paralytic Shellfish Poisoning, PSP)
- 2) Νευροτοξική δηλητηρίαση οστρακοειδών (Neurotoxic Shellfish Poisoning, NSP)
- 3) Αμνησιακή δηλητηρίαση οστρακοειδών (Amnesic Shellfish Poisoning, ASP)
- 4) Διαρροϊκή δηλητηρίαση οστρακοειδών (Diarrhetic Shellfish Poisoning, DSP)
- 5) Ιχθυοτοξίνωση Σιγκουατέρα (Ciguatera Poisoning Toxins, CTX)
- 6) Κυανοβακτηριακή δηλητηρίαση (Cyanobacterial Toxin Poisoning, CTP)

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται πληροφορίες των τοξινώσεων όσον αφορά τους οργανισμούς που τις προκαλούν και τις επιπτώσεις στον άνθρωπο:

Πίνακας 1. Πληροφορίες τοξινώσεων οφειλόμενων σε θαλάσσιους οργανισμούς (Flemming et al., 1995).

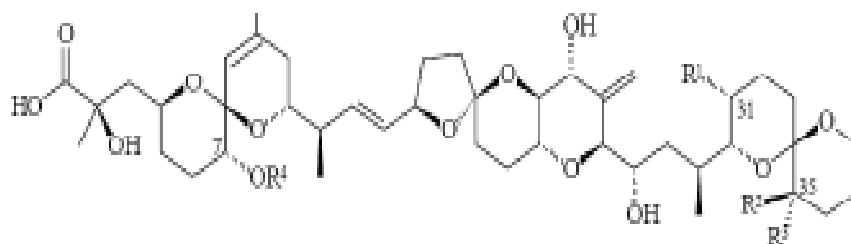
Είδος τοξίνης	PSP	NSP	ASP	DSP	CTX	PFP
Υπεύθυνοι Μικροοργανισμοί	Πελαγικά δινωμαστιγωτά (Alexandrium catanella, Conyaulax catanella)	Πελαγικά δινωμαστιγωτά (Ptychodiscus brevis)	Πελαγικά διάτομα (Pseudo- nitzchia, N. pungens)	Πελαγικά δινωμαστιγωτά (Dinophysis acuminate, D. fortii)	Επιβενθικά δινωμαστιγωτά (Gambioidiscus toxicus)	Δινωμαστιγωτά (θαλάσσια vibrio)
Γεωγραφική κατανομή	Τροπικές- Εύκρατες ζώνες παγκοσμίως	Κόλπος Μεξικού, Ιαπωνία	Καναδάς, Β.Δ. ΗΠΑ	Εύκρατες ζώνες παγκοσμίως	Τροπικές ζώνες παγκοσμίως	Ιαπωνία, παγκοσμίως
Εκπρόσωπος	Σαξιτοξίνη	Μπρεβετοξίνη	Δομοϊκό οξύ	Οκαδαϊκό οξύ	Σιγκουατοξίνη	Τετροδοτοξίνη
Γενικός Τύπος	C ₁₀ H ₁₇ N ₇ O ₄		C ₁₅ H ₁₇ NO ₆	C ₄₄ H ₆₈ O ₁₃	C ₆₀ H ₈₈ O ₁₉	C ₁₁ H ₁₇ N ₃ O ₈
Διαλυτότητα	Υδατοδιαλυτή	Λιποδιαλυτή	Υδατοδιαλυτή	Λιποδιαλυτή	Λιποδιαλυτή	Υδατοδιαλυτή
Μηχανισμός Δράσης	Παρεμπόδιση καναλιών Na ⁺	Ενεργοποίηση καναλιών Na ⁺	Ανταγωνισμός υποδοχέων γλουταμινικού	Αναστολή φωσφατάσης πρωτεϊνών	Ενεργοποίηση καναλιών Na ⁺ και Ca ⁺⁺	Παρεμπόδιση καναλιών Na ⁺
Χρόνος Εκδήλωσης Συμπτωμάτων	5-30 min	30 min- 3 h	Ωρες	Ωρες	Ωρες	5-30 min
Διάρκεια	Ημέρες	2 ημέρες	Έτη	Ημέρες	Έτη	Ημέρες
Κύρια Συμπτώματα	Παραισθήσεις, αναπνευστική δυσχέρεια	Βρογχοσπασμός, αντίστροφη αίσθησης θερμοκρασίας	Αμνησία	Διάρροια	Αντίστροφη αίσθησης θερμοκρασίας	Παραισθήσεις, αναπνευστική δυσχέρεια
Θνησιμότητα	1-14%	0%	3%	0%	<1%	60%

2.3 Κατάταξη DSP τοξινών

Η διαρροϊκή δηλητηρίαση από οστρακοειδή αναφέρθηκε για πρώτη φορά στην Ιαπωνία το 1978 (Yasumoto et al., 1978). Από τότε, κρούσματα DSP τοξικότητας ή εμφάνιση DSP τοξινών σε οστρακοειδή έχουν παρατηρηθεί παγκοσμίως. Στη χώρα μας, περιστατικά αυτής της δηλητηρίασης καταγράφηκαν για πρώτη φορά τον Ιανουάριο του 2000. Συγκεκριμένα, περισσότερα από 120 άτομα προσήλθαν στα κατά τόπους νοσοκομεία με συμπτώματα γαστρεντερίτιδας. Τα συμπτώματα εμφανίστηκαν μετά από 30 λεπτά έως και 10 ώρες μετά την κατανάλωση μολυσμένων οστρακοειδών (Economou et al., 2007).

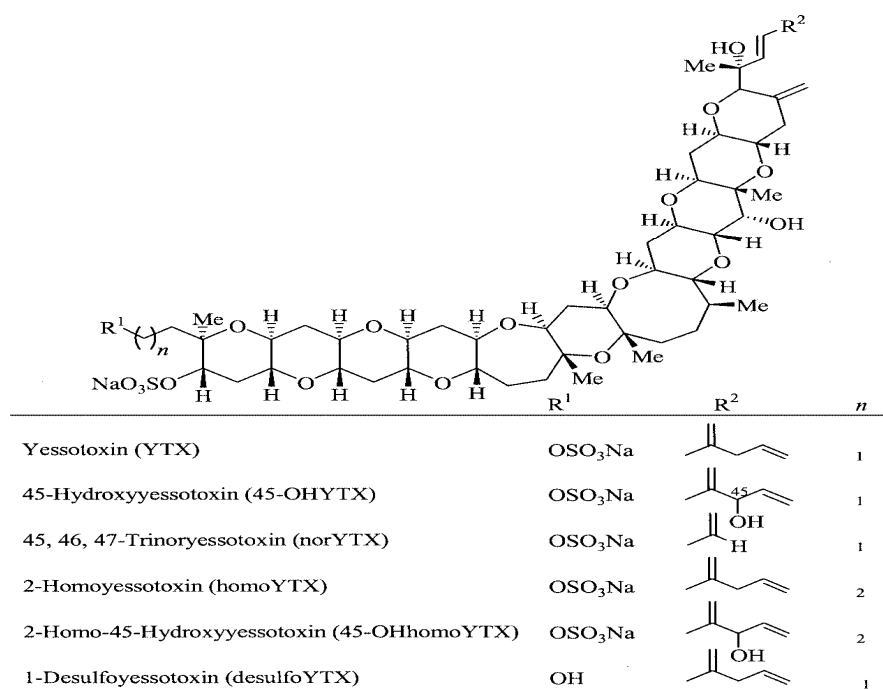
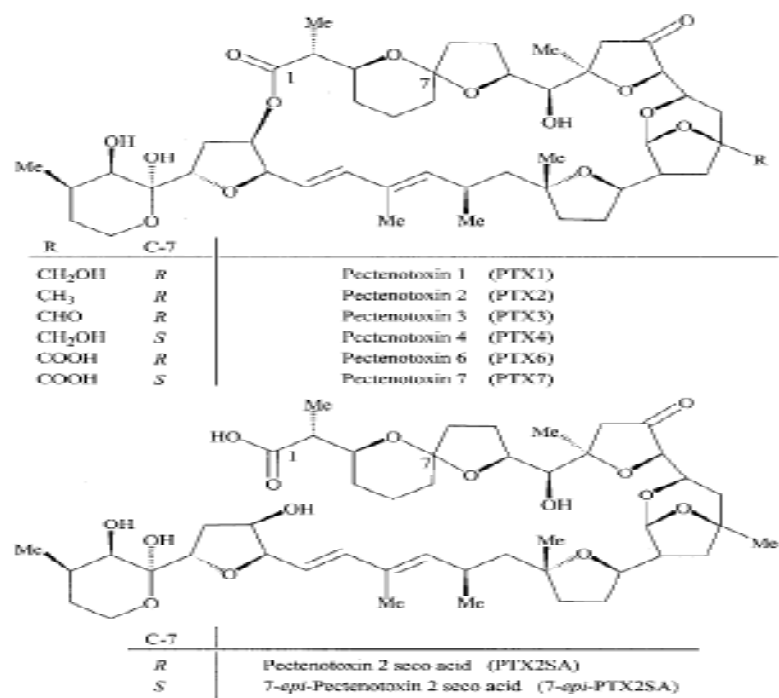
Το όνομά τους προέρχεται από τα διαρροϊκά συμπτώματα που προκαλούν στον άνθρωπο. Οι τοξίνες διαρροϊκής δηλητηρίασης οστρακοειδών ή DSP τοξίνες, είναι μη πολικές ενώσεις με μοριακά βάρη μεγαλύτερα από 500, οι οποίες βιοσυσσωρεύονται στους λιπώδεις ιστούς των οστρακοειδών. Οι περισσότερες είναι πολυαιθερικές ενώσεις με ποικίλες λειτουργικές ομάδες, οι οποίες εμφανίζουν διαφορετικά τοξικολογικά και χημικά χαρακτηριστικά. Κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες, ανάλογα με τη σκελετική δομή των ατόμων άνθρακα:

- 1) Το οκαδαϊκό οξύ (okadaic acid, OA) και τα παράγωγά του (π.χ. δινοφυσυστοξίνες, DTXs) (Σχήμα 1)
- 2) Τις πηκτινοτοξίνες 1 έως 10 (Pectenotoxins, PTXs), που είναι ουδέτερες πολυαιθερικές λακτόνες (Yasumoto et al., 1984, Sasaki et al., 1997&1998) (Σχήμα 2)
- 3) Τη γεσοτοξίνη και τα παράγωγά της (Yessotoxins, YTXs), που είναι θεικοί εστέρες πολυαιθερικών αλκοολών (Murata et al., 1987, Satake et al., 1997) (Σχήμα 2)



	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	MB
OA	CH ₃	H	H	H	804.5
DTX-1	CH ₃	CH ₃	H	H	818.5
DTX-2	H	H	CH ₃	H	804.5
DTX-3 (ακυλιωμένες μορφές του OA και DTX- 1,2).	H/CH ₃	H/CH ₃	H/CH ₃	Λιπαρό οξύ	

Σχήμα 1. Χημική δομή του OA και των DTX-1,2,3 (Larsen et al., 2007)



Σχήμα 2. Χημικές δομές πηκτινοτοξινών και γεστοτοξινών (Ciminiello et al., 2004)

Πρέπει να τονιστεί ότι από τις παραπάνω τρεις κατηγορίες μόνο η ομάδα του OA προκαλεί διαρροϊκά συμπτώματα (van Egmond et al., 1993, Hu et al., 1992a, Yasumoto et al., 1985, Murata et al., 1982). Οι υπόλοιπες απλά συνυπάρχουν στο λιπόφιλο εκχύλισμα που λαμβάνεται στις βιοδοκιμές, προκαλώντας αλλοιώσεις του ήπατος (PTXs) και του μυοκαρδίου (YTXs) στα ποντίκια. Βέβαια, συνεχώς ανακαλύπτονται από τη διεθνή επιστημονική κοινότητα νέες τοξίνες όπως τα αζασπειροζέα, οι γυμνοδιμίνες και οι σπιρολίδες οπότε είναι επιτακτική η ανάγκη κατηγοριοποίησης με βάση άλλο κριτήριο από αυτό των συμπτωμάτων, για παράδειγμα με βάση τη χημική τους δομή. Για το λόγο αυτό, το τελευταίο καιρό οι τοξίνες αυτής της κατηγορίας αναφέρονται και ως λιπόφιλες τοξίνες.

2.4 Οργανισμοί που παράγουν τις DSP τοξίνες

Οι DSP τοξίνες παράγονται από τα δινομαστιγωτά των γενών *Dinophysis spp.* και *Prorocentrum spp.* Η τοξικότητα των κυττάρων αυτών εξαρτάται από την τοποθεσία, την εποχή εμφάνισης και βέβαια από τον οργανισμό που τα προσλαμβάνει. Υπάρχει σύγχυση παγκοσμίως για το κατά πόσο σχετίζεται η αύξηση του αριθμού των κυττάρων *Dinophysis* με την παραγωγή DSP τοξινών. Έχει καταγραφεί χαμηλός αριθμός κυττάρων *Dinophysis* (200 κύτταρα ανά λίτρο) με υψηλές συγκεντρώσεις DSP τοξινών σε οστρακοειδή (Botana et al., 1996). Ενώ έχει παρατηρηθεί και το αντίθετο, δηλαδή μεγάλος αριθμός κυττάρων (9000 κύτταρα ανά λίτρο) και καθόλου συγκέντρωση DSP τοξινών σε οστρακοειδή (Hoshiai et al., 1997).

Στην Πορτογαλία, σύμφωνα με τους Aune & Yndestad (1993) παρατηρήθηκε πως ο χρόνος που απαιτείται για να καταστούν τα όστρακα τοξικά δεν εξαρτάται μόνο από την παρουσία τοξικών ειδών μικροφυκών, αλλά και από την ύπαρξη αφθονίας μη-τοξικών ειδών.

Οι περιοχές που έχουν προσβληθεί από DSP-επεισόδια είναι η Ευρώπη και η Ιαπωνία ενώ συνεχώς καταγράφονται και νέες περιοχές σε όλο το κόσμο. Το είδος που είναι υπεύθυνο για την Νότια Ευρώπη είναι το *Dinophysis cf. acuminata*. Στο Θερμαϊκό Κόλπο έχουν κατά καιρούς καταγραφεί φαινόμενα άνθησης του φυτοπλαγκτού. Τα

τελευταία χρόνια είναι συχνό το φαινόμενο της περιοδικής αύξησης των δινομαστιγωτών του γένους *Dinophysis* (Πίνακας 2). Συγκεκριμένα έχουν εντοπιστεί 9 ταξινομικές μονάδες του παραπάνω γένους, από τις οποίες οι δύο παραμένουν αδιευκρίνιστες σε επίπεδο είδους (Κουκάρας, 2004):

- 1) *Dinophysis cf. acuminata*
- 2) *Dinophysis sacculus*
- 3) *Dinophysis rotundata*
- 4) *Dinophysis rudgei*
- 5) *Dinophysis fortii*
- 6) *Dinophysis odiosa*
- 7) *Dinophysis caudate*
- 8) *Dinophysis tripos*
- 9) *Dinophysis cf. Micropterygia*

Πίνακας 2. Κυριότερα είδη φυκών που ταυτοποιήθηκαν ως παραγωγοί οκαδαϊνού οξέος.

Είδος Φύκους	Χώρα	Βιβλιογραφική Αναφορά
<i>Dinophysis acuminata</i>	Ιαπωνία	Lee et al., 1989
	Καναδάς	Cembella, 1989
	Ισπανία	Blanco et al., 1995
	Δανία	Andersen et al., 1996
	Σουηδία	Johansson et al., 1996
	Γαλλία	Marcaillou et al., 2001
	Ελλάδα	Reizopoulou et al., 2008
<i>Dinophysis acuta</i>	Ισπανία	Lee et al., 1989
	Νορβηγία	Dahl et al., 1996
	Νέα Ζηλανδία	McKenzie et al., 1998
<i>Dinophysis fortii</i>	Ιαπωνία	Lee et al., 1989
	Ιταλία	Sidari et al., 1998
<i>Dinophysis rotundata</i>	Γαλλία	Masselin et al., 1992
<i>Dinophysis norwegica</i>	Νορβηγία, Σουηδία	Lee et al., 1989
<i>Dinophysis sacculus</i>	Γαλλία	Masselin et al., 1992
<i>Dinophysis caudate</i>	Γαλλία	Masselin et al., 1992
	Σιγκαπούρη	Holmes et al., 1999
	Φιλιππίνες	Marasigan et al., 2001
<i>Prorocentrum lima</i>	Καναδάς	Bauder et al., 2001
	Ελλάδα	Aligizaki et al., 2008
<i>Prorocentrum reticulatum</i>	Νέα Ζηλανδία	McKenzie et al., 1998

2.5 Ομάδα του Οκαδαϊκού οξέος

Το οκαδαϊκό οξύ (OA) απομονώθηκε αρχικά ως μια βιοδραστική ουσία από το σπόγγο *Halichondria okadai* και πήρε το όνομά του προς τιμή του Yaichiro Okada (Tachibana & Sheuer, 1981). Όταν απομονώθηκε, θεωρήθηκε ως τοξίνη που είναι ελεύθερη στη φύση και παράγεται από τα δινομαστιγωτά. Σήμερα, θεωρείται ότι παράγεται από την υδρόλυση μεγαλύτερων θειο-πρόδρομων ενώσεων, όπως η DTX-4 (Hu et al., 1992a). Υπάρχουν δύο τρόποι αποδέσμευσης του OA από αυτές τις ενώσεις. Ο πρώτος είναι με τη δράση εστερασών, μέσα στο γαστρεντερικό σωλήνα των οστρακοειδών, και ο δεύτερος με τη δράση αυτολυτικών ενζύμων, κατά τη διάρκεια της εργαστηριακής εκχύλισης των δινομαστιγωτών (Quilliam & Ross, 1996).

Στην ομάδα του OA συγκαταλέγεται ένα σύνολο ενώσεων που έχουν την ίδια βασική δομή με το OA. Δομικά, η δινοφυσιστοξίνη-1 (Dinophysistoxin-1, DTX-1) είναι το 35-μέθυλο-οκαδαϊκό οξύ και η δινοφυσιστοξίνη-2 (Dinophysistoxin-2, DTX-2) είναι το 31,35-διμέθυλο-οκαδαϊκό οξύ. Η δινοφυσιστοξίνη-3 (Dinophysistoxin-3, DTX-3) είναι ένα σύνολο ομόλογων ενώσεων, στις οποίες μια υδροξυλομάδα στον C7 της DTX-1 είναι εστεροποιημένη με ένα λιπαρό οξύ με 14-22 άτομα C και 0-6 ακόρεστους δεσμούς (Yasumoto et al., 1985). Το πιο διαδεδομένο λιπαρό οξύ στην DTX-3 είναι το παλμιτικό οξύ. Παρόμοια εστεροποίηση και στην ίδια θέση (C7-OH) συμβαίνει και στην DTX-2 και στο OA (Marr et al., 1992). Όλες αυτές οι ενώσεις είναι μεταβολικά προϊόντα που απαντώνται στη σάρκα των οστρακόδερμων και όχι *de novo* προϊόντα τοξινογόνων φυκών (Suzuki et al., 1999). Ωστόσο, θα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται στη συνολική συγκέντρωση των τοξινών κατά τη διάρκεια των αναλύσεων.

Ορισμένα ανάλογα του OA έχουν απομονωθεί από καλλιέργειες δινομαστιγωτών του γένους *Prorocentrum*, στα οποία η καρβοξυλική ομάδα είναι συζευγμένη με διάφορες ακόρεστες διόλες (C7-C9), σχηματίζοντας αλλυλικούς διολ-εστέρες (Yasumoto et al., 1987; Hu et al., 1992a). Τα ίδια δινομαστιγωτά παράγουν ορισμένα υδατοδιαλυτά παράγωγα του OA, στα οποία οι διολ-εστέρες είναι περαιτέρω συζευγμένοι με μια πολική πλευρική αλυσίδα. Η δινοφυσιστοξίνη-4 (Dinophysistoxin-4, DTX-4) είναι ένα τέτοιο παράγωγο, στο οποίο το OA είναι συζευγμένο, μέσω μιας C9 διολ-ομάδας, με μια C14 αλειφατική αλυσίδα με τρεις υδροξυλικές και τρεις θεικές ομάδες. Η δινοφυσιστοξίνη-5

(Dinophysistoxin-5, DTX-5α και DTX-5β) είναι παρόμοιες ενώσεις που φέρουν μια αμιδική ομάδα στην πολική πλευρική αλυσίδα (Quilliam, 2003).

Στην πράξη, η κατάσταση είναι πιο πολύπλοκη, καθώς έχουν ανιχνευτεί διάφορα ανάλογα των DTX-4&5 σε κύτταρα του γένους *Prorocentrum*. Επίσης, αρκετά ανάλογα του OA και της DTX-1 έχουν ανιχνευτεί σε οστρακοειδή και μικροφύκη, χωρίς να είναι πλήρως γνωστή η δομή τους, λόγω απομόνωσης περιορισμένης ποσότητας (Quilliam, 1995; James et al., 1997b; Draisci et al., 1998).

Αξίζει να σημειωθεί, ότι τα παραπάνω παράγωγα (DTX-4 & 5) δεν δρουν ως αναστολείς της φωσφατάσης και υδρολύονται εύκολα, είτε χημικά, είτε ενζυμικά, αποδίδοντας τις δραστικές μητρικές ενώσεις. Επίσης, δεν έχουν παρατηρηθεί σε οστρακοειδή, πιθανώς λόγω της εύκολης υδρόλυσής τους από εστεράσες στα κύτταρα ή τους ιστούς των οστρακόδερμων (Quilliam et al., 1996).

Τέλος, πρέπει να αναφερθεί ότι η DTX-3 και οι διολ-εστέρες είναι πολύ πιο λιπόφιλες από τις μητρικές ενώσεις και κατά συνέπεια μπορεί να απολεσθούν μερικώς στην εξανική στοιβάδα, κατά τη διαδικασία της εκχύλισης. Επίσης, εάν ένα υδατομεθανολικό εκχύλισμα φυκών υποστεί κατανομή μεταξύ εξανίου, διαιθυλαιθέρα και βουτανόλης-1, το OA και τα λιποδιαλυτά παράγωγά του θα βρεθούν κυρίως στην αιθερική στοιβάδα, ενώ οι DTX-4&5 θα μεταφερθούν στη βουτανολική φάση.

2.6 Φυσικο-χημικές ιδιότητες OA

Το OA είναι μια ένωση μακράς αλυσίδας που περιέχει κυκλικούς πολυαιθερικούς δακτυλίους, με μια α- υδροξυ-καρβοξυλική ομάδα. Η διαφορά του από τις DTX-1 και DTX-2 έγκειται στον αριθμό των μεθυλομάδων των ατόμων άνθρακα C31 και C35 (Σχήμα 1). Η ομάδα του OA αποτελείται από ενώσεις ευδιάλυτες σε οργανικούς διαλύτες, όπως μεθανόλη, ακετόνη, χλωροφόρμιο, διχλωρομεθάνιο και διμεθυλοσουλφοξείδιο, οι οποίες όμως δε φέρουν κάποια σημαντική χρωμοφόρο ομάδα και δεν παρουσιάζουν αξιόλογη απορρόφηση στο υπεριώδες φάσμα (≤ 300 nm).

Το ΟΑ διαλυμένο σε μεθανόλη και ακετονιτρίλιο είναι αρκετά σταθερό, ενώ εμφανίζεται αρκετά ασταθές σε διάλυμα χλωροφόρμιου, ακόμη και σε θερμοκρασίες κατάψυξης. Ξηρά υπολείμματα καθαρού ΟΑ πάνω σε γυάλινες επιφάνειες βρέθηκε ότι διασπώνται ταχέως, ενώ δε συμβαίνει το ίδιο όταν βρίσκεται σε εκχύλισμα οστρακοειδών ή φυτοπλαγκτού, πιθανώς λόγω προστατευτικής δράσης του υποστρώματος (Quilliam, 1997). Το ΟΑ παρουσιάζει επίσης ευαισθησία στο φως, το οξυγόνο και τη θερμότητα. Οι κυριότερες φυσικοχημικές ιδιότητες του ΟΑ συνοψίζονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3. Φυσικοχημικές ιδιότητες του οκαδαϊκού οξέος.

Φυσική Κατάσταση	Λευκό, φωτοευαίσθητο στερεό
Μοριακός Τύπος	C ₄₄ H ₆₈ O ₁₃
Μοριακό Βάρος	804,47
Χημική Ονομασία	9,10-deepithio-9,10-didehydroacanthifolicin
Σημείο Τήξεως	164-166°C
Διαλυτότητα	Χλωροφόρμιο, αιθανόλη, μεθανόλη, ακετόνη, οξικός αιθυλεστέρας, διμεθυλοσουλφοξείδιο
UV(CH₃CN)	<200 nm
IR	3462 (br) 2937, 1736, 1078, 1008, 999, 878 cm ⁻¹
Σταθερότητα / Συνθήκες Συντήρησης	<u>Στερεή μορφή:</u> Σταθερό όταν συντηρείται ξηρό, σε σκοτεινό μέρος στους -20°C. <u>Διάλυμα:</u> Σταθερό όταν συντηρείται σε μεθανόλη, στους -20°C.

2.7 Συσσώρευση των DSP τοξινών στα μύδια

Συσσώρευση του OA και γενικώς των φυκοτοξινών στα μύδια εξαρτάται κυρίως από δύο παράγοντες. Ο πρώτος αφορά στη κατάσταση του μυδιού που σχετίζεται με το ρυθμό τροφοληψίας και αφομοίωσης της τροφής. Ο δεύτερος σχετίζεται με την παρουσία τοξικών ειδών φυτοπλαγκτού (επιβλαβής άνθηση) και συγκεκριμένα με τη διάρκεια και την ένταση της άνθησης, το βαθμό τοξικότητας των κυττάρων (ικανότητα παραγωγής OA) και το ποσοστό συμμετοχής των τοξικών ειδών στο σύνολο της διαθέσιμης τροφής (παρουσία μη-τοξικών ειδών).

Η γνώση της κινητικής των DSP τοξινών είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς δίνει τη δυνατότητα πρόβλεψης της χρονικής εξέλιξης ενός τοξικού επεισοδίου και κατ' επέκταση ελαχιστοποίησης των συνεπειών του. Ωστόσο, το θέμα αυτό δεν έχει ακόμα διερευνηθεί πλήρως και ο κυριότερος λόγος είναι η αδυναμία πειραματισμών στο εργαστήριο, καθώς τα κύτταρα του γένους *Dinophysis* δεν μπορούν προς το παρόν να καλλιεργηθούν.

Έχουν προταθεί διάφορα μοντέλα κινητικής των DSP τοξινών, τα οποία προσεγγίζουν σε ικανοποιητικό βαθμό την πραγματική κατάσταση (Silvert et al., 1998; Morðno et al., 1998). Μια πιθανή πορεία είναι η εξής:

- 1) Είσοδος τοξικών κυττάρων στη σάρκα του οστράκου.
- 2) Αφομοίωση και/ή απ' ευθείας απομάκρυνση των τοξικών κυττάρων.
- 3) Παραγωγή DSP τοξινών (ελεύθερες και συζευγμένες μορφές) και ελευθέρωσή τους στη σάρκα.
- 4) Συσσώρευση των τοξινών στους διάφορους ιστούς του οστρακοειδούς, κυρίως στο ηπατοπάγκρεας (Murata et al., 1982).
- 5) Μετασχηματισμός των DSP τοξινών κατά την παραμονή τους στους ιστούς, που συνίσταται σε ακυλίωση των ελεύθερων μορφών (Suzuki et al., 1999) και υδρόλυση (Fernández et al., 1998) ή οξείδωση (Windust et al., 1997) των συζευγμένων μορφών.
- 6) Απ' ευθείας απομάκρυνση των τοξινών (ελεύθερων ή μεταβολιτών) από το όστρακο προς το περιβάλλον.

Οι DSP τοξίνες, ως λιπόφιλες ενώσεις, συσσωρεύονται κυρίως στο ηπατοπάγκρεας των οστρακόδερμων, αφού το όργανο αυτό αποτελεί τη μεγαλύτερη αποθήκη λιπιδίων. Ανάλογα με τις φυσικοχημικές ιδιότητες κάθε τοξίνης, συνδέονται λιγότερο ή περισσότερο ισχυρά με το υπόστρωμα.

2.8 Εξυγίανση μυδιών

Η είσοδος των τοξικών κυττάρων στον οργανισμό των μυδιών ενεργοποιεί διάφορους προστατευτικούς μηχανισμούς, όπως π.χ. κλείσιμο των θυρών. Σύμφωνα με ορισμένους ερευνητές (Shumway & Cucci, 1987; Ward & Target, 1989; Lesser & Shumway, 1993; Smaal & Zurburg, 1997), τα δίθυρα μαλάκια διαθέτουν μηχανισμούς αντίληψης του είδους του φυτοπλαγκτού που καταναλώνουν, ακόμα και της τοξικότητας κάποιων μικροφυκών, και μπορούν να μειώνουν ανάλογα τη διηθητική τους ικανότητα. Μάλιστα, οι Ward και Target (1989) υποστηρίζουν ότι τα μύδια αντιλαμβάνονται ενώσεις σε διαλυμένη μορφή, πιθανότατα μέσω κάποιων ειδικών χημειο-υποδοχέων. Η πιθανότερη θέση των υποδοχέων αυτών φαίνεται να είναι οι χηλικές προσακτρίδες (Scholten & Smaal, 1998).

Ένας άλλος παράγοντας που επηρεάζει την αποτοξίνωση των μυδιών, είναι η ποιότητα και ποσότητα της διαθέσιμης τροφής. Ορισμένοι ερευνητές (Bauder et al., 1996; Blanco et al., 1999) θεωρούν ότι η κύρια οδός απομάκρυνσης των DSP τοξινών είναι η απόθεση μεταβολικών περιττωμάτων, η οποία αυξάνεται παρουσία μη τοξικής τροφής, ως αποτέλεσμα της αύξησης του ρυθμού πρόσληψης τροφής και της πεπτικής δραστηριότητας. Σύμφωνα με μία άλλη προσέγγιση, όταν υπάρχει άφθονη μη τοξική τροφή (π.χ. διάτομα), τα δίθυρα χρειάζεται να διηθήσουν μικρότερο όγκο νερού, οπότε συσσωρεύουν λιγότερη ποσότητα τοξινών (Sampayo et al., 1990). Από την άλλη πλευρά βέβαια, απουσία τροφής (κατάσταση νηστείας) έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη χρήση των αποθηκών λίπους, με αποτέλεσμα να αυξάνεται ο ρυθμός κάθαρσης (Svensson, 2003). Οι τοξίνες που αποθηκεύονται στο γαστρεντερικό σωλήνα των μυδιών απομακρύνονται πιο γρήγορα από εκείνες που συσσωρεύονται στους ιστούς.

Έχουν γίνει πολλές προσπάθειες για την εξυγίανση των οστρακοειδών, με σκοπό να μειωθεί ο χρόνος αποκλεισμού τους από την αγορά. Η ανάπτυξη μεθόδων εξυγίανσης σε φυσικά ελεγχόμενα συστήματα προϋποθέτει ταυτοποίηση των περιβαλλοντικών συνθηκών που επηρεάζουν την εξυγίανση, κατανόηση των φυσιολογικών μηχανισμών εξυγίανσης και χαμηλό κόστος εφαρμογής.

Η συμβατική μέθοδος εξυγίανσης συνίσταται στη μεταφορά των οστράκων σε νερά ελεύθερα τοξικών οργανισμών, όπου αφήνονται να αυτοκαθαριστούν. Η μέθοδος αυτή είναι ικανοποιητική για πολλά είδη οστράκων, όμως ο ρυθμός κάθαρσης εξαρτάται από το κάθε είδος και ορισμένα είδη παραμένουν τοξικά για μεγάλο χρονικό διάστημα. Ένα άλλο μειονέκτημα είναι ότι η μεταφορά μεγάλων ποσοτήτων οστράκων είναι επίπονη και δαπανηρή. Εμβάπτιση μυδιών φυσικώς επιβαρυσμένων με OA ($4.25 \mu\text{g/g}$ HP) σε νερά ελεύθερα τοξικών κυττάρων έδειξε ότι το περιεχόμενο OA μειώνεται κατά 83% εντός μίας εβδομάδας και καθίστανται κατάλληλα προς κατανάλωση, ενώ σε 21 ημέρες απομακρύνεται πλήρως (Poletti et al., 1996). Ωστόσο, σε εργαστηριακά πειράματα, όπου μύδια επιβαρυσμένα με OA εμβάπτιστηκαν σε δεξαμενές με νερά ελεύθερα τοξικών κυττάρων, αρχικά παρατηρήθηκε αύξηση του OA (Haamer et al., 1990; Marcaillou-Le Baut et al., 1993). Το φαινόμενο αυτό αποδίδεται είτε σε αυξημένο ρυθμό μεταβολισμού λόγω του στρες κατά τη μεταφορά, είτε σε υδρόλυση των εστεροποιημένων ενώσεων του OA (π.χ. DTX-4) κατά την επεξεργασία των δειγμάτων.

Έχουν μελετηθεί διάφορες τεχνητές μέθοδοι απομάκρυνσης των DSP τοξινών από τους ιστούς των οστρακοειδών. Σύμφωνα με τους ερευνητές Edebo et al. (1988) και Scoging (1991) ο βρασμός των μυδιών (100°C για 163 min) που είχαν επιμολυνθεί με OA οδήγησε σε αργή διάσπαση της τοξίνης. Επίσης, παρατηρήθηκε όσο αυξανόταν η θερμοκρασία βρασμού (από 50 - 150°C) των μυδιών τόσο μειώνονταν οι συγκεντρώσεις τόσο του OA όσο και της DTX-1. Αλλά τα επίπεδα των συγκεντρώσεων των τοξινών καθιστούσαν τα μύδια ακόμα τοξικά (Mc.Carron et al., 2008). Πρόσφατα, οι Mc. Carron et al., (2007) ακτινοβόλησαν δείγματα μυδιών σε δόσεις 6, 12 και 24KGy και παρατήρησαν μείωση από 5-20% στις συγκεντρώσεις των λιπόφιλων τοξινών. Οι Croci et al. (1994), σε πειράματα που έκαναν σε τεχνητό θαλασσινό νερό χωρίς προσθήκη τροφής, έδειξαν ότι ο ρυθμός κάθαρσης αυξάνεται με οξονισμό. Άλλες μέθοδοι που έχουν δοκιμαστεί είναι το θερμικό και ηλεκτρικό σοκ, μείωση του pH και χλωρίωση (Hallegraeff et al., 1995). Οι Gonzales et al., (2002) πέτυχαν μείωση από 55-89% των DSP τοξινών με τη χρήση

υπερκρίσιμου μίγματος διοξειδίου του άνθρακα με οξικό οξύ στους 40°C υπό πίεση 200bar και για χρόνο έκθεσης 30min-5 h.

2.8.1 Ακτινοβόληση

Η συντήρηση των τροφίμων με χρήση ακτινοβολίας κερδίζει συνεχώς έδαφος και τείνει να καθιερωθεί σαν μια από τις πιο αποτελεσματικές μεθόδους βελτίωσης της ασφάλειας των τροφίμων (WHO, 1994; Diehl, 1995; Wilkinson and Gould, 1996). Με τον όρο ακτινοβόληση, εννοείται η χρήση γ-ακτινοβολίας από τα ραδιοϊσότοπα του ^{60}Co ή του ^{137}Cs , ή υψηλής ενέργειας ηλεκτρονίων και ακτίνων X. Η ελάττωση στους πληθυσμούς των αλλοιογόνων βακτηρίων της μικροβιακής χλωρίδας με την μέθοδο της ακτινοβόλησης έχει σαν αποτέλεσμα την παράταση του χρόνου ζωής των φρέσκων αλλά και κατεψυγμένων προϊόντων με υψηλά ποσοστά υγρασίας (Urbain, 1986).

Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου αυτής θα πρέπει να συμπεριληφθεί το γεγονός ότι τα προϊόντα μπορούν να ακτινοβοληθούν αφού έχουν συσκευαστεί με αποτέλεσμα να εξαλείφεται κάθε πιθανότητα επιμόλυνσης, μέχρι να καταναλωθούν. Η ακτινοβόληση μπορεί να αδρανοποιήσει τους μικροοργανισμούς σε ένα τρόφιμο χωρίς να είναι απαραίτητη η απόψυξη αυτού.

Η ακτινοβόληση ως μέθοδος συντήρησης τροφίμων, εφαρμόστηκε στα μέσα της δεκαετίας του 1940 και χρησιμοποιείται σε περίπου 40 χώρες σε εμπορική κλίμακα (Urbain, 1986). Οι διεργασίες ακτινοβόλησης που εφαρμόζονται στα τρόφιμα, κατατάσσονται στις παρακάτω κατηγορίες:

- 1) Ραδιοαποστείρωση (radappertization): παράγεται ένα «εμπορικά αποστειρωμένο» προϊόν (20-25 kGy).
- 2) Ραδιοπαστερίωση (radicidation): καταστροφή παθογόνων μικροοργανισμών που σχετίζονται με τη δημόσια υγεία (1-10 kGy).
- 3) Ήπια ραδιοπαστερίωση (radurization): γενική μείωση του επιπέδου των βλαστικών βακτηρίων και παράταση του χρόνου ζωής του προϊόντος (1-4 kGy).
- 4) Παρεμπόδιση εκβλάστησης σε αποθηκευμένα λαχανικά (≤ 1 kGy).

Η ακτινοβολήση σε συνδυασμό με τις παραδοσιακές μεθόδους συντήρησης τροφίμων, όπως η ψύξη, παίζει σημαντικό ρόλο τόσο στην ασφάλεια, όσο και στη συντήρηση των τροφίμων (Tsiotsias et al., 2002, Chouliara et al., 2007).

2.8.1.1 Τύποι και πηγές ακτινοβολίας

Οι πιο κατάλληλες ακτινοβολίες για την ακτινοβόληση των τροφίμων είναι οι ιονίζουσες, οι οποίες προκαλούν ιονισμό των ατόμων της ύλης μέσα από την οποία διέρχονται. Από τις ιονίζουσες ακτινοβολίες κατάλληλες είναι οι ακτίνες γ και οι δέσμες ηλεκτρονίων (ακτίνες β). Οι ακτίνες X έχουν περιορισμένη εφαρμογή λόγω του υψηλού κόστους (Μπλούκας, 1999).

Ακτίνες γ: Η γ ακτινοβολία είναι μικρού μήκους κύματος ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία υψηλής ενέργειας που εκπέμπεται από τον πυρήνα ραδιενεργών ατόμων και παρουσιάζει μεγάλη διεισδυτική ικανότητα. Ως πηγές γ ακτινοβολίας χρησιμοποιούνται δύο ραδιενεργά ισότοπα, το ^{60}Co με χρόνο ημιζωής 5,3 χρόνια και το ^{137}Cs , με χρόνο ημιζωής 30 χρόνια. Συνήθως στη συντήρηση τροφίμων χρησιμοποιείται πηγή ^{60}Co γιατί αυτό είναι περισσότερο διαθέσιμο σε σχέση με το ^{137}Cs .

Ηλεκτρόνια υψηλής ενέργειας: Ως πηγές ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας χρησιμοποιούνται διάφοροι τύποι επιταχυντών ηλεκτρονίων, που παράγουν ακτινοβολία ενέργειας έως 10 MeV. Η παραγόμενη δέσμη ηλεκτρονίων εξέρχεται από την πηγή, έχοντας πολύ μεγάλη επιτάχυνση καθώς τα τρόφιμα κινούνται σε ιμάντα σε οριζόντια διάταξη.

Η ακτινοβόληση ηλεκτρονίων παρουσιάζει κάποια βασικά πλεονεκτήματα σε σχέση με την ακτινοβόληση με ραδιενεργά στοιχεία όπως η μεγαλύτερη ταχύτητα, η ευκολότερη μόνωση και η κατά βούληση λειτουργία. Μειονεκτεί όμως στο ότι έχει σχετικά περιορισμένη ικανότητα διείσδυσης ($\leq 2\text{mm}$), απαιτεί συχνή συντήρηση και έχει σημαντικές απαιτήσεις σε ενέργεια.

2.8.1.2 Μονάδες μέτρησης δόσης ακτινοβολήσης

Η απορροφούμενη δόση ακτινοβολίας εκφράζει το ποσό της ενέργειας που η ιονίζουσα ακτινοβολία μεταδίδει σε ένα δεδομένο υλικό (π.χ. ένα τρόφιμο). Οι μονάδες μέτρησης που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι:

- 1) Rad (ένα rad είναι η ποσότητα της ακτινοβολίας που προκαλεί απορρόφηση ενέργειας ίσης με 100 erg/g ακτινοβολημένου υλικού).
- 2) Gray (1 Gy ισοδυναμεί με 1 Joule ενέργειας απορροφημένο από 1 Kg υλικού). Συνήθως η ακτινοβολία μετριέται σε kGy.

Άλλες μονάδες μέτρησης είναι το Curie, Roentgen, Becquerel, Electron Volts.

2.8.1.3 Δόσεις ακτινοβολήσης ανάλογα με το επιδιωκόμενο αποτέλεσμα

Οι τιμές των δόσεων που χρησιμοποιούνται στην ακτινοβολήση των τροφίμων κατατάσσονται συνήθως στις παρακάτω κατηγορίες (Γούλας, 1999):

Χαμηλή δόση μέχρι 1 kGy

- 1) Αναστέλλει τη βλάστηση κατά την αποθήκευση σε φυτικά τρόφιμα που αποτελούνται από βολβούς, όπως είναι οι πατάτες, τα κρεμμύδια, τα σκόρδα κ.α. (δόση 0,05-0,15 kGy).
- 2) Καθυστερεί την ωρίμανση καθώς και τις φυσιολογικές πορείες σε φρέσκα φρούτα και κηπευτικά (δόση 0,5-1,0 kGy).
- 3) Προκαλεί θανάτωση εντόμων σε διάφορα τρόφιμα όπως δημητριακά, όσπρια, αλεύρι, λαχανικά, κρέας κ.α. (0,15-0,5 kGy).

Μέτρια δόση: 1-10 kGy

- 1) Προκαλεί παστερίωση θανατώνοντας τους αλλοιωγόνους και παθογόνους μικροοργανισμούς σε φρέσκα ή κατεψυγμένα θαλασσινά, πουλερικά, κρέας κ.α. (δόση 1,0-7,0 kGy).
- 2) Βελτιώνει τις ιδιότητες διαφόρων τροφίμων, όπως είναι τα σταφύλια, στα οποία αυξάνει την απόδοση σε χυμό (δόση 2,0-7,0 kGy).

Υψηλή δόση: 10-50 kGy

- 1) Προκαλεί εμπορική αποστείρωση τροφίμων όπως το κρέας, πουλερικά, θαλασσινά, έτοιμα γεύματα (δόση 10-50 kGy).
- 2) Προκαλεί εξυγίανση διαφόρων πρόσθετων και συστατικών των τροφίμων, όπως καρυκεύματα, έτοιμα γεύματα καθώς και εξάλειψη των ιών (δόση 10-50 kGy).

2.8.1.4 Εγκαταστάσεις και εξοπλισμός

Μια εγκατάσταση πηγής ακτινοβολίας πρέπει να περιλαμβάνει:

- 1) Την πηγή ακτινοβολίας (ραδιενεργό στοιχείο ή δέσμη ηλεκτρονίων).
- 2) Την προστατευτική εγκατάσταση από τυχόν διαρροή ακτινοβολίας.
- 3) Το σύστημα διακίνησης των τροφίμων προς και από την πηγή της ακτινοβολίας.
- 4) Το σύστημα ελέγχου του συστήματος διακίνησης.
- 5) Το σύστημα ελέγχου επιπέδου ακτινοβολίας στο χώρο.

2.8.1.5 Έλεγχος της διαδικασίας της ακτινοβολίας

Ο έλεγχος της διαδικασίας ακτινοβολίας είναι απαραίτητος αφού δεν υπάρχουν απλές τεχνικές που να διαχωρίζουν τα ακτινοβολημένα από τα μη ακτινοβολημένα τρόφιμα. Ο έλεγχος στις διάφορες μονάδες παραγωγής γίνεται προσδιορίζοντας κάποιες

φυσικές παραμέτρους όπως η τελική τιμή της απορροφημένης δόσης της ακτινοβολίας από το προϊόν.

Ετικέτες-δείκτες της τελικής δόσης ακτινοβόλησης χρησιμοποιούνται για να δηλώσουν τα προϊόντα, που έχουν υποστεί ακτινοβόληση. Αυτός είναι ένας εύκολος τρόπος διαχωρισμού ακτινοβολημένων και μη ακτινοβολημένων προϊόντων.

Ο έλεγχος της σωστής λειτουργίας των εγκαταστάσεων ακτινοβόλησης ρυθμίζεται από τις εθνικές Επιτροπές Ατομικής Ενέργειας. Από τη Διεθνή Επιτροπή Ατομικής Ενέργειας (ΙΑΕΑ, Βιέννη), έχουν θεσπιστεί αυστηρά μέτρα ελέγχου για τη χρήση ακτινοβόλησης στη συντήρηση τροφίμων, έτσι ώστε να εξασφαλίζεται η ποιότητα και ασφάλεια των τροφίμων.

Ο έλεγχος των εγκαταστάσεων είναι απαραίτητος για να διασφαλιστεί η λειτουργία της πηγής ακτινοβόλησης σύμφωνα με τα απαραίτητα κριτήρια ασφάλειας που έχουν θεσπιστεί (Γούλας, 1999).

2.8.1.6 Προϊόντα ιχθυρών

Τα μαλάκια, τα καρκινοειδή καθώς και τα πόδια βατράχων, που προέρχονται από μολυσμένα υδάτινα συστήματα, είναι πιθανόν να περιέχουν παθογόνους μικροοργανισμούς και να εγκυμονούν κινδύνους για τη δημόσια υγεία, όπως έχουν δείξει αρκετά περιστατικά στο παρελθόν με υψηλά ποσοστά θνησιμότητας (Kampelmacher, 1984).

Έρευνες σε προϊόντα ιχθυρών έδειξαν ότι δόσεις ακτινοβολίας μέχρι και 4 kGy εμποδίζουν την ανάπτυξη παθογόνων βακτηρίων και μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε κατεψυγμένα προϊόντα ιχθυρών, όπως γαρίδες και πόδια βατράχων (Nerkar and Lewis, 1982, Nouchpramoul, 1985, Ito et al., 1989, Han et al., 1992).

Οι τιμές D_{10} για τα διάφορα στελέχη της *Salmonella* σε εμβολιασμένες γαρίδες από την Ταϊλάνδη, κυμάνθηκαν μεταξύ 0.3 έως 0.5 kGy σε κατεψυγμένα δείγματα και 0.4 έως 0.6 kGy σε δείγματα υπό ψύξη (Nouchpramoul, 1985).

Δόση ακτινοβολίας ίση με 4 kGy είχε σαν αποτέλεσμα την ελάττωση κατά 3 log του πληθυσμού των αερόβιων ψυχρότροφων και μεσόφιλων βακτηρίων σε γαρίδες από τη Μαλαισία που συντηρήθηκαν υπό ψύξη (Prachasitthisakdi et al., 1984). Επιπλέον, τα *Enterobacteriaceae* και ο *S. aureus* δεν ανιχνεύτηκαν σε 1 g δείγματος μετά την εφαρμογή δόσεων ακτινοβολίας μεταξύ 2 και 4 kGy.

Το βακτήριο *Vibrio parahaemolyticus* θεωρήθηκε η αιτία πρόκλησης γαστροεντερικών λοιμώξεων από την κατανάλωση προϊόντων ιχθυρών στην Νοτιοανατολική Ασία (Lewis, 1983). Ποσοστό 60% φρέσκων ψαριών από τοπική αγορά της Βομβάης στην Ινδία, βρέθηκε μολυσμένο με το παραπάνω βακτήριο. Επίσης ο Nouchpramoul (1985), βρήκε το μικροοργανισμό αυτό σε ποσοστό 85% σε φρέσκες και κατεψυγμένες γαρίδες στην Ταϊλάνδη. Το βακτήριο είναι αρκετά ευαίσθητο στην ακτινοβολήση καθώς οι πληθυσμοί διαφόρων στελεχών του βακτηρίου, που εμβολιάστηκαν σε καβούρια και υποβλήθηκαν σε ακτινοβολήση με δόση ακτινοβολίας 0.25 kGy, ελαττώθηκαν κατά 2-5 log CFU (Matches and Liston, 1971). Ο Lewis (1983) ανέφερε ότι οι D_{10} τιμές για τις γαρίδες κυμαίνονται μεταξύ 0.04 και 0.05 kGy. Έτσι, δόση ακτινοβολίας ίση με 1 kGy είναι αρκετή για να εξαλείψει το βακτήριο *V. parahaemolyticus* σε κατεψυγμένα προϊόντα ιχθυρών.

Δόση ακτινοβολίας ίση με 2.5 kGy προκάλεσε ελάττωση του πληθυσμού τεσσάρων στελεχών του μικροοργανισμού *Shigella* περισσότερο από 6 log, όταν αυτός ενοφθαλμίστηκε σε προμαγειρεμένες και κατεψυγμένες γαρίδες.

Τα αποτελέσματα της βιβλιογραφίας διαφοροποιούνται όσον αφορά την οργανοληπτική αποδοχή των ακτινοβολημένων καρκινοειδών, πιθανόν λόγω των διαφορετικών συνθηκών του κάθε πειράματος καθώς και του διαφορετικού διαστήματος που μεσολαβούσε μεταξύ της ακτινοβολήσης και της οργανοληπτικής εξέτασης, διάστημα που χαρακτηρίζεται αρκετά κρίσιμο για την οργανοληπτική αξιολόγηση του προϊόντος. Ο Rhodes (1964), ανέφερε ότι δόση ακτινοβολίας ίση με 3 kGy σε γαρίδες προκάλεσε δυσοσμία αλλά καμία άλλη δυσάρεστη μεταβολή στην εμφάνιση του προϊόντος, σε αντίθεση με τους Coleby και Shewan (1965), που ανέφεραν ότι το ανώτατο όριο ακτινοβολίας για τις γαρίδες μπορεί να είναι τα 9 kGy. Μετά από έρευνα βρέθηκε ότι γαρίδες αμέσως μετά την ακτινοβολήση με δόση ακτινοβολίας 2 kGy είχαν καλύτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά από αυτές που δεν ακτινοβολήθηκαν. (Novak et al., 1968,

Nickerson et al., 1983). Έρευνα στη Ταϊλάνδη με χρήση ακτινοβολίας δόσης 2.2 kGy σε γαρίδες δεν έδειξε μεταβολή στη γεύση, υφή και στο χρώμα του προϊόντος παρά μόνο στην οσμή. Πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι υπήρξε διαφορά στο βαθμό αποδοχής μεταξύ των καταναλωτών στις διάφορες περιοχές (Nouchpramoul, 1985).

Όσον αφορά τα πόδια βατράχων, μελέτες στην Ινδονησία (Tamburan, 1985), έδειξαν ότι ο συνδυασμός της χρήσης χλωριωμένου νερού, ψύξης και ακτινοβόλησης σε δόσεις ακτινοβολίας 3-6 kGy, εξάλειψαν τη *Salmonella* από το προϊόν.

Δόση ακτινοβολίας ίση με 1 kGy είναι αρκετή να εξαλείψει τον μικροοργανισμό *V. vulnificus* στα μύδια.

2.8.1.7 Περιορισμοί στη χρήση της ακτινοβόλησης

Η ακτινοβόληση δεν είναι πανάκεια για όλα τα προβλήματα που σχετίζονται με τη συντήρηση των τροφίμων. Εκτός από τους οικονομικούς παράγοντες και την αποδοχή των ακτινοβολημένων τροφίμων από το καταναλωτικό κοινό (Bruhn, 1995, Resurreccion et al., 1995), οι μεταβολές στην οργανοληπτική ποιότητα αποτελούν ένα από τα βασικότερα κριτήρια για την χρήση της ακτινοβόλησης ως μεθόδου συντήρησης (Urbain, 1982). Η ακτινοβόληση σε θερμοκρασίες κατάψυξης είναι δυνατό να ελαττώσει το σχηματισμό δύσοσμων ενώσεων. Παρόλα αυτά για τεχνικούς και οικονομικούς λόγους, ορισμένα τρόφιμα δεν είναι δυνατόν να καταψυχθούν, οπότε η μέθοδος αυτή δεν βρίσκει παντού εφαρμογή.

2.8.2 Οζονισμός

Το όζον είναι μια αλλοτροπική μορφή του οξυγόνου που παράγεται με τη διέλευση οξυγόνου ή αέρα δια μέσου ηλεκτρικών εκκενώσεων (5000 – 20000 V, 50 – 500 Hz). Είναι ασταθές αέριο, όπου σε θερμοκρασίες >35°C μετατρέπεται σε οξυγόνο. Είναι τοξικό και ισχυρό οξειδωτικό με απολυμαντική δράση και γι' αυτό χρησιμοποιείται ως

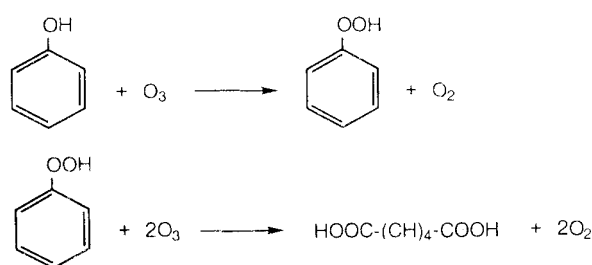
λευκαντικό ή αντιδραστήριο για την απόσμιση. Έχει χαρακτηριστική οσμή, κυανό χρώμα και πρέπει να παράγεται στο σημείο χρήσης του. Ένα από τα πλεονεκτήματά του είναι ότι δεν αφήνει γεύση ή οσμή στο επεξεργασμένο πόσιμο νερό. Για την επεξεργασία καθαρισμού του νερού χρησιμοποιείται κυρίως στις παρακάτω περιπτώσεις αποχρωματισμού, απολύμανσης, οξείδωσης οργανικών ενώσεων και κυρίως φαινολών και κυανιούχων ενώσεων. Η διαλυτότητα του όζοντος εξαρτάται από τη θερμοκρασία ενώ η ημιπερίοδος ζωής σε υδατικά διαλύματα καθορίζεται από το pH. Επίσης η διαλυτότητά του επηρεάζεται από την συγκέντρωση του μονοξειδίου και διοξειδίου του άνθρακα και άλλων οργανικών και ανόργανων ουσιών στο νερό. Έτσι έχει μεγάλη σημασία η καλή γνώση των χαρακτηριστικών του νερού πριν εφαρμοστεί ο οζονισμός για την απολύμανσή του. Το όζον είναι πιο οξειδωτικό από το οξυγόνο, έχει όμως το πλεονέκτημα της μικρής θερμοδυναμικής σταθερότητας σε κανονικές συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης. Διασπάται τόσο στην αέρια φάση όσο και στην υγρή. Η διάσπασή του είναι πιο έντονη στο νερό όπου καταλύεται από την παρουσία υδροξυλιόντων. Μετά τη τροφοδοσία του όζοντος στο νερό, παραμένει για ένα μικρό χρονικό διάστημα, το οποίο είναι αρκετό για την απολυμαντική του δράση, και μετά αποσυντίθενται. Η απολυμαντική του δράση είναι ισχυρή και ταχεία. Ο ιός της πολιομυελίτιδας αδρανοποιείται σε ποσοστό 99,99% σε 4-6 λεπτά υπό την επίδραση 0,4ppm όζοντος.

Έχει μεγάλη απολυμαντική δράση έναντι των πρωτόζωων. Οφείλεται σε οξειδωτικές αντιδράσεις που καταστρέφουν βασικές δομές του μικροβιακού κυττάρου. Εκτός από τη βακτηριοκτόνα δράση του, έχει την τάση να οξειδώνει την οργανική ύλη, καθώς και μέταλλα όπως το σίδηρο και το μαγνήσιο. Προτάθηκε επίσης για την απολύμανση κλειστών θαλάσσιων συστημάτων. Επειδή όμως είναι ασταθής ένωση δεν έχει καμία παραμένουσα δράση στο δίκτυο διανομής. Αντίθετα, επειδή οξειδώνει σύνθετες οργανικές ενώσεις σε απλούστερες βιοαφομοιώσιμες μορφές, σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορεί να αυξήσει την πιθανότητα ανάπτυξης βακτηρίων στο δίκτυο. Σαν οξειδωτικό συμβάλλει στην συντήρηση των φίλτρων. Οι φυσικές ιδιότητες του όζοντος φαίνονται στον πίνακα 4:

Πίνακας 4. Φυσικές Ιδιότητες του όζοντος (Manley and Niegowski, 1967)

Σημείο Βρασμού	-111.9°C
Σημείο Τήξεως	-192.5°C
Κρίσιμη Θερμοκρασία	-12.1°C
Κρίσιμη Πίεση	54.6 atm

Το όζον οξειδώνει πολλές επιβλαβείς ενώσεις σε απλούστερες αβλαβείς μορφές ή και συντελεί στην πλήρη καταστροφή τους. Παράδειγμα αυτής της δραστηριότητας είναι η οξείδωση των φαινολών, η οποία οδηγεί στην πλήρη καταστροφή των ενώσεων αυτών καθώς και των αρωματικών προϊόντων διάσπασής τους με τελικά προϊόντα αλειφατικά οξέα ή εστέρες :



Σχήμα 3. Αντιδράσεις διάσπασης φαινολών με την επίδραση όζοντος

Στη Δ. Ευρώπη υπάρχει μία σημαντική στροφή προς τη χρήση όζοντος. Έχει σχεδόν την ίδια απολυμαντική δράση με την χλωρίωση και συνηθίζεται περισσότερο λόγω του χαμηλού της κόστους. Η υπηρεσία ελέγχου τροφίμων και φαρμάκων (FDA) των ΗΠΑ επέτρεψε τη χρήση όζοντος σε άμεση επαφή με τα τρόφιμα για λόγους συντήρησης των τελευταίων το 2001 (Yousef et al., 2001).

2.8.2.1 Παραγωγή όζοντος

Οι Rice et al., (1986) ήταν οι πρώτοι οι οποίοι μελέτησαν την παραγωγή όζοντος. Καταρχήν, χρειάζεται διατομικό μόριο οξυγόνου. Πρέπει να αντιδράσει ένα διατομικό μόριο οξυγόνου με μία ρίζα οξυγόνου για να σχηματιστεί το όζον. Όμως για να υπάρξει ελεύθερη ρίζα οξυγόνου απαιτείται μεγάλη ενέργεια για το σπάσιμο του δεσμού οξυγόνου-

οξυγόνου. Η ενέργεια αυτή επιτυγχάνεται είτε με τη χρήση UV ακτινοβολίας (188nm) είτε κατόπιν διεύλεσης O₂ μέσω χώρου όπου λαμβάνει χώρα ηλεκτρική εκκένωση (corona discharge). Σε αυτή τη τεχνική εάν διοχετευτεί αέρας από την ατμόσφαιρα τότε παράγεται περίπου 1-3% όζον ενώ εάν διοχετευτεί καθαρό οξυγόνο μπορεί να παραχθεί έως και 6%.

2.8.2.2 Αντιμικροβιακή δράση όζοντος

Το όζον καταστρέφει μικροοργανισμούς με την οξείδωση συστατικών των κυττάρων. Έχει αποδειχθεί ότι είναι αποτελεσματικό έναντι των κατά Gram θετικών βακτηρίων όπως η *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis* και των κατά Gram αρνητικών βακτηρίων όπως *Pseudomonas aeruginosa* και *Yersinia enterocolitica*. Η δράση του οφείλεται στην προσβολή της γλυκοπρωτεϊνικής ή/και γλυκολιπιδικής μεμβράνης των βακτηρίων (Restaino et al., 1995). Επίσης, είναι αποτελεσματικό σε μία ευρεία ποικιλία ιών όπως του *Venezuals equine encephalomyelitis virus*, *hepatitis A*, *influenza A* κ.α. (Guzel-Seydim et al., 2004).

2.8.2.3 Οξείδωση οργανικών και ανόργανων ενώσεων

Το όζον είναι ένας ισχυρότατος παράγοντας για την οξείδωση φυσικών και συνθετικών οργανικών ενώσεων όπως φυτοφάρμακα, υπολείμματα φυσικών ζυμώσεων, εντομοκτόνα κτλ. Μερικές οργανικές ενώσεις καταστρέφονται σε δευτερόλεπτα (π.χ. φαινόλες και μυρμηγκικό οξύ), ενώ άλλες χρειάζονται περισσότερο χρόνο (π.χ. ορισμένα εντομοκτόνα, τριγλωρο-υδρογονάνθρακες). Επίσης, το όζον οξειδώνει ταχύτατα και αποτελεσματικά ανόργανα στοιχεία όπως ο σίδηρος, το μαγγάνιο προς αδιάλυτες ενώσεις που όμως μπορούν να απομακρυνθούν εύκολα με τη χρήση φίλτρου ενεργού άνθρακα. Στην περίπτωση των νιτρωδών εστέρων η οξείδωση οδηγεί στο σχηματισμό νιτρικών αλάτων που είναι αβλαβή. Επίσης, οσμές θείου εξαφανίζονται με τη χρήση όζοντος.

2.8.2.4 Χρήση του όζοντος στα τρόφιμα

Το όζον είναι ένα ασφαλές δυνατό απολυμαντικό και γι αυτό χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της ανάπτυξης ανεπιθύμητων οργανισμών σε προϊόντα και μηχανολογικούς εξοπλισμούς που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων. Το όζον χρησιμοποιείται συστηματικά στη βιομηχανία τροφίμων λόγω της ικανότητάς του να θανατώνει μικροοργανισμούς χωρίς να προσθέτει χημικά υποπροϊόντα στα τρόφιμα ή την ατμόσφαιρα στην οποία τα τρόφιμα αποθηκεύονται. Σε διάλυμα το όζον μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την απολύμανση συσκευών. Σε μορφή αερίου, το όζον δρα ως συντηρητικό των τροφίμων ενώ μπορεί επίσης να εξυγιάνει υλικά συσκευασίας τροφίμων. Προϊόντα που συντηρούνται με το όζον κατά τη διάρκεια αποθήκευσης σε ψύξη είναι τα αυγά, τα ψάρια, τα φρέσκα φρούτα, λαχανικά καθώς και μύδια (Manousaridis et al., 2005).

2.8.2.5 Τοξικότητα του όζοντος

Η τοξικότητα του όζοντος είναι το πιο σημαντικό κριτήριο που λαμβάνεται υπόψη κατά τη χρήση του στην βιομηχανία τροφίμων. Είναι απαραίτητο οι εργαζόμενοι στις βιομηχανίες αυτές να κάνουν χρήση του όζοντος με προσοχή και ασφάλεια. Το όζον προσβάλλει το ανθρώπινο αναπνευστικό σύστημα. Τα συμπτώματα που εμφανίζονται είναι πονοκέφαλος, ζάλη, αίσθηση καψίματος των ματιών και του λαιμού, οξύτητα στη γεύση και την οσμή και βήχας (Hoof, 1982).

Επειδή το όζον είναι ισχυρά τοξικό, η μέγιστη ανεκτή συγκέντρωση του σε συνθήκες συνεχούς έκθεσης είναι 0.1 ppm. Η συνήθης δόση είναι γύρω στα 0.4 mg/l για χρόνο επαφής 4 λεπτών.

2.9 Τοξικές επιπτώσεις των DSP τοξινών στην υγεία των ζώων και του ανθρώπου

Μετά από στοματική χορήγηση μυδιών επιβαρυνμένων με OA σημειώθηκαν συμπτώματα διάρροιας και εμετού (Fernández et al., 2003).

Οι τοξικές επιπτώσεις του ΟΑ, όταν χορηγηθεί ενδοπεριτοναϊκά σε ποντίκια, συνίστανται σε ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις που εμφανίζονται μετά από 30 λεπτά. Μεταξύ των συμπτωμάτων περιλαμβάνονται λήθαργος, γενική αδυναμία, διάρροια και θάνατος (Terao et al., 1993). Πειράματα σε νεαρά ποντίκια, μετά από ενδοπεριτοναϊκή ένεση DSP τοξινών, έδειξαν συμπτώματα διόγκωσης, υπεραιμίας και εκφυλισμού των εντέρων, καθώς και βλάβη του ήπατος (Hamano et al., 1986; Terao et al., 1986 & 1993). Ενδογαστρική χορήγηση του ΟΑ στα ποντίκια απέδειξε 16 φορές μικρότερη τοξικότητα (Yasumoto et al., 1978). Ο θάνατος μπορεί να επέλθει μέσα σε 1.5 έως 48 ώρες από τη στιγμή της ένεσης, ανάλογα με τη δόση. Η μέση θανατηφόρος δόση (LD₅₀) του ΟΑ μετά από ενδοφλέβια ή ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση είναι 192 μg/kg σωματικού βάρους (σ.β.), ενώ η στοματική δόση είναι 200-300 μg/kg σ.β. (Cohen et al., 1990; Shibata et al., 1982). Στον Πίνακα 5 δίνεται αναλυτικά η μέση θανατηφόρος δόση (LD₅₀) των λιπόφιλων τοξινών σε ποντίκια.

Για την έκφραση της τοξικότητας χρησιμοποιούνται οι μονάδες μυών (Mouse Units, MU). Μία (1) MU αντιστοιχεί σε 4 μg ΟΑ και ορίζεται ως η ελάχιστη ποσότητα τοξίνης ικανής να προκαλέσει το θάνατο σε ένα ποντίκι βάρους 20g σε 24 ώρες, μετά από ενδοπεριτοναϊκή ένεση (Yasumoto et al., 1984 & 1989). Δείγμα μυδιών με τοξικότητα πάνω από 4-5 MU ή 16-20 μg ισοδύναμων ΟΑ/100 g ολικού ιστού θεωρείται ακατάλληλο προς κατανάλωση (Yasumoto et al., 1978).

Πίνακας 5. Μέση θανατηφόρος δόση (LD₅₀) διαφόρων λιπόφιλων τοξινών μετά από ενδοπεριτοναϊκή ένεση σε ποντίκια (Fernández et al., 2003).

ΟΜΑΔΑ ΤΟΞΙΝΩΝ	ΑΝΑΛΟΓΑ	LD ₅₀ (μg/kg σ.β.)	ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ
Οκαδαϊκό οξύ	OA	192	Διάρροια, προαγωγή όγκων
Δινοφυσιστοξίνη	DTX-1	160	Διάρροια
	DTX-3	500	Διάρροια
Πηκτινοτοξίνη	PTX-1	250	Ηπατοτοξικότητα
	PTX-2	230	Ηπατοτοξικότητα, διάρροια
	PTX-3	350	*
	PTX-4	770	*
	PTX-6	500	*
	PTX-7	>5000	*
	PTX-8	>5000	*
Γεσοτοξίνη	YTX	100	Καρδιοτοξικότητα
	Υδροξυ- YTX	500	*
	Homo-YTX	100	*
Αζασπειροξύ	AZA-1	200	Διάρροια
	AZA-2	110	Διάρροια
	AZA-3	140	Διάρροια
	AZA-4	470	Διάρροια
	AZA-5	1000	Διάρροια
* Στην περίπτωση των PTXs και YTXs μελέτες στοματικής τοξικότητας και κυττοτοξικότητας έχουν γίνει μόνο για τις PTX-1, PTX-2 και YTX. Τα υπόλοιπα ανάλογα πιθανότατα παρουσιάζουν παρόμοια ή ίδια παθολογία με τις μητρικές ενώσεις.			

Το OA και τα ανάλογά του, DTX-1 και DTX-2, είναι οι κυριότερες τοξίνες που είναι υπεύθυνες για τις DSP δηλητηριάσεις στον άνθρωπο (Murata et al., 1982; Yasumoto et al., 1985). Μεταξύ των συμπτωμάτων είναι κυρίως γαστρεντερικές διαταραχές που

εμφανίζονται 30 λεπτά έως μερικές ώρες (σπάνια υπερβαίνουν τις 12 ώρες) μετά την είσοδο στον οργανισμό. Οι ασθενείς αναρρώνουν πλήρως μέσα σε 3 με 4 ημέρες, ανεξάρτητα από τη θεραπευτική αγωγή. Επίσης, εξαιτίας του λιπόφιλου χαρακτήρα του, το OA μπορεί εύκολα να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη προκαλώντας παρατεταμένη συστολή των μυών (Shibata et al., 1982). Στον Πίνακα 6 παρατίθενται τα συμπτώματα που έχουν καταγραφεί κατά τη διάρκεια DSP επεισοδίων στην Ιαπωνία και τη Γαλλία (Yasumoto et al., 1978; Luckas, 1985).

Η τοξικότητα του OA και των αναλόγων του οφείλεται στην ιδιότητά τους να αναστέλουν τη δράση των ενζύμων π.χ. τις φωσφατάσες, προκαλώντας υπερφωσφορυλίωση (Bialojan & Takai, 1988). Το OA αποτελεί ισχυρό αναστολέα της δράσης της φωσφατάσης PP1 και της φωσφατάσης PP2A της σερίνης και της θρεονίνης (Haystead et al., 1989). Ένα (1) nM OA αναστέλλει πλήρως την PP2A (Cohen, 1989). Η συσσώρευση φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών, οι οποίες ελέγχουν την έκκριση νατρίου στα εντερικά κύτταρα, καθώς και η αναστολή της αποφωσφορυλίωσης κυτταροσκελετικών στοιχείων που ρυθμίζουν τη διαπερατότητα των διαλυμένων ουσιών, έχουν ως αποτέλεσμα την παθητική απώλεια υγρών (Aune & Yndestad, 1993). Εκτενείς μελέτες έδειξαν ότι η δραστηριότητα του OA οφείλεται κατά ένα ποσοστό στην ελεύθερη καρβοξυλομάδα του μορίου του. Αυτό, εξάλλου, αποδεικνύεται και από το γεγονός ότι οι διολ-εστέρες, που είναι φυσικά παράγωγα του OA, δεν αναστέλλουν τη δράση των φωσφατασών PP1 και PP2A *in vitro* (Hu et al., 1992b).

Πίνακας 6. Συμπτώματα ασθενών μετά από κατανάλωση οστρακοειδών μολυσμένων με DSP τοξίνες.

ΣΥΜΠΤΩΜΑ	ΠΟΣΟΣΤΟ ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΩΝ	
	Ιαπωνία ¹	Γαλλία ²
Διάρροια	92	100
Κοιλιακό άλγος	53	94
Ναυτία	80	35
Εμετός	79	38
Γενική αδυναμία	- ³	55
Πυρετός	-	38
Πονοκέφαλος	-	20
Ζάλη	-	10
Έντονη δίψα	-	14
Υπερβολική σιελόρροια	-	9
Υπόταση	-	8
Ταχυκαρδία	-	10
1. Δεδομένα βασισμένα σε 164 περιστατικά από επεισόδια που σημειώθηκαν το 1976 και το 1977 (Yasumoto et al., 1978).		
2. Δεδομένα βασισμένα σε 160 περιστατικά από επεισόδια που σημειώθηκαν το 1984 (Luckas, 1985).		
3. Δεν αναφέρθηκαν δεδομένα.		

Εκτός από τα δεδομένα οξείας τοξικότητας, *in vitro* μελέτες ενοχοποιούν το ΟΑ για προαγωγή νεοπλασιών, κυρίως του στομάχου (Fujiki & Suganuma, 1993), καθώς και

για γενοτοξικές ιδιότητες, οι οποίες οφείλονται κυρίως στην ανάπτυξη παραγόντων που βλάπτουν το DNA (Nagakama et al., 1997).

Τα όρια ανοχής ή επιτρεπτά όρια για τις DSP τοξίνες καθορίζονται με βάση επιδημιολογικά δεδομένα οξείας τοξικότητας σε ανθρώπους (όχι σε ποντίκια), χωρίς να λαμβάνεται υπόψη ο κίνδυνος από τη χρόνια έκθεση στις τοξίνες. Άλλωστε, δεν υπάρχουν δεδομένα σχετικά με τη μακροχρόνια έκθεση στις τοξίνες αυτές, αφού η κατανάλωσή τους δε θεωρείται ότι συμβαίνει σε καθημερινή βάση και καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής των ατόμων.

Επιδημιολογικά δεδομένα από τοξίνωση που παρατηρήθηκε στη Νορβηγία το 1984 οδήγησαν στην καθιέρωση ως *Χαμηλότερου Επιπέδου Παρατηρούμενης Δυσμενούς Επίπτωσης* (*Lower Observed Adverse Effect Level, LOAEL*) τα 0.8 $\mu\text{g/kg}$ σ.β., που αντιστοιχούν σε 48-65 μg OA για άτομο βάρους 60 kg (Hamano et al., 1986). Εφαρμόζοντας ένα συντελεστή ασφαλείας ίσο με 3, το επιτρεπόμενο όριο γίνεται 0,27 $\mu\text{g/kg}$ σ.β. ή 16 μg για άτομο βάρους 60 kg. Εξαιτίας έλλειψης επαρκών δεδομένων σχετικά με την έκθεση του ανθρώπου στα διάφορα είδη μολυσμένων οστρακοειδών, γίνεται η υπόθεση ότι η πρόσληψη όλων των ειδών είναι παρόμοια με την πρόσληψη των μυδιών, η οποία ισούται με 100 g/άτομο. Επομένως, εάν η συγκέντρωση του OA δεν είναι υψηλότερη από 16 $\mu\text{g}/100\text{g}$ ολικού ιστού, τότε δεν υπάρχει σημαντικός κίνδυνος για τη δημόσια υγεία (WG Toxicology, 2001).

2.10 Μέτρα Αντιμετώπισης και Νομοθεσία

Η εμφάνιση των φυκοτοξινών και η επακόλουθη πιθανότητα εκδήλωσης τοξινώσεων είναι ένα φαινόμενο πολυδιάστατο, με σοβαρές επιπτώσεις τόσο στη δημόσια υγεία, όσο και στην οικονομία των οστρακοκαλλιεργητών. Πρόκειται για ένα φαινόμενο που μπορεί να εμφανιστεί απρόσμενα σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή, ανεξάρτητα από την τοποθεσία και τις κλιματολογικές συνθήκες. Πολλές περιοχές παραγωγής και αλιείας οστράκων της Ευρώπης (Ισπανία, Πορτογαλία, Γαλλία, Ολλανδία, Σουηδία, Νορβηγία, Ιρλανδία, Ιταλία) έχουν κλείσει για περιόδους από μία εβδομάδα έως και ένα χρόνο, λόγω θετικής απόκρισης των πειραματόζωων σε βιοδοκιμές ή λόγω τοξικών κρουσμάτων σε

ανθρώπους (van Egmond et al., 1993). Το ίδιο έχει συμβεί και στην Ελλάδα, σύμφωνα με στοιχεία του Εθνικού Εργαστηρίου Αναφοράς Θαλασσίων Βιοτοξινών (Katikou, 2005).

Όπως προαναφέρθηκε, κανένα σύστημα αποτοξίνωσης δεν αποδίδει ικανοποιητικά. Συνεπώς ο καλύτερος τρόπος αντιμετώπισης του προβλήματος, προς το παρόν, είναι η λήψη προληπτικών μέτρων, τα οποία προϋποθέτουν τη θέσπιση ενός συστήματος εντατικής παρακολούθησης του θαλάσσιου περιβάλλοντος και των οστρακοειδών.

Στη χώρα μας, σύμφωνα με την τότε ισχύουσα Εθνική Νομοθεσία (Π.Δ. 412/94), υπό τις κατευθυντήριες γραμμές της Ευρωπαϊκής Κοινότητας (Οδηγία 91/492/ΕΟΚ, Οδηγία 97/61/ΕΚ, Απόφαση 2002/225/ΕΚ και Απόφαση 2002/226/ΕΚ) και σήμερα σύμφωνα με τον Κανονισμό 853/2004 έχει καταρτιστεί το Εθνικό Πρόγραμμα Επιτήρησης Ζωνών ή Περιοχών Παραγωγής Διθύρων Μαλακίων για παρουσία θαλασσίων βιοτοξινών. Το πρόγραμμα συνίσταται (α) στην εξέταση πιθανής παρουσίας τοξικού φυτοπλαγκτού στο θαλασσινό νερό και (β) στην εξέταση των οστρακοειδών για πιθανή παρουσία βιοτοξινών. Συντονιστής του προγράμματος είναι η Γενική Διεύθυνση Κτηνιατρικής του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων και συγκεκριμένα η Διεύθυνση Κτηνιατρικής Δημόσιας Υγείας (Δ/νση Κ.Δ.Υ.), ενώ οι δειγματοληψίες εκτελούνται από τις Διευθύνσεις Κτηνιατρικής των κατά τόπους Νομαρχιακών Αυτοδιοικήσεων. Η εκτέλεση των προαναφερθεισών εξετάσεων γίνεται αντίστοιχα (α) από την Ερευνητική Ομάδα Επιβλαβών Ανθήσεων Φυκών του Εργαστηρίου Βοτανικής του Τμήματος Βιολογίας του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης και (β) από το Εθνικό Εργαστήριο Αναφοράς Θαλασσίων Βιοτοξινών του Ινστιτούτου Υγιεινής Τροφίμων Θεσσαλονίκης του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων. Η ανίχνευση βιοτοξινών σε επίπεδα ανώτερα των κανονιστικά θεσπισμένων οδηγεί στη λήψη υγειονομικών μέτρων, δηλαδή στην απαγόρευση της εξαλίευσης των οστρακοειδών έως ότου παρέλθει το φαινόμενο. Επίσης, σε περίπτωση ανίχνευσης δυνητικά τοξικών κυττάρων (π.χ. δινομαστιγωτών) στο θαλασσινό νερό πάνω από συγκεκριμένα κρίσιμα επίπεδα ανάλογα με το εμπλεκόμενο είδος φυτοπλαγκτού, απαγορεύεται για προληπτικούς λόγους η εμπορία οστρακοειδών.

Η χώρα μας, στα πλαίσια εφαρμογής των προαναφερθεισών διατάξεων, υποχρεούται να εξετάζει τα οστρακοειδή, πριν την κατανάλωσή τους, για τρεις κατηγορίες

τοξινών που προέρχονται από τοξικά είδη μικροφυκών: τις διαρροϊκές (DSP), τις παραλυτικές (PSP) και τις αμνησιακές (ASP) τοξίνες. Σύμφωνα με τον Κανονισμό 2074/2005/EK της Ευρωπαϊκής Κοινότητας, μέθοδος αναφοράς για την ανίχνευση των διαρροϊκών τοξινών είναι η βιοδοκιμή σε μυς ή επίμυς. Εναλλακτικά, ή συμπληρωματικά μπορεί να εφαρμοστούν και άλλες αναλυτικές μέθοδοι, όπως HPLC με φθορισμομετρικό ανιχνευτή (HPLC-FLD) και LC-MS, ανοσολογικές μέθοδοι και λειτουργικές δοκιμές, όπως η δοκιμή αναστολής της φωσφατάσης. Θα πρέπει ωστόσο οι εναλλακτικές αυτές μέθοδοι να πληρούν τις εξής προϋποθέσεις:

- 1) Μεμονωμένα καθεμία ή σε συνδυασμό μεταξύ τους να μπορούν να ανιχνεύσουν τουλάχιστον τα εξής ανάλογα: OA, DTXs (DTX-1, DTX-2, DTX-3), PTXs (PTX-1, PTX-2) και YTXs (YTX, 45-OH-YTX, homo-YTX, 45-homo-YTX).
- 2) Να μην είναι λιγότερο αποτελεσματικές από τις βιολογικές μεθόδους.
- 3) Να παρέχουν ισοδύναμο (προς τις βιολογικές μεθόδους) επίπεδο προστασίας της δημόσιας υγείας.
- 4) Εάν υπάρχουν διαφωνίες στα αποτελέσματα των βιολογικών με τις υπόλοιπες μεθόδους, να λαμβάνονται οι βιολογικές ως μέθοδοι αναφοράς.

Με βάση τις πρόσφατες μελέτες, έχουν καθοριστεί ανώτατα όρια και μέθοδοι ανάλυσης για τις λιπόφιλες τοξίνες που περιέχονται σε δίθυρα μαλάκια, εχινόδερμα, χιτωνόζωα και θαλάσσια γαστερόποδα (Κανονισμός 853/2004/EK). Τα όρια αυτά παρατίθενται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7. Ανώτατα επιτρεπτά όρια διαρροϊκών τοξινών (Κανονισμός 853/2004/ΕΚ).

ΤΟΞΙΝΗ	ΟΡΙΟ
Οκαδαϊκό οξύ	160 µg OA eq / kg ολικού ιστού
Δινοφυσιστοξίνες	160 µg OA eq / kg ολικού ιστού
Πηκτινοτοξίνες	160 µg OA eq / kg ολικού ιστού
Γεσοτοξίνες	1000 µg YTX eq / kg ολικού ιστού
Αζασπειροξέα	160 µg AZA eq / kg ολικού ιστού

Η εφαρμογή ενός προγράμματος παρακολούθησης της ασφάλειας των νερών και των οστρακοειδών γίνεται πολύπλοκη και πολλές φορές μη αποτελεσματική εξαιτίας ορισμένων παραγόντων (Aune & Yndestad, 1993), μεταξύ των οποίων είναι οι εξής:

- 1) Η αφθονία των κυττάρων που ευθύνονται για την παραγωγή των τοξινών μπορεί να παρουσιάζει έντονες διακυμάνσεις.
- 2) Η διάρκεια και περιοδικότητα της τοξικότητας ποικίλει αναλόγως με την περιοχή.
- 3) Δεν παρατηρείται πάντα συσχέτιση τοξινών και τοξικών κυττάρων. Έχουν καταγραφεί επεισόδια DSP τοξικότητας σε νερά ελεύθερα τοξικών κυττάρων.
- 4) Ταυτόχρονη εμφάνιση DSP και PSP τοξινών περιπλέκει την παρακολούθηση.
- 5) Η τοξικότητα στα μύδια μπορεί να διαφέρει αναλόγως με το βάθος, ακόμα και στην ίδια περιοχή δειγματοληψίας.
- 6) Άλλα θαλασσινά (π.χ. στρείδια) μπορεί επίσης να επιβαρυνθούν, έστω και σε μικρότερο βαθμό.

2.11 Μέθοδοι ανίχνευσης/προσδιορισμού οκαδαϊκού οξέος

Οι μέθοδοι ανίχνευσης των DSP τοξινών διακρίνονται σε *in vivo* δοκιμές, που περιλαμβάνουν τις βιοδοκιμές, σε *in vitro* δοκιμές, που περιλαμβάνουν λειτουργικές δοκιμές και δοκιμασίες δομής (π.χ. δοκιμή αναστολής φωσφατάσης), και τις χημικές αναλυτικές μεθόδους (π.χ. HPLC, LC-MS). Στις βιοδοκιμές, το μετρούμενο σήμα μπορεί

να είναι μια συγκεκριμένη απόκριση στη δομή μιας τοξίνης ή ενοποιημένες αποκρίσεις σε διαφορετικές δομές μιας ομάδας τοξινών. Στις *in vitro* δοκιμές και στις χημικές αναλυτικές μεθόδους μετρούνται τα σήματα που αντιστοιχούν σε δομές μεμονωμένων τοξινών.

2.11.1 Δοκιμές *in vivo*

Οι βιολογικές δοκιμές θηλαστικών (*mammalian bioassays*) στηρίζονται στη βιολογική απόκριση των πειραματόζωων στις DSP τοξίνες και παρέχουν ένα μέτρο της συνολικής τοξικότητας ενός δείγματος. Υπάρχουν διάφορες βιοδοκιμές, ανάλογα με το είδος των πειραματόζωων που χρησιμοποιούνται (μύες, επίμυες) και την οδό χορήγησης του ενέσιμου εκχυλίσματος (ενδοπεριτοναϊκώς ή δια του στομάχου). Στη συνέχεια γίνεται μία σύντομη περιγραφή της κάθε κατηγορίας και αναφέρονται συνοπτικά τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά τους.

2.11.1.1 Βιοδοκιμές Μυών

Οι πιο διαδεδομένες μέθοδοι ελέγχου των DSP τοξινών είναι οι βιολογικές δοκιμές σε ποντίκια. Αυτές περιλαμβάνουν ενδοπεριτοναϊκή ένεση ενός εκχυλίσματος οστρακοειδών σε εργαστηριακά ποντίκια ορισμένης ηλικίας, φύλου και βάρους. Μετά την ένεση παρατηρείται η συμπεριφορά των πειραματόζωων, ώστε να ταυτοποιηθούν τα τυπικά συμπτώματα που μπορεί να προέρχονται από τις φυκοτοξίνες, τα οποία εξαρτώνται άμεσα από τη δόση χορήγησης και εμφανίζονται σε συγκεκριμένο χρόνο.

Έχουν αναπτυχθεί διάφορα πρωτόκολλα βιοδοκιμών σε ποντίκια, τα οποία διαφέρουν ως προς το είδος του προς ανάλυση ιστού (ολικός ιστός – ΟΙ ή ηπατοπάγκρεας – ΗΠ) και ως προς τους διαλύτες που χρησιμοποιούνται στα στάδια εκχύλισης και καθαρισμού. Η επιλογή των διαλυτών καθορίζει την ευαισθησία και την εξειδίκευση του εκάστοτε πρωτοκόλλου και θα πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψη προκειμένου το

επιλεγόμενο πρωτόκολλο να καλύπτει όλο το φάσμα των διαρροϊκών τοξινών (Κανονισμός 2074/2005).

Η συνηθέστερη πορεία για την ανίχνευση των DSP τοξινών είναι αυτή που ανέπτυξαν οι Yasumoto et al. (1978), η οποία περιλαμβάνει εκχύλιση με ακετόνη. Ο διαλύτης αυτός έχει την ικανότητα να παραλαμβάνει όλες τις λιπόφιλες τοξίνες, ακόμα και αυτές με μη διαρροϊκή δράση. Επομένως, με τη χρήση ακετόνης εκτιμάται η συνολική DSP τοξικότητα ενός δείγματος και η δημόσια υγεία διασφαλίζεται στο μέγιστο βαθμό. Ωστόσο, δεν μπορεί να γίνει διάκριση των διαφορετικών ειδών των DSP τοξινών που περιέχονται στο δείγμα, ενώ υπάρχει επίσης η πιθανότητα να παραληφθούν και άλλες λιπόφιλες ουσίες που ενδέχεται να αλλοιώσουν το αποτέλεσμα. Το εμπόδιο αυτό αίρεται με την εφαρμογή εναλλακτικών πρωτοκόλλων, στα οποία έχουν προστεθεί ένα ή περισσότερα στάδια κατανομής υγρού – υγρού με διάφορους οργανικούς διαλύτες, ανάλογα με το είδος των DSP τοξινών που πρόκειται να ανιχνευτούν. Για παράδειγμα, με χρήση διχλωρομεθανίου / υδατικής μεθανόλης 60%, στην υδατομεθανολική φάση παραλαμβάνονται οι γεσοτοξίνες, ενώ με οξικό αιθυλεστέρα παραλαμβάνονται εκλεκτικά τα αζασπειροξέα. Έχει βρεθεί ότι οι απώλειες του ΟΑ κατά την εκχύλιση με ακετόνη κυμαίνονται 10.2-17.0%, ενώ κατά την εκχύλιση με ακετόνη / διαιθυλαιθέρα το εύρος απωλειών είναι 9.8-18.5% (Crocì et al., 1995). Στον Πίνακα 8 παρατίθενται στοιχεία από διαφορετικά εναλλακτικά πρωτόκολλα, καθώς και οι ανιχνεύσιμες σε κάθε περίπτωση τοξίνες.

Πίνακας 8. Πρωτόκολλα βιολογικών μεθόδων ανίχνευσης DSP τοξινών.

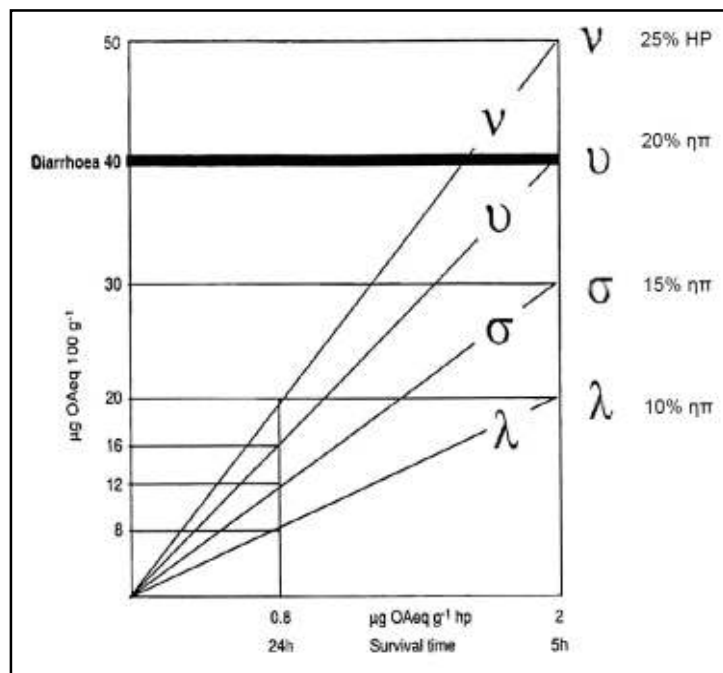
Πρωτόκολλο	Διαλύτες Εκχύλισης	Διαλύτες Καθαρισμού	Κριτήριο Θετικότητας	Ανιχνεύσιμες Τοξίνες
Yasumoto et al., 1978	Ακετόνη	-	Θάνατος 2 εκ 3 ποντικών σε <24h, ε/π ένεση 5g ηπατοπαγκρέατος / ποντίκι (ισοδύναμα με 25g ολικού ιστού/ ποντίκι.	OA, DTXs, PTXs, YTX, AZA
Yasumoto et al., 1984	Ακετόνη, μεθανόλη	Διαιθυλαιθέρας / νερό	Θάνατος 2 εκ 3 ποντικών σε <24h, ε/π ένεση 25g ολικού ιστού / ποντίκι.	OA, DTXs, PTXs, YTXs, AZAs
*	Ακετόνη, μεθανόλη	Διγλωρομεθάνιο (DCM) / υδατική μεθανόλη 60% (WM)	Θάνατος 2 εκ 3 ποντικών σε <24h, ε/π ένεση 25g ολικού ιστού / ποντίκι.	OA, DTXs, PTXs, AZA
			Θάνατος 2 εκ 3 ποντικών σε <5h, ε/π ένεση 2g ολικού ιστού / ποντίκι.	YTXs (WM φάση)
**	Ακετόνη, μεθανόλη	Οξικός αιθυλεστέρας	Θάνατος 2 εκ 3 ποντικών σε <24h, ε/π ένεση 25g ολικού ιστού / ποντίκι.	AZAs
* Αναπτύχθηκε από τον Καθηγητή Yasumoto (Νοέμβριος 2001) και προτείνεται από το Κοινοτικό Εργαστήριο Αναφοράς Θαλασσίων Βιοτοξινών του Vigo (Ισπανία) ως μέθοδος ανίχνευσης των YTXs.				
** Βασίζεται σε εργασία των Yasumoto & Satake και προτείνεται από το Κοινοτικό Εργαστήριο Αναφοράς Θαλασσίων Βιοτοξινών του Vigo (Ισπανία) ως μέθοδος ανίχνευσης των AZAs.				

2.11.1.2 Εκτίμηση τοξικότητας

Για την ποσοτική εκτίμηση της τοξικότητας χρησιμοποιείται συνήθως ο χρόνος επιβίωσης, καθώς ο υπολογισμός της τοξικότητας με χρήση των μεθόδων LD₅₀ (θανατηφόρος δόση για το 50% των εξεταζόμενων πειραματόζων) είναι επίπονος και χρονοβόρος. Θετικό θεωρείται το αποτέλεσμα όταν επέλθει θάνατος δύο εκ των τριών ποντικών σε διάστημα μικρότερο των 5 ή των 24h μετά την ένεση. Ωστόσο, δεν υπάρχει ομοφωνία διεθνώς σχετικά με το χρόνο παρατήρησης των πειραματόζων. Βρέθηκε ότι η μείωση του χρόνου παρατήρησης από 24 σε 5 ώρες αυξάνει κατά 35-76% τα αρνητικά

αποτελέσματα σε δείγματα που περιέχουν 2-3 mg OA/kg ΗΠ (Vieites et al., 1996). Οι Vale & Sampayo (1996) παρατήρησαν ότι, παρόλο που θάνατοι μεταξύ 5 και 24 ωρών αντιστοιχούν συνήθως σε συγκεντρώσεις OA+DTX-2 της τάξης των 2 mg OA eq/kg ΗΠ, σε ορισμένα δείγματα σημαντικές ποσότητες DSP τοξινών (>2 mg OA eq/kg ΗΠ) έδωσαν χρόνους επιβίωσης μεγαλύτερους από 5 ώρες. Το γεγονός αυτό οφείλεται πιθανά στη διαφορά αφενός της τοξικότητας μεταξύ των DSP τοξινών και αφετέρου της κατανομής τους στο δείγμα. Έχει βρεθεί ότι η παρουσία τοξινών πέραν των OA, DTX-1 και DTX-2 στο δείγμα προκαλεί καθυστέρηση στην εμφάνιση των συμπτωμάτων (>5 ώρες). Στην περίπτωση της DTX-3 απαιτείται παρατήρηση 24 ωρών (Terao et al., 1993).

Παρόλο που σκοπός των βιοδοκιμών είναι η εκτίμηση της τοξικότητας στο βρώσιμο τμήμα των οστρακοειδών, η εξέταση γίνεται συνήθως στο ηπατοπάγκρεας, καθώς οι περισσότερες DSP τοξίνες, ως λιπόφιλες, συσσωρεύονται σ' αυτό το τμήμα του ολικού ιστού. Ωστόσο, κάποια ποσότητα κατακρατείται και σε άλλους ιστούς (π.χ. βράγχια, μανδύας, γονάδες κ.λπ.). Το ποσοστό που καταλαμβάνει το ηπατοπάγκρεας στη συνολική σάρκα ενός συγκεκριμένου είδους οστράκου παρουσιάζει σημαντικές διακυμάνσεις ανάλογα με την εποχή και την περιοχή αλίευσης, κυμαινόμενο συνήθως μεταξύ 7 και 25% του συνολικού ιστού. Στο Σχήμα 4 απεικονίζονται τα αποτελέσματα της DSP τοξικότητας σε σχέση με το βάρος του συνολικού ιστού, με κριτήριο τοξικότητας τους διάφορους χρόνους επιβίωσης (Miguez et al., 1998). Τα δεδομένα αυτά στηρίζονται στην υπόθεση ότι όταν στα ποντίκια γίνει ένεση εκχυλίσματος ισοδύναμου με 5g ΗΠ, ο χρόνος επιβίωσης των 24 ωρών αντιστοιχεί σε 0.8 mg OA eq/kg ΗΠ και ο χρόνος επιβίωσης των 5 ωρών αντιστοιχεί σε 2 mg OA eq/kg ΗΠ. Τα αποτελέσματα διαφοροποιούνται ανάλογα με το ποσοστό που καταλαμβάνει το ηπατοπάγκρεας επί του συνόλου του ολικού ιστού.



Σχήμα 4. DSP τοξικότητα ($\mu\text{g OA eq}/100\text{g}$ ολικού ιστού) σε σχέση με το χρόνο επιβίωσης των ποντικών μετά από ε/π ένεση ιστών που περιέχουν διαφορετικά ποσοστά ηπατοπαγκρέατος. (10, 15, 20 και 25%). Συμπτώματα διάρροιας στον άνθρωπο αρχίζουν να εκδηλώνονται μετά την κατανάλωση περίπου $40 \mu\text{g OA eq}/100\text{g}$ ολικού ιστού (Miguez et al., 1998).

2.11.1.3 Βιοδοκιμή Νεαρών Μυών

Μια εναλλακτική βιολογική μέθοδος που έχει προταθεί είναι η βιοδοκιμή σε νεαρά ποντίκια, ηλικίας 4-5 ημερών (*suckling mouse bioassay*). Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, εκχύλισμα οστρακοειδών χορηγούνται ενδογαστρικώς στα ζώα. Μετά από 4 ώρες καθορίζεται ο βαθμός συσσώρευσης υγρών στον γαστρεντερικό σωλήνα, μετρώντας το λόγο της μάζας των εντέρων προς τη μάζα του υπόλοιπου σώματος. Λόγοι μεγαλύτεροι από 0,8-0,9 είναι ενδεικτικοί θετικής αντίδρασης (Hamano et al., 1985). Η συγκεκριμένη μέθοδος είναι βραδύτερη από τη βιοδοκιμή σε ποντίκια και η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων είναι πιο δύσκολη.

2.11.1.4 Βιοδοκιμή Επίμυων

Η βιοδοκιμή σε επίμυς (αρουραίους) περιλαμβάνει σίτιση λευκών θηλυκών, οι οποίοι βρίσκονται σε κατάσταση νηστείας για 24 ώρες, με ηπατοπάγκρεας οστρακοειδών και παρατήρηση των περιττωμάτων τους την επόμενη ημέρα για 16 ώρες. Σε κάθε δοκιμασία χρησιμοποιούνται 3 ζώα και το αποτέλεσμα αξιολογείται ως θετικό εάν εμφανιστεί διαρροϊκή αντίδραση σε ένα από τα τρία πειραματόζωα. Επίσης, αξιολογείται η σύσταση των περιττωμάτων και η άρνηση σίτισης (Kat, 1983).

Η μέθοδος αυτή αποτελεί μοντέλο οξείας τοξικότητας, βιολογικώς πιο «ρεαλιστικό», εφόσον τα συμπτώματα των επίμυων είναι παρόμοια με αυτά που εμφανίζονται στον άνθρωπο από την πέψη των διαρροϊκών τοξινών. Επιπρόσθετα, η απουσία οποιασδήποτε επεξεργασίας ή εκχύλισης του δείγματος αποτρέπει την απώλεια τοξινών. Ωστόσο, η συγκεκριμένη μέθοδος είναι διαγνωστική μόνο για συγκεκριμένες τοξίνες της ομάδας των DSP τοξινών (OA, DTX-1 και DTX-2) και όχι για το σύνολό της. Επίσης, άλλοι διαρρογόνοι παράγοντες, όπως τα εντερικά παθογόνα βακτήρια, είναι δυνατό να συνεισφέρουν στην εμφάνιση συμπτωμάτων διάρροιας.

2.11.2 Δοκιμές *in vitro*

Οι *in vitro* δοκιμές εφαρμόζονται ως μέθοδοι προκαταρκτικής εξέτασης (*screening tests*) και αποσκοπούν στην ανίχνευση του OA και των αναλόγων του στο επίπεδο συγκέντρωσης που ενδιαφέρει. Περιλαμβάνουν ανοσολογικές και ενζυμικές δοκιμές, καθώς και δοκιμές υποδοχέων πρωτεϊνών και κυτταροτοξικότητας. Ταξινομούνται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: στις δοκιμές λειτουργικών ομάδων (*functional assays*) και στις δοκιμασίες δομής (*structural assays*). Η πρώτη κατηγορία στηρίζεται στη βιοχημική δράση των τοξινών (π.χ. δέσμευση στα κανάλια ιόντων του υποδοχέα), οπότε η ποσοτικοποίηση συσχετίζεται ισχυρά με την τοξικότητα της αναλυόμενης ουσίας. Αντιθέτως, οι δοκιμές δομής εξαρτώνται από την αλληλεπίδραση του αναλύτη με έναν παράγοντα αναγνώρισης μορίου, όπως π.χ. της θέσης δέσμευσης των αντισωμάτων στις ανοσολογικές δοκιμές.

2.11.2.1 Δοκιμή Αναστολής Φωσφατάσης

Η δοκιμή αναστολής της φωσφατάσης (*phosphatase inhibition assay*) ανιχνεύει την αποκλειστική ιδιότητα του OA και της DTX-1 να αναστέλουν τη δράση της φωσφατάσης των πρωτεϊνών Τύπου 1 (PP1) και Τύπου 2A (PP2A) (Holmes, 1991). Αρχικά η μέθοδος που αναπτύχθηκε περιελάμβανε χρήση ραδιοεπισημασμένης ^{32}P φωσφορυλάσης και συνδυασμό αυτής με υγρή χρωματογραφία. Μάλιστα, όταν η δοκιμή εφαρμόστηκε σε φυσικώς επιβαρυνμένα μύδια και εκχυλίσματα κυττάρων *Prorocentrum lima*, έδειξε αναστολή της δραστηριότητας των PP1 και PP2A μεγαλύτερη από αυτή που αντιστοιχούσε στο συνολικό επίπεδο των OA και DTX-1, γεγονός που υποδείκνυε την παρουσία «κορυφών» δυνητικώς διαρροϊκών τοξινών (Luu et al., 1993).

Παρόλο που η ευαισθησία της μεθόδου αυτής και γενικότερα των λειτουργικών *in vitro* δοκιμών είναι εξαιρετικά υψηλή, η εφαρμογή τους περιορίζεται εξαιτίας του ειδικού εξοπλισμού που απαιτεί. Εξάλλου, η ανάπτυξη τέτοιων μεθόδων απαιτεί λεπτομερή γνώση της κινητικής των αντιδράσεων και των ενζύμων που σχετίζονται με τη βιοσύνθεση και το μεταβολισμό των τοξινών, και στο πεδίο αυτό υπάρχουν σημαντικές ελλείψεις.

2.11.2.2 Δοκιμή Κυτταροτοξικότητας

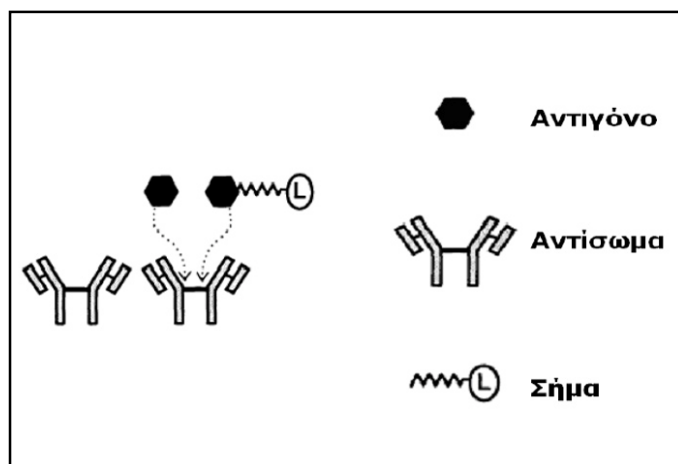
Η δοκιμή κυτταροτοξικότητας (*cytotoxicity bioassay*) στηρίζεται στην ιδιότητα των DSP τοξινών να αναστέλουν την ανάπτυξη και δράση των φωσφατασών. Η τοξική αυτή ιδιότητα εξαρτάται από τη συγκέντρωση των τοξινών και προκαλεί βλάβη στη μορφολογία των κυττάρων, η οποία παρατηρείται μικροσκοπικά. Όταν, για παράδειγμα, ηπατοκύτταρα επίμυων εκτεθούν σε εκχύλισμα DSP τοξινών αλλοιώνεται η επιφάνεια των κυττάρων και παρατηρείται διόγκωση (Aune et al., 1991). Μια ποσοτική δοκιμή κυτταροτοξικότητας που αναπτύχθηκε, στην οποία χρησιμοποιούνται ανθρώπινα κύτταρα προερχόμενα από επιδερμικό καρκίνωμα, αποδείχτηκε ικανοποιητική στην ανίχνευση OA σε μύδια με όριο ευαισθησίας 50 ng OA / g ΗΠ (Tubaro et al., 1996).

2.11.2.3 Ανοσολογικές Δοκιμές

Υπάρχουν διάφοροι τύποι ανοσοδιαγνωστικών δοκιμών για την ανίχνευση των DSP τοξινών. Στις δοκιμές αυτές χρησιμοποιούνται αντισώματα που έχουν αναπτυχθεί αρχικά για μεμονωμένες τοξίνες, τα οποία όμως παρουσιάζουν ως ένα βαθμό διασταυρούμενες αντιδράσεις με τοξίνες παρόμοιας δομής. Οι ανοσολογικές δοκιμές είναι συνεπώς κατάλληλες για τη γνωμάτευση αρνητικών δειγμάτων, αδυνατούν όμως να δώσουν ακριβείς ποσοτικές αναλύσεις, ιδιαιτέρως σε δείγματα που περιέχουν πολλές τοξίνες. Για την επιβεβαίωση της θετικότητας έχουν αναπτυχθεί συμπληρωματικές χημικές μέθοδοι:

Η ανοσοδοκιμή ραδιοεπισημάνσης (*Radio Label Immunoassay, RIA*), στην οποία η διαδικασία ραδιοεπισημάνσης του ^3H για την ανίχνευση του OA είναι αρκετά ευαίσθητη (Όριο Ανίχνευσης: 0,2 pmol OA) και δε δίνει διασταυρούμενες αντιδράσεις με άλλες βιοτοξίνες. Πρόκειται όμως για μια μέθοδο χρονοβόρα και πολύπλοκη που δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε επίπεδο ρουτίνας (Levine et al., 1988).

Η ανταγωνιστική ανοσοδοκιμή δέσμευσης ενζύμου (*Competitive Enzyme-Linked Immunoassay, ELISA*), η οποία βασίζεται στην ανταγωνιστική δράση του OA (αντιγόνο) με ένα μακρομοριακό σύμπλοκο με σεσημασμένο το OA (anti-OA anti-idiotypic 1/59 mAb), για τη δέσμευση στους ίδιους υποδοχείς ενός μονοκλωνικού αντισώματος του OA (mouse anti-OA 6/50 monoclonal antibody, mAb) (Σχήμα 5). Το δεσμευμένο αντίσωμα, στη συνέχεια, ποσοτικοποιείται με ένα ενζυμικά συζευγμένο δευτερογενές αντίσωμα με την προσθήκη του κατάλληλου χρωμογόνου παράγοντα (Uda et al., 1989; Chin et al., 1995). Η αντίδραση αυτή επιτρέπει τον ημιποσοτικό προσδιορισμό του OA και της DTX-1, δίνοντας μια συνολική εκτίμηση και για τις δύο τοξίνες χωρίς να τις διακρίνει.



Σχήμα 5. Σχηματική παράσταση της ανοσολογικής αντίδρασης του ΟΑ.

2.11.3 Χημικές αναλυτικές μέθοδοι

Οι χημικές μέθοδοι ανάλυσης δίνουν τη δυνατότητα ακριβούς και πλήρως αυτοματοποιημένης ποσοτικοποίησης των γνωστών τοξινών, καθώς και την επιβεβαίωση της ταυτότητάς τους. Ένα από τα βασικότερα στάδια των χημικών αναλύσεων είναι η εκχύλιση και ο καθαρισμός των τοξινών. Όλες οι λιπόφιλες τοξίνες, συμπεριλαμβανομένου και του ΟΑ, μπορούν να εκχυλιστούν από τους ιστούς των οστρακοειδών με διάφορους οργανικούς διαλύτες, όπως π.χ. ακετόνη, μεθανόλη ή ακετονιτρίλιο. Η ακετόνη χρησιμοποιείται ευρέως, κυρίως στις βιοδοκιμές, λόγω της ευκολίας με την οποία εξατμίζεται. Ωστόσο, τα ακετονικά εκχυλίσματα είναι πολύπλοκα, εξαιτίας της παρουσίας διαφόρων μη πολικών λιπιδίων, ενώ απαιτούνται μεγάλοι όγκοι διαλύτη και σημαντικός χρόνος εξάτμισης.

Στην αρχική ανάλυση, προτιμάται η εκχύλιση με υδατική μεθανόλη 80%, η οποία μειώνει αισθητά την ποσότητα των εκχυλιζόμενων λιπιδίων δίνοντας καλές ανακτήσεις. Στη συνέχεια, μπορεί να εφαρμοστεί απομάκρυνση των λιπιδίων με κατανομή σε ακετόνη, εκτός και αν δεν είναι επιθυμητή η απώλεια των τοξινών χαμηλής πολικότητας (π.χ. DTX-3) (Fernández et al., 1996). Μετά την προσθήκη νερού, οι τοξίνες κατανέμονται σε χλωροφόρμιο ή διχλωρομεθάνιο, το οποίο στη συνέχεια εξατμίζεται, μέχρι να προκύψει ένα ελαιώδες υπόλειμμα. Ο οξικός αιθυλεστέρας είναι ένας εναλλακτικός μη χλωριωμένος

διαλύτης (González et al., 2000), ο οποίος όμως απαιτεί ένα επιπλέον στάδιο ξήρανσης με άνυδρο θειικό νάτριο για την απομάκρυνση της υγρασίας πριν την εξάτμιση.

Προϋποθέσεις Εφαρμογής

Για την επιτυχή εφαρμογή των χημικών μεθόδων, τόσο σε προγράμματα παρακολούθησης, όσο και σε ερευνητικές μελέτες, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τέσσερα κρίσιμα σημεία:

- 1) Θα πρέπει να έχουν χαρακτηριστεί επαρκώς οι δομές όλων των μελών μιας ομάδας τοξινών. Παρόλο που είναι πλέον διαθέσιμες αρκετές πληροφορίες σχετικά με τις δομές των τοξινών που επιβαρύνουν τα οστρακοειδή, κάθε χρόνο η κατάσταση γίνεται πιο πολύπλοκη με την ανακάλυψη νέων αναλόγων ή νέων ομάδων τοξινών. Επιπλέον, τοξίνες που παράγονται από ένα συγκεκριμένο είδος μικροφύκους μπορεί στη σάρκα να μετασχηματιστούν σε τοξικούς ή μη μεταβολίτες, δυσχεραίνοντας ακόμα περισσότερο την ανάπτυξη των χημικών μεθόδων.
- 2) Απαιτείται η διάθεση πιστοποιημένων πρότυπων διαλυμάτων για κάθε μία από τις τοξίνες.
- 3) Θα πρέπει να προσδιοριστεί η τοξικότητα της κάθε τοξίνης, ώστε να μπορεί να υπολογιστεί η συνολική τοξικότητα των δειγμάτων. Επίσης, θα πρέπει να διεξαχθούν μελέτες εκτίμησης της επικινδυνότητας, ώστε να θεσπιστούν σε αυτή τη βάση τα επιτρεπτά όρια των τοξινών στα οστρακοειδή.
- 4) Απαραίτητη είναι τέλος η ανάπτυξη και επικύρωση αξιόπιστων μεθόδων για τα διάφορα είδη οστρακοειδών. Θα πρέπει να παρέχουν επαρκή όρια ανίχνευσης, της τάξης των ng/g τουλάχιστον, και ακριβή ποσοτικοποίηση όλων των αναλόγων.

2.11.3.1 Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας

Η Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας (*Thin Layer Chromatography, TLC*) χρησιμοποιείται ευρέως στην ανάλυση τροφίμων. Ως εργαλείο προκαταρκτικής εξέτασης των DSP τοξινών παρουσιάζει ορισμένα πλεονεκτήματα, όπως: (α) απλή μεθοδολογία χωρίς την ανάγκη ακριβούς εξοπλισμού, (β) σχετικά μικρό χρόνο ανάλυσης, (γ)

ταυτόχρονη ανάλυση πολλών δειγμάτων και (δ) διαθεσιμότητα πολλών χρωματομετρικών αντιδραστηρίων ψεκασμού για την επιβεβαίωση της ταυτότητας των τοξινών μέσω εκλεκτικών χημικών αντιδράσεων. Ωστόσο, ο αριθμός των δημοσιευμένων εφαρμογών της τεχνικής αυτής για τον προσδιορισμό των DSP τοξινών είναι περιορισμένος (Quilliam & Wright, 1995).

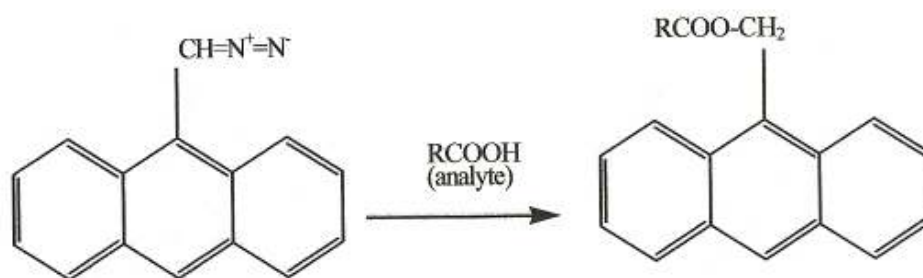
2.11.3.2 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης

Η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Αποδοσης (*High Performance Liquid Chromatography, HPLC*) χρησιμοποιείται μεταξύ άλλων και για τον προσδιορισμό σχετικά πολικών και μη πτητικών ουσιών, μεταξύ των οποίων και η ομάδα του ΟΑ. Ωστόσο, η έλλειψη χρωμοφόρου ομάδας στη δομή των τοξινών αυτών δυσχεραίνει την φθορισμομετρική ή φασματοφωτομετρική ανίχνευσή τους. Αυτό καθιστά απαραίτητη την παραγωγοποίηση των αναλυτών με κατάλληλους χρωμοφόρους παράγοντες, πριν τη διέλευσή τους από τη στήλη χρωματογραφικού διαχωρισμού.

Η φθορίζουσα επισήμανση του ΟΑ και των αναλόγων του απαιτεί την ύπαρξη μιας δραστικής λειτουργικής ομάδας στο μόριό τους και ένα εκλεκτικό αντιδραστήριο που να αντιδρά ποσοτικά κάτω από σχετικά ήπιες συνθήκες και σε μικρό χρονικό διάστημα. Πράγματι, οι τοξίνες της ομάδας του ΟΑ διαθέτουν ελεύθερη καρβοξυλομάδα στο μόριό τους, επιτρέποντας την επισήμανση με διάφορα αντιδραστήρια. Οι διολεστέρες και τα ανάλογα DTX-4 και DTX-5, λόγω της συζευγμένης καρβοξυλομάδας που περιέχουν, θα πρέπει να υδρολυθούν πριν την αντίδραση με το αντιδραστήριο παραγωγοποίησης, ώστε να ελευθερωθούν οι μητρικές ενώσεις.

Ένα από τα πιο διαδεδομένα αντιδραστήρια εστεροποίησης είναι το 9-ανθρυλοδιαζωμεθάνιο (*9-anthryldiazomethane, ADAM*). Έχουν μελετηθεί όμως και άλλα αντιδραστήρια εστεροποίησης (Σχήμα 6), όπως το 1-βρωμοακετυλπυρένιο (*1-bromoacetylpyrene, BAP*), το οποίο είναι πιο σταθερό από το ADAM (Kelly et al., 1996), το N-(9-acridinyl)-bromoacetamide (Allenmark et al., 1990), το 1-pyrenyldiazomethane (PDAM) (Morton & Bomber, 1994), το 2-(anthracene-2,3-dicarboximido)-ethyltrifluoromethanesulfonate (AE-OTf) (Akasaka et al., 1996), ορισμένες κουμαρίνες

(Marr et al., 1994; Shen et al., 1996) και η λουμαρίνη-3 (James et al., 1998). Οι Ramstad et al., (2001) έκαναν λεπτομερή αξιολόγηση της HPLC μεθόδου και συμπέραναν ότι το ADAM είναι το πλέον αξιόπιστο και εκλεκτικό.



Σχήμα 6. Σχηματική παράσταση της αντίδρασης του 9-ανθρυσλοδιαζωμεθανίου (ADAM) με καρβοξυλικά οξέα.

Ορισμένες από τις ιδιότητες του αντιδραστηρίου ADAM παρατίθενται στον Πίνακα 9. Εφόσον η εκχύλιση και η μετατροπή σε παράγωγο είναι ποσοτικές αντιδράσεις και το μόνο αναλυτικό σήμα προέρχεται από τη φθορίζουσα ομάδα, τότε οι μοριακές αποκρίσεις όλων των παραγώγων ενώσεων είναι ίδιες. Κατά συνέπεια, το OA μπορεί να χρησιμοποιηθεί για βαθμονόμηση στους προσδιορισμούς των DTX-1 και DTX-2. Θα πρέπει τέλος να χρησιμοποιείται ισοκρατική έκλυση, διότι αλλαγή στη σύσταση του διαλύτη, σε περίπτωση βαθμωτής έκλυσης, θα επηρέαζε τη μοριακή απόκριση.

Πίνακας 9. Χαρακτηριστικά του αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης (ADAM).

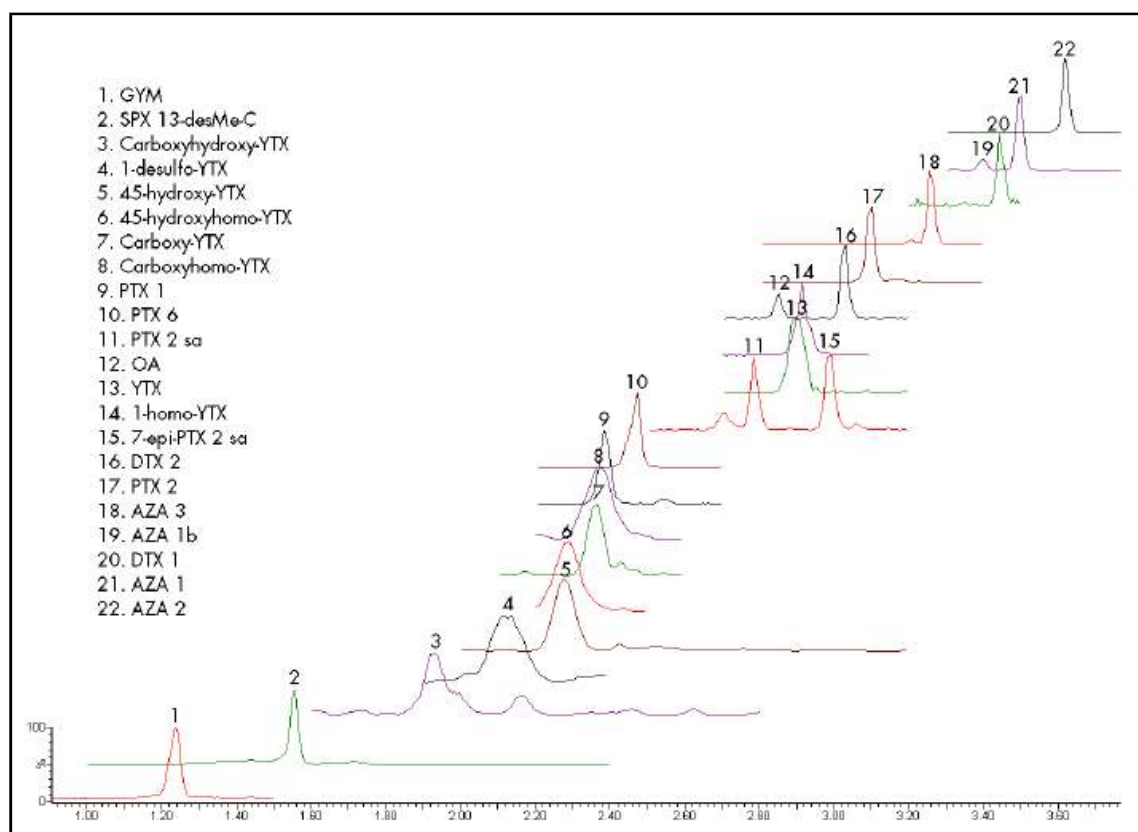
Μοριακός τύπος	C ₁₅ H ₁₀ N ₂
Μοριακό βάρος	218.6 [g/mol]
Εμφάνιση	Ερυθρή-πορτοκαλί εύθρυπτη σκόνη
λ_{max} (σε ακετόνη)	396 nm
Συντήρηση	-20°C

2.11.3.3 Υγρή Χρωματογραφία / Φασματοσκοπία Μαζών

Η τεχνική της Υγρής Χρωματογραφίας με ανιχνευτή Φασματοσκοπίας Μαζών (*Liquid Chromatography / Mass Spectrometry, LC/MS(MS)*) αποτελεί το ισχυρότερο εργαλείο για τον προσδιορισμό των λιπόφιλων τοξινών, ικανοποιώντας όλες τις ανάγκες που μπορεί να έχει ένα εργαστήριο ρουτίνας ή έρευνας:

- 1) Υψηλή ευαισθησία
- 2) Υψηλή ειδικότητα και εκλεκτικότητα
- 3) Μηδαμινή προεργασία δείγματος
- 4) Ικανότητα να ανταπεξέρχεται στη μεγάλη ποικιλία δομών και την ευμετάβλητη φύση των τοξινών
- 5) Διαχωρισμός τοξινών από σύνθετα τρόφιμα
- 6) Ακριβής και επαναλήψιμη ποσοτικοποίηση
- 7) Ευρεία περιοχή γραμμικότητας
- 8) Αυτοματισμός

Σημαντικό χαρακτηριστικό της τεχνικής αυτής είναι η δυνατότητα αντικατάστασης πολλών μεθόδων από μία και μόνο πειραματική διάταξη. Το πρόβλημα της έλλειψης πρότυπων ουσιών, που απαιτούνται για την ανάπτυξη χημικών μεθόδων, εξαλείφεται ως ένα βαθμό με την LC/MS. Εάν είναι γνωστή η δομή μιας ουσίας και περιέχεται στο υπό ανάλυση δείγμα ή εκχύλισμα, τότε η εφαρμογή μιας προσωρινής μεθόδου είναι θέμα ωρών. Η εκτίμηση της συγκέντρωσης της υπό ανάλυση ουσίας μπορεί να γίνει με χρήση καμπύλης βαθμονόμησης, η οποία έχει κατασκευαστεί από πρότυπα διαλύματα παρεμφερών ενώσεων, που με ασφάλεια μπορούμε να υποθέσουμε ότι έχουν ισοδύναμη μοριακή απόκριση (π.χ. βαθμονόμηση του ΟΑ επιτρέπει την ανάλυση των DTX-1 και DTX-2).



Σχήμα 7. LC-MS ανάλυση αντίστροφης φάσης με βαθμωτή έκλουση των DSP τοξινών που περιέχονται σε εκχύλισμα μυδιών (Fux et al., 2007).

Η υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματόμετρο μαζών ψεκασμού ιόντων είναι ιδιαίτερα κατάλληλη μέθοδος για τον προσδιορισμό τοξινών στα οστρακοειδή, με δυνατότητα ταυτοποίησης ακόμα και νέων τοξινών (Hu et al., 1992b; Marr et al., 1992; Pleasance et al., 1992). Παράδειγμα χρωματογραφήματος, που προκύπτει από LC-MS σε ανάλυση δείγματος μυδιού, φαίνεται στο Σχήμα 7. Από την άλλη πλευρά, ένα τέτοιο σύστημα απαιτεί σημαντικό αρχικό κεφάλαιο επένδυσης, ενώ απαιτεί αυξημένο κόστος συντήρησης και χειρισμό μόνο από εξειδικευμένο προσωπικό.

2.11.3.4 Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση

Η Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση (*Capillary Electrophoresis*) είναι μια σχετικά νέα τεχνική με σχετικά χαμηλό κόστος, η οποία παρέχει ταχύ και υψηλής ποιότητας διαχωρισμό και απαιτεί μικρή ποσότητα δείγματος. Υπάρχουν διάφορες αρχές

διαχωρισμού με βάση την Τριχοειδή Ηλεκτροφόρηση. Μία από αυτές είναι η Μικυλλιακή Ηλεκτροκινητική Ηλεκτροφόρηση (Micellar Electrokinetic Chromatography), η οποία συνδυάζει ηλεκτροφόρηση και χρωματογραφία. Η εφαρμογή της τεχνικής αυτής σε συνδυασμό με ανιχνευτή υπεριώδους (200nm) επέτρεψε την ανίχνευση του ΟΑ σε επίπεδο 10 ng/g ολικού ιστού (Bouaicha et al., 1997).

2.11.4 Συγκριτική αξιολόγηση μεθόδων

Το κυριότερο πλεονέκτημα των βιοδοκιμών σε πειραματόζωα, σε σχέση με τις *in vitro* ή τις χημικές αναλυτικές μεθόδους, είναι ότι η προσδιοριζόμενη τοξικότητα σχετίζεται άμεσα με τις τοξικές επιπτώσεις των DSP τοξινών στον άνθρωπο. Παρόλα αυτά, στην πράξη είναι δύσκολη η ακριβής εκτίμηση της τοξικότητας ενός δείγματος για τον άνθρωπο, όπου η χορήγηση γίνεται δια στόματος, με δεδομένο την τοξικότητα στα ποντίκια, όπου η οδός χορήγησης μπορεί να είναι διαφορετική.

Πίνακας 10. Συνοπτική αναφορά των πλεονεκτημάτων και μειονεκτημάτων διαφόρων μεθόδων ανίχνευσης του ΟΑ σε οστρακοειδή (+: χαμηλό, ++: μέτριο, +++: υψηλό).

ΤΕΧΝΙΚΗ	ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ	ΑΚΡΙΒΕΙΑ	ΟΡΙΟ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ (μg ΟΑ/g ΗΠ)	ΧΡΟΝΟΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ	ΚΟΣΤΟΣ	ΕΠΙΠΕΔΟ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΥ	ΠΡΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑ	ΑΝΑΦΟΡΑ
Βιοδοκιμή Θηλαστικών	+	+	0,8	3h+24h **	+	+	+++	Yasumoto et al., 1978
Βιοδοκιμή Κυττάρων	++	++	0,05	3h+24h ***	++	++	++	Tubaro et al., 1996
Δοκιμή PP2A	++	++	0,01	5h	++	++	+++	Della Loggia et al., 1998
ELISA	+++	++	0,04	2-4h	++	++	+++	Frémy et al., 1996
HPLC	+++	+++	0,4	6h	++	++	+	Lee et al., 1987
EC****	+++	+++	0,002*	6h	+++	+++	++	Bouaicha et al., 1997
LC-MS	+++	+++	0,001*	3h	+++	+++	+	Quilliam, 1995
*ΟΑ εμβολιασμένο σε ολικό ιστό. Εφαρμόζεται συντελεστής 5-10 για να εκφραστεί το περιεχόμενο σε ηπατοπάγκρεας.								
**Χρόνος προετοιμασίας + χρόνος παρατήρησης.								
***Χρόνος προετοιμασίας + χρόνος επαφής.								
****Electrokinetic Chromatography								

Από την άλλη πλευρά, οι βιοδοκιμές παρουσιάζουν μια σειρά μειονεκτημάτων, πέραν του ηθικού διλήμματος της χρήσης πειραματόζωων. Η λειτουργία μιας μονάδας εκτροφής πειραματόζωων ή η αγορά τους από εξωτερικό φορέα απαιτεί σημαντικό κεφάλαιο επένδυσης. Επιπλέον, εμφανίζεται μεγάλη ενδοεργαστηριακή και διεργαστηριακή διακύμανση των αποτελεσμάτων, η οποία μπορεί να ξεπεράσει και το 20%. Αυτό οφείλεται σε διάφορες παραμέτρους, όπως για παράδειγμα τα χαρακτηριστικά

των ζώων (στέλεχος, φύλο, ηλικία, βάρος), η γενική κατάσταση υγείας τους, η διαίτά τους, οι συνθήκες στρες κ.ά. Διακύμανση των αποτελεσμάτων αναφέρεται, επίσης, ότι εμφανίζεται και μεταξύ εκχυλισμάτων ολικού ιστού και ηπατοπαγκρέατος (van Egmond et al., 1993; Botana et al., 1996).

Τα τελευταία χρόνια, εξαιτίας των παραπάνω προβλημάτων από τη χρήση των βιοδοκιμών και λόγω των συνεχών πιέσεων από ζωοφιλικές οργανώσεις, εμφανίζεται μια τάση ανάπτυξης εναλλακτικών μεθόδων για τον προσδιορισμό των DSP τοξινών. Οι ενόργανες μέθοδοι προσφέρουν τη δυνατότητα ακριβούς, ευαίσθητης και αυτοματοποιημένης ανάλυσης, τόσο για ερευνητικούς σκοπούς, όσο και για αναλύσεις ρουτίνας. Στον Πίνακα 10 (σελίδα 60) γίνεται μια περιληπτική αξιολόγηση των διαφόρων μεθόδων ανίχνευσης του ΟΑ σε οστρακοειδή (Frémy et al., 1999).

2.12 Περιγραφή βιολογικού υλικού (μύδια)

Η ταξονομική θέση του βιολογικού υλικού το οποίο μελετάται παρουσιάζεται στον Πίνακα 11 (Vaught, 1989).

Πίνακας 11. Ταξονομική θέση βιολογικού υλικού.

Φύλο:	<i>Mollusca</i>
Κλάση:	<i>Bivalvia</i>
Τάξη:	<i>Mytiloida</i>
Υποτάξη:	<i>Mytilacea</i>
Οικογένεια:	<i>Mytilidae</i>
Γένος:	<i>Mytilus</i>
Είδος:	<i>Mytilus edulis</i>

Στην Ευρώπη, από μορφολογικής κυρίως άποψης, διακρίνονται τρία είδη μυδιών: *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis* και *M. trossulus*. Ωστόσο, ορισμένοι πιστεύουν ότι το *M. galloprovincialis* αποτελεί υποείδος του *M. edulis* (McDonald et al., 1990). Το *M. galloprovincialis* απαντάται κυρίως στις ακτές της Μεσογείου, της Δ. Ευρώπης και των Η.Π.Α., καθώς και στην Κίνα, την Ιαπωνία, την Ν. Αφρική και τη Ν. Αυστραλία (Gosling, 1992).

2.12.1 Μορφολογία και βιολογία του μυδιού

Εξωτερικά το *M. edulis* είναι μαύρο ή σκούρο μπλε και εσωτερικά μαύρο γυαλιστερό με ζωηρές μπλε ανταύγειες. Το ζώο μέσα στο όστρακο έχει χρώμα κίτρινο. Χαρακτηρίζεται από το δίθυρο όστρακο, το οποίο αποτελείται από δυο κόγχες συμμετρικές και ίσιες (Σχήματα 8 και 9). Αυτές ενώνονται μεταξύ τους με έναν ελαστικό σύνδεσμο που ελέγχει το άνοιγμα του κελύφους, ενώ το κλείσιμο ελέγχεται από δυο προσαγωγούς μυς.



Σχήμα 8. Μορφομετρικά χαρακτηριστικά του κελύφους του μυδιού.



Σχήμα 9. Απεικόνιση του εσωτερικού μέρους του δίθυρου οστράκου του μυδιού.

Το μήκος του κελύφους ποικίλλει αναλόγως με τη γενετική σύσταση του όστρακου και άλλους παράγοντες που καθορίζουν το ρυθμό αύξησης του ζώου. Σύμφωνα με μια μελέτη του ρυθμού αύξησης μυδιών της περιοχής Χαλάστρας (Θερμαϊκός Κόλπος), το μέσο μήκος κελύφους κυμαίνεται από 22-72 mm, χωρίς να διαπιστώνεται στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ οστράκων καλλιεργούμενων σε βάθη από 1 έως 3 m (Κράββα,

2000). Στην ίδια μελέτη, βρέθηκε ότι το υγρό βάρος του όστρακου (σάρκα) κυμαίνεται μεταξύ 0.38 και 13.27 g, ενώ το συνολικό υγρό βάρος (σάρκα+κέλυφος) κυμαίνεται μεταξύ 1.15-32.52 g.

Το σώμα του μυδιού αποτελείται από το σπλαχνικό σάκο, ο οποίος περικλείει τα περισσότερα όργανα (πεπτικό σωλήνα, καρδιά, ηπατοπάγκρεας, γεννητικούς αδένες), και το πόδι, το οποίο χρησιμεύει για τη μετακίνηση του ζώου, καθώς και για την έκκριση του βύσσου (λεπτά ανθεκτικά νημάτια) με τον οποίο το ζώο προσκολλάται σε διάφορα αντικείμενα. Το σώμα του μυδιού στερείται κεφαλιού.

Στον πεπτικό σωλήνα βρίσκεται το στόμα, ο φάρυγγας και ο οισοφάγος του ζώου. Το στόμα δεν έχει όργανα μάσησης αλλά περιβάλλεται από 4 φυλλοειδείς κεραίες, που πάλλονται διευκολύνοντας έτσι την είσοδο του νερού. Ο σπλαχνικός σάκος σκεπάζεται από μια πτυχή δέρματος, τον μανδύα, στον οποίο εκβάλλουν πολυάριθμοι αδένες. Μεταξύ μανδύα και σπλαχνικού σάκου υπάρχει η μανδυακή κοιλότητα, που περιλαμβάνει το αναπνευστικό σύστημα του ζώου. Αυτό αποτελείται από 4 βράγχια σε σχήμα ημισελήνου, που καλύπτουν τα $\frac{3}{4}$ του μήκους του σώματος. Με το ελαφρύ άνοιγμα των θυρίδων, το νερό περνά στα βράγχια μέσω σχισμών του μανδύα, με αποτέλεσμα την ταυτόχρονη διατροφή και αναπνοή του ζώου. Χάρη στα συνεχή χτυπήματα των μικροσκοπικών βλεφαρίδων των βραγχίων, που δρουν ως φίλτρο κατακρατείται η τροφή.

2.12.2 Χημική σύσταση

Η χημική σύσταση της σάρκας του μυδιού δε διαφέρει σημαντικά από εκείνη των άλλων θαλασσινών. Περιέχει πρωτεΐνες υψηλής βιολογικής αξίας, στις οποίες απαντώνται όλα τα αμινοξέα. Η περιεκτικότητα σε λίπη και υδατάνθρακες είναι μικρή, ενώ μεγάλη είναι η περιεκτικότητα σε ανόργανα άλατα. Τα μύδια είναι ιδιαίτερα πλούσια σε σίδηρο, όπως και όλα τα μαλάκια. Αποτελούν σημαντική πηγή βιταμινών, ιδιαίτερος C, A, D, B₁ και B₂.

2.12.3 Ρυθμός διήθησης και διατροφή

Η ποσότητα του νερού που κυκλοφορεί μέσα από τα βράγχια του μυδιού επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό τόσο την ανάπτυξή του όσο και τη συσσώρευση στη σάρκα διαφόρων ουσιών, όπως π.χ. οι φυκοτοξίνες. Ο ρυθμός διήθησης επηρεάζεται από τους εξής παράγοντες (Walne, 1979):

- 1) Αφθονία τροφής, η οποία έχει θετική επίδραση στο ρυθμό διήθησης (Navarro et al., 1991).
- 2) Θερμοκρασία του νερού, η οποία έχει θετική επίδραση. Έχει βρεθεί ότι ο ρυθμός διήθησης γίνεται μέγιστος στους 20°C, ενώ στους 15°C μειώνεται κατά 20-25%.
- 3) Μέγεθος των οστράκων, το οποίο έχει επίσης θετική επίδραση.
- 4) Ταχύτητα κυκλοφορίας του νερού. Υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ ταχύτητας κυκλοφορίας νερού και ρυθμού διήθησης. Χάρη στην κίνηση του νερού το μύδι εξασφαλίζει αφενός το απαραίτητο οξυγόνο και αφετέρου τις απαραίτητες τροφές, αφού λόγω προσκόλλησής του δεν μπορεί αλλιώς να τραφεί.
- 5) Συγκέντρωση αιωρούμενων σωματιδίων.

Η διατροφή του μυδιού αποτελείται από: (α) μονοκύτταρους φυτικούς οργανισμούς (φυτοπλαγκτό), όπως π.χ. διάτομα, δινωμαστιγωτά, κοκκολιθοφόρα, κυανοφύκη, βακτήρια και (β) ζωικούς οργανισμούς, όπως π.χ. πρωτόζωα μαστιγοφόρα, σπορόζωα, σαρκώδη, βλεφαριδοφόρα.

Η δομή των βραγχιακών νηματίων των μυδιών είναι τέτοια ώστε να κατακρατά εκλεκτικά τα πλαγκτονικά κύτταρα. Τα πολύ μικρά κύτταρα διαφεύγουν, ενώ τα πολύ μεγάλα αδυνατούν να διέλθουν μέσα από τα βράγχια. Πιθανολογείται ότι το καταλληλότερο μέγεθος μικροφυκών που μπορεί να κατακρατηθεί πλήρως από το *M. edulis* είναι περίπου 6 μm.

Μελέτη της τροφοληπτικής δραστηριότητας, που έγινε στο *M. galloprovincialis* στη χώρα μας, έδειξε ότι τα νεαρότερα άτομα (1-3 cm) καταναλώνουν βιομάζα μεγάλου σε διαστάσεις είδους φυτοπλαγκτού (π.χ. *T. suecica*) σε μεγαλύτερο ποσοστό απ' ότι τα μεγαλύτερα άτομα (4-6 cm), ενώ τα δεύτερα προσλαμβάνουν κατά κύριο λόγο βιομάζα ενδιάμεσου σε κυτταρικό όγκο είδους (π.χ. *I. galbana*) (Κουκάρας, 1999).

2.12.4 Αναπαραγωγή και ρυθμός ανάπτυξης

Το μύδι αναπαράγεται με αυγά (5-10 εκατομμύρια/έτος), τα οποία γονιμοποιούνται από το σπέρμα του αρσενικού που ελευθερώνεται στο νερό. Η αναπαραγωγή επιτυγχάνεται μεταξύ 10 και 20°C. Μετά την εκκόλαψη ο γόνος προσκολλάται σε διάφορα αντικείμενα του βυθού όπου και αναπτύσσεται. Ωριμάζει γεννητικά σε ηλικία έξι μηνών και το μεν αρσενικό χαρακτηρίζεται από υπόλευκους αδένες το δε θηλυκό από πορτοκαλόχρωμους. Στη φυσική τους κατάσταση τα μύδια χρειάζονται τρία περίπου χρόνια για να αποκτήσουν εμπορικό μέγεθος (>5cm). Σε καλλιέργεια όμως ο χρόνος αυτός περιορίζεται σε 15 έως 18 μήνες. Ο ρυθμός ανάπτυξης των μυδιών ορίζεται ως η επί τοις εκατό αύξηση του μεγέθους στη μονάδα του χρόνου και εξαρτάται από τους εξής παράγοντες:

- 1) Γενετική σύσταση. Έχει βρεθεί θετική συσχέτιση μεταξύ ετεροζυγωτίας και βιοσημότητας μυδιών και άλλων δίθυρων μαλακίων (Koehn & Gaffney, 1984). Γενικά, τα μύδια των ελληνικών ακτών έχουν υψηλό ρυθμό αύξησης, ιδιαίτερα αυτά που προέρχονται από την περιοχή της Χαλάστρας (Κράββα, 2000).
- 2) Στάδιο ανάπτυξης του ζώου (μέγεθος, ηλικία). Ο ρυθμός ανάπτυξης είναι αντιστρόφως ανάλογος της ηλικίας και του μεγέθους, λόγω μείωσης των βιολογικών δραστηριοτήτων (μεταβολισμού) σε άτομα μεγάλης ηλικίας.
- 3) Ποιότητα και διαθεσιμότητα τροφής.
- 4) Ρυθμός διήθησης.
- 5) Αβιοτικοί παράγοντες (Gosling 1992; Dolmer, 1998) όπως:

a. *Φωτισμός*: Το μύδι είναι θετικά φωτοτροπικός οργανισμός και αναπτύσσεται καλύτερα σε μικρά βάθη (<10 m).

b. *Θερμοκρασία*: Θεωρείται ευρύθερμο είδος, με μέγιστη ανάπτυξη σε θερμοκρασίες 15-19°C.

c. *Αλατότητα*: Χαρακτηρίζεται ως ευρύαλο είδος, δηλαδή επιβιώνει σε μεγάλο εύρος αλμυρότητας (5-35%) με βέλτιστο εύρος 25-35%.

d. *Οξυγόνο*: Έχει μεγάλη αντοχή σε χαμηλές ποσότητες οξυγόνου, ωστόσο, νερά κορεσμένα σε οξυγόνο ευνοούν την ανάπτυξη του ζώου.

e. *pH*: Βέλτιστο εύρος τιμών pH για την ανάπτυξη των μυδιών είναι μεταξύ 7,5-8,1.

f. *Θρεπτικά συστατικά*: Τα θρεπτικά συστατικά επηρεάζουν την πρωτογενή παραγωγή των θαλάσσιων ειδών (π.χ. φυτοπλαγκτό) με την οποία τρέφεται το μύδι.

g. *Τοπογραφία βυθού*: Σε φυσικούς πληθυσμούς, το μύδι αναπτύσσεται καλύτερα σε πέτρινους βυθούς, ενώ σε καλλιέργειες ο βυθός θα πρέπει να είναι αμμώδης ή ελώδης.

2.12.5 Απεκκριτική δραστηριότητα

Η απεκκριτική δραστηριότητα των μυδιών σχετίζεται με το μέγεθος, την αναπαραγωγική ικανότητα και με εξωτερικούς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία και η διαθεσιμότητα τροφής (Smaal & Zurburg, 1997). Η απεκκριτική διαδικασία των μυδιών συνίσταται στην αποβολή διαφόρων αδιάλυτων και διαλυτών περιττωμάτων.

Οι στερεές μορφές περιττωμάτων διακρίνονται στα ψευδοπεριττώματα και στα κανονικά περιττώματα. Τα ψευδοπεριττώματα περιβάλλονται από βλέννα και συνίστανται από οργανισμούς ή τμήματα αυτών που δεν έχουν υποστεί πέψη. Αποτελούν δε καλό υπόστρωμα για την ανάπτυξη βακτηρίων, γεγονός που μπορεί να προκαλέσει ανοξικές συνθήκες, κυρίως σε περιοχές εντατικής καλλιέργειας (Smaal & Prins, 1993). Οι διαλυτές μορφές περιττωμάτων αποτελούνται από διάφορες ενώσεις αζώτου (κυρίως αμμωνιακά άλατα) και φωσφόρου (κυρίως ορθοφωσφορικά άλατα). Στις περιοχές συστηματικής καλλιέργειας τα επίπεδα των ανόργανων θρεπτικών είναι πολύ υψηλά, προάγοντας ακόμα περισσότερο την παραγωγή φυτικής βιομάζας (Prins et al., 1994 & 1995).

Εργαστηριακές μελέτες της απεκκριτικής δραστηριότητας που διεξήχθησαν σε μύδια του είδους *M. galloprovincialis*, προερχόμενα από το Θερμαϊκό Κόλπο, έδειξαν ότι τα μεγαλύτερα σε μέγεθος άτομα εμφανίζουν αυξημένη απεκκριτική δραστηριότητα, πιθανότατα λόγω της μεγαλύτερης αναπαραγωγικής προσπάθειας που καταβάλλουν συγκρινόμενα με τα νεαρότερα άτομα (Κουκάρας, 1999).

2.12.6 Μυδοκαλλιέργειες στην Ελλάδα

Στις ελληνικές ακτές απαντώνται διάφορα εδώδιμα οστρακοειδή, πολλά εκ των οποίων είναι εμπορεύσιμα (Πίνακας 12). Από αυτά, το μύδι αποτελεί το κατ' εξοχήν καλλιεργούμενο είδος, λόγω της υψηλής θρεπτικής αξίας και του υψηλού ρυθμού ανάπτυξης. Άλλωστε, από οικονομικής άποψης, η μυδοκαλλιέργεια χαρακτηρίζεται από χαμηλό κόστος, εύκολο χειρισμό και το προϊόν έχει μεγάλη ζήτηση στην εσωτερική και κοινοτική αγορά.

Πίνακας 12. Κατάλογος των κυριότερων εμπορεύσιμων εδώδιμων οστρακοειδών στην Ελλάδα (Γαληνού-Μητσούδη, 2004).

Επιστημονική Ονομασία	Κοινή Ονομασία
<i>Arca noae</i>	Καλόγνωμη
<i>Aequipecten opercularis</i>	Χτένι, καλόχτενο
<i>Callista chione</i>	Γυαλιστερή
<i>Cerastoderma glaucum</i>	Πουρλίδα, κουτρουλίδα
<i>Donax trunculus</i>	Τελλίνα ή φασολάκι
<i>Flexopecten glaber</i>	Λείο ή γυαλιστερό χτένι
<i>Modiolus barbatus</i>	Χάβαρο
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Μύδι
<i>Ostrea edulis</i>	Στρείδι
<i>Ruditapes decussates</i>	Αχιβάδα
<i>Venus verrucosa</i>	Κυδώνι

Το *M. galloprovincialis* απαντάται κυρίως στις ακτές του Βορείου Αιγαίου, σε κόλπους πλούσιους σε θρεπτικά συστατικά (Πίνακας 13). Αναπτύσσεται σε νερά θερμοκρασίας 10-26°C, αλατότητας 22-42‰ και περιεκτικότητας σε διαλυμένο οξυγόνο μεγαλύτερης από 5 mg/l (Φώτης, 1996).

Το μεγαλύτερο ποσοστό της εθνικής ετήσιας παραγωγής (~88%) καλλιεργείται σε μονάδες του Θερμαϊκού Κόλπου (Katikou, 2005), κυρίως στις δυτικές ακτές του κόλπου, στους Νομούς Θεσσαλονίκης, Ημαθίας και Πιερίας, όπου η συνολική καλλιεργούμενη έκταση καλύπτει 277.000 στρέμματα. Σύμφωνα με στοιχεία της Ευρωπαϊκής Στατιστικής Υπηρεσίας (EUROSTAT, 2005), η συνολική παραγωγή της Ελλάδας, το 2003, ανήλθε στους 31.524 τόνους καλύπτοντας το 5,32% της συνολικής παραγωγής της Ευρώπης.

Πίνακας 13. Περιοχές καλλιέργειας μυδιών στην Ελλάδα (Πηγή: Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, Εθνικό Εργαστήριο Αναφοράς Θαλασσίων Βιοτοξινών).

Νομός	Περιοχές/Σημεία Δειγματοληψίας
Θεσσαλονίκης	Επανωμή, Αγγελολόφρι, Χαλάστρα (Καβούρα, Ναζίκι, Λευκούδι), Κύμινα
Περίας	Βαρικό, Αλυκές Κίτρους, Μακρύγιαλος, Μεθώνη
Καβάλας	Κεραμωτή, Αγίασμα, Βάσοβα, Ν. Ηρακλείτσα
Ημαθίας	Κλειδί
Χαλκιδικής	Ολυμπιάδα
Λέσβου	Καλλονή, Γέρα, Άκρα Μαγειρούδη (Λήμνος)
Φθιώτιδας	Αγ. Ιωάννης, Αγ. Τριάδα, Μώλος
Αττικής	Μέγαρα (Νεράκι, Δρέπανο)
Πρέβεζας	Μάζωμα, Σόγωνο, Κορωνησία
Ροδόπη	Φανάρι
Θεσπρωτίας	Κοίτη Ποταμού Καλαμά
Σερρών	Ν. Κερδύλλια

2.12.7 Συστήματα εκτροφής μυδιών

Τα μύδια τοποθετούνται σε ειδικά πλαστικά δίχτυα μήκους 2-6 m και διαμέτρου 5-10 cm (αναλόγως με το μέγεθος των εκτρεφόμενων μυδιών), που ονομάζονται αρμαθιές και αναρτώνται σε σχοινιά τοποθετημένα σε παράλληλες σειρές. Κάθε αρμαθιά αποδίδει περίπου 40-50 kg μυδιών (μαζί με το κέλυφος). Αναλόγως με τον τρόπο ανάρτησης, τα

συστήματα εκτροφής διακρίνονται σε: (α) πασσαλωτά (Σχήμα 10) και (β) πλωτήρες ή πλωτά (*long line*) (Σχήμα 11).



Σχήμα 10. Πασσαλωτό σύστημα εκτροφής μυδιών.



Σχήμα 11. Πλωτό σύστημα εκτροφής μυδιών.

Στα πασσαλωτά οι αρμαθίες κρέμονται από κατάλληλα διατεταγμένους πασσάλους μήκους 4-6 m που σφηνώνονται στον πυθμένα (Σχήμα 10). Το σύστημα αυτό εκτροφής αποδίδει 15-25 kg/m³. Στο σύστημα των πλωτήρων, οι αρμαθίες κρέμονται από σχοινιά διατεταγμένα σε επιμήκεις πολλαπλές παράλληλες σειρές που επιπλέουν με τη βοήθεια πλαστικών πλωτήρων (Σχ. 11). Η μέθοδος αυτή αποδίδει 50-60 kg/m³ και πλεονεκτεί γιατί μπορεί να εφαρμοσθεί σε βαθιά νερά ή νερά με έντονο κυματισμό.

Εκτός από την ανάρτηση, υπάρχει και η εκτροφή στον πυθμένα, στην οποία ο γόνος διασπείρεται στον πυθμένα και αφού αναπτυχθεί, το εμπορεύσιμο προϊόν συλλέγεται με δράγες, αποδίδοντας 2,5-25 kg/m³.

2.12.8 Οστρακοειδή-δείκτες DSP τοξινών

Οι υδρόβιοι οργανισμοί χρησιμοποιούνται σε πολλές περιπτώσεις ως βιοδείκτες, λόγω συσσώρευσης διαφόρων δυνητικώς επικινδύνων χημικών ρύπων και εξαιτίας των τοξικών επιπτώσεων που αυτές προκαλούν στα ανώτερα θηλαστικά και στον άνθρωπο. Αρκετοί οργανισμοί μπορεί να συσσωρεύσουν τοξίνες στη σάρκα τους, μεταξύ των οποίων δίθυρα μαλάκια, καρκινοειδή (καβούρια, αστακοί), ιχθύες (σιγκουατέρα, μπαρακούντα) και ζωοπλαγκτονικά είδη.

Τα δίθυρα μαλάκια και ιδιαίτερα τα μύδια είναι οργανισμοί που επιδέχονται τη βιοσυσσώρευση των τοξινών, λόγω της ακινησίας και του μηχανισμού τροφοληψίας τους (διήθηση του νερού). Συγκριτική ανάλυση των DSP τοξινών σε διάφορα είδη οστρακοειδών από την ίδια περιοχή έδειξε ότι το μύδι (*M. edulis*) είναι το πιο τοξικό, ακολουθούμενο από το χτένι, ενώ πολύ μικρή τοξικότητα βρέθηκε στο στρείδι (Yasumoto et al., 1978; Berthomé & Beline, 1988). Στον Πίνακα 14 δίνεται η σχετική τοξικότητα του κάθε είδους εκφρασμένη ως προς την τοξικότητα του μυδιού.

Πίνακας 14. Κατανομή των DSP τοξινών σε διάφορα οστρακοειδή (Yasumoto et al., 1978).

Οστρακοειδές	% Σχετική Τοξικότητα*
Μύδι (<i>Mytilus edulis</i>)	100
Χτένι (<i>Pathinopecten yessoensis</i>)	83-86
Χτένι (<i>Chlamys nipponensis akazara</i>)	60
Στρείδι (<i>Crassostrea gigas</i>)	14
Ασκίδιο (<i>Halocynthia roretzi</i>)	<2
* Η εκτίμηση της τοξικότητας έγινε με βιοδοκιμή μυνών.	

3. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΕΡΕΥΝΑΣ

Σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν: α) ο προσδιορισμός οκαδαϊκού οξέος και δινοφυσιστοξινών σε δείγματα οστρακοειδών του Ελλαδικού χώρου, τα οποία επιλέχθηκαν με κριτήριο το θετικό αποτέλεσμα στη βιολογική δοκιμή στα τοξικά επεισόδια της περιόδου 2006-2007 στο Θερμαϊκό Κόλπο (Βόρεια Ελλάδα), στο Μαλιακό Κόλπο (Κεντρική Ελλάδα) και Σαρωνικό Κόλπο (Νότια Ελλάδα) με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης με φθορισμομετρικό ανιχνευτή (HPLC-FLD), με υγρή χρωματογραφία-φασματογραφία μαζών (LC-MS/MS) και σύγκρισή αυτών με την μέθοδο αναφοράς, την βιολογική δοκιμή (MBA) (Α΄ Μέρος) και β) εξυγίανση των παραπάνω επιβαρυνμένων οστρακοειδών με τις τεχνικές της ακτινοβολήσης και του οζονισμού (Β΄ Μέρος).

Τα δίθυρα μαλάκια που προέρχονται από την αλιεία, είναι πολύ λίγα ποσοτικά, σε σχέση με αυτά που προέρχονται από τις καλλιέργειες. Η παγκόσμια παραγωγή των στρειδιών και των μυδιών από τις μονάδες καλλιέργειας το 2006, ήταν περίπου 11 εκατομμύρια και 2 εκατομμύρια τόνοι αντίστοιχα, σε αντίθεση με τους 151 χιλιάδες και 108 χιλιάδες τόνους που προήλθαν από την αλιεία (FAO, 2008). Τα οστρακοειδή που προέρχονται από τη θάλασσα, υπόκεινται σε κινδύνους και αστάθμητους παράγοντες που επηρεάζουν την ποιότητα και την παραγωγή αυτών των προϊόντων. Καθώς τα οστρακοειδή είναι είδη που φιλτράρουν το νερό, συγκεντρώνουν στο σώμα τους διάφορες ουσίες και μικροοργανισμούς σε μεγαλύτερο βαθμό από το νερό μέσα στο οποίο βρίσκονται (FAO, 2008a). Βιοτοξίνες που παράγονται από κάποια μικροφύκη όπως οι διαρροϊκές, οι παραλυτικές, οι νευροτοξικές και οι αμνησιακές μπορεί να αποδειχθούν πολύ σοβαρές για την υγεία των καταναλωτών (FAO 2008a). Στην Ευρώπη, χώρες παραγωγής οστρακοειδών, όπως η Ιρλανδία, η Σκωτία, η Γαλλία και η Ισπανία έχουν υποστεί σημαντικές ζημιές τα προηγούμενα χρόνια από την εμφάνιση παλιρροιών τοξικού φυτοπλαγκτού (FAO, 2000). Η κατάσταση γίνεται περισσότερο ανησυχητική, καθώς είναι άγνωστο που και πότε αυτές θα εμφανιστούν. Περιστατικά όπως το 1996 στο Shetland της Σκωτίας, μια περιοχή χωρίς να έχει προηγούμενο στο παρελθόν ανιχνεύθηκαν σε οστρακοειδή χαμηλά επίπεδα ASP τοξινών. Επίσης, στη Γαλλία το 2002 απαγορεύτηκε η συλλογή και η κατανάλωση οστρακοειδών, εξαιτίας της παρουσίας ενός τοξικού φυτοπλαγκτικού οργανισμού του γένους *Pseudonitzschia* από το οποίο παράγεται ο κύριος εκπρόσωπος των ASP τοξινών, το δομοϊκό οξύ.

Μετά από περιπτώσεις δηλητηρίασης καταναλωτών από τοξικά μύδια οι κυβερνήσεις θέσπισαν μεθόδους για τον έλεγχο των οστρακοειδών που πιθανόν να περιέχουν βιοτοξίνες. Το πρώτο βήμα ήταν το πρόγραμμα ελέγχου για τα επικύνδινα άλγη (Harmful algae blooms (HABs)). Προσπάθειες είχαν γίνει να εναρμονιστούν τοπικές νομοθεσίες και μέθοδοι ελέγχου, με πρώτες αυτές των ΗΠΑ και του Καναδά το 1958. Οι χώρες αυτές θέσπισαν την βιολογική δοκιμή με αποδεκτά όρια για τις PSP τοξίνες τα 400MU και 80μg PSP/100g μυδιού, αντίστοιχα. Η Ευρωπαϊκή Ένωση θέσπισε εργαστήρια αναφοράς για τον έλεγχο της παραγωγής των οστρακοειδών στην κοινότητα και συγκεκριμένους κανόνες για τους επίσημους ελέγχους. Οι περιοχές παραγωγής οστρακοειδών ελέγχονται ανά τακτά χρονικά διαστήματα για την παρουσία τοξικού φυτοπλαγκτού. Παγκοσμίως, αναπτύσσονται οι τεχνικές LC-MS για τον προσδιορισμό τοξινών (ASP και DSP τοξίνες) που προέρχονται από το φυτοπλαγκτόν και από τα μύδια. Η εφαρμογή της LC-MS/MS μπορεί να χρησιμοποιηθεί εργαστηριακά για τον προσδιορισμό ASP, DSP τοξινών και άλλων λιπόφιλων τοξινών λόγω της εκλεκτικότητας, της καλής επαναληψιμότητας και των χαμηλών ορίων ανιχνευσιμότητας.

4.ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.1 Συλλογή δειγμάτων

Στην παρούσα έρευνα επιλέχθηκαν μύδια του είδους *Mytillus galloprovincialis*. Ως φυσικό περιβάλλον για τη διερεύνηση της DSP τοξικότητας σε αυτά τα μύδια επιλέχθηκαν οι περιοχές παραγωγής του Θερμαϊκού Κόλπου (Θεσσαλονίκη, Ημαθία, Πιερία) του Σαρωνικού (Μέγαρα) και του Μαλιακού Κόλπου (Φθιώτιδα) (Σχήμα 12). Επίσης, έγινε διερεύνηση και σε τυχαία αποκελυφωμένα δείγματα από την αγορά (Α΄ Μέρος). Τα δείγματα προέρχονταν από τα τοξικά επεισόδια της περιόδου 2006-2007.



Σχήμα 12. Περιοχές δειγματοληψίας των δειγμάτων

Για την εξυγίανση επιβαρυνμένων μυδιών με DSP τοξίνες, οι περιοχές οι οποίες επιλέχθηκαν ήταν του Θερμαϊκού κόλπου (Θεσσαλονίκη, Ημαθία, Πιερία), του Σαρωνικού (Πειραιάς και Μέγαρα) και του Μαλιακού Κόλπου (Φθιώτιδα). Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν και αποκελυφωμένα δείγματα από την αγορά (Β΄ Μέρος). Τα δείγματα μυδιών προέρχονταν από τα τοξικά επεισόδια των ετών 2007 και 2009.

Στις περιοχές του Θερμαϊκού Κόλπου σημειώνεται έντονη παραγωγική δραστηριότητα, εξαιτίας των αξιόλογων οικολογικών χαρακτηριστικών (π.χ. υψηλό τροφικό δυναμικό λόγω της εισόδου γλυκών νερών και θρεπτικών συστατικών από τις εκβολές κυρίως του Αξιού ποταμού και γενικότερα λόγω της μορφολογίας της περιοχής). Στο Σαρωνικό Κόλπο υπάρχει παραγωγική δραστηριότητα και μέχρι σήμερα έχουν καταγραφεί τοξικά επεισόδια, στο βαθμό όμως που γνωρίζουμε δεν υπάρχει καμία αναφορά σχετικά με το προφίλ της τοξικότητας των μυδιών. Οι δειγματοληψίες μυδιών από το φυσικό τους περιβάλλον διεξήχθησαν στα πλαίσια του «Εθνικού Προγράμματος Επιτήρησης Ζωνών ή Περιοχών Παραγωγής Δίθυρων Μαλακίων για Παρουσία Θαλασσίων Βιοτοξινών», με σκοπό την παρακολούθηση της παρουσίας ΟΑ και του προφίλ τοξικότητας των μυδιών. Τα δείγματα που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη προέρχονταν από τα τοξικά επεισόδια που σημειώθηκαν στις παραπάνω περιοχές κατά τα έτη 2006 – 2007 (103 δείγματα). Όσον αφορά την εξυγίανση, τα δείγματα προέρχονταν από τα τοξικά επεισόδια των ετών 2007 και 2009 (21 δείγματα).

4.2 Επιλογή και προετοιμασία δειγμάτων

Κατά την παραλαβή των δειγμάτων στο εργαστήριο, έγινε αρχικά κωδικοποίηση ανάλογα με την προέλευσή τους. Στη συνέχεια, τα όστρακα ξεπλύθηκαν με νερό για την απομάκρυνση της άμμου ή τυχόν ξένων υλικών. Ακολούθησε απομάκρυνση του ολικού ιστού από το κέλυφος και διαχωρισμός του ηπατοπαγκρέατος με μεταλλική λαβίδα. Από καθένα προσκομισθέν δείγμα προερχόμενο από κάποιο σημείο δειγματοληψίας προέκυψε ένα δείγμα ολικού ιστού και ένα δείγμα ηπατοπαγκρέατος. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν πάνω σε διηθητικό χαρτί για να απομακρυνθεί η περίσσεια της υγρασίας και ακολούθησε ομογενοποίηση, με ηλεκτρικό ομογενοποιητή RONIC-RITMIX1. Τα ομογενοποιημένα δείγματα ηπατοπαγκρέατος υποβλήθηκαν άμεσα σε προετοιμασία για έλεγχο με βιοδοκιμή, ενώ κρατήθηκαν και αντιδείγματα σε πλαστικούς σωλήνες φυγοκέντρωσης, προκειμένου να αναλυθούν με HPLC-FLD και LC-MS/MS (Α΄ Μέρος). Τα παραπάνω δείγματα και τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για την εξυγίανση (δείγματα ολικού ιστού καθώς και ομογενοποιημένου ολικού ιστού), συντηρήθηκαν σε βαθιά κατάψυξη (-70°C), μέχρι τη στιγμή της ανάλυσης.

Στο Α΄ Μέρος, όσον αφορά την βιοδοκιμή και τις αναλύσεις με HPLC-FLD και LC-MS/MS χρησιμοποιήθηκαν μόνο τα δείγματα ηπατοπαγκρέατος των μυδιών, δεδομένου ότι στο τμήμα αυτό του μυδιού συσσωρεύεται εκλεκτικά το OA, ως λιπόφιλη ένωση (Murata et al., 1982). Για την βιολογική δοκιμή λαμβάνονταν κάθε φορά 20 g δείγματος, ενώ για την ανάλυση με HPLC-FLD και LC-MS/MS λαμβάνονταν 1 g δείγματος.

Στο Β΄ Μέρος, όσον αφορά την βιοδοκιμή και την ανάλυση με LC-MS/MS χρησιμοποιήθηκαν τόσο δείγματα ολόκληρα αποκελυφωμένα μύδια όσο και ομογενοποιημένα ολικού ιστού. Για την βιολογική δοκιμή λαμβάνονταν κάθε φορά 100 g δείγματος, ενώ για την ανάλυση της LC-MS/MS λαμβάνονταν 5 g δείγματος.

Όλα τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τις ανάγκες της παρούσας μελέτης επιλέχθηκαν με κριτήριο το θετικό αποτέλεσμα στη βιοδοκιμή σε μυς.

4.3 Αντιδραστήρια

4.3.1 Βιολογική δοκιμή

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την βιολογική δοκιμή ήταν το Tween-60 (Polyoxyethylenesorbitan monostearate) «συνθετικής καθαρότητας» (Sigma, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) και ακετόνη αναλυτικής καθαρότητας (Merck, Darmstadt, Germany).

4.3.2 Υγρή Χρωματογραφία

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τις μεθόδους HPLC-FLD και LC-MS/MS ήταν HPLC καθαρότητας: ακετόνη, ακετονιτρίλιο, μεθανόλη, χλωροφόρμιο, n-εξάνιο, νερό, NaOH και HCl (Merck, Germany). Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν πρότυπος ιστός μυδιού (NRC CRM-DSP-Mus-b), πιστοποιημένης συγκέντρωσης 10.1 ± 0.8 μg OA/g και 1.3 ± 0.2 μg DTX-1/g (Institute for Marine Biosciences, National Research Council of

Canada, Halifax, Canada) και πρότυπο διάλυμα οκαδαϊκού οξέος (Okadaic Acid Certified Calibration Solution, NRC CRM-OA-b), συγκέντρωσης $24,1 \pm 0,8$ $\mu\text{g/ml}$ (22°C) σε μεθανόλη (National Research Council of Canada, Institute for Marine Biosciences, Halifax, Canada). Αντιδραστήριο για την εστεροποίηση (παραγωγοποίηση) χρησιμοποιήθηκε το 9-ανθρυλοδιαζωμεθάνιο (ADAM, 9-anthryldiazomethane). Τέλος, για την εκχύλιση στερεάς φάσης χρησιμοποιήθηκαν στήλες πυριτίας SPE 650 mg (solid phase extraction silica cartridge, Alltech, USA).

4.3.3 Προσδιορισμός θειοβαρβιτουρικού οξέος

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν υδροχλωρικό οξύ 12N (Merck), ανταφριστικό αντιδραστήριο silicone, διάλυμα βουτυλικού υδροξυ-τολουολίου (BHT, Merck) και 2-θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA, Merck).

4.4 Οργανολογία

4.4.1 Βιολογική δοκιμή

Η ζύγιση των δειγμάτων έγινε σε αναλυτικό ζυγό της εταιρείας AND (ΗΠΑ), μοντέλο HF-4000. Τα προς εξέταση δείγματα ομογενοποιήθηκαν σε οικιακό μίξερ, της εταιρείας Ritmix Ronic (Γαλλία). Η ανάδυσή του, κατά το στάδιο της εκχύλισης, έγινε σε τάρακτρο της εταιρείας Edmund Bühler, μοντέλο KS10, 7400 Tübingen (Γερμανία). Για την απομάκρυνση της ακετόνης χρησιμοποιήθηκε περιστρεφόμενος εξατμιστήρας της εταιρείας Büchi, μοντέλο R-200 (Ελβετία), ο οποίος περιλαμβάνει θερμαινόμενο λουτρό (B-490), ρυθμιστή κενού (V-800) και αντλία κενού (V-500). Για την ένεση του τελικού εκχυλίσματος στα πειραματόζωα χρησιμοποιήθηκαν πλαστικές σύριγγες μίας χρήσης, χωρητικότητας 1 ml και διαμέτρου βελόνας 27G.

4.4.2 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης με φθορισμομετρικό ανιχνευτή (HPLC-FLD)

Χρησιμοποιήθηκε όργανο της εταιρίας SHIMADZU μοντέλο LC-10AD (Columbia, USA), με φθορισμομετρικό ανιχνευτή μοντέλου RF-10AXL. Τα μήκη κύματος διέγερσης και απορρόφησης για τον φθορισμομετρικό ανιχνευτή ήταν 365nm και 415nm, αντίστοιχα. Η στήλη χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Lichrospher 100, με υλικό πλήρωσης χημικά τροποποιημένο διοξείδιο του πυριτίου (SiO₂) με δεσμευμένες αλκυλομάδες 18 ατόμων άνθρακα (C18), μεγέθους σωματιδίων 5 μm (Merck, Germany). Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε στους 35°C

4.4.3 Υγρή Χρωματογραφία-Φασματοσκοπίας μαζών (LC-MS/MS)

Χρησιμοποιήθηκε το όργανο της εταιρίας AGILENT μοντέλο LC σειράς 1100 με παγίδα και με ιονισμό ηλεκτροψεκασμού σε ατμοσφαιρική πίεση (atmospheric pressure electrospray ionization, ESI) (Stuttgart, Germany). Η στήλη χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Eclipse XDB-C18 (4.6 mm x 150 mm, 5 μm). Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε στους 30°C.

4.4.4 Ακτινοβολήση-Οζονισμός

Η ακτινοβολήση πραγματοποιήθηκε στο εργοστάσιο ELBIONY στη Μάνδρα Αττικής. Τα δείγματα ακτινοβολήθηκαν με πηγή 150kCi ⁶⁰Co. Οι δόσεις στις οποίες ακτινοβολήθηκαν τα δείγματα ήταν 3, 6 και 10 kGy. Ο μέσος ρυθμός ακτινοβολήσης ήταν 1kGy/h.

Ο οζονισμός στα μύδια πραγματοποιήθηκε μέσα σε ψυγείο (4°C) με δόση αερίου όζοντος τα 15 ppm και για χρόνο έκθεσης τις 6 h. Χρησιμοποιήθηκε η συσκευή

παραγωγής όζοντος C-Lasky series (C-L010-DTI/C-L010-DSI, Airtree Ozone Technology Co, Σχήμα 13).



Σχήμα 13. Οργανολογία οζονισμού

4.4.5 Φασματοφωτόμετρο

Το φασματοφωτόμετρο που χρησιμοποιήθηκε ήταν Perkin Elmer, Lambda 25 UV/VIS Spectrometer. Προσδιορίστηκε η απορρόφηση στα 532 nm.

4.5 Πειραματόζωα

Τα πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν για τη βιολογική δοκιμή ήταν ποντίκια αρσενικά, της φυλής *Albino Swiss*, βάρους 18-19 g. Σε κάθε δοκιμή χρησιμοποιήθηκαν τρία (3) πειραματόζωα. Τα ζώα προέρχονταν από την εγκεκριμένη εκτροφή (Αριθμός Εγκατάστασης: EL 54 BIO 08) του Εθνικού Εργαστηρίου Αναφοράς Θαλασσιών Βιοτοξινών του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων (Σχήμα 14). Οι πειραματισμοί εκτελέστηκαν υπό τη σχετική αδειοδότηση της Νομαρχιακής Διεύθυνσης

Κτηνιατρικής (Αριθμός Εγκατάστασης Πειραματισμού: EL 54 BIO 07), όπως προβλέπεται από την Οδηγία 86/609 της Ευρωπαϊκής Ένωσης.



Σχήμα 14. Εκτροφή ποντικών *Albino Swiss* του Εθνικού Εργαστηρίου Αναφοράς Θαλασσίων Βιοτοξινών.

4.6. Πειραματικές διαδικασίες

4.6.1. Βιολογική δοκιμή (MBA)- Α'Μέρος

Η μέθοδος της βιοδοκιμής εφαρμόστηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που έχει καθιερωθεί από το Εθνικό Εργαστήριο Αναφοράς Θαλασσίων Βιοτοξινών, το οποίο μάλιστα τον Οκτώβριο του 2008 διαπιστεύθηκε κατά ISO 17025 από το Εθνικό Συμβούλιο Διαπίστευσης (Ε.ΣΥ.Δ.).

Από κάθε δείγμα ζυγίστηκαν 20 g ηπατοπαγκρέατος, τα οποία αντιστοιχούν σε περίπου 100 g ολικού ιστού, καθώς εκτιμάται ότι το ηπατοπάγκρεας αποτελεί το 20% του συνολικού ιστού του μυδιού. Στη συνέχεια, το δείγμα μεταφέρθηκε σε κωνική φιάλη, όπου προστέθηκαν 50 ml ακετόνης, αναταράχθηκε σε τάρρακτρο για 5 λεπτά και παραλήφθηκε η υγρή φάση με απλή διήθηση σε χάρτινο ηθμό. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε ακόμα δύο φορές, οπότε προέκυψαν συνολικά 150 ml ακετονικού εκχυλίσματος. Ακολούθησε εξάτμιση της ακετόνης μέχρι ξηρού σε περιστρεφόμενο εξατμιστήρα και επαναιώρηση του στερεού υπολείμματος σε 4 ml διαλύματος Tween-60 1%, ώστε να παραληφθούν όλες οι λιπαρές ουσίες του στερεού υπολείμματος (1 ml Tween αντιστοιχεί σε 5 g ΗΠ). Στη συνέχεια, έγινε ένεση 1 ml του εναιωρήματος ενδοπεριτοναϊκώς σε καθένα από τρία ποντίκια (Σχήμα 15). Μισή ώρα μετά την ένεση του δείγματος, αξιολογήθηκε η αντίδραση

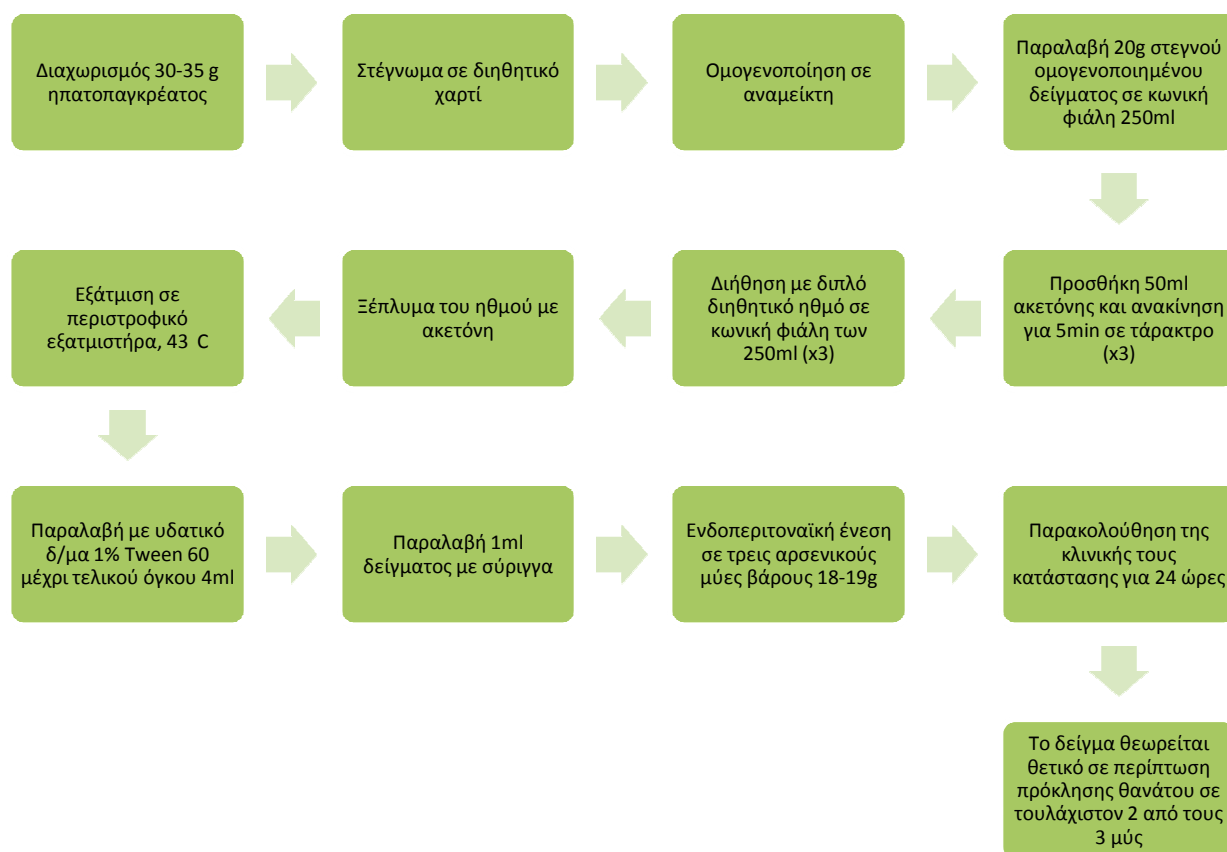
των πειραματοζώων. Το αποτέλεσμα κρίνεται θετικό ως προς την παρουσία ΟΑ ή άλλων DSP τοξινών, σε περίπτωση θανάτου 2 εκ των 3 ποντικών σε χρονικό διάστημα μέχρι τις 24 ώρες μετά την ενδοπεριτοναϊκή ένεση (Σχήμα 16) σύμφωνα με τον Κανονισμό 2074/2005 της Επιτροπής. Συνοπτικά η πορεία της βιολογικής μεθόδου παρουσιάζεται στο Σχήμα 17.



Σχήμα 15. Για τη βιολογική δοκιμή κάθε δείγματος ενέθηκαν ενδοπεριτοναϊκώς 3 ποντίκια.



Σχήμα 16. Για την εκτίμηση του αποτελέσματος της βιοδοκιμής παρατηρούνταν η συμπεριφορά των ποντικών μετά την ένεση, εντός 24h.



Σχήμα 17. Διαγραμματική απεικόνιση της πειραματικής διαδικασίας της βιοδοκιμής.

4.6.2 HPLC-FLD

Η μέθοδος που εφαρμόστηκε στην παρούσα εργασία για τον προσδιορισμό της ελεύθερης μορφής του OA με HPLC βασίστηκε στη μέθοδο των Mouratidou et al. (2004), για την εκχύλιση των δειγμάτων και για την εστεροποίηση με το φθορίζον αντιδραστήριο. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην ιδιότητα του OA, ως καρβοξυλικού οξέος, να αντιδρά με το 9-ανθρυλοδιαζωμεθάνιο (ADAM) και να σχηματίζει φθορίζοντα εστέρα, ο οποίος λαμβάνεται σε πιο καθαρή μορφή μετά από εκχύλιση στερεής φάσης. Εκτός από το οκαδαϊκό οξύ, με τη μέθοδο αυτή είναι δυνατό να ανιχνευτούν και οι λοιπές DSP τοξίνες, όπως η δινοφυσιστοξίνη-1 (DTX-1). Η πορεία της μεθόδου HPLC παρουσιάζεται στο Σχήμα 18.

4.6.3 Εκχύλιση των τοξινών για HPLC-FLD και LC-MS/MS

Η εκχύλιση των τοξινών πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο των Mouratidou et al. (2004). Συνοπτικά, 1 g ομογενοποιημένου ηπατοπαγκρέατος ή 5 g ολικού ιστού (για την εξυγίανση) εκχυλίστηκε με 4 (ή 20 για την εξυγίανση) ml 80% υδατικής μεθανόλης. Από το μεθανολικό κλάσμα, 2.5ml (ή 2 ml για την εξυγίανση), ακολούθησε απομάκρυνση του λίπους με εκχύλιση εις διπλούν με 2 ml n-εξάνιο και προσθήκη 0.5 ml νερού για απομάκρυνση άλλων τυχόν προσμίξεων και τελικά προσθήκη 2 ml χλωροφορμίου, παραλαβή του και διόρθωσή του στα 10 ml. Από το συνολικό εκχύλισμα, 0.5 ml εξατμίστηκε μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου.

4.6.4 Εστεροποίηση/Παραγωγοποίηση για HPLC-FLD

Προκειμένου να είναι δυνατή η ανίχνευσή των τοξινών με φθορισμομετρικό ανιχνευτή στη διάταξη της HPLC, έγινε εστεροποίηση με 200 μl φθορίζοντος αντιδραστηρίου 9-ανθρυλοδιαζωμεθανίου (ADAM 0.2% w/v). Το μίγμα αναδεύτηκε σε vortex για 2 min και στη συνέχεια αφέθηκε στο σκοτάδι στους 35°C για να επιτευχθεί η εστεροποίηση. Μετά το πέρας 1 h, το διάλυμα εξατμίστηκε μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου.

4.6.5 Εκχύλιση Στερεάς Φάσης για HPLC-FLD

Το ξηρό υπόλειμμα μεταφέρθηκε ποσοτικά σε στήλες εκχύλισης στερεάς φάσης, με χρήση 2 ml μείγματος εξανίου / χλωροφορμίου (50:50 v/v), οι οποίες προηγουμένως είχαν ενεργοποιηθεί με την διέλευση 3 ml του μείγματος n-εξανίου:χλωροφορμίου (1:1 v/v) και με 6 ml χλωροφορμίου. Ακολούθησε έκπλυση των στηλών με διαδοχική διέλευση 3 ml διαλύματος n-εξανίου / χλωροφορμίου (1:1 v/v) και 5ml διαλύματος χλωροφορμίου. Η παραλαβή του δείγματος έγινε με 5 ml μείγματος χλωροφορμίου / μεθανόλης (95:5 v/v). Η έκλυση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της βαρύτητας με ροή περίπου 1 ml/min. Τα εκχυλίσματα υποβλήθηκαν σε ξήρανση υπό ήπια ροή αζώτου και επαναδιαλύθηκαν σε 0.2 ml μεθανόλης.

4.6.6 Υδρόλυση των εστεροποιημένων μορφών των DSP τοξινών για LC-MS/MS

Η παραλαβή των εστεροποιημένων μορφών των DSP τοξινών πραγματοποιήθηκε με υδρόλυση. Η υδρόλυση έγινε σύμφωνα με την μέθοδο των Vale and Sampayo (2002). Σε 1 ml μεθανολικού εκχυλίσματος, προστέθηκαν 400 µl μεθανολικού διαλύματος 1M NaOH και αφέθηκε στο σκοτάδι στους 35°C, για 40 min. Έπειτα, το διάλυμα εξουδετερώθηκε με 415 µl 1 M HCl. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε έκπλυση με εξάνιο, εκχύλιση με χλωροφόρμιο, ξήρανση με ρεύμα αζώτου και τέλος επαναδιάλυση και ανάλυση με LC-MS/MS (όπως την μέθοδο εκχύλιση τοξινών 4.6.3).

4.6.7 Ανάλυση HPLC-FLD

Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός των παραγωγοποιημένων τοξινών έγινε σε σύστημα ισοκρατικής έκλουσης. Η κινητή φάση αποτελείτο από μείγμα ακετονιτριλίου:νερού (80:20 v/v) και ο ρυθμός ροής ήταν 1 ml/min. Η στατική φάση περιελάμβανε στήλη αντίστροφης φάσης, θερμοστατούμενες σε θάλαμο θερμοκρασίας 35°C. Ο όγκος έγχυσης ήταν 20 µl και η ανίχνευση του OA και της DTX-1 γινόταν σε μήκη κύματος διέγερσης 365 nm και εκπομπής 415 nm. Στον Πίνακα 15 συνοψίζονται οι συνθήκες της χρωματογραφικής ανάλυσης.

Πίνακας 15. Συνθήκες χρωματογραφικής ανάλυσης (HPLC-FLD).

Στήλη	Lichrospher 100 C18 (5µm)
Loop	20 µl
Κινητή Φάση	ακετονιτρίλιο / νερό (80:20)
Ταχύτητα Ροής	1 ml/min
Ανιχνευτής	FLD (365nm διέγερση / 415nm απορρόφηση)

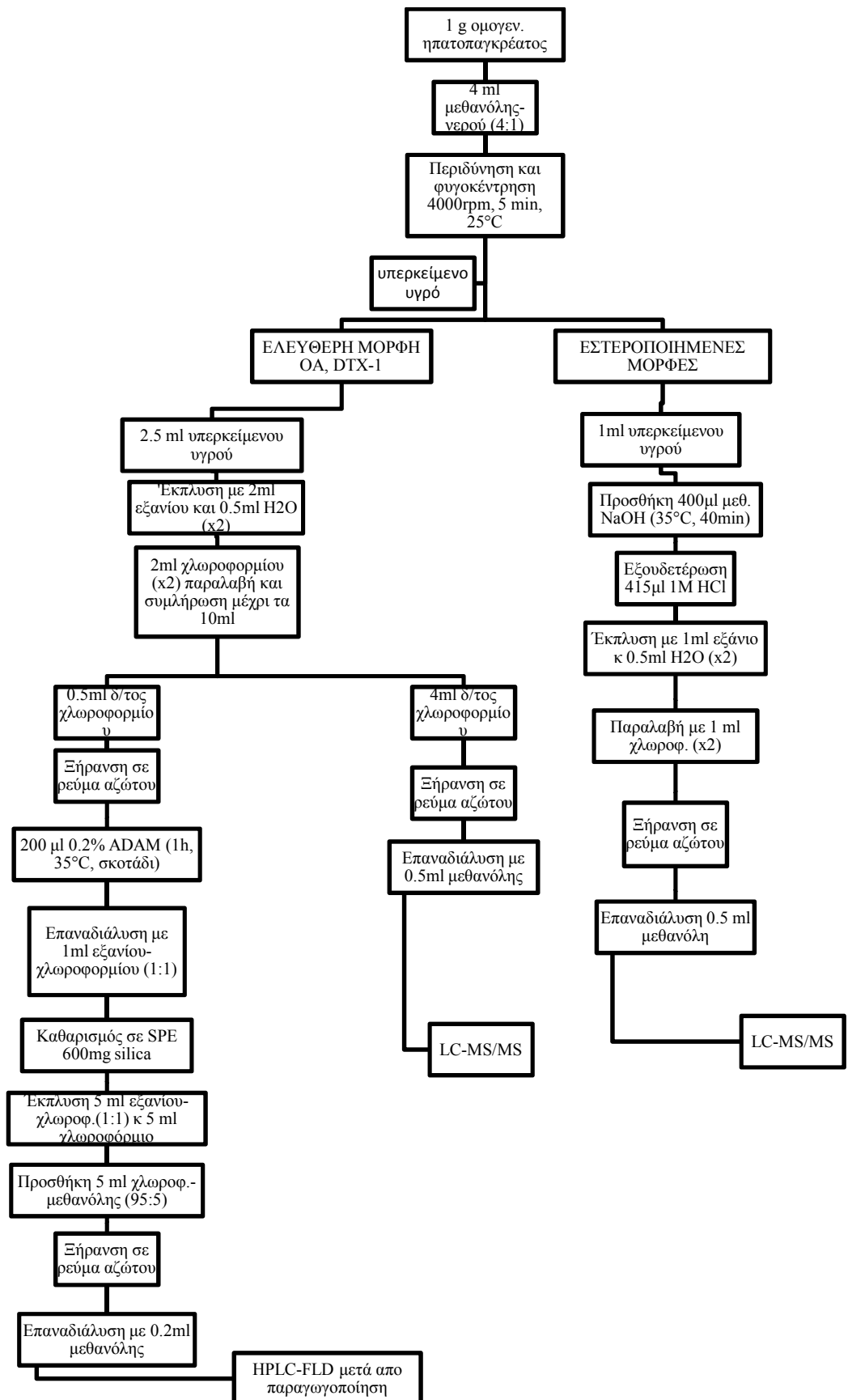
Η ποσοτικοποίηση της DTX-1 στα δείγματα έγινε χρησιμοποιώντας την καμπύλη αναφοράς του OA, λόγω έλλειψης πιστοποιημένου προτύπου DTX-1, θεωρώντας ότι οι

δύο ουσίες έχουν ίσες σχετικές μοριακές αποκρίσεις. Η υπόθεση αυτή κρίθηκε ασφαλής δεδομένου ότι εφαρμόστηκε ισοκρατική έκλουση και ο φθορισμός του εστέρα προέρχεται μόνο από τη φθορίζουσα ομάδα του αντιδραστηρίου εστεροποίησης, η οποία είναι κοινή και στις δύο περιπτώσεις (Quilliam, 1997).

4.6.8 Ανάλυση LC-MS/MS

Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός των τοξινών έγινε σε πρόγραμμα έκλουσης διαλυτών. Η κινητή φάση Α αποτελείτο από 95% υδατικό ακετονιτρίλιο και η κινητή φάση Β αποτελείτο από νερό, και τα δύο περιείχαν όμως 2 mM μυρμηκικό αμμώνιο και 50 mM μυρμηκικό οξύ για διευκόλυνση του ιονισμού. Από 40% η κινητή φάση Α αυξήθηκε στο 95% στα 3 λεπτά, παρέμεινε για 7 λεπτά και επέστρεψε στο 40% σε 2 λεπτά. Ο ρυθμός ροής ήταν 0.6 ml/min. Η στατική φάση περιελάμβανε στήλη (Eclipse XDB-C18, 4.6mm x 150mm, 5μm), θερμοστατούμενη σε θάλαμο θερμοκρασίας 30°C. Ο όγκος έγχυσης ήταν 20 μl. Οι συνθήκες ανάλυσης ήταν οι εξής:

1. Electrospray capillary 4kV
2. Nebulizer 50 psi
3. Dry gas 10 l/min
4. Dry temperature 350°C



Σχήμα 18. Πειραματική πορεία προσδιορισμού ελεύθερων και εστεροποιημένων μορφών DSP-τοξινών με HPLC-FLD και LC-MS/MS.

4.6.9 Βιολογική Δοκιμή (MBA)- Β' Μέρος

Από κάθε δείγμα ζυγίστηκαν 100 g ολικού ιστού σε περιέκτη φυγοκέντρου από πολυπροπυλένιο των 500 ml. Στη συνέχεια, στο δείγμα προστέθηκαν 300 ml ακετόνης, αναμίχθηκε σε αναμίκτη τύπου Ultraturrax για 2 λεπτά σε υψηλή ταχύτητα και παραλήφθηκε η υγρή φάση με φυγοκέντρωση στις 3000 σ.α.λ. για 10 min. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε ακόμα μία φορά, με την προσθήκη 200 ml ακετόνης, οπότε προέκυψαν συνολικά 500 ml ακετονικού εκχυλίσματος τα οποία συγκεντρώθηκαν σε σφαιρική φιάλη όγκου 1lt. Ακολούθησε εξάτμιση της ακετόνης σε περιστροφικό εξατμιστήρα μέχρι να παραμείνει στη φιάλη μόνο η υδατική φάση του εκχυλίσματος (όγκος περίπου 50-70 ml). Ο όγκος του εναπομείναντος εκχυλίσματος ρυθμίστηκε στα 100 ml με απεσταγμένο νερό και ακολούθησε μεταφορά σε διαχωριστική χοάνη και κατανομή υγρού-υγρού με 100 ml διαιθυλαιθέρα. Μετά από ανακίνηση το εναιώρημα αφέθηκε σε ηρεμία ώστε να διαχωριστεί η διαιθυλαιθερική από την υδατική φάση. Η πρώτη συλλέχθηκε σε κενή φιάλη ενώ η διαδικασία επαναλήφθηκε άλλες δύο φορές με προσθήκη 100 ml διαιθυλαιθέρα στην υδατική φάση ώστε να προκύψουν συνολικά 300 ml διαιθυλαιθερικού εκχυλίσματος. Η υδατική φάση απορρίφθηκε, ενώ η διαιθυλαιθερική φάση εκπλύθηκε 2 φορές με 20 ml απιονισμένου νερού ώστε να απομακρυνθούν όλα τα υπολείμματα υδατικής φάσης. Το συνολικό οργανικό εκχύλισμα μεταφέρθηκε σε σφαιρική φιάλη όγκου 500 ml και εξατμίστηκε μέχρι ξηρού. Ακολούθησε επαναιώρηση του στερεού υπολείμματος σε 4 ml διαλύματος Tween-60 1%, ώστε να παραληφθούν όλες οι λιποδιαλυτές ουσίες του στερεού υπολείμματος (1 ml Tween αντιστοιχεί σε 25 g ολικού ιστού). Στη συνέχεια, έγινε ένεση 1 ml του εναιωρήματος ενδοπεριτοναϊκώς σε καθένα από τρία ποντίκια και αξιολογήθηκε η αντίδραση των πειραματοζώων μετά την παρέλευση 30 λεπτών από την ένεση. Το αποτέλεσμα κρίνεται θετικό ως προς την παρουσία μίας ή περισσότερων τοξινών από τις παρακάτω ομάδες: OA, DTXs και PTXs σε επίπεδα ανώτερα από αυτά που καθορίζονται στον Κανονισμό (ΕΚ) 853/2004, σε περίπτωση θανάτου 2 εκ των 3 ποντικών σε χρονικό διάστημα μέχρι τις 24 ώρες μετά την ενδοπεριτοναϊκή ένεση, σύμφωνα με τα κριτήρια του Κανονισμού 2074/2005 της Επιτροπής.

4.6.10 Δοκιμή του θειοβαρβιτουρικού οξέος

Με τη δοκιμή του θειοβαρβιτουρικού οξέος ανιχνεύεται το δευτερογενές προϊόν της οξείδωσης (μηλονική διαλδεύδη). Η δοκιμή αυτή στηρίζεται στο σχηματισμό ροζ χρώματος, προϊόντος συμπύκνωσης, προερχόμενου από δύο μόρια θειοβαρβιτουρικού οξέος και ενός μορίου μηλονικής διαλδεύδης. Για τον προσδιορισμό του θειοβαρβιτουρικού οξέος χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του Pearson (1991).

10g ομογενοποιημένου μυδιού τοποθετήθηκαν σε σφαιρική φιάλη και προστέθηκαν 2.5ml HCl 4N, 97.5ml H₂O, μία σταγόνα silicone αντιαφριστικού αντιδραστηρίου, 1.5ml BHT και τέλος 2-3 πέτρες βρασμού. Μετά από απόσταξη του δείγματος συλλέχθηκαν τα πρώτα 50 ml του αποστάγματος. Από αυτά 5ml μεταφέρθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα και προστέθηκαν 0.6ml BHT και 5 ml TBA 0.0021M. Ο δοκιμαστικός σωλήνας τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 90 °C για 40 min για την ανάπτυξη του ροζ χρώματος. Ακολουθήθηκε ψύξη και μέτρηση της απορρόφησης. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης εκφράστηκαν σε mg μηλονικής διαλδεύδης / kg.

Χρησιμοποιήθηκε ο τύπος : $7.8 \times \text{Abs} = \text{mg μηλονικής διαλδεύδης} / \text{kg}$

4.6.11 Οργανοληπτική αξιολόγηση

Με την οργανοληπτική εξέταση αξιολογήθηκε η εμφάνιση, η δομή και η οσμή οξονισμένων μυδιών. Η οργανοληπτική αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε από 5 έμπειρους δοκιμαστές. Τα οξονισμένα δείγματα μυδιών καθώς και τα φρέσκα κατεψυγμένα μύδια (μάρτυρες) αποψύχθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C). Στη συνέχεια σεβριρίστηκαν στους 5 δοκιμαστές. Όλα τα δείγματα ήταν αποθηκευμένα στους -20°C. Για την αξιολόγηση χρησιμοποιήθηκε ηδονική κλίμακα αποδοχής από 1-10 όπου 10: δεν παρατηρήθηκε καμία αλλοίωση στο μύδι, δείγμα παρόμοιο με το μάρτυρα (μέγιστη αποδοχή), 5: όριο αποδοχής και κάτω από 5: δείγμα αλλοιωμένο, μη αποδεκτό (Chang et al., 1998).

5.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1 Α' ΜΕΡΟΣ

5.1.1 Βιολογική Δοκιμή (MBA)

Η παρούσα μελέτη επικεντρώνεται στον ποσοτικό προσδιορισμό του ΟΑ, της DTX-1 και των εστέρων αυτών των ενώσεων στον ελλαδικό χώρο. Τα αποτελέσματα για την βιολογική δοκιμή φαίνονται στον Πίνακα 18. Από τα 103 δείγματα που αναλύθηκαν βρέθηκαν θετικά τα 89 ενώ τα υπόλοιπα 14 αρνητικά στις DSP τοξίνες.

Πίνακας 18. Αποτελέσματα συγκεντρώσεων ΟΑ και εστέρων του με HPLC-FLD, LC-MS/MS και αποτελέσματα MBA.

Α/Α	Περιοχή Δειγματολ.	Ημερομην. Δειγματολ.	MBA	HPLC-FLD	LC-MS/MS			
				ΟΑ µg/g HP	ΟΑ µg/g HP	µg Esters ΟΑ /g HP	% esters over total ΟΑ	Total ΟΑ µg/g HP
1	Θεσ/νικη	10/1/2007	Θετ.(+++)	16.00	16.40	5.60	25.45	22.00
2	Θεσ/νικη	10/1/2007	Θετ.(+++)	44.00	44.00	ND	0.00	44.00
3	Θεσ/νικη	10/1/2007	Θετ.(+++)	56.80	57.60	ND	0.00	57.60
4	Θεσ/νικη	22/1/2007	Θετ.(+++)	41.13	41.00	24.40	16.55	65.40
5	Θεσ/νικη	25/1/2007	Θετ.(+-+)	30.00	30.27	19.60	17.75	49.87
6	Θεσ/νικη	25/1/2007	Θετ.(+++)	24.70	24.53	11.60	13.62	36.13
7	Θεσ/νικη	1/2/2007	Θετ.(++-)	36.87	36.67	11.40	9.39	48.07
8	Θεσ/νικη	9/2/2007	Θετ.(+++)	23.80	24.20	ND	0.00	24.20
9	Θεσ/νικη	13/2/2007	Θετ.(++-)	18.20	18.20	ND	0.00	18.20
10	Θεσ/νικη	15/3/2007	Θετ.(+++)	31.53	31.87	13.60	12.45	45.47
11	Θεσ/νικη	20/3/2007	Θετ.(-++)	3.40	3.20	3.60	52.94	6.80
12	Θεσ/νικη	27/3/2007	Θετ.(+++)	20.00	19.60	3.80	16.24	23.40
13	Θεσ/νικη	27/3/2007	Θετ.(+++)	8.60	9.00	ND	0.00	9.00
14	Θεσ/νικη	10/4/2007	Θετ.(++-)	14.80	14.40	0.60	3.00	20.00
15	Θεσ/νικη	11/4/2007	Θετ.(-++)	11.60	11.00	ND	0.00	11.00
16	Θεσ/νικη	12/4/2007	Θετ.(+++)	27.60	27.00	12.6	31.82	39.60

17	Θεσ/νικη	17/4/2007	Θετ.(-++)	24.00	25.00	5.80	18.83	30.80
18	Θεσ/νικη	17/4/2007	Θετ.(+++)	5.20	5.40	5.00	48.08	10.40
19	Θεσ/νικη	17/4/2007	Θετ.(+-+)	14.00	14.20	5.80	29.00	20.00
20	Θεσ/νικη	17/4/2007	Θετ.(+++)	12.00	11.00	ND	0.00	11.00
21	Θεσ/νικη	21/8/2007	Θετ.(+++)	27.20	27.60	ND	0.00	27.60
22	Θεσ/νικη	27/8/2007	Θετ.(++-)	29.20	29.26	ND	0.00	29.26
23	Θεσ/νικη	18/9/2007	Θετ.(+++)	6.00	6.20	ND	0.00	6.20
24	Θεσ/νικη	25/9/2007	Θετ.(+++)	62.67	62.07	ND	0.00	62.07
25	Θεσ/νικη	2/10/2007	Θετ.(+++)	13.00	13.40	ND	0.00	13.40
26	Πιερία	3/1/2007	Θετ.(+-+)	9.80	10.20	3.00	22.73	13.20
27	Πιερία	3/1/2007	Θετ.(+++)	35.20	35.00	9.20	20.81	44.20
28	Πιερία	15/1/2007	Θετ.(+++)	26.00	25.20	ND	0.00	25.20
29	Πιερία	15/1/2007	Θετ.(+++)	15.60	15.20	26.60	63.64	41.80
30	Πιερία	15/1/2007	Θετ.(+++)	26.20	25.80	17.40	40.28	43.20
31	Πιερία	15/1/2007	Θετ.(+++)	51.33	50.07	17.80	10.60	67.87
32	Πιερία	15/1/2007	Θετ.(+++)	48.67	48.87	9.40	6.03	58.27
33	Πιερία	15/1/2007	Αρνητικό	ND	ND	ND	N/A	ND
34	Πιερία	24/1/2007	Θετ.(+++)	54.00	53.87	11.40	6.59	65.27
35	Πιερία	24/1/2007	Θετ.(+++)	50.00	49.20	12.40	7.75	61.60
36	Πιερία	24/1/2007	Θετ.(+++)	57.33	57.47	12.80	6.91	70.27
37	Πιερία	24/1/2007	Θετ.(+++)	12.20	11.60	3.80	24.68	15.40

38	Πιερία	24/1/2007	Θετ.(+++)	77.60	78.20	9.60	10.93	87.80
39	Πιερία	29/1/2007	Θετ.(+++)	33.33	34.00	11.80	10.37	35.80
40	Πιερία	29/1/2007	Θετ.(+++)	24.20	23.20	4.20	15.33	27.40
41	Πιερία	29/1/2007	Θετ.(+-+)	13.20	14.00	2.00	12.50	16.00
42	Πιερία	29/1/2007	Θετ.(+++)	20.60	20.40	8.80	30.14	29.20
43	Πιερία	29/1/2007	Αρνητικό	ND	ND	ND	N/A	ND
44	Πιερία	5/2/2007	Αρνητικό	ND	ND	ND	N/A	ND
45	Πιερία	5/2/2007	Θετ.(+++)	26.00	24.40	2.60	9.63	27.00
46	Πιερία	5/2/2007	Θετ.(+++)	8.00	8.40	0.20	2.33	8.60
47	Πιερία	5/2/2007	Θετ.(-++)	6.60	7.00	3.00	30.00	10.00
48	Πιερία	20/2/2007	Θετ.(-++)	3.80	4.40	ND	0.00	4.40
49	Πιερία	19/3/2007	Θετ.(-++)	10.80	11.20	5.80	34.12	17.00
50	Πιερία	26/3/2007	Θετ.(+++)	10.80	10.60	ND	0.00	10.60
51	Πιερία	2/4/2007	Θετ.(+++)	10.20	10.20	14.20	58.20	24.40
52	Πιερία	2/4/2007	Θετ.(+++)	8.40	8.40	1.20	12.50	9.60
53	Πιερία	17/4/2007	Θετ.(+-+)	3.80	4.20	2.40	34.29	7.00
54	Πιερία	17/4/2007	Θετ.(+++)	10.80	10.60	ND	0.00	10.60
55	Ημαθία	5/3/2007	Αρν.(+--)	ND	ND	ND	N/A	ND
56	Ημαθία	12/3/2007	Θετ.(+++)	9.00	8.80	3.80	30.16	12.60
57	Ημαθία	12/3/2007	Θετ.(+++)	50.00	49.20	8.00	13.39	57.20
58	Ημαθία	12/3/2007	Θετ.(+++)	28.00	27.00	ND	0.00	27.00

59	Ημαθία	19/3/2007	Θετ.(+++)	8.00	7.20	ND	0.00	7.20
60	Ημαθία	19/3/2007	Θετ.(+++)	7.00	6.60	ND	0.00	6.60
61	Ημαθία	19/3/2007	Θετ.(+++)	40.00	38.80	22.20	36.69	61.00
62	Ημαθία	27/3/2007	Θετ.(+++)	52.00	50.20	17.80	26.18	68.00
63	Ημαθία	27/3/2007	Θετ.(+++)	25.60	25.00	1.60	6.02	26.60
64	Ημαθία	27/3/2007	Θετ.(+++)	17.00	16.60	9.60	36.64	26.20
65	Ημαθία	2/4/2007	Θετ.(+++)	25.80	26.40	12.60	32.31	39.00
66	Ημαθία	2/4/2007	Θετ.(+++)	17.20	17.80	6.00	25.21	23.80
67	Ημαθία	2/4/2007	Θετ.(+++)	17.60	17.80	1.60	8.25	19.40
68	Ημαθία	11/4/2007	Θετ.(+++)	38.00	36.60	16.00	30.42	52.60
69	Ημαθία	11/4/2007	Θετ.(+++)	6.60	5.80	ND	0.00	5.80
70	Ημαθία	11/4/2007	Θετ.(+++)	12.00	11.40	4.00	25.97	15.40
71	Ημαθία	17/4/2007	Θετ.(+++)	6.00	6.20	ND	0.00	6.20
72	Ημαθία	17/4/2007	Θετ.(+++)	13.40	13.00	7.80	37.50	20.80
73	Ημαθία	17/4/2007	Θετ.(+++)	37.20	34.00	3.40	9.09	37.40
74	Ημαθία	26/4/2007	Θετ.(+++)	4.20	4.00	3.20	44.44	7.20
75	Ημαθία	14/5/2007	Θετ.(+-)	1.20	1.60	ND	0.00	1.60
76	Φθιώτιδα	24/7/2007	Θετ.(++-)	12.80	12.40	4.20	25.30	16.60
77	Φθιώτιδα	1/8/2007	Θετ.(+++)	22.00	21.60	0.80	3.57	22.40
78	Φθιώτιδα	14/8/2007	Θετ.(+++)	12.40	13.00	ND	0.00	13.00
79	Μέγαρα	16/1/2007	Θετ.(+++)	14.00	16.00	27.80	63.47	43.80

80	Μέγαρα	13/2/2007	Θετ.(+++)	46.60	46.40	34.40	48.59	70.80
81	Μέγαρα	27/2/2007	Θετ.(+++)	53.80	52.20	1.40	2.61	53.60
82	Αγορά	17/4/2007	Θετ.(+++)	9.20	8.80	3.40	27.87	12.20
83	Αγορά	9/3/2007	Αρν.(--+)	ND	ND	ND	N/A	ND
84	Αγορά	9/3/2007	Θετ.(+++)	10.00	9.60	5.80	37.66	15.40
85	Αγορά	13/3/2007	Θετ.(+++)	7.60	7.20	3.40	32.08	10.60
86	Αγορά	13/3/2007	Θετ.(+--)	ND	ND	ND	N/A	ND
87	Αγορά	13/3/2007	Θετ.(+-+)	12.80	12.40	5.80	31.87	18.20
88	Φθιώτιδα	13/3/2006	Αρνητικό	ND	ND	ND	N/A	ND
89	Φθιώτιδα	1/6/2006	Αρνητικό	0.40	0.60	ND	0.00	0.60
90	Φθιώτιδα	2/6/2006	Αρν.(+--)	0.50	0.60	ND	0.00	0.60
91	Φθιώτιδα	2/6/2006	Θετ.(-++)	ND	ND	ND	N/A	ND
92	Φθιώτιδα	2/6/2006	Αρνητικό	ND	ND	ND	N/A	ND
93	Φθιώτιδα	6/6/2006	Θετ.(+-+)	0.90	1.00	ND	0.00	1.00
94	Φθιώτιδα	6/6/2006	Αρνητικό	ND	ND	ND	N/A	ND
95	Φθιώτιδα	27/6/2006	Αρνητικό	ND	ND	ND	N/A	ND
96	Φθιώτιδα	27/6/2006	Θετ.(++-)	6.60	7.00	ND	0.00	7.00
97	Φθιώτιδα	27/6/2006	Θετ.(++-)	ND	ND	ND	N/A	ND
98	Φθιώτιδα	13/9/2006	Αρν.(+--)	ND	ND	ND	N/A	ND
99	Φθιώτιδα	19/9/2006	Αρν.(+--)	ND	ND	ND	N/A	ND
100	Φθιώτιδα	21/9/2006	Θετ.(++-)	ND	ND	ND	N/A	ND

101	Μέγαρα	31/10/2006	Θετ.(+++)	23.60	23.40	2.80	10.69	26.20
102	Μέγαρα	14/12/2006	Θετ.(+++)	28.60	28.60	2.80	8.92	31.40
103	Μέγαρα	28/12/2006	Θετ.(+++)	24.40	24.00	ND	0.00	24.00

ND: not detected (μη ανιχνεύσιμη συγκέντρωση)

+ Θάνατος ποντικού

-Ζωντανό ποντίκι

Οι Mouratidou et al., 2004 προσδιόρισαν OA στα μύδια του Θερμαϊκού Κόλπου κατά την διάρκεια τοξικού επεισοδίου (4 μήνες) το 2002 στην Ελλάδα. Τα δείγματα αναλύθηκαν με HPLC με φθορισμομετρικό ανιχνευτή με ELISA και με βιολογική δοκιμή. Για την MBA ακολουθήθηκε η μέθοδος Yasumoto et al., 1978. Όταν εγχύθηκαν 2 µg OA από πρότυπο διάλυμα σε ποντίκι δεν παρατηρήθηκε κανένα σύμπτωμα ενώ σε ποσότητα ≥ 3 µg OA το 50% των ποντικών πέθαναν μέσα σε 4 ώρες. Υπήρξε πολύ καλή συμφωνία (91%) μεταξύ των αποτελεσμάτων της HPLC και της MBA. Στην Ιταλία χρησιμοποίησαν την HPLC-FLD με προστήλη για παραγωγοποίηση της τοξίνης με ADAM, την MBA και την ELISA. Στην MBA τα ποντίκια πέθαναν μεταξύ 1 1/2 ώρας και 24 ωρών. Οι συγκεντρώσεις του OA που υπολογίστηκαν με βάση την HPLC-FLD ήταν από 0.15 µg/g OA έως 1.37 µg/g OA ηπατοπαγκρέατος (Draisci et al., 1998). Οι Croci et al., 2001 προσδιόρισαν DSP τοξίνες με την MBA. Μελέτησαν 15 δείγματα και παρατήρησαν το χρόνο θανάτωσης των ποντικών. Τα δείγματα ήταν μύδια *Mytillus galloprovincialis* και συλλέχτηκαν από την Αδριατική θάλασσα μετά από τοξικό επεισόδιο. Τα ποντίκια πέθαναν από 45 λεπτά μέχρι πάνω από 24 ώρες. Η πλειοψηφία των ποντικών πέθαναν μέσα σε 6.3 ώρες. Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε ήταν η επίσημη μέθοδος αναφοράς (MBA).

Οι Chapela et al., 2008, μελέτησαν την παρουσία λιπόφιλων τοξινών με LC-MS/MS σε φρέσκα, κατεψυγμένα και επεξεργασμένα μύδια και σύγκριναν τα αποτελέσματα με αυτά της MBA. Η συσχέτιση της LC-MS/MS με την επίσημη μέθοδο ήταν 69% ενώ 26% των δειγμάτων σύμφωνα με την MBA απεδείχτηκαν «ψευδώς θετικά». Δείγματα «ψευδώς αρνητικά» δεν παρατηρήθηκαν.

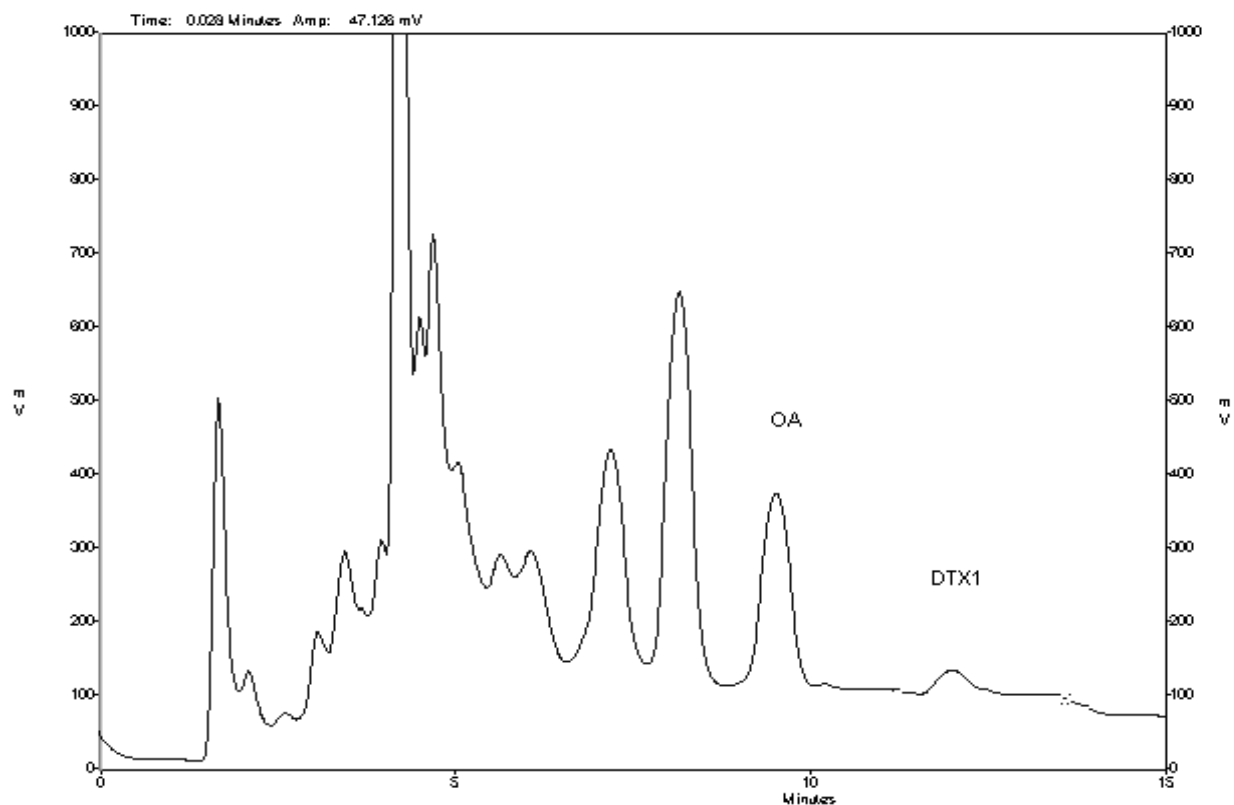
Επίσης, οι Gucci et al., 1994 χρησιμοποίησαν 4 μεθόδους (HPLC, ELISA, MBA και βιοδοκιμή επίμυων) για τον προσδιορισμό OA και DTX-1. Όσον αφορά την MBA

στην πλειοψηφία των δειγμάτων τα ποντίκια πέθαναν σε μία ώρα μετά την ένεση του εκχυλίσματος ενώ για ορισμένα δείγματα τα ποντίκια πέθαναν σε διάστημα 1-3 ώρες. Η μέθοδος που ακολουθήθηκε για την MBA ήταν του Yasumoto et al., 1984. Οι τιμές που προσδιορίστηκαν με την HPLC ήταν από μη ανιχνεύσιμες έως 0.56 $\mu\text{g OA/g HΠ}$.

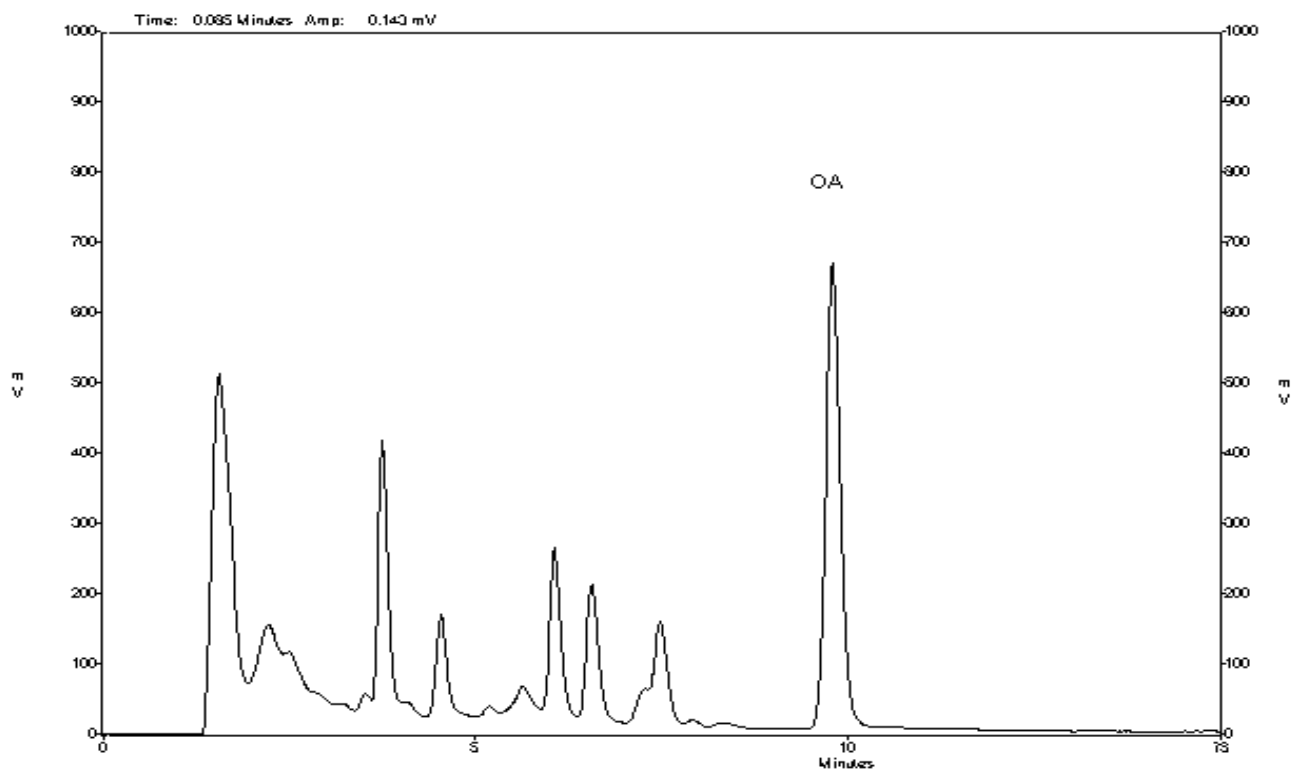
5.1.2 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης με φθορισμομετρικό ανιχνευτή (HPLC-FLD)

Ο χρόνος κατακράτησης για το OA ήταν 9.80 ± 0.01 min και για την DTX-1 11.80 ± 0.01 min. Τυπικά χρωματογραφήματα από πρότυπο ιστό μυδιού και δείγμα (Θεσσαλονίκη) φαίνονται στα Σχήματα 19 και 20, αντίστοιχα. Η αποφυγή παρεμποδίσεων στους χρόνους κατακράτησης των παραπάνω ενώσεων επιτεύχθηκε με τον καθαρισμό των δειγμάτων με εκχύλιση στερεάς φάσης (Gonzalez et al., 1998).

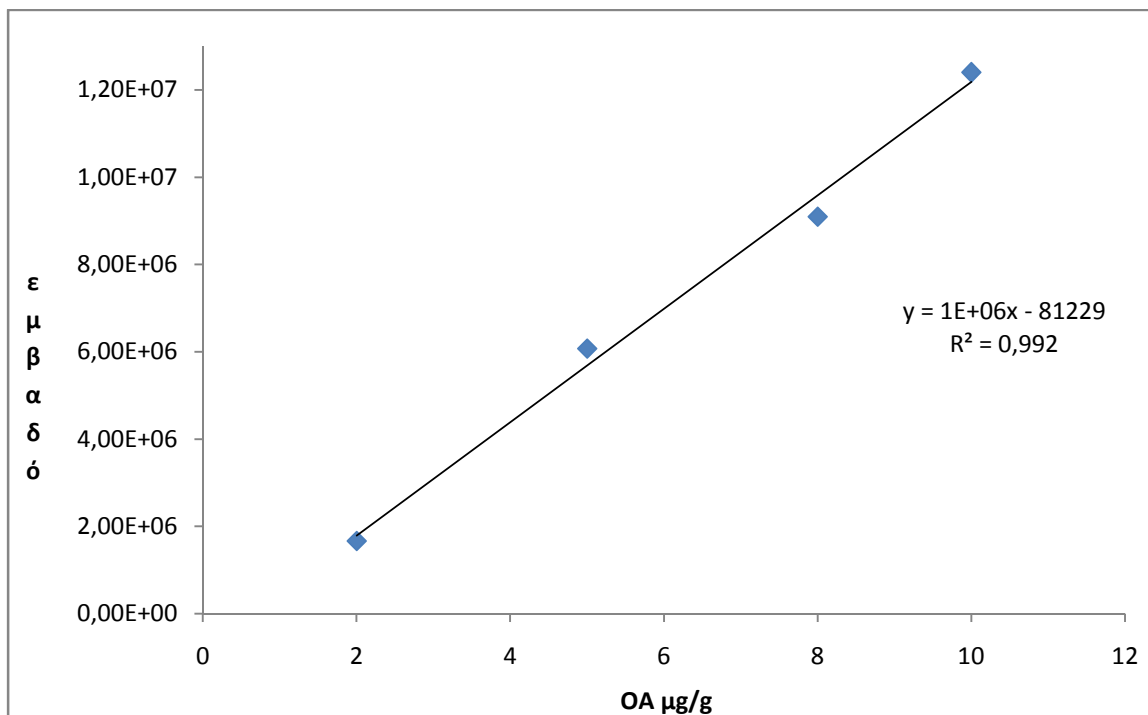
Η πρότυπη καμπύλη για το OA κατασκευάστηκε σε συγκεντρώσεις OA 2-10 $\mu\text{g/g}$ (Σχήμα 21). Από ότι φαίνεται και στο σχήμα η πρότυπη καμπύλη του OA εμφανίζει εξαιρετική γραμμικότητα ($R^2=0.9928$). Για τον προσδιορισμό της συνολικής ανάκτησης της μεθόδου με παραγωγοποίηση, χρησιμοποιήθηκε πιστοποιημένο υλικό αναφοράς, πρότυπος ιστός μυδιού (NRC CRM-DSP-Mus-b) με συγκέντρωση OA 10.1 $\mu\text{g/g}$ και DTX-1 1.3 $\mu\text{g/g}$. Το ομογενοποιημένο δείγμα του CRM αναλύθηκε τρεις φορές. Η ανάκτηση για το OA ήταν 97% και για την DTX-1 (η συγκέντρωση της DTX-1 προσδιορίστηκε με βάση την πρότυπη καμπύλη του OA, γνωρίζοντας ότι οι μοριακές αποκρίσεις των δύο τοξινών είναι ίσες) 92%. Όσον αφορά στο OA, η ανάκτηση της μεθόδου βρίσκεται εντός του εύρους του $95 \pm 5\%$ που αναφέρεται από τους Kelly et al., (1996) και εντός του εύρους 91-99% που αναφέρεται από τους Gonzalez et al., (2000).



Σχήμα 19. Χρωματογράφημα HPLC-FLD του πρότυπου ιστού μυδιού στο οποίο φαίνονται οι κορυφές που αντιστοιχούν στο OA και DTX-1.



Σχήμα 20. Χρωματογράφημα HPLC-FLD δείγματος μυδιού από Θεσσαλονίκη στο οποίο φαίνεται η κορυφή που αντιστοιχεί στο OA.



Σχήμα 21. Πρότυπη καμπύλη οκαδαϊκού οξέος με HPLC-FLD.

Το όριο ανίχνευσης (limit of detection, LOD) για το OA υπολογίστηκε σύμφωνα με το κριτήριο IUPAC (σήμα προς θόρυβο 3:1) το οποίο ήταν 0.015 μg/g ηπατοπαγκρέατος (HP). Το όριο ποσοτικοποίησης (limit of quantification, LOQ) για το OA υπολογίστηκε σύμφωνα με το κριτήριο IUPAC (σήμα προς θόρυβο 10:1) το οποίο ήταν 0.050 μg/g HP.

Σύμφωνα με τον Κανονισμό 853/2004 της Ευρωπαϊκής Κοινότητας, το μέγιστο επιτρεπόμενο όριο OA, DTXs, PTXs στα οστρακοειδή (σε ολικό ιστό ή στα ξεχωριστά εδώδιμα μέρη) έχει καθοριστεί στα 160 μg OA eq/kg (ή 800 μg OA eq/kg HP). Τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού της μεθόδου με HPLC, που εφαρμόστηκε στην παρούσα μελέτη, υπερκαλύπτουν το επίπεδο της κανονιστικής απαίτησης της Ευρωπαϊκής Κοινότητας, ακόμη και στην περίπτωση μείωσης του αποδεκτού επιπέδου για το OA και τις DTXs στα 50 μg OA eq/kg, όπως έχει προταθεί από τον Codex Alimentarius (Codex Alimentarius, 2004).

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης με HPLC-FLD, φαίνονται στον Πίνακα 18 (σελίδα 92). Οι συγκεντρώσεις της ελεύθερης μορφής του OA κυμαίνονταν από 0.40 μέχρι 62.67 μg/g HP (88 δείγματα). Επίσης, υπήρχαν δείγματα στα οποία είτε δεν υπήρχε OA είτε οι συγκεντρώσεις της ελεύθερης μορφής του OA ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης

της μεθόδου (0.015 µg/g HP). Η DTX-1 δεν ανιχνεύτηκε σε κανένα από τα δείγματα, ούτε σε ελεύθερη ούτε σε εστεροποιημένη μορφή.

Οι Mouratidou et al., (2004) μελέτησαν την παρουσία OA και DTX-1 σε μύδια που προέρχονταν από τον Θερμαϊκό Κόλπο με HPLC-FLD με αντιδραστήριο παραγωγοποίησης το ADAM (9-ανθρυλοδιαζωμεθάνιο) κατά το τοξικό επεισόδιο 2002. Σε όλα τα δείγματα προσδιορίστηκαν συγκεντρώσεις, μόνο ελεύθερης μορφής OA (μέγιστη συκέντρωση 36.06 µg/g HP), πολύ μεγαλύτερες από το ανώτατο επιτρεπόμενο όριο 0.80 µg/g HP. Βέβαια, η DTX-1 προσδιορίστηκε μόνο σε ένα δείγμα με υψηλή συκέντρωση (0.51 µg/g HP). Τα επίπεδα των παραπάνω συγκεντρώσεων OA ήταν γενικά χαμηλότερα από αυτά που προσδιορίστηκαν στην παρούσα έρευνα.

Σύμφωνα με τους Prassopoulou et al., (2009), οι οποίοι συνέλεξαν μύδια από τις περιοχές του Θερμαϊκού και του Σαρωνικού Κόλπου κατά τη διάρκεια του τοξικού επεισοδίου 2006-2007, προσδιορίστηκαν συγκεντρώσεις ελεύθερης μορφής OA 0.122-4.099 µg/g ολικού ιστού δηλαδή 0.61-20.50 µg/g HP με ποσοστό δειγμάτων 98% πάνω το ανώτατο επιτρεπτό όριο. Η ανάλυση έγινε με HPLC-FLD με αντιδραστήριο παραγωγοποίησης το 1-βρωμοακετυλοπυρένιο (BAP). Αυτές οι τιμές ήταν γενικά χαμηλότερες από αυτές που προσδιορίστηκαν στην παρούσα μελέτη (0.40-62.67 µg/g HP). Θα πρέπει να τονιστεί ότι ούτε στη έρευνα των Prassopoulou et al., (2009) δεν προσδιορίστηκε η DTX-1 σε κάποιο από τα δείγματα. Αυτό οφείλεται πιθανότατα σε διαφορές μεταξύ των ειδών *Dinophysis* που αφθονούν σε κάθε περιοχή. Σε τοξικά επεισόδια που σημειώθηκαν στην Πορτογαλία το 1995 και το 1998, όπου ανιχνεύτηκαν κυρίως μη πολικοί εστέρες του OA, το *D.acuta* ήταν το κυρίαρχο είδος (Vale & Sampayo, 1999) ενώ ως κυρίαρχο είδος στο Θερμαϊκό Κόλπο, έχει αναγνωριστεί το *Dinophysis cf. acuminata* (Koukaras & Nikolaidis, 2004).

Οι Mak et al., 2005 μελέτησαν το OA, τον κύριο εκπρόσωπο των διαρροϊκών βιοτοξινών με HPLC σε δείγματα πράσινων μυδιών (*Perna viridis*). Τα δείγματα προέρχονταν από 7 διαφορετικές ζώνες αλιείας του Χονγκ-Κογκ. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη μιας πρωτεΐνης (πρωτεΐνη K) για χώνεψη του δείγματος. Τα αποτελέσματα έδειξαν αύξηση της ανάκτησης 2.5 φορές σε σχέση με την ανάκτηση ενοφθαλμισμένων δειγμάτων χωρίς την χρήση του ενζύμου. Η υψηλότερη συκέντρωση του OA που υπολογίστηκε ήταν 1164.9 ng/g HP. Στις διάφορες περιοχές

του Χονγκ-Κογκ προσδιορίστηκαν συγκεντρώσεις OA από 70.0 έως 131.0 ng/g σε ολικό ιστό μυδιού οι οποίες όμως δεν ξεπερνούσαν το διεθνές επιτρεπόμενο όριο (>200 ng/g).

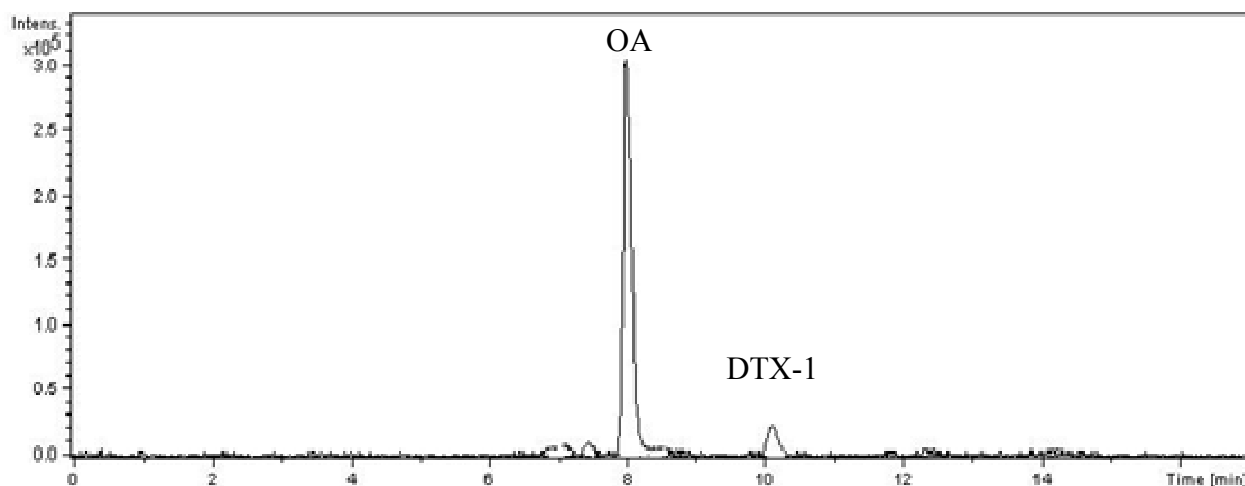
Άλλη έρευνα που πραγματοποιήθηκε το 2003 στην Ισπανία, προσδιόρισε OA και εστεροποιημένες μορφές του OA (DTX-3). Σε αυτήν την εργασία χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της HPLC με φθορισμομετρικό ανιχνευτή. Οι συγκεντρώσεις που υπολογίστηκαν στα μύδια ήταν από 0.18 έως 10.1 µg/g ΗΠ ενώ στο πλαγκτόν (*Dinophysis acuminata*) 11.3 pg/κύτταρο (Morono et al., 2003).

Το 1999 στην Κίνα μελετήθηκε η παρουσία τοξινών σε οστρακοειδή με HPLC και με MBA. Η παραγωγοποίηση της τοξίνης πραγματοποιήθηκε με το αντιδραστήριο 3-βρωμο-μεθυλ-7-μεθοξυλ-1, 4-βενζοξαζιν-2-όνη (BrMB, 3-bromo-methyl-7 methoxy-1, 4-benzoxazin-2-on). Προσδιορίστηκαν τοξίνες PSP και DSP σε σχετικά μικρές συγκεντρώσεις. Οι DSP τοξίνες ήταν περισσότερο ανιχνεύσιμες σε σχέση με τις PSP τοξίνες. PSP τοξίνες προσδιορίστηκαν σε 5 δείγματα από 4 διαφορετικές περιοχές. Η υψηλότερη συγκέντρωση ήταν 320 µg ισοδύναμα STX (Σαξιτοξίνη, STX) /100 ιστού, 4 φορές υψηλότερο από το όριο των 80 µg ισοδύναμα STX/100g. Όσον αφορά τις DSP τοξίνες, προσδιορίστηκαν σε 26 δείγματα (29%) εκ των οποίων τα 6 από αυτά ήταν πάνω από το αποδεκτό όριο. Οι DSP τοξίνες που προσδιορίστηκαν ήταν το OA και η DTX-1 (Zhou et al., 1999).

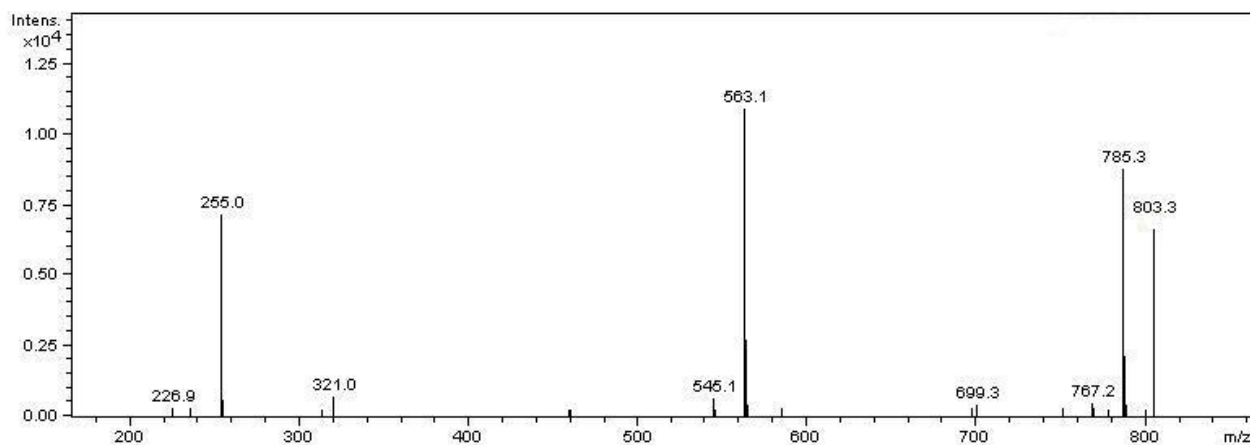
Επιπρόσθετα, οι Ramstad et al., 2001 σύγκριναν την HPLC με την MBA για την ποσοτικοποίηση των διαρροϊκών τοξινών σε μπλε μύδια (*Mytilus edulis*). Για την HPLC χρησιμοποίησαν δύο διαφορετικά αντιδραστήρια παραγωγοποίησης (4-Bromomethyl-7-methoxycoumarin, BrMMC και το ADAM). Η παραγωγοποίηση με ADAM παρατηρήθηκε ότι ήταν πιο ευαίσθητη ενώ η παραγωγοποίηση με BrMMC λιγότερη ευαίσθητη σε σύγκριση και οι δύο με την MBA. Όμως και οι δύο τρόποι παραγωγοποίησης έδειξαν καλή συμφωνία με την MBA. Τέλος, οι ερευνητές προτείνουν την HPLC-FLD με παραγωγοποίηση με ADAM για έλεγχο των DSP τοξινών.

5.1.3 Υγρή Χρωματογραφία – Φασματογραφία μαζών (LC-MS/MS)

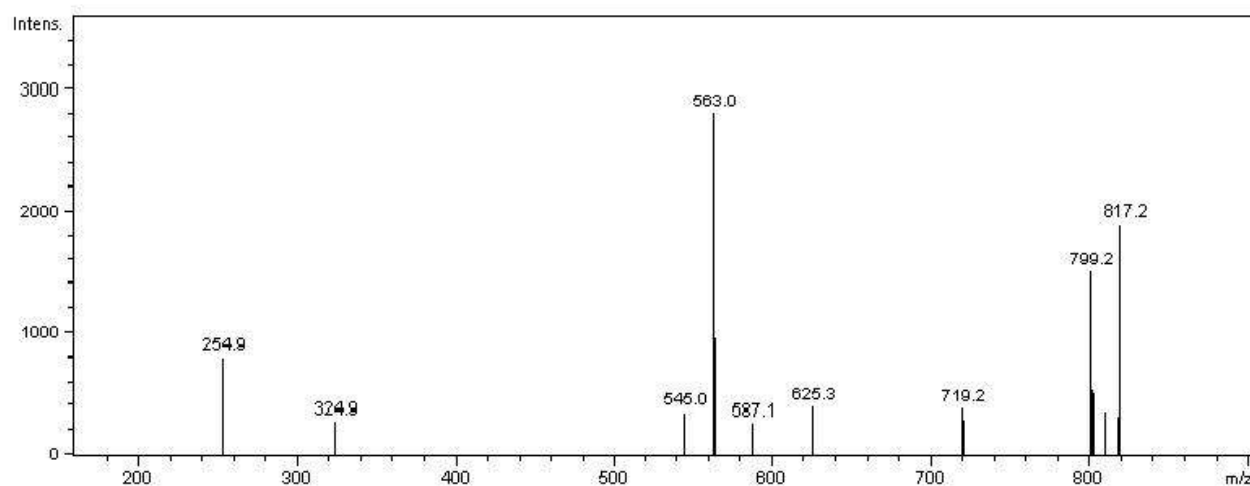
Ο χρόνος κατακράτησης για το OA ήταν 8.00 ± 0.01 min και για την DTX-1 10.10 ± 0.05 min. Τυπικά χρωματογραφήματα από πρότυπο ιστό μυδιού καθώς και η θραυσματοποίηση των μοριακών ιόντων του OA και της DTX-1 φαίνονται στα Σχήματα 22, 23 και 24, αντίστοιχα. Οι τοξίνες αυτές προσδιορίστηκαν με επιλογή συγκεκριμένων ιόντων (selected ion monitoring, SIM), με απώλεια ενός πρωτονίου, όπου το μοριακό ιόν του OA ήταν m/z 803.5 και για την DTX-1 m/z 817.5. Η ανίχνευση βασίστηκε στην περεταίρω θραυσματοποίηση αυτών των μοριακών ιόντων όπου για το OA τα κυριότερα θραύσματα ήταν 254.9, 563.1, 785.2 και για την DTX-1 ήταν 254.9, 563.1 και 799.2. Αυτά τα θραύσματα συμφωνούν με εκείνα της εργασίας των Gerssen et al., (2008) τα οποία ήταν 785.4, 563.3 και 255.1 για το OA.



Σχήμα 22. Χρωματογράφημα MS/MS πρότυπου ιστού μυδιού όπου φαίνονται οι κορυφές που αντιστοιχούν στο OA και DTX-1.

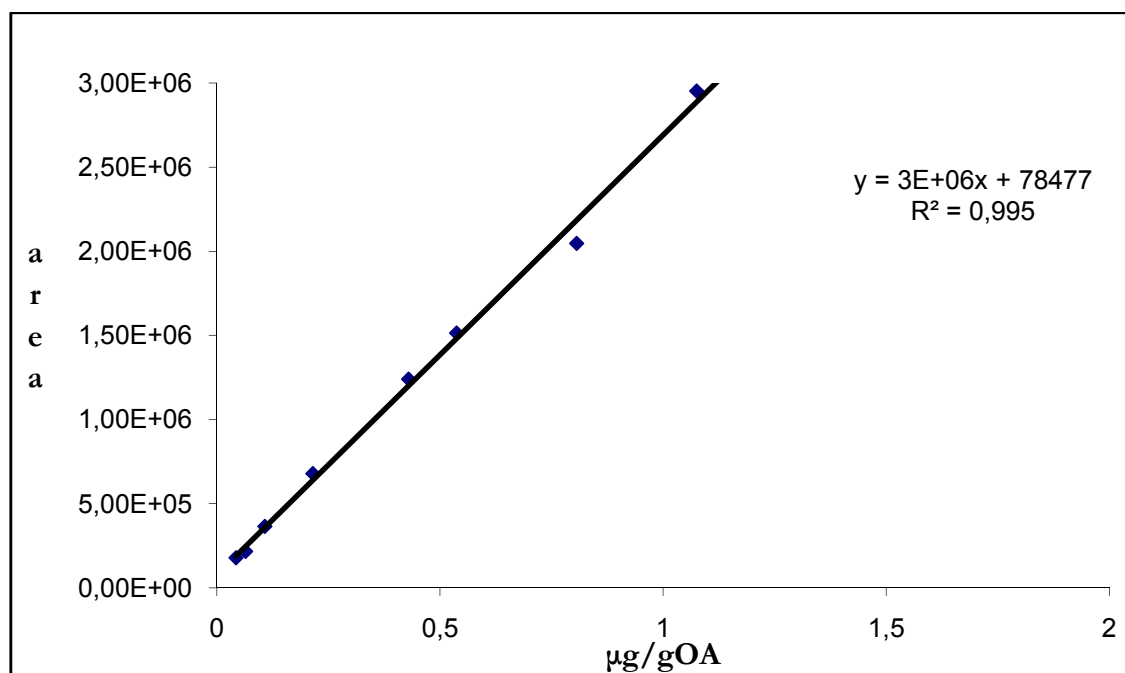


Σχήμα 23. Θραυσματοποίηση MS/MS του OA στα κυρίαρχα ιόντα 785.3, 563.1, 255.0 (m/z 803.5).



Σχήμα 24. Θραυσματοποίηση MS/MS της DTX-1 στα κυρίαρχα ιόντα 799.2, 563.0, 254.9 (m/z 817.5).

Η πρότυπη καμπύλη για το OA κατασκευάστηκε για συγκεντρώσεις OA 0.4-1.07 μg/g (Σχήμα 25). Από ότι φαίνεται και στο σχήμα η πρότυπη καμπύλη του OA εμφανίζει εξαιρετική γραμμικότητα όπως και στη ανάλυση με HPLC-FLD ($R^2=0.9959$). Η ανάκτηση της μεθόδου προσδιορίστηκε όπως και με την ανάλυση με HPLC-FLD η οποία ήταν 96% για το OA και για την DTX-1 92%. Όσον αφορά στο OA, η ανάκτηση της μεθόδου βρίσκεται εντός του εύρους του 98-99% που αναφέρεται από τους Goto et al., (2001) και εντός του ορίου (ca. 100%) που αναφέρεται από τους Suzuki και Yasumoto., (2000).



Σχήμα 25. Πρότυπη καμπύλη οκαδαϊκού οξέος με LC-MS/MS.

Τόσο το όριο ανίχνευσης (LOD) όσο και το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) για το OA υπολογίστηκαν με τα ίδια κριτήρια όπως και με την ανάλυση με HPLC-FLD τα οποία ήταν 0.045 μg/g και 0.135 μg/g HP, αντίστοιχα. Αυτά τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού της μεθόδου LC-MS/MS, που εφαρμόστηκαν στην παρούσα μελέτη, υπερκαλύπτουν το επίπεδο της κανονιστικής απαίτησης της Ευρωπαϊκής Κοινότητας, ακόμη και στην περίπτωση μείωσης του αποδεκτού επιπέδου για το OA και τις DTXs στα 50 μg OA eq/kg, όπως έχει προταθεί από τον Codex Alimentarius (Codex Alimentarius, 2004).

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης με LC-MS/MS, φαίνονται στον Πίνακα 18 (σελίδα 92). Οι συγκεντρώσεις της ελεύθερης μορφής του OA κυμαίνονταν από 0.56 μέχρι 62.07 μg/g HP (88 δείγματα). Επίσης, υπήρχαν δείγματα στα οποία είτε δεν υπήρχε OA είτε οι συγκεντρώσεις της ελεύθερης μορφής του OA ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου (0.045 μg/g HP). Η DTX-1 δεν ανιχνεύτηκε σε κανένα από τα δείγματα, ούτε σε ελεύθερη ούτε σε εστεροποιημένη μορφή. Οι συγκεντρώσεις της εστεροποιημένης μορφής του OA κυμαίνονταν από 0.20 μg/g έως 34.40 μg/g HP και οι συγκεντρώσεις του συνολικού OA (ελεύθερη μορφή και εστεροποιημένη μορφή) από 1.00 μg/g έως 87.80 μg/g HP.

Οι συγκεντρώσεις των εστέρων του ΟΑ που προσδιορίστηκαν στην εργασία των Prassopoulou et al., (2009) σε ελληνικά μύδια με HPLC-FLD κυμαίνονταν από μη ανιχνεύσιμες έως 44903.5 $\mu\text{g/kg}$ ιστό μυδιού που αντιστοιχεί σε 224.5 $\mu\text{g/g}$ ηπατοπαγκρέατος. Οι συγκεντρώσεις που προσδιορίστηκαν στην παραπάνω εργασία είναι πολύ υψηλότερες από αυτές που βρέθηκαν στην παρούσα έρευνα οι οποίες κυμαίνονταν από μη ανιχνεύσιμες έως 34.40 $\mu\text{g/g}$ ηπατοπαγκρέατος με LC-MS/MS. Άλλες μελέτες στον Ελλαδικό χώρο δεν υπάρχουν που να προσδιορίζονται εστεροποιημένες μορφές των DSP τοξινών με LC-MS/MS. Η DTX-1 δεν προσδιορίστηκε σε κανένα από τα δείγματα.

Οι Suzuki και Yasumoto, (2000) μελέτησαν την παρουσία ΟΑ και DTX-1 στην Ιαπωνία το 1995 με LC-MS σε διάφορα οστρακοειδή όπου το ένα δείγμα από αυτά ήταν μύδι. Στα δείγματα αυτά προσδιορίστηκαν συγκεντρώσεις ΟΑ από 0.04 έως 0.29 $\mu\text{g/g}$ HP και στο δείγμα μυδιού 0.06 $\mu\text{g/g}$ HP και συγκεντρώσεις DTX-1 από 0.41 έως 1.36 $\mu\text{g/g}$ HP για τα διάφορα οστρακοειδή και 4.13 $\mu\text{g/g}$ HP για το μύδι. Τα επίπεδα των παραπάνω συγκεντρώσεων ΟΑ ήταν γενικά χαμηλότερα από αυτά που προσδιορίστηκαν στην παρούσα έρευνα (1.00-87.80 $\mu\text{g/g}$ HP).

Οι Vale & Sampayo, (2002) μελέτησαν την παρουσία ΟΑ σε οστρακοειδή στην Πορτογαλία το 2000 χρησιμοποιώντας LC-MS. Προσδιόρισαν συγκεντρώσεις ελεύθερης μορφής ΟΑ σε εδώδιμα μέρη 0.026 $\mu\text{g/g}$ πριν την υδρόλυση και 0.061 $\mu\text{g/g}$ μετά την υδρόλυση με NaOH. Η DTX-1 δεν ανιχνεύτηκε σε κανένα από αυτά τα δείγματα και σε αυτήν την εργασία. Υψηλές συγκεντρώσεις εστέρων παρατηρήθηκαν τόσο σε οστρακοειδή στην Ιαπωνία (Yasumoto et al., 1985, Suzuki & Mitsua, 2001) όσο και στην Νέα Ζηλανδία (Maunford et al., 1999). Οι Kim et al., (2008) προσδιόρισαν συγκεντρώσεις ΟΑ και DTX-1 σε ηπατοπάγκρεας 0.03-0.08 $\mu\text{g/g}$ και 0.07-0.23 $\mu\text{g/g}$ αντίστοιχα χρησιμοποιώντας LC-MS/MS. Τέλος, σε σύγκριση με την εργασία των Prassopoulou et al., (2009) οι συγκεντρώσεις των εστέρων του ΟΑ που προσδιορίστηκαν (μη ανιχνεύσιμες-224.5 $\mu\text{g/g}$ HP) ήταν υψηλότερες από αυτές που προσδιορίστηκαν στην παρούσα έρευνα (μη ανιχνεύσιμες-34.4 $\mu\text{g/g}$ HP).

Σύμφωνα με τους Chapela et al., (2008) οι οποίοι μελέτησαν την παρουσία ΟΑ, DTX-1, DTX-2, YTX, PTX-2, AZA-1, και SPX-1 σε επτά διαφορετικά είδη οστρακοειδών φρέσκων, βρασμένων που στη συνέχεια καταψύχθηκαν και σε κονσερβοποιημένων δειγμάτων χρησιμοποιώντας LC-MS/MS, βρέθηκε ότι το ΟΑ ήταν η

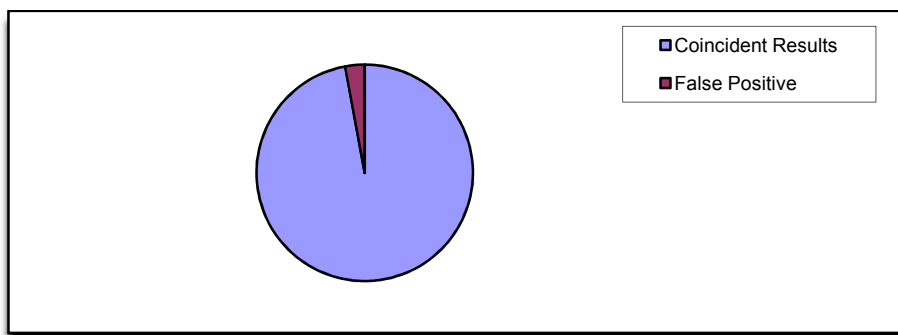
κύρια τοξίνη στα περισσότερα δείγματα. Τα δείγματα προέρχονταν από την Ευρώπη και κυρίως την Ισπανία. Επίσης, βρέθηκαν σε 12 δείγματα το OA, η DTX-2 και η YTX σε συγκεντρώσεις κάτω των κανονιστικών ορίων της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Στην Ιταλία, συγκεντρώσεις OA προσδιορίστηκαν από 0.32 έως 1.51 $\mu\text{g/kg}$ ηπατοπαγκρέατος ενώ η DTX-1 βρέθηκε μόνο σε 4 δείγματα (τα 2 προέρχονταν από την Βόρεια και τα άλλα 2 από την Νότια Αδριατική) σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από 0.21 έως 0.32 $\mu\text{g/kg}$ ηπατοπαγκρέατος. Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε ήταν υγρή χρωματογραφία-φασματογραφία μάζας με χρήση ψεκασμού (LC-ISP-MS) (Draisci et al., 1995). Οι Blanco et al., (2007) προσδιόρισαν OA, DTX-1 και DTX-2 σε μύδια από την Ισπανία σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις χρησιμοποιώντας HPLC-MS. Η μέση συγκέντρωση του ολικού OA ήταν 407 ng/g HP. Επίσης, οι Villar-Gonzalez et al., (2007) προσδιόρισαν λιπόφιλες τοξίνες σε δείγματα του τοξικού επεισοδίου 2005 στην Ισπανία χρησιμοποιώντας LC-MS/MS. Σύμφωνα με την έρευνα αυτή, προσδιορίστηκαν τοξίνες που ανήκουν στην ομάδα του OA αλλά όχι την DTX-1. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε σχέση με το σύνολο των DSP τοξινών προσδιορίστηκε ένα μεγάλο ποσοστό εστέρων (35%-79%) σε αυτή την εργασία.

Για πρώτη φορά το 2011 στην Κροατία χρησιμοποιήθηκε η τεχνική LC-MS/MS για να προσδιοριστούν τοξίνες σε Κροατικά μύδια. Το δινομαστιγωτό που ήταν υπεύθυνο για το τοξικό επεισόδιο στο Lim Bay της Κροατίας ήταν το *Dinophysis fortii*. Εκτός του OA προσδιορίστηκαν και άλλες τοξίνες όπως η γυμνοδιμίνη και οι σπιρολίδες. Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου για το OA ήταν 7 $\mu\text{g/kg}$ και το όριο ποσοτικοποίησης 20 $\mu\text{g/kg}$. (Gladan et al., 2011). Στη Νότια Αυστραλία το 2003 πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός OA και των εστέρων του με LC-MS/MS. Προσδιορίστηκε OA σε συγκεντρώσεις από μη ανιχνεύσιμες έως 0.051 mg/kg και των εστέρων τους σε συγκεντρώσεις από μη ανιχνεύσιμες έως 0.12 mg/kg. Το δινομαστιγωτό που ήταν υπεύθυνο για την παρουσία του OA και των εστέρων του ήταν το *Dinophysis acuminata*. (Madigan et al., 2006). Αναλύσεις λιπόφιλων τοξινών πραγματοποιήθηκε με την τεχνική του συστήματος orbitrap LC-MS για τον προσδιορισμό τους στα οστρακοειδή. Οι λιπόφιλες τοξίνες συμπεριλαμβανομένου του οκαδαϊκού οξέος και των παραγώγων του (DTX-1, DTX-2) διαχωρίστηκαν σε 6 λεπτά. Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου για τα μόρια που πρωτονιώθηκαν ήταν 0.041-0.099 ppb και για αυτά που αποπρωτονιώθηκαν 1.6-5.1 ppb (Blay et al., 2011). Επίσης, τα αποτελέσματα των λιπόφιλων τοξινών με LC-MS/MS σε

μία έρευνα στην Ιαπωνία ήταν συγκρίσιμα με αυτά της βιολογικής δοκιμής (Bernd et al., 2008).

5.1.4 Σύγκριση μεθόδων

Μολονότι στην HPLC-FLD προσδιορίστηκε ποσοτικά η ελεύθερη μορφή του OA ενώ στην MBA προσδιορίστηκε η συνολική τοξικότητα των DSP τοξινών (ελεύθερη και εστεροποιημένη μορφή του OA αλλά και πιθανόν οι άλλες τοξίνες αυτής της κατηγορίας) είναι δυνατό να συγκριθούν (συμφωνία 97.1%) (Σχήμα 26).



Σχήμα 26. Σύγκριση αποτελεσμάτων (συνολική τοξικότητα) MBA και HPLC-FLD.

Σε αντίθεση, η σύγκριση των αποτελεσμάτων (συνολική τοξικότητα) που προσδιορίστηκαν με βάση την HPLC-FLD και την LC-MS/MS έδειξε άριστη συμφωνία (100%) με διάγραμμα γραμμής προσαρμογής μεταξύ των δύο μεθόδων, $R^2 = 0.98$ (Σχήμα 27). Για τιμές $0.95 < |r| < 0.99$ η συσχέτιση θεωρείται ικανοποιητική. Η τιμή του συντελεστή συσχέτισης αποτελεί ενδεικτικό μέτρο του βαθμού διασποράς των πειραματικών σημείων ενός γραμμικού διαγράμματος. Είναι προφανής η πολύ καλή συσχέτιση των τιμών y και x, όπως αυτό φαίνεται από την τιμή του συντελεστή συσχέτισης ($R^2=0.98$). Το διάγραμμα συσχέτισης των αναλυτικών αποτελεσμάτων μιας δοκιμαζόμενης μεθόδου ως προς εκείνα μιας άλλης, ιδανικά θα πρέπει να πλησιάζουν κλίση $\alpha=1$ και τομή στον άξονα $\beta=0$. Στην πράξη οι τιμές αυτές διαφέρουν από τις ιδανικές. Για να εξακριβωθεί εάν οι τιμές α και β διαφέρουν σημαντικά από τις επιθυμητές τιμές 1 και 0, αρκεί να υπολογιστεί εάν οι επιθυμητές (για ικανοποιητική συσχέτιση των μεθόδων A και B) τιμές βρίσκονται στο διάστημα εμπιστοσύνης των α και β . Το διάστημα εμπιστοσύνης υπολογίζεται (σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95%) ως εξής:

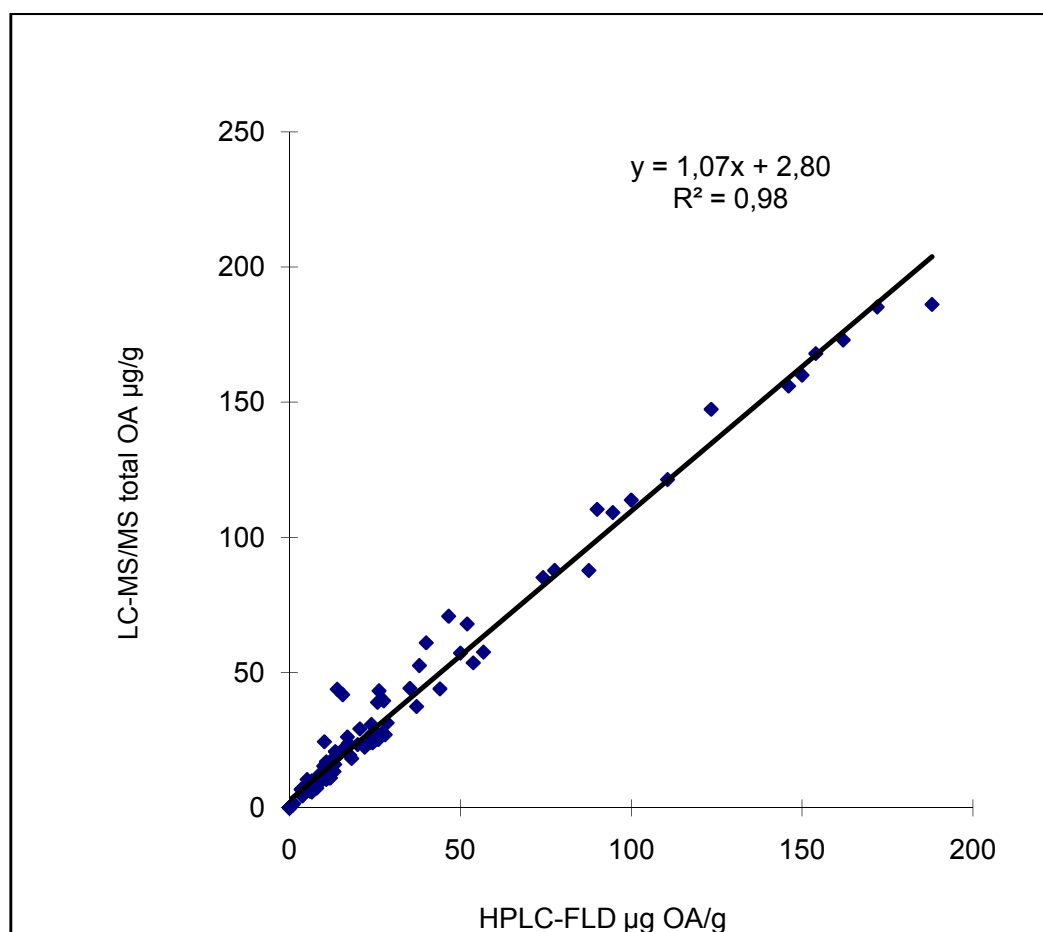
$$\alpha \pm t_{\text{theor}} S_a = 1.069 \pm (3.733 \times 0.018) = 1.069 \pm 0.067 \quad \text{δηλ.: 1.002 έως 1.136}$$

$$\beta \pm t_{\text{theor}} S_b = 2.795 \pm (3.733 \times 0.75) = 2.795 \pm 2.800 \quad \text{δηλ.: -0.005 έως 5.595}$$

όπου t_{theor} χρησιμοποιείται η τιμή 3.733 που αντιστοιχεί σε $\nu = N - 2 = 103 - 2 = 101$ βαθμούς ελευθερίας.

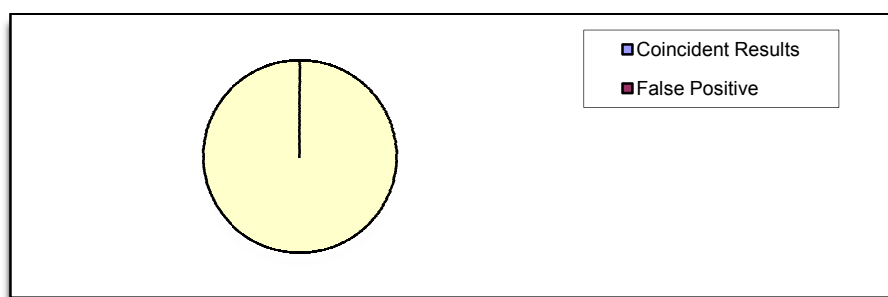
Από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95% τα αποτελέσματα των δύο μεθόδων είναι ισοδύναμα, δηλ. δεν ανιχνεύεται αναλογικό ή σταθερό σφάλμα μεταξύ των δυο σειρών μετρήσεων.

Συμπερασματικά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί εναλλακτικά η LC-MS/MS ως μέθοδος για τον προσδιορισμό του OA και των εστέρων του σε σχέση με την HPLC-FLD διότι στην τελευταία τα στάδια κατεργασίας του δείγματος ήταν περισσότερα και απαιτείται παραγωγοποίηση με φθορίζον αντιδραστήριο, δηλαδή περισσότερος χρόνος, σφάλματα και κόστος.



Σχήμα 27. Συσχέτιση συγκεντρώσεων OA με LC-MS/MS, HPLC-FLD

Η συμφωνία των αποτελεσμάτων της MBA και της LC-MS/MS ήταν υψηλή (97.1%, Σχήμα 28). Όμως, υπήρχαν 3 δείγματα στα οποία δεν ανιχνεύτηκε OA (#91, 97, 100) με την LC-MS/MS αλλά σύμφωνα με την MBA ήταν θετικά. Αυτό πιθανός μπορεί να εξηγηθεί από το διαφορετικό προφίλ των τοξινών. Δηλαδή, να υπήρχαν και άλλες τοξίνες όπου με την MBA ανιχνεύτηκαν οι οποίες δεν ήταν διαρροϊκές, όπως γεσσοτοξίνες, αζασπειροξέα, γυμνοδιμίνη (GYM) ή σπιρουλίδες (SPXs). Η διαφορά μπορεί ακόμα να οφειλόταν στην παρουσία ελεύθερων λιπαρών οξέων (ψευδώς θετικά) (Suzuki et al., 2005). Πρέπει να σημειωθεί ότι τοξίνες όπως GYM και SPX μπορεί να προκαλέσουν το θάνατο των πειραματόζων στην βιοδοκιμή ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις (Gerssen et al., 2009).



Σχήμα 28. Σύγκριση αποτελεσμάτων (συνολικής τοξικότητας) μεταξύ MBA και LC-MS/MS.

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία όλες οι έρευνες συγκλίνουν στο γεγονός ότι η υγρή χρωματογραφία-φασματοσκοπία μαζών είναι ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο για τον ποσοτικό προσδιορισμό των θαλάσσιων τοξινών με πλεονέκτημα τον προσδιορισμό τους σε πολύ χαμηλά όρια συγκεντρώσεων (Goto et al., 2001; Gerssen et al., 2008; Fux et al., 2007, Turrell and Stobo, 2007). Αξίζει να σημειωθεί ότι σύμφωνα με το FAO η Νέα Ζηλανδία είναι η μοναδική χώρα η οποία προσπαθεί να αντικαταστήσει την MBA με LC-MS για τον προσδιορισμό των Βιοτοξινών εισάγοντας ένα νέο πρόγραμμα ελέγχου (FAO, 2004).

Πολλές φορές οι βιολογικές δοκιμές χαρακτηρίζονται ως μη σύμφωνες με την ηθική επειδή κατά την εφαρμογή τους θανατώνονται τα χρησιμοποιούμενα πειραματόζωα. Τουλάχιστον δυο ζώα, συχνά τρία, χρησιμοποιούνται για να ελεγχθεί ένα δείγμα και στο τέλος τα ζώα καίγονται. Παράλληλα έχουν δημοσιευθεί δύο κατευθυντήριες οδηγίες της ΕΕ η 91/492 που αφορά την δημόσια υγεία για έλεγχο των θαλάσσιων βιοτοξινών και η

86/609 για την προστασία των πειραματοζώων που χρησιμοποιούνται σε εργαστήριο με αποτέλεσμα να αυξάνεται η πίεση στην ΕΕ όπως εγκαταληφθούν οι βιολογικές δοκιμές για τον έλεγχο των βιοτοξινών. Επιπρόσθετα, σε πρόσφατη της γνώμη η EFSA που αφορούσε τις θαλάσσιες βιοτοξίνες, πρότεινε να μειωθούν τα επιτρεπόμενα νομοθετικά όρια συγκέντρωσης των βιοτοξινών στα θαλασσινά. Αν αυτό πραγματοποιηθεί, οι βιολογικές δοκιμές δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε αντίθεση με τις χημικές μεθόδους οι οποίες έχουν την δυνατότητα μικρο- και νάνο- συγκεντρώσεις βιοτοξινών. Η FAO/IOC/WHO πρόσφατα πρότεινε την χρήση αναλυτικών τεχνικών αντί της βιολογικής δοκιμής ως μεθόδων αναφοράς για τον έλεγχο των βιοτοξινών (Campbell et al., 2011). Η πλειοψηφία των χωρών παγκοσμίως χρησιμοποιούν για επίσημο έλεγχο του ΟΑ και των παραγώγων του την βιολογική δοκιμή (Πίνακας 19). Πρέπει να τονιστεί όμως ότι πάνω από τις μισές χώρες χρησιμοποιούν και την υγρή χρωματογραφία για επίσημο έλεγχο ενώ υπάρχουν δύο χώρες (Γερμανία και Νέα Ζηλανδία) που χρησιμοποιούν μόνο την υγρή χρωματογραφία για επίσημο έλεγχο. Επιπρόσθετα, πάνω από τις μισές χώρες χρησιμοποιούν αποκλειστικά την βιολογική δοκιμή για προσδιορισμό των διαρροϊκών τοξινών ενώ η Ολλανδία χρησιμοποιεί και την βιοδοκιμή επίμυων εκτός της υγρής χρωματογραφίας.

Πίνακας 19. Μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για επίσημο έλεγχο του ΟΑ και των παραγώγων του σε διάφορες χώρες.

Χώρα	ΟΑ και DTXs
Νορβηγία	MBA και Χημική μέθοδος
Σουηδία	MBA και Χημική μέθοδος
Δανία	MBA και Χημική μέθοδος
Ιρλανδία	MBA και Χημική μέθοδος
Ηνωμένο Βασίλειο	MBA
Γερμανία	Χημική μέθοδος
Ολλανδία	RBA και Χημική μέθοδος
Βέλγιο	MBA
Γαλλία	MBA
Αυστρία	MBA και Χημική μέθοδος
Πορτογαλία	MBA, Χημική και Βιοχημική μέθοδος
Ισπανία	MBA
Ιταλία	MBA και Χημική μέθοδος
Ελλάδα	MBA και Χημική μέθοδος
Τουρκία	MBA
Καναδάς	MBA
Βενεζουέλα	MBA
Χιλή	MBA

Ουρουγουάη	MBA
Κορέα	MBA και Χημική μέθοδος
Ιαπωνία	MBA
Ταϊλάνδη	MBA
Νέα Ζηλανδία	Χημική μέθοδος

Όπου: MBA: mouse bioassay, RBA: rat bioassay, Χημική μέθοδος: HPLC, LC-FLD, LC-MS, LC-MS/MS, Βιοχημική μέθοδος: ELISA

Σύμφωνα με την EFSA, σε 10 διαφορετικές ευρωπαϊκές χώρες χρησιμοποίησαν την ανάλυση LC-MS για τον προσδιορισμό των DSP τοξινών. Η έρευνα αφορούσε τα έτη 2001 μέχρι και 2006 διάστημα μέσα στο οποίο συλλέχθηκαν και αναλύθηκαν 6072 δείγματα. Τα 5980 δείγματα αναλύθηκαν με την μέθοδο LC-MS (πίνακας 20) εκ των οποίων τα 5853 ανήκαν σε συγκεκριμένο είδος οστρακοειδών (πίνακας 21) ενώ τα 127 περιγράφηκαν ως γενικά οστρακοειδή τα οποία και δεν συμπεριλήφθησαν στην έρευνα. Χρησιμοποιήθηκε είτε ολόκληρος ιστός μυδιού είτε μόνο το ήπατοπάγκρεας για τις ανάγκες της ανάλυσης. Από τον Πίνακα 21 φαίνεται ότι τα οστρακοειδή τα οποία επιβαρύνονται περισσότερο είναι τα μύδια ακολουθούμενα από τις γυαλιστερές, τα κυδώνια, τις αχιβάδες, τα στρείδια και τελευταία τα καβούρια. Για την ανάλυση των υπόλοιπων δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές όπως LC-FLD, ELISA.

Πίνακας 20. Στατιστικά δεδομένα ανάλυσης των τοξινών της ομάδας OA σε οστρακοειδή με LC-MS μέχρι το 2007. (EFSA, 2008).

Χώρα	Αριθμός δειγμάτων	Μέση συγκέντρωση $\mu\text{g/kg}$ ιστό	$\leq\text{LOD}$ (%)	$>160 \mu\text{g/kg}$ (%)
Δανία	161	270	0	30
Γαλλία	40	77	3	4
Γερμανία	550	28	66	3
Ιρλανδία	758	268	35	41
Ολλανδία	163	11	96	0
Νορβηγία	1846	130	16	19
Πορτογαλία	1074	148	30	21
Ισπανία	3	332, 259, 335		
Σουηδία	928	158	14	31
Αγγλία	457	92	46	18
Σύνολο	5980	138	30	22

Πίνακας 21. Αποτελέσματα της ανάλυσης των τοξινών της ομάδας OA σε διάφορα είδη οστρακοειδών (EFSA, 2008).

Είδος	Αριθμός δειγμάτων	Μέση συγκέντρωση ομάδας OA $\mu\text{g/kg}$	$\leq\text{LOD}$ (%)	$>160 \mu\text{g/kg}$ (%)
Μύδια	4447	168	23	26
Γυαλιστερές	579	155	39	22
Κυδώνια	288	90	45	12
Αχιβάδες	246	47	59	5
Στρείδια	207	17	86	1
Καβούρια	86	56	22	6

Από τις χώρες με την μεγαλύτερη επιβάρυνση με DSP-τοξίνες στα οστρακοειδή ήταν η Ιρλανδία με ποσοστό 41% με την λιγότερο επιβαρυνμένη την Γερμανία με μηδενικό ποσοστό (πίνακας 20). Η πρώτη χώρα σε αριθμό επιβαρυνμένων δειγμάτων ήταν η Νορβηγία με 1846 και τελευταία η Ισπανία με 3. Σε 2419 δείγματα προσδιορίστηκε όλη η ομάδα του οκαδαϊκού οξέος (OA, DTX-1, DTX-2, DTX-3) όπου διαπιστώθηκε ότι 149 δείγματα είχαν DTX-3 μεγαλύτερο από το όριο ενώ λιγότερα από τα μισά (66) για την DTX-2 (Πίνακας 22). 1210 δείγματα αναλύθηκαν και με τις δυο μεθόδους (LC-MS και βιολογική δοκιμή) (πίνακας 23). Ποσοστό 80% από αυτά τα δείγματα ήταν μύδια κυρίως του είδους *M. Edulis*. Από τα δείγματα που ήταν αρνητικά με βάση την MBA, 13% ήταν πάνω από το επιτρεπτό όριο όταν αναλύθηκαν με LC-MS (160 μg OA eq/kg ολικού ιστού), και ένα ποσοστό 29% των θετικών δειγμάτων με βάση την MBA δεν υπερέβαιναν το όριο με βάση την LC-MS. Πρέπει να σημειωθεί ότι τα οστρακοειδή τα οποία ήταν αρνητικά με βάση την MBA δόθηκαν για κατανάλωση. Θα ήταν ορθότερο να δίνονται στη κατανάλωση δείγματα κατόπιν ελέγχου μόνο με LC-MS.

Πίνακας 22. Αριθμός δειγμάτων μυδιών στα οποία βρέθηκαν διάφορες τοξίνες της ομάδας του OA (EFSA, 2008).

Εύρος συγκεντρώσεων	OA	DTX-1	DTX-2	DTX-3
	Αριθμός δειγμάτων			
<LOD	1328	1914	2051	775
≥LOD μέχρι 160 μg τοξίνης/kg ολικού ιστού	988	416	302	1495
>160 μg τοξίνης/kg ολικού ιστού	103	89	66	149

Πίνακας 23. Συγκεντρώσεις των τοξινών της ομάδας OA οι οποίες προσδιορίστηκαν σε μύδια με LC-MS και MBA (EFSA, 2008).

MBA	Αριθμός δειγμάτων	Συγκέντρωση (μg/kg) με LC- MS	≤LOD (%)	>160 μg/kg
Αρνητικό	755	66	44	100 (13%)
Θετικό	455	486	11	325 (71%)

5.2 Β' ΜΕΡΟΣ

5.2.1 Επεξεργασία δειγμάτων μυδιών με γ-ακτινοβολία

Πριν την ακτινοβόληση προσδιορίστηκαν συγκεντρώσεις ελεύθερου ΟΑ, εστέρων ΟΑ και συνολικού ΟΑ (ελεύθερο ΟΑ και εστέρες ΟΑ) που κυμαίνονταν από 0.18 έως 6.50 µg/g, μη ανιχνεύσιμες έως 7.04 µg/g και από 0.18 έως 13.54 µg/g ολικού ιστού αντίστοιχα (Πίνακας 24). Στην περίπτωση των αρνητικών δειγμάτων, ΟΑ και εστέρες ΟΑ δεν προσδιορίστηκαν είτε επειδή δεν υπήρχαν είτε επειδή ήταν κάτω του ορίου ανιχνευσιμότητας (0.045 µg/g ηπατοπαγκρέατος). Η DTX-1 δεν ανιχνεύτηκε σε κανένα από τα δείγματα της παρούσας έρευνας. Τα αποτελέσματα μετά την επίδραση της γ-ακτινοβολίας στα δείγματα δίνονται στον Πίνακα 25.

Πίνακας 24. Αποτελέσματα ΟΑ με MBA, και LC-MS/MS πριν την εξυγίανση μυδιών.

Α/Α	Περιοχή Δειγματολ.	Έτος Δειγματολ.	Είδος	MBA	LC-MS/MS		
					ΟΑ µg/g	Ester ΟΑ µg/g	Total ΟΑ µg/g
1	Θεσ/νικη	2009	Ολικό	Αρνητικό	ND	ND	ND
2	Φθιώτιδα	2009	Ολικό	Αρνητικό	ND	ND	ND
3	Μέγαρα	2009	Ολικό	Θετ.(+++)	0.18	ND	0.18
4	Μέγαρα	2009	Ολικό	Θετ.(+++)	0.19	ND	0.19
5	Νεράκι	2009	Ολικό	Θετ.(+++)	6.50	7.04	13.54
6	Δρέπανο	2009	Ολικό	Θετ.(+++)	3.54	3.08	6.62
7	Πειραιάς	2009	Ολικό	Θετ.(+++)	0.98	1.76	2.74

ND: not detected (μη ανιχνεύσιμη συγκέντρωση)

Θετ.(+++): Θάνατος και των τριών ποντικών

Πίνακας 25. Αποτελέσματα OA με MBA και LC-MS/MS μετά την εξυγίανση των μυδιών καθώς και τα ποσοστά μείωσης.

Α/Α	Δόση (KGy)	MBA	LC-MS/MS			Ποσ. (OA)	Ποσοστ. Μείωσης (Εστέρες OA)	Ποσοστ. Μείωσης (Συνολικό)
			OA μg/g	Ester OA μg/g	Total OA μg/g			
1	6	Αρνητικό	ND	ND	ND	-	-	-
2	6	Αρνητικό	ND	ND	ND	-	-	-
3	6	Αρνητικό	0.13	ND	0.13	27%	-	27%
4	6	Αρνητικό	0.12	ND	0.12	36%	-	36%
5	3	Θετ.(+++)	5.7	6.5	12.2	12%	8%	10%
6	6	Θετ.(+++)	3.06	1.88	4.94	14%	39%	25%
7	10	Θετ.(+++)	0.78	0.82	1.60	20%	53%	41%

ND: not detected (μη ανιχνεύσιμη συγκέντρωση)

Θετ.(+++): Θάνατος και των τριών ποντικών

Οι μειώσεις των τοξινών κυμαίνονταν από 12% (από 6.50 μg/g σε 5.70 μg/g) έως 36% (από 0.19 μg/g σε 0.12 μg/g) για το ελεύθερο OA, από 8% (από 7.04 μg/g σε 6.50 μg/g) έως 53% (από 1.76 μg/g σε 0.82 μg/g) για τους εστέρες OA και από 10% (από 13.54 μg/g σε 12.20 μg/g) έως 41% (από 2.74 μg/g σε 1.60 μg/g) για το συνολικό OA. Η μέση μείωση ήταν 22%, 33% και 28% για το ελεύθερο OA, εστέρων OA και συνολικού OA αντίστοιχα. Δύο δείγματα τα οποία σύμφωνα με την MBA πριν την εξυγίανση ήταν θετικά μετά την ακτινοβόληση απεδείχθησαν αρνητικά. Τα αρνητικά δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν πριν και μετά την εξυγίανση παρέμειναν αρνητικά ενδεικτικό του ότι η

ακτινοβόληση δεν παρήγαγε τοξικές ενώσεις τουλάχιστον άμεσης τοξικότητας για τα ποντίκια. Ωστόσο, δεν αποκλείεται να παραχθούν ενώσεις όπως για παράδειγμα οι αλκυλοκυκλοβουτανόνες οι οποίες είναι προϊόντα ραδιόλυσης των τριγλυκεριδίων, ενώσεις οι οποίες έχουν προσδιοριστεί σε ακτινοβολημένα τρόφιμα. Το ποσοστό παραγωγής τους εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως την δόση της ακτινοβολίας, το λιπαρό οξύ, το τύπο του προς ακτινοβόληση τροφίμου. Είναι ύποπτες (σε μεγάλες συγκεντρώσεις) για εμφάνιση καρκίνου στα ζώα (Raul et al., 2002).

Στην βιβλιογραφία, δεν υπάρχουν έρευνες που να μελετούν την επίδραση της γ-ακτινοβολίας σε οστρακοειδή με DSP τοξίνες. Εξαίρεση αποτελεί η εργασία των McCarron et al., (2007) όπου μελετήθηκε η επίδραση της γ-ακτινοβολίας σε συγκεντρώσεις λιπόφιλων και υδρόφιλων τοξινών σε μεθανολικό διάλυμα και σε ιστό μυδιού. Ειδικότερα, οι τοξίνες οι οποίες μελετήθηκαν ήταν το AZA-1, το OA, η πεκτενοτοξίνη-2 και η γεσσοτοξίνη από τις λιπόφιλες και το DA από τις υδρόφιλες. Τα δείγματα κατεργάστηκαν σε δόσεις γ-ακτινοβολίας 6kGy, 12kGy και 24kGy. Παρόλο που όλες οι συγκεντρώσεις τοξινών σε διάλυμα μειώθηκαν, το OA ήταν η μόνη τοξίνη που επηρεάστηκε λιγότερο. Επίσης, η μείωση του OA στον ιστό μυδιού ήταν μικρότερη από αυτή στο μεθανολικό διάλυμα. Στα πρότυπα διαλύματα, υπήρχε περίπου 30% μείωση για το OA στη μέγιστη δόση ενώ στον ολικό ιστό υπήρχε μείωση ανάλογα με την δόση ακτινοβολίας αλλά όχι σημαντική. Σε σχέση με τη δόση ακτινοβολίας και την μείωση της τοξίνης, τα ποσοστά στην παρούσα εργασία ήταν υψηλότερα.

Η χρήση της γ-ακτινοβολίας φαίνεται μια αποτελεσματική μέθοδος για την εξυγίανση του περιεχομένου OA στα μύδια. Ωστόσο, η εμφάνιση και η δομή του προϊόντος μετά την ακτινοβόληση πρέπει να σημειωθεί πως ήταν υποβαθμισμένη (υπερβολικά μαλακή υφή), σοβαρό μειονέκτημα αυτής της μεθόδου.

Σήμερα, η Ευρωπαϊκή Νομοθεσία για την ακτινοβόληση τροφίμων δεν περιλαμβάνει την χρήση αυτής στη μείωση των τοξινών στα οστρακοειδή (Οδηγία ΕΕ 1999/2), ενώ η ιονίζουσα ακτινοβολία επιτρέπεται σε ορισμένες χώρες σε δόσεις που δεν ξεπερνούν τα 3kGy με εξαίρεση τις κατεψυγμένες αποκελυφωμένες γαρίδες για τις οποίες επιτρέπεται ακτινοβόληση μέχρι 6KGy (EU Parliament, 2009). Εάν πρόκειται να υιοθετηθεί η τεχνική εξυγίανσης οστρακοειδών με ακτινοβόληση για εμπορικούς σκοπούς θα πρέπει να τροποποιηθεί η ισχύουσα νομοθεσία της ΕΕ.

Η ακτινοβολήση ιονίζει ή διεγείρει τα μόρια οδηγώντας στο σχηματισμό ελευθέρων ριζών (άμεσα προϊόντα ραδιόλυσης) και σπάει τους δεσμούς των μορίων παράγοντας σταθερά έμμεσα προϊόντα ραδιόλυσης (σχηματισμός υδροξυλίου και υπεροξειδίου του υδρογόνου στο νερό). Επίσης υπάρχουν και άλλες επιδράσεις της ακτινοβολήσης στα συστατικά των τροφίμων όπως η αυτοξειδωση των λιπαρών, οι αλλαγές στις δομές των πρωτεϊνών, η διάσπαση των υδατανθράκων στα φρούτα και στα λαχανικά και η μείωση των βιταμινών C και E (Stefanova et al., 2010).

Στην Πορτογαλία το 2011 μελέτησαν την επίδραση της ακτινοβολήσης στα κάστανα, σημαντική πηγή για τη διατροφή σε όλο το κόσμο. Ακτινοβόλησαν σε δόσεις ακτινοβολίας 0.25, 0.50, 1.00 και 3.00 kGy όπου τα δείγματα βρίσκονταν μέσα σε σακούλες πολυαιθυλενίου. Μελέτησαν τις αλλαγές στη χημική σύσταση (σάκχαρα (σακχαρόζη), λιπαρά οξέα (παλμιτικό, ελαϊκό, λινελαϊκό και λινολενικό οξύ) και γ-τοκοφερόλη. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ακτινοβολήση δεν επηρέασε αυτά τα συστατικά οπότε μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μέθοδος συντήρησης αυτών. (Fernandes et al., 2011).

Σε άλλη έρευνα, που πραγματοποιήθηκε στην Ινδία ακτινοβολήθηκαν μήλα custard σε δόσεις από 0.25 έως 1.75kGy και σε συνδυασμό με βενζιλική αδενίνη (benzyl adenine) τα αποθήκευσαν για 12 μέρες, στους 25°C και υγρασία 90%. Μελέτησαν τις μεταβολές στο άρωμα, στη δομή, στην οξύτητα, στο ασκορβικό οξύ, στα σάκχαρα (ανάγοντα και μη ανάγοντα) και στους υδατάνθρακες. Παρατήρησαν ότι σε δόση ακτινοβολίας 1.5 kGy και 50 ppm βενζιλικής αλκοόλης αυξήθηκε ο χρόνος ζωής αυτού του είδους μήλων επιπλέον 6 μέρες σε σχέση με τον μάρτυρα (δείγμα ελέγχου) με μικρές μεταβολές σε αυτά που μελέτησαν (Chouskey et al., 2011).

Επίσης, μελετήθηκε η επίδραση της ακτινοβολίας σε φρεσκοκομμένο σπανάκι στις ΗΠΑ. Μελετήθηκε η επίδραση της ακτινοβολήσης στη μικροβιολογική χλωρίδα και τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες του σπανακιού. Παρατήρησαν ότι σε δόσεις ακτινοβολίας μέχρι 2 kGy δεν υπήρχαν μεταβολές τόσο στην αποδοχή των δειγμάτων από τους καταναλωτές όσο και στις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των δειγμάτων καθώς μειώθηκε ταυτόχρονα ο πληθυσμός των μικροοργανισμών στα δείγματα (Fan et al., 2010).

Όσον αφορά την ακτινοβολήση ζωϊκών τροφίμων έχουν πραγματοποιηθεί πολλές έρευνες. Ερευνητές ακτινοβόλησαν βοδινό κρέας σε δόση ακτινοβολίας μικρότερη των 3

kGy όπου δεν παρατήρησαν σημαντικές μεταβολές στο άρωμα, στη δομή και στο χρώμα του κρέατος. Επίσης, δείγματα κρεάτων κουνελιού ακτινοβολήθηκαν σε δόσεις 1.5 και 3 kGy. Βρέθηκε ότι δεν υπήρχαν σημαντικές μεταβολές στις λειτουργικές ιδιότητες του κρέατος ενώ αυξήθηκε ο χρόνος ζωής των δειγμάτων σε 12 και 21 μέρες αντίστοιχα. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι σε δόση ακτινοβολίας μέχρι 5 kGy και στη συνέχεια αποθήκευση σε ψύξη σε δυο είδη κρέατος (χοιρινό, κοτόπουλο) δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στις λειτουργικές τους ιδιότητες σε σχέση με τα μη ακτινοβολημένα. Πρέπει να σημειωθεί ότι όλα τα παραπάνω προϊόντα ήταν αποδεκτά από τους καταναλωτές (Stefanova et al., 2010).

Η Διεθνής Επιτροπή Ατομικής Ενέργειας (ΙΑΕΑ) ίδρυσε το 1964 τη μικτή επιτροπή εμπειρογνομόνων για την ακτινοβόληση τροφίμων (JECFI), από κοινού με τον Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας (FAO) και τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) με στόχο να ξεπεραστεί η διεθνής αδράνεια μέσω του συντονισμού περαιτέρω ερευνών στην ασφάλεια των ακτινοβολημένων τροφίμων. Η JECFI εκπόνησε μελέτησε οι οποίες στις αρχές της δεκαετίας του 1980 είχαν καταλήξει στο συμπέρασμα ότι η ακτινοβόληση οποιουδήποτε τροφίμου με μέγιστη δόση ακτινοβολίας 10 kGy θεωρείται ασφαλής. Ωστόσο, κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1980 άρχισε να διαφαίνεται η αντίθεση της κοινής γνώμης, κάτι που επιβράδυνε το ρυθμό διεξόδου της ακτινοβόλησης τροφίμων σε ολόκληρο τον κόσμο. Στα τέλη της δεκαετίας του 1990 σημειώθηκε θεαματική αναζωπύρωση των προσπαθειών για την προώθηση της ακτινοβόλησης τροφίμων, αλλά διογκώθηκε επίσης η αντίθεση των καταναλωτών, της βιομηχανίας τροφίμων και ορισμένων εθνικών κυβερνήσεων, λόγω ενός ευρέος φάσματος ερωτημάτων που παρέμεναν αναπάντητα. Προβάλλεται συχνά ο ισχυρισμός ότι η ακτινοβόληση αποτελεί την καλύτερα ερευνημένη μέθοδο από όλες τις μεθόδους επεξεργασίας τροφίμων. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας έχει δηλώσει ότι, με βάση τον μεγάλο αριθμό μελετών που έχουν εκπονηθεί κατά τις τελευταίες δεκαετίες, τα ακτινοβολημένα τρόφιμα είναι ασφαλή και θρεπτικώς επαρκή σε οποιαδήποτε δόση είναι απαραίτητη για την επίτευξη του τεχνολογικού στόχου. Ωστόσο θα πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω αν κατά την ακτινοβόληση λιπαρών τροφίμων παράγονται προϊόντα ραδιόλυσης, πιθανόν καρκινογόνα και μεταλλαξιογόνα. Για παράδειγμα, από τα πορίσματα μελέτης που διενεργήθηκε στην Καρλσρούη της Γερμανίας προκύπτει ότι ορισμένα ακτινολυτικά προϊόντα που σχηματίζονται σε ακτινοβολημένα λιπαρά τρόφιμα, και συγκεκριμένα οι

κυκλοβουτανόνες, θα μπορούσαν να προκαλέσουν ζημιά στο DNA. Αυτές οι χημικές ουσίες δεν έχουν ακόμη βρεθεί σε μη ακτινοβολημένα τρόφιμα και επομένως απαιτείται διεξοδική μακροπρόθεσμη διερεύνηση προκειμένου να αξιολογηθεί ο αντίκτυπός τους στη υγεία. Υπάρχουν ανησυχίες ότι πολλές από τις μελέτες των υγειονομικών επιπτώσεων της ακτινοβόλησης, συμπεριλαμβανομένων ορισμένων μελετών που εκπονήθηκαν από την JECFI δεν ήταν σωστά σχεδιασμένες, εκτελέστηκαν με σφάλματα ή ανεπαρκώς. Συχνά είναι δύσκολο να γίνουν άμεσες συγκρίσεις ανάμεσα σε μελέτες οι οποίες παρουσιάζουν κάποιες δυσμενείς επιπτώσεις για την υγεία, επειδή τα πειράματα δεν πραγματοποιήθηκαν υπό ταυτόσημες συνθήκες. Η Ευρωπαϊκή Επιτροπή και οι εθνικές κυβερνήσεις απαιτείται να διαθέσουν περισσότερους πόρους για την επιτάχυνση της ανάπτυξης και επικύρωσης εναλλακτικών λύσεων στην ακτινοβόληση των τροφίμων (Εκθεση ΕΕ 8/11/2002). Ιάπωνες επιστήμονες είχαν πραγματοποιήσει μελέτες (Kume, Furuta, Todoriki, Uenoyama, Kobayashi, 2009a, 2009b) για την κατάσταση της ακτινοβόλησης των τροφίμων παγκοσμίως. Τα αποτελέσματα φαίνονται στους παρακάτω πίνακες (Πίνακες 26, 27, 28). Από τον Πίνακα 26 παρατηρείται ότι η Ευρώπη ήταν τελευταία στην ακτινοβόληση τροφίμων με ποσοστό 4%. Η αιτία είναι η αυστηρή πολιτική της Ευρωπαϊκής Ένωσης έναντι της ακτινοβόλησης τροφίμων (Farkas et al., 2011). Παρόλο που συγκροτήθηκε επιστημονική επιτροπή τροφίμων στην ΕΕ η οποία πρότεινε μέγιστες επιτρεπόμενες δόσεις για την ακτινοβόληση των τροφίμων (πίνακας 28) ωστόσο οι χώρες-μέλη της ΕΕ διατηρούν τους εθνικούς τους κανονισμούς περί ακτινοβόλησης των τροφίμων. Βέβαια, αρκετές χώρες στην ΕΕ ακτινοβολούν τρόφιμα αλλά λόγω των παραπάνω κανονισμών των κρατών-μελών πωλούνται εκτός ΕΕ.

Πίνακας 26. Ποσότητες τροφίμων που ακτινοβολήθηκαν παγκοσμίως το 2005 (Kume et al., 2009a).

Περιοχές	Ποσότητες (τόνοι)	Ποσοστό (%)
Ασία και Ωκεανία	183309	45
Αμερική	116400	29
Αφρική, Ουκρανία, Ισραήλ	90035	22
Ευρώπη	15060	4
Σύνολο	404804	100

Πίνακας 27. Ποσότητες ανά είδος τροφίμων που ακτινοβολήθηκαν παγκοσμίως το 2005 (Kume et al., 2009b).

Είδη τροφίμων	Ποσότητες (τόνοι)	Ποσοστό (%)
Μπαχαρικά και ξηρά λαχανικά	186000	45
Σκόρδο και πατάτα	88000	22
Φρούτα και λαχανικά	82000	20
Κρέας και θαλασσινά	33000	8
Άλλα	17000	4
Σύνολο	406000	100

Πίνακας 28. Δόσεις ακτινοβολήσης και είδη τροφίμων που επιτρέπονται σύμφωνα με την επιστημονική επιτροπή της ΕΕ (Farkas et al., 2011).

Είδη τροφίμων	Επιτρεπόμενη δόση (kGy)
Φρούτα	Μέχρι 2
Λαχανικά	Μέχρι 1
Δημητριακά	Μέχρι 1
Αμυλούχοι Κόνδυλοι	Μέχρι 0.2
Μπαχαρικά και καρυκεύματα	Μέχρι 10
Ψάρια και οστρακοειδή	Μέχρι 3
Φρέσκο κρέας	Μέχρι 2
Πουλερικά	Μέχρι 7
Τυρί Camembert, τυριά από φρέσκο γάλα	Μέχρι 2.5
Βατραχοπόδαρα	Μέχρι 5
Γαρίδες	5
Gum Arabic	3
Κασεΐνη/caseinates	Μέχρι 6
Ασπράδι αυγού	Μέχρι 3
Νιφάδες δημητριακών	10

Η ακτινοβολήση επιτρέπεται σε πάνω από 60 είδη τροφίμων και σε περισσότερες από 40 χώρες παγκοσμίως. Από το 1997, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) και η Διεθνής Επιτροπή Ατομικής Ενέργειας (IAEA) επέτρεψαν την ακτινοβολήση τροφίμων μέχρι 10 kGy ανάλογα το είδος του τροφίμου και επισήμαναν ότι τα τρόφιμα αυτά είναι

ασφαλή για κατανάλωση χωρίς να μειωθεί η θρεπτική τους αξία. Ωστόσο η ΕΕ τον Απρίλιο του 2003, έκρινε ότι βρίσκονται ακόμα υπό συζήτηση οι μέγιστες επιτρεπόμενες δόσεις ακτινοβολίας για τα τρόφιμα. Πρόσφατη ανάλυση έδειξε πως η καταναλωτική συνήθεια των πολιτών έχει αλλάξει υπέρ των ακτινοβολημένων τροφίμων λόγω των πλεονεκτημάτων αυτής της μεθόδου επεξεργασίας στα τρόφιμα (Rollin et al., 2011).

5.2.2 Οξονισμός

Παρατηρήθηκε μείωση 100% του πρότυπου ΟΑ με οξονισμό μεθανολικό διάλυμα. Στην περίπτωση του πρότυπου ιστού μυδιού παρατηρήθηκε μείωση 14.2% για το ΟΑ και 20.8% για την DTX-1. Τα αποτελέσματα της επίδρασης του αερίου όζοντος στα επιλεγμένα δείγματα μυδιών συνοψίζονται στους Πίνακες 29 και 30. Πριν τη χρήση του όζοντος σε συγκεντρώσεις των τοξινών στα θετικά δείγματα ήταν 0.16-5.96 $\mu\text{g/g}$ για την ελεύθερη μορφή του ΟΑ, μη ανιχνεύσιμες έως 6.84 $\mu\text{g/g}$ για τους εστέρες του ΟΑ και για το συνολικό ΟΑ από 0.98 έως 12.80 $\mu\text{g/g}$. Στα αρνητικά δείγματα δεν παρατηρήθηκαν ανιχνεύσιμα ποσοστά ΟΑ. Παρά τις αρχικές υψηλές συγκεντρώσεις τόσο του ΟΑ όσο και των παραγώγων του (σε ελεύθερη ή εστεροποιημένη μορφή) είναι εμφανές ότι σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε σαφής μείωση αυτών των συγκεντρώσεων, τα ποσοστά της οποίας κυμαίνονταν από 6% (από 2.26 $\mu\text{g/g}$ σε 2.12 $\mu\text{g/g}$) έως 100% (από 0.16 $\mu\text{g/g}$ σε μη ανιχνεύσιμη) για το ελεύθερο ΟΑ, 25% (από 6.84 $\mu\text{g/g}$ σε 5.58 $\mu\text{g/g}$) έως 83% (από 0.66 $\mu\text{g/g}$ σε 0.11 $\mu\text{g/g}$) για τους εστέρες του ΟΑ και 21% (από 12.80 $\mu\text{g/g}$ σε 10.08 $\mu\text{g/g}$) έως 66% (από 1.42 $\mu\text{g/g}$ σε 0.48 $\mu\text{g/g}$) για το συνολικό ΟΑ. Σε πρακτικό επίπεδο, τα ποσοστά αυτά υποδεικνύουν ότι στο πιο απαισιόδοξο σενάριο (ποσοστό μείωσης 21%), μη εμπορεύσιμα μύδια με περιεχόμενο σε συνολικό ΟΑ της τάξης των 193 μg ΟΑ eq/kg, μπορούν με την επεξεργασία αυτή να καταστούν εμπορεύσιμα αφού το ΟΑ που περιέχουν θα μειωθεί σε επίπεδα χαμηλότερα των 160 μg ΟΑ eq/kg, ενώ στην περίπτωση του πιο αισιόδοξου σεναρίου, τα αρχικά επίπεδα των DSP τοξινών που ανέρχονται σε 209 μg ΟΑ eq/kg σε επίπεδα χαμηλότερα των 160 μg ΟΑ eq/kg. Πρέπει να σημειωθεί ότι η μείωση του περιεχόμενου ΟΑ ήταν μικρότερη στο CRM (certified reference material) από ότι στα δείγματα. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι το CRM αποτελείτο από ηπατοπάγκρεας, το οποίο είναι λιπόφιλο (περίπου 10%) σε σχέση με ολόκληρο τον ιστό

(λίπος 3%) (Lubel et al., 1985). Είναι πιθανό το λίπος να δρα προστατευτικά έναντι της τοξίνης, καθώς το OA είναι λιπόφιλη ένωση.

Πίνακας 29. Αποτελέσματα της επίδρασης του οξονισμού στην τοξικότητα (βιοδοκιμή σε μυς, MBA) και στην περιεκτικότητα των μυδιών σε OA και παράγωγά του (LC-MS/MS) καθώς και ποσοστιαία μείωση των τοξινών.

ΔΕΙΓΜΑ : ΟΛΟΚΛΗΡΑ ΑΠΟΚΕΛΥΦΩΜΕΝΑ ΜΥΔΙΑ											
Περιοχή δειγμα- τοληψίας – Έτος	Προ επεξεργασίας				Μετά την επεξεργασία						
	MBA (θάνατοι μυών)	LC-MS/MS			MBA (θάνατοι μυών)	LC-MS/MS			Μείωση OA (%)		
		OA μg/g				OA μg/g					
		ελεύθ ερο	εστέ ρες	συνολ ικό		ελεύθ ερο	Εστέ ρες	συνολ ικό	ελεύθ ερο	εστέ ρες	Συνολ ικό
Θεσ/νίκη 2009	Αρνητικό (- - -)	ND	ND	ND	Αρνητικό (- - -)	ND	ND	ND	-	-	-
Φθιώτιδα 2009	Αρνητικό (- - -)	ND	ND	ND	Αρνητικό (- - -)	ND	ND	ND	-	-	-
Πειραιάς 2009	Θετικό (+++)	5,96	6,84	12,80	Θετικό (+++)	4,50	5,58	10,08	18	25	21
Μέγαρο 2009	Θετικό (+++)	2,26	2,68	4.94	Θετικό (+++)	2,12	1,28	3,40	6	52	31
Δείγμα εμπορίου 2007	Αρνητικό (+ - -)	ND	ND	ND	Θετικό (+++)	0,32	0,38	0,70	-	-	-
Δείγμα εμπορίου 2007	Θετικό (+++)	1,90	0,70	2,60	Θετικό (+++)	1,51	0,30	1,81	21	57	30
Θεσ/νίκη 2009	Θετικό (+++)	1,40	0,65	2,05	Θετικό (+++)	1,13	0,30	1,43	19	54	30

¹ ND : not detectable (μη ανιχνεύσιμο)

² Κανονιστικό όριο θετικότητας για DSP τοξίνες = 0,16 μg OA equivalents/g ολικού ιστού (ή 160 μg OA equivalents/kg ολικού ιστού).

Θετ.(+++): Θάνατος και των τριών ποντικών

Πίνακας 30. Αποτελέσματα της επίδρασης του οξονισμού στην τοξικότητα (βιοδοκιμή σε μύς, MBA) και στην περιεκτικότητα των μυδιών σε OA και παράγωγά του (LC-MS/MS) καθώς και ποσοστιαία μείωση των τοξινών.

ΔΕΙΓΜΑ : ΟΛΙΚΟΣ ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΜΕΝΟΣ ΙΣΤΟΣ ΜΥΔΙΩΝ											
Περιοχή δειγμα- τοληψίας – Έτος	Προ επεξεργασίας				Μετά την επεξεργασία						
	MBA (θάνατοι μυών)	LC-MS/MS			MBA (θάνατοι μυών)	LC-MS/MS			Μείωση OA (%)		
		OA µg/g				OA µg/g					
		ελεύθ ερο	εστέ ρες	Συνολ ικό		ελεύθ ερο	εστέ ρες	συνολ ικό	ελεύθ ερο	εστέ ρες	Συνολ ικό
Θεσ/νίκη 2007	Θετικό (+++)	1,08	2,24	2,32	Θετικό (+++)	0,78	0,82	1,60	28	63	52
Πιερία 2007	Θετικό (+++)	0,84	0,58	1,42	Θετικό (+++)	0,24	0,24	0,48	71	59	66
Πιερία 2007	Θετικό (+++)	1,42	1,70	3,12	Θετικό (+++)	1,03	0,32	1,35	27	81	57
Πιερία 2007	Θετικό (+++)	0,32	0,66	0,98	Θετικό (+++)	0,24	0,11	0,35	25	83	64
Ημαθία 2007	Θετικό (+++)	1,26	1,70	2,96	Θετικό (+++)	0,84	0,62	1,46	33	64	51
Ημαθία 2007	Θετικό (+++)	0,16	0,90	1,06	Θετικό (+++)	ND	0,36	0,36	100	60	66
Μέγαρο 2007	Θετικό (+++)	2,10	3,26	5,36	Θετικό (+++)	0,24	2,00	2,24	89	39	58

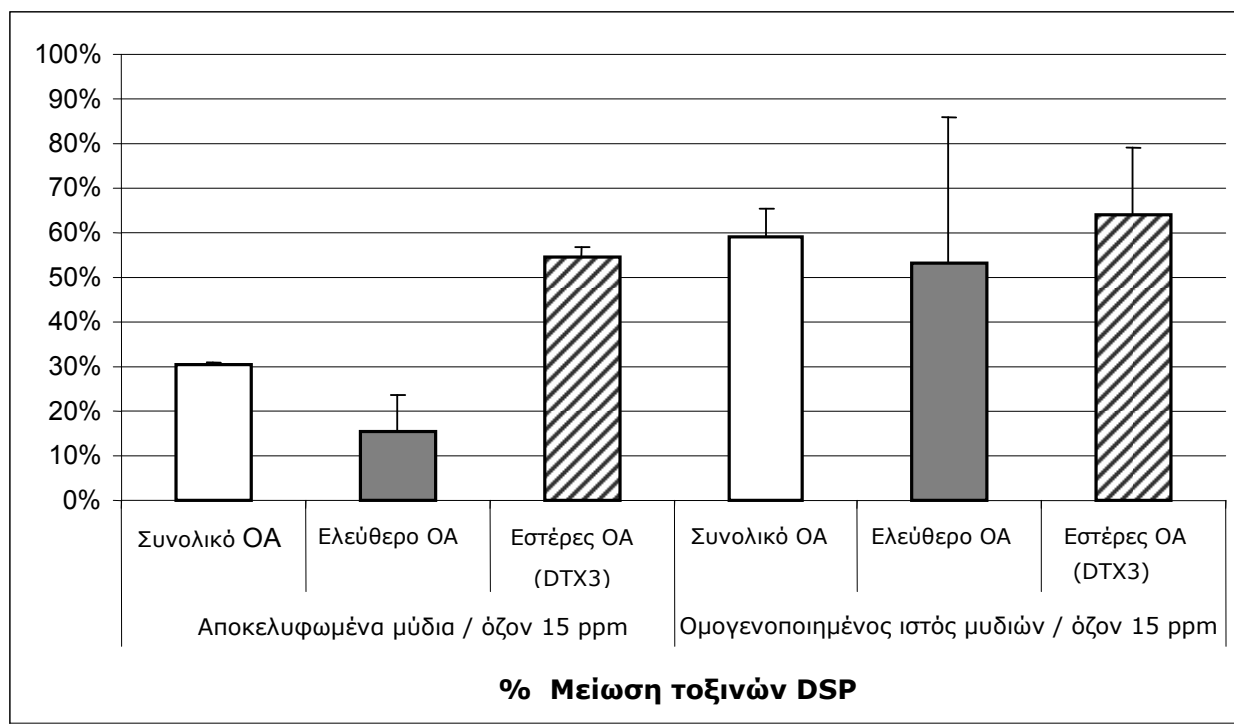
¹ ND : not detectable (μη ανιχνεύσιμο)

² Κανονιστικό όριο θετικότητας για DSP τοξίνες = 0,16 μg OA equivalents/g ολικού ιστού (ή 160 μg OA equivalents/kg ολικού ιστού).

Θετ.(+++): Θάνατος και των τριών ποντικών

Οι Croci et al., (1994) μελέτησαν την εξυγίανση ζωντανών τοξικών μυδιών κατόπιν εμφύσησης σε οξονισμένο θαλασσινό νερό (360 mg O₃/h). Παρατηρήθηκε πλήρης εξυγίανση των μυδιών (καταστροφή OA) σε δείγματα μετά από 3 μέρες, αλλά υπήρχαν και δείγματα τα οποία παρέμεναν τοξικά και μετά από 6 μέρες. Σύμφωνα με άλλη έρευνα (Reboreda et al., 2010) επιβαρυνόμενα με τοξίνες μύδια δεν εξυγιάνθηκαν πλήρως μετά από 24 ώρες σε οξονισμένο θαλασσινό νερό.

Σε ότι αφορά την επίδραση του όζοντος στις DSP τοξίνες στα ολόκληρα αποκελφωμένα μύδια και στον ομογενοποιημένο ολικό ιστό παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στην ποσοστιαία μείωση, η οποία ήταν πολύ υψηλότερη στον ομογενοποιημένου ολικό ιστό μυδιών (Σχήμα 29). Το περιεχόμενο σε τοξίνες στο ομογενοποιημένο δείγμα μειώθηκε με οξονισμό από 25% (από 0.32 μg/g σε 0.24 μg/g) έως 100% (από 0.16 μg/g σε μη ανιχνεύσιμη ποσότητα) για το ελεύθερο OA, από 39% (από 3.26 μg/g σε 2.00 μg/g) έως 83% (από 0.83 μg/g σε 0.11 μg/g) για τους εστέρες του OA και από 51% (από 2.96 μg/g σε 1.46 μg/g) έως 66% (από 1.06 μg/g σε 0.36 μg/g) για το συνολικό OA. Στην περίπτωση των ολόκληρων αποκελφωμένων μυδιών τα αντίστοιχα ποσοστά αυτά κυμαίνονται από 6% (από 2.26 μg/g σε 2.12 μg/g) έως 21% (από 1.90 μg/g σε 1.51 μg/g), από 25% (από 6.84 μg/g σε 5.58 μg/g) έως 57% (από 0.70 μg/g σε 0.30 μg/g) και από 21% (από 12.80 μg/g σε 10.08 μg/g) έως 33% (από 4.94 μg/g σε 3.40 μg/g). Το γεγονός αυτό αιτιολογείται πιθανότατα από την αποτελεσματικότερη διείσδυση του όζοντος στους ιστούς και την ευκολότερη αντίδραση του με τα μόρια του OA. Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι παρατηρήθηκε μεγαλύτερη μείωση στους εστέρες του OA από ότι στο ελεύθερο OA τόσο στα ολόκληρα αποκελφωμένα μύδια όσο και στα ομογενοποιημένα. Αυτό συμφωνεί με τα αποτελέσματα της έρευνας των Reboreda et al. (2010), στην οποία παρατηρήθηκε μείωση της DTX-3 (εστέρες του OA) κατόπιν οξονισμού.

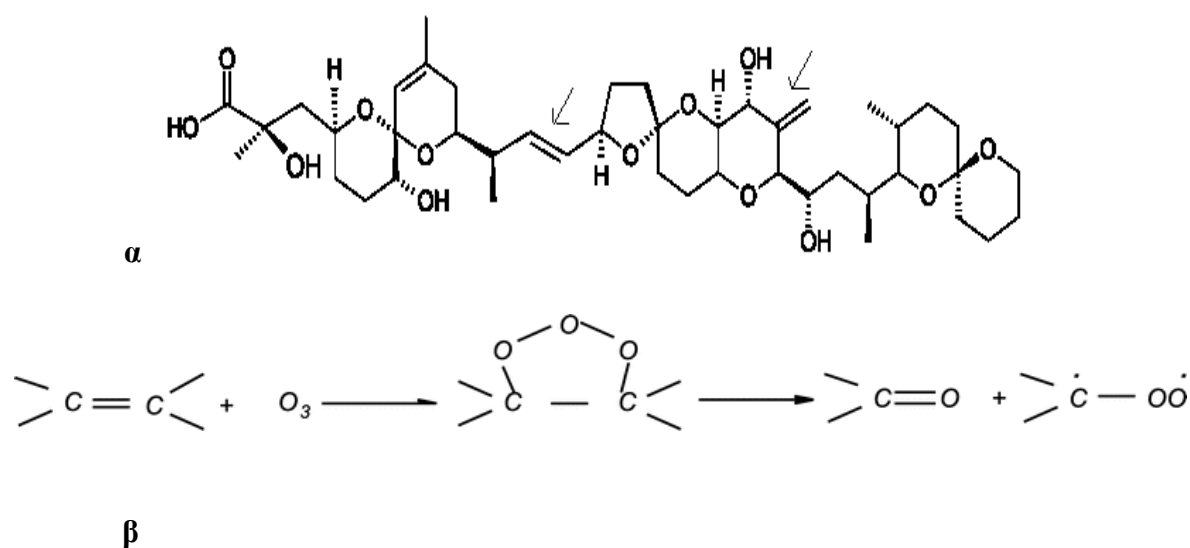


Σχήμα 29. Μέση ποσοστιαία μείωση DSP τοξινών μετά την επίδραση αερίου όζοντος (15 ppm / 6 h) σε ολόκληρα αποκελυφωμένα μύδια και ομογενοποιημένο ολικό ιστό μυδιών.

Δύο από τα αρνητικά δείγματα, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα ελέγχου, παρέμειναν αρνητικά με βάση την MBA και μετά τον οζονισμό με συγκεντρώσεις OA μη ανιχνεύσιμες, ενώ υπήρχε και ένα δείγμα που από αρνητικό (πέθανε ένα ποντίκι στην MBA) κατέστη θετικό μετά τη κατεργασία (δείγμα 19). Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε α) στην ανομοιογένεια του δείγματος αφού τα δείγματα της αγοράς περιλαμβάνουν μύδια από διαφορετικές τοποθεσίες δειγματοληψίας είτε β) στη πιθανή μεταφορά τοξινών από άλλα μέρη του μυδιού (Reboreda et al., 2010).

Πιθανή εξήγηση του μηχανισμού δράσης του όζοντος στις τοξίνες της ομάδας του OA στα μύδια είναι η δέσμευση του όζοντος στους διπλούς δεσμούς του μορίου τόσο στην ελεύθερη όσο και στην εστεροποιημένη μορφή του (Soriano et al., 2003). Το όζον είναι γνωστό ότι αντιδρά στους διπλούς δεσμούς σχηματίζοντας γέφυρες (οζονίδια) (Σχήμα 30) που στην συνέχεια διασπώνται (Smith, 2004) με αποτέλεσμα να μην ανιχνεύεται με LC-MS/MS. Είναι δε πιθανόν, τα προϊόντα διάσπασης του OA να είναι λιγότερα τοξικά για τα ποντίκια. Βέβαια, υπάρχει η πιθανότητα οι εστέρες του OA να μετατρέπονται σε ελεύθερη

μορφή κατά τη κατεργασία των δειγμάτων με όζον με αποτέλεσμα να παρατηρείται μικρότερη μείωση της ελεύθερης μορφής του ΟΑ.



Σχήμα 30. α) Διπλοί δεσμοί του οκταδαϊνού οξέος στους οποίους το όζον μπορεί να δεσμευτεί, β) αντίδραση όζοντος στο διπλό δεσμό.

Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε στην Αργεντινή το 2011 μελετήθηκε η επίδραση του αέριου όζοντος στη ποιότητα του βοδινού κρέατος σε θερμοκρασία ψυγείου. Σε έκθεση αέριου όζοντος 1ppm για 3 ώρες σε θερμοκρασίες 0-4°C μειώθηκε σημαντικά ο πληθυσμός των μικροοργανισμών (ολική μεσόφιλη χλωρίδα και *E.coli*) χωρίς να μεταβληθεί το χρώμα ή να αυξηθεί η οξείδωση του προϊόντος (Coll Cardenas et al., 2011). Σε μια άλλη έρευνα για το βοδινό κρέας οι Polhman et al., το 2002 στις ΗΠΑ, μελέτησαν την επίδραση του όζοντος σε διάλυμα (1%) σε συνδυασμό με άλλες ενώσεις όπως το διοξείδιο του χλωρίου, η χλωριούχος ακετυλπυριδίνη, το οξικό οξύ και το φωσφορικό νάτριο. Μελέτησαν τους μικροοργανισμούς (*E.coli.*, *Salmonella typhimurium* και ολική μεσόφιλη χλωρίδα) καθώς και το χρώμα και την οσμή του κρέατος. Συμπεράναν ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοσδήποτε συνδυασμός του όζοντος με τις παραπάνω ενώσεις για την προστασία του κρέατος από τους μικροοργανισμούς καθώς παρατήρησαν ελάχιστη αλλοίωση στο χρώμα και στην οσμή του προϊόντος.

Ο οζονισμός έχει χρησιμοποιηθεί για την εξυγίανση των σιτηρών από μυκοτοξίνες. Οι Protocor et al., το 2004 μελέτησαν την επίδραση του οζονισμού στις μυκοτοξίνες σε φυστίκια και αλεύρι. Παρατηρήθηκε ότι υπήρξε διάσπαση μέχρι 60% της αφλατοξίνης B₁ μετά από έκθεση σε αέριο όζον συγκέντρωσης 25 mg/ml, για χρόνο έκθεσης 15 min, σε θερμοκρασία δωματίου.

Άλλη έρευνα επικεντρώθηκε στην απομάκρυνση του φυτοφάρμακου fenitrothion με χρήση διαλύματος όζοντος. Οι δόσεις όζοντος που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 1 και 2 ppm σε δείγματα μαρουλιού, τοματών και φραουλών. Το fenitrothion διασπάστηκε πλήρως στην περίπτωση του μαρουλιού σε δόση όζοντος 1 ppm ενώ στην περίπτωση της τομάτας και των φραουλών το φυτοφάρμακο διασπάστηκε πλήρως σε δόση όζοντος 2 ppm (Ikeura et al., 2011).

Μεταβολές στο βαθμό οξείδωσης.

Οι τιμές του TBA στα δείγματα μυδιών πριν και μετά τον οζονισμό ήταν 0.10 mg και 0.21 mg μηλονικής διαλδεύδης (MDA) /kg. Μολονότι η διαφορά των τιμών στο TBA είναι διπλάσια, η οποία ήταν αναμενόμενη αφού το όζον επιδρά στους ακόρεστους δεσμούς των λιπαρών οξέων (Gottshalk et al., 2010) προκαλώντας οξείδωση των τελευταίων, ήταν πολύ χαμηλότερες από το προτεινόμενο όριο του TBA, 2 mg MDA/kg (Connell, 1995) πέραν του οποίου το προϊόν θεωρείται οξειδωμένο (οργανοληπτικά). Αυτό είναι ενδεικτικό ότι ήταν αμελητέα η επίδραση του οζονισμού στην οξείδωση των λιπαρών στα δείγματα μυδιών. Σε συμφωνία με την παρούσα έρευνα, οι Manousaridis et al., (2005) δεν παρατήρησαν σημαντικές διαφορές στο βαθμό οξείδωσης (TBA) στο δείγμα ελέγχου και σε οζονισμένα δείγματα.

Οργανοληπτική αξιολόγηση.

Δεν υπήρχε εμφανής αλλαγή της εμφάνισης ή της δομής στα δείγματα μετά τον οζονισμό. Οι τιμές στην δομή των μυδιών πριν και μετά τον οζονισμό ήταν παρόμοιες, 10.0 και 9.8 αντίστοιχα. Από την άλλη πλευρά, οι τιμές για την οσμή μειώθηκαν μετά τον οζονισμό σε σύγκριση με τα δείγματα ελέγχου, από 10.0 σε 8.1, παραμένοντας ωστόσο

υψηλά πάνω από το αποδεκτό όριο (τιμή 7) (Chang et al., 1998). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στην εργασία των Manousaridis et al., (2005) οι οποίοι μελέτησαν οξονισμένα μύδια την επίδραση του όζοντος στο χρόνο ζωής, στη δομή, στη γεύση και στην οσμή μυδιών.

6. Συμπεράσματα

Οι περισσότερες έρευνες επιβεβαιώνουν ότι το οκαδαϊκό οξύ προέρχεται από τα δινομαστιγωτά του είδους *Dinophysis*. Στην Ιρλανδία, η DTX-2, ισομερές του OA, απομονώθηκε από μύδια και η DTX-3 βρέθηκε σε πλαγκτόν και σε οστρακοειδή. Όλες οι λιπόφιλες τοξίνες μπορούν να εκχυλιστούν από το πλαγκτόν και τα οστρακοειδή με οργανικούς διαλύτες όπως η ακετόνη, η μεθανόλη και το ακετονιτρίλιο. Η χρήση της ακετόνης απαιτείται στην βιολογική δοκιμή για τον προσδιορισμό του OA, DTXs, PTXs και YTXs. Ωστόσο, η χρήση 80% υδατικής μεθανόλης είναι ο πιο αποτελεσματικός διαλύτης εκχύλισης των παραπάνω τοξινών για μεθόδους όπως η HPLC με φθορισμομετρικό ανιχνευτή και η LC-MS/MS. Μετά την προσθήκη μίγματος μεθανόλης/νερού, οι τοξίνες μπορούν να περάσουν στην χλωροφορμική φάση και μετά από συλλογή και εξάτμιση να επαναδιαλυθούν στη συνέχεια σε μεθανόλη και να εγχυθούν στο όργανο της υγρής χρωματογραφίας. Όμως οι εστέρες (DTX-3) πρέπει να υδρολυθούν στις μητρικές τοξίνες με χρήση υδατικής μεθανόλης με NaOH 0.25M. Η δινοφουσιστοξίνη-1 (DTX-1) ήταν υπεύθυνη για τη διαρροϊκή δηλητηρίαση από οστρακοειδή στην Ιαπωνία προερχόμενη από το δινομαστιγωτό *Dinophysis fortii*. Η DTX-1 απαντάται σπάνια στην Ευρώπη παρόλο που ήταν η κύρια τοξίνη σε οστρακοειδή στη Νορβηγία. Στην παρούσα εργασία η κύρια τοξίνη που προσδιορίστηκε ήταν το OA σε συγκεντρώσεις 0.56 έως 62.07 $\mu\text{g/g}$ ΗΠ. Βέβαια προσδιορίστηκαν και εστεροποιημένες μορφές του OA σε συγκεντρώσεις από 0.20 έως 34.40 $\mu\text{g/g}$ ΗΠ. Οι συγκεντρώσεις που υπολογίστηκαν ήταν υψηλές κάτι το οποίο οι αρχές πρέπει να λάβουν σοβαρά υπόψη τους. Είναι επικίνδυνο για τη δημόσια υγεία να διοχετευτούν στην αγορά τέτοια προϊόντα χωρίς να ελεγχθούν. Επειδή τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου ήταν χαμηλά (LOD:0.015 $\mu\text{g/g}$ ΗΠ, LOQ:0.050 $\mu\text{g/g}$ ΗΠ) σε πιθανή μείωση των αποδεκτών ορίων είτε από την ΕΕ είτε από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε η μέθοδος LC-MS/MS είτε η HPLC-FLD όπου η MBA δεν θα μπορεί να χρησιμοποιηθεί. Επιπρόσθετα, η πολύ καλή συμφωνία της MBA τόσο με την HPLC-FLD όσο και με την LC-MS/MS ενισχύει το παραπάνω συμπέρασμα για χρήση της υγρής χρωματογραφίας για επίσημο έλεγχο των πιθανά επιβαρυνμένων μυδιών. Πρώτη φορά χρησιμοποιείται ποσοτικός προσδιορισμός των OA, DTX-1 και των εστέρων τους με LC-MS/MS στην

Ελλάδα όπως και για πρώτη φορά γίνεται έρευνα δειγμάτων από την περιοχή του Μαλιακού Κόλπου.

Στη βιβλιογραφία υπάρχουν λίγες αναφορές για την εξυγίανση επιβαρυμένων μυδιών από τοξίνες. Δεν υπάρχουν καθόλου έρευνες για εξυγίανση επιβαρυμένων μυδιών με DSP τοξίνες με χρήση ακτινοβολίας και αερίου όζοντος. Το προϊόν ήταν αποκελυφωμένο-κατεψυγμένο και σ' αυτό επιτεύχθηκε μείωση 29% σε δόση ακτινοβολίας 6kGy και 34.5% για χρήση όζοντος 15 ppm για χρόνο έκθεσης 6 ώρες. Ο οζονισμός είναι μία υποσχόμενη μέθοδος επεξεργασίας δειγμάτων για την διάσπαση ρυπαντών στα τρόφιμα με μικρή μείωση των οργανοληπτικών τους χαρακτηριστικών. Βέβαια, απαιτείται βελτιστοποίηση της μεθόδου με αέριο όζον όσον αφορά τη δόση όσο και το χρόνο έκθεσης των δειγμάτων. Μεγαλύτερος αριθμός δειγμάτων, χρήση όζοντος και για άλλες κατηγορίες βιοτοξινών στα μύδια θα μπορούσαν στο μέλλον να χρησιμοποιηθούν για καλύτερα αποτελέσματα.

Στις ΗΠΑ, υπολογίστηκε ότι το κόστος στην οικονομία της χώρας ήταν 75 εκατομμύρια δολάρια το χρόνο από την παρουσία των HABs για την περίοδο 1987-2000. Το κόστος αφορούσε σε ζημιές στην δημόσια υγεία, στην εμπορική αλιεία, στην επαναλειτουργία των μονάδων, στο τουρισμό, στον έλεγχο και στη διαχείριση των τοξικών επεισοδίων (Hinder et al., 2011). Στην Ελλάδα το 2006 καλλιεργούνταν 15242 κιλά κυδώνια, 28299240 κιλά μύδια και 3270 κιλά στρείδια με αξία 76241€, 11986435€ και 15405€ αντίστοιχα (Ελληνική Στατιστική Αρχή). Σύμφωνα με τα παραπάνω στατιστικά στοιχεία παρατηρείται ότι είναι μεγάλος ο όγκος των μυδιών που παράγονται στην Ελλάδα αλλά και υψηλή η αξία τους. Σε περιπτώσεις τοξικών επεισοδίων που συνήθως διαρκούν μήνες, τα οικονομικά των αλιέων αλλά και της χώρας αντιμετωπίζουν σοβαρό πρόβλημα όπως υπολογίστηκε και στις ΗΠΑ. Τα τοξικά επεισόδια δεν είναι γνωστό ούτε που μπορούν να συμβούν ούτε πότε δυσχεραίνοντας την κατάσταση. Σε κάθε περίπτωση είναι επιτακτική η λύση της εξυγίανσης των τοξικών μυδιών με μεθόδους γρήγορες, ασφαλείς και όσο το δυνατόν οικονομικά συμφέρουσες. Η μέθοδος του οζονισμού θα μπορούσε να αποτελέσει μια από αυτές διότι ικανοποιεί όλα τα παραπάνω κριτήρια.

7. Περίληψη

Στη παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε α) ο προσδιορισμός των τοξινών της ομάδας του οκαδαϊκού οξέος (OA) σε μύδια από τον Ελλαδικό χώρο, τα οποία επιλέχθηκαν με κριτήριο το θετικό αποτέλεσμα στη βιολογική δοκιμή στα τοξικά επεισόδια της περιόδου 2006-2007, με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με φθορισμομετρικό ανιχνευτή (HPLC-FLD), με υγρή χρωματογραφία-φασματογραφία μαζών (LC-MS/MS) και πραγματοποιήθηκε η σύγκριση αυτών με την μέθοδο αναφοράς, τη βιολογική δοκιμή (MBA) και β) προσπάθεια εξυγίανσης των επιβαρυνμένων οστρακοειδών με τις τεχνικές της ακτινοβόλησης και του οζονισμού. Το ελεύθερο OA και DTX-1 προσδιορίστηκαν με HPLC-FLD και LC-MS/MS, ενώ οι εστέρες τους προσδιορίστηκαν με LC-MS/MS μετά την αλκαλική υδρόλυση των δειγμάτων. Το όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης ήταν 0.015 $\mu\text{g/g}$ ηπατοπαγκρέατος (HP) και 0.050 $\mu\text{g/g}$ HP αντίστοιχα για την HPLC-FLD και 0.045 $\mu\text{g/g}$ HP και 0.135 $\mu\text{g/g}$ HP αντίστοιχα για την LC-MS/MS. Η σύγκριση μεταξύ των δύο αναλυτικών τεχνικών έδειξε άριστη συμφωνία (100%), ενώ η σύγκριση και των δύο με τη βιολογική δοκιμή έδειξε συμφωνία 97.1%. Με την ακτινοβόληση παρατηρήθηκε μείωση 12-36% για το ελεύθερο OA, 8-53% για τους εστέρες του OA και 10-41% για το συνολικό OA. Με τον οζονισμό παρατηρήθηκε μείωση 6-100% για το ελεύθερο OA, 25-83% για τους εστέρες του OA και 21-66% για το συνολικό OA. Μεγαλύτερη μείωση του OA παρατηρήθηκε στον ομογενοποιημένο ιστό μυδιού σε σχέση με τα ολόκληρα αποκελφωμένα μύδια. Σημαντικές διαφορές δεν παρατηρήθηκαν μεταξύ οζονισμένων και μη οζονισμένων μυδιών τόσο οργανοληπτικά όσο και στο TBA.

8. Abstract

An approach involving both chemical and biological methods was undertaken for the detection and quantification of the marine toxins okadaic acid (OA), dinophysistoxin-1 (DTX-1) and their respective esters in mussels from different sampling sites in Greece during the period 2006–2007. Samples were analyzed by means of a) high performance liquid chromatography with fluorometric detection (HPLC-FLD), using 9-athryldiazomethane (ADAM), as a pre-column derivatization reagent, b) liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and c) the mouse bioassay. Free OA and DTX-1 were determined by both HPLC-FLD and LC-MS/MS, while their respective esters were determined only by LC-MS/MS after alkaline hydrolysis of the samples. The detection limit (L.O.D.) and quantification limit (L.O.Q.) of the HPLC-FLD method were 0.015 µg/g HP and 0.050 µg/g HP, respectively, for OA. The detection limit (L.O.D.) and quantification limit (L.O.Q.) of the LC-MS/MS method were 0.045 µg/g HP and 0.135 µg/g HP, respectively, for OA. Comparison of results between the two analytical methods showed excellent agreement (100%), while both HPLC-FLD and LC-MS/MS methods showed an agreement of 97.1% compared to the mouse bioassay. In the present study, both ozonation (15 mg kg⁻¹ for 6 h) and γ-irradiation (6 kGy) have been utilized in order to reduce toxin content of contaminated shucked mussels, collected during the DSP episodes of 2007 and 2009 in Greece. DSP toxicity was detected using the mouse bioassay (MBA) while determination of toxin content of the okadaic acid (OA) group (both free and esterified forms) was conducted by LC/MS/MS analysis. Toxin reduction using γ-irradiation was in the range of 12-36%, 8-53% and 10-41% for free OA, OA esters and total OA respectively. Appearance and texture of irradiated mussels deteriorated, pointing to a low potential for commercial use of this method. Ozonation of mussels resulted in toxin reduction in the range of 6-100%, 25-83% and 21-66% for free OA, OA esters and total OA, respectively. Reduction of OA content was substantially higher in homogenized mussel tissue, compared to that of whole shucked mussels. In addition, differences detected with regard to quality parameters (TBA, sensory attributes) between ozonated and control mussels were not considerable. Present results indicate that upon optimization, ozonation may have the potential for post-harvest commercial DSP detoxification purposes in shucked mussels.

8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Aasen, J., Samdal, I.A., Miles, C.O., Dahl, E., Briggs, L.R., Aune T., 2005. Yessotoxins in Norwegian blue mussels (*Mytilus edulis*): Uptake from *Protoceratium reticulatum*, metabolism and depuration. *Toxicon*, 45, 265-272.

Akasaka, K., Ohrui, H., Meguro, H., and Yasumoto, T. (1996). Fluorimetric determination of diarrhetic shellfish toxins in scallops and mussels by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 729, 381-386.

Aligizaki K., Nikolaidis, G., Katikou, P., Baxevanis, A.D., and Abatzopoulos, T.J. (2008). Potentially toxic epiphytic *Prorocentrum* (Dinophyceae) species in Greek coastal waters. *Harmful Algae* (in press).

Allenmark, S., Chelminska-Bertilsson, M., and Thomson, R.A. (1990). N-(9-acridinyl)-bromoacetamide – A powerful reagent for phase-transfer-catalyzed fluorescence labeling of carboxylic acids for liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, 185(2), 279-285.

Andersen, P. (Ed) (1996). Design and implementation of some harmful algal monitoring systems. Intergovernmental Oceanographic Commission, Technical Series, 44, UNESCO, Paris.

Andersen, P., Hald, B., and Emsholm, H. (1996). Toxicity of *Dinophysis acuminata* in Danish coastal waters. In: Yasumoto, T., Oshima, Y., and Fukuyo, Y (Eds), *Harmful and Toxic Algal Blooms*, Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, pp., 281-283.

Anderson, D.M. (1989). Toxic algal blooms and red tides: A global perspective. In: Okaichi, T., Anderson, D.M., and Nemoto, T. (Eds), *Red Tides: Biology, Environmental Science and Technology*, Elsevier Science Inc., New York, pp. 11-16.

Anderson, D.M., Fukuyo, Y., and Mutsuoka, K. (1995). Cyst methodologies. In: Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., and Cembella, A.D. (Eds), *Manual on Harmful*

Marine Microalgae, Manuals and Guides, 33, Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, pp. 229-249.

Andrews, L.S., Grodner, R.M., 2004. Ionizing radiation of seafood. ACS Symp. Ser. 875, 151-164.

Απόφαση ΥΠΑΑΤ 298909/25-11-2002. Εθνικό Πρόγραμμα Επιτήρησης Ζωνών ή Περιοχών Παραγωγής Δίθυρων Μαλακίων για Παρουσία Θαλασσίων Βιοτοξινών. Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων.

Απόφαση 2002/225/EK. Απόφαση της Επιτροπής της 15ης Μαρτίου 2002 για τον καθορισμό λεπτομερών κανόνων για την εφαρμογή της Οδηγίας 91/492/ΕΟΚ του Συμβουλίου όσον αφορά τα ανώτατα όρια και τις μεθόδους ανάλυσης για ορισμένες θαλάσσιες βιοτοξίνες στα δίθυρα μαλάκια, τα εχινόδερμα, τα χιτωνόζωα και τα θαλάσσια γαστερόποδα. Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης, L75, 62-64.

Απόφαση 2002/226/EK. Απόφαση της Επιτροπής της 15ης Μαρτίου 2002 για τη θέσπιση ειδικών υγειονομικών ελέγχων σχετικά με τη συλλογή και την επεξεργασία ορισμένων δίθυρων μαλακίων με επίπεδο αμνησιακής τοξίνης των μαλακίων (ASP) που υπερβαίνει την οριακή τιμή που έχει καθοριστεί στην Οδηγία 91/492/ΕΟΚ του Συμβουλίου. Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης, L75, 65-66.

Aune, T., and Yndestad, M. (1993). Chapter 5. Diarrhetic shellfish poisoning. In: Falconer, I.R. (Ed), Algal Toxins in Seafood and Drinking Water, Academic Press, London, UK, pp. 87-104.

Aune, T., Yasumoto, T., and Engeland, E.J. (1991). Light and scanning electron microscopic studies on effects of marine algal toxins toward freshly prepared hepatocytes. Toxicological and Environmental Health, 34, 1-10.

Batzios, Ch., Angelidis, P., Papapanagiotou, E.P., Moutopoulos, D.K., Anastasiadou, Ch., Chrisopolitou V., 2004. Greek Consumer's Image of the Cultured Mussel Market. Aquacult Int. 12: 239-257.

Bauder, A.G., Cembella, A.D., and Quilliam, M.A. (1996). Dynamics of the diarrhetic shellfish toxins from the dinoflagellates *Prorocentrum lima*, in the bay scallop, *Argopecten irradians*. In: Yasumoto, T., Oshima, Y., and Fukuyo, Y. (Eds), Harmful and

Toxic Algal Blooms, Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, pp. 433-436.

Bauder, A.G., Cembella, A.D., Bricelj, V.M., and Quilliam, M.A. (2001). Uptake and fate of diarrhetic shellfish poisoning toxins from the dinoflagellate *Prorocentrum lima* in the bay scallop *Argopecten irradians*. *Marine Ecology Progress Series*, 213, 39-52.

Bernd Christian and Bernd Luckas. Determination of marine biotoxins relevant for regulations: from the mouse bioassay to coupled LC-MS methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391 (2008) 117-134.

Berthomé, J-P, and Beline, C. (1988). Bilan des perturbations phytoplanctoniques observées sur les côtes françaises en 1985. Nantes: I.F.R.E.MER.

Bialojan, C., and Takai, A. (1988). Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. *Biochemical Journal*, 256(1), 283-290.

Blanco, J., Fernández, M.L., Mariño, J., Reguera, B., Míguez, A., and Maneiro, J. (1995). From Dinophysis spp. toxicity to DSP outbreaks: A preliminary model of toxin accumulation in mussels. In: Lassus, P., Arzul, G., Erard, E., Gentien, P., and Marcaillou (Eds), *Harmful Marine Algal Blooms*, Lavoisier, Paris, pp. 777-782.

Blanco, J., Fernández, M.L., Míguez, A., and Maroño, A. (1999). Okadaic acid depuration in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. One- and two- compartment models and the effect of environmental conditions. *Marine Ecology Progress Series*, 158, 165-175.

Black, J.L., Jaczynski, J., 2008. Effect of water activity on the inactivation kinetics of *Escherichia coli* O157:H7 by electron beam in ground beef, chicken breast meat, and trout fillets. *Int. J. Food Sci. Technol.* 43, 579-586.

Botana, L.M., Rodriguez-Vieytes, M., Alfonso, A., and Louzao, M.C. (1996). Phycotoxins: Paralytic shellfish poisoning and diarrhetic shellfish poisoning. In: Nollet, L.M.L. (Ed), *Handbook of Food Analysis – Residues and other food component analysis*, vol. 2, pp. 1147-1169.

Bouaicha, N., Hennion, M.C., and Sandra, P. (1997). Determination of okadaic acid by micellar electrokinetic chromatography with ultraviolet detection. *Toxicon*, 35, 273-281.

Bryant, E.A., Fulton, G.P., Budd, G.L., 1992. Disinfection alternatives for safe drinking water. Van Nostrand Reinhold, New York.

Bruhn, C.M., 1995. Strategies for communicating the facts on food irradiation to consumers. *J. Food Protect.* 58, pp. 213–216.

Campbell Katrina, Vilarino Natalia, Botana M. Luis, Elliot T. Christopher. A European perspective on progress in moving away from the mouse bioassay for marine-toxin analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, 30 (2011) 239-253.

Carmody, E.P., James, K.J., Kelly, S.S, 1996. Dinophysistoxin-2: The predominant diarrhoeic shellfish toxin in Ireland. *Toxicon*, 34, 351-359.

Cardenas F.Coll, S. Andres, Giannuzzi L., Zaritzky N. Antimicrobial action and effects on beef quality attributes of a gaseous ozone treatment at refrigeration temperatures. *Food Control* 22 (2011) 1441-1447.

Cembella, A.D. (1989). Occurrence of okadaic acid, a major diarrhetic shellfish toxin, in natural populations of *Dinophysis* spp. from the eastern coast of North America. *Journal of Applied Phycology*, 1, 307-310.

Chang, K.L.B., Chang, J., Shiau, C.-Y., Pan, B.S., 1998. Biochemical, Microbiological, and Sensory Changes of Sea Bass (*Lateolabrax japonicus*) under Partial Freezing and Refrigerated Storage. *J Agr Food Chem.* 46: 682-686.

Chin, J.D., Quilliam, M.A., Frémy, J-M, Mohapatra, S.K., and Sikorska, H.M. (1995). Screening of okadaic acid by immunoassay. *Journal of AOAC International*, 78,508-513.

Chouliara, I., Savvaidis, I.N., Panagiotakis, N., Kontominas, M.G., 2004. Preservation of salted, vacuum-packaged, refrigerated sea bream (*Sparus aurata*) fillets by irradiation: Microbiological, chemical and sensory attributes. *Food Microbiol.* 21, 351-359.

Chouliara, I., Savvaidis, I.N., Riganakos, K., Kontominas, M.G., 2005. Shelf-life extension of vacuum-packaged sea bream (*Sparus aurata*) fillets by combined γ -irradiation and refrigeration: Microbiological, chemical and sensory changes. J. Sci. Food Agric. 85, 779-784.

Ciminiello, P., Dell' Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Magno, G.S., Santelia, F., and Tsoukatou, M. (2004). Investigation of the toxin profile of Greek mussels *Mytilus galloprovincialis* by liquid chromatography – mass spectrometry. Toxicon, 47, 174-181.

Codex Alimentarius (2004). Report of the Joint FAO/IOC/WHO ad hoc Expert Consultation on Biotoxins in Bivalve Molluscs, Sept. 26-30, Oslo, Norway.

Cohen, P. (1989). The structure and regulation of protein phosphatases. Annual Review of Biochemistry, 58, 453-508.

Cohen, P., Holmes, C.F.B., and Tsukitani, Y. (1990). Okadaic acid: A new probe for the study of cellular regulation. Trends in Biochemical Sciences, 15, 98-102.

Coleby, B., Shewan, J.M., 1965. The radiation preservation of fish. In: Borgstrom, G. (Ed.), Fish as Food. Academic Press, New York, Vol. 4, pp. 419.

Connell, J.J. 1995. Control of Fish Quality, 4th Edition. Fishing News Books Limited, Farnham, Surrey, UK, pp. 157: 159–160.

Christian, B., Luckas, B., 2008. Determination of marine biotoxins relevant for regulations from the mouse bioassay to coupled LC-MS methods. Anal. Bioanal Chem. 391, 117-134.

Croci, L., Draisci, R., Lucentini, L., Cozzi, L., Giannetti, L., Toti, L., and Stacchini, A. (1995). Influence of the extraction procedure on recovery of okadaic acid from experimentally contaminated mussels. Toxicon, 33(11), 1511-1518.

Croci, L., Toti, L., De Medici, D., and Cozzi, L. (1994). Diarrhetic shellfish poison in mussels: Comparison of methods of detection and determination of the effectiveness of depuration. International Journal of Food Microbiology, 24, 337-342.

Dahl, E., Aune, T., and Aase, B. (1996). Reddish water due to mass occurrence of *Dinophysis* spp. In: Yasumoto, T., Oshima, Y., and Fukuyo, Y. (Eds), *Harmful and Toxic Algal Blooms*, Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, pp. 265-272.

Della Loggia, R., Sidari, L., Honsel, G., Sosa, S., Viezzoli, A., and Tubaro, A. (1998). The PP2A inhibition assay for DSP monitoring: Two years of experience. *Proceedings of the 8th International Conference on Harmful Algal Blooms*, Vigo, June 1997, 549-550.

Diehl J.F. (1995). *Safety of irradiated foods*. Eds. 2nd. Marcel Dekker, New York.

Dickey, R.W., Granade, H.R., and Bencsath, F.A. (1993). Improved analytical methodology for the derivatization and HPLC-fluorimetric determination of okadaic acid in phytoplankton and shellfish. In: Smayda, T.J., and Shimizu, Y. (Eds), *Phytoplankton Blooms in the Sea*, Elsevier, Amsterdam, 495-499.

Dolmer, P. (1998). Seasonal and spatial variability in growth of *M. edulis* L. in a brackish sound: comparisons of individual mussel growth of size classes. *Fisheries Research*, 34, 17-36.

Doull, J. (1980). Factors influencing toxicology. In: Casarett, L.J., and Bruce, M.C. (Eds), *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*, Macmillan Publishing Co. Inc., pp. 70-83.

Draisci, R., Giannetti, L., Lucentini, L., Marchiafava, C., James, K.J., Bishop, A.G., Healy, B.M., and Kelly, S.S. (1998). Isolation of a new okadaic acid analogue from phytoplankton implicated in diarrhetic shellfish poisoning. *Journal of Chromatography A*, 798, 137-145.

Economou, V., Papadopoulou, C., Brett, M., Kansouzidou, A., Charalabopoulos, K., Filioussis, G., and Seferiadis, K. (2007). Diarrhetic shellfish poisoning due to toxic mussel consumption: The first recorded outbreak in Greece. *Food Additives and Contaminants*, 24(3), 297-305.

Edebo, L., Lange, S., Li, X.P., Allenmark, S., Lindgren, K., and Thompson, R. (1988). Seasonal, geographical and individual variation of okadaic acid content in cultivated mussels in Sweden. *APMIS*, 96(11), 1036-1042.

Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο 8 Νοεμβρίου 2002 Έκθεση σχετικά με την ανακοίνωση της Επιτροπής για τα τρόφιμα και τα συστατικά τροφίμων τα οποία επιτρέπεται να υποβάλλονται σε επεξεργασία με ιοντίζουσα ακτινοβολία στην Κοινότητα.

EUROSTAT (2005). Statistics on European Agriculture and Fisheries, Aquaculture. <http://europa.eu.int/comm/eurostat>.

EU Parliament, 2009. List of Member States' authorisations of food and food ingredients which may be treated with ionising radiation. Off. J. Eur. Union C 283, 52, 5.

EU Recommendation 2007/526, 2007. Commission Recommendation of 18 June 2007 on guidelines for the accommodation and care of animals used for experimental and other scientific purposes. Off. J. Eur. Union L 197, 1-89.

Fanny Rollin, Jean Kennedy and Josephine Wills. Consumers and new food technologies. Trends in Food Science & Technology 22 (2011) 99-111.

Farkas Jozsef and Csilla Mohacsi-Farkas. History and future of food irradiation. Trends in Food Science & Technology 22 (2011) 121-126.

Fernandes Angela, Joao C.M. Barreira, Amilcar L. Antonio, Albino Bento, M. Luisa Botelho, Isabel C.F.R. Ferreira. Assessing the effects of gamma irradiation and storage time in energetic value and in major individual nutrients of chestnuts. Food Chemistry 127(2011) 1105-1113.

Fernández, M.L., Miguez, A., Cacho, E., and Martínez, A. (1996). Detection of okadaic acid esters in the hexane extracts of Spanish mussels. Toxicon, 34, 381-387.

Fernández, M.L., Miguez, A., Morono, A., Cacho, E., Martínez, A., and Blanco, J. (1998). Detoxification of low polarity toxins (DTX-3) from mussels *Mytilus galloprovincialis* in Spain. In: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L., Wyatt, T. (Eds), Harmful Algae, Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, pp. 449-452.

Fernández, M.L., Richard, D.J.A., and Cembella, A.D. (2003). In vivo assays for phycotoxins. In: Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., and Cembella, A.D. (Eds), Manual on

Harmful Marine Microalgae, Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, pp. 347-380.

Flemming, L.A., Bean, J.A., and Baden, D.G. (1995). Epidemiology and Public Health. In: Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., and Cembella, A.D. (Eds), Manual on Harmful Marine Microalgae, Manuals and Guides, 33, Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, pp. 475-486).

Frémy, J.M., Gleizes, E., Quod, J.P., Ammar, M., and Turquet, J. (1996). Reliable use of an ELISA test kit for DSP toxin determination in dinoflagellate cultures and shellfish. Abstracts, IXth International Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, Rome, May 24-31, pp. 266.

Frémy, J.M., Puech, L., Krys, S., and Dragacci, S. (1999). Recent advances in analytical procedures for the detection of diarrhetic phycotoxins: A review. Journal of Applied Phycology, 11, 377-384.

Fujiki, H., and Suganuma, M. (1993). Tumor promotion by inhibitors of protein phosphatases 1 and 2A: The okadaic acid class of compounds. Advance Cancer Research, 61, 143-194.

Fux, E., McMillan, D., Bire, R., and Hess, P. (2007). Development of an ultra-performance liquid chromatography–mass spectrometry method for the detection of lipophilic marine toxins. Journal of Chromatography A, 1157, 273–280.

Φώτης, Γ. (1996). Θερμαϊκός Κόλπος: Πηγή Πλούτου της Μακεδονίας, Προβλήματα-Προτάσεις. Ημερίδα: Η μυδοκαλλιέργεια στο Ν. Πιερίας.

Gacutan, R.Q., Tabbu, M.Y., De Castro, T., Gallego, A.B., Bulalacao, M., 1984. Detoxification of *Pyrodinium*-generated shellfish poisoning toxin in *Perna viridis* from Western Samar, Philippines. In: White, A.W., Anraku, M., Hooi, K.-K., (Eds). Proceedings of a consultative meeting held in Singapore 11-14 September 1984, Southeast Asian Fisheries Development Center and the International Development Research Centre, pp.80-85.

Gacutan, R.Q., Tabbu, M.Y., Aujero, E., Icalto, F., J.R., 1985. Paralytic shellfish poisoning due to *Pyrodinium bahamense* var. *compressa* in Mati, Davao Oriental, Philippines. Mar. Biol. 87, 223-227.

Gago-Martinez, A., Rodriguez-Vazquez, J.A., Thibault, P., Quilliam, M.A., 1996. Simultaneous occurrence of diarrhetic and paralytic shellfish poisoning toxins in Spanish mussels in 1993. Nat. Toxins 4, 72-79.

Γαληνού-Μητσούδη, Σ. (2004). Διαχείριση περιοχών παραγωγής οστράκων. Αλιευτικά Νέα, Απρίλιος 2004, 89-93.

Gerssen, A., Mulder, P.P.J., McElhinney, M.A., de Boer, J., 2009. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the detection of marine lipophilic toxins under alkaline conditions. J. Chromatogr. A 1216, 1421-1430.

Gerssen, A., Mulder, P., van Rhijin, H., de Boer, J., 2008. Mass spectrometric analysis of the marine lipophilic biotoxins pectenotoxin-2 and okadaic acid by four different types of mass spectrometers. J. Mass Spectrom. 43, 1140-1147.

Gladan Nincevic Zivana, Ujevic Ivana, Milardi Anna, Marasovic Ivona, Ceredi Alfiero, Pigozzi Silvia, Arapov Jasna and Skejic Sanda. Lipophilic Toxin Profile in *Mytilus galloprovincialis* during Episodes of Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP) in the N.E. Adriatic Sea in 2006. Molecules 16 (2011) 888-899.

Gonzalez, J.C., Fontal, O.I., Vieytes, M.R., Vieites, J.M., Botana, L.M., 2002. Basis for a new procedure to eliminate diarrhetic shellfish toxins from a contaminated matrix. J. Agric. Food Chem. 50, 400-405.

González, J.C., Leirab, F., Vieytes, M.R., Vieites, J.M., Botana, A.M., and Botana, L.M. (2000). Development and validation of a high-performance liquid chromatographic method using fluorimetric detection for the determination of the diarrhetic shellfish poisoning toxin okadaic acid without chlorinated solvents. Journal of Chromatography A, 876(1-2), 117-125.

González, J.C., Vieytes, M.R., Vieites, J.M., and Botana, L.M. (1998). Improvement on sample clean-up for high-performance liquid chromatographic–

fluorimetric determination of diarrhetic shellfish toxins using 1-bromoacetylpyrene. *Journal of Chromatography A*, 793, 63-70.

Gosling, E.M. (1992). Systematics and geographic distribution of *Mytilus*. In: Gosling, E. (Eds), *The Mussel Mytilus: Ecology, Physiology, Genetics and Culture*. Elsevier, Amsterdam, p. 1-20.

Goto, H., Igarashi, T., Yamamoto, M., Yasuda, M., Sekiguchi, R., Watai, M., Tanno, K., Yasumoto, T., 2001. Quantitative determination of marine toxins associated with diarrhetic shellfish poisoning by liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 907, 181-189.

Gottschalk, R., Libra J.A., Saupe, A., 2010. *Ozonation of Water Ozonation and Waste Water*. (2nd ed.) Wiley-VCH, Verlag GmbH & Co, Weinheim, Germany, pp. 49-52.

Guzel-Seydim, Z., Bever, P., & Greene, A.K. (2004). Efficacy of ozone to reduce bacterial populations in the presence of food components. *Journal of Food Microbiology*.

Haamer, J., Andersson, P.O., Lange, S., Li, X.P., and Edebo, L. (1990). Effects of transplantation and reimmersion of mussels *Mytilus edulis* Linnaeus, 1728, on their contents of okadaic acid. *Journal of Shellfish Research*, 9, 109-112.

Hallegraeff, G.M. (1993). A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia*, 32, 79-99.

Hallegraeff, G.M. (1995). 1. Harmful algal blooms: A global overview. In: Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., and Cembella, A.D. (Eds), *Manual on Harmful Marine Microalgae, Manuals and Guides*, 33, Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, pp. 365-371.

Hallegraeff, G.M. (2003). Harmful algal blooms: A global overview. In: Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., and Cembella, A.D. (Eds), *Manual on Harmful Marine Microalgae*, UNESCO Publishing, Paris, pp. 25-49.

Hamano, Y., Kinoshita, Y., and Yasumoto, T. (1985). Suckling mice assay for diarrhetic shellfish toxins. In: Anderson, D., White, A.W., Baden, D.G. (Eds), *Toxic Dinoflagellates*, Elsevier, New York, pp. 383-388.

Hamano, Y., Kinoshita, Y., and Yasumoto, T. (1986). Enteropathogenicity of diarrhetic shellfish toxins in intestinal models. *Journal of Food Hygiene Society of Japan*, 27, 375-379.

Han, L.-B., Liew, M.-H. and Yeh, L.-T., 1992. Preservation of grass prawns by ionizing radiation. *J. Food Protect.* **55**, pp. 198–202.

Harewood, P., Rippey, S., Montesalvo, M., 1994. Effect of gamma irradiation on shelf life and bacterial and viral loads in hard-shelled clams (*Mercenaria mercenaria*). *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2666-2670.

Haystead, T.A.J., Sim, A.T.R., Carling, D., Honnor, R.C., Tsukitani, Y., Cohen, P., and Hardie, D.G. (1989). Effects of the tumour promoter okadaic acid on intracellular protein phosphorylation and metabolism. *Nature*, 337, 78-81.

Hinder L. Stephanie, Hays C. Graeme, Brooks J Caroline, Davies P Angharad, Edwards Martin, Walne W Antoni and Gravenor B Mike. Toxic marine microalgae and shellfish poisoning in the British isles: history, review of epidemiology, and future implications. *Environmental Health* (2011) 1-12.

Holmes, C.F.B. (1991). Liquid chromatography-linked protein phosphatase bioassay: A highly sensitive marine bioscreen for okadaic acid and related diarrhetic shellfish toxins. *Toxicon*, 29, 469-477.

Holmes, M.J., Teo, S.L.M., Lee, F.C., and Khoo, H.W. (1999). Persistent low concentrations of diarrhetic shellfish toxins in green mussels *Perna viridis* from the Johor Strait, Singapore: First record of diarrhetic shellfish toxins from South-East Asia. *Marine Ecology Progress Series*, 181, 257-268.

Hoof, F.V., 1982. Professional risks associated with ozone. In: Masschelein, W.J., Editor, , 1982. *Ozonation manual for water and waste water treatment*, Wiley-Interscience, New York, pp. 200–201.

Hoshiai, G., Susuki, T., Onodera, T., Yamasaki, M., and Taguchi, S. (1997). A case of non-toxic mussels under the presence of high concentrations of toxic dinoflagellate *Dinophysis acuminata* that occurred in Kesennuma Bay, Northern Japan. *Fisheries Science*, 63(2), 317-318.

Hu, T.M., Doyle, J., Jackson, D., Marr, J., Nixon, E., Pleasance, S., Quilliam, M.A., Walter, J.A., and Wright, J.L.C. (1992a). Isolation of a new diarrhetic shellfish poison from Irish mussels. *Journal of the Chemical Society – Chemical Communications*, 39-41.

Hu, T.M., Marr, J., de Freitas, A.S.W., Quilliam, M.A., Walter, J.A., Wright, J.L.C., and Pleasance, S. (1992b). New diol esters (of okadaic acid) isolated from cultures of the dinoflagellates *Prorocentrum lima* and *Prorocentrum concavum*. *Journal of Natural Products*, 55(11), 1631-1637.

Ikeura H., Kobayashi F., Tamaki M. Removal of residual pesticides in vegetables using ozone microbubbles. *Journal of Hazardous Materials* 186 (2011) 956-959.

Ito, H., Adulyatham, P., Sangthong, N. and Ishigaki, I., 1989. Effect of gamma irradiation on frozen shrimps to reduce microbial contamination. *Radiat. Phys. Chem.* **34**, pp. 1009–1011.

Jakabi, M., Gelli, D.S., Torre, J.C., Rodas, M.A., Franco, B.D., Destro, M.T., Landgrafi, M., 2003. Inactivation by ionizing radiation of *Salmonella enteritidis*, *Salmonella infantis*, and *Vibrio parahaemolyticus* in oysters (*Crassostrea brasiliana*). *J. Food Prot.* 66, 1025-1029.

James, K.J., Bishop, A.G., Gillman, M., Kelly, S.S., Roden, C., Draisci, R., Lucentini, L., Giannetti, L., and Boria, P. (1997a). Liquid chromatography with fluorimetric, mass spectrometric and tandem mass spectrometric detection for the investigation of the seafood-toxin-producing phytoplankton, *Dinophysis acuta*. *Journal of Chromatography A*, 777, 213-221.

James, K.J., Carmody, E.P., Gillman, M., Kelly, S.S., Draisci, R., Lucentini, L., and Giannetti, L. (1997b). Identification of a new diarrhetic toxin in shellfish using liquid chromatography with fluorimetric and mass spectrometric detection. *Toxicon*, 35(6), 973-978.

James, K.J., Furey, A., Healy, B., Kelly, S.S., and Twohig, M. (1998). Lumarine-3, a new fluorimetric reagent for the HPLC determination of diarrhetic shellfish poisoning toxins. In: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L., and Wyatt, T. (Eds), *Harmful Algae, Proceedings of the 8th International Conference on Harmful Algae*, Paris,

Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO and Xunta de Galicia, pp. 519-520.

Johansson, N., Granéli, E., Yasumoto, T., Carlsson, P., and Legrand, C. (1996). Toxin production by *Dinophysis acuminata* and *D. acuta* cells grown under nutrient sufficient and deficient conditions. In: Yasumoto, T., Oshima, Y., and Fukuyo, Y. (Eds), Harmful and Toxic Algal Blooms, Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, pp. 277-280.

Kamat, A., Thomas, P., 1999. Recovery and growth of some food-borne pathogens in irradiated low and high fat fish during storage at 2-4°C. *J. Food Saf.* 19, 35-44.

Κανονισμός 853/2004/ΕΚ. Κανονισμός του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 29ης Απριλίου 2004 για τον καθορισμό ειδικών κανόνων υγιεινής για τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης. Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης, L226, 22-82.

Κανονισμός 2074/2005/ΕΚ. Κανονισμός 2074/2005 της Επιτροπής της 5ης Δεκεμβρίου 2005 για θέσπιση μέτρων εφαρμογής για ορισμένα προϊόντα βάσει του Κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 853/2004 και για την οργάνωση επίσημων ελέγχων βάσει των Κανονισμών (ΕΚ) αριθ. 854/2004 και (ΕΚ) αριθ. 882/2004, για την παρέκκλιση από τον Κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 852/2004 και για τροποποίηση των Κανονισμών (ΕΚ) αριθ. 853/2004 και (ΕΚ) αριθ. 854/2004. Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης, L338, 27-59.

Khadre, M.A., Yousef, A.E., Kim, J.-G., 2001. Microbiological aspects of ozone applications in food: A review. *J Food Sci.* 66: 1242-1252.

Kat, M. (1983). Diarrhetic mussel poisoning in the Netherlands related to the dinoflagellate *Dinophysis acuminata*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 49(4-5), 417-427.

Kampelmacher E.H, Combination process in food irradiation. , International Atomic Energy Agency, Vienna (1984).

Katikou, P. (2005). The mussel in the E.U.: Mussel cultivation, processing and marketing present situation and future perspectives in Greece. II World Conference on Mussel, 12-13 September, Vigo, Spain. Organised by ANFACO-CECOPESCA, pp. 165-177.

Kelly, S.S., Bishop, A.G., Carmody, E.P., and James, K.J. (1996). Isolation of dinophysistoxin-2 and the high-performance liquid chromatographic analysis of diarrhetic shellfish toxins using derivadization with 1-bromoacetylpyrene. *Journal of Chromatography A*, 749, 33-40.

Kim, H., Suzuki, T., Lee, K.J., Kim, P.H., Kamiyama, T., Lee, T.S., 2008. The first detection of okadaic acid and its derivatives in Korean bivalves by liquid chromatography – mass spectrometry. *Fisheries Sci.* 74, 433-438.

Kirk, R.S., Sawyer R., 1991. *Pearson's Composition and Analysis of Foods*. (9th ed.) Longman Scientific & Technical, Essex, England. pp. 642-643.

Koehn, R.K., and Gaffney, P.M. (1984). Genetic heterozygosity and growth rate in *Mytilus edulis*. *Marine Biology*, 82, 1-7.

Κουκάρας, Κ. (1999). Παρατηρήσεις στην τροφοληπτική και απεκκριτική δραστηριότητα του μυδιού *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819, σε κλειστό κύκλωμα νερού. Εργασία στα πλαίσια Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη.

Κουκάρας, Κ. (2004). Χωρο-χρονικές μεταβολές επιβλαβών ανθήσεων ειδών του γένους *Dinophysis* Ehrenberg στο Θερμαϊκό Κόλπο. Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη.

Koukaras, K., and Nikolaidis, G. (2004). *Dinophysis* blooms in Greek coastal waters (Thermaikos Gulf, NW Aegean Sea). *Journal of Plankton Research*, 26 (4), 445-457.

Κράββα, Ν. (2000). Γενετική σύσταση και αύξηση πληθυσμών του μυδιού *Mytilus galloprovincialis* στο Θερμαϊκό Κόλπο. Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη.

Larsen K., Petersen D., Wilkins A.L., Samdal I.A., Sandvik M., Rundberget T., Goldstone D., Arcus V., Hovgaard P., Rise F., Rehmann N., Hess P. and Miles C.O. (2007) Clarification of the C-35 Stereochemistries of Dinophysistoxin-1 and Dinophysistoxin-2 and its consequences for binding to protein phosphatase. *Chem Res.Toxicol* 20, 868-875.

Lawrence, J.F., and Scoot, P.M. (1993). Techniques, Applications and Quality Assurance. In: Barcelo, D. (Ed). Environmental Analysis, 273.

Lee, J.S., Igarashi, T., Fraga, S., Dahl, E., Hovgaard, P., and Yasumoto, T., (1989). Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellate species. *Journal of Applied Phycology*, 1, 147-152.

Lee, J.S., Yanagi, T., Kenma, R., and Yasumoto, T. (1987). Fluorometric determination of diarrhetic shellfish toxins by high-performance liquid chromatography. *Agricultural and Biological Chemistry*, 51(3), 877-881.

Lesser, P.M., and Shumway, E.S. (1993). Effects of toxic dinoflagellates on clearance rates and survival in juvenile bivalve molluscs. *Journal of Shellfish Research*, 12(2), 377-381.

Lewis, N.F., 1983. Development of radiation processes for destruction of enteric pathogens viz. Salmonella, staphylococci and Vibrio spp. in fresh and frozen seafoods. *Food Irradiat. Newsl.* 7 1, p. 8

Levine, L., Fujiki, H., Yamada, K., Ojika, M., Gjika, H.B., and van Vunakis, H. (1988). Production of antibodies and development of a radioimmunoassay for okadaic acid. *Toxicon*, 26(12), 1123-1128.

Lubet, P., Brichon, G., Besnard J.Y., Zwingelstein, G., 1985. Composition and metabolism of lipids in some tissues of the mussel *Mytilus galloprovincialis* L. (Moll. bivalvia)-in vivo and in vitro incorporation of 1(3)-[3H]-glycerol. *Comp Biochem B* 82: 425-431

Lucas, D. (1985). La toxine produite par *Dinophysis acuminata*. I.F.R.E.MER, Nantes.

Luckas, B. (1992). Phycotoxins in seafood—toxicological and chromatographic aspects. *Journal of Chromatography*, 624, 439-456.

Luu, H.A., Chen, D.Z.X., Magoon, J., Worms, J., Smith, J., and Homes, C.F.B. (1993). Quantification of diarrhetic shellfish toxins and identification of novel protein phosphatase inhibitors in marine phytoplankton and mussels. *Toxicon*, 31, 75-83.

Madigan L. Thomas, Lee G., Ken, Padula J. David, McNabb Paul and Pointon M. Andrew. Diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins in South Australian shellfish. *Harmful Algae* 5 (2006) 119-123.

Manley and Niegowski (1967). *Drinking water and health*. National Academic Press, Washington.

Manousaridis, G., Nerantzaki, A., Paleologos, E.K., Tsiotsias, A., Savvaidis, I.N., Kontominas M.G., 2005. Effect of ozone on microbial, chemical and sensory attributes of shucked mussels. *Food Microbiology* 22, 1-9.

Marasigan, A.N., Sato, S., Fukuyo, Y., and Kodama, M. (2001). Accumulation of a high level of diarrhetic shellfish toxins in the green mussel *Perna viridis* during a bloom of *Dinophysis caudata* and *Dinophysis miles* in Sapijan Bay, Panay Island, the Philippines. *Fisheries Science*, 67, 994-996.

Marcaillou-Le Baut, C., Bardin, B., Bardouil, M., Bohec, M., Le Dean, L., Masselin, P., and Truquet, P. (1993). DSP depuration rates of mussels reared in a laboratory and an aquaculture pond. In: Smayda, T.J., and Shimitzu, Y. (Eds), *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*, Elsevier, Amsterdam, pp. 531-535.

Marcaillou, C., Gentien, P., Lunven, M., Le Grand, J., Mondeguer, F., Danilou, M.M., Crassous, M.P., and Youenou, A. (2001). *Dinophysis acuminata* distribution and specific toxin content in relation to mussel contamination. In: Hallegraeff, G.M., Blackburn, S.I., Bolch, C.J., and Lewis, R.J. (Eds), *Harmful Algal Blooms 2000*, Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, pp. 356-359.

Marr, J.C., Hu, T., Pleasance, S., Quilliam, M.A., and Wright, J.L.C. (1992). Detection of new 7-O-acyl derivatives of diarrhetic shellfish poisoning toxins by liquid chromatography-mass spectrometry. *Toxicon*, 30, 1621-1630.

Marr, J.C., McDowell, L.M., and Quilliam, M.A. (1994). Investigation of derivatization reagents for the analysis of diarrhetic shellfish poisoning toxins by liquid chromatography with fluorescence detection. *Natural Toxins*, 2, 302-311.

Masselin, P., Lassus, P., and Bardouil, M. (1992). High performance liquid chromatography analysis of diarrhetic toxins in *Dinophysis* spp. from the French coast. *Journal of Applied Phycology*, 4, 385-389.

Matches, J.R. and Liston, J., 1971. Radiation destruction of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Food Sci.* **36**, p. 339.

McCarron, P., Kotterman, M., de Boer, J., Rehmann, N., Hess, P., 2007. Feasibility of gamma irradiation as a stabilisation technique in the preparation of tissue reference materials for a range of shellfish toxins. *Anal. Bioanal. Chem.*, 387, 2487-2493.

McDonanld, J.H., Seed, R., and Koehn, R.K. (1990). Taxonomy of the genus *Mytilus*. *Marine Biology*, 111, 323-333.

McKenzie, L., Truman, P., Satake, M., Yasumoto, T., Adamson, J., Mounne, D., and White, D. (1998). Dinoflagellate blooms and associated DSP-toxicity in shellfish in New Zealand. In: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L., and Wyatt, T. (Eds), *Harmful Algae, Proceedings of the 8th International Conference on Harmful Algae*, Paris, Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO and Xunta de Galicia, pp. 74-77.

Miguez, A., Fernández, M.L., Cacho, E., and Martínez, A. (1998). Mouse survival time as a DSP toxicity criterion. In: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L., and Wyatt, T. (Eds), *Harmful Algae, Proceedings of the 8th International Conference on Harmful Algae*, Paris, Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO and Xunta de Galicia, pp. 239-240.

Morõno, A., Fernández, M.L., Franco, J.M., Martínez, A., Reyero, M.I., Miguez, A., Cacho, E., and Blanco, J. (1998). PSP and DSP detoxification kinetics in mussels, *Mytilus galloprovincialis*: Effect of environmental parameters and body weight. In: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L., and Wyatt, T. (Eds), *Harmful Algae*, Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, pp. 445-448.

Morton, S.L., and Bomber, J.W. (1994). Maximizing okadaic acid content from *Prorocentrum hoffmannianum* Faust. *Journal of Applied Phycology*, 6(1), 41-44.

Mountfort, D.O., Kennedy, G., Garthwaite, I., Quilliam, M., Truman, P., and Hannah, D.J. (1999). Evaluation of fluorometric protein phosphatase inhibition assay in the determination of okadaic acid in mussels. *Toxicon*, 37, 909-922.

Mouratidou, T., Kaniou-Grigoriadou, I., Samara, C., Koumtzis, T., 2004. Determination of okadaic acid and related toxins in Greek mussels by HPLC with fluorimetric detection. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 27 (14), 2153-2166.

Mouratidou, T., Kaniou-Grigoriadou, I., Samara, C., and Koumtzis, T. (2006). Detection of the marine toxin okadaic acid in mussels during a diarrhetic shellfish poisoning (DSP) episode in Thermaikos Gulf, Greece, using biological, chemical and immunological methods. *Science of the Total Environment*, 366, 894-904.

Μπλούκας Ι. (1999). Επεξεργασία και συντήρηση τροφίμων. Εκδόσεις Σταμούλη Α.Ε, Πειραιάς.

Murata, M., Kumagai, M., Lee, J.S., and Yasumoto, T. (1987). Isolation and structure of yessotoxin, a polyether compound implicated in diarrhetic shellfish poisoning. *Tetrahedron Letters*, 28(4), 5869-5872.

Murata, M., Shimatani, M., Sugitani, H., Oshima, Y., and Yasumoto, T. (1982). Isolation and structural elucidation of the causative toxin of the diarrhetic shellfish poisoning. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 48, 549-552.

Nagakama, H., Kaneko, S., Shoma, H., Inamori, H., Fukuda, H., Kominami, R., Sugimura, T., and Nagao, M. (1997). Induction of minisatellite mutation in NIH 3t3 cells by treatment with the tumor promoter okadaic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 94(20), 10813-10816.

Navarro, E., Iglesias, J.I.P., Perez-Camacho, A., Labarta, U., and Beiras, R. (1991). The physiological energetics of mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk) from different cultivation rafts in the Ria de Arosa (Galicia, N.W. Spain). *Aquaculture*, 94, 197-212.

Nerkar, D. P. and Lewis, N. F. 1982. Radicidation for elimination of *Salmonellae* in frogs legs. *J. Food Protection* 45, 820–823.

Nouchpramoul, K., 1985. Elimination of Salmonella in frozen shrimp by radiation treatment. Food Irradiat. Newsl. **8** 1, pp. 14–15.

Οδηγία 86/609/ΕΟΚ. Οδηγία 86/609/ΕΟΚ του Συμβουλίου της 24ης Νοεμβρίου 1986 για την προσέγγιση των νομοθετικών, κανονιστικών και διοικητικών διατάξεων των κρατών μελών σχετικά με την προστασία των ζώων που χρησιμοποιούνται για πειραματικούς και άλλους επιστημονικούς σκοπούς. Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων, L358, 1-28.

Οδηγία 91/492/ΕΚ. Οδηγία 91/492/ΕΟΚ του Συμβουλίου της 15ης Ιουλίου 1991 για τον καθορισμό των υγειονομικών κανόνων που διέπουν την παραγωγή και τη διάθεση στην αγορά των ζώντων διθύρων μαλακίων. Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων, L268, 1-14.

Οδηγία 97/61/ΕΚ. Οδηγία 97/61/ΕΚ του Συμβουλίου της 20ης Οκτωβρίου 1997 για την τροποποίηση του παραρτήματος της Οδηγίας 91/492/ΕΟΚ περί καθορισμού των υγειονομικών κανόνων που διέπουν την παραγωγή και τη διάθεση στην αγορά ζώντων δίθυρων μαλακίων. Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων, L295, 35-36.

Olson, D.G. (1998). Irradiation of Food. Food Technol. 52(1), 56-62.

Π.Δ. 412/94. Προεδρικό Διάταγμα 412/1994 περί υγειονομικών όρων που διέπουν την παραγωγή και τη διάθεση στην αγορά ζώντων δίθυρων μαλακίων και αλιευτικών προϊόντων σε συμμόρφωση προς τις Οδηγίες 91/492/ΕΟΚ, 91/493/ΕΟΚ και 92/48/ΕΟΚ του Συμβουλίου. Εφημερίδα της Κυβερνήσεως της Ελληνικής Δημοκρατίας, Τεύχος Πρώτο, Αριθμός Φύλλου 232.

Pearl Blay, Hui P.M. Joseph, Chang James and Melanson E. Jeremy. Screening for multiple classes of marine biotoxins by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry. Analytical Bioanalytical Chemistry 400 (2011) 577-585.

Πετρίδης, Δ. (2000). Εφαρμοσμένη Στατιστική (με έμφαση στην επιστήμη των τροφίμων), Όμηρος Εκδοτική, Θεσσαλονίκη.

Pleasance, S., Quilliam, M.A., and Marr, J.C. (1992). Ionspray mass spectrometry of marine toxins. IV. Determination of diarrhetic shellfish poisoning toxins in mussel

tissue by liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 6(2), 121-127.

Prachasitthisakdi, Y., Mossel, D.A.A., de Vries, J., van Netten, P., Williams, J.L., Stegeman, H., Farkas, J., 1984. Lethality and flora shift of the psychrotrophic and mesophilic bacterial associations of frozen shrimps and chicken after radicidation. In: Kiss, I., Deák, T., Incze, K. (Eds.), *Microbial Associations and Interactions in Food*. Akadémiai Kiadó, Budapest, pp. 417–428.

Prassopoulou, E., Katikou, P., Georgantelis, D., Kyritsakis, A., 2009. Detection of okadaic acid and related esters in mussels during diarrhetic shellfish poisoning (DSP) episodes in Greece using the mousse bioassay, the PP2A inhibition assay and HPLC with fluorimetric detection. *Toxicon*, 53, 214-227.

Poletti, R., Viviani, R., Casadei, C., Lucentini, L., Giannetti, L., Funari, E., and Draisci, R. (1996). Decontamination dynamics of mussels naturally contaminated with diarrhetic toxins relocated to a basin of the Adriatic Sea. In: Yasumoto, T., Oshima, Y., and Fukuyo, Y. (Eds), *Harmful and Toxic Algal Blooms*, Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, pp. 429-432.

Pohlman F.W., Stivarius M.R., McElyea K.S., Johnson Z.B., Johnson M.G. The effects of zone, chloride dioxide, cetylpyridium chloride and trisodium phosphate as multiple antimicrobial interventions on microbiological, instrumental color, and sensory color and odor characteristics of ground beef. *Meat Science* 61 (2002) 307-313.

Prins, T.C., Dankers, N., and Smaal, A.C. (1994). Seasonal variation in the filtration rates of a semi-natural mussel bed in relation to seston composition. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 176, 69-86.

Prins, T.C., Escaravage, V., Smaal, A.C., and Peeters, J.C.H. (1995). Nutrient cycling and phytoplankton dynamics in relation to mussel grazing in a mesocosm experiment. *Ophelia*, 41, 289-315.

Protocor A.D., Ahmeda M., Kumar J.V., Goktepe I. Degradation of aflatoxins in peanut kernels/flour by gaseous ozonation and mild heat treatment. *Food Additives and Contaminants* 21 (2004) 786-793.

Quilliam, M.A. (1995). Analysis of diarrhetic shellfish poisoning toxins in shellfish tissue by liquid chromatography with fluorometric and mass spectrometric detection. *Journal of AOAC International*, 78(2), 555-570.

Quilliam, M.A. (1997). OACS-1, Okadaic acid Certified Calibration Solution. Certificate from the NRC Certified Reference Materials Program. Institute for Marine Biosciences, National Research Council of Canada, Halifax, Nova Scotia.

Quilliam, M.A. (2003). Chemical methods for lipophilic shellfish toxins. In: Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., and Cambella, A.D. (Eds), *Manual on Harmful Marine Microalgae*. Paris: UNESCO Publishing, 211-296.

Quilliam, M.A., and Ross, N.W. (1996). Analysis of diarrhetic shellfish poisoning toxins and metabolites in plankton and shellfish by ion-spray liquid chromatography-mass spectrometry. In: Snyder, P.A. (Ed), *Biochemical and Biotechnological Applications of Electrospray Ionization Mass Spectrometry*, American Chemical Society, Washington, D.C., pp. 351-364.

Quilliam, M.A., and Wright, J.L.C. (1995). Methods for diarrhetic shellfish poisoning. In: Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., and Cembella, A.D. (Eds), *Manual on Harmful Marine Microalgae, Manuals and Guides*, 33, Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, pp. 95-111.

Quilliam, M.A., Hardstaff, W.R., Ishida, N., McLachlan, J.L., Reeves, A.R., Ross, N.W., and Windust, A.J. (1996). Production of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins by *Prorocentrum lima* in culture and development of analytical methods. In: Yasumoto, T., Oshima, Y., and Fukuyo, Y. (Eds), *Harmful and Toxic Algal Blooms*, Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, p. 289-292.

Ramstad, H., Larsen, S., and Aune, T. (2001). The repeatability of two HPLC methods and the PP2A bioassay in the quantification of diarrhetic toxins in blue mussels (*Mytilus edulis*). *Toxicon*, 39, 515-522.

Raul, F., Gosse, F., Delince, H., Hartwig A., Marchioni, E., Miesch, M., Werner, D., Burnouf, D., 2002. Food-Borne Radiolytic Compounds (2-Alkylcyclobutanones) May Promote Experimental Colon Carcinogenesis. *Nutrition and Cancer* 44 (2) 189 – 191.

Reboreda, A., Lago, J., Chapela, M.J., Vieites, J.M., Botana, L.M., Alfonso, A., Cabado, A.G., 2010. Decrease of marine toxin content in bivalves by industrial processes. *Toxicon* 55, 235-243. Reboreda, A., Lago, J., Chapela, M.J., Vieites, J.M., Botana, L.M., Alfonso, A., Cabado, A.G., 2010. Decrease of marine toxin content in bivalves by industrial processes. *Toxicon* 55: 235-243.

Reizopoulou, S., Strogyloudi, E., Giannakourou, A., Pagou, K., Hatzianestis, I., Pyrgaki, C, and Granéli, E. (2007). Okadaic acid accumulation in macrofilter-feeders subjected to natural blooms of *Dinophysis acuminata*. *Harmful Algae*, 7(2), 228-234.

Reizopoulou, S., Strogyloudi, E., Giannakourou, A., Pagou, K., Hatzianestis, I., Pyrgaki, C., and Granéli, E. (2008). Okadaic acid accumulation in macrofilter feeders subjected to natural blooms of *Dinophysis acuminata*. *Harmful Algae* 7, 228-234.

Restaino, L., Frampton, E.W., Hemphill, J.B. and Palnikar, P., 1995. Efficacy of ozonated water against various food-related microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* 61 9, pp. 3471–3475.

Resurreccion, A.V.A., Galvez, F.C.F., Fletcher, S.M. and Misra, S.K., 1995. Consumer attitudes toward irradiated food: results of a new study. *J. Food Protect.* 58, pp. 193–196.

Rice, R.G., 1986. Application of ozone in water and waste water treatment. In: Rice, R.G. and Browning, M.J., Editors, 1986. Analytical aspects of ozone treatment of water and waste water, The Institute, Syracuse, NY, pp. 7–26.

Rose, R.T., Engeljohn, D., 2000. Food irradiation in the United States: irradiation as a phytosanitary treatment for fresh fruits and vegetables and for the control of microorganisms in meat and poultry. *Rad. Phys. Chem.* 57, 211-214.

Rositano, J., Nicholson, B.C., Pieronne, P., 1998. Destruction of cyanobacterial toxins by ozone. *Ozone Sci. Eng.* 20, 209-215.

Sampayo, M.A., Alvito, P., Franca, S., and Sousa, I. (1990). *Dinophysis* spp. toxicity and relation to accompanying species. In: Granéli, E., Sundstrom, B., Edler, L., and Anderson, D.M. (Eds), *Toxic Marine Phytoplankton*, Elsevier Science Publishers, London, UK, pp. 215-220.

Sasaki, K., Satake, M., and Yasumoto, T. (1997). Identification of the absolute configuration of pectenotoxin-6, a polyether macrolide compound, by NMR spectroscopic method using chiral anisotropic reagent, phenylglycine methyl ester. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 61(10), 1783-1785.

Sasaki, K., Wright, J.L., and Yasumoto, T. (1998). Identification and characterization of pectenotoxin 4 and 7 as spiroketal stereoisomers of two previously reported pectenotoxins. *Journal of Organic Chemistry*, 53, 2475-2480.

Satake, M., Tubaro, A., Lee, J.S., and Yasumoto, T. (1997). Two new analogues of yesotoxin isolated from mussels of the Adriatic Sea. *Natural Toxins*, 5, 107-110.

Schneider, K., Rodrick, G., 1995. The use of ozone to degrade *Gymnodinium breve* toxins. *Conférence Internationale sur la Purification des Coquillages*, Rennes (France), 6-8 Apr 1992. *Actes de colloques*. Ifremer, Brest, 277-289.

Scholten, H., and Smaal, A.C. (1998). Responses of *Mytilus edulis* L. to varying food concentrations: Testing EMMY, an ecophysiological model. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 219(1-2), 217-239.

Scoging, A.C. (1991). Illness associated with seafood. *Communicable Disease Report*, 1(11), R117-R122.

Shibata, S., Ishida, Y., Kitano, H., Ohizumi, Y., Habon, J., Tsukitani, Y.K., and Kuchi, H. (1982). Contractile effects of okadaic acid, a novel ionophore-like substance from black sponge, on isolated smooth muscles under the condition of calcium deficiency. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 223(1), 135-143.

Shen, J.L., Hummert, C., and Luckas, B. (1996). Sensitive HPLC-fluorometric and HPLC-MS determination of diarrhetic shellfish poisoning (DSP)-toxins as 4-bromomethyl-7-methoxycoumarin esters. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 357(1), 101-104.

Shumway, S.E., and Cucci, L.T. (1987). The effects of the toxic dinoflagellate *Protogonyaulax tamarensis* on the feeding and behaviour of bivalve mollusks. *Aquatic Toxicology*, 10, 9-27.

Sidari, L., Nichetto, P., Cok, S., Sosa, S., Tubaro, A., Honsell, G., and Della Loggia, R. (1998). Phytoplankton selection by mussels and diarrhetic shellfish poisoning. *Marine Biology*, 131, 103-111.

Silvert, W.L., Bricelj, M., and Cembella, A.D. (1998). Dynamic modeling of PSP toxicity in the surfclam (*Spisula solidissima*): Multicompartmental kinetics and biotransformation. In: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L., Wyatt, T. (Eds), *Harmful Algae*, Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, pp. 437-440.

Simon, J.F., and Vernoux, J.P. (1994). Highly sensitive assay of okadaic acid using protein phosphatase and paranitrophenyl phosphate. *Natural Toxins*, 2 (5), 293–301.

Smaal, A.C., and Prins, T.C. (1993). The uptake of organic matter and the release of inorganic nutrients by bivalve suspension feeder beds. In: Dame, R.F. (Ed), *Bivalve Filter Feeders in Estuarine and Coastal Ecosystems Processes*. NATO ASI Series G 33, Springer Verlag, Berlin, p. 271-298.

Smaal, A.C., and Zurburg, W. (1997). The uptake and release of material in oysters and mussels in Marennes Oleron Bay. *Aquatic Living Resources*, 10, 23-30.

Smayda, T.J. (1990). Novel and nuisance phytoplankton blooms in the sea: Evidence for a global epidemic. In: Granéli, E., Sundström, B., Edler, L., and Anderson, D.M. (Eds), *Toxic Marine Phytoplankton*, Elsevier Science Inc., New York, pp. 29-40.

Smith, L.L., 2004. Oxygen, oxysterols, ouabain, and ozone: a cautionary tale. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 318–324.

Soriano, N.U., Migo, V.P., Matsumura, M., 2003. Functional group analysis during ozonation of sunflower oil methyl esters by FT-IR and NMR. *Chem. Phys. Lipids*, 126, 133-140.

Stefanova Rayna, Nikola V. Vasilev, Stefan L. Spassov. Irradiation of Food, current legislation framework, and detection of irradiated foods. *Food Analytical Methods* (2010) 3 225-252.

Stover, E.L., Jarnis, R.W., 1981. Obtaining high level wastewater disinfection with ozone. J. Wat. Pollut. Control Fed. 53, 1637-1647.

Suzuki, T., Jin, T., Shiota, Y., Mitsuya, T., Okumura, Y., Kamiyama, T., 2005. Quantification of lipophilic toxins associated with diarrhetic shellfish poisoning in Japanese bivalves by liquid chromatography – mass spectrometry and comparison with mouse bioassay. Fisheries Sci. 71, 1370-1378.

Suzuki, T., Mitsuya, T., 2001. Comparison of dinophysistoxin-1 and esterified dinophysistoxin-1 (dinophysistoxin-3) contents in the scallop *Patinopecten yessoensis* and the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Toxicon, 39, 905-908.

Suzuki, T., Yasumoto, T., 2000. Liquid chromatography – electrospray ionization mass spectrometry of the diarrhetic shellfish – poisoning toxins okadaic acid, dinophysistoxin-1 and pectenotoxin-6 in bivalves. J. Chromatogr. A 874, 199-206.

Suzuki, T., Mitsuya, T., Imai, M., and Yamasaki, M. (1999). Direct evidence of transformation of dinophysistoxin-1 to 7-O-acyl-dinophysistoxin-1 (dinophysistoxin-3) in the scallop *Patinopecten yessoensis*. Toxicon, 37, 187-198.

Suzuki, T., Yoshizawa, R., Kawamura, T., and Yamasaki, M. (1996). Interference of free fatty acids from the hepatopancreas of mussels with the mouse bioassay for shellfish toxins. Lipids, 31 (6), 641-645.

Svensson, S. (2003). Depuration of okadaic acid (Diarrhetic Shellfish Toxin) in mussels, *Mytilus edulis* (Linnaeus) feeding on different quantities of non-toxic algae. Aquaculture, 218, 277-291.

Swati Chouksey, Alpana Singh, Rajendra Singh Thakur, Reena Deshmukh. Influence of gamma irradiation and benzyl adenine on keeping quality of custard apple fruits during storage. Journal of Food Science and Technology (2011).

Tachibana, K., and Sheuer, J. (1981). Okadaic acid: A cytotoxic polyether from two marine sponges of the genus *Halichondria*. Journal of the American Chemical Society, 103, 2469-2470.

Takagi, T., Hayashi, K., and Itabashi, Y. (1984). Toxic effect of free unsaturated fatty acids in the mouse bioassay of diarrhetic shellfish toxin by intraperitoneal injection. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 50 (8), 1413-1418.

Tambunan, P.R., 1985. Elimination of Salmonella in frog legs by irradiation. *Food Irradiat. Newsl.* 9 2, p. 5

Terao, K., Ito, E., Ohkusu, M., and Yasumoto, T. (1993). A comparative study of the effects of DSP-toxins on mice and rats. In: Smayda, T.J., and Shimizu, Y., (Eds), *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, pp. 581-586.

Terao, K., Ito, E., Yanagi, T., and Yasumoto, T. (1986). Histopathological studies on experimental marine toxin poisoning. I. Ultrastructural changes in the small intestine and liver of suckling mice induced by dinophysistoxin-1 and pectenotoxin-1. *Toxicon*, 24, 1141-1151.

Tsiotsias A., Savvaidis I., Vassila A., Kontominas M. and Kotzekidou P. Control of *Listeria monocytogenes* by low-dose irradiation in combination with refrigeration in the soft whey cheese 'Anthotyros', *Food Microbiol.* **19** (2002), pp. 117–126.

Tubaro, A., Florio, C., Luxich, E., Vertua, R., Della Loggia, R., and Yasumoto, T. (1996). Suitability of the MTT-based cytotoxicity assay to detect okadaic acid contamination of mussels. *Toxicon*, 34(9), 965-974.

Vale, P., Sampayo, M.A.M., 2002. Esterification of DSP toxins by Portuguese bivalves from the Northwest coast determined by LC-MS – a widespread phenomenon. *Toxicon*, 40, 33-42.

Vale, P., and Sampayo, M.A. (1996). DTX-2 in Portuguese bivalves. In: Yasumoto, T., Oshima, Y., and Fukuyo, Y. (Eds), *Harmful and Toxic Algal Blooms*, Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, pp. 539-542.

Vale, P., and Sampayo, M.A.M. (1999). Esters of okadaic acid and dinophysistoxin-2 in Portuguese bivalves related to human poisonings. *Toxicon*, 37, 1109-1121.

van Egmond, H.P., Aune, T., Lassus, P., Speijers, G., and Waldock, M. (1993). Paralytic diarrhoeic shellfish poisons: Occurrence in Europe, toxicity, analysis and regulation. *Journal of Natural Toxins*, 2, 41-83.

Vaught, K.C. (1989). A classification of the living mollusca. Abbott, R.T., and Boss, K.S. (Eds). American Malacologists Inc.

Venugopal, V., Doke, S.N., Thomas, P., 1999. Radiation processing to improve the quality of fishery products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 39, 391-440.

Vieites, J.M., Leira, F., Botana, L.M., and Vieytes, M.R. (1996). Determination of DSP toxins: Comparative study of HPLC and bioassay to reduce the observation time of the mouse bioassay. *Archives of Toxicology*, 70, 440-443.

Vieytes, M.R., Fontal, O.I., Leira, F., Baprista de Sousa, J.M.V., and Botana, L.M. (1997). A fluorescent microplate assay for diarrheic shellfish toxins. *Analytical Biochemistry*, 248, 258-264.

Villar-Ganzález, A., Rodríguez-Velasco, M.L., Ben-Gigirey, B., Botana, L.M., 2007. Lipophilic toxin profile in Galicia (Spain): 2005 toxic episode. *Toxicon* 49, 1129-1134.

Uda, T., Itoh, Y., Nishimura, M., Usagawa, T., Murata, M., and Yasumoto, T. (1989). Enzyme immunoassay using monoclonal antibody specific for diarrhetic shellfish poisons. In: Natori, S., Hashimoto, K., and Ueno, Y. (Eds), *Mycotoxins and Phycotoxins*, Elsevier Science BV, Amsterdam, pp. 335-342.

Urbain W.M. (1986). Food irradiation. Academic press, Orlando.

Walne, R.R. (1979). Culture of bivalve molluscs. Fishing News Books LTD, Farnham, England, p. 18.

Ward, J.E., and Target, N.M. (1989). Influence of marine microalgal metabolites on the feeding behaviour of the blue mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biology*, 101(3), 313-321.

White, A.W., Martin, J.L., Legresley, M., Blogoslawski, W.J., 1985. Inability of ozonation to detoxify shellfish toxins in the soft-shell clams. In: Anderson, D.M., White,

A.W., Baden, D.G., (Eds.), Toxic Dinoflagellates, Elsevier Science Publishers, New York, pp. 473-478.

Wilkinson V.M. and Gould G.W. (1996). Food irradiation: a reference guide. Boston, Oxford England.

Windust, A.J., Quilliam, M.A., Wright, J.L.C., and McLachlan, J.L. (1997). Comparative toxicity of the diarrhetic shellfish poisons, okadaic acid, okadaic acid diol-ester and dinophysistoxin-4, to the diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Toxicon*, 35, 1591-1603.

WG Toxicology (2001). Report of the Meeting of the Working Group on Toxicology of DSP and AZP, 21-23 May 2001, Brussels.

World Health Organization (WHO), 1994. Declaration on occupational health for all. WHO, Geneva.

World Health Organization (WHO), 1988. Food irradiation: A technique for preserving and improving the safety of food. WHO, Geneva.

Wright, J.L.C. (1995). Dealing with seafood toxins: Present approaches and future options. *Food Research International*, 28(4), 347-358. .

Xuetong Fan and Kimberly J.B. Sokorai. Changes in quality, liking and purchase intent of irradiated fresh-cut spinach during storage. *Journal of Food Science* 76 (2010) 363-368.

Yasumoto, T., and Murata, M. (1993). Marine toxins. *Chemical Reviews*, 93, 1897-1909.

Yasumoto, T., Murata, M., Lee, J-S, and Torigoe, K. (1989). Polyether toxins produced by dinoflagellates. In: Natori, S., Hashimoto, K., Ueno, Y. (Eds), *Mycotoxins and Phycotoxins*, Elsevier Science BV, Amsterdam, pp. 375-382.

Yasumoto, T., Murata, M., Oshima, Y., Matsumoto, G.K., and Clardy, J. (1984). Diarrhetic Shellfish Poisoning. In: Ragelis, E.P. (Ed), *Seafood Toxins*, American Chemical Society, Washington, D.C., pp. 207-214.

Yasumoto, T., Murata, M., Oshima, Y., Sano, M., Matsumoto., G.K., and Clardy, J. (1985). Diarrhetic shellfish toxins. *Tetrahedron*, 41(6), 1019-1025.

Yasumoto, T., Oshima, Y., and Yamaguchi, M. (1978). Occurance of a new type of shellfish poisoning in the Tohoku District. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 44(11), 1249-1255.

Yasumoto, T., Oshima, Y., Sugawara, W., Fukuyo, Y., Oguri, H., Igarishi, T., and Fujita, N. (1980). Identification of *Dinophysis fortii* as the causative organism of diarrhetic shellfish poisoning. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 46 (11), 1405-1411.

Yasumoto, T., Seino, N., Murakami, Y., and Murata, M. (1987). Toxins produced by benthic dinoflagellates. *Biological Bulletin of Woods Hole*, 72, 128-131.

Yousef A.E., Khadre M.A., Kim J.G. (2001). Microbiological aspects of ozone applications in Food: a review. *JFS Concise Reviews in Food Science* 66, No 9, 1242-1252.

ZEU-INMUNOTEC's Technical Bulletin for TOXILINE-DSP test for detection of diarrhetic shellfish toxins (DSP) in edible molluscs, G-COM-OA.01, MAR 05, Rev. 8