

中華民國 第 49 屆中小學科學展覽會

作品說明書

高中組 生物（生命科學）科

040709

「藻」知如此——萊茵衣藻之最佳減碳生長環境

學校名稱：高雄市立高雄女子高級中學

作者： 高二 王瑜榛 高二 林美瑤 高二 張以潔 高二 鄭惠欣	指導老師： 梁高賓
---	------------------

關鍵詞：萊茵衣藻、生長環境、減碳

『藻』知如此

一 萊茵衣藻之最佳減碳生長環境

摘要

鑑於溫室效應增強，藻類光合作用為減碳可行之道。本研究以萊茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 為研究材料，期望了解：此藻種最佳生長環境、生物量變化與 CO₂ 吸收、對不同型式碳源的偏好、初始密度的改變對其生長影響和以自然水體大量繁殖之可行性，期使衣藻生長達到最高速率，以吸收最大量 CO₂。由實驗結果可知衣藻最大 OD 值出現在 25°C、有震盪的中性環境，以及用 CO₂ 為碳源的環境，而生長曲線的最大斜率則出現在初始 OD₇₅₀ = 0.3 unit 的處理下。衣藻能夠藉光合作用形成中性脂（高經濟價值脂質）；若用此藻種減碳，滿一標準游泳池，平均每天可減少 1 公噸 CO₂。

壹、研究動機

溫室效應造成地球處境正每況愈下。2009 年初，澳洲南部因為高溫氣候導致野火竄燒^[1]，同一大陸北部卻因熱帶豪雨受水災之苦^[2]。近年來，糧荒與油荒的問題更是迅速引爆人們心中的不安。

2008 年台灣微藻科技研討會中，李宏台博士所主講的專題^[3]提到生質汽柴油的原料不管是玉米或黃豆都是在和人民搶食物，而利用藻類得到生質柴油是較適當的方式，因其佔地面積小且生長快速。產油尚為其次，吸引我們的是：它可以吸收「CO₂」。

萊茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)是既可吸收 CO₂ 又能成生質能源的藻種之一。以它進行一連串的研究，最終期望能藉由衣藻建構一套可快速吸收 CO₂ 且具其他實用附加價值的產業。

貳、前言

據美國能源部能源資訊署預估^[4]，石油還可用 40 年；天然氣 60 年；煤炭 200 年；鈾 70 多年，人類消耗能源時，CO₂ 排放也大量增加，導致全球暖化。為了減碳，生質能源研究與利用極具發展性。而生質能中，種植農作物生產生質酒精或生質柴油，因為耕地有限，均不適台灣。相對的，地球的生物資源中，藻類是最具開發潛力之物種，尤其近期全球暖化日益嚴重的過程中，常可看到關於海洋藻華的報導^[5]。

藻類是生物量龐大且古老的生產者之一，生長過程消耗大量 CO₂，幫助環境中碳的減少。本研究以藻類做為實驗材料，期望發展多樣實用潛能。

萊茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 是一種綠藻屬單細胞藻類。綠藻屬藻類可在淡水、海水甚至土壤中發現，廣泛的分布在地球上^[6]，也是近期許多大學投入研究的材料。本藻種衣藻能有效地減少空氣中的碳，產生油脂，實用價值高。本研究使用的藻種是由中山大學海洋植物研究室李澤民教授所提供。此藻種是單細胞真核鞭毛藻類，細胞成卵形，有葉綠體，具兩條鞭毛，能自由游動^[7]，在錐形瓶中，放置數分鐘後會沉澱，常出現於有機質豐富的淡水或半鹹水中。在細胞中以油脂的形式儲存能量，在逆境中會產氫。此藻是研究多種生命活動(如光合作用、鞭毛組裝、趨光性和生理節律等)的模式生物，素有「光合酵母」之稱^[8]。

參考中山大學所提供的方法，以 HS medium 為培養基^[9]，50 微愛因斯坦 ($\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$) 光照，在震盪下培養。針對衣藻找出最適生長的溫度、pH 值、族群密度，並以醋酸鈉、碳酸氫鈉、葡萄糖、CO₂、空氣等為不同碳源，尋找最佳生長條件。

參、研究器材與方法

一、儀器材料：

滅菌器、恆溫生長箱、分光光度計(U2001)、細胞計數器、HS medium(附錄 1.)等。

二、方法：

(一)、實驗操作：

1. 最適生長環境條件：

(1)光照強度：

取 $\Phi 3\text{cm}$ ，長 70cm 玻璃管，注入培養液與藻液。調整光照強度最高 $1200\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ，此數值為正午開闊空間的光強度。

(2)溫度與震盪：

接種 $\text{OD}_{750}=0.1$ unit 藻液，進行 15°C 、 20°C 、 25°C 、 30°C 、 40°C 的恆溫培養，分別用震盪器及不用震盪培養器培養，照光 $50\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ，每條件 3 重複。

(3)初始 pH 值的影響：

以磷酸緩衝液、強酸(HCl)和強鹼(NaOH)，調配 pH5、6、7、8， 20°C 恆溫培養。

2. 不同碳源對衣藻的影響：

(1)醋酸鈉(CH_3COONa)：

接種藻液到含醋酸鈉培養液。令每公升 2.0 克含水醋酸鈉($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)培養液為 1 倍處理。另設置 10 倍、20 倍和 40 倍的培養液。以 25°C 恆溫震盪培養。

(2)葡萄糖($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)：

以醋酸鈉為基準，使加入碳元素總量相同。

$$\frac{\text{醋酸鈉重量}}{\text{醋酸鈉分子量}} \times 2(\text{每分子醋酸鈉碳數}) = \frac{\text{欲加入碳源重量 (欲知)}}{\text{該碳源分子量 (已知)}} \times \text{該碳源碳數 (已知)}$$

配製 1 倍、10 倍、20 倍、40 倍的葡萄糖培養液。

(3)碳酸氫鈉(NaHCO_3)：

配製 1 倍、10 倍、20 倍、40 倍的碳酸氫鈉培養液。

(4) CO_2 與空氣：

以 CO_2 分壓為操作變因，設定 4 種氣壓，0.2 atm、0.5 atm、1 atm、2 atm。以乾冰調整 CO_2 分壓。再增加以空氣中 CO_2 為碳源的培養方式。

3. 生物量變化：

以 0.45μ 過濾藻液，計算乾重與 OD 值關係，了解生物質量與二氧化碳吸收關聯。

4. 以自然水體培養之可行性：

取用周圍生態環境之淡水與海水，進行藻類培養，了解以自然水體培養之可行性。

(二)、基本測量紀錄：

1. 外觀觀察：觀察藻液顏色的變化、特色。

2. 吸光度值 (OD 值) 測量：以分光光度計測量波長為 750nm 的吸光度值。

3. 酸鹼值測量：以 pH meter 測量。

4. 細胞計數與型態觀察：以細胞計數器於顯微鏡下觀察。

5. 螢光染色：在中山大學海洋植物研究室協助下進行尼羅紅螢光染色 (附錄 2.)。

肆、研究結果

一、最適生長環境

(一)、光照強度

爲了找出最適合衣藻生長的光強度(以光子數代表)，架設同時擁有各種光強度刺激的裝置(圖 1.)。每隔五公分標記，劃分成 14 段，各段最大光子數如下：

代號	區域範圍	最大光子數	代號	區域範圍	最大光子數
A	0~5 公分	1213	H	35~40 公分	20
B	5~10 公分	540	I	40~45 公分	15
C	10~15 公分	256	J	45~50 公分	12
D	15~20 公分	113	K	50~55 公分	9
E	20~25 公分	62	L	55~60 公分	8
F	25~30 公分	38	M	60~65 公分	6
G	30~35 公分	27	N	65~70 公分	5

表 1.: 玻璃管分區情形，以及該區最大光子數值。光子數的單位以微愛因斯坦($\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$)表示。

1 愛因斯坦爲 1 莫耳(亞弗加厥數)光子數量。

衣藻是可游動的藻類，會聚集在適合生長位置。12 小時培養後，觀察到 A~E 區有較大氣泡存在，F 區以下有零星氣泡(圖 2.)。目測細胞聚集在 C 區、E~G 區，其中光強度約 $50\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ 的位置聚集明顯(圖 3.)。36 小時後，整條玻璃管都呈現綠色(圖 4.)。

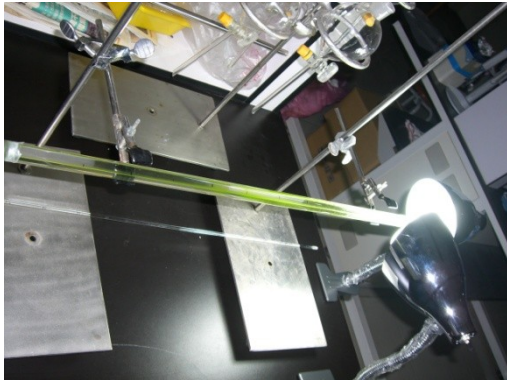


圖 1.完整裝置照片。

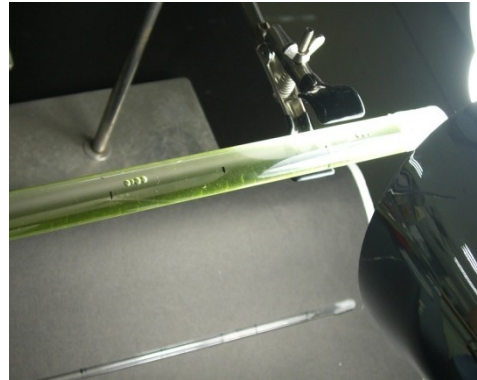


圖 2.A、C 區出現氣泡

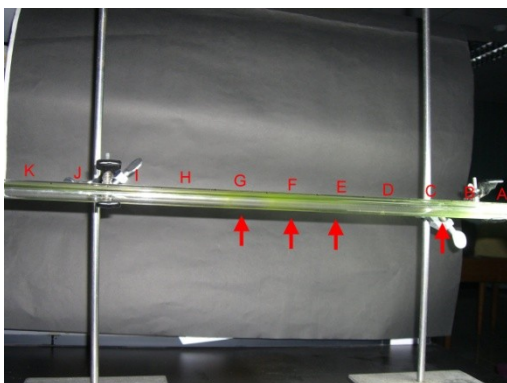


圖 3. 12 小時後

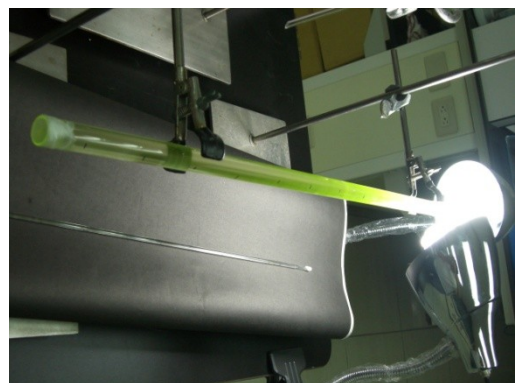


圖 4. 36 小時後

(二)、溫度與震盪實驗

在實驗的觀察上，無震盪的衣藻會聚集在錐形瓶底部特定部位(圖 5.)。無震盪時，各溫度條件下衣藻生長情形不佳。震盪下，各溫度的生長狀況較佳。但 40°C 條件出現結塊現象(圖 6.)，細胞計數時也看到聚集成團的細胞(圖 7.)。

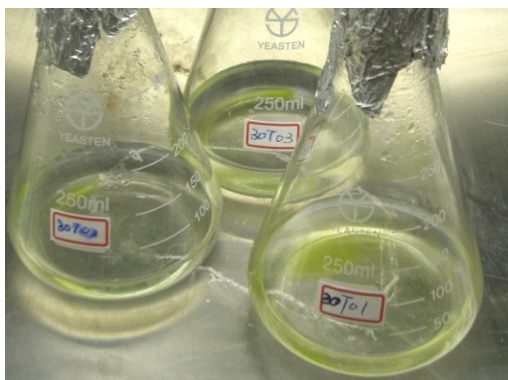


圖 5. 無震盪時衣藻聚集在特定角落

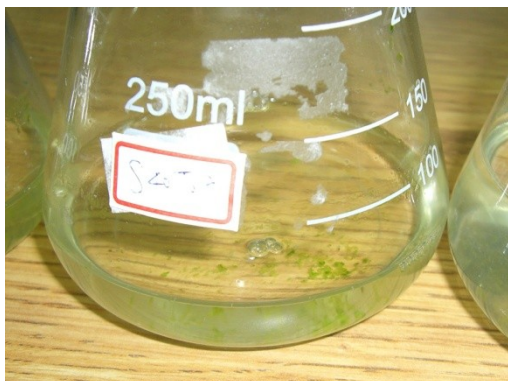


圖 6. 40°C 有震盪下，衣藻凝結情形

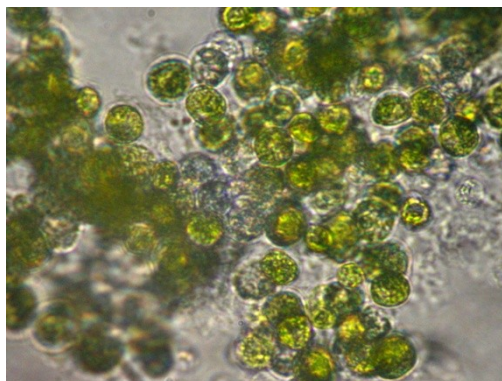


圖 7. 40°C 有震盪下，顯微鏡觀察，衣藻聚集情形

實驗過程中，pH 值變化不明顯，只有微幅偏酸。各種處理 OD 值依時間變化整理於下圖(圖 8.)。

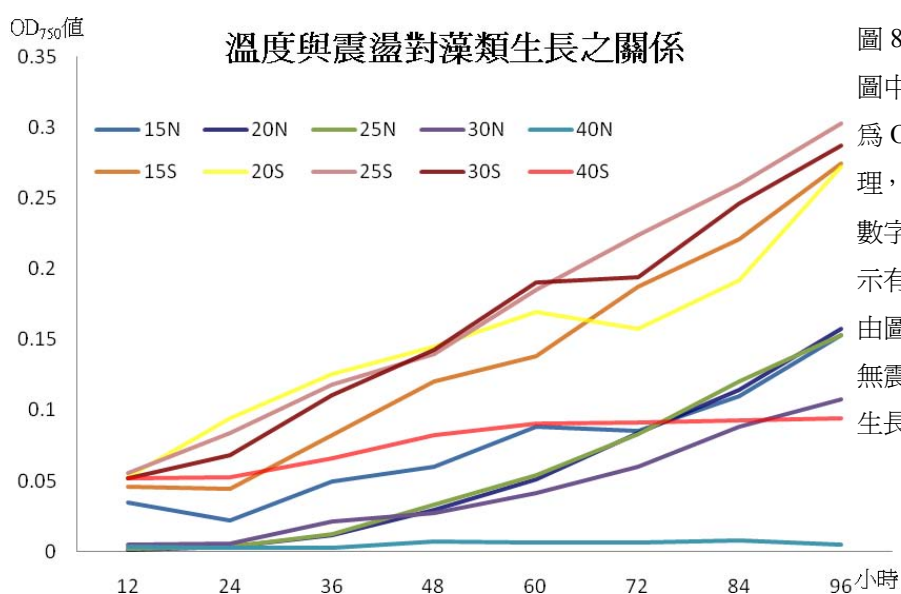


圖 8. 溫度與震盪對藻類生長之關係
圖中橫軸為時間以小時為單位；縱軸為 OD 值。暖色系線條為有震盪處理，冷色系為無震盪。下方圖說標示：數字代表溫度，N 表示無震盪，S 表示有震盪。
由圖中可看出有震盪 OD 值增加會比無震盪好，而不論震盪與否，40°C 的生長相較其他溫度表現都較差。

根據最高 OD 值繪製圖表(圖 9.)，並以 JMP5.0.1 軟體進行變異數分析(ANOVA)，得知震盪與溫度的交互關係不顯著。不考慮交互關係，10 組處理間仍存在顯著差異 ($p < 0.0001$)。針對溫度和震盪與否進行比較：

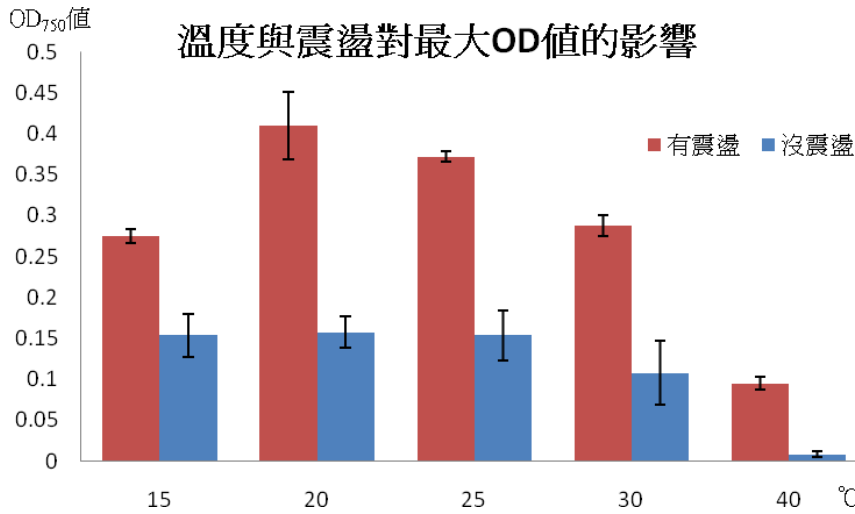


圖 9. 溫度與震盪對最大 OD 值的影響。橫軸是 5 種溫度下，震盪與無震盪的結果。縱軸是 OD 值。圖中在每組平均值上，加上±1 標準差的標示。

1. 溫度對衣藻 OD 值變化的影響：

以溫度為變因的樣品之間存在顯著差異 ($p < 0.0001$)。進行兩兩比較以 JMP5.0.1 軟體的 Tukey test 分析此差異存在的情形，40°C 處理與其他各組都有顯著差異，而各組間無法區隔。由圖 9. 可看出不論震盪有無，15~30°C 間沒有顯著差異，而 40°C 有顯著差異。25°C 20°C 15°C 30°C 40°C。

2. 震盪與否對衣藻 OD 值變化的影響：

有震盪的效果顯著高於無震盪 ($p < 0.0001$)。各種溫度下有震盪均比無震盪好。根據此結果，以下實驗皆用 25°C 且有震盪來培養。

(三)、環境初始 pH 值對衣藻生長的影響

培養過程中，pH8 的藻液顏色最淡，pH5、6、7 顏色較深。OD 值變化的測量(圖 10.)，也獲得相似的結果。

取最高 OD 值進行分析比較，各種初始 pH 值處理間存在顯著差異 ($p = 0.0053$)。兩兩分析的結果，pH7 比 pH5、pH8 的處理要好，而且之間的差異是顯著的。pH7 與 pH6 之間差異不顯著。而 pH6 與 pH5, pH8 之間也不顯著。pH7 pH6 pH5 pH8。

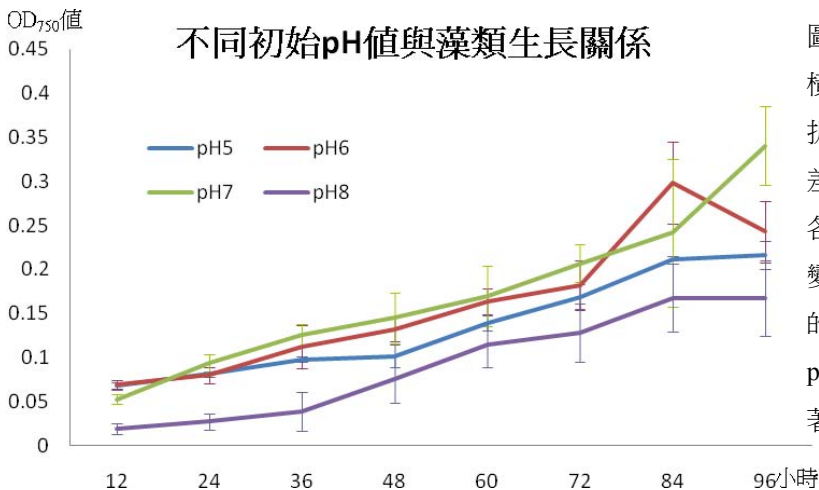


圖 10. 不同初始 pH 值與藻類生長關係：橫軸為時間，以小時為單位。縱軸為 OD 值。折線數據來自 3 重複的平均，並附上±1 標準差。pH6 的組在第三天時 OD 值開始超越其他各組，但第四天又降下來。其他各組，OD 值變化都是不斷增加，並沒有出現低於之前紀錄的情形。從圖中可以看出 pH7 長最好，pH6 與 pH7 之間的最高值差異不大，但是與 pH8 有顯著的差異。pH8 的生長一直都低於其他的處理。

二、不同碳源的影響

希望了解不同碳源對衣藻生長的影響，並找出最適合且經濟環保的碳源。

(一)、醋酸鈉

只有 1X 與 10X 環境下有生長(圖 11.)。1X 處理下，細胞中央有明顯澱粉粒(圖 12.)。10X 處理下，大部分細胞處於分裂中狀態^[10](圖 13.)。40X 處理下，部分細胞破裂。培養過程中，藻液 pH 值會逐漸增加，甚至超過 pH8，尤其是 1X 的處理。



圖 11. 醋酸鈉培養下藻液顏色。

左到右為 1X、10X、20X、40X 的處理。

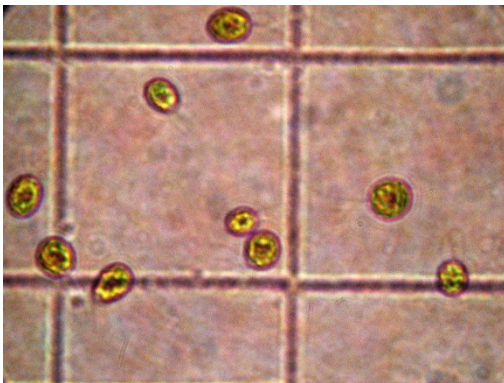


圖 12. 1X 醋酸鈉培養一天。細胞中央澱粉粒明顯。背景中格線為細胞計數器，每邊長為 50 μ m。

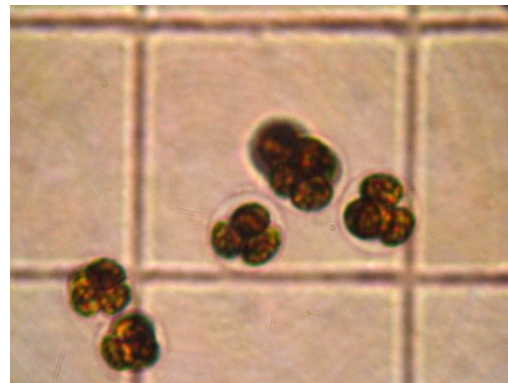


圖 13. 10X 醋酸鈉培養一天。背景格線為細胞計數器，每邊長為 50 μ m。

OD 值變化(圖 14.)，40X, 20X 處理下，其 OD 值始終接近 0，細胞死亡。1X 處理下，在第 2 天達到最高峰。取最大 OD 值進行分析，醋酸鈉濃度對衣藻生長存在顯著差異 ($p < 0.0001$)。兩兩比較結果：1X 10X 20X 40X。

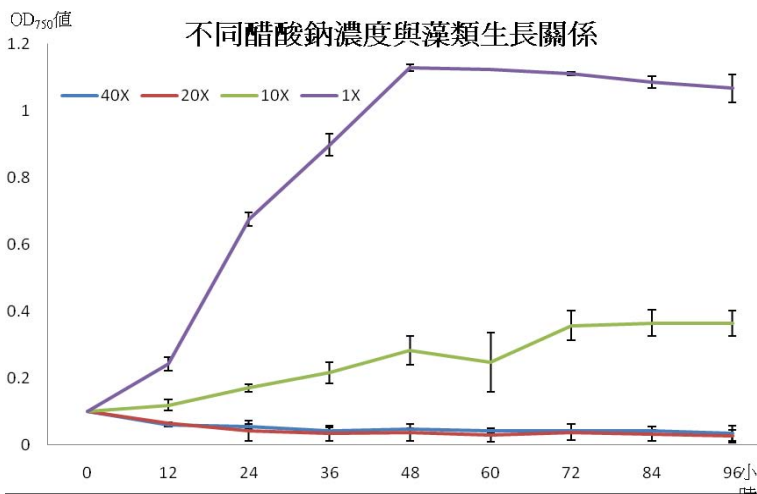


圖 14. 不同醋酸鈉濃度與藻類生長關係。附上 ± 1 標準差。

1X 濃度生長狀況最好，第 2 天就到達最高值，然後漸漸下降。10X 的生長慢，逐漸增加，明顯低於 1X 處理。20X、40X 的處理，曲線是往下走，所以有細胞死亡，導致 OD 值往下降。

(一)、 葡萄糖

滅菌後呈焦糖色(圖 15.)，藻液黃綠色。1X 的細胞少但較大，澱粉粒明顯(圖 16.)。



圖 15. 葡萄糖培養基滅菌後的顏色，由左至右分別為 40X、20X、10X、1X。

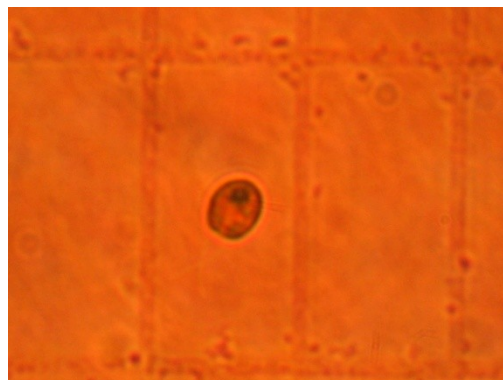


圖 16. 1X 處理下的衣藻，細胞中央黑色澱粉粒明顯。背景中格線為細胞計數器，每邊長為 50 μ m

OD 值變化(圖 17.)發現衣藻生長不佳。取最大 OD 值進行分析，處理間存在顯著差異($p=0.0061$)。兩兩比較，差異存在於 1X 與 40X 之間。1X 10X 20X 40X。

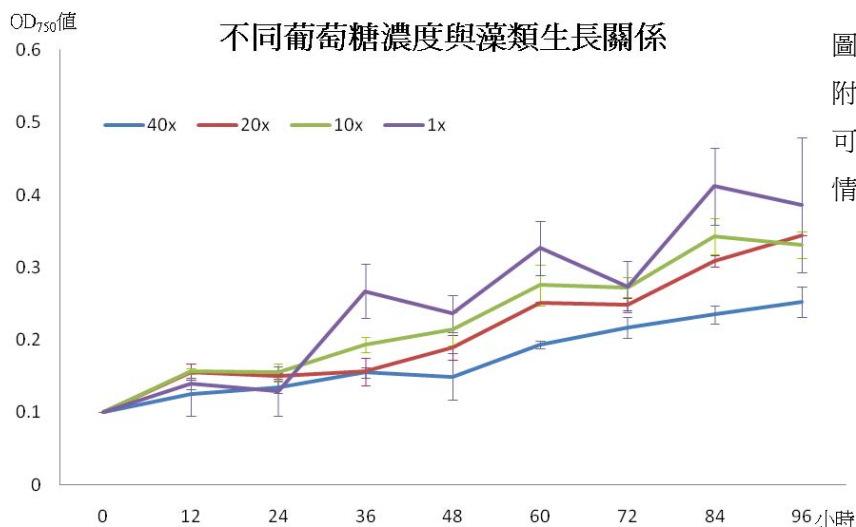


圖 17. 不同葡萄糖濃度與藻類生長關係。附上 ± 1 標準差。

可發現藻類在生長上，OD 值有上下變動的情形，而 1X 的折線圖與 40X 有明顯差異。

(二)、 碳酸氫鈉

CO₂ 溶于水成碳酸，但與空氣成平衡，無法加入純碳酸，以碳酸氫鈉替代。加碳酸氫鈉後，太鹼無法生長。以強酸校正，仍生長不佳(圖 18.)，僅 1X 有些微生長(圖 19.)。



圖 18.碳酸氫鈉的處理
由左至右為 1X、10X、20X、40X 處理。



圖 19. 1X 處理的 3 個重複，有些微顏色的改變。

60 小時後，所有細胞死亡，結束實驗。不同濃度處理存在顯著差異($p=0.0057$)。兩兩比較，差異存在於 1X 與其他各組。從 OD 值變化圖中(圖 20.)發現，只有 1X 處理高於初始 OD₇₅₀。1X 10X 40X 20X。由此實驗結果看來，碳酸氫鈉並非合適碳源。

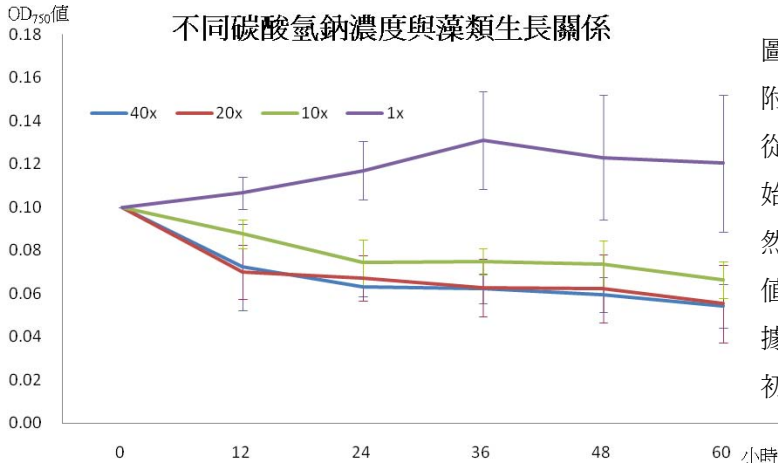


圖 20. 不同碳酸氫鈉濃度與藻類生長關係。附上±1 標準差。

從圖中可發現，除了 1X 處理外，其餘處理開始衣藻就逐漸死亡，因此 OD 值一路下降。然而即使是 1X 的處理，在 36 小時以後 OD 值也開始下降，檢視此處理中各重複的數據，除了下降外，也有一瓶樣本已經低於最初 OD 值。

(三)、二氧化碳與空氣

由於無法定量液體中 CO₂ 量，曾以純 CO₂ 對培養基進行曝氣 5 分鐘為實驗條件(圖 21.)。其一經過長時間培養後生長良好，但是其他樣本變黃、死亡。無法確定 CO₂ 效果，也無法定量加入 CO₂ 量。也曾以鋼瓶連續打入 CO₂ (圖 22.)，但無法維持壓力與速度。衣藻有生長但變黃。而以打氣機打入空氣(圖 23.)，生長良好。直接供給純 CO₂ 可能不是好的方法，也無法定量。最後選擇以 CO₂ 分壓為變因進行培養(圖 24.)，與以空氣培養。藻液顏色顯示 0.5atm、1atm、2atm 與空氣培養生長明顯，但 2atm 下無生長(圖 25.)。

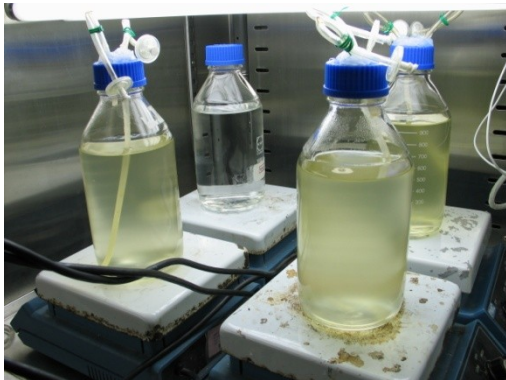


圖 21. 純二氧化碳曝氣 5 分鐘。



圖 22. 打入純二氧化碳。 圖 23. 打入空氣 1.5L/min。



圖 24. 控制二氧化碳分壓的培養方式。



圖 25. 培養 4 天後藻液顏色。由右至左分別為：0.2atm、0.5atm、1atm、2atm、空氣

培養結果衣藻細胞較大，沉澱情形明顯。OD 值變化中，只有 2atm 沒有生長 (圖 26.)。供給二氧化碳使得藻液的 pH 值持續偏酸，生長越好偏酸情形越明顯，尤其 0.2atm，甚至接近 pH5。而 2atm 的處理在一開始就很酸，但衣藻沒有生長，pH 值也沒有變化。

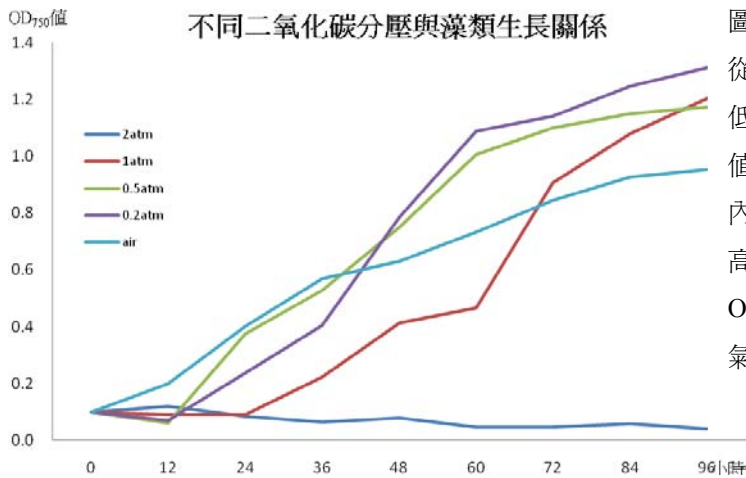


圖 26. 二氧化碳分壓與空氣培養下生長情形。從圖中可觀察到，除了 2atm 的培養 OD 值降至低於初始數值外，其餘處理均有生長，而且 OD 值的數值會高於以 HS medium 培養的情形。4 天內出現在 0.2atm 最高的 OD₇₅₀=1.312，0.5atm 最高 OD₇₅₀=1.201 都比醋酸鈉培養還高。1atm 最高 OD₇₅₀=1.173。空氣中二氧化碳約 0.038%^[11]，空氣處理四天最高 OD₇₅₀=0.952。

(四)、不同碳源差異比較

選取各碳源處理中最佳生長進行比較。碳源間有顯著差異(p<0.0001)。兩兩比較結果：CO₂ 醋酸鈉 空氣 葡萄糖 碳酸氫鈉，以直方圖(圖 27.)呈現。

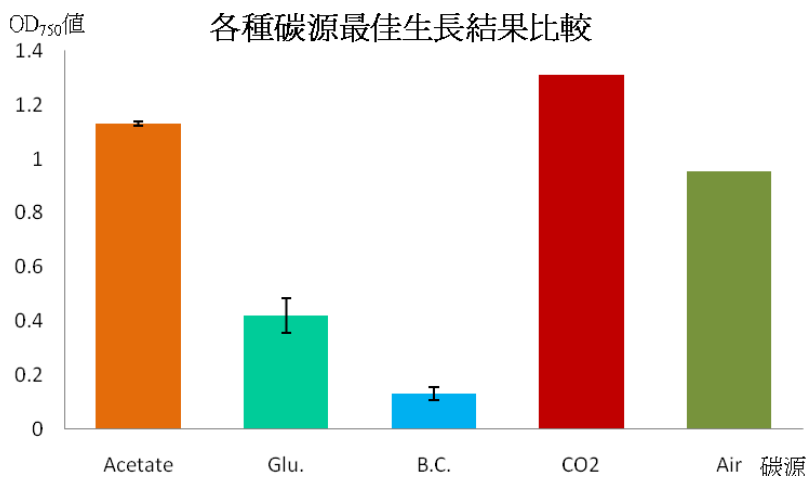


圖 27. 不同碳源間比較
依各組的平均 OD 值與±1 標準差繪製。其中：
Acetate: 醋酸鈉； Glu.: 葡萄糖；
B.C.: 碳酸氫鈉； CO₂: 二氧化碳；
Air: 空氣。

三、螢光染色

萊茵衣藻一種可產生脂質及氫氣的藻種^[10]，本實驗比較各種碳源與脂質產生的關係。

螢光顯微鏡尼羅紅脂質染色結果：

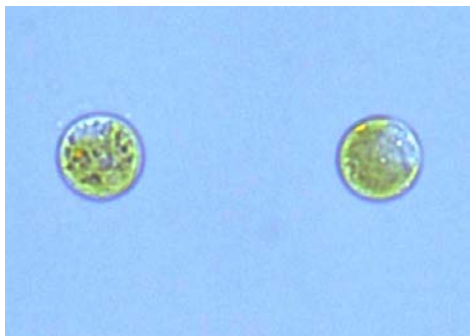


圖 28. 以醋酸鈉培養。白光下顯微鏡放大 400X，細胞旁橘色點為衣藻的眼點。

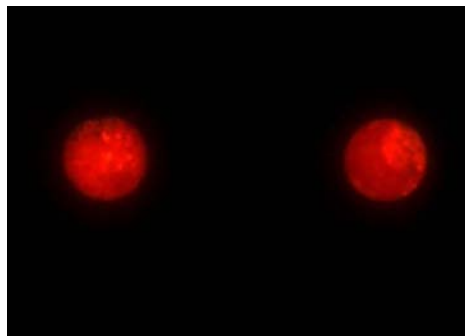


圖 29. 與圖 28.相同視野下的螢光染色，黃色亮點是油滴聚集的位置。整顆細胞會呈現暗橙色是因為細胞膜。

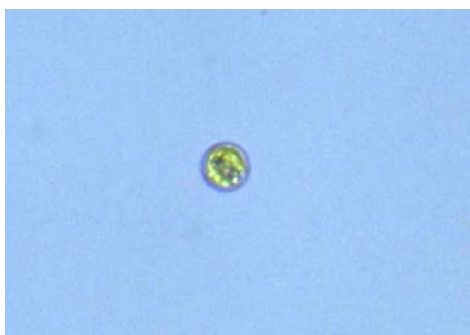


圖 30. 以葡萄糖培養。白光，400X。細胞偏小。



圖 31. 與圖 30.相同視野下的螢光染色，可看到油滴。

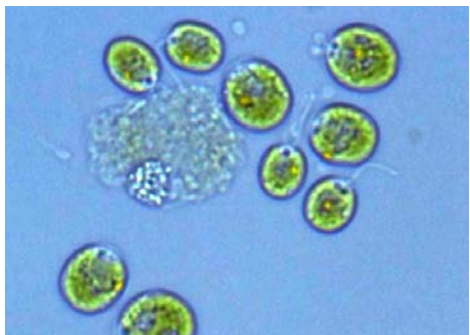


圖 32. 以二氧化碳培養。白光，400X，可觀察到明顯的橘色眼點與細胞前端的鞭毛。

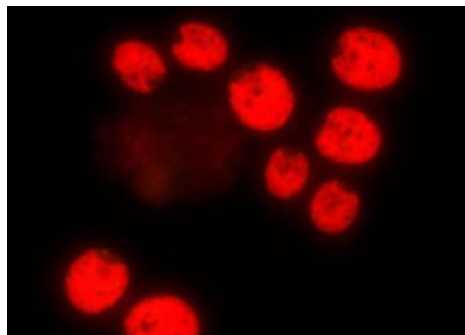


圖 33. 與圖 32.相同視野下的螢光染色，在拍攝時螢光亮度較其他高，無法判斷是否有油滴存在。



圖 34. 以空氣培養。白光，400X。



圖 35. 與圖 32.相同視野下的螢光染色，可看見油滴。

四、初始密度對衣藻生長的影響

探討衣藻移入新環境時，最初移入的數量多寡是否會影響到生物適應期。初始密度以 $OD_{750}=0.1$ 為基準，再增加 0.3、0.5、0.7 的處理。OD 值的變化 (圖 36.)。

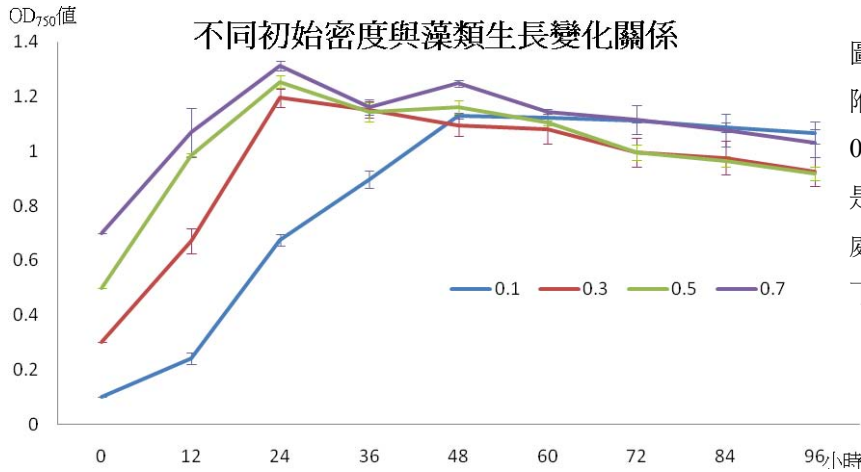


圖 36. 不同初始密度與藻類生長變化關係。附上 ± 1 標準差。

0.1 的處理在 48 小時才到達最高 OD 值，但是接下來減少的幅度較小。0.3、0.5、0.7 的處理在 24 小時就到達最高，而且接下來有下降趨勢。

理論上，環境相同，環境的負荷力應該相同，所以最大 OD 值應該無顯著差異，但是挑選最高 OD 值檢測，處理間差異顯著 ($p < 0.0001$)。兩兩比較，各處理間可明顯區分 (圖 37.)。

0.7 0.5 0.3 0.1。

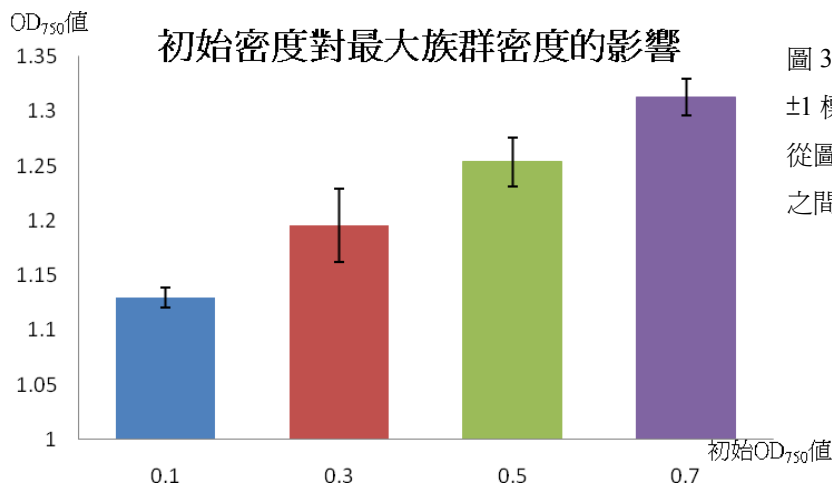


圖 37. 初始密度對最大族群密度的影響。 ± 1 標準差。

從圖中可看出成長到最高族群量時，各組之間是有差異的。

初始密度族群之成長速率的影響 (圖 38.)，密度 0.3 成長速率較快，其次為 0.5、0.7。在分析上，各組也有顯著差異 ($p < 0.0001$)。 0.3 0.5 0.7 0.1。

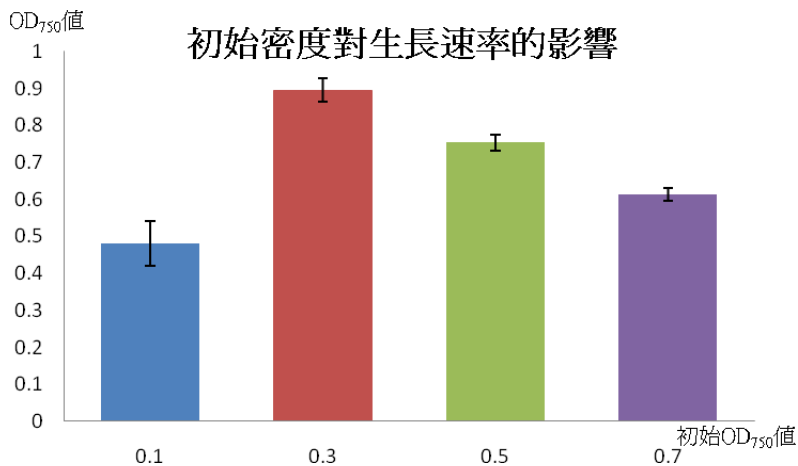


圖 38. 初始密度對生長率的影響。 ± 1 標準差。可以看出，0.3 的處理，雖然在最高 OD 值上比 0.7、0.5 來的低，但成長速度最快。其次 0.5、0.7，最後是 0.1。

五、生物量增加：

實驗中，以 OD_{750} 為比較基準，因為光合色素在 OD_{750} 不吸光，但藻體在此波長吸光值與細胞數、細胞大小有線性關係，因此以其為生長指標。實際計算，以 $0.45\mu\text{m}$ 濾膜，過濾 $OD_{750}=0.864$ 藻液 20mL，烘乾，獲得乾重淨增加 0.06g。算得每毫升每增加 OD_{750} 值 1，相當於增加 $3.47 \times 10^{-3}\text{g}$ 藻。依 CO_2 培養結果，初始 OD_{750} 值為 0.1，最終 OD 值均高於 1.1，若培養 1L 則增加 3.47g 乾重。因高中實驗室缺乏灰化、質譜分析 C 元素含量能力。參考藻類生理生態學書^[12]中提供藻類乾重中 C 元素含量，每公克乾重中含 C 元素 140,000~460,000 μg 。以 CO_2 培養這些 C 都將來自 CO_2 ，以最低數值估算，增加 3.47g 乾重約需吸收 1.78g CO_2 。如果能大規模培養，吸收 CO_2 量將相當可觀。

六、以自然水體培養藻類：

以採自高雄海邊的海水與高雄縣觀音山的溪水，滅菌後培養藻類。生長結果(圖.39)，海水培養的藻類死光，淡水則存活。

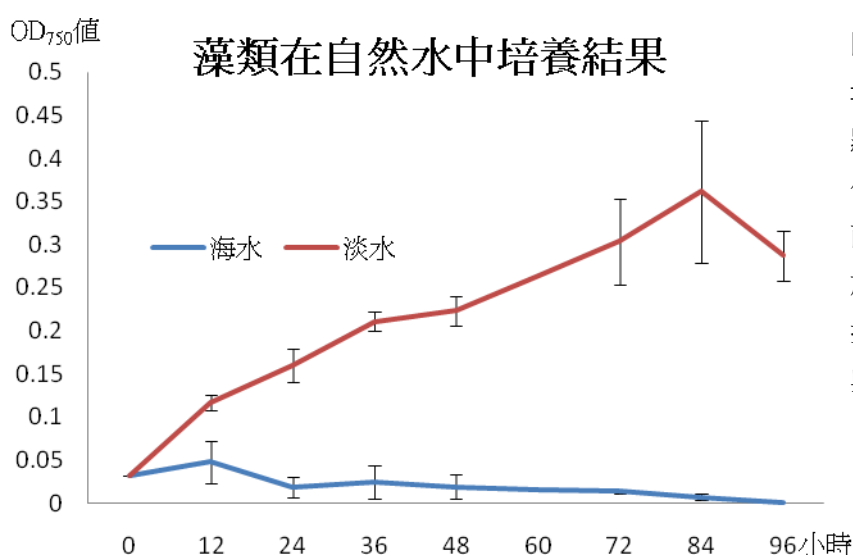


圖 39. 藻類在自然水中培養結果。

± 1 標準差。培養初期觀察藻液顏色即有顯著差異。以海水培養，藻液變白不再有任何綠色， OD 值一直很低，最後為 0。而以淡水培養， OD 值逐漸增加，而且高於最初加入之初始 OD 值。兩種處理都只提供水體，沒加入任何培養基、微量元素與養分。

與未加醋酸鈉的 HS medium 培養情形比較，即 25°C 有震盪的處理，結果以 HSM 培養的最高平均 OD 值為 0.37，以淡水培養最高平均 OD 值為 0.36，兩者差異不顯著($p=0.8446$)。

伍、討論

一、環境變因的影響

(一)、光子數量：

光強度可能不會是限制因子。

(二)、溫度：

溫度對衣藻有顯著影響，40°C 下衣藻的 OD 值顯著低於各溫度。人工培養時水體必然比河川小很多，在日照下溫度會劇烈上升，所以溫度控管十分重要。

(三)、震盪有無：

震盪培養下衣藻的 OD 值顯著較高。且衣藻靜止時會自然沉澱，震盪使得衣藻不易沉澱，代謝廢物不易累積。

(四)、初始 pH 值：

本實驗可獲得 2 種 pH 變化類型：

1. pH 持續變鹼：碳源為醋酸鈉的實驗，其 pH 值曲線和緩上升。根據中山大學的研究經驗，衣藻會產生鹼性的代謝廢物，所以在培養上觀察到 48 小時後，衣藻生長停滯，可能因為代謝廢物影響。密度實驗中，24 小時後，衣藻數量減少也可能是此原因。
2. pH 持續變酸：CO₂ 為碳源，藻液越來越酸，甚至接近 pH5，但在此狀況下，衣藻 OD 值依然很高。而 2atm 一開始就偏酸，但卻沒生長。所以，衣藻偏鹼的代謝廢物可能可促進 CO₂ 溶入水中，而使衣藻生長更好。但若一開始就偏酸或偏鹼，衣藻的生長就會出現問題。

此外初始 pH 值實驗，使用了強酸、強鹼調整 pH 值，使培養液裡鹽類增加，此時培養液對衣藻而言是高張溶液，導致細胞無法適應。

(五)、環境對衣藻綜合影響：

培養衣藻要在有震盪的條件下，溫度不宜超過 30°C。若是為了減少工業 CO₂，可於培養裝置周圍架設遮陰設計以備適時降溫。因為衣藻是淡水藻類，嘗試以淡水培養生長效果佳，但 pH 值不可偏鹼。最適合的碳源是 CO₂，因可中和衣藻代謝廢物。

二、碳的形式

(一)、醋酸鈉：

HS medium 中提到培養液可加入醋酸鈉為碳源^[9]，此情況下衣藻生長不錯，也可中和鹼性代謝物。

(二)、碳酸氫鈉：

加入碳酸氫鈉，初始 pH 值偏鹼，而衣藻在偏鹼的環境無法生存，用強酸來校正時，形成的 CO₂ 氣化而無法保存於培養基中。CO₂ 溶於水中會出現碳酸氫根，CO₂ 培養可以生長，碳酸氫鈉不行，主要原因可能還是 pH 值。在 1X 有些微成長的情形，或許更低的濃度會成長得更好。

(三)、葡萄糖：

葡萄糖培養下生長不佳，高濃度導致高滲透壓使細胞死亡。顯微鏡下觀察細胞經碘液染色出現黑點，研判是澱粉粒，使得衣藻變大變重，靜置時快速沉澱，也可能造成細

胞不易分裂。葡萄糖培養液經滅菌變濃稠，經由「震盪有無」實驗得知，液體的流動性對衣藻的生長會有影響，造成衣藻不易生長，所以葡萄糖不適合做為碳源。

(四)、二氧化碳：

曾經使用純 CO₂ 鋼瓶培養，但衣藻第二天就死亡。使用乾冰可創造不同的 CO₂ 分壓且空間中仍有空氣，以 CO₂ 為碳源但生長上仍需要氧氣的存在。對於 2atm 的處理，可能因壓力太大、CO₂ 過多，抑制衣藻生長。

在 0.2 分壓的環境下較其他分壓環境下生長的好。依據實驗結果，若將工廠排放的 CO₂，直接打入水中，造成的分壓是 0.2 到 1 大氣壓之間，都不會使衣藻死亡。而且衣藻快速生長又可減碳，在沒有額外給碳源時，以空氣養就可長的比大部分碳源還好。

(五)、總結碳源處理：

以 CO₂ 培養衣藻，生長狀況最佳，又可減碳，及進行碳交易，根據世界銀行的報告，2008 年碳交易的總金額已達 640 億美元^[13]。利用其他碳源還需要投入資金獲得，成本較高。所以在培養上以工廠 CO₂ 或是空氣中 CO₂ 培養是最經濟、簡單，甚至可做為獲利來源。

三、密度

(一)、初始密度對最大 OD 值的影響：

不同初始密度處理下的 OD 值 0.7 最高，大於 0.5，大於 0.3，0.1 最小。可能是因為在封閉環境下，原始密度 0.1 的處理下，要發揮最大生物潛能需分裂較多次，而產生的代謝廢物就比較多，阻礙衣藻生長，所以原始密度 0.1 的培養環境下，最大 OD 值為最低。

(二)、初始密度對成長率的影響

成長率是指單位時間內增加的生物量，分析結果初始密度 0.3 > 0.5 > 0.7 > 0.1。可能是因為 0.1 的衣藻較少，所需的適應期較長，需較多天才可達最大 OD 值。而 0.3 以上所需適應期較短，卻較接近環境負荷力，能增長的空間有限，所以本實驗操作中會是以 0.3 為最佳初始密度。衣藻使用初始密度 0.3 的培養條件，可在最短時間內生長最多生物量。以 OD 值計算可收成量(表二)。

原始密度	最大 OD 值	一天收成
0.3	1.20(1 天)	0.90
0.5	1.25(1 天)	0.75
0.7	1.31(1 天)	0.61
0.1	1.13(2 天)	0.52

表二、不同初始密度下，單位時間衣藻增長量。

四、衣藻產生脂質

正常培養下衣藻可產生油滴，缺氮的狀況下油脂累積較為明顯^[14] (圖 39.圖 40.)。

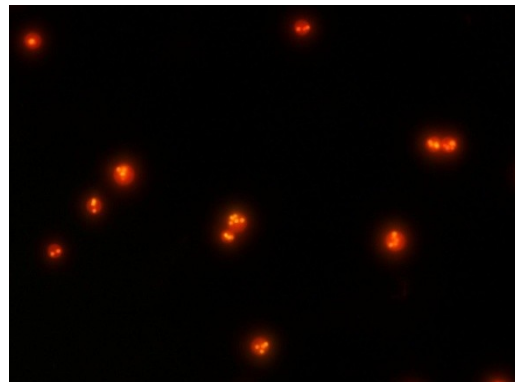


圖 39. 正常培養下，以醋酸鈉為碳源，油滴累積情形。 圖 40. 缺氮培養基，以醋酸鈉為碳源，油滴累積情形。

上二圖引用自 98 年台灣國際科展，複選參展作品：衣藻於營養鹽及光波長變因下油脂累積效率之探討。

左圖為以醋酸鈉正常培養下螢光染色結果。右圖為以醋酸鈉培養但不供給氮元素的螢光染色結果。相較之下缺少氮源處理染色後亮黃色油滴較明顯，但部分細胞偏小。

如果需要以特定培養基使其產生較大量油滴，在大規模培養上會因成本過高而不適合，所以，還是以正常的培養基，提供 CO₂ 為佳。

五、減碳效果

本實驗關著的主題，根據計算結果。以 CO₂ 培養四天，每公升最少約可減少 1.78g CO₂，若將這樣的培養裝置放大，養滿一整個標準游泳池，平均每天將可減少 1 公噸的 CO₂。而這樣的培養過程，又可以自然環境的淡水培養，不需特別調製培養液，在成本上相當節省，當碳交易施行後，或許是一個值得投資的產業—減碳工廠。

陸、結論

根據以上實驗，適合萊茵衣藻生長的環境，是在有震盪，溫度 15°C 到 30°C 之間，且以 CO₂ 為碳源的條件下，最能快速獲得最大增長量。這與本實驗當初的設想相同，以溫室氣體 CO₂ 為碳源，與排放 CO₂ 的工廠，如發電廠、煉油廠合作，收集含 CO₂ 的廢氣通入培養衣藻的裝置內，讓衣藻利用 CO₂ 行光合作用後產生三酸甘油酯等有價值的脂質，再轉化成生質能源循環利用。至於有關溫度的問題，可在中午以遮陽板減少日照降低溫度。同時，維持培養初期衣藻密度，每當萊茵衣藻達到最大生長量時，即可收成加工成其他製品。讓藻類生長維持在最高的效率，減碳效果會最好。

柒、未來展望：

「碳排放交易機制 (ETS)」即透過國際交易平台讓黑碳變黃金。目前 CO₂ 的交易價格為每噸 20 歐元^[13]，而台灣一年的 CO₂ 排放量為 2 億 6 千 5 百萬噸。為求經濟與環保雙贏，最近「溫室氣體減量法草案」^[15]正在審查。企業可藉由植林得到許可增加 CO₂ 排放量。但若採取植林的方式則會有土地成本及生長緩慢的缺點。萊茵衣藻生長迅速且能夠轉化成生殖能源，若是養殖萊茵衣藻除碳取得碳排放權，低成本的抵換方式能使碳交易的想法受企業集團的普遍支持。

未來若是要將衣藻工業化，對日照充足的台灣來說，萊茵衣藻是最便宜的太陽能板。利用淡水大量養殖，使台灣的太陽能資源充分利用，同時降低生產成本。萊茵衣藻的擴大發展或許可替工業發展以來地球所受的傷害塗一點止痛劑。

捌、參考文獻與其他

1. 澳洲大火死亡人數可能進一步增加(2009.2.29)。BBC 中文網。取自：
http://news.bbc.co.uk/chinese/trad/hi/newsid_7870000/newsid_7878100/7878189.stm
2. 大水才退 五級風暴逼近澳洲東北(2009.3.8)。MSN 國際新聞，TVBS 新聞提供。取自：
<http://news.msn.com.tw/news1198178.aspx>
3. 李宏台(民 97)。微藻產油技術商業化面臨之挑戰。載於 2008 台灣微藻科技研討會論文集 (28-36 頁)。國立成功大學化工系。
4. Energy Information Administration Official Energy Statistics from the U.S. Government. (2009, March 10). Forecasts & Analyses: analyses and projections of energy information. March 13, 2009 from <http://www.eia.doe.gov/oiaf/forecasting.html>
5. Doretha B. Foushee (2007). Algal Blooms in the Ocean. May 26, 2008 from <http://www.waterencyclopedia.com/A-Bi/Algal-Blooms-in-the-Ocean.html>
6. Chlamydomonas Center. About *Chlamydomonas*(February 5, 2009). February 25, 2009 from <http://www.chlamy.org/info.html>.
7. *Efritshiva*(民 97)。綠藻類的特徵。魚游達康水族交流網。取自：
<http://fishyu.com/bbs/thread-13289-1-1.html>
8. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature* advance online publication 30 May 2007 from <http://www.nature.com/nature/journal/vaop/ncurrent/full/nature07511.html>
9. Chlamydomonas Center. Sueoka's high salt medium (1960). February 25, 2009 from <http://www.chlamy.org/Sueoka.html>
10. 綠藻(2009, February 7)。百度百科。取自：<http://baike.baidu.com/view/60757.htm>
11. Carbon Dioxide (CO₂) Properties, Uses, Applications CO₂ Gas and Liquid Carbon Dioxide. Universal Industrial Gases, Inc. Retrieved February 25, 2009 from <http://www.uigi.com/carbondioxide.html>
12. Christopher S. Lobban, Paul James Harrison (1985). Table 5.2: Concentration of some essential elements in seawater and in seaweeds. Chapter 5.2, page 165, *Seaweed ecology and physiology*.
13. The World Bank. State and Trends of the Carbon Market 2008. Washington, DC: Karan Capoor and Philippe Ambrosi (May, 2008). Retrieved March 3, 2009 from http://wbcarbonfinance.org/docs/State_Trends_FINAL.pdf
14. 鄭詩仙(民 98)。衣藻於營養鹽及光波長變因下油脂累積效率之探討。2009 台灣國際科展複選參展作品。
15. 經濟部(民 95 年 9 月 20 日)。溫室氣體減量法。行政院：經濟部。民 98 年 3 月 2 日，取自：經濟部溫室氣體減量資訊網 <http://proj.moeaidb.gov.tw/tigo/page4-1.asp>

附錄 1.

Sueoka's high salt medium

from Sueoka, N. (1960) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **46**, 83-91.

Also known as HS or HSM, this is somewhat more economical than [TAP](#) to prepare.

Make the following stock solutions:

1. salts solution (also known as Beijerinck's solution)

NH ₄ Cl	100.0 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	4.0 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	2.0 g
water to 1 liter	

2. phosphate solution

K ₂ HPO ₄	288.0 g
KH ₂ PO ₄	144.0 g
water to 1 liter	

3. Hutner's trace elements (follow this [link](#))

To make the final medium, mix the following:

5 ml solution #1 (salts)
5 solution #2 (phosphate)
1.0 ml solution #3 (trace elements)
water to 1 liter

Sodium acetate can be added at 1.2 g/liter (anhydrous) or 2.0 g/liter (hydrate).

For solid medium, add 15 g agar per liter.

Yeast extract 4.0 g/liter can also be added to solid medium.

All these ingredients can be added before autoclaving.

We don't recommend adding yeast extract to liquid media, since it encourages overgrowth of contaminating bacteria.

附錄 2.

Nile red staining method

by Pei-yung Nien and Ray OYuang

Cytosol method NO.1.doc

Version: 1

IMB/NSYSU/TN/ROC

Reference: Kimura et al. (2004) J Microbiological Methods 56: 331-338 (provided by Prof Chou of FI University)

1. Preparation of Nile red (Sigma, USA)

- dissolve Nile red in acetone in the concentration of 0.1 mg/mL
- store in -20°C as a aliquot of 50 μ L per microcentrifuge tube
- drop the residual after use, do not re-store in -20°C freezer

2. Preparation of algal cell sample

- take 1 mL algal culture from culture vessel into 1.5 mL microcentrifuge tube under laminar flow condition
- transfer the 1.5 mL microcentrifuge tube to bench
- take 100 μ L algal culture into another 1.5 mL microcentrifuge tube
- add 1 μ L Nile red solution, which is just taken out from -20°C freezer and put in ice (ps: light avoidance is necessary)
- incubation at room temperature for 10 min under darkness
- immediately transfer to cover glass and slide
- observe fluorescence emission under fluorescence microscope

3. Use of fluorescence microscope (螢光顯微鏡) :

Equipment: Nikon (mode: ECLIPSE 80i, Japan) with a colour CCD

Excitation and emission condition: B2A (EX:450-490nm DM:505 BA:520nm)(Nikon, Japan) excitation=450nm

先將光源調到最亮，觀察時，再根據以下情況進行調整

觀察狀況	調整參數	40 X	10 X
螢光下觀察	Seconds	0	0
	Milli seconds	300-400	300-400
正常下觀察	Seconds	0	0
	Milli seconds	100	35

【評語】 040709

- 1、 能就地取材設計實驗流程並進行實驗。
- 2、 應加強對於測試條件之濃度和 PH 值分析及控制。
- 3、 應加強光源之選擇與控制。
- 4、 建議加強其他文獻參考資料之收集與比較。