

中華民國第 60 屆中小學科學展覽會 作品說明書

國中組 生物科

第三名

030316

「蕨」處逢生

學校名稱：新興學校財團法人桃園市新興高級中學附
設國中部

作者： 國三 陳昀竺 國三 陳梓寧	指導老師： 陳俐蓉
-------------------------	--------------

關鍵詞：滿江紅、重金屬、固氮作用

摘要

本實驗探討滿江紅在重金屬銅逆境下所產生的生理適應現象。我們以不同濃度銅處理滿江紅，發現滿江紅可能透過不同程度的花青素生成，藉由抗氧化機轉對銅產生耐受性；同時也發現氧化物生成量具有差異，高濃度的氧化產物會造成葉綠素分解。我們進一步以抗氧化劑 **NAC** 處理銅逆境中的滿江紅，發現原本葉綠素分解而白化的程度獲得減緩，我們推測過氧化氫是滿江紅面對銅逆境時，抗氧化系統裡重要的訊號分子。此外，共生藍菌在低強度銅逆境中，固氮產物沒有顯著減少，而過高濃度的銅會阻礙固氮表現。我們透過滿江紅在重金屬逆境下生存策略的基礎研究，期在植生復育上能具有參考的價值性，減緩重金屬污染所造成的環境退化。

壹、研究動機

在一次生物課程進行生態池的生物觀察時，我們發現在生態水池不同區塊栽植不同的水生植物，例如挺水植物有莎草、荸薺、野慈菇、香蒲、紙莎草等，沉水植物有水蘊草等，浮葉植物除了荇菜、睡蓮等與漂浮在水面上的植物青萍外，還有紅色葉體的「滿江紅」。我們查閱文獻得知台灣原產有滿江紅 (*Azolla pinnata*) 一種，這種小型的水生蕨類植物與固氮念珠藍綠菌 (*Anabaena azollae*) 共生，具有極強的固氮能力，植物株體生長非常迅速，每兩天就能增生一倍，且光合作用能力優異，因此 1000 年前亞洲稻農將之引入水田，成為最佳綠肥；而 5600 萬年前的嚴重全球暖化，則仰賴滿江紅將二氧化碳轉化為有機物而減少物種滅絕，這整件事稱之為「滿江紅事件」(李家維,2014)。近年來由於能源危機，化學氮肥之製造成本大為提高，在農業上若能利用天然綠肥來減少化學肥料的使用，就可擺脫昂貴又耗能的化學氮肥，目前農業的發展將滿江紅與水稻共作，其具有前瞻性的經濟價值正逐漸被重視中，同時在能源缺乏之下，滿江紅不失為一種新能源，也可能是生質燃料的好選擇，值得加強研究(李家維,2016；李啟彰等,1981)。

水域和土壤的重金屬污染，困擾著許多國家，而含有重金屬的農作物，更成為令人聞之色變的社會新聞。臺灣土壤受重金屬污染，最著名的是桃園觀音及蘆竹的鎘米污染事件，這兩個案例都是化學工廠不當排放含鉛及鎘的廢水，造成下游約一百一十公頃的農田受污染，嚴重危害作物的生長。臺灣南部各主要河川受重金屬污染的情形也相當嚴重，這些河川流域的土壤也無法倖免。以二仁溪為例，不論其下游或支流，河水本身及底泥都有嚴重的重金屬污染，其中又以銅、鋅、鉛、鎳及鎘為主要污染源，由二仁溪下游灣裡地區的土壤中所萃取出的銅、鋅及鉛的含量，比外圍未污染地區的土壤高出 20~40 倍 (葉顯銘等,2004)。雖然遭受重金屬污染的土地會嚴重影響植物的生長與生存，但幸運的是自然界中植物種類相當繁多歧異，並非在重金屬污染的土地上全然沒有植物生長。文獻報導指出有學者在德國及比利時發現一種十字花科的植物 (*Thlaspi caerulescens*)，這種植物可以適應含鋅量相當高的土地，另外在義大利發現另一種可以蓄積大量鎳 (約 10,000 微克/克乾重) 的十字花科植物 (*Alyssum bertolonii*)，這些可以生長在富含重金屬地區的植物，已經演化出抵抗重金屬的能力(Brown et al.,1994)。

我們好奇在重金屬污染的水域中，滿江紅的生理和適應的反應，本研究針對植物的抗氧化系統，對環境逆境產生之活性氧化物的反應差異，藉以探討滿江紅對重金屬逆境的調適作用及應用於植生復育之可能性。



圖一 台灣重金屬污染的河川。(A)桃園蘆竹工業區營盤溪遭化學藥劑污染，(B)三爺宮溪(二仁溪支流)被廢水染成了橘色和紫色，(C)桃園沿海地區遭銅、鋅等重金屬污染出現的螢光綠牡蠣。(照片取自網路資料)

貳、研究目的

本研究目的以水生蕨類--滿江紅(*Azolla japonica*)為研究對象，探討水生植物在重金屬逆境中的抗氧化反應，並進一步研究和滿江紅共生的藍菌的固氮作用。

一、觀察滿江紅的形態、生長和繁殖速度。

(一)滿江紅的構造形態觀察、生長繁殖速度的測量。

(二)和滿江紅共生的藍綠菌之固氮能力測定。

(三)觀察滿江紅在不同重金屬逆境中的生存適應差異。

二、滿江紅在金屬銅逆境下的生存策略和共生藍菌的固氮能力改變。

(一)滿江紅在不同程度金屬銅逆境中，生長、繁殖速度改變的測量。

(二)滿江紅在不同程度金屬銅逆境中，植株體內和水質樣本的游離銅濃度的測定。

(三)滿江紅在不同程度金屬銅逆境中，氧化產物生成量的測定。

(四)滿江紅在不同程度金屬銅逆境中，共生藍菌固氮產物生成量的測定。

三、滿江紅在氧化壓力下的生存策略和共生藍菌固氮能力的改變。

(一)滿江紅在不同程度的過氧化氫逆境中，生長、繁殖速度改變的測量。

(二)滿江紅在不同程度的過氧化氫逆境中，氧化產物生成量的測定。

(三)滿江紅在不同程度的過氧化氫逆境中，共生藍菌固氮產物生成量的測定。

四、在消除氧化壓力之下，滿江紅的生存策略和共生藍菌的固氮能力改變。

(一)滿江紅在加入抗氧化劑，消除氧化壓力的環境中，生長、繁殖速度改變的測量。


(二)滿江紅在加入抗氧化劑，消除氧化壓力的環境中，氧化產物生成量的測定。

(三)滿江紅在加入抗氧化劑，消除氧化壓力的環境中，共生藍菌固氮產物生成量的測定。

五、討論滿江紅在重金屬銅的氧化逆境中的生存策略，其可能對重金屬具有耐受性，有潛力作為清除重金屬的植物。

參、研究設備與器材

一、儀器設備：

複式光學顯微鏡 (HAMLAT)	電子目鏡 (DinoLite,AM423X)	解剖顯微鏡 (HAMLAT)	水質分析儀 (Lovibond)
			
精密電子分析天秤	烘箱	離心機	恆溫箱
			

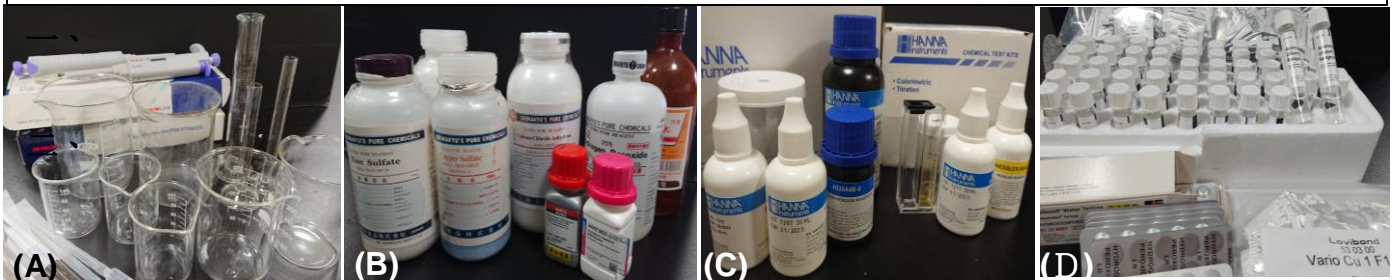
二、研究器材和藥品

(一)測試劑：**(1)**化學物質檢測劑：銨離子測試比色(HANNA)、過氧化氫測試滴定(HANNA)。

(2)分析檢測劑：銅離子測試劑、銨離子測試劑和過氧化氫檢測劑(Lovibond)。

(二)藥品：硫酸銅($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)、硫酸鋅($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)、硝酸鉛($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$)、過氧化氫(30%)、NAC (N-Acetyl-L-Cysteine BioChemica)抗氧化劑、DAB(3,3-Diaminobenzidine)染劑、蒸餾水。

(三)其他：觀察培養盒、量筒(10 ml、50 ml)、燒杯(100 ml、250 ml、500 ml)、微量吸管、乳頭吸管、鑷子、培養皿、藥勺、秤量紙、載玻片、蓋玻片。



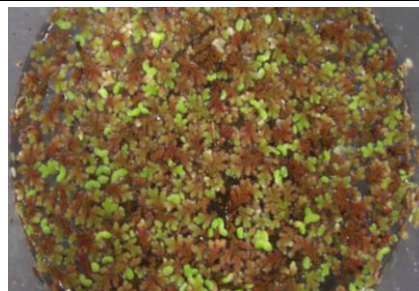
圖二 實驗器材和藥品。(A)配製不同濃度溶液之器材，(B)配製金屬溶液和過氧化氫溶液之藥品，(C)檢驗過氧化物和銨離子之比色檢測劑，(D)銅離子、過氧化氫和銨離子之分析檢測劑。

三、生物材料

(一)名稱：滿江紅（又稱蚊子厥、浮萍厥、水厥、仙苔）

(二)分類地位：

界：植物界 **Plantae**
門：蕨類植物門 **Pteridophyta**
綱：真蕨綱 **Pteridopsida**
目：槐葉蘋目 **Salviniales**
科：滿江紅科 **Azollaceae**
屬：滿江紅屬 **Azolla**
種：日本滿江紅 ***Azolla japonica* (Fr. et Sav.)**

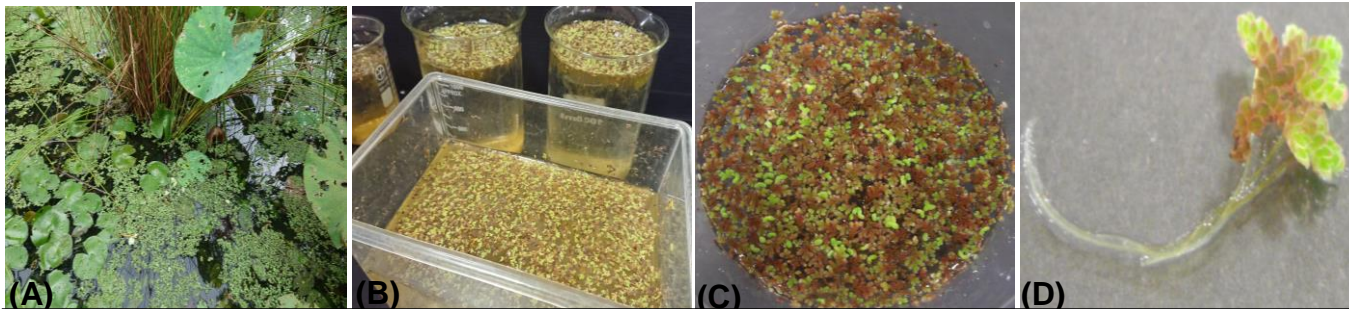


(三)分布：

生長在低海拔至中海拔地區的溼地、水田、池塘、沼澤等靜水域。

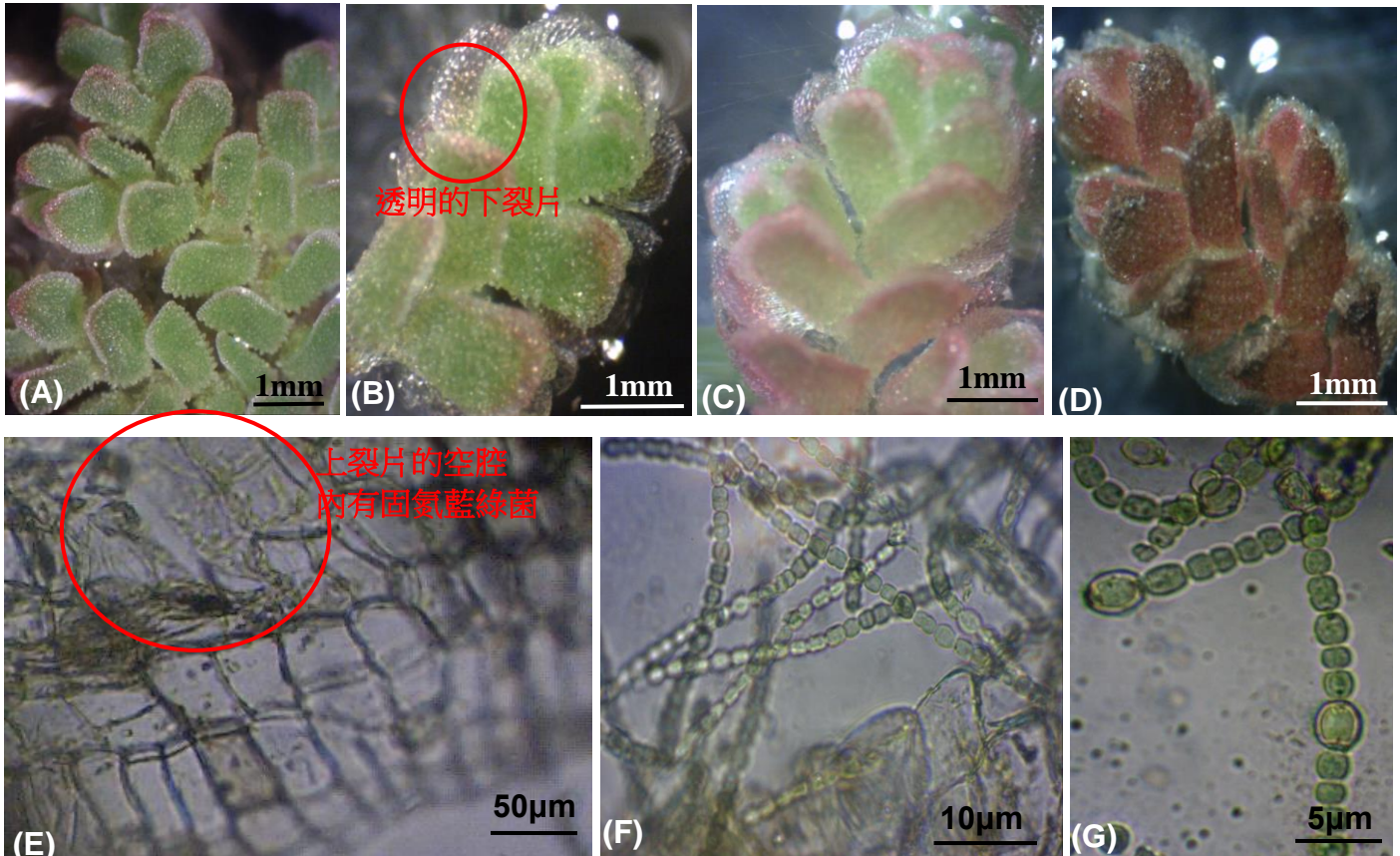
(四)形態：

- (1) 根莖：一年生或多年生草本，漂浮型水生植物，有主莖及互生的側枝，質軟，植株外觀樹枝狀，向下長出細長且沉於水中的根，可吸收養分，並可使個體保持平衡，莖會側生分枝與葉芽，莖與葉合成葉狀體。
- (2) 葉：細小，菱形或卵形，兩列互生且呈覆瓦狀緊密排列，每一小葉裂成上下兩瓣，上裂片肉質，長約 0.05 至 0.1 公分，寬約 0.05 公分，無柄，可行光合作用，表面具細毛，空腔內有藍綠菌共生，行固氮作用，下裂片膜質呈杯狀提供浮力，無葉綠體。
- (3) 孢子囊果：著生於側枝最基部的葉片下方，由下裂片特化而成，雄孢子囊果長卵形，較大，雌孢子囊果球形，較小。
- (4) 特性：生長在不良或低溫環境時，植物體會產生紅色花青素(anthocyanin pigment)，使得葉片由原來的綠色轉變為紅色，故名「滿江紅」。滿江紅葉內具有藍綠菌 *Anabaena azollae* 共生會進行固氮作用，所以具有肥田之效果，為水田優良綠肥作物之一。
- (5) 共生固氮菌：將大氣中的氮固定，再將氮轉為氨。



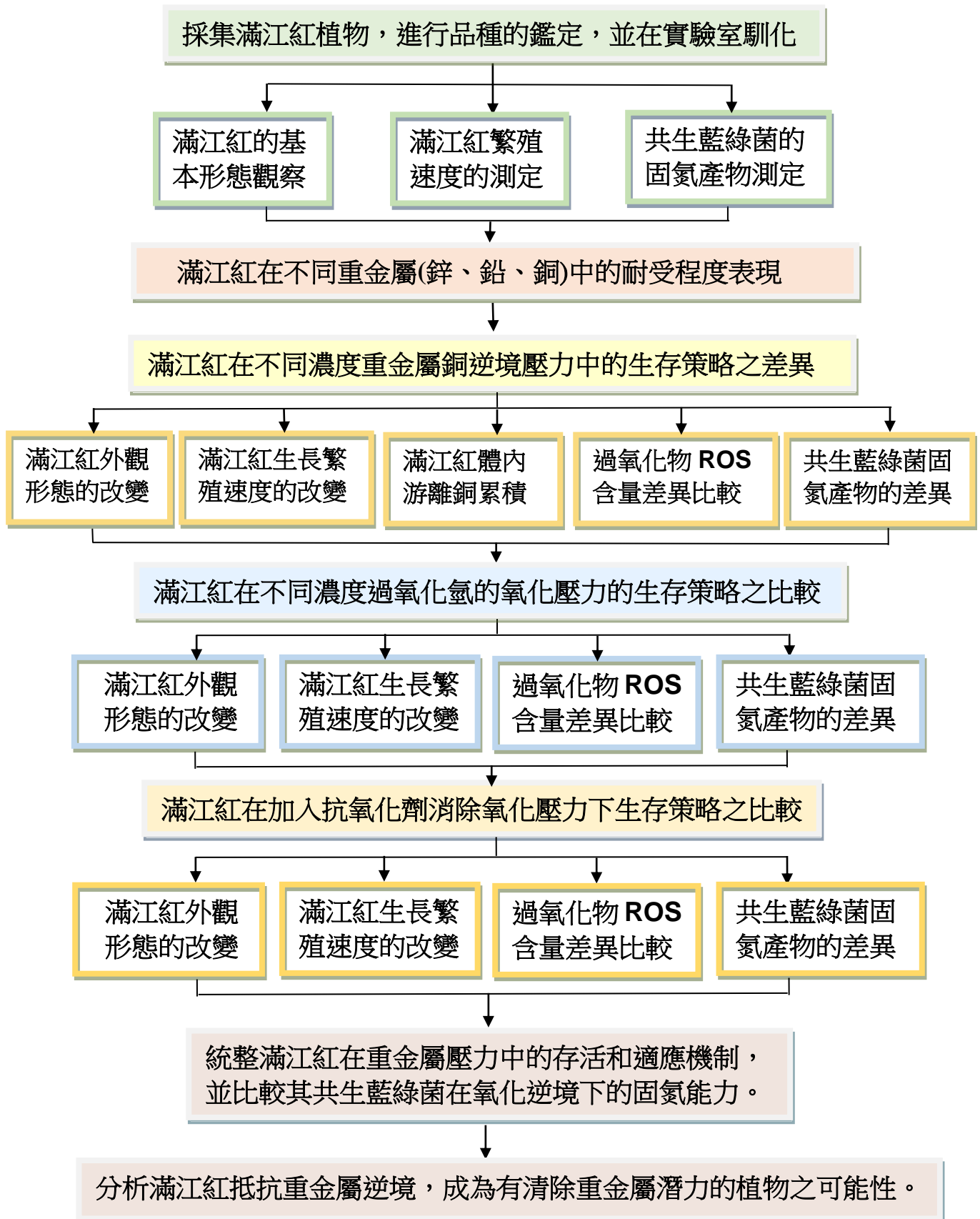
圖三 滿江紅的採集處和實驗室馴化。(A)野外生態池，(B)實驗室馴化，(C)葉會由綠轉紅，一大片紅色滿江紅平鋪在水面上，故名滿江紅，(D)滿江紅有主莖和互生的側枝，向下長出細長的根。

滿江紅是一種水生蕨類植物，葉片細小呈菱形，互生排列在莖的兩側，葉片裂成上下兩瓣，上裂片浮在水面上有氣孔，會進行光合作用，而且葉內側有許多黏液空腔，內有共生的念珠狀藍綠菌，其異形細胞具有固氮能力。下裂片呈透明，沉水能吸收水中營養物質。在低溫環境中時，滿江紅的植物體葉邊緣開始產生紅色花青素(anthocyanin pigment)，由綠色轉為紅色(簡宣裕等,1994)。



圖四 滿江紅外部形態和解剖構造之觀察。(A)葉互生排列成列，(B)葉片裂成上下兩片，下裂片透明，(C)低溫逆境時，植物體內產生紅色花青素，(D)植物體轉紅，下裂片透明，(E)上裂片內側有黏液空腔，腔內有念珠狀固氮藍菌，(F)腔內的固氮藍菌呈絲狀聚群，(G)念珠狀藍綠菌有固氮能力的異形細胞。

肆、研究過程與方法



一、滿江紅的形態觀察和生長繁殖之研究

(一)滿江紅的外形和內部解剖觀察：

- (1)由校園生態池採集滿江紅於實驗室進行培養，馴化一週。
- (2)選擇一滿江紅植株，觀察其外部形態，藉由形態構造進行品種鑑定，並照相紀錄。
- (3)取植株中的一片小葉置於載玻片上，以解剖針將小葉分解後，由複式顯微鏡進行內部解剖形態的觀察，並以電子目鏡連接顯微鏡和DINO-EYE軟體擷取照片。

(二)滿江紅新生葉生長的觀察：

- (1)選擇三對數葉片的植株放置於塑膠觀察盒，並編號之，放進LED白光(波長380-800 nm，光照PPFD109.8 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)恆溫30°C培養箱中，每天持續追蹤新生葉片的生長速度，置於解剖顯微鏡20X倍率下觀察，並以DINO-EYE電子目鏡擷取新生葉生長圖片。
- (2)在特定時間計數滿江紅葉片總數和新生葉片數。此試驗進行三重複，整理數據求得平均值製作統計圖。

(三)滿江紅繁殖速度的測量：

- (1)將0.2g滿江紅置放於培養燒杯中，以方格塑膠透明片作標準量測，約覆蓋水面面積四分之一，在LED白光恆溫30°C培養箱中進行培養，每天持續觀察滿江紅的覆蓋面積和疊層的情形，並拍照記錄和測量之。
- (2)每日以精密電子天平量取各組別的質量，求取鮮重。(已考慮自然蒸發背景值)
- (3)取處理第十四天的滿江紅置放在鋁箔小盒，放入烘箱80°C乾燥六小時，精秤植株乾重。
- (4)重複試驗三次，取平均值作為不同溶液下滿江紅的鮮重和乾重(biomass)的數據，和對照組相比，將原始數據換算成「乾重百分比」，以EXCEL繪製統計圖和SPSS進行統計量分析。

(四)滿江紅的死亡觀察和測量：

- (1)放入相同對數葉片的滿江紅至不同的溶液中進行培養，並放進恆溫培養箱。
- (2)每隔24小時以解剖顯微鏡觀察滿江紅外在形態的變化，並以電子目鏡連接顯微鏡和DINO-EYE軟體擷取照片記錄之。並計算每一片小葉的死亡情形。
- (3)死亡率=白化或褐化的小葉/全部小葉數目(葉子出現白化或呈褐色視為「死亡」)。

二、滿江紅在不同溶質溶液處理中的形態觀察和生長測量：

(一)配製不同的溶液

- (1)配製不同重金屬溶液：分別取硫酸鋅($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 分子量 287.54)、硫酸銅($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 分子量249.69)和硝酸鉛($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, 分子量331.23)配製成200 μM 濃度之溶液(調整pH至6.8)。

編號	1	2	3	4
溶液	蒸餾水 (對照組)	硫酸鋅 ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) _(aq)	硝酸鉛 ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) _(aq)	硫酸銅($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) _(aq)

- (2)配製不同濃度的硫酸銅溶液：取硫酸銅0.125 g置入蒸餾水1 L中，配置成500 μM 濃度的銅離子溶液；再分別以500 μM 硫酸銅溶液加入蒸餾水混合稀釋成200 μM 、100 μM 和50 μM 硫酸銅溶液，以蒸餾水作為對照組。

編號	1	2	3	4	5
溶液	蒸餾水(對照組)	50 μM CuSO_4 _(aq)	100 μM CuSO_4 _(aq)	200 μM CuSO_4 _(aq)	500 μM CuSO_4 _(aq)

- (3)配製不同濃度的過氧化氫溶液：以定量吸管取過氧化氫溶液(35%,分子量34.02)置入蒸餾水

100 ml中，配置成100 mM濃度的過氧化氫溶液；再分別以100 mM過氧化氫溶液加入蒸餾水混合稀釋成50 mM、20 mM、10 mM和 2 mM 過氧化氫溶液，以蒸餾水作為對照組。

編號	1	2	3	4	5
溶液	蒸餾水(對照組)	2 mM H ₂ O ₂ (aq)	10 mM H ₂ O ₂ (aq)	20 mM H ₂ O ₂ (aq)	50 mM H ₂ O ₂ (aq)

(4)配製加入 NAC(N-Acetyl-L-Cysteine BioChemica)抗氧化劑的硫酸銅溶液：

編號	1	2	3	4	5
溶液	蒸餾水(對照組)	100 μM CuSO ₄ (aq)	100 μM CuSO ₄ (aq) + 5 mM NAC(aq)	500 μM CuSO ₄ (aq)	500 μM CuSO ₄ (aq) + 5 mM NAC(aq)

(二)觀察滿江紅在不同溶質溶液中的葉子死亡和新生葉生長情形：

- (1)取培養盒，每一格加入不同溶液並編號，置入相同三對葉片的滿江紅植株。放進 LED 白光恆溫 30°C培養箱中，每隔 24 小時以解剖顯微鏡觀察，並以 DINO-EYE 軟體擷取照片。
- (2)重複上述步驟3次，記錄數據求得各時間的新生葉片的數目和死亡率，以EXCEL軟體繪製統計圖。

(三)觀察滿江紅在不同溶液中的繁殖速度：

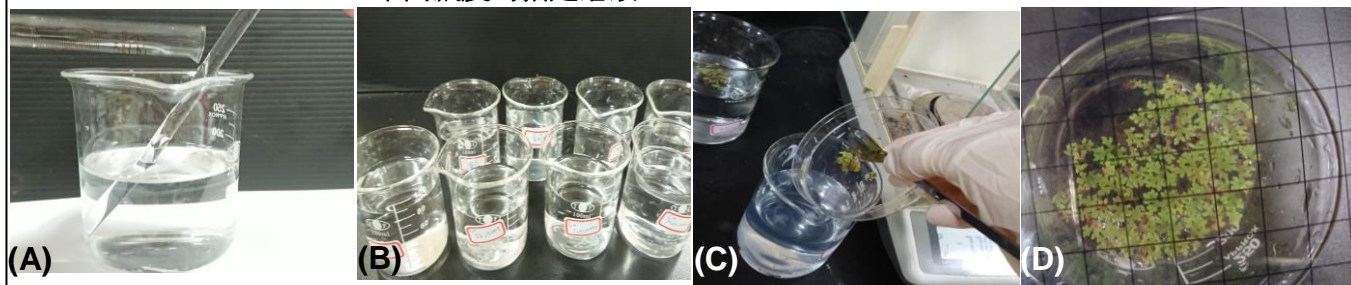
- (1)將0.2 g的滿江紅置放於100 ml不同溶液的各個燒杯並編號，每個處理條件各兩組。
- (2)每天持續觀察滿江紅的覆蓋面積和疊層的情形，且以精密電子天平量取各組別的鮮重和乾重。進行三重後，取得平均值作為不同條件處理下滿江紅的鮮重和乾重(biomass)的數據。

(A)以自製解剖針取特定對數葉子的滿江紅。 → (B)將滿江紅分置特定溶液觀察盒，並編號。 → (C)觀察盒放進 LED 白光恆溫控制培養箱中。 → (D)利用解剖顯微鏡觀察新生葉生長或葉子形態。

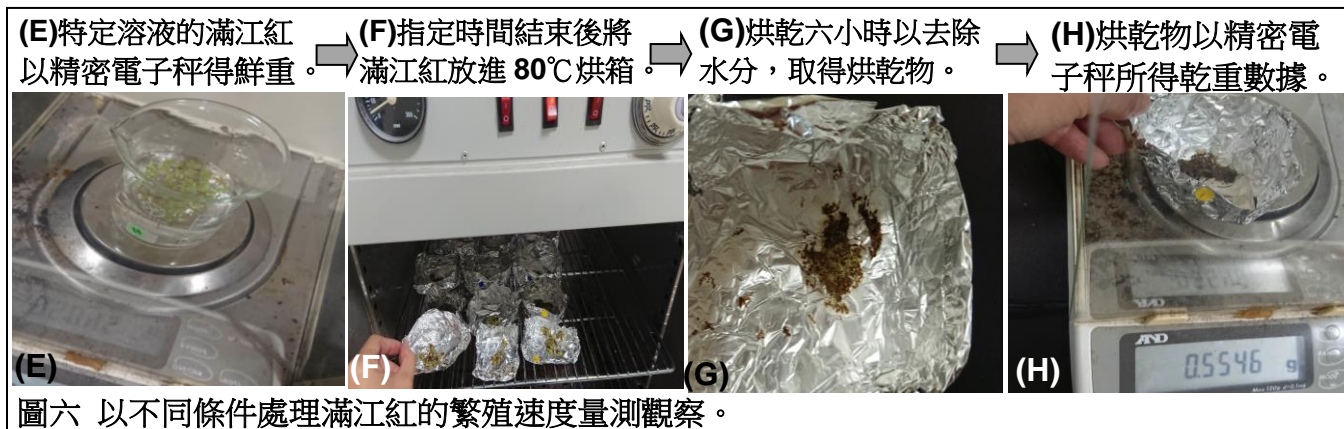


圖五 滿江紅的顯微觀察和生長測量。

(A)配製不同溶質溶液，並稀釋至各特定濃度 → (B)不同重金屬溶質和不同濃度的指定溶液 → (C)取 0.2g 滿江紅植株置於各指定溶液燒杯中。 → (D)以方格子量測滿江紅生長的覆蓋面積。



圖六 以不同條件處理滿江紅的繁殖速度量測觀察。



三、滿江紅植株體內物質的測定：

(一)測定滿江紅植株體內游離銅和水樣中游離銅的含量：

(1)將不同條件處理的新鮮滿江紅置於研鉢中，加入**10 ml**蒸餾水進行研磨，磨至無明顯纖維絲出現為止。

(2)將研磨後的溶液放入離心機中，以轉速**2000 r.p.m.**旋轉五分鐘。

(3)取離心管中**10 ml**上層清澈水樣放入測定瓶中，作為滿江紅植株體內的測定樣本，依分光光度水質分析儀(Lovibond)操作步驟，加入測定游離銅藥錠，將測定瓶放置在水質分析儀中的測定室，儀器會自動偵測顯示結果濃度值(mg/L)，記錄數據後再以滿江紅植株鮮重量(**Fresh Weight, F.W.**)進行轉換數據(**mg/kg F.W.**)=**銅離子(mg)/滿江紅植株重(kg)**。

(4)另外取環境水樣作為測定樣本，和植株體的游離銅濃度進行比較。每一條件處理設計兩組並三重複。將原始數據換算成「百分比」，以**EXCEL**繪製統計圖和**SPSS**進行統計量分析。

(二)滿江紅植株體內過氧化物(**ROS**)的含量測定：

(1)測定滿江紅植株體內過氧化物的含量：

(a)取不同條件處理的新鮮滿江紅置於研鉢中，加入**10 ml**蒸餾水進行研磨。

(b)將研磨後的溶液放入離心機中，以轉速**2000 r.p.m.**旋轉五分鐘。

(c)取離心管中約**10 ml**上層溶液清澈水樣放入於測定瓶中，依分光光度水質分析儀(Lovibond)操作步驟，加入過氧化氫測定藥錠，反應時間終止後，儀器會自動顯示測定結果濃度值(mg/L)，記錄數據後再以滿江紅植株鮮重量(**Fresh Weight, F.W.**)進行轉換數據(**mg/kg F.W.**)=**過氧化氫量(mg)/滿江紅植株重(kg)**，每一條件處理設計兩組並三重複。

(d)和對照組相比，將原始數據換算成「百分比」，以**EXCEL**繪製統計圖和**SPSS**統計量分析。

(2)利用**DAB**染色檢測滿江紅葉片內的過氧化物含量

(a)調配**DAB**(3,3'-Diaminobenzidine,3,3'-二氨基聯苯胺) **0.1 g**加至**50 ml 10 mM MES** (Morpho-line Ethane Sulfonic)緩衝溶液，調整酸鹼度至**pH=6.8**。

(b)將不同條件處理的滿江紅和**10 ml DAB(aq)**藥劑置入**5 cm**培養皿中，確定葉片完全浸泡在**DAB**液體中，並以拭鏡紙覆蓋住，確保滿江紅組織持續泡在藥劑中。

(c)將含有滿江紅與**DAB**藥劑的培養皿置於抽氣幫浦中抽氣**10**分鐘，使藥劑滲透進入細胞內。

(d)抽氣完畢後，將藥劑處理後的滿江紅放置於陰暗處8小時，再將葉片置於95%的酒精中，以隔水加熱處理以去除葉綠素進行退染。

(e)以解剖顯微鏡觀察滿江紅葉片的顏色，並利用電子目鏡連接顯微鏡和DINO-EYE軟體擷取照片記錄之。

(三)滿江紅植株體內共生之藍綠菌固氮產物的含量測定：

(1)測定滿江紅植株體內銨離子的含量：

(a)將不同條件處理的新鮮滿江紅置於研鉢中，加入10 ml蒸餾水進行研磨，磨至無明顯纖維絲出現。

(b)將研磨後的溶液放入離心機中，以轉速2000 r.p.m.旋轉五分鐘。

(c)取離心管中2ml上層清澈水樣放入反應試管中，作為測定樣本，依分光光度水質分析儀(Lovibond)操作步驟，加入測定銨離子藥粉，將反應試管放置在水質分析儀中的測定室，儀器會自動偵測顯示結果濃度值(mg/L)，記錄數據後再以滿江紅植株鮮重量(Fresh Weight, F.W.)進行轉換數據(mg/kg F.W.)=銨離子量(mg)/滿江紅植株重(kg)，每一條件處理設計兩組並三重複。

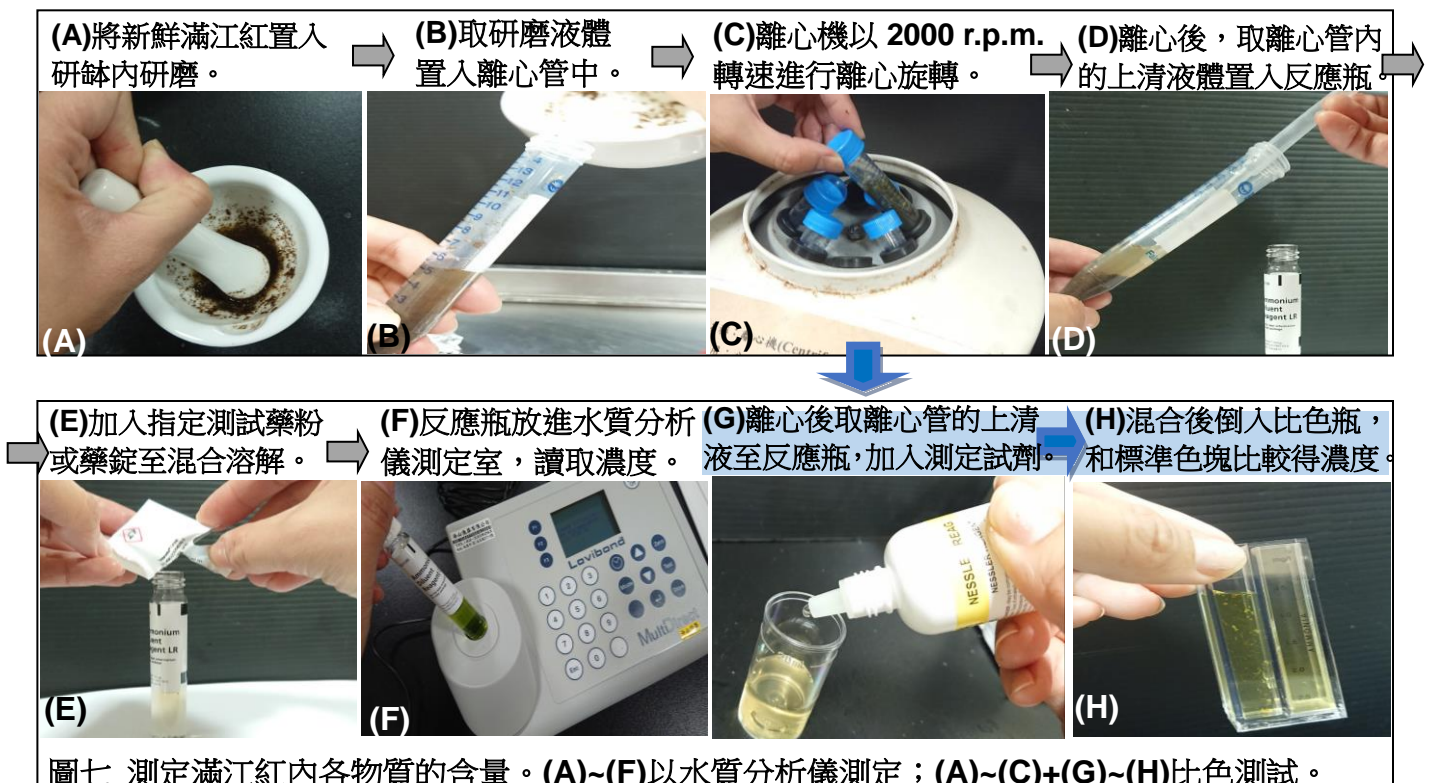
(d)和對照組相比換算成「百分比」，以EXCEL繪製統計圖和SPSS進行統計量分析。

(2)利用比色測定滿江紅植株體內銨離子的含量：

(a)將不同處理的滿江紅新鮮植株置於研鉢，加入10 ml蒸餾水進行研磨至無明顯纖維絲出現。

(b)將研磨後的溶液放入離心管中，離心機以轉速2000 r.p.m.旋轉五分鐘。

(c)取離心管中10ml上層清澈水樣放入反應瓶中作為測定樣本，按操作步驟加入測定試劑充分混合後，將水樣倒入比色瓶中，觀察溶液顏色變化，並與容器中所印的標準色塊相比較，最接近的即為銨離子之濃度(單位mg / L, ppm)。



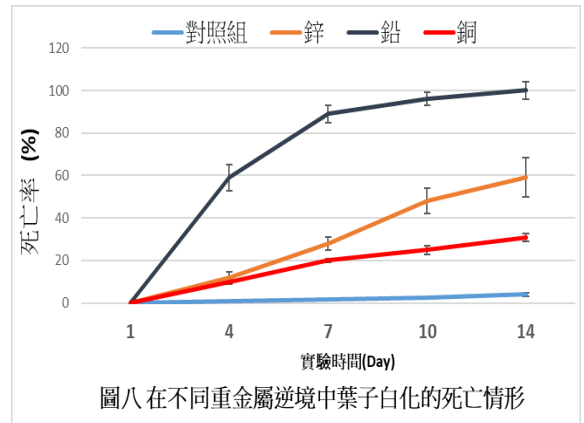
圖七 測定滿江紅內各物質的含量。(A)~(F)以水質分析儀測定；(A)~(C)+(G)~(H)比色測試。

伍、實驗結果

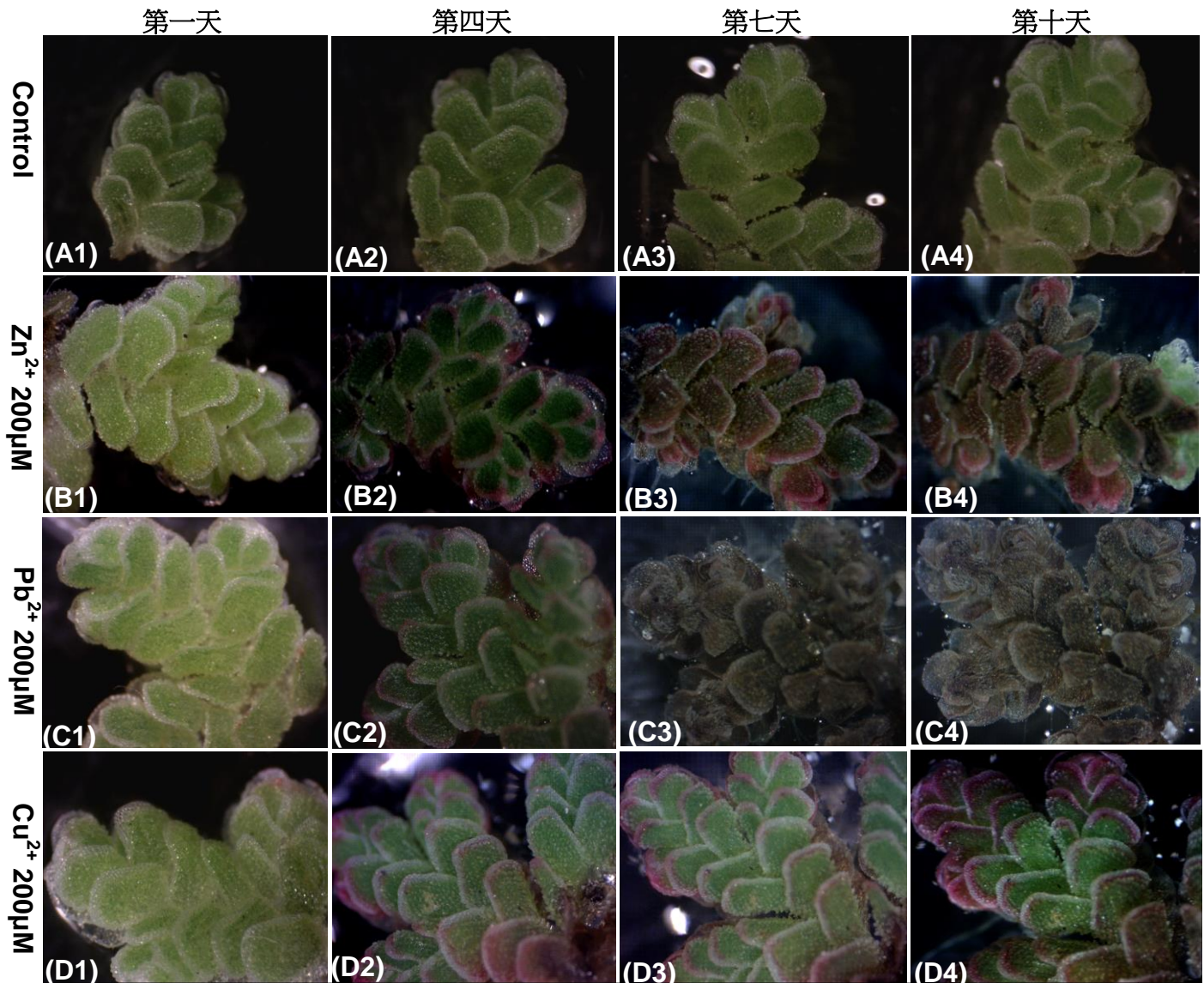
一、探討滿江紅在不同重金屬逆境中的耐受程度

(一)觀察滿江紅在重金屬鋅、鉛、銅的外在形態的改變：

我們以河川水體、土壤常見的重金屬污染物鋅、鉛、銅來處理滿江紅，觀察外在形態變化和生長情形，我們發現滿江紅在 **200 μM** (依據環保署放流水標 **10** 倍以上濃度)的鋅、鉛和銅中出現不同程度的耐受性表現(圖九)。鋅離子和鉛離子造成滿江紅葉綠素嚴重分解，尤其鉛離子在短時間內造成葉子白化，生長受到抑制，死亡率甚高(圖八)；然而滿江紅在銅離子中仍維持綠色，而且植株繼續生長，新生葉片數目增加，部分葉子邊緣開始出現明顯紅色，其結果似乎表示滿江紅對於游離銅相較鋅和鉛有較高耐受表現。



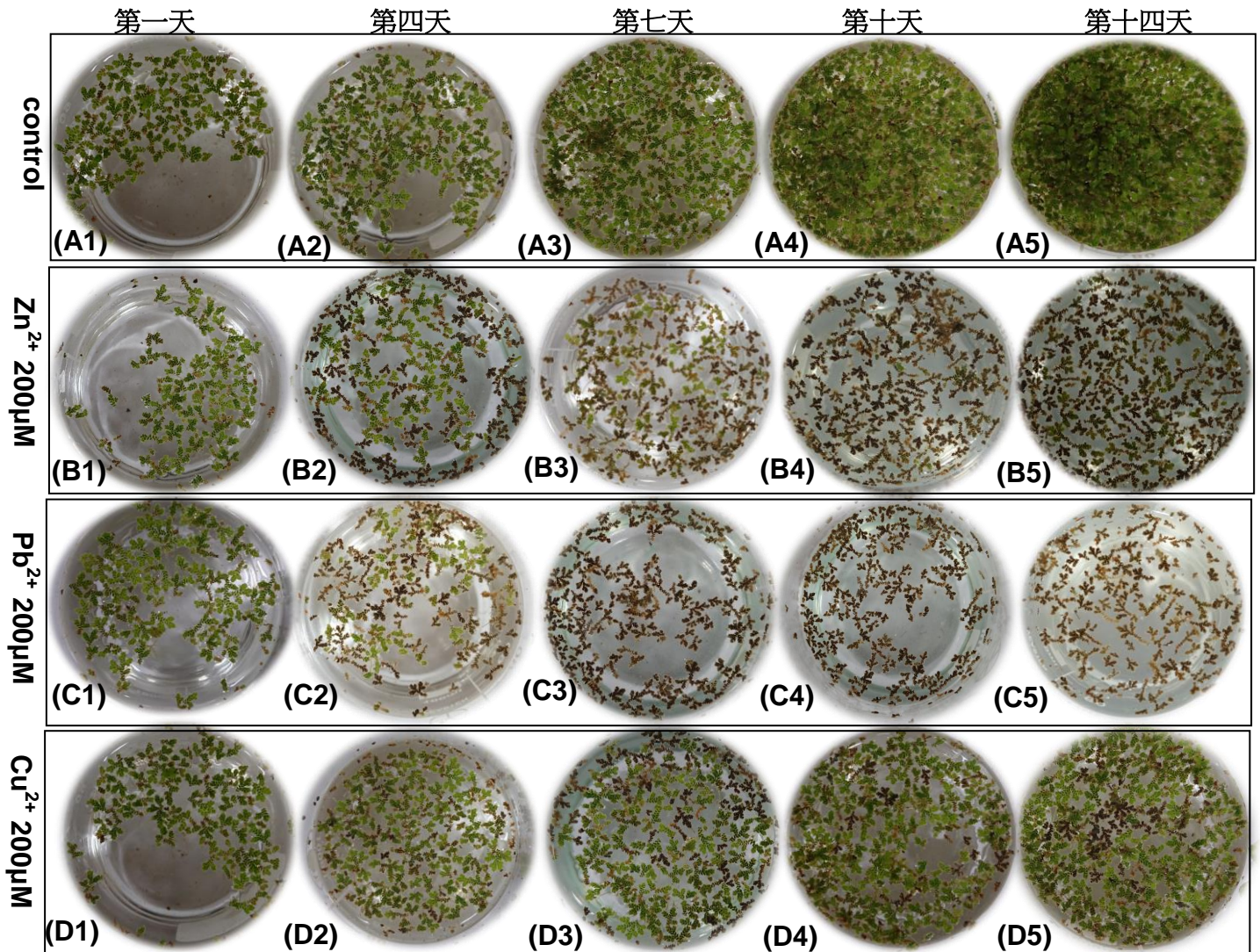
圖八 在不同重金屬逆境中葉子白化的死亡情形



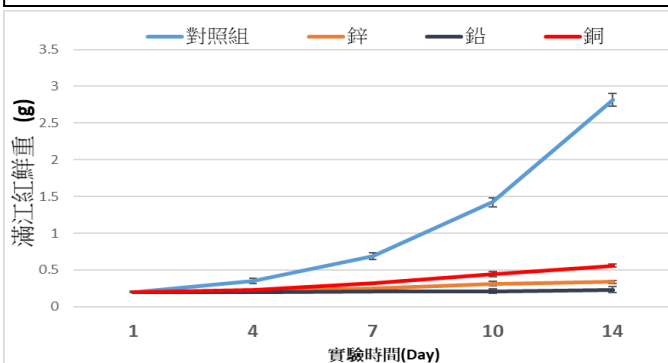
圖九 觀察滿江紅在不同重金屬溶液中外在形態的變化。(A1)~(A4): 對照組, (B1)~(B4): $\text{Zn}^{2+}(\text{aq})$, (C1)~(C4): $\text{Pb}^{2+}(\text{aq})$, (D1)~(D4): $\text{Cu}^{2+}(\text{aq})$ 。

(二)觀察滿江紅在重金屬鋅、鉛、銅的生長繁殖表現：

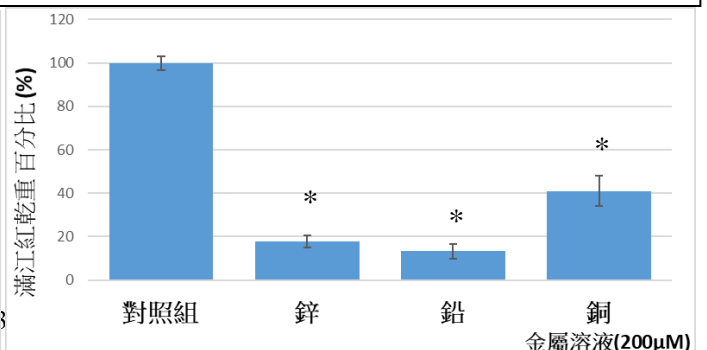
滿江紅在重金屬中若出現耐受存活，是否同時進行細胞分裂而繁殖更多植體，在巨觀結果中，發現不同重金屬溶液中的滿江紅繁殖力有所不同(圖十)。滿江紅在鉛中生殖幾乎停滯，植體由綠轉褐。鋅處理十四天的鮮重雖然增加約 60%，但長時間累積鋅，葉片也大多轉為褐色。相反地，滿江紅在金屬銅裡仍有較高比例維持綠色，且鮮重為原來的兩倍以上(圖十一)，生物量也顯著高於其他重金屬(圖十二)，似乎說明滿江紅對於金屬銅(200 μM)不僅有耐受性存活表現，且具有繁殖力，我們好奇滿江紅細胞透過何種生理機制途徑以適應金屬銅逆境。



圖十 觀察滿江紅在不同重金屬溶液中生長繁殖的情形。(A)對照組，(B)200 μM $\text{Zn}^{2+}(\text{aq})$ ，(C) 200 μM $\text{Pb}^{2+}(\text{aq})$ ，(D) 200 μM $\text{Cu}^{2+}(\text{aq})$ 。



圖十一 滿江紅在不同重金屬逆境中繁殖速度



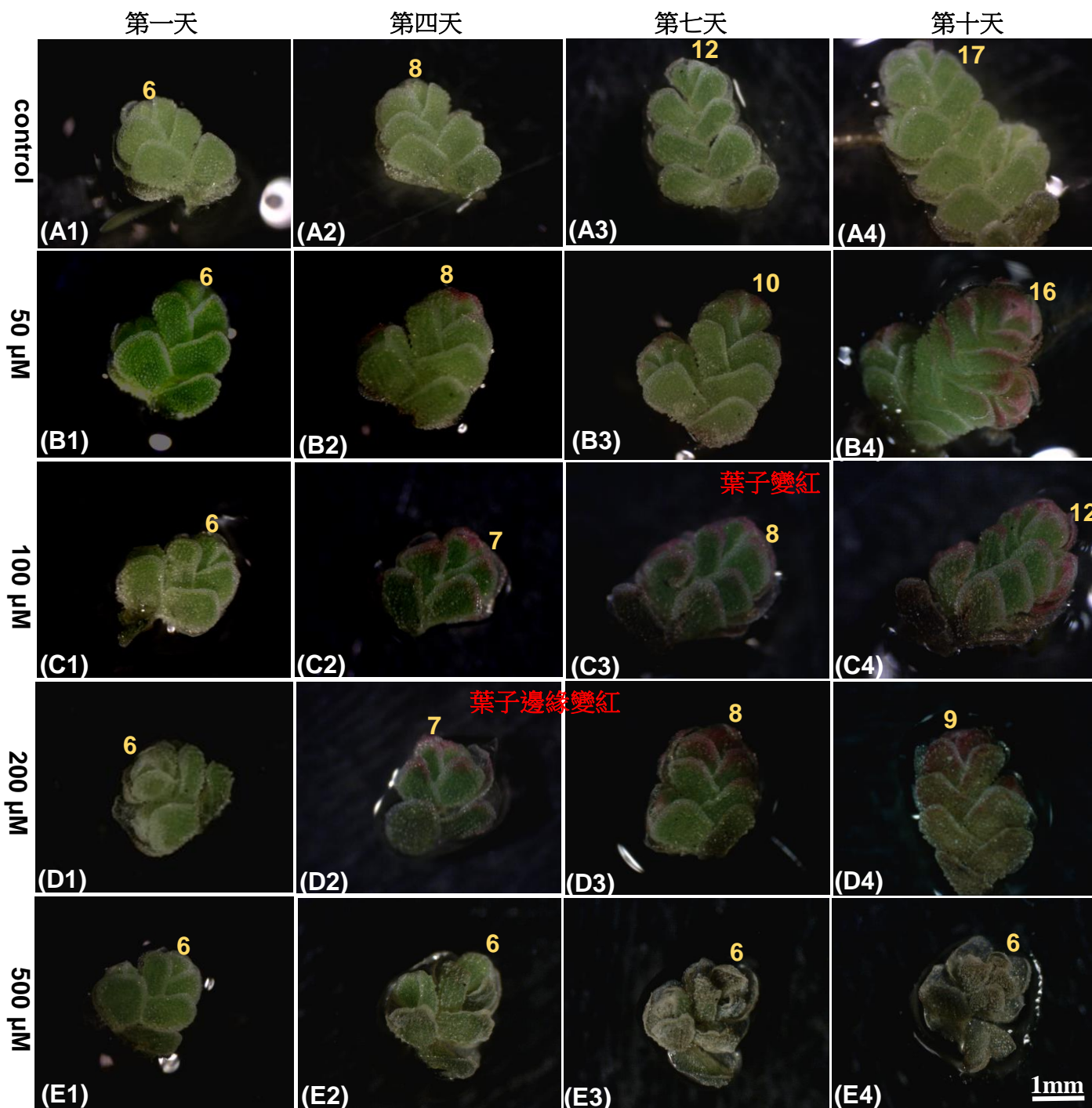
圖十二 滿江紅在不同重金屬的生物量差異

(*: $p < .05$ ，與對照組相比)

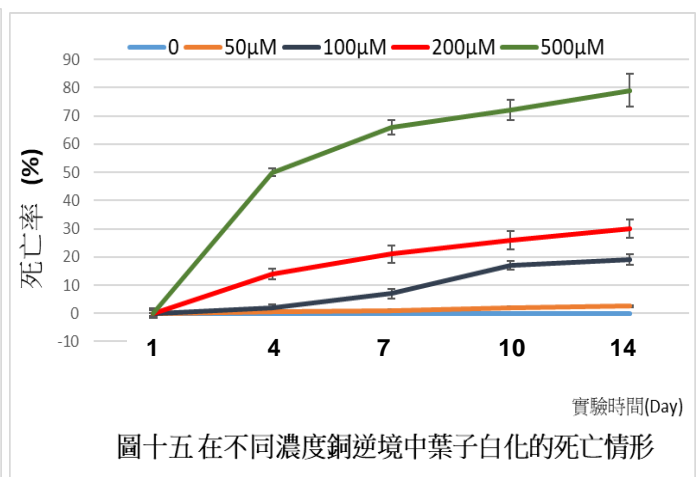
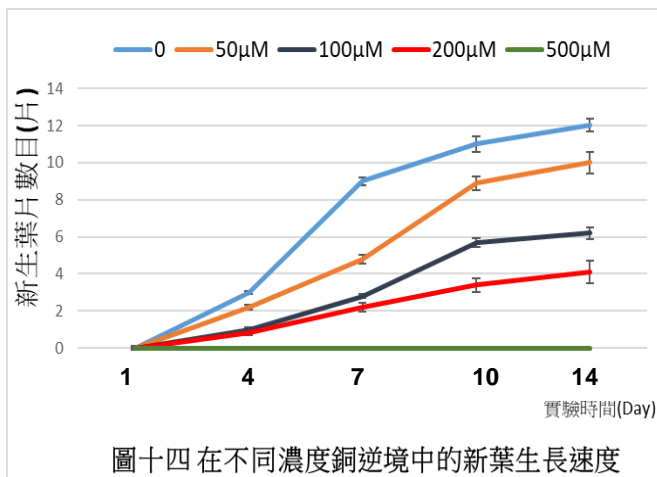
二、探討滿江紅在重金屬銅逆境中的生存適應

(一)觀察滿江紅在不同濃度 $\text{CuSO}_4(\text{aq})$ 的外在形態改變：

我們發現滿江紅在金屬銅環境中的外部形態明顯改變(圖十三)，低濃度銅離子處理中的滿江紅，因長時間累積銅在植株體內，葉片顏色由綠漸漸轉紅，細胞內可能出現大量花青素，而滿江紅在高濃度銅離子中，尤其 $500\mu\text{M}$ 組別在短時間葉子的葉綠素嚴重被分解，明顯呈現白化徵狀，而且出現生長停滯，沒有新生的葉子(圖十四)，大多植株個體甚至呈現死亡狀態(圖十五)。

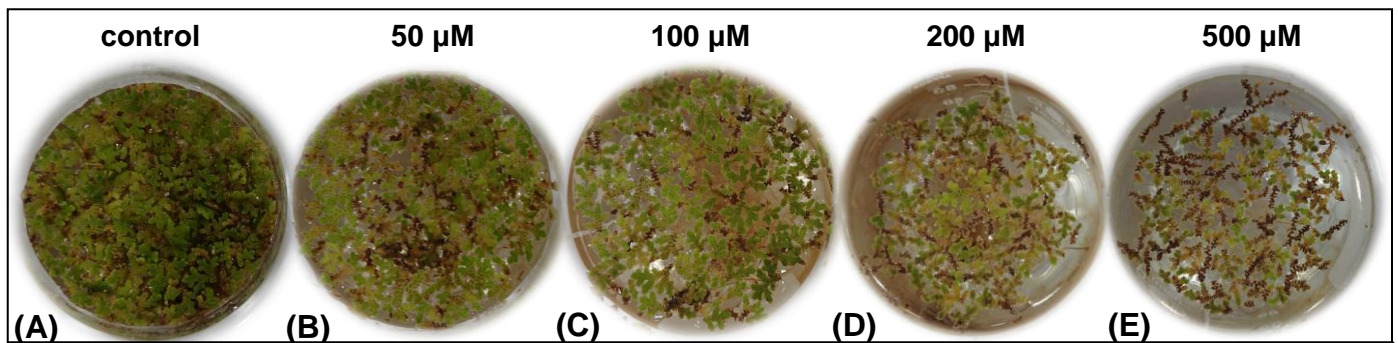


圖十三 觀察滿江紅在不同濃度 $\text{CuSO}_4(\text{aq})$ 中的外在形態變化。(A1)~(A4)：對照組，(B1)~(B4)： $50\mu\text{M Cu}^{2+}(\text{aq})$ ，(C1)~(C4)： $100\mu\text{M Cu}^{2+}(\text{aq})$ ，(D1)~(D4)： $200\mu\text{M Cu}^{2+}(\text{aq})$ ，(E1)~(E4)： $500\mu\text{M Cu}^{2+}(\text{aq})$ 。(圖中數字為植株中最多葉片數)

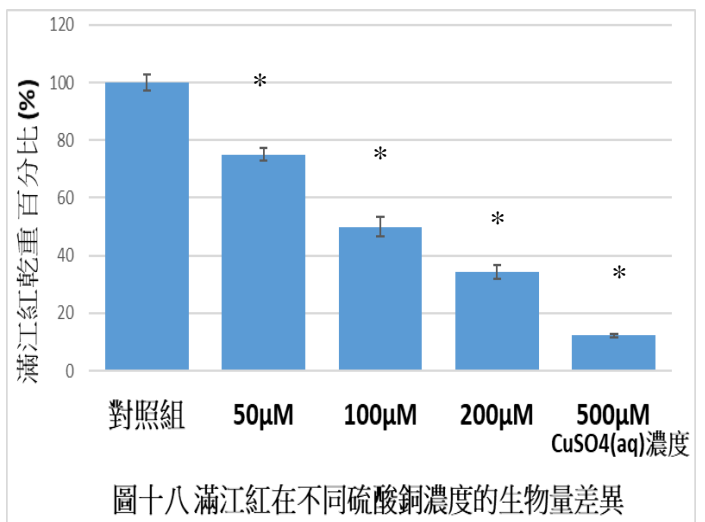
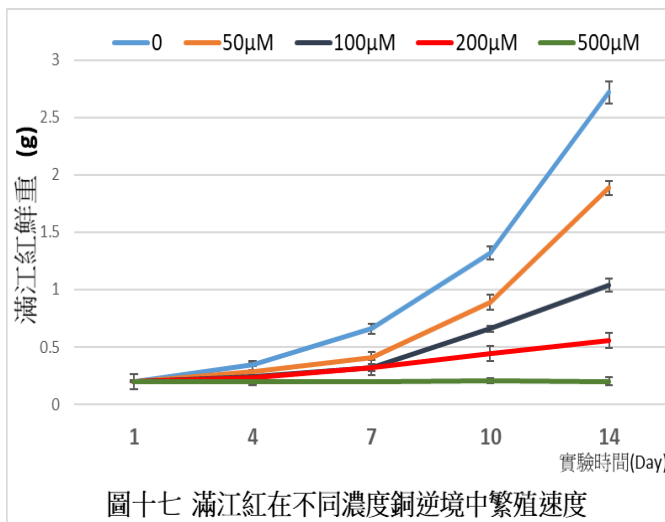


(二) 觀察滿江紅在不同濃度CuSO_{4(aq)}的生長繁殖表現：

滿江紅在高濃度銅離子逆境中呈現嚴重的生長和生殖停滯現象(圖十六)，葉綠素甚至被分解，葉片呈現白化，尤其 500 μM 組別在短時間內，即會造成滿江紅的高致死率，亦無新生葉片。但是在低濃度 50、100 μM 銅離子中的滿江紅，新葉生長的速度在初始階段相較對照組雖然緩慢，且葉子隨著天數增加漸漸轉紅，可能有花青素生成，不過在試驗十天之後，發現滿江紅新生葉片的速度加快(圖十七)，巨觀之下的生物量相較對照組只有抑制 30%(圖十八)，且死亡率極低，滿江紅似乎在低濃度銅離子逆境中表現出適應的能力，適應的個體繼續生長繁殖。



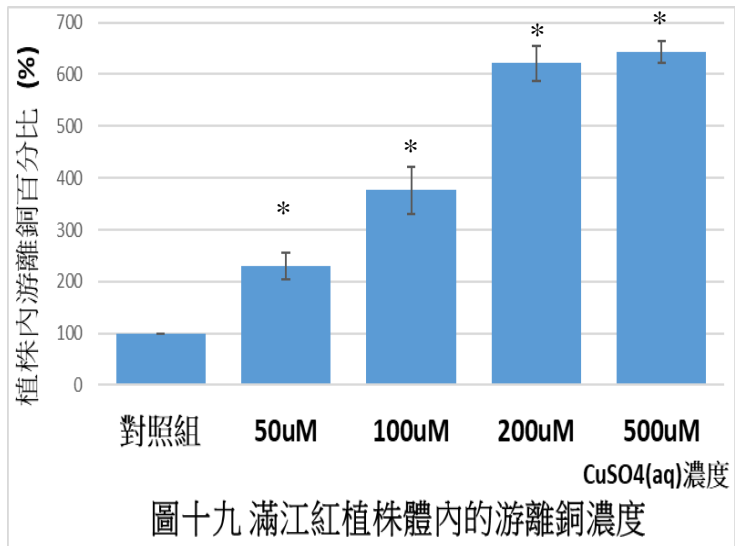
圖十六 觀察滿江紅在不同濃度 CuSO_{4(aq)}中生長繁殖的情形。(A)對照組，(B)50 μM Cu²⁺，(C)100 μM Cu²⁺，(D)200 μM Cu²⁺，(E)500 μM Cu²⁺。



(*: p < .05, 與對照組相比)

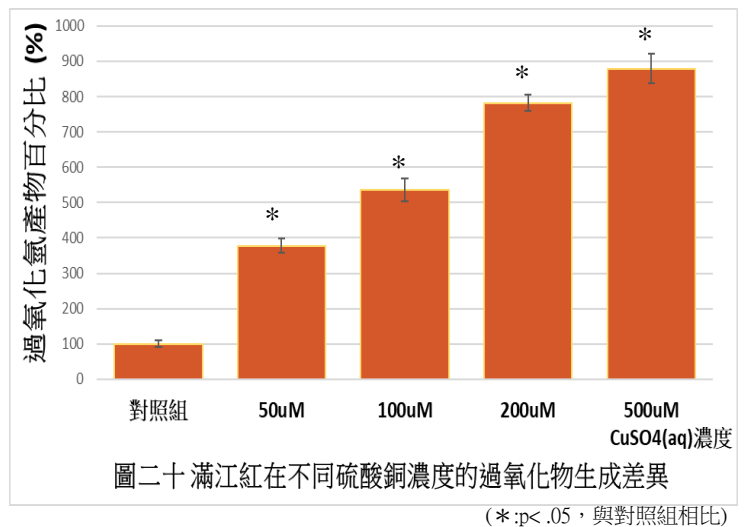
(三)滿江紅植株內和環境水樣中游離銅的含量差異：

我們好奇滿江紅在高濃度銅溶液中葉綠素被分解、葉子出現白化甚至死亡情形，是否是因為滿江紅吸收游離銅所造成。我們將滿江紅研磨之後，經離心取上清液，以水質分析儀測定滿江紅植株內的游離銅濃度，發現組織內的游離銅濃度相較對照組有顯著的增加(圖十九)，而且隨著銅處理濃度的提高，滿江紅組織內的游離銅累積濃度愈高，似乎表示滿江紅從水樣環境中吸收游離銅進入體內，同時我們也測得水樣中的銅離子濃度有減少趨勢。

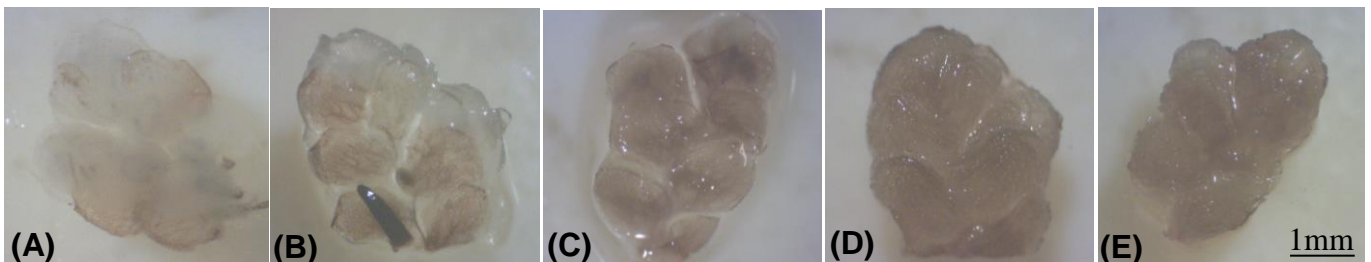


(四)滿江紅植株內氧化產物的含量差異

滿江紅吸收游離銅連續 14 天表現出耐受性，我們好奇滿江紅細胞內的生理反應機制，面對重金屬逆境時是否會產生氧化產物。化學分析結果指出滿江紅在 50 μM 銅中產生的過氧化氫產量相較對照組有明顯的差異，而且隨著銅濃度的提高，過氧化氫產物也隨之增加，同時發現滿江紅在硫酸銅濃度達 500 μM ，過氧化氫增加八倍之多(圖二十)，這似乎暗示可能因為葉內產生大量的過氧化氫造成細胞構造的損傷，使滿江紅植株變黃，甚至白化最後壞死。



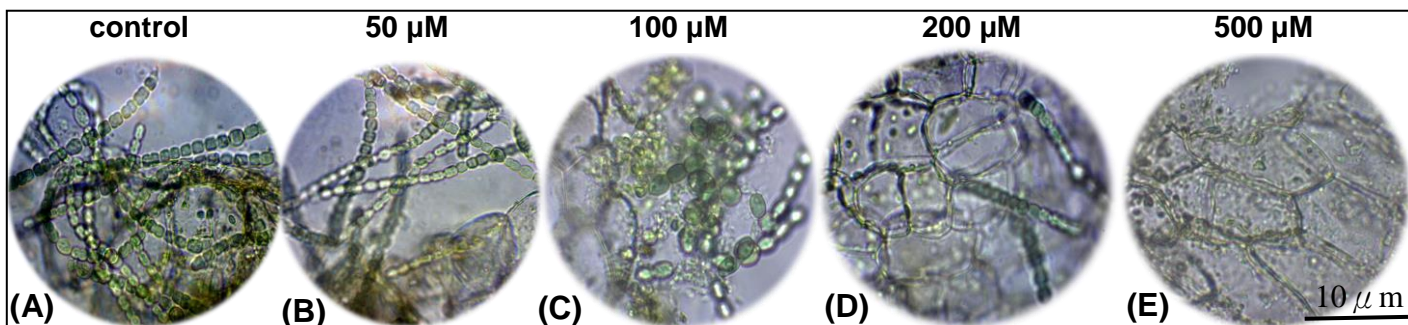
加入DAB藥劑的滿江紅結果中，我們發現滿江紅隨著處理的銅濃度升高，細胞內因為累積過氧化氫含量更高，葉片染色處理後顏色也變得較深(圖二十一)。我們推知滿江紅在銅逆境下會有過氧化氫的累積，當金屬銅濃度過高時，滿江紅葉片所受的的氧化壓力超過耐受程度而造成細胞內構造的嚴重損傷，我們好奇滿江紅在受到金屬銅逆境時， H_2O_2 是否為氧化機制中造成葉綠素分解的關鍵因子。



圖二十一 觀察滿江紅在不同金屬銅濃度中氧化物的生成表現。(A)對照組，(B)50 μM Cu^{2+} ，(C)100 μM Cu^{2+} ，(D)200 μM Cu^{2+} ，(E)500 μM Cu^{2+} 。

(五)和滿江紅共生的固氮菌在不同濃度CuSO_{4(aq)}的存活狀態：

滿江紅遭遇金屬銅會產生氧化逆境，我們好奇是否會影響共生系統中固氮菌的存活狀況，我們解剖滿江紅葉片，以顯微觀察的實驗結果發現，對照組中滿江紅葉內空腔有眾多長鏈狀的念珠菌，低濃度銅離子組別在顯微視野下仍有許多長鏈的固氮菌，在200 μM濃度銅離子中，念珠菌數量有明顯差異，隨著銅濃度的提高，念珠菌的數量明顯減少，在高濃度的銅離子中只有零星、短鏈狀的固氮菌出現(圖二十二)。



圖二十二 觀察和滿江紅共生的固氮菌在不同濃度金屬銅中的存活表現。(A)對照組，(B)50 μM Cu²⁺，(C)100 μM Cu²⁺，(D)200 μM Cu²⁺，(E)500 μM Cu²⁺。

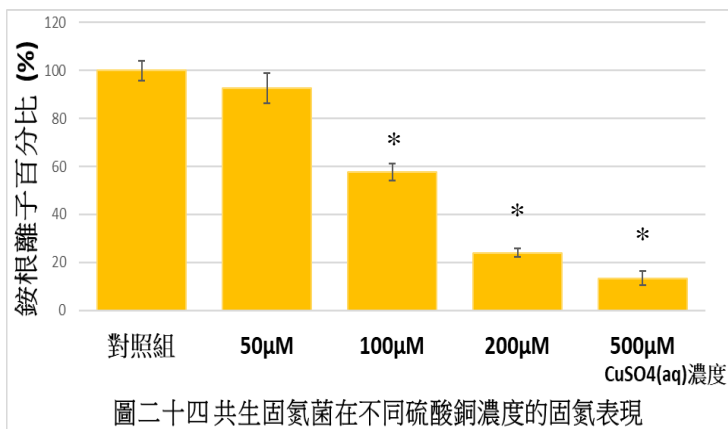
(六)和滿江紅共生的固氮菌在不同濃度CuSO_{4(aq)}的固氮能力改變：

和滿江紅共生的藍菌在游離銅 50、100 μM 逆境中仍維持長鏈狀態，我們好奇其內固氮菌的固氮能力是否也會受到影響。我們以 NH₄⁺比色進行固氮產物的含量測試(圖二十三)，結果發現在滿江紅耐受程度內的銅逆境(50 μM)，產生的銨離子和對照組相比沒有顯著差異(p=0.259)(圖二十四)，這似乎說明滿江紅葉子可能因為逆境誘導細胞局部受傷，但同時也產生抗氧化的保護機制，共生系統中的固氮酶活性表現不受抑制；然而隨著滿江紅葉子細胞內游離銅的累積，可能誘導細胞產生過量的過氧化物造成葉子細胞嚴重傷害，也抑制了葉內共生菌的固氮能力，我們推測這可能是金屬銅直接影響固氮菌的存活和固氮酶活性，或是因為滿江紅葉子的死亡間接影響共生系統內固氮菌的固氮能力。

CuSO_{4(aq)} control 50μM 100μM 200μM 500μM



圖二十三 以比色檢定滿江紅組織內的 NH₄⁺濃度。



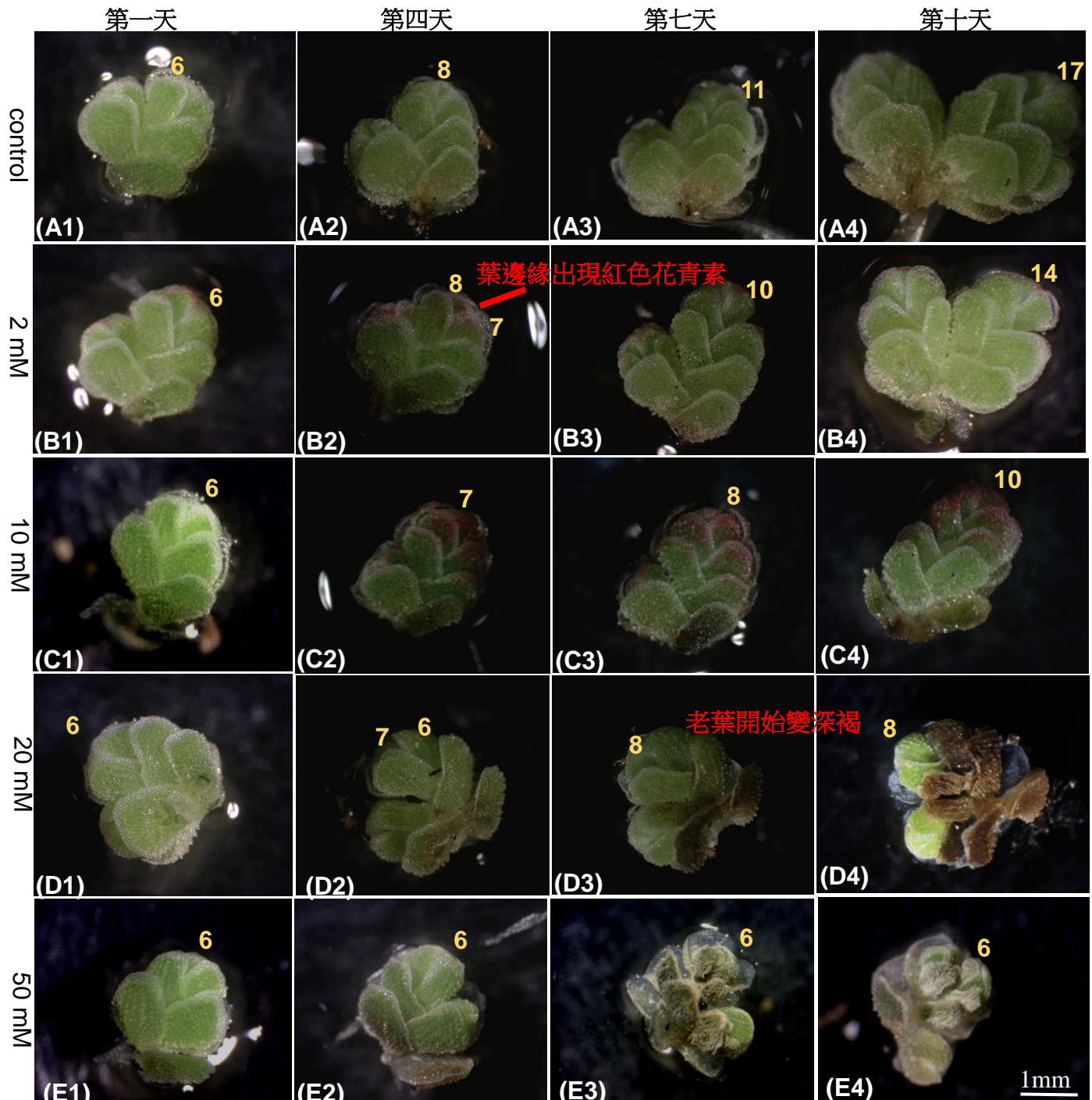
圖二十四 共生固氮菌在不同硫酸銅濃度的固氮表現

(*: p < .05, 與對照組相比)

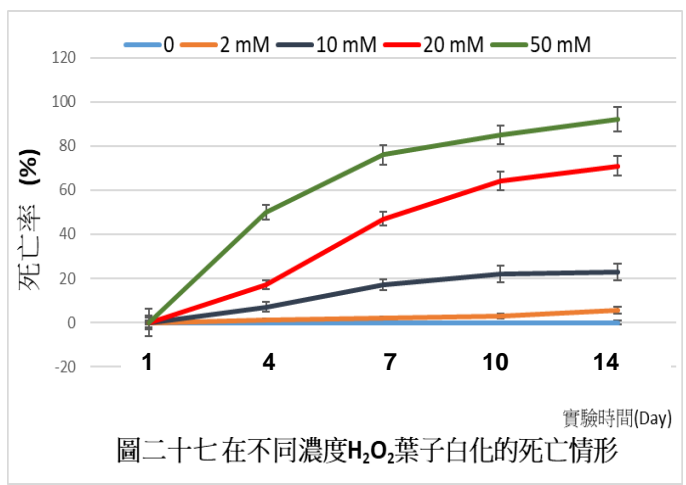
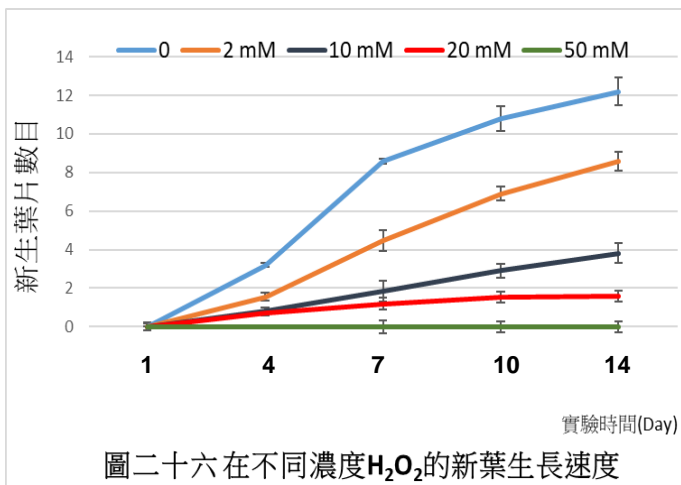
三、探討滿江紅在過氧化氫中的氧化逆境表現

(一) 觀察滿江紅在不同濃度 $H_2O_2(aq)$ 的外在形態改變：

我們為驗證滿江紅在銅逆境中葉子變紅甚至白化是透過 H_2O_2 傳遞訊號，於是我們以不同濃度的過氧化氫水溶液處理滿江紅，連續觀察十天(圖二十五)，我們發現滿江紅在低程度氧化壓力下，短時間內葉子邊緣即由綠轉成紅色，而且新生葉持續增加(圖二十六)，我們推測可能有花青素的大量生成以應付輕微程度的氧化逆境，隨著氧化逆境程度的提高，局部葉片(老葉)被誘導黃褐化死亡，而在高濃度過氧化氫累積之中，起初葉子呈現深褐色，長時間細胞處於嚴重的氧化逆境，葉綠素明顯被分解，漸漸呈現白化趨向死亡(圖二十七)，且抑制植株的生長，沒有新生葉生成。

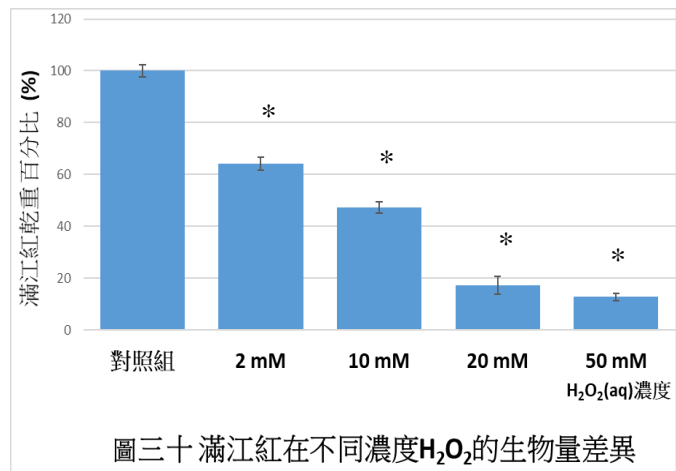
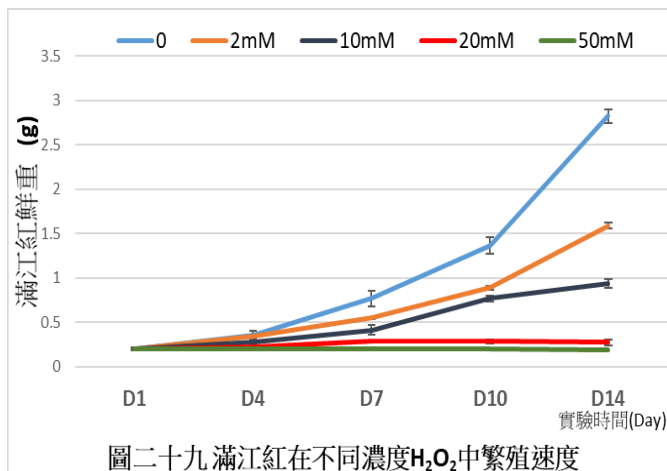
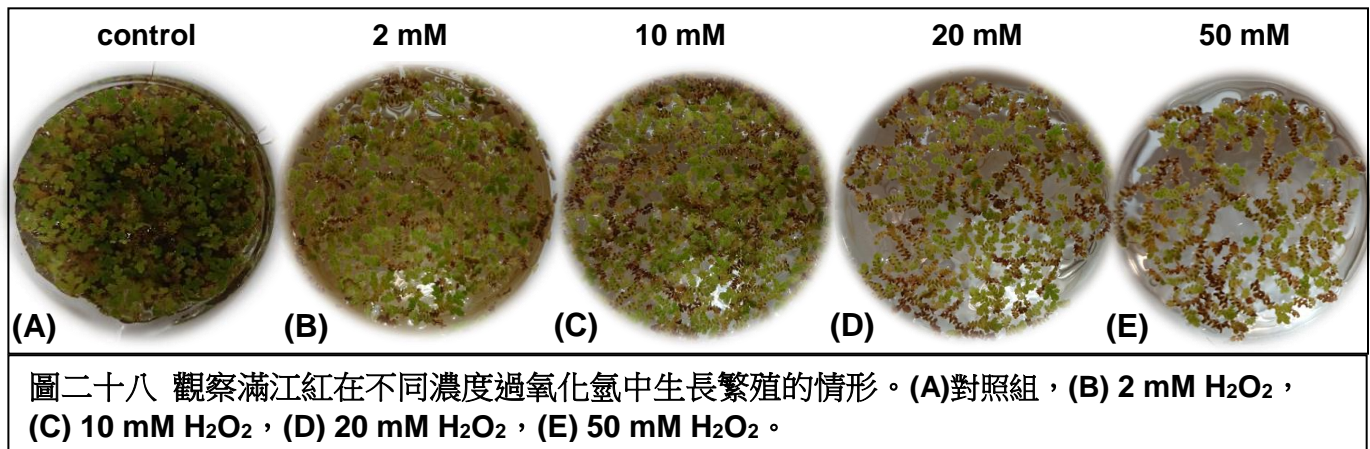


圖二十五 觀察滿江紅在不同濃度 $H_2O_2(aq)$ 中的形態變化。(A1)~(A4)：對照組，(B1)~(B4) 2 mM H_2O_2 ，(C1)~(C4)：10 mM H_2O_2 ，(D1)~(D4)：20 mM H_2O_2 ，(E1)~(E4)：50 mM H_2O_2 。(圖中數字為植株中最多葉片數)



(二) 觀察滿江紅在不同濃度H₂O_{2(aq)}的生長繁殖表現：

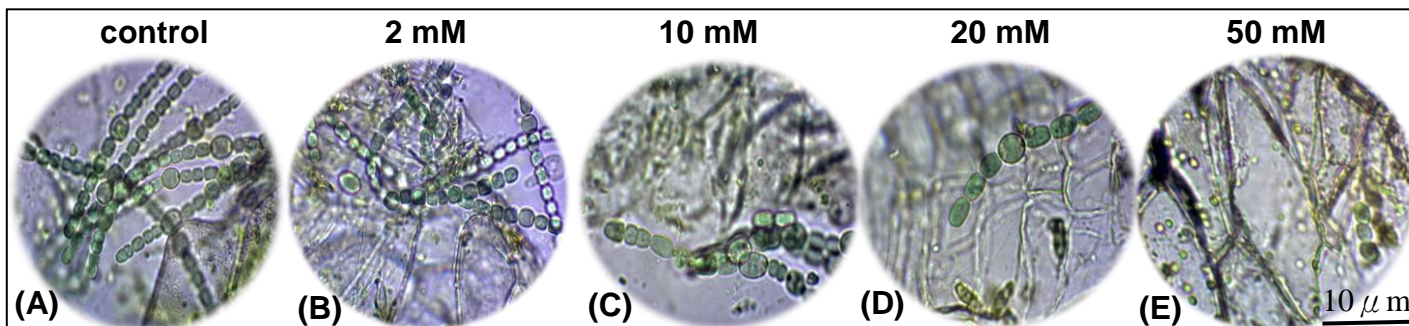
滿江紅在氧化逆境中可能透過大量的花青素生成，葉子明顯由綠轉紅，使低濃度過氧化氫中的滿江紅仍繼續生長繁殖(圖二十八)，鮮重相較對照組大約降低 40%(圖二十九)，但是隨著過氧化氫濃度增加，滿江紅因為氧化壓力的提高，可能因為局部細胞葉綠素分解，使葉子出現黃褐甚至白化的比例增加，在 20 mM 過氧化氫濃度組別，滿江紅的鮮重在 7 天後並無顯著增加，生長繁殖出現停滯，50 mM 過氧化氫組別的生物量(biomass)相較對照組顯著減少，大約只有對照組的 10%(圖三十)。



(*: p < .05, 與對照組相比)

(三)和滿江紅共生的固氮菌在 H_2O_2 (aq)氧化壓力下的存活狀態：

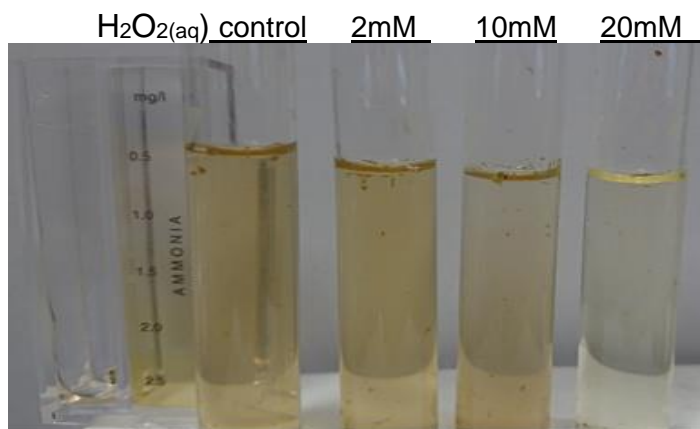
滿江紅在2 mM過氧化氫的逆境之中，其共生的固氮菌狀態和對照組相似，空腔內都有許多長鏈的固氮菌，但在10 mM濃度過氧化氫中，念珠菌數量明顯減少，隨著過氧化氫濃度的提高，在滿江紅葉內空腔中不僅少見固氮菌，且多以零星、短鏈的形態出現(圖三十一)。



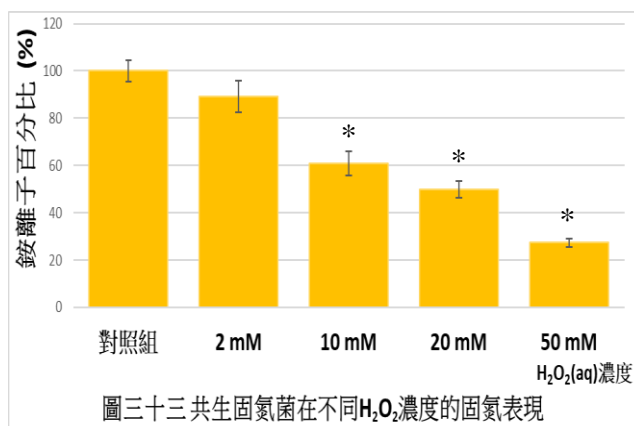
圖三十一 觀察和滿江紅共生的固氮菌在不同濃度過氧化氫中的存活表現。(A)對照組，(B) 2 mM H_2O_2 ，(C) 10 mM H_2O_2 ，(D) 20 mM H_2O_2 ，(E) 50 mM H_2O_2 。

(四)和滿江紅共生的固氮菌在 H_2O_2 (aq)氧化壓力下的固氮能力改變：

實驗結果發現在過氧化氫溶液中，滿江紅共生藍菌的固氮能力改變，以銨離子比色進行固氮產物的含量測試(圖三十二)，發現滿江紅在嚴重氧化逆境(20、50 mM)中，共生藍菌的固氮產量相較對照組有顯著降低，表示滿江紅葉子可能會因為氧化逆境而影響共生藍菌的固氮表現；而且隨著過氧化氫的濃度的累積，固氮表現明顯被抑制，50 mM 過氧化氫組別中的滿江紅，其植株體內產生的銨離子相較對照組減少了 75%以上(圖三十三)。



圖三十二 以比色檢定滿江紅組織內的銨離子濃度。



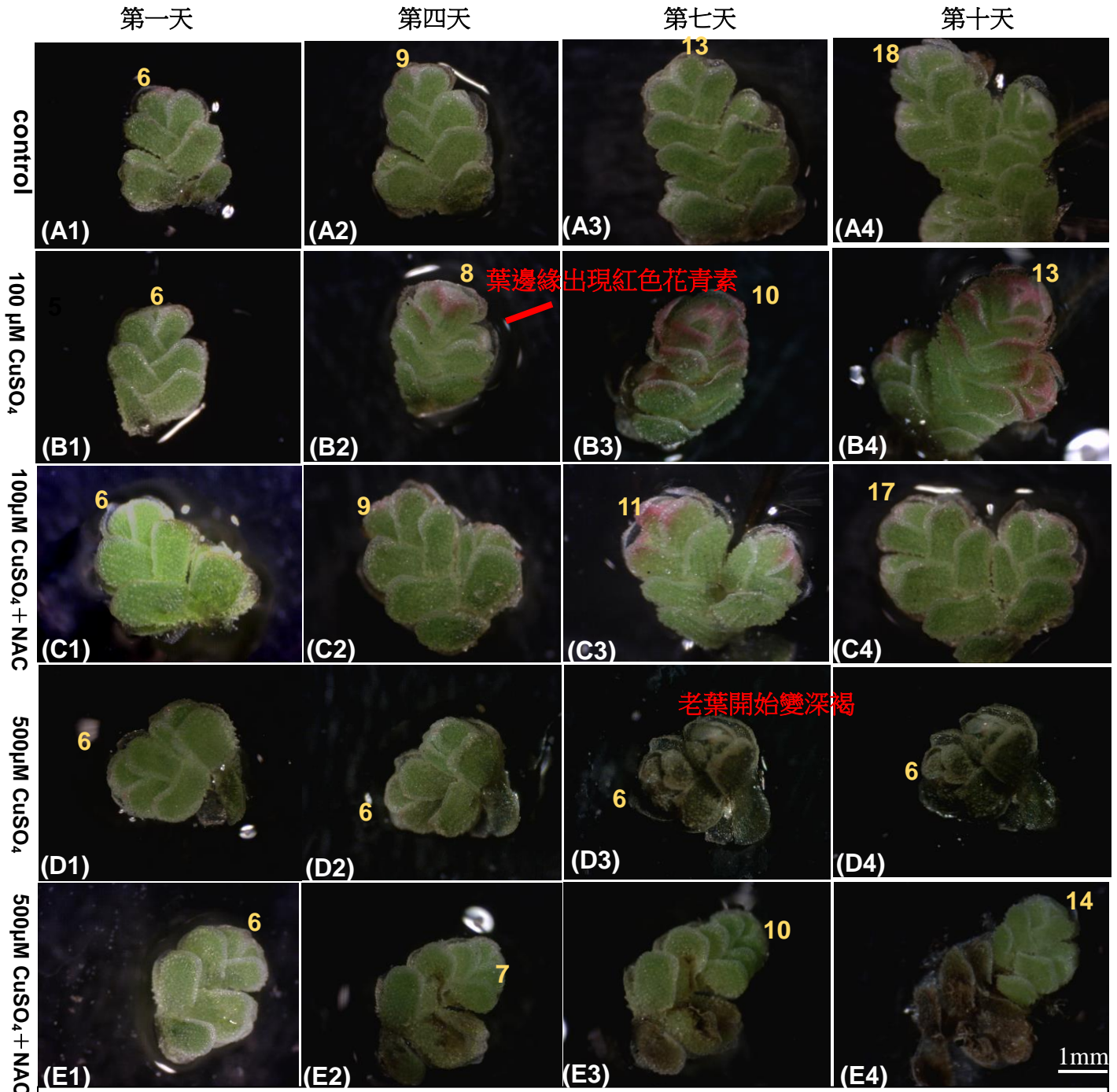
圖三十三 共生固氮菌在不同 H_2O_2 濃度的固氮表現

(* : $p < .05$ ，與對照組相比)

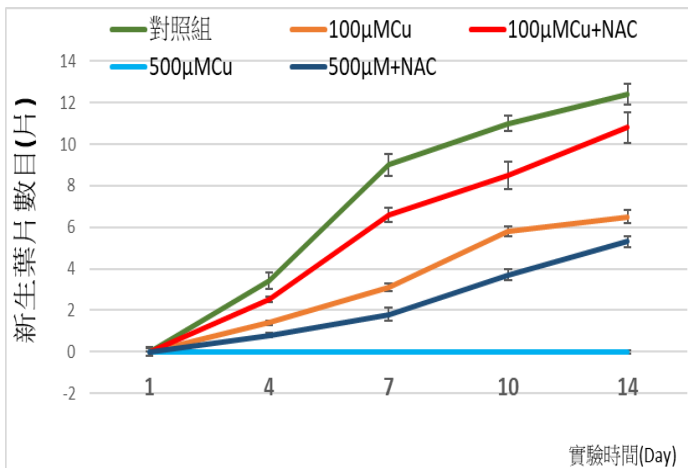
四、探討滿江紅在消除氧化壓力後的改變

(一)觀察滿江紅在消除氧化壓力的 $\text{CuSO}_4(\text{aq})$ 中的外在形態改變：

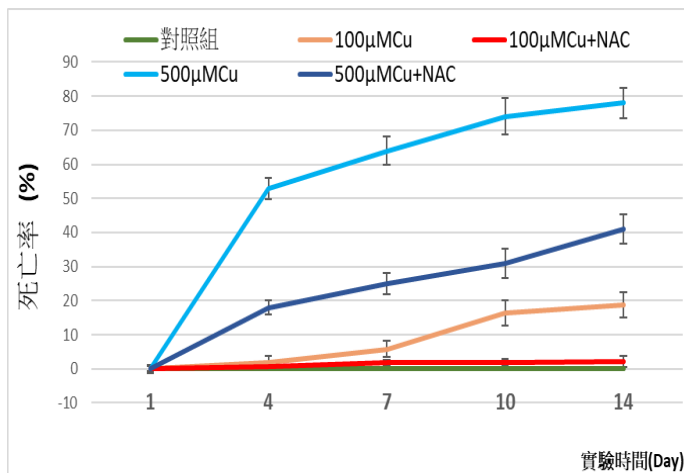
我們企圖以抗氧化劑 **NAC** 消除滿江紅在游離銅中產生的氧化壓力(圖三十四)，實驗結果發現滿江紅原本在 $100 \mu\text{M CuSO}_4$ 溶液中可能因為花青素生成使葉子變紅，而在 **NAC** 的處理後，葉子仍維持綠色，花青素生成量明顯降低；而高濃度 $500 \mu\text{M CuSO}_4$ 處理的滿江紅細胞內葉綠素被分解，葉子呈現黃褐色，最後死亡，而加入 **NAC** 消除氧化的壓力後，葉綠素被分解的速度獲得減緩，雖然老葉黃褐死亡，但滿江紅植株仍有新生葉繼續生長(圖三十五)。我們利用抗氧化劑 **NAC** 證明滿江紅因為金屬銅逆境所造葉綠素的分解情形，會因為減少氧化壓力而減緩游離銅對滿江紅的致死效應(圖三十六)。



圖三十四 觀察滿江紅以抗氧化劑處理在銅重金屬中的外在形態變化。(A1)~(A4)：對照組，(B1)~(B4) $100\mu\text{M Cu}^{2+}$ ，(C1)~(C4)： $100\mu\text{M Cu}^{2+}+\text{NAC}$ ，(D1)~(D4)： $500\mu\text{M Cu}^{2+}$ ，(E1)~(E4)： $500\mu\text{M Cu}^{2+}+\text{NAC}$ 。(圖中數字為植株中最多葉片數)



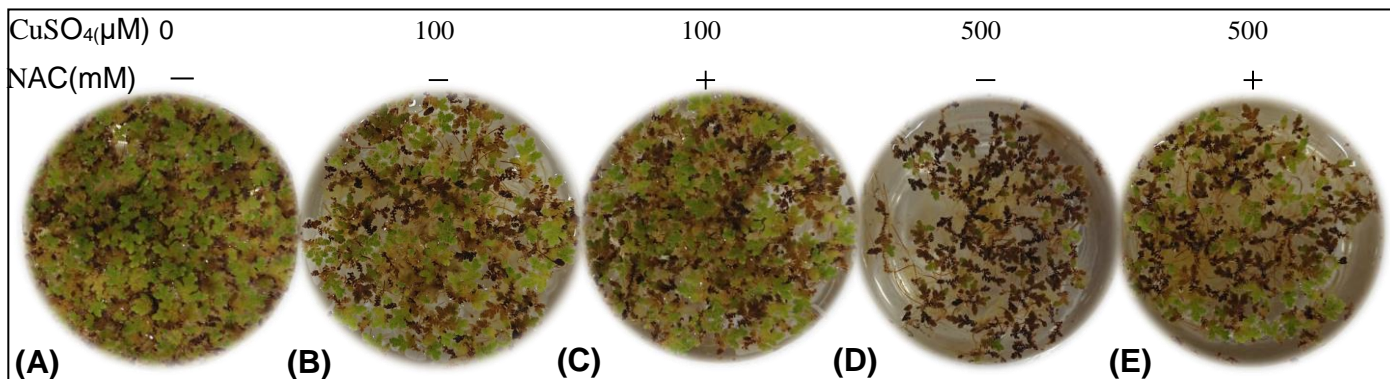
圖三十五 在銅逆境中加入NAC的新葉生長速度



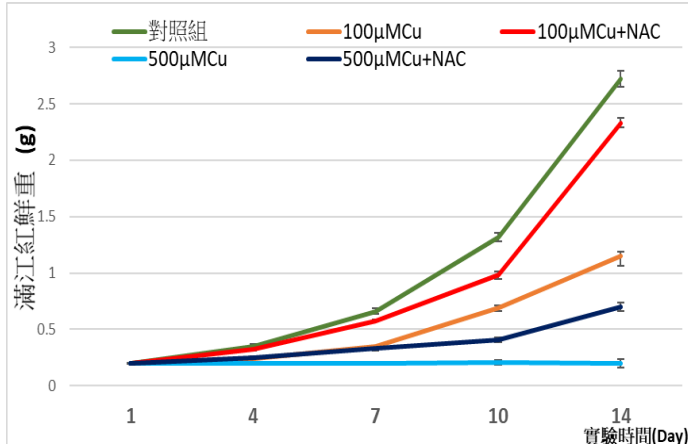
圖三十六 在銅逆境中加入NAC的葉子白化死亡

(二) 觀察滿江紅在消除氧化壓力的CuSO_{4(aq)}中的生長繁殖表現：

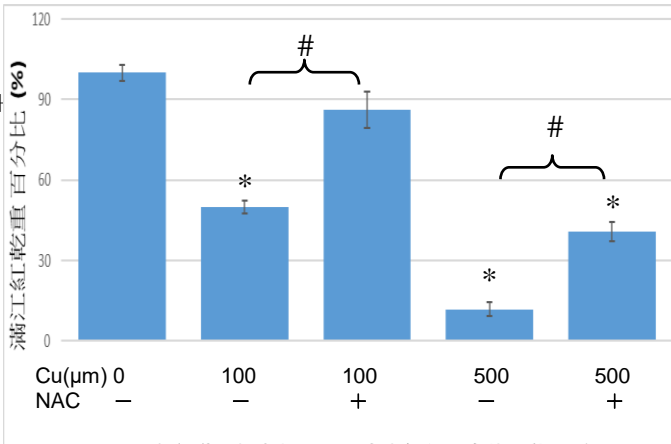
滿江紅在高濃度銅中的生長繁殖受到抑制(圖三十七)，且葉子細胞的死亡率高，但加入 NAC 後，鮮重和乾重都加倍增加(圖三十八、三十九)，而低濃度銅逆境中的滿江紅在抗氧化劑 NAC 加入後，其生長繁殖力復原至和對照組相似，在統計上無顯著差異(p=0.058)，此結果說明當滿江紅細胞遭遇銅逆境時會產生大量的過氧化物，當這些過量的過氧化物產量減少或者活性被抑制時，細胞所受到氧化壓力削減而在氧化耐受程度內，滿江紅的生長和繁殖會有提升的現象。



圖三十七 觀察滿江紅在消除氧化壓力的 CuSO_{4(aq)}中的生長繁殖情形。(A)對照組，(B) 100 µM Cu²⁺，(C) 100 µM Cu²⁺ +NAC，(D) 500 µM Cu²⁺，(E) 500 µM Cu²⁺ +NAC。



圖三十八 滿江紅在加入NAC消除氧化壓力的繁殖速度

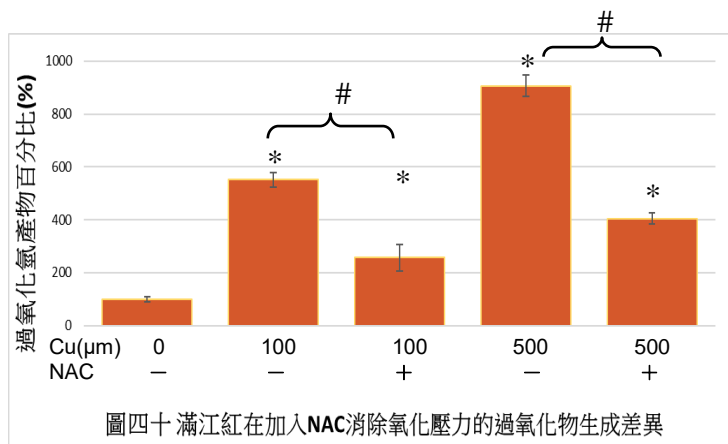


圖三十九 滿江紅在加入NAC消除氧化壓力的生物量差異

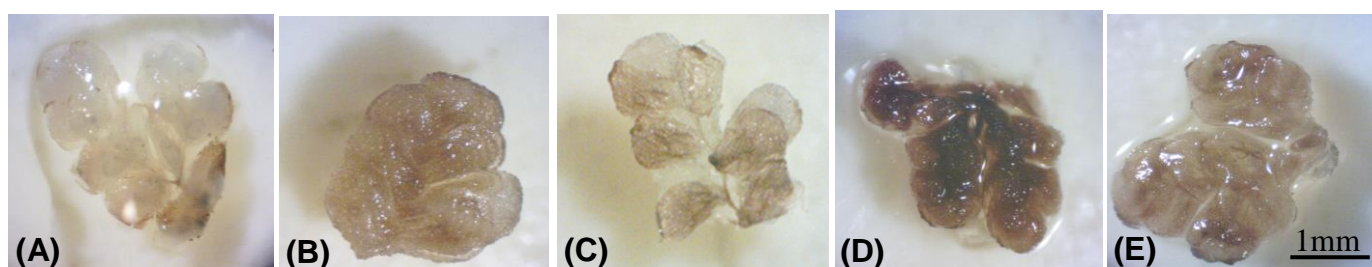
(* :p<.05, 與對照組相比
:p<.05, 與加入 NAC 前後)

(三) 滿江紅在消除氧化壓力的CuSO_{4(aq)}中氧化產物的含量差異

滿江紅在吸收游離銅的同時又以抗氧化劑處理，細胞內的氧化產物顯著降低(圖四十)。尤其滿江紅在高濃度銅溶液中，原本細胞內大量產生過氧化氫，因為加入 **NAC** 降低氧化壓力，我們利用 **DAB** 染色細胞也清楚看到葉子顏色變淡(圖四十一)。綜合實驗結果證實高濃度銅離子造成滿江紅變褐、白化，葉綠素分解，是因為細胞產生大量的 H₂O₂，當 H₂O₂ 生成量減少，細胞內構造受傷的程度降低，滿江紅恢復生長繁殖。



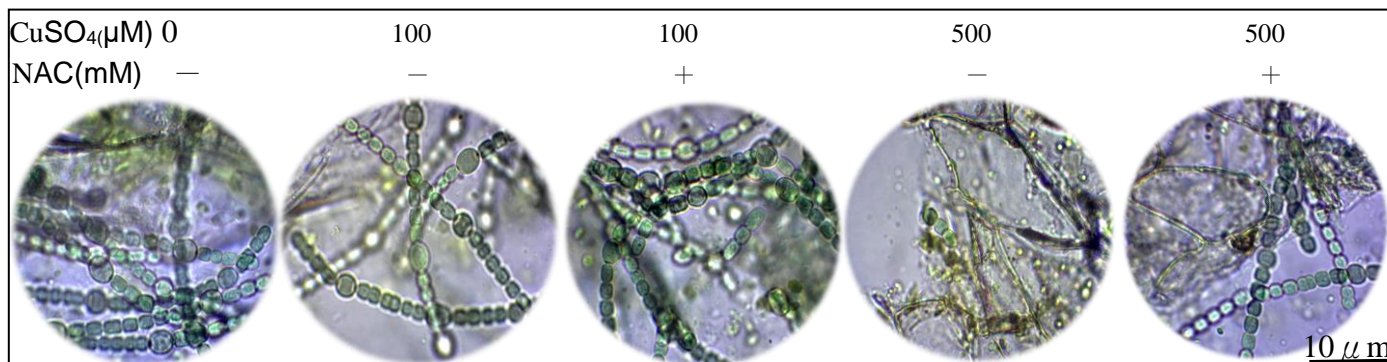
(* :p< .05, 與對照組相比
#:p< .05, 與未加入 NAC 前後)



圖四十一 觀察滿江紅在消除氧化壓力的 CuSO_{4(aq)}中體內過氧化氫產量表現 (A)對照組, (B) 100 μM Cu²⁺, (C) 100μM Cu²⁺ +NAC, (D) 500μM Cu²⁺, (E) 500μM Cu²⁺ +NAC。

(四) 和滿江紅共生的固氮菌在消除氧化壓力的CuSO_{4(aq)}中的存活狀態：

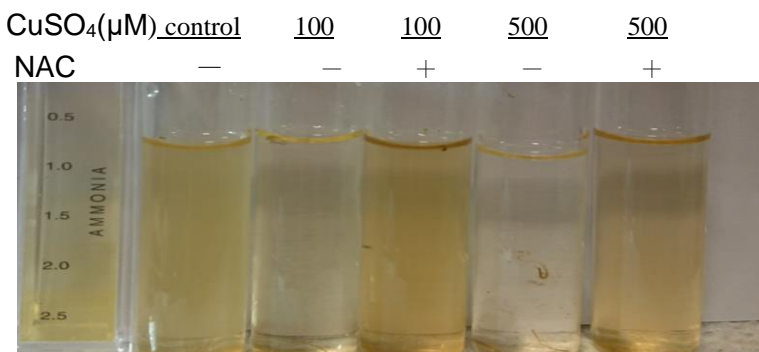
在銅逆境中，和滿江紅共生之藍菌的形態和數量明顯改變，在500 μM CuSO₄以零星、短鏈形態出現，但加入**NAC**消除氧化壓力後，滿江紅葉內空腔共生藍菌的數量明顯回復，且以長鏈形態聚集(圖四十二)，此結果說明滿江紅面對銅逆境時，其共生藍菌在氧化壓力耐受程度內，仍會以長鏈形態聚集、存活。



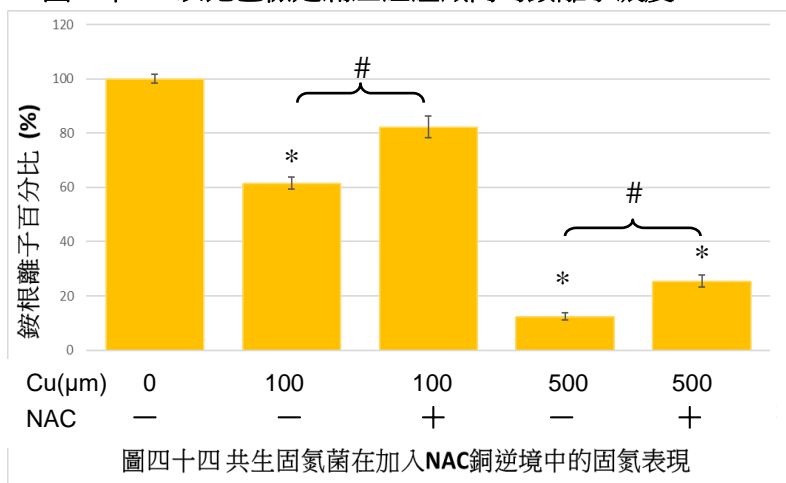
圖四十二 觀察和滿江紅共生的固氮菌在消除氧化壓力下的存活表現。(A)對照組, (B) 100μM Cu²⁺, (C) 100μM Cu²⁺ +NAC, (D) 500μM Cu²⁺, (E) 500μM Cu²⁺ +NAC。

(五)和滿江紅共生的固氮菌在消除氧化壓力的CuSO_{4(aq)}中固氮能力的改變：

滿江紅在金屬銅逆境中產生的氧化壓力影響共生藍綠菌的固氮能力，當我們以抗氧化劑 **NAC** 減輕氧化壓力，我們好奇滿江紅共生系統中的藍菌的固氮能力是否可以恢復。我們以銨離子比色測試固氮產物的含量(圖四十三)，結果發現 **100μM** 硫酸銅處理的滿江紅，在加入 **NAC** 後，固氮產物濃度提高了 **30%**；**500μM** 硫酸銅中的滿江紅因為加入 **NAC** 削弱氧化壓力，共生系統內的藍菌的固氮表現更有明顯提升現象，固氮產物銨離子濃度提高了一倍(圖四十四)。



圖四十三 以比色檢定滿江紅組織內的銨離子濃度。



圖四十四 共生固氮菌在加入**NAC**銅逆境中的固氮表現

(*:p< .05, 與對照組相比
#:p< .05, 與未加入 NAC 相比)

陸、討論

一、以滿江紅為實驗材料，期為綠色能源的好選擇：

滿江紅在一億年前現身地球，5600 萬年前曾拯救地球於熱浪之災，1000 年前亞洲稻農將之引入水田，成為最佳綠肥。滿江紅是水生蕨類與固氮藍綠菌的共生體，絲狀藍綠菌(*Anabaena azollae*)生長在蕨葉內的特化腔室中，因已丟失了一些基因，離開了宿主就不能獨立存活，如此特殊的密切共生關係，在植物界罕見，也被生技界相中，若能將之複製到各種作物中，農業就可以擺脫昂貴又耗能的化學氮肥，也可能是生質能源的好選擇(李家維,2016)。近年來由於能源危機，化學氮肥之製作成本大為提高，利用天然綠肥來減少化學氮肥使用的研究甚多，滿江紅和藍綠菌共生，具有高固氮能力，可與水稻共作，不受土地限制影響，利用滿江紅、固氮藍綠菌來減少水田化學氮肥使用量，研究估計滿江紅生長 35 天的固氮量約 35kg/ha，46 天的固氮量約為 93kg/ha(李啟章,1981)，我們的實驗也測試滿江紅的固氮產物，由結果得知銨離子濃度約在 10~20ppm，滿江紅可以作為非常好的水田綠肥。

我們實驗結果發現滿江紅生長與增殖速度非常快，在培養箱生長兩星期內鮮重往往可增加為原來的 10~15 倍，而且長滿水面的滿江紅能繼續以疊層的方式增殖，文獻指出在溫室培養估計疊層數在 45 天後為 4 層左右，在田間估計在 5~6 層之間。由於滿江紅生長迅速疊層水面，對大部分水田雜草具有抑制的作用，其防治雜草的效果與除草劑相似(李啟章,1981)，所以滿江紅與水稻共作長滿水面時，可以抑制雜草的生長，作為水田雜草的生物防治，加上滿江紅的高氮量、高生長率及高疊層數，相信滿江紅可以成為一種綠色新能源，在可見的未來具有前瞻性經濟價值。

二、滿江紅對重金屬銅具有耐受性，期有植物復育的功能角色：

世界上大部分的工業國家，有許多農地及河川下游土地都受到嚴重的重金屬污染，例如英國有發現二十萬處受重金屬污染的場址，美國政府更估計需要花費七十一億美金，才可能清除國內所有受重金屬污染的土地。同時在台灣地區最著名的是桃園市觀音區大潭村及蘆竹區中福村的鎘米污染事件，這兩個案例都是化學工廠不當排放含鉛及鎘的廢水，造成約一百一十公頃的農田受污染。農田土壤一旦遭受重金屬污染，會嚴重危害作物的生長，如生長在含有鎘污染土壤中的水稻秧苗，生長明顯受到抑制，同時使稻米累積過量重金屬，也會危害人體健康(葉顯銘等,2004)。

自然界中植物種類相當繁多歧異，有研究學者發現一種十字花科的植物(*Thlaspi caerulescens*)可以適應含鋅量相當高的土地(Brown et al.,2014)，也有文獻指出另一種可以蓄積大量鎳的十字花科植物(*Alyssum bertolonii*) (Robinson et al.,1997)。這些可以生長在富含重金屬地區的植物，似乎已經演化出抵抗重金屬的能力，而且似乎不同種類的植物，個別對特定重金屬具抵抗性及累積性，可能是處於環境壓力下所產生的生態生理適應現象。我們的實驗發現滿江紅對於不同重金屬有不同的耐受程度，其中對銅的忍受濃度最高，滿江紅在重金屬銅環境中會繼續生長繁殖，隨著銅離子濃度的提高，滿江紅葉片由綠轉紅，可能透過大量花青素生成，以抗氧

化方式對抗逆境。研究學者 **El- Shahat R. Mohamed** 指出滿江紅對於工業廢水中的重金屬移除能力，以銅的去除效率最高，鎘的移除效果最低，這些結果似乎從側面表示滿江紅具有淨化汗水中重金屬的效果，可以作為植物復育(**phytoremediation**)的角色，以有效、環保和低成本方式處理汗水。

三、滿江紅在面臨銅逆境的氧化壓力時對固氮能力的衝擊：

許多重金屬（如銅、鋅、鐵、錳、鎳及鈷等）在植物生長及發育過程中扮演了相當重要的角色，例如鋅在多種酵素中扮演輔助因子，可以影響酵素活性的高低，在缺乏鋅的培養環境中會造成植物黃化等病徵；而銅在植物體內所扮演的角色，除了是酵素輔助因子外，也是呼吸及光合作用中電子傳遞蛋白質的輔助元素。但是一旦植物吸收過量的重金屬，可能造成毒害，高濃度的銅可以在短時間內造成植物根部細胞死亡，其原因主要是高濃度重金屬會刺激細胞，產生活性氧族及自由基，使得細胞處於氧化逆境，進而抑制植物的生長(**葉顯銘等,2004**)。

我們實驗結果發現滿江紅暴露在金屬銅逆境中會產生過氧化氫產物，而且因為銅濃度的增加，滿江紅葉子細胞會累積大量過氧化物，文獻指出植物在正常生長狀況下，細胞中活性氧化物的產生量很低(在葉綠體中的產生速率為 $240 \mu\text{M s}^{-1}$ ， H_2O_2 到達平衡的濃度為 $0.5 \mu\text{M}$)，逆境會促使高濃度之活性氧化物產生(高達 $240\text{-}720 \mu\text{M s}^{-1}$ ， H_2O_2 為 $5\text{-}15 \mu\text{M s}^{-1}$)，包括乾旱、鹽害、寒害、熱休克、重金屬、紫外光、 O_3 及 SO_2 等空氣污染、機械傷害、營養失調、病原菌攻擊及光害等逆境，均會造成活性氧化物的過量產生，活性氧化物包含了次氯酸、超氧陰離子、過氧化氫等等，這些物質會在細胞中氧化細胞膜、蛋白質、脂肪酸.....，抑制酵素活性，破壞 DNA 和 RNA，進而影響植物生長，導致細胞死亡。(蔣永正,2011；Hossain et al.,2015)

我們的實驗結果發現滿江紅細胞內過氧化氫提高的同時，可能因為細胞內大量花青素，使葉子由綠轉成紅色，研究學者也發現植物受到逆境壓力自體產生花青素來增加體內抗氧化的能力，因為花青素具有抗氧化功能，可以清除細胞內活性氧化物，另外花青素也是一種強力的重金屬螯合物，可以和重金屬結合以降低重金屬對細胞的危害(Hossain et al.,2015)。植物在逆境期間促使活性氧化物產生，雖然對細胞造成威脅，似乎也具有啟動逆境防禦系統的訊息傳導功能，活性氧化物是細胞逆境的監測指標，其在細胞內的含量需要嚴格控制，因為在本身有毒但又具有參與訊息傳導功能的雙重角色下，需有適合之機制來調控細胞內的濃度。這些重金屬性植物除了能夠微調活性氧化物至低量以達到訊息傳導的目的，又能夠將超量之活性氧化物解毒，以達成生物在逆境中求存活的目的。我們由實驗結果和文獻進行推測，滿江紅在銅逆境中因為產生過氧化氫，使葉子細胞的花青素大量形成，產生抗氧化保護機轉，使滿江紅得以對銅產生耐受性。我們以抗氧化劑 **NAC** 進行試驗發現，滿江紅在金屬銅環境因為氧化壓力減弱，使葉片大多維持綠色，花青素的生成降低，滿江紅的生長情形也沒有受到阻礙。但是滿江紅對重金屬銅有一定的耐受程度，氧化逆境誘導細胞局部死亡，且高濃度的銅可能造成氧化壓力超過滿江紅的耐受範圍，使得

滿江紅生長受到抑制，甚至葉綠素、花青素被分解，葉子變黃褐乃至白化。最近研究對「重金屬性植物」(metallophytes)的生存策略可以歸類為以下三種方式：一、防止重金屬進入植物體內，避免重金屬累積在細胞中而造成毒害。二、將重金屬排出細胞外以避免毒害細胞本身，例如日本的奈良科學與技術研究所及日立科學系統公司的研究員發現，菸草可以透過葉片細胞上的絨毛將體內的鎘排除。三、利用某些蛋白質或化學物質直接與重金屬結合，累積在液胞中，進而降低重金屬的負面影響(葉顯銘等,2004)。

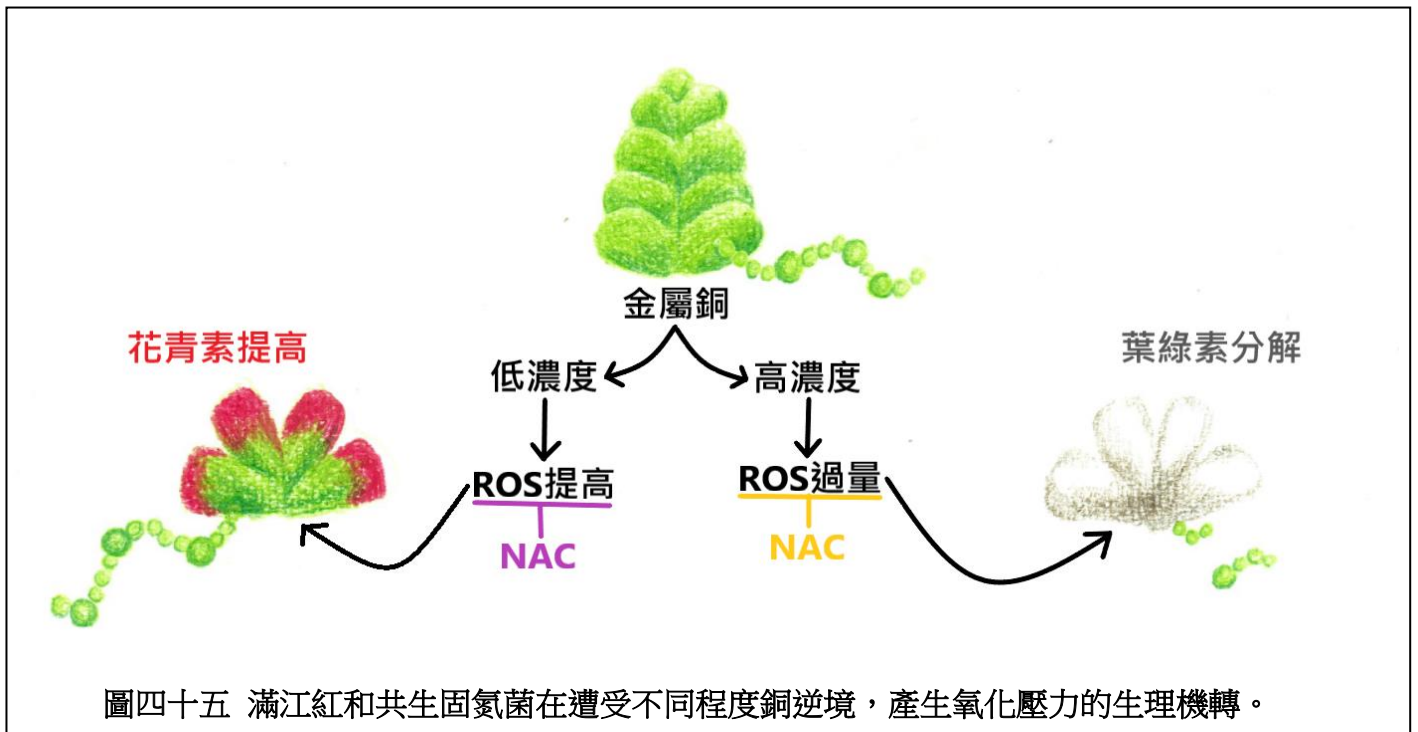
和滿江紅共生的固氮菌進行固氮作用產生銨離子，提供植物氮源，可以幫助作物的生長，我們好奇當水質、土壤受到重金屬汙染，是否會影響固氮菌的固氮表現。我們發現在滿江紅在銅的耐受程度(200 μ M)下，雖然遭遇氧化逆境，其共生藍菌仍具有固氮能力。研究文獻指出儘管土壤重金屬汙染很嚴重，仍有不少種類的固氮微生物及其共生體系仍能在高濃度的重金屬離子環境中生長。例如和大葉相思共生的根瘤菌對重金屬鋅有強耐受性，可以忍受<10.0 mM 濃度，固氮酶仍有活性進行固氮作用(申進玲,2006；Shafi et al.,2015)。國外有許多文獻關於重金屬對不同豆科植物如苜蓿、三葉草以及豌豆等與根瘤菌共生固氮影響的研究，但對共生固氮根瘤菌如何對抗重金屬的研究仍不很成熟，有待篩選出一批抗重金屬能力強的固氮菌及其共生體系。

四、未來展望：

本實驗結果發現滿江紅在銅逆境中，細胞會產生過氧化氫以適應逆境，而滿江紅吸收游離銅後啟動過氧化物的生成和轉變的過程，是否和過氧化氫酶的活性調控有關，值得進一步去思考和釐清，我們期此作品作為植生復育基礎研究的參考指標。如果能應用分子生物學將抗重金屬基因轉入固氮菌中，利用生物共生體系便可以方便、快捷、大面積修復土壤重金屬汙染，從而彌補單純由植物修復土壤重金屬汙染的不足，期能為生物修復重金屬汙染的土壤尋找更多的材料。在農林及經濟發展上，共生系統的研究及運用是非常有潛力的，但仍有需要加強及努力的地方，具有綠肥潛能的滿江紅也許在「植生復育」上能發揮重要角色功能，我們期此基礎研究可以應用在重金屬逆境中的植生復育和共生系統，作為一潛力價值用途。

柒、結論

1. 滿江紅在不同種類重金屬溶液中有不等程度的耐受性表現：銅離子 > 鋅離子 > 鉛離子。
2. 滿江紅在金屬銅逆境中，可能透過花青素生成使葉子變紅，和過氧化物生成的訊號傳遞，作為應付銅逆境的生存策略，但是過高濃度的銅濃度仍會造成局部葉子變黃褐，葉綠素被分解使葉子白化死亡。
3. 以抗氧化劑處理高濃度金屬銅中的滿江紅，滿江紅的葉子死亡率降低，新生葉生成速度增加且植株個體繁殖生長有復原的現象。
4. 和滿江紅共生的固氮菌在銅逆境中的固氮產物，隨游離銅或過氧化物濃度的提高而減少，一旦消除氧化壓力，共生藍菌的固氮能力又得以回升。
5. 滿江紅對於金屬銅具有耐受性，且能吸收水質中的銅離子，有效降低水體中的金屬銅濃度，我們期待滿江紅在「植生復育」上能發揮重要功能，且其共生固氮藍菌有助於滿江紅成為水田綠肥，期此基礎研究可以應用於重金屬逆境中的植生復育和共生系統。



捌、參考文獻

1. 李家維(2014)。滿江紅 救地球。科學人. 150 : 6。
2. 李家維(2016)。保種無國界。科學人. 173 : 8。
3. 李啟彰、林錫錦、林家棻 (1981)。水田滿江紅 *Azolla pinnata* 之研究。中華農業研究，第30卷，第4期。
4. 葉顯銘、陳少燕、黃定鼎、黃浩仁 (2004)。清理重金屬汙染的植物，科學發展.380:P44-49。
5. 蔣永正 (2011)。植物對環境逆境之調控與應用，行政院農委會.第231期。
6. 簡宣裕、林錫錦、李啟彰 (1994)。滿江紅與固氮藍綠藻之研究，微生物肥料之開發與利用研討會專刊, 71-82。
7. Brown, S.L., Chancy, R.L., Angel, J.S., and Baker. A.J.M. (1994) **Phytoremediation Potential of *Thlaspi caerulescens* and Bladder Campion for Zinc- and Cadmium- Contaminated Soil.** *J. Environ. Qual.*, 23: 1151-1157。
8. Hossain, M. A., Bhattacharjee, S., Armin, S. M., Qian, P., Xin, W., Li, H. Y., Burritt, D. J., Fujita, M., and Tran, L. S. P. (2015) **Hydrogen peroxide priming modulates abiotic oxidative stress tolerance: insights from ROS detoxification and scavenging.** *Frontiers in Plant Science*, Vol. 6.
9. Nordiah B., Harah, Z.M., Sidik B. J., and Hazma, W. N. W. (2012) ***Azolla pinnate* Growth Performance in Different Water Sources.** *Pak. J. Biol.Sci.*, 15(13): 621-628。
10. Shafi, N., Pandit, A. K., Kamili, A. N., and Mushtaq, B. (2015) **Heavy Metal Accumulation by *Azolla pinnata* of Dal Lake Ecosystem, India.** *Journal of Environment Protection and Sustainable Development*, 1(1) : 8-12.

【評語】 030316

本作品探討滿江紅在銅、鉛、鋅三種金屬離子逆境下的生理表現，並發現銅離子逆境與過氧化氫自由基的產生有關。本研究主題具有鄉土性及實用性，也有初步的具體結果，研究數據能進行適當的統計分析，且記錄詳實，是一件值得鼓勵的作品。

建議除了銅離子逆境之外，也對鉛、鋅二種離子逆境進行劑量分析，以比較滿江紅對不同金屬離子逆境的感受性與與對應機制的差異。

摘要

本實驗探討滿江紅在重金屬銅逆境下所產生的生理適應現象。我們以不同濃度銅處理滿江紅，發現滿江紅可能透過不同程度的花青素生成，藉由抗氧化對銅產生耐受性；同時也發現氧化物生成量具有差異，高濃度的氧化物會造成葉綠素分解。我們進一步以抗氧化劑NAC處理銅逆境中的滿江紅，發現原本葉片因葉綠素分解而白化的程度獲得減緩，我們推測過氧化氫是滿江紅面對銅逆境時，抗氧化系統裡重要的訊號分子。此外，共生固氮藍菌在可耐受銅逆境中，固氮產物沒有顯著減少，而過高濃度的銅會阻礙固氮表現。我們透過滿江紅在重金屬逆境中生存策略的基礎研究，期在植生復育上能具有參考的價值，減緩重金屬污染所造成的環境退化。

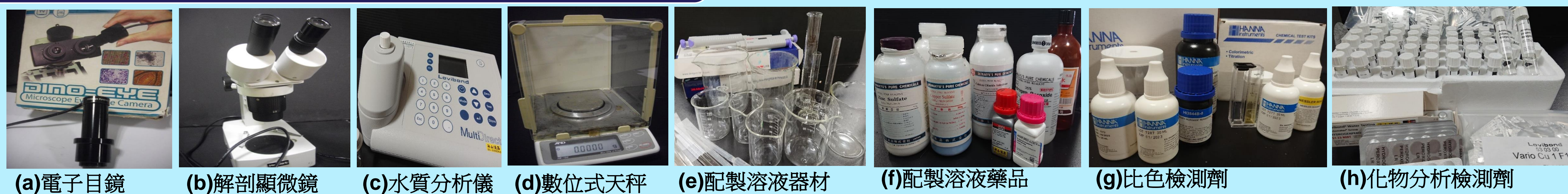
壹、研究動機

在一次生物課時，我們在生態池中發現了紅色葉體的「滿江紅」。我們查閱文獻得知，這種小型的水生蕨類與固氮念珠藍綠菌(*Anabaena azollae*)共生，具有極強的固氮能力，植株生長非常迅速，可以作為綠肥、生質燃料等，具有前瞻性的經濟價值。目前水域和土壤的重金屬污染困擾著許多國家，而含有重金屬的農作物更成為令人聞之色變的社會新聞。雖然遭受重金屬污染的土地會嚴重影響植物的生長與生存，但幸運的是自然界中植物的種類相當繁多歧異，並非在受重金屬污染的土地上全然沒有植物生長。我們好奇在重金屬污染的水域中，滿江紅的生理變化和適應的方式，藉以探討滿江紅對重金屬逆境的調適作用，及應用於植生復育之可能性。

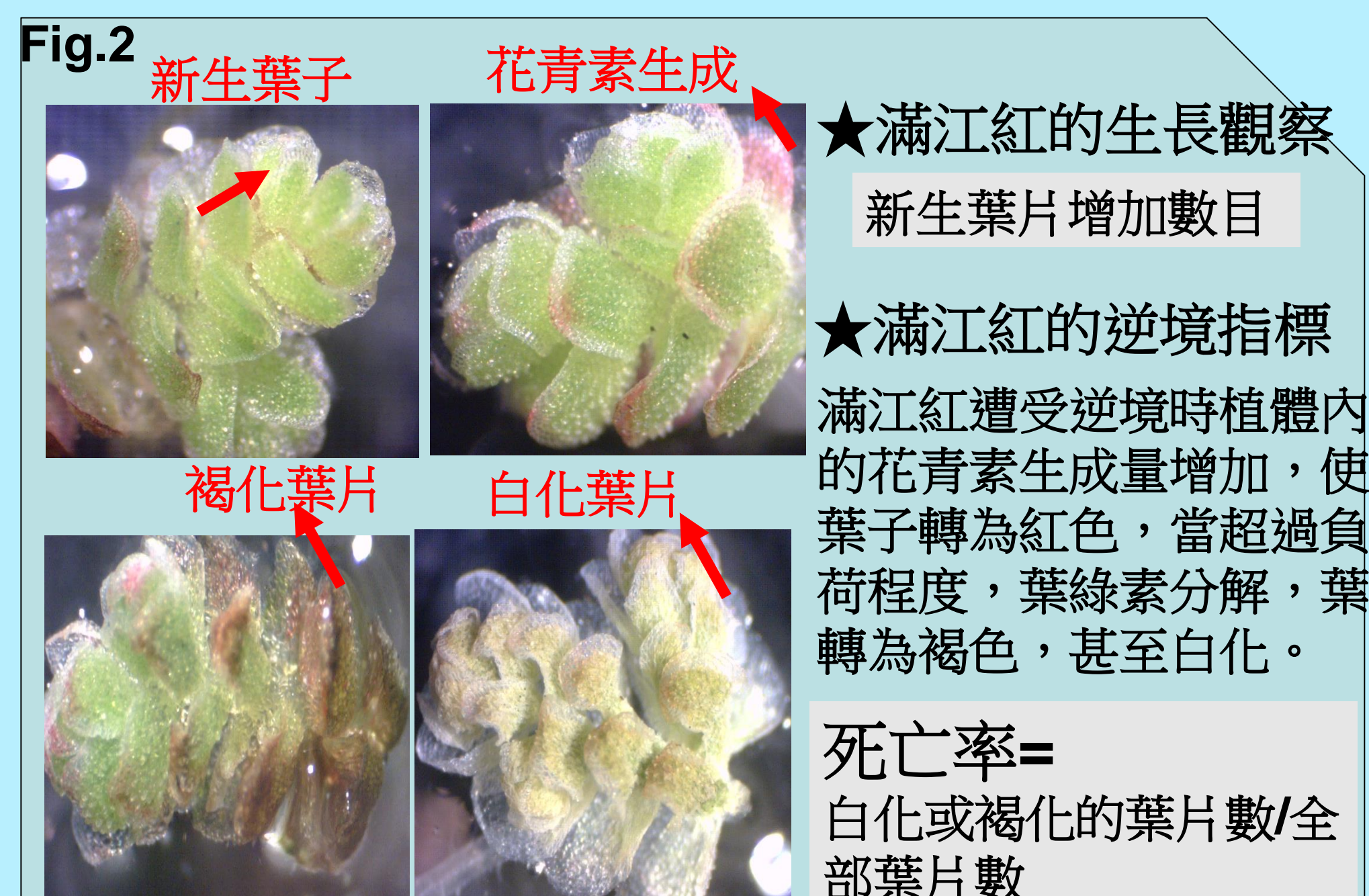
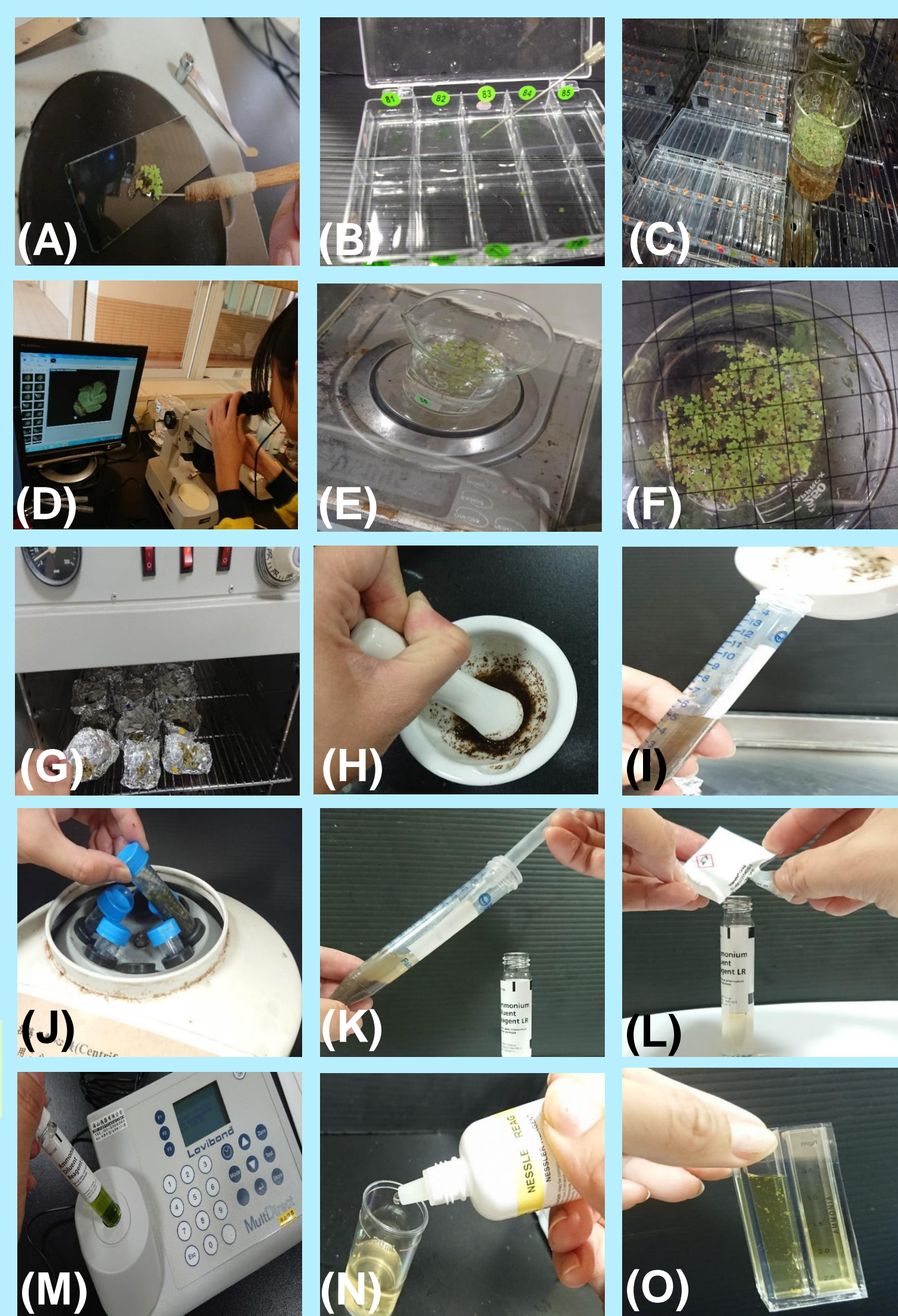
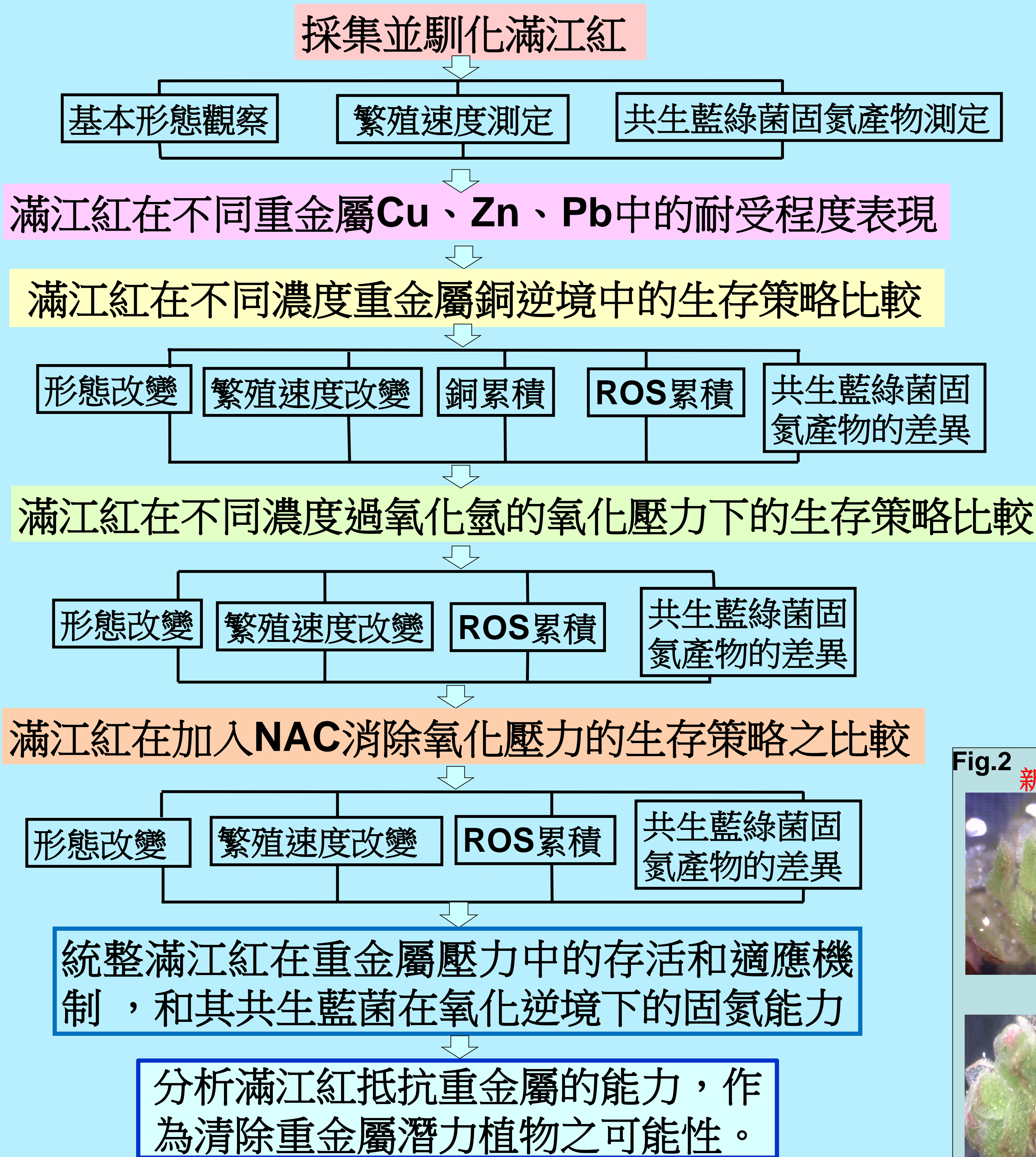
貳、研究目的

- 一、觀察滿江紅的形態、生長和繁殖速度。
- 二、滿江紅在不同重金屬逆境下耐受性的差異，以及在銅金屬中共生固氮菌的固氮能力變化。
- 三、滿江紅在氧化壓力下的生存策略，及共生固氮菌的固氮能力變化。
- 四、在消除氧化壓力下，滿江紅的生存策略和共生固氮菌的固氮能力變化。
- 五、討論滿江紅在重金屬氧化逆境中的生理機制和耐受性，藉以探討滿江紅作為清除重金屬潛力植物的可能性。

參、研究設備與器材



肆、研究過程與方法



滿江紅外部形態和解剖觀察

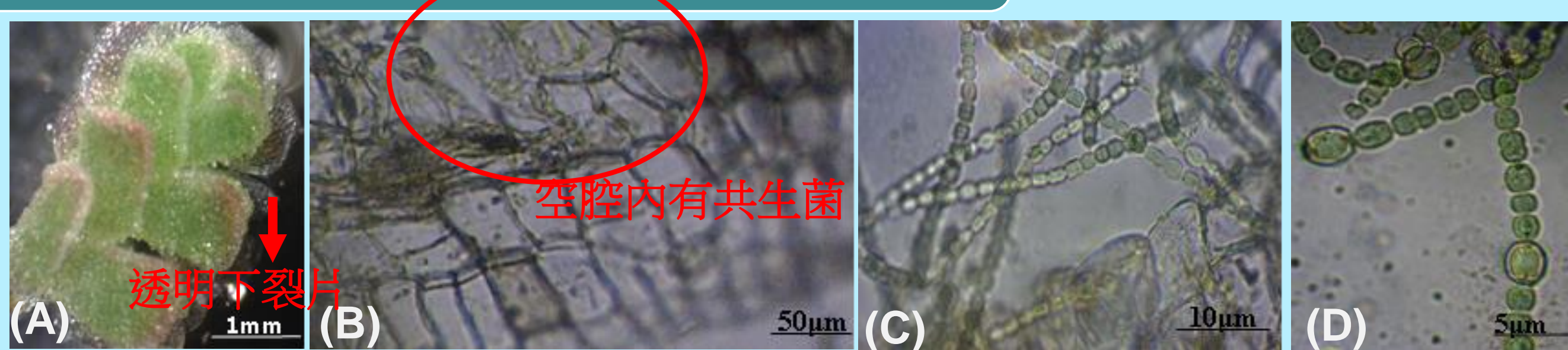


Fig.3 (A)各小葉分裂成上下兩片，下裂片透明。(B)上裂片葉內側有許多黏液空腔，內有共生藍綠菌 (C)穴內的藍綠菌成絲狀聚群。(D)念珠狀藍綠菌具有固氮能力的異形細胞。

滿江紅 (*Azolla japonica*) 是一種水生蕨類植物，葉片細小呈菱形，上裂葉的內側有許多黏液空腔，空腔內有共生的絲狀念珠藍綠菌，其異形細胞具有固氮能力。在逆境時，植物體葉邊緣會開始產生紅色花青素。

伍、實驗結果

一、探討滿江紅在不同重金屬逆境中的耐受程度

(一)滿江紅在重金屬銅溶液中具有高耐受性：

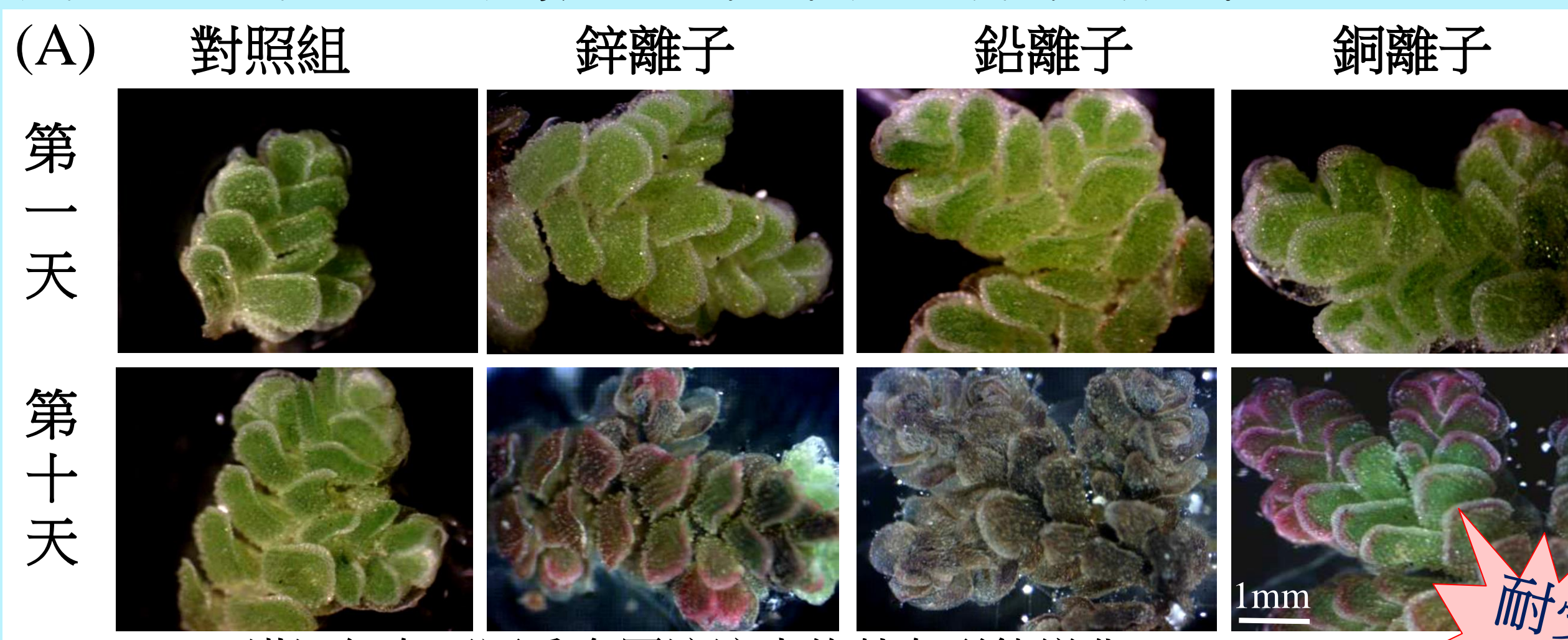


Fig.4 (A) 滿江紅在不同重金屬溶液中的外在形態變化

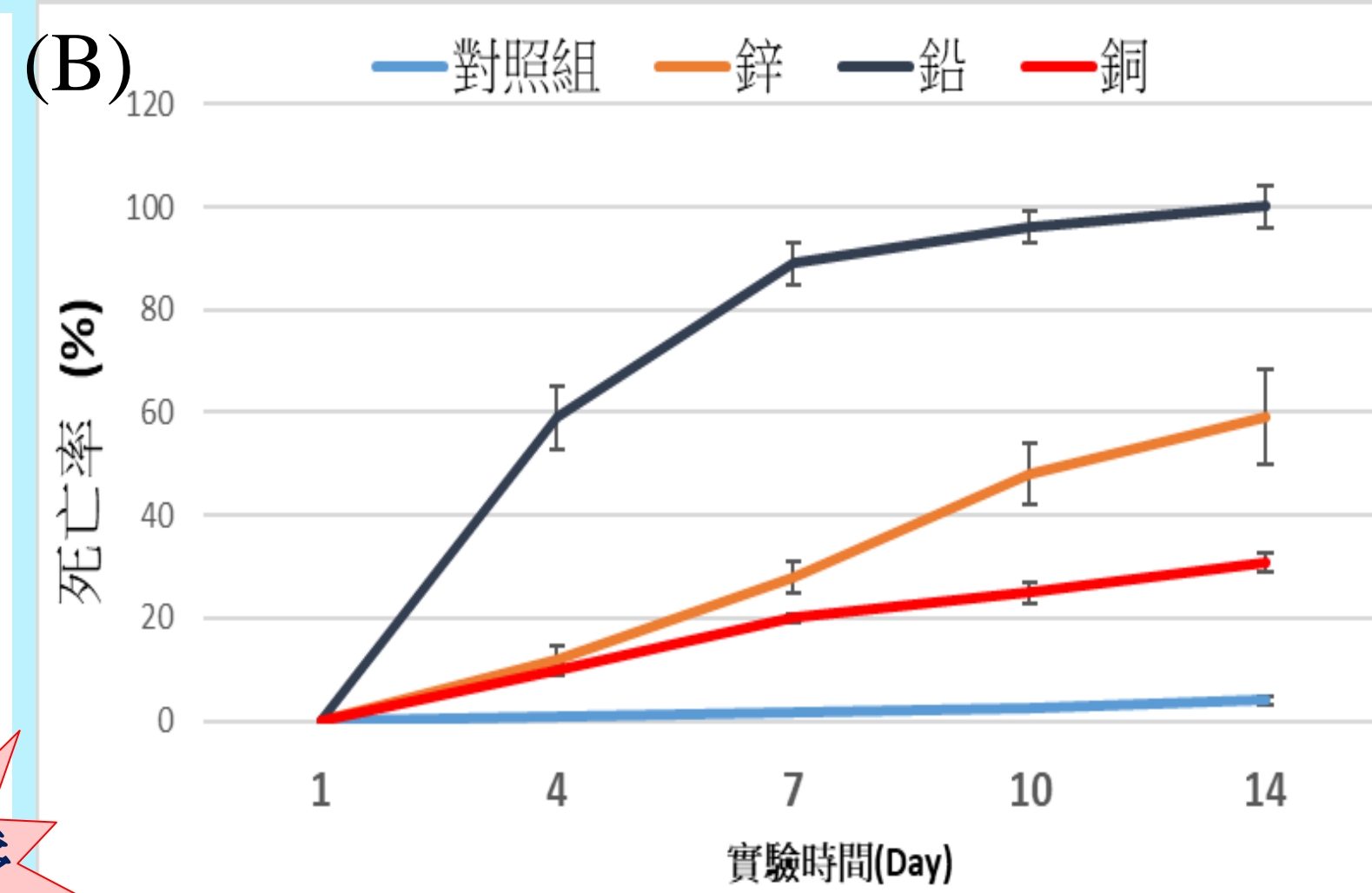


Fig.4 (B) 在不同重金屬中葉子的死亡率

滿江紅在200 μ M(放流水標準10倍以上濃度)的鋅、鉛和銅中出現不同程度的耐受性表現。
Zn、Pb：滿江紅葉綠素嚴重分解，葉片呈現褐色、甚至白化。
Cu：滿江紅呈鮮綠色，唯有葉子邊緣變為紅色，耐受性較Zn、Pb高。

(二)滿江紅在重金屬銅中仍有高繁殖力：

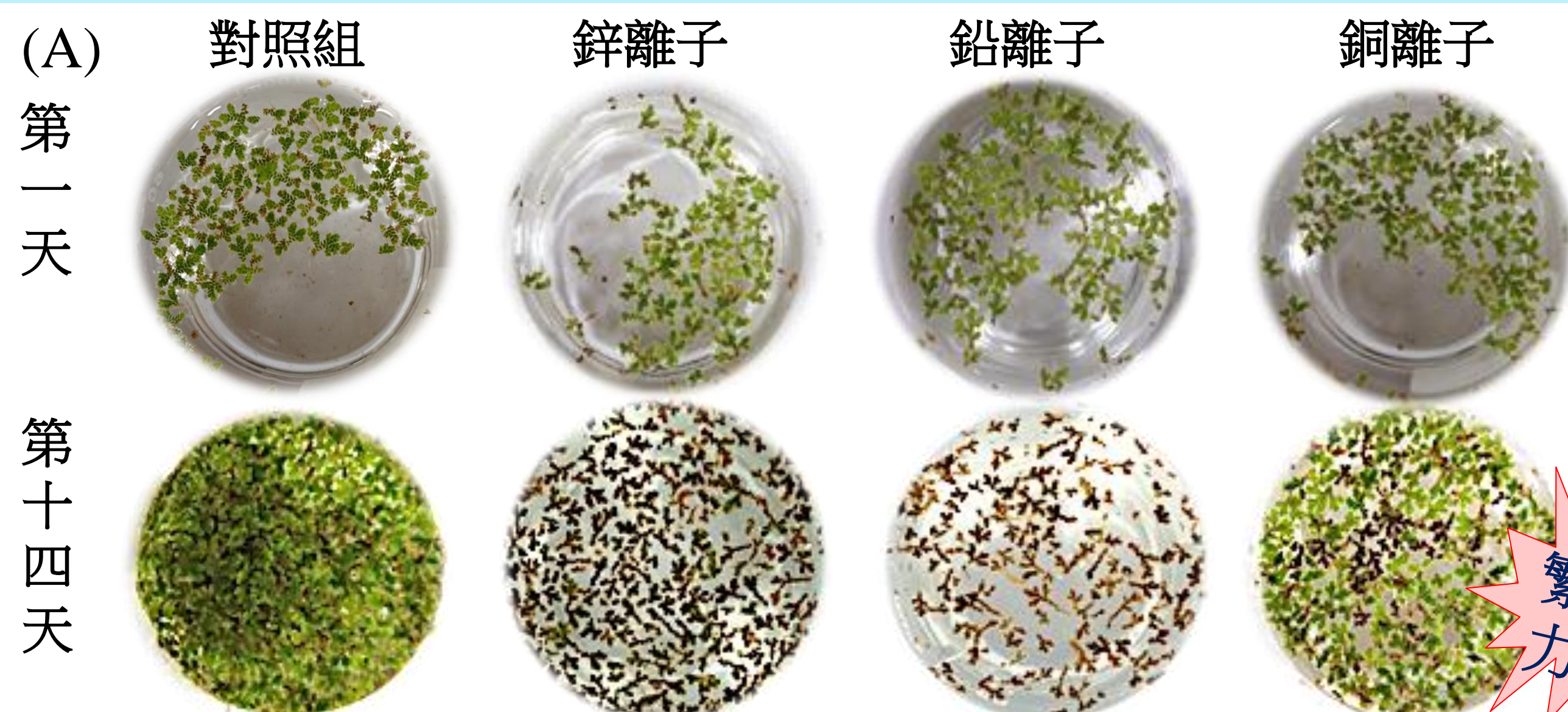
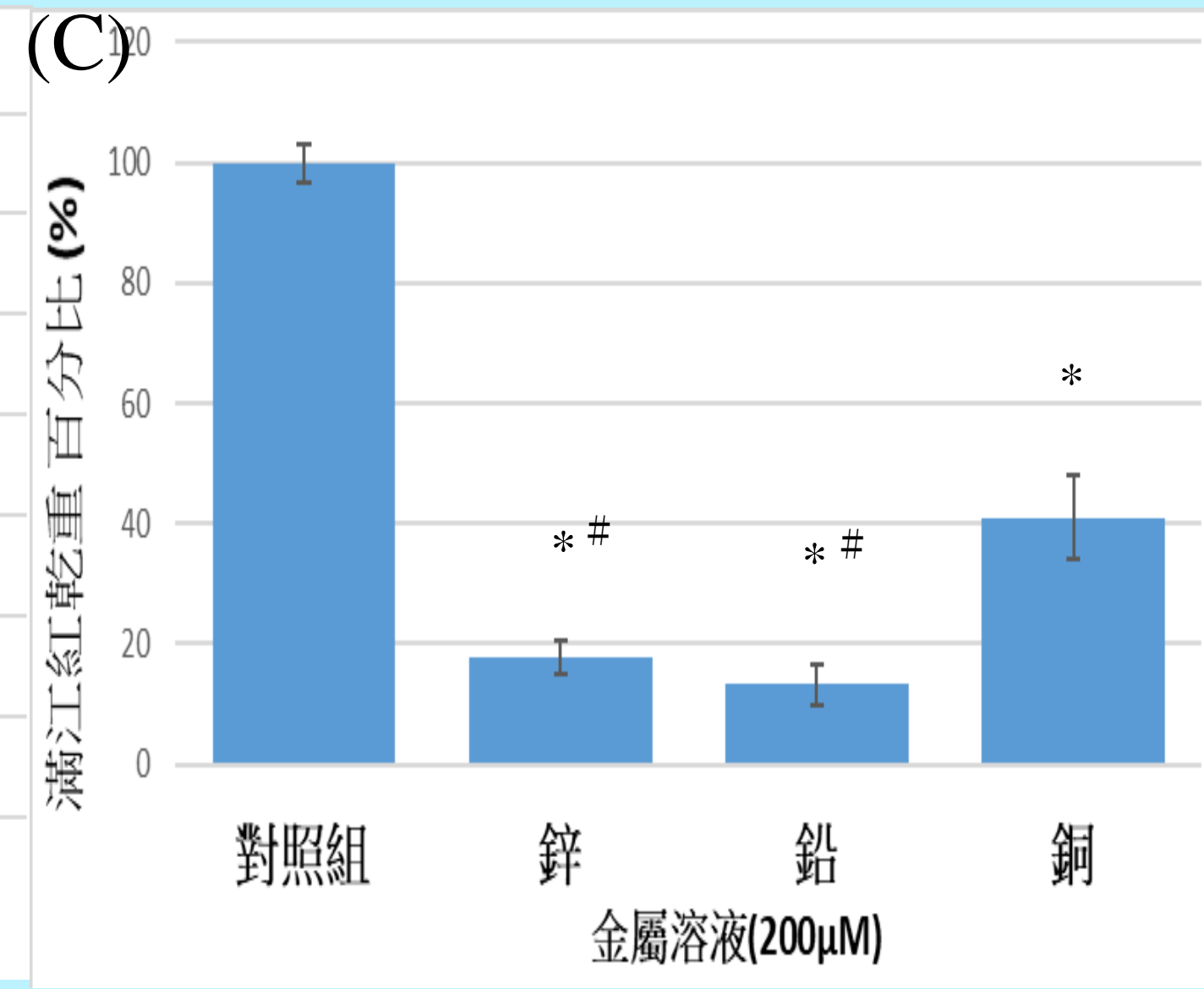
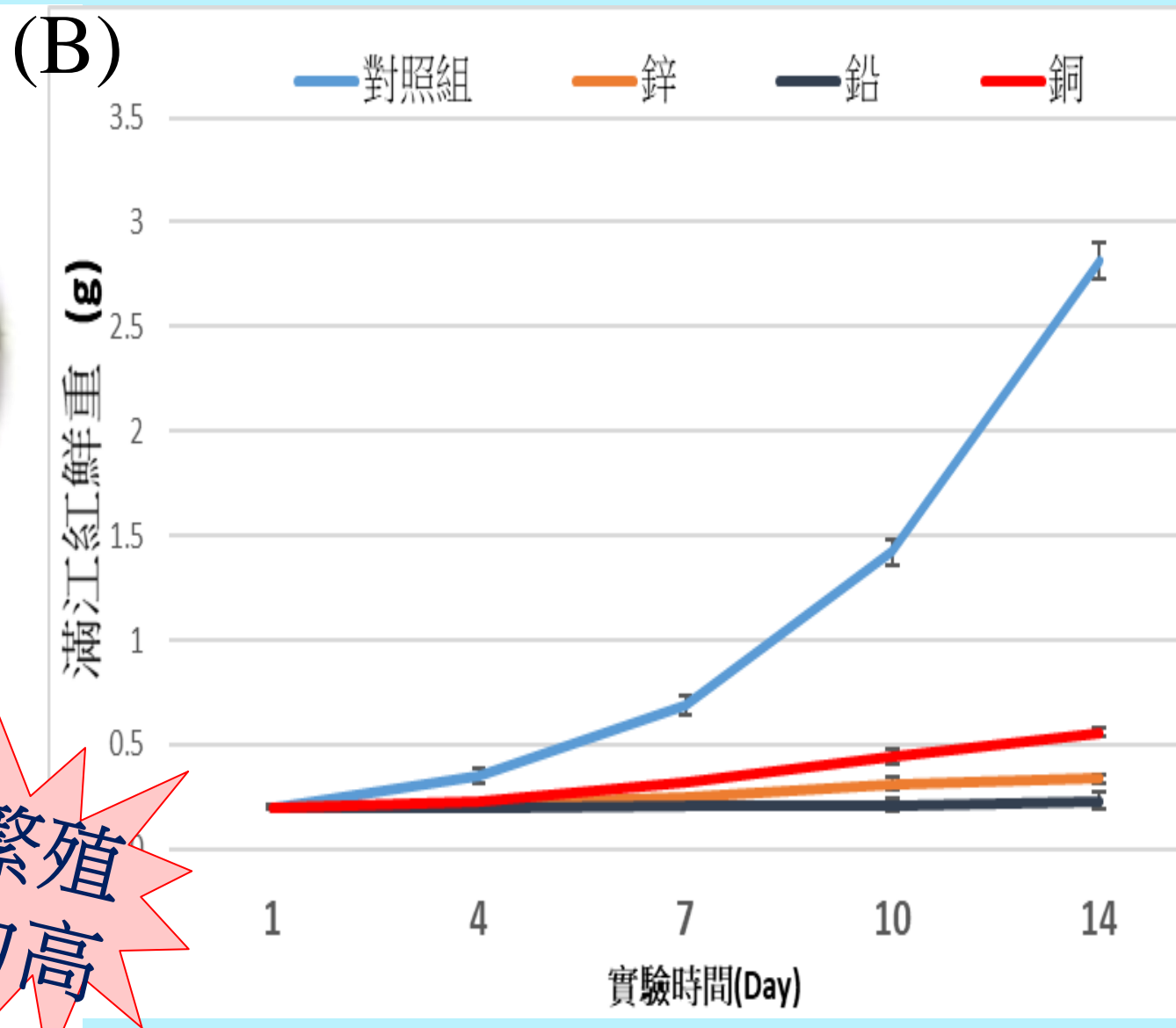


Fig.5 滿江紅在不同重金屬溶液中的 (A)生長繁殖表現 (B)繁殖速度 (C)生物量差異。



(*: p<.05, 與對照組相比; #: p<.05, 與銅相比)

Zn、Pb：滿江紅在鉛中植體由綠轉褐，繁殖速度接近停滯，鮮重無成長；在鋅中的鮮重增加約60%，葉片也轉褐色。
Cu：滿江紅的鮮重為原來的三倍，且生物量明顯高出Zn、Pb數倍，具備相當高的生長繁殖能力。

二、探討滿江紅在金屬銅逆境中的生存適應

(一)滿江紅在可耐受的CuSO_{4(aq)}濃度中累積銅，產生花青素：

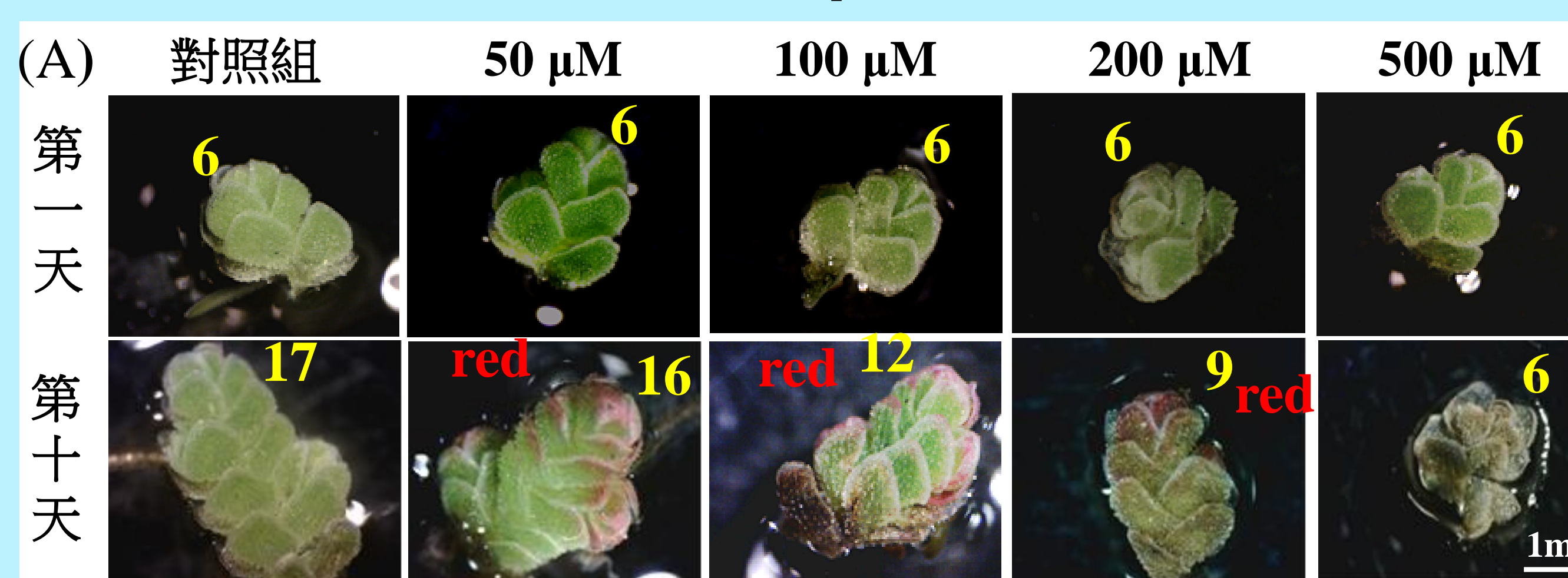
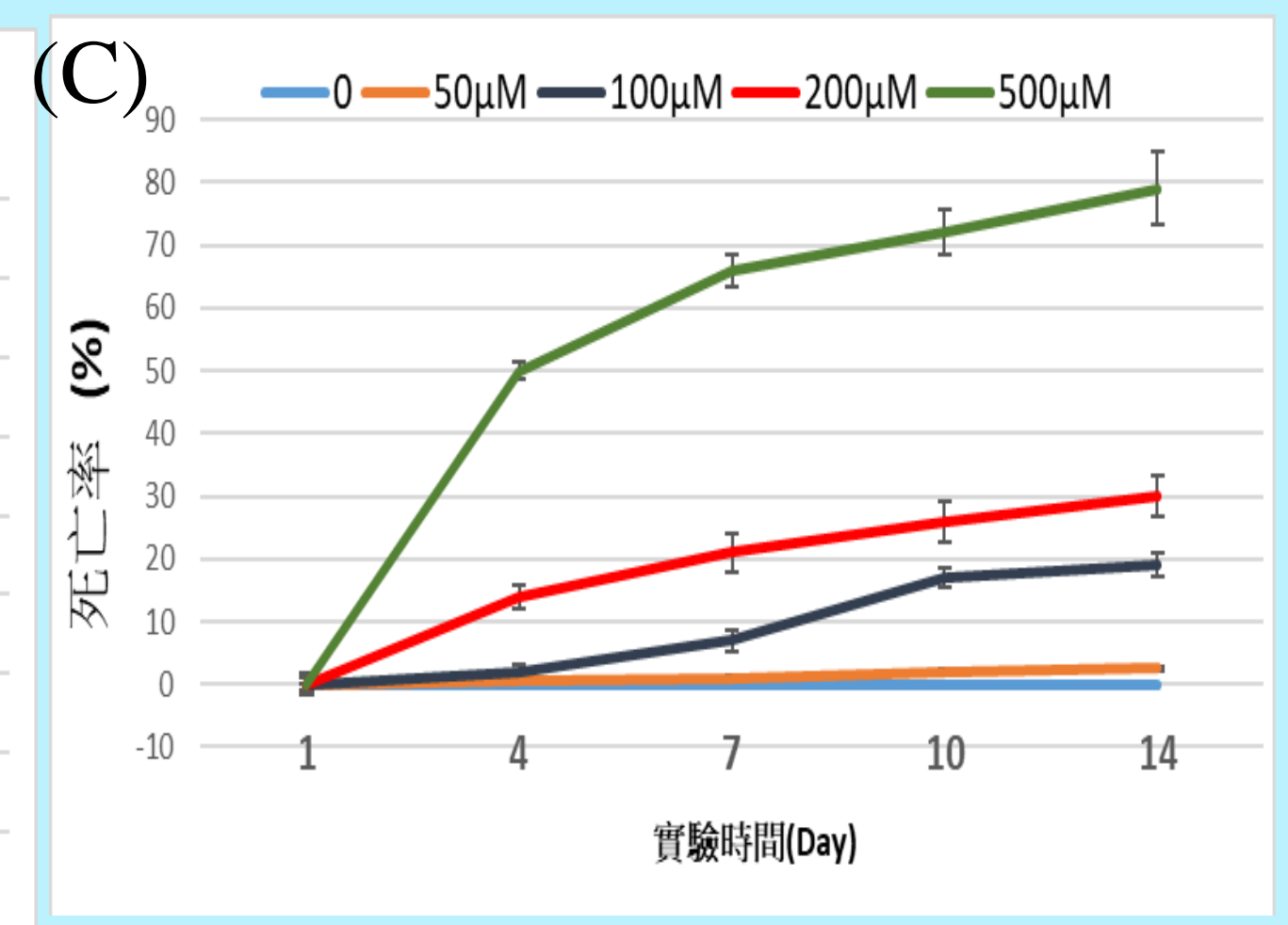
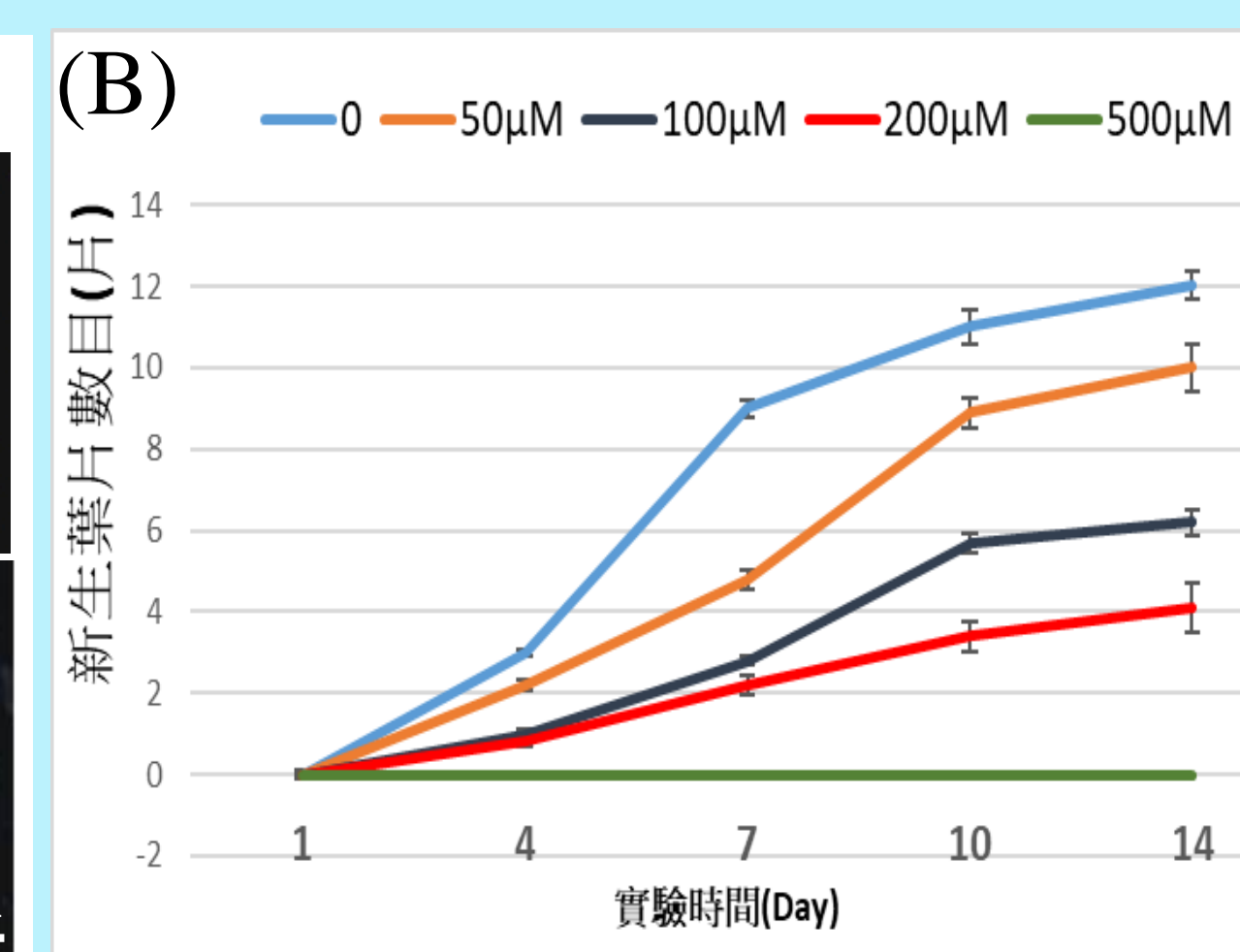


Fig.6 滿江紅在不同濃度銅溶液中的 (A)外在形態變化 (B)新生葉生長情況 (C)葉子的死亡率



低濃度Cu²⁺：滿江紅葉緣生成花青素而逐漸轉為紅色，生存狀況良好；高濃度Cu²⁺：葉綠素分解，葉片轉為灰褐色，植株死亡。

(二)滿江紅在可耐受的CuSO_{4(aq)}濃度中適應繁殖：

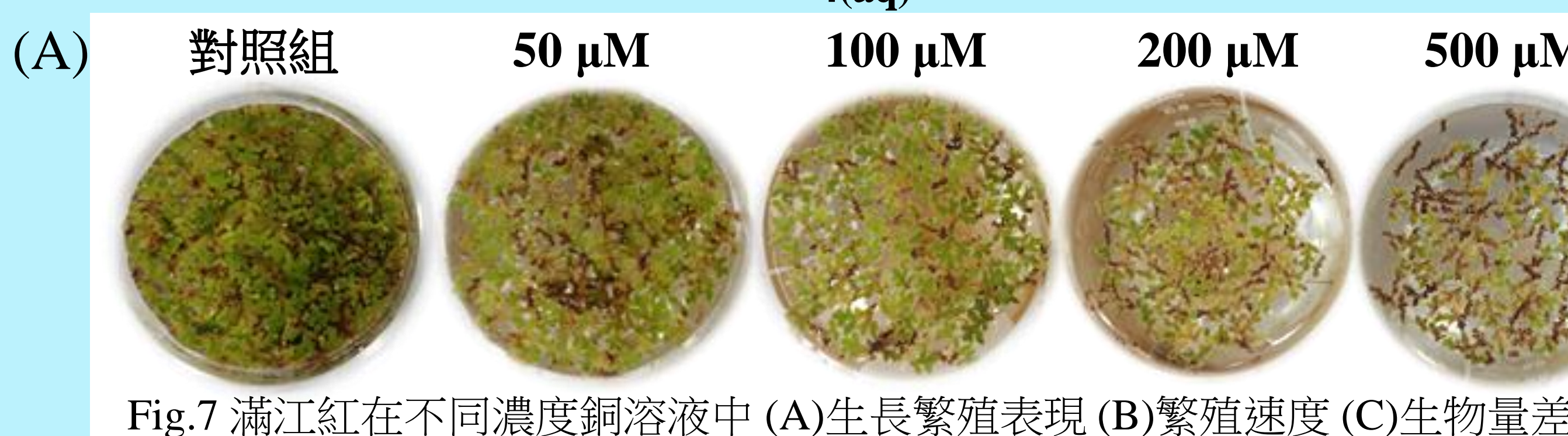
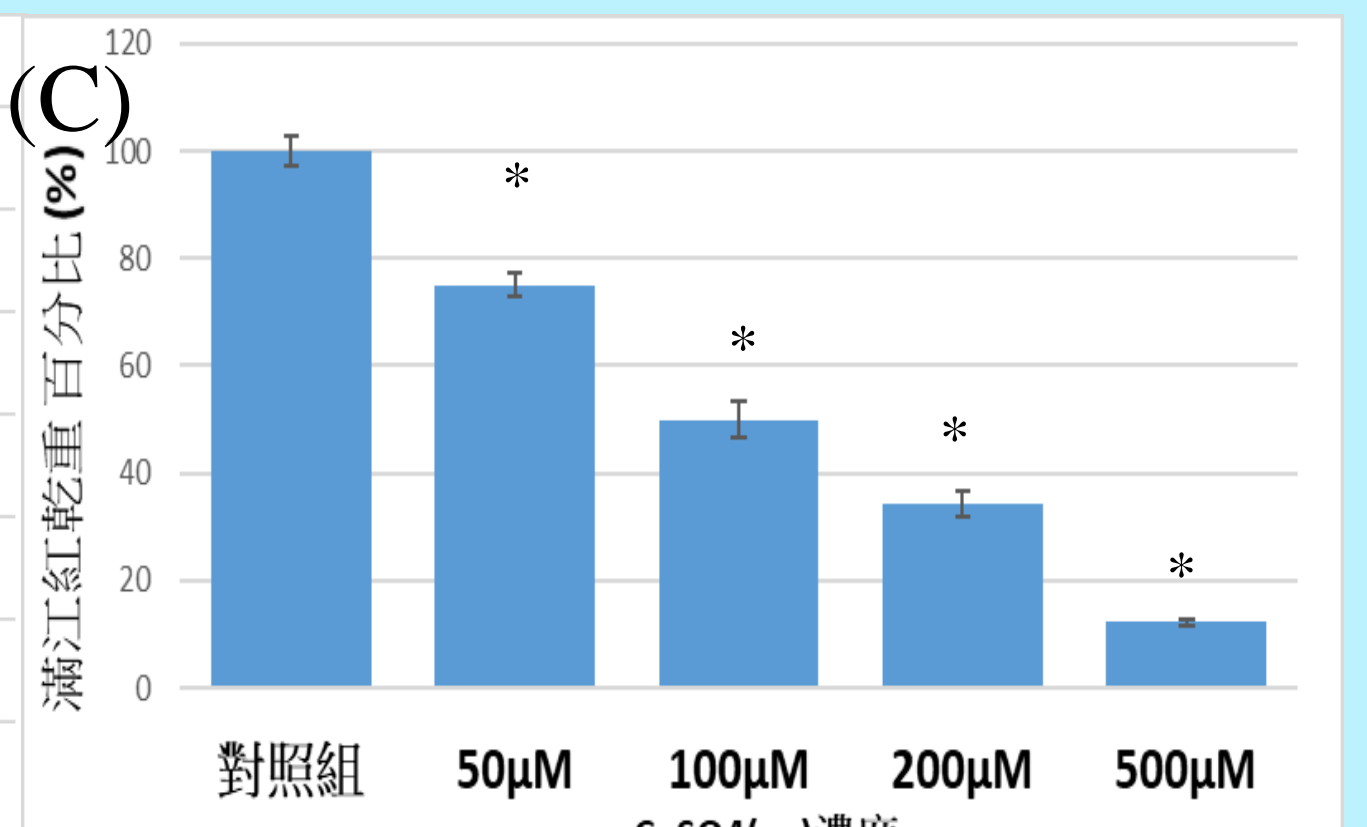
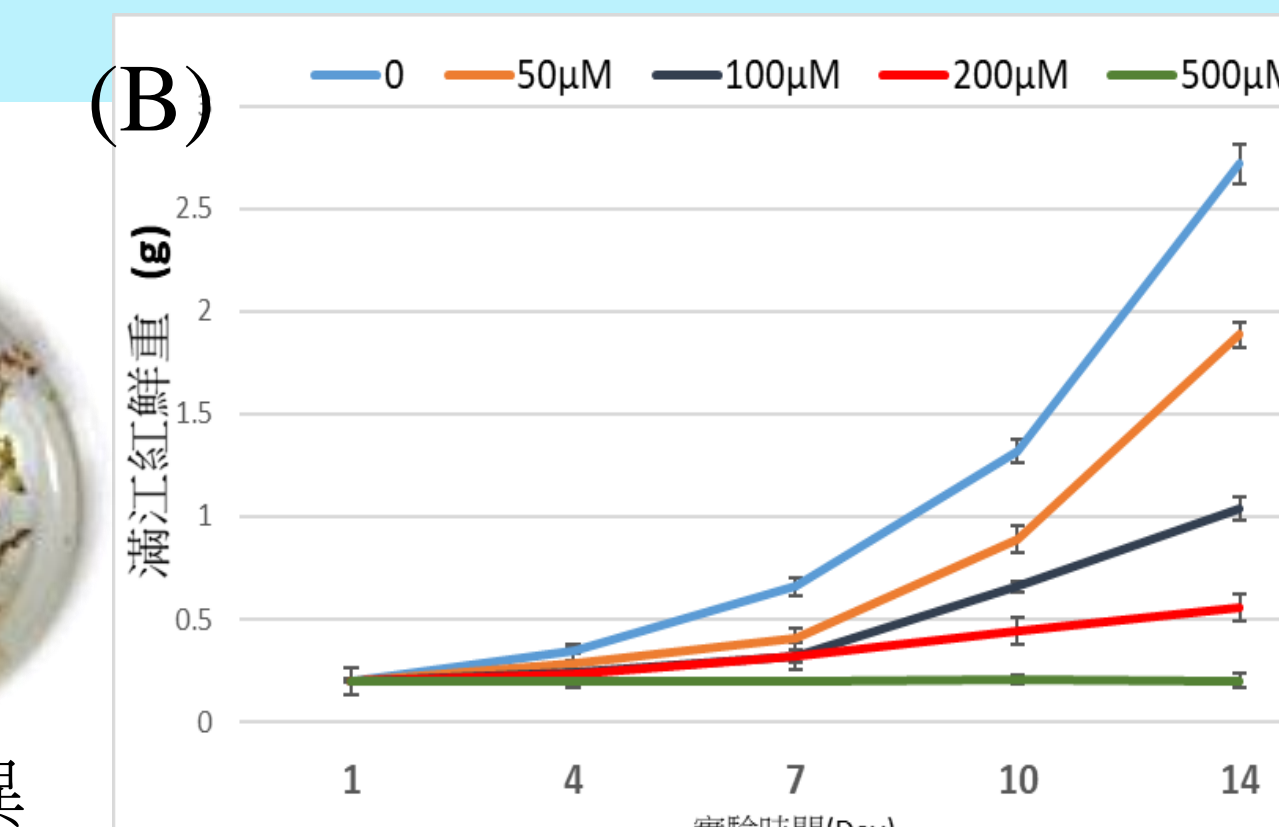


Fig.7 滿江紅在不同濃度銅溶液中 (A)生長繁殖表現 (B)繁殖速度 (C)生物量差異



(*: p<.05, 與對照組相比)

低濃度Cu²⁺：滿江紅鮮重為原本的十倍，生物量是對照組的四分之三，具備一定的生長繁殖能力。
 高濃度Cu²⁺：滿江紅的鮮重完全沒有增加，無繁殖能力。

(三)滿江紅會吸收重金屬游離銅且產生大量過氧化氫：

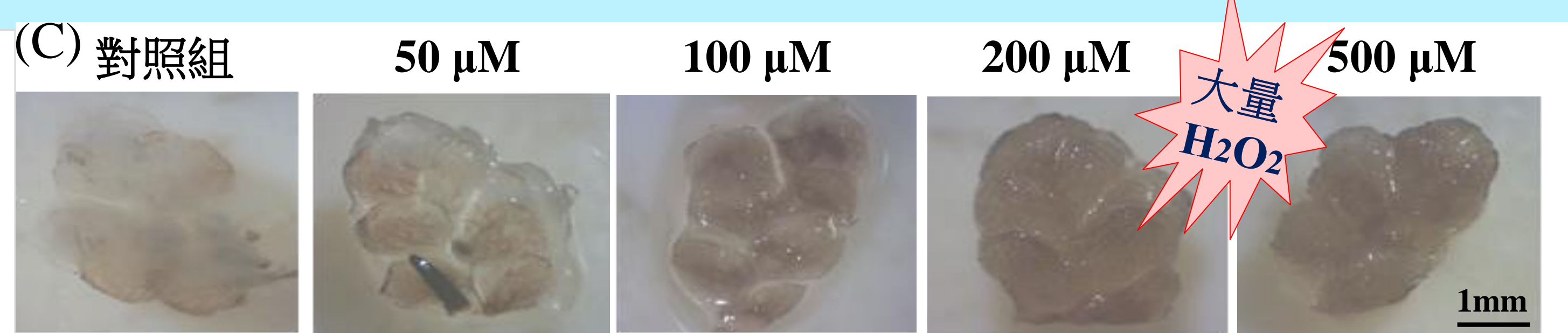
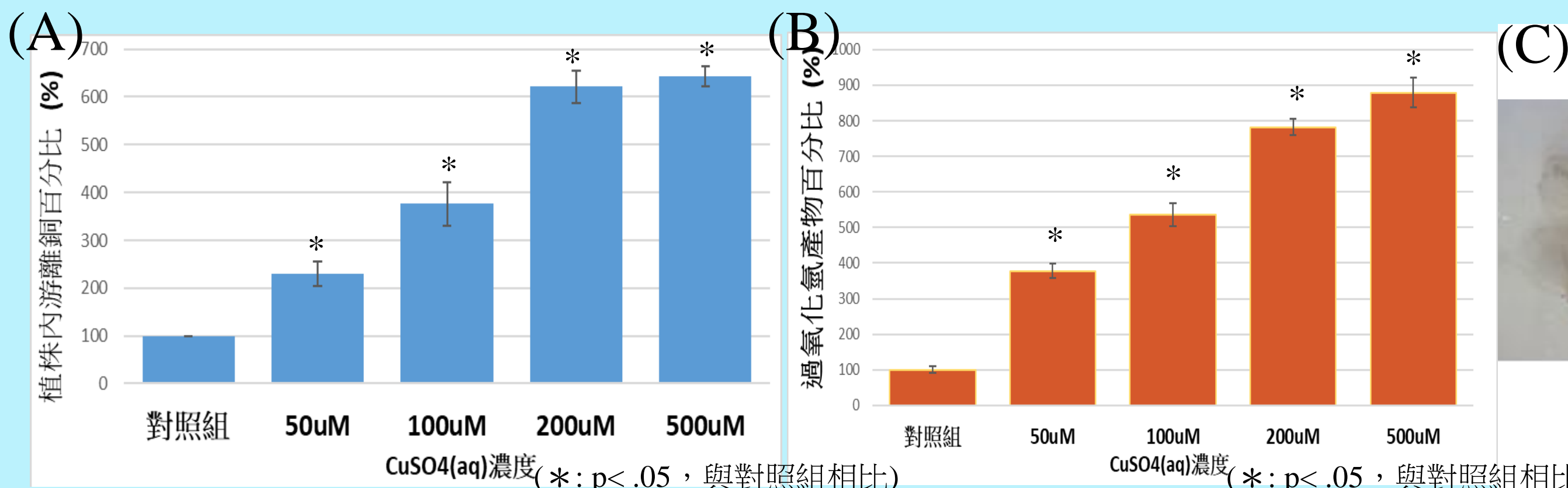


Fig.8 (A)滿江紅植株內游離銅濃度 (B)滿江紅植株內過氧化氫生成量 (C)以DAB染色檢測植株體內過氧化氫生成表現

滿江紅有效吸附銅離子，累積濃度達8 mg/kg F.W.，為對照組的6倍。且體內的過氧化氫產量，隨著銅濃度上升而增加。
 低濃度Cu²⁺：滿江紅體內的H₂O₂濃度是對照組的三倍，產生花青素；高濃度Cu²⁺：體內的H₂O₂是對照組的八倍，葉綠素分解。
 我們推測H₂O₂可能是滿江紅在受到金屬逆境時，造成葉綠素分解、花青素生成的傳訊分子。

(四)和滿江紅共生的固氮菌在可耐受的CuSO_{4(aq)}仍有固氮能力：

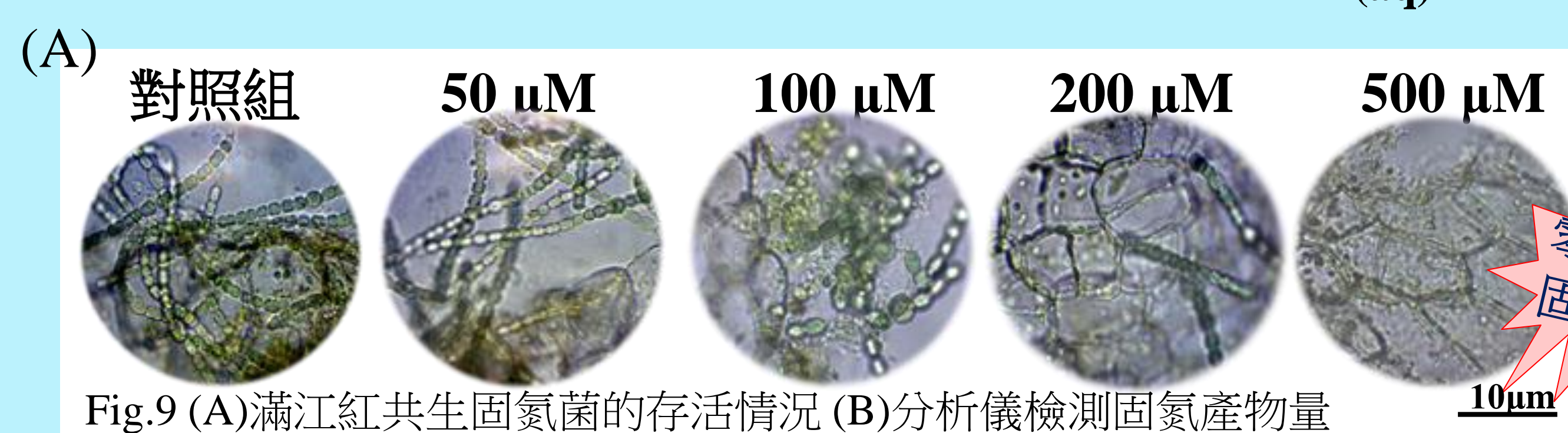
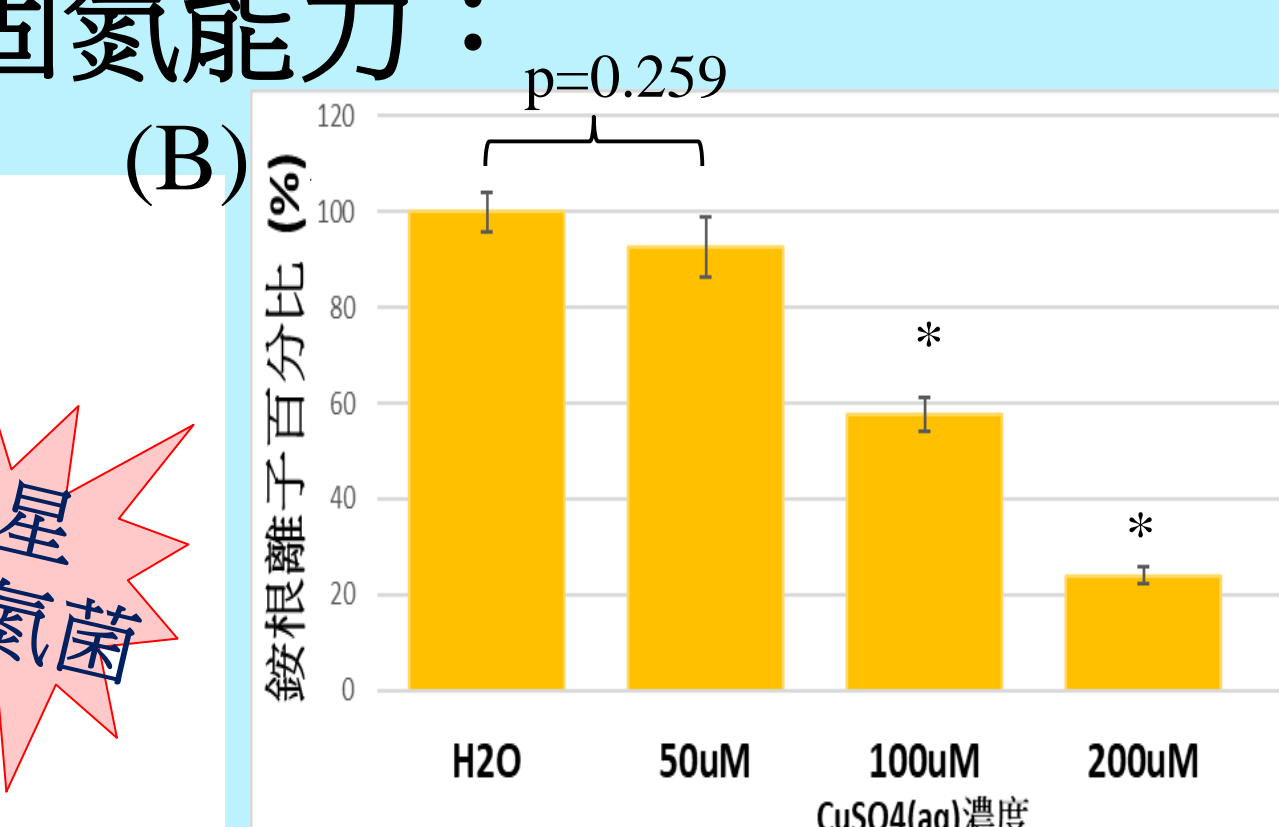


Fig.9 (A)滿江紅共生固氮菌的存活情況 (B)分析儀檢測固氮產物量



低濃度Cu²⁺：空腔內充滿長鏈的固氮菌，固氮產物生成量也和對照組相似。
 高濃度Cu²⁺：空腔內只剩零星的短鏈固氮菌，固氮產物也明顯減少。

可能是銅或過氧化氫直接影響固氮菌的存活和固氮酶活性，或者因為滿江紅的死亡間接影響共生系統內固氮菌的固氮能力。

三、探討滿江紅在過氧化氫的氧化逆境表現

(一) 滿江紅在H₂O₂耐受濃度的生存適應：

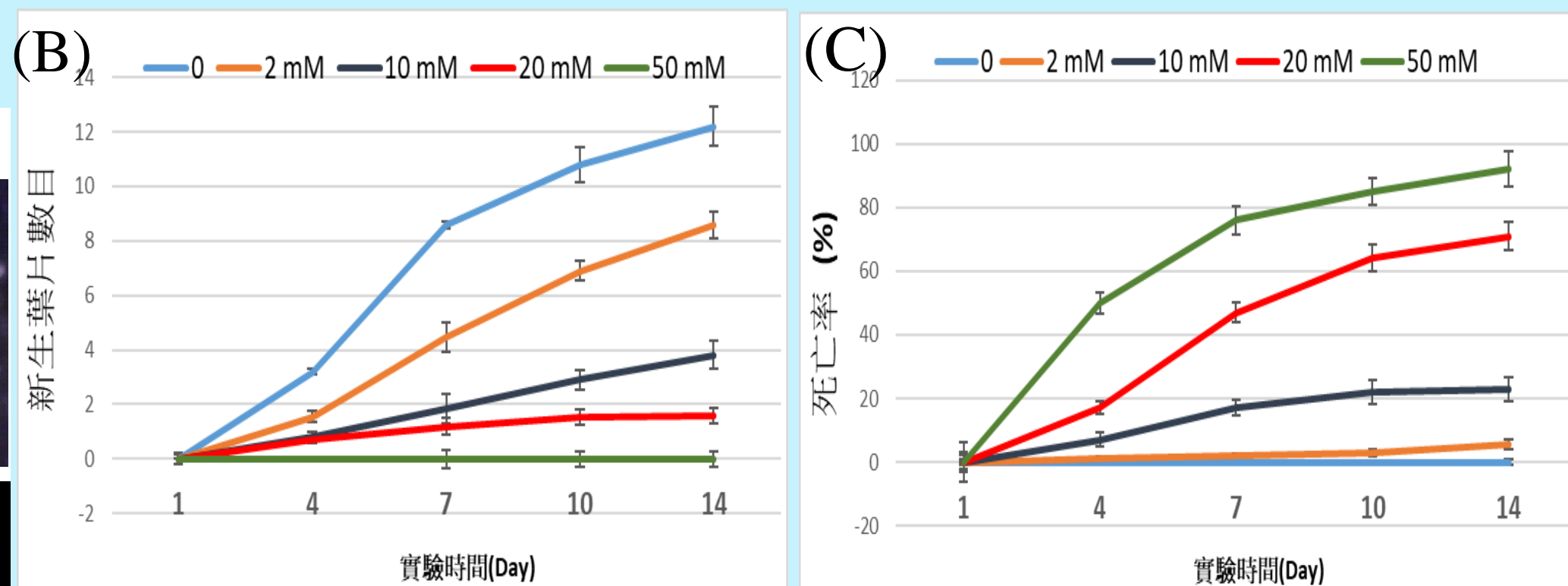
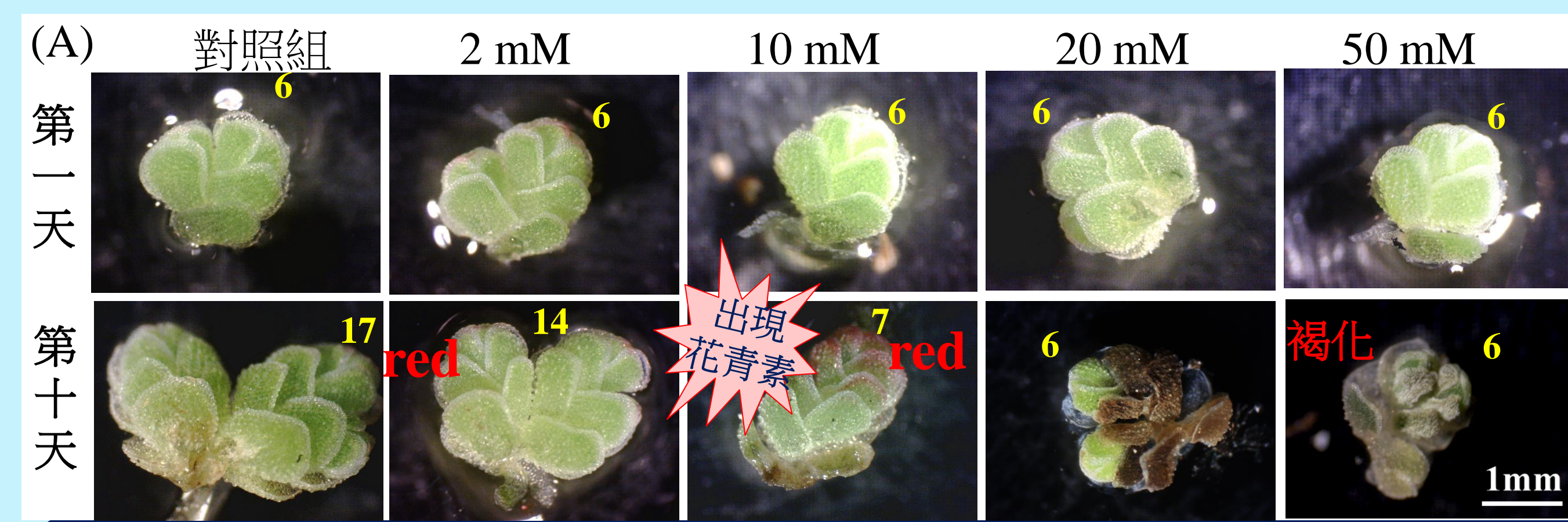


Fig.10 滿江紅在不同濃度H₂O₂溶液中的 (A)外在形態變化 (B)新生葉生長情況 (C)葉子的死亡率

低濃度H₂O₂: 葉緣由綠轉紅，似乎有大量花青素產生，而且新生葉持續增加。
 高濃度H₂O₂: 老葉黃褐化，葉綠素分解，葉片漸漸白化趨向死亡，且抑制植株的生長，沒有新生葉生成。

(二) 滿江紅在H₂O₂耐受濃度中持續生長繁殖：

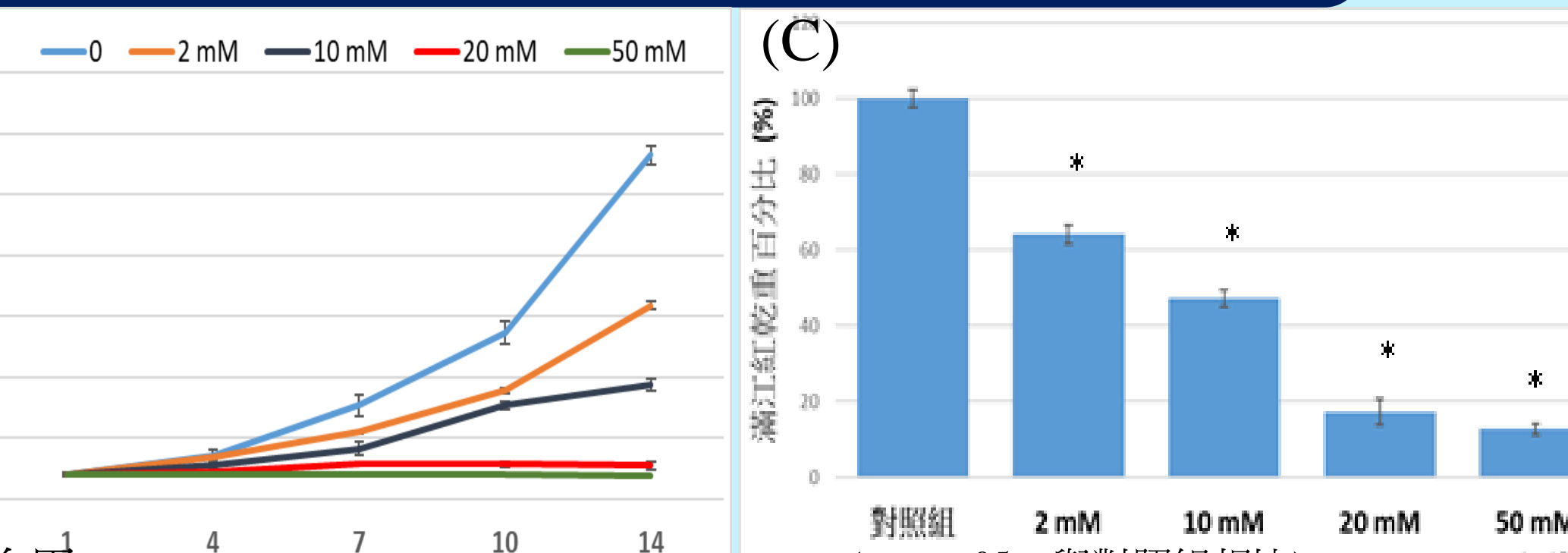
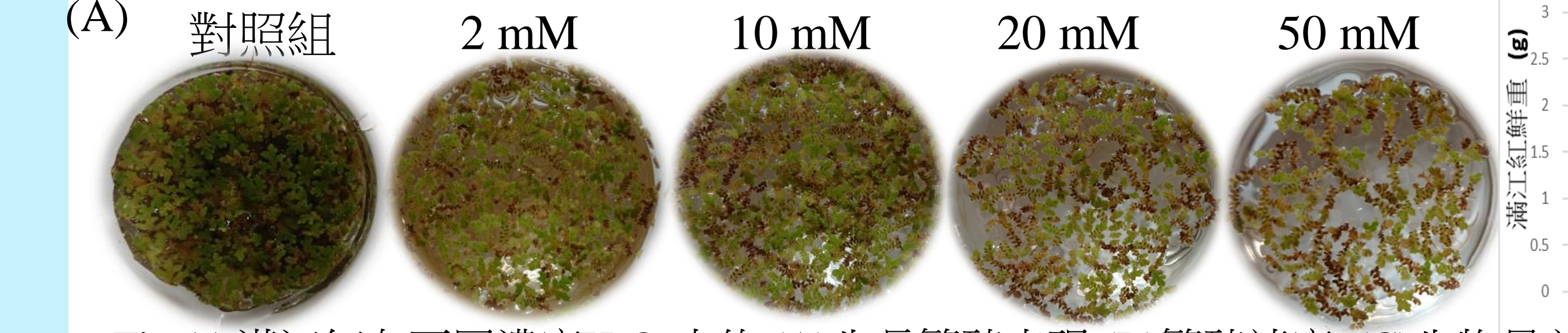


Fig.11 滿江紅在不同濃度H₂O₂中的 (A)生長繁殖表現 (B)繁殖速度 (C)生物量差異
 在低濃度過氧化氫中，滿江紅鮮重和對照組相比，抑制比例低，但是隨著氧化壓力的提高，生長繁殖出現停滯。

(三) 和滿江紅共生的固氮菌在耐受氧化壓力仍進行固氮：

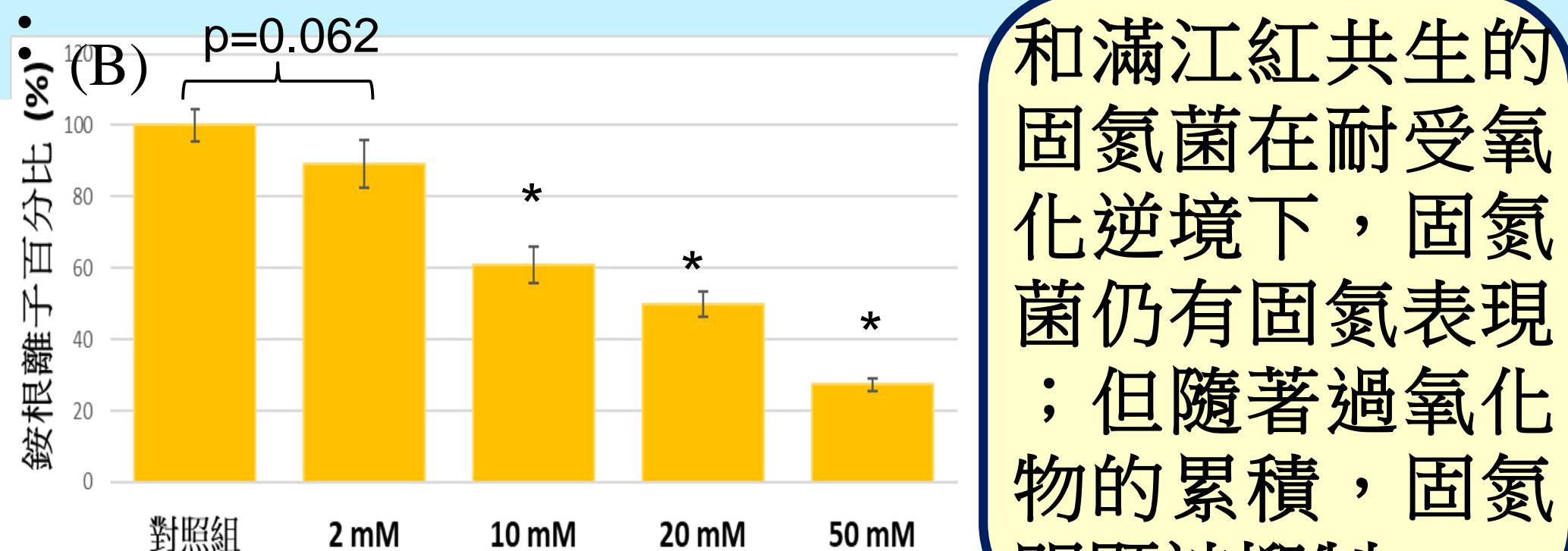
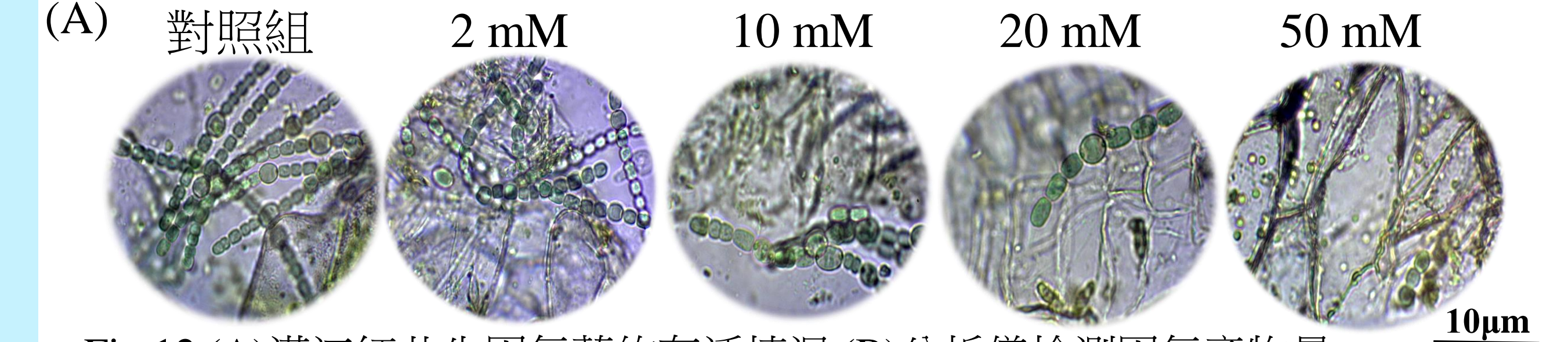


Fig.12 (A)滿江紅共生固氮菌的存活情況 (B)分析儀檢測固氮產物量
 和滿江紅共生的固氮菌在耐受氧化逆境下，固氮菌仍有固氮表現；但隨著過氧化物的累積，固氮明顯被抑制。

四、探討滿江紅在消除氧化壓力後的改變

(一) 抗氧化劑減緩高濃度銅對滿江紅的致死效應：

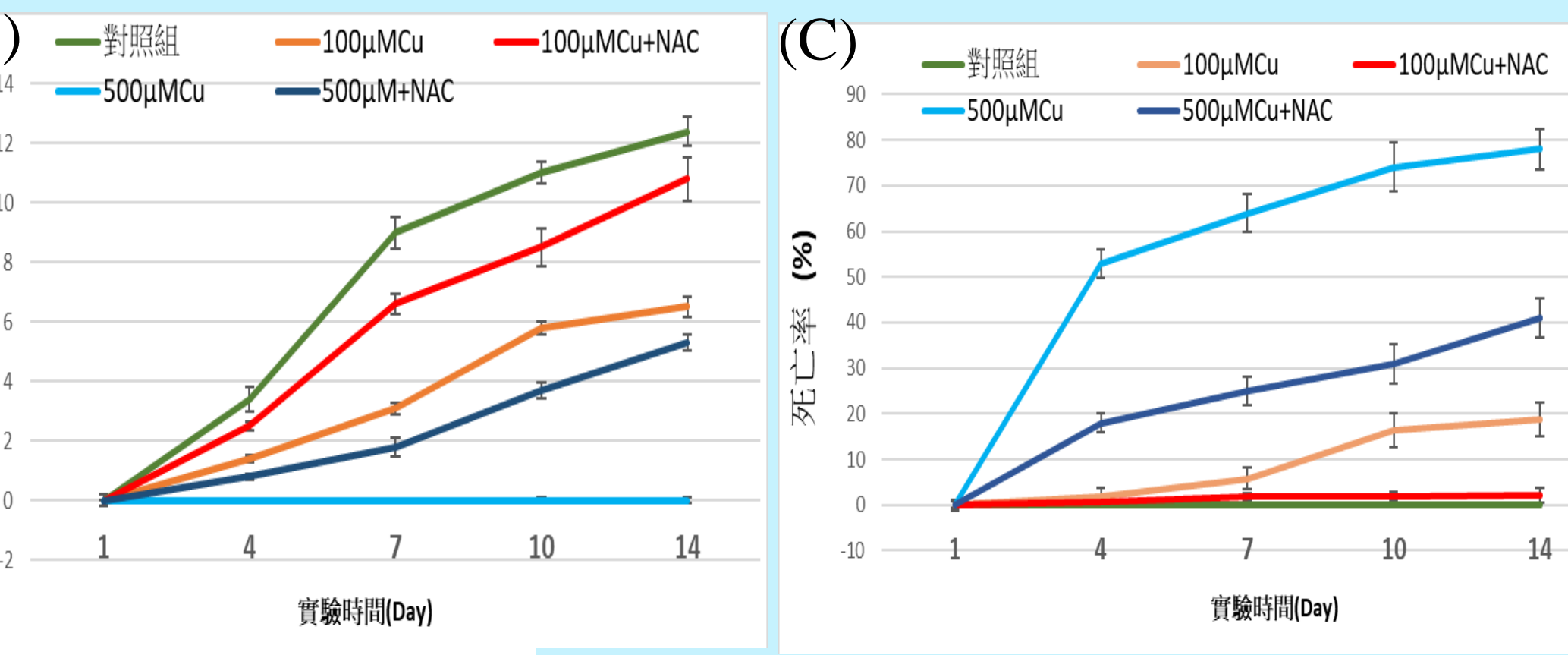
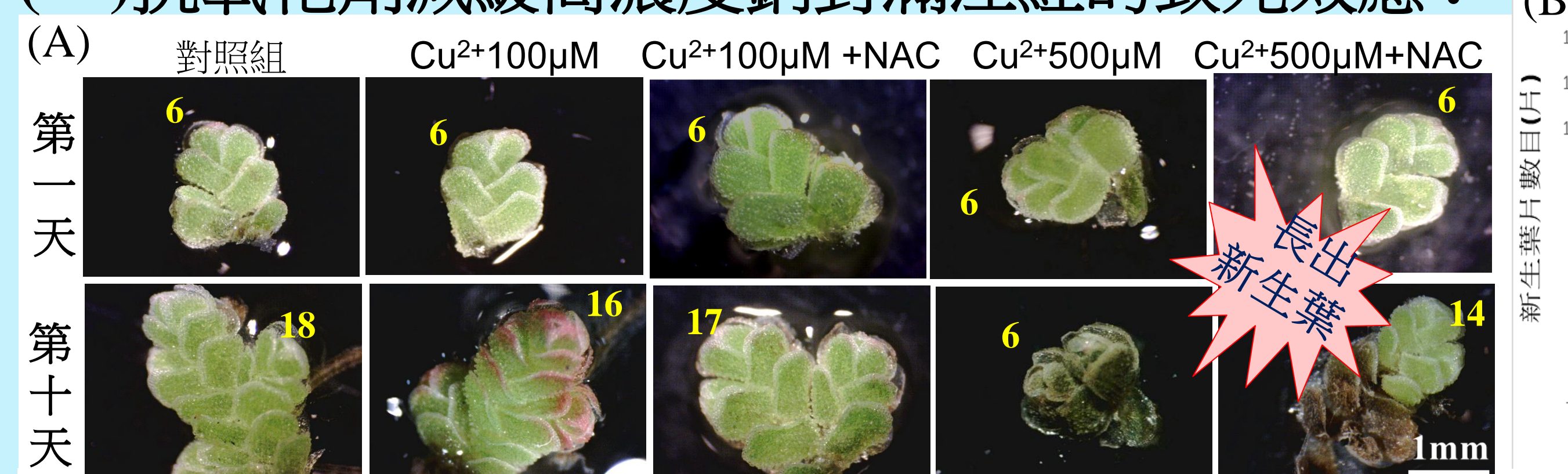


Fig.13 在銅中的滿江紅消除氧化壓力後的 (A)外在形態變化 (B)新生葉生長情況 (C)葉子的死亡率
 低濃度Cu+NAC: 減少花青素的生成；高濃度Cu+NAC: 葉綠素被分解的速度獲得減緩，有新生葉生成。

(二) 消除氧化壓力恢復滿江紅在銅逆境中繁殖：

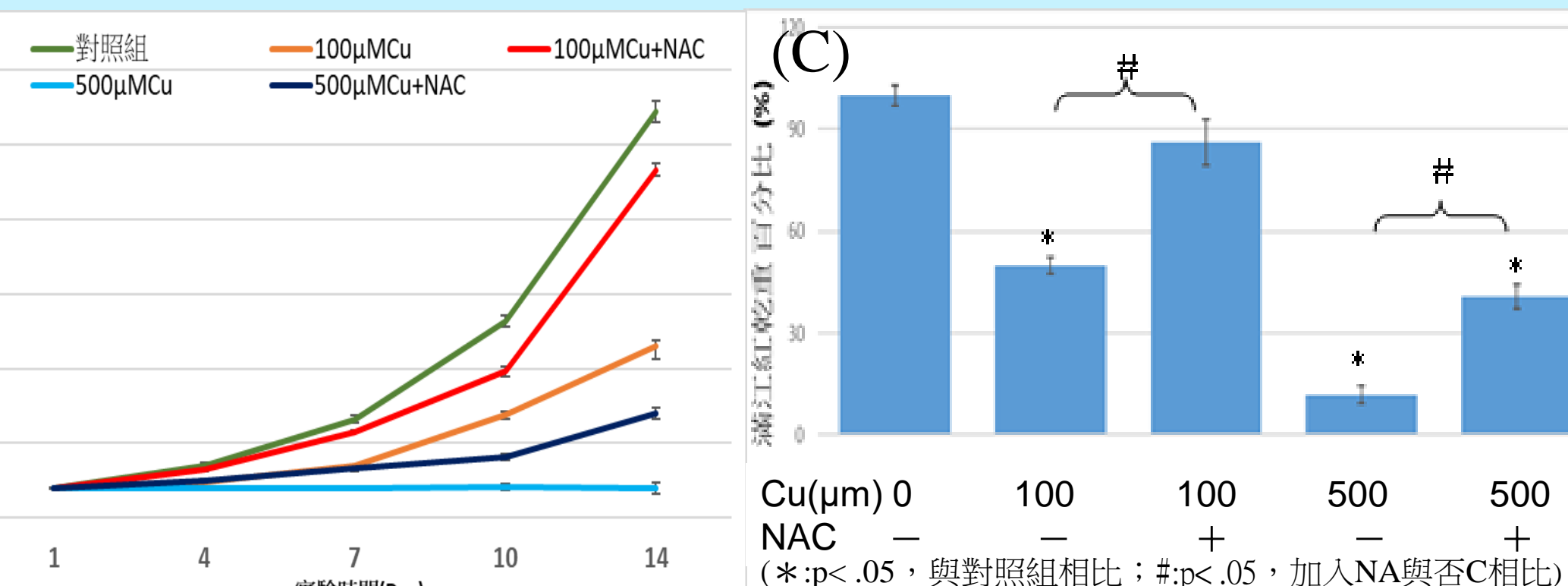
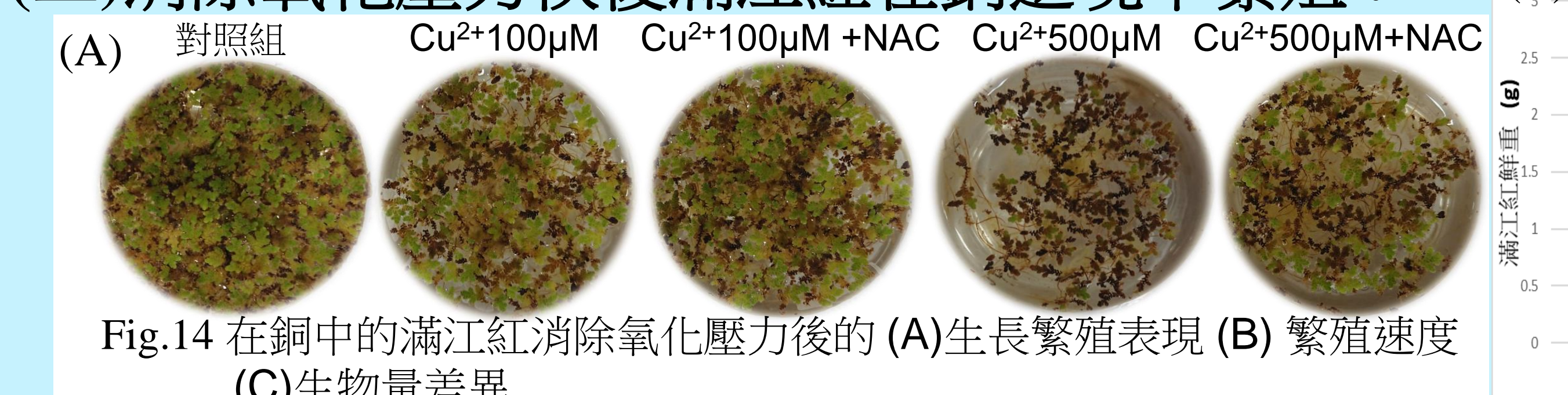
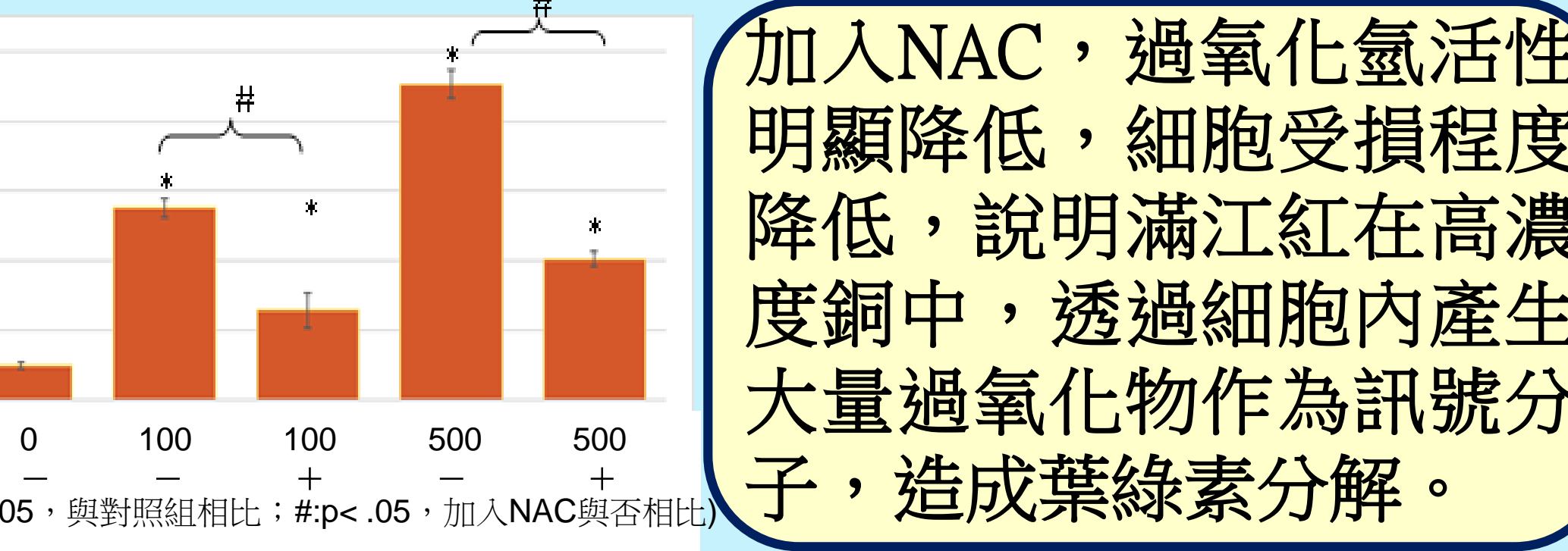
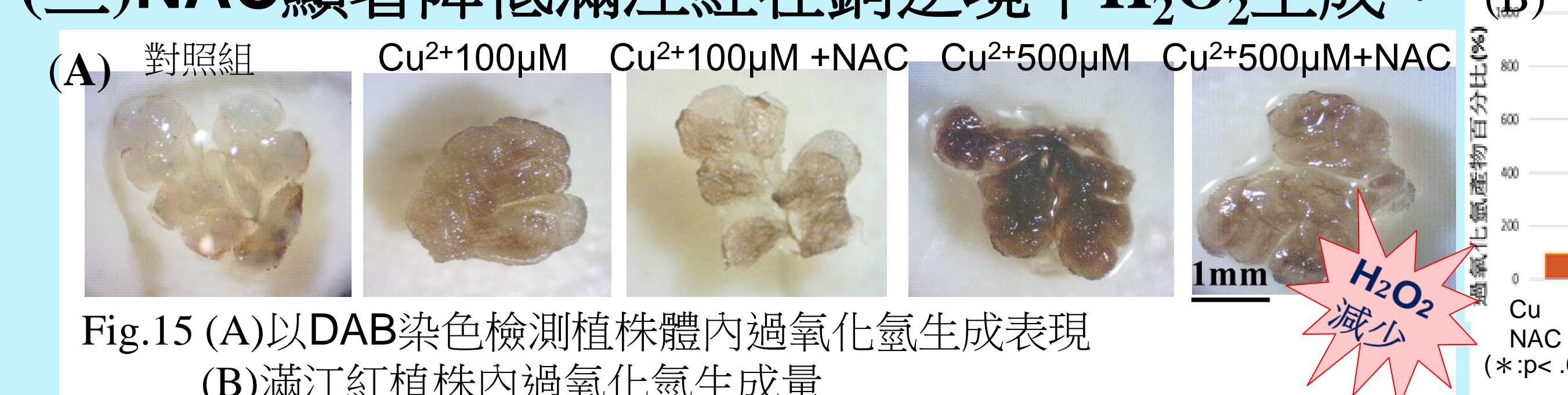
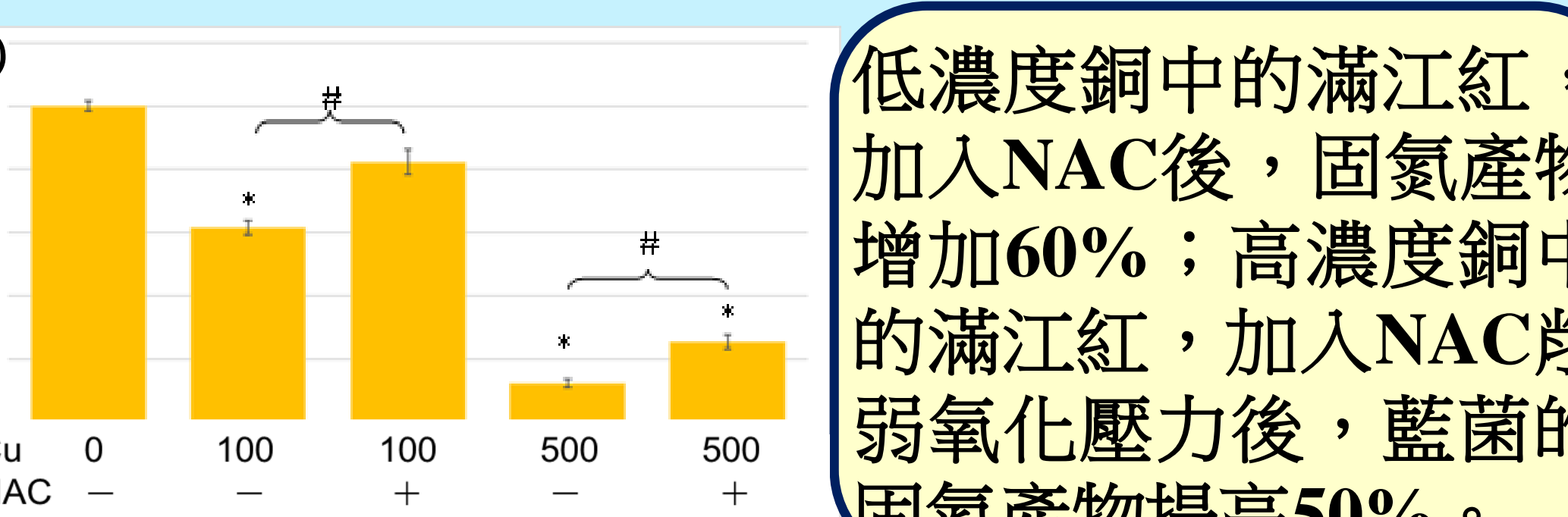
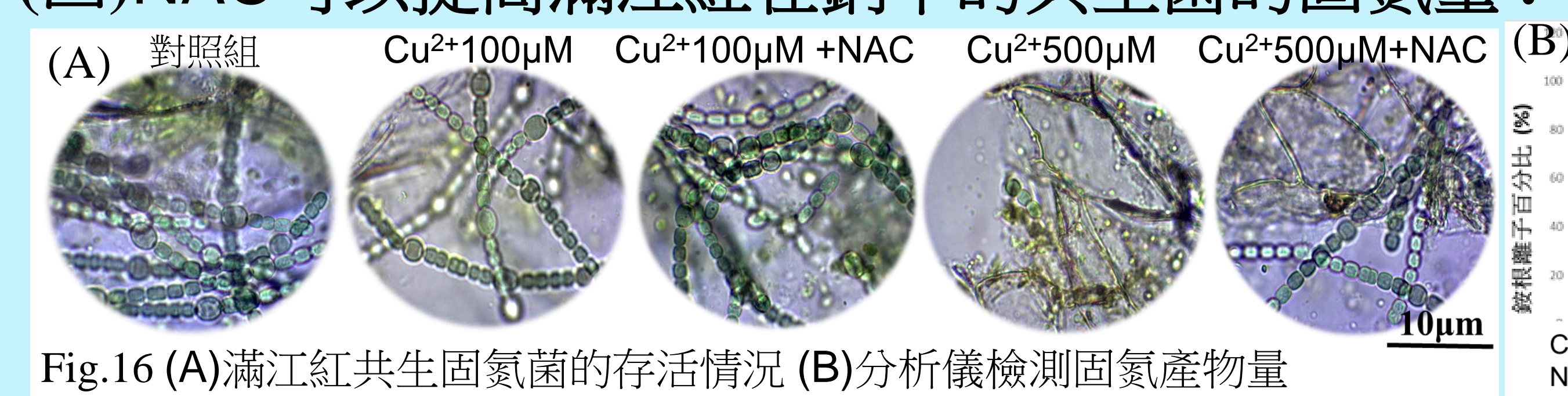


Fig.14 在銅中的滿江紅消除氧化壓力後的 (A)生長繁殖表現 (B)繁殖速度 (C)生物量差異
 滿江紅在加入NAC後，過氧化氫產量和活性被抑制，細胞受到的氧化壓力降低，滿江紅的生長和繁殖表現提高。

(三) NAC顯著降低滿江紅在銅逆境中H₂O₂生成：



(四) NAC可以提高滿江紅在銅中的共生菌的固氮量：



陸、結論

- 滿江紅對重金屬的耐受性：銅 > 鋅 > 鉛。銅逆境誘使滿江紅產生過氧化物傳訊和花青素抗氧化，以行保護生理機制，適應銅逆境。
- 共生固氮菌在耐受氧化壓力中，仍能進行固氮作用。
- 滿江紅在「植生復育」能發揮功能，且其共生固氮菌有助其成為水田綠肥，期此研究能應用於重金屬逆境中的植生復育和共生系統。

柒、參考文獻

- 葉顯銘、陳少燕、黃定鼎、黃浩仁 (2004)。清理重金屬汙染的植物，科學發展, 380: 4449。
- 蔣永正 (2011)。植物對環境逆境之調控與應用，行政院農委會, 第231期。
- Brown, S.L., Chancy, R.L., Angel, J.S., and Baker. A.J.M., (1994)。Phytoremediation Potential of *Thlaspi caerulescens* and *Bladder Campion* for Zinc- and Cadmium- Contaminated Soil. *J. Environ. Qual.*, 23 : 1151-1157.

