

2010年臺灣國際科學展覽會  
優勝作品專輯

編號：120006-04

作品名稱

奈米粒子對細胞與生物之毒性及其分布

**The toxicity and distribution of nano-particles  
for cells and creatures**

得獎獎項

環境科學科大會獎二等獎

美國正選代表:美國第61屆國際科技展覽會

學校名稱：新竹市磐石高級中學

作者姓名：黃品慈、陳昕

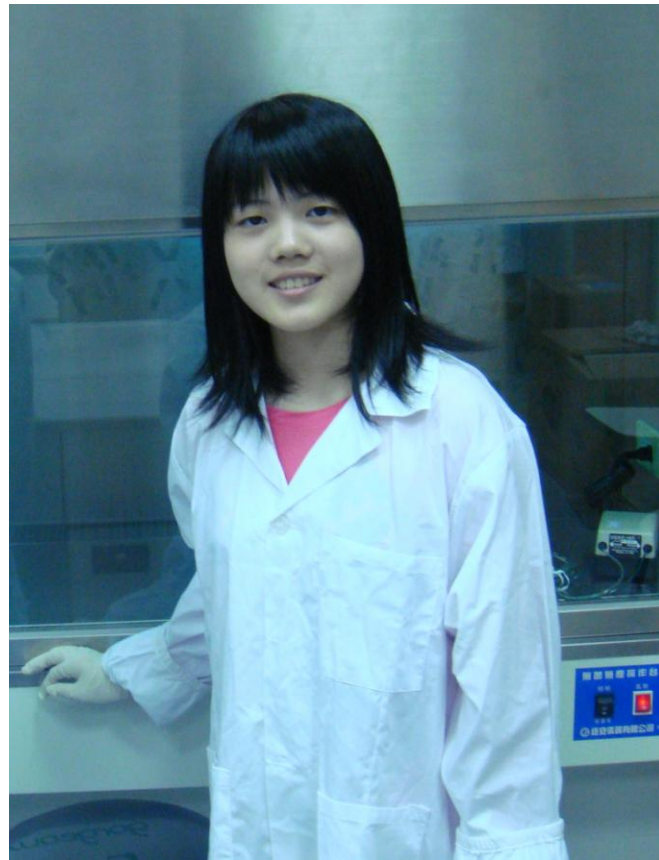
指導老師：吳弘毅老師、林佳穎老師

關鍵詞：奈米鑽石、奈米磁性粒子、共軛焦顯微鏡

## 作者簡介



現在目前就讀磐石中學普二忠班，在高一的暑假時，參加了台北醫學大學所辦的冬令營，與「新竹市 98 學年度學生出國見習美語參訪文化交流活動」讓我對於生物的研究更有興趣，也因為學校老師大力的支持，我們才能參加「2010 年國際科展」。我的在校成績皆為第一名，但我並不是所謂的書呆子，我的個性外向、活潑，且興趣是彈鋼琴，平時都會藉由彈鋼琴放鬆心情或者是聽聽音樂來紓解壓力。



我目前就讀新竹市私立磐石高級中學普通科二年級忠班，在高一的寒假時，我參加了台北醫學大學所舉辦的現代醫學冬令營，也參加了第四十九屆桃竹苗區高中科展，也因為如此，讓我對生物方面的研究更產生興趣。在學校課業方面，也另有亮眼的成績，而在才藝方面也參加過新竹縣美術比賽西畫類—第二名、新竹縣反貪污海報比賽—第三名等。在閒暇之於我也會藉由彈琴來紓發壓力。

## 摘要

人類目前廣泛的應用奈米鑽石，奈米鑽石粒子極為微小因此很容易進入生物體內，對於生物體所產生的影響為本次的研究對象：奈米鑽石、奈米磁性粒子之生物毒性與其在生物體的分布。

加入奈米鑽石、奈米磁性粒子之後綠豆發芽數減少。發芽的綠豆中加入不同量的奈米鑽石、奈米磁性粒子，發現濃度越高生長速度越慢。在綠豆吸收奈米鑽石、奈米磁性粒子後，在根、莖、葉細胞內都有發現奈米鑽石、奈米磁性粒子。在麵包蟲的研究中發現，在0.25克濃度下，有些微的影響，而在0.75克和1克之影響甚大。在人類胎盤滋養層細胞中，發現加入奈米鑽石800微克以上對其有毒性。在細胞的分布，可發現細胞質及細胞核中都有奈米鑽石，當細胞內太多或作用太久時，會出現細胞凋亡的現象，此時奈米鑽石會大量聚集在細胞核，這可能是造成細胞死亡的原因之一。本研究意外發現在細胞分裂時，奈米鑽石只分布在細胞核周圍的細胞質，但是在赤道板及染色體上並沒有。

## **Abstract**

The nano-particle has been applied popularly so far. However, although nano-particle are small, it can cause negative influences if penetrating creatures. This study investigates the biological toxicity of nano-diamond and nano-magnetic particle, and its distribution over an organism.

As the study shows, the number of nano diamond and nano-magnetic particle doses added to the germinating mung beans influences its growing speed: the higher the nano diamond and nano-magnetic particle concentration is, the slower the mung beans grow. It is because the nano-diamond and nano-magnetic particle absorbed completely by the mung beans is discovered to spread over the cells of root, stem and leaves. As a result, the amount of mung beans sprouts reduces by adding nano diamond and nano-magnetic particle. We found a slight effect in bread worm with 0.25g treatment of both two nano particles but a great effect under 0.75 g and 1 g treatment.

Besides, the experiment on the trophoblast reveals that the amount of nano diamond, if over 800 micrograms, will generate severe toxicity. Nano diamond is observed in cytoplasm and a nucleus of a cell by examining its distribution. As nano diamond exceeds in number or is at play, the phenomenon apoptosis," the death of cell," occurs, which likely results from the massive gathering of nano diamond in nucleus and cytoplasm. We, though, unexpectedly discover that there is no nano diamond in the equatorial plate and chromosomes, but around the nucleus and cytoplasm as the cell divides.

## 壹、研究動機

在新聞報導中，看到奈米鑽石似乎是一個熱門的話題，他的直徑大小只有100nm，可是卻有鑽石的結晶和硬度。在我們進一步了解奈米粒子，已經被用在很多地方，例如工業材料，在醫療器材上...等，種種應用似乎已經廣為被應用在生活中了。同時在生物課上聽到礦工的矽肺病，是礦坑中碳或粉塵沉積在肺造成的，讓我聯想到一樣是「奈米粒子」似乎也跟粉塵一樣可被肺吸入，因為如此激起了我們想瞭解「奈米粒子」對動物及植物的毒性有多大，又當奈米粒子進入生物體後如何分布。

## 貳、研究目的

- 一、 探討奈米磁性粒子對綠豆生長的影響。
- 二、 探討奈米磁性粒子對綠豆發芽的影響。
- 三、 探討植物向性受奈米磁性粒子的影響。
- 四、 探討奈米磁性粒子對麵包蟲的毒性。
- 五、 探討奈米鑽石對麵包蟲的毒性。
- 六、 探討奈米鑽石對植物(綠豆)發芽的影響。
- 七、 探討奈米鑽石對植物(綠豆)生長的影響。
- 八、 探討奈米鑽石在植物(綠豆)的分布。
- 九、 探討奈米鑽石對動物細胞(人類的胎盤滋養層細胞)的毒性。
- 十、 探討奈米鑽石對動物細胞(人類的胎盤滋養層細胞)的分布。

## 參、研究藥品與器材

### 一、實驗生物及細胞

未發芽的綠豆、發芽的綠豆、麵包蟲、人類滋養層細胞 (3A-sub-E, 來源於食品工業研究所國家細胞庫)

### 二、實驗器材

恆溫培養箱、培養皿、50 mL 滴管、1.5 mL 微量試管、微量吸管 (micropipette)、微吸管頭 (Micro Pipettor tip)、血清瓶、微量天平、秤量紙、藥匙、複式顯微鏡、載玻片、5 mL, 10 mL 巴士德無菌吸管、37°C 恆溫水浴槽、自動吸取器、倒立式顯微鏡、共軛焦顯微鏡、15 mL 無菌離心管、T25 (25 mm<sup>2</sup>) 培養皿。

### 三、實驗藥品與配方

1. 磷酸鹽緩衝液 (PBS, Phosphate Buffered Saline): PH7.4

NaCl	8 g
KCl	0.4 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.88 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.48 g
蒸餾水	1000 mL

2. 4% 聚甲醛 4g 聚甲醛加 100 mL PBS

3. PBST: 以 PBS 配製 0.05% Tween-20

4. 以 PBS 配製 0.5% Triton-X100

5. 50 nM DAPI 以 PBS 配製 (DAPI, 即 4',6-diamidino-2-phenylindole 是一種能夠與 DNA 強力結合的螢光染料, 常用於螢光顯微鏡觀察)

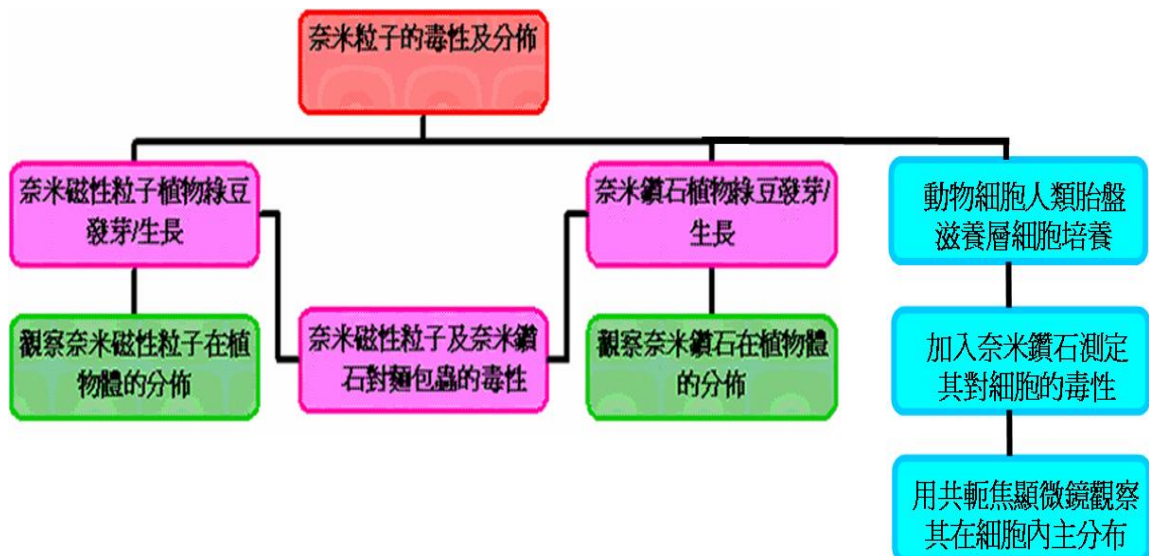
6. Trypsin-EDTA(胰蛋白酶) solution (0.05% trypsin-0.53 mm EDTA 4Na)：使用前放在37°C水槽回溫，避免回溫過久，使酵素失去活性。
7. DMEM +10% FBS + penicillin/streptomycin
 

培養基：基本培養基 Dulbecco's modified eagle's medium，DMEM)

血清：胎牛血清 (fetal bovine serum；FBS)，在基本培養基中加入血清，可以提供細胞生長增殖所需的養分。

抗生素：在基本培養基中加入抗生素，可以預防細菌生長，常用抗生素有penicillin、streptomycin。
8. 封片液：10% 甘油 (glycerol加二次去離子水稀釋)
9. 奈米鑽石、奈米磁性粒子，以滅菌之二次去離子水配製，用超音波震盪機將奈米粒子均勻的分散於水中。

#### 肆、研究方法與過程





## 一、綠豆施予奈米磁性粒子不同劑量及培養不同時間觀察其發芽情形

- (一) 將奈米磁性粒子 3g 加入 3mL 的以滅菌的二次去離子水中再用超音波震盪機(圖一)將奈米磁性粒子均勻的分散於水中。
- (二) 準備 A. B. C. D. E.5 盤綠豆培養皿，分別放置 30 顆綠豆。(圖二)
- (三) 在 A. B. C. D. E.50mg 試管中，裝入 10 mL 的水，再分別依序加入步驟(一)配置的奈米磁性粒子, 0.3 克, 0.6 克, 0.9 克, 1.2 克。(圖三、四)
- (四) 搖晃培養皿，使奈米磁性粒子水溶液分散於水中。(圖五)
- (五) 每隔 12 個小時觀察紀錄一次。



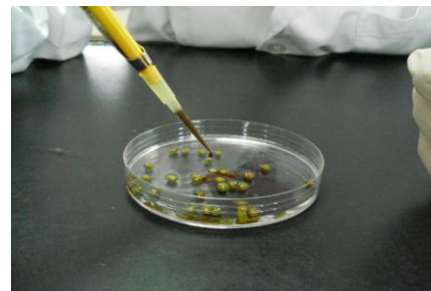
(圖一)



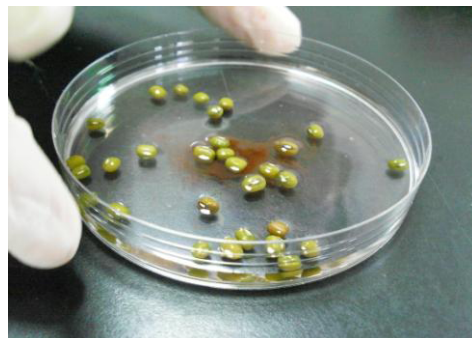
(圖二)



(圖三)



(圖四)



(圖五)

## 二、已發芽之綠豆施予奈米磁性粒子不同劑量及培養不同時間觀察其生長的情形

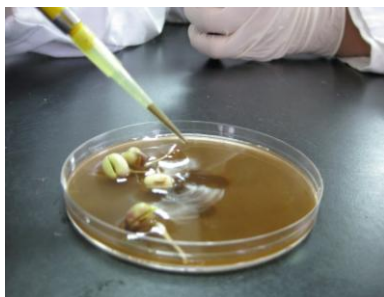
- (一) 將奈米磁性粒子 3 g 加入 3 mL 的以滅菌的二次去離子水中再用超音波震盪機將奈米磁性粒子均勻的分散於水中。
- (二) 準備 A. B. C. D. E.5 盤綠豆培養皿，分別放置 30 顆已發芽 3 公分綠豆。
- (三) 在 A. B. C. D. E.50 mL 試管中，裝入 10 mL 的水，再分別依序加入步驟一配置的奈米磁性粒子，0.3 克，0.6 克，0.9 克，1.2 克。(圖六、七、八)
- (四) 搖晃培養皿，使奈米磁性粒子水溶液分散於水中。(圖九)
- (五) 每兩天觀察紀錄一次。
- (六) 每兩天丈量其增高的長度，並將 30 顆丈量增加的公分數平均得此值。



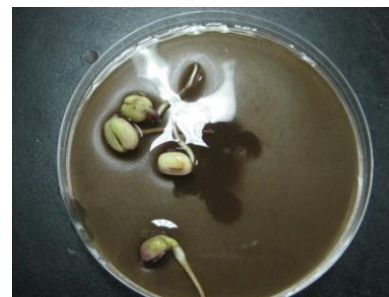
(圖六)



(圖七)



(圖八)



(圖九)

### 三、觀察植物向性受影響情形

將已經吸有奈米磁性粒子的綠豆植株和磁鐵放在一起，觀察被磁鐵影響的情形



(圖十)

(圖十一)

(圖十二)

(圖十三)


(圖十)放至於暗箱中以防止其他條件影響其向性

### 四、觀察麵包蟲內奈米磁性粒子的毒性。麵包蟲施予不同劑量及培養不同時間觀察其死亡情形

- (一) 將奈米磁性粒子 3g 加入 3mL 的以滅菌的二次去離子水中再用超音波震盪機將奈米磁性粒子均勻的分散於水中。
- (二) 準備 A. B. C. D. E.5 盤培養皿，分別放置麵包蟲 10 隻。
- (三) 在 A. B. C. D. E.50ml 試管中，裝入 10 mL 的水，再分別依序加入步驟一配置的奈米磁性粒子, 0 克(對照組)， 0.25 克， 0.5 克， 0.75 克， 1 克。
- (四) 再放入 3x2 大小的麵包依次滴入不同濃度的奈米磁性粒子水溶液。
- (五) 每兩天為一次，為麵包蟲清理培養皿、再重複做步驟一、四。
- (六) 每一天觀察一次和做紀錄，持續 14 天。

## 五、綠豆施予不同劑量及培養不同時間觀察其發芽情形〈參考照片 1~2〉

1. 將奈米鑽石 10 mg 加入 1 mL 的已滅菌的二次去離子水中再用超音波震盪機將奈米鑽石均勻的分散於水中。
2. 準備 A. B. C. D. E. 5 盤綠豆培養皿，分別放置 30 顆綠豆
3. 在 A. B. C. D. E. 50 mL 試管中，裝入 10 mL 的水，再分別依序加入步驟 1 配置的奈米鑽石，20 微升〈200 微克〉，40 微升〈400 微克〉，80 微升〈800 微克〉，160 微升〈1600 微克〉
4. 每隔 6 個小時觀察紀錄一次，在我們無法觀察的時間點時，裝設攝影機拍攝，再依攝影結果紀錄。

	
1. 將裝有奈米鑽石加水的瓶子放入高溫高壓的滅菌箱中。	2. 用超音波震盪機將奈米鑽石均勻的分散於水中。

## 六、已發芽之綠豆施予不同劑量及培養不同時間觀察其生長的情形

1. 將奈米鑽石 10 mg 加入 1 mL 的已滅菌的二次去離子水中再用超音波震盪機將奈米鑽石均勻的分散於水中。
2. 準備 A. B. C. D. E. 5 盤綠豆培養皿，分別放置 30 顆已發芽 2 公分綠豆
3. 在 A. B. C. D. E. 50 mL 試管中，裝入 10 mL 的水，再分別依序加入步驟 1 配置的奈米鑽石，20 微升〈200 微克〉，40 微升〈400 微克〉，80 微升〈800 微克〉，160 微升〈1600 微克〉，每一天觀察紀錄一次
4. 每天丈量其增高的長度，並將 30 顆丈量增加的公分數平均得此值

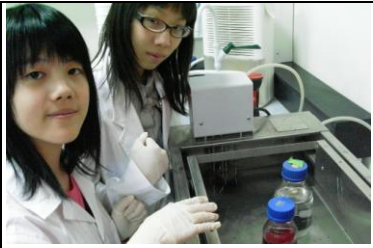

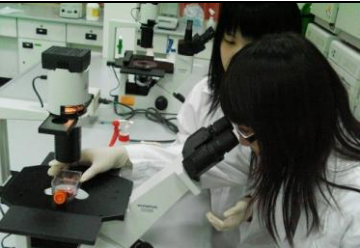

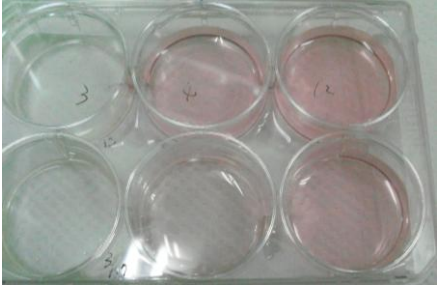
## 七、觀察植物體內奈米鑽石分布情形

將已經吸有奈米鑽石的綠豆植株莖橫切、橫向將葉撕開觀察較薄處、直接觀察根尖較薄處，在複式顯微鏡下觀察其分布情形

## 八、動物細胞繼代〈參考照片3~7〉

1. 將取得自食品工業研究所的「人類滋養層細胞」(3A-sub-E)進行繼代
2. 在 T25 培養皿中，細胞已培養約 90%滿，由 37°C 的培養箱取出後，移入無菌操作台內進行以下所有有關細胞的操作。
3. 以巴士德無菌吸管將含細胞的T25培養皿中的培養液吸乾，再加入1.5 mL 的PBS 潤洗一下，再吸乾。
4. 接著加入1.5 mL回溫的Trypsin-EDTA於T25培養皿中，確定溶液分散於底面，置於37°C 培養箱2~5分鐘左右，用手輕拍培養皿底部，使細胞浮起。
5. 經酵素處理的細胞液，再加入4.5 mLDMEM-10% FBS 於T25培養皿中，以抑制Trypsin 的繼續作用，並用吸管緩慢抽吸沖洗T25培養皿底部，用電動吸取器來回打散細胞呈單顆細胞(不能呈團狀)，打散後即可取20微升進行細胞計數(方法如 實驗過程五.細胞計數 所述)。
6. 細胞液依適當的稀釋比例轉移至新的培養皿中或將其種入實驗所要的培養盤，以正常條件培養。



		
3. 讓PBS、DMEM-10% FBS培養液回溫。	4. 從二氧化碳培養箱中，取出一盤已經培養數日的細胞。	5. 以倒立式顯微鏡觀察細胞培養皿中細胞的生長情形。
		
6. 動物細胞繼代	7. 將細胞種入實驗所要的培養盤	

## 九、細胞計數〈參考照片 8~9〉

### (一)原理:

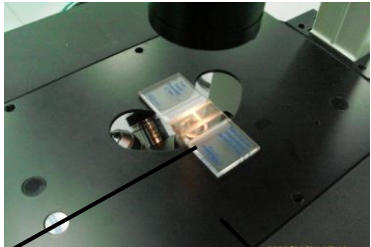
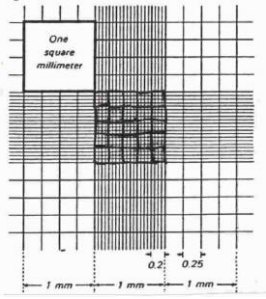
1. 細胞數目的計算可用細胞計數盤如下列照片8。
2. 計數盤一般有二個計數處，每個計數處中細刻9個 $1\text{ mm}^2$ 大正方形，中間的大正方形再細刻25個中正方形，每邊各由三條細線組成。4個角落之大正方形則再細刻各16個中正方形，深度均為 $0.1\text{ mm}$ 。當計數處上方蓋上蓋玻片後，每個大正方形之體積為 $1\text{ mm}^2 \times 0.1\text{ mm} = 1.0 \times 10^{-4}\text{ mL}$ 。使用時，計數每個大正方形內之細胞數目，乘以稀釋倍數，再乘以 $10^4$ ，即為每ml中之細胞數目。
3. 有關於細胞落在大正方形四邊三條細線上的計數原則，為數算落於上邊及左邊線上的細胞，不算落於下邊及右邊線上的細胞。
4. 一般細胞液應充分分散，使計數較準確。
5. 為達細胞計數的精確性，可以多計數幾個大正方形內之細胞數目後，求得平均值。

(二)實驗方法(參考照片8~9)

1. 實驗四之細胞溶液，取20微升的細胞溶液再加入等量的Trypan Blue 20微升加入20微升的細胞中混合，再取出細胞溶液進行計數。
2. 於細胞計數器的每邊，各注入10微升的細胞混合溶液，並於顯微鏡下約放大100倍作觀察。
3. 計算位於細胞計數器左右兩邊各5 大格區域內之所有細胞數目。並以下面方程式求出細胞濃度。

$$\text{細胞濃度 (cells/mL)} = 1 \text{ 格之細胞總數目} \times 10^4$$

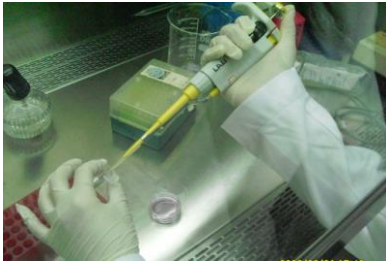
4. 細胞濃度乘以細胞液之體積，即總細胞數目。
5. 再將  $2 \times 10^4$  個細胞放入放有蓋玻片之 3.5 cm 直徑的圓形培養盤。
6. 培養 16 小時後，作為實驗使用。

 <p>①                      ②</p>	 <p>引用自 <a href="http://www.animal.ufl.edu/hansen/protocols/hemacyt1a.JPG">www.animal.ufl.edu/hansen/protocols/hemacyt1a.JPG</a></p>
<p>8. 將細胞計數盤①放在倒立式顯微鏡②下觀察細胞數。</p>	<p>9. 細胞計數盤內的九宮格。</p>

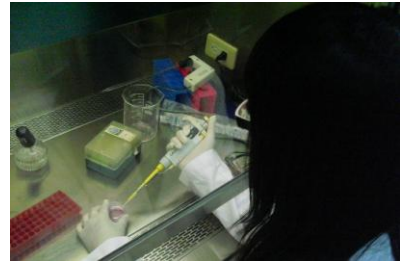
## 十、奈米鑽石動物細胞加入不同劑量的奈米鑽石及培養不同時間

### 〈參考照片 10~11〉

- 1.在種好細胞 16 小時的 3.5 cm 直徑培養盤中，加入 20 微升〈200 微克〉，40 微升〈400 微克〉，80 微升〈800 微克〉，160 微升〈1600 微克〉的奈米鑽石。
- 2.將加有奈米鑽石的細胞放回 37°C 細胞培養箱，作用 0、12、24、36、48 個小時
- 3.對照組只加入滅菌的去離子水。



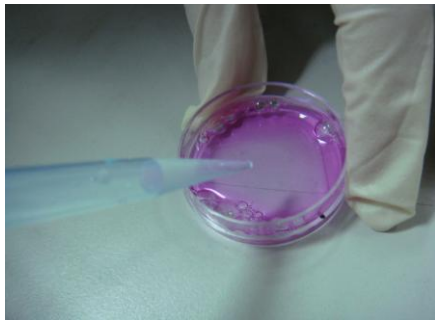
10. 分別吸取不同劑量的奈米鑽石。



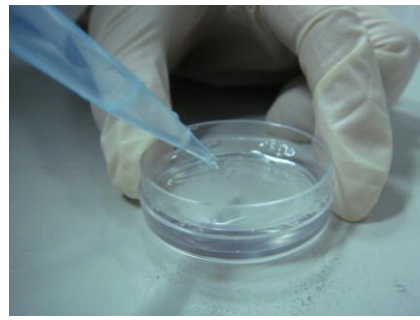
11. 加入不同劑量的奈米鑽石。

## 十一、固定細胞(參考照片 12~13)

- 1.把培養液吸走，加入含有 4% 聚甲醛，1 mL 反應 20 分鐘，以固定細胞型態。
- 2.吸走固定液後，加入 PBS，1 mL 清洗，重覆此步驟兩次。



12. 把培養液吸走，在培養皿中加入含有 4% 聚甲醛 1 mL 反應 20 分鐘。

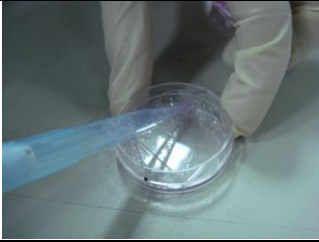




13. 把固定液吸走後，加入 PBS 清洗兩次。



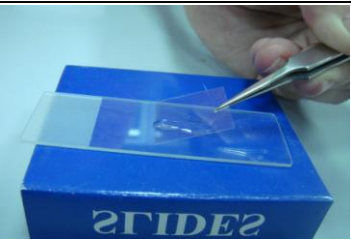

## 十二、細胞核染色(參考照片 14~16)

- 1.在已經固定的細胞中，加入含有 0.5%「Triton-X100」的 PBS 1 mL 反應 20 分鐘後，將細胞膜穿孔，以利於染色劑的進入。
- 2.經過 20 分鐘後，吸掉培養皿上的牛血清(將此動作重覆兩次)，並加入 1 mL\*PBS 清洗
- 3.再加入 50 $\mu$ M 的 DAPI 1 mL 反應 20 分鐘(要避光)。
4. 20 分鐘後，用 PBS 1 mL 清洗，並重覆此步驟兩次。
5. 最後再以二次去離子水 1 mL 清洗 2 次，準備封片。

		
<p>14. 在已經固定的細胞中，加入含有 Triton-X100 的 PBS 反應 20 分鐘後。經過 20 分鐘後，以 PBS 清洗。</p>	<p>15. 在加入 50<math>\mu</math>M 的 DAPI 1 mL 反應 20 分鐘(要避光)後，用 PBS 1 mL 清洗兩次。</p>	<p>16. 最後再以二次去離子水 1 mL 清洗 2 次，準備封片。</p>

## 十三、封片〈參考照片 17~18〉

1. 用封片液 (10% 甘油) 滴在載玻片上，再將蓋玻片 45 度慢慢放下(要用筆尖，弄掉氣泡)。
2. 放乾後，準備用共軛焦顯微鏡觀察。

	
<p>17. 用封片液滴在載玻片上，再以45度角放下。</p>	<p>18. 用共軛焦顯微鏡拍照。</p>

## 伍、研究結果

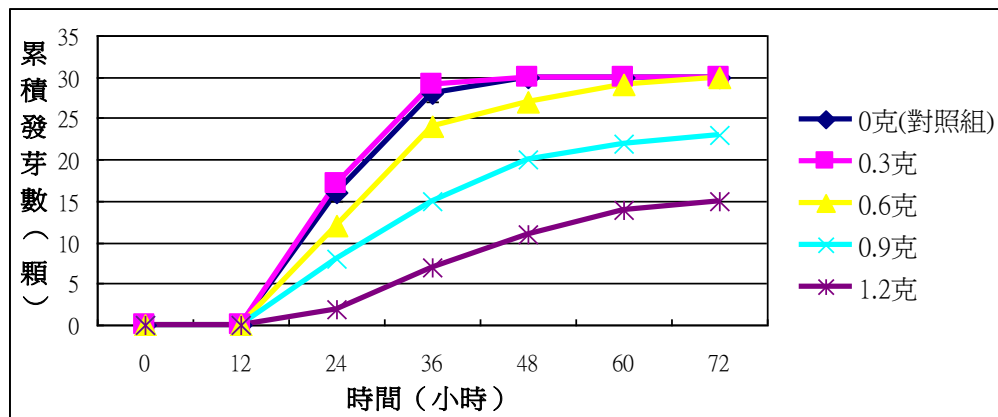
### 一、不同劑量的奈米磁性粒子對綠豆發芽的影響〈參考表一、圖十四〉

在 A. B. C. D. E. 5 盤，分別放置 30 顆綠豆的培養皿，依序加入奈米磁性粒子，0 克 (對照組)、0.3 克、0.6 克、0.9 克、1.2 克，每隔 12 個小時觀察紀錄其是否已經發芽。

結果我們發現從 0.6 克開始已經對發芽有些微影響，到 0.9 克和 1.2 克已經有明顯抑制發芽的效果。

表一、不同劑量的奈米磁性粒子與時間的長短對綠豆發芽的影響數據

時間(小時)	加入量				
	0 克 (對照組)	0.3 克	0.6 克	0.9 克	1.2 克
0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0
24	16	17	12	8	2
36	28	29	24	15	7
48	30	30	27	20	11
60	30	30	29	22	14
72	30	30	30	23	15



圖十四、不同劑量的奈米磁性粒子與時間的長短對綠豆發芽的影響 (折線圖)

註一：橫座標為每隔 12 個小時觀察紀錄，縱座標為累積發芽的顆數。

註二：加入 0.9 克、1.2 克的奈米磁性粒子，綠豆累積發芽顆數較其它來的少。

註三：加入 0.3 克奈米磁性粒子，與對照組差距最小，約 36 小時後，會與對照組的綠豆發芽數相同。

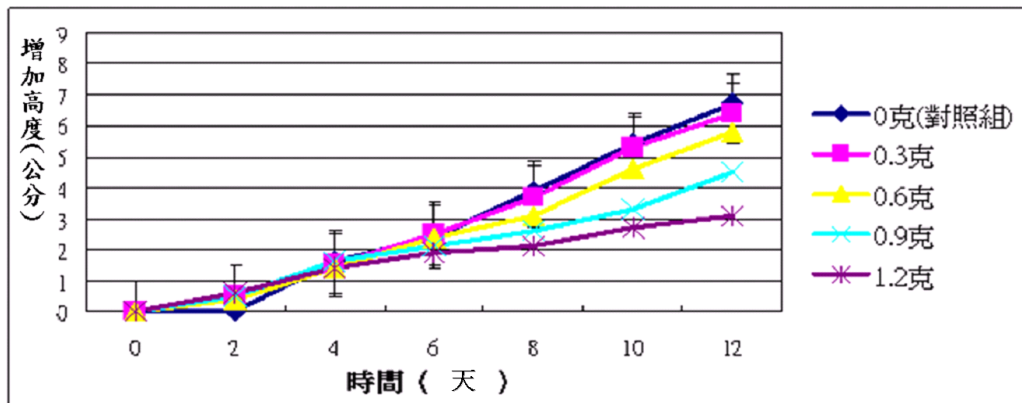
## 二、植物已發芽之綠豆施予奈米磁性粒子不同劑量及不同時間對生長速率的影響數據〈參考表二、圖十五〉：

在 A. B. C. D. E. 5 盤，分別放置 30 顆已經發芽 2 公分綠豆的培養皿，依序加入奈米磁性粒子，0 克（對照組）、0.3 克、0.6 克、0.9 克、1.2 克，每兩天觀察紀錄其生長的情形。

表二、植物已發芽之綠豆施予奈米磁性粒子不同劑量及不同時間對生長速率的影響數據

時間(天)	加入量				
	0 克 (對照組)	0.3 克	0.6 克	0.9 克	1.2 克
0	0	0	0	0	0
2	0	0.5	0.4	0.5	0.6
4	1.6	1.5	1.4	1.6	1.4
6	2.4	2.5	2.4	2.1	1.9
8	3.9	3.7	3.1	2.6	2.1
10	5.4	5.3	4.6	3.3	2.7
12	6.7	6.4	5.8	4.5	3.1

註一：這是將 30 顆已發芽 2 公分的綠豆種在不同劑量的奈米磁性粒子，每兩天丈量其增高的長度，並將 30 顆丈量增加的公分數平均得此值，結果可見奈米磁性粒子的劑量越多，抑制綠豆生長效果越為明顯。



圖十五、植物已發芽之綠豆施予奈米磁性粒子不同劑量及不同時間對生長速率的影響（折線圖）

註一：綠豆的生長高度，會隨著天數與奈米磁性粒子不同的劑量而影響的折線圖。

註二：加入 0.9 克、1.2 克的奈米磁性粒子，有明顯抑制已發芽的綠豆的生長高度。

註三：加入 0.3 克的奈米磁性粒子，會與對照組的綠豆增加高度趨於相同。

### 三、觀察植物吸取奈米磁性粒子後被磁鐵影響的情形



(圖十六)



(圖十七)

將已經吸有奈米磁性粒子的綠豆植株和磁鐵放在一起，綠豆會朝向磁極方向彎曲生長。

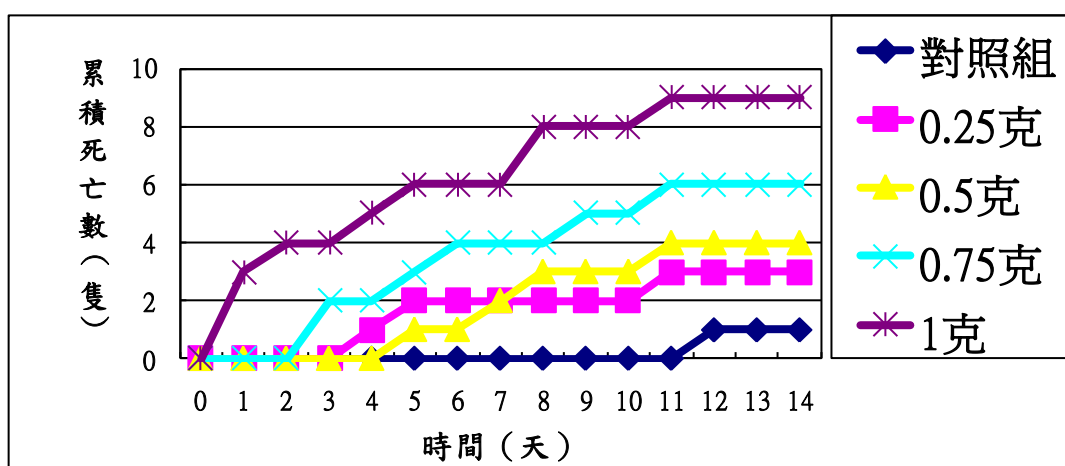
#### 四、不同劑量的奈米磁性粒子對麵包蟲死亡的影響〈參考表三、圖十八〉

在 A. B. C. D. E. 5 盤，分別放置 10 隻麵包蟲的培養皿，依序加入奈米磁性粒子，0 克 (對照組)、0.25 克、0.5 克、0.75 克、1 克，每隔 1 天觀察紀錄其是否死亡。

結果我們發現加入奈米磁性粒子劑量 1 克者死亡累積數與日俱增至第十一天便已死亡 9 隻。

表三、麵包蟲施予不同劑量奈米磁性粒子及不同時間對麵包蟲死亡的影響數據

時間(天)	加入量 0 克(對照組)	0.25 克	0.5 克	0.75 克	1 克
0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	3
2	0	0	0	0	4
3	0	0	0	2	4
4	0	1	0	2	5
5	0	2	1	3	6
6	0	2	1	4	6
7	0	2	2	4	6
8	0	2	3	4	8
9	0	2	3	5	8
10	0	2	3	5	8
11	0	3	4	6	9
12	1	3	4	6	9
13	1	3	4	6	9
14	1	3	4	6	9



圖十八、麵包蟲施予奈米磁性粒子同劑量及不同時間對生長速率的影響（折線圖）

註一：麵包蟲的死亡，會隨著天數與奈米磁性粒子不同的劑量而影響的折線圖。

註二：加入 0.75 克、1 克的奈米磁性粒子，有明顯加速麵包蟲的死亡。

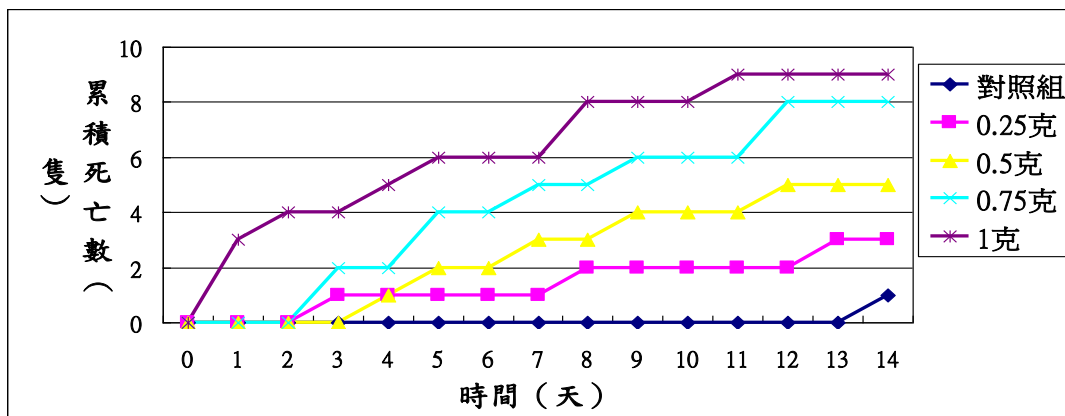
### 五、不同劑量的奈米鑽石對麵包蟲死亡的影響〈參考表四、圖十九〉

在 A. B. C. D. E. 5 盤，分別放置 10 隻麵包蟲的培養皿，依序加入奈米鑽石，0 克（對照組）、0.25 克、0.5 克、0.75 克、1 克，每隔 1 天觀察紀錄其是否死亡。

結果我們發現加入奈米鑽石劑量 1 克者死亡累積數與日俱增至第十一天便已死亡 9 隻。

表四、麵包蟲施予不同劑量奈米鑽石及不同時間對麵包蟲死亡的影響數據

時間(天)	加入量				
	0克(對照組)	0.25克	0.5克	0.75克	1克
0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	3
2	0	0	0	0	4
3	0	1	0	2	4
4	0	1	1	2	5
5	0	1	2	4	6
6	0	1	2	4	6
7	0	1	3	5	6
8	0	2	3	5	8
9	0	2	4	6	8
10	0	2	4	6	8
11	0	2	4	6	9
12	0	2	5	8	9
13	0	3	5	8	9
14	1	3	5	8	9



圖十九、麵包蟲施予奈米鑽石不同劑量及不同時間對生長速率的影響 (折線圖)

註一：麵包蟲的死亡，會隨著天數與奈米鑽石不同的劑量而影響的折線圖。

註二：加入 0.75 克、1 克的奈米鑽石，有明顯加速麵包蟲的死亡。

## 六、不同劑量的奈米鑽石對綠豆發芽的影響(參考表五、圖二十)

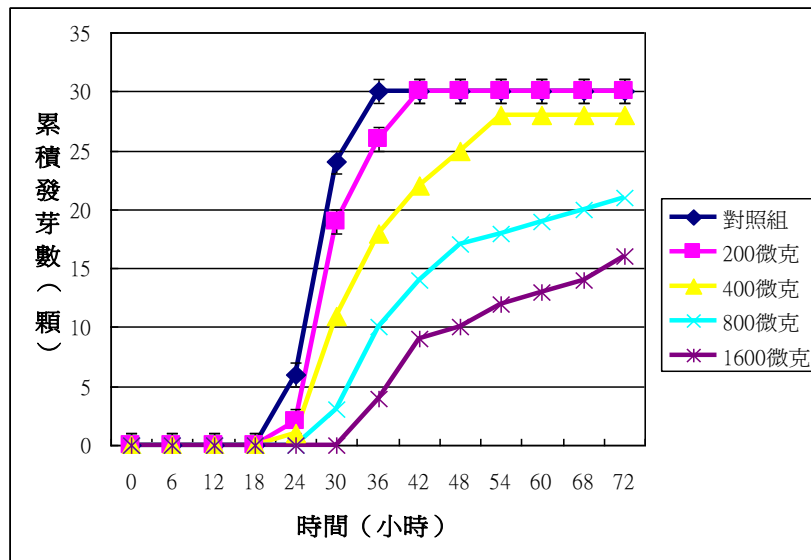
在 A. B. C. D. E. 5 盤，分別放置 30 顆綠豆的培養皿，依序加入奈米鑽石，0 微克(對照組)、200 微克、400 微克、800 微克、1600 微克，每隔 6 個小時觀察紀錄其是否已經發芽。結果我們發現從 400 微克開始已經對發芽有些微影響，到 800 微克和 1600 微克已經有明顯抑制發芽的效果。

表五、不同劑量的奈米鑽石與時間的長短對綠豆發芽的影響數據

時間(h) \ 加入量 發芽數	對照組	200 微克	400 微克	800 微克	1600 微克
0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0
24	6	2	1	0	0
30	24	19	11	3	0
36	30	26	18	10	4
42	30	30	22	14	9
48	30	30	25	17	10
54	30	30	28	18	12
60	30	30	28	19	13
68	30	30	28	20	14
72	30	30	28	21	16

註一：每隔 6 個小時觀察紀錄一次，在我們無法觀察的時間點時，裝設攝影機拍攝，再依攝影結果紀錄。結果發現時間越久，加入量越多，發芽顆數越少，且發芽越慢，代表可以抑制發芽。





圖二十、不同劑量的奈米鑽石與時間的長短對綠豆發芽的影響折線圖

註一：橫座標為每隔 6 個小時觀察紀錄，縱座標為發芽的顆數。

註二：加入 800 微克、1600 微克的奈米鑽石，綠豆累積發芽顆數較其它來的少。

註三：加入 200 微克奈米鑽石，與對照組差距最小，約 36 小時後，會與對照組的綠豆發芽數相同。

## 七、植物已發芽之綠豆施予不同劑量及不同時間對生長速率的影響

### 〈參考表三、表四〉

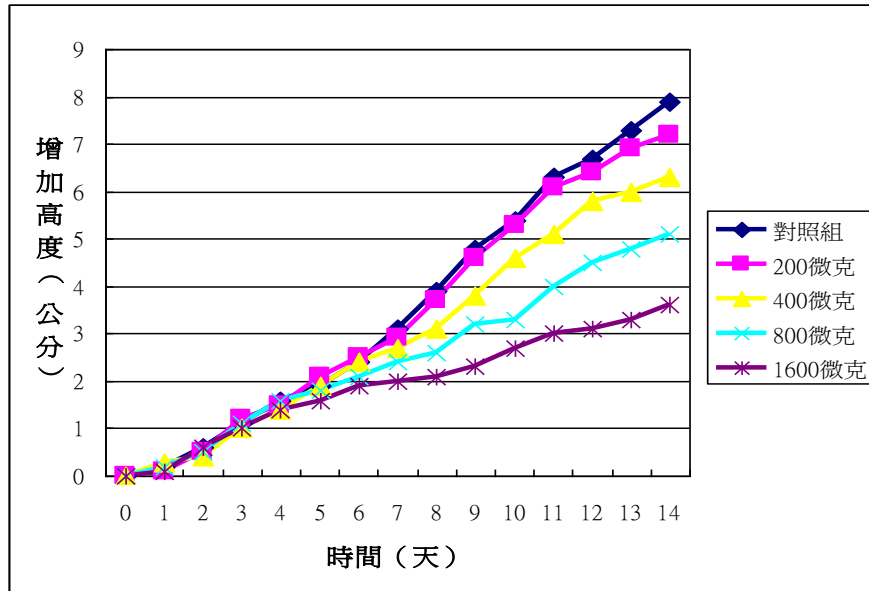
在 A. B. C. D. E. 5 盤，分別放置 30 顆已經發芽 2 公分綠豆的培養皿，依序加入奈米鑽石，0 微克 (對照組)、200 微克、400 微克、800 微克、1600 微克，每一天觀察紀錄其生長的情形。

結果我們發現從 400 微克開始已經對發芽有些微影響，到 800 微克和 1600 微克已經有明顯抑制生長的效果。

表六、植物已發芽之綠豆施予不同劑量及不同時間對生長速率的影響數據

時間(天) 加入量 增高 (cm)	加入量				
	對照組	200 微克	400 微克	800 微克	1600 微克
0	0	0	0	0	0
1	0.2	0.1	0.3	0.2	0.1
2	0.6	0.5	0.4	0.5	0.6
3	1.1	1.2	1	1.1	1
4	1.6	1.5	1.4	1.6	1.4
5	1.9	2.1	1.9	1.8	1.6
6	2.4	2.5	2.4	2.1	1.9
7	3.1	2.9	2.7	2.4	2
8	3.9	3.7	3.1	2.6	2.1
9	4.8	4.6	3.8	3.2	2.3
10	5.4	5.3	4.6	3.3	2.7
11	6.3	6.1	5.1	4	3
12	6.7	6.4	5.8	4.5	3.1
13	7.3	6.9	6	4.8	3.3
14	7.9	7.2	6.3	5.1	3.6

註一:這是將30顆已發芽2公分的綠豆種在不同量的奈米鑽石中，每天丈量其增高的長度，並將30顆丈量增加的公分數平均得此值，結果可見奈米鑽石的量越多，越可抑制綠豆生長效果。



圖二十一、植物已發芽之綠豆施予不同劑量及不同時間對生長速率的影響折線圖

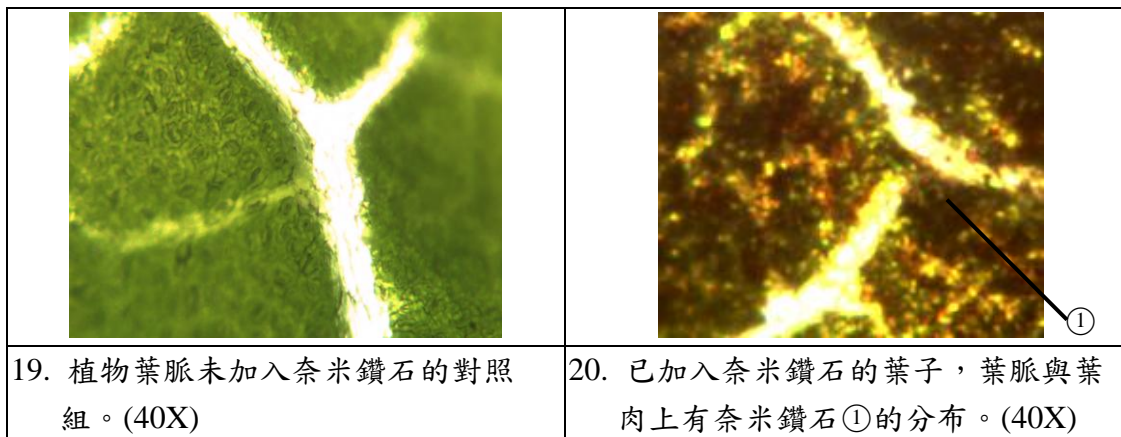
註一：綠豆的生長高度，會隨著天數與奈米鑽石不同的劑量而影響的折線圖。

註二：加入 1600 微克的奈米鑽石，會抑制已發芽的綠豆的生長高度。

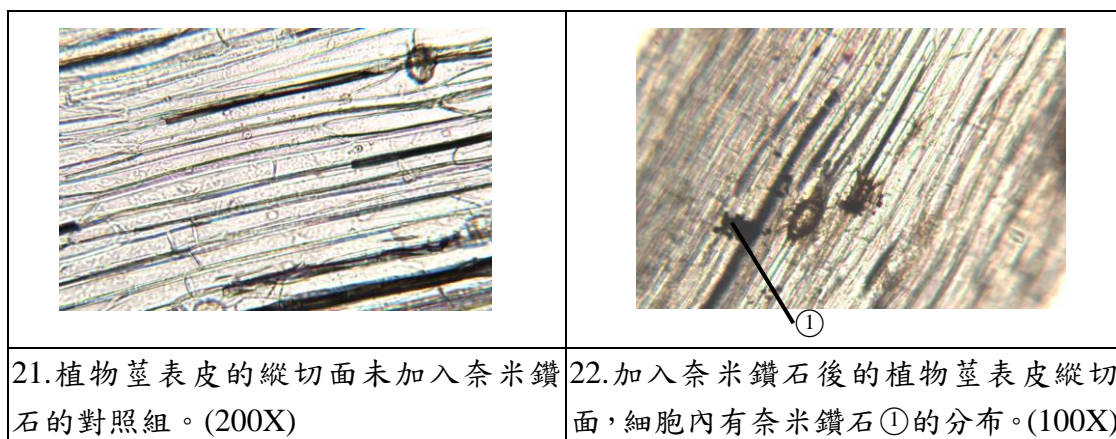
註三：加入 200 微克的奈米鑽石，會與對照組的綠豆增加高度逐漸逼近。

## 八、觀察植物體內奈米鑽石分布情形(參考照片 19~28)

將已經吸有奈米鑽石的綠豆植株切開，在顯微鏡下觀察我們發現奈米鑽石會分布在根、莖、葉的細胞內（圖二十二~二十六），在葉柄基部也有奈米鑽石的大量分布，這可能是造成葉子無法展開而呈現部分捲曲及生長不良的原因（圖五）。

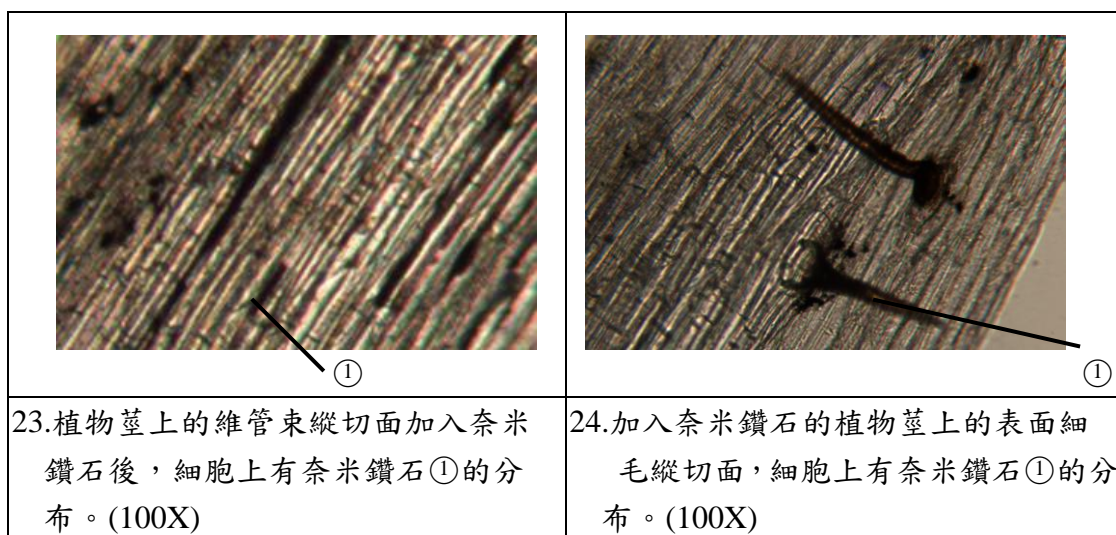


圖二十二：上兩圖(19.20)為植物葉脈加入奈米鑽石前後的對照組（左上圖，照片 19）與實驗組（右上圖，照片 20）。加入奈米鑽石後的葉子（右上圖，照片 20），可明顯的看出，奈米鑽石在植物葉脈與葉肉上的點狀分布。

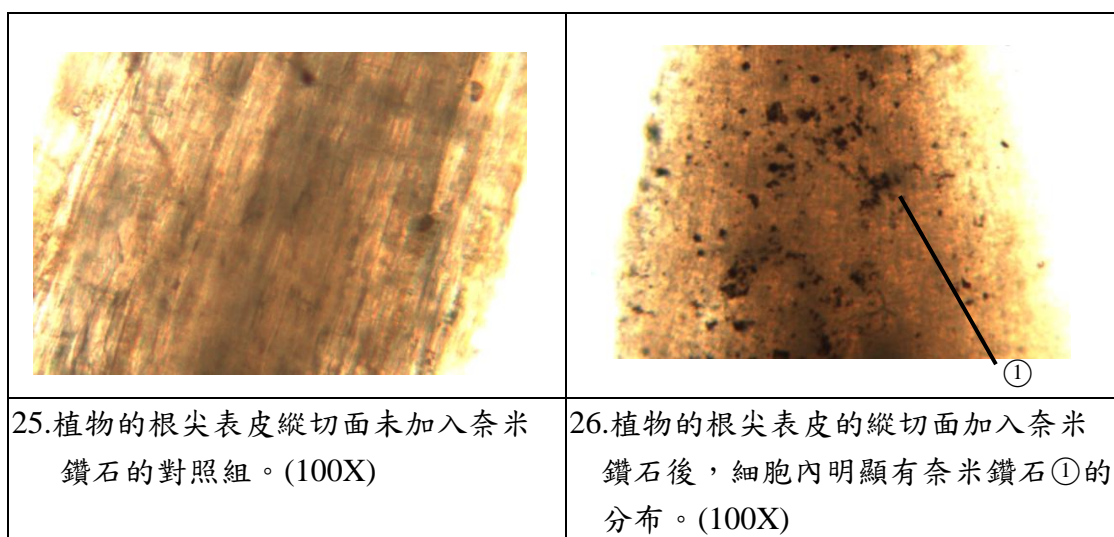


圖二十三：上兩圖(21. 22)為植物莖表皮的縱切面，加入奈米鑽石前後的對照組

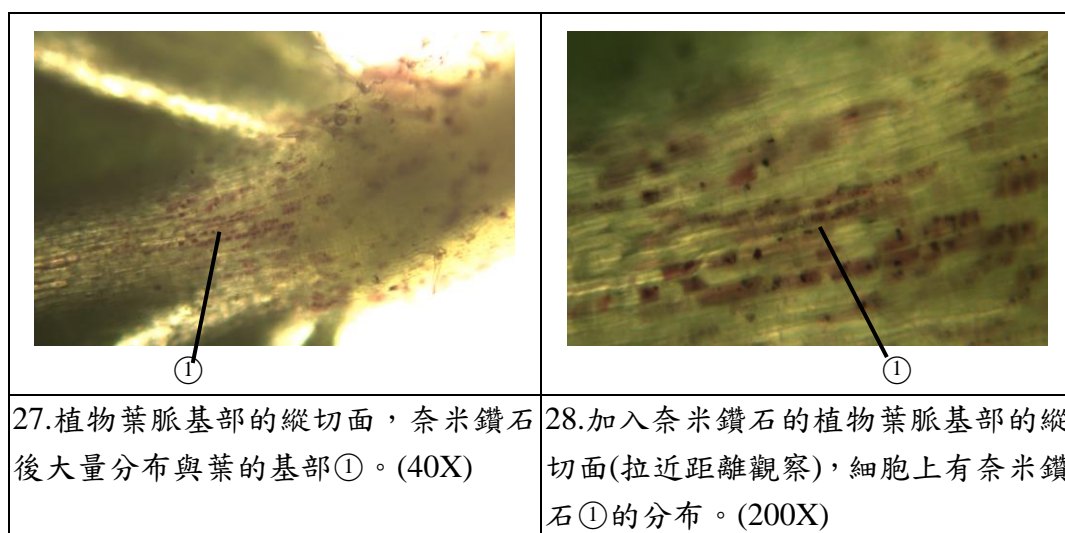
(左上圖，照片 21) 實驗組 (右上圖，照片 22)。加入奈米鑽石後的植物莖表皮的縱切面 (右上圖，照片 22)，明顯的觀察到，奈米鑽石在植物莖表皮縱切面上的聚集分布。



圖二十四：上兩圖(23.24)為植物莖上的維管束的縱切面 (左上圖) 與植物莖上的表面細毛縱切面 (右上圖)，加入奈米鑽石後的實驗組。加入奈米鑽石後的植物莖上的維管束縱切面(左上圖)，明顯的可以觀看出奈米鑽石聚集分布於植物莖上的維管束的情形。表面細毛縱切面 (右上圖)，顯然可看見奈米鑽石密集分布於細毛上的情形。



圖二十五：上兩圖(25.26)為植物的根尖表皮縱切面，加入奈米鑽石前後的對照組(左上圖)與實驗組(右上圖)。加入奈米鑽石後的植物的根尖表皮縱切面(右上圖)，顯然的可觀看到，奈米鑽石在植物的根尖表皮縱切面帶點狀的分布情形。



圖二十六：上兩圖(27.28)為植物葉脈基部的縱切面，加入奈米鑽石後的各實驗組，以不同倍率觀察。在高倍下顯然的可觀看到，奈米鑽石在細胞上點狀的分布情形(右上圖)。

## 九、不同劑量的奈米鑽石在不同時間下對動物細胞存活數的影響

〈參考照片 13、表七、圖二十七〉



在人類的胎盤滋養層細胞中分別加入 0. 200. 400. 800. 1600 微克的奈米鑽石，作用 0. 12. 24. 36 48.72 小時，我們發現細胞的存活數，會隨著劑量愈多存活率愈低，在作用 36 小時後開始會影響，細胞存活率，且隨時間愈久，存活率愈低。



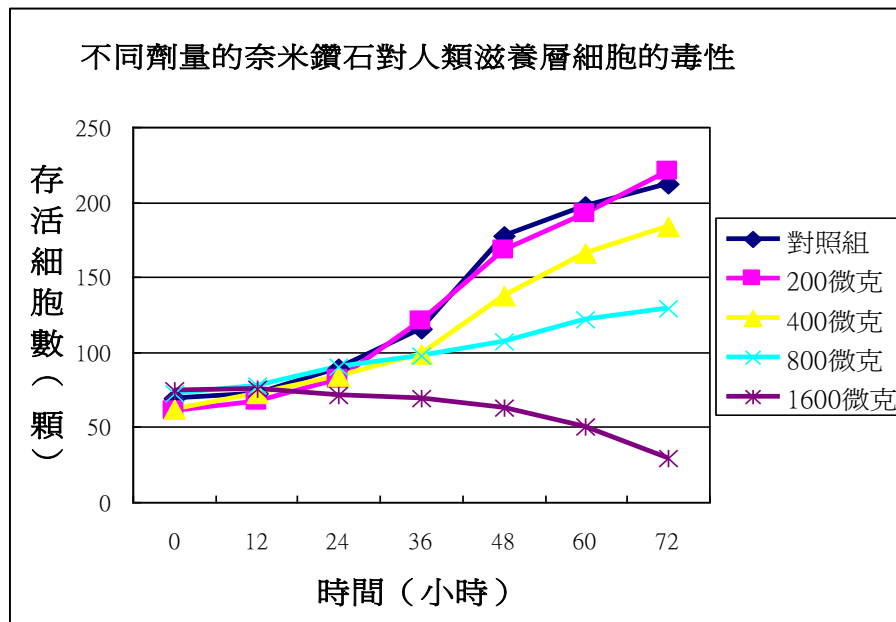
29. 對照組 (只加滅菌後的二次去離子水)，實驗組分別加入不同劑量 (200、400、800、1600 微克) 的奈米鑽石，在「黑圈圈」的這五個位置以倒立式顯微鏡 (40 倍的倍數) 數其存活細胞數(細胞死後會漂浮在培養液裡，無法被數到)，平均得到我們所呈現的值。

表七、不同劑量的奈米鑽石在不同時間下對人類滋養層細胞存活的影响數據

時間(h)	加入量 細胞(顆)	對照組	200 微克	400 微克	800 微克	1600 微克
		0	69	61	62	72
12	72	72	67	73	78	76
24	89	89	82	84	90	71
36	116	116	121	99	98	69
48	177	177	168	138	107	63
60	198	198	192	166	122	50
72	212	212	221	184	129	29

註一：分別人類滋養層細胞在加入奈米鑽石，0 微克 (對照組)、200 微克、400 微克、800 微克、1600 微克，每 12 小時觀察細胞顆數在不同奈米鑽石的劑量中的增長。

註二：加入奈米鑽石的量越多，越能抑制細胞增長的顆數，甚至造成細胞死亡。



圖二十七、不同劑量的奈米鑽石在不同時間下對人類滋養層細胞存活的影響折線圖

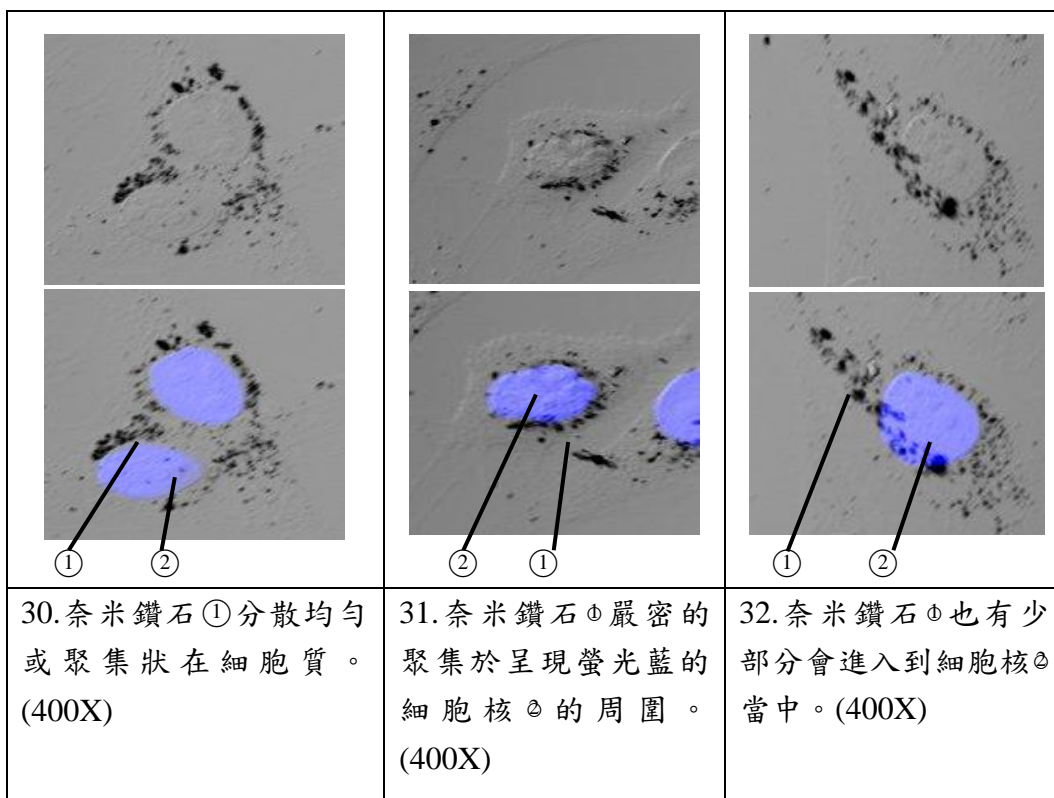
註一：橫座標為每隔 12 小時所觀察的紀錄，縱座標為細胞依奈米鑽石不同的劑量所影響的細胞存活數。

註二：加入 1600 微克的奈米鑽石，會使人類胎盤滋養層細胞的存活數隨時間的變化而有所減少。

註三：加入 200 微克的奈米鑽石，會使人類胎盤滋養層細胞的存活數隨時間的變化而略大於對照組。

## 十、奈米鑽石在細胞內的分布〈參考照片 30~32〉

1. 觀察處理過程奈米鑽石的細胞，我們發現大部分奈米鑽石會在細胞質中出現能成為均勻或聚集狀分布。〈參考照片 30〉
2. 奈米鑽石在細胞質中，我們還發現他會集中在細胞核的周圍，但不見其會貼近細胞膜分布。〈參考照片 31〉
3. 在細胞核的分布，大多是少量奈米鑽石出現，一旦多量時，奈米鑽石會在細胞核內出現聚集的現象。〈參考照片 32〉

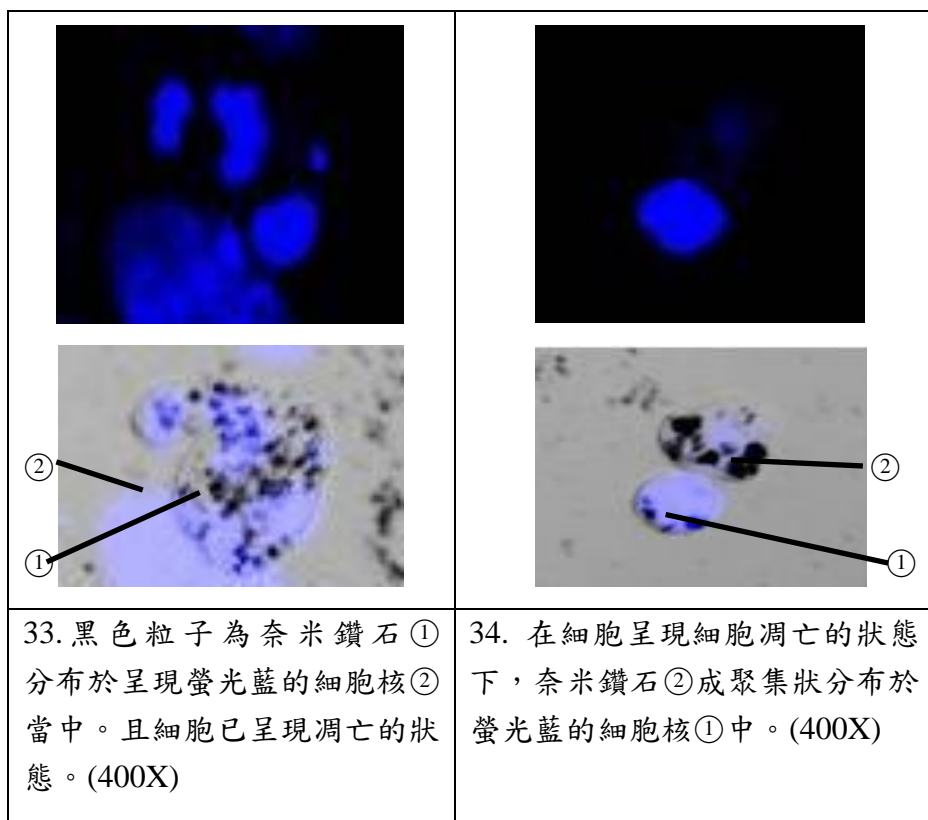


圖二十八：為人類胎盤滋養層細胞用共軛焦顯微鏡觀察放大 400 倍的結果，加入奈米鑽石後在細胞內的分布情形。大部分奈米鑽石會在細胞質中出現能成為均勻或聚集狀分布，也會圍繞在細胞核的周圍。(上圖：一般光下拍攝細胞之影像，下圖：藍色螢光下拍攝之影像和一般光下拍攝細胞之影像的疊圖)

## 十一、分布與細胞死亡情形的探討 (參考照片 33~34)

當奈米鑽石作用時間超過 36 小時，我們觀察到細胞凋亡的現象，就是細胞內細胞核的染色體被分成數個小片段。此時我們發現大部分奈米鑽石會在細胞核中出現能成為較大顆粒的聚集狀分布 (圖二十九)。

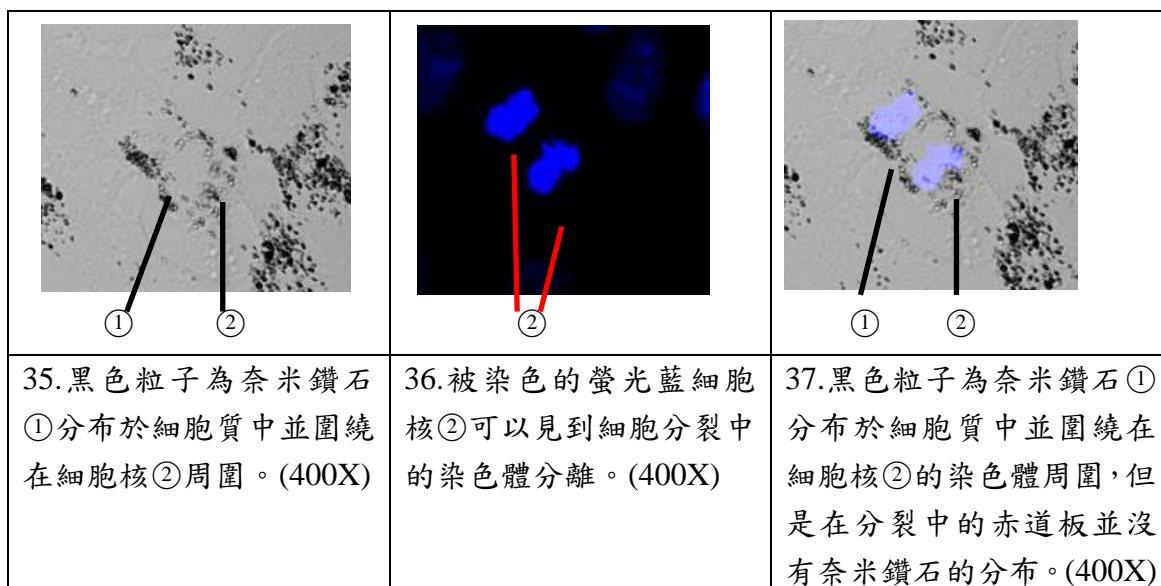




圖二十九：上圖用共軛焦顯微鏡放大 400 倍的觀察的結果，我們發現細胞加入奈米鑽石 36 小時後，細胞凋亡，大部分奈米鑽石會在細胞核中出現，成為較大顆粒的聚集狀分布。(上圖：藍色螢光下拍攝之影像，下圖：藍色螢光下拍攝之影像和一般光下拍攝細胞之影像的疊圖)

## 十二、在細胞分裂時，奈米鑽石在細胞內的分布。〈參考照片 35~37〉

我們發現人類胎盤滋養層細胞加入奈米鑽石 12 小時，發現細胞分裂中的染色體分離現象，就是細胞分裂時複製的染色體被往兩側分開的狀態。此時我們發現大部分奈米鑽石會在細胞核周圍的細胞質中，但是在分裂中兩細胞間的赤道板並沒有奈米鑽石的分布。



圖三十：上圖為共軛焦顯微鏡放大 400 倍觀察的結果，我們發現細胞分裂中的染色體分離時，大部分奈米鑽石會在細胞核周圍的細胞質中，但是在赤道板並沒有奈米鑽石的分布。(左圖 35：一般光下拍攝細胞之影像，中間圖 36：藍色螢光下拍攝之影像，右圖 37：藍色螢光下拍攝之影像和一般光下拍攝細胞之影像的疊圖)

## 陸、討論

### 一、奈米磁性粒子及奈米鑽石對綠豆的影響及分布

奈米磁性粒子及奈米鑽石被使用在工業器材、運動器材、生活用品、化妝品甚至醫療用品.....等，一旦這些用品不被使用而隨意丟棄後，這些奈米磁性粒子及奈米鑽石器材，可隨著水流稻田裏，而到植物體內。我們從實驗結果，看到奈米磁性粒子及奈米鑽石確實進到植物體內造成植物〈綠豆〉發芽及生長受到抑制，進一步的我們發現奈米磁性粒子及奈米鑽石，可能也是會造成一種生物累積現象，因為奈米磁性粒子及奈米鑽石是一個很穩定的物質，不易被利用或代謝成其他物質而排出。

## 二、奈米磁性粒子及奈米鑽石對植物的毒性

當植物吸入奈米磁性粒子及奈米鑽石，因為它很細小所以可以通過細胞壁，進入到細胞內，我們發現細胞內奈米鑽石的含量，會隨著奈米磁性粒子奈米鑽石放愈多，或放愈久而使細胞內累積愈多，會有生物累積作用。其他生物吃了，可能會有生物放大的作用，使危害擴大。

## 三、奈米磁性粒子對植物向性的影響

當植物吸入奈米磁性，可能分布於莖，生長點而造成植物會受磁鐵的吸引，進而往磁極彎曲生長。

## 四、奈米鑽石對動物細胞的毒性

當動物吃入或吸入奈米鑽石，因為它很細小所以可以通過細胞膜，進入到細胞質，我們發現細胞內奈米鑽石的含量，會隨著奈米鑽石放愈多，或放愈久而使細胞內累積愈多〈表七、圖二十七〉。當奈米鑽石累積到某個量時，細胞就會死亡，在圖七中可見細胞凋亡(apoptosis)過程中，細胞核被分成許多小球體(apoptotic body)，最後細胞死亡崩解，但奈米鑽石沒有消失，它可以再回到培養皿以中。

繼續對細胞造成毒性，跟當年挖煤礦工的矽肺病之肺臟細胞一樣，一直受到碳粒的毒害。

## 五、奈米鑽石在細胞質內的分布探討

1.在細胞質的分布，我們發現奈米鑽石可以隨機的散落在細胞質中，也有聚集為在細胞核周圍〈圖二十八〉，有點像內質網分布在細胞核周圍的型態，所以奈米鑽石也有可能到內質網內。

2.有些細胞內的奈米鑽石，則呈線狀或網狀分布，且在細胞質內粒線體的位置上有點狀分布〈圖二十八〉，這讓我們覺得奈米鑽石也會在粒線體內。

3.細胞的死亡原因推測：

如果粒線體內奈米鑽石過多，可能會造成粒線體產生能量〈ATP〉的功能出問題而造成細胞的死亡，這也解釋了為何奈米鑽石過多時，或做用過久時會造成細胞死亡。

## 六、奈米鑽石在細胞核內的分布

我們發現奈米鑽石會到細胞核內，因為細胞核可讓奈米鑽石通過進入到細胞核內，我們觀察到進到核內的奈米細胞會形成聚集的情形〈圖二十九〉，聚集愈大愈容易造成細胞死亡。

## 七、細胞分裂與奈米鑽石的分布

在觀察玻片標本的過程中我們看到複製染色體分離的現象，代表此時細胞正在行細胞分裂，當我們觀察奈米鑽石分布時，發現奈米鑽石只會在染色體外圍，而不會到赤道板及染色體上〈圖三十〉，這真是意外的發現，也是一個非常有趣的現象，這可能是在細胞分裂進行時，有某些酵素、蛋白質或某種細胞結構如紡錘絲，可以將這些外來的異物隔離或排斥在染色體分裂區外，希望我們未來可以將這個問題解開，或是在大學或研究所繼續完成。

## 柒、結論

- 一、在 1.2 克的奈米磁性粒子對植物〈綠豆〉發芽比對照組少五成，高量的奈米磁性粒子對植物〈綠豆〉發芽確實有明顯的抑制效果。
- 二、在 1.2 克的奈米磁性粒子對植物〈綠豆〉增加高度的平均值確實比對照組平均值少了 3.6 cm，高量的奈米磁性粒子對植物〈綠豆〉生長確實有明顯的抑制效果。
- 三、植物體內的奈米磁性粒子，不管 N 極或 S 極都確實被磁鐵所吸引，造成植物體改變其向性，植物體內的奈米磁性粒子確實造成植物體內有向磁性。
- 四、在 1.2 克的奈米磁性粒子對麵包蟲的死亡高達九成的死亡率，高量的奈米磁性粒子對麵包蟲的死亡確實有加速作用。
- 五、在 1 克的奈米鑽石對麵包蟲的死亡高達九成的死亡率，高量的奈米鑽石對麵包蟲的死亡確實有加速作用。
- 六、高量的奈米鑽石對植物〈綠豆〉發芽及生長確實有明顯的抑制效果。
- 七、在受影響的植物體內確實發現奈米鑽石的分布。
- 八、在對動物細胞人類胎盤滋養層細胞，高濃度的奈米鑽石確實是有毒性。
- 九、奈米鑽石在細胞內的細胞質，細胞核都有分布。
- 十、由影像上的推斷可能在細胞質內的胞器、內質網、粒線體都有奈米鑽石。
- 十一、意外發現分裂中的細胞，赤道板、染色體上是不會有奈米鑽石，且細胞質的奈米鑽石會均勻分布在兩個細胞之細胞核周圍的細胞質中。

## 捌、參考文獻

1. 毛怡雯 (2007)。綠色螢光奈米鑽石的製備與生物應用。臺灣師範大學化學系碩士論文。
2. K. Iakoubovskii *et al*, (2000), Structure and defects of detonation synthesis nanodiamond. *Diamond and Related Materials*, 9(3), 861-865.
3. Amanda M.*et al*, (2007), Are Diamond Nanoparticles Cytotoxic? *J. Phys. Chem. B*, 111 (1), 2
4. Kuang-Kai Liu *et al*, 2007, Biocompatible and detectable carboxylated nanodiamond on human cell, *Nanotechnology*, 18, 325102
5. A.P. Puzyr *et al*, (2007), Nanodiamonds with novel properties: A biological study, *Diamond and Related Materials*, 16(12), 2124
6. Hans C Fischer *et al*, (2007), Nanotoxicity: the growing need for *in vivo* study, *Current Opinion in Biotechnology*, 18( 6), 565
7. UO Hafeli *et al*, (1999), In vitro and in vivo toxicity of magnetic microspheres, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 194, 76
8. Wei-xian Zhang *et al*, (2003), Nanoscale Iron Particles for Environmental Remediation: An Overview, *Journal of Nanoparticle Research*, 5, 323