

# 2024年【科學探究競賽-這樣教我就懂】

## 普高組 成果報告表單

<b>題目名稱：探究發光桿菌屬的發光特性與其在水質檢測的應用</b>
<b>一、摘要</b>
通過實驗及計算，本文發現發光桿菌屬 ( <i>Photobacterium spp.</i> ) 的發光特性為其亮度成指數性遞減。本文也進行了實驗證明銅離子對發光桿菌屬有抑制作用。結合以上兩點，本文往發光桿菌屬內加入硫酸銅，並發現加入發光桿菌屬的半衰期比對照組長。因此，本文提出利用半衰期進行水質檢測的方法。
<b>二、探究題目與動機</b>
Ex.問題來源與動機 ( 可用科學的方式來解釋 ) 。 馬來西亞常年遭遇治水問題的困擾，而治水后往往會帶來嚴重的水污染問題。對於這個問題，我們想要以一個簡單、方便且便於人民使用的裝置予人民檢測水質用。這時我們發現了發光桿菌屬對環境敏感的特性可以解決我們的問題。 成功取得發光桿菌屬后，卻對其發光特性感到苦惱。因此我們設計實驗裝置探究發光桿菌屬的發光特性。接著，我們想要知道其發光特性是否能夠用來檢測水質，以解決上述問題。
<b>三、探究目的與假設</b>
<ol style="list-style-type: none"><li>1. 發光桿菌屬的亮度會隨時間遞減，且其遞減方式為指數型遞減。</li><li>2. 發光桿菌的螢光亮度會被重金屬抑制。</li><li>3. 可利用發光桿菌屬的發光特性來檢測水質。</li></ol>
<b>四、探究方法與驗證步驟</b>
一、獲取發光桿菌屬隔離株 <ol style="list-style-type: none"><li>1. 固體培養基的製備：在錐形瓶內加入100 ml的蒸餾水，3.6 g的LB瓊脂及3 g的鹽，以製成鹽濃度百分比為3.28%的LB瓊脂溶液。然後，把調配好的溶液放入高溫高壓滅菌鍋 ( 121°C, 15psi ) 消毒二十分鐘。將LB瓊脂溶液倒入培養皿並待至凝固即可使用。</li><li>2. 發光桿菌屬隔離株的分離：我們從馬來西亞雪蘭莪州的漁港——大港新村取得剛捕撈的漁獲。首先使用事前已消毒的棉簽在3種魚，即<i>Eleutheronema tetradactylum</i> ( 俗名為馬友 ) , <i>Parastromateus niger</i> ( 俗名為黑鯧 ) , <i>Pampus chinensis</i> ( 俗名為斗鯧 ) 的胸鰭下輕刮表皮，之後將棉棒上的菌株接種到固體培養基上，在室溫 ( 約 28°C ) 培養6~8 hr，觀察到3盤培養皿皆有發光菌株 ( 圖1 ) 。之後用接種環從黑鯧</li></ol>

胸鰭下所培養出來的發光菌叢以三區劃法進行第二次分離接種以獲取純的隔離菌株 (圖2)。

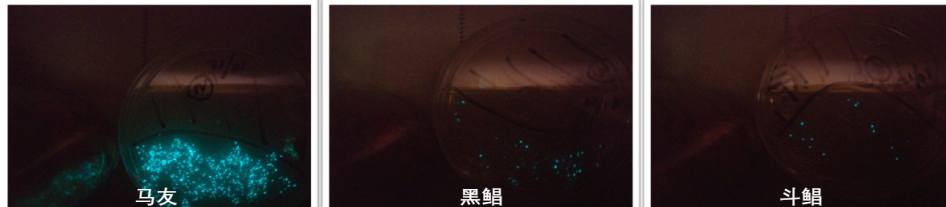


圖1：從三種魚的胸鰭下方輕刮數下，接種至LB培養基培養8小時的結果，亮點表示發光菌叢 (照片ISO值 3200，快門速度 32秒)

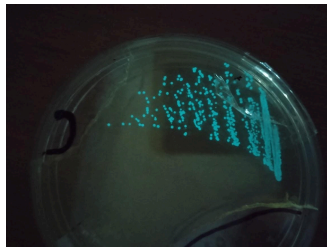


圖2：用三區劃法第二次分離菌種以獲取發光桿菌屬的隔離株 (照片ISO值 15938, 快門速度1/10秒)

### 3. 鑒別所培養的細菌：

我們對細菌進行革蘭氏染色后，在400X顯微鏡下觀察細菌外形，從圖3可觀察到細菌的染色結果為革蘭氏陰性，形態為球桿菌 (coccobacillus)，與Reichert and Baumann (1973) 在文獻中發表的發光桿菌屬結果一致。

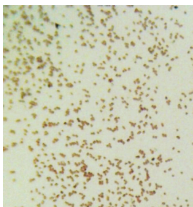


圖3：400倍顯微鏡下的經革蘭氏染色后的發光桿菌屬

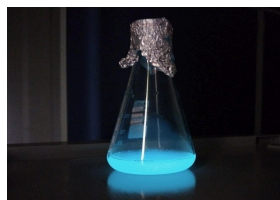


圖4：在黑暗環境中，發亮的發光桿菌屬 (照片ISO值 3200, 快門速度 8秒)

## 二．以液體培養基培養受測菌株

1. 在錐形瓶內加入3g的LB肉湯及100g的蒸餾水。放入高溫高壓滅菌鍋 (121°C, 15psi) 消毒二十分鐘。待至冷卻，即可使用。
2. 使用接種環從第二次培養的培養皿上取出隔離菌株，然後將接種環浸入液體培養基內，輕搖接種環使單株發光菌脫離接種環。
3. 培養一天，在黑暗的環境中就可觀察到液體培養基內有會發亮的發光桿菌屬 (圖4)。

## 三．光傳感器的設計及熒光測量原理

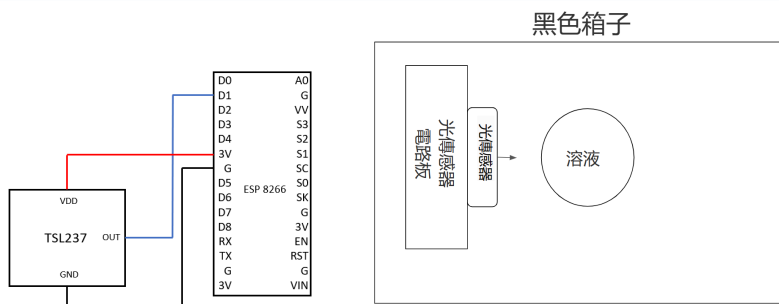


圖5：光傳感器電路圖

圖6：檢測熒光強度的簡單設計圖

本文使用的光傳感器電路連接方式如圖5所示。其中，TSL237光電探測器內含一個可根據接收到的熒光強度產生對應電流的光電二極體，以及一個電流頻率轉換器（current to frequency converter），它可根據光電二極體的電流量值（類比訊號）產生相對應頻率的數位訊號（digital signal）。即TSL237光電探測器接收到的熒光強度越大，輸出的數位訊號頻率也就越高。接着，通過TSL237的OUT端傳送訊號至微控制器ESP8266。ESP8266將訊號傳至電腦，並使用Python進行運算。

圖6為檢測發光桿菌屬所發出的生物熒光強度的裝置設計圖。在實驗過程中，固定含有發光桿菌屬的溶液與光傳感器的距離。

Python運算過程：

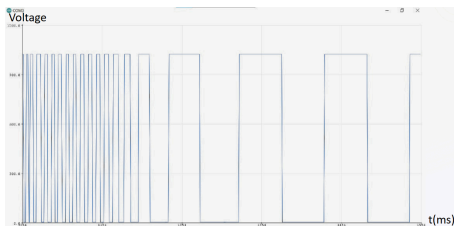


圖7：TSL237檢測到發光桿菌屬發出的生物熒光逐漸變暗過程所產生的方波

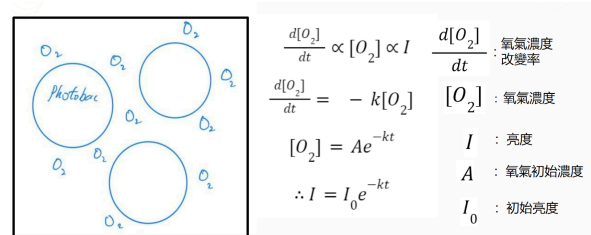


圖8：氧氣擴散入發光桿菌屬的理論模型

1. 計算數位訊號方波的周期（如圖7）。
2. 利用以下公式計算瞬時熒光強度。
3.  $I = \frac{1}{T} \times \frac{1}{R}$ ，其中R為光電感測器的響應率，T為數位訊號周期，I為瞬時熒光強度。根據TSL237的規格，其響應率R為 2.3 kHz/( $\mu\text{W}/\text{m}^2$ )。
4. 取首5秒的瞬時熒光強度數值計算平均值。

从图7，可看出亮度是随时间递减。對此，本文猜测递减方式是指数性递减，論據如下：

图8为我们猜测亮度呈指数性递减的理论模型。理論模型內裝有發光桿菌屬的容器靜置於平面，因此溶進溶液的氧氣可忽略不計。在這前提下，氧氣濃度改變率和氧氣濃度成正比。我們又知道發光桿菌屬發光的其中一條件是需要氧氣，因此亮度與氧氣濃度呈正比。經過計算，我們得出此猜測，即亮度呈指數性遞減。

$$I = I_0 e^{-\frac{\ln 2}{T} \cdot t}$$
$$\ln I = -\frac{\ln 2}{T} t + c$$

因此可見熒光強度的自然對數  $\ln I$  與發光時間  $t$  呈線性關係。

與線性方程對比，

$$y = mx + c$$
$$\therefore T = -\frac{\ln 2}{m}$$

因為初始熒光強度難以固定，但是熒光強度基本上隨時間指數遞減，因此我們嘗試計算熒光遞減的半衰期，並以此來判別發光桿菌是否受到有害物質的影響。由於熒光強度與時間呈指數關係，較難作計算。因此，以其自然對數，作出線性方程表示其關係。我們使用 Python 畫出其最佳擬合線，並以此最佳擬合線計算出其半衰期。

```
import numpy as np
x_data = np.array(x_axis)
y_data = np.array(y_axis)
ylog_data = np.log(y_data)
m,c=np.polyfit(x_data, ylog_data, 1) #calculate m and c
T=-np.log(2)/m #calculate half life
print("Half life: ",T)
```

圖9：計算熒光強度半衰期代碼

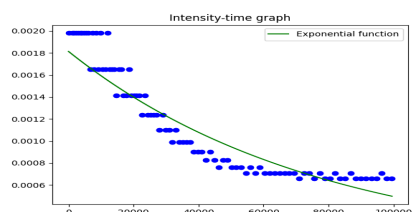


圖10：時間與熒光強度呈指數關係

#### 四、实验步骤

1. 将含发光杆菌属的培养液分成两等份40 ml，并装入烧杯。
2. 在第一份培养液加入5ml的蒸馏水作为对照组。
3. 摇晃均匀后放入黑色箱子内的“溶液”位置（如图6所示），检测初始荧光强度。
4. 静置15分钟后，再次检测荧光强度。
5. 在第二份培养液加入5ml浓度为1g/L的CuSO<sub>4</sub>溶液作为实验组，并重复步骤3，4。
6. 收集并分析数据

	H <sub>2</sub> O	CuSO <sub>4</sub> (1g/L)
初始強度(μW/m <sup>2</sup> ) I <sub>初</sub>	8.4558 × 10 <sup>-4</sup>	6.1283 × 10 <sup>-4</sup>
15分鐘后強度(μW/m <sup>2</sup> ) I <sub>末</sub>	4.8429 × 10 <sup>-4</sup>	1.8344 × 10 <sup>-4</sup>
強度改變量(μW/m <sup>2</sup> ) I <sub>末</sub> - I <sub>初</sub>	- 3.6129 × 10 <sup>-4</sup>	- 4.2939 × 10 <sup>-4</sup>

表1：发光杆菌属在不同环境下的首5秒平均荧光强度

由表1可得知发光杆菌属的荧光强度会因铜离子 (Cu<sup>2+</sup>) 的存在而明显减弱。在15分钟的间隔内，发光杆菌在含有铜离子的环境中荧光强度减弱幅度比没铜离子的环境高出大约18.8%。

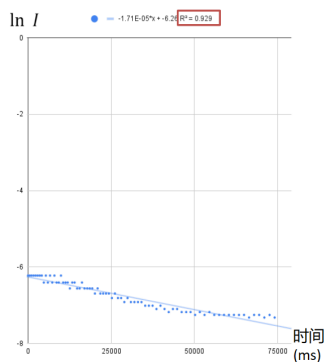


图11：对照组的线性关系图

亮度半衰期=40535 ms

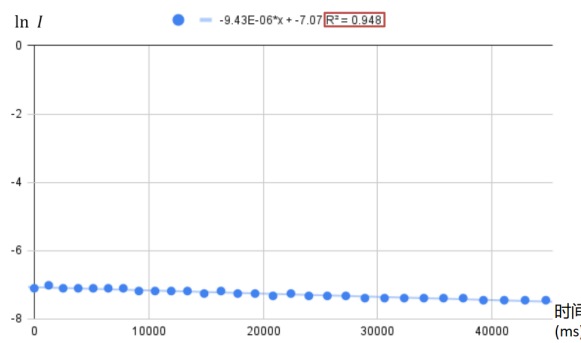


图12：实验组的线性关系图

亮度半衰期=73504 ms

代入如上所說的半衰期公式去計算發光桿菌屬的半衰期，會得出圖11及圖12，並且得知實驗組的半衰期比對照組的半衰期長。我們猜測由於銅離子抑制了發光桿菌屬，導致耗氧量降低，從而導致氧氣濃度減半所需要的時間變長，使得實驗組的半衰期變長。

從實驗可以總結出，毒物會影響發光桿菌屬的半衰期。因此，我們可以通過設計計算半衰期的裝置，即可檢測水質。

## 五、結論與生活應用

結論：

1. 发光杆菌属亮度呈指数型递减。
2. 銅離子會抑制發光桿菌的發光亮度。
3. 可以通过计算发光杆菌属的半衰期即可检测水质。

这三项结论符合了我们的假设。

我們可通過改良檢測裝置設計，以達到實時監控 (real-time monitoring) 的目的，並將我們所有檢測數據上傳到伺服器，公開供社會大眾參考。值得一提的是，本系統的結構設計、操作步驟以及結果判斷方式皆非常簡單，對於非專業人員而言，無需任何專業背景知識或訓練，即可完成檢測步驟，快速得知檢測結果。

#### 參考資料

1. Lin Zhifen, Kong Deyang , Ping Zhong, Kedong Yin, Lihua Dong(2003)Influence of hydroxypropylcyclodextrins on the toxicity of mixtures. *Chemosphere*, 58(9), 1301-1306.
2. Lopez-Roldan, R., Kazlauskaitė, L., Ribo, J., Riva, M. C., González, S., & Cortina, J. L. (2012). Evaluation of an automated luminescent bacteria assay for in situ aquatic toxicity determination. *Science of the Total Environment*, 440, 307–313.
3. Nilam Baizura T. I., Othman F. and Zalina M.N.(2020) Baseline Study of Heavy Metal Pollution in a Tropical River in a Developing Country.*Sains Malaysiana*, 49(4)(2020): 729-742
4. Parvez, S., Venkataraman, C., & Mukherji, S. (2006). A review on advantages of implementing luminescence inhibition test *Vibrio fischeri* for acute toxicity prediction of chemicals. *Environment International*, 32(2), 265–268.
5. Reichelt, J.L., and Baumann, P. (1973) Taxonomy of the marine, luminous bacteria. *Arch Mikrobiol*, 94: 283–330.
6. Reichelt, J.L., Nealson, K., and Hastings, J.W. (1977) The specificity of symbiosis: pony fish and luminescent bacteria. *Arch Microbiol*, 112: 157–161.
7. Ruby, E.G., and Nealson, K.H. (1976) Symbiotic association of *Photobacterium fischeri* with the marine luminous fish *Monocentris japonica*: a model of symbiosis based on bacterial studies. *Biol Bull*, 151: 574–586.
8. S. Ulitzur, T. Lahav, N. Ulitzur (2002) A Novel and Sensitive Test for Rapid Determination of Water Toxicity. *Environmental Toxicology*, 17(3), 291-296.
9. Seyedeh B. T. S., Salleh A., Sulaiman A. H., Sasekumar A., Rezayi M., Tehrani G. M.(2013) Heavy metal contamination in water and sediment of the Port Klang coastal area, Selangor, Malaysia. *Environ Earth Sci*, 69:2013–2025
10. Yetinson, T., and Shilo, M. (1979) Seasonal and geographic distribution of luminous bacteria in the Eastern Mediterranean Sea and the Gulf of Elat. *Appl Environ Microbiol*, 37: 1230–1238
11. Zou Xiaoming, Lin Zhifen,Deng Ziqing,Yin Daqiang,Zhang Yalei(2012)The joint effects of sulfonamides and their potentiator on *Photobacterium phosphoreum*: Differences between the acute and chronic mixture toxicity mechanisms. *Chemosphere*, 86(1), 30-35.