

DISA TREGUES TË NDOTJES NË MOLUSQE DHE UJIN E DETIT NË SHQIPËRI

RIGERTA SADIKAJ ^{*a}, EDMOND PANARITI ^b, DRITAN ARAPI ^c

^aDepartamenti i Prodhimit Shtazor, Fakulteti i Bujqësisë dhe Mjedisit, Universiteti Bujqësor i Tiranës

^bDepartamenti i Lëndëve Klinike, Fakulteti i Mjekësisë Veterinare, Universiteti Bujqësor i Tiranës

^cMinistria e Mjedisit, Pyjeve dhe Administrimit të Ujërave

PËRMBLEDHJA

Qëllimi i këtij studimi është përcaktimi cilësor dhe sasior i biotoksinës PSP në mostra midhjesh të prelevuara në mënyrë rastësore në disa pika monitorimi të bregdetit shqiptar. Duke u nisur nga treguesit e ndotjes në ujerat dhe faunën ujore të bregdetit Adriatik të kryera në kuadrin e projektit MEDWET, u përzgjedh Narta dhe Vjose-Semani për përcaktimin dhe vlerësimin e niveleve të biotoksinave detare PSP tek midhja *Mytilus galloprovincialis*. Mostra të midhjeve *Mytilus galloprovincialis* u morën nga laguna e Nartës dhe në transektin Vjosë-Seman në distancat 50, 100 dhe 200 m nga bregu. Kampionimet u kryen dy herë në periudhën Prill-Maj 2007 dhe 2 herë në periudhën Korrik-Shtator 2007. Mostra u morën edhe për periudhën Janar-Shkurt 2008. Për herë të parë në Shqipëri arrihet të zbulohet dhe të vlerësohet nga ana sasore saksitoksina në midhjen *Mytilus galloprovincialis*. Nivelet maksimale të toksinës PSP në midhje për të dy zonat e monitorimit të marra në konsideratë në pjesën metodike të studimit, arrihen në periudhën e parë dy javore të muajit Maj.

Fjalët celës: *Mytilus galloprovincialis*, biotoksina, helmimi PSP, stres biologjik, ekosistem

SUMMARY

The goal of this study is qualitative and quantitative determination of PSP biotoxin in mollusks samples prelevated casually in same point of monitoring in Albanian seashore. Starting from pollution indicators into the water and aquatic fauna of Adriatic sea done in the framework of the MEDWET project, were selected Narta and Vjose-Semani in order to determine and evaluate the levels of PSP biotoxin in mollusc *Mytilus galloprovincialis*. Samples of molluscs *Mytilus galloprovincialis* were taken from these lagoons in the distances 50, 100 dhe 200 m from the shore. Sampling period was twice in April-May 2007 and twice in July-

September 2007. Again samples were taken during January-February 2008. For the first time in Albania became possible the determination and evaluation of the saxitoxin from the quantitative point of view in mollusc *Mytilus galloprovincialis*. The highest levels of saxitoxine in molluscs in both monitored lagoons were achieved in the first two weeks period of May.

HYRJE

Përdorimi i biomarkerëve përfaqëson një mjet të efektshëm për vlerësimin e gjendjes së ekosistemeve. Nëpërmjet tyre bëhet e mundur zbulimi i ndryshimeve të herëshme biologjike, të cilat mund të jenë pararendëse të ç'rregullimeve afatgjata fiziologjike. Molusqet në përgjithësi dhe lloji *Mytilus galloprovincialis* në veçanti, përdoren gjerësisht në eksperimentët laboratorike si dhe në ato fushore për zbulimin e ndotjes me metale të rënda apo me lëndë organike (4, 5).

Është përcaktuar tashmë se biomarkerat ndikohen më tepër nga niveli i ndotësve organike dhe inorganike se sa nga ndryshimet e parametrave fiziko-kimike. Në këtë mënyrë ndikimi i ndotësve në ndryshimet e biomarkerave duket se është mjaft më i shprehur se sa ndikimi i faktorëve të tjerë.

Lizosomet e gjendrës tretëse të midhjes (*Mytilus galloprovincialis*) përfaqësojnë organelat kryesore ku ndodh përqëndrimi dhe detoksifikimi i ndotësve organike dhe inorganike (8). Stabiliteti i membranave të lizosomeve përbën mënyrën kryesore të reagimit ndaj një spektri të gjerë ndotësish dhe për këtë arsye konsiderohet si një biomarkues shumë i besueshëm i stresit të popullatave të molusqeve në studimet e biomonitorimeve (2).

Objektivat e këtij studimi janë: përshtatja, standartizimi dhe zbatimi i bioprovës intraperitoneale për përcaktimin sasior të biotoksinave PSP, zbatimi i një metode imunoserologjike alternative për përcaktimin e biotoksinave PSP dhe çiftëzimi i saj për

rastet positive me HPLC dhe studimi i varësisë së përqendrimeve të biotoksinave PSP në molusqet bivalvë me faktorët stinore të ekosistemeve ujore dhe praninë e ndotësve të tjerë.

MATERIALET DHE METODAT

Marrja e mostrave të molusqeve dhe ujit.

Përzgjedhja e lagunës së Nartës si vend për marrjen e mostrave të midhjes *Mytilus galloprovincialis* për rëvizimin e niveleve të biotoksinave detare PSP u mbështet nga fakti i shkarkimeve të larta të mbetjeve të ujërave të zeza urbane nga qyteti i Vlorës.

Vendi i dytë i marrjes së mostrave ishte transekti Vjosë-Seman, edhe kjo zonë sipas rëvizimeve të kryera nga plani kombëtar i monitorimit të ujërave detare, rezultoi i ndotur nga shkarkime të mbetjeve urbane dhe të atyre industriale.

Për përpunimin e mostrave të midhjeve përdorëm doreza lastiku dhe thika. Midhjet u vendosën në kova plastike dhe u mbuluan me ujë të detit të vendit nga u morën.

Metoda e injektimit intraperitoneal në minj

Kjo është ende metoda zyrtare e përcaktimit të biotoksinave PSP në minj albinë Balb. Minjtë duhet të jenë të peshës 19-21 g.

U krijua një grup me 5 minj të cilët i nënshtrohen injektimit intraperitoneal të ekstraktit të përfutur, ndërsa një grup tjetër i përbërë nga po kaq individë shërben si kontroll.

Procedura analitike

Merret 5 g molusk, i cili macerohet dhe homogjenizohet me 20 ml ujë të dejonizuar dhe të distiluar.

Përzjerja zehet për 5 minuta në një beker.

Masës së homogjenizuar i shtohet acid klorhidrik deri sa pH të bjerë në vlerat 2-3.

Përzjerja, filtrohet dhe më pas kalohet në një rotavapor ku kryhet tharja e saj e plotë. Precipitati më pas mbledhet me 1 ml Tween 60 dhe injektohet me rrugë intraperitoneale në minj.

Rezultati konsiderohet pozitiv në rast se miu ngordh brenda 5 minutave nga momenti i injektimit. Koha e ngordhjes së miut regjistrohet dhe konvertohet më pas në m.u (njësi miu). Këto më pas konvertohen në $\mu\text{g}/100\text{ g}$ saksitoksinë.

Metoda e imunokromatografisë me fluks anësor (ALERT)

Kjo metodë analitike u përdor si teknikë alternative në kuadrin e këtij studimi për përcaktimin e përqendrimit të saksitoksinës dhe derivateve. Këtë analitike u porositën nga Biotech Ltd, Ontario Canada së bashku me standartet e biotoksinës PSP.

Procedura analitike

Rreth 1 ml ekstrakt u dorëzua acid i moluskut "*Mytilus galloprovincialis*" pikohet në gropëzën e mostrës në krah të djathtë të panelit të testit. Testi lihet të zhvillohet për rreth 20 minuta në temperaturën e dhomës. Më pas kryem vlerësimin sasior të përqendrimit të toksinës duke bërë krahasimin e reaksionit kolorimetrik me tre shkallët përkatëse të toksicitetit.

Procedura e plotë laboratorike e kryerjes së testit të destabilizimit të membranave

Kryet matja e lartësisë dhe gjatësisë së midhjes, pritët dhe veçohet gjëndra tretëse.

Shpëlahet indi i gjëndrës tretëse me tretësirë fiziologjike, copëtohet në pjesë të vogla, rishpëlahet përsëri. Indet kalohen në pllaka kulturash qelizore prej 24 pusetash. Tunden mostrat në një tundës magnetik me frekuencë 120 tundje në minutë për rreth 20 minuta.

Shtohet 400 μl tripsinë e tretur në tretësirë fiziologjike në secilën mostër, tundet përzjerja për 20 minuta dhe ruhet në të ftohtë.

Veçohen mostrat me një pipetë xhami dhe më pas transferohen në një apart filtër mikrocentrifugal dhe kryhet centrifugimi për 5 minuta në 15 °C.

Largohet filtri, shkarkohet supernatanti dhe kalohen në suspension qelizat në 1 ml tretësirë fiziologjike.

Kryhen dy shpëlarje dhe më pas centrifugim për 5 minuta në 15 °C. Supernatanti shkarkohet dhe qelizat kalojnë sërishmi në suspension në 300 μl tretësirë fiziologjike.

I shtohet mostrës tretësira stok (0,04 mg/ml) në raportin 1:1. Përzehet dhe inkubohet në një dhomë qelqi të lagështuar dhe të errët për 60 minuta.

Duke përdorur një mikroskop optik me okular 40X u numëruan qelizat (hepatocitet) duke i klasifikuar ato si qeliza me prani të ngjyrës në lizosom dhe në qeliza me prani të ngjyrës në citosol.

Vlerësimi i NRRT tek hemolimfa

Metoda analitike e zbatuar për këtë qëllim në këtë studim ishte sipas (6) si dhe procedurave analitike të propozuara nga (7) me disa ndryshime të lehta.

Hemolimfa nxirret me anë të shiringës hipodermike nga muskuli abductor posterior i 10 midhjeve, përziejhet me tretësirë fiziologjike në raportin 1:1. Suspensiononi i përgatitur në këtë mënyrë nga secila midhje strishohet mbi lama të imprenjuara me Poly-L-Lizine (1/10) dhe më pas mbyllet në një kamer të errët me një korant të lehtë ajror për rreth 15 minuta për të mundësuar fiksimin e qelizave. Pas kësaj periudhe , mbi secilën nga lamelat pikohen rreth **40ul** tretësirë pune “e kuqe neutrale”. Lihen në këtë gjendje edhe për 15 minuta dhe vrojtohen në mikroskop me zmadhimin 40x. Mikroskopi ishte i pajisur edhe me një kamera digitale Sony. Pamjet e mikroskopit përpunoheshin në mënyrë dixhitale kompjuterike nëpërmjet software Pinnacle Studio ver.8.

Aty ku konstatohej humbje e ngjyrës nga lizosomet e citosolit tek së paku 50% e hemociteve të vrojtuar,

koha e filimit të humbjes së ngjyrës vlerësohej dhe shprehej si koha NRRT për secilën nga midhjet.

Analizat Statistikore

Të gjitha analizat statistikore të të dhënave të përfutuara, u mbështetën mbi testin statistikor të Dulkanit për krahasime të shumëfishta si dhe mbi testin e Studentit midis cifteve të mesatareve duke përdorur programin Microsoft STATISTICA (v.6.0).

REZULTATET DHE DISKUTIMET

Nivelet e Biotoksinave PSP tek molusqet *Mytilis galloprovincialis* në lagunën e Nartës dhe zonën e Vjosë-Semanit dhe ndryshimet përkatëse stinore.

Në pasqyrat e mëposhtëme paraqiten nivelet e saksitoksinës dhe të derivateve të saj në pulpën e molusqeve *Mytilis galloprovincialis*, të prelevuara nga dy stacione kampionimi dhe përkatësisht nga laguna e Nartës dhe zona e Vjosë-Semanit.

Lloji i Molusk dhe vendi	Metoda analitike (PSP)	Jan	Shku	Mars	Prill	Maj	Qersh	Korr	Gush	Shta
<i>M.galloprovincialis</i> Narte	Bioprove	n.d	n.d	n.d	2280 m.u	4100 m.u	n.d	n.d	n.d	n.d
	Alert	n.d	n.d	n.d	++	+++	n.d	n.d	n.d	n.d
	HPLC	n.d	n.d	n.d	112±14	473±70	18	n.d	n.d	n.d
<i>M.galloprovincialis</i> Vjose-Seman	Bioprove	n.d	n.d	n.d	500 m.u	3070 m.u.	n.d	n.d	n.d	n.d
	Alert	n.d	n.d	n.d	+	++	n.d	n.d	n.d	n.d
	HPLC	n.d	n.d	n.d	44±8	178±23	5	n.d	n.d	n.d

Tabela 1. Nivelet Stinore të biotoksinave PSP (saksitoksinë dhe derivate) në midhjen *M.galloprovincialis* të përcaktuara njëkohësisht me tre metoda analitike

Pesha e minjve (g)	Koha e injektimit i/p	Koha e ngordhjes	Diferenca kohore	Rezultatet analoge me HPLC ne ug/100g pulpe	Retzultatet analoge me Testin Alert
20.4	13.42	13.44	2±0,3	811 ug/100g	+++
20.7	13.44	13.48	4±0,3	311 ug/100g	+++
20,9	13.46	13.50	4±0,4	299 ug/100g	+++

Tabela 2. “Të dhënat mbi nivelet e saksitoksinës dhe të derivateve të saj të përcaktuara me provën zyrtare biologjike në minj në midhjet e lagunës së Nartës” Maj 2007 krahasuar me testin Alert dhe me HPLC(mesatare e injektimit në 5 minj)

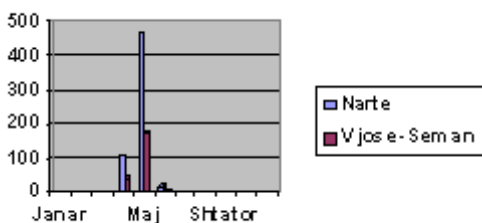
Pesha e minjve (g)	Koha e injektimit i/p	Koha e ngordhjes	Diferenca kohore	Rezultatet analoge me HPLC ne ug/100g pulpe	Rezultatet analoge me Testin Alert
20.4	10,33	10,40	7±0,35	125 ug/100g	++
20.7	10,42	10.48	6±0,4	211 ug/100g	++
20,9	10.46	10.52	6±0,4	199 ug/100g	++

Tabela 3. "Të dhënat mbi nivelet e saksitoksinës dhe të derivateve të saj të përcaktuara me provën zyrtare biologjike në minj në midhjet e Vjosë-Semanit" Maj 2007

Ajo që të bie në sy nga shqyrtimi i të dhënave analitike të matjeve të niveleve të saksitoksinës dhe derivateve në midhjet *Mytilus galloprovincialis* të lagunës së Nartës dhe të zonës së Vjosë- Semanit është ndryshueshmëria e ndjeshme dhe statistikisht domethënëse e vlerave stinore të kësaj biotoksine në midhje.

Përpos faktit, që për herë të parë në Shqipëri arrihet të zbulohet dhe të vlerësohet nga ana sasiore saksitoksina në midhjen *Mytilus galloprovincialis*, ajo që të tërheq më shumë vëmendjen nga të dhënat e pasqyrave përkatëse është se nivelet maksimale të toksinës PSP në midhje për të dy zonat e monitorimit të marra në konsideratë në pjesën metodike të studimit, arrihen në periudhën e parë dy javore të muajit Maj.

Sidoqoftë përqendrimi më i lartë i saksitoksinës dhe i derivateve të saj në pulpën e midhjes *Mytilus galloprovincialis* arrihet në lagunën e Nartës për këtë periudhë të monitorimit.



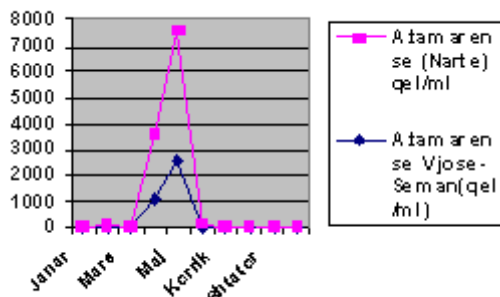
Grafiku 1. Ecuria stinore e përqendrimit të biotoksinës saksitoksinë dhe e derivateve të saj te midhja *Mytilus galloprovincialis* në lagunën e Nartës dhe transektin ujqor Vjosë-Seman (e shprehur si µg/100 g)

Duhet të theksojmë se testet zbulues të përdorur në kuadër të këtij studimi përputhen mjaft mirë me njëri tjetrin në mënyrë statistikisht mjaft domethënëse.

Ajo që të bie në sy është se në periudhën e stresit të lartë biologjik në zonat e monitorimit, nivelet e biotoksinës PSP bien ndjeshëm poshtë kufirit maksimal të lejuar për këtë biotoksinë në midhje. Kemi të bëjmë me një fluktuacion të ndjeshëm stinor të niveleve të kësaj biotoksine në pulpën e midhjeve i cili duket të jetë i ndikuar nga faktorë fiziko-kimikë dhe kryesisht nga temperatura e masave ujore si dhe nivelet përkatëse të oksigjenit të tretur në këto ujëra .

Padyshim një korelacion i qendrueshëm dhe statistikisht mjaft domethënës ekziston ndërmjet përqendrimeve të saksitoksinës dhe të derivateve të saj në midhje dhe niveleve përkatëse të fitoplanktonit toksik në ujërat e ekosistemeve ujore të marra në shqyrtim.

Në grafikun që vijon, paraqitet qartë ecuria stinore e zhvillimit të fitoplanktonit toksik, për llojin më përfaqësues dhe pikërisht *Alexandrium tamarense*, në të dy zonat e monitorimit të biotoksinave (Nartë dhe Vjosë-Seman).



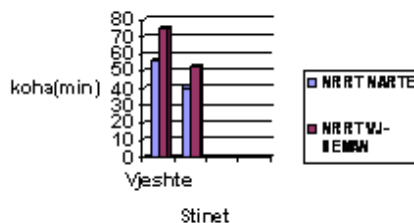
Grafiku 2. "Ecuria stinore e zhvillimit të fitoplanktonit toksik *Alexandrium tamarense* në transektin e Nartës dhe të Vjosë-Semanit"

Vlerat më të larta të fitoplanktonit toksik dhe në vecanti të *Alexandrium tamarense* janë regjistruar në

muajin Maj, duke arritur vlerën e tyre kulmore në muajin Maj në lagunën e Nartës, ku janë përcaktuar edhe nivelet më të larta të fitoplanktonit toksik *A.tamarensis* me 4960 qeliza për ml., gjë që korelon bindshëm edhe me nivelet përkatëse të biotoksinës PSP të përcaktuara në midhje po në këtë periudhë me një vlerë maksimale prej 811µg/100g molusk.

Vleresimi i Testit të retensionit të së Kuqes Neutrale (NRRT) në molusqet *Mytilus galloprovincialis* në zonat e monitorimit.

Në fakt koha e retensionit e së kuqes neutrale e përcaktuar tek hemocitet granulare të midhjeve të Nartës dhe të Vjosë-Semanit, tregon qartë se vlerat e këtij biotreguesi nuk ndjekin një tendencë të qartë. Kështu përshembull koha e shenjimit e membranës së lizosomeve të hemociteve tek midhjet e Nartës ishte në mënyrë domethënëse më e ulët në muajin Korrik e krahasuar kjo me muajin tetor dhe muajin Janar. Gjatë periudhës së vjeshtës dhe të pranverës, kohët e retensionit ishin statistikiisht më të larta tek midhjet e lagunës së Nartës, krahasuar me midhjet e zonës së Vjosë-Semanit.



Grafiku 3. Koha e retensionit të ngjyrës së kuqe neutrale (min)

Kohët e destabilizimit të membranave të lizosomeve të përcaktuara gjatë studimit tonë, dhe që luhaten ndërmjet 40 deri në 56,25 minuta për midhjet e zonës së Nartës dhe ndërmjet 53 deri në 75 minuta për midhjet e zonës së Vjosë-Semanit janë të krahasueshme me ato të regjistruara tek e njëjta specie e ndodhur në brigjet veriore të Greqisë (1) ku nuk kapërcehen vlerat prej 50 minutash tek popullatat që i ekspozohen ndotjeve urbane dhe 65 minuta për popullatat e kultivuara te midhjeve (3). Për pasojë ekziston një bashkëlidhje e qartë ndërmjet shkallës së stresit të vrojtuar tek molusqet tanë dhe cilësisë së biotopit ku ato rriten.

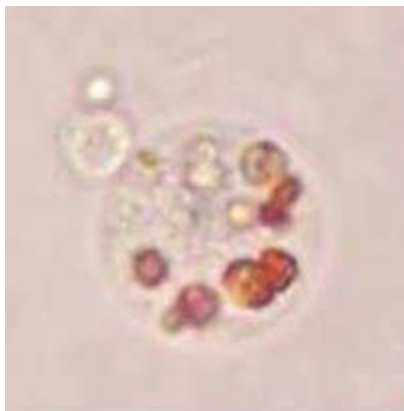


Foto 1. Fiksion normal i ngjyrës së kuqe neutrale brenda lizosomeve të hemociteve të *M.galloprovincialis*

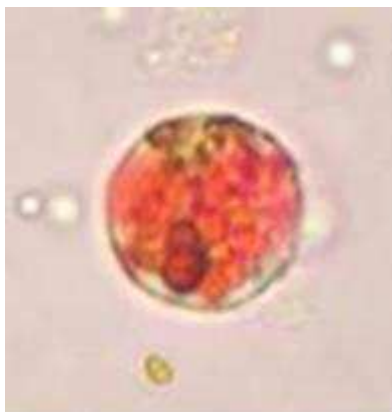


Foto 2. Çlirimi i ngjyrës në citoplazmën e hemociteve të *M.galloprovincialis*

PËRFUNDIME

Përcaktimi analitik i biotoksinave detare PSP në moluskun bivalvor *Mytilus galloprovincialis* u bë e mundur me anë të përdorimit të njëkohshëm të tre metodave analitike dhe përkatësisht, bioprova me injektim intraperitoneal në minj, metoda e imunokromatografisë me fluks anësor (Alert) dhe metoda e HPLC me zbulim të fluoreshencës. Të tre këto metoda, treguan një shkallë të kënaqëshme të ndjeshmërisë.

Për herë të parë u arrit të zbulohet prania e biotoksinës PSP në moluskun *Mytilus galloprovincialis*. Niveli maksimal i biotoksinës i zbuluar në pulpën e moluskut ishte 473 µg/100 g molusk dhe u konstatua

në pulpën e midhjeve të lagunës së Nartës në muajin Maj.

Shfaqja e biotoksinave PSP në pulpën e *Mytilus galloprovincialis*, përbën një dukuri të karakterit stinor.

Shfaqja dhe përqendrimi maksimal i kësaj toksine në molusqe vërehet në muajt Prill-Maj. Në pjesën tjetër të vitit biotoksina detare PSP nuk është e pranishme.

Në periudhat kulmore të përqendrimit të biotoksinës PSP në *Mytilus galloprovincialis*, u arrit të përcaktohej si prania ashtu edhe përqendrimi kulmor i fitoplanktonit toksik dhe kryesisht i algave *Alexandrium tamarense* dhe *Dinophysium acuminata*.

Të dhënat e përfuara dëshmojnë se janë kryesisht këto dy alga të cilat duhet të konsiderohen si përgjegjëse për sintezën e biotoksinës PSP në molusqet bivalvë të dy zonave të monitorimit të marra në shqyrtim.

Për herë të parë në kuadrin e këtij studimi u arrit të zbatohet me sukses metoda e vlerësimit të stabilitetit të membranave të lizosomeve të hemociteve të moluskut *Mytilus galloprovincialis* si tregues i nivelit të stresit biologjik në ekosistemet ujore të rritjes së molusqeve.

Nëpërmjet përcaktimit dhe të vlerësimit të kohës së "retensionit" të së kuqes neutrale në nivel të hemociteve të molusqeve u bë e mundur të vlerësohej edhe dinamika stinore e shkallës së stresit biologjik në popullatat e molusqeve për të dy zonat e monitorimit.

BIBLIOGRAFIA

1. Dailianis S, Domouhtsidou G.P, Raftopoulou E, Kalayianni M, Dimitriadis V. K, (2003) Evaluation of neutral red retention assay, micronucleus test, acetylcholinesterase activity and a signal transduction molecule (cAMP) in tissues of *Mytilus galloprovincialis* (L.), in pollution monitoring, Mar. Environ. Res., 56 (4), 443–470.
2. Domouhtsiadou K, Dimitriadis T, (2001) A rapid assay for the determination of the stress level in the aquatic environment. Aquatic Environ. (4) 67-72.
3. Koukouzika N, Dimitriadis V. K,(2005) Multiple biomarker comparison in *Mytilus galloprovincialis* from the Greece coast: 'Lysosomal membrane stability, neutral red retention, micronucleus frequency and stress on stress', Ecotoxicology, 14 (4), 449–463.
4. Krishnakumar S, Alakubar D, Kristiwasae L, (1994) Estimation of the pollution impact in the Karawa bay biota through the use of biomarkers. Env.Poll.Bulletin (1) 54-62
5. Langston D, Birgam L, Stainley T, (1998) The lysosomal destabilization assay with additional endpoints advantages Aquatic Environm. (2) 18-25.
6. Loewe R, Deschamps T, (1995) Bivalve Molluscs NYAS IV edition Chapter 2.
7. UNEP/RAMOGÉ, (1999) Manual on the biomarkers recommended for the MED POL biomonitoring programme, UNEP, Athens, 92.
8. Viarengo A, (1989) Histopathological changes of the lysosomal membranes in oyster hepatocytes following heavy metal exposure Bull.Env.Poll. (3) 25-33.