

335-340

富营养水体磷酸酶动力学参数的季节变化
——水体酶研究之一

周易勇 夏宜琚

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

P 343-3

提要 本文报道了武汉东湖富营养湖区(东湖I站)水体磷酸酶动力学参数(最大反应速度 V_{max} 和米氏常数 K_m)的季节变化规律, 在6月、8月和11月(或邻近时间), 湖水溶解正磷酸盐的浓度较低而叶绿素的浓度达到高峰值, 同时, V_{max} 达到最大值, K_m 值明显减小。因此, 浮游植物可以通过提高酶的反应速度以及增强酶与底物的亲和能力这两种方式有效地利用有机磷。实验结果表明, 湖水中对紫外线敏感的磷化合物可能是磷酸酶的竞争性抑制剂。

关键词 水体磷酸酶 对紫外线敏感的磷化合物 湖泊磷循环

湖水中可被生物直接利用的正磷酸盐(orthophosphate)的浓度较低, 其含量往往难以满足浮游生物生长的需要^[1,4]。在缺磷状态下, 浮游植物和细菌胞外的或水中溶解的磷酸酶将催化水中溶解的磷酸酯(phosphomonoester, PME)类化合物水解, 释放出磷酸盐; 此外, 湖中溶解的对紫外线敏感的磷化合物(UV-sensitive P compounds, UVSP)亦可在紫外光或太阳光的作用下释放正磷酸盐^[6]。这两种各具特色的反应构成了水生态系统中磷的生物的和非生物的循环、转化过程。目前, 淡水水体磷酸酶的研究日趋活跃^[4,8,10-12], 而在我国, 这一领域的工作尚未见报道, 国外已有的文献亦较少涉及水体磷酸酶的动力学特性。本文讨论了武汉东湖富营养湖区(东湖I站)水体磷酸酶动力学参数(酶的最大反应速度 V_{max} 和米氏常数 K_m)的季节变化规律。这一工作旨在深入探讨富营养化水体磷酸酶的作用规律和特点。

材料与 方法

东湖已被分割成许多子湖, 郭郑湖为东湖最大的湖区, 面积为 12.34 km², I站位于郭郑湖内的水果湖湖湾, 由于水果湖和茶叶港生活污水和工业废水的影响, 水体中氮、磷的含量明显高于其它采样站, 因此, 浮游植物不仅在数量上成倍增长, 而且在群落结构上也发生了明显的变化, 湖水变得混浊, 富营养化程度日趋严重^[1,2]。

1991年3月至1992年2月, 每月从I站采集表层水(0.5m), 将滤过0.4—0.7L湖水的Whatman GFC滤膜置于10mL具塞试管中, 加入10mL 90%丙酮, 静置过夜。用751G型分光光度计测定经过离心的丙酮提取液上清液在663nm及750nm处的消光值, 根据文献^[7]

淡水生态与生物技术开放实验室和本所所长择优基金资助项目。研究课题得到刘建康教授的支持与指导。黄祥飞、林婉莲副研究员以及东湖生态系统试验站全体同志在工作中给予诸多帮助。谨此一并致谢。

本文于1992年4月28日收到, 7月4日改回。

提供的公式计算湖水中叶绿素的浓度。

用通过 0.45 μ 孔径滤膜的过滤水样测定溶解正磷酸盐、磷酸酯(PME)和对紫外线敏感的磷化合物(UVSP)的浓度,具体方法如下:

用 Murphy 和 Riley 建立的方法^[9]测定溶解正磷酸盐的浓度。过滤水样在紫外灯下照射 3h,用照射前后水样中正磷酸盐浓度的差值表示 UVSP 的浓度。

将碱性磷酸酶 (Sigma, 0.5mg/mL) 溶解在浓度为 0.1 mol/L 的 Tris 缓冲液中 (含 0.001mol/L 的 MgCl₂, pH9.0), 酸液与过滤水样以 1:9 的比例混合,在 37℃ 下保温 24h, 用保温前后水样中正磷酸盐浓度的差值表示 PME 的浓度^[5]。

酶促反应的米氏 (Michaelis-Menten) 方程为:

$$V = \frac{V_{\max} \cdot [s]}{K_m + [s]}$$

式中 K_m 为酶的米氏常数, V_{\max} 为酶的最大反应速度, $[s]$ 为底物浓度^[3]。

K_m 是酶的特征参数之一,值小表明酶与底物的亲和能力较强,即酶不需要很高的底物浓度就能够接近其最大反应速度 V_{\max} 。

求取 K_m 和 V_{\max} 值的常用方法是双倒数法,即将米氏方程改写成倒数形式 (Lineweaver-Burke 转换式),使之成为形如 $y = ax + b$ 的直线方程:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[s]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

选择一系列不同的 $[s]$ 测定与之对应的 V , 根据 $1/V$ 与 $1/[s]$ 的线性关系即可求得 K_m 和 V_{\max} 。

表1 采用 V_{\max} 、 K_m 以及 PME 浓度等数值根据米氏方程推算的酶促释放正磷酸盐的速度 V_{release}

Tab. 1 The velocity of release of phosphate from PME (V_{release}) estimated by using the Michaelis-Menten equation

时间	K_m (mmol/L)	V_{\max} (nmol/L·min)	PME-P (mg/L)	V_{release} (nmol/L·min)
1991 年 3 月	0.0372	33.27	0.0287	0.81
4	0.0316	27.58	0.0000	0.00
5	0.0309	40.24	0.0503	2.01
6	0.0098	50.93	0.0055	0.91
7	0.0184	31.27	0.0128	0.59
8	0.0133	52.78	0.0212	2.58
9	0.0075	45.81	0.0043	0.83
10	0.0227	33.25	0.1295	5.15
11	0.0345	79.90	0.0184	1.35
12	0.0101	35.25	0.0134	1.45
1992 年 1 月	0.0213	34.86	0.0000	0.00
2	0.0604	46.50	0.0046	0.11

在未过滤湖水加入 Tris 缓冲液(0.2mol/L, pH8.6)叠氮化钠(5mol/L)以及13种不同浓度(从 1.0×10^5 mol/L 到 21.0×10^{-4} mol/L)的磷酸酶底物对硝基苯磷酸二钠,在37℃下保温一定时间后,用751G 型分光光度计测定反应液在410nm 处的消光值,酶解释放的对硝基苯在410nm 处的克分子消化系数为 1.62×10^4 [3],根据米氏方程的 Lineweaver - Burke 转换式利用回归的方法计算未过滤湖水中磷酸酶的最大反应速度 V_{\max} 和米氏常数 K_m 。

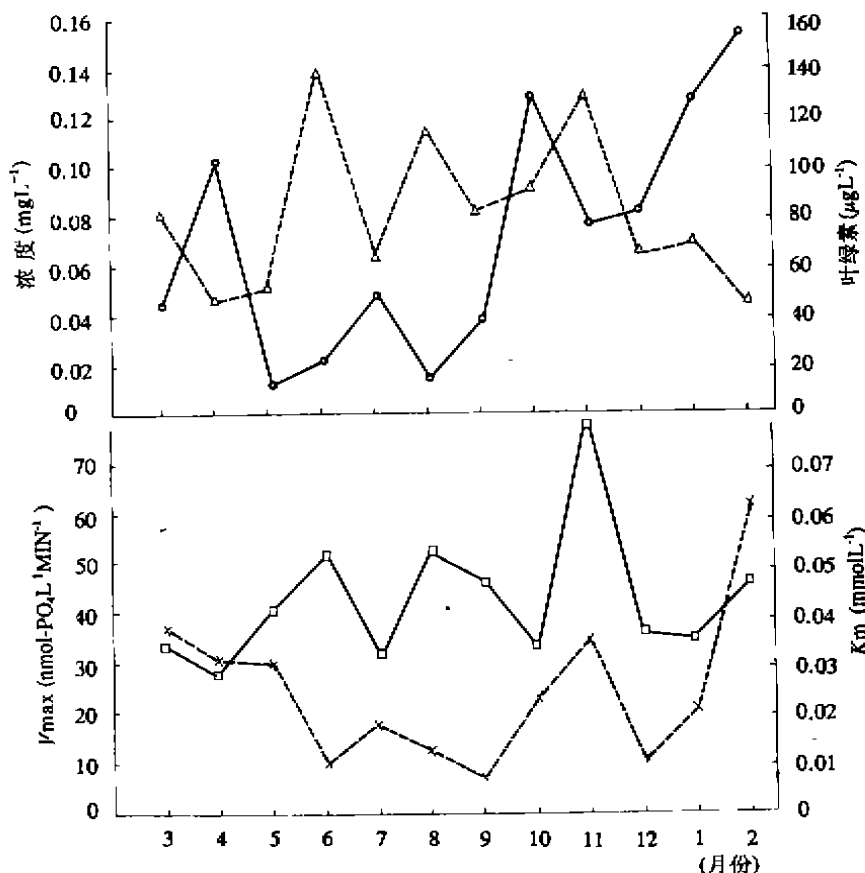


图1 叶绿素(Δ)和正磷酸浓度(○)以及磷酸酶的最大反应速度 V_{\max} (□) 和米氏常数 K_m (×)的季节变化(东湖I站)。

Fig. 1 Orthophosphate (○) and chlorophyll (Δ) concentrations, and V_{\max} (□) and K_m (×) of phosphatase in Donghu Lake (Station I) during the study period

结 果

图1表明,在6、8和11月,湖水中正磷酸盐的浓度较低而叶绿素的浓度较高,同时,磷酸酶的最大反应速度 V_{\max} 出现高峰值,米氏常数 K_m 在相同或相近的时间范围内(6月、9月和12月)明显减小。

将每月测出的 PME 浓度作为湖中磷酸酶底物浓度的近似值,同时利用每月测定的 K_m 值和 V_{\max} 值,即可根据米氏方程,估算湖水中磷酸酶释放正磷酸盐的速度 V_{release} 。

$$V_{\text{release}} = \frac{V_{\text{max}} \cdot [\text{PME}]}{K_m + [\text{PME}]}$$

由表1可知, V_{release} 亦在接近于6月、8月和11月和5月、8月以及10—12月出现最大值。

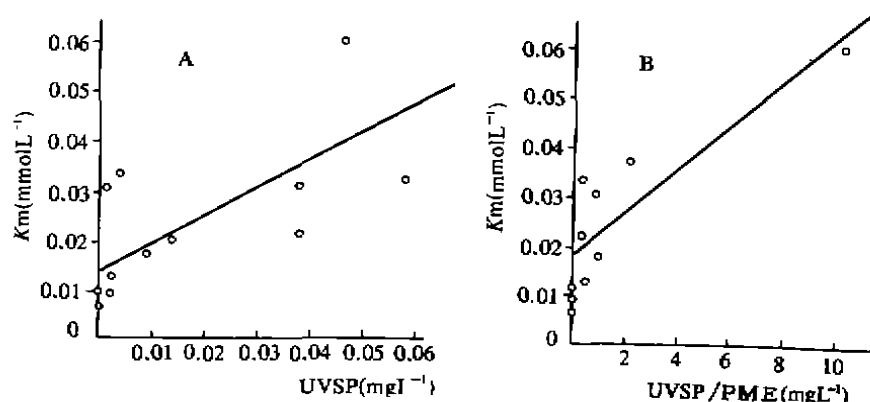


图2 东湖I站碱性磷酸酶的米氏常数 K_m 与对紫外线敏感的磷化合物(UVSP)浓度之间(A)以及米氏常数 K_m 与 UVSP 浓度与磷酸酯浓度之比率之间(B)的相关关系图

Fig. 2 Relationship between Michaelis constant (K_m) of total alkaline phosphatase and the concentration of UV-sensitive P compounds (A, $r = 0.7510$), and between K_m and the ratio of UV-sensitive P compounds to phosphomonoester (B, $r = 0.8411$) at Station I of Donghu Lake during the study period

讨 论

湖水中可以直接利用的溶解正磷酸盐的含量不足时,浮游植物能够借助磷酸酶的作用有效地利用有机态磷而得以繁盛(图1、表1)。富营养型的波兰湖泊中水体磷酸酶活性在浮游植物的增殖高峰期与叶绿素的浓度成正比^[12],根据这些现象以及其它有关的系统研究,Ryszard J. Chrost 等提出不应混淆正磷酸盐限制与总磷限制的概念,因为即使正磷酸盐不足,可供酶解的磷酸酯类化合物仍能满足细胞生长的需要,这一点在富营养化湖泊或许更为重要,因为就其含量而言,富营养湖水中的有机磷库可能等同于乃至超出正磷酸盐库^[13]。本文报道的实验结果为这一观点提供了佐证。

值得注意的是,当 V_{max} 升高时 K_m 值减小, V_{max} 和 K_m 的变化说明浮游植物可以通过提高酶的反应速度和增强酶与底物的亲和能力(即减小 K_m 值)这两种方式有效地转化和利用有机态磷。

方差分析表明,UVSP 浓度与 K_m 值之间($n = 12$, $P < 0.05$, $r = 0.7510$)以及 UVSP 与 PME 的比率(UVSP/PME)与 K_m 值之间($n = 10$ ^①, $P < 0.01$, $r = 0.8411$)均存在正相关关系。根据酶的抑制动力学理论,这种关系说明 UVSP 可能是磷酸酶的竞争性抑制剂,因此,在湖泊磷的生物和非生物转化过程之间可能存在着某种相互调节的机制。

① 由表1可知,1991年4月和1992年1月测得的 PME 的浓度为0,0作式 UVSP/PME 中的分母没有意义,故只取10组数据。

参 考 文 献

- [1] 张水元、刘衢霞、华 俐, 武汉东湖磷含量的变动及其分布, *水生生物学报*, 1989, 13(4): 297—304.
- [2] 张水元、刘衢霞、黄耀桐, 武汉东湖营养物质氮、磷的主要来源, *海洋与湖泊*, 1984, 15(3): 203—213.
- [3] 沈 同、王镜岩、赵邦悌, *生物化学*, 北京, 高等教育出版社, 1980: 235.
- [4] Berman, T., Alkaline phosphatase and phosphorus availability in Lake Kinneret, *Limnol. Oceanogr.*, 1970, 15: 663—674.
- [5] Boavida, M. J., & Heath, R. T., Is alkaline phosphatase always important in phosphate regeneration? *Arch. Hydrobiol.* 1988, 111: 507—518.
- [6] Francko, D. A. & Heath, R. T., Functionally distinct classes of complex phosphorus compounds in lake water, *Limnol. Oceanogr.* 1979, 24: 463—473.
- [7] Gotterman, H. L. & Clymo, R. S., Method for chemical analysis of fresh water. *IBP Handbook No 8*, Blackwell Sc. Publ., Oxford. 1969: 1—188.
- [8] Jansson, Mats., Enzymatic release of phosphate in water from subarctic lakes in northern Sweden, *Hydrobiologia*, 1977, 58: 175—180.
- [9] Murphy, J. & Piley, J. P., A modified single solution method for the determination of phosphate in natural water, *Anal. Chim. Acta*. 1962, 27: 31—36.
- [10] Reichardt, W., Overback, J. & Steubing, L., Free dissolved enzyme in lake water, *Nature*, 1975, 216: 1345—1347.
- [11] Reichardt, W., Catalytic mobilization of phosphate in lake water and by Cyanophyta, *Hydrobiologia*, 1971, 38: 377—394.
- [12] Ryszard J. Chrost, Waldemar Siuda & Grazyna Z. Hajemejko, Longterm studies on alkaline phosphatase activity (APA) in a lake with fish-aquaculture in relation to lake eutrophication and phosphorus cycle, *Arch. Hydrobiol. /Suppl.*, 1984, 70: 1—32.
- [13] Waldemar Siuda & Ryszard J. Chrost, The relationship between phosphatases (APA) activity and phosphate availability for phytoplankton and bacteria in eutrophic lakes, *Acta Microbiologica Polonica*, 1987, 36: 247—257.
- [14] Wetzel, R. G., *Limnology*, 2nd ed. Saunders, Philadelphia, PA. 1983, 767p.

SEASONAL VARIATION OF KINETICS PARAMETERS OF ALKALINE PHOSPHATASE IN THE EUTROPHIC ZONE OF A SHALLOW CHINESE FRESHWATER LAKE (DONGHU LAKE)

Zhou Yiyong Xia Yicheng

(*Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan 430072*)

Abstract

Seasonal variation of kinetics parameters of total alkaline phosphatase in the eutrophic zone of a shallow Chinese freshwater lake (Donghu Lake) was reported. The concentration of chlorophyll and V_{\max} of total alkaline phosphatase reached the highest level when ambient orthophosphate concentration was low and the values of Michaelis constant (K_m) of alkaline phosphatase decreased. Thus, phytoplankton seems to compensate for their phosphorus deficiency not only by an increase in enzyme activity but also an improved ability to use low substrate concentrations. The K_m of alkaline phosphatase bore a direct positive relation to UV-sensitive P compounds (UVSP). A better relationship by plotting K_m values against the ratio UVSP: phosphomonoester is also found, suggesting that UVSP is a competitive inhibitor of alkaline phosphatase activity in the lake.

Key words Phosphatase in aquatic environment, UV-sensitive P compounds,
P cycling in lake