
利用法國秋海棠的氣孔特徵作為土壤中 硫酸及硝酸鉛汙染指標的可行性探討

車亭儀¹ 莊宥潔¹ 房達奇² 鄭茜文³ 房樹生^{1*}

¹ 國立家齊高級中學

² 國立台南第二高級中學

³ 私立長榮高級中學

壹、前言

近年來，由於科技與工業高度的發展，各種汙染問題越來越嚴重，也受到更多的重視。在高二應用生物學第四章就以環境汙染為主題，探討重金屬汙染會造成植物枯萎、生長受損等現象(鄭湧涇，2015)。工業發展的基礎在於充足的能源，現今台灣能源供應依舊以燃煤為大宗，大量的燃煤會產生許多二氧化硫與氮氧化物，兩者與水反應後會產生硫酸和硝酸，隨著雨水降下後，便會形成酸雨。酸雨會使得森林受到直接的傷害，而土壤、河川、湖泊等酸性化的結果，則使得整個生態系都會受到破壞。酸雨內的酸性物質會直接與植物葉部外表蠟質及角質層發生化學反應，使得葉片的組成成分及化學性質改變；間接則會改變植株的生理代謝作用，特別是葉片浸潤後，雨滴保持時間增長，葉片通透性增加，使組成成分溶脫增加，葉片表層擴散抵抗性降低，蒸散速度加快，將使植物體乾燥。此外氣孔阻塞造成氣孔蒸散率低，則會間接造成光合作用的衰退(李健鋒，2003)。

中國大陸的研究發現，空氣汙染嚴重的大都市環境，會造成二球懸鈴木葉片氣孔密度增加，氣孔長度下降(張浩等人，2004)。他們做了長時間的野外調查，利用不同地點的空氣汙染數據與二球懸鈴木葉片氣孔密度與氣孔長度得到相關性的結果。這篇論文引起我們極大的興趣，但他們的實驗是在戶外進行，空氣中汙染物質的變因太多，無法確定到底是何種汙染物質造成的，因此我們選定了常見且容易觀察的秋海棠盆栽做為實驗生物，在實驗室中澆灌不同濃度的硝酸鉛及硫酸，看看秋海棠的氣孔特徵是否會有相對應的變化，希望能以法國秋海棠的氣孔特徵作為土壤汙染及生物檢驗法的量化指標。

許多文獻是模擬酸雨直接澆灌植物的葉片，探討葉片受到的影響為何(魏湘萍等人，2009)。我們則希望了解酸雨造成的土壤酸化對植物的影響，希望利用監測氣孔特徵的改變，反應出土壤的酸化程度，如果這是可行的話，未來我們只需要看氣孔特徵的變化就可以推導出土壤的酸化汙染程度。

*為本文通訊作者

鉛是現存環境中最大量的有毒重金屬，被廣泛使用於各種材料，如顏料、油漆、紅丹漆、及電池之電極等。一般環境中的鉛是經由食物、飲水、周遭的空氣、灰塵及泥土進入動物體內，植物則是經由根吸收土壤中的鉛。土壤的鉛污染會影響植物根部吸收氮和磷，並降低菌根與根瘤的形成，進而影響植物的生長（楊如意等人，2007）；另外，土壤的鉛污染也會影響黃瓜種子的發芽率及幼根的生長（陳新紅等人，2009）。雖然在文獻中，我們並沒有找到前人針對土壤鉛污染對秋海棠根部的影響為何，但鉛污染對秋海棠根細胞會造成一定的生理壓力，為了存活，秋海棠勢必會產生一系列的生理改變，其中可能包括葉片氣孔特徵產生相對應的改變。如果這是可行的話，未來我們也只需要看氣孔特徵的變化就可以推導出土壤的鉛污染程度，或是至少可以得知土壤中有鉛污染發生。

一般實驗室是利用原子吸收光譜儀測定鉛濃度，利用液相層析分析儀測定硫酸濃度，兩者造價昂貴，操作不易，在高中實驗室無此設備，且外送樣本也所費不貲，因此我們希望能利用氣孔特徵的變化做為量化指標，利用簡易的生物檢定法（Bioassay）來測定土壤中的鉛及硫酸的濃度。

生物檢定法是用以測定某生物或生物性材料對某化合物刺激的反應，藉以定性測試該化合物是否具有活性，或定量地測定其適當的劑量（維基百科，2016）。我們的基本假設是，植物遭受硝酸鉛或硫酸處

理時，體內會啟動一系列的生理代謝反應，以度過逆境，其中的反應之一可能跟氣孔特徵的改變有關，以減少或增加水分的蒸散，進而影響光合作用的進行。我們假設土壤中硝酸鉛與硫酸的濃度會與氣孔特徵的改變有線性的關係，希望能利用氣孔特徵做為生物檢定法的量化指標，簡易地量化土壤中的硝酸鉛與硫酸的濃度。

貳、研究目的

- 一、利用法國秋海棠的氣孔特徵做為土壤中硫酸及硝酸鉛污染的指標。
- 二、利用法國秋海棠的氣孔特徵做為生物檢定法的量化指標，用以定性及定量土壤中硫酸及硝酸鉛的污染程度。

參、研究設備及器材

- 一、生物材料：法國秋海棠（以 5 吋塑膠盆培養）。
- 二、儀器設備：照度計、光學顯微鏡（NIKON E100）、量筒、燒杯、有刻度的塑膠滴管。
- 三、其他器材及藥品：載玻片、透明膠帶、剪刀、透明指甲油、標籤紙、500mM 的硝酸鉛儲存溶液、500mM 的硫酸儲存溶液、蒸餾水。

肆、研究過程與方法

- 一、確認葉片氣孔特徵的量化部位
(一)自園藝店挑選 5 吋盆的法國秋海棠(大小及生長狀態盡量一致)，置於學校生物實驗室中，室溫培養，600lux 的光

照下 (12 小時光照, 12 小時黑暗), 每星期一、三、五澆水 60mL, 至少在實驗室內馴養二周以上才開始做測試。

(二) 隨機選取由上而下數來第二葉, 共選取三片 (並須確定為老葉), 在葉基、中段、及葉尖 (定義請見邱相齡等人, 2013) 以指甲油印模法製成玻片, 進行 SD、SW、SL 的測量。(三種指標的定義見下方)

二、各種污染物的處理實驗

(一) 馴養方式同上。

(二) 將 1、50、100mM 的硫酸及硝酸鉛各 80mL, 每星期一、三、五澆灌秋海棠根部, 並另澆灌 80mL 蒸餾水作為對照組。

(三) 計算在不同天數下, 各植株 SD、SW、SL 及 CI 的變化百分比。(為了去除不同株植物之間的差異, 我們的量化選用相對值的變化百分比而不是絕對的單一數值, 以下實驗皆是如此。)

* 氣孔密度(stomatal density;SD) :

在秋海棠葉尖部的指甲油印膜上隨機取三個視野, 放大 400 倍之後, 計算在長寬各為 0.04 mm² 的面積內的氣孔數目, 接著除以 0.04, 以換算得知每平方公釐有多少個氣孔, 並求出三個視野的平均值。

* 氣孔寬度(stomatal width; SW) :

在秋海棠葉尖部的指甲油印膜上隨機取三個視野, 放大 400 倍之後, 利用 image J 測量氣孔兩保衛細胞的最大

寬度, 每個視野測量 3 個, 並求出三個視野的平均值。

* 氣孔長度(stomatal length; SL) :

在秋海棠葉尖部的指甲油印膜上隨機取三個視野, 放大 400 倍之後, 利用 image J 測量氣孔兩保衛細胞的最大長度, 每個視野測量 3 個, 並求出三個視野的平均值。

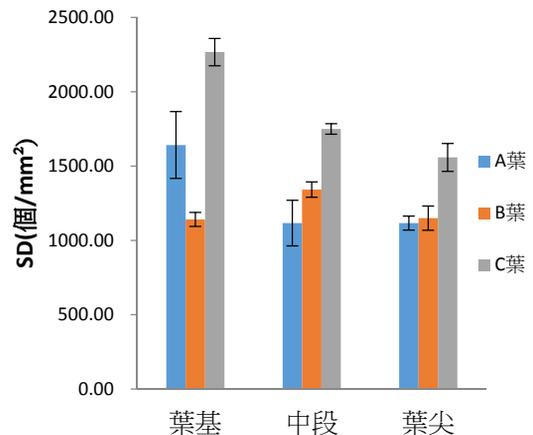
* 氣孔簇發生率(clustering index; CI) :

在秋海棠葉基部的指甲油印膜上隨機取十個視野, 計算共出現多少次氣孔簇, 再除以十, 以平均一個視野出現多少次氣孔簇。

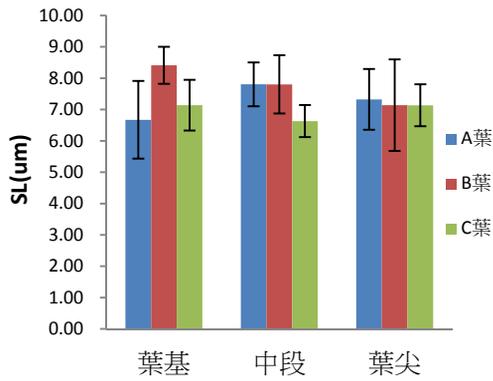
伍、研究結果

一、確認葉片氣孔特徵的量化部位

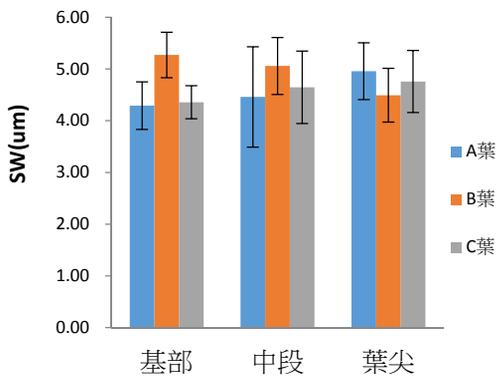
我們將秋海棠的葉片分為葉基、中段、及葉尖 (邱相齡等人, 2013), 為了確定我們的量化指標: SD、SL、SW, 在不同葉片的一致性, 我們隨機選取了三個葉片, 結果如圖一所示。



圖一 不同葉片, 不同部位的氣孔特徵 (A) : SD



圖一(B)：SL



圖一(C)：SW

葉尖在不同葉片的差異最小，後續的實驗我們皆選取葉尖作為三種量化指標的部位。另一個量化指標 CI，我們則依照學姐的實驗結果，選取葉基（邱相齡等人，2013）。

二、不同污染物的處理

(一) 植物外觀的變化

在不同濃度的硫酸及硝酸鉛澆灌土壤處理 14 天後，新葉的葉尖部位皆有不同程度的枯萎現象，但對照組水的處理，外觀一切正常（表一，詳見封底圖說）。這代表對秋海棠而言，硫酸及

硝酸鉛都會對個體造成不同程度的傷害。由於外觀的傷害不易量化，我們接下來選取 SD、SL、SW、CI 這四個氣孔特徵來量化硫酸及硝酸鉛重金屬對秋海棠的影響程度。

(二) 植物氣孔特徵的變化

1. SD 的變化

在不同濃度的硫酸處理下，SD 變化率沒有明顯的一致性結果。但 100mM 硫酸的 SD 變化率在各時間點皆大於水，但 1mM 硫酸的 SD 變化率在各時間點大多比水小，我們推測高濃度的硫酸可能有助於氣孔的大量形成，低濃度的硫酸則可能抑制氣孔的形成。（圖二 A）

由圖二 B 可以明顯發現，植物經不同濃度的硝酸鉛處理後，其 SD 變化率都比對照組水來得大，且低濃度的硝酸鉛，SD 變化率最大。推測硝酸鉛可能有助於氣孔的發育形成，且低濃度的效果較高濃度明顯。

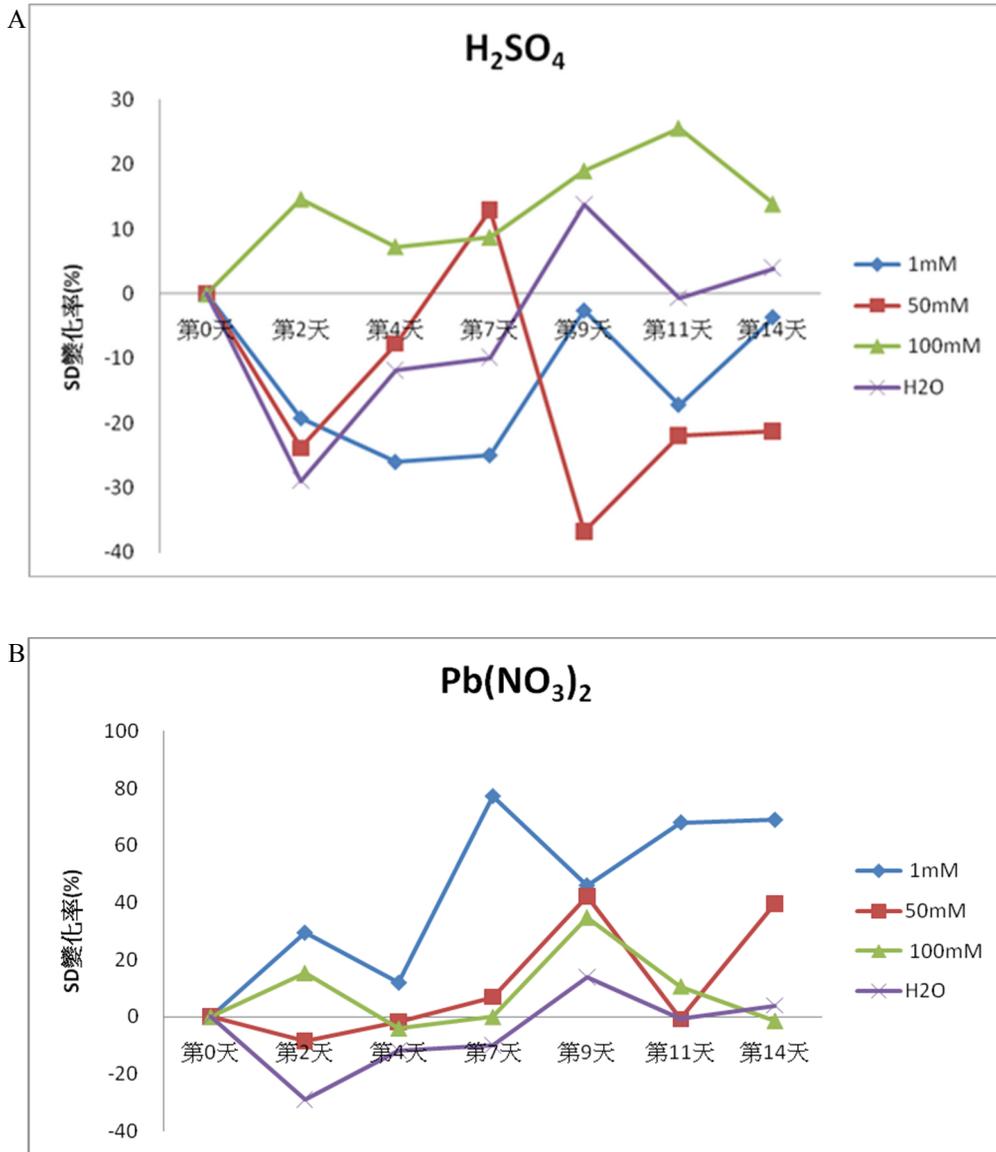
2. SL 的變化

在不同濃度的硫酸處理下，100mM 硫酸的 SL 變化率在各時間點皆小於水，且皆為負值；但 1mM 硫酸的 SL 變化率在各時間點大多比水大，且多為正值。因此，我們推測高濃度的硫酸可能會導致氣孔長度縮小，低濃度的硫酸則可能造成氣孔長度變大。高濃度與低濃度的硫酸對 SL 變化率的影響差異最大可達 30%。（圖三 A）

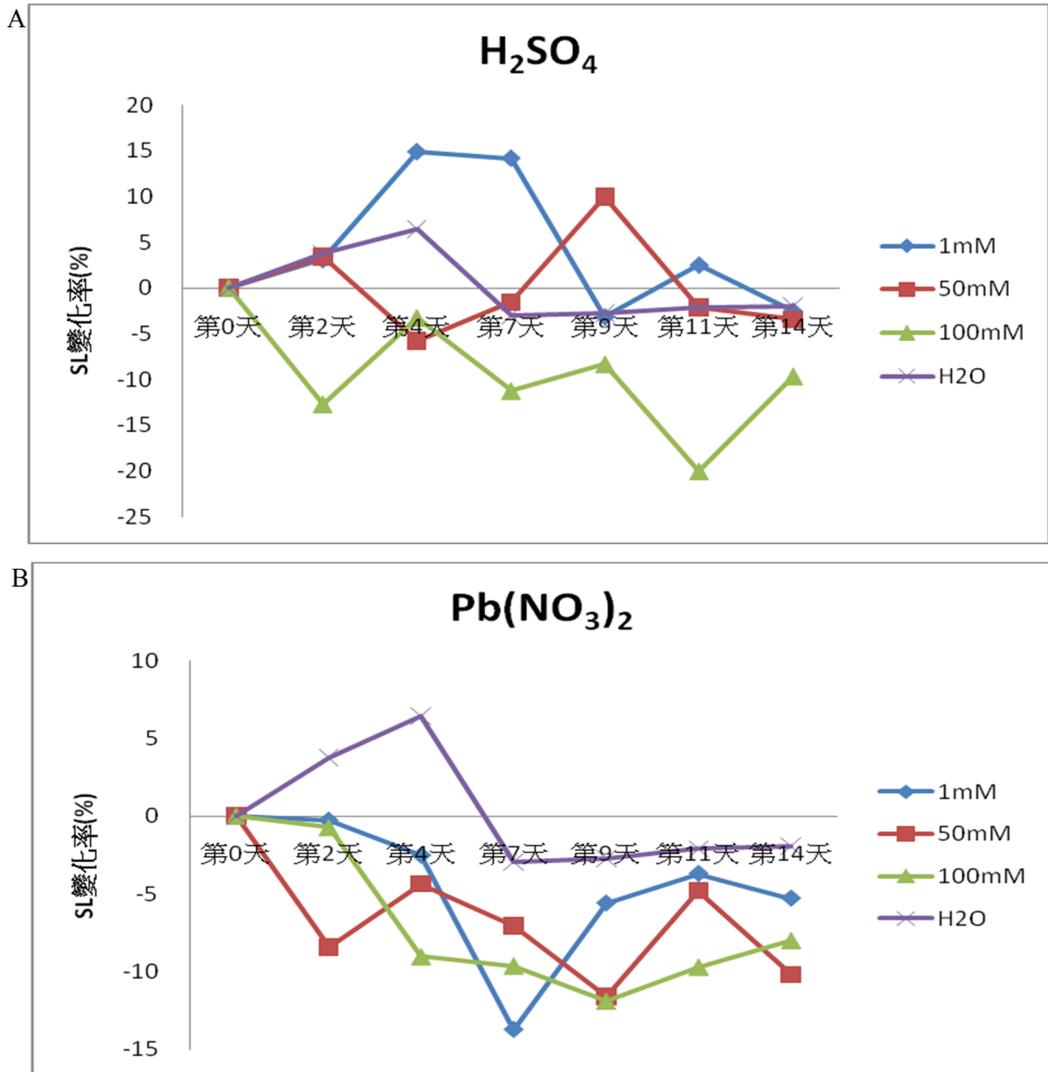
植物經不同濃度的硝酸鉛處理後，其

SL 變化率都比對照組水來得小，且全為負值。但濃度效應並不明顯，三種濃

度處理都可以看到 SL 變小的結果，且差異不大。(圖三 B)



圖二 不同濃度處理下，秋海棠 SD 的變化百分比。A：硫酸處理，B：硝酸鉛處理。變化率計算公式： $(\text{第 } n \text{ 天} - \text{第 } 0 \text{ 天}) \div \text{第 } 0 \text{ 天} \times 100$ 。由於數據是以 SD 變化率呈現，因此圖中並未顯示標準差大小，以下皆同。

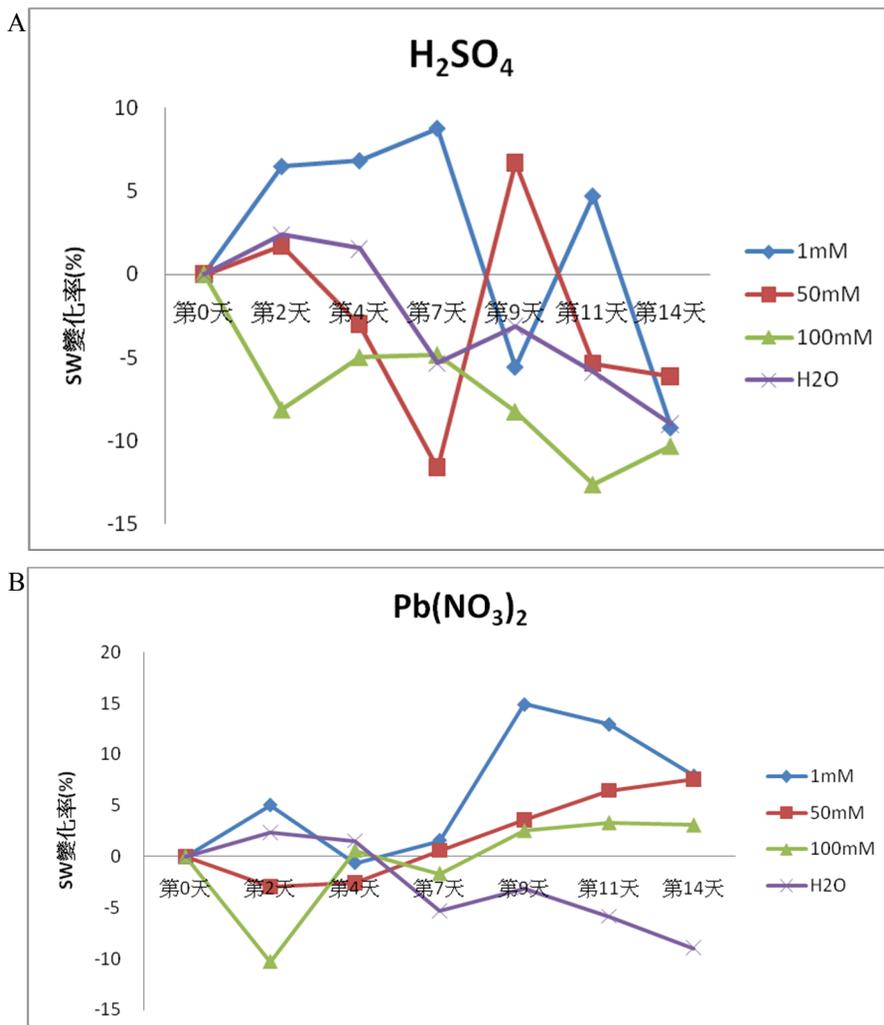


圖三 不同濃度處理下，秋海棠 SL 的變化百分比。A：硫酸處理 B：硝酸鉛處理

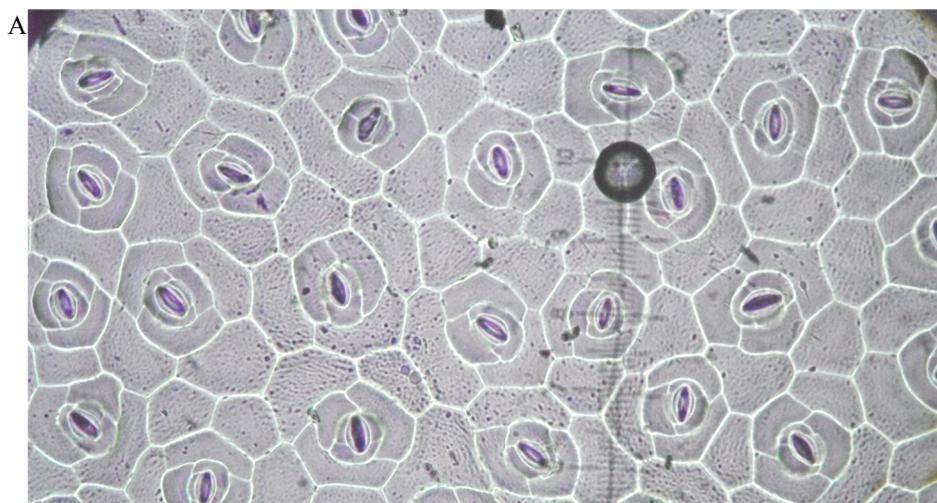
3. SW 的變化

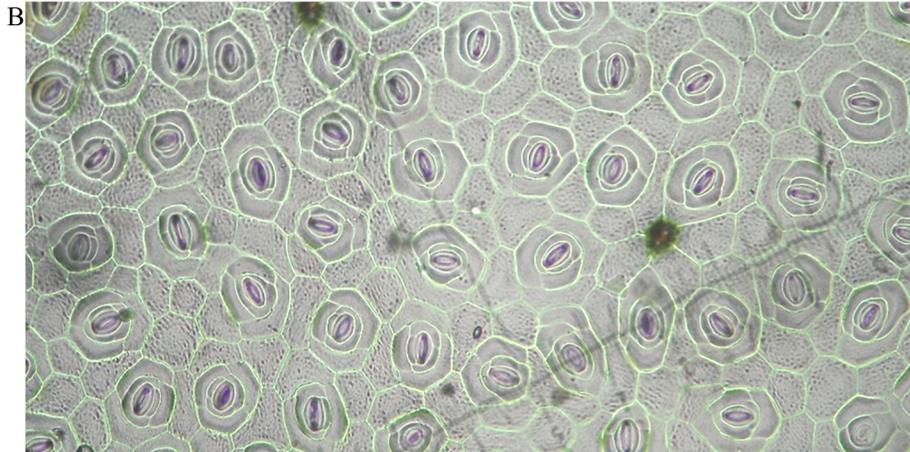
與 SL 的變化類似，在不同濃度的硫酸處理下，100mM 硫酸的 SW 變化率在各時間點皆小於水，且皆為負值；但 1mM 硫酸的 SW 變化率在各時間點大多比水大，且多為正值。因此，我們推測高濃度的硫酸可能會導致氣孔寬度縮小，低濃度的硫酸則可能造成氣孔寬度變大。高濃度與低濃度的硫酸對 SW 變化率的影響差異最大僅達 20%，比對 SL 的影響小（圖四 A）。

除了前四天外，秋海棠經不同濃度的硝酸鉛處理後，其 SW 變化率都比對照組水來得大，且全為正值。低濃度的促進效果最明顯，此結果與硝酸鉛對 SL 變化率的影響相反（圖四 B），也就是說，經硝酸鉛處理後會抑制氣孔長度，但會促進氣孔寬度，也就是會讓氣孔從瘦長形變成矮胖型（圖五）。



圖四 不同濃度處理下，秋海棠 SW 的變化百分比。A：硫酸處理，B：硝酸鉛處理

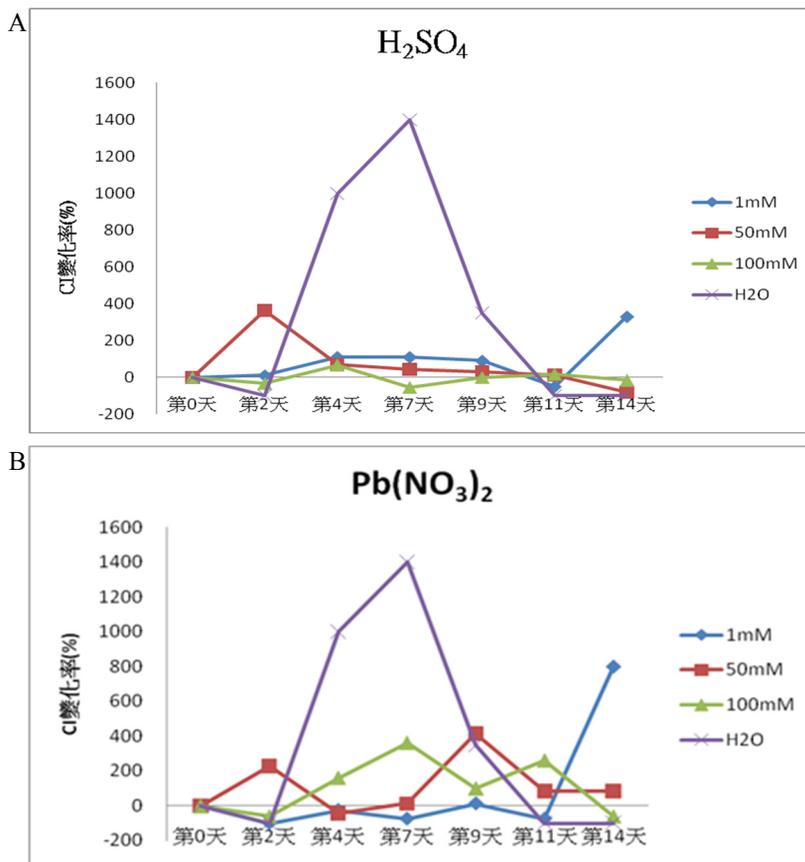




圖五 1mM 硝酸鉛處理的氣孔外觀 (400x)。A：第 0 天、B：第 11 天。經硝酸鉛處理 11 天後，可以清楚看出氣孔從瘦長形變成矮胖型。

4. CI 的變化

硫酸及硝酸鉛處理對 CI 的影響非常類似，與對照組水的處理相比，兩者皆會抑制氣孔簇的產生。(圖六)。

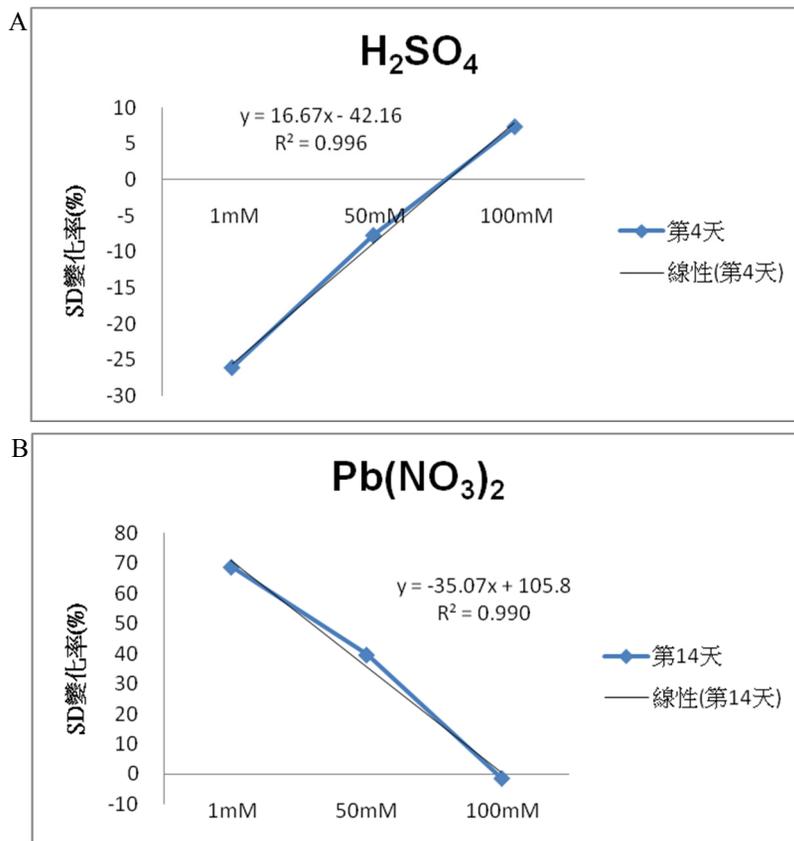


圖六 不同濃度處理下，秋海棠 CI 的變化百分比。A：硫酸處理；B：硝酸鉛處理。

(三) 兩種汙染物的濃度檢定曲線

1. SD 變化率的檢定曲線

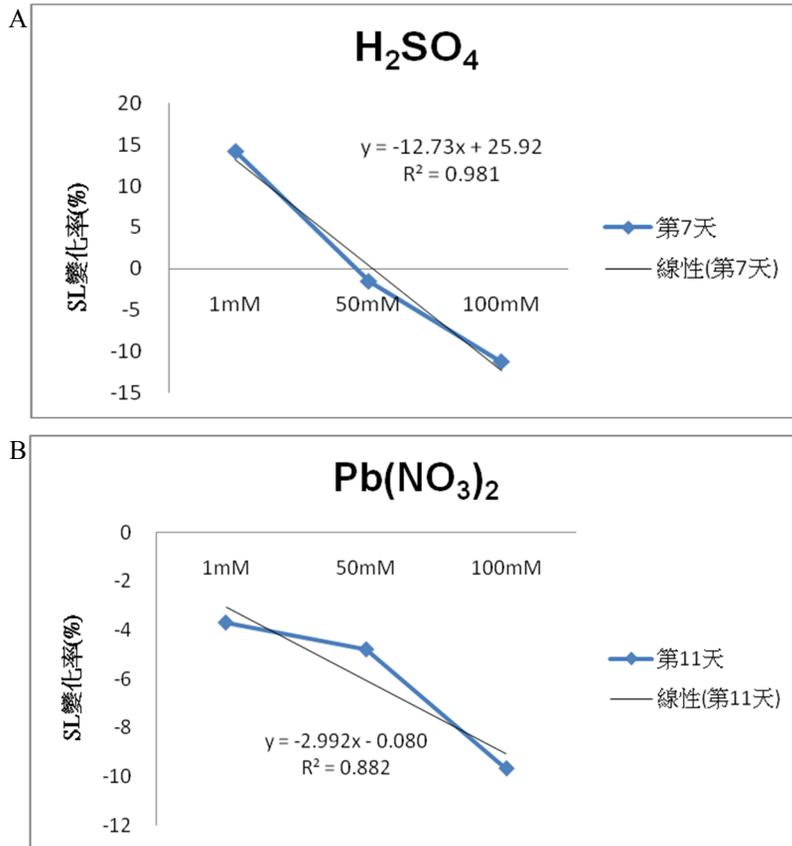
在第 4 天，三種硫酸濃度處理下，可以得到 $R^2=0.996$ 的回歸曲線（圖七 A）。在第 14 天，三種硝酸鉛濃度處理下，可以得到 $R^2=0.990$ 的回歸曲線（圖七 B）。兩種汙染物處理都可以得到接近完美的直線，但比較特別的是，硫酸處理的斜率是正的，代表濃度越高，SD 變化率越大。硝酸鉛處理的斜率是負的，代表濃度越高，SD 變化率越小。利用這兩個曲線可以做為土壤中的硫酸及硝酸鉛汙染的生物檢定之用。



圖七 不同濃度處理下，秋海棠 SD 變化百分比的檢定曲線。A：硫酸處理；B：硝酸鉛處理

2. SL 變化率的檢定曲線

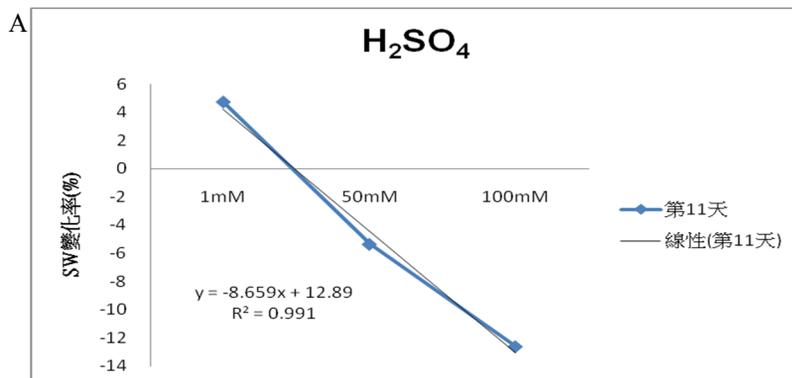
在第 7 天，三種硫酸濃度處理下，可以得到 $R^2=0.981$ 的回歸曲線（圖八 A）。在第 11 天，三種硝酸鉛濃度處理下，可以得到 $R^2=0.882$ 的回歸曲線（圖八 B）。與 SD 變化率不同的是，兩種汙染物處理的斜率皆為負值。利用這兩個曲線，一樣可以做為土壤中的硫酸及硝酸鉛汙染的生物檢定之用。

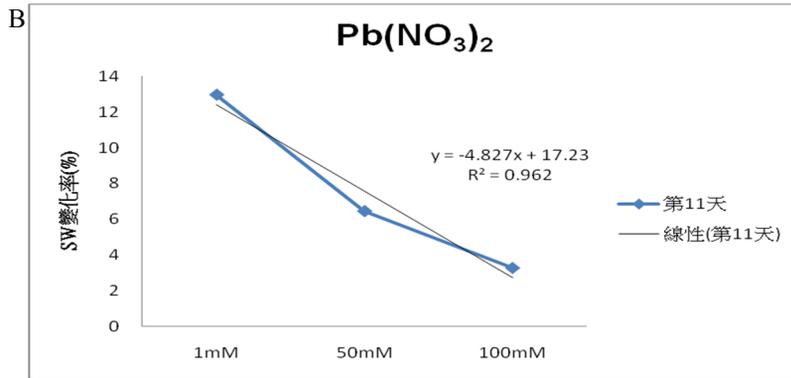


圖八 不同濃度處理下，秋海棠 SL 變化百分比的檢定曲線。
A：硫酸處理，B：硝酸鉛處理

3. SW 變化率的檢定曲線

在第 11 天，三種硫酸濃度處理下，可以得到 $R^2=0.991$ 的回歸曲線（圖九 A）。在第 11 天，三種硝酸鉛濃度處理下，可以得到 $R^2=0.962$ 的回歸曲線（圖九 B）。兩種污染物處理都可以得到接近完美的直線，且兩種污染物處理的斜率皆為負值。利用這兩個曲線，一樣可以做為土壤中的硫酸及硝酸鉛污染的生物檢定之用。

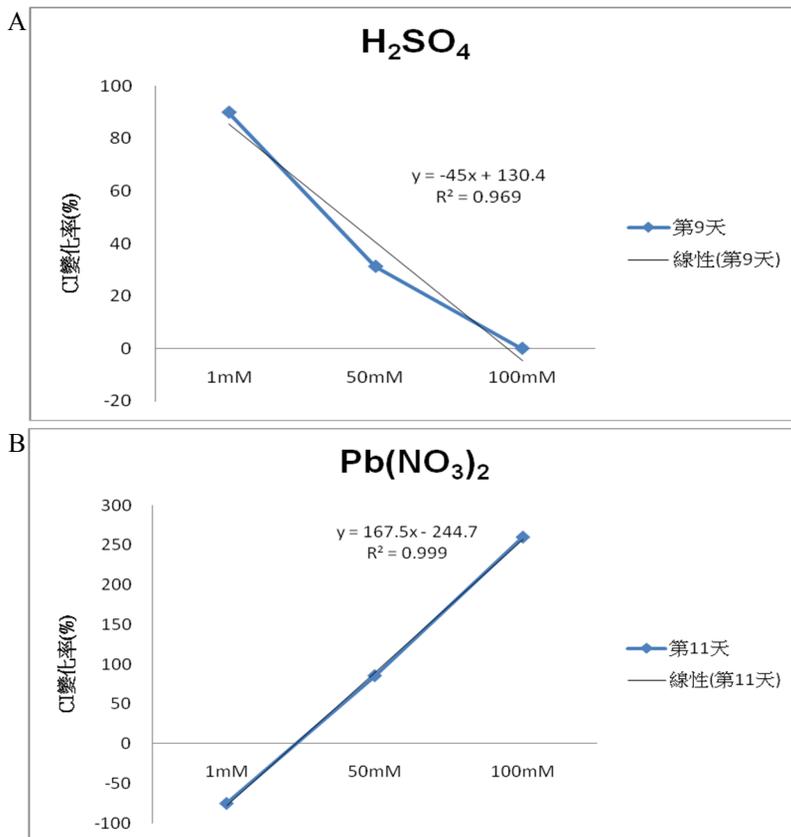




圖九 不同濃度處理下，秋海棠 SW 變化百分比的檢定曲線。A：硫酸處理；B：硝酸鉛處理

4. CI 變化率的檢定曲線

在第 9 天，三種硫酸濃度處理下，可以得到 $R^2=0.969$ 的回歸曲線（圖十 A）。在第 11 天，三種硝酸鉛濃度處理下，可以得到 $R^2=0.999$ 的回歸曲線（圖十 B）。兩種汙染物處理都可以得到接近完美的直線，但比較特別的是，硫酸處理的斜率是負的，代表濃度越高，CI 變化率越小。硝酸鉛處理的斜率是正的，代表濃度越高，SD 變化率越大。利用這兩個曲線，同樣可以做為土壤中的硫酸及硝酸鉛汙染的生物檢定之用。



圖十 不同濃度處理下，秋海棠 CI 變化百分比的檢定曲線。A：硫酸處理；B：硝酸鉛處理

柒、討論

依污染物的型態與接受模式，環境檢測方法可概分為物理性檢測、空氣、水質、土壤、廢棄物、毒性化學物質、環境用藥、生物累積毒素、環境生物檢定、毒性生物測試等 10 大類（行政院環境保護署環境檢驗所，2016）。目前常用的檢測方法有：液相層析(LC)、氣相層析(GC)、原子吸收光譜(AAS)等技術。雖然這些分析方法具有靈敏度高、準確度高等優點，然而其設備昂貴、費時且耗費人力，不適用於現場即時或連續性的監測。而若以生物毒性檢測不僅反應時間長，還受限於僅可在實驗室中分析。目前生物感測器(biosensor)被視為是環境污染毒物現場監測的最適方法，此檢測技術為運用生物的反應及專一性辨識之特性的整合型分析系統。主要的原理為當被檢測物質與生物識別系統發生作用，產生光、熱、質量或電化學等反應，再將其轉換為可輸出信號，以達到分析及檢測的目的。目前在環境污染物中檢測的主要項目包括有：農藥、重金屬、硝酸鹽、二氧化硫……等（袁秋英，2009）。其具有速度快、高靈敏度、低成本、操作簡單等特性，但有菌體酵素保存不易、受體活性保存不易……等缺點，且利用生物感測器檢測得到的僅僅是一串數值，我們無法得知生物真正的生理變化。

在高濃度硫酸（100mM）且水分充足（80mL）的澆灌處理下，法國秋海棠的 SD 增加，而 SL、SW、CI 下降，也就是單位面積的氣孔數目增加，且氣孔的長寬等比例縮小，氣孔簇數目減少。我們認為可能的原因在於澆灌高濃度硫酸時，土壤的滲透壓上升，植物為了避免根部細胞脫水，利用增加氣孔數目，加速蒸散作用，以增加體內細胞的滲透壓。至於 CI 減少是因為水分充足的關係。而在低濃度硫酸（1mM）且水分充足（80mL）的澆灌處理下，法國秋海棠的 SD 下降，而 SL、SW 增加、CI 下降，

本研究利用法國秋海棠作為土壤中硫酸及硝酸鉛的污染指標，藉由觀察氣孔特徵變化可以簡易且快速得知當地的污染情況。秋海棠的分布廣泛，常作為園藝植物栽種，利用秋海棠作為土壤的污染指標不僅容易監測、採樣方便且低成本。我們的結果顯示，秋海棠的氣孔特徵對於土壤中的硫酸及硝酸鉛污染有不同的反應，可以利用氣孔特徵的變化來監測土壤中的污染狀況，而且四種氣孔特徵在特定的天數與不同濃度的硫酸及硝酸鉛有線性關係，可以利用生物檢定法得知相對的濃度大小。

本實驗雖然有初步的結果，但離實際應用秋海棠的氣孔特徵來量化土壤中的硫酸及硝酸鉛濃度，應該還有一大段路要走。生物是複雜且多變的，會依據環境因子的不同來調整自身的各種生理代謝反應，以維持各種恆定性。受限於高中實驗室的設備，我們無法控制秋海棠生長的濕度與溫度，造成在本實驗中，若是天數不對的話，便無法得到有意義的檢定區線，甚至在本實驗的特定天數下，由於上述條件的差異，可能也無法重複本實驗的結果，這個部分是我們後續需進一步努力與改進的方向，以達到可以廣泛應用的目標。

捌、結論

- 一、高濃度 (100mM) 的硫酸處理會促進 SD，但會抑制 SL、SW、及 CI；低濃度 (1mM) 的硫酸則會抑制 SD 及 CI，但會促進 SL 及 SW。
- 二、各種濃度的硝酸鉛處理皆會促進 SD 及 SW，但低濃度處理促進效果較顯著；各種濃度的硝酸鉛處理皆會抑制 SL 及 CI。

氣孔特徵	SD	SL	SW	CI
污染物				
硫酸	高濃度↑ 低濃度↓	高濃度↓ 低濃度↑	高濃度↓ 低濃度↑	高濃度↓ 低濃度↓
硝酸鉛	高濃度↑ 低濃度↑↑	高濃度↓ 低濃度↓	高濃度↑ 低濃度↑↑	高濃度↓ 低濃度↓

註：高濃度：100mM；低濃度：1mM

- 三、可以利用秋海棠的氣孔特徵來做生物檢定法的量化指標，用以定性及定量土壤中硫酸及硝酸鉛的污染程度。

參考文獻

- 張浩、王祥榮、王壽兵 (2004)。城市脅迫環境下的二球懸鈴木葉片氣孔數量特徵分析。
復旦學報 (自然科學版), 43 (4), 651-656。
- 李健掙 (2003)。酸雨對植物光合作用之影響。**臺中區農業改良場特刊**, 61, 89 - 90。
- 邱相齡、童美慈、房達文、劉水德、房樹生 (2013)。秋海棠 (*Begonia coccinea*) 在逆境生長條件下氣孔簇數量的變化關係。**科學教育**, 365, 38-53。
- 翁叔平、郭乃文、呂珮雯 (2013)。高高屏地區細懸浮微粒 (PM_{2.5}) 污染事件的綜觀環境分析。**大氣科學**, 41 (1), 43-64。
- 維基百科。2016 年 1 月 15 日，取自 <https://zh.wikipedia.org/zhtw/%E7%94%9F%E7%89%A9%E6%AA%A2%E5%AE%9A%E6%B3%95>
- 鄭湧涇 (2015)。**高中應用生物**。新北市：康熹文化。
- 行政院環境保護署環境檢驗所(2016)。2016 年 1 月 27 日，取自 <http://www.niea.gov.tw/business/default.asp?id=37>
- 袁秋英、林志鍵、蔣慕琰(2009)。生物感測器檢測環境污染物之研發與應用。行政院農業委員會出版品。2016 年 2 月 15 日，取自 <http://www.coa.gov.tw/view.php?catid=19734>
- 魏湘萍、于曉英、熊旋、侯志勇、謝榮、洪曉曉 (2009)。模擬酸雨對四種地被植物光合特性的影響。**江蘇農業科學**, 5, 318-319。
- 楊如意、唐建軍、楊一松、陳欣 (2007)。入侵植物和非入侵植物對土壤重金屬鉛污染的不同響應。**Botanical Studies**, 48, 453-458。
- 陳新紅、葉玉秀、龐閏瑾 (2009)。鉛、鎘及其互作對黃瓜種子發芽及幼根生長的影響。**北方園藝**, 5, 13-16。

統一編號

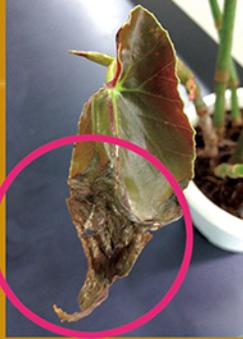
2006500011

相關資料請見本期第30~42頁

表一、各種條件處理14天後，秋海棠新葉的外觀變化。



水



硫酸1mM，
新葉有明顯枯萎現象



硫酸50mM，
新葉有明顯枯萎現象



硫酸100mM，
新葉有明顯枯萎現象



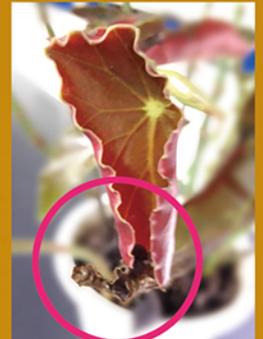
水



硝酸鉛1mM



硝酸鉛50mM，
新葉有明顯枯萎現象



硝酸鉛100mM，
新葉有明顯枯萎現象

ISSN 1021-3708



9 771021 370007