

【2021 全國科學探究競賽-這樣教我就懂】

海洋科學組 成果報告表單

題目名稱：採集發光細菌並檢測水質中塑膠微粒的影響

一、摘要：

本研究透過對發光細菌的實地採集，研究不同魚貨來源對發光細菌採集的影響，並藉由發光細菌的發光特性，研究特定環境下的發光情形。污染物則挑選近年海洋污染的熱門話題—塑膠微粒—作為研究主題。希望將時事與生物實驗結合，利用生物特性製作簡易的環境檢測工具，探究未知的問題，並且重新使大眾重視環境保護的議題。

二、探究題目與動機

近年來，海洋污染日益嚴重，海洋生態受到前所未有的浩劫。海洋中塑膠微粒所造成的環境危害逐漸為大眾所關注。由於塑膠在海洋中不易分解，於是我們想探索一個方法證實它對於水質所帶來的污染。另外，我們對網路上的一篇文章《發光細菌在毒性試驗的應用》提到的水質檢測方式產生濃厚興趣—發光細菌在正常的生理條件之下發光強度是穩定且持續的，但一旦受環境影響、比如暴露在污染物之下時，發光程度可能因為細菌死亡或螢光素酶活性降低而受到抑制，造成發光量減少—因此我們可藉由對發光強度的量測推估環境中污染物對細菌的毒性。

三、探究目的與假設

海洋附生性發光細菌在分類上主要屬於 *Vibrio*(弧菌屬)與 *Photobacterium*(發光菌屬)，主要附生於海洋生物的體表，藉由採集分離後能用肉眼在暗室清楚看見其發光，生長環境適應力強，但在鹽度上有嚴謹的範圍，通常介於 20-35% 的鹽度中培養較為合適，並且對環境刺激具有敏銳迅速的反應，約在五分鐘以內便可觀察到實驗結果，是迅速且花費低廉的水質檢測方式。因此我們利用發光細菌以上特性來檢測塑膠懸浮微粒對海洋環境的影響。

海洋塑膠微粒是藉由人類排放到海中的小於五毫米之塑膠顆粒，材質多樣且混雜，雖然還並未證實對生物體有負面影響，但塑膠微粒進入生物體內便無法排出、分解，長久累積被認為也可能對海洋生物造成影響。因此我們挑選常見塑膠的兩種材質：橡皮筋(合成橡膠)、尼龍繩(聚乙烯)，製作成塑膠微粒加入發光細菌液中觀察其影響。

實驗預期成果：

1. 由於橡皮筋的毒性大於尼龍繩，因為橡皮筋經過久放會產生融化與臭味，並且合成橡膠中的二氧化硫是主要的毒素來源。
2. 加入的汙染物質愈多，發光亮度會有明顯下降的趨勢。

研究大綱如下：

第一部分：探討發光細菌的採集來源。

第二部分：進行發光細菌的培養、繼代與繁殖。

第三部分：運用發光細菌作為檢測的媒介，探討塑膠微粒造成的影響。

四、探究方法與驗證步驟

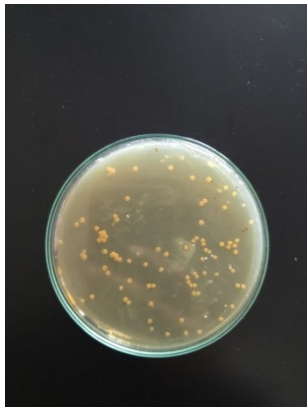
第一部分：

發光細菌的實地採集

(一)市售 vs 實地採集：

我們最初向國家食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心購買研究用的發光細菌，此來源是目前國內唯一市售的發光細菌(*Photobacterium Leioognathi*)，遺憾的是我們依照說明書指示進行菌株活化後，產生的結果並非會"發光"的菌落，並已向所方查證證實該單位提供的菌株沒有發光現象。顯示台灣目前並無單位保存可發光的發光細菌菌種。如圖一所示。後來我們決定以採集的方式，參考網路上的資料後，發現文獻作者幾乎對於採集的來源以及方法沒有多加探討與深入了解，因此決定自行實地採集來尋找。

由於國內沒有市售可用的標準合格發光細菌，所以我們計畫利用實地採集，因此我們想要利用自己採集的發光細菌來證實塑膠微粒對生態可能造成的影響，讓我們投入大量的時間進行實驗！



圖一：*Photobacterium Leiognathi*

圖二、三：組員於漁港進行採集

實地採集

採集方式:

將調製好濃度(35%)的食鹽水分裝到小採集瓶中，接著使用棉花棒塗抹漁獲表層，然後泡至鹽水中並反覆刮抹(使細菌有確實進入鹽水中)。

我們藉由分頭進行來探索更多魚貨來源，主要分布在新竹、苗栗地區，包括漁港、魚市、定置魚場、釣客，採集的魚種有雜魚、軟絲、透抽，其中但實驗發現漁港與魚市所販售的魚，都無法採集出發光細菌，推測原因可能是魚販販售的魚都有事先經過處理，例如:急速冷凍、刷洗魚鱗、浸泡消毒水等，都會造成發光細菌的死亡，而最後在釣客第一手得到的魚並未經過任何處理，並成功尋獲，因此我們推測:未經過任何處理的魚有高機率採集成功。

(二)不同採集來源及採集結果:

類別	地點	結果
傳統魚市場攤位	竹北、頭份傳統市場	30 組樣本，未發現
漁港市場攤位	新竹南寮漁港 桃園永安漁港	40 組樣本，未發現
釣客	新竹南寮漁港	20 組樣本，發現發光菌
定置魚場	新竹海山漁港	10 組樣本，未發現

釣客的樣本共採集 20 組樣本，其中 5 個皿盤上有發光菌出現，成功率 5/20(25%)，根據採集的經驗，可得以下結論:凡是經過清洗魚表的魚獲身上皆無採集到發光菌、魚表觸感愈黏糊採集到發光菌的機率較高。



圖四:發光細菌單株拍攝

圖五:發光細菌菌液拍攝

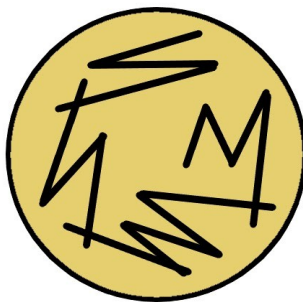
第二部分:

成功採樣後，須將採樣鹽水加入進固態培養基，觀察 1-2 天在暗室中尋找發光的菌落，再單株畫線法將發光的菌落分離純化，保留發光細菌的單一菌株，最後將完整單株用接種環，接種到培養液中。以上便完成發光細菌的培養與繁殖流程，所有操作都必須於無菌操作台中進行。

(一)固態培養基:洋菜粉 4/100g;肉蛋白萃取物 2/100g;鹽 2/100g

液態培養液製作:肉蛋白萃取物 2/100g;鹽 2/100g

(二)畫線法:使菌種純化，分離出單一菌種。



圖六:四區劃線法式示意圖

圖七:無菌操作台

第三部份:

(一)塑膠微粒來源:尼龍繩剪成直徑小於 2mm 之細絲狀，以及橡皮筋剪成塊狀。

(二)設備器材及環境:

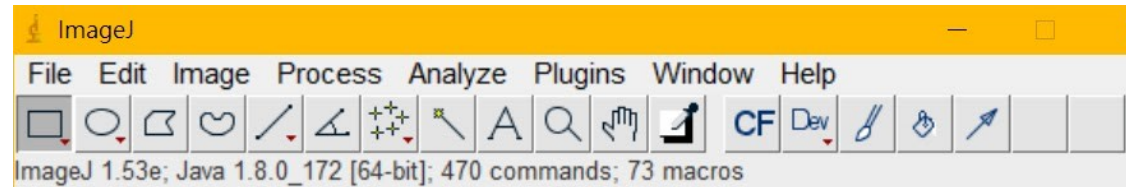
專業生物攝影相機，在暗室中固定焦距拍攝，相機感光度(ISO)設定為 12800。

(三)操作方式:

每分鐘拍照一次，總共計五分鐘。

以圖像分析軟體 ImageJ 來量測照片中的發光亮度，並和對照組的亮度進行比較，計算出亮度的比值。

打開 ImageJ 軟體>輸入照片>以長方形邊框選取測量範圍>點選 plugins 中的 analyze>點選 RGBmeasure 可得此選取範圍中亮度的加權平均值 mean

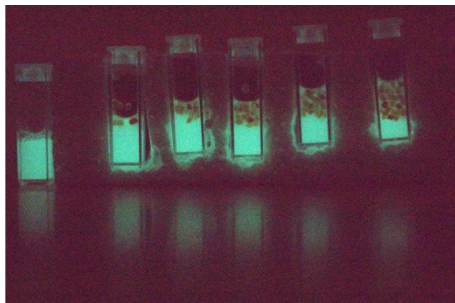


圖八: ImageJ 軟體介面圖

	Label	Area	Mean	Min	Max
1	Red	50400	19.206	0	43
2	Green	50400	70.155	49	90
3	Blue	50400	58.885	38	80
4	(R+G+B)/3	50400	49.593	29	71
5	0.299R+0.587G+0.114B	50400	53.659	33	75

圖九: RGBmeasure 圖

共操作了橡皮筋塊 15 組、尼龍繩八組樣本，檢驗的項目為對照組(原始)、實驗組(微粒 0.1,0.2...-0.5g)共六組樣本



圖十:拍攝發光菌液實驗

數據彙整分析，將實驗組與對照組亮度的比值做計算，以時間為橫軸，比值為縱軸，繪製折線圖，並加入趨勢線。

五、結論與生活應用

整理測量所得的相關數據後製成以下圖表，並歸納出以下結論：

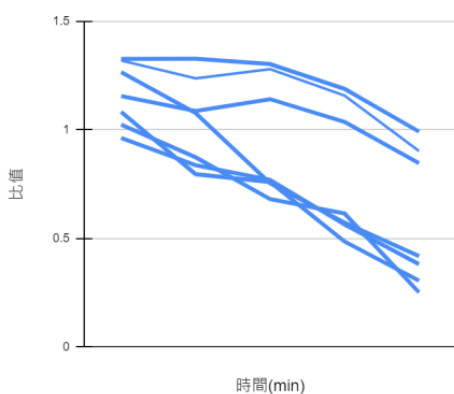
(一)橡皮筋對發光菌的影響有顯著傷害，亮度趨勢明顯下降，證明其對環境

的危害。

(二)尼龍繩對發光菌活性**無顯著影響**，甚至有刺激的效果，我們推測塑膠微粒因為懸浮的特性，可以將氧氣帶往更深處的特性，造成發光亮度不減反增的情形。

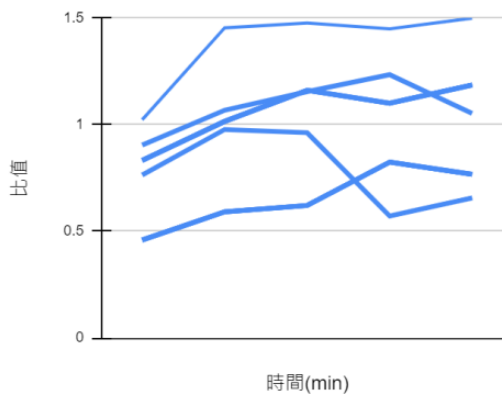
(三)經過這次研究，發現並不是所有塑膠微粒都對環境有害，但共同的特點便是無法分解，長期累積推測對生物體也會造成傷害。

橡皮筋塊實驗組與對照組亮度比值隨時間變化折線圖



圖十一:橡皮筋實驗統計圖表

尼龍繩實驗組與對照組亮度比值隨時間變化折線圖



圖十二:尼龍繩實驗統計圖表

生活應用:

經過這次的實驗，觀察到發光細菌對環境毒素有良好的檢測方式，可以增加不同種類的污染樣品以及相異水質。在未來甚至可以檢測優養化、海水熱污染(珊瑚白化).....等有關含氧量的環境污染，是一向不需大量時間與成本的环境檢測方式。

參考資料

張淳淳。(2016)。發光細菌在毒性試驗的應用

<https://highscope.ch.ntu.edu.tw/wordpress/?tag=%E7%99%BC%E5%85%89%E7%B4%B0%E8%8F%8C>

揭維邦。(1994)。海洋生物附生性發光細菌之研究