

中華民國第 61 屆中小學科學展覽會 作品說明書

高級中等學校組 動物與醫學科

佳作

052001

水熊蟲分類與建立模式生物系統評估

學校名稱：新北市私立竹林高級中學

作者： 高一 顏健弘	指導老師： 顏嘉怡
---------------	--------------

關鍵詞：水熊蟲、模式生物、環境壓力

摘要

大生熊蟲屬 (*Macrobiotus*)對環境壓力較敏感，其在面對環境壓力 (stress)會進入隱生具有作為重複使用模式生物潛能，以減少模式生物倫理問題。本研究以二叉檢索表和支序分類學鑑定南勢角山水熊蟲分布，以利收集實驗動物。並評估水熊蟲短期暴露 (20 分鐘) 於不同壓力下半數隱生時間、半數恢復時間與半數隱生濃度，發現水熊蟲在鹽類壓力下半數隱生濃度為 0.64%氯化鈉及 1126 mg/L 硝酸鹽氮；在 1~4 ppm 銅離子存活率分別為 87、76、60 以及 0%，半數隱生酸鹼值為 pH 5.08，而其在 20000 ppm 二氧化硫壓力無法存活。重複試驗水熊蟲在氯化鈉與硝酸鹽氮壓力下的形態、半數隱生時間及存活率無顯著差異，故推測水熊蟲具高潛能發展為重複使用模式生物，未來將探討其在長期暴露下的耐受度並評估其重複使用性。

壹、研究動機

小斑熊蟲 (*Milnesium tardigradum*) 最低能在酸鹼度 pH1.45 的環境下存活，大生熊蟲科 (*Macrobiotidae*)則在酸鹼度 pH4 無法存活 (Acevedo, 2008)。因次本研究想藉由大生熊蟲屬對環境變化敏感的特性，評估其於未來作為環境汙染檢測模式生物之可行性。

實驗過程中為了避免因物種而影響實驗檢測結果，因此只使用大生熊蟲屬進行實驗。為了取得大量大生熊蟲屬，將先以二叉檢索表與支序分類學，鑑定在地生活圈南勢角山的水熊蟲物種，尋找大生熊蟲屬來源充足的採集樣區，並建立本土南勢角山的水熊蟲二叉檢索表，以利後續建立模式生物系統實驗時，能快速採集大生熊蟲屬進行實驗。

模式生物相關研究廣泛應用於不同的物種，如：渦蟲常作為再生的研究的實驗動物，線蟲則是研究細胞凋亡的重要模式生物 (Goldstein, 2016)。近年來模式生物也常被用於評估毒物或汙染對環境生態及人體影響 (黃, 2015)。目前水熊蟲模式生物相關研究僅探討了太空的高劑量輻射與無重力等環境對其影響 (Weronika & Łukasz, 2017)，然而於人類平常活動的環境中，只確定水熊蟲能作為環境重金屬或空氣汙染指標生物 (Hygum *et al.*, 2017)，而本實驗希望將水熊蟲作為模式生物藉此進行水汙染或空氣汙染程度辨識，間接了解不同汙染程度對於人體的影響。

隨著農、工業發展成熟，農業用化肥與汙水中的氯化鈉以及硝酸鹽除了影響水中鹽度造

成汙染，亦曾經微生物分解後形成硝酸鹽氮，含量過高時造成藻類大量繁殖使水體優養化；重金屬與類金屬經常藉由廢氣或汙水的不當排放影響環境中的水域水質和植物；空氣汙染的硫化物與氮化物也會接觸雨水形成酸雨。目前研究重金屬壓力對水中無脊椎生物影響所用的模式生物如：虎斑猛水蚤 (*Tigriopus japonicus*)和安氏偽鏢水蚤 (*Pseudodiaptomus annandalei*) (沈，2012) (黃，2015)，推估水蚤在銅離子 (Cu^{2+})與鋅離子 (Zn^{2+})壓力下的半致死濃度 (Lethal Concentration 50%, LC_{50})，但這些模式生物實驗後須全數銷毀無法重複行實驗，造成生物倫理的問題。而水熊蟲面對環境改變時會隱生，待環境恢復正常後能恢復正常活動，讓水熊蟲作為模式生物評估環境汙染時具有重複使用潛能。因此本研究將分別以氯化鈉 (NaCl)、硝酸鹽氮 ($\text{NO}_3^- - \text{N}$)、重金屬銅離子 (Cu^{2+})、類金屬銻 (Sb)、不同酸鹼值環境以及二氧化硫 (SO_4)進行實驗，進一步嘗試建立大生熊蟲屬作為單一環境壓力 (stress)下檢測的模式生物系統，並重複實驗探討水熊蟲是否能重複使用。

貳、文獻探討

一、常見物種鑑定方法

物種鑑定主要有二歧檢索表、形態矩陣與分子生物定序 3 種方法。不同物種鑑定方法都有各自優缺點 (表 1)，因此在分類學上需要 3 者相輔相成進行物種鑑定。

表 1 不同物種鑑定方法比較

物種鑑定方法	原理	優點	缺點
二歧檢索表	根據形態特徵檢索	成本低，器材簡便	僅能對當地生物檢索。
形態矩陣	比對形態分析親緣關係	成本低，無地區限制	形態特徵容易歸類錯誤。
分子生物定序	比較保守序列分析親緣關係	結果準確	成本高，耗時。

二、模式生物簡介

人體或其他脊椎動物較不適合作為實驗動物，因此毒物、醫學、遺傳等相關研究在初期常藉由易取得、生命力強以及其獨特的生理現象或機制的模式生物，探討其在不同汙染物劑量或濃度下的半數效應濃度 (Effective Concentration 50%, EC_{50})、半數致死濃度 (Lethal Concentration 50%, LC_{50})、半數致死劑量 (Lethal Dosage 50%, LD_{50}) 與半數致死時間 (Lethal

Time 50%, LT₅₀)，將研究結果套用到其他生物以及人類，並進一步應用在醫學或環境毒物污染評估 (許，2009)。

水熊蟲面臨環境變化時，會觸發隱生機制，後續回到正常環境中可恢復正常活動，其可能重複進行實驗的性質，成為目前模式生物中的最大優勢。本實驗因應水熊蟲能隱生的機制，將以半數隱生時間 (Bio-Cryptobiosis Time 50%, BCT₅₀)、半數隱生濃度 (Bio-Cryptobiosis Concentration 50%, BCC₅₀) 以及半數恢復時間 (Bio-Revival Time, BRT₅₀)，並增加確認其實驗後存活率，評估重複利用可行性。最後在相同壓力的環境下，將水熊蟲的半數隱生隱生濃度 (Bio-Cryptobiosis Concentration 50%, BCC₅₀) 與不同生物的半數致死濃度 (Lethal Concentration 50%, LC₅₀)比較換算。

三、常見水中汙染

(一) 鹽類汙染 — 氯化鈉 (NaCl)與硝酸鹽 (NO₃⁻)

氯化鈉 (NaCl)為生活中常見鹽類之一，汙染多來自地下汙水、道路除冰鹽等 (Durickovic, 2019)。氯化鈉於水中具有高度溶解性，影響滲透壓後造成生物細胞萎縮，使動植物無法儲存水分與養分。

農業化肥與生活汙水等含氮物質經過水中微生物分解後會產生銨根離子 (NH₄⁺)，這些銨根離子進一步由硝化菌行硝化作用，最終降解成水中常見的鹽汙染：硝酸鹽 (NO₃⁻) (圖 1)。過量硝酸鹽使水體酸化，導致藻類會大量繁殖使水質優養化，水中溶氧量隨之降低，對水中生物造成傷害 (彭，2009)。檢測水中鹽類汙染時常以硝酸鹽氮 (NO₃⁻-N) 濃度作為依據。硝酸鹽氮 (NO₃⁻-N) 是指硝酸根 (NO₃⁻) 離子中的氮含量，通常氮佔硝酸根離子的 22.6%。

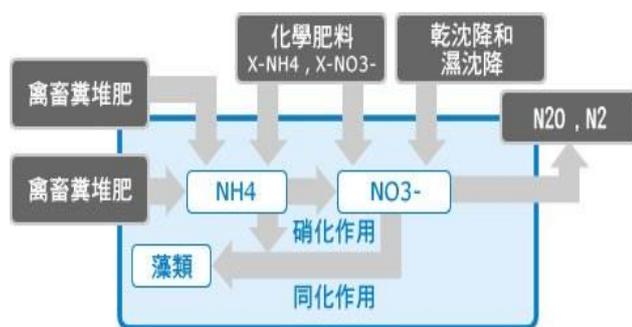


圖 1 氮循環示意圖 (彭，2009)

(二) 重金屬銅 (Cu) 汙染

隨著工業發展重金屬常使用於許多行業，常見重金屬如銅 (Cu) 用於殺菌農藥、殺螺藻類之藥劑與電池製造等行業。而環境學的領域中重金屬則定義為對生物具明顯毒性，且不易被生物分解 (何等, 2004)。為降低水中重金屬汙染，行政院環保署於 2017 年修訂放流水銅離子 (Cu^{2+}) 濃度的標準管限制值為 3 ppm。黃於 2015 的研究指出水中銅離子影響安氏偽鏢水蚤存活率和繁殖力，並推估銅與鋅重金屬離子於其的半數致死濃度 LC_{50} 分別為 $197\mu\text{gL}^{-1}$ 和 $547\mu\text{gL}^{-1}$ 。另外也有研究發現 24 小時對於陸生水熊蟲 *Echiniscus testudo & Ramazzottius oberhaeuseri* 的半數效應濃度 (EC_{50}) 分別為 0.178 ppm 和 0.310 ppm (Hygum *et al.*, 2017)。

(三) 類金屬銻 (Sb) 汙染

工業上銻常用於製作阻燃劑、電池與爆裂物。環境中的銻與其化合物廣泛存在於礦物、土壤與水環境，其中天然水體的銻濃度普遍低於 0.001 ppm，過量的銻容易使人體致癌或造成心肺疾病，因此現行法令規範飲用水中銻濃度須低於 0.01 ppm。環境水體中銻濃度 > 0.1 ppm 即可定義為銻汙染，其汙染源多數為燃燒工廠、汙水處理廠與礦區周遭水域等 (何與萬, 2004)。目前銻汙染研究發現，銻汙染對真鯛 (*Pagrus major*) 在 96 小時的 LC_{50} 為 644 ppm (Takayanagi, 2001)。

(四) 酸雨與空氣汙染

交通運輸工具與工業發展導致大量廢氣排放於空氣中形成空氣汙染，空氣中汙染物主要氣體為二氧化氮 (NO_2) 與二氧化硫 (SO_2)，溶於雨水中形成亞硫酸 (H_2SO_3) 與硝酸 (HNO_3)，改變雨水酸鹼值並影響水中及土壤生物。雨水正常酸鹼值為 6.5 ~ 5 之間，然而受到空氣汙染等因素影響雨水酸鹼值，雨水酸鹼值小於 5 定義為酸雨 (行政院環境保護署)。

四、水熊蟲對抗環境變化的機制

(一) 胞囊 (encystment)

胞囊通常於水中發生 (圖 2)，當溫度逐漸改變，環境不適合居住 (例如：漫長冬季) 時形成。胞囊形成過程中，水熊蟲收縮身體和減少運動。同時，他們會合成 2~3 層的新角質層，形成收縮的橢圓形囊腫。胞囊狀態下會減緩新陳代謝與養分的消耗並且能存活一年 (Westh

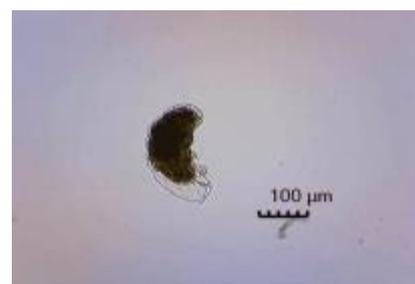


圖 2 胞囊狀態水熊蟲

& Kristensen, 1992)，一旦環境變得有利（例如春季），水熊蟲就可以在幾分鐘內迅速從休眠狀態中恢復。

（二）不同狀態隱生的水熊蟲

1. 缺氧隱生 (anoxybiosis) (圖 3)

環境含氧量過低時會使水熊蟲滲透調節失調，導致水熊蟲因吸收周遭水分使體腔膨脹。多數淡水與陸生水熊蟲此狀態下能存活3~5天。而潮間帶藤壺中的海生水熊蟲能存活超過1個月 (Wright, 1992)。



圖 3 缺氧隱生水熊蟲

2. 低溫隱生 (cryobiosis) (圖 4)

在低溫時，多數生物會因結冰導致細胞破裂無法生存。陸生水熊蟲能夠進行低溫隱生，利用一種無序蛋白 (TDP)來穩定水，可防止水分子結冰使細胞破裂並保持細胞結構完整，因此在高緯度與高海拔地區能發現其蹤跡 (Westh *et al.*, 1992)。

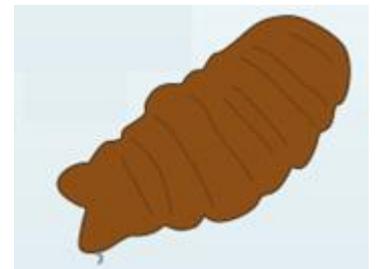


圖 4 低溫隱生水熊蟲 (Møbjerg & Neves, 2020)

3. 變滲隱生 (osmobiosis) (圖 5)

無論棲息於海洋、淡水或陸地的水熊蟲皆能在滲透壓低的環境（如蒸餾水）正常爬行活動，至於高滲透壓（高鹽度）的環境則會使水熊蟲進入變滲隱生並將身體收縮成酒桶狀。水熊蟲為了防止細胞在高滲透壓環境下萎縮，外界滲透壓提高時水熊蟲細胞會產生胺基酸、甘油、多元醇和甜菜鹼（介面活性劑），降低細胞滲透性並使其滲透壓與外界平衡 (Wright *et al.*, 1992)。

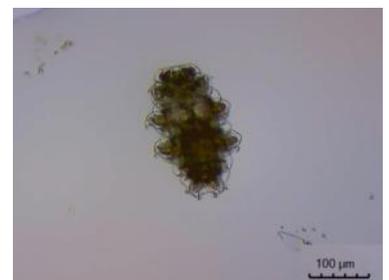


圖 5 變滲隱生水熊蟲

4. 低濕隱生 (anhydrobiosis) (圖 6)

僅有陸生物種的卵與成蟲個體才會有低濕隱生現象。海藻糖和甘油作為細胞膜保護劑，同時細胞膜外層會合成海藻糖，使細胞膜結構保持完整，使細胞內的水分含量降低到1%，降低新陳代謝。水熊蟲會縮成酒桶狀減少表面積並在身體外包覆蠟層防止水分因蒸散作用流失。(Bertolani *et al.*,1990; Pugh & McInnes,1998)。



圖 6 低濕隱生水熊蟲

參、研究目的

一、鑑定南勢角山水熊蟲的物種

- (一) 使用二叉檢索表鑑種與支序分類學鑑定南勢角山水熊蟲物種。
- (二) 建立南勢角山水熊蟲二叉檢索表。

二、大生熊蟲屬模式生物評估

- (一) 探討單一環境壓力（氯化鈉、硝酸鹽氮、銅、銻、酸鹼值與二氧化硫）下對大生熊蟲屬影響。
- (二) 探討大生熊蟲屬作為模式生物重複使用可行性。

肆、研究設備及材料

一、實驗動物—大生熊蟲屬 (*Macrobiotus*) (以下實驗均稱水熊蟲)

(一) 來源

大生熊蟲屬廣泛分布於全球 8 大生物地理分布區。本研究實驗動物採集自新北市南勢角山的捲葉濕地苔 (*Hyophila involute*)。

(二) 形態特徵

大生熊蟲屬 (*Macrobiotus*) (圖 7) 具有爪子的 4 對足，嘴巴後方有類似吸盤的口器 (圖 8)，可以刺穿食物。成蟲平均體長 200~700 μm (Altiero *et al.*, 2006)。本研究使用體長 300~500 μm 的大生熊蟲屬 (*Macrobiotus*) 進行實驗。

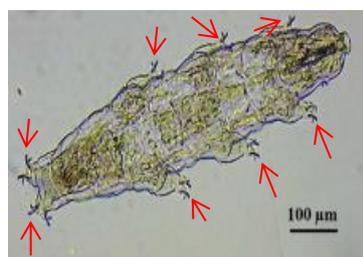


圖 7 大生熊蟲屬
紅色箭頭處為爪子構造。



圖 8 大生熊蟲屬口器構造
紅色箭頭處為(口器)。

(三) 生活史與培養方式

大生熊蟲屬 (*Macrobiotus*) 壽命為 3~7 個月，並藉由孤雌生殖產卵繁衍後代，完整生命週期中可產下 8~37 顆卵，產卵類型為體外卵，孵化時間約為 2~3 個月(Altiero *et al.*, 2006)。水熊

蟲的體長會隨著年齡增長改變，在生命週期中會藉由 3~4 次的蛻皮使其體長增加，蛻皮時機於性未分化 (undifferentiated)、性成熟以及前兩次產卵週期時進行。其食性為雜食性，主要攝食輪蟲、線蟲、蘚苔植物的假葉與土壤中的藻類。本研究將水熊蟲培養於 2 % 洋菜膠 (Agar) 培養基，每日更換培養基內的食物與原生環境水樣。

二、形態鑑定設備器材

名稱	備註
Cat eye三眼實體顯微鏡	購自瑞光儀器
UPMOST UPG309影像擷取器	
複式顯微鏡	Motic BA210
Wifi CMOS彩色相機	Moticam X ²
Nichipet微量吸取器	0.5-10 μ L
Nichipet微量吸管	0.1-10 μ L
PASCO PS-2230 測定儀	pH值測定

三、模式生物評估實驗所需藥品與器材

名稱	備註
氯化鈉 (NaCl)	
醋酸 (CH ₃ COOH)	購自昊明化工
氫氧化鈉 (NaOH)	
含水硫酸銅 (CuSO ₄ · 5H ₂ O)	
硝酸鈉 (NaNO ₃)	購自 SHIMAKYU CHEMICAL
硫酸銻 Sb ₂ (SO ₄) ₃	625 ppm Sb ³⁺ 原液

四、分子生物定序所需藥品與器材

名稱	備註
DNA extraction Lysis buffer	Direct PCR Lysis Reagent 8 μ L 200 mM DTT 1 μ L 5 mg/ml proteinase K 1 μ L
18s rRNA gene primers	
Forward: 18S_Tar_Ffl	(5'-AGGCGAAACCGCGAATGGCTC-3') 參考 Bertolani <i>et al.</i> (2014)
Reverse: 18S_Tar_Rr1	(5'-GCCGCAGGCTCCACTCCTGG-3')
Master mix	1X PCR Buffer 200 μ M dNTPs 1U <i>Taq</i> DNA polymerase 1 mM MgCl ₂ ddH ₂ O
Collection tube	購自 Geneaid
2 % Agarose	購自 LONZA
1X TAE Buffer	
DNA marker(100 bp ladder)	購自 Omics bio
6X Loading dye	
PCR 儀器	購自 biometra
離心機	購自 Thermo
乾浴槽	購自 BioSan
電泳槽與鑄膠器	購自 Labnet

伍、研究過程或方法

一、實驗架構圖 (圖 9)

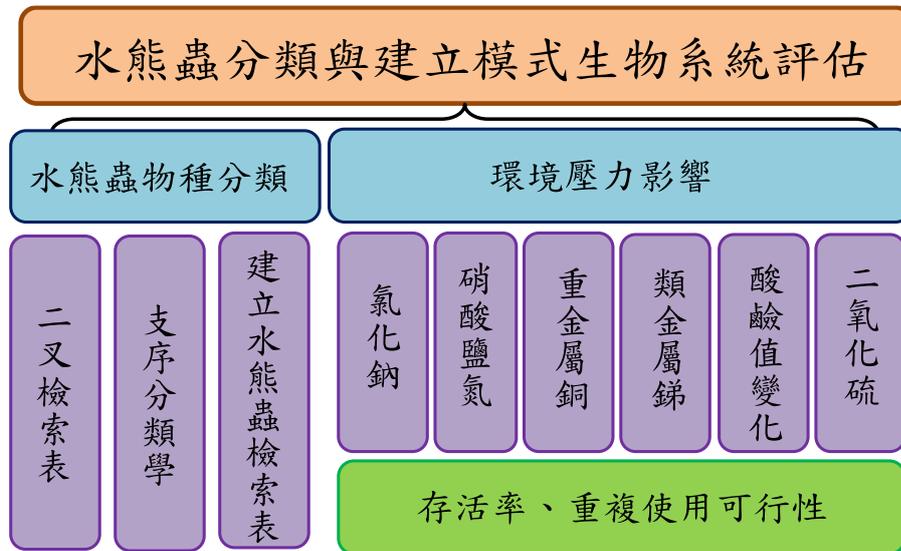


圖 9 實驗架構圖

二、水熊蟲活動狀態定義

本研究將水熊蟲在實驗中的各種狀態進行定義 (表 2)。實驗後 1 天會再次觀察水熊蟲活動狀態，若水熊蟲在原生水溶液環境仍處於類胞囊狀態則歸類為無法存活。

表 2 實驗中水熊蟲活動狀態定義

活動狀態	定義
正常活動	任一對足或口器可運動收縮。
完全隱生 (圖 10a)	體腔與 4 對足完全收縮，形態成酒桶狀。
不完全隱生 (圖 10b)	體腔收縮，任一對足未向內收縮則定義為不完全隱生。
胞囊 (圖 11a)	體腔與 4 對足向內收縮，能明顯觀察到皮蛻。
類胞囊 (圖 11b)	體腔與 4 對足拉長，僅有部分身體向內收縮，能觀察到皮蛻。
無法存活	體腔與 4 對足拉長。

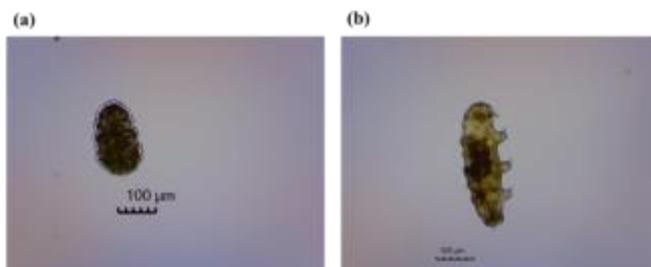


圖 10 水熊蟲隱生狀態

(a) 為完全隱生。(b) 為不完全隱生。

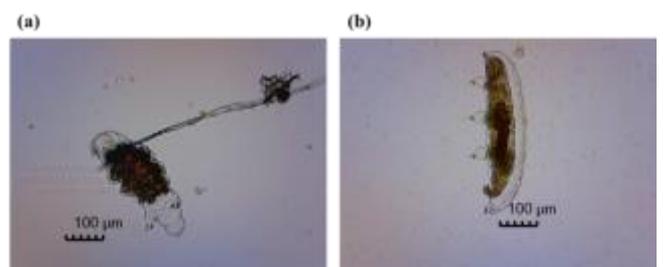


圖 11 水熊蟲胞囊狀態

(a) 為胞囊。(b) 類胞囊。

三、模式生物數據名詞定義與分析方式

(一) 半數隱生時間 (Bio-Cryptobiosis Time 50%, 簡稱 BCT50)

此毒物濃度，使 50 % 實驗總隻數的水熊蟲進入隱生狀態所需時間。

(二) 半數恢復時間 (Bio-Revival Time 50%, 簡稱 BRT50)

加入原生水溶液後，使 50 % 因環境壓力進入隱生狀態水熊蟲恢復活動所需時間。

(三) 半數隱生濃度 (Bio-Cryptobiosis Concentration 50%, 簡稱 BCC50)

使 50 % 實驗總隻數的水熊蟲進入隱生狀態所需毒物濃度。以統計軟體 GraphPad Prism 9.1.2 分析。

(四) 半數效應濃度 (Effective Concentration 50%, 簡稱 EC50) (濃度單位為 ppm)

此毒物濃度影響 50 % 實驗總隻數的水熊蟲活動率。以統計軟體 GraphPad Prism 9.1.2 分析。

(五) 半數致死濃度 (Lethal Concentration 50%, 簡稱 LC50) (濃度單位為 ppm)

使 50 % 實驗總隻數的水熊蟲暴露一定時間後無法存活之毒物濃度。以統計軟體 GraphPad Prism 9.1.2 分析。

(六) 實驗後水熊蟲存活率

實驗中進入隱生狀態或仍為正常活動的水熊蟲，於實驗結束後 7 天仍存活百分比。

四、水熊蟲物種鑑定

參考顏在 2020 年研究使用濕式漏斗法收集棲息於蘚苔植物的水熊蟲。本研究在南勢角山共規劃 4 個樣區 23 個採樣點採集蘚苔植物收集水熊蟲 (圖 12) 進行樣本物種鑑定。

(一) 使用二叉檢索表鑑種 (參考 Key to Tardigrade Genera)

【實驗步驟】

1. 將欲鑑定之水熊蟲移至懸滴玻片，並加入 100 μ L 的 20 % 乙醇浸泡 5 分鐘。
2. 吸出乙醇，改以蒸餾水 100 μ L 浸泡麻醉後的水熊蟲，使其體腔舒展。
3. 將懸滴玻片移至複式顯微鏡下觀察，依據二叉檢索表的描述逐一比對特徵，找出最相近



圖 12 南勢角山樣區

(a)A-L 為水熊蟲分布位置，D 為南勢角山。(b)甲-丁為 D (南勢角山)。

的水熊蟲物種。

(二) 形態矩陣比對親緣關係

使用水熊蟲的特徵繪製形態矩陣。特徵部分參考 (Guil *et al.*, 2013)。

【實驗步驟】

1. 歸納出欲分析之水熊蟲類群與特徵，使用 Nexus Data Editor 製作特徵矩陣。
2. 利用 PAUP4 的分支定界法 (branch & bound search method) 作為親緣工具分析。

(三) 分子生物定序鑑種

使用形態分類觀察記錄形態特徵後，進一步使用分子生物技術進行基因定序。由於 Leong (2019) 的研究發現水熊蟲 ITS-2 & COI 的基因片段無法成功擴增 DNA，因此本研究直接使用濾紙壓碎水熊蟲後進行聚合酶連鎖反應 (PCR) (Bertolani *et al.*, 2014)，使用 18S ribosomal RNA gene (18S rRNA gene) (primers 為 18S_Tar_Ff1 和 18S_Tar_Rr1) 之基因進行定序分析鑑定 (Bertolani *et al.* 2014)。

1. 聚合酶連鎖反應 (PCR) (Bertolani *et al.* 2014)

【實驗步驟】

- (1) 將 2 μ L 的 DNA template、0.5 μ L 的 Primer Forward、0.5 μ L 的 Primer Reverse、12.5 μ L 的 Master mix、9.5 μ L 的 ddH₂O，總體積 25 μ L 加入微量離心管內。
- (2) 將微量離心管放入 PCR 儀器中，PCR 反應條件為 95 °C 5 分鐘 1 個循環；95 °C 30 秒、50 °C 90 秒、72 °C 1 分鐘，共 40 個循環 (Bertolani *et al.*, 2014)。

2. DNA 電泳分析

PCR 反應後將產物進行電泳分析，以確認目標 DNA 片段的產物及大小是否正確。

3. 核酸定序與比對親緣關係

比對水熊蟲的 DNA 序列差異並使用 MEGA6 的 UPGMA 繪製出親緣關係樹。

(四) 建立南勢角山水熊蟲物種檢索表

本實驗將依據形態與分子生物定序的鑑種結果，歸納南勢角山不同水熊蟲種類的特徵，建立南勢角山的水熊蟲二叉檢索表。

五、大生熊蟲屬模式生物系統建立與評估

此實驗探討大生熊蟲屬在不同環境壓力因子下的 BCT₅₀、BRT₅₀、BCC₅₀、EC₅₀ 以及 LC₅₀，

並探討水熊蟲實驗後的存活率，評估水熊蟲作為模式生物重複使用的可行性。

(一) 實驗步驟 (n = 30 ; Bio = 10 ; Tech = 3)

1. 實驗組

- (1) 取 10 隻正常活動的水熊蟲，拍攝其於原生水溶液中活動狀態。
- (2) 以 dH₂O 將其清洗 3 次後，置於懸滴玻片凹槽中，緩慢加入 100 μL 的實驗溶液。
- (3) 每隔 10 分鐘觀察水熊蟲活動情形，直到半數水熊蟲無活動狀態（隱生、胞囊或無法存活），記錄 BCT50。若觀察 3 小時仍未達至半數水熊蟲無活動狀態則結束實驗。
- (4) 將實驗動物以 dH₂O 清洗 3 次，置於含有藻類與食物的原生水溶液中。每隔 10 分鐘觀察一次，共觀察 30 分鐘，記錄 BRT50 後結束實驗。若 30 分鐘隱生狀態水熊蟲仍未達至半數恢復活動狀態，則將所有水熊蟲移至培養基，並每隔 2 天觀察其活動狀態，共觀察 2 週結束實驗。
- (5) 結束實驗後，每隔 2 天觀察實驗後的水熊蟲狀態。於實驗結束後第 7 天計算實驗後水熊蟲存活率。存活率公式： $[(\text{實驗後第 7 天正常活動隻數} + \text{隱生水熊蟲隻數}) / (\text{實驗組水熊蟲總數})] \times 100\%$ 。
- (6) 利用統計軟體 GraphPad Prism 9.1.2 分析 BCC50、EC50 以及 LC50。

2. 對照組：將水熊蟲置於 dH₂O 持續觀察直至實驗結束。

(二) 探討不同濃度氯化鈉 (NaCl) 壓力對水熊蟲影響

滲透壓改變導致生物的細胞萎縮或膨脹。氯化鈉為常見影響細胞滲透的化合物。多數水中生物需於等張溶液環境下才能生存，如水蚤和草履蟲的等張溶液為 0.6 % NaCl；人類等張溶液為 0.9 % NaCl，因此實驗中 NaCl 濃度以以上濃度做為參考進行配置。

步驟

1. 實驗組：探討 0.15、0.3、0.6 與 0.9%NaCl 對水熊蟲影響。

同 **五、(一) 實驗步驟**。

(三) 探討不同濃度硝酸鹽氮 (NO₃⁻-N) 壓力對水熊蟲影響

預備實驗

環保署訂定的地下水標準為 100 mg/L NO₃⁻-N。本研究預實驗探討 100 mg/L NO₃⁻-N 對水熊蟲影響，發現實驗後 2 小時仍有 90 % 的水熊蟲正常活動狀態，因此後續實驗將提升至 1000 mg/L NO₃⁻-N 以上進行實驗。

步驟

1. 實驗組：探討 1000、1500 與 2000 mg/L NO₃⁻-N 對水熊蟲影響。

同 **五、(一) 實驗步驟**。

(四) 探討不同濃度銅離子 (Cu²⁺) 壓力對水熊蟲影響

步驟

1. 實驗組：探討水中 1、2、3、4 ppm [Cu²⁺] (Hygum, 2017) 對水熊蟲影響。

(1) 使用含水硫酸銅 (化學式：CuSO₄·5H₂O) 與 dH₂O 混和配置不同濃度銅離子水溶液

(CuSO₄·5H₂O 中銅元素質量比為 25.45%。濃度換算：1 ppm ≡ 1 mg/L)。

(2) 同 五、(一) 實驗步驟。

(五) 探討不同濃度銻 (Sb) 壓力對水熊蟲影響

預備實驗

本實驗室只具有 625 ppm 的硫酸銻 [Sb₂(SO₄)₃] 原液，因此試驗先以 100 ppm Sb 探討對水熊蟲影響，實驗 1 小時後僅 20 % 水熊蟲進入隱生狀態，因此正式實驗將濃度提升至 400 ppm Sb。

步驟

1. 實驗組：探討 400、500、600 ppm Sb 對水熊蟲影響。

(1) 以 625 ppm Sb₂(SO₄)₃ 原液稀釋至不同濃度的銻實驗溶液。

(2) 同 五、(一) 實驗步驟。

(六) 探討緩慢改變酸鹼值壓力對水熊蟲影響 (此實驗因步驟差異只具 BRT₅₀、BCC₅₀ 和實驗後水熊蟲存活率數據)

初次實驗時將活動狀態水熊蟲直接暴露於 pH4~7 的溶液環境中，發現 pH 4 與 pH 5 環境下水熊蟲無法存活（圖 13）。一般環境污染中酸鹼值為逐漸變化，並非如先前實驗的酸鹼值急遽變化，因此正式實驗設計探討水熊蟲在酸鹼值逐漸改變時狀態。

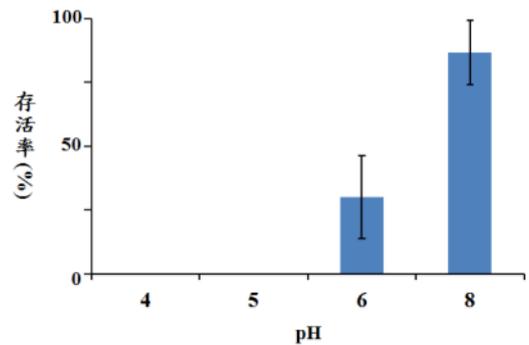


圖 13 水熊蟲直接暴露於不同酸鹼環境下

1. 探討緩慢改變酸鹼值壓力對水熊蟲影響

預備實驗

將水熊蟲置於 pH 7 的實驗環境，接著藉由更換實驗溶液使實驗環境酸鹼值每 10 分鐘下降 0.5，直至實驗環境為 pH 4。實驗結果顯示所有水熊蟲在 pH5.5 時皆正常活動，實驗環境為 pH 5 時所有水熊蟲進入隱生狀態，當酸鹼值下降至 pH 4 時所有水熊蟲則無法存活。為了找出水熊蟲在環境酸鹼值改變的 BCC₅₀，後續實驗進一步探討水熊蟲在 pH 5.1、5.2、5.3 與 5.4 的活動狀態。

步驟

(1) **實驗組**：實驗環境自 pH 7 每隔 10 分鐘就依序向酸性更換溶液配置（實驗溶液配置 pH7、6.5、6、5.5、5.4、5.3、5.2、5.1 和 5）。

A. 同 **五、(一)、1. (1) (2) 實驗步驟**

B. 實驗環境酸鹼值下降至 pH 5 時同 **五、(一)、1. (4) (5) 實驗步驟**。

C. 利用統計軟體 GraphPad Prism 9.1.2 分析 BCC₅₀。

2. 探討不同二氧化硫 (SO₂) 濃度壓力對水熊蟲影響

酸雨的形成多數來自空氣污染中的二氧化硫，二氧化硫易溶於雨水中形成亞硫酸 (H₂SO₃) 使雨水酸鹼值降低。

預備實驗

本實驗室只具有 5% H₂SO₃。第 1 次預備實驗將水熊蟲直接暴露於 10000 與 50000 ppm H₂SO₃ 發現水熊蟲無法存活。由於亞硫酸極易揮發，因此本研究在第 2 次預備實驗使 250、500 與 1000 ppm 亞硫酸於密閉空間揮發成二氧化硫(25000、50000 與 100000 ppm)後，使其

再次溶於實驗水樣形成亞硫酸，發現所有水熊蟲皆無法存活，以 125 ppm 亞硫酸進行實驗水熊蟲則會進入隱生狀態，因此正式實驗探討水熊蟲於小於 250 ppm 亞硫酸揮發成二氧化硫 (5000、10000、12500、18750 與 25000 ppm) 環境下對水熊蟲的影響。

步驟

(1) **實驗組**：探討 50、100、125、187.5 及 250 ppm H_2SO_3 揮發成二氧化硫 (5000、10000、12500、18750 與 25000 ppm) 對水熊蟲影響。

A. 將 10 隻水熊蟲置於懸滴玻片，並加入 100 μL dH_2O 。將玻片置於方形培養皿蓋。

B. 將 10 mL H_2SO_3 加入圓形培養皿中，將其置於方形培養皿內，蓋上方形培養皿的蓋子，製造密閉空間環境 (圖 14)。每隔 10 分鐘觀察水熊蟲活動情形，直到半數水熊蟲無活動狀態 (隱生、胞囊或無法存活)，記錄 BCT_{50} 。若觀察 3 小時仍未達至半數水熊蟲無活動狀態則結束實驗。

C. 同 **五、(一)、1. (4) (5) (6) 實驗步驟**。

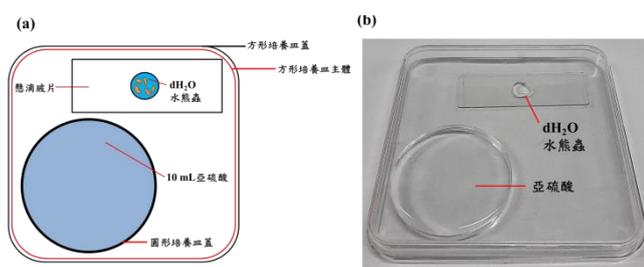


圖 14 二氧化硫對水熊蟲影響實驗裝置

(a) 實驗裝置示意圖。(b) 為實驗裝置實際圖。

(七) 探討水熊蟲作為模式生物重複使用可行性

目的：一般模式生物在實驗後須銷毀且無重複利用之可行性，本實驗探討水熊蟲經歷實驗環境壓力後能否再次作為模式生物。

探討實驗後自隱生恢復正常活動的水熊蟲是否能重複使用，並再次於相同實驗環境壓力進入隱生狀態，比較第 1 次與第 2 次實驗的 BCT_{50} 、 BRT_{50} 和實驗後水熊蟲存活率是否有顯著差異 (因實驗配置溶液皆為單一濃度，無法統計 BCC_{50} 、 LC_{50} 和 EC_{50})。

1. **實驗組**：將第一次實驗存活的水熊蟲再次於相同單一環境壓力下 (0.9 % NaCl 、2000 mg/L NO_3^- -N 以及 2 ppm Cu^{2+}) 進行實驗。實驗步驟參照 **五、(四)、實驗組步驟**。

2. 對照組：將未經歷過任何模式生物評估實驗的水熊蟲，於同實驗組單一環境壓力下 (0.9 %NaCl、2000 mg/L NO₃⁻-N 以及 2 ppm Cu²⁺) 進行實驗，實驗步驟參照五、(四)、實驗組步驟。

陸、研究結果

一、南勢角山水熊蟲鑑定

綜合二叉檢索表的形態特徵 (圖 15a) 與支序分類學鑑定結果，鑑定南勢角山水熊蟲為 *Macrobiotus* sp., *Macrobiotus kamilae*, *Macrobiotus shonaicus*, *Paramacrobiotus* sp., *Adorybiotus* sp., *Nebularmis reticulatus* & *Limmenius*，其中大生熊蟲屬 (*Macrobiotus* sp.) 數量最多，因此在環境壓力耐受度相關實驗使用大生熊蟲屬作為實驗動物。自製出南勢角山水熊蟲二叉檢索表，可以快速檢索出大生熊蟲屬，以利實驗進行。

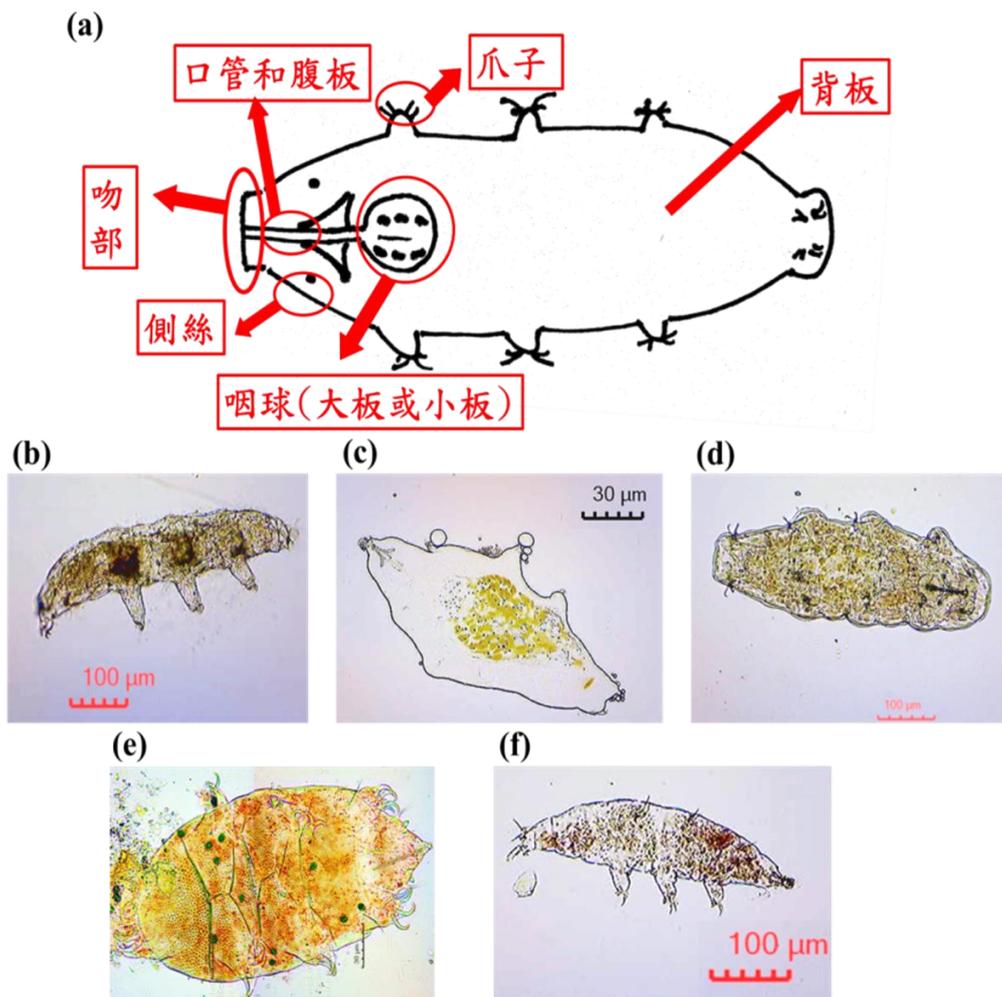


圖 15 南勢角山水熊蟲物種

(a) 為水熊蟲辨識特徵 (b) 為 *Macrobiotus*。(c) 為 *Paramacrobiotus* sp.。(d) 為 *Adorybiotus*。(e) 為 *Nebularmis reticulatus*。(f) 為 *Limmenius*。

二、大生熊蟲屬模式生物評估

(一) 探討不同濃度氯化鈉壓力對水熊蟲影響

水熊蟲半數隱生時間 (BCT_{50})隨氯化鈉濃度增加極顯著下降 ($p < 0.01$) (圖 16a)。分析水熊蟲在加入氯化鈉溶液 20 分鐘後的隱生率，發現其半數隱生濃度 (BCC_{50})為 0.64 %氯化鈉溶液 (圖 16b)，並在 1 天後正常活動率為 100 % (圖 16c)，且實驗後 7 天有超過 80 % 的存活率 (圖 16d)。統計實驗中所有水熊蟲形態，在 0.15 %氯化鈉濃度下有 17 %水熊蟲處於正常活動狀態；而 0.3、0.6 與 0.9 %氯化鈉濃度下所有水熊蟲隱生；其中超過 60 %水熊蟲為完全隱生 (圖 16e)，實驗結束後水熊蟲置於原生水溶液半數恢復時間皆為 10 分鐘。

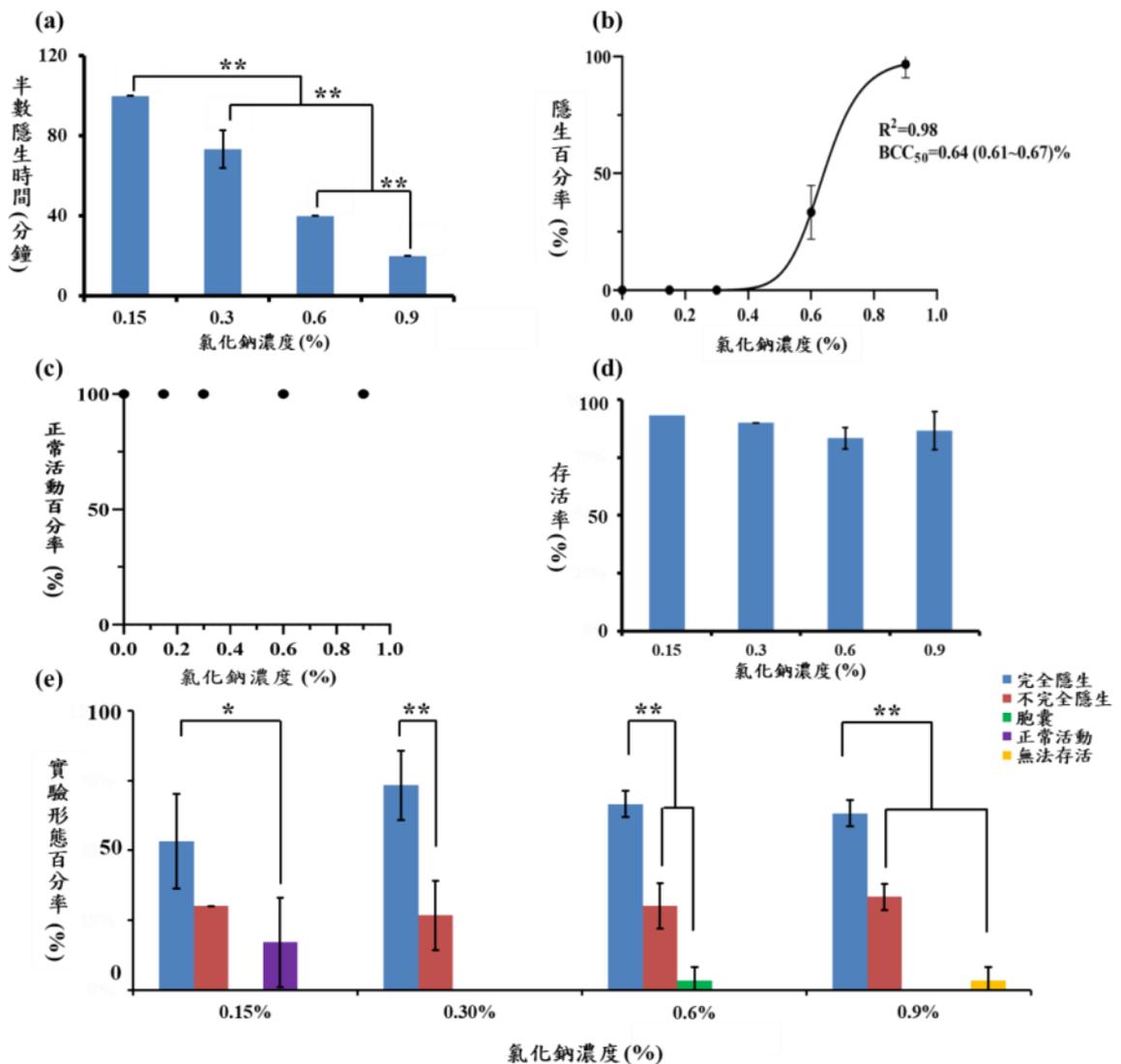


圖 16 不同濃度氯化鈉壓力對水熊蟲影響

(a)水熊蟲半數隱生時間(BCT_{50})；(b) 以實驗 20 分鐘後水熊蟲隱生百分率推算半數隱生濃度 (BCC_{50})；(b) 內為 95% 信賴區間(confidence interval, CI)濃度；(c) 為水熊蟲在實驗 1 天後的正常活動率；(d) 實驗結束後 7 天水熊蟲的存活率；(e) 統計實驗中水熊蟲的形態。以 One Way ANOVA 分析， $p < 0.05$ (*)具顯著差異， $p < 0.01$ (**)具極顯著差異。

(二) 探討不同濃度硝酸鹽氮壓力對水熊蟲影響

水熊蟲在 1000 mg/L 硝酸鹽氮的半數隱生時間 (BCT₅₀)與 1500 和 2000 mg/L 硝酸鹽氮相比極顯著增加 ($p < 0.01$) (圖 17a)。分析水熊蟲在硝酸鹽氮溶液中 20 分鐘後的隱生率，得知其半數隱生濃度 (BCC₅₀)為 1126 mg/L 硝酸鹽氮 (圖 17b)，1 天後除了 2000 mg/L 硝酸鹽氮造成 13 %水熊蟲無法存活，其他存活率皆為 100 % (圖 17c)，實驗後 7 天則有超過 87 %的存活率 (圖 17d)。觀察並統計水熊蟲在 1000、1500 與 2000 mg/L 硝酸鹽氮中狀態，發現其中超過 75 %水熊蟲為完全隱生 (圖 17e)。實驗結束後水熊蟲置於原生水溶液半數恢復時間皆為 10 分鐘。

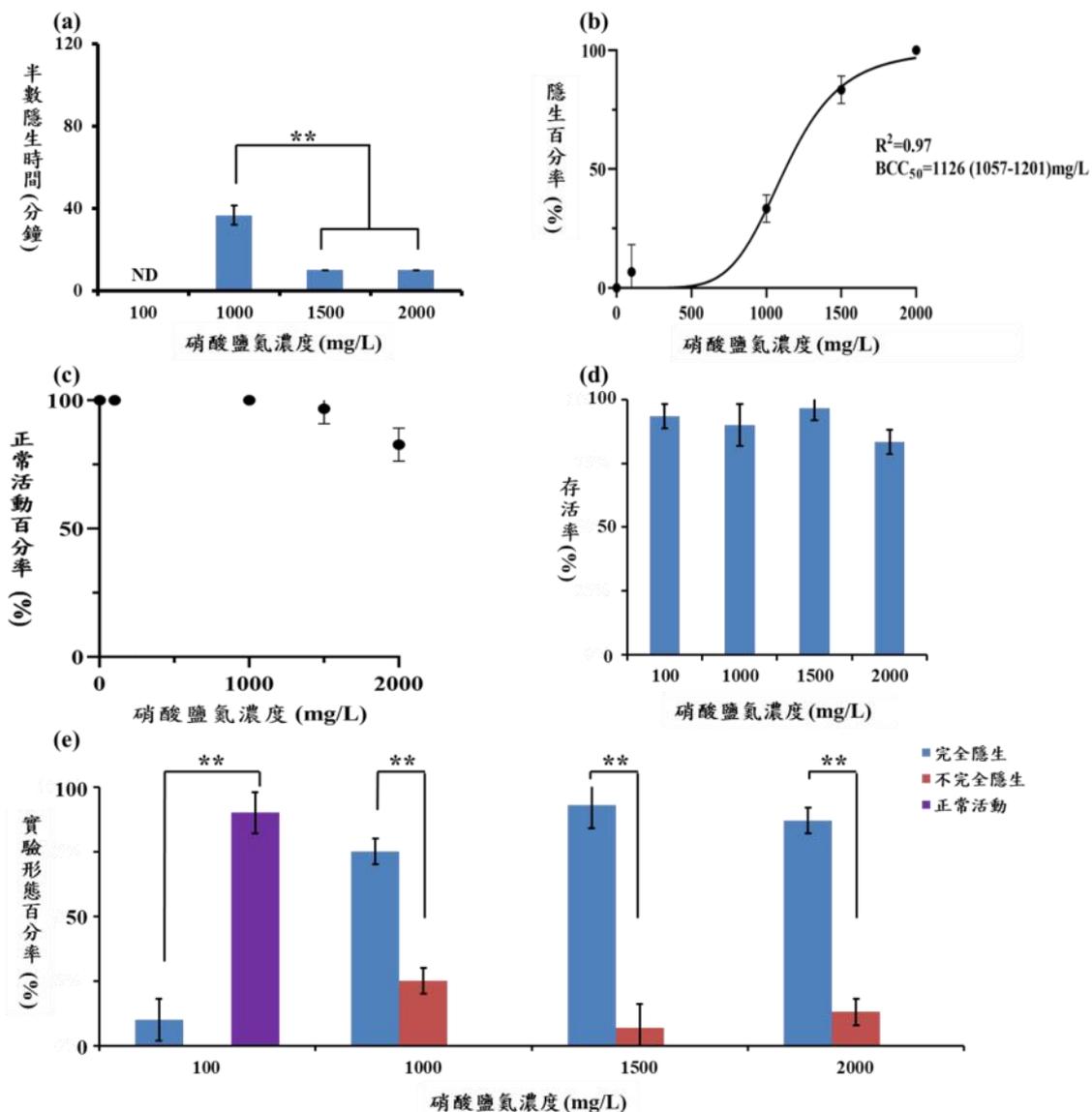


圖 17 不同濃度硝酸鹽氮壓力對水熊蟲影響

(a)水熊蟲半數隱生時間(BCT₅₀);(b) 實驗 20 分鐘後水熊蟲隱生百分率推及半數隱生濃度 (BCC₅₀);(b)內為 95% 信賴區間(confidence interval, CI)濃度;(c) 為水熊蟲在實驗 1 天後正常活動率;(d) 水熊蟲在實驗後 7 天的存活率。(e) 統計實驗中不同水熊蟲的形態。以 One Way ANOVA 分析, $p < 0.05$ (*)具顯著差異, $p < 0.01$ (**)具極顯著差異。

(三) 探討不同濃度銅離子壓力對水熊蟲影響

發現 4 種銅離子濃度壓力下皆有水熊蟲隱生與無法存活，其中 4 ppm 銅離子的半數隱生時間 (BCT₅₀)與 1、2 和 3 ppm 銅離子具顯著差異 ($p < 0.05$) (圖 18a)。並發現水熊蟲在銅離子壓力下 20 分鐘後半數隱生濃度 (BCC₅₀)以及半數致死濃度 (LC₅₀)為 1.98 與 3.2 ppm 銅離子 (圖 18b & c)；實驗後 7 天 1、2 與 3 ppm 銅離子存活率皆超過 60 % (圖 18d)。依據水熊蟲在不同濃度銅離子的正常活動百分率數據推估半數效應濃度為 2.4 ppm (圖 18e)，4 ppm 銅離子水熊蟲則無法存活 (圖 18f)。實驗結束後水熊蟲置於原生水溶液超過 30 分鐘皆未恢復正常活動。

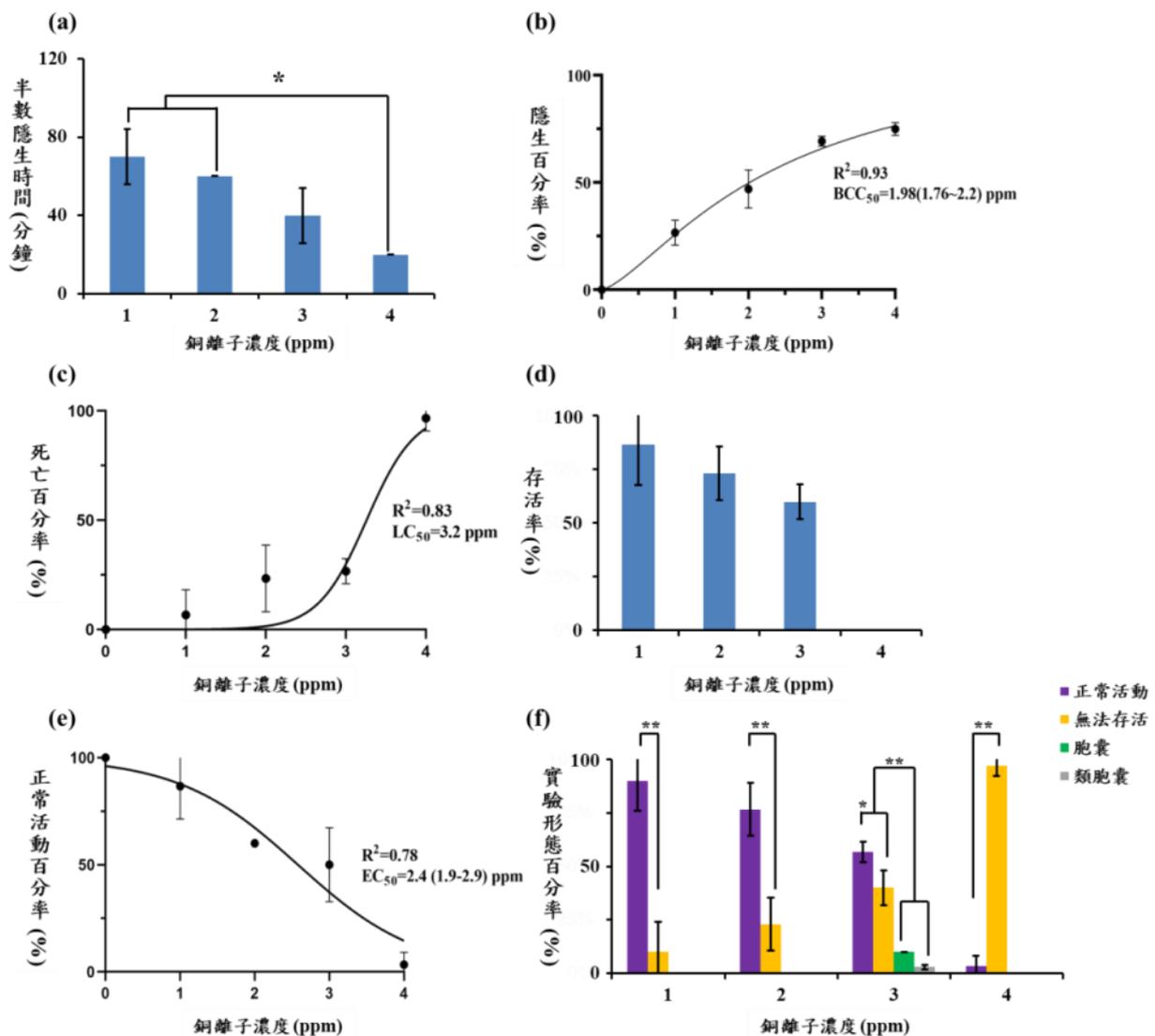


圖 18 不同濃度銅離子壓力對水熊蟲影響

(a)水熊蟲半數隱生時間(BCT₅₀)；(b)與(c) 根據實驗 20 分鐘後水熊蟲隱生及死亡百分比推算半數隱生濃度 (BCC₅₀)與半數致死濃度 (LC₅₀)，(b)、(c) 內為 95% 信賴區間(confidence interval, CI)濃度；(d) 統計實驗結束後 7 天水熊蟲的存活率。(e) 實驗 1 天後水熊蟲活動狀態推估出半數效應濃度 (EC₅₀)。(f) 統計實驗中水熊蟲的形態。以 One Way ANOVA 分析， $p < 0.05$ (*)具顯著差異， $p < 0.01$ (**)具極顯著差異。

(四) 探討不同濃度銻壓力對水熊蟲影響

400、500 與 600 ppm 銻壓力下水熊蟲半數隱生時間皆為 10 分鐘 (圖 19a)，進一步分析發現水熊蟲在銻壓力下半數隱生濃度 (BCC_{50}) 為 415.5 ppm (圖 19b)。實驗結束後 1 天統計 400、500 與 600 ppm 銻壓力下水熊蟲的正常活動百分率分別為 93%、93%與 73% (圖 19c)。實驗結束後水熊蟲存活率皆超過 70% (圖 19d)。實驗中能觀察到完全隱生、不完全隱生與類胞囊形態 (圖 19e)，實驗結束水熊蟲置於原生環境溶液半數恢復時間皆為 10 分鐘。

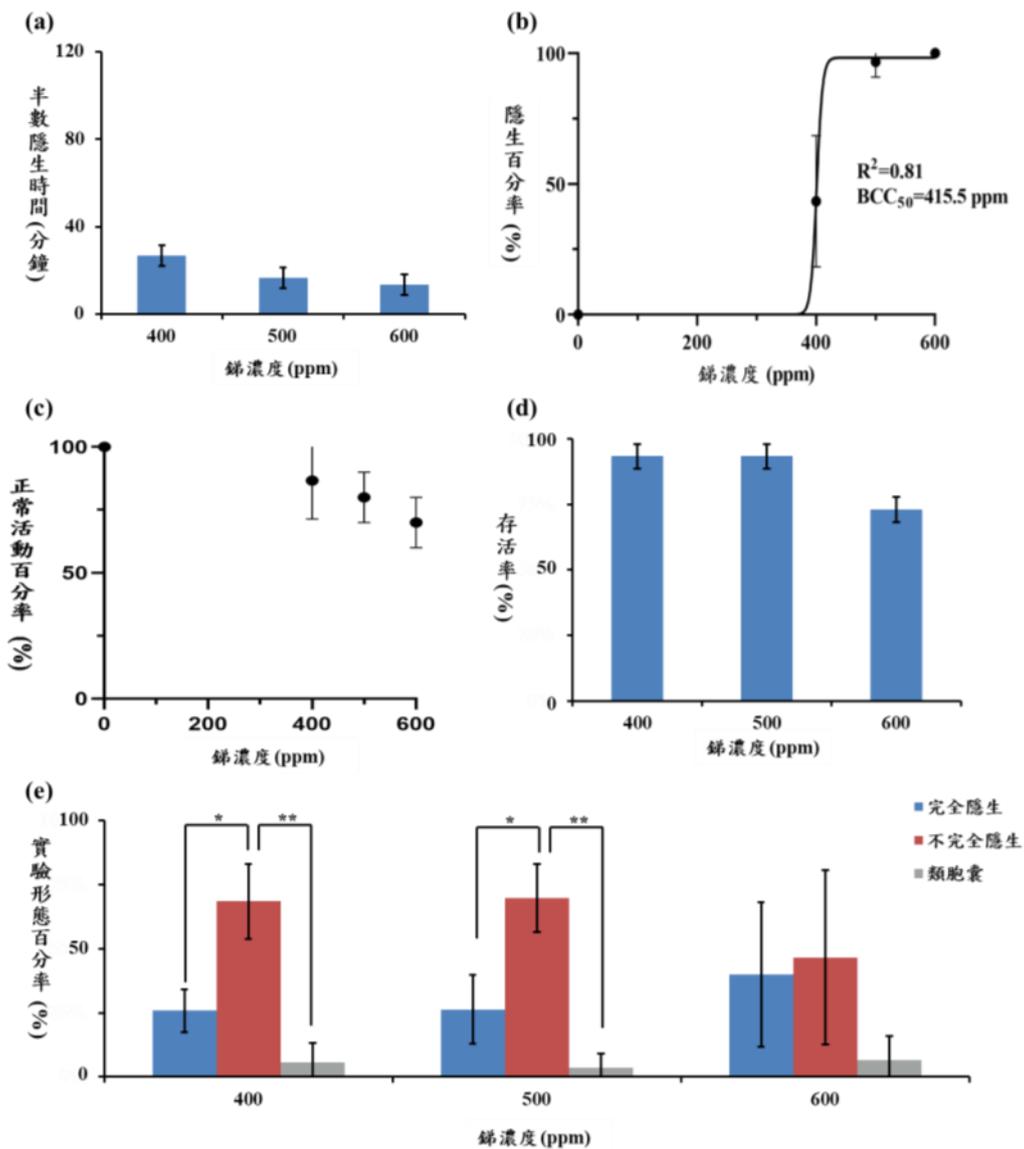


圖 19 不同濃度銻壓力對水熊蟲影響

(a)水熊蟲半數隱生時間(BCT₅₀)；(b) 實驗 20 分鐘後水熊蟲隱生百分比推算半數隱生濃度 (BCC_{50})；(c) 實驗 1 天後水熊蟲活動狀態推估出半數效應濃度 (EC_{50})；(d)為實驗後 7 天存活率；(e) 統計實驗中水熊蟲的形態。以 One Way ANOVA 分析， $p < 0.05$ (*)具顯著差異， $p < 0.01$ (**)具極顯著差異。

(五) 探討緩慢改變酸鹼值壓力對水熊蟲影響

水熊蟲存活率隨實驗環境酸鹼值逐漸下降而降低，根據水熊蟲在隱生率推算出半數隱生酸鹼值 (BCC₅₀)為 pH 5.08 (圖 20a)，實驗結束後 7 天存活率皆超過 80 % (圖 20b)。其在 pH 5 及 pH 4.5 實驗環境下為完全隱生與不完全隱生；於 pH 4 實驗環境下則無法存活(圖 20c)。

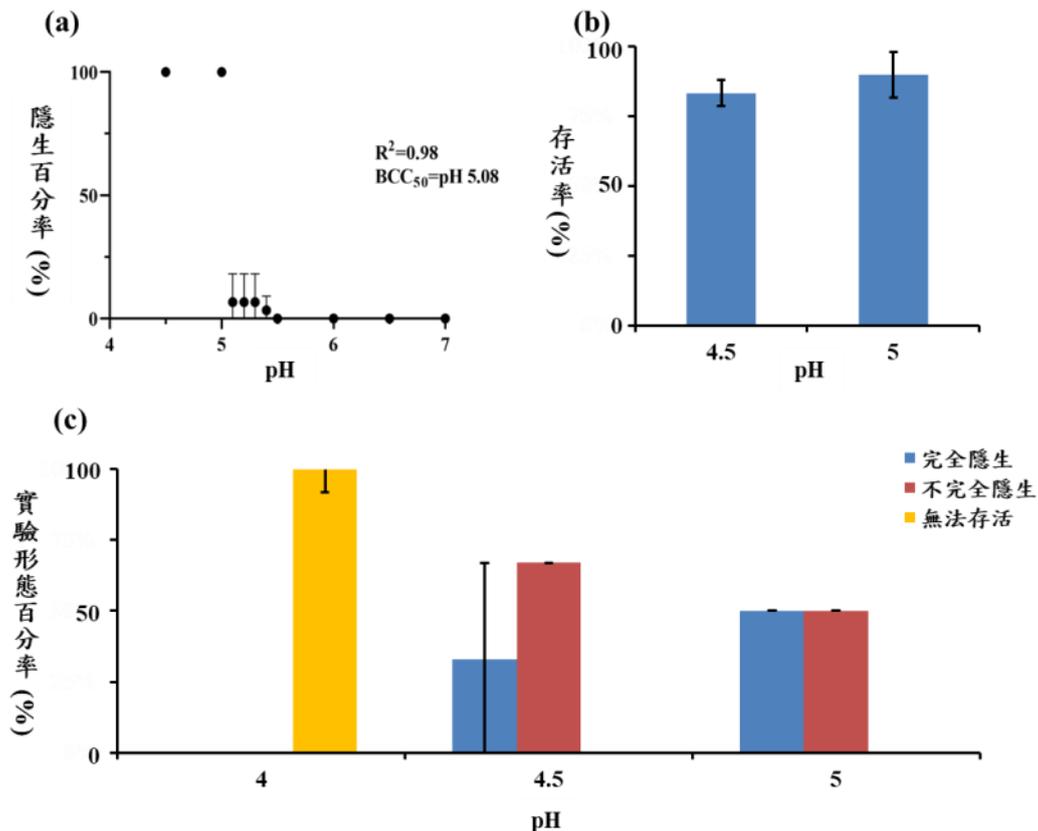


圖 20 緩慢改變酸鹼值壓力對水熊蟲影響

(a) 根據隱生百分率推算水熊蟲半數隱生酸鹼值 (BCC₅₀)。 (b) 水熊蟲在實驗結束後 7 天的存活率， (c) 統計實驗中水熊蟲的形態。以 One Way ANOVA 分析， $p < 0.05$ (*) 具顯著差異， $p < 0.01$ (**) 具極顯著差異。

(六) 探討不同濃度二氧化硫壓力對水熊蟲影響

發現 5000 ppm 二氧化硫半數隱生時間為 17 分鐘，10000、15000 與 18750 ppm 二氧化硫半數隱生時間為 10 分鐘 (圖 21a)。分析水熊蟲在二氧化硫壓力下 20 分鐘的隱生率與死亡百分率，發現其半數隱生濃度 (BCC₅₀) 為 6163 ppm 二氧化硫以及半數致死濃度 (LC₅₀) 為 19360 ppm 二氧化硫 (圖 21b&c)；而半數效應濃度為 19554 ppm (圖 21d)。實驗結束後水熊蟲存活率皆超過 80 % (圖 21e)。水熊蟲在 25000 ppm 二氧化硫壓力無法存活 (圖 21f)。

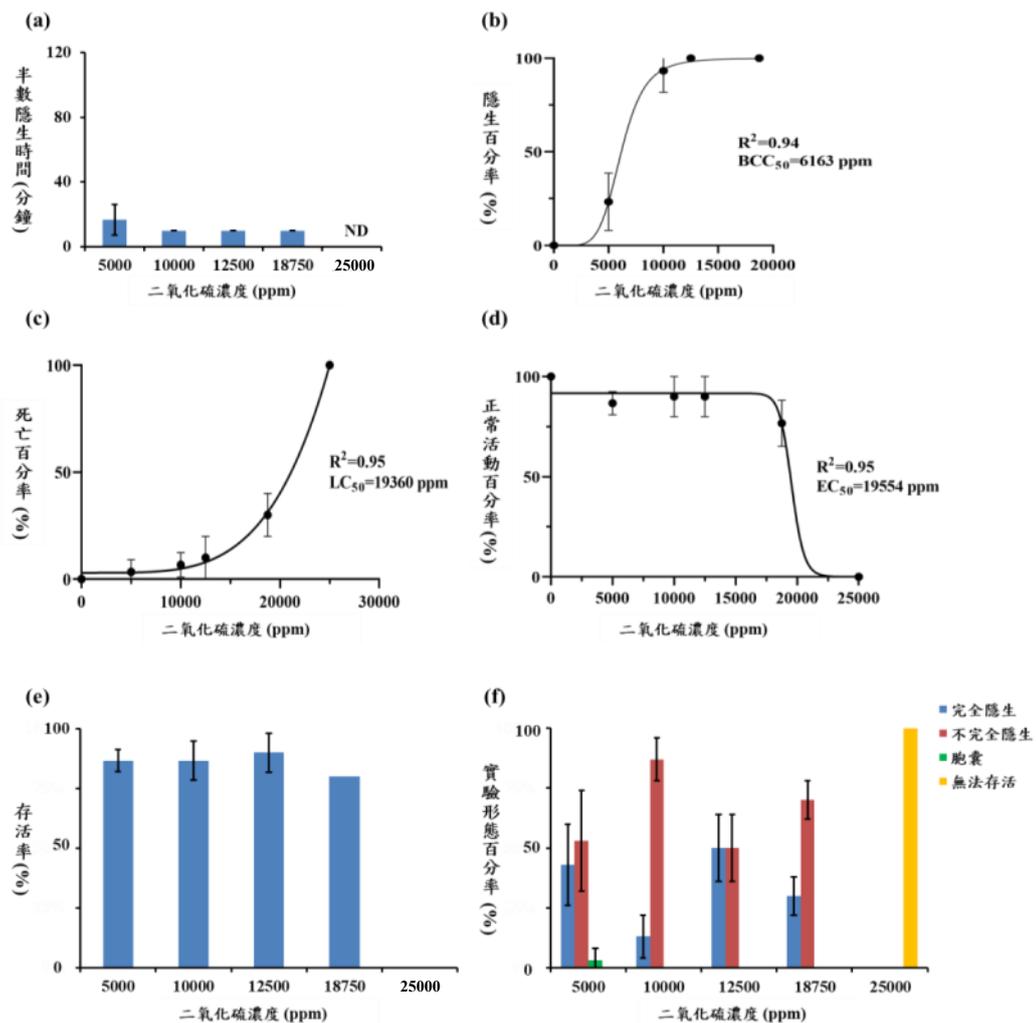


圖 21 不同濃度二氧化硫壓力對水熊蟲影響

(a)水熊蟲半數隱生時間(BCT₅₀)；(b)、(c) 實驗 20 分鐘後水熊蟲隱生與死亡百分比推算半數隱生濃度 (BCC₅₀)與半數致死濃度 (LC₅₀)；(d) 根據實驗 1 天後水熊蟲活動狀態推估出半數效應濃度 (EC₅₀)；(e) 水熊蟲在實驗結束後 7 天的存活率。(f) 統計實驗中水熊蟲的形態。以 One Way ANOVA 分析， $p < 0.05$ (*)具顯著差異， $p < 0.01$ (**)具極顯著差異。

(七) 評估水熊蟲能否作為重複使用之模式生物

將水熊蟲重複進行實驗探討其是否具有重複使用潛能，由圖 22a 中可得知水熊蟲面對氯化鈉及硝酸鹽氮所造成的環境壓力於第一次實驗及第二次實驗在存活率及半數隱生所需時間皆無顯著差異；而水熊蟲在經歷第二次銅離子實驗後，實驗中出現大量類胞囊活動狀態(圖 22a&b)，存活率及半數隱生所需時間及顯著降低 ($p < 0.01$)。

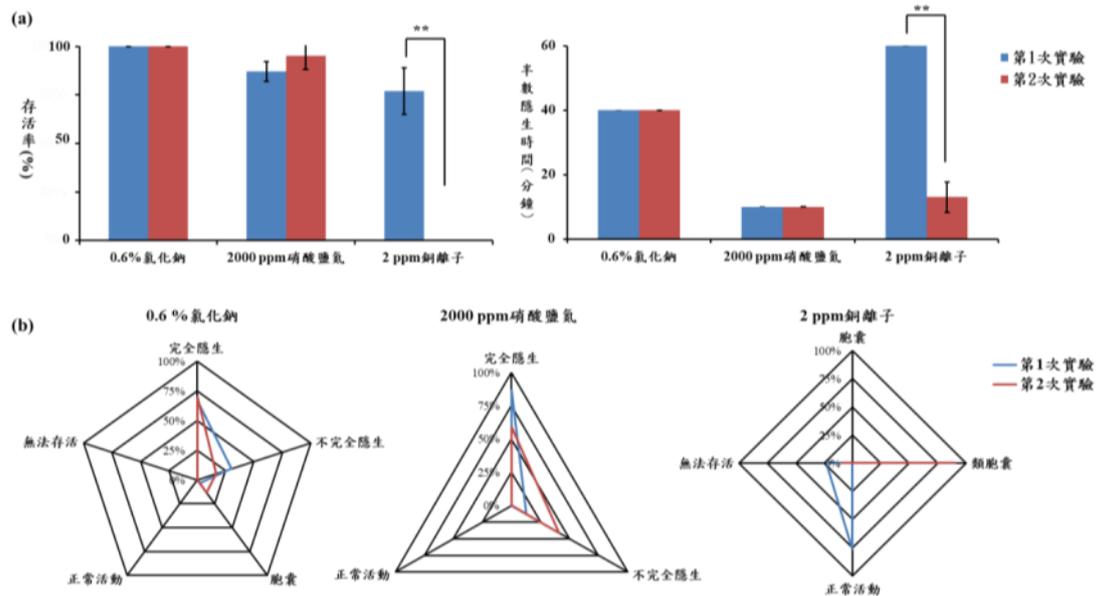


圖 22 水熊蟲重複使用評估

將已經實驗過存活 7 天以上的水熊蟲再次進行重複實驗，(a) 2 次實驗水熊蟲存活率及半數隱生所需時間；(b) 將其形態比例繪製成雷達圖。

柒、討論

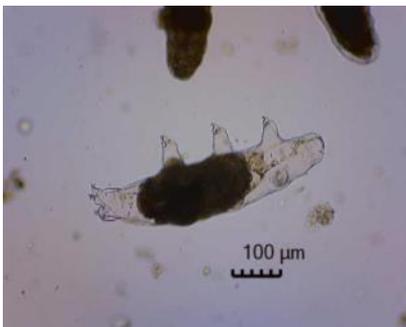
一、水熊蟲二叉檢索表與支序分類學物種鑑定結果比對

本研究使用二叉檢索表、形態矩陣及分子生物定序繪製親緣關係樹鑑定水熊蟲，三者鑑定結果差異較大，推測鑑定時所拍攝形態特徵不明顯，導致進行形態上的分類部分特徵無法辨識。鑑定過程中發現下列兩種情形的水熊蟲不適合做形態鑑定：文獻提到水熊蟲在準備蛻皮時可於其足部看到舊皮的爪及新長出來的爪（張等，2013）；水熊蟲胞囊分三層，其形成胞囊初期除了個體上具有爪子，亦可以於胞囊最外層看到爪構造（Janelt, 2020）。真緩步綱的水熊蟲爪子為其最主要判斷種類特徵（Guil *et al.*, 2013），因此上述兩種狀態的水熊蟲容易導致特徵判定錯誤。推測先前所收集到的水熊蟲多數處於準備蛻皮或形成胞囊階段，未來進行形態鑑定上所使用的水熊蟲，應更嚴謹確認其生理狀態，避免進行形態鑑定時特徵不明顯造成誤判，花時間重複鑑定。

二、類胞囊狀態的水熊蟲無法存活

在所有實驗結果發現進入胞囊狀態的水熊蟲待環境恢復皆可存活（圖 23a）。在 400-600 ppm 銻以及 2 ppm 銅離子第 2 次實驗中可觀察到水熊蟲呈現類胞囊狀態，其中 2 ppm 銅離子第 2 次實驗後有高達 90 % 的類胞囊狀態，最後無法存活（圖 23b&c）。推測水熊蟲體內組織在第 1 次 2 ppm 銅離子實驗受到重金屬傷害，使其在第二次實驗無法進入完全隱生或不完全隱生形態。根據實驗結果推測水熊蟲若無法及時應付環境壓力下進入完全隱生、不完全隱生或胞囊狀態，會呈現類胞囊形態，之後直接死亡無法存活。未來將探討 1 與 3 ppm 銅離子在第 2 次實驗是否也進入類胞囊狀態無法存活。

(a) 胞囊狀態



(b) 類胞囊狀態(銅離子)



(c) 類胞囊狀態(銻)



圖 23 胞囊與類胞囊形態的水熊蟲

(a) 為 2 ppm 銅離子壓力下第 2 次實驗胞囊水熊蟲。(b) 為 2 ppm 銅離子壓力下第 2 次實驗類胞囊水熊蟲。(c) 為水熊蟲在 600 ppm 銻壓力下的類胞囊形態。

三、不同環境壓力水熊蟲實驗中特殊活動狀態與實驗後 7 天存活率比較

由表 3 與圖 24 實驗結果發現水熊蟲不容易受到鹽類、類金屬銻與 pH 4.5~7 的壓力影響其存活率，但高濃度重金屬銅會影響其存活率。現行法規訂定水中硝酸鹽氮與銻的容許濃度標準為 45 mg/L 與 0.1 ppm。另外雨水 pH<5 定義為酸雨。因水熊蟲在加入單一環境壓力（氯化鈉、硝酸鹽氮、銻、酸鹼值與二氧化硫）後，會快速進入隱生自我保護，觀察 7 天以上存活率、形態與活動力皆與未實驗的水熊蟲狀態一致，初步推測水熊蟲適合檢測環境中酸雨、重度硝酸鹽氮與銻汙染，未來需要進一步利用電子顯微鏡拍攝水熊蟲實驗前、中與後形態差異，才能確認是否組織細胞有受到損傷。在銅離子壓力下，也可利用傳統觀測其 LC50，不適合再次利用。

表 3 不同環境壓力水熊蟲實驗中特殊活動狀態與 7 天存活率比較

環境壓力	實驗中特殊活動狀態*	實驗後 7 天存活率
氯化鈉	在 0.6%NaCl 胞囊狀態佔 3~13%	100 %
硝酸鹽氮	-	超過 83 %
銅離子	-	1、2 與 3 ppm 銅離子存活率皆超過 60 % 4 ppm 銅離子壓力下無法存活
銻	類胞囊狀態佔 6~7%	存活率超過 83 % 僅類胞囊狀態水熊蟲無法存活
pH 4.5 與 pH 5	-	100%
二氧化硫	-	存活率皆超過 90 %。

*所有實驗皆可觀察到完全隱生與不完全隱生

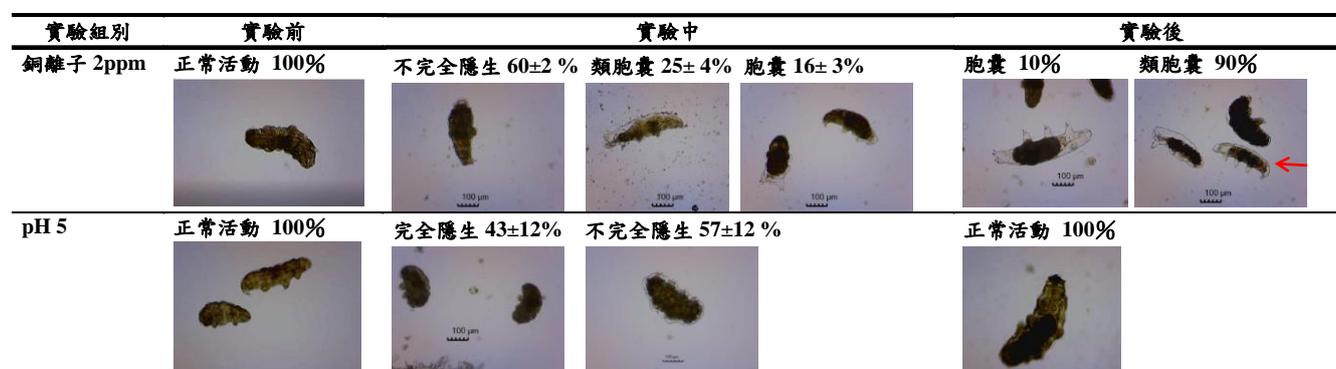


圖 24 水熊蟲進行不同單一環境壓力實驗前中後形態

此為重複進行實驗結果，每組皆觀察、整理並統計，因篇幅僅呈現部份結果。

四、銅離子壓力對水熊蟲影響文獻實驗目的與方法比較

文獻 (Hygum ,2019)將 2 種陸生水熊蟲暴露於 1~4 ppm 銅離子進行實驗，並依據實驗後 24 小時的正常活動百分率推算出水熊蟲暴露在銅離子壓力下 2、24 與 48 小時的半數效應濃度 (EC₅₀)。而本研究目的則是評估大生熊蟲能否作為可重複使用的模式生物，探討其實驗後回收率。將大生熊蟲於銅離子壓力下短時間暴露 20 分鐘，發現其對於銅離子壓力具有極高敏感性，大生熊蟲半數隱生以及半數致死濃度為 1.98 與 3.2 ppm 銅離子；而實驗後 7 天 1、2 及 3 ppm 銅離子存活率皆超過 60 % (表 4)。現行放流水銅離子濃度的標準管限制值為 3 ppm，但由於水熊蟲在實驗後 7 天的存活率低於鹽類和類金屬等環境壓力，故推測水熊蟲僅適合檢測環境在短時間內的銅離子壓力，可利用傳統觀測其 LC₅₀，不適合再次利用。

表 4 銅離子壓力對水熊蟲影響文獻實驗目的與方法比較

實驗物種	實驗方法	監測數據	發展與應用	參考文獻
<i>Macrobiotus</i> sp.	暴露於 1~4 ppm 銅離子 20 分鐘	BCT ₅₀ BCC ₅₀ LC ₅₀ EC ₅₀	1.作為重複利用模式生物 2.於短時間評估銅污染濃度	本研究
<i>E. sigismundi</i> <i>R. oberhaeuseri</i>	暴露於 1~4 ppm 銅離子 2、24 與 48 小時	EC ₅₀	1.毒物耐受性相關研究	Hygum ,2019

五、重金屬銅離子影響水熊蟲機制推測

本研究統計了水熊蟲在不同環境壓力下的隱生狀態，發現超過 95%水熊蟲在 3~4 ppm 銅離子壓力下為不完全隱生狀態，此狀態下 4 對足並未完全收縮。

完全隱生的水熊蟲藉由肌動蛋白絲 (actin filaments)控制外側肌肉群 (調節身體與 4 對足收縮) 與內臟肌肉群 (控制體內組織器官排列) 使其形成酒桶狀 (tun formation)隱生形態 (Møbjerg & Neves, 2020)；文獻亦提到水熊蟲體表具有各種離子通道 (Halberg & Møbjerg ,2013b)。推測實驗中銅離子穿越水熊蟲體表離子通道與其體內肌動蛋白結合，當重金屬與蛋白質結合後會使活性含氧物 (reactive oxygen system)產量增加，進而引起氧化壓力反應 (oxidative stress)，製造出過氧化物與產生自由基導致毒性作用，損害水熊蟲肌肉細胞與組

織，使其無法進入完全隱生狀態。

重複進行銅離子壓力實驗發現水熊蟲在重複實驗後 7 天存活率為 0 %，證明水熊蟲對於銅離子壓力極為敏感，且第一次實驗時肌肉與體內組織已受損，導致第二次實驗後存活率及隱身所需時間極顯著降低 ($p < 0.01$)，並無法進入完全隱生。未來將嘗試對水熊蟲組織進行切片觀察其肌肉組織在銅離子壓力下變化。

捌、研究貢獻

- 一、自製南勢角山水熊蟲二叉檢索表，能快速鑑定在地生活圈水熊蟲物種，有利於實驗動物收集。
- 二、研究結果發現大生熊蟲具潛能應用在檢測環境中酸雨、重度硝酸鹽氮與銻污染，並在檢測鹽類污染具有重複使用之可行性。

玖、結論

- 一、經物種鑑定得知南勢角山大生熊蟲屬 (*Macrobotus*) 數量最多，分布最廣。並自製在地生活圈二叉檢索表，能快速收集大量大生熊蟲屬進行實驗。
- 二、大生熊蟲屬模式生物評估
 - (一) 推測大生熊蟲能檢測的環境壓力為：氯化鈉、硝酸鹽氮、銻、酸雨、二氧化硫以及短時間的銅離子壓力。
 - (二) 大生熊蟲在第 2 次 0.6 % 氯化鈉與 2000 mg/L 硝酸鹽氮實驗的形態、半數隱生時間、半數恢復時間與存活率與第 1 次實驗無顯著差異，能夠重複檢測環境中鹽類壓力。而在銅離子壓力下無法再次利用。

壹拾、未來展望

- 一、嘗試利用電子顯微鏡觀察水熊蟲於銅離子等環境壓力下的形態、肌肉與體內組織變化。
- 二、探討水熊蟲在第 2 次重複實驗的半數隱生濃度 (BCC₅₀) 是否與第 1 次實驗有所差異，並對水熊蟲在銻、酸鹼值與二氧化硫壓力下進行第 2 次實驗。評估水熊蟲在該環境壓力下能否重複使用，嘗試將其實際應用於實際環境污染檢測。

三、探討水熊蟲在長時間環境壓力下的半數隱生與半數致死濃度，了解其耐受性。

四、建立水熊蟲模式生物系統模型。

壹拾壹、 參考文獻

一、 書籍、科展、小論文、期刊

- (一) 何強，井文涌，王翊亭 (2004). 環境學導論。清華大學出版社，125–160.
- (二) 何孟常與萬紅豔。(2004). 環境中銻的分佈，存在形態及毒性和生物有效性. *化學進展*, 16(01), 131.
- (三) 沈泊璵 (2012)。國立臺灣海洋大學海洋生物研究所碩士論文：重金屬銅和鋅對安氏偽鏢水蚤 (*Pseudodiaptomus annandalei*)之急毒性與慢毒性測試。
- (四) 張明輝，吳定娟，陳汝能，吳丹，周堪偉，& 劉清神。(2013). 大生熊蟲屬緩步動物培養的初步研究. *廣東畜牧獸醫科技*, 1.
- (五) 黃一喜 (2015)。科技部大專學生研究計畫研究成果報告：初步建立海水急毒性模式生物及參考毒物。
- (六) 顏健弘 (2020)。中華民國第 60 屆中小學科學展覽會作品說明書：水中蛟「熊」-校園水熊蟲分布與種類調查。
- (七) Altiero, T., Rebecchi, L., & Bertolani, R. (2006). Phenotypic variations in the life history of two clones of *Macrobotus richtersi* (Eutardigrada, Macrobiotidae). *Hydrobiologia*, 558(1), 33-40.
- (八) Acevedo, C. A. 2008. Analyzing the active time and dissolved oxygen levels of *Melnesium (sic) tardigradum* in its anoxybiotic state in both acidic and basic conditions. *Biology 402 Senior Seminar, Research project and thesis*. Available at AccessScience@McGraw-Hill .
- (九) Bertolani, R., L. Rebecchi, & G. Beccaccioli. 1990. Dispersal of *Ramazzottius* and other tardigrades in relation to type of reproduction. *Invert. Reprod. Develop.* 18:153-157.
- (十) Bertolani, R., Guidetti, R., Marchioro, T., Altiero, T., Rebecchi, L., & Cesari, M. (2014). Phylogeny of Eutardigrada: New molecular data and their morphological support lead to the identification of new evolutionary lineages. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 76, 110-126.
- (十一) Durickovic, I. (2019). NaCl Material for Winter Maintenance and Its Environmental Effect. In *Salt in the Earth*. IntechOpen.
- (十二) Goldstein, B., & King, N. (2016). The future of cell biology: emerging model organisms. *Trends in cell biology*, 26(11), 818-824.
- (十三) Guil, N., Machordom, A., & Guidetti, R. (2013). High level of phenotypic homoplasy amongst eutardigrades (Tardigrada) based on morphological and total evidence phylogenetic analyses. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 169(1), 1-26.
- (十四) Halberg, K. A., Larsen, K. W., Jørgensen, A., Ramløv, H., & Møbjerg, N. (2013b). Inorganic ion composition in Tardigrada: cryptobionts contain a large fraction of unidentified organic solutes. *J. Exp. Biol.* 216, 1235–1243. doi: 10.1242/jeb.075531

- (十五) Hengherr, S., Worland, M. R., Reuner, A., Brümmer, F., & Schill, R. O. (2009). High-temperature tolerance in anhydrobiotic tardigrades is limited by glass transition. *Physiological and Biochemical Zoology*, 82(6), 749-755.
- (十六) Hygum, T. L., Fobian, D., Kamilari, M., Jørgensen, A., Schiøtt, M., Grosell, M., & Møbjerg, N. (2017). Comparative investigation of copper tolerance and identification of putative tolerance related genes in tardigrades. *Frontiers in physiology*, 8, 95.
- (十七) Janelt, K., & Poprawa, I. (2020). Analysis of encystment, excystment, and cyst structure in freshwater eutardigrade *Thulinus ruffoi* (Tardigrada, Isohypsibioidea: Doryphoribiidae). *Diversity*, 12(2), 62.
- (十八) Kumar, D. K. V., Choi, S. H., Washicosky, K. J., Eimer, W. A., Tucker, S., Ghofrani, J., ... & Moir, R. D. (2016). Amyloid- β peptide protects against microbial infection in mouse and worm models of Alzheimer's disease. *Science translational medicine*, 8(340), 340ra72-340ra72.
- (十九) Møbjerg, N., & Neves, R. (2020). New insights into survival strategies of tardigrades. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 110890.
- (二十) Pugh, P. & S. McInnes. 1998. The origin of Arctic terrestrial and freshwater tardigrades. *Polar Biol.* 19:177-182.
- (二十一) Takayanagi, K. (2001). Acute toxicity of waterborne Se (IV), Se (VI), Sb (III), and Sb (V) on red seabream (*Pargus major*). *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 66(6), 808-813.
- (二十二) Weronika, E., & Łukasz, K. (2017). Tardigrades in space research-past and future. *Origins of Life and Evolution of Biospheres*, 47(4), 545-553.
- (二十三) Westh, R, J. Kristiansen, & A. Hvidt. 1991. Ice-nucleating activity in the freeze-tolerant tardigrade *Adorybiotus coronifer*. *Comp.Biochem. Physiol.* 99A:401-404.
- (二十四) Westh, P & R. Kristensen. 1992. Ice formation in the freeze-tolerant eutardigrades *Adorybiotus coronifer* & *Amphibolus nebulosus* studied by differential scanning calorimetry. *Polar Biol.*12:693-699.
- (二十五) Wright, J. C., Westh, P., & Ramløv, H. (1992). Cryptobiosis in tardigrada. *Biological reviews*, 67(1), 1-29.

二、網站

- (一) 行政院環保署空氣品質監測網酸雨資訊。2021年3月取自：<https://reurl.cc/ynv226>
- (二) 許一懿。(2009年08月14日)。模式生物(*Model Organisms*)-上。科學Online。2021年05月取自：<https://reurl.cc/a9N7eQ>。
- (三) 彭宗仁。(2009年10月)。水體中硝酸鹽污染之危害。雪霸國家公園資訊網。2021年05月取自：<https://reurl.cc/KArv8j>。
- (四) *Key to Tardigrade Genera*. (1999, October 1). Retrieved March 8, 2020, from: <https://reurl.cc/qg147g>.

【評語】 052001

大生熊蟲屬 (Macrobiotus)對環境壓力較敏感，其在面對環境壓力 (strss)會進入隱生具有作為重複使用模式生物潛能。研究目的 一、 鑑定南勢角山水熊蟲的物種， 二、 大生熊蟲屬模式生物評估。結論： 經物種鑑定得知南勢角山大生熊蟲屬數量最多，分布最廣。大生熊蟲屬模式生物評估 (一) 推測大生熊蟲能檢測的環境壓力為：氯化鈉、硝酸鹽氮、銻、酸雨、二氧化硫以及短時間的銅離子壓力。檢測單純環境變因所造成的影響，邏輯合理，中規中矩，但創意有限，沒有預期外的發現。

1. 此作品的研究目的清楚，但對相關研究領域的貢獻度可能不高。
2. 過去已有利用水熊蟲做為環境壓力監測之模式生物的類似報告，只是環境壓力有些不同，故新穎性略有不足，也看不出其實用價值。
3. 此研究所使用的方法大致合理，資料的數據分析亦有使用統計方法及顯著性檢定，以確定該分析是否具顯著性差異。此外，有些實驗設計會提到使用的樣本數，如 10 隻，但很多地方未提及，也建議可增加樣本數。討論的段落，可加強說明此作品如何可用於監測環境壓力的變化，例如一些實際範例的說明。另外，文獻引用有些小錯誤：應該是 Hygum，2017 非 2019。
4. 簡報資料編排合理，圖表內容清晰。
5. 除了形態觀察之外，最好能深入探討其他的分子變化。

作品簡報

水熊蟲分類與建立模式生物系統評估

高級中等學校組

動物與醫學科

前言

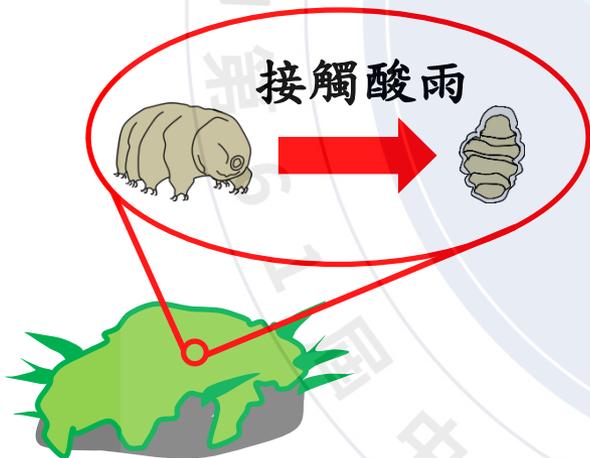


圖1 指標生物

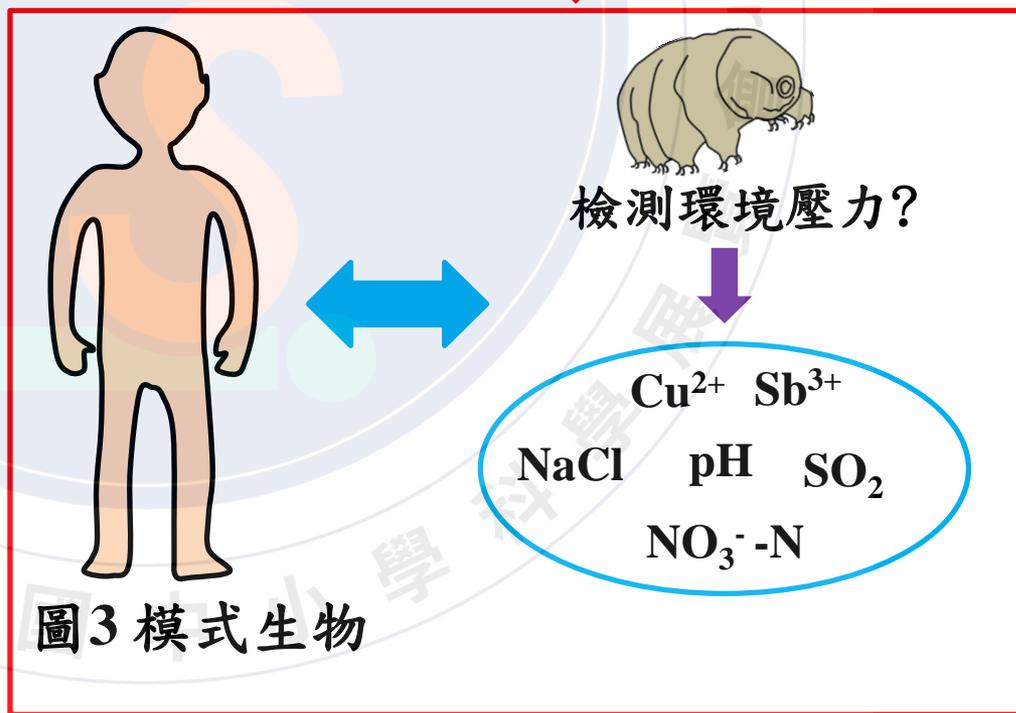
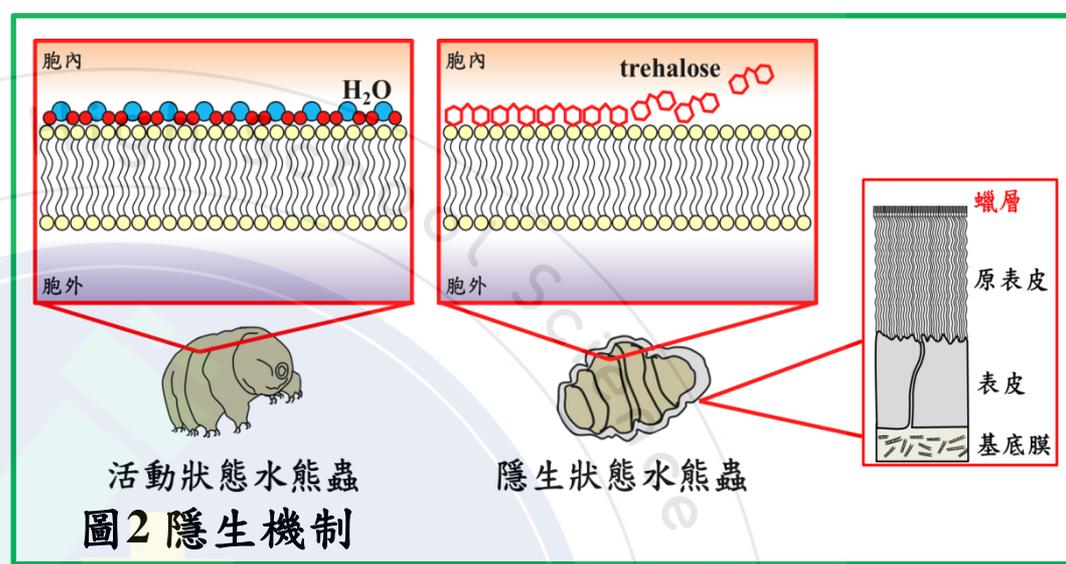


表1 不同水生無脊椎模式生物比較

模式生物	主要應用領域	檢測環境壓力種類	優點	缺點	參考文獻
水熊蟲	太空輻射 無重力環境	重金屬、類金屬、 pH、鹽類、空氣汙染	1. 體長 0.2~0.7 mm 2. 易培養 3. 推測壓力隱生後可重複使用?	子代數量最少 (約 8~37 個卵)	Guidetti <i>etal.</i> , 2012 Jonsson, 2007
線蟲	細胞凋亡	二水重鉻酸鈉 、氯化鉀、pH	1. 體長約 1 mm 2. 易培養 3. 子代數量次多 (約 300 個卵)	無法重複使用	李等, 2013 Gooldstein, 2016
水蚤	農藥汙染 水溫變化	重金屬 氮、氨汙染	1. 體長 1~1.3 mm 2. 易培養 3. 數量多分布廣, 易取得	無法重複使用	沈, 2014 Hussain <i>etal.</i> , 2020
蝦	農藥汙染 半導體重金屬	重金屬、類金屬 氮、氨汙染	1. 易培養 2. 子代數量最多 (1~5 萬個卵)	1. 無法重複使用 2. 不易培養	Chen, 2007 Sucahyo <i>etal.</i> , 2008 Yang, 2010



圖4 一次性無脊椎模式生物



圖5 大生熊蟲屬

是否具重複利用能力?

- ◆完成水熊蟲二叉檢索表，以利快速收集實驗動物。
- ◆評估水熊蟲作為重複使用之模式生物潛能。

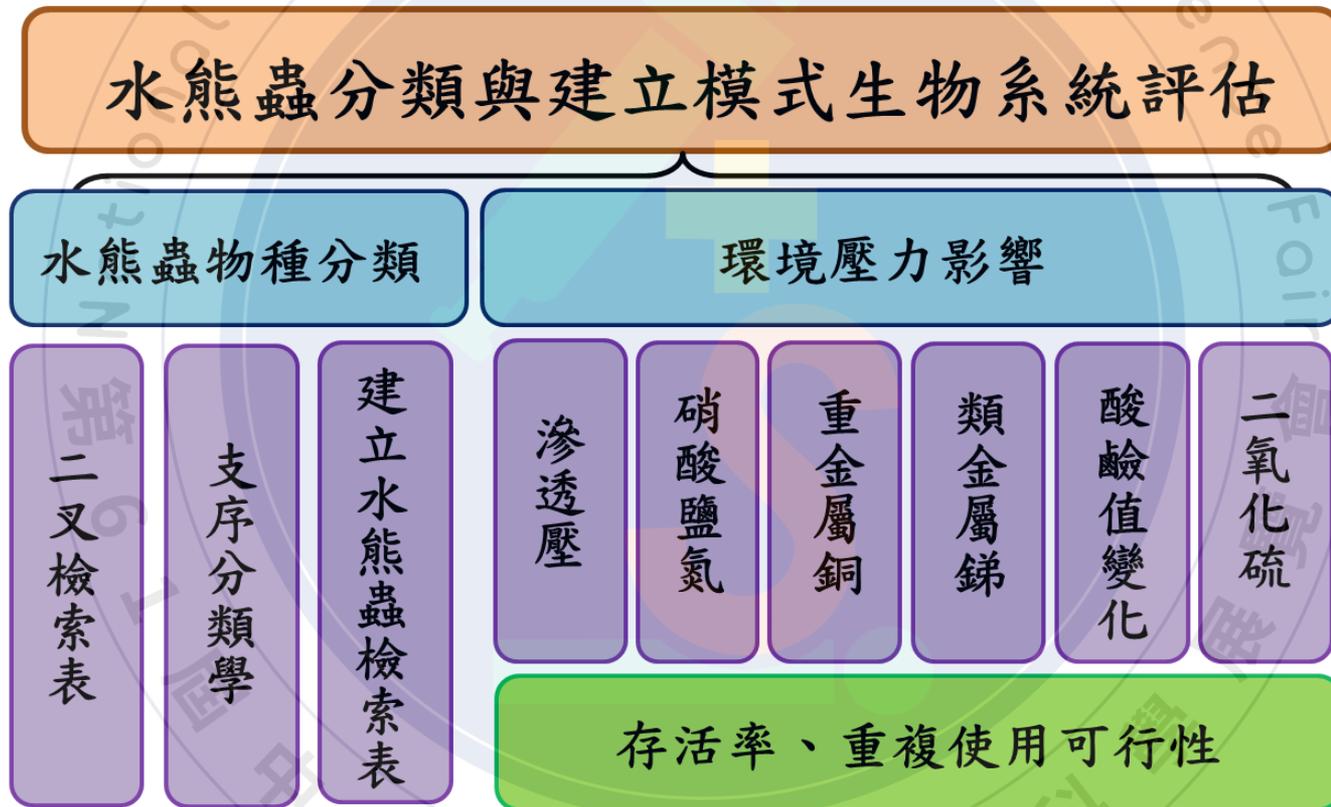
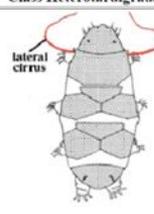


圖6 實驗架構圖

物種鑑定

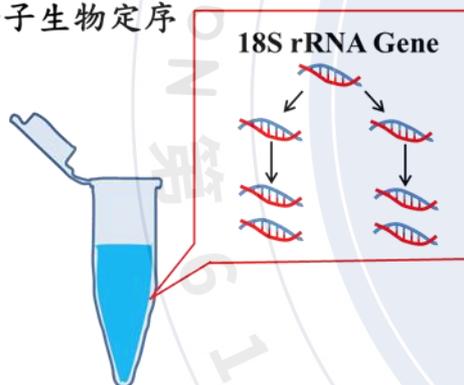
二叉檢索表

Phylum Tardigrada Class Heterotardigrada	Phylum Tardigrada Class Eutardigrada
	
This class of tardigrade is characterized by the presence of <u>lateral cirri</u> .	The Eutardigrada lack lateral cirri.

+

分子生物定序

18S rRNA Gene



+

形態矩陣

水熊蟲樣本/特徵

	1	2	3	4
1-3	0	0	4	1
1-4	0	0	4	1
1-8	0	0	4	1
3-1	0	0	4	1
3-2	0	0	4	1
3-3	0	0	4	1
5-2	0	0	4	1
5-3	0	0	4	1
8-1	0	0	4	1
8-2	0	0	4	1
9c-2	0	0	4	1
9c-3	0	0	4	1
10-3	0	0	4	1
Xerobiotus	0	0	7	1
Ramazzottius	0	0	6	1

◆ 大生熊蟲分布最廣，數量最多。

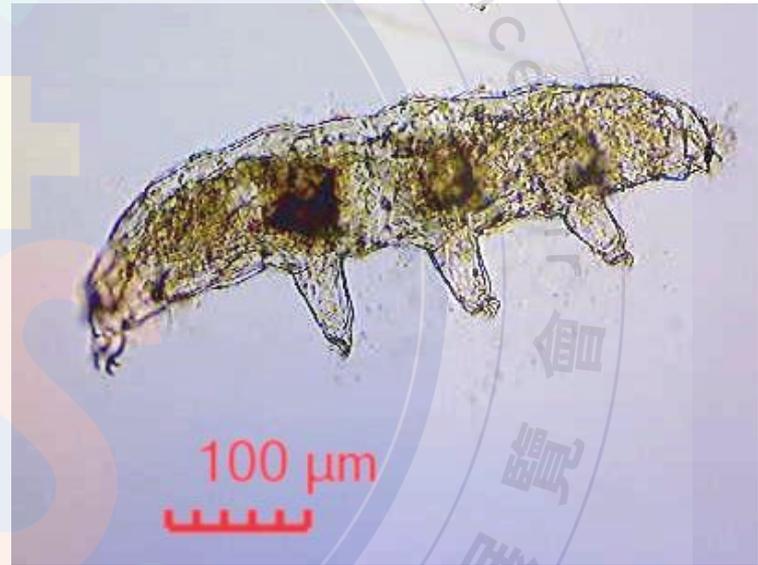


圖7 大生熊蟲 (*Macrobiotus* sp.)

環境壓力影響實驗步驟 (n = 30 ; Bio = 10 ; Tech = 3)

實驗前
拍攝正常活動

實驗中每20分鐘
記錄BCC₅₀、BCT₅₀與LC₅₀

實驗後1天
記錄EC₅₀

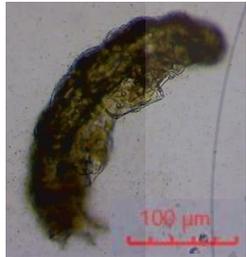


圖8 正常活動水熊蟲

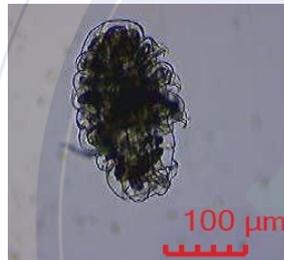


圖9 隱生水熊蟲

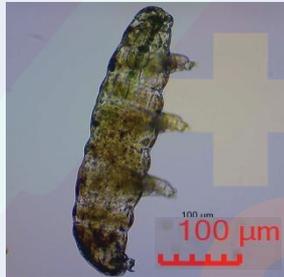


圖10 無法存活水熊蟲

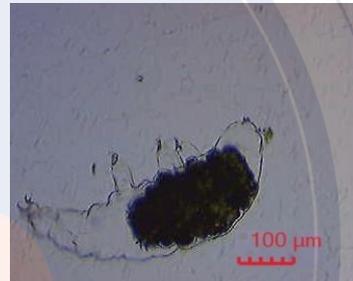


圖11 胞囊水熊蟲

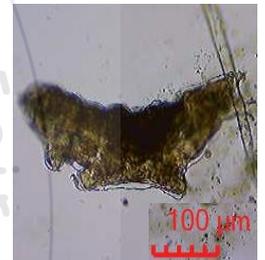


圖12 正常活動水熊蟲



dH₂O



NaCl, Cu²⁺,
NO₃⁻-N etc.



原生水樣

BCC₅₀ : 半數隱生濃度

BCT₅₀ : 半數隱生時間

LC₅₀ : 半數致死濃度

EC₅₀ : 半數效應濃度

環境壓力對水熊蟲影響-具重覆使用潛能

◆ 滲透壓、 NO_3^- -N、pH、 Sb^{3+} & SO_2 在2次實驗中 BCC_{50} 皆無顯著差異 ($p > 0.05$) (圖13)。

◆ 實驗後存活率皆高於70%，具重複使用潛能 (圖14)。

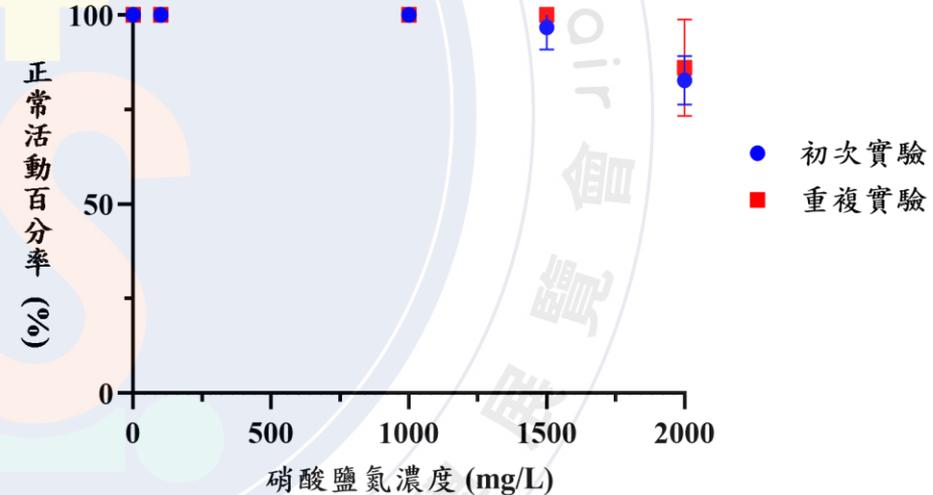
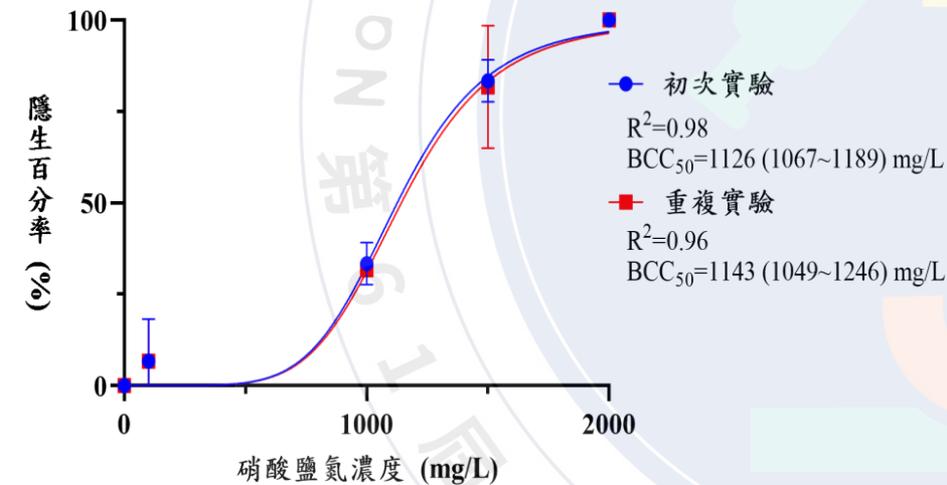


圖13 水熊蟲於硝酸鹽氮壓力下隱生率
20分鐘隱生百分率。

圖14 水熊蟲於硝酸鹽氮壓力實驗後正常活動率
實驗後1天正常活動百分率。

初次實驗：使用未經歷環境壓力實驗的水熊蟲。

重複實驗：使用初次實驗後7天的水熊蟲再次進行實驗。

水熊蟲代謝硝酸鹽氮示意圖

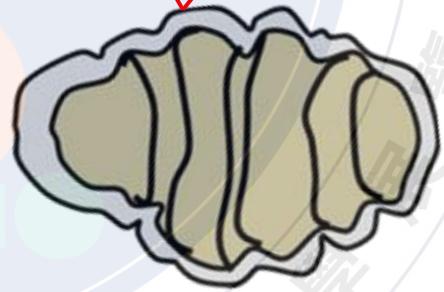
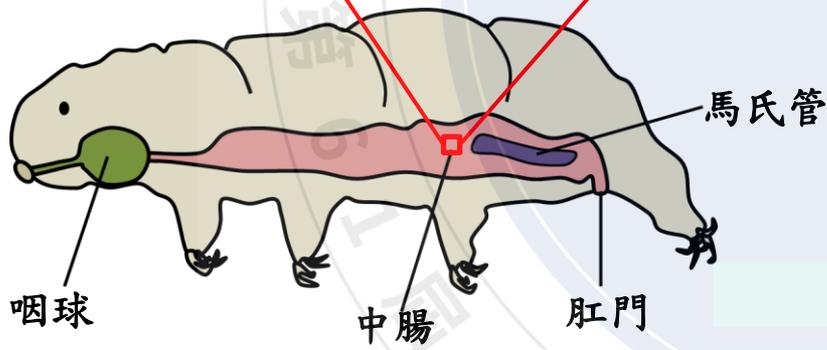
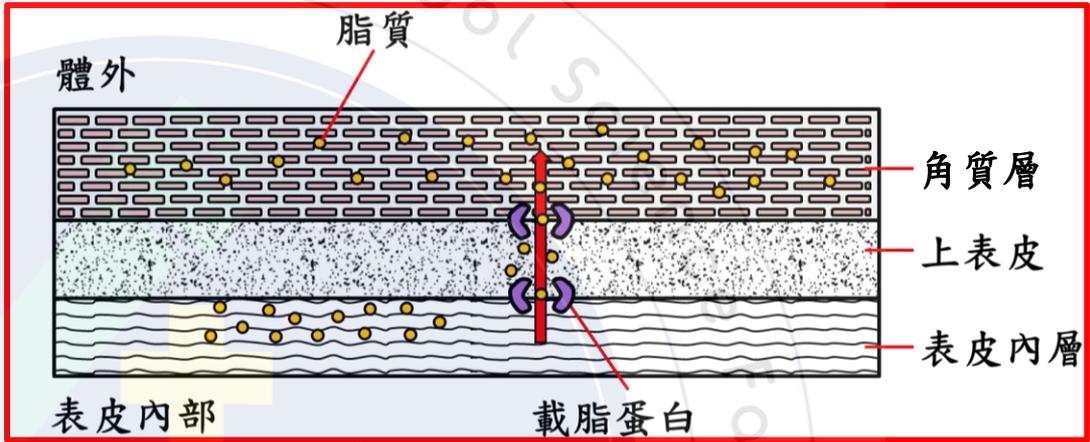
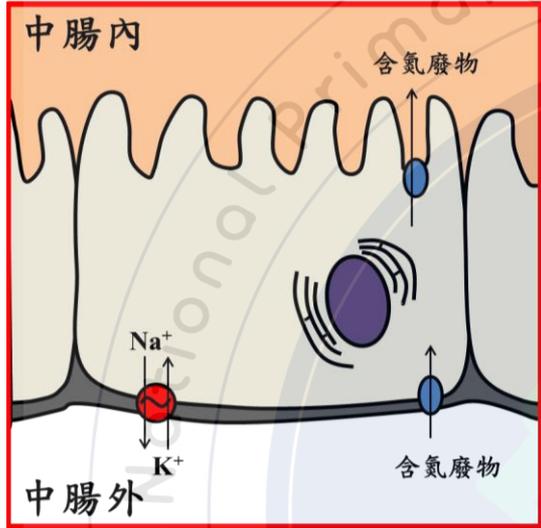


圖15 水熊蟲進入隱生狀態前^[1]

圖16 隱生狀態水熊蟲^[2]

[1] Møbjerg, N., & Neves, R. (2020). New insights into survival strategies of tardigrades. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 110890.

[2] Bjørn-Mortensen, M. (2006). Osmoregulation and osmobiogenesis in the eutardigrade *Richtersius coronifer*. Roskilde Roskilde University Institute for Biology and Chemistry.

環境壓力對水熊蟲影響-單次使用

◆銅離子壓力下水熊蟲於4 ppm無法存活，
無法重複使用並產生類胞囊 (圖17)。

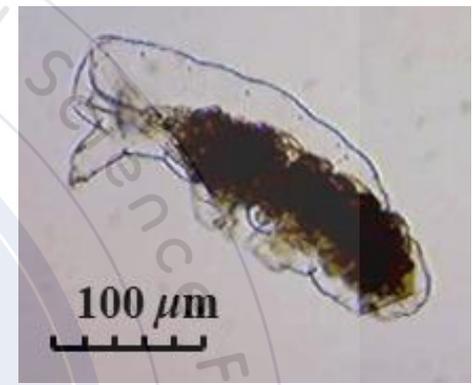


圖17 類胞囊水熊蟲

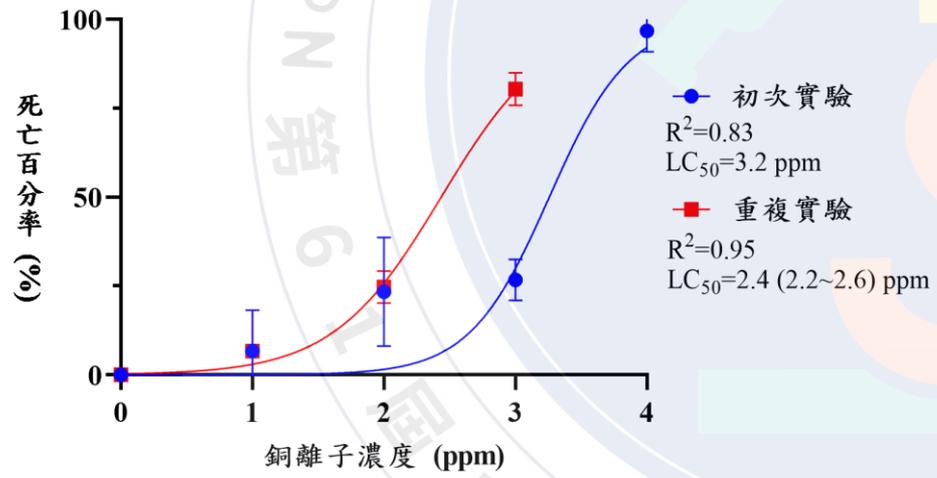


圖18 水熊蟲於銅離子壓力下死亡率
20分鐘死亡百分率。

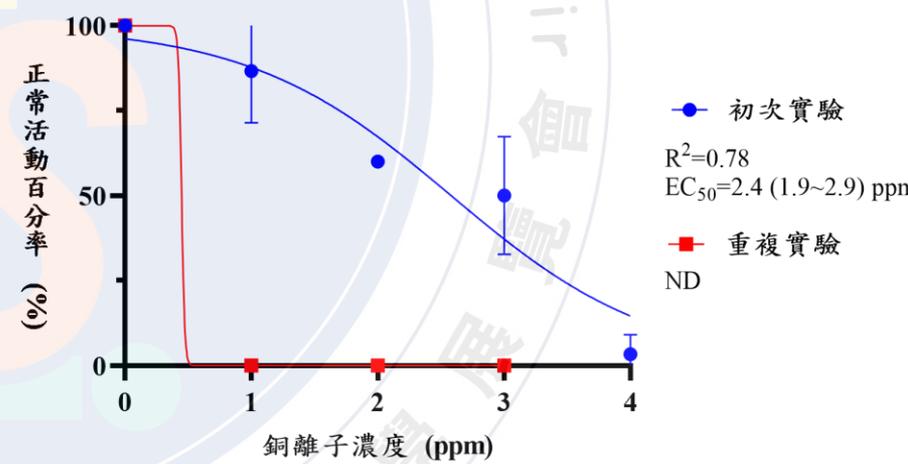


圖19 銅離子壓力實驗後1天正常活動率
實驗後1天正常活動率。

初次實驗：使用未經歷環境壓力實驗的水熊蟲。

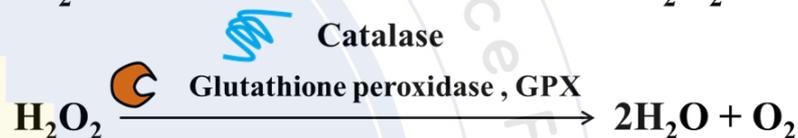
重複實驗：使用初次實驗後7天的水熊蟲再次進行實驗。

銅離子對水熊蟲影響

◆水熊蟲對抗重金屬壓力機制^[1]



圖20 隱生水熊蟲



突觸

◆水熊蟲不完全隱生機制推測^[3]

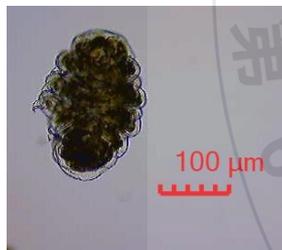


圖21 完全隱生水熊蟲

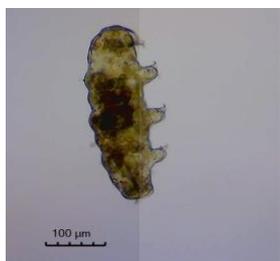
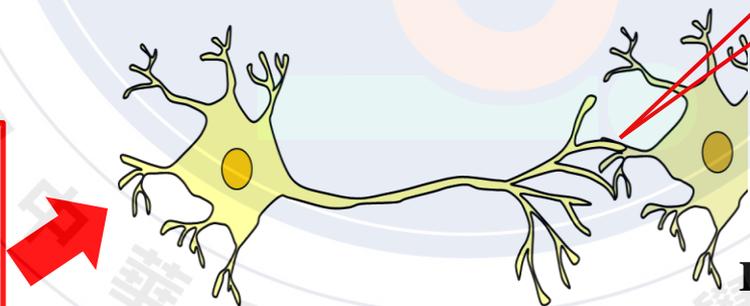
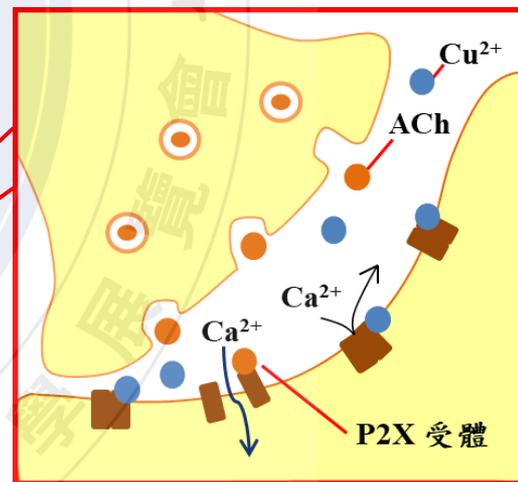


圖22 不完全隱生水熊蟲



~~EPSP~~

興奮性突觸後電位



[3] Bavan, S., Straub, V. A., Blaxter, M. L., & Ennion, S. J. (2009). A P2X receptor from the tardigrade species *Hypsibius dujardini* with fast kinetics and sensitivity to zinc and copper. *BMC evolutionary biology*, 9, 17. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-17>

水熊蟲胞囊與隱生機制比較

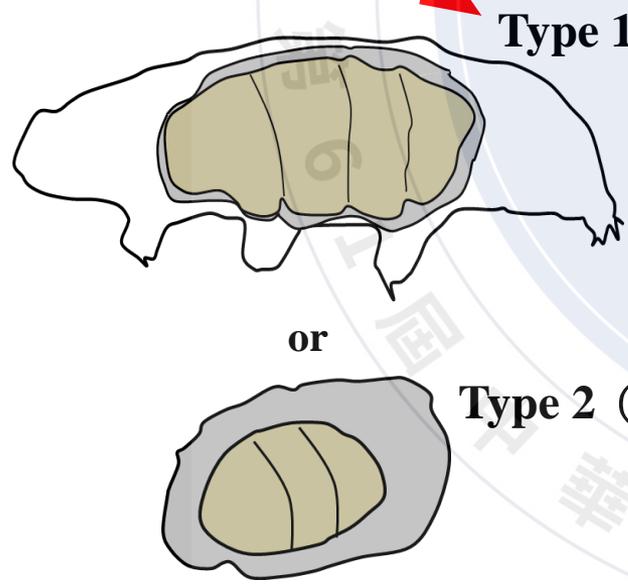
[4] Guidetti, R., Altiero, T., & Rebecchi, L. (2011). On dormancy strategies in tardigrades. *Journal of Insect Physiology*, 57(5), 567-576.



誘導因素：季節交替
形成所需時間：約半個月

誘導因素：環境壓力
形成所需時間：30分鐘內

圖23 氯化鈉壓力下水熊蟲形態



Type 1 (冬季)

Type 2 (夏季)

圖24 胞囊水熊蟲^[4]

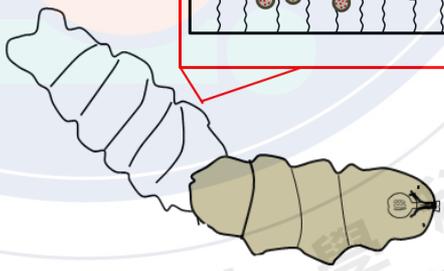
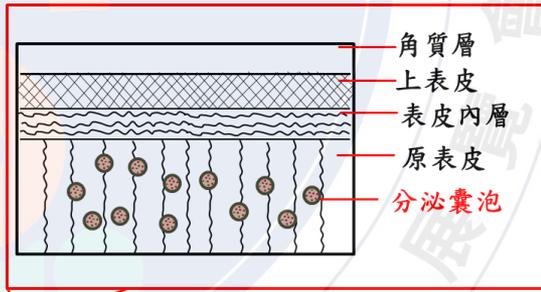


圖25 隱生前對抗環境壓力機制^[2] 圖26 隱生水熊蟲

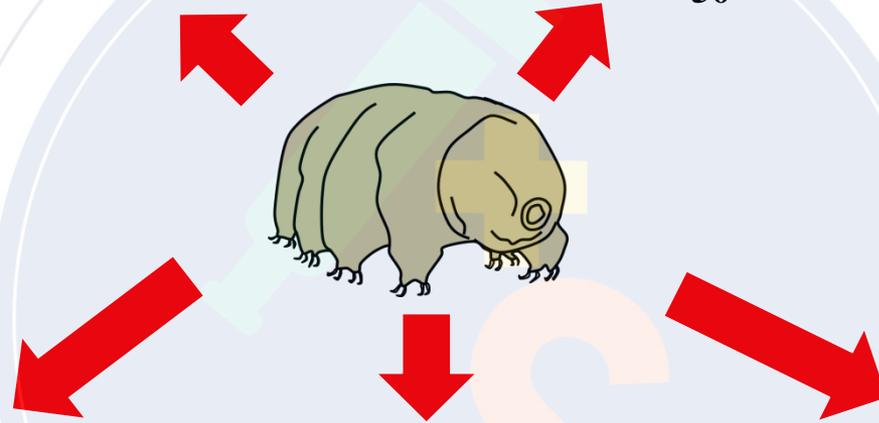
結論

- ◆ 完成在地水熊蟲**二叉檢索表** ◆ 具**重覆檢測環境壓力**之潛能
- 有利於**快速**收集**實驗動物**
- **大生熊蟲**

藉由**BCC₅₀**檢測：

滲透壓、NO₃⁻-N、pH、Sb³⁺、SO₂

藉由**LC₅₀**檢測：**Cu²⁺**



未來展望

◆ 探討**環境壓力**
長時間影響

◆ **顯微鏡**觀察水熊
蟲形態組織受損

◆ 除了**環境污染**檢測，**確認其**
作為**模式生物**應用範疇，如：
檢測農藥或**次氯酸**等物質

P.2 參考文獻

1. 李煜，楊可欣，高珊，敬海明，齊麗娟，寧鈞宇與李國君。(2013)。基於秀麗隱杆線蟲的化學品急性毒性檢測及評估。《毒理學雜誌》，27(2)，79-84.
2. Chen, L. H., & Yang, J. L. (2007). Acute toxicity of antimony chloride and its effects on oxygen consumption of common carp (*Cyprinus carpio*). *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 78(6), 459-462.
3. Hussain, A., Audira, G., Malhotra, N., Uapipatanakul, B., Chen, J. R., Lai, Y. H., ... & Hsiao, C. D. (2020). Multiple screening of pesticides toxicity in zebrafish and daphnia based on locomotor activity alterations. *Biomolecules*, 10(9), 1224.
4. Jönsson, K. I. (2007). Tardigrades as a potential model organism in space research. *Astrobiology*, 7(5), 757-766.
5. Sucahyo, D., van Straalen, N. M., Krave, A., & van Gestel, C. A. (2008). Acute toxicity of pesticides to the tropical freshwater shrimp *Caridina laevis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 69(3), 421-427.
6. Yang, J. L. (2014). Comparative acute toxicity of gallium (III), antimony (III), indium (III), cadmium (II), and copper (II) on freshwater swamp shrimp (*Macrobrachium nipponense*). *Biological Research*, 47(1), 1-4.