

# Ensayo de toxicidad a *Artemia salina*: Puesta a punto y aplicación a micotoxinas

González, Ana M.\*; Presa, Maximiliano F.; Lurá, María C.

Cátedra de Microbiología General. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas.  
Universidad Nacional del Litoral. Ciudad Universitaria. Paraje El Pozo. (3000) Santa Fe. Argentina

**RESUMEN:** El ensayo de toxicidad a *Artemia salina* es una herramienta útil para el estudio preliminar de sustancias con actividad biológica, entre ellas micotoxinas y extractos fúngicos. Los objetivos del presente trabajo fueron poner a punto este ensayo y verificar su capacidad para determinar la toxicidad de algunas de las toxinas fúngicas. Se utilizó dodecil sulfato de sodio (SDS) como sustancia de referencia. El recuento de los nauplii de *A. salina* se realizó a las 24 y a las 48 horas de incubación y se determinó la  $CL_{50}$ . Se obtuvieron mejores resultados con la incubación de 24 horas, determinándose una  $CL_{50}$  media de SDS de 8,302 ppm. El ensayo se aplicó a aflatoxina B<sub>1</sub>, diacetoxiscirpenol, nivalenol, deoxinivalenol y toxina T-2. Se detectó actividad para todas las micotoxinas analizadas. Los resultados obtenidos avalan las condiciones utilizadas en la puesta a punto de este bioensayo, cumpliendo con un tiempo de incubación de 24 horas.

**Palabras claves:** *Artemia salina*, bioensayo, micotoxinas,  $CL_{50}$ .

**SUMMARY:** *Artemia salina*: toxicity assay. Adjustment and application to mycotoxins. González, Ana María\*; Presa, Maximiliano F.; Lurá, María Cristina. The toxicity assay to *Artemia salina* is a useful tool for the preliminary study of substances with biological activity among which mycotoxins and fungi extracts can be found. The aims of this work were to adjust this bioassay and confirm its capacity to determine the toxicity of some of the fungal toxins. Sodium dodecyl sulfate (SDS) was used as standard substance. Nauplii count of *A. salina* was done at 24 and 48 hs. respectively after incubation and  $LC_{50}$  was determined. Incubation at 24 hs. showed better results and a mean  $LC_{50}$  of SDS of 8,302 ppm was established. The bioassay was applied to aflatoxin B<sub>1</sub>, diacetoxyscirpenol, nivalenol, deoxynivalenol and T-2 toxin. Activity was present in all mycotoxins analyzed. The results obtained confirm the conditions used in the adjustment of this bioassay, respecting an incubation time of 24 hs.

**Key words:** *Artemia salina*, bioassay, mycotoxins,  $CL_{50}$ .

## Introducción

La exposición a los metabolitos fúngicos tóxicos, denominados micotoxinas, constituye un problema para la salud humana y animal, debido a que muchos son carcinogénicos, teratogénicos y tremorgénicos, pueden causar hemorragias, dermatitis, etc. (1).

En la actualidad se conocen más de 300 especies de hongos responsables de su producción, siendo los géneros más frecuentes *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. (2)

Si bien el número de micotoxinas conocidas es elevado, el mismo continúa en aumento en función de nuevos descubrimientos. Uno de los ejemplos más notables lo constituyen las toxinas producidas por *Fusarium*. A las ya conocidas zearaleona y las que integran el grupo de los tricotecenos (Toxina T-2, Toxina HT-2, diacetoxiscirpenol (DAS), nivalenol (NIV), deoxinivalenol (DON), acetildeoxinivalenol, fusarenol X, neosolanol), se le suman fumonisinas, beauvericina y fusoproliferina identificadas recientemente y que han sido motivo de numerosos trabajos. (3,4)

Debido a que organismos internacionales, como FAO y OMS, han recomendado la búsqueda de nuevos hongos toxicogénicos (5,6), es que surgió la necesidad de implementar ensayos rápidos y sensi-

Correspondencia a:  
Ana María González. Catamarca 3580,  
(3000) Santa Fe. Argentina.  
E-mail: amgpodio@fbc.unl.edu.ar.

bles, que permitieran poner en evidencia la toxicidad de estos metabolitos fúngicos. Los bioensayos o pruebas biológicas, son herramientas útiles para establecer la toxicidad de los diversos compuestos e investigar la naturaleza de los efectos causados por las micotoxinas. (3) Aunque su aplicación en la inspección de alimentos y piensos es secundaria ya que en general poseen menor especificidad y reproducibilidad que los métodos químicos e inmunoquímicos, han desempeñado un papel importante en el descubrimiento de nuevos metabolitos tóxicos. (2)

Desde hace muchos años, en nuestro laboratorio, se llevan a cabo diferentes pruebas biológicas tendientes a determinar actividad mutagénica (Ensayo Rec), actividad antibiótica (Ensayo con *Bacillus thuringiensis*), actividad antimetabólica (Ensayo de inhibición de la germinación de *Lepidium sativum* y de *Brassica campestris*) y actividad hemolítica (ensayo de hemólisis de glóbulos rojos). (7-10)

A fin de ampliar esta "batería" de pruebas biológicas a aplicar a los extractos fúngicos, hemos considerado más recientemente, la posibilidad de incluir otros ensayos.

*Artemia salina* es un crustáceo muy sensible a un amplio rango de compuestos químicos con actividad biológica. (11) En base a ello, Michael *et al* (12) propusieron su uso para bioensayos y Vanhaecke *et al* (13) desarrollaron una prueba de toxicidad, la que con diversas modificaciones ha sido aplicada por otros autores a extractos de plantas, para detectar actividad citotóxica (3), y guiar el fraccionamiento de los extractos vegetales fisiológicamente activos (14), toxinas de cianobacterias (15), metales pesados (16), pesticidas (17), extractos fúngicos (18) y micotoxinas puras (19,20).

Los objetivos del presente trabajo fueron:

- Poner a punto el ensayo de toxicidad a *A. salina*.
- Verificar la capacidad de este ensayo para determinar la toxicidad de algunas micotoxinas.

## Materiales y Métodos

El ensayo de toxicidad a *A. salina* se llevó a cabo utilizando Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) como sustancia de referencia.

### 1- Preparación del agua de mar artificial estándar

Se realizó según la fórmula y condiciones explicitadas en el protocolo de la Ordenanza Marítima. (21)

### 2- Eclosión de los quistes

En una probeta de 100 ml, se colocaron 70 ml de agua marina y 40 mg de quistes de *A. salina* marca Artemix, adquiridos en acuarios. Se incubó a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 18 a 24 horas, con un régimen de iluminación continua. Los huevos y larvas fueron mantenidos en suspensión con una leve aireación provista por un tubo de aire extendido sobre el fondo de la probeta. (21,22)

Luego de la incubación, se suspendió la aireación, se succionó con una pipeta las larvas nauplii que habían eclosionado, y se transfirió a un vaso de precipitados conteniendo 50 ml de agua de mar, el que había estado sometido a aireación constante durante 72 horas. Las larvas fueron mantenidas en suspensión exactamente 24 horas, bajo idénticas condiciones a las de la primera incubación. De este modo se logró obtener larvas en el estadio II y III para utilizar en el ensayo. (21,22)

### 3- Ensayo con SDS

Se utilizaron policubetas descartables con 24 pocillos, cada uno con 2 ml de capacidad total, y fondo plano. (23)

Se preparó una solución madre de 100 ppm de SDS marca Cicarelli. Se analizaron cinco concentraciones distintas (1, 5, 10, 15 y 20 ppm) (21) de SDS, cada una de ellas se distribuyó en cuatro pocillos de una misma hilera, de modo de tener cuatro réplicas del ensayo. A continuación, todos los pocillos recibieron el volumen de agua de mar necesario para obtener la dilución correspondiente (volumen final 2 ml).

Para distribuir las larvas en los pocillos, se procedió de la siguiente manera: Una alícuota de los nauplii, provenientes de la eclosión de los quistes, se colocó en una caja de Petri y se iluminó un sector de ésta hasta concentrar las larvas en esa zona y facilitar su recolección, aprovechando su fototropismo (11). A continuación se distribuyeron 10 nauplii por pocillo.

Se adicionó el volumen de la solución madre de SDS de acuerdo a la concentración deseada. Los

pocillos de la primera hilera no recibieron SDS, ya que se utilizaron como blanco del ensayo.

La placa se cubrió con un film de polietileno y se incubó en oscuridad a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ .

El recuento de los nauplii muertos se realizó con ayuda de la lupa binocular a las 24 horas (11,23) y a las 48 horas (21). Las larvas se consideraron muertas si no se observó movimiento de sus apéndices durante 10 segundos (21). Al finalizar el ensayo, se colocó la placa en el freezer durante 6 horas y se realizó el recuento del número total de nauplii. (23)

La  $CL_{50}$  se calculó por el método Probit (11,23) utilizando el software SPSS 10.0 para Windows. Para ello se ingresaron los valores correspondientes al número de larvas muertas y al número total de larvas para cada concentración. El método de regresión se aplicó de modo de tener en cuenta los valores obtenidos en los blancos. En los casos en que los datos resultaron insuficientes para la aplicación del método Probit, la  $CL_{50}$  se determinó utilizando transformación logit, la cual no provee intervalos de confianza (11).

Debido a los resultados obtenidos, se repitieron los ensayos con incubación de 24 horas, por duplicado, en seis ocasiones más.

#### 4- Ensayo con micotoxinas puras

Se trabajó con micotoxinas comerciales marca Sigma: aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) (Lote 36H4000), DAS (Lote 114H4064), NIV (Lote 123H4003), DON (Lote 45H4020) y toxina T-2 (Lote 66H4057).

Se analizaron 5 concentraciones diferentes de cada toxina disueltas en metanol, las mismas estuvieron comprendidas entre los siguientes valores: AFB<sub>1</sub>: 24 ppm - 0,024 ppm; DAS: 25 ppm - 0,025 ppm; NIV: 25 ppm - 0,025 ppm; DON: 25 ppm - 0,025 ppm; toxina T-2: 4,5 ppm - 0,0045 ppm.

Las toxinas se distribuyeron en los pocillos, reservándose la primera hilera para los blancos realizados con metanol (400  $\mu\text{l}$ ). Se procedió a la evaporación del solvente, en estufa a  $37^\circ\text{C}$ . (22) Se agregó 1,99 ml de agua de mar y por último 10 nauplii (aproximadamente en 0.01 ml de agua de mar). Como referencia y control de sensibilidad de las larvas (21), se realizó en paralelo el ensayo con SDS descripto. El recuento de las larvas muertas se llevó a cabo a las 24 horas de incubación y se procedió al cálculo de

las  $CL_{50}$  según lo señalado previamente en el ensayo con SDS.

## Resultados y discusión

### Ensayo con SDS

El SDS es un surfactante aniónico, empleado habitualmente como detergente, que ha sido utilizado en otros trabajos como patrón para la prueba de toxicidad a *A. salina* (21,24).

En nuestro ensayo con un tiempo de incubación de 24 horas, la  $CL_{50}$  fue de 7,542 ppm (Figura 1a) y el porcentaje de mortalidad en el blanco menor al 10%, mientras que al efectuarse la lectura a las 48 horas de incubación, la  $CL_{50}$  fue de 1,896 ppm y el porcentaje de muertes en el blanco, superior al 10% (Figura 1b).

Teniendo en cuenta las condiciones exigidas por la Ordenanza Marítima (21) que establece que para considerar válido el ensayo: la  $CL_{50}$  debe estar comprendida entre 5 y 10 ppm y el porcentaje de mortalidad en el control no debe exceder el 10%, el ensayo con incubación de 24 horas respondió a dichas condiciones, no así el ensayo con incubación a las 48 horas en el que se obtuvieron, según el mencionado protocolo, resultados no satisfactorios.

El protocolo de la Ordenanza Marítima mencionada, especifica un tiempo de incubación de 48 horas. Tanto en éste como en nuestro ensayo se utilizaron 10 larvas por cada concentración de SDS, sin embargo en dicho protocolo, el ensayo se lleva a cabo en placas de Petri de 60 mm x 12 mm, una por cada concentración (volumen final 10 ml), lo cual significa que se coloca la misma cantidad de larvas que en nuestro caso pero en un volumen 5 veces mayor.

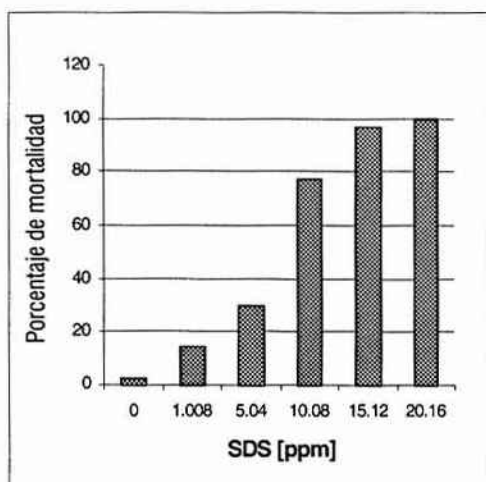
Considerando que la concentración de oxígeno disuelto es un factor crítico para la supervivencia de las larvas (21), el elevado porcentaje de muertes obtenido en el recuento a las 48 horas de incubación podría atribuirse a una disminución de la concentración de este gas, debido posiblemente al consumo metabólico de las larvas. Esto justificaría también la menor  $CL_{50}$  hallada.

En los 6 ensayos llevados a cabo posteriormente con incubación de 24 horas, se obtuvo una  $CL_{50}$  media de 8,302 ppm y una desviación estándar (SD) de 1,790. Los valores de  $CL_{50}$  obtenidos en los

ensayos estuvieron comprendidos entre 5 y 11 ppm, siendo 8 ppm la  $CL_{50}$  más frecuente (Figura 2). Además, se obtuvo un coeficiente de variación (CV) de

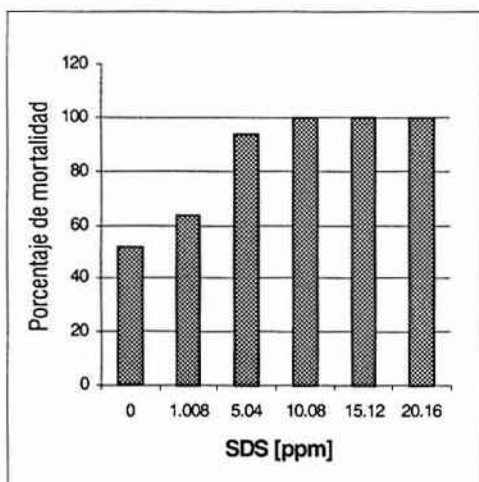
21,5%, valor considerado como aceptable dentro de los estimados como normales para los ensayos biológicos, a pesar de ser ligeramente mayor al CV de 19,8% reportado por otros autores (24).

**Figura 1a:** Ensayo de toxicidad a *A. salina* con SDS. Incubación 24 hs.



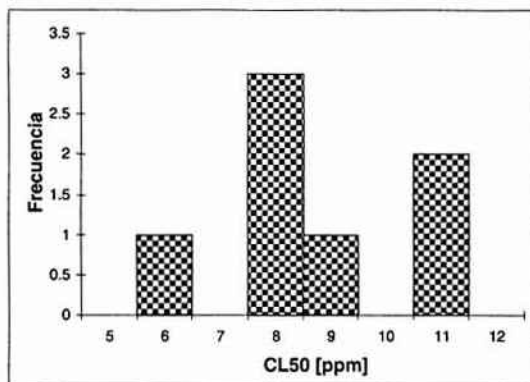
$CL_{50} = 7.542 \text{ ppm} (6.052 - 8.750)\text{ppm}^*$   
\* Intervalo de confianza de 95%

**Figura 1b:** Ensayo de toxicidad a *A. salina* con SDS. Incubación 48 hs.



$CL_{50} = 1.896 \text{ ppm} (0.814 - 2.859)\text{ppm}^*$   
\* Intervalo de confianza de 95%

**Figura 2:** Diagrama de distribución de frecuencias de las  $CL_{50}$  de SDS. Incubación 24 horas.



### Ensayos con micotoxinas puras

Todas las micotoxinas analizadas presentaron valores de  $CL_{50}$  dentro del intervalo de las concentra-

ciones ensayadas. Los resultados obtenidos se observan en la Tabla 1.

Tabla 1: Ensayo de toxicidad a *A. salina* con micotoxinas puras

Micotoxina	$CL_{50}$ [ppm]	Intervalo de confianza de 95%
Aflatoxina B <sub>1</sub>	94,898	--
Diacetoxiscirpenol	0,519	0,362 - 0,750
Nivalenol	10,387	7,915 - 14,146
Deoxinivalenol	13,759	1,636 - 18,817
Toxina T-2	0,471	0,388 - 0,571

En nuestras condiciones de ensayo la  $CL_{50}$  para DAS, resultó semejante a la informada (0,250 ppm) por Shelby *et al* mientras que los valores para la toxina T-2 fueron superiores a lo reportado (0,069 ppm) por los mismos autores. (19)

### Conclusión

Los resultados obtenidos avalan las condiciones utilizadas en la puesta punto del bioensayo de toxicidad a *A. salina*, cumpliendo con un tiempo de incubación de 24 horas. Se comprobó, además, la capacidad del ensayo para detectar la actividad tóxica de las micotoxinas analizadas.

Se propone continuar los estudios aplicando el ensayo a extractos fúngicos y otras micotoxinas.

### Agradecimientos

A los Dres. Antonio Logrieco, Alicia Ronco, Alejandro Beccaria y a los Lic. Liliana Contini y José Lespinaud por el apoyo científico y técnico que nos brindaron.

### Bibliografía

1. "Mycology Economic and Health Risks. Council for Agricultural Science and Technology." 1989. Task Force Report.
2. Saubois, A. 1993. Material bibliográfico del curso sobre Situación del conocimiento de las micotoxinas en materias primas alimenticias y especies forrajeras. Cátedra de Microbiología. Departamento de Biotecnología. Fac. de Ingeniería Química. UNL.
3. Wijnands L.M.; van Leusden, F.M. 2000. "An overview of adverse health effects caused by micotoxins and bioassays for their detection." National Institute of Public Health and the Environment. (Bilthoven). 13
4. Moretti, A.; Logrieco, A.; Bottalico, A.; Ritieni, A.; Fogliano V.; Randazzo, G. (1997) Diversity in beauvericin and fusoproliferin production by different populations of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* section *Liseola*). *Sydowia* an international journal of mycology. Special Issue. 44- 56.
5. Informe de la conferencia mixta FAO/OMS/PNUMA sobre Micotoxinas, celebrada en Nairobi. 1977. Estudio FAO: Alimentación y Nutrición-2
6. Prácticas recomendadas para la prevención de las micotoxinas en los alimentos, los piensos y sus productos. 1979. Libro preparado por la ONU para la agricultura y la alimentación. Estudio FAO: Alimentación y Nutrición Nº 10.
7. Basílico, J.C.; Lurá, M.C.E.; Parada, J.L. 1987. Actividad mutagénica de hongos aislados de sorgo y maíz. *Rev. Boletín Micológico. Chile.* 3, 2: 111-115.

8. Saubois, A.; Basílico, J.C.; González, A.M. 1988. Utilización de *Bacillus megaterium* y *Bacillus thuringiensis* para la detección de hongos toxicogénicos. Boletín Micológico. **3**, 4:243-247.
9. González, A.M.; Nepote, A. 1994. Utilización de semillas de *Brassica campestris* para la determinación de la capacidad toxicogénica en extractos fúngicos. Tercera Jornadas Técnico Científicas. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. UNL.
10. González, A.M.; Lurá, M.C.; Latorre, M.G.; Rico, M.; Carrera, E.; Lound, F. 1998. Estudio de la actividad hemolítica «*in vitro*» de extractos de hongos productores de citrulina. Revista de la Fac. de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la UNL (FABICIB). **2**: 127-130.
11. Meyer, B. N.; Ferrigni, N. R.; Putnam, J. E.; Jacobsen, L. B.; Nichols D. E.; Mc Laughlin, J. L. 1982. Brine Shrimp: A convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *J Med Plant Res.* **45**: 31-34.
12. Michael A.S.; Thompson, C.G.; Abramovitz, M. 1956. *Artemia salina* as test organisms for a bioassay. *Sci.* **123**:464.
13. Vanhaecke, P.; Persoone, G.; Claus, C.; Sorgeloos, P. 1981. Proposal for a short-term toxicity test with *Artemia* nauplii. *Ecotoxicol. Env. Safety.* **5**:382-387.
14. Pimentel Montanher, A. B.; Pizzolatti, M.G.; Costa Brighente, I.M. 2002. An application of the brine shrimp bioassay for general screening of brazilian medicinal plants. *Acta Farm. Bonaerense.* **21**, 3: 175-178.
15. Lee, T.; Chen, Y.; Chou, H. 1999. Toxicity assay of cyanobacterial strains using *Artemia salina* in comparison with the mouse bioassay. *Acta Zoologica Taiwanica* **10**,1.
16. Martínez, N.; Del ramo, J.; Torreblanca, A.; Diaz-Mayans, J. 1998. Effect of cadmium exposure on zinc levels in the brine shrimp *Artemia partenogenetica*. *Aquaculture.* **172**: 315-325.
17. Barahona, M.V.; Sanchez-Fortun, S. 1999. Toxicity of carbamates to the brine shrimp *Artemia salina* and the effect of atropine, Bw284c5 I, iso-OMPA and 2-PAM on carbaryl toxicity. *Env. Pollut* **104**: 469-476.
18. Abdel-Mallek, A.Y.; El-Maraghy, S.S.M.; Hasan, H.A.H. 1993. Mycotoxin-producing potential of some *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium* isolates found on corn grains and sunflower seeds in Egypt. *Journal of Islamic Academy of Sciences.* **6**, 3: 173 -182.
19. Shelby, R.A.; Zhang, D.; Dalrymple, L.W. 1995. Using brine shrimp bioassay to measure toxicity of *Fusarium* toxins. *Phitopathol.* **85**, 10: 1208.
20. Hartl, M.; Humpf, H-U. 2000. The brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay: a simple method to assess the toxicity of fumonisin mycotoxins. *Mycotox. Res.* **16** A: 83.
21. Prefectura Naval Argentina. 1998. Ordenanza Marítima N° 1/98 (DPMA). Anexo III al Agregado 1. Tomo 6. "Régimen de la Protección del Medio Ambiente". Buenos Aires.
22. Carballo, J.L.; Hernandez-Inda, Z.L.; Perez, P.; García-Grávalos, M.D. 2002. A comparison between two brine shrimp assays to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnol.* **2**:17.
23. Logrieco, A.; Moretti, A.; Fornelli, F.; Fogliano, V. Ritieni, A.; Caialfa, M.F.; Randazzo, G.; Bottalico, A.; Macchia, L. 1996. Fusaproliferin production by *Fusarium subglutinans* and its toxicity to *Artemia salina*, SF-9 insect cells, and IARC/LCL171 human B lymphocytes. *Appl Environ Microbiol.* **62**: 3378-3384.
24. Sampaio de Araújo, M.M.; Nascimento, I.A. 1999. Testes ecotoxicológicos marinhos: Análise de sensibilidade. *Ecotoxicology and Environmental Restoration*. **2**,1: 41-47.