

研究简报

## 第二固氮系统在蓝细菌红萍鱼腥藻中的发现\*

戴玲芬 林惠民 何慧

(中国科学院水生生物研究所, 武汉)

### A SECOND NITROGEN FIXATION SYSTEM IN CYANOBACTERIUM ANABAENA AZOLLAE

Dai Lingfen, Lin Huimin and He Hui

(Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan)

关键词 红萍鱼腥藻, 钴-固氮酶, 钨-固氮酶, 乙烯, 乙烷, 氢

**Key words** *Anabaena azollae*, Mo-nitrogenase, V-nitrogenase  $C_2H_4$ ,  $C_2H_6$ ,  $H_2$

人们一般认为金属钼是生物固氮必需的条件, 钼是固氮酶的主要催化活性的组成部分。早先一些学者曾研究以钒、锰代替钼的氮固定作用<sup>[2]</sup>, 到1980年美国的Bishop等人首先提出棕色固氮菌(*Azotobacter vinelandii*)具有不含钼的第二固氮系统<sup>[1]</sup>。通过棕色固氮菌缺失编码固氮酶蛋白基因突变株研究发现, 该菌株并不失去固氮活力, 在无钼培养基中仍然与野生型菌株同样可以有效地固氮。英国Sussex研究小组的Robson发现在圆褐固氮菌(*Azotobacter chroococcum*)中也存在有第二固氮系统, 并证实了其固氮作用依赖于钒<sup>[3]</sup>。所以在好气自养型的棕色固氮菌和圆褐固氮菌中都具有两套遗传不同的固氮系统, 都能把分子氮还原成氨, 一种是钼-固氮酶, 另一种是钒-固氮酶。

在蓝细菌的研究中也有涉及到这方面的工作<sup>[2, 4, 5]</sup>, 但都是初步的报道。我们在研究红萍鱼腥藻的固氮过程中发现在缺钼培养的细胞中出现固氮活力, 并在采用以钒代替钼的培养基培养细胞中, 不但有固氮活力产生同时也有乙烷生成, 这正是钒-固氮酶催化反应的特点, 从而证实在光合自养的蓝细菌红萍鱼腥藻中确实存在第二固氮系统。

### 材料和方法

红萍鱼腥藻是本研究室藻种库提供。培养基采用修改Arnon和Allen培养基, 含钒培养基只是以 $0.5 \times 10^{-6}$  mol/L的 $V_2O_5$ 代替 $Na_2MoO_4$ 即可, 培养温度28℃, 光强为2000—3000 lx, 通气培养(空气)。

乙烯和乙烷测定, 采用气相色谱法, 使用Porapak R柱(柱长3米, 内径4毫米)氢火焰离子鉴定器。

氢测定采用气相色谱法, 使用2米长的5A分子筛柱。

钼和钒测定是用电感耦合等离子体发射光谱仪完成。

### 结果与讨论

我们将藻分别接入钒培养基(含 $0.5 \times 10^{-6}$  mol/L $V_2O_5$ )和钼培养基( $1 \times 10^{-7}$  mol/L $Na_2MoO_4$ )培养7天, 然后再分别用相同的培养

\* 本文研究课题为国家自然科学基金资助项目的一部分。

1989年9月13日收到。

基冲洗后接入新鲜培养基中培养，间隔取样测定(图1)。图1表明，藻在无钼而有钒的无氮培养基中仍保持相当的增殖速度，与含钼的无氮培养基中培养物相比，其增殖速度大体相近，无明显差别。

若将在缺钼条件下培养7天后藻转入含钒而无钼的培养基中培养，发现其仍有较高的固氮活力，但总的水平略低于正常含钼培养物的固氮活力(图2)，这也与培养实验的结果相吻合。在以钒代替钼的培养基中生长的培养物，用乙炔为底物还原产生乙烯的同时，还伴随有乙烷的生成，而在钼培养物中却检不出乙烷的存在(图2)。固氮

氮系统的存在。在实验中，我们有时发现在既不加钼又不加钒的培养物中，在短时间内取样分析也可以检出较低乙炔还原活性和少量的乙烷生成(数据未列)，这可能是因为有极微量的钒污染，蓝细菌第二固氮系统对这微量的污染如此敏感，这也旁证了蓝细菌确实存在第二固氮系统——钒固氮酶，进而还说明缺钼能刺激第二固氮系统的表达。将钒培养物置于暗中培养，我们未测出乙烯和乙烷，说明钒培养物的乙烯和乙烷形成是依赖于光。

蓝细菌的第二固氮系统能将乙炔还原成乙烯并产生乙烷，若我们直接向测定样品中加入乙烯作为反应底物，本应能直接被还原成乙烷。然而，实验结果表明(表1)，样品中加入乙烯却始终检不出乙烷形成，只有加乙炔作为底物才能测到乙烷的生成。当然，无论加乙炔或乙烯作为还原底物都不能被钼培养物还原成乙烷。那么，究竟是什么因子控制蓝细菌第二固氮系统还原乙炔生成乙烷的这类还原能力呢？这是一个十分有趣却尚未找到令人满意的解释的问题。

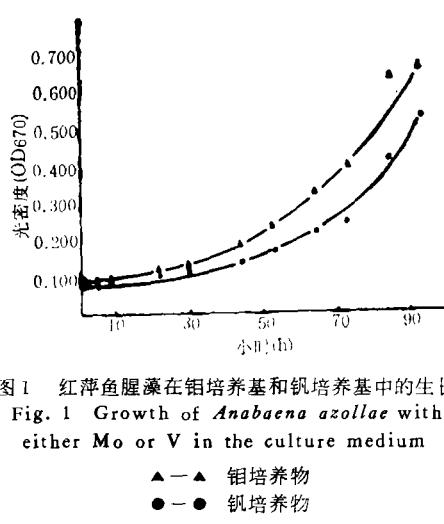


图1 红萍鱼腥藻在钼培养基和钒培养基中的生长  
Fig. 1 Growth of *Anabaena azollae* with either Mo or V in the culture medium

▲—▲ 钼培养物  
●—● 钒培养物

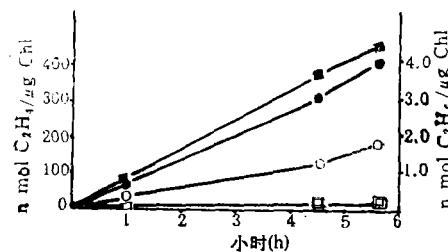


图2 红萍鱼腥藻的钼培养物和钒培养物中乙炔和乙烷的生成  
Fig. 2 Ethylene and ethane formation by either Mo or V culture of *A. azollae*

钼培养物中生成的乙炔(■—■)和乙烷(□—□)  
钒培养物中生成的乙炔(●—●)和乙烷(○—○)

培养物在缺钼条件下，提供钒，其不但能产生乙烯，而且又有乙烷生成，这是钒-固氮酶的重要特征。活性测定结果证明了红萍鱼腥藻中有第二固

表1 红萍鱼腥藻在不同处理条件下的乙烷生成

Tab. 1  $C_2H_6$  formation of *A. azollae* under different treatments

处理 Treatment	乙烷 ( $C_2H_6$ ) n mol/ $\mu gchl^*$
+V + $C_2H_2$	1.59
+V + $C_2H_4$	0
+Mo + $C_2H_2$	0
+Mo + $C_2H_4$	0

\* 反应4小时。

表2  $C_2H_2$  对红萍鱼腥藻放氢活性的影响

Tab. 2 Effect of  $C_2H_2$  on hydrogen formation of *A. azollae*

处理 Treatment	放 $H_2$ 活性 n mol $H_2$ /h. $\mu gchl$
+V + $C_2H_2$	3.00
+Mo + $C_2H_2$	1.29
+V - $C_2H_2$	0.22
+Mo - $C_2H_2$	0.05

在固氮酶催化  $N_2$ 、 $C_2H_2$  等底物还原的同时，还催化  $H^+$  还原生成  $H_2$ ，而放  $H_2$  能力的相对提高被认为是钒-固氮酶催化反应的重要特性之一<sup>[1-3]</sup>。因此我们比较了含钒培养物和含钼培

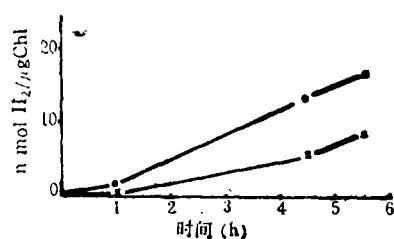


图3 红萍鱼腥藻的钼培养物和钒培养物的放氢活性

Fig. 3 Hydrogen formation by Mo or V culture of *A. azollae*

●—● 钒培养物生成的氢 ×—× 钼培养物生成的氢

养物的放氢活性,结果如图3所示,同样条件下,钒培养物的放氢活性比钼培养物高1倍,同时还发现钒和钼两种培养物放氢活性受乙炔存在与否影响颇大(表2)。当加入乙炔时,钒培养物和钼培养物的放氢活性分别增加10和20倍以上。但无论加乙炔与否,钒培养物的放氢活性总是比钼培养物高1倍左右。同时乙炔对蓝细菌(无论是钒培养物还是钼培养物)的净放氢有明显的刺激作用,这与在 *Anabaena 7120* 和 *A. variabilis* 的报道结果不同<sup>[4]</sup>,乙炔对固氮生物净放氢的影响早有报道,但结果不一,甚至互相矛盾,认为乙炔增加蓝细菌放氢活性研究者,将此解释为乙炔可能抑制吸氢酶的活性,从而大大提高净产氢<sup>[5]</sup>,而报道乙炔抑制固氮酶放氢的结果,则解释为乙炔的还原与固氮酶放氢竞争电子,从而大大地甚至完全抑制其放氢作用<sup>[6]</sup>,这类相互矛盾的结果目前只有用条件和实验材料不同权做解释。看来我们所获得的结果也许是由于所用的红萍鱼腥藻可能有较强的吸氢酶活性,加入乙炔后,其活性受到部分抑制,从而检测出较高的放氢活性。

## 参考文献

- [1] Bishop, P. E., Jarlenski, D. M. L. and Hetherington, D. R. L. 1980. Evidence for an alternative nitrogen fixation system in *Azotobacter vinelandii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77**(12): 7342—7346.
- [2] Fay, P. and Vasconcelos, L. de. 1974. Nitrogen metabolism and ultrastructure in *Anabaena cylindrica*, 11. The effect of molybdenum and vanadium. *Arch. Microbiol.*, **99**(3) 221—230.
- [3] Jones, L. W. and Bishop, N. J. 1976. Simultaneous measurement of oxygen and hydrogen exchange from the blue-green alga *Anabaena*. *Plant Physiol.*, **57**: 659—665.
- [4] Kentemich, T., Danneberg, G., Hundeshagen, B. and Bothe, H. 1988. Evidence for the occurrence of the alternative, vanadium-containing nitrogenase in the Cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *FEMS microbiol. Letters.*, **51**: 19—24.
- [5] Micheal, J., Dilworth, Robert, R., Eady, Robert L., Robson and Richard, W., Miller, 1987. Ethane formation from acetylene as a potential test for vanadium nitrogenase in vivo. *Nature*, **327**(6118): 167—168.
- [6] Robson, R. L., Eady, R. R., Richardson, T. H., Miller, R. W., Hawkins, M. and Postgate, J. P., 1986. The alternative nitrogenase of *Azotobacter chroococcum* is a vanadium enzyme. *Nature*, **322**(6077): 388—390.
- [7] Scherer, S., Kerfin, W. and Böger, P., 1980. Increase of nitrogenase activity in the blue-green alga *Nostoc mucororum* (Cyanobacterium). *Journal of Bacteriology*, **144**: 1017—1023.
- [8] Singh, N. H., Vaishampayan, A. and Singh, R. K., 1978. Evidence for the involvement of a genetic determinant controlling functional specificity of group VI B elements in the metabolism of N<sub>2</sub> and NO<sub>3</sub> in the blue-green alga *Nostoc mucororum*. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **81**(1): 67—74.