

溶解态磷在海洋微藻碱性磷酸酶 活力变化中的调控作用*

黄邦钦

黄世玉

(国家教委海洋生态环境开放研究实验室, 厦门大学环境科学研究中心, 厦门 361005)

(集美大学水产学院养殖环境系, 集美 361021)

翁妍

洪华生

(国家教委海洋生态环境开放研究实验室, 厦门大学环境科学研究中心, 厦门 361005)

(国家教委海洋生态环境开放研究实验室, 厦门大学环境科学研究中心, 厦门 361005)

摘要 在实验室批量培养条件下, 测定了海洋微藻培养体系中碱性磷酸酶活力 (APA) 和各形态溶解磷的动态变化, 分析了二者之间的关系. 结果表明, 在批量培养过程中, APA 的动态变化呈“S”形曲线, 各形态溶解磷在其变化过程中所起的调控作用不同, 介质中溶解无机磷和小分子溶解有机磷的浓度是激发 APA 发生变化的主要调控因子, 大分子溶解有机磷的浓度对 APA 的作用不明显, 但 APA 的增大可加速微藻利用大分子溶解有机磷的速率. 微藻的种类和丰度不影响 APA 的动态变化形式及其调控机理.

关键词 海洋微藻 碱性磷酸酶活力 溶解有机磷 溶解无机磷 丰度

1 引言

随着对浮游植物生长磷限制研究的逐步深入, 碱性磷酸酶 (Alkaline phosphatase, AP) 引起越来越多的关注. 过去一般通过测定水体中溶解无机磷 (DIP) 的含量或通过研究浮游植物对 DIP 的利用来探讨磷限制及其指示参数^[1~4]. 近来的研究表明, 浮游植物可以利用溶解有机磷 (DOP)^[5~9]和颗粒磷^[10], 并认为 AP 在这一过程中起着重要的作用^[6~9], AP 与维持一定的细胞磷和 N/P 比值也有关^[11], 以水体碱性磷酸酶活力 (Alkaline phosphatase activity, APA) 作为磷限制参数正逐步得到应用^[3,12]. 但关于 APA 调控机制的研究仍有待进一步深入

本文于1997-01-27收到, 修改稿于1998-08-27收到.

* 国家自然科学基金资助项目 (编号: 49206063).

第一作者简介: 黄邦钦, 男, 34岁, 副研究员, 博士, 从事海洋生态学、微藻生理生态学及生源要素的生物地球化学研究.

开展. 本实验在已有研究的基础上, 集中探讨海洋微藻培养体系中 *APA* 的动态变化规律, 以及各形态磷在其变化中的作用, 同时也为明确 *APA* 在藻类利用 DOP 过程中的作用, 为实际应用 *APA* 作为藻类生长磷限制的指示参数, 提供理论参考.

2 材料和方法

2.1 藻种及培养

本实验所用藻种为异胶藻 (*Heterogloea* sp.) 和小球藻 (*Chlorella vulgaris* Beij.).

表1 本实验所用的磷源及简写

| 磷源 | 名称 | 简写 |
|--------|-----------|---------|
| 无机磷 | 磷酸二氢钠 | DIP |
| 小分子有机磷 | 6-磷酸葡萄糖 | G. 6. P |
| | 甘油磷酸钠 | G. P |
| 大分子有机磷 | 蛋黄卵磷脂 | LEC |
| | 鱼精子脱氧核糖核酸 | DNA |
| | 酵母核糖核酸 | RNA |

在高潮时采集厦门港区表层海水, 经过滤、消毒后作为储备海水. 以 *f/2* 培养液为基础, 调整起始磷浓度为 $5 \sim 10 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ (表 1), 保持 $N/P=16$, 进行批量培养. 光暗周期为 $10:14$, 光强为 3500lx , 控制水温在 $20^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$.

2.2 各参数测定

2.2.1 细胞数测定

用分光光度计测定藻液消光值 ($\lambda=440 \text{ nm}$), 用藻类细胞计数框 (0.1

cm^3) 计算实验藻类的细胞数, 制作细胞数-消光值工作曲线.

2.2.2 磷的测定

DIP 用以抗坏血酸为还原剂的磷钼蓝比色法测定, 总溶解态磷 (TDP) 用过硫酸钾氧化后, 用磷钼蓝比色法测定, DOP 为 TDP 和 DIP 的浓度差.

2.2.3 碱性磷酸酶活力的测定

采用 3-邻甲基荧光素磷酸盐 (Sigma 产品) 为底物, 主要实验条件为 $\text{pH}=8.7$, 培养温度 28°C , 培养时间 2 h. 荧光强度在日立 850 型分光光度计测定 ($E_x=400 \text{ nm}$, $E_m=520 \text{ nm}$), 酶活力以每小时每毫升培养液降解产生的荧光素量来表示 [$\mu\text{mol}/(\text{cm}^3 \cdot \text{h})$].

3 结果

3.1 海洋微藻培养体系中 *APA* 动态

实验结果表明 (图 1): 培养体系中 *APA* 的动态变化接近 “S” 形曲线, 可划分为 3 个时期:

- (1) 延缓期, 此时各培养体系的 *APA* 均处于一个低值水平, 不同的体系只是持续的时间不同;
- (2) 突越期, 持续时间极短, 说明碱性磷酸酶的活力变化速度很快;
- (3) 反应期, 此时 *APA* 处于高值水平.

3.2 海洋微藻培养体系中各形态磷在 *APA* 动态变化中的调控作用

3.2.1 DIP 浓度的影响

实验结果表明: 培养体系中 DIP 浓度与 *APA* 变化有着密切的联系 (图 2), 表现为当介质中尚存在 DIP 时, *APA* 必然处于延缓期, 只有当介质中的 DIP 被耗尽以后, 才可能观察到 *APA* 的跃迁. 可见, DIP 的耗尽是 *APA* 跃迁的必要条件之一.

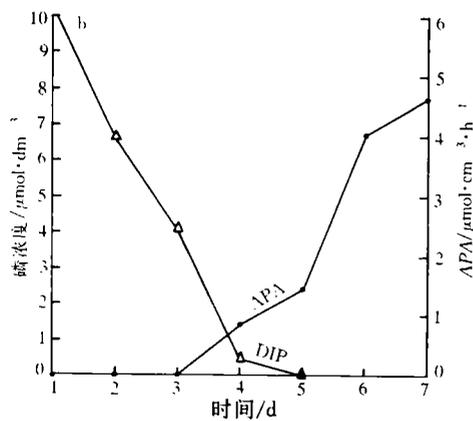
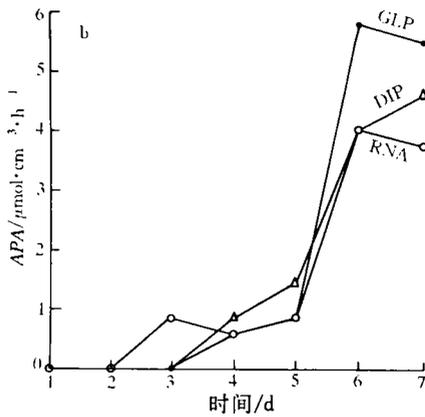
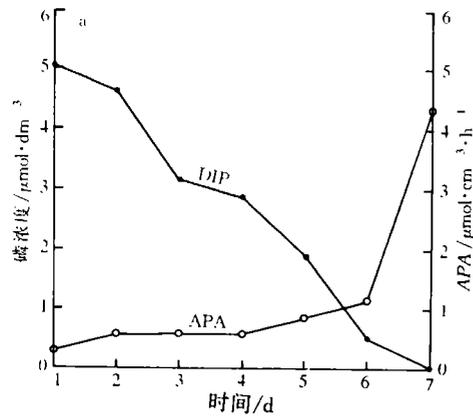
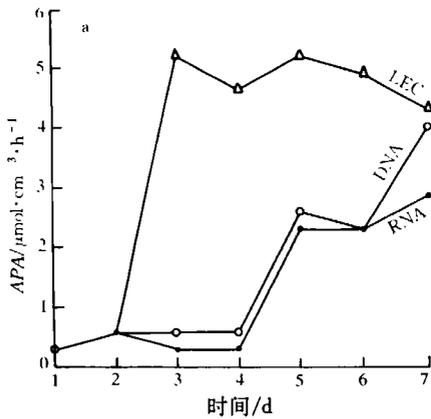


图1 培养体系中APA的动态变化

a. 异胶藻 b. 小球藻

图2 培养体系中DIP浓度对APA的影响

a. 异胶藻 b. 小球藻

3.2.2 小分子DOP浓度的影响

实验结果表明(图3):培养体系中小分子DOP(如G.P和G.6.P)的浓度对APA的影响类似于DIP,同样表现为当介质中存在这类物质时,APA必然处于延缓期,只有当介质中的小分子DOP也被耗尽后,才可能观察到APA的跃迁.如图3a, DIP在第4天即接近于零,但由于介质中始终存在一定的G.6.P, APA始终没有发生跃迁;图3b中, DIP在第3天即接近于零,但APA却到第5天G.P也被耗尽以后才发生跃迁.可见,介质中小分子DOP的耗尽是APA发生跃迁的另一必要条件.

3.2.3 大分子DOP浓度的影响

实验结果表明(图4):在培养过程中,随着藻类的生长繁殖,体系中大分子DOP的浓度逐渐降低,这说明海洋微藻能够利用这类物质作为生长磷源,但其浓度大小对APA的影响并不明显.由图4可见, APA跃迁前后DOP的浓度并无本质差别,激发APA发生跃迁的仍然是DIP的耗尽.只是APA活力的增大引起大分子DOP的降解速率加快,这说明当介质中的DIP被耗尽后,海洋微藻可能通过激活APA来加快对大分子DOP的利用以满足其生长和繁殖的需要.

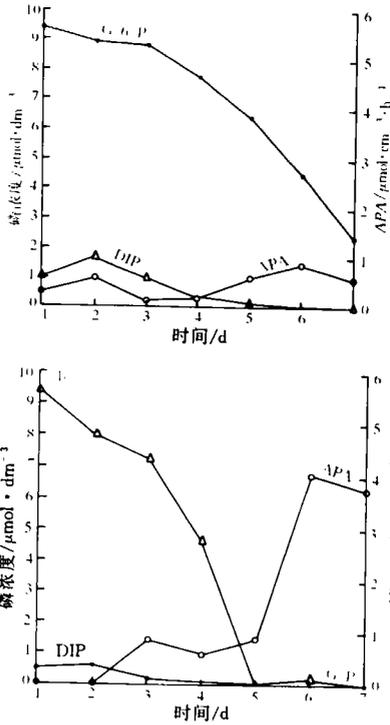


图3 培养体系中小分子DOP浓度对APA的影响
a. 异胶藻 b. 小球藻

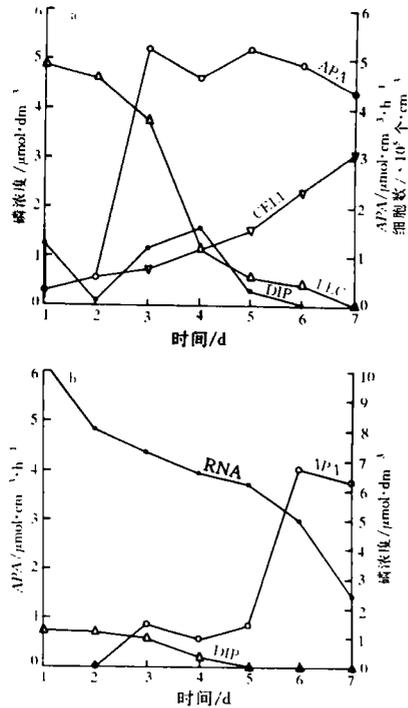


图4 培养体系中大分子DOP浓度对APA的影响
a. 异胶藻 b. 小球藻

3.3 培养体系藻类丰度与APA的关系

实验结果表明,在一定的培养体系中,微藻的丰度大小不影响APA的大小变化.不仅在延缓期内,APA未被激活时,体系APA不随着微藻丰度的增加而增加(见图5),即使在反应期内,碱性磷酸酶处于激活状态时,APA也不随着微藻丰度的增加而增加,而是稳定在一定范围内(图4a).不同种类的培养体系微藻丰度和APA只是数量大小上存在差异,其变化趋势以及二者之间的非相关性是一致的.因此,我们认为APA的动态变化规律与微藻的丰度和种类无关.

4 讨论和小结

4.1 海洋微藻培养体系APA的动态变化规律及其调控机理

关于APA的调控机理的研究,最早发现浮游植物体内的碱性磷酸酶是一种诱导酶,在磷限制时可被诱导激活^[13,14],后来发现只有在DIP很低的情况下,碱性磷酸酶才会被诱导激活^[12],近来的研究又发现,高浓度下DIP对APA的影响微不足道,但当DIP降到一定浓度时则会激发APA达可观增量^[7].这些研究都仅仅涉及DIP对APA的影响,关于DOP对APA的影响则很少提及.本文不仅分析了DIP对APA的影响,证实了以上结果,还分析了不同类型的DOP与APA动态变化的关系,进一步充实了这一调控机理.

综合我们的结果可以发现, 培养体系 *APA* 的动态变化规律不受微藻的种类和丰度的影响, 不同形态的溶解态磷中, 大分子 *DOP* 的浓度大小对 *APA* 动态变化的影响不显著, *DIP* 和小分子 *DOP* 的浓度是 *APA* 动态变化的主要调控因子, 表现为当介质中尚存在一定浓度的溶解无机磷或小分子溶解有机磷时, 碱性磷酸酶活力必定处于低值水平, 对应于 *APA* 动态曲线的延缓期; 当介质中溶解无机磷或小分子溶解有机磷几乎被耗尽时, 则会激发碱性磷酸酶活力跃迁至某一高值, 对应于 *APA* 动态曲线的反应期. 可见, 培养体系 *APA* 动态变化的“S”形曲线正是其调控机理的外在表现, 二者是一致的.

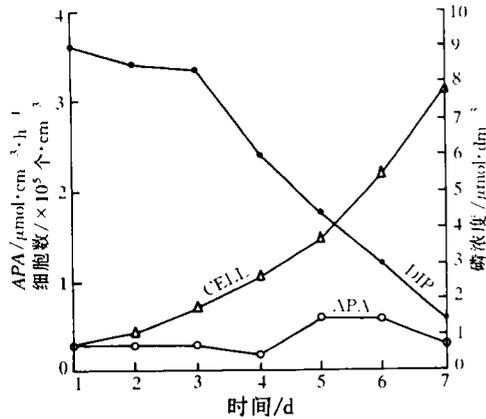


图5 培养体系中藻类丰度与 *APA* 的关系

4.2 AP 在藻类利用 *DOP* 过程中的作用探讨

关于 *DOP* 的生物可利用性已有不少报道^[5-9]. 我们利用碱性磷酸酶制剂 (Sigma 产品) 对本实验所用的大分子 *DOP* 化合物进行酶解的实验结果表明 (表 2): 碱性磷酸酶可以降解这些大分子 *DOP* 化合物. 我们的培养实验结果也表明, 体系中 *APA* 的增大可加快大分子 *DOP* 的降解速率. 综合这些结果, 我们认为当可供直接吸收利用的 *DIP* 和小分子 *DOP* 被耗尽时, 海洋微藻可以通过激活碱性磷酸酶来分解利用大分子 *DOP* 化合物. 这对于低磷海域藻类生长的营养盐限制研究及环境保护具有重要的意义.

表 2 *APA* 对大分子 *DOP* 的酶解作用

(单位: $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$)

| 大分子 <i>DOP</i> | DNA | RNA | LEC |
|---------------------------|------|------|-------|
| 用 AP 酶解后的 <i>DIP</i> 浓度 | 54.2 | 75.8 | 122.9 |
| 对照组 (无酶解) 的 <i>DIP</i> 浓度 | 27.2 | 18.1 | 67.1 |

4.3 以 *APA* 作为水体磷限制指示参数的可行性和优点

过去, 在研究天然水体浮游植物生长繁殖的磷限制时, 多以 *TDP*、*DIP*、 V_{\max} (浮游植物对磷的最大吸收速率) 等作为指示参数, 存在许多不足之处, 特别由于不同季节浮游植物种类组成和丰度不同, 难以在较长时间内进行连续的考察和比较. 而应用 *APA* 作为天然水体磷限制的指示参数, 则可克服不同季节浮游植物种类组成和丰度的影响, 从而可通过连续测定, 综合反映某一较长时期内水体中各形态磷的状况^[3,12,15]. 我们的单种培养实验结果也表明, *APA* 的动态变化主要受各形态磷的影响, 不受藻种和丰度的影响, 从实验室角度支持了这一实际应用.

参考文献

- 胡明辉, 杨逸萍, Harrison P J. 长江口浮游植物生长的磷酸盐限制. 海洋学报, 1989, 11(4): 439~443
- Suttle C X, Harrison P J. Ammonium and phosphate uptake rate, N:P supply ratios and evidence for N and P limitation in some oligotrophic lake. Limnol. Oceaogr., 1988, 33(2): 186~202

- 3 Istvanovics Vera, Petterson Kurt, Pierson Don *et al.* Evaluation of phosphorus deficiency indicators for summer phytoplankton in Lake Erken. *Limnol. Oceanogr.*, 1992, **37**(4): 890~900
- 4 黄邦钦, 洪华生. 几种藻类吸收磷酸盐动力学的初步研究. *厦门大学学报 (自然版)*, 1994, **33**(增刊): 7~11
- 5 黄邦钦, 王海黎, 洪华生等. 厦门海域浮游植物和细菌对溶解有机磷的利用研究. *厦门大学学报 (自然版)*, 1996, **35**(4): 625~630
- 6 Conter Jr JB, Wetzer R G. Uptake of dissolved inorganic and organic phosphorus compounds by phytoplankton and bacterioplankton. *Limnol. Oceanogr.*, 1992, **37**(2): 232~243
- 7 洪华生, 戴汉民, 郑郊成. 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): 415~420
- 8 王海黎, 洪华生, 黄邦钦. 海洋环境中溶解有机磷的生物活性初探. *厦门大学学报 (自然版)*, 1995, **34**(3): 415~420
- 9 Van Boekel W H M. Ability of *Phaeocytis* sp. to grow on organic phosphorus: direct measurement and prediction with the use of an inhibition constant. *J. Plankton Res.*, 1991, (13): 959~970
- 10 杨逸萍, 宋端星, 胡明辉. 河口悬浮物与海洋近岸表层沉积物中磷的海洋浮游植物生物测定. *厦门大学学报 (自然版)*, 1996, **35**(4): 574~579
- 11 Waiser M J, Roberts R D. Microbial nutrient limitation in prairie saline lakes with high sulfate concentration. *Limnol. Oceanogr.*, 1995, **40**(3): 566~574
- 12 Smith R E H, Kalff J. The effect of phosphorus limitation on algal growth rate: evidence from alkaline phosphatase. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 1981, **38**, 1 421~1 427
- 13 Kuenzler E J, Ferras J P. Phosphatase of marine algae. *Biol. Bull. (Woods Hole. Mass.)*, 1965, (128): 271~284
- 14 Healey F P, Hendzel L L. Effect of phosphorus deficiency on two algae growing in chemostats. *J. Phycol.* 1975, (11): 303~309
- 15 Vrba J, Vrhnaek V, Heizlar J *et al.* Comparison of phosphorus deficiency indices during a spring phytoplankton bloom in a eutrophic reservoir. *Freshwater Biol.*, 1995, **33**(1): 73~81

Effect of dissolved phosphorus on alkaline phosphatase activity in marine microalgae

Huang Bangqin,¹ Huang Shiyu,² Weng Yan,¹ Hong Huasheng¹

1. *Research Laboratory of SEDC on Marine Ecological Environment/Environmental Science Research Center, Xiamen University, Xiamen 361005*
2. *Fishery College, Jimei University, Jimei 361021*

Abstract—It was thought that phosphorus limited the primary productivity in lake while nitrogen in ocean, but recent studies showed that phosphorus limited the phytoplankton growth in the specific coastal waters, results also indicated that phytoplankton could utilize dissolved organic phosphorus (DOP) and alkaline phosphatase (AP) played an important role in the utilization of DOP. However, the variation and controlling mechanism of AP are still poorly understood. The present study focused on the effects of different species of dissolved phosphorus on the variation of AP in algal batch culture. The results showed that variation of alkaline phosphatase activity (APA) was closed to "S" curve, different species of dissolved phosphorus had different effects on APA. The concentrations of dissolved inorganic phosphorus and small molecular dissolved organic phosphorus had a significant effect on APA, while the concentration of large molecular dissolved organic phosphorus (LDOP) has little effect on APA, but the increasing of APA could accelerate the decomposing of LDOP in the medium. Results also showed that algae species and abundance had little effect on APA.

Key words Alkaline phosphatase activity, phosphorus, microalgae