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 - 0.010mg·L^{-1}, 无显著差异; 而当 PO_4^{3-}-P 浓度 > 0.010mg·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 - 0.020mg·L^{-1}时, 无显著差异; 而当 PO_4^{3-}-P 浓度 > 0.020mg·L^{-1}时, 差异显著($P<0.05$); 当 PO_4^{3-}-P 浓度 > 0.200mg·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} /μ mol·mL^{-1}·min^{-1}	TAPA K_m /μ mol·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 /mg·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
0－0.005							
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	$P<0.01$	$P<0.01$	$P>0.05$	$P>0.05$	$P>0.05$	$P>0.05$	$P>0.05$

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 0－0.010mg·L^{-1} 时,无显著差异;而当 PO_4^{3-}-P 浓度>0.010mg·L^{-1} 时,差异极显著($P<0.01$)(SPSS, One-way ANOVA).

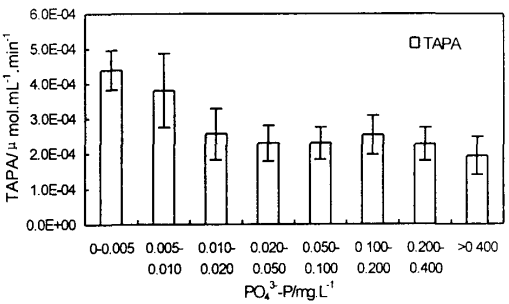


图 1　不同 PO_4^{3-}-P 浓度下,TAPA 的变化

Fig.1　The changes of TAPA at different PO_4^{3-}-P concentrations

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 /mg·L^{-1}	碱性磷酸酶的活性均值(μ mol·ml^{-1}.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	1.25×10^{-4}**	48.8	6
0.020－0.050	7.54×10^{-5}*	32.8	1.64×10^{-5}	7.1	1.38×10^{-4}**	60.0	10
0.050－0.100	9.48×10^{-5}*	41.2	7.78×10^{-6}	3.4	1.27×10^{-4}**	55.2	7
0.100－0.200	9.14×10^{-5}*	36.1	1.62×10^{-5}	6.4	1.46×10^{-4}**	57.7	7
0.200－0.400	6.05×10^{-5}**	26.7	1.25×10^{-5}	5.5	1.55×10^{-4}**	68.3	5
>0.400	3.79×10^{-5}**	19.5	1.11×10^{-5}	5.7	1.45×10^{-4}**	74.7	8

1):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 - 0.020mg·L^{-1}时,无显著差异;而当 PO_4^{3-}-P 浓度 > 0.020mg·L^{-1}时,差异显著($P<0.05$);当 PO_4^{3-}-P 浓度 > 0.200mg·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 > 0.400mg·L^{-1}及 < 0.005mg·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.)

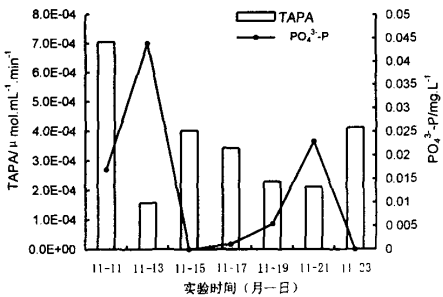


图 2 PO_4^{3-}-P 浓度小于 0.005mg·L^{-1}条件下,水体中 TAPA 及 PO_4^{3-}-P 的变化

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

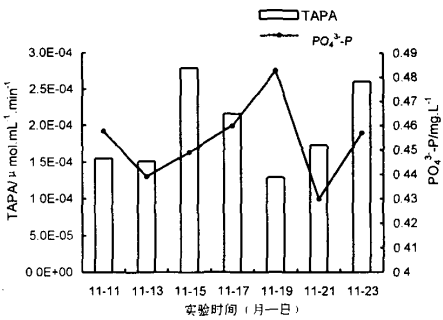


图 3 PO_4^{3-}-P 浓度大于 0.400mg·L^{-1}条件下,水体中 TAPA 及 PO_4^{3-}-P 的变化

Fig.3 The changes of TAPA and PO_4^{3-}-P in the condition of PO_4^{3-}-P > 0.400mg·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 10μg·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 PO_4^{3-}-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 PO_4^{3-}-P 浓度<0.010mg·L^{-1}时,TAPA 极显著地增加($P<0.01$);而当水体中的 PO_4^{3-}-P 浓度<0.020mg·L^{-1}时,PAPA 显著增加($P<0.05$),当 PO_4^{3-}-P 浓度>0.200mg·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,0.020mg·L^{-1}的 PO_4^{3-}-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,PO_4^{3-}-P 是其活性的抑制剂[4],当水体中的 PO_4^{3-}-P 浓度>0.200mg·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}、1.74×10^{-2} μmol·mL^{-1}·min^{-1}, K_m 则分别为:31.72、189.06、1538.45μmol·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 PO_4^{3-}-P 浓度的影响,而 BAPA 则几乎不受 PO_4^{3-}-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 PO_4^{3-}-P 的抑制不明显.

3.3　碱性磷酸酶活性与水体中 PO_4^{3-}-P 浓度的变化

当水体中 PO_4^{3-}-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 PO_4^{3-}-P 浓度的增加;随着 PO_4^{3-}-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 PO_4^{3-}-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 PO_4^{3-}-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 PO_4^{3-}-P,是水体中 PO_4^{3-}-P 的重要来源,尤其是当水体中 PO_4^{3-}-P 浓度较低时,这种作用对水体中在 PO_4^{3-}-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 & Overback. 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 0.010mg·L^{-1}, no significant difference was found in the TAPA. When PO_4^{3-}-P concentrations exceeded 0.010mg·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 0.020mg·L^{-1}, over 0.020mg·L^{-1} and over 0.200mg·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