

# 中華民國第 60 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

052606

以弧測海-探究費氏弧菌並檢測海洋汙染

學校名稱：國立宜蘭高級中學

作者：  高二 王幸好  高二 吳閩卉  高二 游翊民	指導老師：  黃苡甄
---	------------------

關鍵詞：費氏弧菌、海洋汙染檢測

## 摘要

本實驗使用分光光度計檢測費氏弧菌菌液濃度的 OD600 吸光值，並以其判斷費氏弧菌的生長情況，測量各實驗組中細菌含量的差異。

首先檢測其生長情形最良好之鹽度，再以最適鹽度做為培養基基底，並用於檢測有機、無機污染物對於費氏弧菌生長的抑制效果，並將所得結論用於實測東北角海岸線污染，分析各種污染物及各地海水下菌液 OD600 數值之間的關係，進而探討各地海水所受到的污染程度並嘗試了解其污染因素。

為解決耗時過程，我們採用海藻酸鈉可形成凝膠的特質，將費氏弧菌以膠球固定化，加入對應的自體誘導物 N-(3-oxohexanoyl)homoserine lactone，並測試其發光、發熱的強度。加入待測污染物及樣本，測量發光強度，若和上述 OD600 實驗所得的數值正相關，則能夠以此方式迅速進行海水水質檢測方式。

## 壹、研究動機

生長於以好山好水聞名的宜蘭，自有記憶起便時常與自然為伍。小時候，走進潮間帶的每一步都必須注意腳底，只怕不小心踩到了海洋生物；如今，即使努力的在石頭底部、縫隙間尋找，尋獲的生物依然寥寥無幾。因此我們意識到，近年來潮間帶豐富的生態資源迅速地枯竭，並懷疑其主要原因是海水遭受人為污染。

海岸可視為台灣生態最豐富且及重要的環境資源，是萬物們賴以維的棲息地。許多觀光遊憩、學術研究等活動也都和海洋息息相關。若海洋及潮間帶繼續受到過度地開發、污染，將嚴重影響當地的生物生長、繁衍以及任何相關活動的進行，因此了解各地海洋受污染的程度，並予以適當的保護、復育，是當前刻不容緩的工作，需全體人民共同關注與配合。

以當地生物作為某地的環境指標，是現今常見用於觀測一地是否遭受污染與破壞的方法。例如對於熱帶海洋而言，珊瑚的白化規模就可以做為當地污染與受全球暖化影響的指標。深入查詢此類探測方法後，我們發現海洋細菌也是現今常用於檢測水質污染的生物，一般而言會以海洋細菌作為水體受污染程度的判斷依據。

基於上述原因，經討論後我們決定以無致病性、營養需求低的費氏弧菌著手進行實驗，給予其數種模擬汙染的生長環境，最後實際檢測東北角海岸及少數其他地區的海水，分析台灣各地海洋的汙染程度。

## 貳、研究目的

本研究之目的在於創造出一套利用費氏弧菌檢測海水的汙染程度之方法，有以下研究問題：

### 一、不同環境中費氏弧菌的生長率比較

(一) 不同鹽度(2%、3%、3.5%)的費氏弧菌生長率比較 二、不同汙染物中對於費氏弧菌的生長率比較

(一) 有機物汙染：不同酚濃度對於費氏弧菌生長率之影響

(二) 無機物汙染：不同硫酸鋅對於費氏弧菌生長率之影響

(三) 酚與硫酸鋅交互作用下對於費氏弧菌生長率之影響

### 三、不同海域之海水對於費氏弧菌的生長率比較

(一)取台灣東北沿岸之海水實測(福隆、頭城、壯圍、蘇澳、南澳、七星潭、磯崎)對於費氏弧菌的生長率比較

### 四、以海藻酸鈉膠球將費氏弧菌固定化，研發更便利的檢測。

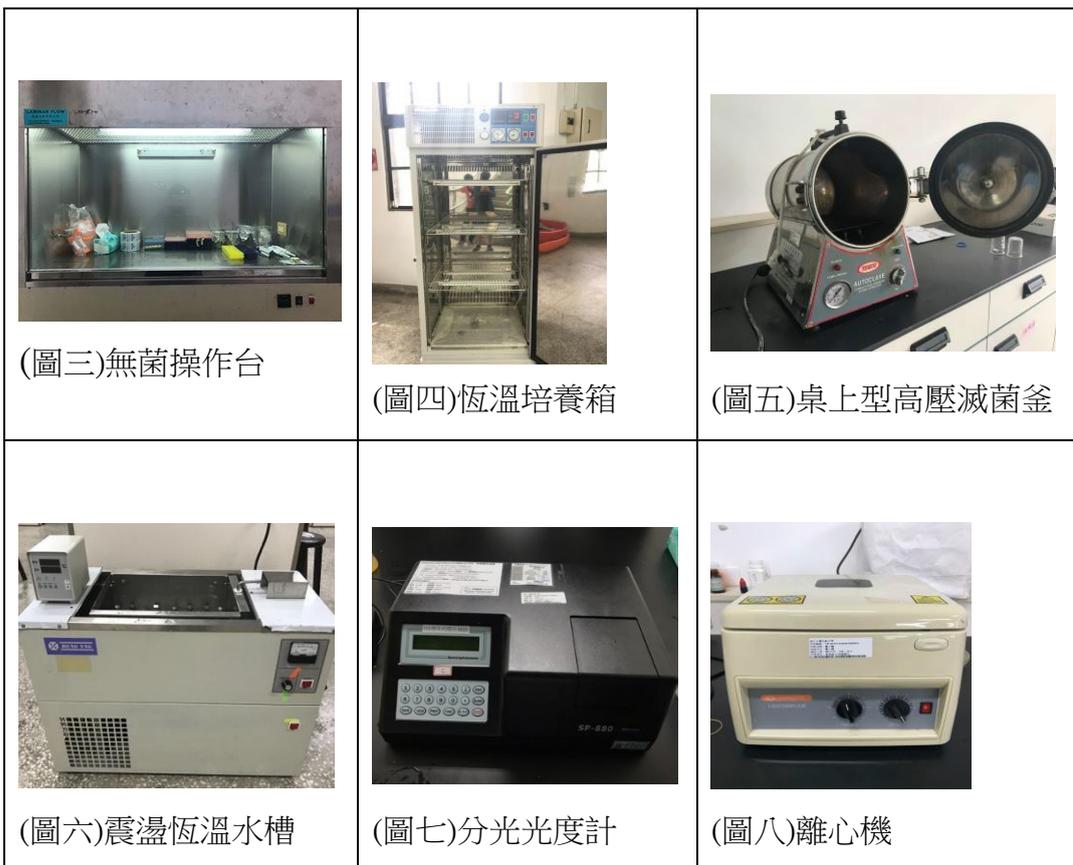
## 參、研究設備及器材

### 一、實驗儀器

無菌操作台、恆溫培養箱、桌上型高壓滅菌釜、往復式震盪恆溫水槽、分光光度計、離心機、電子天平、刮勺、磁石攪拌器、接種環、培養皿、試管、離心管、微量吸管、血清瓶、錐形瓶、酒精燈

### 二、實驗材料

費氏弧菌、培養基(Marine Agar 2216)、酵母萃取物(Yeast Extract)、蛋白胨(Peptone)、氯化鈉、酚、硫酸鋅、清潔劑 (洗髮精、洗碗精、洗衣精、防曬乳、洗手乳、洗面乳)、秤量紙、石蠟膜、鋁箔紙、PCR Tube、Tips、酒精



## 肆、研究過程或方法

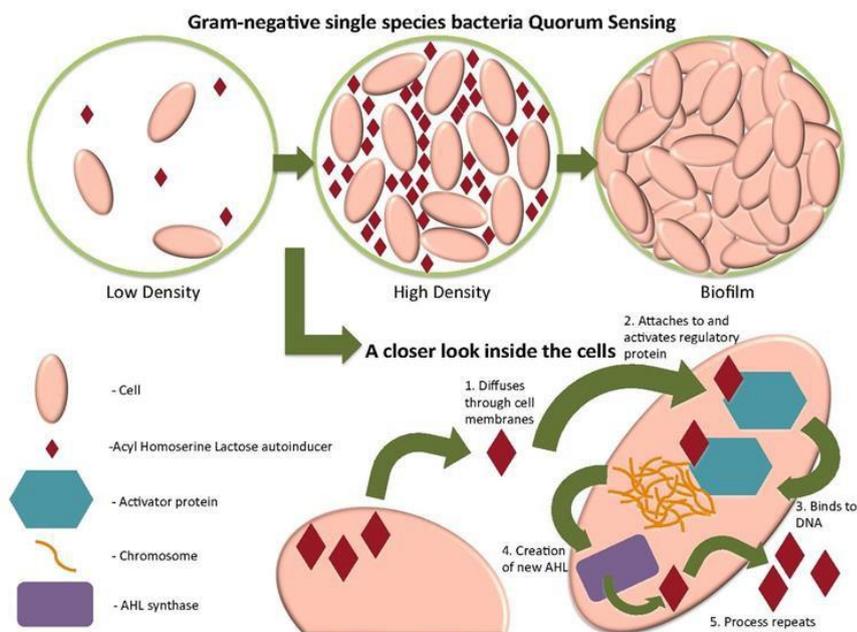
### 一、文獻探討

(一)費氏弧菌簡介 1.屬於革蘭氏陰性菌，細胞壁中肽聚糖含量低、脂類含量高。革蘭氏陰性菌在培養時的營養需求較低，較革蘭氏陽性菌易於培養。2.為海洋發光細菌的一種，所發出的冷光是波長約450~490奈米的藍綠色光，毒物具有抑制其生長及發光的作用。

(二)費氏弧菌與夏威夷短尾烏賊的共生 夏威夷短尾烏賊時常出沒於夏威夷群島的淺海區域，一個類似於手電筒的發光器內置於烏賊的頭部中，但這個發光器本身並不能發光，它的功能為聚集大量費氏弧菌並促進其群聚感應產生冷光，利用發光來隱身。除此之外，費氏弧菌亦可調節夏威夷短尾烏賊的生物鐘及兩者免疫互相作用，形成良好的共生關係。

### (三)群體感應

費氏弧菌的溝通機制為「群體感應」，包含合成、釋放與偵測一些特殊的自體誘導物(AI,autoinducer)。當一個細菌個體附著到適合的物體表面上後，便開始產生AI，告知其他細菌自己的所在位置，進而吸引個體細胞的累積。細菌藉由這種化學對話感知彼此的存在並偵測周遭細胞族群密度高低。群體感應發光的先決條件是螢光素酶基因的合成要被啟動，若僅單一個體被啟動螢光素酶基因，其螢光非常微小，甚至肉眼無法看見。透過群聚感應，費氏弧菌會先聚積在一起，待族群到達一定密度後，啟動特定基因序列，才能有效的發光。



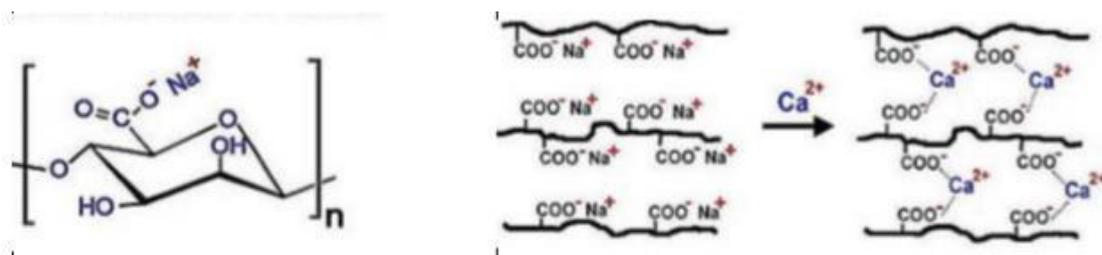
(圖九)群聚感應示意圖

#### (四)固定化技術

固定化技術是近來生物、環境等領域的一個研究熱點。固定化微生物更是一種比一般生物吸附法更為高效的方法，它是利用化學或物理方法將游離細胞限制於固定的空間內後，可以為細胞創造一個適宜的環境，有利於細胞的生長和表達。對基因工程菌而言，相對於游離細胞懸浮培養，固定化細胞培養可以有效減少不穩定現象，提高反應效率。經文獻閱讀後，我們選用海藻酸鈉作為包埋材料進行實驗

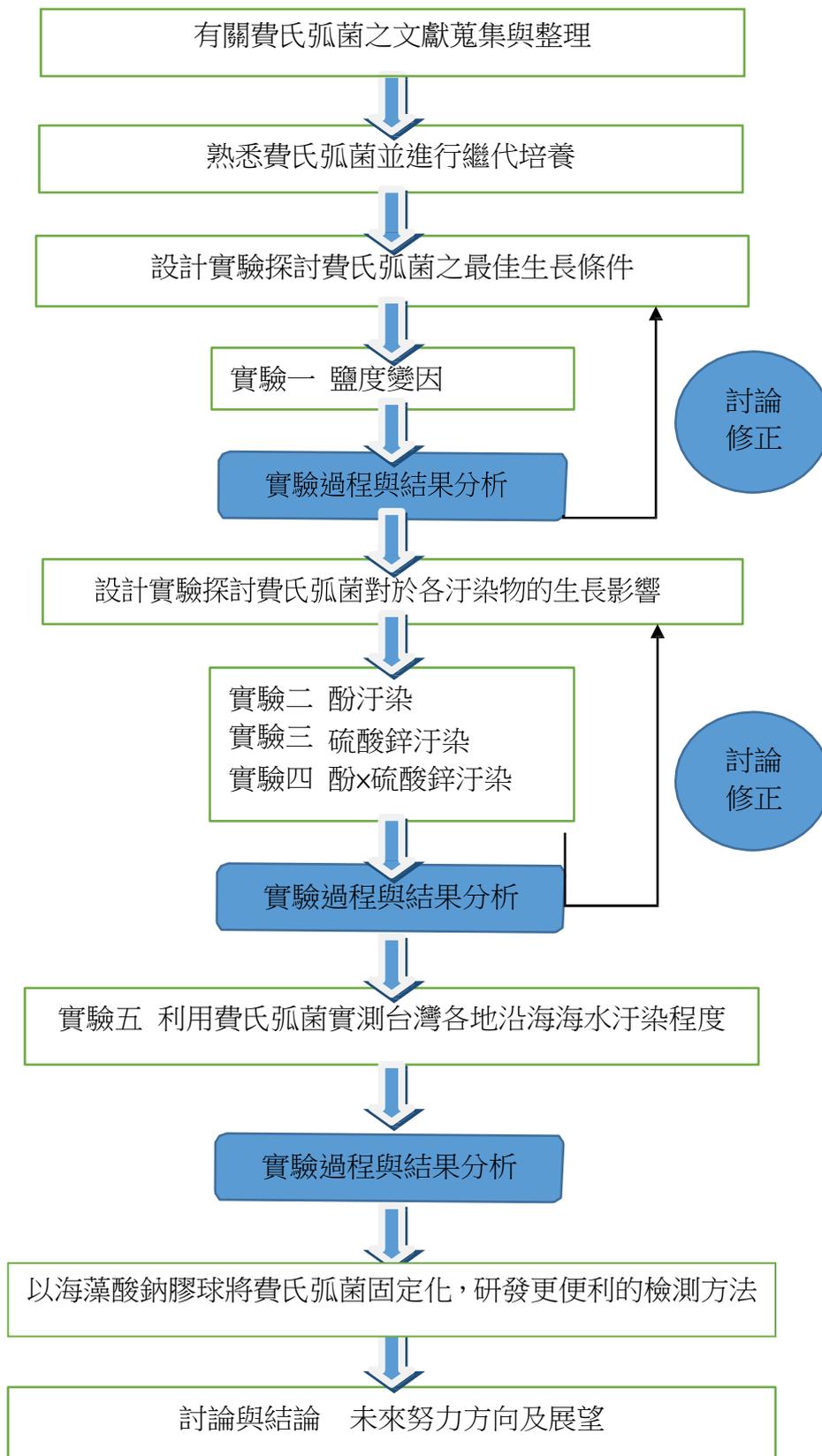
##### 1. 海藻酸鈉

海藻酸鈉(Alginate)是一種天然高分子材料，別名褐藻酸鈉、褐藻膠、藻膠，其分子式為 $(C_6H_7O_6Na)_n$ ，相對分子量在(32000-200000)。海藻酸鈉主要是由兩種單糖  $\beta$ -D-甘露醛酸與  $\alpha$ -L-古羅糖醛酸鍵結所構成的線性多醣化合物，形成一種無支鏈的線性嵌段共聚物。海藻酸鈉很容易與一些二價陽離子結合，形成凝膠。



(圖十)海藻酸鈉之結構式(左)與海藻酸鈉遇鈣離子後的反應(右)

## 二、設計實驗(流程圖)



### 三、實驗步驟

#### (一)、熟悉費氏弧菌並進行繼代培養

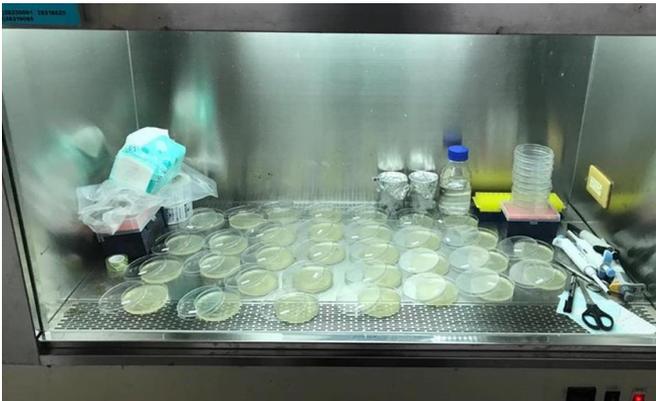
##### 1. 取得費氏弧菌

於食工所 BCRC 網站購買費氏弧菌菌株。

##### 2. 調配培養基

(1) 固態培養基：將 Marine Agar 2216 粉末 55.25 克和蒸餾水 1 公升混合均勻後倒入血清瓶，並放入高壓滅菌釜內滅菌 30 分鐘，在無菌操作箱內將其倒入培養皿中，冷卻凝固後放入冰箱保存。

(2) 液態培養基：將 10 克 Peptone、5 克 Yeast Extract 及 20 克 NaCl 加入 965 毫升的蒸餾水中，混合均勻後倒入錐形瓶，每瓶 100 毫升，以鋁箔紙封口後放入高壓消毒器內滅菌 30 分鐘，待冷卻後放入冰箱保存。



(圖十一)等待冷卻的 Marine Agar 2216 固態培養基



(圖十二)調配完成之 LB 液態培養基

##### 3. 將費氏弧菌進行培養

(1) 先將接種環以酒精燈滅菌。

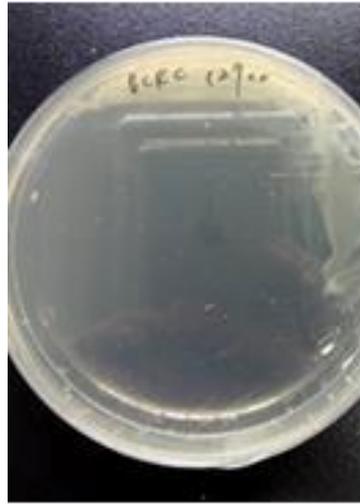
(2) 以接種環輕觸含費氏弧菌之菌株冷凍管，使接種環上沾有細菌。

(3) 將接種環上的細菌以四區畫菌法畫於 Marine Agar 2216 的固態培養基上，畫完後以石蠟膜密封培養皿，放入 26 度之恆溫箱待其生長。

##### 4. 持續進行固態與液態之繼代培養(約每兩天重新培養一代)



(圖十三)四區畫菌法



(圖十四)費氏弧菌之繼代培養

## (二) 探討費氏弧菌在不同環境中的生長率比較

### 1. 實驗一 比較不同鹽度下費氏弧菌生長率

- (1) 配製 NaCl 濃度分別為 2%、3%及 3.5%的 LB 液態培養基，於每個錐形瓶內倒入 100 毫升，每種濃度兩瓶。
- (2) 在無菌操作箱內，取生長於固態培養基上之菌落，放入 2 毫升 LB 中混合均勻。
- (3) 取 0.2 毫升含費氏弧菌之 LB，分別加入每個錐形瓶中。
- (4) 將水倒入震盪式恆溫水槽中並將錐形瓶置於定溫 26 度下，待其生長 16 小時以及 24 小時後，分別以分光光度計測量 OD600 吸光值(待測溶液在 600 奈米波長處吸光值，用以估計細菌的生長情況，1 OD600 約可換算成每毫升菌液含  $10^8 \sim 3 \times 10^8$  個細菌)，記錄數據並繪圖分析。



(圖十五) 錐形瓶置入震盪式恆溫水槽中搖晃

### (三)探討費氏弧菌在不同污染下的生長率比較

#### 1. 實驗二 不同濃度的酚下費氏弧菌生長率比較

- (1) 配製酚濃度分別為 0.02、0.04、0.06、0.08、0.1g/L 的 LB 液態培養基，分別倒 100 毫升至錐形瓶內，每種濃度兩瓶，並另取一瓶純 LB 作為對照組。
- (2) 測量無費氏弧菌生長下，含酚溶液本身的 OD600 吸光值作為背景數據，繪圖時須扣除溶液本身吸光值。
- (3) 在無菌操作箱內，取生長於固態培養基上之菌落，放入 2 毫升 LB 中混合均勻。
- (4) 取 0.2 毫升含費氏弧菌之 LB，分別加入每個錐形瓶中。
- (5) 置於定溫 26 度的震盪式恆溫水槽下，待其生長 16 小時以及 24 小時後，分別以分光光度計測量 OD600 吸光值，記錄數據並繪圖分析。

#### 2. 實驗三 不同濃度的硫酸鋅下費氏弧菌生長率比較

- (1) 配製硫酸鋅濃度分別為 0.02、0.04、0.06、0.08、0.1g/L 的 LB 液態培養基，分別倒 100 毫升至錐形瓶內，每種濃度兩瓶，並另取一瓶不含污染物之 LB 作為對照組。
- (2) 在無菌操作箱內，取生長於固態培養基上之菌落，放入 2 毫升 LB 中混合均勻。
- (3) 取 0.2 毫升含費氏弧菌之 LB，分別加入每個錐形瓶中。
- (4) 置於定溫 26 度的震盪式恆溫水槽下，待其生長 16 小時以及 24 小時後，分別以分光光度計測量 OD600 吸光值，記錄數據並繪圖分析。

#### 3. 實驗四 酚與硫酸鋅交互作用下費氏弧菌生長率比較

- (1) 將酚隔水加熱使其成為液體後，配製 0.04g/L 酚、0.04g/L 硫酸鋅、0.04g/L 酚+0.04g/L 硫酸鋅、0.08g/L 酚、0.08g/L 硫酸鋅、0.08g/L 酚+0.08g/L 硫酸鋅的 LB 液態培養基，於每個錐形瓶內倒入 100 毫升，每種濃度兩瓶，並另取一瓶不含污染物之 LB 作為對照組。
- (2) 各濃度分別取樣，測量無費氏弧菌生長下，含酚、硫酸鋅溶液本身的 OD600 吸光值作為背景數據，繪圖時須扣除溶液本身吸光值。
- (3) 在無菌操作箱內，取生長於固態培養基上之菌落，放入 2 毫升 LB 中混合均

勻。

(4) 取 0.2 毫升含費氏弧菌之 LB，分別加入每個錐形瓶中。

(5) 置於定溫 26 度的震盪式恆溫水槽下，待其生長 16 小時以及 24 小時後，分別以分光光度計測量 OD600 吸光值，記錄數據並繪圖分析。

#### (四)實際測試各地海水受汙染程度

1. 待取得海水中的雜質沉澱，以傾析方式把清澈海水以每 100 毫升分裝入錐形瓶並進行滅菌，每處海水各兩瓶，另取一瓶 LB 作為對照組。

2. 每瓶海水分別加入 1 克的 Peptone、0.5 克的 Yeast Extract，均勻混和後再次滅菌。 3. 每瓶分別取樣，測量無費氏弧菌生長下，含海水內雜質本身的 OD600 吸光值作為背景數據，繪圖時須扣除海水本身吸光值。

4. 在無菌操作箱內，取生長於固態培養基上之菌落，放入 5 毫升 LB 中混合均勻。

5. 取 0.2 毫升含費氏弧菌之 LB，分別加入每個錐形中。

6. 置於定溫 26 度的震盪式恆溫水槽下，待其生長 16 小時以及 24 小時後，分別以分光光度計測量 OD600 吸光值，記錄數據並繪圖分析。



(圖十六)將各地海水加入 Peptone 及 Yeast Extract 並滅菌

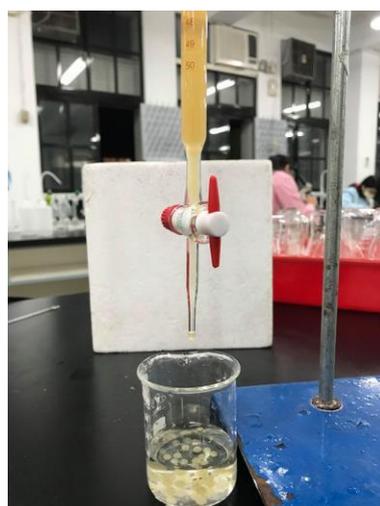
## (五) 費氏弧菌的固定化

### 1. 決定膠壁材質

(1) 海藻酸鈉膠球：配製重量百分濃度 6% 的海藻酸鈉水溶液(水：LB=2：1)，待其完全溶解後倒入滴定管，以滴定管將海藻酸鈉滴入重量百分濃度為 1% 之氯化鈣水溶液，靜置數分鐘後倒出並瀝乾。



(圖十七)海藻酸鈉水溶液



(圖十八)以滴定管製作膠球

### 2. 加入費氏弧菌

(1) 以液態培養方式將費氏弧菌養到菌液吸光值約 1.3 左右(4 瓶，每瓶 100 毫升)，倒入離心管內以每分鐘 3000 轉的速度離心 5 分鐘，離心完畢後去除上層之菌液，僅取管底的費氏弧菌。

(2) 將離心管中的費氏弧菌混合至調配完成的海藻酸鈉水溶液後攪拌均勻，倒入滴定管內，每次約倒 10 毫升。

(3) 以適當速度將含有費氏弧菌的海藻酸鈉滴入 1% 氯化鈣水溶液，靜置數分鐘後倒出並瀝乾。

(4) 每毫升海藻酸鈉約可製作 20 顆膠球，每顆膠球內含有 0.5 毫升(吸光值 1.3) 菌液內的費氏弧菌量。



(圖十九)將菌液離心



(圖二十)取底層之費氏弧菌

3. 浸入自體誘導物 N-(3-oxo hexanoyl)homoserine lactone 溶液中。

(1) 配製濃度為 200Nm 的自體誘導物溶液(以二甲基亞砜為溶劑)

(2) 將 20 顆海藻酸鈉膠球放入試管內，並注入 1 毫升的自體誘導物溶液，放入攝氏 26 度之恆溫培養箱待其反應。



(圖二十一)海藻酸鈉膠球

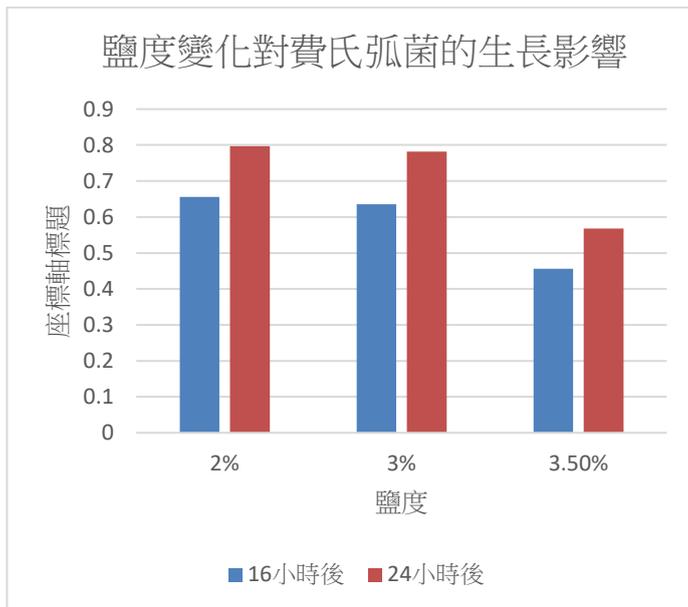
## 伍、研究結果

### 一、費氏弧菌在不同環境中的生長率比較 (一)實驗

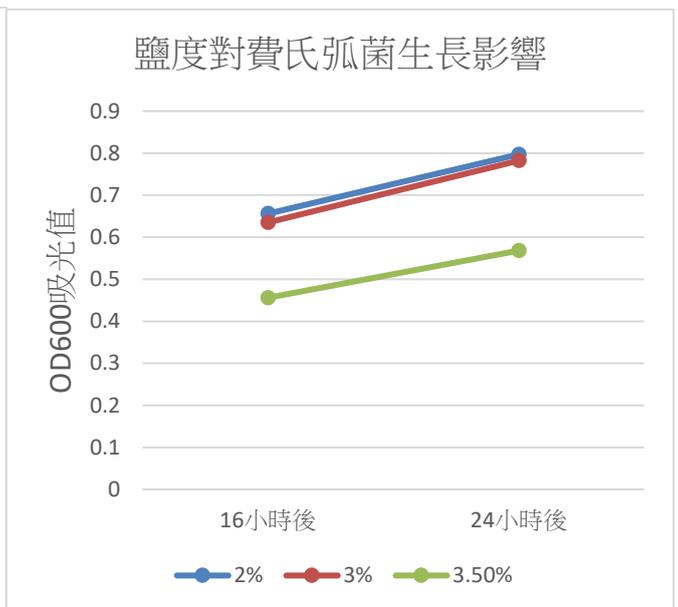
#### 一 鹽度變因對費氏弧菌之生長影響：

鹽度	16 小時後吸光值	24 小時後吸光值
2%	0.666	0.797
3%	0.635	0.782
3.5%	0.456	0.568

(表一)不同鹽度之培養液在 16 及 24 小時後之 OD600 吸光值



(表二)鹽度對費氏弧菌生長之影響折線圖



(表三)鹽度對費氏弧菌生長曲線

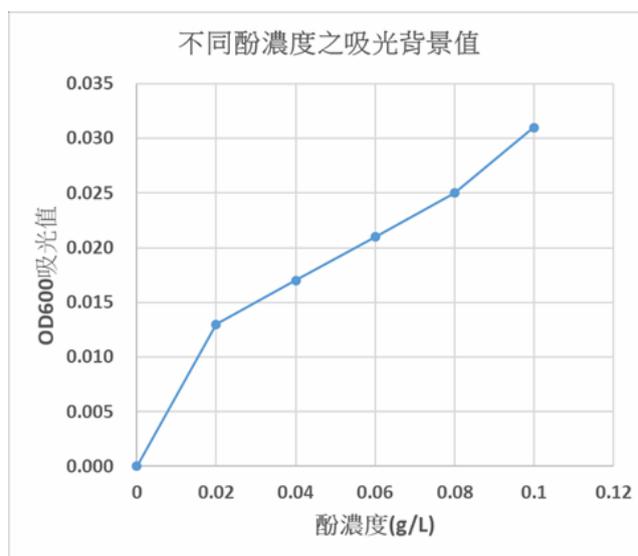
- 1.由表二得知，當液態培養基內的鹽度超過 2%後，鹽度越高，費氏弧菌的生長情況較差。
- 2.由表三得知，費氏弧菌在各鹽度下皆穩定生長，鹽度 2%及 3%生長情況接近，但 2%略佳，鹽度 3.5%之生長情況和前兩者落差甚大。
- 3.基於上述兩點，我們決定使用鹽度 2%之液態培養基作為後續檢測污染的實驗組及對照組，在費氏弧菌之最佳生長鹽度下，檢測污染物對其生長的影響。

## 二、費氏弧菌在不同污染下的生長率比較

(一)實驗二 酚濃度變因對費氏弧菌之生長影響： 1.由於酚濃度越高，吸光值越高，因此我們先將測量不同酚濃度之吸光背景值。

酚濃度	不同酚濃度之吸光背景值
0.00g/L	0.000
0.02g/L	0.013
0.04g/L	0.017
0.06g/L	0.021
0.08g/L	0.025
0.10g/L	0.031

(表四)不同酚濃度之吸光背景值



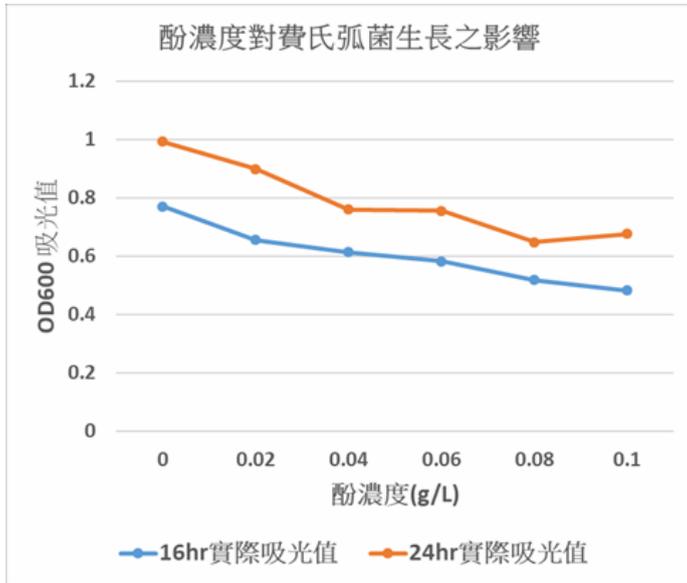
(表五)不同酚濃度之吸光背景值折線圖

2.我們將測得的 OD600 吸光值扣除每一管自身的背景值。

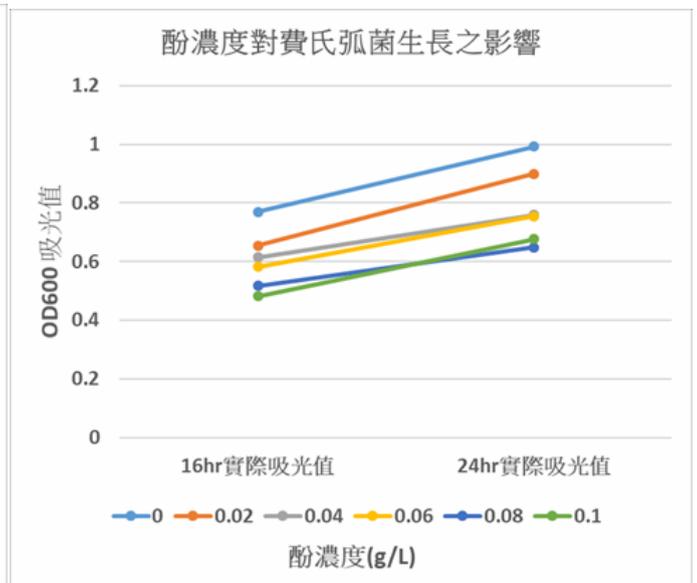
酚濃度	16 小時後吸光值	24 小時後吸光值
0.00g/L	0.770	0.992
0.02g/L	0.668	0.912
0.04g/L	0.631	0.776

0.06g/L	0.603	0.776
0.08g/L	0.543	0.673
0.10g/L	0.513	0.707

(表六)不同酚濃度之培養液在 16 及 24 小時後之 OD600 吸光值(已扣除背景值)



(表七)酚濃度對費氏弧菌生長之影響折線圖



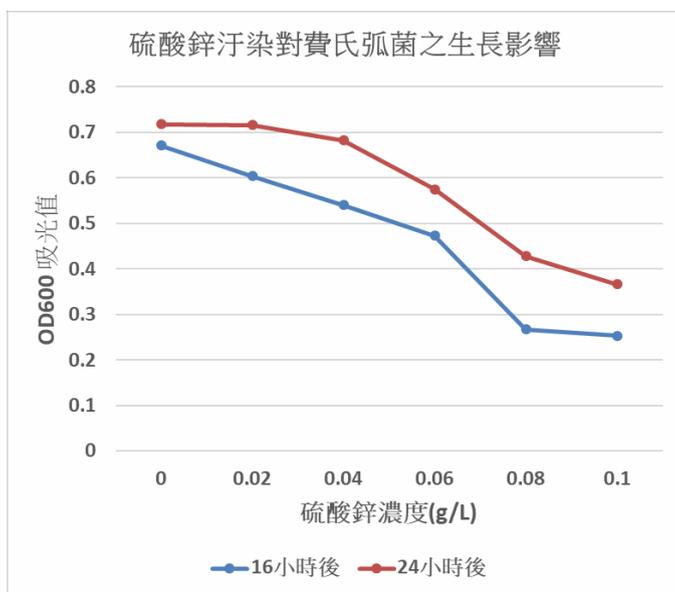
(表八)酚濃度對費氏弧菌生長曲線

- 3.實驗結果：(1)由表五顯示，酚濃度越高，吸光值越高，因此我們將測量所得的吸光值(表六)扣去表四的背景值並做成表七及表八。(2)由表七得知，與無加入酚的對照組相比，費氏弧菌的生長情形和液態培養基內 酚的汙染程度大致上呈現負相關。
- (3)表八中，酚濃度 0.08g/L 及 0.10g/L 的吸光值折線出現交叉，表示經過 24 小時後，費氏弧菌在後者的生長情況較前者略佳。

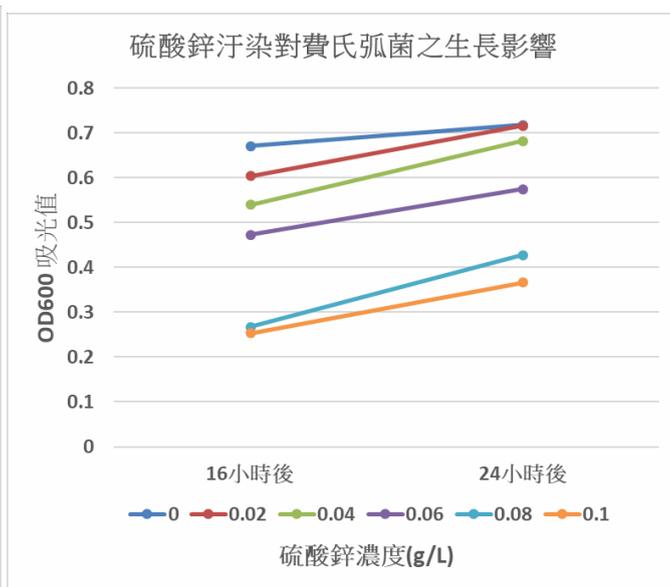
(二)實驗三 硫酸鋅濃度變因對費氏弧菌之生長影響：

硫酸鋅濃度	16 小時後吸光值	24 小時後吸光值
0.00g/L	0.671	0.718
0.02g/L	0.604	0.716
0.04g/L	0.540	0.682
0.06g/L	0.473	0.575
0.08g/L	0.267	0.428
0.10g/L	0.253	0.366

(表九)不同硫酸鋅濃度之培養液在 16 及 24 小時後之 OD600 吸光值



(表十)硫酸鋅濃度對費氏弧菌生長之影響折線圖



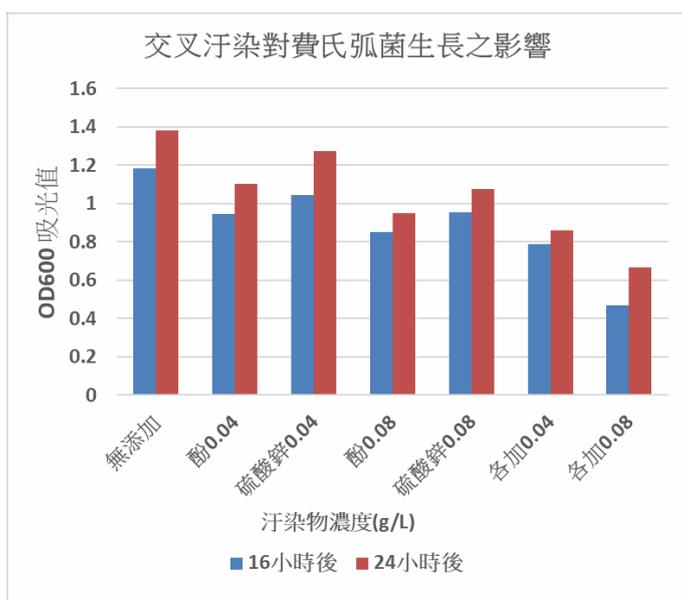
(表十一)硫酸鋅濃度對費氏弧菌生長曲線

- 1.由表十得知，與無加入硫酸鋅的對照組相比，費氏弧菌的生長情形和液態培養基內硫酸鋅的污染程度呈現負相關。
- 2.由表十一得知，雖然硫酸鋅濃度 0.02g/L 及 0.04g/L 在經過 16 小時後與無污染之對照組生長情況有差距，但經過 24 小時後測得的吸光值與對照組相差不大，故我們推測極低濃度的硫酸鋅在長時間的作用下對費氏弧菌的生長影響較小。

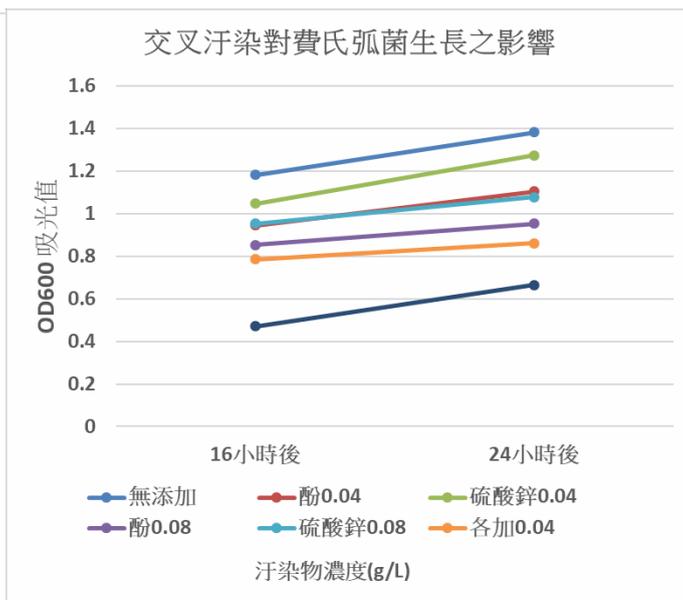
(三)實驗四 酚與硫酸鋅交互作用下費氏弧菌生長率比較：

汙染物濃度	16 小時後吸光值	24 小時後吸光值
0.00g/L	1.182	1.381
0.04g/L 酚	0.945	1.103
0.04g/L 硫酸鋅	1.046	1.074
0.08g/L 酚	0.893	0.952
0.08g/L 硫酸鋅	0.953	1.077
各 0.04g/L	0.786	0.860
各 0.08g/L	0.470	0.665

(表十二)加入不同比例之酚及硫酸鋅之培養液在 16 及 24 小時後之 OD600 吸光值



(表十三)交叉汙染對費氏弧菌生長之影響柱狀圖



(表十四)交叉汙染對費氏弧菌生長曲線

- 1.由表十三得知，同濃度的兩種汙染物相比之下酚汙染對於費氏弧菌的抑制程度明顯大於硫酸鋅汙染。
- 2.在表十四中，加入 0.04g/L 酚以及 0.08g/L 硫酸鋅的兩實驗組，其折線幾乎重疊，更直接證明第一點的結論。
- 3.由表十四得知，同樣擁有 0.08g/L 的汙染物，加入 0.04g/L 酚+0.04g/L 硫酸鋅的實驗

組抑制效果皆大於 0.08g/L 硫酸鋅及 0.08g/L 酚之兩實驗組，代表兩污染物相加後，會具有放大抑制效果。

### 三、各地海水受污染程度

#### (一)實驗六 實際測試各地海水受污染程度：

1. 由於各地海水濁度不一，於是我們每瓶(每個地點之海水二重複)分別取樣，測量無費氏弧菌生長下，含海水內雜質本身的 OD600 吸光值作為背景數據，繪圖時須扣除海水本身吸光值。

地點	OD600 吸光背景值
福隆 1	0.008
福隆 2	0.009
外澳 1	0.037
外澳 2	0.032
壯圍 1	0.034
壯圍 2	0.034
蘇澳 1	0.057
蘇澳 2	0.043
南澳 1	0.040
南澳 2	0.036
七星潭 1	0.042
七星潭 2	0.039
磯崎 1	0.032
磯崎 2	0.040

(表十五)各地海水之吸光背景值

2. 錐形瓶搖晃 16 小時及 24 小時後，由分光光度計測得之 OD600 吸光值，並將及扣去各地海水自身的背景值。

地點	16 小時後測得吸光值 (扣除海水吸光背景值)	24 小時後測得之吸光值 (扣除海水吸光背景值)
LB	0.891	1.042
福隆 1	0.022	0.034
福隆 2	0.008	0.013
外澳 1	0.569	0.764
外澳 2	0.519	0.640
壯圍 1	0.377	0.440
壯圍 2	0.554	0.768
蘇澳 1	0.739	0.877
蘇澳 2	0.548	0.681
南澳 1	0.690	0.769
南澳 2	0.747	0.921
七星潭 1	0.56	0.664
七星潭 2	0.831	0.864
磯崎 1	0.695	0.924
磯崎 2	0.496	0.601

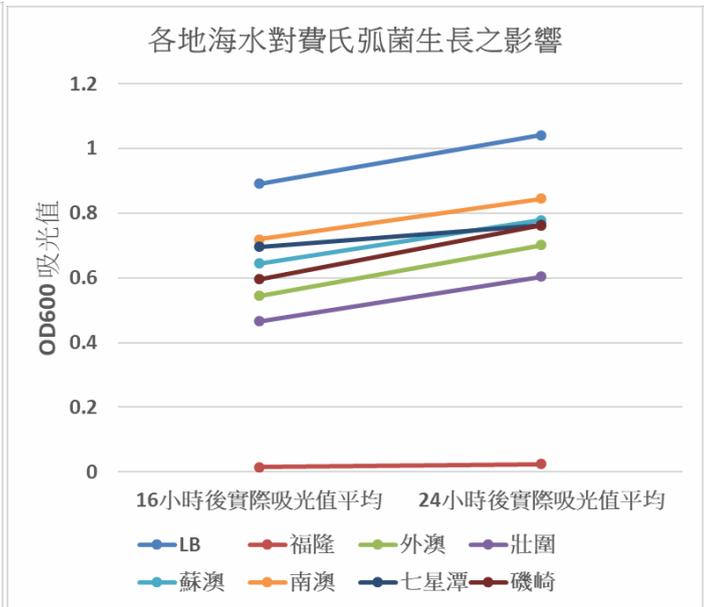
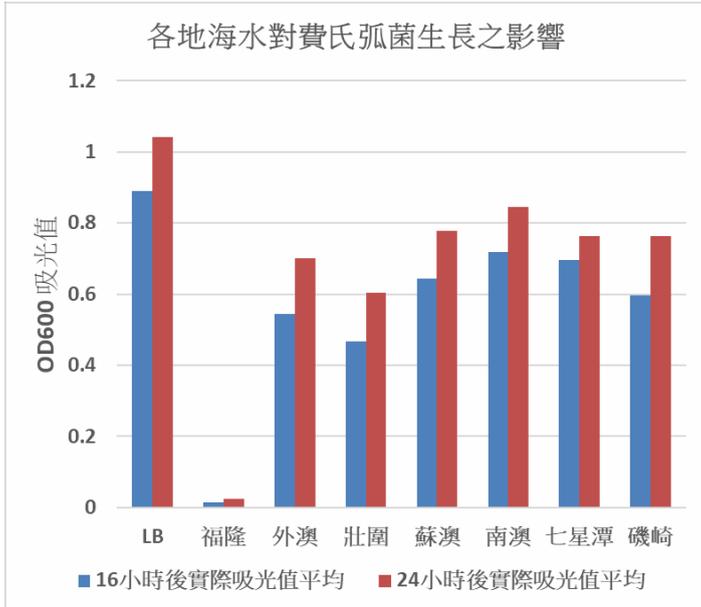
(表十六)各地海水之培養液在 16 及 24 小時後之 OD600 吸光值(已扣除背景值)

3.將各地海水二重複之數據(已扣去背景值)取平均。

地點	16 小時後實際吸光值平均	24 小時後實際吸光值平均
LB	0.891	1.042
福隆	0.015	0.024
外澳	0.544	0.702
壯圍	0.466	0.604
蘇澳	0.644	0.779

南澳	0.719	0.845
七星潭	0.696	0.764
磯崎	0.596	0.763

(表十七)各地海水之培養液在 16 及 24 小時後之 OD600 吸光值(平均值)



(表十八)各地海水對費氏弧菌生長之影響柱狀圖

(表十九)各地海水對費氏弧菌生長曲線

#### 4. 實驗結果：

- (1)由表十八得知，LB 的培養液在 16 及 24 小時之平均吸光值皆為最高，代表所有 海水內皆含有對費氏弧菌的生長有抑制效果的物質。
- (2)由表十九得知，費氏弧菌在各地海水內生長之情形由好至壞的順序為：南澳、蘇澳、七星潭、磯崎、外澳、壯圍、福隆。
- (3)在表十八柱狀圖可見，費氏弧菌生長最良好之培養液中的海水地點大約在宜蘭 縣南部海域，而越往北及越往南的沿海海水，則費氏弧菌生長情形愈差(外澳例外)。
- (4)由表十八可見，由福隆之海水調配的培養液吸光值明顯偏低，甚至接近 LB blank(吸光值 0)的數值，代表費氏弧菌幾乎沒生長。

#### 四、費氏弧菌的固定化

(一)將費氏弧菌浸於自體誘導物溶液中，約 30 分鐘後，無任何光照的環境下可見非常微弱的冷光，但因過於微弱，無法使用機器檢測其發光程度。(二)加入自體誘導物溶液後，試管內費氏弧菌放熱，代表兩者間確實有反應產生。

### 陸、討論

一、以 OD600 為生長情況依據的限制 (一)利用費氏弧菌的生長情況可簡易判別出各地水體受污染之情形，但無法確定精確的污染種類及含有多少種污染物。(二)透過實驗四，我們得知酚與硫酸鋅的交叉污染將放大對費氏弧菌生長的抑制效果，但因僅有一組交叉污染實驗，無法確定是否所有污染物的交叉污染都可以此結果類推，若此結果成立，則測得相同 OD600 吸光值時，可能會是下述兩種情形：

1.單一污染物濃度遠大於其他污染物，較不受交叉污染抑制費氏弧菌生長的放大效果影響，但單一污染物質濃度高。2.數種污染物濃度相差不大，檢測結果須考慮交叉污染抑制費氏弧菌生長的放大效果，因此即使各污染物濃度總和低於第一種結果中的單一污染物，但所呈現的抑制程度仍可能相當。

(三)為以費氏弧菌之最佳生長情形作為對照組，因此選用鹽度 2% 的液態培養基，因此鹽度的不同也可能是實驗六海水內費氏弧菌生長受抑制的原因之一。

二、推測各地污染源(依費氏弧菌生長由壞至好排序)

(一)福隆：

- 1.採樣地點過於接近河口，鹽度過低而生長情況不佳。且河口污染常來源多，若未經過適當的污水處理就直接排入河川，首當其衝的便是河口生態。
- 2.遊客戲水時身上塗有防曬乳、乳液等物質，將透過海浪的沖刷進入海水內。在海灘上留下的垃圾經漲退潮後也會成為海洋污染源之一。
- 3.福隆以沙雕藝術聞名，但若在雕塑過程中大量噴上的定型膠並非大自然可分解之物質，將直接且嚴重污染海洋水質

(二)壯圍：

- 1.位於眾河川(蘭陽溪、宜蘭河、冬山河)之下游匯流處，每年承受大量的民生垃圾與其他大自然產物便直接注入海中，破壞海洋生態。
- 2.濱海保安林內充斥不少廢棄物，經海浪沖刷便可能影響海洋生態。

(三)外澳：

- 1.衝浪客及遊客身上塗抹的防曬乳等物質以及所留下的垃圾，經海浪沖刷後進入海中，衝擊海洋生態。
2. 產業轉型後，民宿的興建、海岸線的開發都可能汙染海洋水質。

(四)磯崎、七星潭：

- 1.廣大遊客、攤販林立所製造出塑膠等不可分解的垃圾，皆可能為海岸水體帶來汙染，更危害海洋生物的健康。
- 2.海邊閒置的漁具、漁網，也帶來了海洋廢棄物的問題。
- 3.近年來海邊度假村、觀光景點的開發，也可能成為汙染的來源。

(五)蘇澳、南澳：

- 1.和其他地點相比，此兩處觀光較不興盛，汙染源亦較少。
- 三、費氏弧菌固定化的測試

#### 四、探討膠球發光的影響因素

(一)冷光過於微弱可能的原因： 1.膠球中費氏弧菌含量過低，未到達引起群體感應發光所需的濃度。

2.自體誘導物濃度不足，無法引起費氏弧菌的群體感應。

3.已超過費氏弧菌生長的對數期，費氏弧菌生長漸緩甚至開始死亡。

(二)改良方式：

1.嘗試以 OD600 吸光值更大或更小的菌液離心製作膠球，觀察其是否放熱與發光。

2.調配不同濃度的自體誘導物溶液，注入試管後觀察費氏弧菌膠球是否放熱及發光。

## 柒、結論

- 一、透過生長環境的實驗探討，我們觀察到費氏弧菌雖然是生長在鹽度 3%至 3.5%的海洋中，但是其最適合生長的環境卻是鹽度 2%的液態培養基。
- 二、汙染物實驗中，有機類汙染物(酚)及無機類汙染物(硫酸鋅)皆會抑制費氏弧菌的生長，菌數多寡和汙染物濃度呈現負相關，且其中又以有機類汙染物對費氏弧菌的抑制程度較大。
- 三、台灣東北沿海的汙染程度以蘇澳、南澳地區最輕微，而花蓮地區的七星潭、磯崎次之，最嚴重的則是較北部的福隆、外澳及壯圍三地。
- 四、以海藻酸鈉製作費氏弧菌膠求需嘗試更多組菌液濃度(OD600 吸光值)與自體誘導物溶液濃度，尋找最適合作為檢測之組合。
- 五、海藻酸鈉膠球可密封低溫保存，在確認可以機器檢測其發光強度後，便可更簡易地檢測海洋水質汙染。

## 捌、參考資料及其他

### 一、細菌冷光法

<http://www.rootlaw.com.tw/Attach/L-Doc/A040300081084100-1060614-1000-001.pdf?fbclid=IwAR2tU8CzkWsxV47B1qErUj3KqhDMjtw6MogY6TRsXzPhj6EH3hSvXWuZMs> 二、來偷聽細菌們的對話吧

[https://dls.ym.edu.tw/course/hb/doc/lecture14-%E4%BE%86%E5%81%B7%E8%81%BD%E7%B4%B0%E8%8F%8C%E5%80%91%E7%9A%84%E5%B0%8D%E8%A9%B1%E5%90%A7%EF%BC%81.pdf?fbclid=IwAR00sLcSoXuhIrr9eTAs\\_RnEc5nR9SOX7kEkwigk1JM5rLY8t9UU7DPDEK8](https://dls.ym.edu.tw/course/hb/doc/lecture14-%E4%BE%86%E5%81%B7%E8%81%BD%E7%B4%B0%E8%8F%8C%E5%80%91%E7%9A%84%E5%B0%8D%E8%A9%B1%E5%90%A7%EF%BC%81.pdf?fbclid=IwAR00sLcSoXuhIrr9eTAs_RnEc5nR9SOX7kEkwigk1JM5rLY8t9UU7DPDEK8) 三、混濁度和活菌數的關係

[https://biology.fandom.com/zh/wiki/%E6%B7%B7%E6%BF%81%E5%BA%A6%E5%92%8C%E6%B4%BB%E8%8F%8C%E6%95%B8%E7%9A%84%E9%97%9C%E4%BF%82?fbclid=IwAR1cHJ\\_Ycgz0-8K3tI2XGDDiba4kIMLLWhTDfV\\_zDuYBuNU89xpuu28-spc](https://biology.fandom.com/zh/wiki/%E6%B7%B7%E6%BF%81%E5%BA%A6%E5%92%8C%E6%B4%BB%E8%8F%8C%E6%95%B8%E7%9A%84%E9%97%9C%E4%BF%82?fbclid=IwAR1cHJ_Ycgz0-8K3tI2XGDDiba4kIMLLWhTDfV_zDuYBuNU89xpuu28-spc)

### 四、自體誘導物

<https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/vibrio-fischeri?fbclid=IwAR26>

ZEv2U2jGS68ukkboyMnnJF0dyYHpblz6n0xV5ufw7lKq8MKajz6xSv4 五、自體誘導  
物

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC178026/pdf/1782897.pdf?fbclid=IwAR3hStgBxS5UZ9sFn\\_MnZYeBowam5anYVHR3r3hdvap13W94CdMp10g-Ak](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC178026/pdf/1782897.pdf?fbclid=IwAR3hStgBxS5UZ9sFn_MnZYeBowam5anYVHR3r3hdvap13W94CdMp10g-Ak)

## 【評語】 052606

本作品使用分光光度計檢測費氏弧菌菌液濃度的 OD600 吸光值，先檢測其生長情形最良好之鹽度，再以最適鹽度做為培養基底，檢測有機、無機污染物對於費氏弧菌生長的抑制效果，並將所得結論用於實測東北角海岸線污染，探討海水所受到的污染程度。本作品並以海藻酸鈉膠球將費氏弧菌固定化，以縮短檢測的時間。本研究具有創新性，有助於提升環境保護的目的。整體研究品質尚可，以指標微生物概念作為檢測海洋水質污染程度之研究動機佳，但可加強了解環境水樣中可能會影響以指標微生物概念作為檢測海洋水質污染程度可能遇到的問題，並針對這些問題進行實驗設計，實驗設計因子單純；但並未考量環境水樣中可能會影響以指標微生物概念作為檢測海洋水質污染程度可能遇到的問題與因子，如不同有機污染物的種類與特性，在測試環境水樣時不易釐清影響指標微生物生長的因素為何。實驗設計以酚代表有機類污染物，且測試的濃度較高，較不合適作為沿海污染程度的測試；各地海水受污染程度之 OD600 吸光值，若可對照環保署同地區各項水質檢測資料，將更有益於實驗結果的解釋。膠球試驗的結果，需再明確說明，其可應用的污染檢測範圍？且其呈現污染物為有機類或無機類能否區分？研究並未使用統計方法針對實驗結果進行分析，討論部分建議可以再加強研究結果與文獻之討論比較，另文獻編列方式應依常用的格式，且應詳列引用之文獻。

## 作品海報

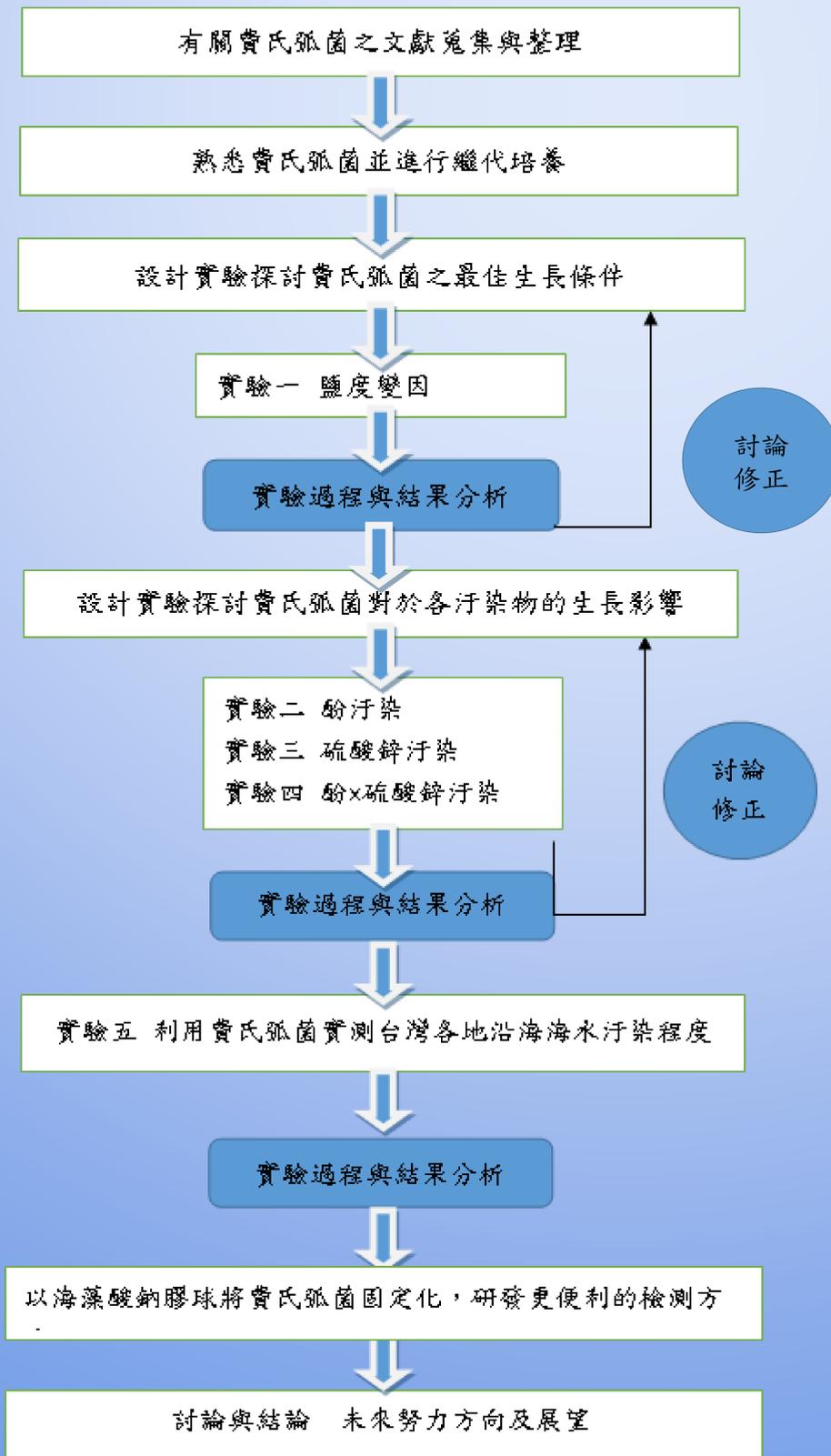
# 摘要

本實驗主要使用分光光度計檢測費氏弧菌生長之菌液濃度的OD600吸光值，以其數值判斷費氏弧菌的生長情況，藉此探討海洋中的費氏弧菌最適合的生長環境(鹽度)，以及各式污染物(酚、硫酸鋅、交叉污染)對於費氏弧菌生長的抑制效果，將所得的結論用於實測台灣東北角海岸線的水體污染，比較費氏弧菌在自新北至花蓮不同地區取得的海水中生長的情形，進而探討各地海水所受到的污染程度。進一步將費氏弧菌均勻混入海藻酸鈉膠球，則能夠更加方便、簡易地進行海水水質檢測。

## 研究目的

- 不同環境中費氏弧菌的生長率比較
  - 不同鹽度(2%、3%、3.5%)的費氏弧菌生長率比較
- 不同污染物中對於費氏弧菌的生長率比較
  - 有機物污染：不同酚濃度對於費氏弧菌生長率之影響
  - 無機物污染：不同硫酸鋅對於費氏弧菌生長率之影響
  - 酚與硫酸鋅交互作用下對於費氏弧菌生長率之影響
- 不同海域之海水對於費氏弧菌的生長率比較
  - 取台灣東北沿岸之海水實測(福隆、頭城、壯圍、蘇澳新、南澳、七星潭、磯崎)對於費氏弧菌的生長率比較
- 以海藻酸鈉膠球將費氏弧菌固定化，研發更便利的檢測方法

## 實驗流程



Marine Agar 2216固態培養基



LB液態培養基



四區畫菌法



費氏弧菌繼代培養



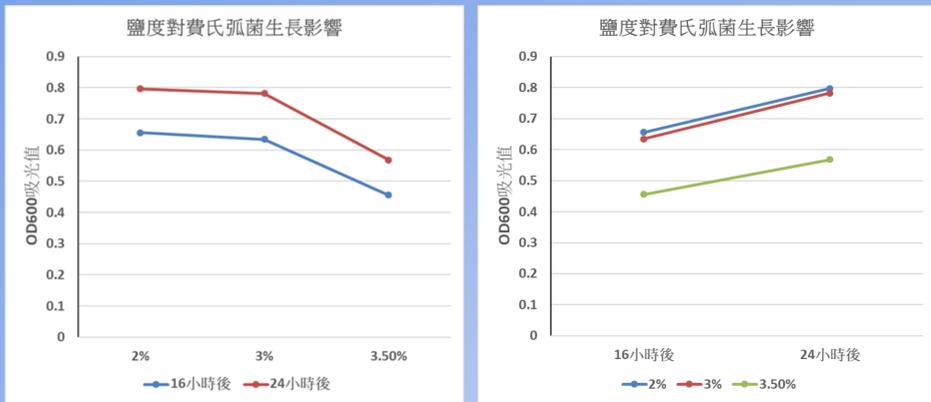
置入震盪式恆溫水槽中搖晃



待測之海水

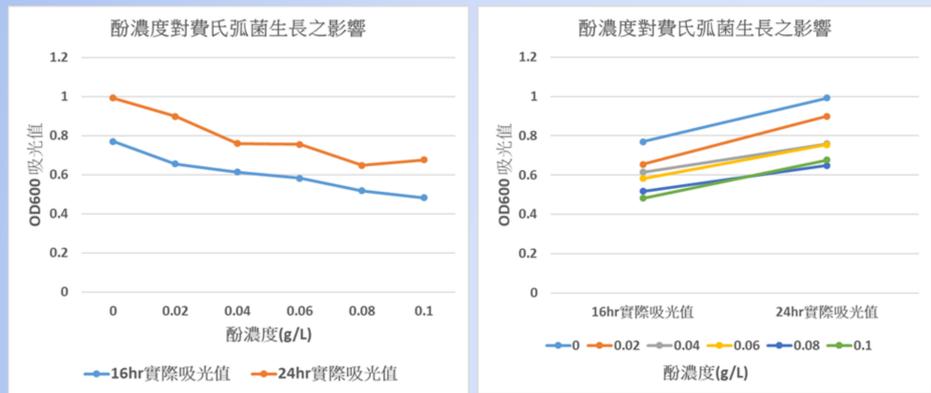
# 研究結果

## 一、鹽度變因對費氏弧菌之生長影響



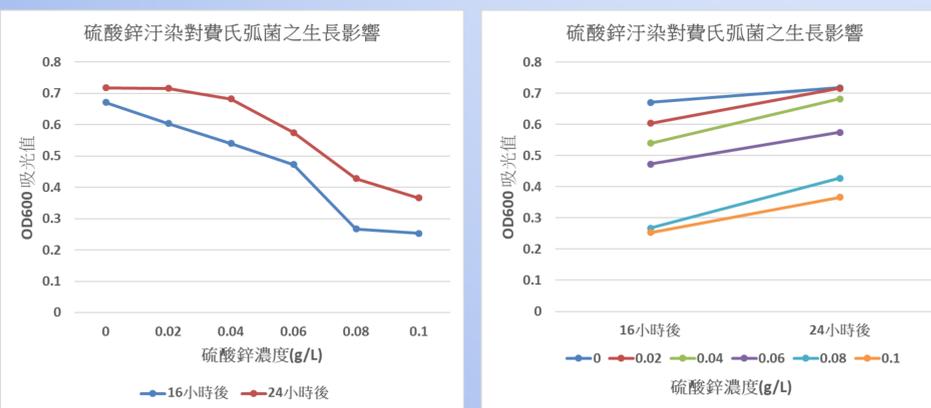
1. 由左圖得知，當液態培養基內的鹽度超過2%後，鹽度越高，費氏弧菌的生長情況較差。
2. 由右圖得知，費氏弧菌在各鹽度下皆穩定生長，鹽度2%及3%生長情況接近，但2%略佳，鹽度3.5%之生長情況和前兩者落差甚大。
3. 基於上述兩點，我們決定使用鹽度2%之液態培養基作為後續檢測污染的實驗組及對照組。

## 二、酚濃度變因對費氏弧菌之生長影響



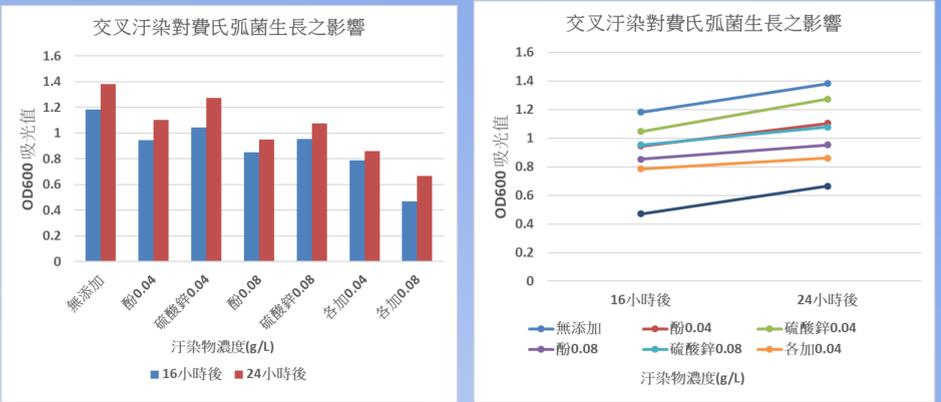
1. 由左圖得知，與無加入酚的對照組相比，費氏弧菌的生長情形和液態培養基內 酚的污染程度大致上呈現負相關。
2. 右圖中，酚濃度0.08g/L及0.10g/L的吸光值折線出現交叉，表示經過 24小時後，費氏弧菌在後者的生長情況較前者略佳。

## 三、硫酸鋅濃度變因對費氏弧菌之生長影響



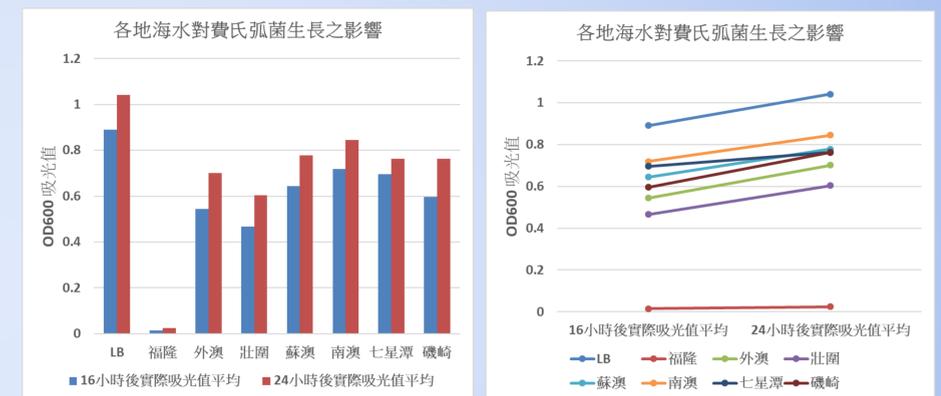
1. 由左圖得知，與無加入硫酸鋅的對照組相比，費氏弧菌的生長情形和液態培養基內硫酸鋅的污染程度呈現負相關。
2. 由右圖得知，雖然硫酸鋅濃度0.02g/L及0.04g/L在經過16小時後與無污染之對照組生長情況有差距，但經過24小時後測得的吸光值與對照組相差不大，故我們推測極低濃度的硫酸鋅在長時間的作用下對費氏弧菌的生長影響較小。

## 四、酚與硫酸鋅交互作用對費氏弧菌之生長影響



1. 由左圖得知，同濃度的兩種污染物相比之下酚污染對於費氏弧菌的抑制程度明顯大於硫酸鋅污染。
2. 在右圖中，加入0.04g/L酚以及0.08g/L硫酸鋅的兩實驗組，其折線幾乎重疊，更直接證明第一點的結論。
3. 由右圖得知，同樣擁有0.08g/L的污染物，加入0.04g/L酚+0.04g/L硫酸鋅的實驗組抑制效果皆大於0.08g/L硫酸鋅及0.08g/L酚之兩實驗組，代表兩污染物相加後，會具有放大抑制效果。

## 五、各地海水受污染程度



1. 由左圖得知，LB的培養液在16及24小時之平均吸光值皆為最高，代表所有海水內皆含有對費氏弧菌的生長有抑制效果的物質。
2. 由右圖得知，費氏弧菌在各地海水內生長之情形由好至壞的順序為：南澳、蘇澳、七星潭、磯崎、外澳、壯圍、福隆。
3. 在左圖柱狀圖可見，費氏弧菌生長最良好之培養液中的海水地點大約在宜蘭縣南部海域，而越往北及越往南的沿海海水，則費氏弧菌生長情形愈差(外澳例外)。
4. 由左圖可見，由福隆之海水調配的培養液吸光值明顯偏低，甚至接近LB blank(吸光值0)的數值，代表費氏弧菌幾乎沒生長。

## 六、費氏弧菌固定化

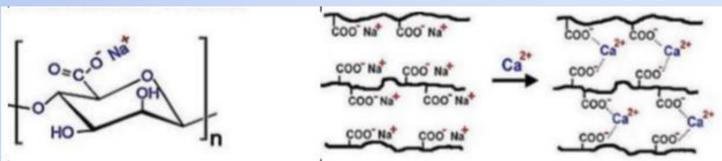
### 文獻探討

#### 1. 固定化技術

固定化技術是近來生物、環境等領域的一個研究熱點。固定化微生物更是一種比一般生物吸附法更為高效的方法，它是利用化學或物理方法將游離細胞限制於固定的空間內後，可以為細胞創造一個適宜的環境，有利於細胞的生長和表達。對基因工程菌而言，相對於游離細胞懸浮培養，固定化細胞培養可以有效減少不穩定現象，提高反應效率。

#### 2. 海藻酸鈉

海藻酸鈉是一種天然高分子材料，別名褐藻酸鈉、褐藻膠、藻膠，其分子式為 $(C_6H_7O_6Na)_n$ ，相對分子量在(32000-200000)。海藻酸鈉主要是由兩種單糖  $\beta$ -D-甘露醛酸與  $\alpha$ -L-古羅糖醛酸鍵結所構成的線性多醣化合物，形成一種無支鏈的線性嵌段共聚物。海藻酸鈉很容易與一些二價陽離子結合，形成凝膠。



### 實際測試

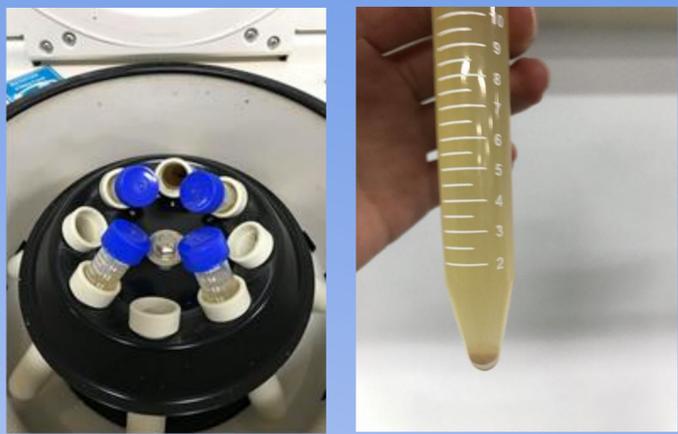
#### 1. 海藻酸鈉膠球

配製重量百分濃度6%的海藻酸鈉水溶液(水：LB=2：1)，待其完全溶解後倒入滴定管，以滴定管將海藻酸鈉滴入重量百分濃度為1%之氯化鈣水溶液，靜置數分鐘後倒出並瀝乾。



#### 2. 加入費氏弧菌

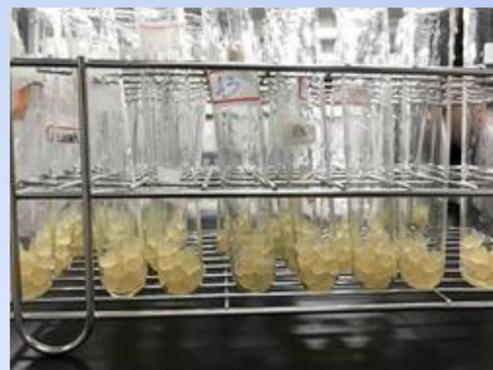
- (1) 以液態培養方式將費氏弧菌養到菌液吸光值約1.3左右(4瓶，每瓶100毫升)，倒入離心管內以每分鐘3000轉的速度離心5分鐘，離心完畢後去除上層之菌液，僅取管底的費氏弧菌。
- (2) 將離心管中的費氏弧菌混合至調配完成的海藻酸鈉水溶液後攪拌均勻，倒入滴定管內，每次約倒10毫升。
- (3) 以適當速度將含有費氏弧菌的海藻酸鈉滴入1%氯化鈣水溶液，靜置數分鐘後倒出並瀝乾。
- (4) 每毫升海藻酸鈉約可製作20顆膠球，每顆膠球內含有0.5毫升(吸光值1.3)菌液內的費氏弧菌量。



#### 3. 浸入自體誘導物

N-(3-oxo hexanoyl)homoserine lactone

- (1) 配製濃度為200Nm的自體誘導物溶液(以二甲基亞砜為溶劑)
- (2) 將20顆海藻酸鈉膠球放入試管內，並注入1毫升的自體誘導物溶液，放入攝氏26度之恆溫培養箱待其反應。



### 討論

#### 1. 冷光過於微弱可能的原因：

- (1) 膠球中費氏弧菌含量過低，未到達引起群體感應發光所需的濃度。
- (2) 自體誘導物濃度不足，無法引起費氏弧菌的群體感應。
- (3) 已超過費氏弧菌生長的對數期，費氏弧菌生長漸緩甚至開始死亡。

#### 2. 改良方式：

- (1) 嘗試以OD600吸光值更大或更小的菌液離心製作膠球，觀察其是否放熱與發光。
- (2) 調配不同濃度的自體誘導物溶液，注入試管後觀察費氏弧菌膠球是否放熱及發光。

### 結論

1. 透過生長環境的實驗探討，我們觀察到費氏弧菌雖然是生長在鹽度3%至3.5%的海洋中，但是其最適合生長的環境卻是鹽度2%的液態培養基。
2. 污染物實驗中，有機類污染物(酚)及無機類污染物(硫酸鋅)皆會抑制費氏弧菌的生長，菌數多寡和污染物濃度呈現負相關，且其中又以有機類污染物對費氏弧菌的抑制程度較大。
3. 台灣東北沿海的污染程度以蘇澳、南澳地區最輕微，而花蓮地區的七星潭、磯崎次之，最嚴重的則是較北部的福隆、外澳及壯圍三地。
4. 以海藻酸鈉製作費氏弧菌膠球需嘗試更多組菌液濃度(OD600吸光值)與自體誘導物溶液濃度，尋找最適合作為檢測之組合。
5. 海藻酸鈉膠球可密封低溫保存，在確認可以機器檢測其發光強度後，便可更簡易地檢測海洋水質污染。