

湿地中碱性磷酸酶的动力学特征 与水生植物的关系*

周易勇 李建秋 张敏

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

提 要 本文讨论了种植茳草(*Potamogeton crispus* L.) 水花生(*Alternanthera philoxeroides* Griseb.) 紫背浮萍(*Spirodela polyrhiza*(L.) Schleid.) 以及对照实验池(12.5m × 9.5m) 过滤(小于 0.45 μ m) 与未过滤水样和沉积物中碱性磷酸酶的动力学特征及其分布。水生植被能降低水样和表层沉积物酶的催化效率, 抑制作用因植物的种类而异, 且在未过滤水中表现得尤为突出。因此, 受抑制者多与较大的颗粒相联系, 这一结果暗示植物克藻效应的胞外酶学机制。水生植物种植区表层沉积物的低酶活性是其中有机磷不易矿化故得以保持从而改善水质的可能原因, 而深层沉积物酶的反应速度则明显高于对照。湿地亚表层沉积物因其具有的理论与实际意义而值得深入研究。

关键词 湿地 碱性磷酸酶 动力学 分布

分类号 Q948.8

作为一种高效经济的水质净化手段, 天然的或人工湿地技术已在世界范围内得到深入研究与广泛应用。湿地的显著特征是有机负荷极高, 其源有二, 一为纳入的污水, 二为自身密集的植物群落。Tanner 等报道, 在以净化农业灌溉废水为目的的新西兰湿地沉积物中, 有机物的累积高达 6.8 - 14.9kg/m², 且与废水中的有机负荷显著正相关。另一方面, 来自芦苇的有机碎屑又远远高出污水引入的有机物^[1]。然而, 湿地出水中有机物的含量却较低, 这种现象在印度^[2]、匈牙利^[3]和澳大利亚^[4]的湿地系统中均可观察到。伊朗人工湿地对于生化需氧量(BOD)与化学需氧量(COD)的去除率可分别高达 90% 与 86%^[5]。这种出入不敷的现象有力地说明, 对有机物的蓄积确系湿地净化水质的关键机制。以磷为例, 英国 Apopka 湿地与 Sunny Hill 农场湿地沉积物中, 磷酸单酯的含量分别占总磷含量的 59% 与 51%^[6]。盛长海草(*Thalassia testudinum*) 的海洋湿地沉积物可在 4 月和 8 月释放有机磷^[7]。这就是说, 作为磷酸酶天然底物的磷酸酯类能大量吸附于湿地中并以整体形式适时释放却未遭酶解。由上述事实可以推论, 湿地沉积物中极低的矿化能力(以低磷酸酶活性为表征)导致极小的净输出, 对上述假设作集中而系统的实证无疑具有重要的理论意义。此外, 伊朗^[5]和德国^[8]学者已注意研究亚表层流湿地的可行性, 借以有效地减缩占地面积, 并通过增加接触反应层面来提高净化效率。匈牙利^[3]学者已提出垂直流向的湿地建构, 这些实践活动都将以对于底层沉积物营养行为的充分了解为基础, 而已有

* 国家自然科学基金(20177033、39670149、39170165)、淡水生态与生物技术国家重点实验室基金、中国科学院东湖湖泊生态系统试验站基金、中国科学院长春地理研究所现代湿地过程与环境开放实验室基金及中国科学院“青年科学家小组”基金联合资助项目。

收稿日期 2001-07-22; 收到修改稿日期 2001-11-12。周易勇, 男, 1956 年生, 研究员。

的相关研究多聚焦于湿地表层沉积物. 本文拟集中探讨湿地水体和沉积物中碱性磷酸酶的动力学行为及特征.

1 材料与方法

1999 年 3 月和 5 月在实验池采集表层水(0.5m),用彼得森采泥器采集表层沉积物,用内径为 3.5cm 的不锈钢管状采泥器采集不同深度的沉积物. 共得 24 个柱芯,随机地分为三组,各组相应的层面充分混匀后用作重复样品并据此对所测数据进行统计分析. 实验池位于东湖水果湖区南岸中国科学院水生生物研究所鱼池南侧,其建构(9.5m × 12.5m)见图 1,其中生长的水生植物分别为菹草(*Potamogeton crispus* L.)、水花生(*Alternanthera philoxeroides* Griseb.)和紫背浮萍(*Spirodela polyrhiza* (L.) Schleid). 用孔径为 0.45 μ m 的滤膜过滤水样,以对-硝基苯磷酸二钠盐(pNPP, AG)为底物,用分光光度法测定碱性磷酸酶的活性(APA)^[9],在 0.01 至 1.8mmol 的范围内取 8 种不同的底物按上文述及的方法测定过滤与未过滤表层水中的 APA,再作进一步的动力学分析.

沉积物 APA 的测定以 pNPP 作底物,取 100g 沉积物加入 300mL tris 缓冲液(pH 7.4)制备成匀浆,用纱布过滤,取 3.0mL 过滤匀浆入试管,加入底物,在 37 $^{\circ}$ C 下保温 1h,离心,在 1.0mL 上清液中加入 4.0mL NaOH(0.1N),循分光光度法测定沉积物中的 APA^[10]. 另在 0.4 至 20.0mmol 范围内取 8 种不同浓度的底物,按分光光度法测定沉积物 APA.

据 Michaelis-Menten 方程 $V = V_{max} \cdot S / (S + K_m)$ 的 Lineweaver-Burk 转换式测算酶最大反应速度(V_{max})和米氏常数(K_m),每一样品作三次重复.

2 结果与讨论

1999 年 3 月,菹草种植区未过滤和过滤(<0.45 μ m)水样与表面沉积物中碱性磷酸酶的活性(V_{max})均明显低于对照值($P < 0.05$) (表 1),东湖围隔中的菹草亦有类似的抑制水体磷酸酶的作用^[11].

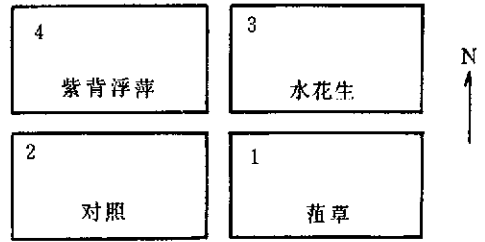


图 1 实验池示意图

Fig. 1 The diagram of experimental pools

表 1 实验池水与沉积物中碱性磷酸酶的动力学参数

Tab. 1 Kinetic parameters of alkaline phosphatase in water and sediment samples of experimental pools

样品	实验地	V_{max}^*	K_m (μ mol/L)
未过滤池水	1	87.75 \pm 1.90	5.24 \pm 0.47
	2	213.98 \pm 1.66	3.46 \pm 0.04
过滤池水(<0.45 μ m)	1	9.79 \pm 0.54	12.23 \pm 2.41
	2	36.38 \pm 0.61	3.97 \pm 0.08
沉积物	1	357.96 \pm 43.08	1632.77 \pm 104.36
	2	686.90 \pm 138.04	3439.92 \pm 633.50

* V_{max} : nmol/(L·min) (水样) μ mol/(g·h) (沉积物); 采样日期: 1999 年 3 月 4 日.

虽然各水生植物种植区中溶解碱性磷酸酶(<0.45 μ m)的活性不同程度地低于相应的对

照值,但就未过滤水体磷酸酶的 V_{max} 而言,种植水花生的 3 号区和种植紫背浮萍的 4 号区均与对照无明显差异(图 2),因此,这种对于水体磷酸酶的抑制效应可能取决于植物的种类。

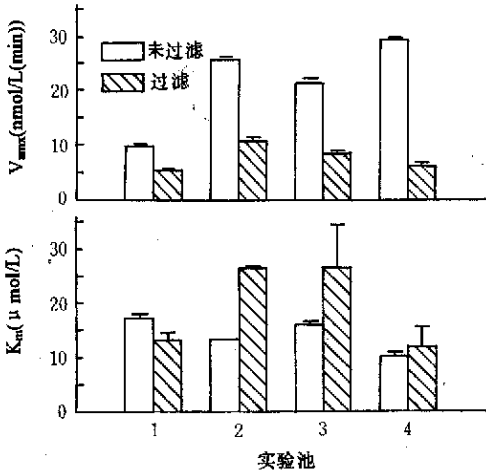


图 2 不同实验池过滤与未过滤水样中碱性磷酸酶的动力学参数
(采样日期:1999年5月11日)

Fig. 2 Kinetic parameters of alkaline phosphatase in unfiltered and filtered water samples in different experimental pools.

Water was sampled on 11 May, 1999

β -葡糖苷酶、 β -N-乙酰酯葡糖苷酶、磷酸酶和芳基硫酸酶与微生物活性(电子传递系统)做了全面研究,同时测定湿地进水与出水中的水化学参数,在所研究的两处湿地沉积物中酶的活性明显较低,出水中硝酸盐与磷酸盐的含量相应地显著减少,上述结果说明,酶学方法是研究湿地沉积物有机质分解过程的有力工具之一,而低酶活性是相应于湿地净化功能的最显著的特征,本文给出的水体与沉积物的综合结果,对上述机制作了进一步的实证。

未种植水生植物的对照区域中水体磷酸酶的活性显著高于菹草种植区的相应值,而差别的悬殊多表现于未过滤样品(图 2)。换言之,在菹草存在时,水体碱性磷酸酶的构成发生明显的变化,主要表现为与大颗粒相联系的酶的活性剧减,而上述大颗粒中当包含藻类,这一现象具有一定的理论意义,即沉水植物克藻效应得到了酶学上的印证,或者进一步说,酶的作用是调节沉水植物与藻类生态关系的机制之一。

实验池沉积物中碱性磷酸酶动力学参数的垂直分布模式如图 3 所示。

从纵向上看未种植水生植物的对照区(2号)沉积物酶的 K_m 值多低于有根植物种植区(1号或3号)的相应值尤其在表层,这种情况在未过滤水样中亦可观察到(图 2)。具体地说,当有根植物存在时,磷酸酶的表现 K_m 值表现出增大的趋势。 K_m 值是酶对底物亲和力的量度,其值愈小,亲和力愈强,因此,有根植物可能具有一种潜在的抑制磷酸酶催化效率的方式,即减弱酶对底物的亲和力,有关的细节尚待验证,而另一方面,与对照相比,沉水植物种植区表层沉积物中酶的 V_{max} 值明显较低($P < 0.05$),这与 Kang 等^[16]的结果一致,而在实验涉及的深度范围内,

水生植物对磷酸酶的这种抑制效应可从水体与沉积物两个方面来加以分析和引证,首先, Kalinowska 等^[12]发现在水生植物占优势的湖泊中,磷酸酶对有机磷的分解作用几乎可以忽略,较大分子量的腐殖质或源于挺水植物的有机质能促进磷酸酶的合成,其原因可能在于较多的酶因腐殖质的络合作用而失活^[13], Ser-ranuo 和 Boor^[14]发现从赤桉(*Eucalyptus camaldulensis*)叶中提取的多酚对于经纯化的磷酸酶具有极强的抑制作用,同时可减弱澳大利亚河流中磷酸酶的活性,多酚或直接作用于酶或与金属(如 Mg)络合,而后者是酶表现活性的必要因子,抑制作用的阈值恰与天然淡水中多酚的浓度相当, Freeman 等^[15]发现去除较大分子量的有机物之后, β -葡糖苷酶、磷酸酶和酯酶的活性增加,因此酚类物质可能是主要的抑制因子,其次, Kang 等^[16]假定湿地沉积物中的低酶活性正是湿地净化水质的机制之一,他们对美国湿地沉积物与邻近高地土壤的横断面中

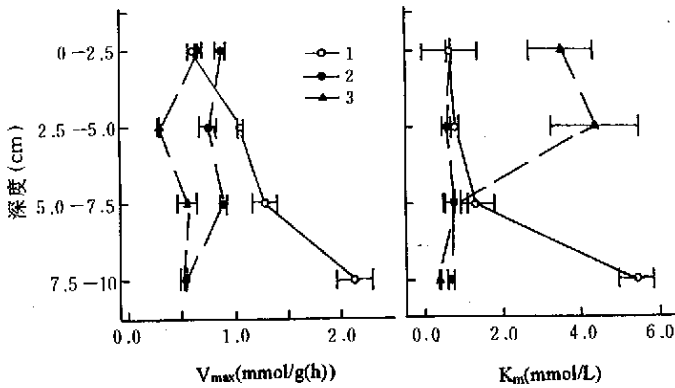


图3 不同实验池沉积物碱性磷酸酶 V_{\max} 和 K_m 值的垂直分布(采样日期:1999年4月28日)

Fig.3 Vertical distribution of V_{\max} and K_m values of alkaline phosphatase in sediments in different experiment pool(Sediments were sampled on 28 April, 1999)

较深层次的变化趋势因种类而异,即与对照相比,水花生种植区(3号)沉积物的 V_{\max} 值始终较低,菹草种植区(1号)沉积物酶的 V_{\max} 值则自上而下递增,且在深处表现出远远高于对照的峰值(至少在某些特定的季节如此)。这就是说,深层沉积物可能仍不失为酶促营养循环与释放的活跃区域,无论是在生物地球化学循环的理论,还是实践过程方面(尤其是那些倚重深层沉积物的人工湿地建构),亚表层的复杂性与不稳定性仍待深入研究。

参 考 文 献

- 1 Tanner C C, Sukias J P S, Upsdell M P. Organic matter accumulation during maturation of gravel-bed constructed wetlands treating farm dairy wastewater. *Water Res*, 1998, **32**(10): 3046 - 3054
- 2 Mohan B S, Hosetti B B. Nutrient removal by *Eichhornia crassipes* Solms. from sewage flowing through Jappinamogaru area, Mangalore. *Indian J Environ Health*, 1998, **40**(2): 125 - 131
- 3 Marrianna K, Gyula L, Magdoina K K. Applicability of a constructed wetlands for improving the water quality of natural waters. *Hidrol Kozl*, 1998, **78**(5-6): 351 - 352
- 4 Sakadevan K, Bavor H J. Nutrient removal mechanisms in constructed wetlands and sustainable water management. *Water Sci Technol*, 1999, **40**(2): 121 - 128
- 5 Bdkoubi A, Ganjidoust H, Ghaderi A, et al. Performance of a subsurface constructed wetland in Iran. *Water Sci Technol*, 1998, **38**(1), Water Quality International '98, Part 1) 345 - 350
- 6 Robinson J S, Johnston C T, Reddy K R. Combined chemical and ^{31}P -NMR spectroscopic analysis of phosphorus on wetland organic soils. *Soil Sci*, 1998, **163**(9): 705 - 713
- 7 Henning S J, Karen J M, Roxanne M, et al. Forms and availability of sediment phosphorus in carbonate sand of Bermuda seagrass beds. *Limnol Oceanogr*, 1998, **43**(5): 799 - 810
- 8 Griffin P, Upton J. Constructed wetlands: a strategy for sustainable wastewater treatment at samll treatment works. *Water Environ Manage*, 1999, **13**(6): 441 - 446
- 9 Berman T. Alkaline Phosphatase and Phosphorus Availability in Lake Kinneret. *Limnol Oceanogr*, 1970, **15**: 663 - 674
- 10 Sinke A J C, Comelese A A, Cappenberg Th E. Phosphatase activity in sediment of the Loosdrecht lakes. *Verh Internat Verein Limnol*, 1991, **24**: 719 - 721

- 11 Zhou Yiyong , Li Jianqiu , Zhang Min . Effects of submerged Macrophytes on kinetics of alkaline phosphatase in lake Donghu— I . Unfiltered water and sediments . *Water Research* 2000 , **34** (15) 3737 – 3742
- 12 Kalinowska K . Eutrophication process in a shallow , macrophyte dominated lake-alkaline phosphatase activity in Lake Luknajno (Poland) . *Hydrobiologia* , 1997 , **342/343** 395 – 399
- 13 Wetzel R G . Extracellular enzymatic interactions : storage , redistribution , and interspecific communication . In ; Chrost R J , eds . Microbial enzymes in aquatic environments . New York : Springer-Verlag , 1991 . 6 – 28
- 14 Serrano L , Boon P I . Effects of polyphenolic compounds on alkaline phosphatase activity : Its implication for phosphorus regeneration in Australian freshwaters . *Arch Hydrobiol* , 1991 , **123** : 1 – 19
- 15 Freeman C , Lock M A , Marxsen J , et al . Inhibitory effects of high molecular weight dissolved organic matter upon metabolic processes in biofilms from contrasting rivers and streams . *Fresh Biol* , 1990 , **24** : 159 – 166
- 16 Kang Hojeong , Freeman C , Lee D , et al . Enzyme activities in constructed wetlands : implication for water quality amelioration . *Hydrobiologia* , 1998 , **368** 231 – 235

Relationship Between the Kinetics of Alkaline Phosphatase and Aquatic Plants in Wetlands

ZHOU Yiyong LI Jianqiu ZHANG Min

(Institute of Hydrobiology , Chinese Academy of Sciences , Wuhan 430072 , P. R. China)

Abstract

Kinetics and distributions of alkaline phosphatase in water , natural and filtered ($< 0.45\mu\text{m}$) , coupled with sediment , in constructed wetland ($12.5\text{m} \times 9.5\text{m}$) inhabited by *Potamogeton crispus* L. , *Alternanthera philoxeroides* Griseb. and *Spirodela polyrhiza* L. respectively , were determined . The plants inactivated the enzyme , in kinetic sense , in surficial sediment and water , depending on species . The inactivation was most obvious in unfiltered water samples implying an enzymatic mechanism explaining the plant-algae interaction . In sediments covered by rooted plants , the enzymatic activity was lower in surficial layers , leading a nutrient retention and water quality amelioration , but significantly higher in the relatively deeper layers . The complexity of subsurface in wetland sediment deserves further study , which is of great theoretical and practical significance .

Key Words Wetland , alkaline phosphatase , kinetics , distribution