

ZASTOSOWANIE METODY OZNACZANIA AKTYWNOŚCI ODDŁCHOWEJ ETS DO BADANIA MINERALIZACJI W OSADACH MORSKICH

UKD 551.35:549.01:550.72:550.846:576.8.095.2:[542.941:549.76:547

Biologiczne procesy zachodzące w wodach bada się stosując oznaczenia enzymatyczne. Jakościowe pomiary aktywności enzymatycznej mają zastosowanie do lokalizowania miejsc przebiegu procesu, natomiast ilościowe do określania jego szybkości. Oznaczanie metabolicznej aktywności mikroflory i mikrofauny polega zwykle na pomiarze zużycia tlenu. Do tego celu stosuje się różne fizyczne i chemiczne metody, jak: jodometryczna, manometryczna i potencjometryczna, które jednakże często są zbyt mało czułe. W odróżnieniu od w/w metod bardzo czuła jest metoda biochemiczna. Zużycie tlenu w procesie biologicznym jest wynikiem przenoszenia elektronu wzdłuż łańcucha oddechowego cząstek transportujących elektrony ETS (elektron transport system), który jest uniwersalny dla wszystkich żywych organizmów począwszy od bakterii a skończywszy na człowieku. Bakteryjne łańcuchy oddechowe są związane z układem plazma-membrana i różnią się od mitochondrialnego łańcucha oddechowego komórek roślinnych i zwierzęcych. Ogólnie łańcuch oddechowy cząstek transportujących elektrony składa się z dehydrogenazy NADH, dehydrogenazy bursztynianowej i cytochromów. W przypadku bakterii, pierwszy etap utlenienia niekoniecznie polega na odwodornieniu substratu przez enzymy cytoplazmatyczne z utworzeniem NADH, proces mogą zainicjować enzymy flawinowe, które przenoszą elektrony bezpośrednio do łańcucha oddechowego (3).

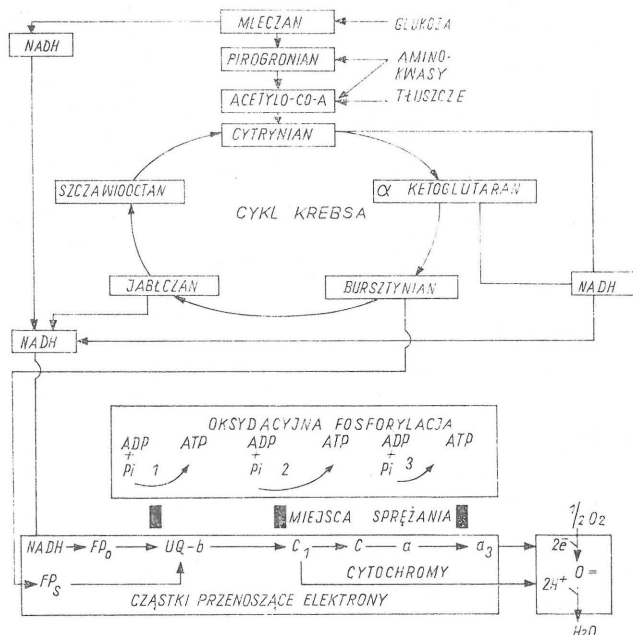
Curl i Sandberg (2) opracowali metodę oznaczania aktywności dehydrogenazy bursztynianowej w celu określenia szybkości oddychania zooplanktonu, natomiast powyższe oznaczenie okazało się nieprzydatne do oznaczania szybkości oddychania fitoplanktonu (11). Inni badacze opracowali metody oznaczania aktywności dehydrogenazowej w glebach (5), które w zmodyfikowanej formie zastosowano do badania metabolizmu w osadach (9, 10).

Zgodnie z Packardem (8) i wynikami prac wcześniejszych badaczy (1, 4) aktywność respiracyjna cząstek transportujących elektrony ETS lepiej koreluje z potencjalną szybkością respiracyjną planktonu aniżeli aktywność dehydrogenazowa, ponieważ zużycie tlenu kontrolowane jest przez cały łańcuch oddechowy cząstek transportujących elektrony a nie tylko przez wchodzące w jego skład dehydrogenazy (ryc. 1). Możliwość ekstrakcji wyników pomiarów ETS do określania szybkości procesów mineralizacji w osadach jest uwarunkowana następującymi czynnikami: — ilościowym wyekstrahowaniem enzymów z badanych próbek osadu, — wyborem optymalnego substratu, — pomiarem maksymalnej prędkości transportu elektronu V_{max}

in vitro, tj. pomiarem ETS, który będzie odbywał się na etapie ograniczającym szybkość transportu elektronu po stronie tlenu. Badania dotyczące wyboru optymalnych parametrów metody oznaczania aktywności ETS w morskich osadach przeprowadzili Olańczuk-Neyman i Vosjan (7). Biorąc pod uwagę, że łańcuch oddechowy wchodzi w skład wszystkich tlenowych i większości beztlenowych bakterii, aktywność ETS będzie wskazywała potencjalną szybkość większej części metabolicznych procesów prowadzonych przez te mikroorganizmy w osadzie (7). Warunkiem prawidłowego wykonania oznaczenia aktywności kompleksowego układu enzymów, jakim jest łańcuch oddechowy cząstek transportujących elektrony ETS, jest określenie prędkości etapu limitującego, tj. etapu utlenienia kompleksu koenzymu — Q cytochromu, — b, którego prędkość można zmierzyć przy zastosowaniu reakcji z INT (ryc. 2). Metoda pomiaru aktywności ETS opiera się na reakcji z chlorkiem 2-(p-jodofenilo)-3-(p-nitrofenilo)-5-fenylotetrazoliowym (INT). Jest to związek czuły na zmiany potencjału redoksoowego i jednocześnie łatwo ulegający redukcji nawet w obecności tlenu. Zredukowana forma INT, INT-formazan, jest rozpuszczalna w wodzie zawierającej 0,16% Triton X-100.

PROCESY MINERALIZACJI W OSADACH Z WADDEN SEA

W płytkich przybrzeżnych wodach, do których należy Dutch Wadden Sea osiada na dnie duża ilość materiału organicznego. Pochodzi on z produkcji pierwotnej przebiegającej w kolumnie wody i na płycznach przyływowowych, a także przenoszony jest z gleb i z przylegającego do Wadden Sea Morza Północnego. Duża część osadzonego na dnie materiału organicznego jest mineralizowana w osadzie, tzn. ulega biologicznemu utlenieniu. W procesie mineralizacji biorą udział różne akceptory elektronów, jak: tlen, azotany, siarczany i dwutlenek węgla, które wykorzystywane są w/w kolejności i redukowane odpowiednio do: wody, azotynów, tlenku azotu, azotu gazowego, siarczynów, siarczków i metanu (6). W środowisku beztlenowym, cząsteczki organiczne mogą ulegać fermentacji, której produktami są: alkohole, niższe kwasy tłuszczowe, mleczany i wodór gazowy. Produkty fermentacji, jak np. zredukowane związki azotu i siarki zawierają w swoich cząsteczkach energię, która może być uwolniona jeżeli produkty te znajdują się w środowisku tlenowym. Ta droga powstają w osadzie różnorodne nisze ekologiczne zasiedlane przez różne grupy mikrobiologiczne i formują się strefy odróżniające się stopniem zaawansowania rozkładu związków organicznych. I tak: w górnej, utle-



Ryc. 1. Powiązanie łańcucha oddechowego cząstek przenoszących elektrony z cyklem Krebsa i oksydacyjną fosforylacją (wg Packarda — 8).

UQ-b — kompleks ubichinon (koenzym Q) — cytochrom-b, FP_D — flawoproteid (układ redukujący NADH), FP_S — flawoproteid (układ dehydrogenazy bursztynianowej), ADP — dwufosforan adenozyne, ATP — trójfosforan adenozyne.

Fig. 1. Relationships between respiratory chain of electron transporting particles and the Krebs cycle and oxidizing phosphorization (after Packard — 8).

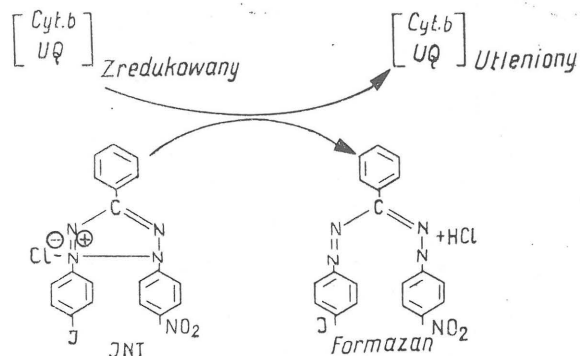
UQ-b — ubiquinone (coenzyme Q) — cytochrome-b complex, FP_D — flavoprotein (NADH reducing system), FP_S — flavoprotein (succinic dehydrogenase system), ADP — adenosine diphosphate, ATP — adenosine triphosphate.

niowej warstwie występują tlenowe, heterotroficzne organizmy, które wykorzystują materiał organiczny z wody nadosadowej. Oprócz tego rozwijają się tlenowe chemoautotroficzne organizmy, które zużywają zredukowane związki siarki i azotu, pochodzące z głębszych warstw beztlenowych. Tlenowa warstwa powierzchniowa o grubości od kilku milimetrów do kilku centymetrów ma ciemnobrunatne zabarwienie pochodzące od wodorotlenków żelaza i manganu. Warstwa beztlenowa znajdująca się poniżej zabarwiona jest na czarno od występujących w niej siarczoków żelaza. W tej warstwie dominują względnie beztlenowe i beztlenowe organizmy, głównie redukujące siarczany. Głębiej znajduje się jasnoszara strefa pirytu (12).

MATERIAŁY I METODY

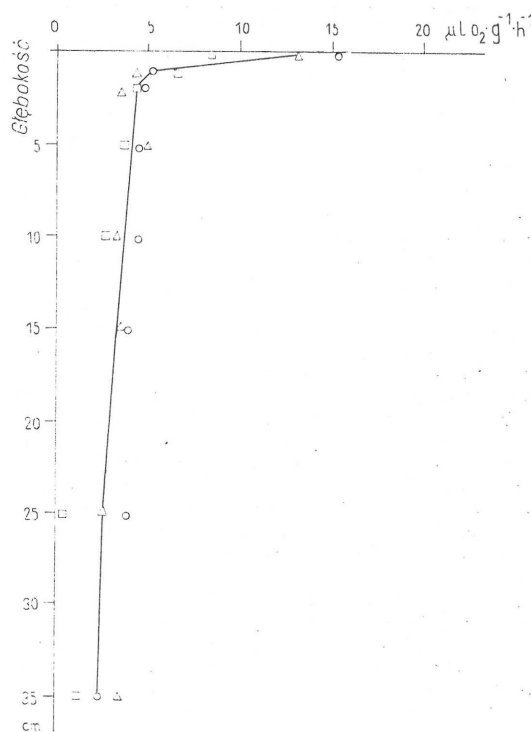
Próbki osadu do badań pobierano przy niskim stanie wód z pływaczni odpływowych w pobliżu wyspy Texel na Dutch Wadden Sea, przy pomocy rurki o średnicy 21 cm. Rdzenie osadu o długości 35 cm po wyjęciu z próbnika dzielono na odcinki odpowiadające różnym głębokościom. Zawartość wody w próbkach osadu określono przez wysuszenie naważki osadu do stałej wagi w temp. 105°C.

Do pomiaru aktywności ETS w osadach morskich zastosowano metodę opisaną przez Olańczuk-Neyman i Vosjana (7). Ekstrakty komórkowe przygotowywano przez homogenizację naważek osadu z buforem w obniżonej temperaturze $\sim 4^\circ\text{C}$ w homogenizatorze mechanicznym (Model MSK, Braum-Melsungen) przez 1 min. przy 4000 obr./min. Surowe homogenaty wirowano przy 1070 g w temp. 4°C przez 30 min. Dwa ml ekstraktu komórkowego inkubowano z 1 ml roztworu substratu i 0,5 ml roztworu INT w temperaturze 20°C , przez 5 min. Końcowe stężenia składników w mieszaninie reakcyjnej wynosiły: 15 μM MgSO_4 , 85 mM buforu fosforano-sodowego pH = 8,0, 0,03% v/v poliwinylpiperolidyny PVP, 0,154% v/v Triton X-100, 0,5 mM NADH, 0,15 mM NADPH, 80 mM bursztynia-



Ryc. 2. Reakcja utlenienia-redukcji pomiędzy INT a kompleksem ubichinon-cytochrom-b.

Fig. 2. Oxidation-reduction reaction between INT and ubiquinone-cytochrome-b system.



Ryc. 3. Pionowe rozmieszczenie aktywności ETS w osadzie morskim z Dutch Wadden Sea. Oznaczenia wykonano w trzech niezależnych rdzeniach osadu.

Fig. 3. Distribution of ETS activity in section of marine deposit from the Dutch Wadden Sea. Determinations were made for three separate cores.

nu sodowego i 0,80 mM INT. Reakcję zatrzymywano 1 ml mieszaniny formaldehydowo-mrówczanej. Absorbancję utworzonego INT-formazanu mierzono przy 490 nm wobec próby ślepej składającej się z: 2 ml ekstraktu komórkowego, 1 ml buforu homogenizacyjnego, 0,5 ml roztworu INT i wprowadzonej po inkubacji mieszaniny formaldehydowo-mrówczanej.

WYNIKI I DISKUSJA

W celu określenia szybkości przebiegu procesów mineralizacji w Dutch Wadden Sea zmierzono aktywność ETS w próbkach osadów dennych i w kolumnie wody nad osadem. Stwierdzono, że regularne przypływy morza wywierają silny wpływ na aktywność ETS. Najwyższa aktywność przypadająca na litr wody wystąpiła podczas odpływu, natomiast aktywność przypadająca na gram suchej substancji zawie-

szonej w wodzie była najwyższa przy niezmiennającym się poziomie wody „slack tide”. Aktywność w wodzie zmieniała się w granicach od 6 do 22 $\mu\text{l O}_2 \text{ l}^{-1}\text{h}^{-1}$ i od 55 do 220 $\mu\text{l O}_2 \text{ g}^{-1}\text{h}^{-1}$.

Aktywność ETS powierzchniowej warstwy osadu na gram suchej masy osadu była o rząd wielkości niższa od aktywności substancji organicznej zawieszonej w wodzie (ryc. 3). Z drugiej zaś strony porównanie aktywności ETS przypadającej na m^2 w wodzie i w osadzie pozwala sądzić, że osad odgrywa daleko ważniejszą rolę w procesie mineralizacji (13).

Pionowe rozmieszczenie aktywności ETS w osadzie przedstawia krzywa wykładnicza: najwyższa aktywność występuje na powierzchni osadu, szybki spadek obserwuje się do głębokości poniżej 2 cm, po czym następuje powolne obniżanie się aktywności (ryc. 3). W kolumnie osadu o długości 35 cm tylko około 10% mineralizacji odbywa się w powierzchniowej warstwie, natomiast pozostałe 90% mineralizacji przebiega w głębszych beztlenowych warstwach. Vosjan (12) dowiódł, że w tej beztlenowej warstwie osadu istotną rolę pełni mineralizacja poprzez redukcję siarczanów. Przedstawione wyniki wskazują na dominujące znaczenie beztlenowych warstw osadów dennych w procesie mineralizacji substancji organicznych.

LITERATURA

1. Chance B. — Cellular oxygen requirements. Fed. Proc. 1957 vol. 16.
2. Curl H. C., Sandberg J. — The measurement of dehydrogenase activity in marine organisms. J. mar. Res. 1961 no. 19.

SUMMARY

A new, biochemical method of studying the rate of aerobic and anaerobic mineralization processes in marine deposits was used. The method is based on measurements of respiratory activity of electron transporting particles, ETS (electron transport activity), with reference to the reaction with INT. A distribution of ETS activity in a column of deposit, 35 cm long, was determined. Anaerobic layers of sea-floor deposits, especially sulfates reducing bacteria were found to be most important in the process of mineralization of organic matter.

3. Gel'man N. S., Lukyanova M. A., Ostrovskii D. N. — Respiration and phosphorylation of bacteria. Plenum Press, New York 1967.
4. Klingenberg M. — The respiration chain. [W:] T. P. Singer — Biological oxidations. Interscience Publishers, New York 1968.
5. Lenhard G., Ross W. R., Du Plooy A. — A study of methods for the classification of bottom deposits of natural waters. Hydrobiologia 1962 vol. 20.
6. McKinney R. E., Conway R. A. — Chemical oxygen in biological waste treatment. Sewage ind. Wastes 1957 no. 29.
7. Olańczuk-Neyman K., Vosjan J. H. — Measuring respiratory electron-transport-system activity in marine sediment. Neth. J. Sea Res. 1977 vol. 11.
8. Packard T. T. — The measurement of respiratory-electron-transport activity in marine phytoplankton. J. mar. Res. 1971 vol. 29.
9. Pamatmat M. M., Bhagmat A. M. — Anaerobic metabolism in Lake Washington sediments. Limnol. Oceanogr. 1973 vol. 18.
10. Pamatmat M. M., Skjoldal H. R. — Dehydrogenase activity and adenosine triphosphate concentration of marine sediments in Lindaspollen, Norway. Sarsia 1974 no. 56.
11. Paerre S. — Metabolic activity as an indicator of zooplankton abundance. M. S. Thesis, Dalhousie Univ., Halifax, 1964.
12. Vosjan J. H. — Sulphate in water and sediment of the Dutch Wadden Sea. Neth. J. Sea Res. 1974 vol. 8.
13. Vosjan J. H., Olańczuk-Neyman K. — Vertical distribution of mineralization processes in tidal sediment. Neth. J. Sea Res. 1977 vol. 11.

РЕЗЮМЕ

Описано применение нового биохимического метода определения скорости хода кислородных и бескислородных процессов минерализации в морских осадках. Метод основан на определении дыхательной активности частиц транспортирующих электроны ЭТС с применением реакции с ИНТ. В статье определено вертикальное расположение активности ЭТС в колонне осадков длиной 35 см. Обращено внимание на доминирующее значение бескислородных пластов донных осадков, а особенно находящихся в них бактерий, которые восстанавливают сульфаты в процессе минерализации органического вещества.