

# BENZOTRIAZOLE PHOSPHATE 對綠藻細胞生長之影響

## A STUDY ON THE EFFECT OF BENZOTRIAZOLE PHOSPHATE TO THE GROWTH OF CHLORELLA CELLS.

魏 明 通

Ming -Tong Wey

### 摘 要

應用綠藻之培養，求 Benzotriazole Phosphate (以上簡稱 B.T.P.) 對綠藻細胞生長及繁殖之影響。

將不同濃度之 B.T.P. 投入於綠藻培養液中，在同一條件下培養兩星期，由計測每升培養液所含細胞數及細胞總體積之變化，知 B.T.P. 對綠藻細胞之生長及繁殖有抑制作用而其作用與所投入 B.T.P. 濃度成正比，並發現綠藻細胞由於 B.T.P. 之存在，未到完全成熟就起分裂之現象。

其次，以放射性同位素磷 —32 為追蹤劑，投入於綠藻培養液中，並將培養所得細胞以化學方法分離細胞各部之磷酸化合物，由測定放射能求得其抑制作用於細胞LIPID部分最多。

Benzotriazole ( $C_6H_5N_3$ ) 被認為生長抑制劑<sup>(1)</sup>，惟其對微生物之影響尚未見聞，臺北醫學院最近將其磷酸鹽 (Benzotriazole Phosphate 以下簡稱 B.T.P.) 合成成功，本研究乃於綠藻培養液中投入不同濃度之 B.T.P.，連無含 B.T.P. 之綠藻培養液在同一條件下培養，實驗尋求其對細胞生長及繁殖之影響。宮地氏曾以放射性同位素磷 —32 為追蹤劑，研究綠藻細胞內磷酸化合物之分佈<sup>(2)</sup>，本研究亦以放射性磷 —32 為追蹤劑投入於綠藻培養液中，由於測定分離細胞各部份磷酸化合物之放射能求得 B.T.P. 對細胞各部份攝取磷之影響。

## 實 驗 部 份

### 一、綠藻之培養

本實驗所用綠藻爲 *Chlorella Vulgaris* 培養分爲三個階段培養液採用魏氏培養液<sup>(9)</sup>，每公升培養液中含。

硫酸銨	2克	磷酸氫二鉀	0.5克
硫酸鎂	1克	醋酸鈉	0.5克
水楊酸	0.3克	微量元素 *	1c.c.
香蕉萃取液 (10%) 1c.c.			

\* (微量元素包括 Mn2ppm., Colppm. Ca 20ppm., Fe 10ppm., Cu 4ppm., Zn 2ppm., Mo 1ppm., W1ppm., B 2PPm.)

#### 1. 預備培養

將已於固體培養基做斜面培養 4 星期之綠藻細胞移至滅菌過之上述培養液內，以 10K Lu 照度日光燈照明及不斷通約含 5 % 二氧化碳之空氣下於  $23 \pm 10^{\circ}\text{C}$  溫度培養約一星期，使該綠藻細胞習慣於該培養液並生長繁殖，

#### 2. 前培養及收集初生暗細胞

將上法培養過之細胞移至含有 500ml 已滅菌之培養液內，以上法同一條件下培養 4~5 天後照度降至 0.8K Lux. 繼續培養約三天則細胞大部份分裂爲直徑  $2.5 \sim 3.5\mu$  之初生期暗細胞，將其以新配培養液稀釋 10 倍後以 2000 r.p.m. 離心 2 分，則較大而重之細胞沉澱，分離後之上澄液以 2000r.p.m. 離心 20 分即可得本實驗之用綠藻之初生期暗細胞。

#### 3. 本實驗：如下述分爲兩部份

#### 二、於不同濃度之 B.T.P. 下培養綠藻

所取得之初生期暗細胞移至 1 升已滅菌之培養液中，混合均勻後均勻分於 4 瓶 500c.c. 之培養瓶中：

第一瓶爲 control 不加 B.T.P.

第二瓶加 10ppm. 之 B.T.P.

第三瓶加 1ppm. 之 B.T.P.

第四瓶加 0.1ppm. 之 B.T.P.

將 4 瓶於同一條件下培養約二星期，則每月以 10K Lux 照度日光燈照明及不斷通入約含 5% 二氧化碳之空氣 10 小時，其間培養溫度大約  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 。並每日同一時間各吸取小量培養液於 600 倍顯微鏡下以 Erma 製 Hemacytometer 測定每升培養液中所含細胞數，每隔一天以 Hematoerit 測定每升培養液中所含細胞之總體積，其測定方法仍吸取培養液 10ml 於 Hematoerit 內以 2000ppm. 速度離心 20 分計測其於管端沉澱之細胞體積而得。

### 三、以放射性磷 $-32$ 為追蹤劑：

所取得之初生期暗細胞移至 500ml 已滅菌過之培養液中，混合均勻後分為 2 瓶並各加  $5\mu\text{c}$  之放射性磷  $-32$ 。A 瓶為 control 不加 B.T.P.，B 瓶另加 10ppm. 之 B.T.P.，與上述同一條件下培養二星期後各收取約 1e.e. 之細胞，按 Schuidt 及 Thaubauer 之變法<sup>(4)</sup> 區分細胞所含之磷酸化合物並測定各區分之放射能而得每區分對  $\text{P}^{32}$  之攝取量，細胞中磷酸化合物之分割法如圖一，茲分別說明如後：

收穫之細胞以冷 0.002M 硫酸鉀溶液洗兩次離心後，以 8 % 冷三氯醋酸溶液 (Trichloroacetic Acid 以後簡稱 TCA，萃取兩次而得 acid soluble 部分之 nucleotide-P 離心除去 TCA 萃取部份後之殘渣以  $\text{pH}=9$  之稀氫氧化鉀萃取二次後，於殘渣加 2N 氫氧化鉀於恒溫槽  $37^\circ\text{C}$  保持 16~18 小時則殘渣中之磷酸化合物幾乎完全溶解於氫氧化鉀溶液內，離心而得之上澄液內加過氯酸並調節  $\text{pH}=7$  成中性後除去沉澱加過氯酸於上澄液至全體成為 10 % 之過氯酸溶液，離心所得上澄液則為 Ribonucleic acid-P (簡稱 RNA-P) 部分並加 10% TCA 於殘渣中於  $100^\circ\text{C}$  沸騰 20 分離心後則於上澄液可得 Deoxyribonucleic acid-P (以下簡稱 DNA-P) 部分而殘渣則為 Protein-P 部分。

## 結果及討論

### 一、不同濃度 BTP 之對綠藻細胞生長及分裂之影響：

表一為於同一條件培養下所加不同濃度之 BTP 每公升培養液內所含之細胞數之例

之一。

表二爲每隔一天所測得每公升培養液中細胞之總體積

由上二表可得：

1. B.T.P. 顯然對綠藻細胞之生長及繁殖有抑制作用而其作用與其濃度成比例。

2. 開始幾天加 B.T.P. 之綠藻每升培養液中細胞數目稍爲增加，惟此時其每公升中細胞總體積沒有增加反而較 control 減少，此則表示加 B.T.P. 可使細胞未到完全成熟就起細胞分裂——則可提前其細胞分裂，此與在顯微鏡觀測符合則正常綠藻細胞通常成長至直徑約  $10\mu$  之完全成熟細胞方起分裂，惟加 B.T.P 之細胞則約於直徑  $8\mu$  時就起分裂。

3. 在整個培養過程中 control 則保持其深綠色惟加 B.T.P. 之綠藻細胞顏色較淺而呈淺綠色。

二、以  $P^{32}$  爲追蹤劑並經化學方法分割細胞並以蓋格計數儀 (Geiger Counter) 測定各部分細胞磷酸化合物中之放射能所得結果如表三：

由此可得加 B.T.P. 於綠藻培養液中，細胞之 Lipid 部分磷酸化合物大量減少，此則表示 B.T.P. 對細胞 Lipid 之生成有抑制作用。

原預期 B.T.P. 對細胞之 RNA, DNA 生成有抑制作用，惟由實驗知其不但無抑制而稍有增加。

誌謝：本研究之完成承蒙國家長期發展科學委員會之研究補助。B.T.P. 蒙臺北醫學院黃蔭樺教授之提供及指正，綠藻之培養承洪霞，陳純美及蔡敏榮諸同學之協助，追蹤實驗則利用清華大學同位素組，保健物理組實驗室及設備，謹致謝忱。

### 參 考 文 獻

- (1) P. G. Stecher et al, "The Merck Index of Chemicals & drugs" 135, Merck & Co. (1960).
- (2) S. Miyachi and H. Tamiya, Distribution and transover of phosphate compounds in growing chlorella cells. Plant & Cell physiol., 2, 405~414 (1961),
- (3) Y. S. Wai and S. M. Wang, A Study on the mass culture method of Chlorella vulgaris, Bulletin of Taiwan Normal Univ. 3, 27~42 (1958).
- (4) G. Schmidt and S. J. Thawnhauser, a method for the determination of desoxyribonucleic acid, ribonucleic acid & phosphoproteins in animal tissues, J. Biol. Chem., 161, 83~89 (1945).

## A study on the Effect of Benzotriazole Phosphate to the Growth of Chlorella Cells

Ming-Tong Wey

Department of Chemistry

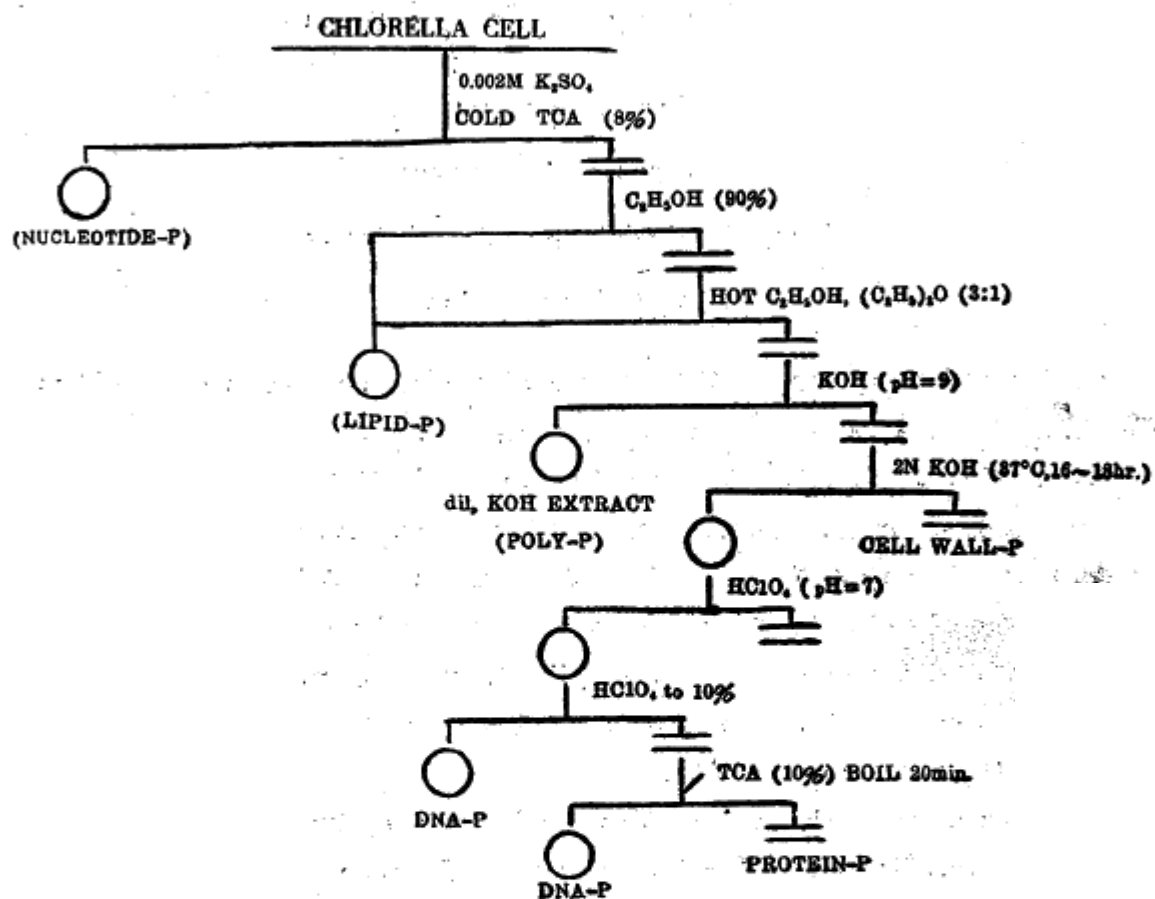
Taiwan Provincial Normal University

Taipei, Taiwan, China

By using the technique of the culture of *chlorella vulgaris*, the effect of Benzotriazole phosphate on the growth of algal cells was investigated.

After adding the different concentration of B.T.P. in separate flask of culture medium, *chlorella* cells were cultivated under the same condition for about two weeks, and during which time from the changes of total cell number per liter culture and packed cell volume per liter culture, it was found that the B.T.P. could inhibit the growth of *chlorella* cells and it was proportional to B.T.P. concentration; moreover *chlorella* cells began to divide before they came to full maturity on account of the presence of B.T.P..

Two weeks after adding radioactive  $P^{32}$  in each culture mediums and the change of the distribution of  $P^{32}$  in various cell fraction being determined by Geiger counter, it was found that B.T.P. exercised its inhibition to the greatest extent on cell lipid fraction.



圖一 綠藻細胞磷酸化合物之分離

表一 於不同 B.T.P. 濃度下每升培養液中所含綠藻細胞數

Cell No. Per Liter Culture	Culture Number	A	B	C	D
		Control	Benzotriazole Phosphate		
			10ppm.	1ppm	0.1ppm
	1	$4.8 \times 10^9$	$4.8 \times 10^9$	$4.8 \times 10^9$	$4.8 \times 10^9$
	2	$4.8 \times 10^9$	$4.8 \times 10^9$	$4.8 \times 10^9$	$4.8 \times 10^9$
	3	$5.3 \times 10^9$	$5.2 \times 10^9$	$6.7 \times 10^9$	$8.0 \times 10^9$
	4	$7.9 \times 10^9$	$5.8 \times 10^9$	$6.9 \times 10^9$	$8.8 \times 10^9$
	5	$13.1 \times 10^9$	$7.9 \times 10^9$	$9.0 \times 10^9$	$10.5 \times 10^9$
	6	$15.0 \times 10^9$	$8.2 \times 10^9$	$10.5 \times 10^9$	$11.8 \times 10^9$
	7	$15.9 \times 10^9$	$10.7 \times 10^9$	$12.3 \times 10^9$	$13.0 \times 10^9$
	8	$18.6 \times 10^9$	$11.7 \times 10^9$	$12.8 \times 10^9$	$13.6 \times 10^9$
	9	$20.1 \times 10^9$	$13.0 \times 10^9$	$14.4 \times 10^9$	$15.3 \times 10^9$
	10	$24.8 \times 10^9$	$14.8 \times 10^9$	$15.6 \times 10^9$	$16.0 \times 10^9$
	11	$24.9 \times 10^9$	$15.3 \times 10^9$	$19.0 \times 10^9$	$19.6 \times 10^9$
	12	$28.8 \times 10^9$	$17.6 \times 10^9$	$20.3 \times 10^9$	$21.7 \times 10^9$

表二 於不同 B.T.P. 濃度下每升培養液中之綠藻細胞總體積

Packed Cell Volume c.c./Lit.	Culture Number	A	B	C	D
		Control	Benzotriazole Phosphate		
			10ppm.	1ppm.	0.1ppm.
	1	0.43	0.43	0.43	0.43
	3	1.65	1.15	1.31	1.46
	5	2.35	1.91	2.05	2.07
	7	2.80	2.30	2.15	2.20
	9	4.00	3.16	3.48	3.68
	11	4.60	3.41	4.02	4.17

表三 於綠藻細胞內  $P^{32}$  之分佈

$P^{32}$ Content (%)	Culture Number	A	B
		control	+ B.T.P. 10 ppm
Nucleotide-P		28.3	30.3
Lipid-P		19.5	8.2
Poly-p		6.8	0.8
Cell-Wall-P		4.8	5.8
Rna-P		45.9	52.7
Dna-P		0.4	0.9
Protein-P		0.3	0.3