

分子氢和氧对受高温胁迫蓝藻固氮活性的影响*

陈 因 方大惟

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海 200032)

提 要

蓝藻 *Anabaena* 7120 经高温处理后,固氮活性下降,对氧的敏感度增大,增大程度随氧浓度增高而递增。高温胁迫下,分子氢与对正常条件下生长的蓝藻一样可以削弱或消除氧对固氮的伤害,氢的此种行为在光照下和黑暗中表现相似,其良好作用比正常生长蓝藻显著,添加光合抑制剂、 CO_2 或 N_2 时亦如此。有外源蔗糖时,氢的良好作用不表现。经 CO 或 C_2H_2 处理的蓝藻,氢在其固氮活性受氧伤害时的良好作用消失。

关键词 鱼腥藻,高温胁迫,固氮活性,分子氢和氧,生理条件

前文揭示,蓝藻经高温处理后,其固氮活性受到削弱,去铵阻抑速率明显减慢,固氮特性也发生一系列变化(如固氮对氧和高低 pH 环境的敏感度增高,氢支持固氮和 CO 抑制固氮的程度增大……等)^[1-3]。这显示高温既阻抑细胞合成固氮酶及某些固氮基因产物^[4],又会通过影响包括固氮特性在内的种种生理生化过程间接制约固氮。因而从研究蓝藻固氮的调节机制和提高固氮效率(特别是在逆境胁迫下)来说,开展高温等逆境因素胁迫下蓝藻固氮的氧敏感性,以及分子氢在保护固氮酶活免受氧伤害和支持固氮中的作用及其生理基础的研究,是有意义的。

1 材料和方法

蓝藻 *Anabaena* 7120 按前文方法^[5]培养和收集。收集藻龄为 5—7d 的藻体以营养液悬浮后,放到原来的光、温条件下继续强化培养 24h,实验时转放到 10ml 的血清瓶中,根据实验方案和前文方法^[2]分别于不同高温水浴中处理,以不作高温处理的为对照。固氮活性和其它指标测定均按前文方法^[2-3]进行。

2 实验结果

2.1 高温胁迫下蓝藻固氮的氧敏感性

高温胁迫下的蓝藻固氮活性对氧极不稳定。表 1 结果揭示:(1)蓝藻经高温处理后,其固氮活性受到氧伤害的程度明显高于正常条件下生长的蓝藻,温度愈高,两者差异愈大,这和王业勤报道高温增加蓝藻固氮对氧敏感性的结果^[1]是一致的。(2)处理温度相对增高时,即使是处理时间缩短,氧对固氮活性的抑制并不减小,且有些增大。

* 国家自然科学基金资助课题。

1992 年 9 月 21 日收到;1993 年 12 月 15 日修回。

表 1 不同浓度氧对受高温伤害蓝藻固氮活性的影响

Tab. 1 Effect of various oxygen concentration on nitrogenase activity of *Anabaena* stressed by high temperature

处 理 Treatment ℃秒 (S)	氧浓度(%) Concentration of oxygen (%)	固氮活性 Nitrogenase activity n mol C ₂ H ₄ h ⁻¹ ml ⁻¹ 藻液 n mol C ₂ H ₄ h ⁻¹ ml ⁻¹ algal suspension	%
未处理 Not treated	0	202.3	100.0
	10	183.2	90.4
	20	130.2	64.2
	30	50.2	24.8
50 30	0	130.2	64.3
	10	105.2	51.9
	20	84.2	41.6
	30	23.2	11.5
60 20	0	112.0	55.6
	10	31.6	10.7
	20	11.6	5.7
	30	4.4	2.2

2.2 高温胁迫下分子氢对氧伤害蓝藻固氮活性的保护

通常分子对氢受氧伤害的蓝藻固氮活性有保护作用,对受高温胁迫的蓝藻亦是如此。从表 2 可见,在不同氧分压下,同时加入分子氢,受高温胁迫的蓝藻固氮活性相对增长率高于正常生长的蓝藻,氧分压高者,氢的良好作用大些,且比受 NaCl 胁迫的蓝藻大^[8]。

表 2 分子氢存在时氧对受高温伤害蓝藻固氮活性的影响

Tab. 2 Effect of oxygen on nitrogenase activity of *Anabaena* stressed by high temperature in presence of molecular hydrogen

处 理 Treatment	氧浓度(%) Concentration of oxygen (%)	氢浓度(%) Concentration of hydrogen (%)	固氮活性 Nitrogenase activity (为对照的% of control)
未处理 Not treated	0	0	100.0
	10	0	79.7
	10	20	84.8
	20	0	68.5
	20	20	77.3
	30	0	42.1
	30	20	61.7
	30	20	61.7
处理(50℃,30 秒) Treated (50℃,30s)	0	0	100.0
	10	0	76.4
	10	20	93.6
	20	0	60.2
	20	20	97.8
	30	0	27.6
	30	20	100.4
	30	20	100.4

2.3 制约分子氢对蓝藻固氮护氧效用的几个生理因素

2.3.1 光、暗条件下的比较 黑暗中分子氢对高温胁迫下蓝藻固氮活性受氧伤害时亦有良好作用,其行为和光照下相似,效用比正常生长的蓝藻大些(表 3)。

表 3 光和暗中分子氢对高温胁迫下受氧伤害蓝藻固氮活性的保护作用比较
Tab. 3 Comparison of protection of nitrogenase activity by molecular hydrogen against O₂-inactivation in *Anabaena* stressed by high temperature under light or dark conditions

处 理 Treatment	加(+)或不加(-) 氧(20%) Added (+) or not added (-) O ₂ (20%)	加(+)或不加(-) 氢(20%) Added (+) or not added (-) H ₂ (20%)	固氮活性 Nitrogenase activity (为对照的% of control)	
			光 light	暗 dark
未处理	—	—	100.0	100.0
Not treated	+	+	67.3	76.6
	+	+	97.1	104.1
处理(50℃,30 秒)	—	—	100.0	100.0
Treated(50℃,30s)	+	+	55.3	44.4
	+	+	137.5	138.8

2.3.2 抑制剂的影响 在光合代谢受到抑制,以致能量和还原剂供应匮乏时,分子氢支持蓝藻固氮更明显^[9],在高温胁迫下亦是这样,其良好效用显著比正常蓝藻大(表 4)。

表 4 高温胁迫下添加光合抑制剂时分子氢对受氧伤害蓝藻固氮活性的保护作用
Tab. 4 Protection of nitrogenase activity of *Anabaena* by molecular hydrogen from damage by oxygen in presence of photosynthetic inhibitors under stress of high temperature

抑制剂 Inhibitor (1 × 10mol L ⁻¹)	加(+)或不加(-) 氧(20%) Added (+) or not added (-) O ₂ (20%)	加(+)或不加(-) 氢(20%) Added (+) or not added (-) H ₂ (20%)	固氮活性 Nitrogenase activity (为对照的 % of control)	
			未处理 Not treated	处理(50℃,30 秒) Treated (50℃ 30s)
不加 None	—	—	100.0	100.0
	+	—	66.6	40.6
	+	+	98.1	123.5
DNP	+	—	47.3	18.0
CCCP	+	—	40.8	13.1
DNP	+	+	86.0	116.0
CCCP	+	+	80.0	110.7

2.3.3 外源蔗糖的效应 作为还原剂库源的蔗糖,在一定程度上能削弱高温胁迫下氧对蓝藻固氮的伤害,但此时氢的良好作用则未表现(表 5)。

2.3.4 CO₂ 和 N₂ 的作用 CO₂ 和 N₂ 加剧氧对蓝藻固氮的抑制,氢对两者的抑制有缓和作用。高温胁迫下,此种缓和作用则明显一些(表 6)。

2.4 高温胁迫下氢对蓝藻固氮的护氧作用与氢酶的关系

表 5 高温胁迫下有蔗糖存在时分子氢对受氧伤害蓝藻固氮活性的影响

Tab. 5 Effect of molecular hydrogen on nitrogenase activity of *Anabaena* injured by oxygen in presence of external sucrose under stress of high temperature

加(+)或不加(-) 蔗糖(0.5%) Added (+) or not added (-) sucrose (0.5%)	加(+)或不加(-) 氧(20%) Added (+) or not added (-) O ₂ (20%)	加(+)或不加(-) 氢(20%) Added (+) or not added (-) H ₂ (20%)	固氮活性 Nitrogenase activity (为对照的% of control)	
			未处理 Not treated	处理(50℃, 30 秒) Treated(50℃, 30s)
-	-	-	100.0	100.0
-	+	-	72.3	59.3
-	+	+	99.6	129.8
+	-	-	103.2	106.8
+	+	-	77.8	62.6
+	+	+	97.7	127.3

表 6 高温胁迫下 CO₂ 和 N₂ 存在时分子氢对受氧伤害蓝藻固氮活性的影响

Tab. 6 Effect of molecular hydrogen on nitrogenase activity of *Anabaena* injured by oxygen in presence of CO₂ and N₂ under stress of high temperature

加(+)或不加(-) CO ₂ (5%) Added (+) or not added (-) CO ₂ (5%)	加(+)或不加(-) N ₂ (20%) Added (+) or not added (-) N ₂ (20%)	加(+)或不加(-) 氧(20%) Added (+) or not added (-) O ₂ (20%)	加(+)或不加(-) 氢(20%) Added (+) or not added (-) H ₂ (20%)	固氮活性 Nitrogenase activity (为对照的% of control)	
				未处理 Not treated	处理(50℃, 30 秒) Treated(50℃, 30s)
-	-	-	-	100.0	100.0
-	-	+	-	75.0	56.9
-	-	+	+	88.9	110.8
+	-	+	-	52.3	54.7
+	-	+	+	60.0	76.7
-	+	+	-	55.5	56.0
-	+	+	+	63.8	82.5
+	+	+	-	37.5	49.7
+	+	+	+	43.4	74.7

将蓝藻放到抑制氢酶活动^[6,9,10]的 60—70 % 的 C₂H₂ 或 CO¹⁾ 中进行暗保温 1h 后,分子氢对蓝藻固氮活性受氧伤害时的良好效应消失,对高温胁迫下的蓝藻更明显些(表 7)。这显示高温胁迫下氢对蓝藻固氮活性受氧伤害时的有益作用和氢酶活动有联系。

3 讨论

蓝藻固氮效率和吸氢能力的高低受其所处外界条件和内在的固氮活力大小两方面的制约^[11,12]。前文曾揭示,受高温胁迫的蓝藻固氮,吸氢和放氢活性都减弱^[2,13]。本实验进一步表明,高温胁迫蓝藻固氮活性的同时,还削弱其对氧等不良环境因素的稳定性。这既和 Kliugkist^[14] 等关于合适的 pH 值和氧分压下,棕色固氮菌固氮活性高,其受 NH₄⁺ 抑制的程度小,反之则大的结果相一致,显示固氮酶活性大小和其抵御不良因素侵袭能力高低的一致性。同时还启示我们,研究逆境或不良环境下蓝藻固氮效率时,应把固氮机制及

1) 测定结果在表 7 中未列出。

表 7 高温胁迫下分子氢和氧对经乙炔预处理蓝藻固氮活性的影响
Tab. 7 Effect of molecular hydrogen and oxygen on nitrogenase activity in *Anabaena* preincubated in acetylene under stress of high temperature

处 理 Treatment	固氮活性 Nitrogenase activity (为对照的% of control)	
	未处理 Not treated	处理(50℃,30 秒) Treated(50℃,30s)
未经乙炔预保温 No preincubated in acetylene		
不加物 Not added	100.0	100.0
加氧(20%) Added O ₂ (20%)	83.3	57.3
加氢(20%)和氧(20%) Added H ₂ (20%) and O ₂ (20%)	96.4	132.1
经乙炔预保温 Preincubated in acetylene		
不加物 Not added	100.0	100.0
加氧(20%) Added O ₂ (20%)	75.8	44.1
加氢(20%)和氧(20%) Added H ₂ (20%) and O ₂ (20%)	80.5	50.8

其调节与固氮特性、以及蓝藻本身固氮酶活性一并加以考虑。

各种逆境因素胁迫蓝藻固氮的效应不尽完全相同。作者曾经观察到，在氯化钠胁迫下，分子氢对受氧伤害的蓝藻固氮也有良好作用，但在同一浓度的氢和氧下，其增益效应^[8]远不如本实验揭示的高温胁迫下大。前者的氢效应和正常条件下生长的蓝藻相仿，而后者则有随氧浓度增加而递增的趋势，显示两者在具体机制上可能有异，值得研究。

高温胁迫不仅影响蓝藻的固氮活性，而且还使固氮特性发生变化。Pederson^[15] 对此曾观察到两点：(1)在 40℃ 和 48℃ 高温下，柱胞鱼腥藻和 *Mastigocladus laminosus* 的固氮活性急剧下降，加氢的空气中亦是如此；(2) 温度升高时，氢有护氧作用，即作为氢利用途径之一的羟化反应对固氮有利。本实验结果也显示，除了外源蔗糖之外，在一般情况下，或是添加光合抑制剂以及有固氮的天然基质 N₂ 和固碳基质 CO₂ 存在时，分子氢对蓝藻固氮活性受氧伤害时的保护作用，都表现出高温胁迫下比正常蓝藻大的特点。高温胁迫下的固氮活性的此种起伏变化和前文所揭示的高温下吸氢变化规律^[13]相呼应，并说明分子氢的作用大小也是受生理条件制约的。

高温胁迫下分子氢支持蓝藻固氮有两方面的意义：(1) 生态学，作为自然界中氮素循环的参与者之一的蓝藻，在高温一类逆境条件下利用分子氢削弱或消除氧对其固氮活性的伤害，可能是其适应复杂多变的自然条件的一种方式，所以即使在千变万化的环境中，它也能对土壤肥力的保护和在维持自然界氮素平衡中发挥作用；(2) 农业应用，采用一些技术措施，改善蓝藻(在广义上还包括其它固氮生物)固氮和氢代谢所需的生理环境，合理调节其间的关系，以期在逆境条件下最大限度地发挥蓝藻的肥效是重要的。

参 考 文 献

[1] 王业勤等. 在光暗及高温下氧与鱼腥藻 *Anabaena* 7120 固氮的关系,水生生物学报,1987. **11**: 247—254。
[2] 陈 因,方大惟. 短时间高温对蓝藻 *Anabaena* 7120 固氮酶活性的影响.核农学报, 1990. **4**: 219—224。
[3] 陈 因,方大惟. 受短期高温伤害的蓝藻 *Anabaena* 7120 固氮活性恢复过程中的去铵阻抑. 植物生理学通

- 讯, 1992. **28**: 107—110。
- [4] Hennecke H, Shamugan K. T. Temperature control of nitrogen fixation in *Klebsiella pucumonica*. *Arch. Microbiol.* 1979. **123**: 259—265.
- [5] 陈 因, 方大惟. 蓝藻 *Anabaena* 7120 固氮的光调节. 植物生理学报, 1983. **9**: 51—59。
- [6] 陈 因, 方大惟. 分子氢支持蓝藻 *Anabaena* 7120 固氮的生理基础研究. 植物生理学报, 1983. **9**: 413—420。
- [7] Bothe H, Distler E, Eisbrenner G. Hydrogen metabolism in bluegreen algae. *Biochimie*, 1978. **63**: 277—289.
- [8] 陈 因, 方大惟. 氯化钠胁迫下蓝藻 *Anabaena* 7120 固氮对氧的敏感性和氢的保护作用. 核农学报. 1993. **7**: 237—242。
- [9] 陈 因, 方大惟. 分子氢在鱼腥藻 *Anabaena* 7120 固氮活性受氧损伤时的保护作用. 植物生理学报, 1983. **9**: 183—192。
- [10] 陈 因, 方大惟. 不同固氮条件下蓝藻固氮酶活性的研究. 植物生理学通讯. 1984. (2): 20—23。
- [11] 陈 因, 方大惟. 蓝藻 *Anabaena* 7120 的固氮活力及其和光合作用的关系. 植物生理学报, 1986. **12**: 351—361。
- [12] 陈 因, 方大惟. 蓝藻 *Anabaena* 7120 吸氢及其和固氮活力之间的关系. 植物生理学通讯, 1986. (5): 28—30。
- [13] 陈 因, 方大惟. 经短期高温处理的蓝藻 *Anabaena* 7120 的吸氢. 植物生理学通讯. 1991. **27**: 178—180。
- [14] Kligkist J, Huub Haker. Inhibition of light on nitrogenase activity by ammonium chloride in *Azotobacter vinelandii*. *Jour. Bacteriol.* 1984. **157**: 148—151.
- [15] Pederson D. M, Daday A, Smith G. D. The use of nickel to probe the role of hydrogen metabolism in cyanobacterial nitrogen fixation. *Biochimie*. 1986. **68**: 113—120.

EFFECT OF MOLECULAR HYDROGEN AND OXYGEN ON NITROGENASE ACTIVITY OF BLUE-GREEN ALGAE *ANABAENA* 7120 DRIVEN BY STRESS OF HIGH TEMPERATURE

Chen Yin and Fang Dawei

(Shanghai Institute of Plant Physiology, The Chinese Academy of Sciences, 200032)

Abstract

In this paper we found that: 1. The nitrogenase activity of *Anabaena* 7120 decreased and was more sensitive to oxygen, when treated at high temperature for a short time. 2. The O_2 -sensitivity of nitrogenase activity of *Anabaena* driven by stress of high temperature was increased with the increase of O_2 -concentration in test system. 3. Molecular hydrogen could protect nitrogenase activity from damage by oxygen in *Anabaena* injured by high temperature. 4. The protection of nitrogenase activity by molecular hydrogen against O_2 inactivation in *Anabaena* influenced by high temperature was more obvious than that in normal algae cells. 5. The protection of nitrogenase activity by molecular hydrogen against O_2 -inactivation in *Anabaena* influenced by high temperature was occurred when the photosynthetic inhibitors, such as DNP or CCCP, or CO_2 or N_2 were presented respectively, but not when external sucrose presented. 6. When algae cells injured by high temperature were preincubated in the dark in 60—70% C_2H_2 and 30—40% Ar atmosphere or in 10% CO the protective action of hydrogen was weakened or disappeared.

Key words *Anabaena*, Stress of high temperature, Nitrogenase activity, Molecular hydrogen and oxygen, Physiological conditions