



# **Biolumineszcencia gátlási teszt**

## ***Aliivibrio fischeri* tesztorganizmussal**

**Laborleirat**

**2018**



**Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem**

**Vegyésmérnöki és Biomérnöki Kar**

**Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék**

# Aliivibrio fischeri biolumineszcencia gátlási teszt

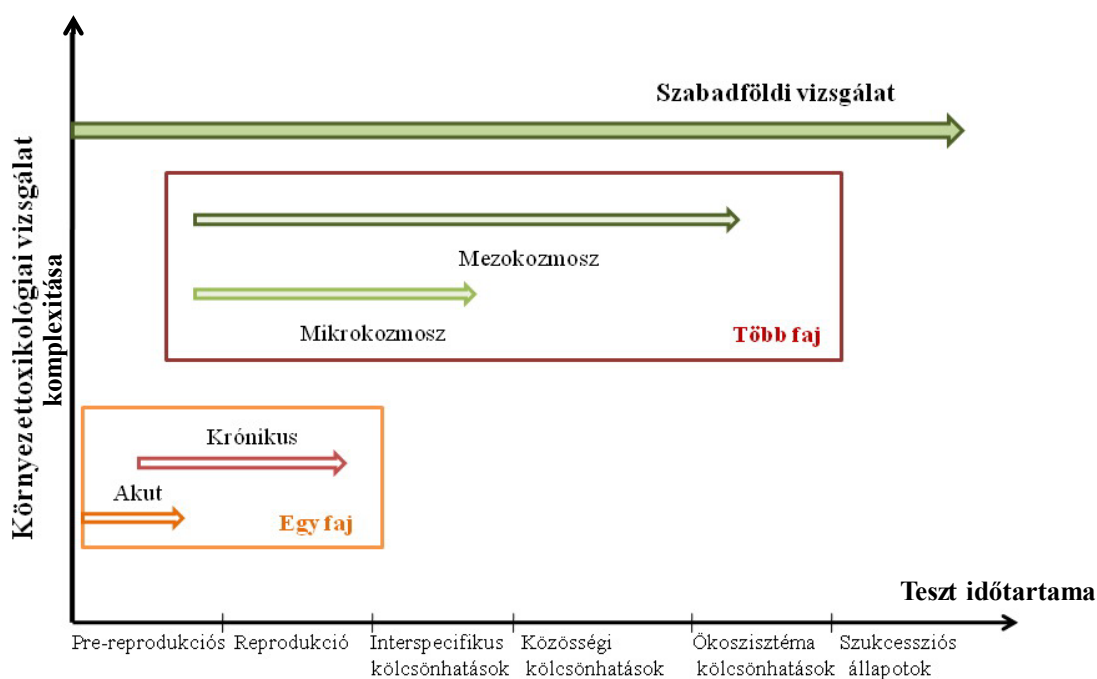
## 1. Bevezetés

### 1.1. A környezettoxikológia jelentősége

A környezetünkbe kerülő vegyi anyagok az ökoszisztéma szerkezetére és funkciójára, ezen keresztül pedig az emberre is veszélyt (potenciális kockázatot) jelentenek. A környezettoxikológia a környezetbe került vegyi anyagoknak az ökoszisztéma tagjaira gyakorolt hatását méri, majd ebből igyekszik előrejelzést adni a teljes ökoszisztémára. Ugyanakkor a teljes ökoszisztémák minden részletére kiterjedő vizsgálat mai tudásunk és a költségek miatt nem vagy korlátozottan lehetséges, ezért kiválasztott, jellemző fajok, laboratóriumi tesztorganizmusok, vagy tesztrendszerek válasza alapján következtetünk az ökoszisztéma egészére (Gruiz és mtsai, 2001).

A környezettoxikológia vagy ökotoxikológia multidiszciplináris tudományág, számos tudományterület közreműködésére szüksége van, úgy mint ökológia, biológia/mikrobiológia, populáció biológia, biokémia, molekuláris genetika, talajtudományok, limnológia, meteorológia, biometria stb.

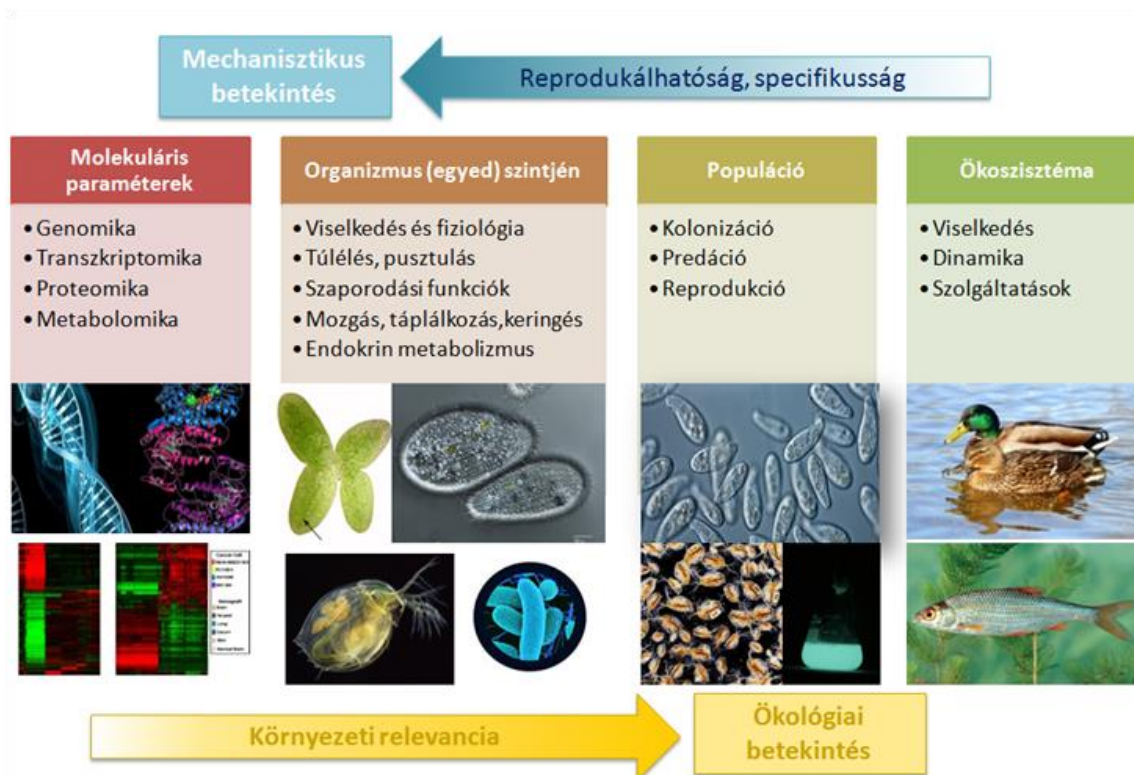
A vegyi anyagok hatásának felmérése több szinten lehetséges. A vegyi anyag környezetbe kerülése után kölcsönhatásba lép a környezettel (környezeti elemekkel), annak fázisaival; a környezetben terjed, megoszlik a különböző fázisok között, átalakul, degradálódik, stb. Ezek a folyamatok határozzák meg a vegyi anyag környezeti koncentrációját, ami eléri a biota tagjait és hat rájuk. Amikor eléri a biota tagjait a vegyi anyag kölcsönhatásba lép az élőlény egy aktív helyével, melyet molekuláris szinten kell értelmeznünk. A hatás molekuláris szinten lehet egy élőlény életfontosságú szerkezeti eleme vagy valamely fontos szereppel bíró molekulája, pl. enzimfehérje, nukleinsav vagy membránreceptor. Majd a molekuláris szintű kölcsönhatás eredményeképpen magasabb szintekre is áttevődik és megjelenik a hatás, pl. biokémiai vagy fiziológiai szinten, a viselkedés szintjén, a populáció, a közösség vagy az egész ökoszisztéma szintjén. (Gruiz és mtsai, 2001)



1. ábra- Az ökotoxikológiai tesztelés különböző szintjei

(Landis és Yu, 2004 nyomán)

Akár a molekuláris szinten, akár a magasabb szinteken, tehát az organizmus, a populáció, a közösség vagy a teljes ökoszisztéma szintjén megjelenő válaszok bármelyikét értelmezhetjük ökotoxikológiai teszt mérendő paramétereként. (1–2. ábra)



2. ábra- Ökotoxikológiai eljárások biológiai szerveződési szint alapján mérési végpontokkal  
(Kim és mtsai, 2015 nyomán)

Az ökotoxikológiai tesztek sokféle szempont szerint csoportosíthatjuk, például a tesztelés időtartama, az alkalmazott tesztorganizmus, a mérési végpont, a tesztelt környezeti elem, vagy akár a rendszer komplexitása alapján. Fő csoportosítási szempontok a tesztelés időtartama, és a tesztorganizmus faja, illetve a tesztrendszer fajösszetétele.

A tesztelés időtartama szerint akut (rövid időtartam) illetve szubakut és szubkrónikus vagy krónikus (hosszabb időtartam) teszteket különböztetünk meg. Az akut tesztek időtartama alatt nincs reprodukció; ezek a módszerek - a leggyakrabban alkalmazott tesztorganizmusok (pl. *Daphnia*, hal) esetében - általában 24–48 óra időtartamúak. Mikroorganizmusokkal végzett akut toxicitási tesztek ugyanakkor mindössze néhány percet vesznek igénybe (pl. *Aliivibrio fischeri* biolumineszcencia gátlási teszt). Az egy fajt alkalmazó krónikus tesztek a kísérleti állat élet-hosszának nagyobb részét magukban foglalják, időigényük a tesztorganizmus életidejétől és reprodukciós ciklusának hosszától függ. Általában nem multigenerációsak, csupán egy-két generációt fognak át.

A tesztorganizmus helyes megválasztása az ökotoxikológiai teszt kritikus pontja. Egy fajt alkalmazó tesztek esetében további különbséget jelent az, hogy vízi vagy szárazföldi ökoszisztéma tagjáról van-e szó, vagy esetleg üledéklakóról. A környezeti elem szerinti megkülönböztetés azért fontos, mert ettől függően az expozíciós útvonalak is eltérnek. Fontos, hogy a vizsgált tesztorganizmus mindig reprezentatív legyen a (lokális) ökoszisztéma hasonló funkcionális vagy rendszertani csoportjainak érzékenysége szempontjából.

A több fajt alkalmazó tesztek két vagy több faj kölcsönhatásait is vizsgálják, itt meghatározó a közösség összetétele. A populációdinamika eredményeképpen létrejövő változások, mint pl. a préda-predátor kölcsönhatás, a kompetíció, vagy fajösszetétel vizsgálata is lehet célja ezeknek a teszteknek.

A mikrokozmoszokban vizsgálhatóak a fajok közötti és a közösségen belüli kölcsönhatások, valamint a biota kölcsönhatása az abiotikus faktorokkal.

A mikrokozmoszok laboratóriumban összeállított és vizsgált többfajú tesztrendszerek, nincsenek szabványosítva térfogat, méret, vagy bonyolultság szerint. A szabadban (a természetes környezettől izoláltan) kialakított mezokozmoszokban is több trofikus szint is képviselve van, általában komplexebb, mint a mikrokozmosz, így már sokkal hűségesebb modellje a valóságos ökoszisztémának. A mezokozmoszok ki vannak téve a természetes behatásoknak, mint a csapadék, a sugárzások, a napfény és az atmoszférából leülepedő anyagok. A szabadföldi vizsgálatok olyan szintet jelentenek, amikor nem egy modellt használunk, amiből extrapolálunk a komplex ökoszisztémára, hanem direkt módon vizsgáljuk a szabadföldi viszonyokat.

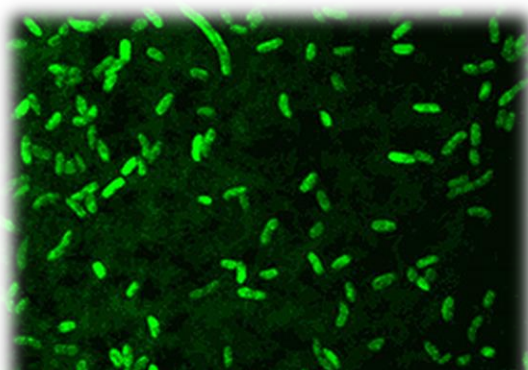
A tesztek válaszai alapján az eredményt a konzervatív becslés és a komplex megközelítés alapján értékeljük és prediktáljuk. A konzervatív becslés alapelve szerint egy xenobiotikum vagy stresszfaktor környezetre való toxikusságát mindig a populáció legérzékenyebb tagjainak válasza alapján becsüljük, hiszen egy komplex életközösségben vagy társulásban már csak egy populáció denzitásának (népességének) megváltozása is hatással lehet a többi ott élő, más fajú populáció egyedeire is.

A komplex megközelítés szellemében egy xenobiotikum társulásra vagy ökoszisztémára gyakorolt hatást csak nagy körültekintéssel lehet kevés faj válaszai alapján meghatározni. Az ilyen predikciók során törekedni kell az ökoszisztéma minél több funkcionális- illetve rendszertani csoportjának együttes megvizsgálására.

Az *Aliivibrio fischeri* biolumineszcencia gátlási teszt egy akut, egy fajt alkalmazó bakteriális tesztorganizmust alkalmazó módszer.

## 1.2. Az *Aliivibrio fischeri* tesztorganizmus jellemzői

Az *Aliivibrio fischeri* (3. ábra) egy olyan Gram-negatív, pálcika alakú baktérium, amely a természetben a mély óceánokban fordul elő. Heterotróf táplálkozású, ostorral mozog. Jelenleg a Gamma-



3. ábra: Az *Aliivibrio fischeri* mikroszkópos képe  
[https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Vibrio\\_fischeri](https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Vibrio_fischeri)

proteobaktériumok *Aliivibrio* családjának tagja, bár az évek során több név-, és taxonómiai változtatáson is átesett. Korábbi irodalmakban ezért is találkozhatunk még a *Vibrio fischeri* vagy akár *Photobacterium fischeri* megnevezéssel (<http://www.uniprot.org/taxonomy/668>). Közeli rokonságban áll a kolera megbetegedést okozó *Vibrio cholerae* és az opportunista patogén, biolumineszkáló *Vibrio harveyi* fajokkal. Megtalálható planktonikus formában a szabad tengervizekben, illetve a természetben más élőlényekkel, például a kurtafarkú tintahallal (*Euprymna scolopes*) való obligát szimbiózisban is. Amennyiben a

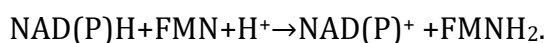
környezeti faktorok és a fiziológiás állapota megfelelő ehhez, alapvető életjelenségeként fény kibocsátásra képes, amit biolumineszcenciának hívnak. A fénykibocsátás (vagy épp „elhomályosodás”) mértéke függ az adott sejt, illetve a populáció denzitásától és vitalitásától. Amikor a sejt vitális és elég ATP molekula gyűlik fel benne, a luciferáz enzim képes oxidálni a luciferin molekulát oxiluciferinné. Az oxiluciferin termelődés során létrejövő teljes energia mennyiség 92%-a fényként sugárzik ki.

A fénykibocsátás redukált flavin mononukleotid (FMNH<sub>2</sub>) és hosszú szénláncú aldehid (R-CHO) oxidációja révén, oxigén(O<sub>2</sub>) jelenlétében megy végbe. (Scheerer et al, 2006; Widder, 2010)

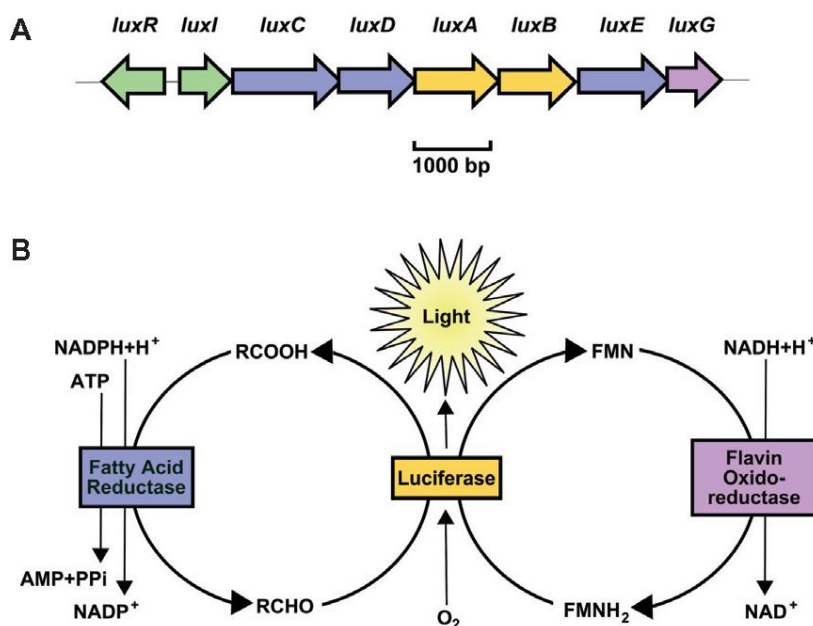
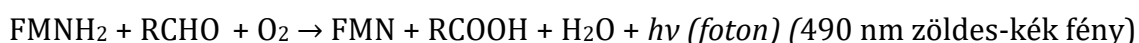
A reakció termékeként flavin mononukleotid (FMN), hosszú szénláncú szerves sav (R-COOH) és víz(H<sub>2</sub>O) keletkezik a 490 nm hullámhosszon detektálható zöldes-kék fény mellett (<http://photobiology.info/Lin.html>).

A reakciót az alábbi reakcióegyenletek írják le:

A flavin-mononukleotid (FMN) átalakul redukált FMNH<sub>2</sub> formába, NAD(P)H kofaktor (nikotinamid adenin dinukleotid foszfát) és egy enzim segítségével, egy H<sup>+</sup> iont felhasználva:



Azután visszaalakul oxidált FMN formába, hosszú szénláncú aldehid (R-CHO) és O<sub>2</sub> jelenlétében, luciferáz enzim segítségével. Eközben fénykibocsátás (emisszió) történik:



4. ábra: Biolumineszcencia az *Aliivibrio fischeri*ben

(Miyashiro és Ruby 2012)

Az *Aliivibrio fischeri* biolumineszcenciája a *Quorum sensing* (kvórum érzékelés) azaz a bakteriális kommunikáció klasszikus példája. Ugyanis ezek a baktériumok nem folyamatosan hozzák létre a biolumineszcenciát, hanem csak akkor, ha elérnek egy kritikus tömeget. Ezt a fajta kommunikációt, amikor a közösség az egyedsűrűségét igyekszik felmérni, kvórum érzékelésnek (quorum sensing) nevezzük. Az *Aliivibrio fischeri* kvórum érzékelését a LuxI-LuxR<sup>1</sup> rendszerrel szabályozza, melyben két N-acil-homoszerin-lakton (AHL) szignálmolekula vesz részt: N-3-oxo-hexanoil-L-homoszerin lakton és N-octanoil-L-homoszerin lakton.

<sup>1</sup> A Gram-negatív baktériumok esetén a biolumineszcenciáért felelős egység (cluster) 8 lux gént tartalmaz (luxA-E, luxG, LuxI, luxR), melyek közül az I fehérjével homológ luxI és az R fehérjével homológ LuxR a biolumineszcencia regulátorai. Az I fehérje katalizálja az kisméretű AHL szignál molekulák szintézisét, melyek diffúzióval képesek átjutni a sejtmembránon. Az intracelluláris R fehérje képes megkötni az AHL molekulákat és bizonyos küszöbértéket elérve, az R fehérje olyan transzkripció aktivátorként működik, amely elindítja különböző gének (luxCDABE) átíródását, aminek eredményeként biolumineszcenciáért felelős fehérjék expresszálódnak. A luxA és luxB gének kódolják a heterodimer luciferáz enzim aleggységeit, a luxC-E gének pedig azokat a fehérjéket, amelyek olyan multienzim komplexet képeznek, ami felelős a luciferáz által használt aldehid szubsztrát szintéziséért, a luxG gén pedig egy lehetséges flavin reduktázt kódol. (Baldwin et al, 1995; Fuqua et al, 1994)

### 1.3. *A Quorum Sensing, azaz a bakteriális kommunikáció*

Egyes mikroorganizmusok - mint például az *Aliivibrio fischeri* baktérium is - képesek arra, hogy csoportosan a többsejtű, magasabb rendű élőlényekéhez hasonló viselkedést mutassanak, különösen akkor, ha a túlélésük a cél. Az ilyen „összehangolt” viselkedésformák létrejöttéhez, elengedhetetlen a különálló, individuális sejtek közötti kommunikáció. Ilyen kommunikációra alkalmasak lehetnek a különböző kémiai jelanyagok révén, a hanghullámok, vagy más összetettebb szimbolikus (meta) kommunikációs kifejezésformák által is.

A kvórum érzékelés tehát egy sejtsűrűség függő jelátviteli folyamat, mely segítségével az egyedek elsősorban egymással, vagy akár magasabb rendű szervezetekkel kommunikálnak. Az információáramlás kémiai anyagokkal, az úgynevezett autoinducerek közvetítésével történik. Ezeket a szignál típusú molekulákat az élőlény maga termeli és eresztí a közvetlen környezetébe. A jelemolekulák felfogását speciális receptorok végzik. A kémiai jelanyagok révén a sejtek információt tudnak nyerni a környezetük egyes jellemzőiről, amilyen a populáció sűrűség is, ezáltal bizonyos mértékben reakcióik által szabályozni is tudják azt. Tipikusan három fő kvórum érzékelésben szerepet játszó jelzőmolekula típust különböztetünk meg. Az N-acil-homoszerin-lakton (AHL) típusú rendszerek a legelterjedtebbek, melyek túlnyomó részt Gram-negatív baktériumokban találhatóak. A Gram-pozitív baktériumok leggyakrabban autoindukáló peptideket használnak, míg a nem faj specifikus furanozil-bór-diészter jelzőmolekulát mindkettőben megfigyelték. (Kleeberczem et al, 1997; Kumari et al, 2008)

**A laborgyakorlat során mérjük és értékeljük különböző szennyezőanyagok és/vagy környezeti minták hatását a baktérium biolumineszcenciájára, összsejtszámának alakulására optikai denzitás mérésével, valamint enzimaktivitására tetrazólium redukciós teszttel.**

### 1.4. *A hatás felméréséhez alkalmazott módszerek rövid áttekintése*

#### **Biolumineszcencia mérése**

A biolumineszcencia mérését speciális spektrofotométerrel (luminométerrel) fényintenzitás mérésével tudjuk számszerűsíteni (lásd a mérés részletes leírása).

#### **Összsejtszám jellemzése optikai denzitás (OD) mérés alapján**

Az optikai módszerekkel nem közvetlenül a sejtszámra, hanem a sejttömegre lehet következtetni. A turbidimetriás mérés a kolloid oldaton áthaladó és a részecskéken szóródó fény relatív intenzitás csökkenésén alapszik. A mikrobák szaporodásuk során tiszta oldatok zavarosodását okozzák. A fényáteresztő képesség csökkenése ilyenkor nem a sejtszámmal, hanem a szuszpendált mikrobák sejttömegével arányos. Ha a sejtek méretei nem változnak meg jelentősen a szaporodás alatt, a mért adatokat sejtszámra is kalibrálhatjuk. Fotométerekkel a szuszpenzióra eső és az átmenő fény hányadosának logaritmusát, az extinkciót vagy optikai denzitást mérjük. Összehasonlító oldatnak, mindig a sejtnélküli tápoldatot vesszük ugyanolyan hígításban.

#### **Enzimaktivitás mérése**

Az enzimaktivitás monitorozására tetrazólium redukciós tesztet használunk.

A szerves anyagok aerob mikrobiális lebontása egy membránhoz kötött elektrontranszfer láncon keresztül történik, ahol az oxigén a végső elektronakceptor. Eközben ATP szintetizálódik, ezt nevezzük oxidatív foszforilációnak.

A légzési lánc valamelyik enzimének aktivitását megmérve információhoz juthatunk a sejt energiatermeléséről, teljes oxidatív aktivitásáról. Ez a felismerés vezetett a dehidrogenáz enzimaktivitás méréséhez (Alef, 1995). A dehidrogenáz enzimaktivitás méréshez leggyakrabban TTC-t (trifenil-tetrazólium-klorid) vagy INT-t (2-(p-jódifenil)-3(p-nitrofenil)-5-feniltetrazóliumklorid) natív mesterséges elektronakceptort használnak (www.enfo.hu). A dehidrogenáz, más egyéb enzimekhez hasonlóan a TTC-t vagy INT-t színes termékké, formazánná (TPF, INF) redukálja. Szinte valamennyi mikroorganizmus képes erre a redukcióra, és a reakció mértéke kolorimetriáisan meghatározható.

Az *Aliivibrio fischeri* tesztorganizmus enzimaktivására gyakorolt hatás vizsgálatára a laborgyakorlat során elektronakceptorként INT-t használunk. Az INT natív, oxidált alakja színtelen, viszont a sejtekben végbemenő enzimreakció során kialakult, redukált jódnitroformazán pirosas színű, nem autooxidábilis vegyület. Mivel az anyag redukciója ép sejtek esetén automatikus megtörténik, ezért a színreakció hiánya a sejtek a funkcionalitására utal, így vizsgálata alkalmas a biológiai aktivitás jellemzésére is.

## 2. Laborgyakorlat

### 2.1. A mérés célja

A mérés során célunk, hogy felmérjük a különböző vegyi anyagok, szennyezőanyagok (és/vagy környezeti minták) citotoxikus, élettani és *quorum sensing (QS)* gátló hatását. Az egyes szennyezőanyagok esetén megvizsgáljuk a szennyezőanyag toxicitásának koncentráció és időfüggését, elkülönítve a vizsgált minta citotoxikus és *Quorum Sensing* gátló hatását is.

A módszer az *Aliivibrio fischeri* tengeri baktérium által emittált lumineszcens fényintenzitásának, a sejtek optikai denzitásának (bizonyos hullámhosszú fény áteresztése illetve elnyelése), és a tetrazólium redukció által létrejött színváltozásnak a mérésén alapul. Gátló hatású anyag jelenlétében a fényemisszió illetve az OD, illetve az enzimaktivitás csökkenhet a tesztelt vegyi anyagtól, ennek hatásmechanizmusától és koncentrációjától függően, amelynek mértékét a biolumineszcencia esetén luminométerrel, az OD és az INF színintenzitás esetén DIALAB ELISA-leolvasó készülékkel mérjük.

A tesztet elvégezhetjük fagyasztva szárított vagy frissen átoltott tenyészzel. A frissen átoltott tenyészet használatát írja le az alábbi leírat. Ebben az esetben a tesztorganizmus érzékenységét folyamatosan ellenőrizni kell.

### 2.2. A laborgyakorlat során alkalmazott módszer elve és jellemzői

A teszt típusa: egy fajt alkalmazó, laboratóriumi akut toxicitási teszt

- ✚ Végpontok: *mérési végpont* – biolumineszcencia, *vizsgálati (teszt) végpont* - EC<sub>20</sub> és EC<sub>50</sub>, ED<sub>20</sub> és ED<sub>50</sub>, illetve rézegenérték
- ✚ Tesztelhető minták: folyadék fázisú, színtelen vagy halvány színű minták vizsgálatára (módszerbeli módosításokkal talaj állagú minták és bizonyos esetekben színes vegyületek is mérhetőek)
- ✚ Tesztorganizmus: *Aliivibrio fischeri*: (1) az EPA és a DIN szabványokhoz liofilezett formában (2) laboratóriumi törzstenyészet
- ✚ Szükséges műszerek: luminométer, DIALAB Elisa-leolvasó készülék

- ✚ Tesztelés időtartalma: 5–120 min (függ a kísérlet céljától); hagyományos szabványmódszer esetén: 30 min
- ✚ Szabvány módszeres: US EPA, DIN38412, talajra és direkt kontakt hatásra kidolgozott változat: BME-ABÉT
- ✚ Alkalmazási terület: Előzetes és részletes állapotfelmérés, kockázatbecslés, remediáció követése és ellenőrzése, utómonitoring
- ✚ Megjegyzés: Jól reprodukálható és a legtöbb xenobiotikum és stresszfaktorra érzékeny teszt.

### 2.3. Alkalmazott műszerek

FLUOstar OPTIMA: spektrofotométer, amely a fényintenzitást méri. Multifunkcionális lemezolvasó, képes fluoreszcencia-intenzitás mérésre, annak időbeli felbontására illetve lumineszcencia és abszorbancia mérésre is. Mikrotitrátor lemezes leolvasással, alsó és felső optikával is rendelkezik. Széles hullámhossztartományban képes mérni. A mintákat képes fűteni és inkubálni. Számítógépre installált szoftveres vezérléssel használható.

ELISA DIALAB EL800 mikrotitrátor lemezolvasó: mind az optikai denzitási értékek leolvasására, mind az enzimaktivitást jellemző abszorbancia leolvasására alkalmazzuk ezt a fotométert. Mikrotitrátor lemez rendszerű leolvasóval rendelkezik. 400-750 nm-s hullámhossztartományban képes mérni. A műszert a KC Junior programmal vezéreljük a leolvasás 405 nm, 450 nm, 490 nm és 630 nm-s tartományban történik meg.



5. ábra: FLUOstar OPTIMA műszer  
([www.bmglabtech.com](http://www.bmglabtech.com))

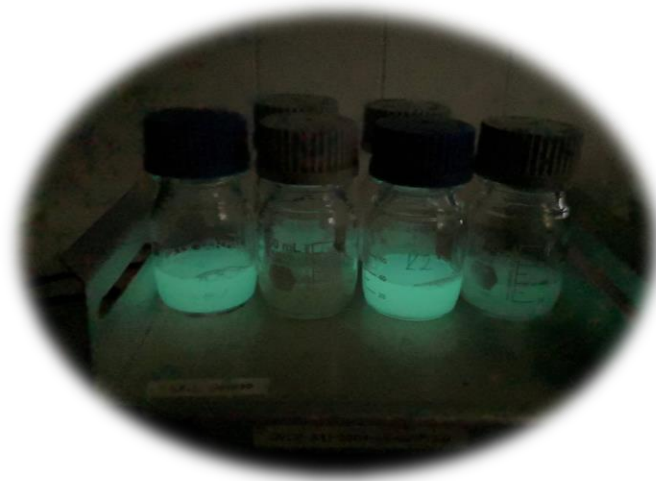


6. ábra: ELISA DIALAB EL800 műszer  
([www.dialab.hu](http://www.dialab.hu))

### 2.4. Törzsfenntartás

Az *Aliivibrio fischeri* törzset folyékony tápoldatban, hűtőben tartjuk fenn, folyamatos átoltással. A vizsgálathoz frissen átoltott tenyészetet használunk. 16–18 órás, 28 °C-on *Aliivibrio fischeri* tápoldatban történő rázatás után a sejtszuszpenzió használható mérésre.





7. ábra: *Aliivibrio fischeri* tenyészetek

Az inokulum készítéséhez használt tápoldat összetétele a következő.

*Aliivibrio fischeri* tápoldat (1000 cm<sup>3</sup> desztillált vízre számolva):

|                   |  |
|-------------------|--|
| 30 g              | NaCl   |
| 6,1 g             | NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O |
| 2,75 g            | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                    |
| 0,204 g           | MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O               |
| 0,5 g             | (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>   |
| 5 g               | pepton   |
| 0,5 g             | élesztőkivonat                                     |
| 3 cm <sup>3</sup> | glicerin   |
| pH=7,2            |  |

A tápoldat sterilizése autoklávban 121 °C-on, 10 percig történik.

### 2.5. Vízi mikro-szennyezőanyagok hatásának vizsgálata

A mérés során elsősorban az ún. újonnan felismert káros hatású mikro-szennyezőanyagok (úgynevezett *Emerging Pollutants* – EP) hatásainak felmérését célozzuk meg a tesztrendszerrel. Az EP anyagok közé tartoznak (tartozhatnak) egyes gyógyszerhatóanyagok, ipari segédanyagok, nanoanyagok, felületaktív anyagok, peszticidek, táplálék-kiegészítők, élelmiszer-adalékok, kozmetikumok és a háztartásban használt egyéb vegyszerek. Ehhez kapcsolódóan a kiválasztott mikro-szennyezőanyagok, például ösztradiol, diklofenák, triklozán, nanoTiO<sub>2</sub>, 4-klórfenol és peszticidek hatásának tesztelése, a koncentráció válasz összefüggések feltárása a cél a tesztrendszerrel (biolumineszcencia, OD és enzimaktivitás eredmények összehasonlításával).

A koncentráció-válasz összefüggések vizsgálatához a vizsgálandó mintákból hígítási sorokat készítünk desztillált vízzel.

A mérés során nem csak a mikro-szennyezőanyagok hígítási sorát, hanem pozitív és negatív kontroll anyagok hatását is megmérjük.

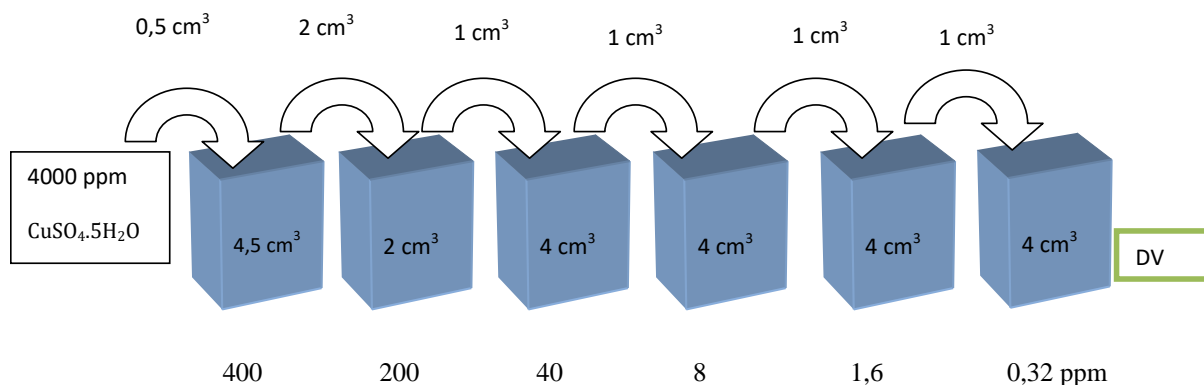
Negatív kontroll: desztillált víz (és NaCl)

Pozitív kontroll: CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (kalibráció sor)

## CuSO<sub>4</sub> kalibráció sor

Mivel a mérés érzékenysége erősen függ a tenyészet korától, illetve például a hőmérséklettől, a minták mellé standard Cu-sor lumineszcencia gátlását is mérjük. Eltérő érzékenységű tesztszuspenzió esetén a különböző mérési sorozatok eredményét mindig az aktuális Cu-sorra viszonyítva adjuk meg

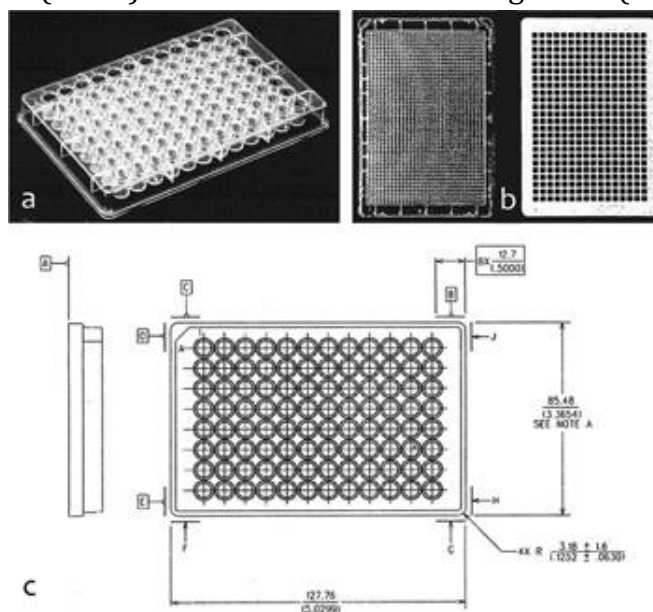
A felhasznált Cu-só: CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, a hígítás menetét a következő ábra mutatja.



8. ábra: Réz kalibráció sor készítése

## 2.6. A mérés menete

A vizsgálatot 96 lyukú (cellás) mikrotitrátor lemezben végezzük. (6. ábra)



9. ábra: Mikrotitrátor lemez

(Forrás: <http://www.matud.iif.hu/2014/09/09.htm>)

Egy kísérleti összeállítást, egy mikrotitrátor lemezt alkalmazunk a lumineszcencia, az optikai denzitás majd végül az enzimaktivást jellemző abszorbancia értékek mérésére is.

### A mérés lépései:

1. Elkészítjük a vizsgálni kívánt vegyi anyag oldatból a hígítási sort. (Ez esetben ez egy 6 tagú, felező hígítás)
2. Elkészítjük a standardként használt rézszulfát  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  oldat hígítási sorát.
3. A mikrotitrátor lemez celláiba 3-3 párhuzamosan bemérünk 50-50  $\mu\text{l}$  oldatot a vegyi anyag és a Cu-kalibráció sor megfelelő hígításaiból.

|          | 1                | 2               | 3              | 4             | 5           | 6            | 7                    | 8                   | 9                  | 10               | 11               | 12               |
|----------|------------------|-----------------|----------------|---------------|-------------|--------------|----------------------|---------------------|--------------------|------------------|------------------|------------------|
| <b>A</b> |                  |                 |                |               |             |              |                      |                     |                    |                  |                  |                  |
| <b>B</b> | Cu 0,32 mg/L     | Cu 1,6 mg/L     | Cu 8 mg/L      | Cu 40 mg/L    | Cu 200 mg/L | Cu 400 mg/L  | Triklozán 0,125 mg/L | Triklozán 0,25 mg/L | Triklozán 0,5 mg/L | Triklozán 1 mg/L | Triklozán 2 mg/L | Triklozán 4 mg/L |
| <b>C</b> | Cu 0,32 mg/L     | Cu 1,6 mg/L     | Cu 8 mg/L      | Cu 40 mg/L    | Cu 200 mg/L | Cu 400 mg/L  | Triklozán 0,125 mg/L | Triklozán 0,25 mg/L | Triklozán 0,5 mg/L | Triklozán 1 mg/L | Triklozán 2 mg/L | Triklozán 4 mg/L |
| <b>D</b> | Cu 0,32 mg/L     | Cu 1,6 mg/L     | Cu 8 mg/L      | Cu 40 mg/L    | Cu 200 mg/L | Cu 400 mg/L  | Triklozán 0,125 mg/L | Triklozán 0,25 mg/L | Triklozán 0,5 mg/L | Triklozán 1 mg/L | Triklozán 2 mg/L | Triklozán 4 mg/L |
| <b>E</b> | Dv-kont          | Dv-kont         | Dv-kont        | Dv-kont       | Dv-kont     | Dv-kont      | Fototáp              | Fototáp             | Fototáp            | Fototáp          | Fototáp          | Fototáp          |
| <b>F</b> | ACD 0,3125 mg/mL | ACD 0,625 mg/mL | ACD 1,25 mg/mL | ACD 2,5 mg/mL | ACD 5 mg/mL | ACD 10 mg/mL | nTiO2 6,25 mg/l      | nTiO2 12,5 mg/l     | nTiO2 25 mg/l      | nTiO2 50 mg/l    | nTiO2 100 mg/l   | nTiO2 200 mg/l   |
| <b>G</b> | ACD 0,3125 mg/mL | ACD 0,625 mg/mL | ACD 1,25 mg/mL | ACD 2,5 mg/mL | ACD 5 mg/mL | ACD 10 mg/mL | nTiO2 6,25 mg/l      | nTiO2 12,5 mg/l     | nTiO2 25 mg/l      | nTiO2 50 mg/l    | nTiO2 100 mg/l   | nTiO2 200 mg/l   |
| <b>H</b> | ACD 0,3125 mg/mL | ACD 0,625 mg/mL | ACD 1,25 mg/mL | ACD 2,5 mg/mL | ACD 5 mg/mL | ACD 10 mg/mL | nTiO2 6,25 mg/l      | nTiO2 12,5 mg/l     | nTiO2 25 mg/l      | nTiO2 50 mg/l    | nTiO2 100 mg/l   | nTiO2 200 mg/l   |

10. ábra: Mikrotitrátor lemez összeállítására példa

4. A mikrotitrátor lemez celláihoz hozzáadjuk a 200-200  $\mu\text{l}$  16–18 órás *Aliivibrio fischeri* sejtszuszpenziót
5. 0 ( $I_0/OD_0$ ), 15 ( $I_{15}/OD_{15}$ ), 30 ( $I_{30}/OD_{30}$ ) és 45 ( $I_{45}/OD_{45}$ ) perces kontaktidővel lemérjük a cellákban a lumineszcenciát és optikai denzitást (4 hullámhossz 405/450/490/630 nm; értékeléshez a 630 nm-t használjuk).
6. A 45 perces kontaktidő után minden cellához pipetázunk a 30-30  $\mu\text{l}$  INT oldatot. Az indikátor vegyülettel (mesterséges elektronakceptor) 10 percig inkubálunk, majd lemérjük az abszorbanciát (4 hullámhossz 405/450/490/630 nm, értékeléshez a 490 nm-t használjuk).
7. Az eredmények értékelését excel és az „Origin 6.0 DEMO” program segítségével végezzük

A mérés során a koncentráció – válasz összefüggést kísérletesen vizsgáljuk, úgy, hogy a kérdéses vegyi anyag növekvő koncentrációinak függvényében mérjük a hatást, a megfelelően megválasztott ökotoxikológiai végpontot. Akut toxicitás mérése esetén (rövid idejű kitettség) a koncentráció – hatás görbéről leolvashatjuk a 10, 20 50 vagy 90 %-os gátlást okozó koncentrációt. Ennek megfelelően az alábbi vizsgálati végpontokat szoktuk, mint eredményt megadni.

$EC_{10}$ ,  $EC_{20}$ ,  $EC_{50}$ ,  $EC_{90}$  = hatásos koncentráció (*Effect Concentration*), mely a mérési vagy vizsgálati végpont 10, 20, 50, 90 %-os csökkenését okozza.

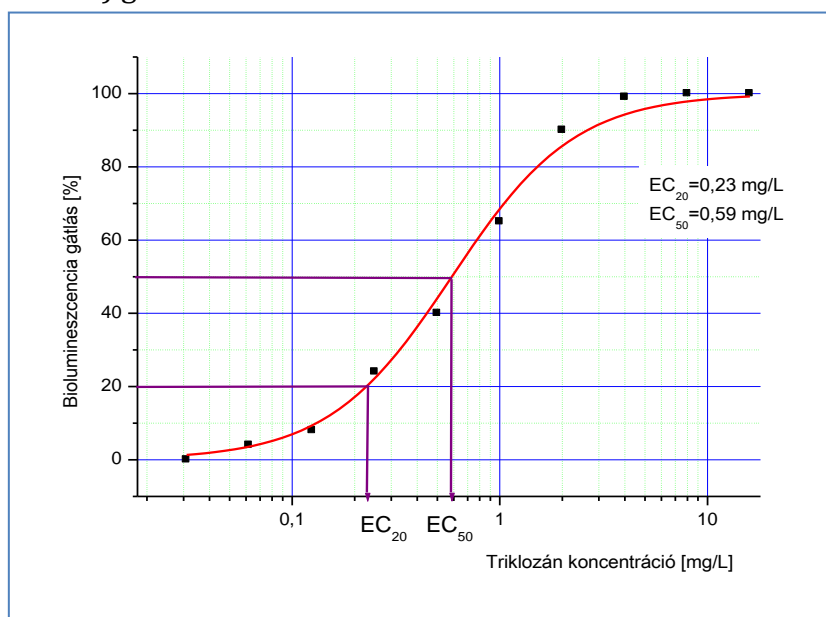
## 2.7. Eredmények értékelése

Minden esetben a kontroll minta (desztillált víz) fényintenzitásához viszonyítva az adott „kezelt” mintákra százalékos gátlást számítunk a koncentráció és az idő függvényében.

1. A kontroll (desztillált víz) 3-3 párhuzamosából az adott időpontra vonatkozóan átlagot számítunk
2. A vizsgált vegyi anyagok hígítási tagjainak százalékos gátlását ehhez az átlag értékhez viszonyítva határozzuk meg, úgy hogy 3-3 gátlási százalék értéket kapjunk.

$$G (\%) = 100 \times \frac{I_k - I_{minta}}{I_k}$$

3. A három párhuzamos gátlási értékből átlagot és szórást számítunk.
4. Az átlag gátlási százalék értékeket a koncentráció függvényében ábrázoljuk Origin 6.0 programmal, majd a pontokra illesztjük a koncentráció-válasz (*dose-response function*) görbét.



11. ábra: Trihalomethán koncentráció-válasz görbéje biolumineszcencia gátlási tesztben (minta)

5. A koncentráció válasz görbéről leolvassuk a 20 és 50%-os gátlást okozó koncentráció értékeket (EC<sub>20</sub>, EC<sub>50</sub>).
6. A tesztelt vegyi anyagok hatását összehasonlítjuk és jellemezzük a meghatározott gátlási százalék értékek (G%) és hatásos koncentráció értékek (EC<sub>20</sub> és EC<sub>50</sub>) alapján.

## Laborgyakorlat jegyzőkönyve

1. Mérés háttérének rövid leírása. A tesztorganizmus rövid bemutatása. A teszt legfontosabb jellemzőinek meghatározása
2. Mérés menetének pontos megadása. A felhasznált vegyi anyagok és koncentrációik tételes felsorolása
3. Mért eredmények megadása (táblázatosan), számolás menetének leírása
4. Gátlási százalék értékek (G%) és hatásos koncentráció értékek (EC<sub>20</sub> és EC<sub>50</sub>) megadása
5. A tesztelt vegyi anyagok hatásának összehasonlító értékelése. Toxikussági sor felállítása az EC értékek alapján

## Irodalomjegyzék:

1. Baldwin, T. O., Christopher, J. A., Raushel, F. M., Sinclair, J. F., Ziegler, M. M.; Fisher, A. J., Rayment, I.: Structure of bacterial luciferase, Current Opinion. *Structural Biology*. 1995, 5:798–809.
2. Fuqua, WF., Winans, SC., Greenberg, EP.: Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology*. 1994, 176:269–275.
3. Gruiz, K., Horváth, B., Molnár, M.: Környezettoxikológia. Műegyetemi Kiadó, 2001, Budapest
4. Kim, H.J., Koedrith, P., Seo, Y.R.: Ecotoxicogenomic Approaches for Understanding Molecular Mechanisms of Environmental Chemical Toxicity Using Aquatic Invertebrate, Daphnia Model Organism. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015, 16:12261–12287.
5. Kleerebezem M.; Quadri, L.E.N.; Kuipers, O.P.; deVos, W.M.: Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology*. 1997, 24(5):895–904.
6. Kumari A.; Pasini P.; Dauner S.:Detection of bacterial quorum sensing N-acyl homoserine lactones in clinical samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2008, 1619–1627.
7. Landis W.G. & Yu M.-H.: Introduction to Environmental Toxicology, Impact of Chemicals Upon Biological Systems. CRC Press, 2004.
8. Miyashiro, T., Ruby, E.: Shedding light on bioluminescence regulation in *Vibrio fischeri*. *Molecular Microbiology*. 2012, 84 (5):795–806.
9. Scheerer S., Gomez F., Lloyd D.: Bioluminescence of *Vibrio fischeri* in continuous culture: Optimal conditions for stability and intensity of photoemission. *Journal of Microbiological Methods*. 2006, 67:321–329.
10. Widder, E.A.: Bioluminescence in the ocean: Origins of biological, chemical, and ecological diversity. *Science*. 2010, 328:704–708.