中華民國第 57 屆中小學科學展覽會
作品說明書

高級中等學校組　環境學科

第三名

052605

一「藻」一世界—新月梨甲藻的發光與生長

學校名稱：高雄市立高雄高級中學

作者：	指導老師：
高二 方奕閔	李靜怡 蔡喬木

關鍵詞：bioluminescence、*Pyrocystis lunula*、Living Lamps

摘要

生物螢光(bioluminescence)相關概念性產品已引起熱潮，本研究嘗試多種培養條件對螢光藻生長的影響，並了解影響螢光藻螢光亮度的因子。

依本研究得到結果，當環境中缺乏鐵、銅和鋅營養鹽時，會減緩螢光藻的增殖並降低螢光亮度。當營養鹽中的 $CuSO_4$ 添加過多時，新月梨甲藻(*Pyrocystis lunula*)會受其毒性影響而大量死亡並大幅度降低螢光亮度。而以螯合劑配合硫酸銅添加時，可減少對新月梨甲藻的毒性，但並不能降低銅對其生物螢光的破壞。在長期黑暗中，螢光藻的族群密度和螢光亮度皆會下降。

壹、研究動機

去年看到一則非常有趣的新聞，荷蘭飛利浦公司設計了一種「生物燈」，可將接觸沼氣時會發出螢光的細菌作為居家照明(參考文獻 1)；如此一來，便不用消耗電力。查詢相關資料後，發現還有波蘭的設計師利用螢光藻，打造了「活生生的燈」(Living Lamps) (參考文獻 2)。目前生物螢光的相關應用正在萌芽，而開發利用此螢光的首要之務，就是了解發光生物的特性。

此外，螢光藻的發光現象還可用於毒物偵測；雖然在環境毒物的檢定上最常使用動物作為毒物毒性的測定標準，但 Lewis(1992)中指出浮游植物對於環境汙染可能比動物具備更高的靈敏度，加上亮度高之發光生物尚有容易識別的好處。如本研究中採用 *Pyrocystis lunula* 即為一亮度高之藻種。

1986 年的綠牡蠣事件，即銅離子的污染所致，造成沿海養殖業的巨大損失，因此若能及早偵測環境中的毒物，便可避免不必要的傷害。

本研究希望能比較不同條件下，螢光藻的生長情形和發光亮度等特性，未來可改善生物螢光燈的亮度和檢測銅離子汙染的效能。

貳、研究目的

一. 設計可測定 *P. lunula* 族群螢光亮度之方法

二. 繪製 *P. lunula* 生長曲線

三. 探討鐵、銅、鋅營養鹽缺乏與 *P. lunula* 族群量變化及生物發光現象之關係。

四. 探討銅離子與 *P. lunula* 與 *P. lunula* 族群量變化及生物發光現象之關係。

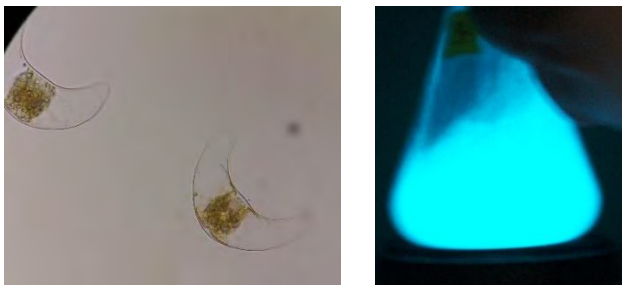
五. 探討以 EDTA 作為銅離子毒性之抑制劑與 *P. lunula* 族群量變化及生物發光現象之關係。

六. 探討長時間黑暗與 *P. lunula* 族群量變化及產生生物發光現象之關係。

參、研究器材與設備

一、研究材料

現已存在兩種螢光藻，做為測定環境汙染的試驗生物，分別為 *Lingulodinium polyedrum* 及 *Pyrocystis lunula*。其中，*P. lunula* 較 *L. polyedrum* 所產生生物發光現象之亮度高(Seliger et al. 1969)，利於識別，故於本研究中採用 *P. lunula* 作為試驗對象。

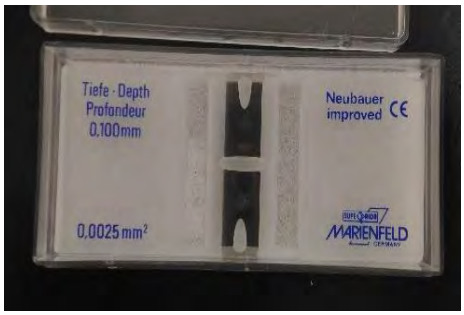


(圖一)新月梨甲藻

新月梨甲藻(*Pyrocystis lunula*) (圖一)，為單細胞真核生物，細胞呈新月形，兩端尖細，體長約 0.15mm，於黑暗狀態下受到外在環境物理擾動可發出藍色螢光，本身無毒。螢光藻來自台灣大學周宏農教授。

二、實驗器材

微量吸管、錐形瓶、血球計數器(圖二)、生長箱、滅菌釜、無菌操作台、複式顯微鏡、磁力攪拌器、單眼相機、試管震盪機(圖三)、光度計(圖四)



(圖二) 血球計數器

(圖三) 試管震盪機

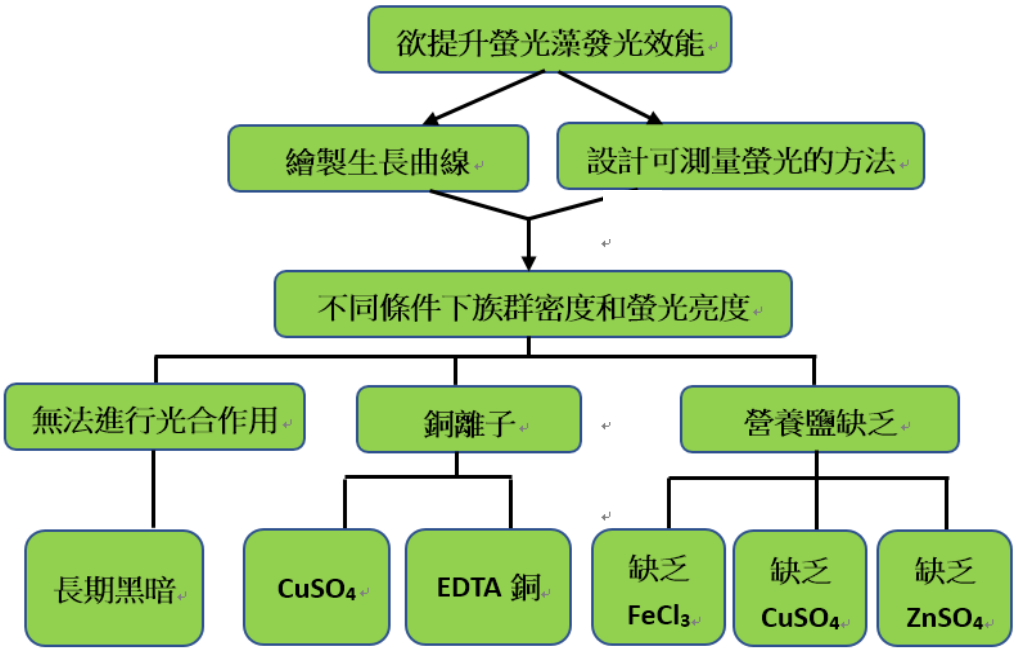
(圖四)光度計

三、實驗藥品

F/2 培養基(附錄一)、調製海水、$FeCl_3$、$CuSO_4$、$ZnSO_4$、$CoCl_2$、$MnCl_2$、$NaNO_3$、NaH_2PO_4、Na_2EDTA、Na_2MoO_4、Vitamin B_{12}、Biotin、Thiamine HCl

肆、研究過程或方法

本研究流程如圖五所示：



(圖五)研究流程

一、*P. lunula* 養殖

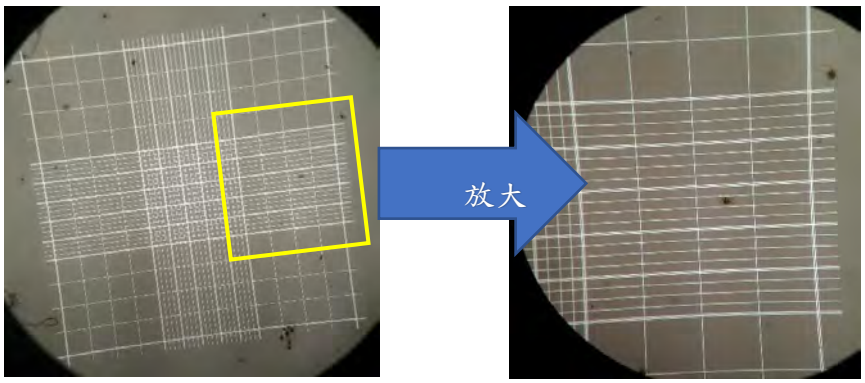
P. lunula 養殖：培養環境為設定為光照及黑暗各 12 小時，並放置在恆溫培養箱中以 22℃培養；光照時 *P. lunula* 所受到的光照強度為 36.41μmol。F/2 培養基更換週期為 30 天，以確保 *P. lunula* 生長所需營養鹽充足。*P. lunula* 之生存環境如下圖所示(圖六)。

(圖六) 生長環境

二、*P. lunula* 族群量估計方式

以微量吸管吸取定量培養液，將之置於顯微鏡下以血球計數器估計數量，並將任兩樣區(下圖黃框)計數後取平均值，最後將樣區個體數量換算回單位體積培養液所含個體數量，採三重複計算以取得培養液中族群中 *P. lunula* 更精確數量，計算樣區中個體數及換算方法如(圖七)所示：

$$\text{每毫升藻數} = \text{黃色區域內藻數} \times 10^4$$



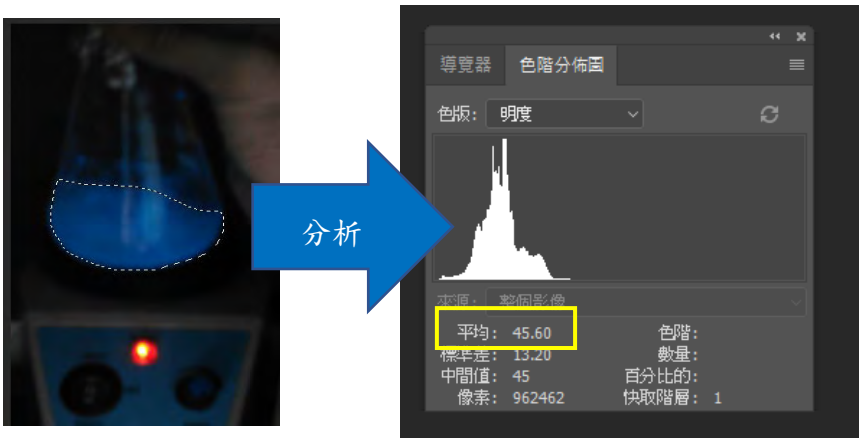
(圖七)血球計數器記數方式

三、*P. lunula* 族群螢光亮度測定：

由於使 *P. lunula* 產生螢光方式為機械擾動，且發光強度可受外力機械擾動不同而變化，故於本實驗中使用試管震盪器做為外力機械擾動來源以確保單次 *P. lunula* 所受外力擾動皆相同，一次發光的時間能維持七秒左右。螢光亮度會隨擾動強度增強而增加。我們改良前人的研究方法，使用試管震盪器取代手搖，確保每次的搖動有相同的擾動強度。將試管振盪器放置在有開口的箱子內，相機從開口中拍攝，相機和箱子之間覆蓋黑布，確保不會被外部光線干擾。相機的畫面和箱子開口的兩側對齊，相機高度和錐形瓶等高，和試管振盪器水平間隔 35 公分。

(圖八) 螢光亮度測定方式

震盪時，使用相機錄影，感光度(ISO)設定在 3200，快門 1/4 秒，光圈 5.6。分析方面，在影片撥放時，將最亮的畫面，擷取成照片。以 photoshop 進行分析，以色階分布圖查看錐形瓶範圍內的明度平均值(圖九)。



(圖九)亮度分析方法

在計算螢光亮度時，會取同一變數組內明度的平均值，將此平均明度除以藻的總數，得每顆藻的平均亮度。因所得的值極小，故將其值以 10^{-6} 表示。

四、繪製 Pyrocystis lunula 的生長曲線

從水族館購買來的海水中，營養鹽的濃度較低。需先配置成 F/2 培養基，才可引起藻類的大量繁殖。我們先把藻液在海水中培養數周，不添加營養鹽。使觀察前 *Pyrocystis lunula* 的族群維持在低密度，以便在添加培養基後，觀察到從低密度至高密度，完整的生長曲線。

(一) 將培養海水中的藻液 10 毫升加入錐形瓶，再加 F/2 培養基營養鹽 0.1 毫升至 100 毫升之後不再添加營養鹽

(二) 每天固定時間計數細胞數一次，並記錄結果

五、營養鹽缺乏的處理

(一)配置 F/2 時，設計五組各缺乏 Fe^{3+}、Cu^{2+}、Zn^{2+}離子營養鹽的培養基

(二)先將海水中的藻液分裝後，加入缺乏營養鹽的培養基。分裝的藻液已在海水中培養數周，且添加營養鹽時採較低稀釋比的接種，來排除舊培養基濃度的影響，避免過去添加的 F/2 殘留營養鹽。

六、不同濃度 $CuSO_4$ 的配製

參考其他文獻中，$CuSO_4$ 濃度對於其他種藻類生長的影響後，我們選擇了額外添加 1ppm、3ppm、5ppm $CuSO_4$ 來進行實驗。

(一) 在配置好的一公升 F/2 中加入 5 毫克的硫酸銅，製成含外加 5ppm 硫酸銅的 F/2 培養基

(二) 用稀釋法，配置含 3ppm 和 1ppm 外加硫酸銅的 F/2 培養基

七、金屬螯合劑 EDTA 添加方式

查詢相關資料後發現，硫酸銅對藻類的毒性會受到 EDTA 的抑制。在額外添加 1ppm 硫酸銅的 F/2 培養基中，加入 1ppm 的 EDTA。探討 EDTA 是否可以有效抑制硫酸銅的毒性。

(一) 在一公升 F/2 中加入 1 毫克的硫酸銅，製成含外加 1ppm 硫酸銅的 F/2 培養基

(二) 在培養基中加入 1 毫克的 EDTA，製成含 EDTA 銅的培養基

八、長期黑暗的實驗設計

藻類需要光以進行光合作用。在黑暗的環境中，不但無法進行光合作用，還會消耗原先儲存的能量，進而降低螢光亮度。

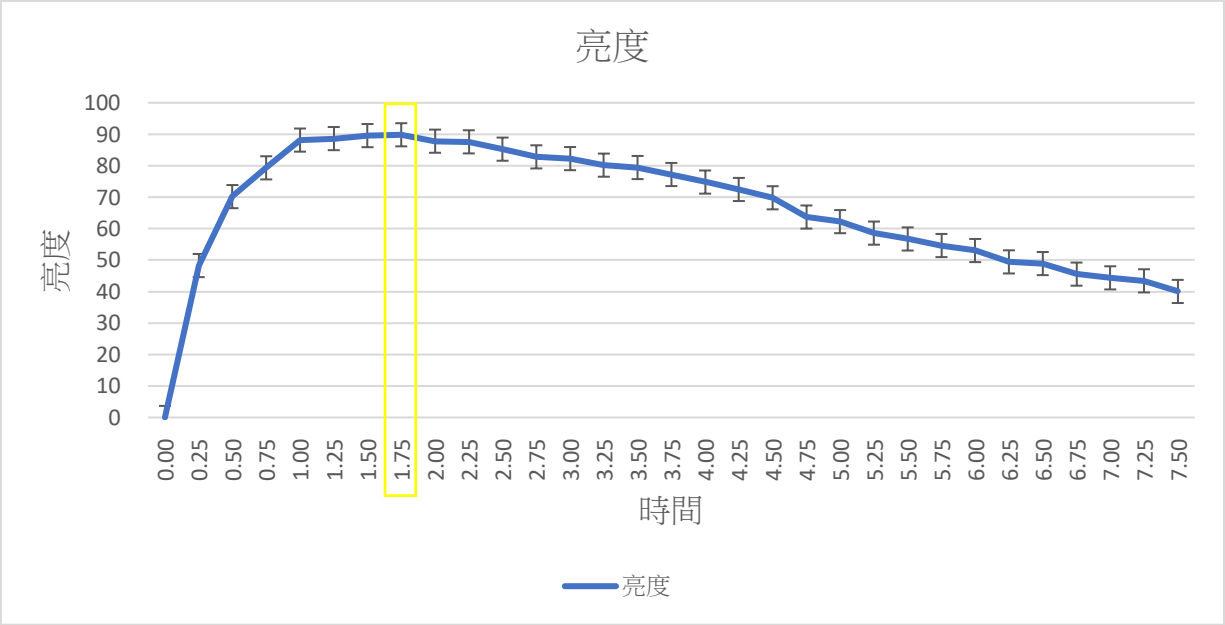
(一)製作可放入數個錐形瓶的紙箱，確保內部為完全黑暗但仍可通風

(二)實驗分為兩組，一組的錐形瓶放入紙箱，另一組則為對照組

伍、研究結果

一、設計可測定 *P. lunula* 族群螢光亮度之方法

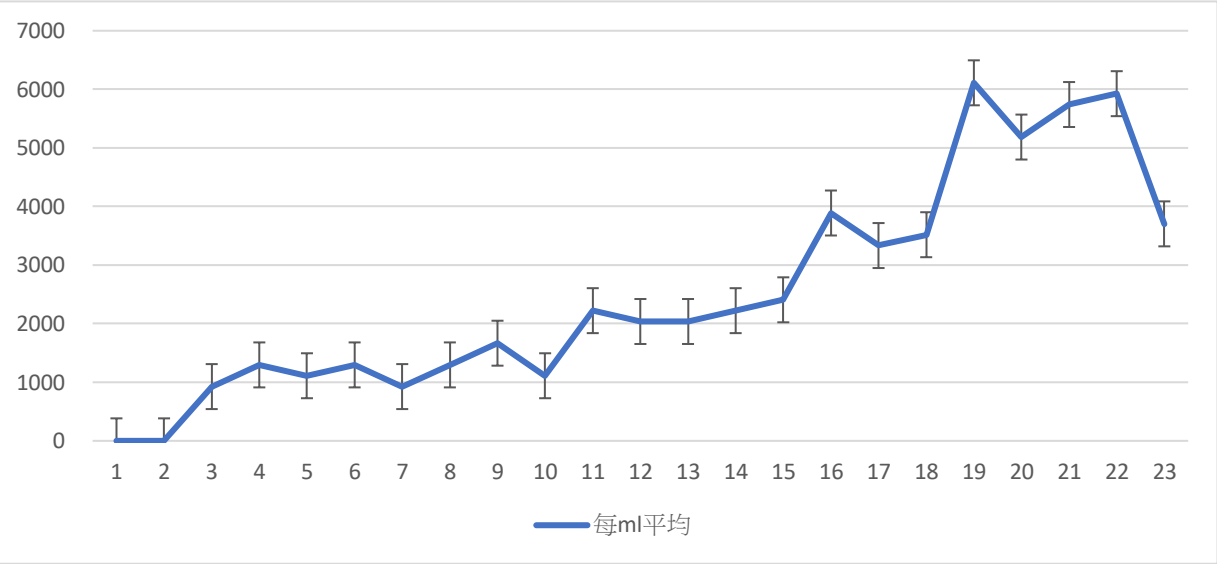
P. lunula 產生螢光方式為閃光呈現，螢光產生至消滅過程極短(Seliger et al. 1969)，故本實驗以 0.25 秒為單位取樣，分析總長 7.5 秒影片之族群總亮度變化量；由於培養液中 *P. lunula* 個體受力產生螢光表現存在時間差，故以最高亮度作為該組螢光亮度代表。如下圖所示，所有取樣單位中，以 1.75 秒時亮度為最高，故取 1.75 秒時亮度作為該組亮度代表。



(圖十) 7.5 秒螢光分析

二、繪製 *P. lunula* 生長曲線：

以下圖為例，第一天於培養液中添加 f/2 培養基後，至第三天數量始得增加；第三天至第十九天培養液中 *P. lunula* 個體總數量呈上升趨勢，而第十九天至第二十二天族群量持平並呈動態平衡，變化幅度小；第二十二天後培養液中 *P. lunula* 個體總數量開始下降。

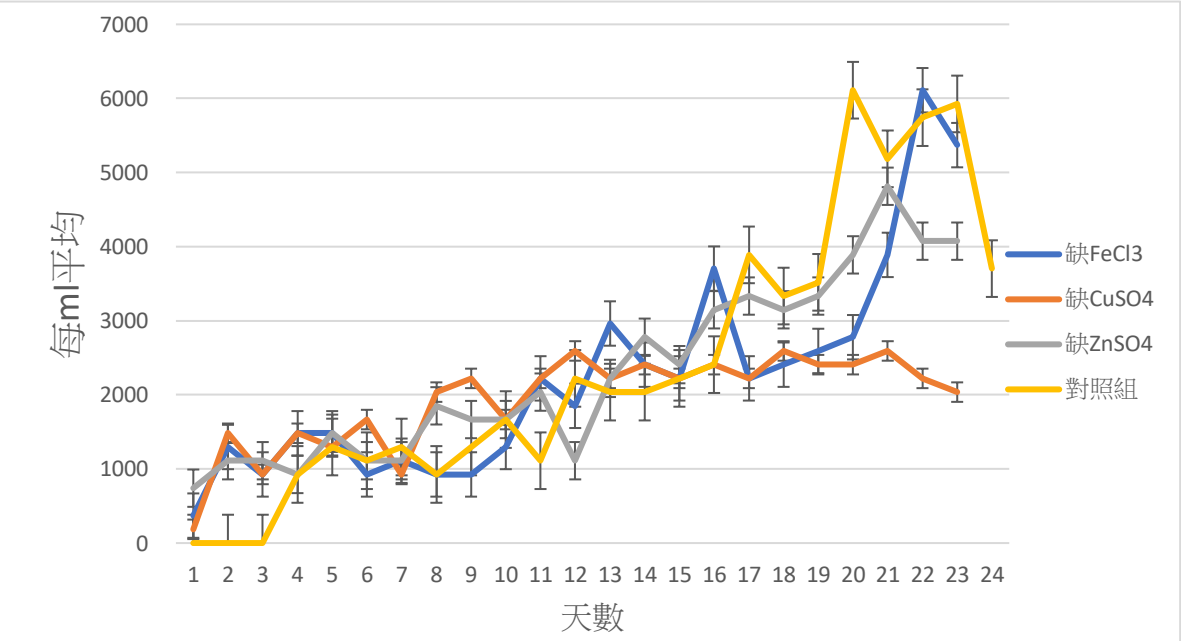


(圖十一) 生長曲線

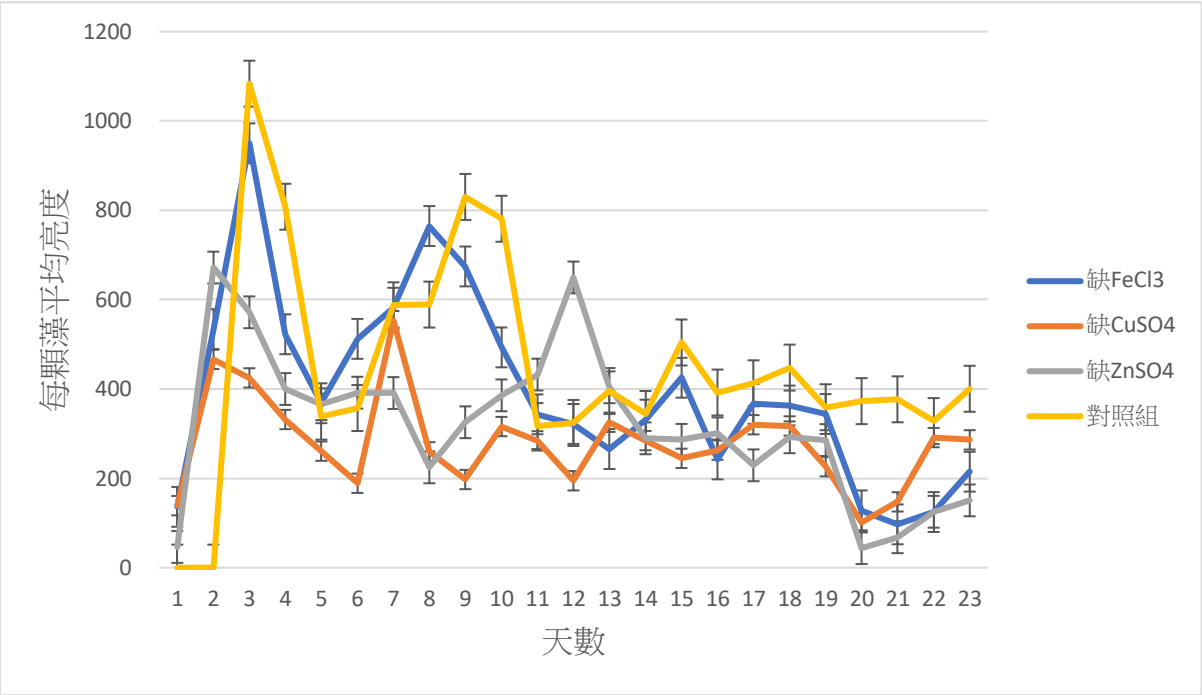
三、探討鐵、銅、鋅營養鹽缺乏與 *P. lunula* 族群量變化及生物發光現象之關係：

實驗分為四組，分別為缺少鐵、銅、鋅離子和對照組。由四組 *P. lunula* 族群中個體總數變化量可知四組於十七天內，族群中個體總數呈穩定成長，但於第十七天開始，缺少銅離子組別個體總數已無呈現上升趨勢，並於第二十一天後個體總數開始下降；缺少鋅離子組別亦於第二十一天後個體總數不再上升，呈現持平狀態；缺少鐵離子組別與對照組比較並無明顯差異，族群中個體總數亦無過大差異。

螢光亮度方面。於第十六天前，所有實驗組平均亮度均與對照組相差幅度小；第十六天後，可見實驗組與對照組差異漸增，三組實驗組均出現 *P. lunula* 平均亮度下降情形。



(圖十二) 養分缺乏下族群密度

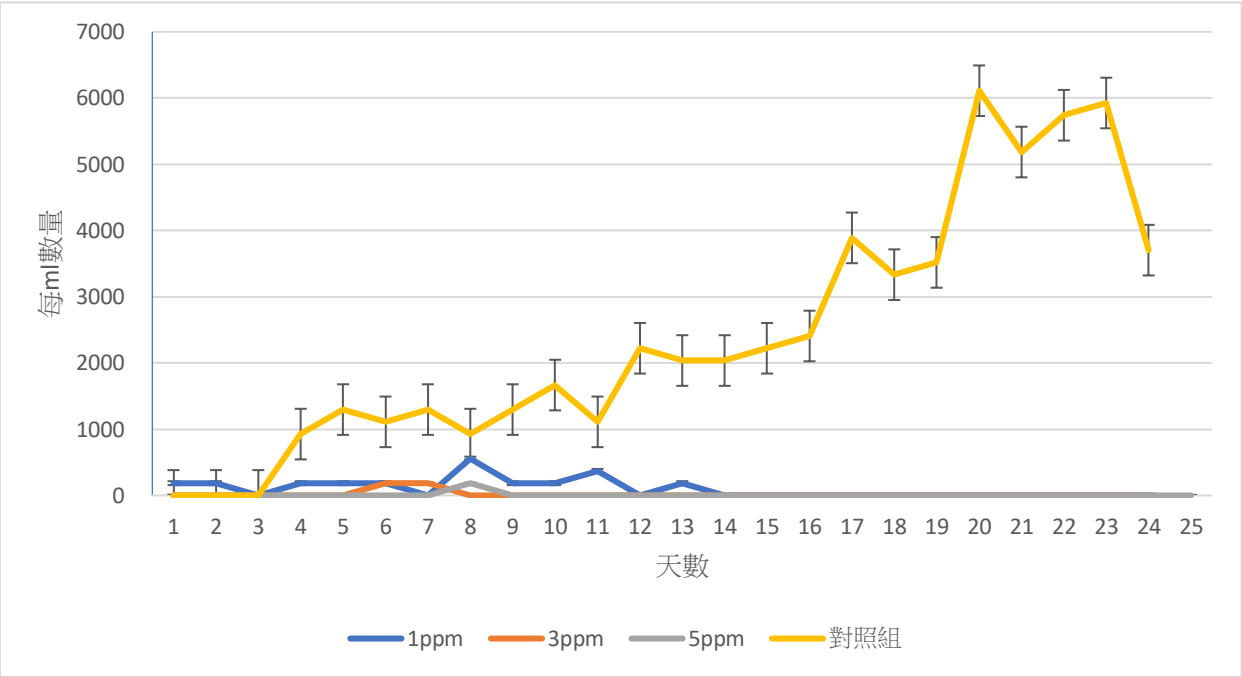


(圖十三) 養分缺乏下每顆藻平均亮度

四、探討銅離子與 *P. lunula* 與 *P. lunula* 族群量變化及生物發光現象之關係：

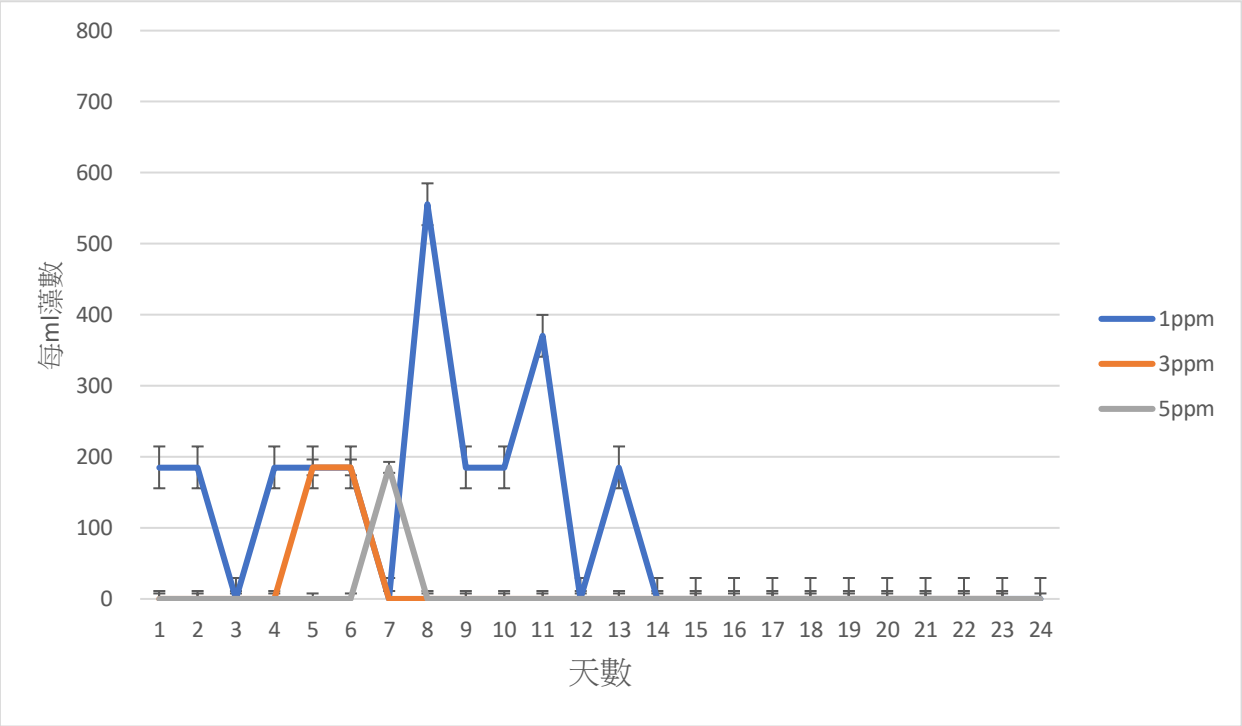
實驗分為四組，分別為額外加入 1ppm 銅離子、額外加入 3ppm 銅離子、額外加入 5ppm 銅離子與對照組。由四組 *P. lunula* 族群中個體總數變化量可知，三組實驗組 *P. lunula* 個體總數皆與對照組存在明顯差異，1ppm 組別於第十四天後個體總數變為零，3ppm 及 5ppm 組別亦於第九天後族群不復存在。

由下圖可知，三組實驗組之平均亮度均與對照組差異顯著，額外加入 1ppm 銅離子組別於第八天後平均亮度開始下降，至第十二天時已無法偵測出 *P. lunula* 受機械擾動所產生之螢光；額外加入 5ppm 銅離子組別則於實驗開始時即無法測出 *P. lunula* 所產生之螢光。

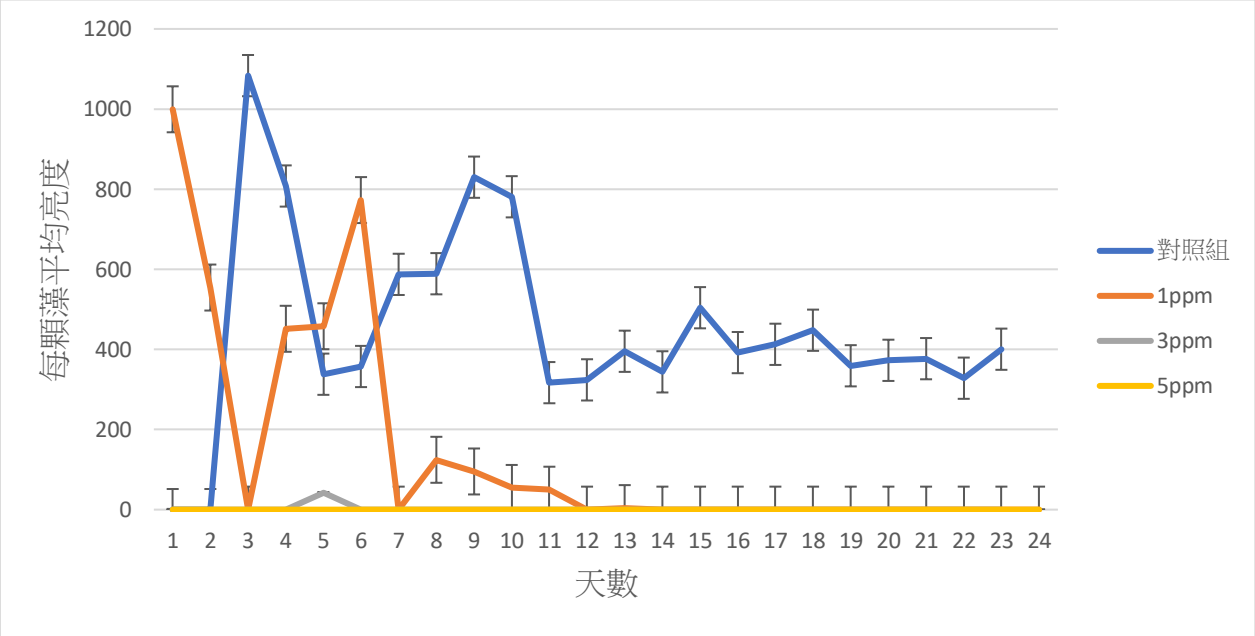


(圖十四) 不同濃度 $CuSO_4$ 中族群密度

為了方便比較不同濃度 $CuSO_4$ 對 *Pyrocystis lunula* 的生長情形的影響，在下圖中我們先移除對照組，只比較 1ppm、3ppm 和 5ppm $CuSO_4$ 中，*Pyrocystis lunula* 的生長曲線。



(圖十五) 1ppm、3ppm 和 5ppm $CuSO_4$ 中的族群密度

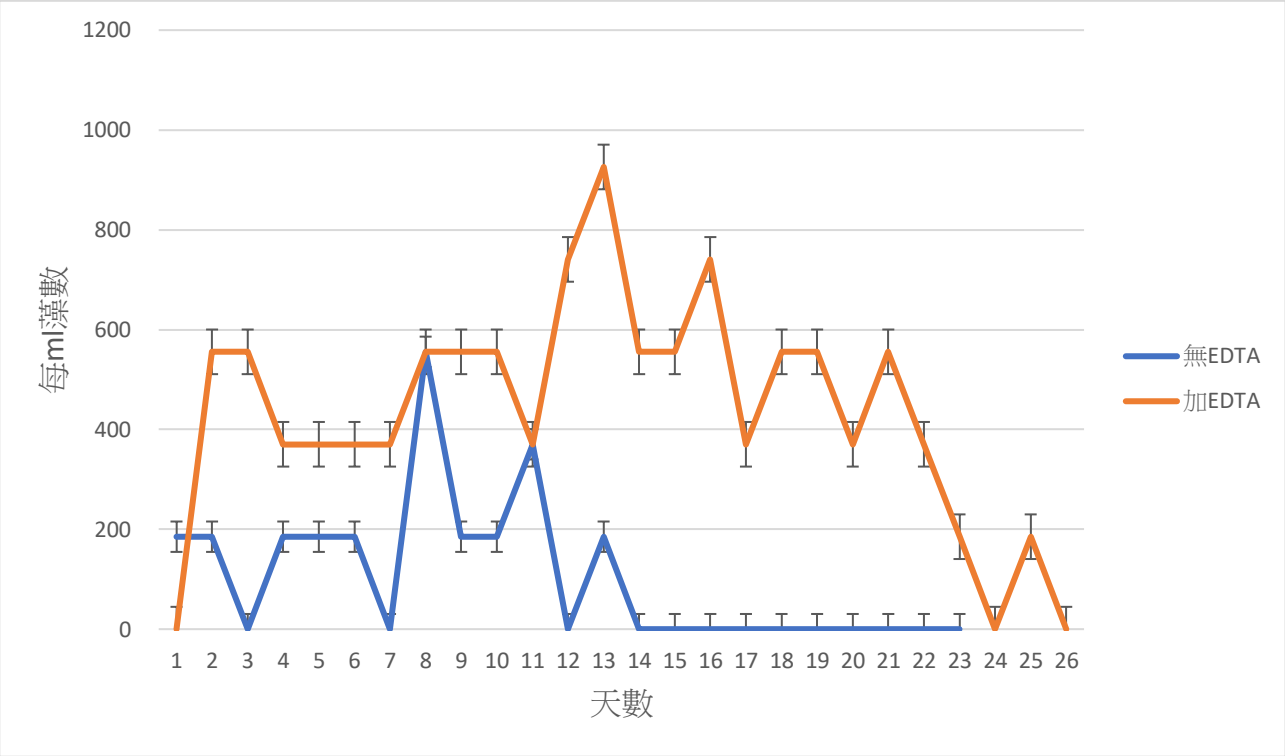


(圖十六) 添加 $CuSO_4$ 每顆藻平均亮度

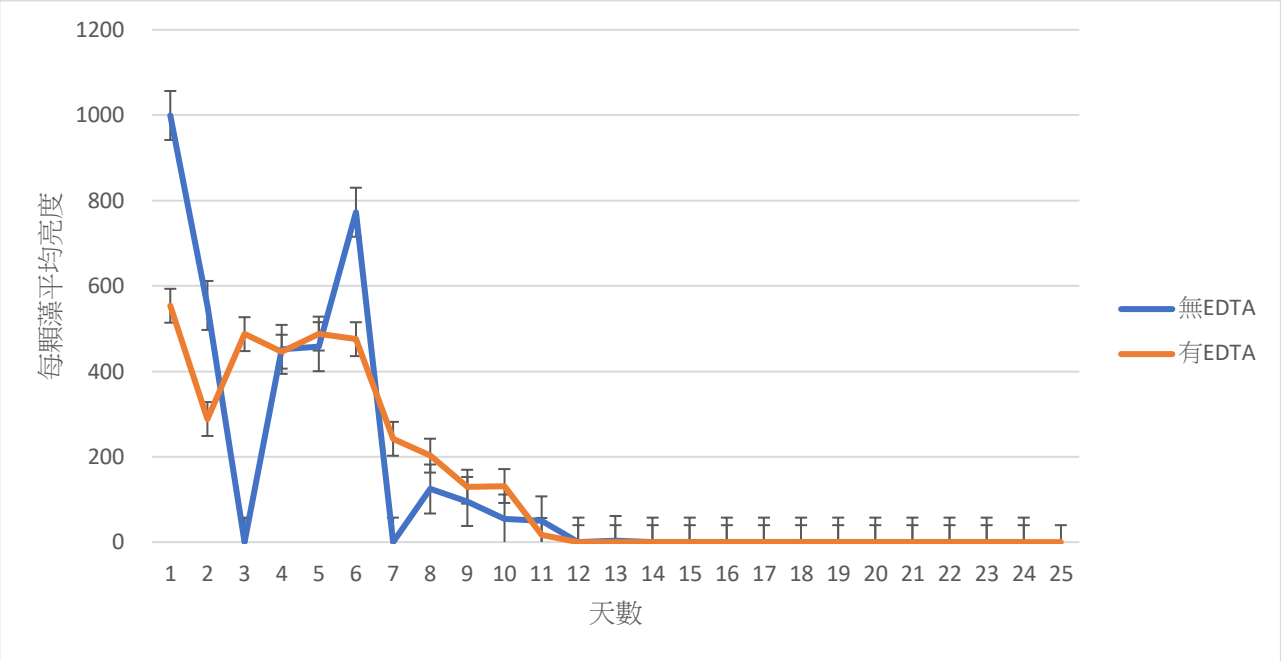
五、探討以 EDTA 作為銅離子毒性之抑制劑與 *P. lunula* 族群量變化及產生生物發光現象之關係：

實驗分為兩組，分別額外加入 EDTA 及 1ppm 銅離子的實驗組及無加入 EDTA 但有額外加入 1ppm 銅離子之對照組。由兩組 *P. lunula* 族群中個體總數變化量可知，無加入 EDTA 組別於第八天後即開始下降，至第十四天變為零；有加入 EDTA 組別則於第十二天後數量與對照組出現顯著差異，但與前項實驗中無加入銅離子組別相比，其族群中個體數量仍較低。

螢光亮度方面，由下圖可知，有加入 EDTA 組別與吳加入 EDTA 組別結果差異不顯著，均於第十二天後無法測出 *P. lunula* 所發出螢光，惟有加入 EDTA 組別較無加入 EDTA 組別平均亮度波動幅度較小。



(圖十七) 添加 EDTA 族群密度

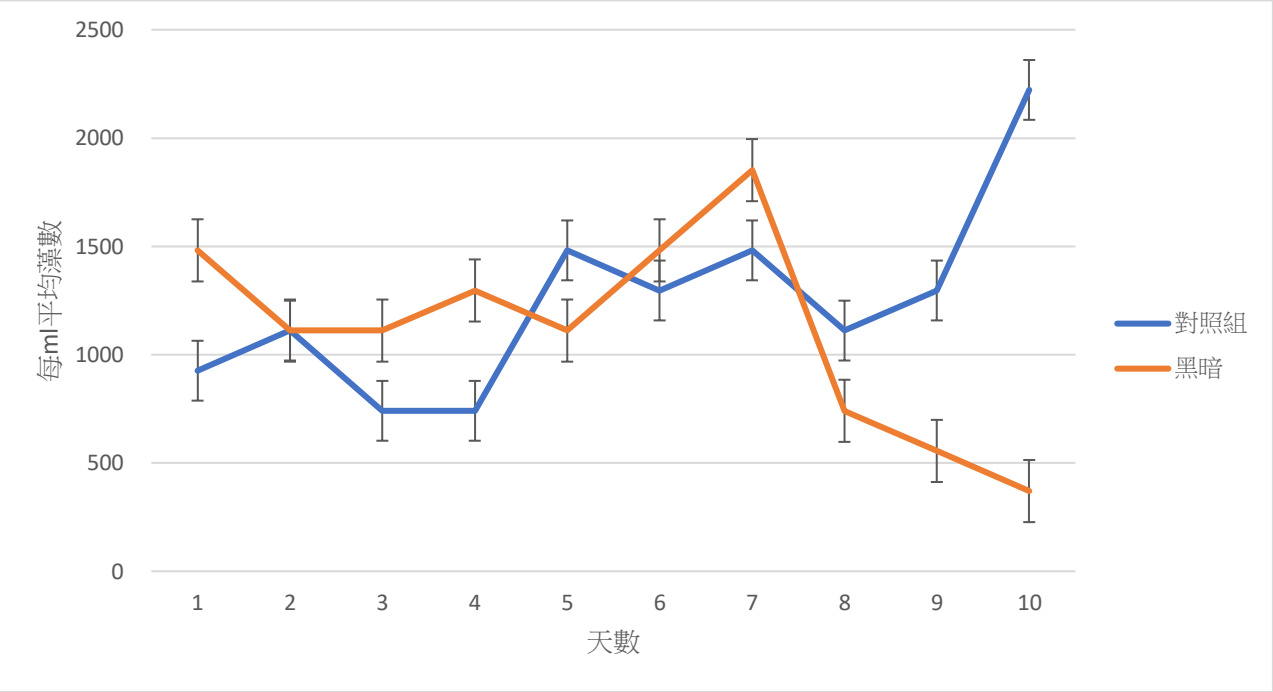


(圖十八) 添加 EDTA 每顆藻平均亮度

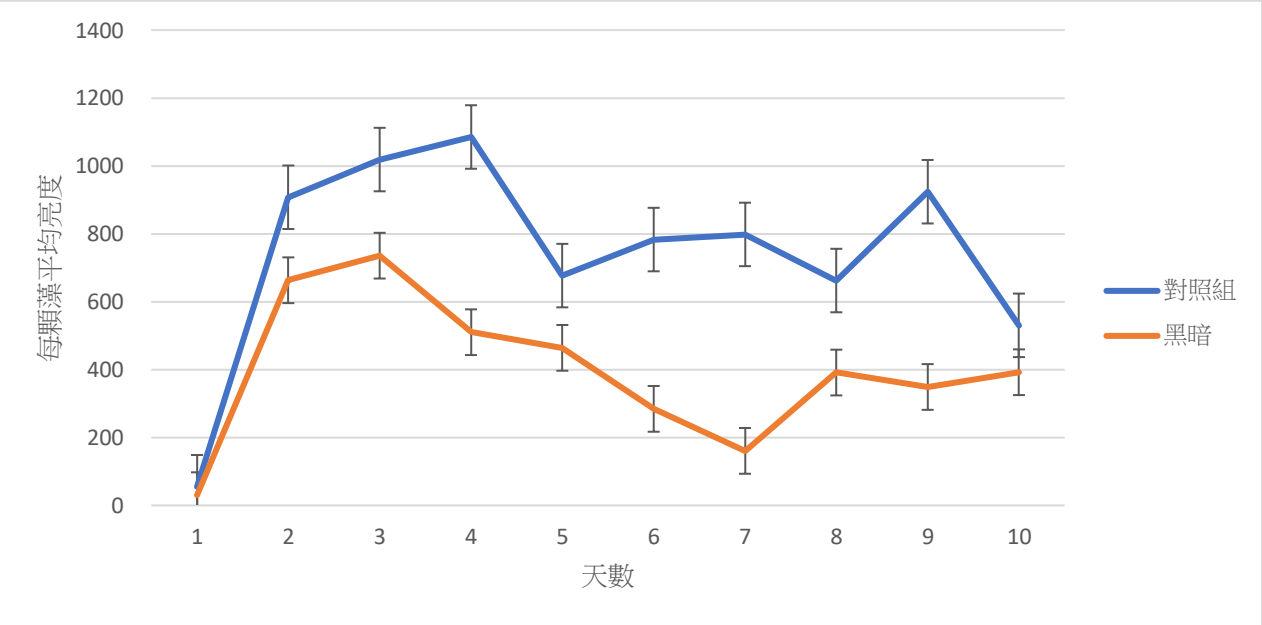
六、探討長時間黑暗與 *P. lunula* 族群量變化及生物發光現象之關係：

實驗分兩組，分別為置於完全黑暗組別與對照組。由兩組 *P. lunula* 族群中個體總數變化量可知，黑暗組別於第八天後族群中個體總數有下降趨勢，對照組則否，呈上升趨勢。

螢光亮度方面，由下圖可知，黑暗組別之平均亮度皆低於對照組。



(圖十九)長期黑暗族群密度



(圖二十)長期黑暗每顆藻平均亮度

陸、討論

一、*P. lunula* 族群螢光亮度測定：依據實驗結果可知，*P. lunula* 受同樣物理擾動時所產生螢光亮度隨時間改變，且個體間發光現象持續時間不一致，因此無法得知單一培養液中所有個體同時產生螢光之亮度，故於後續實驗選擇以各單位時間最大亮度作為該族群總亮度代表。此外，於亮度變化圖中可見螢光消退時亮度變化所成函數呈遞減，而非直接降為零，推測原因亦為個體間發光現象持續時間及時機不一所致。

二、繪製 *P. lunula* 生長曲線：依據實驗結果可知，*P. lunula* 族群中個體總量變化亦符合細菌於密閉環境中培養之生長曲線。初加入培養基時，*P. lunula* 仍在適應新加入培養基，故數量未上升，為遲滯期(lag phase)；個體總量於第二天後開始上升，顯示 *P. lunula* 已開始適應新加入培養基並進入指數期(log phase)；接著於第十九天後個體總量呈動態平衡，並漸趨定值，顯示已達最大環境負載量，為靜止期(stationary phase)；二十二天後族群總量開始下降，推測為代謝廢物累積無法排除所致，開始進入死亡期(death phase)。

三-1、探討鐵、銅、鋅金屬營養鹽缺乏與 *P. lunula* 族群量變化之關係：依據實驗結果可知，三組實驗組中 *P. lunula* 族群個體數量變化以第十七天做分界可略分做兩時期，第十七天前，三組實驗組個體總量皆與對照組差距不顯著，推測為由於營養鹽缺乏培養基於實驗開始時才加入原培養液中，故實驗進行時仍殘留原培養液中所剩營養鹽。第十七天後，缺少銅離子組個體數量已無繼續上升，並於第二十一天後開始下降，推測為原培養液中銅離子已消耗殆盡，從而降低最大環境負載量；缺少鋅離子組別與對照組差異較銅離子組別不顯著，但進入靜止期時數量仍小於對照組，推測鋅離子的缺乏亦可能使 *P. lunula* 族群個體總量限縮；缺少鐵離子組別個體數量與對照組差異不顯著，故可推知鐵離子的缺乏對於 *P. lunula* 族群個體總量影響較不明顯。

第 23 天以後，每一組的族群密度都有明顯的下降。錐形瓶內的甲藻無法獲得外界的營養鹽，我們推測可能是除了 $FeCl_3$、$CuSO_4$ 和 $ZnSO_4$，其他營養鹽也開始缺乏，造成藻的密度下降。表一為 f/2 中的金屬微量元素營養鹽的配方：

(表一) 金屬微量元素營養鹽的配方

Quantity	Compound	Stock Solution	Molar Concentration in Final Medium
3.15 g	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	-	1×10^{-5} M
4.36 g	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	-	1×10^{-5} M
1 mL	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	9.8 g/L dH_2O	4×10^{-8} M
1 mL	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	6.3 g/L dH_2O	3×10^{-8} M
1 mL	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	22.0 g/L dH_2O	8×10^{-8} M
1 mL	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	10.0 g/L dH_2O	5×10^{-8} M
1 mL	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	180.0 g/L dH_2O	9×10^{-7} M

三-2 探討鐵、銅、鋅金屬營養鹽缺乏與 *P. lunula* 生物發光現象之關係：由實驗結果可知，前十六天三組實驗組 *P. lunula* 之螢光平均亮度與對照組差異並不顯著，直至第十六天後平均亮度始得下降，推測原因為金屬營養鹽缺乏，加之無外部營養鹽補充所致。此外，於第十三天前螢光亮度變化呈現較大波動原因推估為細胞數量過少，造成計算平均亮度時誤差過大，故呈現變化幅度大之情形。

四-1 探討銅離子與 *P. lunula* 族群量變化之關係：由實驗結果可知，所有實驗組均於 15 天內個體數目降至零。然若培養液中缺乏銅離子亦會限縮 *P. lunula* 最大族群個體數，故可推測銅離子雖為 *P. lunula* 維持生存所需金屬鹽，但濃度過高亦可對其生長產生抑制效果。

四-2 探討銅離子與 *P. lunula* 生物發光現象之關係：由實驗結果可知，銅離子亦會抑制 *P. lunula* 所產生生物發光現象，且效果顯著。此外，1ppm 實驗組別於第二天至第十一天時，其亮度變化幅度大，推測為族群中個體數大量減少，使計算平均亮度時產生誤差過大所致。

五-1 探討以 EDTA 作為銅離子毒性之抑制劑與 *P. lunula* 族群量變化之關係：由實驗結果可知，EDTA 可抑制銅離子對 *P. lunula* 毒性，但與未加入銅離子組別相比，其族群中個體總數仍偏低，推測原因為 EDTA 於加入培養液中雖與銅離子形成螯合物，但所產生 EDTA-銅仍對 *P. lunula* 存在毒性，故族群中個體數量較無加入銅離子組別小。

五-2 探討以 EDTA 作為銅離子毒性之抑制劑與 *P. lunula* 生物發光現象之關係：由實驗結果可知，加入 EDTA 組別與未加入 EDTA 組別差異不顯著，推測原因亦為 EDTA-銅之毒性抑制 *P. lunula* 所產生之發光現象。我們推測是因為產生螢光的作用，或也受到銅離子的抑制其發光機制，只要環境中 Cu^{2+}的濃度超出了生命所能耐受的濃度，就會迅速對螢光亮度產生影響。雖然已使用毒性較低的 EDTA 銅，但仍將新月梨形藻螢光亮度降低至和無添加 EDTA 的組別沒有明顯區別的程度。由於螢光發光機制對汙染物的靈敏度，在不殺死細胞濃度下，就能使新月梨形藻的螢光減弱。

六-1 探討長時間黑暗與 *P. lunula* 族群量變化之關係：由實驗結果可知，於無法行光合作用狀態下，仍可存活數日。第七天後，黑暗組族群中個體數大幅下降，推測為於原先環境所儲存營養用罄所致。

六-2 探討長時間黑暗與 *P. lunula* 生物發光現象之關係：由實驗結果可知，黑暗組別中 *P. lunula* 所產生螢光亮度較對照組低，但仍具備產生螢光能力，推測為此發光能力為生存所需，故即使處於營養貧乏狀態仍須具備發光能力。換言之，若此推論屬實，則可推知 *P. lunula* 所具備發光能力可能和其他甲藻相同，屬防禦掠食者機制中一環。

柒、結論

於本實驗中，可得知新月梨甲藻發光持續時間短，故無法作為長時間照明燈具之光源，但可依此特性製成其他具備此需求之產品。此外，如長時間黑暗實驗結果所示，若新月梨甲藻於短時間內無照光，不會造成族群數量銳減，故可依此優勢製成只需短暫發光能力且無法時常接觸陽光之螢光產品，例如：鬧鐘刻度的顯示燈及螢光棒。

實驗中亦測試新月梨甲藻於金屬離子缺乏及銅離子毒性等逆境下，所產生反應。前者可作為無法提供足夠金屬離子的培養依據，後者則可將此結果用於環境中毒物監測及試驗。期待未來能進一步探知螢光藻於實際應用之理論基礎，以作為後人開發此領域的基石。

捌、參考資料及其他

1. 生物燈裡的活細菌發出綠色熒光, http://dolamo.com/article/tech/1/556, [Accessed on 2017, 12 Feb]
2. 利用硅藻發光的生物螢光燈，將靜謐的藍色隨身攜帶, https://read01.com/dymPd.html, [Accessed on 2017, 12 Feb]
3. 養殖池中藻類過度生長之控制, http://www.miobuffer.com.tw/fishworld/199904/03.htm, [Accessed on 2017, 12 Feb]
4. Biggley, W. H., Swift, E., Buchanan, R. J., & Seliger, H. H. (1969). Stimulable and spontaneous bioluminescence in the marine dinoflagellates, Pyrodinium bahamense, Gonyaulax polyedra, and Pyrocystis lunula. The Journal of general physiology, 54(1), 96-122.
5. Colepicolo, P., Roenneberg, T., Morse, D., Taylor, W. R., & Hastings, J. (1993). Circadian regulation of bioluminescence in the dinoflagellate Pyrocystis lunula. Journal of phycology, 29(2), 173-179.
6. Conrad, F., Lofthouse, V. A., & Escobar-Tello, M. (2016). Design based on nature–a literature investigation.
7. Conrad, F., Lofthouse, V., & Escobar-Tello, C. (2016). Design Based On Nature–A Literature Investigation. In DS 83:
8. Cussatlegras, A. S., & Le Gal, P. (2007). Variability in the bioluminescence response of the dinoflagellate Pyrocystis lunula. Journal of experimental marine biology and ecology, 343(1), 74-81.
9. Dunlap, J. C., & Hastings, J. W. (1981). Biochemistry of dinoflagellate bioluminescence: the purification and characterization of dinoflagellate luciferin from Pyrocystis lunula. Biochemistry, 20(4), 983-989.

10. Heimann, K., Matuszewski, J. M., & Klerks, P. L. (2002). Effects Of Metals And Organic Contaminants On The Recovery Of Bioluminescence In The Marine Dinoflagellate Pyrocystis Lunula (Dinophyceae) 1. Journal of phycology, 38(3), 482-492.
11. Lewis, M. A. (1995). Use of freshwater plants for phytotoxicity testing: a review. Environmental Pollution, 87(3), 319-336.
12. Macdonald, R. W., & Bewers, J. M. (1996). Contaminants in the arctic marine environment: priorities for protection. ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil, 53(3), 537-563.
13. Seliger, H. H., Biggley, W. H., & Swift, E. (1969). Absolute Values Of Photon Emission From The Marine Dinoflagellates Pyrodinium Bahamense, Gonyaulax Polyedra And Pyrocystis Lunuu. Photochemistry and photobiology, 10(4), 227-232.
14. Shilla, D. A. (2016). Distribution of Pb, Cr, Cu and Zn in the marine-coastal region of Zanzibar (Tanzanian archipelago, East Africa). Chemistry and Ecology, 32(8), 774-785.

(附錄一)F/2 培養基成分表

f/2 stock solution（a）

藥品	最終濃度	重量
$NaNO_3$	8.83×10^{-4}M	75g
$NaH_2PO_4H_2O$	3.63×10^{-5}M	5g
Distilled water up to 1000ml		

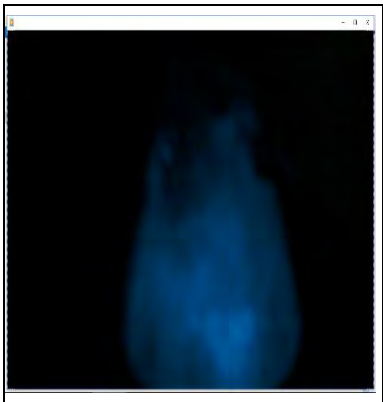
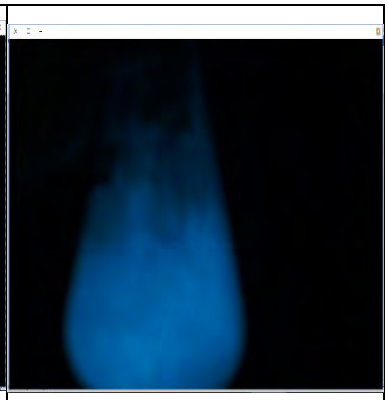
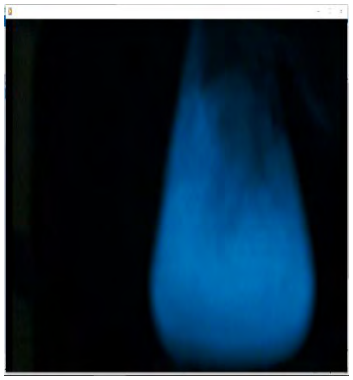
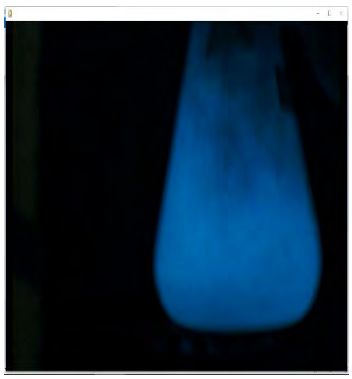
f/2 stock solution（b）-Trace metal solution

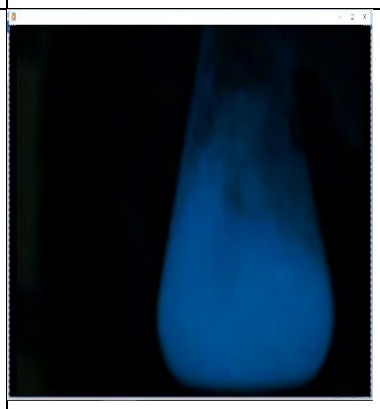
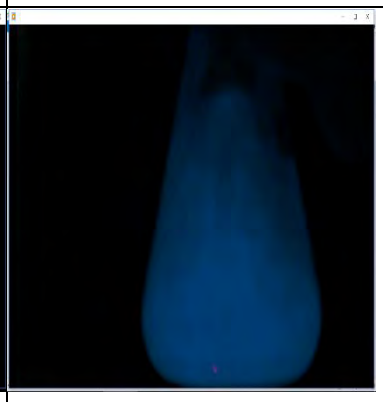
藥品	最終濃度	重量
$FeCl_3\cdot6H_2O$	1×10^{-5}M	3.15g
$Na_2EDTA\cdot2H_2O$	1×10^{-5}M	4.36g
$CuSO_4\cdot5H_2O$	4×10^{-8}M	1mL
$Na_2MoO_4\cdot2H_2O$	3×10^{-8}M	1mL
$ZnSO_4\cdot7H_2O$	8×10^{-8}M	1mL
$CoCl_2\cdot6H_2O$	5×10^{-5}M	1mL
$MnCl_2\cdot4H_2O$	9×10^{-7}M	1mL
Distilled water up to 1000ml		

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
Thinamine HCl;	3×10^{-7}M	100mg
Distilled water up to 1000ml		

(附錄二)螢光亮度分析照片

		
0.25 秒	0.50 秒	0.75 秒
1.00 秒	1.25 秒	1.50 秒
		
1.75 秒	2.00 秒	2.25 秒
		
2.50 秒	2.75 秒	3.00 秒

3.25 秒	3.50 秒	3.75 秒
		
4.00 秒	4.25 秒	4.50 秒
4.75 秒	5.00 秒	5.25 秒
		
5.50 秒	5.75 秒	6.00 秒

6.25 秒	6.50 秒	6.75 秒
7.00 秒	7.25 秒	7.50 秒

【評語】052605

1. 本作品探討新月梨甲藻（Pyrocystis lunula）在不同培養條件下對螢光藻生長的影響，以了解影響螢光藻螢光亮度的因子，並希望未來應用在環境重金屬毒性監測與生物冷光商用產品。本研究利用生物技術，進行環境科學研究，頗具特色。

2. 實驗變因包括照光與否、營養鹽成份、螯合劑等，實驗設計完整，並能針對不同營養鹽及其濃度進行系統性分析測試。本實驗亦能系統性收集數據，實驗數據能呈現標準偏差，具有統計觀念。

3. 未來若能獲得螢光藻螢光量度與專一性重金屬離子濃度關係，並應用於檢測水體銅離子污染，將更具環境生態毒性監測之應用價值。

作品海報

壹、研究動機

去年看到一則非常有趣的新聞，荷蘭飛利浦公司設計了一種「生物燈」，可將接觸沼氣時會發出螢光的細菌作為居家照明；如此一來，便不用消耗電力，達成節能減碳的效果。查詢相關資料後，發現還有波蘭的設計師利用螢光藻，打造了「活生生的燈」（Living Lamps）。目前生物螢光的相關應用正在萌芽，而開發利用此螢光的首要之務，就是了解發光生物的特性。
本研究希望能比較不同條件下，螢光藻的生長情形和發光亮度等特性，未來可改善生物螢光燈的亮度和檢測銅離子汙染的效能。

貳、研究目的

一、設計可測定*P. lunula*族群螢光亮度之方法
二、繪製*P. lunula*生長曲線
三、探討鐵、銅、鋅營養鹽缺乏與*P. lunula*族群量變化及生物發光現象之關係。
四、探討銅離子與*P. lunula*與*P. lunula*族群量變化及生物發光現象之關係。
五、探討以EDTA作為銅離子毒性之抑制劑與*P. lunula*族群量變化及生物發光現象之關係。
六、探討長時間黑暗與*P. lunula*族群量變化及生物發光現象之關係。

參、研究器材與設備

一、研究材料

新月梨甲藻(*Pyrocystis lunula*)，為單細胞真核生物，細胞呈新月形，兩端尖細，體長約0.15mm，於黑暗狀態下受到外在環境物理擾動可發出藍色螢光，本身無毒。螢光藻來自台灣大學周宏農教授。

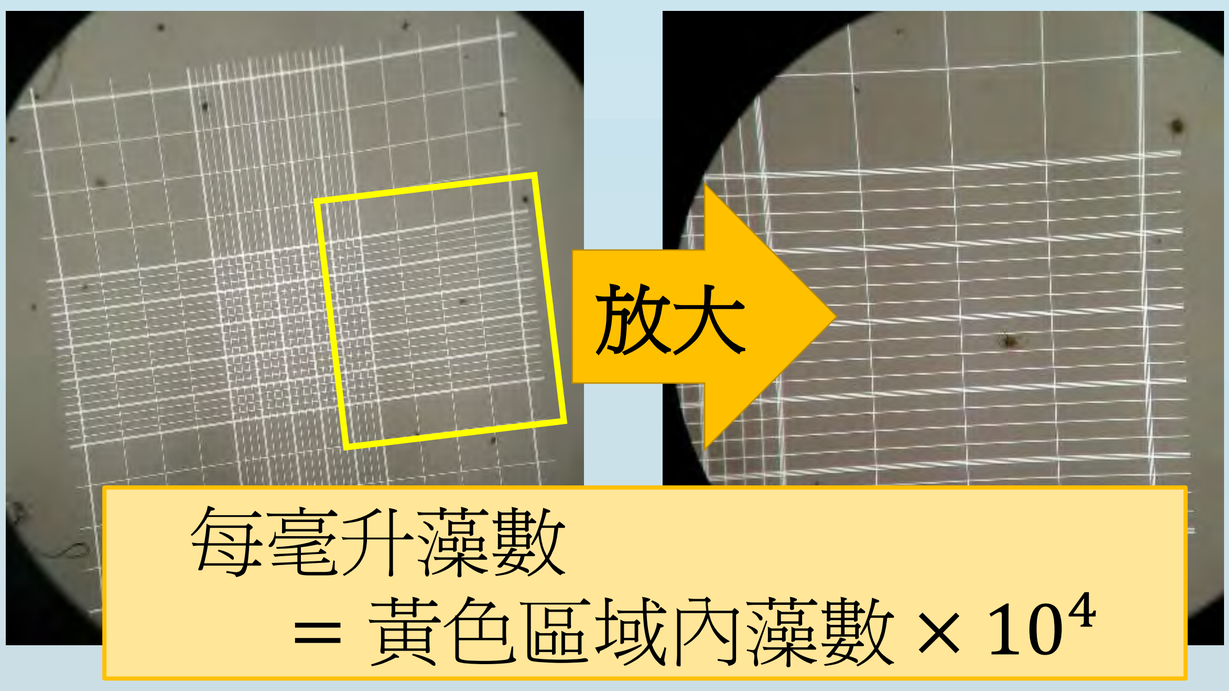
二、實驗器材

微量吸管、錐形瓶、血球計數器、生長箱、滅菌釜、無菌操作台、複式顯微鏡、磁力攪拌器、單眼相機、試管震盪機、光度計

肆、研究過程或方法

一、*P. lunula*族群量估計方式

以微量吸管吸取定量培養液，將之置於顯微鏡下以血球計數器估計數量，並將樣區(右圖黃框)計數後取平均值，最後將樣區個體數量換算回單位體積培養液所含個體數量，採三重複計算以取得培養液中族群中*P. lunula*更精確數量。



二、*P. lunula*族群螢光亮度測定：

由於*P. lunula*螢光亮度隨機械擾動強度不同而變化。故於本實驗中使用試管震盪器做為機械擾動來源以確保單次*P. lunula*所受外力擾動皆相同。將試管振盪器放置在有開口的箱子內，相機從開口中拍攝，相機和箱子之間覆蓋黑布，確保不會被外部光線干擾。相機的畫面和箱子開口的兩側對齊，相機高度和錐形瓶等高，和試管振盪器水平間隔35公分。

震盪時，使用相機錄影，感光度(ISO)設定在3200，快門1/4秒，光圈5.6。分析方面，在影片撥放時，將最亮的畫面，擷取成照片。以photoshop進行分析，以色階分布圖查看錐形瓶範圍內的明度平均值。

伍、研究結果

欲提升螢光藻發光效能

繪製生長曲線

設計可測量螢光的方法

不同條件下的生長情形和螢光亮度

缺乏營養鹽

無法行光合作用

$CuSO_4$

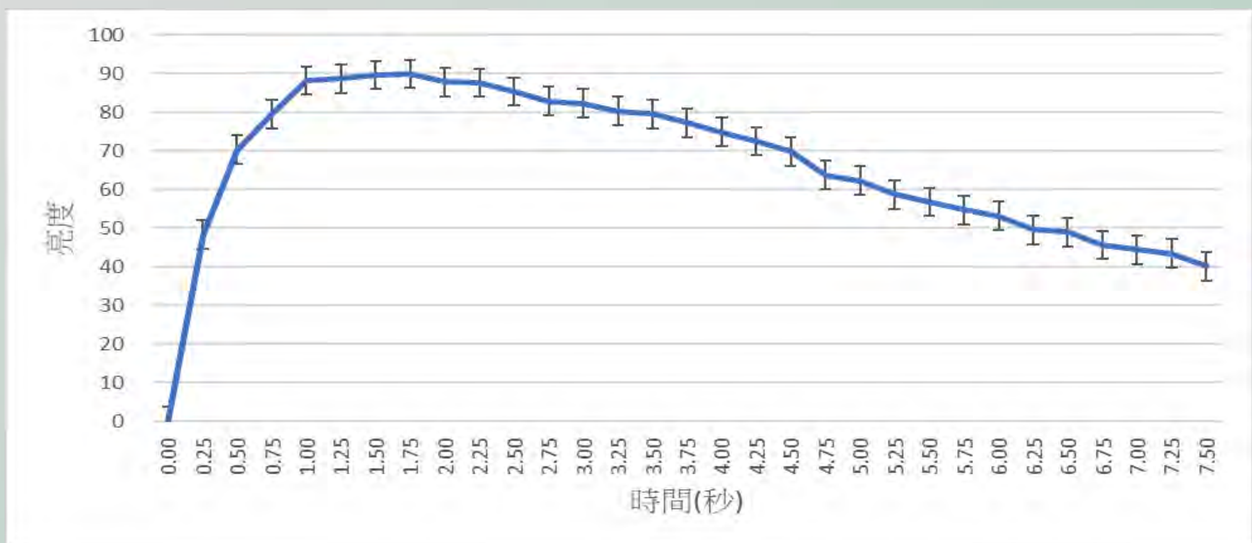
$FeCl_3$

$ZnSO_4$

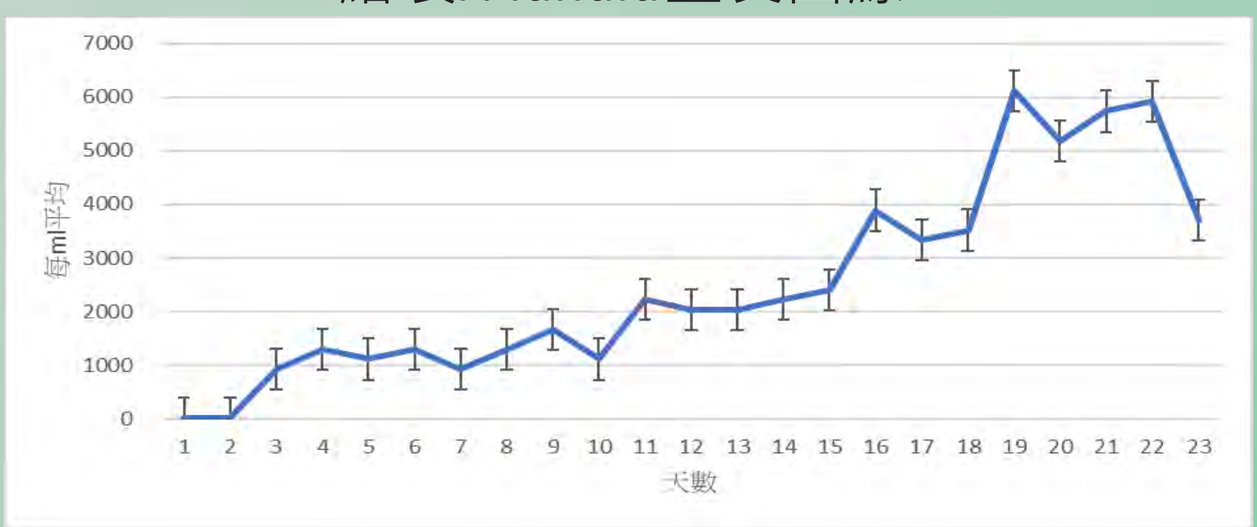
黑暗

外加$CuSO_4$ → 外加EDTA銅

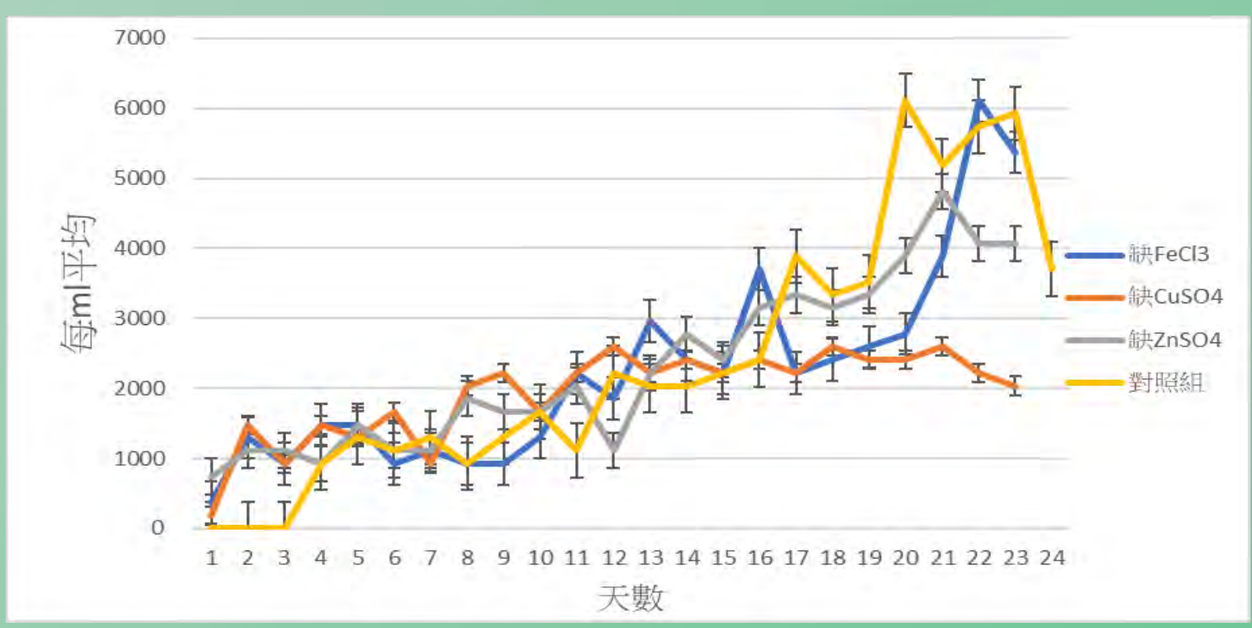
*P. lunula*族群螢光亮度分析



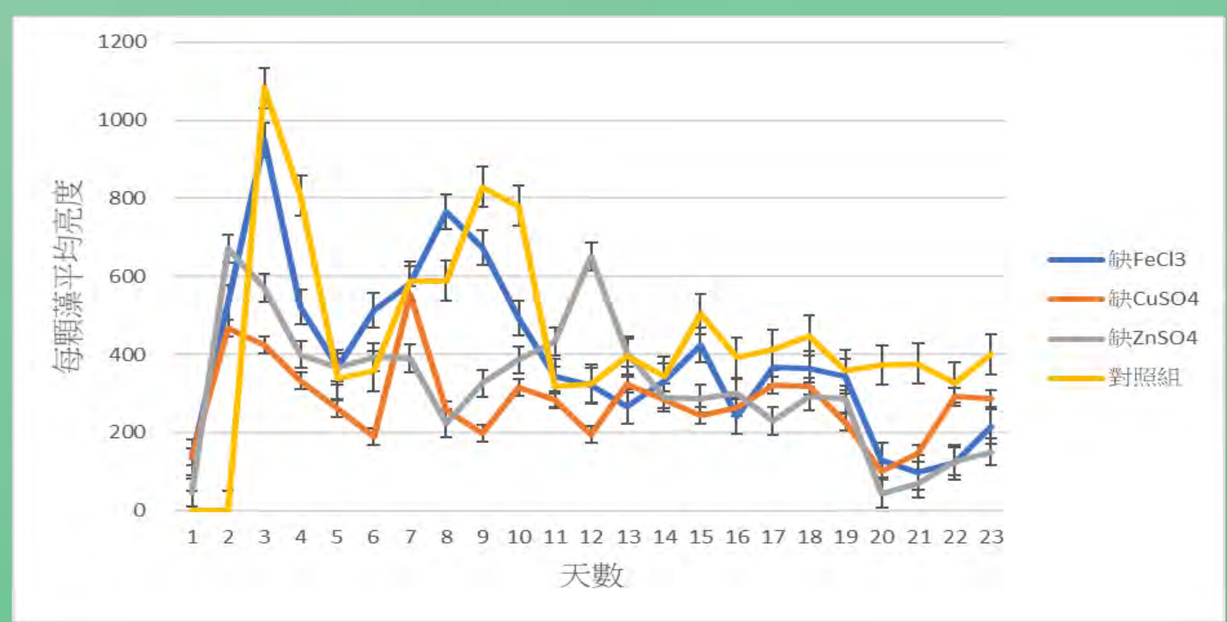
繪製*P. lunula*生長曲線



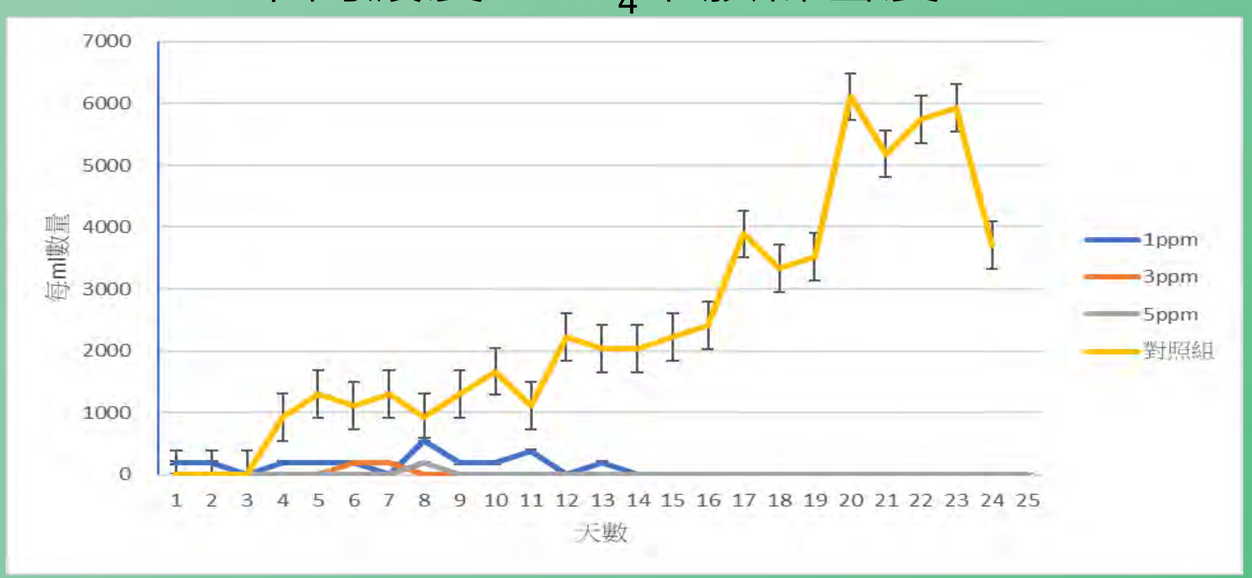
鐵、銅、鋅營養鹽缺乏下族群密度



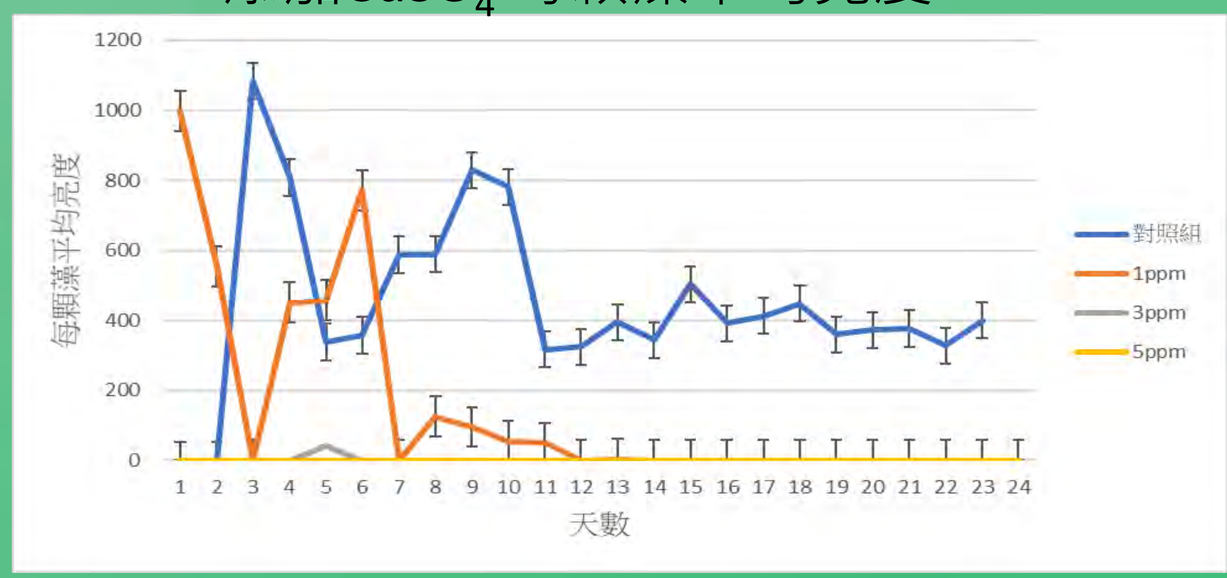
養分缺乏下每顆藻平均亮度



不同濃度$CuSO_4$中族群密度

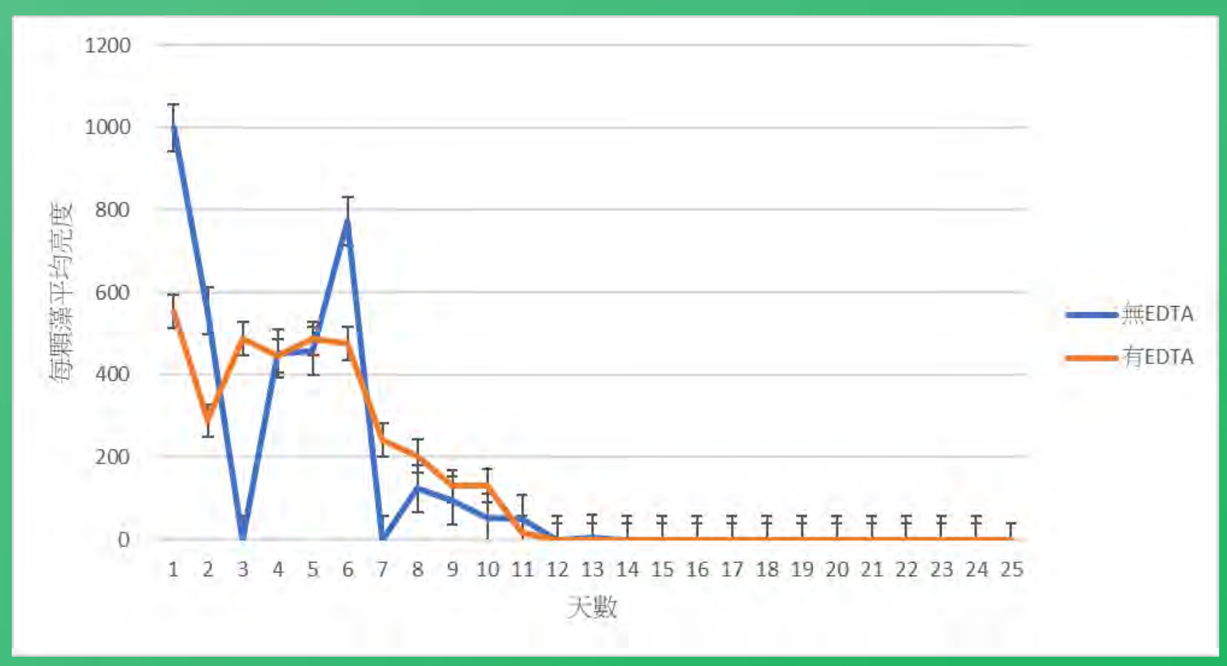


添加$CuSO_4$ 每顆藻平均亮度

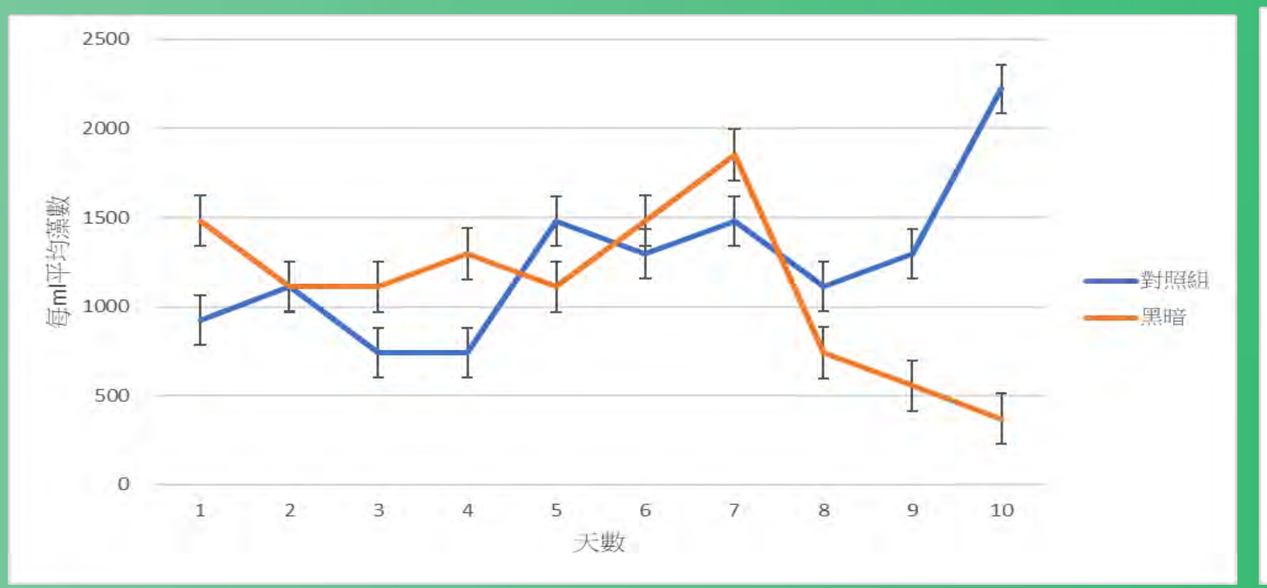


添加EDTA族群密度

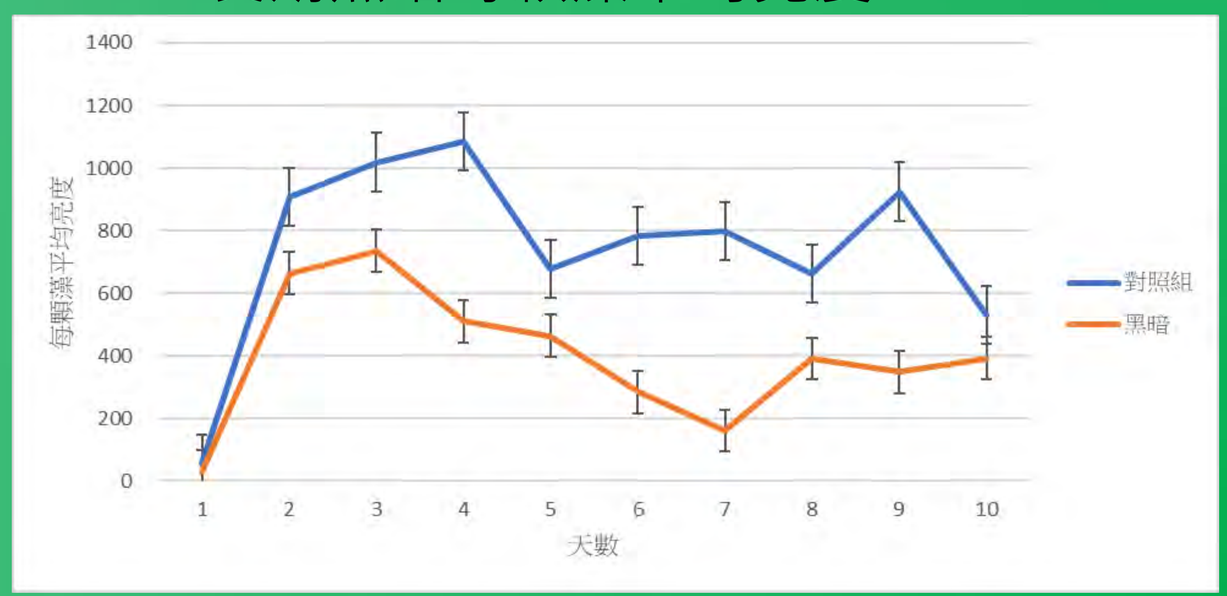
添加EDTA每顆藻平均亮度



長期黑暗族群密度



長期黑暗每顆藻平均亮度



陸、討論

一、*P. lunula*受同樣物理擾動時所產生螢光亮度隨時間改變，且個體間發光現象持續時間不一致，因此無法得知單一培養液中所有個體同時產生螢光之亮度，故於後續實驗選擇以各單位時間最大亮度作為該族群總亮度代表。此外，於亮度變化圖中可見螢光消退時亮度變化所成函數呈遞減，而非直接降為零，推測原因亦為個體間發光現象持續時間及時機不一所致。

二、*P. lunula*族群中個體總量變化符合細菌於密閉環境中培養之生長曲線。初加入培養基時，*P. lunula*仍在適應新加入的培養基，數量未上升，為遲滯期(lag phase)；個體總量於第二天後開始上升，顯示*P. lunula*開始適應新加入培養基並進入指數期(log phase)；接著於第十九天後個體總量呈動態平衡，並漸趨定值，顯示已達最大環境負載量，為靜止期(stationary phase)；二十二天後族群總量開始下降，推測為代謝廢物累積無法排除所致，開始進入死亡期(death phase)。

三-1、依據實驗結果可知，三組實驗組中*P. lunula*族群個體數量變化以第十七天做分界可略分做兩時期，第十七天前，三組實驗組個體總量皆與對照組差距不顯著，推測為由於營養鹽缺乏培養基於實驗開始時才加入原培養液中，故實驗進行時仍殘留原培養液中所剩營養鹽。第十七天後，缺少銅離子組個體數量已無繼續上升，並於第二十一天後開始下降，推測為原培養液中銅離子已消耗殆盡，從而降低最大環境負載量；缺少鋅離子組別與對照組差異較銅離子組別不顯著，但進入靜止期時數量仍小於對照組，推測鋅離子的缺乏亦可能使*P. lunula*族群個體總量限縮；缺少鐵離子組別個體數量與對照組差異不顯著，故可推知鐵離子的缺乏對於*P. lunula*族群個體總量影響較不明顯。

三-2、前十六天三組實驗組*P. lunula*之螢光平均亮度與對照組差異並不顯著，直至第十六天後平均亮度始得下降，推測原因為金屬營養鹽缺乏，加之無外部營養鹽補充所致。此外，於第十三天前螢光亮度變化呈現較大波動原因推估為細胞數量過少，造成計算平均亮度時誤差過大，故呈現變化幅度大之情形。

四-1、所有實驗組的個體數目均於15天內降至零。然而若培養液中缺乏銅離子亦會限縮*P. lunula*最大族群個體數，故可推測銅離子雖為*P. lunula*維持生存所需金屬鹽，但濃度過高亦可對其生長產生抑制效果。

四-2、銅離子亦會抑制*P. lunula*所產生生物發光現象，且效果顯著。此外，1ppm實驗組別於第二天至第十一天時，其亮度變化幅度大，推測為族群中個體數大量減少，使計算平均亮度時產生誤差過大所致。

五-1、EDTA可抑制銅離子對*P. lunula*毒性，但與未加入銅離子組別相比，其族群中個體總數仍偏低，推測原因為EDTA雖與銅離子形成螯合物，但所產生EDTA-銅仍對*P. lunula*存在毒性，故族群中個體數量較無加入銅離子組別小。

五-2、加入EDTA組別與未加入EDTA組別差異不顯著，推測原因亦為EDTA-銅之毒性抑制*P. lunula*所產生之發光現象。我們推測是因為產生螢光的作用，或也受到銅離子的抑制其發光機制，只要環境中Cu2+的濃度超出了生命所能耐受的濃度，就會迅速對螢光亮度產生影響。雖然已使用毒性較低的EDTA銅，但仍將新月梨形藻螢光亮度降低至和無添加EDTA的組別沒有明顯區別的程度。由於螢光發光機制對汙染物的靈敏度，在不殺死細胞濃度下，就能使新月梨形藻的螢光減弱。

六-1、於無法行光合作用狀態下，仍可存活數日。第七天後，黑暗組族群中個體數大幅下降，推測為於原先環境所儲存營養用罄所致。

六-2、黑暗組別中*P. lunula*所產生螢光亮度較對照組低，但仍具備產生螢光能力，推測發光能力為生存所需，故即使處於營養貧乏狀態仍須具備發光能力。換言之，若此推論屬實，則可推知*P. lunula*所具備發光能力的原因可能和其他甲藻相同，屬防禦掠食者機制中一環。

陸、結論

於本實驗中，可得知新月梨甲藻發光持續時間短，故可依此優勢製成只需短暫發光能力且無法時常接觸陽光之螢光產品，例如：鬧鐘刻度的顯示燈及螢光棒。此外，如長時間黑暗實驗結果所示，若新月梨甲藻於短時間內無照光，不會造成族群數量銳減。實驗中亦測試新月梨甲藻於金屬離子缺乏及銅離子毒性等逆境下，所產生反應。前者可作為無法提供足夠金屬離子的培養依據，後者則可將此結果用於環境中毒物監測及試驗。期待未來能進一步探知螢光藻於實際應用之理論基礎，以作為後人開發此領域的基石。