

浅水湖泊中沉积物碱性磷酸酶 动力学参数的分布^{*}

周易勇 李建秋 张 敏 陈旭东 张玉敏^{**}

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

提 要 东湖沉积物磷酸酶在较高的 pH 范围内表现出较高活性, 故为碱性磷酸酶。东湖与严西湖沉积物中碱性磷酸酶的动力学参数表现出明显的空间异质性, 且与间隙水和表层水中正磷酸根浓度无明显的对应关系。此外, 它们在垂直方向上亦极具变化, 除在沉积物表面显示较高催化效率之外, 较深层面(约距表面 8-12cm)亦有类似峰值, 这一结果补充说明了湖泊沉积物磷循环的另一活跃区域以及相应的生物化学机制。

关键词 沉积物 碱性磷酸酶 分布 浅水湖泊

分类号 P343.3 P512.3

湖泊沉积物和间隙水中营养物质的释放是决定湖泊营养状态的重要因素, 了解其补给能力和机制是预测和控制湖泊营养水平的必要基础。磷常为湖泊浮游植物生长的第一限制性营养元素, 目前关于沉积物释放磷的机理的研究偏重于探讨磷在沉积物中的吸附-解吸过程和含磷金属络合物在底层缺氧状态下的还原解离反应。然而, 磷酸酶在水体(包括湖泊^[1]和海洋^[2])有机物质的矿化过程中具有关键作用。美国田纳西州的 Melton Hill 水库、池塘和溪流沉积物中碱性磷酸酶的活性与细菌总量和 ATP 含量正相关^[3]。印度 Porto Novo 海岸和港湾沉积物中磷酸酶的活性在 7-9 月出现高峰, 这种现象与“水华”引起的有机碎屑的大量沉积和矿化过程之间有某种联系^[4]。富营养型的威尼斯泻湖沉积物中碱性磷酸酶的活性正比于磷的释放速率, 且由间隙水中溶解活性磷的浓度调节^[5]。已知淡水湖泊水柱和间隙水中碱性磷酸酶的动力学参数与磷的生物可用性有关^[6-9], 而其沉积物中磷酸酶的性质却极少见诸报道。本文拟从空间与垂直的尺度上讨论淡水湖沉积物中磷酸酶的动力学特征, 以期初步揭示湖泊沉积物磷库中有机态磷的转化潜力与补给机制。

1 材料与方 法

相互毗邻的东湖与严西湖位于武汉东郊(114°23'E, 30°33'N), 东湖的总面积为 27.9km², 平均水深为 2.21m; 严西湖的总面积为 13.0km², 平均水深为 2.0m。工业废水和生活污水的大量排放以及不合理的水产养殖致使东湖的富营养化程度日趋严重^[10]。

^{*} 国家自然科学基金(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、中国科学院“青年科学家小组”基金及农业部水产增殖生理生态开放实验室(LEPA)基金联合资助项目。

收稿日期: 2000-05-17; 收到修改稿日期: 2001-03-19。周易勇, 男, 1956 年生, 副研究员。

^{**} 现在黑龙江省桦南县环境保护局工作。

1995年5月在东湖和严西湖采集表层水(0.5m)和上覆水(距沉积物表面0.1m,先用透明度盘测量水深以期准确定位).用彼得森采泥器采集沉积物,且循离心法^[5](3000转/分.)制备间隙水.根据彼得森采泥器的性质,所得沉积物多位于表层,且有少许上覆水与之混合,为了尽可能保持间隙水的原始性,在用牛角勺将沉积物移入离心管之前,先用粗滤纸轻轻吸干表面的水分.另于1995年8月在东湖I站(图1)采样分析沉积物中酶的垂直分布模式,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.



图1 东湖和严西湖采样点分布图

Fig.1 Map of Lake Donghu and Yanxihu, showing the location of sampling sites

用孔径为 $0.45\mu\text{m}$ 的滤膜(Millipore)过滤水样,取滤液据 Murphy 和 Riley 建立的方法^[11]测定溶解正磷酸根(o-P)的浓度;以对-硝基苯磷酸二钠盐(pNPP, AG)为底物(最终浓度为 0.3mmol/L)循分光光度法测定碱性磷酸酶的活性(APA)^[12],用未过滤以及通过 $0.45\mu\text{m}$ 滤膜的间隙水样分别测定酶的总体活性(APA_{Tot})和溶解态磷酸酶的活性(APA_{Dis}).

沉积物 APA 的测定以 pNPP 作底物,用 tris 缓冲液($\text{pH}7.4$)将沉积物制备成匀浆,用纱布过滤,取 3.0mL 过滤匀浆入试管,加入底物,在 37°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^[13].且以 pH 值不同的万用缓冲液建立反应体系,分析东湖沉积物磷酸酶对 pH 的响应方式.

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

如图2所示在碱性条件下,东湖沉积物磷酸酶表现出较高活性,故为碱性磷酸酶.碱性磷酸酶多具外部功能,其主要作用是从外界向细胞提供磷营养,它的合成有赖于环境中生物可用

性磷的浓度.生长在碱性环境中的藻类和细菌通常合成较多的碱性磷酸酶^[14-16].因此,沉积物碱性磷酸酶的活性及其动力学行为无疑具有重要的生态学意义.

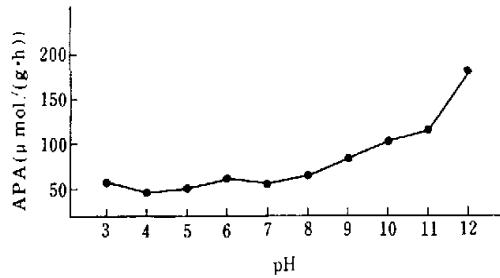


图2 不同 pH 条件下东湖沉积物表层磷酸酶的活性

Fig. 2 Phosphatase activity in sediments of Lake Donghu under different pH values

表 1 和表 2 分别给出了各站沉积物中碱性磷酸酶的动力学参数以及水样中 o-P 的浓度.酶的动力学行为具有明显的空间异质性.这种异质性已有报道,只是尚未涉及动力学参数和垂直方向.南亚海区表面沉积物磷酸酶的活性略高于 neritic 海区沉积物中的相应值^[17,18], Silva 和 Bhosle 发现, Mandovi 海湾的不同实验站之间,沉积物碱性磷酸酶活性无明显变化.而酸性磷酸酶的活性具有显著差异^[19].一般地说,粘土底质磷酸酶的活性较高,这与其中高含量的有机质和高密度的微生物种群有关^[21,22].本文报道的结果进一步体现了湖泊沉积物磷酸酶动力学参数在水平方向上分布的非均一性.

表 1 东湖及严西湖各站沉积物碱性磷酸酶的动力学参数

Tab. 1 Kinetic parameters of alkaline phosphatase in sediments at different stations in Lake Donghu and Lake Yanxihu

站点	V_{max} ($\mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{h})$)	K_m ($\mu\text{mol}/\text{L}$)	V_{max}/K_m
1	231.28	340.37	0.68
2	444.73	148.64	2.99
3	211.88	163.94	1.29
4	300.88	243.19	1.24
5	172.01	310.92	0.55
6	549.71	309.05	1.78

表 2 东湖及严西湖各站水样中 o-P($\mu\text{g}/\text{L}$)的浓度

Tab. 2 Concentrations of o-P($\mu\text{g}/\text{L}$) in water samples at different stations in Lake Donghu and Lake Yanxihu

站点	1	2	3	4	5	6
表层水	8.7	5.0	12.0	7.0	12.3	6.0
上覆水	7.0	13.0	9.0	4.5	10.0	6.0
间隙水	645.0	76.0	3.7	8.0	9.0	6.0

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, V_{max} 与 K_m 的比值可大体反映酶的催化效率.森林河流和农业区域河流沉积物中磷酸酶的活性迥然有别,前者较高,说

明该处磷营养受到限制^[20]。据此推测,酶的催化效率应与 o-P 浓度负相关。然而,除在间隙水 o-P 浓度极高的 I 站(表 2)观察到较低的 V_{\max}/K_m 值(表 1)之外,两种变量之间并未出现明晰的此消彼长的对应关系。生活污水^[23]和养殖废水^[24,25]等环境污染因素对酶的分布亦有影响。通过对东湖磷细菌种群结构的细致分析,李勤生等发现至少有 15 个属的不同菌株以其对有机磷、无机磷化合物的分解能力推动着湖泊中磷的循环,其中以芽孢杆菌属和微球菌属居于明显的优势;磷细菌在湖泊中的分布随水质的污染程度和磷化合物含量的不同而表现出明显的差别^[26]。由上述事实可知,沉积物磷酸酶的行为与分布受制于多重因素。这种现象值得进一步深入探讨。总之,在浅水湖泊沉积物中,由磷酸酶介导的磷循环具有显著的地域特征,这种变异可能与沉积物的质地、微生物的区系、磷的形态特征以及胁迫状况密切相关。

据报道,碱性磷酸酶活性的最大值出现在海洋^[2]与湖泊^[13,27]沉积物表层,且随深度的增加而递减。1995 年 8 月,东湖表面沉积物碱性磷酸酶的 V_{\max} 值最大,而 K_m 值最低(图 3),故其催化效率最高。这一结果从酶动力学的角度进一步说明,在水体沉积物的表面,由磷酸酶介导的磷循环过程是至为活跃的。值得注意的是,在实验涉及的垂直范围内,沉积物碱性磷酸酶 V_{\max} 值的另一高峰出现在距表面 8–12cm 的层面,此处间隙水中 APA_{Tot} 与 APA_{Dis} 值最大, o-P 的浓度最高。经典模式指出,湖泊沉积物正磷酸盐的释放一般遵循矿化^[28]或还原解离机制^[29],因而间隙水中 o-P 的最大值多出现在溶解氧浓度相对较高的表层或远距表层故处于极端厌氧状态的纵深层面。图 3 描述的酶活性与 o-P 浓度的峰值以及相互之间的对应关系说明,距表层 8–12cm 的中间层面系沉积物磷酸酶的另一重要作用区域,其机制在于酶的催化,而该层面 APA 的高 K_m 值可能是由与之对应的高浓度 o-P 对酶的竞争性抑制作用所致。综上所述,湖泊沉积物中存在一个尚未被充分认识的活跃的磷循环区域,即亚表层,作用于其间的关键机制是有机态磷的酶促水解。

致谢 严西湖采样点分布图及有关参数由中国科学院水生生物研究所张堂林和官子和先生提供,谨此致谢。

参 考 文 献

- 1 Chrost R J, Siuda W, Halemejkó G Z. 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
- 2 Taga N, Kobori H. Phosphatase activity in eutrophic Tokyo Bay. *Mar Biol*, 1978, 49:223–229
- 3 Saylor G S, Puziss M, Silver M. Alkaline phosphatase assay for freshwater sediments: application to perturbed sediment systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 1986, 38:922–927
- 4 Venkateswaran K, Natarajan R. Distribution of free phosphatase in sediments of Porto Novo. *Indian J Mar Sci*, 1983, 14:231–232
- 5 Degobbi D, Homme-Maslaowska E, Orio A A, et al. The role of alkaline phosphatase in the sediments of Venice Lagoon on Nutrient regeneration. *Estuar Coast Shelf Sci*, 1986, 22:425–437
- 6 周易男,李建秋,陈旭东. 东湖溶解态磷酸酶的活性动力学特征及其空间分布. *环境科学*, 1997, 18(5):37–40
- 7 周易男,李建秋,付永清等. 浅水湖泊中碱性磷酸酶活性及其动力学参数的分层现象. *湖泊科学*, 2000, 12(1):53–58
- 8 周易男,夏宜珍. 富营养水体磷酸酶动力学参数的季节变化. *湖泊科学*, 1993, 5(4):335–340
- 9 Zhou Yiyong, Zhou Xinyu. Seasonal variation in kinetic parameters of alkaline phosphatase activity in a shallow chinese freshwater lake (Donghu Lake). *Wat Res*, 1997, 31(5):1232–1235

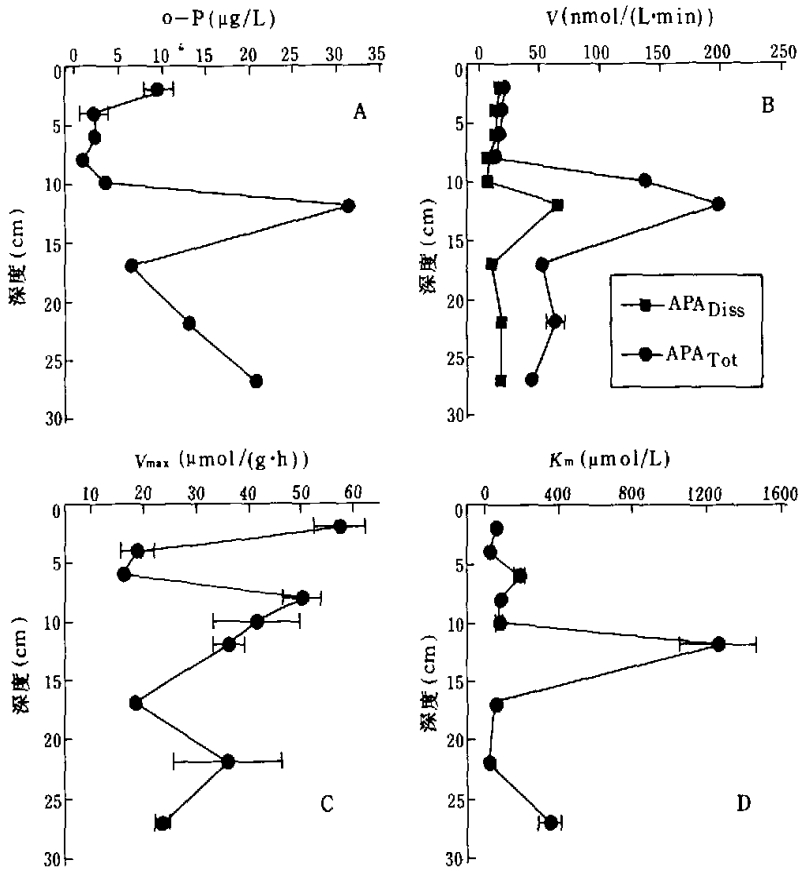


图3 东湖I站沉积物间隙水 o-P 浓度(A)、碱性磷酸酶活性(B)、沉积物碱性磷酸酶最大反应速度(C)及米氏常数(D)的垂直分布

Fig. 3 Vertical distribution of o-P concentrations (A) and values of APA_{Tot} and APA_{Diss} in interstitial water (B), along with V_{max} (C) and K_m (D) values of APA in core sediments of Lake Donghu (Station I). Samples were taken on 15 August 1995

- 10 张水元, 刘震霞, 黄耀桐. 武汉东湖营养物质氮、磷的主要来源. 海洋与湖沼, 1984, 15(3): 203-213
- 11 Murphy J, Riley P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural water. *Anal Chim Acta*, 1962, 27: 31-36
- 12 Berman T. Alkaline phosphatase and phosphorus availability in Lake Kinneret. *Limnol Oceanogr*, 1970, 15: 663-674
- 13 Sinke A J C, Cornelisse, A A, Cappenberg Th E. Phosphatase activity in sediment of the Loosdrecht lakes. *Verh Internat Verein Limnol*, 1991, 24: 719-721
- 14 Kuenzler E J, Perras J P. Phosphatase of marine algae. *Biol Bull W Woods Hole*, 1965, 128: 271-284
- 15 Aaronson S, Patni N J. The role of surface and extracellular phosphatases in the phosphorus requirement of *Ochromonas*. *Limnol Oceanogr*, 1976, 21: 838-845
- 16 Cembella A D, Antia N J, Harrison G. The utilization of inorganic and organic phosphorus-compounds as nutrients by euka

- ryotic microalgae.-A multidisciplinary pective. Part 1. *CRC Crit Rev Microbiol.*, 1984, **10**:317 - 391
- 17 Kobori H, Taga N. Occurrence and distribution of phosphatase in neritic and oceanic sediments. *Deep-Sea Research* 26A; 1979. 799 - 808
- 18 Taga N, Kobori H. Phosphatase activity in eutrophic Tokyo Bay. *Marine Biology*, 1978, **49**:223 - 229
- 19 Silva C D, Bhoale N B. Phosphorus availability and phosphatase activity in the sediments of Mandovi estuary, Goa. *Indian Journal of Marine Sciences*, 1990, **19**:143 - 144
- 20 Klotz R L. Factors controlling phosphorus limitation in stream sediments. *Limnol Oceanogr*, 1985, **30**:543 - 553
- 21 Ayyakkannu K, Chandramohan D. Occurrence and distribution of phosphate solubilizing bacteria and phosphatase in marine sediments at Porta Nava. *Marine Biology*, 1971, **11**:201 - 205
- 22 Venkateswaran K, Natarajan R. Distribution of phosphatase in sediments of Porto Novo. *Indian Journal of Marine Sciences*, 1983, **12**:231 - 232
- 23 Chappell K R, Goulder R. Enzymes as pollutants and the response of native epilithic extracellular enzyme activity. *Environ Pollut*, 1994, **86**:161 - 169
- 24 Carr O J, Goulder R. Fish-farm effluents in rivers (I) Effects on bacterial populations and alkaline phosphatase activity. *Water Res*, 1990, **24**:631 - 638
- 25 Davis S H, Goulder R. Deterioration in bacteriological quality of water through fish farms. *J Appl Bacteriol*, 1993, **74**:336 - 339
- 26 李勤生, 华 俐. 武汉东湖磷细菌种群结构的研究. *水生生物学报*, 1989, **13**(4):340 - 346
- 27 Newman S, Reddy K R. Sediment resuspension effects on alkaline phosphatase activity. *Hydrobiologia*, 1992, **245**:74 - 86
- 28 Lijklema L. Internal loading-mechanisms and assesment of magnitude. In: Vismara R, Marlorio R, mezzanatte v, et al, eds. *Lake Pollution and Recovery European Water Pollution Control Association*, Rome. 1985. 181 - 189
- 29 Carigan R, Flett R J. Postdepositional mobility of phosphorus in lake sediments. *Limnol Oceanogr*. 1981, **26**:361 - 366

Distribution of Kinetic Parameters of Alkaline Phosphatase in Sediments of Shallow Lakes

ZHOU Yiyong LI Jianqiu ZHANG Min CHEN Xudong ZHANG Yumin
(*Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, P. R. China*)

Abstract

Phosphatase in sediments in Lake Donghu, Wuhan can be classified as alkaline phosphatase, showing a higher activity at alkaline pH ranges. The kinetics of alkaline phosphatase exhibited a distinct spatial heterogeneity in sediments of Lake Donghu and Yanxihu, which is not significantly correlated with the concentrations of soluble reactive phosphorus in interstitial water, overlying water and surface water. Furthermore, it varied greatly in vertical profiles, and peaked both at surface and in a middle layer (8 - 12 cm beneath the surface). The latter added a new demension in which P cycling mediated by some biochemical mechanisms is active.

Key Words Sediments, alkaline phosphatase, distribution, shallow lakes