

生物海洋学研究中 ^{15}N 技术的方法与问题

焦念志

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

近 20a, 人们对海洋浮游生物 N 代谢、真光层 N 循环以及各种途径的 N 通量有了比较全面的了解。这在很大程度上取决于 ^{15}N 技术在生物海洋学研究中的应用。不论是 N 的吸收实验与再生实验, 还是营养动力学研究和不同 N 源相互作用研究, 以及解 N 作用和硝化作用, 从室内模拟到现场测定, 从单胞藻生长观测到浮游植物-浮游动物 N 循环试验, 无一不与 ^{15}N 技术有关。特别是海洋学研究领域的一个全新的概念——“新生产力”——也是 ^{15}N 技术的应用产物。这个概念的提出, 又使得 ^{15}N 技术的应用超出了海洋生态系物流研究的范围, 而成为生源要素生物地化循环研究乃至海洋对大气 CO_2 (进而全球气候)调节作用研究中的重要手段。随着 ^{15}N 技术应用的迅速发展, 这项技术本身也得到不断改进和完善。同时, 也提出了一些业已被人们广泛接受的理论、假设和研究结论的修正和再评价问题^[5]。

由于受到种种条件的限制(如: 仪器、设备等), 迄今, 国内尚未进行过生物海洋学 ^{15}N 示踪的专门研究。然而, 随着一些重大的国际性联合研究计划(如: JGOFS<全球海洋通量联合研究>)的实施, 这方面工作的开展势在必行。国外已有的研究成果为我们提供了大量的参考资料, 全面了解国外目前的研究现状和存在问题, 有效地把握关键性技术环节, 是我们迅速赶上国外研究步伐的捷径。本文的目的就在于介绍海洋 ^{15}N 技术的理论与方法, 并着重论述影响方法效果的主要因素。

1 生物海洋学 ^{15}N 技术的理论与方法

海洋生物 ^{15}N 示踪研究的基本思想是, 在介质中引入 ^{15}N 作示踪物, 经过生物的一段代谢活动之后, 检测生物细胞内或介质中 ^{15}N 丰度的变化, 从而指示有关物质的转运过程和数量规模。

Atkins(1969)指出, 理想的示踪物应具备下列基本条件: 第一, 示踪物与非标记物质应经历同样的代谢变化, 即同位素效应可忽略或可定量; 第二, 示踪物对整个体系的状态无明显影响; 第三, 示踪物最初不能与体系达成平衡状态, 其随时间的数量变化是可测的, 且能指示物质的转运过程; 第四, 在标记物与其他物质之间不存在同位素交换。对于海洋 ^{15}N 示踪而言, 第一、四条件基本成立, 但第二、三两条则难以保证。海洋 ^{15}N 示踪通常都是无载体示踪。标记化合物的加入, 不仅起到标记示踪作用, 同时还改变了 N 营养盐的本底浓度, 从而也影响到各种形态 N 之间的平衡; 而培养时间的长短与 N 浓度、 ^{15}N 丰度之间的关系是复杂的。此外, N 的示踪更有其本身的特殊点: 参与代谢、循环的 N 形态有多种(如, NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+ 、尿素、氨基酸等), 它们之间又存在着各种相互作用, 这就使得海洋生物 ^{15}N 示踪技术更趋复杂化。

生物海洋学研究中, 意义最大、应用最多的是真光层浮游生物 ^{15}N 示踪。早期的研究者假设, 浮游生物 ^{15}N 示踪研究中满足下列条件: (1) 浮游生物对 ^{15}N 无分馏作用; (2) 非标记 N 源具有同样的天然丰度; (3) 培养期间 PON(颗粒有机氮)无变化; (4) 培养期间 ^{14}N 吸收对 PON 的贡献可忽略; (5) 培养期间介质 ^{15}N 丰度保持恒定, 即 $^{14}\text{NH}_4^+$ 的再生可忽略; (6) 培养期间无 ^{15}N 再生。后来的研究证明, 大多数假设是难以成立的。

通常, 海洋浮游生物的 ^{15}N 示踪技术包括以下步骤: 封闭一定体积(一般不少于 1L)的水样于培养器内; 加入一定量的 ^{15}N 高丰度化合物(现场实验一般为本底浓度的 10%); 在一定条件下(光照、温度等)培养一段时间; 分离 PON(通常用 Whatman GF/F 在低真空条件下抽滤); 测定 PON 或介质 ^{15}N 丰度; 计算有关参数。一些有代表性的实验条件见表 1。

表 1 生物海洋学¹⁵N 技术中一些有代表性的实验条件

海区	目的	预过滤 (μm)	培养体积 (L)	示踪物及剂量 $\mu\text{mol/L}$	培养时间 (h)	滤膜种类	分析方法	作者
外海	U		12	NO_3^- NH_4^+ 5~20%A	24	F	M	Dugdale <i>et al</i> (1967)
外海	U		4	NO_3^- NH_4^+ ~10%A	6-24	F	M	MacIsaac <i>et al</i> (1972)
外海	U	183	4	NO_3^- NH_4^+ 0.1	24	F	M	Eppley <i>et al</i> (1977)
近岸	U	183	4	NO_3^- NH_4^+ 0.1, 1 0.1	24	F	M	McCarthy <i>et al</i> (1972)
外海	U,R	130, 10	2.5	NH_4^+ 0.05 10%A	4	F	M	Glibert <i>et al</i> (1982)
南极	U,K		1	NO_3^- NH_4^+ 0.3~150	3~5	F	E	Priscu <i>et al</i> (1989)
海湾	U,R	200	1	NO_3^- NH_4^+ 10%A	1.5	C, F	M	Owens <i>et al</i> (1986)
室内	U			NO_3^- NH_4^+ 10	3	C	E	Lund <i>et al</i> (1987)

U,R,K——分别代表吸收、再生、动力学实验；

A——本底浓度；

F,C——分别代表 Whatman GF/F, GF/C；

M,E——分别代表质谱法、发射光谱法。

2 影响¹⁵N 方法效果的因素分析

由于海洋环境中 N 的含量低、时空变化大,不同形态的 N 营养盐同时存在,加之浮游生物的代谢活动(吸收、分泌、捕食、排泄等)随时都会发生变化,使得¹⁵N 技术有许多误差环节。如何控制这些环节,是保证方法效果的关键。下面就若干主要方面予以分析。

2.1 封闭效应

封闭效应又称瓶子效应(bottle effect),即将水样置于瓶内培养过程中,由于水样转移,过滤等操作的刺激和水样封闭后阻止了与外界水体的交换、改变了生物原有的环境条件而导致生理活动的变化所引起的人为性误差。尽量缩短操作时间、减少人为刺激、增大培养体积并在尽可能接近原有生态条件(温度、光照等)下培养可减少这类误差。但在现场实验时,常存在一些实际困难。如,瓶子体积增大,瓶子的数量必然会受到限制。大型围

隔曾被应用过,但却难于普及。

2.2 示踪剂量

无载体示踪的示踪剂量直接关系到结果的真实性。Dugdale 和 Goering(1967)建议用本底浓度的 10% 为标准,但由于大多数情况(特别是大洋环境)下本底浓度很低,这个剂量常常受到仪器检出限的制约,有时不得不加大剂量。对于事先不知道本底浓度的情况常加入 0.1 $\mu\text{mol/L}$ (表层)~1.0 $\mu\text{mol/L}$ (真光层底部),过高的比例必然会导致吸收率的人为误差,对此,Dugdale(1969),Eppley 等(1973)曾用 Michaelis-Menten 动力学方程进行过校正。这的确是一种较好的方法,但在任何情况下都行之有效,有时 N 的吸收并不符合 Michaelis-Menten 方程。

2.3 测定方法

各种形态 N 浓度的分析方法无疑会影响到结果的精密性,Crompton(1989)^[2]给出了有关样品贮存、处理和各种测定方法的评述。示踪技术的测定关键还在于同位

素丰度。报道的测定方法有：质谱法、发射光谱法、红外光谱法、核磁共振法以及层析法等。对于 ^{15}N 来说，应用最多的是质谱法，其次是光谱法，Harrison(1983)^[5]给出了这两种方法的评述。通常，质谱法精密度高，但成本较高；光谱法成本较低而精密度较低，但其进样量少(0.1~10 μg)使其在同位素分析中占有独特的地位。作者认为，在 ^{15}N 富集度较低海洋生物示踪实验中，质谱法能得到更精确的结果，更值推崇。新近我国自行研制的ST-MS88型质谱仪进样量只需以往质谱法的1/3(10 μg)，经我们测试，很适合海洋样品的分析。

2.4 计算公式

迄今， ^{15}N 实验中有关比吸收率(Specificuptakerate)和吸收率(又称转运率;transportrate)的计算公式尚未统一，常见的有下列几种：

$$\rho = \text{PON}_i(a_p - a_0)/(a_d - a_0)T \quad (1)$$

$$\rho = \text{PON}_0((a_p - a_0)/(a_d - a_p)T \quad (2)$$

$$\rho = \text{PON}_i(a_p - a_0)/(a_d - a_p)T \quad (3)$$

$$\rho = \text{PON}_i(a_p - a_0)/a_d T \quad (4)$$

$$\rho = \text{PON}_0(a_p - a_0)/a_d T \quad (5)$$

$$V_i = (a_p - a_0)/(a_d - a_0)T \quad (6)$$

$$V_0 = (a_p - a_0)/(a_d - a_p)T \quad (7)$$

$$V_e = \frac{1}{T} \ln \left(\frac{a_d - a_0}{a_d - a} \right) \quad (8)$$

其中， ρ ——N的吸收率， $\mu\text{mol/L} \cdot \text{h}$ ；

$\text{PON}_0, \text{PON}_i$ ——培养开始时、结束时的PON， μmol ；
 a_0, a_d, a_p —— ^{15}N 的天然丰度、介质中丰度、PON中丰度；
 V_i, V_0, V_e ——分别由(6)，(7)，(8)式求得的比吸收率， $1/t$ ；

T ——培养时间，h。

(1)式由Neess等(1962)提出，曾被Stewart(1967)，MacIsaac等(1979)用过；(2)式由McCarthy(1977)提出，MacIsaac(1985)等人用过；(3)式由Dugdale和Goering(1967)提出，此后许多人都用过此式，如Eppley等(1979)，McCarthy等(1984)等；(4)，(5)式分别是(1)，(2)的简化式，Paasche和Kristiansen(1982)，Fisher等(1981)，Toetz等(1977)都用过这类式子。(6)，(7)式是由(1)，(2)式除去PON而得出的，由于式中少了 PON_0 或

PON_0 的调节，(6)式成为 V 的偏高估计，而(7)式则成为 V 的偏低估计。(8)式由Grunseich等人(1980)提出，它是假设 V 恒定，且在培养过程中每个新产生的细胞都具有与原来细胞同样的 V 而建立的公式，它不受PON变化的影响。MacIsaac等((1985)建议用(8)式或 $V_e = \frac{(V_i + V_0)}{2}$ 作为 V 的无偏估。Collos(1987)^[1]的分析表明，当只有标记化合物一种N源时 V_e, V_i 是 V 的可靠估计，当有未标记N源同时被吸收时，所有 V 的计算公式都有误差。特别是当 V 被用于计算不同N源相对偏好指数(RPI)时，误差被进一步放大了。

对于 ρ 的计算公式，当“1”中假设条件全部成立时(1)~(5)式都是有效的，但(4)，(5)式精度较低；当假设(3)不成立时，只有(1)，(2)式是有效的；当假设(4)不成立时，只有(1)式是有效的；当假设(5)不成立时，则(1)~(5)式全有误差。事实上，早期的假设条件中，只有(1)，(2)是基本成立的，而(6)是必须保证的。

2.5 同位素稀释效应

许多作者(Harrison, 1978; Caperon等, 1979; Sharp等, 1980; Fisher等, 1981; Glibert等, 1982)都证明，不论沿岸还是外海，经常存在着 NH_4^+ 的快速再生，这就使得实验中介质 ^{15}N 丰度被稀释。早期的研究者忽视了这一点(假设(5))，构成了实验数据的重要误差来源，这种误差有时高达两倍。

Blackburn(1979)和Caperon等(1979)提出了同时估计吸收率 ρ 和再生率 r 的线性模型：

$$S_i = S_0 + (r - \rho)T \quad (9)$$

$$r = \frac{\ln(R_i/R_0)}{\ln(S_i/S_0)}(S_0 - S_i)/T \quad (10)$$

其中， S_0, S_i ——实验开始时、结束时介质；

R_0, R_i ——实验开始时、结束时介质 ^{15}N 原子%超；

ρ, r —— NH_4^+ 的吸收率，再生率。

Blackburn-Gaperon模型是建立在介质 NH_4^+ 中 ^{15}N 减量($R_0S_0 - R_iS_i$)基础上的，Glibert等(1982)^[4]指出，当介质 NH_4^+ 浓度较低，在仪器检出限附近时，模型的精确度就很难保证了。他们提出了一个建立在PON ^{15}N 增量 $[\text{PON}(a_i - a_0)]$ 基础上的吸收率计算公式(这里用 μ ，以区别于(9)式中的 ρ)：

$$\mu = \frac{\text{PON}(a_i - a_0)}{\bar{R} \cdot T} \quad (11)$$

$$\text{其中，}\bar{R} = \frac{R_0}{KT}(1 - e^{-KT}) \quad (12)$$

$$K = -\frac{1}{T} \ln(R_i/R_0)$$

$\bar{R}$ ——培养期间介质 NH_4^+ 的平均 ^{15}N 原子百分超。

至于 τ 的求法, 当 $|S_i - S_0| \rightarrow 0$ 时有:

$$\tau = K \bar{S} \quad (13)$$

$\bar{S}$ ——培养期间介质 NH_4^+ 的平均浓度。

Laws(1984)^[6]对 Glibert 等(1982)的 $\bar{R}$ 计算公式提出了批评。指出(12)式在 $\rho < \tau$ 时过高估计了 $\bar{R}$, 在 $\rho > \tau$ 时过低估计了 $\bar{R}$ 。更准确的计算公式是:

$$\bar{R} = (R_0 S_0 - R_i S_i) / \rho T \quad (14)$$

他还证明了 Glibert 等(1982)关于 $|S_i - S_0| \rightarrow 0$ 时

$\ln(S_i/S_0)$ 的极限运算是错误的, 并给出了 $|S_i - S_0| \rightarrow 0$ 情况下的再生率公式:

$$\tau = \frac{\ln(R_0/R_i) S_0}{T} \quad (15)$$

Glibert 等(1985)则坚持认为(12)式是更实用的。作者认为, 在实际研究中, 微量 NH_4^+ 的测定确非易事, 假如对所测 NH_4^+ 浓度数据没有怀疑的话, (9), (10), (14), (15)式是最好的选择, 反之, (12), (13), 式也是有效的替代公式。可以肯定地讲, 不考虑再生的吸收率只能是表观吸收率, 它将随培养时间的增长而降低。而考虑了再生的吸收率是同化率的近似估计。Laws(1985)在他的分析模型中给出了包括 NH_4^+ 以外的其它 N 源净同化率在内的计算公式; 而最为复杂的要算 Lipschultz(1986)的模型了, 它包括 NH_4 , NO_2 , NO_3 , PON 4 个 N 库以及相互间转化的多个参数。

2.6 营养盐耗尽

相对于 $^{15}\text{NH}_4^+$ 实验中的再循环问题, $^{15}\text{NO}_3^-$ 实验中的主要问题是 NO_3^- 耗尽。特别是大洋水域, 真光层中的 N 源主要是 NH_4^+ , NO_3^- 的含量极低, 如果培养时间掌握不好, 很容易导致本底耗尽而产生较大误差, Goldman 等(1981)的研究表明, 由 24h 培养的结果要比 2h 测得的结果小一个数量级。因而, $^{15}\text{NO}_3^-$ 实验中的培养时间, 必须根据吸收线性范围来确定。

2.7 碎屑干扰

非活体 PON 的存在会使所有 V 的计算公式产生负误差:

$$V_{\text{细胞}} = V_{\text{测}} \cdot \frac{\text{PON}_{\text{细胞}} + \text{PON}_{\text{碎屑}}}{\text{PON}_{\text{细胞}}}$$

而 ρ 则不受其影响:

$$\rho_{\text{细胞}} = V_{\text{细胞}} \cdot \text{PON}_{\text{细胞}} = V_{\text{测}} (\text{PON}_{\text{细胞}} + \text{PON}_{\text{碎屑}}) = V_{\text{测}} \cdot \text{PON}_{\text{总}}$$

因而, 遇有有机碎屑含量高的情况(如河口、沿岸区)应以 ρ 为参数进行计算或描述。

2.8 培养时间

与培养时间有关的问题有 5 方面: 其一, $^{14}\text{NH}_4^+$ 再生; 其二, $^{15}\text{NO}_3^-$ 耗尽; 其三, $^{15}\text{NH}_4^+$ 再生; 其四, ^{15}N 测定精密密度; 其五, 营养盐异速吸收。一般地, 培养时间稍长(数小时)就不能忽略 $^{14}\text{NH}_4^+$ 再生造成的 ^{15}N 丰度稀释, 再长就要注意有无本底耗尽, 过长(超过 24h) $^{15}\text{NH}_4^+$ 再生就成问题。早期的研究者为了获得“日吸收率”常常作 24h 培养(表 1), 他们的数据难免有上述 3 方面的问题。但并非培养时间越短越好, 时间太短 PON 中 ^{15}N 富集度太低, 必然造成 ^{15}N 测定上的困难和误差。一般认为 2~6h 的培养时间是比较合理的。异速吸收有两种情况, 即, 在实验开始后数分钟到数小时的快速吸收和迟滞吸收, 前者常见于营养动力学实验, 而后者则出现于饥饿实验。对异速吸收的处理有两类方法: 其一, 通过预培养消除异速期, 或抛掉异速期的数据; 其二, 用时间(分钟)上标加注: 如 V^{0-5} , V^{15-30} 等。

不同时间、不同海区的生物状况和营养条件差异较大, 为获得真实可靠的数据, 应该进行培养时间试验。必顺指出, 直接用 a_p 对时间作图是危险的, 由于 a_p 随 V_i , PON 的变化, 可能导致一个类似趋于饱和的假象。同样, ρ 也不宜作为时间的变量, 而只能用 $V_{\text{测}}$ 或 V_0 。

2.9 非标记 N 的干扰

^{15}N 示踪培养过程中未标记 N 源(如 $^{15}\text{NO}_3^-$ 示踪中的 $^{14}\text{N}-\text{NH}_4$, 氨基酸、尿素等)的同时吸收, 会导致所有 V 的计算误差。Dugdale 等(1986)^[3]给出了 V_0 , V_i 的校正公式, 但其中要求事先知道各种未标记 N 源的 ρ , 这在实际应用中是不易做到的。与其通过校正求得 V , 不如直接用 ρ 作参数, (1)式即是在有非标记 N 源同时吸收情况下 ρ 的一个精确估计。

2.10 ^{15}N 失踪

同位素稀释效应实验的一个额外发现是溶解态 ^{15}N 减量法和颗粒态 ^{15}N 增量法的不一致现象。Glibert 等(1982)^[4]将此归咎于 NH_4^+ 测定的误差, 但他们无法解释所有情况下减量法结果都大大高于增量法的原因。Laws(1984)^[6]的模型改善了计算效果, 但仍然难以解释两者之间高达 30~50% 的差异。Laws 认为, 在可能的 ^{15}N 损失途径(硝化作用, 瓶壁, 粘土颗粒吸附, DON 释出等)中, DON 是最值得怀疑的。然而 Dugdale 等(1986)^[3]对秘鲁上升流区的实验表明, DON 在培养过程中常常不是上升而是下降了, 而此时两种方法的差异仍达 34%。Laws 等(1985)在夏威夷附近的实验中发现, 异养微生物的 NH_4^+ 吸收竟占 NH_4^+ 吸收总量的 50~75%, 而这些微小 PON 在过滤(特别是使用 Whatman GF/C 时)过程中有相当部分被漏掉了。尽管到目前为止尚未有人得出明确结论, 但作者认为, 超微型异养生物的吸收很可能就

是两种方法差异的主要原因之一,新近关于 NH_4^+ 异养吸收的研究结果^[7]就是很好的佐证。

参考文献

- [1] Collos, Y. , 1987. Calculations of ^{15}N Uptake rates by phytoplankton assimilating one or several nitrogen sources. *Appl. Radiat. Isot.* **38** (4):275-282.
- [2] Crompton, T. R. , 1989. Analysis of Seawater. *Butterworths*. 20-53.
- [3] Dugdale, R. C. & F. P. Wilkerson, 1986. The use of ^{15}N to measure nitrogen uptake in eutrophic Oceans; experimental consideration. *Limnol. Oceanogr.* **31** (4):673-689.
- [4] Glibert, P. M. , F. Lipschultz, J. J. McCarthy & M. A. Altabet, 1982. Isotope dilution models of uptake and remineralization of ammonium by marine plankton. *Limnol. , Oceanogr.* **27**(4):639-650.
- [5] Harrison, W. G. , 1983. Use of isotope, In: Nitrogen in the Marine Environment, ed. E. J. Carpenter & D. G. Capone. Academic Press Inc, 763-807.
- [6] Laws, E. , 1984. Isotope dilution models and mystery of the vanishing ^{15}N . *Limnol. Oceanogr.* **29** (2):379-386.
- [7] Tvpas, L. & I. Koike, 1990. Amino acid and ammonium utilization by heterotrophic marine bacteria grown in enriched seawater. *Limnol. Oceanogr.* **35** (5):1 145-1 155.