

固氮藍綠藻培養的探討及經濟的效用

高中組生物第一名

私立徐匯中學

作者：王虞舜等四名

指導老師：范振社

一、研究動機：

作藻類實驗時，觀察到含有「異胞」的固氮藍綠藻很特別，於是想把它分離，找出適當的條件來，大量繁殖。

二、研究目的：

含「異胞」的固氮藍綠藻有旺盛的固氮的作用，因此想在能源缺乏的今天，探討作為植物氮肥的可行性。

三、研究材料與方法：

1 固氮藍綠藻的分離：

解剖顯微鏡下用毛細管吸取固氮藍綠藻並吹放於另一玻片上，加一滴蒸餾水鏡檢，反復多次後直到祇含固氮藍綠藻時為止。為了防止乾燥必須將此分離的固氮藍綠藻玻片放在含有水的培養皿內保存，以便接種。

2 通氣培養法：

固氮藍綠藻進行固氮作用時，需空氣中的游離氮素作為原料，故用通氣培養法以通氣馬達（110v，5w）把空氣打入培養瓶內底部，因為氣泡往上跑，所以此法不但可以供應固氮作用氮素，也可使培養液與藍綠藻充分混合。

3 乾重量測定法：

取濾紙分別標上記號，放在烘箱內，溫度保持 80°C 經 24 小時後用精微天平秤其重量記錄後，再將液態培養液之藍綠藻混合液用過濾法將藍綠藻濾在濾紙上，複置入 80°C 的烘箱，24 小時後，再用精微天平去秤，其差即為乾重量。

4 各種離子濃度的配法：

(1) NH_4^+



$$K = \frac{[\text{NH}_4^+]^2}{[\text{NH}_4\text{OH}]} = 1.8 \times 10^{-5}$$

可用 $1.8 \times 10^{-5} = \frac{X^2}{\text{NH}_4\text{OH 濃度} - X}$ 來配，解 X 即為 NH_4^+ 的濃度。

(2) NO_3^-

$\because \text{HNO}_3 \rightarrow \text{H}^+ + \text{NO}_3^-$ 因爲完全解離

可用 $mv = m'v'$ 公式來求 NO_3^- 之濃度。

(3) Fe^{+3} 及 $\text{M}_0\text{O}_4^{-2}$



$$\text{所需濃度 } M = \frac{\text{重量(克)}}{\text{克分子量}(X)} \div \text{體積(升)}$$

5. 無氮培養液的配方：

將 H_3BO_3 0.31g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.223g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0287g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.0125g, KBr 0.119g, KI 0.0083g 再加蒸餾水到 100ml 配成貯存液。

再取 K_2HPO_4 2g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4g, CaCl_2 0.2g, $\text{Na}_2\text{M}_0\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.25g, 檸檬酸鐵 0.25g, 貯存液 20 ml 配成 2000 ml 即得。

6. 水稻的培養法：

取沙倒入濃鹽酸浸泡半小時，倒去鹽酸再用大量蒸餾水沖洗多次後，將沙放入塑膠盒內添加不同處理的固氮藍綠藻及氮肥以待移植。

台北 309 號水稻種子，以 5% 次氯酸鈉消毒 5 分鐘後，也用蒸餾水沖洗多次，放在含有棉花及水的培養皿內萌芽，等長到 5 公分時再移入塑膠盒內放室外，觀察其生長的情形。

四、研究結果與結論：

1. 學名的鑑定：

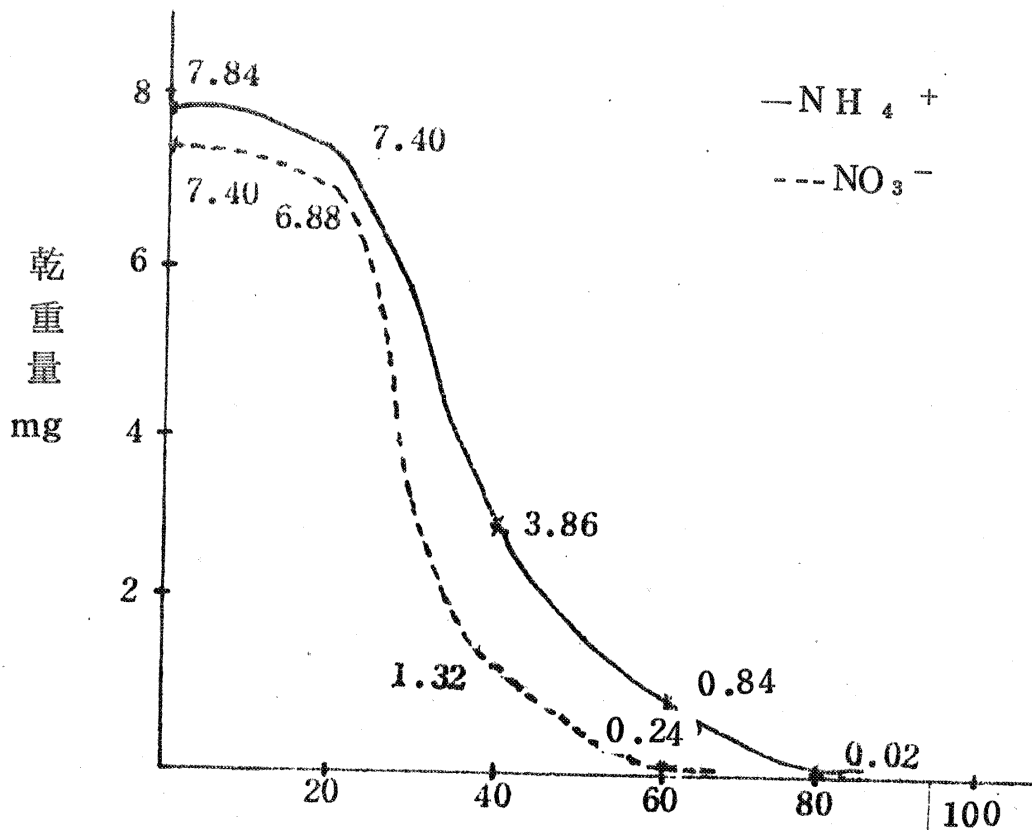
將分離的固氮藍綠藻用葛仙米藻科的檢索表鑑定爲屬藍綠

藻植物群、藍藻綱、顫藻目、葛仙米藻科。

2. 培養的探討：

(1) NH_4^+ 及 NO_3^- 對固氮藍綠藻生長的影響

取各地農田水 500 毫升煮沸冷卻後，接種固氮藍綠藻在日光下通氣培養，三週後，測乾重量發現幾乎不生長。「農田水因經常施肥必含有 NH_4^+ 及 NO_3^- 的存在(2)」，可能抑制了固氮藍綠藻的生長，因此配成各種不同的 NH_4^+ 及 NO_3^- 濃度的溶液接種固氮藍綠藻在日光下通氣培養三週，來觀察對固氮藍綠藻生長的影響，經比較乾重量得：



圖一 離子濃度 (單位 PP M)

由圖一可知 NH_4^+ 濃度及 NO_3^- 濃度的增加時固氮藍綠藻的生長有抑制現象，濃度愈大愈抑制，如超過 100 PP M 則不能生長。

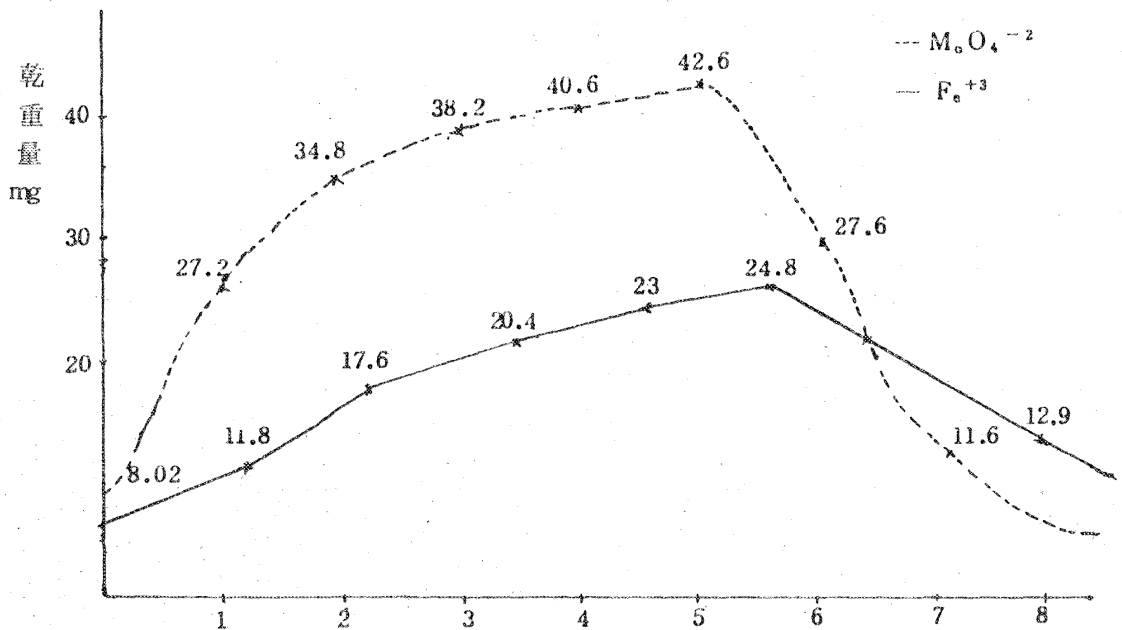
60 PP M NO_3^- 溶液及 80 PP M NH_4^+ 溶液生長的藻體生長

很慢，在顯微鏡下觀察，發現藻體細胞較小，排列不正常也無「異胞」產生，而在 $60 \mu\text{M}$ MnO_4^- 更發現了正在進行不正常分裂生殖。

由此可知 NH_4^+ 及 NO_3^- 的存在會抑制固氮作用的「異胞」產生，而導致生長不良。所以經常施氮肥含有 NH_4^+ 及 NO_3^- 農田水並不是良好的培養劑。

(2) Fe^{+3} 及 MnO_4^{-2} 對固氮藍綠藻生長的影響

鐵及鉬為影響固氮作用酵素的主要金屬元素，欲要固氮作用好，必定與鐵及鉬之含量有關，因此用不同的 Fe^{+3} 及 MnO_4^{-2} 離子濃度來觀察對藻體生長的影響，將固氮藍綠藻接種後在日光下通氣培養三週，得乾重量如圖二：



圖二 離子濃度單位 10^{-4}M

由圖二可知 Fe^{+3} 濃度在 $5.8 \times 10^{-4} \text{ M}$ ， $\text{M}_0\text{O}_4^{-2}$ 在 $5.17 \times 10^{-4} \text{ M}$ 生長並不怎麼好，在顯微鏡下觀察細胞的體形較正常，有「異胞」產生。但在 $5.8 \times 10^{-4} \text{ M Fe}^{+3}$ 仍有不正常的分裂生殖。因此將 $5.8 \times 10^{-4} \text{ M Fe}^{+3}$ 及 $5.17 \times 10^{-4} \text{ M M}_0\text{O}_4^{-2}$ 混合在一起配成 500 毫升，接種固氮藍綠藻在日光下用通氣培養三週，得乾重量 203mg 比較上述所得之結果都好。在顯微鏡下觀察發現藻體較長，也有「異胞」的產生。

所以可知 $5.8 \times 10^{-4} \text{ M Fe}^{+3}$ ， $5.17 \times 10^{-4} \text{ M M}_0\text{O}_4^{-2}$ 混合液是可使固氮藍綠藻產生「異胞」而促使其生長的。

(3)溫度、光度、PH 值對固氮藍綠藻生長的影響：

綠色植物都需仰賴光合作用來生長，含有葉綠素之固氮藍綠藻自然也不例外，因此想利用影響光合作用之因子溫度、光度、PH 值來找出最適合固氮藍綠藻生長之條件。

由上結果得知培養液不能含有 NH_4^+ 及 NO_3^- ，而鐵及鉬在適量下有促進現象，因此用無氮培養液 500 ml，以溫度 $15^\circ\text{C} \sim 20^\circ\text{C}$ ， $25^\circ\text{C} \sim 30^\circ\text{C}$ ，光源為 50 W，100 W，150 W，來代替（距培養瓶 13 公分）PH 為 5.5，6.0，6.5，7.0，7.5，8.0，8.5，9.0 等條件接種固氮藍綠藻後通氣培養三週，測乾重量得：

溫度	PH 值 光度	PH 值								單位 mg
		5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	
15 ~ 20 °C	60W	15	21	38	72	170	104	60	53	
	100W	25	42	68	173	206	222	102	75	
	150W	44	87	205	304	472	432	136	101	
25 ~ 30 °C	60W	16	30	41	66	213	106	75	63	
	100W	29	50	72	205	434	240	163	132	
	150W	54	92	226	383	572	505	310	209	

由上圖表可知在 $25^{\circ}\text{C} \sim 30^{\circ}\text{C}$ 、 150 W ， $\text{PH} = 7.5$ 時所得乾重量 572mg 為最多。因此可知此條件最適合固氮藍綠藻生長。

(4) 固氮藍綠藻的簡易培養法：

「照度對固氮藍綠藻有顯著的差異(1)」。

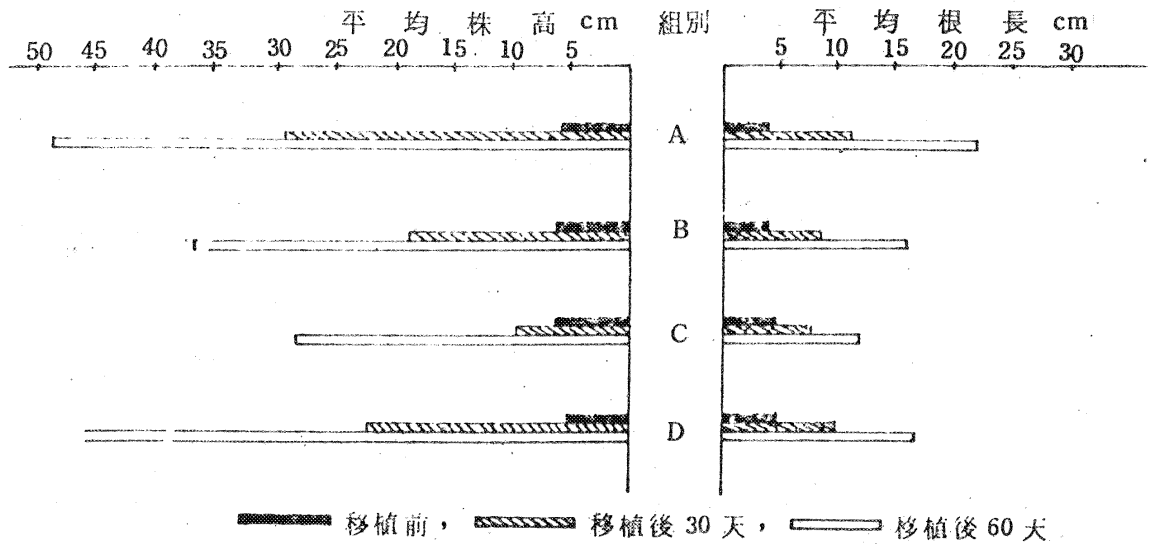
由上面結果可知 150 W （距 13 公分）的照度及 $25^{\circ}\text{C} \sim 30^{\circ}\text{C}$ 的溫度，用日光即可代替且可節省大量電費。經用大型玻璃缸注入 10 公升 $\text{PH} = 7.5$ 的無氮培養液接種 10 ml 固氮藍綠藻的懸浮液上蓋玻璃，在日光下通氣培養三週，可得 11.32 克乾重量。在顯微鏡下觀察有「異胞」的產生，而且藻體也很長。

3. 作為植物氮肥的經濟效用：

塑膠盒分為四組，即 A 組：加入乾燥的藻體 1 g ，B 組：加入濕的藻體 5 g ，C 組：不加藻體，D 組：加入氮肥 1 g ，等台北 309 號水稻長到 5 公分時移入。再三星期觀察葉子生長情形得 A 組及 D 組葉子較綠、生長良好，B 組次之，C 組葉萎黃生長不良。再取其培養 30 天及 60 天的水稻觀察植株及根部也發現 A 組及 D 組植株較長、鬚根多且長，B 組次之，C 組植株最短，鬚根少又短。

組別	生長情形 號碼	移植前 cm		移植後 cm			
		株高	根長	30天		60天	
				株高	根長	株高	根長
A	1	5.6	4.2	29.5	12.8	48.3	25.4
	2	5.7	4.3	27.6	10.6	46.8	23.4
	3	5.3	4.7	32.3	13.4	51.6	21.6
	4	5.0	4.2	27.4	8.5	45.9	19.6
	5	5.4	4.7	28.6	12.6	49.7	22.3
	平均	5.4	4.42	29.08	11.58	48.46	22.46
B	1	5.5	4.1	10.9	7.9	36.6	16.2
	2	5.8	4.8	11.5	8.5	41.5	18.1
	3	4.9	4.2	27.6	9.8	35.4	15.6
	4	5.4	4.6	19.8	8.4	31.9	14.2
	5	5.3	4.1	21.8	9.4	40.2	17.5
	平均	5.38	4.36	18.32	8.8	37.12	16.32
C	1	5.6	4.8	8.8	7.9	28.4	11.6
	2	5.3	4.1	8.5	8.1	24.0	10.5
	3	5.2	4.6	7.4	7.4	26.7	9.9
	4	5.5	4.7	9.6	8.6	30.1	14.0
	5	5.1	4.9	11.8	7.6	32.2	13.0
	平均	5.34	4.66	9.22	7.8	28.28	11.8
D	1	5.2	4.8	28.6	10.4	48.5	18.0
	2	4.9	4.7	25.4	10.2	46.4	14.6
	3	5.8	4.5	20.3	9.8	48.1	16.6
	4	5.3	4.2	18.6	8.6	40.7	15.1
	5	5.2	4.4	20.3	9.8	46.2	17.2
	平均	5.28	4.52	22.64	9.76	45.98	16.5

水稻根葉生長的情形



因此可證明缺少固氮藍綠藻的C組葉及植株發育不良而填加乾燥固氮藍綠藻的A組它的葉較綠，植株長，鬚根多也較長。由以上的結果可知乾燥的固氮藍綠藻是可以作為氮肥促進水稻的生長。

五、討論：

1. NH_4^+ 及 NO_3^- 離子可抑制固氮藍綠藻有固氮作用的「異胞」產生，因而也阻礙了生長及繁殖，與「植物的固氮作用中， NH_4^+ 及 NO_3^- 對植物固氮酵素的合成有負作用」(2)的結果相同。
2. 鐵及鉬為固氮酵素的金屬元素，若 $5.8 \times 10^{-4} \text{ M Fe}^{+3}$ 及 $5.17 \times 10^{-4} \text{ M Mo}_4\text{O}_4^{-2}$ 混合在一起，可以產生固氮作用的「異胞」與「缺少鐵及鉬二元素，無法進行固氮作用」(3)的結果是相同的。
3. 由於能量來源日漸缺乏，進口石油不斷上漲，利用化學工業法來固定空氣中的氮素製造肥料，已不是一種合乎經濟及根本解

決的方法。所幸固氮藍綠藻能利用「日光能」及空氣中的「氮素」就能大量繁殖生長。且它也可作為植物的氮肥在經濟上實有很大的裨益。

六、參考文獻：

- 1 范振社：1980年 用統計法來研究溫度、酸鹼度、照度等對 *Anabaenopsis arnoldii* 生長及固氮活性的影響。
- 2 黃啟穎：1977年 植物的固氮作用，生物科學 12：1
- 3 黃啟穎：1978年 高等植物固氮作用的理論與實際。
中研院號八號專刊：遺傳工程與固氮作用 P. 19

評語：1 內容設計週詳。

2 內容充實。

3 理論與實用並重。

4 表達完整。