

有用淡水藻類之分離及其利用——I

三種不同培養基對於綠藻生長之影響

鍾碧鶯 劉英昕 蔡惠耀

緒 言

單細胞綠藻通常係指原球藻(*Chlorella sp.*)及菱藻(*Scenedesmus sp.*)。其分類上之地位，兩者同屬於綠藻門(Chlorophyta)，綠藻綱(Chlorophyceae)，綠藻目(Chlorococcales)。原球藻屬於單細胞綠藻科(Chlorellaceae)，菱藻則屬於Coelastraceae科。原球藻已知的種(Species)已有十餘種，其中常見的有*Chlorella vulgaris*(BEYERINCK)，*C. ellipsoidea*(GERNECK)。菱藻已知的種類有20種，其中則以*Scenedesmus obliquus*(TURPIN) KÜTZING, *S. quadricauda*(TURPIN) BREBISSON, *S. acuminatus*(LAGERHEIM) CHODAT等三種最為普遍。本實驗則以原球藻(*Chlorella sp.*)為實驗的材料。

*Chlorella*的分佈極廣；池水，魚池，沼地，污水中均可發現其存在之踪跡。通常言之，潮濕，溫暖及日光照射良好之地區，即為其繁殖的溫床。*Chlorella*之形態及性質，常因地方而有不同，即常有地方型的發生。最顯著者，即對溫度之適應性，各地方型均有不同，依其對溫度之適應力，可分成：

- (1)低溫種(Psychrophilic)：15~20°C間能生長繁殖。
- (2)中溫種(Mesophilic)：20—30°C間。
- (3)高溫種(Thermophilic)：31—40°C間。
- (4)超高溫種(Super thermophilic)：41—52°C間。

台灣的種類以中溫種及高溫種最為普遍，但亦有超高溫種之發現。

*Chlorella*生長勢旺盛，經過幼期暗細胞(Nascent dark cells)，活動期暗細胞(Active dark cells)，移行期細胞(Cells of transient stage)，未成熟明細胞(Ripened light cells)，半成熟明細胞(Half-ripened light cells)，成熟明細胞(Ripened-light cells)及完全成熟明細胞(Fully matured light cells)時期，行無性生殖(Asexual reproduction)之分裂生殖法(Dividing)來大量繁殖，故而*Chlorella*的繁殖極為迅速。綠藻生長過程中行光合作用製造所需養分，故而光線強度及溫度對於綠藻之生長及繁殖影響甚劇。*Chlorella*在0.4 Lux以下之光線強度，非但對其光合作用有所不利，同時在此光線強度下細胞不能分裂。綠藻之光合作用及分裂與光線強度有直接關係，故而在綠藻培養上，光線為重要因子。溫度對*Chlorella*之影響則視各地方型而異。通常在室溫(25°C)時，細胞分裂所需之時間適中，故在室溫狀況下即可培養*Chlorella*。

本試驗為藉著*Chlorella Sp.*原種在三種不同培養基，在同一試驗條件之下觀察其生長速度及對於培養基之適應性。

實驗及結果

一、品種之分離方法

此次實驗所用*Chlorella sp.*原種係由台灣省水產試驗所竹北分所試驗池分離而來。用 Streak Plate Culture及Miles & Misra Surface Counting Method來作分離。從池塘取樣本，以篩選用培養基

第1表) 把二重皿 (Petri-dish) 置於 30~35°C 裝置有 3000~3500 Lux 日光燈之保溫箱中培養 3~5 天，並用白金耳 (Loop) 取出 Single colony，移植於斜面培養基 (Slant culture) 培養之。接種後的斜面培養基亦置於 3000~3500 Lux 日光燈及 30~35°C 保溫箱中培養。

第1表 篩選綠藻品種用培養基

Table 1 Composition of Screening Medium

硝酸鉀 (KNO ₃)	7.5gm
硫酸鎂 (MgSO ₄ · 7H ₂ O)	3.75gm
磷酸一鉀 (KH ₂ PO ₄)	1.87gm
硫酸亞鐵 (FeSO ₄ · 7H ₂ O)	7.5mg
E.D.T.A (Xylat 試藥)	10.5mg
* Arnon 5 Solution	1.5ml
水 (H ₂ O)	1000. ml
pH.	7.2—7.4
* A5 Solution 的組成如下：	
硼酸 (H ₃ BO ₃)	2.85gm
氯化錳 (MnCl ₂ · 4H ₂ O)	1.81gm
硫酸鋅 (ZnSO ₄ · 7H ₂ O)	0.22gm
硫酸銅 (CuSO ₄ · 5H ₂ O)	0.078gm
鉬鹽 [3(NH ₄) ₂ O ₇ MoBO ₃]	0.171gm
水 (H ₂ O)	1000ml

二、室內培養

(A) 培養液：

在室內培養選擇田宮 (Tamiya)，柴田 (Makida)，Lewin 三種培養液 (第2,3,4表)

第2表 田宮培養液

Table 2 Composition of Tamiya's medium

硝酸鉀 (KNO ₃)	5gm
硫酸鎂 (MgSO ₄ · 7H ₂ O)	2.5gm
磷酸一鉀 (KH ₂ PO ₄)	1.25gm
硫酸亞鐵 (FeSO ₄ · 7H ₂ O)	5mg
E.D.T.A. (Xylat 試藥)	7mg
* Arnon 5 Solution	1ml
水 (H ₂ O)	1000ml
pH	6.8—7.0
* Arnon 5 Solution 的組成如下：	
硼酸 (H ₃ BO ₃)	2.85gm
氯化錳 (MnCl ₂ · 4H ₂ O)	1.81gm
硫酸鋅 (ZnSO ₄ · 9H ₂ O)	0.22gm
硫酸銅 (Cu SO · 5H ₂ O)	0.078gm
鉬鹽 [3(NH ₄) ₂ O ₇ MoBO ₃]	0.171gm
水 (H ₂ O)	1000ml

第3表 柴田培養液

Table 3 Composition of Makida's medium

硝酸鈣 [Ca(NO ₃) ₂]	1gm
硫酸鎂 (Mg SO ₄ · 7H ₂ O)	0.25gm
磷酸一鉀 (KH ₂ PO ₄)	0.25gm
氯化鉀 (K Cl)	0.25gm
氯化鐵 (FeCl ₃)	Trace
水 (H ₂ O)	1000ml
pH	6.8—7.0

第4表 Lewin 培養液

Table 4 Composition of Lewin's medium

硝酸鈣 [Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O]	1gm
硫酸鎂 (MgSO ₄ · 7H ₂ O)	0.2gm
磷酸一鉀 (KH ₂ PO ₄)	Trace
醋酸 (CH ₃ COOH · 2H ₂ O)	1gm
檸檬酸鈉 (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ · 2H ₂ O)	1gm
水 (H ₂ O)	1000ml
pH	6.8—7.0

(B) 室內培養方法：

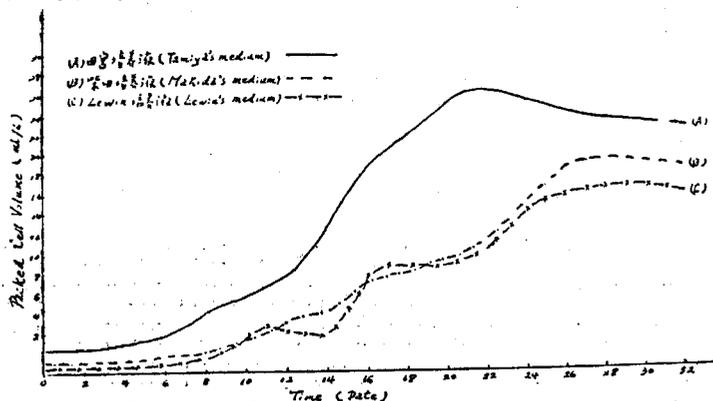
培養瓶分為小型扁平培養瓶 (100ml)，及大型扁平培養瓶 (1000ml) 兩種。

將上述的三種培養液各分注 50ml 於小型扁平培養瓶內，每種培養液均採用四重覆，在無菌室將斜面培養基 (Slant culture) 移植於小型扁平培養瓶內。然後將此培養瓶置於 3000—3500 Lux 的日光燈下培養，並由小管通入含有二氧化碳 (CO₂) 3~5% 之空氣，一方面促進光合作用，另一方面具有攪拌之功效，避免綠藻細胞發生沉澱，在試驗中每隔二天測其細胞數 (Cell number) 及藻體容積 (Packed Cell Volume 簡稱 P.C.V)，當 P.C.V. 達 10~15 ml/l 時再將小型扁平培養瓶移至大型扁平培養瓶。

大型扁平培養瓶內亦是分別裝入此三種不同的培養液各 500ml 並採用四重覆。其光源亦為 3000~3500 Lux 之日光燈亦由管子通入含有 3~5% 二氧化碳的空氣。待其繁殖藻體濃度達 10~15 ml/l 時再移至室外做大量培養。

三、室內培養結果

經試驗結果其生長速度如第 1 圖：



第1圖 在室內三種不同培養液之生長速度

Fig 1. The growth rate in three different media

四、室外培養

採用長方形塑膠槽（62cm×42cm×32cm），培養基也同樣的使用田宮、柴田、LEWIS N三種培養液。並無藉機械攪拌及通氣，為一粗放培養法。每一塑膠槽內放入30公升的培養液，再將室內大型扁平培養瓶，當其培養液藻體濃度達10—15ml/l時移至室外，倒入塑膠槽內，將此塑膠槽置於陽光充足，空氣流通處培養，俾能使其進行光合作用。通常每小時以玻璃棒攪拌一次。當溫度較低時，必需移至溫室內培養，以促進其生長。

在室外培養的過程中，由於其大量繁殖，故為補充所需之碳源，必需加入追加液(Feeding medium)如第5表，並維持培養液在中性至微鹼性以促進綠藻之繁殖。

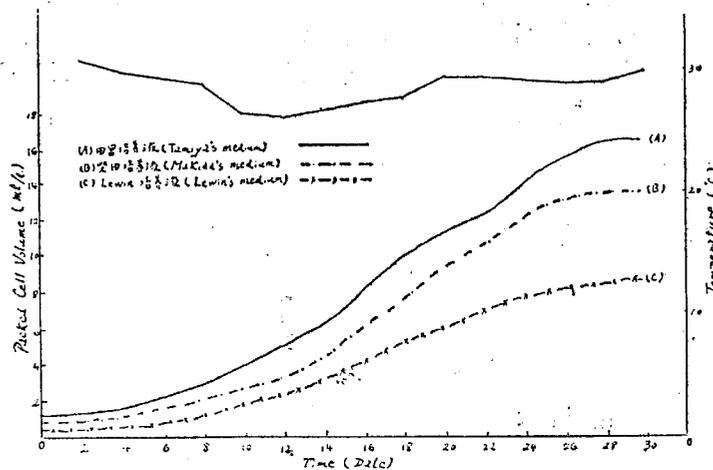
第5表追加液之成分

Table 5 Composition of Feeding Medium

醋酸鈉 ($\text{CH}_3\text{COO Na}$)	400gm
尿素 [$\text{CO}(\text{NH}_2)_2$]	50gm
磷酸一鉀 (KH_2PO_4)	25gm
磷酸鎂 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	12.5gm
硫酸亞鐵 ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	1.25gm
水 (H_2O)	2000ml

五、室外培養結果

經實驗結果其生長速度如



第2圖 在室外三種不同培養液之生長速度

Fig. 2 The growth rate in three different media

討 論

著者等所分離之 *Chlorella Sp.* 原種在室內於3000~3500 Lux又通氣培養(含 CO_2 3~5%)之條件下採用田宮、柴田及 Lewis 三種不同培養基培養結果，使用田宮培養基對於生長速度較快，此三種不同之培養基雖田宮培養基及 Lewis 培養基含有機碳源，且田宮培養基除鐵外含有錳、鋅、鉬、硼、等微量元素對於綠藻之生長似具有促進效果，並在室外培養似乎較適應于本原種之生長。

誌謝：本實驗承蒙農復會漁業組陳組長同白，林技正書顏，袁技正柏偉，省水產試驗所鄧所長火土，劉分所長嘉剛之技術指導及鼓勵，著者等謹致謝忱。

參 考 文 獻

1. Gerloff, G. C., Fitzgerald, G. P., Skoog, F. : The Isolation, Purification and culture of Blue-green Algae. *Am. J. Botany*, 37, 216 (1950)
2. Pringsheim, E. G. : Method for the cultivation of algae; in "Manual of Phycology"(G. M. Smith, ed.), p. 347, Chronica Botanica Company, Waltham, Mass., U. S. A.
3. Allen, M. B. : *Plant Physiol.*, 30, 366 (1955)
4. Kratz, W. A., Myers, J. : *Am. J. Botany*, 42, 282 (1955)
5. Myers, J., Phillips, J. N., Graham, J. R. : *Plant Physiol.*, 26, 539 (1951)
6. Allen, M. B., Arnon, D. I. : *Plant Physiol.*, 30, 366 (1955)
7. Krauss, B. W. : *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 9, 207 (1958)
8. Hase, E., Mihara, S., Tamiya, H. : *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 6, 61 (1960)
9. Hase, E., Mihara, S., Tamiya, H. : *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 6, 68 (1960)
10. Nihei, T. : *J. Biochem.*, 44, 389 (1957)
11. Northcote, H., Goulding, K. J., Horne, R. W. : *Biochem. J.*, 70, 391 (1957)
12. Katoh, S. : *Plant & Cell Physiol.*, 1, 91 (1959)
13. 田宮 博 : 東大應微研シンポジウム, 1, 93 (1960)
14. 田宮 博 : 生化學27, 1 (1955)
15. 田宮 博, 森佑信次 : 東大微研シンポジウム, 1, 190 (1960)
16. 武智芳郎, クロレラの話
18. 田宮 博, 渡邊 篤 : 藻類實驗法

Isolation and Utilization of Economic Phytoplankton

1. The Effect of Three Different Media on the Growth of *Chlorella*

Pi-Ying Chung, Ying-Shin Liu, and Huei-Yau Tsai.

SMMARY

In order to investigate the growth rate and adaptability to different cultural media for *Chlorella sp.*, an experiment was carried out in the same experiment conditions. The original species of *Chlorella sp.* were obtained by isolation of the water of the experimental ponds of Chupei Fish Culture Station. In the process of isolation, the composition of used screening medium is shown in table 1, the inoculated plate culture and slant culture were incubated in an incubator equipped with 3000-3500 lux light intensity fluorescent lights. During the incubating period, the range of temperature is kept at 30-35° C. The second step was indoor cultivation. We selected Tamiya's medium, Makida's medium and Lewin's medium as shown in table 2, 3, 4, During the cultivation, small flat flask (100 ml.) and big flat flask (1000 ml.) were used, and in the condition of supplying both light source and carbon dioxide. The growth curves of *Chlorella sp.* in different media are shown in figure 1. The third step was outdoor mass production. The media used were the same as the second step. In this process, it was necessary to supply feeding solution, its composition is shown in table 5. The growth curves are shown in figure 2. In our experiment, *Chlorella sp.* grow better in Tamiya's medium, since, Tamiya's medium contains microelements; Mn, Mo, Zn, B, Cu, and those microelements affect the growth of *Chlorella sp.* significantly.