

满江红鱼腥藻中氘的 生物学同位素效应研究*

张永波¹⁾ 施定基²⁾ 王文清¹⁾ 罗上庚³⁾

1) (北京大学技术物理系,北京 100871)

2) (中国科学院植物研究所,北京 100044)

3) (中国原子能科学研究院放射化学研究所,北京 102413)

用含重水0%、10%、30%、60%、90%的BG-11培养基培养满江红鱼腥藻(*Anabaena azollae*)并测定不同生长时间的光合活性、呼吸活性、固氮酶活性以及生长曲线,同时测定了室温吸收光谱及低温荧光光谱,用扫描电镜观察了细胞形态的变化。实验结果表明,重水使指数生长期后延,显著抑制光合活性、呼吸活性和固氮酶活性;随着重水含量的增加,藻胆素和类胡萝卜素相对含量逐渐降低,光系统I与光系统II的相对荧光强度 F_{735}/F_{695} 变小,光合作用光能分配趋向于光系统II。根据净光合最大值和固氮酶最大值讨论了氘的同位素效应。

关键词 满江红鱼腥藻 光合活性 氘 同位素效应

自1932年Urey等实验发现氘之后,人们就认识到氢和氘的化学、物理性质的差别会导致它们对生物活性的影响显著不同,这种预测早已被完全证实,氘化生物体系已成为分子生物学研究中的一种重要方法^[1]。生物大分子的结构测定需要多维NMR及稳定同位素编辑(isotope-editing)技术^[2,3],而各种同位素标记化合物则是其必需的条件,微藻是稳定同位素(²H,¹³C,¹⁵N)标记化合物的理想来源^[1,2]。可以通过改变其生长环境而制造不同的标记化合物^[4]。氘的标记产物就是通过向培养基中加入重水来得到的。当重水含量较小时,对微藻的影响不明显,而当重水含量较大时,则呈显著的抑制作用^[5,6]。这些研究都是用单细胞藻为材料、以生物量或者同化产物的分析为基础,尚未见用具异型胞的丝状体蓝藻作研究的报道,同时过去的工作只是给出了累积的结果,没有揭示出抑制的动态过程。为了探索利用微藻光合作用反应处理氘废水的可行性,需进行微藻筛选。本文采用固氮的丝状体蓝藻——满江红鱼腥藻作为材料,通过几项生理指标直接跟踪重水对蓝藻抑制作用的全部过程,研究在不同时间的抑制作用。

* 核工业科学基金资助项目

收稿日期:1995-07-21 收到修改稿日期:1996-06-17

1 材料和方法

1.1 材料

实验所用的满江红鱼腥藻(*Anabaena azollae*)按照文献[7]处理,接种于不含重水(D_2O)和含重水10%、30%、60%、90%的BG-11培养基中,在 $28 \pm 1^\circ C$ 恒温、振荡(频率为2.17 Hz)、照光培养,光强为 $150 \mu mol/m^2 \cdot s$ 。

1.2 实验方法

1.2.1 生长曲线的测定 此步骤与光合测量同步进行,采用细胞计数法。用国产XSZ-D型倒置生物显微镜在血球计数板上测量每毫升样品中异形胞数目。

1.2.2 光合和呼吸活性测定 移取5 ml 满江红鱼腥藻样品均匀悬浮液,用文献[8]的方法,测定放氧量、耗氧量;用文献[9]的方法测量叶绿素a(叶绿素分为a和b两类,满江红鱼腥藻只含a类)的质量浓度。然后,计算放氧与耗氧速率($\mu mol/mg \cdot h$),以表示光合活性和呼吸活性。

1.2.3 固氮酶活性的测定 根据文献[9]采用乙炔还原法。采用气相色谱法测量乙烯的量,并测量叶绿素a的质量浓度,计算固氮酶活性,以每毫克样品每小时还原生成的乙烯量($\mu mol/mg \cdot h$)表示。

1.2.4 吸收光谱的测定 取重水中经过一个培养周期的满江红鱼腥藻,用岛津UV-3000双光束双波长分光光度计测定室温下的吸收光谱。

1.2.5 低温荧光光谱的测定 取培养中期的满江红鱼腥藻,与甘油以体积比1:1混合,用日立MPF-4500型荧光分光光度计在77K温度下测量低温荧光光谱。激发波长分别为436 nm和575 nm。

2 结果和讨论

2.1 重水对满江红鱼腥藻净光合及真正光合活性的影响

图1(a)表示净光合活性曲线。当重水质量分数从0%—30%变化时,光合放氧速率及变化趋势并没有很大差别,而当重水质量分数达到60%—90%时,光合活性受到强烈抑制,尤其是

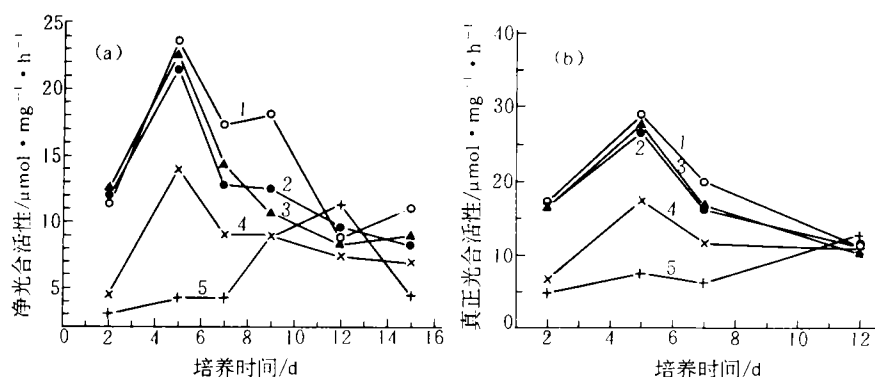


图1 不同浓度重水对满江红鱼腥藻的光合活性的影响
 w_{D_2O} : 1—0%, 2—10%, 3—30%, 4—60%, 5—90%

90%时,最大值约为无重水时的二分之一,而且最大值出现的时间也大大滞后。氘取代氢后,由于同位素效应而造成的生化反应速度上的差别使整个代谢过程受阻,生长受到影响。可以预料,由于重水中生化反应速度减低,对于小的机体,比如单细胞藻类,可以在较短时间内达到各部均衡,只是造成代谢减缓,但对大的机体,重水的作用往往是局部的,因而会使整体代谢紊乱,出现病态甚至死亡。图1(b)表明了不同浓度重水对真正光合活性的影响。从图1(b)可以看到,当重水含量达到90%时,最大值出现的时间远远落后于其他情况。

2.2 重水对满江红鱼腥藻呼吸活性的影响

图2(a)为呼吸活性的变化。该图与图1(a)几乎有同样的变化趋势,但在图2(a)中,不含重水的藻细胞呼吸活性一直是下降的;而含重水的则不然,它们都是先升后降,而且随着重水质量分数的增加,呼吸活性逐渐降低。这可能是因为就呼吸作用而言,藻细胞在重水中的生长有一个显著的适应期。从其他生理指标中(如光合活性和固氮酶活性)也可看出这个趋势,但用耗氧速率(呼吸活性)表示这一现象,可能较明显。

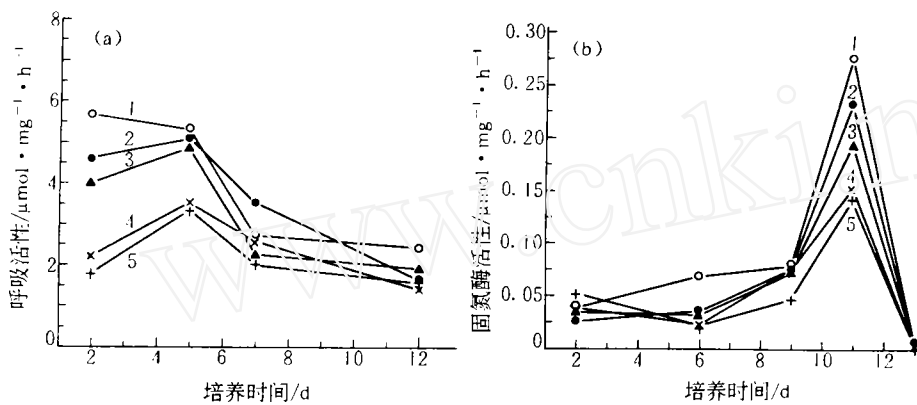


图2 不同浓度重水对满江红鱼腥藻呼吸活性和固氮酶活性的影响
 w_{D_2O} : 1—0%, 2—10% 3—30%, 4—60%, 5—90%

2.3 重水对固氮酶活性的影响

固氮酶活性的变化如图2(b)所示。从图2(b)可以看出,随着培养天数的增加,固氮酶活性和呼吸活性一样,对重水的加入很敏感且有一段适应期,适应期后固氮酶活性更明显。不含重水的满江红鱼腥藻,固氮酶活性逐步上升而达最大值,而含重水的则通常是先降低,等到适应了重水环境后才逐渐上升到最大值。因为最大值出现较晚,可以认为固氮酶对重水的响应较光合为慢。比较其最大值,固氮酶活性仍受重水的抑制,当重水质量分数为90%时,满江红鱼腥藻固氮酶活性的最大值仅为对照值的一半左右。

2.4 重水对光合色素的影响

藻细胞含有两种重要的光合色素——藻胆素和类胡萝卜素。它们的相对含量 R 反映了它们在光合效应中作用的大小。采用分光光度法测定在不同 w_{D_2O} 下光合色素藻胆素和类胡萝卜素的吸收光谱,根据750 nm 处的峰高计算 R 值,作 $R-w_{D_2O}$ 图并示于图3。从图3可以看出,重水使类胡萝卜素的含量升高。

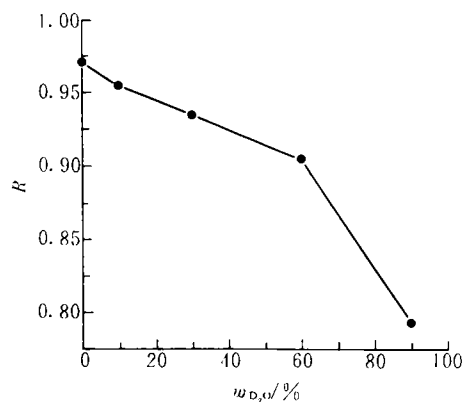


图3 满江红鱼腥藻中藻胆素和类胡萝卜素相对含量 R 的变化

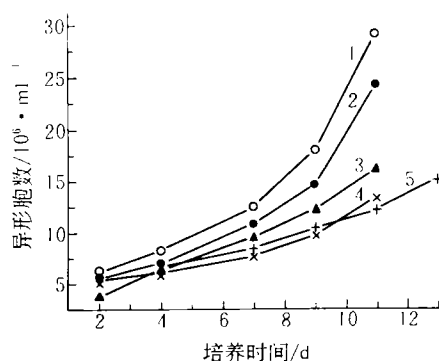


图4 不同浓度重水对满江红鱼腥藻生长的影响
 w_{D_2O} : 1—0%, 2—10%, 3—30%,
4—60%, 5—90%

2.5 重水对光能分配的影响

对于满江红鱼腥藻,根据光对能量的吸收与传递的不同,其荧光光谱分为光系统 I 和光系统 II (吸收波长分别在 733 nm 和 695 nm 处),光系统 I 与 CO_2 的固定相联系,光系统 II 与 H_2O 的氧化相联系。从低温 (77K) 荧光光谱,可以了解光合作用中光能在光系统 I 和光系统 II 之间的分配。当重水的质量分数为 0%、10%、30%、60%、90% 时,满江红鱼腥藻中光系统 I 与光系统 II 的相对荧光强度 F_{733}/F_{695} 分别为 5.29、3.90、3.60、3.50、2.38。这表明,随着重水质量分数增高,光合作用的光能分配明显地趋向于光系统 II。

2.6 重水对满江红鱼腥藻生长的影响

满江红鱼腥藻中的异形胞是固氮酶存在的场所。从扫描电镜照片上可以看到,随着重水含量增高,满江红鱼腥藻的丝状体变短,破碎严重,异形胞数目降低,这与各种生理活性降低相一致。满江红鱼腥藻生长曲线示于图 4,从图 4 可以看出,随着重水质量分数的增大,满江红鱼腥藻的生长受到抑制,这种影响表现在以下两个方面:(1)细胞的指数生长期后延,这是藻细胞对重水的适应^[5];(2)细胞数目减少。因为随着重水质量分数的增加,满江红鱼腥藻的光合活性与固氮酶活性都显著降低,故其同化产物大为减少,细胞分裂所需物质受到限制,所以分裂速度放慢,此外,当重水达到 60% 以上时,测得的各项生理活性已没有多大差别,可以认为此时氘的同位素效应已接近限值。

2.7 同位素效应

本实验用参数 β 代表同位素效应,即重水质量分数为 90% 时,微藻生理活性最大值与不含重水时的生理活性最大值的比值。取不同浓度重水中藻细胞的最大净光合作用值作图 5,从图 5 曲线 1 可以看出,重水对光合作用的抑制并不呈线性关系,这与文献^[5]的结果是不同的。根据图 5 曲线得到重水质量分数为 90% 时的 β 值约为 0.45,从变化趋势来看,在纯重水中的 β 值应该小于此值。固氮酶活性最大值的变化趋势(图 5 曲线 2)与净光合最大值变化不同,低浓度重水就可使活性迅速下降。从图 5 曲线 2 看出,当重水质量分数为 90% 时, β 值约为 0.5。

3 结 论

(1) 固氮的丝状体蓝藻——满江红鱼腥藻可以在高浓度的重水中生长。重水显著抑制满江红鱼腥藻的光合活性、呼吸活性和固氮酶活性。满江红鱼腥藻的生长、光合活性、呼吸活性及固氮酶活性是相辅相成、互为佐证的。

(2) 随着重水含量的增加,藻细胞中两种重要的光合色素——藻胆素与类胡萝卜素的相对含量逐渐降低,光系统 I 与光系统 II 的相对荧光强度变小,光合作用光能分配趋向于光系统 II。

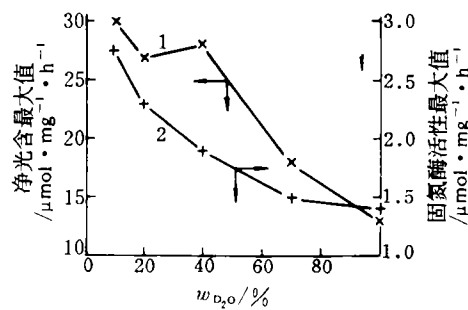


图5 不同浓度重水对满江红鱼腥藻净光合最大值和固氮酶活性最大值的影响

感谢中国科学院植物研究所的仇媛媛、金苹、吴玉华等同学和老师及仪器室的几位老师,感谢中国科学院青岛海洋所的彭国宏博士,他们为本文实验提供了诸多方便。

参 考 文 献

- Behrens PW, Valerie JS, Jacques D. Microalgae as a Source of Stable Isotopically Labelled Compounds. *J Appl Phys*, 1994, 6: 113—121.
- LeMaster DM, Richards FM. NMR Sequential Assignment of *Escherichia Coli* Thioredoxin Utilizing Random Fractional Deuteration. *Biochemistry*, 1988, 27: 142—150.
- Oh BH, Westler WH. Protein Carbon-13 Spin Systems by a Single Dimensional Nuclear Magnetic Resonance Experiment. *Science*, 1988, 240: 908—911.
- Behrens PW, Binham SE. Studies on the Incorporation of CO₂ into Starch by *Chlorella Vulgaris*. *J Appl Phys* 1989, 1: 123—130.
- Moses V, Holm-Hansen O, Calvin M. Response of *Chlorella* to a Deuterium Environment. *Biochem Biophys Acta*, 1958, 28: 62.
- Keiko Unno, Hiroki Busujima. Characteristics of Growth and Deuterium Incorporation in *Chlorella Ellipsoidea* Grown in Deuterium Oxide. *Chem Pharm Bull*. 1988, 36(5): 1828—1833.
- Shi Dingji, Brouers M, Hall DO. The Effects of Immobilization on the Biochemical, Physiological and Morphological Features of *Anabaena azollae*. *Planta*, 1987, 172: 298—308.
- Shi Dingji. Energy Metabolism and Structure of Immobilized Cyanobacterium *Anabaena Azollae* [Ph. D. thesis]. University of London, 1987, 1—381.
- 施定基、李佳格、钟泽朴. 满江红和蕨类满江红固氮作用和光合作用的研究. *植物学报*, 1981, 23: 306—315.

RESEARCH OF BIOLOGICAL ISOTOPE EFFECT OF DEUTERIUM IN *ANABAENA AZOLLAE*

Zhang Yongbo¹⁾ Shi Dingji²⁾ Wang Wenqing¹⁾ Luo Shanggen³⁾

1) (Department of Technical Physics, Beijing University, Beijing 100871)

2) (Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100044)

3) (China Institute of Atomic Energy, P. O. Box 275(93), Beijing 102413)

ABSTRACT

Anabaena azollae is cultured in BG-11 medium whose mass fraction of heavy water is 0%, 10%, 30%, 60% and 90%, respectively. During different time, activities of photosynthesis, respiration and nitrogenase are measured. In addition, growth-curve, absorption spectrum and low temperature fluorescence spectrum are given. The change of cellular morphology is observed with scanning electron microscope. The results show that the addition of heavy water causes lagging of the exponential period of growth, and inhibits the activities of photosynthesis, respiration and nitrogenase markedly. Absorption spectrum shows that the ratio of phycobilin to carotenoid decreases with increasing percentage of heavy water. Low temperature fluorescence spectrum indicates that the ratio of F_{733}/F_{695} decreases and photo-energy is distributed to system II more than to system I. According to the maximum of net photosynthesis, the isotope effect is also discussed.

Key words *Anabaena azollae* Photosynthesis Deuterium Isotope effect