

中華民國第四十八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

040714

Bling Bling 的渦鞭毛藻-塔瑪亞歷山大藻的生物發光

學校名稱：臺北市立中山女子高級中學

作者： 高二 蕭妘芯 高二 林靜佳	指導老師： 顏映帆
-------------------------	--------------

關鍵詞： 塔瑪亞歷山大藻、生物發光、日周期規律

作品名稱：**Bling Bling** 的渦鞭毛藻－塔瑪亞歷山大藻的生物發光

摘要：

塔瑪亞歷山大藻會受震盪刺激產生生物發光現象。本實驗為探討塔瑪亞歷山大藻的生物發光機制，設計震盪平台結合高感光度數位相機，藉照片紀錄其發光變化情形，並以Photoshop軟體計量各實驗組藻液的螢光亮度。實驗比較了不同細胞密度、刺激模式、光週期變化及光合作用抑制劑對其生物發光的影響。結果得知該藻只在夜間發光，並有跟隨培養期間光週期適應的生物時鐘效應，黑暗期愈長，其維持發光狀態愈久，天亮前自動減低其亮度且在晝間不發光。此外，細胞密度、電擊強度與其受刺激後發出的光強度成正相關；而刺激愈頻繁，亮度驟減愈快，需足夠的時間間隔以恢復應有亮度，推測其與螢光素、螢光酵素及能的消耗、復原有關。因較短光照期或在晝間加入光合作用抑制劑（DCMU）將降低其夜間受激發光的亮度，且與抑制劑濃度有關。

壹、研究動機

我們對生物發光一直很有興趣，與學姊聊天得知一種會發光的渦鞭毛藻。在偶然的夜晚，我們發現培養瓶中的塔瑪亞歷山大藻在搖動後發出閃閃藍白光，進而觸動我們進一步研究此渦鞭毛藻生物發光的興趣。

塔瑪亞歷山大藻 (*Alexandrium tamarense*)，是有毒的赤潮藻類，因水體優養化而大量繁殖所引發的赤潮曾多次發生在各地海域。因貝類的濾食與蓄積，經常造成麻痺性貝毒中毒 (paralytic shellfish poisoning, PSP) 事件，威脅人類健康與生命安全，也影響海洋保育類哺乳動物的生存，受到各國政府與社會各界的關注 (周, 1999)。研究單位藉這類渦鞭毛藻的培養，作為研究其毒素化學與水華成因的材料。渦鞭毛藻的一些種類，也曾被披露出現在夜間的海岸，顯現鬼火般的生物發光現象，而有「夜光蟲」之稱 (周, 2005)。

我們在研究初始，利用營養鹽培養出高密度的活細胞族群，觀察到藻液在搖晃震盪後，產生肉眼可見的螢光，但要測量晃動中一閃即逝的微弱光線並不容易，也無法以儀器偵測並記錄比較，可能是造成這類發光現象與機制相關研究少見的原因。

貳、研究目的

- 一、設計能夠紀錄與分析塔瑪亞歷山大藻生物發光的方法
- 二、探討震盪刺激頻率對塔瑪亞歷山大藻生物發光的影響
- 三、探討塔瑪亞歷山大藻生物發光對日夜週期的生物時鐘效應
- 四、塔瑪亞歷山大藻細胞密度與其生物發光光強度之關係
- 五、不同電壓的電擊刺激對塔瑪亞歷山大藻生物發光強度的影響
- 六、改變日週期對塔瑪亞歷山大藻生物發光的影響
- 七、光合作用抑制劑對塔瑪亞歷山大藻生物發光的影響

參、研究設備及器材

一、生物對象：

塔瑪亞歷山大藻 (*Alexandrium tamarense*)，海洋渦鞭毛藻又稱甲藻的一種。該藻種分離自赤潮發生的海域。

- (一) 培養條件：光週期為14小時光照 (清晨4點至晚上6點) 和10小時黑暗 (晚上6點至清晨4點)，溫度24°C，光照強度2000燭光，F/2海水培養基，接種比例為藻液：培

養基=1：1，培養五至八天，細胞密度約8,000至11,000 cells/mL。兩週後更換新鮮培養基繼代培養

(二) 分裝藻液：所有實驗皆於下午4:00（黑暗期前兩小時）將來源藻液分裝至500mL的錐形瓶中各250mL。

二、實驗器材：

錐形瓶、量筒、微量吸管、試管、石蠟紙、震盪器、拭鏡紙、計數器、格線載玻片、高壓蒸氣滅菌器、複式顯微鏡、三用電表、九伏特電池、可變電阻、電線、無菌操作台、培養箱、光週期調控器、電腦設備與Photoshop 7.01影像處理軟體

三、實驗藥品：

F/2培養基組成成分（附錄表一）、新鮮潔淨海水、去離子水、光合作用抑制劑DCMU。

四、拍攝設備：

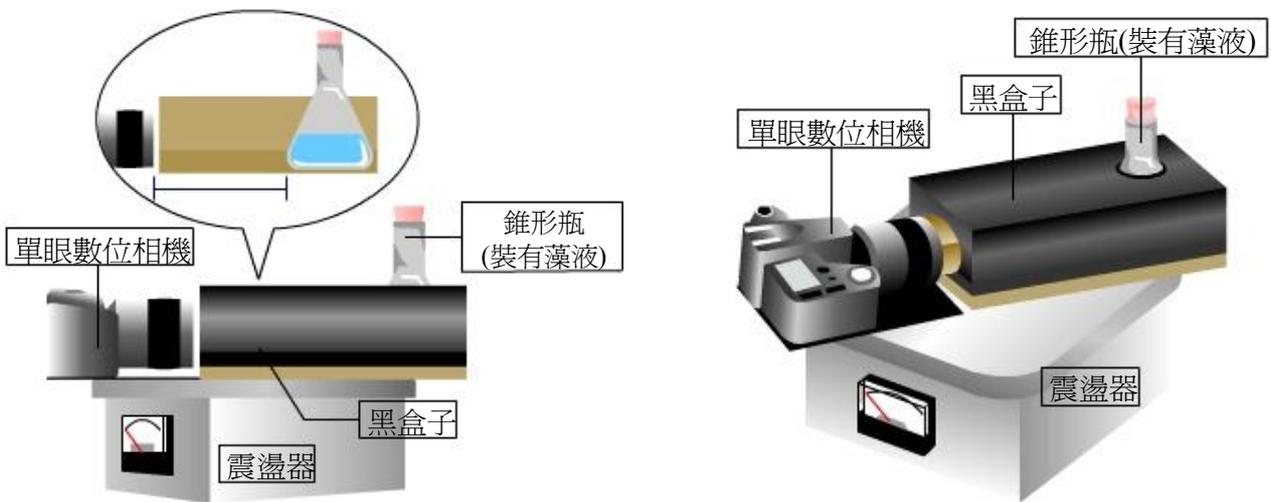
高感光度單眼數位相機（Nikon D80）、桌上型震盪器、長型黑盒子。

肆、研究過程或方法

一、設計能夠紀錄與分析塔瑪亞歷山大藻生物發光的方法：

(一) 拍攝條件

塔瑪亞歷山大藻需要晃動刺激才會發出螢光，實驗室一般使用的光度計無法偵測到光源不穩定的螢光，而高感度水下光度計價格昂貴。經過設計，我們製作出一套簡易的拍攝設備（圖一），將長型黑盒子和相機固定在桌上型的往復震盪器上，長型黑盒子一端對鏡頭，並在該側盒面依鏡頭徑寬剪個洞口，使相機鏡頭埋入洞口以拍攝盒中的錐形瓶。另一側的盒蓋上，依錐形瓶高度剪另一洞口，使錐形瓶頭從洞口伸出。如此的設計，除固定瓶身，更隔絕了照相時外部光線的影響，也固定了相機與錐形瓶距離，減少焦距與放大倍率對紀錄光亮的影響，同時藉由震盪器的操作，得以保持被照體與相機同步，達到兩者同步運動下的靜止狀態，加上相機高感光度與電子避震效果，讓所獲得的螢光照片清晰精準。



【圖一】拍攝設備

我們在密閉暗室中進行拍攝，將相機的感光（ISO）值調為HL1（即最高值：3200），拍攝模式設定成夜間模式，連拍速度為一秒一張，拍攝距離固定為22公分，震盪速率250rpm，相片尺寸最小（1936×1296像素）。

啟動震盪器的同時按下快門，連拍十張照片，比較最具代表性的照片（隨後的比較分析皆採第一秒所拍照片做亮度分析），再藉由 Photoshop 7.01 影像處理軟體，針對拍攝的照片以色階分佈圖將照片中藻液所產生的螢光亮度量化。所有照片均採用同樣參數拍攝，數據可信度更高。

藻液螢光亮度愈高，呈現在照片的明度愈大。影像處理軟體色階分佈圖中的明度值可代表照片中影像的亮度。以Photoshop 7.01影像處理軟體，開啓拍攝照片檔，選取錐形瓶範圍（圖二中虛線所圈出區域），打開色階分佈圖（如圖三），紀錄明度平均值，再轉換為明度百分比值以校正黑暗的差異，百分比值定義如下：

$$\text{明度百分比值} = \frac{\text{明度值} - \text{完全黑暗之明度值}}{\text{明度最大值} - \text{完全黑暗之明度值}} \times 100\%$$

【註】震盪前拍攝一張完全黑暗之照片作為基準，即完全黑暗之明度值

以下用兩張肉眼可明顯辨識出光強度差異的照片（如圖三）來佐證。



【圖二】



【圖三】

二、探討震盪刺激頻率對塔瑪亞歷山大藻生物發光的影響：

晃動藻液觀察亮度時，我們發現距離第一次震盪不久後的第二次震盪所產生的螢光強度比第一次震盪弱，因而想瞭解塔瑪亞歷山大藻在兩次震盪之間要多久時間才能使第二次震盪產生的螢光恢復至第一次震盪的亮度，探討在不同間隔時間震盪造成的光度變化情形。我們將震盪間隔分成2小時、1小時、30分鐘、20分鐘和10分鐘等五組，連續紀錄兩小時。

- (一) 分裝藻液
- (二) 實驗組別設定：第一組震盪間隔為2小時；第二組震盪間隔為1小時；第三組震盪間隔為30分鐘；第四組震盪間隔為20分鐘；第五組震盪間隔為10分鐘，震盪同時拍照。
- (三) 實驗紀錄：按照各組設定的拍照時間間隔拍照紀錄發光情形。
- (四) 數據分析

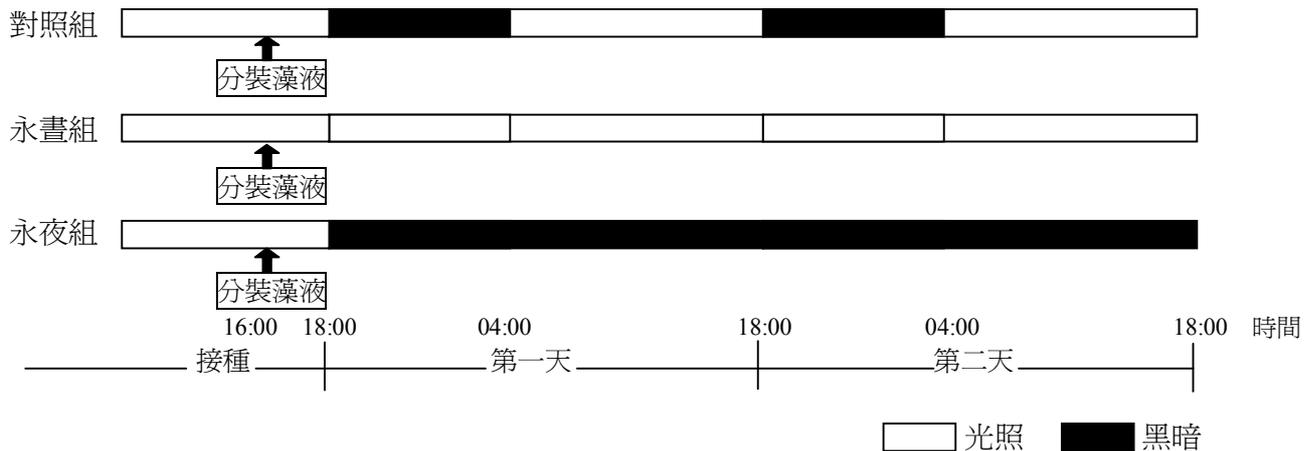
三、探討塔瑪亞歷山大藻生物發光對日夜週期的生物時鐘效應：

在培養過程中，我們發現塔瑪亞歷山大藻在黑暗期亮度較亮，在光照期亮度較低，甚至

不發光。本實驗中塔瑪亞歷山大藻的培養條件之光週期是光照期/黑暗期=14小時/10小時（以下稱光照期為L，黑暗期為D），我們無法得知黑暗期發光的特性是感應外界光線（生命科學(上)3-4）還是內在生物時鐘機制所造成。所以我們設定三組：對照組（14L/10D）、永晝組（24L）及永夜組（24D），連續紀錄兩天（48小時）其發光情形。

(一) 分裝藻液

(二) 實驗組別設定：所有組別放置於24小時照光的培養箱中，對照組與永夜組在相對時間以鋁箔紙遮光，代表夜間。實驗示意圖如下：



【圖四】實驗二光週期處理示意圖

(三) 實驗記錄：拍照起始時間為第一天的18:00，每兩小時震盪拍照一次。

(四) 數據分析

四、塔瑪亞歷山大藻細胞密度與其生物發光光強度之關係：

在實驗中可能因細胞密度不同導致照片明度上的差異，為確認明度值的差異來自細胞密度而非實驗接種來源細胞間的差異，將同一狀態培養的細胞以海水稀釋為原細胞密度的10%、20%、60%，拍照紀錄並分析其螢光亮度。

(一) 分裝藻液（來源藻液培養了15天，細胞密度約14,000 cells/mL）

(二) 實驗組別設定：取不同體積塔瑪亞歷山大藻液以不同量海水稀釋（如下表一）得到多瓶不同濃度藻液。

稀釋液 \ 組別	100%	60%	20%	10%
藻液 (mL)	250	150	50	25
海水 (mL)	0	100	200	225
濃度比	1	3/5	1/5	1/10
密度 (cells/mL)	14,000	8,400	2,800	1,400

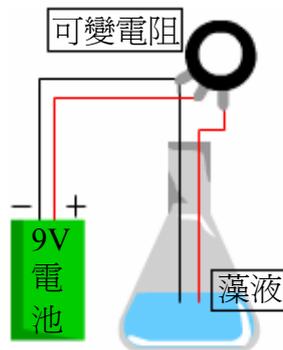
【表一】不同細胞密度藻液的配製

(三) 實驗記錄：於夜間光強度最大的00:00左右進行實驗。

(四) 數據分析

五、不同電壓的電擊刺激對塔瑪亞歷山大藻生物發光強度的影響：

由von Dassow and Latz (2002)的研究報告得知塔瑪亞歷山大藻接受電擊刺激後會發出螢光。因此利用3V、6V、9V、18V的電流（實驗設備如圖五）通過相同細胞密度的塔瑪亞歷山大藻培養液，測量其對螢光釋出的影響並觀察實驗後的細胞。



【圖五】電擊刺激藻液釋出螢光裝置圖

(一) 分裝藻液

(二) 觀察與紀錄：觀察記錄電擊過程中藻液的發光情形，電擊結束後取細胞用顯微鏡觀察並拍照紀錄。

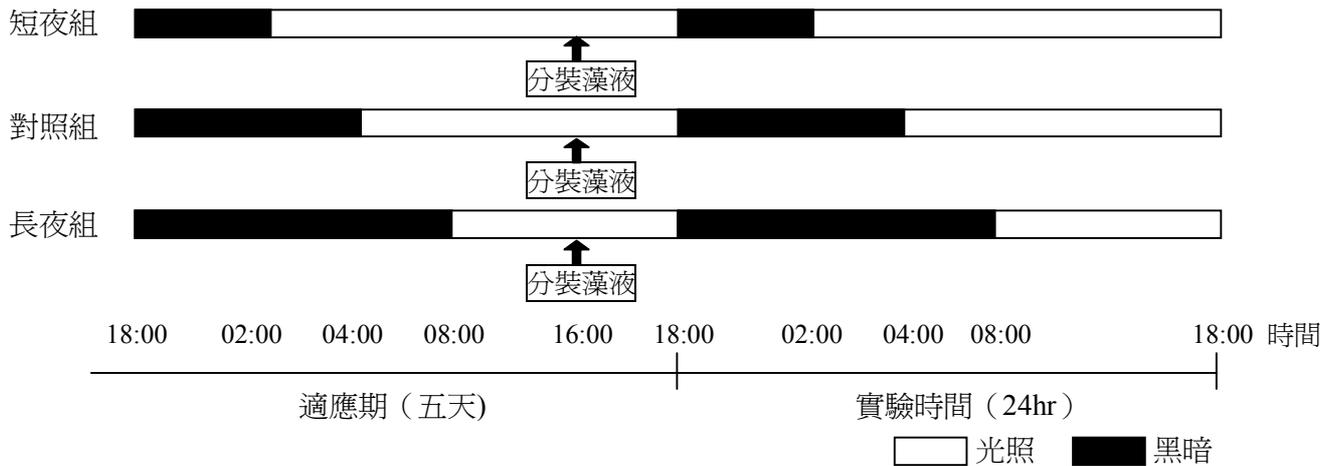
六、改變日週期對塔瑪亞歷山大藻生物發光的影響：

經由實驗三得知塔瑪亞歷山大藻在黑暗期中螢光強度在黑暗期中的趨勢，並非進入黑暗期接受刺激就馬上發光，也非一進入光照期就立刻不發光，而是進入黑暗期後的第四至六小時亮度開始減弱，我們想瞭解此現象是生物時鐘的影響還是發光所需的物質或能量限制所致。本實驗分為三組：對照組（14L/10D）、短夜組（18L/6D）、長夜組（10L/14D），連續紀

錄一天（24小時）發光情形。

(一) 分裝藻液

(二) 實驗組別設定：設定三種週期：原週期、18小時光照期及6小時黑暗期、10小時光照期及14小時黑暗期，持續培養適應五天。實驗示意圖如下：



【圖六】實驗六不同日夜週期示意圖

(三) 實驗紀錄：拍照起始時間為第一天的晚上六點，每兩小時震盪拍照一次。

(四) 數據分析

七、光合作用抑制劑對塔瑪亞歷山大藻生物發光的影響

從實驗六得知塔瑪亞歷山大藻的生物發光強度會隨日夜週期有所不同，為確認其生物發光與光合作用之間是否有關係，所以我們在塔瑪亞歷山大藻進入光照期前添加光合作用抑制劑—DCMU，經過一個光照期直到進入黑暗期開始實驗。本實驗設定為四組：對照組、低濃度組 (10^{-8} M)、中濃度組 (10^{-7} M)、高濃度組 (10^{-6} M)，連續紀錄10小時其發光情形。

(一) 分裝藻液

(二) 實驗組別設定：初進入光照期時於低濃度組、中濃度組及高濃度組的藻液中分別添加 DCMU 25 μ L，250 μ L及2500 μ L，再將其按照原週期照光至進入黑暗期。

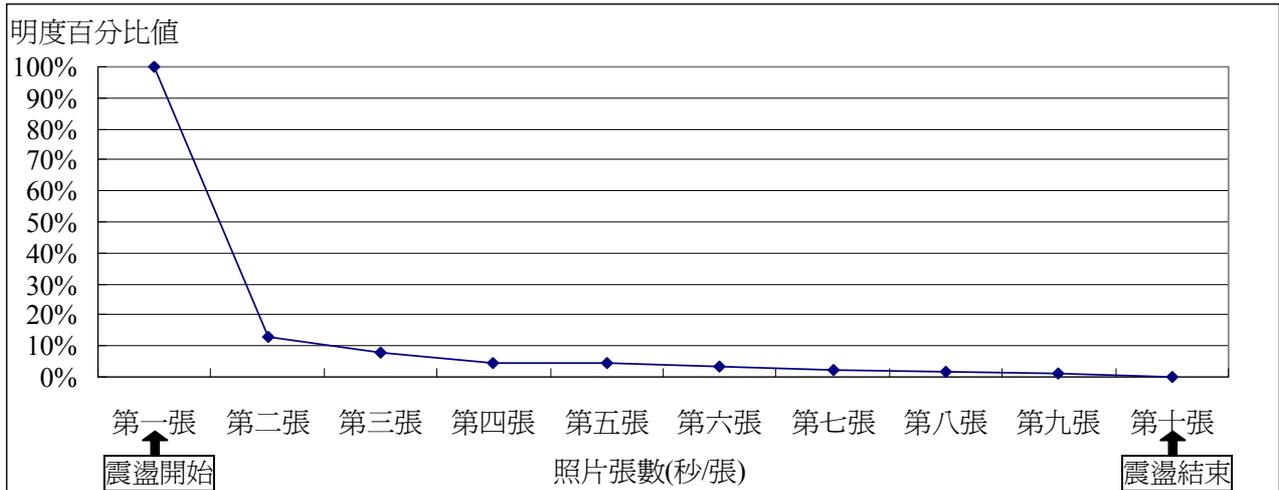
(三) 實驗紀錄：拍照起始時間為當天的18:00，每兩小時震盪拍照一次。

(四) 數據分析

伍、研究結果

一、設計能夠紀錄與分析塔瑪亞歷山大藻生物發光的方法：

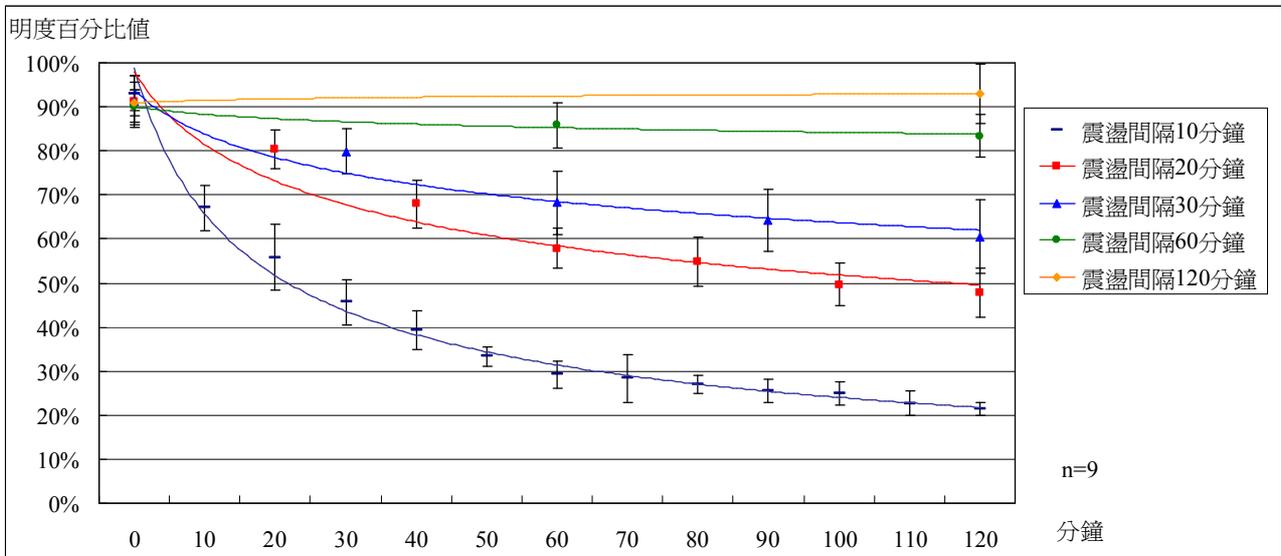
塔瑪亞歷山大藻在震盪開始的第一秒所攝照片（第一張）亮度最高，第二張則明顯變弱，並逐漸下降，第五秒後就幾乎無光，證實塔瑪亞歷山大藻發光是閃光性質，而非連續發光，也確認這套震盪拍照系統能有效紀錄，且只能取用震盪開始之第一秒所拍照片，做亮度分析。



【圖七】震盪中塔瑪亞歷山大藻每秒連續拍攝之螢光光度變化折線圖

二、探討震盪刺激頻率對塔瑪亞歷山大藻生物發光的影響：

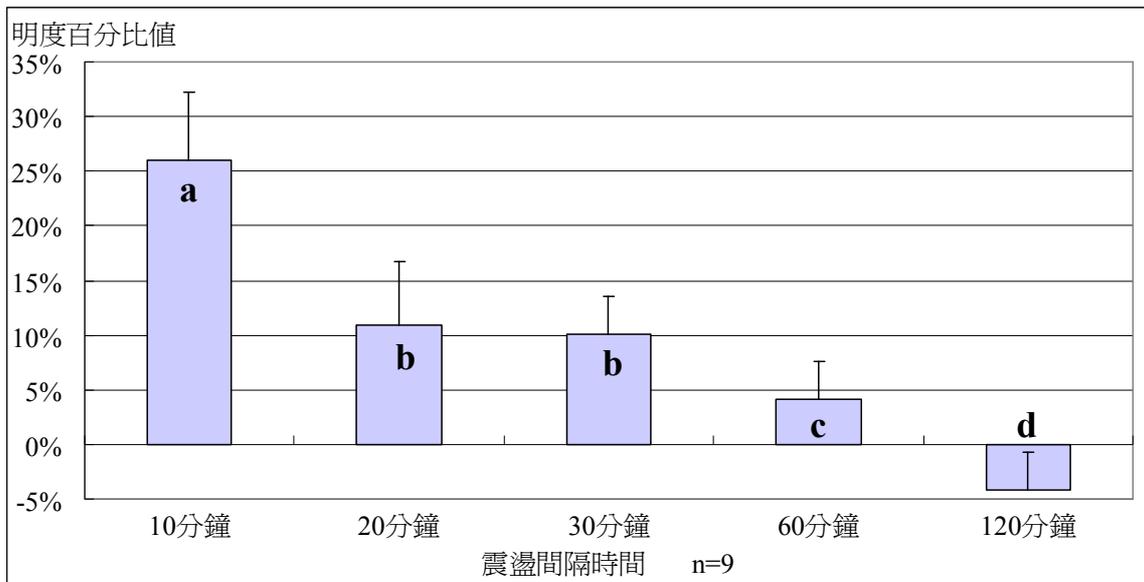
將震盪時間間隔分成2小時、1小時、30分鐘、20分鐘和10分鐘等五組，紀錄兩小時內的發光情形，所得結果分別呈現於圖八及圖九。本實驗在入夜後第四至第五小時螢光亮度最高的時段進行，由實驗結果得知，第一次震盪到第二次震盪產生螢光之間間隔時間愈短，光強度下降愈顯著(圖九)，而一到兩小時的間隔時間可恢復到相似光強度。震盪發光的次數愈多，光度逐漸減少，但減少趨勢趨於緩慢，不像初始時快速。此實驗的結果證實日夜週期實驗的長時間測量，兩小時的間隔是必要的且較不易產生誤差。細胞對連續刺激以產生螢光的反應，似乎隨次數的增加，愈來愈不敏感，可能是用於發光反應的能量或物質越來越少，以致光強度越來越弱。



【圖八】塔瑪亞歷山大藻連續震盪激發螢光之間隔時間與光強度關係趨勢圖

	10 分鐘	20 分鐘	30 分鐘	60 分鐘	120 分鐘
TTEST	0.0000009	0.0002737	0.0011415	0.0073716	0.1973046

【表二】各組第一次與第二次明度值各組間比較統計表



【圖九】塔瑪亞歷山大藻不同震盪時間間隔之第一次與第二次震盪明度百分比值差直條圖（以第一次震盪的明度百分比值減去第二次震盪的明度百分比值）

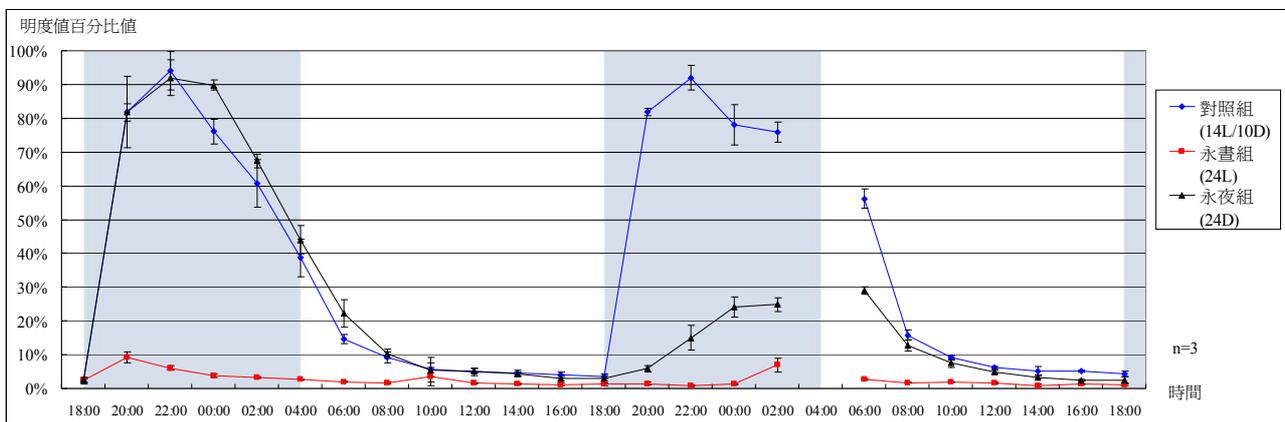
a、b、c、d 之間皆有顯著差異（單尾 t 檢定， $p < 0.005$ ）

TTEST	10 分鐘	20 分鐘	30 分鐘	60 分鐘
20 分鐘	0.0000121	—	—	—
30 分鐘	0.0000398	0.4261889	—	—
60 分鐘	0.0001409	0.0012197	0.0006806	—
120 分鐘	0.0000002	0.0000028	0.0000035	0.0001409

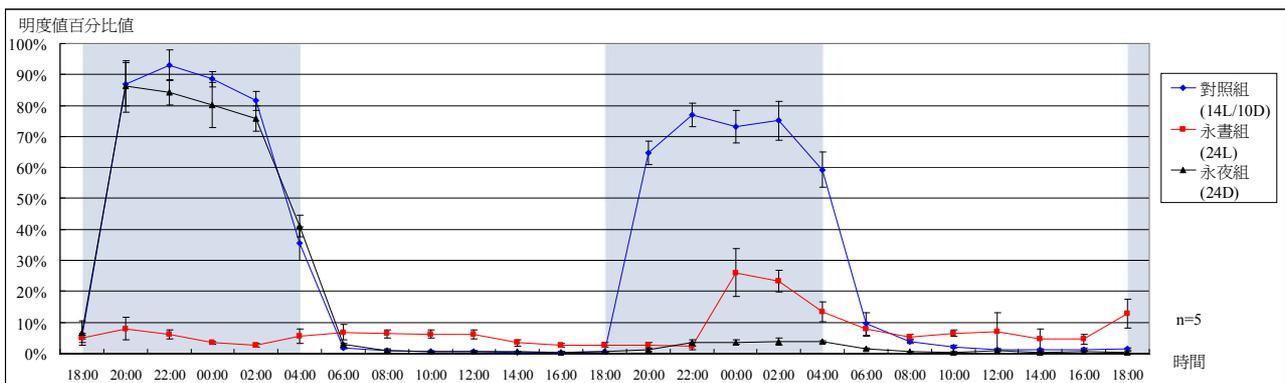
【表三】不同震盪時間間隔之第一次與第二次震盪明度百分比值差各組間比較統計表

三、探討塔瑪亞歷山大藻生物發光對日夜週期的生物時鐘效應：

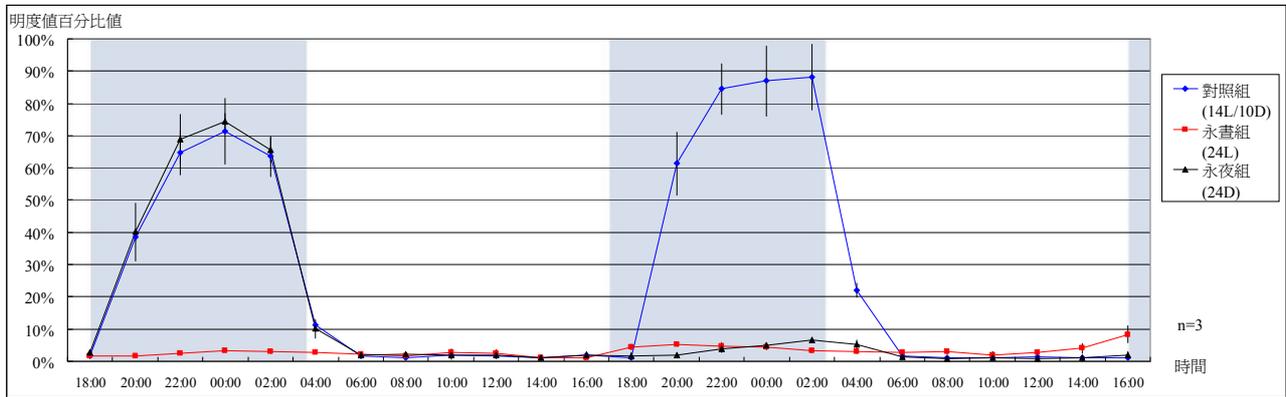
結果分別呈現於圖十、圖十一及圖十二中，圖中背景為灰藍色部分是順應原日夜週期中的黑暗期，白色則是光照期：



【圖十】日夜週期的適應對塔瑪亞歷山大藻生物發光的影響在後續相同週期（對照組）、永晝與永夜處理下的表現（其中沒有連結的時段點，因失誤而忽略了測量）



【圖十一】日夜週期的適應對塔瑪亞歷山大藻生物發光的影響在後續相同週期（對照組）、永晝與永夜處理下的表現



【圖十二】日夜週期的適應對塔瑪亞歷山大藻生物發光的影響在後續相同週期（對照組）、永晝與永夜處理下的表現

三次實驗的結果（圖十、圖十一、圖十二）有相似性。在實驗第一天，對照組及永夜組在進入黑暗期開始時幾乎不發光；直到進入黑暗期兩個小時後，明度百分比值明顯提高許多；第四小時的明度百分比值達到最高，第六小時的明度百分比值漸減，也就是在光照期前四小時光強度漸減，進入光照期當時，光強度驟減至最高光強度一半以下，照光兩小時後，塔瑪亞歷山大藻幾乎不發光，永夜組也不因無照光而發出螢光。永晝組在進入其原適應黑暗期的瞬間不發螢光，到第二與第四小時，藻液發出微弱的螢光（僅為對照組當時光強度的4%~9%），隨後光強度不穩定且趨弱，最後在光照期內的表現與對照組、永夜組相同，光強度偏低，甚至不發光。

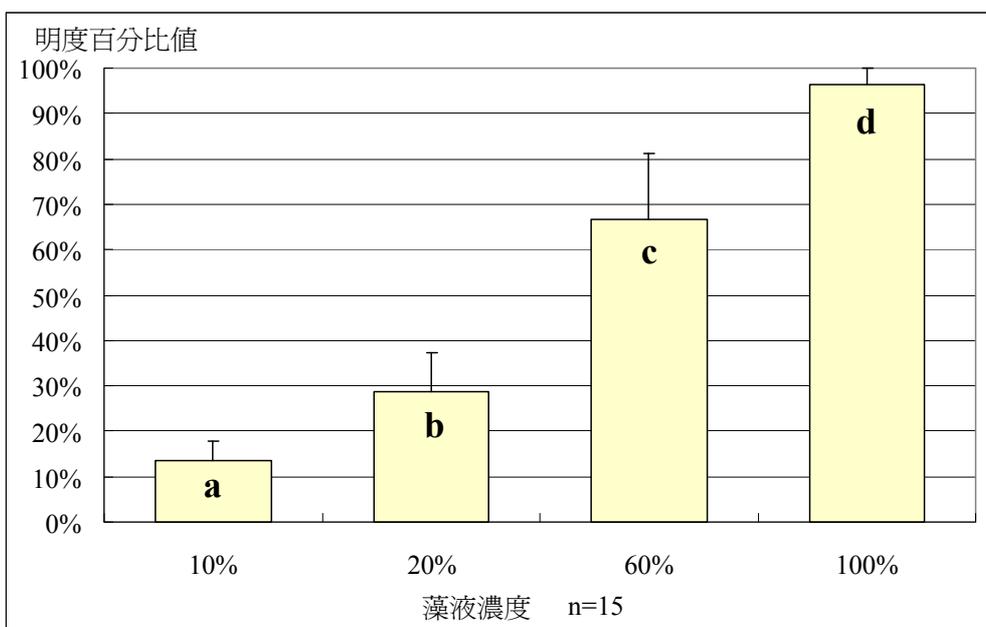
在第二天日夜週期中，對照組的亮度趨勢與第一天相近；永夜組在進入相當於順應原週期的黑暗期當下幾乎不發光，到第四與第六小時的光強度才提高些許（統計中有顯著差異），與第一天週期變化一樣，在進入光照期前二至四小時，明度百分比值就已下降，在相當於光照期間，永夜組與對照組都與第一天的週期一樣不發螢光。然而在永晝組的螢光釋出，其現象與第一天週期大略相同。

不同實驗組的差異可能來自於不同接種的藻源，我們由日夜週期的實驗推測光週期的存在讓細胞可行光合作用累積能量，而螢光的產生，除了要給予震盪刺激才能釋出外，也需要有夜間的存在，顯示塔瑪亞歷山大藻可感應環境光線，在進入黑暗期一段時間（至少兩小時）後才能具備發出螢光的能力。然而在進入黑暗期一段時間（六小時）後，發出螢光的能力減弱，推測可能是螢光素與螢光酵素減少、活性漸弱或能量轉移。

四、塔瑪亞歷山大藻細胞密度與其生物發光光強度之關係：

為瞭解單位細胞所發出的光是否會隨成長狀態而有不同，首先需瞭解細胞密度的差異和錐形瓶中整體族群中的發光表現是否相關，所以利用成長達穩定的塔瑪亞歷山大藻，取不同

體積添加不同體積過濾海水，配成同體積密度不同的藻液，予以震盪激發螢光，分析其螢光差異，結果如圖十三所示，顯示隨藻液細胞密度的減少，其光強度隨之遞減。

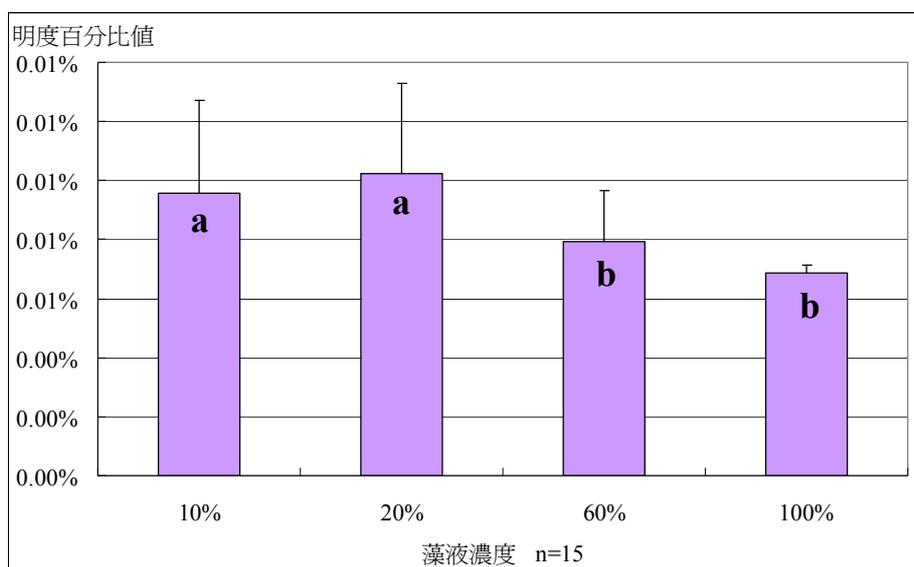


【圖十三】藻液細胞密度與生物發光光強度之關係直條圖

a、b、c、d 之間皆有顯著差異(單尾 t 檢定, $p < 0.005$)

TTEST	100%	60%	20%
60%	0.0000560	—	—
20%	0.0000000	0.0000004	—
10%	0.0000000	0.0000003	0.0000142

【表四】藻液細胞密度與生物發光光強度之關係各組間比較統計表



【圖十四】單一細胞發光量直條圖 (藻液明度百分比值除以細胞數)

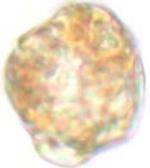
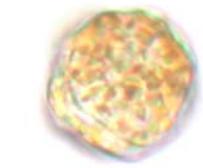
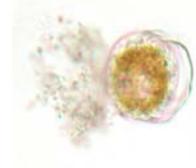
a、b 之間有顯著差異(單尾 t 檢定, $p < 0.005$)

TTEST	100%	60%	20%
60%	0.0224069	—	—
20%	0.0008914	0.0002662	—
10%	0.0003678	0.0001217	0.0800393

【表五】單一細胞發光量各組間比較統計表

五、不同電壓的電擊刺激對塔瑪亞歷山大藻生物發光強度的影響：

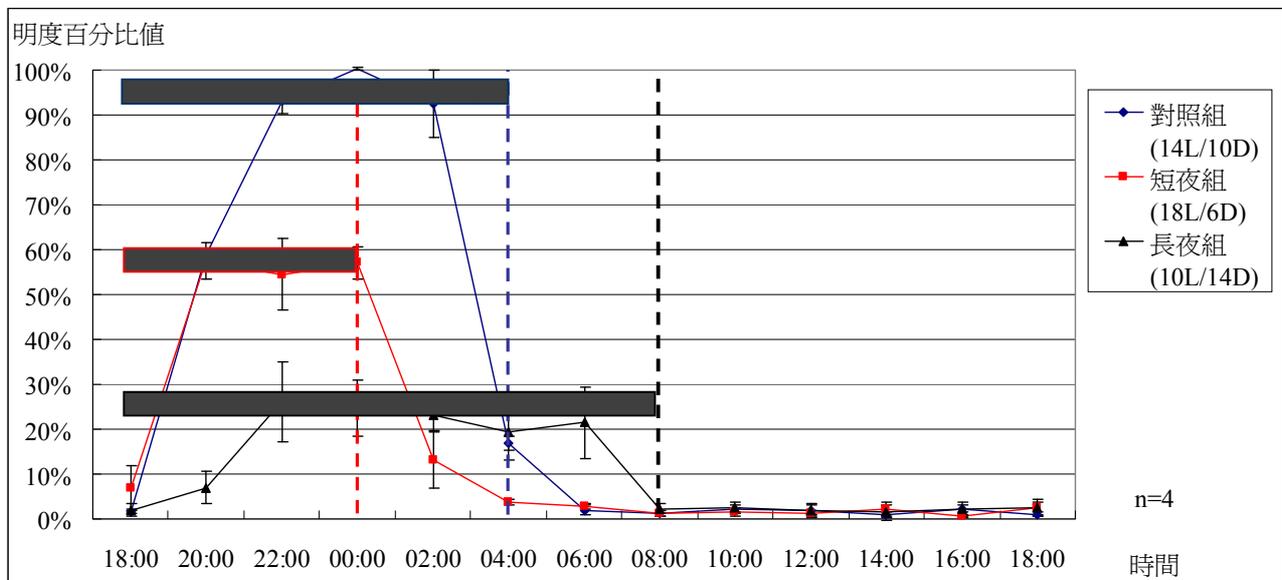
由於以電極刺激塔瑪亞歷山大藻所發出的螢光相當微弱，故此實驗的結果以表六所示，在較高電壓下，細胞發出螢光的反應較快。通電時，隨電壓越高持續發光（呈現點狀的單細胞閃光）時間越短。細胞的顯微觀察在2分鐘的螢光觀察後執行，顯現在6伏特以上的電壓刺激下，細胞開始死亡、破裂、變形，螢光顯現後的消失，代表細胞的破裂死亡。

電壓	3 伏特	6 伏特	9 伏特	18 伏特
電擊開始至開始發光時間	約 10 秒鐘	約 10 秒鐘	約 5 秒鐘	約 1 秒鐘
持續發光時間	2 分鐘（以上）	2 分鐘（以上）	約 1.5 分鐘	約 1 分鐘
發光狀態	一點一點極為微弱的閃光（量少）	一點一點微弱的閃光（量多）	一點一點的閃光，閃光範圍隨時間增加，充滿整瓶藻液。	一點一點的閃光，閃光範圍隨時間增加，充滿整瓶藻液。
細胞狀態	幾乎無死細胞，極為活潑。	活細胞減少，死細胞增多但細胞並無嚴重破裂。	細胞膜破裂受損，未發現活細胞。	細胞膜破裂受損，未發現活細胞。
圖示說明				

【表六】不同電壓刺激塔瑪亞歷山大藻釋出螢光的現象及兩分鐘後的細胞顯微觀察。

六、改變日週期對塔瑪亞歷山大藻生物發光的影響：

從實驗三中我們發現塔瑪亞歷山大藻在還未進入光照期前螢光強度就已下降的現象。為瞭解此現象是生物時鐘的影響還是藻細胞用於發光所需的物質或能量為定量，及與光合作用的關係，實驗設定為三組：對照組（14L/10D）、短夜組（18L/6D）、長夜組（10L/14D）。結果分別呈現於圖十五，圖中灰色部份為各組黑暗期：

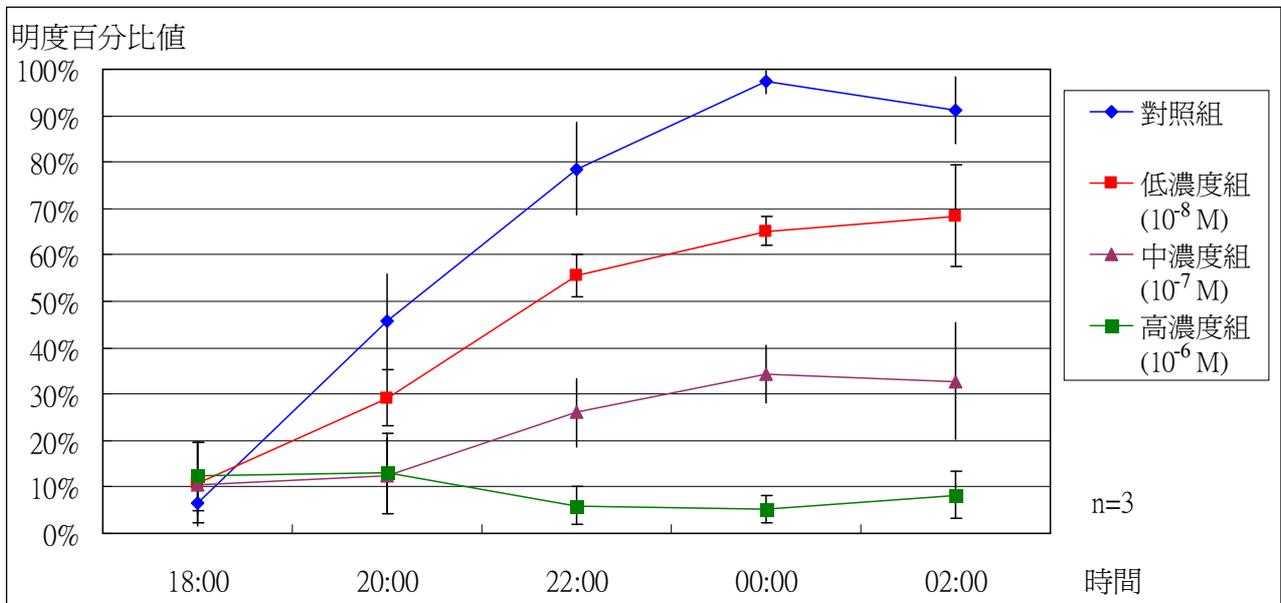


【圖十五】改變日週期對塔瑪亞歷山大藻生物發光的影響之關係折線圖

對照組的趨勢與實驗三的結果相似；短夜組在進入黑暗期後的第六個小時即進入光照期，而從此時至第八小時亮度漸減，且黑夜中亮度最大值明顯小於對照組（為對照組亮度的50%~60%），亮度趨勢開始下降的時間比對照組早，即在黑夜中維持可發光狀態時間比對照組短；長夜組在進入黑暗期後的第十個小時進入光照期，而從此時亮度減弱接近不發光，而在黑暗期中亮度最大值僅為對照組的20%~30%，亮度趨勢開始下降的時間比對照組晚，即在黑夜中維持可發光狀態時間比對照組長。從以上可得知，黑暗期愈短，其維持可發光狀態則愈短。短夜組光強度最大值小於對照組光強度最大值，可能與其黑暗期較短有關；長夜組光強度又比前述兩者弱，可能與其光合作用時間較短，所得能量較少有關。此三組的生物發光皆順應其日週期。

七、光合作用抑制劑對塔瑪亞歷山大藻生物發光的影響：

此實驗利用添加不同濃度的DCMU來抑制光合作用，即使照光，藻細胞仍無法行光合作用，以藉此了解塔瑪亞歷山大藻的生物發光與光合作用之間的關係。結果呈現於圖十六：



【圖十六】不同濃度之 DCMU 與塔瑪亞歷山大藻生物發光光強度之關係折線圖

從圖十六可知，高濃度組的光強度最大值僅為對照組光強度最大值的12%，中濃度組的為對照組的34%，低濃度組為對照組的65%。此三組的光強度皆隨DCMU濃度增加而遞減；對照組、低濃度組及中濃度組的光強度隨時間漸增和原週期趨勢相似，但高濃度組的光強度卻先減後增，發光情形不如前三組穩定。

陸、討論

從實驗的結果得知，塔瑪亞歷山大藻的生物發光需要震盪或電擊的刺激，才會發出自生性的螢光，同時也需在光週期適應中的黑暗期才會顯現。光照期間的震盪刺激只能產生極微弱的螢光，甚至不發光，我們推測在光照期間的光合作用，除儲備能量以供夜間進行螢光素與螢光酵素反應產生螢光外，在晝間因缺少螢光素（或螢光酵素）或受光線抑制，導致螢光無法產生。而進入黑夜一段時間後，螢光素與螢光酵素接合（此作用可能受到光線的抑制），在接受刺激後，激活細胞內離子環境，類似鈣離子濃度的增加，促使螢光素與螢光酵素反應產生螢光。而電擊可能破壞了細胞膜對離子滲透壓調節，導致離子激活螢光素與螢光酵素接合體反應產生螢光。從進一步的實驗中，日夜長短影響了其可發光的長短，黑夜較長則較久，但螢光亮度較低，可初步證實其生物發光仰賴光合作用，光照時間較短（即光合作用時間較短），產生螢光亮度較低，同時添加光合作用抑制劑 DCMU 的實驗組證實，添加越高濃度的 DCMU，抑制光合作用的電子傳遞，導致 ATP 與 NADPH 生成受阻，沒有足夠的化學能累積，光強度下降，證明該藻的生物發光與其光合作用的能量生成有極大的關係。

在連續震盪刺激下的細胞，因為螢光素或能量的消耗，需等待反應產物的回逆或能量的轉化再生，才能持續激發酵素反應以產生螢光。兩次震盪時間間隔為兩小時得以讓螢光素與能量回充至細胞內的飽和量，再接受刺激產生足量的螢光。震盪時間間隔縮短，螢光量逐漸減少。連續間隔式的震盪刺激造成螢光量減少的情形有漸緩趨勢，顯示在夜間持續進行反應物再生，只要有足夠的震盪時間間隔使其恢復，應使細胞內產生螢光的物質與能量達到足量。本實驗未能證實這樣的假設，需進一步在夜間以連續震盪至無螢光產生後，測定恢復至足量螢光所需的時間間隔。

藻液發出的螢光皆由個別藻細胞匯集而成，我們推測其細胞密度愈高，測得藻液螢光強度愈強。但兩者並無線性關係以證實單位細胞平均光亮一致，可能是利用不同量海水稀釋藻液導致微量元素濃度改變而產生變因。

周 (2005)描述類似塔瑪亞歷山大藻的渦鞭毛藻生物發光機制，是經外界擾動與酸鹼刺激，引起膜上結合螢光素的蛋白質將螢光素分子釋出再與螢光酵素作用產生光線，也有可能細胞所產生的螢光素與螢光酵素（及所需的化學能）先行結合，再接受震盪刺激改變細胞內的離子濃度，使酵素反應發出螢光 (von Dassow and Latz, 2002)。過去文獻中使用酸鹼液的刺激造成細胞膜結構改變，相信給予不同電壓的電擊，也會使細胞內離子量改變或刺激螢光素（已與膜結合）與螢光酵素結合反應產生螢光。本實驗證實電擊確實刺激該藻產生螢光，但不像震盪整瓶藻液引起整個細胞族群同時發光，而是一連串單一細胞受到電流刺激而產生點狀閃光，在低電壓刺激下，藻細胞一個個持續發光，可延續長時間；在高電壓下藻細胞可在較短時間（1 秒內）產生螢光，但藻細胞在發光的同時即破裂死亡。

柒、結論

塔瑪亞歷山大藻受刺激而發出螢光的反應幾乎只在黑夜中才發生，即在白天時不會進行螢光反應，夜間維持可發光狀態與其黑暗期的長短有關，這些隨地球日夜週期變化而演化出的特性也牽涉到光合作用所產生的能量或物質。藻液所發出的螢光強度與其細胞密度呈正相關，刺激頻率愈頻繁則光強度驟減愈快。然而在夜間發出螢光顯示藻細胞的存在，對於藻細胞本身生理或生態他感作用的意義到底為何，目前在學術研究界中仍然無解。釋出螢光的藻種可能經過長時間實驗室培養而失去發光能力，是否因缺少了有性繁殖或實驗室培養的日夜週期絮亂而逐漸喪失也仍未知。是否單細胞的渦鞭毛藻也像多細胞生物存在著生物時鐘的機制，還是光照在細胞內的代謝反應中扮演著調節的角色以控制夜間才會發光，還需進一步研究，掌握渦鞭毛藻螢光反應的途徑與調控的機制，才能真正瞭解這生物發光系統在生理或生態上的意義。

捌、參考文獻及其他

一、參考文獻：

周宏農, 1999, 水產品藻原毒素檢測操作手冊, 行政院衛生署, 132p.

周宏農, 2005, 從海面的螢光談起—水環境中之渦鞭毛藻, 環境檢驗通訊雜誌, 42, 3-14

陳秋炳, 高中化學（上）, 翰林出版社, 2007, 211p.

張玉娟, 曹宇, 王朝暉, 韓博平, 楊宇鋒, 2006, 熱帶亞熱帶植物學報—N、P 營養鹽對塔瑪亞歷山大藻（*Alexandrium tamarense*）生長的影響, 熱帶亞熱帶植物學, 14(6), 482- 486.

黃敬軒, 2003 年, 黑棘蟻聚落的生物時鐘, 台北縣, 7p.

楊冠政, 高中生命科學（上）, 龍騰文化, 2007, 142p.

葉開溫, 高中生物（上）, 泰宇出版社, 2007, 151p.

鄭湧涇, 高中生物（下）, 康熙文化, 2002, 256p.

嚴婉禎, 2003 年, 由溶氧量之變化分析單胞固氮藍綠藻光合韻律之特性, 高雄市.

A. J. Poulain, M. Amyo, D. Findlay, S. Telor, T. Barkay, H. Hintelmann, Biological and photochemical production of dissolved gaseous mercury in a boreal lake, 2004, *Limnol. Oceanogr.*, 49(6), 2265 - 2275

von Dassow, P. and Latz, M. I., 2002, The role of Ca^{2+} in stimulated bioluminescence of the dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum*, *J. Experimental Biology* 205, 2971-2986.

<http://explorations.ucsd.edu/biolum/>

<http://oceanexplorer.noaa.gov/explorations/05deepscope/background/fluorescence/fluorescence.html>

<http://oceanexplorer.noaa.gov/explorations/04deepscope/background/deeplight/deeplight.html>

<http://en.wikipedia.org/wiki/Chemiluminescence>

<http://en.wikipedia.org/wiki/Bioluminescence>

<http://en.wikipedia.org/wiki/Luciferin>

<http://en.wikipedia.org/wiki/Luciferase>

<http://www.lifesci.ucsb.edu/~biolum/chem/>

<http://en.wikipedia.org/wiki/Dcmu>

二、其他：

(一) f/2 medium 之成分表：

f/2 stock solution (a)

藥品	最終濃度	重量
NaNO ₃	8.83×10 ⁻⁴ M	75g
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	3.63×10 ⁻⁵ M	5g
Distilled water up to 1000ml		

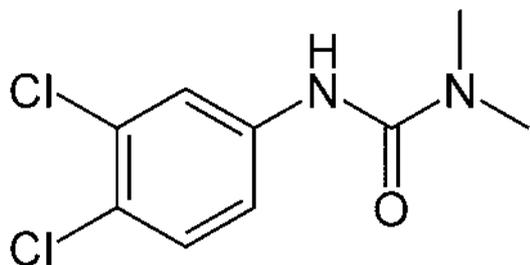
f/2 stock solution (b) -Trace metal solution

藥品	最終濃度	重量
FeCl ₃ ·6H ₂ O	1×10 ⁻⁵ M	3.15g
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	1×10 ⁻⁵ M	4.36g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	4×10 ⁻⁸ M	1mL
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	3×10 ⁻⁸ M	1mL
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8×10 ⁻⁸ M	1mL
CoCl ₂ ·6H ₂ O	5×10 ⁻⁵ M	1mL
MnCl ₂ ·4H ₂ O	9×10 ⁻⁷ M	1mL
Distilled water up to 1000ml		

f/2 stock solution (c) -Vitamin solution

藥品	最終濃度	重量
Vitamin B ₁₂	3.69×10 ⁻¹⁰ M	1mL
Biotin	2×10 ⁻⁹ M	1mL
Thiamine HCl;	3×10 ⁻⁷ M	100mg
Distilled water up to 1000ml		

(二) 光合作用抑制劑DCMU：



DCMU (Dichlorophenyldimethyl Urea)
3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea

CAS number: 330-54-1

Density: 1.48g/cm³

Melting point: 158°C

Solubility in water: 42 mg/L

Toxicity: 10⁻⁸~10⁻⁶M (2.33~233μg/L)

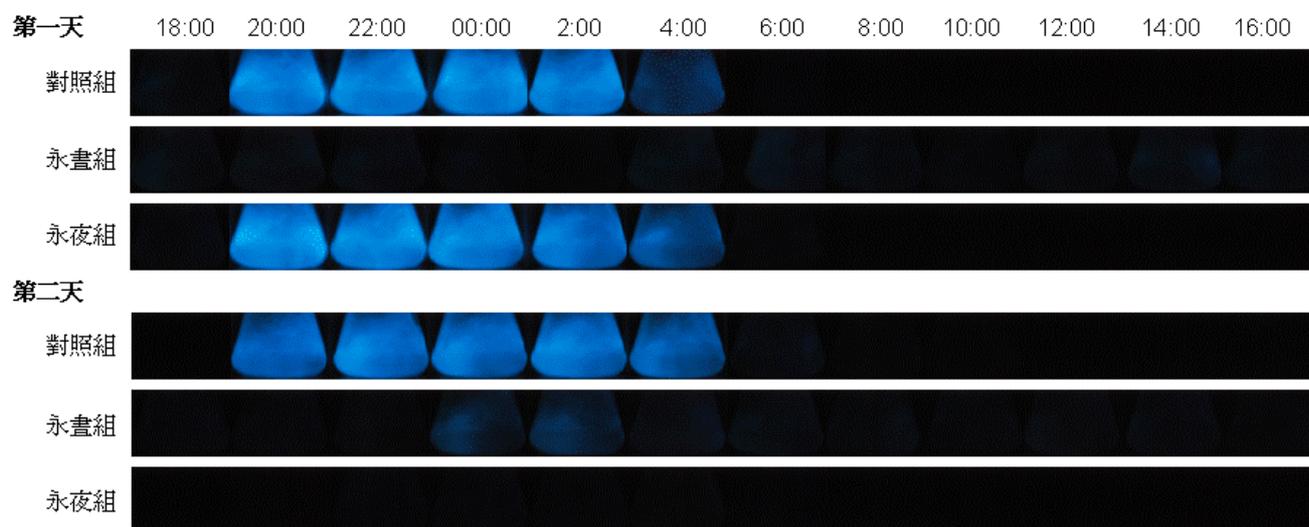
Molecular formula: C₉H₁₀Cl₂N₂O

Molar mass: 233.10 g/mol

Boiling point: 180°C

(三) 實驗二之螢光照片實驗記錄：

改變光週期對生物發光的影響之拍攝結果



(四) 實驗器材：



拍攝設備



電表



光週期調控器



培養箱



微量吸管頭



微量吸管



石蠟紙



量筒



海水



複式顯微鏡



拭鏡紙



無菌操作台

【評語】 040714

能善用科技方法闡明生物發光現象，但其肇因及運行機制有待深入之探討。