

在光、暗及高温下氧与鱼腥藻 7120 固氮的关系

王业勤 何家苑 章德萍 黎尚豪

(中国科学院水生生物研究所, 武汉)

提 要

鱼腥藻 7120 从光转暗不同时间后,照光检测固氮活性的损失速度与氧量直接相关。在黑暗 12 小时后,复光时的活性恢复被氧霉素、氯化铵或 38—40℃ 空气氧所阻遏,黑暗中生成的酶易被氧失活。在光下和黑暗中短时暴露于不同氧压时,黑暗中氧引起固氮活性的下降比光下快得多。抗坏血酸大大减少高氧引起的失活,高温可能增加固氮酶活性对氧的敏感性。在光下 100% O₂ 处理 120 分钟,活性没有进一步下降,也没有活性的恢复,没有观察到构型保护。讨论了环境条件与氧保护的关系。

关键词 氧,固氮,鱼腥藻

固氮鱼腥藻的自然群体长期适应于光暗周期的改变,它们所固定的氮绝大多数是在光下进行的^[1]。柱孢鱼腥藻和多变鱼腥藻的固氮活性随光暗周期而升降^[5,14]。暗固氮活性下降的速度取决于黑暗处理前光照的强度和碳源的提供状况^[4]。而 ATP 库在短时黑暗时是相对稳定的^[3]。而胶球藻在暗中 12 小时后固氮活性的消失不是由于碳源的耗尽,也不是由于 ATP 库的减少。已有报道指出,黑暗抑制胶球藻固氮酶的合成,黑暗 4 小时后,酶的合成几乎完全停止,而在光下 100% O₂ 中,固氮酶的合成速度不受氧的影响,提高氧压主要使已合成的酶失活^[10]。氧并不阻遏多变鱼腥藻氧敏感突变种钼铁蛋白的合成^[11]。

本文研究光、暗及高温 (38—40℃) 下不同氧含量对鱼腥藻 7120 固氮活性的影响,黑暗期间固氮酶是否易被氧所失活,试图说明鱼腥藻 7120 防氧保护固氮酶的能力与光、暗、温度的关系。

材 料 与 方 法

藻种及培养: 鱼腥藻 (*Anabaena*) 7120 如前文所述^[1] 用不加结合态氮的 Allen 和 Arnon 基本培养基静止照光培养,光源为三支 40 瓦日光灯,藻龄 5—10 天。

黑暗、温度及氧处理条件：详见各图表说明。通常将 2 毫升藻细胞悬液置于 7 毫升反应瓶中，放在 30℃，光下或完全不透光的容器中振摇不同时间。不同氧量处理是先将反应瓶抽真空后，注入不同配比的气体，注入藻液后放去多余的气体。温度处理在照光的恒温水浴中进行，温度稳定 $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 。

固氮活性的测定：用乙炔还原法。在光下 30℃ 反应 30 分钟。一般在氩气中加 10% C_2H_2 ，活性按叶绿素 a 或蛋白量计算。

叶绿素 a 的测定：整细胞用 80% 丙酮提取后光谱测定。

蛋白量的测定：整细胞用超声破碎后， $2,000\times g$ 离心除去残渣，上清液中蛋白量用 Folin 酚法测定。

溶氧量的测定：用 YSI Model 53 型生物学测氧仪测定。

结果与讨论

(一) 光暗下不同氧量对固氮活性的影响

在空气中光照培养的有异形胞鱼腥藻 7120 藻液中的溶氧量通常是超过饱和溶氧量的，每毫升培养物含 210nmol O_2 以上，但藻细胞能活跃固氮。一旦在空气中转入黑暗，经过不同时间暗温育 (30℃) 后，再在光下检测固氮活性，其活性随暗期的延长而迅速下降。如果在氩气中，暗温育 2.5 小时，活性没有任何减少，黑暗 5 小时，保持原来在光下活性的 80% 左右，甚至黑暗 9 小时，尚有原来活性的 70% 左右，而在空气中黑暗 9 小时，活性已降至近零值 (表 1)。

Murry 等人应用钼铁蛋白免疫抗体测定的结果表明，鱼腥藻用氯霉素处理，在不同氧压下钼铁蛋白免疫交叉反应物质的丧失速度与氧压相关，在微氧条件下，交叉反应物的半衰期为 25 小时，在空气中为 12 小时，在 245% 空气氧量下为 6.6 小时。而固氮酶活的丧失速度比交叉反应物丧失的速度快^[12]。看来，在空气氧下黑暗时，一方面固氮酶的合成受阻，另一方面已合成酶迅速被氧失活。

为了解在黑暗中不同氧量对固氮酶的失活速度，尽量减少黑暗对固氮酶的抑制，在以下的实验中将黑暗时间缩短至 30 分钟。比较光下和暗中不同氧量预处理对固氮活性的影响。将在空气中光照培养的藻液移至玻璃瓶中，抽气除氧并注入氩气后，立即放在含不

表 1 在有氧及厌氧条件下黑暗时，固氮活性下降的比较

Tab. 1 Loss of nitrogenase activity in aerobic and anaerobic condition under darkness

黑暗时间(小时) Dark (h)	%暗前活性 % activity before dark	
	在空气中 in air	在氩气中 in Ar
2.5	49	105
5.0	17	78
9.0	3	69

注：检测条件光照，10% C_2H_2 ，在 Ar 中 30℃ 30 分钟。

Assay condition In light, 10% C_2H_2 in Ar 30℃, 30min.

同氧量的反应瓶中,在 30℃ 黑暗或光下振摇 30 分钟,接着用氩气置换氧,注入乙炔在光下检测固氮活性,30℃ 反应 30 分钟。如表 2 所示,当气相氧量为空气氧量一半时 (10% O₂ + 90% Ar), 仅黑暗 30 分钟,固氮活性下降 25%,当氧量为 20% 时,下降 50%,当氧量为 40% 时,下降 85%,当氧量为 100% 时,活性丧失 95% 以上。然而当气相为 100% Ar 时(藻液中残余溶氧为 20 nmol O₂/ml), 暗处理 30 分钟没有导致固氮活性的下降,这与表 1 结果是一致的。可见环境中氧量的多少与黑暗中固氮活性的维持有密切关系。在暗中即使氧量低于空气氧的一半时,细胞也不能防止氧对固氮酶的失活。 如果以在光下 20% 氧处理作为对照 (鱼腥藻在光下适应的氧压) 那么当气相氧量提高至 40%, 处理 30 分钟(溶氧量为 315nmol O₂/ml), 细胞中尚存 67% 的固氮活性,而在暗中作相应处理后仅存 15% 的活性。即使气相氧量达到 100% (溶氧量为 703nmol O₂/ml), 在光下剩余的活性也高于在暗中相同氧处理后剩余的固氮活性(表 2)

表 2 在光下或暗中不同氧量短时处理的失活效果

Tab. 2 Loss of nitrogenase activity through treatments of different oxygen concentrations in short time under light or darkness

处理条件 Treatment conditions		固氮活性 nitrogenase activity	%活性 % activity
氧 量 oxygen content	光 或 暗 light or dark		
100% Ar	暗 dark	210	100
10% O ₂	暗 dark	161.6	77
20% O ₂	暗 dark	100	47.6
40% O ₂	暗 dark	31.6	15
100 %O ₂	暗 dark	16	7.9
20% O ₂	光 light	211	100
40% O ₂	光 light	141.6	67.5
100% O ₂	光 light	26.7	12.7

注: 处理条件 30℃, 30 分钟振摇温培养。
Treatment condition Incubation at 30℃ with shaking for 30 min.
检测条件 光照 10% C₂H₂ 在 Ar 中, 30℃, 30 分钟。
Assay condition in light, 10% C₂H₂ in Ar, 30℃, 30 min.
活性表示 nmoles C₂H₄/分/mg 叶绿素 a。
Activity is defined as nmoles C₂H₄/min/mg chl a

用 100% O₂ 处理 15 分钟的前后分别增加一次短时的黑暗期 (在氩气中), 以观察 100% O₂ 处理前和处理后的黑暗对固氮活性的影响(表 3)。结果表明, 100% O₂ 处理前的短暂黑暗增加氧的失活作用, 这与上述的结果是一致的, 也就是在暗中防氧能力下降。

最近已有报道指出, 在光下用 100% O₂ 处理 30 分钟, 并不影响鱼腥藻的光合磷酸化、光合放氧及标记氨基酸的渗入等生理过程, 而是直接使细胞内的固氮酶组分失活^[13]。当然不能排除在高氧下, 提供给固氮酶的还原剂或电子传递蛋白被氧化。至于在高氧下固氮酶的失活是可逆的还是不可逆的, 目前有不同的看法^[6, 13]。

如果暗预处理固氮活性的下降主要是由于还原剂和能量供应不足, 那么, 在厌氧条件下黑暗 2.5 小时, 固氮活性也应有所下降; 但没有观察到活性的减少, 直至 9 小时尚有较高的活性。以上结果表明, 当空气中黑暗时, 固氮酶易被氧迅速失活。

表 3 100% O₂ 处理之前的黑暗期使氧的失活作用增加

Tab. 3 Increase of oxygen inactivation resulting from darkness before 100% O₂ treatment

处理条件 Treatment conditions		乙炔还原活性 Acetylene reduction activity	对 照 % control
1	2		
100% O ₂ , 照光 15 分钟 100% O ₂ , light, 15 min.	100% Ar, 黑暗 30 分钟 100% Ar, dark 30 min.	50.9	24
100% Ar, 黑暗 30 分钟 100% Ar, dark, 30 min.	100% O ₂ , 照光 15 分钟 100% O ₂ , light 15 min	25.4	11.8

注: 检测条件 光照, 10% C₂H₂ 在 Ar 中, 30℃ 30 分钟。
Assay conditions In light, 10% C₂H₂ in Ar, 30℃ 30 min.
活性表示 nmoles C₂H₄/分/mg 叶绿素 a, 对照活性为 215。
Activity is defined as nmoles C₂H₄/min/mg chl a Control: 215nmoles C₂H₄/min/mg chl a.

(二) 经 12 小时暗期后固氮活性恢复的条件

经 12 小时暗期(在空气中, 30℃)后,固氮活性已降至最低值。一旦恢复光照, 活性逐渐呈线性回升。复光后 5—8 小时,活性恢复到黑暗前的水平。

1. 氯霉素的影响 当恢复光照时,加入氯霉素(50μg/ml), 抑制蛋白质合成,乙炔还原活性在复光后没有任何增加。延长一段时间后,剩余的活性进一步下降(图 1)。

2. NH₄Cl 的影响 在复光时,加入氯化铵,如氯霉素处理一样,完全消除了乙炔还原活性的恢复(图 1), 氯霉素或氯化铵处理,活性均不能恢复的结果表明, 复光时活性的恢复涉及蛋白质(可能是固氮酶本身)的重新合成,这与胶球藻用 100% O₂ 处理 12 小时后,固氮活性的恢复受氯霉素和氯化铵阻抑的结果类似^[6]。

3. 温度的影响 将黑暗 12 小时后的培养物放在 38—40℃/空气氧条件下恢复光照

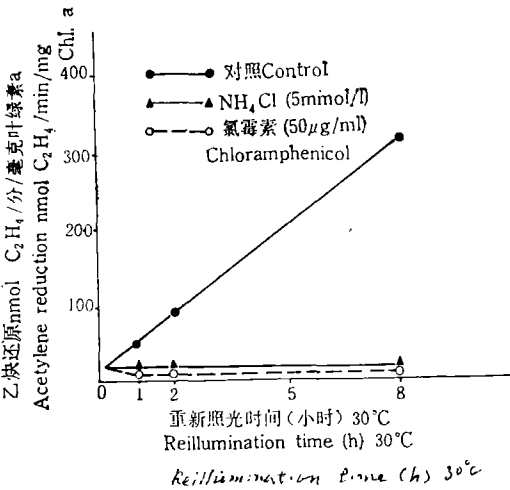


图 1 氯霉素、氯化铵阻抑暗期后固氮活性的恢复

Fig 1 Chloramphenicol and NH₄ inhibited the recovery of nitrogenase activity after darkness (h)

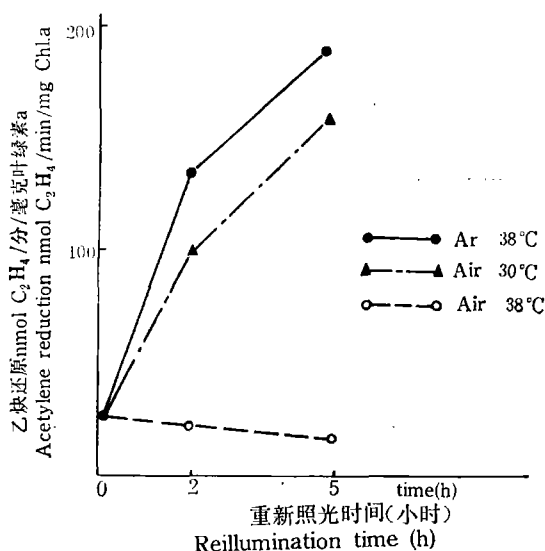


图 2 12 小时暗期后高温 (38°C) 和氧对固氮活性恢复的影响

Fig 2 The effect of higher temperature (38°C) and oxygen on recovery of nitrogenase activity after darkness (12h)

时,没有观察到乙炔还原活性的恢复。活性保持在黑暗结束时的最低水平上,类似于氯霉素和氯化铵处理的结果(图 2)。为判明 38—40°C 是否使固氮酶失活,将在 28°C/空气中培养的藻液分别放在 25, 30, 35, 40°C 检测乙炔还原活性,分别为 91.6, 113, 190, 206 nmol C₂H₄/分钟/毫克叶绿素 a。可见 38—40°C 温度并没有使已形成的固氮酶失活。此外,我们进行了变温试验,将 38°C/空气氧中的培养物转向 28°C/空气氧中时,乙炔还原活性恢复,但变温时,加入氯霉素(25 微克/毫升)则活性不能恢复,暗示活性的恢复涉及蛋白质的重新合成(结果未列出)。已有报道指出 38—40°C 温度阻抑肺炎克氏杆菌固氮酶的合成^[7]。我们认为在空气氧条件下,38°C—40°C 温度也可能阻遏了鱼腥藻固氮酶的合成。与肺炎克氏杆菌不同,有氧时,温度对鱼腥藻 7120 的影响才表现出来。在氩气中 38—40°C 温度下并不影响黑暗后复光时活性的恢复。似乎是高温增加了固氮对氧的敏感性。应当指出,不同固氮蓝藻对温度的适应性不同。如 *Anabaena* sp CA 最适的生长温度为 39°C。

(三) 100% O₂ 处理后固氮活性的恢复

鱼腥藻 7120 在光下用 100% O₂ 处理 30 分钟后,固氮活性迅速下降,活性损失 85% 左右。如果延长 100% O₂ 处理时间至 120 分钟,活性没有进一步下降,而是保持在低的稳定水平(图 3),作者没有观察到 Pienkos^[13] 等在 *Anabaena* sp CA 中所观察到的现象,即在 100% O₂ 中延长处理时间后,固氮活性恢复,比活性逐渐增加。他们认为这是鱼腥藻固氮酶存在构型保护的一个证据。作者的结果与 Mullineaux 等用胶球藻实验的结果一致,他们指出,延长 100% O₂ 处理至 4 小时,虽然固氮酶继续合成,但检测不到乙炔还原活性^[10]。

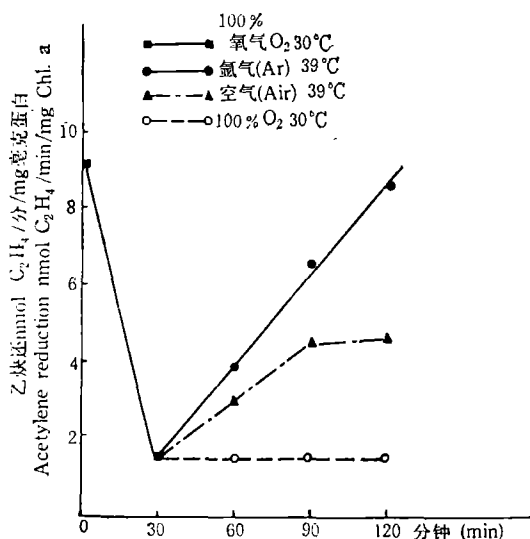


图3 100% O₂ 处理后固氮活性的恢复

Fig 3 Recovery of nitrogenase activity after 100% O₂ treatment

鱼腥藻 7120 用 100% O₂ 在 30°C 光照振荡处理 30 分钟, 然后在不同氧量和温度条件下恢复。0 分钟表示氧处理前的活性。30 分钟点是处理后的活性

Treatment of *Anabaena* 7120 with 100% O₂ at 30°C in light and shaking for 30 min, then, recovery under different oxygen content and temperatures 0 min being the activity before oxygen treatment and 30 min, the activity after oxygen treatment.

Gallon 和 Hamadi 以及 Pienkos 等都已证明用 100% O₂ 处理后, 一转入空气氧中, 固氮活性恢复, 但活性的恢复被氯霉素和 NH₄ 阻抑, 表明活性的恢复涉及蛋白质的重新合成。作者用 39°C/空气氧处理, 经 60 分钟后, 固氮活性的恢复被阻抑, 但在 100% Ar 中 39°C 温度不能阻止活性的恢复。这与黑暗 12 小时后复光时温度的影响效果是类似的。但其影响有滞后期。

(四) 抗坏血酸在高氧和暗中的保护作用

依据上述观察, 作者试图了解, 在高氧或黑暗条件下外加一些可能参与细胞氧化还原的物质能否缓和氧的失活作用。在 30°C/空气氧条件下黑暗 30 分钟期间, 加入 5mmol/L 抗坏血酸钠活性少损失 20%。为此进一步检查在高氧下光照时, 外加抗坏血酸的保护效果(表 4)。结果表明, 在 100% O₂ 中, 固氮活性为在空气氧中活性的 14.8%, 但在此条件下加 5mmol/L 抗坏血酸后, 活性为对照的 38%。在光下用 40% O₂ 处理时, 加入抗坏血酸后氧的失活作用完全被屏蔽。抗坏血酸是鱼腥藻细胞中的一种还原剂, 我们已证明它存在于细胞中, 它参与细胞氧化还原的机制尚不清楚。但外加抗坏血酸钠确能减少黑暗中或高氧条件下氧对固氮活性的抑制。这暗示, 在暗中或高氧下进入细胞的氧量增多, 但没有足够的还原剂清除氧。

有异形胞固氮鱼腥藻防氧保护固氮酶的机制是一个尚有待阐明的问題。目前比较一致的看法是异形胞本身不放氧, 但氧是可以进入异形胞的。细胞在其结构上如何减少氧

表 4 高氧量下抗坏血酸对固氮酶的保护

Tab. 4 Ascorbate protects nitrogenase from high oxygen content

处理条件 Treatment conditions	乙炔还原活性 Acetylene reduction activity	百分活性 % activity
对照, 在空气中 Control, in air	180	100
加 5mmol/L 抗坏血酸, 在空气中 Ascorbate (5mmol/L) added in air	208.3	115
在 40% O ₂ 中 In 40% O ₂	133	74
在 40% O ₂ 中, 加 5mmol/L 抗坏血酸 Ascorbate (5mmol/L) added in 40% O ₂	208	115
在 100% O ₂ 中 In 100% O ₂	26.7	14.8
在 100% O ₂ 中加 5mmol/L 抗坏血酸 Ascorbate (5mmol/L) added in 100% O ₂	68	38

注：处理和检测条件 在光下 30℃ 振荡 30 分钟, 并在此条件下加 10% 乙炔反应 30 分钟。

Conditions of treatment and assay: Incubation in light at 30℃ with shaking for 30 min, then added 10% C₂H₂ and reacted for 30 min.

活性表示 nmol C₂H₂/分/mg 叶绿素 a

Activity is defined as nmoles C₂H₂/min/mg chl a

扩散进入细胞, 以及通过什么途径清除细胞中的氧, 以维持固氮酶所要求的厌氧环境, 这是防氧保护机制的两个方面。不同研究者对此意见各异, 没有定论。异形胞是鱼腥藻固氮的主要场所, 但成熟异形胞的分化是需氧的, 而且最近有报道指出, 提高氧压时, 有适应保护机制的存在^[8]。可见防氧与需氧是保护机制的两个方面。

在光、暗、高温及不同氧量下, 氧进入细胞的速度及其被清除的速度可能有明显的差别, 而细胞膜的结构与功能在其防氧保护机制上可能具有重要作用, 并且受到光、暗、高温、高氧条件的影响。作者在前文中已指出, 鱼腥藻 7120 细胞中有膜防氧保护系统^[2]。我们将继续报道膜结构的完整性与防氧保护机制的关系。

参 考 文 献

- [1] 王业勤、何家菀、戴玲芬、黎尚豪, 1981. 鱼腥藻 (*Anabaena*) 对氧敏感的固氮突变种. 植物学报, **23**: 288—296.
- [2] 王业勤、何家菀、黎尚豪, 1982. 固氮蓝藻细胞中保护固氮酶的除氧系统. 植物学报, **24**: 231—240.
- [3] Bottomley, P. J. and Steward, W. D. P., 1977. ATP pools and transients in the blue green alga, *Anabaena cylindrica*. *Arch. Microbiol.* **108**: 249—258.
- [4] Fay, P., 1976. Factors influencing dark nitrogen fixation in a blue green alga. *Appl. Environ. Microbiol.* **31**: 376—379.
- [5] Gallon, J. R., 1981. The oxygen sensitivity of nitrogenase: a problem for biochemists and microorganisms. *Trends in Biochemical Sciences*, **6**: 19—23.
- [6] Gallon, J. R. and Hamadi, A. F., 1984. Studies on the effect of oxygen on acetylene reduction (nitrogen fixation) in *Gloeotheca* sp ATCC 27152. *J. Gen. Microbiol.* **130**: 495—503.
- [7] Hennecke, H. and Shamugan, K. T., 1979. Temperature control of nitrogen fixation in *Klebsiella pneumoniae*. *Arch. Microbiol.* **123**: 259—265.
- [8] Mackey, E. J. and Smith, G. D., 1983. Adaptation of the cyanobacteria *Anabaena cylindrica* to higher oxygen tensions, *FEBS letter*, **156**: 108—112.

- [9] Mullineaux, P. M., Chaplin, A. E. and Gallon, J. R., 1980. Effect of a light to dark transition on carbon reserves, nitrogen fixation and ATP concentration in cultures of *Gloeocapsa* sp 1430/3. *J. Gen. Microbiol.*, **120**: 227—232.
- [10] Mullineaux, P. M., Chaplin A. E. and Gallon, J. R., 1983. Synthesis of nitrogenase in the cyanobacterium *Gloeotheca* (*Gloeocapsa*) sp CCAP 1430/3. *J. Gen. Microbiol.*, **129**: 1689—1696.
- [11] Murry, M. A., 1983. Evidence for the lack of oxygen repression of Fe-Mo protein in mutants of *Anabaena variabilis*. *Current Microbiol.*, **8**: 159—163.
- [12] Murry, M. A., 1983. Nitrogenase inactivation by oxygen and enzyme turnover in *Anabaena cylindrica*. *Can. J. Microbiol.*, **29**: 1286—1294.
- [13] Pienkos, P. T., Bodner, S. and Tabita, F. R., 1983. Oxygen inactivation and recovery of nitrogenase activity in cyanobacteria. *J. Bact.*, **153**: 192—190.
- [14] Rowell, P., Reed, R. H., Hawkosford, M. J., Ernst, A., Diez, J. and Steward, W. D. P., 1981. Some aspects of the regulation of nitrogenase activity in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. In: "Current perspectives in nitrogen fixation (Gibson A. H. and W. E. Newton ed.) pp. 180—189.

RELATIONSHIP BETWEEN OXYGEN AND NITROGEN FIXATION OF *ANABAENA* 7120 IN LIGHT, DARKNESS AND AT HIGH TEMPERATURE (38—40°C)

Wang Yeqin, He Jiawan, Zhang Deping and Li Shanghao

(Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan)

Abstract

When photoautotrophically-grown *Anabaena* culture was transferred to darkness/air, the reduction rate of nitrogen-fixing activity was proportional to oxygen concentration. When dark-treated culture (in air for 12 hrs) was reilluminated, the recovery of activity was depressed by chloramphenicol, NH_4 or by 38—40°C/air. This implies that the preformed nitrogenase was inactivated by atmospheric oxygen in darkness. When *Anabaena* cells were exposed to different oxygen tensions for a short time (30 min) in light or in darkness, the decline of activity in darkness was much greater than that in light. Ascorbate could alleviate the inactivation at higher oxygen content, whereas high temperature may enhance the oxygen sensitivity of nitrogenase. Treatment of cells with 100% O_2 for up to 120 min did not result in further inactivation, nor did it show any recovery of the activity. Therefore, no conformational protection has been observed. Relationship between oxygen protection and environmental conditions is discussed.

Key words oxygen, nitrogen fixation, *Anabaena*