中華民國第63屆中小學科學展覽會

作品說明書

高中組 植物學科

(鄉土)教材獎

052102

探討重金屬離子對臺灣羽苔之生理影響

學校名稱:國立新竹女子高級中學

關鍵詞:蘚苔、重金屬、光合色素

摘要

竹科為新竹帶來不計其數的好處,卻也造成環境汙染,重金屬汙染就包含其中。 重金屬若未經處理就流放會汙染土壤、水質等,影響生態環境。蘚苔是方便取得的生 物監測指標,因此本研究以臺灣羽苔作為模式生物,探討不同重金屬種類、濃度對其 葉綠體個數、光合色素含量、光反應速率及細胞壁厚度的影響。根據實驗結果我們發 現低濃度的鋅、銅離子對臺灣羽苔的葉綠體個數、光合色素含量、光反應速率皆有提 升,並且找到鋅離子、銅離子對臺灣羽苔有正向影響的濃度區間,而鋇離子、高濃度 的鋅銅離子則對植物有相反的影響。細胞壁的部分,低濃度鋅離子會造成細胞壁增厚, 而在高濃度時變薄;銅、鋇離子增厚程度則與離子濃度呈正相關。

壹、前言

一、研究動機

新竹身為台灣的科技城,科學園區帶來了無數的好處,但同時也會產出許多汙 染物,其中就包含重金屬元素,若是排放水沒有經過妥善處理,重金屬元素可能會隨 著水流放到各地,汙染土壤和飲用水,破壞土質、生態環境與人類健康。蘚苔因作為 原始植物,缺少像維管束等運輸系統,也因體積小,較不易排除所吸收的物質,進而 影響其生理運作,是方便取得又容易觀察的生物監測指標。因此我們想藉此機會研究 施加重金屬離子對蘚苔的顯微觀察(葉綠體個數、細胞壁厚度)、光合色素含量、光 反應速率等是否有影響。

作品與教材相關性:

高中選修生物二第二章植物體的組成層次、第三章植物的營養與生殖

二、研究目的

(一)探討重金屬離子對蘚苔形態之影響

1. 葉綠體數目

2. 細胞壁厚度

(二)探討不同重金屬離子對蘚苔光合色素含量之影響

(三)探討不同重金屬離子對蘚苔光反應速率之影響

三、文獻回顧

(一)蘚苔作為模式生物

蘚苔為無維管束植物,有很高的金屬累積能力,同處於汙染環境中,蘚苔植物體內的重金屬含量會高於維管束植物。且蘚苔植物會將重金屬離子累積在細胞內、外部及細胞間隙中,影響其他養分離子的儲存。苔類具有假根、莖狀枝、單層細胞構成的擬葉,易藉由觀察擬葉細胞型態變化得知環境對其影響。常用於生物監測的蘚苔種類包括木苔、羽苔與泥炭苔等(Mahapatra *et al.*, 2019)。 (二)微量元素對蘚苔的影響

微量元素為植物生長之必須元素,但其需要量十分微小,故稱微量元素, 若缺乏微量元素或吸收過量都會對植物產生不同的負面影響:

1.鋅:

辞為植物生理作用的輔酶,與生長激素合成和醣類代謝有關。若 缺乏鋅會導致葉片變小、產生黃斑。另一方面,過量的鋅會使植物葉尖 發黃、植株生長受阻、根呈刺鐵絲狀。

2.銅:

銅是參與電子傳遞鏈的酵素的一部分,如葉綠體中的質體藍素 (plastocyanin)或粒線體中的細胞色素 c 氧化酶(cytochrome c oxidase),可 促進植物之蛋白質利用。另一方面,過量的銅對植物具有毒性,因為它 會與各種酶結合,從而改變或阻斷酶的原始功能,這會導致活性氧(ROS) 的產生和積累,進而破壞膜並導致氧化還原電位的破壞(Antreich *et al.*, 2016)。

(三)重金屬對蘚苔的影響

重金屬在植物組織中累積過量,會引起各種生理上的改變,如蒸散作用、



光合作用和光合電子傳遞、葉綠素的合成以及細胞膜完整性等。

圖一、重金屬對植物的影響

(圖片來源:研究者繪製)

(四)Hill 反應

二氯酚靛基酚(DCPIP)在光合作用系統中,因還原反應褪色。二氯酚靛基酚比鐵氧還蛋白有較高電子親合能,可被光合作用電子傳遞鏈還原,取代光合作用中最終電子接受者 NADP⁺。當二氯酚靛基酚因還原反應而脫褪色時,可由分光光度計測量到其吸光值上升。

DCPIP (藍色) + $H^+ \rightarrow DCPIPH_2$ (無色)

貳、研究設備與器材

一、實驗植物



臺灣羽苔(Plagiochila taiwanensis),

為葉苔目齒萼苔亞目羽苔科羽苔屬

圖二、臺灣羽苔照片 (圖片來源:研究者拍攝)

二、實驗藥品

表一、實驗樂材(取用量詳見研究過	程)
------------------	----

名稱	重量(數量)	規格
六水合硝酸鋅	34.31mg	分子量:297
五水合硫酸銅	75.77mg	分子量:250
二水合氯化鋇	171.53mg	分子量:244
95%酒精	3瓶	500ml
0.05%二氯酚靛基酚(DCPIP)	10ml	
0.5M 蔗糖溶液	60ml	

三、實驗設備與器材

表二、實驗設備與器材

名稱	圖片	數量	規格
分光光度計		一台	MT-200
電子秤(量土)	Received and the second	一台	DHW-1.5kg
電子秤(量藥、蘚		一台	HT-224 R
苔)	A DEC		(220gx0.0001g)
烘箱		一台	KS-21
離心機		一台	DSC-200T
台和全能培養土	全能培養土	四包	25 公升
塑膠箱	2	30 個	31.5*20*13
量筒(量萃取液體積)		30 個	10ml
燒杯		30 個	50ml
紗布		數塊	
研缽		兩個	
塑膠離心管		30 個	
容量瓶		三個	100ml

參、研究過程與方法

研究架構圖



圖三、實驗流程架構圖

一、採集蘚苔

(一)採集地點:學校教學大樓間草地

(二)採集方法:

1.將蘚苔挖起,並將附著的土清除

2.將蘚苔種入裝好 250g 培養土的塑膠箱中

(三)照顧方法:

1.每隔2天澆水100ml

2.種植在半日照處

二、施加重金屬離子

(一)實驗組

1.依下表用電子秤取相應克數的含重金屬離子鹽類倒入容量瓶中,加蒸 餾水至 100ml

表三、不同濃度含金屬離子溶液秤取毫克數

	300µM	750µM	1500µM
六水合硝酸鋅(分子 量:297)	8.59	11.72	14
五水合硫酸銅(分子 量:250)	水合硫酸銅(分子 量:250) 21.47 29.3		35
二水合氯化鋇(分子 量:244)	42.93	58.6	70

2.利用連續稀釋法,取步驟一配置出的溶液 2.5ml 加入量筒,加入蒸餾水

至 250ml

3.將步驟二配置出的溶液均匀澆在塑膠箱中的蘚苔上

(二)對照組

1.用量筒量取 250ml 蒸餾水均匀澆在塑膠箱中的蘚苔上



圖四、羽苔種植情形

三、應變變因測量方法(取三重複實驗,共30盆)

(一)盲法試驗



圖五、盲法試驗流程圖

(二)光合色素含量(每兩週做一次,共測試五週。實驗步驟參考 Sumantaet al.(2014))

1.萃取光合色素

(1)採集各變因新鮮蘚苔樣本,用清水仔細洗淨並擠乾

(2)將新鮮葉片用烘箱烘乾30分鐘至1小時,取0.5g至研缽中,

剪至粉狀

(3)用量筒取 95%乙醇 10ml 加入研缽中,研磨混和並浸泡 50 分鐘

(4)將研缽中的汁液用雙層紗布過濾

(5) 倒入離心管,用離心機轉速 2500 rpm 離心 3 分鐘

(6)以量筒測量並記錄萃取液體積

(7)將液體分裝到比色管中

2.光合色素定量

(1)利用分光光度計測量光合色素萃取液在波長 470nm、649nm、

664nm下的吸光度

(2)以95%乙醇為空白對照

(3)利用公式計算光合色素含量(以下為參考文獻之公式)

葉綠素 a 含量 C_a = (13.36D₆₆₄ - 5.19D₆₄₉) × V / (1000 × W) mg/g

葉綠素 b 含量 C_b = (27.43D₆₄₉ - 8.12D₆₆₄) × V / (1000 × W) mg/g

類胡蘿蔔素含量 C_{x+c} = [(1000D₄₇₀ - 2.13C_a - 97.63C_b)/209]×V/

 $(1000 \times W) \text{ mg/g}$

D_x = 萃取液在 Xnm 的吸光值

(三) 觀察顯微構造變化(第三週測試)

1.取各組實驗組和對照組蘚苔的數片葉子作為樣本

2.將樣本葉片清洗乾淨後製成水埋玻片

3.將水埋玻片置於顯微鏡下觀察,觀察葉尖的變化及葉綠體數量並拍照4.利用 imagej 分析:

(1)細胞壁厚度測量:取照片葉片處測量細胞壁厚度

(2)單位面積所含葉綠體數量: 取照片葉尖處之 50*50 像素,分析 葉綠體個數



圖六、細胞壁厚度測量實驗操作圖



圖七、單位面積所含葉綠體數量實驗操作圖

(四)光反應速率(第五週測試)

1.備置葉綠體懸浮液

(1)取 5g 新鮮羽苔加入 10ml 0.5M 蔗糖溶液研磨

(2)以雙層紗布過濾汁液

(3)將濾液以1000rpm離心5分鐘取沉澱

(4)將 5ml 0.5M 蔗糖溶液加入沉澱物中,以玻棒輕攪至沉澱物均匀 懸浮

2、Hill 反應檢測

試管		А	В	
内容物	0.5M 蔗糖溶液	3ml		
	懸浮液	1ml		
	0.05%DCPIP 液	0.5ml		
處理		照光	遮光	

靜置 30 分鐘後,以 3000rpm 離心 3 分鐘,
用分光光度計測量在 596nm 的吸光值

肆、研究結果

- 一、羽苔體內光合色素含量(將鋅離子簡寫為Zn,銅、鋇以此類推)
 - (一) 光合色素含量隨天數(d)之變化
 - 葉綠素 a:根據圖七可看出,施加 Zn7.5µM、Zn3µM 葉綠素 a 含量大於 對照組且與對照組差距隨時間變大。Cu7.5µM、Zn15µM、Cu15µM小於 對照組但在 7d-21d 差距變小,在 21d-35d 差距又變大。Ba7.5µM、 Ba15µM小於對照組且差距隨時間變大。Cu3µM 葉綠素 a 含量在 7d 小於 對照組,在 21d、35d 又大於對照組,且在 35d 的差距大於 21d。Ba3µM 葉綠素 a 含量在 7d 大於對照組,在 21d、35d 又小於對照組,且在 35d 的差距大於 21d。



圖八、葉綠素 a 與對照組差隨天數(d)變化

2. 葉綠素 b:根據圖四可看出,Zn7.5µM、Zn3µM、Cu3µM 葉綠素 b 含量 大於對照組且與對照組差距隨時間變大。Zn15µM 小於對照組且差距隨 時間變大。Cu7.5µM、Cu15µM、Ba15µM 小於對照組但在 7d-21d 差距變 大,在 21d-35d 差距變小。Ba3µM 小於對照組但在 7d-21d 差距變小,在 21d-35d 差距變大。Ba7.5μM小於對照組,但在7d-21d 差距持平,在
 21d-35d 差距變小。



圖九、葉綠素 b 與對照組差隨天數(d)變化

 3. 葉綠素總量:根據圖五可看出,Zn7.5µM、Zn3µM、Cu3µM葉綠素總量 大於對照組且差距隨時間變大。Ba3µM、Cu7.5µM、Zn15µM、Ba7.5µM、 Cu15µM、Ba15µM小於對照組且差距隨時間變大。



4. 類胡蘿蔔素:根據圖六可看出,Zn7.5µM類胡蘿蔔素含量大於對照組且 與對照組差距隨時間變大。Zn3µM、Cu3µM含量大於對照組,且在7d-21d差距上升,在21d-35d差距持平。Cu7.5µM、Zn15µM、Cu15µM小 於對照組但在7d-21d差距變小,在21d-35d差距又變大。Ba7.5µM、 Ba15µM小於對照組且差距隨時間變大。Ba3µM類胡蘿蔔素含量在7d大 於對照組,在21d、35d又小於對照組,且在35d的差距大於21d。



圖十一、類胡蘿蔔素與對照組差隨天數(d)變化

综上可知鋅離子在 0-7.5μM 時對羽苔有正向影響,在 15μM 則否;銅離 子在 0-3μM 正向影響,在 7.5-15μM 則否;鋇離子則有負面影響。且從 圖中能看出金屬離子的正向影響隨時間趨近飽和。以及葉綠素 b 的含量 與對照組的差距在 21d-35d 大致上變化不大。

(二)相同金屬離子不同濃度間之比較

由於種植7天、21天、35天的結果相差不大,故取差異最顯著的21天 來說明實驗結果。

 根據圖七可看出施加 Zn3µM 的羽苔(葉綠素 a: 0.261, 葉綠素 b: 0.226, 總葉綠素: 0.487, 類胡蘿蔔素: 0.158mg/g)與施加 Zn7.5µM(葉綠素 a: 0.273, 葉綠素 b: 0.24, 總葉綠素: 0.513, 類胡蘿蔔素: 0.165mg/g)的光 合色素(葉綠素 a、b、總及類胡蘿蔔素)含量均高於對照組(葉綠素 a: 0.236, 葉綠素 b: 0.195, 總葉綠素: 0.43, 類胡蘿蔔素: 0.144mg/g),其 中 Zn7.5μM 的葉綠素 a、b 含量及總量高於 Zn3μM, 而類胡蘿蔔素則相 當。Zn15μM(葉綠素 a: 0.186, 葉綠素 b: 0.178, 總葉綠素: 0.364, 類胡 蘿蔔素: 0.118mg/g)的光合色素含量則低於對照組。根據單因子變異數 分析(oneway ANOVA),對照組、Zn3μM、Zn7.5μM、Zn15μM 的光合色 素含量皆有顯著差異。



圖十二、施加不同濃度鋅離子 21 天後對蘚苔光合色素含量影響

 根據圖八可看出施加 Cu3μM 的羽苔(葉綠素 a : 0.223, 葉綠素 b : 0.21, 總葉綠素 : 0.433, 類胡蘿蔔素 : 0.156mg/g)的光合色素(葉綠素 a、b、 總及類胡蘿蔔素)含量高於對照組(葉綠素 a : 0.236, 葉綠素 b : 0.195, 總葉綠素 : 0.43, 類胡蘿蔔素 : 0.144mg/g), Cu7.5μM(葉綠素 a : 0.198, 葉綠素 b : 0.175, 總葉綠素 : 0.374, 類胡蘿蔔素 : 0.119mg/g)、Cu15μM (葉綠素 a : 0.17, 葉綠素 b : 0.136, 總葉綠素 : 0.306, 類胡蘿蔔素 :

0.103mg/g)則低於對照組,其中 Cu15μM 又低於 Cu7.5μM。根據單因子 變異數分析,對照組、Cu3μM、Cu7.5μM、Cu15μM 葉綠素 a 含量無顯 著差異,其餘三者則有。



圖十三、施加不同濃度銅離子 21 天後對蘚苔光合色素含量影響

3. 根據圖九可看出施加 Ba3µM 的羽苔(葉綠素 a: 0.243, 葉綠素 b: 0.176, 總葉綠素: 0.419, 類胡蘿蔔素: 0.151mg/g)、Ba7.5µM(葉綠素 a: 0.188, 葉綠素 b: 0.137, 總葉綠素: 0.325, 類胡蘿蔔素: 0.117mg/g)、 Ba15µM(葉綠素 a: 0.155, 葉綠素 b: 0.136, 總葉綠素: 0.291,類胡蘿蔔 素: 0.097mg/g)的光合色素(葉綠素 a、b、總及類胡蘿蔔素)含量皆低 於對照組(葉綠素 a: 0.236, 葉綠素 b: 0.195, 總葉綠素: 0.43, 類胡蘿蔔 素: 0.144mg/g),其中含量隨金屬離子施加濃度增高而降低。根據單因 子變異數分析,對照組、Ba3µM、Ba7.5µM、Ba15µM的光合色素含量 皆有顯著差異。



圖十四、施加不同濃度鋇離子 21 天後對蘚苔光合色素含量影響 綜上可知,臺灣羽苔所需的 Zn²⁺濃度介在 7.5-15μM 間,而 Cu²⁺則介於 3-7.5μM。而鋇離子以及高濃度的鋅、銅離子皆對羽苔有負面影響。

- (三)相同濃度不同金屬離子間之比較 由於種植7天、21天、35天的結果相差不大,故取差異最顯著的21天 來說明實驗結果。
 - 根據圖十可看出施加 Zn3µM 的羽苔(葉綠素 a: 0.261, 葉綠素 b: 0.226, 總葉綠素: 0.487, 類胡蘿蔔素: 0.158mg/g)及施加 Cu3µM 的羽苔(葉 綠素 a: 0.223, 葉綠素 b: 0.21, 總葉綠素: 0.433, 類胡蘿蔔素: 0.156mg/g) 光合色素(葉綠素 a、b、總及類胡蘿蔔素)含量均高於對照組(葉綠素 a: 0.236, 葉綠素 b: 0.195, 總葉綠素: 0.43, 類胡蘿蔔素: 0.144mg/g), 其中 Zn3µM 又高於 Cu3µM, 而施加 Ba3µM 的羽苔(葉綠素 a: 0.243, 葉綠素 b: 0.176, 總葉綠素: 0.419, 類胡蘿蔔素: 0.151mg/g)則低於對照

組。然而根據單因子變異數分析,鋅、銅、鋇及對照組的光合色素含量 皆無顯著差異。



圖十五、施加 3μM 不同金屬離子 21 天後對蘚苔光合色素含量影響 2. 根據圖十一可看出施加 Zn7.5μM 的羽苔(葉綠素 a:0.273, 葉綠素 b: 0.24, 總葉綠素:0.513, 類胡蘿蔔素:0.165mg/g), 其體內的光合色素 (葉綠素 a、b、總及類胡蘿蔔素)含量高於對照組(葉綠素 a:0.236, 葉綠素 b:0.195, 總葉綠素:0.43, 類胡蘿蔔素:0.144mg/g), 而施加 Cu7.5μM (葉綠素 a:0.198, 葉綠素 b:0.175, 總葉綠素:0.374, 類胡蘿蔔 素:0.119mg/g)及 Ba7.5μM (葉綠素 a:0.188, 葉綠素 b:0.137, 總葉綠 素:0.325, 類胡蘿蔔素:0.117mg/g)的組別則低於對照組, 其中又以 Ba7.5μM 的光合色素含量較低。根據單因子變異數分析, 鋅、銅、鋇及 對照組的光合色素含量皆有顯著差異。



圖十六、施加 7.5μM 不同金屬離子 21 天後對蘚苔光合色素含量影響
3. 根據圖十二可看出 Zn15μM (葉綠素 a : 0.186, 葉綠素 b : 0.178, 總葉綠素: 0.364, 類胡蘿蔔素: 0.118mg/g)、Cu15μM (葉綠素 a : 0.17, 葉綠

素 b:0.136,總葉綠素:0.306,類胡蘿蔔素:0.103mg/g)、Ba15μM(葉 綠素 a:0.155,葉綠素 b:0.136,總葉綠素:0.291,類胡蘿蔔素: 0.097mg/g)的光合色素(葉綠素 a、b、總及類胡蘿蔔素)含量均低於對 照組(葉綠素 a:0.236,葉綠素 b:0.195,總葉綠素:0.43,類胡蘿蔔素: 0.144mg/g),其中光合色素含量:Ba15μM < Cu15μM < Zn15μM。根據 單因子變異數分析,鋅、銅、鋇及對照組的光合色素含量皆有顯著差異。



圖十七、施加 15μM 不同金屬離子 21 天後對蘚苔光合色素含量影響

綜上可知,對羽苔的正向影響:鋅>銅,負面影響:鋇>銅>鋅。

二、光反應速率(種植35天)

相同時間內遮光組與照光組知吸光值差距越大代表其光反應速率越大。

(一)相同金屬離子不同濃度間之比較

 根據圖十三可看出施加 Zn3μM (0.123A)與 Zn7.5μM (0.132A) 的吸光值差 均高於對照組,其中 Zn7.5μM 高於 Zn3μM,而 Zn15μM (0.035A)則低於 對照組 (0.073A)。根據獨立樣本 t 檢定分析(Two-Sample t Test),僅 Zn15μM 與對照組吸光值差有顯著差異。



圖十八、施加不同濃度鋅離子對光反應效率影響

 4. 根據圖十四可看出施加 Cu3μM (0.079A)的吸光值差高於對照組 (0.073A), 而 Cu7.5μM (0.039A)和 Cu15μM (0.014A)則低於對照組,其中 Cu7.5μM 高於 Cu15μM。根據獨立樣本 t 檢定分析(Two-Sample t Test), Cu7.5μM 與對照組、Cu15μM 與對照組吸光值差有顯著差異。



圖十九、施加不同濃度銅離子對光反應效率影響

3. 根據圖十五可看出施加 Ba3µM (0.057A)、Ba7.5µM (0.02A)、
 Ba15µM(0.008A) 的吸光值差均低於對照組 (0.073A),其中 Ba15µM
 Ba7.5µM
 Ba3µM。根據獨立樣本 t 檢定分析(Two-Sample t Test),
 Ba7.5µM 與對照組、Ba15µM 與對照組吸光值差有顯著差異。



圖二十、施加不同濃度鋇離子對光反應效率影響

綜上可知,對羽苔有正向影響的鋅離子濃度上限介於 7.5-15µM 之間,銅 在 3-7.5µM。而鋇離子以及高濃度的鋅、銅離子皆有負面影響。

- (二)相同濃度不同金屬離子間之比較
 - 根據圖十六可看出施加 Zn3μM (0.123A) 與 Cu3μM (0.079A) 的吸光值差 均高於對照組 (0.073A),其中 Zn3μM 高於 Cu3μM,而 Ba3μM (0.057A) 則略低於對照組。根據獨立樣本 t 檢定分析(Two-Sample t Test), Zn3μM



與對照組、Cu3µM與對照組、Ba3µM與對照組吸光值差皆無顯著差異。

4. 根據圖十七可看出施加 Zn7.5μM(0.132A)的吸光值差高於對照組(0.073A),而 Cu7.5μM (0.039A)和 Ba7.5μM (0.02A)則低於對照組,其中 Cu7.5μM 高於 Ba7.5μM。根據獨立樣本 t 檢定分析(Two-Sample t Test), Cu7.5μM 與對照組、Ba7.5μM 與對照組吸光值差皆有顯著差異。



圖二十二、施加7.5µM不同金屬離子對光反應效率影響

3. 根據圖十八可看出施加 Zn15μM (0.035A)、Cu15μM (0.014A)、Ba15μM (0.008A) 的吸光值差均低於對照組 (0.073A),其中 Ba15μM < Cu15μM < Zn15μM。根據獨立樣本 t 檢定分析(Two-Sample t Test),Zn15μM 與對照 組、Cu15μM 與對照組、Ba15μM 與對照組吸光值差皆有顯著差異。</p>

圖二十一、施加 3µM 不同金屬離子對光反應效率影響



圖二十三、施加 15µM 不同金屬離子對光反應效率影響 綜上可知,對羽苔的正向影響:鋅>銅,負面影響:鋇>銅>鋅。
三、觀察顯微構造之變化(種植 21 天)

(一)細胞壁厚度測量

根據圖十九可看出施加 Zn 離子的羽苔細胞壁厚度在 0μM 至 3μM 間上升, 而在 3μM 至 15μM 之間呈下降趨勢;施加 Cu 離子的在 0μM 至 3μM 間 上升, 3μM 至 7.5μM 之間幾乎沒變化,且在 15μM 時上升;而施加 Ba 離子的在 0μM 至 3μM 間上升, 3μM 至 7.5μM 之間微幅下降,且也在 15μM 時上升。

而比較不同金屬離子間的差異,施加金屬濃度在 3µM下,羽苔細胞壁厚 度為鋅>銅>鋇,施加金屬濃度 7.5µM 時厚度為銅>鋅>鋇,15µM 時厚度 則為銅>鋇>鋅;施加三種金屬細胞壁厚度皆較沒施加的大,Zn15 則是接 近沒施加的厚度。





根據圖二十可看出施加鋅離子的羽苔葉綠體個數從 $0\mu M$ (79 個)開始至 $3\mu M$ (81 個)上升,到 7.5 μM (81 個)時幾乎沒變化,而至 $15\mu M$ (75 個)時下降;施加銅離子的在 $0\mu M$ (79 個)至 $3\mu M$ (82 個)間上升, $3\mu M$ 至 7.5 μM (68 個)至 $15\mu M$ (61 個)時下降,且下降幅度隨施加金 屬濃度增大而趨緩;施加鋇離子的隨濃度上升而下降(79 \rightarrow 78 \rightarrow 71 \rightarrow 50 個),且下降幅度漸遽。

而比較不同金屬離子間的差異,施加金屬濃度在 3μM 下,羽苔葉綠體個 數為銅>鋅>鋇,施加金屬濃度 7.5μM 時個數為鋅>鋇>銅,15μM 時厚度 則為鋅>銅>鋇。



伍、討論

一、光合色素含量(種植天數以 d 表示, Zn3 表示施加 3μM 鋅離子的羽苔,以此類推)
 (一)金屬離子影響

鋅和銅屬於微量元素,在低濃度下對羽苔的光合色素含量有正向的影響, 其中又以鋅的正向影響較大。然而,鋅、銅、鋇三者在較高濃度下皆對羽苔的 光合色素含量有負面影響,其中,負面影響:鋇>銅>鋅。我們發現臺灣羽苔所 需的 Zn²⁺濃度介在 7.5-15μM 間,而 Cu²⁺則介於 3-7.5μM。然而,Mahapatra *et al.*(2019)的研究指出,蘚苔的品種會影響到對金屬離子的耐受度,故此數值不 一定適用於其他品種的蘚苔。Tsonev *et al.*(2012)、Abbasifar *et al.*(2020)、Wang *et al.*(2019)及 Shakya *et al.*(2008)的研究指出,鋅離子可以作為葉綠素合成酶 (Chlorophyll synthase)、鎂螯合酶(Mg-chelatase)、原葉綠素還原酶 (Protochlorophyllide reductase)的輔因子幫助提升葉綠素、類胡蘿蔔素的合成, 然而過高的濃度則會破壞類囊體膜的結構完整性,造成葉綠素的降解,Antreich et al.(2016)、Chettri et al.(1998)、Drouin et al.(1973)及Yruela(2005)的研究也指 出銅離子可以作為5-氨基酮戊酸脱水酶(5-aminolevulinate dehydratase,ALAD)的 輔因子,催化葉綠素前體的合成,而過高的濃度則會膽色素原氧化酶 (Porphobilinogen oxidase)及亞鐵螯合酶(Ferrochelatase)等酵素運作進而導致葉綠 素含量降低。Shakya et al.(2008)的研究指出鋅相較於銅對於葉綠素的損害較小。 Arundhathi et al.(2016)的研究也指出鋇會造成細胞中的葉綠體聚集,阻擋光進入 細胞、降低葉綠體利用二氧化碳的效率,進而導致葉綠素的生成減少。 (二)光合色素含量隨週次之變化

施加Zn3µM、Zn7.5µM及Cu3µM的羽苔之光合色素含量與對照組之差 大致為正且隨時間上升,而上升有趨緩的趨勢推測應是趨近飽和。施加 Zn15µM、Cu7.5µM、Cu15µM、Ba3µM、Ba7.5µM、Ba15µM之光合色素含量 與對照組之差大致為負且隨時間下降。且施加低濃度鋅、銅離子之羽苔光合色 素含量隨時間上升,施加鋇以及高濃度的鋅、銅離子之羽苔光合色素含量隨時 間下降之結果與前項呼應。

二、光反應速率

鋅和銅屬於微量元素,在我們的低濃度處理下對羽苔,對其光反應速率 有正向的影響,其中又以鋅的正向影響較大。然而,鋅、銅、鋇三者在較高濃 度下皆對羽苔的光反應速率有負面影響,其中,負面影響:鋇>銅>鋅。此結果 與光合色素含量呼應,能更進一步支持我們的實驗結果。

根據林玟娟與張永達(2009)的文章中說明植物光反應在葉綠體囊狀膜上 進行,其上嵌有由色素和蛋白質形成的複合體。其中有兩種主要的色素蛋白質 複合體:光系統I(photosystem I, PSI)、光系統II(photosystem II, PSII)是由光 合色素和蛋白質組成,可以幫助吸收光能。PSI核心由十一條多肽鏈組成,其 中兩條最大的多肽鏈結合兩個葉綠素 a 分子,此為 PSI的反應中心。PSII核心 由兩條多肽鏈聚合成雙體(dimer),雙體內有四個葉綠素 a 分子,此雙體為 PSII的反應中心。另外,PSII的輔助系統內也含有大量葉綠素 a、b 及胡蘿蔔素 等幫助光反應進行。 從我們的實驗數據顯示,光合色素含量增加的羽苔,其 DCPIP 褪色的效率同時也較佳,呼應光反應速率與光合色素含量相關,論光合色素含量較高時, 光反應速率也隨之提升,又光反應速率的提升能為光合色素的合成提供更多能量,造成光合色素含量的提升,形成正向循環。

三、觀察顯微構造之變化

(一)細胞壁厚度測量

施加鋅離子的羽苔細胞壁厚度在 0μM 至 3μM 間上升,而在 3μM 至 15μM之間下降;而施加銅離子與鋇離子的羽苔細胞壁厚度大致隨濃度增加而 有上升趨勢。Roberts *et al.*(2012)的研究說明蘚苔的細胞壁成分包含纖維素、果 膠(包括同型半乳醣醛酸(homogalacturonan)、半乳聚醣(β-1,4-galactan)和阿拉伯 聚醣(α-1,5-arabinan))與多種聚合物,在 Konno *et al.*(2010)的研究結果顯示銅離 子會與同型半乳醣醛酸中的負電荷區域緊密結合,導致蘚苔之原絲體細胞壁增 厚,與我們研究中觀察到葉尖細胞壁增厚相呼應,推測葉尖細胞壁亦具有此種 聚合物與部分吸收之重金屬離子結合,使細胞壁厚度隨銅離子與鋇離子濃度上 升而增厚。

而依 Chen et al.(2015)的研究推測,因低濃度鋅離子為各種修飾細胞壁酵素(包括果膠甲基酯酶(pectin methylesterases, PMEs)、擴展蛋白(expansin))的 組成元素,可促使酶作用而讓細胞壁增厚。然而高濃度鋅離子則會抑制這些酵素,進而使細胞壁分泌減少或變形。

22



圖二十六、同型半乳醣醛酸聚合物與負電荷區

(圖片來源:參考文獻)

(二)單位面積所含葉綠體數量

施加鋅離子的羽苔葉綠體個數從 0µM 開始至 3µM 上升,到 7.5µM 時幾 乎沒變化,而至 15µM 時下降;施加銅離子的在 0µM 至 3µM 間上升,3µM 至 15µM 時下降;施加鋇離子的隨濃度上升而下降。此結果與光合色素定量、光 反應速率結果吻合,能更進一步支持我們的實驗數據。施加低濃度鋅、銅離子 的羽苔葉綠體數目之所以增加,應是因光合作用速率的提升促進組成葉綠體之 分子的合成,造成葉綠體的生成。而在 Maresca *et al.*(2022)的研究結果中指出, 葉綠體的超微結構變化與蘚苔吸收的重金屬濃度有關,過量重金屬與活性氧會 造成生物膜脂質過氧化、類囊體損傷,隨有害物質濃度增加更出現葉綠體變形、 類囊體分界不明顯等損害,造成葉綠體數目減少。

23

陸、結論

圖二十七、結論架構圖

(圖片來源:研究者繪製)



 一、微量元素之正面影響: 鋅和銅為植物生長所需之微量元素,在達到植物對該離子 所需的飽和濃度前會對植物生長有正面影響,超過飽和濃度後則會有負面影響。根據
 本實驗,臺灣羽苔對鋅離子所需的飽和濃度落在 7.5-15μM 之間;對銅離子的飽和濃度
 落在 3-7.5μM 之間。

二、重金屬離子對葉綠體影響:低濃度鋅離子與銅離子因光合作用速率的提升促進組 成葉綠體之分子的合成,造成葉綠體的生成,使植物葉綠體數目增加。鋇離子及高濃 度的鋅、銅離子則有相反的效果。

三、重金屬離子對細胞壁影響:低濃度鋅離子可助於合成各種修飾細胞壁酵素,而高 濃度鋅離子則會抑制這些酵素,使細胞壁變薄。銅離子與鋇離子會與細胞壁內的陰離 子結合位點結合而導致蘚苔細胞壁增厚,增厚程度與離子濃度呈正相關。

柒、未來展望

一、可延伸探討之層面

本研究是針對重金屬對於羽苔的光合色素含量與葉綠體個數之影響。因實驗室 資源有限及實驗安全考量,我們選擇了工業所產生重金屬其中三種:鋅、銅、鋇,然 而實際上工業污染的狀況不僅如此。此外,金屬對於不同種蘚苔生理變化略有不同 (例如蘚苔對於銅、鉛等重金屬之耐受度較一般蘚苔大),蘚苔的生理變化也不僅限 於本研究,諸如假根、原絲體、配子體、孢子等,未來更可多方探討。 二、發展與應用

未來我們可藉由檢測蘚苔的生理變化與生長狀況監測工業區鄰近土壤汙染程度, 更可利用蘚苔易吸附與囤積重金屬的特性,探討蘚苔是否能除去環境中的重金屬汙染, 作為淨化土質與水質的天然材料。

捌、參考文獻資料

- \sim Brown, D. H., & Wells, J. M. (1990). Physiological effects of heavy metals on the moss Rhytidiadelphus squarrosus. *Annals of Botany*, *66*(6), 641-647.

 — Chang, Y. P., Yeoh, L. Y., Chee, S. Y., & Lim, T. M. (2017, April). Looking for a
 substituent of spinach (Spinacia oleracea) chloroplasts. In *AIP Conference Proceedings* (Vol.
 1828, No. 1, p. 020015). AIP Publishing LLC.

 \equiv \circ Chen, Y. E., Cui, J. M., Yang, J. C., Zhang, Z. W., Yuan, M., Song, C., ... & Yuan, S. (2015). Biomonitoring heavy metal contaminations by moss visible parameters. *Journal of Hazardous Materials*, 296, 201-209.

□ · Shakya, K., Chettri, M. K., & Sawidis, T. (2008). Impact of heavy metals (copper, zinc, and lead) on the chlorophyll content of some mosses. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *54*, 412-421.

 Ξ \cdot Salemaa, M., Derome, J., Helmisaari, H. S., Nieminen, T., & Vanha-Majamaa, I. (2004). Element accumulation in boreal bryophytes, lichens and vascular plants exposed to heavy metal and sulfur deposition in Finland. *Science of the Total Environment*, *324*(1-3), 141-160. \land \cdot Fernandez, J. A., Vazquez, M. D., Lopez, J., & Carballeira, A. (2006). Modelling the extra and intracellular uptake and discharge of heavy metals in Fontinalis antipyretica transplanted along a heavy metal and pH contamination gradient. *Environmental Pollution*,

139(1),21-31.

 \pm Rascio, N., & Navari-Izzo, F. (2011). Heavy metal hyperaccumulating plants: how and why do they do it? And what makes them so interesting?. *Plant science*, *180*(2), 169-181.

八、Sassmann, S., Weidinger, M., Adlassnig, W., Hofhansl, F., Bock, B., & Lang, I. (2015). Zinc and copper uptake in Physcomitrella patens: Limitations and effects on growth and morphology. *Environmental and experimental botany*, *118*, 12-20.

九、Goyal, D., Yadav, A., Prasad, M., Singh, T. B., Shrivastav, P., Ali, A., ... & Mishra, S. (2020). Effect of heavy metals on plant growth: an overview. *Contaminants in agriculture: sources, impacts and management*, 79-101.

+ \cdot Tsonev, T., & Cebola Lidon, F. J. (2012). Zinc in plants-an overview. *Emirates Journal of Food & Agriculture (EJFA)*, 24(4).

+- × Abbasifar, A., Shahrabadi, F., & ValizadehKaji, B. (2020). Effects of green synthesized zinc and copper nano-fertilizers on the morphological and biochemical attributes of basil plant. *Journal of Plant Nutrition*, 43(8), 1104-1118.

+二 ∧ Arundhathi, A., Marisamy, K., Duraipandian, M., Sevugaperumal, R., & Ramasubramanian, V. (2016). Comparison of the Metal Toxicity due to Aluminum and

Barium on the Growth Attributes of Vigna trilobata (L.) Verde. *Bioengineering and Bioscience*, *4*(4), 64-69.

 \pm · Richfield, D. (2023). Chlorophyll. Wikimedia.

https://en.wikipedia.org/wiki/Chlorophyll

+ 🖂 、 Chettri, M. K., Cook, C. M., Vardaka, E., Sawidis, T., & Lanaras, T. (1998). The effect of Cu, Zn and Pb on the chlorophyll content of the lichens Cladonia convoluta and Cladonia rangiformis. *Environmental and Experimental Botany*, *39*(1), 1-10.

+五、Yruela, I. (2005). Copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, *17*, 145-156.

十六、Antreich, S., Sassmann, S., & Lang, I. (2016). Limited accumulation of copper in heavy metal adapted mosses. *Plant Physiology and Biochemistry*, *101*, 141-148.

 $+\pm$ Yruela, I. (2013). Transition metals in plant photosynthesis. *Metallomics*, 5(9), 1090-1109.

十八、Saxena, D. K., & Saiful-Arfeen, M. (2009). Effect of Cu and Cd on oxidative enzymes and chlorophyll content of moss Racomitrium crispulum. *Taiwania*, *54*(4), 365-374. 十九、Molas, J. (2002). Changes of chloroplast ultrastructure and total chlorophyll concentration in cabbage leaves caused by excess of organic Ni (II) complexes.

Environmental and Experimental Botany, 47(2), 115-126.

 \pm × Konno, H., Nakashima, S., & Katoh, K. (2010). Metal-tolerant moss Scopelophila cataractae accumulates copper in the cell wall pectin of the protonema. *Journal of plant physiology*, *167*(5), 358-364.

→ Maresca, V., Bellini, E., Landi, S., Capasso, G., Cianciullo, P., Carraturo, F., ... & Basile, A. (2022). Biological responses to heavy metal stress in the moss Leptodictyum riparium (Hedw.) Warnst. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 229, 113078.

 $\pm \pm \pm$ > Petschinger, K., Adlassnig, W., Sabovljevic, M. S., & Lang, I. (2021). Lamina cell shape and cell wall thickness are useful indicators for metal tolerance—An example in bryophytes.

 $=+\equiv$ Noberts, A. W., Roberts, E. M., & Haigler, C. H. (2012). Moss cell walls: structure and biosynthesis. *Frontiers in Plant Science*, *3*, 166.

 \pm + \square \land Chen, Q., Liang, X., Li, W., Jiang, H., Luo, Y., & Zheng, J. (2015). Zinc-induced changes in anatomy, antioxidative capability, and photosynthetic capacity of mesophyll cells in the leaves of maize seedlings. *Frontiers in plant science*, 6, 1148. doi: 10.3389/fpls.2015.01148

 $\pm\pm\pm$ Ochoa-Villarreal, M., Aispuro-Hernández, E., Vargas-Arispuro, I., & Martínez-Téllez, M. Á. (2012). Plant cell wall polymers: function, structure and biological activity of their derivatives. *Polymerization*, *4*, 63-86.

二十六、林玟娟, &張永達. (2009, August 11). 光反應 - 上. 科學 Online.

https://highscope.ch.ntu.edu.tw/wordpress/?p=3725

二十七、林浩潭.(n.d.). 重金屬及微量元素對作物之影響. 行政院農委會農業藥物毒物 試驗所 https://www.tactri.gov.tw/Uploads/Item/a0b68bd1-112b-4fe7-a2ce-5fde3a2662f9.pdf 二十八、Sumanta, N., Haque, C. I., Nishika, J., & Suprakash, R. (2014). Spectrophotometric analysis of chlorophylls and carotenoids from commonly grown fern species by using various extracting solvents. *Res J Chem Sci*, 2231, 606X.

【評語】052102

- 本研究以臺灣羽苔作為模式生物,探討不同重金屬種類、濃度對 其葉綠體個數、光合色素含量、光反應速率及細胞壁厚度的影響。
- 本研究探討不同濃度的各種重金屬對光合色素含量及光反應速率 的影響,是成果相當豐富的作品。可惜缺乏與相關研究的比較, 沒有詳細陳述本作品創新之處。
- 3. 本研究以生理觀察結果為主,對結果解釋可強化。

作品海報

探討重金屬離子對臺灣羽苔之生理影響

摘要

本研究以臺灣羽苔作為實驗生物,探討不同重金屬種類、濃度對其葉綠體個數、光合色素含量、 光反應速率及細胞壁厚度的影響。根據實驗結果我們發現低濃度的鋅、銅離子對臺灣羽苔的葉綠 體個數、光合色素含量、光反應速率皆有提升,並且找到鋅離子、銅離子對臺灣羽苔有正向影響 的濃度區間,而鋇離子、高濃度的鋅銅離子則對植物有相反的影響。細胞壁的部分,低濃度鋅離 子會造成細胞壁增厚,而在高濃度較低濃度時薄;銅、鋇離子增厚程度則與離子濃度呈正相關。



貳、研究設備

一、實驗生物:臺灣羽苔(Plagiochila taiwanensis) 二、實驗材料: 六水合硝酸鋅、五水合硫酸銅、二水合氯化鋇、95%乙 醇、0.05%二氯酚靛基酚(DCPIP)、0.5M蔗糖溶液 三、實驗設備&軟體:分光光度計、離心機、烘箱、imagej等 臺灣羽苔照片 參、研究過程架構 施加重金屬離子濃度 細胞壁厚度 植物型態分析 7.5µM Zn 15µM Zn 3µM Zn 葉綠體數目 葉綠素a 重金屬對羽苔的影響 7.5µM Cu 15µM Cu 3µM Cu 光合色素含量測定 葉綠素b 生化分析 類胡蘿蔔素 ·反應速率測定 7.5µM Ba ЗµМ Ва 15µM Ba 二、應變變因測量 (一) 顯微構造觀察 (1) 取數株 羽苔製成水埋玻片,以imagej 分析葉尖之細胞壁厚度、單位面積所含葉綠體數目 (二)光合色素含量測定 (1)用95%乙醇10ml萃取羽苔光合色素,並以2500rpm離心3分鐘後,量取上清液體積

(2)量測上清液在波長470、649、664nm下的吸光值,並以文獻公式計算各光合色素濃度

(三)光反應速率測定

(1)取5g羽苔+0.5M蔗糖溶液10ml研磨過濾,並以1000rpm離心5分鐘取沉澱製成懸浮液 (2)取懸浮液1ml+0.5M蔗糖溶液3ml+0.05%DCPIP液0.5ml,分別以照光遮光處理靜置30 分鐘後,以3000rpm離心3分鐘,並量測在波長596nm下的吸光値,計算其差値

(二)葉緑體個數

辞、銅:先升後降

肆、研究結果

一、**顯微構造觀察(**將鋅離子簡寫為Zn,銅、鋇以此類推)

(一)細胞壁厚度

辞:7.5-15µM增加的細胞壁厚度較0-3µM少 銅、鋇:隨濃度上升而呈上升趨勢



二、施加<mark>鋅離子</mark>之羽苔**21**天後之光合色素含量及光反應效率(圖表中*:p<0.05、**:p<0.01、***:p<0.001) 光合色素含量及光反應效率在0-7.5µM上升,15µM以上下降,兩者互相呼應





、施加不同濃度鋅離子對光反應效率影響 圖四

三、施加銅離子之羽苔21天後之光合色素含量及光反應效率



光合色素含量及光反應效率在0-3µM上升,7.5µM以上下降,兩者互相呼應



四、施加鋇離子之羽苔21天後之光合色素含量及光反應效率



光合色素含量及光反應效率隨濃度增加呈下降趨勢,兩者互相呼應



Zn7.5µM

五、施加不同離子之羽苔光合色素含量隨天數之變化 葉緑素含量隨天數之變化大致與前項呼應



圖九、施加不同濃度金屬離子葉綠素總量與對照組差隨時間變化 (天數以d表示)

圖三、施加不同濃度鋅離子對光合色素含量影響



- 一、鋅離子之影響
 - 現象:0-7.5µM使光合色素含量、光反應速率、葉緑體數目上升,15µM則下降
 - 解釋:鋅離子可以作為葉緑素合成酶、鎂螯合酶、原葉緑素還原酶的輔因子幫助提升光合色素
 - 合成,然而過高的濃度則會破壞葉綠體,造成光合色素的降解。(Willow, 2003)
- 二、銅離子之影響
 - 現象:0-3µM使光合色素含量、光反應速率、葉緑體數目上升,7.5-15µM則下降
 - 解釋:銅離子可以作為5-氨基酮戊酸脫水酶的輔因子,催化葉緑素前體的合成,而過高的濃度 則會阻礙膽色素原氧化酶及亞鐵螯合酶等酵素運作,進而導致葉緑素含量降低。 (Drouin et al.,1973)
- 三、鋇離子之影響
 - 現象:光合色素含量、光反應速率、葉緑體數目隨濃度上升而下降
 - 解釋: 鋇離子會造成細胞中的葉綠體聚集,阻擋光進入細胞並降低葉綠體利用二氧化碳的效率, 使光合效率變差。(Arundhathi et al., 2016)
- 四、細胞壁厚度
 - (一) 辞離子
 - 現象: 0-3µM使細胞壁變厚,而3-15µM增加的厚度隨濃度增 加而減少(0-15µM皆可使細胞壁變厚)
 - 解釋: 低濃度鋅離子為修飾細胞壁酵素(果膠甲基酯酶、擴展蛋



白等)的組成元素,可促使酶作用而讓細胞壁增厚。然而 高濃度鋅離子則會抑制這些酵素,進而使細胞壁分泌減 少或變形。(Chen, 2015)

- (二)銅、鋇離子
 - 現象:細胞壁隨濃度增加而變厚
 - 解釋:金屬離子與同型半乳醣醛酸中的負電荷區域結合,導致 細胞壁增厚。(Konno, 2010)

	陸、結論與展望			
—、結	命			
微量	微量元素對臺灣羽苔生長有正向影響之濃度上限	=	、展望	
元素	鋅:7.5-15µM,銅:3-7.5µM		延伸	汙染之重金屬種類
重金屬	施加低濃度鋅、銅離子可使葉綠體數目增加		探討	不同蘚苔種類與構造
葉緑體	銀、高濃度鋅銅離子則有相反效果		未來	監測土壤汙染程度
重金屬	低濃度鋅離子增加的細胞壁厚度較高濃度多		應用	作為重金屬汙染吸附材
^釣 細胞壁	銅鋇離子會與細胞壁内負電荷區結合而導致其增厚			