

WPŁYW ODCZYNU (pH) NA AKTYWNOŚĆ ALKALICZNYCH FOSFATAZ W WODACH POWIERZCHNIOWYCH MIERZONĄ METODĄ SPEKTOFOTOMETRYCZNĄ

Hanna Siwek, Leokadia Lewandowska

Katedra Chemii Ogólnej, Akademia Rolnicza w Szczecinie

Wstęp

Jednym z ważniejszych ektoenzymów w środowisku wodnym są niespecyficzne fosfomonoesterazy, zwane powszechnie fosfatazami, które katalizują reakcje uwalniania orofosforanów z większości wielkocząsteczkowych związków organicznych oraz z nieorganicznych piro- i metafosforanów. Ze względu na optymalny dla ich aktywności odczyn, rozróżnia się fosfatazy alkaliczne i fosfatazy kwaśne. Alkaliczne fosfatazy wykazują maksymalną aktywność w zakresie pH 7,6–9,6 [SIUDA 2001]. Wody powierzchniowe charakteryzują się na ogół odczynem w zakresie od pH 6,5 do pH 8,5, rzadko przekraczając wartość poniżej pH 4,0 i powyżej pH 9,0 [DOJLIDO 1995]. Z tego powodu, w środowiskach wodnych, alkaliczne fosfatazy odgrywają większą rolę w uwalnianiu fosforanów z nieprzyswajalnych przez rośliny form fosforu i są częściej badaną grupą enzymów niż fosfatazy kwaśne [JANSSON i in. 1988; SIUDA 2001].

Szybkość reakcji enzymatycznych zależy od stopnia zjonizowania wszystkich składników chemicznych układu, rodzaju enzymu oraz rodzaju substratu [JANSSON i in. 1988]. Aktywność alkalicznych fosfataz oznacza się metodą fluorometryczną lub spektrofotometryczną, stosując różnego rodzaju substraty, np. *p*-nitrofenylofosforan disodu [NIEWOLAK 1978; YIYONG, XINYU 1997; BARIK i in. 2001], fosforan metylofluoresceiny [SMITH, KALF 1981; NEWMAN, REDDY 1992], fosforan metyloumbelliferonu [KIERSZTYN i in. 2002]. We wszystkich metodach substrat wprowadza się do badanej próby wody, po wcześniejszym ich zbuforowaniu, a następnie inkubuje. Odczyn buforów w zależności od metody zmienia się w zakresie od pH 7,6 do pH 10,9.

Celem pracy jest ocena wpływu odczynu na rozkład *p*-nitrofenylofosforanu disodu przez alkaliczne fosfatazy w wodach powierzchniowych i wyznaczenie optymalnego dla aktywności alkalicznych fosfataz pH buforu. Jako kryterium oceny aktywności alkalicznych fosfataz przyjęto stałe w równaniu Michaelisa-Menten (v_{\max} i K_M).

Materiał i metody

Aktywność alkalicznej fosfatazy (APA) badano w wodach pobranych w sezonie wiosennym i jesiennym, z siedmiu zbiorników powierzchniowych, zlokalizowanych na terenach wiejskich: z rzeki Płoni (W1), z Jeziora Zaborsko (W2) i z czterech oczek wodnych w Kołowie i Binowie, różniących się sposobem zagospodarowania zlewni (W3-W7). APA oznaczono metodą spektrofotometryczną z *p*-nitrofenylofosforanem disodu (*p*-NPP) w środowisku czterech zmodyfikowanych uniwersalnych buforów (MUB) o odczynie pH: 7,5; 8,0; 8,5 i 9,0, które przygotowano zgodnie z metodą opisaną przez BIELIŃSKĄ 2005. Mieszanki reakcyjne przygotowano zgodnie z metodą opisaną przez BARIKA i in. 2001. Stężenia początkowe *p*-NPP wyniosły: $7,14 \cdot 10^{-5}$; $1,42 \cdot 10^{-4}$; $2,43 \cdot 10^{-4}$; $3,57 \cdot 10^{-4}$; $7,14 \cdot 10^{-4}$ mol·dm⁻³. Próby inkubowano przez 48 godz. w temperaturze 25°C. Zawartość nitrofenolu oznaczono na dwuwiązkowym spektrofotometrze UV/VIS firmy Techcomp, przy długości fali 410 nm. W taki sam sposób badano rozkład *p*-NPP bez udziału enzymów, zastępując wody naturalne wodą destylowaną. Wszystkie oznaczenia przeprowadzono w trzech powtórzeniach.

Aktywność APA charakteryzowano na podstawie stałych w równaniu Michaelisa-Menten, tj. v_{\max} i K_M . Ich wartości wyznaczono z regresji liniowej Lineweaver-Burke'a stanowiącej przekształconą postać równania Michaelisa-Menten.

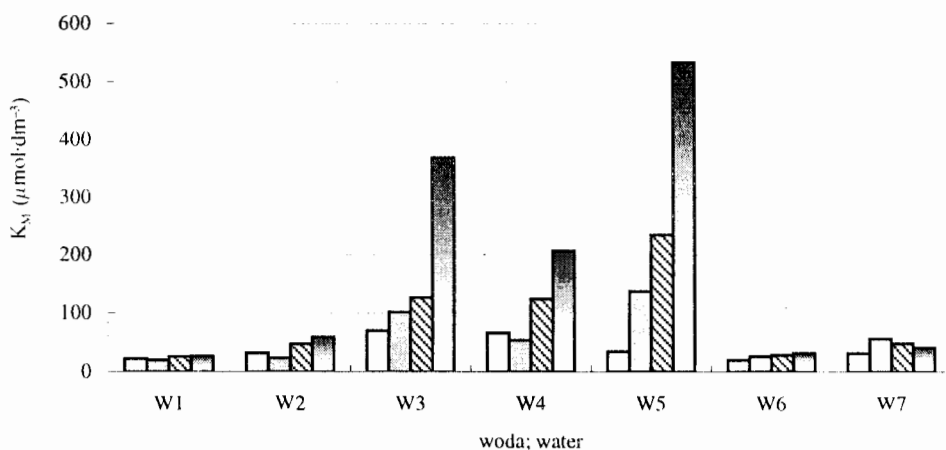
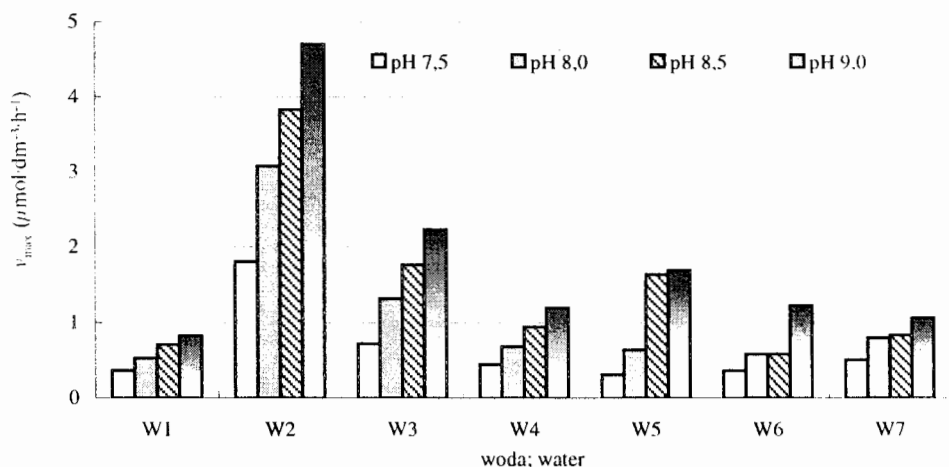
Wyniki badań i dyskusja

Wyniki badań APA w próbach wód naturalnych, w środowisku buforów o różnym pH, przedstawiono na rysunku 1. We wszystkich badanych wodach v_{\max} rosła wraz ze wzrostem pH, najwyższe wartości stałych reakcji katalizowanych przez alkaliczne fosfatazy odnotowano przy pH 9,0. Wartości K_M prawie we wszystkich wodach wzrastały wraz ze wzrostem odczynu, z wyjątkiem wody W7. W wodach W3 i W5 przy pH 9,0 stała K_M była ponaddwukrotnie wyższa niż w porównaniu ze stałą w próbach przy odczynie pH 7,5–8,5. Wskazuje to, że wraz ze wzrostem pH powinowactwo fosfataz alkalicznych do *p*-NPP zmniejsza się.

Stopień rozkładu *p*-NPP w wodzie bez udziału enzymów dla badanego zakresu odczynu pH przedstawiono na rysunku 2. Dla wszystkich buforów otrzymano istotne zależności liniowe. Najmniejszy rozkład *p*-NPP odnotowano we wszystkich próbach o pH 8,0, i pH 8,5. Największy rozkład odnotowano: dla niskich stężeń *p*-NPP w próbach o pH 9,0, a dla wysokich stężeń *p*-NPP w próbach o pH 7,5.

Analiza otrzymanych wyników wskazuje, że rozkład *p*-NPP przez alkaliczne fosfatazy zachodzi najszybciej w środowisku o pH 9,0, jednak przy doborze optymalnych parametrów oznaczania APA w wodach naturalnych należy uwzględnić, że równolegle zachodzi reakcja hydrolizy *p*-NPP bez udziału enzymów. W wodach naturalnych znajdują się ortofosforany, które są produktem reakcji rozkładu *p*-NPP oraz inhibitorem kompetencyjnym dla większości fosfataz [JANSSON i in. 1988; SIUDA 2001]. Podczas badania aktywności fosfataz ortofosforany mogą przesunąć równowagę reakcji hydrolizy *p*-NPP w stronę substratów. W efekcie przy niskich stężeniach fosfataz reakcja rozkładu *p*-NPP w ślepej próbce może zachodzić szybciej niż w próbach badanych wód. Z przedstawionych danych wynika, że

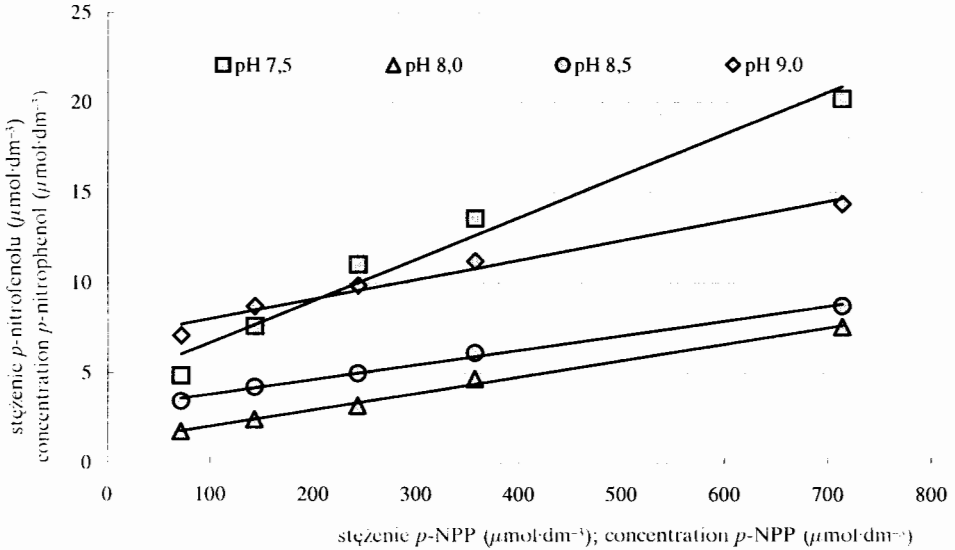
reakcja hydrolizy *p*-NPP bez udziału enzymów zachodzi w najmniejszym stopniu w środowisku buforów o pH: 8,0 i 8,5. Optymalny bufor, w środowisku którego powinno się oznaczać APA, powinien zapewniać największą szybkość rozkładu *p*-NPP z udziałem alkalicznych fosfataz oraz minimalizować wpływ dodatkowych reakcji zachodzących podczas oznaczania APA w wodach naturalnych. Spośród badanych buforów największe wartości v_{\max} odnotowano we wszystkich badanych



- W1 rzeka Płoń; Płoń river
 W2 jezioro Zaborsko; Zaborsko lake
 W3–W5 oczka wodne w Kołowie; field-ponds in Kołowo
 W6–W7 oczka wodne w Binowie; field-ponds in Binowo

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

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



Rys. 2. Zależność stężenia produktu od stężenia substratu w reakcji hydrolizy *p*-nitrofenylofosforanu disodu (*p*-NPP) przeprowadzonej bez udziału enzymów w środowisku buforów o różnym pH

Fig. 2. Relation between concentrations of product and substrate at hydrolysis of disodium *p*-nitrophenylphosphate (*p*-NPP) conducted without enzymes at different pH levels

wodach naturalnych przy pH 9,0 i 8,5, a reakcja rozkładu *p*-NPP bez udziału enzymów zachodziła w najmniejszym stopniu w środowisku pH 8,0 i 8,5. Dlatego wśród badanych buforów oba warunki optymalnego buforu, w środowisku którego powinno się oznaczać APA, najlepiej spełnia bufor o pH 8,5.

Wnioski

- 1 We wszystkich testowanych wodach naturalnych szybkość maksymalna (v_{max}) i stała Michaelisa-Menten (K_M) reakcji rozkładu *p*-nitrofenylofosforanu disodu katalizowanej przez alkaliczne fosfatazy wzrastały wraz ze wzrostem odczynu pH w zakresie pH 7,5–9,0.
- 2 Reakcja hydrolizy *p*-nitrofenylofosforanu disodu bez udziału enzymów zachodzi w najmniejszym stopniu w środowisku buforów o pH: 8,0 i 8,5.
- 3 Analiza wpływu odczynu na aktywność alkalicznej fosfatazy w wodach naturalnych wykazała, że optymalny odczyn (pH) dla oznaczania aktywności alkalicznej fosfatazy wyniósł 8,5.

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.

- BIELIŃSKA E.J. 2005. *Oznaczanie aktywności fosfataz*. Acta Agrophysica, Rozprawy, Monografie 3: 63–74.
- DOJLIDO J. R. 1995. *Chemia wód powierzchniowych*. Wydawnictwo Ekonomia i Środowisko, Białystok: 342 ss.
- JANSSON M., HAKAN O., PETTERSON K. 1988. *Phosphatases; origin, characteristics and function in lakes*. Hydrobiol. 170: 157–175.
- KIERSZTYN B., SIUDA W., CHRÓST R.J. 2002. *Microbial ectoenzyme activity: useful parameters for characterizing the trophic conditions of lakes*. Polish J. Environ. Stud. 11(4): 367–373.
- NEWMAN S., REDDY K.R. 1992. *Sediment resuspension effects on alkaline phosphatase activity*. Hydrobiol. 245: 75–86.
- NIEWOLAK S. 1978. *Aktywność fosfatazy alkalicznej w wodzie jezior nawożonych*. Roczn. Nauk Rol., Seria H 98(3): 147–175.
- SIUDA W. 2001. *Enzymatyczna regeneracja ortofosforanu w wodach jeziornych*. Post. Mikrobiol. 40(2): 187–217.
- SMITH R.E.H., KALF J. 1981. *The effect of phosphorus limitation on algal growth rates: evidence from alkaline phosphatase*. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 38: 1421–1426.
- YIYONG Z., XINYU Z. 1997. *Seasonal variation in kinetic parameters of alkaline phosphatase activity in shallow Chinese freshwater lake*. Wat. Res. 31(5): 1232–1235.

Słowa kluczowe: aktywność fosfatazy, kinetyka, pH, woda

Streszczenie

W pracy badano zmiany aktywności alkalicznych fosfataz w próbach wód naturalnych w obecności buforów o różnym odczynie pH (7,5–9,0). Wraz ze wzrostem odczynu pH wzrastała szybkość maksymalna (v_{\max}) oraz stała Michaelisa-Menten (K_M) enzymatycznej reakcji hydrolizy *p*-nitrofenylofosforanu disodu. Optymalny odczyn pH przy oznaczaniu aktywności alkalicznej fosfatazy w wodach naturalnych wyniósł 8,5.

THE INFLUENCE OF REACTION (pH) ON ALKALINE PHOSPHATASE ACTIVITY IN SURFACE WATERS MEASURED BY SPECTROPHOTOMETRIC METHOD

Hanna Siwek, Leokadia Lewandowska

Department of General Chemistry, Agricultural University, Szczecin

Key words: phosphatase activity, kinetics, pH, water

Summary

The changes of alkaline phosphatase activity (APA) in water samples with the buffers at different pH (7.5–9.0) were studied. The Michaelis-Menten cons-

tant (K_M) and maximum rate (v_{max}) of disodium *p*-nitrophenylphosphate hydrolysis increased with an increase of pH. The optimum reaction for phosphohydrolytic activity was observed at pH 8.5.

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