

海水中碱性磷酸酶活力的测定及其 在磷的循环中的作用初探*

洪华生 戴民汉 郑效成

(厦门大学海洋系, 厦门 361005)

提要 建立了海水介质中浮游植物、细菌及游离态三种碱性磷酸酶活力的分光测定法。在厦门西港海域及实验生态中分别测定了这三种碱性磷酸酶的活力;同时采用 ^{32}P 示踪法探讨了碱性磷酸酶对小球藻直接利用溶解有机磷(DOP)的影响。结果表明,浮游植物体的碱性磷酸酶活力占主导地位;当水体溶解无机磷降低到一定浓度时,浮游植物体碱性磷酸酶活力可突增,它提供了浮游植物直接利用DOP的条件。

关键词 碱性磷酸酶 活力 磷

日益增多的证据表明了磷的生物地球化学循环过程中碱性磷酸酶起着重要的作用^[2-6,10], Cembrella等视碱性磷酸酶的存在为磷限制初级生产力的一个指标^[4], Jones证实了英国16个富营养湖泊中碱性磷酸酶活力与富营养化程度成正相关^[5], 在天然水环境中,碱性磷酸酶往往与磷的循环速率、溶解有机磷(DOP)的生物可利用性^[8]及磷的有效浓度(生物可利用的磷浓度)有关,但有关这方面研究的数据还不多,特别是国内至今尚未见这方面的报道。

本文建立了海水介质中浮游植物、细菌和游离态三种碱性磷酸酶活力的分级测定方法,并把该法应用于现场测定和培养实验中,着重探讨了碱性磷酸酶在各载体相的分布、碱性磷酸酶活力与介质溶解无机磷(DIP)的关系以及浮游植物直接利用溶解有机磷(DOP)的可能性与现实性。

一、实验与结果

1. 碱性磷酸酶活力的测定方法

碱性磷酸酶能催化水解对硝基苯酚磷酸二钠(PNP-P),水解产物对硝基苯酚(PNP)具有稳定的黄色,可进行分光测定^[4]。天然海水样品中存在碱性磷酸酶,外加底物PNP-P后,经一定反应时间产生黄色PNP,而PNP的产生速率即为碱性磷酸酶活力(APA)大小的指标^[2,9]。

影响酶促反应的主要条件有pH、温度、反应时间及反应物体积,经过了多种条件实

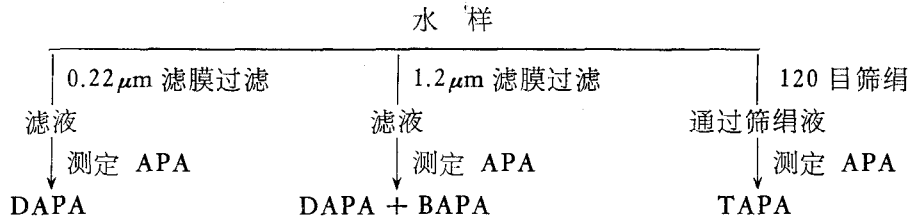
* 国家自然科学基金资助,碱性磷酸酶活力测定得到欧阳培老师的指导, ^{32}P 放射性活度测定得到李文权老师的大力支持,在此一并致谢。

接受日期: 1991年1月8日。

验,最终选择反应条件为: $\text{pH} = 8.20$, $T = 27.8^\circ\text{C}$, 反应物体积 4ml, 反应时间 5h。反应产物用 721C 分光光度计在 400nm 下测定,测定的工作曲线如图 1 所示。

2. 现场浮游植物、细菌及游离态三种碱性磷酸酶活力的分级测定

(1) 实验流程 现场水样碱性磷酸酶活力分级测定流程图(参照文献[3]的方法改进而成)如下:



其中, APA 为碱性磷酸酶活力; TAPA 为样品总碱性磷酸酶活力; PAPA 为浮游植物体碱性磷酸酶活力, $\text{PAPA} = \text{TAPA} - \text{DAPA} - \text{BAPA}$; BAPA 为细菌碱性磷酸酶活力; DAPA 为游离态碱性磷酸酶活力。

(2) 现场海水中碱性磷酸酶的分布 分别在 1989 年 3 月 24 日、1989 年 5 月 20 日及 1990 年 2 月 23 日于厦门西港进行了三次现场碱性磷酸酶活力的分级测定, 结果见表 1, 取样站位如图 2 所示。由表 1 可见, 水体中游离态 APA 变化不甚显著, 三次测定均在 $15.0 - 30.0 \times 10^{-7} \mu\text{mol}/(\text{ml} \cdot \text{min})$ 之间; 碱性磷酸酶主要分布于浮游植物体内, 浮游植物体的 PAPA 占水样总 APA 的百分比平均达 66%; 另外, APA 与介质溶解无机磷 (DIP) 浓度不存在明显相关关系。但值得注意的是, 1989 年 3 月 24 日 3 号站表层 $\text{DIP} = 0.06 \mu\text{mol}/\text{L}$, 已接近 DIP 测定的最低检测限, 此时 PAPA 达 $162.6 \times 10^{-7} \mu\text{mol}/(\text{ml} \cdot \text{min})$, 比其它站位的 PAPA 高出甚多; 同时, 该航次在该站位出现唯一的 BAPA 值, 看来生物体内碱性磷酸酶活力与介质溶解无机磷的浓度有一定的相关性, 但其关系并非单一的正或负相关关系, 关于这一点将在培养实验中进一步讨论。

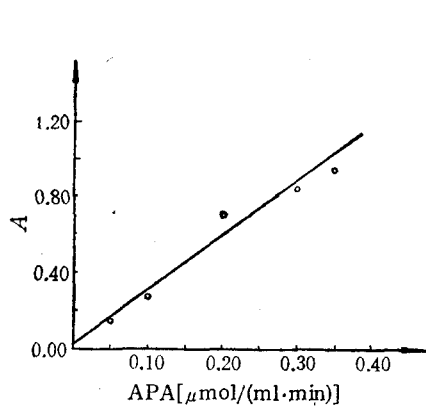


图 1 碱性磷酸酶活力工作曲线

Fig. 1 Calibration curve of APA

$$A = 1.80 \times 10^{-2} C + 1.34 \times 10^{-2} (r = 0.999, n = 5)$$

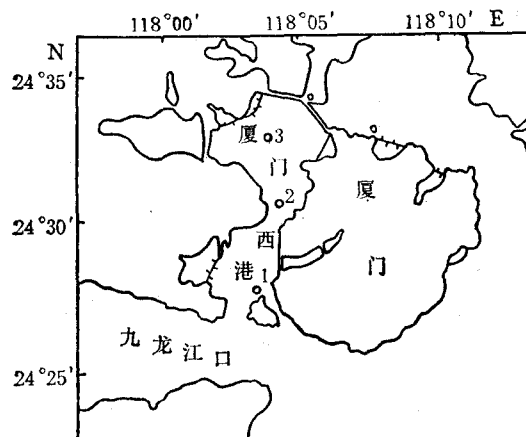


图 2 取样站位图

Fig. 2 Sampling location

表 1 现场碱性磷酸酶活力测定结果

Tab. 1 Observed results of alkaline phosphatase activity in situ

测定时间	站位	层次	APA [$10^{-7} \mu\text{mol}/(\text{ml} \cdot \text{min})$]				DIP ($\mu\text{mol}/\text{L}$)
			DAPA	BAPA	PAPA	TAPA	
1989	1	表层	—	—	4.79	4.79	0.34
3.24		底层	—	—	79.0	79.1	0.21
	2	表层	15.9	—	86.5	102	0.10
		底层	23.3	—	30.8	54.2	0.43
	3	表层	19.6	75.4	162	257	0.06
		底层	29.9	—	6.65	36.6	0.11
1989	3	表层	15.9	79.1	116	211	0.72
5.20		底层	19.6	27.1	107	153	0.67
1990	3	表层	19.6	11.1	50.1	80.9	0.43
2.23		底层	—	—	—	—	—

3. 培养实验

(1) 培养实验过程中 APA 的变化 图 3 所示的是小球藻纯种无菌培养过程中 DIP, DAPA, PAPA, 细胞密度的变化。结果表明, 随生物生长繁殖, DIP 被消耗而降低, 游离态碱性磷酸酶活力 (DAPA) 变化不显著, PAPA 在培养初期变化不大, 但到了第 8 天, PAPA 迅速增大, 达到最大的增长斜率, 而此时 DIP 是降到了最低值的第 2 天。

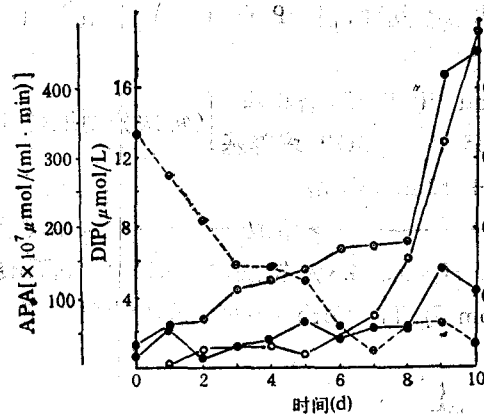


图 3 培养实验过程中 DIP, APA, 细胞密度的变化

Fig. 3 Variation of DIP, APA and the cellular density during the incubation of *Chlorella* sp.

○ ---- DIP; ● ---- DAPA; ○ ---- PAPA; ○ ---- 细胞密度。细胞密度以 410nm 下的吸光值 A 表示。

综合现场观测结果与培养实验结果可以推测, DIP 对 PAPA 的影响作用主要在介质 DIP 较低时产生, 尽管目前尚难确定该 DIP 最低值的界限, 但可认为在某一界限值以上, DIP 对 PAPA 的影响是不显著的, 下面的实验将进一步证实这一推测。

(2) DIP 浓度对 APA 的影响 取对数生长期小球藻培养液, 分成六组, 外加 DIP, 培养 4h, 测定 DIP, PAPA, 结果如表 2 所示。由表 2 可见, 在较高 DIP 浓度的

表2 DIP 浓度对 APA 的影响

Tab. 2 The influence of DIP concentration upon APA

序 号	DIP ($\mu\text{ mol/L}$)	APA [$10^{-7} \mu\text{ mol}/(\text{ml} \cdot \text{min})$]		
		DAPA	PAPA	TAPA
1	1.15	56.8	189.4	246
2	2.66	64.2	39.0	93.9
3	3.07	66.1	29.7	105
6	3.15	53.1	44.6	97.6
7	4.51	62.4	39.0	101
8	6.37	66.1	39.0	105

介质中, DIP 对 APA 的影响不大;只有在 DIP 较低时(本实验条件下, $\text{DIP} < 2.66$), PAPA 才有突跃性的增大。同时还可观察到不同浓度下 DAPA 的变化始终不大, 这与现场观测的结果也是类似的。

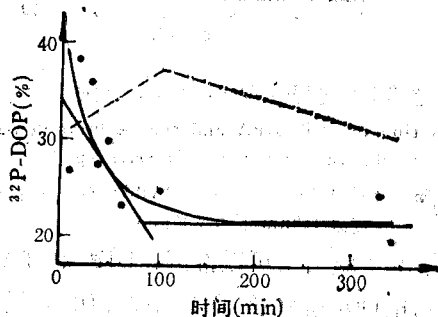
(3) 小球藻对 DOP 的利用 由现场观测与上述的培养实验的结果似乎暗示了在较低 DIP 介质浓度下, 小球藻具有直接利用 DOP 的条件, 因此, 进一步运用 ^{32}P 放射性核素示踪法进行小球藻对 DOP 的利用性实验。

小球藻培养液接种培养至对数生长期, 加 $^{32}\text{P}\text{-H}^3\text{PO}_4$ 示踪剂继续培养至 DIP 耗尽, 过滤取滤液, 此时, 滤液基本含 $^{32}\text{P}\text{-DOP}$, 以该滤液为培养基接入小球藻藻种, 进行脉冲标记试验(另做一组空白, 即不接藻种, 视 $^{32}\text{P}\text{-DOP}$ 自然变化)。开始实验时, 以 10min 为间隔取样, 实验流程如下所示:

15ml 藻种 + 135ml $^{32}\text{P}\text{-DOP}$ 培养基
 15ml 重蒸水 + 135ml $^{32}\text{P}\text{-DOP}$ 培养基 } (每次分别取样 12ml) $\xrightarrow{\text{过滤}}$
 + 1ml 钼铈试剂 + 12ml 异丁醇

取滤液 $\xrightarrow{\text{萃取}}$ 取水相测放射性活度 (cpm)

其中, 钼铈试剂取 4.8mol/L H_2SO_4 、4.8% 钼酸铵、0.218% 酒石酸铈钾, 按 5:2:1 的比例混合配成; 放射性活度 cpm 用 Tri-Carb 4640 型液闪计数仪测定。实验结果如图 4 所

图4 小球藻对 $^{32}\text{P}\text{-DOP}$ 的吸收曲线Fig. 4 $^{32}\text{P}\text{-DOP}$ Uptake by *Chlorella* sp.
虚线表示 $^{32}\text{P}\text{-DOP}$ 的自然变化。

示。由图可见,未加小球藻的水样 $^{32}\text{P-DOP}$ 变化不大;接入小球藻后, $^{32}\text{P-DOP}$ 迅速降低;小球藻利用其本身产生的 DOP 的吸收速率常数为 $1.46 \times 10^{-3}/\text{min}$ (计算方法参照 Lean^[7]);小球藻对 $^{32}\text{P-DOP}$ 的吸收曲线与普遍的吸收曲线极为相似,大致在 2h 内达到吸收平衡。

二、讨论与小结

现场观测与培养实验均表明在正常营养状况下,浮游植物是碱性磷酸酶的主要载体, Veldhnis^[10] 等人用荧光法测得的碱性磷酸酶活力也以藻类为最大,这一结果暗示了浮游植物直接利用生源 DOP 的量可能比以往所认识的要大,我们的示踪实验也证实了小球藻对生源 DOP 有再利用的能力,但有关不同藻种对 DOP 的利用问题以及这种利用与碱性磷酸酶的相关性实质尚有待进一步研究。

另外, Cembrella 等认为只有在 DIP 很低的情况下,碱性磷酸酶才会被激活^[9]。我们的实验也表明,高浓度下 DIP 对 APA 的影响是微不足道的,但当 DIP 降到一定低浓度时会激发 APA 达可观的增大量,而且增大量也主要体现在 PAPA 上,这与浮游植物对 DOP 的利用也有一定的关联;与此同时, DAPA 的相对恒定性似乎还表明,水体 DOP 由水体中碱性磷酸酶分解再生为 DIP 的这一途径的重要性还值得进一步进行实验加以比较。

参 考 文 献

- [1] 欧阳培, 1985, 几种重金属离子对厦门文昌鱼碱性磷酸酶的作用, *海洋环境科学*, 4 (3): 25—31.
- [2] Berman, T., 1970, Alkaline phosphatases and phosphorus availability in Lake Kinneret, *Limnol. Oceanogr.*, 15: 663—674.
- [3] Berman, T., 1988, Differential uptake of orthophosphate and organic phosphorus substrates by bacteria and algae in Lake Kinneret, *J. Plankt. Res.*, 10: 1239—1249.
- [4] Cembrella, A. D. et al., 1983, The utilization of inorganic phosphorus and organic compounds as nutrients by eukaryotic microalgae: a multidisciplinary perspective: Part I. *CRC, Crit. Rev. Microbiol.*, 10: 317—391.
- [5] Kensei Kobayashi et al., 1983, Identification of alkaline phosphatase in sea water, *J. Inorg. Biochem.*, 18: 41—47.
- [6] Lean, D. R. S., 1973, Phosphorus dynamics in lake water, *Science*, 179: 678—679.
- [7] Lean, D. R. S. and White, E., 1983, Chemical and radiotracer measurements of phosphorus uptake by plankton, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 40: 147—155.
- [8] Pyszard, J. Chrost et al., 1986, A method for determining enzymatically hydrolyzable phosphate (EHP) in natural waters, *Limnol. Oceanogr.*, 31(3): 662—667.
- [9] Taga, N. and Kobori, H., 1978, Phosphatase activity in eutrophic Tokyo Bay, *Mar. Biol.*, 49: 223—229.
- [10] Veldhnis, M. J. W. et al., 1987, Availability of phosphorus sources for blooms of phaeocystic Pouchetii (Haptophyceae) in the North Sea: Impact of the River Rhine, *Neth. J. Sea Res.*, 21(3): 219—229.

MEASUREMENT OF ALKALINE PHOSPHATASE ACTIVITY IN SEAWATER SUBSTRATES AND INVESTIGATION ON THE ROLE OF ALKALINE PHOSPHATASE IN THE CYCLING OF PHOSPHORUS

Hong Huasheng, Dai Minhan and Zheng Xiaocheng

(Department of Oceanography, Xiamen University, Xiamen 361005)

ABSTRACT

Spectrophotometric analysis of PAPA (alkaline phosphatase activity of phytoplankton), BAPA (bacteria alkaline phosphatase activity), and DAPA (dissolved alkaline phosphatase activity) in seawater substrate showed these three APA detected in Xiamen harbour seawater and in a laboratory culture system showed that phytoplankton is the major carrier of alkaline phosphatase, which implies the capability of directly utilizing dissolved organic phosphorus (DOP) of algae. Radiophosphorus tracer study also demonstrated that *Chlorella* sp. can use biooriginal DOP. It was found that APA is stimulated only when the dissolved inorganic phosphorus (DIP) level in the seawater is low (especially when the PAPA increases dramatically) which provides the bioavailable phosphorus from DOP for phytoplankton growth when DIP is depleted. DAPA is relatively constant whether DIP is low or high, suggesting that the importance of regeneration of DIP from DOP through catalytic hydrolysis by dissolved alkaline phosphatase needs to be further studied.

Key words Alkaline phosphatase, Activity, Phosphorus.