

AKTYWNOŚĆ ALKALICZNEJ FOSFATAZY NA TLE CHEMICZNYCH I BIOLOGICZNYCH WSKAŹNIKÓW EUTROFIZACJI WYBRANYCH JEZIOR POMORZA ZACHODNIEGO

Hanna Siwek

Katedra Chemii Ogólnej, Akademia Rolnicza w Szczecinie

Wstęp

Efektem antropogenicznego wzbogacania ekosystemów wodnych związkami azotu i fosforu jest przyspieszona eutrofizacja większości wód stojących. Badania prowadzone przez ponad 50 lat nad rolą, zawartością oraz przemianami związków azotu i fosforu w naturalnym środowisku wodnym wykazały, że podstawowym czynnikiem pokarmowym, kontrolującym rozwój mikroorganizmów planktonowych jest zawartość fosforu [LAMPERT, SOMMER 1996; SIUDA 2001]. Powstało wiele modeli empirycznych, które pozwalają na prognozowanie biomasy fitoplanktonu na podstawie wielkości podaży zasobów fosforu [FORSBERG, RYDING 1980; JONES, LEE 1982; PETERS 1986; WHITE 1989; LAMPERT, SOMMER 1996]. Najbardziej znanym modelem empirycznym jest porównawcze studium eutrofizacji, opracowane przez Organizację ds. Współpracy Ekonomicznej i Rozwoju (OECD), który jest analizą regresji między stężeniem fosforu ogólnego (TP) w wodzie a zawartością chlorofilu a, określającego biomasę fitoplanktonu. Choć regresja jest istotna, to podobnie jak w większości innych modeli, zmienność między jeziorami w granicach przedziału ufności jest znaczna, jeziora muszą różnić się ponaddziesięciokrotnie zawartością fosforu w wodzie, aby 95% przedziały ufności nie zachodziły na siebie [LAMPERT, SOMMER 1996]. Wynika z tego, że o trofii jeziora nie decyduje zawartość fosforu ogólnego w wodzie, ale raczej jego gospodarka i dostępność przyswajalnych dla organizmów wodnych frakcji fosforu. Jony ortofosforanowe powstają w reakcjach hydrolizy nierozpuszczalnych frakcji fosforu, które są katalizowane przez grupy enzymów fosfohydrolitycznych, należą do nich niespecyficzne fosfomonoesterazy, zwane powszechnie fosfatazami.

Celem pracy jest zbadanie aktywności alkalicznej fosfatazy w strefach pelagialu i profundalu wybranych jezior, ocena stanu troficznego tych wód w oparciu o chemiczne i biologiczne wskaźniki jakości wody oraz analiza zależności występujących między badanymi wskaźnikami.

Materiał i metody

Badano wody jeziora Będzin (14°49'20"E; 53°10'35"N) leżącego na Pojezierzu Zachodniopomorskim oraz trzech jezior Pobrzeża Szczecińskiego:

Dołgie Myśluborskie (14°55'25" E, 53°02'45" N), Piaseczno (14°44'45" E, 53°04'30" N) i Zaborsko (15°00'20" E, 53°10'35" N). Próby wody do badań pobrano w sierpniu 2005 roku, w punktach zlokalizowanych nad głęboczkami, z warstwy powierzchniowej (1 metr pod powierzchnią wody) w trzech punktach jeziora Będzin (B1, B2, B3), w dwóch punktach jeziora Dołgie Myśluborskie (D1, D2) oraz w jednym punkcie jezior: Piaseczno (P) i Zaborsko (Z). W punktach pomiarowych, w których występowały warstwy metalimnionu lub hipolimnionu pobrano próby wody w strefie profundalu, z jeziora Będzin w punktach B1 i B2 (odpowiednio na głębokości 13 i 12,5 m), z jeziora Dołgie Myśluborskie w punkcie D2 (na głębokości 8 m) oraz z jeziora Piaseczno w punkcie P (na głębokości 12 m).

W każdej próbie wody oznaczono aktywność alkalicznej fosfatazy (APA) metodą spektrofotometryczną z *p*-nitrofenylofosforanem disodu (*p*-NPP), 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 Techeomp, 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 $2,85 \cdot 10^{-5}$ mol·dm⁻³ do $7,14 \cdot 10^{-4}$ mol·dm⁻³). W oparciu o równanie Lineweavera-Burka, które jest zlinearyzowaną formą Michaelisa-Menten, obliczono stałe charakteryzujące APA w badanych wodach: szybkość maksymalną (v_{\max}) i stałą Michaelisa-Menten (K_M).

Przedstawione w pracy wskaźniki charakteryzujące trofię badanych jezior: stężenie azotu ogólnego (TN), stężenie fosforu ogólnego (TP), stężenie rozpuszczonego fosforu fosforanowego (P-PO₄), zawartość chlorofilu *a* (Chl) oraz widzialność krążka Sacchiego (KS), zostały odnotowane w ramach badań monitoringowych wód powierzchniowych, prowadzonych przez Wojewódzki Inspektorat Ochrony Środowiska w Szczecinie. Ocenę typu troficznego badanych wód przeprowadzono w oparciu o wskaźniki stanu trofii jezior: TSI(KS) – charakteryzujący przezroczystość wody (obliczony w oparciu o KS), TSI(Chl) – charakteryzujący zawartość fitoplanktonu (obliczony w oparciu o Chl), TSI(TP) – charakteryzujący zawartość fosforu (obliczone w oparciu o TP) [CARLSON 1977]. Pierwiastki limitujące rozwój fitoplanktonu w badanych wodach zostały określone w oparciu o stosunek TN : TP [[FORSBERG, RYDING 1980] oraz porównanie parametrów TSI(Chl) i TSI(TP) [CARLSON 1977].

Wyniki badań i dyskusja

Ocena stanu troficznego jezior przeprowadzona w oparciu o wskaźniki stanu trofii TSI (tab. 1) wskazuje, że proces eutrofizacji był najbardziej zaawansowany w jeziorze Będzin, w którym wszystkie wskaźniki TSI (w skali I–100) wynosiły w warstwie powierzchniowej ponad 70. W warstwie przydennej wskaźnik TSI(TP) wynosił 94, co kwalifikuje jezioro Będzin do zbiorników silnie zeutrofizowanych. Potwierdzają to wcześniejsze badania KUBIAKA 2003, który badał stan troficzny tego jeziora w latach 1977–1998 i ocenił, że jest to zbiornik hipertroficzny o silnie zanieczyszczonych wodach. Wg autora średnia wartość wskaźnika trofii TSI wynosiła 69, co wskazuje na pogorszący się stan troficzny jeziora.

Na podstawie wskaźnika chemicznego TSI (TP) badane jeziora można zaliczyć do eutroficznych, a biorąc jako kryteria wskaźniki biologiczne TSI(SD) i TSI(Chl) jeziora Będzin i Zaborsko do eutroficznych, a Dołgie Myśluborskie oraz Piaseczno do mezoeutroficznych [CARLSON 1977]. Obliczone różnice między chemicznymi a biologicznymi wskaźnikami TSI (TSI(Chl) i TSI(TP)) w jeziorze Będzin były stosunkowo małe co wskazuje, że fosfor był czynnikiem limitującym rozwój biomasy fitoplanktonu w warstwie epilimnionu tego jeziora. Potwierdza to większy od 16 stosunek TN : TP, co wskazuje na braki fosforu w tym środowisku [FORSBERG, RYDING 1980; WHITE 1989; FORSBERG 1993]. W warstwie powierzchniowej pozostałych jezior różnice wskaźników TSI(TP) i TSI(Chl) wynosiły od 11 w jeziorze Zaborsko do 19 w punkcie D2 jeziora Dołgie Myśluborskie, co wskazuje, że fosfor w mniejszym stopniu ograniczał rozwój biomasy w tych jeziorach. Wysokie wartości TN : TP w wodach powierzchniowych pozostałych jezior mieściły się w przedziale od 37 w jeziorze Piaseczno do 43 w jeziorach Zaborsko i Dołgie Myśluborskie, wskazując na większe braki fosforu w tych jeziorach niż w najbardziej zeutrofizowanym jeziorze Będzin.

Tabela 1; Table 1

Wskaźniki poziomu trofii i limitacji pokarmowych w wodach badanych jezior
Trophic state and growth-limiting indices in waters of examined lakes

Jezioro Lake	TSI(KS)	TSI(Chl)	TSI(TP)		TN : TP	P-PO ₄ (mg P·dm ⁻³)
	powierzchnia surface	powierzchnia surface	powierzchnia surface	dno bottom	powierzchnia surface	dno bottom
Będzin 1 (B1)	70	73	76	94	32	0,40
Będzin 2 (B2)	67	74	77	99	34	0,65
Będzin 3 (B3)	70	73	76		36	
Dołgie 1 (D1)	47	49	65		43	
Dołgie 2 (D2)	47	46	65	69	40	0,02
Piaseczno (P)	59	54	67	79	37	0,06
Zaborsko (Z)	65	62	73		43	

TSI(KS) wskaźnik stanu trofii obliczony w oparciu o widzialność krążka Sacchiego; trophic state index computed for Secchi disk transparency

TSI(Chl) wskaźnik stanu trofii obliczony w oparciu o zawartość chlorofilu; trophic state index computed for content of chlorophyll

TSI(TP) wskaźnik stanu trofii obliczony w oparciu o zawartość fosforu ogólnego; trophic state index computed for content of total phosphorus

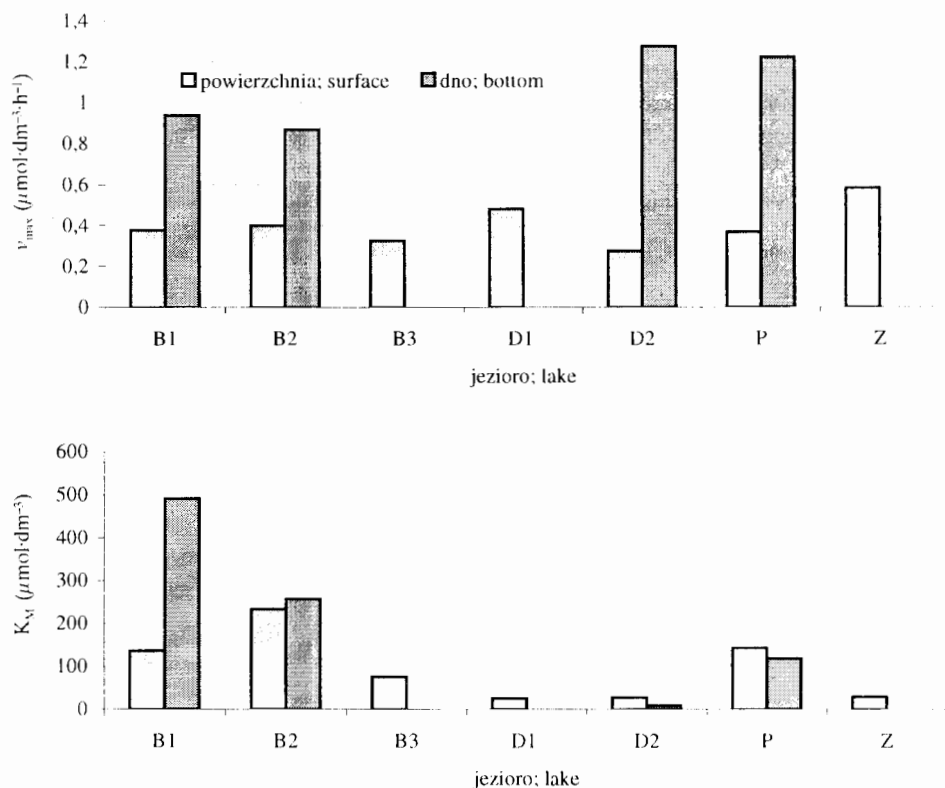
TN stężenie azotu ogólnego; concentration of total nitrogen

TP stężenie fosforu ogólnego; concentration of total phosphorus

We wszystkich badanych jeziorach TSI(TP) było wyższe w warstwie przydennej niż w warstwie powierzchniowej. W jeziorach Będzin i Piaseczno różnica wynosiła ponad 20, a w płytszym jeziorze Dołgie Myśluborskie zaledwie 4, co może sugerować uwalnianie fosforu z osadów dennych.

Parametry charakteryzujące aktywność alkalicznej fosfatazy w wodach badanych jezior przedstawiono na rysunku 1. W warstwie powierzchniowej badanych jezior v_{max} były porównywalne. Najwyższą wartość v_{max} odnotowano w jeziorze Zaborsko ($0,583 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$), a najniższą w jeziorze Dołgie Myśluborskie w punkcie D2 ($0,273 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$). Stała K_M w warstwie epilimnionu różniła się nawet

dziesięciokrotnie. Jej najwyższą wartość odnotowano w jeziorze Będzin (punkt B2, $K_M = 233 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$), a najniższą w jeziorze Dolgie Myśluborskie (punkt D1, $K_M = 25,4 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$). W punktach pomiarowych, w których występowały warstwy metalimnionu lub hipolimnionu, v_{\max} reakcji enzymatycznych była wyższa w warstwie naddenej. W punktach pomiarowych B1 i B2 jeziora Będzin odnotowano ponaddwukrotnie wyższe wartości v_{\max} w warstwie naddenej w porównaniu z wartościami odnotowanymi w warstwie powierzchniowej, a w jeziorach Dołgie Myśluborskie i Piaseczno ponadtrzykrotny wzrost v_{\max} . Analogiczne wyniki odnotowano w wodach jeziora Kinneret, w którym w okresie stagnacji letniej aktywność alkalicznej fosfatazy była kilkakrotnie wyższa w warstwie metalimnionu na głębokości 20 m w porównaniu z warstwą epilimnionu, najmniejszą aktywność odnotowano w warstwie naddenej na głębokości 40 m [BERMAN 1970]. W badanych jeziorach pobierane były próby w warstwie naddenej na głębokości od 8 do 13 m, która mogła mieć cechy charakterystyczne dla metalimnionu. Porównanie stałych K_M w poszczególnych warstwach jezior nie wykazało żadnych prawidłowości-



B1, B2, B3, D1, D2, P, Z – objaśnienia jak w tab. 1; explanations see Table 1

Rys. 1. Szybkość maksymalna (v_{\max}) i stała Michaelisa-Menten (K_M) reakcji hydrolizy p -nitrofenylofosforanu disodu (p -NPP) w wodach badanych jezior

Fig. 1. Maximum rate (v_{\max}) and Michaelis-Menten constant (K_M) of disodium p -nitrophenylphosphate (p -NPP) hydrolysis in the waters of examined lakes

ci charakterystycznych dla wszystkich badanych jezior, w jeziorze Będzin K_M było wyższe w warstwie naddennej, a w pozostałych jeziorach w warstwie powierzchniowej.

W warstwie epilimnionu badanych jezior największą wartość v_{max} i najniższą K_M odnotowano w punkcie D1 jeziora Dołgie Myśluborskie i w jeziorze Zaborsko, co potwierdza wysoką aktywność alkalicznej fosfatazy w tych jeziorach. Analiza TN : TP wykazała, że są to wody, w których rozwój biomasy był najbardziej ograniczony przez niskie stężenia fosforu, czyli otrzymano wyniki zgodne z założeniem FORSBERGA 1993. Wg autora aktywność alkalicznej fosfatazy powinna być najwyższa w wodach o niskich stężeniach fosforu. We wszystkich jeziorach v_{max} i TP były niższe w warstwie powierzchniowej i wyższe w warstwie naddennej, co wskazuje, że v_{max} enzymatycznej hydrolizy związków fosforu jest związana z dostępnością substratów. Wyższą aktywność alkalicznej fosfatazy odnotowano w wodach o większej zawartości TP. Niższa aktywność alkalicznej fosfatazy w warstwie naddennej jeziora Będzin była najprawdopodobniej związana z bardzo wysokimi stężeniami $P-PO_4$ (tab. 1). Jony fosforanowe są inhibitorem kompetencyjnym dla reakcji katalizowanych przez fosfatazy, których aktywność jest funkcją zarówno sumy stężeń dostępnych w środowisku substratów jak i jonów ortofosforanowych [SIUDA, GÜDE 1994]. Inną przyczyną mogła być mniejsza przezroczystość wód jeziora Będzin, w których współczynniki TSI(KS) i TSI(Chl) były znacznie większe niż w pozostałych jeziorach, co mogło mieć wpływ na skład gatunkowy organizmów w warstwie metalimnionu, wśród których dominują glony zaadaptowane do światła o małym natężeniu i ich rozwój cofa się wraz ze wzrostem zagęszczenia glonów w epilimnionie [LAMPERT, SOMMER 1996]. Potwierdza to duża różnica powinowactwa enzymów do substratów w jeziorze Będzin, w którym było ono znacznie niższe niż w jeziorach Zaborsko i Dołgie Myśluborskie.

Wnioski

1. Wartości chemicznych wskaźników stanu trofii jezior kwalifikowały wody wszystkich badanych jezior do wód eutroficznych, wskaźniki biologiczne kwalifikowały wody jeziora Będzin i Zaborsko do tego typu jezior, a jeziora: Dołgie Myśluborskie i Piaseczno do jezior mezoeutroficznych.
2. We wszystkich badanych jeziorach aktywność alkalicznej fosfatazy była wyższa w warstwie naddennej w porównaniu z warstwą powierzchniową epilimnionu, szybkość maksymalna reakcji hydrolizy związków fosforu katalizowanej przez fosfatazy była ponaddwukrotnie wyższa w warstwie naddennej.
3. Największą aktywność alkalicznej fosfatazy odnotowano w wodach jezior Dołgie Myśluborskie i Zaborsko, których rozwój fitoplanktonu był najbardziej ograniczany przez braki fosforu. W wodach tych jezior odnotowano największą maksymalną szybkość reakcji katalizowanych przez alkaliczne fosfatazy oraz największe powinowactwo tych enzymów do substratów.

Literatura

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.
- CARLSON R.E. 1977. *A trophic state index for lakes*. Limnol. and Oceanogr. V 22(2): 361–369.
- 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.
- JONES R.A., LEE G.F. 1982. *Recent advances in assessing impact of phosphorus loads on eutrophication-related water quality*. Water Res. 16: 503–515.
- KUBIAK J. 2003. *Największe dimiktyczne jeziora Pomorza Zachodniego. Poziom trofii, podatność na degradację oraz warunki siedliskowe ichtiofauny*. Rozprawy nr 214, AR w Szczecinie: 43–47.
- LAMPERT W., SOMMER U. 1996. *Ekologia wód śródlądowych*. PWN, W-wa: 329–350.
- PETERS R.H. 1986. *The role of prediction in limnology*. Limnol. Oceanogr. 31(5): 1143–1159.
- SIUDA W. 2001. *Enzymatyczna regeneracja ortofosforanu w wodach jeziornych*. Post. Mikrobiol. 40(2): 187–217.
- SIUDA W., GÜDE H. 1994. *The role of phosphorus and organic carbon compounds in regulation of alkaline phosphatase activity and P regeneration processes in eutrophic lakes*. Pol. Arch. Hydrobiol. 41: 171–187.
- WHITE E. 1989. *Utility of relationships between lake phosphorus and chlorophyll a as predictive tools in eutrophication control studies*. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Res. 23: 35–41.

Słowa kluczowe: fosfataza alkaliczna, eutrofizacja, fosfor, jeziora

Streszczenie

W wodach czterech jezior Pomorza Zachodniego badano kinetyczne parametry określające aktywność alkalicznej fosfatazy (APA). We wszystkich badanych jeziorach APA była wyższa w warstwie naddennej w porównaniu z warstwą powierzchniową, szybkość maksymalna reakcji hydrolizy związków organicznych fosforu katalizowanej przez fosfatazy była ponad dwa razy wyższa w warstwie naddennej. Największą szybkość maksymalną (v_{max}) i najniższe wartości stałej Michaelisa-Menten (K_M) odnotowano w wodach jezior Dołgie Myśluborskie i Zaborsko, w których występowały największe letnie braki fosforu, które fitoplankton mógł kompensować przez wzrost produkcji enzymów.

ACTIVITY OF ALKALINE PHOSPHATASE AGAINST THE BACKGROUND OF BIOLOGICAL AND CHEMICAL EUTROPHICATION INDICES IN SELECTED LAKES OF WESTERN POMERANIA

Hanna Siwek

Department of General Chemistry, Agricultural University, Szczecin

Key words: alkaline phosphatase, eutrophication, phosphorus, lakes

Summary

Kinetic parameters of alkaline phosphatase activity (APA) were studied in waters of the four lakes in Western Pomerania. APA was higher in near-bottom waters in all the lakes, maximum rate of the hydrolysis of organic phosphate compounds was over twice higher than in the surface waters. The highest maximum rate (v_{\max}) and the lowest Michaelis-Menten constant (K_M) values were observed in surface waters of Dołgie Myśluborskie and Zaborsko Lakes, where the strongest summer phosphorus depletion occurred. Phytoplankton could compensate their phosphorus deficiency by increasing enzyme production.

Dr inż. Hanna **Siwek**
Katedra Chemii Ogólnej
Akademia Rolnicza
ul. Słowackiego 17
71-434 SZCZECIN
e-mail: hsiwek@agro.ar.szczecin.pl