

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 工程學(二)科

佳作

(鄉土)教材獎

052409

利用三棘蠶稚蠶蠶殼作為應用材料之評估

學校名稱：國立金門高級中學

作者： 高二 董明晉 高二 董昱伶	指導老師： 蘇詠晴
-------------------------	--------------

關鍵詞：稚蠶蠶殼、抗氧化、抑菌

摘要

目前，三棘鬚已被列為瀕危物種。在美國，藥廠為了保育野外的稚鬚族群，會以商業化模式進行人工飼養和放流復育，以利生物資源的永續。本研究先以 DMSO 進行稚鬚殼成分的萃取，再進一步探究能否將其應用於抗氧化和抑菌之可能。此外，由於鬚殼能吸附水分，且當中的螢光物質能與銅離子結合，因此，實驗也利用了鬚殼碎片做為吸附汗水中銅離子的濾材。結果顯示，稚鬚殼萃取液具有良好的抗氧化特性、同時也具有抑制大腸桿菌生長的效果。此外，鬚殼也能有效地吸附硫酸銅溶液中的銅離子，並且利用金屬螯合劑（EDTA）溶液清洗後，讓鬚殼可重覆使用淨化水中銅離子。總結，應用稚鬚殼做為生物材料，以人工飼養除能延續物種永續外，還能兼顧商業應用達到雙贏。

壹、研究動機

求學過程聆聽諸多海洋講座中，最令我印象深刻的莫過於活化石—鬚，有「活」化石之稱得牠引起我的注意，那天傍晚見爺爺捕魚回來，無意間帶回來一對鴛鴦魚—鬚，見它張牙舞爪的樣子令我無比懼怕，隔日就被爺爺送往水試所，這是我對牠的第一印象。一次課程中老師帶領我們到海邊撿拾鬚殼，沿著潮汐交界處，我發現那薄透的鬚殼（如圖一），我一邊仔細觀察一邊聽著老師講述這些小鬚們正遭遇嚴重生存威脅，遊客干擾、海洋垃圾、外來種互花米草和拖網漁船誤捕等，查閱近年調查報告發現牠們在金門潮間帶的數量大不如前，使我對牠產生更多好奇，故開始參與老師野外受傷稚鬚飼養與觀察的實驗，希望能對這個特別的生物有更多的了解並為保育牠盡一份心力。



圖 1. 海邊拾獲的稚鬚殼



圖 2. 實驗室飼養野外受傷稚鬚(圖右下)之情形

貳、研究目的

金門三棘蠶（*Tachypleus tridentatus*）為金門重要生物種，其生長過程中所脫下之甲殼常見於海岸，根據文獻探討發現許多研究會針對節肢動物所脫下的甲殼進行再利用，其中前人的實驗證實三棘蠶的成蠶殼具有抑菌、吸收重金屬的功效，因此此次我們希望能將海邊採集到的許多稚蠶脫下的稚蠶殼進行相關研究，在不傷害蠶體的情況下，取用稚蠶殼為應用材料，並透過實驗室養殖系統的建立，讓生物資源開發和保育同步進行，如此才有源源不絕的生物循環。因此我們設計實驗分為兩大面向：

一、三棘蠶稚蠶的觀察與紀錄

(一) 三棘蠶稚蠶之人工飼養

(二) 三棘蠶稚蠶殼的蒐集與齡期鑑定

二、探討三棘蠶稚蠶萃取液之應用可能性

(一) 稚蠶殼萃取液之製備

(二) 探討稚蠶殼萃取液「抗氧化」之功效

(三) 探討稚蠶殼萃取液「抑菌」之功效

(四) 探討稚蠶殼「吸附重金屬銅離子」之功效

參、研究設備及器材

一、實驗動物

三棘蠶 (*Tachypleus tridentatus*) 是金門海洋底棲性無脊椎動物，早在 4 億 5000 萬年前就已出現在地球上，有活化石之稱。全球目前現生種蠶有四種，分別是：美洲蠶、三棘蠶、南方蠶、圓尾蠶。本次研究對象為三棘蠶，分布於台灣的金門、澎湖和嘉義布袋等沿海。

在動物界的分類中三棘蠶屬於甲殼類動物，甲殼類動物以脫殼的方式讓個體成長，文獻指出三棘蠶稚蠶每脫一次殼為增加一「齡」，每次脫殼後體長約增長 1.2 至 1.5 倍，一齡蠶在第一年不會脫殼，第二年脫殼 3 次，第三年脫殼 2 次，之後每年脫殼 1 次，雄蠶會在脫殼 15 或 16 次後，在第 13 年左右達到性成熟；而雌蠶則在脫殼 16 或 17 次，約於第 14 年達到性成熟，故要從一隻稚蠶長成具生殖能力的成蠶，需經歷 15-17 次的脫殼，歷時 13-14 年之久。

孵化成功的仔蠶在一齡時不需覓食，是靠胚胎期所剩餘的卵黃為養分來源，當順利脫殼成長至二齡時便會開始在潮間帶泥灘地覓食生活，牠以攝取多毛類和雙殼貝類等為食生長，而成蠶則生長棲息在沿海水深 20 至 30 公尺的沙質海域。本研究採集樣區主要為金門浯江溪出海口海域，研究期間於野外採集到約 5 至 10 齡之稚蠶個體和蒐集已脫下稚蠶殼進行實驗。

目前科學上關於蠶的應用最主要為**蠶血中的變形細胞**之免疫機制，已被開發成快速、準確和靈敏可檢測藥品和生醫用品等是否有被細菌內毒素污染的蠶試劑檢驗法 (Levin et al.,1964)，目前也因幫助 COVID-19 疫苗的開發再受到關注，然而蠶血的抽取會導致蠶隻 2%-3% 的死亡率。

對蠶殼的應用，在傳統醫學中是以曬乾或低溫烤乾後，使其質地變脆，再研磨成粉末的方式保存使用，外敷可用跌打散瘀、創傷止血和燙傷等，內服則如本草綱目：「蠶殼治積年咳嗽」(謝等，2011)。近年開始有以有機溶劑萃取蠶殼成分探討其功效之研究，研究指出：三棘蠶成蠶殼萃取液能抑制大腸桿菌生長 (洪等，2018)，和使用三棘蠶蠶殼萃取液中的螢光物質做為檢測重金屬銅離子之工具 (呂等，2019)，上述兩篇文獻為本研究重要之基礎。

二、實驗藥品與器材

(一) 稚蟹飼養

名稱	使用說明
活體稚蟹	飼養對象 1-10 齡
豐年蝦	稚蟹食物，自製豐年蝦孵化器，穩定食物來源
沙蠶	稚蟹食物，購自釣具行
鹽度測量器	測量飼養水質鹽度
濾網	濾除水中的殘渣以及蒐集稚蟹排遺
打氣機	提供稚蟹生存所需氧氣
黑色水盆	稚蟹養殖環境

(二) 稚蟹蟹殼萃取液應用測試實驗

1. 實驗藥品

藥品名稱	使用說明
二甲基亞砜 (DMSO)	蟹殼萃取之溶劑
1,1-二苯-2-三硝苯肼(DPPH)	用於抗氧化實驗
大腸桿菌菌液	抑菌測試之菌種
LB BROTH、LB AGAR	細菌培養用
青黴素	抑菌測試所使用之抗生素
硫酸銅溶液	做為銅離子溶液
乙二胺四乙酸 (EDTA)	螯合銅離子之用

2. 實驗器材

名稱	使用說明
Biochrom 攜帶型分光光度計	測量溶液不同反應後之吸光度值
恆溫培養箱	設定溫度進行細菌培養 (37°C、30°C)
手持式顯微鏡	拍攝蟹殼螢光反應

筆記型電腦	進行影像拍攝、擷取與分析
微量吸管 (pipetman)	進行細微藥物配置
針筒過濾器 (小飛碟)	萃取液過濾製備用
比色管	12 x 12 x 45mm
酒精燈	儀器滅菌用
接種環、滅菌棉花棒	養菌、塗菌用
培養皿、濾紙、打洞機	液菌測試用之紙錠
各式玻璃管、離心管	浸泡鰲殼、分裝溶液操作使用，有 1.5ml、15ml 和 50ml
燒杯、量筒、鑷子	藥品配置、螢光物質萃取、光譜分析操作時使用



圖 3. 活體稚鰲飼養器材

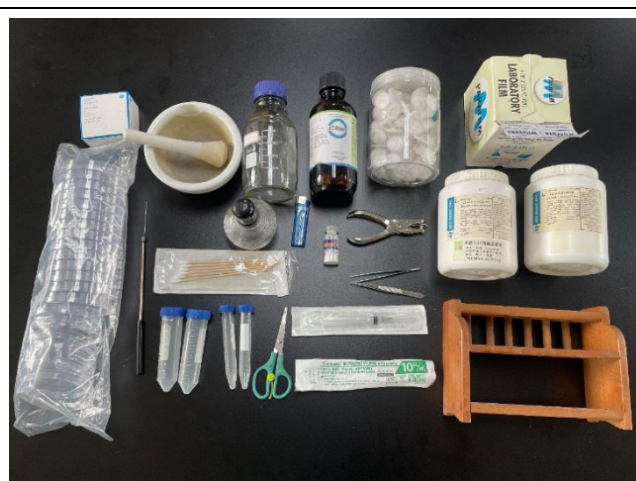


圖 4. 鰲殼萃取液抗氧化測試器材



圖 5. 鰲殼萃取液抑菌測試器材

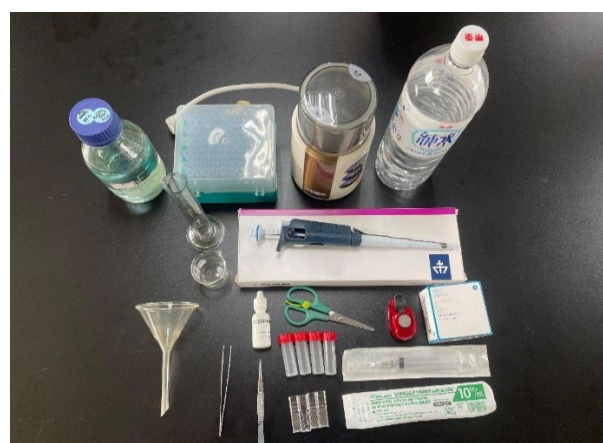


圖 6. 鰲稚鰲鰲殼吸收銅離子之定量反應器材

肆、研究過程與方法

一、實驗架構圖

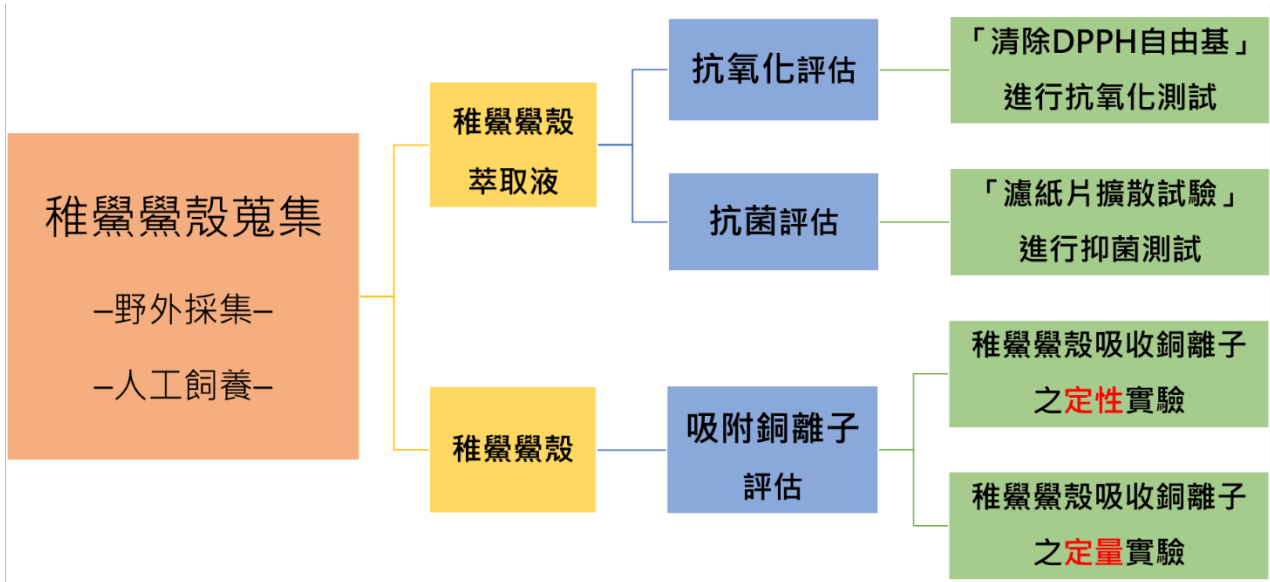


圖 7. 實驗架構圖

三、實驗方法：

(一) 實驗一：活體稚鸞飼養

1. 說明：將野外撿拾之稚鸞，進行人工飼養，觀察及記錄其生長情形。

2. 飼養過程：

(1) 飼養環境建置：

a. 從海邊取得泥沙，並定期進行掏洗，做為室內飼養之土壤底質。

b. 從金門水試所取得經初步過濾之海水，做為飼養水質。

c. 架設打氣及濾水設備。

d. 飼養餌料來源有二：

一從釣具店購置沙蠶餵食大齡期稚鸞。

二為自製豐年蝦孵化器，穩定孵化新鮮豐年蝦做為小齡期稚鸞食物。

(2) 飼養動物配置：

- a. 以游標尺量測各稚蟹之頭胸甲寬，將所採集之稚蟹進行個體齡期鑑定。
- b. 依齡期大小將稚蟹分成 A、B、C 三區飼養及定期記錄。

A 區主要為 5.6 齡，數量最多，餵食豐年蝦。

B 區主要為 8-10 齡，體型大，且有一隻野外受傷稚蟹，餵食沙蠶。

C 區為 1 齡，不需餵，食物來源是胚胎期時期所剩之卵黃。

(3) 飼養環境維護：

每隔一天將飼養水中的殘渣（如：排遺、死去的豐年蝦）移除，並免水質惡化並用鹽度測量器測量水質鹽度，適時添加自來水或海水，來調整水質鹽度維持在約為 35psu（35‰），持續監測水質及維生系統，讓稚蟹在合適的環境下成長。

(4) 定期紀錄稚蟹進食和代謝情形，適時調整餵食頻率。

(5) 量測稚蟹頭胸甲的最大寬度，並比對稚蟹分齡對照表，紀錄其齡期大小變化。

(二) 實驗二：稚蟹蟹殼萃取液製備

1. 說明：參考前人研究，以有機溶劑 DMSO 浸泡野生/人工稚蟹蟹殼，製作稚蟹殼萃取液。

2. 實驗步驟：

(1) 清洗並秤量稚蟹殼，將稚蟹殼秤1公克裝入玻璃試管中，分別加入 5ml 和 10ml 的 DMSO，以超音波震盪48小時，等待DMSO破壞稚蟹殼，進而溶解出有效成分。

(2) 觀察並拍攝稚蟹殼在浸泡DMSO過程的變化。

(3) 將 DMSO 溶解出的稚蟹殼萃取液分別放入針筒，以手動按壓使其通過針筒過濾器過濾，取得無菌之野生稚蟹殼萃取液（0.1g/ml 和 0.2g/ml）和人工稚蟹殼萃取液，分裝於 15ml 離心管備用。

(三) 實驗三：稚蟹蟹殼萃取液之抗氧化測試

1. 說明：以「清除DPPH自由基」測定，探討不處理稚蟹殼萃取液之抗氧化效果。

2. 原理：自由基是氧在生物體內新陳代謝後所產生的物質，其擁有不成對的價電子，故活性極強，可與任何物質發生強烈的反應。本次實驗使用較穩定的自由基 DPPH 作

為氧化還原反應指示劑，當其與氫原子等抗氧化劑結合，還原穩定後，可使原本紫色的溶液變無色。故若加入的待測樣品和 DPPH 自由基直接反應，則會阻斷 DPPH 自由基的連鎖反應，此時呈現藍紫色的DPPH溶液顏色會轉成澄清的黃色，這就表示加入的待測樣品具有捕捉 DPPH自由基的抗氧化能力。

3. 實驗步驟：

- (1) 將DPPH和甲醇以1：4比例，配置成DPPH檢測液。
- (2) 以微量吸管取1c.c.DPPH檢測液與0.1c.c.待測樣本（由實驗二所得之萃取液）均勻混合。
- (3) 將各組別試管以鋁箔紙包覆，進行避光處理反應30分鐘後，各組取1c.c.放入比色管，利用分光光度計測量其在波長520nm的吸光值，紀錄各組吸光值，再利用以下公式計算其 DPPH自由基清除率，以探討其抗氧化功效。

$$\text{清除率 (\%)} = \left[1 - \left(\frac{\text{樣品吸光值}}{\text{空白組吸光值}} \right) \right] \times 100\%$$

*備註：本次實驗空白組為 DMSO + DPPH 檢測液，並以 DMSO 溶劑做歸零校正。

(四) 實驗四：稚鸞殼萃取液之抑菌測試

1. 說明：以「濾紙片擴散試驗」探討實驗二所得之稚鸞殼萃取液、抗生素與DMSO對大腸桿菌（革蘭氏陰性菌）之抑菌效果。
2. 實驗步驟：
 - (1) 將實驗所用器材，圓形濾紙和鑷子等用具以121°C高溫高壓滅菌消毒處理。
 - (2) 取16克的LB BROTH AGAR與400克的水均勻混合，送入滅菌釜滅菌，而後將液態LB BROTH AGAR分別裝入培養皿中，並靜置冷卻 LB BROTH AGAR溶液至固態，完成培養基的製備。
 - (3) 將接種環用酒精燈加熱至泛紅。將加熱之接種環在培養基旁降溫並使其包覆LB BROTH AGAR。使用降溫後之接種環取大腸桿菌菌落，並輕輕劃於培養基上。將大腸桿菌培養基放入培養箱調至30°C培養24小時，進行大腸桿菌之培養。
 - (4) 取5.cc的LB BROTH 放入試管，將接種環過火高溫殺菌後，挖取大腸桿菌放入試管。將試管放在震盪儀上，並置於37°C的恆溫培養箱18小時，進行菌液製備。

- (5) 樣本製備：DMSO溶劑作為空白對照組、野生稚蟹殼萃取液（0.1g/ml 和 0.2g/ml）、青黴素（1000ppm）作為陽性對照組，共分5組。
- (6) 以滅菌醫療棉花棒沾附大腸桿菌菌液，均勻塗抹於培養皿上。
- (7) 用鑷子夾取圓形濾紙分別浸泡在上述步驟(5)之4種溶液樣本中，吸取適量溶液後，再將圓形濾紙輕放在培養皿上適當位置。
- (8) 將此培養皿置於37°C培養24小時後，觀察各溶液的抑菌表現。
- (9) 拍照記錄結果並對抑菌環大小進行量測，再將數據進行統計分析。

(五) 實驗五：稚蟹殼吸收銅離子之定性反應

1. 說明：前人研究顯示蟹殼的內角質層具有螢光現象，並且將蟹殼中的螢光物質萃取後，能利用與銅離子與螢光物質的結合而使螢光消失。因此，利用稚蟹殼浸泡於銅離子中而螢光消失的情形，可推論蟹殼具有吸附銅離子的能力。
2. 實驗步驟：
 - (1) 剪取兩組大小厚薄一致的稚蟹殼片，利用 400nm 藍光手持顯微鏡觀察蟹殼螢光現象，並將蟹片進行拍照，紀錄其螢光型態。
 - (2) 將兩片稚蟹殼片分別浸泡於水（對照組）與 500ppm 硫酸銅溶液（實驗組）5 分鐘後，再次利用 400nm 藍光手持顯微鏡觀察蟹殼螢光現象，並將蟹片進行拍照，紀錄其螢光型態，進行前後比較。
 - (3) 將兩組稚蟹殼片再分別浸泡於銅離子螯合劑 EDTA 溶液 20 分鐘，再拍照紀錄其螢光型態，進行前後比較。
 - (4) 再一次將兩片稚蟹殼片分別浸泡於水（對照組）與 500ppm 硫酸銅溶液（實驗組）5 分鐘，再拍照紀錄其螢光型態，進行前後比較。

(六) 實驗六：稚蟹殼吸收銅離子之定量反應

1. 說明：探討稚蟹殼浸泡於硫酸銅溶液對銅離子的吸附現象。
2. 實驗步驟：

- (1) 以微量吸管取 500ppm 銅標準液，運用稀釋法配置一系列標準品（0.125、0.25、0.5、1ppm 和 2ppm）。
- (2) 將各已知濃度銅標準液分別滴加一滴銅離子試劑，進行呈色反應後，再以分光光度計測量其在波長 470nm 的吸光值，紀錄並利用 Microsoft Excel 製作硫酸銅溶液檢量線。
- (3) 取可裝入 50ml 離心管之大小的稚蟹蟹殼，每管 0.1g 稚蟹殼，共 3 管備用。
- (4) 樣本製備：純水作為空白液、1ppm 硫酸銅溶液（對照組）、浸泡稚蟹蟹殼之 1ppm 硫酸銅溶液（實驗組），共分 3 組。
- (5) 每管皆靜置浸泡 10 c.c 溶液，於 30 分鐘時吸取 50ml 離心管內之溶液進行呈色反應。
- (6) 利用分光光度計測量吸光度，並使用步驟(2)所得之硫酸銅溶液檢量線，以內插法計算出 30 分鐘時溶液中所殘留之銅離子濃度，進而了解稚蟹蟹殼對銅離子之吸收情形。

伍、研究結果

一、實驗一：活體稚蟹飼養

(一) 稚蟹飼養紀錄

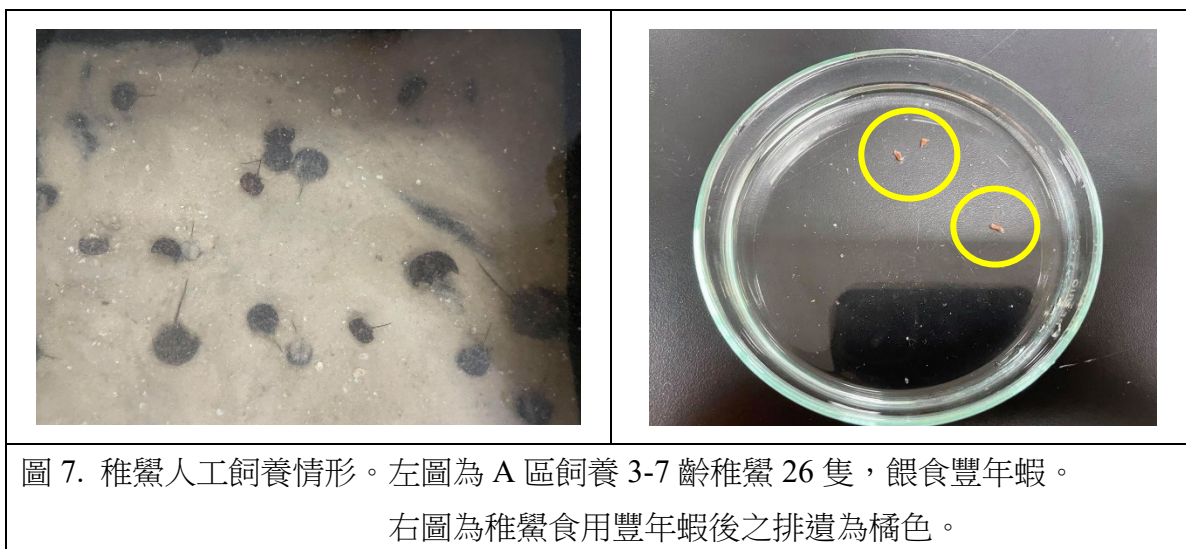




圖 8. 稚蟹人工飼養情形。左圖為 B 區飼養為 8-10 齡稚蟹 5 隻，體型較大，且有一隻野外受傷之稚蟹。右圖為稚蟹食用沙蠶後之排遺為黑色。

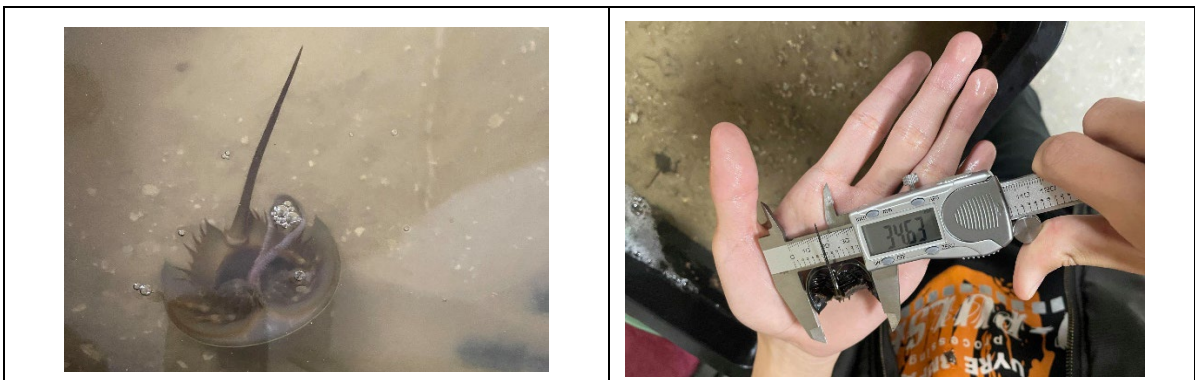


圖 9. 稚蟹進食沙蠶之情形

圖 10. 測量稚蟹頭胸甲寬，紀錄齡期

(二) 稚蟹生長紀錄

從 109 年 10 月開始進行稚蟹人工飼養，至今歷時 9 個月，稚蟹均全數存活，健康無虞。自 110 年 4 月底起，稚蟹陸續脫殼成長，脫殼情形如圖 11，彙整結果如圖 13。



圖 11. 人工飼養稚蟹脫殼前後變化情形



圖 12. 本實驗所蒐集到不同齡期的稚蟹殼

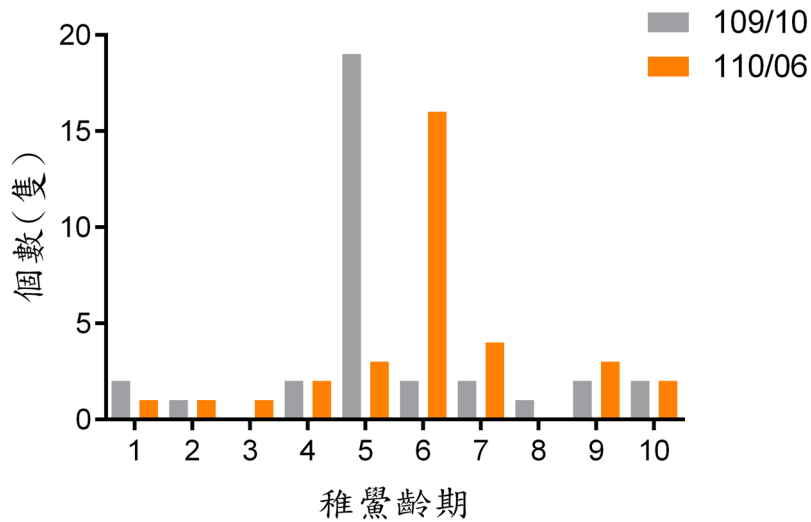


圖 13. 紀錄人工飼養稚蟹成長之統計表

結果說明：

稚蟹脫殼時會從頭部前緣開始裂開鑽出，脫下之蟹殼透明（如圖 11 紅色箭頭處所指），脫殼後稚蟹體型明顯增大。稚蟹脫殼的時機和次數與齡期有明顯的關係，本研究依稚蟹齡期分成 A 區（3-7 齡）、B 區（8-10 齡）和 C 區（1 齡）飼養，其中，A 區脫殼率為 26/26，全數脫殼，B 區脫殼率為 1/5，C 區脫殼率則為 1/2，結果顯示餵食豐年蝦和沙蠶能讓稚蟹成長，且大齡期的稚蟹，脫殼的時機較晚。

二、實驗二：稚蟹蟹殼萃取液製備

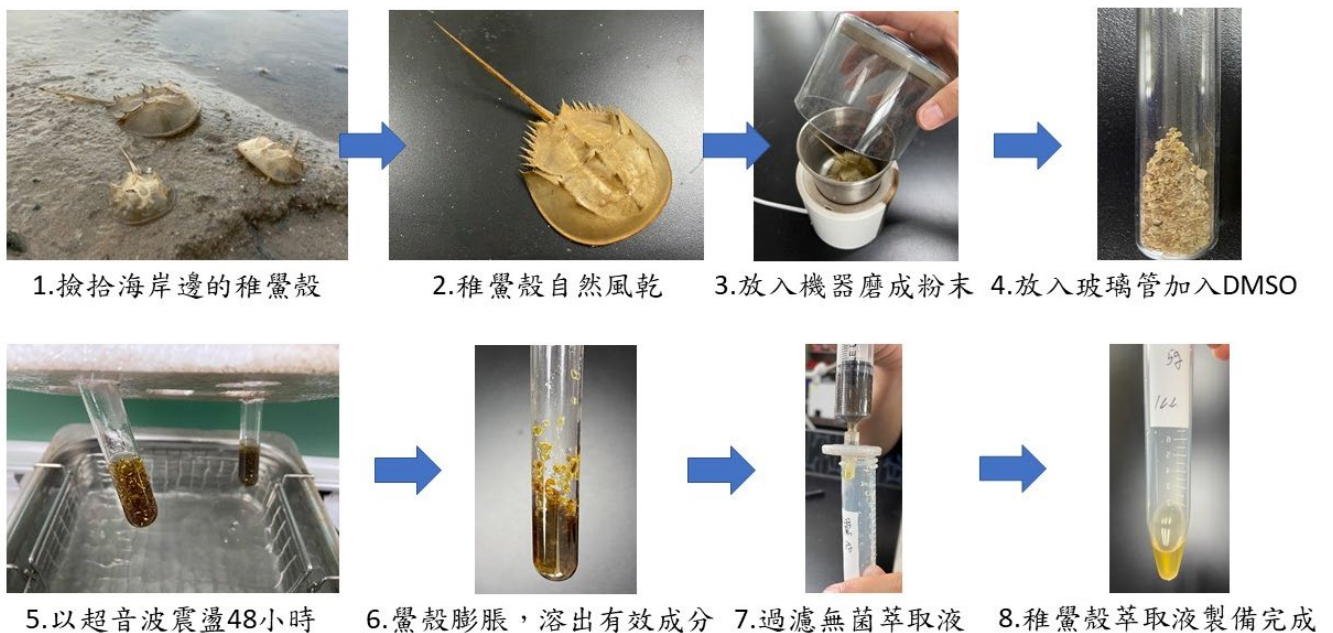


圖 14. 稚蟹蟹殼浸泡 DMSO 進行萃取之情形

結果說明：

由先前的研究得知，浸泡DMSO會破壞成蠶殼結構（造成膨脹），並溶解出殼內物質，本次實驗觀察結果與前人相符（如上圖步驟6），稚蠶殼經DMSO浸泡後明顯可見出現了膨脹現象。本次實驗為了探究稚蠶殼較佳的萃取條件，各將1克重的蠶殼碎片，分別以不同劑量的 DMSO（10ml和5ml）進行萃取，最終所獲得的萃取液以0.1g/ml和0.2g/ml標示作為後續實驗之使用。

三、實驗三：稚蠶殼萃取液之抗氧化測試

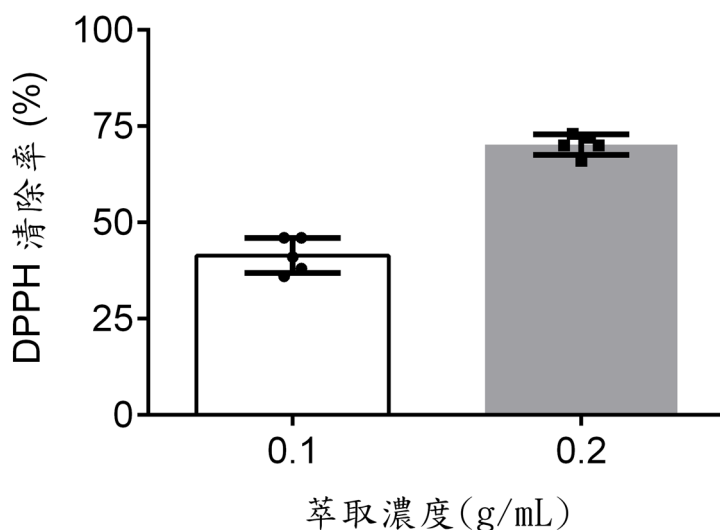


圖 15. 不同濃度之稚蠶殼萃取液的抗氧化特性。實驗以 0.1、0.2g/ml 濃度的稚蠶殼萃取液對 DPPH 的自由基進行清除作用。

結果說明：

由實驗結果顯示，稚蠶殼萃取液具有清除 DPPH 自由基的功效，且 0.2g/ml 稚蠶殼萃取液清除率比 0.1g/ml 稚蠶殼萃取液高，顯示當稚蠶殼萃取液有效濃度提升時，其抗氧化能力愈強。

四、實驗四：稚鸞殼萃取液之抑菌測試

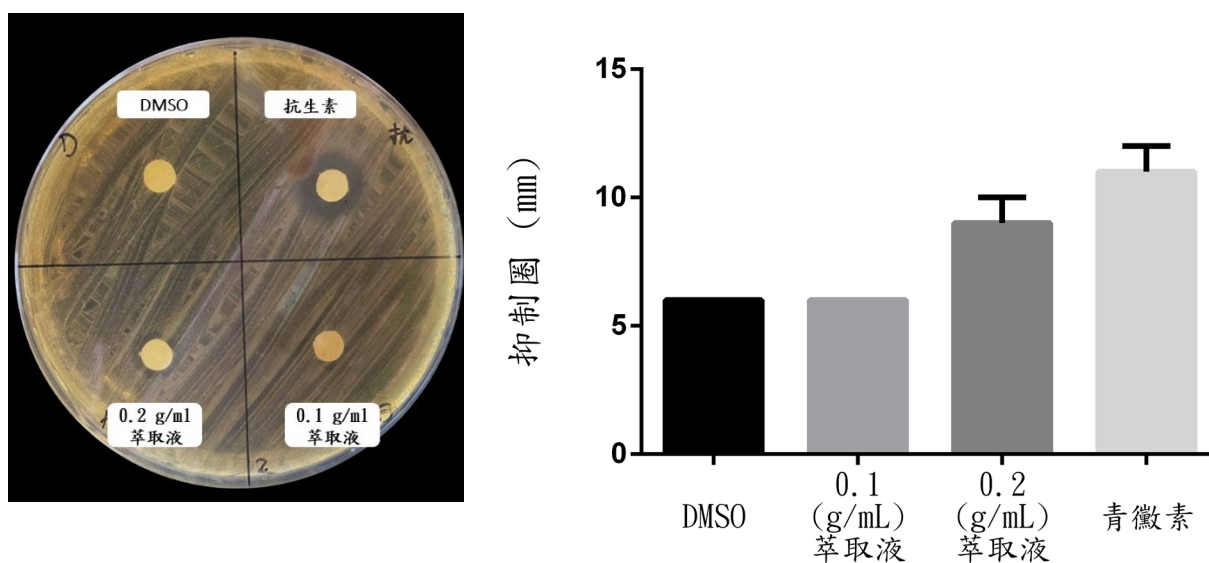


圖 16. 不同濃度之稚鸞殼萃取液對大腸桿菌的抑菌檢測。左圖為將沾附 DMSO、0.1 g/ml 稚鸞殼萃取液、0.2g/ml 稚鸞殼萃取液、青黴素等四種溶液的圓形濾紙，置放於大腸桿菌培養皿中。待 24 小時的培養後，紀錄並測量各組抑制圈之直徑。

結果說明：

由實驗結果顯示，作為溶劑的 DMSO 和 0.1g/ml 稚鸞殼萃取液並無抑菌圈的形成，但 0.2g/ml 稚鸞殼萃取液和抗生素（青黴素）則有明顯的抑菌圈，顯示萃取液在 0.2g/mL 濃度下，內含可達抑菌效果的成分物質。

五、實驗五：稚鸞鸞殼吸收銅離子之定性實驗

先前的研究指出，稚鸞鸞殼螢光層萃取液與銅離子結合後有螢光淬滅現象，且可知螢光層位於鸞殼內側。因此本實驗以鸞殼內側接觸銅離子溶液後所產生的螢光變化進行觀察，藉以評估利用稚鸞鸞殼作為吸附銅離子的濾材（結果如圖 17）。

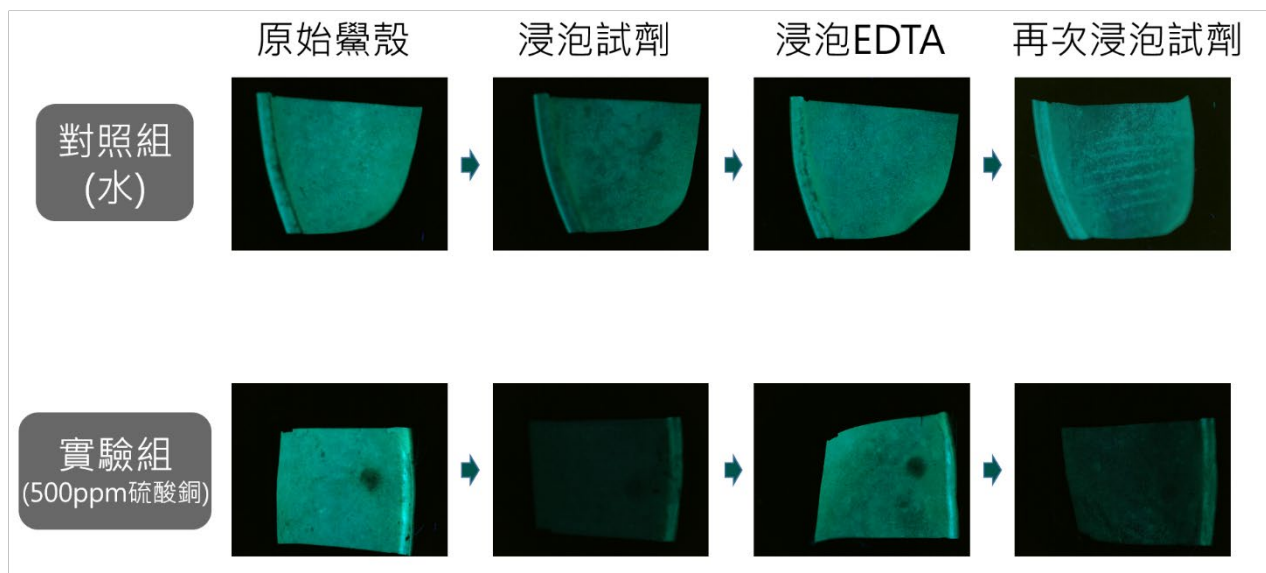


圖 17. 銅離子引起稚鸞鸞殼螢光消失現象。將稚鸞鸞殼分別浸泡於水和硫酸銅溶液 5 分鐘後，再以 400nm 螢光顯微鏡進行觀察。結果發現銅離子能讓鸞殼的螢光現象消失，且將螢光消失的鸞殼浸泡於 EDTA 溶液後，鸞殼的螢光現象便能恢復。

結果說明：

先利用藍光手持式顯微鏡(400nm)照射，觀察浸泡前的稚鸞鸞殼內側螢光現象。將含有螢光現象的兩片稚鸞鸞殼分別浸泡於硫酸銅溶液和純水，經過五分鐘的浸泡，經純水處理過的稚鸞鸞殼其螢光現象仍在，但浸泡硫酸銅的鸞殼螢光現象則消失了。為了進一步檢視螢光的消失是與銅離子有關，我們將螢光消失的鸞殼再與金屬螯合劑 EDTA 作用，結果是讓鸞殼消失的螢光重新恢復。綜合上述結果，本實驗證實稚鸞鸞殼具有吸附銅離子之能力。

六、實驗六：稚鸞鸞殼吸收銅離子之定量反應

將已知濃度銅標準液分別滴加一滴銅離子試劑，進行呈色反應後，利用 Biochrom 分光光度計測量其在波長 470nm 的吸光值如下表一，建立銅離子標準溶液之檢量線圖如圖 18 所示，檢量線具有良好線性相關(相關係數 R^2 值 0.9995)，可供後續實驗使用。

表一.各濃度硫酸銅於 470nm 呈色反應之吸光值

銅離子濃度	0	0.125	0.25	0.5	1	2
吸光值	0	0.02	0.04	0.08	0.15	0.31

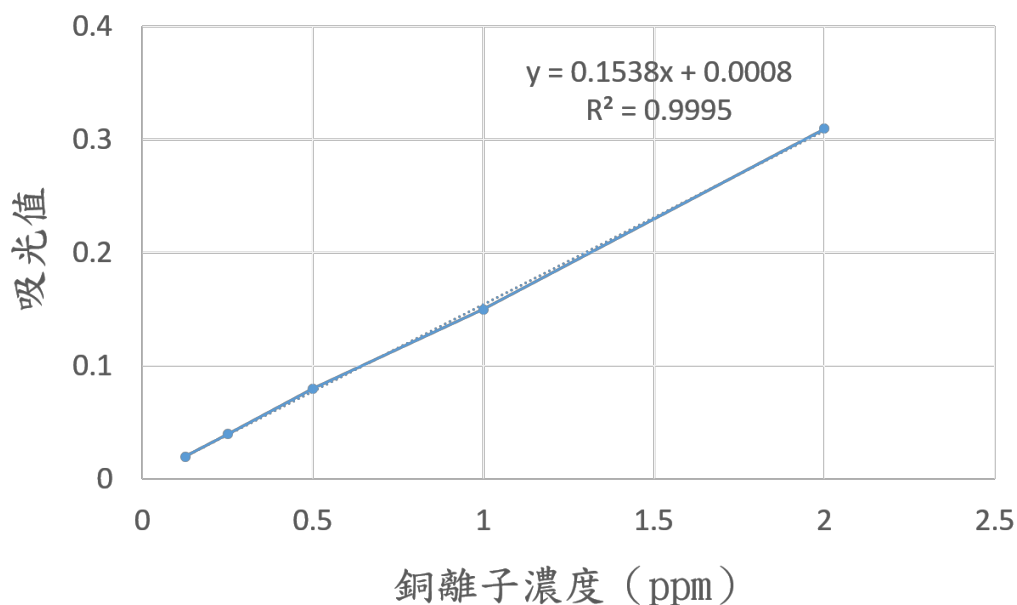


圖 18. 利用銅離子呈色反應製備檢量線。

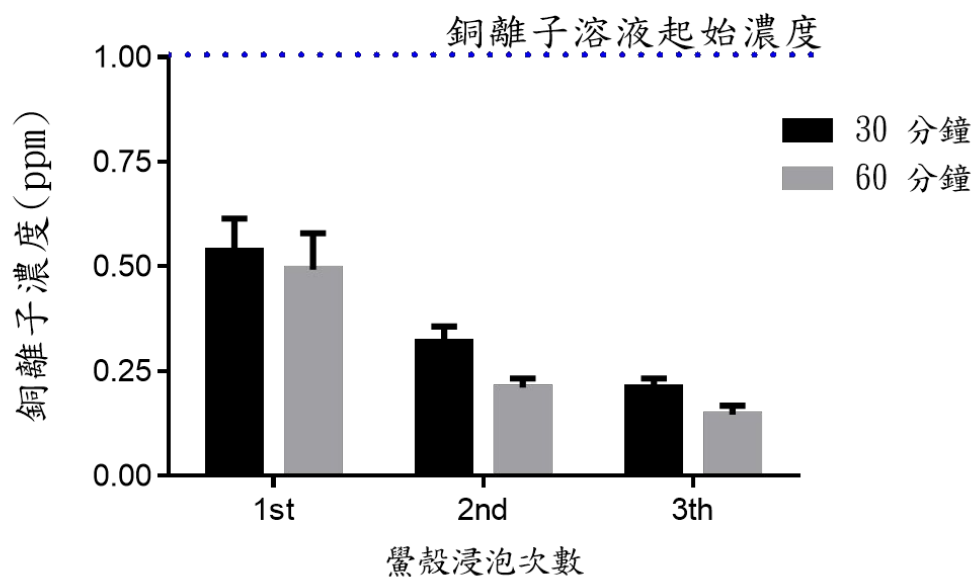
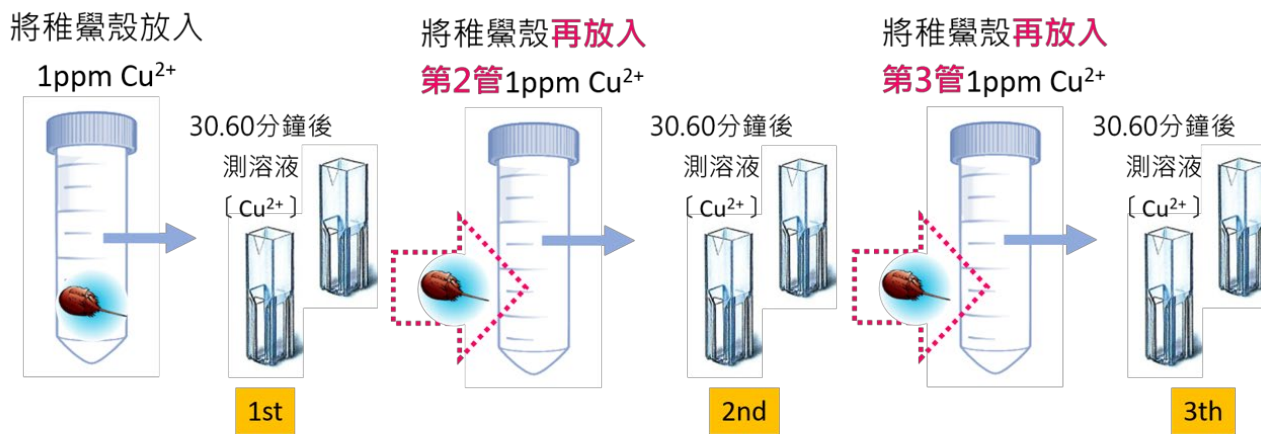
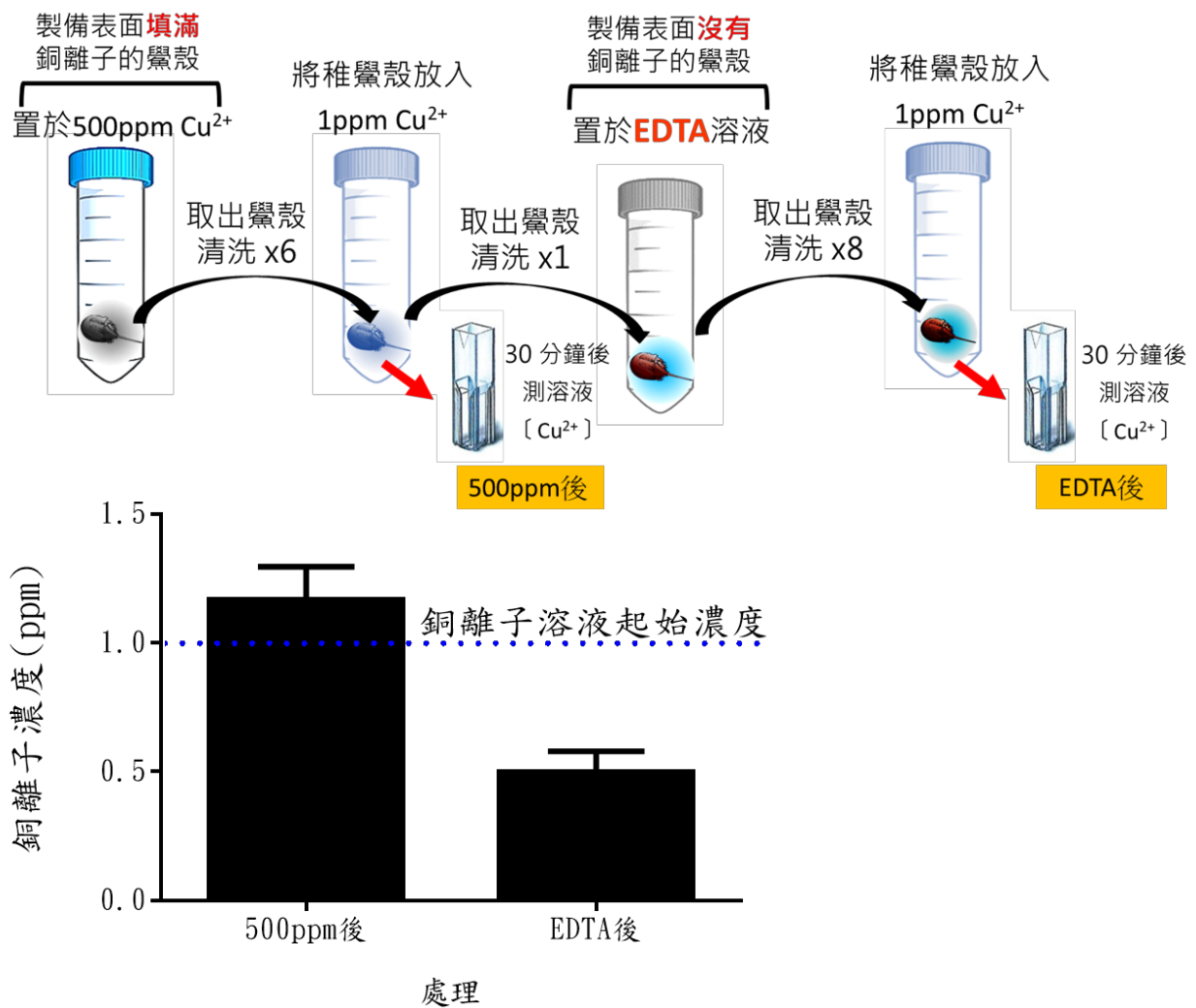


圖 19. 探討稚蠶蠶殼對銅離子的吸附效果及限度。實驗中進行了三次浸泡 (1st 2nd 3th) 用以檢視蠶殼對銅離子吸附和限度。實驗發現，稚蠶蠶殼對 1.0 ppm 銅離子溶液中的銅離子有良好的吸附性，都能顯著的降低溶液中的銅離子，且將同一個蠶殼經三次使用後，仍然能持續有效地吸附銅離子。

結果說明：

從實驗結果可見隨著浸泡時間的增加，溶液中的吸光值下降，比對銅離子標準溶液檢量線後，顯示殘留在溶液中的銅離子逐漸消失，表示 0.1g 的蠶殼對於吸附 1.0 ppm 濃度的銅離子有很好的效果，而且在第二、三次浸泡時，還能達到較第一次有最佳的吸附效果。



20. 探討稚鬚殼對於吸附銅離子後的可復用性。首先，實驗將鬚殼浸泡於高濃度的銅離子溶液中，讓鬚殼對於銅離子的吸附力達到飽和。接著再利用金屬離子螯合劑 EDTA 作用於鬚殼，使其將鬚殼中已吸附的銅離子全數去除。結果發現，將吸附銅離子達飽和的鬚殼（即 500ppm 後）浸泡於 1.0 ppm 銅離子溶液中，鬚殼已無吸附銅離子的效果。但經過 EDTA 作用後（EDTA 後），鬚殼又恢復了對銅離子的清除效果。

結果說明：

實驗結果顯示，利用高濃度的銅離子可阻斷鬚殼後續對銅離子的吸附能力，但利用 EDTA 清除鬚殼中銅離子後，鬚殼即可再次被使用，並且仍然能有效的去除溶液中的銅離子。

陸、討論

蟹（Horseshoe crab）在地球上存活了 4 億多年，因此被稱為「活化石」，是金門潮間帶重要的明星物種。但現今三棘蟹已被國際自然保育聯盟（IUCN）列為瀕危物種。新冠肺炎 (COVID-19) 疫情在全球迅速延燒，因此相關疫苗的開發和需求大增，讓蟹的保育議題再次引起國際的關注和討論，因為若缺少了用以細菌內毒素檢測的「蟹血」試劑，人類的藥物和醫材將不再安全。本研究首先透過人工飼養的方式來觀察稚蟹的成長，目標是透過以此方式來維護此生物，並將其生長過程中會自然脫下的蟹殼做更進一步的研究利用。期盼，三棘蟹的人工飼養除了能延續物種繁衍和永續外，還能兼顧商業應用，達成雙贏目標。

(一) 人工養殖三棘蟹稚蟹之紀錄

經過 9 月的細心飼養，自今年 5 月份開始，飼養的稚蟹陸續脫殼，但明顯可見齡期較小的稚蟹會集中在 5 月脫殼。此時，我們也在海岸上發現了稚蟹的脫殼。透過人工飼養的方式，我們初步了解了稚蟹脫殼的行為具有一定的周期性，每年的 5、6 月會是收集蟹殼的最佳時機。有隻稚蟹在去年被發現時，頭胸甲處已有一個明顯的大孔，推測應是在野外被水鳥所啄傷，因而將牠帶回實驗室內養傷兼飼養觀察。隨著飼養的過程中，透過對其脫下來的稚蟹殼觀察，我們發現殼上的洞傷逐漸地減小，顯示稚蟹脫殼能夠癒合傷口，希望在未來牠能夠痊癒，再將之野放回大海。

(二) 稚蟹蟹殼萃取液應用於「抗氧化」之探討

三棘蟹屬於節肢動物甲殼類，文獻指出甲殼類動物的外骨骼具有幾丁質、蛋白質和酚類化合物等成分。且其中酚類化合物經酵素作用所產生的物質，在 UV 照射下，能產生螢光反應，因此本研究遵循前人作法以有機溶劑 DMSO 破壞蟹殼結構，在萃取液中觀察到螢光現象，顯示本實驗做法可提取出稚蟹殼中的酚類化合物，而許多研究也指出多酚類物質具有防止氧化傷害的「抗氧化作用」，因此第一個應用我們以清除 DPPH 自由基做檢測。從本次稚蟹蟹殼

萃取液的實驗結果，確實看到隨著萃取液的濃度加倍，DPPH 的清除率也伴隨接近倍增，顯示稚蠶殼萃取液未來具有發展成抗氧化物之應用可能性。

(三) 稚蠶殼萃取液抑菌應用於「抑菌」之探討

許多文獻指出甲殼類動物體內的甲殼素具有抑菌之功效，因此本研究立基於前人成蠶殼可以抑制大腸桿菌生長之觀察，進一步想在不犧牲蠶生命的情況下，利用自然脫下的稚蠶殼進行抑菌功效的試驗。然而稚蠶殼的結構對比於成蠶殼，較為薄透，本研究多次嘗試不同的萃取條件後，不斷設法針對有效成分的提取做改良，終於發現以 1 克稚蠶殼溶於 5 ml DMSO 並以超音波震盪 48 小時所獲得的萃取液（即 0.2g/ml 稚蠶殼萃取液）能產生對大腸桿菌的抑制圈，顯示其內含能抑菌的物質，而這項發現也大大提高了未來將稚蠶殼萃取液應用於發展抗菌產品之可能性。

(四) 稚蠶殼萃取液抑菌應用於「吸附重金屬銅離子效果」之探討

前人研究指出當蠶殼經過萃取處理後所得之螢光物質與銅離子結合後會產生螢光淬滅現象，本實驗據此先以定性實驗觀察簡單自然風乾之蠶殼在滴加銅離子後是否會螢光消失，初步證實稚蠶殼具有抓取銅離子之能力。

接著以在 520nm 下銅離子與檢測試劑的呈色反應，繪製銅離子檢量線做為探討蠶殼能否有效吸附銅離子之檢測，目的是將蠶殼做為淨水器濾材之概念來進行開發，預實驗時使用咖啡機將蠶殼打成粉狀，目的希望增加其吸附表面積，但反而造成蠶殼螢光物質的消失。為了讓具吸附銅離子的螢光物質能穩定的存在固體物上，因此將實驗改良成浸泡整隻稚蠶殼。實驗過程中為了能聚焦在蠶殼對銅離子的吸附效果，我們會以過濾方式先去除溶液中的懸浮物後，再做銅離子檢測的藥劑呈色。因此，未來若以稚蠶殼作為主要過濾材料的同時，也需要考量濾芯設計上的結構，例如以更多元的結構，達到含重金屬汙水的有效過濾和淨化。

實驗發現，每次蠶殼浸泡於 1.0ppm 銅離子溶液後，都仍會殘留低濃度的銅離子，我們推論這現象的發生是因為浸泡過呈都是在靜置的狀態下，因此難以在 1 小時內將低量的銅離子完全吸附，且在第二、三次浸泡時，還能比第一次有更佳的吸附效果，推測可能蠶殼表面覆蓋了某些會阻礙銅離子被蠶殼吸附的物質，但隨著每一次更換銅離子溶液的過程，逐漸讓

這些表面覆蓋物脫落，使得對於銅離子的吸收效果逐漸加強，因此未來利用稚鬻殼製備濾芯時，必須將鬻殼做進一步的清潔。另外透過稚鬻殼可復用性的實驗探討，我們也初步證實稚鬻殼對銅離子的吸附是具有再現性，如此一來，未來若以濾芯作為開發，當銅離子汙水流經特定長度的濾芯時，應可在短時間內讓水中的銅離子更有效率的與鬻殼接觸，淨化水體，並且此濾材具有可重複利用的特性，如此不僅可降低成本也兼具環保之概念。

（五）綜合討論

有了以上的研究基礎，我們初步證實稚鬻殼能應用於抗氧化、抑菌和吸收重金屬銅離子等方面，後續如何將這些基礎進一步應用在生物材料的開發，是本研究的下一步的規劃，例如：將其發展成具抗菌和抗氧化功能的「生物膜」覆蓋於人體表面，以延長保護時效。此外，有研究發現，體內銅離子大量累積於細胞中，會讓細胞受到高度的氧化壓力及傷害，甚至被認為是引起阿茲海默症的致病原因（Eskici G. and Axelsen PH, 2012）。鬻殼中的萃取液同時兼備良好的抗氧化和銅離子皆合力，因此，或許未來也能將稚鬻殼萃取液應用在阿茲海默症的治療上。此外，亦可進一步發展出能做為過濾水中重金屬銅離子的天然抗菌濾材等，這些都是未來可以再深入研究的方向，當然最終期待透更多對三棘鬻的相關研究，讓世人更了解其價值，進而共同來保護牠，且在不傷害其生命並尋找其應用價值的雙重理念，將稚鬻殼做生物天然資源的再利用，以達新穎生物資材之開發和環境永續之目標。

柒、結論

- 一、三棘蠶能以人工方式進行飼養觀察，豐年蝦和沙蠶的餵食能有效供應其生存所需，且其生長脫殼週期與野外稚蠶接近。
- 二、稚蠶殼萃取液具有清除 DPPH 自由基的抗氧化之功效。
- 三、稚蠶殼萃取液具有可抑制大腸桿菌生長之功效。
- 四、稚蠶殼浸泡在硫酸銅溶液中螢光物質會消失，且能將硫酸銅溶液中的銅離子進行吸附，進而迅速降低溶液中銅離子的含量。

捌、參考資料及其他

陳章波、陳勇輝（2011）。**蠶的史詩—台灣三棘蠶保育特展專刊**。屏東：國立海洋生物博物館。

成勇生、楊文璽、柯逢樟、楊誠國（2003）。**金門地區古寧頭、浯江溪口潮間帶中國蠶稚蠶調查報告**。金門：金門縣水產試驗所。

謝明昌、張志堅、林金榮、陳其欽、黃丁士、蔡萬生（2011）。蠶的研究與應用。
水試專訊，33，11-15。

洪承欣、陳旻禧（2018）。光耀「蠶」世—金門三棘蠶自體螢光現象之探究。全國中小學科展。

呂芯如、盧姿蓉、謝苑軒（2019）。「蠶」續「偵」藏—蠶殼螢光萃取液應用於銅離子檢測之研究。金門縣中小學科展。


練鴻裕、林孟頡、陳詩桓（2012）。甲若殼以結素重金屬汙染—甲殼素吸附重金屬水溶液。全國中小學科展。

Eskici, G., & Axelsen, P. H. (2012). Copper and oxidative stress in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry*, 51(32), 6289-6311.

【評語】 052409

本作品以人工飼養三棘蠶稚蠶，觀察稚蠶生長歷程，收集稚蠶脫下的蠶殼，以有機溶劑 DMSO 浸泡稚蠶蠶殼，製作稚蠶蠶殼萃取液，探討蠶殼萃取液的抗氧化性與抑制大腸桿菌的功效，及蠶殼吸附銅離子功能，將稚蠶後殼作天然生物資源再利用，具有趣味及實用的研究題材。作者宜回顧文獻並詳細陳述本作品與文獻差異處，以凸顯本作品的亮點。針對蠶殼吸附銅離子的探討，可進一步設計靜態及動態吸附實驗，以確認吸附機制及平衡吸附量，提高實用性。

作品簡報



利用三棘蠶稚蠶蠶殼 作為應用材料之評估

科別：工程學科（二）

組別：高級中等學校組

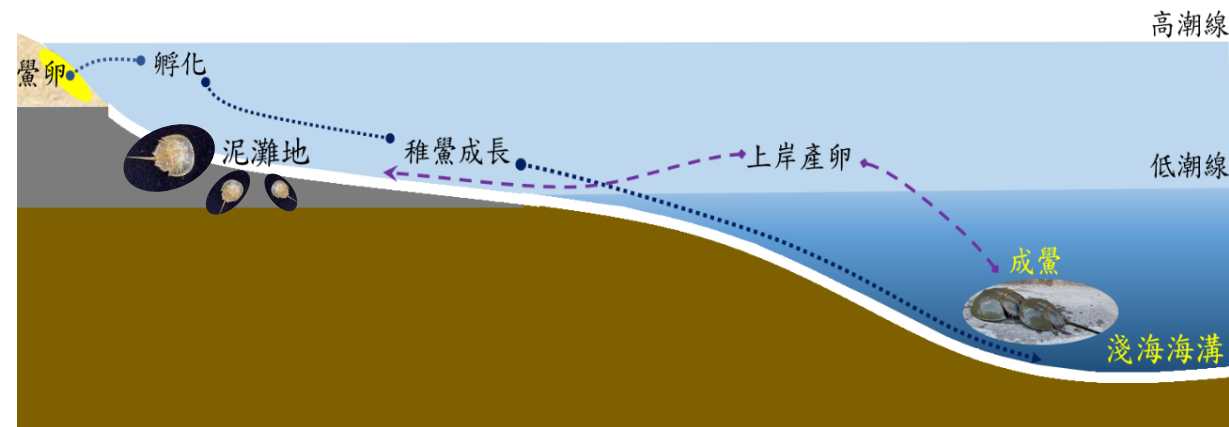


研究動機與目的



- **三棘鬣**是一種獨特的生物，有「活化石」之稱。
- 因棲地被人為破壞，使得三棘鬣面臨生存威脅，2019年國際自然保育聯盟列為「**瀕危**」物種。
- 在校參與稚鬣飼養與觀察實驗，因而產生研究興趣。

- 文獻指出**成鬣鬣殼**當中具有**抑菌**及**抗氧化**的成分。
因此**發想**是否能在**不犧牲成鬣**情況下，改以海邊撿拾或人工飼養稚鬣所得到的**稚鬣鬣殼**作為取代。

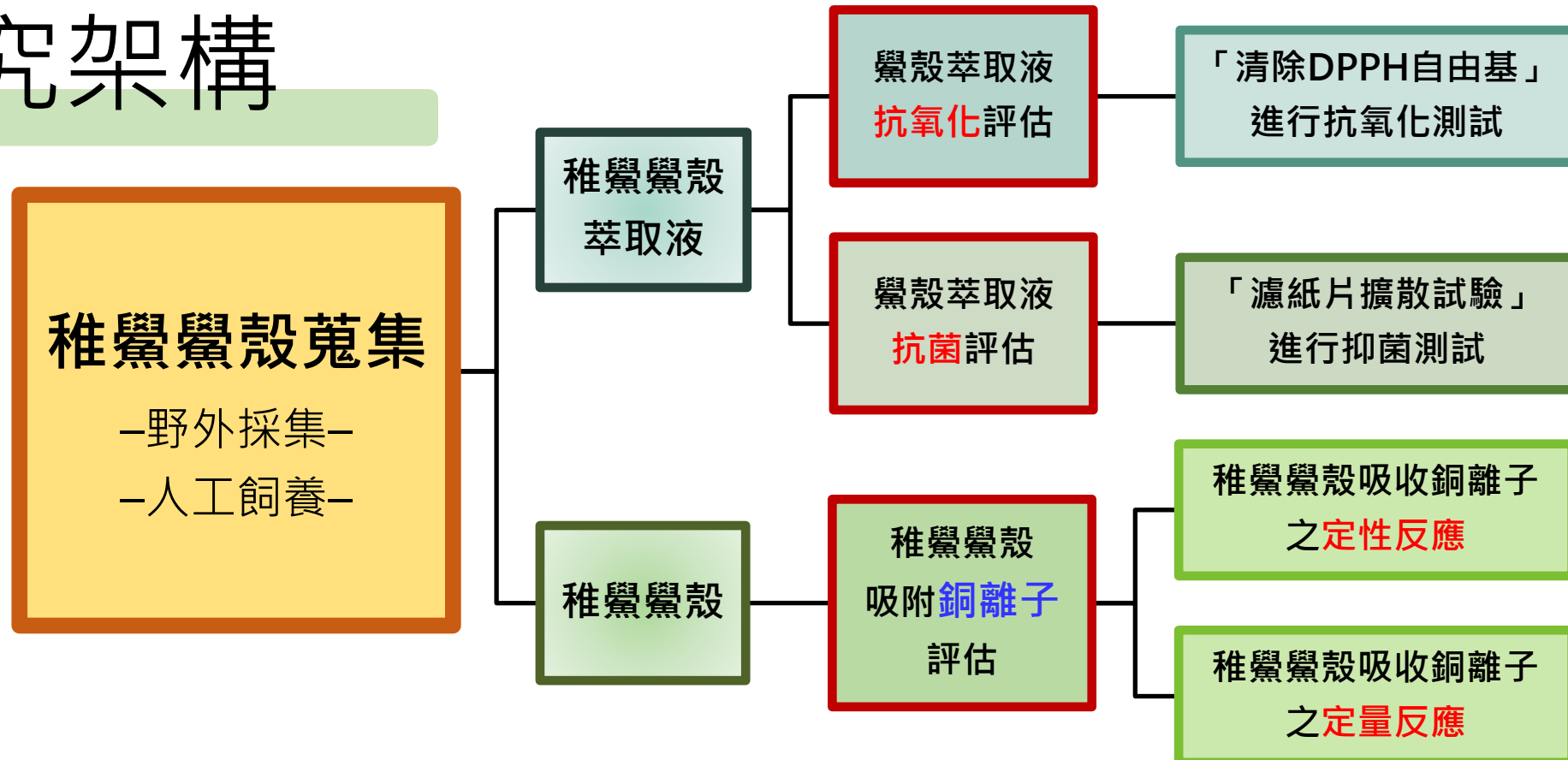


▲ 三棘鬣生活史中不同階段之棲地分布

文獻探討

- 巨鬻成鬻鬻殼萃取液具有抗氧化的功效 (Siddhartha *et al.*, 2020)
- 三棘鬻成鬻鬻殼具自體螢光現象，且其萃取液能抑制大腸桿菌生長 (洪等，2018)
- 三棘鬻稚鬻鬻殼萃取液中的螢光物質可用以檢測重金屬銅離子 (呂等，2019)

研究架構



一 稚鬻飼養



定期掏洗海沙



檢測水質鹽度



餵食 豐年蝦 或 沙蠶



清除代謝物



◀ 測量稚鬻頭胸甲寬
紀錄生長齡期情形



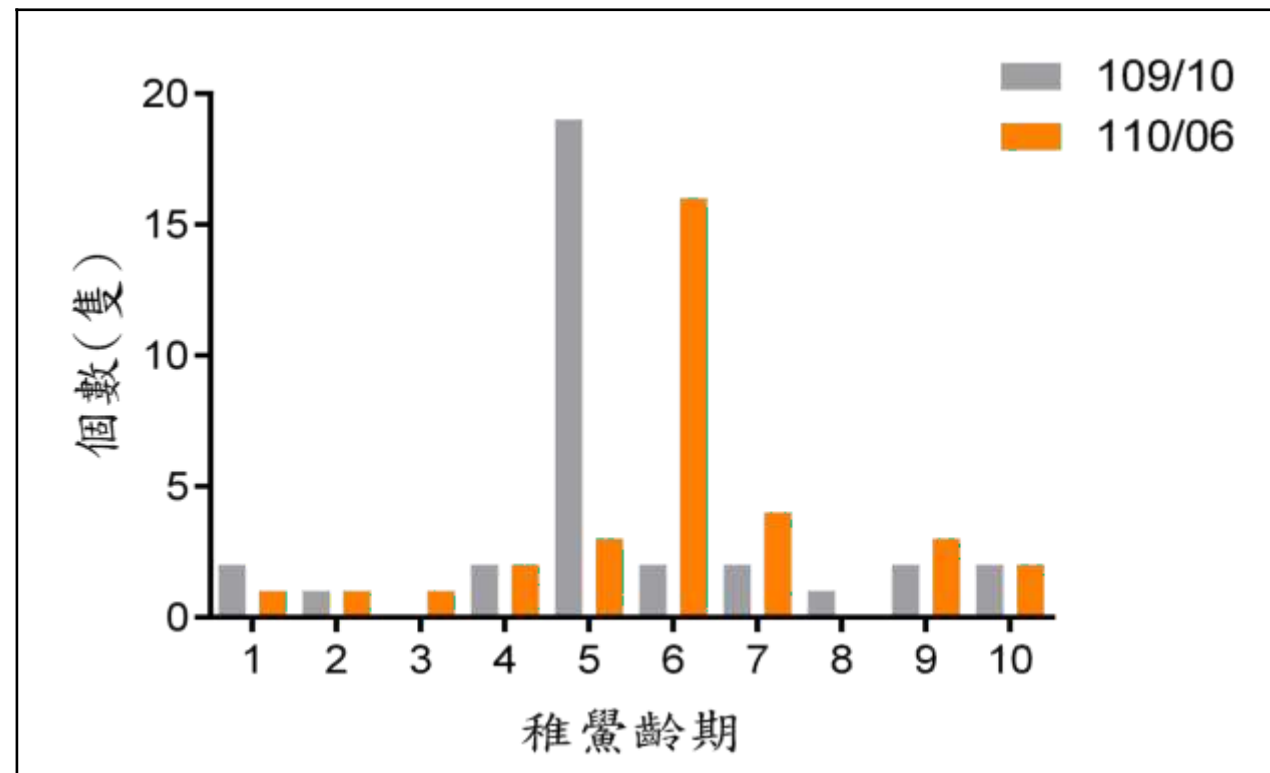
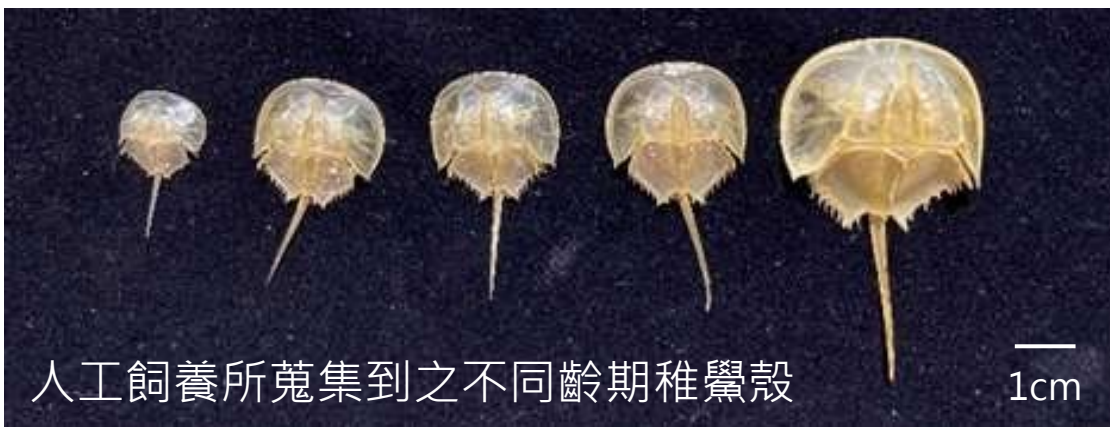
示意圖

人工飼養稚鬻脫殼情形▶

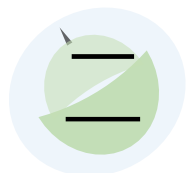


剛脫下之殼

一 稚鬻飼養



三棘鬻稚鬻每脫一次殼即增加一「齡」，經過 9 個月細心飼養均全數存活，且陸續脫殼成長。人工飼養的稚鬻，其脫殼時間與野外族群同步，大多集中在 5 - 6 月間發生，顯示稚鬻生長有其週期性，並且可藉由人工飼養蒐集稚鬻殼。



稚鬻鬻殼萃取液製備



1. 撿拾海岸邊的稚鬻殼



2. 稚鬻殼自然風乾



3. 放入機器磨成粉末



4. 放入玻璃管加入DMSO



5. 以超音波震盪48小時



6. 鬻殼膨脹，溶出有效成分



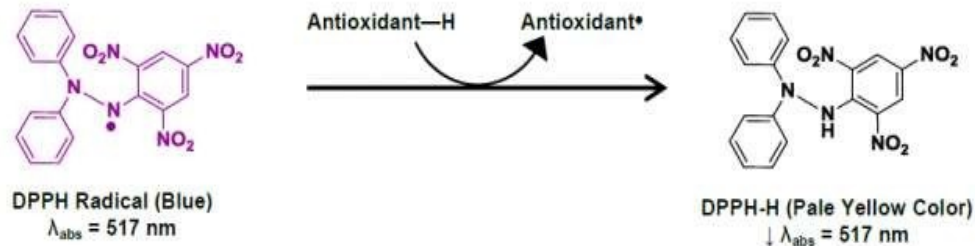
7. 過濾無菌萃取液



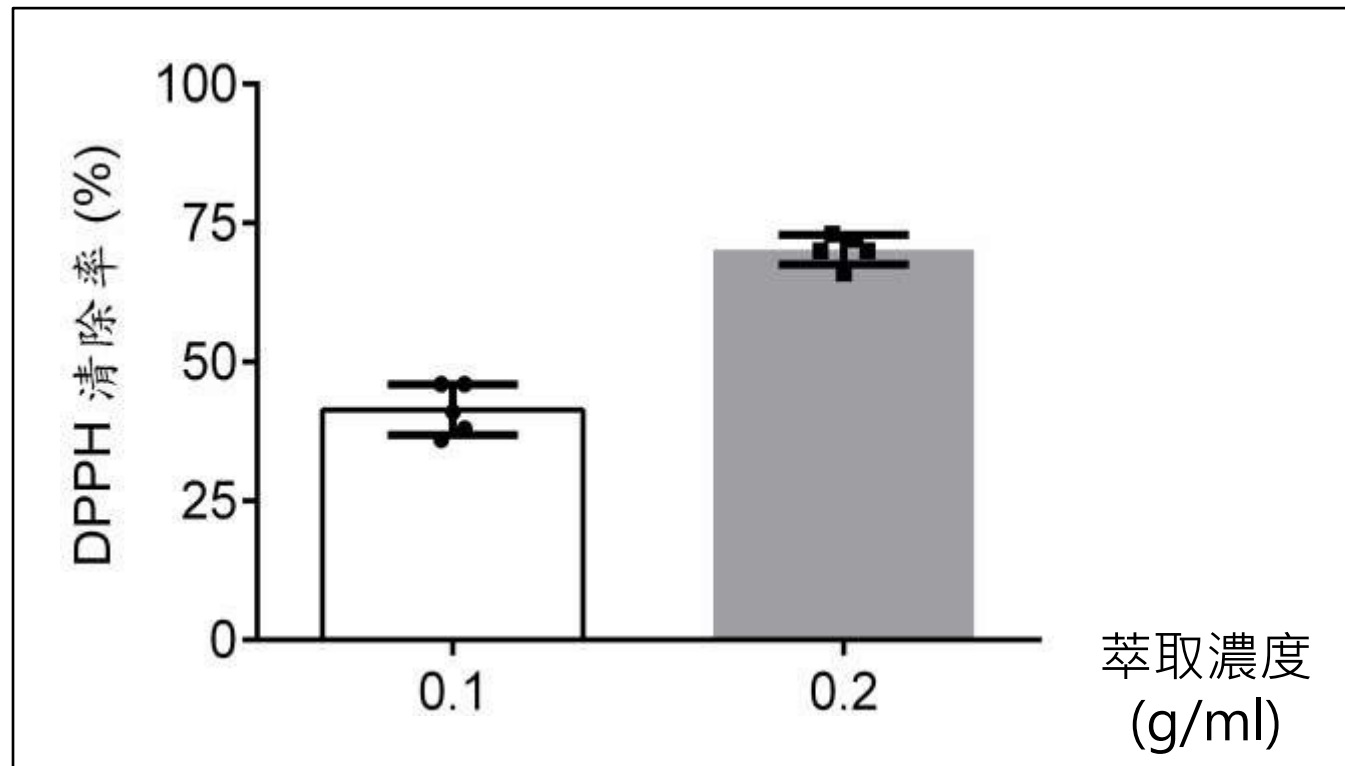
8. 稚鬻殼萃取液製備完成

本實驗規劃製備兩種不同濃度的鬻殼萃取液，分別為將1克重的鬻殼(野外採集9齡稚鬻)碎片，浸泡於10ml和5ml的DMSO溶液中，以超音波震盪進行萃取，獲得萃取液以0.1g/ml(低濃度) 和0.2g/ml (高濃度)標示作為後續實驗之使用。

三 稚鸞殼萃取液之抗氧化實驗

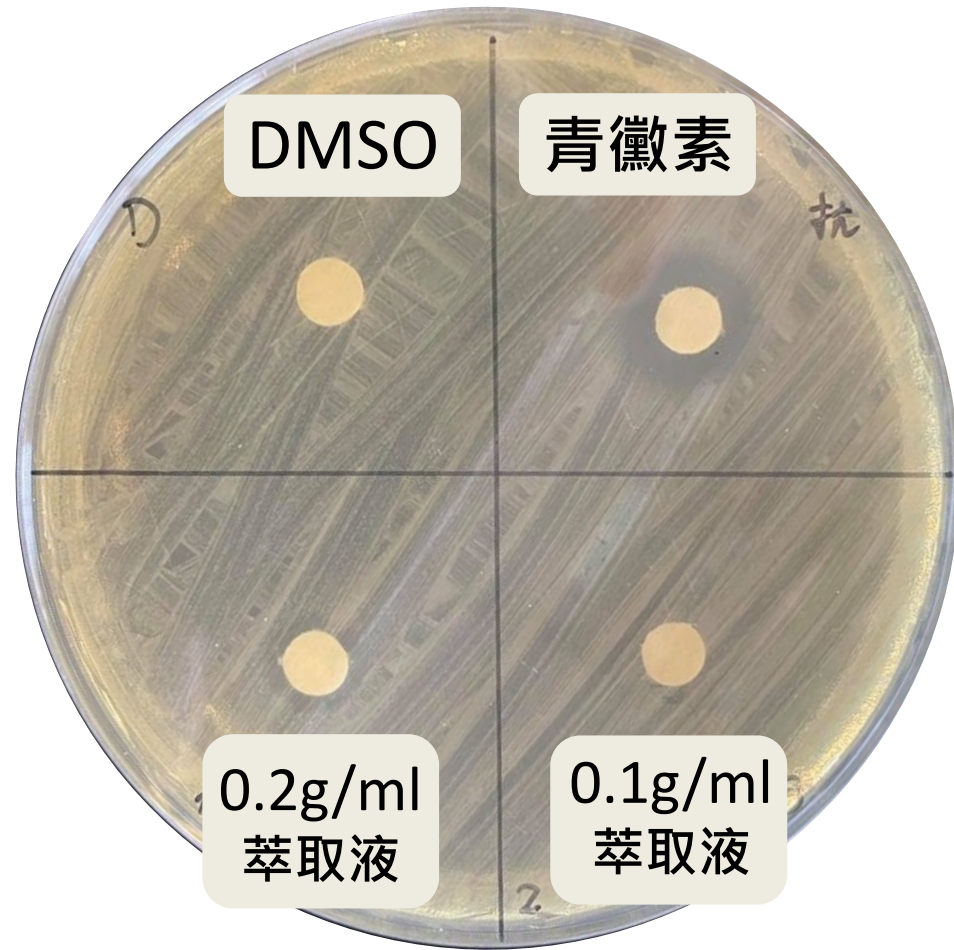


DPPH DPPH DPPH
 + +
 0.1g/ml 0.2/ml
 萃取液 萃取液

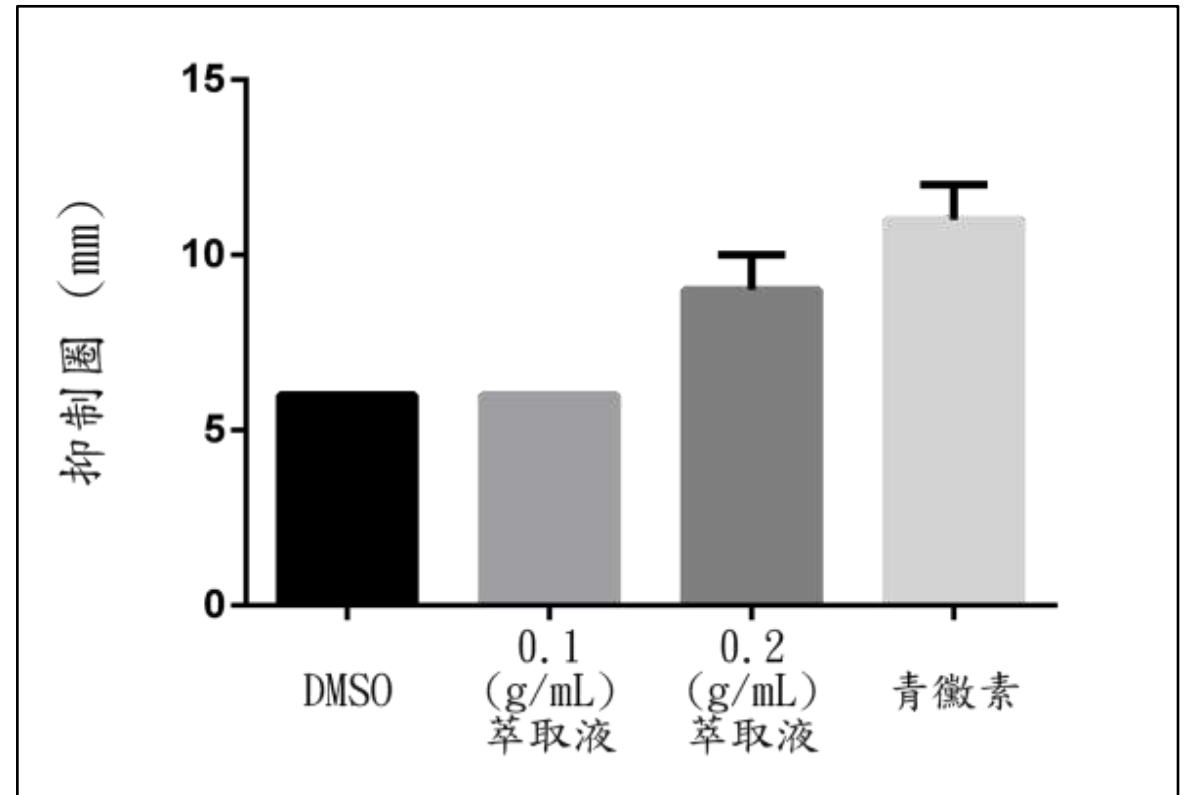


稚鸞殼萃取液具有清除DPPH自由基的**抗氧化功效**，且抗氧化之效果與萃取液濃度呈正相關。由實驗結果推得，未來若能進一步**提升稚鸞殼萃取液有效濃度**，將可增強其**抗氧化能力**。

四 稚鬻鬻殼萃取液之抑菌實驗



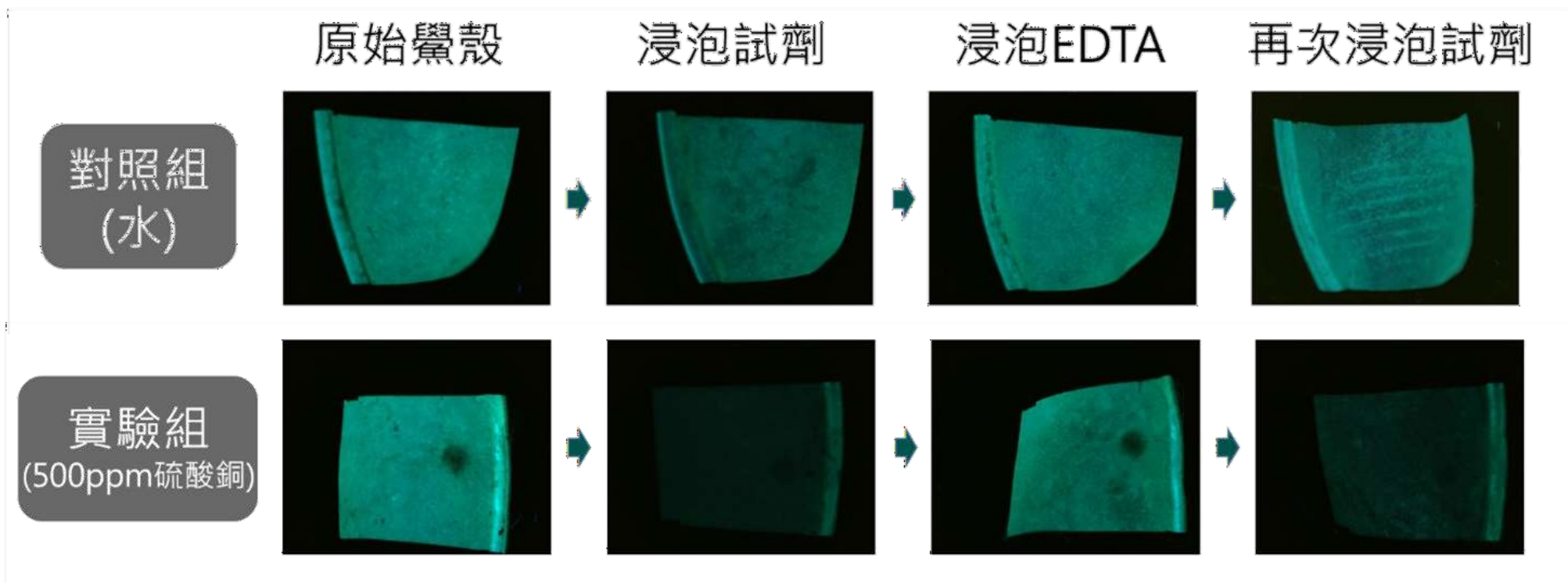
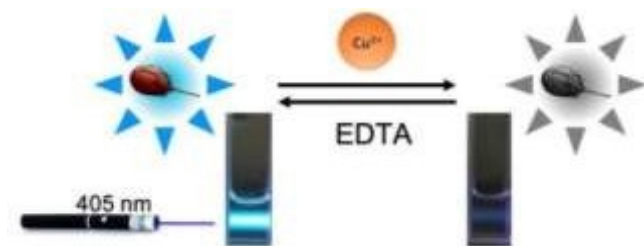
濾紙片擴散試驗



實驗結果顯示高濃度萃取液與青黴素皆能產生抑菌環，可達抑菌的效果。但低濃度鬻殼萃取液則無抑菌效果。

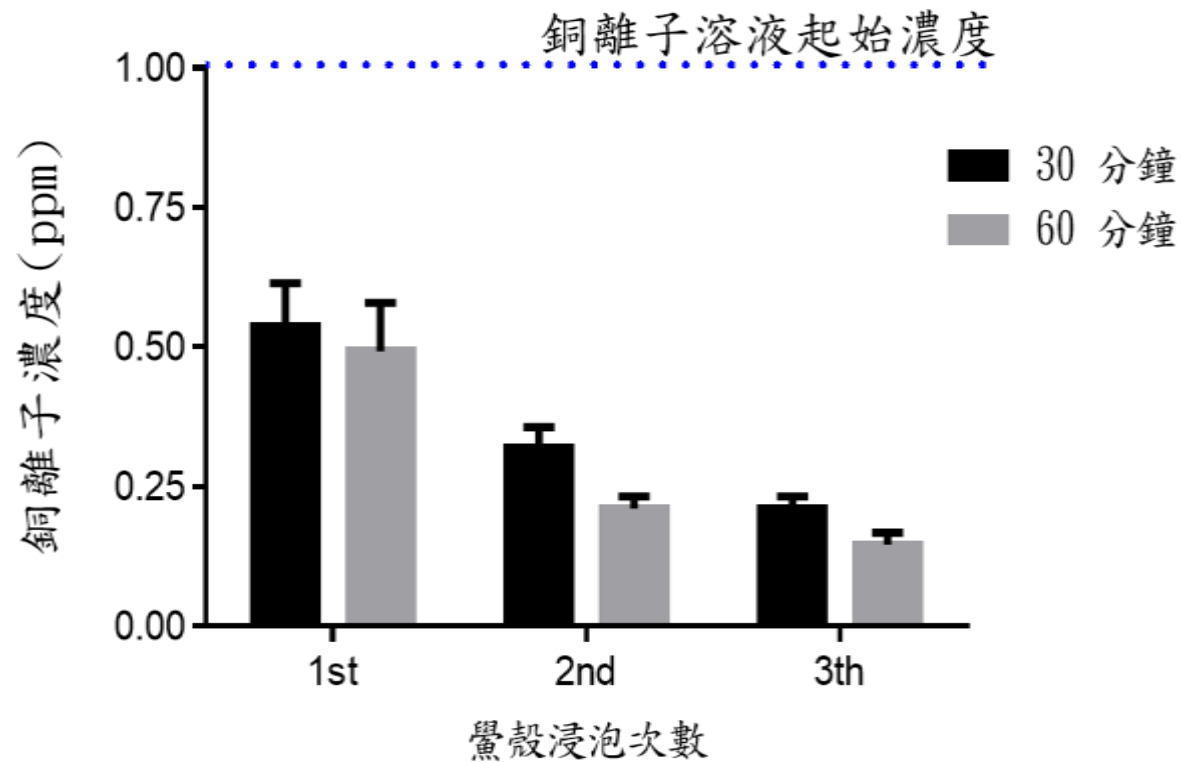
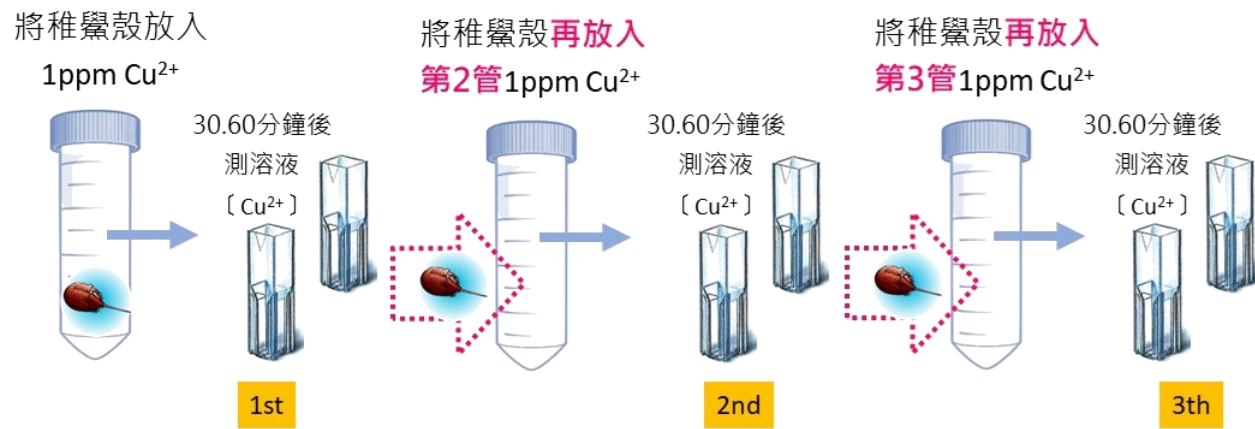
五 稚鬻鬻殼吸收銅離子之定性反應

以前人研究：稚鬻鬻殼萃取液和 Cu^{2+} 結合會發生螢光淬滅現象，再加入EDTA螯合 Cu^{2+} 後螢光會再次顯現作為本實驗基礎



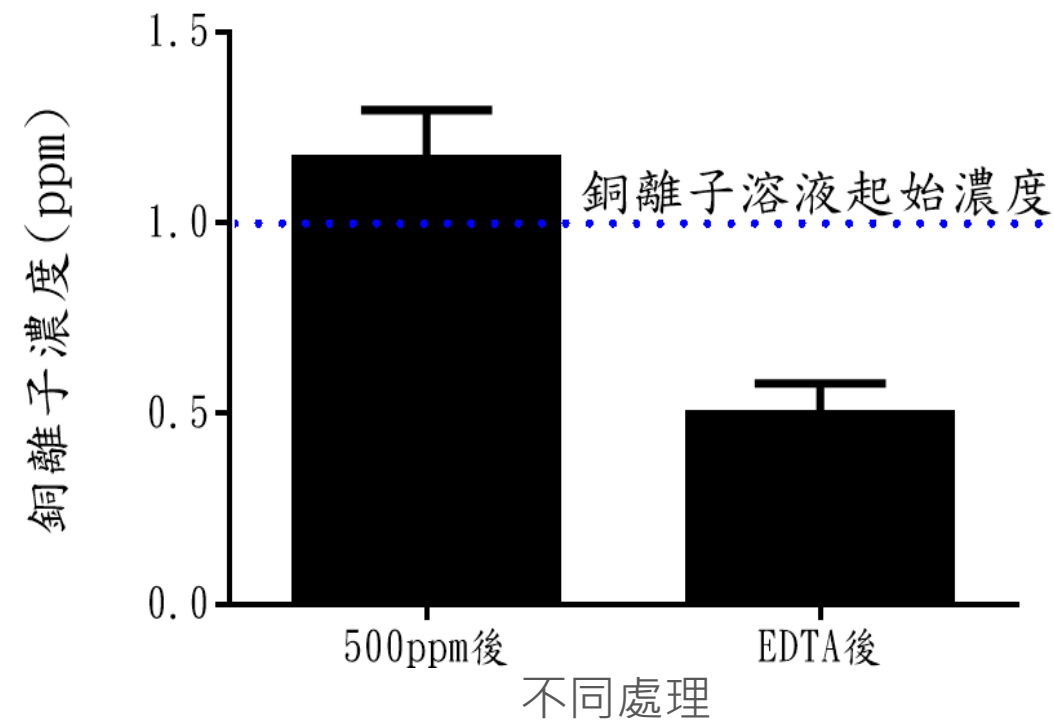
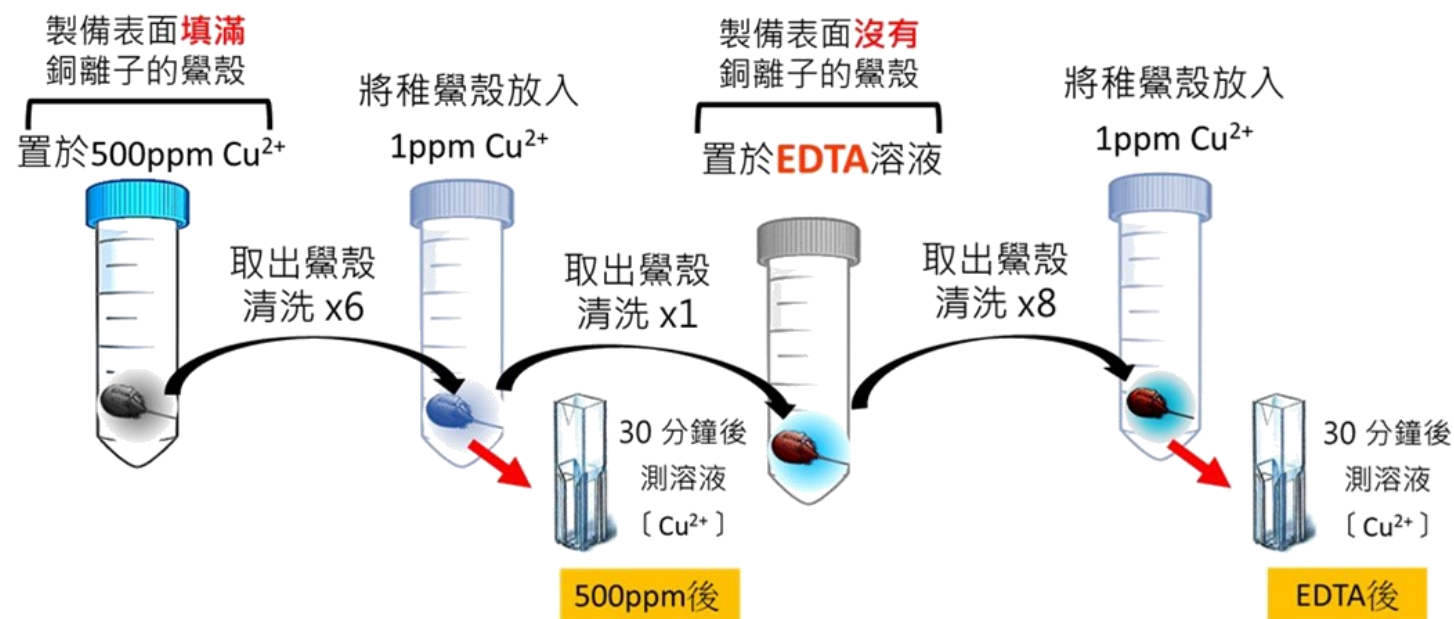
本實驗將風乾的鬻殼浸泡於硫酸銅溶液中，造成螢光淬滅現象發生。接續再與金屬螯合劑EDTA作用會使螢光重新恢復，證實稚鬻鬻殼具有與銅離子結合之能力。

六 稚鬻鬻殼吸收銅離子之定量反應—有效性



將鬻殼浸泡於1ppm的銅離子溶液中，可有效降低溶液中的銅離子濃度，並且在連續的第二、三次浸泡後，還能持續有良好的吸附效果。由實驗結果推論，野外所撿拾之鬻殼若經適當清潔應可達到更好的吸附效果。

六 稚鬻鬻殼吸收銅離子之定量反應—可復用性



先以高濃度的銅離子溶液讓鬻殼中的銅離子達到飽和，再以EDTA清除鬻殼中的銅離子後，可再次有效的去除溶液中的銅離子，顯示鬻殼具有重複使用之特性。

結論

- 一、利用**人工飼養**方式可有效獲取三棘鬯稚鬯鬯殼。
- 二、高濃度稚鬯鬯殼萃取液具有**抗氧化**和**抑制大腸桿菌**的功效。
- 三、稚鬯鬯殼具有**吸附重金屬銅離子**的功效，且**鬯殼可再次被使用**。
- 四、透過人工養殖系統的建立，可讓保育和生物資源開發同步進行。

未來 展望

讓更多人認識、關心三棘鬯，進而一起**保育三棘鬯**這獨特生物

設法**提高萃取液有效成分**，以本研究為基礎做**進一步探究將稚鬯鬯殼
萃取出**發展成為抗氧化藥物、生物膜、吸附重金屬之濾芯等應用

參考文獻

Pati, Siddhartha, et al. (2020). Structural characterization and antioxidant potential of chitosan by γ -irradiation from the carapace of horseshoe crab. *Polymers*, 12(10), 2361.

謝明昌、張志堅、林金榮、陳其欽、黃丁士、蔡萬生 (2011)。鬯的研究與應用。水試專訊，33，11-15。

洪承欣、陳旻禧 (2018)。光耀「鬯」世—金門三棘鬯自體螢光現象之探究。全國中小學科展。

呂芯如、盧姿蓉、謝苑軒 (2019)。「鬯」續「偵」藏—鬯殼螢光萃取液應用於銅離子檢測之研究。金門縣中小學科展。