

中華民國第 59 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

佳作

052605

以衣藻探討 DEET 對環境初級生產者的影響

學校名稱：國立臺南女子高級中學

作者： 高二 黃鈺喬 高二 申翊萱	指導老師： 李碧芬
---------------------------------	------------------

關鍵詞：DEET、衣藻、新興污染物

摘要

環境中有許多「新興污染物」，防蚊液的有效成分 DEET 便是其中一種。過去對 DEET 的研究，以動物與人類細胞為主，較少關注藻類。藻類是水域的初級生產者，是消費者的食物來源，對環境來說相當重要。本研究以模式生物衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*) 進行實驗，探討 DEET 對環境初級生產者的影響效應。結果發現：1. 加入最高濃度 768mg/L 的 DEET，至多 3 小時，細胞就會增加 ROS。2. 加入 DEET 後，至多 5 小時，細胞鞭毛會變短甚至消失，以至於影響細胞的行動力。3. DEET 濃度 192mg/L 以上，衣藻細胞 72 小時的急毒反應會出現明顯的生長抑制狀況。本研究同時也比較細胞壁的有無與 DEET 影響的關係，發現細胞壁有利於提高衣藻對於 DEET 的耐受度。一般文獻對細胞壁與污染物毒性之間關係的探討較少，這是本實驗的重要研究成果。

壹、研究動機

在《基礎生物》(下)的第六章我們曾學到生態學的基本原理，也初步了解人類對環境的影響；而在《應用生物》第肆主題當中，再次關注到環境污染物質對生物的傷害問題。課本中主要提到工業重金屬和環境賀爾蒙等物質對生物的影響，但除此之外，現今於日常消費、健康醫藥等活動下，也會產生許多有別於傳統工業的污染物與化合物，我們稱之「新興污染物」。新興污染物 (Emerging Contaminants) 主要為「新認定或之前未確認」、「未受法規規範」、「且對人體健康及生態環境具有風險性」的化學污染物，此類污染物通常經由人類活動（包括：工商業、農業、醫療場所、製藥廠，甚至一般家庭生活等）所產生且不容易於環境中分解。¹這些新興污染物在環境中的濃度即使不高，但仍然會對各類生物有所影響。

在眾多新興污染物當中，防蚊液是生活中最常見，也是隨手可得的一種，尤其臺南曾在 2015 年因登革熱造成嚴重的疫情，當時甚至出現 200 多起的死亡病例，因此防蚊、滅蚊成了政府和市民每年夏天的共同行動。雖然防蚊液品牌眾多，但根據 2002 年《新英格蘭醫學雜誌》(New England Journal of Medicine) 上的一項研究顯示：僅有含 DEET 成分者才能有效驅蚊。DEET，即是待乙妥 (*diethyltoluamide*) 的縮寫，又稱敵避、敵避胺、避蚊胺。它在使用上的安全性一直是人們關注的重點，但因是一般民眾廣泛使用的化合物，

¹ 新興污染物定義。見國立中山大學新興污染物研究中心網頁 <http://www2.nsysu.edu.tw/cecr/source.htm>，查閱日期：2018.1.21

並曾在環境的水樣本中測得，對環境的影響甚大，所以本研究針對 DEET 作為新興污染物質的研究項目。

過去針對 DEET 的研究，從遺傳學、細胞學到毒理學，大多以動物與人類細胞的實驗為主，較少關注在自營生物藻類上。微藻是水域中的初級生產者，不僅能固定二氧化碳與製造氧氣，也是消費者的食物來源，對環境來說相當重要。而藻類所處的水域環境，向來是最沉默的容受者，人類慣常將廢棄物排放到水裡，理所當然地以為水流會帶走一切，因此，水域環境中自然不乏這些新興的污染物質。然而聯合國在 2016 年所提出的 17 項永續發展目標(SDGs)中，就有兩項與水資源相關，可知水域環境的生態關懷是未來地球環境很重要的議題。





因為上述種種動機，故本研究以模式生物單胞藻衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)來進行實驗，探討新興污染物質 DEET 對環境中水生自營生物的影響效應為何。接下來將藉由一連串的實驗來探究之。




貳、研究目的




- 一、測試所選定之新興污染物質 DEET 對於衣藻參考品系 cc-4533 的生長影響，以判斷衣藻對 DEET 的耐受度
- 二、觀察新興污染物質 DEET 對衣藻參考品系 cc-4533 外觀型態與行動之影響
- 三、測試衣藻參考品系 cc-4533 加入新興污染物質 DEET 之後，是否造成活性氧化物質 ROS 的增加
- 四、測試衣藻細胞壁的有無對於新興污染物質 DEET 所造成的影響是否具有作用

參、研究設備及材料

一、研究設備

			
DEET	TAP	pipette 微量吸管	Tip

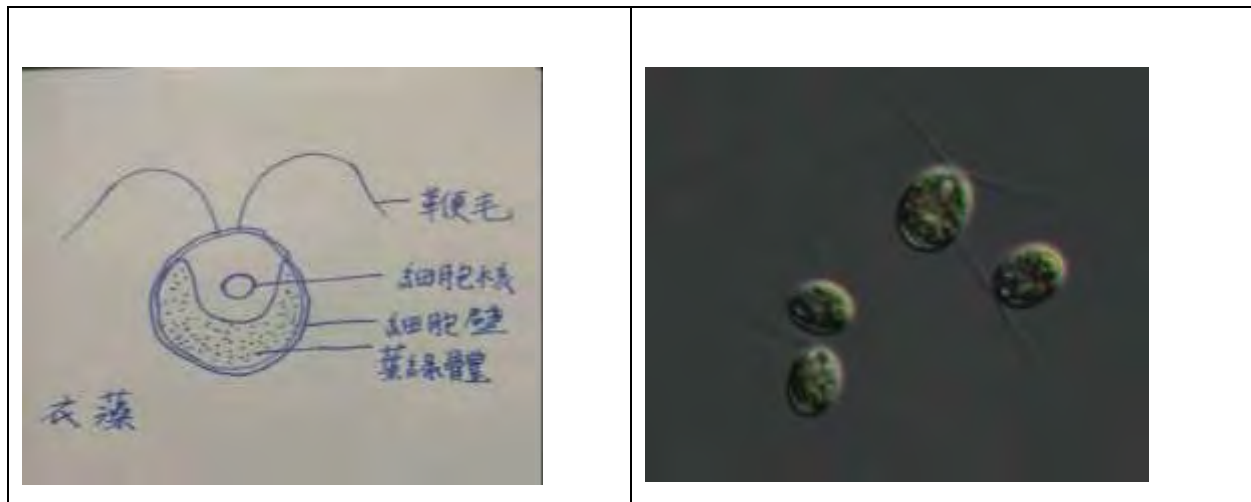
			
分光光度計	離心機	酒精燈	培養皿
			
血球計數器	接種環	24 well plate	倒立顯微鏡
			
比色管	50ml 離心管	染色劑 Lugol' s	1.5ml 微量離心管
			
Shaker	光版	酒精	ddH2O

			
趨光板	多功能螢光檢測機	DIC 顯微鏡	

二、研究名詞定義

(一) 模式生物-衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*)

利用某種生物所研究出來的細胞運作原理或是調控機制，類推到其他生物體系，這種拿來當作研究對象的生物，就是一種當作範例的模式生物(model organism)。本次實驗的主要對象衣藻為真核生物的單胞藻，屬於綠藻門衣藻屬。外觀呈圓球形或橢圓形，直徑大小約為 7 微米到 10 微米，具有兩條明顯的等長鞭毛，可借鞭毛的擺動而游動，且有高效率的光合作用和生長能力。因可簡單大量培養，易做基因改造，所以成為實驗中標準的遺傳學模式生物之一，目前已有各種不同性狀的突變品系，可供實驗使用。



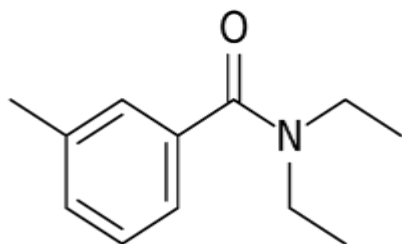
圖一 衣藻的型態與構造示意圖及顯微鏡下的衣藻

藻類在生態上被稱為初級生產者，在水域環境中，它提供初級消費者(動物)的食物，它供應水生生物所需要的氧氣和食物，在生態系中的角色不可被取代。藻類生長在水中，

水中的物理和化學環境都會影響它的生長。由於藻類是第一個反應污染物進入水中的生物，其承受的反應是直接的，因此，早在二十世紀初藻類即被應用為水質指標之一。藻類的多寡可看出生態被影響的狀態，故本研究以模式生物衣藻來進行探討。

(二) DEET(N,N-diethyl-meta-toluamide)

待乙妥 (*diethyltoluamide*) 的縮寫，又稱敵避、敵避胺、避蚊胺，化學式為 $C_{12}H_{17}NO$ ，化學結構如下：



DEET 是一種淡黃色的液油狀物體，微溶於水，帶有些許氣味，可能會溶解某些塑膠、人造纖維或皮革。是經科學驗證具驅蚊效能的化學物質，早在 1950 年代就開始在國際上使用，目前臺灣的管理定位是屬於「環境用藥」和「藥品」，可噴灑於居家環境如紗窗、紗門上，或於戶外登山、露營時，噴灑於帳篷，但避免噴灑於皮膚、衣物上，尤其皮膚有傷口或過敏時。根據 WHO 建議，針對兩個月大以上的孩童及成人可選用 $\leq 50\%$ 濃度的 DEET，而小於兩個月以下的嬰兒應使用 $\leq 10\%$ DEET 的防蚊藥品。²過去針對 DEET 的研究，從遺傳學、細胞學到毒理學，大多以動物與人類細胞的實驗為主，較少關注在自營生物藻類上。

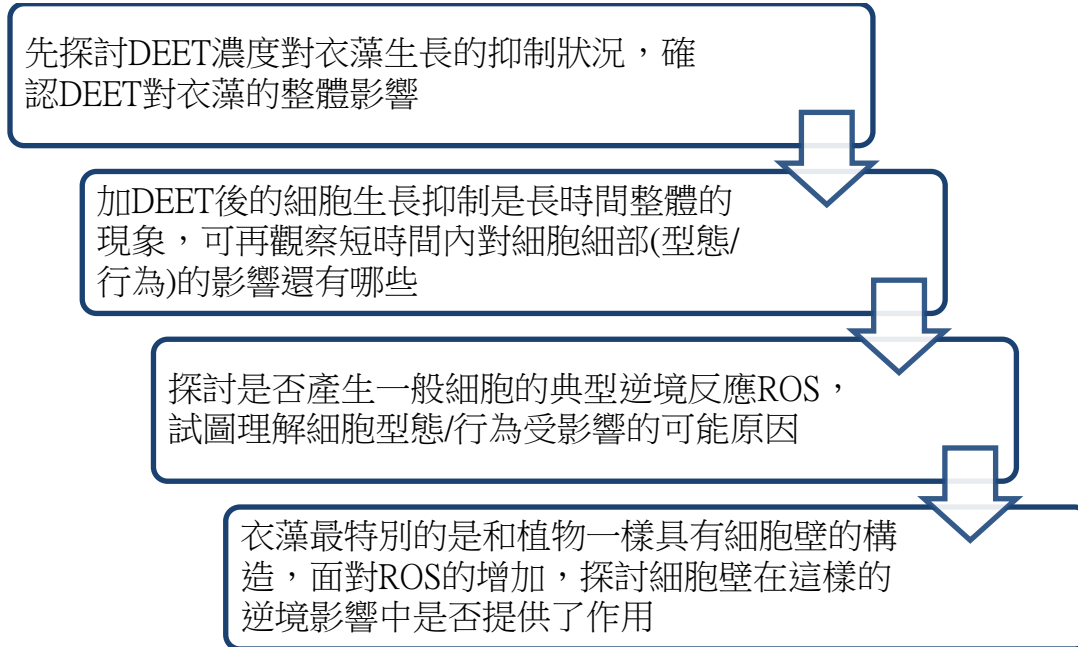
(三) 細胞內活性氧物質(reactive oxygen species)

細胞內的活性氧化物(reactive oxygen species，以下簡稱 ROS)，是生物有氧代謝過程中的一種副產品，包括氧離子、過氧化物和含氧自由基等。這些粒子相當微小，但過量的 ROS 會破壞體內抗氧化防禦系統的恆定性。一般的生物逆境和非生物逆境的時候，常常會引發細胞的 ROS 氧化活性分子的產生，這是生物典型的逆境反應。

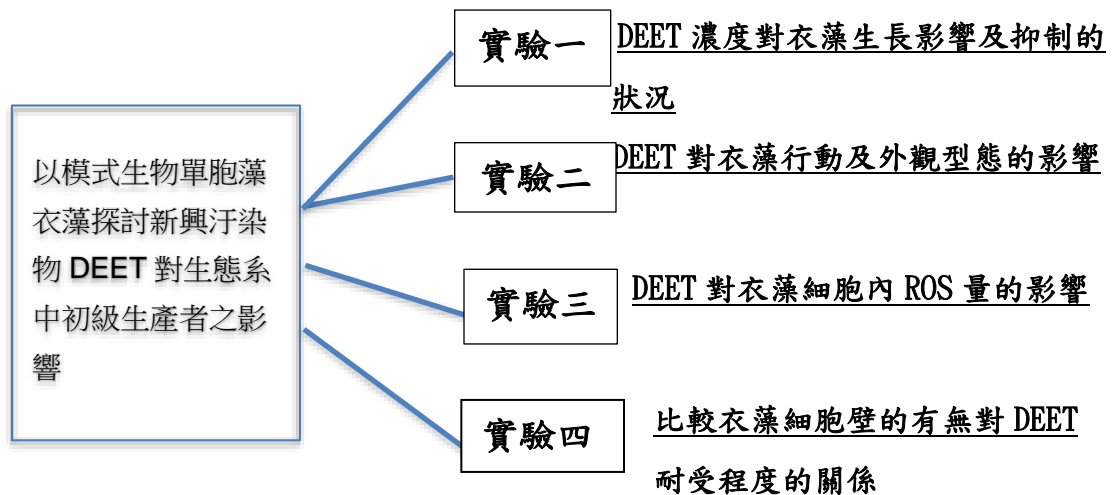
² 參考自衛生福利部疾病管制署網站：<https://www.cdc.gov.tw/>，參閱時間：2018.1.21

肆、研究過程或方法

本研究的實驗設計概念和進程如下：



故本研究主要藉由以下四項實驗的進行，來探討研究主題：



由於這四項實驗均須使用到液態培養基 TAP，以及衣藻細胞計數的方法，故於下方先就這兩部分做說明。

一、液態培養基 TAP 配製 (500ml) 和衣藻的培養

TAP 是培養衣藻的溶液，以下列成分配製：

名稱	用量
Tris	5ml
Solution A	5ml
Phosphate buffer	0.5ml
Hunter's trace elements	0.5ml
ddH ₂ O	~500ml

調配好的液態培養基 TAP 即是用來培養實驗用衣藻的，培養基配製好後，把細胞放在攝氏 22°C 恆溫的環境中，搖晃培養。衣藻雖有鞭毛會運動，但是它也有細胞壁和葉綠體，是能行光合作用自己合成養分的自營生物，因此需要有光照，讓衣藻可以自行生長分裂。所以溶液看來是透明稍帶一點點淡淡的綠色。等到後來細胞濃度高數目多了，就會呈現濃濃翠綠色。



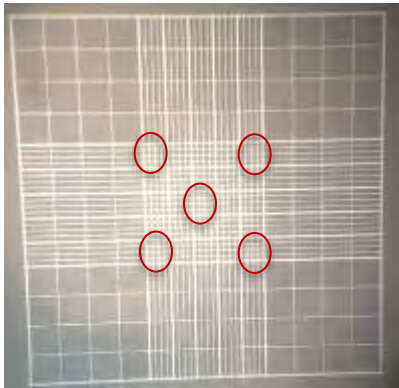
圖二 液態培養基 TAP 和衣藻的培養

二、衣藻細胞計數的方法

實驗中須透過對衣藻細胞數量的確定，來作為實驗的依據，而要計算細胞數量，則是運用血球計數器來處理，操作步驟為：

- (一) 從液態藻液中吸取 100 μ l 的衣藻到 1.5ml 微量離心管中，再吸取染色劑 10 μ l 均勻混合。

(二) 吸取 $10\ \mu\text{l}$ 染色後的細胞於血球計數器上，計算部分格子（如下圖），取其平均值，每格體積為 $0.2\text{mm}\times 0.2\text{mm}\times 0.1\text{mm}$ 。



圖三 血球計數器的計算方式

以下為各項實驗的研究過程和步驟，包含一項「預備實驗」及四項「正式實驗」：

三、預備實驗：衣藻細胞吸光值與細胞數的測量

由於實驗過程中每一項實驗的細胞數量都要進行三重覆實驗而且測量三次，利用血球計數器來計數衣藻細胞非常繁複而細瑣，所以我們利用細胞的數量和細胞吸收光的吸光值有一定關係的基礎，以吸光值的高低來代表細胞的數量，作為之後實驗中計算細胞數量的替代方法。

但要將之後的實驗皆以測量吸光值的方法帶入兩者的對照關係來換算細胞數量，必須先確認兩者確切的關係為何，所以要先檢驗吸光值和細胞數量之間是怎樣的關係，因而有此預備實驗。

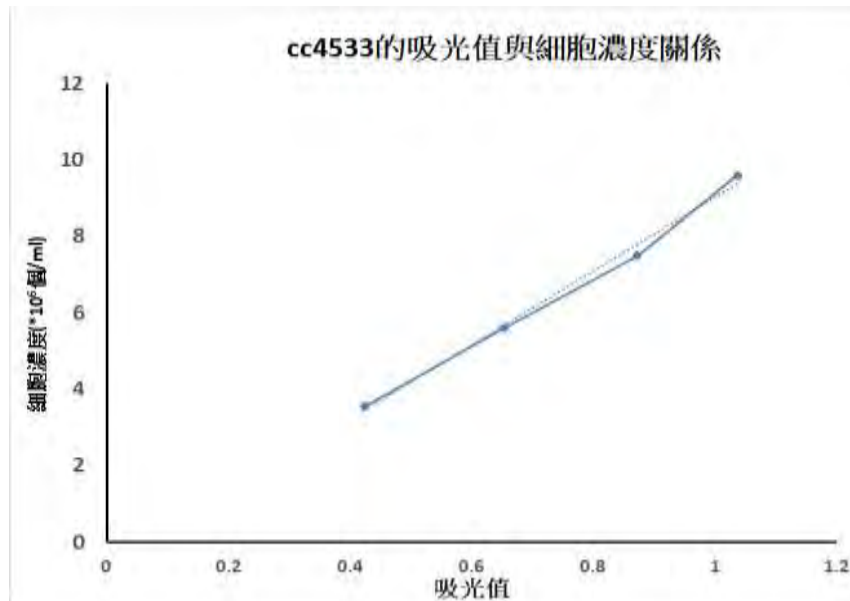
大致上我們要先針對不同濃度的細胞，去測量它們的吸光值是多少，同時計算細胞數量是多少，之後再透過對照圖形，確定兩者間有一直線的關係，後續便可利用吸光值來代替細胞數量，用吸光值來呈現實驗結果。

(一) 取出培養箱中於培養皿養殖數天的 cc4533 細胞，並取出 1ml 至比色管，放入分光光度計中，以波長 750nm 測量其吸光值。

(二) 從分光管中吸取細胞依上述方法「二、衣藻細胞計數的方法」步驟算出細胞數。

(三) 依照 $1/4$ 倍稀釋，重覆（一）、（二）的步驟，分別測量出 10^6 個細胞的 1 、 $3/4$ 、 $2/4$ 、 $1/4$ 倍四種濃度的吸光值和細胞濃度的關係。

(四) 得出下面的關係圖：



圖四 衣藻參考品系 cc4533 的吸光值與衣藻細胞濃度關係表

由上圖(四)可看出：衣藻吸光值在 0.4 至 1.1 的區間，與細胞數量之間的關係重疊為一直線，確認兩者一致性後，在本研究後續的實驗中，便可利用吸光值的測量來代替細胞數量。

四、實驗一 測試衣藻對 DEET 有明顯反應的濃度

(一)實驗目的：

測試衣藻參考品系 cc-4533 對於 DEET 有明顯反應的濃度，也就是看 DEET 濃度對衣藻的影響，而判斷依據則是看衣藻的生長受到抑制的狀況，我們的檢測終點是 72 小時的細胞濃度，希望確認 DEET 的何種濃度，是對衣藻細胞有明顯的抑制效果。

(二)實驗步驟：

本實驗預設進行時間為 72 小時，屬於急性毒物反應時間。設定 DEET 濃度分別為 0、24、48、96、192、384、768(mg/L)，是因為一般文獻資料顯示，濃度 24 mg/L 以上對生物才有影響，遂以 24mg/L 為基準，以兩倍數加乘上去。

1. 從固態培養基中使用接種環取適量衣藻加入液態培養基的培養皿，放置於 22°C 培養箱的 Shaker，使其生長至肉眼判斷足夠的量。

2. 取出培養數天的細胞算出每毫升細胞數，並取 10^6 的細胞於 24 孔盤中的每個孔洞。
3. 將每一孔洞用 1ml 扣除衣藻和 DEET 的體積後，加入對應的液態培養基，將總體積配成 1ml。
4. 分別取濃度 0、24、48、96、192、384、768(mg/L) 的 DEET，以三重覆的方式加入每個孔洞中所需的體積。

配置比例如下圖：

DEET 濃度(mg/L)	衣藻	DEET (μ l)	TAP
0	每毫升 10^6 個	0	To 1ml
24	每毫升 10^6 個	0.048	To 1ml
48	每毫升 10^6 個	0.096	To 1ml
96	每毫升 10^6 個	0.192	To 1ml
192	每毫升 10^6 個	0.384	To 1ml
384	每毫升 10^6 個	0.768	To 1ml
768	每毫升 10^6 個	1.536	To 1ml

5. 將加好 DEET 的 24 孔盤用石蠟封條貼好後，放置於 22°C 培養箱的 Shaker，放置 72hr。
6. 觀察方式以第 0 天起點細胞數量的多少，分別比較加 DEET 與不加 DEET，72hr 後細胞數量各自增加的情況。

五、實驗二 觀察 DEET 對衣藻細胞外觀和行為的影響

(一)實驗目的：觀察在不同濃度的 DEET 處理之下，對細胞會有怎麼樣的影響。從較易觀察到的細胞外觀型態與運動狀態來探討。想進一步確認 DEET 除了對衣藻整體生長有所抑制之外，對衣藻其他方面的影響情況為何。

(二)實驗步驟：

1. 從固態培養基中使用接種環取適量衣藻於加入液態培養基的培養皿，放置於 22°C 培養箱的 Shaker，使其生長至肉眼判斷足夠的量。
2. 取出培養數天的細胞算出每毫升細胞數，並取 10^6 的細胞於 24 孔盤中的每個孔洞。
3. 將每一孔洞用 1ml 扣除衣藻和 DEET 的體積後，加入對應的液態培養基，將總體積配成 1ml。
4. 取濃度 0、192、768(mg/L) 的 DEET，以每個濃度三重覆的方式加入孔洞中，混合均勻。
5. 將加好 DEET 的 24 孔盤用石蠟封條貼好後，放置於 22°C 培養箱的 Shaker，培養 24hr。
6. 將有正方形孔洞的鋁箔紙放在光板上。
7. 取出放培養 24hr 的衣藻，將 24well plate 放在鋁箔紙上（孔洞位置避免放置於正中心，否則無法判斷衣藻聚集是因為沉澱或是趨光），蓋上黑色紙箱，放置五分鐘。
8. 五分鐘後將紙箱移走，並將 24well plate 置於白板上，觀察趨光變化。
9. 趨光實驗之外，又加不同濃度的 DEET，以低倍數顯微鏡觀察 3 至 5 小時的短時間效應，來確認細胞活動力。
10. 再以 DIC 高倍數顯微鏡觀察衣藻細胞，看細胞外觀型態是否有受到影響。



圖五 操作 DIC 顯微鏡觀察衣藻細胞的型態和運動狀況

六、實驗三 DEET 對衣藻細胞內 ROS 量的影響

(一)實驗目的：ROS 的產生是細胞在遭遇逆境時會出現的現象，所以本實驗將測驗衣藻遇到 DEET 時，是否也會出現這種生物典型的逆境反應。故以衣藻可忍受之濃度的 DEET 處理後，測試是否會造成衣藻參考品系 cc-4533 細胞中活性氧化物質 ROS 的增加。

(二)實驗步驟：

1. 從固態培養基中使用接種環取適量衣藻於加入液態培養基的培養皿，放置於 22°C 培養箱的 Shaker，使其生長至肉眼判斷足夠的量。
2. 取出培養數天的細胞算出每毫升細胞數，並取 10^7 個的細胞於 24 孔盤中的每個孔洞。
3. 將每一孔洞用 1ml 扣除衣藻和 DEET 的體積後，加入對應的液態培養基，將總體積配成 1ml。
4. 取濃度 0、192、768(mg/L) 的 DEET，以每個濃度三重覆的方式加入孔洞中，混合均勻。
5. 將加好藥的 24 孔盤用石蠟封條貼好後，放置於 22°C 培養箱的 Shaker，放置培養 3hr 和 5hr。
6. 取出放置培養 3hr 和 5hr 的衣藻，將 24well plate 中每孔洞的衣藻吸 1.5ml 微量離心管，放入離心中以 3000rpm.730xg 的離心機中，離心 2 分 30 秒。
7. 取出微量離心管，將上清液吸掉，再加入 TAP 至 1ml。
8. 加入螢光劑 DC-FDA 使其濃度為 $10 \mu M$ 避光放置 30 分鐘。
9. 將 1.5ml 微量離心管放入離心機以步驟 6 重複三次。
10. 將 TAP 及每管藻液各取 $200 \mu L$ 放入黑色測量盤中，每管重複加入三次，接著放入螢光檢測機中檢測。

七、實驗四 衣藻細胞壁對 DEET 耐受程度的關係

(一)實驗目的：藻類和植物等光自營生物的特點是具有細胞壁與可以行光合作用，細胞壁對於化學物質的生理影響扮演何種角色卻少有人探討。前人的研究中發現衣藻具有細胞壁缺失的突變株，故以這項特點，來探討細胞壁是否會影響衣藻對 DEET 的耐受程度。

(二)實驗步驟：

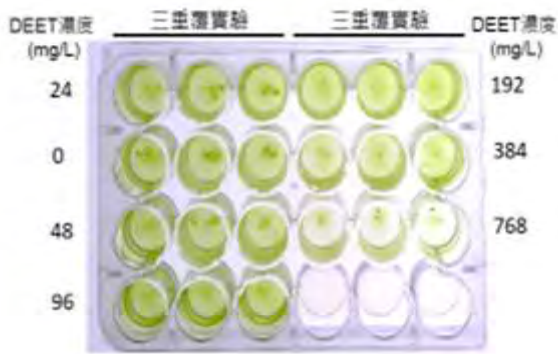
1. 採用 cc-4533、cw-15（皆為細胞壁缺陷），cc125、21gr（皆有細胞壁）四種細胞。
2. 從固態培養基中，使用接種環取適量衣藻於加入液態培養基的培養皿，放置於 22°C 培養箱的 Shaker，使其生長至肉眼判斷足夠的量。
3. 取出培養數天的細胞算出每毫升細胞數，並取 10^6 的細胞於 24 孔盤中的每個孔洞。
4. 將每一孔洞用 1ml 扣除衣藻和 DEET 的體積後，加入對應的液態培養基，將總體積配成 1ml。
5. 分別取濃度 0、192、384、768(mg/L) 的 DEET，以三重覆的方式加入每個孔洞中所需的體積。
6. 將加好 DEET 的 24 孔盤用石蠟封條貼好後，放置於 22°C 培養箱的 Shaker，放置 72hr。

伍、研究結果

一、實驗一 測試衣藻對 DEET 有明顯反應的濃度

本實驗以衣藻的生長受到抑制的狀況為判斷依據，來測試衣藻參考品系 cc-4533 對於 DEET 有明顯反應的濃度。

下圖右側為依序加入不同濃度的 DEET 後(192、384、768mg/L)，明顯得見顏色由深到淺，表示細胞濃度由高到低，可知細胞的生長在加入不同濃度 DEET 後有不同的抑制效果，且 DEET 濃度越高，抑制效果越明顯。而實驗結果也顯示，DEET 必須達較高濃度時，肉眼可見衣藻的細胞密度才有明顯的差異。

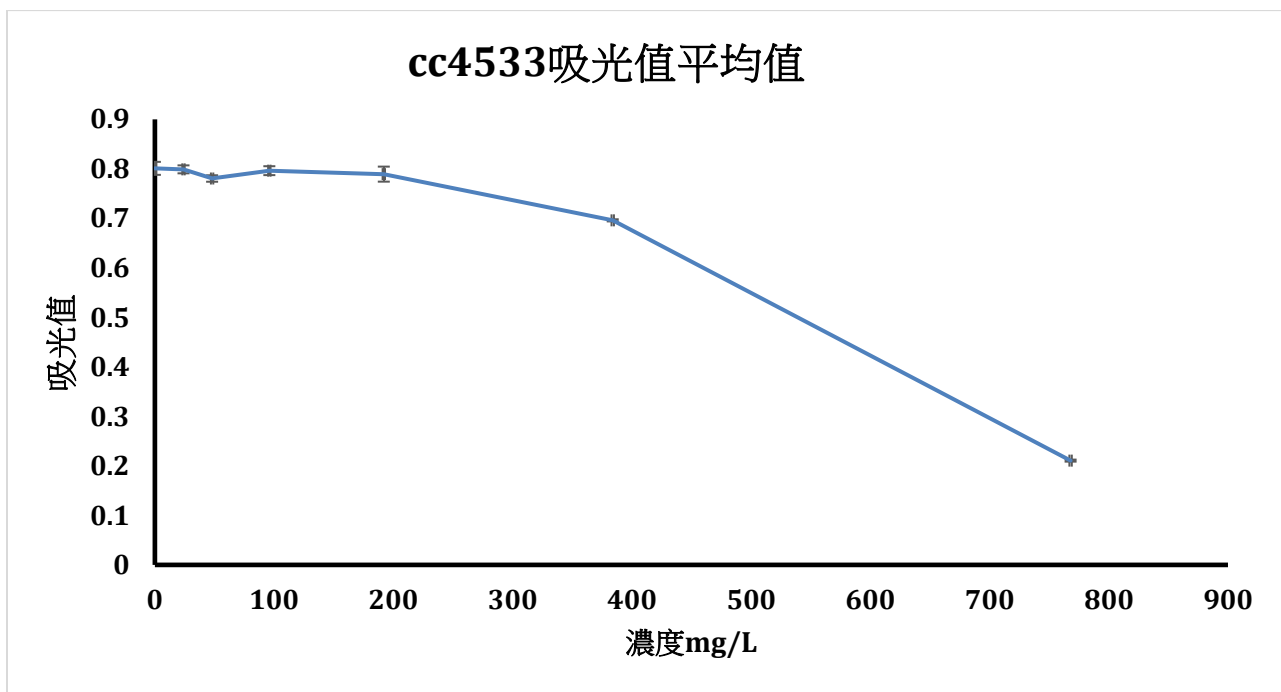


圖六 不同 DEET 濃度下細胞生長的狀況(N=3)

由下方細胞吸光值折線圖可知在加入 DEET 72hr 後，cc-4533 在 0~192mg/L 的細胞吸光值並無太大變化，而濃度 192mg/L 之後吸光值呈現下降的趨勢，表示其細胞可能分裂減緩或不分裂或死亡，可知細胞生長受到抑制，因此可以判斷 DEET 濃度高於 192mg/L 才可能對細胞有顯著影響。

由此結果，當我們選擇濃度為 0、192、384、768mg/L 的 DEET 進行「衣藻細胞壁是否會影響衣藻對 DEET 的耐受程度」這項實驗，衣藻對 DEET 有明顯反應差異的濃度，至少要在 192mg/L 以上。

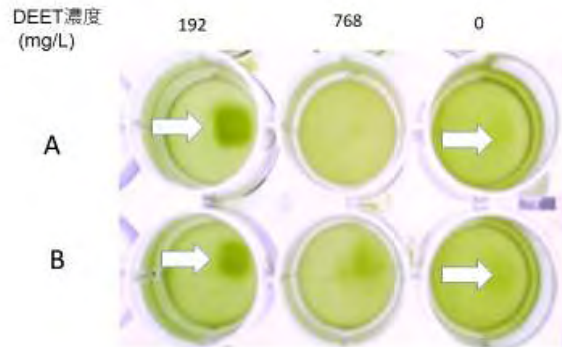
而且即使在較高濃度的 DEET 下，衣藻細胞生長雖受到抑制，但並非大量立即死亡，可見衣藻對於 DEET 有一定程度的耐受性。



圖七 細胞吸光值在 DEET 濃度 192mg/L 之後明顯的下降趨勢(N=3)

二、實驗二 觀察 DEET 對衣藻細胞外觀和行為的影響

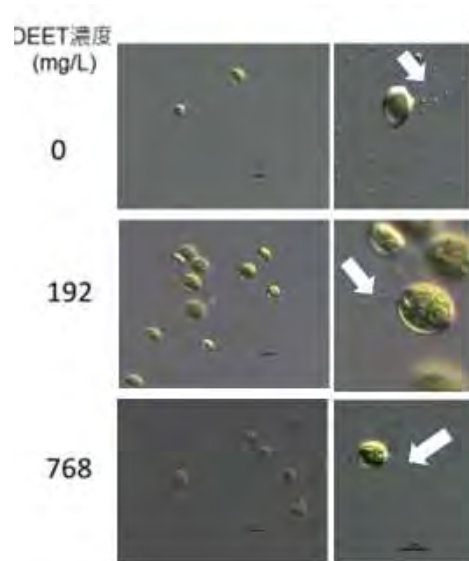
本實驗測試加入 DEET 後，觀察衣藻運動行為中的趨光情況有無改變，前三小時的觀察並無變化，但加入 DEET 第五小時的觀察則發現如下圖八所示，左至右 DEET 濃度分別為 192、768、0mg/L，濃度 0 和 192 mg/L 時如箭頭所示有趨光效果，但濃度 768mg/L 則無顯示趨光狀態。



圖八 趨光實驗的結果(N=2)

但不確定此時的無趨光反應，是因為趨光反應能力受阻，還是因為細胞行動力受影響，於是我們先以低倍率顯微鏡確認衣藻細胞的活動狀態。

首先，以低倍數顯微鏡觀察加入 DEET 3 小時細胞型態在不同濃度的 DEET 影響下，仍保有活動力，以高倍率 DIC 顯微鏡細部觀察，細胞行動與外觀尚未發生變化，見下圖九。



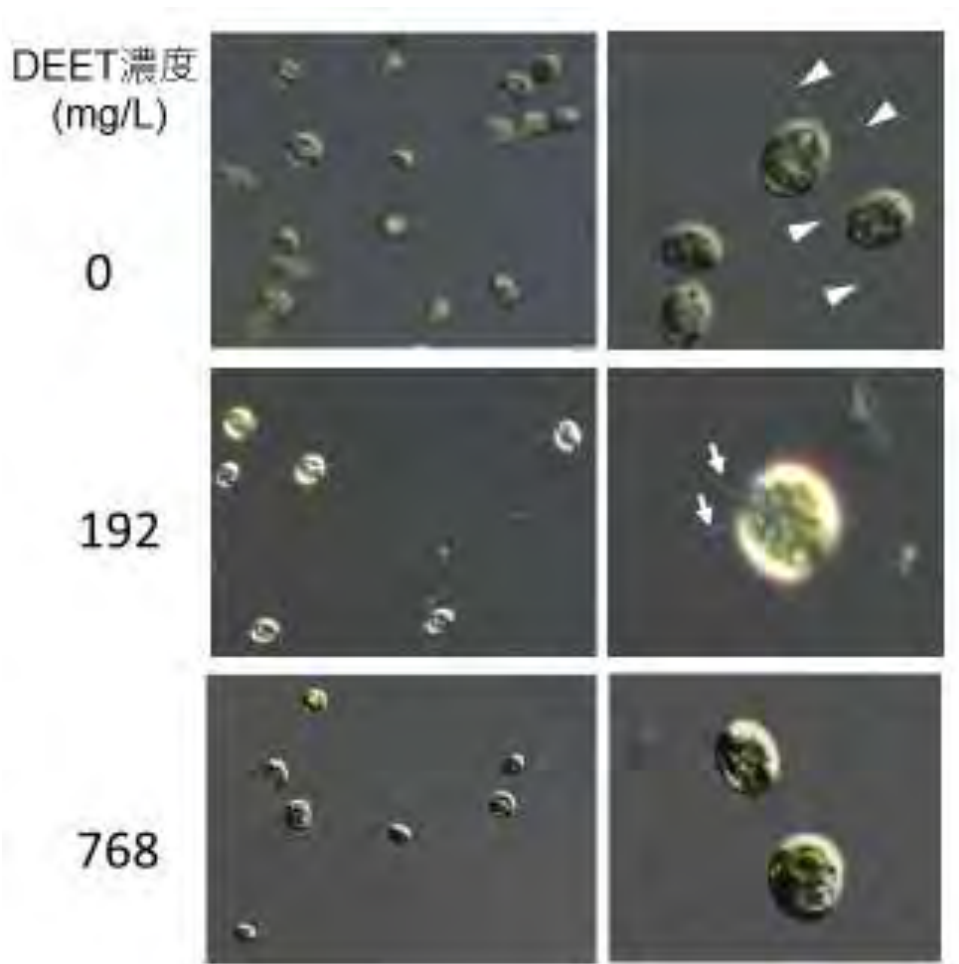
圖九 加入不同濃度的 DEET，3 小時的衣藻外觀型態和運動狀況尚無變化

但在以低倍數顯微鏡觀察加入 DEET 5 小時後的短時間效應，發現絕大多數細胞不游動，為了瞭解造成細胞不能運動的原因是什麼，我們以高倍率 DIC 顯微鏡細部觀察，了解衣藻外觀型態的情形，並找出細胞行為受影響的可能原因。發現 5 小時後，在不同濃度的 DEET 影響下，細胞出現不同的發展。最明顯的影響，就是細胞的活動力與鞭毛型態發生變化。我們從下方三種濃度實驗的觀察可知：

(一) 濃度 0mg/L 時，左圖：細胞數量多且活動力強；右圖：細胞外觀型態構造完整，鞭毛完整無缺，如箭號所示。

(二) 濃度 192mg/L 時，左圖：活動力近乎無；右圖：大部分細胞鞭毛明顯變短或斷裂，如箭號所示，不容易看見鞭毛。

(三) 濃度 768mg/L 時，左圖：無法活動；右圖：絕大多數細胞就只有呈現圓形外觀，鞭毛完全斷裂或消失。



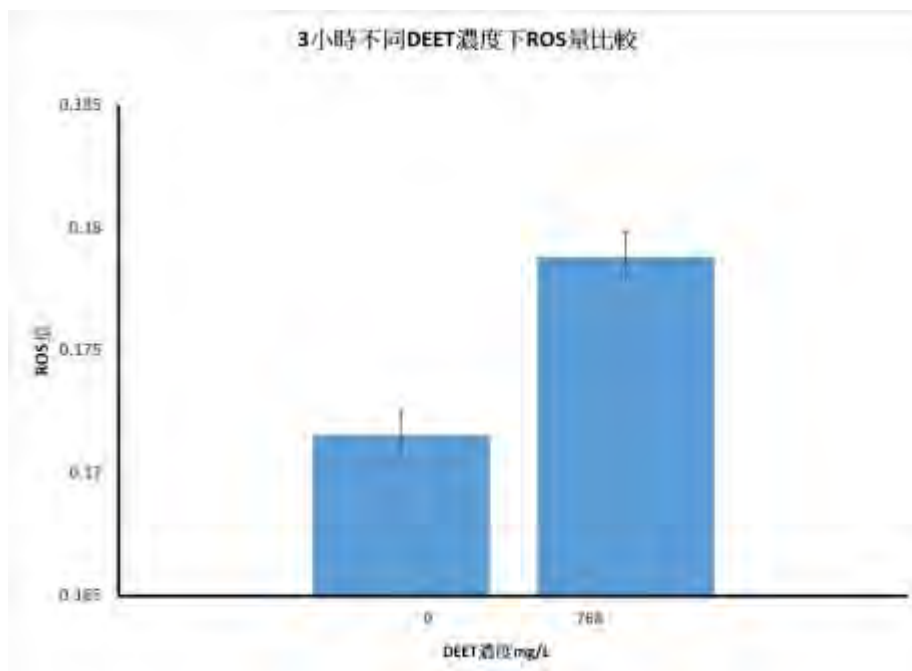
圖十 加入不同濃度的 DEET，5 小時的衣藻外觀型態和運動狀況出現變化

上圖十可見加入 DEET 5 小時前後，細胞型態有明顯差異，利用 DIC 顯微鏡觀察可發現不加 DEET 的衣藻細胞都有兩根鞭毛，加入 DEET 後，低濃度鞭毛比較短，高濃度鞭毛直接就斷裂了，大部分細胞鞭毛消失後僅呈現圓形外觀。因為衣藻是靠鞭毛活動，所以鞭毛消失直接會影響細胞運動，所以就不會游動了。

三、實驗三 DEET 對衣藻細胞內 ROS 量的影響

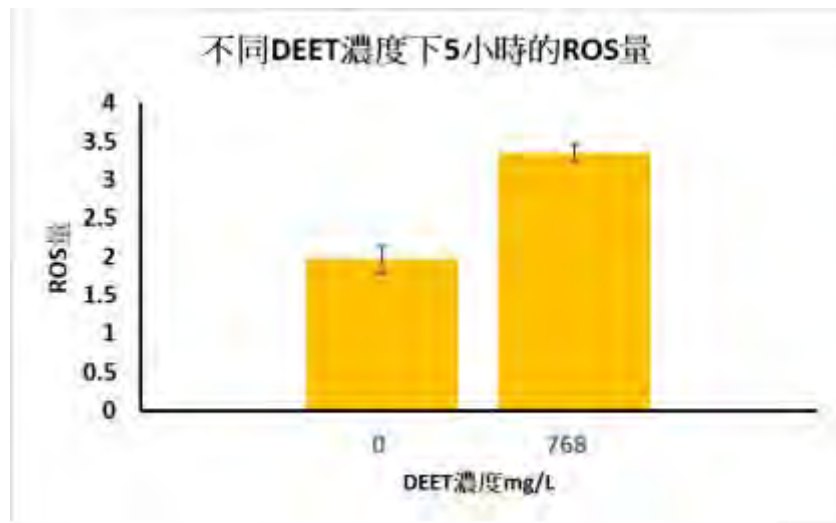
ROS 的產生可以用 DCFDA 來測量，DCFDA 是一種藥物，加入細胞後會進入細胞內，當細胞產生 ROS 的氧化活性分子的時候會對 DCFDA 進行氧化還原反應，會將之氧化，並出現發螢光的形式，所以細胞的 ROS 越多，越能將 DCFDA 轉化成發螢光的形式，就可以藉螢光量的多寡反應出細胞內 ROS 量的多寡，量越多表示 ROS 越多，ROS 越多表示細胞受到的逆境反應就越強。

細胞原本就存在 ROS，但實驗 3 小時後發現螢光量有些微增加，這代表加入 DEET 的處理之後短時間內就會引發 ROS 的產生，見圖十一，加入高濃度 DEET 3 小時即會造成細胞 ROS 量的增加，呈現典型的生物逆境反應。



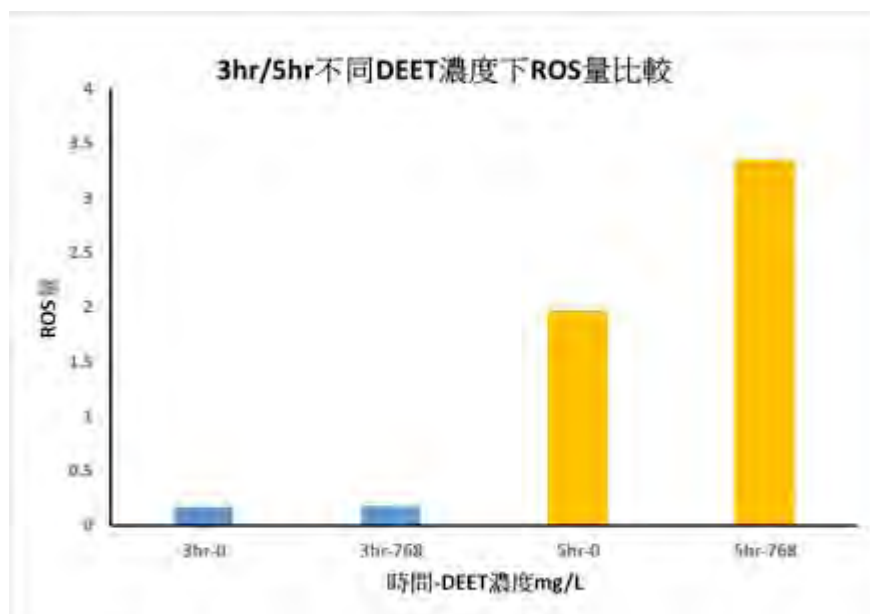
圖十一 加入高濃度 DEET 後，3 小時內 ROS 高於沒有添加 DEET 的控制組(N=2)

實驗 5 小時後，加入高濃度 DEET 的實驗組和對照組，ROS 增加的量差距更大，如圖十二所示，可知 ROS 量隨增時間持續增加，可見細胞受到的逆境反應更大了。



圖十二 加入高濃度 DEET 後，5 小時內 ROS 高於沒有添加 DEET 的控制組(N=2)

統整加入高濃度 DEET 的兩時段下的 ROS 量比較，如圖十三，5 小時的 ROS 產生量明顯高於 3 小時的增加量，且比較 3 小時與 5 小時無添加和高濃度的差異時可發現差距明顯變大。可知衣藻細胞在加入 DEET 至多 3 小時後 ROS 開始產生，但至 5 小時後 ROS 量上升趨勢增大。



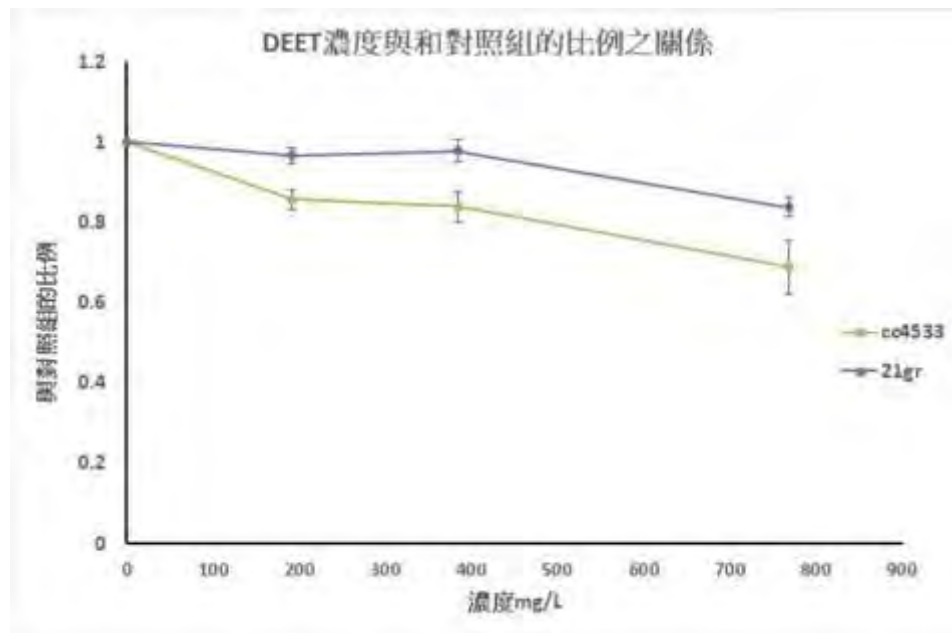
圖十三 加入高濃度 DEET 後，3 小時和 5 小時 ROS 量增加的比較

四、實驗四 衣藻細胞壁對 DEET 耐受程度的關係

選用衣藻實驗的優勢就在於：衣藻是細胞學和遺傳學的模式生物，所以目前已經有一些特殊的突變品系，是沒有細胞壁的，可以拿來作為對照比較的觀察對象。換言之，衣藻這樣的模式生物正可以提供機會，讓我們檢測細胞壁的有無對 DEET 造成的影響是否具有作用，與衣藻對 DEET 的耐受程度是否有關。

我們先藉由參考品系 21gr 和細胞壁有缺陷的突變品系 cc-4533 的比較，來探測細胞壁的有無是否影響 DEET 對衣藻的作用。

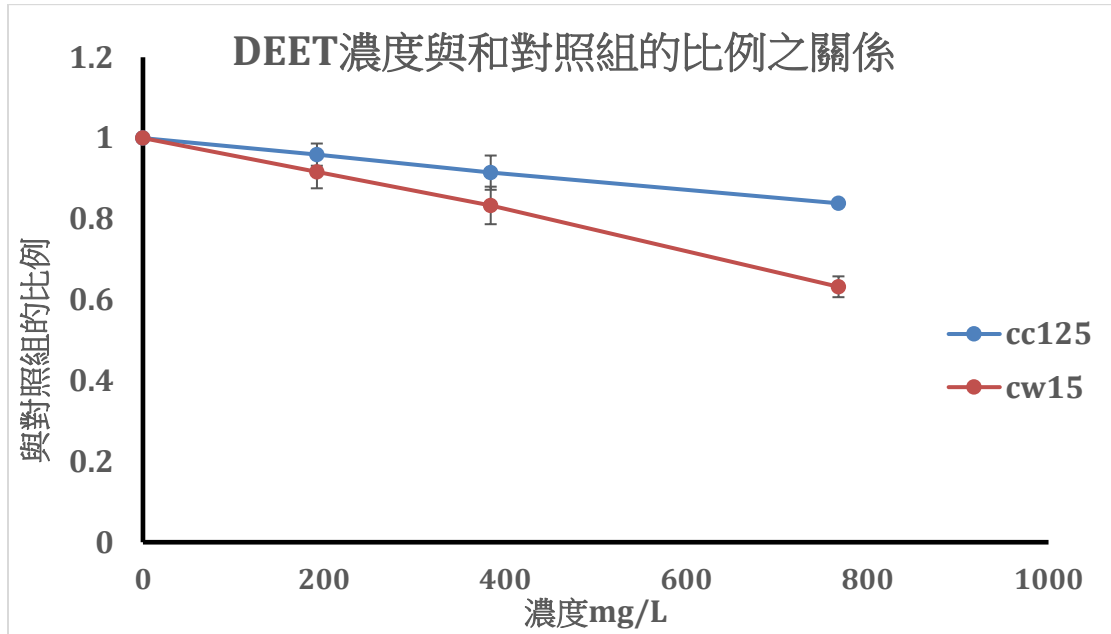
可知：在分別加入濃度 192、384、768mg/L 的 DEET 72hr 後，與不加入 DEET 的對照組細胞相比，兩種細胞的濃度均有下降的趨勢，可以推斷出有無細胞壁，DEET 都會影響衣藻的生長。我們以不加入 DEET 對照組的細胞濃度當作標準，計算其他 DEET 處理組別在 72 小時後的細胞濃度的比值，作圖來分析隨著 DEET 濃度增加，抑制細胞濃度的變化趨勢。根據圖十四可以看到 21gr 下降趨勢較平緩，而細胞壁有缺陷的突變品系 cc-4533 下降趨勢則較陡，下降比例比較高，表示 DEET 對 cc-4533 細胞生長的抑制較大，可見缺乏細胞壁會讓細胞受到的影響較有細胞壁者還大，換言之，細胞壁的存在對污染物的耐受度或許有幫助。



圖十四 DEET 對有無細胞壁的兩種衣藻品系影響的比較，顯示細胞壁可能影響其耐受度

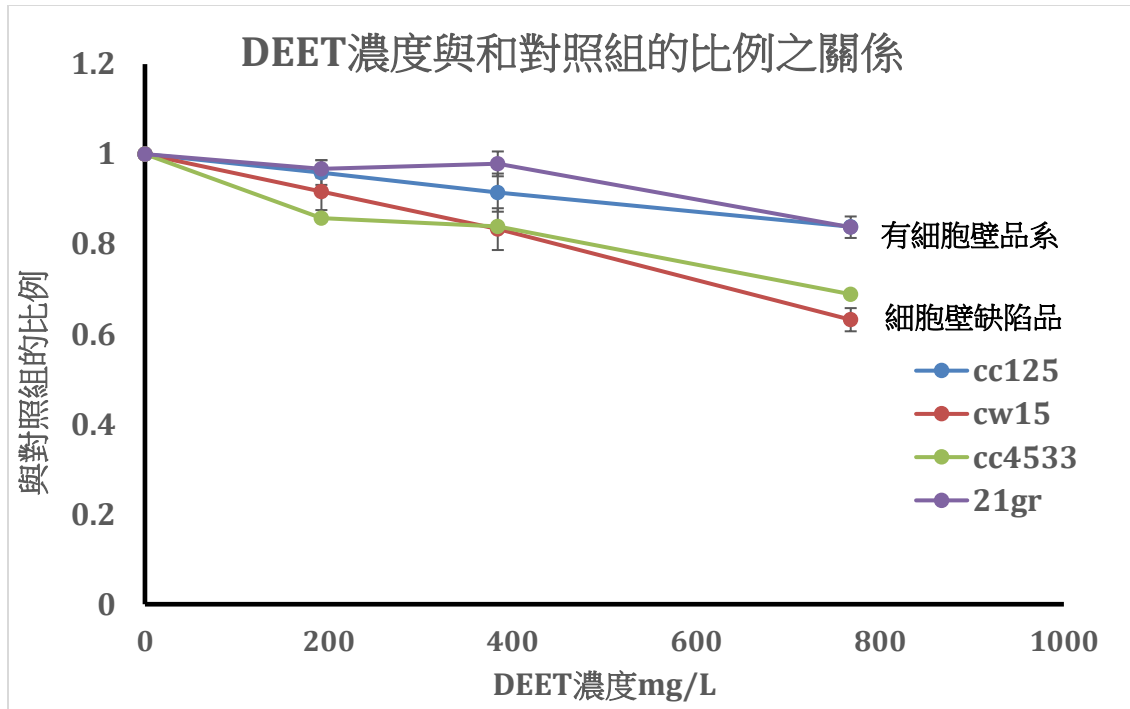
(N=3)

但為了避免上述選用的參考品系對 DEET 有特殊反應，故我們又選用另外兩種參考品系，分別為 cc125 和細胞壁缺陷的突變品系 cw-15。由圖十五也可發現相同的實驗趨勢：有細胞壁的 cc125 下降趨勢較平緩，而細胞壁有缺陷的突變品系 cw-15 下降趨勢則較陡，下降得快，表示隨濃度增加抑制越明顯。實驗結果顯示：有細胞壁者之於 DEET 確實較無細胞壁者耐受程度為高。



圖十五 cc125 與 cw15 細胞壁有無的對照實驗(N=3)

總之，cc-4533、cw-15（皆有細胞壁缺陷），21gr、cc125（皆有細胞壁）四種細胞整合曲線圖（如圖十六），可明顯看出無細胞壁的兩種品系細胞濃度比值變化下降幅度皆較陡，表示其對 DEET 耐受程度比有細胞壁者差，生長較容易被抑制。



圖十六 cc-4533、cw-15、21gr、cc125 四種細胞的細胞壁有無對照實驗整合曲線圖(N=3)

陸、討論

一、加入 DEET 後細胞生長受到抑制，所謂受抑制的狀況為何？

所謂衣藻細胞生長受到抑制，究竟是指細胞的死亡，還是細胞活力變差或是細胞不再分裂，要用染色的方式做一區分，才能確知。但這次實驗並未從實際抑制型態或利用特殊的染色方法去區分，但可考慮作為之後進一步探討的方向。

二、加入 DEET 後，衣藻無趨光反應，是因為衣藻趨光反應能力受阻嗎？

加入 DEET 後衣藻的趨光反應能力是否受到影響，本實驗並不能證明這點，實驗中衣藻的無趨光反應，也有可能是因為細胞行動力受損，而無法趨光所致。實驗可以確認的只有：加入高濃度的 DEET 後，細胞會因外觀型態的受損(鞭毛斷裂消失)而影響行動力。

三、衣藻細胞的鞭毛因 DEET 的加入而受影響的機制模式為何？

衣藻細胞的鞭毛因高濃度 DEET 的加入而消失，可以理解為高濃度 DEET 確實對衣藻細胞型態與行動有所影響，但其鞭毛受影響的機制是如何的？是消失、斷裂抑或是自行吸收，則有待日後再深入的探討，也是可再發展的部分。

另外，ROS 明顯增加的時間點(5 小時)和觀察到衣藻細胞受損的時間點(5 小時)接近，但是否就是因為 ROS 的產生而造成鞭毛的變化，也只能持保留態度，雖然 ROS 的氧化活性物質大量的產生時，細胞無法及時移除這些物質，會造成細胞胞器的損傷，但目前本研究的實驗未能直接實際證明鞭毛消失的原因，所以對於 ROS 的累積和鞭毛消失之間的關係，也只可說是有此可能，尚無法斷定。

四、實驗結果衣藻對 DEET 具一定耐受度，而且目前環境中存在的 DEET 濃度並不高，這是否意味著 DEET 這樣的新興污染物不會對環境造成傷害？

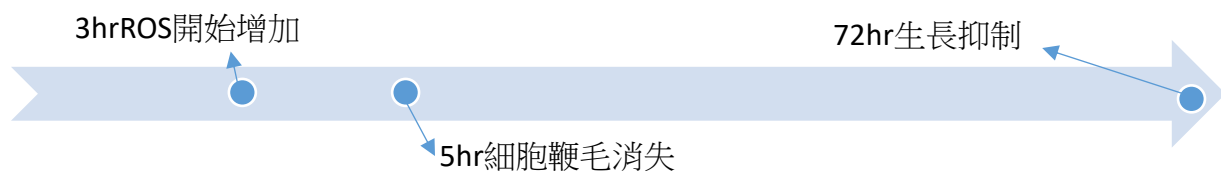
因本實驗是在現實可行的考量下，採用 72 小時的急毒反應實驗，然而環境中的 DEET 卻是低劑量長期存在的狀態，長期接觸、日積月累之後對整個生態系會有何影響或效應，甚至是否可能改變環境中藻類的遺傳組成，危害生物多樣性，都還需長時間追蹤測試才能確定。

柒、結論

本研究探討的是新興污染物 DEET 對衣藻的影響，過去相關研究多半針對動物與人類細胞實驗為主，較少關注在藻類上，像藻類這種水生光自營生物的研究相對較少，而根據本實驗結果，得出以下結論：

- 一、在加入 DEET 後，最高濃度(768mg/L)的情況下，在很短的時間之內(最多3小時)就開始出現 ROS 量增加的情況，5 小時開始 ROS 量明顯上升，並可能會促成其他生理現象的變化。
- 二、在加入 DEET 後，依據不同濃度，最多5小時之內，細胞的外觀型態與行動皆會有所影響：細胞鞭毛變短甚至消失，以至於影響細胞游泳的行動力。
- 三、DEET 濃度至少要 192mg/L 以上，衣藻細胞 72 小時的急毒反應才會出現明顯的生長抑制狀況。

綜上所述，高濃度 DEET(768mg/L)下，衣藻細胞各實驗結論可約略統整為下列發展軸：



- 四、DEET 濃度要很高才會對衣藻的生長有明顯的抑制效果，也才會對環境造成明顯的危害。但實驗結果可見衣藻可耐受 DEET(不會立即大量死亡)，而且目前環境中存在的 DEET 濃度並不高，所以環境中的 DEET 不至於立即對衣藻的生理生態造成太大的影響，對環境的危害目前也可以不必過度擔心。
- 五、從細胞壁有無的對照中，可知衣藻細胞壁對 DEET 的影響效應是具有防護作用的，細胞壁可以減緩 DEET 對細胞生長的抑制，提高衣藻對於 DEET 的耐受度。一般文獻目前對細胞壁與污染物毒性之間關係的探討較少，所以這是本實驗的重要研究成果。

捌、參考資料

1. 化學品測試方法編委會編(2013)。化學品測試方法生物系統效應卷 2。北京：中國環境出版社。
2. 謝傳曉、韓偉、余增亮(2003)。模式生物衣藻及其研究進展。遺傳，25 卷 3 期 (2003 / 05 / 01)，P.350 - 354。
3. 古力孜拉、史博、熱依汗古麗、吾甫爾·米吉提(2004)。野生型萊茵衣藻及其不同突變株的抗 NaCl 能力檢測。植物生理學報，2004 年 05 期 (2004 / 07 / 05)，P614 - 616。
4. 吳巧玉、蘭利瓊、劉萍、耿曉娟、傅華龍(2008)。沙角衣藻的抗菌活性研究。四川大學學報（自然科學版），2008 年 01 期 (2008/07), P.194-198。
5. 秦琅、朱毅(2012)。萊氏衣藻鞭毛研究進展。首都師範大學學報（自然科學版），2012 年 01 期 (2012/07), P.45-49。
6. SC Johnson (2012)。Assessment of the environmental fate and ecotoxicity of N,N-diethyl-m-toluamide (DEET). Integr Environ Assess Manag. 2012 Jan;8(1):120-34
7. 陳宛君(2014)。衣藻運動能力異常突變種的表現型觀察與基因研究。國立臺南大學生物科技學系碩士論文。
8. 陳以庭(2017)。鄰苯二甲酸二乙酯對衣藻所造成的生理影響。國立臺南大學生物科技學系碩士論文。
9. 新興污染物定義。國立中山大學新興污染物研究中心：
<http://www2.nsysu.edu.tw/cecr/source.htm>，查閱日期：2018.1.21
10. 衛生福利部疾病管制署網站：<https://www.cdc.gov.tw/>，查閱時間：2018.1.21

【評語】 052605

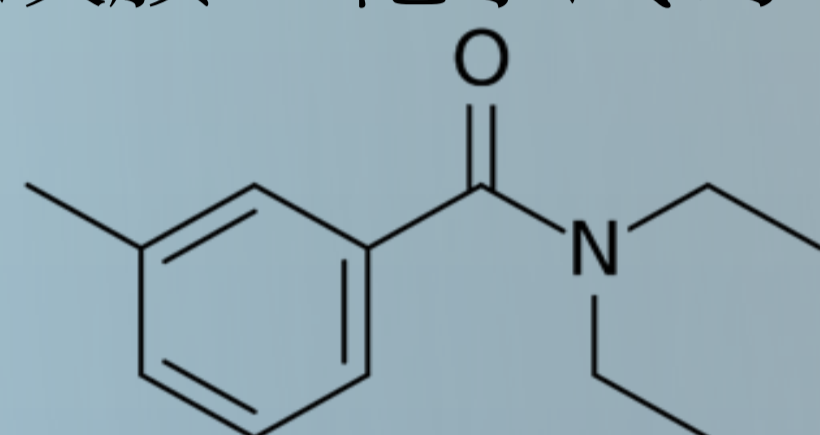
本研究以衣藻進行實驗，探討不同濃度防蚊液主要成分待乙妥 (Diethyltoluamide, DEET)，是否對環境初級生產者之生態毒性效應。實驗架構清晰、分工細膩、研究結果豐富，具有生態環境保護之觀點。建議可先收集 DEET 在不同環境與生物模式之百分之五十致死濃度(LC50)或百分之五十效應濃度(EC50)等急毒性資料，將有助於解釋實驗設計中 DEET 濃度分布之合理範圍。實驗步驟中，配置不同濃度的 DEET 進行衣藻暴露毒性試驗，如何克服 DEET 親脂性高、難溶於水的特性及 DEET 可能存在於污染水體之實際濃度，應再予以說明。

摘要

過去針對DEET的研究，大多以動物與人類細胞實驗為主，較少關注在藻類上。微藻是水域中的初級生產者，不僅能固定二氧化碳與製造氧氣，也是消費者的食物來源，對環境來說相當重要。本研究以模式生物單胞藻衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)進行實驗，探討新興污染物DEET對生態系中水生自營生物的影響效應為何。結果發現：1. 加入最高濃度768mg/L的DEET，至多3小時，細胞就會增加ROS。2. 加入DEET後，至多5小時，細胞鞭毛會變短甚至消失，以至於影響細胞的行動力。3. DEET濃度192mg/L以上，衣藻細胞72小時的急毒反應會出現明顯的生長抑制狀況。本研究同時也比較細胞壁的有無與DEET影響的關係，發現細胞壁有利於提高衣藻對於DEET的耐受度。

壹、研究動機

在《基礎生物中我們曾學到生態學的基本原理，也初步了解人類對環境的影響；而在《應用生物》第肆主題當中，再次關照到環境汙染物質對生物的傷害問題。除了課本中提到的工業重金屬和環境賀爾蒙等物質外，現今還會產生許多「新興污染物」。防蚊液是生活中最常見，也是隨手可得的一種，其中它的有效成分DEET(N,N-diethyl-meta-toluamide) 待乙妥 (diethyltoluamide) 的縮寫，又稱敵避、敵避胺、避蚊胺，化學式為C₁₂H₁₇NO，化學結構如下：

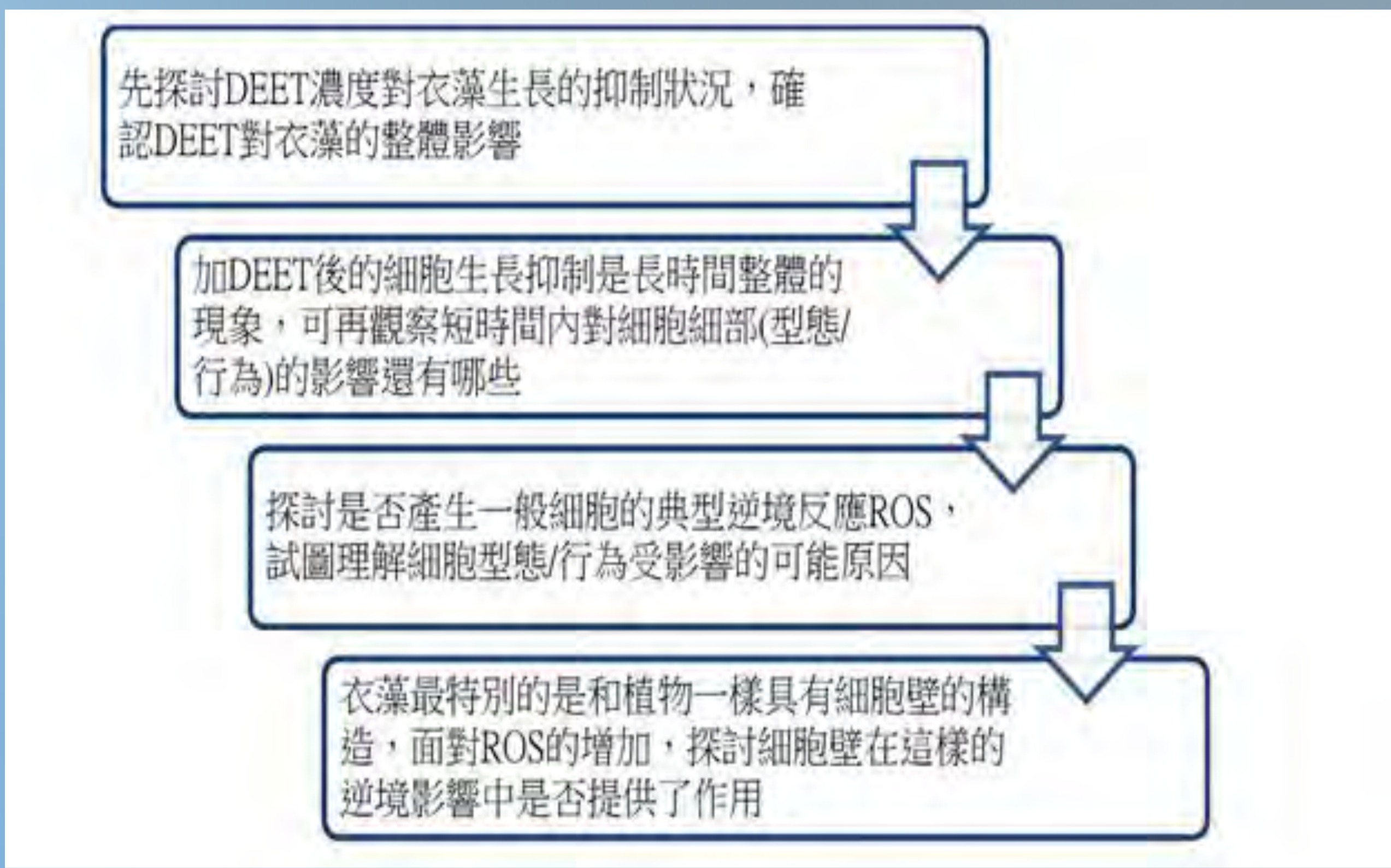


是一種淡黃色的液油狀物體，微溶於水。因是一般民眾廣泛使用的化合物，並曾在環境的水樣本中測得，所以在使用上的安全性一直是人們關注的重點。微藻是水域中的初級生產者，不僅能固定二氧化碳與製造氧氣，也是消費者的食物來源，對環境來說相當重要。水域環境中自然不乏這些新興的污染物質。然而聯合國在2016年所提出的17項永續發展目標(SDGs)中，就有兩項與水資源相關，可知水域環境的生態關懷是未來地球環境很重要的議題。

本研究以模式生物單胞藻衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)進行實驗，探討新興污染物DEET對生態系中水生自營生物的影響效應為何。

肆、實驗步驟

本研究的實驗設計概念和進程如下：



所以本研究主要藉由以下四項實驗的進行，來探討研究主題：

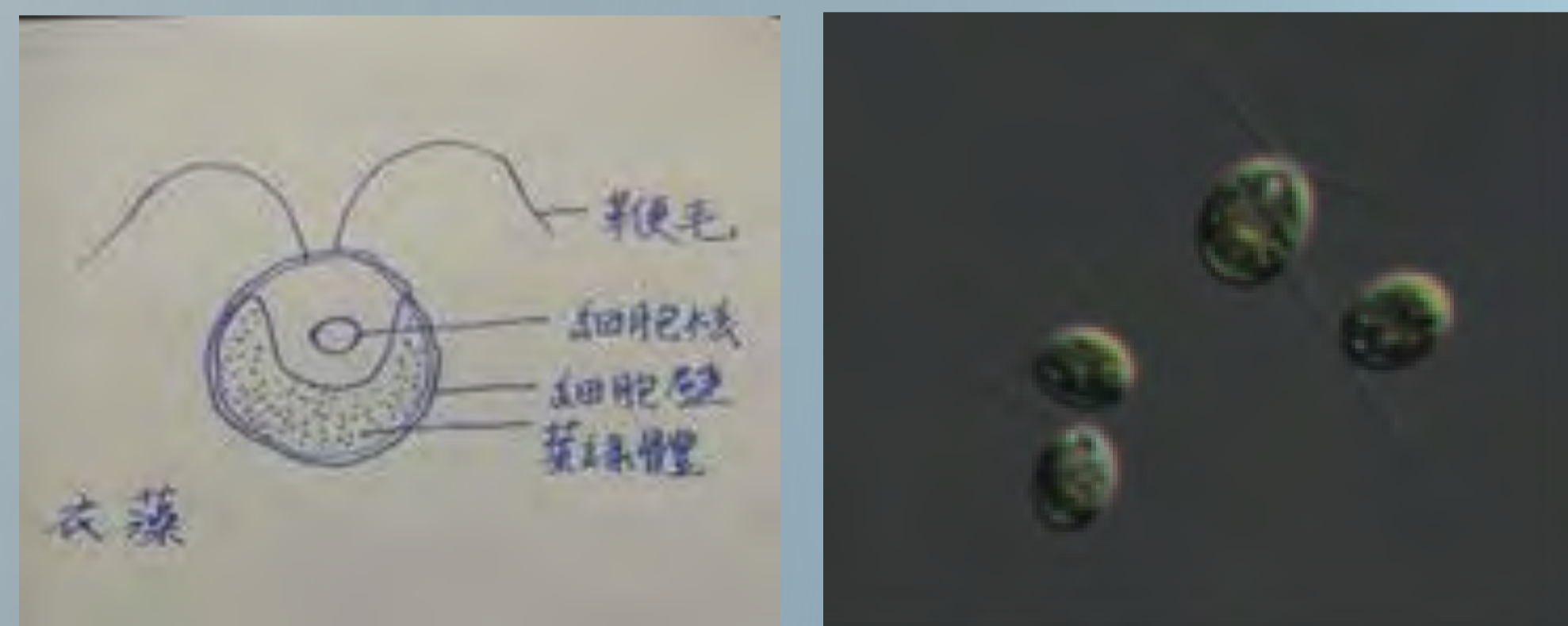


貳、研究目的

- 一、測試DEET對於衣藻的生長影響，以判斷衣藻對DEET的耐受度
- 二、觀察DEET對衣藻外觀型態與行動之影響
- 三、測試衣藻加入DEET處理後，是否造成活性氧化物質ROS的增加
- 四、測試衣藻細胞壁的有無對於新興污染物DEET 造成的影響是否具有作用

參、研究設備及器材

請參閱作品說明書



圖一 衣藻的型態與構造示意圖及顯微鏡下的衣藻

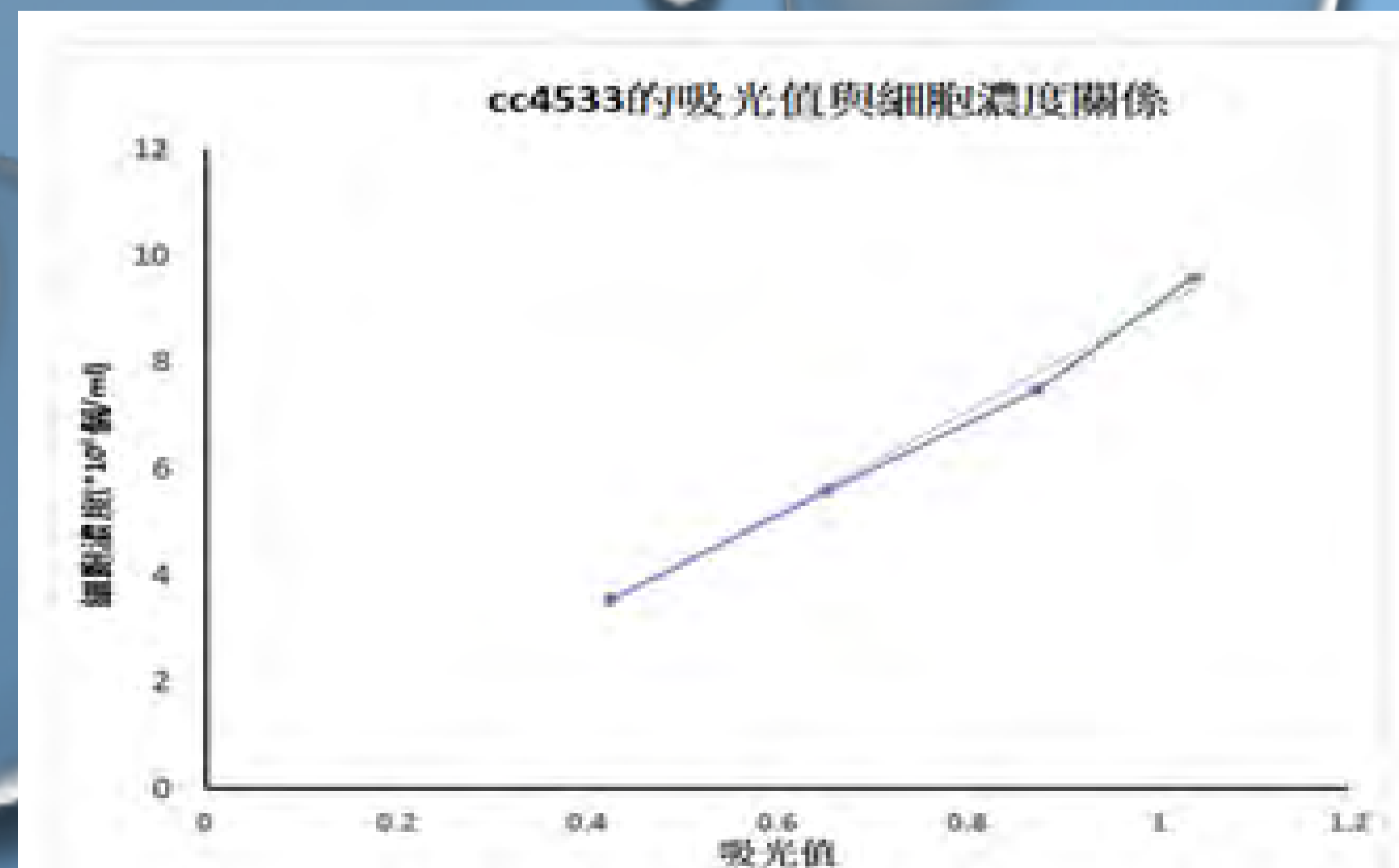


圖二 液態培養基TAP和衣藻的培養

預備實驗：衣藻細胞吸光值與細胞數的測量

細胞的數量和細胞吸收光的吸光值有一定關係的基礎，所以欲利用吸光值的高低來代表細胞的數量，作為之後實驗中計算細胞數量的替代方法。故必須先確認兩者確切的關係為何，所以要先檢驗吸光值和細胞數量之間的關係為何，因而有此預備實驗。

先針對不同濃度的細胞，去測量它們的吸光值是多少，同時計算細胞數量是多少，之後再透過對照圖形，確定兩者間有一直線的關係，後續便可利用吸光值來代替細胞數量，用吸光值來呈現實驗結果



圖三 衣藻參考品系cc4533的吸光值與衣藻細胞濃度關係表

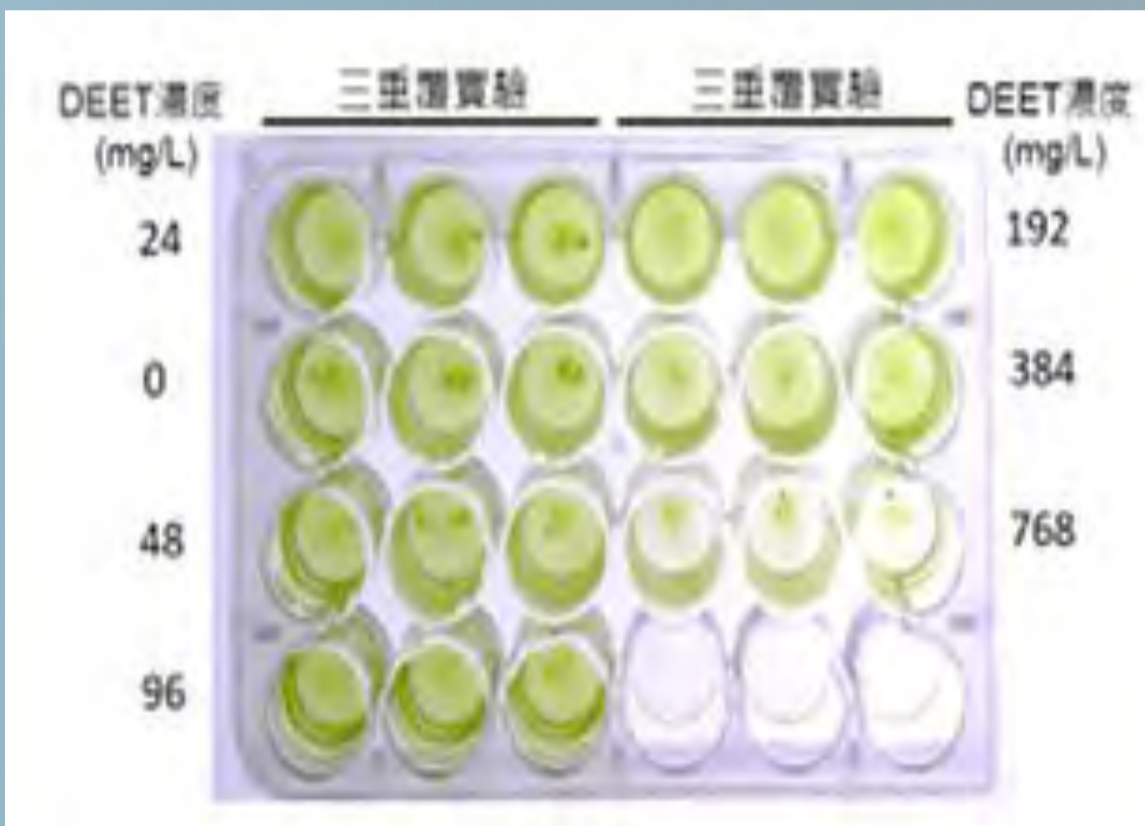
伍、結果

一、衣藻對DEET有明顯反應的濃度

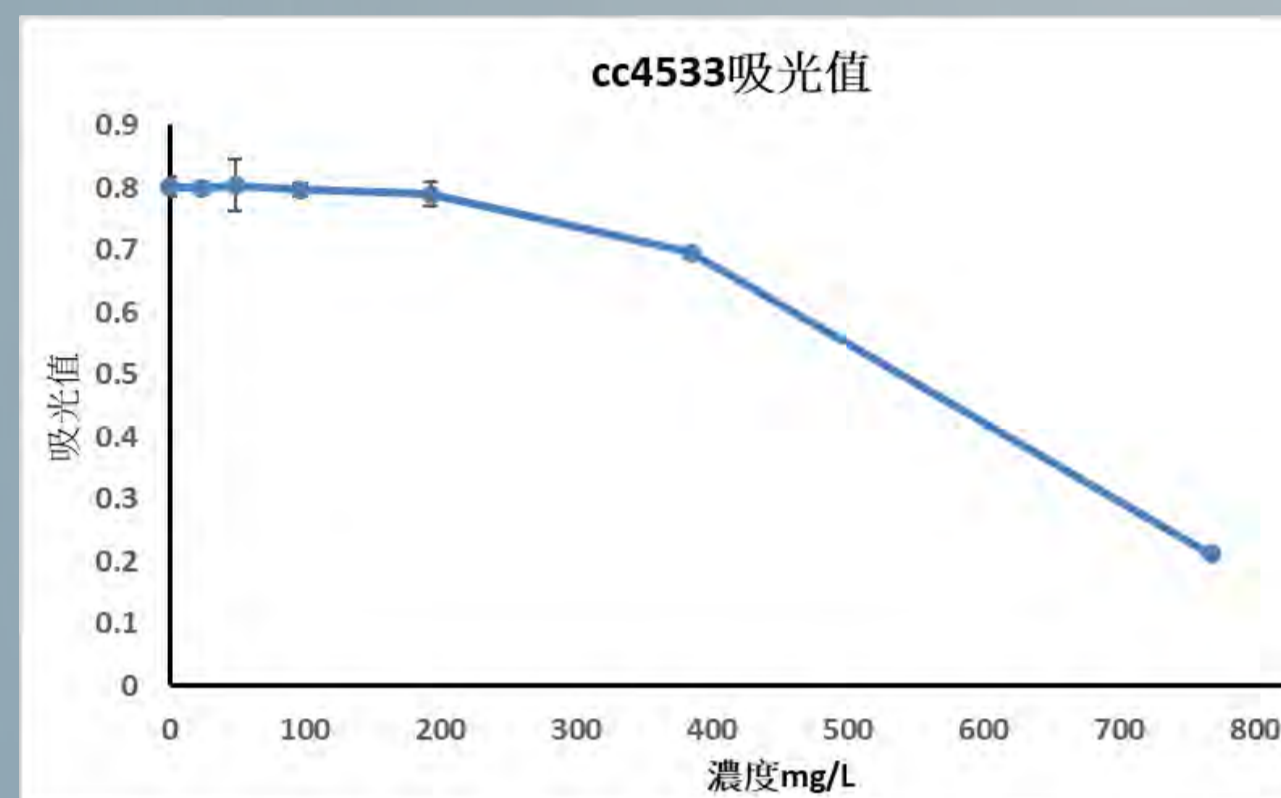
本實驗以衣藻的生長受到抑制的狀況為判斷依據，依序加入不同濃度的DEET後(192、384、768mg/L)，明顯得見顏色由深到淺，表示細胞濃度由高到低(圖四)，可知細胞的生長在加入不同濃度DEET後有不同的抑制效果，且DEET濃度越高，抑制效果越明顯。

由細胞吸光值折線圖可知在加入DEET 72hr後，濃度192mg/L之後吸光值呈現下降的趨勢(圖五)，表示其細胞可能分裂減緩或不分裂或死亡，細胞生長受到抑制，可知衣藻對DEET有明顯反應差異的濃度，至少要在192mg/L以上。

而且即使在較高濃度的DEET下，衣藻細胞生長雖受到抑制，但並非大量立即死亡，可見衣藻對於DEET有一定程度的耐受性。



圖四 不同DEET濃度下細胞生長的狀況



圖五 細胞吸光值在DEET濃度192mg/L之後明顯的下降趨勢

二、DEET對衣藻細胞外觀和行為的影響

測試加入DEET後，觀察衣藻運動行為中的趨光情況有無改變，發現左至右DEET濃度分別為192、768、0mg/L，濃度0和192 mg/L時如箭頭所示有趨光效果，但濃度768mg/L則無顯示趨光狀態。(圖六)

不確定此時的無趨光反應，是因為趨光反應能力受阻，還是因為細胞行動力受影響，首先，以低倍數顯微鏡觀察加入DEET 3小時細胞型態在不同濃度的DEET影響下，仍保有活動力，以高倍率DIC顯微鏡細部觀察，細胞行動與外觀尚未發生變化(圖七)，接著觀察5小時的細胞狀態。

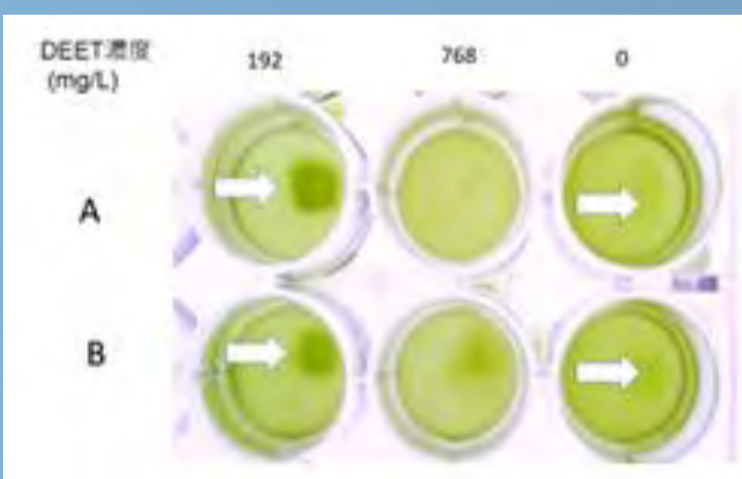
發現細胞型態在不同濃度的DEET影響下，有不同的發展。最明顯的影響，就是細胞的活動力與鞭毛型態發生變化。(圖八)

(一) 濃度0mg/L時，細胞數量多且活動力強；細胞外觀型態構造完整，鞭毛完整無缺。

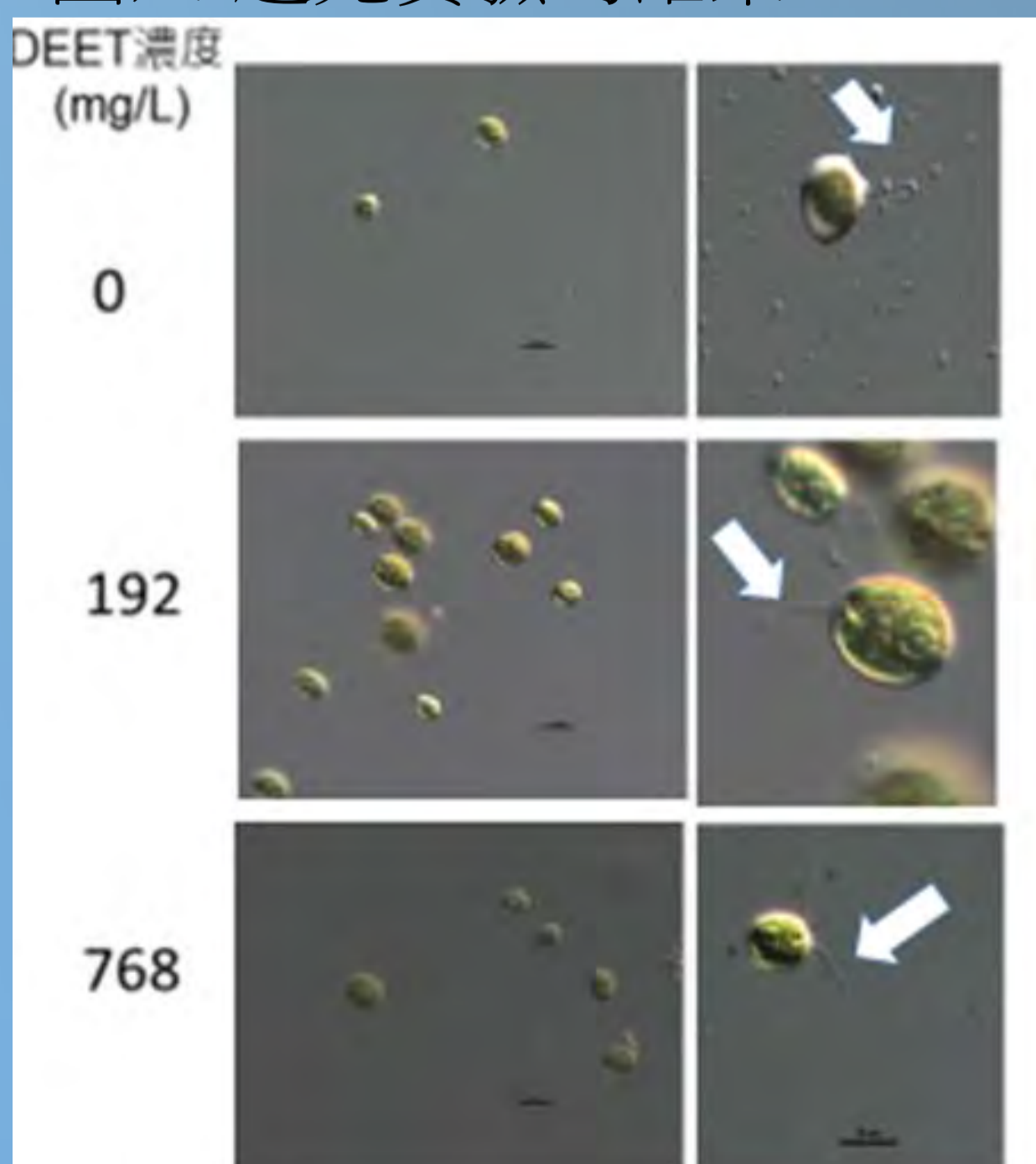
(二) 濃度192mg/L時，活動力近乎無；大部分細胞鞭毛明顯變短或斷裂，不容易看見鞭毛。

(三) 濃度768mg/L時，無法活動；絕大多數細胞就只有呈現圓形外觀，鞭毛完全斷裂或消失。

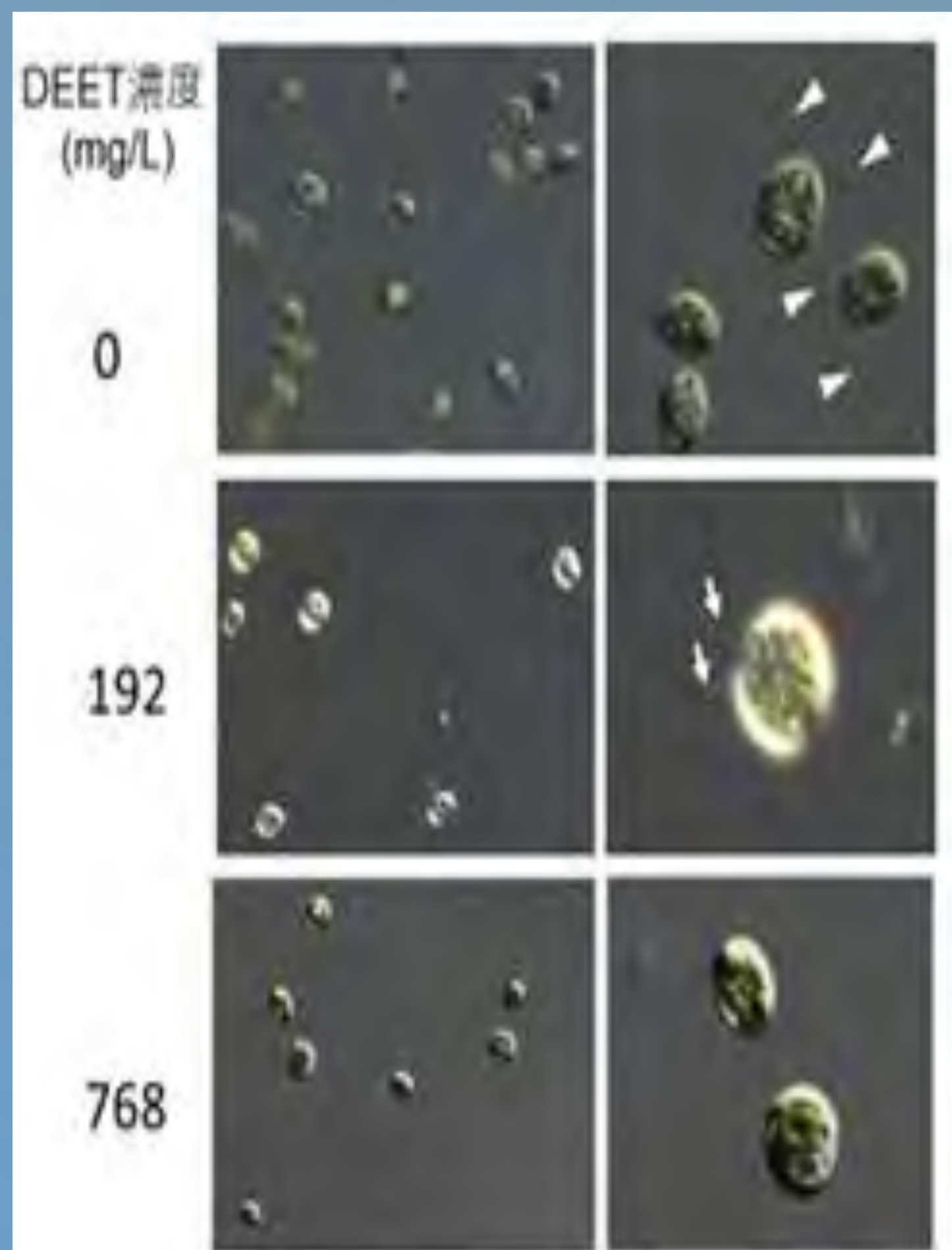
可知加入DEET前後，細胞型態有明顯差異，也會影響細胞運動能力。



圖六 趨光實驗的結果



圖七 3小時不同濃度的DEET下，衣藻外觀型態和運動狀況的變化



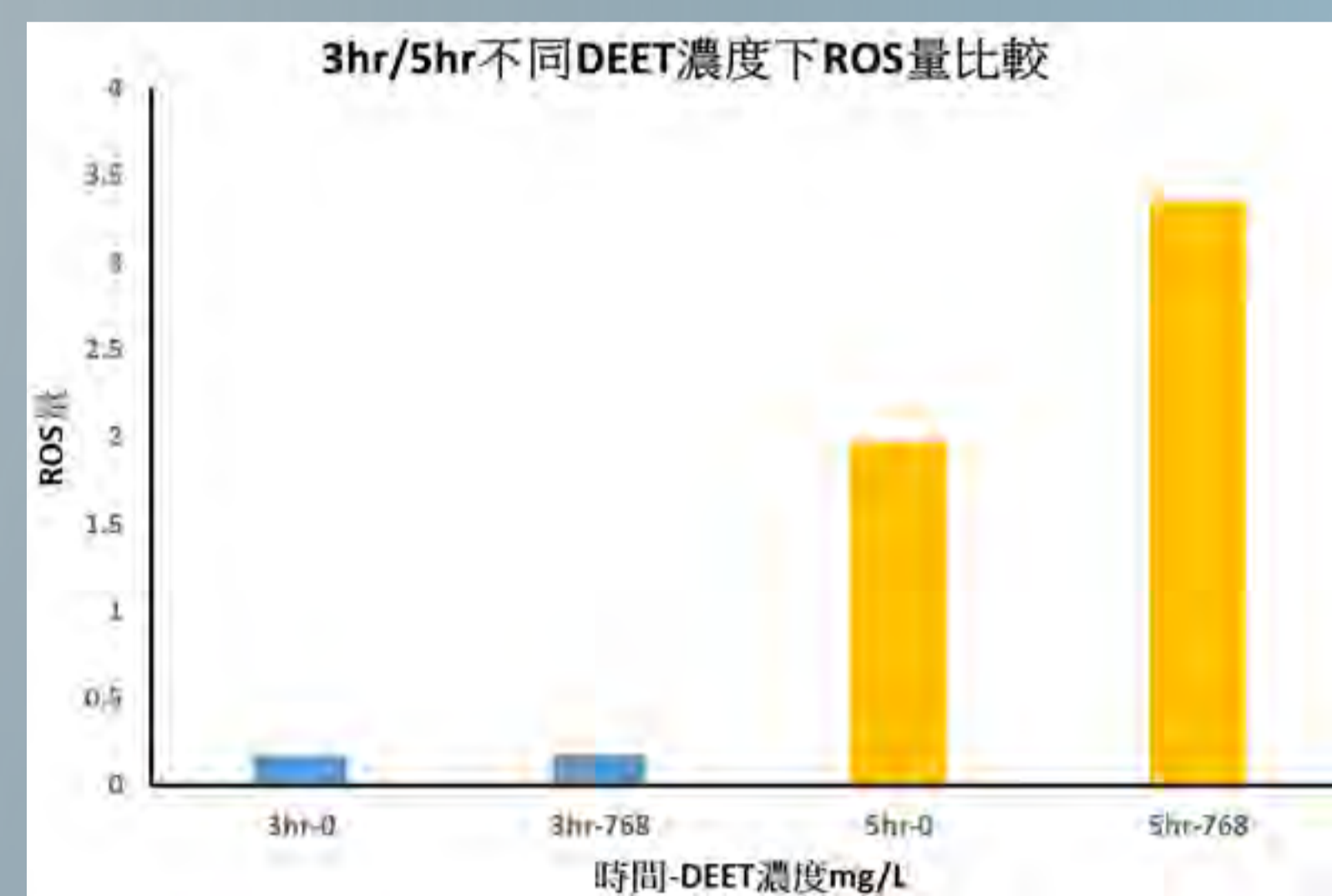
圖八 5小時不同濃度的DEET下，衣藻外觀型態和運動狀況的變化

三、DEET對衣藻細胞內ROS量的影響

ROS，細胞內的活性氧化物(reactive oxygen species)，是生物有氧代謝過程中的一種副產品，這些粒子相當微小，但過量的ROS會破壞體內抗氧化防禦系統的恆定性。一般的生物逆境和非生物逆境的時候，常常會引發細胞的ROS氧化活性分子的產生。

ROS的產生可以用DCFDA來測量，當細胞產生ROS的氧化活性分子的時候會對DCFDA進行氧化還原反應，並出現發螢光的形式，就可以藉螢光量的多寡反應出細胞內ROS量的多寡。

3小時時有添加DEET者ROS略多於未加者。5小時的ROS產生量明顯高於3小時的增加量，且比較3小時與5小時無添加和高濃度的差異時可發現差距明顯變大。可知衣藻細胞在加入DEET至多3小時後ROS開始產生，但至5小時後ROS量上升趨勢增大。(圖九)

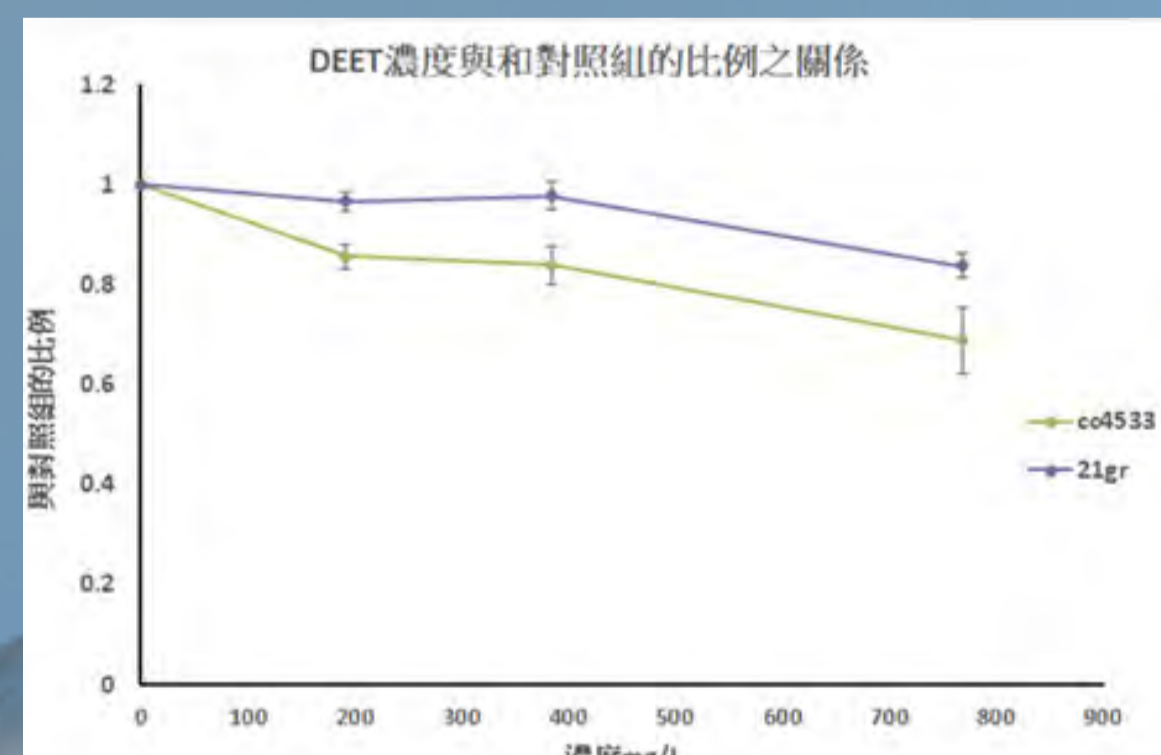


圖九 加入高濃度DEET後，短時間內ROS明顯高於沒有添加DEET的控制組(N=3)

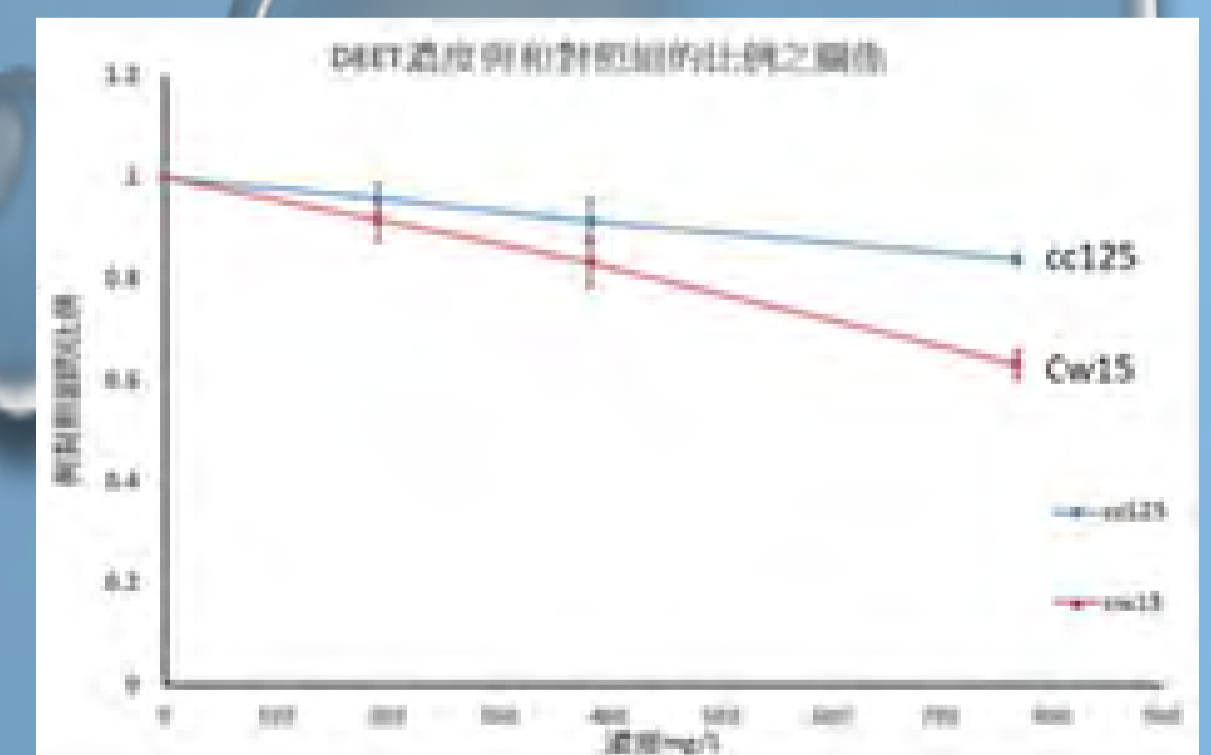
四、衣藻細胞壁對DEET耐受程度的關係

衣藻是細胞學和遺傳學的模式生物，所以目前已經有一些特殊的突變品系，是沒有細胞壁的，可以拿來作為對照比較的觀察對象，檢測細胞壁的有無對DEET造成的影響是否具有作用，與衣藻對DEET的耐受程度是否有關。

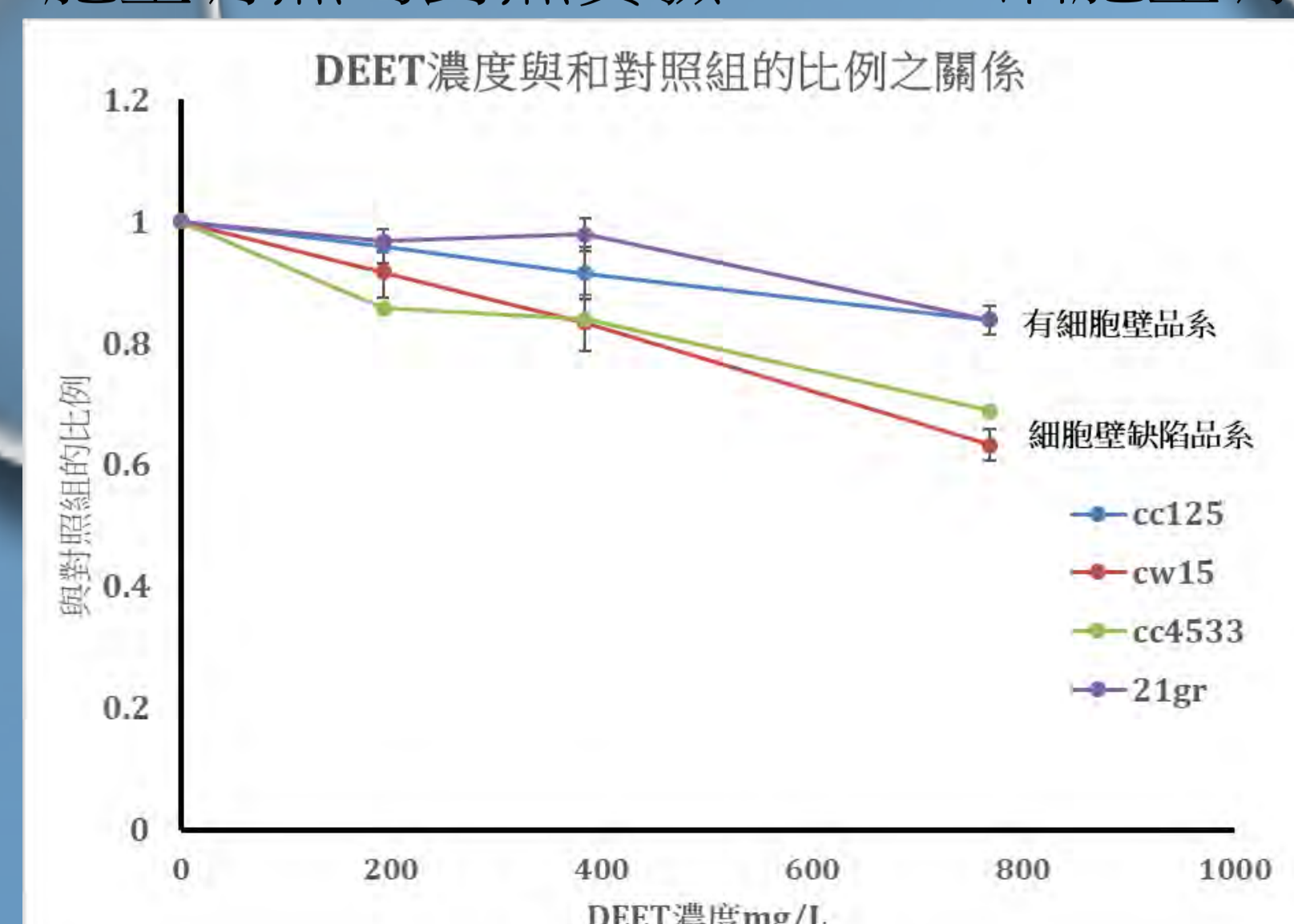
分別藉由參考品系21gr和cc125與細胞壁有缺陷的突變品系cc-4533和cw-15來比較，探測細胞壁的有無是否影響DEET對衣藻的作用。發現：在分別加入濃度192、384、768mg/L的DEET 72hr後，兩種細胞的濃度均有下降的趨勢，可以推斷出有無細胞壁，DEET都會影響衣藻的生長。但有細胞壁的品系下降趨勢較平緩，而細胞壁有缺陷的突變品系下降趨勢則較陡，下降比例比較高，表示DEET對細胞壁有缺陷的突變品系的細胞生長抑制較大，可見缺乏細胞壁會讓細胞受到的影響較有細胞壁者還大，換言之，細胞壁對污染物的耐受度是有幫助的。(圖十~十二)



圖十 21gr與cc4533細胞壁有無的對照實驗



圖十一 cc125與cw-15細胞壁有無的對照實驗



圖十二 cc-4533、cw-15，21gr、cc125四種細胞整合曲線圖

陸、討論

一、加入DEET後細胞生長受到抑制，所謂受抑制的狀況為何？

所謂衣藻細胞生長受到抑制，究竟是指細胞的死亡，還是細胞活力變差或是細胞不再分裂，要用染色的方式做一區分，才能確知。但這次實驗並未從實際抑制型態或利用特殊的染色方法去區分，但可考慮作為之後進一步探討的方向。

二、加入DEET後，衣藻無趨光反應，是因為衣藻趨光反應能力受阻嗎？

加入DEET後衣藻的趨光反應能力是否受到影響，本實驗並不能證明這點，實驗中衣藻的無趨光反應，也有可能是因為細胞行動力受損，而無法趨光所致。實驗可以確認的只有：加入高濃度的DEET後，細胞會因外觀型態的受損(鞭毛斷裂消失)而影響行動力。

三、衣藻細胞的鞭毛因DEET的加入而受影響的機制模式為何？

衣藻細胞的鞭毛因高濃度DEET的加入而消失，可以理解為高濃度DEET確實對衣藻細胞型態與行動有所影響，但其鞭毛受影響的機制是如何的？是消失、斷裂抑或是自行吸收，則有待日後再深入的探討，也是可再發展的部分。

另外，是否是因為ROS的產生而造成鞭毛的變化，也只能持保留態度，雖然ROS的氧化活性物質大量的產生時，細胞無法及時移除這些物質，會造成細胞胞器的損傷，但目前本實驗未實際證明鞭毛消失的原因，所以對於ROS的累積和鞭毛消失之間的關係，也只可說是有此可能，尚無法斷定。

四、實驗結果衣藻對DEET具一定耐受度，而且目前環境中存在的DEET濃度並不高，這是否意味著DEET這樣的新興污染物不會對環境造成傷害？

因本實驗是在現實可行的考量下，採用72小時的急毒反應實驗，然而環境中的DEET卻是低劑量長期存在的狀態，長期接觸、日積月累之後對整個生態系會有何影響或效應，甚至是否可能改變環境中藻類的遺傳組成，危害生物多樣性，都還需長時間追蹤測試才能確定。

柒、結論

本研究探討的是新興污染物DEET對衣藻的影響，過去相關研究多半針對動物與人類細胞實驗為主，較少關注在藻類上，像藻類這種水生光自營生物的研究相對較少，而根據本實驗結果，得出以下結論：

- 一、在加入DEET後，最高濃度(768mg/L)的情況下，在很短的時間之內(最多3小時)就增加ROS，5小時開始ROS量明顯上升，並可能會促成其他生理現象的變化。
- 二、在加入DEET後，依據不同濃度，最多5小時之內，細胞的外觀型態與行動皆會有所影響：細胞鞭毛變短甚至消失，以至於影響細胞游泳的行動力。
- 三、DEET濃度至少192mg/L以上，衣藻細胞72小時的急毒反應才會出現明顯的生長抑制狀況。
- 四、DEET濃度要很高才會對衣藻的生長有明顯的抑制效果，也才會對環境造成很大的危害。實驗結果可見衣藻非常耐受DEET，而且目前環境中存在的DEET濃度並不高，所以環境中的DEET不至於立即對衣藻的生理生態造成太大的影響，對環境的危害目前也可以不必過度擔心。

3hr ROS增加

72hr 生長抑制

5hr 細胞鞭毛消失

- 五、從細胞壁的有無對照中，可知衣藻細胞壁對DEET的影響效應是具有防護作用的，細胞壁可以減緩DEET對細胞生長的抑制，提高衣藻對於DEET的耐受度。一般文獻目前對細胞壁與污染物毒性之間關係的探討較少，這是本實驗的重要研究成果。

捌、參考資料

1. 化學品測試方法編委會編(2013)。化學品測試方法生物系統效應卷2。北京：中國環境出版社。
2. 謝傳曉、韓偉、余增亮(2003)。模式生物衣藻及其研究進展。遺傳，25卷3期(2003 / 05 / 01)，P.350-354。
3. 古力孜拉、史博、熱依汗古麗、吾甫爾·米吉提(2004)。野生型萊茵衣藻及其不同突變株的抗NaCl能力檢測。植物生理學報，2004年05期(2004 / 07 / 05)，P614-616。
4. 吳巧玉、蘭利瓊、劉萍、耿曉娟、傅華龍(2008)。沙角衣藻的抗菌活性研究。四川大學學報(自然科學版)，2008年01期(2008/07)，P.194-198。
5. 秦琅、朱毅(2012)。萊氏衣藻鞭毛研究進展。首都師範大學學報(自然科學版)，2012年01期(2012/07)，P.45-49。
6. SC Johnson (2012)。Assessment of the environmental fate and ecotoxicity of N,N-diethyl-m-toluamide (DEET). Integr Environ Assess Manag. 2012 Jan;8(1):120-34
7. 陳宛君(2014)。衣藻運動能力異常突變種的表現型觀察與基因研究。國立臺南大學生物科技學系碩士論文。
8. 陳以庭(2017)。鄰苯二甲酸二乙酯對衣藻所造成的生理影響。國立臺南大學生物科技學系碩士論文。
9. 新興污染物定義。國立中山大學新興污染物研究中心：<http://www2.nsysu.edu.tw/cecr/source.htm>，查閱日期：2018.1.21
10. 衛生福利部疾病管制署網站：<https://www.cdc.gov.tw/>，查閱時間：2018.1.21