

中華民國第四十八屆中小學科學展覽會
作品說明書

國中組 生物及地球科學科

031713

生命中不可承受之「重」--重金屬誘導萌芽的綠豆根部產生
氧化傷害之研究

學校名稱：高雄市立民族國民中學

作者： 國二 陳海寧 國二 蔡昀庭 國二 蔡孟容 國二 謝沁彤	指導老師： 蔡喬木 邱曼妮
---	-----------------------------

關鍵詞： 重金屬、氧化傷害、自由基

摘要

我們觀察重金屬對萌芽後綠豆根與莖的生長，發現銅離子的抑制效果最為顯著，而鋅離子在低濃度下對植株的生長抑制較弱，而影響植株的部位而言，以根部的抑制成效最大；重金屬的處理會抑制過氧化氫酶的活性，以 Evans blue、DAB 及 NBT 染色的結果也印證重金屬的處理後會造成根部細胞過氧化氫及超氧化物陰離子的產生，並造成細胞死亡的情形。

壹、研究動機

在南一版生物下冊的第二章「突變」的課堂中，老師曾有補充說明「活性氧化合物，ROS」這種化學性質很活潑的「自由基」物質，與細胞的老化與死亡有密切的關聯；再加上生物下冊的最後一章「生物與環境的交互作用」中提及近年來相關產業產生之廢棄物可能造成土壤或河川不同程度的重金屬污染（以鎘、銅、汞、鎳、鉛及鋅為主要的污染源），及近年來常在新聞中得知重金屬污染事件，例如香山地區牡蠣銅鋅含量世界第一、市售文蛤測出含砷和鉛、桃園觀音鎘米污染等；因此引起了我們想結合這兩個主題-重金屬與活性氧化合物 的興趣，藉著簡單的染色法，去了解重金屬的處理時間長短對植物種子萌芽後的生長傷害是否有牽涉到活性氧化合物的參與，尤其是根部組織。

貳、研究目的

- 一、探討綠豆萌芽過程中，重金屬【銅離子 Cu^{2+} 、鋅離子 Zn^{2+} 、鉛離子 Pb^{2+} 及複合重金屬離子 ($\text{Cu}^{2+} + \text{Zn}^{2+} + \text{Pb}^{2+}$)】對其生長狀況之影響。
 - (一) 重金屬對胚根生長之影響。
 - (二) 重金屬對下胚軸生長之影響。
 - (三) 重金屬對全株生長之影響。
 - (四) 重金屬對側根長度之影響。
 - (五) 重金屬對側根數目之影響。

- 二、利用 Evans blue 染色技術，探討重金屬（銅離子，鋅離子，鉛離子）處理對萌芽綠豆的根部所造成之傷害。
- 三、利用 DAB（3',3'-diaminobenzidine，3',3'-二氨基聯苯胺）染色技術，探討重金屬處理後在萌芽綠豆根部內誘導產生的 H₂O₂
- 四、利用 NBT（Nitroblue tetrazolium，硝基藍四氮唑）染色技術，探討重金屬處理後在萌芽綠豆根部內誘導產生的超氧化物陰離子（·O₂⁻）
- 五、研究重金屬處理後在萌芽綠豆根部內的過氧化氫酶（catalase）的活性。

參、研究設備及器材

- 一、化學藥劑：硫酸銅、硫酸鋅、硝酸鉛、Evans blue、DAB（3',3'-diaminobenzidine）、NBT（Nitroblue tetrazolium）、12M 濃鹽酸溶液、35%過氧化氫溶液、蒸餾水、碘液、藥用酒精。
- 二、設備器材：燒杯（200ml，500ml，1000ml）、量筒（10ml，50ml）、錐形瓶、培養皿、電子秤、桌上型酸鹼測定儀（pH meter）、15ml 塑膠離心管、加熱攪拌器、磁性攪拌石、濾紙、馬錶、玻棒、研钵、滴管、試管。
- 三、生物材料：綠豆（mungbean；*Vigna radiata* L.）
- 四、以上圖片請參照附圖一。

肆、研究方法

一、綠豆的栽培與重金屬的處理

購自大賣場的綠豆先浸泡於 70%的酒精溶液中 5 分鐘，進行種子表面的消毒，再用自來水清洗數次，去除殘餘的酒精；之後，將綠豆種子半浸泡於含水的容器內，於室溫黑暗的環境下，進行萌芽。

經過一天的培養，挑選已發芽且胚根長度相似的綠豆，將其培養於鋪有兩層濾紙的培養皿內，使每一盤培養皿內的萌芽種子數為 5~6 顆，將已配製好的不同濃度（0.5、1、5、25mM）重金屬溶液（硫酸銅、硫酸鋅、硝酸鉛及複合重金屬）加入培養皿內，以自來水培養的綠豆當做對照組（濃度 0mM），於黑暗中培養 4 天及 7 天，每天觀察並於 4 天及 7 天後測量萌芽種子的胚根長，下胚軸長，側根長度及側根數目。

二、Evans blue 染色法

(一) 原理：活的細胞或組織能代謝排除所吸收的 Evans blue 染劑，因此無法染上藍色；死細胞或組織無法代謝排除所吸收的 Evans blue 染劑，便停留在細胞內，呈現藍色。

(二) 實驗方法主要參考 Chung-Wen Lin et al. (2005)、Wan-Chi Hung et al. (2007) 及蔡逸文 (2006)。於重金屬處理 4 天及 7 天後，將萌芽綠豆的根浸泡於 0.25% 的 Evans blue 溶液中 15 分鐘，之後再用自來水清洗 2 次，每次 15 分鐘，洗去多餘的染劑；細胞死亡的程度由染色的深淺，以美術的色卡，用肉眼來判斷評估，分成 5 個等級 (0-4)。

三、DAB (3',3'-diaminobenzidine, 3',3'-二氨基聯苯胺) 染色法

(一) 原理：DAB 染劑能和細胞內所產生的 H_2O_2 結合，形成不可溶、肉眼可辨認的紅棕色聚合物。

(二) 實驗方法主要參考 Hans Thordal-Christensen et al. (1997)。配製 1mg/ml 3',3'-diaminobenzidine (DAB) -HCl, pH3.8；於重金屬處理 4 天及 7 天後，將根部組織切除下來，於弱光環境中，浸泡於此溶液 4 小時，之後先以自來水清洗根部組織，再以沸水加熱 96% 酒精 10 分鐘，處理後的根部組織可儲存於 96% 酒精中；染色結果出現紅褐色，表示有 H_2O_2 的產生， H_2O_2 的產生量多寡由染色的深淺來判斷評估，分成 5 個等級 (0-4)。

四、NBT (Nitroblue tetrazolium, 硝基藍四氮唑) 染色法

(一) 原理：NBT 染劑能和細胞內所產生的 $\cdot O_2^-$ 結合， $\cdot O_2^-$ 能將黃色的 NBT 還原成不可溶、肉眼可辨認的藍色 formazan 聚合物。

(二) 實驗方法主要參考 M.C.Romero-Puertas et al (2004)。配置 0.1% 的 NBT 溶液 (0.1 克的 NBT 溶於 100ml 的 10mM, pH7.4 磷酸鈉緩衝液)；將根部切下，於黑暗環境中，浸泡於此溶液 8 小時，染色結果出現藍色，表示有 $\cdot O_2^-$ 的產生。

五、過氧化氫酶 (catalase, CAT) 活性測定

(一) 原理： $2H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalase}} 2H_2O + O_2$

(二) 實驗方法主要參考王月雲、陳是瑩、童武夫 (1987) 植物生理學實驗及莊秉樹等人 (2006)。每一次實驗前新鮮配製 5% 的過氧化氫溶液，取不同重金屬處理後的根部組織 0.5 克，加水 2ml 一起研磨，2 分鐘沉澱後，用吸管吸取 1ml 的懸浮液於 15ml 塑膠離心管內，並馬上加入 5% 的過氧化氫溶液，進行反應過程中，不斷地搖晃離心管，5 分鐘後記錄泡沫的產生量。

伍、結果與討論

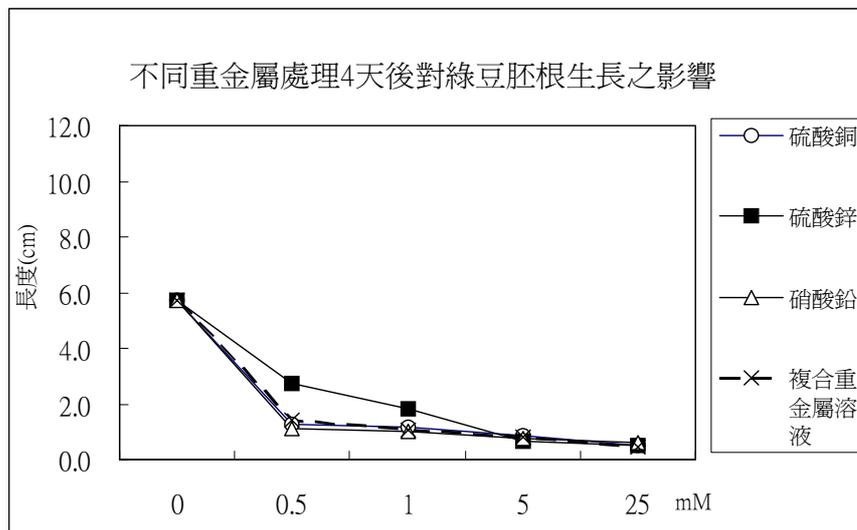
一、綠豆萌芽過程中，不同重金屬處理對其生長狀況之影響

我們藉著量測萌芽過程中，種子的胚根、下胚軸（種子的子葉或胚乳以下到胚根的部位）及總長度的生長變化，以了解重金屬處理所造成的外觀影響【附圖（2）及（3）】。

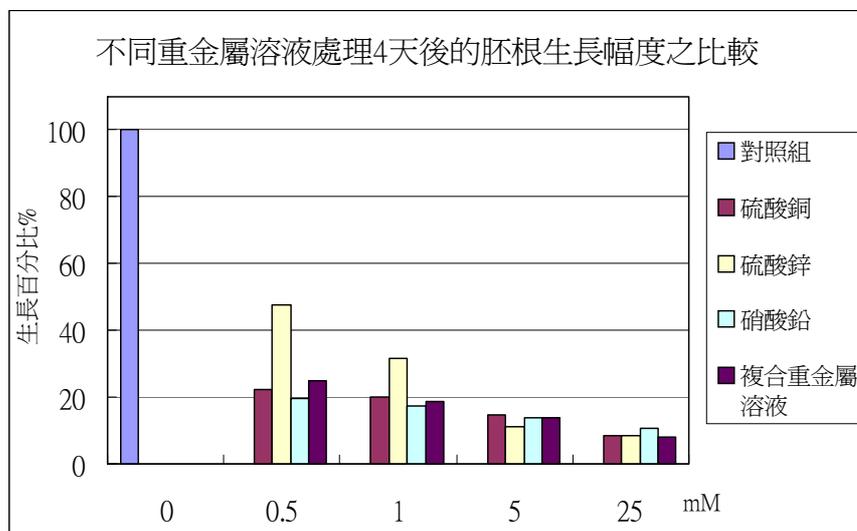
（一）處理 4 天後對胚根生長之影響。

由圖（1A）及（1B）可以看出胚根生長的變化方，不論何種重金屬離子的處理，都隨著濃度的增加，生長狀況明顯受到抑制，甚至呈現生長停滯現象；若以自來水處理的植株胚根長為基準（100%），我們發現銅離子與鉛離子及複合重金屬離子於低濃度時（0.5 及 1 mM），對胚根生長的抑制最為顯著（長度抑制了 80%），但是鋅離子處理的結果非常特殊，相較於其它重金屬的處理，在低濃度狀態時，胚根生長即使受到抑制但受影響程度不算太大；然而在高濃度狀態下培養的結果，不論是何種重金屬，胚根生長的抑制幅度高達 90% 以上。

圖（1A）



圖（1B）



(二) 處理 4 天後對下胚軸生長之影響。

由於萌芽初期，上胚軸並未發展出來，因此整個實驗便以下胚軸的長度代表莖的長度；由圖 (2A) 及 (2B) 可以看出在下胚軸生長的變化方面，與胚根生長趨勢類似，即重金屬濃度愈高，生長速度愈慢，但是由生長百分比的結果可發現，在綠豆萌芽初期，下胚軸受到重金屬的影響比較輕微 (例如鋅離子濃度 0.5mM，下胚軸仍保有 73% 的生長幅度)，銅離子的抑制效果仍然是最顯著，在濃度 0.5mM 情況下，下胚軸的生長已被抑制高達 70% 的程度；在高濃度狀態下的結果，生長幅度百分比與胚根的情形相同，即生長的抑制幅度平均為 87%。(以自來水處理的植株下胚軸長為基準 (100%))

圖 (2A)

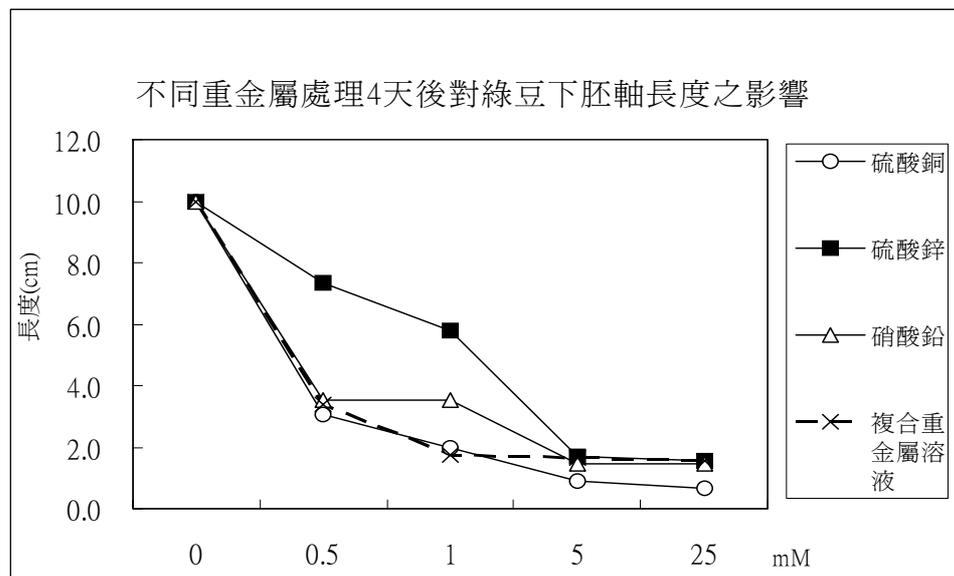
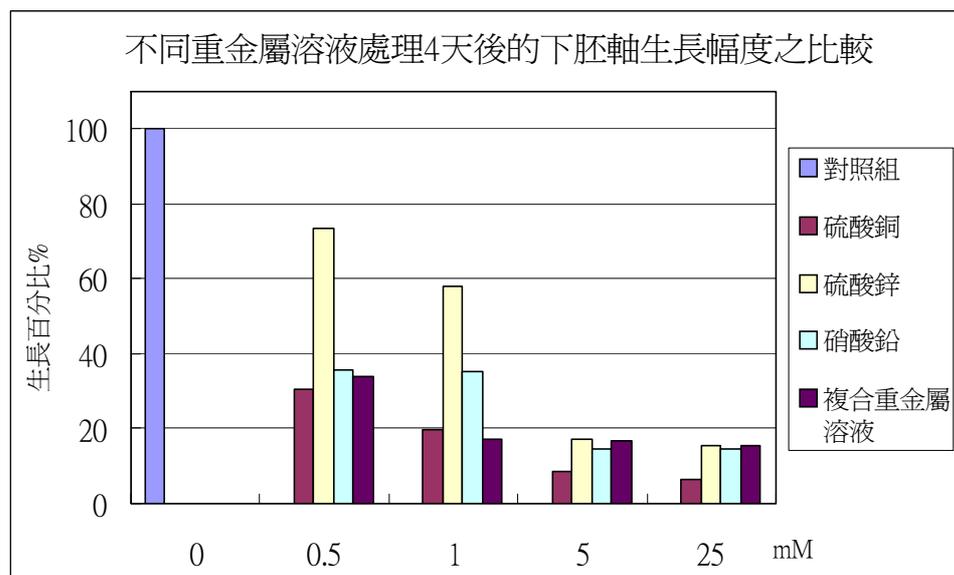


圖 (2B)



(三) 處理 4 天後對總長度生長之影響。

由於下胚軸生長速度大於胚根，因此由圖 (3A) 及 (3B) 可以看出在重金屬對萌芽總長度的變化方面，其生長趨勢及生長幅度百分比都與圖 (2A)、(2B) 極為雷同，亦即不論在何種濃度，銅離子的抑制效果最佳，而在綠豆萌芽初期，低濃度的鋅離子溶液對植株的總長度生長變化影響幅度最少，在高濃度時，生長均被抑制。

圖 (3A)

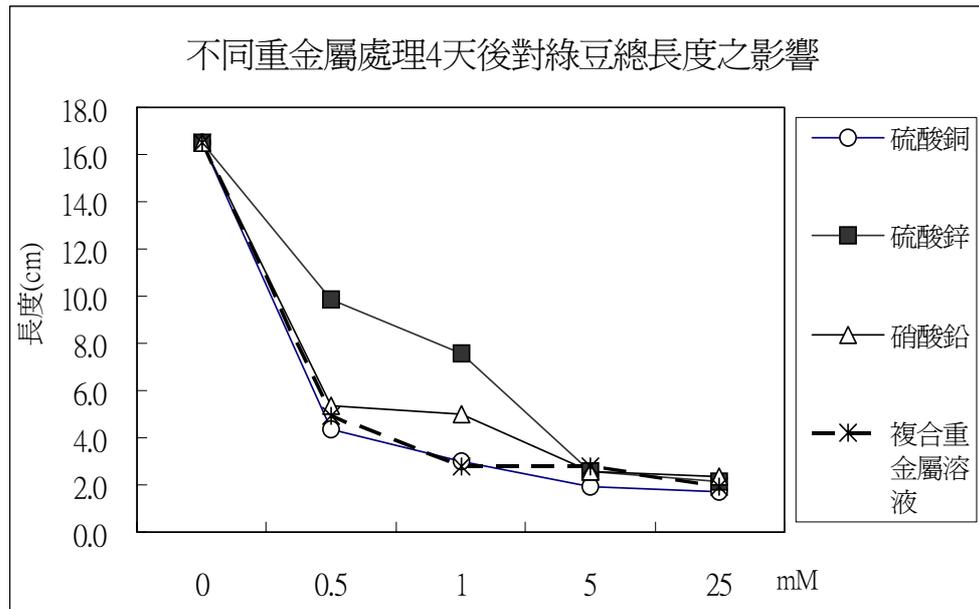
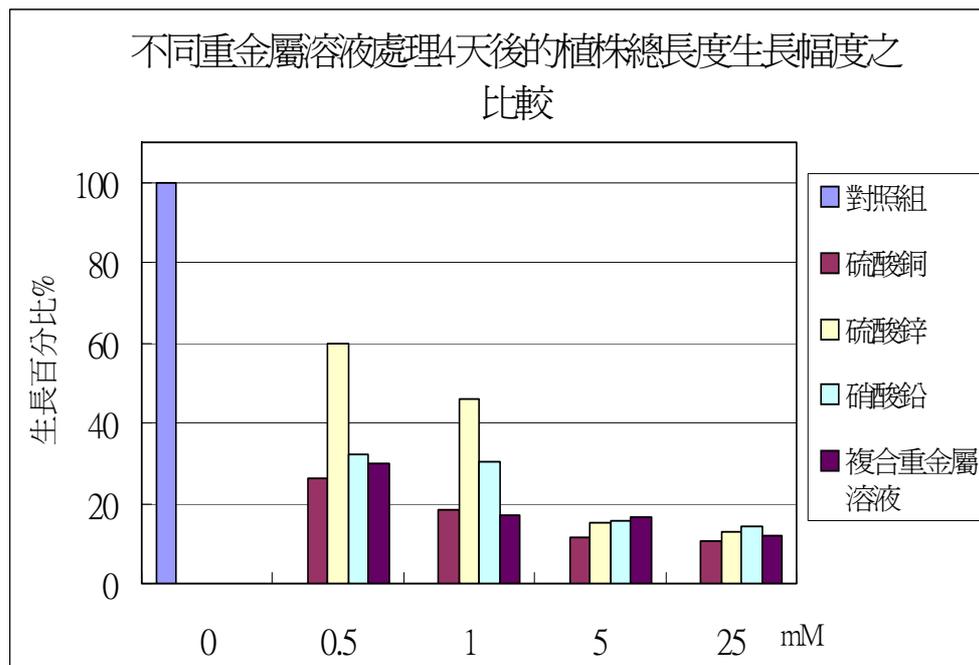


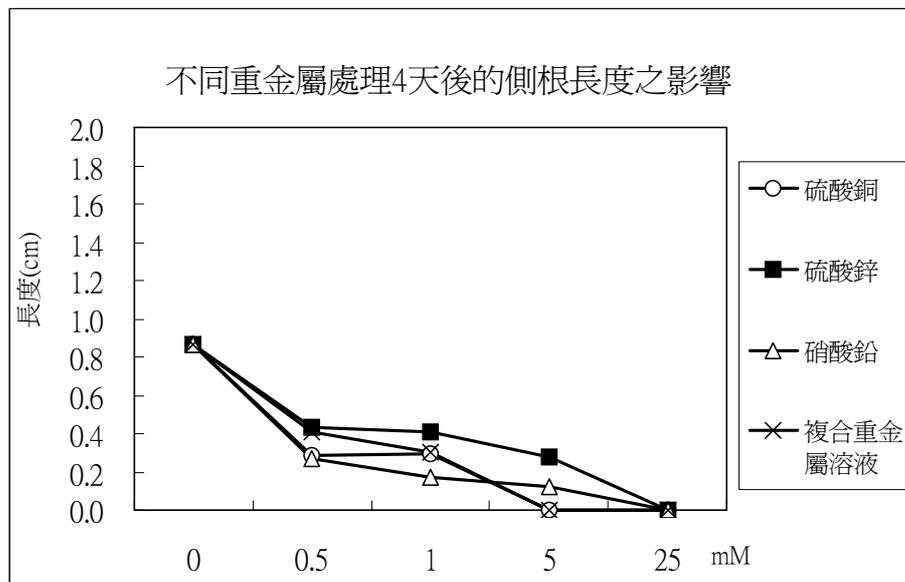
圖 (3B)



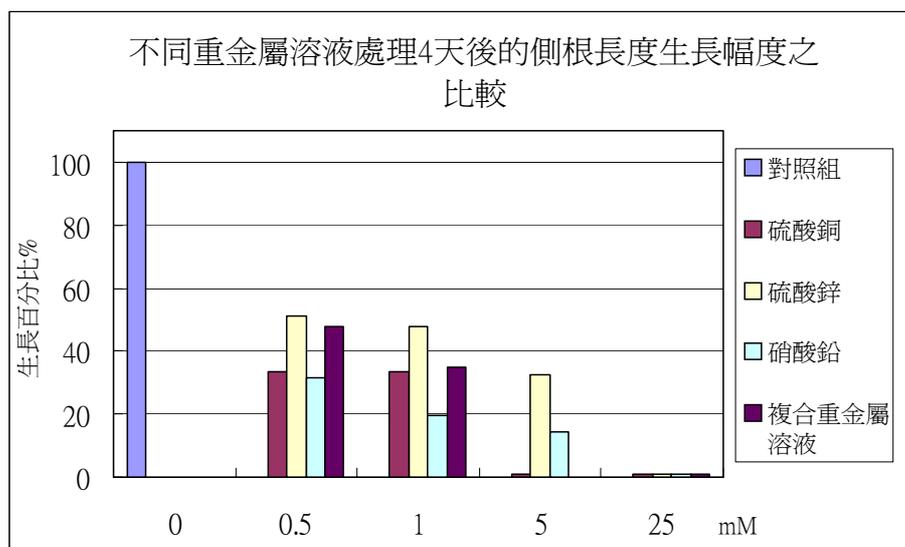
(四) 處理 4 天後對側根長度之影響。

由圖(4A)及(4B)可以看出在側根長度的變化方面，受到重金屬的抑制影響更大；若以自來水處理的植株側根長為基準(100%)，在低濃度狀態下(0.5及1mM)，鉛離子對側根長度的抑制是最明顯(抑制比例達80%)，當濃度增加為5mM和25mM時，側根的生長完全受到抑制，至於培養於鋅離子溶液中的萌芽綠豆而言，側根長度的生長亦受到影響(抑制50%)，但是濃度增加為1和5mM時,其生長幅度大制維持在相同的水準，由此可推測側根受到鋅離子的影響相對而言，是比較輕微的。

圖(4A)



圖(4B)



(五) 處理 4 天後對側根數目之影響。

由圖 (5A) 及 (5B) 可以看出在側根數目的變化方面，鉛離子的處理對萌芽綠豆的生長抑制影響是最大的，若以自來水處理的植株側根數為基準 (100%)，當鉛離子濃度僅為 0.5mM 時，側根的數目便只有對照組的 11%，濃度為 1mM 時，側根的數目便就縮減為原來的 6%，在所有重金屬的高濃度狀態下，培養 4 天的萌芽綠豆幾乎長不出側根。

圖 (5A)

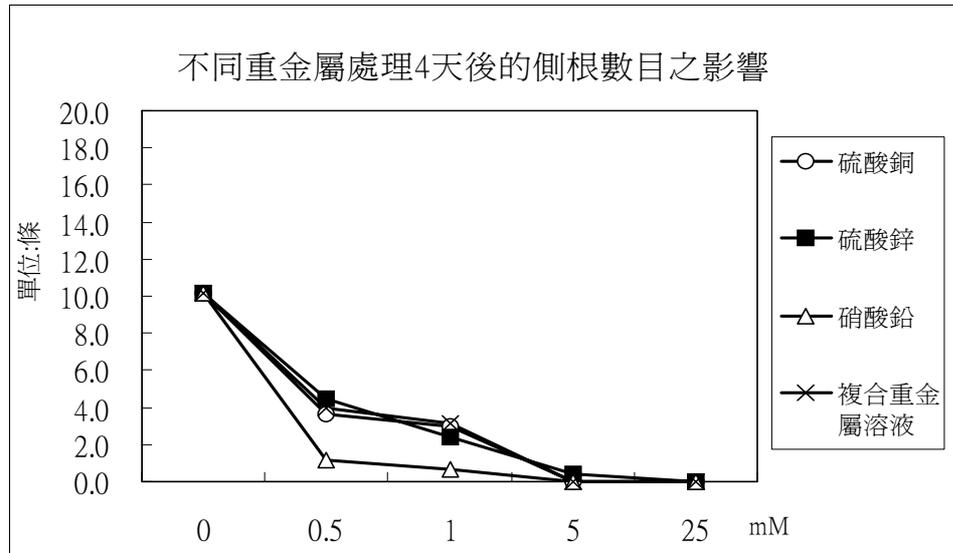
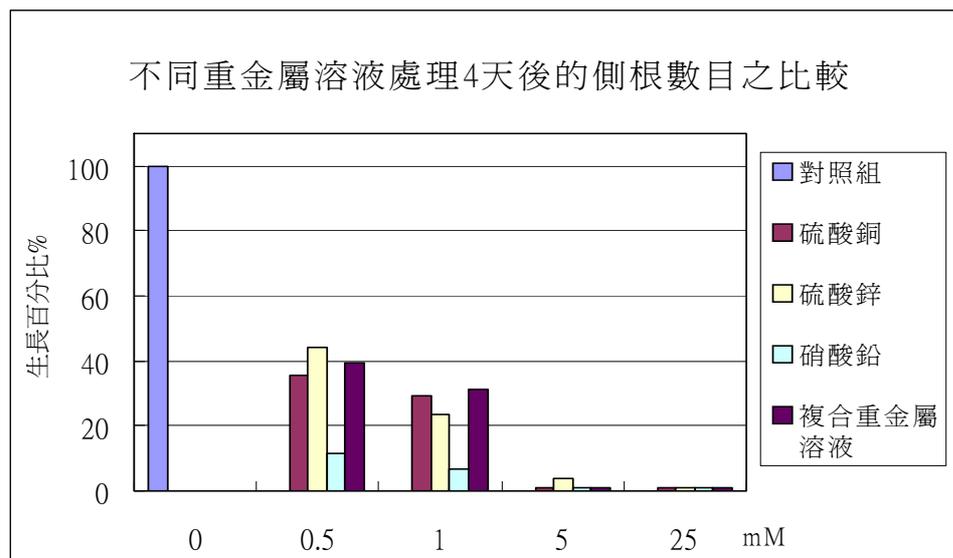


圖 (5B)



(六) 處理 7 天後對胚根生長之影響。

由圖 (6A) 及 (6B) 可以看出在重金屬處理 7 天後的變化，胚根生長受到抑制的情形更加嚴重；培養於低濃度 (0.5 及 1 mM) 鋅離子溶液中的綠豆，其胚根的生長幅度只有對照組的 31%，其餘的重金屬處理，不論濃度高低，抑制程度高達 95%，亦即胚根的生長幾乎停滯，沒有繼續發育的現象。

圖 (6A)

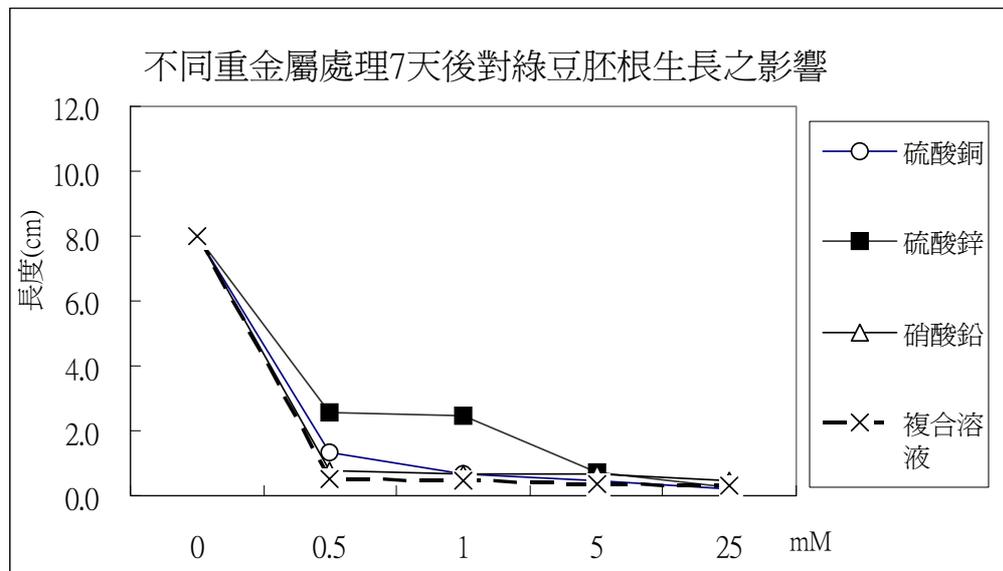
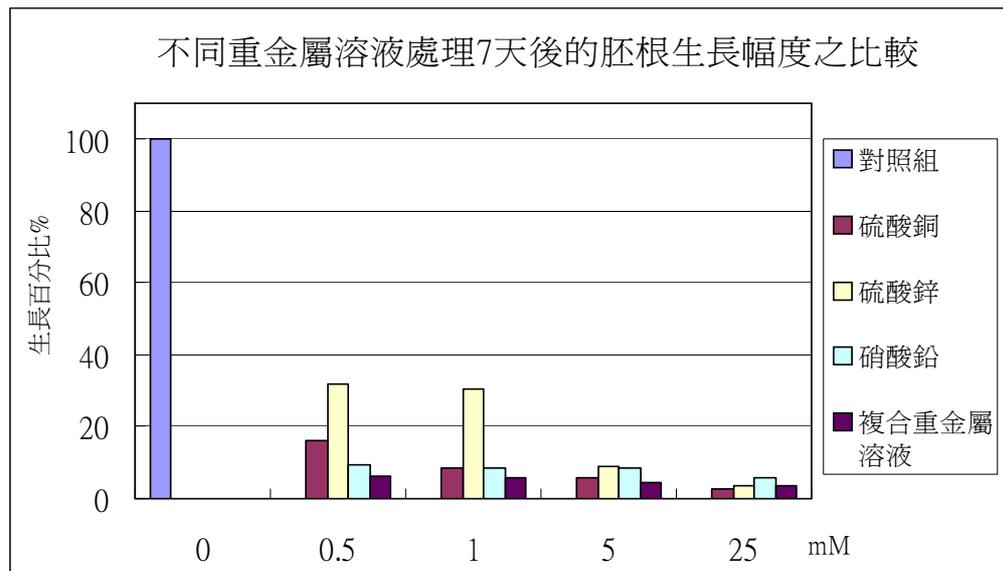


圖 (6B)



(七) 處理 7 天後對下胚軸生長之影響。

由圖 (7A) 及 (7B) 可以看出在重金屬處理 7 天後的變化，先前提過重金屬的處理對下胚軸的生長較為輕微，尤其是鋅離子的部份；但是培養 7 天後，即使是鋅離子溶液培養下的綠豆，其下胚軸仍然只有 47% 的生長（重金屬處理 4 天：73%），銅離子溶液培養下的綠豆，其下胚軸的抑制情況依舊是最嚴重，生長幅度都只在 20% 以下，當濃度為 25mM 時，甚至長不出下胚軸。

圖 (7A)

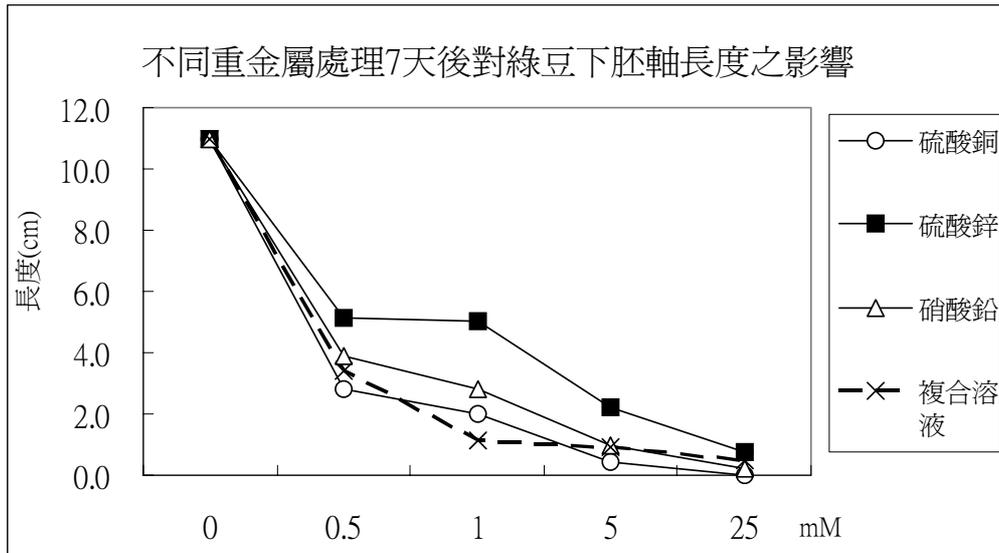
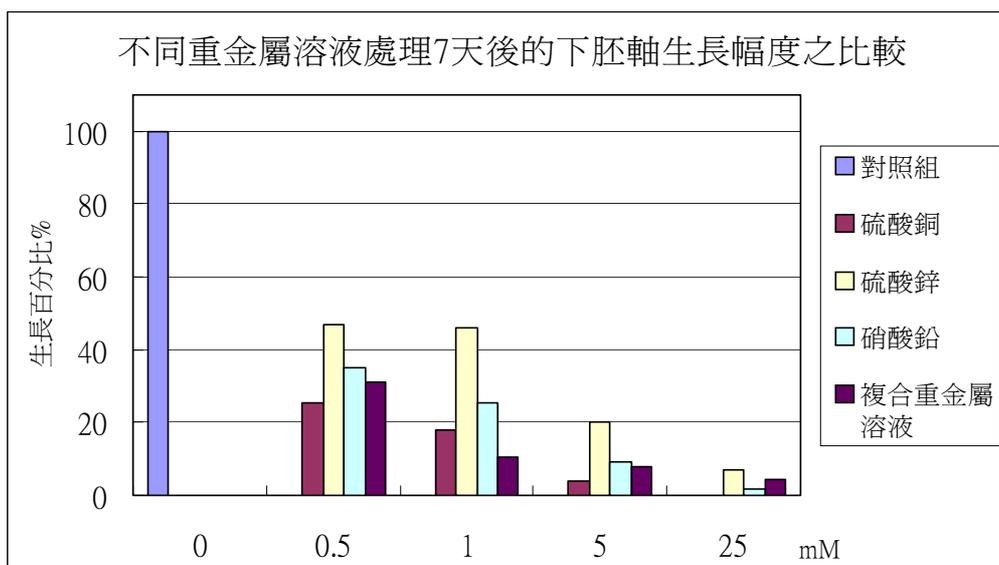


圖 (7B)



(八) 處理 7 天後對總長度生長之影響。

由圖 (8A) 及 (8B) 可以看出在重金屬對萌芽總長度的變化方面，比較培養 4 天的結果，其生長幅度減緩許多，不論在何種濃度，銅離子的抑制效果最佳，。

圖 (8A)

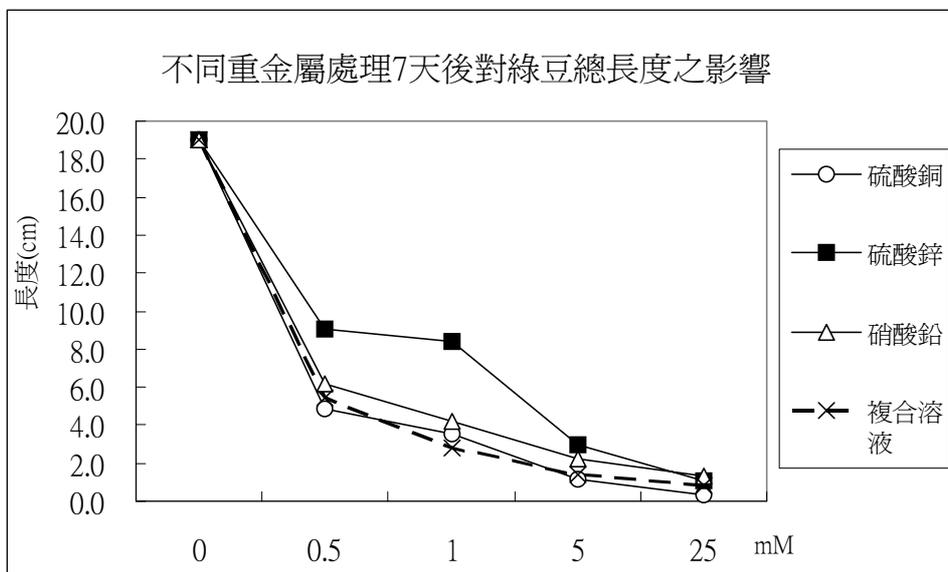
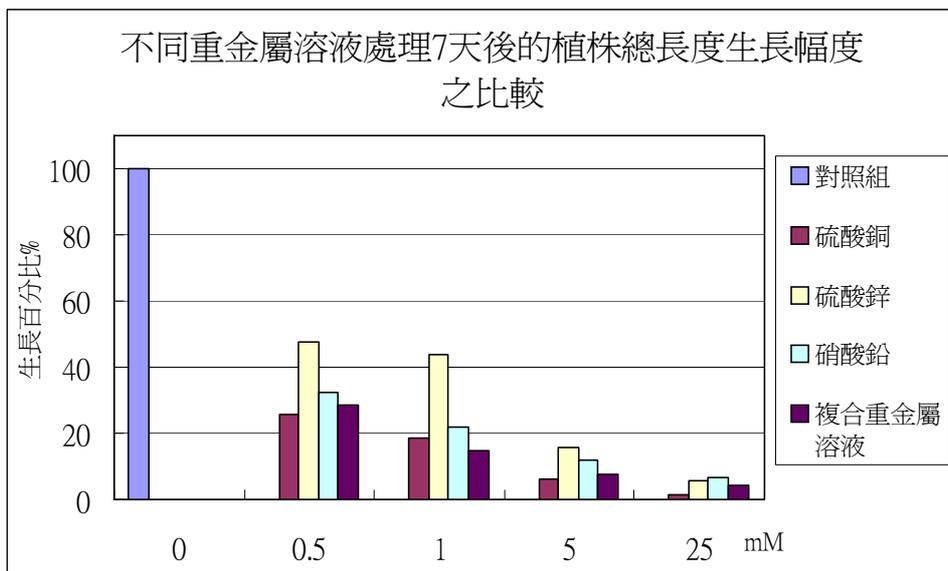


圖 (8B)



(九) 處理 7 天後對側根長度之影響。

由圖 (9A) 及 (9B) 發現，相較於處理 4 天後的數據,重金屬處理 7 天後的側根長度變化，其圖形折線的斜率大,即生長抑制效果顯著,尤其是銅離子和鉛離子在其濃度為 1mM 時，側根已幾乎長不出來，抑制程度約為 90%，到了濃度為 5 及 25mM 時，抑制生長的效率達到 100%，完全長不出側根。

圖 (9A)

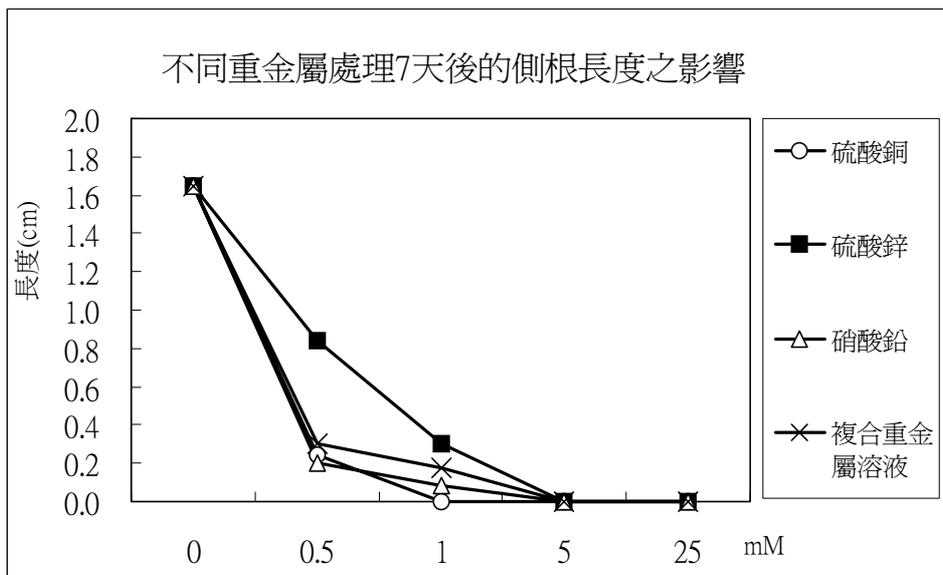
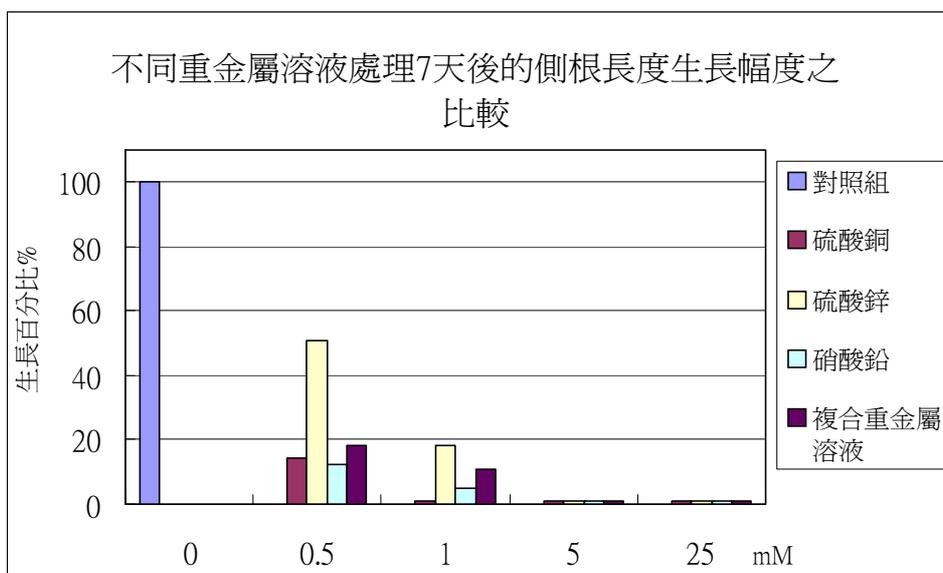


圖 (9B)



(十) 處理 7 天後對側根數目之影響。

由圖 (10A) 及 (10B) 所示，在重金屬處理 7 天後的綠豆種子，如側根長度的數據一樣，在濃度 0.5mM 的狀況下，就己能達到很好的抑制結果，尤其以鉛離子的成效最顯著 (90%的抑制)，而當濃度為 1、5 及 25mM 時，萌芽綠豆的胚根上已看不出有側根的跡象

圖 (10A)

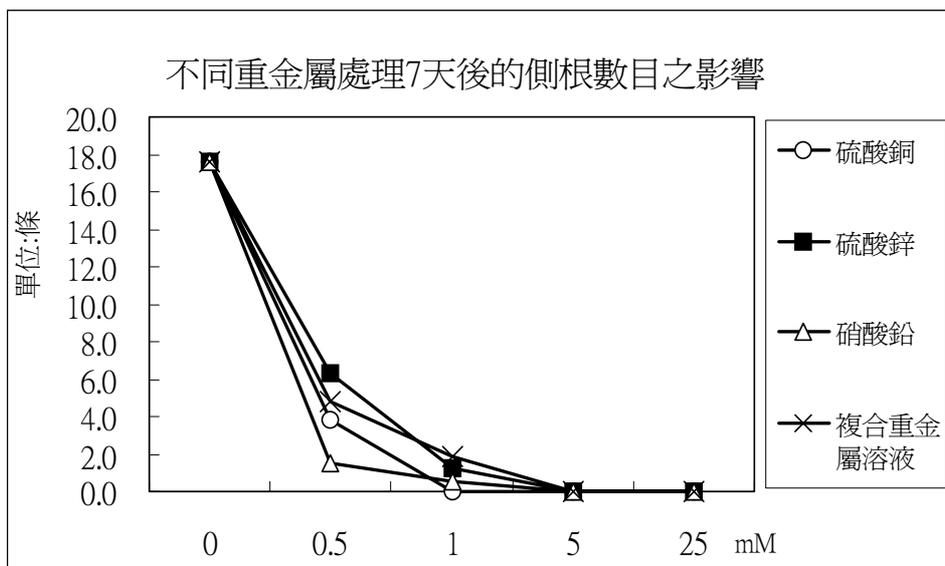
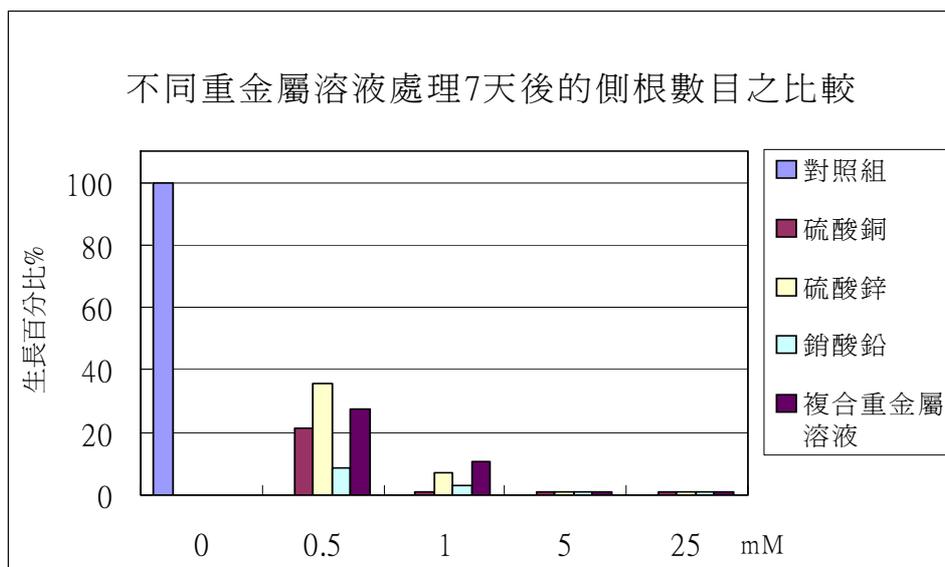


圖 (10B)



二、重金屬溶液的處理對萌芽綠豆根部細胞的傷害影響

由型態上的觀察發現，重金屬的處理對萌芽綠豆的根部組織影響很大，尤其是銅離子的處理，而且隨著重金屬濃度的增加及處理天數的增加，胚根及側根的生長減緩甚至無法長出根部組織，這可能意味著根部細胞受到某種程度的傷害而死亡，因此在這個部份的實驗，我們以根部組織是否能染上 Evans blue 染劑，來判斷細胞死亡的程度，並依染色深淺，區分為 5 個等級 (0-4)，等級愈高，細胞死亡比例愈高。由圖 (11A)、(11B) 及附圖 (4)、(5) 所示，不論是 4 天後或 7 天後的處理，Evans blue 的染色隨著重金屬濃度的增加而加深，表示根部細胞死亡的比例提高，並且也觀察到銅離子和複合重金屬離子造成根部死亡所需要的濃度較低；此結果與根部型態的結果互相呼應 (根部的生長受到抑制)，而在重金屬溶液中培養 7 天的萌芽綠豆，其根部死亡的情況是最嚴重，在較低的濃度狀態，其根部細胞死亡的比例就可達到如同高濃度的結果。(例如重金屬處理 4 天後，濃度 5mM，細胞染色等級為 4，但於重金屬處理 7 天後，濃度只要 1mM，細胞染色的等級便可為 4)。

圖 (11A)

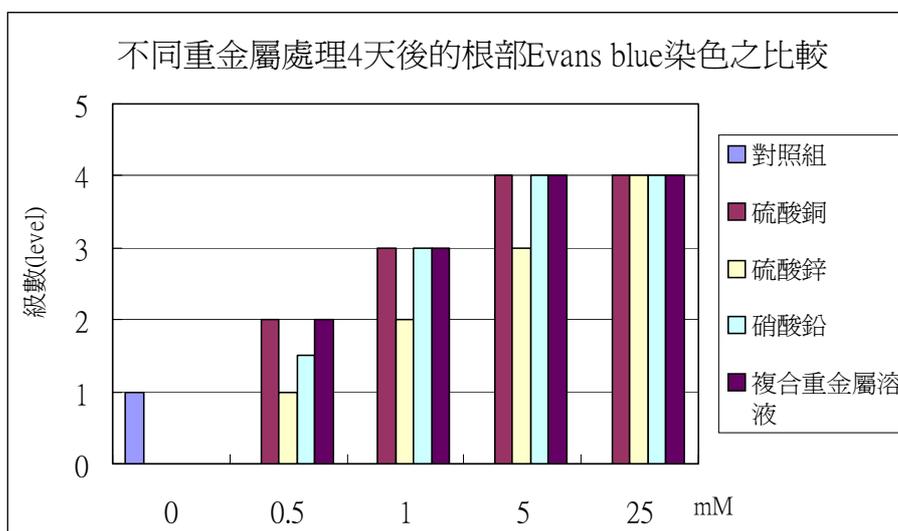
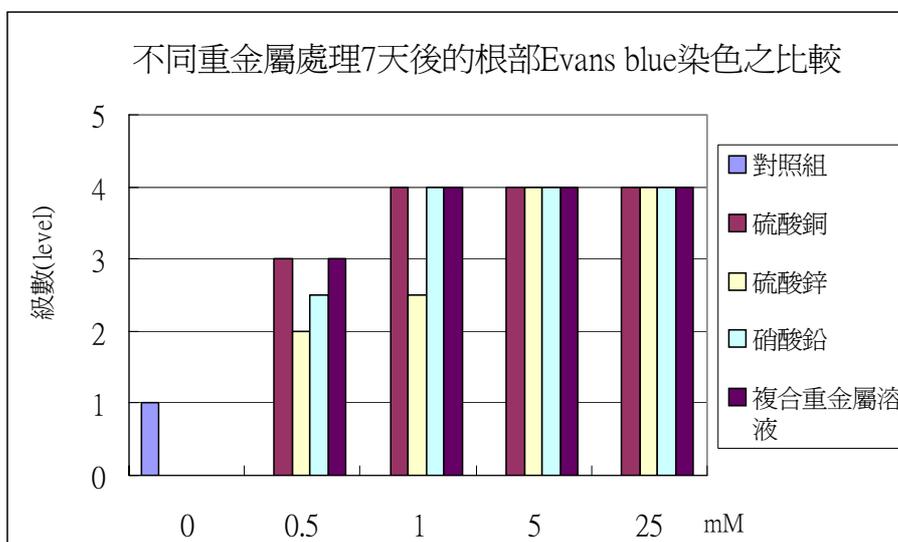


圖 (11B)



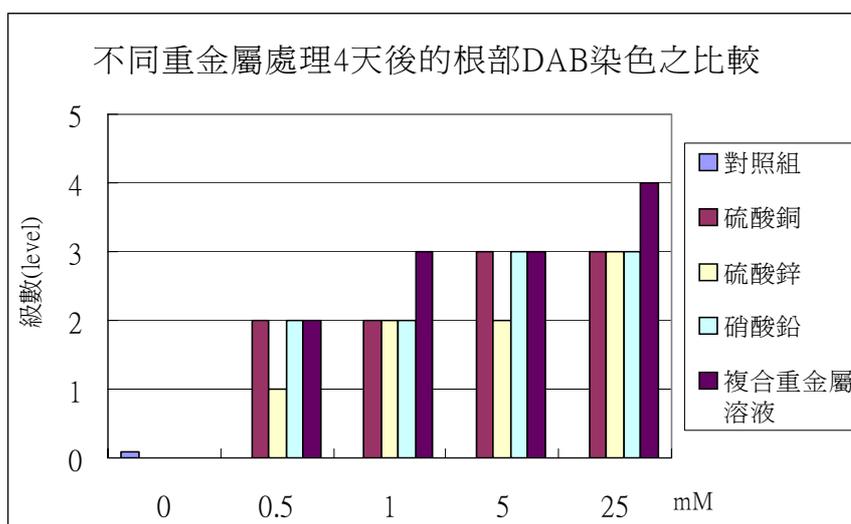
三、重金屬溶液的處理誘導根部細胞產生 H₂O₂ 之結果。

環境中逆境（如重金屬）常會導致植物細胞內產生許多活性氧化合物，許多文獻報告指出這些物質可能直接或間接造成細胞的死亡。在本次實驗中，我們利用 DAB 染色法，來偵測細胞內過氧化氫的誘發；由圖（12A）、（12B）及附圖（6）、（7）我們發現，相較對照組，隨著重金屬濃度的增加，根部細胞的 DAB 染色愈深，即表示細胞內 H₂O₂ 的誘導產生量愈多；處理 7 天後的實驗組，相同的重金屬濃度處理下，其 DAB 的染色都至少比處理 4 天後的結果，染色深度上昇了一級，表示 H₂O₂ 產生量也增加，增加倍數由本實驗結果則無法推測。

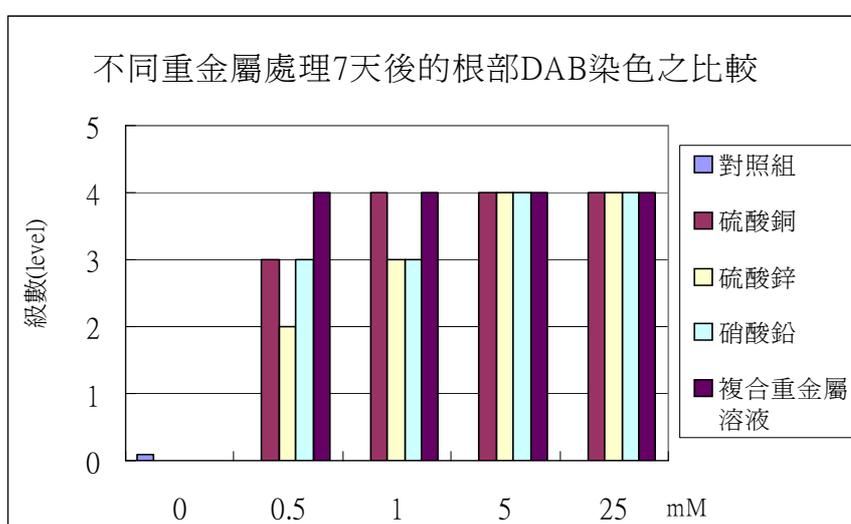
此外比較起單一重金屬的處理，經過複合重金屬離子的處理能造成較深的 DAB 染色，推測可能的原因是細胞同時在三種重金屬的刺激下，重創清除 H₂O₂ 的的酵素活性，使得 H₂O₂ 大量產生。

本部份的實驗若比對 Evans blue 染色的結果，可發現有一種正相關性的關聯，DAB 染色愈深，Evans blue 染色亦愈深，即表示根部細胞內 H₂O₂ 的產生量愈多，根部死亡的現象愈顯著。

圖（12A）



圖（12B）



四、重金屬溶液的處理誘導根部細胞產生 $\cdot O_2^-$ 之結果。

在本次實驗中，我們利用 NBT 染色法，來偵測細胞內超氧化物陰離子的誘發；由附圖 (8)(9) 的結果發現：相較對照組，隨著重金屬濃度的增加，根部細胞的 NBT 染色愈淺，在本實驗的最高濃度 (25mM) 狀況下，不論是何種重金屬處理，根部細胞已沒有 NBT 的呈色反應，比較特殊的是鋅離子的結果，綠豆根部在鋅離子濃度 0.5mM 到 5mM 的培養下，都能呈現明顯藍色反應，至於銅離子及複合重金屬離子，在其濃度為 1mM 時已幾乎看不到藍色的 formazan 生成物。重金屬處理 7 天後的根部 NBT 染色淺於重金屬處理 4 天的結果，表示誘導出較少的 $\cdot O_2^-$ ；我們推測可能是因為根部細胞嚴重損傷，死亡比例高，因而抑制粒線體的電子傳遞鍊的氧化反應，造成沒有或只有微量 $\cdot O_2^-$ 的產生。

圖 (13A)

不同重金屬處理 4 天後的根部 NBT 染色				
濃度 (mM)	硫酸銅	硫酸鋅	硝酸鉛	複合重金屬
0.5	+++	++++	+++	++
1	+	+++	++	+
5	-	+	+	-
25	-	-	-	-
對照組	-			

圖 (13B)

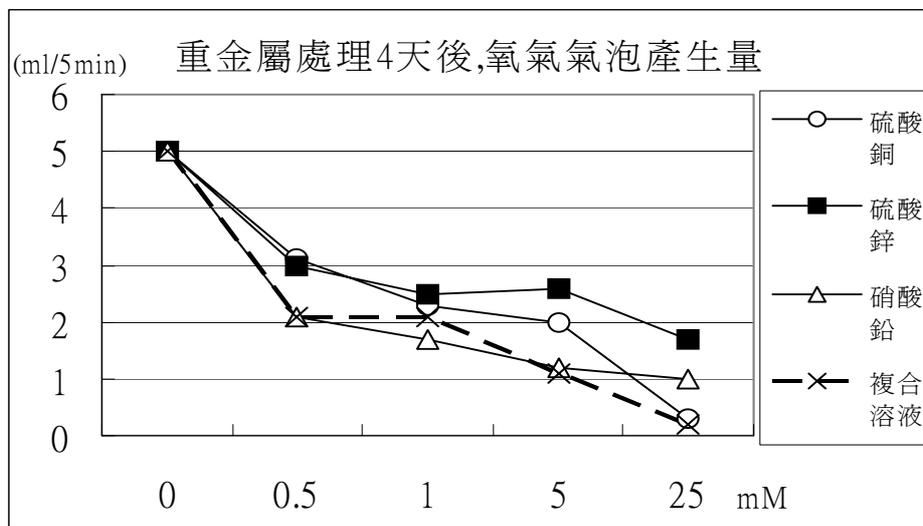
不同重金屬處理 7 天後的根部 NBT 染色				
濃度 (mM)	硫酸銅	硫酸鋅	硝酸鉛	複合重金屬
0.5	++	+++	++	++
1	+	++	++	-
5	-	++	-	-
25	-	-	-	-
對照組	-			

(註：+愈多，藍色愈深)

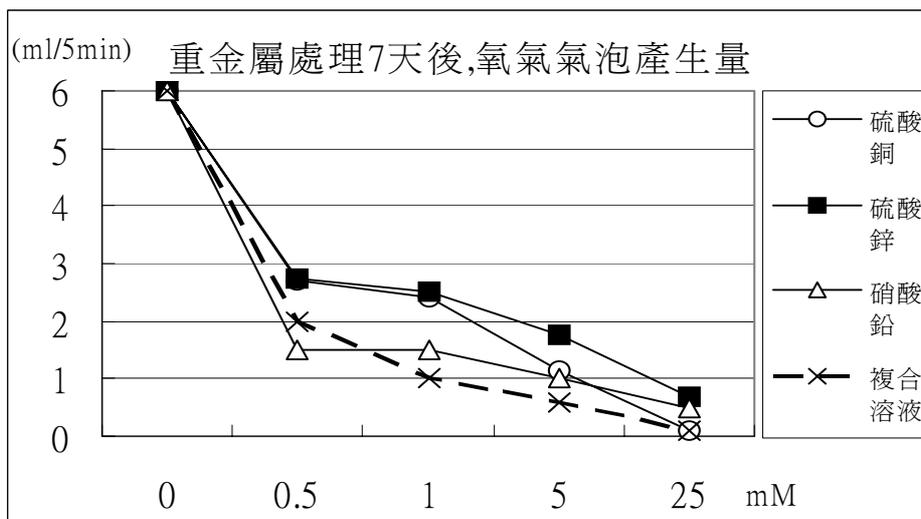
五、重金屬溶液的處理抑制過氧化氫酶活性的結果

重金屬會影響酵素的活性；細胞內所誘發產生的過多 H_2O_2 ，可以經由過氧化氫酶的參與，將之轉變成較無毒性的 H_2O 及 O_2 ，而減輕對細胞的傷害。原先要以排水集氣法收集氧氣，產生氧氣量的多寡可做為過氧化氫酶活性的好壞，但是以我們採收的根部重量去研磨，進行排水集氣法，無法收集到可以測量的體積，因此我們採取目測在於離心管反應中產生的（氧氣）氣泡量，作為過氧化氫酶活性的指標；我們先衡量對照組於 5 分鐘內能否產生足夠的氣泡量，如果可以，便以此時間點當作本部份實驗中氣泡產生量的基準，由圖（14A）、（14B）及附圖（10）、（11）可發現，重金屬溶液的濃度愈高，氣泡產生量愈少，重金屬處理的時間愈久，氣泡產生量也有減少的趨勢，在本實驗中，鉛離子與複合重金屬溶液對過氧化氫酶活性的抑制較大，此結果亦與先前染色的結果相互呼應。

圖（14A）



圖（14B）

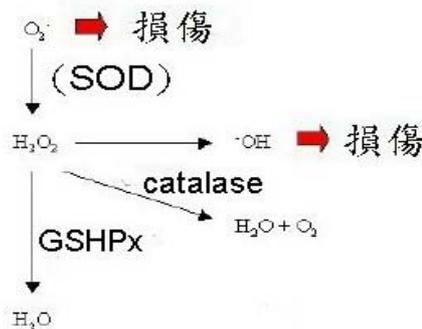


陸、結論

- 一、本實驗的結果發現：不論處理的時間長短，銅離子溶液對植株生長的抑制最顯著，鋅離子的影響最弱；由我們所參考的文獻「清理重金屬污染的植物」一文中，作者指出許多重金屬在植物生長發育過程中，扮演著「必須金屬元素」的角色，例如鋅，在許多酵素中扮演輔助因子，可以影響酵素活性的高低；也許如此，在低濃度下，鋅離子對萌芽後的綠豆生長抑制效果最弱，但是其濃度升高，抑制程度便和其它重金屬離子雷同。
- 二、在本實驗中發現，萌芽後的綠豆植株受到重金屬影響最顯著的部份在根部，這可能是因為根是吸收水份和養份的組織，直接接觸到重金屬的刺激所致；側根是由主根分枝出來的構造，可以增加吸收的面積，由結果我們發現，重金屬濃度愈高，側根的長度及數目都明顯減短、變少，尤其是鉛離子的抑制效果最佳；在本實驗的最高濃度狀態下（25mM），幾乎長不出側根，吸收效率受到抑制。
- 三、綠豆的下胚軸受到重金屬的影響較小，但隨著重金屬濃度的提高，生長也受到抑制；我們推測的原因可能是因為根部受到重金屬的刺激而抑制其吸收效率，水份養份無法被往上運送，也間接導致下胚軸或莖的生長。
- 四、根部受到重金屬的刺激而導致其長度及數目減短或變少的原因，我們推測是因為細胞受到傷害而死亡，因此無法進行細胞分裂產生新的細胞及修復受傷；利用 Evans blue 的染色技術，死亡的細胞不會將藍色染劑排除而呈現藍色，我們發現重金屬的處理確實會造成根部的死亡，尤其是銅離子與複合重金屬離子；重金屬的處理時間愈久（7 天）、重金屬的濃度愈高（25mM），根部的藍色愈深，細胞死亡愈多，受到的傷害程度也愈大。
- 五、爲了量化 Evans blue 的染色深淺，我們以目視法（semi-quantitative method），區分爲 5 等級（0-4），大致上可以知道細胞受到傷害的影響程度；我們詢問老師得知另有更精密的量化方法，即利用甲醇溶液萃取出根內的 Evans blue 染劑，再使用分光光度儀去測量其吸光值，吸光值愈高，染色愈深，細胞死亡比率愈多，但受限於時間，無法與相關的大學實驗室商借儀器，進行此實驗。
- 六、由一些科學的報導得知重金屬的刺激會誘導細胞內自由基的產生，而造成細胞的傷害，自由基成員中，以活性氧化合物（Reactive oxygen species）被研究最清楚，這些物質包括了超氧化物陰離子（ $\cdot O_2^-$ ）、氫氧自由基（ $\cdot OH$ ）及過氧化氫（ H_2O_2 ）；我們利用 DAB 染色法，可以捕捉到細胞內受到重金屬的刺激而產生的過氧化氫（ H_2O_2 ），實驗結果發現，重金屬的處理時間愈久（7 天）、重金屬的濃度愈高（25mM），根部被染成棕褐色的現象愈顯著，染色也愈深，表示誘導出更多的過氧化氫，尤以複合重金屬離子的處理。這個結果只能部份解釋根部細胞死亡的現象，因為重金屬的刺激還會造成其它自由基的產生，都可能導致根細胞的死亡。

七、我們利用 NBT 染色法，可以捕捉到細胞內受到重金屬的刺激而產生的超氧化物陰離子 ($\cdot O_2^-$)，實驗結果發現不論是何種重金屬的處理，隨著重金屬濃度的提高，NBT 染色的深度愈淺 (即所誘導出的 $\cdot O_2^-$ 愈少)，在最高濃度的處理後，甚至沒有呈色反應；此現象與我們的預期相反，我們推測可能的原因是：當植物受到重金屬刺激後，其體內大量誘導出 $\cdot O_2^-$ ，部份的 $\cdot O_2^-$ 抑制過氧化氫酶的活性使得根部開始累積 H_2O_2 ，隨著重金屬濃度的提高， H_2O_2 的誘導量也隨著增加，根部內形成所謂的「自由基風暴」，在 H_2O_2 及 $\cdot O_2^-$ 雙重作用下，造成根部細胞死亡比例增加，因而抑制粒線體的電子傳遞鍊的氧化反應，造成沒有或只有微量 $\cdot O_2^-$ 的產生。由於 H_2O_2 分子較為穩定，因此即使 $\cdot O_2^-$ 大量衰減，在細胞內仍可偵測到 H_2O_2 分子；根據上述推論，重金屬處理時間愈久，NBT 染色深度反而減弱的原因可能就是根部細胞死亡程度大幅提高，使得生理機能嚴重受到影響，粒線體的電子傳遞鍊的氧化反應不再進行，便無法產生足量可以偵測到的 $\cdot O_2^-$ ；至於硫酸鋅的處理，由我們先前的實驗發現鋅離子對綠豆的傷害程度較小，因此在較高濃度及較長時間處理下，細胞存活率較高，所以仍可誘導出 $\cdot O_2^-$ ，使得 NBT 被還原成藍色。

八、重金屬的刺激會抑制酵素活性；細胞內有許多可以清除自由基的酵素，例如超氧歧化酶 (SOD)，可將超氧化物陰離子轉變成過氧化氫及氧，過氧化氫酶 (catalase, CAT)，可將過氧化氫轉變成水及氧，而穀胱胺過氧化酶 (GSHPx) 則可將過氧化氫轉變成水及氧。我們本次實驗利用國中理化所學過的方法來檢測過氧化氫酶的活性，發現重金屬的處理抑制了該酵素的活性 (即氧氣的氣泡量變少)，也就是說被誘導出來的過氧化氫 (H_2O_2) 無法被完全清除，累積在細胞內的過氧化氫將可能造成傷害。



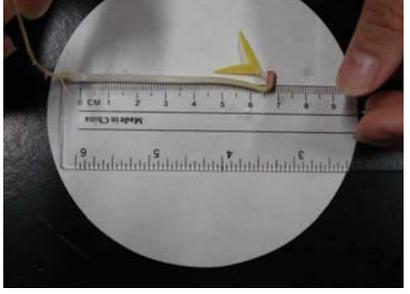
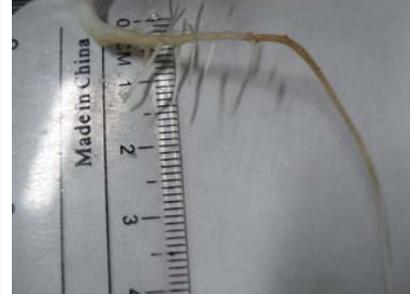
九、綜括言之，由這次實驗能推導得知：重金屬的刺激會誘導出超氧化物陰離子 ($\cdot O_2^-$)，並進而產生過氧化氫，再加上重金屬誘導的過多自由基破壞根部內過氧化氫酶的活性，導致過氧化氫濃度提高，在活性氧化合物濃度增加及抗氧化酵素被抑制的情形下，對根部細胞造成傷害，使得根的生長受到抑制，再接著影響到莖的生長。

柒、參考資料

- 一、王月雲、陳是瑩、童武夫（民 83 年）。植物生理學實驗。台北市：藝軒圖書出版社。
- 二、葉顯銘、陳少燕、黃定鼎、黃浩仁（2004）。清理重金屬污染的植物。科學發展，308，44-49。
- 三、蔡逸文（2006）。銅影響大豆及田菁根部生長，細胞死亡和訊息傳遞。國際科學展覽會作品書。
- 四、生物濾水器-重金屬的吸附能力。中華民國第四十四屆中小學科學展覽會作品說明書。
- 五、Chung-Wen Lin, Hsien-Bing Chang, Hao-Jen Huang（2005）Zinc induces mitogen-activated protein kinase activation mediated by reactive oxygen species in rice roots. *Plant Physiology and Biochemistry* 43, 963–968.
- 六、Eva Vranová, Dirk Inzé and Frank Van Breusegem（2002）Signal transduction during oxidative stress. *Journal of Experimental Botany* 53, 1227-1236
- 七、Hans Thordal-Christensen, Ziguang Zhang, Yangdou Wei, David B. Collinge（1997）Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *The plant Journal* 11(6), 1187-1194
- 八、M. C. Romero-Puertas, M. Rodríguez-Serrano, F. J. Corpas, M. Gómez, L. A. Del Río and L. M. Sandalio（2004）Cadmium-induced subcellular accumulation of O₂⁻ and H₂O₂ in pea leaves. *Plant, Cell and Environment* 27,1122-1134
- 九、Wan-Chi Hung , Dinq-Ding Huang , Pei-Shan Chien, Chuan-Ming Yeh,Po-Yu Chen, Wen-Chang Chi, Hao-Jen Huang（2007）Protein tyrosine dephosphorylation during copper-induced cell death in rice roots. *Chemosphere* 69 ,55–62.

捌、附圖：

附圖 (1)

1A. 重金屬溶液配置	1B. 銅離子處理的綠豆	1C. 鋅離子處理的綠豆
		
1D. 鉛離子處理的綠豆	1E. 複合重金屬離子處理的綠豆	1F. 對照組
		
1G. 測量根長	1H. 測量下胚軸長	1I. 測量側根長
		
1J. Evans blue 染劑	1K. DAB 染劑	1M. NBT 染劑
		

附圖 (2) 重金屬溶液培養 4 天後的綠豆生長狀況



附圖 (3) 重金屬溶液培養 7 天後的綠豆生長狀況



附圖（4）重金屬溶液培養 4 天後的綠豆根部 Evans blue 染色情形



附圖（5）重金屬溶液培養 7 天後的綠豆根部 Evans blue 染色情形



附圖（6）重金屬溶液培養 4 天後的綠豆根部 DAB 染色情形



附圖（7）重金屬溶液培養 7 天後的綠豆根部 DAB 染色情形

硫酸銅	對照組
 <p>0.5 1 5 25(mM)</p> <p>硫酸銅</p>	 <p>對照組 (無重金屬處理)</p>
<p>硫酸鋅</p>	
 <p>0.5 1 5 25 (mM)</p> <p>硫酸鋅</p>	
<p>硝酸鉛</p>	
 <p>0.5 1 5 25(mM)</p> <p>硝酸鉛</p>	
<p>複合重金屬</p>	
 <p>0.5 1 5 25(mM)</p> <p>複合重金屬溶液</p>	

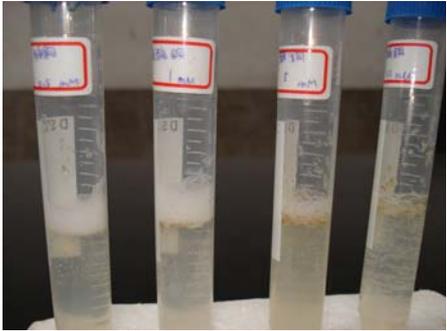
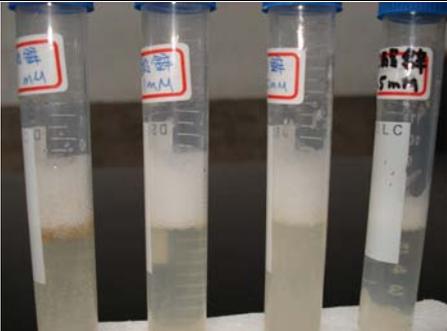
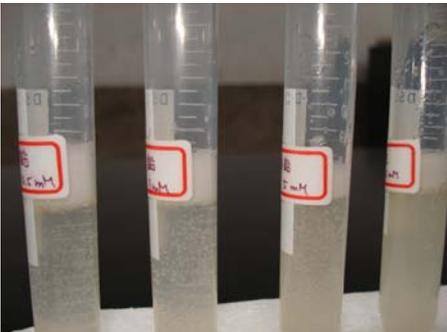
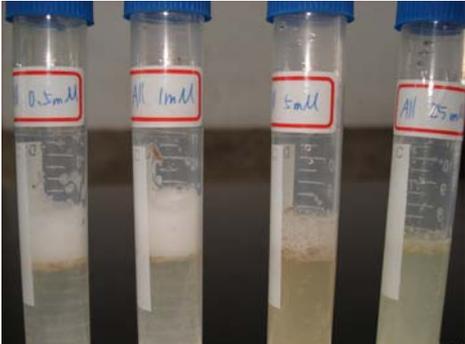
附圖 (8) 重金屬溶液培養 4 天後的綠豆根部 NBT 染色情形



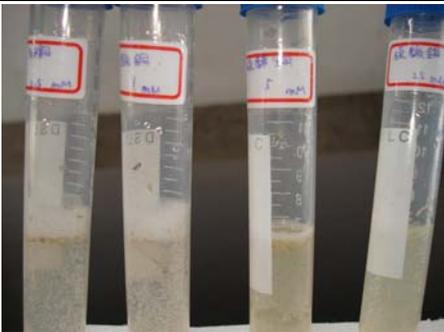
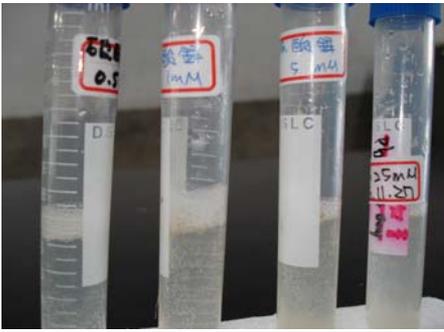
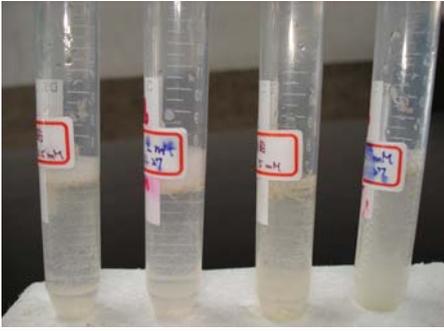
附圖 (9) 重金屬溶液培養 7 天後的綠豆根部 NBT 染色情形



附圖 (10) 重金屬溶液培養 4 天後的綠豆根部過氧化氫酶活性的測定

硫酸銅	0.5	1	5	25mM	對照組
					
硫酸鋅	0.5	1	5	25mM	
					
硝酸鉛	0.5	1	5	25mM	
					
複合溶液	0.5	1	5	25mM	
					

附圖 (11) 重金屬溶液培養 7 天後的綠豆根部過氧化氫酶活性的測定

硫酸銅	0.5	1	5	25mM	對照組
					
硫酸鋅	0.5	1	5	25mM	
					
硝酸鉛	0.5	1	5	25mM	
					
複合溶液	0.5	1	5	25mM	
					

玖、附表（實驗 5 重複的平均值）

重金屬處理 4 天後的綠豆胚根長度(單位:公分)					重金屬處理 7 天後的綠豆胚根長度(單位:公分)				
對照組	5.71cm				對照組	8.0cm			
	硫酸銅	硫酸鋅	硝酸鉛	複合重金屬		硫酸銅	硫酸鋅	硝酸鉛	複合重金屬
0.5mM	1.26	2.73	1.13	1.43	0.5mM	1.31	2.56	0.77	0.49
1mM	1.15	1.81	0.99	1.07	1mM	0.67	2.46	0.67	0.47
5mM	0.84	0.64	0.78	0.8	5mM	0.47	0.72	0.67	0.37
25mM	0.48	0.48	0.60	0.45	25mM	0.2	0.28	0.46	0.3

重金屬處理 4 天後的綠豆下胚軸長度(單位:公分)					重金屬處理 7 天後的綠豆下胚軸長度(單位:公分)				
對照組	10cm				對照組	11.0cm			
	硫酸銅	硫酸鋅	硝酸鉛	複合重金屬		硫酸銅	硫酸鋅	硝酸鉛	複合重金屬
0.5mM	3.07	7.35	3.55	3.4	0.5mM	2.8	5.16	3.87	3.4
1mM	1.96	5.79	3.51	1.72	1mM	2	5.05	2.8	1.14
5mM	0.87	1.70	1.48	1.66	5mM	0.45	2.21	1	0.9
25mM	0.66	1.56	1.47	1.54	25mM	0.01	0.75	0.2	0.49

重金屬處理 4 天後的綠豆總長度(單位:公分)					重金屬處理 7 天後的綠豆總長度(單位 公分)				
對照組	16.50				對照組	19.00			
	硫酸銅	硫酸鋅	硝酸鉛	複合重金屬		硫酸銅	硫酸鋅	硝酸鉛	複合重金屬
0.5mM	4.33	9.88	5.35	4.95	0.5mM	4.88	9.09	6.2	5.4
1mM	3.02	7.60	4.98	2.81	1mM	3.56	8.37	4.2	2.78
5mM	1.9	2.54	2.6	2.76	5mM	1.14	3	2.26	1.42
25mM	1.75	2.12	2.36	1.94	25mM	0.3	1.05	1.29	0.79

重金屬處理 4 天後的側根數目(單位:條)					重金屬處理 7 天後的側根數目(單位:條)				
對照組	10.2				對照組	17.6			
	硫酸銅	硫酸鋅	硝酸鉛	複合重金屬		硫酸銅	硫酸鋅	硝酸鉛	複合重金屬
0.5mM	3.63	4.5	1.17	4.00	0.5mM	3.8	6.3	1.5	4.84
1mM	3.00	2.41	0.67	3.16	1mM	0	1.25	0.5	1.87
5mM	0	0.41	0	0	5mM	0	0	0	0
25mM	0	0	0	0	25mM	0	0	0	0

重金屬處理 4 天後的側根長度(單位:公分)				
對照組	0.86			
	硫酸銅	硫酸鋅	硝酸鉛	複合重金屬
0.5mM	0.29	0.44	0.27	0.41
1mM	0.29	0.41	0.17	0.30
5mM	0	0.28	0.125	0
25mM	0	0	0	0

重金屬處理 7 天後的側根長度(單位:公分)				
對照組	1.65			
	硫酸銅	硫酸鋅	硝酸鉛	複合重金屬
0.5mM	0.24	0.84	0.2	0.3
1mM	0	0.3	0.08	0.18
5mM	0	0	0	0
25mM	0	0	0	0

重金屬處理 4 天後的根部 Evans blue 染色深淺級數				
對照組	1			
	硫酸銅	硫酸鋅	硝酸鉛	複合重金屬
0.5mM	2	1	1.5	2
1mM	3	2	3	3
5mM	3	3	4	4
25mM	4	4	4	4

重金屬處理 7 天後的根部 Evans blue 染色深淺級數				
對照組	1			
	硫酸銅	硫酸鋅	硝酸鉛	複合重金屬
0.5mM	3	2	2.5	3
1mM	4	2	3	3
5mM	4	4	4	4
25mM	4	4	4	4

重金屬處理 4 天後的根部 DAB 染色深淺級數				
對照組	0			
	硫酸銅	硫酸鋅	硝酸鉛	複合重金屬
0.5mM	2	1	2	2
1mM	2	2	2	3
5mM	3	2	3	3
25mM	3	3	3	4

重金屬處理 7 天後的根部 DAB 染色深淺級數				
對照組	0			
	硫酸銅	硫酸鋅	硝酸鉛	複合重金屬
0.5mM	3	2	3	4
1mM	4	3	3	4
5mM	4	4	3	4
25mM	4	4	4	4

重金屬處理 4 天後的氧氣氣泡量(單位: ml/5min)				
對照組	5			
	硫酸銅	硫酸鋅	硝酸鉛	複合重金屬
0.5mM	3.1	3	2.1	2.1
1mM	2.3	2.5	1.7	2.1
5mM	2	2.6	1.2	1.1
25mM	0.3	1.7	1	0.2

重金屬處理 7 天後的氧氣氣泡量(單位: ml/5min)				
對照組	6			
	硫酸銅	硫酸鋅	硝酸鉛	複合重金屬
0.5mM	2.7	2.75	1.5	2
1mM	2.4	2.5	1.5	1
5mM	1.15	1.75	1	0.6
25mM	0.1	0.7	0.5	0.1

【評語】 031713

1. 本件解決問題之能力佳，思考完整。
2. 由於重金屬之傷害可預期，故在創新能力上缺。以往類似研究多，而缺學術性。
3. 在方法上，如處理，可加改善。