

7 光合作用-底物浓度曲线的解释

将按照以上方法测定的数据绘制成光合作用-底物浓度曲线。底物浓度可以表示为 CO_2 、 HCO_3^- 或 DIC (Dissolved inorganic carbon)。如上所述,解释光合作用与 CO_2 浓度关系的关键值是最大光合作用速度 (V_{\max}) 和 $1/2 V_{\max}$ 时的底物浓度 $K_m(\text{CO}_2)$ 。求出 V_{\max} 和 K_m 的方法有几种:(1)从饱和曲线中直接读出(图 2A);(2)两倒数法(图 2B);(3) $[S]/v \sim [S]$ 绘图法(图 2C)。应用酶反应解析方法,图 2B 所示的两倒数绘图线的倾斜度是 K_m/V_{\max} , x 轴(底物浓度的倒数)的截距是 $-1/K_m$ 。 y 轴(光合作用的倒数)的截距是 $1/V_{\max}$ 。图 2C 中所示的 $[S]/v \sim [S]$ 直线关系中,倾斜度为 $1/V_{\max}$, 纵轴上的截距为 K_m/V_{\max} , 横轴上的截距是 $-K_m$ 。

高浓度 CO_2 (5%) 充气条件下培养的藻类对 CO_2 的亲合力降低, V_{\max} 增大。这种特性在微藻与海藻中都有报道。在 CO_2 饱和与限制两种条件下评价光合作用特性的重要性是不言而喻的。比较高 CO_2 浓度下培养的细胞(高 CO_2 细胞)与低 CO_2 浓度下培养的细胞(低 CO_2 细胞),可以看出,高 CO_2 细胞的 V_{\max} 比低 CO_2 的高。但是,在与空气达到平衡的溶液中, CO_2 浓度仅仅是 $10 \mu\text{mol}$, 高 CO_2 细胞的光合作用速度还达不到其最大光合作用的一半(譬如,高 CO_2 浓度下培养的小球藻, K_m 是 $20 \sim 25 \mu\text{mol}$); 而低 CO_2 细胞在这种浓度下几乎能达到其最大光合作用速度。

因此,解析光合作用对底物浓度的依赖曲线对理解藻类光合作用特性是很重要的。特别是,从生态学的视点评估某种藻类光合作用特性的情况下,单单凭其高 CO_2 浓度下的光合作用速度并不能把握其光合作用对 CO_2 的依赖特性。

8 结语

CO_2 在水中的不同存在形式决定了藻类固碳的复杂性。在实验室微观水平上进行的藻类固碳特性的研究,特别要注意无 CO_2 反应液的配制和细胞内“ CO_2 ”调零的操作,避免人为的实验误差。在此基础上,应用可靠的解析方法对所得数据进行解析,才能正确把握藻类的固碳特性。

参考文献

- 1 高坤山、华文青。海洋科学,1997,6: 33~35
- 2 都筑榊夫、白岩善博。藻类的光合成。见:宫地重远编 现代植物生理学第 1 卷,光合成。东京:朝仓书店,1992。125~133
- 3 佐藤郎、小林宽等。藻类(sorui)。1997,45:21~28
- 4 白岩善博、广川丰康。クロレラ(クラミドモナス,セネテイスムス)。见:江上信雄(编)实验生物学讲座 1,生物材料调制法。东京:丸善,1982。235~349
- 5 Larsson, C. and Axelsson, L. et al. Eur. J. Phycol, 1997, 32: 49~54

海洋浮游生物电子传递系统研究进展*

REVIEW ON ELECTRON TRANSPORT SYSTEM OF MARINE PLANKTON

黄邦钦 徐宪忠^① 王大志 洪华生

(国家教育部海洋生态环境重点实验室 / 厦门大学环境科学研究中心 361005)

呼吸作用是代谢的中心,有机物转化的枢纽,它提供生命活动所需的能量,为其他化合物合成提供原料。了解呼吸率对定量建立食物链中物质和能量模型是很有必要的。呼吸率同时也是海洋生态学研究的重要参数之一。

常规的呼吸率测定方法有 Winkler 法、氧电极法、压力测定法、浮沉子法、径流装置法等等。这些方

法各有其优缺点,大都要求在密闭容器中并模拟海区环境,且生物在转移过程中生理状态发生了变化,这

* 国家自然科学基金资助项目 49636220, 49776308 号。

① 现在福建海洋研究所工作。

收稿日期:1998-12-21;修回日期:1999-07-07

些方法耗时,灵敏度低,准确度差。与上述常规方法相比,电子传递系统(ETS)活力测定法弥补了他们的一些不足,在灵敏度、准确度方面均有所提高。Packard 于 1971 年首次采用 ETS 活力测定法计算浮游植物的呼吸率。这种方法发展迅速,已在各类海洋生物及水体耗氧率等方面研究中得到广泛应用。

1 ETS 活力测定法概述

1.1 ETS 的组成

Fernandez-moran 等 1964 年和 Strittmatter 1968 年在细胞线粒体和微粒体中首次发现 ETS,它是一个复杂的多酶体系,由细胞色素、黄素蛋白、金属离子和有关的脱氢酶、氧化酶等组成,ETS 的功能是把电子从待氧化的底物逐级传递给分子氧,并在电子传递过程中释放能量,经氧化磷酸化作用合成 ATP,供给生物生命活动的需要(图 1)。

1.2 ETS 活力测定的原理

ETS 是一个复杂的多酶体系,在 ETS 中有 3 种脱氢酶:还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)、琥珀酸脱氢酶,分别测定的 3 种酶活力的总和等于 3 种酶一起测定时的 ETS 活力^[1]。测定 ETS 活力必须判断电子传递过程中的限速步骤,在 ETS 中是辅酶 Q-细胞色素 b 复合体的氧化。现在普遍采用 INT (2-(对碘苯基)-3-(对硝基苯)-5-苯基四唑氯化物, 2-p-iodophenyle-3-p-nitrophenyl-5-phenyl tetrazolium chloride) 作为外来电子受体,以 NADH 和 NADPH 为底物,与辅酶 Q-细胞色素 b 复合体反应,反应后,辅酶 Q-细胞色素 b 复合体被氧化,INT 被还原成甲臍(Formazan)。甲臍是一种有色物质,可以在 490 nm 下测其吸光度,然后据此计算 ETS 活力,再根据 ETS 活力与呼吸率之间的经验关系,估算该种群的呼吸率。

1.3 ETS 活力测定一般操作流程

根据浮游植物的密度,在 <1/3 大气压下通过玻璃纤维滤膜过滤 2~8 L 海水(视浮游植物生物量多寡而定),随后立即把滤膜放在液氮中保存,测定时再取出。有报道说在液氮中酶活可保存 1 a^[2]。

目前的 ETS 活力测定方法基本上依据 Packard 1971 年提出的 INT 还原法。

将滤膜放在磷酸缓冲液(0.1 mol/L, pH=7.7)中,在 0~4 °C 下匀浆 2 min,得到的粗制液在 0~4 °C 下离心 1 min。取得 1 ml 上清液并加入 3 ml 底物溶液(NADH 和 NADPH 混合液)和 1 ml INT(0.2%)反

应 20 min,随后加入终止剂使其终止反应。将混合液在 0~4 °C 下 4 000 r/min 离心 15 min。样品恢复至室温后,用分光光度计在 490 nm 和 750 nm 测其吸光度。750 nm 下的吸光度是为了校正正常忽略的浊度。

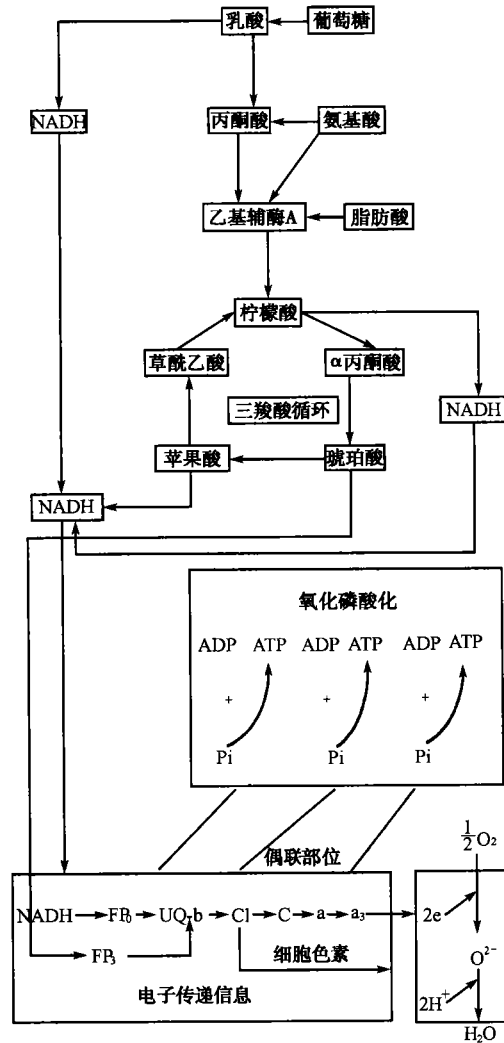


图 1 ETS 及其与三羧酸循环和氧化磷酸化作用的关系

ETS 活力可表示为单位时间单位体积海水所消耗的氧量,可以下式计算:

$$\text{ETS 活力} (\times 10^{-6} \text{h}^{-1}) = \frac{\text{校正吸光度} \times 3 \times H \times F}{V}$$

3 为转化分钟为小时; H 是匀浆体积(ml); V 是过滤的海水体积(L); F 是标准化曲线中的因子。

Packard 和 Williams 于 1987 年修正后又提出下
海洋科学

式:

$$\text{ETS 活力} (\times 10^{-6} \text{h}^{-1}) = 60 \times H \times S \times \text{校正吸光度} / (1.42 \times f \times v \times t)$$

H 是匀浆液体积(ml); S 是终止反应后混合液体积(ml); v 是过滤的海水体积(L); f 是每次测定使用的提取液体积(ml); t 为反应时间(min); 60 是转化分钟为小时; 1.42 是转化 INT-formazan (甲萘) 为氧单位。

2 影响 ETS 活力测定的因素

生物体由于自身特殊性,其呼吸方式多种多样。海洋生物的呼吸受其所处的时间、空间和环境因子等影响,作为呼吸量度的 ETS 也会受到这些因素的影响。

2.1 温度

理论上,温度变化对酶促反应影响的原因主要有两方面,一是温度对酶蛋白稳定性的影响,即对酶热变性失活作用,引起酶构象的变化;二是温度对酶促反应本身的影响,即影响酶与底物的结合,影响最大速率(V_{\max}),影响酶和底物、辅助因子的解离基团的解离常数(pK),影响同工酶的表达等等。Vosjan 和 Olanczu-kneyman 1991 年曾以南极水域表层的微型浮游生物为对象,研究了低温环境下温度对 ETS 活力的影响,表明:2 月份 ETS 活力为 $5 \sim 14 \mu\text{g}/(\text{dm}^3 \cdot \text{d})$,但在 Bransfield 海峡 ETS 活力为 $54 \sim 17 \mu\text{g}/(\text{dm}^3 \cdot \text{d})$ 。研究表明 ETS 活力最适温度为 $20 \sim 25 \text{ }^\circ\text{C}$,活化能 E_a 为 75 kJ/mol ,对温度的微小变化有强烈的反应。但是 Packard 等 1975 年曾以太平洋西部 $10^\circ \sim 45^\circ \text{N}$ 海区的浮游生物为研究对象,对温度与 ETS 活力变化的关系进行探讨,结果没有得到 ETS 的 K_m 和 E_a 的预期变化,因此,他们认为温度对小型浮游生物 ETS 活力的影响很小甚至可以忽略。这与 Vosjan 和 Olanczukneyman 1991 年的结果相反。此外不同地方的小型浮游生物样品的活化能非常相似,范围为 $58.6 \sim 71.2 \text{ kJ/mol}$,平均值为 $67.8 \pm 8.5 \text{ kJ/mol}$,个别地方略有不同,如南极为 $49.91 \pm 2.72 \text{ kJ/mol}$,Barents 海为 $48.15 \pm 2.51 \text{ kJ/mol}$,Weddell 海为 $50.24 \pm 2.09 \text{ kJ/mol}$ ^[2]。因此,尚待更多的证据来证明温度对海洋生物 ETS 活力是否有影响。

Aristegui 和 Montero 1995 年总结出若不是在现场温度下 ETS 测定活力,则可以根据下式换算成现场温度的值^[2]:

$$\text{ETS}_s = \text{ETS}_a \times e^{E_a/R \times (1/T_a - 1/T_s)}$$

E_a 为阿累尼乌斯(Arrhenius)活化能(kJ/mol); R 是气

体常数(8.319 kJ/mol); ETS_s 为现场温度时的 ETS 活力; ETS_a 为测定时的活力; T_a 为测定时的温度(卡氏温度); T_s 为采集的样品所处的温度(卡氏温度)。

2.2 空间变化

对海洋中 ETS 活力水平和垂直分布有较多的报道。一般来说,在富氧的上层,ETS 活力随深度的增加而逐渐下降。King 等 1978 年指出,当以体积单位为度量时,ETS 活力垂直方向上的降低是由于温度的降低和浮游生物丰度下降,且后者影响更大; Devol 1981 年根据对沿岸水域调查指出 O_2 浓度是决定 ETS 活力垂直分布的限制因子; Devol 等 1976 年在北大西洋西部对缺氧层 ETS 活力垂直分布研究中发现,氧分压最低处 ETS 活力最高,而以 ATP 为指数表征的生物量并不高,他认为这是生物对环境低氧分压胞内适应的结果。

在对台湾海峡及厦门港浮游植物 ETS 活力研究过程中发现,在营养盐相对丰富的区域,例如在台湾海峡近岸测站及台湾浅滩上升流附近测站的浮游植物 ETS 活力较高;从垂直分布看,ETS 活力并不象 Packard 所说的随深度增加而下降,而是在某个水层出现最大值,往往是底层和中层,有时是表层,ETS 活力垂直分布曲线呈双峰分布,与正规半日潮的影响相一致,可能是受潮汐影响的结果(另文报道)。

2.3 时间变化

对 ETS 活力季节变化的研究不是很多。Bamstedt 1979 年发现瑞典海湾深水浮游动物的呼吸率和 ETS 都表现出季节变化,春季最高,夏季最低,但并不总是平行地变化,且 ETS 活力年变化幅度比呼吸率更大,ETS : R 值的年变化为 $0.3 \sim 5.6$,因此,他们对 ETS : R 值可估算耗氧率提出疑问。Vosjan 和 Olanczukneyman 1991 年对 Akmiralty 湾浮游生物研究发现 ETS 活力的季节变化不明显。因此,仍有待进一步研究。

台湾海峡及厦门港浮游植物 ETS 活力研究表明,浮游植物 ETS 活力有明显的季节变化,夏季明显高于冬季,台湾海峡夏季浮游植物平均 ETS 活力为 $0.1062 \times 10^{-6} \text{h}^{-1}$,冬季为 $0.0596 \times 10^{-6} \text{h}^{-1}$;从昼夜变化来看,浮游植物 ETS 活力在午夜(零时)和午时(12 时)较高,而且午夜比午时的大。

2.4 实验方法

由于实验对象的不同以及测定方法在试剂成分上的差异,从而在一定程度上影响了实验结果。Christensen 和 Packard 1979 年曾比较了 6 种 ETS 活力测定方法测定浮游植物和细菌的结果,发现 ETS 活力

由于表面活性剂曲力通(Triton X-100)的加入而大大提高,有无加入曲力通所得的ETS活力可以相差4~10倍。因此,笔者建议有必要对现行ETS测定方法的试剂组分进行标准化,以便结果能在全球范围内进行比较。

2.5 其他因素

除了以上因素外,生理状态、压力、盐度、食物等也会影响ETS活力。由于海洋生物在实验室条件下,环境发生较大的变化,ETS活力随着生理状态的变化而呈现下降的趋势,不能很好地反映自然状态下的ETS活力。Packard和King 1975年发现ETS活力受压力的影响很小,目前对此因素的报道很少,尚有待进一步研究。

3 ETS活力测定法在海洋生态学研究中的应用

越来越多证据表明,海洋中浮游生物、微生物、底栖生物、有机物、沉积物的呼吸率都与ETS活力有关。Packard等1970年,Setchell和Packard 1979年, Packard和Williams 1981年, Packard 1985年发现ETS活力与叶绿素浓度、呼吸率相关,总结出以下经验关系式:

$$\log \text{ETS} = 2.93 + 0.65 \log \text{CHL}, (r^2 = 0.6, n = 60)$$

$$\log R = 2.32 + 0.4 \log \text{CHL}, (r^2 = 0.67, n = 60)$$

式中R是呼吸率;CHL是叶绿素的浓度;ETS为电子传递系统酶活力。在对台湾海峡及厦门港浮游植物ETS活力研究过程中发现ETS活力与CHL的关系与上述类似,呈正相关性:

$$\text{ETS} = 0.0793 \text{CHL} + 0.0596,$$

$$(r^2 = 0.5481, n = 21)$$

测定ETS活力已经被应用于细菌、浮游植物、浮游动物、底栖生物和鱼类的代谢研究^[1]。

Kenner和Ahmed 1975年定义了R:ETS比值。在以后的研究中大多数人采用了这个定义,也有人采用其倒数ETS:R。Aristegai和Montero 1995年认为浮游植物呼吸率与ETS活力是相关的,R:ETS一般小于1^[2]。Giorgio 1992年研究了湖沼浮游植物R与ETS的关系,也得出类似的结论。根据R:ETS值及其经验关系式,可以从ETS活力估算该海域某种种群的呼吸率。从理论上,R:ETS值是稳定的,实验结果也表明该值不受环境温度和个体大小的影响。因此,R:ETS的经验值被广泛用于估算种群或群落的呼吸率,这就大大方便了呼吸率的测定。

总之,ETS活力测定法自从Packard于1971年建立以来,已得到较快的发展和完善,目前大多数用于估算种群或群落的呼吸率,但还存在一些问题,如ETS活力反映的并不是生物实际的生理耗氧率,而是其潜在的最大呼吸率(在最适条件下测其最大反应速率),即生物耗氧率的上限,而实际情况并不总是最适条件;理论上,R:ETS值是稳定的,实际上却有可能有波动(可达3~4倍),所以对不同对象、不同时间、不同地点的样品,要重测呼吸率校正,这大大限制了ETS法的应用。然而由于ETS活力测定法有其他呼吸率测定法不可比拟的优点,因此对ETS活力测定方法作进一步研究是十分必要。

参考文献

- 1 Savenkoff, C. et al., *J. Plankton Res.*, 1995, 17(8): 1 593 ~ 1 604
- 2 Aristegui, J. & M. F. Montero. *J. Plankton Res.*, 1995, 17(7): 1 563 ~ 1 571

服务窗 · SERVICE WINDOW

新型的养殖水质测定剂研制开发成功——简便、准确、快速、实用

“中国科学院海洋研究所青岛海水养殖技术开发公司”同澳大利亚“Aquasonic公司”合作研究开发出“奥阔卫士(Aqua Guard)”牌水质测定试剂盒,该试剂盒有一系列产品,目前主要有测试两种pH值的($6.0 \times 10^{-6} \sim 7.6$, $7.4 \sim 9.0$),测试氨氮($0.1 \times 10^{-6} \sim 10.0 \times 10^{-6}$,此值即ppm值,后同)、硬度、溶解氧($0.1 \times 10^{-6} \sim 10.0 \times 10^{-6}$)、硝酸盐($0 \times 10^{-6} \sim 160 \times 10^{-6}$)、亚硝酸盐($0 \times 10^{-6} \sim 20 \times 10^{-6}$)、铜离子($0.05 \times 10^{-6} \sim 1.00 \times 10^{-6}$)、磷酸盐($0.1 \times 10^{-6} \sim 3.0 \times 10^{-6}$),以及测试其他金属离子的等10余种。这一系列产品,是集中、澳两国水产科学家研究成果的精华,并针对中国水产养殖业的特点设计而成的,系高科技产品。其突出特点为:快速准确、操作简便、经济实用,可广泛应用于海、淡水的苗种生产,池塘养殖及水族馆的管理。该系列产品研制开发的成功,将为广大水产养殖业主、水产生产科技工作者、管理工作对养殖水环境质量的监控提供直接快便的帮助,以使养殖工作更科学更高效。

欲要咨询订购,请同中国科学院海洋研究所青岛海水养殖技术开发公司经理柯亚夫先生联系。地址:青岛市南海路7号,邮编:266071,电话:0532-2964138,2879062-6143,传真:0532-2964158,E-mail: Yafuke@ms.qdio.ac.cn

青岛海水养殖技术开发公司

海洋科学