

# 臺灣二〇〇三年國際科學展覽會

科 別：植物學科

作品名稱：由溶氧量之變化分析單胞固氮藍綠藻光合韻律之  
特性

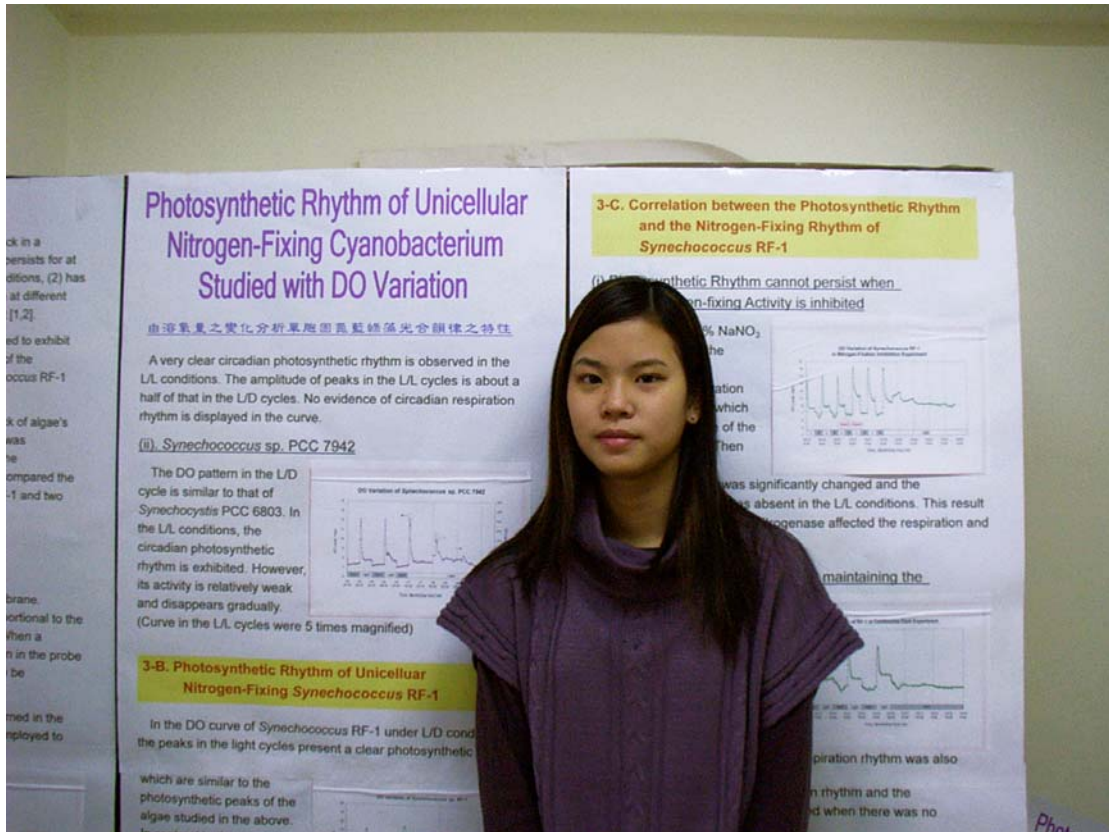
得獎獎項：植物學科第一名

美國第五十四屆國際科技展覽會

學 校：國立高雄師範大學附屬高級中學

作 者：嚴婉禎

## 作者簡介



我叫嚴婉禎,目前就讀國立高雄師大附中二年級.從國小開始,在父親的帶領下就一直參加科展的研究活動,為我在科學研究的基礎上紮根.近年來承蒙許多老師的指導,參與生物方面的研究,讓我對生物這個領域產生濃厚興趣.平時的興趣是聽聽音樂或是閱讀陶冶自己,未來我會繼續往學術研究方面發展,找到屬於自己的一片天空.

## 摘要

此項研究是用溶氧計連續偵測培養液中之溶氧量，藉以分析固氮單胞藻 RF-1 的光合韻律。實驗的結果清楚地看出 RF-1 之光合韻律，而且能夠清晰地觀察到其中光合作用、呼吸作用和固氮作用之間的相互關係。研究中還發現：在不進行光合作用時，RF-1 的固氮作用也會停止；另一方面，在有進行光合作用、但是停止固氮作用的狀況下，RF-1 光合作用之韻律現象會喪失。這些實驗結果值得未來更深入地探討。報告中也包括了單胞藻 PCC6803 的光合韻律實驗，藉以做為有固氮能力與沒有固氮能力藍綠藻之間的對照。

## **Abstract**

The variation of dissolved oxygen (DO) in the culture of the unicellular nitrogen-fixing cyanobacterium *Synechococcus* RF-1 under diurnal light/dark condition was detected automatically by DO meter. The results indicated that the algae exhibited circadian photosynthetic rhythm. The results also revealed that a respiration rhythm occurred at dark phase when the culture was grown in nitrogen-free medium. There was correlation between the rhythm of photosynthesis and nitrogen fixation. The nitrogen-fixing activity could not be detected if the photosynthesis was stop by cultivated under continuous darkness. On the other hand, the rhythm of photosynthesis could not persist when the nitrogen-fixing activity was inhibited by NaNO<sub>3</sub>. In order to compare the difference between *Synechococcus* RF-1 and the cyanobacterium, which cannot fix nitrogen, the DO pattern of *Synechocystis* PCC6803 was also investigated.

## 致 謝 詞

(按照科教館之規定，文中不能出現相關人員之完整姓名，敬請見諒)

這個階段的研究總算是告一段落了，在這些研究成果的背後得到了許多人的指導、支援與協助，才有可能如期地將結果呈現出來。首先要感謝我的研究工作的指導教授：中研院的黃教授，研究工作進行期間，黃教授對我的實驗一直十分支持，讓我在暑假到他的實驗室進行實驗，給了我很多實驗操作中的指導，以及這個領域的相關知識，也教導我做研究應有的科學精神與態度，與我一起討論實驗上的問題等等，讓我深感自己何其幸運！在黃教授的實驗室的工作期間也常常受到實驗室學長和學姊們的幫忙和照顧，都讓我十分的感謝！

除了謝謝學校能讓我們長時間的使用生物實驗室進行實驗外，也謝謝我在學校的兩位指導老師：蕭老師與陳老師，時常地對我的實驗進度付出關心，並且在我研讀論文或是實驗上有問題時，也盡力的幫我解決疑惑，不斷給我鼓勵，才讓實驗能順利進行。謝謝您們！

在我們的研究小組中，也要謝謝許學妹和蘇學妹幫我整理數據資料，並於研究的過程相互扶持、幫忙，讓我感到研究之路不再是那麼孤單。謝謝爸爸幫忙我們維護實驗系統，也常常提出一些構想引導我們解決問題，謝謝爸爸和媽媽對我們付出的關心，以及同學們的鼓勵。謝謝自己總算也堅持到最後，還有好多未能提及的人，這些研究結果都是大家的支持得來的，沒有你們就不會有這份報告的呈現，謝謝大家！

## 縮寫對照表

RF-1	Rice Field-1 (聚球藻 <i>Synechococcus</i> RF-1 之簡稱)
PCC	Pasteur Culture Collection
DO	Dissolved Oxygen (溶氧量)
D-cycle	Dark-cycle (黑暗週期)
L-cycle	Light-cycle (照光週期)
L/D	Light / Dark Condition (輪流照光及黑暗)
L/L	Light / Light Condition (連續照光)
D/D	Dark / Dark Condition (連續黑暗)
12h L/12h D	12 hours Light/12 hours Dark (12 小時照光/12 小時黑暗)
PhE	Photosynthesis Enhancement Signal(光合作用增強訊號)
PhI	Photoinhibition Signal (光抑制作用訊號)
PhB	Photosynthesis Balance State (光合作用與大氣溶氧平衡之狀態)
DRE	Dark Respiration Enhancement Signal (暗呼吸作用增強訊號)
PhR <sub>N</sub>	Photosynthetic Rhythm of N-type (N 型之光合韻律)
PhR <sub>C</sub>	Photosynthetic Rhythm of C-type (C 型之光合韻律)

## 第一節 簡介

過去三年，我們一直在發展用溶氧計（Dissolved Oxygen Meter, 簡稱 DO Meter）偵測培養液中溶氧量隨時間的變化，藉以觀察藻類光合作用之生物時鐘現象。在傳統的研究方法中，大約是兩個小時抽取一次樣品以進行實驗，這種間斷取樣不但會對樣品造成影響，而且所測得訊號的變化也很不自然。我們的方法具有連續偵測的優點，克服了上述的傳統方法的困擾，所得到的實驗圖形遠比傳統方法所得者自然；而且可以由其中發現一些新的現象，尤其是一些較快的、時間較短的反應。此外，這個方法也可以應用在別種藻類的實驗中。

這份報告將說明我們最近運用這個方法到固氮單胞藻 RF-1 之光合韻律研究的實驗結果，除了成功地偵測到 RF-1 光合作用的概日韻律之外，也深入探討了之光合韻律與固氮韻律之間的關係。

生物學家所稱的生物時鐘（Biological Clock）或內生性韻律（Endogenous Rhythm）是用來表示 --- 生物的“內生機制變化”表現在“行為上、生理上或生物化學上”的現象，且可以在“環境維持不變”的情況下，依然維持“週期性變化”的現象之總稱。

隨著生物種類之不同，生物時鐘之週期也會不同，但大多數生物時鐘之週期與日夜變化一致，稱為概日韻律（Circadian Rhythm）。它有四個主要的特點：

1. 需要某種環境因子加以設定。
2. 韻律設定之後，於恆定環境下其韻律可以維持一段時間。

3. 韻律週期之長短受溫度之影響不顯著。
4. 可以重新設定。

生物時鐘十分廣泛地存在於動物、植物或真核微生物等真核生物中，許多科學家嘗試研究原核生物是否也有生物時鐘的現象。但是許多對光合細菌、大腸桿菌、適鹽生物或藍綠藻之生物時鐘的研究並沒有成功，故推論原核生物不會產生生物時鐘的現象，而且推論生物時鐘之存在可能需要某種特別的細胞結構。直到 1986 年中央研究院植物所黃檀溪教授的實驗室發現 --- 藍綠藻品系之聚球藻 RF-1 的固氮酵素活動具有內生之週期韻律現象，此後在 RF-1 的細胞分裂、胺基酸吸收或是蛋白質的合成之研究中，皆發現了生物時鐘的現象，從此開啟了原核生物之生物時鐘的研究領域。由於原核生物的細胞構造、基因表現及訊息傳導運作都比真核生物單純，立即成為探討生物時鐘之起源及其調控機制的最好的材料。

生物時鐘在生物體內扮演重要的一環，控制生物體對環境的適應情形，若生物時鐘有失調現象，對生物體生活上的影響有各種各樣的嚴重性。例如 --- 每個人都有過失眠的痛苦經驗，就是個很好的例子。而生物時鐘的研究，除了是生物學學術上的基礎研究之外，在醫學應用上也有其重要性。

在這份報告以下各節中，我們在第二節會先簡述 RF-1 的生理性質，接著討論過去的學者們關於 RF-1 之光合韻律及固氮韻律的研究結果，藉以說明 RF-1 光合韻律之溶氧量曲線變化的情形，做為爾後諸節討論之基礎。第三節分為四個部份，分別詳細說明我們實驗系統的組成、溶氧計之工作原理、實驗樣品製備以及實驗步驟。

接下來是實驗結果的部份，第四節先報告單胞藻 PCC 6803 之光合韻律實驗，PCC 6803 是一種沒有固氮能力之藍綠藻，因此它的光合作用及韻律之表現會和有固氮能力之藍綠藻非常不一樣，我們將它放在這一節中提供第五、六節做對比，同時這個實驗也展示了我們的實驗方法可以運用在別種藻類的研究中。

第五節是 RF-1 之光合韻律的基本實驗結果，這次的數據比去年好了很多，我們驚訝地發現 L/L 之下的概日韻律曲線幾乎完全重現 L/D 的實驗曲線。第六節是兩個進階研究，探討 RF-1 的光合韻律與固氮韻律之相互關係 --- 在沒有光合作用的情況下，固氮作用將無法進行；另一方面，即使有光合作用在進行，如果固氮作用被抑制，則光合作用之韻律將消失，顯示光合韻律與固氮韻律之間可能有著互為因果的關係。最後在第七節中報告我們的結論。

## 第二節 固氮單胞藻 RF-1 之光合韻律與固氮韻律

聚球藻 RF-1 (PCC 編號 8801) 品系是分離自本省水田中之單胞固氮藍綠藻，RF 表示來自 rice field。其分類地位應屬於：

*Cyanophyta* 藍綠藻綱

*Chroococcales* 色球藻目

*Chroococcaeae* 色球藻科

*Synechococcus* 聚球藻屬

RF-1 為單細胞個體、桿狀、具類囊膜、無鞘、採二分法繁殖，平均大小在  $3.8 \times 3.0 \mu\text{m}$  左右。在結構上，它包含了一些不尋常的葡萄糖細粒，使它的大小變化在  $0.1$  到  $0.4 \mu\text{m}$  之間。RF-1 是一種光自營生物，當它在  $28^\circ\text{C}$  的 BG-11<sub>o</sub>(無氮源)中培養、並使用  $35 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  的白螢光燈給予光照時，一代的生長週期約為三天。在培養基 BG-11 中，生理上正常的溫度範圍為  $20^\circ\text{C} \sim 42^\circ\text{C}$ ；而在無氮的 BG-11<sub>o</sub> 中，則是  $20^\circ\text{C} \sim 37^\circ\text{C}$ 。最適合生長之環境光強度為  $2000 \sim 3000 \text{ Lux}$ 。RF-1 的細胞可以在 "suspended state" (即連續黑暗(D/D)的環境下) 維持生存超過兩星期。

各類生物所發現之固氮酵素均非常怕  $\text{O}_2$ ，因此固氮生物通常需要有保護其固氮酵素不受  $\text{O}_2$  破壞的機制。藍綠藻在行光合作用時會產生許多  $\text{O}_2$ ，為了避免其固氮酵素受到  $\text{O}_2$  之破壞，一般的藍綠藻是以細胞生理分工之方式來解決 --- 即在絲狀的細胞群體中有些細胞特化成異形細胞 (細胞中沒有葉綠體)，專司固氮之責，其他的營養細胞負責光合作用。但是單胞固氮藍綠藻由於只有一個細胞，便無法

以細胞特化的方式來解決固氮酵素怕氧氣的問題。中央研究院植物所的黄檀溪教授對於單細胞固氮藍綠藻如何以一個細胞又要進行光合作用，又要進行固氮作用的問題深感興趣，深入探討之後，發現在原核的單胞固氮藍綠藻 RF-1 品系中，是以時間區隔的方式解決上述問題，而使得 RF-1 在生理運行上表現出與真核生物相同之概日韻律。

黃教授在實驗中發現：RF-1 在光/暗週期（例如 12hL/12hD）下，其固氮作用僅出現於暗週期，因此形成照光時進行光合作用、沒有固氮活性，在黑暗時則進行固氮作用之 24 小時變化的固氮週期。如將已建立固氮週期變化之聚球藻，再從光/暗週期（L/D）移到連續照光（L/L）下，則此 24 小時之固氮週期變化會依然持續表現，黃教授並進一步檢驗了此固氮週期變化具有生物時鐘的四個特性，這是對原核生物也具有內生性概日韻律之首次發現。

圖 2-1 是典型的 RF-1 在 BG11。中、於 L/D 條件下，用溶氧計測得之溶氧量變化圖，實驗時培養箱溫度為 28°C，光暗週期的設定為 12h L/ 12h D，準確開燈時間是上午 6:00，於晚上 18:00 關燈。以下我們將詳細說明圖中溶氧量曲線變化的情形，並做為爾後諸節討論之基礎。

實驗前我們先測量未加入任何樣品、只有培養液的溶氧量，其值大約維持在 7.4 左右，這個數值是大氣中氧氣溶入培養液中的平衡值，我們稱為培養液溶氧量的背景值。

RF-1 在 6:00 開燈時進入 L-cycle，RF-1 受到光線刺激，開始啟動光合作用製造氧氣，由於 DO 曲線上升非常劇烈，顯示其光合作用

的活性在此有強烈增強的表現，我們將此部份之訊號簡稱為 PhE (Photosynthesis Enhancement Signal：光合作用增強訊號)。大約一個小時之後，RF-1 察覺到細胞中氧氣的量太高，為了保護其固氮酵素，啟動一種光抑制作用 (Photoinhibition Effect)，抑制光合作用的活性，於是 DO 曲線開始急速下降，我們將此一下降的區間簡稱為 PhI (Photoinhibition Signal：光抑制作用訊號)。PhE 和 PhI 合起來形成一個光合作用的尖峰。

在 L-cycle 的後段 (大約在 10 時之後)，DO 降到一個固氮酵素可以接受的數值之後，光合作用的活性就維持在一個穩定的狀態、穩定地製造氧氣，使得培養液中的溶氧量和大氣之間達到新的平衡數值，而表現出近似水平的線段，我們將此部份簡稱為 PhB

(Photosynthesis Balance State：光合作用與大氣溶氧平衡之狀態)，圖中 PhB 的 DO 數值約為 8.7，由於此時有光合作用在進行，此一數值自然會明顯地高於背景值。PhB 的數值會反應出 L-cycle 中穩定的光合作用旺盛之程度。

18:00 關燈之後進入 D-cycle，RF-1 的光合作用很快地停止了，DO 迅速下降，大約在 20 時降到背景值附近。21 時開始，DO 曲線呈現出一個快速下降的凹陷，我們稱之為 DRE (Dark Respiration Enhancement Signal：暗呼吸作用增強訊號)。清晨 2 時左右，DRE 逐漸停止，DO 曲線開始回升，並逐漸趨近於背景值，接著 6 時又開燈，展開下個週期的循環。

DRE 的表現和過去 Grobbelaar 及黃教授在“固氮作用與呼吸作用之關係”的研究結果相符合。在 L/D 條件下，RF-1 會於 D-cycle

(即無光合作用時)進行固氮作用，藉以與光合作用的時間分開，保護固氮酵素的活動不受到 O<sub>2</sub> 的破壞。由於在 L-cycle 中，RF-1 的光合作用十分旺盛，產生大量的氧氣；進入 D-cycle 之後，光合作用雖然停止了，但培養液及細胞中仍然累積了濃度很高的 O<sub>2</sub>，於是 RF-1 必須增強呼吸作用，急速地消耗氧氣，以提供適當的低氧環境讓固氮作用得以順利進行，這使得培養液中的溶氧量下降，並且在 DO 曲線中表現出 DRE 的訊號。因此我們可以說 --- DRE 是固氮作用和呼吸作用之間交互作用的結果（固氮作用要求呼吸作用必須急速增強）；DO 曲線是以 DRE（增強呼吸作用）的形式表現固氮作用的運行。此外，增強呼吸作用的另一個功能是可以提供固氮作用所需的大量能量。

在 L/D 條件下，L-cycle 的週期性產生了光合作用的光合韻律（Photosynthetic Rhythm），D-cycle 的週期性產生了固氮作用的固氮韻律（Nitrogen-Fixing Rhythm），如果 L-cycle 大約為 8-16 小時、D-cycle 大約為 8-16 小時、而且 L-cycle 加 D-cycle 的總時間大約為 24 小時，在適當的條件下，光合作用和固氮作用的交互作用就形成了 RF-1 的概日韻律。

有一些研究指出：PhE 形成的原因可能是 --- 藻類在 D-cycle 的呼吸作用中製造了大量的 CO<sub>2</sub>，這些 CO<sub>2</sub> 持續地累積，因此在進入 L-cycle 的初期，必需增強光合作用藉以快速地消耗 CO<sub>2</sub>。目前我們已經觀察過的四種藻類 --- RF-1、PCC 6803、小球藻、單殼縫藻，它們的溶氧量變化都有 PhE 的訊號，PhE 可能是大部分藻類普遍都存在的現象。由 PhE 可看出光合作用受開燈動作的影響很大，可見得藻類從 D-cycle 到 L-cycle 的生理轉變非常大。

如果我們連續幾天做 L/D 的實驗、觀察 DO 曲線的變化，我們通常會發現：PhE 的峰值及 PhB 的平衡值會逐日增強，這可能是因為樣品增殖、細胞濃度越來越高所導致的。但是 DRE 的強度（DO 曲線凹陷的深度）則沒有明顯的改變趨勢，意味著：DRE 的強度與細胞濃度無關，只和培養液中溶氧量的數值有關。

## 第三節 實驗方法

在這一節中我們分四個小節，分別介紹我們的實驗系統、實驗儀器（溶氧計）、實驗樣品製備及實驗步驟。

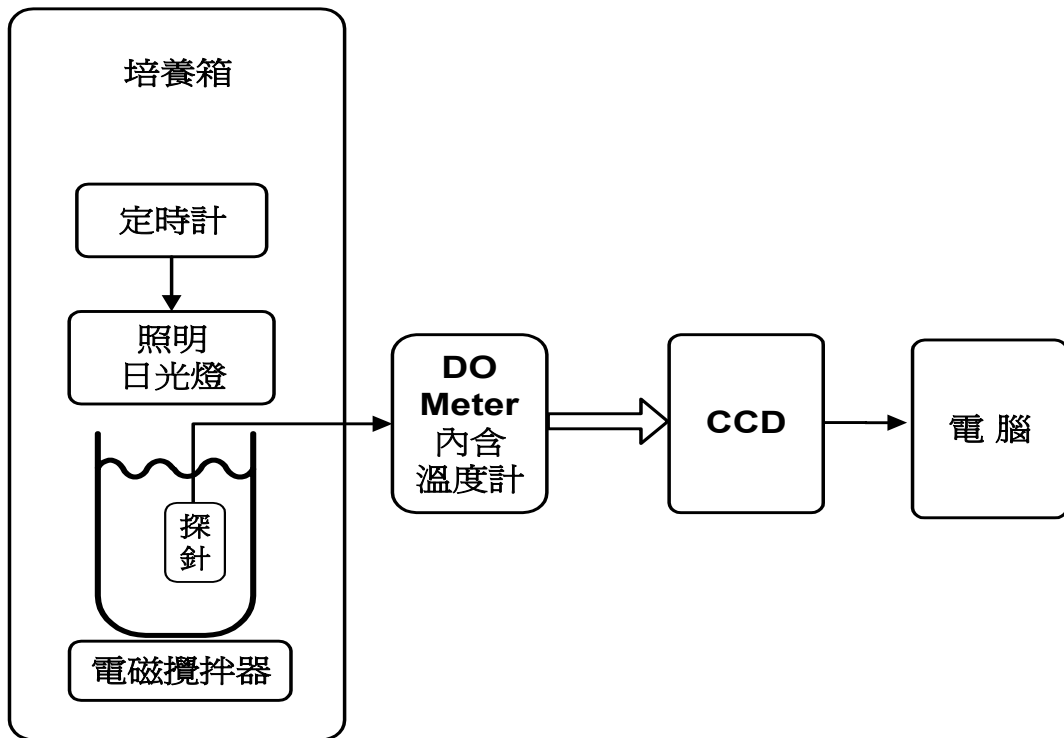
### 3-1. 實驗系統

圖 3-1 為我們實驗系統的示意圖。實驗都是在培養箱中進行，以便較穩定地控制光照及溫度，所有的實驗溫度都設定為 28°C。

我們的實驗系統可分為置於培養箱內及培養箱外兩個部分。

1. 培養箱：這是大型的培養箱，內建照明設施，具有控制溫度及照光時間的功能。燈具為一般的照明日光燈，我們以定時計自動控制燈光的開關。在 28°C 左右，培養箱內溫度的穩定度為  $\pm 2^{\circ}\text{C}$ ；我們以照度計測得實驗樣品放置位置的光強度約為 2700 Lux。
2. 實驗樣品：放在 100 c.c 的玻璃瓶中。
3. 電磁攪拌器：持續攪動樣品溶液，以免樣品附著於 DO 探測頭上造成 DO 偵測值不可靠；並使培養液中的 DO 值、光照及溫度維持均勻。攪拌器轉速為 250 rpm。
4. DO Meter：這是 YSI model-55 的 DO Meter，內含溫度計，可同時測量培養液之溶氧量及溫度。
5. CCD：小型監視用 CCD。由於 DO Meter 沒有電腦界面，我們用 CCD 攝取 DO Meter 的讀數，以電腦記錄為影像檔，每天再由影像中讀出數據。
6. 電腦：電腦每十分鐘擷取一次螢幕影像，將影像（DO Meter 讀數）儲存於硬碟機中。我們以電腦的計時器做為實驗系統的時間基準。

圖3-1. 實驗系統圖



### 3-2 溶氧計 (DO Meter) 之工作原理

溶氧計的感測器有一個金質的陰極和一個銀質的陽極，為增加陽極的表面積通常會用多孔性的 (porous) 銀棒、或採用繞線式的銀線製作陽極。兩電極浸在一個小型電解槽中，一般均採用 KCl 溶液為電解液，其中需添加少量的表面活性劑以增強電極和溶液的接觸。

感測器上以一片滲透性的薄膜隔離電解槽與外界，這種薄膜可以容許氧氣透過而進入感測器。偵測時需在電極上加電壓，致使透過薄膜進入電解槽的氧氣在陰極產生反應而形成電流。

氧氣透過薄膜的速率和薄膜內外氧氣的分壓差 (濃度差) 成正比，由於氧氣在陰極消耗得很快，我們可以假設薄膜內氧氣的分壓為零。因此，氧氣滲入薄膜的驅動力只與薄膜外的氧氣的濃度成正比。當外界氧氣的濃度改變時，氧氣滲入薄膜的量也成正比地改變，使得感測器偵測到的電流也成正比地改變。

在進行測量的過程中，感測器附近的氧氣一直滲入電解槽，因此樣品必須持續不斷地攪動、以便均勻地測量樣品中的溶氧值。若是攪動發生停滯，讀數會變低而不正確。攪動的動作可以用機械帶動感測器周圍的樣品，或是直接迅速地將感測器在樣品中移動。攪拌的速率應至少每秒 1 英尺。

在我們的實驗中，是用一個電磁攪拌器攪動樣品溶液，如果攪拌的速度較慢，藻類會在感測器的四周凝聚，使得 DO 的讀值有嚴重的、不規則的變化、因此我們是用嘗試的方式，逐漸調整電磁攪拌器的轉速，使得感測器四周不會發生藻類凝聚的現象。

實驗期間由於需要持續提供 CO<sub>2</sub> 給藻類，以維持生長，光合作用又會不斷地產生氧氣，因此我們不能將樣品放在封閉的容器內進行實驗。由於樣品和外界之間不是隔離的，DO Meter 所測得的數值並不是純粹由樣品所產生出來地氧氣，還包括大氣和溶液交互作用的結果 --- 溶液中的氧含量超過飽和溶解度時，溶液中的氧會溢出液面跑到大氣中，若是溶液中的氧含量低於飽和溶解度，大氣中的氧氣會溶入液體中。因此這個測量法在數據的討論和分析上有一些複雜和缺點。不過，由於在培養箱中溫度相當穩定，氧的飽和溶解度和空氣中氧的分壓可視作常數，使得大氣和溶液的交互作用也可視為常數，因此數據的變化仍然會相當真實地反應出實驗所發生的現象。

這個實驗方法還有一個獨具的優點 --- 我們可以即時 (real time) 且連續地偵測樣品，這是一般傳統的方法所做不到的，因此可能可以由其中發現一些新的現象，特別是一些較快的、時間較短的反應。此外，這個方法可以很方便地應用在許多不同藻類的光合作用研究上，也是很重要的優點。

### 3-3. 實驗樣品製備

研究中所用到的實驗樣品有兩種，它們所需的培養基條件各有不同：

RF-1：使用無氮源的 BG-11<sub>0</sub> 培養。PH 值用 EPPS 控制在 8.0。

PCC-6803：6803 不會行固氮作用，因此我們用 BG-11 培養。

詳細配方如下：

藥品成份	濃度(g/ L)	註
NaNO <sub>3</sub>	1.5	6803 用
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.004	
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.075	
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.036	
Citric acid	0.006	
Ferric ammonium citrate	0.006	
EDTA(Disodium magnesium salt)	0.001	
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.02	
Trace-metal mix A5 <sup>6</sup>	1.0(ml/L)	
EPPS	2.523	RF-1、PCC 6803 用

Trace-metal mix A5<sup>6</sup> 配方：

藥品	濃度(g/L)
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.86
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	1.81
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.22
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.08
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> · 4H <sub>2</sub> O	3
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.0494

培養液藥品都配好後，再使用 1M 的 HCl 或 NaOH 調整 pH 至 8.0

### 3-4 實驗步驟

每次實驗時取正在培養中的新鮮樣品以 100 c.c.的燒杯盛裝，置入培養箱中，以 DO Meter 探測溶氧量及溫度，並以電磁攪拌器持續攪拌、以維持樣品中溶氧量、光照及溫度的均勻性。我們會讓樣品在 L/D 之下適應三天以上，以建立其概日韻律。並觀察樣品及訊號是否已達穩定，再進行之後的實驗。每一個實驗階段至少取三天的數據，由訊號的重複性確定實驗結果之可靠性。

標準的光合韻律的實驗過程是在 L/D 狀態下三天以上以建立其韻律，並且由實驗訊號的重複性，以確定樣品及實驗系統的可靠性。然後進入 L/L 或 D/D 狀態（保持外界狀況不變），觀察訊號是否還有週期性的變化。如果有週期性的變化，那就表示有韻律；如果有韻律而且韻律週期大約為 24 小時，那就是概日韻律的表現了。

樣品的正常培養溫度為 28°C。L/D 的設定採取 12h L/12h D。實驗期間，每天早、中、晚三次檢視系統是否工作正常，以避免電腦當機損失太多數據。每天晚間讀出電腦記錄的數據，立即繪圖分析，以了解系統及樣品的狀況，做為實驗進展的依據。

## 第四節 無固氮能力之單胞藻 PCC6803 之光合韻律

### 特性

PCC6803 也是一種單細胞的藍綠藻，它和 RF-1 的親源關係很近（相當於堂兄弟），但是它沒有固氮能力，因此它的光合作用及韻律之表現會和有固氮能力之藍綠藻不一樣，非常適合作為 RF-1 的對照、藉以探討光合韻律與固氮韻律之間的關係。PCC 6803 的分類地位應屬於：

*Cyanophyta* 藍綠藻綱

*Chroococcales* 色球藻目

*Chroococcaeae* 色球藻科

*Synechocystis* 集胞藻屬

圖 4-1 是 PCC 6803 由 L/D 進入 L/L 之溶氧量變化圖，在這一系列的實驗中，L/D 的控制時間為上午 08:30 開燈、晚間 20:30 關燈，Do 的背景值為 7.8。不論是在 L/D 或是在 L/L 期間，PCC 6803 的 DO 曲線都非常規律，令我們非常驚訝。在 L/D 期間，DO 曲線非常漂亮地表現出光合作用活性有週期性的變化；在進入 L/L 之後仍然有尖峰型的訊號週期性地出現，而且相鄰尖峰之間的時間大約為 24 小時，這就是標準的概日韻律的訊號了。

若是仔細地去觀察 PCC 6803 在 L/D 狀況下 DO 曲線的變化，並且和圖 2-1 中 RF-1 的 DO 曲線比較，首先我們會發現 PCC 6803 沒有 DRE 的訊號！充分反應出有固氮作用和沒有固氮作用的樣品間的差異，間接映證了 DRE 訊號的確是固氮作用的表現。類似的推論

也可以在 Phi 中顯示出來，PCC6803 的 Phi 降得不夠快，可能是它不須要保護固氮酵素，而是另外有一個因素使得 Phi 降下來、但是不需要降得太快。

在 L/L 的訊號方面，L/L 中光合作用尖峰的 DO 值（尖峰的高低）比 L/D 中的尖峰低了很多，反映由 D-cycle 進入 L-cycle 會大幅地增強光合作用，單純由概日韻律引發的光合作用只有大約一半的數值。

由於 PCC6803 沒有固氮作用，本實驗中所測得的概日韻律顯示出 --- 除了固氮作用之外，也有別種作用可以和光合作用之間形成概日韻律，這是未來值得深入研究的。

這個實驗同時也展示了用溶氧計研究藻類光合韻律的實驗方法的確可以運用在別種藻類的研究中，事實上我們已經用此一方法研究過了 RF-1、PCC 6803、小球藻、單殼縫藻等四種樣品，而且都有很好的實驗結果，證實了這個方法的優點。

## 第五節 固氮單胞藻 RF-1 之光合韻律特性

圖 5-1 是 RF-1 由 L/D 進入 L/L 之溶氧量變化圖，在這一系列的實驗中，L/D 的控制時間為晚間 22:00 開燈、上午 10:00 關燈。進入 L/L 之前的 24 小時，曲線的變化為 RF-1 典型的 L/D-cycle 的 DO 曲線表現。進入 L/L 狀態後，我們可以明顯的看到 DO 曲線持續地隨著時間週期性的變化，形狀與 L/D 的 DO 表現大致相同。而且變化的週期大約為 24 小時，這就是 RF-1 光合作用之概日韻律的表現。我們將這種光合韻律的訊號簡稱為  $\text{PhR}_N$  (Photosynthetic Rhythm of N-type : N 型之光合韻律)。

連續光照下，第一個光合作用的尖峰仍是屬於正常 L/D 下的 PhE 的表現，這是由環境開燈動作的刺激所引起的訊號。在接下去時間中， $\text{PhR}_N$  幾乎都會在 22:00 左右（亦即正常 L/D 下進入 L-cycle 的時間點）急遽地上升，產生一個明顯的尖峰，這個部份是屬於 PhE 的訊號。第二個 cycle 之後 PhE 有點減弱了，我們認為這是因為少了環境變化的刺激，RF-1 的內生生物時鐘之調控逐漸鬆弛的現象。

10:00~22:00 之間，原本是正常的 L/D 狀態下的 D-cycle，雖然在 L/L 狀況下是連續光照，但  $\text{PhR}_N$  每次到了 16:00 左右，也會有一個強烈的下降，這是 DRE 訊號的表現，也就是固氮作用的表現，因此固氮作用與光合作用同樣地表現出概日韻律的現象。但是很明顯的 DRE 出現的時間比原本的時間點（10:00）向後位移了 6 小時。

我們非常驚訝地發現： $\text{PhR}_N$  居然是幾乎完全重現 L/D 的 DO 曲

線 --- PhE、PhI、PhB、DRE 的訊號全部都有。這意味著 L/D 的訊號中幾乎包含了建立概日韻律所有的交互作用，更顯得對 L/D 曲線的深入研究有其必要性。

另一個值得深思的現象是 DRE 訊號的振幅。在 PhR<sub>N</sub> 中 DRE 的振幅仍然相當大（凹陷相當深），這表示在此固氮作用旺盛的程度和 L/D 情況下差不多，而且這個時候光合作用幾乎被停掉了（或是被抑制得很低），一如原本在 D-cycle 的情況。換句話說，雖然一直都有照光，但是在這個區段可能並沒有在進行光合作用。

和 PCC 6803 的概日韻律實驗比起來，RF-1 的概日韻律訊號比較不穩定，由此可看出 RF-1 的生物時鐘相對地比較鬆弛，PCC 6803 的生物時鐘比較強韌，從交互作用的角度來講，RF-1 生物時鐘機制中的交互作用可能會較多，以致於一旦缺少了外界的制約，生物時鐘的調控就會顯示鬆弛的現象。

## 第六節 固氮單胞藻 RF-1 的光合韻律與固氮韻律

### 之相互關係

我們也進行了兩個系列更深入的研究，觀察 RF-1 在 L/D、L/L、和 D/D 實驗情況之間往復切換的情形，企圖探討 RF-1 的光合韻律和固氮韻律之間的相互關係。

#### 6-1. 在有光合作用的條件下、固氮作用才能進行

圖 6-1 到圖 6-4 是第一個系列實驗的結果，在這一系列的實驗中，我們先讓 RF-1 由 L/D 進入 D/D (圖 6-1)，觀察在沒有光照時是否可以看見韻律的表現，再讓 RF-1 由 D/D 進入 L/L (圖 6-2)，然後再用 L/D 設定概日韻律 (圖 6-3)，最後進入 L/L (圖 6-4) 觀察經過這一系列的過程之後光合韻律的變化。

在圖 6-1 中，我們先觀察了三個 L/D cycle 的曲線，由訊號的重複性，確定樣品及實驗系統為穩定、可靠，然後將照光控制切入 D/D。進入 D/D 後，溶氧量變化的訊號立即消失了。正如我們所預期的 --- 在無光照的環境下，就無法進行光合作用。但是我們也發現：原本 D-cycle 應表現的 DRE 訊號也消失了，由於 DRE 是固氮作用的表現，這個結果告訴我們光合作用停止後，固氮作用也立即停止運行。換句話說，在有光合作用的條件下，固氮作用才能進行。因此固氮韻律似乎也受到光合作用的調控，是一種從屬的關係。

根據黃教授的研究，RF-1 在 D/D (連續黑暗) 的環境下，大約

經過三天就會進入懸浮狀態 (suspended state)，在此狀態下細胞能夠維持存活，但不能進行生長分裂，當環境改善後即可迅速恢復正常生長。因此在 D/D 中，DO 曲線很快地就趨近於背景值附近，反映出 RF-1 停止了生理的活動。

RF-1 經過四個 D/D-cycle 後，我們把樣品切入 L/L (連續光照) 觀察恢復光照後 RF-1 的反應。在圖 6-2 中，由 D-cycle 切換到 L-cycle 的瞬間，光合作用似乎如往常一樣有 PhE 的表現，然後是 PhI，但是 DO 降下來之後，就不再有任何變化了，更沒有光合韻律或固氮韻律的跡象。

我們再仔細觀察 DO 的數值，圖中不但沒有 PhB，而且 DO 十分地接近培養液的背景值，看來光合作用的活性非常弱，RF-1 好像仍然處於懸浮狀態 --- 好像還沒醒過來。由此解讀剛切入 L/L 時的 PhE 與 PhI 的訊號，它們像是受到環境變化刺激的神經性反射的表現。

經過了 D/D 和 L/L 的過程後，我們再次把 RF-1 切回 L/D 狀態，在圖 6-3 中，RF-1 又恢復了活性，DO 曲線中又可以看到光合作用和固氮作用的表現。不過若是和圖 6-1 中正常的 L/D 曲線比起來，各種訊號似乎都比較弱了些，意味著各種作用的活性都減弱了，可見得之前的 D/D 和 L/L 過程對 RF-1 有一些基本性的影響。而且 D-cycle 的 DRE 也顯得十分不穩定。

在圖 6-3 中，我們讓 RF-1 經歷四個 L/D，企圖建立其韻律，然後切入 L/L 觀察韻律的訊號。我們在圖 6-4 中看到 DO 曲線在 L/L 下又呈現出將近 24 小時週期的變化，這應該是 RF-1 光合作用之概日

韻律的訊號。但是整個曲線的形狀與第五節中的  $\text{PhR}_N$  全然不同，讓我們感到非常訝異！不過它的確符合生物時鐘的表現，我們將 RF-1 的這種光合韻律訊號簡稱為  $\text{PhR}_C$  (Photosynthetic Rhythm of C-type : C 型之光合韻律)。因此 RF-1 除了  $\text{PhR}_N$  之外，可能還有另外一種光合韻律  $\text{PhR}_C$ 。

這個系列的實驗中，RF-1 進入 D/D 之後，似乎就失去了某種生理活性，以致於後面的實驗不論是切入 L/L 或 L/D，我們發現 RF-1 的光合作用或光合韻律都有很大的變化。我們推測這是因為在進入 D/D 的過程中，有一種和  $\text{PhR}_N$  有關的機制被破壞了，使得在第二次的 L/L 中， $\text{PhR}_N$  不會表現，只有  $\text{PhR}_C$  能表現出來。不過在圖 6-3 的 L/D 之中仍然有固氮作用的活動，只是其活性明顯較弱。這些結果顯示：“ $\text{PhR}_N$  不會表現”以及“ $\text{PhR}_C$  表現出來”並不是因為沒有了固氮作用。

## 6-2. 光合作用之韻律現象在固氮作用被抑制後無法維持

RF-1 是一種具有固氮能力的藍綠藻，因此我們使用沒有氮源的培養液 BG110 培養它。過去的研究已經知道：若是在實驗中加入氮源，RF-1 發現培養液中有了氮源之後，就會直接由培養液吸收氮源，而停止進行固氮作用。第二系列的實驗（圖 6-5 到 6-8）就是研究加入氮源、抑制了固氮作用之後，RF-1 光合韻律的表現。

圖 6-5 中我們先觀察兩個 L/D-cycle 以確定樣品及實驗系統的可靠性，然後在實驗的 D-cycle 開始之前加入 0.2% 的  $\text{NaNO}_3$ 。我們立即發現 DRE 消失了！D-cycle 的 DO 值仍然低於背景值表示呼吸作

用仍然持續進行，但是卻沒有增強的表現，這是固氮作用停止了的現象，與之前的固氮作用的研究結果相符合。

但是在之後的 L-cycle 中，PhE 明顯地增強了，PhI 下降的速率變緩了而且 PhB 的值變高了。這些現象可以用 RF-1 要保護固氮酵素來理解。加入氮源之後，RF-1 不再需要那麼小心地保護固氮酵素，因此解除或減緩了光抑制作用，使得光合作用更旺盛，於是 DO 曲線有了上述的表現。從作用的角度來說：加入硝酸鹽後，細胞中監督氮素成份的機制發現：吸收氮素的機制已經吸收了大量的氮素了，就發出訊號停止生產及保護固氮酵素，因而造成了 DO 曲線的變化 --- 在 D-cycle 中 DRE 訊號消失了、在 L-cycle 中 PhI 減緩、光合作用更加旺盛，使得 PhE 和 PhB 都增加了許多。

接著我們將樣品從 L/D 切入 L/L，觀察加入氮源抑制呼吸作用後，對 RF-1 光合韻律的影響。在圖 6-6 中進入 L/L 之後，DO 曲線在連續兩個 6:00 的時間點都有一點微弱的上升跡象，但是欲振乏力終至消失了。沒有明顯的韻律訊號能夠維持著，而且整個實驗期間 DO 的值都很高，相當於之前 L/D 的 PhB 數值，顯示抑制固氮作用之後，光合作用持續地保持旺盛。

加入氮源，RF-1 的固氮作用被抑制之後，會增強光合作用，但是也會致使光合韻律喪失 --- 沒有了固氮作用，就沒有了光合韻律。若是綜合 6-1 節的結果 --- 在有光合作用的條件下，固氮作用才能進行；固氮韻律似乎也受到光合作用的調控，我們可以說：在生物時鐘的機制中，光合韻律和固氮韻律之間似乎互為因果，而不是從屬的關係。

RF-1 的光合韻律因為加入了氮源而消失了。圖 6-7 中我們再次將 RF-1 放入 L/D 中，企圖重新設定它的概日韻律。在切回 L/D 的第一個 D-cycle 中，我們又看到 RF-1 的 DRE 了，接下去的 2 個 D-cycle 之內 DRE 都有表現，RF-1 又開始進行固氮作用；但漸漸地 DRE 的表現又再次消失，使得最後兩個 D-cycle 的 DO 曲線與在圖 6-5 中加入氮源後的表現類似。關於這個現象我們有兩種推測，一個可能是 culture 中的氮源被耗盡使 RF-1 又開始在 D-cycle 行固氮作用，但是 DRE 會逐漸消失的現象和此一想法矛盾；若是在這期間氮源被消耗而越來越少，DRE 的表現應該會繼續維持。因此我們推測 culture 還是在穩定的提供氮源。另一種解釋是：從 L/L 切入 L/D 的第一個 D-cycle 只是一種 RF-1 在環境變化下的過渡表現。

另一個值得注意的現象是：再次切入 L/D 後，PhE 逐漸變弱，而且 PhB 的值變得異常的低、趨近於背景值，光合作用的活性明顯地減弱了，這和圖 6-6 中 L/L 狀態下，DO 數值一值都很高的情況截然不同。

RF-1 經過 4 個 L/D 設定後，我們再切回 L/L 觀察是否會有韻律的表現。圖 6-8 中在 L/L 下的確有訊號！訊號也的確將近 24 小時出現一次！但是十分奇特 --- 在實驗的 4 個 cycle 中，DO 曲線每兩個 cycle 呈現一大、一小的變化。振幅大的訊號像是  $PhR_N$ ，而振幅小的訊號像是  $PhR_C$ 。

我們嘗試解釋這些韻律的現象，我們有兩種可能性：一種是  $PhR_N$  不穩定，以致於訊號間斷性的出現，意即  $PhR_N$  可能不是呈每兩個週期表現一次的韻律，而是沒有特定規律的表現。另一種可能性是：

PhR<sub>N</sub>的週期可能改變為 48 小時一次而不再是概日韻律。這些都需要更多的實驗求證。

不過我們應該可以確定 PhR<sub>N</sub>和 PhR<sub>C</sub>之間會有一些關係。從數據中看起來 PhR<sub>C</sub>的訊號其實不小，因此如果 PhR<sub>C</sub>會表現，我們應該在實驗數據中看得到它；由於在 L/D 或 PhR<sub>N</sub>表現時，數據中看不到 PhR<sub>C</sub>，可見得當 PhR<sub>N</sub>表現時，PhR<sub>C</sub>就不會表現。

我們也嘗試重新思考圖 6-1 中韻律消失的現象，RF-1 在加入氮源、抑制固氮作用後，打斷了固氮作用到生物時鐘調控中心的迴路，使得光合韻律 (PhR<sub>N</sub>) 喪失了制衡 (調控) 的訊號，以致於 PhR<sub>N</sub> 不會表現。而且在之後的兩個 L/D 之內，RF-1 的光合作用還來不及和別的生理作用建立新的韻律，因此我們看不到任何韻律的現象。我們認為此時若是加長 RF-1 L/D 設定韻律的時間，RF-1 極有可能會再次建立以及表現出新的韻律。

## 第七節 結論

我們成功地將溶氧計應用到固氮單胞藻 RF-1 光合韻律的研究中，這是我們在上個年度的研究工作中所發展出來的實驗方法。實驗結果充分表現了這個方法可以連續偵測的優點，觀察到了許多其他的實驗方法所無法測得的現象。而且這個方法也可以運用到別種藻類的相關實驗中，我們的報告中也展示了一個聚球藻 PCC 6803 的光合韻律實驗，藉以做為有固氮能力與沒有固氮能力藍綠藻之間的對照。

在基本的概日韻律實驗方面，實驗結果除了可以漂亮地描繪出 RF-1 光合作用的概日韻律之外，更能夠清晰地表現出 RF-1 概日韻律中光合作用、呼吸作用和固氮作用之間的交互作用。

我們也報告了兩個進階的研究。在連續黑暗 (D/D) 的實驗中，RF-1 無法進行光合作用，但是它的固氮作用也會立即停止，這是之前預期不到的。在另一個培養液加入氮源的實驗中，氮源會抑制 RF-1 進行固氮作用，實驗發現即使在有進行光合作用的情況下，停止固氮作用同時會使得 RF-1 喪失光合作用之韻律現象。以上的實驗結果暗示我們光合韻律和固氮韻律之間似乎互為因果，而不是從屬的關係。這些實驗結果值得未來更深入地探討。

進一步的研究還發現：RF-1 的光合韻律可能有兩種，這兩種光合韻律的建立與培養液中是否有氮源有關。其中之一存在於培養液中無氮源時，我們稱之為  $PhR_N$ ：訊號中有光合作用增強的表現以及呼吸作用增強的表現，充分反應出光合作用與固氮作用的相互關係；這

些現象與過去關於 RF-1 之概日韻律及固氮作用的研究結果相符合。另一種光合韻律發生在培養液中無氮源時，我們稱為 PhR<sub>C</sub>：訊號中只有光合作用的表現、沒有呼吸作用的表現，這是一種過去無法察覺到的韻律。由於我們的實驗方法可以進行連續偵測，因此可由波形的變化分辨這兩種韻律的差異，這是過去的實驗方法所做不到的，更顯出這個方法的優點。

深入的分析也顯示出這兩種韻律之間有一些關連性，當 RF-1 需要進行固氮作用時，PhR<sub>N</sub> 就會表現出來；PhR<sub>C</sub> 則和固氮作用無關。而且當 PhR<sub>N</sub> 表現時，PhR<sub>C</sub> 就不會表現。由於 PCC6803 沒有固氮作用，PCC6803 的實驗中所測得的概日韻律顯示出 --- 除了固氮作用之外，也有別種作用可以和光合作用之間形成概日韻律，這些現象值得未來更深入地研究。

新的實驗方法會揭示一些新的面貌，但是沒有任何一種方法可以探知全貌。新舊結果之間的對照，可以幫我們對真實更加了解。我們期待未來能將這些實驗結果和 RF-1 的蛋白質韻律實驗相比對，希望可以藉此找出一些 RF-1 的生理現象和蛋白質之間的關係。

## 參考資料

1. 陽明柳與微小單殼縫藻之生物節律研究. 第四十一屆全國中小學科學展覽會 國中組生物科 作品說明書 (2000).
2. 黃檀溪 (1991). 原核生物之週期韻律. 生命科學簡訊 第五卷, 第五期, p.3.
3. 黃檀溪 (1995). 概日韻律在原核系統之研究近況. 生命科學簡訊 第九卷, 第九期, p.2.
4. 聚球藻 RF-1 品系生物時鐘之特性. 2002 年臺灣國際科學展覽會 植物學科 作品說明書
5. Grobbelaar, N., Li, W.-T., Huang, T.-C. (1991). Relationship between the nitrogenase activity and dark respiration rate of *Synechococcus* RF-1. FEMS Microbiology letters 83, 99-102
6. Huang, T.-C., Chen, H.-M., Pen, S.-Y., Chen, T.-H. (1994). Biological clock in the prokaryote *Synechococcus* RF-1. Planta 193, 131-136.
7. Huang, T.-C., Grobbelaar, N. (1995). The circadian clock in the prokaryote *Synechococcus* RF-1. Microbiology 141, 535-540.
8. Huang, T.-C., Pen, S.-Y. (1994). Induction of a circadian rhythm in *Synechococcus* RF-1 while the cells are in a “suspended state” . Planta 194, 436-438.
9. Iwasaki, H., Kondo, K. (2000). The Current State and Problem of Circadian Clock Studies in Cyanobacteria. Plant Cell Physiol 41, 1013-1020.
10. YSI (1997). Model-55 Dissolved Oxygen and Temperature System Operations Manual. YSI Incorporated Co., Yellow Springs, Ohio, USA.

## 評語

本實驗已建立一個完整的實驗監測系統，清楚確立用此實驗系統研究固氮藍綠藻光合韻律而得到非常有意義的結果。  
本實驗架構明確、執行力佳，如能更進一步往分子階層探討更佳。  
整體而言，本研究十分優良。

**EFFECTS OF NITRATE ON THE CIRCADIAN  
PHOTOSYNTHETIC RHYTHM IN *CYANOTHECE* SP.  
PCC 8801, A UNICELLULAR DIAZOTROPHIC  
CYANOBACTERIUM**

- Uan-Chen Yen
- The Affiliated Senior High School of  
National Kaohsiung Normal University  
Kaohsiung, Taiwan

## Abstract

*Cyanothece* sp. PCC 8801 is a unicellular, photosynthetic and diazotrophic cyanobacterium. It is also the first prokaryote shown to exhibit circadian rhythm which consists of photosynthetic and nitrogen-fixing oscillations. Although it has been known that the photosynthetic and nitrogen-fixing rhythms are temporally separated, very little is explored about their possible interactions or causal relationships between these two systems. In the current studies, a growth chamber equipped with a dissolved-oxygen (DO) meter was used to continuously and automatically record the DO variation in the culture. The data clearly indicated that, in the nitrate-rich medium, there were similar diurnal and circadian photosynthetic rhythms in *Cyanothece* sp. PCC 8801 as well as in *Synechocystis* sp. PCC 6803, a non-nitrogen-fixing cyanobacterium. In the nitrate-free medium, however, *Cyanothece* sp. PCC 8801 presented a different DO pattern, which included a circadian respiration rhythm in the dark period. When nitrate, an inhibitor of nitrogen fixation, was added into the medium, the diurnal respiration rhythm disappeared and the diurnal photosynthetic rhythm was significantly affected. Moreover, the circadian photosynthetic rhythm was also suppressed. These results reveal that there is a strong correlation between the rhythms of photosynthesis and nitrogen fixation in *Cyanothece* sp. PCC 8801.

## 1. Introduction

Biological clock is a very interesting topic in biology. For example, we can sense time via a feeling of hunger without having to watch a clock. How do plants know about time? What is the sense of time in plants? Does Prokaryote that is the simplest organism has the sense of time? These questions stimulated my interest in the research of the circadian rhythm of unicellular organism.

The circadian rhythm designates an endogenous oscillation, which is generated by the "biological clock" of the organism, in a behavioral or biochemical phenomenon which (1) has a periodicity of about 24 hours (*circa* = approximately: *diem* = day), (2) persists for at least several days under uniform environmental conditions, (3) changes but little at different constant ambient temperatures with a temperature compensation and (4) can be reset. The term "diurnal rhythm" denotes the conditions in which there is a direct input of external periodic signals [1].

The circadian rhythm has been ubiquitously observed in various physiological processes in most of organisms. Circadian rhythms in a wild variety of eukaryotes have been intensively studied. Until the middle of 1980s, it was believed that circadian rhythms do not occur in prokaryote, and some researchers even suggested that the existence of biological clock must demand a special cell structure.

In 1986, Huang first discovered that the prokaryotic *Cyanothece* sp. PCC 8801, a unicellular, photosynthetic and diazotrophic cyanobacterium, exhibited an endogenous circadian dinitrogen-fixing rhythm [2, 3]. Since then, circadian rhythms of cell division, nitrogenase activity, amino acid uptake, protein synthesis, *nif* gene expression, and *psbA* gene expression in the prokaryote have been intensively investigated [3]. Moreover, these endogenous rhythms could be induced by many factors, such as a changing in the diurnal L/D cycles, a small changing in temperature within its physiological range, an alteration of

the intensity of the light source and a different exposition from red light to far-red light [3]. Because of the prokaryote is structurally and functionally simpler than the eukaryote, it is potentially the best system for studying the control mechanism of circadian rhythms.

Although it has been known that photosynthesis and nitrogen fixation of *Cyanothece* sp. PCC 8801 are temporally separated [2], the possible interactions or causal relationships between these two systems have received little attention so far. In the current research, I investigated the diurnal and circadian photosynthetic rhythms of *Cyanothece* sp. PCC 8801 in medium with or without nitrate to explore the correlation between its photosynthesis and nitrogen fixation. Similar experiments were also conducted with *Synechocystis* sp. PCC 6803, which was a non-nitrogen-fixing cyanobacterium, as a comparative study.

The method that I employed in this research was to use a dissolved-oxygen (DO) meter to continuously and automatically record the DO evolution in the culture, which could be a reflection of the photosynthetic and respiration activity of the sample. DO meter is a popular instrument for ecologist to monitor the oxygen concentration in rivers or in lakes. Nevertheless, it was no been applied in the research of circadian rhythm before.

Typical methods that are intensively used to study the circadian rhythm in traditional experiments include the use of oxygen monitoring system to detect the photosynthesis and the use of the Clark-type oxygen electrodes to measure the dark respiration. However, the manual samplings in these methods are actually considered as arduous works, which take strenuous effort. An automatically sampling system is expected. In addition, the influence of discrete samplings in traditional works sometimes introduces unpredictable factors into the experiments and makes the experimental results fluctuated. This influence is essentially eliminated in my DO monitoring system making the experimental results appeared much naturally.

My experimental results clearly indicated that there was a strong correlation between the photosynthesis and the nitrogen fixation in *Cyanothece* sp. PCC 8801. Furthermore, two types of circadian photosynthetic rhythm in this cyanobacterium were observed. These findings also revealed that the DO meter could be effectively used to investigate the photosynthetic and respiration rhythm of aquatic algae.

## 2. Materials and Methods

### 2-1. Morphology and culturing

The *Cyanothece* sp. PCC 8801 is an aerobic diazotrophic unicellular cyanobacterium isolated from rice fields in southern Taiwan [2]; therefore it is also designated as RF-1 (Rice-Field-1). Figure 1 depicts a microscopic photograph of this strain, which is a sheathless organism with an average size of 3.8 x 3.0  $\mu\text{m}$  containing many uncommon polyglucan granules with a size varying from 0.1 to 0.4  $\mu\text{m}$ , which are found only in the sheathless nitrogen-fixing unicellular cyanobacterium. *Cyanothece* sp. PCC 8801 is a strict photoautotroph having a cell division cycle of about three days. The general culture conditions for *Cyanothece* sp. PCC 8801 are 20°C~42°C in temperature and 2500~3000 lux in illumination from white fluorescent lamps. The cells can survive in a “suspended state” for more than 2 weeks in continuous darkness [3].

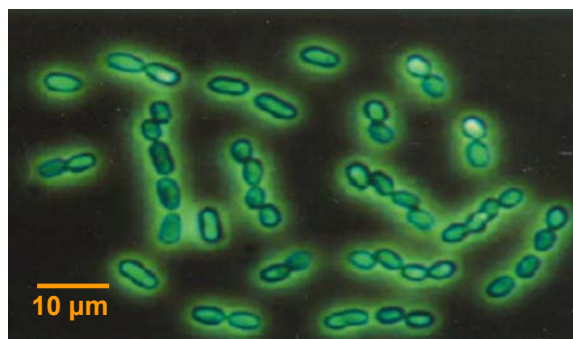


Fig.1. Microscopic photograph of *Cyanothece* sp. PCC 8801

Two types of media were used. The first was the nitrate-containing medium BG-11 [4]. BG-11 is usually used for strains of freshwater, soil or thermal origin, and for those strains isolated from a marine environment which do not display the ionic requirements characteristic of true marine strains. The second medium was the nitrate-free medium BG-11<sub>0</sub>, which was a modification of BG-11. BG-11<sub>0</sub> is employed for nitrogen-fixing strains after addition of a solution of filter-sterilized NaHCO<sub>3</sub> (5 or 10 mM final

concentration). The ingredient of BG-11 is tabulated in Table 1.

	mM	*Ingredient of Trace metal mix A5 <sup>6</sup>	g/L
NaNO <sub>3</sub>	17.65	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.86
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	0.18	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1.81
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.30	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.22
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.08
Citric acid	0.03	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	3
Ferric ammonium citrate	0.03	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.494
EDTA (disodium magnesium)	0.003	<b>a. Deionized water to 1L</b>	
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.19		
*Trace metal mix A5+Co	1 ml	<b>b. pH after autoclaving and cooling: 8</b>	
EPPS	2.523 g/L		

Table 1. Ingredient of the nitrate-containing medium BG-11.

Cultures were cultivated without shaking in 125 ml Erlenmeyer flasks containing 30 ml medium. Each running of experiments required a culture with a volume of about 90 ml. The initial cell concentration for each running was around 10<sup>7</sup> cells/ml in log phase. All experiments were performed at 28°C with the diurnal light/dark (L/D) cycle set as 12 hours in light and 12 hours in darkness. In light cycles, the illumination was maintained at a constant of about 2900 lux from white fluorescent lamps.

In each experiment, cultures were first adapted to diurnal L/D-cycles for three days to establish their circadian rhythms. Then, depending on the requirement of the experiments, the cultures were transferred to continuous light (L/L), continuous darkness (D/D) or other conditions to observe the evolution of DO in the cultures.

## 2-2. Experimental setup

Figure 2 presents the experimental setup. A YSI Model-55 DO meter was employed in the experiments. The probe of the DO meter consists of a Clark-type polarographic sensor covered with a permeable membrane. Oxygen diffuses through the membrane at a rate proportional to the partial pressure, or concentration, of oxygen in the culture. When a polarizing voltage is applied across the sensor, oxygen in the probe reacts at the cathode, causing a current to flow and to be measured [5]. Since oxygen was consumed in the vicinity of the probe, an electromagnetic stirrer was employed to ensure a uniform distribution of the oxygen concentration in the culture. The stirrer also prevented the adherence of the algae to the probe. The stirring speed was about 300 rpm.



Fig. 2. Experimental setup.

A: 100 ml culture. B: DO probe. C: DO meter. D: computer.  
E: stirrer. F: light meter.

For a long-term experiment of monitoring temporal DO variation, about seven days per running, the culture must be exposed to the air to provide a normal physiological condition for the sample. Therefore, the air in the container of the culture is allowed to exchange with the ambient maintaining a constant air composition in the vicinity of the culture. In such a situation, the oxygen concentration in the culture was a result of the equilibrium between the atmospheric diffusion and the oxygen production or consumption by the algae. The oxygen concentration of the ambient was fairly constant. Therefore, under L/D conditions, the DO variation of the culture reflected the photosynthetic activity in the light cycle and the dark respiration activity in the dark cycle. A typical DO variation of *Cyanothece* sp. PCC 8801, which had been cultivated in BG-11, is displayed in Fig. 3.

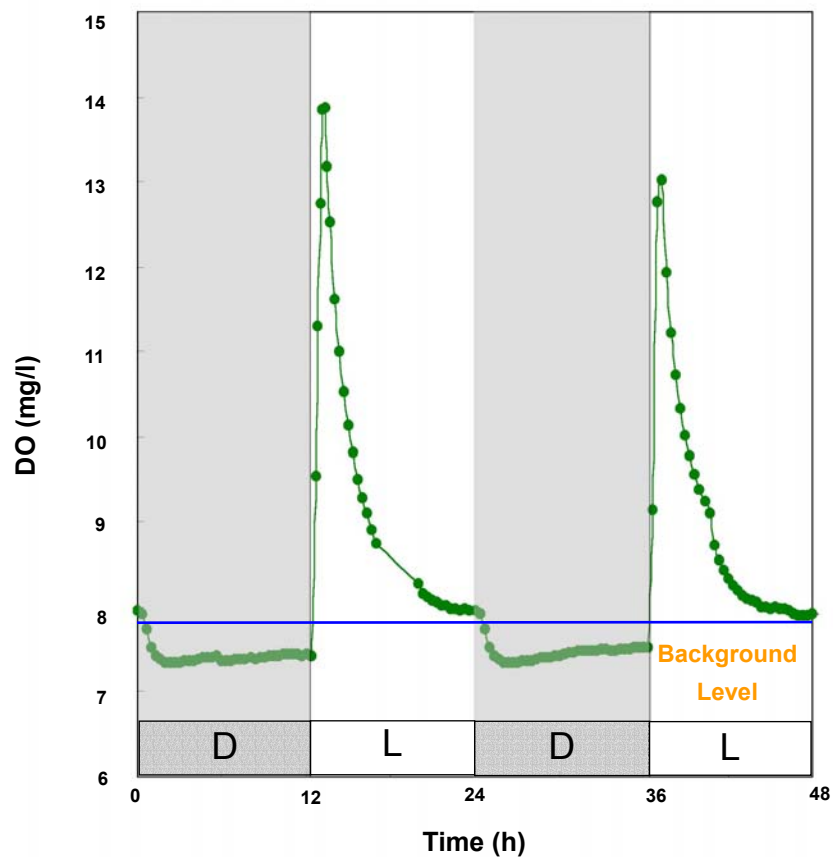


Fig.3. Typical DO Variation of *Cyanothece* sp. PCC 8801 in BG-11

In each running of experiments, DO evolutions in the first two diurnal L/D-cycles were observed to examine the condition of the culture. The repetition of the traces in the first two L/D-cycles, for example the curve in Fig. 3, would confirm the stability of the cultures and the reliability of the experimental system as well as the signals.

### 3. Results and Discussion

#### 3-1. Diurnal and Circadian Photosynthetic Rhythms of *Cyanothece* sp. PCC 8801 and *Synechocystis* sp. PCC 6803 in BG-11

BG-11 is a nitrate-containing medium. A culture of *Cyanothece* sp. PCC 8801 and a culture of *Synechocystis* sp. PCC 6803 were individually cultivated in BG-11. These cultures experienced a diurnal L/D condition of 12 hours in light and 12 hours in darkness for three cycles to establish their endogenous biological clocks. Then the cultures were transferred to the continuous light condition to examine the exhibition of their circadian photosynthetic rhythms.

Figure 4A, B depict the temporal DO variations of these cultures. The repetition of the traces in the first two L/D-cycles confirms the stability of the cultures and the reliability of the signals. The periodic patterns in the continuous light interval with a period around 24 hours exhibit the existence of the endogenous circadian photosynthetic rhythms in both of the cultures.

The DO variations of the curves for both of the cultures in the L/D-cycles could be understood as the following: at the onset of the light cycles, the photosynthesis was stimulated to intensively produce oxygen, resulting in sharp DO peaks. After about 2 hours, the photosynthetic oxygen production rate was gradually decreased to a stable value achieving equilibrium between the air diffusion and the oxygen production in the second half of the light cycle.

At the instant that the light was turned off, the DO level dropped rapidly due to the cessation of the photosynthesis, and then maintained at a relatively constant level until the next cycle started. The fact that the DO level in the dark cycle was lower than the background DO level, as shown in Fig. 3, exhibited the activity of the dark respiration. Furthermore, the nearly constant DO level in the dark cycle indicated that the respiration was kept steady in that period.

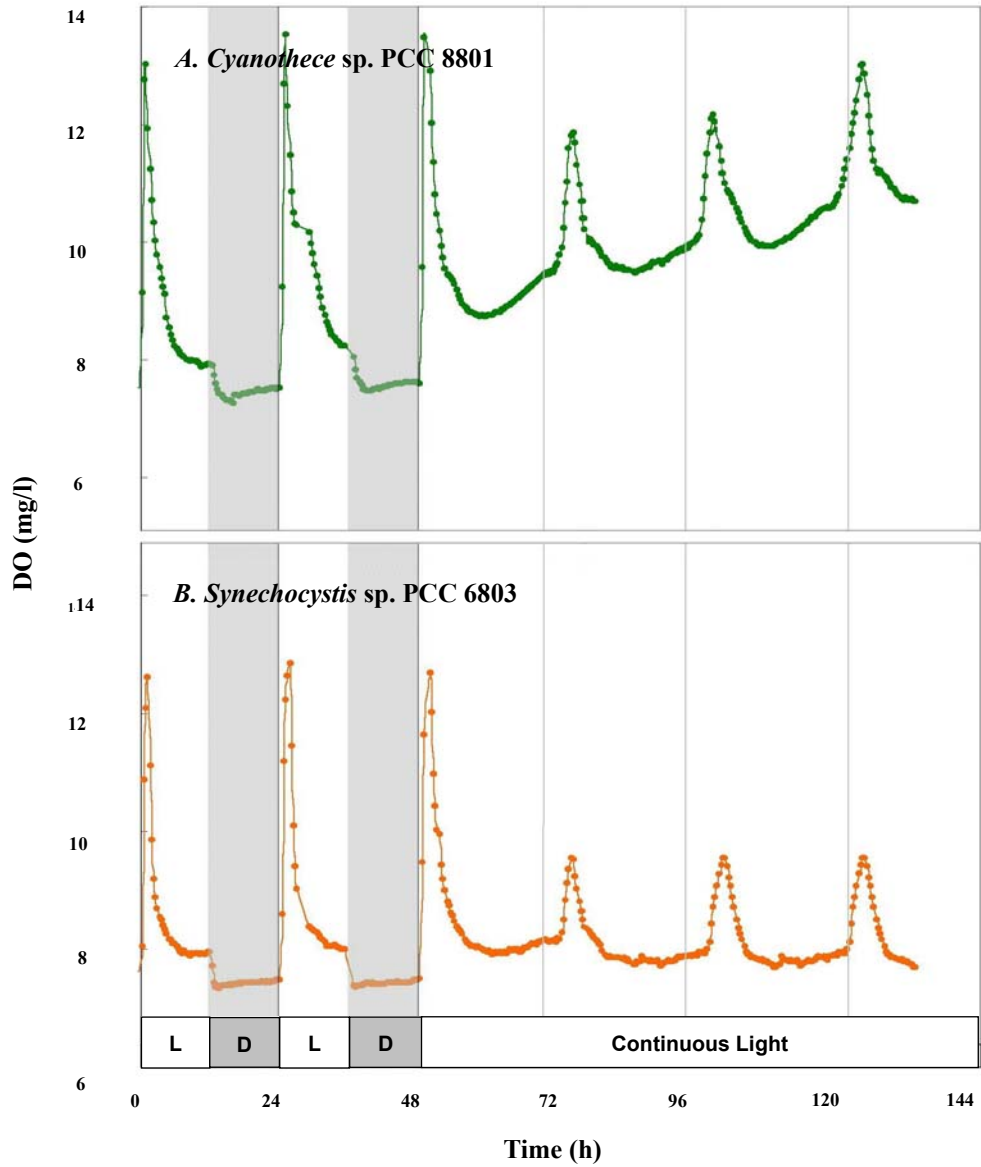


Fig. 4A, B. Exhibition of diurnal and circadian rhythms of *Cyanothece* sp. PCC 8801 (A) and *Synechocystis* sp. PCC 6803 (B) in BG-11 under L/D and continuous light.

It is known that *Cyanothece* sp. PCC 8801 fixes nitrogen in the dark period in the nitrate-free medium BG-11<sub>0</sub> [2]. According to the research of Grobbelaar *et al.* [6], this cyanobacterium enhances its respiration rate in the dark phase to depress the ambient oxygen level in the culture avoiding the damage of oxygen-sensitive nitrogenase by the oxygen, and to supply energy for the energy-intensive nitrogen fixation. The fairly constant dark respiration in the DO curve of *Cyanothece* sp. PCC 8801 implied that this strain did not require the nitrogenase activity in BG-11, agreed with earlier investigations [7].

When cultures were switched to the continuous light condition, the first DO peak was still considered to be a typical DO exhibition under L/D condition, which was stimulated by the switch on of the illumination. Then the curves exhibited a rhythmically drastic DO variation with a period around 24 hours. The rhythmic signals persisted for more than three days. They were endogenous phenomena, not be conducted by the variation of environmental factors. The amplitude of the following peaks in the continuous light period was relatively weak. The DO base line of *Cyanothece* sp. PCC 8801 in continuous light period increased monotonically indicating an accumulation of oxygen in the culture. Accordingly, in *Cyanothece* sp. PCC 8801 there are two types of photosynthesis, an AC component oscillated with the circadian rhythm and a DC (non-oscillating) component kept steady with respect to the circadian rhythm. In contrast, there is only one (AC) type of photosynthesis in *Synechocystis* sp. PCC 6803, no DC type exhibited.

The similarity between the DO patterns in these two cultures suggested that their circadian photosynthetic rhythms were probably driven by the same mechanism. Furthermore, since nitrogenase activity is not required in *Cyanothece* sp. PCC 8801 in BG-11, this circadian photosynthetic rhythm is unrelated to the nitrogen-fixing oscillation.

The DO variations of these two strains in continuous darkness are illustrated in Fig. 5A, B. The activity of the photosynthesis was terminated due to the lack of light; therefore, the DO level was quickly dropped to the background level and no further rhythmic signal was observed thereafter.

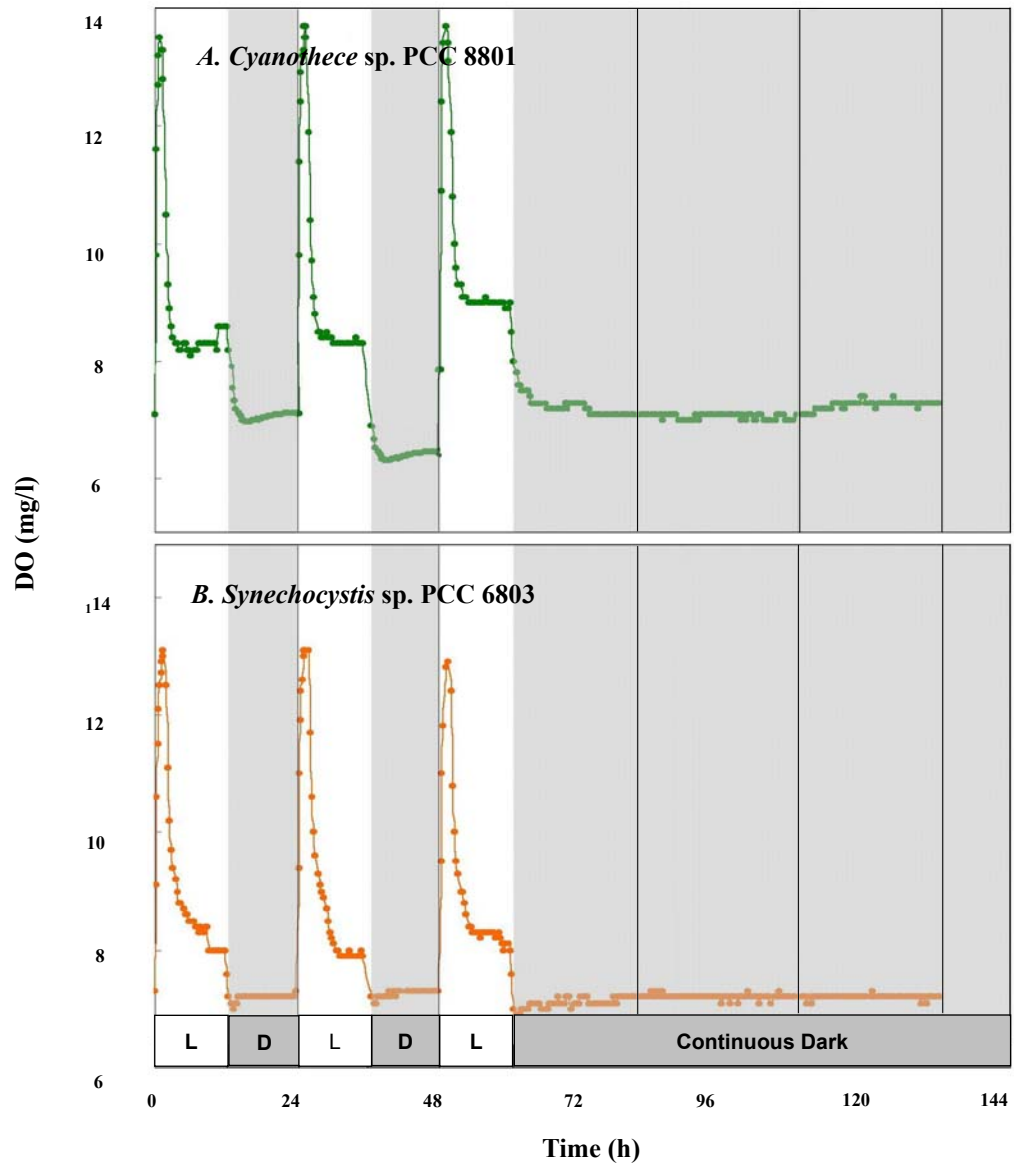


Fig. 5A, B. Absence of circadian rhythm of *Cyanothece* sp. PCC 8801 (A) and *Synechocystis* sp. PCC 6803 (B) in BG-11 under continuous darkness.

### 3-2. Diurnal Photosynthetic Rhythms of *Cyanothece* sp. PCC 8801 in BG-11<sub>0</sub> and Nitrate-added BG-11<sub>0</sub>

Figure 6 depicts a series of diurnal experiments of *Cyanothece* sp. PCC 8801 cultured in 90 ml of BG-11<sub>0</sub>. Since BG11<sub>0</sub> is a nitrate-free medium, as *Cyanothece* sp. PCC 8801 is a diazotrophic cyanobacterium, the nitrogen fixation would take place in the culture. According to the investigations of Huang et al. [2, 3], *Cyanothece* sp. PCC 8801 fixes nitrogen almost exclusively within the dark phase when grown in a diurnal L/D regimen. We expected that a significant signal could be observed in the dark period of the DO curve.

The first two L/D cycles in Fig. 6 displayed the typical DO pattern in BG-11<sub>0</sub>. In contrast to the nearly constant dark-DO level in the culture of *Cyanothece* sp. PCC 8801 in BG-11, as shown in Fig. 4A, a large dip with a DO value lower than the background level was observed during the dark period. Such a dip implies that the oxygen is drastically consumed in the culture; hence, it is the evidence of the Grobbelaar's proposal of dark respiration enhancement mentioned earlier [6]. Accordingly, the dip in the DO curve is representative of the nitrogenase activity in the dark phase. The typical DO patterns also clearly illustrated the temporal separation between photosynthesis and nitrogen fixation in *Cyanothece* sp. PCC 8801 [2], which was a very clever strategy to incorporate two mutually exclusive effects in a single cell.

Furthermore, at the beginning of the dark period in the third L/D cycle, 10 ml of 0.2% NaNO<sub>3</sub> was added into the culture to study the effects of nitrate on the diurnal rhythm of *Cyanothece* sp. PCC 8801 in BG-11<sub>0</sub>. The DO dip in that dark phase disappeared immediately and the DO level kept nearly constant in all the dark periods thereafter. This observation consists with the earlier research that nitrate is the inhibitor of nitrogenase activity [7], so that, *Cyanothece* sp. PCC 8801 does not require to enhance its dark respiration for the protection of the nitrogenase. Consequently, the dark respiration enhancement, which is representative of the nitrogenase activity, was also

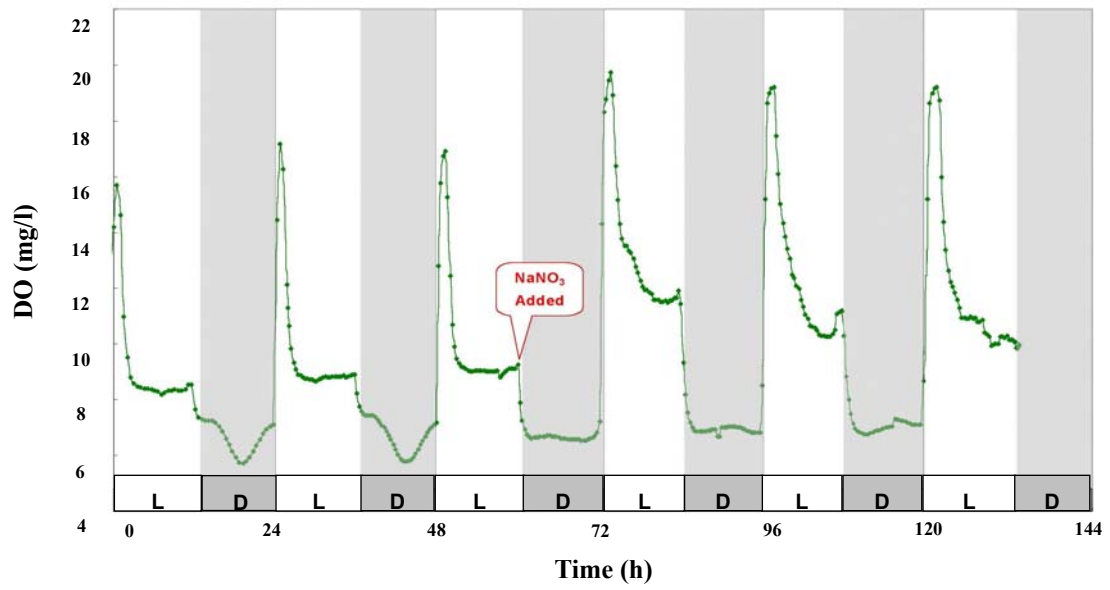


Fig. 6. Effects of nitrate on the diurnal rhythm of *Cyanothece* sp. PCC 8801 in BG-11<sub>0</sub>.

inhibited resulting in a constant respiration and a constant DO level in the dark phase.

However, the photosynthetic activity in the following light cycles was also significantly affected. The decrease of the photosynthetic oxygen production rate at the rear edge of the DO peak was slowed down. The equilibrium level of dissolved oxygen in the second half of the light cycle rose drastically as well. These observations reveal that there is a strong correlation between the nitrogenase activity and the photosynthetic activity, which is not reported before.

### 3-3. Circadian Photosynthetic Rhythms of *Cyanothece* sp. PCC 8801 in BG-11<sub>o</sub> and Nitrate-added BG-11<sub>o</sub>

A culture of *Cyanothece* sp. PCC 8801 grown in BG-11<sub>o</sub>, which had been adapted to 12 hours in light and 12 hours in darkness for more than three days, was transferred to continuous light condition to study its circadian rhythm. Figure 7A illustrates the DO evolution of the culture during the transfer. In the L/D periods, the DO patterns presented the same characteristics as those in the first two L/D cycles of Fig. 6; a sharp peak in the light cycle and a large dip in the dark cycle, which was the typical DO pattern of *Cyanothece* sp. PCC 8801 in BG-11<sub>o</sub>. At the onset of continuous light, the first DO peak was still a typical peak stimulated by the turn on of the illumination, as peaks in the L/D period. The successive evolution of the curve displayed a rhythmic variation with a period of about 24 hours persisting for three days, which was the exhibition of the circadian rhythm.

This circadian rhythmic signal consisted of all the characteristics of L/D patterns. Accordingly, there were two types of circadian rhythms included in the signal: a circadian photosynthetic rhythm presented by the peaks and a circadian respiration rhythm presented by the dips while the circadian respiration rhythm was representative of a circadian nitrogen-fixing rhythm as well. Also shown in the figure was a 6-hours phase shift in the circadian rhythm signal. Moreover, the DO curve oscillated with respect to the background level, about 7.8 mg/l, revealed that the photosynthesis was ceased and the respiration was intensively enhanced in the periods in which the DO were level lower than the background level, even under a constant illumination.

A nitrate-added experiment was conducted to study the effects of nitrate on the circadian rhythm of *Cyanothece* sp. PCC 8801 in BG-11<sub>o</sub>. Another 90 ml subculture cultivated under the same conditions as above was added 10 ml of 0.2% NaNO<sub>3</sub> at the beginning of the dark period just prior to the onset of continuous light condition. However, no any rhythmic signal was observed in the following continuous light period, as shown in Fig. 7B.

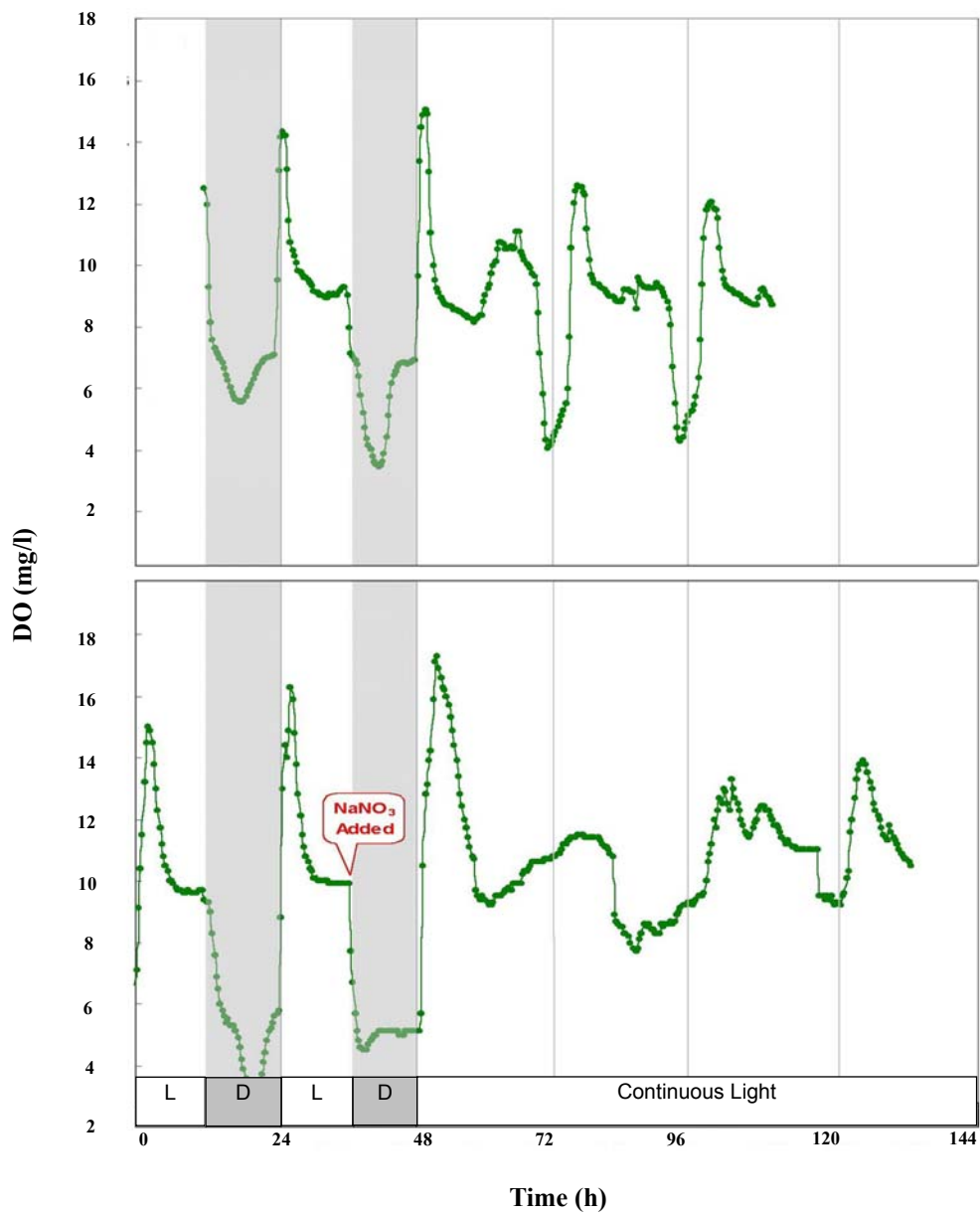


Fig. 7A, B. (A): Circadian photosynthetic rhythm persisted under continuous light conditions in BG-11<sub>O</sub>.

(B): Addition of NaNO<sub>3</sub> drastically affected the circadian photosynthetic rhythm under continuous light conditions.

Since the nitrate was the inhibitor of nitrogenase activity [7], the disappearance of the circadian respiration rhythm was expected. Nevertheless, the circadian photosynthetic rhythm was also absent. These results suggest that, for *Cyanothece* sp. PCC 8801 in BG-11<sub>0</sub>, there is a strong correlation between the photosynthesis and the nitrogen fixation. The circadian rhythm presented in Fig. 7A consists of a coupling oscillation between the photosynthetic rhythm and the nitrogen-fixing rhythm. Due to the strong coupling, the cessation of one oscillator will terminate the rhythmic expression of the other oscillation.

It is also suggested that the circadian photosynthetic rhythm presented in Fig. 7A is different from that in Fig. 4A while the latter is unrelated to the nitrogenase activity. Consequently, there are two types of circadian photosynthetic rhythms in *Cyanothece* sp. PCC 8801 associated with two different mechanisms of biological clock, or two different biochemical pathways, in the cell. This organism exhibits different photosynthetic rhythms in nitrate-free medium and in nitrate-containing medium.

## 4. Conclusions

This research investigated the possible interactions or causal relationships between the circadian photosynthetic rhythm and the nitrogen-fixing rhythm in *Cyanothece* sp. PCC 8801, which was a unicellular, photosynthetic and diazotrophic cyanobacterium. A DO meter was employed to continuously and automatically record the DO evolution in the cultures with the assistance of a computer.

In the nitrate-containing medium BG-11, the *Cyanothece* sp. PCC 8801 expressed similar diurnal and circadian photosynthetic rhythms as that in *Synechocystis* sp. PCC 6803, a non-nitrogen-fixing cyanobacterium. No significant indication of nitrogenase activity was observed in the DO curves.

In the nitrate-free medium BG-11<sub>0</sub>, as *Cyanothece* sp. PCC 8801 was a diazotrophic cyanobacterium, the diurnal and circadian rhythms of this organism consisted of a photosynthetic rhythm in the light cycle and a respiration rhythm in the dark cycle while the later was a representative of the nitrogen-fixing rhythm. The DO pattern also clearly displayed the temporal separation between these two rhythms.

When nitrate, an inhibitor of nitrogenase activity, was added into the medium BG-11<sub>0</sub>, the respiration rhythm of *Cyanothece* sp. PCC 8801 was absent as expected. However, its diurnal photosynthetic rhythm was significantly affected; and the circadian photosynthetic rhythm was also missing. These results suggest that, in *Cyanothece* sp. PCC 8801, the photosynthetic rhythm and the nitrogen-fixing rhythm are strongly coupled together so that the completion of one oscillator will conclude the rhythmic expression of the other oscillation.

Moreover, the diurnal and circadian rhythmic signals of *Cyanothece* sp. PCC 8801 in BG-11 and in BG-11<sub>0</sub> were significant differences in pattern and in characteristics. These observations also suggest that these two DO

variations correspond to different circadian photosynthetic rhythms associated with different biochemical pathways in *Cyanothece* sp. PCC 8801.

Our findings show that the DO meter can be effectively used to monitor the photosynthetic rhythm of aquatic algae. One of the advantages of this method is that it can be applied to record signals continuously and automatically. Therefore, the influences of discrete sampling in traditional works are essentially eliminated making the experimental curves appeared much naturally. Furthermore, this method can explore new discoveries in the experiments of other algae.

## References:

1. Iwasaki, H. and Kondo, T. (2000) *Plant Cell Physiol* **41**, 1013-1020.
2. Grobbelaar, N., Huang, T.-C., Lin, H.-Y. and Chow, T.-J. (1986) *FEMS Microbiol lett* **37**, 173-177.
3. Huang, T.-C. and Grobbelaar, N. (1995) *Microbiology* **141**, 535-540.
4. Stanier, R.Y., Kunisawa, R., Mandel, M. and Cohen-Bazire, G. (1971) *Bacteriol. Rev.* **35**,171-205.
5. YSI (1997) *Model-55 Dissolved Oxygen and Temperature System Operations Manual*. YSI Incorporated Co., Yellow Springs, Ohio, USA.
6. Grobbelaar, N., Li, W.-T. and Huang, T.-C. (1991) *FEMS Microbiol lett* **83**, 99-102.
7. Huang, T.-C. and Chou, W.-M. (1991) *Plant Physiol* **96**, 324-326.