

DOI: 10.7524/j.issn.0254-6108.2017.03.2016071501

张友, 吕迎春, 高丽. 样品前处理方式对沉积物酶水解有机磷的影响[J]. 环境化学, 2017, 36(3): 635-641.

ZHANG You, LV Yingchun, GAO Li, et al. Effect of sample pretreatment on enzymatic hydrolysis of organic phosphorus in sediment [J]. Environmental Chemistry, 2017, 36(3): 635-641.

## 样品前处理方式对沉积物酶水解有机磷的影响\*

张 友<sup>1,2</sup> 吕迎春<sup>1</sup> 高 丽<sup>3</sup> 刘书花<sup>4</sup> 徐 刚<sup>1\*\*</sup> 王安东<sup>5</sup> 赵亚杰<sup>5</sup>

(1. 中国科学院烟台海岸带研究所, 烟台, 264003; 2. 中国科学院大学, 北京, 100049; 3. 烟台大学, 烟台, 264003;  
4. 山东省分析测试中心, 济南, 250014; 5. 山东省黄河三角洲国家级自然保护区管理局, 东营, 257091)

**摘 要** 磷酸酶水解技术是研究沉积物有机磷形态和生物有效性的有力工具. 沉积物样品处理过程对酶水解有机磷的影响尚不清楚. 为此, 以天鹅湖表层沉积物为研究对象, 研究了干燥方式、提取剂、提取比例、提取时间条件对沉积物酶水解有机磷的影响特征, 以寻求最佳的酶水解技术的实验条件. 研究结果表明, 自然风干处理引发了有机磷水解, 降低了磷酸二酯磷(Diester-P)含量. 而冻干处理更真实地保存了沉积物有机磷形态特征, 比较适合有机磷分析. 尽管 HCl 预提取显著增大了有机磷的提取比例, 但是存在 Diester-P 水解风险, 因此 NaOH/EDTA 一步提取更适合有机磷的测定. 较长的提取时间和较大固液比同样也显著增大了有机磷的提取效率, 但是同样存在 Diester-P 水解风险. 研究显示 Diester-P 极不稳定, 易受实验条件的影响, 在实际操作中需要特别注意. 总之沉积物样品采用冷冻干燥处理, 固液比 1:30, 采用  $0.25 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaOH} + 50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ EDTA}$  提 8 h 更适合沉积物酶水解有机磷的分析.

**关键词** 沉积物, 磷酸酶, 有机磷, 提取条件.

## Effect of sample pretreatment on enzymatic hydrolysis of organic phosphorus in sediment

ZHANG You<sup>1,2</sup> LV Yingchun<sup>1</sup> GAO Li<sup>3</sup> LIU Shuhua<sup>4</sup>  
XU Gang<sup>1\*\*</sup> WANG Andong<sup>5</sup> ZHAO Yajie<sup>5</sup>

(1. Yantai institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Science, Yantai, 264003, China;

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100049, China;

3. Yantai University, Yantai, 264003, China; 4. Analysis and Test Center of Shandong Province, Ji'nan, 250014, China;

5. Administration Bureau of the Yellow River Delta National Nature Reserve, Dongying, 257091, China)

**Abstract:** Enzymatic hydrolysis is a powerful tool to study the speciation and bioavailability of sediment organic phosphorus (P). However, the effects of the sample treatment on the enzymatic hydrolysis need to be fully understood. In order to investigate the optimal condition for enzymatic hydrolysis, the surface sediments of Swan Lake were collected to study the effects of sample preparation procedures, including sample pretreatment, extraction solution, extraction time, and ratio of sample to extraction efficiency on enzymatic hydrolysis. The results showed that air-drying caused the hydrolysis of diester-P in sediments. Freeze drying preserved the characteristics of organic phosphorus, and is recommended for the study of organic phosphorus in sediments. Although the

2016 年 7 月 15 日收稿(Received: July 15, 2016).

\* 国家自然科学基金(41573120, 41273130)和山东省科技攻关计划(2014GGH02004)资助.

Supported by the National Natural Science Foundation of China(41573120, 41273130) and Key Science and Technology Program of Shandong (2014GGH02004).

\*\* 通讯联系人, Tel: +86-535-2109118, E-mail: gxu@yic.ac.cn

Corresponding author, Tel: +86-535-2109118, E-mail: gxu@yic.ac.cn

recovery of P was significantly increased by HCl pre-extraction, there is also a risk of diester-P hydrolysis at the same time. As a result, one step extraction of NaOH/EDTA is recommended for enzymatic hydrolysis of organic phosphorus in sediment. In addition, longer extraction time and higher extraction ratio ( $S$  (sediment) /  $V$  (volume)) tend to increase the risk of diester-P hydrolysis although they increased the recovery of P from sediment. Our results suggest that diester-P in sediment is extremely unstable and vulnerable to extraction conditions. Thus it deserves special caution with sample analysis and data interpretation. In conclusion, the freeze dried sediments were extracted with  $0.25 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaOH +  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  EDTA at 8 h and sediment/solution ratio of 1:30 which were recommended for enzymatic hydrolysis of organic phosphorus in sediments.

**Keywords:** sediment, phosphatase, organic phosphorus, extraction conditions.

水体富营养化是当今世界面临的重要环境安全问题<sup>[1-2]</sup>,而磷也是造成水体富营养化的关键营养元素<sup>[3]</sup>,有机磷(OP)是湖泊总磷的重要组成部分,在沉积物中可占总磷(TP)的20%—60%<sup>[4-5]</sup>,在水中可占总磷的40%—90%<sup>[6-7]</sup>.夏季藻类大量爆发时,活性磷不足以维持藻类的生长,有机磷循环供磷的成为活性磷主要来源<sup>[8]</sup>.目前对环境磷的研究主要集中在无机磷,包括磷含量、形态、吸附解吸、来源和交换通量等的研究<sup>[9-11]</sup>.而有机磷由于其化学结构复杂种类多样,同时受研究技术和方法的限制<sup>[12-13]</sup>,目前人们对其认识十分有限.

酶水解技术是将有机磷分子中的P—O—P和C—O—P键通过酶催化反应使其断裂最终生成无机磷的过程.近年来,商品化磷酸单酯酶、磷酸二酯酶和植酸酶被应用到环境有机磷的研究中<sup>[14-15]</sup>,该方法可在较温和的实验环境下分析沉积物有机磷,从而避免了部分有机磷水解.用酶水解技术可较好地模拟有机磷的潜在生物有效性.李凌萍<sup>[16]</sup>利用酶水解技术研究了滇池有机磷对水污染的贡献.结果表明,入湖河流输入湖泊可酶水解磷总量为每年10.02吨,并且以活性单酯磷的含量最高.Zhu等<sup>[17]</sup>利用酶水解法分析了滇池表层沉积物有机磷形态及其生物有效性,发现滇池沉积物中12.1%—27.2%的有机磷具有潜在生物可利用性.为了完善酶水解技术,使得所研究的数据具有统一性和可比性,He和Turner等<sup>[18-19]</sup>对可水解的有机磷的酶作了大量研究,研究结果表明,磷酸单酯酶能够水解聚合态磷和单酯磷,磷酸二酯酶能够较好地水解二酯磷,植酸酶则可以水解所有的磷酸酯键.He和Honeycutt等研究酶水解有机磷的培养条件的结果表明,以Tris-HCl为缓冲液,pH=9作为碱性磷酸酶水解有机磷的条件,以Tris-HCl为缓冲液,pH=5作为植酸酶水解有机磷的条件<sup>[20]</sup>.但是,对样品处理方法(如干燥方式、提取溶剂、提取时间和比例等)对酶水解有机磷的影响尚不清楚.

滨海湿地是磷的“汇”、“源”和“转化器”,对保护近海海洋环境具有重要作用.荣成天鹅湖湿地是黄海和渤海交汇处最重要的湿地之一,近年来,天鹅湖水质恶化,大型丝状硬毛藻滋生泛滥,湿地功能退化<sup>[21]</sup>.本文以天鹅湖沉积物为研究对象,研究不同条件下有机磷的酶水解特征.明确了不同样品处理方法对有机磷形态及其生物有效性影响,研究结果对水体富营养化的预防与治理及其保护近海环境具有重要意义.

## 1 材料与方法(Materials and methods)

### 1.1 样品采集与处理

样品供试沉积物样品为天鹅湖表层沉积物(1—10 cm),其基本理化性质见表1.在表1中,采用SMT法测定沉积物TP与OP,用元素分析仪(VarioMaxcns)测定TN,沉积物pH值采用酸度计法测定(测定时的土水比为1:2.5);沉积物Ca、Fe、Al、Zn采用ICPS-7500测定.样品A为天鹅湖的近海端,受潮汐影响较大,沉积物有机质含量低,有机磷含量也低.而样品B受陆源污染和大型藻类影响较大,有机质含量高,有机磷含量也较高.沉积物样品采集后用3种方法进行前处理:(1)自然风干并研磨过筛(2 mm);(2)未加任何处理的新鲜沉积物样品;(3)冷冻干燥并研磨过筛(2 mm)的样品采集与处理.

### 1.2 沉积物有机磷提取条件单因素实验

提取剂采用两种方法:(1)用 $0.25 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaOH +  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  EDTA单独一步提取;(2)采用

1 mol·L<sup>-1</sup> HCl 预提 2 h,再用 0.25 mol·L<sup>-1</sup> NaOH + 50 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA 主提取.提取时间设定为 8 h,固液比为 1:30;(2)为考察提取时间影响,采用 0.25 mol·L<sup>-1</sup> NaOH + 50 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA 一步提取方法,固液比为 1:30,提取时间设定为 2、4、8、16 h;(3)为考察提取比例对酶水解有机磷的影响:将沉积物与提取剂按照沉积物与提取剂的比例设置为 1:8、1:30 和 1:100,提取时间设定为 8 h,用 0.25 mol·L<sup>-1</sup> NaOH + 50 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA 一步提取.提取液经离心后过 0.45 μm 滤膜按照 1.3 节的方法测定提取液中磷酸单酯磷(Monoester-P)、磷酸二酯磷(Dieste-P)、植酸磷(Phytic-P).另外,取适量提取液稀释后用于 TP 和 IP 分析,TP 测定需要首先利用过硫酸钾高温消解,被提取的有机磷(EOP)为 TP 和 IP 的差值.

表 1 供试沉积物的理化性质

Table 1 General characteristics of surface sediments in Swan Lake

样品 Sample	有机质 Organic	pH	TP/ (mg·kg <sup>-1</sup> )	OP/ (mg·kg <sup>-1</sup> )	TN/ (g·kg <sup>-1</sup> )	Fe/ (mg·kg <sup>-1</sup> )	Al/ (mg·kg <sup>-1</sup> )	Ca/ (g·kg <sup>-1</sup> )	Zn/ (mg·kg <sup>-1</sup> )
A	5.2%	8.0	516.0	140.4	2.7	1981.8	706.1	8.9	103.2
B	10.3%	8.2	772.4	203.4	2.4	1125.7	292.7	17.7	98.5

### 1.3 沉积物酶水解有机磷的测定

选择来自 Sigma 公司的碱性磷酸酶(Alkaline Phosphatase, APase)(活性 28 U·mg<sup>-1</sup>)、磷酸二酯酶(Phosphodiesterase, PDEase)(活性 0.02 U·mg<sup>-1</sup>)以及植酸酶(Phytase)(活性 0.03 U·mg<sup>-1</sup>)等 3 种酶,并分别配置成活性为 1 U·mL<sup>-1</sup>的碱性磷酸酶、0.02 U·mL<sup>-1</sup>的磷酸二酯酶和 0.06 U·mL<sup>-1</sup>植酸酶.3 种酶溶液在合适的 pH 和温度条件下进行组合见表 2.

表 2 磷酸酶组合

Table 2 Combination of phosphatases

酶溶液 Enzyme solution	缓冲溶液 Buffer solution	pH	水解温度 Hydrolysis temperature/°C	可水解有机磷 Enzyme hydrolysis phosphorus
APase	Tris-HCl	9.0	37	磷酸单酯磷+聚合态磷
APase+PDEase	Tris-HCl	9.0	37	磷酸二酯磷+磷酸单酯磷+聚合态磷
APase+PDEase+Phytase	Tris-HCl	7.0	37	植酸磷+磷酸二酯磷+磷酸单酯磷+聚合态磷

取 5 mL 沉积物提取液于 25 mL 比色管中,添加 0.5 mL 相应的磷酸酶组合溶液(表 2).分别加入 0.05 mL MgCl<sub>2</sub>(0.002 mol·L<sup>-1</sup>)、0.05 mL 0.1 mol·L<sup>-1</sup>的 NaN<sub>3</sub><sup>[22]</sup>.将比色管中的混合液密封后置于恒温摇床中,在对应温度下(表 2)恒温水解 16 h,取出后冷却至室温,定容后磷钼蓝比色法测定正磷酸盐含量.根据酶水解前后的差值,得出不同的酶水解出正磷酸盐的含量即对应有机磷的含量.

### 1.4 数据处理与统计分析

试验数据处理与分析采用 SPSS 19.0 和 Excel 2007 软件进行.

## 2 结果与讨论(Results and discussion)

### 2.1 样品前处理方式对沉积物有机磷酶水解的影响

3 种样品前处理方法下(冷冻干燥、自然风干和鲜样)沉积物有机磷含量结果见表 3.由表 3 得出,不同预处理方法对湖泊沉积物总有机磷及其各形态结果的影响较大,冷冻处理方法所得含量最高,鲜样处理方法其次,而风干处理所得结果最低.尽管鲜样更能反映自然环境中有机磷的真实情况,但是实际操作中仍有难度.一方面,大量样品在运输和分析过程中难免有水分损失,很难保证其自然状态.另一方面,新鲜样品很难保证样品的均匀性和代表性,因此其分析结果的重现性也较差<sup>[23]</sup>.自然风干处理过程中存在团聚体破碎化,有机质氧化都有可能致有机磷的矿化加速,从而降低了有机磷含量<sup>[24]</sup>.本研究中风干处理后有机磷含量比冷冻处理和鲜样有机磷含量分别低 28%—29%和 9%—10%.我们研究结果跟周毅等<sup>[25]</sup>研究结果类似,他们采用添加有机磷标样探讨了干燥温度对沉积物有机磷含量的影响,结

果表明在较高的温度下干燥会低估有机磷的含量,建议冷冻干燥用于沉积物样品的处理,因此,从实际操作角度上讲,冷冻干燥保存更适合沉积物有机磷分析测试。

本研究中,各种预处理对沉积物有机磷形态影响差异明显。风干和冻干可提取有机磷含量分别高于新鲜样品可提取有机磷含量的 13%—26% 和 27%。这一方面是微生物细胞随着风干样的再湿润过程而溶解,磷的提取比例会增加<sup>[26]</sup>;另一方面有机化合物团聚体的破坏,大量胶体有机磷被释放,导致干燥样品有机磷的溶解度比鲜样高<sup>[26-27]</sup>。值得注意的是,样品干燥处理在增加磷提取率的同时也促使有机磷水解。如表 3 所示,风干处理 Monoester-P 含量比鲜样高 6%—8%,其 Diester-P 和 Phytic-P 含量均明显低于新鲜样品。这说明风干处理导致了部分 Diester-P 和 Phytic-P 发生矿化,生成了活性更高的 Monoester-P。白秀玲等<sup>[28]</sup>核磁测定有机磷的结果也表明,沉积物风干处理后 DNA 含量明显减少,并且风干处理沉积物磷酸单酯/磷酸二酯比例均显著增加,表明样品风干过程中磷酸二酯分解成为磷酸单酯。冷冻干燥处理得到 Monoester-P、Diester-P 和 Phytic-P 含量比较接近于新鲜样品,这跟沉积物有机磷含量结果相一致。综上所述,不同样品处理方式影响了酶水解有机磷含量,其中风干处理影响显著,引发了有机磷水解矿化,所以不适合沉积物中有机磷的分析测试。而冷冻干燥更真实地保存了沉积物有机磷形态特征,比较适合有机磷分析。

表 3 预处理方式对有机磷的影响

Table 3 Influence of pretreatment methods on organic phosphorus

样品 Sample	处理 Treatment	Monoester-P/ (mg·kg <sup>-1</sup> ) (% of EOP)	Diester-P/ (mg·kg <sup>-1</sup> ) (% of EOP)	Phytic-P/ (mg·kg <sup>-1</sup> ) (% of EOP)	EOP/ (mg·kg <sup>-1</sup> ) (% of OP)	OP/ (mg·kg <sup>-1</sup> )
A	风干	34.6±4.0(39) a	7.3±1.5(8) a	1.2±0.9(1) a	88.7±1.0(72) b	124.4±16.5a
	鲜样	32.1±4.4(46) a	26.9±0.2(38) b	3.7±0.4(5) b	70.1±4.8(58) a	119.9±6.3a
	冷冻	39.5±0.9(29) a	25.6±1.4(39) b	2.2±0.1(2) a	88.8±4.4(63) b	140.4±17.7a
B	风干	33.3±0.6(52) a	8.8±0.2(14) a	7.8±2.0(12) a	63.6±2.6(37) b	173.5±10.4a
	鲜样	31.3±2.5(55) a	15.1±0.2(27) b	8.8±1.2(16) a	56.4±0.34(33) a	171.6±11.8a
	冷冻	39.3±0.7(55) b	12.7±0.9(18) b	5.5±0.2(8) a	71.7±2.42(35) c	203.4±17.7b

注:数据为平均值±标准偏差,括号中数字为占可提取有机磷或总有机磷百分比。同一样品列中不同字母表示显著性水平  $P < 0.05$ ,  $n = 3$ 。下同。

Note: Average and standard deviation are shown in the table. The number in brackets is the percentage of EOP or OP. Different letters in the same column indicate the significance at  $P < 0.05$ ,  $n = 3$ . As same are herein.

## 2.2 预提取对沉积物有机磷酶水解的影响

不同提取方式下,沉积物有机磷的含量如表 4 所示,由表 4 可见,用 HCl 预提取使主提取沉积物可提取有机磷含量增加了 34.1—51.4 mg·kg<sup>-1</sup>。这说明 HCl 预提取显著提高了沉积物有机磷的回收率,可使更多有机磷被表征。原因一方面是 HCl 的预提作用可以去除大部分的无机磷使得有机磷的比例增加,从而增大了提取效率<sup>[12]</sup>;另一方面可能是 HCl 的预提取提取了沉积物中大量 Fe、Al、Ca 等金属离子<sup>[29]</sup>,从而降低了对有机磷吸附固定,有利于沉积物中有机磷的提取。

表 4 提取方式对有机磷的影响

Table 4 Influence of extraction methods on organic phosphorus

样品 Sample	提取方式 Extraction method	Monoester-P/ (mg·kg <sup>-1</sup> ) (% of EOP)	Diester-P/ (mg·kg <sup>-1</sup> ) (% of EOP)	Phytic-P/ (mg·kg <sup>-1</sup> ) (% of EOP)	EOP/ (mg·kg <sup>-1</sup> ) (% of OP)
A	HCl 预取/NaOH/EDTA 主提取	45.9±1.8(37) **	14.2±1.2(12) **	6.1±0.5(5) **	122.9±3.5(88) **
	NaOH/EDTA 提取	39.5±0.9(44)	25.6±1.4(29)	2.2±0.1(2)	88.8±4.4(63)
B	HCl 预取/NaOH/EDTA 主提取	57.9±0.1(47) **	3.3±0.6(3) **	11.6±1.0(9) **	123.1±5.1(61) **
	NaOH/EDTA 提取	39.3±0.7(55)	12.7±0.9(18)	5.5±0.2(8)	71.7±2.4(35)

不同提取方式对有机磷的形态影响差异明显,用 HCl 预提取使得测得 Monoester-P 含量增加了

16%—47% ,Phytic-P 含量增加了 110%—177% ,Diester-P 含量下降了 45%—74% .这可能是提取过程中在酸的作用下 Diester-P 发生了水解有关.不同有机磷对酸处理的响应不同.Bowman 研究表明,葡糖磷酸、植酸、对硝基苯磷酸在强酸条件下很稳定,不容易水解<sup>[30]</sup>.而 Anderson 结果显示 DNA 和 RNA 在强酸条件下很容易水解<sup>[13,31]</sup>.周毅的研究结果也表明, HCl 存在条件下,沉积物有机磷存在明显的水解过程,会改变沉积物有机磷的分布<sup>[25]</sup>.总之, HCl 预提取提高了沉积物 Monoester-P 和 Phytic-P 含量以及有机磷的回收率,但存在 Diester-P 水解的风险.因此沉积物有机磷提取推荐采用 NaOH/EDTA 提取一步提取方式进行.

### 2.3 提取时间对沉积物有机磷酶水解的影响

不同提取时间对沉积物有机磷结果影响如表 5,提取时间对可提取有机磷的影响差异明显,有机磷的提取率随着提取时间的延长而提高,从 2 h 到 16 h,可提取有机磷的含量增加了 50%—63%,为保证沉积物有机磷充分提取,沉积物磷提取时间最好延长至 8—16 h.提取时间对有机磷各形态的影响差异显著: Monoester-P 和 Diester-P 含量从 2 h 到 8 h 分别增加了 32%—57%和 25%—55%,从 8 h 到 16 h 后其含量却分别下降了 24%—29%和 30%—35%.这表明提取时间过长会导致 Monoester-P 和 Diester-P 水解<sup>[17]</sup>.Phytic-P 含量跟提取时间呈负相关,从 2 h 到 16 h,Phytic-P 含量降低了 67%—69%.这说明提取过程中 Phytic-P 稳定性差,容易发生发生水解.提取时间既要使有机磷充分释放,又要避免提取过程中有机磷水解.因此 8 h 是沉积物有机磷酶水解最佳提取时间.

表 5 提取时间对有机磷的影响

Table 5 Influence of extraction time on organic phosphorus

样品 Sample	提取时间 Extraction time/h	Monoester-P/ ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) (% of EOP)	Diester-P/ ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) (% of EOP)	Phytic-P/ ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) (% of EOP)	EOP/ ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) (% of OP)
A	2	29.9±0.3(45) ab	16.5±1.5(25) a	6.1±0.7(9) c	67.0±3.4(48) a
	4	32.7±2.5(43) b	20.4±0.1(27) b	4.7±0.4(6) b	76.1±0.4(54) b
	8	39.5±0.9(44) c	25.6±1.4(29) c	2.2±1.4(2) a	88.8±4.4(63) c
	16	27.9±2.5(28) a	17.9±0.1(18) a	2.0±0.8(2) a	100.6±5.2(72) d
B	2	25.1±0.2(45) a	10.1±0.7(18) b	16.0±0.9(29) c	55.7±2.7(27) a
	4	31.36±2.8(50) b	11.2±0.7(18) b	9.5±0.7(15) b	62.3±2.2(31) b
	8	39.3±0.7(55) c	12.7±0.9(18) c	5.5±0.2(8) b	71.7±2.4(35) c
	16	29.8±5.6(33) ab	8.3±0.4(9) a	4.9±0.5(5) a	91.0±2.7(45) d

### 2.4 提取剂比例对沉积物有机磷酶水解的影响

3 种沉积物与提取剂比例对提取沉积物有机磷含量的影响如表 6 所示,从表 6 中可得,不同提取比例下,有机磷形态及其含量差异明显.随着提取剂比例的提高,可提取有机磷含量不断增加.在 1:100 提取比例下,可提取有机磷含量分别是 1:30 和 1:10 的可提取有机磷含量的 1.5—2.4 倍和 2.5—4.2 倍,有机磷的回收率最高可达到 93%,表明大部分有机磷被表征; Monoester-P 的含量相较于 1:30 和 1:10 提取剂比例分别提高了 1.1—1.9 倍和 2.9—9.5 倍,Phytic-P 的含量相应的提高了 1—10 倍.而 Diester-P 的含量变化最为显著,从 1:30 到 1:100 Diester-P 含量发生了断崖式的下降,降低了 98%.Diester-P 随提取剂比例的变化,一方面可能说明 Diester-P 随着提取比例增加而发生了水解.另一方面也可能是随着提取剂比例增大,提取液中浓度迅速降低,检测的灵敏度也降低,被检测出来的可能性也降低<sup>[12]</sup>.总之,比例过低可能低估 Monoester-P、Phytic-P 的实际含量,提取比例过高存在低估 Diester-P 含量的风险.因此,提取剂比例为 1:30 更适合沉积物酶水解有机磷的分析.

### 2.5 天鹅湖沉积物酶水解有机磷含量

2015 年 12 月,分别在天鹅湖河口、湖心区和入海口采集表层沉积物样品.沉积物样品采用冷冻干燥处理,提取固液比为 1:30,采用  $0.25 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NaOH} + 50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ EDTA}$  提取,提取时间为 8 h,所得酶水解有机磷含量如表 7 所示.天鹅湖 OP 含量为 140.2—268.8  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,均值为 191.2  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,其中,有机磷含量大小顺序为:河口区>湖心区>入海口.EOP 的提取率为 46%—60%,Monoester-P、Diester-P、

Phytic-P 含量分别为 5.6—23.8  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、11.5—30.9  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、6.2—49.0  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 其均值分别为 14.8  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、21.1  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、25.4  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ . 入海口受潮汐影响较大, 沉积物有机质含量低, 有机磷含量也低. 河口区受陆源污染影响较大, 有机质含量高, 有机磷含量也高. 天鹅湖沉积物中生物可利用有机磷占 OP 的 25%—47% (平均占 OP 的 35%), 这说明沉积物是水体活性磷重要来源. 因此, 天鹅湖沉积物有机磷的循环供磷可能是水体活性磷重要补偿机制.

表 6 提取比例对有机磷的影响

Table 6 Effect of extraction ratio on organic phosphorus

样品 Sample	提取比例 Extraction ratio	Monoester-P/ ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) (% of EOP)	Dieste-P/ ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) (% of EOP)	Phytic-P/ ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) (% of EOP)	EOP/ ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) (% of OP)
A	1:10	21.1±2.3(41) a	26.0±0.6(51) b	0.1±0.4(0) a	50.8±1.8(36) a
	1:30	39.5±0.9(44) b	25.6±1.4(29) b	2.2±0.5(2) a	88.8±4.4(63) b
	1:100	83.1±2.9(64) c	0.6±0.4(0) a	24.8±2.2(19) b	130.3±0.7(93) c
B	1:10	11.1±0.5(27) a	16.1±0.8(40) c	1.8±0.4(4) a	40.6±2.0(20) a
	1:30	39.3±0.7(55) b	12.7±0.9(18) b	5.5±0.4(8) b	71.7±2.4(35) b
	1:100	116.7±4.2(68)	0.3±0.3(0) a	10.8±0.5(6) c	170.5±8.1(84) c

表 7 天鹅湖沉积物酶水解有机磷含量

Table 7 The concentration of organic phosphorus from enzymatic hydrolysis of surface sediments in Swan Lake

样点 Sample	Monoester-P/ ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) (% of EOP)	Dieste-P/ ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) (% of EOP) P	Phytic-P/ ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) (% of EOP)	EOP/ ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) (% of OP)	OP/ ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )
河口区	5.6±0.8(4)	11.5±6.4(9)	49.0±5.2(39)	124.6±3.6(46)	268.8±10.3
湖心区	23.8±4.9(30)	30.9±4.6(38)	22.4±5.8(28)	80.6±7.0(49)	164.5±6.5
入海口	14.9±4.4(18)	23.9±2.9(28)	6.2±1.5(7)	84.7±0.2(60)	140.2±10.6

### 3 结论(Conclusions)

本研究提供一种利用商品化磷酸酶研究沉积物有机磷的实验方法, 该方法可以表征有机磷生物有效性. 研究表明, 沉积物样品采用冷冻干燥处理, 提取固液比为 1:30, 采用  $0.25\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaOH +  $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  EDTA 一步提取 8 h 是沉积物酶水解技术的最佳实验条件.

#### 参考文献(References)

- [1] 李子成, 邓义祥, 郑丙辉. 中国湖库营养状态现状调查分析[J]. 环境科学与技术, 2012, 35(S1): 209-213.  
LI Z C, DENG Y X, ZHENG B H. Investigation of the eutrophication status of the lakes and reservoirs in China[J]. Environmental Science & Technology, 2012, 35(S1): 209-213 (in Chinese).
- [2] FRUMIN G T, GILDEEVA I M. Eutrophication of water bodies - A global environmental problem[J]. Russian Journal of General Chemistry, 2014, 84(13): 2483-2488.
- [3] 王海军, 王洪铸. 富营养化治理应放宽控氮、集中控磷[J]. 自然科学进展, 2009, 19(6): 599-604.  
WANG H J, WANG H Z. In the control of nitrogen and phosphorus in eutrophic treatment should be relaxed[J]. Progress in Natural Science, 2009, 9(6): 599-604 (in Chinese).
- [4] ZHANG R, WU F, LIU C, et al. Characteristics of organic phosphorus fractions in different trophic sediments of lakes from the middle and lower reaches of Yangtze River region and Southwestern Plateau China[J]. Environmental Pollution, 2008, 152(2): 366-372.
- [5] 刘超, 朱淮武, 王立英, 等. 滇池与红枫湖沉积物中磷的地球化学特征比较研究[J]. 环境科学学报, 2013, 33(4): 1073-1079.  
LIU C, ZHU H W, WANG L Y, et al. Comparative study on the geochemical characteristics of phosphorus in sediments from Lake Dianchi and Hongfeng[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2013, 33(4): 1073-1079 (in Chinese).
- [6] MONBET P, MCKELVIE I D, WORSFOLD P J. Dissolved organic phosphorus speciation in the waters of the Tamar estuary (SW England)[J]. Geochimica et Cosmochimica Acta, 2009, 73(4): 1027-1038.
- [7] 高光, 朱广伟, 秦伯强, 等. 太湖水体中碱性磷酸酶的活性及磷的矿化速率[J]. 中国科学(D辑: 地球科学), 2005(S2): 157-165.  
GAO G, ZHU G W, QIN B Q, et al. The activity of alkaline phosphatase and the mineralization rate of phosphorus in the water of Taihu lake[J]. Chinese Science (series D: Earth Sciences), 2005(S2): 157-165 (in Chinese).
- [8] 杨宏伟, 高光. 太湖流域不同类型区河流水体磷形态分布及矿化速率[J]. 土壤学报, 2010, 49(4): 758-763.

- YANG H W , GAO G. Distribution and mineralization rate of phosphorus in different polluted River in TaiHui Basin [J]. *Journal of Soil Science* , 2012 , 49( 4) : 758-763 ( in Chinese) .
- [ 9 ] 高丽, 侯金枝, 宋鹏鹏. 天鹅湖沉积物对磷的吸附动力学及等温吸附特征[J]. *土壤* , 2013 , 45( 1) : 67-72.  
GAO L , HOU J Z , SONG P P. Characteristics of adsorption kinetics and isotherms of phosphate on sediments in Swan Lake [J]. *Soils* , 2013 , 45( 1) : 67-72( in Chinese) .
- [ 10 ] 曹文卿, 刘素美. 东、黄海柱状沉积物中有机磷与无机磷的含量与分布研究[J]. *中国海洋大学学报( 自然科学版)* , 2010 , 40( 1) : 69-74.  
CAO W Q , LIU S M. A Study on inorganic and organic phosphorus in core sediment of the Yellow and East China Seas [J]. *Periodical of Ocean University of China* , 2010 , 40( 1) : 69-74 ( in Chinese) .
- [ 11 ] 卢瑛, 龚子同, 张甘霖. 南京城市土壤磷的形态和吸附-解吸特征[J]. *土壤通报* , 2013 , 34( 1) : 40-43.  
LU Y , GONG Z T , ZHANG G L. Phosphorus forms and adsorption-desorption characteristics of urban soils in Nanjing [J]. *Chinese Journal of Soil Science* , 2013 , 34( 1) : 40-43 ( in Chinese) .
- [ 12 ] 陆瑾, 王海文, 郝红. 等. 环境磷形态分析中的磷-31 核磁共振技术[J]. *土壤科学* , 2013 , 1( 3) : 15-20.  
LU J , WANG H W , HAO H , et al.  $^{31}\text{P}$  Nuclear magnetic resonance (  $^{31}\text{P}$ -NMR) in environmental phosphorus analysis [J]. *Hans Journal of Soil Science* , 2013 , 1( 3) : 15-20 ( in Chinese) .
- [ 13 ] TURNER B , CADEMENUN B , CONDRON L , et al. Extraction of soil organic phosphorus [J]. *Talanta* , 2005 , 66( 2) : 294-306.
- [ 14 ] CHROST R J , SIUDA W , ALBRECHT D , et al. A method for determining enzymatically hydrolysable phosphate ( EHP) in natural waters [J]. *Limnology & Oceanography* , 1986 , 31( 3) : 662-667.
- [ 15 ] 熊强. 滇池不同来源有机磷特征及其生物有效性[D]. 南昌: 南昌大学硕士学位论文, 2014.  
XIONG Q. Characteristics and bioavailability of organic phosphorus from different sources in Dianchi Lake [D]. Nanchang: Master Degree Thesis of Nanchang University , 2014 ( in Chinese) .
- [ 16 ] 李凌萍. 滇池有机磷特征及其对水污染的贡献[D]. 南昌: 南昌大学硕士学位论文, 2015.  
LI L P. Characteristics of organic phosphorus in Dianchi Lake and the contribution to water pollution [D]. Nanchang: Master's Degree Thesis of Nanchang University , 2015 ( in Chinese) .
- [ 17 ] ZHU Y , WU F , HE Z , et al. Characterization of organic phosphorus in lake sediments by sequential fractionation and enzymatic hydrolysis [J]. *Environmental Science & Technology* , 2013 , 47( 14) : 7679-7687.
- [ 18 ] HE Z Q , HONEYCUTT C W. Enzymatic characterization of organic phosphorus in animal manure [J]. *Journal of Environmental Quality* , 2001 , 30( 5) : 1685-1692.
- [ 19 ] TURNER B L , MCKELVIE D , HAYGARTH P M. Characterisation of water-extractable soil organic phosphorus by phosphatase hydrolysis [J]. *Soil Biology & Biochemistry* , 2002 , 34( 1) : 27-35.
- [ 20 ] HE Z Q , GRIFFIN T S , HONEYCUTT C W. Enzymatic hydrolysis of organic phosphorus in swine manure and soil [J]. *Journal of Environmental Quality* , 2004 , 33( 1) : 367-372.
- [ 21 ] 邵雪琳, 魏权, 高丽, 等. 天鹅湖泻湖表层沉积物中各形态磷的空间分布特征[J]. *土壤通报* , 2015 , 16( 1) : 127-132  
SHAO X L , WEI Q , GAO L , et al. Spatial distribution of different forms of phosphorus in surface sediments from Swan Lake Lagoon [J]. *Chinese Journal of Soil Science* , 2015 , 46( 1) : 127-132 ( in Chinese) .
- [ 22 ] FEUILLADE M , DORIOZ J M. Enzymatic release of phosphate in sediments of various origins [J]. *Water Research* , 1992 , 26( 9) : 1195-1201.
- [ 23 ] 王圣瑞, 金相灿, 梁海清. 不同预处理方法对湖泊沉积物有机磷分级的影响[J]. *中国农学通报* , 2007 , 23( 4) : 355-359.  
WANG S R , JIN X C , LIANG H Q. Effect of different pretreatments on organic phosphorus fractions in lake sediment [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin* , 2007 , 23( 4) : 355-359 ( in Chinese) .
- [ 24 ] 姜一, 步凡, 张超, 等. 土壤有机磷矿化研究进展[J]. *南京林业大学学报( 自然科学版)* , 2014 , 38( 3) : 160-166.  
JIANG Y , BU F , ZHANG C , et al. Research advances on soil organic phosphorus mineralization [J]. *Journal of Nanjing Forestry University ( Natural Sciences Edition)* , 2014 , 38( 3) : 160-166 ( in Chinese) .
- [ 25 ] 周毅, 张福绥, 杨红生, 等. 干燥方式对沉积物样品有机磷分析的影响[J]. *海洋环境科学* , 2002 , 21( 1) : 60-62.  
ZHOU Y , ZHANG F S , YANG H S , et al. Effects of different drying way on analysis of organic phosphorus in marine sediments [J]. *Marine Environmental Science* , 2002 , 21( 1) : 60-62( in Chinese) .
- [ 26 ] 任文畅, 王沛芳, 钱进, 等. 干湿交替对土壤磷素迁移转化影响的研究综述[J]. *长江科学院院报* , 2015 , 32( 5) : 41-47.  
REN W C , WANG P F , QIAN J , et al. Review of the effect of drying-rewetting alternation on the transportation and transformation of soil phosphorus [J]. *Journal of Yangtze River Scientific Research Institute* , 2015 , 32( 5) : 41-47 ( in Chinese) .
- [ 27 ] STYLES D , COXON C. Laboratory drying of organic-matter rich soils: Phosphorus solubility effects , influence of soil characteristics , and consequences for environmental interpretation [J]. *Geoderma* , 2006 , 136( 1-2) : 120-135.
- [ 28 ] 白秀玲, 周云凯, 李斌, 等. 基于液相 $^{31}\text{P}$ 核磁共振分析的沉积物样品制备方法研究[J]. *环境科学* , 2011 , 32( 7) : 1980-1985.  
BAI X L , ZHOU Y K , LI B , et al. Refining sample preparation procedures for solution  $^{31}\text{P}$ -NMR analysis of organic P in sediment [J]. *Environmental Science* , 2011 , 32( 7) : 1980-1985( in Chinese) .
- [ 29 ] BRIGENO M , ESCUDEY M , GALINDO G , et al. Comparison of extraction procedures used in determination of phosphorus species by  $^{31}\text{P}$ -NMR in Chilean volcanic soils [J]. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* , 2006 , 37( 11-12) : 1553-1569.
- [ 30 ] BOWMAN R A. A sequential extraction procedure with concentrated sulfuric acid and dilute base for soil organic phosphorus [J]. *Soil Science Society of America Journal* , 1989 , 53( 2) : 362-366.
- [ 31 ] ANDERSON G. Factors affecting the estimation of phosphate esters in soil [J]. *Journal of the Science of Food & Agriculture* , 1960 , 11( 11) : 497-503.