

臺灣二〇〇八年國際科學展覽會

科 別：植物學

作 品 名 稱：野外實測嗜酸性溫泉紅藻光合作用能力之特性

學校 / 作者：臺北市私立開南高級商工職業學校 邱玉婷
臺北市私立開南高級商工職業學校 林煜修

作者簡介



我叫邱玉婷，熱心負責，富有細心，踏實穩健，受挫力及抗壓性高，虛心謙卑是我一直秉持的學習態度，張開雙手才能容納更多。我喜歡團隊合作。從研究研討，一直到進入實驗室研究，我均受益於團隊中的夥伴，藉由互相討論研究，不僅發現本身思考的漏洞，也可以知道自己可以貢獻之處，最後享受共同奮鬥的甜美果實。在研究室，我學習到融入人群，並以「同理心」對待週遭夥伴，這對於往後人際溝通都具有相當大的助益。充實的經歷、淬練更高的能力。我喜歡觀察與思考，思考事件背後的本質，感覺每個行為背後的因果。我相信不同領域的元素會在腦中激盪出新的創意、沉澱出真正的智慧。培養自己與國際接軌的能力，善用自身的競爭優勢，積極創造生命中不同的可能性。豐富的生命來自於不同經驗的累積。

作者簡介



我的名字叫林煜修，目前就讀開南商工實驗班一年級，非常榮幸能代表學校參加國際科展比賽，以前曾得到創藝鳥裝比賽第二名，沒拿到第一名，非常可惜，但這代表我還有進步的空間，有了這次的比賽，能測試我在這段時間是否有進步，我要感謝學校老師給我這次機會，謝謝。

中文摘要

台灣溫泉資源豐富，不同的溫泉泉質適合不同的溫泉藻類生長。溫泉藻屬於極端生物，其應用資源極待研究開發。本研究根據細胞型態、藻膽蛋白種類分析以及 *rbcL* 基因定序等結果推測北投溫泉藻屬於一種溫泉紅藻，其種類近似於 *Galdieria* sp. (Rhodophyta)。此外，本研究利用葉綠素螢光分析儀於野外實測北投溫泉紅藻於不同光強度下，光合作用能力的差異，發現適應於不同光強度的溫泉紅藻，其電子傳遞速率並無顯著的差異。推測其原因可能與北投溫泉紅藻的 *phycocyanin* 含量會隨著光量有所調整，藉此達到最佳的光合作用能力有關。另外，本研究發現隨著光強度的上升，溫泉藻的 NPQ 值有上升的趨勢，然而低光區的溫泉藻有較高的 NPQ 值，此與一般理論不符。利用 HPLC 分析北投溫泉紅藻的類胡蘿蔔素種類組成，其種類分別為 Lutein、 α -carotene、 β -carotene 與 Zeaxanthin，未發現 Violaxanthin 與 Antheraxanthin，北投溫泉紅藻並不具有葉黃素迴圈。因此根據研究結果，我們認為 NPQ 值與色素的關係仍有討論的空間。

英文摘要

Taiwan is resourceful in hot springs. Various hot spring algae are adapted to different types of hot springs. Hot spring algae applications are still under developing. In this work, based upon the morphology, analysis of phycobiliproteins, and *rbcL* sequences, the hot spring algae of Peitou is found to be *Galdieria maxima* (Rhodophyta). In addition, the dependence of the photosynthesis of *Galdieria maxima* on the light intensity was measured by Diving-PAM. The results show that the light energy availability efficiency of *Galdieria maxima* adapting to different light intensity exhibited different, although the electron circulate rate differed insignificantly. This suggests that the concentration of *phycocyanin* in *Galdieria maxima* may vary to attain optimal photosynthesis. Furthermore, the NPQ of *Galdieria maxima* increase with the light intensity. However, contradict to the theory; even under the same light intensity, the NPQ of *Galdieria maxima* was higher at low light zone. The carotene composition of *Galdieria maxima* was analyzed using HPLC and found lutein, α -carotene, β -carotene, and zeaxanthin. Violaxanthin and antheraxanthin were not present. Therefore, *Galdieria maxima* do not exhibit xanthophyll. Based on the results of this study, the correlation between NPQ and pigment still needs to be investigated.

目錄

一、	研究動機.....	5
二、	研究目的.....	6
三、	研究方法與過程.....	7
四、	研究結果與討論.....	10
五、	結論.....	16
六、	參考文獻.....	17

壹、研究動機

在生物課堂中，我了解到早期的聚合酶連鎖反應(PCR)操作是相當費時的，因為在過程中，一般的 DNA 聚合酶容易受到高溫的破壞，需要不斷添加 DNA 聚合酶，使得 PCR 相當地耗費人力及時間。極端生物卻提供改善實驗效率的新契機。耐高溫或耐酸的極端生物通常都具有特殊的酵素系統以面臨嚴苛的生存條件，例如嗜熱細菌 *Thermus aquaticus* 生存於 110 度的高溫間歇溫泉，其體內產生的 *Taq polymerase* 具有耐高溫的效果，大大地改善聚合酶連鎖反應的效率，也使得生物科學研究能有大量的突破。因此我深信除了溫泉細菌，其他像是溫泉藻類未來在生技及醫藥方面亦有極大的利用價值。

台灣溫泉藻類資源相當豐富，其中北投地區的溫泉泉質屬於酸性的硫磺泉，幾次探勘中發現泉水溫度介於 40~50°C 之間、pH 值約 3 左右，並且有綠色的微細藻類分布於此。根據文獻指出，溫泉紅藻是單細胞球狀藻類，為目前世界上唯一能夠存活在高溫(45~55 °C)、低酸鹼值(pH < 3)下的真核自營性生物。溫泉紅藻 Cyanidiales 這一目中包含了三個屬，分別為 *Cyanidium*、*Galdieria* 以及 *Cyanidioschyzon*，這三個屬(genus)皆能生存於高溫、低酸鹼值的環境之下。因此北投溫泉藻極有可能是某一種溫泉紅藻。本研究首要目標為鑑定北投溫泉藻之種類。

在光合作用過程中，因為PSII 系統所吸收的光能，並非全部都利用在光化學作用，因此葉綠體通常會殘存過多的激發能量。為了保護光合作用系統，藻類會利用一些光保護機制，例如：熱散失，來消耗多餘的激發能量。當環境光量超過光合作用系統所能利用的範圍時，過量的光能會抑制藻類的光合作用表現(photoinhibition)，甚至破壞其光合作用系統的D1蛋白的結構(photodamage)。在所有的高等植物、蕨類、蘚苔類以及部分藻類中，葉黃素迴圈(xanthophylls cycle)中的類胡蘿蔔素普遍被認為參與了光保護的機制。當光合作用系統受到強光誘導或是類囊膜內的pH值太低，葉黃素迴圈中的紫黃質(violaxanthin)會進行去環氧化作用(epoxidation)轉變成環氧玉米黃質(antheraxanthin)，最後轉變成玉米黃質(zeaxanthin)，玉米黃質經研究被認為能將光系統中剩餘的激發能量以熱能的形式散失掉，藉此保護光系統不被破壞。早期學者認為藍綠藻以及紅藻缺乏葉黃素迴圈(Falkowski and Raven 1997)，其後陸續有學者在紅藻*Gracilaria birdiae*中發現紫黃質、環氧玉米黃質以及玉米黃質且存在有葉黃素迴圈的功能性(Ursi et al. 2003)。*G. gracilis* 以及*G. multipartia*具有功能性的葉黃素迴圈，但迴圈中僅存在環氧玉米黃質和玉米黃質，缺少紫黃質。南極冰藻(Antartic red algae *Delesseria lancifolia*)雖然具有三種葉黃素，但在經過光照和暗適應時，卻沒有觀察到三種葉黃素之間有相互轉變的情形，因此此種紅藻是否具有功能性的葉黃素迴圈目前尚未確定。總結而言，在部分紅藻中確實存在紫黃質、環氧玉米黃質以及玉米黃質等葉黃素迴圈色素，但在溫泉紅藻中，是否具有葉黃素或是其葉黃素迴圈的功能性仍尚未被確定。

北投溫泉藻類能生長於高溫、低pH值的環境，或許未來也能成為具商業潛力的物種。然而在開發其商業價值之前，必須對其基本的生理特性有所了解，例如，大量培養藻類細胞時，必須找出其最佳的生長條件，最適的生長溫度、酸鹼值以及光量條件，因此對於光合生理方面的基礎研究仍然是相當重要的。許多實驗室內的研究往往會因為培養條件很難塑造出與野外環境相似的條件，實驗結果往往與實際情形不同。近年來葉綠素螢光分析儀的發展越漸成熟，方便使用者於野外測量植物或藻類的光合作用能力，而且有不傷害藻類本體的優點，因此本實驗採用葉綠素螢光分析儀進行北投溫泉藻光合作用能力之研究。

貳、研究目的

- 一、鑑定北投溫泉藻種類
- 二、野外實測適應於不同光強度下的溫泉藻，其光合作用能力的差異。
- 三、光源對北投溫泉藻 Chl *a* 與 phycocyanin 含量之影響
- 四、北投溫泉紅藻類胡蘿蔔素種類分析

參、研究方法或過程

一、北投溫泉藻種類之分析

光學顯微鏡觀察與色素分析

1. 本實驗研究對象為生長於北投溪之溫泉露點的溫泉藻類，首要目標是鑑定溫泉藻的種類。我們於野外以牙刷將附於石頭上的溫泉藻刷入塑膠瓶中，並立即置入冰筒於4°C以下低溫保存，帶回實驗室進行光學顯微鏡鏡檢。藻類界中僅藍綠藻、隱藻及紅藻具有藻膽蛋白，因此進行藻膽蛋白萃取分析應可以初步縮小北投溫泉藻種類辨識的範圍。

2. 藻膽蛋白萃取方式

將藻液高速離心後除去上清液，立即添加液態氮將藻體冰凍固定，再將藻體避光、冷凍乾燥備用。萃取步驟參照 Beer and Eshel (1985) 的方法，將乾燥藻體秤重後用研鉢低溫磨碎，使其呈現均質，加入 10ml、0.1M phosphate buffer 避光、低溫萃取藻膽蛋白，經 4°C 黑暗下隔夜處理然後，以 10000g 離心 20 分鐘，取澄清液，用分光光度計測定波長，帶入其下列公式求值。

$$\text{Phycoerythrin} = \{(A_{564}-A_{592})-(A_{455}-A_{592})0.2\}0.12$$

$$\text{Phycocyanin} = \{(A_{618}-A_{645})-(A_{592}-A_{645})0.51\}0.15$$

基因定序方面

我們以 *rbcL* 基因作為鑑定種類的基因片段。溫泉藻總DNA是以商業化試劑DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Santa Clarita, CA, USA) 進行萃取，PCR所利用的引子對是參考 (Ciniglia, 2004) 所設計如下，

rC475F :

5'-AAAACCTTCCAAGGCCWGC-3'

rCR :

5'-GCWGTGGTGT Y TCH ACWAAA TC-3'

PCR產物大小經過DNA marker比對確認無誤後，將PCR產物送定序。所得之序列以軟體Bioedit 7.0開啓，並以肉眼檢查是否有錯誤。將整理後之序列至網站NCBI上作序列比對。

二、適應於不同光強度下的溫泉藻其光合作用能力的差異

實驗設計

1. 樣點選擇：

選定北投溪部分範圍進行環境因子之測量，測定之環境因子包括溫度、pH 值、光強度。初步選取環境因子相近但有部分被樹蔭遮蔽的區域，在進一步紀錄溫度、pH 值、和光強度等環境因子的日變化情形，評估環境的穩定性，並以統計軟體 SPSS 分析高光區與低光區環境因子的差異。確認兩區域的溫度、pH 值、和光強度等環境因子中僅光強度有差異後，我們假設兩區塊的溫泉藻分別是高光族群與低光族群。

2. 光合作用能力測定：

首先測量兩樣點溫泉藻的實際光效率(effective yield)與光效能受到強光抑制後的回覆率(LC-recovery)確認兩樣點溫泉藻的光合生理情形是否存在差異。以葉綠素螢光分析儀中的快速光曲線功能(Rapid light curve),可立即測量藻類當下電子傳遞鏈速率最大值(ETR_{max})、Alpha 值(光合作用效率)等基本參數。其公式如下： $ETR_{max} = Y * PPF * 0.5 * AF$ ； $Y = (Fm' - F) / Fm'$ 。另外，以葉綠素螢光分析儀分析藻類光合作用過程中的 NPQ 值，代表藻類熱散失的能力。樣點選取後於野外測量高光群與低光群的光合作用能力之日變化，並分析兩群之差異。

三、光源對北投溫泉藻 Chl a 與 phycocyanin 含量之影響

實驗設計

1. 將溫泉藻採回實驗室內培養，以當地溫泉水作為培養液，於恆溫生長箱內 40°C 、轉速125 rpm，並於黑暗(以鋁箔紙包裹)與光照($58 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)情形下培養，每3天一次採集藻體，測量葉綠素a、phycocyanin含量，並且紀錄電子傳遞速率的最大值。

2. 藻體收集方式

將藻液高速離心後除去上清液，立即添加液態氮將藻體冰凍固定，再將藻體避光、冷凍乾燥備用。

3. 葉綠素a萃取方式

將乾燥藻體秤重後用研鉢低溫磨碎，使其呈現均質，加入 10ml、90%的丙酮，避光、低溫萃取葉綠素 a，經 4°C 黑暗下隔夜處理然後，以 3500 轉、離心 5 分鐘，取澄清液，用分光光度計測定波長 645、663 的吸光值，以 Arnon (1949) 公式

$$\text{【Chl.a】} (\text{mg Chl g fw}^{-1}) = [0.0127 \times D_{663} - 0.00269 \times D_{645}] \times V / (1000 \times W)$$

【Chl.a】：葉綠素 a 濃度

D_{663} = 波長 663nm 吸光值

D_{645} = 波長 645nm 吸光值

V：葉綠素 90%丙酮抽出液的總體積

W：藻體冷凍乾燥後的重量

4. 藻膽蛋白含量測定方式：

萃取步驟參照 Beer and Eshel (1985) 的方法，將乾燥藻體秤重後用研鉢低溫磨碎，使其呈現均質，加入 10ml、0.1M phosphate buffer 避光、低溫萃取藻膽蛋白，經 4°C 黑暗下隔夜處理然後，以 10000g 離心 20 分鐘，取澄清液，用分光光度計測定波長，帶入其下列公式求值。

四、北投溫泉紅藻類胡蘿蔔素種類分析

將溫泉藻至於生長箱內培養，培養條件為 40°C 、100r.p.m、黑暗處理培養兩天，之後將藻體冷凍乾燥，秤取定量的乾燥藻體置於研鉢內，並在冰上加以研磨，之後再逐次加入10ml 99.5%酒精、充分研磨後收集至離心管，再於 4°C 黑暗下作隔夜處理，使色素被完全地萃取。將色素萃取液高速離心(4°C 、13200 rpm)20分鐘，收集上清液，上清液再以孔徑 $0.45 \mu\text{m}$ 的過濾膜過濾以去除雜質。利用高效能液相層析儀進行色素種類分析，其分析系統

分述如下: Waters 600 pump (flow rate 1 mL/min), Waters 2487 Dual λ Detector, 逆相C18管柱(SpheriClone 5ODS, 250×4.60 mm, 5 μ m particle size, Phenomenex)及保護管柱(1 mm, C18, Optiguard)。本實驗所使用的solvent system program 係參照(Hsiu-Ping Li et al. 2002) 描述於Table 1。各種類胡蘿蔔素的標準品分別為葉綠素a、violaxanthin、antheraxanthin、zeaxanthin、a- carotene、b-carotene、lutein，皆自 Sigma Chemical 購得。

Table 1.

Time (min)	%A	%B	%C
0.0	100	0	0
2.0	0	100	0
2.6	0	90	10
13.6	0	65	35
18.0	0	31	69
23.0	0	31	69
25.0	0	100	0
26.0	100	0	0
34.0	100	0	0

A: Methanol: 0.5 M ammonium acetate/80:20, (v:v, pH 7.2); B: Acetonitrile: water/90:10, (v:v); C: 100% Ethyl acetate.

肆、研究結果與討論

一、北投溫泉藻野外生長情形與細胞型態觀察

本研究的北投溫泉藻的生長環境微水流速緩慢的溫泉水中(Fig. 1A)，並附著於石塊上，以泉水潑灑時藻類不容易被沖刷懸浮於水中，外觀顏色呈現深綠色(Fig. 1B)。露出水面的石頭並沒有觀察到有藻類生長，而且可以明顯觀察到有大量黃色沉澱物質(Fig. 1C)。北投溪上游為地熱谷，為高溫的硫黃泉池，Tomita等人於2006年研究中亦提到北投溫泉中含有大量的硫酸鹽類，因此推測此黃色物質為某種硫酸鹽類。在光學顯微鏡放大倍率1000倍下觀察，北投溫泉藻的細胞型態為單細胞的微藻，細胞直徑大小約3~5 μ m。

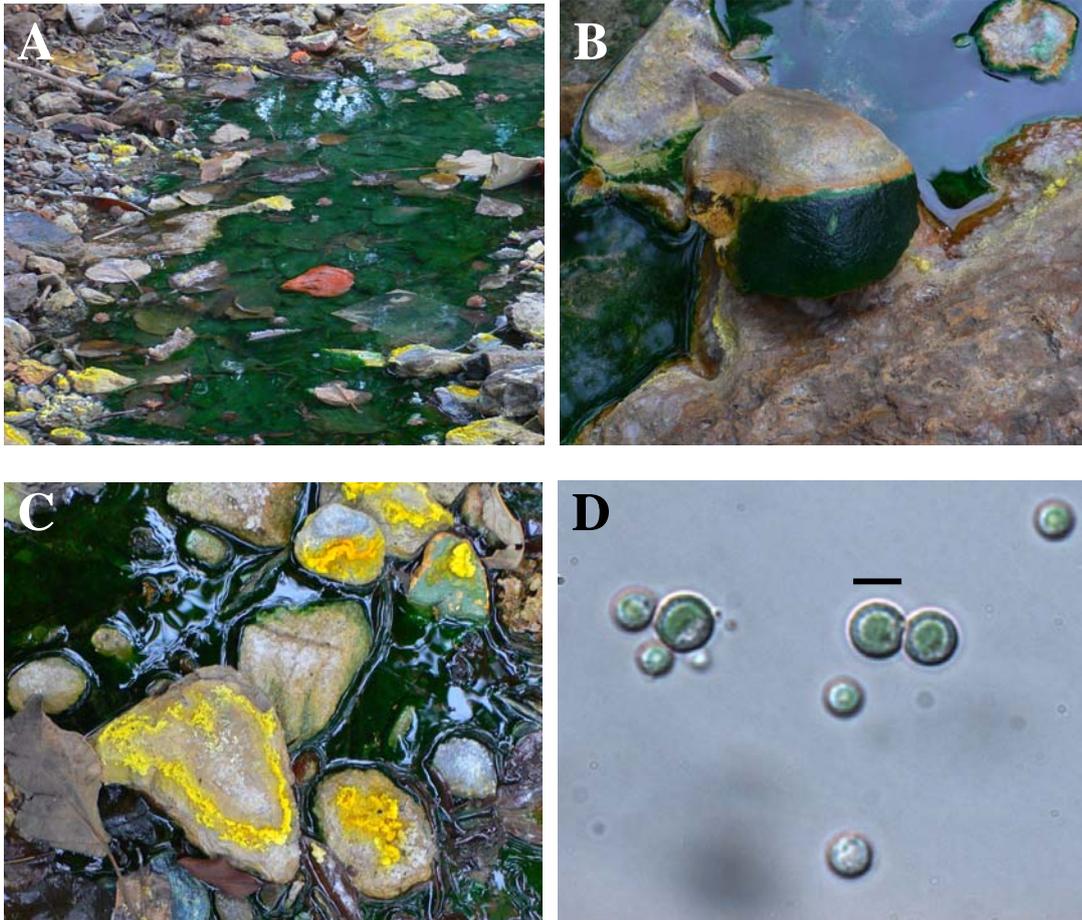


Figure 1. 北投溫泉藻生長環境、藻類附著情形、細胞型態觀察

(A) 大量溫泉藻生長於溫泉水中。(B) 大量的藻類細胞附著於石頭上，形成藻墊。(C) 石頭露出水面乾燥後，有大量的黃色物質沉澱析出。(D) 在光學顯微鏡放大倍率1000倍下觀察，北投溫泉藻為單細胞微藻，照片中可以看出此藻類具有相當厚的細胞壁。Bar = 5 μ m。

二、北投溫泉藻藻膽蛋白(phycobiliprotein)萃取分析

參照Beer and Eshel (1985) 的方法，嘗試將北投溫泉藻進行藻膽蛋白的萃取。萃取液經過分光光度計偵測後，結果表示於Fig. 2。我們將萃取液的波形與Allen 在1959年的研究相互比較，發現北投溫泉藻萃取液的整體光譜波型與藍綠藻*Microcoleus rupicolar*及溫泉紅藻*Cyanidium caldarium* 的波形非常相似，波峰皆落於波長620左右。此外將O.D值帶入Beer and Eshel (1985) 的公式，結果Phycocyanin的濃度為1.68mg/ml，Phycoerythrin為趨近於0的負值。此結果暗示北投溫泉藻為內含有Phycocyanin 的某種紅藻或藍綠藻，然而目前科學界尚未發現有藍綠藻能存活於高溫、低酸鹼值的環境中，因此我們初步推斷北投溫泉藻為某種溫泉紅藻。

此圖截取自 Allen (1959) 的研究

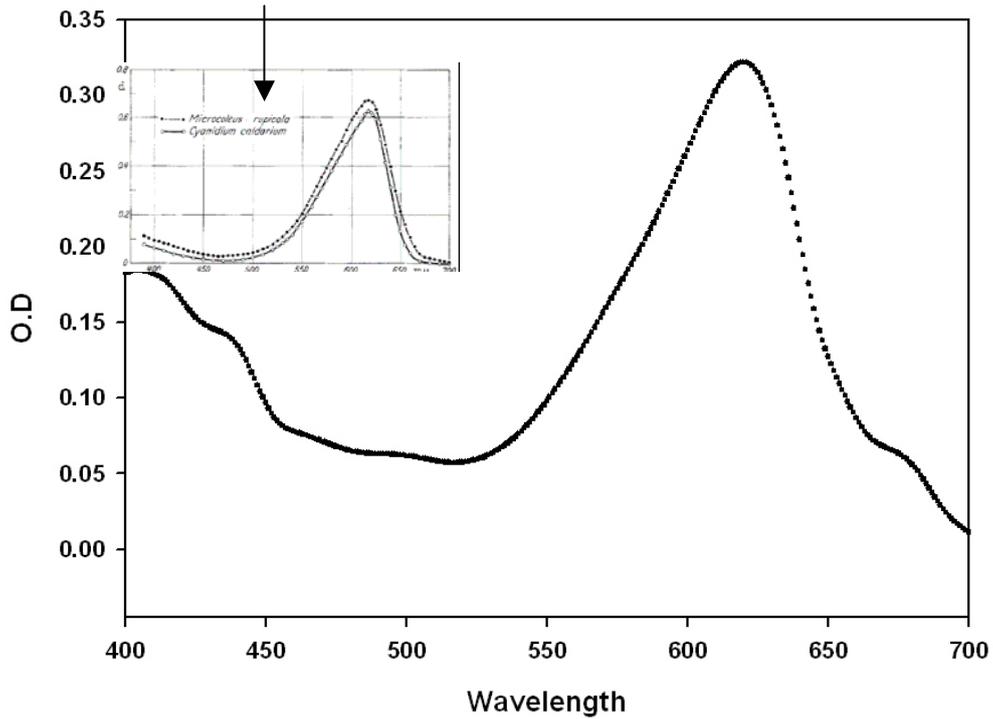


Figure 2. 北投溫泉藻萃取液於波長400~700的吸收光譜，波峰出現在波長620。

三、北投溫泉藻*rbcL*基因序列

溫泉紅藻Cyanidiales的*rbcL*基因大小約1.2k，而本實驗所使用的Forward端引子是設計在*rbcL*基因片段內部，所擴增出來的片段大小約1k左右(Fig 3.)，定序結果列於Table 2。將序列送往NCBI 基因資料庫比對，結果北投溫泉藻*rbcL*基因的序列與*Galdieria maxima*相似度最高，此結果表示北投溫泉藻可能是*Galdieria maxima* (Rhodophyta)。

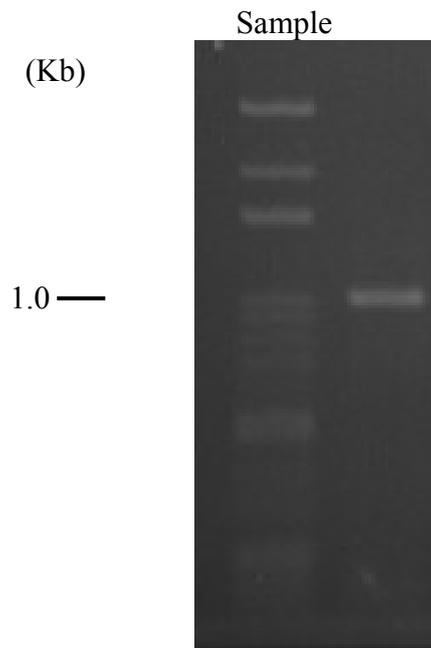


Figure 3. PCR產物之電泳膠圖。北投溫泉藻*rbcL*基因以引子對rC475F與Rcr擴增之後片段大小約1k左右。

Table 2. 北投溫泉藻*rbcL*部分基因序列

```

GTGGAACGTTTGAATAAGTTTGGTCGTCCATTATTAGGTTGTACAGTGAAACCAAAATTAGGTTTATCTGGAAAAACTATGGACGTG
TGGTGTATGAAGGTTTAAAAGGAGGATTAGACTTCTAAAAGATGACGAAAATATTAATTCACAACCTTTCATGCGTTGGAGAGATCGTT
ATTTATACGTAATGGAAGGGGTGAATAGAGCATCTGCAGCATCAGGAGAAGTGAAAGGTTTCATATTTGAACGTAACAGCAGCCACCATG
GAGGAGATCTATAAGAGAGCTGAATTTGCCAAAGAAGTAGGTTTCAGTCATCATTATGATTGACCTTGTGATTGGTTATACAGCGATCCAA
ACCATGGCGATTTGGGCACGTGAAAATAACATGATTCTTCACCTACATAGAGCAGGCAACTCCACATATTCTCGTCAGAAAAATCATGGC
ATTAACCTCCGAGTGATTTCTAAGTGGATGCGTATGGCAGGAGTTGATCACATTCATGCAGGAACAGTAGTAGGTAACCTTGAAGGTGAT
CCTGTCATTATCAAAGGTTTCTACAACACCTTATTATTACCGAAATTAGAGATCAACTTGCTCAAGGTTTGTCTTTGAAATGGATTGGG
CGTCTCTACGTAAAGTCATGCCAGTAGCTTCAAGTGGTATCCACGCTGGTCAAATGCATCAATTGATTCATTACTTGGGTGAAAATGTAG
TGTTACAATTCAGAGGAGGAACCATTGGTCACCCCA

```

四、野外實驗樣點-高光區與低光區溫度、pH值及光強度之日變化情形

高光區與低光區兩樣點距離在一公尺內，低光區因為受到周圍樹蔭遮蔽，光強度低於高光區，但是溫度與pH值等環境因子仍非常相似。兩樣點溫度與pH值的日變化不明顯，溫度變化介於48~51°C，pH值變化介於2.5~3.3。

將兩樣點溫度與pH值的日變化數據以T-test分析之後，發現高光區與低光區的溫度與pH值並無顯著差異(Table 3)。高光區的光強度高峰出現在上午11點，光強度達到956 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ，低光區的光強度高峰出現在下午1點，光強度達到550 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 。

Table 3. 高光區與低光區溫度與pH值日平均值比較(n=16, mean \pm se)

Parameter	High light	Low light	P-value
Temperature (°C)	49.6 \pm 0.4	49.2 \pm 0.4	0.059
pH	2.92 \pm 0.16	2.95 \pm 0.14	0.648

註: 顯著水準設為0.05。

五、高光與低光區溫泉紅藻光合作用能力的差異

兩者的電子傳遞速率最大值(ETR_{max})卻幾乎沒有呈現顯著差異，僅在下午3點時呈現顯著差異(P < 0.05)(Fig. 4)。接下來將藉由實驗室內的培養來進一步探討兩者電子傳遞速率無顯著差異的原因。

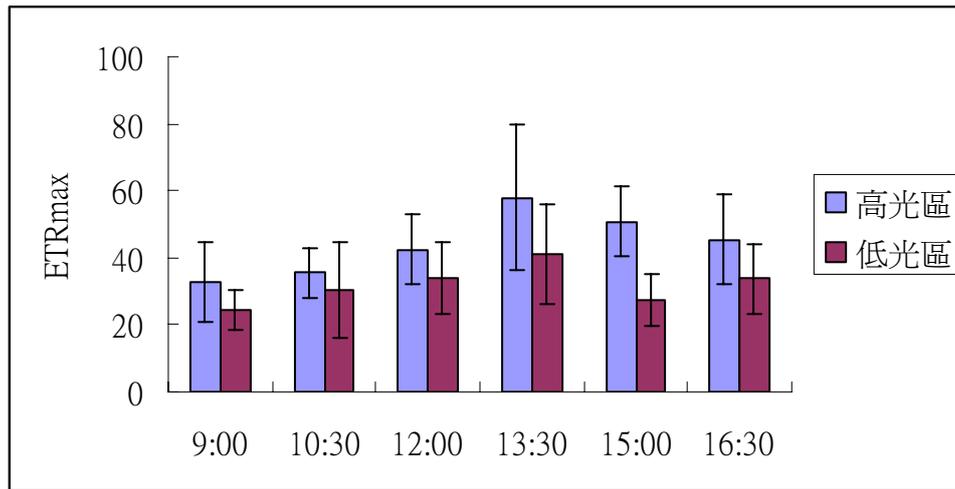
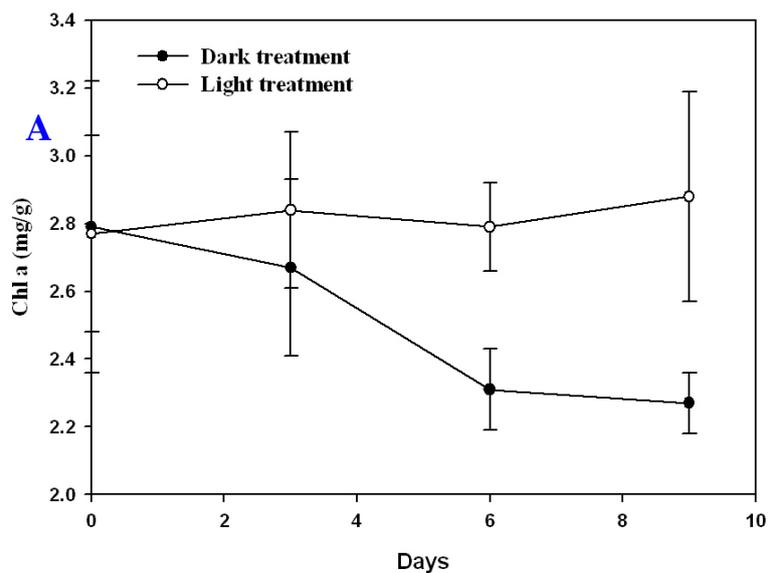


Figure 4. 高光與低光區溫泉紅藻電子傳遞速率最大值(ETR_{max})之日變化比較，(n = 5)。

六、黑暗與光照處理對北投溫泉紅藻Chl a、phycocyanin含量以及 ETR_{max} 的影響

當北投溫泉藻在黑暗處理下，結果發現黑暗處理組的葉綠素a含量有下降的情形，初始值約2.8(mg/g)，第9天已下降至2.2(mg/g)，然而光照處理組的葉綠素a含量並沒有顯著的變化(Fig. 5A)。在黑暗處理下，phycocyanin含量的變化趨勢跟葉綠素a的變化趨勢呈現相反的情形(Fig. 5A,B)。在黑暗處理下，phycocyanin含量從第一天的2.25(mg/g)上升至第九天的2.52(mg/g)，而光照處理組的phycocyanin含量並無明顯的變化。此結果顯示北投溫泉藻的葉綠素a與phycocyanin含量容易受到持續黑暗處理的影響。此結果中，光照處理組的葉綠素a與phycocyanin含量似乎不受影響，推測可能原因為光照組的光強度只有 $58 \mu \text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ，遠低於自然界太陽光，使得實驗結果沒有明顯變化。



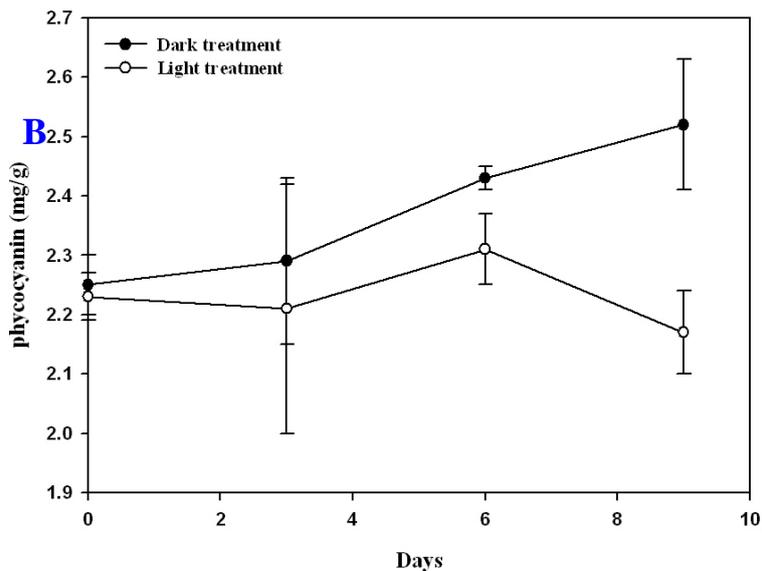


Figure 5. 北投溫泉藻在黑暗與光照處理下(A)Chl *a*含量與(B)Phycocyanin的變化情形，(n=3)。

利用葉綠素螢光分析儀的快速光曲線功能，可以立即得知藻類在當下的光合作用潛能，亦即當下的光合生理潛能。在黑暗處理下，北投溫泉藻的電子傳遞鍊最大值(ETR_{max}) 有上升的趨勢(Fig. 6)。結果可能暗示北投溫泉藻在缺乏光源時，短期內仍會提升光合作用的能力，以提高存活的能力。在黑暗處理下，我們發現北投溫泉藻光合作用潛能與phycocyanin含量呈現正相關($R^2=0.89$)(data not showed)，但是光照處理組的相關性並不強烈， R^2 值僅達0.18(data not showed)。

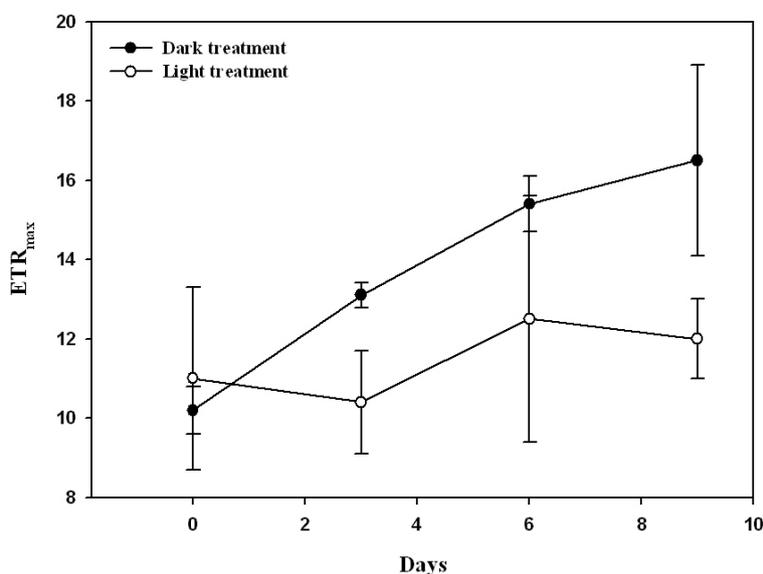


Figure 6. 北投溫泉藻在黑暗與光照處理下葉綠素含量的變化情形，(n=3, mean±se)

七、高光與低光區溫泉紅藻熱散失能力的差異

NPQ值代表光系統將多於光能以熱的形式散失的參考值，值越高代表熱散失的比例越高。我們發現一個比較特別的結果：在相同的光強度之下，低光區溫泉紅藻的熱散失能力比高光

區的溫泉紅藻來的好。這情形與一般認為高光適應下的NPQ值會較高的想法正好相反。根據前言文獻指出，葉黃素迴圈能以熱散失的方式扮演著光保護的角色，因此接著我們又進行了北投溫泉藻類胡蘿蔔素的種類分析。

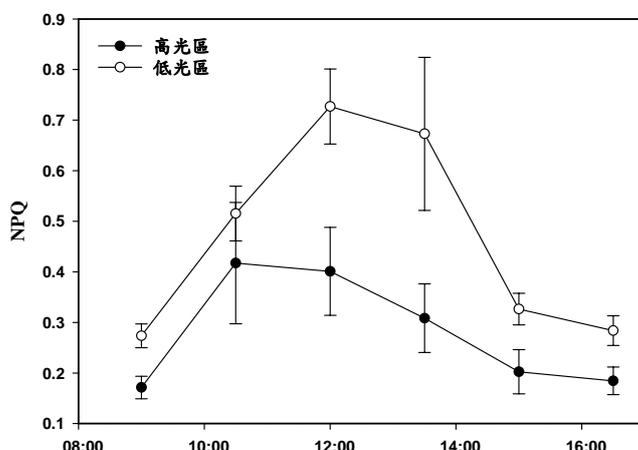


Figure7. 高光與低光區溫泉紅藻的NPQ表現情形。

八、北投溫泉紅藻類胡蘿蔔素的種類分析

由於標準品價格昂貴，我們僅使用部分最常見的種類，HPLC分析結果顯示北投溫泉藻的色素的種類至少含有以下三類：

葉綠素：Chl *a*

胡蘿蔔素：Lutein、 α -carotein、 β -carotein

葉黃素：Zeaxanthin

北投溫泉紅藻的葉黃素種類僅有Zeaxanthin，並未發現Violanxanthin與Antheraxanthin。將北投溫泉藻黑暗處理一週後，仍未發現Violanxanthin與Antheraxanthin，因此推測北投溫泉紅藻不俱有葉黃素迴圈(Xanthophyll cycle)。Cyanidioschyzon merolae 在三屬溫泉紅藻中，較為原始(Seckbach et al. 1994)，其色素種類組成較為單純，僅含有Chl *a*、 β -carotein與Zeaxanthin (Francis et al. 2007)。本次研究中，北投溫泉紅藻應屬於Galdieria sp.，在演化地位上較為進化，因此其色素種類也比Cyanidioschyzon merolae 多出Lutein 與 α -carotein。根據本研究結果，北投溫泉紅藻缺乏葉黃素迴圈，僅有Zeaxanthin，是否仍有光保護的功能尚待進一步去實驗驗證。

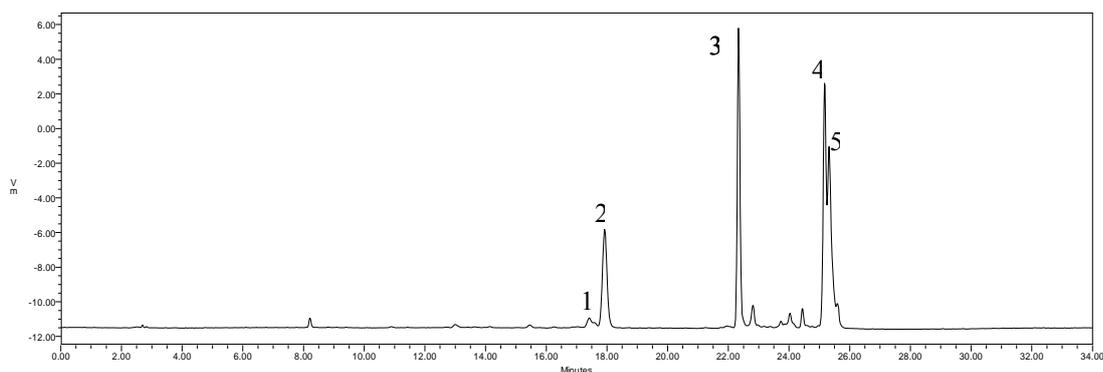


Figure 8. 以HPLC分析北投溫泉藻的類胡蘿蔔素種類。1: Lutein, 2: Zeaxanthin, 3: Chl *a*, 4: α -carotene, 5: β -carotene。

伍、結論

1. 根據光學顯微鏡觀察結果，北投溫泉紅藻的細胞為外觀綠色、大小約 $5\sim 3\ \mu\text{m}$ 的圓球狀細胞。從型態觀察中，我們難以區別北投溫泉藻屬於何種藻門。由於藻類界中僅藍綠藻、隱藻及紅藻具有藻膽蛋白，因此我們試著去檢驗北投溫泉藻是否含有藻膽蛋白。我們利用(Beer and Eshel, 1985)的方法去萃取北投溫泉藻，萃取液經過分光光度計偵測後，結果發現萃取液的光譜圖與(Allen, 1959)的研究很相似，北投溫泉藻萃取液的整體光譜波型與藍綠藻*Microcoleus rupicular*及溫泉紅藻*Cyanidium caldarium*的波形非常相似，波峰皆落於波長620左右。此外將O.D值帶入Beer and Eshel (1985)的公式，結果Phycocyanin的濃度為1.68mg/ml，Phycoerythrin為趨近於0的負值。此結果暗示北投溫泉藻為僅含有Phycocyanin的某種紅藻或藍綠藻。另外根據文獻指出溫泉紅藻飾目前唯一能存活於高溫($42\sim 57^\circ\text{C}$)、低酸鹼值(pH 0.2~4)的光自營生物，因此我們推斷北投溫泉藻屬於某一種溫泉紅藻。接著我們收尋文獻，尋找用來擴增溫泉紅藻rbcL基因的引子，進一步將北投溫泉紅藻rbcL基因做定序工作。將訂序結果整理後，利用NCBI網站的BLAST系統將北投溫泉藻rbcL基因與基因資料庫作比對，結果發現北投溫泉藻的序列與*Galdieria* sp. (Rhodophyta)最為相似。
2. 我們在樣區經過幾次探勘後找尋到光強度不同但溫度與pH值卻無顯著差異的兩個樣點，目的想要在野外下探討適應於不同光強度的溫泉藻在光合生理上的差異。實驗結果發現適應於不同光強度下的北投溫泉紅藻，其電子傳遞速率無顯著的差異。經過黑暗處理後，北投溫泉紅藻phycocyanin的含量有增加的趨勢，此外黑暗處理組的ETR_{max}值與phycocyanin含量呈現正相關($R^2=0.8956$)。此結果暗示光線缺乏時，溫泉紅藻能藉由phycocyanin含量的增加，使光合作用能力達到最佳化。此結果也間接佐證為何高光與低光區溫泉紅藻的ETR_{max}並無顯著差異。
3. 我們發現低光區溫泉藻的NPQ值大於高光區溫泉藻的NPQ值。從生理的角度而言，高光區的溫泉藻應該更需要加強光保護機制才對。針對這點，我們進一步去分析北投溫泉藻的類胡蘿蔔素種類，期盼能深入探討葉黃素迴圈與熱散失的關係。結果在黑暗的情形下，北投溫泉藻的類胡蘿蔔素種類僅包括Lutein、 α -carotene、 β -carotene與Zeaxanthin，並未沒有Violanxanthin與Antheraxanthin，因此推測北投溫泉紅藻不俱有葉黃素迴圈(Xanthophyll cycle)。所以關於熱散失程度的問題有待未來進一步做實驗佐證。

陸、參考文獻

- Allen M.B. 1959. Studies with *Cyanidium caldarium*, an anomalously pigmented chlorophyte. *Archly für Mikrobiologie*. 32, 270—277.
- Beer S. and A. Eshel. 1985. Determining phycoerythrin and phycocyanin concentrations in aqueous crude extracts of red algae. *Aust. J. Mar. Freshw. Res.* 36:785-92.

Falkowski PG, Raven JA (1997). Aquatic photosynthesis. Blackwell Science, Oxford, p 375.

Francis X. Cunningham, Jr., Hansel Lee, Elisabeth Gantt. 2007. Carotenoid Biosynthesis in the Primitive Red Alga *Cyanidioschyzon merolae*. *EUKARYOTIC CELL*, p. 533–545.

Hsiu-Ping Li, Gwo-Ching Gong, and Tung-Ming Hsiung()Phytoplankton pigment analysis by HPLC and its application in algal community investigations. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 43: 283-290.

Seckbach Joseph. 1994. The first eukaryotic cells - acid hot-spring algae. *Journal of Biological Physics* 20: 335-345.

Ursi S, Pedersen M, Plastino E, Snoeijs P. 2003. Intraspecific variation of photosynthesis, respiration and photoprotective carotenoids in *Gracilaria birdiae* (Gracilariales: Rhodophyta). *Mar Biol* 142:997-1007.

評語

作者有效地利用各種不同方法瞭解嗜酸性溫泉紅藻光合作用受光照強弱的影響，工作內容豐富，缺點是對實驗方法的瞭解不夠深入，有些儀器雖然較貴重無法親自操作，但也應瞭解實驗的原理。