

LARVE *Artemia salina* KAO TEST ORGANIZAM U ISTRAŽIVANJU SINERGIZMA MIKOTOKSINA

S. Duraković¹, Z. Duraković², A. Duraković³, T. Beritić⁴,
O. Pospišil¹ i B. Radić⁵

Zavod za biokemijsko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb¹, Medicinski fakultet, Zagreb², Medicinski fakultet, Bethesda, MD, SAD³, Jugoslavenska akademija znanosti i umjetnosti, Zagreb⁴, Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb⁵

(Primljeno 10. XI. 1986)

Istraživan je utjecaj koncentracije i vremena djelovanja aflatoksina B₁ i diacetokscirpenola na larve račića *Artemia salina*, u rasponu temperature od 20 do 35°C. Određeno je toksičko djelovanje za svaki mikotoksin zasebno i u kombinaciji različitih koncentracija. Nakon što su određene LC₅₀ i T₅₀ vrijednosti, dokazan je sinergistički odziv na osnovi smanjenja koncentracija za podjednak toksički učinak.

Mikotoksini su sekundarni produkti metabolizma nekih vrsta gljiva, što ih sintetiziraju tijekom rasta na nizu najrazličitijih supstrata. Mikotoksini izazivaju akutna otrovanja ljudi i životinja, ali mogu izazvati i kronična oštećenja kože i unutrašnjih organa (1, 2). Opisano je oko 250 vrsta toksikogenih plijesni i oko 200 vrsta mikotoksina (3). Zbog toksičnosti, karcinogenosti i mutagenosti mnogih mikotoksina, obavljaju se intenzivna istraživanja s ciljem rasvjetljavanja putova njihove sinteze i učinaka *in vitro* i *in vivo*. Iako prisutnost pojedinačnih mikotoksina u namirnicama i krmivima predstavlja očevidnu potencijalnu opasnost, sve se više pažnje posvećuje mogućim opasnostima što su povezane s istodobnom prisutnošću dvaju ili više mikotoksina. Drži se da se različiti mikotoksini kao metaboliti gljiva mogu u istom supstratu nalaziti ili stoga što ih jedan soj sintetizira nekoliko, ili stoga što postupno raste nekoliko vrsta gljiva. Mikotoksikolozi osobito istražuju toksičke interakcije u kojima zajedničko djelovanje dvaju ili više kemijskih agenasa može izazvati ne samo aditivan nego i ukupan efekt veći od zbroja efekata svakog agensa zasebno. Ovaj je fenomen poznat kao sinergizam. Za određivanje mikotoksinskog sinergizma razvijen je niz tehnika (4-7). One uključuju brzine rasta, funkcije organa, akutnu toksičnost, histologiju, funkcije stanica, kemiju krvi, imunološki odziv i indukciju tumora (8-22). Budući da na prirodnim supstratima postoji vjerojatnost istodobnog porasta plijesni iz rodova *Aspergillus* i *Fusarium*, pa tako i sinteze aflatoksina i trihotecena, bio je zadatak ovog rada da se, u odabranim parametrima, istraži utjecaj kombiniranog učinka različitih koncentracija aflatoksina B₁ i diacetokscirpenola u pokusima *in vivo*, na larvama *A. salina*. Na osnovi dobivenih podataka valjalo je ocijeniti mogućnost praktičke primjene larvi tijekom istraživanja toksičnosti namirnica i/ili krmiva u kojima su ti mikotoksini kvalitativno dokazani.

MATERIJAL I METODE

Test organizam

U radu su upotrijebljene larve račića *A. salina*, u literaturi opisane kao vrlo osjetljivi organizmi na djelovanje niza različitih kemijskih agenasa (8). Dehidrirana jaja spomenutih račića su dobavljena od tvrtke Hans Brustmann, SR Njemačka. Larve su izvaljene, uz snažnu aeraciju, prema metodi što su je opisali Harwing i Scott (7). Aflatoksin B₁ je dobiven biosintezom s pomoću plijesni *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 na kukuruznom zrnu s 38% vode, pri 28°C. Nakon izolacije i pročišćavanja određena mu je struktura masenom spektroskopijom, a koncentracija s fluorodenzitometrom (23). Diacetoksiscirpenol je dobavljen od tvrtke Carl Roth - Karlsruhe kao kristalni toksin. Oba toksina su otopljena u kloroformu do koncentracije 0,5 - 5,0 µg × ml⁻¹.

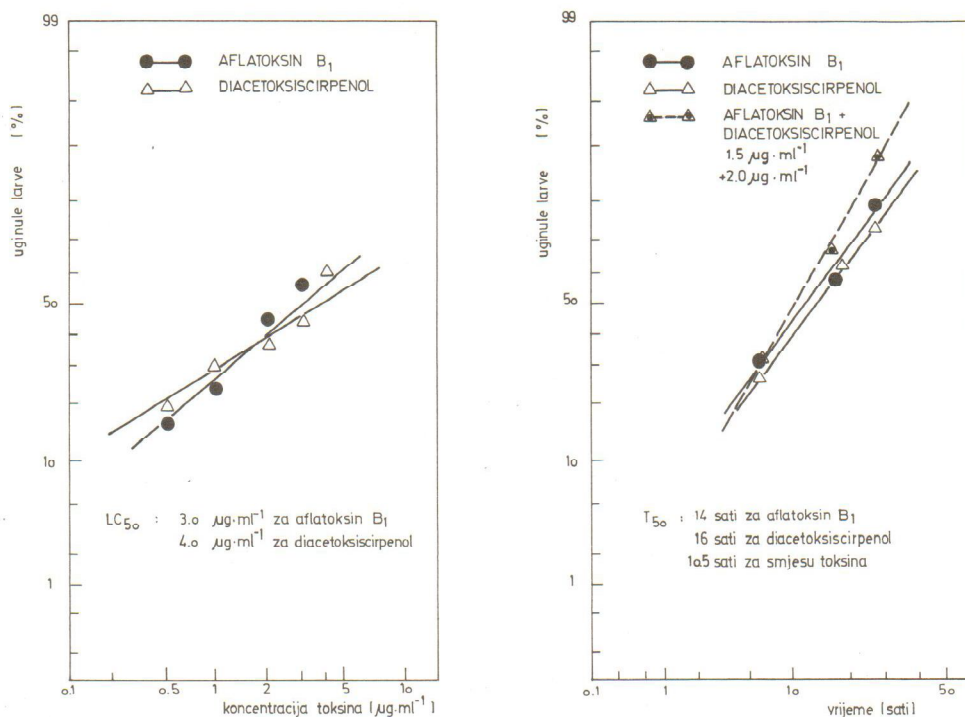
Toksičko djelovanje na larve *A. salina* je određivano na diskovima od filtrir-papira, koji su se nalazili na udubljenim pločicama od porculana. Na diskove su, s pomoću mikrolitaršprica, nanošeni istraživani toksini, a nakon što je otapalo ishlapjelo nanesene su istraživane larve. Raspon koncentracija toksina je bio od 5 do 50 ng/disk, a pokusi su vodeni tako da na jednom disku nije bilo manje od 20 niti više od 50 larvi. Tijekom inkubacije pri 20, 25, 30 i 35°C uzimani su svakih 6, 18 i svaka 24 sata uzorci i pod stereoskopskim mikroskopom su izbrojene žive larve. Usporedo je, uz svaki pokus, određivan u slijepom pokusu postotak prirodno uginulih larvi. U ovisnosti o početnom broju i broju prirodno uginulih larvi, određenom u slijepom pokusu na jednak način, izračunate su, kao srednje vrijednosti, LC₅₀ i T₅₀. Na osnovi vrijednosti dobivenih numeričkim načinom, određene su LC₅₀ i T₅₀ vrijednosti grafički, u log/log koordinatnom sustavu, za svaki istraživani mikotoksin zasebno i za kombinaciju njihovih koncentracija. Vrijednostima dobivenim u pokusima s toksinima su pridodane vrijednosti slijepih pokusa.

REZULTATI I RASPRAVA

Na slikama 1-4 su prikazane grafičkim načinom određene LC₅₀ i T₅₀ vrijednosti aflatoksina B₁ i diacetoksiscirpenola, na osnovi rezultata što su dobiveni kao srednje vrijednosti serija od po 10 usporednih pokusa.

Istraživanja dosad nepoznatih toksina kao fungalnih metabolita na osnovi letalnih učinaka ili patoloških simptoma, kao što su oštećenja jetre i bubrega u viših organizama su mukotrpana, a postavljaju i niz ograničenja za pojedine fungalne metabolite, otežavajući njihovo testiranje.

Larve *A. salina*, *Brachydanio rerio* i *Tenebrio molitor*, kao test organizmi za određivanje toksičnosti različitih fungalnih ekstrakata, opisane su u radovima niza autora (5-7, 11). Brown (5) je usporedo istraživao djelovanje aflatoksina B₁ i okratoksina A u pokusima s larvama *A. salina* pri 37,5°C. Dodatak aflatoksina B₁ u koncentraciji od 1,0 µg × ml⁻¹ rezultirao je s 90% smrtnosti larvi, nakon 24 sata. Prema rezultatima Abedija i Scotta (6) u pokusima s larvama *Brachydanio rerio*, metabolit plijesni *Aspergillus versicolor* - sterigmatocistin, bio je 3-4 puta toksičniji nego aflatoksin B₁. Istražujući utjecaj toksina plijesni iz roda *Fusarium* (T₂-toksin) na larve *Tenebrio molitor*, Davis i Schiffer (18) su dokazali da T₂-toksin, pri temperaturi od 27°C (±0,25), inhibira sintezu proteina. Harwing i Scott (7) su, istražujući djelovanje nekih mikotoksina na larve *A. salina* ustvrdili da aflatoksin B₁ u koncentraciji od 0,2 ng/disk, ubija 21% populacije istraživanih larvi,



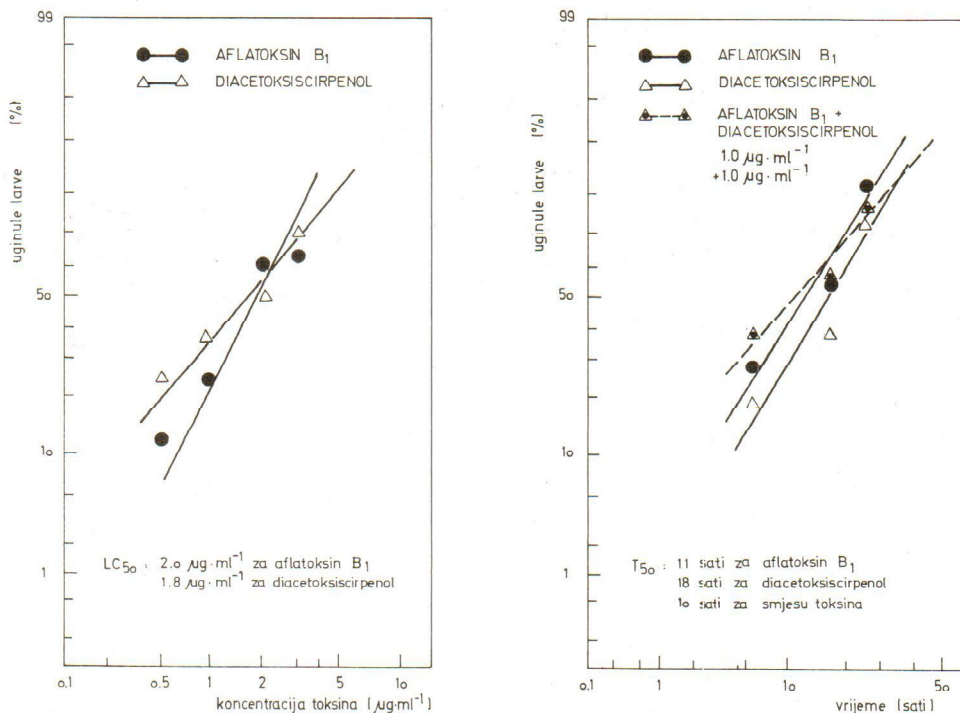
Sl. 1. LD₅₀ i T₅₀ vrijednosti aflatoksina B₁ i diacetoksiscirpenola u akutnoj toksičnosti u pokusima s larvama *A. salina* pri 20°C

nakon 16 sati kontakta, pri 30°C. Autori navode da se rezultati moraju uzeti s rezervom, jer su dobiveni na osnovi samo jedne serije pokusa.

Rezultati naših kontrolnih pokusa pokazuju da, u gradijentu temperature, nema bitnih razlika u broju prirodno uginulih larvi. Pri svim istraživanim temperaturama je, nakon 6 sati, uginulo 8-12% larvi. Produžujući, međutim, vrijeme inkubacije na 18 odnosno 24 sata, povećala se i prirodna smrtnost na 11-18%, odnosno na 16-23%. U pokusima s čistim aflatoksinom B₁ se primjećuje da povišenje temperature inkubacije znatno utječe na djelovanje toga toksina. U pokusima s visokom koncentracijom (3 µg × ml⁻¹) uginulo je pri 20°C, nakon 24 sata, 80% istraživanih larvi (sl. 1). Povišenjem temperature na 25°C postignut je, s 20-33% nižom koncentracijom toga toksina, jednak toksični učinak (sl. 2). Pri temperaturi inkubacije od 30°C još je izrazitije bilo djelovanje aflatoksina B₁. Upotrebljavajući dvostruko nižu koncentraciju, u odnosu na pokuse pri 25°C, dobiven je približan toksički učinak (sl. 3). U pokusima pri 35°C, a primjenjujući koncentraciju aflatoksina B₁ jednaku kao i pri 30°C, povećao se postotak uginulih larvi za oko 25% (sl. 4). Literaturni navodi o *in vivo* djelovanju aflatoksina B₁ i diacetoksiscirpenola se znatno razlikuju. Tako *Harwing* i *Scott* (7) opisuju diacetoksiscirpenol kao izrazitiji toksički agens, u odnosu na aflatoxin B₁. Istraživanja što su ih proveli *Abedi* i *Mc Kinley* (8) u

pokusima s larvama *Brachydanio rerio* pokazuju da je, u odnosu na diacetoksiscirpenol, aflatoksin B₁ mnogo toksičniji.

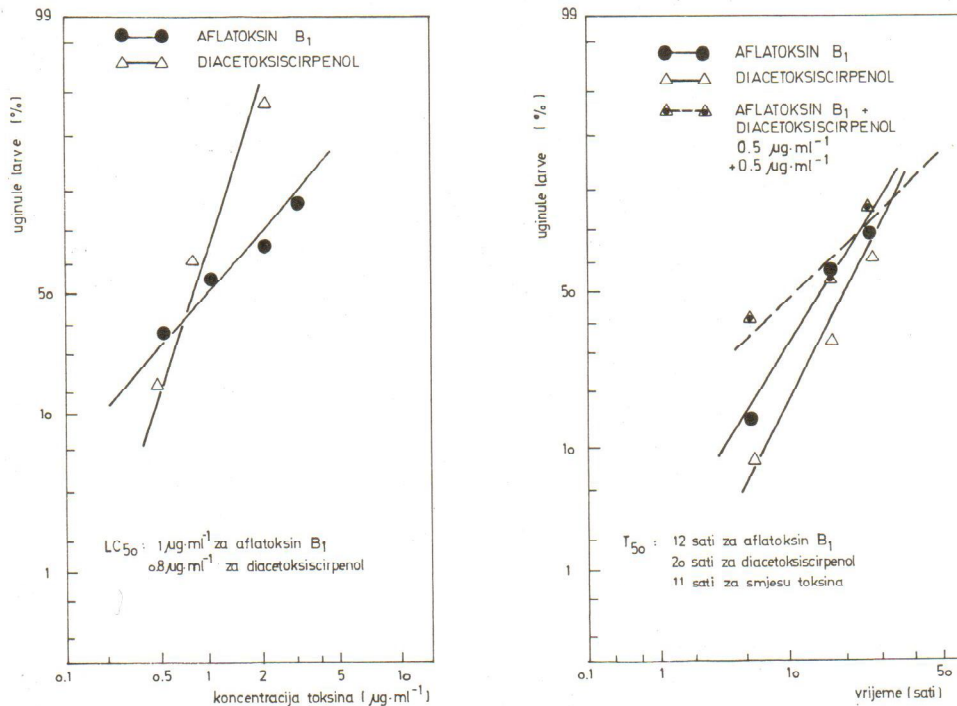
U pokusima s diacetoksiscirpenolom, što su u ovom radu načinjeni, dobiven je pri 20°C, a s 25% višom koncentracijom u odnosu na koncentraciju aflatoksina B₁, slabije izražen toksički efekt (sl. 1). Povišenjem temperature inkubacije na 25°C djelovanje diacetoksiscirpenola se, u odnosu na djelovanje aflatoksina B₁, neznatno razlikuje. Na



Sl. 2. LC_{50} i T_{50} vrijednosti aflatoksina B₁ i diacetoksiscirpenola u akutnoj toksičnosti u pokusima s larvama *A. Salina* pri 25°C

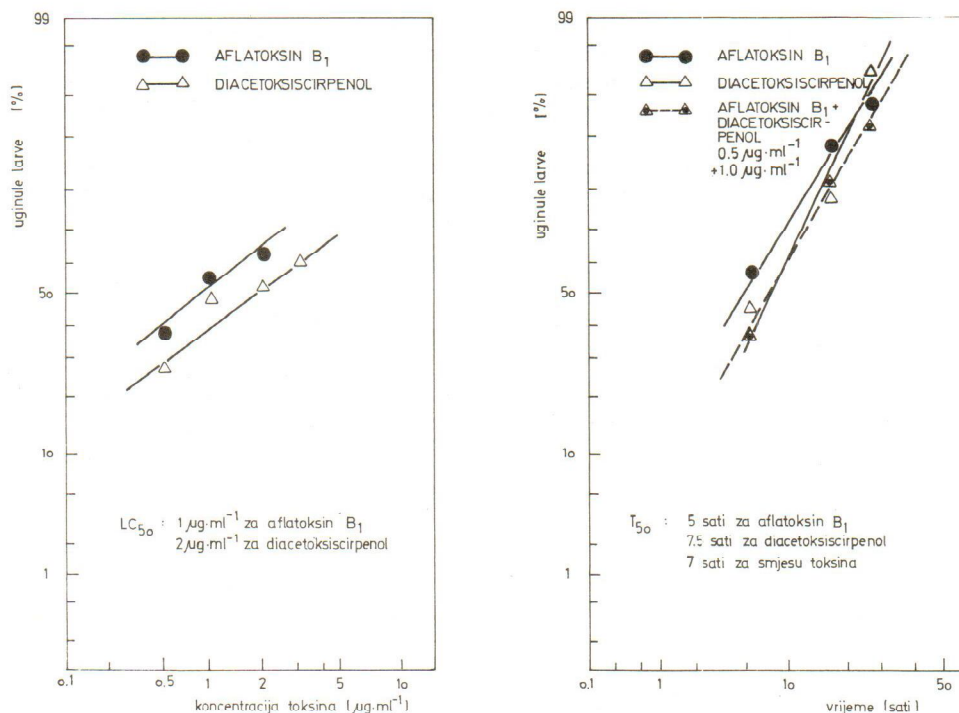
slici 2 se vidi da je u pokusima s 10% nižom koncentracijom diacetoksiscirpenola dobiveno 8% manje uginulih larvi, u odnosu na pokuse s aflatoksinom B₁. Ako se, međutim, promatra vrijeme potrebno za postizanje jednakog toksičkog efekta, primjećuje se da je za diacetoksiscirpenol ono produženo za više od 50% (sl. 2). Uspoređujući djelovanje istraživanih mikotoksina pri temperaturi od 30°C vidi se da, iako su koncentracije obaju istraživanih toksina za postizanje jednaka toksičkog učinka bile praktički iste, vrijeme djelovanja diacetoksiscirpenola bilo je produženo za oko 70% (sl. 3). Rezultati istraživanja pri 35°C pokazuju da je pri toj temperaturi inkubacije aflatoksin B₁, u odnosu na diacetoksiscirpenol, mnogo toksičniji. Naime, ne samo da je s dvostruko nižom koncentracijom aflatoksina B₁ dobiven jednak toksički učinak nego je i vrijeme djelovanja diacetoksiscirpenola bilo 50% duže (sl. 4).

Uz pretpostavku da bi zajedničko djelovanje tih dvaju toksina moglo rezultirati povećanim toksičkim efektom, istraživanja njihova sinergističkog djelovanja su provedena s 50%-tnim koncentracijama, u odnosu na koncentracije što su bile upotrijebljene tijekom istraživanja učinaka svakog toksina zasebno. Rezultati pokusa pri 20°C u kombinaciji koncentracija pokazuju da je dobiven sinergistički odziv jer, ne samo što je nakon 24 sata uginulo 88% larvi (za aflatoksin B₁ 80%, a za diacetoksiscirpenol 75%), nego je T₅₀ kraće za 35-55% (sl. 1). Temperatura inkubacije od 25°C je, sudeći prema dobivenim



Sl. 3. LC₅₀ i T₅₀ vrijednosti aflatoksina B₁ i diacetoksiscirpenola u akutnoj toksičnosti u pokusima s larvama *A. salina* pri 30°C

rezultatima, nepovoljnija u smislu sinergističkog djelovanja. Dobiveni rezultati pokazuju da je za postizanje jednaka toksičkog učinka T₅₀ kao i u pokusima s aflatoksinom B₁, a u odnosu na T₅₀ za diacetoksiscirpenol ono bilo za 80% kraće (sl. 2). U pokusima pri 30°C su dobiveni izrazitiji sinergistički efekti, u odnosu na pokuse pri 20 i 25°C. Nakon 24 sata je, u kombinaciji koncentracija, uginulo 77% larvi uz dvostruko niže koncentracije nego pri 25°C i 3 do 4 puta niže koncentracije u odnosu na pokuse pri 20°C (sl. 3). Rezultati pokusa pri 35°C pokazuju da nije dobiven sinergistički odziv, a da je T₅₀ za 50-70% kraće u odnosu na pokuse pri ostalim istraživanim temperaturama (sl. 4).



Sl. 4. LC₅₀ i T₅₀ vrijednosti aflatoksina B₁ i diacetoksisirpenola u akutnoj toksičnosti u pokusima s larvama *A. salina* pri 35°C

ZAKLJUČCI

- 1) Zbog izuzetno jednostavnog izvođenja, neznatnih ulaganja i u kratkom vremenu dobivanja velikog broja ponovljivih rezultata, metoda istraživanja toksičnosti aflatoksina B₁ i diacetoksisirpenola u pokusima s larvama *A. salina* je prihvatljiva.
- 2) Budući da su vrlo osjetljive na submikrogramske količine istraživanih mikotoksina, larve *A. salina* se mogu uspješno upotrijebiti kao test organizam za određivanje toksičnosti ekstrakata namirnica i/ili krmiva kontaminiranih plijesnima, u kojima su aflatoxin B₁ i diacetoksisirpenol kvalitativno dokazani.
- 3) U istraživanju sinergističkog djelovanja aflatoksina B₁ i diacetoksisirpenola na larvama *A. salina* dobiven je sinergistički odziv u pokusima pri 20, 25 i 30°C.

Literatura

1. Krogh, P., Hasselager, E., Friis, P.: Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B., 78 (1970) 401.
2. Krogh, P.: Mycotoxin nephropathy. U: Mycotoxins, ur: I. F. H. Purchase, Elsevier Scientific Publishing Co. Amsterdam, 1974, str. 419-428.
3. Ciegler, A.: Mycotoxins. U: Handbook of Microbiology, Vol. III - Microbial products., ur. A. I. Laskin and H. A. Lechevalier, CRC Press, Cleveland 1973, str. 525.
4. Bontwell, R. K.: Prog. Exp. Tumor Res., 4 (1964) 207.
5. Brown, R. F.: J. Assoc. Off. Anal. Chem., 46 (1969) 119.
6. Abedi, Z. H., Scott, P. M.: J. Assoc. Off. Anal. Chem., 52 (1969) 963.
7. Harwing, J., Scott, P. M.: Appl. Microbiol., 21 (1971) 1011.
8. Abedi, Z. H., Mc Kinley, W. P.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. 51 (1968) 902.
9. Detroy, R. W., Lillehoy, E. B., Ciegler, A.: Aflatoxin and related compounds. U: Microbial toxins, ur: A. Ciegler, S. Kadis, S. J. Ajl, Vol. VI, Academic Press, New York 1971, str. 3.
10. Lillehoy, E. B., Ciegler, A., Detroy, R. W.: Fungal toxins, U: Essays in toxicology, ur: F. R. Blood, Vol. II, Academic Press, New York 1971, str. 1.
11. Scott, P. M., Van Valbeek, W., Kennedy, B., Anyeli, D.: J. Agric. Food Chem., 20 (1972) 1103.
12. Wyatt, R. D., Tung, H. T., Hamilton, P. B.: Poult. Sci., 52 (1973) 395.
13. Nixon, J. E., Sinnhuber, R. O., Lee, D. J., Landers, M. K., Harr, J. R.: J. Natl. Cancer Inst., 53 (1974) 453.
14. Richard, J. L., Thurston, J. R., Deyoe, B., Both, G. D.: Appl. Microbiol., 29 (1975) 27.
15. Steber, S. M., Correa, P., Dalgard, D. W., Adamson, R. H.: Cancer Res., 39 (1979) 4545.
16. Hitokoto, H., Morozumi, S., Wauke, T., Sakai, S., Durata, H.: Appl. Environ. Microbiol., 39 (1980) 818.
17. Ahmad, S., Branen, A. L.: J. Food Sci., 46 (1981) 1059.
18. Davis, G. R. F., Schiffer, H. B.: Comp. Biochem. Physiol., 73 (1982) 13.
19. Buchanan, R. L., Hoover, D. C., Jones, S. B.: Appl. Environ. Microbiol., 46 (1983) 1193.
20. Buchanan, R. L., Lewis, D. F.: Appl. Environ. Microbiol., 47 (1984) 1216.
21. Spilmann, J. R.: J. Assoc. Off. Anal. Chem., 68 (1985) 43.
22. Duraković, S., Pospisil, O., Radić, B., Delaš, F.: Larve *Artemia salina* kao biološki reagens u istraživanju toksičnosti okratoksina A. 29. kongres mikrobiologa, epidemiologa i infektologa Jugoslavije, Pula 1987. Zbornik radova (u tisku).
23. Pons, W. A.: J. Assoc. Off. Anal. Chem., 57 (1971) 392.

Summary

ARTEMIA SALINA LARVAE AS A TEST ORGANISM IN RESEARCH ON MYCOTOXIN SYNERGISM

The effect of concentration and contact time of two mycotoxins, aflatoxin B₁ and diacetoxyscirpenol was studied on the larvae of *Artemia salina*. These organisms are sensitive to sub-microgram quantities of the toxins and can be used as bioassay test organisms. In a study of aflatoxin B₁ and diacetoxyscirpenol synergism in acute toxicity, the LC₅₀ values of toxin pairs exhibited a distinct increase in toxicity.

Department of Biochemical Engineering, Faculty of Food Science
and Biotechnology, Zagreb¹, Faculty of Medicine, Zagreb²,
University of Health Science, Faculty of Medicine, Bethesda, MD., USA³,
Yugoslav Academy of Sciences and Arts, Zagreb⁴,
Institute for Medical Research and Occupational Health,
University of Zagreb, Zagreb⁵

Received for publication
November 10, 1986