

中華民國第四十四屆中小學科學展覽會

作者說明書

高中組生物(生命科學)科

040715

北縣私立金陵女子高級中學

指導老師姓名

吳恬妮

作者姓名

楊佩穎

陳珮姍

蔡瑩睿

中華民國第四十四屆中小學科學展覽會

作品說明書

科 別：生物科

組 別：高中組

作品名稱：SARS 來了！消毒劑對水稻幼苗生長影響之研究

關 鍵 詞：水稻、次氯酸鈉、過氧化氫

編號：

SARS 來了！消毒劑對水稻幼苗生長影響之研究

壹、摘要

本研究是以水稻（台中在來 1 號）幼苗為材料，探討消毒劑過氧化氫 (H_2O_2) 與次氯酸鈉 ($NaOCl$) 對水稻幼苗生長與生理之影響。 H_2O_2 或 $NaOCl$ 處理水稻幼苗，均會明顯抑制水稻的地上部與根之生長，且在低濃度即有顯著效果。 H_2O_2 或 $NaOCl$ 同時也會降低水稻幼苗內地上部與根之蛋白質含量、增加 MDA 與 H_2O_2 的含量，說明此二種消毒劑會造成氧化逆境。 H_2O_2 或 $NaOCl$ 處理對水稻幼苗生長的抑制效果，在處理後 1 天即明顯發生。 H_2O_2 或 $NaOCl$ 處理造成水稻幼苗地上部與根之蛋白質含量下降、MDA 與 H_2O_2 的含量增加也是在處理後 1 天就出現。上述結果顯示，消毒劑對水稻幼苗生長之抑制與生理之影響，可能是由氧化逆境所造成。

貳、研究動機

近來 SARS 疫情蔓延，各種消毒藥水使用機率大增，其作用可殺死病毒與細菌，但使用過的消毒劑大部分均未再處理而直接被排放至環境中，其殘留的有效成份是否會導致自然界中植物的生長受影響，進而改變生態環境，值得我們加以探討。雖然每人每年的食米量已明顯較農業社會時期減少，但米食仍為國人的主食，在國內為最重要的糧食作物之一，種植面積與產量均佔第一位，因此為一良好之研究對象，此外，選用水稻為材料的原因還有其種子大小均一，生長一致，材料取得方便。

參、研究目的

本研究之目的是以水稻幼苗為材料，探討消毒劑 ($NaOCl$ 與 H_2O_2) 對水稻幼苗生長之影響。

肆、研究設備及器材

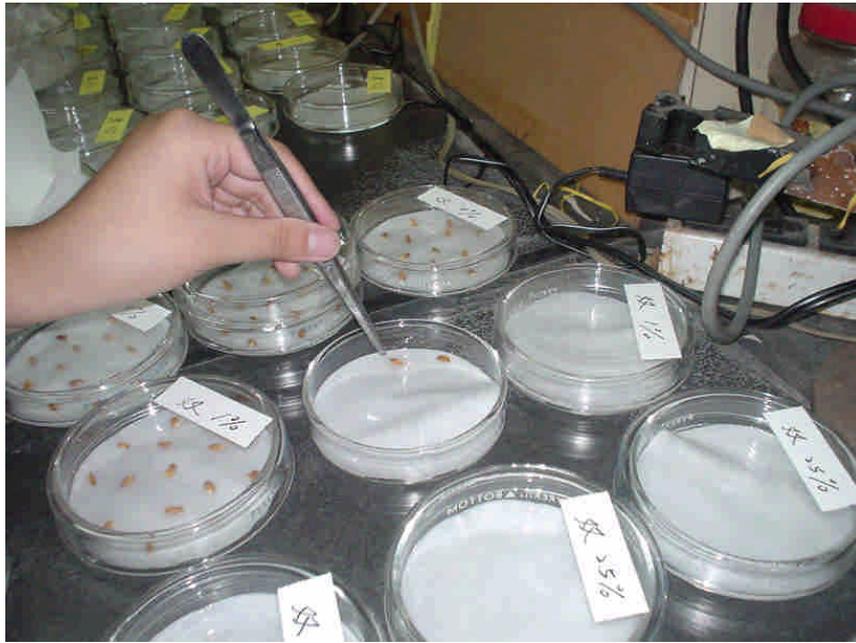
- 一、冷凍離心機
- 二、微量分注器、吸管尖
- 三、光電比色計

- 四、微量電子天平
- 五、27°C 恆溫生長箱、37°C 恆溫生長箱、60°C 烘箱、4°C 冰箱、-80°C 超低溫冷凍櫃
- 六、水浴槽
- 七、數位相機
- 八、製冰機
- 九、研钵與杵
- 十、單面刀、切割版、直尺、鑷子
- 十一、培養皿、試管、試管架、離心管
- 十二、定量瓶、錐形瓶、血清瓶、量杯
- 十三、pH 計
- 十四、秤藥紙、藥勺、石蠟紙、濾紙、吸水紙、漏斗、冰桶
- 十五、蒸餾水製造機
- 十六、超音波震盪槽
- 十七、藥品：NaOCl、H₂O₂、sodium phosphate、bovine serum albumin、commissie brilliant blue G-250、phosphoric acid、TBA (thiobabituric acid)、TCA (trichloroacetic acid)、TiCl₄、H₂SO₄、牛血清蛋白 (bovine serum albumin；BSA)
- 十八、水稻種子 (水稻品種台中在來 1 號)

伍、研究過程或方法

一、材料種植、選取與處理：

選取飽滿之穀粒，以 2.5 % sodium hypochlorite 溶液浸泡消毒 15 分鐘後，再以自來水流洗穀粒至無餘氯之氣味。將穀粒均勻播於鋪有已潤濕的吸水紙之培養皿 (直徑 20 公分) 中，在 37 °C、黑暗之催芽箱中催芽 24 小時。取露白均一的穀粒，撒播每 10 粒種子為 1 重複，置於含 10 mL 之不同試劑溶液的培養皿 (直徑 9 公分) 中，於 27 °C、黑暗下處理，在適當時間取材做各項分析。



二、處理藥劑濃度：

NaOCl：0%，0.1%，0.5%，1%，3%，5%。

H₂O₂：0%，1%，2.5%，5%，7.5%，10%。

三、生長分析：

根 (root) 長，根鮮重，地上部 (shoot) 長與地上部鮮重，分別以單面刀切取後度量。根乾重，地上部乾重係將樣本以秤藥紙折疊包起後，置於 60°C 烘箱，烘乾 2 天後秤重。

四、生理分析：

(一)、可溶性蛋白質含量之測定：

可溶性蛋白質含量測定係採用 Bradford (1976) 之方法。材料秤取鮮重後，以 1 mL sodium phosphate buffer (50 mM, pH 6.8) 將材料研磨成均質。在 4 °C 下以 17,600 g 離心 20 分鐘。離心後吸取 20 μ L 之上清液注入試管，再加入 5 mL 之 dye solution。振盪使其均勻後靜置約 10 分鐘，接著以光電比色計測定 595 nm 波長之吸光值。以牛血清蛋白 (bovine serum albumin; BSA) (5 μ g ~ 100 μ g)，依同樣步驟做標準曲線，求得消光係數為 0.001 μ g⁻¹ cm⁻¹。可溶性蛋白質含量是以每克鮮重含可溶性蛋白質之毫克數 (mg g⁻¹ FW) 表

示。

Dye solution 之配製：

取 100 mg commassie brilliant blue G-250，加入 50 mL 酒精 (95 %，v/v) 攪拌至完全溶解後，加入二次蒸餾水稀釋至約 800 mL。混合均勻後，再加入 100 mL phosphoric acid (85 %，v/v)，然後定量至 1 L。將溶液搖晃均勻後，以 Whatman No. 1 濾紙過濾，所得濾液即為 dye solution。置於褐色瓶中，儲存於 4 °C 冰箱備用。

(二)、脂質過氧化作用之測定：

MDA (malondialdehyde) 含量可做為脂質過氧化作用之指標。MDA 含量測定，採用 Heath 與 Packer (1968) 之方法。以 1 mL TCA (trichloroacetic acid) (5 %，w/v) 將材料研磨成均質。在室溫下以 10,000 g 離心 5 分鐘後，吸取 0.5 mL 上清液注入試管中，再加入 2 mL TBA (thiobabaturic acid) (0.5 %，w/v，溶於 TCA [20 %，w/v] 中)。混合均勻後置於 95 °C 熱水浴 30 分鐘，然後迅速將試管插入冰中，中止反應。約 5 分鐘後取出試管振盪，除去氣泡。在室溫下以 2,000 g 離心 10 分鐘後，取上清液以光電比色計測定 532 nm、600 nm 波長之吸光值。空白試驗是以 0.5 mL 之 TCA (5 %，w/v) 代替萃取液。MDA 含量之計算為以 532 nm 之吸光值扣除 600 nm 之吸光值後，除以消光係數 $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ，乘以體積 (2.5 mL)，再乘以稀釋倍數 (2 倍)，然後乘以 1,000 (nmol/ μmol)，最後除以樣品鮮重 (g)。MDA 含量之表示法為每克鮮重所含 MDA 之 nmol 數 ($\text{nmol g}^{-1} \text{ FW}$)。

(三)、H₂O₂ 含量測定：

H₂O₂ 含量測定採用 Jana 與 Choudhuri (1981) 的方法。在冰浴下，以 1 mL sodium phosphate buffer (50 mM，pH 6.8) 將材料研磨成均質，於 4 °C 下以 6,000 g 離心 25 分鐘。取 0.6 mL 上清液置於離心管中，再加入 0.3 mL TiCl₄ [0.1 %，v/v，溶於 20 % H₂SO₄ (v/v)]，混合均勻後於 20 °C，6,000 g 離心 10 分鐘後測定 410 nm 之吸光值。空白試驗以 0.6 mL sodium phosphate buffer (50 mM，pH 6.8) 代替 H₂O₂ 萃取液。H₂O₂ 計算方式為 410 nm 吸光值除以消光係數 ($0.28 \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)，乘以稀釋倍數 (1.5 倍)，除以鮮重 (g)。H₂O₂ 含量以每克鮮重所含有的 H₂O₂ μmol 數 ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{ FW}$) 表示。

陸、研究結果

做實驗難免會出錯，因此我們同一個處理均有四次重複，而每一個實驗均做三~四次。在不同次的實驗中我們發現結果其實都有類似的趨勢，為使實驗結果更容易表達，我們挑選出最具代表性的一組實驗結果做為報告。

為了瞭解 NaOCl 對水稻幼苗生長的影響，我們先用不同濃度的 NaOCl 處理。圖 1 是不同濃度 NaOCl 處理水稻幼苗的外觀，從照片中可看出水稻生長明顯受抑制，且幼苗有褐化的現象。圖 2 是將圖 1 的結果數量化，圖中可以看出 NaOCl 在低濃度 (0.1%) 即對水稻幼苗根部的生長指標 (長度、鮮重與乾重) 有明顯抑制的效果。圖 3 的結果告訴我們，地上部也會遭受 NaOCl 的毒害，無論長度、鮮重與乾重均明顯受到抑制，而且也是在低濃度的 NaOCl 即有顯著效果。

不同濃度的 H₂O₂ 處理水稻幼苗，也有類似的情形 (圖 4)，但是有趣的是，水稻幼苗外觀並無褐化的情形。無論根部或地上部，低濃度 (1%) H₂O₂ 就有顯著抑制生長的情形 (圖 5 與圖 6)，結果也顯示根部受損較地上部嚴重。

由於這兩種消毒劑有很強的氧化力，因此我們想從植物生理的角度去推測它們對水稻毒害的機制。強氧化劑通常會造成氧化逆境，植物細胞壁之內即為富含脂質的細胞膜，還有細胞質內的胞器均為膜系構造，若在氧化逆境下，這些以脂質為主成分的膜系構造即易被過氧化，稱為脂質過氧化作用 (lipid peroxidation)，若細胞本身無法修復受損的膜系構造，此結果將造成細胞原生質滲漏，導致細胞瓦解死亡。脂質過氧化作用的產物為丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 或乙烷，所以我們可以測定 MDA 含量代表植物細胞脂質過氧化作用的程度。而植物體內 H₂O₂ 含量增加可視為植物正遭受氧化逆境。蛋白質為酵素的主要成分，是維持細胞正常運作不可或缺的要素，如果植物遭受逆境時，特別是氧化逆境，蛋白質會被氧化而結構不穩定，容易被分解成小分子。因此我們可以用 MDA、H₂O₂ 與蛋白質的含量變化來觀察植物是否遭受氧化逆境或毒害。

由於 NaOCl 處理水稻幼苗濃度在 3% 以上幾乎完全不生長，因此生理分析僅處理較低濃度之 NaOCl (0%、0.1%、0.5% 與 1%)，H₂O₂ 的部分也是如此，僅處理 0%、1%、2.5% 與 5%。

圖 7 的結果顯示，與水處理 (對照組) 比較，0.1% 之 NaOCl 明顯降低水稻幼苗根的蛋白質含量、增加 MDA 與 H₂O₂ 含量，說明 NaOC 藉由產生氧化逆境對水稻幼苗根造成傷害而影響生長。水稻幼苗地上部也有類似的情形 (圖 8)，NaOCl 可減少其蛋白質含量、提高 MDA 與 H₂O₂ 含量，與生長 (圖 2 與圖 3) 相符的結果為根部對 NaOCl 的反應較地上部明顯。



圖 1. 不同濃度 NaOCl 對水稻幼苗根生長之影響。水稻幼苗於 27°C，黑暗中處理 3 天後拍照。

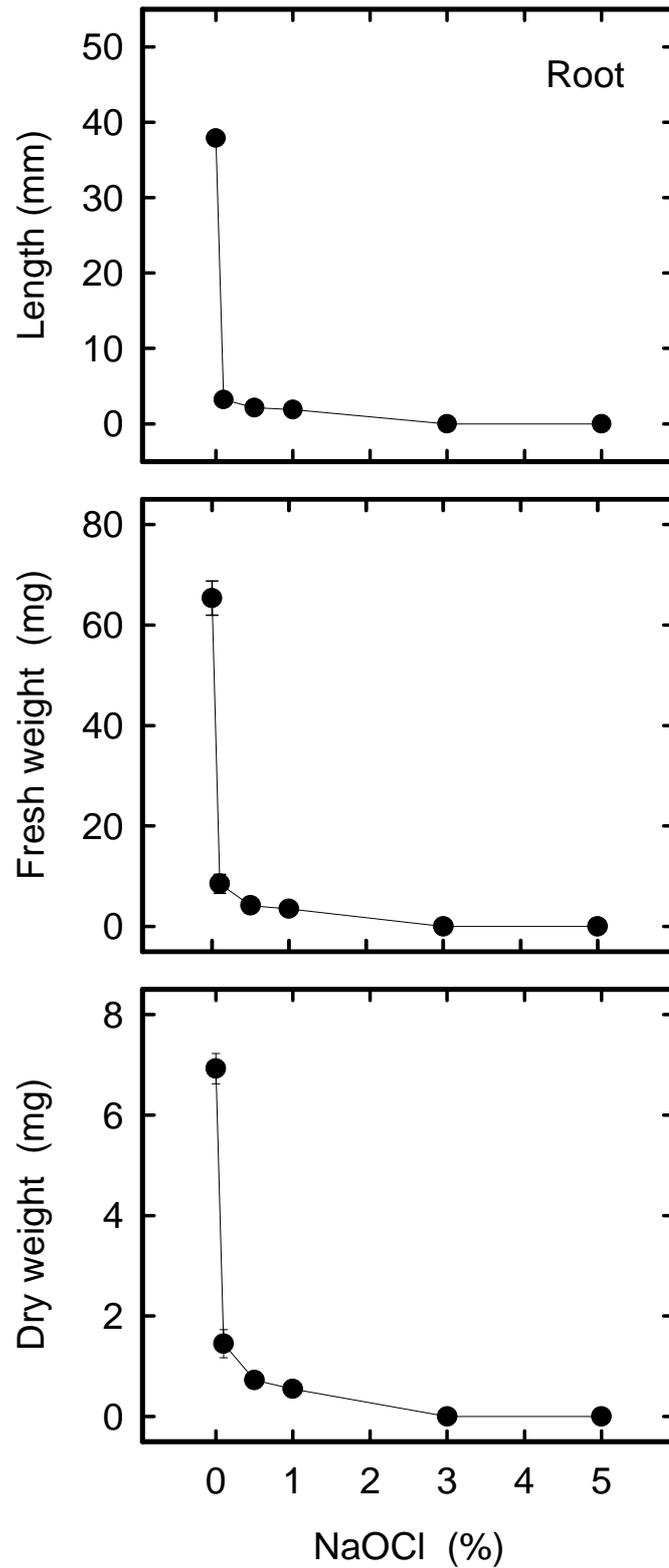


圖 2. 不同濃度 NaOCl 對水稻幼苗根生長之影響。NaOCl 濃度分別為 0%、0.1%、0.5%、1%、3% 與 5%。根長度、鮮重與乾重分別於 27°C，黑暗中處理 3 天後測量。

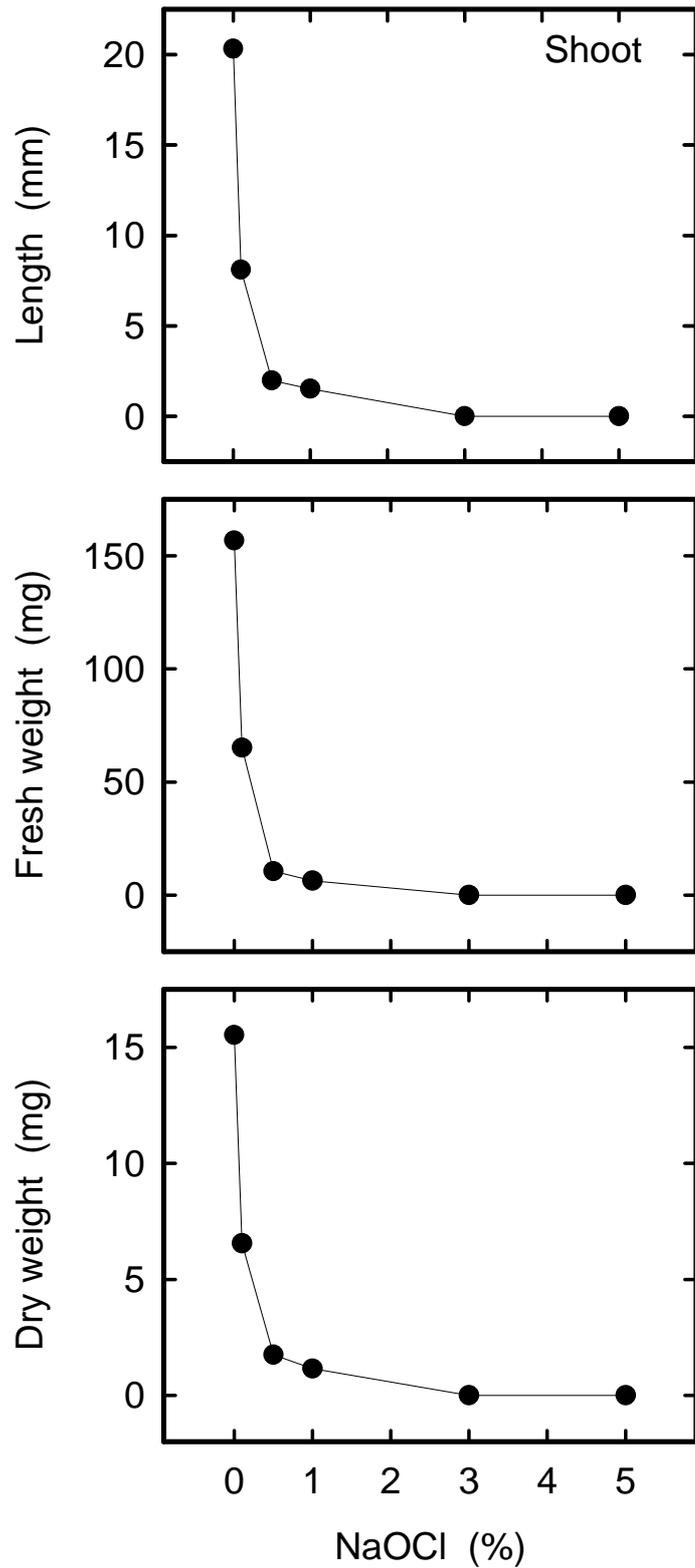


圖 3. 不同濃度 NaOCl 對水稻幼苗地上部生長之影響。NaOCl 濃度分別為 0%、0.1%、0.5%、1%、3% 與 5%。地上部長度、鮮重與乾重分別於 27°C，黑暗中處理 3 天後測量。

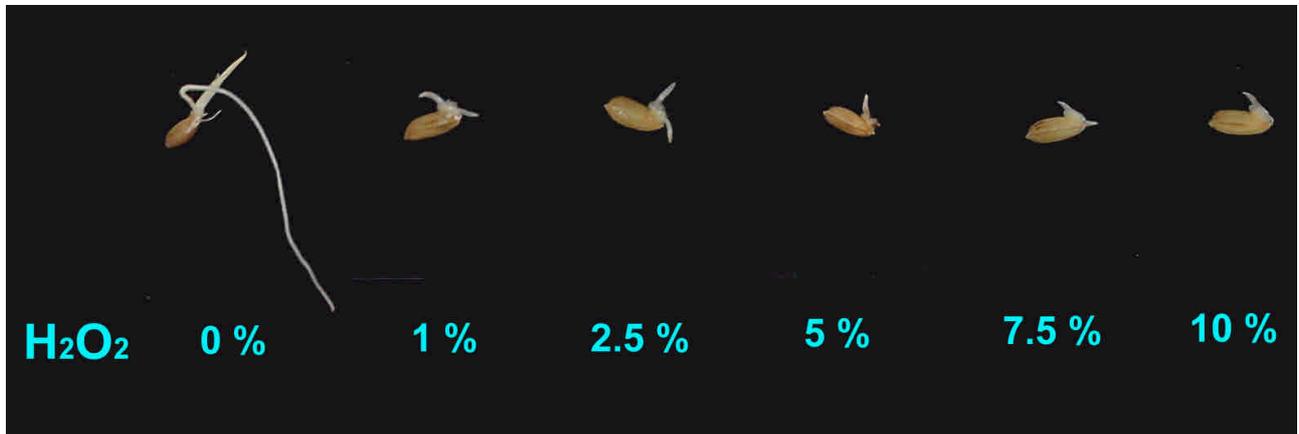


圖 4. 不同濃度 H₂O₂ 對水稻幼苗生長之影響。水稻幼苗於 27°C，黑暗中處理 3 天後拍照。

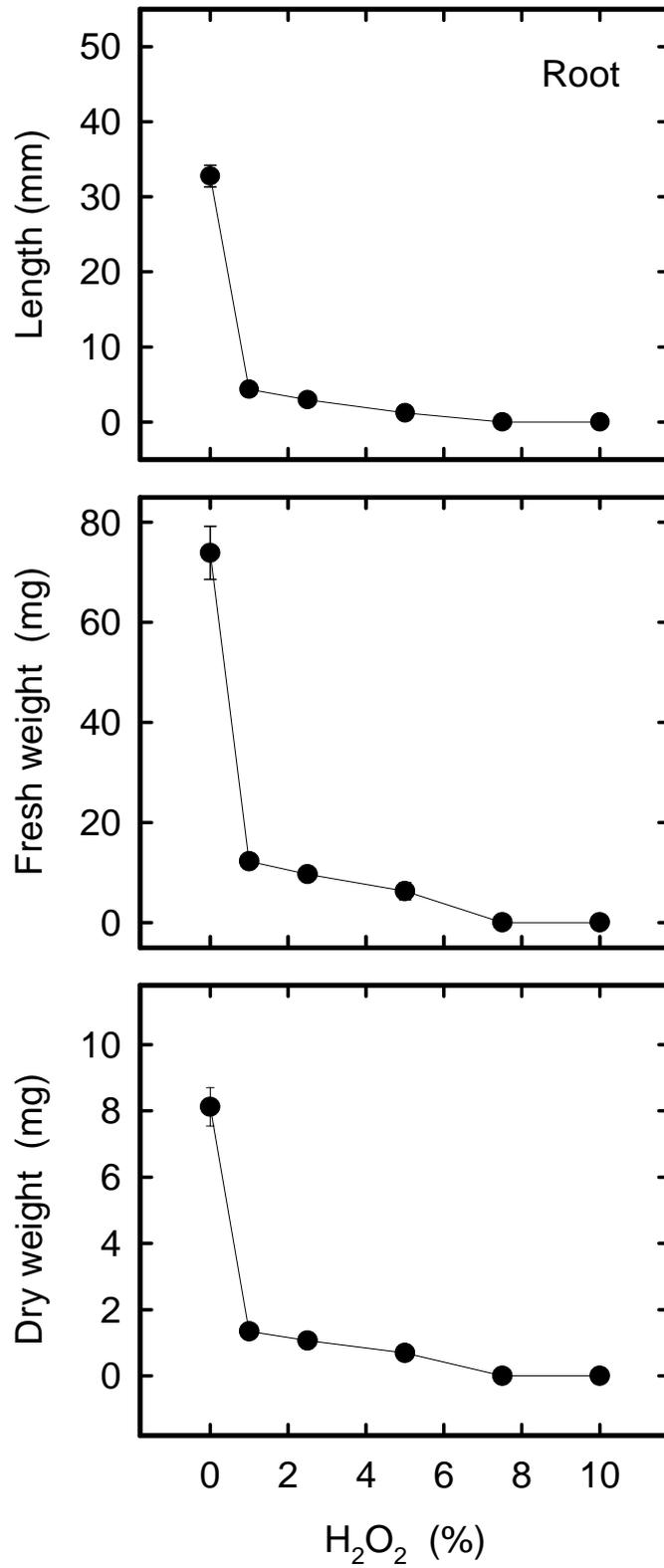


圖 5. 不同濃度 H₂O₂ 對水稻幼苗根生長之影響。H₂O₂ 濃度分別為 0%、1%、2.5%、5%、7.5% 與 10%。根長度、鮮重與乾重分別於 27°C，黑暗中處理 3 天後測量。

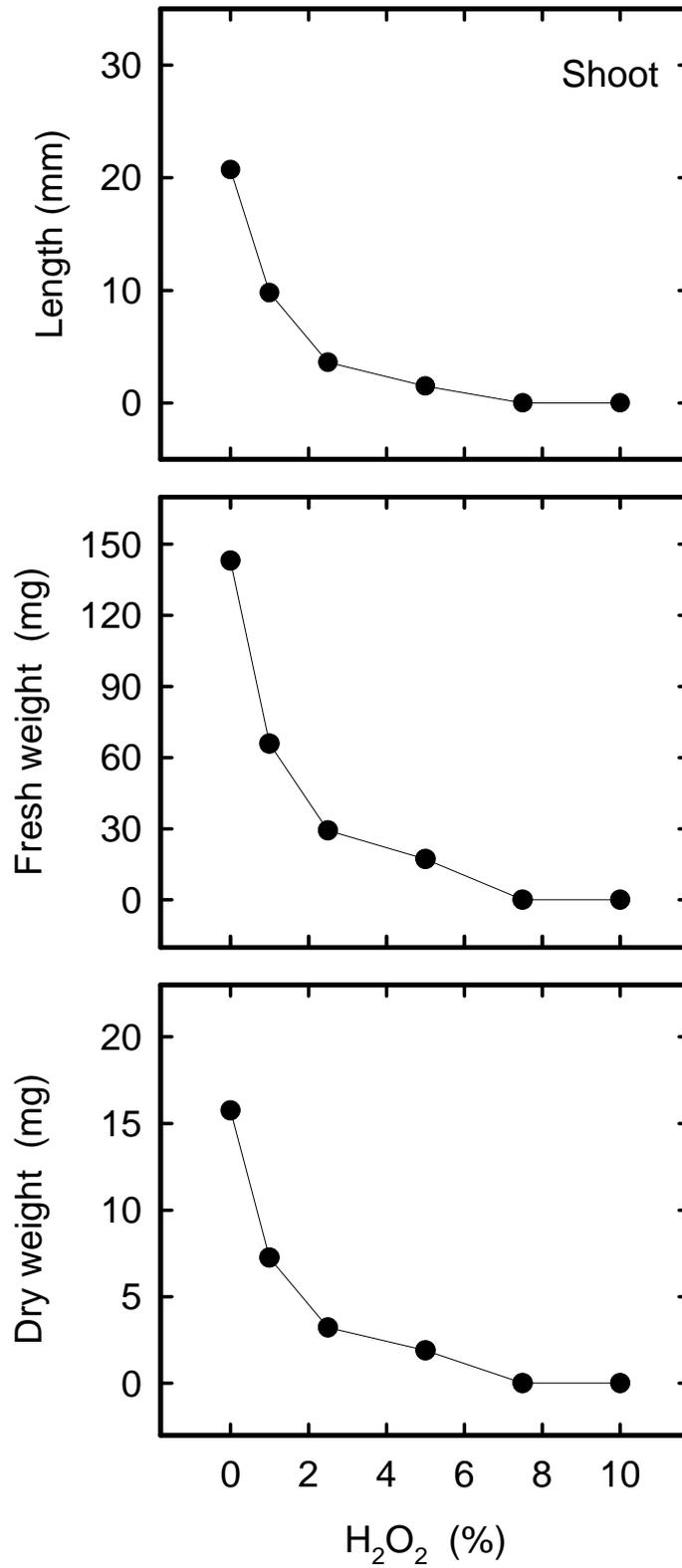


圖 6. 不同濃度 H₂O₂ 對水稻幼苗地上部生長之影響。H₂O₂ 濃度分別為 0%、1%、2.5%、5%、7.5% 與 10%。地上部長度、鮮重與乾重分別於 27°C，黑暗中處理 3 天後測量。

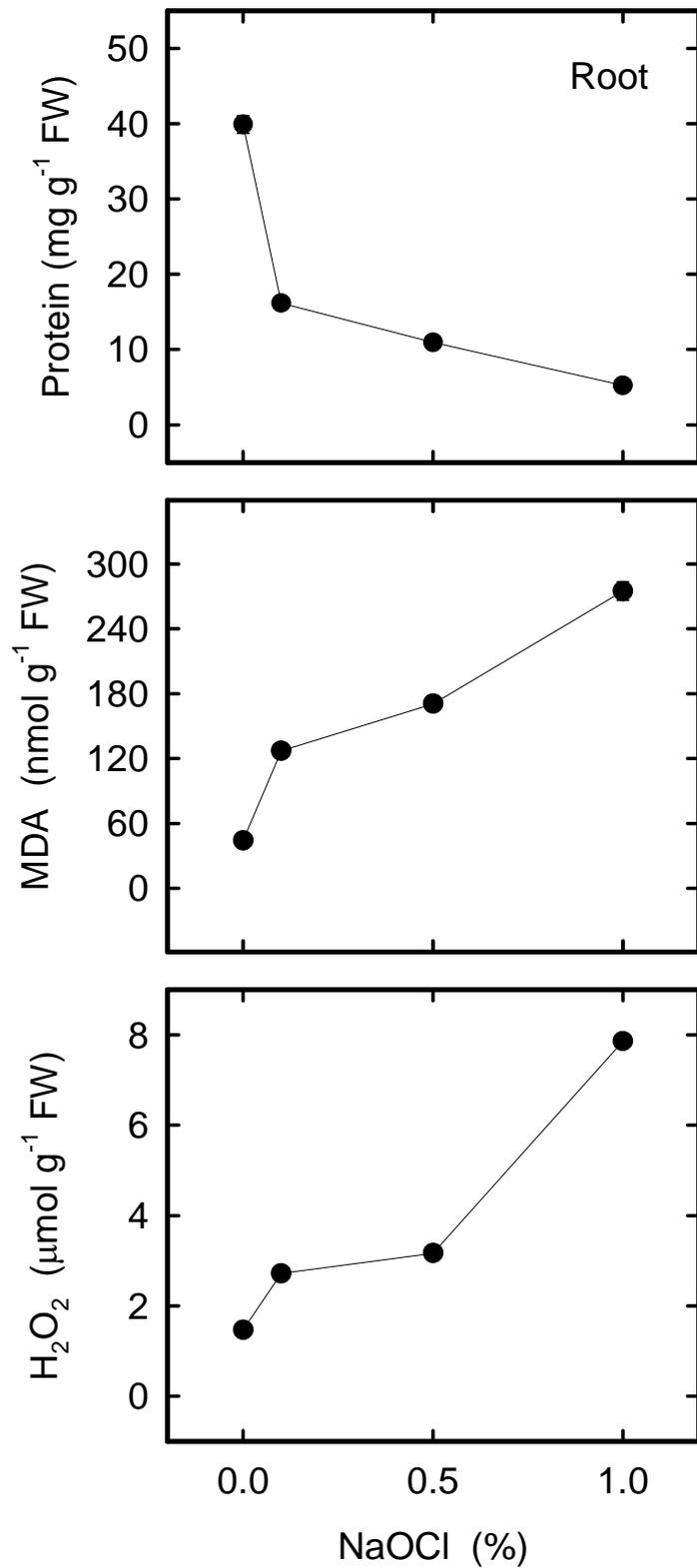


圖 7. 不同濃度 NaOCl 對水稻幼苗根生理之影響。NaOCl 濃度分別為 0%、0.1%、0.5% 與 1%。蛋白質、MDA 與 H₂O₂ 含量分別於 27°C，黑暗中處理 3 天後分析。

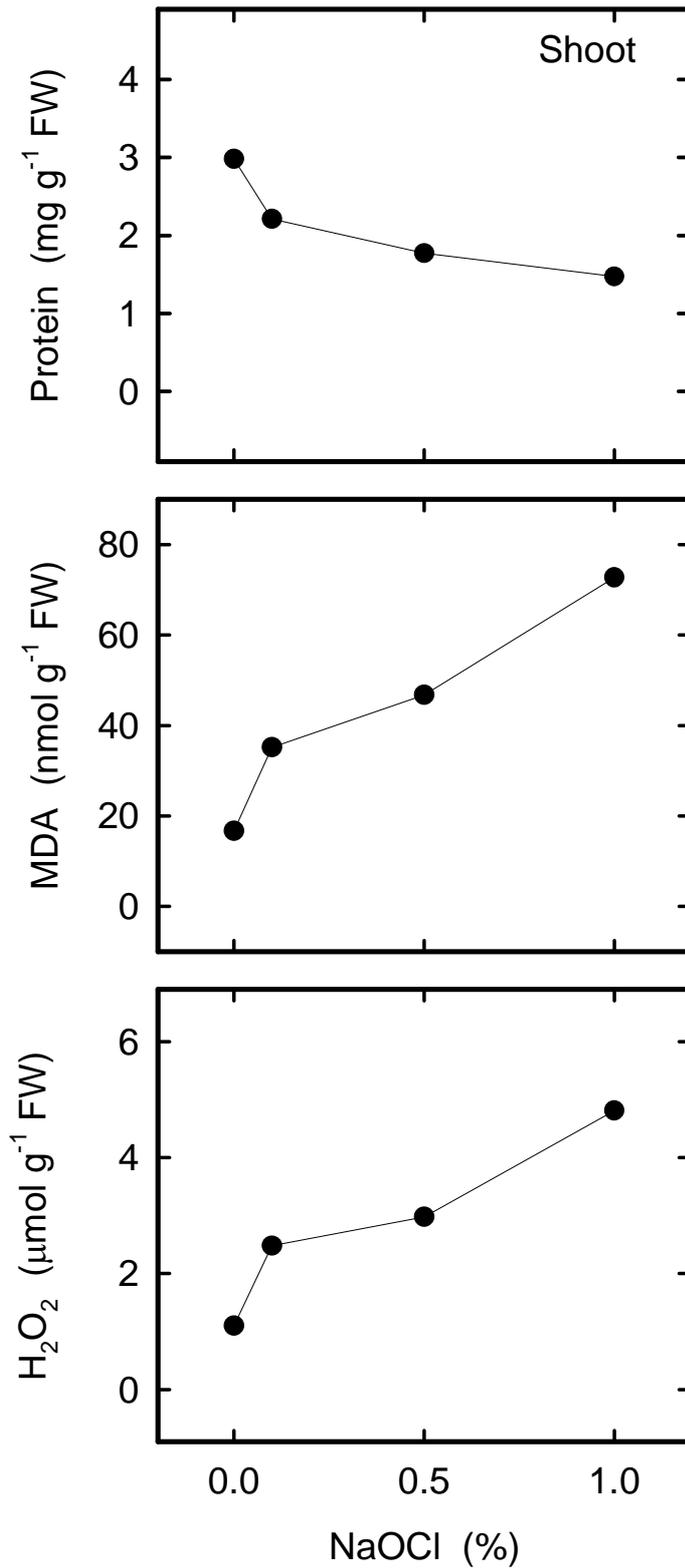


圖 8. 不同濃度 NaOCl 對水稻幼苗地上部生理之影響。NaOCl 濃度分別為 0%、0.1%、0.5% 與 1%。蛋白質、MDA 與 H₂O₂ 含量分別於 27°C，黑暗中處理 3 天後分析。

相同的結果也反映在 H_2O_2 處理之水稻幼苗根與地上部 (圖 9 與圖 10)，說明了 H_2O_2 也是經由氧化逆境對水稻幼苗產生毒害。

由前述的濃度反應結果得知，水稻幼苗根部或地上部在低濃度的 NaOCl (0.1%) 或 H_2O_2 (1%) 處理即明顯受傷害而生長受阻。因此我們選擇此兩種濃度進行後續的時程研究，瞭解水稻幼苗於何時開始遭受消毒劑之毒害。

從外觀來看 (圖 11)，0.1% 之 NaOCl 對水稻生長明顯在第 1 天即明顯抑制。將生長因子數量化的結果 (圖 12) 也顯示，0.1% 之 NaOCl 處理水稻幼苗 1 天內，幼苗根之生長即受到抑制。無論是根長度、鮮重或乾重，結果均相同。而地上部亦有雷同的情形 (圖 13)，但從與水處理相比較看來地上部差異較為緩和。類似的情形亦發生在外加 1% H_2O_2 處理的水稻幼苗，不管是根或地上部，均於處理 1 天即與水處理有明顯差異 (圖 14~16)。

從生理的層面 (圖 17 與圖 18) 來看， NaOCl 處理水稻幼苗 1 天，即明顯的促進水稻幼苗根與地上部蛋白質含量下降、MDA 與 H_2O_2 含量上升，說明生理方面 NaOCl 處理第 1 天即與水處理發生差異，也就是說氧化逆境的傷害在短時間內就已經發生。

同樣的結果在圖 19 與 圖 20 也得到證明， H_2O_2 可在短時間 (1 天) 對水稻幼苗根與地上部產生氧化逆境。

生理的失序，可能是使得生長受阻之主要原因，而 NaOCl 或 H_2O_2 對水稻幼苗產生氧化逆境，也可能是扮演造成生理代謝失去正常的重要角色之一。

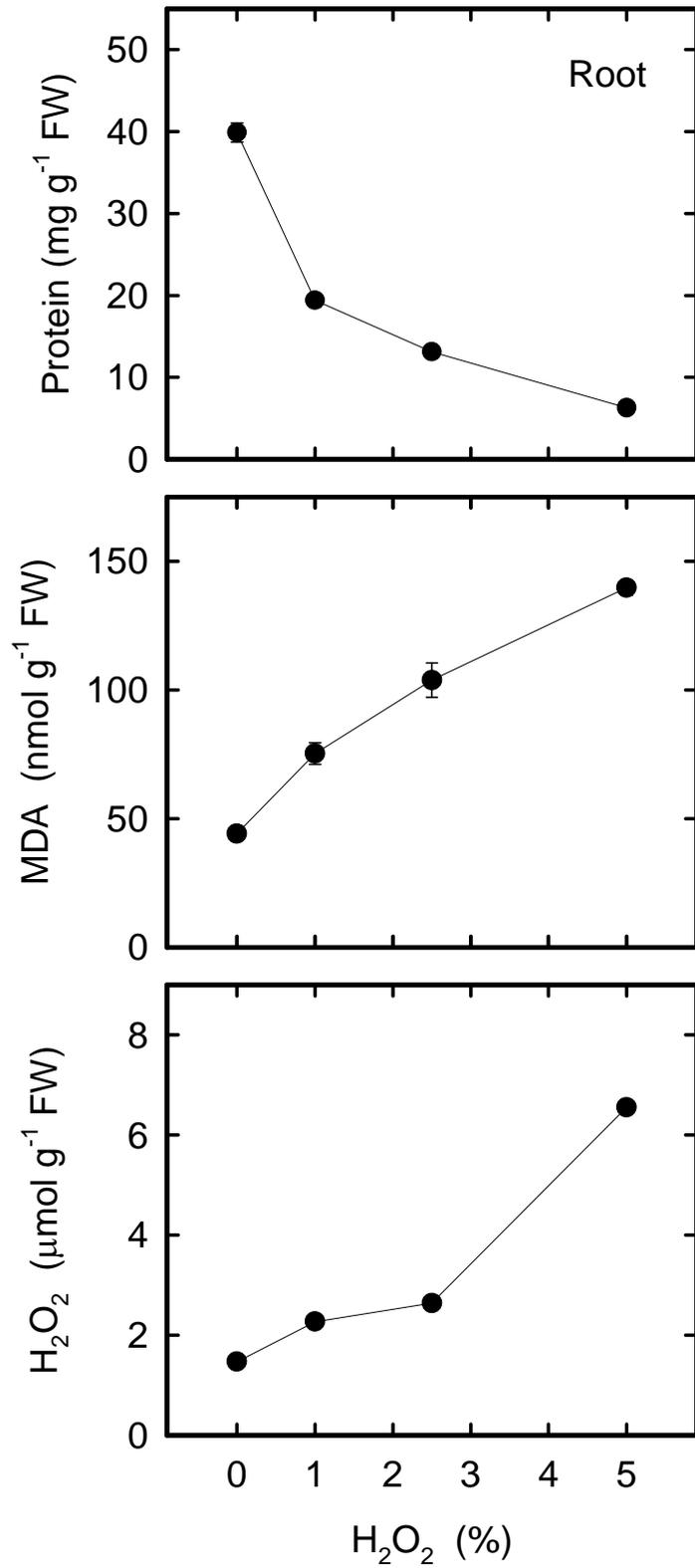


圖 9. 不同濃度 H_2O_2 對水稻幼苗根生理之影響。 H_2O_2 濃度分別為 0%、1%、2.5% 與 5%。蛋白質、MDA 與 H_2O_2 含量分別於 27°C，黑暗中處理 3 天後測定。

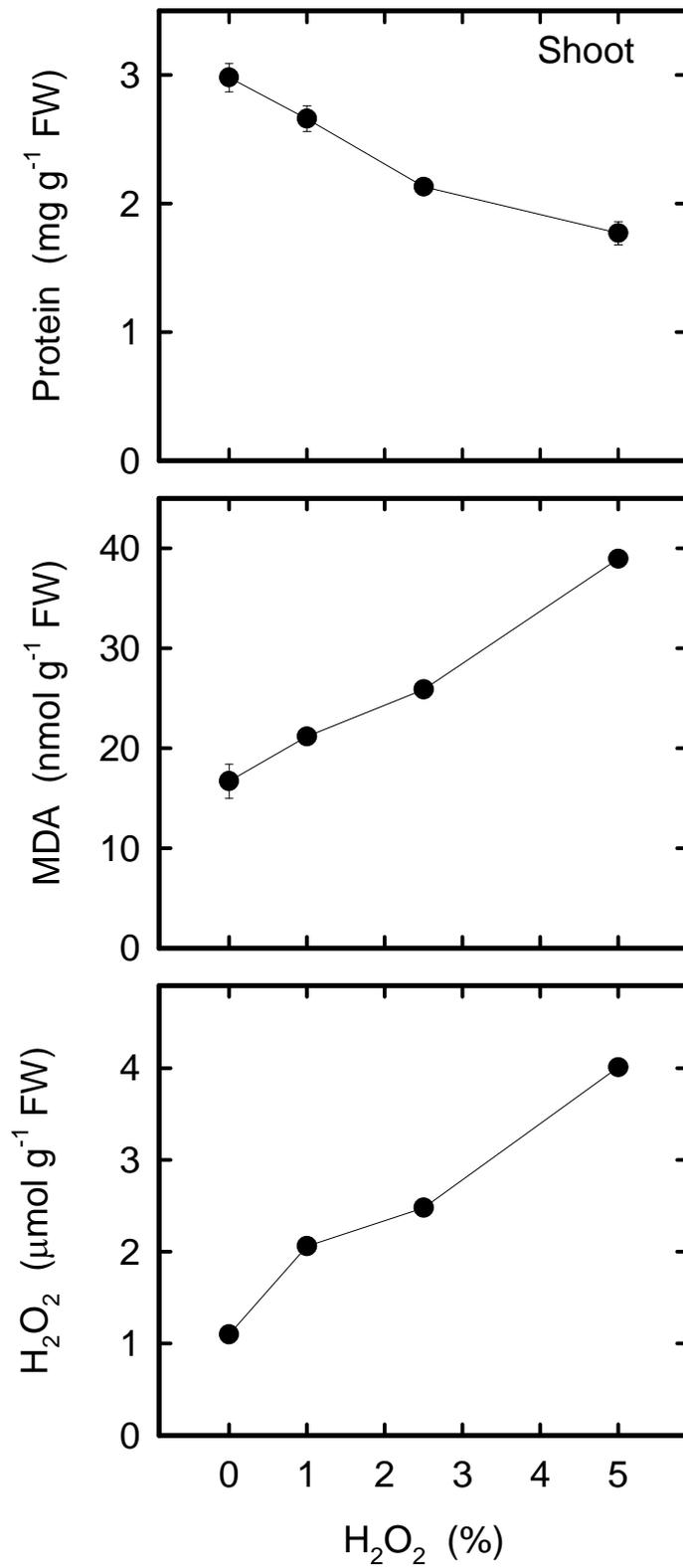


圖 10. 不同濃度 H₂O₂ 對水稻幼苗地上部生理之影響。H₂O₂ 濃度分別為 0%、1%、2.5% 與 5%。蛋白質、MDA 與 H₂O₂ 含量分別於 27°C，黑暗中處理 3 天後測定。

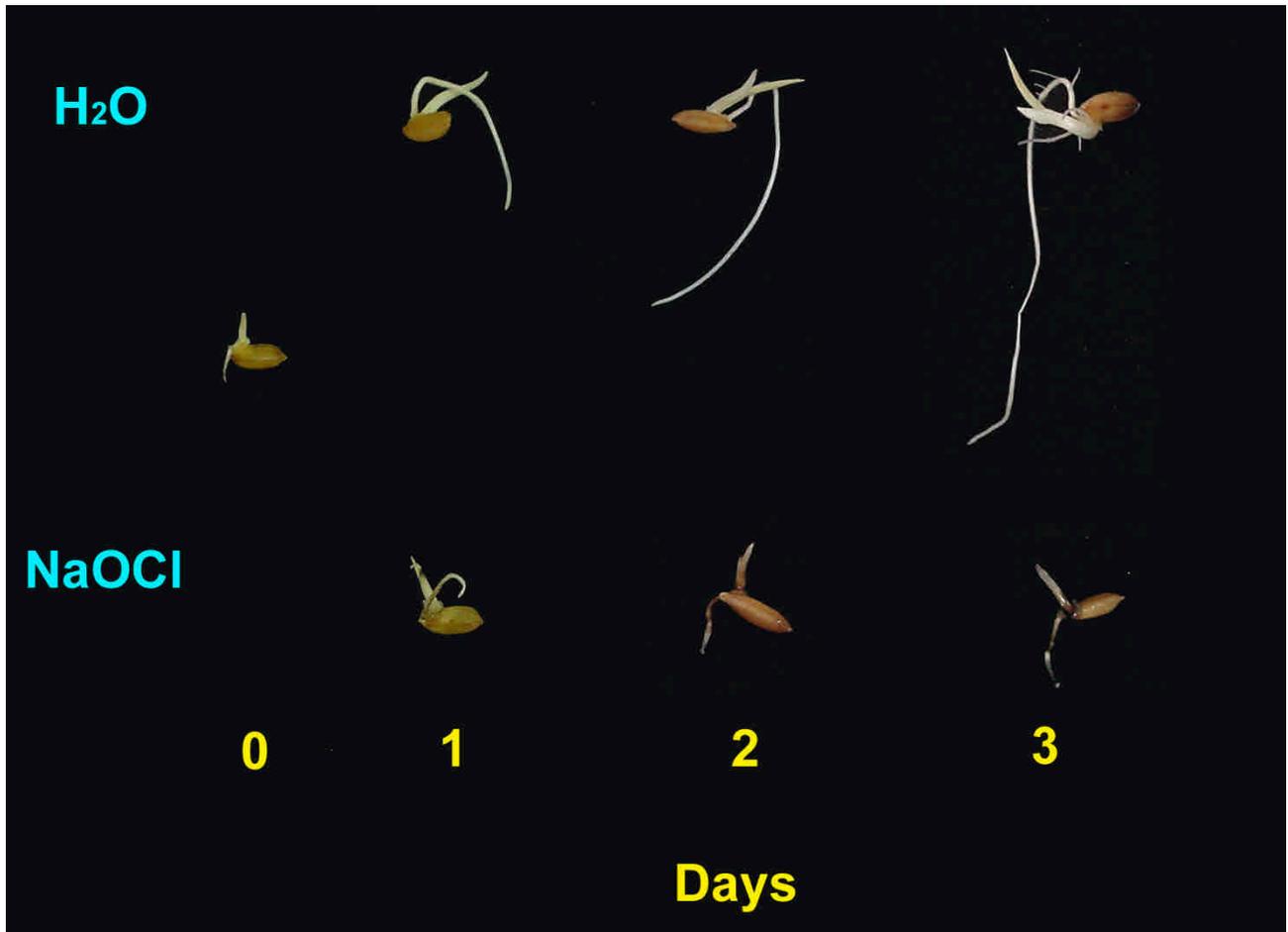


圖 11. 不同時間 NaOCl 處理對水稻幼苗生長之影響。NaOCl 濃度為 0.1%。水稻幼苗分別於 27°C，黑暗中處理 0、1、2 和 3 天拍照。

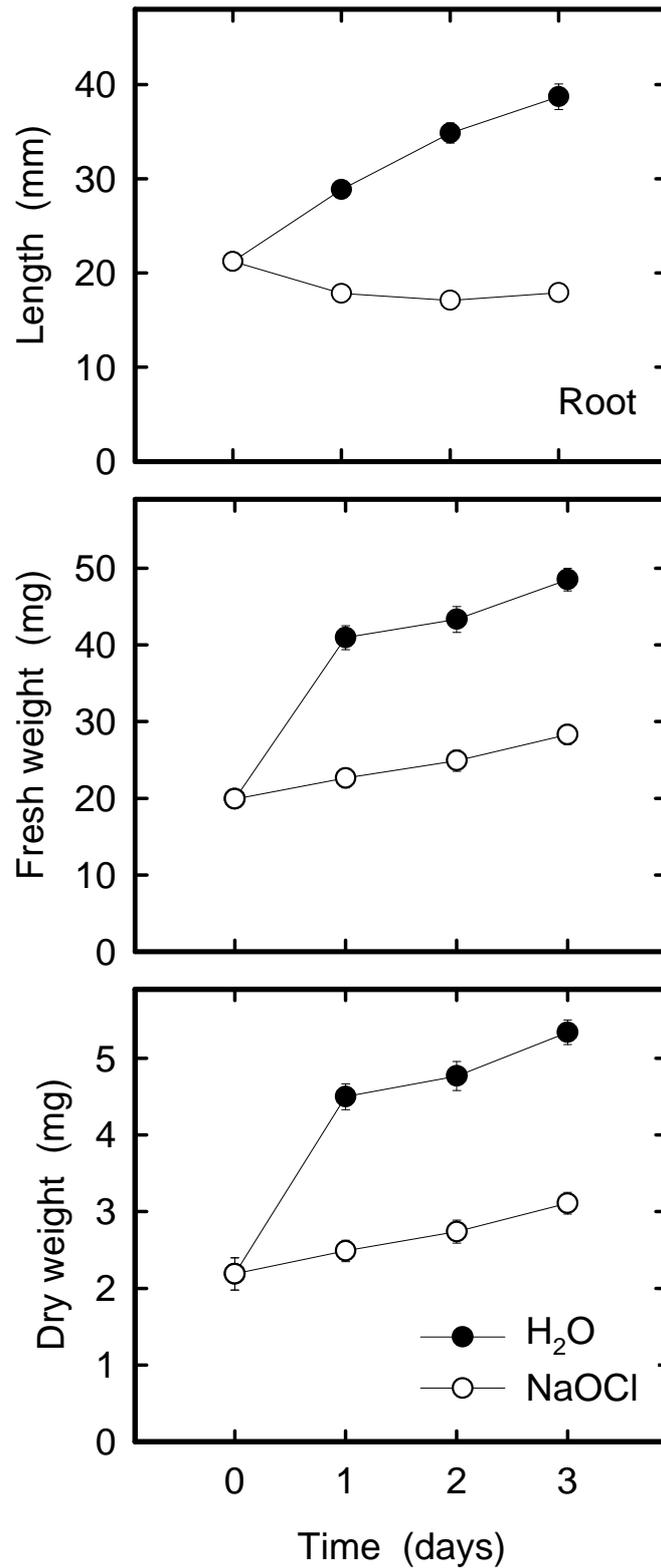


圖 12. 不同時間 NaOCl 處理對水稻幼苗根生長之影響。NaOCl 濃度為 0.1%。根長度、鮮重與乾重分別於 27°C，黑暗中處理 0、1、2 和 3 天測量。

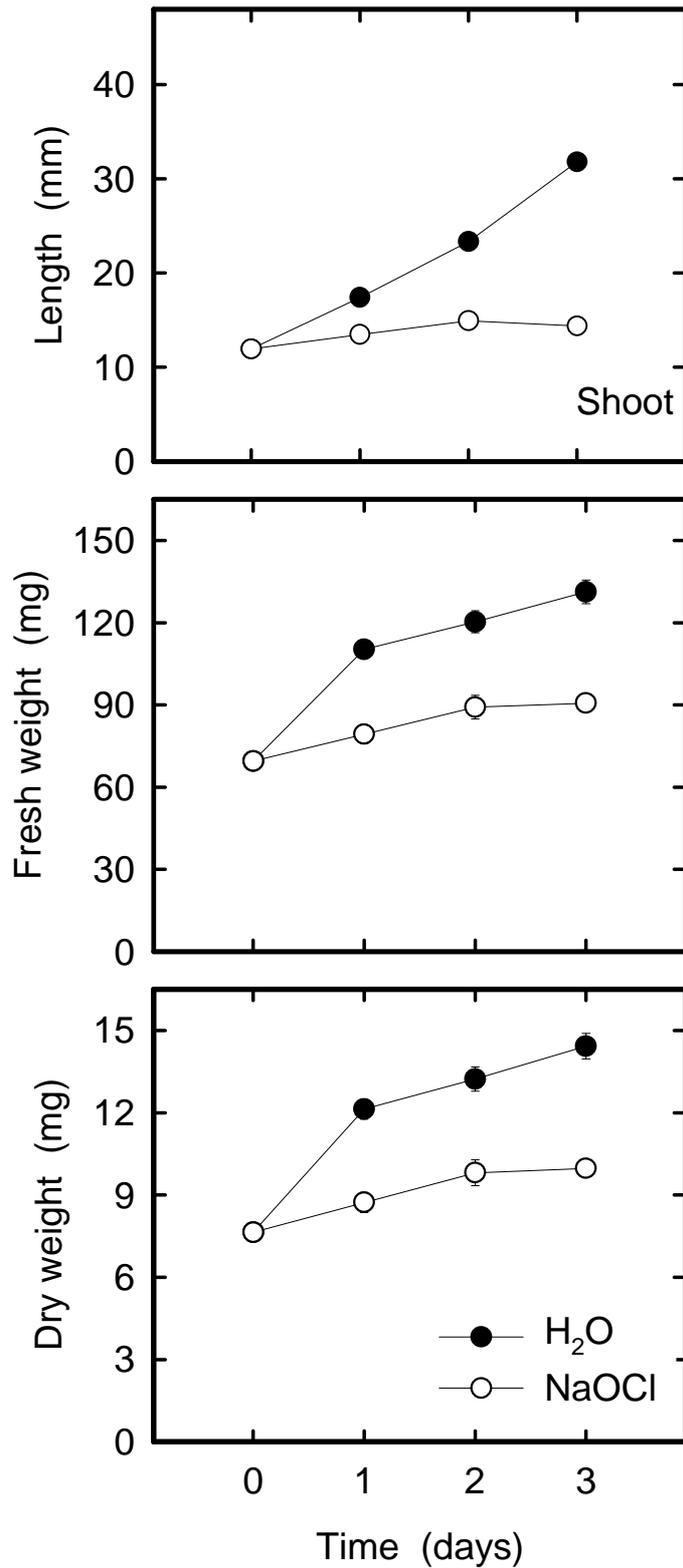


圖 13. 不同時間 NaOCl 處理對水稻幼苗地上部生長之影響。NaOCl 濃度為 0.1%。地上部長度、鮮重與乾重分別於 27°C，黑暗中處理 0、1、2 和 3 天測量。

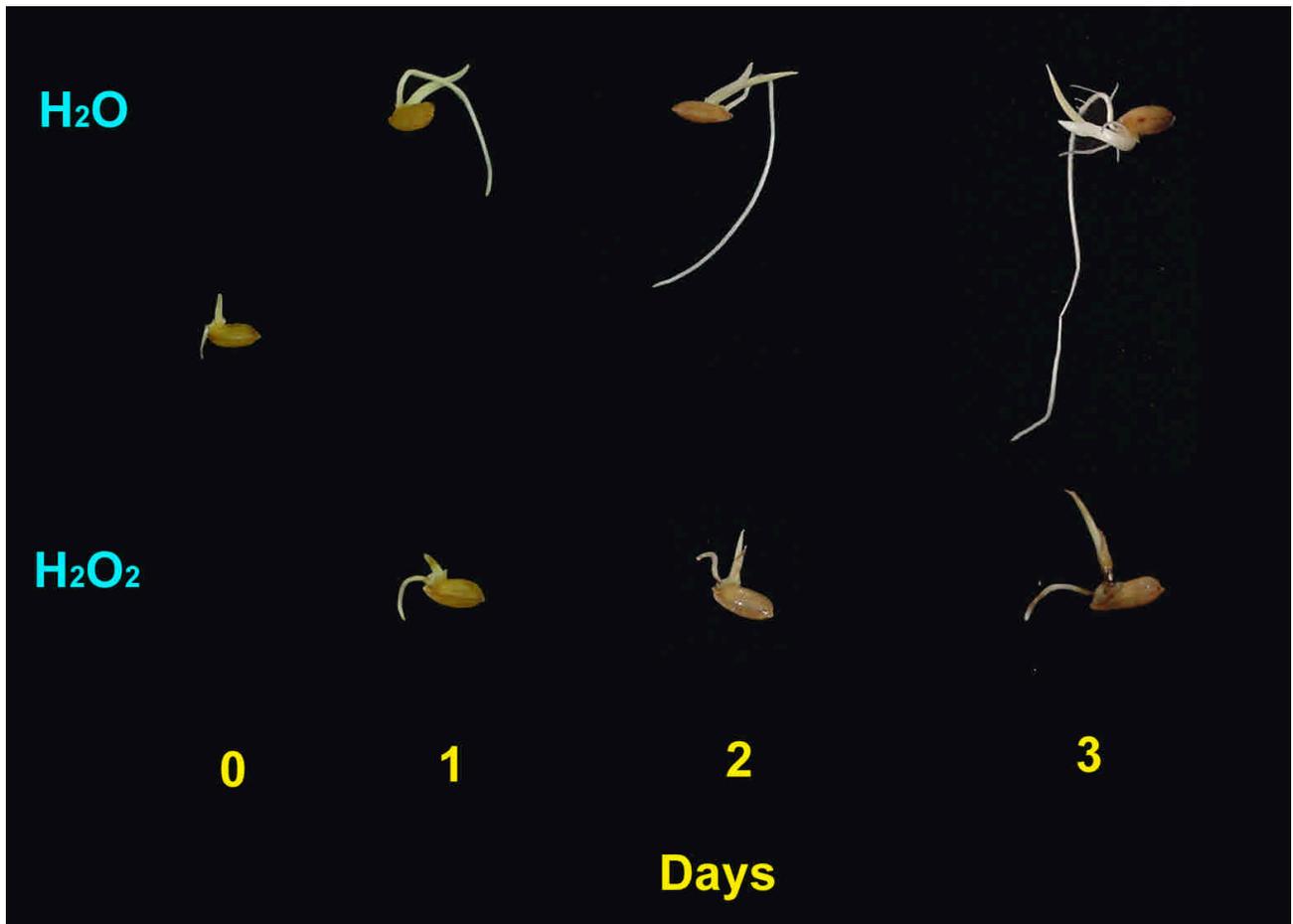


圖 14. 不同時間 H_2O_2 處理對水稻幼苗生長之影響。 H_2O_2 濃度為 1%。水稻幼苗分別於 $27^\circ C$ ，黑暗中處理 0、1、2 和 3 天拍照。

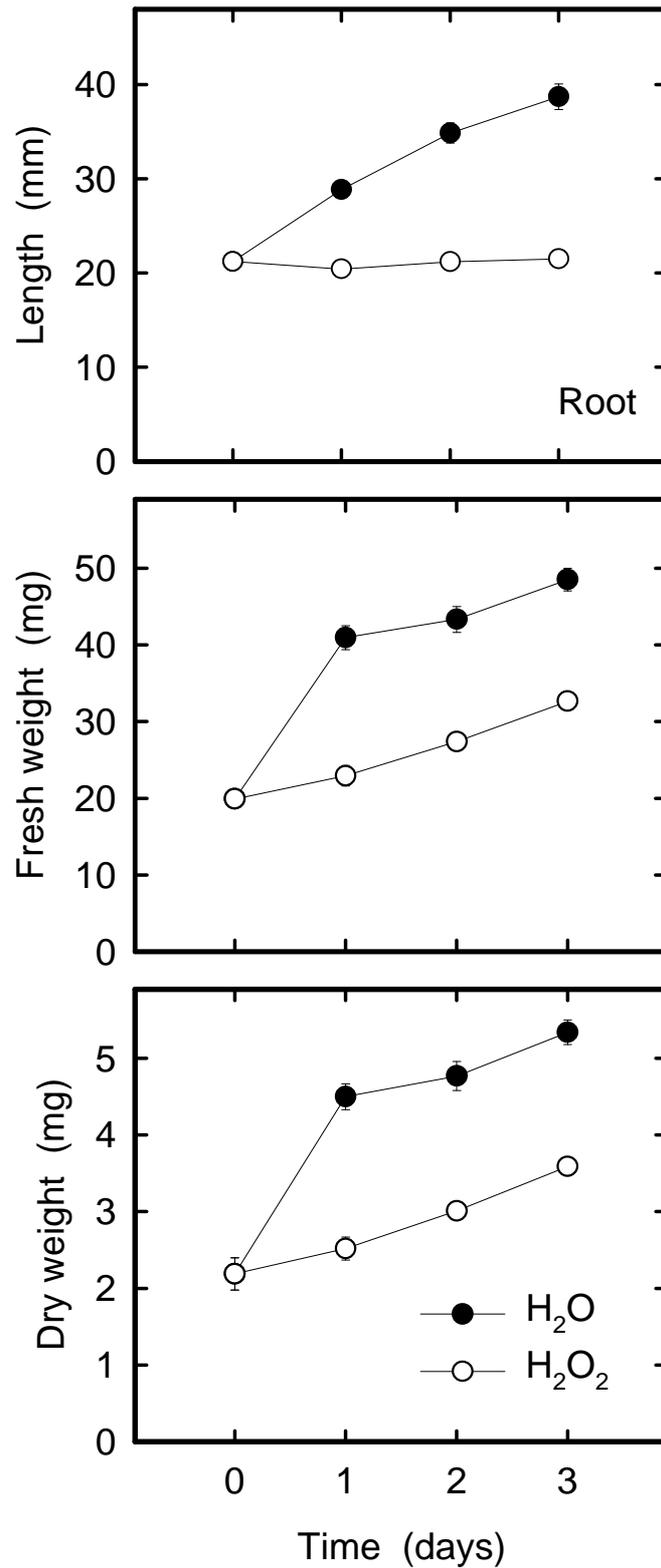


圖 15. 不同時間 H₂O₂ 處理對水稻幼苗根生長之影響。H₂O₂ 濃度為 1%。根長度、鮮重與乾重分別於 27°C，黑暗中處理 0、1、2 和 3 天測量。

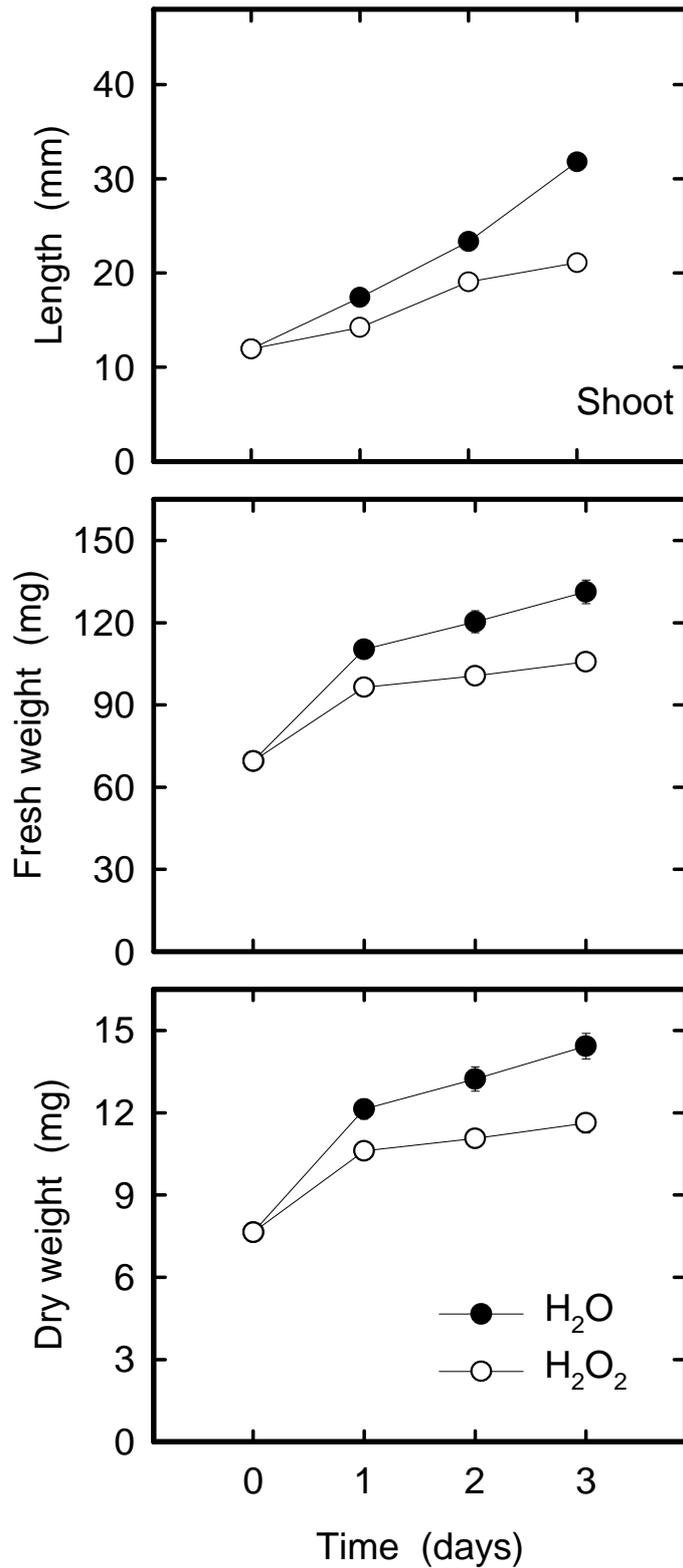


圖 16. 不同時間 H₂O₂ 處理對水稻幼苗地上部生長之影響。H₂O₂ 濃度為 1%。地上部長度、鮮重與乾重分別於 27°C，黑暗中處理 0、1、2 和 3 天測量。

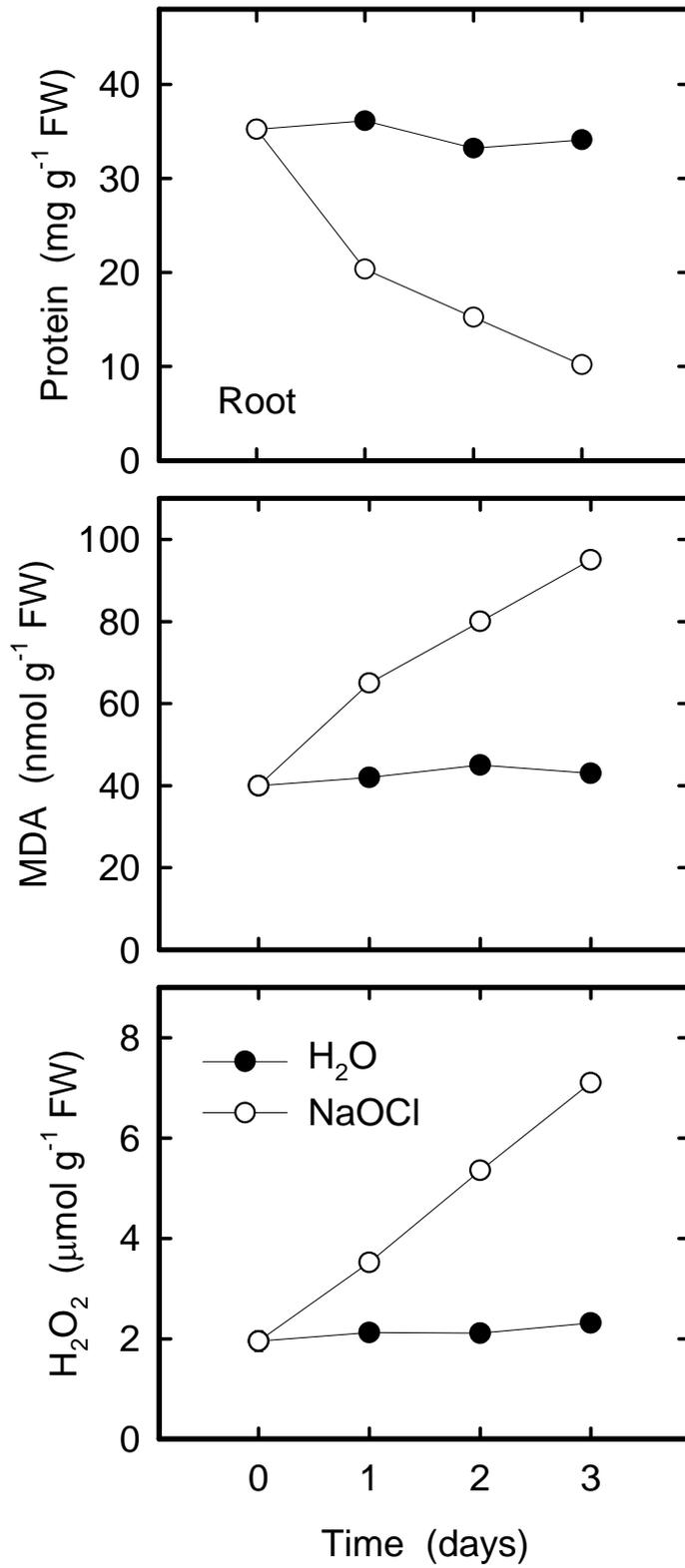


圖 17. 不同時間 NaOCl 處理對水稻幼苗根生理之影響。NaOCl 濃度為 0.1%。蛋白質、MDA 與 H₂O₂ 含量分別於於 27°C，黑暗中處理 0、1、2、3 天後分析。

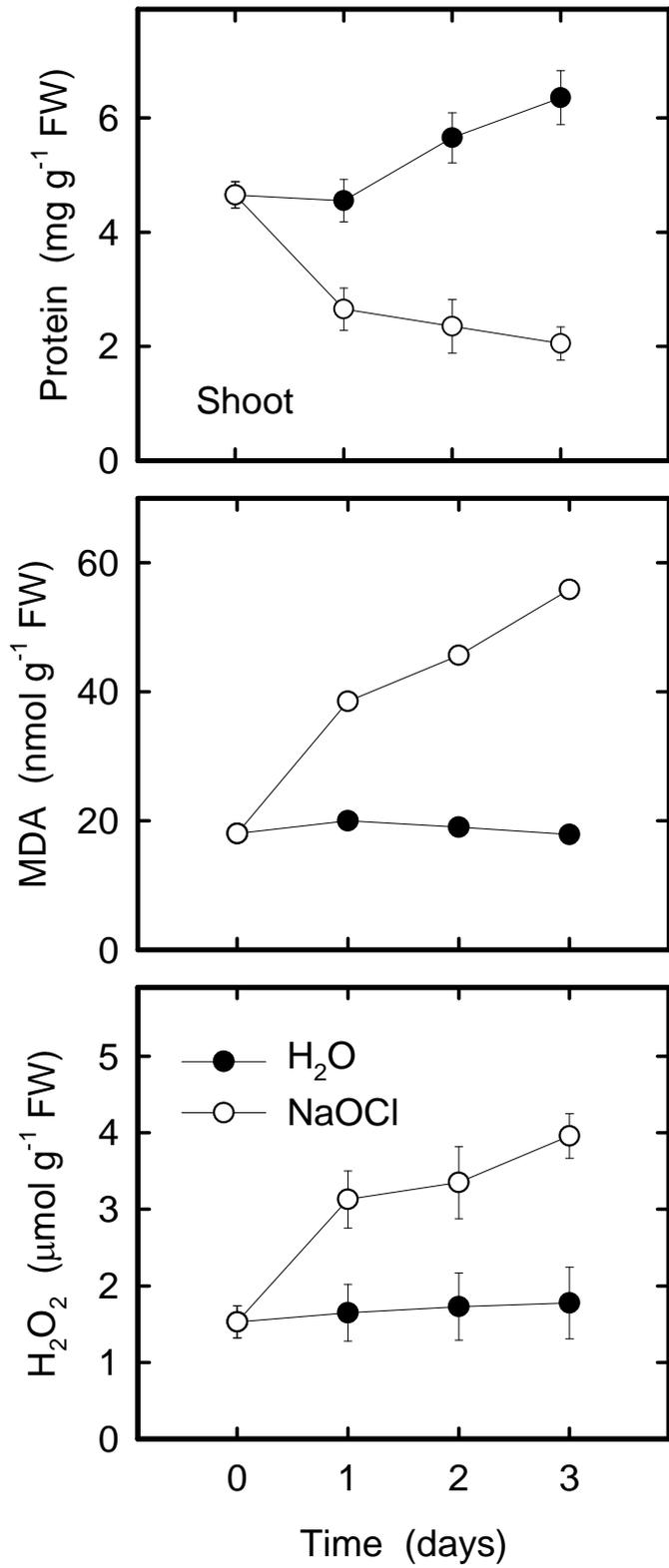


圖 18. 不同時間 NaOCl 處理對水稻幼苗地上部生理之影響。NaOCl 濃度為 0.1%。蛋白質、MDA 與 H₂O₂ 含量分別於於 27°C，黑暗中處理 0、1、2、3 天後分析。

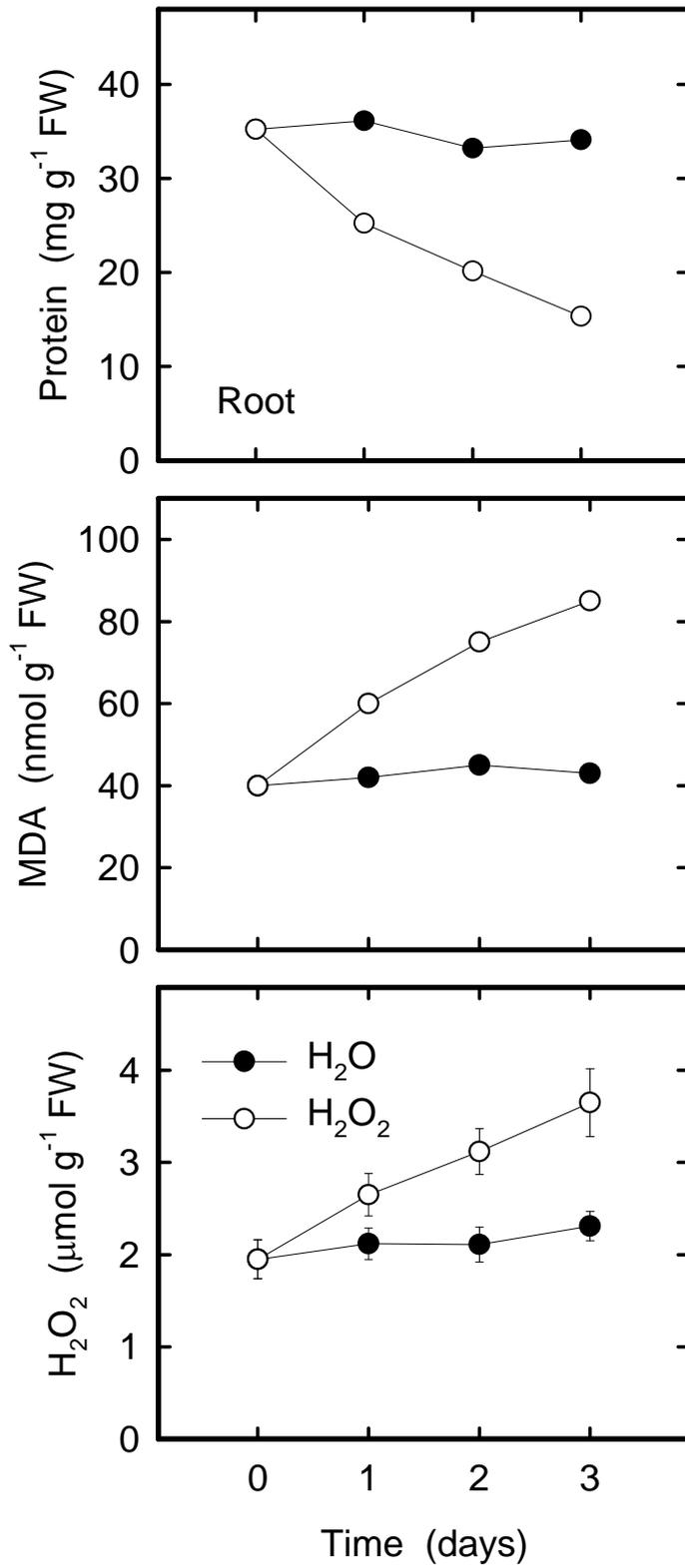


圖 19. 不同時間 H₂O₂ 處理對水稻幼苗根生理之影響。H₂O₂ 濃度為 1%。蛋白質、MDA 與 H₂O₂ 含量分別於於 27°C，黑暗中處理 0、1、2、3 天後分析。

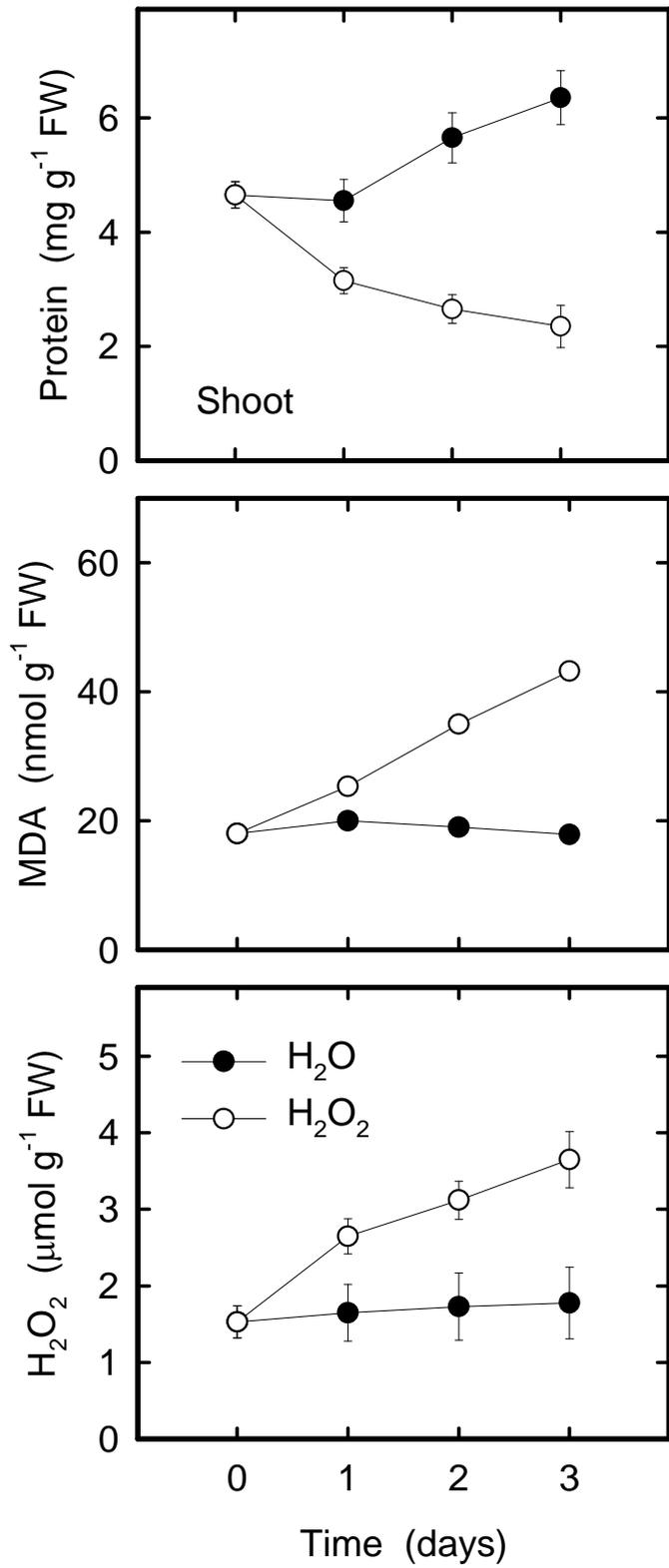


圖 20. 不同時間 H₂O₂ 處理對水稻幼苗地上部生理之影響。H₂O₂ 濃度為 1%。蛋白質、MDA 與 H₂O₂ 含量分別於於 27°C，黑暗中處理 0、1、2、3 天後分析。

柒、討論

雖然無論根部或地上部，低濃度 (1%) H_2O_2 就有顯著抑制生長之情形，然而就濃度效應而言 (圖 2~3 與圖 5~6)，相同濃度的 H_2O_2 對水稻幼苗之傷害不及 NaOCl 。

0.1% NaOCl 抑制根生長約 80% ~ 90% (圖 2)，而地上部生長大約被抑制 60% 左右 (圖 3)，可能的原因為根是吸水器官， NaOCl 的鈉離子與次氯酸根離子經由水溶液被根吸收，因此根受損程度較地上部嚴重，此種情形也同樣在生理分析的結果可看出 (圖 7~8)，而 H_2O_2 處理也是類似的情形 (圖 5~6 與圖 9~10)。此外，從多次試驗的結果歸納，鮮重與乾重之比值約為 10。

從我們使用的 NaOCl 濃度來看，0.1% NaOCl 處理，根部與地上部的生長一下子便受明顯抑制 (圖 11~13)，生理方面也是在短時間即受影響 (圖 17~18)，而平常家用 NaOCl 的濃度通常大於 0.1%，可見我們使用的 NaOCl 對土壤乃至於自然的危害不可小覷。 H_2O_2 處理 (圖 14~16) 也類似 NaOCl 處理的結果，根部與地上部的生長處理 1 天即受抑制，生理方面也同步受到影響 (圖 19~20)，平常醫護使用的 H_2O_2 濃度約在 3% 左右，也遠高於我們所使用的 1%。

試驗的結果很清楚的告訴我們， NaOCl 與 H_2O_2 處理，對水稻幼苗確實產生了氧化逆境，因此我們推測這兩種消毒劑對水稻幼苗生長的抑制，應是氧化逆境所造成。然而，由試驗結果是否表示 NaOCl 與 H_2O_2 對水稻幼苗生長之抑制與生理之傷害完全是經由氧化逆境，其實並不能完全確定，可能還牽涉了其他未探討的生理生化反應變化。

從防治 SARS 的觀點來看，目的是希望在解決問題的過程中，不要再產生新的問題，因此我們在本研究中即是想瞭解消毒劑的使用是否會衍生環保問題。綜合本研究的結果，無論從形態外觀、生長分析與生化分析的層面來看，消毒劑確實會對水稻幼苗產生明顯的毒害，因此，我們在使用消毒劑的同時，應審慎考量其殘留性以及其對環境生態造成的影響。所幸 NaOCl 與 H_2O_2 易溶於水，而 H_2O_2 在常溫下容易自行分解為水與氧分子，且 NaOCl 比起農藥或重金屬均易於分解與稀釋，因此短時間內以大量清水稀釋這兩類消毒劑的處理方式應為減低其殘留毒性對生態破壞較可行之方法，但在水資源匱乏的現在也需要考慮水資源之消耗。要是今天被排放的不是消毒劑而是工業用的重金屬，情況便會更糟，日本的痛痛病就是鎘污染稻米所引起，還有水俣病是由汞污染水產品所造成，台灣也曾發生抽取飲用含砷量太高的地下水引發之烏腳病，因此，本研究的動機可說是非常具有環境保護的觀念。

本研究之消毒劑處理濃度均很低，應可排除濃度太高造成處理藥劑變成高張溶液使得幼苗脫水進而影響生長的因素。 NaOCl 處理可能為鈉離子與次氯酸根離子兩種效果同時或單獨

存在，此部分之釐清可做為進一步之研究方向。 H_2O_2 處理應可確認為是 H_2O_2 分子的影響，然而有趣的是，最近植物生理界將其 H_2O_2 定位為植物體內訊息傳遞的分子之一，因此也可朝此方向深入探討。有趣的是， NaOCl 處理會造成水稻幼苗褐化 (圖 1)，而 H_2O_2 處理則不會 (圖 4)，是否 NaOCl 促進了水稻幼苗合成某種物質，值得進一步研究。此外，經過污染的植物要是受傷害不嚴重，是否再使用未污染的水源種植能夠繼續生長下去，亦是值得探討的地方。

捌、結論

- 一、低濃度的 NaOCl (0.1%) 或 H₂O₂ (1%) 即明顯抑制水稻幼苗生長。
- 二、相同濃度下，對生長之影響 NaOCl 的效果比 H₂O₂ 明顯。
- 三、相同濃度下，對生理之影響 NaOCl 的效果比 H₂O₂ 明顯。
- 四、與水處理比較，消毒劑對水稻生長與生理之影響應在短時間 (1 天內) 即發生。

玖、參考資料及其他

林傳琦，高景輝 (2000) 氯化鈉對水稻幼苗生理作用影響之研究。國立台灣大學農藝學研究所博士論文。

洪國棟，高景輝 (1995) 脂質過氧化作用與 Methyl Jasmonate 所誘導葉片老化之關係研究。國立台灣大學農藝學研究所碩士論文。

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254

Heath RL, Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 125: 189-198

Jana S, Choudhuri MA (1981) Glycolate metabolism of three submerged aquatic angiosperms during aging. *Aquat Bot* 12: 345-354

感謝所有指導與協助本實驗的老師與補助經費之機構。

評語

040715 高中組生物科

SARS 來了！消毒劑對水稻幼苗生長影響之研究

1. 記錄完整。
2. 對試劑之生化原理應深入瞭解。
3. 試劑濃度高，反應時間長，超過一般逆境反應的條件。