

2021 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 200023

參展科別 環境工程

作品名稱 塑膠微粒對大型蚤生殖的影響

就讀學校 國立中興大學附屬高級中學

指導教師 林士超、孫承矩

作者姓名 羅芝鈺、梁筑庭、宮昕儀

關鍵詞 塑膠微粒、大型蚤、生殖影響

作者簡介



我們是國立興大附中數理資優班高二的梁筑庭、宮昕儀、羅芝鈺，有幸在高一時參與中研院的計畫，接觸到塑膠微粒這個議題，這份研究不只累積我們在科學上的經驗，更讓我們重新反思自己的生活去落實減塑，也希望透過我們的研究能讓更多人重視塑膠污染的嚴重性。

特別感謝一路上指導我們的林士超老師以及彰師大王瑋龍教授，還有在專題研究這條路上給於我們建議和幫助的老師、學長們，陪伴我們跨過一次次的難關和挑戰，如今我們才能站上國際科展的舞台。

摘 要

塑膠微粒常見於自然環境中，若攝入塑膠是否會對生物生存造成威脅？本研究以塑膠及小球藻餵食大型蚤(*Daphnia magna*)，以螢光顯微鏡觀察大型蚤腸道並監測小球藻濃度以推測大型蚤攝食情形，並監測新生水蚤個體數。

研究發現大型蚤在濾食中會攝入塑膠微粒，在含 0.08 mg/L 塑膠的培養環境下大型蚤攝食量顯著減少。在含 0.01mg/L 的塑膠環境下大型蚤開始抱卵天數有延長、第一子代個體數會減少，且平均體長亦減少。若子代出生即放回無塑環境，可恢復生長情形。

在含 0.01mg/L 的塑膠環境下，族群大小有顯著減少且在 0.08mg/L 濃度下的族群在第七天全部死亡，也就是有塑環境對大型蚤生殖及生長確實造成影響。

Abstract

Microplastics are widely distributed in freshwater environments^[1], thus our study looked into whether ingesting microplastic poses a threat to creatures' survival.

In this study, *Chlorella* sp. was used to feed *Daphnia magna*, and at the same time, Polystyrene (PS, 6-8 μ m in diameter) with a size similar to that of *Chlorella* sp. was also fed to *Daphnia magna* to study its effects. Fluorescence microscope and spectrophotometer were used to monitor the concentration of *Chlorella* cells in the cultivated environment to observe the feeding situation and reproductive effect of *Daphnia magna*. Also, growth of body length of *Daphnia magna* was observed by a microscope and recorded.

It was found that *Daphnia magna* truly ingested plastic particles in our experiment. In the environment of high concentration of microparticles (0.08 mg/L), parent flea will be affected by polystyrene plastic particles, causing a significant reduction in food intake ($P < 0.05$). Besides, the days to birth of F1 (first generation in experiments) have a tendency to be prolonged and the number of F1 individuals has decreased, and a decrease in body length has been observed. The survival rate of *Daphnia magna*'s F1 in the environment with PS (0.01 mg/L) is lower than that of the control group, but when F1 at birth was returned to plastic-free environment, its growth situation has a tendency to recover. Furthermore, at the concentration of plastic particles of 0.01 mg/L, 0.02 mg/L, 0.04 mg/L, and 0.08 mg/L, the population size decreased significantly ($p < 0.05$) and at the concentration of 0.08 mg/L, the parents all died out on the 6th day.

This study speculates that Polystyrene will affect the reproduction and body growth of *Daphnia magna*. Between 0.04~0.08 mg/L there existed a threshold of microplastics concentration in water. If the concentration exceeds the threshold, this environment could lead to death of *Daphnia magna*.

壹、研究動機

一、前言

近年來有關塑膠的環保議題日漸被重視，在實際參與淨灘和到回收站幫忙分類的活動中，我們親自體會到平時接觸不到的環境中，塑膠垃圾是如何污染原本乾淨環境。在關心塑膠垃圾及對環境產生污染之虞，我們經由網路搜尋相關議題後了解到這些污染產生的途徑，包括人們大量使用塑膠產品卻又不妥善回收而是直接丟入垃圾掩埋場或隨地丟棄，進而造成塑膠垃圾經由雨水的沖刷或風的吹送等因素進入海洋中。這些塑膠經長時間的裂解(Pyrolysis)後會變成肉眼無法看見的塑膠微粒 (Microplastic)。因為其非常微小且遍佈於自然環境中，所以很容易被動物攝入。於是我們想知道塑膠微粒是否會對生物的生存造成威脅？因此本實驗希望探討塑膠微粒是否會對大型蚤之生殖造成影響。

二、文獻探討

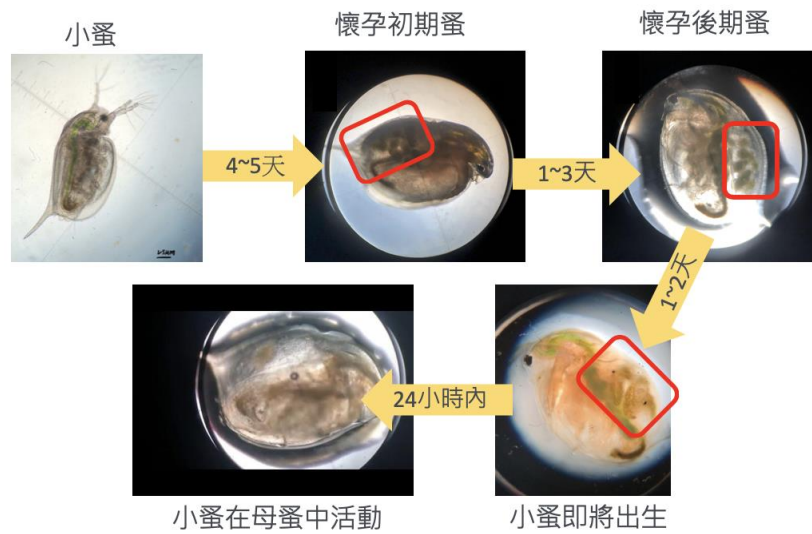
(一) 大型蚤 (*Daphnia magna*)

大型蚤分類地位為節肢動物門 (Arthropoda)、鰓足綱 (Branchiopoda)、枝角目 (Cladocera)、溞科 (*Daphniidae*)、溞屬 (*Daphnia*)。橈足類體型微小，是淡水浮游動物的重要份子，所謂浮游動物是指體型微小，具有微弱的游泳能力並無法反抗強大的水流，只能隨著水流載浮載沉^[10]。

大型蚤屬於濾食性動物，主要濾食水中浮游植物 (Phytoplankton)。由於其濾食的方式無法選擇性攝入食物，在受污染的淡水生態系中也有機會攝入環境中的塑膠微粒，且大型蚤因其體表透明方便進行觀察，故長期被用來作為毒物試驗指標生物。大型蚤生殖週期短 (圖一、二)，約一週內就能產下子代，且每代子代數多。另外，大型蚤是孤雌生殖，在實驗中更能降低因世代間個體差異所造成的誤差，而使實驗變得更加精確。大型蚤為初級消費者，除不易因生物放大效應，而受到攝食對象原先的累積影響外，更可有效推估對其上層消費者造成的影響。



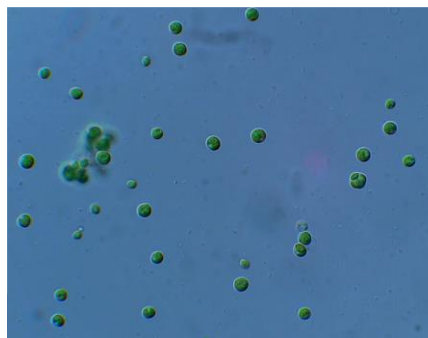
圖一：出生兩日大型蚤 (*Daphnia magna*, 本研究所攝)



圖二：大型蚤生殖週期 (紅線圈起處為卵或小蚤，本研究所攝)

(二) 小球藻 (*Chlorella* sp.) (圖三)

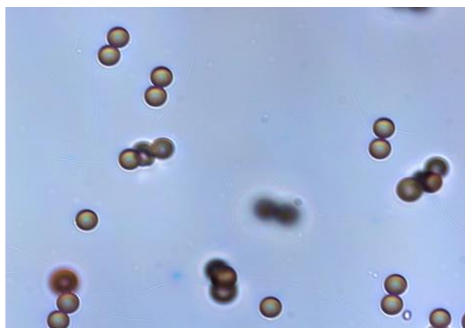
分類地位為綠藻門 (Chlorophyta)、四胞藻綱 (Trebouxiophyceae)、綠球藻目 (Chlorellales)、小球藻科 (*Chlorellaceae*)、小球藻屬 (*Chlorella*)。屬單細胞生物，富含高蛋白質(60%)，經常作為水生動物的食物，個體直徑約 2~10 μm ，分裂速度快，在 20 小時內細胞數就能成長 4 倍^[2]。



圖三：小球藻 (*Chlorella* sp.) 直徑 2~10 μm (拍攝倍率 630X，本研究所攝)

(三) 塑膠微粒

根據美國國家海洋暨大氣總署 (The National Oceanic and Atmospheric Administration, NOAA) 規定塑膠微粒定義為直徑小於 5 mm 的塑膠碎片 (圖四)。黑潮基金會在台灣沿海進行塑膠微粒分佈的調查顯示，在台灣沿海 51 個測點中，每個測點皆有發現塑膠微粒，每立方公尺海水中含有 0.016 到 64.12 個不等的塑膠微粒^[1]。



圖四：本研究使用的塑膠微粒 (Polystyrene, PS) 直徑 6~8 μm 、密度 1.04 g/cm^3 、紅色螢光 (拍攝倍率 630X，本研究所攝)

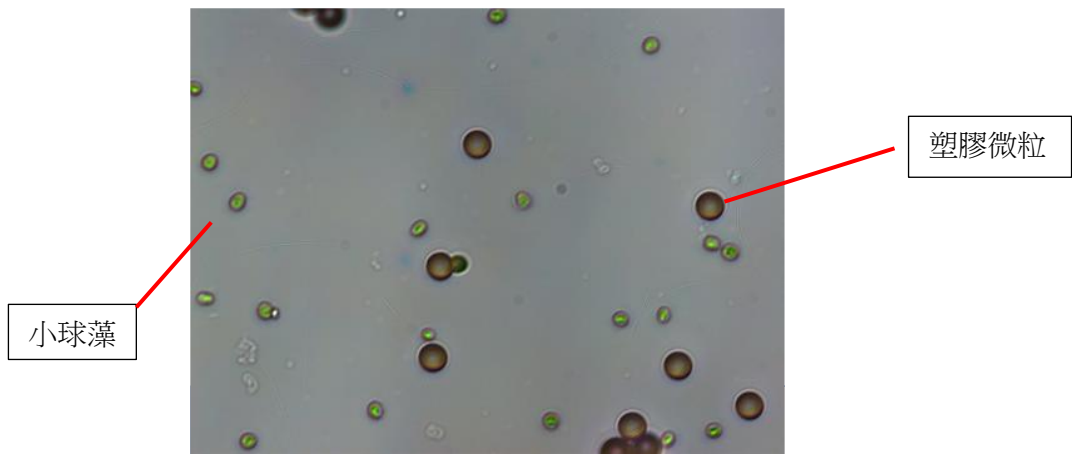
(四) 塑膠微粒與大型蚤相關研究

Martins & Guilhermino (2018) 將大型蚤暴露於 1~5 μm 0.1 mg/L 塑膠微粒濃度下，觀察對大型蚤親代以及子代所產生的影響。結果顯示，在此環境中大型蚤的生長、生育、族群成長率都有被抑制的趨勢，在兩個世代的時間內就能使該族群滅絕。此外，上述的這項影響於第三子代才完全恢復^[4]。

(五) 大型蚤、小球藻以及塑膠微粒之間關係

大型蚤為淡水生態系中的基石生物，主要濾食淡水中生長之富含高蛋白的小球藻。因其為濾食生物，故將有機會攝入各種在所生長生態系中的物質。現今，環境中塑膠並無有效率的分解方式，且數量持續增加中，已成為人類開始重視的議題。塑膠進一步裂解為人類肉眼看不見的塑膠微粒後，可輕易地廣泛散播出去，近年有研究證實塑膠微粒已遍布在淡水生態系中^[5]。

小球藻的大小約為 2~10 μm ，而本實驗選用的塑膠微粒為直徑 6~8 μm 的圓粒，顆粒大小與小球藻接近，容易被濾食性的大型蚤攝入(圖五)，因此塑膠微粒會對大型蚤帶來甚麼影響，就成為了一項值得探究的題目了。其中屬於四大生命現象之一的繁殖對整個族群是很重要的參數，因此我們想了解塑膠微粒會對大型蚤的生殖造成什麼影響。



圖五：本研究使用的塑膠微粒 (棕色) 與小球藻 (綠色)，塑膠微粒較大，約為 6 μm 、
 小球藻約為 2~4 μm (拍攝倍率 630X，本研究所攝)。

貳、研究目的

- 一、暴露於塑膠微粒環境中是否會對大型蚤的生殖造成影響?
- 二、暴露於塑膠微粒環境中是否會影響大型蚤攝食量?
- 三、將塑膠微粒環境中的母蚤產下的子代移至乾淨環境中是否會使其子代恢復?

參、研究設備及器材

		
<p>一、塑膠微粒(見備註)</p>	<p>二、小球藻藻液</p>	<p>三、花寶四號 (N : S : P=25 : 5 : 20)</p>
		
<p>四、酒精</p>	<p>五、燒杯</p>	<p>六、滴管</p>

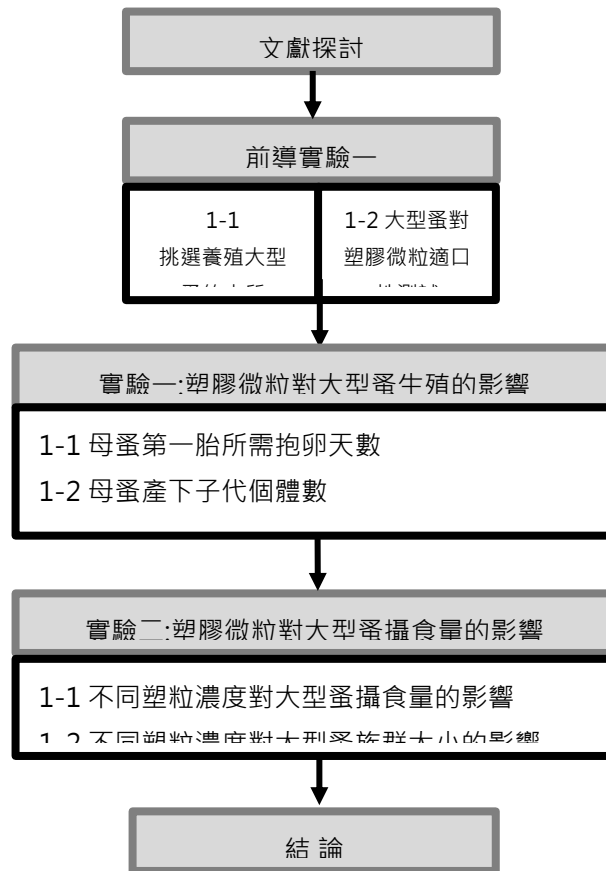
		
七、抽氣過濾瓶機	八、濾紙(孔徑:0.45um\非塑膠材質)	九、量筒
		
十、pipette(定量滴管)	十一、滅菌機	十二、載玻片
		
十三、燈管(晝光)	十四、打氣機塑膠管	十五、洗滌瓶
		
十六、離心機、離心管	十七、螢光顯微鏡	十八、複式顯微鏡
		
十九、手機攝影架	二十、水質測量器 (YSIPRO-3)	二十一、光度計

備註：
 塑粒生產公司為美國 Spherotech, Inc.，材質：聚苯乙烯，粒徑：6~8 μm ，平均密度：
 $1.04\text{g}/\text{cm}^3$ ，發螢光。

肆、研究過程或方法

一、研究架構

研究架構流程如下：



二、實驗材料與實驗方法

(一) 大型蚤 (*Daphnia magna*)

實驗中使用的大型蚤取自嘉義大學淡水生物資源中心及行政院農委會農業藥物毒物試驗所應用毒理組，並在 3500 lux 的光照下在光週期 16 hr 光照/ 8 hr 黑暗整日打氣培養。打氣量約每秒十二個氣泡 (60~120 mL/分鐘)，置於實驗室內穩定培養三代後才開始進行實驗，且實驗中皆以出生 24~48 hr 時間內的大型蚤開始進行實驗。

(二) 塑膠微粒 (Polystyrene, PS)

1. 無塑膠微粒環境

為增加實驗的準確度，確保環境中僅有研究過程提供的塑膠微粒，本研究以 0.45 μm 孔徑大小的濾紙過濾，以製備無塑膠微粒的水，實驗中使用的水體皆經過無塑膠微粒處理，且實驗器具皆經過無塑膠微粒水潤洗，以降低實驗誤差。

2. 塑膠微粒：

本實驗使用的塑膠微粒為購買自美國 Spherotech, Inc. 的 6~8 μm ，460~480 nm 激發橘色螢光的聚苯乙烯塑粒。實驗中選擇的環境塑粒濃度設定以前人研究^[4] 中使用的 0.1 mg/L 作為一倍濃度。在實驗一中使用的塑膠微粒濃度分別為 0.01 mg/L、0.1 mg/L 及無塑膠微粒的對照組，實驗二的塑膠微粒濃度分別為 0.01 mg/L、0.02 mg/L、0.04 mg/L、0.08 mg/L 及無塑膠微粒的對照組。

(三) 小球藻 (*Chlorella* sp.)

本次實驗一與實驗二中使用的小球藻取自彰化師範大學藻類研究室，分別以 BG11 培養液及花寶四號培養液 (1 g/L 濃度) 於反應器中進行培養，並控制在 3500 lux 的光照下，光週期為 16 hr 光照/8 hr 黑暗，溫度控制在攝氏 21~25 度中放大其細胞數，作為實驗中所使用的藻液。

三、前導實驗一：挑選培養大型蚤之水質及對塑膠微粒之適口性

(一) 培養大型蚤之水質挑選

為提供適合大型蚤成長之水源，本研究保留了原有的蒸餾水作為對照組，並分別加入經過兩種除氯處理的水體分別為氣曝水（自來水靜置打氣 24 小時去除氯氣）、煮沸水（學校飲水機的熱水並靜置 24 小時以上），以及人工硬水（加入碳酸鈣粉末至飽和）。在上述環境中放入各放入 10 隻大型蚤，2~3 天換水一次，並每日觀察紀錄大型蚤族群大小變化。

(二) 大型蚤對塑膠微粒適口性挑選檢測

以氣曝後無塑膠微粒水製備出 0.01 mg/L、0.1 mg/L 二種濃度的塑膠微粒環境，使其水體為 40 mL 的氣曝水。加上 10 mL 小球藻 (濃度 $>10^6$ cell/mL) 後，在每個環境中皆放置大型蚤 (24~48 hr) 10 隻，並全天保持打氣。在大型蚤自由攝食一日後，使用 ZEISS Axio Imager 2 螢光顯微鏡以汞燈激發出 580~600 nm 螢光且在 YFP 濾鏡下 (YFP 500 nm~600 nm) 進行鏡檢 (鏡檢前以氣曝水沖洗大型蚤體表外之塑膠微粒，但還是會有少許塑膠微粒附著在大型蚤身體表面)。

四、實驗一：暴露在不同塑膠微粒環境中對大型蚤生殖影響實驗

(一) 環境設定

分為無塑膠微粒環境的對照組和兩種不同塑膠微粒濃度的塑膠環境組，分別為 0.01 mg/L、0.1 mg/L 塑膠微粒濃度，並置於 200 mL 燒杯中培養，環境中皆含有 185 mL 氣曝水和 15 mL 小球藻，且每日更新水體環境。每一燒杯內放入 10 隻大型蚤，整日保持每秒約十二顆氣泡的打氣量 (60~120 mL/分鐘)、控制光週期為 16 hr 光照/8 hr 黑暗。

(二) 實驗方法：

以 10 隻出生 24~48 hr 的大型蚤為起始，在上述三種環境設定中進行三重覆實驗。實驗進行中每日鏡檢觀察是否有親代大型蚤已經抱卵，若有則移至乾淨無塑膠微粒的水體環境中，確保其產下的子代不會接觸塑膠微粒，直到子代出生再將親代放回原本環境中。第一子代 (以下稱為 F1) 出生後隨機挑選 10 隻並依親代的處理組放置不同環境中；對照組子代將保持在無塑膠微粒環境中，塑膠微粒環境組的子代將分為和親代處理組中相同濃度的塑膠微粒組 (以下稱為 F1 塑膠組，F1-MP) 和回到乾淨無塑膠微粒的環境中 (以下稱為 F1 恢復組，F1-R)。

實驗過程中除了透過鏡檢觀察親代是否抱卵、蒐集親代抱卵天數，同時計算大型蚤每胎產下的平均子代數、觀察大型蚤子代的體長 (從頂脊椎到尾端的最長連線)、在子代大型蚤出生後七天時蒐集其族群大小計算子代存活率。

五、前導實驗二：換水頻率對大型蚤健康度影響

(一) 環境設定

設定四種環境分別為 500 mL 燒杯且兩天換水一次、500 mL 三天換水一次、500 mL 燒杯實驗終止前都不換水、1L 燒杯實驗終止前都不換水。每種環境皆 20 隻大型蚤，每兩日餵食 50~75 μ L 的小球藻液 (細胞濃度 2 億隻/mL 以上)。

(二) 實驗方法：每日進行大型蚤活動力觀察及存活率計算。

六、實驗二、暴露於塑膠微粒環境中對大型蚤的攝食量影響

(一) 環境設定

分為無塑膠微粒環境的對照組 (以下稱為對照組 C) 和四種塑粒濃度的塑粒環境組 MP，分別為含 0.01 mg/L、0.02 mg/L、0.04 mg/L 和 0.08 mg/L 塑粒濃度的 1L 水體環境，至實驗終止日前不更新水體，但仍會保持環境中小球藻含量。每一燒杯內放入 20 隻大型蚤，整日保持每秒約 12 顆氣泡的打氣量 (60~120 mL/分鐘)、在 3500 lux 下控制光週期為 16 hr 光照/ 8 hr 黑暗。

(二) 實驗方法：

在上述 5 種環境各放入 20 隻大型蚤 (出生 24~48 hr)，進行三重覆實驗。實驗進行中，每日測量 OD 值 (光學密度值，波長設定為 682 nm) 記錄環境中小球藻的細胞濃度，若發現環境中的小球藻濃度過低 ($OD \leq 0.1$)，則再補充至適當濃度 ($OD=0.35$)，確保環境中有足夠食物。每日觀察大型蚤是否有抱卵現象，依最後抱卵處理組的抱卵日期加上七天作為實驗終止日，並在當日計算燒杯中大型蚤數做為總族群大小。

伍、研究結果

一、前導實驗一：挑選培養大型蚤之水質及對塑膠微粒之適口性

(一) 水質挑選

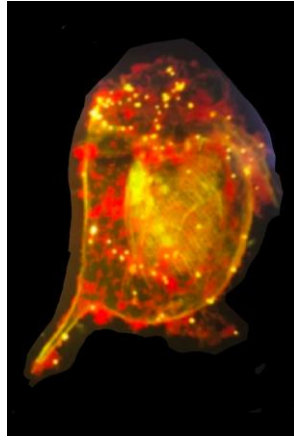
結果發現用氣曝水養殖的大型蚤活動力相較於另外兩種水質更為旺盛 (表一)，且水質硬度屬於大型蚤偏好的硬度約 350 mg/L，所以最後使用氣曝水作為養殖大型蚤的環境。

表一、各水質的導電度 SPC、硬度 TDS 及 pH 值

	人工硬水	氣曝水	煮沸水	蒸餾水
SPC ($\mu S/cm$)	1466	367.8	22.8	12.9
TDS (mg/L)	955.5	239.2	14.95	8.45
pH	8.27	8.13	7.76	8.11

(二) 大型蚤對聚苯乙烯塑膠微粒之適口性

透過 ZEISS Axio Imager 2 螢光顯微鏡鏡檢後，發現三種塑粒濃度下的大型蚤皆有攝入塑膠微粒 (圖六)。

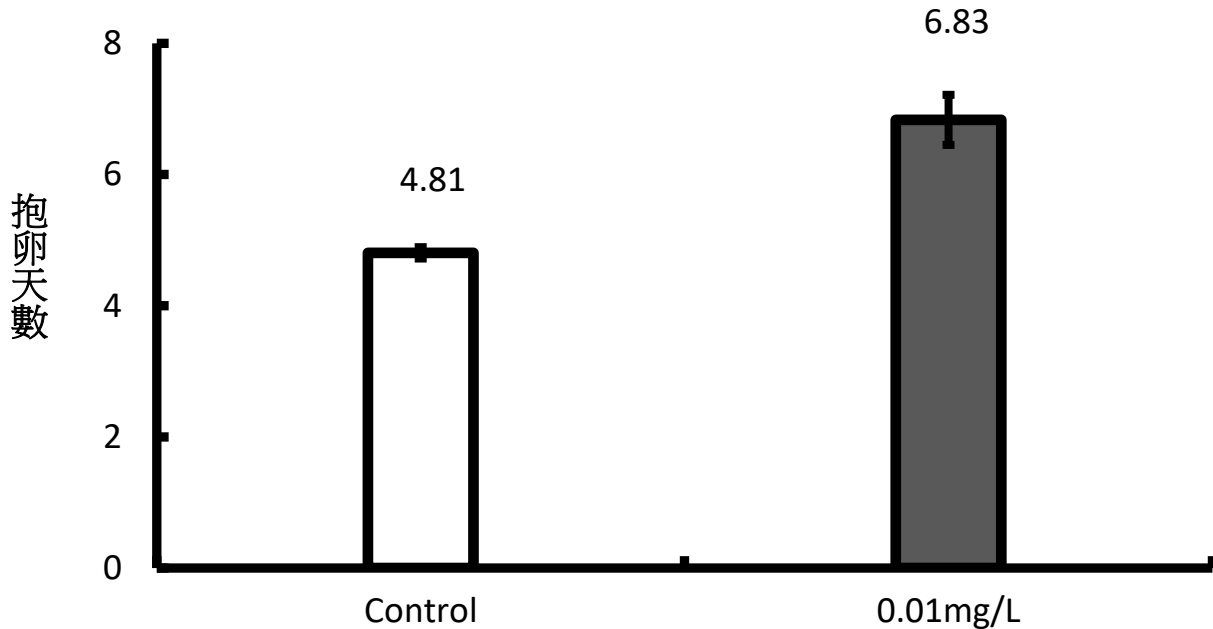


圖六：大型蚤攝入塑膠微粒 (黃點為塑膠微粒，紅色為小球藻)

二、實驗一：暴露在不同塑膠微粒環境中對大型蚤生殖影響實驗

(一) 暴露在塑膠微粒環境中對大型蚤從出生到抱卵所需的天數的影響

本研究將大型蚤首次抱卵的情形視為其性成熟的指標根據(圖七)，暴露在塑粒環境中的大型蚤產齡相較對照組中晚(約 6.83 天)，從出生到抱卵所需的天數有被延緩的趨勢 ($p < 0.05$)(詳見附錄六)。

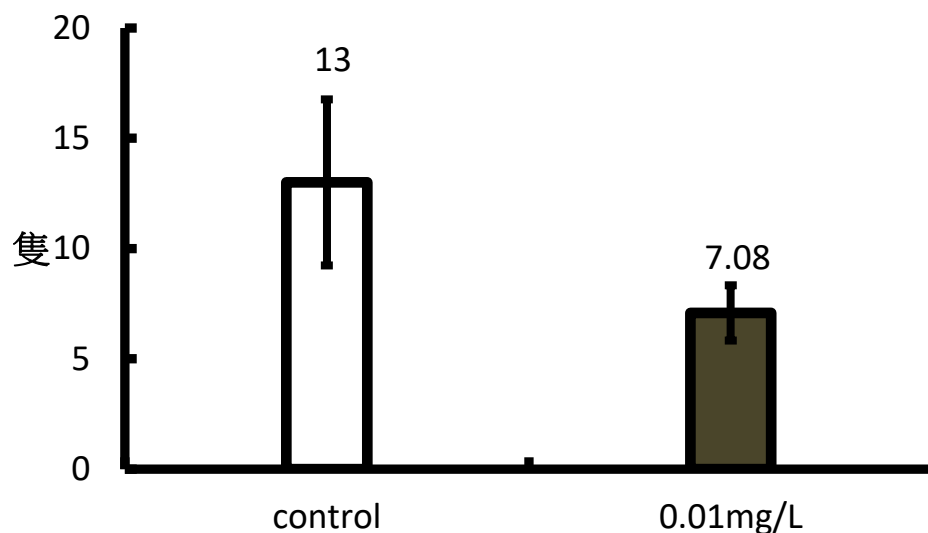


圖七、母蚤第一胎所需的抱卵天數

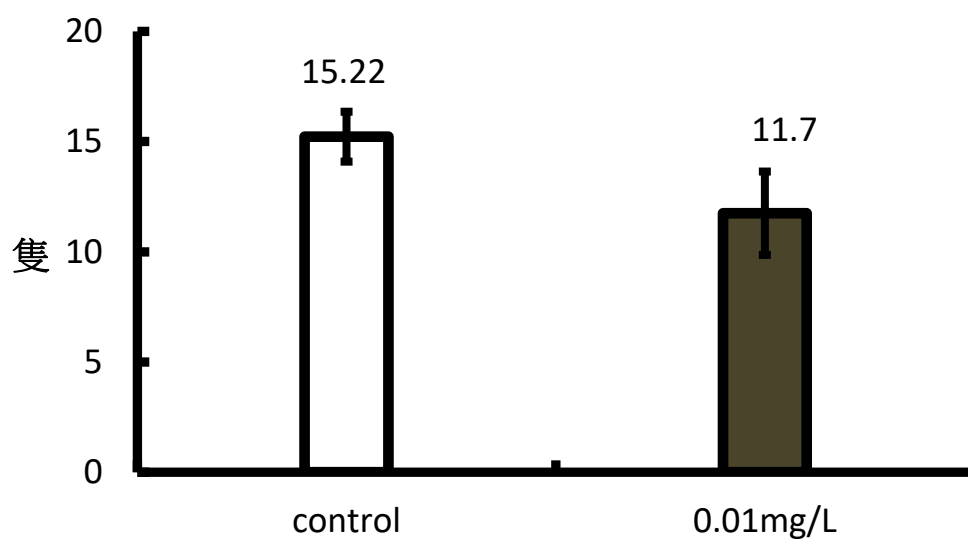
(二) 暴露於塑膠微粒環境中是否會影響大型蚤子代數

根據圖八，暴露在塑粒環境中的母蚤每胎平均生下的幼蚤數 (7 隻) 相較對照組 (13 隻) 中有減少的現象 ($p = 0.12$)(詳見附錄六)。而根據圖九塑粒組的平均子代數 (11.8

隻) 還是少於對照組 (15.2 隻) 的平均子代數，但塑粒對母蚤平均子代數的影響在從第一胎至第二胎平均子代數有減緩的趨勢($p=0.32$ ，詳見附錄六)。



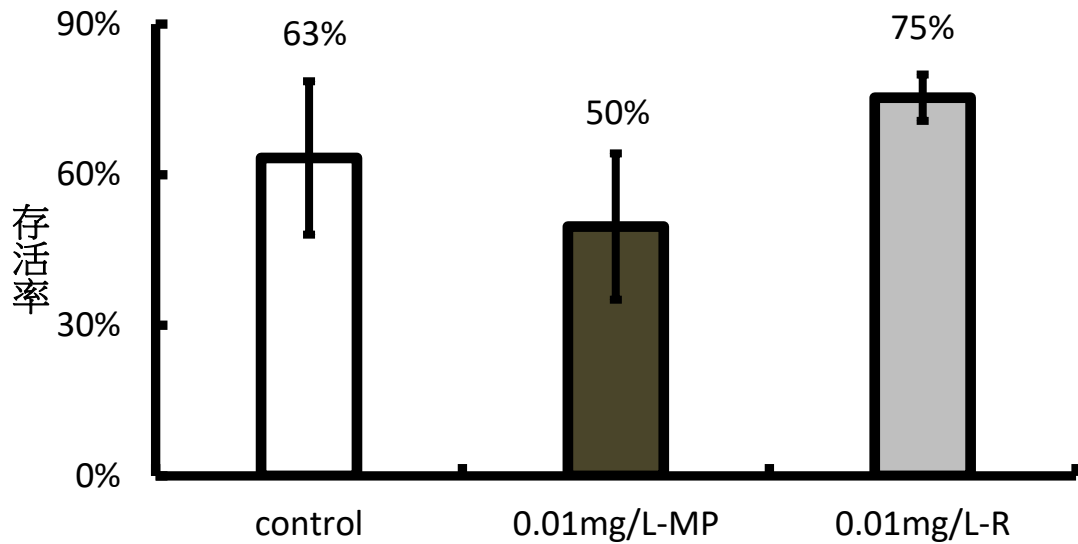
圖八、母蚤第一胎平均子代數



圖九：母蚤第二胎平均子代數

(三) 暴露在塑膠微粒環境中是否會影響子代存活率

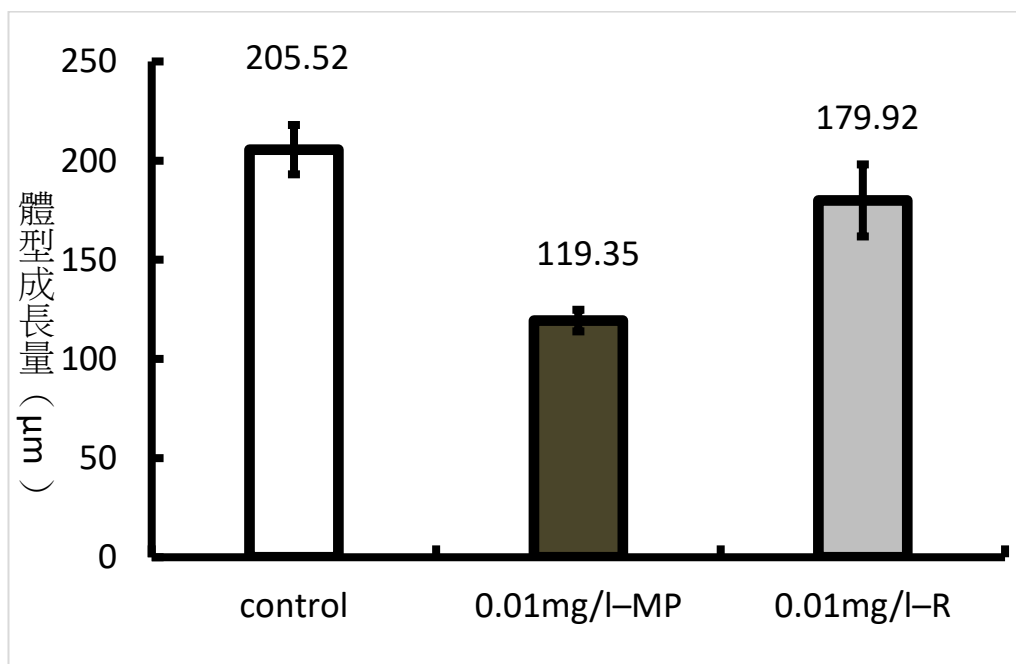
根據圖十結果顯示，塑粒組幼蚤存活率(50%)較對照組(63%)低，但放置到恢復組的幼蚤存活率(75%)有恢復的情形，存活率與對照組相近($p=0.97$ ，詳見附錄六)。



圖十：母蚤第一胎子代平均存活率 (0.01mg/L-R：恢復組，0.01mg/L-MP：塑粒組)

(四)暴露於塑膠微粒環境中對體型成長量是否有抑制的趨勢

根據圖十一結果顯示，暴露在塑粒環境中的幼蚤的體型成長量(119.3 μm)較對照組(205.5 μm)來的低($p=0.08$ ，詳見附錄六)，而恢復組的體型成長量(179.9 μm)則是高於塑粒組的體型成長量，因此有恢復的趨勢。但較對照組而言，還是能看見母蚤生活在塑粒環境中所留下的影響，體型成長量較對照組低。

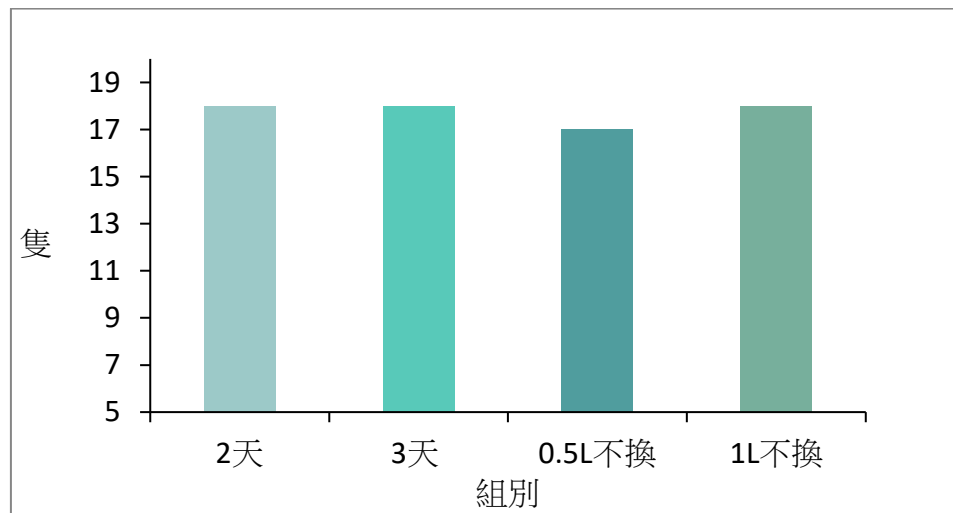


圖十一：大型蚤第一胎子代的體型成長量 (0.01mg/L-R：恢復組，0.01mg/L-MP：塑粒組)

三、前導實驗二：換水頻率對大型蚤健康度影響

(一)選擇換水頻率

在實驗進行到第 14 天時，發現 1 L 不換水、500 mL 每兩天換水一次及 500 mL 每三天換水一次中的族群大小最高，在考慮實驗的操作可行性及為了降低實驗誤差我們選擇了 1 L 不換水的實驗配置來進行實驗二。

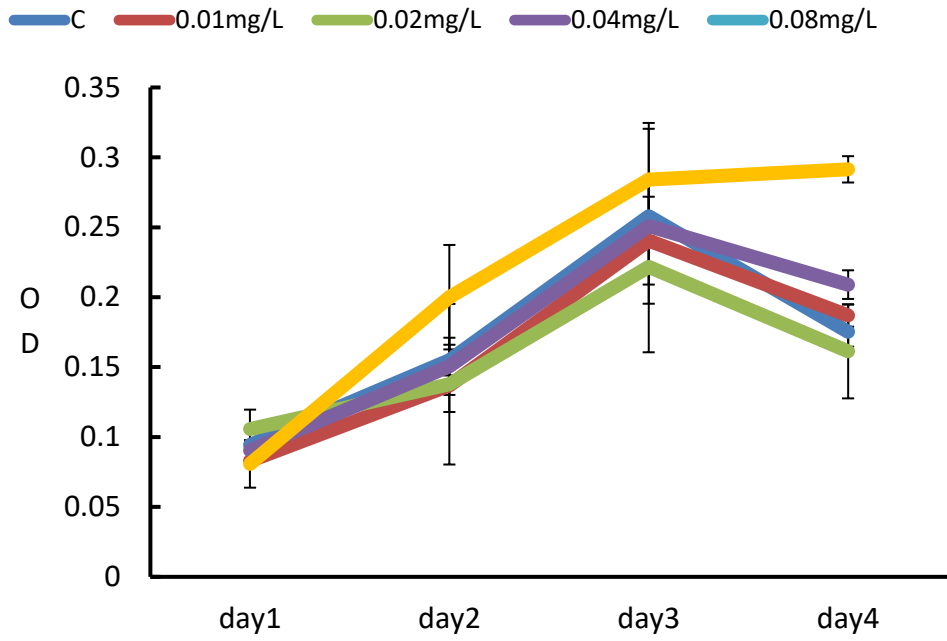


圖十二:不同換水頻率中大型蚤的族群大小

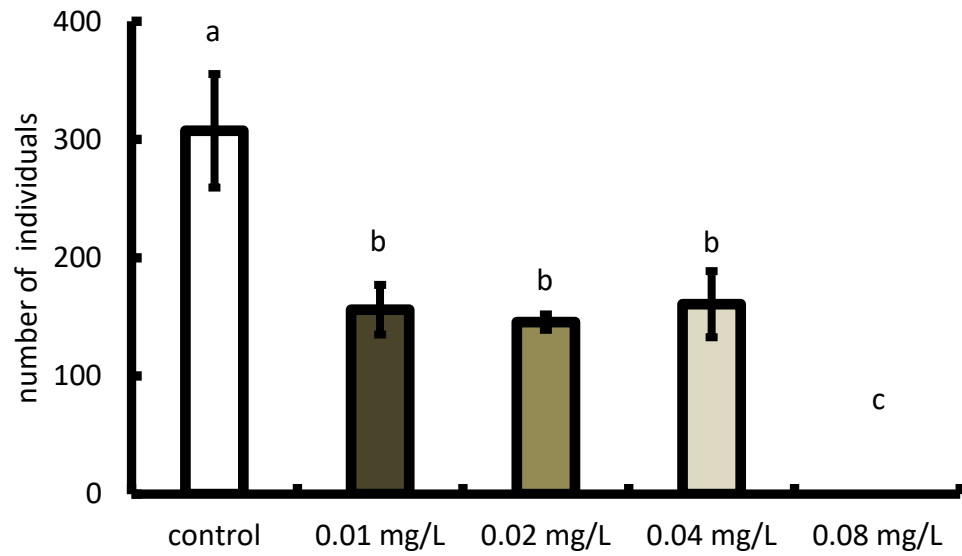
四、實驗二：暴露在不同塑膠微粒環境中對大型蚤攝食量影響

(一)暴露在不同塑膠微粒環境中對大型蚤攝食量影響

根據圖十三結果顯示，依波長 682 nm 下的 OD 值作為環境中小球藻的濃度指標，在第四日時 0.08 mg/L 組環境中的綠藻濃度(OD=0.3)與對照組、0.02 mg/L、0.01 mg/L 皆有顯著差異($p < 0.05$ ，詳見附錄六)。總族群大小根據圖十四結果顯示，在實驗中止日(第 12 天) 0.01 mg/L、0.02 mg/L、0.04 mg/L 三個組別中大型蚤的總族群大小(156、145.5、160.7 隻)皆與對照組(307.3 隻)有明顯差異($p < 0.05$ ，詳見附錄六)，總族群大小已有被抑制的現象，而 0.08 mg/L 組則是在第 6 天大型蚤皆死光(本次實驗是進行三重覆)，和其他組別間皆有明顯差異 ($p < 0.05$ ，詳見附錄六)，也就是 0.08 mg/L 為本實驗中所得塑粒影響濃度閾值。



圖十三：不同塑粒濃度環境下對大型蚤生活環境中小球藻含量的影響



圖十四：不同塑粒濃度環境下對大型蚤族群大小的影響

陸、討論

- 一、根據黑潮基金會對臺灣周遭的塑粒濃度的調查顯示 目前周遭塑粒含量皆低於本研究。但其中標示為嚴重受污染的八掌溪的塑粒污染主要為圓形塑粒 與本研究中使用的形狀相同。且黑潮基金會調查的僅含 1~5mm 的塑粒 環境中可能存在其他大小的塑膠微粒。因此若台灣海域的塑膠排放量持續增長，環境將愈來愈接近本實驗所設定的污染環境，並對大型蚤族群造成影響且破壞生態平衡。
- 二、在參考論文中寫到，大型蚤會避開攝食和塑粒形狀相似的藻類，減少高達 40%的藻類攝取量^[8]。且已知生態中的塑粒不但數量多且形狀也十分多元，因此我們認為此現象會造成大型蚤攝食降低進而對其族群造成影響^[11]。
- 三、本研究中暴露於塑粒環境的除了試驗生物大型蚤外也有作為食物來源的小球藻，小球藻雖然並非本實驗中研究生物但已有研究顯示有部分藻類在塑粒環境中有藻類在PVC(聚氯乙烯)跟PP(聚丙烯)的暴露中都有葉綠素a被抑制的現象，以及在PVC中光合作用受到抑制；同時，也有部分藻類在塑粒中成長有正向的影響^[9]，本研究的實驗中皆有提供足量藻液因此不考慮塑粒對小球藻的影響。
- 四、為了觀察到大型蚤性成熟的時間，本研究將抱卵的第一天視為性成熟的參數。在實驗一數據中發現，0.1 mg/L 塑粒環境組中的大型蚤在未開始抱卵前就全數死亡了。而且，0.01 mg/L 塑粒環境組的開始抱卵天數則是分佈在 6~7 天，相較於對照組中分佈在 4~5 天的開始抱卵天數，有被顯著延遲的趨勢(圖七)，本研究推測暴露在塑粒環境中的大型蚤會有性成熟時間延緩的現象。
- 五、為了觀察暴露在塑粒環境中的母蚤所誕下的子代數是否有減少的現象，選擇將第一胎及第二胎的子代數作為參數，發現在塑粒環境中第一胎(7 隻)及第二胎(11 隻)數量相較於對照組 (13~15 隻)都比較低，而其中第二胎的子代數(11 隻)相較於第一胎的子代數(7 隻)又都有成長的情形 (圖八、九)，其中塑粒組的增加趨勢明顯比對照組大，兩處理組的差異減緩，推測是在母蚤待產期間將其移至乾淨環境中所造成的恢復。
- 六、為了觀察暴露在塑粒環境下的母蚤所誕下的幼蚤存活情形，在子代出生後七天觀察其存活率，發現對照組 (63 %) 及恢復組 (75 %) 的子代存活率相較於塑粒組高 (50 %) (圖十)，本研究推測暴露在塑粒環境中會造成大型蚤子代數存活率降低。
- 七、在體型成長量這項數據中發現塑粒組的幼蚤體型成長量 (119.3 μm)為最低，恢復組(179.9 μm)次之，對照組最高(205.5 μm) (圖十一)。所以可以推測暴露在塑粒環境中會抑制大型

蚤的生長情形，而放回到恢復組中，大型蚤雖未完全恢復，但已有成長恢復的現象。也就是說，大型蚤對塑粒低濃度影響下，會有一定的忍受，會有一定的調適。

八、塑粒對於大型蚤的物性、化性方面的成長影響的探討：

- (一) 實驗一中數據顯示暴露在塑粒環境下會延遲大型蚤的抱卵天數並降低其子代的體型成長量及存活率，我們認為除了在塑粒環境下會抑制大型蚤的攝食量，在化性方面的影響，在參考文獻中^[6]透過蛋白質組分析，發現聚苯乙烯塑膠微粒會增加橈足類細胞合成的次數並減少能量的儲存，進而導致橈足類存活率和繁殖力下降，因此塑膠微粒的影響，不只在物性上會抑制大型蚤攝食量，也可能在化性方面對其細胞、基因造成破壞。
- (二) 聚苯乙烯塑粒結構上含有苯環，因此是否會對大型蚤在化性方面造成的影響呢？在自然環境中的塑膠，常會吸附環境賀爾蒙或溶出塑化劑，進而對生物體並造成嚴重的傷害，而本研究在結果上僅可以看到塑粒本身的大小就可能造成大型蚤攝食量降低的情形，而實驗過程中是否有化學成份的溶出，還需進一步的定性與定量分析。
- (三) 透過實驗二，發現在 0.01 mg/L、0.02 mg/L、0.04 mg/L 塑粒濃度下的大型蚤族群數相較於對照組都有減少的現象，但三者之間濃度與族群大小並沒有線性相關；而塑粒濃度到了 0.08 mg/L 則在第七天全部死光(圖十四)，所以本研究認為塑粒會在物性方面對大型蚤造成影響，且在 0.04 mg/L 及 0.08 mg/L 塑粒濃度之間有存在一個閾值，超過閾值會使大型蚤族群全數死亡。
- (四) 在實驗二中，在 0.08 mg/L 塑粒濃度下的環境 OD 值相較於其他塑粒濃度是高出許多的(圖十三)，因此我們認為在 0.08 mg/L 塑粒濃度下的大型蚤的攝食量相較於其他塑粒濃度是偏低的，故可推測是在高塑粒濃度下的大型蚤的攝食量有被抑制的現象，而在 0.04 mg/L 及 0.08 mg/L 塑粒濃度之間存在閾值，此項結果也能解釋實驗一中的 0.1 mg/L 塑粒濃度及實驗二中的 0.08 mg/L 塑粒濃度中大型蚤全數死亡，進而推測實驗一中所觀測到大型蚤性成熟時間被延遲及子代體型成長量降低可能是因為攝食量降低而導致的結果。

九、塑膠微粒相關的研究之探討

- (一) 在參考文獻^[4]中所進行實驗的溫度控制是在攝氏 20 ± 1 度，提供直徑 1~5 μm 的塑膠微粒，結果顯示大型蚤在 0.1 mg/L 塑粒環境中可存活三個世代；在本研究則是靜置於開放環境中，模擬野外隨著天氣變動的環境，並提供直徑 6~8 μm 的塑膠微

粒，最終結果顯示在塑粒濃度 0.08 mg/L 中的母蚤在有抱卵能力前就已全數死亡。

比較兩者進而推測在溫度波動較大的環境中可能會降低大型蚤存活率。

(二) 在實驗中我們所使用的塑粒會累積在大型蚤的腸道內也有相關文獻針對塑粒的排出做研究^[7]，因此我們推測是這項原因而造成大型蚤的攝食量下降，進而導致大型蚤存活率降低。

柒、結論

- 一、塑膠微粒會造成大型蚤育卵年齡延遲、平均子代數、體長成長量及子代存活率下降。
- 二、在暴露於聚苯乙烯塑膠微粒環境(0.08 mg/L)中會影響大型蚤的進食效率。
- 三、暴露在塑粒環境中的親代所產下的子代成長於無塑環境中會有恢復的現象。

捌、參考資料

1. 島航計畫 塑膠微粒成果分析 2019 黑潮基金會 Kuroshio Ocean Education Foundation, Taiwan
2. 魏印心和胡鴻鈞，中國淡水藻類——系統、分類及生態，科學出版社，北京 2006
3. Ebert, D., 2005. Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in *Daphnia*. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information.
4. Martins, A., & Guilhermino, L, 2018. Transgenerational effects and recovery of microplastics exposure in model populations of the freshwater cladoceran *Daphnia magna* Straus. *Science of The Total Environment*, 631, 421-428.
5. Richardson, S.D., & Ternes, T.A., 2018. Water analysis: emerging contaminants and current issues, *Anal. Chem.*, 90(1), 398-428.
6. Transgenerational Proteome Plasticity in Resilience of a Marine Copepod in Response to Environmentally Relevant Concentrations of Microplastics
7. Polystyrene Microplastics Ingestion Induced Behavioral Effects to the Cladoceran *Daphnia magna*
8. Effects of Nylon Microplastic on Feeding, Lipid Accumulation, and Moulting in a Coldwater Copepod
9. Effect of microplastics exposure on the photosynthesis system of freshwater algae
10. Limnoecology: The Ecology of Lakes and Streams. Lampert, W. and Sommer, U., 2nd edition. Oxford: Oxford University Press, 2007, 324 pp. ISBN ISBN-13: 9780199213931
11. Microplastics alter feeding selectivity and faecal density in the copepod, *Calanus helgolandicus*

玖、附錄

附錄一、大型蚤抱卵天數

產齡						
產齡	第一隻	第二隻	第三隻	第四隻	第五隻	第六隻
甲對照組	5	5	5	5	5	N/A
乙對照組	4	5	5	5	N/A	N/A
丙對照組	4	4	5	5	5	5
甲1X	7	7	7	7	8	9
乙1X	7	7	7	7	N/A	N/A
丙1X	6	6	6	N/A	N/A	N/A
甲10X	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
乙10X	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
丙10X	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

附錄二、大型蚤子代數

子代數	F1-1單隻母蚤平均生產量	F1-2單隻母蚤平均生產量	F1+F2
對照組甲	11.25	16	27.25
對照組乙	21.25	17	38.25
對照組丙	6.5	12.67	19.17
AVE	13	15.22333333	28.22333333
1X甲	9.5	14.75	24.25
1X乙	7.25	7.5	14.75
1X丙	4.5	13	17.5
AVE	7.083333333	11.75	18.83333333
10X甲	N/A		
10X乙	N/A		
10X丙	N/A		

附錄三、大型蚤子代存活率 (MP 塑粒、R 恢復)

存活率	F0存活率/10隻 13 days 後	F1-1存活率(0609-b1)		
		6days		
三重覆			MP	R
對照組甲	4	5/10	N/A	N/A
對照組乙	4	8/10	N/A	N/A
對照組丙	6	6/10	N/A	N/A
1倍甲	4		6/10	7/10
1倍乙	4		5/9	7/9
1倍丙	1		3/9	7/9

附錄四、大型蚤子代體型成長量

			date	初1	初2	初3	初4	初5	初6	初7	初8	初始平均	標準差
甲	C	-	609	3.8	3	3	3.5	3.5	3.5	3	3.5	3.288	0.2846
甲	1X	MP	609	4	3.5	3.5	4	3.5	-	-	-	3.700	0.2236
甲	1X	R	609	3.5	3.8	3	3.2	3.8	3.5	-	-	3.300	0.2236
乙	C	-	609	2.5	2.3	3.5	3	3.2	2.5	3	-	2.917	0.4031
乙	1X	MP	609	2.8	3	3.8	3.8	3.8	2.9	3.7	3.8	2.917	0.4031
乙	1X	R	609	3.8	3.8	3	3	3.6	2.9	3.8	3.3	2.917	0.4031
丙	C	-	609	4	2.3	3.2	3.8	3.5	4	2	-	3.133	0.7519
丙	1X	MP	609	2.8	3.2	3.4	2.8	3	3.2	3.3	3.6	3.133	0.7519
丙	1X	R	609	2.9	3	3	3.2	3	3	3	3.2	3.133	0.7519

(1 unit = 25um)

			date	結1	結2	結3	結4	結5	結6	結7	結8	結束平均	標準差
甲	C	-	609	12	9	11	13	10	-	-	-	11.000	1.4142
甲	1X	MP	609	11	9	10	7.5	9	9	8	-	9.071	1.0833
甲	1X	R	609	9	12	10	13	12	11	10	11	11.000	1.2247
乙	C	-	609	12	10	11	10	10	11	9	11	10.500	0.8660
乙	1X	MP	609	9.5	9	9	7.5	-	-	-	-	8.750	0.7500
乙	1X	R	609	9	10.5	9.5	8.5	11	10	10.5	-	9.857	0.8330
丙	C	-	609	16	11	12	11	-	-	-	-	12.500	2.0616
丙	1X	MP	609	6	6.5	7	5.5	-	-	-	-	6.250	0.5590
丙	1X	R	609	10	9.5	10.5	9.5	11	10	-	-	10.083	0.5336

(1 unit = 25um)

附錄五、環境中小球藻含量與大型蚤族群大小

	c	1	2	4	8
A	OD AVG	OD AVG	OD AVG	OD AVG	OD AVG
191129	0.0933	0.0813	0.1187	0.0913	0.0587
191130	0.1530	0.1107	0.1503	0.1247	0.2527
191201 old	0.2503	0.2473	0.1027	0.2273	0.3357
191201 ne	0.1697	0.1913	0.1357	0.2227	0.2890
191202	0.2240	0.2167	0.1550	0.2550	0.3277
191203	0.1773	0.1610	0.1330	0.3103	0.2787
191204	0.0260	0.0207	0.0743	0.0317	0.3400
191129	0.0983	0.0850	0.0887	0.0920	0.1000
191130	0.1693	0.1450	0.0620	0.1523	0.1773
191201 old	0.3380	0.2750	0.0837	0.2270	0.2770
191201 ne	0.1903	0.1757	0.1393	0.2063	0.2813
191202	0.2957	0.1657	0.1560	0.2220	0.2107
191203	0.2007	0.1520	0.2000	0.2347	0.1200
191204	0.0263	0.0137	0.1500	0.0190	0.0117
191129	0.0913	0.0823	0.1177	0.0880	0.0837
191130	0.1427	0.1547	0.2010	0.1747	0.1700
191201 old	0.1853	0.1990	0.2217	0.2983	0.2370
191201 ne	0.1660	0.1937	0.2087	0.1980	0.3040
191202	0.1917	0.1460	0.1973	0.2363	0.2070
191203	0.2123	0.2153	0.2053	0.1743	0.1790
191204	0.0713	0.0967	0.0600	0.0170	0.0575

	c			1X			2X			4X			8X		
A	od1	od2	od3	od1	od2	od3	od1	od2	od3	od1	od2	od3	od1	od2	od3
191129	0.098	0.087	0.095	0.091	0.083	0.070	0.115	0.121	0.120	0.090	0.093	0.091	0.085	0.085	0.091
191130	0.153	0.157	0.149	0.099	0.117	0.116	0.156	0.148	0.147	0.133	0.122	0.119	0.231	0.218	0.309
191201 ok	0.257	0.252	0.242	0.242	0.249	0.251	0.153		0.155	0.238	0.202	0.242	0.338	0.340	0.329
191202	0.239	0.208	0.225	0.209	0.225	0.216	0.171	0.146	0.148	0.252	0.253	0.260	0.329	0.331	0.323
191203	0.155	0.169	0.208	0.161	0.165	0.157	0.141	0.137	0.121	0.341	0.318	0.272	0.279	0.256	0.301
191204	0.029	0.019	0.030	0.016	0.018	0.028	0.024	0.142	0.057	0.011	0.013	0.071	0.450	0.330	0.240
B	od1	od2	od3	od1	od2	od3	od1	od2	od3	od1	od2	od3	od1	od2	od3
191129	0.085	0.100	0.110	0.090	0.080	0.085	0.090	0.097	0.079	0.092	0.086	0.098	0.110	0.090	0.100
191130	0.170	0.166	0.172	0.147	0.135	0.153	0.058	0.075	0.053	0.177	0.145	0.135	0.178	0.173	0.181
191201 ok	0.347	0.332	0.335	0.289	0.281	0.275	0.124		0.127	0.227	0.237	0.217	0.260	0.320	0.251
191202	0.293	0.312	0.282	0.163	0.171	0.163	0.168	0.158	0.142	0.217	0.209	0.240	0.224	0.211	0.197
191203	0.169	0.214	0.219	0.139	0.166	0.151	0.168	0.230	0.202	0.290	0.220	0.194	0.130	0.120	0.110
191204	0.049	0.010	0.020	0.008	0.015	0.018	0.183	0.096	0.171	0.022	0.005	0.030	0.032	0.003	0.000
C	od1	od2	od3	od1	od2	od3	od1	od2	od3	od1	od2	od3	od1	od2	od3
191129	0.090	0.090	0.094	0.077	0.090	0.080	0.123	0.110	0.120	0.083	0.085	0.096	0.086	0.080	0.085
191130	0.138	0.141	0.149	0.164	0.152	0.148	0.196	0.199	0.208	0.183	0.169	0.172	0.163	0.170	0.177
191201 ok	0.184	0.182	0.190	0.199	0.213	0.185	0.201	0.211	0.253	0.309	0.290	0.296	0.230	0.237	0.244
191202	0.221	0.190	0.164	0.127	0.156	0.155	0.212	0.187	0.193	0.206	0.263	0.240	0.221	0.198	0.202
191203	0.233	0.228	0.176	0.201	0.198	0.247	0.181	0.227	0.208	0.173	0.140	0.210	0.150	0.130	0.257
191204	0.074	0.044	0.096	0.083	0.109	0.098	0.080	0.041	0.059	0.013	0.002	0.036	0.115	0.071	

附錄六、ANOVA 分析

第一次育卵天數 *			單因子變異數分析						
c	1								
甲	5	7.5							
乙	4.75		摘要						
丙	4.67	6	組	個數	總和	平均	變異數		
			c	3	14.42	4.806667	0.029633		
			1	2	13.5	6.75	1.125		
			ANOVA						
			變源	SS	自由度	MS	F	P-值	臨界值
			組間	4.531853	1	4.531853	11.48015	0.04283	10.12796
			組內	1.184267	3	0.394756			
			總和	5.71612	4				

有顯著差異
P<0.05

F1平均子代數			單因子變異數分析						
對照組	1								
甲	11.25	9.5							
乙	21.25	7.25	摘要						
丙	4.5		組	個數	總和	平均	變異數		
			對照組	2	32.5	16.25	50		
			1	3	21.25	7.083333	6.270833		
			ANOVA						
			變源	SS	自由度	MS	F	P-值	臨界值
			組間	100.8333	1	100.8333	4.836775	0.115251	10.12796
			組內	62.54167	3	20.84722			
			總和	163.375	4				

無顯著差異

F2平均子代數			單因子變異數分析						
對照組		1							
甲	16	14.75	摘要						
乙	17	7.5	組	個數	總和	平均	變異數		
丙	12.67	13	16	2	29.67	14.835	9.37445		
			14.75	2	20.5	10.25	15.125		
			ANOVA						
			變源	SS	自由度	MS	F	P-值	臨界值
			組間	21.02223	1	21.02223	1.716139	0.320436	18.51282
			組內	24.49945	2	12.24973			
			總和	45.52168	3				

無顯著差異

子代存活率			單因子變異數分析						
對照組	F1-恢復	F1-塑粒							
0.633	0.753	0.497	摘要						
0.153	0.046	0.146	組	個數	總和	平均	變異數		
			對照組	2	0.786086	0.393043	0.115479		
			F1-恢復	2	0.799521	0.399761	0.250027		
			F1-塑粒	2	0.642383	0.321192	0.061583		
			ANOVA						
			變源	SS	自由度	MS	F	P-值	臨界值
			組間	0.007587	2	0.003794	0.026647	0.973932	9.552094
			組內	0.427089	3	0.142363			
			總和	0.434676	5				

無顯著差異

體長			單因子變異數分析						
c	1	2							
甲	192.825	134.275	193.825	摘要					
乙	191.05	132.5	161.425	組	個數	總和	平均	變異數	
丙	181.075	77.2	176.15	192.825	2	372.125	186.0625	49.75031	
				134.275	2	209.7	104.85	1529.045	
				193.825	2	337.575	168.7875	108.4128	
			ANOVA						
			變源	SS	自由度	MS	F	P-值	臨界值
			組間	7321.266	2	3660.633	6.508918	0.081054	9.552094
			組內	1687.208	3	562.4027			
			總和	9008.475	5				

無顯著差異

總族群數	C	1X	2X	4X	8X	
	260	177	152	129		0
	306	135	139	182		0
	356			171		0

單因子變異數分析

摘要

組	個數	總和	平均	變異數
C	3	922	307.33333	2305.3333
1X	2	312	156	882
2X	2	291	145.5	84.5
4X	3	482	160.66667	782.33333
8X	3	0	0	0

ANOVA

變源	SS	自由度	MS	F	P-值	臨界值
組間	141965.24	4	35491.311	39.755967	2.53074E-05	3.8378534
組內	7141.8333	8	892.72917			
總和	149107.08	12				

D4	b	b	b	b	a
	c	1	2	4	8
	0.1697	0.1913	0.1357	0.2227	0.2890
	0.1903	0.1757	0.1393	0.2063	0.2813
	0.1660	0.1937	0.2087	0.1980	0.3040

單因子變異數分析

摘要

組	個數	總和	平均	變異數
c	3	0.526	0.175333	0.000172
1	3	0.560667	0.186889	9.58E-05
2	3	0.483667	0.161222	0.001692
4	3	0.627	0.209	0.000157
8	3	0.874333	0.291444	0.000133

ANOVA

變源	SS	自由度	MS	F	P-值	臨界值
組間	0.031839	4	0.00796	17.68923	0.000157	3.47805
組內	0.0045	10	0.00045			
總和	0.036339	14				

【評語】 200023

本作品以塑膠微粒及小球藻餵食大型蚤，以螢光顯微鏡觀察大型蚤之攝食量，抱卵天數，子代個體數等，求出水體中為塑膠濃度對大型蚤之閾值。建議作品可朝環境工程應用方向去思考，是否可利用大型蚤來達到降低水中塑膠微粒的濃度。