

太湖水体中碱性磷酸酶的作用阈值

高 光 高锡芸 秦伯强 季 江

(中国科学院南京地理与湖泊研究所, 南京 210008)

提 要 对不同 PO_4^{3-} -P 浓度下, 不同粒级组分中碱性磷酸酶活性的分布及其变动规律的研究表明: ①随着水体中 PO_4^{3-} -P 浓度的增加, 水体中总碱性磷酸酶活性(TAPA)相应地减少($r = -0.586, n = 55$)。水体中的 TAPA 均值, 在 PO_4^{3-} -P 浓度范围为 $0 - 0.010 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 无显著差异; 而当 PO_4^{3-} -P 浓度 $> 0.010 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 差异极显著($P < 0.01$)。②水体中的碱性磷酸酶在不同粒级组分中的分布差异明显, 其中以溶解性碱性磷酸酶活性(DAPA)所占的比例最大, 浮游植物体中的碱性磷酸酶活性(PAPA)所占的比例次之, 细菌体中的碱性磷酸酶活性(BAPA)所占的比例最小。③随着水体中的 PO_4^{3-} -P 浓度的增加, 水体中的 PAPA 也相应地减少。水体中的 PAPA 的活性均值, 在 PO_4^{3-} -P 浓度范围为 $0 - 0.020 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 无显著差异; 而当 PO_4^{3-} -P 浓度 $> 0.020 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 差异显著($P < 0.05$); 当 PO_4^{3-} -P 浓度 $> 0.200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 差异极显著($P < 0.01$)。④水体中的 BAPA 未表现出与 PO_4^{3-} -P 浓度的相关性。

关键词 太湖 碱性磷酸酶 阈值

分类号 P343.3

磷在生物代谢过程中起着极其重要的作用。对于一般的湖泊来说, 总磷的绝大部分为有机磷(>90%), 其中 70% 以上是悬浮态颗粒有机磷, 剩下部分是溶解态及胶体态有机磷。而作为能直接进入细胞体内, 被浮游植物吸收、利用的无机态的溶解性正磷酸盐, 其含量一般只占 5%, 且这部分磷由于被直接利用, 其变化是非常快的^[1]。

实验表明: 在正磷酸盐浓度很低的湖泊中, 蓝藻水华照样发生^[2]。浮游植物种群能通过外部负荷、再循环或内部负荷等途径, 得到可利用的正磷酸盐^[3]。碱性磷酸酶作为一种专一水解磷酸单酯的诱导酶类, 当水体中缺乏正磷酸盐时, 可在藻类及细菌体中诱导产生^[4]。碱性磷酸酶活性的增加, 使得藻类可以利用有机磷以及无机的多聚磷做为磷源, 其生长、繁殖得以持续。

目前对碱性磷酸酶的研究很多^[5-9], 但涉及酶反应动力学的研究不多, 尤其是对诱导产生碱性磷酸酶的正磷酸盐的浓度阈值的研究, 尚少见报道。作者对不同正磷酸盐浓度水平下, 湖水中不同粒级组分中碱性磷酸酶活性的分布及其变化进行了研究:

1 材料与方法

1.1 实验设置

将取自太湖湖水、池塘水(作为浓度较高的天然磷源), 用绢纱过滤除去较大的杂质颗粒

* 中国科学院“九五”重点项目(KZ952-J1-212)、院“九五”重大项目(KZ951-B1-205-02)、院特别支持项目(KZ-T-04-04)及中国科学院南京地理与湖泊研究所所长基金联合资助。

收稿日期: 2000-09-10. 高光, 男, 1964 年, 副研究员。

后,与去离子水按一定比例进行混合,配制成含不同正磷酸盐浓度的实验水样,进行实验。每份水样共计 500mL,每隔一天取样一次,分析其中的 TP、TDP、 PO_4^{3-} -P 浓度及不同粒级组分中的碱性磷酸酶的活性。全部实验在室温、自然条件下进行,共 12d。

1.2 分析方法

1.2.1 总磷、总溶解性磷、正磷酸根磷的测定^[10] 总磷的测定:过硫酸钾氧化法。总溶解性磷的测定:将水样预先用 0.45μm 的醋酸纤维素滤膜过滤后,用过硫酸钾氧化法。正磷酸根磷的测定:将水样预先用 0.45μm 的醋酸纤维素滤膜过滤后,用钼-锑-抗比色法测定。

1.2.2 水体中碱性磷酸酶活性的测定^[6,11,12] 碱性磷酸酶能催化水解对硝基苯磷酸二钠(p-NPP),水解产生具有稳定的黄色的对硝基苯酚(PNP),用比色法测定 PNP 的产生速率,作为碱性磷酸酶活性(APA)的指标。

由于影响酶促反应的主要因素有 pH 值、温度、反应时间及反应物体积,经过预实验及考虑到太湖的实际情况,本实验中所选择的反应条件为:pH8.4(用 Tris 缓冲溶液调)、温度 30℃、反应物体积 5mL、反应时间 6h、波长 410nm。用岛津 UV-2401 分光光度计测定。

1.2.3 不同粒级组分中碱性磷酸酶活性的分级测定^[4,11,12] 将水样在不过滤、用 3.0μm 滤膜过滤及 0.2μm 滤膜过滤的条件下,分别测定其中的碱性磷酸酶活性。

1.2.4 碱性磷酸酶活性的最大反应速率(V_{\max})及米氏常数(K_m)的测定^[13] 在 0.01-3mmol·L⁻¹浓度范围内,取 8 个不同的底物浓度,分别测定 APA。根据 Michaelis-Menten 方程:

$$V = V_{\max} \cdot [S] / (K_m + [S])$$

式中, V_{\max} 、 K_m 、[S] 分别为最大反应速度、米氏常数及底物浓度。

用双倒数作图法(Lineweaver-Burk 法)将上式进行转化,可得一线性方程,其横轴上的截距为 $-K_m^{-1}$,带入方程即可求得 V_{\max} 及 K_m 。

1.3 实验数据的处理^[14]

实验获得的数据用 SPSS (Statistics Package for Social Science)统计软件包进行统计处理。

2 实验结果与分析

2.1 实验用湖水、池塘水中的磷含量及酶反应动力学参数

预先对用于配置实验用水样的池塘水及太湖水进行了测定,湖水、池塘水中磷的含量及酶反应动力学参数见表 1。

2.2 不同 PO_4^{3-} -P 浓度下,实验水样中 TAPA 的变化

实验过程中,分别测定了不同 PO_4^{3-} -P 浓度下,实验水样中的 TAPA,并对其均值进行了比较。结果如图 1、表 2 所示。

表 1 实验水样中的磷含量及酶反应动力学参数

Tab. 1 The phosphorus concentrations and enzymatic parameters of testing water

	TP /mg·L ⁻¹	TDP /mg·L ⁻¹	PO_4^{3-} -P /mg·L ⁻¹	TAPA V_{\max} $/ \mu \text{mol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	TAPA K_m $/ \mu \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
太湖水	0.068	0.044	未测出	9.71×10^{-3}	49.98
池塘水	1.323	0.606	0.418	2.37×10^{-3}	11.56

表 2 不同 PO_4^{3-} -P 浓度下, 水样中 TAPA 均值差异显著性检验Tab. 2 The significant difference test of mean TAPA at different PO_4^{3-} -P concentrations

PO_4^{3-} -P / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	0 - 0.005	0.005 - 0.010	0.010 - 0.020	0.020 - 0.050	0.050 - 0.100	0.100 - 0.200	0.200 - 0.400	> 0.400
0 - 0.005								
0.005 - 0.010	$P > 0.05$							
0.010 - 0.020	$P < 0.01$	$P < 0.01$						
0.020 - 0.050	$P < 0.01$	$P < 0.01$	$P > 0.05$					
0.050 - 0.100	$P < 0.01$	$P < 0.01$	$P > 0.05$	$P > 0.05$				
0.100 - 0.200	$P < 0.01$	$P < 0.01$	$P > 0.05$	$P > 0.05$	$P > 0.05$			
0.200 - 0.400	$P < 0.01$	$P < 0.01$	$P > 0.05$	$P > 0.05$	$P > 0.05$	$P > 0.05$		
> 0.400	$P < 0.01$	$P < 0.01$	$P > 0.05$					

图 1 表明, 水体中的 TAPA 与 PO_4^{3-} -P 浓度密切相关。随着水体中 PO_4^{3-} -P 浓度的增加, 水体中 TAPA 相应地减少 ($r = -0.586$, $n = 55$)。不同 PO_4^{3-} -P 浓度下, 水体中的 TAPA 的均值, 存在差异。单因素方差分析表明: 在 PO_4^{3-} -P 浓度范围为 $0 - 0.010 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 无显著差异; 而当 PO_4^{3-} -P 浓度 $> 0.010 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 差异极显著 ($P < 0.01$) (SPSS, One-way ANOVA)。

2.3 不同 PO_4^{3-} -P 浓度下, 不同粒级组分中碱性磷酸酶的活性分布及变化

不同 PO_4^{3-} -P 浓度下, 不同粒级组分中碱性磷酸酶的活性分布及变化情况如表 3。

表 3 不同粒级组分中碱性磷酸酶的活性分布及变化¹⁾

Tab. 3 The changes of composition of APA in different part of the testing waters

PO_4^{3-} -P / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	碱性磷酸酶的活性均值 ($\mu \text{ mol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}$)						样本数
	PAPA	占 TAPA 的 %	BAPA	占 TAPA 的 %	DAPA	占 TAPA 的 %	
0 - 0.005	1.32×10^{-4}	30.1	1.64×10^{-5}	3.7	2.90×10^{-4}	66.1	7
0.005 - 0.010	1.38×10^{-4}	36.3	9.08×10^{-6}	2.4	2.33×10^{-4}	61.3	5
0.010 - 0.020	1.23×10^{-4}	48.0	7.70×10^{-6}	3.0	$1.25 \times 10^{-4}**$	48.8	6
0.020 - 0.050	$7.54 \times 10^{-5}*$	32.8	1.64×10^{-5}	7.1	$1.38 \times 10^{-4}**$	60.0	10
0.050 - 0.100	$9.48 \times 10^{-5}**$	41.2	7.78×10^{-6}	3.4	$1.27 \times 10^{-4}**$	55.2	7
0.100 - 0.200	$9.14 \times 10^{-5}*$	36.1	1.62×10^{-5}	6.4	$1.46 \times 10^{-4}**$	57.7	7
0.200 - 0.400	$6.05 \times 10^{-5}**$	26.7	1.25×10^{-5}	5.5	$1.55 \times 10^{-4}**$	68.3	5
> 0.400	$3.79 \times 10^{-5}**$	19.5	1.11×10^{-5}	5.7	$1.45 \times 10^{-4}**$	74.7	8

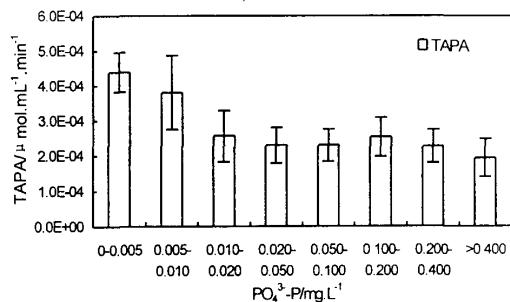
图 1 不同 PO_4^{3-} -P 浓度下, TAPA 的变化Fig. 1 The changes of TAPA at different PO_4^{3-} -P concentrations1): 有 * 者为差异显著 ($P < 0.05$); 有 ** 者为差异极显著 ($P < 0.01$)。

表 3 表明, ①水体中 TAPA 在不同粒级组分中的分布是不均匀的, 有着极其明显的差异。

其中:DAPA 占 TAPA 的比例最高,为 48.8%~74.7%,平均为 61.5%;PAPA 所占的比例次之,为 19.5%~48.0%,平均 33.8%;BAPA 所占的比例最少,仅为 2.4%~7.1%,平均 4.7%。②随着水体中 PO_4^{3-} -P 浓度的增加,水体中的 PAPA 也相应地减少。水体中的 PAPA 的活性均值,在 PO_4^{3-} -P 浓度范围为 0~0.020 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,无显著差异;而当 PO_4^{3-} -P 浓度 > 0.020 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,差异显著($P < 0.05$);当 PO_4^{3-} -P 浓度 > 0.200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,差异极显著($P < 0.01$)(SPSS, One-way ANOVA)。③不同 PO_4^{3-} -P 浓度下,水体中的 BAPA 未显示出差异性(SPSS, One-way ANOVA)。

2.4 不同 PO_4^{3-} -P 浓度条件下,水体中 TAPA 及其随 PO_4^{3-} -P 浓度的变动

实验过程中,水体中的 TAPA 及其随 PO_4^{3-} -P 浓度的变动情况,如图 2、图 3 所示。(此处仅选择了 PO_4^{3-} -P 浓度 > 0.400 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 及 < 0.005 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的两种情况为例,其它 PO_4^{3-} -P 浓度下的变动情况与其类似。)

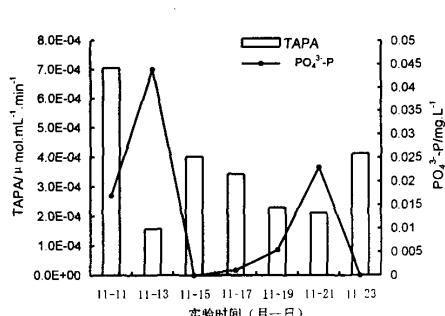


图 2 PO_4^{3-} -P 浓度小于 $0.005 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 条件下,
水体中 TAPA 及 PO_4^{3-} -P 的变化

Fig. 2 The changes of TAPA and PO_4^{3-} -P
in the condition of PO_4^{3-} -P < $0.005 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

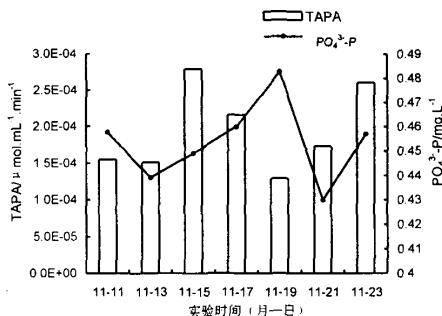


图 3 PO_4^{3-} -P 浓度大于 $0.400 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 条件下,
水体中 TAPA 及 PO_4^{3-} -P 的变化

Fig. 3 The changes of TAPA and PO_4^{3-} -P
in the condition of PO_4^{3-} -P > $0.400 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

从图 2、图 3 中可以明显看出:在实验过程中,水体中的总碱性磷酸酶活性伴随着水体中 PO_4^{3-} -P 浓度的变化,而出现不断的波动。碱性磷酸酶活性的这种变化,在 PO_4^{3-} -P 浓度较低时,表现的更加明显。在水体中 PO_4^{3-} -P 浓度较高时,虽然这种变化的趋势仍然存在,但相比而言,其变化的相对幅度则要小得多。

3 讨论

3.1 碱性磷酸酶活性的作用阈值

水体中的碱性磷酸酶作为一种专一性水解磷酸单酯的诱导酶类,其活性与水体中的 PO_4^{3-} -P 浓度密切相关。研究表明^[12,15,16],当水体中的 DIP 浓度较低、不足以维持藻类、细菌生长时,藻类、细菌体中的碱性磷酸酶受到诱导,其活性显著地增加。通过对海洋的现场观测及藻类培养实验,洪华生等推测^[11],DIP 对 APA 的影响作用主要是在 DIP 浓度较低时产生,并且在某一界限以上时,DIP 对 APA 的影响是不显著的。Chrost 等的实验表明^[12]:当 DIP 浓度低

于 $10\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,总碱性磷酸酶活性明显增加,藻类的碱性磷酸酶活性对磷酸盐也有类似的响应。本实验的结果,证实了他们的推测。本实验的结果显示:随着水体中的 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 浓度的增加,碱性磷酸酶活性相应地减少($r = -0.586, n = 55$)。当水体中的 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 浓度 $<0.010\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,TAPA极显著地增加($P < 0.01$);而当水体中的 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 浓度 $<0.020\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,PAPA显著增加($P < 0.05$),当 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 浓度 $>0.200\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,PAPA极显著地减少($P < 0.01$)。预示着对于太湖中的浮游植物来说, $0.020\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 浓度可能是激发浮游植物体中碱性磷酸酶活性的阈值浓度;由于碱性磷酸酶是一种诱导酶, $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 是其活性的抑制剂^[4],当水体中的 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 浓度 $>0.200\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,可能对其活性产生抑制,致使其活性显著减少。

3.2 碱性磷酸酶在不同粒级组分中的分布及其性质

研究表明^[3,4,11]:碱性磷酸酶在水体不同粒级组分中的分布差异极大。本实验中,水体中的碱性磷酸酶在各粒级组分中的分布差异也极大,其中DAPA所占的比例最大,PAPA所占的比例次之,BAPA所占的比例最小。与文献^[9]报道的海洋中的结果略有不同。除了所占的比例不同以外,DAPA、PAPA、BAPA的性质也差异极大。本实验中,DAPA、PAPA、BAPA的最大反应速率(V_{\max})及米氏常数(K_m)也差异极大。其中DAPA、PAPA、BAPA的 V_{\max} 分别为: 2.86×10^{-4} 、 1.54×10^{-2} 、 $1.74 \times 10^{-2}\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, K_m 则分别为:31.72、189.06、 $1538.45\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。 K_m 值的大小,反应了底物与酶结合的紧密程度。 K_m 值小,意味着酶与底物的结合紧密。虽然从理论上说,将米-门方程应用于存在多种水解相同底物的混合酶类的情况,可能会产生一定的误差,但用其来比较一组酶的性质还是可行的^[4]。此外,实验结果显示:PAPA、DAPA显著受 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 浓度的影响,而BAPA则几乎不受 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 浓度的影响,这与Chrost等的实验结果是一致的^[12],其原因可能是由于细菌的 K_m 值较大,受 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 的抑制不明显。

3.3 碱性磷酸酶活性与水体中 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 浓度的变化

当水体中 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 浓度较低时,碱性磷酸酶的活性增加,使得水体中有机磷的分解、释放速率加快,导致水体中 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 浓度的增加;随着 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 浓度的增加,水体中碱性磷酸酶的活性受到抑制,逐渐减少,从而使得水体中有机磷的分解、释放速率减缓,再加上藻类、细菌的利用,导致水体中 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 浓度的又逐渐减少,最终又使得水体中碱性磷酸酶的活性逐渐增加。在实验过程中,这种循环往复的波动,在 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 浓度较低的情况下,表现得更加明显。表明:通过碱性磷酸酶作用而产生的 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$,是水体中 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 的重要来源,尤其是当水体中 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 浓度较低时,这种作用对水体中 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 浓度的影响更加不能忽视。

参 考 文 献

- 1 Wetzel R G. Limnology. 2nd Edition. Saunders College Publishing, 1983
- 2 Hutchinson G E. A Treatise on Limnology (II): Introduction to Lake Biology and the Limnoplankton. New York: John Wiley and Sons Inc. 1967. 1115
- 3 Robert T H, Cooke G D. The significance of alkaline phosphatase in a eutrophic lake. *Verh Internat Verein Limnol*, 1975, 19: 959-965
- 4 Jansson M, Olsson H & Pettersson K. Phosphatases; origin, characteristics and function in lakes. *Hydrobiologia*, 1988, 170:

157 - 175

- 5 Pick. F R. Interpretations of alkaline phosphatase activity in Lake Ontario. *Can J Fish Aquat Sci*, 1987, 44:2087 - 2094
- 6 Berman T. Alkaline phosphatases and phosphorus availability in Lake Kinneret. *Limnol Oceanogr*, 1970, 15:663 - 674
- 7 Berman T. Phosphatase release of inorganic phosphorus in Lake Kinneret. *Nature*, 1969, 224:1231 - 1232
- 8 Chrost R J, Siuda W & Halemejko G. 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
- 9 周易勇, 付永清. 水体磷酸酶: 来源、特征及其生态学意义. *湖泊科学*, 1999, 11(3):274 - 279
- 10 金相灿等编著. *湖泊富营养化调查规范(第二版)*. 北京: 中国环境科学出版社, 1990
- 11 洪华生等. 海水中碱性磷酸酶活力的测定及其在磷循环中的作用初探. *海洋与湖沼*, 1992, 23(4):415 - 419
- 12 Chrost R J & Overbeck. J. Kinetics of alkaline phosphatase acitivity and phosphorus availability for phytoplankton and bacterioplankton in lake Plu β see (North German Eutrophic lake). *Microb. Ecol.*, 1987, 13:229 - 248
- 13 张龙翔等主编. *生化实验方法和技术*. 北京: 高等教育出版社, 1987. 145 - 152
- 14 卢纹岱主编. *SPSS for Windows 统计分析*. 北京: 电子工业出版社, 2000
- 15 Steven R J & Parr M P. The significance of alkaline phosphatase activity in Lough Neagh. *Freshwater Biology*, 1977, 7:351 - 355
- 16 Feuillade J, Feuillade M & Blanc P. Alkaline phosphatase activity fluctuation and associated factors in a eutrophic lake dominated by *Oscillatoria rubescens*. *Hydrobiologia*, 1990, 207:233 - 240

Experimental Study on the PO_4^{3-} -P Threshold of the Alkaline Phosphatase Activity in Taihu Lake

GAO Guang GAO Xiyun QIN Boqiang

(Nanjing Institute of Geography and Limnology, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, P. R. China)

Abstract

The composition and activity of alkaline phosphatase in waters with different PO_4^{3-} -P concentrations were studied experimentally. The results show: ①The total alkaline phosphatase activity (TAPA) was decreased with the increase of PO_4^{3-} -P concentration ($r = -0.586$, $n = 55$). Based on the statistic analyses, when PO_4^{3-} -P concentrations were between 0 to $0.010\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, no significant difference was found in the TAPA. When PO_4^{3-} -P concentrations exceeded $0.010\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, the TAPA was significant difference ($P < 0.01$). ②The contents of APA in phytoplankton (PAPA), bacteria (BAPA) and dissolved (DAPA) were different. The ratio of DAPA to TAPA was the highest and BAPA was the smallest. ③With the increasing of PO_4^{3-} -P concentration, the PAPA decreased. When PO_4^{3-} -P concentrations were between 0 to $0.020\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, over $0.020\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ and over $0.200\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, the PAPA were no significant, significant ($P < 0.05$) and highly significant, respectively ($P < 0.01$). ④The BAPA showed no significant relationship with the PO_4^{3-} -P concentration.

Key Words Taihu Lake, alkaline phosphatase activity, threshold value of phosphatic concentration