

中華民國第四十七屆中小學科學展覽會
作品說明書

高中組 生物(生命科學)科

佳作

040720

「小藻立大功」-應用單細胞微藻製作之重金屬檢測器

學校名稱：國立家齊女子高級中學

作者：	指導老師：
高二 戴榕萱	房樹生
高二 黃脩涵	蘇曉霓
高二 楊晴雯	
高二 黃雅楣	

關鍵詞：單細胞微藻 重金屬吸附 重金屬檢測器

壹、摘要

重金屬污染中，常見的有錳、銅、鋅、鐵、鎘、鎳等。研究指出，藻類有金屬吸附能力，在環保上，可處理金屬廢水。另外，有些金屬在低劑量會促進藻類生長，過量則會抑制其生長。利用此特性，希望藉金屬濃度與藻數目的高度相關迴歸方程式 ($R^2 > 0.9$)，當作生物性的金屬檢測器。實驗中使用單細胞之等邊金藻 (*Isochrysis galbana*) 和具相同陰離子之重金屬溶液 (ZnSO_4 、 MnSO_4 、 NiSO_4 、 CuSO_4) 及非重金屬溶液 (Na_2SO_4) 進行共培養。結果，求得第 7 天之 NiSO_4 及 CuSO_4 與等邊金藻數目的高度相關迴歸方程式。利用此 NiSO_4 及 CuSO_4 金屬檢測器，可換算出 1g 之 Na^+ 型陽離子交換樹脂對 200mM NiSO_4 的吸附率為 29%，4g 為 88.9%。而 Na^+ 型陽離子交換樹脂對 5mM CuSO_4 的吸附率則達 100%。另外，並推測等邊金藻對 200mM NiSO_4 與 5mM CuSO_4 並無吸附力。

貳、研究動機

在高一的課堂中曾經學過，藻類是原生生物界的成員，為大自然中所佔比例最大的生產者。其可以藉光合作用將無機碳固定下來並產生氧氣，提供地球生物進行呼吸，目前已有研究利用藻類來減少環境中的二氧化碳，進一步降低溫室效應(1)，另外，藻類也可吸收水中的無機鹽類，當作營養來源或吸附一些重金屬離子，應用在環保上，可用來處理重金屬污染的水(5)。

由以上的資訊，我們希望可以觀察藻類吸附重金屬的能力，但我們如何得知水中重金屬的濃度呢？測量水中重金屬濃度需要使用特殊昂貴的儀器，如：火焰式原子吸收光譜儀或原子吸收光譜儀(3)，才能夠測量，在沒有特殊設備的狀況下，我們也希望能利用簡單的生物檢測法來做為測量的金屬濃度的檢測器，進一步利用此生物性的金屬檢測器來測量藻類是否具吸附重金屬的能力。

參、文獻探討

重金屬是不精確的名詞，有很多種說法。依環境污染的定義，重金屬為密度大於 4 或原子量在 40 以上的金屬原子，如鋅、錳、銅、鉛、汞、鎘、鎳、銀等。其污染的特點在於它不能被微生物所分解，相反地，它可以經由食物鏈進入人體，之後不易排泄，能在人體的一定部位累積，導致慢性中毒，而中毒後又極難治療。因此，世界各國都把重金屬列為水質的監測項目，並嚴格控制水中重金屬的濃度。另外重金屬污染中，常見的有錳、銅、鋅、鐵、鎘、鉛、鋁、鎳等(2、3、4)。

已有文獻指出，藻類在水環境的保護中，可利用來吸附金屬，做為重金屬廢水之處理或貴重金屬之回收。像是一些藻類的細胞壁是由纖維素的微纖維形成的網狀結構，含有豐富的多糖，如果膠、木糖、甘露糖、藻酸或地衣酸多糖等，為帶負電物質，可以藉由靜電引力與許多金屬離子（如： Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cd^{2+} ）相結合，進一步降低水中重金屬的含量(5)。而藻類的重金屬累積力會因重金屬濃度、季節變化、藻類所屬的位置及藻類的不同部位而有所不同。另外，也已知重金屬在低劑量會促進藻類生長，過量則會對藻類造成生化的影響、改變生化組成、改變細胞的體積、干擾細胞分裂、改變生長速率、對胞器造成影響、影響藻細胞的活動力、對海藻生活史和族群造成影響(6)。

由上述的資料，我們相信金屬濃度與會影響藻類的生長，也許可利用此特性，找出金屬濃度與藻數目之間的相關，若獲得高度相關之迴歸方程式（ $R^2 > 0.9$ ），就可利用此方程式，藉由溶液對藻數目的影響，推算該溶液所含之金屬濃度，製作成一簡單的生物性檢測器。為了量化的方便，我們利用單細胞之等鞭金藻(*Isochrysis galbana*)進行實驗。*Isochrysis galbana* 又稱微藻，單細胞，缺乏纖維素的細胞壁，體型小，約 5 微米（ μm ），容易計數，且生長效率高，經過 5—7 天培養，藻細胞就增殖數十倍，使實驗過程較為方便好控制(7、9)。實驗中也選用含有相同陰離子之金屬溶液（ ZnSO_4 、 MnSO_4 、 NiSO_4 、 CuSO_4 ）來進行實驗，避免實驗的誤差。而 Na^+ 不屬於重金屬，以 Na_2SO_4 做為負控制組，利用來排除 Na^+ 型陽離子交換樹脂所置換出的 Na^+ 所造成的影響。



另外，「 Na^+ 型陽離子交換樹脂法」是最被普遍用來去除水中鈣、鎂等硬度離子或其它溶解

離子，它是利用「 Na^+ 型陽離子交換樹脂」與水中鈣、鎂、鋁離子或其它重金屬離子之結合力比鈉離子更強的原理，來吸附去除水中的金屬陽離子(8)。所以本實驗會利用「 Na^+ 型陽離子交換樹脂」來進行金屬陽離子的吸附，做為上述自製金屬檢測器的驗證，證明此檢測器的確可用以推算金屬濃度。

最後，利用等鞭金藻 *Isochrysis galbana* 來進行金屬之吸附，並利用自製金屬檢測器來計算吸附後金屬濃度，進一步計算 *Isochrysis galbana* 吸附金屬之能力。

肆、研究目的

- (1) **製作各種金屬檢測器**：利用等鞭金藻(*Isochrysis galbana*)數目與金屬濃度之相關，希望製作出各種金屬檢測器 (ZnSO_4 、 MnSO_4 、 NiSO_4 、 CuSO_4)。
- (2) **金屬檢測器之測試驗證**：利用 Na^+ 型陽離子交換樹脂進行金屬溶液之吸附，並利用金屬檢測器的測量吸附後之金屬濃度。
- (3) **等鞭金藻(*Isochrysis galbana*)的吸附能力**：測試等鞭金藻(*Isochrysis galbana*)是否具金屬之吸附能力，利用金屬檢測器測量吸附後之金屬濃度。

伍、研究設備與器材

生物材料：等鞭金藻(*Isochrysis galbana*)。

化學藥品：福馬林(約 40%)、硫酸鎳、硫酸鋅、硫酸銅、硫酸鈉、硫酸錳、海鹽、液體花寶、酒精、 Na^+ 型陽離子交換樹脂。

恆溫器材：低溫恆溫培養箱。

儀器設備：電子天秤、加熱攪拌器、滅菌鍋、自製簡易無菌操作台(附錄三)、光學顯微鏡、筆記型電腦、數位相機(Olympus C-770)、離心機、電子目鏡。

其他器材：微量吸取器(Pipette)、微量吸取尖(Tips)、試管、有蓋試管、細胞計數盤、手按式計次器、三角錐瓶、量筒、燒杯、鑷子、刮勺、玻璃漏斗、離心試管、玻棒、懸滴玻片、紙巾、拭鏡紙、石蠟膜(Parafilm)、濾紙、鋁箔紙、蒸餾水。

各種溶液：(1) 1%福馬林：取 $250\mu\text{l}$ 40%福馬林加入 9.75ml 之海水中。

(2) 1M 金屬溶液（硫酸鎳、硫酸鋅、硫酸銅、硫酸鈉、硫酸錳）

(3) 海水（3.33%）：於 1L 蒸餾水加入 33.3g 海鹽，過濾後滅菌使用

(4) 0.1%海水花寶：於 1L 之無菌海水中加入 1ml 無菌之液體海寶。

陸、研究過程與方法

一、實驗流程

預備實驗（金屬與藻共培養）：

試驗各濃度金屬溶液與 *Isochrysis galbana* 數目之關係，進一步求得

(1) 相關係數

(2) 迴歸方程式

吸附實驗：

Na⁺型陽離子交換樹脂

（已知可吸附金屬）與

Isochrysis galbana

（未知是否可吸附金屬）

之吸附。

接種實驗：

將吸附液與 *Isochrysis galbana* 共培養，並利用金屬與藻共培養所算出之迴歸方程式推算吸附液金屬的濃度及吸附率。

二、等鞭金藻(*Isochrysis galbana*)的培養

0.1%的海水花寶為 *Isochrysis galbana* 的培養液。培養於低溫恆溫培養箱中，培養條件控制在 25℃，光照 12 小時，黑暗 12 小時。

三、等鞭金藻(*Isochrysis galbana*)的計數

Isochrysis galbana 以 0.5% 的福馬林固定，在顯微鏡下，利用細胞計數器(附錄一)計算 *Isochrysis galbana* 的數目。



四、等鞭金藻(*Isochrysis galbana*)型態的觀察

利用電子目鏡連接於顯微鏡及筆記型電腦上，利用 Ulead 照相軟體，進行等鞭金藻(*Isochrysis galbana*) 型態的觀察與拍照。



五、等鞭金藻(*Isochrysis galbana*)的生長趨勢

於試管中置入 10ml, 5×10^5 /ml 之 *Isochrysis galbana*，於第 2,4,7,9 天計數 *Isochrysis galbana* 之數目。各組為三重覆之實驗，以求平均值及標準差。

六、等鞭金藻(*Isochrysis galbana*)與各金屬溶液共培養

(一) 各金屬對等鞭金藻 *Isochrysis galbana* 生長的影響

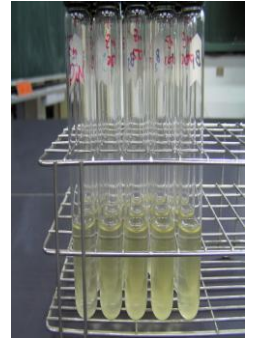
不同濃度之特定金屬溶液（NiSO₄、MnSO₄、ZnSO₄、CuSO₄、Na₂SO₄）與 *Isochrysis galbana*, 5×10^5 /ml，共培養 2-9 天，總體積為 10ml，於特定天數計算 *Isochrysis galbana* 數目。利用 *Isochrysis galbana* 數目與各金屬濃度求相關，並計算出相關係數與迴歸方程式（註：利用 Excel 內建軟體求得）。各組為三重覆之實驗，以求平均值及標準差。

(二) 高濃度 (10mM) 之各金屬溶液對 *Isochrysis galbana* 生長的毒性測試

10mM 之金屬溶液 (NiSO_4 、 MnSO_4 、 ZnSO_4 、 CuSO_4 、 Na_2SO_4) 與 *Isochrysis galbana*, $5 \times 10^5/\text{ml}$, 共培養, 總體積為 10ml, 於第 4 天及第 7 天進行 *Isochrysis galbana* 數目之計數。將金屬處理之 *Isochrysis galbana* 數目與未處理金屬之對照組 (Blank) 比較, 計算存活率。未處理金屬之對照組 (Blank) 存活率為 100%。各組為三重覆之實驗, 以求平均值及標準差。

(三) 吸附液之接種實驗

200 μ l 吸附液與 *Isochrysis galbana*, $5 \times 10^5/\text{ml}$, 共培養 7 天, 總體積為 10ml (相當於將吸附液稀釋 50 倍), 於第 7 天進行 *Isochrysis galbana* 數目之計數。利用相對應第 7 天之迴歸方程式 (*Isochrysis galbana* 數目與金屬濃度) 回推金屬濃度。各組為三重覆之實驗, 以求平均值及標準差。註: 未吸附之 NiSO_4 接種後的理論值為 4mM; 未吸附之 CuSO_4 接種後理論值為 100 μ M。



七、 Na^+ 型陽離子交換樹脂對 Ni^{2+} 及 Cu^{2+} 之吸附

取不同克數 Na^+ 型陽離子交換樹脂分別與 200mM 之 NiSO_4 及 5mM 之 CuSO_4 進行吸附, 吸附體積為 8ml, 吸附 1 小時後, 取 200 μ l 吸附上清液進行接種實驗 (步驟六之 (三))。

八、*Isochrysis galbana* 對 Ni^{2+} 及 Cu^{2+} 之吸附

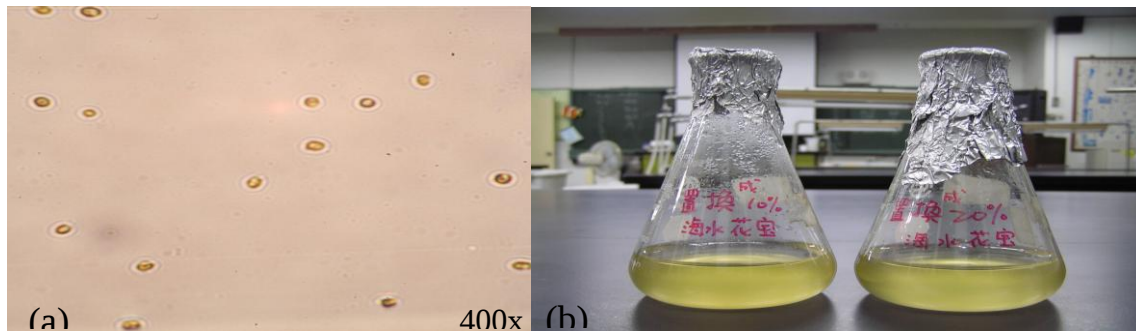
取不同個數之 *Isochrysis galbana* 分別與 200mM 之 NiSO_4 及 5mM 之 CuSO_4 進行吸附, 吸附體積為 8ml, 吸附 7 天後, 取 200 μ l 吸附上清液進行接種實驗 (步驟六之 (三))。

柒、研究結果

一、等邊金藻 (*Isochrysis galbana*)

(一) 外觀型態

等邊金藻 (*Isochrysis galbana*) 為肉眼看不到的單細胞微藻，呈橢圓型，培養濃度約 $2 \sim 5 \times 10^5/\text{ml}$ 時，藻液呈黃綠色 (圖一)。



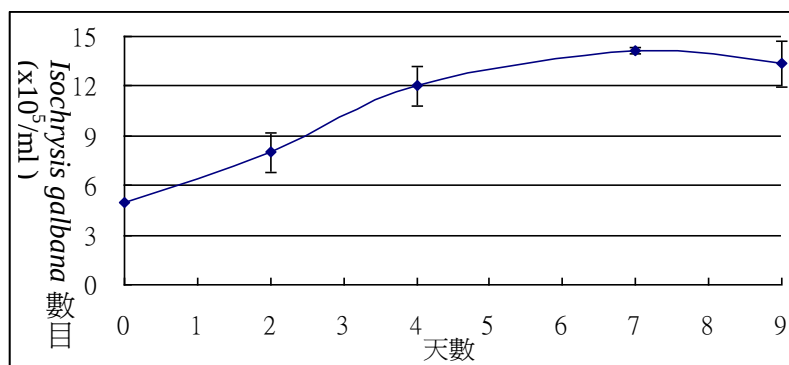
圖一、(a) 在 400x 下拍攝的 *Isochrysis galbana*； (b) *Isochrysis galbana*, $2 \sim 5 \times 10^5/\text{ml}$

(二) 生長曲線

$5 \times 10^5/\text{ml}$ 之等邊金藻 (*Isochrysis galbana*)，大約 4-7 天可以複製 1-1.5 倍，而到第 7 天之後，藻液濃度約為 $1.42 \times 10^6/\text{ml}$ ，而到第九天 *Isochrysis galbana* 生長趨於平緩，藻數不再增加，估計在此起始藻數 ($5 \times 10^5/\text{ml}$) 下，*Isochrysis galbana* 生長的對數期大約在 7 天內，但因計數藻數時可能會造成誤差，故之後的實驗天數，最多觀察到第 9 天 (表一、圖二)。

表一、等邊金藻 (*Isochrysis galbana*) 的生長趨勢。每組數據皆為三重覆實驗所計算而得，表中數據皆以平均值 $\pm$ 標準差表示。

培養天數(Days)	0	2	4	7	9
<i>Isochrysis galbana</i> 數目 ($\times 10^5/\text{ml}$)	5.0	8 ± 1.2	12 ± 1.2	14.2 ± 0.2	13.3 ± 1.4



圖二、等邊金藻 (*Isochrysis galbana*) 的生長曲線。

在試管中接種 $5 \times 10^5/\text{ml}$ *Isochrysis galbana*，於 2, 4, 7, 9 天計算藻的數目。

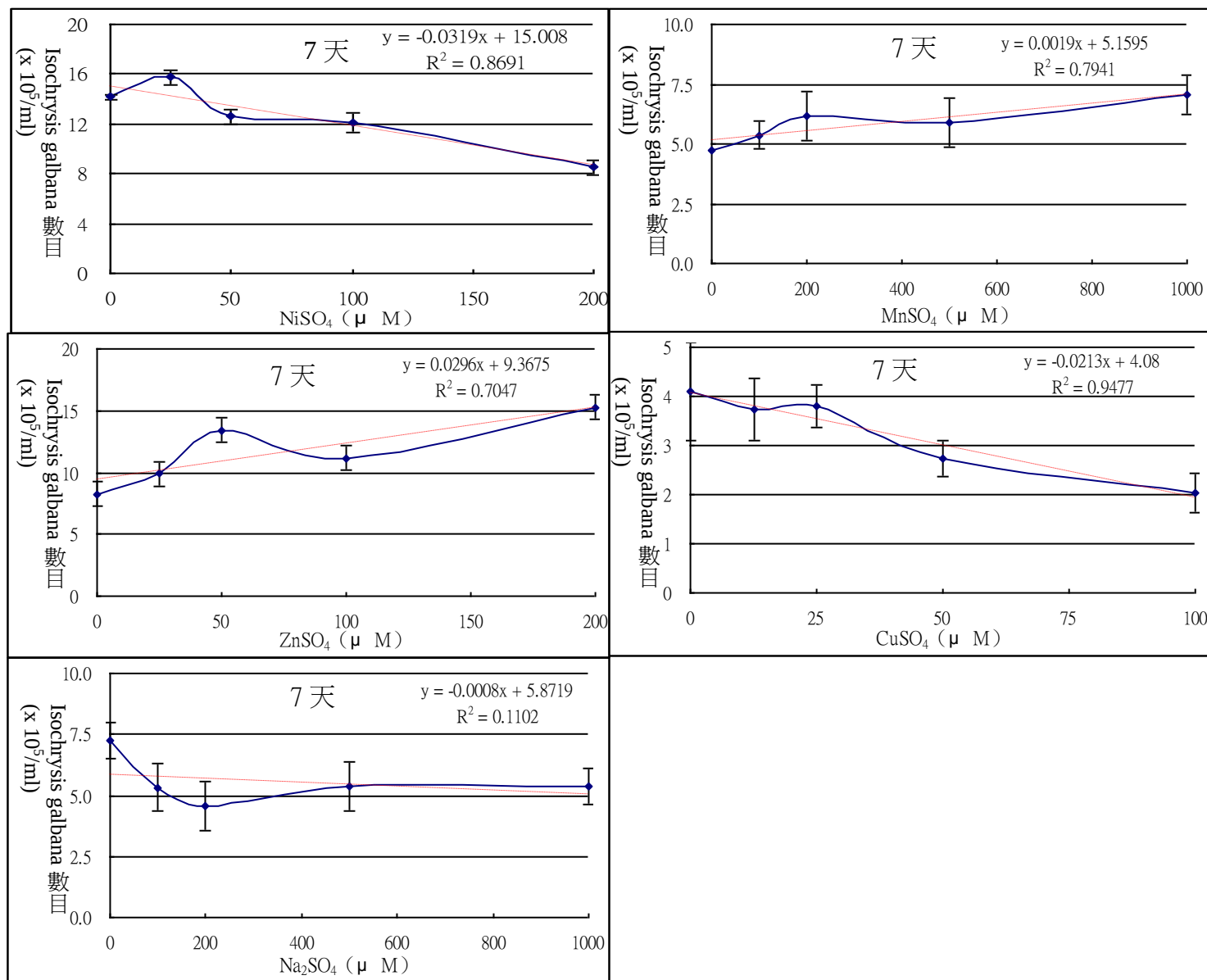
二、重金屬對等邊金藻 *Isochrysis galbana* 生長的影響

(一) 不同濃度的各金屬在第七天對等邊金藻 *Isochrysis galbana* 生長的影響

預備實驗觀察了 2-9 天之中，不同濃度的各金屬溶液 (NiSO₄、MnSO₄、ZnSO₄、CuSO₄、Na₂SO₄) 在特定天數下對 *Isochrysis galbana* 數目的影響 (附錄四)，而由 *Isochrysis galbana* 的生長曲線 (圖二) 可知，在第七天有最大的生長且落在對數期內，故針對第七天不同濃度的各金屬溶液對 *Isochrysis galbana* 數目影響的結果加以整理 (表二、圖三)，可知 NiSO₄ 濃度對 *Isochrysis galbana* 數目的相關係數 (R² 值) 為 0.87，接近 0.9；MnSO₄ 濃度對 *Isochrysis galbana* 數目所得到的 R² 值，不到 0.8；ZnSO₄ 濃度對 *Isochrysis galbana* 數目所得到的 R² 值，也不到 0.8；CuSO₄ 濃度對 *Isochrysis galbana* 數目所得到的 R² 值達 0.95；而 Na₂SO₄ 濃度對 *Isochrysis galbana* 數目所得到的相關係數 (R² 值) 則只有 0.1。以預備試驗的結果，只有 NiSO₄ 與 CuSO₄ 獲得高度相關的迴歸方程式 (y=ax+b)，可以利用 *Isochrysis galbana* 藻數目進行金屬濃度的推算。

表二、不同濃度的各金屬在第七天對等邊金藻 *Isochrysis galbana* 生長的影響。

NiSO ₄ 濃度(μ M)	0	25	50	100	200	R ² = 0.8691 y = -0.0319x + 15.008
Isochrysis galbana 數目 (x 10 ⁵ /ml)	14.2±0.2	15.7±0.6	12.6±0.6	12.1±0.8	8.5±0.6	
MnSO ₄ 濃度(μ M)	0	100	200	500	1000	R ² = 0.7941 y = 0.0019x + 5.1595
Isochrysis galbana 數目 (x 10 ⁵ /ml)	4.8	5.4±0.6	6.2±1.0	5.9±1.0	7.1±0.8	
ZnSO ₄ 濃度(μ M)	0	25	50	100	200	R ² = 0.7047 y = 0.0296x + 9.3675
Isochrysis galbana 數目 (x 10 ⁵ /ml)	8.2±1.0	9.9±1.2	13.4±0.4	11.2±4.6	15.3±1.4	
CuSO ₄ 濃度(μ M)	0	12.5	25	50	100	R ² = 0.9477 y = -0.0213x + 4.08
Isochrysis galbana 數目 (x 10 ⁵ /ml)	4.1±1.0	3.7±0.6	3.8±0.4	2.7±0.4	2.0±0.4	
Na ₂ SO ₄ 濃度(μ M)	0	100	200	500	1000	R ² = 0.1102 y = -0.0008x + 5.8719
Isochrysis galbana 數目 (x 10 ⁵ /ml)	7±0.8	5.3±1.0	4.6±1.0	5.4±1.0	5.4±0.7	



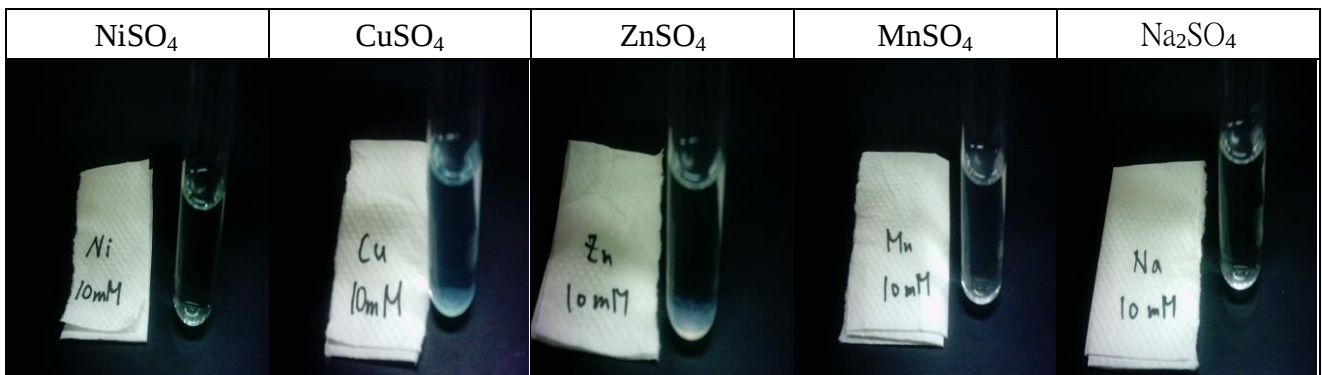
圖三、不同濃度的各金屬在第七天對等邊金藻 *Isochrysis galbana* 生長的影响。以迴歸方式得到 *Isochrysis galbana* 數目與金屬濃度的相關係數 (R^2) 與迴歸方程式。

三、高濃度金屬對等邊金藻 *Isochrysis galbana* 生長的影響

不同濃度的各金屬在第七天對等邊金藻 *Isochrysis galbana* 生長的影響，我們得到了各金屬濃度與藻數目的相關係數及迴歸方程式， CuSO_4 及 NiSO_4 的濃度與藻數有高度相關，可利用迴歸方程式來進行 *Isochrysis galbana* 藻數目與金屬濃度的推算，但 MnSO_4 、 ZnSO_4 與 Na_2SO_4 則無法求得高相關迴歸方程式，也許為所使用之濃度太低，無法達到抑制作用，另外， CuSO_4 及 NiSO_4 也許可以因提高濃度而得到更佳之推算方程式。故提高金屬濃度，先試驗高濃度（10mM）各金屬對 *Isochrysis galbana* 的影響，希望可藉由提高金屬濃度來增加處理金屬前後 *Isochrysis galbana* 數目的差異。由於 *Isochrysis galbana* 生長四天時也落在生長的對數期內，故第四天及第七天金均測試。而高濃度金屬溶液於培養液（0.1%海水花寶）中，可能會與海水螯合，產生沈澱，故先進行沈澱測試，避免沈澱對 *Isochrysis galbana* 數目計算造成影響。

（一）高濃度（10mM）金屬溶液的沈澱測試

利用 *Isochrysis galbana* 培養液，配置 10mM 之 NiSO_4 、 MnSO_4 、 ZnSO_4 、 CuSO_4 及 Na_2SO_4 金屬溶液，其中 ZnSO_4 、 CuSO_4 有些為沈澱，而 NiSO_4 、 MnSO_4 及 Na_2SO_4 則不會造成沈澱（圖四）。



圖四、10mM 各種金屬於 *Isochrysis galbana* 培養液中的沈澱測試。

（二）高濃度金屬對等邊金藻 *Isochrysis galbana* 生長的影響

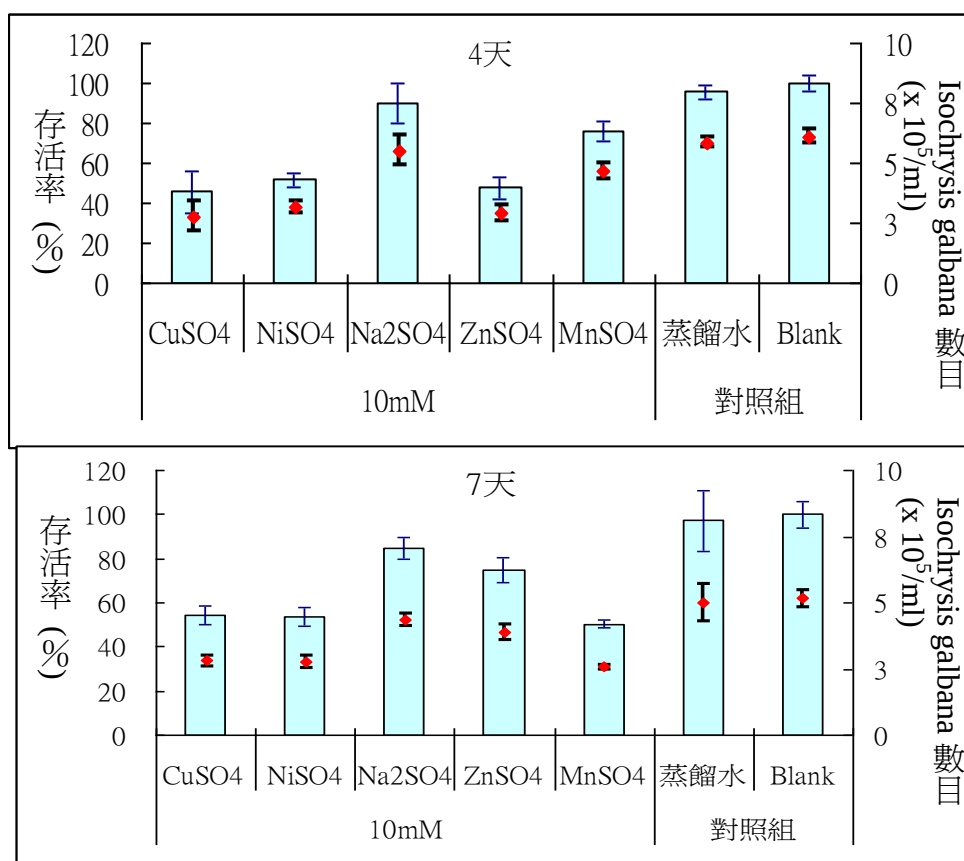
由結果（表三、圖五）可知， Na_2SO_4 無論在第四天或第七天均對 *Isochrysis galbana* 無明顯之毒性。 ZnSO_4 及 MnSO_4 第四天及第七天結果不一致，其中一天有抑制（存活率 <50%），另一天則無，無法確認其對 *Isochrysis galbana* 生長的影響，就不進一步進行金屬濃度與藻數目的相關測試。 NiSO_4 及 CuSO_4 在第四天及第七天對 *Isochrysis galbana* 生長，都有 50% 的抑制。蒸餾水為負控制組，對 *Isochrysis galbana* 無毒性。故只針對 NiSO_4 及 CuSO_4 對 *Isochrysis galbana* 數目的影響，並選用無沈澱之濃度進行實驗，求得金屬濃度與 *Isochrysis galbana* 數目的高度相關曲線，進一步利用求得之迴歸方程式來推算未知金屬的濃度。

表三、10mM 五種金屬在 4 和 7 天下，對 *Isochrysis galbana* 的毒性。

存活率 = 金屬處理之 *Isochrysis galbana* 數目 / Blank 之 *Isochrysis galbana* 數目 $\times 100\%$

以 T-test 統計分析，標有*為與 Blank 比較具顯著差異 ($p < 0.05$)。

處理條件		CuSO ₄ (10mM)	NiSO ₄ (10mM)	Na ₂ SO ₄ (10mM)	ZnSO ₄ (10mM)	MnSO ₄ (10mM)	蒸餾水	Blank (培養液)
4 天	Isochrysis galbana 數目 ($\times 10^5/\text{ml}$)	2.8* ± 0.6	3.2* ± 0.2	5.5 ± 0.6	2.9* ± 0.3	4.7* ± 0.3	5.9 ± 0.2	6.1 ± 0.3
	存活率 (%)	45.5 ± 10.2	51.8 ± 3.4	90.5 ± 10.0	47.7 ± 5.7	76 ± 5.4	95.6 ± 3.3	100 ± 4.4
7 天	Isochrysis galbana 數目 ($\times 10^5/\text{ml}$)	2.8* ± 0.2	2.8* ± 0.2	4.4 ± 0.3	3.9* ± 0.3	2.6* ± 0.1	5 ± 0.7	5.2 ± 0.3
	存活率 (%)	54.4 ± 4.0	53.7 ± 4.5	84.5 ± 4.9	75.1 ± 5.7	50.2 ± 1.8	97.1 ± 13.6	100 ± 5.9



圖五、10mM 五種金屬在 4 和 7 天下，對 *Isochrysis galbana* 的毒性。

長條圖代表存活率 (%)，紅點代表 *Isochrysis galbana* 數目。

四、Na⁺型陽離子交換樹脂及等邊金藻 *Isochrysis galbana* 對 Ni²⁺ 或 Cu²⁺ 的吸附

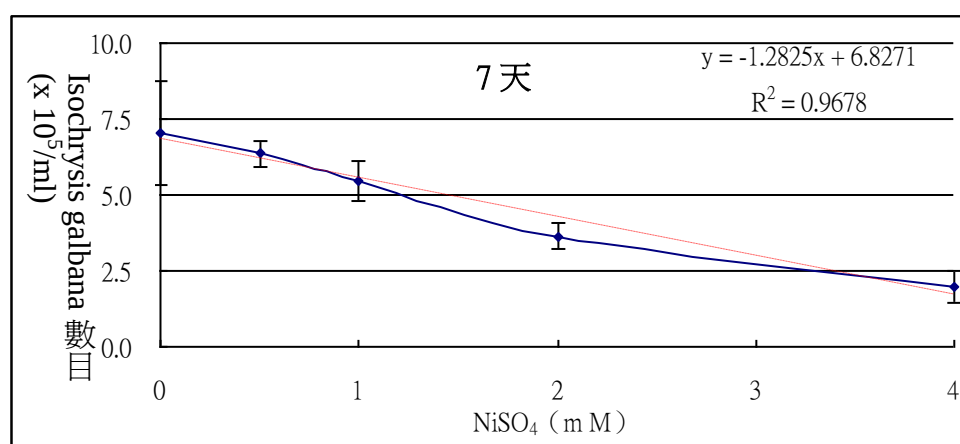
利用已知有陽離子吸附能力之 Na⁺型陽離子交換樹脂來進行 NiSO₄ 或 CuSO₄ 的吸附，希望可以利用金屬濃度與 *Isochrysis galbana* 數目的相關所求得之迴歸方程式來推算未知金屬的濃度，來驗證 NiSO₄ 及 CuSO₄ 金屬檢測器的可利用性。另外，想要測試等邊金藻 *Isochrysis galbana* 是否具吸附金屬的能力，所以，再吸附之後，利用金屬濃度與 *Isochrysis galbana* 數目的迴歸方程式，當成金屬檢測器，推算出經等邊金藻 *Isochrysis galbana* 吸附過後之金屬溶液，看其金屬濃度是否降低。

(一) NiSO₄ 及 CuSO₄ 之濃度與 *Isochrysis galbana* 數目的迴歸方程式

做出 7 天時 NiSO₄（表四、圖六）及 CuSO₄（表五、圖七）之濃度與 *Isochrysis galbana* 數目的相關曲線，並求得迴歸方程式，所得到的相關係數（R² 值）均>0.95，故可將 *Isochrysis galbana* 數目帶入迴歸方程式來換算金屬的濃度。

表四、不同濃度的 NiSO₄ 與 *Isochrysis galbana* 共培養 7 天，觀察其對 *Isochrysis galbana* 生長的影響。

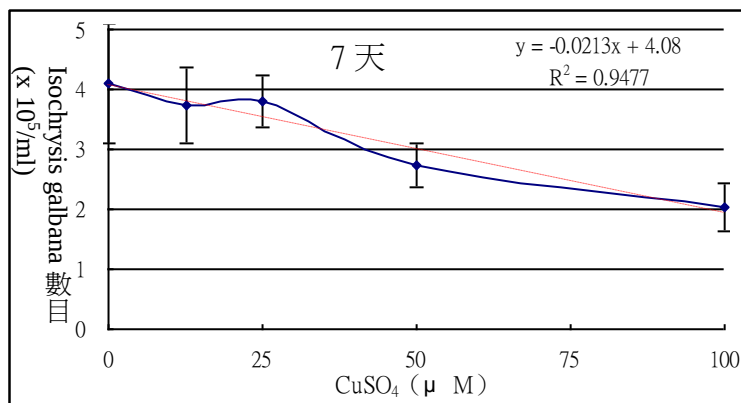
NiSO ₄ 濃度(mM)		0	0.5	1	2	4
Isochrysis galbana 數目 (x 10 ⁵ /ml)	7 天	7±1.7	6.4±0.4	5.5±0.7	3.7±0.4	2.0*±0.5



圖六、NiSO₄ 濃度與 *Isochrysis galbana* 數目之迴歸方程式與相關係數（R²）。

表五、不同濃度的 CuSO_4 與 *Isochrysis galbana* 共培養 7 天，對其生長的影响。

CuSO_4 濃度 (μM)		0	12.5	25	50	100
<i>Isochrysis galbana</i> 數目 ($\times 10^5/\text{ml}$)	7 天	4.1 ± 1.0	3.7 ± 0.6	3.8 ± 0.4	2.7 ± 0.4	$2.0^* \pm 0.4$



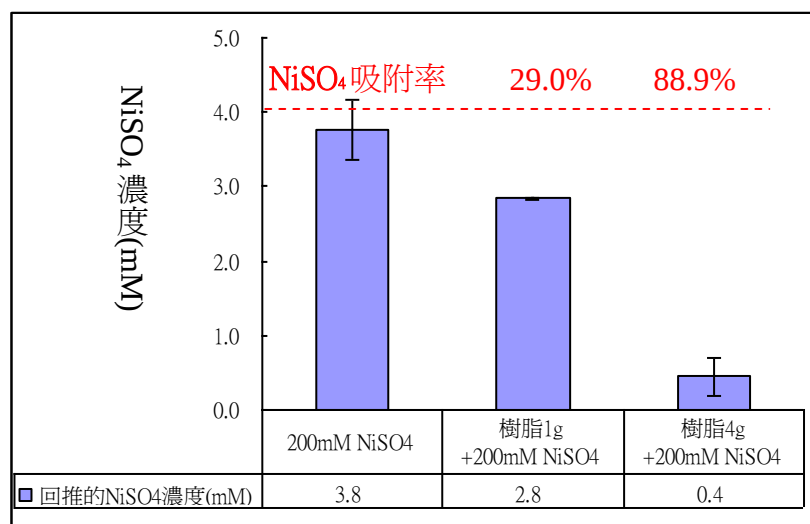
圖七、 CuSO_4 濃度與 *Isochrysis galbana* 數目之迴歸方程式與相關係數 (R^2)。

(二) Na^+ 型陽離子交換樹脂對的 Ni^{2+} 或 Cu^{2+} 的吸附

Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 等陽離子已知可被 Na^+ 型陽離子交換樹脂吸附，而置換出的 Na^+ 並不會造成 *Isochrysis galbana* 的毒性而混亂金屬濃度與 *Isochrysis galbana* 數目的趨勢關係（圖三、表三、圖五）。故利用不同克數之 Na^+ 型陽離子交換樹脂對 NiSO_4 及 CuSO_4 進行吸附，驗證金屬檢測器的可測量性。結果得知，利用 1g 與 4g 的樹脂進行 Ni^{2+} 之吸附（表六、圖八）， NiSO_4 有隨著吸附物越多而濃度越低的趨勢，1g 與 4g 樹脂的吸附率，1g 為 29%，4g 為 88.9%，差約 3 倍，準確性很高。但由樹脂吸附蒸餾水的實驗得知，蒸餾水回推 NiSO_4 濃度為 1mM 左右，此結果可能為計算藻數目時的誤差或樹脂交換出的物質（ Na^+ ）對藻數目造成影響所導致。在 Cu^{2+} 的吸附結果（表七、圖九），利用 1g、2g 及 4g 的樹脂進行 Cu^{2+} 之吸附，結果都達 100%之吸附（誤差或樹脂中置換出之 Na^+ 干擾使吸附率大於 100%），而所用的 CuSO_4 的濃度較低，樹脂的量太高，使得 1g、2g 及 4g 的樹脂均可將 5mM CuSO_4 的 Cu^{2+} 完全吸附，所以無法得到樹脂之克數與回推 CuSO_4 濃度的趨勢關係。但若看沒有吸附物之培養液，利用所做出的迴歸方程式來換算金屬濃度，得到 $-15.0 \pm 8.9 \mu\text{M}$ ，接近理論值之 $0 \mu\text{M}$ 。表示此 NiSO_4 及 CuSO_4 金屬檢測試是可以利用的。

表六、不同克數 Na⁺型陽離子交換樹脂對 200mM NiSO₄ 吸附，利用 NiSO₄ 濃度與 *Isochrysis galbana* 數目求相關之迴歸方程式（圖九）回推 NiSO₄ 濃度。

吸附物	樹脂 1g	樹脂 4g	樹脂 4g	X	X	X
被吸附液	200mM NiSO ₄	200mM NiSO ₄	蒸餾水	200mM NiSO ₄	蒸餾水	培養液
吸附後接種-NiSO ₄ 濃度理論值 (mM)	4	4	0	4	0	0
<i>Isochrysis galbana</i> 數目 (x 10 ⁵ /ml)	3.2±0	6.3±0.3	5.5±0.3	2.0±0.5	7.0±1.7	9.2±1.2
回推 NiSO ₄ 濃度(mM)	2.8±0	0.4±0.2	1.0±0.2	3.8±0.4	-0.2±1.3	-1.8±0.9

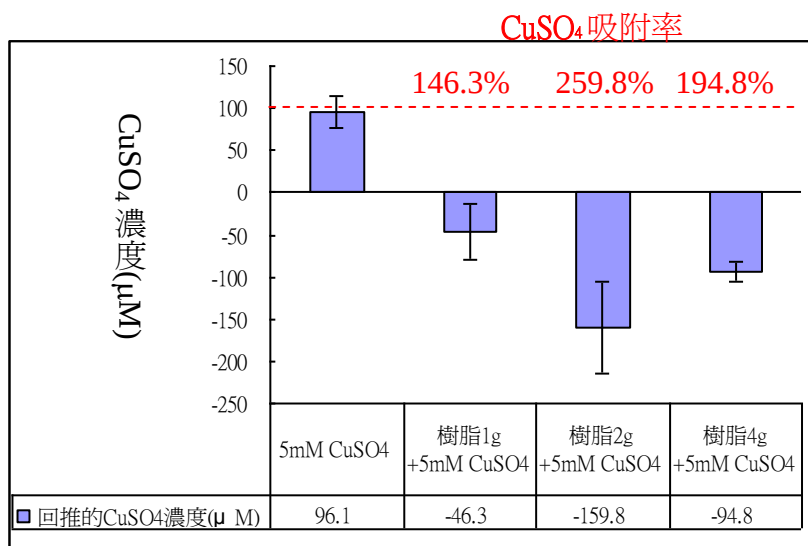


圖八、Na⁺型陽離子交換樹脂對 Ni²⁺之吸附。

吸附率 = [未吸附 (200mM NiSO₄) 之 NiSO₄ 濃度理論值 - 樹脂吸附所回推之 NiSO₄ 濃度(mM)] / 未吸附 (200mM NiSO₄) 之 NiSO₄ 濃度理論值 × 100%

表七、不同克數 Na^+ 型陽離子交換樹脂對 5mM CuSO_4 吸附，利用 CuSO_4 濃度與 *Isochrysis galbana* 數目求相關之迴歸方程式（圖六）回推 CuSO_4 濃度。

吸附物	樹脂 1g	樹脂 2g	樹脂 4g	X	X	X
被吸附液	5mM CuSO_4	5mM CuSO_4	5mM CuSO_4	5mM CuSO_4	蒸餾水	培養液
吸附後接種 - CuSO_4 濃度 理論值 (μM)	100	100	100	100	0	0
<i>Isochrysis galbana</i> 數目 ($\times 10^5/\text{ml}$)	5.1 ± 0.7	7.5 ± 1.2	6.1 ± 0.3	2.0 ± 0.4	4.1 ± 1.0	4.4 ± 0.2
回推 CuSO_4 濃度(μM)	-46.3 ± 32.1	-159.8 ± 54.6	-94.8 ± 11.8	96.1 ± 18.8	-0.9 ± 46.9	-15.0 ± 8.9



圖九、 Na^+ 型陽離子交換樹脂對 Cu^{2+} 之吸附。

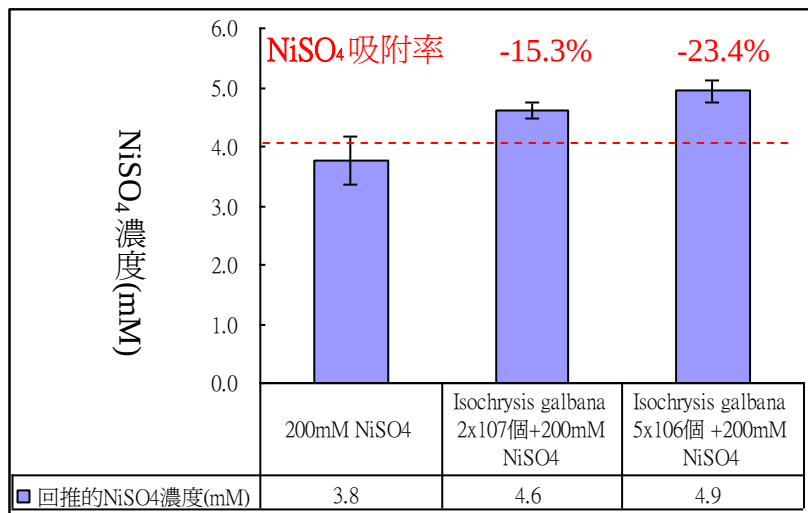
吸附率 = $\left[\text{未吸附}(5\text{mM CuSO}_4) \text{之 } \text{CuSO}_4 \text{ 濃度理論值} - \text{樹脂吸附所回推之 } \text{CuSO}_4 \text{ 濃度}(\mu\text{M}) \right] / \text{未吸附}(5\text{mM CuSO}_4) \text{之 } \text{CuSO}_4 \text{ 濃度理論值} \times 100\%$

(三) 等邊金藻 *Isochrysis galbana* 對 Ni^{2+} 或 Cu^{2+} 的吸附

利用金屬濃度與 *Isochrysis galbana* 數目之相關迴歸方程式，進行金屬濃度的測量，分析等邊金藻 *Isochrysis galbana* 對 Ni^{2+} 或 Cu^{2+} 的吸附能力，若有吸附回推之金屬濃度會較理論值低。對 Ni^{2+} 吸附結果（表八、圖十）可知，無論 2×10^7 及 5×10^6 的 *Isochrysis galbana* 吸附後回推之 NiSO_4 濃度為 $4.6 \pm 0.1 \text{ mM}$ 及 $4.9 \pm 0.2 \text{ mM}$ ，與理論值（ 4 mM ）比較，可知其完全無吸附能力（誤差或樹脂中置換出之 Na^+ 干擾，使吸附率小於 0%），而只加入吸附物 *Isochrysis galbana*，而以培養液取代 NiSO_4 的條件下，會測出 $1.3 \pm 1.2 \text{ mM}$ 應是計算藻數目的誤差所造成的干擾。而對 Cu^{2+} 吸附結果（表九、圖十一）可知，無論 1×10^7 及 5×10^6 的 *Isochrysis galbana* 均無吸附效果（誤差或樹脂中置換出之 Na^+ 干擾，使吸附率小於 0%）。

表八、不同數目之 *Isochrysis galbana* 對 200mM NiSO₄ 吸附，利用 NiSO₄ 濃度與 *Isochrysis galbana* 數目相關之迴歸方程式（圖九）回推 NiSO₄ 濃度。

吸附物	<i>Isochrysis galbana</i> 2x10 ⁷ 個	<i>Isochrysis galbana</i> 5x10 ⁶ 個	<i>Isochrysis galbana</i> 2x10 ⁷ 個	X	X	X
被吸附液	200mM NiSO ₄	200mM NiSO ₄	培養液	200mM NiSO ₄	蒸餾水	培養液
吸附後接種- NiSO ₄ 濃度 理論值 (mM)	4	4	0	4	0	0
<i>Isochrysis galbana</i> 數目 (x 10 ⁵ /ml)	0.9±0.1	0.5±0.1	5.2±0.9	2.0±0.5	7.0±1.7	9.2±1.2
回推 NiSO ₄ 濃度(mM)	4.6±0.1	4.9±0.2	1.3±1.2	3.8±0.4	-0.2±1.3	-1.8±0.9

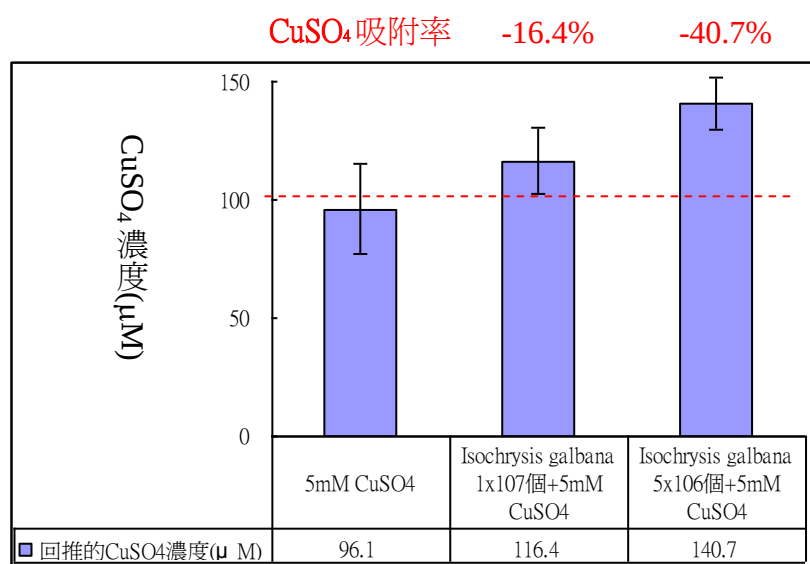


圖十、*Isochrysis galbana* 對 Ni²⁺ 之吸附。

吸附率 = [未吸附 (200mM NiSO₄) 之 NiSO₄ 濃度理論值 - *Isochrysis galbana* 吸附後所回推之 NiSO₄ 濃度(mM)] / 未吸附 (200mM NiSO₄) 之 NiSO₄ 濃度理論值 × 100%

表九、不同數目之 *Isochrysis galbana* 對 200mM CuSO₄ 吸附，利用 CuSO₄ 濃度與 *Isochrysis galbana* 數目相關之迴歸方程式（圖九）回推 CuSO₄ 濃度。

吸附物	<i>Isochrysis galbana</i> 1x10 ⁷ 個	<i>Isochrysis galbana</i> 5x10 ⁶ 個	X	X	X
被吸附液	5mM CuSO ₄	5mM CuSO ₄	5mM CuSO ₄	蒸餾水	培養液
吸附後接種- CuSO ₄ 濃度 理論值 (μ M)	100	100	100	0	0
<i>Isochrysis galbana</i> 數目 (x 10 ⁵ /ml)	1.6±0.2	1.1±0.1	2.0±0.4	4.1±1.0	4.4±0.2
回推 CuSO ₄ 濃度(μ M)	116.4±14.1	140.7±10.8	96.1±18.8	-0.9±46.9	-15.0±8.9



圖十一、 *Isochrysis galbana* 對 Cu²⁺ 之吸附。

吸附率=[未吸附(5mM CuSO₄)之 NiSO₄濃度理論值-*Isochrysis galbana* 吸附後所回推之 CuSO₄濃度(μ M)] / 未吸附(5mM CuSO₄)之 CuSO₄濃度理論值 ×100%

捌、討論

- 一、所使用之 $5 \times 10^5/\text{ml}$ 等邊金藻 *Isochrysis galbana* 的生長（圖二），約在第 7 天會達到靜止期，大約生長 2-3 倍，與起始濃度差異倍數不大。雖然 *Isochrysis galbana* 數目與各濃度 NiSO_4 及 CuSO_4 具高度相關，但由於藻原本成長的倍數就低，所以容易造成藻的數目些微改變，回推的金屬濃度就差異頗大。例如：（表六、七），蒸餾水因為誤差造成回推之 NiSO_4 濃度為 $-0.2 \pm 1.3 \text{ mM}$ ，而 CuSO_4 濃度為 $-0.9 \pm 46.9 \mu \text{ M}$ 。若扣掉誤差的部分（圖六、七）， NiSO_4 金屬檢測器之靈敏度最小為 1 mM ，而 CuSO_4 金屬檢測器之靈敏度最小為 $25 \mu \text{ M}$ 。
- 二、實驗之進行均利用人爲的方式進行等邊金藻 *Isochrysis galbana* 的計數，而等邊金藻 *Isochrysis galbana* 為會游動的單細胞微藻，故在取出計數時易造成誤差，而因為個體小，在利用細胞計數器計數時也容易造成計數之誤差。另外，*Isochrysis galbana* 對環境變化敏感，每組實驗藻類的生長快慢不同，故進行吸附實驗時，所用來推算金屬濃度之迴歸方程式，必須是同一次實驗的結果才能利用。例如：圖六與圖三之 NiSO_4 ，都是在第七天時 NiSO_4 濃度與 *Isochrysis galbana* 數目之關係，但迴歸方程式差異甚大。
- 三、實驗的結果計算得到 Na^+ 型陽離子交換樹脂對 Cu^{2+} 具 $>100\%$ 的吸附力，而 *Isochrysis galbana* 對 Ni^{2+} 及 Cu^{2+} 的吸附力則 $<0\%$ ，並不合理，應為計數誤差所致，另外，也可能為樹脂中交換出之 Na^+ 或 *Isochrysis galbana* 釋放出其他物質影響 *Isochrysis galbana* 的生長，造成結果的誤差。
- 四、環保署所公布之污染標準（附錄二），各金屬污染上限均 $<100 \mu \text{ M}$ ，低於本實驗之 NiSO_4 金屬檢測器的可測得最小值，所以只能可用此金屬檢測器測量較高濃度之 NiSO_4 溶液。
- 五、目前本實驗做出的 NiSO_4 及 CuSO_4 金屬檢測器主要為針對單一金屬做測試，但真實的環境中，所含金屬一定不只一種，如何進一步應用於測量真實環境水樣之金屬濃度，可能還必須要加以改進，才能有更好之應用。
- 六、許多藻類吸附重金屬是利用其細胞壁之多糖的結構，本實驗所利用的等邊金藻 *Isochrysis galbana* 為不具細胞壁之單細胞藻，可能因為此原因，所以沒有 Ni^{2+} 及 Cu^{2+} 金屬吸附能力，若換成大型藻類可能就可觀察到金屬吸附能力，但必須解決量化的問題。
- 七、新聞中提到(10)，保特瓶曬太陽可能釋出加倍的微量金屬「銻」，我們曾試著將保特瓶裝海水照 UV 燈，進一步測試照保特瓶是否會釋放有毒物質到海水中，此海水是否會造成 *Isochrysis galbana* 毒性，毒性是否會因樹脂或 *Isochrysis galbana* 之吸附而降低（結果沒有呈現），我們得到的結果為，無論照 UV 保特瓶中的海水、以 Na^+ 型陽離子交換樹脂或以 *Isochrysis galbana* 吸附，對 *Isochrysis galbana* 都有很強的毒性（*Isochrysis galbana* 存活率約為 0% ），但因培養箱曾出現過熱的狀況，所以結果還需要進一步驗證。

玖、結論

- 一、本實驗可獲得 NiSO_4 之金屬檢測器，其靈敏度為 1-4mM。
- 二、本實驗可獲得 CuSO_4 之金屬檢測器，其可測量的範圍為 25-100 μ M。
- 三、 Na^+ 型陽離子交換樹脂可驗證金屬檢測器的可行性。
- 四、在所測試的條件下，*Isochrysis galbana* 無 NiSO_4 及 CuSO_4 之吸附能力。

壹拾、參考文獻

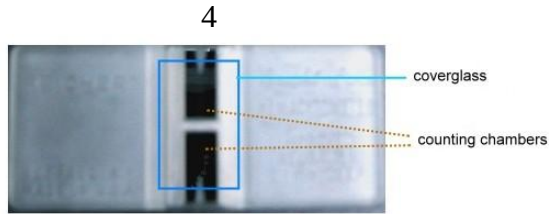
1. 利用海洋微細藻類固定二氧化碳及在資源化應用 張富龍 林畢修平 財團法人生物技術開發中心
2. http://www.epa.gov.tw/attachment_file/upload/R/名詞定義/05肆-水質保護統計類.pdf
3. <http://www.epa.gov.tw/main/index.asp> 行政院環保署
4. <http://e-info.org.tw/node/14107> 道路工程對生態環境的影響——間接影響
5. 生物吸附劑及其吸附性能研究進展 黃娜 華南師範大學
6. <http://www.bio.ncue.edu.tw> 國立彰化師範大學生物系之藻類及重金屬
7. http://www.nhm.ac.uk/hosted_sites/ina/CODENET/galleries/DICimages/source/iso.htm 等邊金藻 (*Isochrysis galbana*)
8. http://mail.dali.tcc.edu.tw/~tech/activities/act1_2.html Na^+ 型離子交換樹脂吸附陽離子之原理
9. <http://etd.lib.nsysu.edu.tw/ETD-db/ETD-search/getfile?URN=etd-0625103-042548&filename=etd-0625103-042548.pdf> 等邊金藻的介紹
10. http://bbs.burgersu.com/forum/forum_posts.asp?TID=239&PN=1&get=last 保特瓶曬太陽可能釋出加倍的微量金屬「銻」

壹拾壹、附錄

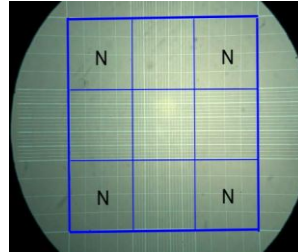
一、細胞計數原理：

計數時只數九大方格中之最外四格，也就是（b）圖之 N。

細胞數 = $\frac{\text{四格數目相加}}{4} \times \text{稀釋倍數} \times 10^4 / \text{ml}$



（a）細胞計數盤外觀



（b）顯微鏡 40 倍所看到九大方格

二、環保署所公布之金屬污染標準

金屬元素	分子量	工廠(mg/L)	工廠(μ M)	人體(mg/L)	人體(μ M)
Zn ²⁺	65.39	5	76.5	0.5	1.65
Cu ²⁺	63.55	3	47.2	0.03	0.472
Ni ²⁺	58.69	1	17	NA	NA
Mn ²⁺	54.94	NA	NA	0.05	0.91
Na ⁺	22.99	NA	NA	NA	NA

NA:為無定義污染標準

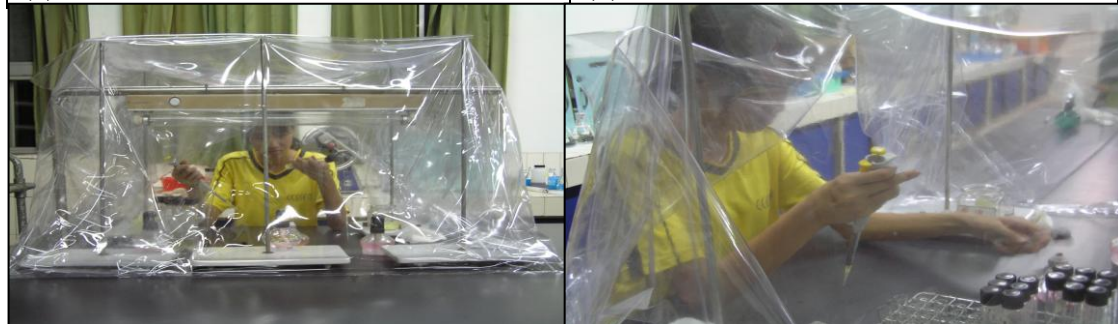
三、設備照片



（a）電子天平與加熱攪拌器



（b）離心機



（c）自製無菌操作台

四、預備實驗數據

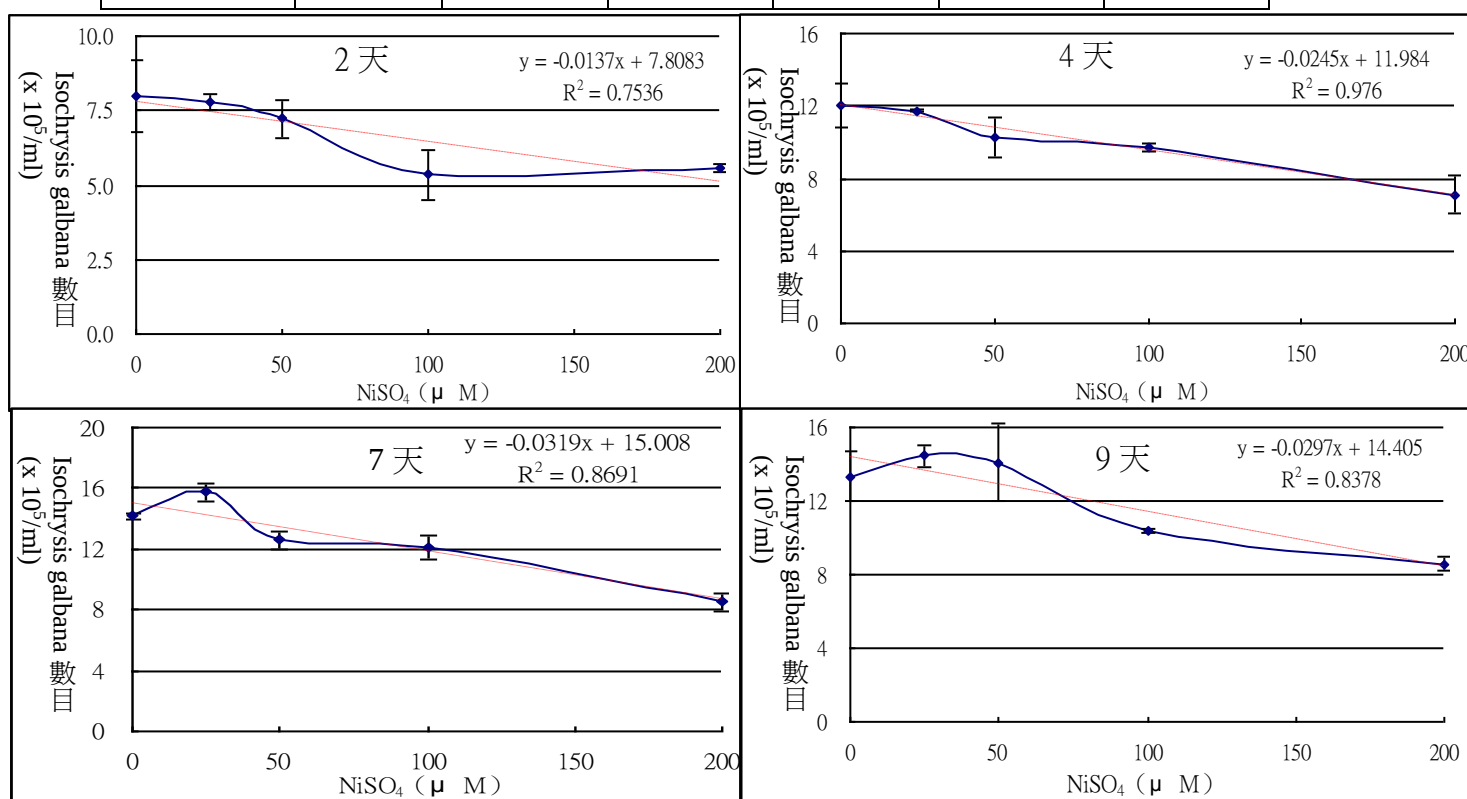
(各重金屬在不同天數下，對等邊金藻 *Isochrysis galbana* 生長的影响)

(一) NiSO_4 對等邊金藻 *Isochrysis galbana* 生長的影响

由結果可知(表一、圖一)，無論 NiSO_4 與 *Isochrysis galbana* 共培養 2, 4, 7, 9 天，都會抑制 *Isochrysis galbana* 生長，並呈現濃度趨勢。但抑制程度以第 7 天及 9 天最明顯。且於 $200\mu\text{M}$ 下，與未處理金屬($0\mu\text{M}$)比較，具顯著差異。就 NiSO_4 濃度與 *Isochrysis galbana* 數目間的迴歸曲線來看，可求得相關係數(R^2 值)。由 R^2 值可知，第二天的相關程度最差， R^2 值不到 0.8 (0.75)，第 9 天次之，約 0.84，第四天相關程度最高，相關係數 R^2 值大於 0.9，而第七天的 R^2 值(0.87)則接近 0.9，且迴歸方程式為一次方程式。由此結果，可簡單利用第四天或第七天所得到的迴歸方程式來進行 *Isochrysis galbana* 數目與 NiSO_4 濃度之間的換算，而之後其他金屬只試驗第四天或第七天。

表一、不同濃度的 NiSO_4 與 *Isochrysis galbana* 共培養 2, 4, 7, 9 天，觀察對其生長的影响。

NiSO_4 濃度(μM)		0	25	50	100	200
<i>Isochrysis galbana</i> 數目 ($\times 10^5/\text{ml}$)	2 天	8 ± 1.2	7.8 ± 0.3	7.2 ± 0.7	5.4 ± 0.8	5.6 ± 0.1
	4 天	12 ± 1.2	11.7 ± 0.1	10.3 ± 1.1	9.7 ± 0.2	$7.1^*\pm 1.0$
	7 天	14.2 ± 0.2	$15.7^*\pm 0.6$	$12.6^*\pm 0.6$	$12.1^*\pm 0.8$	$8.5^*\pm 0.6$
	9 天	13.3 ± 1.4	14.5 ± 0.6	14.1 ± 2.1	10.4 ± 0.1	$8.6^*\pm 0.4$



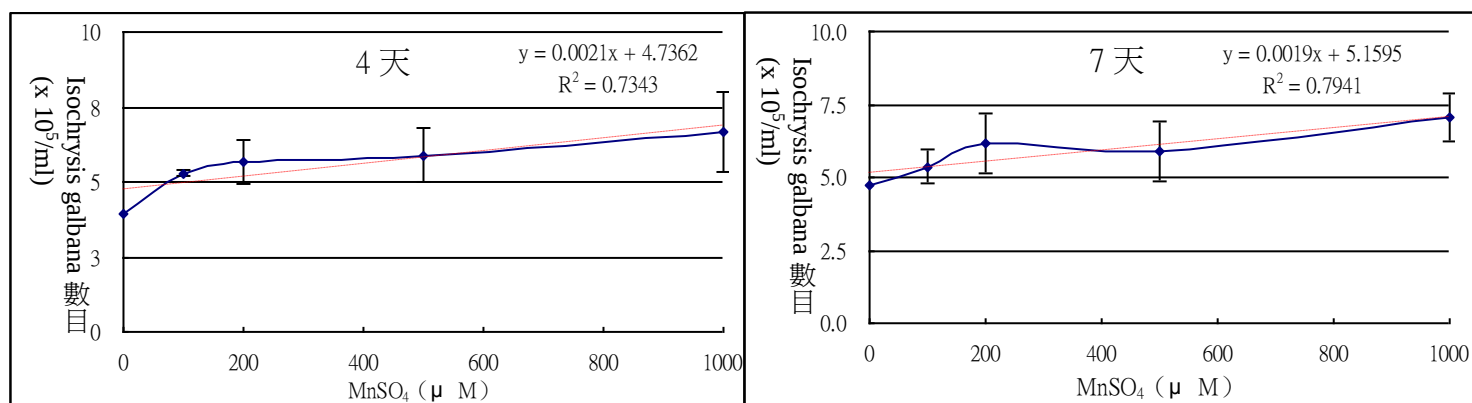
圖一、不同濃度的 NiSO_4 與 *Isochrysis galbana* 共培養 2, 4, 7, 9 天，對其生長的影响。以迴歸方式得到 *Isochrysis galbana* 數目與 NiSO_4 濃度的相關係數(R^2 值)與迴歸方程式。

(二) MnSO_4 對等邊金藻 *Isochrysis galbana* 生長的影响

由結果可知（表二、圖二）， MnSO_4 與 *Isochrysis galbana* 共培養 4 和 7 天，都會促進其生長，並呈現濃度趨勢。但在各濃度下，都未達顯著差異。就 MnSO_4 濃度與 *Isochrysis galbana* 數目間的迴歸曲線來看，所求的 R^2 值，都不到 0.8，所以，未找到一個較適合的迴歸方程式可進行 *Isochrysis galbana* 藻數目與 MnSO_4 濃度之間的推算。

表二、不同濃度的 MnSO_4 與 *Isochrysis galbana* 共培養 4,7 天，觀察對其生長的影响。

MnSO_4 濃度 (μM)		0	100	200	500	1000
<i>Isochrysis galbana</i> 數目 ($\times 10^5/\text{ml}$)	4 天	4.0	5.3 ± 0.1	5.7 ± 0.7	5.9 ± 0.9	6.7 ± 1.3
	7 天	4.8	5.4 ± 0.6	6.2 ± 1.0	5.9 ± 1.0	7.1 ± 0.8



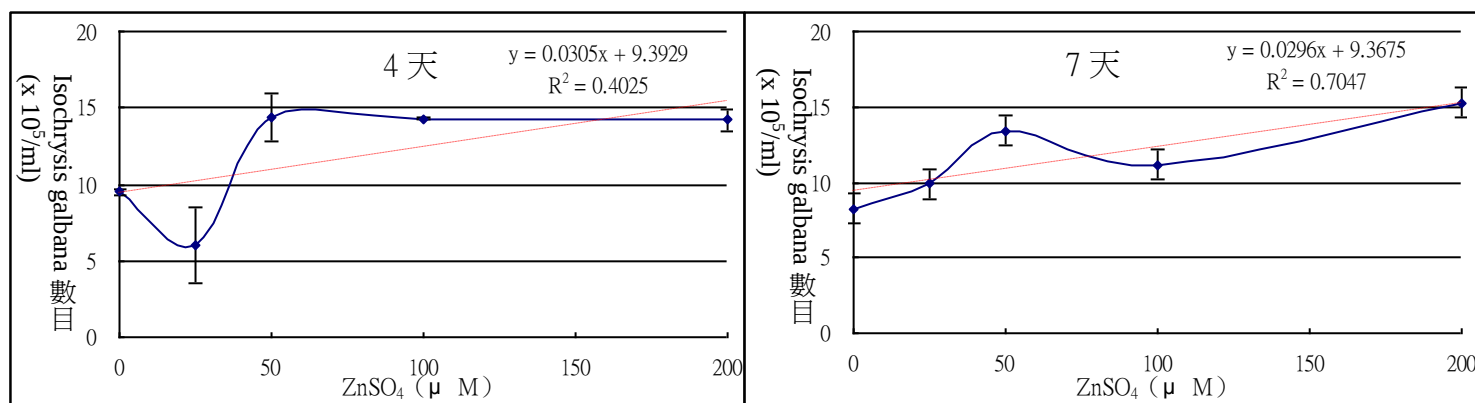
圖二、不同濃度的 MnSO_4 與 *Isochrysis galbana* 共培養 4,7 天，對其生長的影响。

(三) ZnSO_4 對等邊金藻 *Isochrysis galbana* 生長的影響

由結果可知（表三、圖三）， ZnSO_4 與 *Isochrysis galbana* 共培養 4 和 7 天，都會促進其生長，並呈現濃度趨勢。在 $200\mu\text{M}$ 下，與未處理金屬（ $0\mu\text{M}$ ）比較，達顯著差異。但就 ZnSO_4 濃度與 *Isochrysis galbana* 數目間的迴歸曲線來看，所得之 R^2 值，都不到 0.8，故未找到一個較適合的迴歸方程式來進行 *Isochrysis galbana* 藻數目與 ZnSO_4 濃度的推算。

表三、不同濃度的 ZnSO_4 與 *Isochrysis galbana* 共培養 4,7 天，觀察對其生長的影響。

ZnSO_4 濃度(μM)		0	25	50	100	200
<i>Isochrysis galbana</i> 數目 ($\times 10^5/\text{ml}$)	4 天	9.5 ± 0.2	6.0 ± 2.4	$14.4^*\pm 1.6$	$14.3^*\pm 0.1$	$14.2^*\pm 0.7$
	7 天	8.2 ± 1.0	9.9 ± 1.2	$13.4^*\pm 0.4$	11.2 ± 4.6	$15.3^*\pm 1.4$



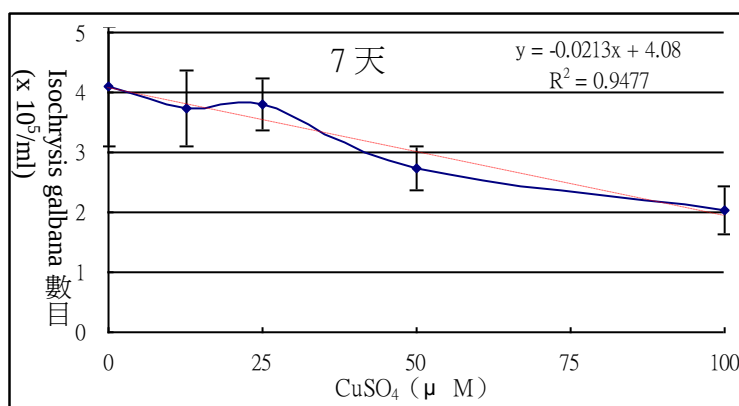
圖三、不同濃度的 ZnSO_4 與 *Isochrysis galbana* 共培養 4,7 天，對其生長的影響。

(四) CuSO_4 對等邊金藻 *Isochrysis galbana* 生長的影響

CuSO_4 只觀察 7 天的結果（表四、圖四），在 $100\mu\text{M}$ 下，與未處理金屬（ $0\mu\text{M}$ ）比較，雖未具顯著差異，但抑制生長的趨勢明顯。而 CuSO_4 濃度與 *Isochrysis galbana* 數目之 R^2 值達 0.95，且迴歸方程式為一次方程式。由此結果，可簡單利用第七天所得到的迴歸方程式來進行 *Isochrysis galbana* 藻數目與 CuSO_4 濃度的推算。

表四、不同濃度的 CuSO_4 與 *Isochrysis galbana* 共培養 7 天，觀察對其生長的影響。

CuSO_4 濃度(μM)		0	12.5	25	50	100
<i>Isochrysis galbana</i> 數目 ($\times 10^5/\text{ml}$)	7 天	4.1 ± 1.0	3.7 ± 0.6	3.8 ± 0.4	2.7 ± 0.4	$2.0^* \pm 0.4$



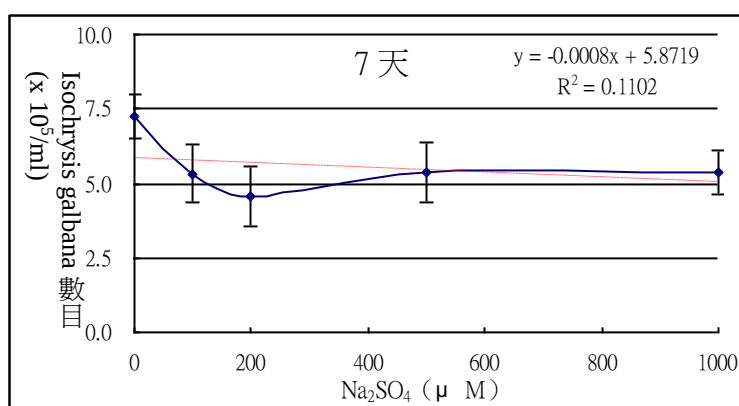
圖四、不同濃度的 CuSO_4 與 *Isochrysis galbana* 共培養 7 天，對其生長的影響。

(五) Na_2SO_4 對等邊金藻 *Isochrysis galbana* 生長的影响

Na_2SO_4 也只觀察 7 天的結果 (表五、圖五)，在 $1000\mu\text{ M}$ 下，與未處理金屬 ($0\mu\text{ M}$) 比較，不具顯著差異，無明顯抑制生或促進生長的趨勢。而 Na_2SO_4 濃度與 *Isochrysis galbana* 數目之 R^2 值為 0.1。表示無法獲得一的迴歸方程式來進行 *Isochrysis galbana* 數目與 Na_2SO_4 濃度的推算。

表五、不同濃度的 Na_2SO_4 與 *Isochrysis galbana* 共培養 7 天，觀察對其生長的影响。

Na_2SO_4 濃度($\mu\text{ M}$)		0	100	200	500	1000
<i>Isochrysis galbana</i> 數目 ($\times 10^5/\text{ml}$)	7 天	7 ± 0.8	5.3 ± 1.0	4.6 ± 1.0	5.4 ± 1.0	5.4 ± 0.7



圖五、不同濃度的 Na_2SO_4 與 *Isochrysis galbana* 共培養 7 天，對其生長的影响。

「小藻立大功」-應用單細胞微藻製作之重金屬
【評語】 040720
檢測器

1. 表達清晰，具團隊合作精神。
2. 能控制變因，測得顯著實驗結果。
3. 建議選用對重金屬較敏感之藻種進行實驗。
4. 需加強科學文獻探討。