

光合菌大量培養技術與收成時機

黃世鈴、楊豐隆、黃麗玲

水產試驗所淡水繁養殖研究中心

前言

光合菌具有葉綠素或類胡蘿蔔素等色素，可以行光合作用合成自身所需的醣類或能量，是自然界的生產者，光合菌的生長環境和微細藻類類似，相關的生態因子可以作適當的調整，在強光照的環境下，光合菌自身的工廠利用簡單的鹽類來合成所需求的營養組成「葡萄糖和其它營養」，人工大量培養時，基本的培養條件包括水分、鹽類（簡單的鹽類、微量元素、維生素等）、緩衝溶液、生態因子（光照、溫度、pH、鹽度、溶氧量），茲分述如下。

人工大量培養時基本的培養條件

一、水分、鹽類與緩衝溶液

水分為光合菌合成體組成必要的元素，培養光合菌無論是固態培養或液態培養，培養環境中均含有大量的水分，沒有水分缺乏的問題，在此不再贅言。光合菌需要的營養鹽包括氮源、碳源等，氮源是合成胺氨酸的基本原料，碳源是合成碳水化合物（醣類）的基本原料，光合菌可以經光合作用合成胺氨酸和碳水化合物在 TCA 循環釋放能量，供

細菌生存生長和繁殖等需求。氮源和碳源是人工培養光合菌不可缺少的基本要素，在培養液中可以加入簡單的無機氮源和碳源，光合菌即可合成自身所需，但也可以在培養液中加入分子較小的胺氨酸和醣類等，光合菌可以直接利用達到快速成長的目的。在培養液中如果只加入簡單的無機氮源和碳源，因為營養條件較貧乏限制其它雜菌成長，可以讓光合菌有很好的環境；如加入分子較小的胺氨酸和醣類，培養液因含豐富的營養鹽，其它雜菌也可以快速增殖，如果控制不好會導致雜菌大量增殖，喧賓奪主覆蓋光合菌或抑制光合細菌的增殖而告培養失敗。如不小心污染病原菌時，病原菌會大量增殖，若未細察灑入池塘可能造成病害傳染，未蒙其利反受其害。光合菌培養時，培養基中可以加入微量鹽類，例如 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 K_2HPO_4 、 NaCl 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 CaCl_2 、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 等；磷酸鹽（如 K_2HPO_4 和 NaH_2PO_4 等）溶液可以形成緩衝溶液，提供光合菌穩定的培養環境，在緩衝溶液中 pH 穩定不會劇烈變動，光合菌或其它微生物可以穩定成長與活存。另，磷酸鹽同時也充當光合菌的營養鹽。

二、生態因子

光合菌具鞭毛，有運動性和趨光性，大量培養時應考慮的生態因子包括溫度、光照、鹽度、溶氧（微氧環境）與 pH 等。

（一）溫度

大量培養光合菌的適當水溫為 30—40℃，溫度愈高成長愈快。高溫下菌體較大，菌體中菌綠素和類胡蘿蔔素的含量會增加，培養液顏色會變得較紅或呈紫紅色。水溫會影響光合菌的新陳代謝率和增殖率，高水溫下，細菌的活力和增殖率均較佳。室外培養時採自然光照即可，室內則可使用燈泡加強光照並有增溫效果。溫度過低時，其成長與繁殖速率均緩慢，但保存菌種可以採用短光照時間和較低溫環境。

（二）光照

紫外線會殺死大部分的細菌，光合菌則具較強的忍受性。光合菌具菌綠素，在強日光下仰賴光合作用合成醣類，在大量培養時需要較強的光照，在室外養殖池以上層水體的成長繁殖較好，但開放的空間雜菌容易混入，雜菌往往長得比較快，所以培養液容易遭受污染。可利用透明的含蓋塑膠桶在自然光下培養，但具有晚上無光照的缺點；在室內可以用玻璃瓶、透明的含蓋塑膠桶或水族缸等進行大量培養，但在進行菌種純度的維持時，需要用含蓋的血清瓶才可。培養時照光可以使用 40 或 60 w 燈泡，舊式燈泡除供應強光外也會供給熱源，造成高水溫強光照的良好環境；LED 燈也有足夠的光照條件但沒有增溫效果。

（三）鹽度和溶氧

光合菌為廣鹽性細菌，從淡水至海水（鹽度 0—35 psu）都可成長，但大量培養時仍

以鹽度 10—15 psu 較好，亦即培養液鹽度與光合菌菌體的滲透壓一致時最佳。光合菌無須浪費能量在維持滲透壓的平衡上，10—15 psu 條件下培養，光合菌增殖快速，菌顏色會稍淡，但細菌活力佳分泌物酵素強，灑入海水池、淡水池或半淡鹹水池均可快速增殖。如果使用較高鹽度（30—35 psu）培養光合菌時，成長會較慢，菌體較老所以菌液顏色會較深，灑入半淡鹹水或海水池也會快速增殖，但如灑入淡水池可能因滲透壓的關係，細菌不易適應，不易達到快速增殖的目的。光合菌對於水中溶氧適應很廣，在高溶氧和厭氧條件下均可增殖，在高溶氧時，成長率較差，在微氧環境成長繁殖最好。在室外養殖池底部泥土厭氧層出現後，會導致厭氧性細菌大量增殖，反而因其它厭氧菌強勢競爭會影響光合菌的增殖；在微氧環境下如有足夠的光照和可利用的營養鹽，光合菌因旺盛光合作用產生足夠的能量，可以迅速大量增殖。以室外養殖池的環境而言，下層水體的微氧環境最好但光照不足，而在上層水體光照足但有溶氧太高的缺點。

（四）pH

實驗證據顯示，光合菌培養時培養液 pH 會隨著培養時間（菌體增加量）愈來愈高，光合菌最適的 pH 範圍為 7.0—8.3，在這個範圍內 pH 愈高，光合菌的成長和繁殖愈好，當 pH 低於 6.0 會嚴重抑制光合菌的生長和繁殖，培養液中光合菌會大量死亡，導致菌數劇烈降低。一般光合菌的無機培養液為中性溶液，pH 介於 6.8—7.3 之間，可以正常培養光合菌，培養液之 pH 在 8.3—8.5 時，菌量變動不大，無法繼續增長，pH > 8.5 會造成

光合菌死亡，導致培養液光合菌菌量劇烈降低。

光合菌培養時會遭遇的問題

光合菌也存在著種或品系的優勢性，寒帶地區有好低溫型的光合菌種類，熱帶地區有好高溫型的光合菌種類，臺灣也有本地種的光合菌種類，如能篩選活力好的本地光合菌菌種，在培養時可迅速擴量，使用後在池塘中因適應良好，會在本地生態環境中快速增殖，生態菌相穩定，達到快速淨化水質的目標；如果選擇不佳的品系，可能因為增殖慢和生態適應不良等相關因素，使用後無法在池塘中造成穩定的生態菌相，無法達到光合菌應用的目標，在環境中如活力不佳也無法達到淨化水質的目標。

防止品系污染和劣化

光合菌容易和共生菌互利共生，本來就容易吸引某些細菌，光合菌可以在貧營養鹽的環境中依賴光合作用製造本身所需的營養，也會分解含氮有機物供其它微生物利用，所以容易遭受其它微生物的污染或共生。污染的微生物增殖速率往往比光合菌快，光合菌被抑制後導致大量培養失敗。除了微生物實驗室專業人員以無菌操作的技術在培養皿繼代培養，可以輕易保持純種外，一般人員由於缺乏專業知識和技術在連續轉菌培養過程中，容易遭受共生菌或其它細菌等污染，所以在連續培養過程中，如果發現培養基顏色不對或光合菌量不足，就要從光

合菌供應處重新取得菌種再接種，才是大量培養優良光合菌最好的方式。

大家都知道，養殖魚類如果基因庫太小(即種魚數量不夠)，長期培養後常常有品系劣化的現象，包括繁殖量變少、體型變小變弱、成長不佳、病害率增加、畸型率增加等；光合菌也有相同的情形，出現增殖速率變慢、增殖量變少(世代交替時間變長)、菌體變小變弱、鞭毛或纖毛異常、光合作用物質合成率變弱、營養物質利用率變弱及雜菌逐漸變得優勢等問題，所以在連續培養過程中，須隨時可以從供應處重新取得菌種再接種，才能保持最佳的狀態。

培養基中 pH 變化的省思

大量培養光合菌，可以自行調整培養基的成分製作簡易培養基，進行碳水化合物和胺基酸等成分調整時，應以大量增殖為目標，需適度添加礦物鹽溶液，培養液中具備較完整的成分才可以將光合菌培養得很好，相關的培養條件包括培養溫度為 35℃，培養期間的 pH 值應調整為 6.0—8.3，才能將光合菌維持在細菌增殖的高峰，讓細菌量很快達到預期的濃度。

開始培養光合菌初期，細菌會快速利用碳水化合物，培養液 pH 會迅速降低，細菌濃度增加後，光合菌會迅速利用胺基酸導致培養液中 pH 急速升高，甚至超過 pH 9.0(如表)，如果沒有適當調整 pH，細菌增殖被抑制，導致菌量急遽減少，需要以 2N HCl 調整 pH 值。如表所示，光合菌 (*R. sphaeroides*) 大量培養初始濃度為 4.1×10^9 CFU/ml，24 h

細菌濃度為 1.5×10^{10} CFU/ml, 48 h 為 2.25×10^{10} CFU/ml, 72 h 為 2.25×10^{10} CFU/ml, *R. sphaeroides* 培養初期 (0–2 h) pH 會稍微降低為 7.3–6.2, 隨著培養時間增加, pH 會快速升高, 培養 24–30 h 後, 培養液 pH 升高至 8.5–8.9, 導致細菌增殖受到抑制, 從 6 h–24 h–30 h 細菌數量由 1.85×10^{10} CFU/ml 降為 1.50×10^{10} CFU/ml 再降低為 1.35×10^{10} CFU/ml (如表), 適時以 2N HCl 將培養液 pH 調整為 8.3–6.0 後, 48 h 細菌濃度快速增加為 2.25×10^{10} CFU/ml, 72–96 h 細菌濃度為 2.75×10^{10} CFU/ml, 從開始培養到 48 h, 細菌濃度增加 5.5 倍, 從開始培養到 72–96 h, 細菌濃度增加 6.7 倍。

4 種光合菌在發酵槽中大量培養的情形

時間 (h)	濃度 (10^{10} CFU/ml)			
	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
0	0.41	0.25	0.22	0.25
1	0.40	0.50	0.31	1.00
2	0.41	0.70 [Ⓢ]	0.80	1.25
3	1.45	0.80 [Ⓢ]	1.1	1.25
4	1.25	0.80 [Ⓢ]	1.1	1.70
5	1.85	0.80 [Ⓢ]	1.4	1.70
6	1.85	1.0 [Ⓢ]	1.35	2.15
24	1.5 [※]	2.0 [Ⓢ]	2.0	1.70 [Ⓢ]
30	1.35 [※]	—	2.12	2.05
48	2.25	1.5	1.57	2.00
56	2.20	1.95	2.52	2.30
72	2.25	1.80	2.91	2.70
80	2.75	1.2	2.80	3.00
96	2.75	1.35	2.80	3.10

※ pH=8.5-8.9 ; [Ⓢ] pH=5.2-5.6 ; [Ⓢ] pH=5.1-5.53

採收光合菌

培養光合菌時應適時採收細菌與添加新的培養液, 根據細菌生長曲線的位置決定細菌採收量, 採收細菌係直接取走培養液後並添加新培養液, 新培養液加入的效應包括調整 pH、加入新營養物質、更大成長空間、拿走或稀釋光合菌的分泌物和死亡菌體等, 理想的光合菌培養液的菌量應介於 10^8 – 10^{10} CFU/ml 才實施採收, 可以得到最大的生產量, 光合菌繁殖可以維持在生長曲線的對數期和穩定期前期, 可以得到最大的菌體生產量, 而且菌體的活力也最佳, 進入池塘後可以得到最大的效應; 持續培養時採收量需視培養液的狀況而定, 如細菌生長曲線在對數期後期和穩定期前期時可以採收 6/10–7/10 培養液, 細菌生長曲線在對數期前期和穩定期後期時可以採收 3/10–5/10 培養液, 細菌生長曲線在停滯期和衰敗期時不要採菌, 因培養液中光合菌的菌數太低且以老菌為大宗, 採收變得沒有意義, 應以增菌為主, 待菌量提高至 10^9 – 10^{10} CFU/ml 再行持續採菌培養才有意義。

將光合菌維持在對數成長期和穩定期前段, 此階段光合菌活力佳, 繁殖與成長速率最好, 光合菌採收後加入新培養液可以立即快速增殖達到採收所需的菌數濃度, 採收光合菌的時間如果在穩定期中後段, 加入新培養基後, 尚可很快回復快速成長速率, 採收時間如果已經進入衰敗期, 光合菌需要經過停滯期和對數期前期, 才會回到旺盛的繁殖成長期對數期中後期, 回復到採收應有的濃度所需的時間較長, 會打斷快速採收的頻率。



光合菌適用在水產養殖場，在各種不同養殖魚蝦貝類養殖場均可以得到很好的利益 (A：養殖場；B：鰻線或幼鰻養殖場；C：成魚養殖場；D：小魚養殖池)



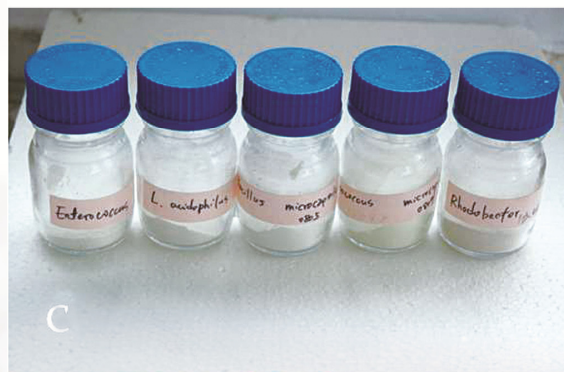
光合菌適用在農業作物上，在不同農作物種植均可以得到很好的利益，用液肥的方式或用基肥的方式都可以，或以醱酵堆肥增肥的方式，可以稀釋噴灑葉，也可以直接加入水中灌溉，光合菌對土壤有改善的功效，也可以分解其它有機物供作物使用，當然還具有平衡土壤肥分的功能 (A：黃瓜；B：水稻；C：青蔥)



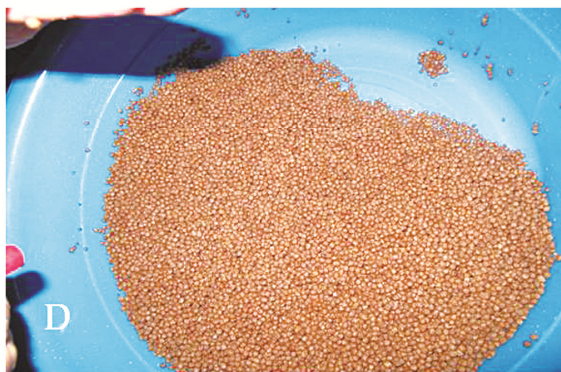
A



B



C



D

光合菌大量培養後可以直接稀釋潑灑到水產養殖場中，也可以用口投的方式滲入飼料投與，以增強魚體消化能力、成長、健康和增強魚體免疫力 (A：以 5 公升水桶在室外或室內大量培養；B：以 80 公升水族缸在室內照光大量培養；C：光合菌大量培養後，收集菌體濃縮經微粒包覆磨粉，準備加入飼料中口投；D：將光合菌以微粒包覆方式加入飼料中)