

# 用統計法研究溫度、酸鹼度、照度對 *Anabaenopsis arnoldii*的生長及固氮活性之影響

## 高中教師組生物第一名

私立徐匯中學

作者：范振社

### 一、緒論：

固氮藍綠藻 *Anabaenopsis arnoldii* 可利用空氣中之氮素  $N_2$  及光合作用來生長。經用無氮培養劑分析溫度、照度及 pH 值在  $25^\circ C$ 、4750 Lux、pH 7.5 時生長最好，固氮作用也最好。

### 二、材料：*Anabaenopsis arnoldii*

### 三、方法：

#### 1 無氮培養液：

(1)  $H_3BO_3$  0.31g,  $MnSO_4 \cdot H_2O$  0.223g,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  0.0287g,  $CaSO_4 \cdot 5H_2O$  0.0125g,  $KBr$  0.0119g,  $KI$  0.0083g, 加水到 100 毫升成貯存液。

(2) 取貯存液 20 ml 加  $K_2HPO_4$  2g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.4g,  $CaCl_2$  0.2g,  $N_2M_2O_4 \cdot 2H_2O$  0.25g, Ferric Citrate 0.25g, 配成 2000 ml 即得。

#### 2 培養裝置：

藍綠藻進行固氮作用時，需空氣中游離之氮素  $N_2$  作為原料，用通氣培養法，把空氣打入瓶內底部後，因氣泡往上跑，不但可以供應固氮作用的氮素，也可使培養液與藍綠藻充分混合，更可使藍綠藻獲得較同樣之照度。

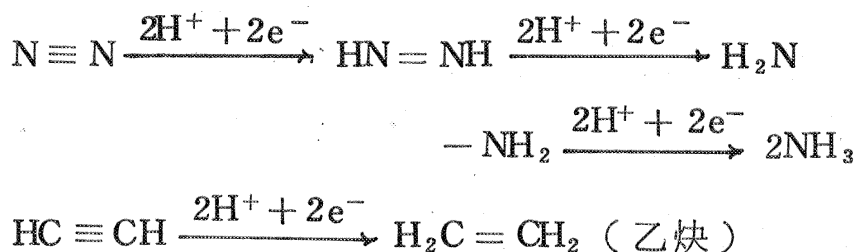
#### 3 乾重量之測定法：

固氮藍綠藻為絲狀，無法用計算血球方法或用透光度來測繁殖之量，故用乾重量來測其法為：

取濾紙分別標上記號，放入烘箱內，溫度保持在  $80^\circ C$ 、24 小時後，用電動天平測其重量記錄後，再將藍綠藻用抽氣過濾法過濾在濾紙上，復置入  $80^\circ C$  之烘箱 24 小時、再稱其乾重量，其差即為藻體之乾重量。

#### 4. 固氮活性之測定：

植物固氮酵素不僅可把空氣中之游離氮素  $N_2$  還原成  $NH_3$ ，也同樣可以把含有三鍵之乙炔  $C_2H_2$  還原，其反應過程為：



(反應到此不會被固氮酵素繼續還原成  $CH_4$ )

由上列反應式知道，固氮酵素把  $N_2$  還原成  $NH_3$  時需消耗 6 個氫離子及 6 個電子；而乙炔還原成乙炔只需 2 個氫離子及 2 個電子。所以一個摩爾之  $N_2$  被固氮酵素還原成  $NH_3$  時相當於 3 個摩爾乙炔被還原，也即  $N_2$  與  $C_2H_2$  都是同一固氮酵素之基質，而  $C_2H_2$  被還原之速率比  $N_2$  被還原速率快 3 倍，因此可用  $C_2H_2$  取代  $N_2$  作為反應基質，利用下式把  $C_2H_2$  被還原之量換成  $N_2$  被固定之量。

$$\text{固氮量 } \mu\text{g} = \frac{C_2H_4 \text{ 濃度 } \mu\text{mole} \times \frac{28 \mu\text{g}}{\mu\text{mole}}}{3}$$

$C_2H_4$  之濃度可用氣體色層分析儀 Gas chromatograph 定量出來：

$$C_2H_4 \mu\text{mole (g.d.wt)} = \frac{1000 \text{ mg}}{\text{乾重量 mg}} \times \frac{\text{瓶子容積}}{\text{注射量 } 0.5 \text{ ml}} \times \frac{\text{peak weight (cm)}}{0.328 \times 10^5}$$

#### 四、結果與結論：

綠色植物都需仰賴光合作用來生長，含有葉綠素之藍綠藻自然也不例外。因此取 500 ml 無氮培養液接種 1 ml (100 ml 約含有 0.1 mg. d. wt) 藍綠藻之懸浮液分別以不同溫度、照度及 pH 值來探討對固氮藍綠藻生長之關係，通氣培養 20 天後，測乾

重量得：

| pH \ T | 10 °C          |                |                | 15 °C          |                |                | 20 °C          |                |                | 25 °C          |                |                | 30 °C          |                |                |
|--------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|        | L <sub>1</sub> | L <sub>2</sub> | L <sub>3</sub> | L <sub>1</sub> | L <sub>2</sub> | L <sub>3</sub> | L <sub>1</sub> | L <sub>2</sub> | L <sub>3</sub> | L <sub>1</sub> | L <sub>2</sub> | L <sub>3</sub> | L <sub>1</sub> | L <sub>2</sub> | L <sub>3</sub> |
| 5.5    | 3              | 17             | 18             | 13             | 20             | 30             | 15             | 25             | 44             | 16             | 29             | 54             | 20             | 31             | 60             |
| 6.0    | 10             | 24             | 60             | 18             | 39             | 85             | 21             | 42             | 87             | 30             | 50             | 92             | 27             | 62             | 83             |
| 6.5    | 17             | 40             | 73             | 27             | 51             | 112            | 38             | 68             | 205            | 41             | 72             | 226            | 53             | 81             | 185            |
| 7.0    | 35             | 67             | 87             | 55             | 101            | 197            | 72             | 173            | 304            | 66             | 205            | 383            | 74             | 150            | 402            |
| 7.5    | 62             | 87             | 112            | 105            | 156            | 232            | 170            | 206            | 472            | 213            | 434            | 572            | 220            | 450            | 602            |
| 8.0    | 33             | 75             | 120            | 92             | 140            | 183            | 104            | 202            | 432            | 106            | 240            | 505            | 150            | 295            | 570            |
| 8.5    | 19             | 51             | 70             | 50             | 64             | 82             | 60             | 102            | 136            | 75             | 163            | 310            | 88             | 193            | 321            |
| 9.0    | 12             | 26             | 35             | 30             | 44             | 70             | 53             | 75             | 101            | 63             | 132            | 209            | 67             | 142            | 225            |

L<sub>1</sub> = 950 Lux.    L<sub>2</sub> = 2840 Lux.    L<sub>3</sub> = 4750 Lux.

由上表可知：

$$TSS(\text{Total sum square}) = \sum X_{ijk}^2 - \frac{(\sum X_{ijk})^2}{rt} = 2226833$$

$$SS(T) = \frac{\sum X_i^2}{rbc} - C = \frac{1}{24} [T_1^2 + T_2^2 + \dots + T_5^2] - C = 355053$$

$$SS(L) = \frac{\sum X_j^2}{rac} - C = \frac{1}{40} [L_1^2 + L_2^2 + \dots + L_3^2] - C = 416247$$

$$SS(P) = \frac{\sum X_k^2}{rab} - C = \frac{1}{15} [P_1^2 + P_2^2 + \dots + P_8^2] - C = 753328$$

1 初次交互作用 ( Interaction )

(1) T 與 L 之交互作用：

| L \ T          | 10 °C       | 15 °C | 20 °C | 25 °C | 30 °C |
|----------------|-------------|-------|-------|-------|-------|
| L <sub>1</sub> | TL總和<br>191 | 390   | 533   | 610   | 669   |
| L <sub>2</sub> | 387         | 615   | 913   | 1325  | 1404  |
| L <sub>3</sub> | 575         | 991   | 1781  | 2351  | 2448  |

$$SS(L \times T) = \frac{1}{8} [ (T_1 L_1)^2 + (T_2 L_2)^2 + \dots + (T_5 L_3)^2 ] - C - SS(T) - SS(L) = 1033365$$

(2) 與 pH 之亦互作用

| L \ pH         | 5.5 | 6.0 | 6.5 | 7.0  | 7.5  | 8.0  | 8.5 | 9.0 |
|----------------|-----|-----|-----|------|------|------|-----|-----|
| L <sub>1</sub> | 67  | 106 | 176 | 302  | 770  | 485  | 292 | 225 |
| L <sub>2</sub> | 122 | 217 | 312 | 696  | 1333 | 1457 | 573 | 419 |
| L <sub>3</sub> | 206 | 407 | 801 | 1373 | 1990 | 1710 | 919 | 640 |

$$SS(P \times L) = \frac{1}{5} [ (P_1 L_1)^2 + (P_1 L_2)^2 + \dots + (P_8 L_3)^2 ] - C - SS(P) - SS(L) = 306288$$

(3) T 與 pH 之交互作用

| T \ pH         | 5.5 | 6.0 | 6.5 | 7.0 | 7.5  | 8.0  | 8.5 | 9.0 |
|----------------|-----|-----|-----|-----|------|------|-----|-----|
| T <sub>1</sub> | 38  | 94  | 130 | 189 | 261  | 228  | 140 | 73  |
| T <sub>2</sub> | 63  | 142 | 190 | 353 | 493  | 415  | 196 | 144 |
| T <sub>3</sub> | 84  | 150 | 311 | 549 | 848  | 758  | 298 | 229 |
| T <sub>4</sub> | 99  | 172 | 339 | 654 | 1219 | 851  | 548 | 404 |
| T <sub>5</sub> | 111 | 172 | 319 | 626 | 1272 | 1015 | 602 | 434 |

$$SS(T \times P) = \frac{1}{3} [ (T_1 P_1)^2 + (T_1 P_2)^2 + \dots + (T_5 P_8)^2 ] - C - SS(T) - SS(P) = 202944$$

2. 貳次交互作用：

$$SS(L \times T \times P) = TSS - SS(L) - SS(P) - SS(T) - SS(L \times T) - SS(L \times P)$$

$$= 89456$$

經變方分析得：

| 變因       | 自由度 df | 平方和 SS  | 均方 $\frac{SS}{df}$ | 實測 F 值 | 理論 F 值 |
|----------|--------|---------|--------------------|--------|--------|
| T        | 4      | 355053  | 88763.25           | 55.6   | 3.21   |
| L        | 2      | 416247  | 208123.5           | 130.3  | 3.63   |
| P        | 7      | 753328  | 107618.28          | 67.4   | 2.70   |
| T × L    | 8      | 103365  | 12920.63           | 8.1    | 2.59   |
| T × P    | 28     | 202994  | 7249.79            | 4.54   | 2.15   |
| L × P    | 14     | 306288  | 21877.71           | 13.69  | 2.38   |
| 二次交互作用機差 | 56     | 89458   |                    |        | 1.82   |
| 總和       | 119    | 2226833 |                    |        |        |

變因 T、L、P 所測 F 值均大於理論 F 值，再作顯着性測驗得：

(1) 溫度：

| T         | 10 °C              | 15 °C              | 20 °C               | 25 °C               | 30 °C               |
|-----------|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| 平均乾重量(mg) | 48.04 <sup>a</sup> | 83.17 <sup>b</sup> | 134.46 <sup>c</sup> | 178.58 <sup>d</sup> | 189.63 <sup>d</sup> |

$$\text{因最低差異顯著標準值 } LSD = t_{df} 0.05 = 5.6 \times \sqrt{\frac{2MSE}{2 \times 7}}$$

$$= 27.5$$

所以欲培養藍綠藻時，在 25 °C 與 30 °C 均可達到同樣之結果，若溫度達 25 °C 不必提高溫度也可得到同樣之結果，這樣在培養上可省去很多能量。

(2) 照度：

| L         | L <sub>1</sub>     | L <sub>2</sub>     | L <sub>3</sub>      |
|-----------|--------------------|--------------------|---------------------|
| 平均乾重量(mg) | 60.58 <sup>a</sup> | 116.1 <sup>b</sup> | 203.65 <sup>c</sup> |

$$LSP = t_{df} 0.05 = 56 \times \sqrt{\frac{2MSE}{2 \times 7}} = 19.44$$

因此可知培養時照度  $L_1$ 、 $L_2$ 、 $L_3$  有顯著性之差異

(3) pH 值：

| pH        | 5.5               | 6.0                | 6.5                | 7.0                 | 7.5                 | 8.0                | 8.5                 | 9.0               |
|-----------|-------------------|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|--------------------|---------------------|-------------------|
| 平均乾重量(mg) | 26.3 <sup>a</sup> | 48.67 <sup>b</sup> | 85.93 <sup>b</sup> | 158.07 <sup>c</sup> | 272.87 <sup>d</sup> | 217.8 <sup>e</sup> | 118.98 <sup>b</sup> | 85.6 <sup>d</sup> |

$$LSD = t_{df} 0.05 = 56 \times \sqrt{\frac{2MSE}{8}} = 36.37$$

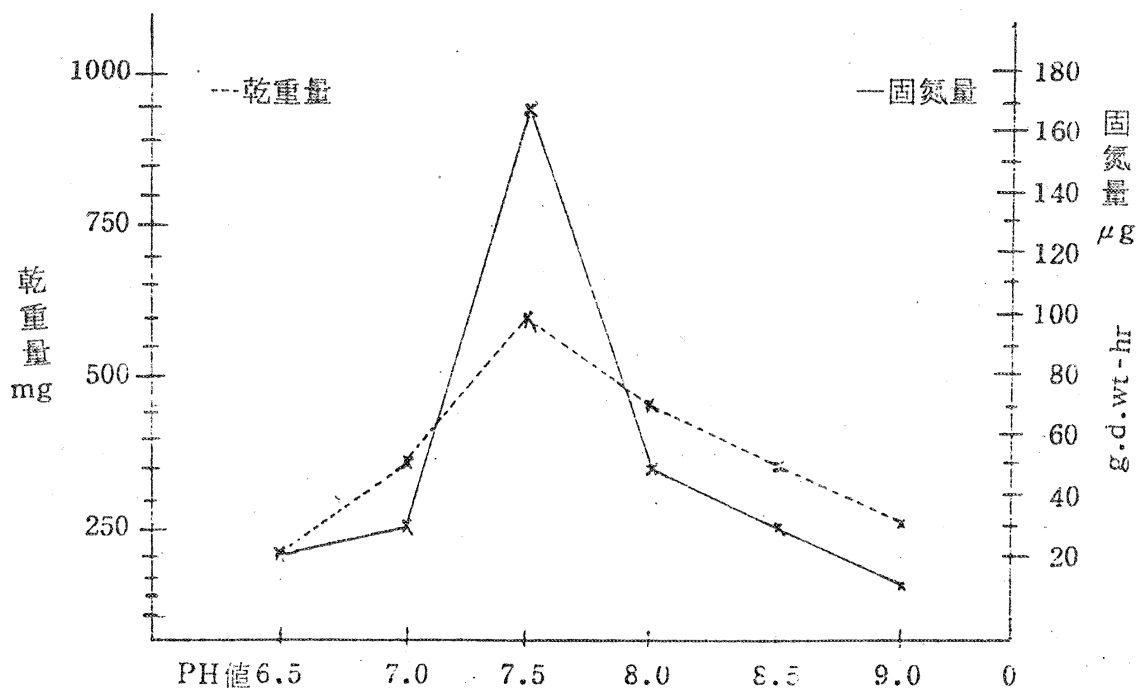
知 pH = 5.5 與 pH = 6.0 及 pH = 6.5, pH = 8.5, pH = 9.0 所得結果相同, 而 pH = 7.0, pH = 7.5, pH = 8.0 則有顯著性之差異。

綜合可知變因溫度 ( 10 °C ~ 30 °C ), 照度 (  $L_1 \sim L_3$  ), pH 值 ( 5.5 ~ 9.0 ) 與繁殖之關係是正相關的, 而在 30 °C,  $L_3$  及 pH = 7.5 時生長最為良好。再用固氮活性測得：

| 固氮作用<br>pH | 乾重量<br>瓶子 142 ml | 0.5 ml peak ( cm ) R=4 |      |      |                  | $C_2H_4$ 濃度<br>$\mu\text{mole g.d.wt-60分}$ | 固氮量 $\mu\text{g}$<br>g.d.wt-60分 |
|------------|------------------|------------------------|------|------|------------------|--|---------------------------------|
|            |                  | 0.1分                   | 30分  | 60分  | $\Delta H$<br>60 |  |                                 |
| 6.5        | 12.3             | 4.7                    | 5.4  | 6.1  | 1.4              | 3.942                                      | 36.793                          |
| 7.0        | 19.1             | 4.9                    | 6.0  | 7.3  | 2.3              | 4.171                                      | 38.926                          |
| 7.5        | 29.2             | 6.8                    | 14.0 | 21.6 | 14.8             | 17.554                                     | 163.840                         |
| 8.0        | 25.4             | 5.2                    | 8.1  | 9.9  | 4.7              | 6.409                                      | 59.814                          |
| 8.5        | 16.7             | 4.5                    | 5.0  | 5.7  | 1.2              | 2.489                                      | 23.228                          |
| 9.0        | 10.6             | 4.9                    | 5.0  | 5.2  | 0.3              | 0.980                                      | 9.149                           |

可知在  $T_5$ 、 $L_3$  時 pH = 7.5 固氮量最好, pH = 0.8 次之, pH = 7.0 又次之, 而 pH = 9.0 最少。pH = 7.5 時約為 pH = 8.0 時之 2.7 倍, 為 pH = 7.0 時之 4.2 倍。也即 pH 值在 5.5 ~ 7.5 料 pH 值增加, 固氮活性增加; pH 值在 7.5 ~ 9.0 時, pH 值而固氮活性反而減少, 但在 pH = 7.5 時, 固氮活性最為良好。

再比較生長與固氮活性得：



知在  $T_5$ 、 $L_3$  條件下，pH 值從 6.5 ~ 7.5，pH 值增加，繁殖量增加，固氮活性也增加。從 pH 7.5 ~ 9.0 時 pH 值增加，其繁殖量減少固氮活性也減少。而 pH = 7.5 時，不但繁殖最好，而且固氮量也最多。

所以要大量培養且又有良好之固氮活性，需要無氮培養液 pH 在 7.5、30 °C，4750 Lux 時為最好。

### 五、討論：

- 1 乙炔是一種便宜又很普通之氣體，在市面上很易購得或自行製造。所以用乙炔還原法測固氮活性除省錢外，因其操作容易也省時、省事，而且靈敏度、穩定性很高；不受其他酵素干擾就可以很精確地測得結果。
- 2 固氮酵素要把空氣中之游離氮素固定而還原或  $NH_3$  時，必須同時具備基質 ( $N_2$  及  $C_2H_2$ )、還原劑 ( $H^+$  及  $e^-$  供應者)、能量 ADP，金屬元素  $Mg^{+2}$  等。藍綠藻固氮作用所需之還原劑  $NADH + H^+$  或  $NADPH + H^+$  及能量 ATP 均來自藍綠藻之呼吸作用，而呼吸作用所用之原料則有賴於光合作用，所以藍綠藻

之固氮活性間接還是者光合作用之產物是有關的。因此設法增加光合作用活性也是一種可增加固氮作用之可行方法。

#### 六、參考資料：

- 1 Brill, W.J. 1975 Regulation & genetics of bacterial nitrogen fixation. *Ann. Rev. Microbiol* 29:109-129.
- 2 Conn, E.E & P.K Stumpf, 1972 The nitrogen Cycle, In "Outline of Biochemistrg" P.P. 403 ~ 407 John, Wiley & Son, Inc. New York.
- 3 Dobereiner J 1974, Nitrogen fixing bacteria in rbyzosphere, In "The Biology of Nitrogen fixation" ed. ouispel A PP86 ~ 117.  
North-Holland, Amsterdan.
- 4 Havelka . V.D & R.W.F Hardy, 1975 Nitrogen fixation research; A Key to World food ? *Science* 188 :633 ~ 643.
- 5 Ljones T, 1974, The enzyme system In. "The Biology of Nitrogen Fixation" ed. Ouispel A, PP617 ~ 635, North - Holland, Amsterdan.
- 6 Mulder E.G & S. Brotonegoro, 1974 Free-living heterotrophic Nitrogen fixing bacteriar, in "The Biology of Nitrogen fixation" ed, Ouispel, A PP38 ~ 80.  
North-Holland, Amsterdan.
- 7 Postgate, J.R 1974 Prerequisites for biological fixation in free-living heterotrophic bacteria, In "The Biology at Nitrogen Fixation" ed, Ouispel, A PP663 ~ 684 North-Holland.
- 8.黃啟穎，1975 生物科學技術之介紹二  
生物研究中心專刊第5號 P20
- 9.黃啟穎，1977 藍綠藻之固氮作用：科學農業 25：280
- 10.黃啟穎，1977 植物之固氮作用：生物科學 12:1
- 11.黃啟穎，1978 高等植物固氮作用之理論與實際：中研院生物



研究中心專刊第 8 號。

- 評語：
1. 題目擬修改為“溫度、酸鹼度、照度對 *Anabenopsis arnoldii* 生長與固氮活性之影響在統計法上之研究”。
  2. 應用新技術將菌類 *Anabenopsis arnoldii* 固氮和溫度、鹼度、照度的關係分析的非常清楚，有學術及教育的價值。
  3. 論文簡明扼要易讀，是篇優良的論文應給予獎勵。
  4. 圖片中有三張，其倍數一樣，但都不準確，應改之，並應取一張圖片示出即可。