

環境因子對聚球藻RF-1品系 (*Synechococcus* SP. RF-1) 生長的影響)

李文婷⁽¹⁾ 吳丁蓉⁽²⁾ 周雪美⁽³⁾

(1)台北市立三民國中

(2)台北縣立板橋國中

(3)國立台灣師範大學生物學系

摘要

本論文的目的是在探討各種環境因子對聚球藻 RF-1 (*Synechococcus*: RF-1) 生長的影響。以不同光照強度處理，聚球藻 RF-1 之生長速率隨照度增強而增加，但超過其飽和光照後，照度已不是藻體生長的限制因子。在比較通氣與不通氣培養及含氮源與不含氮源下培養之結果，發現其在通氣及含氮培養基下培養，生長狀況較佳。在 pH 值為 6、7、8、9、10 的無氮源培養基下培養，發現聚球藻 RF-1 之生長速率隨 pH 值之上升而加快，在 pH 9 時生長最快，於 pH10 時生長速率開始下降。以紅、橙、黃、綠、藍、紫六種不同玻璃紙包裹在錐形瓶外，發現聚球藻 RF-1 以黃色玻璃紙包裹下生長最好，其次為紅色、橙色、紫色和綠色，藍色生長最慢。

關鍵詞：藍綠細菌，環境影響，生長速率、聚球藻，單細胞。

緒言

早在十九億年前，藍綠藻即已出現在地球上，其起源尚不清楚。因為它和光合細菌之間並未發現中間型 (Transition form) 的存在，故推測兩者可能平行演化出利用氧的機制 (Harold et al., 1978)。

藍綠藻通常分佈於淡水或海水中，亦可生長於土壤表層、岩石表面或夾縫中，一般生長在中性或微鹼性的環境。根據 Brock (1973) 報導 pH 小於 4 或 5 的水中，沒有藍綠藻的存在。藍綠藻

能忍受的溫度可高達 73~74°C，低則可達 -15°C (郭, 1976)。因為藍綠藻具有廣鹽性和廣溫性，可生存在特殊的環境中，它的繁盛常可作為環境污染的指標。Van Baalen 等人 (1971) 研究 *Agmenellum quadruplicatum* 和 *Lynbya lagerheimii*，發現其細胞分裂速度隨光照強度增強而增加。大多數藍綠藻行好氣性的自營方式，所以其生活中僅需空氣、光線及無機鹽類。少數如生長於泥漿內的顫藻可行無氧呼吸，由無機鹽類 (如硫化氫) 獲得能量。有些藍綠藻具有化合自營的能力，供給

有機物，則可於黑暗中生長 (Carr, 1973)。

藍綠藻的構造，大體上相似；細胞壁主要成份為肽聚醣 (Peptidoglycan)，由醣類與肽鏈以化學鍵結合之巨大網狀構造，其功能在維持細胞之形狀與抵抗滲透壓。藍綠藻之細胞壁在構造及組成上，類似革蘭氏陰性細菌，即在肽聚醣外有一層外膜。肽聚醣內的細胞膜則稱為內膜。外膜、肽聚醣、內膜三者合稱為細胞套 (Cell envelope) (黃, 1986)。細胞中央有一團由 DNA 構成的基因體，周圍細胞質中含許多核糖體，有時細胞質中有很多氣泡，使細胞易於漂浮。在電子顯微鏡下，可看到一層層的類囊膜 (Thylakoids)。其中含有葉綠素 a (Chlorophyll a)、類胡蘿蔔素 (Carotenoids)、藻藍素 (Phycocyanin) 及藻紅素 (Phycocerythrin)，其比例不一，所顯現出來的顏色也不同；類胡蘿蔔素、藻藍素及藻紅素均為輔助色素，可將光能吸收後轉移給葉綠素 a 進行光合作用 (李, 1983)。

有些藍綠藻可固定游離氮變成有機氮；大多數固氮藍綠藻具有異形細胞 (Heterocyst) 以避免氧破壞固氮酶活性，其他好氣性固氮作用的單細胞藍綠藻，到目前所發現的種類不多；依鞘的有無分為兩大類：有鞘的為黏球藻 (*Gloeocapsa*) 品系，無鞘的為聚球藻 (*Synechococcus*) 品系。這些單胞固氮藍綠藻的光合作用與固氮作用均在同一細胞內進行，有關其克服氧氣破壞固氮酶活性的問題有二種說法：一是時間隔離 (Temporal separation)；配合呼吸作用降低氧濃度，並以鈣離子保護固氮酶

(Chen et al., 1987; Globbelaar et al., 1986 & 1987; Leon et al., 1986; Mitsui et al., 1986)；二是空間隔離 (Spatial separation)，光合作用與固氮作用在細胞內不同區域進行，但尚未有論文支持此說法。

聚球藻 RF-1 (*Synechococcus* RF-1) 為單胞固氮藍綠藻中聚球藻品系的一種，其超顯微構造有外膜、肽聚醣層 (Peptidoglycan layer)、細胞膜、類囊膜、羧基體 (Carboxysomes)、藍藻顆粒體 (Cyanophysin granules)、脂體 (Lipid bodies)、及多磷體 (Polyphosphate bodies)。具有微弱的澱粉酶及觸酶活性，若供給氮源，則其觸酶活性以及藻紅素與藻藍素的含量較無氮源培養時高。其對鉍離子的敏感濃度為 10^5 ppm，較一般細菌高出許多，對汞離子、銅離子、銀離子、鉛離子的敏感濃度依次為 0.01 ppm、0.4 ppm、0.4-0.8 ppm、4 ppm，遠較一般微生物敏感 (周, 1987)。連續光照處理時，聚球藻 RF-1 之固氮活性不規則；以光暗週期 (12D : 12L 培養，固氮活性出現在黑暗期，具內在節律性，改以連續光照培養，則此固氮節律可維持四天以上 (Grobbeelaar et al., 1986)。週期性的降低氧濃度，亦能誘導連續光照培養下之聚球藻 RF-1 產生固氮週期；同時暗呼吸加快，有效降低氧濃度，以保護固氮酶不受氧破壞 (Grobbeelaar, et al., 1987)。有關固氮酶的週期性出現方面，已知合成固氮酶的 mRNA 會週期性出現；亦即控制在轉錄 (Transcription) 的層次 (Huang et al., 1988)。以 24 小時為一個循環的光暗

週期中，若光照時數超過 12 小時以上，則光照時數與固氮活性之大小有成正比的趨勢(周, 1988)。

目前有關聚球藻 RF-1 之研究多為固氮作用，亦有研究其細微構造及生理性質者，但各種環境因素對其生長的影響，則尚未詳細研究過。本論文以聚球藻 RF-1 為研究材料，以吸光度代表其生長速率，探討光照強度、溫度、酸鹼度 (pH)、氮源、色光種類及通氣培養等各種環境因子對其生長速率之影響，並進一步推測光合作用與固氮作用和其生長速率之間的關係。

材料與方法

一、菌種來源與培養條件

本實驗所採用之聚球藻 RF-1 品系，為分離自台灣南部水田之單胞固氮藍綠藻，由中央研究院植物所黃檀溪博士所提供。培養基乃是採用 BG-11 或是不含氮源的 BGo-11 (即除去 NaNO_3 成分的 BG-11) 培養基 (Stanier et al., 1971)，並添加 0.01 M EPPS (N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-3-Propanesulfonic acid) 緩衝劑，且在滅菌之前，以 1N NaOH 將培養基的 pH 調整為 8.0；培養溫度為 28°C 光暗週期為 12 小時：12 小時，光照強度為 3000 Lux。

二、實驗方法

(1) 光照強度的影響

將二週齡之聚球藻 RF-1 以 BGo-11 培養基稀釋 (比例為 3:20)，各取 70 ml 置入 500 ml 之錐形瓶中，再分別置於 500、1000、2000、3000

4000、5000、6000 Lux 之光照強度下靜置培養，光暗週期為 12 小時：12 小時，培養溫度為 33.5°C。每天取 3 ml 以波長 660 nm 測其吸光度。

(2) 通氣培養的影響

將二週齡之聚球藻 RF-1 以 BGo-11 培養基稀釋至吸光度 0.1 左右，取 150ml 置於 500ml 之錐形瓶中作靜置培養；另取 150ml 置入長 75 cm，直徑 8.5 cm 之柱狀玻璃管中作通氣培養 (通氣速率為每分鐘 1.1 升)。光暗週期為 12 小時：12 小時，培養溫度為 28°C，光照強度為 2000 Lux。每天取 3ml 以波長 660 nm 測其吸光度。

(3) 氮源的影響

將二週齡之聚球藻 RF-1 各以 BGo-11 (不含氮) 培養基及 BG-11 (含氮) 培養基稀釋至吸光度 0.1 左右，再分別作通氣培養與靜置培養。通氣培養的方法與前項所述相同。

(4) pH 值的影響

將二週齡之聚球藻 RF-1 以 BGo-11 培養基稀釋 (比例為 3:20)，調 pH 值為 6、7、8、9、10，各取 1000ml 置入 5000ml 之錐形瓶中作靜置培養。光暗週期為 12 小時：12 小時，培養溫度為 28°C，光照強度為 2000 Lux 每天取 3ml 以波長 660nm 測其吸光度，並測其 pH 值之變化。

(5) 色光種類的影響

將二週齡之聚球藻 RF-1 以 BGo-11 培養基稀釋 (比例為 3:20)，各取 80 ml 置入 250ml 之錐形瓶中，瓶外分別以紅、橙、黃、綠、藍或紫色之玻璃紙 (吸收光譜如圖一) 包裹後，作靜置培養。因為不同色之玻璃紙透光率不同，透過玻璃紙之光照強度也不同，

故將各瓶置於適當的位置下以便透過玻璃紙後之光照強度均為 1500 Lux，以避免不同光照強度影響聚球藻之生長速率。光暗週期為 12 小時：12 小時，培養溫度為 28°C。每天取 3ml 以波長 660 nm 測其吸光度。

結 果

(1) 光強度

如圖二所示，聚球藻 RF-1 之生長隨光照強度之增強而加快。當光照強度為 500Lux、1000Lux、2000Lux 時，發現生長速率隨光照強度增強而增加的趨勢很明顯；而於 3000Lux、4000Lux、5000Lux、6000Lux 時，生長速率的差異則較不明顯，甚至可發現在 3000Lux 與 5000Lux 下，聚球藻 RF-1 的生長趨勢幾乎一致。

(2) 氮源與通氣培養的影響

根據圖三所示，通氣培養下的聚球藻 RF-1 之生長速率較靜置培養快二倍左右。又在通氣培養下，以含氮培養基培養的聚球藻 RF-1 的生長速率較以不含氮培養基培養者來得快；同樣的，在靜置培養下，含氮培養的聚球藻 RF-1 也比不含氮培養者的生長速率快。由上可推得聚球藻 RF-1 適於在通氣及含氮培養基下培養。

(3) pH 的影響

由圖四得知，聚球藻 RF-1 在 pH 值 6 - 9 的範圍內，在 pH6 時，無生長，在 pH7 時開始生長，並隨 pH 值增加而增加。於 pH9 時，生長速率最快。於 pH10 時，生長速率開始下降。

(4) 色光的影響

由圖五，可發現聚球藻 RF-1 在黃

色玻璃紙包裹下培養生長最好，依次為紅色、橙色、紫色、綠色、藍色。

討 論

一般藍綠藻生長最適照度為 2000 Lux (Chapman, 1977)。根據 Ogawa (1972) 對藻體生長動力學的研究，指出在營養條件充足的情況下，對數生長期 (Log phase) 中之藻體其生長速率與入射光強度之關係符合 Monod-Type 方程式： $U = U_{max} I_0 / (I_0 + K_c)$

其中 U 為生長速率， I_0 為入射光強度， K_c 為飽和光強度。由圖二的資料推測 3000Lux 的光照強度對聚球藻 RF-1 而言，應超過飽和光照強度，故照度已不是藻體的生長限制因子。

在通氣培養的情況下，因為空氣流動；在光照期可源源不斷供給二氧化碳供聚球藻 RF-1 行光合作用；在黑暗期，則可提供一定比例的氧和氮；氧可供其呼吸之用，氮則可供給其固氮作用。故比靜置培養下之聚球藻 RF-1 的生長為佳。

以含氮培養基培養時，聚球藻 RF-1 可由培養基中直接抓取硝酸根離子作氮源，而不含氮培養基所培養之聚球藻 RF-1 僅能利用由空氣中溶於水中的少量氮 (黃, 1978)。所以含氮培養基培養之聚球藻 RF-1 的生長速率較快。且氮源亦會影響色素的含量，當有氮源培養時，藻紅素與藻藍素的吸收峰會明顯的提高 (周, 1988)，因為光合作用的輔助色素增加，故其光合作用的效率亦隨之增加，更有助其生長。

一般而言，藍綠藻多生長在中性或鹼性的環境中 (Bold, et al., 1978)。高 pH 值對藻體生長可能有下列影響：1. 元素有效性，磷、鐵與微量元素在高 pH 值下溶解度低。2. 光合作用受阻，高 pH 值下， OH^- 流出 (Efflux) 作用緩慢，導致 HCO_3^- 流入 (Influx) 變緩，而影響二氧化碳的供應 (陳, 1983)。Kaplan (1980) 指出 *Anabaena variabilis* 在高 pH 值下，因為內在 pH 值改變而影響 Carboxylation 的進行，藻體生長與氧的釋出同時受阻；氧釋出受阻程度與光照強度有關。3. 在細胞膜外或細胞外之輸送元素的酵素系統，高 pH 值對此系統有不利的影響。所以聚球藻 RF-1 於 pH 10 時的生長速率反而不及 pH 9 時為高。

Brock (1973) 曾報導在 pH 4 或 5 的情況下，很少發現藍綠藻的存在，但卻可發現真核藻類的分佈。此乃因為藍綠藻光合作用的物質分散於細胞質內，沒有特別的膜將其隔離。葉綠素對酸相當敏感，在酸性環境下很容易就分解成脫鎂葉綠素 (Pheophytin)，喪失光合作用的能力，而影響其生長，故藍綠藻不喜生長於酸性環境中。由圖四可看出 pH 8 及 9 時聚球藻 RF-1 之生長較佳。

根據 Jones & Myers (1964) 研究藍綠藻的光合作用，發現其光合作用之 Emerson 加強作用 (Emerson enhancement phenomenon) 乃是吸收兩種不同波長的光後協同作用的結果：一是葉綠素 a 的吸光波長，二是輔助色素藻膽色蛋白 (Phycobiliprotein) 的吸光波長。即葉綠素和藻藍素共同吸光所產生的氧量較它們個別吸光所產生的氧量總

合來得多。在光合系統 II (Photosystem II) 中，葉綠素 a 在 440 nm，藻藍素在 670 nm 均有微弱的吸收峰。在光合系統 I 中，葉綠素 a 在 675、440 nm，藻藍素在 625 nm 均有吸收峰。類胡蘿蔔素在光合系統中，吸光波長在 470 - 490 nm 間，以上兩個光合系統的加強作用使得光能能得到最大利用。

聚球藻 RF-1 在 438、572、626、682 nm 均有吸收峰，其中在 438 nm 吸光最強 (周, 1988)。又根據劉 (1987) 之研究，發現各藻膽色蛋白之可見光吸收峰普遍向短波處偏移，藻藍蛋白之吸收峰偏移至 609、606、603、600 nm，藻紅蛋白的吸收峰則偏移至 558 nm。

本論文所用之黃色玻璃紙透光範圍為 450 - 800 nm，透光範圍最大，所以透過黃色玻璃紙照射的聚球藻 RF-1 生長最好。紅色玻璃紙透光範圍為 550 - 800 nm，較黃色玻璃紙小其生長較黃光差；橙色玻璃紙之透光範圍為 545 - 800 nm，另有一透光度波峰在 520 nm，因其透光範圍與紅色玻璃紙接近，所以生長速率與紅光者接近。紫色玻璃紙之透光範圍在 620 - 800 nm，較橙色玻璃紙小，故生長速率又更慢一點，綠色玻璃紙之透光範圍為 660 - 800 nm，所以其生長速率又較紫色玻璃紙慢。藍色玻璃紙之透光範圍為 650 - 800 nm，雖然其透光範圍較綠玻璃紙稍大，但生長速率為所有玻璃紙中最慢者。

誌 謝

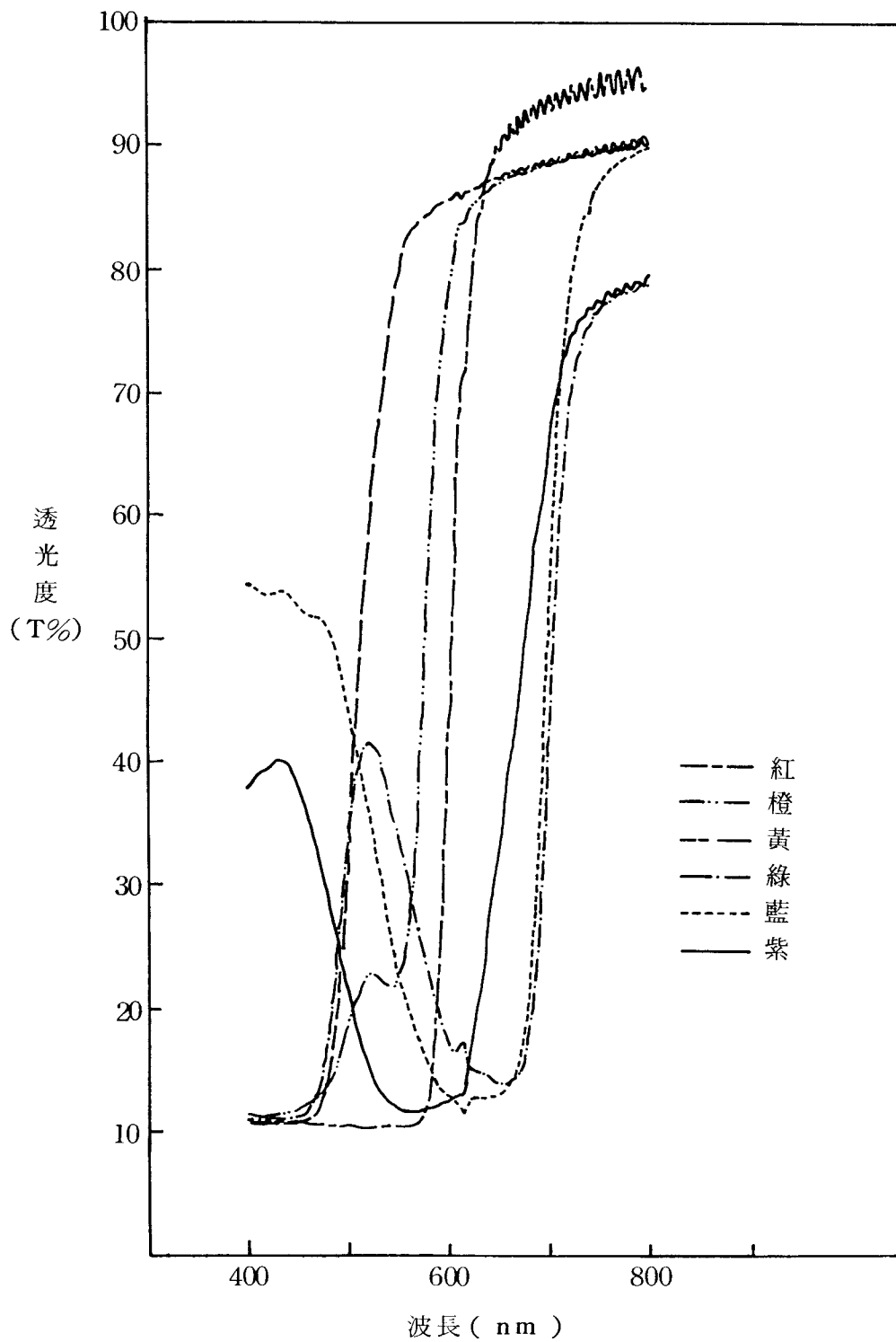
本論文承蒙中央研究院植物所黃檀溪博士悉心指導，並提供材料及儀器，

稿成後又蒙其詳細批閱。以及周德珍小姐之多方協助，在此一併致謝。

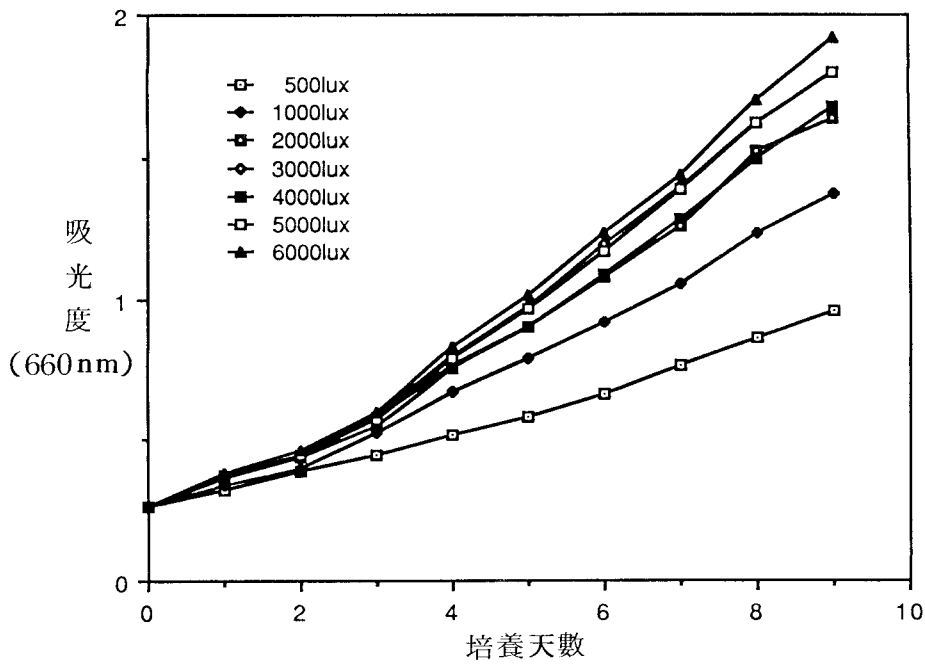
參考文獻

- 李學勇。1983。光合作用。植物學要義 pp. 209。
- 周雪美。1987。二種單胞固氮藍綠藻之形態與生理特性之比較。師大生物學報第 22 期。pp. 33-39。
- 周雪美。1988。聚球藻 RF-1 之超顯微構造及其生理特質。師大生物研究所碩士論文。pp. 1,2, 46。
- 陳琪璜。1983。螺旋藻 *Spirulina platensis* 之生長與細胞特性。台大農化研究所碩士論文 pp. 19。
- 郭長生。1976。藍綠藻。生物科學 9 : 35。
- 黃啓穎。1978。高等植物固氮的理論與實際。中央研究院生物研究中心專刊第八號。pp 1 - 25。
- 黃檀溪。1986。藍綠藻的形態與構造。國科會生物學研究中心研討會論文集專刊第15號。pp 1 - 21。
- 劉淑瑛。1987。六種臺灣分離種魚腥藻膽色體之研究。中興大學植物研究所碩士論文。pp. 32。
- Bold, H.C., M.J. Wynne. 1978. Division *Cyano-chloronta*. Introduction to Algae. pp. 31-32.
- Brock, D.T., 1973. Lower pH limit for the existence of blue-green algae. Evolutionary and ecological implication. Science 179: 480-483.
- Carr, N.G. & B.A. Whitton, 1973. Metabolic Control and Autotrophic Physiology. The Biology of Blue-green Algae. pp. 41.
- Chapman, V.J. & D.J. Chapman, 1977. *Cyanophaceae*. The Algae. 2nd edition. pp. 16.
- Chen, T.M., T.C. Huang, and T.J. Chow, 1987. Calcium requirement in nitrogen fixation in the cyanobacterium *Synechococcus* RF-1. *Planta* (Berlin) in press.
- Grobbelaar, N., T.C. Huang, H.Y. Lin, and T.J. Chow, 1986. Dinitrogen-fixation endogenesis rhythm in *Synechococcus* RF-1. *FEMS. Microbiol. Lett.* 37: 173-177.
- Grobbelaar, N., H.Y. Lin, and T.C. Huang, 1987. Induction of nitrogenase activity rhythm in *Synechococcus* RF-1 and the protection of its nitrogenase against photosynthetic oxygen. *Current Microbiol.* 15: 29-33.
- Huang, T.C., T.J. Chow, and I.S. Hwang, 1988. The cyclic synthesis of the nitrogenase of *Synechococcus* RF-1 and its control at the transcription level. *FEMS Microbiol. Lett.* 50: 127-130.
- Jones, L.W. and J. Myers, 1964. Enhancement in the blue-green algae *Anacystis nidulans*. Pl.

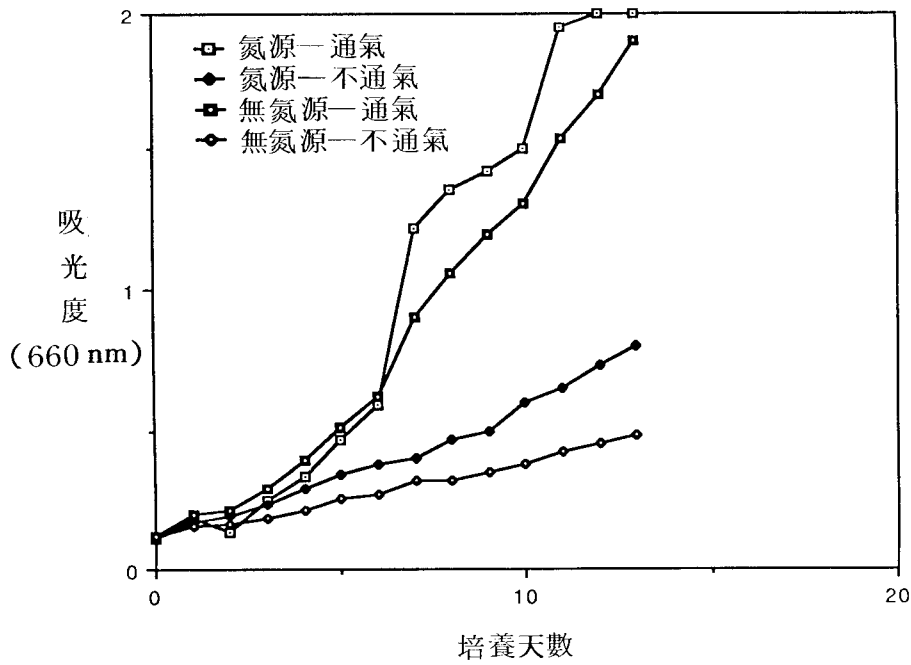
- Physiol. 39:938-946.
- Kaplan, A. 1981. Photosynthetic response to alkaline pH in alkaline pH in *Anabaena variabilis*. Plant Physiol. 67: 201-204.
- Leon, C., S. Kumazawa, and A. Mitsu, 1986. Cyclic appearance of aerobic nitrogenase activity during *Synechococcus* growth of unicellular cyanobacteria. Current Microbiol. 13:149-153.
- Leopold, C.A. 1964. Light. Plant Growth and Development. pp. 334. Mitsui, A., S. Kamazawa, A. Takahashi, H. Ikemoto, S. Cao, and T. Arai, 1986. Strategy by which nitrogen-fixing unicellular cyanobacteria grow photoautotrophically. Nature. 323: 720-722.
- Ogawa, T., H. Kozasz, and G. Terui, 1972. Studies on the growth of *Spirulina platensis* (2) Growth kinetics of an autotrophic culture. J. Ferment. Technical. 50: 143-149.
- Van Bacilen C., D.S. Hiase, and E. Brandt, 1971. Heterotrophic growth of blue-green algae in dim light. J. Bact. 105: 685-689.



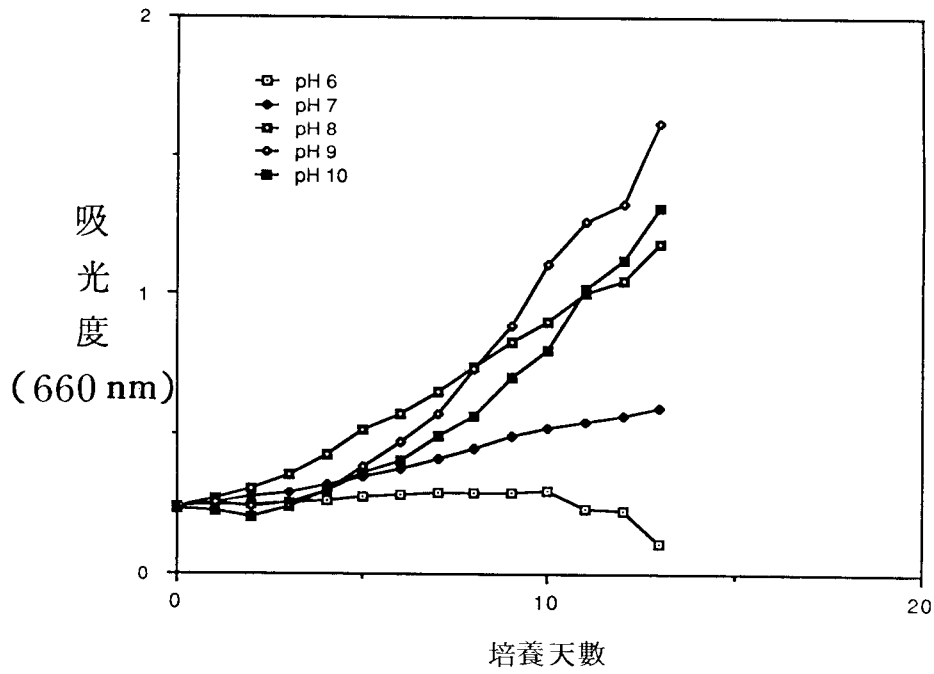
圖一 紅、橙、黃、綠、藍、紫色玻璃紙之吸收光譜



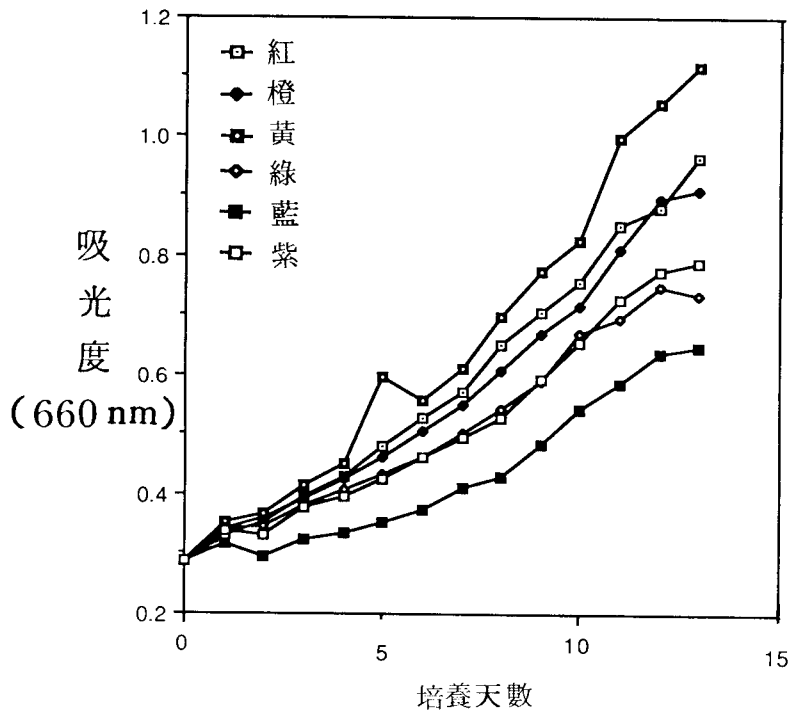
圖二 不同光強度對聚球藻 RF-1 生長之影響



圖三 培養基中氮源之有無以及通氣與否對聚球藻 RF-1 生長之影響



圖四 不同 pH 值對聚球藻 RF-1 生長之影響



圖五 色光種類對聚球藻 RF-1 生長速率的影響

Environmental Effects on the growth of *Synechococcus* RF-1

Wen-Tyng Li (1) Ding-Rung Wung (2) Hsueh-Mei Chou (3)

(1) San-Ming Junior High School, Taipei

(2) Baan-Chyan Junior High School, Taipei Shiann

(3) Department of Biology, National Taiwan Normal
University

Abstract

The assay is to study the effects of the environmental factors on *Synechococcus* sp. RF-1. Studying the growth rate of *Synechococcus* by using different light intensity revealed that it is proportional to the light intensity but not limited over the satisfactory light intensity. Comparing the growth rate of air-pumping regimen with that of no air-pumping regimen, and comparing the growth rate of addition of nitrogen source with that of nitrogen starvation, we found that it is faster by grown in air-pumping and nitrogen-supplying regimen than by grown in other regimens. The growth rate of *Synechococcus*, grown in nitrogen starvation conditions at pH value 6, 7, 8, 9, and 10, increases at elevated pH value, best at pH value 9 and decreasing at pH value over 10. *Synechococcus* cultivated in flasks wrapped by six kinds of transparent paper whose colors are red, orange, yellow, green, blue, and violet, its growth is best in yellow - light regimen, then red, orange, violet, and green - light regimen in order, worst in blue - light regimen.

Key words: Cyanobacterium, Environmental effects,
Growth rate, *Synechococcus*, Unicellular.