

Bartosz Kiersztyn, Waldemar Siuda

Zakład Ekologii Mikroorganizmów, Instytut Mikrobiologii, Uniwersytet Warszawski

Wpłynęło w lipcu 2007 r.

1. Wstęp. 2. Klasyfikacja i pochodzenie substancji białkowych występujących w środowiskach wodnych. 3. Skład aminokwasowy DCAA i DFAA. 4. Substancje białkowe jako źródło energii i biogenów dla mikroorganizmów wodnych – labilność biologiczna białek. 5. Proteazy w ekosystemach wodnych. 6. Charakterystyka aminopeptydazy – wzorcowego enzymu w badaniach aktywności proteolitycznej wodnych bakterii heterotroficznych. 7. Regulacja aktywności proteaz zewnątrzkomórkowych. 8. Metody pomiaru aktywności zewnątrzkomórkowych enzymów proteolitycznych. 9. Podsumowanie

Proteins as a nutritive substrate for water microorganisms

Abstract: This paper reviews the role of proteins in nutrition of heterotrophic bacteria in aquatic ecosystems. It presents a classification of various forms of proteinaceous matter present in the lake water and analyses their origin, concentration, and amino acid composition. Moreover, the authors summarized the current knowledge on extracellular proteases in aquatic environments, discussed the suitability of various methods for exoprotease activity determination and described environmental factors affecting enzymatic hydrolysis of proteins *in situ*. Special attention was paid to the biological availability of proteins and the role of attached bacteria in the biodegradation of protein containing particles.

1. Introduction. 2. Classification and origin of proteinaceous matter present in water environments. 3. Amino acid composition of the DCAA and DFAA pool. 4. Proteinaceous matter as a source of energy and biogens for aquatic microorganisms – biological lability of proteins. 5. Proteases in aquatic ecosystems. 6. Characterization of aminopeptidase as a model enzyme for investigations of proteolytic activity in aquatic environments. 7. Regulation of extracellular proteases activity. 8. Methods for the determination of extracellular proteases activity. 9. Summary

Słowa kluczowe: bakterie wodne, białka, biogeny, biodegradacja, proteazy zewnątrzkomórkowe

Key words: aquatic bacteria, proteins, biogens, biodegradation, extracellular proteases

1. Wstęp

Odkąd na początku XIX wieku odkryto chemiczną naturę białek, poznano szczegółowo ich budowę, mechanizm syntezy oraz liczne funkcje jakie pełnią w komórkach żywych organizmów. Na tym tle wiedza dotyczące roli białek jako źródła pokarmu dla mikroorganizmów słono i słodkowodnych jest stosunkowo uboga.

Niniejsza praca stanowi próbę zebrania i usystematyzowania informacji o znaczeniu białek jako substratu pokarmowego dla bakterii heterotroficznych zamieszkujących środowiska wodne. Autorzy skupili się na pochodzeniu i klasyfikacji substancji białkowych obecnych w wodach naturalnych, roli białek jako źródła C i N dla bakterii, oraz charakterystyce aktywności proteaz zewnątrzkomórkowych.

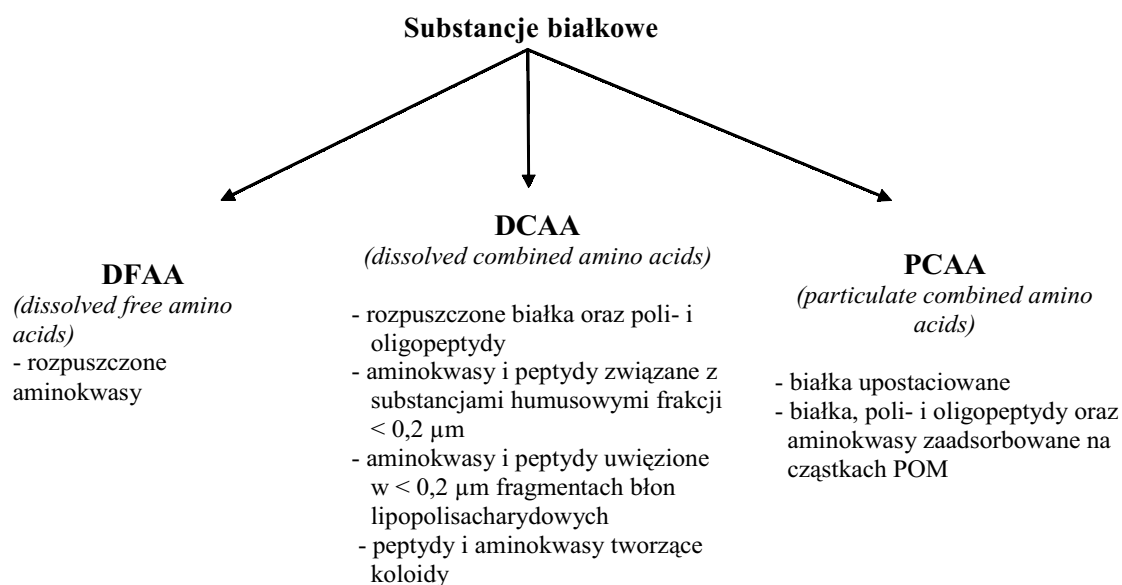
2. Klasyfikacja i pochodzenie substancji białkowych występujących w środowiskach wodnych

Istotny problem przy klasyfikacji substancji białkowych występujących w środowiskach wodnych dotyczy zdefiniowania tego, co określamy mianem „roz-

puszczone”. *Ex definitione*, do puli rozpuszczonej materii organicznej (DOM – dissolved organic matter) zalicza się frakcję materii organicznej obecnej w filtracie wody naturalnej przesączonej przez filtr o średnicy porów 0,2 μm , zaś do frakcji upostaciowanej (POM – particulate organic matter) cząstki materii organicznej pozostające na filtrze [96]. Jednakże frakcję materii o wielkości cząstek $<0,2 \mu\text{m}$ tworzą nie tylko związki rozpuszczone w znaczeniu chemicznym. W jej skład wchodzi również: cząstki wirusowe (virus like particles) o średnicy $<0,2 \mu\text{m}$ [100]; sferyczne lub fibrylarne cząstki koloidowe $<0,2 \mu\text{m}$ [17]; elastyczne cząstki materii organicznej (o średnicy $>0,2 \mu\text{m}$), które nie są zatrzymywane na filtrach 0,2 μm [57] oraz ultramikrobakterie (bakterie o średnicy komórki $<0,2 \mu\text{m}$).

Pomimo tych wątpliwości substancje o charakterze białkowym występujące w środowiskach wodnych dzielone są zwykle na trzy podstawowe kategorie (Rys. 1):

(i) **DFAA** (dissolved free amino acids) – rozpuszczone aminokwasy, których stężenie mierzone jest w przesączu przez filtr o średnicy porów wynoszącej 0,2 μm , najczęściej fluorymetrycznie z wykorzystaniem OPA (orto-phthaldialdehyde) [63].



Rys. 1. Klasyfikacja substancji białkowych występujących w środowiskach wodnych

(ii) **DCAA** (dissolved combined amino acids) – rozpuszczone różnorodne połączenia aminokwasów ($<0,2 \mu\text{m}$), których zawartość w wodzie określana się jako stężenie aminokwasów uwolnionych z DCAA po hydrolizie chemicznej [10].

(iii) **PCAA** (particulate combined amino acids) – upostaciowana materia białkowa o średnicy cząstek $>0,2 \mu\text{m}$.

O ile DFAA (wolne aminokwasy rozpuszczone w wodzie) stanowią względnie jednorodną grupę związków chemicznych, to frakcja DCAA jest bardziej złożona. Należą do niej: różnorodne białka oraz poli- i oligopeptydy [60], często w postaci glikozylowanej [78], aminokwasy i peptydy związane z substancjami humusowymi bądź na nich zaadsorbowane [82], aminokwasy i białka uwiecznione w lipopolisacharydowych fragmentach osłon komórkowych oraz w substancjach koloidowych o niescharakteryzowanym składzie chemicznym [55].

Również PCAA są bardzo zróżnicowaną fizykochemicznie frakcją materii białkowej. Do PCAA zalicza się zarówno białka i peptydy wchodzące w skład żywych organizmów oraz cząstek martwej materii organicznej (detrytus, „fecal pellets” i inne), jak również aminokwasy zaadsorbowane na powierzchni sestonu i uwiecznione w matrix biofilmów otaczających cząstki POM, a także inne, często niepeptydowe, połączenia aminokwasów [89].

Zakresy stężeń DCAA i DFAA w wodach naturalnych są względnie dobrze poznane. Zwykle ilość DCAA przewyższa DFAA (Tab. 1).

Znacznie mniej wiadomo na temat stężeń i składu upostaciowanej materii białkowej, która stanowi na ogół zaledwie 10–20% całkowitej ilości materii organicznej występującej w wodach jeziornych [40, 91].

Udział ten może jednakże znacznie wzrastać podczas intensywnych zakwitów glonów czy cjanobakterii [25, 40].

Materia organiczna (OM) obecna w ekosystemach wodnych klasyfikowana jest także ze względu na źródło jej pochodzenia. Allochtoniczna OM, wytworzona w procesach produkcji pierwotnej i wtórnej w ekosystemach lądowych, dociera do zbiorników wodnych wraz ze spływami ze zlewni lub drogą powietrzną. Ponieważ łatwo utylizowalne frakcje allochtonicznej OM są intensywnie wykorzystywane przez glebowe mikroorganizmy heterotroficzne, pozostałość docierająca do wód odznacza się na ogół małą labilnością biologiczną, wysoką odpornością na hydrolizę enzymatyczną i jest raczej ubogim źródłem białek dla mikroorganizmów wodnych. Charakteryzuje ją przy tym wysoki stosunek C:N, wynoszący zwykle od kilkunastu do kilkudziesięciu [95], wskazujący na duży udział w jej składzie opornych na mikrobiologiczną degradację wielkocząsteczkowych związków aromatycznych [71].

Większość białek obecnych w wodach należy do autochtonicznej OM, wytwarzanej przede wszystkim

Tabela I
Stężenia DFAA i DCAA w powierzchniowej warstwie wód różnorodnych ekosystemów wodnych

Zbiornik	DFAA ($\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$)	DCAA ($\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$)	Piśmiennictwo
Sargasso Sea	<10	197–810	Keil i Kirchman [55]
Delaware Estuary	50–1400	100–8000	Coffin [23]
Delaware Bay	300–700	1200–2000	Middelboe i wsp. [72]
Lake Constance	50–210	2000–9500	Grossart i Simon [40]

przez mikroorganizmy planktonowe. Jak wykazali Rosenstock i Simon [85] główne źródło białek obecnych w wodach jeziora Bodeńskiego* stanowiła frakcja planktonu o wielkości 1–140 μm . Tezę tę potwierdzają wyniki badań wskazujące na znaczny wzrost stężeń różnorodnych związków organicznych, a wśród nich PCAA, DCAA i DFAA, w okresach intensywnych zakwitów fitoplanktonu [85].

Ponieważ procesy produkcji pierwotnej i wtórnej prowadzą m.in. do syntezy budujących komórki mikroorganizmów polimerycznych związków organicznych, białka wytwarzane w tych procesach są zwykle upostaciowane i wchodzi w skład puli PCAA. Obecność w wodzie rozpuszczonych form autochtonicznej materii białkowej jest zatem efektem procesów wtórnych prowadzących do uwalniania DFAA i DCAA z PCAA. Najważniejsze z nich to: (i) rozpuszczanie i enzymatyczna degradacja cząstek materii organicznej, głównie martwych komórek fitoplanktonu – uwalniane są głównie DCAA, ale też w niewielkim stopniu DFAA [39, 11]; (ii) autoliza, bądź liza wirusowa komórek glonów oraz bakterii, prowadząca do uwalniania białek komórkowych do frakcji DOM [1]; (iii) żerowanie zooplanktonu i pierwotniaków uwalniające DFAA oraz DCAA z komórek bakterii oraz glonów (sloppy feeding) [32], a także rozpuszczanie wytwarzanego przez zooplankton *fecal material* [85]; (iiii) wydzielanie materii organicznej przez fitoplankton (choć proces ten ma zwykle niewielkie znaczenie we wzbogacaniu toni wodnej w DCAA i DFAA, gdyż produkty fotosyntezy wydzielane do środowiska to w przeważającej części węglowodany 60–80%).

3. Skład aminokwasowy DCAA i DFAA

Wyniki badań Simon i Azam [87] nad zespołem bakterii morskich dowodzą, że kwas glutaminowy i asparagina dominują w składzie białek tej grupy mikroorganizmów heterotroficznych. Kwas glutaminowy i asparagina oraz seryna dominują również w białkach wytwarzanych przez morski fitoplankton [25]. Przewaga ilościowa seryny, kwasu glutaminowego i asparaginy w białkach organizmów planktonowych znajduje częściowe odzwierciedlenie w proporcjach aminokwasów wchodzących w skład puli DFAA i DCAA. Keil i Kirchman [55] stwierdzili, że w wodach Morza Sargassowego głównymi składnikami puli DFAA i DCAA były: seryna, glicyna, treonina i asparagina. Coffin [23] badając wody Delaware Estuary wykazał, że w skład rozpuszczonej w nich materii białkowej wchodziły głównie: glicyna, seryna,

kwas glutaminowy, asparagina i alanina. Jørgensen i wsp. [53] wykazali w tej frakcji zwiększoną częstość występowania glicyny, lizyny, seryny i ornityny, zaś Simon i Rosenstock [88] przewagę seryny, glicyny, alaniny i kwasu asparaginowego. Wysokie stężenia wolnych aminokwasów – glicyny i seryny, występujące w wodach naturalnych, tłumaczy zapewne fakt, że aminokwasy te są głównymi produktami fotorespiracji [79]. Istnieją też prace dokumentujące preferencyjne uwalnianie do środowiska tych aminokwasów na skutek żerowania pierwotniaków na bakteriach [2]. Wydaje się istotnym, że pomimo dominacji glicyny oraz seryny w puli DCAA i DFAA żaden ze znanych aminokwasów nie jest preferencyjnie asymilowany przez heterotroficzne bakterie wodne [88].

4. Substancje białkowe jako źródło energii i biogenów dla mikroorganizmów wodnych – labilność biologiczna białek

Białka stanowią ok. 62% suchej masy bakterii wodnych [87]. Charakteryzuje je przy tym szybki metabolizm wewnątrzkomórkowy. W ciągu godziny degradowanych jest, w zależności od fazy wzrostu komórki, od 1% do aż 10% białek występujących w cytoplazmie komórki bakteryjnej [38]. Pozyskiwanie aminokwasów ze środowiska pozwala na znaczne ograniczenie wydatkowania energii na syntezę aminokwasów *de novo*. Ponadto dzięki niskiemu stosunkowi C:N (wynoszącemu 4–5) białka i aminokwasy stanowią dobrze zbilansowane źródło tych pierwiastków dla mikroheterotrofów [76].

DCAA i DFAA. Na istotne znaczenie związków białkowych jako źródła energii, węgla i azotu dla mikroorganizmów wodnych wskazują liczne prace [12, 54, 52]. Wolne, rozpuszczone aminokwasy (DFAA) uznawane są za frakcję „substancji białkowych”, której obieg w środowisku wodnym jest najszybszy. Middelboe i wsp. [72], stosując techniki radioizotopowe i enzymatyczne wykazali, że w wodach Zatoki Delaware DFAA asymilowane są przez bakterie heterotroficzne co najmniej o rząd wielkości szybciej niż DCAA (odpowiednio: od 100 do 300 $\text{nmol l}^{-1}\text{godz}^{-1}$ oraz od 4 do 23 $\text{nmol l}^{-1}\text{h}^{-1}$). Cunningham i Wetzel [26], badając osady denne jeziora Lawernce, stwierdzili zaś, że utylizacja aminokwasów przez zespół mikroheterotrofów jest od 9 do 57 razy wydajniejsza niż białek. Badania modelowe prowadzone z wykorzystaniem hodowli bakteryjnych wykazały ponadto, że DFAA, obok NH_4^+ , stanowi podstawowe źródło N dla bakterii heterotroficznych [54, 52].

W wielu naturalnych środowiskach wodnych dominująca rola DFAA jako źródła N i C jest jednak

* Jezioro Bodeńskie zwane też jeziorem Konstancja (niem. Bodensee, ang. Constanze)

kwestionowana. Dowodzą tego prace których autorzy wykazują, iż to raczej DCAA, a nie DFAA stanowią podstawowe źródło biogenów stymulujących produkcję wtórną bakterioplanktonu, zwłaszcza w wodach oligotroficznym, stosunkowo ubogich w DFAA [23, 59]. Na przykład Keil i Kirchman [55] stwierdzili, że w Morzu Sargassowym DCAA są podstawowymi związkami organicznymi utylizowanymi przez bakterie, pokrywającymi w 25–60% ich zapotrzebowanie na azot. Szacuje się, że w wodach naturalnych DFAA łącznie z DCAA zaspokajają średnio 50% zapotrzebowania bakterii na azot i 25% zapotrzebowania na węgiel [72]. Ze względu na dużą różnorodność ekosystemów wodnych i gatunków zasiedlających je mikroorganizmów wartości te mogą jednakże ulegać znacznym wahaniom. Warto także podkreślić, że DCAA z DFAA pozostają w ścisłym związku. DCAA, degradowane w procesie enzymatycznej hydrolizy, stanowią źródło DFAA, a niskie stężenia DFAA mierzone w toni wodnej mogą być następstwem istnienia tzw. *coupling system* – mechanizmu, dzięki któremu monomery uwolnione z polimeru przez enzymy zewnątrzkomórkowe określonej komórki bakteryjnej są natychmiast przez nią asymilowane [35].

PCAA. Chociaż za najważniejsze źródło biogenów dla heterotroficznym bakterii wodnych uznawana jest DOM (frakcja materii organicznej, do której należą DFAA i DCAA), to znaczenie frakcji białek upostaciowanych (PCAA) jako substratu pokarmowego bakterii jest nie mniej istotne.

Upostaciowana materia organiczna tworzy skupienia – mikro- i makroagregaty (określane również w zależności od miejsca występowania jako „marine snow” lub „lake snow”) o wielkości odpowiednio: 1–500 μm oraz $>500 \mu\text{m}$ [89]. Liczebność makro- i mikroagregatów POM w ekosystemach wodnych jest bardzo różna. W zależności od stopnia eutrofizacji zbiornika i składu gatunkowego bytujących w nim organizmów planktonowych waha się ona od <1 do 10^8 cząstek l^{-1} [89]. Istnieją podstawy by sądzić, że powierzchnię tych cząstek charakteryzuje geometria fraktalna [16]. Implikuje to istnienie w ich obrębie mikroporów, których obecność determinuje przepływ biogenów we wnętrzu cząstki, oraz zwiększa jej powierzchnię sorpcyjną [66]. Duża powierzchnia cząstek „lake snow” oraz „marine snow” ma ogromne znaczenie dla krążenia białek w ekosystemach słodkowodnych i morskich, gdyż białka i glikoproteiny łatwo do niej przywierają, dzięki czemu ich stężenie wewnątrz i na powierzchni biofilmów otaczających POM jest wysokie [13, 64].

Poza białkami, na powierzchniach cząstek zarówno organicznych jak i mineralnych łatwo sorbuje się również niektóre aminokwasy. Armstrong i Barlow

cher [4] wykazali, że zwłaszcza dodatnio naładowana arginina i lizyna, a także pozbawione ładunku polarne aminokwasy takie jak: glicyna, seryna, trenina, glutamina i asparagina przejawiają wysokie powinowactwo do naturalnych powierzchni mineralnych (SiO_2).

Mikroagregaty oraz makroagregaty występują powszechnie w wodach morskich i jeziorowych. Long i Azam [67] w litrze wody morskiej stwierdzili ok. 10^7 takich cząstek o średnicy od kilku do kilkuset μm i łącznej powierzchni 10^3 – 10^4 mm^2 , z którymi związane było ok. 10^7 komórek bakterii. Grosart i Simon [39] odnotowali obecność makroskopowych, sedymentujących cząstek POM w wodach Jeziora Constance i wykazali, że stężenia aminokwasów i białek budujących „lake snow” przekraczają od kilku do kilkudziesięciu razy stężenia DCAA i DFAA mierzone w toni wodnej [40].

Bogate w białka cząstki POM odgrywają ważną rolę w życiu bakterii wodnych. W końcowej fazie zakwitów fitoplanktonu obserwowana jest zwykle zwiększona liczebność bakterii heterotroficznym [93] oraz wysoka aktywność bakteryjnym proteaz [21]. Białka związane z tonącymi cząstkami POM degradowane są na ogół szybciej niż cukrowce, a maksymalna, potencjalna aktywność aminopeptydaz bakterii żyjących na sestonie jest wyższa niż innych, zewnątrzkomórkowych hydrolaz wytwarzanych przez bakterie osiadłe takich jak np. α - czy β -glukozydaz [93, 89]. Na intensywniejszy metabolizm bakterii osiadłych, w porównaniu z bakteriami swobodnie pływającymi, wskazuje również ich większa aktywność oddechowa [40], wyższy współczynnik tempa wzrostu [30] oraz wyższa maksymalna potencjalna aktywność enzymatyczna [9]. Należy jednak podkreślić, że istnieją również prace nie dokumentujące tych różnic [29, 49].

Cząstki POM uczestniczą również w transporcie wertykalnym materii organicznej wytworzonej w strefie fotycznej do głębszych partii zbiornika. Dzięki procesom sorpcji DCAA i DFAA na tonących cząstkach sestonu nawet rozpuszczona materia białkowa może być transferowana z warstwy powierzchniowej do profundalu.

O znaczeniu białek jako źródła biogenów dla mikroheterotrofów niejednokrotnie przesądza nie tylko ich stężenie w środowisku, lecz również ich biologiczna dostępność. Chociaż skład chemiczny puli materii organicznej w różnorodnym ekosystemach wodnych jest stosunkowo dobrze poznany [33], to niewiele wiadomo o labilności biologicznej jej poszczególnych komponentów. Uważa się, że zaledwie ok. 15–20% DOM występującej w wodach naturalnych podlega łatwej degradacji przez mikroorganizmy heterotroficzne. Frakcja ulegająca mikrobiologicznej biotransformacji w stosunkowo krótkim (od kilku minut do kilku dni) czasie, określana jest mianem frakcji labilnej [27].

W literaturze światowej brak jest publikacji opisujących wyczerpująco udział białek labilnych w całkowitej puli DCAA i PCAA obecnych w naturalnych ekosystemach wodnych. Wynika to zapewne z ograniczeń metod powszechnie wykorzystywanych do oceny aktywności proteaz zewnątrzkomórkowych. Większość tych metod opiera się bowiem na analizie tempa hydrolizy oczyszczonych białek modelowych (np. ^{14}C -metylowanego BSA, [44]), pomiarach szybkości hydrolizy białek naturalnie występujących w wodach przez preparaty enzymatyczne np. pronazę E [77], lub na określeniu maksymalnej, potencjalnej aktywności enzymów proteolitycznych (V_{\max}) wobec „sztucznych” substratów fluoroforowych [46]. Ograniczenia tych metod praktycznie uniemożliwiają jednoznaczne określenie udziału białek labilnych w całkowitej puli białek obecnych w środowisku. Znane są jednakże liczne mechanizmy prowadzące do ochrony białek występujących w środowiskach wodnych przed biodegradacją. Najważniejsze z nich to: (i) glikozylacja białek [55]; (ii) wiązanie DCAA i DFAA przez substancje humusowe, bądź ich adsorpcja na cząstkach sestonu [47]; (iii) adsorpcja białek wewnątrz mezoporów (porów o średnicy od 2–50 nm) występujących w tonących cząstkach POM i ich deponowanie w beztlenowych osadach dennych [70]; (iiii) osadzenie białek w strukturach błon komórkowych, lub ich zamknięcie wewnątrz liposomów, powstających spontanicznie z fragmentów błon komórkowych, uniemożliwiające ich bezpośredni kontakt z enzymami proteolitycznymi [77]; (iiiii) fotochemiczna modyfikacja białek [42].

5. Proteazy w ekosystemach wodnych

Dostępność białek dla mikroheterotrofów wodnych zależy w dużej mierze do funkcjonowania sprawnego systemu zewnątrzkomórkowych proteaz. Wytwarzanie przez heterotroficzne bakterie wodne szeregu enzymów hydrolitycznych rozkładających duże polimery organiczne na zewnątrz komórki umożliwia im efektywną eksploatację zasobów pokarmowych. Drobnoustroje, w tym bakterie Gram-ujemne, przeważające ilościowo w środowiskach wodnych, jako typowe osmoorganotrofy są zdolne do asymilacji jedynie rozpuszczonej materii organicznej o niskiej masie cząsteczkowej [22]. Wynika to m.in. z geometrii białek porynowych usytuowanych w ich błonie zewnętrznej. Białka te pozwalają na swobodne przenikanie do przestrzeni peryplazmatycznej tylko tych związków, których masa cząsteczkowa nie przekracza 600 Da [99], np. oligopeptydów zbudowanych z 4–6 aminokwasów [81].

Struktura i funkcja enzymów hydrolitycznych mikroorganizmów, jak i czynniki kontrolujące ich ekspresję od dawna budzą zainteresowanie badaczy [84].

Pomimo, że część opracowań dotyczy charakterystyki biochemicznej specyficznych enzymów wytwarzanych przez mikroorganizmy wodne [3], to wciąż stosunkowo niewiele wiadomo o strukturze, mechanizmie działania, regulacji ekspresji, inhibicji i aktywacji na ogół słabo specyficznych enzymów proteolitycznych wytwarzanych przez heterotroficzne bakterie morskie i słodkowodne.

Proteazy wytwarzane przez bakterie klasyfikowane są zwykle na podstawie trzech kryteriów:

I. Charakterystyki miejsca aktywnego.

Wiele różnic funkcjonalnych występuje np. pomiędzy proteazą serynową, cysteinową i metaloproteazami. Każda z tych grup zawiera enzymy o różnej wielkości i strukturze cząsteczek oraz odmiennych właściwościach katalitycznych [5, 84].

II. Miejsca cięcia przez enzym cząstki polimeru.

Na podstawie tego kryterium proteazy dzieli się na endo-proteazy przecinające wewnętrzne wiązania peptydowe i egzo-proteazy odcinające C i N terminalne aminokwasy.

III. Lokalizacji względem komórki wytwarzającego je mikroorganizmu.

Wyróżnia się tu zwykle proteazy zewnątrzkomórkowe (wolne, rozpuszczone w wodzie bądź zaadsorbowane na cząstkach nie będących komórkami mikroorganizmów, które je wytworzyły), ekto-proteazy – enzymy pozostające w związku ze ścianą komórkową, powierzchnią błony cytoplazmatycznej, bądź przestrzenią peryplazmatyczną, oraz funkcjonujące w cytoplazmie proteazy wewnątrzkomórkowe [22].

Podział na enzymy zewnątrzkomórkowe i ekto-enzymy wydaje się nie w pełni uzasadniony. Frakcję enzymów zewnątrzkomórkowych może bowiem tworzyć grupa ektoenzymów uwolnionych przypadkowo ze struktur osłon komórkowych na skutek takich procesów, jak żerowanie bakteriożerców czy liza wirusowa [97, 86]. Ektoenzymy i enzymy wolne mogą mieć zatem zarówno identyczne pochodzenie, jak również podobną funkcję. Dlatego też część autorów (np. Arnosti [5]) wyróżnia jedynie dwie grupy enzymów: – wewnątrzkomórkowe (IE – intracellular enzymes) oraz zewnątrzkomórkowe (EE – extracellular enzymes). Zgodnie z tą klasyfikacją grupę enzymów zewnątrzkomórkowych tworzyłyby ektoenzymy oraz enzymy wolne, nie związane z komórkami mikroorganizmów, które je wytworzyły.

Najliczniejszą i najważniejszą grupą producentów zewnątrzkomórkowych enzymów proteolitycznych w środowiskach wodnych są bakterie heterotroficzne [22]. Chociaż zewnątrzkomórkowe proteazy wytwarza od 80 do 100% gatunków mikroheterotrofów żyjących w wodach jeziornych i morskich [69], to wciąż niewiele wiadomo na temat różnic w aktywności specyficznej

proteaz (aktywności proteolitycznej/komórke) pomiędzy poszczególnymi rodzajami czy gatunkami bakterii. Na ich występowanie wskazują wyniki badań nad mikrobiologiczną bioróżnorodnością wielu środowisk wodnych. Na przykład Cottrell i Kirchman [24] wykazali istnienie różnic w szybkości hydrolizy białek przez 3 klasy bakterii: α , β , γ – *Proteobacteria* oraz grupę *Cytophaga-flavobacter*. Najwyższa aktywność proteolityczna charakteryzowała grupę *Cytophaga-flavobacter*, najniższa zaś α -*Proteobacteria*, które ponadto wydajniej wykorzystywały wolne aminokwasy niż białka.

Poza bakteriami heterotroficznymi również inne organizmy planktonowe zasiedlające środowiska słone i słodkowodne zdolne są do degradacji białek i asymilacji aminokwasów. Istnieją doniesienia potwierdzające wytwarzanie zewnątrzkomórkowych enzymów proteolitycznych przez cyjanobakterie. I tak np. Martin i Azam [68] stwierdzili, że morskie pikocyjanobakterie z rodzaju *Synechococcus* syntetyzują konstytutywną, zewnątrzkomórkową aminopeptydazę uczestniczącą w pozyskiwaniu azotu białkowego w sytuacji niedoboru mineralnych form tego pierwiastka w środowisku. Z drugiej strony w przypadku *Oscillatoria rubescens* zaobserwowano, że z wyjątkiem argininy wolne aminokwasy nie stymulowały jej wzrostu ponad poziom obserwowany w kontroli bez źródła azotu, zaś część aminokwasów była nawet dla tej cyjanobakterii toksyczna [59]. Biorąc pod uwagę fakt, że poza okresami intensywnej zakwitów, liczebność cyjanobakterii jest w strefie fotycznej na ogół o 3–4 rzędy wielkości mniejsza od liczebności bakterii heterotroficznych, można sądzić, że ich aktywność proteolityczna stanowi prawdopodobnie tylko niewielki procent całkowitej aktywności zewnątrzkomórkowych proteaz w wodach naturalnych.

Azot pochodzenia białkowego potrafią utylizować również niektóre gatunki glonów [65, 80]. Jednakże nie wykazują one zwykle aktywności proteolitycznej i pozyskują azot wyłącznie z wolnych aminokwasów dzięki aktywności zewnątrzkomórkowej aminooksydazy. Enzym ten katalizuje reakcję prowadzącą do uwolnienia z aminokwasów jonów NH_4^+ , transportowanych następnie do wnętrza komórki [10].

Istnieją również nieliczne prace dotyczące sekrecji enzymów hydrolitycznych przez występujące w środowiskach wodnych grzyby [83]. Jak się wydaje, większość grzybów izolowanych z wód naturalnych to jednakże gatunki allochtoniczne. Docierają one do rzek i jezior wraz ze spływami po obfitych deszczach, w postaci zarodników przenoszonych przez wiatr, bądź też na powierzchni opadających do wody liści [28]. Znaczenie proteaz grzybowych w środowiskach wodnych jest prawdopodobnie niewielkie. Tym niemniej zwłaszcza w strefie litoralnej jezior grzyby mogą

odgrywać istotną rolę w degradacji upostaciowanej, niebiałkowej, allochtonicznej materii organicznej. Przykład stanowią tu grzyby z rodzaju *Hypomyces* uczestniczące w mikrobiologicznej biodegradacji liści [7].

6. Charakterystyka aminopeptydazy – wzorcowego enzymu w badaniach aktywności proteolitycznej wodnych bakterii heterotroficznych

Wiedza dotycząca molekularnej charakterystyki proteaz zewnątrzkomórkowych wytwarzanych przez mikroorganizmy wodne jest ciągle niewystarczająca. Wyjątek stanowi tu jedynie L-leucyno-aminopeptydaza, która jest w chwili obecnej najlepiej poznanym i scharakteryzowanym enzymem proteolitycznym powszechnie wytwarzanym przez heterotroficzne bakterie wodne [69]. Intensywne badania tego enzymu zapoczątkowało wprowadzenie do rutynowych analiz sztucznie skonstruowanych substratów enzymatycznych opartych na foto- oraz fluorochromach [46]. Substraty te stały się szybko podstawowym narzędziem badawczym, wykorzystywanym w pomiarach aktywności enzymów w środowiskach naturalnych. Aktywność L-leucyno-aminopeptydazy traktowano przy tym często jako miarę ogólnej aktywności wszystkich proteaz zewnątrzkomórkowych występujących w badanych próbkach.

Budowa aminopeptydaz. Aminopeptydazy (EC 3.4.11, wg International Union of Biochemistry and Molecular Biology) należą do grupy egzoenzymów katalizujących hydrolizę wiązania peptydowego od N-terminalnego końca białek i peptydów. O ile aminopeptydazy wewnątrzkomórkowe są cząsteczkami białkowymi zbudowanymi często z 2, 4, 6 lub 8 podjednostek, to prawie wszystkie poznane dotąd aminopeptydazy zewnątrzkomórkowe są enzymami monomerycznymi. Masa cząsteczkowa zewnątrzkomórkowych L-leucyno-aminopeptydaz jest na ogół niewielka i wynosi od 20 do 30 kDa. Nieco wyższą masę cząsteczkową (odpowiednio 70 i 53 kDa) mają zewnątrzkomórkowe aminopeptydazy argininowe i prolinowe [50].

Ze względu na mechanizm działania oraz strukturę części aktywnej, bakteryjne aminopeptydazy podzielić można na trzy podstawowe grupy – metaloaminopeptydazy, aminopeptydazy cysteinowe i serynowe. Metaloaminopeptydazy stanowią grupę najliczniejszą, do której zaklasyfikowano ponad 60% wszystkich znanych aminopeptydaz. Na ogromne znaczenie metaloproteaz w środowiskach wodnych wskazują m.in. badania dowodzące, iż EDTA – związek chelatujący dwuwartościowe kationy metali, w znacznym stopniu bądź całkowicie hamuje aktywność proteolityczną w wodach naturalnych [34, 43].

Mechanizm reakcji katalizy z udziałem metalopeptydaz nie został całkowicie wyjaśniony. Zakłada się, że jon metalu zwiększa reaktywność przyłączonej cząsteczki wody, ułatwiając przecięcie wiązania peptydowego oraz stabilizując reakcję [45]. Stwierdzono, że w miejscu aktywnym większości metalo-aminopeptydaz występują jony Zn^{2+} . Obecność tego jonu wykazano m.in. w bakteryjnej zewnątrzkomórkowej L-leucyno-aminopeptydazie [45]. Do funkcjonowania pozostałych aminopeptydaz niezbędne są jony Co^{2+} lub Mn^{2+} oraz Mg^{2+} [61]. Interesujący wydaje się opisany przez Bayliss i Prescott [8] fakt, że L-leucyno-aminopeptydaza wytwarzana przez *Vibrio proteolyticus* wykazuje odmienną specyficzność wobec odcinanych aminokwasów w zależności od rodzaju kationu metalu aktywującego reakcję (Zn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} lub Ni^{2+}).

W przypadku bakterii gram (–) aminopeptydazy zewnątrzkomórkowe, zlokalizowane są w przestrzeni peryplazmatycznej lub związane z błoną zewnętrzną bakterii [50]. W przypadku bakterii gram (+) najczęściej pozostają one zakotwiczone w ścianie komórkowej [62]. Ciekawym jest, że poza nielicznymi wyjątkami – np. aminopeptydazą *Pseudomonas aeruginosa* [14] praktycznie nieznanymi są aminopeptydazy wolne, nie związane z komórkami syntetyzujących je bakterii.

7. Regulacja aktywności proteaz zewnątrzkomórkowych

Mechanizmy kontrolujące ekspresję genów kodujących zewnątrzkomórkowe proteazy, ich syntezę oraz dojrzewanie, stanowią pierwszy poziom regulacji ich aktywności w środowisku. Na aktywność już wytworzonych proteaz zewnątrzkomórkowych wpływa z kolei szereg czynników środowiskowych takich jak: temperatura, pH, obecność aktywatorów i inhibitorów, stężenie substratów i produktu, tempo ich enzymatycznej degradacji przez inne proteazy czy zjawiska sorpcji/desorpcji na powierzchniach cząstek sestonu.

Regulacja ekspresji genów kodujących aminopeptydazę. Regulacja ekspresji genów kodujących aminopeptydazy nie została w pełni poznana. Zachodzi ona głównie na poziomie transkrypcji. Większość genów kodujących aminopeptydazy ma charakter monocistronowy i zawiera promotor charakterystyczny dla genów transkrybowanych przez polimerazę RNA związaną z czynnikiem s_{70} [50]. Synteza aminopeptydaz ma charakter zarówno konstytutywny jak i indukowany. Choi i wsp. [18] wykazali, że podłoże zawierające kazeinę indukuje syntezę zewnątrzkomórkowych aminopeptydaz *L. casei*, podczas gdy podłoże zawierające glukozę nie. W obydwu przy-

padkach stwierdzono jednak stałą aktywność aminopeptydaz konstytutywnych. Z kolei w przypadku aminopeptydazy N z *E. coli* (metaloaminopeptydazy Zn^{2+}) poziom ekspresji genu odpowiedzialnego za syntezę tego enzymu zwiększał się w warunkach niedoboru fosforu i tlenu, podczas gdy deficyt C i N nie powodował takiej reakcji [37]. Istnieją również doniesienia, że represja syntezy aminopeptydaz ma miejsce przy wysokim stężeniu rozpuszczonych aminokwasów takich jak histydyna i fenyloalanina [19].

Wpływ parametrów fizyko-chemicznych środowiska na aktywność aminopeptydaz zewnątrzkomórkowych. Optymalna temperatura dla działania zewnątrzkomórkowej leucyno-aminopeptydazy wytwarzanej przez bakterie jeziorne wynosi ok. 20°C. Poniżej 15°C i powyżej 26°C maksymalna aktywność potencjalna tego enzymu (V_{max}) spada poniżej 60%. W przypadku endoproteaz nie zaobserwowano tak ścisłej zależności, choć optimum temperaturowe tej grupy enzymów wynosiło również 20°C [41]. Podobne wyniki (optimum temperaturowe – 19°C) uzyskali Huston i wsp. [48] w odniesieniu do aminopeptydazy wytwarzanej przez morską psychrofilną bakterię *Colwellia psychreerythraea* (szczep 34H).

Powierzchniowa warstwa wód większości jezior charakteryzuje się odczynem lekko alkalicznym (pH 7,2–8,5). W zakresie tym mieści się również pH optymalne dla aminopeptydazy, które wynosi ok. 7,5 [41, 73]. Hoffman i Decho [43] wykazali jednak, że np. zewnątrzkomórkowe proteazy izolowane z morskiej bakterii *Pseudoalteromonas atlantica* wykazują znaczną tolerancję wobec wahań pH w środowisku (od 4,4 do 10,5). Tak duży zakres tolerancji stanowić może rodzaj przystosowania enzymów proteolitycznych do alkalizacji wody będącej efektem dużej aktywności fotosyntetycznej fitoplanktonu [51] bądź do możliwych, np. w obrębie biofilmu otaczającego cząstkę sestonu, spadków pH, w następstwie intensywnej respiracji heterotroficznych bakterii osiadłych.

Na tempo enzymatycznej hydrolizy substratów białkowych wpływają również obecne w wodzie związki o charakterze inhibitorów lub/i aktywatorów reakcji enzymatycznych. Wydaje się, że potencjalnymi inhibitorami enzymów proteolitycznych mogą być produkty (aminokwasy) a także naturalne substraty (białka) uczestniczące w reakcji proteolizy. Efekt kompetycyjnej inhibicji proteaz przez aminokwasy i krótkie peptydy występuje jednak dopiero przy ich stężeniach, rzędu 200–300 μM [94]. Zatem inhibicja proteaz zewnątrzkomórkowych przez produkt nie ma w wodach naturalnych większego znaczenia, bowiem stężenia rozpuszczonych aminokwasów wahają się w nich zwykle od kilku do kilkuset $nmol\ l^{-1}$ (Tab. I). Znacznie

większy, hamujący wpływ na aktywność tych enzymów mają prawdopodobnie białka rozpuszczone w wodzie. Już przy stosunkowo niewielkich stężeniach albuminy (rzędu 50–500 µg/l) obserwowano kompetycyjne i niekompetycyjne hamowanie zarówno aktywności aminopeptydazy, jak i endopeptydaz [44, 94, 41].

Na tempo proteolizy, katalizowanej przez zewnątrzkomórkowe proteazy wpływa również obecność w środowisku jonów metali ciężkich, uszkadzających strukturę aktywnej domeny enzymów [36]. *V i v e s - R e g o* i wsp. [98] wykazali znaczny spadek aktywności zewnątrzkomórkowych proteaz w obecności jonów: Cd^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} oraz Cr^{3+} .

Spadek aktywności katalitycznej proteaz w naturalnych środowiskach wodnych powoduje również często adsorpcja na substancjach humusowych, prowadząca do zmiany konformacji tych enzymów [74]. Z drugiej jednak strony w wodach o dużej zawartości substancji humusowych obserwuje się niejednokrotnie wysoką aktywność proteaz, będącą następstwem dużej liczebności i aktywności metabolicznej bakterii osiadłych [15, 75]. Wydaje się, że obecność zawiesin i substancji humusowych w środowisku może z jednej strony skutkować wzrostem liczebności bakterii powodującym wzmożenie tempa syntezy proteaz, z drugiej zaś wzmożoną inhibicją już wytworzonych enzymów.

8. Metody pomiaru aktywności zewnątrzkomórkowych enzymów proteolitycznych

Rozwój badań nad degradacją białek w wodach naturalnych, jaki nastąpił w ciągu ostatnich dwudziestu lat stał się możliwy dzięki opracowaniu czulej metodyki umożliwiającej szybki pomiar aktywności zewnątrzkomórkowych enzymów proteolitycznych. Stosowane obecnie metody mierzą jednak najczęściej potencjalną aktywność maksymalną enzymów (V_{max}) wobec sztucznych, specjalnie skonstruowanych substratów fluoroforowych dodawanych do badanych próbek wody. W przypadku proteaz powszechnie wykorzystywanym sztucznym substratem jest L-leucyno-4-metylo-kumarynylamid (L-leucine-methyl-coumarinylamide – LMCA). Po enzymatycznej hydrolizie wiązania peptydowego występującego pomiędzy leucyną a rodniem fluoroforowym z nieaktywnego fluorescencyjnie LMCA, powstaje produkt o właściwościach fluorescencyjnych – metylo-kumarynylamid (methylcoumarinylamide – MCA). Przyrost fluorescencji podczas inkubacji próbki jest proporcjonalny do przyrostu ilości produktu, co umożliwia określenie tempa hydrolizy substratu [46, 94]. Szybkość hydrolizy LMCA [v] katalizowanej przez Leucyno-aminopeptydazę zmienia się wraz ze stężeniem substratu [S]. Zależność tą opisuje równanie funkcji Michaelisa-Menten:

$$[v] = V_{max} * [S] / (K_m + [S]),$$

gdzie V_{max} – jest potencjalnie maksymalną szybkością reakcji przy całkowitym wysyceniu enzymu(ów) substratem (w danych warunkach pomiarowych), a K_m (stała, substratowa, stała Michaelisa) – wyznacza takie stężenie substratu przy którym $[v] = V_{max}/2$.

Metody fluorescencyjne oparte na hydrolizie prostego analogu substratów naturalnych są metodami pośrednimi. Choć pozwalają one na szybkie porównanie potencjału enzymatycznego w różnorodnych środowiskach, to obciążone są jednak licznymi, opisanymi poniżej ograniczeniami.

I. Budowa chemiczna prostego „sztucznego” substratu LMCA nie odzwierciedla skomplikowanej trójwymiarowej struktury wielkocząsteczkowych polimerów organicznych, jakimi są białka. Powinowactwo naturalnych proteaz do LMCA może być inne niż do większości białek naturalnych. I tak np. *Feller* i wsp. [31] wykazali, że parametry kinetyczne (V_{max} i K_m) izolowanych enzymów, określone na podstawie sztucznych substratów, różnią się od wyliczanych dla reakcji hydrolizy substratów naturalnych.

II. Pomiar tempa degradacji LMCA pozwala na określenie aktywności zaledwie jednego, konkretnego enzymu (L-leucyno-aminopeptydazy) z licznej grupy egzo- i endoproteaz wytwarzanych przez mikroorganizmy wodne. Pozostaje wątpliwym, czy wyniki uzyskane za pośrednictwem pomiaru aktywności jednego z enzymów mogą być ekstrapolowane na aktywność całej puli proteaz zewnątrzkomórkowych obecnych w środowisku.

III. Pomiar tempa degradacji LMCA – substratu stosunkowo prostego, łatwo degradowanego enzymatycznie, nie uwzględnia różnic w labilności poszczególnych komponentów puli naturalnej materii białkowej. Z tego względu otrzymane wyniki raczej nie nadają się do ilościowego opisu enzymatycznej biotransformacji materii białkowej w wodach, a umożliwiają jedynie określenie potencjalnego tempa jej obrotu.

IV. Tempo degradacji rozpuszczonego LMCA może nieprecyzyjnie odzwierciedlać nawet aktywność potencjalną aminopeptydazy, w przypadku enzymów ułożonych w matrix biofilmów otaczających cząstki materii organicznej, gdyż penetracja tego substratu do głębszych warstw biofilmu jest utrudniona.

V. Zjawisko konkurencji LMCA z substratami naturalnymi, których stężenia nie są znane, wpływa na wartość K_m – miarę powinowactwa enzymu do LMCA. W tym wypadku K_m w rzeczywistości zależy nie tylko od stężenia dodanego LMCA, ale również od stężeń substratów naturalnych występujących w wodzie.

Zastrzeżenia te każą traktować wyniki pomiarów aktywności enzymów proteolitycznych za pomocą

sztucznych, modelowych substratów z dużą ostrożnością. Wyniki te świadczą bowiem jedynie o potencjale proteolitycznym enzymów zewnątrzkomórkowych mikroheterotrofów, a nie o rzeczywistej aktywności proteaz w środowiskach naturalnych.

Rozwiązaniem problemów wynikających ze stosowania do pomiaru aktywności proteaz prostych substratów modelowych może być zastąpienie ich różnorodnymi białkami znakowanymi węglem ^{14}C . Tego typu podejście metodyczne, zaproponowane przez Hollibough i Azam już w 1983 r. [44], umożliwia pomiar aktywności całego zespołu egzo- i endoproteaz zewnątrzkomórkowych obecnych w badanej próbce wody. Jednakże i przy tym podejściu metodycznym substrat (np. ^{14}C albumina) dodawany jest z zewnątrz i szybkość jego hydrolizy również nie odzwierciedla rzeczywistego tempa degradacji białek naturalnych, w różnym stopniu chronionych przed hydrolizą enzymatyczną. Pomiar aktywności proteaz metodami radioizotopowymi utrudnia ponadto fakt, że na tempo degradacji znakowanych białek dodawanych do badanych próbek wody wpływać może ich skład aminokwasowy oraz wielkość.

Inne metody np. kombinacje technik chromatograficznych i spektroskopii rezonansu magnetycznego umożliwiają śledzenie zmian wielkości makromolekuł oraz rodzaju wiązań chemicznych w nich występujących, i na tej podstawie bezpośrednio określenie tempa hydrolizy polimerów naturalnie występujących w próbkach wody [6]. Ze względu na wysoki koszt i duży stopień skomplikowania metody te nie są jednak powszechnie stosowane w rutynowych badaniach środowiskowych.

Z uwagi na opisane tu ograniczenia konieczny jest dalszy rozwój metodyki umożliwiającej zarówno określenie rzeczywistego tempa degradacji materii białkowej *in situ*, jak również jej biologicznej labilności w środowisku. Pewne rozwiązanie stanowić może podejście metodyczne oparte na idei zaproponowanej przez S i u d ę [90] oraz C h r ó s t a i wsp. [20], zgodnie z którą, jedynie pomiar tempa przyrostu produktu uwalnianego przez cały zespół naturalnych izo/alloenzymów zewnątrzkomórkowych z puli naturalnych substratów występujących w wodach dostarczyć może informacji o rzeczywistej aktywności enzymatycznej bytujących tam mikroorganizmów. Pomiar enzymatycznego tempa uwalniania aminokwasów z białek naturalnych umożliwia oszacowanie puli białek labilnych, rzeczywistego tempa ich degradacji *in situ* oraz czasu ich połowicznej hydrolizy enzymatycznej [56, 92].

9. Podsumowanie

W niniejszej pracy przeglądowej zaprezentowano jedynie podstawowe i stosunkowo dobrze udokumentowane zagadnienia związane z rolą pokarmową białek

dla bakterii wodnych. Wiele kwestii związanych np. z sorpcją i enzymatyczną degradacją białek w matrix biofilmów otaczających cząstki sestonu, potraktowano, z konieczności w dużym uproszczeniu. Szereg zagadnień dotyczących przemian materii białkowej w ekosystemach wodnych wciąż czeka na wyjaśnienie. Stosunkowo niewiele wiadomo np. o: udziale bakterii osiadłych i zjawiskach kolonizacji cząstek POM w procesach degradacji białek, realnym (rzeczywistym) tempie degradacji materii białkowej występującej w ekosystemach wodnych oraz jej labilności biologicznej *in situ*, roli cząstek wirusowych w przemianach substancji białkowych, trwałości proteaz związanych z komórkami martwych organizmów i udziale tych enzymów w procesach degradacji białek czy różnicowaniu preferencji odżywczych różnych gatunków bakterii wodnych. Wydaje się, że bez rozwiązania tych zagadnień pełny opis mechanizmów biotransformacji białek w wodach naturalnych nie jest możliwy.

Piśmiennictwo

1. Agusti S., Satta M.P., Maura M.P., Benavent E.: Dissolved esterase activity as a tracer of phytoplankton lysis: evidence of high phytoplankton lysis rates in the northeastern Mediterranean. *Limnol. Oceanogr.* **43**, 1836–1849 (1998)
2. Andersson A., Lee C., Azam F., Hagström A.: Release of amino acids and nutrients by heterotrophic marine microflagellates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **23**, 99–106 (1985)
3. Araki T., Hashikawa S., Morishita T.: Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of the new gene encoding b-1,3-xylanase from a marine bacterium, *Vibrio* sp. Strain XY-214. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1741–1743 (2000)
4. Armstrong S., Bärlocher F.: Adsorption and release of amino acids from epilithic biofilms in stream. *Freshwater Biol.* **22**, 153–159 (1989)
5. Arnosti C.: Microbial extracellular enzymes and their role in dissolved organic matter cycling (w:) Aquatic ecosystems: Interactivity of dissolved organic matter, Elsevier Science, USA, 2003, s. 315–343
6. Arnosti C., Repeta D.J.: Extracellular enzyme activity in anaerobic bacterial cultures: Evidence of pullulanase activity among mesophilic marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 840–886 (1994)
7. Baldy V., Chauvet E., Charcosset J.Y., Gessner M.O.: Microbial dynamic associated with leaves decomposing in the main-stream and floodplain pond of a large river. *Aquat. Microb. Ecol.* **28**, 25–36 (2002)
8. Bayliss M.E., Prescott J.M.: Modified activity of *Aeromonas* aminopeptidase: metal ion substitution and role of substrates. *Biochemistry*, **25**, 8113–8115 (1986)
9. Becquevort S., Rousseau V., Lancelot C.: Major and comparable roles for free-living and attached bacteria in the degradation of *Phaeocystis*-derived organic matter in Belgian coastal waters of the North Sea. *Aquat. Microb. Ecol.* **14**, 39–48 (1998)
10. Berman T., Bronk A.: Dissolved organic nitrogen: a dynamic participant in aquatic ecosystems. *Aquat. Microb. Ecol.* **31**, 279–305 (2003)

11. Berman T., Viner-Mozzini Y.: Abundance and characteristic of polysaccharide and proteinaceous particles in Lake Kinneret. *Aquat. Microb. Ecol.* **25**, 255–264 (2001)
12. Billen G., Protein degradation in aquatic environments (w:) Microbial enzymes in aquatic environments, red. R. Chróst, Springer-Verlag, New York, 1991, s. 123–141.
13. Bos R., van der Mei H.C., Busscher H.J.: Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions: Its mechanisms and methods of study. *FEMS Microbiol. Rev.* **23**, 179–230 (1999)
14. Cahan R., Axelrad I., Safrin M., Ohman D.E., Kessler E.: A secreted aminopeptidase of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* **276**, 43645–43652 (2001)
15. Carlsson P., Edling H., Bechemin Ch.: Interactions between a marine dinoflagellate (*Alexandrium catenella*) and a bacterial community utilizing riverine humic substances. *Aquat. Microb. Ecol.* **16**, 65–80 (1998)
16. Chen S., Eisma D.: Fractal geometry of *in situ* flocs in estuarine and coastal environments. *Neth. J. Sea Res.* **32**, 173–183 (1995)
17. Chin W., Orellana M., Verdugo P.: Spontaneous assembly of marine dissolved organic matter into polymer gels. *Nature*, **391**, 568–572 (1998)
18. Choi H., Laley L., Amantea G.F., Simard R.E.: Production of aminopeptidase from skim milk whey permeate medium by *Lactobacillus casei* spp. *J. Dairy. Sci.* **79**, 956–963 (1996)
19. Christian R., Karl D. M.: Ektoaminopeptidase specificity and regulation in Antarctic marine pelagic microbial communities. *Aquat. Microb. Ecol.* **15**, 303–310 (1998)
20. Chróst R.J., Siuda W., Albrecht D., Overbeck J.: A method for determining enzymatically hydrolysable phosphate (EHP) in natural waters. *Limnol. Oceanogr.* **31**, 662–667 (1986)
21. Chróst R.J. Münster U., Rai H., Albrecht D., Witzel P.K., Overbeck J.: Photosynthetic production and exoenzymatic degradation of organic matter in the euphotic zone of a eutrophic lake. *J. Plankton Res.* **11**, 223–242 (1989)
22. Chróst R.J., Environmental control of synthesis and activity of aquatic microbial ectoenzymes (w) Microbial enzymes in aquatic environments, red. R. Chróst, Springer-Verlag, New York, 1991, s. 29–59.
23. Coffin R.B.: Bacterial uptake of dissolved free and combined amino acids in estuarine waters. *Limnol. Oceanogr.* **34**, 531–542 (1989)
24. Cottrell M.T., Kirchman D.L.: Natural assemblages of marine proteobacteria and members of the *Cytophaga-Flavobacter* cluster consuming low- and high-molecular-weight dissolved organic matter. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1692–1697 (2000)
25. Cowie G.L., Hedges J.I.: Sources and reactivities of amino acids in a coastal marine environment. *Limnol. Oceanogr.* **37**, 703–724 (1992)
26. Cunningham H.W., Wetzel G.: Kinetic analysis of protein degradation by a freshwater wetland sediment community. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 1963–1967 (1989)
27. Del Giorgio P.A., Davis J.: Patterns in dissolved organic matter lability and consumption across aquatic ecosystems (w:) Aquatic ecosystems: Interactivity of dissolved organic matter, Elsevier Science, USA, 2003, s. 399–424.
28. Dix N.J., Webster J., Fungal ecology, Chapman & Hall, London UK., 1995, roz. 9
29. Ducklow H.W., Kirchman D.L.: Bacterial dynamics and distribution during a spring diatom bloom in the Hudson River plume, *USA J. Plankton. Res.* **5**, 333–355 (1983)
30. Fandino L.B., Riemann L., Steward G.F., Long R.A., Azam F.: Variation in bacterial community structure during a dinoflagellate bloom analyzed by DGGE and 16S rDNA sequencing. *Aquat. Microb. Ecol.* **23**, 119–130 (2001)
31. Feller G., Narinx E., Arpigny J.L., Aittaleb M., Baise E., Genicot S., Gerday C.: Enzymes from psychrophilic organisms. *FEMS Microbiol. Rev.* **18**, 189–202 (1996)
32. Ferrier-Pagés C., Karner M., Rassoulzadegan F.: Release of dissolved amino acids by flagellates and ciliates grazing on bacteria. *Oceanol. Acta*, **21**, 485–494 (1998)
33. Findlay S., Sinsabough R.L.: Unraveling the sources and bioavailability of dissolved organic matter in lotic aquatic ecosystems. *Mar. Fresh. Res.* **50**, 781–790 (1999)
34. Fontigny A., Billen G., Vives-Rego J.: Some kinetic characteristics of exoproteolytic activity in coastal seawater. *Estuar Coast Shelf Sci.* **25**, 127–133 (1987)
35. Fuhrman J.: Close coupling between release and uptake of dissolved free amino acids in seawater studied by an isotope dilution approach. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **37**, 45–52 (1987)
36. Gadd G., Criffiths A.J.: Microorganisms and heavy metal toxicity. *Microbiol. Ecol.* **4**, 303–317 (1978)
37. Gharbi S., Belaich A., Murgier M., Lazdunski A.: Multiple controls exerted on *in vivo* expression of pepN gene in *Escherichia coli*. Studies with pepN-lacZ operon and protein fusion strain. *J. Bacteriol.* **163**, 1191–1195 (1985)
38. Gottesman S. Maurizi M.R.: Regulation by proteolysis: energy-dependent proteases and their targets. *Microbiol. Rev.* **56**, 529–621 (1992)
39. Grossart H.P., Simon M.: Signification of limnetic organic aggregates (lake snow) for the sinking flux of particulate organic matter in a large lake. *Aquat. Microb. Ecol.* **15**, 115–125 (1998a)
40. Grossart H.P., Simon M.: Bacterial colonization and microbial decomposition of limnetic organic aggregates (lake snow). *Aquat. Microb. Ecol.* **15**, 127–140 (1998b)
41. Hałemejko G.Z., Chróst R.J.: Enzymatic hydrolysis of proteinaceous particulate and dissolved material in eutrophic lake. *Arch. Hydrobiol.* **107**, 1–21 (1986)
42. Hedges J.L., Polymerization of humic substances in natural environments (w) (eds) Humic substances and their role in environment, red. F. Frimmel, R.Christman, John Wiley & Sons, New York, 1988, s. 45–58.
43. Hoffman M., Decho A.W.: Proteolytic enzymes in marine bacterium *Pseudoalteromonas atlantica*: post-secretional activation and effects of environmental condition. *Aquat. Microb. Ecol.* **23**, 29–39 (2000)
44. Hollibaugh J.T., Azam F.: Microbial degradation of dissolved proteins in seawater. *Limnol. Oceanogr.* **28**, 1104–1116 (1983)
45. Holtz R.C.: The aminopeptidase from *Aeromonas proteolytic*: structure and mechanism cocatalytic metal centers involved in peptide hydrolysis. *Coordination Chem. Rev.* **232**, 5–26 (2002)
46. Hoppe H.G.: Significance of exoenzymatic activities in the ecology of brackish water: Measurements by means of methylumbelliferyl-substrates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **11**, 299–308 (1983)
47. Hubberten U., Lara R.J., Kattner G.: Amino acids composition of seawater and dissolved humic substances in the Greenland Sea. *Mar. Chem.* **45**, 121–128 (1994)
48. Huston A.L., Methe B., Deming J.: Purification, characterization, and sequencing of an extracellular cold-active aminopeptidase produced by marine Psychrophile *Colwellia psychrerythrae* Strain 34H. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 3321–3328 (2004)

49. Iriberry J., Unanue M., Ayo B., Barcina I., Egea L.: Bacterial production and growth rate estimation from [³H]Thymidine incorporation for attached and free-living bacteria in aquatic systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 483–487 (1990)
50. Jankiewicz U., Bielawski W.: The properties and function of bacterial aminopeptidase. *Acta Microb. Polon.* **52**, 217–231 (2003)
51. Jones J.L., Eaton J.W., Hardwick K.: The influence of periphyton on boundary layer condition: a pH microelectrode investigation. *Aquat. Bot.* **67**, 191–206 (2000)
52. Jörgensen N.O.G., Kroer N., Coffin R.B., Yang X.H., Lee C.: Dissolved free amino acids, combine amino acids, and DNA as source of carbon and nitrogen to marine bacteria. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **98**, 135–148 (1993)
53. Jörgensen N.O.G., Kroer N., Coffin R.B.: Utilization of dissolved nitrogen by heterotrophic bacterioplankton: effect of substrate C/N ratio. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 4124–4133 (1994)
54. Keil R.G., Kirchman D.L.: Dissolved combined amino acids: chemical form and utilization by marine bacteria. *Limnol. Oceanogr.* **38**, 1256–1270 (1993)
55. Keil R.G., Kirchman D.L.: Utilization of dissolved protein and amino acids in the northern Sargasso Sea. *Aquat. Microb. Ecol.* **18**, 293–300 (1999)
56. Kiersztyn B.: Enzymatyczny rozkład substancji białkowych w jeziorach o różnym stopniu eutrofizacji – próba opisu, implikacje ekologiczne. Rozprawa doktorska, Uniwersytet Warszawski, Warszawa 2005
57. Koike I.S., Hara K., Terauchi K., Kogure K.: Role of submicrometer particles in the ocean. *Nature*, **345**, 242–244 (1990)
58. Kroer N., Jorgensen N.O.G., Coffin R.B.: Utilization of dissolved nitrogen by heterotrophic bacterioplankton: a cross-ecosystem comparison. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 4116–4123 (1994)
59. Krupka H.M., Feuillade M.: Amino acids as a nitrogen source for growth of *Oscillatoria rubescens*. *Arch. Hydrobiol.* **112**, 125–142 (1988)
60. Lee C., Bada J.L.: Dissolved amino acids in the equatorial Pacific, the Sargasso Sea and Biscayne Bay. *Limnol. Oceanogr.* **22**, 502–510 (1977)
61. Lee G.D., Chung S.S., Kho Y.H., Chun H.K.: Purification and properties of an extracellular leucine aminopeptidase from the *Bacillus* sp. N2. *J. App. Microbiol.* **84**, 561–566 (1998)
62. Linder L.E., Lonnie H., Sund M.L.: Analysis of sodium dodecyl sulfate-stable cell wall aminopeptidases in strain of viridans streptococci. *FEMS Microbiol. Lett.* **143**, 19–23 (1996)
63. Lindroth P., Mopper K.: High performance liquid chromatographic determination of subpicomol amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with o-phthalaldehyde. *Anal. Chem.* **51**, 1667–1674 (1978)
64. Little B.: Factors influencing the adsorption of dissolved organic matter from natural waters. *J. Colloid Interface Sci.* **108**, 331–340 (1985)
65. Liu M.S., Hellebust J.A.: Uptake of amino acids by the marine centric diatom *Cyclotella cryptica*. *Can. J. Microbiol.* **20**, 1109–1118 (1974)
66. Logan B.E., Alldredge A.L.: Potential for increased nutrient uptake by flocculating diatoms. *Mar. Biol.* **101**, 443–450 (1989)
67. Long R., Azam F.: Abundant protein-containing particles in the sea. *Aquat. Microb. Ecol.* **10**, 213–221 (1996)
68. Martinez J., Azam F.: Aminopeptidase activity in marine *Chroococcoid Cyanobacteria*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 3701–3707 (1993)
69. Martinez J., Smith D.C., Steward G.F., Azam F.: Variability in ectohydrolytic enzyme activities of pelagic marine bacteria and its significance for substrate processing in the sea. *Aquat. Microb. Ecol.* **10**, 223–352 (1996)
70. Mayer L.M.: Surface area control of organic carbon accumulation in continental shelf sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **54**, 1271–1284 (1994)
71. McKnight, D.M., Aiken G.R., Sources and age of aquatic humus (w) Aquatic humic substances, red. D.O. Hessen I. Tranvik, Springer-Verlag, Berlin, 1998, s. 9–40.
72. Middelboe M., Borch N.H., Kirchman D.L.: Bacterial utilization of dissolved free amino acids, dissolved combined amino acids and ammonium in the Delaware Bay estuary: effects of carbon and nitrogen limitation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **128**, 109–120 (1995)
73. Münster U., Extracellular enzyme activity in eutrophic and polyhumic lakes (w) Microbial enzymes in aquatic environments, red. R. Chróst, Springer-Verlag, New York, 1991, s. 96–122.
74. Münster U., de Haan H.: The role of microbial extracellular enzymes in the transformation of dissolved organic matter in humic waters (w) Aquatic humic substances, red. D.O. Hessen I. Tranvik, Springer-Verlag, Berlin, 1998, s. 199–257.
75. Münster U., Einio P., Nurminen J., Overbeck J.: Extracellular enzymes in a polyhumic lake: important regulators in detritus processing. *Hydrobiologia*, **229**, 225–238 (1992)
76. Nagata T.: Carbon and nitrogen content of natural planktonic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**, 28–32 (1986)
77. Nagata T., Fukuda R., Koike I., Kogure K., Kirchman D.L.: Degradation of membrane and soluble protein in seawater. *Aquat. Microb. Ecol.* **14**, 29–37 (1998)
78. Nagata T., Kirchman D.L.: Bacterial degradation of proteins adsorbed to model submicron particles in seawater. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **132**, 214–248 (1996)
79. Ogren W.L., Chollet R., Photorespiration (w) Photosynthesis: development, carbon metabolism, and plant productivity, red. A. Govindjee, Academic Press, New York, 1982, s. 92–230.
80. Palenik B., Morel F.M.M.: Amino acid utilization by marine phytoplankton: A novel mechanism. *Limnol. Oceanogr.* **35**, 260–269 (1990)
81. Payne J.W.: Transport and utilization of peptides by bacteria (w:) Microorganisms and nitrogen sources, red. J.W. Payne, John Wiley and Sons, Chichester, 1980, s. 212–256.
82. Poutanen E.L., Morris R.J.: Comparison of the structure of humic acids from marine sediments and degraded field diatoms by ¹³C- and ¹H-NMR spectroscopy. *Mar. Chem.* **17**, 115–126 (1985)
83. Raghukumar C., Raghukumar S.: Barotolerance of fungi isolated from deep-sea sediments of the Indian Ocean. *Aquat. Microb. Ecol.* **15**, 153–163 (1998)
84. Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Deshpande V.V.: Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microb. Mol. Biol. Rev.* **62**, 597–635 (1998)
85. Rosenstock B. Simon M.: Sources and sinks of dissolved free amino acids and protein in large and deep mesotrophic lake. *Limnol. Oceanogr.* **46**., 644–654 (2001)
86. Shibata A., Kogure K., Koike I., Ohwada K.: Formation of submicron colloidal particles from marine bacteria by viral infection. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **155**, 303–307 (1997)

87. Simon M., Azam F.: Protein content and protein synthesis rates of planktonic marine bacteria. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **52**, 201–213 (1989)
88. Simon M., Rosenstock B.: Carbon and nitrogen sources of planktonic bacteria in Lake Constance studied by the composition and isotope dilution of intracellular amino acids. *Limnol. Oceanogr.* **37**, 1496–1511 (1992)
89. Simon M., Grossart H.P., Schweitzer B., Ploug H.: Microbial ecology of organic aggregates in aquatic ecosystems. *Aquat. Microb. Ecol.* **28**, 175–211 (2002)
90. Siuda W. Rola i znaczenie fosfataz w mineralizacji organicznych połączeń fosforu w jeziorze eutroficznym. Rozprawa doktorska, Uniwersytet Warszawski, Warszawa 1985
91. Siuda W., Chróst R.J.: Decomposition and utilization of particulate organic matter by bacteria in lakes of different trophic status. *Pol. J. Environ. Studies*, **11**, 367–373 (2002)
92. Siuda W., Kiersztyn B., Chróst R.J. The dynamics of protein decomposition in lakes of different trophic status-reflections on the assessment of the real proteolytic activity *in situ*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **17**, 897–904 (2007)
93. Smith D.C., Steward G.F., Long R.A., Azam F.: Bacterial mediation of carbon fluxes during a diatom bloom in a mesocosm. *Deep-Sea Res.* **42**, 75–97 (1995)
94. Somville M., Billen G.: A method for determining exoproteolytic activity in natural waters. *Limnol. Oceanogr.* **28**, 190–193 (1983)
95. Stepanauskas R.: Utilization of terrestrially derived organic nitrogen by aquatic bacteria. Ph D Dissertation, Lund University, Sweden, 2000, s. 5–23.
96. Tranvik L.J.: Effect of colloidal organic matter on the growth of bacteria and protists in lake water. *Limnol. Oceanogr.* **39**, 1276–1285 (1994)
97. Vives-Rego J., Billen G., Fontigny A., Somville M.: Free and attached proteolytic activity in water environments. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **21**, 245–249 (1985)
98. Vives-Rego J., Vaqué D., Martinez J.: Effect of heavy metals and surfactants on glucose metabolism, thymidine incorporation and exoproteolytic activity in sea water. *Water Res.* **20**, 1411–1415 (1986)
99. Weiss M.S., Able U., Weckesser J., Welte W., Schiltz E., Schulz G.E.: Molecular architecture and electrostatic properties of a bacterial porin. *Science*, **254**, 1627–1630 (1991)
100. Williamson S.J., Paul J.H.: Nutrient stimulation of lytic phage production in bacterial population of the Gulf of Mexico. *Aquat. Microb. Ecol.* **36**, 9–17 (2004)