

放射性同位素技术在鸟类能量学上的应用——双标记水方法简介

张 正 旺

(北京师范大学生物系)

鸟类能量学是近年来鸟类生态学研究中日益引人注目的一个领域，是研究鸟类能量代谢的科学。传统的研究方法是把实验鸟放进一个密闭的环境中，通过测定耗氧量来研究其能量代谢。随着对生态系统研究的日益深入，对生活在自然条件下的鸟类能量代谢的研究成为受到重视的课题。许多人采用不同的研究方法讨论了自由生活鸟类能的支出 (daily energy expenditure)。其中近年来最为常用的两种方法是时间-能量预算法 (time-energy budget method) 和双标记水法 (doubly labeled water method)。

(一) 时间-能量预算法简称 TB 法 其原理是将鸟类的活动分为睡眠、飞行和非飞行活动三类或更多的类别，仔细地观察并记录实验鸟一天中各类活动的时间，通过实验室的方法得出鸟类各类活动的能量当量值 (energy equivalents)，然后再根据一定的 TB 模型估算出实验鸟的日能支出。自从奥里恩斯 (Orians) 1961 年第一次在鸟类能量学研究中使用 TB 法以来，应用这种方法研究的现已超过四十个。

TB 法原理简单，使用方便，所需要的仪器设备也较少，因此得到了广泛的应用。但是近年来的研究表明，TB 法常常出现一定范围的

误差。误差的来源主要是两个方面：一是鸟类活动的类别不可能分得很细，因此只能将一些能耗不同的活动归入到同一个类别之中，例如将行走、跳跃、觅食、鸣叫以及炫耀、营巢、育雏等一系列能耗不同的活动统统归并到非飞行活动中，这必然导致产生较大的误差；二是实验室的温度、湿度、光照等条件与野外显然不同，把从实验室中得到的数据用于估算自由生活在野外的鸟类的能量代谢也会导致较大误差的产生。韦瑟斯 (Weathers)^[12-13] 等人对不同的 TB 模型进行检验的结果表明，有些 TB 模型的日能支出的估计值的误差高达 20—40%。因此，在鸟类能量学的研究中迫切需要一种准确地测定能量代谢水平的方法，双标记水法由此而受到人们的重视。

(二) 双标记水法简称 DLW 法 此法是利夫森 (Lifson)^[15,6] 等人在 1955 年提出的。他们在研究鼠类代谢时发现，动物呼吸产生的二氧化碳中的氧元素与动物体水 (body water) 中的氧元素能达到同位素平衡 (isotopic equilibrium)。在这个事实的基础上，他们提出了用放射性同位素测定动物能量代谢的方法，即双标记水法。双标记水法的基本原理是用氢、氧两种元素的稳定性同位素 (^2H 或 ^3H 和 ^{18}O) 对动物的体水进行双重标记，在特定的时间周期内抽取体水样品，确定其中的同位素含量，算出前后两次抽样之间 ^2H 或 ^3H 与 ^{18}O 两种同位素的周转率 (turnover rate)。因为氢元素只以水的形式排出体外，而氧元素既以水的形式又以二氧化碳的形式从体内排出，因此 ^{18}O 的周转率肯定比 ^2H 或 ^3H 大，两者周转率的差值与二氧化碳的产生量相当，而二氧化碳的产生量又反映着能量代谢的水平，所以通过 ^{18}O 或 ^2H 与 ^3H 的周转率就可以计算出动物的能量支出。

利夫森等人给出了双标记水法的计算公式。

假设：

K_* 是某种同位素的周转率。

S_* 是该种同位素在样品中的特异性活性。

Δt 是前后两次取样的时间间隔。

则该种同位素的周转率可以通过前后两次取样的样品中同位素活性的改变量求得，即存在着如下关系式：

$$K_* = \Delta \ln S_* / \Delta t$$

假设：

N 为动物的总体水量。

K_D 为体水中 ^2H 或 ^3H 的周转率。

K_{O*} 为体水中 ^{18}O 的周转率。

则二氧化碳的生成率可由下式求得：

$$r\text{CO}_2 = N/2(K_{O*} - K_D)$$

内奇 (Nagy)^[17-21] 在利夫森等人工作的基础上，通过大量的实验工作，改进并发展了双标记水技术。1983 年，他出版了《双标记水法：使用指南》(The doubly labeled water (^3H ^{18}O) method: a guide to its use) 一书，对双标记水法进行了全面系统的总结。内奇对利夫森等人的计算公式也做了适当的修改，得出了更为实用的计算公式。

内奇的计算公式为：

$$K_{O*} = \frac{\ln(S^{18}\text{O}_i - S^{18}\text{O}_n) - \ln(S^{18}\text{O}_f - S^{18}\text{O}_n)}{\Delta t}$$

$$K_D = \frac{\ln(SD_i - SD_n) - \ln(SD_f - SD_n)}{\Delta t}$$

$$r\text{CO}_2 = \bar{N}/2.08(K_{O*} - K_D) - 0.015K_D\bar{N}$$

其中

K_{O*} , K_D 分别是 ^{18}O 和 ^2H 或 ^3H 每小时的周转率。

$S^{18}\text{O}_i$, SD_i 分别是初始血样中 ^{18}O , ^2H 或 ^3H 的浓度 (ppm)。

$S^{18}\text{O}_f$, SD_f 分别是最终血样中 ^{18}O , ^2H 或 ^3H 的浓度。

$S^{18}\text{O}_n$, SD_n 分别是血液中自然存在的 ^{18}O , ^2H 或 ^3H 的浓度。

Δt 为初始取样到最终取样之间的时间间隔 (hour)。

\bar{N} 为总体水量 (mM)。

假设：

W 为动物的体重 (克)。

P 为水分占身体重量的百分率。

则可由下式求得:

$$\bar{N} = (W \cdot P) / 0.018$$

双标记水技术的实际操作由以下几部分组成:

1. 注射双标记水 将含有一定放射性浓度²H或³H和¹⁸O的水分用微量注射器注射到实验鸟的胸肌中。然后将实验鸟释放,令其自由活动。

2. 抽取血样 注射双标记水后经过1个小时的平衡,从鸟体静脉中抽取一定量(一般为0.10ml)的血液样品,放入经过肝素化处理的微量血球容量计(microhematocrit)的玻璃管中。将鸟释放,令其自由活动。24小时后第二次抽取血样。

3. 体水样品的制备 血样经微量蒸馏(micro-distilled)后便可获得纯净的体水样品。

4. 同位素含量的测定 利用贝克曼 LS230 液体闪烁计数器(Beckman LS230 liquid scintillation counter)进行³H或³H活性的测定。¹⁸O的含量通过使用帕克-伽玛-旋转计数系统(Packard-Gamma-Rotomatic counting system)测量由¹⁸O到¹⁸F过程中回旋加速器中所产生的质子的活性和伽玛射线的强度来获得。

5. 利用内奇公式计算二氧化碳的生成率,然后再根据实验鸟的呼吸熵估算出该鸟的日能支出。

双标记水法能够准确地测量自由生活的鸟类的能量支出。威廉斯(Williams)^[14-15]和内奇将家鸽、家燕和一种雀类用双标记水法估算得到的二氧化碳产量与直接测量的结果进行了比较,发现双标记水法的平均误差只有3—7%,从而证实了双标记水法测量能量代谢的有效性。著名鸟类学家金(King)指出,双标记水法是适用于测量自由生活鸟类能量代谢的一种最准确的方法。正是由于这个特点,双标水技术在鸟类能量学研究中得到了日益广泛的应用。

首次将双标记水技术引进到鸟类能量学研究领域的是美国鸟类学家尤金·A·利菲弗(Eugene A. Lefebver)^[14]。1964年,他以家鸽

为对象,运用双标记水法研究家鸽静止时和飞行时的能量支出。他将用双标记水法确定的二氧化碳产量与用常规的直接测量的方法得到的结果进行了比较,发现双标记水法获得的结果误差只有 $8 \pm 2\%$ (Mean \pm SE)。此外,他用双标记水法得出的结论“普通家鸽和信鸽飞行时能量支出大约是静止时能量支出的八倍”,同从其他动物研究中得到的结论一致。这些结果说明了双标记水法,可以应用于鸟类能量代谢的研究中。由此,利菲弗倡议在鸟类能量学研究中广泛地应用双标记水法这一先进技术。

利用双标记水法来检验TB法的准确性及其产生误差的原因,是双标记水法应用的一个重要方面。韦瑟斯和内奇1980年同时应用双标记水法和TB法来研究丝亮鹌的日能支出,结果发现双标记水法测得的日能支出是79.1千卡/天,而TB法的估算值为48.1千卡/天,TB法的估算值比双标记水法的结果几乎低40%。造成这种误差的原因是TB法的鸟类活动能耗是以实验室所确定的代谢率为基础进行估算的,未能将太阳辐射等气候学因素的影响考虑在内。1984年,韦瑟斯等人又以笼养的伯劳鸟为研究对象,将用双标记水法所获得的日能支出值与用几个TB模型估算的结果进行比较,以检验这几个模型的准确性。结果发现,只有一种对流调节电模拟模型(convective adjusted electrical analog model)的估算值与双标记水法所获得的结果相似。这个模型的准确性来自考虑了太阳辐射等气候学因素。其余几种TB模型的估算值误差高达18—21%。

利用双标记水技术研究鸟类的日能支出,是双标记水技术应用的另一个重要方面。厄特(Utter)^[11]和利菲弗对家燕在繁殖期的日能支出进行过专门的讨论。布莱恩特(Bryant)^[13]和维斯特普(Westerterp)利用双标记水法分析了影响繁殖期家燕能量支出的因素。通过对79只鸟的分析得出结论:平均日能代谢率(average daily energy)与环境条件、时间-活动预算(time-activity budget)及成鸟所处的繁殖阶段有关;繁殖期占区雄鸟的日能支出最低

($2.44 \times \text{BMR}^{1)}$), 而育雏的成鸟日能支出最高 ($3.59 \times \text{BMR}$); 带有幼雏的成鸟的能量支出是繁殖期其它阶段该鸟能量支出的两倍。威廉斯和内奇 1985 年测定了稀树[美洲]草鸮育雏雌鸟的日能支出。他们通过双标记水技术获得的结果是: 抚育 2 只雏鸟与抚育 3 只雏鸟的雌鸟在能量支出上无明显差异, 雌鸟的日能支出的平均值为 67.7 ± 7.5 千卡/天。

生活于热带地区的鸟类的繁殖率一般都较温带鸟类低。有两种不同的观点对这种现象进行了解释。一种观点认为, 低的繁殖率是不良环境的产物。不良环境包括短暂的白昼、剧烈的捕食和竞争、食物的缺乏等等。另一种观点则认为, 低的繁殖率反映了与存活率相关的繁殖支出的最优化。布莱恩特和他的同事们 1984 年在马来西亚利用双标记水法测定了洋燕和蓝喉蜂虎这两种热带鸟繁殖期的日能支出。他们测得繁殖期洋燕的日能支出为 79.7 千卡/天, 蓝喉蜂虎为 77.4 千卡/天。这个结果比温带地区空中取食的食虫鸟的日能支出少, 从而支持了“热带鸟类低的繁殖率反映了与存活率相关的能量支出的最优化的”点。

斑嘴环企鹅是一种生活在南非海岸以鲱鱼为食的鸟类, 其数量 50 年代以来曾几度减少。据分析, 造成企鹅数量下降的主要原因是污染和捕鱼业的影响。内奇等人 1984 年利用双标记水技术测定了这种企鹅的代谢率, 并在此基础上对企鹅的食物消耗量进行了估算。结果表明, 1 只成体企鹅每年需捕食大约 138 千卡的鱼, 生活在南非沿岸的 160,000 只企鹅每年将捕食 2.21×10^6 千卡的鱼, 其中 80% 即 1.77 $\times 10^6$ 千卡是鲱鱼, 相当于这个地区鲱鱼商业捕获量的 7.7%。这个结果揭示了捕鱼业与企鹅取食之间竞争的定量关系。

雏鸟的能量学研究, 过去一般以标准代谢率为基础, 而用标准代谢率来计算鸟类自由活动时的能量代谢明显地会产生误差; 根据雏鸟的取食量和排泄量来讨论雏鸟的能量支出, 由于野外测量方面的困难是不可行的。肯特(Kent)^[3]和康登(Condon) 1983 年首次将双

标记水技术, 应用于红翅黑鹇雏鸟的能量学研究中并获得了成功。红翅黑鹇雏鸟两性体型二型(sexual size dimorphism)的现象十分显著, 到雏鸟离巢时, 雄雏鸟的体重大约比雌雏鸟重 1/3。这种两性体型大小的差异, 被认为与亲鸟所满足的雏鸟总的能量需求的差异相联系。肯特和康登的研究结果表明, 雄、雌雏鸟在代谢率上的差别不显著, 而在总能量预算上则存在着十分显著的差异。对于雄雏鸟来说, 19% 的能量用于生长, 81% 的能量用于维持正常的生命活动; 而雌雏鸟将总能量的 17% 用于生长, 83% 用于维持正常的生命活动。刚从蛋中孵出到雏鸟离巢的整个阶段中, 雄雏鸟总的同化能为 1014 千卡, 雌雏鸟为 797 千卡。这说明红翅黑鹇雏鸟两性在总能量预算上的差异是雏鸟体型差异的基础。肯特和康登由此推论, 对于亲鸟来说, 抚育雄雏鸟比雌雏鸟所消耗的能量更多。

目前, 随着同位素测定技术的发展与进步, 双标记水法已逐渐为鸟类学工作者所接受, 越来越多的鸟类能量学研究应用了这种先进的技术方法。

参 考 文 献

- [1] Bryant, D. M. et al. 1984 Reproductive energetics of two tropical bird species. *Auk*: 101: 25—37.
- [2] Goidstein, D. L. & K. A. Nagy 1985 Resources utilization by desert quails: time and energy, food and water. *Ecology* 66: 378—387.
- [3] Kent, L. F. & J. D. Condon 1983 Energetic consequences of sexual size dimorphism in nestling red-winged blackbirds. *Ecology* 64: 642—647.
- [4] Lefebvre, E. A. 1964 The use of D_2O^{18} for measuring energy metabolism in *Columba livia* at rest and in flight. *Auk* 81: 403—416.
- [5] Lifson, N. et al. 1955 Measurement of total carbon dioxide production by D_2O^{18} . *J. Appl. Physiol.* 7: 704—710.
- [6] Lifson, N. & R. McClintock 1966 Theory and use of turnover rates of body water for measuring energy and material balance. *J. Theor. Biol.* 12: 46—74.
- [7] Nagy, K. A. 1980 CO_2 production in animals: analysis of potential error in doubly labeled water method. *Amer. J. Physiol.* 238: R466—R473.
- [8] Nagy, K. A. 1983 The doubly labeled water me-

1) BMR = Basal Metabolism Rate.

- thod ($^3\text{HH}^{18}\text{O}$): a guide to its use. Publication 12—1417, University of California at Los Angeles, Los Angeles, California, USA.
- [9] Nagy, K. A. et al. 1984 Energy utilization by free-ranging Jackass penguins. *Ecology* 65: 1648—1655.
- [10] Paynter, R. A. 1974 Avian energetics. 4-85. Nuttall Ornithological Club, Cambridge, Massachusetts, USA.
- [11] Utter, J. M. & E. A. Lefebver 1973 Daily energy expenditure of purple martin (*Progne subis*) during the breeding season: estimates using D_2O^{18} and time budget methods. *Ecology* 54: 597—604.
- [12] Weathers, W. W. & K. A. Nagy 1980 Simultaneous doubly labeled water ($^3\text{HH}^{18}\text{O}$) and time-budget estimates of daily energy expenditure in *Phainopepla nitens*. *Auk* 97: 861—867.
- [13] Weathers, W. W. et al. 1984 An evaluation of time-budget estimates of daily energy expenditure in birds. *Auk* 101: 459—471.
- [14] Williams, J. B. & K. A. Nagy 1984 Daily energy expenditure of Savannah sparrows: comparison of time-energy budget and doubly-labeled water estimates. *Auk* 101: 221—229.
- [15] Williams, J. B. & K. A. Nagy 1985 Daily energy expenditure by female Savannah sparrows feeding nestlings. *Auk* 102: 187—190.