

AKTYWNOŚĆ ALKALICZNYCH FOSFATAZ W CIEKACH WODNYCH
ZLOKALIZOWANYCH NA TERENACH WIEJSKICH
NA TLE WYBRANYCH FIZYKOCHEMICZNYCH
WSKAŹNIKÓW JAKOŚCI WODY

Hanna Siwek

Katedra Chemii Ogólnej, Akademia Rolnicza
ul. J. Słowackiego 17, 71-434 Szczecin
e-mail: hanna.siwek@agro.ar.szczecin.pl

Streszczenie. Gwałtowne przyśpieszenie procesu eutrofizacji wód obserwuje się obecnie nie tylko w wodach stojących, ale także w wodach płynących. Badano wody wybranych rzek zlokalizowanych na terenach rolniczych. Próby wody do badań pobierano od kwietnia do października 2006 roku. W każdej próbie oznaczono: temperaturę, zawartość azotu ogólnego (TN), fosforu ogólnego (TP), fosforu fosforanowego, chlorofilu *a* oraz aktywność alkalicznych fosfataz (APA). Pierwiastki limitujące rozwój fitoplanktonu w badanych wodach zostały określone w oparciu o stosunek TN:TP. Największą aktywność fosfataz oraz największe zawartości związków biogennych odnotowano w sezonie wiosennym.

Słowa kluczowe: aktywność alkalicznej fosfatazy, eutrofizacja, fosfor, rzeki

WSTĘP

Stan troficzny wód nie zależy od ogólnej zawartości związków biogenicznych w wodzie, ale od ich dostępności biologicznej. W przypadku fosforu przyswajalną formą, zarówno dla glonów jak i bakterii, są jony ortofosforanowe, które powstają w reakcjach hydrolizy nierozpuszczalnych frakcji fosforu. Procesy te są katalizowane przez enzymy fosfohydrolityczne – niespecyficzne fosfomonoesterazy, zwane powszechnie fosfatazami. Fosfatazy są wytwarzane przez prawie wszystkie organizmy wodne: bakterie, glony, grzyby i zooplankton (Siuda 2001).

Ocena i modelowanie trofii środowiska wodnego są ściśle związane ze znalezieniem związków ograniczających produkcję pierwotną. Istnieje kilka metod wyznaczania pierwiastków limitujących zakwity glonów, np. poprzez chemiczne

badanie stosunku zawartości azotu do fosforu w wodzie lub stosując biotesty potencjalnego wzrostu glonów. Na szczególną uwagę zasługuje badanie aktywności alkalicznej fosfatazy (APA), o wartości której decydują zarówno procesy chemiczne jak i biologiczne zachodzące w środowisku wodnym. APA jest wskaźnikiem stopnia ograniczenia rozwoju biomasy przez fosfor (Forsberg 1993). W wielu pracach obliczono odwrotnie proporcjonalne zależności między zawartością fosforu i APA w ekosystemach wodnych, np. między zawartością jonów fosforanowych i APA (Jansson i in. 1988, Barik i in. 2001) oraz zawartością fosforu ogólnego i APA (Berman 1970, Smith i Kalff 1981, Yiyong and Xinyu 1997).

Gwałtowne przyspieszenie procesu eutrofizacji wód obserwuje się obecnie nie tylko w wodach stojących, ale także w wodach płynących, szczególnie w ich strefach przyujściowych. Ponieważ znaczna część związków biogenicznych pochodzi ze spływów obszarowych, których ocena jako źródeł zanieczyszczeń jest bardzo trudna, proces zanieczyszczania wód powierzchniowych związkami azotu i fosforu kontroluje się poprzez ich monitorowanie.

Celem pracy jest ocena sezonowych zmian parametrów kinetycznych reakcji katalizowanych przez alkaliczne fosfatazy w ciekach wodnych zlokalizowanych na terenach rolniczych na tle wybranych wskaźników fizykochemicznych badanych wód.

MATERIAŁ I METODY

Badano wody rzek: Ostrowicy, Krzekny, Iny, Dziwny, Gowienicy, Myśli, Kanału Młyńskiego, Wołczenicy i Stepnicy oraz Odry, na odcinkach ujściowych przepływających przez tereny wiejskie. Wyjątek stanowiła rzeka Odra, z której wody pobierano w punkcie kontrolno-pomiarowym na wysokości Krajnika. Próby wody do badań pobierano trzy razy w roku, w sezonie: wiosennym, letnim i jesiennym od kwietnia do października 2006 roku. W każdej próbie oznaczono aktywność alkalicznej fosfatazy (APA) metodą spektrofotometryczną z p-nitro-fenylfosforanem disodu (p-PP). Mieszaninę reakcyjną przygotowano zgodnie z metodą opisaną przez Barika i in. 2001, próby inkubowano przez 48 h w temperaturze 25°C w środowisku o pH = 8,5. Zawartość powstałego nitrofenolu oznaczano na dwuwiązkowym spektrofotometrze UV/VIS firmy Techcomp, przy długości fali 410 nm. W każdej próbie wody przeprowadzono reakcje, w trzech powtórzeniach, z 5 roztworami substratu o różnych stężeniach początkowych w mieszaninie (p-NPP od $2,85 \cdot 10^{-5}$ M do $7,14 \cdot 10^{-4}$ M). W oparciu o równanie Lineweavera-Burka, obliczono parametry charakteryzujące aktywność enzymatyczną alkalicznych fosfatazy – stałą Michaelisa-Menten (Km) oraz szybkość maksymalną (v_{max}). Analizowane w pracy wybrane wskaźniki jakości badanych jezior: temperaturę, zawartość azotu ogólnego (TN), fosforu ogólnego (TP) i fosforu fosforanowego (P-PO₄) oraz chlorofilu_a (Chl_a) zostały odnotowane

w ramach badań monitoringowych wód powierzchniowych prowadzonych przez Wojewódzki Inspektorat Ochrony Środowiska w Szczecinie. Pierwiastki limitujące rozwój fitoplanktonu w badanych wodach zostały określone w oparciu o stosunek TN:TP oraz stosunek rozpuszczonego azotu nieorganicznego (DIN) do fosforu fosforanowego (P-PO₄)

WYNIKI I DYSKUSJA

Średnie roczne parametrów kinetycznych reakcji hydrolizy p-NPP katalizowanych przez alkalicznej fosfatazy w wodach badanych rzek zestawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Średnie roczne parametrów kinetycznych reakcji hydrolizy p-NPP katalizowanych przez alkalicznej fosfatazy w wodach badanych rzek

Table 1. Annual means of kinetic parameters of p-NPP hydrolysis catalysed by alkaline phosphatase in waters of tested rivers

Rzeka – River	v_{\max} ($\mu\text{M}\cdot\text{h}^{-1}$)	K_M (μM)
Ostrowica	0,88	145
Krzekna	1,04	129
Ina	1,16	54
Dziwna	1,17	53
Gowienica	1,26	97
Myśla	0,62	237
Kanał Młyński	1,00	103
Odra	1,98	19

v_{\max} – szybkość maksymalna reakcji hydrolizy p-NPP katalizowanej przez alkalicznej fosfatazy – maximum velocity of p-NPP hydrolysis catalysed by alkaline phosphatase

K_M – stała Michaelisa-Menten hydrolizy p-NPP katalizowanej przez alkalicznej fosfatazy – Michaelis-Menten constant of p-NPP hydrolysis catalysed by alkaline phosphatase

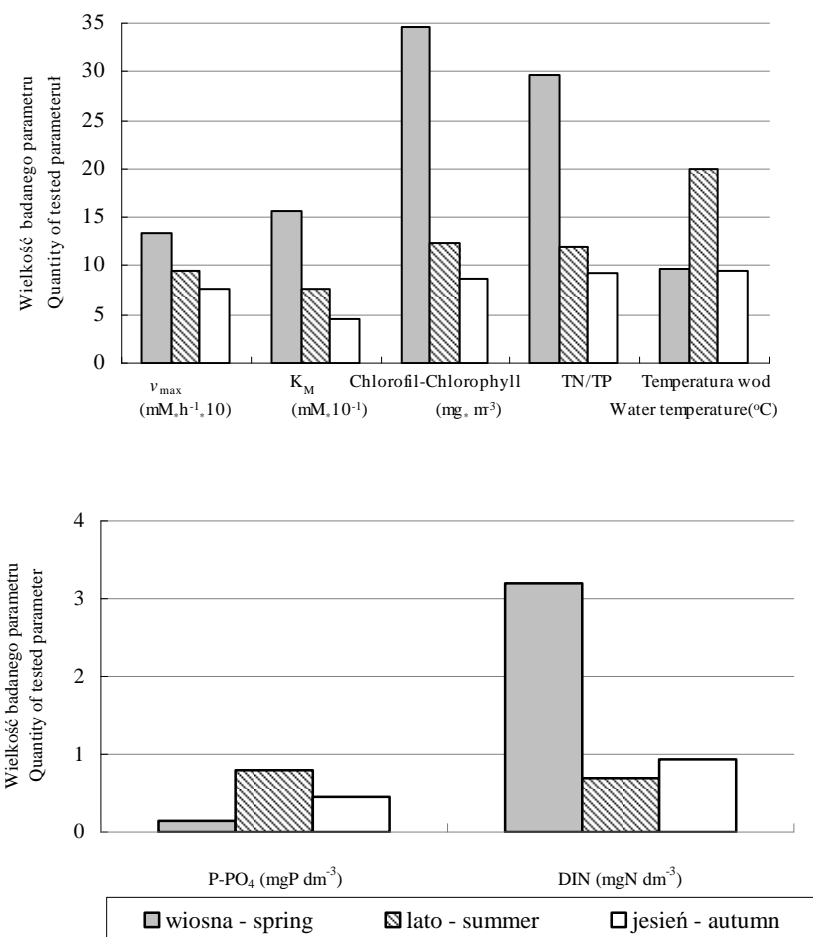
Najwyższe średnie wartości v_{\max} odnotowano w rzece Odrze ($1,98 \mu\text{M}\cdot\text{h}^{-1}$), a najniższe w rzece Myśli ($0,62 \mu\text{M}\cdot\text{h}^{-1}$). Średnie wartości stałej K_m mieściły się w przedziale od $19 \mu\text{M}$ w Odrze do $237 \mu\text{M}$ w wodach rzeki Myśli. Czyli najmniejszą aktywność alkalicznych fosfataz odnotowano w rzece Myśli, w wodach której badana reakcja enzymatyczne przebiegała najwolniej, a najwyższa średnia wartość K_m wskazuje na najmniejsze powinowactwo alkalicznych fosfa-

taz do substratów reakcji hydrolizy nierozpuszczalnych frakcji fosforu. Największą aktywność alkalicznych fosfataz odnotowano w rzece Odrze, w której szybkość badanej reakcji i powinowactwo do substratu były największe.

Średnie sezonowe wartości parametrów kinetycznych charakteryzujących APA w badanych wodach były najwyższe w sezonie wiosennym (rys. 1). W tym samym okresie odnotowano także największą średnią zawartość Chl_a oraz najwyższą wartości stosunku TN:TP, średnia temperatura wody wynosiła 9,9°C i była porównywalna z sezonem jesiennym. Czyli aktywność alkalicznych fosfataz była najwyższa w sezonie wiosennym, w okresie największego rozwoju biomasy fitoplanktonu, którego rozwój był ograniczany przez braki fosforu na co wskazuje wysoka średnia wartość TN:TP, która wynosiła w tym okresie 29,7.

Dla wyników odnotowanych w poszczególnych sezonach badań przeprowadzono analizę regresji liniowej między zawartością Chl_a, formami azotu i fosforu oraz stosunkiem TN:TP oraz DIN : P-PO₄ a parametrami kinetycznymi charakteryzującymi APA w badanych wodach. Obliczono istotne dodatnie korelacje jedynie dla wyników odnotowanych sezonie wiosennego, pomiędzy TP, TN, N-NO₃ a v_{\max} . Obliczone funkcje regresji liniowej zostały przedstawione na rysunkach 2 i 3. W przypadku zależności między TP i v_{\max} w obliczeniach nie uwzględniono wyników pomiarów w wodach rzeki Iny, której wody zawierały ponad dwa razy więcej TP niż wody pozostałych rzek. Tak duże ilości fosforu były najprawdopodobniej związane z zanieczyszczeniami punktowymi w obrębie miasta Goleniowa, poniżej którego znajdował się punkt kontrolno-pomiarowy. Otrzymane zależności wskazują, że w sezonie wiosennym aktywność badanych enzymów w wodach rzek wzrastała wraz ze wzrostem zawartości biogenów w wodzie.

W wielu pracach obliczono odwrotnie proporcjonalne zależności między zawartością fosforu i APA w ekosystemach wodnych, np. między zawartością jonów fosforanowych i APA (Jansson i in. 1988, Barik i in. 2001) oraz zawartością fosforu ogólnego i APA (Berman 1970, Smith i Kalff 1981, Yiyong and Xinyu 1997). Ocena wpływu zawartości fosforu na aktywność alkalicznych fosfataz w badanych rzekach, przeprowadzona w oparciu o zawartość fosforu ogólnego i fosforu fosforanowego w wodzie wskazuje, że nie odnotowano wzrostu aktywności fosfataz na skutek wyczerpywania się ładunków fosforu w rzekach. Odwrotnie, wraz ze wzrostem zawartości fosforu ogólnego szybkość reakcji enzymatycznych wzrastała. Nie znaleziono istotnych korelacji między zawartością bioprzyswajalnych jonów fosforanowych i szybkością maksymalną reakcji enzymatycznej hydrolizy nierozpuszczalnych frakcji fosforu. Natomiast w wodach, w których w sezonie wiosennym stosunek masowy przyswajalnych form biogenów – rozpuszczonego azotu nieorganicznego do fosforu fosforanowego DIN:RP był większy od 10, czyli pierwiastkiem ograniczającym był fosfor (Forsberg i Ryding 1980), obliczono istotną ujemną korelację między DIN:RP i v_{\max} (rys. 3).



v_{max} – szybkość maksymalna reakcji hydrolizy p-NPP katalizowanej przez alkalicznej fosfatazy - maximum velocity of p-NPP hydrolysis catalysed by alkaline phosphatase,

K_M – stała Michaelisa-Menten hydrolizy p-NPP katalizowanej przez alkalicznej fosfatazy – Michaelis-Menten constant of p-NPP hydrolysis catalysed by alkaline phosphatase,

TP – fosfor ogólny – total phosphorus,

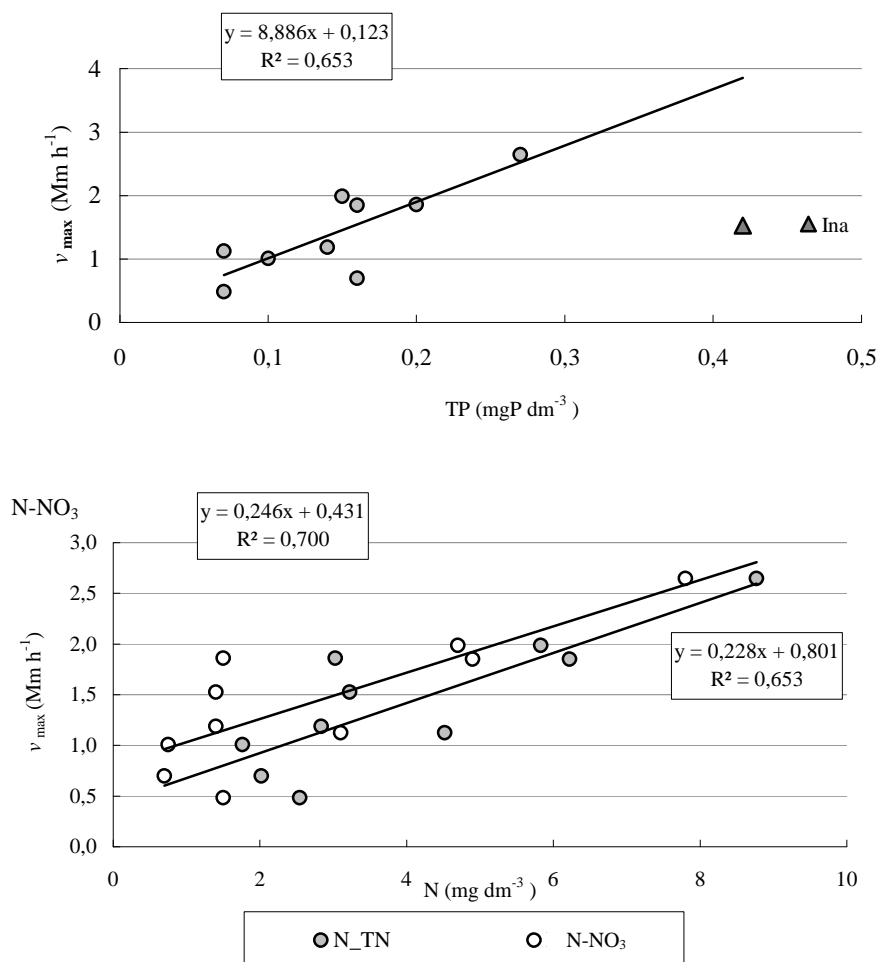
TN – azot ogólny – total nitrogen,

DIN- rozpuszczony azot niorganiczny – dissolved inorganic nitrogen,

RP – rozpuszczone fosforany – dissolved phosphate.

Rys. 1. Średnie sezonowe wartości wskaźników jakości wody w badanych rzekach

Fig. 1. Season average values of water quality indexes in tested rivers



TP – fosfor ogólny – total phosphorus

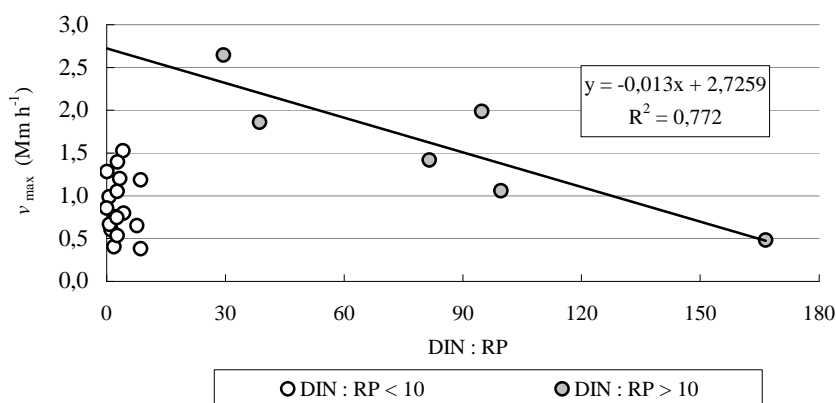
TN – azot ogólny – total nitrogen

N-NO₃ – azot azotanowy(V) – nitrate nitrogen

v_{\max} – szybkość maksymalna reakcji hydrolizy p-NPP katalizowanej przez alkalicznej fosfatazy - maximum velocity of p-NPP hydrolysis catalysed by alkaline phosphatase

Rys. 2. Zależności między zawartością związków biogennych i v_{\max} reakcji hydrolizy p-NPP katalizowanej przez alkaliczne fosfatazy w wodach badanych rzek w sezonie wiosennym

Fig. 2. Relationships between contents of biogenic compounds and v_{\max} of p-NPP hydrolysis catalysed by alkaline phosphatase in waters of tested rivers in spring season



DIN – zpuszczony azot nieorganiczny – dissolved inorganic nitrogen

RP – reaktywne fosforany – reactive phosphate

v_{max} – szybkość maksymalna reakcji hydrolizy p-NPP katalizowanej przez alkalicznej fosfatazy –

maximum velocity of p-NPP hydrolysis catalysed by alkaline phosphatase

Rys. 3. Zależności między DIN:RP i v_{max} reakcji hydrolizy p-NPP katalizowanej przez alkalicznej fosfatazy w wodach badanych rzek w sezonie wiosennym

Fig. 3. Relationships between DIN:RP and v_{max} of p-NPP hydrolysis catalysed by alkaline phosphatase in waters of tested rivers in spring season

Otrzymane zależności wskazują, że nawet w sezonie wiosennym, w którym odnotowano największy rozwój biomasy, APA nie może być wskaźnikiem limitacji pokarmowych w rzekach. Brak istotnych zależności między wskaźnikami stanu trofii badanych rzek a parametrami charakteryzującymi APA może wynikać z nadmiaru zasobów pokarmowych w stosunku do poziomu biomasy. Obliczone zależności dotyczą tylko sezonu wiosennego, a dopływ związków biogennych do wód powierzchniowych ma charakter sezonowy i najwięcej biogenów wpływa do wód wiosną ze względu na infiltrację wód z topniejącej, zanieczyszczonej pokrywy śnieżnej (Koc i Skwierawski 2004). Dlatego inną przyczyną mogą być spływy obszarowe związków fosforu i enzymów fosfohydrolitycznych znajdujących się w glebach, czyli pochodzących ze źródeł allochtonicznych.

WNIOSEK

Najwyższą aktywność enzymatyczną alkalicznych fosfataz odnotowano w sezonie wiosennym. Dodatnia korelacja pomiędzy zawartości biogenów i szybko-

ścią maksymalną reakcji hydrolizy p-NPP katalizowanych przez alkaliczne fosfatazy wskazuje, że aktywność alkalicznych fosfataz nie może być wskaźnikiem limitacji pokarmowych w badanych rzekach.

PIŚMIENNICTWO

- Barik S.K., Purushothaman C.S., Mohanty A.N., 2001. Phosphatase activity with reference to bacteria and phosphorus in tropical freshwater aquaculture pond system. *Aquacult. Res.*, 32, 819-832.
- BERMAN T. 1970. Alkaline phosphatases and phosphorus availability in lake Kinneret. *Limnol. and Oceanogr.*, XV (5), 663-674.
- Forsberg C., 1993. Eutrophication of the Baltic Sea. Fyris-Tryck AB, Uppsala, 5-6.
- Forsberg C., Ryding S.O., 1980. Eutrophication parameters and trophic state indices in 30 Swedish waste-receiving lakes. *Arch. Hydrobiol.*, 89, 189-207.
- Jansson M., Olsson H., Pettersson K., 1988. Phosphatases; origin and function in lakes. *Hydrobiologia* 170, 166.
- Koc A., Skwierawski A, 2004. Fosfor w wodach obszarów rolniczych. *Prace Naukowe Akademii Ekonomicznej we Wrocławiu*, 1017,168.
- Siuda W., 2001. Enzymatyczna regeneracja ortofosforanów w wodach jeziornych. *Post. Mikrobiol.*, 40, 2, 187-217.
- Smith R.E.H., Kalff J., 1981. The effect of phosphorus limitation on algal growth rates: evidence from alkaline phosphatase. *Can.J.Fish Aquat Sci.*, 38,1425,
- Yiyong Z., Xinyu Z., 1997. Seasonal variation on kinetic parameters of alkaline phosphatase activity in shallow Chinese freshwater lake (Donghu lake). *Wat.Res.*, 31(5), 1234.

ACTIVITY OF ALKALINE PHOSPHATASE IN RIVERS LOCATED IN AGRICULTURAL AREAS ON THE BACKGROUND OF SELECTED PHYSICOCHEMICAL INDEXES OF WATER QUALITY

Hanna Siwek

Department of General Chemistry, Agricultural University of Szczecin
ul. Słowackiego 17, 71-434 Szczecin
e-mail: hanna.siwek@agro.ar.szczecin.pl

Abstract. Rapid acceleration of eutrophication can be observed not only in limnic waters but also in streams and rivers. Water of selected rivers located in agricultural area of Western Pomerania was analysed, with samples taken monthly from April to October, 2006. Each sample was analysed for the temperature, total nitrogen, total phosphorus, soluble reactive phosphorus, chlorophyll_a and activity of alkaline phosphatase (APA). Compounds which limit the growth of phytoplankton were assayed using the ratio of total nitrogen to total phosphorus. The biggest APA and contents of the nutrients was observed in the spring. For the season, positive correlation was calculated between the contents of nutrients and APA.

Key words: activity of alkaline phosphatase, eutrophication, phosphorus, rivers