

# 受固氮活性制约的蓝藻固氮去铵阻抑 及其与生理条件的关系\*

陈 因 方 大 惟

(中国科学院上海植物生理研究所, 200032)

## 摘 要

在不同气体环境中培养的蓝藻 *Anabaena* 7120 固氮活性各异, Ar + CO<sub>2</sub> 中最大, 空气中次之, Ar 中最小。固氮活性高者去铵阻抑速率大, 反之则小。它们对各种生理条件的反应不一样, 固氮活性高者, 其去铵阻抑速率受氧和氮的抑制小。在氮和氧加合条件下, 三种活性的蓝藻去铵阻抑均加快, 但活性低者慢而小些。光强减弱或加光合抑制剂时, 固氮活性低者去铵阻抑速率显著小于活性高者, 而添加外源的蔗糖或丙酮酸时, 也是固氮活性低者小些。

**关键词** 鱼腥藻, 固氮去铵阻抑, 光合作用, 生理条件

前文揭示<sup>[3]</sup>, 经氩、空气和 Ar + CO<sub>2</sub> 等不同组成气体处理或在这些不同组成气体条件下培养的蓝藻, 它们的固氮、放氢和吸氢活性都有明显的差异, 固氮活性以 Ar + CO<sub>2</sub> 下为最高, 空气和氩中依序次之<sup>[3]</sup>, 其去铵阻抑速率也随蓝藻所处的内外生理条件而异<sup>[5,6]</sup>。另据 kliukis 报道, NH<sub>4</sub>Cl 抑制棕色固氮菌固氮活性的程度受不同氧浓度、pH 和呼吸率所导致的固氮活性高低制约, 活性高者受 NH<sub>4</sub>Cl 的抑制程度小些, 反之则大。从这些现象看来, 氮化物对固氮的阻抑和解阻抑作用似乎与固氮生物本身的固氮活性高低以及制约固氮活性大小的生理条件有一定的联系。为此, 本文对此问题进行了探讨。

## 一、材料和方法

蓝藻 *Anabaena* 7120 按前文<sup>[1]</sup>方法培养和收集。不同固氮活性蓝藻的获得按另文<sup>[3]</sup>方法进行, 收集到的藻体以营养液悬浮, 转放到 100—150 ml 的试剂瓶中, 盖上橡皮塞, 抽去瓶中气体后作 (1) 充入 100% 氩气; (2) 充入空气; (3) 充入 97:3 的 Ar:CO<sub>2</sub> 等处理。所有各种处理中藻的光密度值 (650nm, 1cm) 均控制在 0.2 左右。另外, 按照实验方案有时还要加入或注入处理的物质或气体, 在用作固氮酶合成和活性实验的培养液中加入  $2 \times 10^{-3}$  mol/L NH<sub>4</sub>Cl, 然后放到原来培养的条件下培养 24 小时之后, 定时取样以气相层析法测定固氮活性。其他项目测定均按前文<sup>[1]</sup>。

## 二、实验结果

### (一) 不同固氮活性蓝藻的固氮去铵阻抑

\* 国家自然科学基金资助课题。

表 1 不同组成气体中培养的蓝藻固氮去铵阻抑

Table 1  $\text{NH}_4^+$ -derepression of nitrogen fixation in *Anabaena* cultured in various composition of gas

处 理 Treatment (%)	固 氮 活 性 Nitrogenase activity ( $\text{nmol C}_2\text{H}_4/\text{h} \cdot \text{ml algae suspension}$ )					
	处 理 后 时 间 Time after treatment (h)					
	24	48	72	96	120	144
Ar 100	95.8	101.2	90.6	40.6	36.9	33.2
100 $\text{NH}_4\text{Cl}$	0	0	2.1	6.7	10.1	16.5
Air 100	125.4	148.4	176.5	203.5	211.1	218.4
100 $\text{NH}_4\text{Cl}$	0	0	3.2	7.9	14.5	21.1
$\text{Ar}:\text{CO}_2$ 97:3	179.5	199.6	263.4	305.6	327.2	347.2
97:3 $\text{NH}_4\text{Cl}$	0	0	15.7	23.2	33.7	44.2

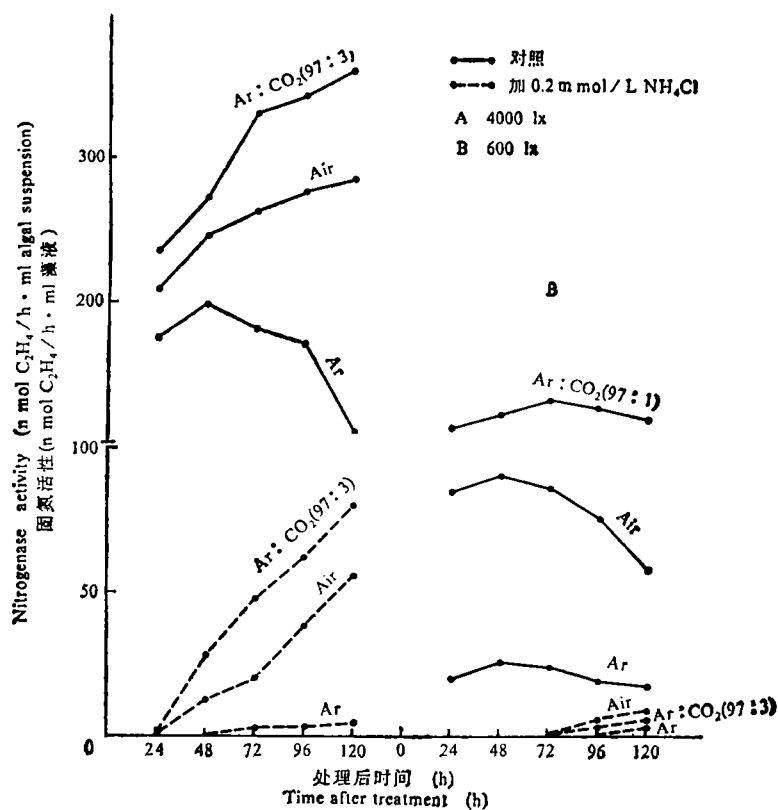
注:  $\text{NH}_4\text{Cl}$  浓度为:  $2 \times 10^{-3}$  mol/L。

图 1 光照强度对蓝藻固氮去铵阻抑的影响

Fig. 1 Effect of light intensity on the  $\text{NH}_4^+$ -derepression of nitrogen fixation in *Anabaena*

不同组成气体下培养得到固氮活性有异的蓝藻去铵阻抑速率不一样。固氮活性最高

者 (Ar + CO<sub>2</sub> 中培养的)最快,中等活性的(空气中)次之,活性最低者 (Ar 中,蓝藻长期在 Ar 和无氮培养基中生长,由于厌氧和缺少固氮底物,固氮活性易下降)最慢(表 1),显示蓝藻固氮去铵阻抑速率和其本身固氮酶活性有一定的联系。

### (二) 固氮活性有异的蓝藻固氮去铵阻抑和光合作用的关系

蓝藻固氮活性高低受光合作用制约,光合放氧能力大者,其固氮活性高<sup>[5]</sup>,去铵阻抑也受光合作用调控<sup>[5]</sup>,并且与蓝藻固氮活性大小有联系。这体现在:

1. 光强度减弱时,所有处理的蓝藻的去铵阻抑均延迟,固氮活力最低者最慢(图 1)。
2. 添加光合抑制剂时,三种固氮活性的蓝藻的去铵阻抑速率都有不同程度延迟,固氮活性低者更明显些(表 2)。
3. 外源蔗糖和丙酮酸(资料未列出)对不同固氮活性蓝藻的去铵阻抑均有促进作用,固氮活性高者更大些(表 3),显示光合产物的还原库 (reductant pool) 在去铵阻抑中也有作用<sup>[6]</sup>。

表 2 光合抑制剂对蓝藻固氮去铵阻抑的影响

Table 2 Effect of photosynthetic inhibitors on the NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-derepression of nitrogen fixation in *Anabaena*

处 理 Treatment (mol/L)	固 氮 活 性 Nitrogenase activity (nmol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /h · ml algae suspension)					
	处 理 后 时 间 Time after treatment (h)					
	24	48	72	96	120	144
Ar, 不加物	53.5	96.4	104.3	85.3	84.0	80.1
NH <sub>4</sub> Cl	0	3.8	8.6	16.4	19.3	22.4
NH <sub>4</sub> Cl, DNP 1 × 10 <sup>-4</sup>	0	2.1	4.2	6.3	7.2	8.6
NH <sub>4</sub> Cl, CCCP 1 × 10 <sup>-4</sup>	0	2.7	5.4	8.1	7.6	10.4
Air 不加物	98.8	106.6	114.8	122.1	131.4	143.2
NH <sub>4</sub> Cl	0	6.4	9.8	20.1	31.4	46.4
NH <sub>4</sub> Cl, DNP 1 × 10 <sup>-4</sup>	0	2.9	4.9	7.0	8.9	9.8
NH <sub>4</sub> Cl, CCCP 1 × 10 <sup>-4</sup>	0	3.2	6.8	10.2	11.4	13.1
Ar:CO <sub>2</sub> (97:3) 不加物	157.7	165.3	174.3	184.2	197.4	211.3
NH <sub>4</sub> Cl	0	14.3	28.6	42.9	45.4	58.6
NH <sub>4</sub> Cl, DNP 1 × 10 <sup>-4</sup>	0	3.7	5.8	8.2	9.8	11.0
NH <sub>4</sub> Cl, CCCP 1 × 10 <sup>-4</sup>	0	4.4	8.6	12.2	13.6	15.4

注: NH<sub>4</sub>Cl 浓度为: 2 × 10<sup>-3</sup> mol/L。

### (三) 几种生理因素对不同固氮活性蓝藻去铵阻抑的影响

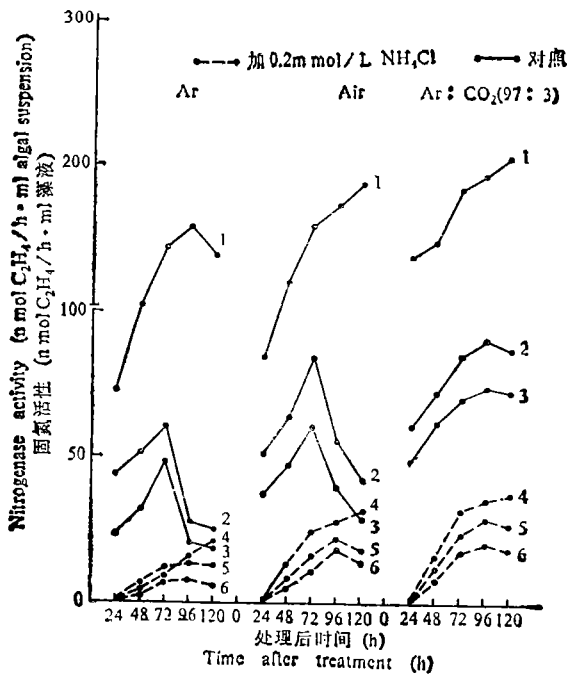
一般来说,作为固氮酶天然底物的 N<sub>2</sub> 对蓝藻还原乙炔有抑制作用,而在培养过程中供应一定配比的 CO<sub>2</sub> 和 N<sub>2</sub> 混合气体时,固氮活性则显著增长<sup>[4]</sup>,固氮去铵阻抑也是如此<sup>[5]</sup>。表 4 显示,在 N<sub>2</sub> 的影响下,固氮活性高的蓝藻去铵阻抑快一些,其固氮活性则和前文<sup>[4]</sup>一样,可能由于光合产物还原库和固氮酶蛋白合成的物质基础丰富,明显高于不加 N<sub>2</sub> 而仅供给 CO<sub>2</sub> 的。

表 3 蔗糖对蓝藻固氮去铵阻抑的影响

Table 3 Effect of sucrose on the  $\text{NH}_4^+$ -derepression of nitrogen fixation in *Anabaena*

处 理 Treatment	固 氮 活 性 Nitrogenase activity ( $\text{nmol C}_2\text{H}_4/\text{h} \cdot \text{ml}$ algae suspension)				
	处 理 后 时 间 Time after treatment (h)				
	24	48	72	96	120
Ar 不加物	112.1	142.0	154.8	108.9	63.1
$\text{NH}_4\text{Cl}$	0	0.8	2.9	12.6	26.0
蔗糖	124.1	170.0	186.5	183.0	179.5
$\text{NH}_4\text{Cl}$ , 蔗糖	7.5	8.9	10.7	16.9	28.6
Air 不加物	148.9	178.8	199.8	209.7	219.5
$\text{NH}_4\text{Cl}$	0	1.0	14.0	15.8	31.0
蔗糖	168.5	195.6	216.5	233.0	249.5
$\text{NH}_4\text{Cl}$ , 蔗糖	8.7	19.4	26.5	32.4	45.4
Ar: $\text{CO}_2$ (97:3) 不加物	197.9	227.0	249.1	273.4	313.0
$\text{NH}_4\text{Cl}$	0	1.6	21.0	29.7	40.4
蔗糖	200.2	230.5	250.1	292.5	307.5
$\text{NH}_4\text{Cl}$ , 蔗糖	9.8	28.4	39.6	47.6	71.2

注:  $\text{NH}_4\text{Cl}$  浓度:  $2 \times 10^{-3}$  mol/L; 蔗糖浓度: 0.5%。



1,4 不加物; 2,5 加 20%  $\text{O}_2$ ; 3,6 加 40%  $\text{O}_2$

图 2 氧对蓝藻固氮去铵阻抑的影响

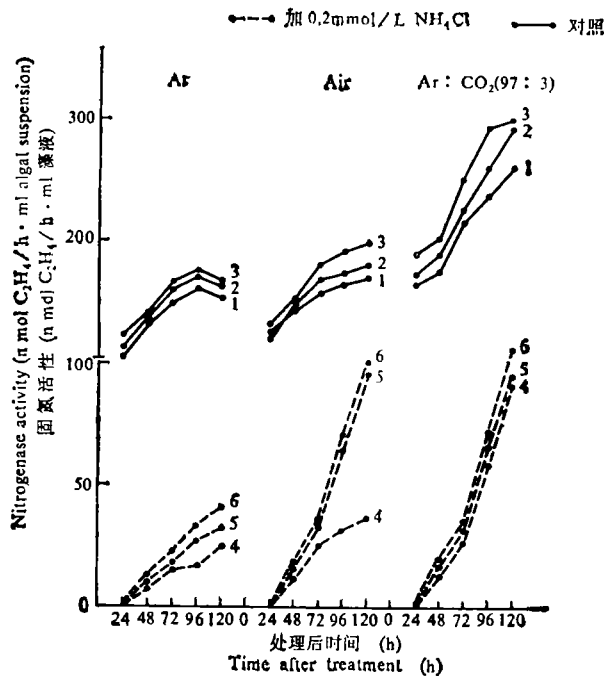
Fig. 2 Effect of oxygen on the  $\text{NH}_4^+$ -derepression of nitrogen fixation in *Anabaena*

表 4 分子氮对蓝藻固氮去铵阻抑的影响

Table 4 Effect of molecular nitrogen on  $\text{NH}_4^+$ -derepression of *Anabaena*

处 理 Treatment	固 氮 活 性 Nitrogenase activity ( $\text{nmol C}_2\text{H}_4/\text{h} \cdot \text{ml algae suspension}$ )					
	处 理 后 时 间 Time after treatment (h)					
	24	48	72	96	120	144
Ar 不加物	49.3	89.3	91.8	90.3	89.3	88.4
$\text{NH}_4\text{Cl}$	0	0.7	1.6	6.2	12.4	18.0
$\text{N}_2$	41.8	83.4	86.6	85.1	84.5	83.1
$\text{NH}_4\text{Cl}, \text{N}_2$	0	1.4	3.1	4.2	6.9	13.2
Air 不加物	89.7	97.3	104.8	119.4	120.1	125.2
$\text{NH}_4\text{Cl}$	0	10.0	19.9	26.8	33.9	38.3
$\text{N}_2$	85.7	90.4	96.3	103.3	110.3	117.3
$\text{NH}_4\text{Cl}, \text{N}_2$	0	2.2	3.9	8.5	17.2	23.7
Ar + $\text{CO}_2(97:3)$ , 不加物	99.1	107.2	123.9	138.0	155.1	169.1
$\text{NH}_4\text{Cl}$	0	22.6	25.4	30.5	36.6	48.4
$\text{N}_2$	84.2	118.2	142.1	162.4	173.5	188.4
$\text{NH}_4\text{Cl}, \text{N}_2$	0	9.8	20.0	22.2	25.1	30.2

注:  $\text{NH}_4\text{Cl}$  浓度:  $2 \times 10^{-3}$  mol/l.;  $\text{N}_2$  浓度: 30%。



1,4 不加物; 2,5 加 20%  $\text{H}_2$ ; 3,6 加 20%  $\text{H}_2, 15\% \text{O}_2$

图 3 氢和氧加合对蓝藻固氮去铵阻抑的影响

Fig. 3 Effect of the addition of  $\text{H}_2$  together with  $\text{O}_2$  on the  $\text{NH}_4^+$ -derepression of nitrogen fixation in *Anabaena*

氧是抑制蓝藻固氮和去铵阻抑的<sup>[5]</sup>,其抑制程度随氧浓度增高而增大,尤以固氮活性低者为甚(图2)。

分子氢支持蓝藻固氮,加速去铵阻抑速率<sup>[5]</sup>。图3显示分子氢对不同固氮活性的蓝藻去铵阻抑都有不同程度的加速作用,固氮活性高者去铵阻抑快一些。

作为固氮能量来源之一的羟化反应<sup>[7]</sup>(knallgas reaction)对固氮去铵阻抑速率也有影响。当 H<sub>2</sub> 和 O<sub>2</sub> 一同加入反应系统时,不同固氮活性蓝藻的去铵阻抑都比单加 H<sub>2</sub> 的快,其中固氮活性高的蓝藻有受益大的趋势(图3)。

### 三、讨 论

固氮作用的铵阻抑(或铵阻抑效应)和去铵阻抑及其调节是生物固氮研究中的基本问题之一。一般多从细胞遗传水平上(例如对铵调节的遗传分析,以及采用遗传操作技术选择忍耐氨、分泌氨且固氮活性又高的固氮微生物工程株等,并已有成功的报道)进行着探讨。这是一种多半发生在结构基因的转录和有关信息的翻译水平上,并且是控制和决定着固氮酶有关组分的浓度及其在细胞内能否存在的调节,应该说是调节的主要方面。但是,从前文<sup>[3]</sup>和本文的结果来看,蓝藻的固氮去铵阻抑与其内外在生理条件及其本身的固氮活力水平有关系。这种生理调控性的工作,对研究固氮作用的去铵阻抑效应和寻求提高蓝藻固氮效率的实际应用来说,显然也应引起重视。

蓝藻固氮依赖于光,光通过光合作用与固氮发生联系,并且对其进行调节<sup>[1]</sup>。这种调节既表现在固氮酶活性的变化上<sup>[1]</sup>,也体现在固氮去铵阻抑中<sup>[5-6]</sup>。本文结果揭示,不同固氮活性蓝藻的去铵阻抑也都受光合作用的制约,在光合受到削弱的条件下,固氮活性低者受到的影响更大些。其原因是多方面的,就固氮活性高的蓝藻来说,由于其光能利用效率高<sup>[3]</sup>,因而除了其固氮所需要的还原物质,能量比较充足以外,其体内催化固氮产物氨进一步同化的谷氨酰胺合成酶活性也可能大一些<sup>[2]</sup>,以致体内氨的有效积累高些,这样也就避免了氨对固氮反应的反馈性抑制。另外,正因为固氮活性高的蓝藻光合效率高,其碳架供应可能比较充足,因而体内积累的氨可以被同化合成酶蛋白,于是固氮酶蛋白合成的物质基础增加,最终导致去铵阻抑加快,固氮效率提高,而在固氮活性低的蓝藻中则可能完全相反。这再次显示,深入研究光合和固氮之间的协调机制依然是重要的。

蓝藻固氮的去铵阻抑除受外界(如 pH、厌氧与否、光照、温度等)和内在(如光合功能和其它生理代谢)条件制约之外<sup>[5-6]</sup>,固氮酶本身活性的强弱也是很重要的因素。本文结果表明,由不同气体组成导致固氮酶活性有异的蓝藻,活性高者,去铵阻抑速率相对快些,而且受弱光、光合抑制剂、氧和分子氮的削弱程度也小一些。这显示蓝藻本身固氮酶活力水平的高低似乎是抵御影响固氮去铵阻抑中不良因素的内在基础。此种现象不仅与 Kliugkist 报道的 NH<sub>4</sub>Cl 对棕色固氮菌固氮的抑制程度受由不同浓度氧、pH 及细胞呼吸率导致的固氮活力高低制约的结果相似<sup>[8]</sup>,而且我们从中还可以得到这样的启示,即研究固氮生物的去铵阻抑及其调节机制,乃至应用于生产实践时,亦应考虑固氮生物本身的固氮酶活力水平。

## 参 考 文 献

1. 陈 因、方大惟, 1983: 蓝藻 *Anabaena* 7120 固氮的光调节。植物生理学报, 9: 51—59 页。
2. 陈 因、方大惟, 1984: 蓝藻光合固氮和谷氨酰胺合成酶之间关系的初探。植物生理学通讯, (5): 24—27 页。
3. 陈 因、方大惟, 1986: 蓝藻 *Anabaena* 7120 的固氮及其和光合作用的关系。植物生理学报, 12: 355—361 页。
4. 陈 因、方大惟, 1989: 分子氮影响下的蓝藻 *Anabaena* 7120 乙炔还原。植物生理学报, 15: 245—250 页。
5. 陈 因、方大惟, 1990: 不同 pH 下蓝藻固氮的去铵阻抑及其和生理条件的关系。植物生理学通讯, (3): 24—28 页。
6. 陈 因、方大惟, 1991: 不同生理条件下外源蔗糖对蓝藻固氮去铵阻抑的影响。植物生理学通讯, 27(4): 266—271 页。
7. Bothe H, Eisbrenner G., 1980: The hydrogenase-nitrogenase relationship in nitrogen-fixing organism. In Bothe H, Trebst A (eds) *Biology of Inorganic nitrogen and Sulfur*. Springer-Verlag N. Y. pp. 141—150.
8. Kliugkist J., 1984: Inhibition of nitrogenase activity by ammonium chloride in *azotobacter vinelandii*. *Jour. Bacteriol.* 157:148—151.

## NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-DEREPRESSION OF NITROGEN FIXATION IN BLUE-GREEN ALGAE *Anabaena* 7120 RESTRICTED BY NITROGEN-FIXING ACTIVITY AND ITS RELATION TO PHYSIOLOGICAL CONDITIONS

Chen Yin and Fang Dawei

(Shanghai Institute of Plant Physiology, Academia Sinica, 200032)

### Summary

Under an atmosphere containing 97% Ar and 3% CO<sub>2</sub> or containing 100% Ar, the nitrogenase activity of *Anabaena* 7120 was much higher or lower, respectively, than that in air. When the treatment was done in the above listed atmosphere considerable variation in the NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-derepression of nitrogen fixation in *Anabaena* occurred. Moreover, the response of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-derepression of nitrogen fixation in *Anabaena* to physiological conditions differed. When algae was incubated in O<sub>2</sub> or N<sub>2</sub>, respectively, the extent of inhibition of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-derepression in *Anabaena* with a lower nitrogen-fixing activity was greater than that in one with a higher activity. A great acceleration of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-derepression of nitrogen fixation by hydrogen in *Anabaena* with a higher nitrogen-fixing activity was observed. The rate of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-derepression of nitrogen fixation in *Anabaena* with a higher nitrogen-fixing activity was significantly faster when the hydrogen was added with oxygen or added only with exogenous carbohydrates, such as sucrose or pyruvate, to the test system. Under weak light or in the presence of photosynthetic inhibitors in the reaction system, the NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-derepression of nitrogen fixation was more pronounced in *Anabaena* with a lower nitrogen-fixing activity.

**Key words** *Anabaena*, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-derepression, Photosynthesis, Nitrogen-fixing activity, Physiological conditions