

## 磷酸盐氧同位素在有机磷降解研究中的应用

张弛<sup>1</sup>,季宏兵<sup>1\*</sup>,陈志刚<sup>2</sup>

1. 北京科技大学能源与环境工程学院, 北京 100083

2. 厦门大学海洋与环境学院, 福建 厦门 361005

**摘要:** 磷的有机化合物广泛分布于土壤和水中, 发挥着重要作用的同时, 也给环境带来潜在的污染。研究有机磷化合物的磷循环过程对于防控磷的污染有着重要作用。磷酸盐中的氧同位素作为一种地球化学的示踪剂, 近年来被广泛应用于研究磷在自然界中的循环过程。本文总结了磷酸盐中氧同位素的应用原理以及其在有机磷降解和溯源方面的应用, 并在此基础上展望本领域下一步的工作重点。

**关键词:** 磷酸盐氧同位素; 有机磷; 降解

**中图分类号:** X131.3

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-2324(2018)06-1008-07

## The Application of Phosphate Oxygen Isotope in Organophosphorus Degradation

ZHANG Chi<sup>1</sup>, JI Hong-bing<sup>1\*</sup>, CHEN Zhi-gang<sup>2</sup>

1. School of Energy & Environmental Engineering/University of Science and Technology Beijing, Beijing 100083, China

2. College of Ocean and Earth Sciences/Xiamen University, Xiamen 361005, China

**Abstract:** Organophosphorus compounds are widely spread in soils and waters, which plays an important role in natural environment as well as bring potential pollution. Therefore, research on phosphate cycling of Organophosphorus compound will plays an vital role in preventing phosphorus pollution. Recently, Oxygen Isotope in Phosphate, as a geochemical tracer, was widely used in research on cycling pathways of phosphate in the natural environment. This paper concludes the principle of application of Phosphate Oxygen Isotope and its function in research on Organophosphorus compounds degradation and source trace. Based on this, we give a prospect of the further study in this area.

**Keywords:** Phosphate Oxygen Isotope; Organophosphorus; degradation

磷对于生命体来说是一种不可或缺的元素, 参与了几乎所有的生命循环形式<sup>[1]</sup>。磷的有机化合物种类繁多, 与人们的生活息息相关。磷的有机化合物包括含有机基团的磷酸衍生物和含有 C-P 键的化合物。前者包括 DNA 和 RNA 等, 在生物体内构成了生命的基本物质, 后者主要为氯代烃类杀虫剂的替代品, 被广泛用于农业生产中。磷的有机化合物在发挥重要作用的同时, 也对环境有潜在的威胁。相对于其他大量元素, 生物体对于磷的需求相对较小, C、N、P 的需求比例为 106:16:1<sup>[2]</sup>, 农业废水和生活废水中含有大量有机磷, 排入湖泊中会引起水体富营养化。有机磷农药排入环境中, 会通过食物链进入人体, 在体内富集, 长期威胁人体健康。因此, 研究磷的有机化合物在自然界中的来源及循环过程对于有效防控磷的污染具有重要意义。

在自然界中, 微生物和植物优先利用无机磷酸盐 ( $\text{PO}_4$ ) 进行生命代谢活动。但许多水体中的磷酸盐含量极低, 难以满足生物的生长代谢需要, 发生“磷饥饿”现象<sup>[3]</sup>。此时, 微生物会分泌多种酶来分解有机磷, 生成磷酸盐以满足生长代谢的需要。水体透光层中, 在太阳光中紫外线的作用下, 有机磷会发生光解作用生成磷酸盐, 同时, 自然界中广泛存在的金属氧化物也会大大提高有机磷光解的速率<sup>[4]</sup>。有机磷化合物在自然界中多种多样的生物、非生物反应途径使得研究有机磷的来源, 反应路径及循环过程变得十分困难。

稳定同位素技术对于研究自然界中元素的循环过程是一种极为有效的工具<sup>[5]</sup>。C、N、S 等大量元素的稳定同位素被广泛用于研究其循环过程。稳定同位素技术的使用, 为研究元素循环过程开辟了全新的领域。但由于磷只有一种稳定同位素  $^{31}\text{P}$ , 所以无法利用其稳定同位素来研究磷的循环过程。在自然界中, 磷主要以 +5 价的形式存在, 并且绝大多数情况下以正磷酸盐 ( $\text{PO}_4$ ) 形式存在<sup>[1,6]</sup>。

**收稿日期:** 2018-02-10

**修回日期:** 2018-03-12

**基金项目:** 中国国家自然科学基金(41173113); 中国环保部公益项目(201509049)

**作者简介:** 张弛(1987-), 男, 博士研究生, 主要从事同位素地球化学方面的研究。E-mail: zhangchiustb@foxmail.com

**\*通讯作者:** Author for correspondence. E-mail: ji.hongbing@hotmail.com

数字优先出版: 2018-10-07 <http://www.cnki.net>

尽管磷只有一种稳定同位素,氧却有三种稳定同位素 $^{16}\text{O}$ 、 $^{17}\text{O}$ 、 $^{18}\text{O}$ [5]。在绝大多数的生物地球化学循环过程中,磷总是与氧紧密相连[7-10]。P-O 键在地表温度下非常稳定,在没有生物活动时,磷酸盐中的氧几乎不与周围水中的氧进行交换[11-15]。磷酸盐中的氧同位素可以作为示踪剂来研究磷的循环过程[16]。当有生物活动时,在酶的催化下,磷酸盐和水中的氧会在酶的催化下进行交换,并逐渐达到平衡分馏状态。因此,氧同位素值也可以指示磷酸盐被生物利用的程度和速率[17]。

利用磷酸盐中氧同位素来研究有机磷的循环过程不同于无机磷酸盐。无机磷酸盐可以直接通过 $\text{PO}_4$ 中氧同位素值来研究其循环过程,而有机磷在降解生成磷酸盐的过程中,可能会结合外源氧,因此在分析磷酸盐氧同位素时,要同时考虑外源氧的数量和同位素分馏效应的影响。在不同的降解途径下,有机磷分解生成的磷酸盐具有独特的氧同位素分馏值和结合氧特性。因此,识别不同途径下的氧同位素分馏特征是利用氧同位素对有机磷进行示踪、溯源的第一步。

本文综述了有机磷在不同降解途径下氧同位素特征的研究进展。目前,氧同位素成为磷在自然界中生物地球化学循环速率和规模的重要指示剂[18-22]。磷酸盐中的氧同位素方法在土壤[23-27]、水生系统[28-32]以及古气候[33,34]研究中得到了一定应用。在多种不同的反应路径下,磷酸盐呈现独特的氧同位素特征,这使得氧同位素值用于研究磷酸盐的溯源、追踪及循环成为可能。

## 1 磷酸盐氧同位素应用原理

自然界中氧有 3 种稳定同位素( $^{16}\text{O}$ 、 $^{17}\text{O}$ 、 $^{18}\text{O}$ ),其在地球圈中的相对丰度分别为 99.762%, 0.038%, 0.2%, 氧的同位素值计算方法表示如下: $\delta^{18}\text{O}(\text{‰}) = (R_{\text{样品}}/R_{\text{标样}} - 1) \times 1000$

$R_{\text{样品}}$ 为测试样品的 $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ 的比值; $R_{\text{标样}}$ 为氧同位素标准样品的 $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ 比值,氧同位素标准为一般为标准大洋水(VSMOW)[5]。

在没有生物的参与下,P-O 键非常稳定[35,36]。在 10 $^5$  下,10%的磷酸盐中的氧与水发生交换需要 6000 年[28]。在有生物参与的情况下,磷酸盐和水中的氧会在酶的催化下进行迅速的交换,逐渐达到平衡分馏。但 Young 等[37]研究发现大多数水体中的磷酸盐没有达到平衡分馏,因此水中的氧同位素值可以保留部分源头的氧同位素特征。用磷酸盐氧同位素示踪其磷来源的一个重要前提是不同的磷酸盐来源具有显著的磷酸盐氧同位素区别[38]。Young 等[37]对土壤、污水处理厂、动物粪便、磷矿等研究发现,尽管不同类别的来源之间存在重叠,但是这些不同来源的磷酸盐中具有显著不同的 $\delta^{18}\text{O}_p$ 值,其区间跨度也很大(8.4‰~24.9‰),因此可以认为 $\delta^{18}\text{O}_p$ 可以用来确定水体的不同磷酸盐来源。有机磷在自然界循环的过程中,经历了多种的生物、非生物反应途径,因此,了解各反应途径的磷酸盐氧同位素特征是解析磷来源的必要措施之一。

## 2 磷酸盐氧同位素特征

### 2.1 有机磷化学降解的磷酸盐氧同位素特征

有机磷具有多种化学降解途径。在浅水层,有机磷会受到紫外光的作用发生降解,自然界中广泛存在的金属氧化物作为催化剂会加速这一过程。同时,有机磷也可被硝酸消解。对于有机磷化学降解过程中的氧同位素特征研究近年来逐渐展开。

McLaughlin[39]用硝酸对不同的有机磷化合物(磷酸钾、磷酸钠、植酸、DNA、*L*- $\alpha$ -磷脂酰胆碱、焦磷酸钙、三聚磷酸盐、ATP、2-氨基磷酸)在 $\delta^{18}\text{O}_w$ 标记水中进行消解。磷酸钾和磷酸钠为已知 $\delta^{18}\text{O}_p$ 的标准样品,其 $\delta^{18}\text{O}_p$ 分别为 11.3‰和 20‰,在 50 $^{\circ}\text{C}$  硝酸溶液中进行消解后, $\delta^{18}\text{O}_p$ 并没有发生变化,说明在 50 $^{\circ}\text{C}$  时,硝酸溶液不会对磷酸盐中的氧同位素产生影响。硝酸对其他有机磷化合物进行消解后,通过标记水和非标记水中磷酸盐 $\delta^{18}\text{O}_p$ 分析发现,生成磷酸盐中外源氧比例与根据化学式推算出的外源氧比例(原化合物中 P 基团生成 $\text{PO}_4$ 所需结合氧的比例)基本保持一致。此一致性说明,标记水与非标记水中磷酸盐 $\delta^{18}\text{O}_p$ 差异是由于外源氧(来自于水)的 $\delta^{18}\text{O}_w$ 不同,而不是因为氧同位素的分馏。根据质量守恒,可得出公式: $\delta^{18}\text{O}_{\text{标记水中磷酸盐}} = x \delta^{18}\text{O}_{\text{样品}} + (1-x) \delta^{18}\text{O}_{\text{标记水}}$ ;  $\delta^{18}\text{O}_{\text{非标记水中磷酸盐}} = x \delta^{18}\text{O}_{\text{样品}} + (1-x) \delta^{18}\text{O}_{\text{非标记水}}$

由此可计算出有机磷中 P 基团的 $\delta^{18}\text{O}_p$ 值: $\delta^{18}\text{O}_{\text{样品}} = [(\delta^{18}\text{O}_{\text{标记水中磷酸盐}} * \delta^{18}\text{O}_{\text{非标记水}}) - (\delta^{18}\text{O}_{\text{标记水}} * \delta^{18}\text{O}_{\text{非标记水中磷酸盐}})] / (\delta^{18}\text{O}_{\text{非标记水}} - \delta^{18}\text{O}_{\text{标记水}})$

非标记水中磷酸盐) ] / [ (  $\delta^{18}\text{O}_{\text{标记水中磷酸盐}} - \delta^{18}\text{O}_{\text{非标记水}}$  ) - (  $\delta^{18}\text{O}_{\text{标记水}} - \delta^{18}\text{O}_{\text{非标记水中磷酸盐}}$  ) ]

Yuhong Liang 等<sup>[8]</sup>将  $\alpha$ -D-葡萄糖-1-磷酸、 $\beta$ -甘油磷酸盐和 5'-AMP 分别溶解在  $\delta^{18}\text{O}_w$  为 -5.5‰~99.8‰的水中,放置在 500 W 汞灯下进行照射。对生成磷酸盐  $\delta^{18}\text{O}_p$  进行分析发现,添加  $\text{H}_2\text{O}_2$  对于水中磷酸盐的  $\delta^{18}\text{O}_p$  几乎没有影响。-5.5‰和 99.8‰水中磷酸盐的  $\delta^{18}\text{O}_p$  差异在 1.8‰左右,但相对于反应水的  $\delta^{18}\text{O}_w$  跨度大于 100‰,此差异可以忽略,由此可推断其紫外光降解机制为:生成磷酸盐中的四个氧都来自于反应物本身且没有发生同位素分馏。由此反应机制可计算出  $\alpha$ -D-葡萄糖-1-磷酸、 $\beta$ -甘油磷酸盐和 5'-AMP 中- $\text{PO}_4$  基团的  $\delta^{18}\text{O}_p$  值分别为  $20 \pm 1\%$ ,  $11 \pm 1\%$  和  $12 \pm 1\%$ 。

Sandy 等<sup>[4]</sup>将草甘膦和磷酰基乙酸溶解在不同氧同位素标记水中,放置在 1200 W 汞灯下进行紫外光降解。对水的  $\delta^{18}\text{O}_w$  与生成磷酸盐的  $\delta^{18}\text{O}_p$  进行线性拟合发现,草甘膦和磷酰基乙酸光解生成磷酸盐  $\delta^{18}\text{O}_p$  与  $\delta^{18}\text{O}_w$  呈正相关,其斜率均为 0.17 左右。与其他研究结果相比较,草甘膦和磷酰基乙酸属于磷酸酯,而  $\alpha$ -D-葡萄糖-1-磷酸(磷酸单酯)光解的  $\delta^{18}\text{O}_p$  与  $\delta^{18}\text{O}_w$  的线性拟合斜率为 0.01, DNA, RNA (磷酸双酯)为 0.11, 不同有机磷的斜率不同源于其化学结构和反应机制的差异性,可能作为区别发生光降解反应的物质的特征之一。斜率 0.17 代表草甘膦和磷酰基乙酸降解生成的磷酸盐中有 17% 的氧来自于周围的水。根据草甘膦和磷酰基乙酸的化学式可以得知,其分解生成磷酸盐的外源结合氧应该占  $\text{PO}_4$  中氧的 25%, 17% 的氧来自于水, Sandy 推测另外 8% 的氧来自于周围的氧气。根据质量守恒,在不考虑结合氧发生同位素分馏的情况下,可得到公式如下:

$$\delta^{18}\text{O}_{\text{磷酸盐}} = 0.75 * \delta^{18}\text{O}_{\text{样品}} + x * \delta^{18}\text{O}_{\text{水}} + (0.25 - x) * \delta^{18}\text{O}_{\text{氧气}}$$

已知周围空气  $\delta^{18}\text{O}$  约为 23.5‰<sup>[40]</sup>,可计算得知草甘膦和磷酰基乙酸中的- $\text{PO}_3$  基团的  $\delta^{18}\text{O}_p$  分别为 4.73‰和 -0.02‰。利用此反应模型所计算出原始有机磷中的  $\delta^{18}\text{O}_p$  值可以用来对草甘膦和磷酰基乙酸进行溯源。

Hui Li<sup>[41]</sup>等利用同位素标记法来探究磷酸盐中外源氧的来源。将草甘膦和氨甲基磷酸在水钠锰矿 ( $\text{K}_x(\text{M}_n^{4+}, \text{M}_n^{3+})_2\text{O}_4$ ) 催化作用下进行降解,分别在不同氧同位素标记水,  $\text{M}_n\text{O}_2$  ( $\delta^{18}\text{O} = -3.69 \pm 0.03\%$ ,  $55.31 \pm 0.02\%$  和  $94.79 \pm 0.02\%$ ) 和  $\text{O}_2$  ( $\delta^{18}\text{O} = 110.15 \pm 0.92\%$ ,  $2082.41 \pm 2.37\%$ ) 中进行反应。通过对磷酸盐  $\delta^{18}\text{O}_p$  与  $\delta^{18}\text{O}_{\text{MnO}_2}$ 、 $\delta^{18}\text{O}_{\text{O}_2}$  线性拟合分析发现,外源氧并非来自  $\text{M}_n\text{O}_2$  和  $\text{O}_2$ 。对磷酸盐的  $\delta^{18}\text{O}_p$  与  $\delta^{18}\text{O}_w$  进行线性拟合,发现其  $\delta^{18}\text{O}_p$  与  $\delta^{18}\text{O}_w$  线性拟合的斜率为 0.21,说明生成的磷酸盐中有 21% 氧来自于周围的水中。作者将 AMPA 直接加入到 TCEA 中测得  $\delta^{18}\text{O}$ , 根据公式:

$$F = (\delta^{18}\text{O}_{\text{磷酸盐}} - 0.75 * \delta^{18}\text{O}_{\text{样品}}) / (0.21 * \delta^{18}\text{O}_{\text{水}})$$

计算出 AMPA 在水钠锰矿催化降解时,磷酸盐的氧同位素动力学分馏值为  $-11.81 \pm 4.14\%$ 。目前,关于有机磷化学降解的研究仍然比较缺乏,为了更好的示踪有机磷在水体中的循环过程,需要进一步的研究。

## 2.2 有机磷酶降解的磷酸盐氧同位素特征

在细胞体内有多种酶参与了磷的代谢过程,其中无机焦磷酸酶 (PPase) 起到了重要作用。PPase 广泛分布于细菌,真菌和古菌中<sup>[42-44]</sup>,其主要功能是催化焦磷酸盐分解成磷酸盐,这一过程使得 P-O 断裂,与周围水中的氧进行交换。因此,研究认为细胞体内的磷酸盐在 PPase 的作用下逐渐与周围的水达到氧同位素平衡分馏<sup>[45]</sup>。Blake 等<sup>[20]</sup>用 PPase 催化  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 发现  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  中的氧快速的与周围的水进行氧交换,逐渐趋近于氧同位素平衡分馏。在 5.7、15 和 22 下反应的  $\delta^{18}\text{O}_p$  与根据 Longinelli 氧同位素平衡分馏公式计算的结果相一致,从而印证了 PPase 是细胞体内促进氧同位素达到平衡分馏的酶,其反应过程如下所示:  $\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7^{2-} + \text{H}_2\text{O} \xrightleftharpoons[\text{PPase}]{\text{Mg}^{2+}} 2\text{HPO}_4^{2-} + 2\text{H}^+$

除了 PPase 外,胞外酶中常见的有酸性磷酸酶 (Acid Phosphatase) 和碱性磷酸酶 (APase), 5'-核苷酸酶,其产生的同位素效应主要为动力学分馏。Liang 等<sup>[8]</sup>研究了碱性磷酸酶对磷酸单酯催化降解的磷酸盐氧同位素特征。其用不同来源的 APase (来源于牛肠、虾和大肠杆菌) 在氧同位素标记水中催化降解磷酸单酯底物 ( $\alpha$ -D-葡萄糖-1-磷酸、 $\beta$ -甘油磷酸盐和 5'-AMP), 不同底物降解生成磷酸盐的  $\delta^{18}\text{O}_p$  与  $\delta^{18}\text{O}_w$  线性拟合直线的斜率均在 0.23~0.28 之间。用 5'-核苷酸酶在同样条件下催化降

解 5'-AMP, 其 $\delta^{18}\text{O}_p$ 与 $\delta^{18}\text{O}_w$ 线性拟合斜率为 0.25, 由此证明 APase 和 5'-核苷酸酶催化有机磷降解生成的磷酸盐中有 75%继承自原底物, 25%来自于水中。由此, 根据质量守恒, 可得公式如下:

$$F=4*(\delta^{18}\text{O}_{\text{磷酸盐}}-0.75*\delta^{18}\text{O}_{\text{原始有机磷}})-\delta^{18}\text{O}_{\text{水}}$$

可计算出 APase 催化有机磷降解时生成磷酸盐的动力学分馏值为 $-30(\pm 8)\%$ , 5'-核苷酸酶催化降解 5'-AMP 的动力学分馏值为 $-10(\pm 1)\%$ , 说明酶催化反应时, 水中的 $^{16}\text{O}$ 更易被结合入磷酸根中。研究发现, 由酸性磷酸酶产生的氧同位素分馏为 20~30‰, 大于碱性磷酸酶的分馏值, 可能是因为降解机制的不同<sup>[13]</sup>。

Liang 等<sup>[3]</sup>研究了磷酸双酯 (DNA 和 RNA) 被二酯酶 (脱氧核糖核酸酶、磷酸二酯酶) 和磷酸单酯酶 (5'-核苷酸酶, 碱性磷酸酶) 催化降解的过程。DNA 和 RNA 先由二酯酶分解为磷酸单酯, 再由碱性磷酸酶分解为无机磷酸盐。通过将磷酸盐的 $\delta^{18}\text{O}_p$ 与 $\delta^{18}\text{O}_w$ 进行线性拟合发现, 所有 DNA 的实验组 (不同酶的组合), 其斜率均为 0.45 ( $\pm 0.02$ ), 说明两步过程约有两个水中的氧被结合到了生成的 $\text{PO}_4$ 中。通过实验发现, 二酯酶 (脱氧核糖核酸酶和磷酸二酯酶) 产生的同位素分馏效应相同, 而不同单酯酶 (碱性磷酸酶和 5'-核苷酸酶) 同位素分馏效应不同。

磷酸二酯酶降解 RNA 的 $\delta^{18}\text{O}_p$ 与 $\delta^{18}\text{O}_w$ 线性拟合斜率为 0.66, 推测 RNA 降解时存在两种反应途径, 一是磷酸二酯酶和 5'-核苷酸酶使得 RNA 降解生成 $\text{PO}_4$ , 有 50%氧来自于水。二是购买的磷酸二酯酶中含有少量的 RNA 水解酶, 降解 RNA 生成了环 2'3'-磷-双酯中间产物, 中间产物会与水生成 3'-磷酸, 此过程为可逆反应, 此可逆反应促使 $-\text{PO}_4$ 基团与水发生了完全的氧交换。3'-磷酸通过碱性磷酸酶降解生成 $\text{PO}_4$ , 其 100%的氧都来自于水。由反应机理可得出计算公式如下:  $1x+0.5*(1-x)=0.66$

由此公式可计算出此实验有 68%的 RNA 通过第一种途径降解, 32%通过第二种途径降解。由此推导出公式如下:  $\delta^{18}\text{O}_{\text{磷酸二酯酶}}=[\delta^{18}\text{O}_{\text{磷酸盐}}-0.32*0.25*(\delta^{18}\text{O}_{\text{水}}-30)-0.32*0.75*\delta^{18}\text{O}_{\text{平衡分馏值}}]/0.68$ 。

由此公式可计算出 RNA 通过磷酸二酯酶降解的氧同位素值。磷酸二酯酶降解 DNA 产生的氧同位素分馏值为 $-20\%$ , 降解 RNA 的氧同位素分馏值为 $+20\%$ , 说明磷酸二酯降解 DNA 和 RNA 的反应机制不同。磷酸盐中氧同位素的应用为降解途径与降解机制的识别提供了新的可能。

C.von Sperber 等<sup>[46]</sup>研究了不同植酸酶 (提取自小麦和黑曲霉) 和酸性磷酸酶 (提取自麦芽和马铃薯) 降解植酸的磷酸盐氧同位素特征。实验发现植酸酶降解植酸分子会释放出 66.6%的 $-\text{PO}_4$ 基团。通过磷酸盐氧同位素 $\delta^{18}\text{O}_p$ 与 $\delta^{18}\text{O}_w$ 线性拟合斜率为 0.23~0.24 可知, 植酸分子降解时 P-O 键断裂, 生成的 $\text{PO}_4$ 中有一个氧来自于水中。作者用紫外光降解完整植酸分子 (肌醇六磷酸) 和植酸酶催化降解后剩余肌醇二磷酸, C-O 键断裂, 可分离出完整的 $-\text{PO}_4$ 基团。根据 Maclauglin 公式<sup>[29]</sup>可计算出被植酸酶所分离的四个磷酸分子中的氧同位素值:  $\delta^{18}\text{O}_{\text{肌醇六磷酸}}=2/3*\delta^{18}\text{O}_{\text{四个磷酸分子}}+1/3*\delta^{18}\text{O}_{\text{肌醇二磷酸}}$

再根据如下公式, 可计算出植酸酶降解的动力学分馏值:

$$\delta^{18}\text{O}_{\text{磷酸盐}}=0.75*\delta^{18}\text{O}_{\text{四个磷酸分子}}+(0.25*\delta^{18}\text{O}_{\text{水}}+\varepsilon)$$

酶解出来的四个 $\text{PO}_4$ 分子中的氧同位素值为 $23.2\pm 0.7\%$ , 小麦植酸酶的氧同位素动力学分馏值为 $6.4\pm 2.9\%$ , 黑曲霉植酸酶的氧同位素分馏值为 $6.7\pm 3.4\%$ 。麦芽酸性磷酸酶降解了约 10%的植酸, 马铃薯中的酸性磷酸酶活性较强, 降解了 40%, 其氧同位素动力学分馏值分别为 $0.9\pm 0.6\%$ ,  $7.2\pm 2.9\%$ 。

研究认为焦磷酸酶使得 $\text{PO}_4$ 中的氧与周围水进行交换逐渐达到与温度呈线性关系的氧同位素平衡分馏。为了精确测量氧同位素-温度平衡分馏公式, Sae 等<sup>[15]</sup>利用焦磷酸酶在 3~37 范围内对氧同位素标记水中的 $\text{PO}_4$ 进行实验, 发现 $\text{PO}_4$ 中的氧快速与水中的氧交换, 在 818 min 内就与水中的氧同位素达到了平衡分馏。根据实验结果推导出 3~37 下的平衡分馏公式 (开尔文温度) 为:

$$1000 \ln \alpha_{\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}}=14.43 (\pm 0.39) *1000/T-26.54 (\pm 1.33) \quad r^2=0.99$$

### 2.3 有机磷微生物降解的磷酸盐氧同位素特征

微生物降解有机磷的过程涉及不同酶的催化作用。自然界中, 微生物优先利用无机磷, 但是水体中以有机磷为主, 占总溶解磷的 80~99%<sup>[47]</sup>, 相比之下, 无机磷的含量很低, 在表层土壤中约为 1~10  $\mu\text{mol/L}$ <sup>[38]</sup>, 海水中为 1~3  $\mu\text{mol/L}$ <sup>[38,47]</sup>。因此, 在大多数的水体中, 有机磷是生物生长所需磷的主要来源。在自然界的温度和 pH 下, 水体中的 P-O 键基本不受非生物作用的影响, 只有在生物酶

的作用下才会发生断裂。有机磷在酶催化下分解为无机磷酸盐,无机磷酸盐被生物吸收利用,在体内焦磷酸酶(PPase)的作用下,发生P-O键的断裂<sup>[20]</sup>,与周围的水发生氧交换,逐渐与周围的水达到平衡分馏。Longinelli<sup>[48]</sup>通过大量研究,首先提出了磷酸盐和水中氧同位素的平衡分馏公式:

$$T( ) = 111.4 - 4.3(\delta^{18}\text{O}_p - \delta^{18}\text{O}_w)$$

公式中  $T$  为水体的温度,  $\delta^{18}\text{O}_p$  为水体中磷酸盐的氧同位素值,  $\delta^{18}\text{O}_w$  为周围水的氧同位素值。

耶鲁大学 Blake<sup>[18]</sup>在实验室中模拟研究微生物降解有机磷化合物的磷酸盐氧同位素特征。实验利用 RNA 为唯一磷源,在 15~35 °C 下培养混合细菌,以模拟自然界中细菌生长情况。发现在细菌的作用下,生成的磷酸盐氧同位素值有了较大改变,与水发生了氧交换,过程为平衡分馏而非动力学分馏。-5.5‰, -6.6‰水中培养的 RNA 降解的磷酸盐氧同位素值正好符合 Longinelli 的平衡分馏曲线,而其他  $\delta^{18}\text{O}_w$  水中生成的磷酸盐氧同位素偏离平衡分馏曲线。推断磷酸盐中有 50%的氧继承自原来的 RNA 中,经过校正后发现其余 50%的氧同位素值符合平衡分馏值。Blake 根据实验结果得出细菌催化氧同位素平衡分馏公式如下:  $T( ) = 155.8 - 6.4(\delta^{18}\text{O}_p - \delta^{18}\text{O}_w)$

Blake<sup>[19]</sup>以葡萄糖-1-磷酸为唯一碳源和磷源,利用克雷伯氏菌(*Klebsiella aerogenes*)对其进行降解,发现生成的磷酸盐氧同位素值没有达到平衡分馏。根据葡萄糖-1-磷酸结构式,假设磷酸盐中有 25%的氧来自于反应物对其进行校正,发现依然不符合平衡分馏曲线,推测克雷伯氏菌降解葡萄糖-1-磷酸有更复杂的降解机制。但总体来说,在克雷伯氏菌的作用下,生成的磷酸盐与水发生了剧烈的氧交换。

Liang 等<sup>[3]</sup>发现,用大肠杆菌降解 RNA,生成的磷酸盐  $\delta^{18}\text{O}_p$  与水的  $\delta^{18}\text{O}_w$  线性拟合直线斜率为 0.51(±0.07)。说明 RNA 降解生成的磷酸盐中有两个氧来自于水,与所预测的反应模型相一致,所测氧同位素值与 Blake 培养混合菌降解 RNA 的氧同位素值只有 1‰的差别。其磷酸盐氧同位素值与磷酸二酯酶+5'-核苷酸酶的反应模型计算出的结果相一致,说明尽管大肠杆菌的降解机制较为复杂,有多种酶的参与,但只有一种反应途径主导了生成磷酸盐的氧同位素值。

### 3 结论和展望

磷酸盐氧同位素已经作为一种地球化学示踪剂被应用于古环境和水生生态系统中,成为研究生物地球化学循环过程有效手段。从上世纪起,国外许多实验室对于自然样品的分离纯化手段以及氧同位素样品的测定作了许多改进,奠定了本领域的基础。之后对于自然样品和实验室模拟有机磷的生物地球化学循环过程的氧同位素的特征都有了一定研究,使得磷酸盐氧同位素的研究有了长足进展,使得其在溯源和研究磷循环方面成为可能。但是总体来说,磷酸盐氧同位素研究还处于起步阶段,国内研究较少,主要集中在海水样品的处理和分析方面,其余研究还基本处于空白状态。在以后的研究中,还需要解决如下问题:

(1) 磷酸盐样品的分离纯化手段已经得到了很大改进。但目前的分离纯化手段主要针对海水中的溶解磷酸盐,对于淡水水体和天然土壤样品<sup>[49]</sup>,由于其组成的复杂性,还缺少有效的分离纯化手段,限制了样品分析范围。例如在处理土壤样品时,土壤样品中含有大量的生物酶,针对不同组分的土壤,如何处理才能避免有机质发生分解以及在处理过程中是否会引起磷酸盐的氧同位素分馏;

(2) 生物活动会引发磷酸盐氧同位素的平衡分馏。现在平衡分馏公式仍主要基于 Longinelli 在 1973 年提出的磷灰石与水发生平衡分馏时的公式, Sae 对于这个公式进行了补充,在 2015 年提出了 3~37 °C 的磷酸盐-水平衡分馏公式,但在其他温度条件下发生的平衡分馏公式仍需进行补充;

(3) 国外许多研究者实验模拟有机磷的生物地球化学循环过程,计算出氧同位素分馏值,提供了许多有价值的信息。但目前的研究主要集中于磷酸单酯和磷酸双酯少数几种有机磷化合物,对于磷酸酯等其他类型有机磷化合物研究较少;

(4) 对于有机磷不同降解途径的研究目前主要集中于酶催化降解,对于其他降解形式例如化学降解和微生物降解的氧同位素分馏机理还研究较少,限制了其在有机磷溯源和循环过程方面的应用,以后应该对有机磷在自然界生物地球化学循环过程中的氧同位素分馏机制进行更全面和深入的研究;

(5)现在对有机磷在降解过程中的同位素分馏计算是基于有机磷的-PO<sub>4</sub>基团中四个氧的氧同位素值一致,但对于含有C-O-P结构的磷化合物来说,其C-O-P中的氧是否与P-O中的氧的同位素值有差异,对于同位素分馏值的计算来说是至关重要的。但目前并没有可行的手段和方法能测定出其中单个键位的氧同位素值,在未来的研究中函待解决。

## 参考文献

- [1] 陈志刚,黄奕普,刘广山,等.磷酸盐氧同位素组成的测定方法及分馏机理研究进展[J].地球科学进展,2010,25(10):1040-1050
- [2] Jaisi DP, Blake RE. Tracing sources and cycling of phosphorus in Peru Margin sediments using oxygen isotopes in authigenic and detrital phosphates[J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2010,74(11):3199-3212
- [3] Liang Y, Blake RE. Compound- and enzyme-specific phosphodiester hydrolysis mechanisms revealed by  $\delta^{18}\text{O}$  of dissolved inorganic phosphate: Implications for marine P cycling[J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2009,73(13):3782-3794
- [4] Sandy EH, Blake RE, Chang SJ, et al. Oxygen isotope signature of UV degradation of glyphosate and phosphonoacetate: Tracing sources and cycling of phosphonates[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2013,260(6):947-954
- [5] 田丽艳,郭庆军,何会军,等.磷酸盐氧同位素技术在环境科学中的研究进展[J].生态学杂志,2016,35(7):1947-1956
- [6] 周 威.淡水水体磷酸盐中磷氧同位素分析方法及应用[D].合肥:安徽理工大学,2015
- [7] Angert A, Weiner T, Mazeh S, et al. Seasonal variability of soil phosphate stable oxygen isotopes in rainfall manipulation experiments[J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2011,75(15):4216-4227
- [8] Liang Y, Blake RE. Oxygen isotope signature of Pi regeneration from organic compounds by phosphomonoesterases and photooxidation[J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2006,70(15):3957-3969
- [9] Jaisi DP, Blake RE, Kukkadapu RK. Fractionation of oxygen isotopes in phosphate during its interactions with iron oxides[J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2010,74(4):1309-1319
- [10] 卢阳阳,郑珍珠,尹希杰,等.海水溶解磷酸盐氧同位素组成的测定[J].地球学报,2012,33(6):961-966
- [11] Jaisi DP, Blake RE, Liang Y, et al. Investigation of Compound-Specific Organic-Inorganic Phosphorus Transformation Using Stable Isotope Ratios in Phosphate[M]. *Applied Manure and Nutrient Chemistry for Sustainable Agriculture and Environment*, 2014:267-292
- [12] Pouech J, Amiot R, Lécuyer C, et al. Oxygen isotope composition of vertebrate phosphates from Cherves-de-Cognac (Berriasian, France): environmental and ecological significance[J]. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 2014,410(5):290-299
- [13] Sperber CV, Kries H, Tamburini F, et al. The effect of phosphomonoesterases on the oxygen isotope composition of phosphate[J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2014,125(1):519-527
- [14] Wu L, Yao J, Trebse P, et al. Compound specific isotope analysis of organophosphorus pesticides[J]. *Chemosphere*, 2014,111:458-463
- [15] Chang SJ, Blake RE. Precise calibration of equilibrium oxygen isotope fractionations between dissolved phosphate and water from 3 to 37 °C[J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2015,150(8):314-329
- [16] 郑珍珠.水体中溶解磷酸盐氧同位素的准确测定及其在九龙江口、台湾海峡磷循环中的应用[D].厦门:厦门大学,2013
- [17] 雷学铁.九龙江河口溶解磷酸盐及沉积物中不同形态磷酸盐的氧同位素分布特征及意义[D].厦门:厦门大学,2014
- [18] Blake RE, O'Neil JR, Garcia GA. Oxygen isotope systematics of biologically mediated reactions of phosphate: I. Microbial degradation of organophosphorus compounds[J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 1997,61(20):4411-4422
- [19] Blake RE, O'Neil JR, Garcia GA. Effects of microbial activity on the  $\delta^{18}\text{O}$  of dissolved inorganic phosphate and textural features of synthetic apatites[J]. *American Mineralogist*, 1998,83(11-12 Part 2):1516-1531
- [20] Blake RE, O'Neil JR, Surkov AV. Biogeochemical Cycling of Phosphorus: Insights from Oxygen Isotope Effects of Phosphoenzymes[J]. *American Journal of Science*, 2005,305(6-8):596-620
- [21] Vennemann TW, Fricke H, Blake RE, et al. Oxygen isotope analysis of phosphates: a comparison of techniques for analysis of Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>[J]. *Chemical Geology*, 2002,185(3-4):321-336
- [22] Liang YH. Oxygen Isotope Studies of Biogeochemical Cycling of Phosphorus[D]. New Haven: Yale University, 2005
- [23] Zohar I, Shaviv A, Young M, et al. Phosphorus dynamics in soils irrigated with reclaimed waste water or fresh water — A study using oxygen isotopic composition of phosphate[J]. *Geoderma*, 2010,159(1):109-121
- [24] Zohar I, Shaviv A, Klass T, et al. Method for the Analysis of Oxygen Isotopic Composition of Soil Phosphate Fractions[J]. *Environmental Science & Technology*, 2010,44(19):7583-7588

- [25] Tamburini F, Pfahler V, Bünenmann EK, *et al.* Oxygen Isotopes Unravel the Role of Microorganisms in Phosphate Cycling in Soils[J]. *Environmental Science & Technology*, 2012,46(11):5956-5962
- [26] Gross A, Turner BL, Wright SJ, *et al.* Oxygen isotope ratios of plant available phosphate in lowland tropical forest soils[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2015,88(C):354-361
- [27] Gross A, Angert A. What processes control the oxygen isotopes of soil bio-available phosphate?[J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2015,159(3):100-111
- [28] Colman AS, Blake RE, Karl DM, *et al.* Marine phosphate oxygen isotopes and organic matter remineralization in the oceans[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005,102(37):13023-13028
- [29] McLaughlin K, Kendall C, Silva SR, *et al.* Phosphate oxygen isotope ratios as a tracer for sources and cycling of phosphate in North San Francisco Bay, California[J]. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 2006,111(G3):145-180
- [30] McLaughlin K, Chavez F, Pennington JT, *et al.* A time series investigation of the oxygen isotopic composition of dissolved inorganic phosphate in Monterey Bay, California[J]. *Limnology and Oceanography*, 2006,51(5):2370-2379
- [31] McLaughlin K, Cade-Menun BJ, Paytan A. The oxygen isotopic composition of phosphate in Elkhorn Slough, California: A tracer for phosphate sources[J]. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 2006,70(3):499-506
- [32] McLaughlin K, Sohm JA, Cutter GA, *et al.* Phosphorus cycling in the Sargasso Sea: Investigation using the oxygen isotopic composition of phosphate, enzyme labeled fluorescence, and turnover times[J]. *Global Biogeochemical Cycles*, 2013,27(2):375-387
- [33] Amiot R, Wang X, Lécuyer C, *et al.* Oxygen and carbon isotope compositions of middle Cretaceous vertebrates from North Africa and Brazil: Ecological and environmental significance[J]. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 2010,297(2):439-451
- [34] Amiot R, Olsen PE. Oxygen isotopes of East Asian dinosaurs reveal exceptionally cold Early Cretaceous climates[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011,108(13):5179-5183
- [35] 张金流, 鲍祥. 溶解磷酸盐氧同位素示踪剂研究进展及展望[J]. *环境科学与技术*, 2015,38(11):21-26
- [36] 陈法锦, 黄亚楠, 曾珍. 氧同位素在海洋磷酸盐研究中的应用[J]. *矿物岩石地球化学通报*, 2014,33(6):925-931
- [37] Young MB, McLaughlin K, Kendall C, *et al.* Characterizing the Oxygen Isotopic Composition of Phosphate Sources to Aquatic Ecosystems[J]. *Environmental Science & Technology*, 2009,43(14):5190-5196
- [38] 冀建鹏, 徐志方. 磷酸盐的氧同位素示踪磷来源及循环研究进展[J]. *环境科学与技术*, 2010(S2):360-363
- [39] McLaughlin K, Paytan A, Kendall C, *et al.* Oxygen isotopes of phosphatic compounds—Application for marine particulate matter, sediments and soils[J]. *Marine Chemistry*, 2006,98(2-4):148-155
- [40] Keeling RF. The atmospheric oxygen cycle: The oxygen isotopes of atmospheric CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> and the O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> ratio[J]. *Reviews of Geophysics*, 1995,33(S2):2399-2409
- [41] Li H, Joshi SR, Jaisi DP. Degradation and Isotope Source Tracking of Glyphosate and Aminomethylphosphonic Acid[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016,64(3):529-538
- [42] Leppänen VM, Nummelin H, Hansen T, *et al.* Sulfolobus acidocaldarius inorganic pyrophosphatase: structure, thermostability, and effect of metal ion in an archaeal pyrophosphatase[J]. *Protein science*, 1999,8(6):1218-1231
- [43] Pohjanjoki P, Lahti R, Goldman A, *et al.* Evolutionary conservation of enzymatic catalysis: quantitative comparison of the effects of mutation of aligned residues in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* inorganic pyrophosphatases on enzymatic activity[J]. *Biochemistry*, 1998,37(7):1754-1761
- [44] Cooperman BS, Baykov AA, Lahti R. Evolutionary conservation of the active site of soluble inorganic pyrophosphatase[J]. *Trends in biochemical sciences*, 1992,17(7):262-266
- [45] Cohn M. A study of oxidative phosphorylation with O<sup>18</sup>-labeled inorganic phosphate[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1953,201(2):735-750
- [46] Sperber CV, Tamburini F, Brunner B, *et al.* The oxygen isotope composition of phosphate released from phytic acid by the activity of wheat and *Aspergillus niger* phytase[J]. *Biogeosciences*, 2015,12(13):4175-4184
- [47] Henry LE. *Geomicrobiology*[M]. 5<sup>th</sup> ed. Boca Raton: CRC Press, 2009
- [48] Longinelli A, Nuti S. Revised phosphate-water isotopic temperature scale[J]. *Earth and Planetary Science Letters*, 1973,19(3):373-376
- [49] 张晗, 王佳妮, 郭庆军, 等. 土壤磷酸盐氧同位素分析方法和应用研究进展[J]. *土壤学报*, 2015,52(1):19-27