

柱孢鱼腥藻固氮酶防氧的呼吸保护

何振荣 杜代贤 林惠民 戴玲芬 辛武生

(中国科学院水生生物研究所, 武汉)

提 要

柱孢鱼腥藻生长在缺氮情况下,发现其固氮活性增加的同时也减少了对氧的敏感性。缺氮生长细胞的乙炔还原活性给氧抑制一半时的氧分压(pO_2)是 $0.5atm.$,而有氮生长细胞的抑制浓度为 $0.35atm.$ 。这表明蓝藻有可能通过增加呼吸耗氧而提高了它的固氮酶活性。

呼吸作用与固氮酶活性之间存在着密切的关系。无论在有氮、缺氮还是光诱导固氮酶形成的情况下,其固氮活性均随着呼吸速率的变化而变化。本研究结果,支持了柱孢鱼腥藻固氮酶的主要防氧手段是呼吸保护的观点。

固氮酶是对氧不稳定的;固氮生物在进行固氮作用过程中,必须防止氧的损伤。蓝藻是光合固氮生物,它除了要防止空气中的氧损伤外,还必须防止自身光合作用产生的氧损伤。不同的固氮生物有不同的氧保护途径,目前提出的观点有空间分隔、时间分隔、构型保护、呼吸保护、固氮酶迅速更新以及藻细胞中存在一个除氧系统等^[1,7,14],而固氮生物常常具备其中一种或多种的氧保护机制。柱孢鱼腥藻(*Anabaena cylindrica*)是具有异形胞的丝状蓝藻,一般认为它的固氮作用与光合放氧之间有空间分隔,固氮作用主要在异形胞中进行^[8]。异形胞胞被的特殊糖脂层形成一个气体扩散屏障的说法^[9],实际上也属于“空间分隔”这一氧保护机制。然而,由于对异形胞认识的深入,证明它同样可以与外界进行气体交换,氧可以进入内部^[5,19]。它存在着旺盛的呼吸作用,离体的异形胞有氧化磷酸化能力^[18],超氧歧化酶(一种通常只局限于好气微生物中的酶)也在柱孢鱼腥藻的异形胞中高水平存在着^[13],这都是它有氧进入的佐证。最近,还发现与产氧有关的光合系统II的色素——藻胆蛋白,存在于一种鱼腥藻(*Anabaena* sp. strain CA.)的异形胞中^[11]。所以,到底是哪种机制在柱孢鱼腥藻的固氮酶(不管是在异形胞中还是在营养细胞中)防氧保护中实际上起了主要作用,意见是不一致的。前人观点,以空间分隔(气体扩散屏障)居多;Murry^[13]的观点则强调呼吸保护与气体扩散屏障在异形胞的固氮酶氧保护中同样重要。Bothe等(1977)^[14],程双奇和莫熙穆(1981)^[3]以及陈因等(1983)^[2]则认为,氢酶的活动支持蓝藻固氮,它催化的氢与氧的Knallgas反应,在保护固氮酶免受氧损伤的过程中,起了很大的作用。王业勤等(1982)^[1]提出一个除氧系统的保护作用。我们认为,呼吸保护的观点在其他固氮生物中已经得到肯定和支持^[14,15],在固氮蓝藻中,从整个藻丝体来看,它仍然是一种主要的氧保护手段。本文试图通过对处在不同生理条件下柱孢鱼腥藻的固

1984年11月27日收到。

氮活性与氧分压关系的研究,说明呼吸作用对该种蓝藻固氮酶的抗氧保护作用。

材 料 与 方 法

蓝藻培养 柱孢鱼腥藻为水生所藻种组保存。培养基: 一升蒸馏水加入: MgSO_4 0.25 克, NaCl 0.232 克, CaCl_2 0.056 克, K_2HPO_4 0.436 克, EDTA-Fe (含 $\text{Fe}^{3+}0.001\%$) 0.8ml, 微量元素液 Arnon A5, B7 各一毫升。培养基按常规高压蒸汽灭菌。接种及培养过程采用一般无菌操作。培养容器为 2500ml 的玻璃三口瓶, 电磁搅拌, 插入 Brinkmann PC 800 探针比色计的光导玻璃纤维探针(用前以酒精浸泡灭菌)监测培养物生长, 插入 PHS-92A 型酸度计的复合电极(用前以酒精浸泡灭菌)监测 pH 变化, 加入灭菌的 0.2% NaHCO_3 使 pH 变化在 7.0—7.6。

通氮气培养 连续通入含 2.5% CO_2 的 N_2 , 流量 10—15ml/min。一支 500W 碘钨灯(需装冷却水套)一面光照, 照度为 3,000—5,000lx, 温度 $30 \pm 1^\circ\text{C}$ (在恒温室中培养)。

通氩气培养(缺氮培养) 连续通入 0.5% CO_2 的氩气, 流量 20—25ml/min, 两只 500W 碘钨灯两面光照, 表面照度为 10,000lx 温度 $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 。

呼吸速率、光合放氧及培养液溶氧量的测定 皆用极谱法, 所用仪器为 YSI53 型生物氧监测仪(美国 Yellow Spring Ins Co.)。有两种测定方法: 一是将氧探针直接插入培养液内(使用前反复用无菌培养液洗涤), 定时连续监测; 另一种方法是定时取样 5ml (用注射器取样, 不能带气泡), 放入预先用氩气冲洗 3 分钟的测定杯中, 保温 30°C , 黑暗时测氧消耗(呼吸速率), 光照时测氧增加(光合放氧速率)。最初记录到的氧含量, 即为培养液当时的溶氧量。记录仪用 100mV, 走纸速度 4mm/min, 记录 5 或 10 分钟。用空气饱和的水作标准样。每项测定, 做三个重复。

固氮活性的测定 用乙炔还原为乙烯的方法。取藻液 2ml, 放入 6.3ml 的反应瓶中, 盖上反耳塞, 在真空泵下抽气充氩一次, 放平压后, 加入 0.8ml C_2H_2 , 置瓦勃氏呼吸仪下摇动保温 30 分钟, 摇动频率 100 次/分, 温度 30°C , 两支 40W 日光灯下 10cm 距离光照, 反应 30 分钟, 加 20% 的三氯醋酸或饱和碳酸钾溶液 0.2ml 终止反应。形成的乙烯在气相色谱仪(“上分”100 型)测定, 用氢火焰离子化鉴定器, 柱为 GDX-502 固定相(天津化学试剂二厂生产) 4mm $\times$ 2m。

蓝藻生长速率的测定 一般用 Brinkmann 探针比色计监测, 滤光片为 500nm, 用 10mm 光径的光纤探针。有时也用分光光度计(“上分”三厂 721 型)测定, 波长 500nm, 读光密度(O. D.) 值, 用 5mm 光径的比色杯。在此情况下, 1O. D. 相当于 1.1mg 的藻液。

结 果

(一) 在不同生长条件下氧分压与柱孢鱼腥藻固氮活性的关系

柱孢鱼腥藻(O. D. 0.33)在有氮(通氮气)和缺氮(通氩气)的条件下培养, 它们的固氮活性是十分不同的; 在这种情况下, 它们对 pO_2 的忍受范围, 亦表现出明显的差异(图 1)。在固氮活性低的生长条件(通氮), pO_2 的半抑制浓度在 0.35atm 左右; 而在高活性生

长条件(通氮), pO_2 的半抑制浓度可达 0.5atm 左右。缺氮生长的藻细胞对氧忍受范围的

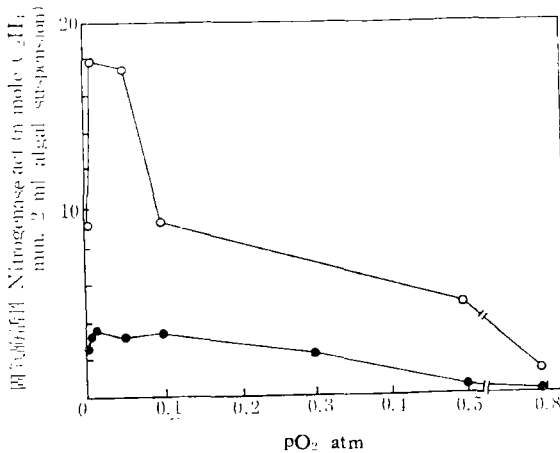


图1 在不同生长条件下 pO_2 对柱胞鱼腥藻固氮酶活性的不同作用

Fig. 1 Under different growth conditions the effects of pO_2 on the nitrogenase activity of *Anabaena cylindrica* are different.

- — ○ 生长在 0.5% CO_2 -99.5% Ar
growing in 0.5% CO_2 -99.5% Ar
● — ● 生长在 2.5% CO_2 -97.5% N_2
growing in 2.5% CO_2 -97.5% N_2

增大,说明藻细胞有可能通过提高呼吸速率而把较多的氧清除掉,使固氮酶在较高氧分压的环境中,仍表现较高的固氮活性。

另外,我们还可以看到微氧环境 0.001—0.1atm 对固氮酶的促进作用(图1),这种促进作用,在缺氮培养的蓝藻培养物中更为明显。藻细胞中的固氮酶在完全厌氧的环境中不能呈现最高活性,过多的氧对它又有抑制作用,只有微氧环境才显示最高活力。这说明氧在固氮酶的调节中起了重要作用;而这种氧调节很可能是通过呼吸作用进行的。

为了解呼吸作用对固氮酶的影响,我们进一步研究了在不同的生理条件下呼吸作用与固氮作用的关系。

(二) 在有氮(通氮气)培养中呼吸作用与固氮作用的关系

柱胞鱼腥藻在通入 2.5% CO_2 的 N_2 的培养中,如果对其呼吸速率、生长率及固氮活性进行连续测定,可见到它在生长过程中,其呼吸速率有一个抛物线形的变化:生长初期,呼吸速率较低;对数生长期,呼吸速率最高;对数生长后期,则又下降。这种情况,恰与固氮活力的变动相适应(图2)。

在有氮生长时,柱胞鱼腥藻所能达到的最高固氮比活是 4.63 n moles C_2H_4 /mg/min,而且总是出现在对数生长期。此数值一般只及缺氮(通氮气)生长所能达到的最高比活的 1/6—1/8。呼吸速率在最高的对数生长期是 5.3 μ l O_2 /mg/h,与该种蓝藻培养在缺氮环境中的最高呼吸速率相差无几。这种情况表明,以这样的呼吸速率,足以排除氧对固氮酶的损害。

(三) 柱胞鱼腥藻培养在缺氮环境中固氮活性与呼吸作用的关系

藻细胞从有氮培养转至缺氮培养,其生理特性产生一系列变化:生长停滞,或只略有增加;光合放氧速率降低;藻蓝素光密度值 ($O. D._{618}$) 对叶绿素 a ($O. D._{645}$) 的比值从 1.5 降至 0.8,使培养物的颜色由蓝绿色变为绿色甚至黄色。此时,藻细胞的固氮酶活性从原来的 3.2 n moles C_2H_4 /mg/min 增至 50 小时后的 21 n moles C_2H_4 /mg/min 而呼吸速率则相应地从原来的 2.0 μ l O_2 /mg/h 增至 5.3 μ l O_2 /mg/h (图3)。固氮作用的变化再次表

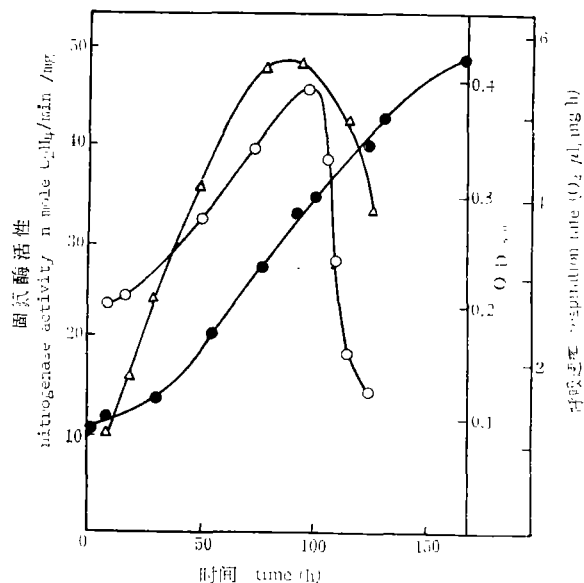


图 2 柱胞鱼腥藻在通氮气培养时呼吸作用与固氮作用的关系

Fig. 2 The relationship between respiration rate and N₂-fixing activity in *A. cylindrica* grown in 2.5%CO₂-97.5%N₂.

△——△固氮活性 Nitrogenase act. O——O呼吸速率 Respiration rate
●——●生长曲线 growth curve

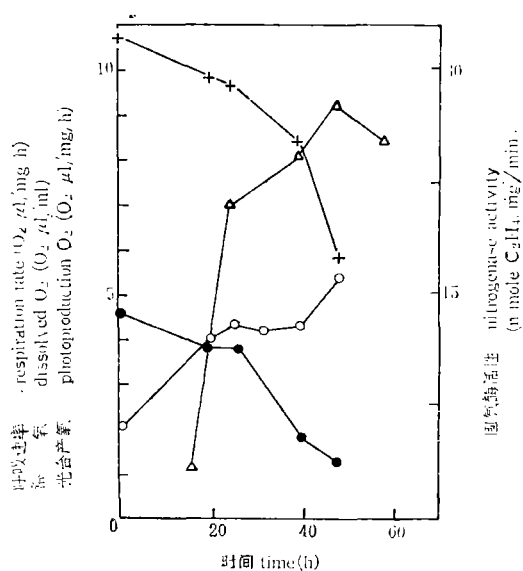


图 3 柱胞鱼腥藻在通氮气培养时,其呼吸速率与固氮活性的关系

Fig. 3 The relationship between respiration rate and nitrogenase activity in *A. cylindrica* grown in 0.5%CO₂-99.3%Ar.

△——△固氮活性 N₂-fixing activity O——O呼吸速率 Respiration rate
●——●光产氧速率 Photoproduction O₂ ×——×溶解氧 Dissolved O₂

现出与呼吸作用的一致性。

(四) 光诱导柱孢鱼腥藻的呼吸速率与固氮活性的共同增进

光对蓝藻呼吸作用的影响,虽然有所谓“光抑制”的观点,但这是在低氧分压(低于0.5%气相体积)情况下的现象,在高氧分压情况下,光对藻类的呼吸有明显的促进作用^[6]。我们用生物氧监测仪进行连续监测,也证明了这点(图4)。

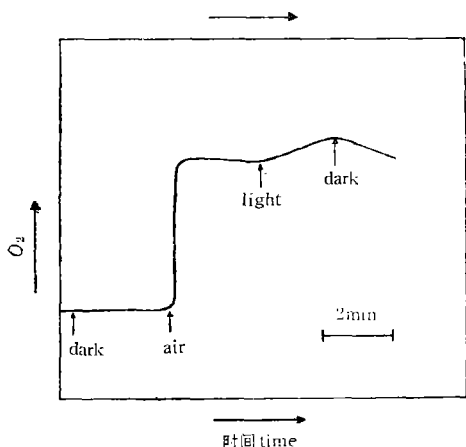


图4 光对柱孢鱼腥藻呼吸作用的影响

Fig. 4 The effects of light on respiration of *A. cylindrica*.

藻细胞(O.D. 0.56) 5ml 置生物氧监测仪上测定,加入空气,对呼吸无多大影响;光照(10,000 lx)对呼吸作用有明显促进。

Oxygen is monitored using oxygen monitor (YSI model 53). The reaction cell contains 5ml suspension of *A. cylindrica* (O.D. 0.56). As shown in the figure, light (10,000 lux) distinctly stimulates the O_2 -consumption but adding air has no pronounced effect

柱孢鱼腥藻培养在有氮条件下,经5小时黑暗,其呼吸速率即趋近于零,固氮活性亦降至很低。此时再进行光照(10,000 lx),随着光照时间的增加,固氮活力亦相应增加(图5)。

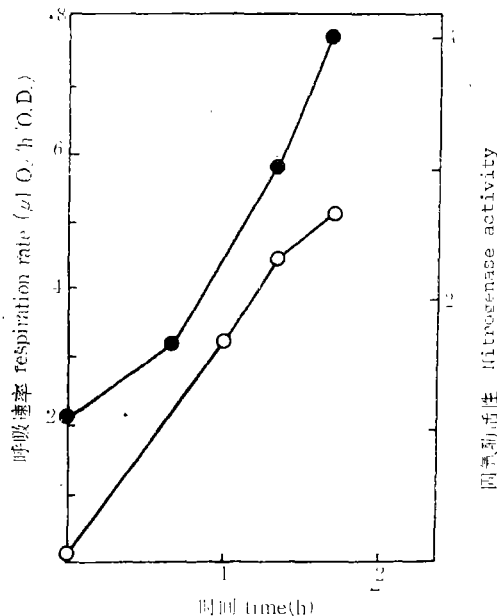


图5 光诱导柱孢鱼腥藻的呼吸速率与固氮酶活性的共同增进

Fig. 5 Light induces the simultaneous increase in the respiratory rate and nitrogenase activity of *A. cylindrica*.

A. cylindrica (O.D. 0.4) grown in 99.95% N_2 -0.03% CO_2 in the light (5,000 lx). Before determination, the alga was incubated in the dark for 5 hours

●——● 固氮酶活性 Nitrogenase activity
○——○ 呼吸速率 Respiration rate

讨 论

在我们的试验条件下,采用生物氧, pH 及生长连续监测系统测定,发现柱孢鱼

腥藻不管是在有氮培养、缺氮培养或光诱导固氮酶形成的条件下,它的固氮活性的变动皆与其呼吸速率的变动成正相关。呼吸作用如何影响固氮酶? 目前虽未搞得十分清楚,但在清除氧及供应电子、还原剂以及 ATP 方面,其作用是明显的。对于一般生物,呼吸的主要作用是提供 ATP 及还原剂,供给各种耗能生理过程的需要,也是固氮作用所需要的。但在蓝藻中,ATP 的生产并作为氮固定的能源,光合磷酸化过程是重要的,循环光合磷酸化就能提供固氮作用的全部需要,支持最大的固氮活力^[17]。Stewart 等(1976)证明,柱胞鱼腥藻培养在连续光照并通空气或 N₂/CO₂ 的条件下,ATP 是保持稳定的;加入 DCMU 抑制非循环光合磷酸化及氧化磷酸化,则固氮能力下降,这表明是还原剂而不是 ATP 的短缺,因为 ATP 库仍保持在高水平上^[16]。在黑暗中,蓝藻氧化磷酸化产生的 ATP,只很少一部分为固氮所利用,支持一个极低的固氮酶活力^[16]。所以,呼吸作用对固氮作用的影响,主要是通过呼吸链将氧从固氮酶的部位清除掉,保护固氮酶免受氧的损伤,同时提供还原剂和电子。

呼吸保护的作用机理目前还不很清楚,尚需我们深入研究。但通过对呼吸链微妙的修饰并加强其作用,无疑是重要的。另外,氢酶的作用亦无容忽视。它吸收的氢,主要消耗于需氧反应,即 Knallgas 反应,还能为固氮酶提供还原剂与能量^[4]。鉴于 Knallgas 反应也受 KCN, CO 等一些呼吸链的抑制剂所抑制^[4],因此氢酶的除氧作用与呼吸作用的关系也是非常密切的。

参 考 文 献

- [1] 王业勤等, 1982. 固氮蓝藻细胞中保护固氮酶的除氧系统. 植物学报, **24**(3): 240—281.
- [2] 陈因、方大惟, 1983. 分子氢支持蓝藻 *Anabaena* 7120 固氮的生理基础研究. 植物生理学报, **9**(4): 413—420.
- [3] 程双奇、莫熙穆, 1981. 固氮鱼腥藻 (*Anabaena azotica* Ley HB 686) 的固氮和放氢作用. 植物生理学报, **7**(3): 241—248.
- [4] Bothe, H., Tennigkeit, J., G. Eisbrenner, 1977, The utilization of molecular hydrogen by the blue-green alga *Anabaena cylindrica*. *Arch Microbiol.*, **114**: 43—49.
- [5] Bothe, H., Nelles, H., Häger, K. P. Papen, H. and G. Neucr, 1984. Physiology and Biochemistry of N₂-Fixation by cyanobacteria. in Veeger, C. and W. E. Newton (eds.), *Advances in Nitrogen Fixation Research*. Nijhoff/Junk, Pudoc, Netherlands. 1984. pp. 199—210.
- [6] Brown, A. H. and G. C. Webeter, 1953. The influence of light on the rate of respiratory of the blue-green alga *Anabaena*. *Am. J. Bot.*, **40**: 753—758.
- [7] Gallon, J. R., 1981. Oxygen sensitivity of nitrogenase A problem for biochemistes and nitrogen-fixing organism. *Trends in Biochem. Sci.*, **6** (1): 19—23.
- [8] Gallon, J. Kurz, R. W. G. W., T. A. LaRue, 1973. Isocitrate supported nitrogenase activity in *Gloeocapsa* spLB759. *Can. J. Microbiol.*, **19**: 461—465.
- [9] Hallenbeck, P. C., Kostel, P. J. J. R. Benemann, 1979. Purification and properties of nitrogenase from the cyanobacterium, *Anabaena cylindrica*. *Enr. J. Biochem.*, **98**(1): 275—284.
- [10] Lex, M. and W. D. P. Stewart, 1973. Algal nitrogenase. Reductant pools and photosystem I activity. *Biochim. Biophys. Acta*, **292**: 198—203.
- [11] Kumar, A., Tabita, F. R., Ch. van 'Baalen, 1982. Isolation and characterization of heterocysts from *Anabaena* strain CA. *Arch. Microbiol.*, **133**(2): 103—109.
- [12] Morris, J. G., 1976. The physiology of obligate anaerobiosis. *Adv. Microb. Physiol.*, **12**: 169—246.
- [13] Murry, M. A., Horne, A. J. and J. R. Benemann, 1983. Physiological studies of oxygen protection mechanism in the heterocysts of *Anabaena cylindrica*. *Appl. and Environ. Microbiol.*, **47**(3): 449—454.
- [14] Post, E. Kleiner, D. and J. Oelze, 1983. Whole cell respiration and nitrogenase activities in *Azotobacter vinelandii* growing in oxygen controlled continuous culture. *Arch. Microbiol.*, **134**(1): 68—

72.

- [15] Robson, R. L. and J. R. Postgate, 1980. Oxygen and hydrogen in biological N_2 -fixation. *Ann. Rev. Microbiol.*, **34**: 183—207.
- [16] Stewart, W. D. P. and P. J. Bottomley, 1976. Nitrogenase of Blue-Green Algae. in *Proceedings of the 1st International Symposium on Nitrogen Fixation*. Vol. I, p. 257. Academic Press, London.
- [17] Stewart, W. D. P., 1977. A botanical ramble among the blue-green algae. *Br. phycol. J.*, **12**: 89—115.
- [18] Tel-Or, E., and W. D. P. Stewart, 1976. Photosynthetic electron transport, ATP synthesis, and nitrogenase activity in isolated heterocysts of *Anabaena cylindrica*. *Biochem. Biophys. Acta*, **423**: 189—195.
- [19] Wolk, C. P., 1980. Cyanobacteria (Blue-green Algae) in Stumpe, P. K. and E. E. Conn, eds. *The Biochemistry of Plants*, Vol. I pp. 659—688. Academic Press, New York.

THE RESPIRATION PROTECTING NITROGENASE AGAINST OXYGEN IN *ANABAENA CYLINDRICA*

He Zhenrong, Du Daixian, Lin Huimin, Dai Lingfen and Xing Wusen
(*Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan*)

Abstract

When *A. cylindrica* was grown under the condition of N_2 -deficiency, an increase in N_2 -fixing activity and a decrease in oxygen sensitivity were found simultaneously. The acetylene reduction was inhibited by 50% by 0.5 atm. partial pressure of oxygen (pO_2) in the N_2 -deficient algal cells, and by 0.35 atm. pO_2 in the N_2 -sufficient algal cells. It indicates that the enhanced nitrogenase activity is possibly due to an increase in respiratory O_2 -consumption of the alga.

Further research suggests that there is close relationship between respiration and nitrogenase activity. When the alga grew under such conditions as N_2 -sufficiency, N_2 -deficiency and light induced nitrogenase synthesis, the N_2 -fixing activity varied with respiration rate correspondingly. Our results support the concept that the main means of nitrogenase against O_2 damage is respiration protection.

Key words *Anabaena cylindrica*, nitrogenase, respiration protection