

PHƯƠNG PHÁP THỬ NGHIỆM ĐỘC HỌC SỬ DỤNG HỆ HÔ HẤP CỦA MÀNG TY THỂ TIM BÒ

Lê Phi Nga ⁽¹⁾, Nguyễn Thị Thu Hiền ⁽¹⁾, Nguyễn Thị Hoa Liên ⁽¹⁾,
 Dương Thị Hương Giang ⁽²⁾, Đinh Duy Kháng ⁽³⁾

(1) Viện Môi trường và Tài nguyên, ĐHQG - HCM

(2) Viện Nghiên cứu Phát triển và Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

(3) Viện Công nghệ Sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

1. GIỚI THIỆU

Các thử nghiệm độc học môi trường dạng ống nghiệm (*in vitro*) sử dụng cơ thể sinh học nhỏ bé như vi sinh vật, ấu trùng sò... hoặc các chất sống cấu trúc nhỏ bé hơn tế bào như: bào quan, enzyme, khắc phục được những yếu điểm của các thử nghiệm dùng cơ thể sinh học bậc cao. Các thử nghiệm *in vitro* này thường cho kết quả nhanh, độ lặp lại cao và rẻ hơn nhiều mà độ nhạy của phép thử nghiệm cũng tương đương trong đa số các trường hợp. Vì không có một loại thử nghiệm nào là lý tưởng cho tất cả các chất độc môi trường, hơn nữa, mỗi công cụ thử nghiệm đều có ưu và nhược điểm riêng và thường chỉ nhạy cảm với một số dạng chất độc nhất định, cho nên để có được những đánh giá rủi ro tin cậy nhất, cần sử dụng một nhóm hay một bộ công cụ thử nghiệm có mối quan hệ sinh thái.

Ở Việt Nam các dạng thử nghiệm đã và đang tồn tại là thử nghiệm dùng cá, dùng bộ nước (*Daphnia magna* và *Ceriodaphnia cornuta*), dùng tảo *Selenastrum*, dùng vi khuẩn *Vibrio fischeri* - đây cũng là một phương pháp thử nghiệm *invitro* đã được thương mại hóa dưới dạng *Test Kit* và yêu cầu đo trên máy chuyên dụng được sản xuất bởi công ty Microtox.

Phương pháp thử nghiệm độc tố môi trường sử dụng hệ hô hấp của màng ty thể tim bò đã được nghiên cứu rất sớm từ cuối những năm 70 [4]. Ty thể là những bào quan riêng biệt có thể được nghiên cứu sớm nhất và đầy đủ nhất về cả cấu trúc, cấu tạo phân tử và chức năng sinh lý, sinh hóa trong tế bào. Vai trò chính của ty thể là cung cấp năng lượng cho tế bào thông qua việc tổng hợp các phân tử ATP (adenosine triphosphate) mang năng lượng cao. Quá trình tổng hợp ATP được diễn ra khá phức tạp nhờ chênh lệch thế năng ($\Delta\phi$) giữa hai bên của màng trong ty thể do quá trình proton được bơm qua màng thông qua hoạt động của chuỗi chuyền dịch điện tử trên màng được gọi là chuỗi hô hấp. Oxy là chất nhận điện tử cuối cùng của chuỗi hô hấp.

Hoạt động của chuỗi hô hấp thực chất là những quá trình sinh lý của các enzym thông qua trao đổi vật chất qua màng ty thể. Vì vậy các enzym này là cửa ngõ đầu tiên của tế bào có phản ứng nhạy cảm với sự có mặt của các chất kim hãm - chất gây độc. Các phần màng lớp trong của ty thể sau khi phá bằng siêu âm cho các tiểu phần hình cầu (Sub-mitochondrial particles, viết tắt là SMP) mang các enzym của hệ hô hấp được hướng ra phía ngoài, nhờ vậy mà các phản ứng enzym có thể được khảo sát. Bản thân SMP rất nhỏ nên phản ứng có thể được thực hiện trong ống nghiệm và được theo dõi bằng phổ hấp thụ vì không cần bước sóng.

Về nguyên tắc thì thử nghiệm độc học dùng SMP là thử nghiệm khả năng ức chế hoạt tính của hệ enzym của từng phần hay toàn phần chuỗi hô hấp tạo bởi sự tương tác của các enzym sau: Phức hợp (Complex)-I: NADH dehydrogenase; Phức hợp-II: succinate hydrogenase; Phức hợp-III: cytochrome-c; Phức hợp-IV: ferrocycytochrome-c; Phức hợp-V: ATPase. Các phản ứng thử nghiệm độc học thường là: 1/ ETr: phản ứng vận chuyển điện tử xuôi với sự tham gia của 3 Phức hợp-I, III và IV; 2/ RET: phản ứng vận chuyển điện tử ngược với sự tham gia của 3 Phức hợp-I, II và V; 3/ FEW : phản ứng lấy điện tử với sự tham gia của Phức hợp-I. Thử nghiệm độc học sử dụng hoạt tính của của các phản ứng trên đã được công bố trong các tài liệu [1], [2], [4], [5] và [6].

Mục đích của nghiên cứu này là nhằm thử nghiệm ứng dụng phương pháp SMP ty thể tim bò cho thử nghiệm độc học nước, bao gồm các nội dung: 1/ Thu nhận ty thể và SMP từ tim bò; 2/ Thử nghiệm độc học dùng SPM trên cơ sở hoạt tính phản ứng RET và hoạt tính phản ứng ETr với: a) kim loại nặng: Cd, Cu, Hg, Pb, Zn; b) Thuốc bảo vệ thực vật Carbamat và thuốc diệt cỏ

Vifosalt; c) 4 mẫu nước thải công nghiệp);3/ So sánh với phương pháp thử nghiệm dùng SMP với các phương pháp hiện hành: *Daphnia* và Mirotox. Sự thành công của nghiên cứu góp phần đưa thêm một phương pháp thử nghiệm độc học *invitro* vào sử dụng ở Việt Nam.

2.VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1.Vật liệu

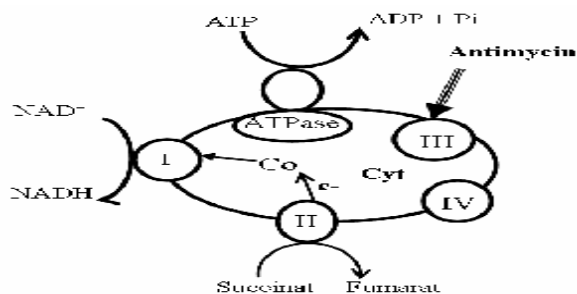
Tim bò tươi mới, sau giết mổ không quá 6 giờ và được bảo quản trong đá lạnh (~ 4 °C - 6°C). Hoá chất sử dụng đều có độ tinh sạch cao (nhà cung cấp: Merk, Sigma): Tris (Trimabse), ATP (Adenosine triphosphate), NADH (Nicotinamide adenine dinucleotide), NAD⁺ (dạng bị khử của NADH), PMSF (Phenylmethylsulfonylfluoride), GSH (Glutathion), và DCPIP (2,6-dichlorophenolindophenol).

Các kim loại nặng dùng cho thử nghiệm là dung dịch chuẩn: Cu(NO₃)₂, Zn(NO₃)₂, Cd(NO₃)₂, Pb(NO₃)₂, và Hg(NO₃)₂ của nhà sản xuất Merk. Carbamate là thuốc trừ sâu do công ty thuốc sát trùng Miền nam cung cấp. Glyphosalt (chứa hoạt chất Glyphosate-isopropylamine) là thuốc diệt cỏ cho cây trồng cạn được bán rộng rãi trên thị trường. Bốn mẫu nước thải công nghiệp có mã số: T03.57-1/4, T03.36-1/5, T03.38-3/8 và T03.18-5/5 được cung cấp bởi Phòng Chất lượng nước Viện Môi trường và Tài nguyên, ĐHQG-HCM.

2.2.Phương pháp tách ty thể và SMP từ tim bò

Quá trình tách chiết chủ yếu tiến hành theo Rodney F. Boyer [3] có cải tiến. Toàn bộ quá trình được thực hiện ở nhiệt độ 7 ± 3 °C. Sau khi loại bỏ phần mỡ và gân, tim bò được xắt miếng, rửa, và xay nhuyễn trong Tris-sucrose: 10 mM Tris chứa 0,25 M sucrose, pH 7,8 (Đệm-1). Lọc bỏ dịch và máu. Đồng hóa tim bò đã xay bằng cối nghiền piston trong cùng dung dịch Đệm-1 trên có thêm 5 mM MgCl₂, 1 mM Succinate, 2 µg/ml Leupeptin và 0,1 mM PMSF (Đệm-2). Loại bỏ tế bào chưa vỡ bằng cách ly tâm ở tốc độ 1500 rpm trong 20 phút với máy ly tâm Sorvall RC26. Ty thể được tủa lại sau khi ly tâm ở tốc độ 8000 rpm trong 45 phút trên cùng máy ly tâm. Ty thể nặng được đồng hóa trong dung dịch Đệm-2 có thêm 2 mM GSH (Đệm-3), sau đó được rửa lại bằng cùng dịch đệm, lắng bằng ly tâm, rồi đồng hóa lại. Từ đây ty thể có thể chuyển sang bước tách SMP hoặc đông lạnh nhanh bằng nitơ lỏng rồi bảo quản ở nhiệt độ -20°C.

Ty thể (~ 20 mg/ml) còn tươi hay đã rã đông được đưa qua máy siêu âm (Sonics model VC130PB). Ty thể chưa vỡ được loại bỏ bằng ly tâm 8000 rpm trong 15 phút (Sorvall RC26), thu phần dịch. SMP được lắng bằng ly tâm siêu tốc 30.000 rpm trong 1 giờ (Sorvall UltraPro 80). Sau khi đồng hóa, rửa và đồng hóa lại bằng dung dịch Đệm-3 có thêm 1mM ATP, SMP được đông lạnh nhanh bằng nitơ lỏng và bảo quản ở nhiệt độ -20°C.



Hình 1. Nguyên tắc của phản ứng RET

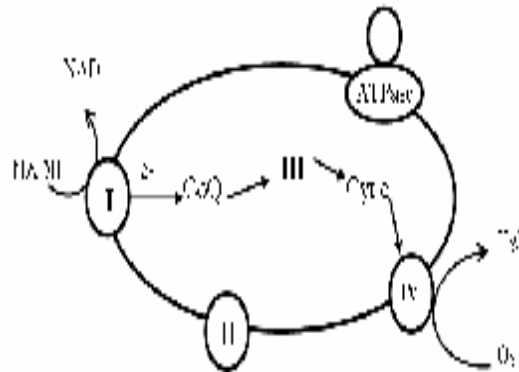
2.3. Phản ứng RET [6]:

Nguyên tắc của phản ứng được trình bày trong Hình-1. Phản ứng được thực hiện trong đệm 25 mM HEPES-KOH, pH 7,5, 6 mM MgCl₂, 5 mM Na-succinat, 1 mM NAD⁺, 2,5µg/ml Antimycin và ~ 0,2 mg/ml SMP. Phản ứng bắt đầu khi thêm 1 mM ATP vào dung dịch. Độ gia

tăng hấp thu quang phổ ở bước sóng 340 nm được ghi lại cứ mỗi 10 giây (tính từ thời điểm thêm ATP).

2.4. Phản ứng ETR [6]:

Nguyên tắc của phản ứng được trình bày trong Hình-2. Phản ứng được thực hiện trong đệm 25 mM HEPES-/KOH, 6 mM MgCl₂, pH 7,5 và ~ 0,2 mg/ml SMP. Phản ứng bắt đầu khi 0,16 mM NADH thêm vào dung dịch. Độ giảm hấp thu quang phổ ở bước sóng 340 nm được ghi lại cứ mỗi 10 giây (tính từ thời điểm thêm NADH).



Hình 2. Nguyên tắc của phản ứng ETR

2.5. Phương pháp xác định EC₅₀ và đánh giá độ tương đương giữa các phương pháp:

EC₅₀ được tính theo tuyến tính bậc nhất của logarit phần trăm độ kìm hãm hoạt tính theo sự thay đổi nồng độ trong đó tỉ lệ phần trăm kìm hãm = $[1 - (S_n / S_0)] * 100\%$ với S₀ là hệ số góc khi không có chất độc; S_n là hệ số góc khi có chất độc. Độ tương đương giữa 2 phương pháp được biểu diễn mỗi bằng tương quan tuyến tính ($y = ax + b$) của nhóm trị số logarit EC₅₀ của tất cả các mẫu thu được theo phương pháp này đối với nhóm trị số logarit EC₅₀ của tất cả các mẫu thu được theo phương pháp kia [4].

2.6. Các phương pháp khác:

- 1/ Xác định hàm lượng protein bằng phương pháp Lowry [7];
- 2/ Phản ứng hô hấp của ty thể với DCPIP như là chất nhận điện tử cuối cùng;
- 3/ Thử nghiệm độc tính cấp EC₅₀ -24h trên *Daphnia magna* theo OECD-202;
- 4/ Thử nghiệm độc tính cấp 15 phút trên *Vibrio Fisheri* theo Microtox [8].

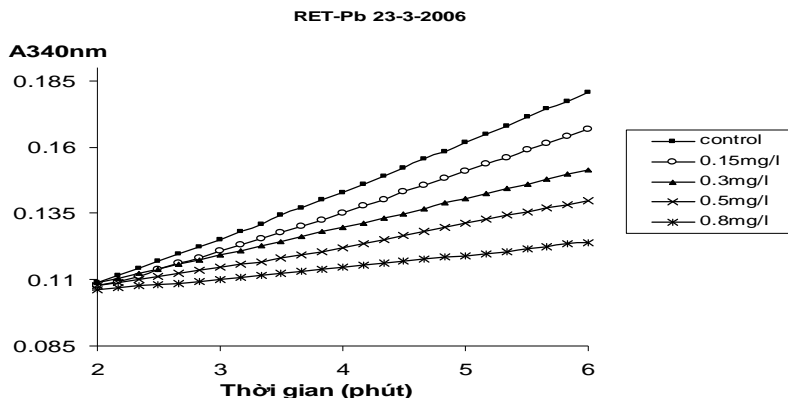
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả tách ty thể và SMP

Hiệu suất thu protein ty thể đạt trong khoảng 1-1,4% trọng lượng tim bò tươi (đã loại bỏ phần mỡ và bao tim). Hoạt tính chuỗi hô hấp trên ty thể được khảo sát dựa trên phản ứng chuyển điện tử với chất nhận điện tử cuối DCPIP ($0,754 \pm 0,013$ mmoles/mg protein/phút). Quá trình tạo SMP từ ty thể thu được khó khăn hơn với yêu cầu năng lượng của máy siêu âm phải đủ lớn để làm đứt gãy nhanh màng ty thể, sau đó hỗn dịch thu được phải được ly tâm tốc độ cao, nhanh chóng tủa màng, tách bỏ chất nền. Với năng lượng máy 100 W/22 Hz, hiệu suất thu được không cao, $4,4 \pm 0,4\%$ trọng lượng tươi của ty thể. Cũng do năng lượng thấp nên việc phá vỡ ty thể bằng siêu âm phải lặp lại nhiều lần trên đá lạnh, do vậy tăng nguy cơ làm giảm hoạt tính SMP sau này. Tuy nhiên, hoạt tính của SMP thu được theo quy trình này khá ổn định và được đề cập đến một cách chi tiết trong phần sử dụng SMP cho các phản ứng thử nghiệm độc học dưới đây.

3.2. Hoạt tính của SMP theo phản ứng RET và ETr

Hình-3 là một kết quả thu được làm ví dụ cho phản ứng RET trong đó hoạt tính của RET bị ức chế bởi Pb^{2+} . Phản ứng tạo NADH tuyến tính ít nhất trong vòng 15-20 phút. So với phản ứng ETr thì tốc độ RET chậm hơn nhiều do là phản ứng vận chuyển điện tử ngược. Tốc độ phản ứng RET khi không có chất độc là $6,2 \pm 2.5$ μ moles NADH/g protein/phút (18 thí nghiệm).

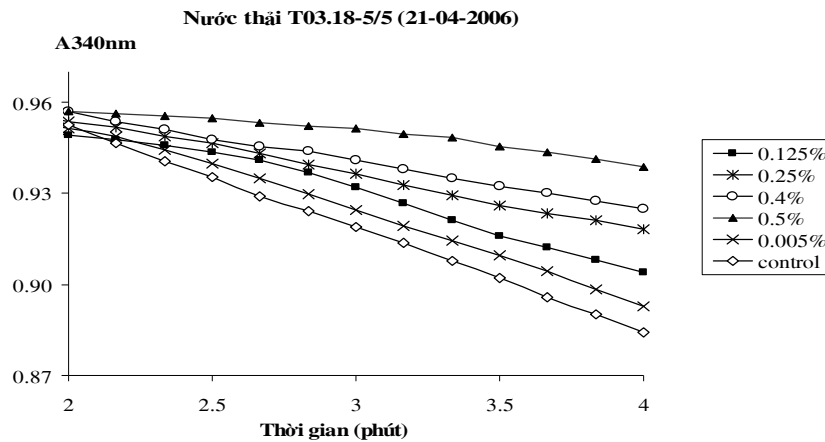


Hình 3. Ảnh hưởng của Pb^{2+} đối với hoạt tính RET

Hình-4 là một kết quả thu được làm ví dụ về phản ứng ETr, phản ứng phân hủy NADH, bị ức chế bởi nước thải sản xuất bột cá. So với phản ứng RET thì tốc độ của ETr nhanh hơn do đây là phản ứng vận chuyển điện tử xuôi, có nghĩa là theo chiều hoạt tính sinh lý của chuỗi hô hấp. Tốc độ phản ứng ETr khi không có chất độc đo được là $12,0 \pm 4,3$ μ moles NADH/g protein/phút (14 thí nghiệm).

3.3. Đánh giá độc tính của kim loại nặng (EC_{50}) bằng phương pháp thử nghiệm độc học dùng SMP

Các kim loại nặng đặc biệt là các kim loại hóa trị II ở nồng độ nhỏ có vai trò tạo nên Co-enzyme xúc tác cho nhiều phản ứng sinh học: như Fe, Zn, Cu, Ni, Se, ... tuy nhiên ở nồng độ cao hơn nồng độ sinh lý các ion này thường là các chất kìm hãm các quá trình enzym do cơ chế cạnh tranh (thay thế) hoặc không cạnh tranh (khóa vị trí xúc tác) với cơ chất. Việc tích lũy các ion này trong cơ thể người và động vật gây độc tính. Trên Bảng-1, đối với các kim loại nặng (chất chuẩn), giá trị EC_{50} thu được qua thí nghiệm hoàn toàn có thể so sánh được với các giá trị EC_{50} cùng phương pháp ghi nhận trong tài liệu số [4]. Đối với kẽm, kết quả rất ngạc nhiên là giá trị EC_{50} thu được nhỏ hơn trong tài liệu gần 100 lần, điều này chưa tìm được lý giải, trong khi đó SMP tỏ ra ít nhạy cảm hơn đối với Cadmium.



Hình 4. Ảnh hưởng của nước thải sản xuất bột cá đối với hoạt tính ETr

Bảng 1. Giá trị EC₅₀ của các kim loại nặng (ppb)

	Kim loại Phương pháp	Cd	Cu	Hg	Pb	Zn
Kết quả thực nghiệm	RET	1103 -1263	-	69,5	7,6 -419	4,32-13,1
	ETr	463	243	-	720	25,2
	Microtox	60,5	66,6	72,6	10,2	199
	<i>Daphnia</i>	39	25	<10	169	-
Tài liệu tham khảo [4]	RET	520	-	130	2000	1700
	ETr	-	300	-	-	-
	Microtox	41000	9300	59	11000	33000

3.4. Đánh giá độc tính của TBVTV và một số nước thải công nghiệp bằng phương pháp thử nghiệm độc học dùng SMP

Hai công cụ thử nghiệm (SMP-RET, SMP-ETr) đều đáp ứng tốt với 2 loại thuốc BVTV, cho các giá trị EC₅₀ tương đương với phương pháp Microtox (Bảng-2). *Daphnia* cực kỳ nhạy với Carbamate (EC₅₀ < 50 ppb). Ở đây Vifosalt là thuốc diệt cỏ, kết quả cho thấy thuốc này có khả năng gây độc cho các động vật phù du như bọ nước ở nồng độ khoảng 10 ppm và với SMP ở khoảng 5 ppm, như vậy có nguy cơ gây độc cho động vật bậc cao hơn. Carbamate chẳng những diệt sâu bọ mà còn có khả năng diệt các sinh vật sống hồ ở nồng độ cực kỳ nhỏ, < 50 ppb.

Bảng 2. Giá trị EC₅₀ của mẫu TBVTV và một số mẫu nước thải công nghiệp

	Phương pháp	RET	ETr	Microtox	<i>Daphnia</i>
Thuốc bảo vệ thực vật (ppb)	Mẫu				
	Vifosalt (Glyphosate)	4510	-	4339	9684
	Carbamate	-	4400	8760	< 50
Nước thải công nghiệp (% v/v)	T03.38-3/8 (Vedan)	4,8-10,2	47,5	>45	>100
	T03.57-1/4 (da giày)	0,266-0,375	0,081-1,136	0,68	1,587

	T03.18-5/5 (bột cá)	0,134	0,084	0,117	2,504
	T03.36-1/5 (mỹ phẩm)	78,1	27,2	-	-

Nước thải T03.57-1/4 từ sản xuất da giày và T03.18-5/5 từ sản xuất bột cá, rất độc với chỉ số $EC_{50} < 0,5\%$ v/v (Bảng-2). T03.38-3/8 (nước thải Vedan) gây độc mạnh cho phản ứng RET (EC_{50} : 4,8 ~ 10,2% v/v) nhưng dường như ít gây độc nếu sử dụng các công cụ còn lại. Một điều đáng ngạc nhiên nữa là, trong khi mẫu T03.18-5/5 và T03.36-1/5 (nước thải hóa mỹ phẩm) khá tương tự nhau về kết quả phân tích hóa học (không công bố của Phòng chất lượng nước Viện Môi trường và Tài nguyên) thì lại rất khác nhau về độ độc. T03.36-1/5 gây độc nhẹ ($EC_{50} < 27,2$) còn T03.18-5/5 gây độc rất mạnh ($EC_{50} < 0,2\%$). Hai công cụ SMP/RET và SMP/ETr tỏ ra nhạy với nước thải tương đương với phương pháp Microtox, trong khi đó *Daphnia* ít nhạy hơn khoảng 10 lần.

3.5. So sánh phương pháp SMP với các phương pháp hiện hành

Bảng-3 là kết quả xử lý số liệu EC_{50} của từng cặp công cụ thử nghiệm. Có tất cả là 6 cặp công cụ. Giá trị “ R^2 ” cho biết độ tin tưởng hay là độ gần sát của các điểm thực nghiệm so với đường tuyến tính. $R^2 = 1$ khi tất cả các điểm đều nằm trên đường tuyến tính. Hệ số góc “a” cho phép so sánh độ nhạy giữa 2 phương pháp. Ví dụ: so sánh ETr và RET (ETr/RET) có $a = 0,9651$ thì ETr nhạy hơn RET chút ít, ngược lại *Daphnia*/ETr có $a = 1,1049$ cho biết ETr nhạy hơn *Daphnia*. Độ lệch góc hay lệch tâm “b” của đường tuyến tính cho biết sai số của các phép thử nghiệm. Ở đây sai số lớn nhất là khoảng 0,5 tức có nghĩa là sai lệch giữa các cặp giá trị EC_{50} không quá 4 ppb. Nếu quy ước sự tương đương giữa 2 phương pháp khi các giá trị $0,9 \leq a \leq 1,1$ và độ tin tưởng $R^2 \geq 0,9$ thì phương pháp *Daphnia* không tương đồng với các phương pháp khác trong thử nghiệm độc học nước thải công nghiệp, trong khi đó ETr và RET tương đồng với phương pháp Microtox đối với tất cả các mẫu thử nghiệm.

Bảng 3. Bảng so sánh phương pháp SMP với các phương pháp hiện hành (sử dụng giá trị EC_{50} của tất cả các mẫu thử nghiệm: KLN, TBVT, nước thải)

	Số lần thử nghiệm (n)	Độ tin tưởng (R^2)	Hệ số góc (a)	Độ lệch góc (b)
ETr/RET	20	0,9727	0,9651	0,3214
Microtox/ RET	20	0,8958	1,067	-0,2968
<i>Daphnia</i> / RET	21	0,8302	1,0969	0,0462
Microtox/ ETr	17	0,9131	1,0579	-0,4902
<i>Daphnia</i> / ETr	17	0,8162	1,1049	-0,4973
<i>Daphnia</i> /Microtox	20	0,8615	1,054	-0,1004

4. KẾT LUẬN

Đề tài đã tạo thành công phép thử độc học sử dụng SMP dựa trên cơ sở phản ứng RET và phản ứng ETr tương tự như “kit” thử độc học của công ty MitoScan. Hoạt tính phản ứng RET là $6,2 \pm 2,5$ $\mu\text{moles NADH/g protein/phút}$, tuy nhiên, chỉ bằng 10% hoạt tính của kit thử của công ty MitoScan, vì vậy cần có bước cải tiến để nâng cao hiệu suất và hoạt tính SMP. Hoạt tính phản ứng ETr là $12,0 \pm 4,3$ $\mu\text{moles NADH/g protein/phút}$, gấp 2 lần phản ứng RET. Cả 2 hoạt tính cùng đáp ứng tốt với chất độc thử nghiệm.

SM-/RET và SMP-ETr có thể dùng thay thế công cụ Microtox, đáp ứng về tiêu chí kỹ thuật nhưng ưu điểm hơn về kinh tế.

SMP-RET và SMP-ETr nên dùng thay thế phương pháp *Daphnia* cho thử nghiệm chất độc hữu cơ (ví dụ như nước thải công nghiệp hay các loại thuốc bảo vệ thực vật) vì 2 công cụ này nhạy cảm hơn. Tuy nhiên, *Daphnia* lại nhạy cảm với kim loại nặng hơn, vì vậy đây là công cụ thích hợp nhất trong trường hợp mẫu thử nghiệm chứa kim loại nặng.

Cũng giống như các thử nghiệm độc học môi trường khác, phương pháp dùng ty thể hoặc SMP của ty thể cũng có yếu điểm của nó. SMP có độ nhạy kém với ammonia, colchicin [9]. Hơn nữa, do phép thử sử dụng phương pháp so màu cho nên mẫu có độ đục cao hoặc có màu đều gây ảnh hưởng tới tính chính xác của phép thử. Một lần nữa kết quả nghiên cứu này cho thấy để đánh giá độc tính của một mẫu môi trường nên kết hợp một vài hay nhiều công cụ thử nghiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. E. Manuele Argese, Cinzia Bettiol, Annamaria Volpi Ghiradini, Matteo Fasolo, Gianumberto Giurin, Pier Francesco Ghatti Comparison of in vitro submitochondrial Particle and Microtox assays for determining the toxicity of organotin compounds. *Environ. Toxicol. Chem.* 17(6), 1005-1012 (1998).
- [2]. E. Manuele Argese, Cinzia Bettiol, Francesca Agnoli, Agfonso Zambon, Martina Mazzola, Annamaria Volpi Ghiradani. *Assessment of chloroaniline toxicology by the submitochondrial particle assay.* *Environ. Toxicol. Chem.* 20 (4), 826-832 (2001).
- [3]. Rodney F. Boyer. *Modern experimental Biochemistry* (1993)
- [4]. Harry W. Read, John M. Harkin, Karl E. Gustavson. *Environmental Applications with Submitochondrial Particles.* Microscale testing in aquatic toxicology: Advances, Techniques, and Practice, 31-52 (1998).
- [5]. Karl E. Gustavson, Andres Svenson, John M. Harkin. Comparison of toxicities and mechanism of action of N-Alkanols in the submitochondrial particles and the *Vibrio fischeri* bioluminescence (Microtox®) bioassay - *Environmental toxicology and Chemistry* 17(10), 1917-19214 (1998).
- [6]. Assessing toxicity of wastewater using the submitochondria particle (SMP) reverse electron transfer (RET) bioassay - Mitoscan corporation
- [7]. www.mitoscan.com
- [8]. Lowry protein assay - P.J. Hansen
- [9]. [www.animal .ufl.edu/hansen/protocols/LOWRY.htm](http://www.animal.ufl.edu/hansen/protocols/LOWRY.htm)
- [10]. Microtox® Rapid Toxicity Testing System
- [11]. <http://www.azurenv.com/mtox.htm>
- [12]. L.M. Knobeloch, G.A. Blondin, H.W. Read and J.M. Harkin. *Assessment of chemical toxicity using mammalian mitochondrial electron transport particles.* *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 19, 828-835 (1990).