

# Toksyczność metali dla mikroorganizmów — badania metodą fluorogennego substratu

Józef Grabowski<sup>1</sup>, Patricia P. Scully<sup>2</sup> Robert Edwards<sup>2</sup>  
Sally El Saadawy<sup>2</sup>, Magdalena Latosińska<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Pracownia Fizyki Środowiska, Instytut Fizyki  
Politechnika Poznańska, Poznań

<sup>2</sup>Liverpool John Moores University  
School of Chemical and Physical Sciences  
Liverpool, England

## 1. Wstęp

Termin „metale ciężkie” kojarzy się z toksycznością. Mimo że jest on powszechnie stosowany, dotąd nie został ściśle zdefiniowany, np. wg Wentsela i in. [1], metale ciężkie to: Ag, As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Ni, Pb, Sn, Ti oraz V.

Wong i Li [2] uważają, że należy jeszcze dodatkowo zaliczyć do wymienionej grupy: Ca, Mg, Mn oraz Na.

Ze względu na to, że nie ma żadnego związku pomiędzy masą właściwą a masą atomową metali termin „metale ciężkie” jest niejednoznaczny. Ponadto obejmuje on heterogenną grupę metali o różnorodnych właściwościach fizykochemicznych.

Bardziej zasadny jest podział metali ze względu na charakter ich oddziaływania biologicznego. Nieboer i Richardson [3] wskazali, że metale można klasyfikować odpowiednio do powinowatości do tworzenia kompleksów (z jonami i atomami) według ciągu preferencyjnego:



Metale klasy A tworzą kompleksy według podanego ciągu, metale klasy B dokładnie odwrotnie, natomiast metale klasy C tworzą klasę pośrednią — charakteryzują się tolerancyjnością.

Według podanego podziału do poszczególnych klas należą:

- A: Al<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>, Be<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Cs<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>;
- B: Ag<sup>+</sup>, Au<sup>+</sup>, Bi<sup>3+</sup>, Cu<sup>+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Pb<sup>4+</sup>, Pt<sup>2+</sup>;
- C: As<sup>3+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cr<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Sn<sup>2+</sup>, Sn<sup>4+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, V<sup>2+</sup>.

Na ogół, jony metali z klasy B są bardziej toksyczne od jonów klasy C, a C bardziej toksyczne od jonów klasy A.

Najczęściej, efekt metalu bada się wprowadzając go do naturalnego środowiska określonej kultury mikroorganizmów. Uzyskane tą drogą wyniki trudno uogólniać, przede wszystkim dlatego, że w obecności licznych chemikaliów metale tworzą różnorodne związki, których oddziaływanie na mikroorganizmy może być krańcowo różne. Przykładowo chrom, oprócz kationu metalu, może występować jako:  $\text{HCrO}_4^-$ ,  $\text{CrO}_4^{2-}$ ,  $\text{Cr(OH)}_4^-$ ,  $\text{Cr(OH)}_3^0$ ,  $\text{Cr(OH)}_2^+$ ,  $\text{CaCrO}_4^0$ ,  $\text{CuCrO}_4^0$ , itd. [3]. Na postać chromu w roztworze znaczny wpływ mają też inne metale, np.  $\text{Fe}^{2+}$  redukuje Cr(VI) do Cr(III), natomiast  $\text{Mn}^{6+}$  utlenia Cr(III) do Cr(VI). Efekt obu wymienionych procesów zależy silnie od pH i innych parametrów fizykochemicznych [4]. Stąd, niezwykle ważne przy badaniu toksyczności metali dla mikroorganizmów jest analizowanie najpierw możliwie najprostszych przypadków. W pracy badano:

- a) glony *Chlorella pyrenoidosa* w roztworze soli metalu,
- b) biocenozy mikroorganizmów (glony, bakterie) w warunkach naturalnych z różnymi dawkami metalu.

Toksyczność metali dla mikroorganizmów badano metodą testu opartego na fluorogennym substracie (w pracy wykorzystano dwuoctan fluoresceiny: FDA).

## 2. Materiały i metody

Glony *Chlorella pyrenoidosa* hodowano w warunkach laboratoryjnych jako kulturę statyczną.

Osad czynny hodowano w warunkach laboratoryjnych na sztucznych ściekach [5].

Glony oddzielono od pożywki: 2 razy odwirowanie + „roztworzenie w wodzie destylowanej”. Następnie, glony w wodzie destylowanej mieszano w odpowiednich proporcjach z roztworem metalu w wodzie destylowanej i uzupełniano do wymaganej objętości wodą destylowaną. Badano metale: Cd, Co, Cr(III), Cr(VI), Cu, Hg, Ni, Pb i Zn, które rozpuszczano w wodzie destylowanej w postaci chlorków.

W przypadku osadu czynnego próbki do badań przygotowywano poprzez mieszanie zawiesiny osadu w roztworze ścieków z roztworem danego metalu i rozcieńczono buforem fosforanowym (pH 7,0; 0,2 M) w proporcji 1:1.

Szybkość narastania sygnału fluoresceiny rejestrowano spektrofluorometrem PERKIN-ELMER. Badaną próbkę wzbudzano długością fali 465 nm, a sygnał natężenia rejestrowano dla długości fali 512 nm.

## 3. Test toksyczności

W badaniach toksyczności metali dla mikroorganizmów stosowano metodę substratu fluorogennego. Jako substrat fluorogeny wykorzystano dwuoctan

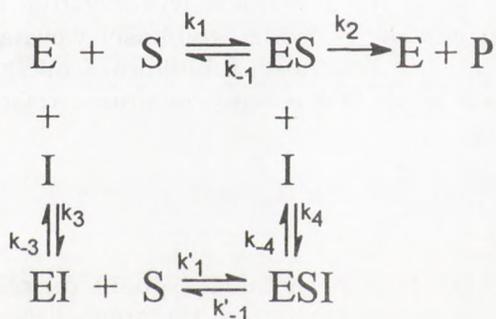
fluoresceiny (Fluorescein diacetate: 596-09-8, SIGMA). Do badanej próbki z mikroorganizmami dodawano FDA w acetonie (2 mg/ml) w ilości 50  $\mu$ l na 5 ml [3,6].

Molekuły dwuoctanu fluoresceiny (FDA), jako niepolarne łatwo wnikają do wnętrza komórek mikroorganizmów, gdzie z udziałem wewnątrzkomórkowego enzymu: esterazy, ulegają przemianę w silnie fluoryzujący produkt: fluoresceinę — patrz ryc. 1.



Ryc. 1. Schemat wewnątrzkomórkowej hydrolizy dwuoctanu fluoresceiny.

Szybkość wymienionej reakcji (mierzona szybkością narastania natężenia fluorescencji fluoresceiny) zależy od toksyczności środowiska komórek mikroorganizmów. W obecności inhibitora reakcja enzymatyczna może przebiegać według schematu (przypadek inhibicji mieszanej):



Ryc. 2. Schemat reakcji enzymatycznej w obecności inhibitora (E — enzym; S — substrat; ES — kompleks; enzym — substrat, EI — kompleks: enzym — inhibitor, ESI — kompleks: enzym — substrat — inhibitor, P — produkt).

Dla tego schematu, szybkość przemiany enzymatycznej jest określona zależnością [7,8]:

$$\mu = \frac{\mu_m}{1 + S I_2} \frac{[S]}{K_s \frac{1 + S I_1}{1 + S I_2} + [S]} \quad (1)$$

gdzie:

$\mu_m$  — maksymalnie możliwa względna szybkość reakcji,

- $K_S$  — stała Michaelisa-Mentena,  
 $[S]$  — koncentracja substratu,  
 $SI1$  — stała inhibicji związana z powstawaniem kompleksu: enzym — inhibitor (EI);  $SI1 = [I] \cdot k_3 / k_{-3}$ ,  
 $SI2$  — stała inhibicji związana z powstawaniem kompleksu: enzym — substrat — inhibitor (ESI);  $SI2 = [I] \cdot k_4 / k_{-4}$ .

W zależności od wartości  $SI1$  oraz  $SI2$  można wyróżnić następujące przypadki szczególne:

- |                                |                       |
|--------------------------------|-----------------------|
| 1) inhibicja konkurencyjna:    | $SI1 \neq 0; SI2 = 0$ |
| 2) inhibicja niekonkurencyjna: | $SI1 = SI2 \neq 0$    |
| 3) inhibicja akonkurencyjna:   | $SI1 = 0; SI2 \neq 0$ |
| 4) brak inhibicji:             | $SI1 = SI2 = 0$       |

Podstawiając:

$$\mu_M = \frac{\mu_m}{1 + SI2}$$

$$K_M = K_S \frac{(1 + SI1)}{1 + SI2}$$

do wyrażenia (1) otrzymuje się związek mający postać zależności Michaelisa-Mentena:

$$\mu = \frac{\mu_M [S]}{K_M + [S]} \quad (2)$$

Test toksyczności oparty na fluorogennym substracie wykorzystuje bezpośredni związek pomiędzy  $\mu/\mu_0$  (stosunek względnej szybkości wewnątrzkomórkowej reakcji enzymatycznej „z” i „w” obecności inhibitora) i mierzoną szybkością narastania sygnału fluorescencji fluoresceiny zgodnie z relacją:

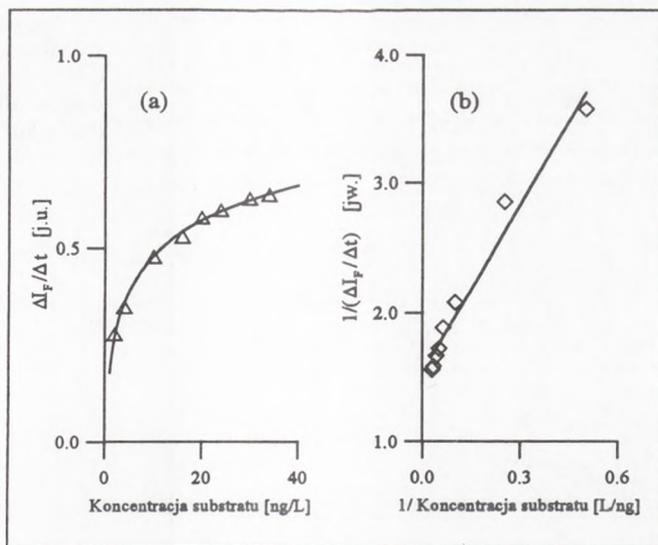
$$\frac{\mu}{\mu_0} = \frac{\frac{\Delta I_F}{\Delta t}}{\frac{\Delta I_{F_0}}{\Delta t}} = \frac{\Delta I_F}{\Delta I_{F_0}} \quad (3)$$

gdzie  $\Delta I_{F_0}/\Delta t$  oraz  $\Delta I_F/\Delta t$  są szybkościami narastania sygnału mierzonej fluorescencji, odpowiednio: bez i w obecności, inhibitora. Badanie zależności  $\mu/\mu_0$  (gdzie  $\mu_0$  jest względną szybkością enzymatycznej reakcji przy braku inhibicji) pozwala uzyskać dane o toksyczności i mechanizmie inhibicji.

## 4. Wyniki i dyskusja

### 4.1. Wewnątrzkomórkowa hydroliza FDA

Celem sprawdzenia słuszności wyrażenia (4) w przypadku FDA, analizowano w pracy zależności  $1/\mu$  od  $1/[S]$ , dla różnych koncentracji substratu.



Ryc. 3. Eksperymentalne potwierdzenie spełnienia zależności (4).

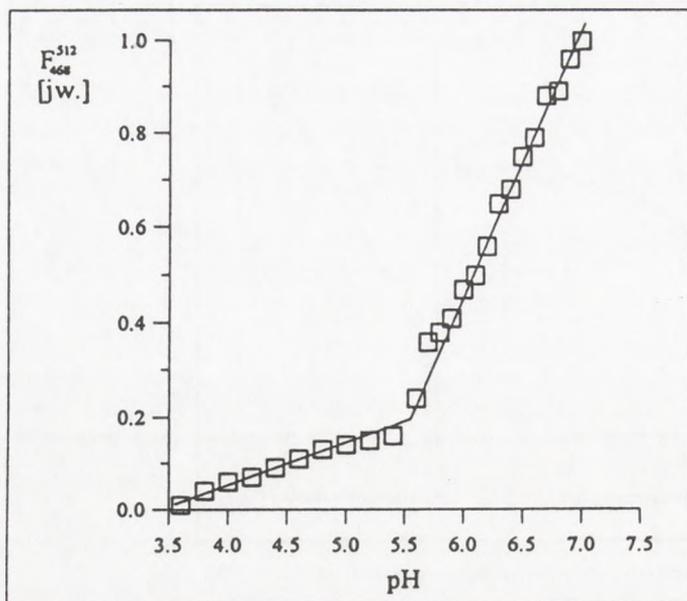
Prostoliniowy charakter wymienionych zależności — patrz ryc. 2B — wskazuje, że przyjęty schemat reakcji (patrz ryc. 1) opisuje satysfakcjonująco wewnątrzkomórkową hydrolizę FDA do fluoresceiny. W związku z tym wyrażenie (4) może być wykorzystane do badania mechanizmów inhibicji (np. poprzez analizę wykresów Lineweaver-Burka charakteryzujących metale).

## 4.2. Wpływ pH

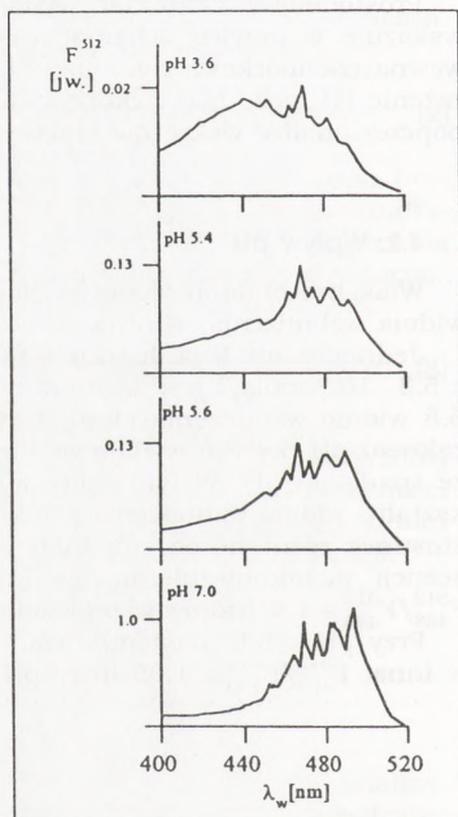
Właściwości fluorescencyjne fluoresceiny, wydajność fluorescencji i kształt widma wzbudzenia, silnie zależą od pH — patrz ryc. 4 i 5.

Jednocześnie kształt widma fluorescencji, dla koncentracji fluoresceiny  $< 5,3 \cdot 10^{-6}$  mola/l jest zachowany, tj. niezależny od pH. W zakresie pH 7,0–5,8 widmo wzbudzenia charakteryzuje się stosunkiem  $F_{468}^{512}/F_{490}^{512} \cong 0,9$ . Dla zakresu pH 5,4–3,5 wydajność fluorescencji maleje, choć dużo wolniej wraz ze spadkiem pH. W tym zakresie obserwuje się jedynie nieznaczną zmianę kształtu widma wzbudzenia pH 5,4:  $F_{468}^{512}/F_{490}^{512} \cong 1,4$ ; pH 3,5:  $F_{468}^{512}/F_{490}^{512} \cong 2,0$ ; stosunek różni się od stosunku w zakresie pH 7,0–5,6 a wydajność fluorescencji monotonicznie maleje ( $\Delta F/\Delta pH = 0,5$ ) ze spadkiem pH. Kształt  $F_{468}^{512}/F_{490}^{512} \cong 1,4$  widma wzbudzenia w tym zakresie nie ulega zmianie.

Przy pH  $\cong 5,5$ , następuje transformacja poprzedniej postaci fluoresceiny w inną:  $F_{468}^{512}/F_{490}^{512} \cong 1,05$  (przy pH 5,6), do  $F_{468}^{512}/F_{490}^{512} \cong 1,4$  (przy pH 5,4).



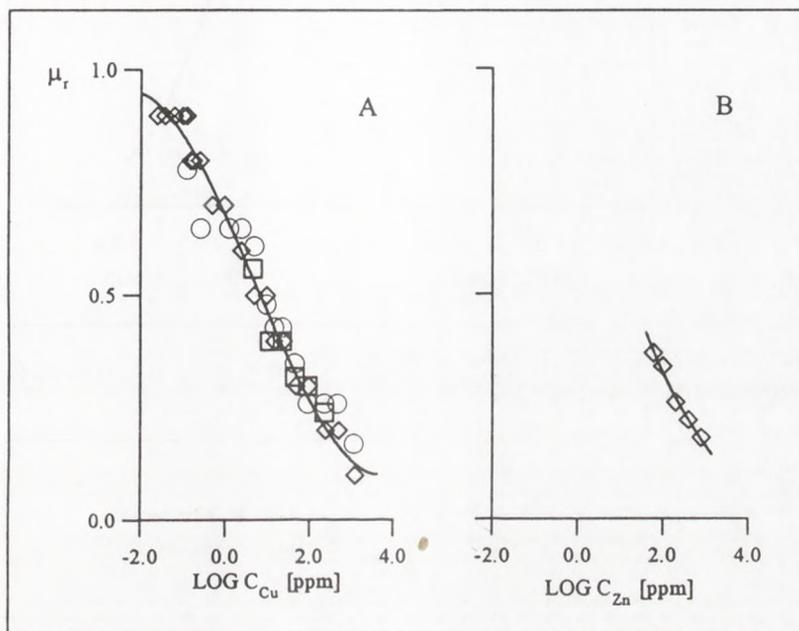
Ryc. 4. Wpływ pH na wydajność fluorescencji (jednostki względne: wydajność dla pH = 7,0 przyjęto jako 1) fluoresceiny.



Ryc. 5. Wpływ pH na kształt widma wzbudzenia (jednostki względne, jak na ryc. 3).

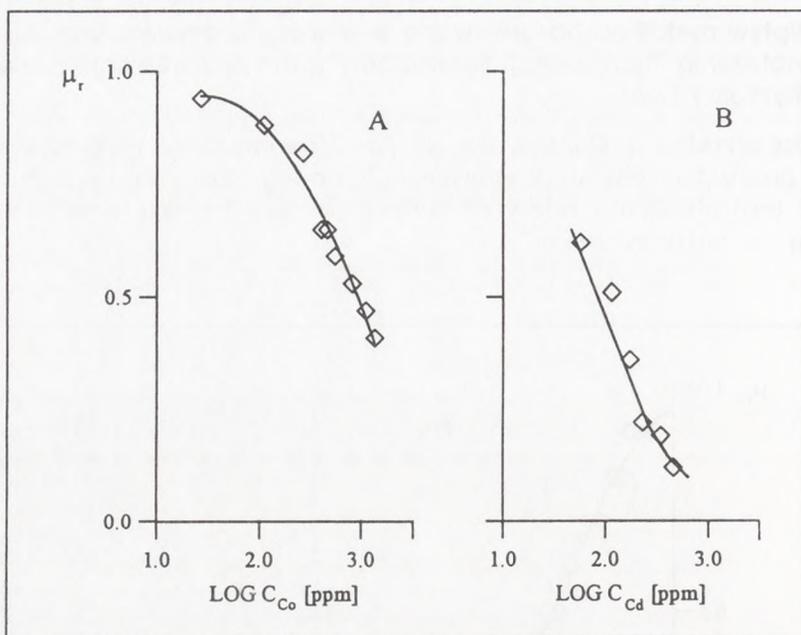
### 4.3. Wpływ metali na obserwowaną szybkość narastania sygnału natężenia fluorescencji fluoresceiny (produktu wewnątrzkomórkowej hydrolizy FDA)

Badane metale Cd, Co, Cu, Hg, Ni, Pb i Zn, obniżają szybkość narastania sygnału produktu wewnątrzkomórkowej hydrolizy FDA: fluoresceiny — skuteczność tego obniżenia zależy od rodzaju metalu i rośnie wraz z jego koncentracją — patrz ryc. 6 i 7.

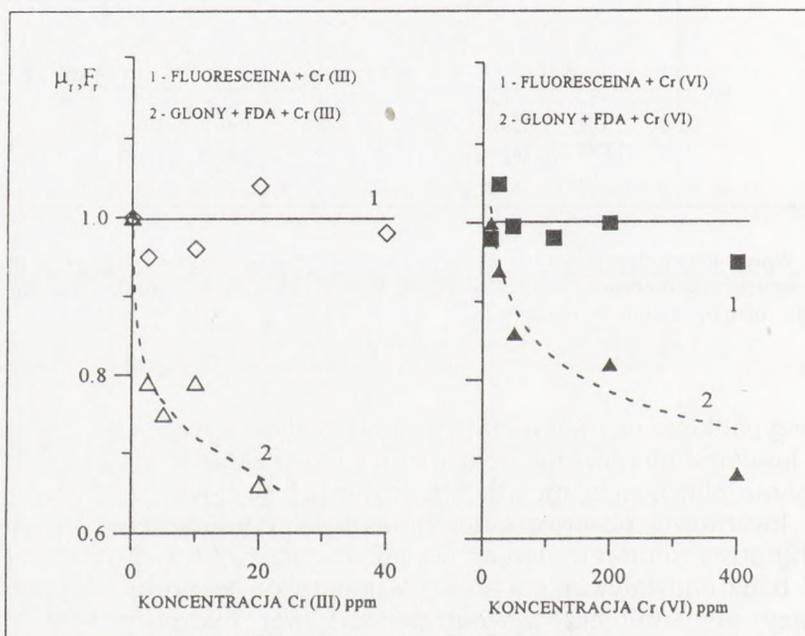


Ryc. 6. Wpływ koncentracji metalu (Cu oraz Zn) na szybkość narastania sygnału fluoresceiny (produktu wewnątrzkomórkowej hydrolizy FDA). Różne oznaczenia punktów dla Cu (część A) odpowiadają różnym seriom pomiarowym.

Dla przypadków, gdy sól metalu stanowi jedyny związek chemiczny w zawiesinie komórek glonów, na efekt metalu mogą składać się dwie przyczyny: (1) wywołane obecnością metalu obniżenie pH środowiska (i obniżenie wydajności kwantowej obserwowanej fluorescencji fluoresceiny — patrz ryc. 4) oraz (2) stres komórek glonów (wywołany bądź obniżeniem się zewnętrznego pH bądź oddziaływaniem samego metalu na komórki — patrz ryc. 8) objawiający się inhibicją wewnątrzkomórkowej hydrolizy FDA do fluoresceiny.



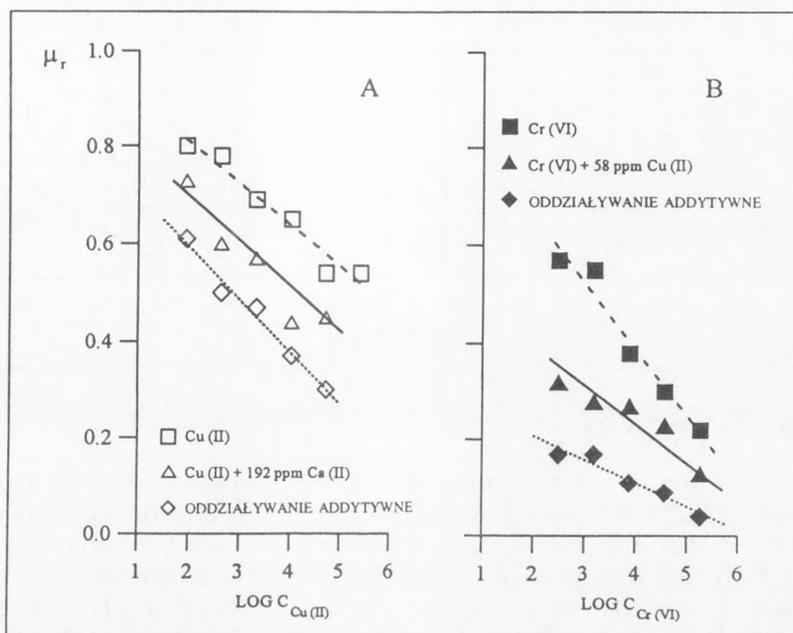
Ryc. 7. Wpływ koncentracji metalu (Co oraz Cd) na szybkość narastania sygnału fluorescencji (produkt wewnątrzkomórkowej hydrolizy FDA).



Ryc. 8. Wpływ metalu [Cr(III) oraz Cr(VI)] na natężenie fluorescencji fluoresceiny w roztworze buforu: krzywe 1 oraz szybkość narastania sygnału fluorescencji fluoresceiny — produkt wewnątrzkomórkowej hydrolizy FDA: krzywe 2.



Dla badanych dwóch przypadków mieszanin metali: Cr(VI)+Cu(II) oraz Cu(II)+Ca(II) — patrz ryc. 9 — obserwuje się wyraźne oddziaływanie antagonistyczne (efekt inhibicji dla mieszaniny jest mniejszy niż wynikałoby to ze zwykłej addytywności efektów pojedynczych metali). Najprawdopodobniej oznacza to, że sumaryczna koncentracja dwóch metali obniża pH zawiesiny mniej niż to wynikałoby ze zwykłej addytywności efektów od pojedynczych metali.



Ryc. 9. Wpływ mieszanin metali: Cu(II) + Ca(II) oraz Cr(VI) + Cu(II), na szybkość narastania sygnału fluorescencji fluoresceiny — produktu wewnątrzkomórkowej hydrolizy FDA.

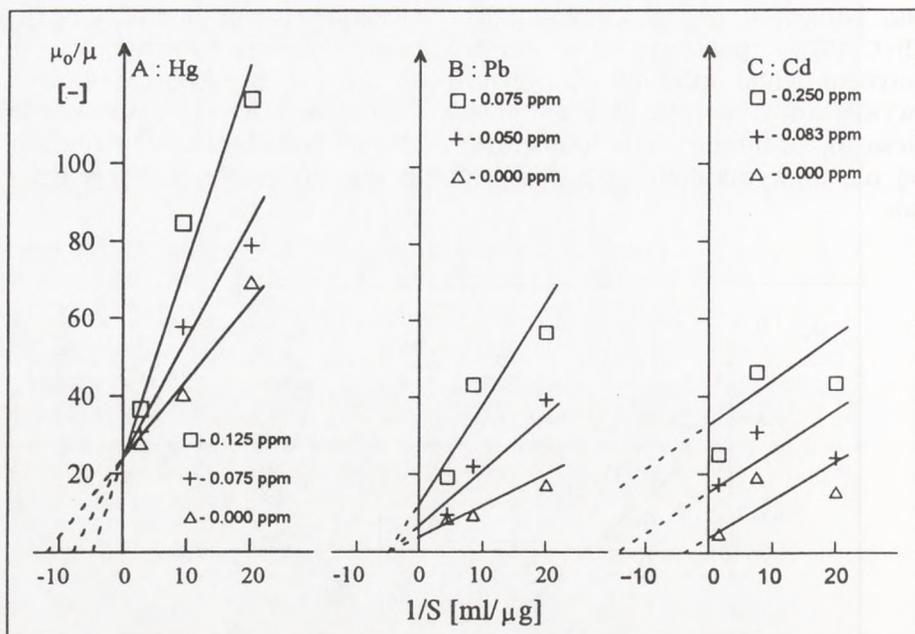
#### 4.4. Mechanizm inhibicji metali

Wykres Lineweaver-Burka [9] zależności (4), pozwala wnioskować o mechanizmie inhibicji metalu. Przykładowe wyniki uzyskiwane dla Hg, Pb i Cd oraz biocenozy osadu czynnego przedstawiono na ryc. 10.

Postać wymienionej zależności wskazuje na to, że w przypadku rtęci, inhibicja ma charakter konkurencyjny (patrz ryc. 2A), dla ołowiu niekonkurencyjny (patrz ryc. 2B), a dla kadmu akonkurencyjny (patrz ryc. 2C)

#### 5. Podsumowanie i wnioski

Wpływ metali na mikroorganizmy, mimo licznych prac [10,11,12,13], wciąż nie jest zrozumiały. Metale, zwłaszcza metale ciężkie, obniżają aktywność metaboliczną mikroorganizmów (np. intensywność oddychania, względ-



Ryc. 10. Wykres Lineweaver-Burk'a dla wewnątrzkomórkowej hydrolizy FDA osadu czynnego w obecności metali: Hg, Pb i Cd.

ną szybkość wzrostu, lub bioluminescencję — pomiar z użyciem instrumentu Microtox). Możliwość występowania metalu — w obecności związków chemicznych — pod różnymi postaciami (różne ładunki i kompleksy) nie pozwala na jednoznaczną interpretację uzyskiwanych wyników.

W pracy — zgodnie ze wskazaniem Knighta i Mcgratha [15], że przy badaniu wpływu metali na mikroorganizmy należy wyeliminować z badanych zawiesin składniki pożywki — badano wpływ metalu wprowadzanego do zawiesiny komórek glonów w wodzie destylowanej — efekt metalu badano poprzez wpływ metalu na szybkość wewnątrzkomórkowej hydrolizy dwuoctanu fluoresceiny do fluoresceiny. Uzyskane wyniki wskazują, że wszystkie badane w pracy metale ciężkie inhibują wymienioną reakcję przez interakcję z wewnątrzkomórkowym enzymem: esterazą. Na podstawie, tzw. 50% efektu (obniżania szybkości wewnątrzkomórkowej hydrolizy FDA do 50%) badane metale tworzą następujący łańcuch toksyczności:



W pracy pokazano, że przy wykorzystaniu metody substratu fluorogenego, można mierzyć toksyczność metali w stosunkowo prostych, tj. chemicznie jednoznacznych, warunkach, np.

- 1 — mikroorganizmy + sól metalu w wodzie destylowanej,
- 2 — mikroorganizmy + sól metalu w buforze fosforowym, pH 7,0 (0,05 M).

Z uzyskanych danych wynika, że metal obniża pH roztworu i w związku z tym obserwowany efekt (oddziaływanie z komórkami mikroorganizmu) jest,

na ogół, sumą efektów od zmiany pH i obecności samego metalu. Zastosowana w pracy metoda badania toksyczności pozwala oddzielić oba efekty.

Dla badanych mieszanin metali:

1 — Cu(II) + Ca(II), oraz

2 — Cr(VI) + Cu(II)

zaobserwowano oddziaływanie antagonistyczne: efekt inhibicji mieszaniny był mniejszy niż wynikałoby to z addytywnego oddziaływania pojedynczych metali. Efekt ten najprawdopodobniej jest spowodowany antagonistycznym efektem pH (mieszanina metali nie obniża pH roztworu tak bardzo jak wynikałoby to z obniżen pH powodowanych przez pojedyncze metale).

Praca finansowana przez Instytut Fizyki Politechniki Poznańskiej (DS).

## Literatura

1. Wentzel R., McIntosh A., McCafferty W. P., Atchison G., Anderson V., (1977), *Hydrobiologia*, 55, 171-175.
2. Wong M., Li M., (1977), *Hydrobiologia*, 56, 265-272.
3. Nieboer E., Richardson D. H. S., (1980), *Environment Pollution (Ser. B)*, 1, 3-26.
4. Grabowski J., Baker P., Scully P. J., (1995), *SPIE „Air Toxics and Water Monitoring”*, 2503, 78-88.
5. Leszczyńska M., (1989), *Oznaczanie toksyczności próbek wody i ścieków przy pomocy dwuocianu fluoresceiny — zastosowanie opracowanej metody do sterowania procesem biodegradacji zanieczyszczeń ścieków toksycznych*, pr. doktorska, Politechnika Poznańska — Instytut Inżynierii Środowiska, Poznań.
6. Grabowski J., Baker P. R., Latosińska M., Scully P. J., Edwards R., (1995), *A rationale for using a fibre optic toxicity sensor in the automatic control of a sewage treatment plant — some measurements of the inhibition effects of metal contaminants*, in: *Sensors and their Applications VII*, Institute of Physics Publishing, Bristol and Philadelphia, 319-323.
7. Hjelmar O., Hansen E. A., Larsen F., Thomassen H., (1991), *Leaching and soil/groundwater transport of contaminants from coal combustion residues*, Water Quality Institute, Research Centre, 11 Agern Allé, DK-2970 Horsholm (Denmark) — Final Report.
8. Blake R. C., Choate D. M., Bardhan S., Revis N., Barton L. L., Zocco T. G., (1993), *Environ. Toxicol. Chem.*, 12, 1365-1376.
9. Robyt J. F., White B. J., (1987), *Biochemical techniques — theory and practice*, Brooks/Cole Publishing Company, Monterey, California, 291-320.
10. Piskiewicz D., (1977), *Kinetics of chemical and enzyme-catalyzed reactions*, Oxford University Press, New York.
11. Dutka B. J., Kwan K. K., (1984), *Studies on synthetic activated sludge toxicity screening procedure with comparison to three microbial toxicity tests*, in: *Toxicity Screening Procedures using Bacterial Systems*, Eds. Dickson Liu, Dudka B. J., Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, 433-444.
12. Beaubien A., Jolicoeur C., (1984), *The toxicity of various heavy metal salts, alcohols and surfactants to microorganisms in a biodegradation process: a flow microcalorimetry investigation*, in: *Toxicity Screening Procedures using Bacterial Systems*, Eds. Dickson Liu, Dudka B. J., Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, 433-444.
13. Honor S. G., (1984), *Toxicity of zinc concentrate to stream bacteria*, in: *Toxicity Screening Procedures using Bacterial Systems*, Eds. Dickson Liu, Dudka B. J., Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, 433-444.
14. Aoyama I., Okamura H., (1984), *Toxicity evaluation of heavy metals in phytoplankton*,

- in: *Toxicity Screening Procedures using Bacterial Systems*, Eds. Dickson Liu, Dudka B. J., Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, 433-444.
15. Knight B., McGrath S. P., (1995), *Environ. Toxicol. Chem.*, 14 (12), 2033-2039.

## Metals' toxicity for microorganisms — studies with the use of fluorogenic substrate

### Summary

In the work the effect of several metals: Cd., Co, Cr(III), Cr(VI), Cu, Hg, Ni, Pb and Zn on a metabolic activity of alga *Chlorella pyrenoidosa* and microorganisms of activated sludge was studied. The toxicity (inhibition effect) of metals was studied with the use of a fluorogenic substrate: diacetate of fluorescein.

The results indicate for two mechanisms of inhibition: (1) — lowering of pH induced by a given metal and (2) — a pure metal effect.

The paper shows advantages of fluorogenic substrate in toxicity studies: (1) — the evaluation of a pure metal effect; (2) — the determination of antagonistic effects (in these studies it has been found in a case of: Cr(VI)+Cu(II) and Cu(II)+Ca); (3) — the mechanism of inhibition (Hg, Pb and Cd were characterized by competitive, noncompetitive and ancompetitive, appropriately).

### Key words:

toxicity, metals, fluorescein, *Chlorella pyrenoidosa*

### Adres do korespondencji:

Józef Grabowski, Pracownia Fizyki Środowiska, Instytut Fizyki,  
Politechnika Poznańska, ul. Piotrowo 2, 60-965 Poznań.