

鱼类饲养对地下水中溶解态磷酸酶的影响

曹秀云 宋春雷 彭 亮 李建秋 周易勇
(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

摘要: 比较了鱼类养殖前后, 地下水中正磷酸盐(σ P) 浓度、碱性磷酸酶活性 (APA) 在不同大小颗粒之间的分布、溶解态 APA 对 pH、温度、 CuSO_4 、 ZnSO_4 、 $\text{EDTA} \cdot 2\text{Na}$ 与表面活性剂 (CTAB 与 Triton X-100) 的应答方式及其动力学特征。养鱼之后, 玻璃缸水中碱性磷酸酶表现出明显较高的活性, 且以溶解态为主要存在形式, 这种效应与鱼类的品种有关, 溶解态 APA 的最大反应速度 (V_{max}) 与米氏常数 (K_m) 均明显提高, 最适温度与 pH 值以及对于 Zn^{2+} 的应答方式亦发生明显改变, 颗粒结合态 APA 甚微或不可监测, 藻类极少, 故非溶解态 APA 的主要贡献者。因此, 鱼类饲养与溶解态 APA 之间具有密切联系。养鱼缸底颗粒的蒸馏水提取液与同缸水中的溶解态 APA 对 pH 值的应答方式十分接近, 这一结果暗示养殖产生的固体废物是溶解态 APA 的来源之一。

关键词: 地下水; 鱼类饲养; 溶解态磷酸酶
中图分类号: X17 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2004)03-0310-07

海洋、湖泊、池塘、江河与溪流等地表水中的胞外磷酸酶在水体磷循环过程中具有关键作用^[1-5], 而关于地下水中磷酸酶的研究甚少。水体与沉积物间隙水中的溶解态碱性磷酸酶可能表现较高的活性^[6-9], 且与磷水平以及污染状况密切相关^[9], 其来源为浮游动物与浮游植物的主动释放^[10-12]。实验证明, 接受虹鳟养殖场污水的英国河流中溶解态磷酸酶活性陡增^[13-14]。由此引出下述问题: 鱼类是否会成为溶解态磷酸酶的另一来源, 或重要的影响因素? 针对这一问题, 本文比较了鱼类养殖前后, 地下水中正磷酸盐(σ P) 浓度、碱性磷酸酶活性 (APA) 在不同大小颗粒之间的分布、溶解态 APA 对 pH、温度、 CuSO_4 、 ZnSO_4 、 $\text{EDTA} \cdot 2\text{Na}$ 与表面活性剂 (CTAB 与 Triton X-100) 的应答方式及其动力学特征, 有关结果亦可为地下水中的胞外酶这一极少涉及的研究领域提供若干先期性的基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料 养殖所用的地下水均取自武汉新世界水族公园内(井深约 10m), 饲养过程中不断循环过滤, 实验鱼种类、数量、生存环境及其相应体积详见

表 1(水体中均无高等水生植物)。玻璃缸行 12h/d 光照并充氧处理, 水泥池为露天环境。

表 1 实验鱼种类、数量、生存环境及其相应体积
Tab. 1 Species, number, surrounding and its Volume of experimental fishes

种 类	数 量	生存环境	体 积
Species	Number	Surrounding	(m ³)
血鸚鵡	5	玻璃缸	0.235
曼龙	9	玻璃缸	0.235
红尾鼠	15	玻璃缸	0.235
火龙	8	玻璃缸	0.235
七彩神仙	20	玻璃缸	0.650
黄鳍鲳	5	玻璃缸	0.235
魔鬼刀	6	玻璃缸	0.235
中华鲟	4	水泥池	75
锦鲤	86	水泥池	300
青草鲢鳙	20	水泥池	75

1.2 样品采集与制备 2001 年 11 月、12 月、2003 年 5 月分 5 次直接或用虹吸法采集原始地下水以及饲养火龙 (*Mastcembetus erythrotaenia*)、七彩神仙

收稿日期: 2003-07-07; 修订日期: 2003-10-24
基金项目: 中国科学院知识创新工程重大项目 (KZCX1-SW-12-11-02-02); 国家重点基础研究发展计划; 国家自然科学基金 (20177033、39670149、39170165); 中国科学院知识创新工程重要方向性项目 (KSCXZ-SW-102) 资助
作者简介: 曹秀云, (1972—), 女, 湖北黄梅人; 研究生; 研究方向: 水环境酶学。采样与部分实验工作得到张敏与陈芳同学的帮助, 谨此致谢
通讯作者: 周易勇

(*Aymphysodon aquifasciata*)、黄鳍鲳(*Monodactylus argenteus*)、魔鬼刀(*Apteronotus aslfrons*)、中华鲟(*Acipenser sinensis Grtey*)、锦鲤(*Cyprinus Carpio Linnaeus*)、曼龙(*Trichogaster trichopteru*)、血鹦鹉(*Cichasoma synspolum*)、红尾鼠(*Botia licontei*)以及青草鲢鳙(*Myliopharyngodon piceus* Richardson, *Ctenopharyngodon idellus* Cuvier et Valenciennes, *Hypophthalmichthys molitrix*, *Aristichthys nobilis*)的上层水和富含颗粒底层水,分别用孔径为 3.0 μ m 和 0.45 μ m 的滤膜(Millipore)过滤水样,取通过 0.45 μ m 滤膜的滤液测定正磷酸盐(σ P)浓度和溶解态 APA。以 GF/C(Waterman)滤膜过滤富含颗粒的底层水,以灭菌双蒸馏水为介质,碾磨截流颗粒的滤膜,再以孔径 0.45 μ m 的滤膜提取液,并取滤液测溶解态 APA。另取 1000mL 上层水样,用鲁铬氏液固定,沉淀,浓缩,镜检计算其中的藻类细胞数。

1.3 APA 的测定 以对硝基苯磷酸二钠盐(pNPP, AG)为底物(最终浓度为 0.3mmol/L),循分光光度法测定碱性磷酸酶的活性(APA)^[15],按下述公式 $A = U - F(3.0)$ and $B = F(3.0) - F(0.45)$ 计算藻类(> 3.0 μ m)、细菌(3.0– 0.45 μ m)、溶解态 APA (< 0.45 μ m):其中 A 为大颗粒(藻类)表现的 APA, B 为细菌大小的颗粒表现的 APA, U 为未过滤水表现的总体 APA, F(3.0)为通过 3.0 μ m 孔径的滤液表现的 APA, F(0.45)为通过 0.45 μ m 孔径的滤液表现的 APA。

另在不同的温度和 pH 条件下分别测定溶解态 APA, pH 值分别用 HAc-NaAc(0.2mol/L)和 Tris-HCl(0.2 mol/L)调节。溶解态 APA 应答不同胁迫因素的反应条件相同(pH 8.5、37℃),胁迫因素的种类及其浓度分别为: CuSO₄ (0.1, 0.2mmol/L)、ZnSO₄ (0.25, 0.5mmol/L)、EDTA- 2Na(1, 2 mmol/L)、Triton X-100 (12, 24, 36 μ mol/L)和 cetyltrimethylammonium bromide(CTAB: 12, 24, 36 μ mol/L)。

在 0.01—1.2mmol/L 的范围内取 6 种不同浓度的底物在 37℃、pH8.5 的条件下测定溶解态 APA, 据 Michaelis-Menten 方程 $V = V_{max} * S / (S + K_m)$ 的 Lineweaver-Burk 转换式测算溶解态 APA 的最大反应速度(V_{max})和米氏常数(K_m)。

1.4 磷的测定 用 Murphy 和 Riley 建立的方法测定正磷酸盐(σ P)的浓度^[16]。

所有测试均重复 3 次,并用 t 检验法分析不同处理间的差异。

2 结果与讨论

2.1 鱼类饲养对地下水中溶解态碱性磷酸酶活性的影响

养鱼前后的地下水中,溶解态 APA 均受不同浓度的 Cu²⁺、CTAB 以及高浓度的 EDTA- 2Na(2mmol/L)的抑制(图 1、图 2)。且被不同浓度的 Triton X-100 激活(图 2)。铜(CuCl₂)对土壤酸性磷酸酶具有强烈的抑制作用^[17],土壤中以微生物生物量为基准的 APA 与不同形态的铜之间呈现显著的负相关关系^[18]。CTAB 与 Triton 均能明显改变土豆酸性磷酸酶的活性,其原因在于酶的三维结构的细微变化,紫外光谱的分析结果证明了这种异动,CTAB 存在时,内荧光强度亦增,表面活性剂所提供的疏水环境可能导致酶分子的有序构象的产生^[19]。EDTA 抑制 APA 的动力学机制十分复杂,前者能与底物竞争酶的活性位点,发生于初始阶段的 EDTA 与酶的络合较为迅速,而后续步骤较缓,且涉及酶构象的改变^[20]。总之,对于典型胁迫因素的有效反应进一步证实地下水中溶解态 APA 的存在。饲养曼龙、红尾鼠之后,碱性磷酸酶表现出明显较高的活性(图 3),且以溶解态为主要存在形式(图 4)。此外,溶解态 APA 可能在原始及饲养火龙、七彩神仙、黄鳍鲳、魔鬼刀、中华鲟、锦鲤的地下水中低于可被监测的水平,但在饲养血鹦鹉、红尾鼠、四大家鱼的相同水中犹存,且于饲养曼龙的水中凸显(表 2)。因此,鱼类的有无乃至其品种的差异将直接影响水体 APA。

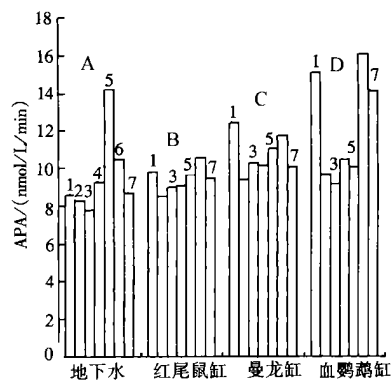


图 1 不同水样中溶解态 APA 对若干抑制剂的应答
Fig. 1 The responses of dissolved APA in different water samples to several inhibitors
1. Control 2. Cu²⁺ (0.1mmol/L) 3. Cu²⁺ (0.2mmol/L)
4. Zn²⁺ (0.25mmol/L) 5. Zn²⁺ (0.5mmol/L) 6. EDTA- 2Na (1mmol/L) 7. EDTA- 2Na(2mmol/L)

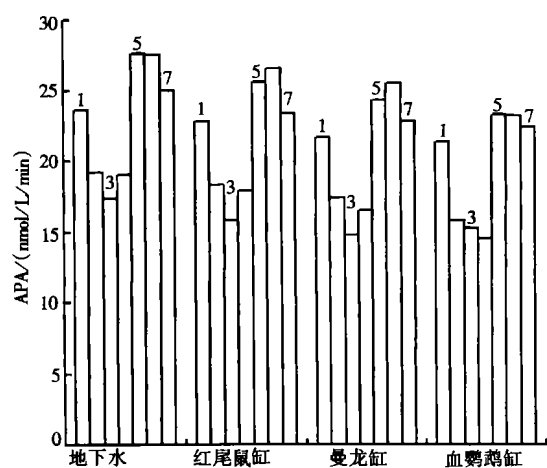


图2 不同水样中溶解态APA对表面活性剂的应答

Fig.2 The responses of dissolved APA in different water samples to two surfactants
1. Control 2. CTAB(12 μ mol/L) 3. CTAB(24 μ mol/L)
4. CTAB(36 μ mol/L) 5. Triton X-100(12 μ mol/L)
6. Triton X-100(24 μ mol/L) 7. Triton X-100(36 μ mol/L)

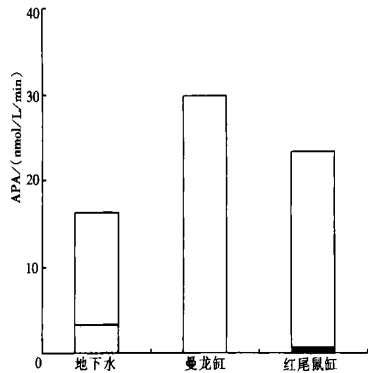


图3 不同水样中碱性磷酸酶活性的大小分级

Fig.3 Size-fractionation of APA in different water samples

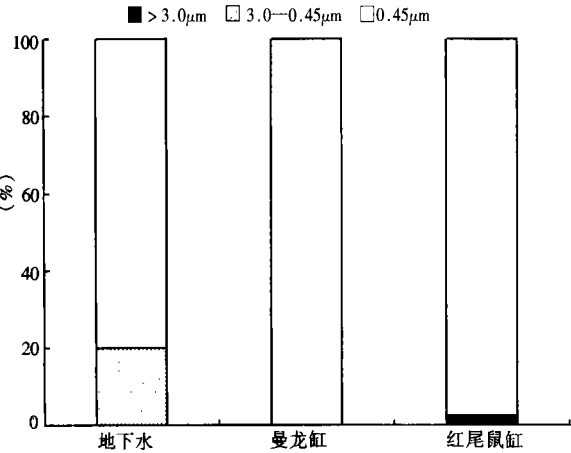


图4 不同水样中碱性磷酸酶活性的组成

Fig.4 Compositions of APA in different water samples
■ > 3.0 μ m □ 3.0—0.45 μ m ▨ 0.45 μ m

Jana 等发现在玻璃缸实验系统中, APA 将随引入的鲤科类鱼苗(*Cyprinus carpio*) 数量的增加而以 logistic 方式升高^[21]。

表2 不同水样中σP浓度与溶解态APA

Tab.2 The σP concentrations and dissolved APA in different water samples

样点	σP	APA
Sample	mg/L	(nmol/ L/min)
地下水	0.146	-
血鹦鹉	0.941	6.03
曼龙	0.93	17.66
红尾鼠	0.85	2.95
火龙	0.58	-
七彩神仙	0.941	-
黄鳍鲳	1.712	-
魔鬼刀	1.775	-
中华鲟	0.444	-
锦鲤	0.084	-
青草鲢	0.456	1.39

注:“-”表示监测不出(undetactable)。

本文图表的结果不仅从鱼类的多样性与数据的重现性方面进一步强化了鱼类与水体 APA 之间的紧密联系,而且指明了酶可能具有的主要存在形态即溶解态。美国 Apopka 湖 APA 多与较大的颗粒相联系,仅少数(约 10%)呈溶解态,因此,底物需极度靠近固相酶时,水解方能发生^[22]。从这个意义上讲,养鱼引发的 APA 因多呈溶解态故易接近底物,从而加速有机磷的水解。

2.2 鱼类饲养对地下水溶解态碱性磷酸酶特征的影响

原始地下水溶解态 APA 的最适温度为 35℃,饲养曼龙、红尾鼠之后,其活性在 35℃与 55℃的条件下均表现峰值,且后者更高(图 5)。

原始地下水溶解态 APA 的最适 pH 为 7.0,饲养曼龙、红尾鼠之后,其活性在 pH5.8 与 pH8.9 的条件下均出现峰值(图 6)。

原始地下水中溶解态 APA 被较高浓度(0.5mmol/L)的 Zn²⁺ 显著激活,而饲养曼龙、红尾鼠的水体溶解态磷酸酶却被不同浓度 Zn²⁺ 明显抑制(图 1)。锌(ZnCl₂)能完全抑制猪肠黏膜碱性磷酸酶的活性,而这种抑制效应可被从植物中纯化的多酚物质部分地解除^[23]。同一碱性磷酸酶(PIMAP) 在 Glycine 甘氨酸缓冲液中被锌抑制,在 Tris-HCl 缓冲

液中却被锌激活, 这种显著的差异反映出酶构象的变化^[24]。

原始以及饲养曼龙、红尾鼠的地下水中的溶解态酶遵从经典的 Michaelis-Menten 动力学模式, 饲养鱼类之后, 其特征常数 ($V_{\max}$ 与 K_m 值) 均显著增加 ($P < 0.05$) (图 7)。东湖罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 养殖网箱下层 (2.5—5 cm) 沉积物中 APA 的 $V_{\max}$ 与 K_m 值均明显高于对照值^[25]。János Oláh 等发现, 匈牙利鱼塘水体 APA 与酶的 K_m 值往往同步增长。此外, K_m 值明显高于文献给出的天然湖水中的相应值, 这意味着在因养鱼引起的有机磷浓度较高的水体中, 碱性磷酸酶对底物的亲和能力相对较弱^[26]。图 7 表示的源于同一水体的实验结果进一步说明, 溶解态 APA 的动力学特征与鱼类的饲养确有密切的联系。

总之, 饲养鱼类之后, 溶解态碱性磷酸酶的最适 pH、最适温度、对抑制剂的应答方式以及动力学常数等方面均发生明显改变, 这些结果进一步证实鱼类对溶解态酶的重要贡献。

2.3 鱼类饲养影响溶解态 APA 的可能原因

养鱼废水污染的英国河中, 胞外酶的活性显著增加, 其中葡萄糖苷酶活性多与细菌和藻类相联系^[13]。图 3 表明, 井水与大颗粒相联系的酶活性甚微或不可监测, 而藻类数量极低, 地下水中几乎未见, 饲养曼龙与红尾鼠的体内相应定性定量结果分别为: 隐藻 30 个/L 和针杆藻 60 个/L, 因此, 藻类显然不是溶解态酶的主要生产者。此外, 介于 3.0—0.45 μm 之间的颗粒上 APA 亦低, 故自由生活的细菌对溶解态 APA 似无重要贡献。上述逐个分析的结果进一步突出了鱼类养殖与溶解态 APA 之间的紧密联系。

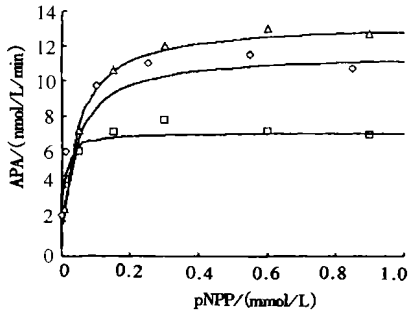


图 7 不同水样中溶解态 APA 的动力学模式

Fig. 7 Kinetic model of dissolved APA in different water samples
1. 曼龙缸 2. 红尾鼠缸 3. 地下水

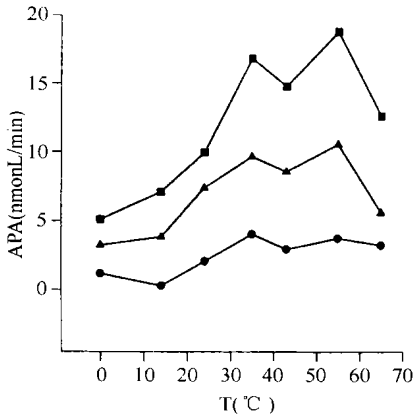


图 5 不同水样中溶解态 APA 对温度的应答
Fig. 5 The responses of dissolved APA in different water samples to different temperatures

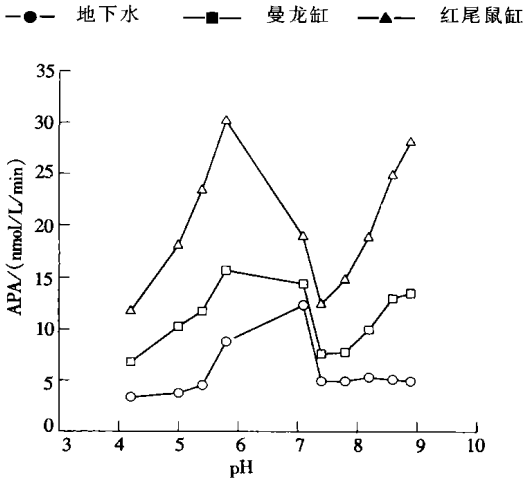
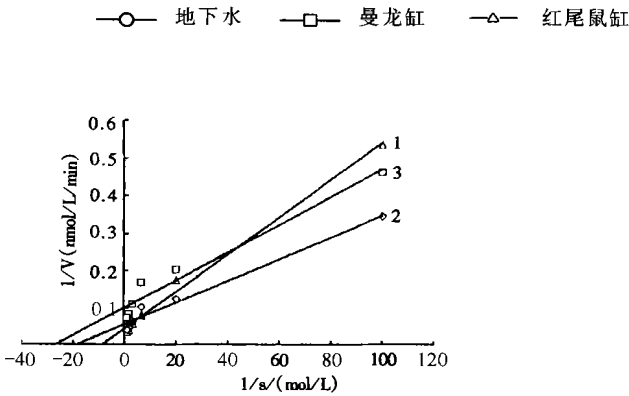


图 6 不同水样中溶解态 APA 对 pH 的应答
Fig. 6 The responses of dissolved APA in different water samples to different pH values



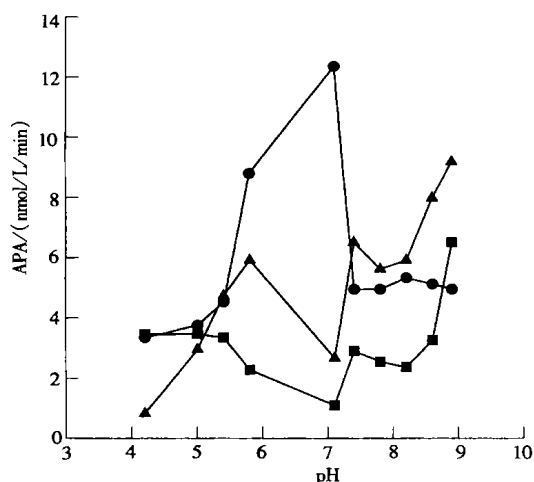


图8 不同鱼缸底层大颗粒蒸馏水提取液中溶解态 APA 对 pH 的应答

Fig. 8 The responses of dissolved APA in extracts from particles in the bottom of jars by distilled water to different pH values

—●— 地下水 —■— 曼龙缸 —▲— 红尾鼠缸

必须指出, 曼龙与红尾鼠鱼缸底层大颗粒的蒸馏水提取液与同缸井水中的溶解态 APA 对 pH 值的应答方式十分接近(图 8)。即在酸性和碱性条件下均显示较高水平。Barik 等认为, 养鱼废水引起的高溶解态 APA 可能源于营养富足的沉积物^[27], 上述结果从酶对 pH 的适应性的角度为此说提供了具体的实证。值得注意的是, 在正磷酸盐浓度最低的锦鲤池中, 溶解态 APA 未表现, 这一事实说明, 溶解态酶与 $\sigma\text{-P}$ 的关系不能用经典的“诱导抑制机制(Induction/Depression Mechanism)”来加以描述。具体地说, 溶解态 APA 可能不受高浓度 $\sigma\text{-P}$ 的抑制(参见饲养曼龙红尾鼠血鹦鹉等诸缸)。Scholz 等利用荧光底物(甲基伞形酮)在德国的溪流沉积物中监测出分别在酸性和碱性条件下显示较高活性的磷酸酶同工酶^[28]。酶的动力学行为与沉积物中有机质、总磷和溶解反应磷的浓度无关, 酶的多重性说明酶的合成受控于某种调节机制, 其目的是为竞争不同的底物。这一例证说明, 沉积物可能成为水柱中适应不同 pH 值且对反应产物不甚敏感的溶解态酶的来源^[28]。综上所述, 酶的动力学特征、大小分级、以及最适 pH 值、温度以及对于胁迫因素的应答方式等多方面的数据充分说明, 鱼类养殖确能提高水体 APA, 沉积的固体废物可能是其重要来源之一, 酶以溶解态为主, 且适应不同的 pH 值以及不受产物调节等诸多特征使之具有更加广泛的作用范围, 因而更具生态学意义。

参考文献:

- [1] Jamet D, Boge G. Characterisation of marine zooplankton alkaline phosphatase activity in relation to water quality[J]. *Hydrobiologia*, 1998, **373-374**: 311—316
- [2] Wynne D. The role of phosphatase in the metabolism of *peridinium cinctum*. from Lake Kinneret[J]. *Hydrobiologia*, 1981, **83**: 93—99
- [3] Song C L, Cao X Y, Liu B Q, *et al.* A relationship between algae blooms and benthic phosphorus status in ponds[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, **28**(1): 7—12. [宋春雷, 曹秀云, 刘兵钦, 等. 池塘水华与底层磷营养状态的关系. 水生生物学报, 2004, **28**(1): 7—12]
- [4] Sinsabaugh, Foreman. Activity profiles of bacterioplankton in a eutrophic river[J]. *Freshwater Biology*, 2001, **46**(9): 1239—1249
- [5] Baneras L, Rodriguez Gonzalez J, Garcia Gil L J. Contribution of photosynthetic sulfur bacteria to the alkaline phosphatase activity in anoxic aquatic ecosystems[J]. *Aquatic Microbial Ecology*, 1999, **18**(1): 15—22
- [6] Zhou Y Y, Dodds W K. Kinetics of size fractionated and dissolved alkaline phosphatase in a farm pond[J]. *Archiv fur Hydrobiologie. Stuttgart*, 1995, **134**(1): 93—102
- [7] Zhou Y Y, Li J Q, Fu Y Q. Effects of submerged macrophytes on kinetics of alkaline phosphatase in Lake Donghu. I. Unfiltered water and sediments[J]. *Water Research*, 2000, **34**(15): 3737—3742
- [8] Zhou Y Y, Li J Q, Zhang M. Relationship between the kinetics of alkaline phosphatase and aquatic plants in wetlands[J]. *Journal of Lake Sciences*, 2002, **14**(2): 138—143. [周易勇, 李建秋, 张敏. 湿地中碱性磷酸酶的动力学特征与水生植物的关系. 湖泊科学, 2002, **14**(2): 138—143]
- [9] Zhou Yiyong, Li Jianqiu, Song Chunlei, *et al.* Seasonality in activity and heterogeneity in composition of free alkaline phosphatase in interstitial water of lake Donghu[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2003, **27**(1): 100—102. [周易勇, 李建秋, 宋春雷, 等. 东湖间隙水自由碱性磷酸酶活性的季节性与组成的非均一性. 水生生物学报, 2003, **27**(1): 100—102]
- [10] Currie D J, Bertzen E, Kalf J. Does algal bacterial phosphorus partitioning vary among lakes? A comparative study of orthophosphate uptake and alkaline phosphatase activity in freshwater[J]. *Can. J. Fish Aquat Sci*, 1986, **43**: 311—318
- [11] Jansson M. Phosphatases in Lake water: Characterization of Enzymes from phytoplankton and Zooplankton by Gel Filtration[J]. *Science*, 1976, **194**: 320—321
- [12] Healey F P, Hendzel L L. Fluorometric measurement of alkaline phosphatase activity in algae[J]. *Freshwater Biol.* 1979, **9**: 429—439
- [13] Brown S E, Goulder R. Extracellular enzyme activity in trout-farm effluents and a recipient river[J]. *Aquaculture Research*, 1996, **27**(12): 895—901
- [14] Carr O J, Goulder R. Fish-farm effluents in rivers I. Effects on bacterial populations and alkaline phosphatase activity[J]. *Water Research* 1990, **24**(5): 631—638
- [15] Mauraa G, Eville G. Alkaline phosphatase activity and cellular phosphorus as an index of the phosphorus status of phytoplankton in Mir

- nesota lakes [J]. *Freshwater Biology*, 1985, **15**: 227—233
- [16] Murphy J, Riley P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. [J]. *Anal Chim Acta*, 1962, **27**: 31—36
- [17] Huang Q Y, Haruo Shindo. Comparison of the Influence of Cu, Zn, and Cd on the Activity and Kinetics of Free and Immobilized Acid Phosphatase [J]. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 2001, **47**(4): 767—772
- [18] Kunito T, Saeki K, Goto S, *et al.* Copper and zinc fractions affecting microorganisms in long term sludge amended soils [J]. *Bioresour. Technol.*, 2001, **79**(2): 135—146
- [19] Lalitha J, Mulinani V H. Stability and activity of potato acid phosphatase in aqueous surfactant media [J]. *Biochemistry and molecular biology international*, 1997, **41**(4): 797—803
- [20] Yang D, Wang J Y, Peng X J, *et al.* Kinetics of inactivation of *Ulva pertusa* Kjellm alkaline phosphatase by ethylenediaminetetraacetic acid disodium [J]. *Journal of Enzyme Inhibition*, 2001, **16**(4): 331—339
- [21] Janna B B, Das S K. Bioturbation induced changes of fertilizer value of phosphate rock in relation to alkaline phosphatase activity [J]. *Aquaculture*, 1992, **103**(3-4): 321—330
- [22] Newman S. Sediment resuspension effects on alkaline phosphatase activity [J]. *Hydrobiologia*, 1992, **245**: 75—86
- [23] Laura S, Paul I B. Effect of polyphenolic compounds on alkaline phosphatase activity: Its implication for phosphorus regeneration in Australian freshwaters [J]. *Arch. Hydrobiol.*, 1991, **123**(1): 1—19
- [24] Buainain L B, Kaowaki M K, Maria de Lourdes Polizeli: *et al.* Characterization of a conidial alkaline phosphatase from the thermophilic fungus *Hemicella grisea* var. *thermoidea* [J]. *Basic Microbiol.*, 1998, **38**(2): 85—94
- [25] Zhou Y Y, Li J Q, Fu Y Q, *et al.* Kinetics of alkaline phosphatase in lake sediment associated with cage culture of *Oreochromis niloticus* [J]. *Aquaculture*, 2001, **203**: 23—32
- [26] János Oláh, Erzsébet O. Tóth. The function of alkaline phosphatase enzyme in the phosphorus cycle of fertilized fishponds [J]. *Aquacultura Hungarica (Szarvas)*, 1978, **1**: 15—23
- [27] Barik S K, Purushothaman C S, Mohanty A N. Phosphatase activity with reference to bacteria and phosphorus in tropical freshwater aquaculture pond systems [J]. *Aquaculture Research*, 2001, **32**(10): 819—832
- [28] Scholz O, Marxsen J. Sediment phosphatases of the Breitenbach (Germany), a first order central European stream [J]. *Arch. Hydrobiol.*, 1996, **135**(4): 433—450

EFFECTS OF FISH CULTURE ON DISSOLVED PHOSPHATASE IN GROUNDWATER

CAO Xir-Yun, SONG Chun-Lei, PENG Liang, LI Jian-Qiu and ZHOU Yi-Yong

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

Abstract: Extracellular phosphatase plays a crucial role in P cycling in aquatic ecosystem. Little attention has been paid on the occurrence of extracellular phosphatase in groundwater. Furthermore, effects of aquaculture on extracellular phosphatase, especially dissolved alkaline phosphatase, were inadequately studied. The objective of this study was to investigate the influences of fish culture on dissolved alkaline phosphatase, including its origin, activity and kinetics, in freshwater. Water was taken from a well, as a control, and 10 different pools rearing a variety of fishes with the same well water in November and December 2001, as well as May 2003, for 5 times. Variables involved in cycling, such as orthophosphate (σ P) concentrations, size fractionation of alkaline phosphatase, responses of dissolved alkaline phosphatase activity (DAPA) to pH, temperature, CuSO_4 , ZnSO_4 , EDTA-2Na, as well as surfactants (CTAB and Triton X-100) and its kinetics, were determined. DAPA in groundwater, with and without fish rearing was inhibited by Cu^{2+} , CTAB with different concentrations and EDTA-2Na at higher concentration (2 mmol/L). At the same time, it was enhanced by Triton X-100 with different concentrations. The sensitive responses to the specific inhibitors provided further evidences that alkaline phosphatase occurred in groundwater. In the water of glass jars with fish culturing, DAPA increased significantly, and the extent of increase was depended on fish species cultured. In details, groundwater with *Trichogaster trichopterus* and *Botia licentei* rearing showed significantly higher DAPA than controls. Besides, DAPA was undetectable in the groundwater with *Mastomys erythrotaenia*, *Ampelisca aculeata*, *Monodactylus argenteus*, *Apterionotus asifrons*, *Acipenser sinensis* Grtze, *Cyprinus carpio Linnaeus* rearing, but detectable in the water with *Gambusia holbrooki*, *Botia licentei*, *Myliopharyngodon piceus* Richardson, *Ctenopharyngodon idella* Cuvier et Valenciennes, *Hypophthalmichthys molitrix*, *Aristichthys nobilis* rearing and reshowed the highest value with *Trichogaster trichopterus* rearing, DAPA was characterized in control and that rearing *Trichogaster trichopterus* and *Botia licentei* (culture medium). It showed the highest level at 35 °C in control, while it peaked at both 35 °C and 55 °C in the culture medium. Its optimum pH was pH 7.0 in control, but was pH 5.8 and pH 8.9 in the culture medium. Moreover, it was enhanced by Zn^{2+} at higher concentration (0.5 mmol/L) in control, but was inhibited significantly by Zn^{2+} at different concentrations in culture medium. Kinetics of dissolved alkaline phosphatase conformed to the Michaelis-Menten model. The significantly higher $V_{\max}$ and K_m values were recorded in the culture medium compared to those in control. In short, DAPA in culture medium exhibited distinct models responding to temperature, pH, ZnSO_4 as well as higher $V_{\max}$ and K_m values. In addition, alkaline phosphatase activity associated with particles ($> 3.0 \mu\text{m}$) was very low, or undetectable, coupled with scarcely observed algae cells, indicating that phytoplankton is unlikely to be the main producer of DAPA. Hence the occurrence of DAPA was causatively linked to fish culture. Extracts from particles collected in the bottom of jars with fish culture, by distilled water, exhibited DAPA. It showed a similar manner responding to pH values with that of water in the same jars, implying that the solid wastes resulted from fish culture is one of the sources providing dissolved alkaline phosphatase.

Key words: Groundwater; Fish culture; Dissolved phosphatase