

# Wpływ jonów kadmu ( $Cd^{2+}$ ) i ołowiu ( $Pb^{2+}$ ) na mikrobiologiczną degradację biopolimerów organicznych w jeziorze eutroficznym

Adam J. Gajewski

Ryszard J. Chróst

Zakład Ekologii Mikroorganizmów

Uniwersytet Warszawski

## 1. Wprowadzenie

**B**akterie heterotroficzne stanowią bardzo ważny element sieci troficznych występujących w wodach naturalnych (1,2,3). Mikroorganizmy te są ogniwem odpowiedzialnym za procesy degradacji, mineralizacji i utylizacji materii organicznej w wodach naturalnych (3,4). Ponadto stanowią one pożywienie dla szerokiej grupy zwierzęcych organizmów planktonowych (5,6). Tak zatem dzięki bakteriom heterotroficznym możliwy jest zarówno przepływ energii jak i krążenie biogenów w ekosystemach wodnych.

Materia organiczna w wodach naturalnych występuje w dwóch postaciach. Frakcja o wielkości cząstek poniżej  $0,2 \mu m$  jest określana mianem rozpuszczonej materii organicznej (*dissolved organic matter* — DOM), zaś frakcja powyżej  $0,2 \mu m$  nosi nazwę upostaciowanej materii organicznej (*particulate organic matter* — POM) (7). Stężenie DOM jak i POM w zbiornikach wodnych zależy od stopnia eutrofizacji wód i waha się od 2 i  $0,2 \text{ mg } C_{org}/L$  (odpowiednio DOM i POM) w wodach oligotroficznych do 10 i  $1 \text{ mg } C_{org}/L$  w zbiornikach eutroficznych (8). Stosunek stężeń DOM do POM zwykle wynosi 9–10:1. Oznacza to, że podstawowym źródłem związków odżywczych dla mikroheterotrofów wodnych jest rozpuszczona materia organiczna. Jednakże zaledwie ok. 5% puli DOM stanowią związki niskocząsteczkowe, takie jak: aminokwasy i krótkie peptydy, proste kwasy organiczne, monosacharydy oraz krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe, które mogą być bezpośrednio transportowane do wnętrza komórki bakteryjnej i tam mogą zostać włączone w procesy metaboliczne (9,10). Porównanie tempa produkcji wtórnej bakterii w ekosystemach wodnych z wielkością puli łatwo dostępnych substratów wskazuje, że bakterie korzystają z wielkocząsteczkowej materii organicznej. Ponad 90% DOM i cała frakcja POM złożona jest ze związków polimerycznych takich jak: białka, lipidy, polisacharydy, organiczne związki fosforu, kwasy nukleinowe i in. oraz z opornych na degradację mikrobiologiczną substancji humusowych (8,10). Ze względu na swoją masę związki te nie mogą być transportowane przez błonę zewnętrzną, a szczególnie cytoplazmatyczną bakterii (11). Wyko-



rzystanie tej puli materii organicznej przez mikroheterotrofy wodne wymaga jej pozakomórkowego rozkładu do niskocząsteczkowych monomerów bezpośrednio przed ich pobraniem do komórki. W związku z tym bakterie produkują enzymy z grupy hydrolaz, które są wydzielane do środowiska (tzw. „enzymy wolne”), bądź częściej lokowane są w obrębie zewnętrznych struktur komórkowych (głównie w błonie cytoplazmatycznej lub przestrzeni peryplazmatycznej), katalizujących rozkład różnych związków polimerycznych. Bakterie produkują wiele różnych typów ektoenzymów, jak np.  $\alpha$ - i  $\beta$ -glukozydazy, N-acetylo-D-glukozaminidazy, lipazy, proteazy, fosfatazy i wiele innych odpowiedzialnych za rozkład wielkocząsteczkowej materii organicznej, pełniąc tym samym ważne ekologicznie funkcje w wodach naturalnych. Z dotychczasowych badań wynika, że są to zwykle enzymy indukcyjne, często o bardzo skomplikowanym systemie regulacji syntezy i aktywności (12,13,14). Na ich działanie mają wpływ zarówno czynniki fizyczne, tj. pH, temperatura, zasolenie (15,16,17) jak i stężenie substratu, obecność aktywatorów i czynników zmieniających konformację białka (14,18,19).

Wraz ze wzrostem zanieczyszczeń ekosystemów wodnych w tym metalami ciężkimi, obserwowano zmiany i zakłócenia w funkcjonowaniu całych zbiorników polegające w swej istocie na zaburzeniu lub przerwaniu naturalnego obiegu materii. Między innymi skażenie kadmem i ołowiem, metalami powszechnie używanymi w gospodarce człowieka (powlekanie antykorozyjne, barwniki, farby, paliwa płynne, środki ochrony roślin) stały się przedmiotem intensywnych badań ekofizjologów (20,21,22). Zwykle jednak przeprowadzane doświadczenia miały charakter typowych badań laboratoryjnych prowadzonych na czystych kulturach mikroorganizmów. Dlatego naszym zdaniem istniała konieczność zbadania wpływu jonów tych metali na aktywność metaboliczną naturalnych populacji mikroorganizmów planktonowych.

Celem naszej pracy było: 1) zbadanie wpływu jonów kadmu i ołowiu na aktywność trzech wybranych ektoenzymów bakteryjnych, tj. alkalicznej fosfatazy (APA), aminopeptydazy (AMI) i lipazy (LIP); 2) identyfikacja mechanizmu ewentualnej inhibicji tych ektoenzymów przez jony  $\text{Cd}^{2+}$  i  $\text{Pb}^{2+}$ ; 3) zbadanie wpływu wymienionych jonów metali na tempo asymilacji przez mikroorganizmy wzorcowych, niskocząsteczkowych związków organicznych (glukozy i glukozaminy).

## 2. Materiał i metodyka

### Pobór próbek

Próbki wody pobierano z pelagialu (głębokość 1 m) Jeziora Mikołajskiego czerpakiem Bernatowicza (pojemność 3,5 l) w okresie letniej stratyfikacji termicznej jeziora. Następnie sączono je przez siatkę planktonową (100  $\mu\text{m}$ ) w celu usunięcia większych form fito- i zooplanktonu.



### Wpływ jonów $\text{Cd}^{2+}$ i $\text{Pb}^{2+}$ na aktywność ektoenzymów bakteryjnych

Pomiaru wpływu stężenia jonów  $\text{Cd}^{2+}$  i  $\text{Pb}^{2+}$  na aktywność enzymów w zależności od czasu inkubacji próbek dokonano przy użyciu sztucznych substratów kolorymetrycznych (odpowiednio dla oznaczeń aktywności AMI, APA, LIP użyto L-leucyno-p-nitroaniliny, fosforanu p-nitrofenolu i palmitynianu p-nitro-fenolu, Sigma, Niemcy). Do 9 ml próbek wody z jeziora dodawano 0,25 ml 0,2 M buforu Tris-HCl o  $\text{pH}=7,5$  oraz 0,25 ml wodnego roztworu  $\text{NaN}_3$  (stężenie finalne w próbce 5 mmol/L). Azydek sodu pełnił funkcję środka bakteriostatycznego (23). Następnie, do próbek dodawano 0,5 ml wodnego roztworu  $\text{CdCl}_2$  lub  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  w stężeniu 2,5 mg/L jonów  $\text{Cd}^{2+}$  lub  $\text{Pb}^{2+}$  w próbce. Ostatecznie, próbki były wzbogacane przez dodanie 0,1 ml roztworu odpowiedniego substratu do stężenia końcowego w próbce 200  $\mu\text{mol/L}$ . Substraty do pomiaru aktywności aminopeptydazy i lipazy rozpuszczane były w 95% etanolu, zaś substrat dla alkalicznej fosfatazy w wodzie destylowanej. Natychmiast po dodaniu substratu mierzono absorpcję prób, traktując otrzymane wyniki jako kontrolę. Próbki inkubowano w ciemności, w temperaturze pokojowej przez 72 godziny dokonując pomiarów w 12-godzinnych odstępach czasu. Wszystkie pomiary spektrofotometryczne wykonano zgodnie z procedurą szczegółowo opisaną przez Chrósta i in. (24) (APA), Gajewskiego i wsp. (14) (LIP) oraz Gajewskiego (19) (AMI). Próbki przed pomiarem były sączone przez filtry szklane GFF (Whatman, USA) w celu usunięcia zawiesiny tworzonej bądź to przez substrat (LIP) bądź przez jony ołowiu.

Pomiar wpływu różnych stężeń jonów  $\text{Cd}^{2+}$  i  $\text{Pb}^{2+}$  na aktywność enzymatyczną bakterii polegał na dodawaniu do przygotowanych tak jak już opisano próbek wody 0,5 ml roztworów  $\text{Cd}^{2+}$  lub  $\text{Pb}^{2+}$  o wzrastających stężeniach tych jonów (ostateczne stężenie 2,5, 5, 10, 25 mg/L jonów kadmu lub ołowiu w kolejnych próbkach). Próbki inkubowano 24 – 48 godzin.

W celu określenia parametrów kinetycznych reakcji enzymatycznej w próbkach wzbogaconych jonami  $\text{Pb}^{2+}$  i  $\text{Cd}^{2+}$  do standardowo przygotowanych próbek wody dodawano 0,5 ml roztworu jonów  $\text{Cd}^{2+}$  lub  $\text{Pb}^{2+}$  w stężeniu końcowym 2,5 mg/L w próbce. Następnie próbki wzbogacano przez dodanie 0,1 ml roztworów odpowiednich substratów o rosnącym stężeniu, aż do zapewnienia pełnego wysycenia enzymu substratem, uzyskując następujące końcowe stężenia substratów w próbkach: 6,25, 12,5, 25, 50, 100, 200 i 400  $\mu\text{mol/L}$ . Kontrolę stanowiły identyczne próbki, do których jednak nie dodawano jonów metali. Z otrzymanych wyników wyliczono za pomocą programu komputerowego (Enzfitter, Biosoft) metodą *direct plot* parametry kinetyczne enzymów, szybkość maksymalną reakcji ( $V_{\text{max}}$ ) i stałą Michaelisa ( $K_m$ ) (25).

### Pomiar tempa asymilacji ( $^{14}\text{C}$ )glukozy i ( $^3\text{H}$ )N-acetyloglukozaminy w próbkach wzbogacanych jonami $\text{Cd}^{2+}$ i $\text{Pb}^{2+}$

Do dwóch serii 9 ml próbek dodawano 0,1 ml roztworu D-[(U)- $^{14}\text{C}$ ]glukozy (New England Nuclear, akt. spec. 358,6 mCi/mmol) w stężeniu końcowym



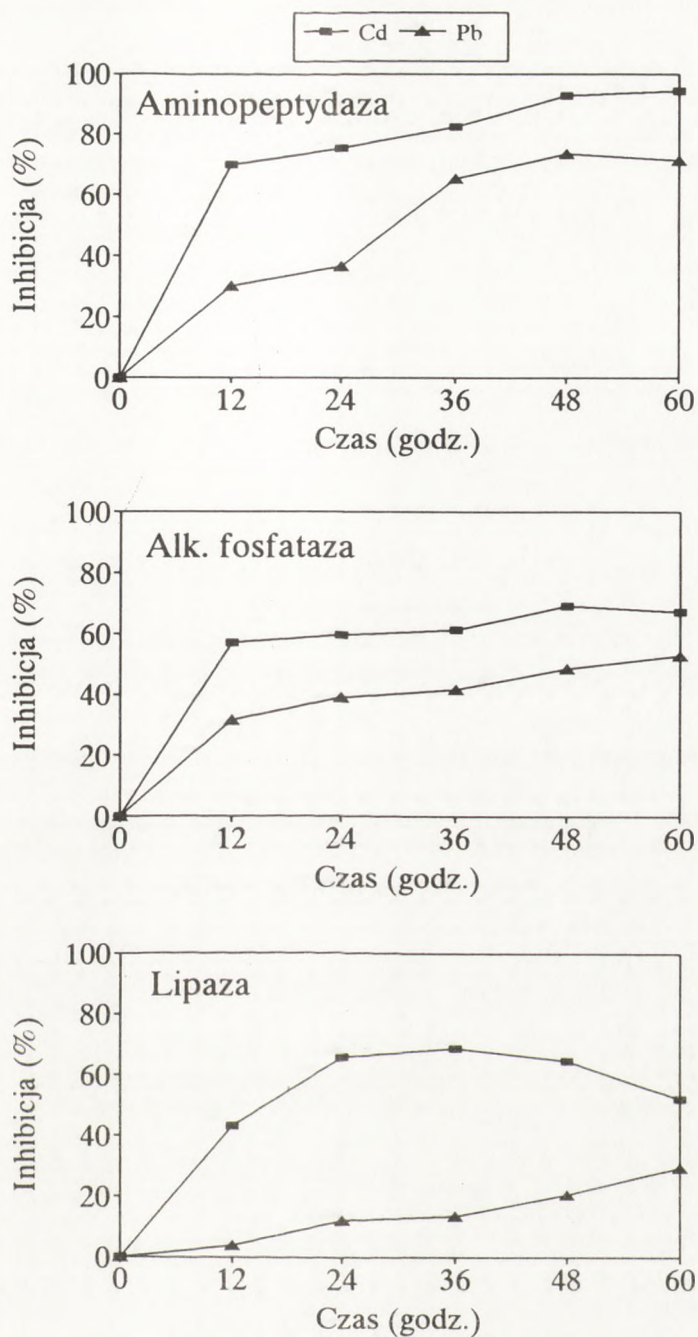
60 nmol/L, zaś do kolejnych dwóch [<sup>3</sup>H]N-acetyloglukozaminy (New England Nuclear, akt. spec. 34,25 Ci/mmol) w stężeniu końcowym 7,31 nmol/L. Do jednej z serii próbek dla obu wzbogaceń dodano jony kadmu w stężeniu końcowym 2,5, 5, 10, 25, 50 mg/L, zaś do drugiej jony ołowiu w tym samym ostatecznym stężeniu jak jony kadmu. Kontrolę stanowiły próbki bez dodatku jonów metali. Inkubowano je w ciemności przez 4 godziny. Dalsza procedura laboratoryjna, pomiar tempa asymilacji [<sup>14</sup>C]glukozy i [<sup>3</sup>H]N-acetyloglukozaminy oraz obliczenia zostały wykonane zgodnie z opisem zawartym w pracy Chrósta (26).

### 3. Omówienie wyników

W trakcie badań stwierdzono silny wpływ inhibicyjny zarówno jonów kadmu jak i ołowiu na aktywność badanych enzymów. Już po 12 godzinach inkubacji (rys. 1) następował wyraźny spadek aktywności aminopeptydaz i alkalicznej fosfatazy w próbkach zawierających jony Cd<sup>2+</sup> i Pb<sup>2+</sup> w stężeniu 2,5 mg/L. Dla AMI wynosił on 70% i 30%, zaś dla APA 57% i 31% odpowiednio dla próbek z kadmem i ołowiem. Najsilniej hamowanym enzymem była aminopeptydaza, której aktywność po 60 godzinach inkubacji spadła o 94% w próbkach zawierających Cd<sup>2+</sup> oraz o 71% w próbkach wzbogaconych w jony Pb<sup>2+</sup>. Wyraźna inhibicja aktywności lipaz w próbkach z kadmem (43%) następowała już na początku czasu inkubacji (12 godz.) i wolno rosła w trakcie trwania eksperymentu (do 69% w 36 godzinie inkubacji). Nieco odmiennie przedstawiała się krzywa hamowania lipazy w czasie przez jony ołowiu. Po 12 godzinach inkubacji zanotowano zaledwie 4% inhibicję jej aktywności, która jednakże stopniowo rosła w trakcie inkubacji do maksymalnej wartości (29%) po 60 godzinach trwania doświadczenia.

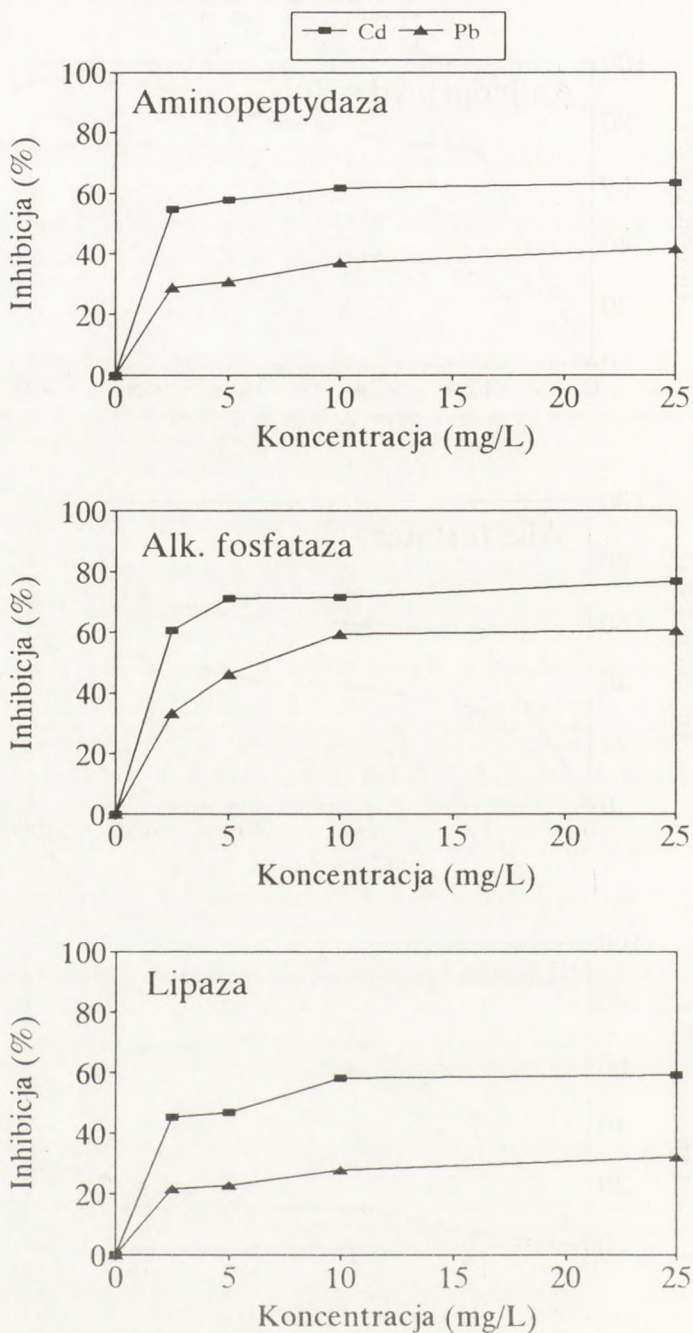
Ponadto stwierdzono, że istotna inhibicja badanych ektoenzymów następuje już przy stężeniu 2,5 lub 5 mg/L jonów Cd<sup>2+</sup> lub Pb<sup>2+</sup> w próbce (rys. 2). We wszystkich badanych enzymach silniejsze działanie hamujące wykazywały jony kadmu, powodując w stężeniu 2,5 mg/L spadek (o 196 nmol/L/godz. (55%), 221 nmol/L/godz. (60%) i 89 nmol/L/godz. (45%)) aktywności odpowiednio dla AMI, APA i LIP w stosunku do aktywności mierzonej w próbkach kontrolnych bez dodatku jonów metali. Dodatek ołowiu do próbek powodował mniejszą, aczkolwiek również wyraźną inhibicję aktywności badanych enzymów. Przy stężeniu 5 mg/L Pb<sup>2+</sup> notowano spadek aktywności o 31%, 46% i 23% odpowiednio dla AMI, APA i LIP. Zwykle wzrost stężenia jonów kadmu lub ołowiu powyżej 5 mg/L powodował nieznaczne dalsze obniżenie aktywności enzymatycznej bakterii, co dokumentuje hiperboliczny charakter krzywych (rys. 2).

W tab. 1 przedstawiono zmiany  $V_{max}$  i  $K_m$  badanych enzymów pod wpływem jonów Cd<sup>2+</sup> i Pb<sup>2+</sup> w stosunku do parametrów kinetycznych, wyliczonych dla prób kontrolnych nie zawierających jonów metali. Ogólnie stwierdzono trzy typy inhibicji aktywności ektoenzymatycznej bakterii powodowanych



Rys. 1. Inhibicja aktywności aminopeptydazy, alkalicznej fosfatazy i lipazy przez jony  $\text{Cd}^{2+}$  i  $\text{Pb}^{2+}$  (2,5 mg/L) w czasie inkubacji próbek wody jeziornej.





Rys. 2. Stopień inhibicji aktywności aminopeptydazy, alkalicznej fosfatazy i lipazy w zależności od wzrastających stężeń jonów  $\text{Cd}^{2+}$  i  $\text{Pb}^{2+}$ .

przez jony kadmu lub ołowiu. Pierwszy z nich to inhibicja mieszana, tj. jednoczesne zmniejszenie szybkości maksymalnej reakcji ( $V_{max}$ ) i powinowactwa enzymu do substratu (wzrost stałej Michaelisa  $K_m$ ). Był on obserwowany w przypadku aktywności bakteryjnej alkalicznej fosfatazy przy dodaniu do próbek zarówno jonów kadmu jak i ołowiu. Drugi z nich okreśłany jest jako inhibicja kompetytywna, a polegający wyłącznie na spadku powinowactwa enzymu do jego substratu, bez zmiany szybkości maksymalnej reakcji dotyczył aminopeptydazy zarówno w obecności jonów  $Pb^{2+}$  jak i  $Cd^{2+}$  oraz lipazy przy wzbogaceniu w jony ołowiu. Natomiast wzbogacenie próbek w jony kadmu powodowało niekompetytywną inhibicję aktywności lipazy ( $K_m$  bez większych zmian w stosunku do kontroli, spadek  $V_{max}$ ).

TABELA 1

WPLYW JONÓW  $CD^{2+}$  I  $PB^{2+}$  (STĘŻENIE 2,5 MG/L) NA PARAMETRY KINETYCZNE BADANYCH ENZYMÓW.  
WYNIKI PODANE SĄ JAKO PROCENT ZMIAN  $V_{MAX}$  I  $K_M$  W STOSUNKU DO PRÓBEK KONTROLNYCH

Badane jony	Aminopeptydaza		Alkaliczna fosfataza		Lipaza	
	$V_{max}$	$K_m$	$V_{max}$	$K_m$	$V_{max}$	$K_m$
$Cd^{2+}$	+8%	+104%	-85%	+21%	-38%	-6%
$Pb^{2+}$	-3%	+143%	-69%	+40%	+9%	+221%

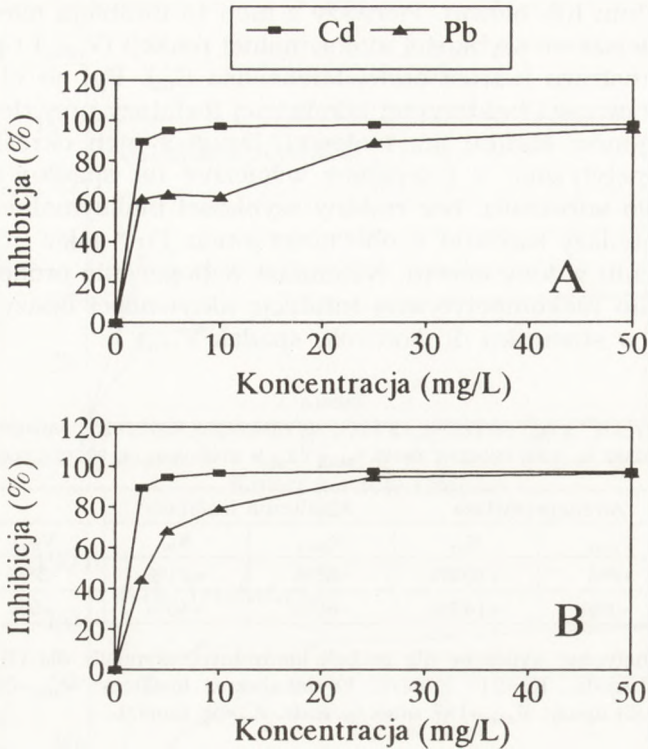
Parametry kinetyczne wyliczone dla próbek kontrolnych wynosiły dla (1) aminopeptydazy:  $V_{max}=848$  nmol/L/godz.,  $K_m=217$   $\mu$ mol/L; (2) alkalicznej fosfatazy:  $V_{max}=582$  nmol/L/godz.,  $K_m=225$   $\mu$ mol/L; (3) lipazy:  $V_{max}=197$  nmol/L/godz.  $K_m=58$   $\mu$ mol/L.

Tempo pobierania [ $^{14}C$ ]glukozy i [ $^3H$ ]N-acetyloglukozaminy przez bakterie planktonowe było bardzo silnie hamowane zarówno przez jony kadmu jak i ołowiu (rys. 3). Przy stężeniu 2,5 mg  $Cd^{2+}$  szybkość przyswajania obu tych substratów spadała aż o 90% w stosunku do notowanego tempa w próbkach kontrolnych (87 nmol/L/godz. [ $^{14}C$ ]glukozy i 73 pmol/L/godz. [ $^3H$ ]N-acetyloglukozaminy). Najniższe stężenie jonów ołowiu (2,5 mg/L) działało również hamująco na proces pobierania tych substratów do komórki bakteryjnej, choć procent inhibicji był niższy niż w przypadku analogicznego stężenia jonów  $Cd^{2+}$  (spadek tempa asymilacji o 61% i 44% dla [ $^{14}C$ ]glukozy i [ $^3H$ ]N-acetyloglukozaminy, odpowiednio).

#### 4. Dyskusja

Jony metali ze względu na swoje znaczenie dla mikroorganizmów mogą być zaklasyfikowane do trzech podstawowych grup: A, B i *borderline* (22,27,28). Grupa A zawiera podstawowe metale niezbędne dla prawidłowego metabolizmu mikroorganizmów (np. Mg, Ca, K i Na), natomiast do klasy jonów *borderline* zaliczane są przede wszystkim mikroelementy (np. Cu, Fe, Mn i Zn). Grupę B stanowią metale toksyczne dla mikroorganizmów i zbędne dla procesów biologicznych (np. Hg, Pb, Cd). Są one wprowadzane do środowiska





Rys. 3. Hamowanie pobierania  $[^{14}\text{C}]$ glukozy (A) i  $[^3\text{H}]$ N-acetyloglukozaminy (B) przez bakterie planktonowe w próbkach wody jeziornej, do których dodano wzrastających stężeń jonów  $\text{Cd}^{2+}$  i  $\text{Pb}^{2+}$ .

przede wszystkim w drodze procesów przemysłowych, np. wydobywania i oczyszczania rud, spalania paliw kopalnianych, produkcji farb i barwników, jak również w wyniku niektórych zabiegów rolniczych, np. nawożenia wapnem pochodzenia hutniczego (29,30). W wodach naturalnych stężenie jonów kadmu waha się od 0,1 do 5  $\mu\text{g}/\text{L}$ , zaś ołowiu od 0,03 do 5  $\mu\text{g}/\text{L}$  w zależności od typu wód i stopnia ich zanieczyszczenia (21). Zwykle dla większości laboratoryjnych szczepów bakterii toksyczne stężenie jonów  $\text{Cd}^{2+}$  wynosi od 20 do 80  $\text{mg}/\text{L}$  (31,32), natomiast  $\text{Pb}^{2+}$  waha się między 15 a 100  $\text{mg}/\text{L}$  (32,33,34). Jednakże, badania środowiskowe przeprowadzone w warunkach *in situ* wskazują, że hamujące aktywność mikroorganizmów stężenia jonów metali ciężkich są znacznie niższe, często rzędu  $10^{-4}$  –  $10^{-6}$  g (35,36). Także w naszych badaniach obserwowaliśmy znaczną inhibicję ektoenzymatycznej i asymilacyjnej aktywności mikroorganizmów — już przy względnie niskich stężeniach — zarówno jonów kadmu (2,5  $\text{mg}/\text{L}$ ) jak i jonów ołowiu (5  $\text{mg}/\text{L}$ ). Rozbieżność tę można wytłumaczyć tym, że zarówno optymalne warunki wzrostu mikroorganizmów w hodowlach laboratoryjnych czynią je bardziej odpornymi na toksyczne wpływy środowiska, jak i kompleksacyjne właściwości różnych związków nieorganicznych i organicznych (wchodzących w skład za-



zwyczaj stosowanych podłoży hodowlanych) mogą powodować osłabienie toksyczności tych jonów (37). Tym samym wydaje się, że rzeczywista toksyczność jonów metali ciężkich jest znacznie wyższa w warunkach naturalnych, niż ta szacowana na podstawie przeprowadzanych badań *in vitro*.

Stwierdzono, że jony metali ciężkich mogą wiązać się na powierzchni komórki bakteryjnej (np. Cu) lub być pobierane do jej wnętrza (np. Hg) (21,38). Hamujący wpływ metali ciężkich, (które znalazły się we wnętrzu komórki) na aktywność i syntezę enzymów bakteryjnych może polegać na: 1) maskowaniu aktywnych katalitycznie podjednostek enzymu; 2) denaturowaniu białek; 3) zmianie konformacji cząsteczki enzymu; 4) konkurencji z kationowymi aktywatorami związanymi z tworzeniem kompleksu substrat-enzym (39). Niektóre z tych mechanizmów, jak nam się wydaje, obserwowaliśmy w naszych badaniach. Typowa dla jonów metali ciężkich inhibicja niekompetytywna (40), została stwierdzona w jednym przypadku (LIP w próbkach z dodatkiem  $\text{Cd}^{2+}$ ). Prawdopodobnie była ona wynikiem unieczynnienia enzymu na drodze blokowania jego centrów katalitycznych, bądź zniszczenia trzeciorzędowej struktury białka poprzez wiązanie z jonami kadmu. Drugim typem hamowania aktywności ektoenzymów bakteryjnych, obserwowanym w naszych badaniach, była inhibicja kompetytywna. Zwykle polega ona na konkurencji między cząsteczkami inhibitora i substratu o połączenie z centrum katalitycznym enzymu. Jednakże w przypadku hamowania aktywności AMI w obecności  $\text{Pb}^{2+}$  i  $\text{Cd}^{2+}$  było to prawdopodobnie wynikiem wypierania i zastępowania ważnego katalitycznie jonu  $\text{Zn}^{2+}$  w centrum aktywnym enzymu przez dodawane przez nas jony (13). Taka zamiana metali w centrum katalitycznym, która nadaje cząsteczce tego metaloproteidu inne właściwości enzymatyczne zwykle zmienia jego powinowactwo do substratu (41). Innym możliwym do przyjęcia wyjaśnieniem faktu inhibicji kompetytywnej AMI przez  $\text{Pb}^{2+}$  i  $\text{Cd}^{2+}$  jest występowanie konkurencji między jonami aktywującymi powstanie kompleksu enzym-substrat, a dodanymi jonami kadmu lub ołowiu. Znacznie bardziej kompleksowy charakter mogła mieć inhibicja kompetytywna LIP przez jony  $\text{Pb}^{2+}$ . Wiąże się to z faktem, że substrat dla lipaz nie jest rozpuszczalny w wodzie, lecz tworzy emulsję posiadającą określone właściwości powierzchniowe. Dlatego oprócz wymienionych już procesów, duże znaczenie mógł mieć wpływ jonów metali na zmiany jakościowe interfazy między substratem, a wodnym środowiskiem działania enzymu, jak również kompleksacja kwasów tłuszczowych (produkt reakcji) przez jony metali (42). Jednakże wyjaśnienie tego problemu może nastąpić tylko na podstawie szczegółowych badań biochemicznych. Najczęściej występującym w środowiskach naturalnych typem inhibicji aktywności ektoenzymatycznej jest inhibicja mieszana. Jest to proces złożony i związany z jednoczesną zmianą konformacji cząsteczki enzymu oraz z częściowym unieczynnieniem jego centrów aktywnych. W naszych badaniach ten sposób inhibicji obserwowaliśmy badając aktywność APA zarówno w obecności jonów ołowiu jak i kadmu. Jednakże otrzymany przez nas wynik dotyczył wypadkowej działania jonów  $\text{Pb}^{2+}$  i  $\text{Cd}^{2+}$  na różne cząsteczki APA produkowane przez naturalne populacje mikroplanktonowe. Z tego też powodu, trud-



no jest nam ocenić czy oba wymienione procesy tego typu inhibicji dotyczyły tych samych cząsteczek enzymu. Być może niektóre z cząsteczek APA ulegały inhibicji kompetytywnej, inne zaś niekompetytywnej, a w wyniku przyjętej procedury badawczej odczytywany przez nas wynik stanowił niejako sumę obu tych procesów. Wydaje się, że wątpliwości te mogą być rozstrzygnięte w badaniach z użyciem czystych preparatów enzymatycznych.

Podsumowując, możemy stwierdzić, że mimo wieloletnich intensywnych badań nad mechanizmami działania jonów metali ciężkich na aktywność mikroorganizmów, wiele procesów inhibicji ich dynamiki metabolicznej pozostaje wciąż nieznane i wymaga dalszych szczegółowych studiów.

## Literatura

1. Joint I. R., Morris R. J., (1982), *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*, 20, 65 – 118.
2. Fenchel T., (1988), *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 19, 19 – 38.
3. Chróst R. J., (1992), *Hydrobiologia*, 243/244, 61 – 70.
4. Hoppe H-G., Ducklow H., Karrasch B., (1992), *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 93, 277 – 283.
5. Caron D.A., Goldman J.C., Dennett M.R., (1988), *Hydrobiologia*, 159, 27 – 40.
6. McManus G.B., Fuhrman J.A., (1988), *Hydrobiologia*, 159, 51 – 62.
7. Tranvik L., (1984), *The Role of Heterotrophic Bacterioplankton in Carbon Flow of Pelagic Ecosystems. A Review of Some Ecological and Methodological Problems*, Lund Universitet, Limnologiska Institutionen.
8. Thurman E.M., (1985), *Organic Geochemistry of Natural Waters*, Nijhoff/Junk, Boston.
9. Chróst R.J., Münster U., Rai H., Albrecht D., Witzel K.P., Overbeck J., (1989), *J. Plankt. Res.*, 11, 223 – 242.
10. Münster U., Chróst R.J., (1990), *Aquatic Microbial Ecology: Biochemical and Molecular Approaches*, Eds. Overbeck J., Chróst R.J., 8 – 45, Springer-Verlag, New York.
11. Rogers H.J., (1961), *The Bacteria*, Eds. Gunsalus I. C., Stanier R. Y., Academic Press, New York, 2, 261 – 318.
12. Chróst R.J., (1990), *Aquatic Microbial Ecology: Biochemical and Molecular Approaches*, Eds. Overbeck J., Chróst R.J., Springer-Verlag, New York, 47 – 78.
13. Chróst R.J., (1991), *Microbial Enzymes in aquatic environments*, Ed. Chróst R.J., Springer-Verlag, New York, 29 – 59.
14. Gajewski A.J., Chróst R.J., Siuda W., (1993), *Arch. Hydrobiol.*, 128, 107 – 126.
15. Hoppe H-G., (1983), *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 11, 299 – 308.
16. King G.M., (1986), *Appl. Environ. Microbiol.*, 51, 373 – 380.
17. Chróst R.J., Overbeck J., (1987), *Microb. Ecol.*, 13, 229 – 248.
18. Chróst R.J., (1991), *Verh. Internat. Verein. Limnol.*, 24, 2597 – 2600.
19. Gajewski A.J., (1993), *Acta Microbiol. Polon.*, 42, 291 – 302.
20. Babich H., Stotzky G., (1983), *Aquatic Toxicology*, Ed. Nriagu J.O., J. Wiley & Sons, New York, 2 – 46.
21. Erhlich H.L., (1978), *Microbial Life in Extreme Environments*, Ed. Rushner D.J., Academic Press, London, 381 – 408.
22. Collins Y.E., Stotzky G., (1989), *Metal Ions and Bacteria*, Eds. Beveridge T.J., Doyle R.J., J. Wiley & Sons, New York, 32 – 90.
23. Huber A.L., Kidby D.K., (1984), *Hydrobiologia*, 111, 3 – 11.
24. Chróst R.J., Siuda W., Hałemejko G. Z., (1984), *Arch. Hydrobiol. Suppl.*, 70, 1 – 32.
25. Leatherbarrow R.J., (1987), *Enzfitter. A Non-Linear Regression Data Analysis Program for the IBM PC*, Elsevier-Biosoft, Cambridge.



26. Chróst R.J., (1990), Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol., 34, 111 – 117.
27. Nieboer E., Richardson D. H. S., (1980), *Environmental Pollution*, Ed. Mellanby K., Applied Science Publishers, London, 1, 3 – 26.
28. Collins Y.E., Stotzky G., (1992), Appl. Environ. Microbiol., 58, 1592 – 1600.
29. Leland H.V., Luoma S.N., Elder J. F., Wilkes D. J., (1978), Journal WPCF, 6, 1469 – 1514.
30. Tomkova D., (1989), Agrochemia, 29, 37 – 39.
31. Winslow D.E.A., Hotchkiss M., (1921/22), Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 19, 314 – 315.
32. Avakyan Z.A., (1967), Mikrobiologiya, 36, 446 – 450.
33. Malanchuk J.L., Gruending G.K., (1973), Water, Air, Soil Pollut., 2, 181 – 190.
34. Iverson W.P., Huey C., Brickman F.E., Jewett K. J., Blair W., (1975), *Heavy Metals in the Aquatic Environment*, Ed. Krenkel P. A., Pergamon Press, Oxford, 193.
35. Wainwright M., Duddridge J.E., (1982), Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 15, 241 – 245.
36. Babich H., Stotzky G., (1985), Environ. Res., 36, 111 – 137.
37. Borgmann U., (1983), *Aquatic Toxicology*, Ed. Nriagu J. O., John Wiley & Sons, New York, 48 – 72.
38. Sadler W.R., Trudinger P.A., (1967), Min. Dep., 2, 158 – 168.
39. Tyler G., (1981), *Soil Biochemistry*, Eds. Paul E. A., Ladd J. N., Marcel Dekker, New York, 5, 371 – 414.
40. Armstrong F.B., (1983), *Biochemistry*, Oxford University Press, New York, 139 – 140.
41. Wackett L.P., Orme-Johnson W.H., Walsh C.T., (1989), *Metal Ions and Bacteria*, Eds. Beveridge T.J., Doyle R.J., John Wiley & Sons, New York, 165 – 206.
42. Sugiura M., (1984), *Lipases*, Eds. Borgström B., Brockman H.L., Elsevier, Amsterdam, 505 – 520.

### The effect of cadmium ( $\text{Cd}^{2+}$ ) and lead ( $\text{Pb}^{2+}$ ) ions on microbial decomposition of organic biopolymers in an eutrophic lake

#### Summary

The effects of cadmium and lead ions on bacterial ectoenzymatic activities (aminopeptidase, alkaline phosphate and lipase) and on the rates of [ $^{14}\text{C}$ ]glucose and [ $^3\text{H}$ ]N-acetylaminoglucose uptake were investigated in short-period experiments. Both the activities of ectoenzymes and rates of organic substrates uptake by bacteria were strongly inhibited by studied metal ions, even in their low concentrations. Three types of inhibition: competitive (aminopeptidase), non-competitive (lipase) and mixed (alkaline phosphatase) due to  $\text{Pb}^{2+}$  and  $\text{Cd}^{2+}$  were observed. The potential mechanisms of changes of the physical and chemical properties of studied enzymes by cadmium and lead were discussed.

#### Key words:

cadmium, lead, organic matter, ectoenzymes, eutrophic lake.

#### Adres dla korespondencji:

Adam J. Gajewski, Ryszard J. Chróst, Zakład Ekologii Mikroorganizmów, Uniwersytet Warszawski, ul. Karowa 18, 00-927 Warszawa 64.