

中華民國第42屆中小學科學展覽會

::: 作品說明書 :::

高中-應用科學科

科 別：生活與應用科學

組 別：高中組

作品名稱：螢光棒的濫用對生態環境的影響

關 鍵 詞：螢光棒、蝦胰臟細胞

編 號：040810

學校名稱：

臺北市私立延平高級中學

作者姓名：

周嗣堯、許博彥、張毓帆、黃佳琳

指導老師：

李義豐、張漢鏞



一、 摘要：

本文旨在研究螢光棒內的物質對於生物的影響；選擇以蝦的胰臟細胞、*B.cereus*, *S.aureus*, *V.damsela*, *Streptococcus*, *E.coli*, *V.alginolytious*, *A.hydrophia* 等七種細菌及三斑鯛魚、斑馬魚等作為生物的代表，在實驗室內培養細胞及細菌並觀察螢光棒的內含物是否會抑制細菌的生長、細胞及生物個體的生存。

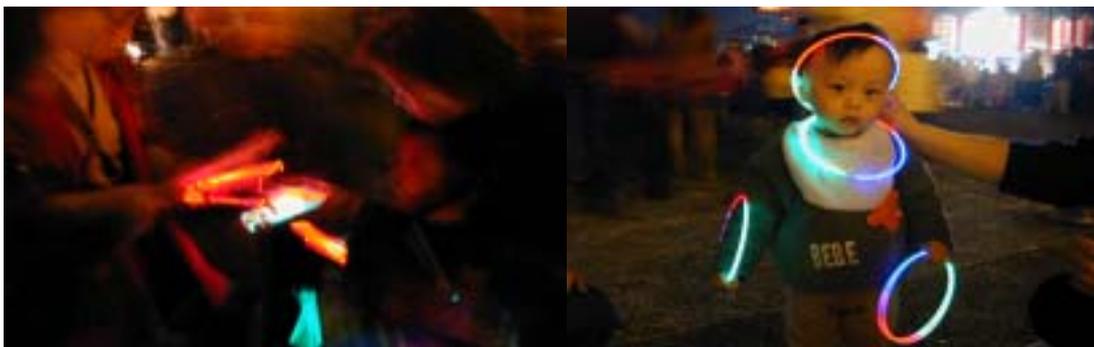
當我們每每在電視上看到無數隨歌手節奏舞動的螢光棒，在一場大型演唱會後被隨意丟棄，我們便不禁自問，它們是否有被適當的分類及處理呢？

在對七株不同的菌株進行不同濃度的抑菌圈實驗以及將不同量的螢光棒內含物加入蝦胰臟細胞培養液共同培養後得知，僅要微量的螢光棒內含物質，便可以對上述兩種對象產生相當的損害以及影響；接下來，我們還將以三斑鯛魚及斑馬魚的魚苗來進行生物個體的實驗。然而以目前的結果可初步得知，以一般的掩埋及焚燒法來處理螢光棒，可能不是一項明智的舉動，有待政府相關機構來深入研究，並提出更好的解決之道。

二、 研究動機

我們是一群注重學校課業，但也更關心週遭環境變遷與環保的高中生。我們每每在電視上看到無數隨歌手節奏舞動的螢光棒，在一場大型演唱會後被隨意丟棄，我們不禁自問，它們是否有被適當的分類及處理呢？在高中的有機化學課程中，我們了解到有機物質具有一定的毒性，又由基礎生物中了解到生態環境對生物生長的重要性；然而在元宵燈會中，處處可見販賣螢光棒的小販和滿地亂丟的螢光棒，可見此項物品的廣泛使用，甚至可稱之濫用。可是由我們針對高中生發出並回收的問卷(附件一)中，竟然約有 80% (80/96) 對螢光棒的內含物質以及其處理方式並不在意。

這些會發光的螢光物質到底是否對自然生態有害呢？有什麼不良的影響嗎？因此我們嘗試以實驗的方法來觀察他們對於細胞、細菌及個體的影響。





三、 研究目的

本文旨在研究螢光棒內的物質對於生物的影響；選擇以蝦的胰臟細胞、*B.cereus*, *S.aureus*, *V.damsela*, *Streptococcus*, *E.coli*, *V.alginolytious*, *A.hydrophia* 等七種細菌及三斑鯛魚、斑馬魚等作為生物的代表，在實驗室內培養細胞及細菌並觀察螢光棒的內含物是否會抑制細菌的生長、細胞及生物個體的生存，並由本研究的過程中學習研究科學的態度及實驗的技巧和操作。

四、 研究設備及器材（詳如附件二）

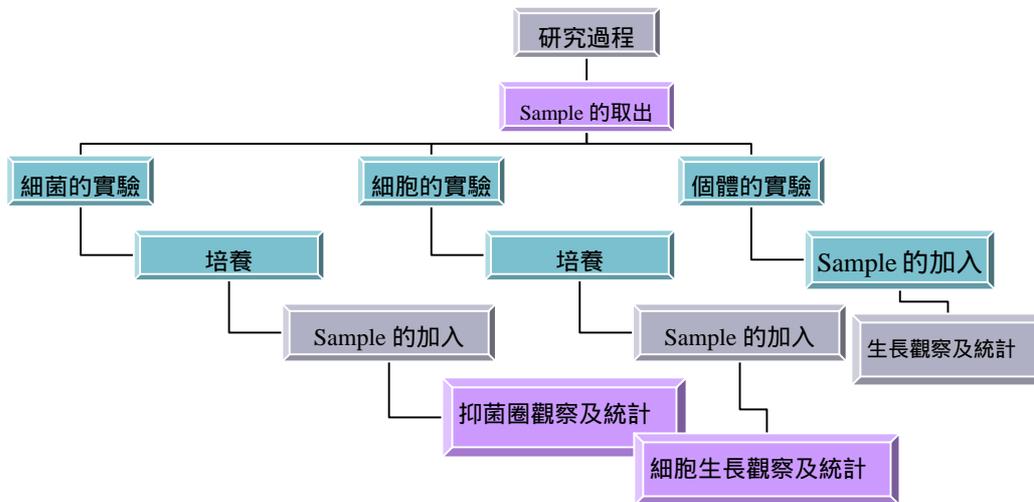
螢光棒 (Cyalume light stick) 美國 Omni glow 公司

實驗細胞：蝦胰臟細胞 (PMH cell) [中研院動物所提供]

實驗菌株：*B.cereus*, *S.aureus*, *V.damsela*, *Streptococcus*, *E.coli*, *V.alginolytious*, *A.hydrophia*
[中研院動物所提供]

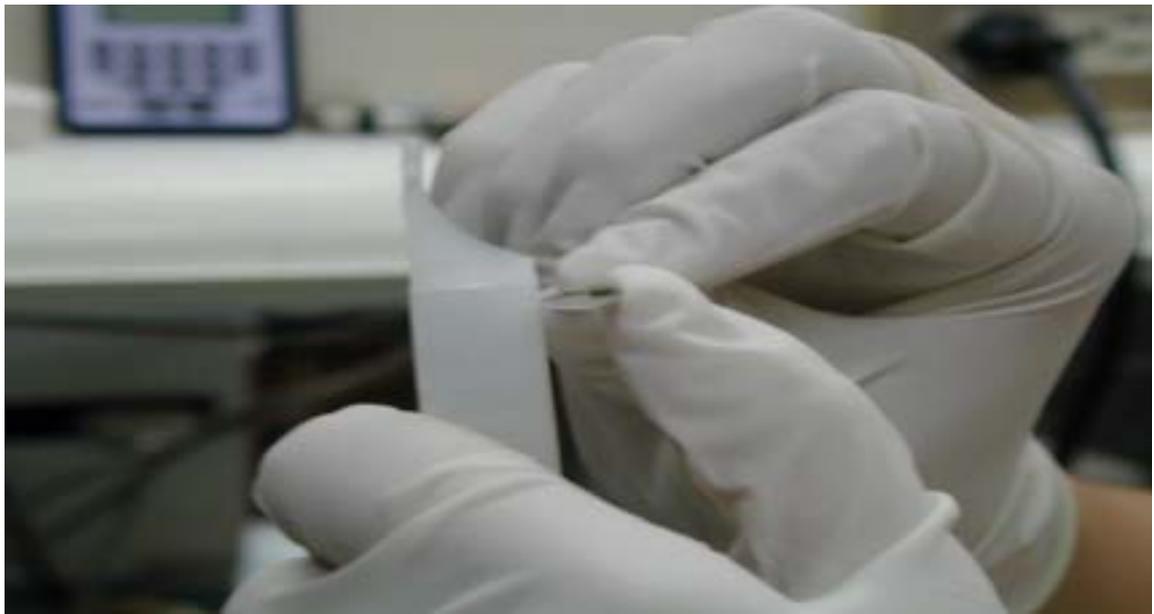
實驗個體：三斑鯛魚魚苗 (宜蘭礁溪特有) 斑馬魚魚苗 (*Zebra Fish*) [中研院動物所提供]

五、 研究過程及方法



(一) 螢光棒內含物質之取出與稀釋

取一刀片，用火燒過，把螢光棒（尚未折過）的外管割破，將外管的液體倒入塑膠試管中（小心內管），將螢光棒的內管（玻璃管）小心取出，用水把其表面的外管液體沖掉並用紙巾擦乾（避免內外管提早反應）；用夾子小心的把內管夾破，將其中的液體用電動吸取器裝上 1ml 的管子吸出，倒入另一試管中，重複上面步驟三次（共有白，紅，綠三色）；用電動吸取器分別從各色的內管及外管吸出 1ml 的液體，並注入一新試管中，將此步驟重複兩次，取得三種不同顏色的混合試劑管。接著使用 450ul 的 DMF 溶劑溶解 50ul 的上述試液，並利用階梯稀釋法稀釋得到 $10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}$ 的試液。將以上蒐集的 54 支試管放入試管架中，以待下列兩項實驗使用。



(二) 細菌、細胞及個體的培養、Sample 的加入

1. 細菌的培養

(1) 單一菌落的培養

- A. 取一個 TSA plate。
- B. 將接種環在酒精燈火焰上燒紅，接種環上方部分亦得以火焰燒過後使之冷卻。
- C. 將接種環於養有菌落之液態培養基中點幾下，使之沾有菌落。
- D. 打開空白的 TSA plate，將沾有菌落的接種環於其上輕輕連畫數條橫線後，將培養皿蓋子置回。
- E. 再次將接種環在酒精燈火焰上燒紅並使冷卻，將培養皿旋轉約 60 度，畫第二次線。
- F. 重複上一步驟之操作，畫第三次線。

G. 將培養皿倒置，於 37 培養箱中培養過夜，即可培養出單一菌落。

(2) Sample 的加入

A. 將培養好之單一菌落 *B.cereus* 刮取少許，置於液態培養基中。

B. 再從液態培養基中，以 Pipet-aid 吸取少許液體，滴於固態培養基上並以三角形玻棒均勻塗抹。

C. 重複 B 的步驟，共須塗 60 個培養基。

D. 重複 A C 的步驟，做 *S.aureus*, *V.damsela*, *Streptococcus*, *E.coli*, *V.alginolytious*, *A.hydrophilia* 等六株菌的培養。

E. 取 4 個 *B.cereus* 的培養基，在背面將之分成數格，分別寫上 Red 外管、Red 內管、Yellow 外管、Yellow 內管、White 外管、White 內管、Red 內外管混合、Yellow 內外管混合、White 內外管混合、Antibiotic(Kanamycin)、Water、DMF 等。

F. 以鑷子夾取一個 Paper Disc，於其上滴上 10ul 的紅色外管液體，再將其置於寫有 Red 外管的培養基格子上；其他亦同。

G. 重複做一個培養基（為了實驗的重複性）。

H. 重複 E G 的步驟，製作 *S.aureus*, *V.damsela*, *Streptococcus*, *E.coli*, *V.alginolytious*, *A.hydrophilia* 等六株菌的培養基。

I. 放入三十七度的恆溫箱中培養 1 2 小時，等待實驗結果。

2 . 細胞的培養實驗（以下實驗皆在中研院動物所的攝氏 18 度恆溫無菌室內進行）

(1) 細胞的培養

A. 先把原在細胞培養罐中的培養液倒入廢液瓶中。



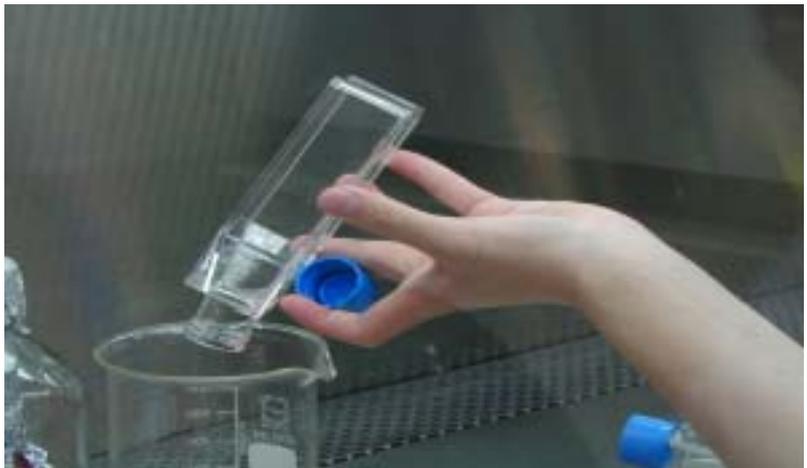
B. 電動吸取器裝上 5ml 的吸管吸取 PBS 4ml，加入細胞培養罐中。



C. 蓋上蓋子，搖晃罐子，使 PBS 和罐壁均勻接觸。

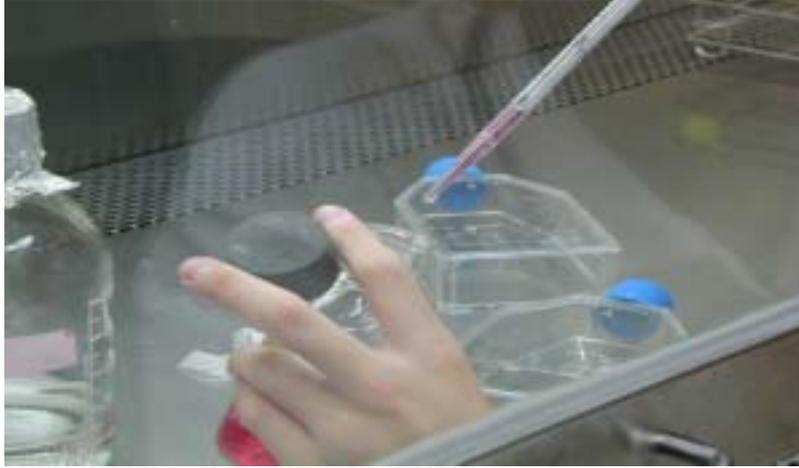


D. 把罐內液體倒入廢液瓶中。



E. 重複步驟二至四三次

F. 用電動吸取器裝上 1ml 的吸管吸取 tripsi 0.5c.c 並加入罐中



G. 搖晃罐子，並拍打罐壁

H. 用電動吸取器裝上 5ml 的吸管吸取培養液 3ml 沖洗罐壁

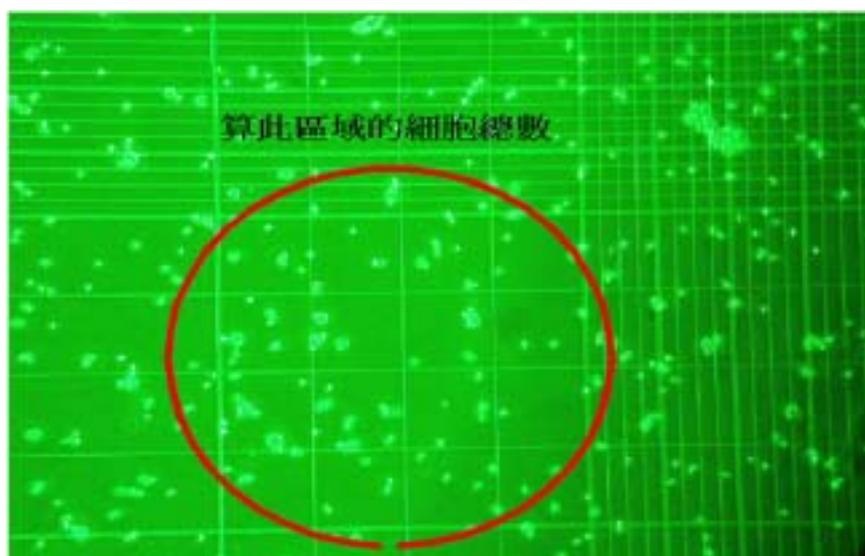


I. 吸起，沖入，重複三次

J. 用電動吸取器裝上吸管，吸取少量罐中液體，滴入 Hemacytometer



K. 待其吸入後，拿至反光顯微鏡下算細胞個數。



- L. 將得到的細胞數 $\times 1000$ ，得到每 ml 培養液中有的細胞數
- M. 因為再細胞培養盤中一格需要有 1c.c 內含細胞的培養液；一共有 24×2 格，因此用電動吸取器裝上 25ml 的吸管，吸取 48ml 的培養液，滴入罐中。
- N. 把罐中內含細胞的培養液倒入一乾淨並消毒後的容器中



- O. 使用電動吸取器裝上 1ml 的吸管，從上述容器中吸取 1 ml 的細胞培養液，並注入細胞培養盤中的小槽中
- P. 步驟 O 重複 48 次



- Q. 拿至反光顯微鏡下觀察細胞是否均勻分布



R. 以膠帶密封後平放，靜置於攝氏 18 度的恆溫室中；讓細胞於其中生長 24 至 48 小時。

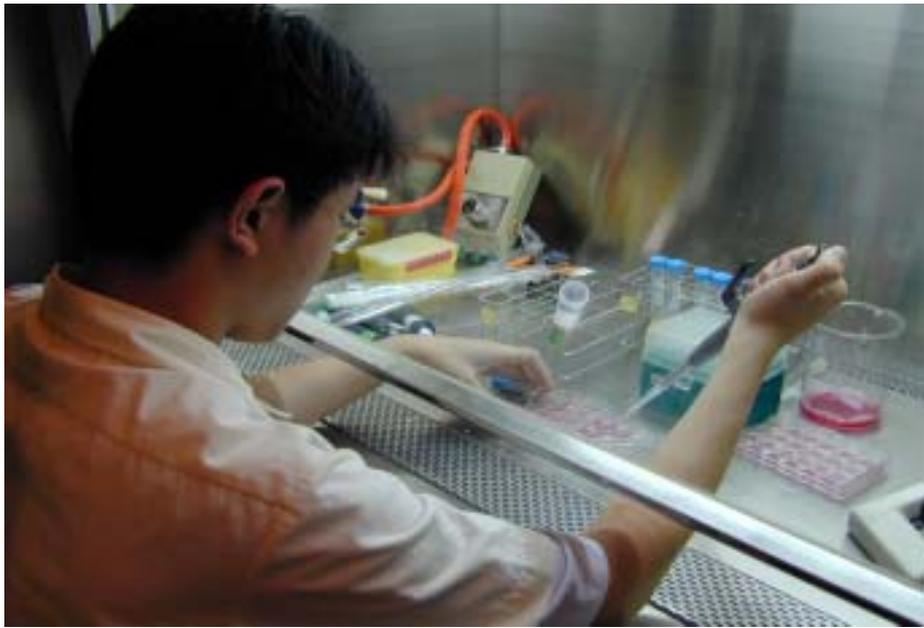
(2) Sample 的加入

A. 把步驟 R 的兩個細胞培養盤取出

B. 將原來於其中的培養液用電動吸取器裝上 1ml 的吸管吸出倒入廢液瓶



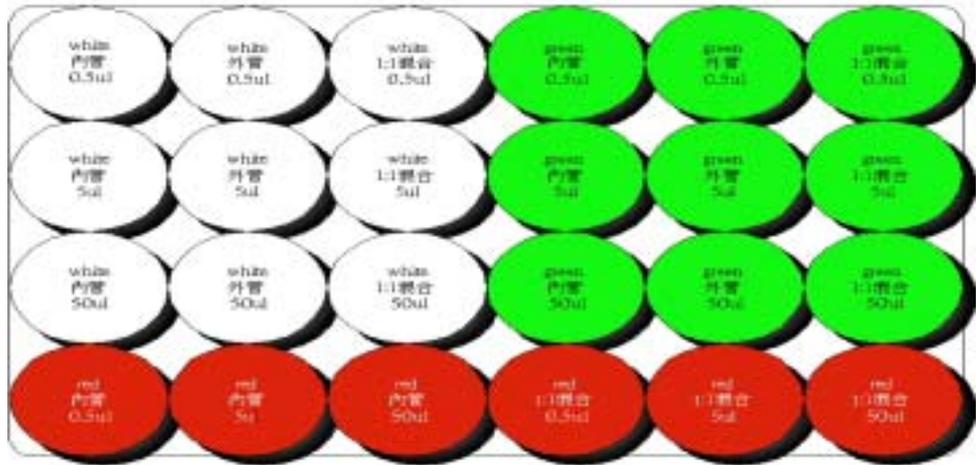
C. 用微量滴管 (P200) 吸取 1c.c 的培養液，沿著細胞培養盤內槽的槽壁注入 24X2 個槽中



D. 用微量滴管 (P 2) (P20) (P200) 分別吸取三種顏色的內管、外管和混合液體 0.5、5、50ul，並依下圖滴入細胞培養盤中的槽內。Repeat 一盤



E. 以膠帶密封後，靜置於攝氏 18 度的無菌恆溫室中，培養 24 小時，等待實驗結果。



TISSUE CULTURE TEST PLATES SAMPLE
細胞培養盤示意图 (24wells) diameter 16.2mm

六、 研究結果

(一) 在細菌的抑菌圈直徑測量方面

下列圖表分別是七種細菌在做 paper disk 實驗以後，經過兩天攝氏 37 度的恆溫培養後所產生的抑菌圈直徑（如下列圖表和照片所示）由以下的圖表及照片可看出微量的螢光棒內含物質即可對細菌的增殖造成抑制的影響

（以下表格 x 表示無抑菌圈產生 ? 表示無有數據）

細菌 S.Aureus 的抑菌圈直徑大小 (mm)											
濃度 \ 試劑	WO	WI	WM	RO	RI	RM	GO	GI	GM	DMF	抗生素
1	9	13	11	8	13	12	9	12	28	X	20
10-1	X	16	14	X	15	13	X	14	25	X	
10-2	X	18	15	X	14	X	X	17	12	X	
10-3	X	14	14	X	11	X	X	12	X	X	
10-4	X	9	X	X	X	X	X	X	X	X	
10-5	X	9	X	X	X	X	X	X	X	X	

細菌 <i>V.Damsela</i> 的抑菌圈直徑大小 (mm)											
濃度 \ 試劑	WO	WI	WM	RO	RI	RM	GO	GI	GM	DMF	抗生素
1	19	12	12	17	13	15	18	13	15	X	15
10-1	10	15	13	10	14	14	11	14	13	X	
10-2	X	16	16	9	13	15	X	14	13	X	
10-3	X	12	X	X	X	X	X	X	X	X	
10-4	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
10-5	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	

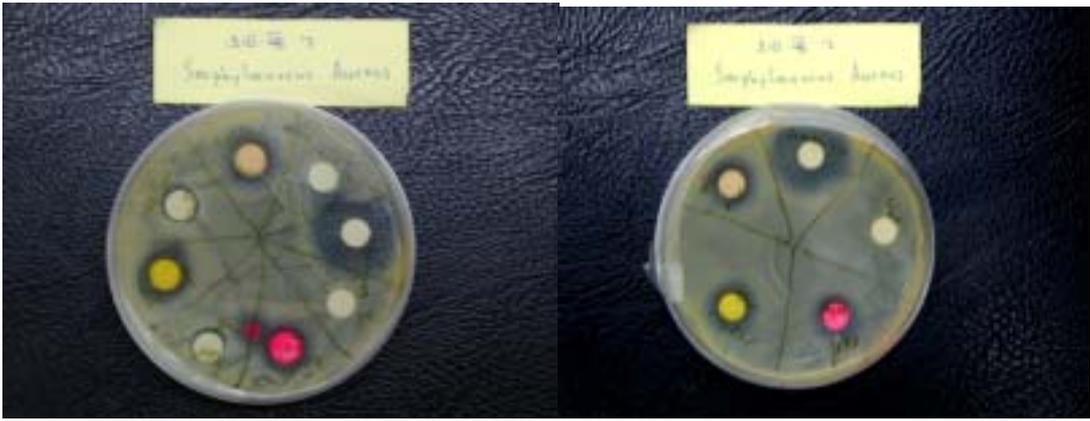
細菌 <i>B.Cereus</i> 的抑菌圈直徑大小 (mm)											
濃度 \ 試劑	WO	WI	WM	RO	RI	RM	GO	GI	GM	DMF	抗生素
1	21	21	13	21	15	18	23	15	21	X	23
10-1	11	24	15	11	13	14	12	7	16	X	
10-2	X	14	12	X	11	11	9	10	11	X	
10-3	X	18	X	X	X	X	X	X	X	X	
10-4	X	X	X	X	X	X	X	X	9	X	
10-5	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	

細菌 <i>Streptococcus</i> 的抑菌圈直徑大小 (mm)											
濃度 \ 試劑	WO	WI	WM	RO	RI	RM	GO	GI	GM	DMF	抗生素
1	13	12	14	20	12	15	26	13	20	X	15
10-1	X	10	X	12	12	15	?	13	11	X	
10-2	X	12	X	X	12	X	X	13	X	X	
10-3	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
10-4	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
10-5	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	

細菌 E.Coli 的抑菌圈直徑大小 (mm)											
濃度 \ 試劑	WO	WI	WM	RO	RI	RM	GO	GI	GM	DMF	抗生素
1	20	X	13	20	X	22	20	X	17	X	20
10-1	10	X	X	X	X	X	12	X	X	X	
10-2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
10-3	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
10-4	X	X	12	X	X	X	X	X	X	X	
10-5	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	

細菌 V.Elpinolyftious 的抑菌圈直徑大小 (mm)											
濃度 \ 試劑	WO	WI	WM	RO	RI	RM	GO	GI	GM	DMF	抗生素
1	22	12	19	27	10	20	?	11	20	X	28
10-1	16	?	11	15	9	9	12	X	12	X	
10-2	11	X	10	21	X	12	X	X	12	X	
10-3	9	X	X	21	?	X	X	X	16	X	
10-4	X	X	X	X	X	X	X	X	12	X	
10-5	X	X	X	X	X	X	X	X	10	X	

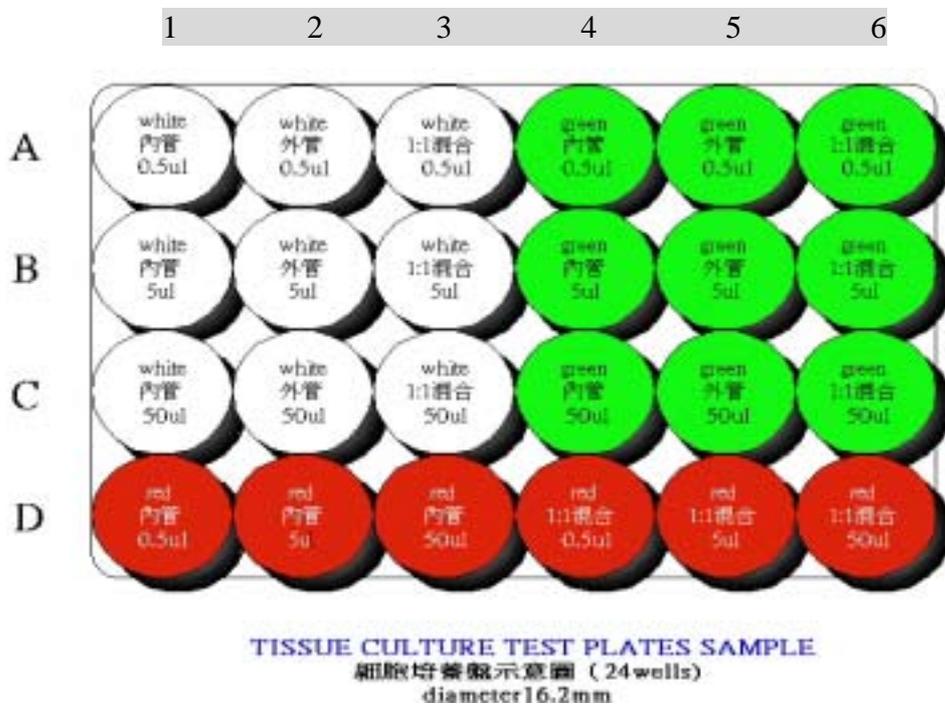
細菌 A.Hydrophia 的抑菌圈直徑大小 (mm)											
濃度 \ 試劑	WO	WI	WM	RO	RI	RM	GO	GI	GM	DMF	抗生素
1	29	12	16	26	12	15	22	12	20	X	13
10-1	X	11	12	X	12	13	11	11	X	X	
10-2	X	12	X	X	12	X	X	11	X	X	
10-3	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
10-4	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
10-5	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	





(二) 在細胞 (蝦的胰臟細胞) 的生長與否方面

每個槽中皆以以下濃度的 sample 加入 (在每個槽內原有 1c.c 的 PBS 培養液)



除了加入 0.5ul sample 的槽以外 (1-A, 2-A, 3-A, 4-A, 5-A, 6-A, 1-D, 4-D), 其他槽內的細胞皆萎縮、發黑, 呈現嚴重的死亡狀態, 顯示少量的螢光棒內含物質就可對細胞造成極致命的影響。

七、 討論：

如前所述，本文主要在於研究螢光棒的內含物質對於生態環境的影響，因此選擇了病毒、細菌、細胞及生物個體作為實驗的對象。由於病毒實驗所需的時間、經費以及技術超出我們高中生的能力範圍，所以未將病毒納入本研究範圍。至於在細菌及細胞的選取上，利用實驗室當時可得到的七種細菌以及生長較為快速的蝦胰臟細胞（PMH）作為實驗對象；而在個體的實驗方面，我們選擇了中研院動物所中可取得的三斑鰱魚和斑馬魚來進行實驗，又考慮到時間的因素，我們使用較為敏感的魚苗來做對象。但是，實驗的結果是否可以在其他的細菌、細胞以及個體上成立則有待進一步的確認和探討。雖然個體的實驗在完成本說明書前尚未完成，但我們相信，經由本實驗學習到的實驗過程、方法和技巧在相關的研究上則是一致的。

在實驗的過程中，為了避免其他外在變因的影響以及考慮到實驗的可重複性，不論是細菌或是細胞的實驗，我們採用兩組實驗分別進行並確定其有一致的結果。

在整個研究的過程中，我們花了不少的時間和精力在熟悉整個實驗的流程以及技巧，其中又以最容易遭到污染的細胞實驗遭遇最多問題；例如因為技巧的不純熟及操作上疏忽造成實驗的無效或失敗，此等再再說明實驗技巧、經驗及細心對於實驗結果的重要性。

在研究過程中，我們曾經嘗試控制 sample 的濃度來探討其對細胞生長的影響，但在嘗試的過程中，發現 sample 並無法順利溶解於培養液中，在嘗試用酒精、DMF 等有機溶劑來溶解 sample 後，卻因其化性及無法溶解於水中的因素而作罷；最後，我們使用微量及低濃度的 sample 來進行抑菌圈大小的實驗，而在細胞生長影響的實驗方面，我們改使用微量、並未稀釋的 sample，在其中觀察到一些現象，在 sample 和培養液因本身極性的問題而僅能微量互溶的情況下，竟會在如此微量（10ul）和低劑量（5ul sample 滴在 1ml 的培養液中）的情況下產生如此明顯的抑菌圈和細胞嚴重死亡的結果。然而，很奇怪的是，在我們所採用之 Omnilight 公司所生產的螢光棒外部包裝套上，卻注明著無毒害（NON-TOXIC）。

八、 結論

僅是一支小小的螢光棒，即有許多不容忽視的潛藏危機，僅以六種不同濃度的螢光物質，加入七株菌就顯現出其對生態的影響，看似極微，實則甚鉅。在以 e-mail (附件三) 向政府單位詢問後得知，政府並未將螢光棒列為有毒廢棄物的回收管制範圍，與一般垃圾同等處理，但其毒性亦會危害大自然的分解者——細菌，而有毒物質流散各處。

我們僅是高二的學生，能力有限；但我們有極強的環保意識，盡我們最大的能力，提出警訊與呼籲。在實驗結果上，我們分析了螢光棒對七株菌的影響，為的是想進一步對政府環保單位及製造廠商提出這樣一份資料，希望政府能繼續完成下一步的改善措施並將這一份工作移交給較有能力及權力的環保單位，讓人都意識到一個少有人認為會危害大自然的奢侈品，也會對我們的生存環境存有潛在的威脅，並希望能提高全國人民的環保意識，更加愛護這個地球。

另一方面，螢光棒包裝上所稱的非毒性物質其實是就安全使用的情況而言。當使用完及處理過程中即成一項劇毒的廢棄物，這也是我們研究之初所注意到的。但我們最終的目的，不只是提出螢光棒對環境的影響，我們還有另一份心得：生活中各式各樣的必需品或奢侈品若其成分不加以分析，任何一產品都有可能增加環境負荷，或是直接波及生物生存的安危，我們秉持這份使命，希望有能力之單位承接這一份意念，實際付諸行動。

九、 參考資料

- 中正化學諮詢月刊九十年八月三十一號由中正大學化學研究所黃永吉、于淑君所著螢光棒一文 (<http://www.chem.ccu.edu.tw/~consult/jnl9008.htm>)
- 余岳川教授所著的生活與化學第二章 (中山學術文化基金會發行)
- 行政院環保署環境檢驗通訊雜誌網路資料
(<http://www.niea.gov.tw/analysis/publish/month/issu.htm>)
- 行政院環保署環境檢驗通訊雜誌的第 31 期研究報告
(<http://www.niea.gov.tw/analysis/publish/month/31/31th2-1.htm>，東吳大學 張碧芬教授，檢驗所 袁紹英 著)

(第三名)

實驗過程細心認真，亦尋求多方面之資源探討螢光棒內容物之環境毒性，值得嘉許，使用之材料亦含蓋細菌、藻類與魚類等，用心值得肯定，故予以推薦。