

VILNIAUS UNIVERSITETAS

**Virginija Kalciienė**

**APLINKOS TARŠALŲ AROCLOR 1248, OLEINO  
RŪGŠTIES IR SIEROS TOKSIŠKUMAS *VIBRIO*  
*FISCHERI* BAKTERIJOMS IR JO BIOCHEMINIAI  
MECHANIZMAI**

Daktaro disertacija  
Fiziniai mokslai, biochemija (04 P)

Vilnius, 2011

Disertacija rengta 2004 – 2011 metais Vilniaus universitete

**Mokslinis vadovas:**

doc. dr. Anolda Četkauskaitė (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai,  
biochemija – 04 P)

## Turinys

Sutartiniai žymėjimai ir santrumpos.....	5
Sutartinės sąvokos.....	6
ĮVADAS.....	7
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	13
1.1. Aroclor 1248/PCB kaip globalus pramoninis taršalas gamtoje.....	13
1.1.1. Aroclor 1248/PCB fizikinės-cheminės savybės.....	13
1.1.2. Aroclor 1248/PCB šaltiniai, paplitimas ir apykaita gamtoje.....	14
1.1.3. Aroclor 1248/PCB patvarumas, bioakumuliacija ir biomagnifikacija.....	16
1.1.4. Aroclor 1248/PCB ekotoksiškumas (ūminiai efektai).....	17
1.1.5. Aroclor 1248/PCB poveikis biomembranom, susijusioms fermentų sistemoms, ir biocheminiai mechanizmai.....	18
1.2. Oleino rūgštis kaip gamtinė toksinė medžiaga.....	20
1.2.1. Oleino rūgšties fizikinės-cheminės savybės.....	20
1.2.2. Oleino rūgšties šaltiniai, paplitimas ir apykaita gamtoje.....	21
1.2.3. Oleino rūgšties ekotoksiškumas (ūminiai efektai).....	22
1.2.4. Oleino rūgšties poveikis biomembranom, susijusioms fermentų sistemoms, ir biocheminiai mechanizmai.....	23
1.3. Elementinė siera kaip gamtinės ir antropogeninės kilmės medžiaga vandens ekosistemose.....	26
1.3.1. Sieros fizikinės-cheminės savybės.....	26
1.3.2. Sieros šaltiniai, paplitimas ir apykaita gamtoje.....	27
1.3.3. Sieros ekotoksiškumas (ūminiai efektai).....	28
1.3.4. Sieros poveikis biomembranom, susijusioms fermentų sistemoms, ir biocheminiai mechanizmai.....	29
1.4. Bakterinė bioluminescencija ekotoksikologijoje.....	30
1.4.1. Standartinis testas ir individualių medžiagų toksiškumo tyrimai.....	30
1.4.2. Mišinių toksiškumo tyrimai, panaudojant bakterinę bioluminescenciją.....	32
1.5. <i>Vibrio fischeri</i> bakterijų fermentų sistemos ar jų veiklos produktai kaip biožymenys cheminių medžiagų toksiškumui nustatyti.....	37
1.5.1. Bendroji bakterijų bioluminescencijos fermentų sistema ( <i>in vivo</i> ), jos induktoriai, ksenobiotikų biotransformacijos ir jų išmetimo iš ląstelių fermentai.....	38
1.5.2. Švytinčių bakterijų kvėpavimo grandinė.....	42
1.5.3. Energiją (ir potencialą) gaminančios ir naudojančios sistemos.....	43
1.5.4. Aktyviųjų deguonies formų susidarymas ir jas neutralizuojantys fermentai švytinčiose bakterijose.....	45
1.5.5. Ląstelių redukcinė geba ir šio metodo vertė švytinčiose bakterijose.....	47
1.5.6. Bioluminescencijos komplekso <i>in vitro</i> fermentų sistemos struktūra bei slopikliai.....	49
1.5.7. Daugybinio toksiškumo tyrimų vertė švytinčiose bakterijose.....	59
2. MEDŽIAGOS IR METODAI.....	62

2.1. Medžiagos.....	62
2.1.1 Biologinis objektas.....	62
2.1.2. Reagentai.....	62
2.1.3. Terpės.....	62
2.2. Metodai.....	63
2.2.1. Švytinčių bakterijų <i>V. fischeri</i> auginimas ir suspensijos paruošimas.....	63
2.2.2. Švytinčių bakterijų <i>V. fischeri</i> bioluminescencijos ( <i>in vivo</i> ) įvertinimas.....	63
2.2.3. Beląstelinio NADH:FMN oksidoreduktazės-liuciferazės komplekso ( <i>in vitro</i> ) paruošimas.....	64
2.2.4. Bioluminescencijos <i>in vitro</i> pokyčių matavimas.....	65
2.2.5. NADH oksidacijos NADH:FMN oksidoreduktazės-liuciferazės kompleksu <i>in vitro</i> pokyčių matavimas.....	66
2.2.6. <i>V. fischeri</i> ląstelių redukcinės (antioksidantinės) gebos nustatymas.....	66
2.2.7. Aktyviųjų deguonies formų nustatymas <i>V. fischeri</i> ląstelėse.....	67
2.2.8. <i>V. fischeri</i> ląstelių deguonies sunaudojimo matavimai.....	68
2.2.9. Tetrafenilfosfonio jonų sugerties <i>V. fischeri</i> ląstelėmis nustatymas.....	69
2.2.10. Statistinė duomenų analizė.....	69
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	72
3.1. Individualių cheminių medžiagų (A, OR ir S <sub>8</sub> <sup>0</sup> ) ir jų binarinių mišinių poveikis <i>V. fischeri</i> bioluminescencijai.....	72
3.1.1. Individualių cheminių medžiagų (A, OR ir S <sub>8</sub> <sup>0</sup> ) poveikis bioluminescencijai <i>in vivo</i> ir <i>in vitro</i> .....	73
3.1.2. A, OR ir S <sub>8</sub> <sup>0</sup> binarinių mišinių poveikis bioluminescencijai <i>in vivo</i> ir <i>in vitro</i> (statistinė interpretacija).....	77
3.2. A, OR ir S <sub>8</sub> <sup>0</sup> poveikis <i>V. fischeri</i> bakterijų oksidoredukcinių fermentų sistemos ir citoplazminės membranos būklei <i>in vivo</i> .....	89
3.2.1. Aktyviųjų deguonies formų susidarymo pokyčiai.....	89
3.2.2. Ląstelių redukcinės gebos skatinimas.....	90
3.2.3. Deguonies sunaudojimo skatinimas.....	93
3.2.4. Poveikis membranos potencialui.....	94
3.3. A, OR ir S <sub>8</sub> <sup>0</sup> poveikis bioluminescencijos fermentų sistemai.....	99
3.3.1 Nuo liuciferazės komplekso priklausomo deguonies sunaudojimo slopinimas <i>in vivo</i> .....	100
3.3.2. <i>V. fischeri</i> bioluminescencijos apgynimas <i>n</i> -dekanaliu mišiniuose su slopikliais A, OR ir S <sub>8</sub> <sup>0</sup> .....	101
3.3.3. A, OR ir S <sub>8</sub> <sup>0</sup> poveikis NADH oksidacijai <i>in vitro</i> .....	102
3.3.4. Agentų, reaguojančių su –SH grupėmis, poveikis bioluminescencijai <i>in vivo</i> ir <i>in vitro</i> .....	105
IŠVADOS.....	108
MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS.....	109
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	111

## Sutartiniai žymėjimai ir santrumpos

$\Delta\psi$	membranos potencialas
$\Delta\mu_{H^+}$	elektrocheminis protonų gradientas
$\Delta\mu_{Na^+}$	elektrocheminis $Na^+$ gradientas
$\Delta pH$	$H^+$ koncentracijos gradientas
2,4-DNF	2,4-dinitrofenolis
A	Aroclor 1248, komercinis polichlorintų bifenilų mišinys
ABC nešiklis	ATP surišančios kasetės nešiklis (angl. k. ATP-binding cassette transporter)
Acil-APB	acilgrupę pernešantis baltymas
ANOVA	dispersinė analizė (angl.k. analysis of variance)
CA	koncentracijos adityvumas (angl.k. concentration addition)
CCCP	karbonilcianido <i>m</i> -chlorofenilhidrazonas
DCDHF-DA	2',7'-dichlorodihydrofluoresceino diacetatas
DCF	2',7'-dichlorofluoresceinas
Dek	<i>n</i> -dekanalis
DTT	2,4-ditiotreitolis
EK <sub>50</sub>	efektyvi koncentracija, kuri sukelia 50% tiriamos funkcijos pakitimą
<i>F</i>	Fišerio (Fisher) dispersijų homogeniškumo
kriterijus	
FMN	flavino mononukleotidas (oksiduota forma)
FMNH <sub>2</sub>	flavino mononukleotidas (redukuota forma)
FRAP	geležį (III) redukuojanti plazmos geba, kaip antioksidantinė galia (angl. k. ferric reducing ability of plasma as "antioxidant power")
IA	nepriklausomas veikimas (angl. k. independent action)
KC-400	Kanechlor-400, polichlorintų bifenilų mišinys
KCN	kalio cianidas
K <sub>m</sub>	Michaelis-Menten konstanta
LK <sub>50</sub>	letalų koncentracija, kuri sukelia 50% testuojamų gyvūnų žūtį
Log <i>K</i> <sub>ow</sub>	medžiagos pasiskirstymo tarp oktanolio ir vandens fazių koeficiento logaritmas
LRR	laisvosios riebalų rūgštys
MATE	daugybinių vaistų ir toksinių medžiagų išmetimo nešiklių šeima (angl. k. multidrug and toxic compound extrusion)
NAD(P) <sup>+</sup>	nikotinamido adenino dinukleotidas (fosfatas) (oksiduota forma)
NAD(P)H	nikotinamido adenino dinukleotido (fosfatas) (redukuota forma)

NEM	N-etilmaleimidas
OR	oleino rūgštis
ORAC	deguonies radikalų sugerties geba (angl. k. Oxygen radical absorbance capacity)
OT <sub>590nm</sub>	optinis tankis, esant 590 nm bangos ilgiui
pK <sub>α</sub>	rūgštis disociacijos konstanta
P	statistinės imties stebėtas reikšmingumo lygmuo
PCB	polichlorinti bifenilai
P <sub>n</sub>	neorganinis fosfatas
QSAR	kiekybinis struktūros-aktyvumo santykis (angl. k. quantitative structure-activity relationship)
R <sup>2</sup>	determinacijos koeficientas
REACH	cheminių medžiagų registracija, įvertinimas, autorizacija ir apribojimai (angl. k. registration, evaluation, authorisation and restriction of chemical substances)
ROS	aktyviosios deguonies formos (angl. k. reactive oxygen species)
RTX toksinų šeima	viena iš gram-neigiamų bakterijų gaminamų egzotoksinų grupių (angl. k. repeats in toxin)
S <sub>8</sub> <sup>0</sup>	rombinė siera turinti aštuonis elementinės sieros atomus
TCB	tetrachlorobifenilas
ToIC	įvairių daugybinio atsparumo vaistams baltymų šeimų daugiakomponenčių sistemų kanalų baltymas
TPP <sup>+</sup>	tetrafenilfosfonio jonai
TPTZ	2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazinas
v/v	tūrio procentai
VCE	VceCAB, daugybinio atsparumo vaistams pompa atsakinga už <i>V. cholerae</i> atsparumą CCCP
V <sub>max</sub>	maksimalus reakcijos greitis

### Sutartinės sąvokos

Bioluminescencija *in vivo* – *V. fischeri* ląstelių bioluminescencija

Bioluminescencija *in vitro* – beląstelinio ekstrakto bioluminescencija, pridėjus NADH-FMN oksidoreduktazės ir liuciferazės fermentų substratų.

## ĮVADAS

Standartinis *Vibrio fischeri* bioluminescencijos gesimo bandymas, Microtox<sup>®</sup> (EN ISO 11348-3:1998) yra naudojamas vertinant cheminių medžiagų ir jų binarinių mišinių ekotoksiškumą. Daugiau nei du dešimtmečius *V. fischeri* bioluminescencijos slopinimo bandymas, kaip pavienis arba kartu su kitais tyrimais, naudojamas kaip vienas iš ankstyvojo perspėjimo sistemų (angl. k. Early Warning Systems) metodų. Šių metodų pagalba įvertinamas atskirų cheminių medžiagų toksiškumas bei atliekamas aplinkos (geriamojo vandens, nuotekų, sedimentų ir kt.) užterštumo monitoringas, t.y. ilgalaikiai pastovūs tyrimai (US EPA, 2005). Europos Komisija (EK) yra pripažinusi cheminių medžiagų mišinių toksiškumo ir jų rizikos aplinkai vertinimo svarbą. EK ataskaitoje (Kortenkamp et al., 2009) pabrėžiamas poreikis analizuoti tuos cheminių medžiagų mišinius, kurie pramoninių gamybos procesų metu patenka į aplinką arba randami toje pačioje aplinkoje. Pastarąjį dešimtmetį *V. fischeri* bioluminescencijos gesimo testas buvo panaudotas sunkiųjų metalų jonų (Mowat ir Bundy, 2002) ar organinių junginių mišinių toksiškumo tyrimams (Altenburger et al., 2000; Backhaus et al., 2000; Fernández-Alba et al., 2002; Christensen et al., 2006; Cedergreen et al., 2008). Tačiau mišinių, kurių komponentai yra skirtingos prigimties (pvz., organiniai ir neorganiniai junginiai), tyrimai naudojant *V. fischeri* buvo reti (McCarty ir Borgert, 2006; Wang et al. 2009a). Be to, visai mažai dėmesio buvo skiriama pramoninės ir gamtinės kilmės cheminių medžiagų mišinių toksiškumui. Mūsų žiniomis per pastaruosius 10 metų publikuotas tik vienas darbas apie sunkiųjų metalų ir humininių rūgščių mišinių toksiškumą *V. fischeri* bakterijoms (Tsiridis et al., 2006). Iki šiol atliktas tik vienas darbas, kuriuo įvertintas humininių rūgščių ir 1,4-hidrochinonų (fenolių) mišinių toksiškumas naudojant *Photobacterium phosphoreum* bioluminescencijos fermentų sistemą *in vitro* (Tarasova et al., 2008). Todėl mūsų darbe mišinių toksiškumo analizei, naudojant *V. fischeri* bioluminescencijos gesimo testą, pasirinkti trys skirtingos kilmės cheminiai junginiai: pramoninės kilmės Aroclor 1248 bei gamtinės kilmės – oleino

rūgštis ir elementinė oktaedrinė siera. Šių junginių paplitimas toje pačioje aplinkoje, hidrofobiškumas, patvarumas gamtinėje aplinkoje ir sąlyginis pajėgumas bioakumuliuotis buvo pagrindinės priežastys lėmusios šių junginių pasirinkimą mišinių toksiškumo analizei.

Pirmasis pasirinktas junginys, komercinis polichlorintų bifenių (PCB) mišinys, Aroclor 1248, pasižymi dielektrinėmis savybėmis ir kaip kiti PCB buvo gaminamas 1929–1977 m. laikotarpiu. Bendras visų PCB kiekis, patekęs į rinką viršija 1 mln. tonų (Frame et al., 1996). Jie bioakumuliuojasi ir, dėl didelio atsparumo biologiniam skaidymui bei hidrolizei, fotolizei, ilgai išlieka vandens ekosistemose (Frame et al., 1996; Henry ir DeVito, 2003). Kadangi aplinkos mėginiuose ar komerciniuose preparatuose yra randami skirtingi PCB analogų mišiniai, todėl nustatomos skirtingų PCB mišinių (Aroclor 1242, 1260, bendrų PCB) efektyvios koncentracijos ( $EK_{50}$ ) bioluminescuojančioms bakterijoms (*P. phosphoreum*, *V. fischeri*) skiriasi mažiausiai 10 kartų (Chu et al., 1997; Salizzato et al., 1998a; Salizzato et al., 1998b). Tačiau duomenų apie Aroclor 1248 toksiškumą *V. fischeri* bakterijoms nėra.

Antras pasirinktas junginys, oleino rūgštis yra viena labiausiai paplitusių laisvųjų riebalų rūgščių vandens aplinkoje, ypatingai dugno nuosėdose ir vandens paviršinio sluoksnio plėvelėje (Patty, 1963, Odham et al., 1978; Sodergren A. 1987; Сиренко ir Козицкая, 1988). Be to, pati oleino rūgštis ir oleatai yra hidrofobiškos ir toksiškos *V. fischeri* bakterijoms bei eukariotiniams vandens organizmams (Četkauskaitė, 2004; Četkauskaitė ir Bražėnaitė, 2004; REACH, 2006). Nustatyta, kad laisvosios oleino rūgšties kiekiai, randami upės, tekančios per pušyną, dugno nuosėdose ir kranto dirvožemyje, slopina *V. fischeri* bakterijų bioluminescenciją (Četkauskaitė, 2004). Pagrindiniai laisvosios oleino rūgšties ir kitų laisvųjų riebalų rūgščių patekimo į vandens ekosistemas keliai yra pramoniniai procesai (pvz., popieriaus gamyba iš medienos) (Morales et al., 1992) bei biomasės (pvz., mikrodumblių) įrimo produktų (riebalų, fosfolipidų) mikrobiologinis



skaidymas (Odham et al., 1978; Sodergren, 1987; Сиренко ir Козицкая, 1988).

Trečias pasirinktas junginys yra hidrofobinė  $S_8^0$  – ciklinė elementinės sieros S forma, kuri yra randama vandens aplinkoje (sedimentuose, jų porų vandenyje) ir mažomis koncentracijomis ( $\mu\text{g/L}$ ) sedimentų organiniuose ekstraktuose stipriai slopina *V. fischeri* bakterijų bioluminescenciją (Svenson et al., 1998). Geologiniai bei mikroorganizmų tyrimai rodo, kad vandens aplinkoje pagrindinė elementinės sieros forma yra oktaedrinė  $S_8^0$  (Beffa et al., 1993; Gagnon et al., 1996). Kadangi minėti skirtingos kilmės hidrofobiniai taršalai randami tose pačiose vandens ekosistemų vietose, jų mišinių toksiškumo *V. fischeri* bakterijoms analizė yra aktuali cheminių medžiagų rizikos aplinkai vertinimo požiūriu.

Vyrauja nuomonė, kad hidrofobinių (nepolinių ar silpnai polinių) organinių junginių toksiškumas vandens organizmams subletalomis (artimomis  $LK_{50}$  ar  $EK_{50}$ ) koncentracijomis pasireiškia narkotiniu veikimu, t.y. dėl savo hidrofoboškumo jie veikia biologinių membranų struktūrą ir jų fermentus (Hermens et al., 1985, Vaes et al., 1998). Šie junginiai stipriai slopina *V. fischeri* bakterijų bioluminescenciją jau po 5–15 min. (Hermens et al., 1985; Kaiser ir Palabrica, 1991), bet po ilgesnio inkubacijos laiko (45 min.) bioluminescencija visiškai atsistato (Dawson et al., 2006). Toks bioluminescencijos atsistatymas nėra būdingas skyriklinio aktyvumo bei reaktyviųjų elektrofilinių junginių (negrižtamai modifikuojančių fermentus) veikimui, t.y. jie pasižymi ilgalaikiu bioluminescencijos slopinimu (Dawson et al., 2006). Todėl, siekiant išaiškinti trijų hidrofobinių toksinių junginių veikimo tendencijas bioluminescencijos *in vivo* sistemoje, standartiniame teste pasiūlytas poveikio laikas (30 min.) buvo prailgintas iki 60 min.

Nors individualių cheminių junginių ir jų mišinių poveikio *V. fischeri* bakterijų švytėjimui duomenys gausūs, tačiau medžiagų veikimo būdų/mechanizmų aiškinimą retai remia papildomi eksperimentiniai tyrimai. Per pastaruosius dešimt metų skirtingos mokslininkų grupės detaliau analizavo tik chinonų ir fenolių veikimo mechanizmus švytinčiose bakterijose

(Ismailov et al., 2000; Kudryasheva et al., 2002; Vetrova et al., 2007; Wang et al., 2009b). Šiems veikimo mechanizmomis interpretuoti šalia tradicinės *in vivo* sistemos buvo naudojami įvairūs biožymenys, tokie kaip deguonies sunaudojimas *in vivo*; ROS gamyba; aerobinis ir anaerobinis ląstelių augimas; antioksidantinių fermentų (superoksidazės ir katalazės) indukcija; bioluminescencijos fermentų komplekso ir išgrynintos liuciferazės aktyvumas; ir NADH oksidacija (Ismailov et al., 2000; Kudryasheva et al., 2002; Vetrova et al., 2007; Wang et al., 2009b). Pažymėtina, kad šiuose negausiuose darbuose toksiškumo vertinimui buvo pasirinkta tik tam tikra, nedidelė biožymenų grupė. Todėl šiame darbe cheminių medžiagų veikimo mechanizmai buvo analizuojami, vertinant jų poveikį tiek ląstelėms (*in vivo*), tiek fermentų (*in vitro*) sistemoms.

### **Darbo tikslas**

Įvertinti pramoninio ksenobiotiko Aroclor 1248, gamtinių medžiagų – oleino rūgšties bei elementinės oktaedrinės sieros ir jų binarinių mišinių poveikį *Vibrio fischeri* bioluminescencijai bei šių medžiagų biocheminius veikimo mechanizmus.

### **Pagrindiniai tyrimų uždaviniai**

1. Nustatyti Aroclor 1248, oleino rūgšties ir sieros bei jų binarinių mišinių toksikodinaminius efektus *V. fischeri* bioluminescencijai *in vivo* ir *in vitro*.
2. Įvertinti Aroclor 1248, oleino rūgšties ir sieros poveikį *V. fischeri* redukcinei gebai ir aktyviųjų deguonies formų (ROS) susidarymui.
3. Įvertinti Aroclor 1248, oleino rūgšties ir sieros poveikį *V. fischeri* kvėpavimui ir membranos potencialui.
4. Nustatyti Aroclor 1248, oleino rūgšties ir sieros efektus *V. fischeri* NADH:FMN oksidoreduktazės-liuciferazės komplekso atskiroms funkcijoms:

- a) deguonies sunaudojimui *in vivo* (užslopinus kvėpavimo grandinę su KCN);
- b) bioluminescencijos atstatymui *n*-dekanaliu *in vivo*;
- c) NADH oksidacijai *in vitro*.

### **Darbo naujumas**

Taikant daugialypės regresijos modelį, pirmą kartą nustatyti pramoninio taršalo (Aroclor 1248) ir gamtinių toksinių medžiagų (oleino rūgšties ir sieros) binarinių mišinių toksikodinaminiai efektai *V. fischeri* bioluminescencijai *in vivo* ir *in vitro*. Parodyta, kad Aroclor 1248, oleino rūgštis ir siera skirtingai slopina bioluminescenciją *in vivo* ir *in vitro*: ilgėjant poveikio trukmei *in vivo* sistemoje stebimas bioluminescencijos atsistatymas, tuo tarpu *in vitro* – ne. Šie eksperimentų rezultatai ir duomenų bazėse pateikti duomenys apie žinomus *Vibrio* spp. (ir *V. fischeri*) baltymus bei genus liudija, kad *V. fischeri* ląstelės turi apsaugines (ksenobiotikų biotransformacijos, išmetimo) sistemas, galinčias atstatyti nuslopintas funkcijas. Nustatyta, kad *V. fischeri* turi antioksidantinę gebą *in vivo*, kuri gali būti indukuojama siera. Be to, gauti rezultatai, kad siera mažina *V. fischeri* ląstelėse gaminamų aktyviųjų deguonies formų kiekį. Aroclor 1248 sukelia daugybinius efektus *V. fischeri* ląstelėse: silpnai slopina bioluminescenciją, skatina deguonies sunaudojimą, indukuoja aktyviųjų deguonies formų susidarymą, ir mažina membranos potencialą *in vivo*. Nustatyta, kad oleino rūgštis, šalia kitų daugybinių efektų, skatina aktyviųjų deguonies formų gamybą *V. fischeri* ląstelėse. Be to, tos pačios Aroclor 1248 koncentracijos slopina NADH oksidaciją ir bioluminescenciją *in vitro*, tačiau oleino rūgšties ir sieros poveikis NADH oksidacijai nėra toks stiprus.

### **Darbo mokslinė vertė**

Darbe gauti rezultatai papildo žinias apie ekotoksikologijos srityje retai analizuojamų pramoninio (Aroclor 1248) ir gamtinių (oleino rūgšties ir sieros) taršalų veikimo pobūdį biologinėse membranose. Šio tyrimo metu nustatytas pramoninio taršalo toksiškumo išdidinimas gamtiniais junginiais mišiniuose,

rodytų, kad reikalingas tokio tipo mišinių ir jų komponentų rizikos vertinimas ir reguliacinė kontrolė aplinkos ekosistemose bent jau per valstybinių ir tarptautinių programų valdymo struktūras, pvz., REACH.

### **Ginamieji disertacijos teiginiai**

1. Individualių taršalų (A, OR ir  $S_8^0$ ) ir jų binarinių mišinių slopinamasis poveikis bioluminescencijai mažėja, ilgėjant poveikio laikui (30, 60 min.) *in vivo*, bet ne *in vitro* sistemoje.
2. Aroclor 1248 ir oleino rūgštis, bet ne siera skatina ROS susidarymą *V. fischeri* ląstelėse. Siera (daugiau nei A ir OR) didina *V. fischeri* ląstelių redukcinę gebą.
3. Oleino rūgšties ir sieros pagrindinė poveikio vieta bioluminescencijos komplekse yra liuciferazės aktyvusis centras.
4. Aroclor 1248 pagrindinė poveikio vieta bioluminescencijos komplekse yra NADH:FMN oksidoreduktazė.

### **Darbo apimtis ir struktūra**

Disertaciją sudaro: Įvadas, Literatūros apžvalga, Medžiagos ir metodai, Rezultatai ir jų aptarimas, Išvados, Literatūros sąrašas (247 šaltiniai), Mokslinių darbų sąrašas (2 straipsniai). Disertacijos apimtis – 131 puslapis, 14 lentelių ir 21 paveikslas. Disertacija parašyta lietuvių kalba.

## 1. LITERATŪROS APŽVALGA

### 1.1. Aroclor 1248/PCB kaip globalus pramoninis taršalas gamtoje

Polichlorinti bifenilai (PCB) tai labai hidrofobiškų ( $\log K_{ow} = 5-8,2$ ), gerai riebaluose tirpstančių, sunkiai skylančių gamtinėje aplinkoje, susikaupiančių mitybinėje grandinėje bei toksinių junginių grupė. Nuo 1929 m. PCB ir jų mišiniai pradėti gaminti visame pasaulyje, ir apytiksliai paskaičiuota, kad pasauliniu mastu (iki apytiksliai 1980 m.) jų pagaminta nuo 900000 iki 1200000 tonų (Johnson et al., 2006).

#### 1.1.1. Aroclor 1248/PCB fizikinės-cheminės savybės

AROCLOR 1248/PCB 1248 yra PCB mišinys (CAS RN: 12672-29-6), pasižymintis dideliu hidrofobiškumu ( $\log K_{ow} = 6,2$ ) (ChemIDPlus: <http://chem.sis.nlm.nih.gov>). Polichlorinto bifenilo (dviejų benzeno žiedų) molekulėje iki 10 vandenilio atomų gali būti pakeisti chloro atomais. Pagal chloro atomų skaičių ir padėtį bifenilo molekulėje PCB grupei priskiriami 209 atskiri junginiai, kurių bendra formulė  $C_{12}H_{10-x}Cl_x$ . Pagal chloro atomų padėtį molekulėje išskiriamos dvi pagrindinės PCB grupės: planariniai (t.y. plokščios struktūros) PCB, kurie turi vieną arba du chloro atomus orto (2,6' arba 2'6) padėtyse ir neplanariniai (t.y. neplokščios struktūros), kurie turi du chloro atomus 2,2' arba 6,6' orto padėtyse. Aroclor 1248 yra komercinis PCB mišinio preparatas (gamintojas – Monsanto kompanija, JAV). Aroclor 1248 pavadinimo pirmieji skaičiai žymi bifenilo molekulę, turinčią 12 anglies atomų (t.y. du fenilo žiedus), kiti du skaičiai žymi, kad PCB mišinio sudėtyje yra 48% chloro atomų pagal svorį. Aroclor 1248 mišinį sudaro 60,3% tetrachlorobifenilų, 20,9% trichlorobifenilų, 18,1% pentachlorobifenilų, o mono-, di-, hekso, hepta-chlorobifenilai neviršija 1% (Frame et al., 1996). Paskaičiavome, kad Aroclor 1248 mišinyje yra mažiausiai 42% neplanarinių PCB (pagal Frame et al., 1996). Palyginus įvairių pasaulio kompanijų gaminamų PCB mišinių sudėtį nustatyta, kad Aroclor 1248 (Monsanto, JAV)

yra panašios sudėties kaip Clophen A40 ("Bayer", Vokietija), Phenochlor DP 4 (Caffaro, Italija), Kanechlor-400 (Kanegafuchi, Japonija), Nr3 (Delor Chemco, Čekoslovakija) komerciniai mišiniai (Johnson et al., 2006).

### **1.1.2. Aroclor 1248/PCB šaltiniai, paplitimas ir apykaita gamtoje**

Aroclor 1248 praeityje buvo plačiai naudojamas pramonėje (1929–1977 m.) kaip šilumą pernešantis skystis lubrikantuose, hidrauliniuose skysčiuose, pvz., vakumo pompose; kaip plastifikatorius gumos gamyboje; ir kaip rišamoji medžiaga (Johnson et al., 2006). Aroclor'ai 1260, 1254 ir 1242 dažniausiai buvo naudojami kaip dielektriniai skysčiai gaminant elektros įrenginius (pvz., dielektriniais skyčiais užpildytus transformatorius). Vien Monsanto kompanija (JAV) iki 1977 m. (kai gamyba buvo uždrausta Toksinių medžiagų kontrolės įstatymu) yra pagaminusi PCB nuo 499000 iki 635000 tonų (Johnson et al., 2006; Holoubek, 2001). Tūkstančiai tonų tokių PCB mišinių plačiam pramoniniam naudojimui buvo gaminama buvusiose komunistinio bloko šalyse tokiose kaip Rusija, Rytų Vokietija, Rumunija, tačiau gamybos apimtys nėra žinomos. Pavyzdžiui, Balkanų karo metu (1990-1997 m.) per serbų išpuolius tik Dubrovniko srityje (Kroatija; 1992 rudenį) transformatorių dielektrinių skysčių pavidalu į gamtinę aplinką išpilta iki 12 tonų Rumunijoje pagamintų PCB mišinių (kartu tri- ir tetrachlorobenzenų) (Richardson, 1995). Dėl ilgalaikio elektros įrenginių (pvz., dielektriniais skysčiais užpildytų transformatorių), savo sudėtyje turinčių PCB, naudojimo, avarinių, gamybos ir įrenginių remonto darbų metu PCB patekimo į aplinką, PCB patvarumo ir išsilaikymo aplinkoje bei atmosferinės pernašos žymios PCB koncentracijos iki šiol randamos gamtoje. Yra paskaičiuota, kad 99% globaliai aplinkoje esančių PCB yra susikcentravę dirvožemyje ir dugno nuosėdose. Tai sąlygoja didelis PCB hidrofobiškumas ir palyginti mažas garų slėgis ( $4,9 \times 10^{-4}$  mmHg, t.y. dviems šimtais kartų mažesnis už naftaleno). Nors toksikologinių ir cheminių tyrimų rezultatai rodo, kad tik maža dalis globaliai pasklidusių PCB yra garų fazėje, tačiau ši dalis yra pakankama, kad PCB būtų laikomi globaliais atmosferiniais taršalais (Johnson et al., 2006). PCB poveikio tyrimų metu

nustatyta, kad išsipylimo vietose, užterštose PCB teritorijose įkvėpimas yra pagrindinis PCB patekimo į žmogaus ir gyvūnų organizmą būdas (DeCaprio et al., 2005). Dėl hidrofobinių savybių PCB vandens telkiniuose susikaupia ne tik dugno nuosėdose, bet ir vandens paviršinio sluoksnio plėvelėje, ir šilto klimato zonose, kylant temperatūrai, išgaruoja nuo vandens paviršiaus. Ilgalaikė atmosferinė PCB pernaša yra pagrindinė globalaus PCB pasklidimo priežastis. Nustatyta, kad PCB kondensuojasi šalto klimato zonose bei ypatingai kalnų viršukalnių bei ašigalių ledynų paviršiuje. Be PCB patekimo su įkvepiamu oru, žymūs šių hidrofobinių medžiagų kiekiai į žmogaus ir gyvūnų organizmą patenka su maistu, kuriame PCB susikaupia iš aplinkos per mitybos grandines (Johnson et al., 2006).

Dėl atsparumo biodegradacijai, savybės kauptis biologinėse membranose, riebaliniame audinyje bei didelio toksiškumo PCB gamyba pasaulyje pradėta drausti nuo XX amžiaus aštuntojo dešimtmečio pabaigos. Nustatyta, kad didžioji PCB ir jų turinčios įrangos dalis, šiuo metu esanti Lietuvoje, yra pagaminta buvusioje Sovietų Sąjungoje. PCB gamyba ir jų turinčios įrangos naudojimas buvusioje Sovietų Sąjungoje uždrausti 1989 m. (Lietuvos respublikos aplinkos ministerija, 2003). Nors PCB ir PCB turinčios įrangos gamyba ir naudojimas uždrausti, šie junginiai iki šiol randami gamtoje. Žinoma, kad Baltijos jūros sedimentuose PCB (PCB 52, 101, 105, 118, 126, 138, 153, 180) koncentracija šiaurinėje dalyje siekia 213 µg/kg, o pietinėje – 382 µg/kg organinės anglies (Jonsson, 2000). Pagal sedimentų kokybės rekomendacijas (SQG – angl. k. Sediment Quality Guidelines) išskiriami trys sedimentų taršos PCB lygmenys: slenkstinių efektų lygmuo (TEL – angl. k. threshold effects level), kai visų PCB bendra koncentracija yra 22 arba 34 µg/kg sauso sedimentų svorio (s. sv.); vidutinių efektų intervalas (ERM – angl. k. effects range median) – visų PCB bendra koncentracija yra 180 µg/kg s. sv.; ir sunkių efektų lygmuo (SEL – angl. k. severe effects level) – visų PCB koncentracija yra 5300 µg/kg s. sv. (MacDonald et al., 2000). Taigi, Baltijos sedimentuose randamų PCB koncentracijos atitinka vidutinių efektų (ERM)

intervalą, o miestams artimų telkinių dugno nuosėdose PCB kartais randama sunkių efektų koncentracijų lygmenyje (Eisler ir Belisle, 1996).

### **1.1.3. Aroclor 1248/PCB patvarumas, bioakumuliacija ir biomagnifikacija**

Polichlorinti bifenilai yra priskiriami patvarių, bioakumuliuojamų ir toksinių (PBT – angl. k. persistent, bioaccumulating and toxic) ar net labai patvarių ir labai toksinių (vPBT – angl. k. very persistent, bioaccumulating and toxic) organinių taršalų kategorijai (Robertson ir Hansen, 2001; REACH, 2006). Komerciniai PCB mišiniai, tokie kaip Aroclor, yra atsparūs cheminiam ir biologiniam skaidymui ar dechloravimui vandens aplinkoje. Ši savybė priklauso nuo chloro atomų skaičiaus procentinės sudėties mišinyje: Aroclor 1248 yra mažiau atsparus nei didesnę chloro atomų skaičiaus procentą turintis Aroclor 1260. PCB mišinių redukcinis dechloravimas (daugiausiai anaerobinių) mikroorganizmų pagalba priklauso nuo chloro atomų padėties bei skaičiaus molekulėje. Pavyzdžiui, anaerobiniuose sedimentuose lengviau dehalogeninami mažesnę chloro atomų skaičių turintys PCB, labai sunkiai arba visiškai nešalinami orto padėtyse esantys chloro atomai, truputį lengviau šalinami meta- ir para- padėtyse esantys chloro atomai (Wu et al., 1998).

PCB, kaip labai hidrofobiški cheminiai junginiai, kurių  $\log K_{ow} > 4$ , pasižymi bioakumuliacija ir biomagnifikacija (biologiniu išdidinimu). PCB, patekę tiesiogiai iš vandens arba su maistu, kaupiasi vandens organizmuose (t.y. bioakumuliuojami). Cheminio junginio susikaupimo organizmo audiniuose iš vandens aplinkos laipsnį aprašo biokoncentracijos faktoriaus dydis. Paskaičiuota, kad fitoplanktonas Osakos įlankoje iš vandens sukaupia nuo šimtų iki kelių tūkstančių kartų didesnes PCB koncentracijas (biokoncentracijos faktorius  $2 \times 10^2 - 2 \times 10^3$ ), o zooplanktonas iš vandens sukaupia dešimtimis tūkstančių kartų didesnes PCB koncentracijas (biokoncentracijos faktorius  $0,5 \times 10^5$ ), nei jos randamos vandenyje (Yasushi Hiraizumi et al., 1979). Nustatyta, kad PCB koncentracija organizmų audiniuose padidėja 10–100 kartų, PCB patekus iš vieno mitybos lygmens į kitą (t.y. vyksta biologinis išdidinimas) (Eisler ir Belisle, 1996).



#### 1.1.4. Aroclor 1248/PCB ekotoksiškumas (ūminiai efektai)

PCB toksiškumo duomenys švytinčioms bakterijoms ir vėžiagyviams bei žuvims pateikti 1.1 lentelėje. Kadangi lauko tyrimų mėginiuose, ar komerciniuose preparatuose yra randami skirtingų PCB analogų mišiniai, tai tyrimų duomenys apie PCB toksiškumo stiprumą bioluminescuojančioms bakterijoms (*Photobacterium phosphoreum*, *V. fischeri*) yra priešaringi. Skirtingų Aroclor (1242, 1260) efektyvios koncentracijos (EK<sub>50</sub>) skiriasi apie 10 kartų (Chu et al., 1997), o skirtingų autorių bendro PCB kiekio sedimentų ekstraktuose nustatytos EK<sub>50</sub> taip pat skiriasi apie 10 kartų (Chu et al., 1997; Salizzato et al., 1998a; Salizzato et al., 1998b). Tuo tarpu duomenų apie Aroclor 1248 toksiškumą *V. fischeri* bakterijoms nėra.

1.1 lentelė. Polichlorintų bifenilų ekotoksiškumo duomenys

Rūšis/testas	Poveikio trukmė	Cheminė medžiaga	Efektas	Koncentracija	Literatūra
<i>Vibrio fischeri</i>	15 min.	Bendras PCB*	EK <sub>50</sub>	1,4 mg/L sedimentų ekstraktams	Salizzato et al., 1998a; Salizzato et al., 1998b
<i>Photobacterium phosphoreum</i>	15 min.	AROCLOR 1242	EK <sub>50</sub>	140 µg/L	Chu et al., 1997
		AROCLOR 1254	EK <sub>50</sub>	18 µg/L	Chu et al., 1997
		Bendras PCB	EK <sub>50</sub>	120 µg/L	Chu et al., 1997
		PCB5	EK <sub>50</sub>	2 µg/L	Chu et al., 1997
<i>Daphnia magna Strauss</i>	14 d.	AROCLOR 1248	LK <sub>50</sub>	2,6 µg/L	US EPA, 1980
<i>Penaeus duorarum</i>	48 val.	AROCLOR 1248	LK <sub>50</sub>	32 µg/L	Johnson ir Finley, 1980
<i>Salmo clarki</i>	96 val.	AROCLOR 1248	LK <sub>50</sub>	5,75 µg/L	Johnson ir Finley, 1980
<i>Lepomis macrochirus</i>	96 val.	AROCLOR 1248	LK <sub>50</sub>	690 µg/L	Johnson ir Finley, 1980

Santrumpos: EK – efektyvi koncentracija; LK – letali koncentracija; \*bendras PCB yra suminis gamtoje randamas PCB kiekis.

Aroclor 1248 toksiškumas vėžiagyviams (*Daphnia magna* ir *Penaeus duorarum*) ir laišinėms žuvims (rūšiai *Salmo clarki*) pasireiškia mažomis (nuo 2,6 iki 32 µg/L) koncentracijomis. Kadangi Aroclor 1248 yra biologiškai neskaidomas, sukelia ūminį toksiškumą (96 val., LK<sub>50</sub>) žuvims, esant

mažesnėmis nei 1 mg/L koncentracijomis bei jo  $\log K_{ow}$  yra didesnis už 3, pagal Europos Sąjungos komisijos rekomendaciją 93/21/EEC (Commission of the European Union, 1993), Aroclor 1248 klasifikuojamas kaip labai toksiškas vandens organizmams, galintis sukelti ilgalaikį toksinį poveikį vandens aplinkoje.

### **1.1.5. Aroclor 1248 poveikis biomembranoms, susijusioms fermentų sistemoms, ir biocheminiai mechanizmai**

Kelios mokslininkų grupės nustatė, kad tam tikri PCB arba jų mišiniai (kurie pagal chromatografijos rezultatus įeina į Aroclor 1248 sudėtį) (Johnson et al., 2006) sukelia daugybinius efektus mitochondrijoms (Nishihara, 1984; Mildažienė et al., 2002a, 2002b; Schlezinger et al., 2006; Aly ir Domenech, 2009). PCB mišinio KC-400 skyriklinis veikimo pobūdis žiurkių kepenų mitochondrijose buvo stebimas, esant sąlygiškai didelėms koncentracijoms (nuo 10 iki 40 mg/L), ir pasižymėjo šiais efektais: ketvirtos mitochondrijų būsenos su  $\alpha$ -ketoglutaratu/malatu kvėpavimo pagreitėjimu; viduląstelinio  $K^+$  išėjimu; endogeninio  $H^+$  išėjimu (nespecifiniu membranų pralaidumo didėjimu); išorinio NADH oksidacija; ir membranų potencialo mažėjimu (Nishihara, 1984, 1985). Tokiomis pačiomis ir didesnėmis koncentracijomis (40–80  $\mu$ M arba 11,6–46,2 mg/L) neplanariniai tetrachlorinti bifeniilai sukėlė panašius efektus: oksidacinio fosforilinimo atskyrimą,  $Ca^{2+}$ ,  $K^+$  išėjimą, ir membranų potencialo sumažėjimą žiurkių kepenų mitochondrijose (Nishihara et al., 1987). Tačiau, pastebėta, kad koplanariniai tetrachlorobifeniilai neveikia kaip oksidacinio fosforilinimo skyrikliai žiurkių kepenų mitochondrijose (Nishihara et al., 1987).

Naudojant fermentinių modulių kinetinę analizę nustatyta, kad neplanarinio 2,2',5,5'-tetrachlorinto bifeniolo (TCB, PCB 52, 20  $\mu$ M arba 5,8 mg/L) poveikis žiurkių kepenų mitochondrijų oksidaciniam fosforilinimui buvo daugybinis ir pasireiškė tokiais efektais: fosforilinimo ir kvėpavimo sistemų slopinimu, membranų pralaidumo jonams padidėjimu ir silpnu membranų potencialo padidėjimu (Naučienė et al., 2000; Mildažienė et al.,

2002a, 2002b). Be to, ta pati TCB koncentracija (5,8 mg/L) reikšmingai (20%) sumažino ATP sintazės slopiklio – oligomicino jungimosi vietų skaičių (Naučienė et al., 2000; Mildažienė et al., 2002b).

Nustatyta, kad didelė koplanarinio PCB (3,3',4,4',5-pentachlorobifenilas) dozė (25 mg/kg) sukėlė specifinius lipidų metabolizmo pasikeitimus žiurkių kepenyse per penkias dienas, t.y. 50% sumažino arachidoninės rūgšties (C<sub>20:4</sub>) ir padidino jos pirmtakų oleino (C<sub>18:1</sub>) ir linoleno (C<sub>18:2</sub>) rūgščių koncentraciją (Matsusue et al., 1997). Parodyta, kad neplanarinis 2,2',4,4',5,5'-heksachlorobifenilas ir Aroclor 1248 didelėmis koncentracijomis (30–100 μM) sukelia oleino rūgšties išėjimą iš viduląstelių fosfolipidų į laisvųjų riebalų rūgščių frakciją inkstų ląstelių kultūroje (Sanchez et al., 2000). Panašūs duomenys gauti su Aroclor 1254 (esant koncentracijoms nuo 10 iki 60 μM), kuris žiurkių kepenų mitochondrijose sukėlė šiuose efektus: slopino kvėpavimo grandinės I ir III kompleksus; skatino ROS gamybą; sukėlė antioksidantinių fermentų glutationo peroksidazės ir glutationo reduktazės išsekvojimą; slopino laisvųjų riebalų rūgščių β-oksidaciją; ir indukavo citochromo P-450 monooksigenazes CYP1A, CYP2B, ir kt. (Aly ir Domenech, 2009). Kiti autoriai nustatė, kad Aroclor 1254, priklausomai nuo poveikio dozės (1–25 nmol/mg baltymo), slopina įvairių cheminių medžiagų (atraktilozido, menadiono, *tert*-butilvandenilio peroksido, ir kt.) indukuojamos mitochondrinės pralaidumo poros susidarymą (Salvi ir Toninello, 2001). Galima pastebėti, kad endoplazminio tinklo NADPH citochromo P-450 oksidoreduktazės kelias (Schleizinger et al., 2006) yra 120–200 kartų jautresnis PCB nei elektronų pernašos sistema mitochondrijų kvėpavimo grandinėje (Naučienė et al., 2000; Mildažienė et al., 2002a, 2002b). Taigi, remiantis literatūros duomenimis apie įvairių PCB poveikį eukariotinių ląstelių membranoms bei su jomis susijusių fermentų sistemoms, galima išskirti šiuos pagrindinius PCB efektus: oksidacinio fosforilavimo atskyrimas, atskirų oksidoredukcinių fermentų aktyvumo slopinimas bei ROS susidarymo skatinimas. Vertinga pažymėti, kad šie efektai yra sukeliama didelių PCB

koncentracijų (6,5–65 mg/L), kurios yra artimos arba daug didesnės už PCB užterštose teritorijose gyvenančių vandens gyvūnų kepenyse nustatomas PCB koncentracijas (nuo kelių vienetų  $\mu\text{g}/\text{kg}$  iki 35 mg/kg), ir daug didesnės už eukariotų kraujyje randamas PCB koncentracijas (6  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) (Eisler ir Belisle, 1996). Be to, šios biologinių membranų fermentus veikiančios PCB koncentracijos (6,5–65 mg/L) žymiai viršija organizmų endokrininę sistemą ardančias PCB koncentracijas (0,01–0,1 mg/kg) (Eisler ir Belisle, 1996). Tenka pastebėti, kad specifinės indukcijos eukariotinėse sistemose (T-47D žmogaus krūties vėžio ląstelėse) slenkstinės PCB 126 koncentracijos, kurios indukuoja jautraus biožymens EROD (etoksi-rezorufino-O-deetilazės) aktyvumą yra 1  $\mu\text{M}$  (0,3 mg) (Matthews et al., 2007). Tuo tarpu, estrogenų atsako iNR indukcija upėtakio hepatocituose yra daug jautresnė, t.y. sukeliama 0,001 mM PCB 77 koncentracijomis (Mortensen ir Arukwe, 2007).

Mūsų žiniomis, visiškai nėra duomenų apie PCB poveikį *V. fischeri* membranoms ir susijusiems fermentams. Kadangi mūsų analizuojamas Aroclor 1248 savo sudėtyje turi mažiausiai 42% neplanarinių PCB, tikėtina, kad ir prokariotinėse *V. fischeri* ląstelėse, šie PCB (sedimentų ekstraktuose nustatomų koncentracijų ribose), kaip ir kiti neplanariniai PCB mitochondrijose, gali sukelti oksidacinio fosforilavimo atskyrimą, oksidoredukcinių fermentų slopinimą bei ROS susidarymo skatinimą.

## **1.2. Oleino rūgštis kaip gamtinė toksinė medžiaga**

Oleino rūgštis (OR) yra viena iš labiausiai gamtoje paplitusių laisvųjų riebalų rūgščių, susidaranti lipidų biologinio skaidymo metu, susikaupianti sedimentuose bei vandens telkinių paviršinio sluoksnio plėvelėje, ir pasižyminti toksiškumu vandens organizmams.

### **1.2.1. Oleino rūgšties fizikinės-cheminės savybės**

OR (CAS RN: 112-80-1) yra cis mono nesočioji  $\omega$ -9 riebalų rūgštis ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ ). Pagal paskaičiuotą OR disociacijos konstantą ( $\text{pK}_\alpha = 5,02$ ) (Riddick et al., 1986) 99% OR yra anijono pavidalu

neutralioje terpėje (pH 7,0), o reakcijos terpėje, turinčioje 340 mM Na<sup>+</sup> ir 50 mM K<sup>+</sup>, pH 7,0 (*V. fischeri* tyrimų sąlygos šiame darbe), papildomai yra šių jonų oleatų pavidalu. Tačiau, priklausomai, nuo terpės pH, gali keistis ir OR hidrofobiškumas. OR pasisikirstymo tarp oktanolio ir vandens fazių koeficiento logaritmas ( $\log K_{ow}$ ) yra lygus 7,73 (<http://www.syrres.com>), OR tirpumas vandenyje yra 3 mg/L (<http://www.molinspiration.com>); natrio oleato  $\log K_{ow} = 3,92$ , tirpumas vandenyje – 5,21 mg/L (REACH, 2006). Paskaičiuota, kad OR pasiskirstymo tarp dirvos/sedimentų organinės anglies ir vandens koeficientas yra  $K_{oc} = 38000$  (Swann et al, 1983), kuris nurodo, kad OR linkusi kauptis sedimentuose arba dirvožemyje. Paskaičiuotas OR molekulinis polinio paviršiaus plotas, lygus 37,3 Å ([www.molinspiration.com](http://www.molinspiration.com)) yra mažesnis už 60. Tai leidžia teigti, kad OR, taip pat kaip ir vaistai su panašiu polinio paviršiaus plotu, gali būti pernešama per biologines membranas pasyvios difuzijos būdu (Ertl, 2007).

### 1.2.2. Oleino rūgšties šaltiniai, paplitimas ir apykaita gamtoje

OR yra viena iš labiausiai gamtoje paplitusių laisvųjų riebalų rūgščių. Pavyzdžiui, laisvosios riebalų (oleino (C<sub>18:1</sub>) ir palmitoleino (C<sub>16:1</sub>)) rūgštys kartu su kitais gamtinės kilmės junginiais (augalų fenoliais) randamos medienos apdirbimo, popieriaus pramonės nuotekose (Sodergren, 1993; Wesen et al., 1992; Morales et al., 1992; Svenson et al. 1996b). Nustatyta, kad laisvoji nesočioji OR yra pušinių šeimos (*Pinaceae*) taksonominis žymuo (Wolff et al., 2001). Pastebėta, kad pušyno ekosistemos upės dugno nuosėdose bei kranto dirvožemyje randami OR kiekiai sukelia slopinantį poveikį *V. fischeri* bioluminescencijai (Četkauskaitė, 2004). OR su kitais hidrofobiniais taršalais randama miško upės vandenyje panaudojant pusiau pralaidžias membranas (t. y. polietileno maišelius pripildytus trioleinu), skirtas pramoninių junginių pasyviai ilgalaikiam (iki keturių savaičių) surinkimui (Sabaliūnas et al., 1999). Anksčiau gauti rezultatai parodė, kad laisvosios karboksi rūgštys gali būti randamos siera turtinguose ežerų sedimentuose (Barakat ir Rullkotter, 1994); nesočioji OR (C<sub>18:1</sub>) gali būti paversta sočiosiomis riebalų rūgštimis

upių deltu/ūlankų (estuarijų) sedimentuose (Rhead et al., 1971); laisvosios riebalų rūgštys išsiskiria iš nusėdusių į sedimentus gliceridų (riebalų), veikiamų mikroorganizmų lipolitiniais fermentais (Farrington ir Quinn, 1973); ir molio mineralai (montmorilonitas ir kaolinitas) lėtina žaliųjų dumblių organinės medžiagos įrimą iki riebalų rūgščių ( $C_{14:0}$ ,  $C_{16:0}$ ,  $C_{16:1}$ ,  $C_{18:1}$ , ir  $C_{20:5}$ ) tiek deguoninėmis, tiek bedeguoninėmis sąlygomis (Lu et al., 2010).

Remiantis OR  $pK_{\alpha}$  ( $pK_{\alpha} = 5,02$ ) (Riddick et al., 1986), artimoje neutraliai aplinkoje (pH 5,0 – 9,0) didžioji OR dalis yra anijono pavidalu pačiame vandenyje. Būdamą vandens-oro sąveikos paviršiuje, OR gali reaguoti su ozonu (jos išlikimo pusperiodis 45 min.) (King et al., 2009), tačiau garavimas nuo vandens paviršiaus nėra svarbus OR apykaitos procesas (Doucette, 2000). Vandens telkiniuose OR daugiausiai koncentruojasi sedimentuose bei vandens telkinių paviršiaus mikroplovėlyje (Patty, 1963, Odham et al., 1978; Sodergren A. 1987; Сиренко ir Козицкая, 1988). Galimas biologinis OR skaidymas sedimentuose gali būti sumažintas dėl igerties sedimentuose, dėl OR polinkio pasiskirstymo tarp dirvos organinės anglies ir vandens koeficientas yra  $K_{oc} = 38000$  (Swann et al., 1983).

Laisvoji OR pušyno upės sedimentuose randama 1,6–1,8 mg/kg sedimentų sauso svorio koncentracijomis (Četkauskaitė, 2004). Popieriaus pramonės rajonų vandens telkinių sedimentuose OR koncentracija – 4,3 mg/kg sedimentų sauso svorio (Morales et al., 1992).

### **1.2.3. Oleino rūgšties ekotoksiškumas (ūminiai efektai)**

Oleino rūgšties toksiškumo duomenys vandens organizmų rūšims pateikti 1.2 lentelėje. Verta pastebėti, kad *V. fischeri* labai jautri OR, esant mažoms (kelių dešimčių ar šimtų  $\mu\text{g/L}$ ) koncentracijoms (Svenson et al., 1996b; Sabaliūnas et al., 1999; Četkauskaitė ir Beržinskienė, 2000). Tačiau dumbliai, vėžiagyviai ir žuvis yra mažiau jautrios OR. Kadangi oleino rūgšties bei jos druskų efektyvios koncentracijos ( $EK_{50}$ ), sukeliančios ūminius efektus dumbliams (72 val.) bei dafnijoms (48 val), yra mažesnės nei 1 mg/L, OR gali

būti klasifikuojama kaip labai toksiška vandens organizmams (Commission of the European Union, 1993).

**1.2 lentelė.** Oleino rūgštis ir jos druskų ekotoksiškumo duomenys

Rūšis/testas	Poveikio trukmė	Cheminė medžiaga	Efektas	Koncentracija	Literatūra
<i>V. fischeri</i>	15 min.	Oleino rūgštis	EK <sub>50</sub>	37 µg/L	Četkauskaitė ir Bražėnaitė, 2004
	30 min.	Oleino rūgštis	EK <sub>50</sub>	110 µg/L	Četkauskaitė ir Bražėnaitė, 2004
<i>Selenastrum capricornutum</i>	72 val.	Oleino rūgštis	IK <sub>50</sub>	470 µg/L	Kamaya et al., 2003
<i>Selenastrum capricornutum</i>	96 val.	Oleino rūgštis	IK <sub>50</sub>	580 µg/L	Kamaya et al., 2003
<i>Chlorella vulgaris</i> Beij, <i>Monoraphidium contortum</i>	24 val.	Oleino rūgštis	EK <sub>50</sub>	12 mg/L	Wu et al., 2006
<i>Daphnia magna</i>	48 val.	Kalio oleatas	EK <sub>50</sub>	570 µg/L	Pesticide Ecotoxicology Database, 2000
<i>Daphnia magna</i>	96 val.	Kalio oleatas	LK <sub>50</sub>	23 mg/L	Pesticide Ecotoxicology Database, 2000
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	96 val.	Kalio oleatas	LK <sub>50</sub>	9,19 mg/L	Pesticide Ecotoxicology Database, 2000

Santrumpos: EK – efektyvi koncentracija; IK – inhibitorinė koncentracija; LK – letali koncentracija; OR – oleino rūgštis.

#### 1.2.4. Oleino rūgštis poveikis biomembranom, susijusioms fermentų sistemoms, ir biocheminiai mechanizmai

Pagrindiniai OR sukelti efektai yra susiję su biologinių membranų pažeidimais, jų pralaidumo padidėjimu. Eksperimentiškai įrodyta, kad OR skirtingose ląstelėse sukelia šiuos efektus: skatina ATP sumažėjimą (60%) Erlichio ascitų vėžinėse ląstelėse 25–50 mg/L koncentracijų intervale (Ewald ir Sundin, 1993); slopina Na<sup>+</sup> srovę (18%) ovocitų acetilcholinu reguliuojamuose Na<sup>+</sup> kanaluose, esant 5,64 mg/L (20 µM) koncentracijai (Arias, 1998); pažeidžia jonų pernašą ir sukelia alveolių epitelio edemą žmonių ir gyvūnų plaučiuose (Vadasz et al., 2005; Matalon ir Ji, 2005); atskiria oksidacinių

fosforilinimą (50%) mitochondrijose, esant 5,64 mg/L (20  $\mu$ M) koncentracijai (Rottenberg ir Hashimoto, 1986); padidina DNR pažaidų kiekį seserinių chromatidžių mainų bandyme kartu su genotoksinais, esant 14,2 mg/L (50  $\mu$ M) koncentracijai (Higgins et al., 1999); ir skatina  $K^+$  išėjimą iš fitoplanktoninių dumblių (*Monoraphidium contortum*) ląstelių, esant 0,1 mg/L (0,354  $\mu$ M) koncentracijai (Wu et al., 2006).

*ATP sintazės hidrolazinio aktyvumo skatinimas.* Yra nustatyta, kad visi klasikiniai oksidacinio fosforilinimo skyrikliai skatina ATP sintazės hidrolazinį aktyvumą mažesnėmis koncentracijomis ( $EK_{50}$ ), nei reikalingomis stebėti skyriklinį poveikį (Terada, 1981). Nustatyta, kad cis-nesočiosios riebalų rūgštys efektyviau skatina mitochondrijų ATP sintazės hidrolazinį aktyvumą nei sočiosios riebalų rūgštys (Pressman ir Lardy, 1956).

*Skyriklinis OR veikimas.* Laisvosios riebalų rūgštys mitochondrijose pasižymi skyrikliniu veikimu. Kadangi mitochondrijų membrana nėra laidi riebalų rūgščių anijonams, teigiama, kad riebalų rūgštis per mitochondrijų fosfolipidinę membraną perneša baltymų nešikliai, pvz., dikarboksi rūgščių nešiklis, glutamato/aspartato ir ATP/ADP priešinės pernašos nešikliai (Skulachev, 1998, Wieckowski ir Wojtczak, 1998). Eksperimentiškai patvirtinti tokie OR efektai: didesnėmis nei 2,54 mg/L (10  $\mu$ M) koncentracijomis veikia kaip protonoforas jaučio širdies liposomose, turinčiose citochromo c oksidazę (Sharpe et al., 1996); panašia koncentracija (5,64 mg/L arba 20  $\mu$ M) sukelia oksidacinio fosforilinimo atskyrimą eukariotų mitochondrijose (Rottenberg ir Hashimoto, 1986); didelė koncentracija (28,2 mg/L arba 100  $\mu$ M) visiškai panaikina  $\Delta\psi$  ir  $\Delta pH$  proteoliposomose (Sharpe et al., 1996); mažomis koncentracijomis (0,8  $\mu$ M), kartu su  $K^+$  jonoforu valinomycinu, veikia kaip elektroneutralus  $K^+/H^+$  keitiklis arba jonoforas; ir panašiai kaip ir kitos laisvosios riebalų rūgštys (LRR), formuoja kompleksus su vienvalečiais ir dviavalečiais katijonais, katalizuodama jų judėjimą per membraną (Sharpe et al., 1996). Taigi, priklausomai nuo koncentracijos OR ir kitos LRR gali veikti kaip protonoforai bei jonoforai.



*Atskiriantysis arba entropinis OR veikimas.* OR, kaip ir kitos LRR, gali veikti membranos potencialo neformuojančius elektronų transporto grandinės fermentus (pvz., citochromą c), t.y. gali veikti kaip entropinis atskiriantysis agentas (arba vidinis skyriklis, angl. k. decoupler) (Rottenberg ir Hashimoto, 1986; Rottenberg, 1990; Skulachev, 1998). Tokie entropiniai agentai (OR ir kitos LRR) susikaupia membranose ir keičia minėtų membranos fermentų fosfolipidų apsuptį, slopindami fermentų aktyvumą. Pastebėta, kad LRR gali išlaisvinti citochromą c iš mitochondrijų vidinės membranos (Schönfeld ir Wojtczak, 2008). Tačiau nustatyta, kad LRR neveikia kaip detergentai (t.y. nesukelia lizės) cholatu dializuotose liposomose (Sharpe et al., 1996). Be to, LRR keičia jaučio širdies proteoliposomų citochromo oksidazės aktyvumą (Sharpe et al., 1996). Remiantis proteoliposomų citochromo oksidazės tyrimų duomenimis teigiama, kad LRR veikia kaip elektroneutralūs protonų nešikliai membranos viduje tarp vidinės vandeninės fazės ir binuklearinio fermento centro (tarp citochromo hemo  $a_3$  ir  $Cu_B$ ), keisdami kvėpavimo kontrolę (Sharpe et al. 1996). Nustatyta, kad LRR, kaip ir oksidacinio fosforilimo skyriklis 2,4-dinitrofenolis, didesnėmis koncentracijomis slopina mitochondrijų kvėpavimą (Schönfeld ir Wojtczak, 2007; Četkauskaitė et al., 2006). Tai leidžia teigti, kad OR gali veikti kaip entropinis kvėpavimo slopiklis.

Kai kurie autoriai pabrėžia, kad LRR sumažina ROS susidarymą mitochondrijose atgalinio elektronų transporto metu (aukštas potencialas), tačiau skatina ROS gamybą tiesioginio elektronų transporto metu ir teigia, kad ROS susidaro tiek dėl skyriklinio poveikio, tiek ir dėl dalinio arba entropinio kvėpavimo slopinimo (Schönfeld ir Wojtczak, 2007).

Nepriklausomai nuo oksidoredukcinio ROS susidarymo kelio eukariotinėse ląstelėse, OR geba skatinti ROS susidarymą metabotropiniu (signalo perdavimo) reguliaciniu keliu. OR ( $C_{18:1}$ ) indukuoja ROS Jurkat ląstelėse (žmogaus ūmios leukemijos T-limfocitų ląstelių linija) ir Raji ląstelėse (žmogaus B-limfocitų ląstelių linija). Teigiama, kad OR ir kitų LRR indukuojamas ROS susidarymas vyksta per baltymų kinazę C, aktyvuojant membraninę NADPH oksidazę (Cury-Boaventura ir Curi, 2005).

Nustatyta, kad OR (< 1 mM) efektyviai slopina Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPazę (Burth et al., 1997) ir kovalentiškai jungiasi prie Na<sup>+</sup> kanalo ir Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPazės subvienetų (Vadasz et al., 2005).

Taigi, OR poveikis eukariotų membranoms yra daugybinis ir pasižymi šiais efektais: ATP sintazės hidrolazinio aktyvumo skatinimu; skyrikliniu/protonoforiniu aktyvumu; atskirų oksidoredukcinų fermentų entropiniu slopinimu, keičiant membranos baltymų fosfolipidų apsuptį; ir ROS susidarymo skatinimu kvėpavimo grandinės kompleksuose.

Žinoma, kad OR slopina tiesiogiai su bakterijų bioluminescencijos kompleksu susijusius citoplazminius fermentus *V. harveyi* miristinės riebalų rūgšties reduktazę (Ulitzur ir Hastings, 1980) bei *V. harveyi* aldehido dehidrogenazę (Ahvazi et al., 2000). Manoma, kad OR slopina šiuos fermentus konkuruodama su atitinkamu substratu dėl hidrofobinės surišimo vietos. Todėl tikėtina, kad pagrindinės OR poveikio vietos *V. fischeri* membranose, kaip ir mitochondrijose ir liposomose, yra membraniniai oksidoredukciniai fermentai bei jų sistemos.

### **1.3. Elementinė siera kaip gamtinė ir antropogeninės kilmės medžiaga vandens ekosistemose**

Elementinė siera yra mikroorganizmų atliekamos sieros junginių oksidacijos-redukcijos reakcijų produktas, dėl savo hidrofobiškumo susikaupiantis sedimentuose, ir sedimentų ekstraktuose randamomis koncentracijomis toksiškas *V. fischeri* bioluminescencijai.

#### **1.3.1. Sieros fizikinės-cheminės savybės**

Paskaičiuotas elementinės sieros S<sup>0</sup> (CAS RN: 7704-34-9) log K<sub>ow</sub> yra lygus 0,23 (ChemIDPlus: <http://chem.sis.nlm.nih.gov>); o elementinės oktaedrinės sieros S<sub>8</sub><sup>0</sup> log K<sub>ow</sub> = 4,52 (<http://www.molinspiration.com>). Žinoma, kad oktaedrinė sieros forma dominuoja komerciniuose elementinės sieros preparatuose (Steudel, 2000, Steudel ir Eckert, 2003). Vandens aplinkoje, sedimentuose elementinė siera randama įvairaus ilgio grandinių bei žiedų pavidalu, S<sub>n</sub> (n>50), ir pagrindinė elementinės sieros forma yra

oktaedrinė (ortorombinė)  $S_8^0$  (Beffa et al., 1993; Gagnon et al., 1996; Steudel, 2000; Steudel ir Eckert, 2003). Sieros hidrofobiškumą patvirtina dar ir tai, kad  $S_8^0$  pasižymi šiomis savybėmis: silpnai tirpsta vandenyje (5  $\mu\text{g/L}$  +25°C temperatūroje) (Boulegue, 1978); yra ekstrahuojama panašiai kaip ir hidrofobiniai organiniai junginiai (PCB ir poliaromatiniai angliavandeniliai), naudojant sąlygiškai hidrofobinių tirpiklių heksano/acetono mišinį (Hong ir Nakra, 2009); randama ištirpusi riebaluose, pvz., trioleine, panaudojamame užpildyti pusiau pralaidžioms (mažo tankio polietileno) membranoms, kai pastarosios yra 2-4 savaites išlaikomos organinių hidrofobinių taršalų surinkimui vandens telkiniuose (Sabaliūnas, 1999); ir jos tirpumas vandenyje yra padidinamas (iki 4000 kartų) anijoninėmis ir katijoninėmis organinėmis micelėmis (Cleaves ir Miller, 1998).  $S_8^0$  turi silpnas nukleofilines savybes ir gali reaguoti su kitais stipresniais nukleofilais, pvz., su  $\text{SH}^{\delta-}$ , sudarydama polisulfidų ( $S_9^{2-}$ ) arba oligosulfidų ( $S_2^{2-}$ ) grupes (Cleaves ir Miller, 1998).

### 1.3.2 Sieros šaltiniai, paplitimas ir apykaita gamtoje

Pagrindiniai sieros taršos šaltiniai yra šie: siera turtingi naftos produktai (pvz., tiofenai); skalbimo priemonės (alkilbenzolsulfonatai, alkilsulfatai); pesticidai, savo sudėtyje turintys sieros; sieros turinčių uolienuų (gipso, epsomito, piritito, markasito, sferito, pirhalito, arsenopiritito) gavyba; trašų gamyba; ir popieriaus-celiuliozės pramonės nuotekos, kai naudojama sieros rūgštis medienos plaušams apdoroti (БАНДМАН, 1989). Elementinė oktaedrinė  $S_8^0$  susidaro dėl mikroorganizmų atliekamo: baltymų skaidymo;  $\text{H}_2\text{S}$  oksidacijos anoksinėmis sąlygomis fototrofinių (žaliųjų ir purpurinių sieros bakterijų) ir nefototrofinių bakterijų (*Beggiatoa* sp., *Thiobacillus*) pagalba bei anaerobinių sulfatredukcinčių bakterijų vykdomos oksiduotų sieros junginių (sulfatų, tiosulfatų, tetratonatų) redukcijos (Madigan et al., 1997).

$S_8^0$  randama 100–290  $\mu\text{M}$  (arba 3,2–9,28  $\text{mg/L}$ ) koncentracijų ribose eutrofikuotų ežerų sedimentų 2–5 cm viršutiniame sluoksnyje (Smith ir Klug, 1981). Anaerobiniuose,  $\text{H}_2\text{S}$  turinčiuose, Kuršių marių sedimentuose įvairių sieros formų koncentracija viršija 5,5  $\text{mg/g}$  (Četkauskaitė et al., 2005).

Oksiduotų sedimentų ekstraktuose  $S_8^0$  koncentracija mažesnė nei Microtox<sup>®</sup>  $EK_{50}$  (Svenson et al., 1996a, 1996c). Venecijos kanalų sedimentuose bendra sieros koncentracija sudaro nuo 6,1 iki 34,7 mg/g s. sv. (Salizzato et al., 1998b). Uosto sedimentuose rasta  $S_8^0$  koncentracija yra 150 kartų didesnė nei įlankos sedimentuose (243 ir 1,5  $\mu\text{g/g}$  sauso svorio, atitinkamai) (Gagne et al., 1999).

### 1.3.3. Sieros ekotoksiškumas (ūminiai efektai)

1.3 lentelė. Elementinės sieros ekotoksiškumo duomenys

Rūšis/testas	Poveikio trukmė	Cheminė medžiaga	Efektas	Koncentracija	Literatūra
Microtox <sup>®</sup> ( <i>V. fischeri</i> )	15 min.	$S_8^0$	$EK_{50}$	25–36 $\mu\text{g/L}$	Jacobs et al., 1992
	15 min.	$S_8^0$	$EK_{50}$	22 $\mu\text{g/L}$	Salizzato et al., 1998a
	15 min.	$S_8^0$	$EK_{50}$	15–29 $\mu\text{g/L}$	Svenson et al., 1998
	15 min.	$S_8^0$	$EK_{50}$	11,9 $\mu\text{g/L}$	Pardos et al., 1999
<i>V. fischeri</i>	15 min.	$S_8^0$	$EK_{50}$	11,8 $\mu\text{g/L}$	Četkauskaitė et al., 2004
<i>Selenastrum capricornutum</i>	96 val.	$S_8^0$	$EK_{50}$	>1 mg/L	Pardos et al., 1999
<i>Daphnia magna</i> Strauss	48 val.	$S_8^0$	$EK_{50}$	802,9 $\mu\text{g/L}$	Pardos et al., 1999
<i>Mysidacea</i> šeima	96 val.	$S_8^0$	LK <sub>50</sub>	736 mg/L	US EPA, 1991
<i>Lepomis macrochirus</i> , <i>Salmo irideus</i>	96 val.	$S_8^0$	LK <sub>50</sub>	> 180 mg/L	US EPA, 1991

Santrumpos:  $S_8^0$  – elementinė oktaedrinė siera; EK – efektyvi koncentracija; LK – letali koncentracija.

$S_8^0$  toksiškumas prokariotiniams ir eukariotiniams vandens organizmams pateiktas 1.3 lentelėje. Tarp visų tirtų vandens organizmų *V. fischeri* bakterijos yra jautriausios elementinės sieros poveikiui, kurios  $EK_{50}$  yra 11,8–36  $\mu\text{g/L}$  koncentracijų intervale (Pardos et al., 1998). Pagal ūminį toksiškumą dafnijoms (48 val.  $EK_{50} < 1 \text{ mg/L}$ ) siera galėtų būti klasifikuojama kaip labai toksiška vandens organizmams (Commission of the European Union, 1993), tačiau, žuvims toksiškumą sukelia tik labai didelės  $S_8^0$  koncentracijos (>100 mg/L).

Kadangi A, OR ir  $S_8^0$  yra hidrofobinės, didžiausios jų koncentracijos randamos toje pačioje aplinkoje – užterštuose sedimentuose. Tokie gamtiniai

mišiniai gali būti labiau toksiški nei pavienės medžiagos tomis pačiomis koncentracijomis. Tačiau tokių modelinių mišinių toksiškumas, naudojant *V. fischeri* bioluminescencijos gesimo testą, iki šiol nebuvo tirtas.

#### **1.3.4. Sieros poveikis biomembranom, susijusioms fermentų sistemoms, ir biocheminiai mechanizmai**

*S<sub>8</sub><sup>0</sup> toksiškumas, apspręstas hidrofobinių savybių.* Kadangi  $S_8^0$  yra hidrofobiška, tikėtina, kad  $S_8^0$  gali ištirpti membranoje, išdidindama nespecifinį membranos pralaidumą jonams, ir išsklaidyti elektrocheminį jonų gradientą. Buvo nustatyta, kad  $S_8^0$  (mg/L) skatina mitochondrijų kvėpavimą ir slopina fosfatų jonų patekimą į triušio širdies mitochondrijas (Džėja et al., 1993). Autoriai teigia, kad  $S_8^0$  veikia kaip silpnas skyriklis ir kvėpavimo slopiklis triušio širdies mitochondrijose (Džėja et al., 1993). Be to nustatyta, kad  $S_8^0$  (2,2 mg/L) skatina *V. fischeri* ląstelių kvėpavimą (Četkauskaitė et al., 2004).

*S<sub>8</sub><sup>0</sup> toksiškumas, apspręstas nukleofilinių savybių.* Tikėtina, kad nukleofilinių savybių  $S_8^0$ , panašiai kaip ir siera sulfhidrilinėse grupėse, gali nukleofiliškai atakuoti baltymų karboksilines grupes (Purich ir Allison, 2000). Pagal rentgeno spindulių absorbcijos spektrą nustatyta, kad bakterijų (*Acidithiobacillus ferrooxidans*) ląstelėse randamos  $S_8^0$  globulės yra prisijungę prie baltymų sulfhidrilinių grupių (He et al., 2009; Rohwerder ir Sand, 2003). Pagrindinių klasių fermentai, tokie kaip dehidrogenazės, transferazės, kinazės, karboksilazės, sintetazės savo aktyviajame centre turi –SH grupes (Торчинский, 1977), kurios gali būti slopinamos  $S_8^0$ . Žinoma, kad  $S_8^0$  slopina –SH grupes aktyviuose centruose turinčius mitochondrijų fermentus: adenino nukleotidų nešiklį ir adenilato kinazę (Džėja et al., 1993, Russell et al., 1995). Remiantis išvardintais duomenimis tikėtina, kad  $S_8^0$  veikia švytinčių bakterijų liuciferazę kaip sulfhidrilinių grupių slopiklis, nes žinoma, kad bakterinės liuciferazės  $\alpha$ -subvieneto hidrofobinėje srityje yra katalitiniam aktyvumui svarbi –SH grupė. Be to,  $S_8^0$  poveikis gali būti papildytas jos galimais biotransformacijos produktais, pvz.,  $H_2S$ . Silpnos nukleofilinės bei oksidoredukcinės sieros savybės ypatingai gali būti išreikštos  $H_2S$  molekulėje,

kuri gali veikti membranos viduje kaip skyriklis ar kaip fermentų slopiklis veikdamas sulfhidrilines arba karboksilines grupes.

Nors žinoma, kad  $S_8^0$  yra toksiška prokariotiniams mikroorganizmams, tačiau nėra aišku kaip  $S_8^0$  veikia jų membranose. Remiantis tyrimais su mitochondrijomis, galima tikėtis, kad  $S_8^0$  prokariotuose gali veikti kaip oksidacinio fosforilavimo skyriklis bei fermentų slopiklis, veikiantis jų sulfhidrilines grupes.

#### **1.4. Bakterinė bioluminescencija ekotoksikologijoje**

##### **1.4.1. Standartinis testas ir individualių medžiagų toksiškumo tyrimai**

Gram neigiamos bakterijos *Vibrio fischeri* (Beijerinck 1889) (anksčiau vadintos *Photobacterium fischeri*, kai kurių autorių nurodomos kaip *Photobacterium phosphoreum*, dabar perklasifikuotos į *Aliivibrio fischeri* Urbanczyk et al., 2007), kaip biologinis objektas, yra naudojamos vandens mėginių toksiškumo nustatymui pagal švytėjimą slopinantį mėginiuose esančių taršalų poveikį. Ūminio toksiškumo įvertinimui plačiai naudojama *V. fischeri* bakterijų padermė NRRL B-11177 bei šią padermę savo sudėtyje turintys komerciniai testų rinkiniai, pvz., Microtox<sup>®</sup>, LUMIStox ir ToxAlert.

Tarptautinis (ISO) standartinis testas: “Vandens kokybė. *Vibrio fischeri* švytėjimą slopinančio vandens mėginių poveikio nustatymas“ (ISO: 11348:1998) 2000 metais yra standartizuotas Lietuvoje (LST EN ISO 11348-3:2000), o vėliau pakeistas nauju: „Vandens mėginių slopinančio poveikio *Vibrio fischeri* švytėjimui nustatymas (švytinčiųjų bakterijų tyrimas)” (ISO: 11348:2007; LST EN ISO 11348-3:2009). Skiriami šie trys standartinio metodo būdai: 1) naudojant ką tik išaugintas bakterijas (ISO 11348-1:2007); 2) naudojant dehidratuotas bakterijas (ISO 11348-2:2007); 3) naudojant liofilizuotas (užšaldytas, laisvo vandens pašalinimui) bakterijas (ISO 11348-3:2007). Tyrimams naudojamos bakterijos yra užauginamos iki stacionarios augimo fazės pradžios. Šis metodas taikomas: nuotekų, paviršinio vandens,

dugno nuosėdų ekstraktų ir porų vandens, cheminių medžiagų toksiškumo vertinimui.

Pastebėta, kad *V. fischeri* bioluminescencijos testas yra jautriausias, lyginant su kitais mikroorganizmų toksiškumo testais (pvz., nitrifikacijos slopinimo, kvėpavimo ir fermentų slopinimo) (Kaiser, Palabrica, 1991; Kaiser ir Devillers, 1994). Individualių cheminių medžiagų toksiškumo *V. fischeri* bakterijų bioluminescencijai duomenys ( $EK_{50}$ ) prieinami monografijose (Kaiser, Palabrica, 1991; Kaiser ir Devillers, 1994) ir duomenų bazėse, pvz., Computox (Environment Canada, 1995), TerraTox (TerraBase Inc., 1998), kurios apima daugiau nei 1200 cheminių junginių. Cheminių junginių toksiškumas bioluminescencijai ( $EK_{50}$ ) gerai koreliuoja su kitų standartinių ūminio toksiškumo dumbliams, vėžiagyviams ir žuvims testų rezultatais ( $LK_{50}$ ) (Kaiser, 1998), kurie naudojami cheminių medžiagų klasifikacijai (93/21/EEC) pagal jų toksiškumo laipsnį vandens organizmams (Commission of the European Union, 1993). *V. fischeri* bioluminescencijos slopinimo bandymas, kaip pavienis arba kartu su kitais tyrimais, yra naudojamas kaip vienas iš ankstyvojo perspėjimo sistemų metodų. Šių metodų pagalba įvertinamas atskirų cheminių medžiagų toksiškumas bei atliekamas aplinkos užterštumo monitoringas (US EPA, 2005). *V. fischeri* toksiškumo duomenys taip pat naudojami Europos Sąjungos cheminių medžiagų registracijos, įvertinimo, autorizacijos ir apribojimų (angl. k. registration, evaluation, authorisation and restriction of chemical substances, REACH) programoje kaip papildomas testas akivaizdumo svorio įrodymo metodologijoje (WOEA – angl. k. weight of evidence approach).

#### 1.4.2. Mišinių toksiškumo tyrimai, panaudojant bakterinę bioluminescenciją

Dažniausiai vandens organizmai toksiškai nėra veikiami tik pavienėmis medžiagomis, bet daugybiniais cheminių medžiagų mišiniais. Dėl aplinkos mišinių sudėties kitimo laiko ir erdvės atžvilgiu, tiesiogiai įvertinti mišinių efektus daugelyje atvejų neįmanoma. Tačiau, žinant mišinio komponentų sudėtį bei individualių junginių toksiškumą, įmanoma prognozuoti jų mišinio toksiškumą. Vandens toksikologijos srityje mišinio toksiškumo prognozavimui dažniausiai yra naudojamas koncentracijos adityvumo (CA – angl. k. concentration addition) modelis. Šią sąvoką įvedė Loewe ir Muischnek (1926), ir ji paremta prielaida, kad adityvaus efekto atveju, mišinio komponentai turi bendrą veikimo vietą (Plackett ir Hewlett, 1963). Koncentracijos adityvumas matematiškai išreiškiamas tokia formule:

$$\sum_{i=1}^n c_i = \frac{c_i}{ECx_i} = 1 \quad (1)$$

čia  $n$  yra mišinio komponentų skaičius,  $ECx_i$  yra  $i$ -tojo mišinio komponento koncentracija, kuri naudojama individualiai sukelia  $x\%$  efektą (dažniausiai 50%), ir  $c_i$  yra atitinkamo komponento koncentracija mišinyje. Kiekviena trupmena  $c_i/ECx_i$  žymi mišinio komponento koncentraciją, kuri įvertinta pagal komponento santykinį toksiškumą, ir ši trupmena dar vadinama komponento toksiškumo vienetu (angl. k. Toxic Unit, TU). Taigi, kiekvienas junginys mišinyje gali būti pakeistas kitu, nepakeičiant bendro mišinio toksiškumo taip, kad toksinių vienetų suma nekistų. Jei bendra mišinio koncentracija sukelia  $x\%$  efektą, ir toksinių vienetų suma lygi vienam, vadinasi, galioja CA modelis. Dėl šios priežasties toksinių vienetų suma dažnai naudojama palyginti CA modelio prognozuojamą mišinio toksiškumą su nustatytu mišinio toksiškumu. Yra priimta, kad CA modelis yra tinkamas panašaus veikimo medžiagų mišinių toksiškumo prognozei. Priešingai CA modeliui, nepriklausomo veikimo modelis, IA (angl. k. independent action) (taip pat žinomas kaip Bliss (1939) nepriklausomybė arba efekto išdidinimas) yra paremtas prielaida, kad duoto



mišinio komponentai veikia skirtingas fiziologines sistemas tiriamajame organizme. Matematinė šio modelio išraiška tokia:

$$E(c_{\text{Miš}}) = E(c_1 + \dots + c_N) = 1 - \prod_{i=1} [1 - E(c_i)] \quad (2)$$

čia  $E(c_{\text{Miš}})$  žymi prognozuojamą efektą (0–1 skalėje)  $n$ -junginių mišinio,  $c_i$  yra  $i$ -tojo junginio koncentracija, ir  $E(c_i)$  yra tos pačios individualaus junginio koncentracijos poveikis. Neformaliai priimta, kad CA modelis galioja panašiai veikiančių cheminių medžiagų mišiniams. Tuo tarpu IA modelio tinkamumas skirtingo veikimo cheminėms medžiagoms yra dar ginčijamas. Todėl, prognozuojant mišinių toksiškumą, siūloma naudoti abu modelius ir lyginti jų prognozavimo gebą (Backhaus et al., 2000).

Be to, šie metodai turi trūkumų, kurie apsunkina analizę, nes papildomai reikia nustatyti pavienių medžiagų  $EK_{50}$ , taip pat svarbu iš anksto žinoti mišinių komponentų veikimo mechanizmus, kurie *V. fischeri* bakterijose dažniausiai nėra nustatyti. Verta pastebėti, kad individualių medžiagų  $EK_{50}$  yra paskaičiuojamas pagal koncentracijos-atsako kreives, kurios apima nuo 10 iki  $10^4$   $\mu\text{M}$  arba ( $\mu\text{g/L}$ ) koncentracijų intervalą, pvz.,: dionai (2,3-butano-, 3,4-heksa-dionai) (Dawson et al., 2006), fuzido rūgštis (Backhaus et al., 2000), herbicidai veikiantys skirtingus galutinius taikinius (Vighi et al., 2003; Junghans et al., 2006). Remiantis kiekybinio struktūros-aktyvumo santykio (QSAR – angl. k. quantitative structure-activity relationship) modeliavimo praktika ir šiuolaikine neurofiziologų nuomone, cheminis junginys (fermentų slopiklis) gali pasižymėti specifiniu reguliaciniu mechanizmu nanomolių koncentracijų ribose, tačiau mikromolių koncentracijomis gali keisti įvairių membranos baltymų aktyvumą, keisdamas membranos dvisluoksniu fizikines savybes (storį) (Kubinyi, 1993; Lundbæk, 2008). Taigi,  $EK_{50}$  apskaičiavimui naudojama koncentracijos-atsako kreivė apima daug skirtingų (reguliacinių ir slopinimo) efektų, todėl ekotoksikologijoje naudojamas cheminių medžiagų skirstymas pagal vieną veikimo mechanizmą,  $EK_{50}$  pagrindu, nėra tikslus.

**1.4 lentelė.** Pagrindiniai pramoninės gamybos cheminių medžiagų mišinių toksiškumo analizės būdai, naudojant *V. fischeri* bioluminescencijos gesimo testą (pagal 2000–2009 metų publikacijas)

Analizė (tikslas)	Analizuotos struktūrinės klasės (su pavyzdžiais)	Metodologija	Išvados/prielaidos
Daugianarių (16 komponentų) panašaus veikimo junginių mišinių toksiškumo prognozavimas CA ir IA modeliais.	Silpnos rūgštys: chloro- ir nitrofenoliai (pvz., herbicidai dinoterbas, dinoserbas, 4,6-dinitro- <i>o</i> -kresolis, ir kt.), kurios pagal QSAR modeliavimą yra oksidacinio fosforilavimo skyrikliai.	Pagal CA ir IA modelius, remiantis $EK_{50}$ ir $EK_1$ .	CA modelis mišinio toksiškumą prognozavo su 10 % paklaida. IA modeliu prognozuojamas toksiškumas nuo eksperimentiškai nustatyto skyrėsi 3 kartus (Altenburger et al., 2000).
CA ir IA modelių prognozavimo geba daugianariams (14 komponentų) skirtingų cheminių junginių mišiniams.	14 antibiotikų, besiskiriančių poveikio vietomis bakterijose: 8-azaguaninas, fuzido rūgštis, chloramfenikolis, streptomocinas, metalaksilis, 1,5-fluoruracilas, aktinomicinas, nalidiksinė rūgštis, azaserinas, ampicilinas, cikloserinas, dodecylpiridino bromidas, diltiazemas, etakrininė rūgštis.	Pagal CA ir IA modelius, remiantis $EK_{50}$ ir $EK_1$ reikšmėmis; fiksuoto santykio eksperimento planas.	IA modelis mišinio toksiškumą prognozavo puikiai. CA modelio prognozuojamas toksiškumas nuo eksperimentiškai nustatyto skyrėsi < 3 kartus (Backhaus et al., 2000).
Pavienio ir kombinuoto pesticidų toksiškumo įvertinimas.	Karbofuranas, ciromazinas, fenamifosas, formetanatas.	CA modelis, pagal $EK_{50}$ .	Sinergistinis ir antagonistinis poveikis nustatytas 25% tirtų mišinių (Fernández-Alba et al., 2002).
Ūminio cheminių junginių mišinių toksiškumo įvertinimas.	Neorganinės medžiagos: As, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb, Zn jonai.	$EK_{50}$ ir matematinis algoritmas.	Priklausomai nuo mišinio komponentų koncentracijos nustatytas: antagonizmas, adityvumas ir sinergizmas (Mowat ir Bundy, 2002).
MTBE ir pesticidų kombinuoto poveikio įvertinimas.	Kuro oksigenatas (MTBE), pesticidai (diuronas, dichlofluanidas, irgarolis 1051, linuronas, SeaNine 211, TBT).	$EK_{50}$ ir MTI sąveikos įvertinimui.	MTBE padidino diurono toksiškumą. Dichlofluanido, irgarolio 1051, linurono, SeaNine 211 ir jų mišinių toksiškumas nesiskyrė (Hernando et al., 2003).

**1.4 lentelės tęsinys**

Glutaraldehido ir paviršiaus aktyviųjų medžiagų, kombinuoto veikimo įvertinimas.	GA su CTAB (katijoninė), SDS (anijoninė), Tritonas X-100 (nejoninė) paviršiaus medžiaga.	CA modelis, toksiškumo indekso skaičiavimas remiantis $EK_{50}$ .	GA ir CTAB veikė adityviai; GA ir SDS – antagonistišškai, GA ir Tritonas X-100 – sinergistiškai (Emmanuel et al., 2005).
Mišinių toksiškumo <i>V. fischeri</i> ir kitiems organizmams įvertinimas.	Antibiotikai naudoti akvakultūrų gydymui (pvz., eritromicinas, florfenikolis, flumekvinas, oksolininė rūgštis, oksotetraciklinas).	CA ir IA modeliai, $EK_{50}$ , izobologramų analizė.	<i>V. fischeri</i> testas neįtrauktas naudotiems junginiams (Christensen et al., 2006).
Mišinio toksiškumo įvertinimas LPT veiksmu.	Švelnūs elektrofilai ir nepoliniai narkotikai (halo- ir metil- pakaitus turintys: organinės rūgštys, ketonai, alkandionai) tirti 27 binariniuose mišiniuose.	$EK_{50}$ , nuokrypio reikšmė: 1) teoretiniam dozės adityvumo ir nepriklausomo dozės-atsako kreivių skaičiavimui; 2) adityvumo koeficientui; ir, 3) nuo laiko priklausomo toksiškumo metodologijai.	Prognozuojami mišinio efektai pagal dozės adityvumą visais atvejais buvo artimi nustatytiems. Grįžtamas/negrižtamas toksiškumas svarbus mišinio toksiškumui. Toksiškumas klasifikuojamas: 1) visiškai nuo laiko priklausomas toksiškumas (LPT), 2) dalinis LPT; ir, 3) nuo laiko nepriklausomas toksiškumas, t.y. visiškai grįžtamas toksinis poveikis (Dawson et al., 2006).
Huminių rūgščių poveikio atskirų metalų ir jų mišinių toksiškumui įvertinimas (Tsiridis et al., 2006).	Humininės rūgštys su Cu, Pb, Zn jonais.	Tikimybių teorija paremtas matematinis modelis (Kungolos et al., 1999).	Humininės rūgštys neveikė Zn jonų toksiškumo, sumažino Cu, bet sustiprino Pb jonų toksiškumą, atitinkamai. Humininės rūgštys sumažino Zn ir Cu, Zn ir Pb jonų binarinių mišinių toksiškumą. Cu ir Pb jonų mišinio toksiškumas sumažintas nereikšmingai (Tsiridis et al., 2006).

**1.4 lentelės tęsinys**

Apaugimus kontroliuojančių junginių kombinuoto poveikio binariniuose mišiniuose įvertinimas.	1. Chlorinto karbamido, sulfamido, tiazolo dariniai: herbicidas diuronas, fungicidas dichlofluanidas, SeaNine 211. 2. Cu-pt or Zn-pt. 3. PTPB. 4. $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . 5. Karbamatai: IPBC ir cirkas. 6. Triazino darinys irgarolis 1051.	EK <sub>50</sub> individualiems junginiams, mišinio toksiškumo indekso (MTI) skaičiavimas.	Dažniausiai nustatytas iš dalies adityvus poveikis, antagonistinis poveikis nenustatytas. Diuronas, PTPB, arba SeaNine 211 mišiniuose su IPBC veikė adityviai. Irgarolis 1051, cirkas, Zn-pt, ir Cu-pt mišiniuose su Cu <sup>2+</sup> sukėlė sinergistinį poveikį (Zhou et al., 2006).
CA ir IA modelių prognozavimo/tikslumo palyginimas (Cedergreen et al., 2008).	Cheminės medžiagos, veikiančios skirtingose molekulinio poveikio vietose (herbicidai, pvz., akifluorenas, dikvatas, glifosatas, mekopropas ir t.t., ir vaistai) (toksiškumo duomenys paimti iš Christensen et al., 2006; Cedergreen et al., 2006) 26 binariniuose mišiniuose.	CA ir IA modeliai remiantis EK <sub>50</sub> ; Jonker et al. (2005) statistinis metodas ir programa.	15% mišinių adekvaciai prognozuojami IA modeliu, 8% – tik CA modeliu, 15% – abiem CA ir IA modeliais, 65% – negalėjo būti teisingai aprašomi nei vienu iš modelių (Cedergreen et al., 2008).
Mišinių poveikio bioluminescencijai ir ROS susidarymui nustatymas (Wang et al., 2009a).	Fenantrenchinono mišiniai su Cd ir Cu jonais.	Izobologramų metodas su EK <sub>50</sub> reikšmėmis.	Mišinio toksiškumas priklausė nuo individualių medžiagų koncentracijų santykio mišinyje. Mišinių toksiškumas <i>V. fischeri</i> bioluminescencijai susijęs su ROS skatinimu (Wang et al., 2009a).

Santraukos: CTAB – cetiltrimetilamonio bromidas; Cu-pt – vario 2-piridinetiol-1-oksidas; GA – glutaraldehidai; IPBC – 3-jodo-2-propinilo butilkarbamatas; LPT – nuo laiko priklausomas toksiškumas; MTBE – metil-tert-butilo eteris; PTPB – piridino trifenilboronas; SDS – natrio dodecilsulfonatas; TBT – tributiltinas; Zn-pt – Zn 2-piridinetiol-1-oksidas.

Apžvelgus 2000-2009 metų publikacijas, galima pastebėti, kad binarinių mišinių toksiškumas naudojant *V. fischeri* testą buvo dažniausiai analizuojamas naudojant CA modelį (1.4 lentelė). Analizei buvo naudojamos įvairios su CA modeliu susijusios metodologijos: matematiniai algoritmai, mišinio toksiškumo indeksas, adityvumo koeficientas ir klasikinės izobologramos. CA metodologijų pagalba buvo įvertintas skirtingos paskirties, didelės gamybos apimtys cheminių medžiagų (pesticidų, apaugimus kontroliuojančių agentų,

antibiotikų, paviršiaus aktyviųjų medžiagų ir t.t) mišinių toksiškumas. Be to, CA ir IA modelių tinkamumas mišinių prognozavimui buvo vertinamas su pramoniniais junginiais, kurių veikimo pobūdis iš anksto buvo prognozuotas pagal QSAR metodologiją, tačiau nepatvirtintas eksperimentiškai. Taigi, tradiciniai mišinių toksiškumo tyrimai su *V. fischeri* buvo atliekami su panašios arba skirtingos struktūros pramoniniais cheminiais junginiais. Tačiau per šį periodą nedaug dėmesio skirta pramoninių ir gamtinių toksinių junginių poveikio binariniuose mišiniuose įvertinimui.

Verta pastebėti, kad apie 90% mišinių analizių, atliktų naudojant bakterinės bioluminescencijos tyrimus, remiasi  $EK_{50}$ , o kiti statistiniai metodai nėra dažnai naudojami. Tačiau kiti statistiniai metodai taip pat gali būti naudojami cheminių medžiagų kombinuoto veikimo įvertinimui. Pavyzdžiui, Bois (1986) ir Ren (2004) su bendraautoriais mišinių toksiškumo švytinčioms bakterijoms įvertinimui naudojo daugialypę regresinę analizę. Tai statistinis metodas, kurio pagalba paskaičiuojami toksinį poveikį sukeliančių veiksnių (cheminių junginių) bei jų sąveikos regresijos koeficientai, ir pagal koeficientų ženklus įvertinamas mišinio komponentų toksikodinaminis poveikis. Yra žinoma, kad šis statistinis daugialypės regresijos modelis yra CA modelio, sąveikos indekso skaičiavimo alternatyva (Meadows et al., 2002). Daugialypės regresijos modelio ir pilno faktominio eksperimento privalumas yra tas, kad analizei nereikalingi pavienių medžiagų poveikio duomenys bei jų  $EK_{50}$ .

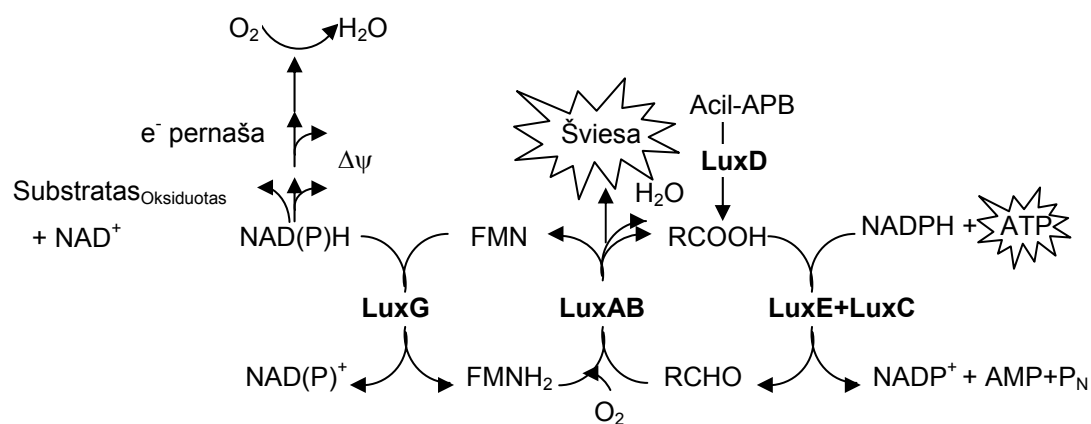
### **1.5. *Vibrio fischeri* bakterijų fermentų sistemos ar jų veiklos produktai kaip biožymenys cheminių medžiagų toksiškumui nustatyti**

Nors publikuojama daug cheminių junginių toksiškumo bakterijų švytėjimui duomenų, tačiau papildomi metodai, padedantys išsiaiškinti medžiagų veikimo būdus/mechanizmus nėra dažnai naudojami. Per pastaruosius dešimt metų skirtingos mokslininkų grupės detaliau analizavo tik chinonų ir fenolių veikimo mechanizmus švytinčiose bakterijose (Ismailov et al., 2000; Kudryasheva et al., 2002; Vetrova et al., 2007; Wang et al., 2009b). Šiems veikimo mechanizmams interpretuoti šalia tradicinės *in vivo* sistemos

buvo naudojami įvairūs biožymenys, tokie kaip deguonies sunaudojimas *in vivo* (Ismailov et al., 2000); ROS gamyba (Wang et al., 2009b); aerobinis ir anaerobinis ląstelių augimas (Wang et al., 2009b); antioksidantinių fermentų (superoksidazės ir katalazės) indukcija (Wang et al., 2009b); bioluminescencijos fermentų komplekso ir išgrynintos liuciferazės aktyvumas (Ismailov et al., 2000; Kudryasheva et al., 2002; Vetrova et al., 2007); ir NADH oksidacija (Vetrova et al., 2007). Pažymėtina, kad šiuose negausiuose darbuose toksiškumo vertinimui buvo pasirinkta tik tam tikra, nedidelė biožymenų grupė. Todėl šiame darbe cheminių medžiagų veikimo mechanizmai buvo analizuojami, vertinant jų poveikį tiek ląstelėms, tiek fermentų sistemoms *in vitro*.

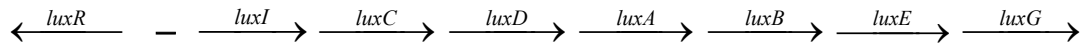
### 1.5.1. Bendroji bakterijų bioluminescencijos fermentų sistema (*in vivo*), jos induktoriai, ksenobiotikų biotransformacijos ir jų išmetimo iš ląstelių fermentai

Bendroji bakterijų bioluminescencijos fermentų sistema (*in vivo*) ir jos induktoriai. Švytinčiose bakterijose, tokiose kaip *V. fischeri*, šviesą gamina du subvienetus (LuxA ir LuxB) turintis fermentas liuciferazė (1.1 pav.). LuxAB paeiliui prisijungia FMNH<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> ir alifatinį aldehidą (RCHO), kurie paverčiami alifatine rūgštimi, FMN, ir vandeniu, bei išspinduliuojama šviesa. Papildomi baltymai, LuxC, LuxD, ir LuxE, yra atsakingi už aldehido regeneravimą, tuo tarpu kitas baltymas LuxG perneša redukuojančius ekvivalentus nuo NAD(P)H ant FMN sudarydamas FMNH<sub>2</sub> (Stabb, 2005).



1.1 pav. *Vibrio fischeri* bioluminescencijos biochemija ir enzimologija (pagal Stabb, 2005)

*V. fischeri* bakterijų genome *lux* operono genai *luxC*, *luxD*, *luxE*, ir *luxG* genai apsupta *luxA* ir *luxB*. Šie genai yra nurašomi kartu su *luxI*, tuo tarpu *luxR* yra šalia kitų *lux* genų, tačiau nėra nurašomas su jais. Genai išsidėsto tokia tvarka:



LuxI ir LuxR atlieka pagrindinį vaidmenį reguliuojant kolektyvinį jutimą (angl. k. quorum-sensing). LuxI gamina autoinduktorių, kuris sąveikauja su LuxR, ir tokiu būdu sužadinas *lux* genų nurašymas. Genų raiška yra stimuliuojama, kai viduląstelinė autoinduktoriaus N-3-oksoheksanoil-L-homoserino laktono koncentracija tampa didesnė už slenkstinę. Taigi, šviesa yra gaminama kai ląstelių tankis yra didelis, pavyzdžiui, kai *V. fischeri* auga simbiotinio organizmo (kalmaro, žuvies) šviesos organe, tačiau šviesos gaminimas neindukuojamas mažo tankio planktoninėse ląstelėse (Stabb, 2005). Verta pabrėžti, kad cheminių medžiagų toksiškumo tyrimams naudojamos *V. fischeri* bakterijos yra ankstyvos stacionarios augimo fazės, kur švytėjimo fermentai yra susiformavę, t.y. tyrimams naudojamos jau švytinčios bakterijos, todėl švytėjimo reguliacija autoinduktoriumi nėra toksikologinių tyrimų objektas.

*Ksenobiotikų biotransformacijos fermentai.* Eksperimentiškai įrodyta, kad *Vibrio* spp. genties bakterijos geba atlikti riebalų rūgščių β-oksidacijos ir elongacijos reakcijas, redukuoti chromata, biotransformuoti aliciklinius ketonus ir degraduoti baltymus (1.5 lentelė). Be to, pagal genų sekų panašumą su jau žinomų prokariotinių sistemų fermentus, koduojančioms genų sekoms, *Vibrio* spp. genties bakterijos gali turėti fermentus, katalizuojančius riebalų rūgščių β-oksidaciją, sulfito redukciją, ir alkoholio oksidaciją (1.5 lentelė). Dauguma paminėtų reakcijų substratų redukcijai kaip vandenilio donorą naudoja NAD(P)H, tuo tarpu alkoholio ir riebalų rūgščių skaidymo metu vandenilis pernešamas ant NAD<sup>+</sup>. Taigi, priklausomai nuo to, ar cheminė medžiaga yra oksiduojama ar redukuojama *V. fischeri* ląstelėse, NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup> santykis didėja arba mažėja, atitinkamai, tuo pačiu

reguliuodamas nuo NAD(P)H kiekio priklausomą bioluminescencijos reakciją.

**1.5 lentelė.** *Vibrio fischeri* ir kitų *Vibrio* spp. bakterijų galimos cheminių junginių biotransformacijos sistemos

<i>Vibrio</i> spp.	Fermentai arba genai	Reakcija(os)	Literatūra
Eksperimentiškai nustatyti fermentų aktyvumai			
<i>V. fischeri</i> , <i>V. harveyi</i>	Fermentai ekstralastelinių (išorinių) riebalų rūgščių paėmimui, aktyvavimui ir panaudojimui.	Riebalų rūgščių (t.y. miristinės rūgšties C <sub>14:0</sub> ) β-oksidacija.	Byers, 1989; Byers ir Shen, 2002
<i>V. fischeri</i> , <i>V. harveyi</i>	Acilgrupę pernešančio baltymo (APB) sintazė	Riebalų rūgščių biosintezė ir grandinės ilginimo reakcija (ilgiausia rasta riebalų rūgštis – palmitino C <sub>16:0</sub> ).	Byers, 1989; Jiang et al., 2010
<i>V. harveyi</i>	Nitrato reduktazė	Nespecifinis fermento aktyvumas: veikia kaip chromato reduktazė.	Kwak et al., 2003
<i>V. fischeri</i> ATCC 7744, <i>Photobacterium phosphoreum</i>	Liuciferazė	Aliciklinių ketonų nukleofilinė oksigenacija iki atitinkamų laktonų.	Villa ir Willetts, 1997
<i>V. parahaemolyticus</i> 18 štamų	Nenustatyti	H <sub>2</sub> S produkcija iš organinių medžiagų pvz., baltymų.	Jegathesan ir Paramasivam, 1976
Galimi fermentų aktyvumai pagal genų sekos panašumą			
<i>V. cholerae</i> , <i>V. fluvialis</i> , <i>V. fischeri</i> , <i>V. harveyi</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. splendidus</i> , <i>V. vulnificus</i>	Riebalų rūgščių oksidacijos fermentų kompleksas.	Riebalų rūgščių β-oksidacija.	Grimes et al., 2009; <a href="http://www.uniprot.org">http://www.uniprot.org</a>
<i>V. fischeri</i>	3-oksoacil-APB sintazė 3	Riebalų rūgščių biosintezės kondensacijos reakcija.	<a href="http://www.uniprot.org">http://www.uniprot.org</a>
<i>V. fischeri</i>	Sulfito reduktazės hemo baltymo β komponentas	Sulfito redukcija 6 elektronais iki sulfido.	<a href="http://www.uniprot.org">http://www.uniprot.org</a>
<i>V. fischeri</i> , <i>V. harveyi</i>	Alkoholio dehidrogenazė	Alkoholio oksidacija	<a href="http://www.uniprot.org">http://www.uniprot.org</a> , <a href="http://www.brenda-enzymes.org/">http://www.brenda-enzymes.org/</a>



**1.6 lentelė.** Galimos daugybinio vaistų ir toksinių cheminių medžiagų išmetimo sistemos *Vibrio fischeri* ir kitose *Vibrio* spp. genties bakterijose

<i>Vibrio</i> spp.	Fermentai arba genai	Atsparumas	Literatūra
<i>V. cholerae</i> , <i>V. fischeri</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. vulnificus</i>	MATE nešikliai – (du genai <i>hMATE1</i> ir <i>hMATE2</i> ); tai antrinė pernašos sistema, vaistų pernašai naudojanti katijonų electrocheminį gradientą skersai membranos.	NorM (MATE šeimos nešiklis), kurio aktyvumas didėja pridėjus Na <sup>+</sup> . Pavyzdžiui, dažo etidžio bromido išmetimas apjungtas su Na <sup>+</sup> transportu į ląstelės vidų (t.y. Na <sup>+</sup> /vaisto priešnaša). Tokiu būdu išmetami fluorochinolonai (norfloksacinas, ir kt.), katijoniniai dažai (akriflavinas, etidis), įvairių struktūrų substratai.	Kuroda ir Tsuchiya, 2009)
<i>V. fischeri</i>	Išorinės membranos išmetimo baltymas (TolC); periplazminis išmetimo sistemų komponentas; Eksperto ABC nešiklio permeazės baltymas; ABC nešiklis.	Plataus cheminių medžiagų atsparumo genai išreikšti kaip atsakas į kolektyvinio jutimo signalinį junginį N-3-oksoheksanoil-L-homoserino laktoną.	Antunes et al., 2007
<i>V. cholerae</i> , <i>V. fischeri</i> ( <i>Aliivibrio fischeri</i> ), <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. vulnificus</i>	Daugybinio atsparumo vaistams išmetimo pompa VceCAB (VCE) koduojama operonu <i>vceCAB</i> .	Atsparumas skyrikliui CCCP, deoksicholatui, pentachlorofenoliui.	Gu et al., 2009
<i>V. fischeri</i>	MurA – UDP-N-acetilglukozės-amino enolpiruvil transferazė (ląstelės sienelės peptidoglikano sintezės fermentas).	Atsparumas fosfomicinui (t.y. organinis anijonas, agentas slopinantis peptidoglikano sintezę, fosfoenolpiruvato analogas).	Kumar et al., 2009
<i>V. cholerae</i>	TolC – išorinės membranos baltymas (genas <i>tolC</i> ), būtinas daugelio molekulių per ląstelės apvaskalėlį pernašai.	Suteikia atsparumą antibakteriniams agentams, tulžies rūgštims ir užtikrina kolonizaciją žarnyne; eksportuoja koliciną V, RTX toksiną.	Bina ir Mekalanos, 2001

Santrumpos: ABC (angl. k. ATP-binding cassette transporter) – ATP surišančios kasetės nešiklis; CCCP – karbonilo cianido-m-chlorofenilhidrazonas; MATE (angl. k. multidrug and toxic compound extrusion) – daugybinio vaistų ir toksinių medžiagų išmetimo nešiklių šeima; RTX (angl. k. repeats in toxin) toksinų šeima – viena iš gram-neigiamų bakterijų gaminamų egzotoksinų grupių; UDP – uridino difosfatas, VCE – VceCAB; daugybinio atsparumo vaistams pompa atsakinga už *V. cholerae* atsparumą CCCP; TolC – įvairių daugybinio atsparumo vaistams baltymų šeimų daugiakomponenčių sistemų kanalų baltymas.

*Daugybinio vaistų ir toksinių medžiagų išmetimo genai ir baltymai.* Be to, buvo nustatyta, kad *V. fischeri* turi genus, koduojančius nuo ATP (pvz., ABC nešikliai) ar nuo elektrocheminio katijonų gradiento skersai membranos (pvz., NorM) priklausomų daugybinio vaistų ir toksinių medžiagų išmetimo nešiklius, kitus kanalų baltymus (TolC, VCE), kurie palaiko *Vibrio* spp. genties bakterijų atsparumą vaistams ir toksinėms medžiagoms (1.6 lentelė).

Taigi, yra galimybė, kad *V. fischeri* geba biotransformuoti arba išmesti kitas toksines medžiagas, ir bioluminescencijos *in vivo* atsistatymas praėjus 30 min nuo poveikio pradžios galėtų rodyti, kad vyksta medžiagų biotransformacija ar išmetimas, o ne tik narkotinių medžiagų veikimo pobūdį kaip buvo pasiūlyta anksčiau (Hermens et al., 1985; Kaiser ir Palabrica, 1991).

### 1.5.2. Švytinčių bakterijų kvėpavimo grandinė

*Vibrio* genties bakterijų kvėpavimo grandinė nėra gerai ištirta, tačiau, remiantis žiniomis apie *V. fischeri* genomą (Ruby et al., 2005), apie artimai susijusią *V. cholerae* (Braun ir Thöny-Meyer, 2005) bei *V. fischeri* bioluminescencijos, kvėpavimo bei augimo tyrimų duomenimis, galima sudaryti elektronų pernašos grandinės struktūrą. Kaip ir būdinga bakterijoms, *V. fischeri* turi šakotą elektronų transporto grandinę (Dunn et al., 2010). Manoma, kad pirmas kompleksas yra Na<sup>+</sup> pompuojanti NADH:chinono oksidoreduktazė, antras kompleksas – sukcinato dehidrogenazė (Ruby et al., 2005). *V. fischeri* neturi homologo mitochondrijų citochromui c, ir nėra žinoma, ar mažas c tipo citochromas yra reikalingas elektronų pernašai tarp trečiojo ir ketvirtojo kompleksų (Braun ir Thöny-Meyer, 2005). Prognozuojama, kad *V. fischeri* trečiasis kompleksas yra bc<sub>1</sub> citochromų kompleksas ir ketvirtasis – cbb<sub>3</sub> tipo citochromo oksidazė. Pagal analogiją su kitomis rūšimis teigiama, kad *V. fischeri* turi papildomą bd tipo chinono oksidazę (Dunn et al., 2010). Manoma, kad bd tipo chinono oksidazė ir cbb<sub>3</sub> citochromo oksidazė turi sąlygiškai didelį giminingumą deguoniui ir gauna elektronus iš chinonų ir citochromų bc<sub>1</sub> komplekso, atitinkamai. Kadangi kvėpavimo grandinės ir liuciferazės reakcijoms būtinas NADH (1.1 pav.), yra

teigiama, kad redukuoti ekvivalentai liuciferazę pasiekia tik tada, kai citochromų kelias yra prisotintas. Be to, manoma, kad simbiotinės *V. fischeri* bakterijos turėtų naudoti didelio giminingumo deguoniui bd ir cbb<sub>3</sub> tipo oksidazes, kad galėtų būti aktyvios esant mažiems deguonies kiekiams simbioonto šviesos organe bei pajėgtų efektyviai konkuruoti dėl deguonies su liuciferaze (Bourgois et al., 2001). Žinoma, kad bioluminescencijos keliui *V. fischeri* ląstelėse tenka 17–20,7% viso kvėpavimui sunaudojamo deguonies (Makemson, 1986; Bourgois et al., 2001).

Tiriant oksidacinio fosforilinimo skyriklių poveikį jūrinių *V. harveyi*, *V. fischeri*, *V. alginolyticus* bakterijų augimui arba deguonies sunaudojimui pastebėta, kad bakterijos yra mažiau jautrios skyriklių poveikiui kai terpės pH  $\geq 7,0$ . Autoriai teigia, kad tokį atsparumą skyrikliams lemia Na<sup>+</sup> pompuojančios NADH:chinono oksidoreduktazės sukuriamas Na<sup>+</sup> elektrocheminis gradientas (Tokuda ir Unemoto, 1983, Wada et al., 1992). Todėl bakterijų deguonies sunaudojimo tyrimai ne tik neutralioje (pH 7,0), bet ir rūgštinėje (pvz., pH 6,0) terpėje yra naudingi, vertinant cheminių medžiagų poveikį oksidaciniam fosforilinimui.

### 1.5.3. Energiją (ir potencialą) gaminančios ir naudojančios sistemos

*Energiją (ir potencialą) gaminanti sistema.* *V. fischeri* bakterijose, kaip ir mitochondrijose, trečias (bc<sub>1</sub> citochromai) ir ketvirtas (cbb<sub>3</sub> citochromo oksidazė) kvėpavimo grandinės kompleksai pompuoja H<sup>+</sup> iš citoplazmos į periplazminę erdvę. Pagal literatūros duomenis, jūrinėse *Vibrio* spp. bakterijose sukuriamas ne tik H<sup>+</sup>, bet ir papildomas Na<sup>+</sup> elektrocheminis gradientas, kurį formuoja Na<sup>+</sup> pompuojanti NADH-chinono oksidoreduktazė (pirmas kompleksas) bei Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> priešnašos nešiklis (Oh et al., 1991; Hayashi et al., 2001). Taip pat yra žinoma, kad bakterijos turi ir K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> priešnašos ir K<sup>+</sup> viennašos nešiklius, kurie formuoja K<sup>+</sup> gradientą (Скулачев, 1989). Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> gradiento talpa bakterijose priklauso nuo druskų koncentracijos išorės terpėje. *V. fischeri* atveju, esant terpėje 3% NaCl (~200 mM), K<sup>+</sup> koncentracija ląstelėse gali siekti 300 mM (Watanabe et al., 1991). Taigi, membranos

potencialas, registruojamas pagal atitinkamų hidrofobinių zondų (pvz., tetrafenilfosfonio, TPP<sup>+</sup>) sugėrimą atspindi elektrocheminį jonų gradientą skersai *V. fischeri* citopazminės membranos, suformuotą H<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> gradientų.

*Energiją (ir potencialą) naudojanti sistema.* Protonų elektrocheminis gradientas ( $\Delta\mu_{H^+}$ ) ir jį buferinanti forma – Na<sup>+</sup> elektrocheminis gradientas ( $\Delta\mu_{Na^+}$ ) gali būti panaudojami ATP sintezei, medžiagų (P<sub>n</sub>, metabolitų ir toksinų) transportui, žiuželio judėjimui, ir gali būti išsklaidytas, protonams pratekant per membraną (Скулачев, 1989).

Priimta, kad membranos potencialo sumažėjimą mitochondrijose lemia didesnis potencialą gaminančios sistemos slopinimas nei potencialą naudojančios sistemos slopinimas, o membranos potencialo padidėjimą lemia didesnis potencialą naudojančios (fosforilinimo) sistemos slopinimas (Mildažienė et al., 2002b).

Tačiau jūrinėse liuminescuojančiose bakterijose be fosforilinimo ir jonų pernašos sistemų, naudojančių  $\Delta\mu_{H^+}$  ar  $\Delta\mu_{Na^+}$ , yra svarbi bioluminescencijos reakcijai energiją teikianti sistema. Problema yra ta, kad abi potencialą ir bioluminescenciją gaminančios sistemos priklauso nuo energijos redukuotų ekvivalentų pavidalu (pvz., NAD(P)H). Tokiu požiūriu bioluminescencijos fermentų sistema, taip pat naudodama redukuotus ekvivalentus, iš dalies gali reguliuoti potencialo gamybą (jos paviršį). Taigi, *V. fischeri* bakterijų membranos potencialas galėtų būti geras biožymuo, vertinant cheminių medžiagų poveikį ne tik citoplazminės membranos pralaidumui, bet ir vertinant bioluminescencijos fermentų sistemos būklę (t.y. bioluminescencijos gesimą).

Antra vertus, bioluminescencijos komplekso būklės tyrimai yra galimi ir pagal kitas jo funkcijas. Nuo liuciferazės priklausomas deguonies sunaudojimas *in vivo*, paprastai, yra tiriamas užslopinus kvėpavimo grandinės deguonies sunaudojimą kalio cianidu (Makemson, 1986; Bourgois et al., 2001). Nustatyta, kad toks KCN neįtaria deguonies sunaudojimas gali būti visiškai nuslopintas žinomo liuciferazės slopiklio *n*-dekanolio (Makemson, 1986). Todėl cheminių medžiagų poveikio tik nuo liuciferazės priklausomam

deguonies sunaudojimui tyrimai galėtų nurodyti, ar cheminės medžiagos veikia kaip liuciferazės slopikliai bakterijose *in vivo*.

#### **1.5.4. Aktyviųjų deguonies formų susidarymas ir jas neutralizuojantys fermentai švytinčiose bakterijose**

Aktyviosios deguonies formos (ROS) yra deguonies nepilnos fermentinės ir nefermentinės redukcijos produktai, pvz., superoksido radikalas  $O_2^{\bullet-}$ , vandenilio peroksidas  $H_2O_2$ , hidroksilo radikalas  $OH^{\bullet}$ . Tiriant mitochondrijas, nustatyta, kad padidėjęs ROS susidarymas yra susijęs su I-ojo ir III-ojo kvėpavimo grandinės kompleksų slopinimu (Schönfeld ir Wojtczak, 2007; Aly ir Domenech, 2009). Be to manoma, kad ROS gamyba mitochondrijose yra susijusi su dideliu membranos potencialu. Teigiama, kad didelis membranos potencialas yra pavojingas, nes kvėpavimo grandinės fermentų centrų išotininimas skatina atgalinę elektronų pernašą (t.y. NAD(P)H susidarymą iš  $NAD(P)^+$ ), kurios metu susidaro daugiau ROS nei tiesioginės elektronų pernašos metu (Skulachev, 1998; Schönfeld ir Wojtczak, 2007). Kadangi liuciferazę elektronai pasiekia tik tada, kai citochromų kelias yra išotintas elektronais (Bourgois et al., 2001), galėtų būti, kad liuciferazės atšakos funkcija yra sumažinti membranos potencialą bei apsaugoti nuo ROS. Tačiau, liuciferazės katalizuojama deguonies redukcija taip pat gali būti ROS šaltinis švytinčiose bakterijose (1.3 pav.). Pavyzdžiui, nustatyta, kad  $H_2O_2$  susiformuoja I-ojo ir II-ojo bioluminescencijos tarpinio junginio spontaninio skilimo metu (1.3 pav.) (Tu, 1982; Tu ir Mager, 1995). Nustatyta, kad *Vibrio harveyi* liuciferazė, ekspresuota *Escherichia coli* bakterijose, gamina superoksido radikalą  $O_2^{\bullet-}$ , kuris, manoma, susidaro dalinai ar visiškai redukuoto FMNH<sub>2</sub> ir liuciferazės kompleksui (t.y. I-ajam tarpiniam junginiui) reaguojant su  $O_2$  (Gonzalez-Flecha ir Demble, 1994). Be to, nustatyta, kad  $H_2O_2$  susidaro išgrynintos *V. fischeri* NAD(P)H:FMN oksidoreduktazės katalizuojamos reakcijos metu susidariusiam FMNH<sub>2</sub> reaguojant su deguonimi (Inouye, 1994). Todėl labiau tikėtina, kad  $H_2O_2$  susidaro, kai sutrikdomas FMNH<sub>2</sub> perdavimas nuo NAD(P)H:FMN oksidoreduktazės liuciferazei.

Žinoma, kad ROS susidarymą *V. fischeri* bakterijose skatina fenantrenchinonas, poliaromatinis junginys, gebantis pernešti elektronus deguoniui (Wang et al., 2009b). Fenantrenchinonas gali priimti elektronus iš NAD(P)H ir pernešti juos ant deguonies, susidarant superoksido radikalui  $O_2^{\bullet}$  arba kitoms ROS. Kadangi NAD(P)H naudojamas tiek *V. fischeri* bioluminescencijos reakcijoje, tiek fenantrenchinono indukuojamame ROS susidaryme, teigiama, kad fenantrenchinonas konkuruoja su FMN dėl NAD(P)H elektronų, taip slopindamas NAD(P)H:FMN oksidoreduktazės reakciją (Wang et al., 2009b).

*V. fischeri* apsauga nuo ROS. Literatūroje skelbiama, kad mažiausiai trys fermentai dalyvauja *V. fischeri* apsaugoje nuo oksidacinio streso liuciferazė (Spilewska et al., 2003; Lyzen ir Wegrzyn, 2005), katalazė (Visick ir Ruby 1998; Wang et al., 2009b) ir superoksido dismutazė (Wang et al., 2009b). Įdomu tai, kad pati bakterinė liuciferazė gali katalizuoti bioluminescencijos reakciją vietoj aldehido naudodama vandenilio peroksidą (Watanabe et al., 1993). Liuciferazės reakcija su  $H_2O_2$  yra panaši į katalazės bei peroksidazės reakciją, kai II-asis bioluminescencijos reakcijos tarpinis junginys reaguoja su  $H_2O_2$  sudarydamas sužadintą hidroksidą (E-FMNH-OH\*),  $H_2O$  ir  $O_2$  (Watanabe et al., 1993). Liuciferazės antioksidantinių aktyvumą patvirtina ir tai, kad tamsiniai (*lux*) *V. fischeri* ir *Photobacterium leiognathi* bakterijų mutantai negali normaliai augti, kai aplinkoje yra įvairių oksidantų, pvz., vandenilio peroksido, kumeno hidroperoksido, t-butilo hidroperoksido ir geležies jonų (Lyzen ir Wegrzyn, 2005).

Logaritminio ir stacionaraus augimo *V. fischeri* bakterijose maži  $H_2O_2$  (60  $\mu$ M) kiekiai indukuoja 3-4 kartus didesnę katalazės aktyvumą, lyginant su peroksidu nepaveiktomis ląstelėmis (Visick ir Ruby, 1998). Laukinio tipo *V. fischeri* ląstelių katalazė lokalizuota periplazmoje, kur, manoma, ji skaldo vandenilio peroksidą, patenkantį iš išorinės aplinkos. Be to, pastebėta, kad *V. fischeri* katalazės mutantai nesugeba kolonizuoti šviesos organų kalmaruose (Visick ir Ruby, 1998). Poliakrilamidinio gelio elektroforezės ir spektrofotometrinių metodų pagalba nustatyta, kad superoksido dismutazės ir

katalazės aktyvumas *V. fischeri* bakterijose yra indukuojamas ROS susidarymą skatinančiu ir bioluminescenciją slopinančiu fenantrenchinonu (Wang et al., 2009b). Be minėtų antioksidantinių fermentų, *V. fischeri* antioksidantinę sistemą gali sudaryti taip pat glutationas, cisteinas, ir, panašiai kaip kitose bakterijose, ferredoksino ir glutationo oksidoreduktazės, glutationo disulfido reduktazės sistema (www.uniprot.org).

Taigi, padidėjusi ROS gamyba *V. fischeri* ląstelėse galėtų reikšti, kad yra sutrikęs kvėpavimo grandinės ar bioluminescencijos komplekso fermentų aktyvumas. Daugėjant ROS ląstelėje, gali vykti ir antioksidantinių fermentų slopinimas. Todėl, analizuojant cheminių medžiagų veikimo pobūdį *V. fischeri* bakterijoms, ROS gamybos pokyčiai ląstelėse yra vertingas biožymuo.

#### **1.5.5. Ląstelių redukcinė geba ir šio metodo vertė švytinčiose bakterijose**

*V. fischeri* ląstelių redukcinės savybės. Bioluminescencijos reiškinio priklausomybė nuo redukuotų kofermentų NAD(P)H, FMNH<sub>2</sub> reiškia, kad *V. fischeri* ląstelės gali turėti žymią redukcinę gebą. Autoriai teigia, kad *V. fischeri* ląstelių bioluminescencijos reakcija neutralizuoja tiek oksidacinį stresą, tiek redukuojančių ekvivalentų perteklių (Bose et al., 2007). Kvėpavimo grandinės fermentų centrų išotininimas redukuotais ekvivalentais yra susijęs su dideliu membranos potencialu (Skulachev, 1998; Schönfeld ir Wojtczak, 2007), be to, tik tada kai kvėpavimo grandinė yra prisotinta redukuotais ekvivalentais, jie pasiekia ir liuciferazę (Bourgois et al., 2001).

Nustatyta, kad *V. fischeri* geba redukuoti Cr<sup>6+</sup> iki Cr<sup>3+</sup> per 3-4 dienas, ir išskiria neidentifikuotas nebaltymines redukuojančias medžiagas (Fulladosa et al., 2006). Taip pat yra žinoma, kad *V. fischeri* ląstelės turi redukuojančių fermentų, pvz., trimetilamino N-oksido reduktazes (Dunn ir Stabb, 2008), ir kad *V. harveyi* nitroreduktazė atlieka chromato reduktazės funkcijas (Kwak et al., 2003). Gamtinėmis sąlygomis *V. harveyi* dumblių mikrosporinų amino rūgštis gali paversti redukuojančiais junginiais, pvz., 4-deoksigidusoliu (Shick ir Dunlap, 2002). Tirpioje *Vibrio anguillarum* bakterijų frakcijoje nustatyta nuo NADH priklausoma geležies reduktazė, kuri geba redukuoti įvairius

geležies kompleksus, pvz., geležies citratą, geležies-EDTA kompleksą, geležies chloridą, ir, matyt, šio fermento funkcija yra redukuotos geležies formos išlaisvinimas iš stabilių  $Fe^{3+}$  kompleksų su sideroforais (natūraliais geležies kompleksadariais) (Hasanuzzaman ir Araki, 2001).

Atsižvelgiant į šiuos eksperimentinius duomenis, yra tikimybė, kad *V. fischeri* gali turėti redukcinę gebą arba tam tikras fermentines redukuotus ekvivalentus gaminančias sistemas, indukuojamas tokių bioluminescencijos slopiklių, kurie gali dalyvauti oksidoredukcinėse reakcijose.

Aplinkos mikrobiologijoje naudojamas mikroorganizmų dehidrogenazių aktyvumo nustatymo metodas, kuris paremtas tetrazolio druskų (pvz., (2-(p-jodofenil)-3-(p-nitrofenil)-5-feniltetrazolio chlorido (JNT) (Lopez et al., 1986) trifeniltetrazolio chlorido (TTC) (Gabbita ir Hang, 1984) redukcija iki intensyvios spalvos formazano. Šis metodas yra taikomas mikroorganizmų aktyvumo nustatymui paviršiniuose vandenyse, dirvožemio ir sedimentų mėginiuose, viršutiniuose sedimentų sluoksniuose, bioplėvelėse ir veikliajame dumble (Maier et al., 2009). Tačiau šis metodas turi trūkumų, nes yra jautrus daugeliui slopiklių, o spalvinė reakcija yra lėta ir trunka nuo 1 iki 12 val. (Maier et al., 2009). Todėl šis redukcinio aktyvumo testas, šalia trumpalaikio bioluminescencijos gesimo tyrimo, nėra tinkamas *V. fischeri* bakterijų dehidrogenazių aktyvumo analizei iki 1 val. Veikliojo dumblo, sedimentų mikroorganizmų dehidrogenazių aktyvumas taip pat yra nustatomas remiantis rezazurino (7-hidroksi-3H-fenoksazin-3-1-10-oksido), mėlynos spalvos nefluorescuojančio junginio, redukcija iki rausvos spalvos fluorescuojančio junginio rezorufino (Liu, 1986). Ši spalvinė reakcija trunka iki 20 min. ir galėtų būti taikoma *V. fischeri* bakterijoms.

Vienas iš populiariausių eukariotinių ląstelių redukcinės gebos nustatymo metodų yra FRAP (angl. k. ferric reducing ability of plasma as “antioxidant power“) metodas, kuris taikomas kraujo plazmos tyrimuose, ir šis greitas (4-15 min.) metodas paremtas plazmos geba redukuoti geležį (Benzie ir Strain, 1996). Galima pažymėti, kad FRAP tyrimas yra netiesioginis bendrosios antioksidantinės gebos testas, kuris jautrus tiek gryniems, tiek plazmoje



esantiems antioksidantiems junginiams (pvz.,  $\alpha$ -tokoferoliui, askorbo rūgščiai, šlapimo rūgščiai ir kt.) (Benzie ir Strain, 1996), tačiau nejautrus –SH grupes turintiems antioksidantinės sistemos komponentams (pvz., fermentų cisteinui, glutationui) (Prior ir Cao, 1999). Be to, FRAP duomenys serumo pavyzdžiuose statistiškai reikšmingai koreliuoja su deguonies (arba prooksidantų – peroksilo, hidroksilo) radikalų sugerties geba (ORAC – angl. k. Oxygen radical absorbance capacity) (Prior ir Cao, 1999). Taigi, FRAP metodas gali būti tinkamas prokariotinių *V. fischeri* ląstelių redukcinės gebos įvertinimui.

### **1.5.6. Bioluminescencijos komplekso *in vitro* fermentų sistemos struktūra bei slopikliai**

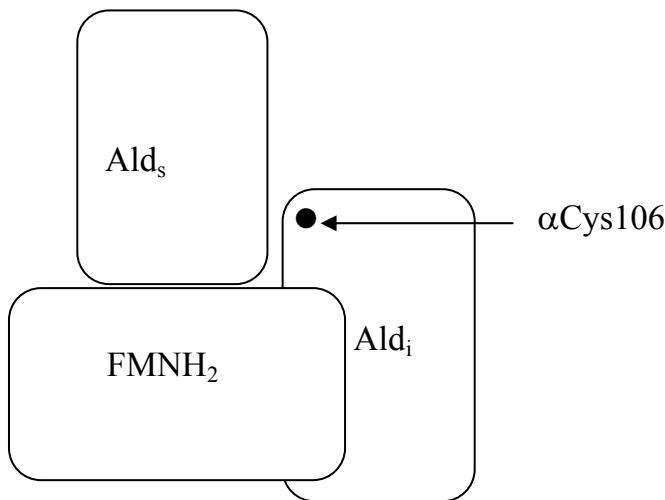
Žinoma, kad švytėjimą katalizuoja fermentų liuciferazės (LuxAB) ir NAD(P)H:FMN oksidoreduktazės (FMN reduktazės, Lux G) kompleksas, kurio substratai yra ilgagrاندžiai alifatiniai aldehidai (pvz., dekanalis), flavinmononukleotidas ir NAD(P)H (Jeffers et al., 2002). Imunocitocheminio žymėjimo auksu metodu nustatyta, kad liuciferazė yra prisijungusi prie *V. fischeri* bakterijų vidinės membranos (Angell et al., 1989).

#### **1.5.6.1. Liuciferazės struktūra ir jos katalizuojama reakcija**

Šiuo metu žinoma, kad bakterinė liuciferazė yra heterodimerinis fermentas, turintis skirtingus vieną  $\alpha$  ir du  $\beta$  subvienetus (Francisco et al., 1993). Švytinčių bakterijų *V. harveyi* ir *V. fischeri* liuciferazės laikomos homologiškomis, nes jų  $\alpha$  subvienetų amino rūgščių seka identiška 63%, o  $\beta$  subvienetų – 52% (Foran, Brown, 1988). Bakterinės liuciferazės struktūra literatūroje nagrinėjama daugiau tirtos rūšies *V. harveyi* duomenų pagrindu. Tiriant *V. harveyi* liuciferazę nustatyta, kad  $\alpha\beta$  liuciferazės dimeras turi 14 cisteino radikalų: aštuonis  $\alpha$  subvienete ir šešis  $\beta$  subvienete.  $\alpha$ Cys106 liekana liuciferazės  $\alpha$  subvienete yra atsakinga už aldehido surišimą slopinimo centre (Lin et al., 2002). Tarp visų *V. harveyi* liuciferazėje esančių keturiolikos cisteino liekanų tik viena  $\alpha$ Cys106 jungiasi su įvairiais chemiškai modifikuojančiais agentais (Nicoli et al., 1974; Lin et al., 2002). Izoliuoti

subvienetai yra atsparesni –SH grupės slopinimui naudojant tripsiną ir N-etilmaleimidą, nei gryna liuciferazė (Choi et al., 1995). Šie faktai leidžia manyti, kad –SH grupė yra aktyviajame liuciferazės centre.

*Aktyvieji centrai.* Atskiri subvienetai išlaiko gryno fermento aktyviojo centro katalitines savybes, bet jų specifinis aktyvumas šimtą tūkstančių ( $10^5$ ) kartų mažesnis (Choi et al., 1995). Izoliuoti liuciferazės subvienetai turi dvi aldehido surišimo vietas: aldehido kaip substrato surišimo vietą ir jo kaip slopiklio surišimo (alosterinio reguliavimo) vietą bei flavino surišimo centrą (1.2 pav.) (Lei et al., 1994; Choi et al., 1995). Teigiama, kad  $\alpha$ Cys106 liekanos –SH grupė, aldehido bei FMNH<sub>2</sub> surišimo vietos išsidėsčiusios labai arti viena kitos (Lei et al., 1994). Susijungę į globules liuciferazės  $\alpha$  ir  $\beta$  subvienetai sudaro vieną aktyvų centrą liuciferazėje šių subvienetų sąlytyje (Lei et al., 1994; Choi et al., 1995).



**1.2 pav.** Tikėtina  $\alpha$ Cys106, FMNH<sub>2</sub> ir dviejų aldehido surišimo (Ald<sub>s</sub> ir Ald<sub>i</sub>) vietų santykinė padėtis (Lei et al., 1994; Choi et al., 1995).

*Aldehido surišimo vietas.* Grynoje liuciferazėje, kaip ir izoliuotuose fermento subvienetuose, yra dvi aldehido surišimo vietos. Aldehidas gali jungtis prie aldehido kaip substrato ir juo slopinamo centro vietų, atitinkamai. Aldehidu slopinamame centre yra  $\alpha$ Cys106 radikalas (Lei et al., 1994). Dvi *n*-dekanolio surišimo vietos (substrato ir slopiklio vieta, su dideliu ir mažu

giminingumu, atitinkamai) ir žinios apie jų struktūrą rodytų alosterinės slopinimo vietos buvimą ir abiejų centrų jautrumą –SH grupių slopikliams (oksidatoriams).

*Flavino surišimo vieta.* FMNH<sub>2</sub> surišimo vieta yra arti aldehidu slopinamos vietos, tačiau su ja nepersidengia (Lei et al., 1994). Flavino-liuciferazės binariniame komplekse flavino izoaloksazino žiedas tiesiogiai liečiasi su αCys106 liekanos sulfhidriline grupe (Lin et al., 2002). αCys106 liekanos sulfhidrilinės grupės išsidėstymas šalia Ala74-Ala75 peptidinės jungties yra būtinas taisyklingam flavino prisijungimui prie liuciferazės aktyviojo centro, kad susidarytų stabilus – 4a-hidroperoksiflavino (antrasis tarpinis junginys žiūrėti 1.3 pav.) galintis prisijungti aldehidą, susidarant organiniam peroksidui (trečiasis tarpinis junginys), kurio skilimas duoda šviesos kvantą (Lin et al., 2002). Tiriant izoliuotus liuciferazės subvienetus nustatyta, kad α subvienetas turi  $8,4 \times 10^9 \text{ q s}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  savitąjį aktyvumą (kvantinę išėigą) redukuotam flavinui ir  $K_m - \text{FMNH}_2$  yra  $0,15 \mu\text{M}$ , tuo tarpu β subvienetas turi  $1,1 \times 10^9 \text{ q s}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  savitąjį aktyvumą redukuotam flavinui ir  $K_m - \text{FMNH}_2$  yra  $0,58 \mu\text{M}$  (Choi et al., 1995). Redukuoto flavinmononukleotido (FMNH<sub>2</sub>) Michaelis-Menten konstanta ( $K_m$ ) α subvienete yra mažesnė nei β subvienete, t.y. reikalingos mažesnės FMNH<sub>2</sub> koncentracijos, kad α subvieneto katalizuojamos reakcijos greitis taptų lygus pusei maksimalaus. Didesnė kvantinė išėiga ir  $K_m$  patvirtina, kad α subvienetas yra aktyvesnis už β subvienetą.

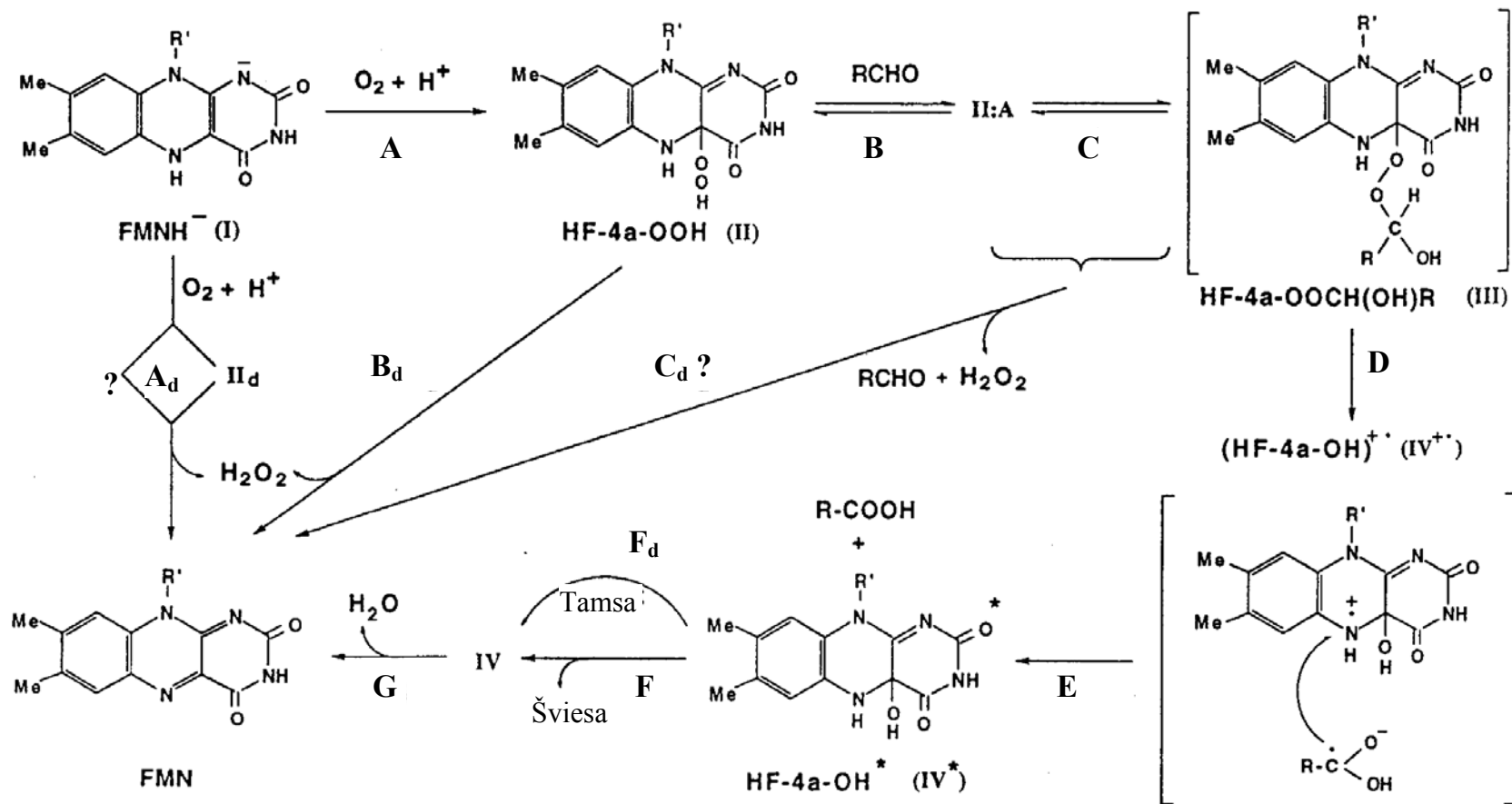
*Nestruktūrizuota kilpa α subvienete.* *V. harveyi* liuciferazės α subvienete tarp 257-291 amino rūgščių liekanų yra nestruktūrizuotos, atsparios proteolizei kilpos zona. Manoma, kad ši kilpa atlieka judrių vartų vaidmenį, apgaubdama pirmąjį bioluminescencijos tarpinį junginį ir apsaugodama jį nuo savaiminės oksidacijos terpėje esančiu deguonimi (Low ir Tu, 2002).

*Amino rūgščių liekanų funkcinės grupės svarbios katalitiniam liuciferazės aktyvumui.* Eksperimentiškai įrodyta, kad keturios fenilalanino (αPhe46, αPhe49, αPhe114, αPhe117) liekanos liuciferazėje yra svarbios FMNH<sub>2</sub>

surišimui; *n*-dekanolio oksidacijai, II-ojo tarpinio junginio (HF-4a-OOH, žiūr. 1.3 pav.) susidarymui; liuciferazės maksimaliam reakcijos greičiui,  $V_{max}$  (Li ir Tu, 2005). Cisteino ( $\alpha$ Cys106) liekana apsaugo nuo tamsinio II-ojo tarpinio produkto skilimo ir/arba FMNH<sub>2</sub> netekimo ir yra reikalinga aldehido substrato surišimui (Fried ir Tu, 1984; Abu-Soud et al., 1993). Histidino ( $\alpha$ His 45), triptofano ( $\alpha$ Trp250) bei lizino (Lys283, Lys286) funkcinės grupės nestruktūrizuotoje judrioje kilpoje dalyvauja II-ojo tarpinio junginio natūraliame stabilizavime (Li ir Meighen, 1995; Li et al., 1999; Campbell ir Baldwin, 2009). Glicino ( $\alpha$ Gly275) ir fenilalanino ( $\alpha$ Phe261) liekanos nestruktūrizuotoje kilpoje svarbios II-ojo tarpinio junginio tamsinio skilimo greičio sumažinimui (Low ir Tu, 2002).

Kadangi liuciferazės fermento aktyvumui yra svarbios hidrofobinės ir hidrofobinės-polinės amino rūgštys (Cys, His, Trp, Gly, Phe), jos gali nurodyti hidrofobinių arba hidrofobinių-polinių slopiklių veikimo vietas, o  $\alpha$ Cys106 buvimas liuciferazės aktyviajame centre – galimą ypatingą jautrumą –SH grupių slopikliams.

*Liuciferazės katalizuojama reakcija.* Bakterinė liuciferazė katalizuoja substratų – redukuoto flavino mononukleotido (FMNH<sub>2</sub>) ir alifatinio aldehido (RCHO) – oksidaciją deguonimi, susidarant karboksi rūgščiai, FMN, vandeniui ir mėlynai-žaliai šviesai (Francisco et al., 1993; Choi et al., 1995). Žinoma, kad gamtinis liuciferazės substratas yra *n*-tetradekanolis (Meighen, 1988), tačiau dėl nestabilumo ir mažo tirpumo paprastai eksperimentuose yra naudojamas retai (Hastings et al., 1978).



1.3 pav. Liuciferazės katalizuojamos reakcijos schema ir susidarantys tarpiniai junginiai (Tu ir Mager, 1995)

Paveiksle 1.1 pristatėme pagrindinius bioluminescencijos reakcijai svarbius fermentus, o šioje 1.3 paveikslo schemoje pateikiame pagrindinius nustatytus ir pasiūlytus ( $A_d$ ,  $C_d$ ) šviesos susidarymo bei tamsinius kelius bakterinės liuciferazės katalizuojamoje reakcijoje. Pirminėje reakcijoje (A) liuciferazė, prisijungusi N1-deprotonizuotą FMNH<sup>-</sup> (I-ąjį tarpinį junginį), reaguoja su deguonimi, sudarydama 4a-hidroperoksilFMNH, II-ąjį tarpinį junginį (HF-4a-OOH). Kai aplinkoje yra aldehidas, susidaro HF-4a-OOH ·aldehido kompleksas (II:A) (B reakcija), kuris transformuojamas į 4a-peroksihemiactalioFMNH III-ąjį tarpinį junginį (HF-4a-OOCH(OH)R). Sekančiu etapu (D reakcija) susidaro vienu elektronu redukuotos karboksirūgšties radikalas (R-C[OH]O<sup>-</sup>) ir naujas 4a-hidroksilFMNH radikalas (HF-4a-OH)<sup>-</sup> (IV<sup>-</sup> tarpinis junginys). Būdamas stiprus reduktorius vienu elektronu redukuotos karboksirūgšties radikalas atiduoda vieną elektroną (HF-4a-OH)<sup>-</sup> radikalui, sudarydamas karboksirūgštį ir šviesos šaltinį – sužadinto būvio 4a-hidroksilFMNH IV\* tarpinį junginį (HF-4a-OH\*). 4a-HidroksilFMNH IV\* tarpinis junginys išspinduliuoja šviesą (F), ir IV-ojo junginio dehidratacija, susidarant H<sub>2</sub>O ir FMN (G), užbaigia visą bioluminescencijos reakcijos kelią (Tu ir Mager, 1995).

#### **1.5.6.2. NAD(P)H:FMN oksidoreduktazės struktūra ir jos katalizuojama reakcija**

*FMNH<sub>2</sub> tiekimas.* Liuminescencijos reakcijai vykti būtinas FMNH<sub>2</sub> susidaro fermento NAD(P)H:FMN oksidoreduktazės (flavino reduktazės) katalizuojamos reakcijos metu (Inouye, 1994). *V. fischeri* bakterijose identifikuoti du NAD(P)H:FMN oksidoreduktazės tipai: 1) didžioji FMN reduktazė (FRazė I) (Duane ir Hastings, 1975); ir, 2) į *Escherichia coli* bakterijose randamą flavino reduktazę (Fre) panaši reduktazė (Zenno ir Saigo, 1994). Nors abiejų tipų reduktazės gali tiekti FMNH<sub>2</sub> liuciferazės reakcijai (Zenno ir Saigo, 1994; Zenno et al., 1994), manoma, kad FRazė I yra svarbiausia (Hastings et al., 1985). Be to, FRazė I sudaro >90% visų flavino reduktazių grubiame fermentų ekstrakte (Zenno et al., 1994). FRazė I, 26 kDa

baltymas, funkcionuojantis kaip homodimeras, kur subvienetui tenka vienas FMN (Zenno et al., 1994; Koike et al., 1998). Kiekvienas subvienetas gali būti padalintas į du domenų. Didysis šerdies domenas sudarytas iš 2–89 ir 135–218 amino rūgščių liekanų, o mažąjį lankstųjį domeną sudaro 90–134 amino rūgščių liekanos. Verta pabrėžti, kad FRazė I turi tik tris cisteinus jos 218 amino rūgščių sekoje (Koike et al., 1998).

*FMN jungimosi vieta.* Žinoma, kad FMN izoaloksazino žiedo azoto ir deguonies atomai sudaro penkias vandenilines jungtis su baltymo amino rūgščių Lys16, Asn73, Glu165, Gly166 azoto ir deguonies atomais. Reakcijai vykti reikalinga vandens molekulė sudaro vandenilines jungtis tarp His76, Asn73 ir flavino žiedo. Visi fosfato deguonies atomai sudaro vandenilines jungtis su amino rūgščių Thr14, Arg12, ir Lys206 amidine grupe. FMN ribitilo hidroksilo dalis sudaro vieną vandenilinę jungtį su Thr14 deguonies atomu (Koike et al., 1998).

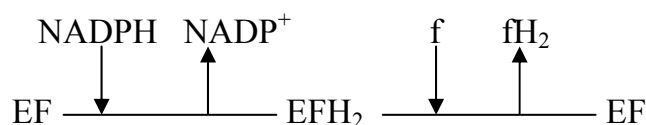
*NAD(P)H jungimosi vieta.* Remiantis *V. fischeri* NAD(P)H:FMN oksidoreduktazės kristalinės struktūros pokyčių, naudojant NAD(P)H struktūrinį analogą dikumarolį, analizės duomenimis autoriai teigia, kad NAD(P)H jungimosi vieta yra tarp kofaktoriaus FMN ir Phe124 (Koike et al., 1998). Ser42, Ile43, Lys16, Phe72, Glu165, ir Gly166 sąveikauja su dikumaroliu, todėl pagal struktūros analogiją šios amino rūgštys galėtų taip pat sąveikauti su NAD(P)H (Koike et al., 1998).

*FRazės I katalizuojama reakcija.* Žinoma, kad FRazė I yra nespecifiška substratui, ir FMN redukcijai gali naudoti tiek NADPH, tiek NADH (Duane ir Hastings, 1975). FRazės I katalizuojama reakcija:



Remiantis NAD(P)H:FMN oksidoreduktazės reakcijos kinetinėmis tyrimais, stacionariomis (pusiausvyrinės būsenos) sąlygomis, manoma, kad reakcija yra ping-pong tipo (1.4 pav.), kur pirmoje reakcijos dalyje NAD(P)H

redukuoja prie fermento prisijungusį FMN, ir antroje reakcijos dalyje produktas (redukuotas FMN) atsiskiria nuo fermento (Lei ir Tu, 1998).

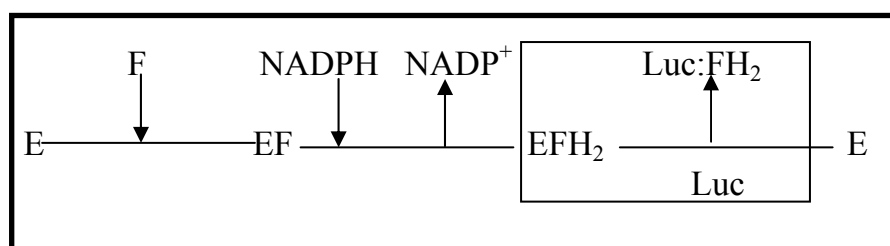


**1.4 pav.** *Vibrio harveyi* flavino reduktazės P katalizuojamos reakcijos schema, kur E yra apofementas, F ir FH<sub>2</sub> oksiduoto ir redukuoto flavino kofaktorius, atitinkamai, f ir fH<sub>2</sub> oksiduoto flavino substratas ir redukuoto flavino substratas, atitinkamai.

Tiriant *V. harveyi* flavinreduktazės P (FRP) reakciją nustatyta, kad pirmoji reakcijos dalis yra grįžtama, ir todėl liuciferazės substrato (FMNH<sub>2</sub>) susidarymą gali lemti NADP<sup>+</sup> ir NADPH koncentracija ląstelėje (Tu, 2008).

Kadangi NAD(P)H:FMN oksidoreduktazės produktas FMNH<sub>2</sub> deguoninėje aplinkoje nestabilus, slopiklių poveikis NAD(P)H:FMN oksidoreduktazės aktyvumui gali būti vertinamas matuojant NADH sugerties (340 nm) pokyčius.

*NAD(P)H:FMN oksidoreduktazės ir liuciferazės kompleksas.* Nustatyta, kad *V. harveyi* liuciferazė ir NADPH:FMN oksidoreduktazės (flavino reduktazės P, FRP) monomeras sudaro kompleksą *in vivo* ir *in vitro* (Jeffers et al., 2003; Low ir Tu, 2003; Tu, 2008.).



**1.5 pav.** Bakterinės NAD(P)H:FMN oksidoreduktazės (E) ir liuciferazės (Luc) komplekso schema. E yra apofementas, F ir FH<sub>2</sub> oksiduoto ir redukuoto flavino kofaktorius (Jeffers et al., 2003; Low ir Tu, 2003).

Teigiama, kad šiame komplekse NAD(P)H:FMN oksidoreduktazės monomero apofermentas prisijungia liuciferazės reakcijos metu susidariusį



FMN, tapdamas holofermentu (1.5 pav.). Holofermentas paima du elektronus iš NAD(P)H ir susidareęs fermento-redukuoto flavino kompleksas jungiasi su liuciferaze. Komplekse flavino reduktazė atiduoda redukuotą flaviną tiesiogiai liuciferazei, taip apsaugodama redukuotą flaviną nuo cheminės oksidacijos (Jeffers et al., 2003). Šiame komplekse bakterinė liuciferazė yra žymiai didesnis fermentas nei NAD(P)H:FMN oksidoreduktazė, ir jos koncentracija ląstelėje yra žymiai didesnė. Nustatyta, kad optimalaus švytėjimo sąlygomis *V. harveyi* ląstelėse yra 170  $\mu\text{M}$  liuciferazės (mol. sv. 80 kDa) ir 3  $\mu\text{M}$  NAD(P)H:FMN oksidoreduktazės (mol. sv. 26 kDa) (Jeffers et al., 2003; <http://www.brenda-enzymes.org>).

### 1.5.6.3. Bioluminescencijos komplekso *in vitro* fermentų slopikliai

Pagal veikimo pobūdį galima išskirti dviejų tipų liuciferazės slopiklius, t.y. konkurencinius ir bekonkurencinius. Konkurencinio slopinimo atveju slopikliai konkuruoja su aldehidu arba su FMNH<sub>2</sub>. Bekonkurencinio slopinimo atveju stebimas slopiklių poveikis liuciferazės reakcijos II-ojo tarpinio junginio susidarymui bei skilimui.

*Slopikliai, konkuruojantys su aldehidu.* Tai – hidrofobiniai anestetikai (ciklopropanas, dietileteris, chloroformas, halotanas, metoksifluoranas), ilgagrandžiai alifatiniai junginiai (dialkilsulfidai), su fermentų sulfhidrilinėmis grupėmis reaguojantys junginiai (N-etilmaleinimidas, jodacetamidas, anhidridai) (Данилов и Егоров, 1990). Kitų autorių kinetiniai tyrimai patvirtina, kad hidrofobiniai anestetikai konkurentiškai veikia aldehido atžvilgiu, kai naudojamos mažos (1–4  $\mu\text{M}$ ) substrato koncentracijos (Curry et al., 1990). Taip pat yra duomenų apie –SH grupių slopinimą. Tarp visų *V. harveyi* liuciferazėje esančių keturiolikos cisteino liekanų tik  $\alpha\text{Cys106}$  liekanos –SH grupė jungiasi su įvairiais chemiškai modifikuojančiais agentais (Lin et al., 2002).

*Slopikliai, konkuruojantys su FMNH<sub>2</sub>.* Liuciferazės aktyvumo slopinimas methemoglobinu, citochromu c, menadionu yra aiškinamas kaip šių junginių konkurencinis slopinimas, konkuruojant dėl FMNH<sub>2</sub> surišimo vietos liuciferazėje (Inouye, 1994).

*Slopiklių poveikis II-ojo tarpinio liuciferazės reakcijos junginio susidarymui ir skilimui.* Nustatyta, kad bendrieji anestetikai (*n*-alkil slopikliai) veikia bekonkurentiškai, t.y. jungiasi prie fermento-substrato kompleksų (I-ojo ir II-ojo tarpinio junginio) ir mažina II-ojo tarpinio junginio susidarymo ir skilimo greitį, atitinkamai (Curry et al., 1990; Francisco et al., 1993). Naudojant sustabdytos srovės (angl. k. Stopped Flow) metodą, nustatyta, kad *n*-alkil karboksi rūgštys, *n*-alkil alkoholiai, *n*-alkil aminorai ir *n*-alkil boro rūgštys sumažina II-ojo bioluminescencijos tarpinio junginio (380 nm) susidarymo greitį (Francisco et al., 1993). Manoma, kad tokį poveikį lemia trinario E·FMNH<sub>2</sub>·slopiklio komplekso susidarymas. II-ojo tarpinio junginio susidarymo greičio konstanta priklauso nuo naudojamo slopiklio. *n*-Alkil slopikliai 2–4 kartus sumažina II-ojo tarpinio junginio susidarymo greitį. Alkoholiai pasižymi didžiausiu poveikiu, o karboksi rūgštys turi mažiausią įtaką II-ojo tarpinio junginio susidarymo greičiui. Pastebėta, kad, ilgėjant anglies atomų grandinei, slopinantis poveikis liuciferazės reakcijai didėja (Francisco et al., 1993).

Be to autoriai teigia, kad aldehydų struktūriniai analogai (aminai, alkoholiai, karboksi rūgštys, boro rūgštys, ir trifluormetilo ketonai) sudaro E·FMNOOH·slopiklio kompleksą, kuris lėtai skyla iki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ir FMN (445 nm). Kadangi II-ojo tarpinio junginio skilimas yra stabilizuojamas komplekse su slopiklio molekule, liuciferazės reakcijos greitis yra apsprendžiamas E·FMNOOH·slopiklio komplekso tamsinio skilimo iki FMN ir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> greičiu (Curry et al., 1990; Francisco et al., 1993).

*NAD(P)H:FMN oksidoreduktazės slopikliai.* Remiantis turimais duomenimis apie NAD(P)H:FMN oksidoreduktazės slopiklius, galime teigti, kad šio fermento aktyvumas gali būti slopinimas konkurenciniu būdu, ypač kai slopikliai konkuruoja su NAD(P)H substratu (pvz., dikumarolis) (Koike et al., 1998), arba su FMN (pvz., chinonai) (Vetrova et al., 2007).

Taigi, remiantis duomenimis apie bioluminescencijos komplekso struktūrą bei žinomus slopiklius, galima teigti, kad NAD(P)H:FMN oksidoreduktazės ir liuciferazės aktyvieji centrai tam tikroje vietoje pajėgūs

prisijungti hidrofobinius ir hidrofobinis-polinis junginius (substratus, substratų struktūrinius analogus, slopiklius), ir yra didelė konkurencinio (specifinio) ir bekonkurencinio (katalitinio) liuciferazės ir NAD(P)H:FMN oksidoreduktazės slopinimo tipų galimybė. Todėl, analizuojant *V. fischeri* bioluminescencijos slopiklių (A, OR, S<sub>8</sub><sup>0</sup>) veikimo vietas, verta aiškintis konkurencinį slopiklių poveikį su substratais ir su kitais slopikliais *in vivo* ir *in vitro*.

### 1.5.7. Daugybinio toksiškumo tyrimų vertė švytinčiose bakterijose

Ekotoksikologijoje cheminių medžiagų toksiškumas *V. fischeri* bioluminescencijai paprastai yra vertinamas pagal jų sukeliama poveikio efektyvių koncentracijų (EC<sub>50</sub>) reikšmes. Remiantis QSAR metodologija, šios EC<sub>50</sub> reikšmės kartu su ksenobiotikų fizikinių-cheminių savybių parametrais (log *K*<sub>ow</sub>, p*K*<sub>a</sub>, molekulinio poliarinio paviršiaus plotu ir kt.) bei žiniomis apie jų veikimo mechanizmus kitose rūšyse yra naudojamos veikimo mechanizmų *V. fischeri* bakterijose prognozavimui (sk. 1.4.1.). Todėl dažniausiai vienos struktūrinės klasės junginiai priskiriami to paties veikimo būdo (angl. k. mode of action) medžiagų grupei (Rand, 1995). Šios grupės pasižymi tais pačiais fiziologiniais ir elgesio efektais ar net tokiu pačiu veikimo mechanizmu, t.y. tokia pačia toksikokinetika (įskaitant ir biotransformaciją) organizme/audinyje (McCarty ir Borgert, 2006). Tačiau EC<sub>50</sub> reikšmės vienai – bioluminescencijos – funkcijai neatspindi kitų efektų *V. fischeri* bakterijose, kurie gali būti sukelti mažesnėmis arba didesnėmis negu EC<sub>50</sub> koncentracijomis. Pavyzdžiui, PCB atveju mažas bioluminescencijos *in vivo* jautrumas (išreikštas EC<sub>50</sub>) dar nereiškia, kad PCB nepažeidžia membranų laidumo ar neslopina membraninių oksidoredukcinių fermentų aktyvumo.

Pripažįstama, kad cheminių medžiagų mišinių toksiškumo *V. fischeri* bakterijoms visapusiškai/kokybiškai analizei trūksta žinių apie individualių mišinio komponentų veikimo būdą. Paprastai, stambios cheminių medžiagų klasės priskiriamos narkotikams (poliniams, nepoliniams, monoesteriniams), oksidacinio fosforilinimo skyrikliams, kvėpavimo slopikliams, reaktyviosioms medžiagoms (silpniems ir stipriems elektrofilams, nespecifiškai

reaguojantiems su tam tikromis cheminėmis struktūromis biomolekulėse ir veikiantiems specifiniu negrįžtamu elektro(nukleo)filiniu mechanizmu) ir kt. (Verhaar et al., 2000; Dawson et al., 2006). Tačiau nesigilinama į galimą tų pačių medžiagų daugybinį veikimą, esant skirtingoms jų koncentracijoms. Dėl šios priežasties susiduriama su sunkumais nustatant tikslesnius toksikodinaminius mišinio komponentų veikimo būdus (antagonistinis, adityvus, sinergistinis) bei parenkant tinkamą modelį (pvz., CA ar IA) toksiškumo prognozei (sk. 1.4.2.). Taigi, daugybinio toksiškumo tyrimų analizė, naudojant *V. fischeri* bakterijas, gali paremti statistines toksikodinaminio pobūdžio bei toksiškumo prognozavimo modelių interpretacijas.

Šioje literatūros apžvalgoje (sk. 1.5.2. ir 1.5.6.6) akcentuota, kad *V. fischeri* ląstelių bioluminescencija, kaip ir kvėpavimo grandinės fermentų aktyvumą *in vivo*, sąlygoja NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup> koncentracijų santykis ląstelėje. Vertos dėmesio bioluminescencijos komplekso *in vivo* fermentų funkcionavimo sąlygos – elektronai patenka į šią metabolinę atšaką tik tada, kai jais yra išotinta kvėpavimo fermentų grandinė (sk. 1.5.2.). Todėl ksenobiotikai NAD(P)H kiekio reguliuojamose membranose gali veikti šiuos tarpusavyje susijusius procesus: deguonies sunaudojimo reakcijas (sk. 1.5.2.); elektrocheminį jonų gradiento susidarymą (sk. 1.5.3.); ir nuo NAD(P)H kiekio priklausomų bioluminescencijos komplekso fermentų reakcijas (sk. 1.5.6.). Taigi, kvėpavimo grandinės ir nuo liuciferazės priklausomo deguonies sunaudojimo tyrimai, bei membranos potencialo pokyčių analizė, greta bakterijų švytėjimo, gali atskleisti individualių cheminių medžiagų poveikio vietas ar jų kaitą kvėpavimo grandinės ir bioluminescencijos komplekso fermentų sistemose.

Dažniausiai hidrofobinių ksenobiotikų sukeltos pažeidimai biologinėse membranose yra siejami su ROS susidarymu membraninių oksidoredukcinių fermentų grandinėje (sk. 1.5.4.). Tačiau tokių integralinių procesų, kaip ROS susidarymo, tyrimų rezultatai įgauna didesnę vertę jei jie paremiami kitų oksidoredukcinių rodiklių (pvz., ląstelių redukcinės gebos, atskirų

oksidoredukcinų fermentų aktyvumo) analize. Taigi, redukcinės gebos ir jos kitimo laiko bėgyje nustatymas (sk. 1.5.5.) *V. fischeri* bakterijose gali būti naudingas papildomas ksenobiotiko(ų) oksidoredukcinės biotransformacijos žymuo.

Ksenobiotikų poveikis bioluminescencijos komplekso fermentų aktyvumui apima NAD(P)H:FMN oksidoreduktazės ir liuciferazės reakcijas. Remiantis literatūros duomenimis, galima teigti, kad slopiklių su substratais ar su kitais slopikliais kombinuoto poveikio bioluminescencijai *in vivo* ir *in vitro* analizė bei slopiklių poveikio liuciferazės ir NAD(P)H:FMN oksidoreduktazės aktyvumui *in vitro* tyrimai yra naudingi, siekiant išsiaiškinti slopiklių veikimo vietas bioluminescencijos komplekso fermentų aktyviajame centre ar alosterinėse vietose.

Taigi, slopiklių poveikio analizė *V. fischeri* bakterijų fermentų sistemų, oksidoredukcinų procesų *in vivo* bei atskirų fermentų lygmenyse leidžia tiksliau apibūdinti ksenobiotikų veikimo mechanizmus/būdus ar jų daugybinio pasireiškimo paveikslą, dominuojantį cheminių medžiagų ar jų mišinių toksikodinamikoje. Šiuo požiūriu *V. fischeri* organizmas, kuriame tiriamos oksidoredukcinų fermentų sistemos tiek integraliniame, tiek individualiame lygmenyse, yra patogus objektas cheminių medžiagų veikimo mechanizmų analizėms. Be to, *V. fischeri* biologinių funkcijų tyrimai turi privalumų yra greiti, ekonomiškai bei tausojantys biologines rūšis. Rezultatai, gauti fermentų sistemų (kvėpavimo grandinės, bioluminescencijos atšakos), integralinių pažaidų (ROS susidarymo), apsauginių funkcijų (redukcinės gebos) indukcijos, bioluminescencijos komplekso fermentų (konkurencinio ar alosterinio) slopinimo tyrimų lygmenyse gali sėkmingai papildyti toksikodinaminę mišinių poveikio bakterinei bioluminescencijai rezultatų interpretaciją.

## 2. MEDŽIAGOS IR METODAI

### 2.1. Medžiagos

#### 2.1.1. Biologinis objektas

Darbe buvo naudotas švytinčių bakterijų *Vibrio fischeri* NRRLB-11177 (standartinis Microtox<sup>®</sup>) padermė. Šis padermė įsigyta iš oficialios Amerikos tipo kultūros kolekcijos ATCC 7744 (angl. k. American Type Culture Collection) ir išlaikyta laboratorijoje nuo 1998 metų.

#### 2.1.2. Reagentai

Visi darbe naudoti cheminiai junginiai (substratai, slopikliai, redukuojantys agentai, reagentai, tirpikliai) aukščiausio grynumo (Sigma-Aldrich, JAV; Serva, JAV; Merck, Vokietija), ir elementinė siera cheminio analitinio grynumo, įsigyta iš Reachim (Rusija). Aroclor 1248 įsigytas iš Supelco (JAV). Druskos bakterijų kultivavimo terpėms įsigytos iš Serva (JAV) ir Roth (Vokietija). Cheminių medžiagų kamieniniai tirpalai ruošti etanolyje arba izopropanolyje (galutinė tirpiklio koncentracija sudarė iki 1% bendro reakcijos terpės tūrio). Auginimo ir reakcijų terpių paruošimui naudotas dejonizuotas vanduo.

#### 2.1.3. Terpės

*Skysta bakterijų auginimo terpė (BHB)*. NaCl – 30 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O – 9,45 g (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 4 g) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0,5 g, MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O – 0,3 g, triptonas – 5 g, mielių ekstraktas – 3 g, glicerolis 50% - 5 ml, dejonizuotas vanduo iki 1 L, pH 7,0.

*Agarizuota bakterijų auginimo terpė (BHA)*. Sudėtis tokia pati kaip BHB, ir papildomai pridedamas “Bacto” agaras – 18 g/L.

Terpės autoklavuojamos 1 atm. slėgyje 20 min. Glicerolio ir MgSO<sub>4</sub> tirpalai autoklavuojami atskirai 0,5 atm. slėgyje 20 min. ir pridedami į skystą terpę (iki reikiamos koncentracijos) prieš mikroorganizmų kultivavimą.

## 2.2. Metodai

### 2.2.1. Švytinčių bakterijų *V. fischeri* auginimas ir suspensijos paruošimas

Kultūros patikrinimui (ar išgryninimui) iš gerai šviečiančio bakterijų gazono agarų paviršiuje paruošiama suspensija, kuri įvairiai praskiedus, išsėjama ant agarizuotos terpės Petri lėkštelėse. Lėkštelės inkubuojamos kambario temperatūroje 2-3 dienas. Geriausiai šviečiančios 4-5 kolonijos užsėjamos į kolbas su 10 ml BHB terpės ir auginamos aeruojant purtyklėje +25°C temperatūroje. Bakterijos auginamos iki liuminescencijos (liumi) ir optinio tankio ( $OT_{590\text{ nm}}$ ) reikšmių santykis (liumi/OT) pasiekia  $1,5-1,8 \times 10^6$ . Išrenkamas mėginys su didžiausiu liumi/OT, iš jo imama steriliai 0,8 ml ir dedama į 4 Erlenmejerio kolbutes, kurių kiekvienoje yra 60 ml BHB terpės. Bakterijos inkubuojamos +25°C temperatūroje, purtant (180 apsis./min.). Praėjus 12 val. nuo auginimo pradžios pradedamas registruoti suspensijos optinis tankis ir liuminescencija. Matuojama kas 1 val., kol liumi/OT santykis nebekinta (ar didėja nežymiai). Kolbutės išimamos iš purtyklės, statomos į ledą ir vandens mišinį 15-20 min., po to centrifuguojamos 3200g pagreičiu 10 min. Į gautas nuosėdas pridedama krioprotektoriaus – 16% laktozės. Sumaišoma naudojant Vortex maišytuvą. Paruošta homogeniška suspensija išpilstoma į Ependorfo mėgintuvėlius po 0,5 ml. Mėgintuvėliai laikomi -80°C temperatūros šaldiklyje.

### 2.2.2. Švytinčių bakterijų *V. fischeri* bioluminescencijos (*in vivo*) įvertinimas

Pirmiausia *V. fischeri* bakterijų suspensija atšildoma, apie valandą laikant +4°C temperatūroje. Atšilusi suspensija praskiedžiama matavimo terpe 100 kartų, tokiu būdu gaunama darbinė suspensija ( $OT_{590} = 0,125$ ). Tikrinama jos liuminescencija: į liuminometro kiuvetę su 950 µl matavimo buferio (50 mM  $KH_2PO_4$ , 2% NaCl, pH 7,0) pilama 50 µl darbinės suspensijos, sumaišoma ir išmatuojama liuminescencija, kurios reikšmė turėtų būti 2000–4000 mV intervale, matuojant liuminometru Model 1250 (LKB-Wallac, Švedija).

Kadangi ką tik praskiestos suspensijos liuminescencija svyruoja, ji paliekama kambario temperatūroje 20–30 min. tam, kad stabilizuotųsi jos švytėjimas. Liuminescencijos matavimai atliekami taip: į liuminometro kiuvetes pilama po 940 µl matavimo buferio, 50 µl darbinės bakterijų suspensijos ir 10 µl slopiklio tirpalo arba dviejų slopiklių mišinio (1:1) (kontrolinėje kiuvetėje – 10 µl tirpiklio: izopropanolio, etanolio ar buferio). Galutinė ląstelių koncentracija kiuvetėje siekia apie  $0,5 \times 10^7$ /ml.

Liuminescencija matuojama po 5, 15, 30, 60 min. ląstelių inkubacijos su slopikliais arba jų mišiniais, atitinkamai, kambario temperatūroje. Matavimo trukmė iki 30 s. A, OR,  $S_8^0$  binarinių mišinių toksiškumo bioluminescencijai tyrimas atliktas pagal dviejų lygmenų pilno faktorinio eksperimento planą. Binariniuose mišiniuose buvo tiriamos šios cheminių medžiagų koncentracijos: A: 2,5 ir 5 mg/L; OR: 0,012 ir 0,195 mg/L;  $S_8^0$ : 0,027 ir 0,055 mg/L. *n*-dekanalis (Dek) į *V. fischeri* suspensiją buvo pridėdamas tik po A, OR, ar  $S_8^0$  individualių priedų, atitinkamai. Be to, -SH grupių apgynimas disulfidines jungtis redukuojančiu 1,4-ditiotreitoliu (DTT), buvo vertinamas DTT pridėdant po  $S_8^0$  arba N-etilmaleimido (NEM) priedo į *V. fischeri* bakterijų suspensiją. Liuminescencijos reikšmės tiriamosiose kiuvetėse lyginamos su kontroline ir apskaičiuojamas liuminescencijos slopinimas procentais nuo kontrolės. Reikėtų pažymėti, kad reakcijos terpėje (pH = 7,0), kurioje yra  $K^+$  ir  $Na^+$ , OR gali būti atitinkamos druskos pavidalu. *V. fischeri* bakterijų jautrumui įvertinti naudota palyginamoji medžiaga: 3,5-dichlorfenolis.

### **2.2.3. Beląstelinio NADH:FMN oksidoreduktazės-liuciferazės komplekso (*in vitro*) paruošimas**

Ruošiantis bandymui, *V. fischeri* bakterijos išimamos iš -80°C šaldiklio ir atšildomos +4°C temperatūroje, tai trunka apie 40-60 min. *V. fischeri* ląstelės skiedžiamos 14 kartų matavimo buferiu ir suspensija atsargiai sumaišoma. Gauta suspensija supilama į centrifuginį mėgintuvėlį ir centrifuguojama 15 min. 3200g pagreičiu. Gautos nuosėdos užpilamos 4 ml 100 mM  $KH_2PO_4$  buferiu (pH 7,0), laikoma šaldytuve (+4°C) 30 min. kol įvyks ląstelių lizė ir vėl



centrifuguojame 20 min. 4400g pagreičiu. Po centrifugavimo gautas skaidrus supernatantas (fermentų ekstraktas), laikomas leduose. Baltymo koncentracija išskirtame fermentų ekstrakte nustatyta naudojant Bredfordo metodą (Bredford, 1976).

#### **2.2.4. Bioluminescencijos *in vitro* pokyčių matavimas**

Bioluminescencijos *in vitro* matavimo terpė paruošta pagal Данилов ir Еропов (1990), ir pritaikyta liuminescencijos matavimams su mikroplokštelėmis. Liuminescencijos matavimai atlikti liuminometru/fluorimetru Fluoroscans Ascent (BioLab Systems, Helsinkis, Suomija).

Bendra fermentinės reakcijos mišinio sudėtis: 223  $\mu$ l 100 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7,0); 50  $\mu$ l fermentų ekstrakto (0,6 mg/ml baltymo), kuris inkubuotas su slopikliu ar jų mišiniu; 12  $\mu$ l NADH (7mg/ml buferyje), 12  $\mu$ l FMN (0,5 mg/ml buferyje), 3  $\mu$ l *n*-dekanolio (2 mg/ml etanolyje). Galutinės substratų koncentracijos: 280 mg/L (arba 400  $\mu$ M) NADH, 4 mg/L (arba 8,8  $\mu$ M) FMN, 2 mg/L (arba 13  $\mu$ M) *n*-dekanolio. Eksperimento metu: 1) 50  $\mu$ l fermentų ekstrakto (0,6 mg/ml baltymo) pridedama į 150  $\mu$ l mėginio (buferio ir kontrolės (etanolio), ar slopiklių, ar jų mišinių, atitinkamai) ir inkubuojama atitinkamai 5, 15, 30 min. kambario temperatūroje; ir, 2) liuciferazės aktyvumo matavimai pradami tuoj pat po substratų su likusiu buferio kiekiu įnešimo. Viskas gerai suplakama ir tuoj pat išmatuojama liuminescencija. Belastelinio fermentų ekstrakto švytėjimas kontroliniame mėginyje iki eksperimento pabaigos krito nedaug ir išlaikė 80% aktyvumą; tai patvirtino, kad bakterinės liuciferazės fermentas yra stabilus žemesnėje nei +35°C temperatūroje (<http://www.brenda-enzymes.org>). Fermentų ekstrakto liuminescencija kontroliniame mėginyje prilyginama 100% ir pagal ją lyginamas liuminescencijos intensyvumo pokytis procentais mėginiuose su slopikliais. Kalibracijos metu nustatyta, kad mažiausias bioluminescencijos lygis matuojama Fluoroscans'u yra visiškai palyginamas su liuminometru (LKB-Wallac, Švedija) nustatomais liuminescencijos vienetais. Mišinių toksiškumo

tyrimai atlikti pagal pilno faktorinio eksperimento planą, naudojant tokias slopiklių koncentracijas: 1) A: 2,5 ir 5 mg/L; 2) OR: 6,25 ir 12,5 mg/L; 3) S<sub>8</sub><sup>0</sup>: 0,55 ir 1,1 mg/L. Vertinant A, OR ir S<sub>8</sub><sup>0</sup> bei jų mišinių poveikį bioluminescencijai, galutinė baltymo koncentracija bioluminescencijos matavimo terpėje su substratais buvo 0,1 mg/ml. Sulfhidrilinių grupių slopinimo/apgynimo tyrimas *in vitro* atliktas fermentų ekstraktą 30 min. išlaikius su NEM arba S<sub>8</sub><sup>0</sup>, ar jų kombinacijomis su DTT. Pastaruoju atveju galutinė baltymo koncentracija buvo 0,05 mg/ml.

### **2.2.5. NADH oksidacijos NADH:FMN oksidoreduktazės-liuciferazės kompleksu *in vitro* pokyčių matavimas**

Pagal aukščiau aprašytą metodiką iš *V. fischeri* ląstelių paruoštas fermentų ekstraktas (*in vitro*) naudojamas NADH oksidacijos slopinimo įvertinimui. Naudojamos terpės, atitinkamos substratų koncentracijos, eksperimento eiga tokia pati, kaip ir bioluminescencijos slopinimo *in vitro* tyrimuose. Fermento ekstraktas veikiamas A, OR ir S<sub>8</sub><sup>0</sup> 5, 15 ir 30 min. kambario temperatūroje. NADH oksidacija pradedama matuoti tuojau po substratų pridėjimo. Kadangi eksperimento sąlygos buvo aerobinės, susidaręs reakcijos produktas FMNH<sub>2</sub> buvo greitai oksiduojamas, todėl FMN redukcijos produkto nebuvo įmanoma užregistruoti. NADH:FMN oksidoreduktazės aktyvumas vertinamas pagal NADH sugerties pokyčius ties 340 nm bangos ilgiu per 1 min. laikotarpį, naudojant FMN kaip elektronų akceptorį. Sugerties matavimai atliekami mikroplokštelių skaitytuvu Tecan Infinite M200 su i-control™ kompiuterine programa (Tecan group Ltd., Menedorfas, Šveicarija). NADH koncentracijos mažėjimas paskaičiuojamas naudojant NADH ekstinkcijos koeficientą 6220 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

### **2.2.6. *V. fischeri* ląstelių redukcinės (antioksidantinės) gebos nustatymas**

FRAP tyrimas yra paprastas tiesioginis redukcinės (antioksidantinės) gebos įvertinimas, pirmą kartą aprašytas ir naudojamas kraujo plazmos redukcinei gebai įvertinti (Benzie ir Strain, 1996). Šio eksperimento metu ties 593 nm bangos ilgiu registruojamas mėlynos spalvos junginys Fe<sup>2+</sup>-2,4,6-tri(2-

piridil)-1,3,5-triazinas, kuris susidaro antioksidantams redukuojant bespalvę oksiduotą  $\text{Fe}^{3+}$ . FRAP reagentas ruošiamas 10:1:1 santykiu sumaišant: 300 mM  $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$  buferį (pH 3,6), 10 mM 2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazino (TPTZ) 40 mM HCl tirpalą ir 20 mM  $\text{FeCl}_3$  tirpalą. Visi reakcijai naudoti tirpalai ruošiami tą pačią dieną. *V. fischeri* ląstelės suspenduojamos 2% NaCl terpe ( $\text{OT}_{590} = 0,3$  arba  $0,24 \times 10^9$  ląstelių/ml) ir inkubuojamos su A, OR ir  $\text{S}_8^0$ , ar kontroliniuose mėginiuose su etanoliu 1 ml tūryje 5, 15, 30, 60 min. Reakcija pradedama 50  $\mu\text{l}$  mėginio (slopikliais paveiktų *V. fischeri* ląstelių suspensijos) pridėjimu į 200  $\mu\text{l}$  naujai paruoštą FRAP reagentą. Taigi, mėginys sudarė 1/5 reakcijos mišinio. Sugertis matuojama po 15 min. ties 593 nm bangos ilgiu, sugerties skaitytuvu ASYS UVM 340 su kompiuterine programa MicroWin 2000 (ASYS Hitech GmbH, Eugendorf, Austrija).

*V. fischeri* bakterijų (be FRAP reagento)  $\text{OT}_{593}$  reikšmės atimamos iš galutinių FRAP reakcijos (su ląstelėmis) sugerties ( $\text{OT}_{593}$ ) reikšmių. FRAP bandymo techninė kontrolė,  $\text{S}_8^0$  (0,11 ir 2,2 mg/L) be ląstelių 2% NaCl terpėje, neturėjo įtakos spalvinei reakcijai (t.y.  $\text{Fe}^{2+}$  komplekso susidarymui). A (2,5 mg/L) ir OR (3,12 mg/L) techninės kontrolės (be ląstelių) keitė FRAP reagento sugertį, taigi, šios kontrolės buvo atimtos iš galutinių FRAP reakcijos (su ląstelėmis) absorbcijos ( $\text{OT}_{593}$ ) reikšmių. Paskaičiuotos galutinės OT reikšmės naudojamos tolimesniems skaičiavimams. Rezultatai išreikšti paskaičiuota  $\text{Fe}^{2+}$  koncentracija ( $\mu\text{M}$ ) mikroplokštelėje pagal  $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  standartinę kreivę.

### 2.2.7. Aktyviųjų deguonies formų nustatymas *V. fischeri* ląstelėse

Aktyviųjų deguonies formų (ROS) susidarymas *V. fischeri* ląstelėse buvo nustatomas naudojant 2',7'-dichlorodihidrofluoresceino diacetatą (DCDHF-DA). Šis nefluorescuojantis junginys difuzijos būdu pereina per ląstelės membraną. Citoplazminės esterazės pašalina acetatines grupes, susidarant 2',7'-dichloro dihidrofluoresceinui (DCDHF), kuris dėl savo poliškumo nesugeba difunduoti iš ląstelės. DCDHF lengvai oksiduojamas ląstelėje esančių ROS, susidarant fluorescuojančiam junginiui 2',7'-dichlorofluoresceinui (DCF). Šio galutinio produkto fluorescencija matuojama mikroplokštelių skaitytuvu Tecan

Infinite M200 (Šveicarija), ties atitinkamais sužadavimo ir išspinduliavimo bangos ilgiais: 485 ir 538 nm. Darbo eiga: a) *V. fischeri* ląstelių suspensija ( $OT_{590} = 0,3$ ) veikiama DHDCF-DA ( $10 \mu\text{M}$ ) 30 min.; b) paveikta suspensija centrifuguojama  $4400g$  15 min., ir supernatantas pašalinamas; c) ląstelės suspenduojamos iki pradinio optinio tankio ( $OT_{590} = 0,3$ ) su  $50 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$ ,  $2\% \text{ NaCl}$  pH 7,0; d) atskiri *V. fischeri* suspensijos mėginiai ( $OT_{590} = 0,3$ ) veikiami A, OR,  $S_8^0$  arba etanolis; e) fluorescencija užrašoma 2 val. 15 min. intervalais, ties atitinkamais sužadavimo ir išspinduliavimo bangos ilgiais.

### 2.2.8. *V. fischeri* ląstelių deguonies sunaudojimo matavimai

*V. fischeri* ląstelių deguonies sunaudojimo matavimai atlikti naudojant poliarografą su Klarko-tipo deguonies elektrodu (Rank Brothers Ltd, Kembridžas, Anglija). Naudojama ta pati matavimo terpė, kaip ir liuminescencijos *in vivo* matavimuose (pH 7,0), ir, palyginimui, mažesnio pH (pH 6,0) terpė. Deguonies sunaudojimas pradedamas matuoti tuoj po  $20 \mu\text{l}$  *V. fischeri* priedo įnešimo į 1 ml terpės (galutinis  $OT_{590\text{nm}} = 0,3$ ). Po 5 min. į poliarografo kiuvetę įnešama  $5-10 \mu\text{l}$  A, 2,4-dinitrofenolio (2,4-DNP), NEM, OR, arba  $S_8^0$  etanolinių tirpalų ar kontrolės (etanolio). Matavimai tęsiami dar 5 min. kambario temperatūroje. Tirpiklio koncentracija bendrame reakcijos terpės tūryje siekė  $0,5-1\%$ . Visais atvejais įvertinama ar patys cheminiai junginiai, be *V. fischeri* ląstelių, neveikia deguonies elektrodo. *V. fischeri* ląstelių deguonies sunaudojimo skatinimas (metodo jautrumas) tikrinamas klasikiniu skyrikliu 2,4-DNP ( $200 \mu\text{M}$ ).

Nuo liuciferazės priklausomas *V. fischeri* ląstelių deguonies sunaudojimas pradedamas registruoti, į *V. fischeri* ląstelių suspensiją (galutinis  $OT_{590\text{nm}} = 0,3$ ) įnešus citochromo oksidazės slopiklio KCN ( $1\text{mM}$ ). Po 5 min pridedamas *n*-dekanolis ( $0,06 \text{ mM}$ ; liuciferazės slopiklis), OR arba  $S_8^0$ , arba kontrolė (etanolis). Matavimai tęsiami dar kitas 5 min.

### 2.2.9. Tetrafenilfosfonio jonų sugerties *V. fischeri* ląstelėmis nustatymas

Skvarbių tetrafenilfosfonio jonų ( $\text{TPP}^+$ ) sugėrimas *V. fischeri* ląstelėmis buvo vertinamas jonometriškai, pagal šių jonų koncentracijų pokyčius terpėje, naudojant jiems atrankų elektrodą (doc. dr. A. Zimkus, Vilniaus Universitetas).  $\text{TPP}^+$  yra lipofilinis katijonas, jis greitai patenka į ląstelių vidų ir pasiskirsto tarp ląstelių vidaus ir išorinės terpės, priklausomai nuo membranos potencialo dydžio. Šis metodas 1969 metais pasiūlytas Skulachiovo, ir daugiau nei du dešimtmečius naudojamas mitochondrijų membranos potencialo įvertinimui (Gennis, 1989; Скулачев, 1989). Be to, jis naudojamas kaip jautrus mikroorganizmų ir mitochondrijų membranos būklės biosensorius aplinkos tyrimuose (Beržinskienė ir Četkauskaitė, 1996; Da Silva et al., 1998). Šviežiai užaugintos *V. fischeri* bakterijos nucentrifuguojamos 4400g 15 min., auginimo terpė pašalinama. *V. fischeri* bakterijos suspenduojamos reakcijos terpe ir laikomos leduose. Reakcijos terpės (50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2% NaCl, pH 7,0) tūris – 1 ml. Galutinė  $\text{TPP}^+$  koncentracija terpėje siekė 0,4  $\mu\text{M}$ . Praėjus 5 min. po *V. fischeri* ( $\text{OT}_{590} = 0,9$ ) suspensijos įnešimo į terpę (t.y. kai  $\text{TPP}^+$  koncentracija terpėje nebekinta) į reakcijos terpę pridedami A, OR arba  $\text{S}_8^0$ .  $\text{TPP}^+$  koncentracijos pokyčiai terpėje registruojami dar 10 min. Potencialas apskaičiuojamas pagal modifikuotą Nersto lygtį (Četkauskaitė et al., 2006), ir remiantis prielaida, kad, panašiai kaip *Escherichia coli*, *V. fischeri*  $\text{OT}_{590} = 0,9$  atitinka 0,5 mg sauso svorio, ir intersticinio vandens tūris yra 2,7  $\mu\text{l}/\text{mg}$  sauso svorio (Hirota et al., 1981).

### 2.2.10. Statistinė duomenų analizė

Statistinė duomenų analizė atlikta naudojant trifaktorinę ir dvifaktorinę dispersinę analizę (ANOVA – angl. k. analysis of variance) ir daugialypės regresijos modelius. Visiems statistikos metodams reikšmingumo lygmuo buvo 0,05. Toksiškumo duomenys pateikiami kaip trijų arba keturių atskirų eksperimentų vidurkis  $\pm$  standartinis nuokrypis. Duomenų statistinė analizė atlikta naudojantis Sigma Plot 10 programa.

*Mišinių statistinės analizės seka.* Mišinių toksiškumo pokyčių reikšmingumas, kintant poveikio laikui, įvertintas trifaktorine ANOVA. Po to mišinių efektai po 30 min. poveikio laiko buvo vertinami detaliau. Pirmiausia, cheminių junginių ir jų sąveikos reikšmingumas bendram mišinio toksiškumui įvertintas naudojant dvifaktorinę ANOVA (30 min. poveikio matavimams). ANOVA duomenys įvertinti remiantis Fišerio kriterijaus reikšmėmis ir  $P$  reikšmių analize. Toliau sąveikos reikšmingumo patvirtinimui bei toksikodinaminio (antagonistinio, adityvaus, sinergistinio) pobūdžio nustatymui buvo naudojamas redukuotas daugialypės regresijos polinominis modelis. Siekiant išvengti multikolinearumo (stiprios koreliacijos tarp nepriklausomų kintamųjų) daugialypės regresijos analizės metu naudotos cheminių medžiagų koduotos koncentracijos (Ren et al., 2004). Mažos ir didelės tirtų cheminių medžiagų koncentracijos mišiniuose koduotos -1 ir +1 reikšmėmis, atitinkamai, pagal šią formulę:

$$C = \frac{C_{naudota} - (C_{didelė} + C_{maža})/2}{(C_{didelė} - C_{maža})/2} \quad (4)$$

kur  $C$  yra koduota individualios cheminės medžiagos koncentracija (t.y. lygtyje (6)  $C_x$  ir  $C_y$ , ar mūsų atveju  $C_A$ ,  $C_{OR}$ ,  $C_S$  yra koduotos Aroclor 1248, oleino rūgšties ir sieros koncentracijos, atitinkamai);  $C_{naudota}$  tai konkreti (didelė arba maža) naudota cheminės medžiagos koncentracija mišinyje;  $C_{maža}$  – maža koncentracija;  $C_{didelė}$  – didelė koncentracija.

Pilnas antro laipsnio daugialypės regresijos polinominis modelis matematiškai išreiškiamas taip:

$$BL(\%) = b_0 + b_x C_x + b_y C_y + b_{xy} C_x \times C_y + b_x C_x^2 + b_y C_y^2 \pm \varepsilon \quad (5)$$

Eksperimentų duomenys atitiko redukuotą modelį:

$$BL(\%) = b_0 + b_x C_x + b_y C_y + b_{xy} C_x \times C_y \pm \varepsilon \quad (6)$$

kur  $BL$  (%) – atsakas, t.y. bioluminescencijos lygmuo;  $b_0$  – lygties laisvasis narys;  $b$  – regresijos koeficientai;  $C$  – koduota (paskaičiuota) cheminio junginio koncentracija;  $x, y$  – skirtingi mišinio komponentai ( $C_A$ ,  $C_{OR}$ ,  $C_S$  – koduotos A, OR ir  $S_8^0$  koncentracijos, atitinkamai);  $xy$  – žymi sąveikos ( $C_x \times$

$C_y$ ) tarp cheminių medžiagų X ir Y regresijos koeficientą,  $\varepsilon$  – prognozuojamo bioluminescencijos lygmens (BL) standartinė paklaida. Siekiant sukurti geriausios kokybės modelius, lygtyje paliekami tik tie lygties nariai, kurių regresijos koeficientai yra reikšmingi, o nariai su nereikšmingais regresijos koeficientais yra pašalinami iš atitinkamos lygties. Modelių adekvatumas įvertinamas atsižvelgiant į determinacijos koeficiento ( $R^2$ ), Fišerio kriterijaus ( $F$ ) ir  $P$  reikšmes. Individualių X ir Y mišinio komponentų poveikis binarinio mišinio toksiškumui interpretuojamas pagal lygties narių regresijos koeficientų ženklus. Binarinių mišinių toksikodinaminis poveikis išreiškiamas tokiu būdu:

- 1) adityvus, kai regresijos koeficientų ( $b_x, b_y$ ) ženklai neigiami, ir kai  $C_x \times C_y$  sąveika nereikšminga;
- 2) adityvus su sinergistine sąveika pirmu atveju ir kai  $C_x \times C_y$  sąveika reikšminga su neigiamu  $b_{xy}$ ;
- 3) adityvus su antagonistinės sąveikos komponente pirmu atveju, ir kai  $C_x \times C_y$  sąveika nereikšminga su teigiamu  $b_{xy}$ ;
- 4) antagonistinis, kai regresijos koeficientų ( $b_x, b_y$ ) ženklai skiriasi, ir kai  $C_x \times C_y$  sąveika yra nereikšminga; ir,
- 5) antagonistinis su reikšminga sąveika ketvirtu atveju, kai  $C_x \times C_y$  sąveika reikšminga su neigiamu arba teigiamu  $b_{xy}$ .

### 3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Aplinkos tyrimų srities žurnaluose skelbiama daug darbų, analizuojančių ksenobiotikų mišinių poveikį *V. fischeri* bakterijų bioluminescencijai, remiantis koncentracijos adityvumo (CA) ir nepriklausomo veikimo (IA) modeliais (Altenburger et al., 2000; Backhaus et al., 2000). Be minėtų metodų kiti statistinės analizės metodai yra taikomi rečiau. Žinoma, kad daugialypės regresijos modelių analizė yra tinkama mišinio komponentų toksikodinaminių efektų apibūdinimui švytinčiose bakterijose (Bois et al., 1986; Ren et al., 2004). Taigi, šiame darbe A, OR ir  $S_8^0$  binarinių mišinių poveikį bioluminescencijai *in vivo* ir *in vitro* analizavome remiantis statistiniais daugialypės regresijos modeliais.

Toksikodinaminius mišinio efektus vengiama interpretuoti, kadangi trūksta žinių apie individualių cheminių medžiagų poveikio vietas *V. fischeri* bakterijose. Yra atlikta tik keletas darbų, kurie cheminių medžiagų toksiškumą sieja su biocheminiais (enzimologiniais) duomenimis apie žinomas ar galimas ksenobiotikų poveikio vietas bioluminescencijos *in vivo* ir *in vitro* sistemose (Ismailov et al., 2000; Kudryasheva et al., 2002; Wang et al., 2009b). Taigi, norėdami išsiaiškinti toksinių medžiagų poveikio vietas bioluminescencijos *in vivo* sistemoje, šiame darbe vertinome individualių mišinio komponentų (A, OR ir  $S_8^0$ ) poveikį atskirų *V. fischeri* oksidoredukcinių fermentų sistemoms. Siekiant nustatyti galimas slopiklių veikimo vietas bioluminescencijos komplekso fermentuose, tyrėme A, OR ir  $S_8^0$  poveikį su šių fermentų substratais ar bendrą jų binarinių mišinių poveikį bioluminescencijai *in vivo* ir *in vitro*.

#### 3.1. Individualių cheminių medžiagų (A, OR ir $S_8^0$ ) ir jų binarinių mišinių poveikis *V. fischeri* bioluminescencijai

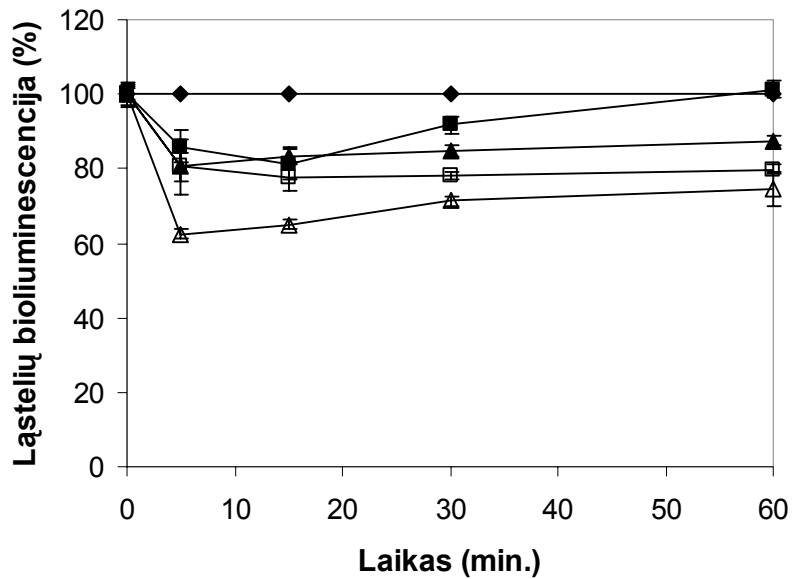
Hidrofobinių (nopolinių) organinių junginių toksiškumas pasireiškia narkotiniu veikimo būdu, t.y. jie veikia biologinių membranų struktūrą ir jų fermentus (Verhaar et al., 2000). Pastebėta, kad narkotinio veikimo medžiagos



stipriai slopina *V. fischeri* bakterijų bioluminescenciją pirmomis poveikio (5–15) minutėmis (Hermens et al., 1985; Kaiser ir Palabrica, 1991), tačiau po ilgesnio inkubacijos laiko (45 min.) stebimas visiškas bioluminescencijos atsistatymas, kuris nėra būdingas elektrofiliniams (reaktyviesiems, negrįžtamai modifikuojantiems fermentus) junginiams, pasižymintiems ilgalaikiu bioluminescencijos slopinimu (Dawson et al., 2006). Todėl, siekiant išaiškinti hidrofobinio ir silpnai polinio A (kaip silpnai polinių oligoaromatinių PCB junginių mišinio), hidrofobinės polinės OR ir hidrofobinės, oksidoredukinių savybių (su sulfhidrilinėmis grupėmis reaguojančios)  $S_8^0$  veikimo tendencijas bioluminescencijos *in vivo* sistemoje, šiame darbe poveikio laikas – 30 min., standartinio testo sąlygomis (LST EN ISO 11348-3:2000), pailgintas iki 60 min.

### **3.1.1. Individualių cheminių medžiagų (A, OR ir $S_8^0$ ) poveikis bioluminescencijai *in vivo* ir *in vitro***

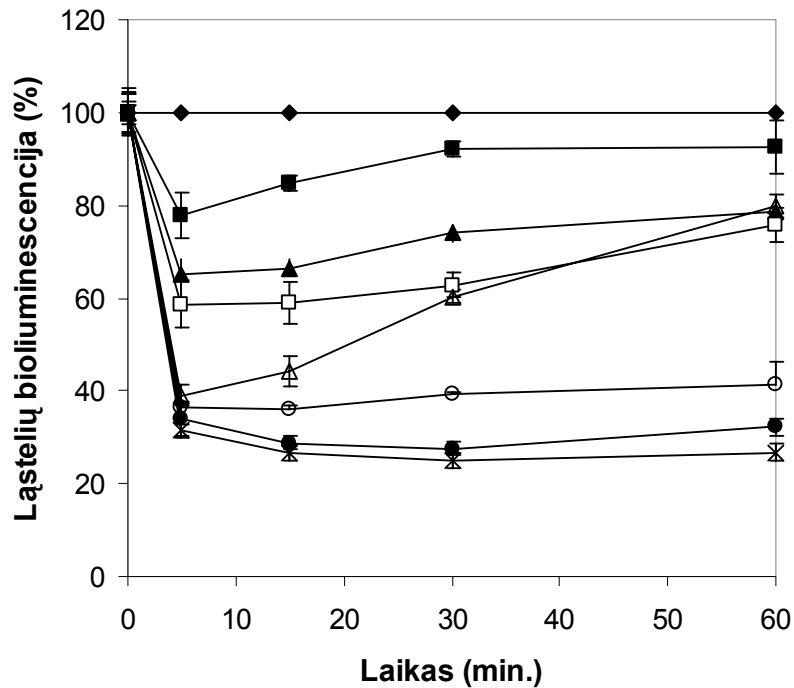
*In vivo* eksperimentų metu nustatyta, kad 0,625 mg/L ir 5 mg/L A *V. fischeri* ląstelių bioluminescenciją stipriausiai slopino (19% ir 23%, atitinkamai) po 15 min. (3.1 pav.). OR mažesnių koncentracijų intervale (0,390–3,12 mg/L) sukėlė didžiausią bioluminescencijos slopinimą (nuo 64 iki 71%) po 15 min. (3.2 pav.). Tai remia ankstesnius mūsų grupės mokslininkų duomenis, kad OR panašiam koncentracijų intervale (1,56–3,12 mg/L) stipriai (iki 85%) slopina *V. fischeri* bioluminescenciją (Četkauskaitė ir Beržinskienė, 2000). Mūsų darbe  $S_8^0$  siaurame mažesnių koncentracijų intervale (0,11–0,27 mg/L) slopino bioluminescenciją nuo 90% iki 99% po 15 min (3.3 pav.). Šie rezultatai patvirtina anksčiau paskelbtus rezultatus, kad  $S_8^0$  (0,11–0,22 mg/L) yra labai toksiška *V. fischeri* bakterijoms po 5, 15 min. (Četkauskaitės et al., 2004). Gauti pavienių medžiagų toksiškumo bioluminescencijai *in vivo* duomenys (3.1–3.3 pav.) liudija, kad OR ir  $S_8^0$  yra toksiškesnės *V. fischeri* ląstelėms 11  $\mu$ g/L–3 mg/L koncentracijų intervale nei A 0,625–10 mg/L koncentracijų intervale.



**3.1 pav.** Aroclor 1248 poveikis *V. fischeri* ląstelių bioluminescencijai (*in vivo*). Pateikti keturių atskirų eksperimentų vidurkiai ± standartinis nuokrypis.

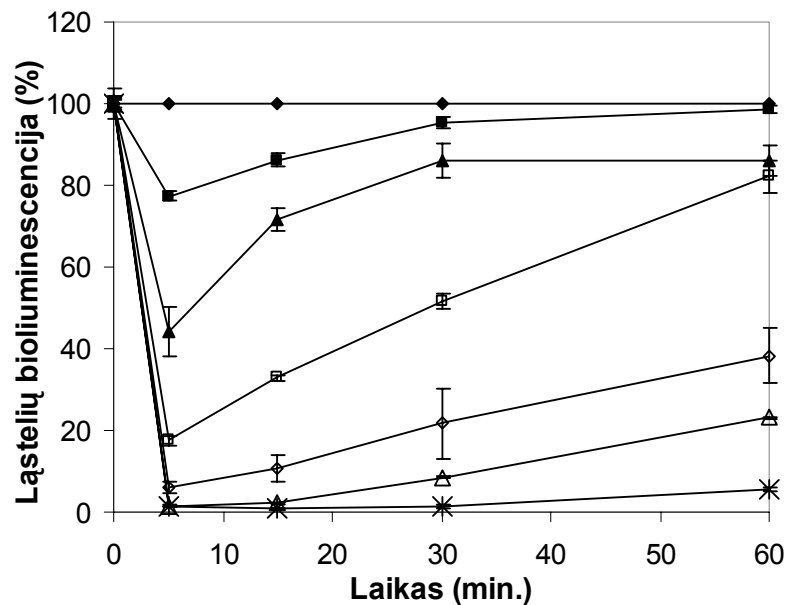
Aroclor 1248 koncentracijos: -◆- 0 mg/L; -■- 0,625 mg/L; -▲- 2,5 mg/L; -□- 5 mg/L; -△- 10 mg/L.

A (0,625; 10 mg/L), OR (12–195 µg/L) ir S<sub>8</sub><sup>0</sup> (11–220 µg/L) sukeltas bioluminescencijos *in vivo* slopinimas mažėjo, ilgėjant poveikio trukmei iki 60 min. (3.1–3.3 pav.). Taigi, galime teigti, kad daugumos A, OR ir S<sub>8</sub><sup>0</sup> koncentracijų sukeltas bioluminescencijos *in vivo* slopinimas buvo grįžtamas. Yra nustatyta, kad panašius nuo laiko priklausomus efektus *V. fischeri* bakterijų bioluminescencijai *in vivo* sukelia hidrofobiniai organiniai junginiai (nepolinės narkotinės medžiagos) – ketonai (Dawson et al., 2006).



**3.2 pav.** Oleino rūgšties poveikis *V. fischeri* ląstelių bioluminescencijai (*in vivo*). Pateikti keturių atskirų eksperimentų vidurkiai ± standartinis nuokrypis.

Oleino rūgšties koncentracijos: -◆- 0 µg/L; -■- 12 µg/L; -▲- 24 µg/L; -□- 48,5 µg/L; -△- 195 µg/L; -○- 390 µg/L; -●- 1560 µg/L; -✱- 3120 µg/L.



**3.3 pav.** Elementinės sieros poveikis *V. fischeri* ląstelių bioluminescencijai (*in vivo*).

Pateikti keturių atskirų eksperimentų vidurkiai ± standartinis nuokrypis.

Elementinės sieros koncentracijos: -◆- 0 µg/L; -■- 11 µg/L; -▲- 27 µg/L; -□- 55 µg/L; -◇- 110 µg/L; -△- 220 µg/L; -✱- 270 µg/L.

Palyginus A, OR ir S<sub>8</sub><sup>0</sup> poveikį bioluminescencijos kompleksui *in vitro* po 5 min., matyti, kad A (2,5 mg/L) slopino fermentus daug efektyviau, nei OR (3,12 mg/L) ir S<sub>8</sub><sup>0</sup> (2,2 mg/L) (3.1 lentelė). Tačiau, S<sub>8</sub><sup>0</sup> tokia pačia koncentracija (2,2 mg/L) sukėlė stipriausią slopinimą (70%) po 30 min. (3.1 lentelė). Be to, A (2,5–10 mg/L), OR (didžiosiomis tirtomis koncentracijomis 6,25–25 mg/L) ir S<sub>8</sub><sup>0</sup> (0,27–2,2 mg/L) sukeltas bioluminescencijos *in vitro* slopinimas didėjo, ilgėjant poveikio trukmei iki 30 min. (3.1 lentelė). Remiantis šiais duomenimis, galima teigti, kad bioluminescencijos *in vitro* slopinimas A, OR ir S<sub>8</sub><sup>0</sup> buvo negrįžtamas.

**3.1 lentelė.** Aroclor 1248, oleino rūgšties ir sieros poveikis *V. fischeri* bioluminescencijai *in vitro*

Koncentracija, mg/L	Bioluminescencija <sup>a</sup> , % (lyginant su kontrole)		
	5 min.	15 min.	30 min.
Aroclor 1248			
2,5	52,99 ± 7,27*	55,92 ± 1,63*	51,08 ± 6,63*
5	65,68 ± 4,26*	64,18 ± 1,01*	44,17 ± 7,17*
10	72,52 ± 2,38*	68,61 ± 5,88*	63,64 ± 4,13*
Oleino rūgštis			
3,12	73,34 ± 1,48*	93,95 ± 4,86	87,62 ± 4,22
6,25	62,36 ± 1,56*	69,22 ± 2,60*	51,81 ± 0,46*
12,5	58,04 ± 3,50*	58,17 ± 6,90*	43,81 ± 1,85*
25	43,60 ± 0,76*	37,83 ± 1,69*	43,84 ± 2,62*
Siera			
0,27	76,92 ± 8,03*	78,95 ± 0,70*	56,23 ± 9,10*
0,55	68,66 ± 7,03*	50,72 ± 6,76*	32,15 ± 2,25*
1,1	78,90 ± 2,89*	53,82 ± 3,28*	32,67 ± 4,98*
2,2	70,20 ± 2,69*	55,45 ± 0,09*	30,10 ± 2,80*

<sup>a</sup> – Pateikti keturių atskirų eksperimentų vidurkiai ± standartinis nuokrypis. Sloplikiais paveiktų mėginių bioluminescencija statistiškai reikšmingai skirėsi nuo atitinkamų kontrolinių reikšmių (\**P* < 0,05)

Taigi, individualių medžiagų A, OR ir S<sub>8</sub><sup>0</sup> neigiamas poveikis bioluminescencijai *in vivo* mažėjo ilgėjant inkubacijos laikui, o sistema *in vitro* buvo slopinama negrįžtamai. Šie rezultatai leidžia manyti, kad *V. fischeri* ląstelės (*in vivo*) skatina apsauginių sistemų aktyvumą, kurios užtikrina cheminių medžiagų toksiškumo mažinimą. Kaip jau minėta literatūros apžvalgoje, *V. fischeri*, kaip ir kitose *Vibrio* spp. bakterijose, gali būti

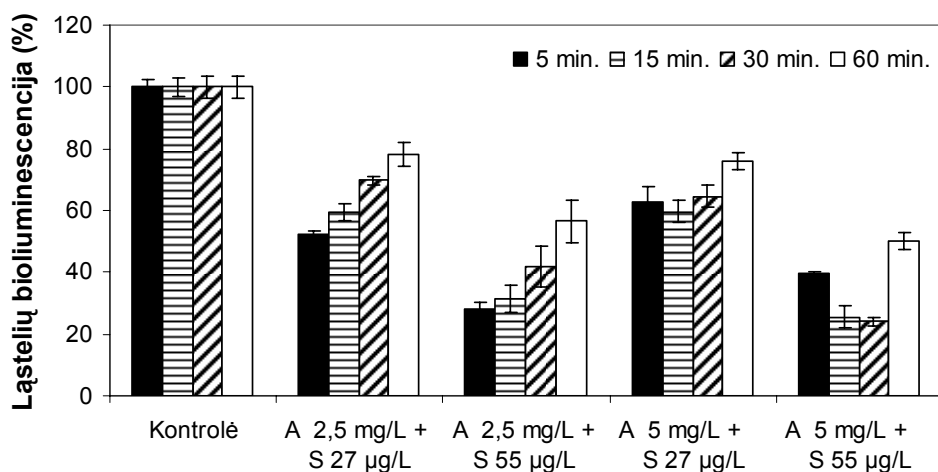
aktyvinami hidrofobines toksines medžiagas šalinantys (Antunes et al., 2007; Gu et al., 2009; Kuroda ir Tsuchiya, 2009) arba biotransformuojantys (Jegathesan ir Paramasivam, 1976; Byers, 1989; Villa ir Willetts, 1997; Kwak et al., 2003; Jiang et al., 2010) fermentai.

### **3.1.2. A, OR ir $S_8^0$ binarinių mišinių poveikis bioluminescencijai *in vivo* ir *in vitro* (statistinė interpretacija)**

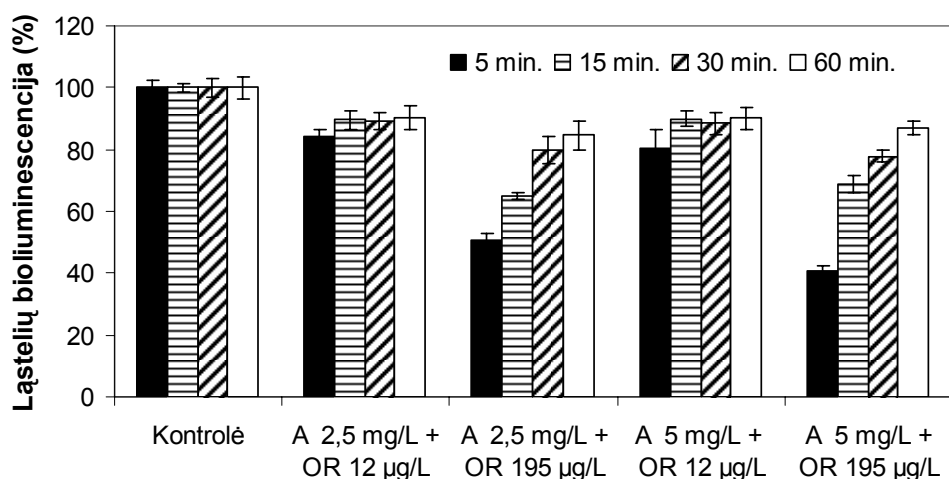
Šiame darbe A, OR ir  $S_8^0$  binarinių mišinių toksiškumo pokyčius, kintant poveikio laikui, vertinome naudodami trifaktoriinę dispersinę analizę. Slopikliu kombinuoto veikimo toksikodinaminius efektus *V. fischeri* bioluminescencijai *in vivo* ir *in vitro* interpretavome naudojant trifaktoriinę ir dvifaktoriinę dispersinę analizę bei daugialypės regresijos modelius.

#### **3.1.2.1 Binarinių mišinių poveikis bioluminescencijai *in vivo***

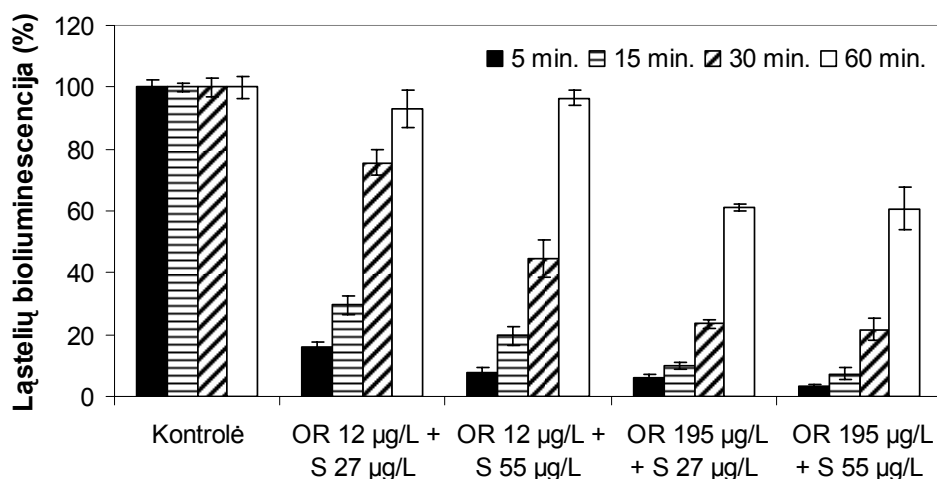
*Poveikio trukmės įtaka mišinių toksiškumui.* A, OR ir  $S_8^0$  binarinių mišinių toksiškumo *V. fischeri* bioluminescencijai *in vivo* duomenys skirtingais poveikio laikais pateikti 3.4–3.6 paveiksluose. Bendriausia slopinamojo poveikio bioluminescencijai *in vivo* kitimo laike analizė leidžia daryti išvadą, kad didžioji dalis tirtų OR ir  $S_8^0$ , A ir OR, ir A ir  $S_8^0$  binarinių mišinių sukėlė dalinį bioluminescencijos funkcijos atsistatymą iki 60 min. Trifaktoriinės dispersinės analizės duomenys atskleidė, kad visų trijų binarinių mišinių toksiškumas (3.4–3.6 pav.) *V. fischeri* ląstelėms kito reikšmingai per 60 min. (3.2 lentelė; t veiksnys:  $P < 0,001$ , žiūrėti kitas  $F$ ,  $P$  reikšmes). Taigi, binarinių mišinių, kuriuose vienas komponentas buvo silpnai polinis (A) ar polinis (OR), o kitas pasižymintis oksidoredukcinėmis savybėmis ( $S_8^0$ ), poveikis *V. fischeri* bioluminescencijai buvo grįžtamas.



**3.4 pav.** Aroclor 1248 ir sieros mišinių poveikis *V. fischeri* ląstelių bioluminescencijai skirtingais poveikio laikais. Pateikti trijų atskirų eksperimentų vidurkiai ± standartinis nuokrypis.



**3.5 pav.** Aroclor 1248 ir oleino rūgšies mišinių poveikis *V. fischeri* ląstelių bioluminescencijai skirtingais poveikio laikais. Pateikti trijų atskirų eksperimentų vidurkiai ± standartinis nuokrypis.



**3.6 pav.** Oleino rūgšties ir sieros mišinių poveikis *V. fischeri* ląstelių bioluminescencijai skirtingais poveikio laikais. Pateikti trijų atskirų eksperimentų vidurkiai ± standartinis nuokrypis.

Preliminari dvifaktorinė dispersinė analizė fiksuotais atskirais poveikio laikais parodė, kad cheminių junginių koncentracijų skirtingi deriniai beveik visais atvejais sukėlė reikšmingai besiskiriančius efektus ir individualių cheminių junginių įtaka mišinio toksiškumui buvo reikšminga po 30 min. Dėl šių priežasčių, 30 min. standartinis poveikio laikas buvo pasirinktas detaliau analizuoti binarinių mišinių poveikį bioluminescencijai *in vivo*.

**3.2 lentelė.** Poveikio trukmės binariniais mišiniais reikšmingumas bioluminescencijai *in vivo*: trifaktorinės dispersinės analizės duomenys<sup>a</sup>

A ir S <sub>8</sub> <sup>0</sup> mišinys			A ir OR mišinys			OR ir S <sub>8</sub> <sup>0</sup> mišinys		
Poveikio veiksnys	<i>F</i>	<i>P</i>	Poveikio veiksnys	<i>F</i>	<i>P</i>	Poveikio veiksnys	<i>F</i>	<i>P</i>
<i>t</i>	68,90	< 0,001	<i>t</i>	99,13	< 0,001	<i>t</i>	96,57	< 0,001
<i>t</i> × A	19,57	< 0,001	<i>t</i> × A	4,69	0,003	<i>t</i> × OR	3,58	< 0,060
<i>t</i> × S <sub>8</sub> <sup>0</sup>	21,68	< 0,001	<i>t</i> × OR	51,96	< 0,001	<i>t</i> × S <sub>8</sub> <sup>0</sup>	12,58	< 0,001
<i>t</i> × A × S <sub>8</sub> <sup>0</sup>	7,44	< 0,001	<i>t</i> × A × OR	1,98	0,116	<i>t</i> × OR × S <sub>8</sub> <sup>0</sup>	1,17	< 0,345

<sup>a</sup> – santrumpos: A – Aroclor 1248; OR – oleino rūgštis; S<sub>8</sub><sup>0</sup> – elementinė oktaedrinė sierra; *F* – Fišerio dispersijų homogeniškumo kriterijus; *P* – reikšmingumo lygmuo; *t* – laikas (≤ 60 min.).

*Mišinių komponentų įtaka toksikodinaminiam efektams.* Dvifaktorinės dispersinės analizės duomenys patvirtino A (*P* < 0,001), S<sub>8</sub><sup>0</sup> (*P* < 0,001) ir jų

sąveikos ( $P < 0,015$ ) reikšmingumą A ir  $S_8^0$  mišinio toksiškumui po 30 min. poveikio (3.3 lentelė; 3.4 pav.). Pagal daugialypę regresinę analizę ši sąveika yra sinergistinė (visi regresijos koeficientai yra neigiami), t.y. toksiniai mišinio efektai yra stipresni nei individualių medžiagų efektų paprastas adityvumas (3.4 lentelė; lygtis 1).

**3.3 lentelė.** Poveikio veiksnių ir jų sąveikos reikšmingumas mišinio efektams po 30 min., naudojant *V. fischeri* ląstelių bioluminescencijos testą (*in vivo*): dvifaktorisės dispersinės analizės duomenys<sup>a</sup>

A ir $S_8^0$ mišinys			A ir OR mišinys			OR ir $S_8^0$ mišinys		
Poveikio veiksny	<i>F</i>	<i>P</i>	Poveikio veiksny	<i>F</i>	<i>P</i>	Poveikio veiksny	<i>F</i>	<i>P</i>
A	33,26	< 0,001	A	0,60	0,462	OR	39,97	< 0,001
$S_8^0$	277,69	< 0,001	OR	27,25	< 0,001	$S_8^0$	207,97	< 0,001
$A \times S_8^0$	9,55	< 0,015	$A \times OR$	0,15	0,706	$OR \times S_8^0$	31,56	< 0,001

<sup>a</sup> – santrumpas žiūr. po 3.2 lentele.

**3.4 lentelė.** Aroclor 1248, oleino rūgšties, elementinės sieros binarinių mišinių toksikodinaminiai efektai *V. fischeri* bioluminescencijai *in vivo* po 30 min.: statistinė analizė<sup>a</sup>

Daugialypės regresijos lygtis	Pastabos	Toksikodinaminių efektų pobūdis
Aroclor 1248 ir siera		
1) $BL (\%) = 50,0 - 6,0 C_A - 17,4 C_S - 3,2 C_A \times C_S \pm 3,6$ $R^2 = 0,98, F = 106,84, P < 0,001$	Visi reg. koef. reikšmingi ( $P < 0,015$ )	A ir $S_8^0$ toksinis efektas adityvus, sinergistinė sąveika
Aroclor 1248 ir oleino rūgštis		
2) $BL (\%) = 83,8 - 5,0 C_{OR} \pm 3,1$ $R^2 = 0,76, F = 31,15, P < 0,001$	$C_A$ ir $C_A \times C_{OR}$ pašalinti, kadangi jų reg. koef. nereikšmingi ( $P = 0,462; P = 0,706$ , atitinkamai); $C_{OR}$ reg. koef. reikšmingas ( $P < 0,001$ )	Mišinio toksinį efektą apsprendžia tik OR koncentracija; sąveikos nėra
Oleino rūgštis ir siera		
3) $BL (\%) = 41,3 - 18,8 C_{OR} - 8,2 C_S + 7,3 C_{OR} \times C_S \pm 4,3$ $R^2 = 0,98, F = 98,4, P < 0,001$	Visi reg. koef. reikšmingi ( $P < 0,031$ )	OR ir $S_8^0$ toksinis efektas adityvus; su antagonistine sąveikos komponente

<sup>a</sup> – lygties kintamųjų ( $BL (\%)$ ,  $C_A$ ,  $C_{OR}$ ,  $C_S$  ir kt.) reikšmes žiūrėti sk. "Medžiagos ir metodai";  $R^2$  (determinacijos koeficientas),  $F$  (Fišerio dispersijų homogeniškumo kriterijus) ir  $P$  (reikšmingumo lygmuo) – regresijos lygčių statistinio reikšmingumo ir adekvatumo įverčiai; reg. koef. – regresijos koeficientas(ai).



Dvifaktorinės ANOVA pagalba nustatyta, kad A ir OR sąveika ( $A \times OR$ ) yra nereikšminga ( $P = 0,71$ ; 3.3 lentelė) ir tik OR koncentracijų pokytis turi reikšmingos ( $P < 0,001$ ; 3.3 lentelė) įtakos A ir OR mišinio toksiškumui po 30 min. (3.5 pav.). Pagal geriausiai rezultatus atitikusią daugialypės regresijos lygtį 30 min. poveikio laikui, šio binarinio mišinio toksiškumą lėmė tik OR koncentracijų pokyčiai (3.4 lentelė; lygtis 2). Taigi, A, mišinyje su OR, poveikis bioluminescencijai *in vivo* buvo sumažintas, nors, kaip aprašyta aukščiau, tos pačios A koncentracijos (2,5 ir 5 mg/L) mišinyje su  $S_8^0$  reikšmingai apsprendė bioluminescencijos slopinimą ( $P < 0,015$ ). Be to, individualiai OR (195  $\mu\text{g/L}$ ) sukeltas bioluminescencijos slopinimas (40%; 3.3 pav.) buvo didesnis, nei A (5 mg/L) ir OR (195  $\mu\text{g/L}$ ) koncentracijų mišinio sukeltas slopinimas (23%) po 30 min. (3.5 pav.). OR toksinio efekto mišinyje sumažėjimas 17%, ir A indėlio bendram mišinio toksiškumui susilpnėjimas leidžia daryti prielaidą, kad A ir OR veikė antagonistiskai.

Dvifaktoringe ANOVA nustatyta, kad OR,  $S_8^0$  ir jų sąveika ( $OA \times S_8^0$ ) reikšmingai nulėmė OR ir  $S_8^0$  mišinio toksiškumą bioluminescencijai *in vivo* po 30 min. ( $P < 0,001$  visais atvejais; 3.3 lentelė; 3.6 pav.). Pagal daugialypės regresijos lygtį, aprašančią OR ir  $S_8^0$  mišinio toksiškumą po 30 min. (3.4 lentelė; lygtis 3), OR ir  $S_8^0$  sukėlė adityvų toksinį poveikį su antagonistinės sąveikos komponente. Kitaip sakant, OR arba  $S_8^0$  koncentracijų padidinimas sukelia mišinio toksiškumo padidėjimą po 30 min., bet mišinių poveikis bioluminescencijai yra stipresnis, nei individualių medžiagų efektų suma.

Taigi, nustatėme, kad trijų binarinių mišinių sukeliama toksikodinaminiai efektai *in vivo* yra skirtingi ir priklauso nuo binarinio mišinio sudėties. Interpretuojant A ir  $S_8^0$  binarinių mišinių efektus bioluminescencijai *in vivo*, teigtume, kad papildomų poveikio vietų buvimas, gali sąlygoti šių medžiagų sinergistinę sąveiką. Remiantis žiniomis apie chlorintų bifenilų (Nishihara, 1984; Mildažienė et al., 2002b; Schlezinger et al., 2006; Aly ir Domenech, 2009) ir sieros (Džėja et al., 1993, Russell et al., 1995) keletą poveikio vietų biologinėse membranose ir apie hidrofobinių junginių poveikį švytinčių bakterijų fermentų sistemoms (Francisco et al., 1993; Vetrova et al., 2007;

Wang et al., 2009b), galima teigti, kad hidrofobiniai A ir  $S_8^0$  turi skirtingas ir daugybines poveikio vietas *V. fischeri* bakterijose. Abi šios hidrofobinės medžiagos gali išdidinti membranos pralaidumą, silpnai polinis A ir oksidoredukcinių savybių  $S_8^0$  gali slopinti kvėpavimo grandinės ir bioluminescencijos komplekso oksidoredukcinių fermentų aktyvumą veikdami aktyviųjų centrų hidrofobines ar hidrofobines-polines ir sulfhidrilines grupes turinčias amino rūgštis. Interpretuojant šių medžiagų toksiškumo mažėjimą laiko bėgyje buvo pasiūlyta, kad šios medžiagos individualiai indukuoja biotransformacijos ar šalinimo procesus (sk. 1.5.1.). Tačiau, tikėtina, kad A ir  $S_8^0$ , veikdami kartu mišinyje, lėtina šią *V. fischeri* ląstelių apsauginę funkciją.

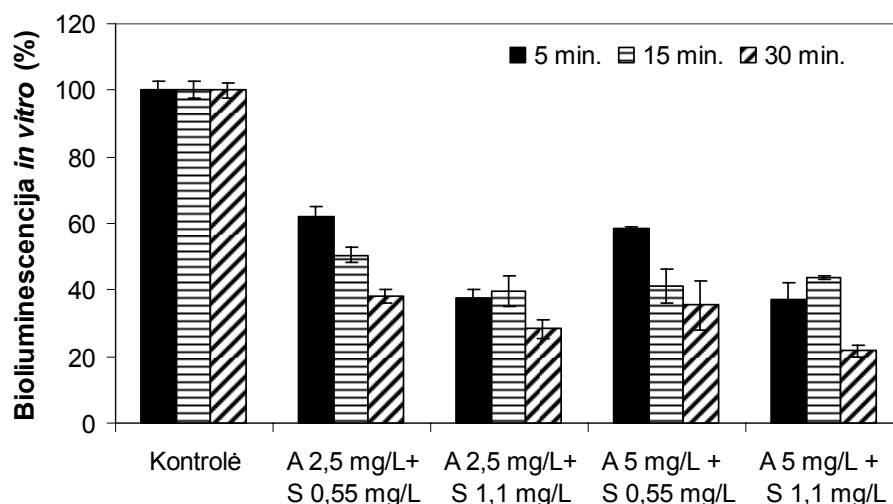
A ir OR antagonistinį poveikį bioluminescencijai *in vivo* interpretuoti yra sudėtinga, kadangi šie rezultatai iš esmės yra priešingi anksčiau nustatytam OR poveikiui mišiniuose su chlorintais aromatiniais angliavandeniliais. Pavyzdžiui, anksčiau nustatyta, kad OR (48 ir 190  $\mu\text{g/L}$ ) sustiprina chlorintų fenilkarbamidinių herbicidų (monurono ir diurono) ir palyginamosios toksinės medžiagos 3,5-dichlorofenolio slopinantį poveikį *V. fischeri* bioluminescencijai (Četkauskaitė ir Beržinskienė, 2000; Četkauskaitė ir Bražėnaitė, 2004). Naudojant Caco ląstelių linijos monosluoksnį kaip žmogaus žarnyno ląstelių modelį, parodyta, kad didelė, micles formuojanti, oleino rūgšties koncentracija (0,5 mM arba 0,14 mg/L) didina PCB patekimą į ląsteles (Dulfer et al., 1996). Kadangi mūsų darbe mišinių tyrimuose naudojamos OR koncentracijos ( $\leq 195 \mu\text{g/L}$  arba 0,69  $\mu\text{M}$ ) yra 100 kartų mažesnės, negu kritinė micelių susidarymui koncentracija (0,7–3,5 mM) (Murakami et al., 1986), tikėtina, kad OR nepadidino PCB patekimo į membranas.

OR ir  $S_8^0$  toksiškumo padidėjimą mišinyje, matyt, lemia tai, kad dvi skirtingos struktūros cheminės medžiagos veikia keliose skirtingose *V. fischeri* membranos vietose. Remiantis prielaida, kad bioluminescencijos atsistatymas yra sąlygojamas apsauginių fermentų aktyvumo (biotransformacijos ir išmetimo), tikėtina, kad tokių fermentų aktyvumas lėmė, kad OR ir  $S_8^0$  sukeltas

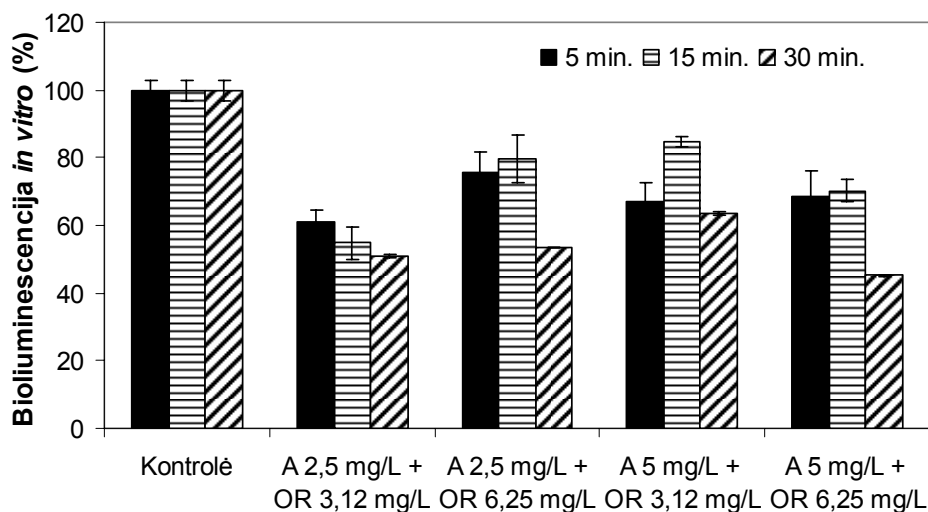
poveikis buvo mažesnis nei adityvus (t.y. su antagonistinės sąveikos komponente).

### 3.1.2.2 Binarinių mišinių poveikis bioluminescencijai *in vitro*

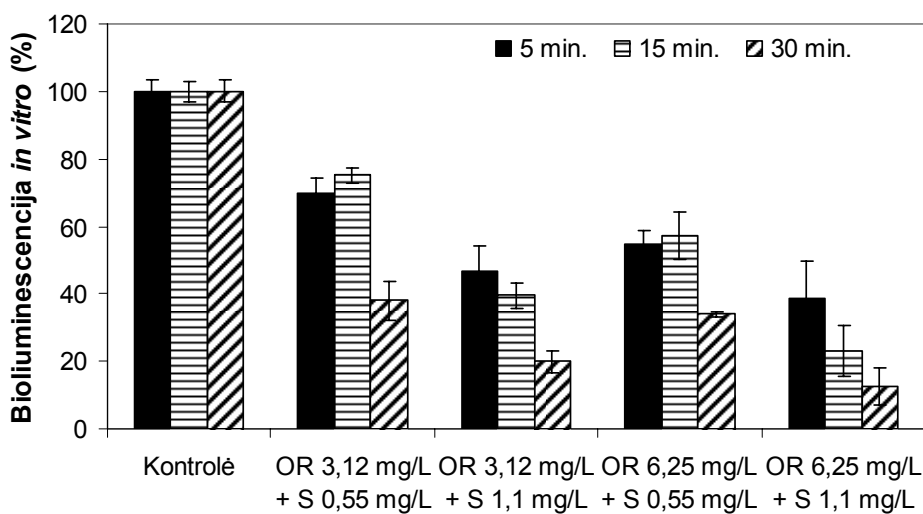
*Poveikio trukmės įtaka mišinių toksiškumui.* Šio tyrimo metu bioluminescencijos gesimas buvo stebimas 30 min., kai *V. fischeri* NADH:FMN oksidoreduktazės-liuciferazės kompleksas buvo veikiamas A, OR ir S<sub>8</sub><sup>0</sup> binariniais mišiniais. Palyginus mišinių slopinantį poveikį bioluminescencijai *in vitro* skirtingu poveikio laiku (3.7–3.9 pav.) galima daryti išvadą, kad didžioji tirtų binarinių mišinių dalis sukėlė bioluminescencijos funkcijos gesimą ilgėjant poveikio laikui iki 30 min. (t.y. sukėlė negrįžtamą bioluminescencijos slopinimą). Trifaktorinės ANOVA duomenys patvirtino, kad bioluminescencijos komplekso *in vitro* preinkubacijos su A, OR ir S<sub>8</sub><sup>0</sup> binariniais mišiniais laikas buvo reikšmingas mišinių toksiškumui (3.5 lentelė; t veiksnys:  $P < 0,001$ ). Taigi, A, OR ir S<sub>8</sub><sup>0</sup> binarinių mišinių, kaip ir individualių junginių, slopinantis poveikis bioluminescencijai kito skirtingai sistemose *in vivo* ir *in vitro*.



**3.7 pav.** Aroclor 1248 ir sieros mišinių poveikis NADH:FMN oksidoreduktazės - liuciferazės komplekso bioluminescencijai *in vitro* skirtingais poveikio laikais. Pateikti trijų atskirų eksperimentų vidurkiai ± standartinis nuokrypis.



**3.8 pav.** Aroclor 1248 ir oleino rūgšies mišinių poveikis NADH:FMN oksidoreduktazės - liuciferazės komplekso bioluminescencijai *in vitro* skirtingais poveikio laikais. Pateikti trijų atskirų eksperimentų vidurkiai ± standartinis nuokrypis.



**3.9 pav.** Oleino rūgšies ir sieros mišinių poveikis NADH:FMN oksidoreduktazės - liuciferazės komplekso bioluminescencijai *in vitro* skirtingais poveikio laikais. Pateikti trijų atskirų eksperimentų vidurkiai ± standartinis nuokrypis.

**3.5 lentelė.** Poveikio trukmės binariniais mišiniais reikšmingumas bioluminescencijai *in vitro*: trifaktoriaus dispersinės analizės duomenys<sup>a</sup>

A ir S <sub>8</sub> <sup>0</sup> mišinys			A ir OR mišinys			OR ir S <sub>8</sub> <sup>0</sup> mišinys		
Poveikio veiksnys	F	P	Poveikio veiksnys	F	P	Poveikio veiksnys	F	P
t	94,76	< 0,001	t	43,05	< 0,001	t	106,34	< 0,001
t × A	0,71	0,505	t × A	3,57	0,051	t × OR	7,05	0,008
t × S <sub>8</sub> <sup>0</sup>	24,87	< 0,001	t × OR	7,84	0,004	t × S <sub>8</sub> <sup>0</sup>	15,25	< 0,001
t × A × S <sub>8</sub> <sup>0</sup>	3,87	0,038	t × A × OR	5,03	0,019	t × OR × S <sub>8</sub> <sup>0</sup>	1,24	0,320

<sup>a</sup> – santrumpas žiūr. po 3.2 lentelę; t ≤ 30 min.

*Mišinių komponentų įtaka toksikodinaminiam efektams.* Pagal dvifaktoriaus ANOVA duomenis A ir S<sub>8</sub><sup>0</sup> reikšmingai apsprendė jų mišinio slopinantį poveikį (A: P < 0,042; S<sub>8</sub><sup>0</sup>: P < 0,001; 3.6 lentelė; 3.7 pav.), tačiau A ir S<sub>8</sub><sup>0</sup> sąveika po 30 min. buvo nereikšminga (P = 0,202; 3.6 lentelė). Pagal A ir S<sub>8</sub><sup>0</sup> mišinio efektus po 30 min. aprašančią daugialypės regresijos lygtį A ir S<sub>8</sub><sup>0</sup> slopino bioluminescenciją *in vitro* adityviai be reikšmingos sąveikos (3.7 lentelė; lygtis 1). A ir S<sub>8</sub><sup>0</sup> adityvumo paaiškinimui galima padaryti keletą prielaidų. Verta prisiminti, kad liuciferazės ir NAD(P)H:FMN oksidoreduktazės aktyviuosius (FMNH<sub>2</sub>/FMN ir NAD(P)H surišimo) centrus sudaro hidrofobinės ir hidrofobinės - polinės amino rūgštys (sk. 1.5.6.; Koike et al., 1998; Low ir Tu, 2002; Li ir Meighen, 1995; Li et al., 1999; Campbell ir Baldwin, 2009). Cisteino sulfhidrilinė grupė yra svarbi liuciferazės aktyvumui (Fried ir Tu, 1984; Abu-Soud et al., 1993; Lei et al., 1994). Taigi, šiame darbe naudotas silpnai polinis A, kaip galimas kandidatas veikti NADH ir FMN surišimo vietose NADH:FMN oksidoreduktazėje bei FMNH<sub>2</sub> surišimo vietoje liuciferazėje, ir S<sub>8</sub><sup>0</sup>, kaip sulfhidrilinės grupės oksiduojantis agentas, padidino vienas kito toksiškumą, veikdami skirtingose bioluminescencijos komplekso vietose.

**3.6 lentelė.** Poveikio veiksnių ir jų sąveikos reikšmingumas, naudojant bioluminescencijos *in vitro* testą, po 30 min.: dvifaktoriaus dispersinės analizės duomenys<sup>a</sup>

A ir S <sub>8</sub> <sup>0</sup> mišinys			A ir OR mišinys			OR ir S <sub>8</sub> <sup>0</sup> mišinys		
Poveikio veiksnys	F	P	Poveikio veiksnys	F	P	Poveikio veiksnys	F	P
A	6,64	< 0,042	A	72,28	0,001	OA	95,82	< 0,001
S <sub>8</sub> <sup>0</sup>	42,59	< 0,001	OA	759,00	< 0,001	S <sub>8</sub> <sup>0</sup>	741,58	< 0,002
A × S <sub>8</sub> <sup>0</sup>	2,05	< 0,202	A × OA	1356,10	0,001	OA × S <sub>8</sub> <sup>0</sup>	12,19	< 0,040

<sup>a</sup> – santrumpas žiūr. po 3.2 lentelę.

**3.7 lentelė.** Aroclor 1248, oleino rūgšties ir elementinės sieros binarinių mišinių toksikodinaminiai efektai *V. fischeri* bioluminescencijos kompleksui *in vitro* po 30 min.: statistinė analizė<sup>a</sup>

Daugialypės regresijos lygtis	Pastabos	Toksikodinaminių efektų pobūdis
Aroclor 1248 ir siera		
1) $BL (\%) = 30,3 - 2,7 C_A - 5,4 C_S \pm 2,69$ $R^2 = 0,89, F = 22,74, P < 0,001$	Sąveikos narys ( $C_A \times C_S$ ) pašalintas iš lygties, kadangi jo reg. koef. nereikšmingas ( $P < 0,202$ ); kiti reg. koef. reikšmingi ( $P < 0,019$ ).	A ir $S_8^0$ adityvus toksinis efektas; sąveika nereikšminga
Aroclor 1248 ir oleino rūgštis		
2) $BL (\%) = 53,3 + 1,23 C_A - 3,9 C_{OR} - 5,3 C_A \times C_{OR} \pm 0,42$ $R^2 = 0,99, F = 679, P < 0,001$	Visi reg. koef. reikšmingi ( $P < 0,001$ ).	A ir OR antagonistinis toksinis efektas; reikšminga sąveika
Oleino rūgštis ir siera		
3) $BL (\%) = 26,64 - 3,39 C_{OR} - 9,44 C_S - 1,21 C_{OR} \times C_S \pm 0,82$ $R^2 = 0,99, F = 257, P < 0,001$	Visi reg. koef. reikšmingi ( $P < 0,04$ ).	OR ir $S_8^0$ adityvus toksinis efektas; sinergistinė sąveika

<sup>a</sup> – paaiškinimus ir santrumpas žiūr. po 3.4 lentelę.

A ir OR binarinių mišinių toksiškumo analizė, remiantis dvifaktorine ANOVA, leidžia teigti, kad A, OR ir jų sąveika  $A \times OR$  po 30 min. buvo reikšminga bendram mišinio toksiškumui ( $P \leq 0,001$  visais atvejais; 3.6 lentelė; 3.8 pav.). Toksiškumo rezultatus atitikusi daugialypės regresijos lygtis A ir OR mišiniams 30 min. poveikio laikotarpiui (3.7 lentelė; lygtis 2) nurodo, kad A ir OR neigiamas poveikis bioluminescencijai pasireiškė su reikšminga bioluminescencijos funkciją slopinančia sąveika. Be to, teigiamas regresijos koeficientas prieš A lygties narį reiškia, kad A koncentracijos padidinimas sukelia mišinio toksiškumo sumažėjimą, t.y. antagonistinį poveikį. A gali veikti FMNH<sub>2</sub> surišimo ir kitose liuciferazės ir NADH:FMN oksidoreduktazės hidrofobinėse vietose. OR (arba kalio oleatas, abu hidrofobinės alifatinės struktūros junginiai, poliniai ties pH 7,0) galimai jungiasi *n*-dekanolio surišimo vietose, kadangi žinoma, kad hidrofobinės struktūros alifatiniai junginiai konkuruoja su dekanaliu (Данилов и Егоров, 1990; Curry et al., 1990). Taigi, šių cheminių junginių surišimas skirtingose vietose gali padidinti bioluminescencijos komplekso slopinimą dėl kombinuoto jų poveikio. Be to, remiantis *V. harveyi* liuciferazės slopinimo aldehidu kinetiniais tyrimais

pasiūlyta, kad FMNH<sub>2</sub> surišimo vieta ir aldehidu slopinama vieta persidengia (Lei et al., 1994). Taigi, A ir OR binarinio mišinio toksiškumo mažėjimas, didinant A koncentraciją mišinyje, gali būti paaiškintas hidrofobinių silpnai polinių oligoaromatinių PCB molekulių išsidėstymu šalia OR prisijungimo vietos, taip užkertant kelią ir OR prisijungimui.

OR ir S<sub>8</sub><sup>0</sup> binarinių mišinių efektų dvifaktorinė ANOVA 30 min. poveikio laikui, nurodo, kad OR, S<sub>8</sub><sup>0</sup> ir jų sąveika (OR × S<sub>8</sub><sup>0</sup>) statistiškai reikšmingai ( $P < 0,04$ ; 3.6 lentelė) nulėmė mišinio toksiškumą (3.9 pav.). Pagal daugialypę regresinę lygtį, aprašančią OR ir S<sub>8</sub><sup>0</sup> mišinio toksiškumą po 30 min. poveikio (3.7 lentelė; lygtis 3), galima interpretuoti, kad OR ir S<sub>8</sub><sup>0</sup> veikė adityviai su sinergistine sąveika. Tokio efekto paaiškinimas galėtų būti toks: alifatinė OR, galimai prisijungianti alifatinio aldehido *n*-dekanolio surišimo vietose, ir S<sub>8</sub><sup>0</sup>, reaguojanti su sulfhidrilinėmis fermentų funkcinėmis grupėmis, išdidina viena kitos toksiškumą, veikdamos skirtingose bioluminescencijos komplekso vietose (Lei et al., 1994; Choi et al., 1995).

Apibendrinant mišinių toksikodinaminių efektų statistinę interpretaciją (sk. 3.1.2.), galima teigti, kad nustatyti skirtingi toksikodinaminiai efektai bioluminescencijai po 30 min. priklausė nuo tiriamos bioluminescencijos sistemos. A ir S<sub>8</sub><sup>0</sup> veikė sistemą *in vivo* adityviai su sinergistine sąveika, o sistemą *in vitro* – adityviai be reikšmingos sąveikos; A ir OR veikė antagonistiskai abiejose sistemose; OR ir S<sub>8</sub><sup>0</sup> poveikis sistemai *in vivo* buvo adityvus su antagonistinės sąveikos komponente, o *in vitro* – adityvus su sinergistine sąveika. Individualių taršalų (A, OR ir S<sub>8</sub><sup>0</sup>) ir jų binarinių mišinių slopinantis poveikis bioluminescencijai mažėjo, ilgėjant poveikio laikui (30, 60 min.) *in vivo*, bet ne *in vitro* sistemoje. Tai leidžia teigti, kad bioluminescencijos *in vivo* sistemoje yra indukuojami apsauginiai fermentai, kurie šalina arba transformuoja šias toksines medžiagas.

*Skirtumai tarp bioluminescencijos in vivo ir in vitro tyrimų sistemų.* Kadangi skiriasi pačios bioluminescencijos *in vivo* ir *in vitro* sistemos bei šių sistemų poveikio vertinimo metodologijos, yra sudėtinga lyginti toksinių medžiagų ir jų mišinių efektus abiem sistemoms. Gerai žinoma, kad

švytinčiose bakterijose (*V. fischeri*, *V. harveyi*, *P. phosphoreum*) tik apie 17% viso sunaudojamo deguonies tenka liuciferazės reakcijai. Be to, elektronų srautas nukreipiamas į liuciferazės (bioluminescencijos komplekso) kelią tik tada kai kvėpavimo grandinės (citochromų) kelias yra išotintas (Bourgois et al., 2001). Kadangi bioluminescencijos *in vitro* sistema gaunama atskiriant ją nuo membranos, tokioje sistemoje nelieka oksidoredukcinio apjungimo su kvėpavimo grandine, todėl sistemos *in vitro* atveju nebelieka slopikliams jautrios NAD(P)H tiekimo bioluminescencijos kompleksui reguliacijos. Taigi, bioluminescencijos sistemos *in vivo* slopinimą gali lemti ne tik tiesioginė cheminių medžiagų sąveika su bioluminescencijos komplekso fermentais, bet ir redukuoto kofermento NAD(P)H tiekimo bioluminescencijos kompleksui reguliacija. Antra vertus, pagrindiniai metodologiniai skirtumai yra šie: baltymo koncentracija, reikalinga pasiekti panašų bioluminescencijos lygmenį; didelės substratų koncentracijos sistemos *in vitro* atveju (kai nėra substratus regeneruojančios apjungtos fermentų sistemos); terpės sudėtis (jūrinių bakterijų *V. fischeri* terpės atveju – 340 mM Na<sup>+</sup> koncentracija), ir kt. Šios sąlygos veikia bioluminescencinės sistemos jautrumą slopikliams. Nepaisant šių skirtumų, sistemos *in vitro* tyrimų duomenys gali papildyti sistemos *in vivo* tyrimų rezultatus, nes rodo papildomas toksinių medžiagų veikimo vietas konkrečiose fermentų sistemose.

Aiškinant bendrųjų anestetikų (hidrofobinių, nepolinių organinių cheminių junginių) toksikodinaminius efektus, priimta, kad abu, adityvus ir antagonistinis, efektai gali pasireikšti, kai cheminės medžiagos konkuruoja dėl to paties, ar keičia kitą (alosterinę) receptoriaus arba fermento vietą (Jenkins et al., 2008; Lei et al., 1994). Taigi, šiame darbe nustatyti trys skirtingi toksikodinaminiai efektai (antagonistinis, adityvus ir adityvus su sinergistine sąveika) sistemai *in vitro*, kartu su apibendrintais literatūros duomenimis, rodo, kad net fermentų sistemoje (*in vitro*) hidrofobinės toksinės medžiagos gali turėti kelias veikimo vietas (Curry et al., 1990; Abu-Soud et al., 1993; Lei et al., 1994; Koike et al., 1998; Low ir Tu, 2002). Iš kitos pusės, priešingas toksiškumo stiprumo kitimas bioluminescencijos sistemose *in vivo* ir *in vitro*,



liudija, kad tik sistema *in vivo* pasižymi toksinių efektų mažinimu. Visi šie duomenys paskatino išsamesnius individualių toksinių junginių poveikio vietų tyrimus abiejose (*in vivo* ir *in vitro*) sistemose.

### **3.2. A, OR ir $S_8^0$ poveikis *V. fischeri* bakterijų oksidoredukcinių fermentų sistemų ir citoplazminės membranos būklei *in vivo***

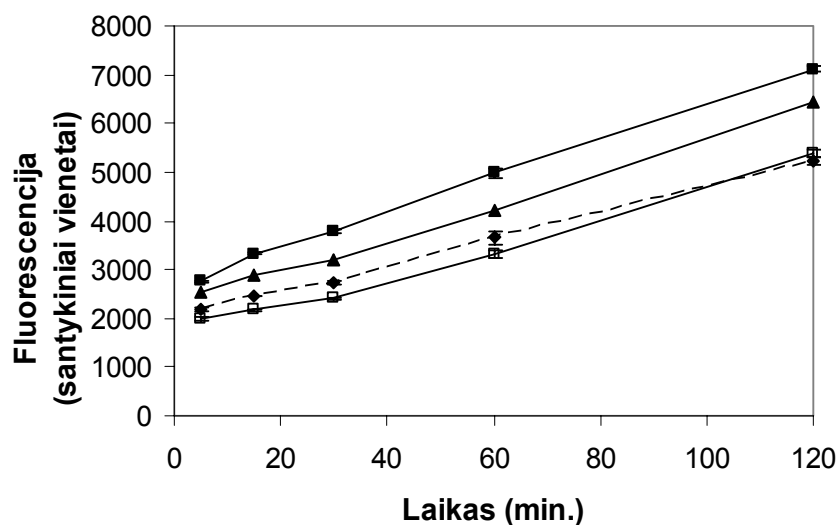
Antruoju tyrimo etapu analizavome galimus taršalų efektus *V. fischeri* ląstelių oksidoredukicinei būklei: ląstelių ROS gamybai; ląstelių redukcinei gebai; deguonies sunaudojimui; ir membranos potencialui.

#### **3.2.1. Aktyviųjų deguonies formų susidarymo pokyčiai**

Nustatyta, kad aktyviosios deguonies formos (ROS) susidarė *V. fischeri* ląstelėse, paveiktose tiek A, OR ir  $S_8^0$ , tiek kontroliniu tirpiklio kiekiu (etanoliu, 0,5%) (3.10 pav.). Lyginant su kontrole, A (5 mg/L) ir OR (6,25 mg/L) skatino ROS gamybą, tačiau  $S_8^0$  (1,1 mg/L) – mažino (3.10 pav.). Aktyviųjų deguonies formų kiekis slopikliais paveiktose ląstelėse didėjo ilgėjant poveikio laikui.

Žinoma, kad eukariotų hepatocituose PCB giminingi junginiai plačiame koncentracijų intervale (28,9  $\mu$ g/L–33 mg/L) sukelia ROS susidarymo skatinimą (Schlezinger et al., 2006; Aly ir Domenech, 2009) bei antioksidantinių fermentų (glutatio peroksidazės ir glutatio reduktazės) išsekvojimą (Aly ir Domenech, 2009). Tuo tarpu, mūsų tyrimų duomenys įrodo, kad PCB (Aroclor 1248) 5 mg/L koncentracija gali didinti ROS gamybą *V. fischeri* ląstelėse.

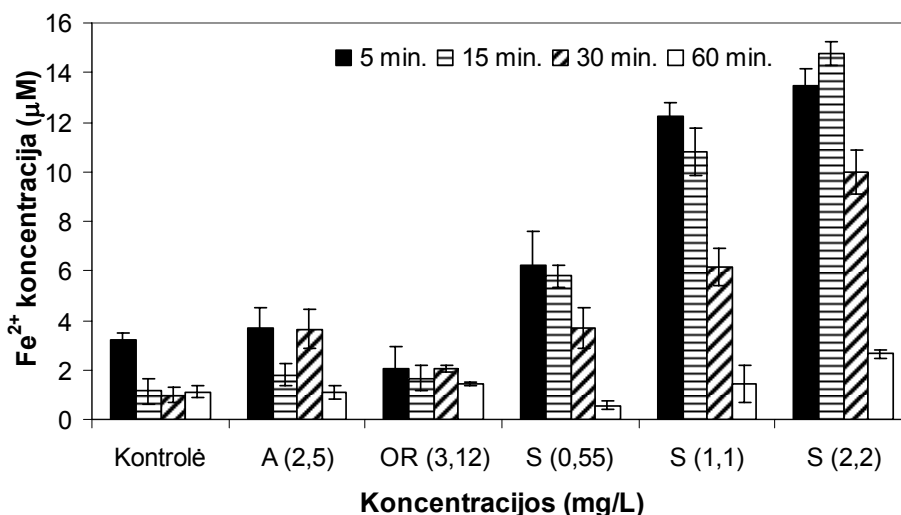
Anksčiau buvo nustatyta, kad LRR skatina ROS gamybą mitochondrijose tiesioginio elektronų transporto metu, bet mažina ROS susidarymą atgalinio elektronų transporto metu (Schönfeld ir Wojtczak, 2007). Taigi, mūsų duomenys, kad OR skatina ROS susidarymą ir deguonies sunaudojimą (t.y. tiesioginis elektronų transportas) *V. fischeri* ląstelėse yra palyginami su Schönfeld ir Wojtczak (2007) gautais riebalų rūgščių poveikio mitochondrijoms rezultatais.



**3.10 pav.** Aroclor 1248, oleino rūgšties ir sieros įtaka ROS susidarymui *V. fischeri* ląstelėse. Galutinis *V. fischeri* ląstelių optinis tankis ( $OT_{590}$ ) buvo 0,3; kitas sąlygas žiūrėti sk. “Medžiagos ir metodai”. Pateikti trijų atskirų eksperimentų vidurkiai  $\pm$  standartinis nuokrypis. --♦-- Kontrolė, -■- A 5 mg/L, -▲- OR 6,25 mg/L, -□- S 1,1 mg/L.

### 3.2.2. Ląstelių redukcinės gebos skatinimas

Bioluminescencijos *in vivo* atsistatymą (sk. 3.1.1.) gali lemti apsauginių fermentų sistemų aktyvumas *V. fischeri* ląstelėse. Vienas iš galimų *V. fischeri* apsauginių sistemų aktyvumo požymių yra redukcinė (antioksidantinė) ląstelių geba, kurią vertiname FRAP metodu. Nustatyta, kad pačių *V. fischeri* ląstelių FRAP reikšmės buvo mažos (3.11 pav.). Tačiau,  $S_8^0$  (0,55–2,2 mg/L) padidino ląstelių redukcinę gebą net per pirmąją minutę (duomenys nepateikti), o po 5 min. FRAP reikšmės buvo 2-4 kartus didesnės, lyginant su kontrole ( $S_8^0$  ir etanolis neturėjo įtakos FRAP reakcijai be ląstelių). Šios FRAP reikšmės mažėjo, ilgėjant ląstelių preinkubacijos su  $S_8^0$  laikui iki 60 min. Priešingai, labai nedidelis FRAP reikšmių padidėjimas (artimas kontrolinėms reikšmėms) buvo stebimas su kitais dviem junginiais A (2,5 mg/L) ir OR (3,12 mg/L) per 5–60 min. Tai leido daryti prielaidą, kad  $S_8^0$  indukavo *V. fischeri* ląstelių redukcinę gebą daug stipriau nei A ir OR. Ląstelių pagamintų redukuojančių ekvivalentų kiekis mažėjo, ilgėjant poveikio laikui (iki 60 min.).



**3.11 pav.** Aroclor 1248, oleino rūgštis ir sieros įtaka *V. fischeri* ląstelių redukcinės gebos pokyčiams. Galutinis *V. fischeri* ląstelių optinis tankis ( $OT_{590}$ ) buvo 0,3; kitas sąlygas žiūrėti sk. “Medžiagos ir metodai”. Pateikti trijų atskirų eksperimentų vidurkiai  $\pm$  standartinis nuokrypis.

FRAP metodas yra paremtas reagento redukcija, kaip ir tetrazolio duskų, rezazurino ir kt. redukcijos metodai, kurie naudojami mikroorganizmų dehidrogenazių aktyvumo nustatymui (Lopez et al., 1986; Gabbita ir Hang, 1984; Liu, 1986). Tai rodytų, kad FRAP metodu nustatoma,  $S_8^0$  indukuojama *V. fischeri* ląstelių redukcinė geba atspindi oksidoredukcinių fermentų aktyvumą. Kyla klausimas, kokie redukuojantys ekvivalentai gaminami *V. fischeri* oksidoreduktazių.

Žinoma, kad *Vibrio* spp. geba redukuoti įvairius junginius (chromatą, dumblių mikrosporinų amino rūgštis, geležies druskas) (Fulladosa et al., 2006; Shick ir Dunlap, 2002; Hasanuzzaman ir Araki, 2001), todėl yra tikimybė, kad *V. fischeri* taip pat gali redukuoti  $S_8^0$  iki  $H_2S$ .

Yra tikimybė, kad *V. fischeri* geba atlikti kitokias biotransformacijos reakcijas. Četkauskaitė su bendraautoriais (2004) teigė, kad  $S_8^0$  toksiškumo mažėjimą gali lemti yra  $S_8^0$  oksidacija. Verta pažymėti, kad  $S_8^0$  oksiduojančios bakterijos (pvz., *Acidithiobacillus thiooxidans*) turi sieros dioksigenazes (EC 1.13.11.18), kurių katalizuojamos  $S_8^0$  oksidacijos pradinėse stadijose susidaro  $H_2S$  ir monoorganilpolisulfanas ( $GS_nH$ ,  $n>1$ ) (Rohwerder ir Sand, 2003).

Be to, nustatyta, kad H<sub>2</sub>S gamyba iš baltymų arba kitų sieros organinių junginių yra daugumos heterotrofinių bakterijų, įskaitant *Vibrio* spp., identifikavimo žymuo (Jegathesan ir Paramasivam, 1976). Taigi, atsižvelgiant į išvardintus duomenis, tikėtina, kad *V. fischeri* ląstelėse susidaręs redukuojantis junginys yra H<sub>2</sub>S.

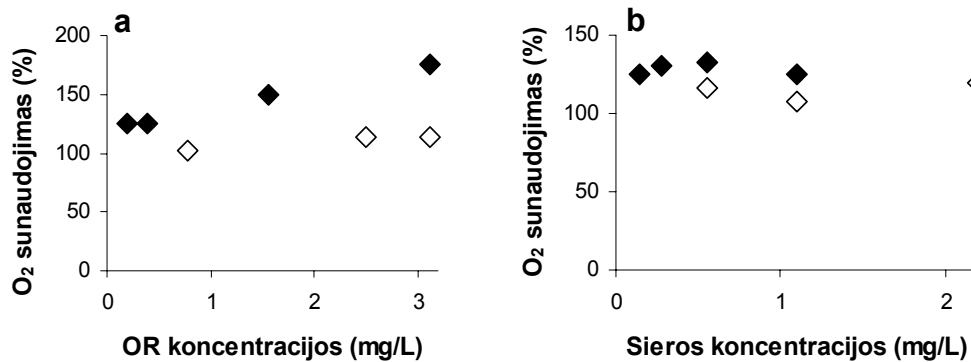
Šią prielaidą remia ir tai, kad įvairios geležies (III) druskos (sulfatas, citratas, chloridas), kartu su kitais oksidacijos-redukcijos reakcijose dalyvaujančiais organiniais junginiais yra naudojamos kaip H<sub>2</sub>S nustatymo arba pašalinimo agentai (<http://lydakis.chania.teicrete.gr/>; <http://www.wipo.int/>).

Didžiausias bioluminescencijos slopinimas S<sub>8</sub><sup>0</sup> bei didžiausios FRAP reikšmės buvo nustatytos po 5 ir 15 min. poveikio S<sub>8</sub><sup>0</sup>, o vėliau buvo stebimas šių procesų silpimas. Taigi, tikėtina, kad bioluminescencijos atsistatymą lėmė S<sub>8</sub><sup>0</sup> biotransformacija iki mažiau toksiško junginio. Pavyzdžiui, žinoma, kad H<sub>2</sub>S (30 min. EC<sub>50</sub> = 9,38 mg/L) yra mažiau toksiškas *V. fischeri* bakterijoms nei sieros S<sub>8</sub><sup>0</sup> (15 min. EC<sub>50</sub> = 11,9–36 µg/L) (Jacobs et al., 1992; Salizzato et al., 1998a; Svenson et al., 1998; Pardos et al., 1999). Be to, mūsų gauti rezultatai rodo, kad natrio sulfidas 100-1000 kartų didesnėmis (0,04–8 mg/L) nei sieros koncentracijomis silpnai slopina *V. fischeri* bioluminescenciją, esant pH 7,0 (Kalcienė ir Četkauskaitė, 2006).

Verta pažymėti, kad FRAP tyrimas yra netiesioginis bendrosios antioksidantinės gebos testas (jis nejautrus –SH grupes turintiems antioksidantinės sistemos fermentams); tačiau FRAP duomenys serumo pavyzdžiuose silpnai, bet statistiškai reikšmingai koreliuoja su deguonies (arba pro-oksidantų - peroksilo, hidroksilo) radikalų sugerties geba (ORAC) (Prior ir Cao, 1999). Tokia pačia S<sub>8</sub><sup>0</sup> koncentracija (1,1 mg/L) sukeltas ROS gamybos sumažėjimas (3.10 pav.) ir antioksidantinės ląstelių gebos aktyvumas (3.11 pav.) (abu iki 1 val.) rodo galimą oksidoredukcinių fermentų sistemos indukciją.

### 3.2.3. Deguonies sunaudojimo skatinimas

Deguonies sunaudojimas arba kvėpavimas daugelyje prokariotinių ląstelių ir eukariotų mitochondrijose atspindi oksidacinio fosforilavimo būklę. Klasikinis kvėpavimo skyriklis, silpna rūgštis ( $pK_a$  4,1) 2,4-dinitrofenolis (200  $\mu$ M arba 36,8 mg/L), naudotas šiame darbe kaip palyginamasis junginys, ir A (5 mg/L) padidino *V. fischeri* ląstelių deguonies sunaudojimą 31% ir 13%, atitinkamai (duomenys nepateikti), esant pH 7,0. Panašiai, OR (2,5–3,12 mg/L) skatino *V. fischeri* ląstelių kvėpavimą 14% (3.12a pav.). Tik didelė  $S_8^0$  koncentracija (2,2 mg/L) skatino kvėpavimą 20%, esant pH 7,0 (3.12b pav.).



**3.12 pav.** *V. fischeri* bakterijų deguonies sunaudojimo skatinimas po 5 min. trukmės poveikio oleino rūgštimi (a) ir siera (b) esant skirtingiems pH. Galutinis *V. fischeri* ląstelių optinis tankis ( $OT_{590}$ ) buvo 0,3. -◆- pH 6,0; -◇- pH 7,0.

Šiame darbe nustatyta, kad OR ir  $S_8^0$  sukeltas kvėpavimo skatinimas esant pH 6,0 buvo reikšmingai ( $P < 0,05$ ) didesnis nei ties pH 7,0 (3.12a pav.; 3.12b pav.). Yra žinoma, kad oksidacinio fosforilavimo skyrikliai yra mažiau aktyvūs šarminiame pH ( $\geq 7,0$ ) (Tokuda ir Unemoto, 1983; Wada et al., 1992). Ankstesni tyrimai rodo, kad *V. harveyi* augimas, liuminescencija ir kvėpavimas yra atsparūs CCCP (10  $\mu$ M or 2 mg/L) poveikiui, esant pH 7,5–8,5, t.y. kai elektrocheminis gradientas palaikomas  $Na^+$  jonais (Wada et al., 1992; Fujiwara-Nagata et al., 2003). Taigi, gauti rezultatai leidžia teigti, kad OR ir  $S_8^0$  koncentracijų intervale nuo 0,14 iki 3,12 mg/L veikė panašiai kaip

klasikiniai skyrikliai, kurie išsklaido protonų gradientą efektyviau esant pH 6,0, kai elektrocheminė energija priklauso daugiausiai nuo  $H^+$ , bet ne nuo  $Na^+$  gradiento.

*V. fisheri* bakterijų kvėpavimas, oksiduojant NADH, atspindi deguonies sunaudojimą tiek kvėpavimo grandinės fermentais (apimant  $Na^+$ -pompuojančią NADH:chinono oksidoreduktazę, kuri geba pernešti  $Na^+$  iš ląstelės vidaus į išorę), tiek bioluminescencijos kompleksu. Be to, žinoma, kad kvėpavimo skatinimas elektrocheminį protonų ir jonų gradientą generuojančiose membranose, kurios būdingos ir jūrinėms *V. fisheri*, yra skyriklinio veikimo požymis (Skulachev, 1998).

Taigi, šio darbo duomenys apie du vienu metu vykstančius procesus, t.y. A, OR arba  $S_8^0$  sukeltą bioluminescencijos slopinimą ir deguonies sunaudojimo skatinimą, leidžia teigti, kad keli iš daugelio galimų šių junginių veikimo mechanizmų yra nepakankamas elektronų patekimas į bioluminescencijos komplekso kelią (kai nepakankamai išotinta kvėpavimo grandinė); galimas bioluminescencijos komplekso kelio fermentų slopinimas; ir galimas citoplazminės membranos pralaidumo didėjimas (specifinis arba ne). Pastarąjį efektą gali sukelti skyriklinis, atskiriantysis entropinis arba narkotinis cheminių medžiagų veikimas.

#### **3.2.4. Poveikis membranos potencialui**

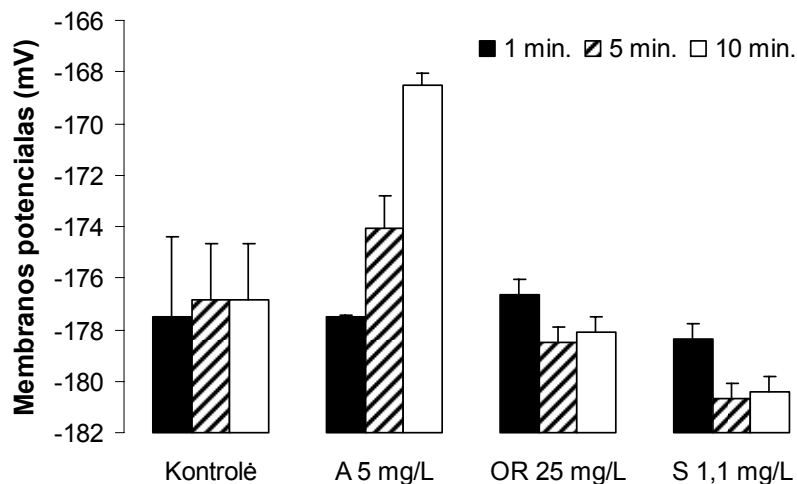
Rezultatai, kad hidrofobiniai junginiai A, OR ir  $S_8^0$  sukelia *V. fisheri* bioluminescencijos slopinimą, deguonies sunaudojimo skatinimą bei ROS gamybos pokyčius, rodo, kad toksinių medžiagų veikimo vietos yra citoplazminėje membranoje. Kyla klausimas, kaip šios toksinės medžiagos keičia vidinės membranos laidumą.

Verta pabrėžti, kad įprastai vidinės membranos lipidų dv sluoksnis yra pakankamai laidus lipofiliniams junginiams. Tačiau gram-neigiamų bakterijų išorinė membrana sudaro barjerą pasyviai lipofilinių katijoninių junginių difuzijai į ląsteles, nes turi neigiamai įkrautą lipopolisacharidų sluoksnį, kuris yra stabilizuojamas divalenčių metalų jonų (Nikaido, 2003). Pavyzdžiui,

gram-neigiamų *Escherichia coli* išorinės membranos pralaidumui padidinti yra naudojamas EDTA, kuris sudaro kompleksus su divalenciais metalų jonais, ir kelis kartus padidina išorinės membranos pralaidumą (Leive, 1965; Pudžiuvytė et al., 2008). Šiame darbe, kaip ir bioluminescencijos matavimo atveju, panaudotos EDTA neapdorotos *V. fischeri* ląstelės. Neapdorotos *V. fischeri* ląstelės ( $10^9$  ląstelių/ml) sugėrė apie  $0,3 \mu\text{M TPP}^+$ . *V. fischeri* bakterijų išorinės membranos baltymai porinai gali užtikrinti lipofilinio katijono sukaupimą bei bioluminescencijos jautrumą įvairioms hidrofobinėms medžiagoms. *V. fischeri* kaip ir kitos gram-neigiamos bakterijos turi išorinės membranos porinus, pavyzdžiui OmpU (32,5 kDa baltymą), kuris, pirma, kaip ir kiti porinai praleidžia iki 1000 Da molekulinio svoro junginius; antra, yra katijonams selektyvus; trečia, suteikia atsparumą tulžies druskoms; ir, ketvirta, yra svarbus simbiotinei kolonizacijai (<http://www.tcdb.org/>; Aeckersberg et al., 2001; Benz, 2004). Todėl galima manyti, kad tokie baltymai išorinėje membranoje galėtų sudaryti pakankamą pralaidumą katijoniniam  $\text{TPP}^+$ . Antra vertus, mažas lipopolisacharidų neigiamas krūvis bei išorinėje membranoje eksponuoti fosfolipidų fragmentai gali sudaryti geras  $\text{TPP}^+$  laidumo sąlygas. Pavyzdžiui, pastarąsias membranos savybes turi lipofiliniams junginiams jautrios *V. cholera* bakterijos, kurios membranos sudėtimi yra panašios į *V. fischeri* (Paul et al., 1992).

Kaip minėta literatūros apžvalgoje (sk. 1.5.3.), jūrinėse *Vibrio* spp. bakterijose skersai citoplazminės membranos sukuriama ne tik  $\text{H}^+$ , bet ir papildomas  $\text{Na}^+$  elektrocheminis gradientas, kurį formuoja  $\text{Na}^+$  jonus pompuojanti NADH-chinono oksidoreduktazė bei  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  priešnašos nešiklis (Oh et al., 1991; Hayashi et al., 2001). Protonų elektrocheminis gradientas ( $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ ) ir jį buferinanti forma –  $\text{Na}^+$  gradientas ( $\Delta\mu_{\text{Na}^+}$ ) gali būti panaudojami ATP sintezei, medžiagų ( $\text{P}_n$ , metabolitų ir toksinų) transportui, žiuželio judėjimui, ir gali būti išsklaidytas, protonams pratekant per membraną (Скулачев, 1989). Taigi,  $\Delta\mu_{\text{H}^+}$  ir  $\Delta\mu_{\text{Na}^+}$  yra naudojami *V. fischeri* ląstelėse membranos potencialo palaikymui. Todėl šiame darbe atliktų eksperimentų sąlygomis (2% NaCl, pH 7,0) membranos potencialo jautrumas lipofiliniams ar

skyrikliniams junginiams galėtų būti žymiai mažesnis, nei rūgštiniame pH, kai dominuoja tik protonų gradientas.



**3.13 pav.** Aroclor 1248, oleino rūgšties ir sieros sukelti *V. fischeri* ląstelių membranos potencialo pokyčiai. Galutinis *V. fischeri* ląstelių optinis tankis ( $OT_{590}$ ) buvo 0,9. Nurodytas inkubacijos su slopikiais ar kontrole (etanoliu) laikas. Pateikti trijų atskirų eksperimentų vidurkiai  $\pm$  standartinis nuokrypis.

Šiame darbe A (5 mg/L arba 17,12  $\mu$ M) sumažino *V. fischeri* membranos potencialą 8 mV per 10 min. (3.13 pav.). Verta priminti, kad tokia pati A koncentracija skatino deguonies sunaudojimą ir ROS susidarymą *V. fischeri* ląstelėse. Anksčiau panašūs efektai buvo nustatyti, paveikus žiurkių kepenų mitochondrijas PCB mišiniu KC-400, kurio sudėtis yra analogiška Aroclor 1248 sudėčiai. KC-400 (30 mg/L) skatino 4-os metabolinės būsenos mitochondrijų kvėpavimą, naudojant  $\alpha$ -ketogliutaratą/malatą, išskleidė membranos potencialą bei skatino viduląstelių  $K^+$  išėjimą (Nishihara, 1985). Buvo parodyta, kad neplanariniai tetrachlorobifenilai, TCB (turintys mažiausiai 2 Cl atomus 2,2' ir kitose, pvz., 6,6', bifenilo žiedų padėtyse), koncentracijų ribose nuo 40 iki 80  $\mu$ M sukelia oksidacinio fosforilimo atskyrimą, membranos pralaidumą  $Ca^{2+}$ ,  $K^+$  jonams bei potencialo sumažėjimą žiurkių kepenų 4-os metabolinės būsenos mitochondrijose (Nishihara et al.,



1987). Tačiau tirti planariniai TCB skyrikliniu veikimu nepasižymėjo (Nishihara et al., 1987). Tuo tarpu neplanarinis 2,2',5,5'-TCB (5,8 mg/L arba 20  $\mu$ M) padidino vidinės membranos pralaidumą jonams, silpnai padidino membranos potencialą (3 mV) ir slopino kvėpavimą bei fosforilinimą 3-ios metabolinės būsenos žiurkių kepenų mitochondrijose (Mildažienė et al., 2002b).

Kadangi A turi pakankamai didelį kiekį neplanarinių PCB (~42%), kai kurie A sukelti efektai *V. fischeri* ląstelėse (deguonies sunaudojimo (sk. 3.2.3.) ir ROS (sk. 3.2.1.) susidarymo skatinimas, membranos potencialo mažinimas) buvo panašūs į neplanarinių PCB sukeltus efektus mitochondrijose. Be to membranos potencialo mažinimas būdingas skyrikliniam veikimui, o PCB neturi disocijuojančios organinės rūgšties grupės, todėl jie neturėtų veikti kaip klasikiniai protonoforiniai skyrikliai.

Anksčiau buvo nustatyta, kad Aroclor 1257 (10–60  $\mu$ M arba 6,5–33 mg/L koncentracijų intervale) (Aly ir Domenech, 2009) ir 2,2',5,5'-TCB (5,8 mg/L) (Mildažienė et al., 2002b) slopina žiurkių kepenų mitochondrijų kvėpavimo grandinės pirmąjį kompleksą. Taigi, mūsų darbe A (5 mg/L) veikė keliais būdais: skatino deguonies sunaudojimą (sk. 3.2.3.); mažino membranos potencialą; skatino ROS susidarymą, matyt, veikdamas specifiskai *V. fischeri* kvėpavimo grandinės komponentus (pvz., NADH dehidrogenazes). Taip pat yra tikimybė, kad A *V. fischeri* bakterijose sukėlė nespecifinį membranos pralaidumą kaip ir kiti neplanariniai PCB mitochondrijose anksčiau minėtais atvejais.

Mūsų darbe maža OR koncentracija neturėjo įtakos membranos potencialui (3,12 mg/L arba 11  $\mu$ M), o didelė OR koncentracija (25 mg/L) nežymiai padidino membranos potencialą ~2 mV per 10 min. (3.13 pav.). Žinoma, kad riebalų rūgštys mitochondrijose veikia kaip klasikiniai oksidacinio fosforilinimo skyrikliai, t.y. mažina membranos potencialą (Rottenberg ir Hashimoto, 1986). Tačiau OR poveikis *V. fischeri* ląstelėms skiriasi nuo poveikio mitochondrijoms. OR skatino deguonies sunaudojimą

(3.12 pav.), tačiau membranos potencialui neturėjo įtakos arba jį nežymiai didino (3.13 pav.). Tikėtina, kad membranos potencialo padidėjimą 10 minučių laikotarpyje lėmė papildomų  $\text{Na}^+$  ar  $\text{K}^+$  gradientų pokyčiai (pvz.,  $\text{K}^+$  išėjimas). Žinoma, kad jūrinėse *Vibrio* spp. protonų elektrocheminį gradientą reguliuoja  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ,  $\text{K}^+/\text{H}^+$  priešnašos nešikliai (Nakamura et al., 1984; Nakamura et al., 1995; Dibrov ir Fliegel, 1998), todėl membranos potencialas priklauso ir nuo šių nešiklių veiklos. Nustatyta, kad riebalų rūgštys (0,304–0,497  $\mu\text{M}$ ) pažeidžia cianobakterijų (*Anabaena* P-9) citoplazminės membranos integralumą, sukeldamos viduląstelių  $\text{K}^+$  išėjimą (Wu et al., 2006). Tiriant eukariotinėse ląsteles parodyta, kad OR (25  $\mu\text{M}$  arba  $\sim 7$  mg/L) blokuoja aktyviają transepitelinę  $\text{Na}^+$  pernašą (92%) kovalentiškai prisijungdama prie  $\text{Na}^+$  kanalų, ir panašiomis koncentracijomis ( $>10$   $\mu\text{M}$ ) slopina  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPazės aktyvumą triušių plaučių alveolėse (Vadasz et al., 2005). Remiantis duomenimis apie riebalų rūgščių poveikį pro ir eukariotų membranoms, galima tikėtis, kad OR gali keisti  $\text{Na}^+$  arba  $\text{K}^+$  pernašą per *V. fischeri* membraną (pvz., didelė koncentracija skatinti  $\text{K}^+$  ištekėjimą, kadangi nustatyta, kad švytinčiųjų bakterijų ląstelių viduje sukaupiami  $\text{K}^+$  koncentracija gali siekti 300 mM (Watanabe et al., 1991)). Anksčiau parodyta, kad  $\text{TPP}^+$  sugėrimą ir  $\text{K}^+$  ištekėjimą iš švytinčiųjų *P. phosphoreum* ląstelių skatina didelės herbicido propanilo (50 mg/L) koncentracijos (Beržinskienė ir Četkauskaitė, 1996). Remiantis šiais duomenimis galima tikėtis, kad OR sukeltas kvėpavimo skatinimas indukavo nespecifinį ir specifinį  $\text{H}^+$ ,  $\text{K}^+$  ištekėjimą ir palengvino  $\text{TPP}^+$  sugėrimą.

$\text{S}_8^0$  (1,1 mg/L), kaip ir OR, sukėlė nežymų membranos potencialo padidėjimą ( $\sim 2$  mV) per 10 min (3.13 pav.), nepaisant jos sukulto kvėpavimo skatinimo (3.12 pav.).

Tokie silpni OR ir  $\text{S}_8^0$  efektai membranos potencialui gali būti paaiškinti stipriu buferinančiu  $\text{Na}^+$  ir  $\text{K}^+$  gradientu (papildomu protonų gradientui) ir pavyzdžiui,  $\text{K}^+$  išmetimu iš ląstelių (Beržinskienė ir Četkauskaitė, 1996). Pažymėtina, kad esant aktyvioms ląstelėms ir stipriems  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{H}^+$  gradientams, skyriklinio aktyvumo medžiagų nulemtas žymus membranos

potencialo sumažėjimas gali būti pasiekiamas daugiau nei per 30 min. Be to, membranos potencialo nejautrumas hidrofobiniams poliniams junginiams (OR,  $S_8^0$  ir TPP<sup>+</sup>) gali būti sąlygotas daugybinio atsparumo vaistams pumpų, kurios nustatytos *Vibrio* spp. (Ruby et al., 2005; Antunes et al., 2007; Gu et al., 2009; Kuroda ir Tsuchiya, 2009).

Taigi, nustatėme A, OR ir  $S_8^0$  sukeltus fiziologinius-biocheminius efektus *V. fischeri* ląstelėse, kurie yra susiję su ląstelių bioluminescencijos funkcijos slopinimu. Parodėme, kad A ir OR, bet ne  $S_8^0$  skatino ROS susidarymą *V. fischeri* ląstelėse. Priešingai,  $S_8^0$  (daugiau nei A ir OR) didino *V. fischeri* ląstelių redukcinę gebą (FRAP), , tai leidžia teigti, kad *V. fischeri* ląstelėse yra aktyvios apsauginės oksidoredukcinių fermentų sistemos. A, OR ir  $S_8^0$  (0,14–5 mg/L) sukeltas *V. fischeri* bakterijų kvėpavimo skatinimas nurodo į skyriklinį medžiagų aktyvumą. Tačiau skirtingi efektai jūrinių bakterijų membranos potencialui (A mažina, o OR ir  $S_8^0$  neturi reikšmingos įtakos) leidžia manyti, kad individualių junginių veikimo mechanizmai yra daug sudėtingesni. Taigi, neabejotina tai, kad tirti hidrofobiniai junginiai pasižymėjo daugybiniais biocheminiais toksiniais efektais ir kiekvieno šių junginių (A, OR ir  $S_8^0$ ) individualių efektų paveikslas skyrėsi.

### **3.3. A, OR ir $S_8^0$ poveikis bioluminescencijos fermentų sistemai**

Siekiant prognozuoti galimas A, OR ir  $S_8^0$  veikimo vietas fermentų sistemose, vertinome jų poveikį nuo bioluminescencijos komplekso priklausomam deguonies sunaudojimui, analizavome šių taršalų sukulto bioluminescencijos *in vivo* slopinimo pokyčius, pridėjus *n*-dekanolio (liuciferazės substrato), lyginome toksinių medžiagų efektus NADH oksidacijai ir bioluminescencijai *in vivo*. Be to, siekiant išsiaiškinti  $S_8^0$  veikimo vietas, lyginome  $S_8^0$  ir –SH grupes alkilinančio N-etilmaleimido (NEM) individualiai, bei kartu su disulfidinių tiltelių reduktoriumi 1,4-ditiotreitoliu (DTT) sukeltus efektus bioluminescencijai *in vivo* ir *in vitro*.

### 3.3.1. Nuo liuciferazės komplekso priklausomo deguonies sunaudojimo slopinimas *in vivo*

Žinoma, kad liuciferazės (bioluminescencijos) komplekso keliui *V. fischeri* ląstelėse tenka 17–20,7% viso kvėpavimui sunaudojamo deguonies (Makemson, 1986; Bourgois et al., 2001). Mūsų duomenys patvirtina, kad 18% viso kvėpavimui tenkančio deguonies sunaudoja bioluminescencijos kompleksas, kuris yra nejautrus KCN (1 mM) (3.8 lentelė). OR ir  $S_8^0$ , panašiai kaip žinomas liuciferazės slopiklis – *n*-dekanolis, slopino likusį kvėpavimo grandinės slopikliui (KCN 1 mM) atsparų (t.y. bioluminescencijos kelio), deguonies sunaudojimą. Taigi, nejautrus KCN *V. fischeri* deguonies sunaudojimo nuslopinimas OR ir  $S_8^0$  leidžia teigti, kad OR ir  $S_8^0$ , panašiai kaip ir *n*-dekanolio, poveikio vietos yra *V. fischeri* ląstelių liuciferazės fermente. Kadangi žinoma, kad bioluminescentinėje reakcijoje su deguonimi gali reaguoti pirmasis susidaręs liuciferazės·FMNH<sup>-</sup> tarpinis junginys (1.3 pav.) (Tu ir Mager, 1995), todėl FMNH<sub>2</sub> prieinamumas lemia deguonies sunaudojimą liuciferaze. Taigi, liuciferazės deguonies sunaudojimo slopinimą OR ir  $S_8^0$  galima paaiškinti FMNH<sub>2</sub> perdavimo atskirimu nuo NADH:FMN oksidoreduktazės liuciferazei šių fermentų komplekse arba šių fermentų slopinimu.

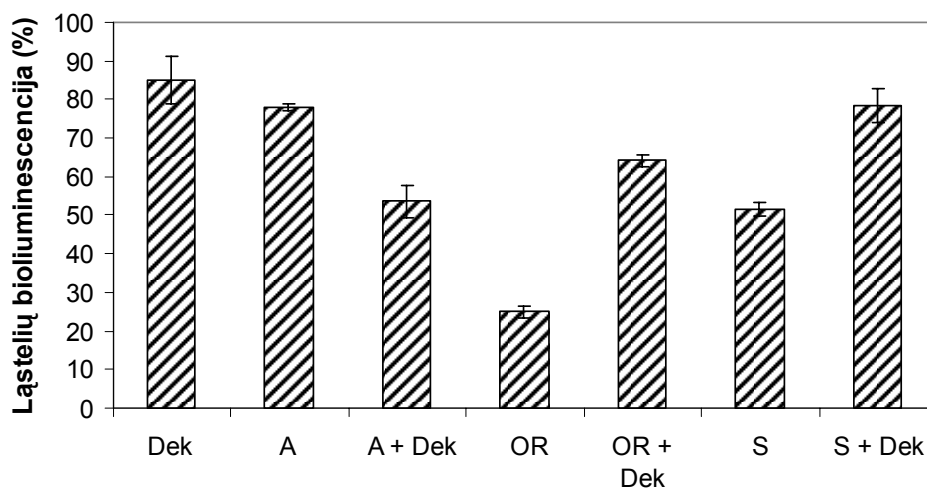
**3.8 lentelė.** *n*-Dekanolio, oleino rūgšties ir sieros poveikis bioluminescencijos komplekso deguonies sunaudojimui *in vivo*<sup>a</sup>

Parametras	O <sub>2</sub> sunaudojimas (%)
KCN	18 %
KCN + <i>n</i> -dekanolis	0 %
KCN + OR	9 %
KCN + $S_8^0$	9 %

<sup>a</sup> – Reakcijos terpė: 50 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2% NaCl, pH 6,0. Galutinis *V. fischeri* ląstelių optinis tankis (OT<sub>590</sub>) buvo 0,3. Koncentracijos: KCN 1 mM; *n*-dekanolis 60 μM; OR 0,78 mg/L arba 2,75 μM;  $S_8^0$  0,55 mg/L arba 2,15 μM.

### 3.3.2. *V. fischeri* bioluminescencijos apgynimas *n*-dekanaliu mišiniuose su slopikliais A, OR ir $S_8^0$

Siekiant išsiaiškinti slopiklių (A, OR ir  $S_8^0$ ) poveikio vietas liuciferazėje, tyrėme jų poveikį bioluminescencijai *in vivo* kartu su liuciferazės substratu *n*-dekanaliu (Dek). Yra žinoma, kad Dek didesnėmis koncentracijomis ( $> 10 \mu\text{M}$ , priklausomai nuo tiriamos sistemos baltymo koncentracijos) slopina bioluminescencijos funkciją (Abu-Soud et al., 1993; Lei et al., 1994). Šiame darbe A (5 mg/L arba  $17 \mu\text{M}$ ) ir Dek (3,12 mg/L arba  $20 \mu\text{M}$ ) binarinio mišinio sukeltas bioluminescencijos slopinimas *in vivo* po 30 min. buvo reikšmingai didesnis ( $P < 0,05$ ), nei individualių Dek (3,12 mg/L) ir A (5 mg/L) medžiagų sukelti efektai (3.14 pav.). Šie pastebėjimai leidžia teigti, kad A nekonkuruoja su Dek dėl prisijungimo aktyviajame liuciferazės centre *in vivo* (Lei et al., 1994; Choi et al., 1995).



**3.14 pav.** Liuciferazės substrato *n*-dekanolio (Dek) poveikis *V. fischeri* bioluminescencijai *in vivo*, kartu su A, OR ir  $S_8^0$  po 30 min. Pateikti trijų atskirų eksperimentų vidurkiai  $\pm$  standartinis nuokrypis. Koncentracijos (mg/L): Dek – 3,12; A – 5,0; OR – 3,12;  $S_8^0$  – 0,055.

OR (3,12 mg/L) buvo pridėta į ląstelių suspensiją pirmiau nei Dek (3,12 mg/L). Toks mišinys slopino ląstelių bioluminescenciją ~40% mažiau nei viena OR (3,12 mg/L) po 30 min. (3.14 pav.). Taigi, Dek (3,12 mg/L) mišinyje

su OR (3,12 mg/L) apgynė nuo OR toksiškumo ir galimai veikė antagonistiskai (3.14 pav.). Šie rezultatai leidžia teigti, kad OR prisijungimo vieta yra arti bent jau prie Dek kaip liuciferazės substrato jungimosi vietos.

Liuciferazės substratas Dek (3,12 mg/L), pridėtas po  $S_8^0$  (0,055 mg/L), sumažino  $S_8^0$  toksiškumą 30% po 30 min. poveikio (3.14 pav.). Be to, šio binarinio mišinio ir individualiai Dek (3,12 mg/L) sukeltas neigiamas poveikis bioluminescencijai statistiškai reikšmingai nesiskyrė ( $P > 0,05$ ). Šie duomenys liudija antagonistinį (galimai konkurencinį) Dek veikimą  $S_8^0$  atžvilgiu. Interpretuojant šiuos rezultatus, galima teigti, kad  $S_8^0$ , kaip sulfhidrilių grupių reagento (Russell et al., 1995; Rohwerder ir Sand, 2003), poveikio vieta yra susijusi su hidrofobinio Dek jungimosi vieta. Šis siūlymą paremia tai, kad pagal žinomą bakterinės liuciferazės aktyviojo centro struktūrą cisteino sulfhidrilinė grupė yra arti aldehido surišimo vietų (Fried ir Tu, 1984; Abu-Soud et al., 1993; Lei et al., 1994).

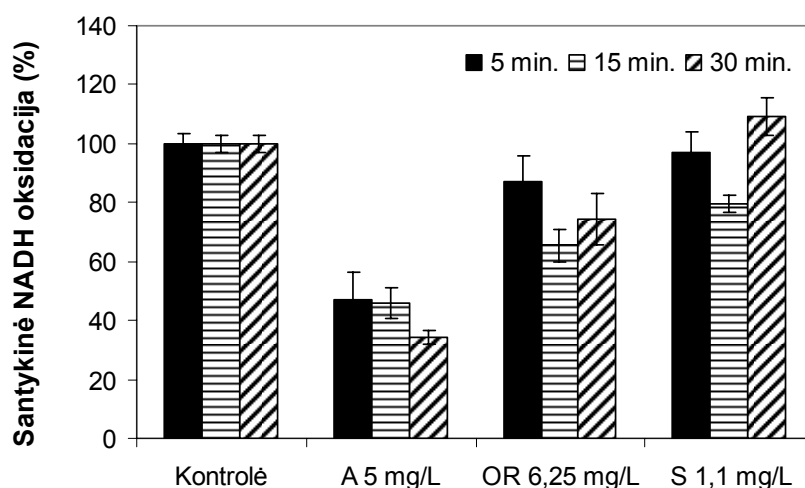
### 3.3.3. A, OR ir $S_8^0$ poveikis NADH oksidacijai *in vitro*

Kadangi visos analizuotos medžiagos slopino bioluminescenciją *in vitro*, bioluminescenciją ir deguonies sunaudojimą bioluminescencijos kompleksu *in vivo* (esant KCN), buvo iškelta prielaida, kad be FMNH<sub>2</sub> perdavimo tarp fermentų yra veikiamas NADH oksidacija NADH:FMN oksidoreduktaze.

Šiame darbe A (5 mg/L) slopino NADH oksidaciją *in vitro* 53% po 5 min. ir 66% po 30 min. (3.15 pav.). Taigi, galime teigti, kad A (5 mg/L) veikė kaip negrįžtamas NADH:FMN oksidoreduktazės slopiklis. Tačiau, ta pati A koncentracija (5 mg/L) bioluminescenciją *in vitro* slopino 35 ir 56% po 5 ir 30 min., atitinkamai (3.1 lentelė). Stipresnis NADH oksidacijos slopinimas nei bioluminescencijos slopinimas *in vitro* liudija, kad pagrindinė A jungimosi vieta yra NADH:FMN oksidoreduktazėje ir, galbūt, tai NADH jungimosi vieta.

Verta prisiminti, kad NADH:FMN oksidoreduktazės aktyvųjį centrą sudaro hidrofobinės ir hidrofobinės-polinės amino rūgštys, tarp kurių yra elektrofilinės amino rūgštys (His, Lys, Arg). Be to, NADH prisijungimui svarbūs fenilalanino žiedai sąlygoja aktyviojo centro erdvines savybes (Koike

et al., 1998). Visos šios NADH:FMN oksidoreduktazės fermento aktyviojo centro savybės (hidrofobiškumas, poliškumas ir aromatinių žiedų turinti sterinė aplinka) atitinka PCB (kaip hidrofobinių oligoaromatinių junginių, su silpnai nukleofilinėmis savybėmis) susirišimo poreikius.



**3.15 pav.** Aroclor 1248, oleino rūgšties ir sieros paveikis bioluminescencijos komplekso *in vitro* NADH oksidacijai. Pateikti trijų atskirų eksperimentų vidurkiai  $\pm$  standartinis nuokrypis.

Literatūros duomenys, kad neplanarinis 2,2',5,5'-TCB (20–140  $\mu$ M) (Mildažienė et al., 2002b) ir Aroclor 1254 (20–60  $\mu$ M) (Aly ir Domenech, 2009) slopina žiurkių kepenų mitochondrijų I-ąjį kvėpavimo kompleksą (NADH-chinono oksidoreduktazę) paremia mūsų prielaidą, kad A (turinčio ~42% 2,2' neplanarinių PCB) veikimo vieta yra artima NADH surišimo vietai NADH:FMN oksidoreduktazėje.

OR (6,25 mg/L) sumažino NADH oksidaciją bioluminescencijos komplekse *in vitro* 13% ir 28% po 5 ir 30 min., atitinkamai (3.15 pav.). Be to, ta pati OR koncentracija slopino bioluminescenciją *in vitro* 38% ir 48% po 5 ir 30 min., atitinkamai (3.1 lentelė). OR sukeltas mažesnis NADH oksidacijos, nei bioluminescencijos (abu *in vitro*) slopinimas, galėtų liudyti, kad OR yra giminingesnė liuciferazei nei NADH:FMN oksidoreduktazei. Verta priminti,

kad *in vitro* eksperimentai atlikti su 22  $\mu\text{M}$  (6,25 mg/L) OR koncentracija, kuri buvo apie 2 kartus didesnė nei liuciferazės substrato Dek koncentracija (13  $\mu\text{M}$  arba 2 mg/L). Tikėtina, kad alifatinės struktūros hidrofobinis junginys OR, gali veikti liuciferazės substrato Dek jungimosi vietoje. Anksčiau buvo pasiūlyta prielaida, kad didelės *n*-dekanolio koncentracijos ( $> 10 \mu\text{M}$ ) su liuciferaze sudaro neaktyvaus fermento kompleksą, kuris negali prisijungti FMNH<sub>2</sub> ir fermento aktyvumas mažėja dėl nefermentinės FMNH<sub>2</sub> oksidacijos deguonimi (Abu-Soud et al., 1993; Lei et al., 1994). Todėl tikėtina, kad NADH:FMN oksidoreduktazės pagamintas FMNH<sub>2</sub> negalėjo atstatyti bioluminescencijos funkcijos *in vitro* dėl susiformavusio neaktyvaus komplekso tarp OR ir liuciferazės fermento.

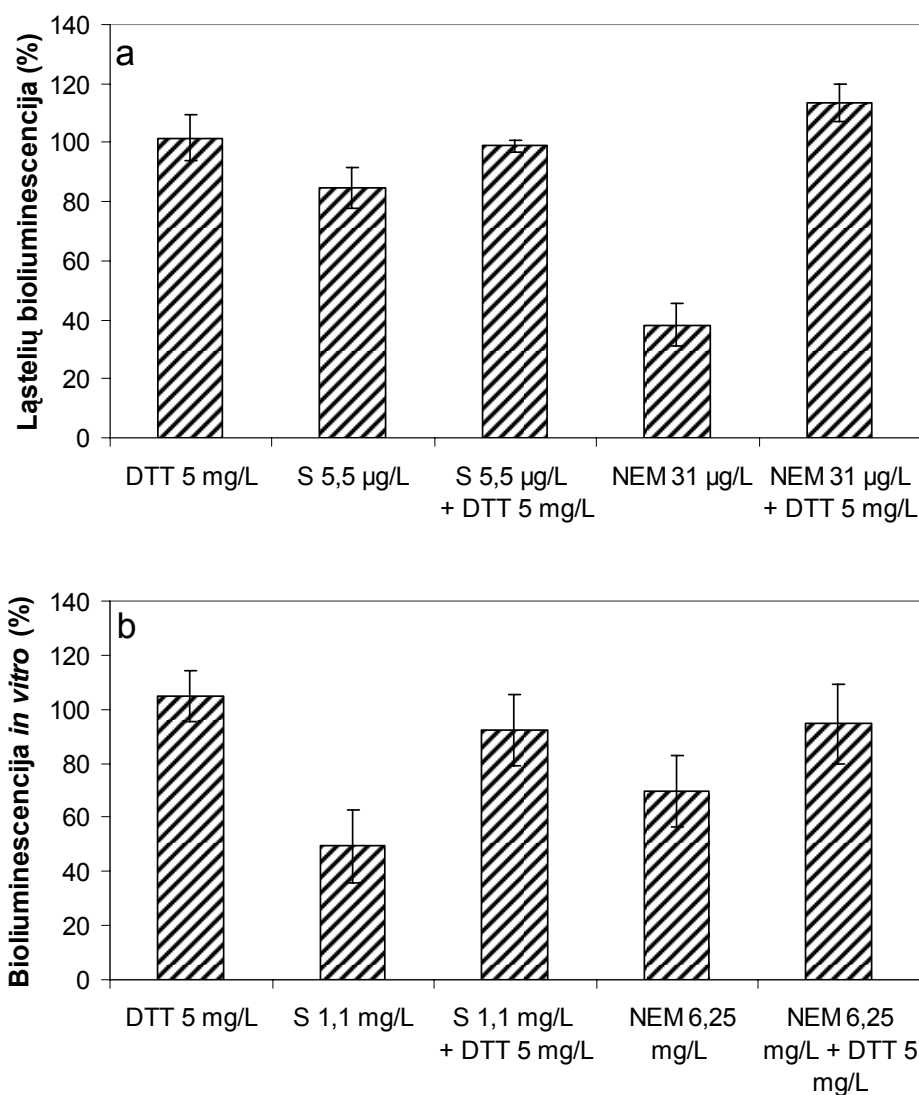
S<sub>8</sub><sup>0</sup> (1,1 mg/L) neslopino NADH oksidacijos po 5 min. poveikio, o po 30 min. net ją padidino (3.15 pav.). Tačiau, ta pati S<sub>8</sub><sup>0</sup> koncentracija (1,1 mg/L) slopino bioluminescenciją *in vitro* 21 ir 67% po 5 ir 30 min., atitinkamai (3.1 lentelė). Šie duomenys leidžia teigti, kad bioluminescencijos *in vitro* slopinimas nėra susijęs su NADH oksidacija NADH:FMN oksidoreduktaze, ir, kad S<sub>8</sub><sup>0</sup> veikė labiau kaip liuciferazės slopiklis.

Taigi, nustatėme, kad nuo bioluminescencijos komplekso priklausomas deguonies sunaudojimas *in vivo* yra jautrus OR ir S<sub>8</sub><sup>0</sup>, panašiai kaip ir *n*-dekanolio (liuciferazės slopiklio) poveikiui. Parodėme, kad Dek (liuciferazės substratas) gali apginti nuo OR ir S<sub>8</sub><sup>0</sup>, bet ne nuo A neigiamo poveikio bioluminescijai *in vivo*. A labiau nei OR ar S<sub>8</sub><sup>0</sup> slopino NADH oksidaciją. Pastarieji duomenys kartu įrodo, kad A, priešingai nei OR ir S<sub>8</sub><sup>0</sup>, turi skirtingas poveikio vietas bioluminescencijos (t.y. NADH:FMN oksidoreduktazės-liuciferazės) komplekse, ir šios vietos yra NADH:FMN oksidoreduktazėje. Tuo tarpu OR ar S<sub>8</sub><sup>0</sup> veikia liuciferazėje.



### 3.3.4. Agentų, reaguojančių su –SH grupėmis, poveikis bioluminescencijai *in vivo* ir *in vitro*

Žinoma, kad  $S_8^0$  gali veikti kaip fermentų –SH grupių slopiklis. Nustatyta, kad  $S_8^0$  veikia mitochondrijų adenino nukleotidų nešiklio, adenilato kinazės sulfhidrilines grupes (Džėja et al., 1993; Russell et al., 1995).



**3.16 pav.** *V. fischeri* ląstelių (a) ir bioluminescencijos komplekso *in vitro* (b) bioluminescencija po 30 min. trukmės poveikio DTT,  $S_8^0$ , NEM, ir jų kombinacijomis. Pateikti keturių atskirų eksperimentų vidurkiai  $\pm$  standartinis nuokrypis.

Iš kitos pusės, yra žinoma, kad dauguma bakterinių liuciferazių yra  $\alpha\beta$  dimerai turintys bendrai daugiau nei 10 cisteino liekanų (*V. harveyi* – 14 Cys liekanų). Vienas aktyviausių cisteinų yra  $\alpha$  subvienete, pvz., nustatyta, kad *V.*

*harveyi*  $\alpha$ 106Cys yra pačioje arba arti aldehido, kaip slopiklio surišimo vietos (Lei et al., 1994). Siekiant patvirtinti, kad  $S_8^0$  veikia kaip –SH grupių slopiklis *V. fischeri* ląstelėse, palyginome  $S_8^0$  ir žinomo –SH grupes alkilinančio agento N-etilmaleimido (NEM) poveikį bioluminescencijai *in vivo* ir *in vitro*. Be to, analizavome bioluminescencijos apgynimą disulfidinius tiltelius redukuojančiu agentu 1,4-ditiotreitoliu (DTT).

Nustatyta, kad  $S_8^0$  (5,5  $\mu$ g/L) ir NEM (31  $\mu$ g/L) sumažino bioluminescenciją *in vivo* 15% ir 62% po 30 min., atitinkamai (3.15a pav.). DTT (5 mg/L) neveikė bioluminescencijos, ir, pridėtas su NEM arba  $S_8^0$ , apgynė nuo kiekvieno –SH grupių slopiklio poveikio, atitinkamai.

*In vitro* sistemoje DTT (5 mg/L) apgynė bioluminescencijos funkciją per 30 min. nuo  $S_8^0$  (1,1 mg/L) ir nuo NEM (6,25 mg/L) 40% ir 25%, atitinkamai (3.15b pav.). Kadangi žinoma, kad DTT yra redukcinis agentas, bioluminescencijos atsistatymas reiškia, kad DTT apgina –SH grupes, t.y. atstato jas po galimos oksidacijos  $S_8^0$  arba palaiko redukcinę aplinką. Be to,  $S_8^0$  ir NEM slopino bioluminescenciją *in vivo* šimtą kartų mažesnėmis koncentracijomis nei bioluminescencijos kompleksą *in vitro*. Šie rezultatai leidžia teigti, kad  $S_8^0$ , panašiai kaip ir NEM, –SH grupes veikia daug efektyviau bioluminescencijos *in vivo* nei *in vitro* sistemoje, arba sistema *in vivo* yra labiau jautresnė  $S_8^0$  slopinimui (gali būti, kad *in vivo* sistemoje yra daugiau fermentų, turinčių jautrias –SH grupes). Kadangi bioluminescencijos intensyvumas *in vivo* priklauso tiek nuo liuciferazės, tiek ir nuo kvėpavimo grandinės fermentų (turinčių –SH grupes aktyviuose centuose) aktyvumo, tuo galima paaiškinti didelį *in vivo* sistemos jautrumą  $S_8^0$ .

Apibendrinant gautus rezultatus galima daryti išvadą, kad A, OR ir  $S_8^0$  5,5  $\mu$ g/L–10,0 mg/L koncentracijų intervale gali sukelti nuo koncentracijų priklausomus daugiaveiksnius efektus *V. fischeri* ląstelėms *in vivo* – energetiškai apjungtose membranose ir *in vitro* – atskirose oksidoredukcinių

fermentų grandinėse. Veikimo mechanizmai (vietos) yra daugybiniai ir efektų stiprumas skiriasi, kai elektronų pernašos procesai yra apjungti (*in vivo*, t.y. jautrūs reguliacijai) arba ne (*in vitro*). A, OR ir  $S_8^0$  pagrindiniai toksiniai efektai *V. fischeri* yra bioluminescencijos gesinimas, kvėpavimo skatinimas, ROS gamybos skatinimas, toksinis poveikis bioluminescencijos kompleksui konkurenciniu ir/ar alosteriniu šio komplekso slopinimu. Fermentų slopinimo toksikodinamika ir surišimo vietos priklauso nuo cheminių medžiagų struktūros, fizikinių-cheminių savybių (hidrofobiškumo, silpno ar stipraus poliškumo,  $pK_a$ , oksidoredukcinių savybių ir kt.), koncentracijos ir poveikio laiko. A, OR ir  $S_8^0$  poveikis bioluminescencijai *in vivo*, kvėpavimui, aktyviųjų deguonies formų susidarymui, redukcinei gebai ir fermentų sistemai *in vitro* rodo skirtingas poveikio vietas *V. fischeri* bakterijose ir patvirtina nustatytus skirtingus mišinių toksikodinaminius efektus bioluminescencijai *in vivo ir in vitro*.

## IŠVADOS

1. Aroclor 1248 (A), oleino rūgštis (OR) ir elementinės sieros ( $S_8^0$ ) binariniai mišiniai pasižymi skirtingais, bioluminescencijos pokyčiais nustatomais toksikodinaminiais efektais *Vibrio fischeri* ląstelėms ir NADH:FMN oksidoreduktazės-liuciferazės kompleksui *in vitro*. A ir  $S_8^0$  veikia sistemą *in vivo* adityviai su sinergistine sąveika, o sistemą *in vitro* – adityviai be reikšmingos sąveikos; A ir OR veikia antagonistiškai abiejose sistemose; OR ir  $S_8^0$  poveikis *in vivo* yra adityvus su antagonistinės sąveikos komponente, o *in vitro* – adityvus su sinergistine sąveika.
2. Individualių taršalų (A, OR ir  $S_8^0$ ) ir jų binarinių mišinių slopinamasis poveikis bioluminescencijai mažėja, ilgėjant poveikio laikui (30, 60 min.) *in vivo*, bet ne *in vitro* sistemoje.
3. Aroclor 1248 ir oleino rūgštis, bet ne siera skatina ROS susidarymą *V. fischeri* ląstelėse. Priešingai,  $S_8^0$  (daugiau nei A ir OR) didina *V. fischeri* ląstelių redukcinę gebą.
4. Oleino rūgštis ir sieros pagrindinė poveikio vieta bioluminescencijos komplekse yra liuciferazės aktyvusis centras.
5. Aroclor 1248 pagrindinė poveikio vieta bioluminescencijos komplekse yra NADH:FMN oksidoreduktazė.

## **MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS**

### **Moksliniai straipsniai, paskelbti leidiniuose, įrašytuose į Mokslinės informacijos instituto (ISI) sąrašą:**

**Kalcienė V**, Četkauskaitė A. 2006. Effects of elemental sulfur and metal sulfides on *Vibrio fischeri* bacteria. *Biologija* 2:42–46.

**Kalcienė V**, Četkauskaitė A. 2007. Environmental and synthetic sulfhydryl group inhibitors: effects on bioluminescence and respiration of *Vibrio fischeri*. *ATLA: Alternatives to Laboratory Animals* 35: 93–100.

### **Konferencijų pranešimų tēzės:**

**Kalcienė V**, Četkauskaitė A. 2005. Environmental and synthetic –SH groups inhibitors: effects on bioluminescence and respiration of *Vibrio fischeri*. Joint Conference of Estonian Society of Toxicology & Scandinavian Society for Cell Toxicology. Programme and abstracts. „Chemicals, Human and Environment”, October 20-23, 2005. Toila, Estonia.

**Kalcienė V**, Četkauskaitė A. 2006. Elementinės sieros ir metalų sulfidų poveikis *Vibrio fischeri* bakterijoms. IX-sis suvažiavimas-konferencija „Biochemija: mokslas ir žinių visuomenė”, 2006 m. birželio mėn. 16-18 d. Tolieja (Molėtų raj.).

**Kalcienė V**, Četkauskaitė A. 2006. *Vibrio fischeri* bioluminescencijos kvėpavimo pokyčiai –SH grupių inhibitorių aplinkoje. Ketvirtoji mokslinė konferencija „Mokslas Gamtos mokslų fakultete“, 2006 m. lapkričio mėn. 23-24 d., GMF, VU.

**Kalcienė V**, Četkauskaitė A. 2008. The toxicity of time-depending exposure to mixtures of AROCLOR 1248, oleic acid and elemental sulphur on *Vibrio fischeri*. SETAC Europe 18th Annual Meeting. Abstract book. „Word under stress: scientific and applied issues in environmental toxicology and chemistry“, 25-29 May 2008, Warsaw, Poland.

## **PADĖKA**

Nuoširdžiai dėkoju savo darbo vadovei doc. dr. Anoldai Četkauskaitei už vertingus patarimus planuojant eksperimentus, pagalbą ruošiant šią disertaciją ir visokeriopą nuolatinę paramą.

Ypatingai esu dėkinga Mervyn'ui Richardson'ui JT konsultantui (Office Birch Assessment Services for Information on Chemicals, Crawley, DB) už vertingas rekomendacijas, skatinimą, kritiką ir pirmojo disertacijos santraukos rankraščio peržiūrą.

Nuoširdžiausiai dėkoju visam Gamtos mokslų fakulteto Biochemijos ir biofizikos katedros kolektyvui už vertingas diskusijas ir naudingas pastabas ruošiant šią disertaciją. Esu labai dėkinga doc. dr. Janinai Braženaitei už malonų mokymą, patirties ir žinių pasidalinimą bei pagalbą auginant *Vibrio fischeri* bakterijas. Labai dėkoju doc. dr. Aurelijui Zimkui už galimybę naudoti TPP<sup>+</sup> atrankų elektrodą. Taip pat dėkoju dr. Daivai Dabkevičienei už patarimus ir bendradarbiavimą ieškant tinkamiausio statistinio metodo mišinių rezultatų analizei.

Labai ačiū savo šeimai už palaikymą, kantrybę ir tikėjimą.

Šis darbas buvo iš dalies finansuojamas Lietuvos valstybinio mokslų ir studijų fondo (2005–2006 m. doktorantų stipendijos).

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Abu-Soud HM, Clark AC, Francisco WA, Baldwin TO, Raushel FM. 1993. Kinetic destabilization of the hydroperoxy flavin intermediate by site-directed modification of the reactive thiol in bacterial luciferase. *J Biol Chem* 268:7699–7706.
2. Aeckersberg F, Lupp C, Feliciano B, E. Ruby G. 2001. *Vibrio fischeri* Outer membrane protein OmpU plays a role in normal symbiotic colonization. *J Bacteriol* 183:6590–6597.
3. Ahvazi B, Coulombe R, Delarge M, Vedadi M, Zhang L, Meighen E, Vrielink A. 2000. Crystal structure of the NADP<sup>+</sup>-dependent aldehyde dehydrogenase from *Vibrio harveyi*: structural implications for cofactor specificity and affinity. *Biochem J* 349:853–861.
4. Aly HAA, Domenech O. 2009. Aroclor 1254 induced cytotoxicity and mitochondrial dysfunction in isolated rat hepatocytes. *Toxicology* 262:175–183.
5. Altenburger R, Backhaus T, Boedeker W, Faust M, Scholze M, Grimme LH. 2000. Predictability of the toxicity of a multiple chemical mixtures to *Vibrio fischeri*: mixtures composed of similarly acting chemicals. *Environ Toxicol Chem* 19:2341–2347.
6. Angell P, Langley D, Chamberlain AHL. 1989. Localisation of luciferase in luminous marine bacteria by gold immunocytochemical labelling. *FEMS Microbiology letters* 65:177–181.
7. Antunes LCM, Schaefer AL, Ferreira RBR, Qin N, Stevens AM, Ruby EG, Greenberg EP. 2007. Transcriptome analysis of the *Vibrio fischeri* LuxR-LuxI regulon. *J Bacteriol* 189:8387–8391.
8. Arias HR. 1998. Binding sites for exogenous and endogenous non-competitive inhibitors of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochim Biophys Acta* 1376:173–220.
9. Backhaus T, Altenburger R, Boedeker W, Faust, M., Scholze M, Grimme LH. 2000. Predictability of the toxicity of a multiple mixture of dissimilarly acting chemicals to *Vibrio fischeri*. *Environ Toxicol Chem* 19:2348–2356.
10. Barakat AO, Rullkotter J. 1994. Free aliphatic acids in sulfur rich lacustrine sediments: their origin and relation to hydrocarbons. *Energy and Fuels* 8:474–480.
11. Beffa T, Berzcy M, Aragno M. 1993. Elemental sulfur production during mixotrophic growth on hydrogen and thiosulfate of thermophilic hydrogen-oxidizing bacteria. *Curr Microbiol* 27:349–353.

12. Benz R, editor. 2004. Bacterial and eukaryotic porins: structure, function, mechanism. Weinheim: Wiley-VCH.
13. Benzie IF, Strain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP Assay. *Anal Biochem* 239:70–76.
14. Beržinskienė J, Četkauskaitė A. 1996. Chlorinated acetanilides: biodegradation and toxicity in gram negative cells. In: Richardson M, editor. Environmental xenobiotics. London: Francis and Taylor. p. 261–282.
15. Bina JE, Mekalanos JJ. 2001. *Vibrio cholerae tolC* is required for bile acid resistance and colonization. *Infect Immun* 69:4681–4685.
16. Byers DM, Shen Z. 2002. Biochemical evidence against protein-mediated uptake of myristic acid in the bioluminescent marine bacterium *Vibrio harveyi*. *Can J Microbiol* 48:933–939.
17. Byers DM. 1989. Elongation of exogenous fatty acids by the bioluminescent bacterium *Vibrio harveyi*. *J Bacteriol* 171:59–64.
18. Bliss CI. 1939. The toxicity of poisons applied jointly. *Ann J App Biol* 26:585–615.
19. Bois F, Vaillant M, Vasseur P. 1986. Multiple regression analysis of toxic interactions: Application to the Microtox test and general comments. *Bull Environ Contam Toxicol* 36:707–714.
20. Bose JL, Kim U, Bartkowski W, Gunsalus RP, Overley AM, Noreen L, Lyell NL, Visick KL, Stabb EV. 2007. Bioluminescence in *Vibrio fischeri* is controlled by the redox-responsive regulator ArcA. *Molec Microbiol* 65:538–553.
21. Boulegue J. 1978. Solubility of elemental sulfur in water at 298 K. *Phosphorus Sulfur Silicon Relat Elem* 5:127–128.
22. Bourgois JJ, Sluse FE, Baguet F, Mallefet J. 2001. Kinetics of light emission and oxygen consumption by bioluminescent bacteria. *J Bioenerg Biomemb* 33:353–363.
23. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein–dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254.
24. Braun M, Thöny-Meyer L. 2005. Cytochrome c maturation and the physiological role of c-type cytochromes in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* 187:5996–6004.



25. BRENDA (BRaunschweig ENzyme DAtabase). The Comprehensive Enzyme Information System [fermentų duomenų bazė internete]. Braunschweig (Vokietija): Department of Bioinformatics and Biochemistry. Sukurta 1987 knygu pavidalu [cituota 2010 04 21]. Adresas: <http://www.brenda-enzymes.org/>.
26. Burth P, Younes-Ibrahim M, Goncalvez FHFS, Costa ER, Castro Faria MV. 1997. Purification and characterization of a Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup> ATPase inhibitor found in an endotoxin of *Leptospira interrogans*. *Infect Immun* 65:1557–1560.
27. Campbell ZT, Baldwin TO. 2009. Two Lysine Residues in the Bacterial Luciferase Mobile Loop Stabilize Reaction Intermediates. *J Biol Chem* 284:32827–32834.
28. Cedergreen N, Christensen AM, Kamper A, Kudsk P, Mathiasen SK, Streibig JC, Sørensen H. 2008. A review of independent action compared to concentration addition as reference models for mixtures of compounds with different molecular target sites. *Environ Toxicol Chem* 27:1621–1632.
29. Cedergreen N, Kamper A, Streibig JC. 2006. Is prochloraz a potent synergist across aquatic species? A study on bacteria, daphnia, algae, and higher plants. *Aquat Toxicol* 78:243–252.
30. ChemIDPlus [duomenų bazė internete]. JAV: National library of medicine. Sukurta 2005 05; atnaujinta 2009 05 [cituota 2009 09 20]. Adresas: <http://chem.sis.nlm.nih.gov/>.
31. Choi H, Tang CK, Tu SC. 1995. Catalytically active forms of the individual subunits of *Vibrio harveyi* luciferase and their kinetic and binding properties. *J Biol Chem* 270:16813–16819.
32. Christensen AM, Ingerslev F, Baun A. 2006. Ecotoxicity of mixtures of antibiotics used in aquacultures. *Environ Toxicol Chem* 25:2208–2215.
33. Chu S, He Y, Xu X. 1997. Determination of acute toxicity of polychlorinated biphenyls to *Photobacterium phosphoreum*. *Bull Environ Contam Toxicol* 58:263–267.
34. Cleaves HJ, Miller SL. 1998. Oceanic protection of prebiotic organic compounds from UV radiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:7260–7263.
35. Commission of the European Union. 1993. Commission Directive 93/21/EEC of 27 April 1993 adapting to technical progress for the 18th time Council Directive 67/548/EEC on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances. *Off J Eur Commun L* 110:0020–0021.

36. Cury-Boaventura MF, Curi R. 2005. Regulation of reactive oxygen species (ROS) production by C18 fatty acids in Jurkat and Raji cells. *Clinical Sci* 108:245–253.
37. Curry S, Lieb WR, Franks NP. 1990. Effects of general anesthetics on the bacterial luciferase enzyme from *Vibrio harveyi*: an anesthetic target site with differential sensitivity. *Biochemistry* 29:4641–4652.
38. Četkauskaitė A, Beržinskienė J, Baršienė J, Gulbinskas S, Lekevičius R, Petrauskienė L, Svecevičius G, Šyvokiene J, Vosylienė MZ, Paškauskas R. 2005. Curonian Lagoon and Nemunas River Delta: Toxicity and eutrophication. Chapter 5.2a. In: Russo RC, editor. NATO/CCMS Pilot Study. Modeling nutrient loads and response in river and estuary systems. Final Report No. 271, Committee on the Challenges of Modern Society, North Atlantic Treaty Organization, p. 175–193.
39. Četkauskaitė A, Beržinskienė J. 2000. Toxicity of oleic acid to *Vibrio fischeri*: combined action with 3,5-dichlorophenol. *Biologija* 2:325–328.
40. Četkauskaitė A, Bražėnaitė J. 2004. Effects of mixtures of oleic acid with chlorinated herbicides on *Vibrio fischeri* bacteria. *Biologija* 4:36–39.
41. Četkauskaitė A, Pessala P, Sodergren A. 2004. Elemental sulfur: toxicity *in vivo* and *in vitro* to bacterial luciferase, *in vitro* yeast alcohol dehydrogenase, and bovine liver catalase. *Environ Toxicol* 19: 372–386.
42. Četkauskaitė A, Zimkus A, Borovik J. 2006. Simultaneous measurements of mitochondrial trans-membrane electric potential and oxygen consumption as biosensors for ecotoxicological research. *Int J Environ Stud* 63:259–271.
43. Četkauskaitė A. 2004. Oleic acid: detection in environmental samples, modes of toxic action. *Biologija* 1:13–16.
44. Da Silva EM, Soares AMVM, Moreno AJM. 1998. The use of the mitochondrial transmembrane electrical potential as an effective biosensor in ecotoxicological research. *Chemosphere* 36:2375–2390.
45. Dawson DA, Pösch G, Schultz TW. 2006. Chemical mixture toxicity testing with *Vibrio fischeri*: Combined effects of binary mixtures for ten soft electrophiles. *Ecotox Environ Saf* 65:171–180.
46. DeCaprio AP, Johnson GW, Tarbell AM, Carpenter DO, Chiarenzelli JR, Morse GS, Santiago-Rivera AL, Schymura MJ. 2005. Polychlorinated biphenyl (PCB) exposure assessment by multivariate statistical analysis of serum congener profiles in an adult Native American population. *Environ Res* 98:284–302.

47. Dibrov P, Fliegel L. 1998. Comparative molecular analysis of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers: a unified model for Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport? *FEBS letters* 424:1–5.
48. Doucette WJ. 2000. Handbook of property estimation methods for chemicals. Boethling RS, Mackay D, editors. Florida: Boca Raton, Lewis Publ. p. 141–188.
49. Duane W, Hastings JW. 1975. Flavin mononucleotide reductase of luminous bacteria. *Mol Cell Biochem* 6:53–64.
50. Dunn AK, Karr EA, Stabb EV. 2010. The alternative oxidase (AOX) gene in *Vibrio fischeri* is controlled by NsrR and upregulated in response to nitric oxide. *Mol Microbiol* 77:44–55.
51. Dunn AK, Stabb EV. 2008. Genetic Analysis of Trimethylamine N-Oxide Reductases in the Light Organ Symbiont *Vibrio fischeri* ES114. *J Bacteriol* 190:5814–5823.
52. Džėja P, Baužaitė J, Toleikis A, Praškevičius A, Jasaitis A. 1993. Ligandų ir adenino nukleotidų translokazės širdies mitochondrijose sąveika. *Biologija* 2:51–56 (Rusų kalba).
53. Eisler R, Belisle AA. 1996. Planar PCB hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. Biological Report 31. Washington: U.S. Department of the Interior, National Biological Service.
54. Emmanuel E, Hanna K, Bazin C, Keck G, Clement B, Perrodin Y. 2005. Fate of glutaraldehyde in hospital wastewater and combined effects of glutaraldehyde and surfactants on aquatic organisms. *Environ Int* 31:399–406.
55. EN ISO 11348-3:1998. Water quality-Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test)-Part 3: Method using freeze-dried bacteria.
56. Environment Canada. 1995. Computox toxicity database (PC version 5.0) [CD-ROM]. Canada, Ontario, Burlington: National Water Research Institute.
57. Ertl P. 2007. Polar surface area. In: Mannhold R, editor. Molecular drug properties. Weinheim: Wiley-VCH. p. 111–126.
58. Ewald G, Sundin P. 1993. Release of ATP from ELD cells after exposure to stearic, monochlorostearic, dichlorostearic and oleic acid. *Pharmacol Toxicol* 73:159–162.
59. Farrington JW, Quinn JG. 1973. Biogeochemistry of fatty acids in recent sediments from Narragansett Bay, Rhode Island. *Geochim Cosmochim Acta* 37:259–268.

60. Fernández-Alba AR, Hernando Guil MD, López GD, Chisti Y. 2002. Comparative evaluation of the effects of pesticides in acute toxicity luminescence bioassays. *Anal Chim Acta* 451:195–202.
61. Frame GM, Cochran JW, Bowadt SS. 1996. Complete PCB congener distribution for 17 Aroclor mixtures determined by 3 HRGC systems optimized for comprehensive, quantitative congener specific analysis. *J. High Resol Chromatogr* 19:657–668.
62. Francisco WA, Abu-Soud HM, Baldwin TO, Raushel FM. 1993. Interaction of bacterial luciferase with aldehyde substrates and inhibitors. *J Biol Chem* 268:24734–24741.
63. Fried A, Tu SC. 1984. Affinity labeling of the aldehyde site of bacterial luciferase. *J Biol Chem* 259:10754–10759.
64. Fujiwara-Nagata E, Kogure K, Kita-Tsukamoto K, Wada M, Eguchi M. 2003. Characteristics of Na<sup>+</sup>-dependent respiratory chain in *Vibrio anguillarum*, a fish pathogen, in comparison with other marine Vibrios. *FEMS Microbiol Ecol* 44:225–230.
65. Fulladosa E, Desjardin V, Murat JC, Gourdon R, Villaescusa I. 2006. Cr (VI) reduction into Cr (III) as a mechanism to explain the low sensitivity of *Vibrio fischeri* bioassay to detect chromium pollution. *Chemosphere* 65:644–650.
66. Gabbita KV, Hang JYC. 1984. A modified method for determination of dehydrogenases activity of activated sludge. *Toxicol Environ Chem* 8:119–132.
67. Gagne F, Pardos M, Blaise C, Turcotte P, Quemerais B, Fouquet A. 1999. Toxicity evaluation of organic extracts resolved by size exclusion chromatography using rainbow trout hepatocytes. *Chemosphere* 39:1545–1570.
68. Gagnon C, Mucci A, Pelletier E. 1996. Vertical distribution of dissolved sulphur species in coastal marine sediments. *Marine Chem* 52:195–209.
69. Gonzalez-Flecha B, Demble B. 1994 Intracellular Generation of Superoxide as a By-Product of *Vibrio harveyi* Luciferase Expressed in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 176:2293–2299.
70. Grimes DJ, Johnson CN, Dillon KS, Flowers AR, Noriea NF, Berutti T. 2009. What genomic sequence information has revealed about *Vibrio* ecology in the ocean – a review. *Microb Ecol* 58:447–460.
71. Gu J, Neary J, Cai H, Moshfeghian A, Rodriguez SA, Lilburn TG, Wang Y. 2009. Genomic and systems evolution in *Vibrionaceae* species. *BMC Genomics* 10 (Suppl 1): S11.

72. Hayashi M, Nakayama Y, Unemoto T. 2001. Recent progress in the Na<sup>+</sup>-translocating NADH-quinone reductase from the marine *Vibrio alginolyticus*. *Biochim Biophys Acta* 1505:37–44.
73. Harris RA, Farmer B, Ozawa T. 1972. Inhibition of the mitochondrial adenine nucleotide transport system by oleyl CoA. *Arch Biochem Biophys* 150:199–209.
74. Hasanuzzaman M, Araki Y. 2001. Characterization of a major ferric reductase from soluble fraction of *Vibrio anguillarum* E6-5. *Microbes Environ* 16:161–168.
75. Hastings JW, Baldwin TO, Nicoli MZ. 1978. Bacterial luciferase: assay, purification, and properties. *Meth Enzymol* 57:135–152.
76. Hastings JW, Potriku CJ, Gupta SC, Kzurfurst M, Makemson JC. 1985. Biochemistry and physiology of bioluminescent bacteria. *Advan Microbiol Physiol* 26:235–291.
77. He H, Zhang CG, Xia JL, Peng AA, Yang Y, Jiang HC, Zheng L, Ma CY, Zhao YD, Nie ZY, Qiu GZ. 2009. Investigation of elemental sulfur speciation transformation mediated by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Current Microbiol* 58:300–307.
78. Henry TR, DeVito MJ. 2003. Non-dioxin-like PCBs: effects and consideration in ecological risk assessment. ERASC-003, NCEA-C-1340, US: Environment Protection Agency.
79. Hermens J, Busser F, Leeuwangh P, Musch A. 1985. Quantitative structure–activity relationships and mixture toxicity of organic chemicals in *Photobacterium phosphoreum*: The Microtox test. *Ecotoxicol Environ Saf* 9:17–25.
80. Hernando MD, Ejerhoon M, Fernández-Alba AR, Chisti Y. 2003. Combined toxicity effects of MTBE and pesticides measured with *Vibrio fischeri* and *Daphnia magna* bioassays. *Water Res* 37:4091–4098.
81. Higgins S, Vasconcelos MH, O'Brien NM. 1999. Effects of oleic acid, docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid on background and genotoxin-induced frequencies of SCEs in Indian muntjac fibroblasts. *Mutagenesis* 17:335–338.
82. Hiraizami Y, Takahashi M, Nishimura N. 1979. Adsorption of polychlorinated biphenyl onto sea bed sediment, marine plankton, and other adsorbing agents. *Environm Sci Techn* 13:580–584.

83. Hirota N, Matsuura S, Mochizuki N, Mutoh N, Imae Y. 1981. Use of lipophilic cation-permeable mutants for measurement of transmembrane electrical potential in metabolizing cells of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 148:399–405.
84. Holoubek I. 2001. Polychlorinated biphenyl (PCB) contaminated sites worldwide. In: Robertson LW, Hansen LG, editors. PCBs: recent advances in the environmental toxicology and health effects. Lexington: The University Press of Kentucky. p. 17–26.
85. Hong PKA, Nakra S. 2009. Rapid extraction of sediment contaminants by pressure cycles. *Chemosphere* 74:1360–1366.
86. Inouye S. 1994. NAD(P)H-flavin oxidoreductase from the bioluminescent bacterium, *Vibrio fischeri* ATCC 7744, is a flavoprotein. *FEBS Letters* 347:163–168.
87. Ismailov AD, Pogosyan SI, Mitrofanova TI, Egorov NS, Netrusov AI. 2000. Bacterial bioluminescence inhibition by chlorophenols. *Prikl Biokhim Mikrobiol* 36:404–408.
88. Jacobs MW, Delfino JJ, Bitton G. 1992. The toxicity of sulfur to Microtox from acetonitrile extracts of contaminated sediments. *Environ Toxicol Chem* 11:1137–1143.
89. Jeffers ChE, Nichols JC, Tu ShCh. 2003. Complex formation between *Vibrio harveyi* luciferase and monomeric NADH:FMN oxidoreductase. *Biochemistry* 42:529–534.
90. Jegathesan M, Paramasivam T. 1976. Hydrogen sulphide production as an aid to the identification of *Vibrio parahaemolyticus*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 7:377–379.
91. Jenkins A, Lobo IA, Gong D, Trudell JR, Solt K, Harris RA, Eger EI. 2008. General anesthetics have additive actions on three ligand gated ion channels. *Anesth Analg* 107:486–493.
92. Jiang Y, Morgan-Kiss RM, Campbell JW, Chan ChH, Cronan JE. 2010. Expression of *Vibrio harveyi* Acyl-ACP synthetase allows efficient entry of exogenous fatty acids into the *Escherichia coli* fatty acid and lipid A synthetic pathways. *Biochemistry* 49:718–726.
93. Johnson WW, Finley MT. 1980. Handbook of Acute Toxicity of Chemicals to Fish and Aquatic Invertebrates. Resource Publication No. 137. Washington: U.S. Department of Interior, Fish and Wildlife Service. Government Printing Office. Adresas: <http://www.cerc.usgs.gov/pubs/center/pdfDocs/90301.pdf>.

94. Jonker MJ, Svendsen C, Bedaux JJM, Bongers M, Kammenga JE. 2005. Significance testing of synergistic/antagonistic, dose level dependent, or dose ratio-dependent effects in mixture dose-response analysis. *Environ Toxicol Chem* 24:2701–2713.
95. Jonsson P. 2000. Sediment Burial of PCBs in the Offshore Baltic Sea. *Ambio* 29:260–267.
96. Junghans M, Backhaus T, Faust M, Scholze M, Grimme LH. 2006. Application and validation of approaches for the predictive hazard assessment of realistic pesticides mixtures. *Aquat Toxicol* 76:93–100.
97. Kaiser KLE, Devillers J. 1994. Ecotoxicity of chemicals to *Photobacterium phosphoreum*. Handbooks of ecotoxicological data. Vol 2. Switzerland, Yverdon: Gordon and Breach Science.
98. Kaiser KLE, Palabrica VS. 1991. *Photobacterium phosphoreum* toxicity data index. *Water Pollut Res J Can* 26:361–431.
99. Kaiser KLE. 1998. Correlation of *Vibrio fischeri* bacteria test data with bioassay data for other organisms. *Environ Health Prospect* 106:583–591.
100. Kalcienė V, Četkauskaitė A. 2006. Effects of elemental sulfur and metal sulfides on *Vibrio fischeri* bacteria. *Biologija* 2:42–46.
101. Kamaya Y, Kurogi Y, Suzuki K. 2003. Acute toxicity of fatty acids to the freshwater green algae *Selenastrum capricornutum*. *Environ Toxicol* 18:289–294.
102. King MD, Rennie AR, Thompson KC, Fisher FN, Dong CC, Thomas RK, Pfrang C, Hughes AV. 2009. Oxidation of oleic acid at the air–water interface and its potential effects on cloud critical supersaturations. *Phys Chem Chem Phys* 11:7699–7707.
103. Koike H, Sasaki H, Kobori T, Zenno S, Saigo K, Murphy MEP, Adman ET, Tanokura M. 1998. 1.8 Å crystal structure of the major NAD(P)H:FMN oxidoreductase of a bioluminescent bacterium, *Vibrio fischeri*: overall structure, cofactor and substrate-analog binding, and comparison with related flavoproteins. *J Mol Biol* 280:259–273.
104. Kortenkamp A, Backhaus T, Faust M. 2009. State of the art report on mixture toxicity - Final Report, Executive Summary. Contract No. 070307/2007/485103/ETU/D.1. [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/pdf/report\\_Mixture%20toxicity.pdf](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/pdf/report_Mixture%20toxicity.pdf).

105. Kubinyi H. 1993. QSAR: Hansch analysis and related approaches. Series: Methods and principles in medicinal chemistry, vol. 1, Mannhold R, Krogsgaard-Larsen P, Timmerman H, editors. Weinheim: Wiley-VCH.
106. Kudryasheva NE, Vetrova E, Kuznetsov A, Kratasyuk V, Stom D. 2002. Bioluminescence assays: effects of quinones and phenols. *Ecotoxicol Environ Saf* 53:221–225.
107. Kumar S, Parvathi A, Hernandez R., Cadle K, Varela MF. 2009. Identification of a novel UDP-*N*-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase (MurA) from *Vibrio fischeri* that confers high fosfomycine resistance in *Escherichia coli*. *Arch Microbiol* 191:425–429.
108. Kungolos A, Samaras P, Kipopoulou AM, ZoumboulisA, Sakellaropoulos GP. 1999. Interactive toxic effects of agrochemicals on aquatic organisms. *Water Sci Technol* 40:357–364.
109. Kuroda T, Tsuchiya T. 2009. Multidrug efflux transporters in the MATE family. *Biochim Biophys Acta – Proteins Proteom* 1794:763–768.
110. Kuster E, Dorusch F, Altenburger R. 2005. Effects of hydrogen sulfide to *Vibrio fischeri*, *Scenedesmus vacuolatus*, and *Daphnia magna*. *Environm Toxicol Chem* 24:2621–2629.
111. Kwak YH, Lee DS, Kim HB. 2003. *Vibrio harveyi* nitroreductase is also a chromate reductase. *Appl Environ Microbiol* 69:4390–4395.
112. Lei B, Cho KW, Tu SC. 1994. Mechanism of aldehyde inhibition of *Vibrio harveyi* luciferase. Identification of two aldehyde sites and relationship between aldehyde and flavin binding. *J Biol Chem* 269:5612–5618.
113. Lei B, Tu SC. 1998. Mechanism of reduced flavin transfer from *Vibrio harveyi* NADPH-FMN oxidoreductase to luciferase. *Biochemistry* 37:14623–14629.
114. Leive L. 1965. Release of lipopolysaccharide by EDTA treatment of *E. coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 21:290–296.
115. Li CH, Tu SC. 2005. Active site hydrophobicity is critical to the bioluminescence activity of *Vibrio harveyi* luciferase. *Biochemistry* 44:12970–12977.
116. Li H, Ortego BC, Maillard KI, Wilson RC, Tu SC. 1999. Effects of mutations of the alpha His45 residue of *Vibrio harveyi* luciferase on the yield and reactivity of the flavin peroxide intermediate. *Biochemistry* 38:4409–4415.
117. Li Z, Meighen EA. 1995. Tryptophan 250 on the  $\alpha$  subunit plays an important role in flavin and aldehyde binding to bacterial luciferase. Effects of W3Y mutations on catalytic function. *Biochemistry* 34:15084–15090.



118. Lietuvos respublikos aplinkos ministerija. 2003. Lietuvos respublikos aplinkos ministro įsakymas dėl polichlorintų bifenių ir polichlorintų terfenių (PCB) ir įrangos, turinčios PCB, nukenksminimo ir/ar šalinimo plano rengimo pagrindinių nuostatų bei polichlorintų bifenių ir polichlorintų terfenių (PCB) ir įrangos, turinčios PCB, nukenksminimo ir/ar šalinimo plano patvirtinimo. Nr. 679, Vilnius. *Valstybės žinios*, 2004, 10:287.
119. Lin LYCh, Sulea T, Szittner R, Kor Ch, Purisima EO, Meighen EA. 2002. Implications of the reactive thiol and the proximal non-proline cis-peptide bond in the structure and function of *Vibrio harveyi* luciferase. *Biochemistry* 41:9938–9945.
120. Liu, D. 1986. Resazurin reduction method for toxicity assessment of water soluble and insoluble chemicals. *Toxicity Assess: Int Q*: 1:253–258.
121. lydakis.chania.teicrete.gr [internetinė svetainė]. Aslanidou S, Lydakis-Simantiris N, Kotsifaki C, Pentari D, Katsivela E. Ferric chloride (FeCl<sub>3</sub>) as regulatory agent for the reduction of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) in municipal wastewater. [cituota: 2010 02 20]. Adresas: <http://lydakis.chania.teicrete.gr/>.
122. Lyzen R, Wegrzyn G. 2005. Sensitivity of dark mutants of various strains of luminescent bacteria to reactive oxygen species. *Arch Microbiol* 183:203–208.
123. Loewe S, Muischnek H. 1926. Über Kombinationswirkungen. 1. Mitteilung: Hilfsmittel der Fragestellung. *Arch Exp Pathol Pharmacol* 114:313–326.
124. Lopez JM, Koopman B, Bitton G. 1986. INT-dehydrogenase test for activated sludge process control. *Biotechnol Bioeng* 28:1080–1085.
125. Low JC, Tu SC. 2002. Functional roles of conserved residues in the unstructured loop of *Vibrio harveyi* bacterial luciferase. *Biochemistry* 41:1724–1731.
126. Low JC, Tu, SC. 2003. Energy transfer evidence for *in vitro* and *in vivo* complexes of *Vibrio harveyi* flavin reductase P and luciferase. *Photochem Photobiol* 77:446–452.
127. LST EN ISO 11348-3:2000. Vandens kokybė. *Vibrio fischeri* švytėjimą slopinančio vandens mėginių poveikio nustatymas (švytinčių bakterijų tyrimas). 3 dalis Metodas, naudojant sublimuotas bakterijas. (ISO: 11348: 1998).
128. LST EN ISO 11348-3:2009. Vandens kokybė. Vandens mėginių slopinančio poveikio *Vibrio fischeri* švytėjimui nustatymas (švytinčių bakterijų tyrimas). 3 dalis. Metodas, naudojant sublimuotas bakterijas (ISO 11348-3:2007).

129. Lu D, Qian S, Wang XC. 2010. Decomposition of algal lipids in clay-enriched marine sediment under oxic and anoxic conditions *Chinese J Oceanol Limnol* 28:131–143.
130. Lundbæk JA. 2008. Lipid bilayer-mediated regulation of ion channel function by amphiphilic drug. *J Gen Physiol* 131:421–429.
131. MacDonald DD, Dipinto LM, Field J, Ingersoll CG, Long ER, Swartz RC. 2000. Development and evaluation of consensus-based sediment effect concentrations for polychlorinated biphenyls. *Environ Toxicol Chem* 19:1403–1413.
132. Madigan MT, Martinko JM, Parker J. 1997. Brock Biology of Microorganisms. 8th ed. London: Prentice Hall International.
133. Makemson JC. 1986. Luciferase-dependent oxygen consumption by bioluminescent *Vibrios*. *J Bacteriol* 165:461–466.
134. Matalon S, Ji HL. 2005. Oleic acid damages ion transport and promotes alveolar edema. *Amer J Respirat Crit Care Medic* 171:424–425.
135. Matsusue K, Ishii Y, Ariyoshi N, Oguri K. 1997. A highly toxic PCB produces unusual changes in fatty acid composition of rat liver. *Toxicology Letters* 91:99–104.
136. Matthews J, Wihlén B, Heldring N, MacPherson L, Helguero L, Treuter E, Haldosén LA, Gustafsson J-Å. Co-planar 3,3',4,4',5-pentachlorinated biphenyl and non-co-planar 2,2',4,6,6'-pentachlorinated biphenyl differentially induce recruitment of oestrogen receptor  $\alpha$  to aryl hydrocarbon receptor target genes. *Biochem J* 406:343–353.
137. McCarty LS, Borgert CJ. 2006. Review of the toxicity of chemical mixtures containing at least one organochlorine. *Regulat Toxicol Pharmacol* 45:104–118.
138. Meadows SL, Gennings Ch, Carter WH, Bae DS. 2002. Experimental Designs for Mixtures of Chemicals along Fixed Ratio Rays. *Environmental Health Perspectives* 110:979–983.
139. Meighen EA. 1988. Enzymes and genes from the *lux* operons of bioluminescent bacteria. *Annu Rev Microbiol* 42:151–176.
140. Mildažienė V, Naučienė Z, Baniienė R, Demin O, Krab K. 2002a. Analysis of effects of 2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl on the flux control in oxidative phosphorylation system in rat liver mitochondria. *Molec Biol Reports* 29:35–40.

141. Mildažienė V, Naučienė Z, Baniienė Z, Grigienė J. 2002b. Multiple Effects of 2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl on oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. *Toxicological sciences* 65, 220–227.
142. molinspiration.com [internetinė svetainė]. Slovensky Grob (Slovak Republic): Molinspiration Cheminformatics; sukurta 2002 [cituota: 2010 03 01]. Adresas: <http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties: calculation>.
143. Morales A, Birkholz D, Hrudey SE. 1992. Analysis of pulp mill effluent contaminants in water, sediment, and fish bile - fatty and resin acids. *Water Environ Res* 64:660–668.
144. Mortensen AS, Arukwe A. 2007. Interactions between estrogen- and ah-receptor signaling pathways in primary culture of salmon hepatocytes exposed to nonylphenol and 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl (congener 77). *Compar Hepatol* 6:1–14.
145. Mowat FS, Bundy KJ. 2002. Experimental and mathematical computational assessment of the acute toxicity of chemical mixtures from the Microtox<sup>®</sup> assay. *Adv Environ Res* 6:547–558.
146. Murakami K, Chan SY, Routtenberg A. 1986. Protein kinase C activation by cis-fatty acid in the absence of Ca<sup>2+</sup> and phospholipids. *J Biol Chem* 261:15424–15429.
147. Nakamura T, Komano Y, Unemoto T. 1995. Three aspartic residues in membrane –spanning regions of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter from *Vibrio alginolyticus* play a role in the activity of the carrier. *Biochim Biophys Acta – Bioenergetics* 1230:170–176.
148. Nakamura T, Tokuda H, Unemoto T. 1984. K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter functions as a regulator of cytoplasmic pH in a marine bacterium, *Vibrio alginolyticus*. *Biochim Biophys Acta – biomembranes* 776:330–336.
149. Naučienė Z, Baniienė R, Čiapaitė J, Grigienė J, Mildažienė V. 2000. Pleiotropic effect of polychlorinated biphenyl on oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. *Biologija* 2:196–199.
150. Nicoli MZ, Meighen EA, Hastings JW. 1974. Bacterial luciferase chemistry of the reactive sulfhydryl. *J Biol Chem* 249:2385–2382.
151. Nijvipakul S, Wongratana J, Suadee Ch, Entsch B, Ballou BP, Chaiyen P. 2008. LuxG is a functioning flavin reductase for bacterial luminescence. *J Bacteriol* 190:1531–1538.
152. Nikaido H. 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited *Microbiol Mol Biol Rev* 67:593–656.

153. Nishihara Y, Robertson LW, Utsumi K. 1987. Studies of the influence of chloro- substituent sites in tetrachlorobiphenyls on the uncoupling of oxidative phosphorylation in isolated rat liver mitochondria. *Chem Pharm Bull* 35:1587–1595.
154. Nishihara Y. 1984. Uncoupling action of polychlorinated biphenyls (Kanechlor-400) on oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. *Arch Environ Contam Toxicol* 13:225–229.
155. Nishihara Y. 1985. Comparative study of the effects of biphenyl and Kanechlor-400 on the respiratory and energy linked activities of rat liver mitochondria. *Br J Ind Med* 42:128–132.
156. Odham G, Noren B, Norkrans B, Sodergren A, Lofgren H. 1978. Biological and chemical aspects of the aquatic lipid surface microlayer. *Prog Chem Fats Other Lipids* 16:31–44.
157. Oh S, Kogure K, Ohwada K, Simidu U. 1991. Correlation between possession of a respiration-dependent Na<sup>+</sup> pump and Na<sup>+</sup> requirement for growth of marine bacteria. *Appl Environ Microbiol* 57:1844–1846.
158. Pardos M, Benninghoff C, Thomas RL, Khim-Heang S. 1999. Confirmation of elemental sulfur toxicity in the Microtox assay during organic extracts assessment of freshwater sediments. *Environ Toxicol Chem* 18:188–193.
159. Patty F, editor. 1963. *Industrial Hygiene and Toxicology: Volume II: Toxicology*. 2nd ed. New York: Interscience Publishers.
160. Paul S, Haudhuria K, Chatterjee AN, Das J. 1992. Presence of exposed phospholipids in the outer membrane of *Vibrio cholera*. *J General Microbiol* 138:755–761.
161. Pesticide Ecotoxicology Database (Formerly Environmental Effects Database (EEDB), [duomenų bazė internete]. Sukurta 2000 [cituota 2010 05 14]. Washington, DC: Office of Pesticide Programs Environmental Fate and Effects Division, US EPA, (Ref. No. 344) – Ecotoxicology References. Adresas: <http://www.pesticideinfo.org/>.
162. Plackett RL, Hewlett PS. 1967. A comparison of models for quantal responses to mixtures of drugs. *Biometrics* 23:27–44.
163. Pressman BC, Lardy HA. 1956. Effect of surface active agents on the latent ATPase of mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 21:458–466.
164. Prior RL, Cao G. 1999. *In vivo* total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radic Biol Med* 27:1173–1181.

165. Pudžiuvytė B, Daugelavičius R, Kirvelienė V, Sasnauskienė A, Bakienė E. 2008. Photodynamic action of the cationic dye tetrakis (N-ethylpyridinium-4-yl) porphyrin tetratosylate on *Escherichia coli* cell envelope. *Biologija* 3:198–201.
166. Purich DL, Allison DR. 2000. Handbook of biochemical kinetics. London: Academic Press.
167. Rand GM, Wells P, McCarty LS. 1995. In: Rand GM, editor. Introduction to aquatic toxicology. Fundamentals of aquatic toxicology. Washington: Taylor and Francis. p. 3–67.
168. REACH. 2006. Review of Annex IV of the Regulation No 1907/2006 (REACH). Evaluation of existing entries, p. 159. Adresas: <http://ec.europa.eu/environment/chemicals/reach/pdf/6B%20Appendix%202.pdf>.
169. Ren S, Mee RW, Frymier PD. 2004. Using factorial experiments to study the toxicity of metal mixtures. *Ecotoxicol Environ Saf* 59:38–43.
170. Rhead MM, Eglinton G, Draffan GH, England PJ. 1971. Conversion of oleic acid to saturated fatty acids in Severn Estuary sediments. *Nature* 232:327–330.
171. Richardson M. 1995. Opportunities for Joint Prospects. In: Mervyn Richardson, editor. The Effects of War on the Environment – Croatia. London: E and FN Spon. p. 127–153.
172. Riddick JA, Bunger WB, Sakano TK. 1986. Organic Solvents: Physical Techniques of Chemistry. Vol. II. 4th ed. New York: John Wiley and Sons.
173. Robertson LW, Hansen LG, editors. 2001. PCBs: Recent advances in environmental toxicology and health effects. Lexington: University Press of Kentucky.
174. Rohwerder T, Sand W. 2003. The sulfane sulfur of persulfides is the actual substrate of the sulfur-oxidizing enzymes from *Acidithiobacillus* and *Acidiphilium* sp. *Microbiology* 149:1699–1709.
175. Rottenberg H, Hashimoto K. 1986. Fatty acid uncoupling of oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. *Biochemistry* 25:1747–1755.
176. Rottenberg H. 1990. Decoupling of oxidative-phosphorylation and photophosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 1018:1–17.
177. Ruby EG, Urbanowski M, Campbell J, Dunn A, Faini M, Gunsalus R, Lostroh P, Lupp C, McCann J, Millikan D, Schaefer A, Stabb E, Stevens A, Visick K, Whistler C, Greenberg EP. 2005. Complete genome sequence of *Vibrio*

- fischeri*: A symbiotic bacterium with pathogenic congeners. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:3004–3009.
178. Russell PJ, Williams A, Avila D, Chinn E, Taulane JP. 1995. Characteristics of rabbit muscle adenylate kinase inhibition by sulfur and recovery by dithiothreitol. *J Enzyme Inhib* 9:179–194.
179. Sabaliūnas D, Ellington J, Sabaliūnienė I. 1999. Screening bioavailable hydrophobic toxicants in surface waters with semipermeable membrane devices: role of inherent oleic acid in toxicity evaluations. *Ecotox Env Safety (Env Res Section B)* 44:160–167.
180. Salizzato M, Bertato V, Pavoni B, Ghirardini AV, Ghetti PF. 1998a. Sensitivity limits and  $EK_{50}$  values of the *Vibrio fischeri* test for organic micropollutants in natural and spiked extracts from sediments. *Environ Toxicol Chem* 17:655–661.
181. Salizzato M, Pavoni B, Ghirardini AV, Ghetti PF. 1998b. Sediment toxicity measured using *Vibrio fischeri* related to the concentrations of organic (PCBs, PAHs) and inorganic (metals, sulphur) pollutants. *Chemosphere* 36:2949–2968.
182. Salvi M, Toninello A. 2001. Aroclor 1254 inhibits the mitochondrial permeability transition and release of cytochrome c: A possible mechanism for its *in vitro* toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 176:92–100.
183. Sanchez E, Santiago MF, Lopez-Aparicio P, Recio MN, Perez-Albarsanz MA. 2000. *Chemico-Biological Interactions* 125:117–131.
184. Schlezinger JJ, Struntz WDJ, Goldstone JV, Stegeman JJ. 2006. Uncoupling of cytochrome P450 1A and stimulation of reactive oxygen species production by co-planar polychlorinated biphenyl congeners. *Aquat Toxicol* 77:422–432.
185. Schönfeld P, Wojtczak L. 2007. Fatty acids decrease mitochondrial generation of reactive oxygen species at the reverse electron transport but increase it at the forward transport. *Biochim Biophys Acta* 1767:1032–1040.
186. Schönfeld P, Wojtczak L. 2008. Fatty acids as modulators of the cellular production of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 45:231–241.
187. Scrimshaw MD, Bubb JM, Lester JN. 1994. Magnitude and distribution of contaminants in salt marsh sediments of the Essex coast. IV. Organochlorine insecticides and polychlorinated biphenyls. *Sci Tot Environ* 155:73–81.
188. Sharpe M, Perin I, Wrigglesworth J, Nicholls P. 1996. Fatty acids as modulators of cytochrome c oxidase in proteoliposomes. *Biochem J* 320:557–561.

189. Shick JM, Dunlap WC. 2002. Mycosporine-like amino acids and related gadusols: Biosynthesis, accumulation, and UV-protective functions in aquatic organisms. *Ann Rev Physiol* 64:223–262.
190. Skulachev VP. 1998. Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochim Biophys Acta* 1363:100–124.
191. Smith RL, Klug MJ. 1981. Reduction of sulfur compounds in the sediments of a eutrophic lake basin. *Appl Environ Microbiol* 41:1230–1237.
192. Sodergren A, editor. 1993. Bleached pulp mill effluents. Composition, fate and effects in the Baltic Sea. Swedish Environmental Protection Agency Report No: 4047.
193. Sodergren A. 1987. Origin and composition of surface slicks in lakes of differing trophic status. *Limnol Oceanogr* 32:1307–1316.
194. Spilewska H, Czyz A, Wegrzyn G. 2003. Experimental evidence for the physiological role of bacterial luciferase in the protection of cells against oxidative stress. *Current Microbiol* 47:379–382.
195. Spiro S. 2010. An alternative route to nitric oxide resistance. *Molecular Microbiology* 77:6–10.
196. SRC (Syracuse Resaerch Corporation).Fizikinių-cheminių savybių duomenų bazė internete. Sukurta 2005 [cituota: 2010 03 01]. Adresas: <http://www.syrres.com/what-we-do/databaseforms.aspx?id=386>
197. Stabb EV. 2005. Shedding Light on the Bioluminescence “Paradox”. *ASM News* 71: 223–229.
198. Steudel R, Eckert B. 2003. Solid sulfur allotropes. In: Steudel R, editor. *Elemental sulfur and sulfur-rich compounds I*, Vol 230-Top Curr Chem. Berlin: Springer. p. 1–79.
199. Steudel R. 2000. The chemical sulfur cycle. In: Lens P, Hulshoff PW, editors. *Environmental Technologies to Treat Sulfur Pollution*. London: IWA Publishing. p. 1–31.
200. Sun MY, Wakeham SG, Lee C. 1997. Rates and mechanisms of fatty acid degradation in oxic and anoxic coastal marine sediments of Long Island Sound, New York, USA. *Geochim Cosmochim Acta* 61:341–355.
201. Svenson A, Edsholt E, Ricking M, Remberg M, Rottorp J. 1996a. Sediment contaminants and Microtox toxicity in a direct exposure test. *Environ Toxicol Water Qual: An Internat J* 11:293–300.

202. Svenson A, Norin H, Hynning PA. 1996b. Toxicity-directed fractionation of effluents using the bioluminescence of *Vibrio fischeri* and gas chromatography/mass spectroscopy identification of the toxic components. *Environ Toxicol Water Qual* 11:277–284.
203. Svenson A, Viktor T, Remberger M. 1996c September 15–19. The role of sulphur in the assessment of sediment toxicity. Proceedings of the II International Symposium on Sediment Quality Assessment. Tools. Criteria and Strategies in Fresh, Marine and Brackish Waters. Italy: Verbania Pallanza.
204. Svenson A, Viktor T, Remberger M. 1998. Toxicity of elemental sulphur in sediments. *Environ Toxicol Water Qual* 13:217–224.
205. Swann RL, Laskowski DA, McCall PJ, Vander Kuy K, Dishburger HJ. 1983. A rapid method for the estimation of the environmental parameters octanol/water partition coefficient, soil sorption constant, water to air ratio and water solubility. *Res Rev* 85:17–28.
206. Tarasova AS, Kudryasheva NS, Fedorova ES, Stom DI. 2008. Bioluminescent monitoring: detoxification of phenol solutions by humic substances and UV-irradiation. *J Sib Fed Univ Biology* 2:136–144.
207. TCDB Transporter classification database [duomenų bazė internete]. JAV: University of Sant Diego, Saier Lab Bioinformatics group. Sukurta 2005 (cituota: 2011 01 20]. Adresas: <http://www.tcdb.org/>.
208. Terada H. 1981. Interaction of highly active uncouplers with mitochondria *Biochim Biophys Acta* 639: 225–242.
209. TerraBase Inc.1998. TerraTox/TerraFit software suite (PC version 1.5) [CD-ROM]. Canada, Ontario, Burlington: TerraBase Inc.
210. Tokuda H, Unemoto T. 1983. Growth of a marine *Vibrio alginolyticus* and moderately halophilic *V. costicola* becomes uncoupler resistant when the respiration-dependent Na<sup>+</sup> pump functions. *J Bacteriol* 156: 636–643.
211. Tsiroidis V, Petala M, Samaras P, Hadjispyrou S, Sakellaropoulos G, Kungolos A. 2006. Interactive toxic effects of heavy metals and humic acids on *Vibrio fischeri*. *Ecotoxol Environ Saf* 63:158–167.
212. Tu SC. 1982. Isolation and properties of bacterial luciferase intermediates containing different oxygenated flavins. *J Boil Chem* 257:3719–3725.
213. Tu SC. 2008. Activity coupling and complex formation between bacterial luciferase and flavin reductases. *Photochem Photobiol Sci* 7:183–188.
214. Tu SCH, Mager HIX. 1995. Biochemistry of bacterial bioluminescence. *Photochem Photobiol* 62:615–624.



215. Ulitzur S, Hastings JW. 1980. Reversible inhibition of bacterial bioluminescence by long-chain fatty acids. *Current Microbiol* 3:295–300.
216. UniProt. Protein sequence data base UniProtKB. Uniport Protein Knowledgebase [duomenų bazė internete]. Hinxton (UK), Geneva (Switzerland), Washington (USA): UniProt Consortium. Uniprot Consortium. Sukurta 1986, internete nuo 2002 [cituota: 2010 04 21]. Adresas: <http://www.uniprot.org>.
217. Urbanczyk H, Ast JC, Higgins MJ, Carson J, Dunlap PV. 2007. Reclassification of *Vibrio fischeri*, *Vibrio logei*, *Vibrio salmonicida* and *Vibrio wodanis* as *Aliivibrio fischeri* gen. nov., comb. nov., *Aliivibrio logei* comb. nov., *Aliivibrio salmonicida* comb. nov. and *Aliivibrio wodanis* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:2823–2829.
218. US EPA. 1980. Ambient Water Quality Criteria Document. Polychlorinated Biphenyls. 440/5-80-068. US Environmental Protection Agency Office of Water Regulations and Standards Criteria and Standards Division. USA: Washington DC.
219. US EPA. 1991. Reregistration Eligibility Document Facts: Sulfur. US, Office of Pesticides Programs. USA: Washington DC.
220. US EPA. 2005. Technologies and techniques for Early Warning Systems to monitor and evaluate drinking water quality. A State-of-the-art review, Research report. EPA/600/R-05/156. Office of Research and development, National Homeland Security Research Center.
221. Vadasz J, Morty RE, Kohstall MG, Olschewski A, Grimminger F, Seeger W, Ghofrani HA. 2005. Oleic acid inhibits alveolar fluid reabsorption: a role in acute respiratory distress syndrome? *Am J Resp Crit Care Med* 171:469–479.
222. Vaes WHJ, Ramos EU, Verhaar HJM, Hermens JLM. 1998. Acute toxicity of nonpolar versus polar narcosis: is there a difference? *Env Toxicol Chem* 17:1380–1384.
223. Verhaar HJM, Solbe J, Speksinjder J, van Leeuwen CJ, Hermens JLM. 2000. Classifying environmental pollutants: Part 3. External validation of the classification system *Chemosphere* 40:875–883.
224. Verschueren K. 1996. Handbook of Environmental Data on Organic Chemicals. 3rd ed. New York, NY: Van Nostrand Reinhold Co.
225. Vetrova EV, Kudryasheva NS, Kratasyuk VA. 2007. Redox compounds influence on the NAD(P)H:FMN-oxidoreductase-luciferase bioluminescent system. *Photochem Photobiol Sci* 6:35–40.

226. Vighi M, Altenburger R, Arrhenius A, Backhaus T, Bodeker W, Blanck H, Consolaro F, Faust M, Finizio A, Froehner K, Gramatica P, Grimme LH, Gronvall F, Hamer V, Scholze, Walter H. 2003. Water quality objectives for mixtures of toxic chemicals: problems and perspectives. *Ecotoxicol Env Safety* 54:139–150.
227. Villa R, Willetts A. 1997. Oxidations by microbial NADH plus FMN-dependent luciferases from *Photobacterium phosphoreum* and *Vibrio fischeri*. *J Mol Catal B: Enzym* 2:93–197.
228. Visick KL, Ruby EG. 1998. The periplasmic, group III catalase of *Vibrio fischeri* is required for normal symbiotic competence and is induced both by oxidative stress and by approach to stationary phase. *J Bacteriol* 180:2087–2092.
229. Wada M, Kogure K, Ohwada K, Simidu U. 1992. Respiratory dependence of the CCCP-resistant luminescence of *Vibrio harveyi*. *J Gen Microbiol* 138:2525–2529.
230. Wang W, Lampi MA, Huang XD, Gerhardt K, Dixon DG, Greenberg BM. 2009a. Assessment of mixture toxicity of copper, cadmium, and phenanthrenequinone to the marine bacterium *Vibrio fischeri*. *Environ Toxicol* 24:166–177.
231. Wang W, Nykamp J, Huang XD, Gerhardt K, Dixon DG, Greenberg BM. 2009b. Examination of the mechanism of phenanthrenequinone toxicity to *Vibrio fischeri*: Evidence for a reactive oxygen species-mediated toxicity mechanism. *Environ Toxicol Chem* 28:1655–1662.
232. Watanabe H, Inaba H, Hastings JW. 1991. Osmoregulation of bioluminescence expression in *P. phosphoreum* is related to gyrase activity. In: Stanley PE, Kricka LJ, editors. *Bioluminescence and Chemiluminescence. Current Status*. Chichester: John Wiley and Sons. p. 43–46.
233. Watanabe H, Nagoshi T, Inaba H. 1993. Luminescence of a bacterial luciferase intermediate by reaction with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: the evolutionary origin of luciferase and source of endogenous light emission. *Biochim Biophys Acta – Bioenergetics* 1114:297–302.
234. Wesen C, Carberg GE, Martinsen K. 1992. Chlorinated organic substances in aquatic organisms and sediments. *Ambio* 19:36–38.
235. Wieckowski MR, Wojtczak L. 1998. Fatty acid-induced uncoupling of oxidative phosphorylation is partly due to opening of the mitochondrial permeability transition pore. *FEBS Letters* 423:339–342.

236. wipo.int [internetinè svetainè]. Word intelectual property organization – agency United Nations. Sukurta 2008 09 [atnaujinta 2008 09; cituota: 2010 02 20]. Adresas: <http://www.wipo.int/pctdb/ja/wo.jsp>
237. Wolff RL, Lavalie O, Pedrano F, Pasquier E, Deluc GL, Marpeau AM, and Aitzetmüller K. 2001. Fatty acid composition of Pinaceae as taxonomic markers. *Lipids* 36:439–451.
238. Wu JT, Chiang YR, Huanga WY, Jane WN. 2006. Cytotoxic effects of free fatty acids on phytoplankton algae and cyanobacteria. *Aquat Toxicol* 80:338–345.
239. Wu Q, Sowers KR, May HD. 1998. Microbial reductive dechlorination of Aroclor 1260 in anaerobic slurries of estuarine sediments. *Appl Environ Microbiol* 64:1052–1058.
240. Zenno H, Saigo K, Kanoh H, Inouye S. 1994. Identification of the gene encoding the major NAD(P)H-flavinoxidoreductase of the bioluminescent bacterium *Vibrio fischeri* ATCC 7744. *J Bacteriol* 176:3536–3543.
241. Zenno H, Saigo K. 1994. Identification of the genes encoding NAD(P)H-flavin oxidoreductases that are similar in sequence to *Escherichia coli* Fre in four species of luminous bacteria: *Photobacterium luminescens*, *Vibrio fischeri*, *Vibrio harveyi*, and *Vibrio orientalis*. *J Bacteriol* 176:3544–3551.
242. Zhou XJ, Okamura H, Nagata S. 2006. Remarkable synergistic effects in antifouling chemicals against *Vibrio fischeri* in a bioluminescent assay. *J Health Sci* 52:243–251.
243. Бандман АЛ. 1989. Сера и ее соединения. Волкова НВ, Грехова ТД, и др. Вредные химические вещества. Неорганические соединения V–VIII групп. Ленинград.: Химия. с. 170–256.
244. Данилов ВС, Егоров НС. 1990. Бактериальная билюминесценция. Москва: Издательство Московского государственного университета.
245. Сиренко ЛА, Козицкая ВН. 1988. Биологически активные вещества водорослей и качество воды. Киев: Наукова думка.
246. Скулачев ВП. 1989. Эническиргетика биологических мембран. Москва: Наука.
247. Торчинский ЮМ. 1977. Сера в белках. Москва: Наука.