

DOI: 10.13758/j.cnki.tr.2020.03.015

蔡述杰, 邓开英, 李九玉, 等. 不同金属离子对稻田自然生物膜磷酸酶活性的影响. 土壤, 2020, 52(3): 525–531.

不同金属离子对稻田自然生物膜磷酸酶活性的影响^①

蔡述杰^{1,2}, 邓开英¹, 李九玉^{1*}, 徐仁扣¹

(1 土壤与农业可持续发展国家重点实验室(中国科学院南京土壤研究所), 南京 210008; 2 中国科学院大学, 北京 100049)

摘 要: 以稻田自然生物膜为研究对象, 研究不同浓度金属离子对生物膜酸性和碱性磷酸单酯酶(ACPase 和 ALPase)活性与酶反应动力学参数的影响。发现 K^+ 和 Na^+ 在 0~1.0 mmol/L 浓度下均对 ACPase 和 ALPase 无明显影响, Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 对 ACPase 和 ALPase 活性均有激活效应, 可使磷酸酶活性最大提高 14.1% 和 46.7%; Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Al^{3+} 和 Ag^+ 对 ACPase 和 ALPase 活性均有抑制作用。 Co^{2+} 在低浓度时对 ACPase 和 ALPase 活性有一定的激活作用, 高浓度时变为抑制作用; Cr^{6+} 在 0.1 mmol/L 时对 ACPase 活性有促进作用, 而在离子浓度 0.25~1 mmol/L 的范围内, 均对 ACPase 活性产生抑制作用。通过酶反应动力学分析发现, Mg^{2+} 的加入使 ACPase 与底物的亲和力与催化效率增强, Cu^{2+} 对 ACPase 和 ALPase 的抑制作用主要是非竞争性抑制作用, Zn^{2+} 虽然提高 ACPase 与底物的亲和力, 但是降低了 ALPase 与底物的亲和力与催化效率。金属离子对酶活性的影响因金属离子种类、浓度和磷酸酶类型而异, 主要通过与酶活性位点或底物结合, 改变酶的活性、对底物的亲和力, 以及影响酶基因的表达等实现的。研究结果将为评估自然生物膜在稻田磷的生物地球化学循环中的作用, 以及稻田受重金属污染的可能风险提供理论依据。

关键词: 自然生物膜; 磷酸酶活性; 金属离子; 酶动力学常数; 稻田

中图分类号: S511 文献标志码: A

Effects of Metal Ions on Phosphatase Activity of Periphytic Biofilm in Paddy Fields

CAI Shujie^{1,2}, DENG Kaiying¹, LI Jiuyu^{1*}, XU Renkou¹

(1 State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; 2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: The effects of metal ions on acidic and alkaline phosphatase (ACPase and ALPase) activities and kinetic parameters of periphytic biofilm in paddy fields were studied. The results suggested that both K^+ and Na^+ had no significant effect on ACPase and ALPase activities in the concentration range of 0-1.0 mmol/L while both Ca^{2+} and Mg^{2+} had activating effects on ACPase and ALPase activities, which increased phosphatase activity by 14.1% and 46.7%, respectively. The metal ions of Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Al^{3+} and Ag^+ all had inhibitory effect on ACPase and ALPase activities. While Co^{2+} could promote ACPase and ALPase activities at low concentration, but inhibit them at high concentration. And Cr^{6+} promoted ACPase activity at 0.1 mmol/L, while inhibited ACPase activity in the concentration range of 0.25-1.0 mmol/L. The addition of Mg^{2+} enhanced the affinity and catalytic efficiency of ACPase with substrates. The inhibitory effect of Cu^{2+} on ACPase and ALPase activities was mainly considered as non-competitive inhibition. Although Zn^{2+} increased the affinity of ACPase with substrate, it reduced the affinity and catalytic efficiency of ALPase with substrate. The effect of metal ions on enzyme activity varied with the type and concentration of metal ions, and the type of phosphatase. It is mainly achieved by binding with the site or substrate of enzyme activity, changing the affinity between enzyme activity and substrate, and influencing the expression of enzyme genes. The results can provide a theoretical basis for assessing the role of periphytic biofilm in the biogeochemical cycle of phosphorus in paddy fields, and the possible risk of heavy metal contamination in paddy fields.

Key words: Periphytic biofilm; Phosphatase activity; Metal ions; Enzyme kinetic constant; Paddy fields

①基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)青年科学家专题(2015CB158220), 国家自然科学基金项目(41877102)和中国科学院创新交叉团队和创新促进会项目(2014272)资助。

* 通讯作者(jyli@issas.ac.cn)

作者简介: 蔡述杰(1992—), 男, 福建宁德人, 硕士研究生, 主要从事稻田土壤界面化学研究。E-mail: sjcai@issas.ac.cn

稻田水土界面之间的微生物通常以稻田自然生物膜的形式存在。自然生物膜是在自然环境条件下形成于淹水基质表面的微生物聚集体及其交织的非生物物质的集合体。微生物包括细菌、真菌、原生动物、藻类、病毒等；非生物物质包括微生物分泌的多糖、蛋白质、脂类等有机质以及铁锰氧化物、碳酸盐、硅酸盐等无机矿物质^[1]。稻田自然生物膜覆盖于土壤表面，是外源污染物如重金属离子进入土壤的必经之地，是多种物质包括养分、重金属重要的存储库以及传输介质^[2]。大量研究发现自然生物膜是水体中重要的短期磷库，也对富营养化水体-底泥界面无机磷的缓释和缓释起着重要的调控作用^[3]。而且，自然生物膜，作为一种微生物聚集体，还可以分泌多种水解酶，对土壤和底泥中有机磷的降解和生物有效性等起着促进作用^[4]。

当前，由于工业废物排放、污水灌溉以及含有重金属的农药、化肥的不合理使用等，许多污染物包括过量的重金属离子不断进入稻田生态系统。这些重金属污染可对稻田水土界面中的微生物产生毒害，阻碍了碳氮循环、代谢活性、酶活性等各种微生物过程^[5]。自然生物膜在水环境中对重金属的迁移、生物地球化学特性、生物可利用性和毒性等过程中，均起着非常重要的作用^[6]。关于自然生物膜和金属之间的相互作用进行了较多的研究，Dong 等^[7-9]发现自然生物膜对 Pb、Cd、Cu、Zn 等重金属有很强的吸附作用。Serra 等^[10]报道了河流系统中自然生物膜群落对水体金属 Cu 暴露的响应，分析表明自然生物膜中重金属含量如 Cd (II) 和水体 Cd (II) 浓度的变化一致，具有较高的相关性。一些研究也表明水体中存在许多光合物种，如蓝藻 *Chlamydomonas* 具有强烈的吸收金属元素的能力。这些研究均表明自然生物膜具有较大潜在富集水体中金属元素的能力^[11]。但重金属离子对稻田自然生物膜的磷酸酶活性的影响研究还极少涉及。

自然生物膜包含多种磷酸酶，如磷酸单酯酶、磷酸二酯酶、聚磷酸酶等，其中磷酸单酯酶活性最高、分布最广泛。已有研究证明覆盖于淹水基质表面的自然生物膜能够释放磷酸单酯酶来水解环境中的有机磷，这是提高环境中磷有效性的重要途径^[12]。磷酸单酯酶是广泛存在于微生物中的一种金属酶，其构象及活力受到金属离子的影响^[13]，而且金属离子对磷酸酶基因的表达也受其种类和浓度等影响^[14]。目前关于金属离子对于稻田自然生物膜磷酸酶活性影响的研究很少，因此本文研究了部分金属离子对稻田自然生物膜酸性磷酸单酯酶(ACPase)和碱性磷酸单酯

酶(ALPase)活性及酶动力学参数的影响，以期揭示金属离子与自然生物膜磷酸酶的作用机制，为稻田磷的生物地球循环过程的认识和重金属污染的风险评估提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 自然生物膜富集与培养

在南京江宁区水稻田采集土壤溶液于自制玻璃缸(长×宽×高=30 cm×20 cm×50 cm)中，并将纤维载体淹没其中。每周添加 BG-11 营养液^[15]，以充分维持生物膜的生长。将水缸置于人工气候室中，光/暗周期为 14 h(26 °C)/10 h(20 °C)，光强度为 12 000 lux，湿度为 80%。一个月后，微生物聚集体附着在载体上，形成稳定的生物膜。从玻璃缸中收集在纤维载体上附着的生物膜，并用于后续试验。采用光学显微镜(Nilcon-80i, Japan) 和激光共聚焦扫描显微镜(CLSM, Zeiss-LSM710, German) 对周生生物膜的形态进行表征。

1.2 试验设计

用磷酸单酯酶标准底物对硝基苯基磷酸二钠盐(pNPP)来测定酶活性。不同金属离子的选取如下：K⁺、Na⁺、Ca²⁺ 选取相对应的可溶性氯化盐，Mg²⁺、Co²⁺、Al³⁺、Mn²⁺、Ni²⁺和 Zn²⁺ 选取可溶性硫酸盐，Cu²⁺ 和 Ag⁺ 选取可溶性硝酸盐，用 K₂Cr₂O₇ 作为 Cr⁶⁺ 的来源。Tris-HCl 缓冲溶液被用于控制体系 pH。将 100 ml 生物膜悬浮液在 15 °C 下 1 157 g 离心 10 min 后移除上清液，用 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液(酸性条件为 pH 6.0，碱性条件为 pH 9.0)重新悬浮生物膜样品，离心和洗涤过程重复两次，尽可能减少培养基中本身携带离子的含量。将生物膜再悬浮于 100 ml 的 0.05 mmol/L Tris-HCl 缓冲液中，用于后续试验。

1.2.1 不同离子对磷酸酶活性的影响 依据稻田土壤中各种离子的有效态含量以及重金属污染对土壤酶活性的影响研究^[16]，在 50 ml 离心管中加入不同浓度的金属离子溶液 5 ml，控制金属离子最终浓度为 0、0.1、0.25、0.5、1.0 mmol/L，以测试其对磷酸酶活性的影响。按照相当于 0.4 g/L 干物质量的比例加入清洗后的生物膜悬液 2 ml，统一用水定容至 12 ml 后在 25 °C、200 r/min 的避光条件下振荡 2 h。然后加入 5 ml 的 0.2 mol/L Tris-HCl 缓冲液和 2 ml 的 10 mmol/L pNPP 溶液(终浓度为 1 mmol/L)，在 37 °C、200 r/min 的避光条件下继续振荡 1 h，立即加入 1 ml 的 0.5 mol/L NaOH 终止水解反应。过滤后将滤液在 405 nm 下测定吸光度。每个处理设定 3 个

重复。以不加上述金属离子体系中的生物膜酶活性为100,其余条件下测定的酶活性与未加金属离子条件测得酶活性相比得到相对酶活性。

1.2.2 不同离子影响下磷酸酶活性的动力学分析 选取不同浓度的 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Cu^{2+} (0、0.25、0.5、1.0 mmol/L) 溶液,测定其对磷酸酶动力学参数的影响, pNPP 浓度范围为 0 ~ 1 500 mmol/L。酶的催化速度随着底物浓度的增加而增加,直到接近最大速度 ($V_{\max}$) 的某一点。酶催化的反应动力学通常用符合米氏方程(Michaelis-Menten 方程),其中米氏常数(K_m)是速度达最大速度一半时的底物浓度;米氏常数表明酶对底物的亲和力: K_m 越低,亲和力越高。这些参数由 Michaelis-Menten 方程描述:

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{[S] + K_m} \quad (1)$$

式中: V 是任意时刻酶催化反应的速度($\mu\text{mol}(\text{g} \cdot \text{h})$); S 是相应时间的底物浓度(mmol/L); $V_{\max}$ 是最大催化反应速率($\mu\text{mol}(\text{g} \cdot \text{h})$); K_m 是米氏常数(mmol/L)。动力

学参数 $V_{\max}$ 和 K_m 使用 Michaelis-Menten 方程的线性变换 Hanes-Woolf 方程计算:

$$\frac{[S]}{V} = \frac{[S]}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} \quad (2)$$

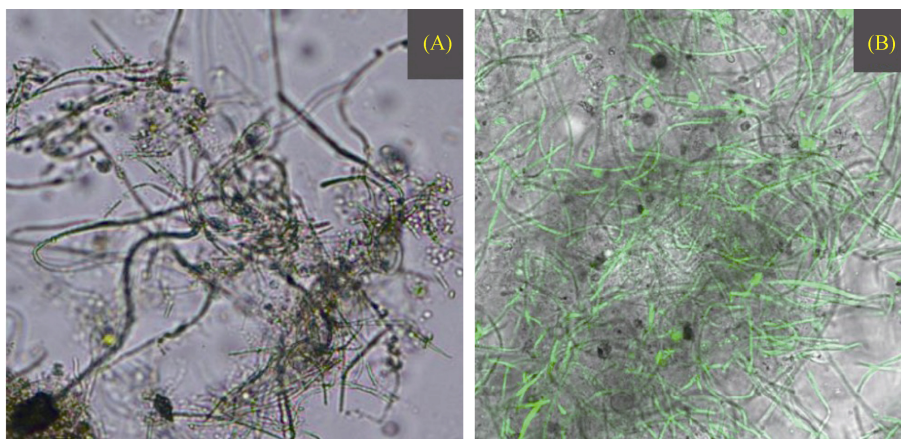
1.3 统计分析

本研究每组试验重复 3 次,结果以平均值 $\pm$ 标准误差表示。采用 Microsoft Excel 2016 以及数据进行统计、制图;采用 SPSS 中 Duncan 法对数据进行差异显著性分析, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与讨论

2.1 自然生物膜形态表征

采用光学显微镜(Nilcon-80i, Japan)和激光共聚焦扫描显微镜(CLSM, Zeiss-LSM710, German)对自然生物膜的形貌进行了表征(图 1)。结合文献[17]分析,发现自然生物膜主要由光自养微藻,尤其是丝状藻类组成。丝状藻类交织在一起,很多细菌、真菌、原生动物和小型多细胞动物等附着在丝状藻类上面。



(A. 光学显微镜(400 $\times$); B. 激光共聚焦扫描显微镜)

图 1 自然生物膜的形态特征

Fig. 1 Morphological characteristics of periphytic biofilm

2.2 不同金属离子对生物膜磷酸酶活性的影响

金属离子对自然生物膜中 ACPase 和 ALPase 活性影响的结果表明,影响的方式有 4 种:抑制型、激活型、相对无害型和混合型(表 1)。正一价碱金属离子(K^+ 和 Na^+) 在 0 ~ 1.0 mmol/L 浓度范围内均对 ACPase 和 ALPase 无明显影响($P > 0.05$),属于相对无害型。 Ca^{2+} 可以提高 ACPase 和 ALPase 的活性,在 0.1 ~ 1.0 mmol/L 浓度范围内最大可提高磷酸酶的活性达 14% ($P < 0.05$)。 Mg^{2+} 对 ACPase 和 ALPase 活性均有显著的激活效应,随着离子浓度的增大,ACPase 和 ALPase 活性不断增强;在 Mg^{2+} 浓度 1.0 mmol/L 时,酶活性最大可提高 54%,属于激活型。 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、

Mn^{2+} 、 Al^{3+} 对 ACPase 和 ALPase 活性均有显著抑制作用($P < 0.05$),属于抑制性;抑制剂浓度达到 1.0 mmol/L 时,最大抑制率可达 85%。但是这些离子对于 ACPase 和 ALPase 活性的抑制程度不同, Cu^{2+} 、 Al^{3+} 对 ACPase 活性的影响明显大于 ALPase,而 Zn^{2+} 对 ALPase 活性的影响明显大于 ACPase。 Ni^{2+} 、 Ag^+ 在低浓度(0.1 mmol/L)时对 ACPase 活性无明显影响,随着离子浓度的增加,ACPase 和 ALPase 活性降低。 Co^{2+} 在低浓度时对 ACPase 和 ALPase 活性有一定的激活作用,随着浓度的增大,变为抑制作用,属于混合型。 Cr^{6+} 在低浓度(0.1 mmol/L)时对 ACPase 活性有促进作用,而在离子浓度 0.25 ~ 1.0 mmol/L 的范围

内, 均对 ACPase 活性产生抑制作用, 当 Cr^{6+} 离子浓度达到 1.0 mmol/L 时, 生物膜已丧失 ACPase 活性。而 Cr^{6+} 对 ALPase 活性具有激活作用, 随着离子浓度的增大, ALPase 活性不断增加。

表 1 不同金属离子对生物膜磷酸酶活性的影响
Table 1 Effects of different metal ions on activities of acid and alkaline phosphatases (ACPase and ALPase)

金属离子	不同离子浓度(mmol/L)下 ACPase 相对活性(%)					不同离子浓度(mmol/L)下 ALPase 相对活性(%)				
	0	0.1	0.25	0.5	1.0	0	0.1	0.25	0.5	1.0
K^{+}	100 a	102.45 a	101.51 a	103.42 a	102.49 a	100 a	98.09 a	103.19 a	103.47 a	102.86 a
Na^{+}	100 a	100.53 a	101.91 a	100.98 a	99.64 a	100 a	99.75 a	98.54 a	103.27 a	102.86 a
Ca^{2+}	100 b	113.87 a	108.49 ab	112.36 a	109.74 a	100 bc	94.05 c	93.67 c	102.61 b	114.11 a
Mg^{2+}	100 c	116.05 b	118.63 b	144.38 a	154.38 a	100 d	103.45 d	109.11 c	123.43 b	146.72 a
Zn^{2+}	100 a	73.76 b	76.21 b	67.23 b	53.58 c	100 a	29.09 b	23.88 c	17.89 d	14.83 d
Cu^{2+}	100 a	79.21 b	73.47 b	59.96 c	1.08 d	100 a	85.58 b	80.98 c	75.74 d	75.41 d
Mn^{2+}	100 a	66.05 b	58.96 b	22.05 c	14.10 c	100 a	39.44 b	31.23 c	28.59 c	16.26 d
Al^{3+}	100 a	48.97 b	41.53 c	27.70 d	21.98 d	100 a	98.45 a	93.45 b	90.09 b	78.36 c
Ni^{2+}	100 a	103.67 a	89.91 b	87.26 b	65.52 c	100 a	95.61 a	83.75 b	78.22 bc	72.99 c
Ag^{+}	100 a	101.69 a	66.12 b	43.89 c	39.04 c	100 a	73.29 bc	78.17 b	69.17 c	69.77 c
Co^{2+}	100 a	125.27 a	86.36 a	55.23 ab	12.99 b	100 ab	121.30 a	119.06 a	95.33 ab	62.20 b
Cr^{6+}	100 ab	132.37 a	68.56 b	25.54 c	0.00 d	100 b	114.58 b	118.02 ab	123.68 ab	143.70 a

注: 同行数据小写字母不同表示不同浓度金属离子对 ACPase 或 ALPase 相对活性影响达 $P<0.05$ 显著水平。

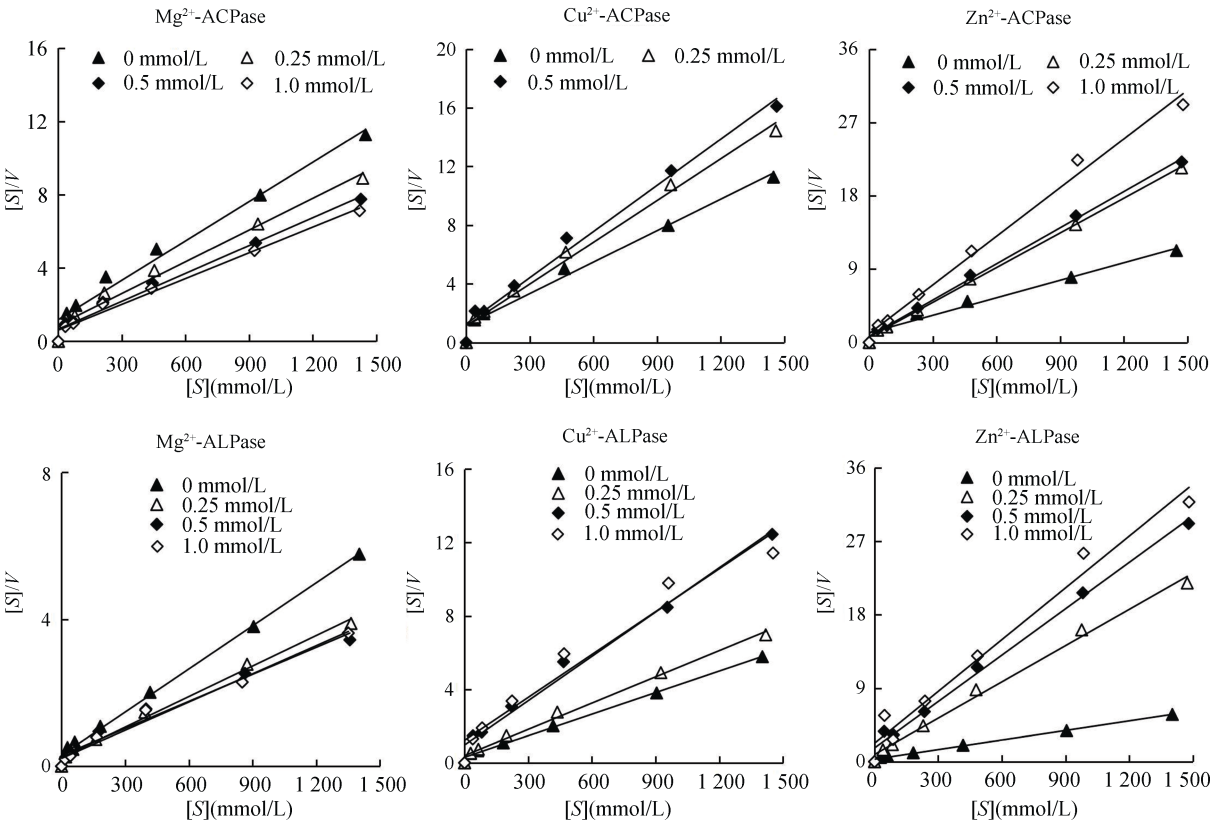
2.3 不同金属离子对生物膜磷酸酶反应动力学的影响

磷酸酶是一种金属酶, 其酶活性的充分发挥需要两种金属离子: Mg^{2+} 和 Zn^{2+} , 其中 Zn^{2+} 位于酶活性中心, 是酶活性必需基团之一, Mg^{2+} 对酶活性的表达起到重要作用^[18]; 而 Cu^{2+} 是土壤污染的几种主要重金属之一。所以选取 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Cu^{2+} 对磷酸酶的动力学常数(K_m 和 $V_{\max}$)进行探讨。图 2 中显示了在 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 存在下, 酶反应动力学变形方程的 Hanes-Woolf 曲线, $[s] / V$ 和 $[s]$ 拟合方程的截距和斜率与不添加金属离子的处理不同, 说明金属离子对生物膜磷酸酶活性产生了影响。拟合得出的 K_m 和 $V_{\max}$ 值表明(表 2), 无金属离子加入下自然生物膜 ACPase 的 K_m 值为 164.58 $\mu\text{mol/L}$, $V_{\max}$ 值为 pNP 138.89 $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{h})$, 而 ALPase 的 K_m 值为 76.90 $\mu\text{mol/L}$, $V_{\max}$ 值为 pNP 256.41 $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{h})$ 。可知自然生物膜 ALPase 与底物的亲和力与催化效率都强于 ACPase。随着 Mg^{2+} 浓度的增加, ACPase 的 K_m 值降低, $V_{\max}$ 值增大, 说明 Mg^{2+} 的加入使 ACPase 与底物的亲和力与催化效率增强; 而 ALPase 的 K_m 值变化不大, $V_{\max}$ 值增大, 说明 Mg^{2+} 的加入主要使 ALPase 催化效率增强。 Cu^{2+} 的加入(1.0 mmol/L 条件下 ACPase 完全失活, 无法拟合)对 ACPase 的 K_m 值无明显变化, 而 $V_{\max}$ 值不断下降, 所以 Cu^{2+} 对 ACPase 的抑制作

用可认为是非竞争性抑制作用; 在低浓度条件下(0 ~ 0.25 mmol/L), Cu^{2+} 的加入对 ALPase 的 K_m 值无明显变化, 而 $V_{\max}$ 值下降, 也可认为是非竞争性抑制作用, 而在高浓度范围下(0.25 ~ 1 mmol/L), K_m 值增大, $V_{\max}$ 值降低, 所以 Cu^{2+} 在高浓度下同时降低了 ALPase 的亲力和催化效率, 属于混合型抑制作用。 Zn^{2+} 的加入均降低了 ACPase 的 K_m 值和 $V_{\max}$ 值, 表明 Zn^{2+} 虽然提高 ACPase 与底物的亲和力, 但是降低了 ACPase 的催化速度。在低浓度范围(0 ~ 0.25 mmol/L), Zn^{2+} 对 ALPase 的作用效果与 ACPase 类似, 同时降低了 K_m 值与 $V_{\max}$ 值。在较高浓度范围(0.25 ~ 1 mmol/L), 随着 Zn^{2+} 浓度的升高, K_m 值升高, $V_{\max}$ 值降低, Zn^{2+} 同时降低了 ALPase 与底物的亲和力与催化效率。

3 讨论

由图 1 可以看出, 自然生物膜主要是丝状藻等光合藻类为主导的物种相互缠绕而构成自然生物膜的基质, 而其他生物栖息于此基质上。许多微生物共存于自然生物膜中, 意味着自然生物膜是一个有别于单一微生物种群的复杂微生态系统。在自然生物膜这种非均相体系中, 金属离子、胶体、微生物和酶之间的复杂反应都有可能干扰任何金属离子对于磷酸酶的影响。已有研究证明自然生物膜通过本身这种复杂



(V : 任意时刻酶催化反应的速度($\mu\text{mol}(\text{g}\cdot\text{h})$); $[S]$: 相应时间的底物浓度)

图 2 不同 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Cu^{2+} 离子浓度影响下 ACPase 和 ALPase 动力学 Hanes-Woolf 方程的拟合

Fig. 2 Hanes - Woolf plots of phosphatase kinetics under different concentrations of Mg^{2+} , Zn^{2+} and Cu^{2+}

表 2 不同浓度 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Cu^{2+} 作用下 ACPase 和 ALPase 动力学常数 $V_{\text{max}}(\mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{h}))$ 和 $K_{\text{m}}(\mu\text{mol}/\text{L})$ 的变化
Table 1 Changes of kinetic constants (V_{max} and K_{m}) of ACPase and ALPase under different concentrations of Mg^{2+} , Zn^{2+} and Cu^{2+}

生物膜磷酸酶	金属离子	0 mmol/L		0.25 mmol/L		0.5 mmol/L		1.0 mmol/L	
		V_{max}	K_{m}	V_{max}	K_{m}	V_{max}	K_{m}	V_{max}	K_{m}
ACPase	Mg^{2+}	138.89	164.58	172.41	151.21	196.08	129.96	212.77	129.57
	Cu^{2+}	138.89	164.58	109.89	168.05	99.01	169.27	nd	nd
	Zn^{2+}	138.89	164.58	71.43	63.9	68.97	71.29	51.28	75.63
ALPase	Mg^{2+}	256.41	76.90	357.14	78.64	370.37	94.15	384.62	81.38
	Cu^{2+}	256.41	76.90	208.33	81.58	133.33	128.9	120.48	135.18
	Zn^{2+}	256.41	76.90	67.57	59.77	52.63	88.42	47.17	106.58

注: nd 表示未测定。

特殊的组成结构可能使其在抵抗外源污染物时,具有有别于简单微生物种群的性质,由于自然生物膜能够承受一定的金属离子胁迫而不会严重丧失其生物化学活性^[19]。一些关于稻田自然生物膜的研究表明,自然生物膜能够适应一定浓度的重金属污染,而胞外聚合物的吸附、群落中藻类丰度提高和组成变化导致碳代谢活性功能的响应,是自然生物膜能够适应重金属胁迫的主要原因^[20]。本文中生物膜磷酸酶活性对重金属的敏感性远低于麦芽中磷酸酶的,如 0.5 mmol/L 的 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 抑制生物膜酸性的活性约 40%,而同

样浓度的 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 使麦芽中磷酸酶的活性降低 80% 以上^[21]。活性污泥中微生物和介质环境更加复杂,因此 0.5 mmol/L 的 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 仅使活性污泥的磷酸酶活性降低约 15%^[22]。

金属离子对酶活性的影响可表现为对酶蛋白的作用,一般分为 3 种类型^[16]: ①一些金属离子的加入可以促进酶活性中心与底物间的配位结合,改变酶蛋白的表面电荷以及催化反应的平衡性质,从而增强酶活性,即有激活作用。②一些金属离子占据了酶的活性中心或与酶分子的巯基、胺基和羧基结合,导致

酶活性降低,即有抑制作用。③重金属与酶没有专一性对应关系,对酶活性影响小。而且,金属离子还会影响磷酸酶基因的表达^[14]。如细菌碱性磷酸酶的种类多样,根据碱性磷酸酶蛋白序列的相似度和底物的不同,可主要分为 3 种类型:*phoA*, *phoX* 和 *phoD*。由于 Zn^{2+} 与 Mg^{2+} 是碱性磷酸酶 *phoA* 的辅基,一定浓度的 Zn^{2+} 与 Mg^{2+} 的存在会促进细菌 *phoA* 基因的表达;而一定浓度的 Ca^{2+} 和 Co^{2+} 能重新促进 *phoX* 基因的表达^[14]。因此,一定浓度的某些金属离子通过促进磷酸酶基因的表达,促进磷酸酶活性,但这种作用与金属离子的种类、浓度和磷酸酶基因的类型有关。但浓度过高时,则会因毒害作用而抑制酶活性表达。

我们的研究表明,正一价碱金属离子(Na^+ 和 K^+)对磷酸酶活性无明显影响,这一发现与 Chen 等^[23]的发现一致,说明 Na^+ 和 K^+ 对稻田自然生物膜磷酸酶没有对应关系。 Mg^{2+} 促进了 ACPase 和 ALPase 酶活性,因为它是磷酸酶中心结合位点的调节离子,加入能够促进酶活性中心与底物间的配位结合,来改变酶催化反应的平衡性和酶蛋白的表面电荷,从而可增强酶活性^[18]。 Mg^{2+} 也是磷酸酶的辅基,并促进磷酸酶功能基因的表达^[14],因此在 0 ~ 1.0 mmol/L 范围内显著提高了酸性和碱性磷酸酶活性。 Ca^{2+} 、 Co^{2+} 在一定条件下也能够提升酶活性,Wu 等^[24]研究发现加入一定浓度 Ca^{2+} 、 Co^{2+} 后能促进磷酸酶 *phoX* 基因的表达。但 Ca^{2+} 、 Co^{2+} 其对磷酸酶活性的激活作用明显低于 Mg^{2+} 。 Cr^{6+} 在酸性条件下抑制磷酸酶活性,在碱性条件下激发磷酸酶活性,这可能与 Cr^{6+} 在不同 pH 条件下 Cr^{6+} 的离子形态及其对藻类的毒性效应不同有关^[25]。 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Al^{3+} 、 Ag^+ 对磷酸酶表现出了抑制作用,尤其是 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} ,可能是这些重金属离子占据了酶的活性中心或与酶分子的巯基、胺基和羧基等基团结合导致酶活性降低甚至失活即有抑制作用^[16],甚至直接毒害生物膜中的微生物,使其丧失生命力^[5]。通常来说,酸碱度是影响藻类或细菌磷酸酶活性的重要因子,我们的研究发现自然生物膜的 ALPase 具有比 ACPase 更高的酶活性,这可能是由于自然生物膜属于光营养性微生物聚集体,其光合作用导致微域环境呈碱性条件^[26],并适应该碱性环境,酸性条件一定程度上抑制了微生物的生命活力。

通常来说,抑制剂对酶促反应的作用可分为^[27]:

①竞争性抑制:竞争性抑制是指当抑制物与底物的结构类似时,它们将竞争酶的同一可结合部位,阻碍了

底物与酶相结合,导致酶催化反应速率降低。这种抑制使得 K_m 增大,而 $V_{\max}$ 不变。②非竞争性抑制:抑制剂与酶的非活性部位相结合,形成抑制物-酶的络合物后会进一步再与底物结合;或是酶与底物结合成底物酶络合物后,其中有部分再与抑制物结合。虽然底物、抑制物和酶的结合无竞争性,但两者与酶结合所形成的中间络合物不能直接生成产物,导致了酶催化反应速率的降低,这种抑制使得 $V_{\max}$ 变小,但 K_m 不变。③反竞争性抑制:抑制剂不直接与游离酶相结合,而仅与酶-底物复合物结合形成底物-酶-抑制剂复合物,从而影响酶促反应的现象。这种抑制作用使得 $V_{\max}$ 、 K_m 都变小,但 $V_{\max}/K_m$ 比值不变。 Mg^{2+} 同时降低了 ACPase 和 ALPase 的 K_m 值,说明其有助于提高生物膜磷酸酶与底物结合的能力。 Cu^{2+} 对 ACPase 的非竞争性抑制作用说明 Cu^{2+} 可能与 ACPase 的非活性部分结合,或与酶促反应中的中间产物络合物结合并阻止产物生成,使酶的催化活性降低。而 Zn^{2+} 对于磷酸酶以及 Cu^{2+} 对于 ALPase 的抑制作用并不符合竞争抑制性、非竞争抑制性或反竞争性抑制性作用,可能是直接对生物膜产生了毒害作用。通常来说,在土壤、植物、活性污泥或动物粪便中的酸性或碱性磷酸酶动力学常数 K_m 值是相似的,在 0.2 ~ 0.8 mmol/L 之间,而我们的研究发现自然生物膜的磷酸酶的 K_m 值在 0.1 左右,即使在金属离子的影响下, K_m 值仍小于 0.2,说明自然生物膜的磷酸酶对底物有更强的亲和力,而且这种亲和力受金属离子的影响相对较小。而酶动力学常数 $V_{\max}$ 值通常随着所研究的材料的生物量浓度或不同物质的富集程度而显著变化,例如,各种磷酸酶的 $V_{\max}$ 值在植物材料中比在土壤、动物粪便和污水污泥中大得多。对 $V_{\max}$ 值产生显著影响的抑制剂浓度也会有很大差异。例如, Cu^{2+} 对活性污泥中碱性磷酸酶的抑制模型与土壤中游离和固定化酸性磷酸酶的抑制模型相似,但 Cu^{2+} 对活性污泥中碱性磷酸酶的抑制浓度(0.1 ~ 2.5 mmol/L)明显高于土壤的(0.1 ~ 0.4 mmol/L)。这可能是由于活性污泥中生物量或磷酸酶的浓度较高^[22]。而我们研究的稻田自然生物膜的生物组成可能与活性污泥中微生物群落的复杂性更加相似。

4 结论

1)不同金属离子对稻田自然生物膜酸性或碱性磷酸酶具有不同的作用,有可能抑制、激活或无明显作用,这种作用因金属离子的种类、浓度和磷酸酶类型而异。

2)金属离子影响自然生物膜中磷酸酶活性,主要通过改变酸性或碱性磷酸酶与底物的亲和力和催化效率,以及影响磷酸酶基因的表达实现的。

3)自然生物膜中磷酸酶对底物有很强的亲和力,金属离子对这种亲和力的影响较小。而且由于自然生物膜本身是一个复杂的微生态系统,因此抵御金属离子毒性的作用也明显强于单一微生物种群。

参考文献:

- [1] Larned S T. A prospectus for periphyton: Recent and future ecological research[J]. *Journal of the North American Benthological Society*, 2010, 29(1): 182–206.
- [2] Wu Y, Yang J L, Tang J, et al. The remediation of extremely acidic and moderate pH soil leachates containing Cu (II) and Cd (II) by native periphytic biofilm[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2017, 162: 846–855.
- [3] Li J Y, Deng K Y, Hesterberg D, et al. Mechanisms of enhanced inorganic phosphorus accumulation by periphyton in paddy fields as affected by calcium and ferrous ions[J]. *Science of The Total Environment*, 2017, 609: 466–475.
- [4] Pohlen E, Marxsen J, Küsel K. Pioneering bacterial and algal communities and potential extracellular enzyme activities of stream biofilms[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2010, 71(3): 364–373.
- [5] 张妍, 崔骁勇, 罗维. 重金属污染对土壤微生物生态功能的影响[J]. *生态毒理学报*, 2010, 5(3): 305–313.
- [6] Headley J V, Gandrass J, Kuballa J, et al. Rates of sorption and partitioning of contaminants in river biofilm[J]. *Environmental Science & Technology*, 1998, 32(24): 3968–3973.
- [7] Dong D M, Derry L A, Lion L W. Pb scavenging from a freshwater lake by Mn oxides in heterogeneous surface coating materials[J]. *Water Research*, 2003, 37(7): 1662–1666.
- [8] Dong D M, Hua X Y, Li Y, et al. Cd adsorption properties of components in different freshwater surface coatings: the important role of ferromanganese oxides[J]. *Environmental Science & Technology*, 2003, 37(18): 4106–4112.
- [9] Dong D M, Li Y, Zhang J J, et al. Comparison of the adsorption of lead, cadmium, copper, zinc and Barium to freshwater surface coatings[J]. *Chemosphere*, 2003, 51(5): 369–373.
- [10] Serra A, Corcoll N, Guasch H. Copper accumulation and toxicity in fluvial periphyton: the influence of exposure history[J]. *Chemosphere*, 2009, 74(5): 633–641.
- [11] Fortin C, Denison F H, Garnier-Laplace J. Metal-phytoplankton interactions: modeling the effect of competing ions (H^+ , Ca^{2+} , and Mg^{2+}) on uranium uptake[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2007, 26(2): 242.
- [12] Ellwood N T W, Pippo F D, Albertano P. Phosphatase activities of cultured phototrophic biofilms[J]. *Water Research*, 2012, 46(2): 378–386.
- [13] Applebury M L, Coleman J E. *Escherichia coli* alkaline phosphatase[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1969, 244(2): 308.
- [14] Luo M, Guo Y C, Deng J Y, et al. Characterization of a monomeric heat-labile classical alkaline phosphatase from *Anabaena* sp. PCC7120[J]. *Biochemistry (Moscow)*, 2010, 75(5): 655–664.
- [15] Guzzon A, Bohn A, Diociaiuti M, et al. Cultured phototrophic biofilms for phosphorus removal in wastewater treatment[J]. *Water Research*, 2008, 42(16): 4357–4367.
- [16] 高秀丽, 邢维芹, 冉永亮, 等. 重金属积累对土壤酶活性的影响[J]. *生态毒理学报*, 2012, 7(3): 331–336.
- [17] Lu H Y, Yang L Z, Shabbir S, et al. The adsorption process during inorganic phosphorus removal by cultured periphyton[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2014, 21(14): 8782–8791.
- [18] 廖金花, 陈清西. 金属离子对鲍鱼碱性磷酸酶活力的影响[J]. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2004, 43(S1): 12–15.
- [19] Wu Y H, Li T L, Yang L Z. Mechanisms of removing pollutants from aqueous solutions by microorganisms and their aggregates: A review[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 107(107): 10–18.
- [20] Yang J L, Tang C L, Wang F W, et al. Co-contamination of Cu and Cd in paddy fields: Using periphyton to entrap heavy metals[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2016, 304: 150–158.
- [21] 陆珊, 胡源, 苏波, 等. 几种金属离子对麦芽酸性磷酸酶活性及构象的影响[J]. *化学研究与应用*, 2007, 19(4): 386–389.
- [22] Xie C S, Lu R J, Huang Y, et al. Effects of ions and phosphates on alkaline phosphatase activity in aerobic activated sludge system[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(10): 3394–3399.
- [23] Chen Q X, Zheng W Z, Lin J Y, et al. Effect of metal ions on the activity of green crab (*Scylla serrata*) alkaline phosphatase[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2000, 32(8): 879–885.
- [24] Wu J R, Shien J, Shieh H K, et al. Cloning of the gene and characterization of the enzymatic properties of the monomeric alkaline phosphatase (PhoX) from *Pasteurella multocida* strain X-73[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2007, 267(1): 113–120.
- [25] 赵娜, 朱琳, 冯鸣凤. 不同 pH 条件下 Cr^{6+} 对 3 种藻的毒性效应[J]. *生态毒理学报*, 2010, 5(5): 657–665.
- [26] Lu H Y, Wan J J, Li J Y, et al. Periphytic biofilm: a buffer for phosphorus precipitation and release between sediments and water[J]. *Chemosphere*, 2016, 144: 2058–2064.
- [27] 吕迎春, 孙志伟, 宋佳伟, 等. 磷和金属对荣成天鹅湖水体碱性磷酸酶活性和动力学性质的影响研究[J]. *环境科学学报*, 2018, 38(10): 4083–4089.