

四唑 (*Tetrazolium*) 对固氮鱼腥藻 固氮和氢代谢的影响*

程双奇 廖水发 莫熙穆

(华南师范大学生物系, 广州)

提要

固氮鱼腥藻 (*Anabaena azotica* Ley) 细胞能还原无色的 TTC 和 NBT 分别成为红色或蓝色的甲臜 (formazan) 沉淀。异形胞还原 TTC 的速率高于营养细胞。前异形胞及异形胞附近的营养细胞对 NBT 的还原作用最强。而异形胞对 NBT 不起还原作用。

无论在异形胞形成红色甲臜或在营养细胞形成蓝色甲臜后都抑制固氮酶活性。NBT 甲臜对固氮酶活性的抑制作用大于 TTC 甲臜, 因为 NBT 氧化还原电位低于 TTC。

TTC 和 NBT 两者都明显地抑制固氮鱼腥藻完整细胞的放氢。因鱼腥藻的放氢是由固氮酶催化的结果。四唑抑制放氢推想是由于它截取了固氮酶催化系统中的电子的缘故。

固氮微生物(包括蓝色细菌和根瘤菌)对四唑还原与吸氢酶之间有无相关是一个争论的问题。一些学者认为分离豆科植物体的一些根瘤菌株培养于含有 TTC 的琼脂培养基, 如还原, 便可证明这些根瘤菌株能氧化氢; 换言之, 应用 TTC 的还原可作为一些根瘤菌的菌落具有吸氢酶的验证。相反, 我们发现固氮鱼腥藻还原 TTC 和 NBT 之后, 都没有影响吸氢的能力。因此, 我们推想固氮鱼腥藻对四唑之还原与吸氢酶是没有直接的关系。

柱孢鱼腥藻 (*Anabaena cylindrica*) 兼有固氮和放氢现象已为 Benemann 和 Weare (1974)^[4] 所发现。随后 Bothe 等 (1978 a, 1978 b^[7,8]) 研究其氢酶与固氮酶的相互关系。他们认为吸氢酶 (uptake hydrogenase) 促使氢再利用, 有利于固氮作用。

Fay 等 (1972)^[11] 用 TTC 和 NBT 处理柱孢鱼腥藻, 时间愈长, 细胞内形成甲臜的百分率愈大, 其固氮活性随之愈为降低。王业勤等 (1981)^[14] 报道了在空气中不能固氮的鱼腥藻突变种的分离和特点, 这种突变种必须在微氧条件下才能固氮, 而且其固氮活性很低, 故还原 TTC 的能力也很弱。这些试验都说明有异形胞的蓝藻对四唑的还原与固氮活性之间有密切的联系, 但对鱼腥藻等固氮蓝藻尚无应用四唑检验其吸氢酶活性的报道。

Maier 等 (1978)^[14] 和 Pahwa 等 (1981)^[15] 分别论述了在大豆和绿豆根瘤菌菌落还原 TTC 者中, 其吸氢酶活性也较高, 可应用此方法筛选有吸氢酶的菌株, 认为将可能有实践意义。程双奇等 (1981)^[3] 对固氮鱼腥藻在一般条件下的固氮和氢代谢进行了研究。本文报道固氮鱼腥藻对四唑还原与固氮和氢代谢的关系, 着重探讨四唑与固氮微生物吸氢

* 杨挺同志参加测定工作。
1984年4月13日收到。

酶的关系问题。

材料与方法

材料 固氮鱼腥藻 HB686 由中国科学院水生生物研究所提供，纯培养5天后可供试验。培养方法同前(1981)^[3]

检查四唑还原反应的方法 取固氮鱼腥藻匀浆一滴放在凹面载玻片上，随即滴1—2滴0.1%的氯代三苯四氮唑(TTC)和氯化硝基四氮唑蓝(NBT)溶液，然后在1800lx下光照，温度为25℃，经过一段时间(不同间隔时间)，加含有10%戊二醛磷酸缓冲液，pH7.6，即可在光学显微镜下检查异形胞和营养胞形成甲臜沉积的百分率。

固氮、放氢和吸氢的测定 TTC和NBT溶液分别加入固氮鱼腥藻HB686的匀浆中(细胞完整未破碎)，最终浓度为0.03%，在18,000—20,000lx，30℃进行磁搅拌。隔一定时间取出一定量的匀浆离心沉淀，用新鲜培养基洗2次，然后将细胞悬浮并用新鲜培养基调整至原来的浓度，分别进行乙炔还原、放氢和吸氢试验，其测定方法同前(1981)^[3]。

结 果

(一) TTC的还原

固氮鱼腥藻HB686在1800lx，25℃和有氧条件下，用TTC处理20分钟后即被还原成红色的甲臜沉积在细胞内。沉积细胞的数量随着时间的延长而增加(表1)。从表1可以看出，TTC在异形胞内被还原的速度快于营养细胞。反应20分钟即有31%的异形胞出现甲臜沉积，而此时营养胞仅有1.2%。反应60分钟时异形胞甲臜沉积达87.2%，而营养胞只有64.1%。TTC在异形胞和营养胞内还原速度的差异与这两种细胞代谢特点不同有密切关系。

表1 固氮鱼腥藻还原TTC的时程

Tab. 1 Time course of TTC reduction by *A. azotica* HB686

处理时间(分) Time of exposure to TTC (min)	含甲臜的营养胞 Vegetative cells with formazan (%)	含甲臜的异形胞 Heterocysts with formazan (%)
5	—	—
10	—	—
15	—	—
20	1.20	31.0
25	2.50	32.1
30	3.90	57.1
35	24.1	73.3
40	30.0	78.5
45	43.5	83.5
50	50.0	85.0
55	56.7	86.8
60	64.1	87.2

Fay 等 (1972)^[1] 的试验证明, 柱胞鱼腥藻用 TTC 处理 20 分钟即有 82% 异形胞出现甲臜晶体沉积, 而我们试验表明固氮鱼腥藻 HB686 的异形胞此时只有 31% 沉积。这可能是由于这两种固氮蓝藻异形胞的包套和细胞壁的结构有差异所引起的。

(二) NBT 的还原

NBT 原来是无色的, 经还原后则变成蓝色的甲臜沉淀。我们的试验看到固氮鱼腥藻 HB686 用 NBT 处理后在异形胞旁的营养细胞出现蓝色的甲臜沉积, 离异形胞越近的营养细胞蓝色甲臜沉积越明显(图 1)。NBT 在营养细胞内所形成的甲臜不生成大的结晶, 而是弥漫地分散在整个细胞中, 在显微镜下难以统计其沉积细胞的百分率。

值得注意的是固氮鱼腥藻 HB686 用 NBT 处理之后异形胞没有出现甲臜沉积, 虽处理时间延长至 2 小时, 仍无甲臜生成; 而前异形胞 (proheterocyst) 则出现大量的甲臜沉积。

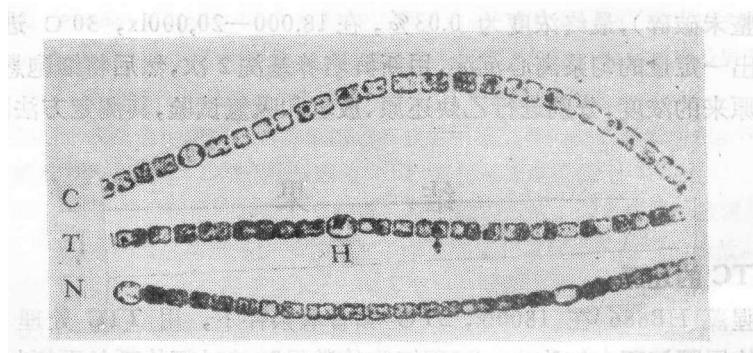


图 1 示固氮鱼腥藻丝异形胞和营养胞内的甲臜结晶

C: 对照 N: NBT 处理 T: TTC 处理 H: 异形胞↑: 甲臜结晶

Fig. 1 Filaments of *A. azotica* HB686 showing formazan crystals in the heterocysts and vegetative cells

C: Control N: Treatment with NBT T: Treatment with TTC H: Heterocyst ↑: Formazan crystals

(三) TTC 和 NBT 对固氮活性的影响

我们用 TTC 和 NBT 溶液处理固氮鱼腥藻分别在 0、20、40、60 分钟取出一定量匀浆测定其固氮活性, 其结果如图 2 所示。从试验结果可知无论是 TTC 或 NBT 处理固氮鱼腥藻, 前 20 分钟乙烯生成量明显地下降。20—40 分钟乙烯生成量亦趋下降, 但较不明显, 40—60 分钟基本趋于恒定。乙烯生成量下降的趋势与沉积甲臜的细胞数有一定的相关性(表 1, 图 2)。

NBT 对乙炔还原的抑制作用比 TTC 更为强烈, 反应 20 分钟后两者抑制作用的差异已显示出来。到 60 分钟时其差异更大, 这时 TTC 对乙炔还原抑制为 NBT 所抑制的 67%。

(四) TTC 和 NBT 对放氢和吸氢的影响

我们用 TTC 和 NBT 处理固氮鱼腥藻 HB686, 发现四唑对固氮鱼腥藻放氢的抑制分别达到 73 和 90%。处理 60 分钟时, 二者对放氢的抑制已分别在不同的水平上趋于恒定。NBT 对固氮鱼腥藻放氢的抑制甚于 TTC。这种情形与对乙炔还原抑制的总趋势

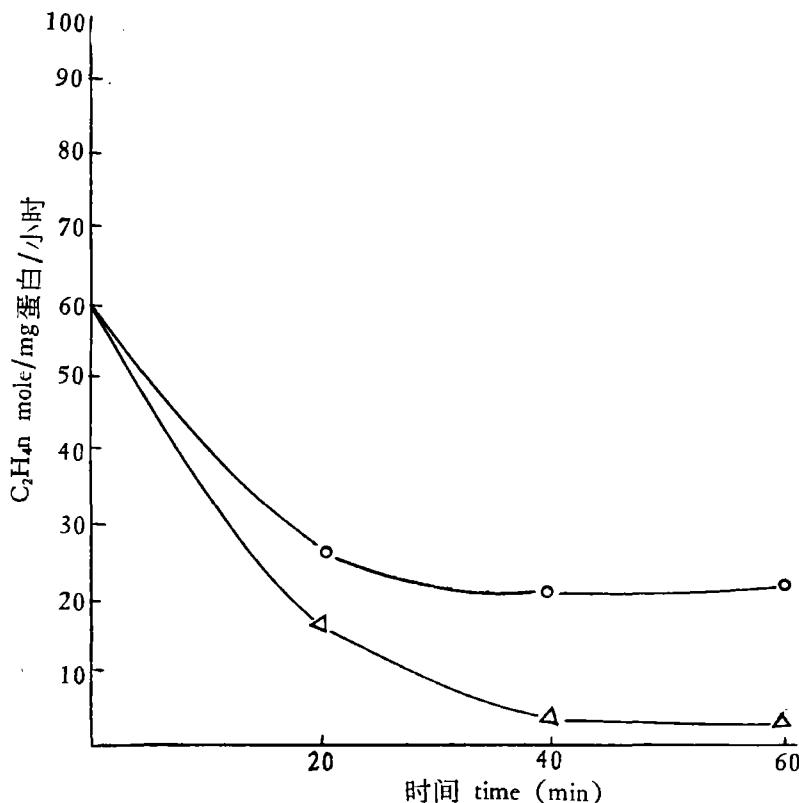


图2 TTC 和 NBT 对固氮鱼腥藻 HB686 对乙炔还原的影响
乙炔还原以氩为气相加 10% 乙炔, 20,000lx, 冷白炽光照射, 30℃ 振荡

○——○ TTC △——△ NBT

Fig. 2 Effect of TTC and NBT on acetylene reduction of *A. azotica* HB686
Acetylene reduction by using argon together with 10% C₂H₂ as gas phase,
fluorescent light (20,000 lx), shaking at 30℃

是一致的。

由于固氮鱼腥藻细胞内存在着固氮酶催化的放氢和吸氢酶催化的吸氢作用，我们认为固氮鱼腥藻的放氢量应是二者作用的净结果。为了探明 TTC 和 NBT 作用下固氮鱼腥藻氢代谢的途径，我们进行了吸氢试验。从试验结果（图4）看出 TTC 和 NBT 对固氮鱼腥藻 HB686 的吸氢作用都没有明显的影响。

讨 论

(一) TTC 和 NBT 在固氮鱼腥藻 HB686 细胞中形成甲臜沉积问题

因为 TTC 和 NBT 是一类无色的低氧还电位指示剂 (TTC E^{o'} = +490mV, NBT E^{o'} = +50mV)，在细胞内可接受由脱氢酶催化所提供的电子而被还原成为有颜色的不溶性沉淀物甲臜，成为现代组织化学鉴定氧化还原酶的好方法。四唑既然是低氧还电位的物质，它在组织细胞内可能成为酶催化的氧化还原反应的电子受体，干扰细胞内电子传

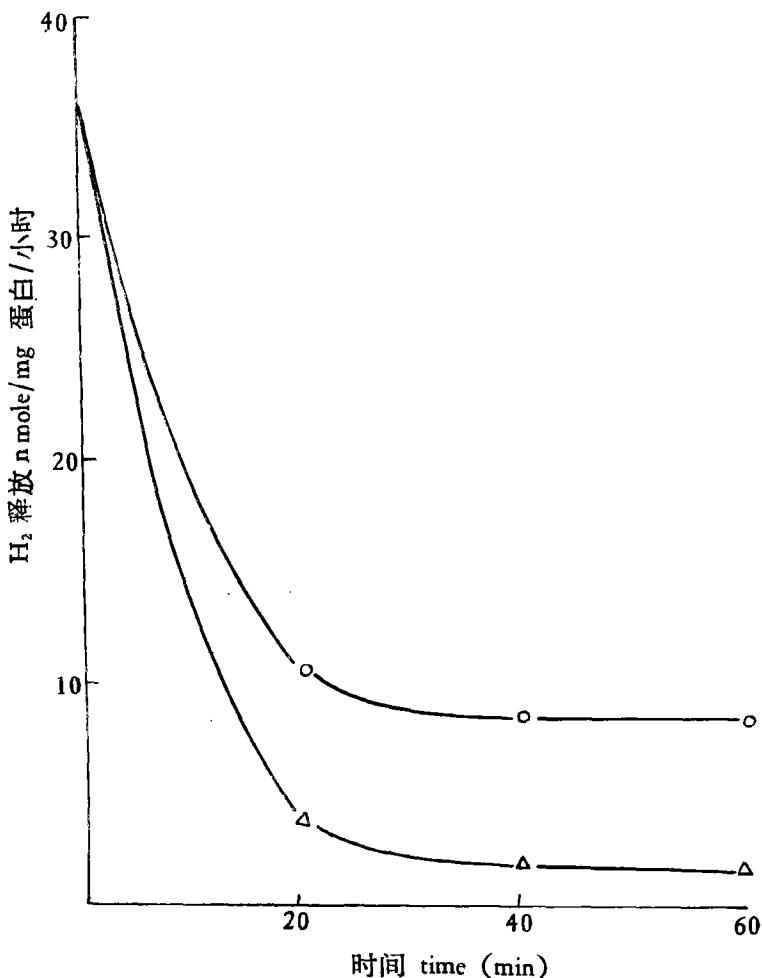


图 3 TTC 和 NBT 对固氮鱼腥藻 HB686 放氢的影响
反应系统以氩为气相, 20,000lx, 冷白炽光照射, 30°C 振荡

○——○ TTC △——△ NBT

Fig. 3 Effect of TTC and NBT on hydrogen evolution of *A. azotica* HB686
In the reduction system gas phase was argon, fluorescent light
(20,000 lx), shaking at 30°C

递系统, 从而影响细胞内氧化还原的进行。Pearse 等(1959)^[16]曾指出四唑在细胞内被还原成甲臜能导致脱氢酶的抑制。

Bradley 等(1971)^[9]和 Donze 等(1972)^[10]的实验结果已表明鱼腥藻异形胞不存在光系统 II, 不产生氧, 并有较强的呼吸作用, 使异形胞具有较低的氧分压, 从而使细胞内维持较低的还原状态。因此 TTC 在异形胞内比在营养细胞内较易被还原为甲臜。NBT 则在离异形胞愈近的营养细胞蓝色甲臜沉积愈明显。尤其是前异形胞出现大量的甲臜沉积, 离异形胞愈远则蓝色甲臜沉积愈少, 其原因可能是由于异形胞具有多层结构的胞膜, TTC 分子量较小 (MW334.80), 尚能透过, NBT 分子量较大 (MW817.7), 不能透过; 而前异形胞无这种胞膜, NBT 分子量虽大仍能透过。接近异形胞的营养细胞比远离异

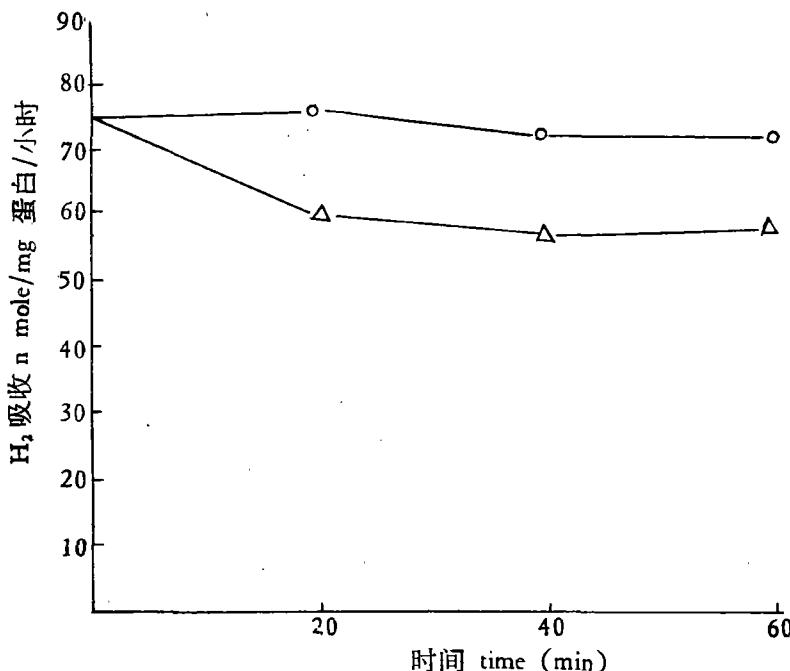


图4 TTC 和 NBT 对固氮鱼腥藻 HB686 氢吸收的影响
反应系统以氩气为气相内含 2% 氢气和 1% 氧

○——○ TTC △——△ NBT

Fig. 4 Effect of TTC and NBT on hydrogen consumption of *A. azotica* HB686
In the reaction system gas phase was argon together with 2% H₂ and 1% O₂

形胞的营养细胞具有较低的氧还原电位,因此近异形胞的营养细胞较易还原 NBT。王业勤等(1981)^[1]认为蓝藻细胞还原 TTC 形成甲臜结晶的能力可衡量细胞中氧化还原状态。我们的试验结果支持这种看法。

(二) 关于固氮鱼腥藻对四唑还原与固氮酶活性的关系问题

Horton (1968)^[13] 和 Biggins (1969)^[5] 试验证明,在蓝藻中光合作用和呼吸作用具有某些共同的电子传递和能量转换过程。固氮蓝藻的固氮作用的能源和还原物质主要是通过光合作用而获得的。TTC 和 NBT 都是活泼的电子受体。它们进入细胞后,一方面截取还原物质的电子,减少细胞内还原物质的供应,使氧的还原受阻;同时异形胞(也包括营养细胞)呼吸链的电子也未能最后传递给氧,ATP 合成受阻,从而减少 ATP 的供应。另一方面固氮蓝藻的光合作用和呼吸作用与膜结构有密切的关系。Bisalputra 等(1969)^[6] 用圆球念珠藻 (*Nostoc sphaericum*) 为材料证明四唑还原产物,沉积在光合片层结构,因此甲臜在细胞内的沉积直接影响蓝藻细胞内电子传递系统,从而影响其固氮作用。

TTC 首先在异形胞形成红色甲臜,因而抑制其固氮作用是较易理解的。至于 NBT 主要在接近异形胞的营养细胞形成蓝色甲臜,推想是由于使营养胞减少对异形胞提供还原物,从而抑制其固氮作用。

总之 TTC 和 NBT 抑制固氮作用仍由于截取固氮作用过程所需的电子,从而降低其固氮能力,而不是四唑与固氮酶直接作用的结果。

(三) 关于固氮微生物对四唑还原与吸氢酶有无关系的问题

按 Maier 等 (1978)^[1] 的实验,含有吸氢酶的大豆根瘤菌株(未用 TTC 处理者)其吸氢量随着温育时间的延长而增加。反之,无吸氢酶的根瘤菌株(也未用 TTC 处理者)没有吸氢现象。他们用 TTC 是否被菌株还原作为鉴别有无吸氢酶的手段,发现 TTC 很容易被含有吸氢酶的菌株所还原,而 TTC 则不能被无吸氢酶的菌株所还原。但 Maier 等说,还原 TTC 是否直接或间接与吸氢酶活性有关尚未确定。汪化等 (1984)^[2] 对紫云英根瘤菌的吸氢试验,其结果是:吸氢的菌株和不吸氢菌株对 TTC 还原并没有多大差别,他们对 TTC 还原与氢酶活性之间是否有专一性有所怀疑。遗憾的是 Maier 和 Pahwa 等都未做过根瘤菌株还原了 TTC 之后对吸氢有无影响的实验。

我们推想,如果 TTC 是直接被吸氢酶所还原而形成甲酇,则吸氢量理应减少,而放氢也理应增加。可是我们发现固氮鱼腥藻 HB686 分别还原 TTC 或 NBT 为甲酇后,吸氢量并没有多大变化,而放氢量不仅没有增加,反而减少。必然是由于 TTC 和 NBT 对固氮酶催化系统的抑制而引起的。正如 Bothe (1978 a)^[3] 所认为的蓝藻完整细胞的放氢是由于固氮酶作用的结果。由此我们可以得出这样的看法:鱼腥藻对 TTC 的还原与吸氢酶没有直接的关系。Pahwa 的实验虽证明了不能还原 TTC 的绿豆根瘤菌都无吸氢酶,但是能还原 TTC 的根瘤菌并不全部都有吸氢酶。从 Pahwa 本人的实验亦难说明 TTC 的还原与吸氢酶有直接的关系。

总之,固氮微生物对四唑还原与吸氢酶的关系问题,目前尚有争论。因此进一步弄清这问题无论在理论和实践上都是有意义的。

参 考 文 献

- [1] 王业勤、何家苑、戴玲芳、黎尚豪,1981。鱼腥藻(*Anabaena*)对氧敏感固氮突变种。植物学报,23: 288—295。
- [2] 汪化、宋鸿遇,1984。紫云英根瘤菌的吸氢与固氮的关系。植物生理学报,10: 63—71。
- [3] 程双奇、莫熙穆,1981。固氮鱼腥藻 HB686 的固氮和放氢作用。植物生理学报,7: 241—248。
- [4] Benemann, J. R. and N. M. Weare, 1974. Hydrogen evolution by nitrogen-fixing *Anabaena cylindrica* culture. *Science*, 184: 174—175.
- [5] Biggins, J., 1969. Respiration in blue-green alga. *J. Bact.*, 99: 570—575.
- [6] Bisalputra, T., Brown, D. L. and T. E. Weier, 1969. Possible respiratory site in a blue-green alga *Nostoc sphaericum* as demonstrated by potassium tellurite and nitro-blue tetrazolium reduction. *J. Ultrastructure Res.*, 27: 182—197.
- [7] Bothe, H. and G. Eisbrenner, 1978a. Aspects of hydrogen metabolism in blue-green algae in Hydrogenase: Their Catalytic Activity, Structure and Function. Edited by H. G. Schlegel and K. Schneider. pp. 353—369.
- [8] Bothe, H., E. Distler and G. Eisbrenner, 1978b. Hydrogen metabolism in blue-green algae. *Biochem.*, 60: 277—289.
- [9] Bradley, S. and N. C. Carr, 1971. The absence of a functional photosystem II in heterocysts of *Anabaena cylindrica*. *J. General Microbiology*, 68: 13—14.
- [10] Donze, M., Haveman, J. and P. Schiereck, 1972. Absence of photosystem II in heterocysts of the blue-green alga *Anabaena*. *Biochem. Biophys. Acta*, 256: 157—161.
- [11] Fay, P. and S. A. Kulasooriya, 1972. Tetrazolium reaction and nitrogenase activity in heterocystous blue-green algae. *Arch. Mikrobiol.*, 88: 341—352.
- [12] Fay, P. and A. E. Walsby, 1966. Metabolic activities of isolated heterocysts of the blue-green alga *Anabaena cylindrica*. *Nature (London)*, 209: 94—95.
- [13] Horton, A. A., 1968. NADH oxidase in blue-green algae. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2: 839—845.
- [14] Maier, R. J., Campbell, N. E. R., Hanus, G. J., Simpson, F. B., Russell, S. A. and H. J. Evans.

1978. Expression of hydrogenase activity in free-living *Rhizobium japonicum*. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **75**: 3258—3262.
- [15] Pahwa K. and R. C. Dogra, 1981. H₂-recycling system in Mungbean *Rhizobium* in relation to N₂ fixation. *Arch. Microbiol.*, **129**: 380—383.
- [16] Pearse, A. G. E., Scarpetti, D. G. and R. Hess, 1959. In: *Histochemistry Theoretical and Applied*. Pearse, A. G. E. 2nd edition. J and A Churchill Ltd. London, p. 543. 1960.

EFFECT OF TETRAZOLIUM ON NITROGEN FIXATION AND HYDROGEN METABOLISM IN *ANABAENA AZOTICA* LEY

Cheng Shuangqi Liao Shuifa and Mo Ximu

(Biology Department, South China Normal University, Guangzhou)

Abstract

The cells of *Anabaena azotica* reduce the colourless TTC and NBT into red or blue water-insoluble formazans respectively. Heterocysts reduce TTC faster than the vegetative cells. NBT has revealed the strongest reducing power in proheterocysts and vegetative cells next to heterocysts. There is none of reduced NBT in heterocysts.

Both red formazan deposition in heterocysts and blue-formazan formation in vegetative cells inhibit nitrogenase activity. The NBT formazan more inhibits the nitrogenase activity than TTC formazan, because the potential redox of NBT is lower than TTC.

Both TTC and NBT conspicuously inhibit hydrogen evolution, as a result of catalysis of nitrogenase in intact cells of *Anabaena azotica*. It is considered that tetrazolium intercepts the electrons from the system catalyzed by nitrogenase.

There is controversy about the relationship between tetrazolium reduction and uptake hydrogenase activity in nitrogen fixing organisms (*Cyanobacteria* and *Rhizobia*). Some scientists consider that the reduction of TTC in agar medium is used to detect strains of free living *Rhizobia* capable of oxidizing H₂, that is use of TTC as a method for detecting colonies with uptake hydrogenase is advantageous. On the contrary, we discover that after reducing TTC and NBT by *Anabaena azotica* there is no effect on H₂-uptake capacity. So we suppose that the reduction of tetrazolium does not directly relate to uptake hydrogenase.

Key words *Anabaena azotica*, TTC, NBT, Formazan, Acetylene reduction, H₂-evolution, Nitrogenase, Uptake-Hydrogenase