

# 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<sup>①</sup> 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<sup>[1]</sup>。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 被还原成甲管(Formazan)。甲管是一种有色物质,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<sup>[2]</sup>。

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。

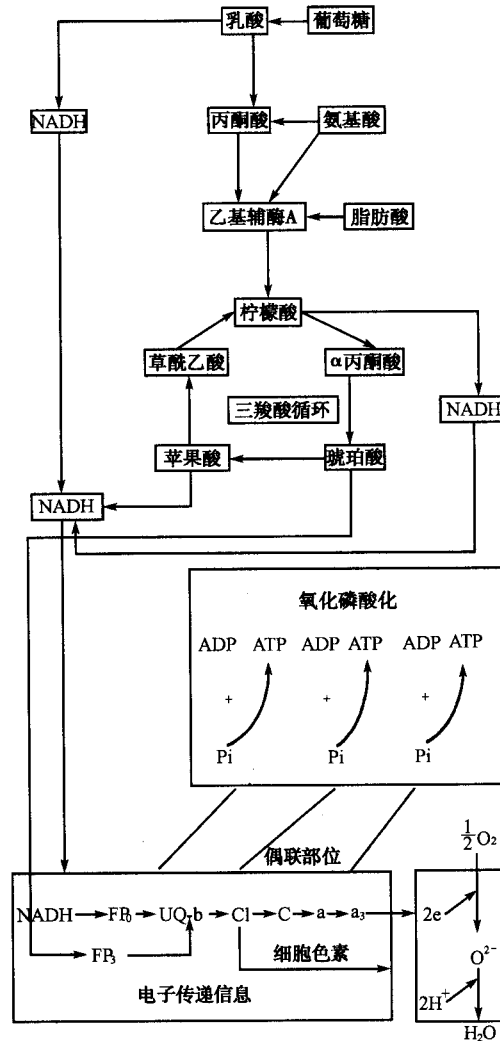


图 1 ETS 及其与三羧酸循环和氧化磷酸化作用的关系

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);  $S$  是终止反应后混合物体积(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(甲簪)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  $75 \text{ kJ/mol}$ ,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  $50.24 \pm 2.09 \text{ kJ/mol}$ <sup>[2]</sup>。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<sup>[2]</sup>:

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

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

体常数( $8.319 \text{ kJ/mol}$ );  $\text{ETS}_s$  为现场温度时的 ETS 活力;  $\text{ETS}_a$  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  $\text{O}_2$  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;  $\text{CHL}$  是叶绿素的浓度;  $\text{ETS}$  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  $\text{CHL}$  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<sup>[1]</sup>。

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<sup>[2]</sup>。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): 1593~1604
- 2 Aristegui, J. & M. F. Montero. *J. Plankton Res.*, 1995, 17(7): 1563~1571