

2020 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 050010

參展科別 動物學

作品名稱 終「子」之「疫」-渦蟲野外防治評估及消
化蚊幼蟲機制

得獎獎項 大會獎：一等獎

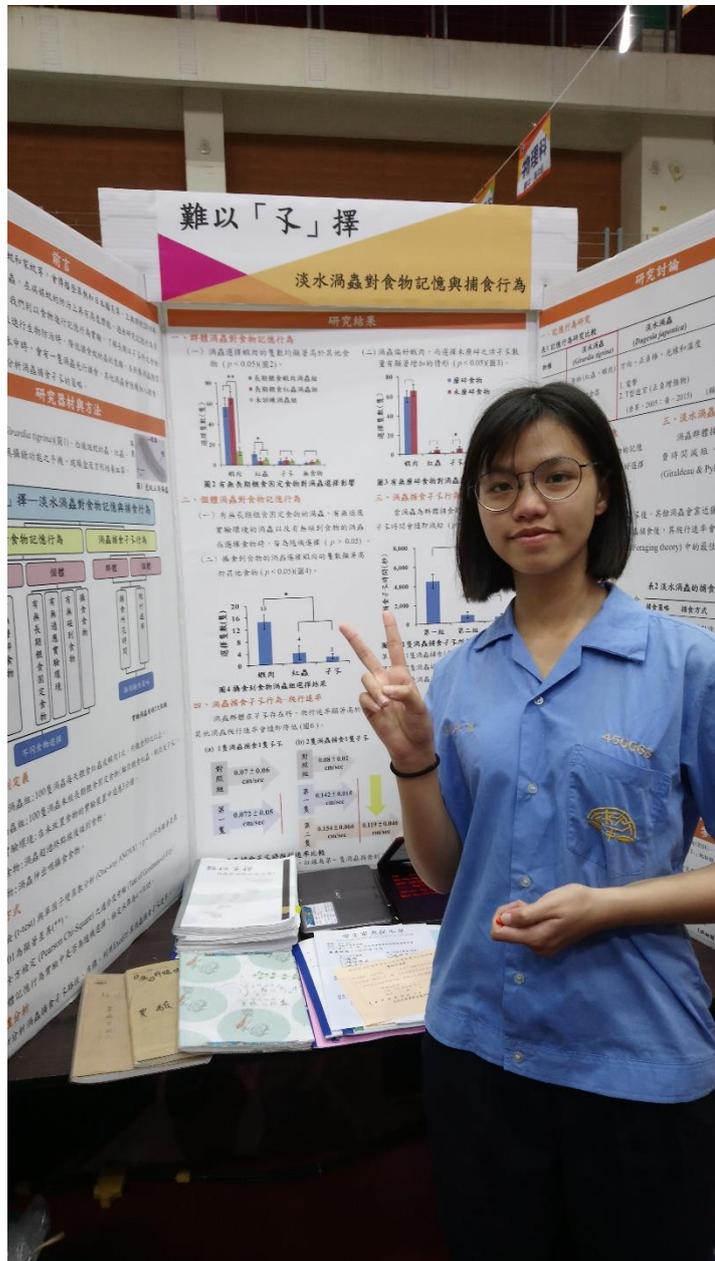
就讀學校 新北市私立竹林高級中學

指導教師 顏嘉怡

作者姓名 陳澤葳

關鍵詞 台灣淡水渦蟲、白線斑蚊幼蟲、野外防治

作者簡介



我是陳澤葳，新北市竹林中學的學生，在機緣巧合下踏入了竹林生物科展團。科展的過程中，學習實驗設計、操作和邏輯思考，在一路上也容易遇到失敗或挫折，但感謝給予我幫助的老師、學長姐、家人和教授，讓我堅持繼續做科展，讓我慢慢到不同的科展舞台上與同樣喜愛科學的人互相學習，最終使我能夠抵達國際科展這個大舞台，能讓我的視野更廣闊，因為有你們，才会有今天的我，謝謝你們!!

摘要

台灣淡水三角渦蟲 (*Girardia tigrina*) 主要以水生小動物為食，且會捕食蚊幼蟲，具生物防治潛能 (王與郭，2016)。根據投放前的評估結果，渦蟲對食物無記憶，為機會主義捕食者且會搶食，有利於評估未來投放的數量；野外防治實驗中發現渦蟲可有效抑制模擬水耕地景中蚊幼蟲，且生存水質與蚊幼蟲相似。未來可大範圍投放渦蟲，評估是否能有效抑制蚊幼蟲。本研究另一目標為確認渦蟲消化蚊幼蟲機制。由薄層分析法發現渦蟲黏液需長時間才能水解少量的幾丁質，推測其主要行體外物理消化蚊幼蟲，化學消化則為協助的角色。以石蠟切片發現 5% 福馬林加 30% 蔗糖之固定液可切出完整的渦蟲咽部組織。未來將持續探討渦蟲消化蚊幼蟲機制，如確認渦蟲捕食蚊幼蟲時咽部肌肉組織變化，以及利用冷凍切片固定渦蟲捕食蚊幼蟲時當下組織，再進行染色觀察。

Abstract

Girardia tigrina feeds on some aquatic invertebrates. A previous study showed that *G. tigrina* was a suitable biological agent for controlling larvae of mosquito vectors (Wang and Guo, 2016). According to the field tests pre-evaluation results: *G. tigrina* had no memory for food and are opportunistic predators. *G. tigrina* will snatch on food, which can be used to estimate the amount of releasing in future field tests; as for being opportunistic predators, *G. tigrina* would prey on all animals including larvae. Among the results, *G. tigrina* could effectively cause the number of larvae to decrease, and the field test will go on in the future, such as releasing *G. tigrina* into the non-removable edible landscaping. In this study, it was found that chitinase is presented in the mucus of *G. tigrina*. It was found by thin layer chromatography (TLC) that planarian needs a long time for hydroplankton mucus to hydrolyze a small amount of chitin. *G. tigrina*, physical digestion is mainly performed in vitro, and chemical digestion is used to assist predation. The fixative of *G. tigrina* paraffin tissue section contains 5% formalin and 30% sucrose, which can be used to cut the entire pharyngeal tissue off. In the future, we will perform further investigation on the mechanism of mosquito larvae digestion by *G. tigrina*, including confirming if there are changes in the pharynx muscle tissue when mosquito larvae are eaten by *G. tigrina*, and using frozen sections to fix the tissues of the moment when larvae are being preyed by *G. tigrina*, and observing after performing sectioning and staining.

壹、前言

一、研究動機

近年來登革熱與屈公病的境外移入病例數量有增加的趨勢，同時潛在的帶原者數量增加與本土埃及斑蚊、白線斑蚊的傳播，使得本土病例也層出不窮。因應日漸增加的病例，行政院核准補助 5318 萬元 (自由時報) 用以防治登革熱。

在疫區的緊急處理上，多以噴灑藥劑等化學方式來抑制病媒蚊，但在易降雨地區，藥劑容易因為降雨而跟著被沖刷掉，導致防疫效果並沒有想像中的理想 (圖 1)。化學防治不但無法根除病媒蚊，且有傷害環境等問題，可說是治標不治本。也因此，利用生物進行防治成為了登革熱重要的研究方向。

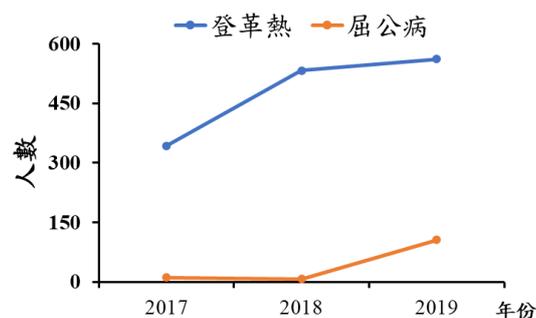


圖 1 台灣近年登革熱及屈公病人數

數據為每年境外移入病例加本土病例。

我們研究團隊發現渦蟲在「室內」模擬野外投放時可有效的捕食所有齡期的白線斑蚊幼蟲 (王與郭, 2016)。由於本團隊從未探討過飼養方式是否會影響野外投放成效，且考量過往研究皆提到渦蟲具記憶行為 (唐等, 2005; 黃, 2015)，所以去年主要針對野外投放前的評估，發現渦蟲對食物不回有記憶，為機會主義捕食者且會搶食，有利於進行野外生物防治，所以今年我們將渦蟲「野外」投放，進行生物防治評估。

我們團隊先前研究推測渦蟲會於體外物理消化 (王, 2018) 或化學消化 (徐, 2019) 蚊幼蟲，因此今年將針對往年研究進行進一步的驗證，確認渦蟲消化蚊幼蟲機制。

二、背景介紹

(一) 2016 年室內模擬野外投放結果 (表 1)

在 2016 年我們團隊學長姐以「室內」模擬野外防治發現渦蟲可以達到 100% 的抑制蚊幼蟲效果 (表 1)(王與郭, 2016)。

考量進行野外投放會有許多變因 (如氣候或周遭環境等)，因此今年將探討渦蟲對長期餵食食物是否具記憶以及確認其捕食蚊幼蟲行為，再評估渦蟲於野外生物防治之潛力。

表 1 室內模擬野外投放實驗結果 (王與郭，2016)

實驗後渦蟲數量	白線斑蚊幼蟲數量		抑制效果	
	實驗前	實驗後		
實驗組	9±1	210±15	0	100%
對照組	0	102±2	102±2	0%

(二) 國外生物防治文獻回顧 (表 2)

過去研究顯示以渦蟲野外防治蚊幼蟲抑制效果最高可達 99% (表 2)，由於文獻皆未提及渦蟲於野外防治時的生存狀況，且渦蟲於不同國家中防治蚊幼蟲效果可能會有差異，因此本研究將探討渦蟲於本國防治蚊幼蟲潛能，並且進行野外防治評估。

表 2 野外防治文獻整理

實驗樣區	渦蟲種類	抑制蚊幼蟲效果	參考資料
池塘	<i>Dugesia dorotocephala</i>	最高達 77%	Ali & Mulla (1983)
稻田	無描述	最高達 99%	Case & Washino (1979)
輪胎	<i>Dugesia tigrina</i>	最高達 99%	Melo & Andrade (2001)

(三) 歷年研究渦蟲消化蚊幼蟲機制推測

王於 2018 年發現渦蟲捕食蚊幼蟲時，口部會不斷地收縮運動，將食物吸入體內進行化學消化，因此推測渦蟲會於體外行物理消化 (圖 2)(王，2018)；2019 年時，徐利用 API ZYM 發現渦蟲捕食蚊幼蟲時黏液中含至少 8 種酵素能協助消化蚊幼蟲，推測其會於體外行化學消化 (圖 3)(徐，2019)。今年將進一步確認渦蟲於體外化學消化蚊幼蟲之方式，並且深入探討渦蟲消化蚊幼蟲機制。

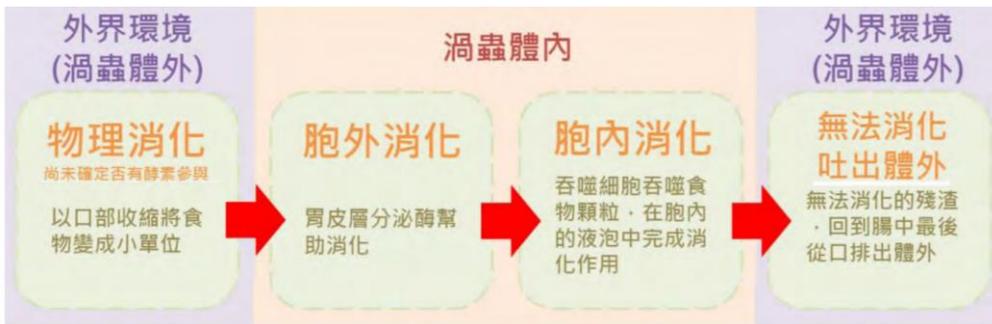


圖 2 渦蟲消化食物途徑示意圖 (王, 2018)

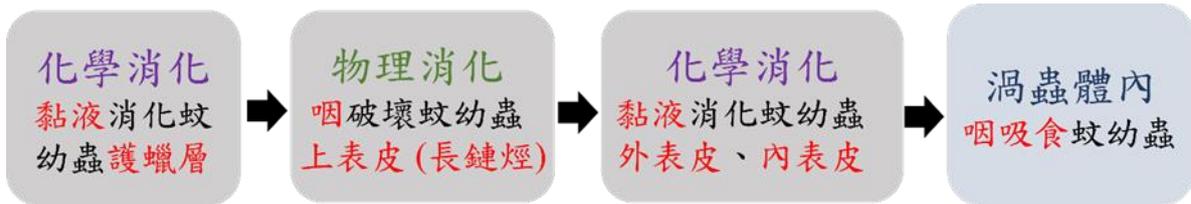


圖 3 渦蟲體外消化蚊幼蟲過程推測 (徐, 2019)

(四) 幾丁質基礎介紹

昆蟲外殼多以幾丁質組成，幾丁質是由 N-乙醯葡萄糖胺 (N-acetylglucosamine, NAG) 連成的聚合物，根據排列方向分 α 、 β 和 γ 型，兩個雙螺旋反向排列為 α -幾丁質 (圖 4a)，大部分為蝦或蟹等的外殼；兩個雙螺旋平行排列為 β -幾丁質 (圖 4b)(其分子間氫鍵較少，故構造較鬆散) 為烏賊的軟骨或昆蟲外骨骼等； γ 型為 α 、 β 型混合合體。幾丁質可利用酵素作用水解成聚合物，再還原成 N-乙醯葡萄糖胺單元體。2019 年我們團隊發現渦蟲在捕食蚊幼蟲時，N-acetyl- β -D-glucosamine 量會增加 (圖 5)(徐, 2019)，因此我們今年將深入探討渦蟲消化蚊幼蟲機制。

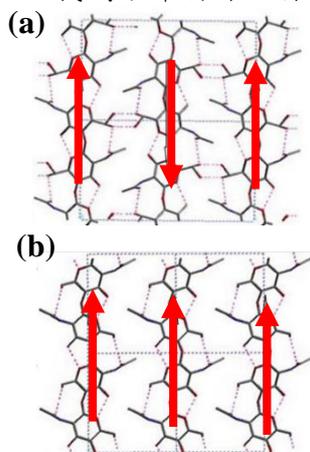


圖 4 α 和 β -幾丁質排列 (宮, 2008)
(a) 為 α -幾丁質；(b) 為 β -幾丁質

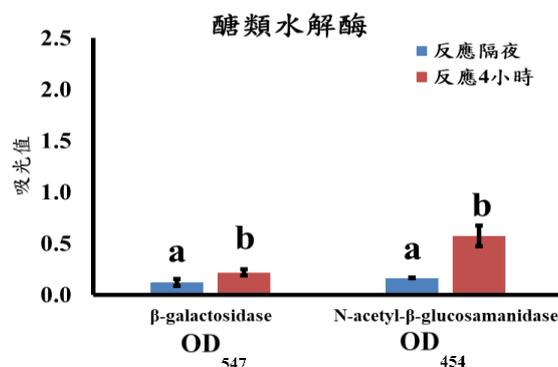


圖 5 渦蟲捕食蚊幼蟲黏液中酵素吸光值 (徐, 2019)

利用 One-way ANOVA 分析，柱狀圖上方英文代號不同，則代表有顯著差異 ($p < 0.05$)。

三、研究目的

(一) 野外防治

1. 確認渦蟲是否可在短時間內捕食完蚊幼蟲。
2. 評估渦蟲在模擬野外抑制蚊幼蟲之潛力。
3. 評估渦蟲在模擬水耕地景抑制蚊幼蟲之潛力。

(二) 消化蚊幼蟲機制

1. 觀察渦蟲捕食蚊幼蟲行為。
2. 探討渦蟲捕食蚊幼蟲組織。
3. 確認渦蟲黏液中幾丁質分解酶活性。
4. 確認蚊幼蟲外殼是否會被渦蟲黏液分解。

貳、研究方法及過程

一、研究動物、設備及器材

(一) 台灣淡水渦蟲 (*Girardia tigrina*)

1. 來源：台灣台北市民權東路水族館。
2. 淡水三角渦蟲外觀成扁平葉狀，體長 5-30 mm，身寬 1-5 mm，顏色多為棕色。頭部形狀呈三角形，故名淡水三角渦蟲。頭部三角形向外凸出的部位為耳突，有觸覺及視覺等感官受器，受器可用來偵測水中的震動和獵物的位置及氣味，黑點部分為其眼點，由色素細胞與感光的神經元組成，具有感應光線的功能。其咽自體腹面伸出，具攝食獵物功能 (圖 6)。
3. 將渦蟲飼養於塑膠罐中，每日餵食紅蟲或蝦肉 (大小約 0.6 公分) 一次，並且定期與換水。
4. 以下實驗均稱為渦蟲。

(二) 白線斑蚊 (*Aedes albopictus*)

1. 來源：國立台灣大學環境衛生研究所蟲媒傳染病實驗室提供。
2. 將蚊幼蟲卵片放入恆溫箱中，待其孵化後加入酵母菌飼養。
3. 成長期分為四期，卵-幼蟲 (圖 7)-蛹-成蟲。
4. 以下實驗均稱為蚊幼蟲。



圖 6 台灣淡水渦蟲



圖 7 白線斑蚊幼蟲

(三) 冷凍組織切片使用器材

名稱	廠牌
OCT	購自 Leica
氮氣 冷凍組織切片機	國立台灣大學生命科學系提供
Haematoxylin-Eosin staining	購自 SIGMA

(四) 石蠟組織切片器材

名稱	廠牌
二甲苯	購自 SIGMA
福馬林	購自 MACRON
石蠟 冷凍組織切片機	中央研究院 細胞與個體生物研究所提供

Haematoxylin-Eosin staining	購自 SIGMA
-----------------------------	----------

(五) 薄層層析相關器材

名稱	廠牌
正丁醇	購自 CHONEYE PURE REAGENT
醋酸	購自 CHONEYE PURE REAGENT
茴香醛	購自 Alfa Aesar
硫酸	購自 CHONEYE PURE REAGENT
β -Chitin	購自 SIGMA
N-acetyl- β -D-glucosamine (NAG)	購自 SIGMA
Chitinase (from St)	購自 SIGMA

(六) 其他使用器材

名稱	備註
電子秤、量筒、碼表、量筒	購自瑞光儀器
防蚊桌蓋	購自大賣場
保鮮膜	購自大賣場
誘捕桶	國立台灣大學昆蟲系提供
培養皿 (玻璃、塑膠)	購自 ExtraGene
離心管	購自 FALCON
微量分注器 (2-20 μ L)	NICHIRYO
水質檢測器 (pH 計、溶氧計、濁度計和導電計)	廠牌 PASCO 購自錫昌科技
手機 (光度計 Pro)	品牌：Apple

二、實驗架構圖 (圖 8)

本實驗主要進行渦蟲野外防治評估及探討其消化蚊幼蟲機制。王與郭於 2016 年發現渦蟲可於室內有效抑制蚊幼蟲；王於 2018 年發現渦蟲會利用口部的收縮及舒張 (物理破壞) 破壞蚊幼蟲幾丁質外殼；徐於 2019 年以 API ZYM 發現渦蟲捕食蚊幼蟲時黏液含至少 8 種酵素能協助化學消化蚊幼蟲。我們將延續先前實驗，進行渦蟲生物防治評估、探討捕食策略及消化蚊幼蟲機制 (圖 8)。

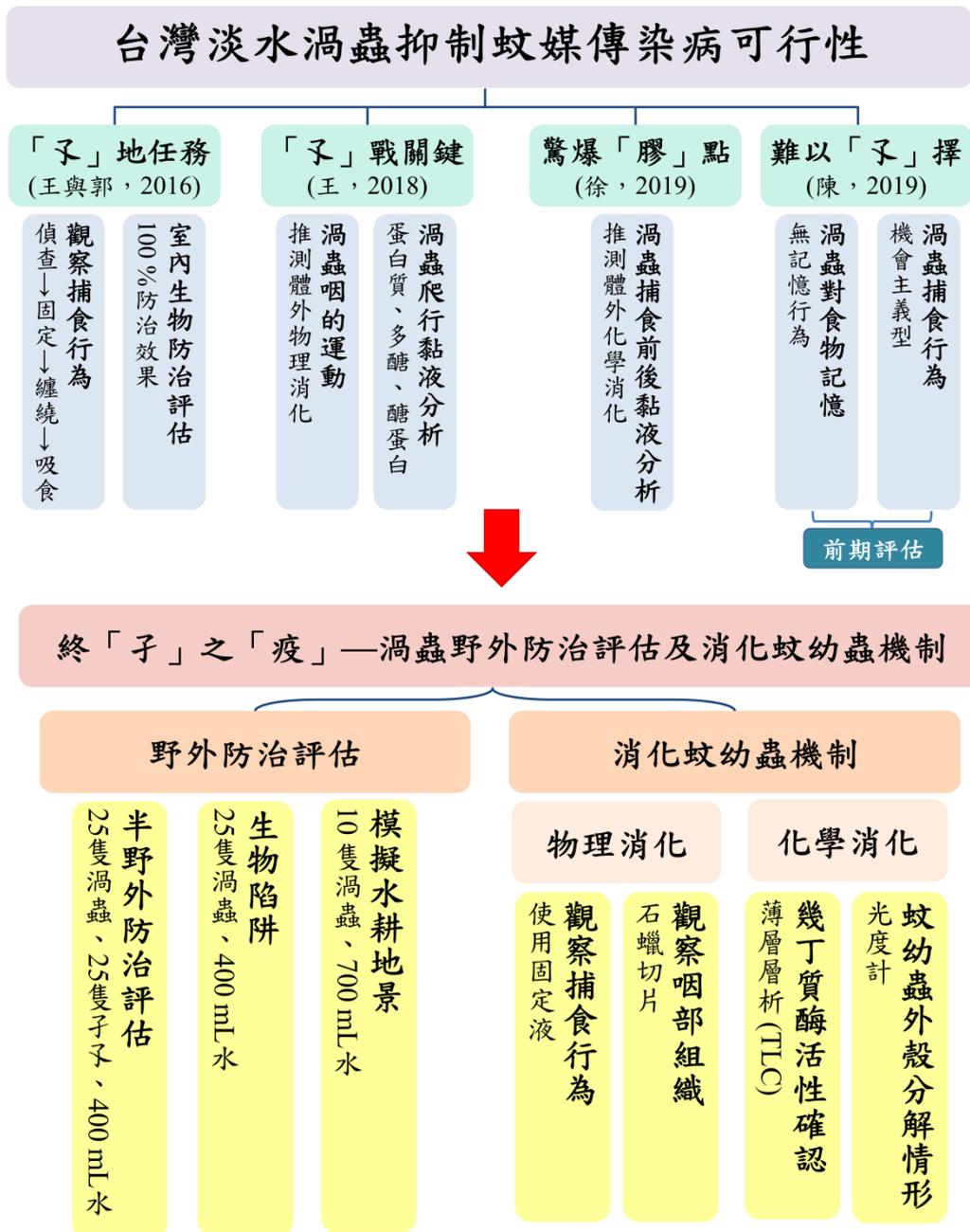


圖 8 實驗架構圖

三、實驗樣本組別配置

(一) 渦蟲黏液定義

表 3 渦蟲黏液實驗樣本配置及處理方法 (參考徐, 2019)

樣本名稱	樣本處理方法
渦蟲組 (對照組)	24 隻渦蟲爬行 於 0.5 mL ddH ₂ O 玻璃罐中 60-90 分鐘後, 移除實驗動物, 剩下溶液即為該實驗樣本
共存組 (實驗組)	24 隻渦蟲與 4 隻蚊幼蟲共存
捕食組 (實驗組)	24 隻渦蟲捕食 4 隻蚊幼蟲, 捕食完畢後, 移除渦蟲及蚊幼蟲

四、實驗步驟

(一) 野外防治評估

【實驗一】半野外評估

在進行實驗前, 考量蚊幼蟲偏好樹陰遮蔽處, 於校園先選擇了 10 個樣區進行評估, 最後選擇: 球場右側 (圖 11a)、樹叢中 (圖 11b) 及農場 (圖 11c), 因以上樣區可放置足夠數量誘捕桶, 且預備實驗期間皆有穩定的蚊幼蟲數。王與郭於 2016 年發現 1 隻渦蟲可捕食 5 隻蚊幼蟲, 但考量到渦蟲會有個體差異, 在投放置野外採樣的水質時, 會有渦蟲因無適應溫度或氣候等死亡, 且【實驗二】發現群體渦蟲在捕食蚊幼蟲時, 會出現搶食的行為, 可增加其捕食效率, 因此選擇投放 25 隻渦蟲進行野外防治。

目的: 在已有蚊幼蟲的室外積水容器中, 投入渦蟲, 評估渦蟲是否能有效的抑制蚊幼蟲生長。

1. 實驗組: 25 隻渦蟲與 25 隻蚊幼蟲

- (1) 於誘捕桶中裝入 400 mL 曝氣水。
- (2) 在誘捕桶上包上保鮮膜, 必免蚊蟲羽化飛出。
- (3) 在保鮮膜上方戳數個小洞, 使空氣可流通。



圖 9 誘捕桶

(4) 分別在校園 (圖 10) 的球場右側 (圖 11a)、樹叢中 (圖 11b) 及農場 (圖 11c) 擺放誘捕桶 (圖 9)。

(5) 每週利用水質檢測器 PASCO 和軟體 SPARKvue 檢測水樣中蚊幼蟲隻數、渦蟲隻數、水溫、水量、酸鹼值、溶氧量、導電度和濁度數據。

(6) 實驗皆 3 重複，共觀察 1 週。

2. 對照組：25 隻蚊幼蟲

同實驗組步驟

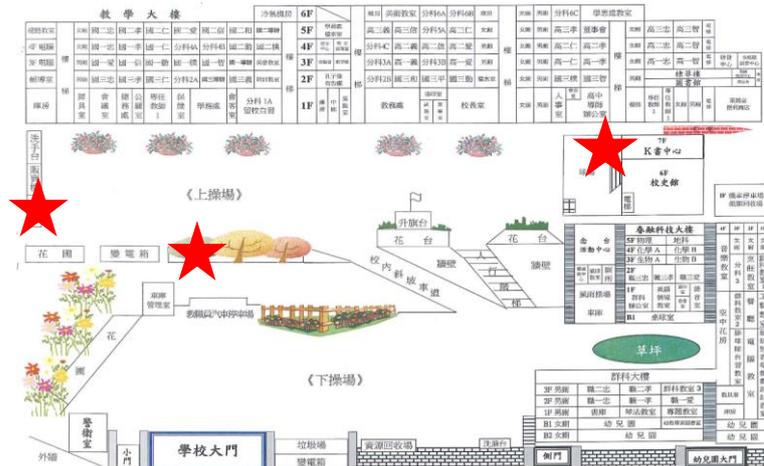


圖 10 校園平面圖

★為樣區位置



圖 11 誘捕桶擺放位置

(a) 球場右側；(b) 樹叢中；(c) 農場

【實驗二】生物陷阱

目的：利用誘捕桶營造蚊子偏好的環境，將渦蟲投放於桶中，

觀察是否可有效的防治蚊幼蟲。

1. 實驗組：25 隻渦蟲

- (1) 於誘捕桶裝入 400 mL 曝氣水。
- (2) 分別在校園 (圖 10) 的球場右側 (圖 11a)、樹叢中 (圖 11b) 及農場 (圖 11c) 擺放誘捕桶 (圖 9)。
- (3) 每週利用水質檢測器 PASCO 和軟體 SPARKvue 檢測水樣中蚊幼蟲隻數、渦蟲隻數、水溫、水量、酸鹼值、溶氧量、導電度和濁度數據。(註：若檢測水樣當天，水量低於 400mL 時，會加入新的曝氣水，若水量有多，會將多餘的水倒出)。
- (4) 實驗皆 3 重複，共觀察 2 個月。

2. 對照組：無渦蟲

同實驗組步驟

【實驗三】模擬水耕地景投放防治

目的：在不可噴灑化學藥劑和無法直接移除積水容器中，投入渦蟲，評估渦蟲是否能有效的抑制蚊幼蟲生長。

1. 實驗組：10 隻渦蟲

- (1) 於誘捕桶裝入 700 mL 曝氣水。
- (2) 在水面上放入保麗龍使植物可漂浮在上方。
- (3) 分別在校園 (圖 10) 的球場右側 (圖 11a)、樹叢中 (圖 11b) 及農場 (圖 11c) 擺放誘捕桶 (圖 12)。
- (4) 每週利用水質檢測器 PASCO 和軟體 SPARKvue 檢測水樣中蚊幼蟲隻數、渦蟲隻數、水溫、水量、酸鹼值、溶氧量、導電度和濁度數據。(註：若檢測水樣當天，水量低於 700mL 時，會加入新的曝氣水，若水量有多，會將多餘的水倒出)。
- (5) 實驗皆 3 重複，共觀察 1 個月。

2. 對照組：無渦蟲

同實驗組步驟



圖 12 模擬水耕地景誘捕桶

(二) 消化蚊幼蟲機制

【實驗四】物理消化—捕食行為

王於 2018 年指出渦蟲偏好從蚊幼蟲尾段進行攻擊，卻無了解渦蟲正在捕食蚊幼蟲時的捕食行為，所以本實驗利用滴固定液方式，將渦蟲正在捕食蚊幼蟲時組織固定，以便觀察渦蟲捕食蚊幼蟲當下的情形。

1. 將渦蟲飢餓 2 天。
2. 利用蒸餾水清洗渦蟲和蚊幼蟲各 10 分鐘。
3. 將渦蟲與蚊幼蟲放置於同一個培養皿中待其捕食。
4. 快速將周圍水分吸乾，滴 10% 福馬林滴於正在捕食蚊幼蟲的渦蟲。
5. 放於解剖顯微鏡下拍照記錄。

【實驗五】物理消化—咽部組織切片

王於 2018 年指出渦蟲偏好從蚊幼蟲尾段進行攻擊，推測是因蚊幼蟲的尾段較薄，但無直接的證據，因此本實驗將利用冷凍組織切片方式，了解渦蟲攻擊蚊幼蟲的部位，同時觀察渦蟲捕食蚊幼蟲的組織。利用切片染色觀察渦蟲分泌黏液部位，咽部是否也同樣具有可分泌黏液的細胞，在捕食前後渦蟲咽部黏液細胞或組織（如肌肉）是否會有差異，藉此探討渦蟲捕食蚊幼蟲為化學或物理消化。

1. 冷凍組織切片

目的：利用冷凍組織切片，了解渦蟲捕食蚊幼蟲機制。

- (1) 將蚊幼蟲、渦蟲、渦蟲咽部和渦蟲在捕食蚊幼蟲樣本放入固定液（10% 中性福馬林）中泡 6 小時。
- (2) 利用 PBS（phosphate buffer saline）沖洗樣本。
- (3) 將樣本利用 OCT (optimal cutting temperature compound) 進行冷凍包埋。
- (4) 將包埋後的樣本放入 -20°C 中冷凍。
- (3) 將冷凍好的樣本放入切片機裡進行切片。
- (4) 將切出的組織放置於載玻片上。
- (5) 使用蘇木精—伊紅染色 (Haematoxylin-Eosin staining, HE) 組織 (Fischer *et al.*, 2008)。
- (6) 觀察並紀錄染色情形。

2. 石蠟組織切片 (部分步驟參周等, 2016)

目的：利用石蠟組織切片，了解渦蟲捕食蚊幼蟲機制。

● 固定 (fixation)：

- (1) 將欲固定之渦蟲置於培養皿上，並置於冰塊上降低渦蟲活動力。
- (2) 利用拭鏡紙吸乾渦蟲四周的水分，移至低溫液態固定液（10%福馬林）中。
- (3) 將蟲體浸泡於固定液中 overnight 後，進行脫水步驟。

● 脫水 (dehydrate)：

- (1) 將標本依序置入 50%、60%、70%、80% 酒精各 10 分鐘。
- (2) 將標本依序置入 90%、99.5% 酒精各 10 分鐘，分別重複兩次。

● 透明 (clearing)：

- (1) 將標本置入 99.5% 酒精與二甲苯(Xylene)等比例混合溶液 10 分鐘。
- (2) 將標本置入二甲苯(Xylene)中 10 分鐘。

● 滲蠟 (infiltration)：

- (1) 將標本置入熔融石蠟 30 分鐘，重複兩次。

● 包埋 (embedding)：

- (1) 將標本置入標本盒中，調整標本平放於盒中。
- (3) 將熔融石蠟填滿標本盒，蓋上包埋盒。
- (4) 將標本盒置於速凍台，約 5 分鐘後分離包埋盒與標本盒。

● 切片 (cutting)

蘇木精—伊紅染色 (Haematoxylin-Eosin staining, HE)

【實驗六】化學消化—幾丁質酶活性確認

徐於 2019 年利用 APIZYM 發現渦蟲捕食蚊幼蟲時黏液中 N-acetyl- β -D-glucosamine 含量增加，卻未針對渦蟲黏液是否含 β -幾丁質分解酶進行探討，因此本研究將測定酵素活性，探討渦蟲黏液 (表 3) 中是否含有 β -幾丁質分解酶。

1. DNS 還原糖測定法 (Tanabe *et al.*, 2000)

(1) 標準曲線：

利用 DNS 試劑中 3,5-二硝基水楊酸 (3,5-dinitrosalicylic acid) 具還原性特徵，與還原糖發生反應，生成 3-氨基-5-硝基水楊酸，產物在煮沸後呈現棕紅色。

- ① 8 mL 的 5.3M 酒石酸鉀鈉溶液加入 10 mL 的 96 mM 3,5-二硝基水楊酸，在加水至 40 mL，配置成顯色劑溶液 (Clr Rgt Soln)。
- ② 取 0.1% N-Acetyl- β -D-Glucosamine Standard Solution (NAG) : 50 mM 磷酸鉀 (pH6) : 顯色劑=0.1 : 0.5 : 0.3 mL。
- ③ 在沸水中煮 10 分鐘。
- ④ 利用呈色劑於 540 nm 下測其吸光值。

(標準曲線測定溶液為 NAG (0~100 μ g/mL)。酵素活性定義為：於 40°C 下反應，每分鐘可水解膠態幾丁質產生 1 μ mol 還原糖之酵素量為 1 個酵素活性單位。)

(2) 黏液活性：

- ① 0.5 mL 樣本溶液 (表 3) 加 2 mL 幾丁質，在 25°C 中反應 2 小時。
- ② 反應完後在沸水中煮 10 分鐘。
- ③ 利用呈色劑於 540 nm 下測其吸光值。

2. 薄層層析 (TLC)：TLC 的矽砂土為固定相；展開液 (流動相) 為正丁醇：醋酸：水 = 2 : 1 : 1

樣本處理：純化幾丁質酶和渦蟲黏液樣本 (表 3) 與 β -幾丁質反應 (Tanabe *et al.*, 2000)，將反應後的溶液進行離心，取上清液作為 TLC 樣本溶液。

呈色劑 (p-anisaldehyde) 配置：3 mL 醋酸和 0.7 mL 茴香醛加入 70 mL 絕對酒精，在緩慢加入 10 mL 濃硫酸 (60 分鐘內)(參 TLC stains)。

- (1) 在 TLC 板上具底 1.5 公分處畫上基線。
- (2) 在基線上每隔 1 公分處畫上記號，分別滴上樣本溶液：
0.1% N-Acetyl- β -D-Glucosamine Standard Solution (標準品，NAG)；處理後的樣本—純 β -幾丁質酶 (對照組)、渦蟲組 (對照組) 共存組和捕食組 (實驗組)。
- (3) 不同樣本各滴 20 μ L 於 TLC 板平行放入燒杯中。

- (4) 將展開液加至燒杯 0.2 公分處，用鋁箔紙蓋住燒杯，待反應 30 分鐘。
- (5) 將反應完的 TLC 板，利用吹風機吹乾 TLC 板。
- (6) 在乾 TLC 板上劃停止線。
- (7) 將乾 TLC 板浸泡於茴香醛 (p-anisaldehyde) 後立即取出。
- (8) 將 TLC 板放置於 110°C 烘箱烤，待顏色出現。
- (9) 於紫外燈下顯色紀錄。

【實驗七】蚊幼蟲外殼透光度

徐於 2019 年推測渦蟲捕食蚊幼蟲時會利用其黏液中酵素消化蚊幼蟲外殼，卻未直接將渦蟲黏液滴於蚊幼蟲外殼測試，因此本研究將滴渦蟲黏液於蚊幼蟲體表，觀察其黏液是否可直接分解蚊幼蟲外殼；因蚊幼蟲較小隻，無法用一般光度計測試蚊幼蟲外殼透光度，而指出文獻自行設計測光器，探討黑棘蟻蟻絲膜的透光程度(鍾，2018)，因此本研究也嘗試自行設計簡易的透光度實驗裝置 (圖 13)。

目的：利用物理透光方式，觀察蚊幼蟲外殼是否被黏液化學或物理破壞。

1. 取一隻完整的蚊幼蟲。
2. 將蚊幼蟲放置於實驗裝置測其透光度 (圖 13)。
3. 將蚊幼蟲放入 200 μ L 黏液樣本 (表 3) 中待 20 分鐘。
4. 將沾有黏液的蚊幼蟲利用蒸餾水將其身上黏液沖洗掉。
5. 放置於實驗裝置測其透光度，比較蚊幼蟲實驗前後透光度。
6. 實驗皆重複 3 次。



圖 13 透光度實驗裝置

參、研究結果與討論

一、野外防治評估

【實驗一】半野外評估

根據一週的半野外評估結果，於圖 14 (a) 中結果則顯示渦蟲數量有增加的情形；圖 14 (b)中得知蚊幼蟲在有渦蟲的誘捕桶中皆被捕食完畢，且無成蚊；圖 14 (c)中發現蚊幼蟲隻數有減少的情形。

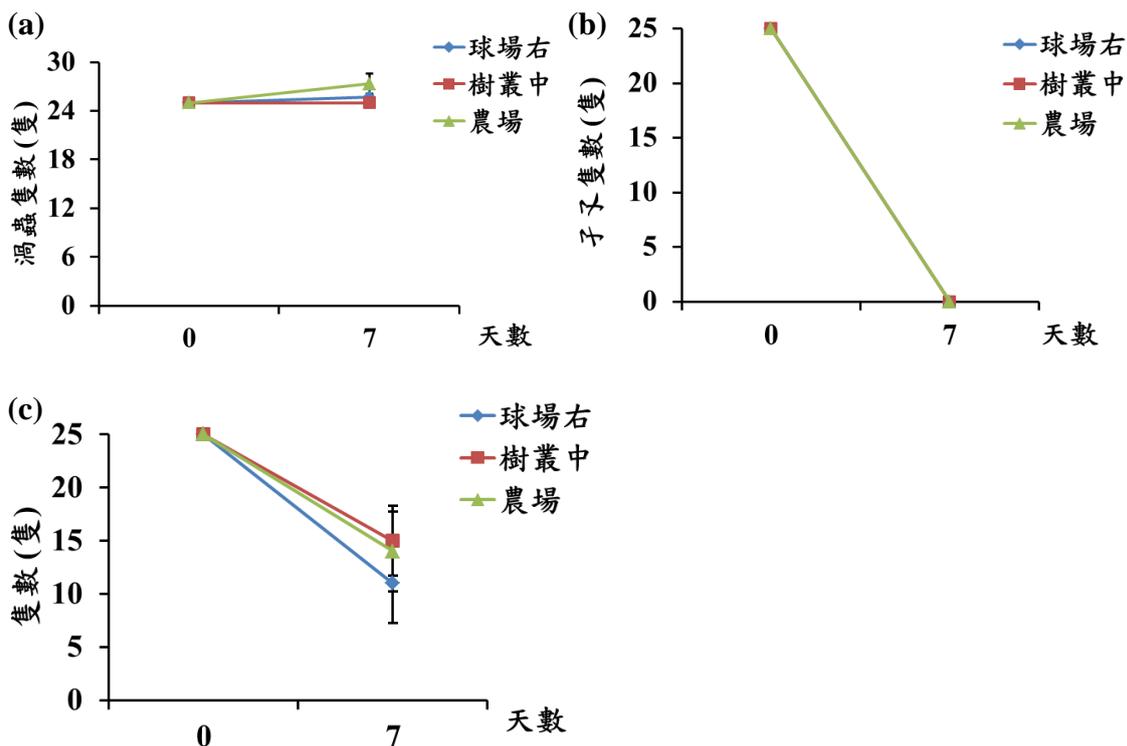


圖 14 半野外防治渦蟲與蚊幼蟲生存情形

(a) 為實驗組誘捕桶中渦蟲存活隻數；(b) 為實驗組誘捕桶中的蚊幼蟲隻數；(c) 為對照組誘捕桶中蚊子+蚊幼蟲+死亡的蚊幼蟲隻數

實驗討論

(一) 渦蟲可達到防治效果

從圖 14 (a)中發現渦蟲隻數於一週的半野外防治實驗中有增加的情形，推測是因食物 (蚊幼蟲) 充足，使其隻數上升，因此推測渦蟲可達到防治蚊幼蟲效果，未來將以此比例進行在已有蚊幼蟲的積水中投放。

(二) 蚊幼蟲因養分不足出現同類相食行為

從圖 14 (c)中發現對照組中誘捕桶蚊幼蟲隻數 (蚊子+蚊幼蟲+死亡的蚊幼蟲全體) 少於投放時的 25 隻，推測由於誘捕桶外側有包保鮮膜，導致蚊幼蟲養分不足，出現同類相食的行為。

【實驗二】生物陷阱

從圖 15 中得知 28 天以前實驗組誘捕桶中，有渦蟲存活的情形下，皆無蚊幼蟲，28 天至 42 天前，發現有 1 齡的蚊幼蟲，在 42 天以後，全部渦蟲消失的誘捕桶才開始出現 1 齡以上的蚊幼蟲；每週採樣時，未含渦蟲的誘捕桶（對照組）皆有蚊幼蟲存在。

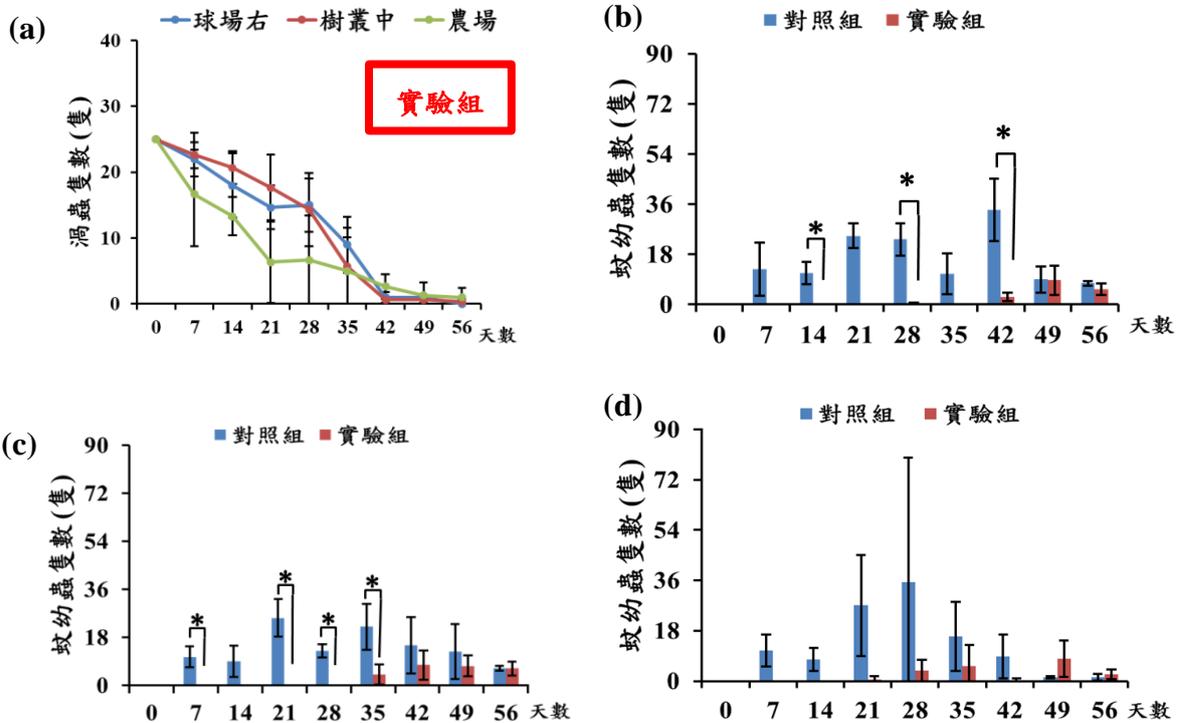


圖 15 不同樣區誘捕桶中渦蟲和蚊幼蟲隻數

(a) 實驗組的渦蟲隻數；(b) 球場右蚊幼蟲隻數；(c) 樹叢中蚊幼蟲隻數；(d) 農場蚊幼蟲隻數；對照組為不含渦蟲的誘捕桶。以 T 檢驗證 (t-test) 比較是否有顯著差異，檢定水準皆設為 $\alpha = 0.05$ ， $p < 0.05$ 為顯著差異(*)， $p < 0.01$ 為顯著差異(**)。

實驗討論

(一) 白線斑蚊會隨機產卵，分散風險

在 28 天時，農場對照組其中一個誘捕桶出現 98 隻蚊幼蟲，其它誘捕桶蚊幼蟲數量卻分別是 0 隻和 8 隻，推測白線斑蚊會隨機產卵 (每次 80~120 顆卵)，分散風險，而非平均分布卵的數量，且該誘捕桶可能非一隻母蚊產卵，才會導致同樣區只有一個誘捕桶出現 98 隻蚊幼蟲，造成農場實驗組和對照組的誘捕桶中蚊幼蟲數量無顯著差異 ($p > 0.05$) (圖 15d)。

(二) 渦蟲因饑餓而死亡

28 天以前有誘捕桶中的渦蟲在慢慢減少，在 28 天以後，有些誘捕桶中的渦蟲全部死亡，將水質與渦蟲存活隻數進行比較時 (圖 16)，發現渦蟲不會因濁度而影響其生存，其他水質檢測項目亦是如此，且每次計數渦蟲數量時，均發現渦蟲體型越來越小，初步推測渦蟲因食物不足而死亡，將會減少投放渦蟲數量，進行【實驗三】，觀察渦蟲存活情形，以利了解未來野外投放渦蟲的數量。

(a)		第0天	第7天	第14天	(b)		第0天	第7天	第14天
	球場右(b1)	25	21	18		球場右(b1)	1.33	3.5	2.3
	球場右(b2)	25	21	24		球場右(b2)	1.33	15.1	0
	球場右(b3)	25	24	12		球場右(b3)	1.33	1.9	1.3
	樹叢中(b1)	25	19	20		樹叢中(b1)	1.33	5.2	11.1
	樹叢中(b2)	25	22	18		樹叢中(b2)	1.33	1.8	8.3
	樹叢中(b3)	25	27	24		樹叢中(b3)	1.33	1	4.5
	農場(b1)	25	19	13		農場(b1)	1.33	6	2.7
	農場(b2)	25	25	17		農場(b2)	1.33	8.9	9.8
	農場(b3)	25	6	10		農場(b3)	1.33	1.2	61.3

圖 16 渦蟲存活隻數與水質濁度相關性

(a) 為渦蟲存活隻數數據；(b) 為水質濁度數據

(三) 有無渦蟲存在的環境中蚊子均會產卵

在實驗組 (含渦蟲) 的誘捕桶中，均無發現蚊幼蟲存在。為了避免在渦蟲存在時蚊子亦會產卵，每週取樣時均會將多餘的水量 (400 mL) 放於恆溫箱中培養，並且紀錄孵出的蚊幼蟲數。根據後續結果發現，在實驗組有多出的積水中，平均孵出 4 隻蚊幼蟲，且亦有在誘捕桶中發現蚊子產卵 (圖 17)，因此確認不論有無渦蟲存在的環境中蚊子均會產卵。

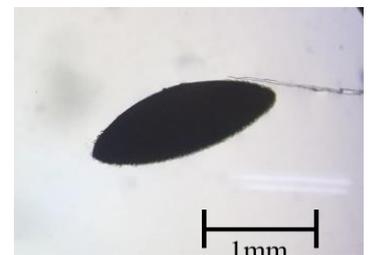


圖 17 有渦蟲存在誘捕桶中發現蚊子的卵

(四) 渦蟲可生存於有蚊幼蟲的水域 (表 4)

根據表 4 發現渦蟲與蚊幼蟲所生存水域環境相似，證明渦蟲具野外防治蚊幼蟲潛能，未來將進一步將渦蟲投放置不可移除的水耕地景，進行野外防治評估。

表 4 生物陷阱實驗結果

觀察項目	曝氣水	數值範圍	
		對照組	實驗組
蚊幼蟲隻數	0 隻	0~98 隻	0~16 隻
渦蟲隻數	25 隻	X	25~0 隻
溫度 (°C)	35	20~35	20~35
酸鹼值 (pH)	7.6	5~8	5~8
溶氧度 (mg/L)	7.82	5.27~7.96	5.71~7.97
導電度 (µs/cm)	93.33	19~906	93~781
濁度 (NTU)	1.33	0~66.5	0~61.3

水質是利用 PASCO 檢測 1 分鐘後停止。

(五) 渦蟲還未捕食剛孵化的蚊幼蟲

圖 15(bcd) 28 天至 42 天期間，發現有渦蟲的誘捕桶中出現 1 齡的蚊幼蟲，從其它數據數據中發現 3 隻渦蟲以上時，可在誘捕桶中捕食蚊幼蟲，抑制蚊幼蟲數量，因此推測是因 1 齡蚊幼蟲剛孵化，渦蟲還未捕食。

【實驗三】模擬水耕地景投放防治

圖 16(a) 發現渦蟲存活穩定；圖 16(bcd) 中 14 日前都未有蚊幼蟲存活在誘捕桶中；球場右實驗組的誘捕桶 28 和 42 日中出現了 1 齡的蚊幼蟲 (圖 16b)；根據圖 16(bcd) 發現在無渦蟲的誘捕桶中 (對照組) 14 日後開始出現 1 齡以上的蚊幼蟲。

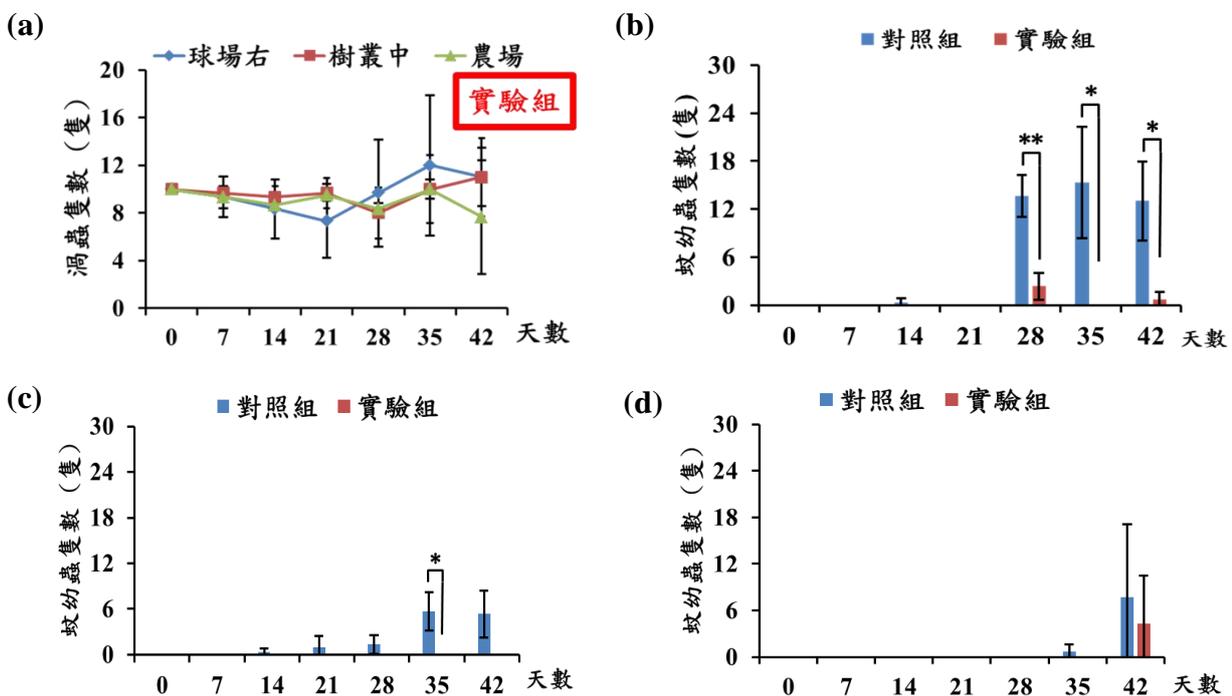


圖 16 模擬水耕地景投放渦蟲與蚊幼蟲生存情形

(a) 實驗組的渦蟲隻數；(b) 球場右蚊幼蟲隻數；(c) 樹叢中蚊幼蟲隻數；(d) 農場蚊幼蟲隻數；對照組為不含渦蟲的誘捕桶。以 T 檢驗 (t-test) 比較是否有顯著差異，檢定水準皆設為 $\alpha = 0.05$ ， $p < 0.05$ 為顯著差異 (*)， $p < 0.01$ 為顯著差異 (**)。

實驗討論

(一) 渦蟲適合投放於種植水耕植物的水域

相較於【實驗二】，由圖 16(a) 發現到 42 天，誘捕桶渦蟲隻數最多有 15 隻渦蟲，由此可得隻 10 隻渦蟲適合生存於 700 mL 水中；水耕植物浮在水面上方，可抵當較多的野外生態影響水質，使渦蟲較能適應環境，因此本實驗建議渦蟲投放於種植水耕植物的水域中，進行蚊媒防治，同時可彌補無法進行物理和化學防治等缺點。

(二) 渦蟲還未捕食剛孵化的蚊幼蟲

圖 16(b) 第 28 和 42 天，兩個實驗組誘捕桶 (有渦蟲) 中，出現 3 到 4 隻皆為 1 齡的蚊幼蟲，推測因蚊幼蟲剛孵化，還未來得及捕食，其不影響渦蟲抑制蚊幼蟲能力。

(三) 渦蟲可生存於有蚊幼蟲的水域 (表 5)

表 5 渦蟲生存環境與蚊幼蟲相似，且與【實驗二】比較水質，可發現在此實驗中 (水上具有植物) 水質濁度較低，渦蟲生長也較好，所以未來渦蟲可用於不可移除的水耕地景中，進行蚊媒防治。

表 5 模擬水耕地景投放防治結果

觀察項目	曝氣水	對照組	實驗組
		數值範圍	
蚊幼蟲隻數	0 隻	0~25 隻	0~4 隻
渦蟲隻數	25 隻	X	10~4 隻
溫度 (°C)	35	19~23	19~23
酸鹼值 (pH)	7.6	5~8	5~8
溶氧度 (mg/L)	7.82	6.12~8.55	6.79~8.94
導電度 (μs/cm)	93.33	84~1000	45~290
濁度 (NTU)	1.33	0~5.3	0~10.6

【實驗四】物理消化—捕食行為

圖 17 (b) 中發現蚊幼蟲肛部受渦蟲咽部破壞；圖 17 (c) 叢毛受渦蟲黏液纏繞；圖 17 (d) 發現被捕食完的蚊幼蟲肛部受渦蟲咽部破壞。

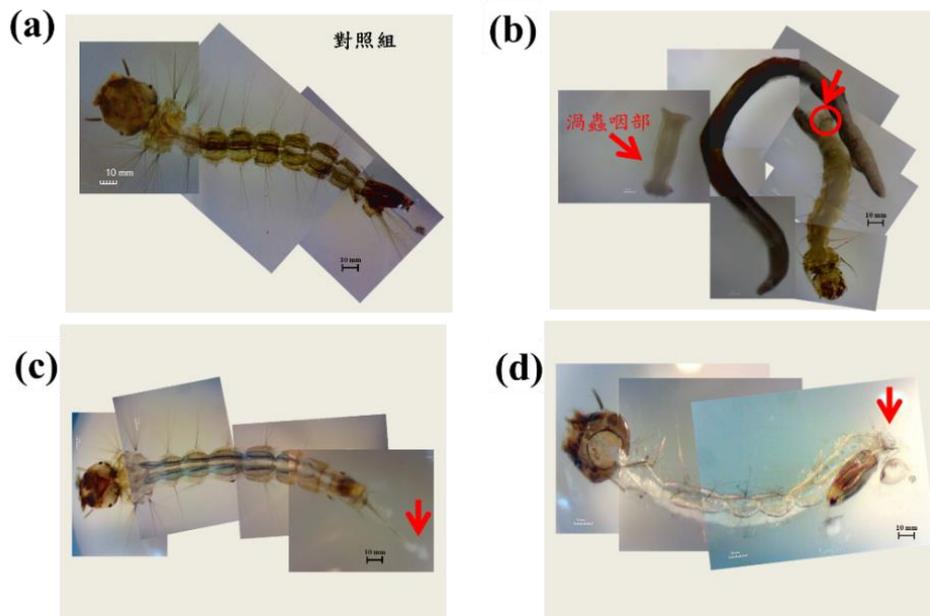


圖 17 渦蟲捕食蚊幼蟲

(a) 蚊幼蟲；(b) (c) 渦蟲捕食的蚊幼蟲個體；(d) 渦蟲捕食完的蚊幼蟲個體。
固定液：10%福馬林。

【實驗五】物理消化—咽部組織切片

圖 18 (a)(b) 已可切出渦蟲石蠟縱切面型體，且可清楚觀察到渦蟲的眼點及咽部組織；圖 18 (c) 在冷凍組織切片中，已可初步看出渦蟲咽部，未來會持續建切片技術，觀察並記錄渦蟲咽部、黏液腺捕食前後組織差異等染色情形。

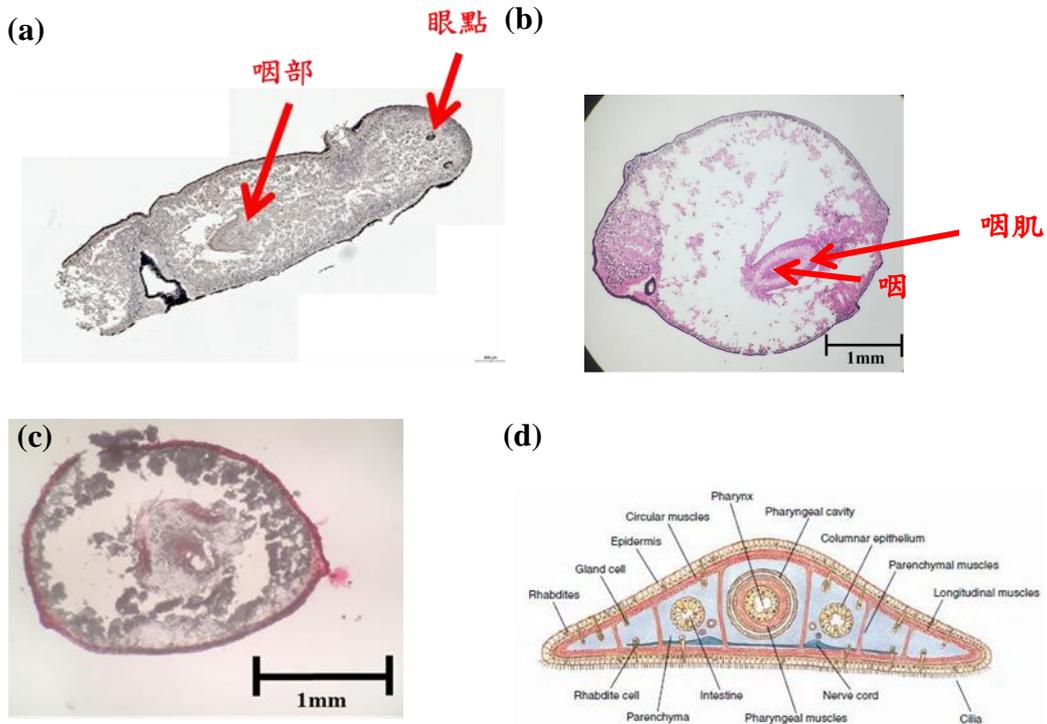


圖 18 冷凍組織切片

(a) (b) 渦蟲實際石蠟切片 (縱切)；(c) 渦蟲實際冷凍切片 (橫切)；(d) 示意圖

實驗討論

(一) 目前正持續建立冷凍組織切片技術中

在進行冷凍切片前，需要建立許多技術，如找出如何讓渦蟲維持體型進行冷凍包埋、建立細胞組織染色方法等，因渦蟲為淡水動物，體內的含水量較多，目前推測冷凍組織切片時，體內的水會變冰晶，將周圍組織刺破，使組織消失。目前仍在建立實驗方法，未來會考慮利用固定液將渦蟲固定後再進行冷凍包埋切片。

(二) 利用 PAS 染渦蟲捕食蚊幼蟲冷凍組織切片

目前實驗先初步利用 HE 染色，藉此了解渦蟲和蚊幼蟲組織，未來可將渦蟲捕食蚊幼蟲的組織切片，再利用 PAS 染渦蟲黏液後再進行觀察，探討渦蟲消化機制。

【實驗六】化學消化—幾丁質酶活性確認

(一) 薄層層析 (TLC)

圖 19(a) 除了 NAG，其餘樣本與 β -幾丁質反應 1 天，於基點處有醣類；直到反應 3 天後，NAG 的 $R_f = 0.53$ ，其餘分別 $R_f = 0.48$ 、 0.41 、 0.41 、 0.42 cm 的地方皆有水解產物 (圖 19b)。

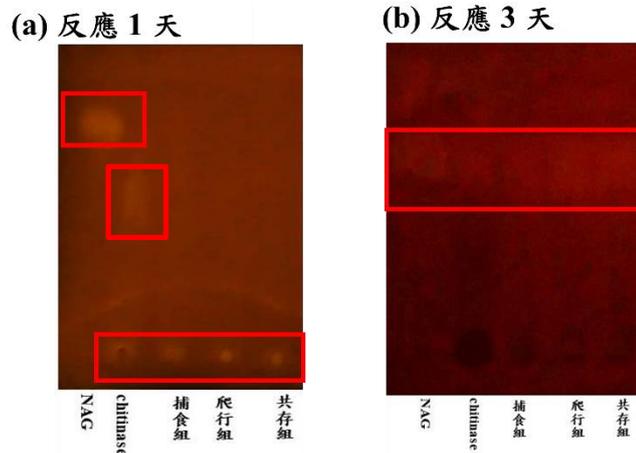


圖 19 渦蟲黏液水解 β -幾丁質產物

樣本與 β -幾丁質反應後，進行離心並且取上清液。

TLC 的矽砂土為固定相；展開液 (流動相) 為正丁醇：醋酸：水 = 2 : 1 : 1；呈色劑為茴香醛；(紫外光燈顯色)。

實驗討論

(一) 渦蟲黏液量少

在 DNS 還原醣測定法中，嘗試利用不同濃度 NAG (標準品) 測吸光值，初步測出標準取線後 (圖 20)。本研究發現因渦蟲分泌微量的黏液量，在進行 DNS 還原醣測定法時，無法使用內插法測出渦蟲黏液中的酵素含量。

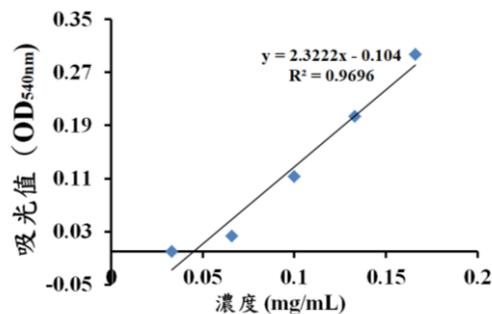


圖 20 NAG 標準曲線圖

利用不同濃度的 NAG (標準品) 測取吸光值，劃出 NAG 標準曲線。

(二) 渦蟲黏液需長時間才可水解 β -幾丁質

從圖 20 中可發現渦蟲黏液與 β -幾丁質反應 1 天，會導致樣本皆停留在基點，而在反應 3 天後，渦蟲黏液會水解少量的 β -幾丁質，在 $R_f = 0.48$ 、 0.41 、 0.41 、 0.42 cm 處有水解產物，可證明渦蟲黏液需長時間才能水解 β -幾丁質。

(三) 渦蟲體外化學消化為協助捕食

從本實驗發現渦蟲黏液須將 β -幾丁質水解出少量產物需花到 3 天的時間，無法在渦蟲捕食蚊幼蟲時將其外殼完全水解，因此推測渦蟲行體外化學消為協助的角色。

(四) 嘗試不同呈色劑使渦蟲水解幾丁質產物顯色

渦蟲黏液水解幾丁質後的產物無法經由烤片顯色，推測是因渦蟲不為純酵素的緣故，無法將幾丁質直接水解成 N-acetyl- β -D-glucosamine，未來可再嘗試不同呈色劑使渦蟲水解幾丁質產物顯色。

【實驗七】化學消化—蚊幼蟲外殼分解情形

圖 21 得知將渦蟲黏液滴於蚊幼蟲體表後，透光度並無顯著差異 ($p > 0.05$)。

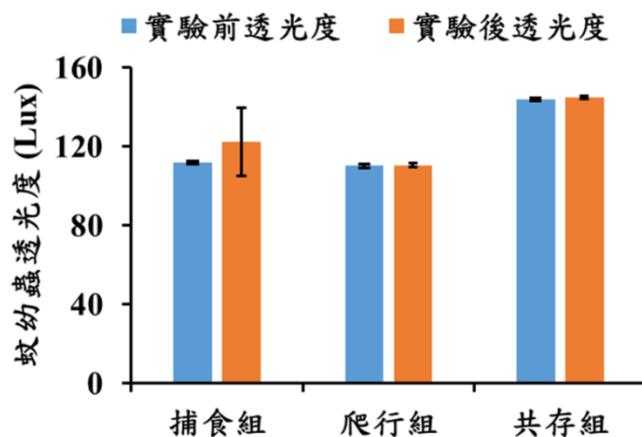


圖 21 渦蟲黏液滴於蚊幼蟲體表前後透光度

反應 20 分鐘。透光度增加表示蚊幼蟲體表受渦蟲黏液分解。

實驗討論

(一) 渦蟲黏液無法在短時間將蚊幼蟲外分解

圖 21 可發現渦蟲黏液在 20 分鐘內無法將蚊幼蟲外殼變薄 (分解)，而渦蟲捕食蚊幼蟲只需花費 10~15 分鐘，因此推測渦蟲黏液無法在短時間內將蚊幼蟲外殼分解。

肆、研究討論

一、野外防治成效 (表 7)

國外研究 (Ali & Mulla, 1983 ; Case & Washino, 1979 ; Melo & Andrade, 2001)開始利用渦蟲來進行野外防治，成效最高達到 99%，而本研究【實驗一】【實驗二】【實驗三】中發現渦蟲在誘捕桶中可達到 99%抑制蚊幼蟲，而在【實驗三】含有水耕植物實驗發現，渦蟲可生長得更好，未來可以將渦蟲投放置不可移除的水耕地景進行生物防治。

表 7 不同地區的渦蟲抑制蚊幼蟲效果

實驗樣區	渦蟲種類	抑制蚊幼蟲效果	參考資料
池塘	<i>Dugesia dorocephala</i>	最高達77%	Ali & Mulla (1983)
稻田	無描述	最高達99%	Case & Washino (1979)
輪胎	<i>Dugesia tigrina</i>	最高達99%	Melo & Andrade (2001)
水耕地景	<i>Girardia tigrina</i>	最高達99%	本研究

二、組織切片固定液比較

本實驗在利用不同的固定液情況下，目前發現冷凍切片使用 10%福馬林可切出較好的組織 (圖 29)，而在不同文獻中最常使用的固定液也是 10%福馬林 (表 8)；石蠟切片適合 5 %福馬林加 30 %蔗糖，可切出完整的咽部，但本實驗切出的組織仍然有破碎，未來回持續研究並建立技術。

表 8 扁蟲不同固定液效果比較

實驗動物	固定液成分	文獻
大孔藻、朝鮮線蟲和暗色價單胞菌	10%福馬林	Morita <i>et al.</i> , 2018
海洋渦蟲	10%冷凍福馬林	Dixit <i>et al.</i> , 2018
渦蟲	0.1M 中的 2%低聚甲醛和 15%苦味酸 pH7.6 的磷酸鈉緩衝溶液	Kotikova <i>et al.</i> , 2002
陸地渦蟲	甲醛 4%/磷酸鹽緩衝或無緩衝	Winsor,1991
淡水渦蟲	(1) 10%福馬林 (2) 固定液是 2.5% glutaraldehyde 配在 0.1M cacodylate buffer 中，外加 10% sucrose (3) 直接將渦蟲放入裝有 OCT 的模型中，放置-20°C冷凍	本研究

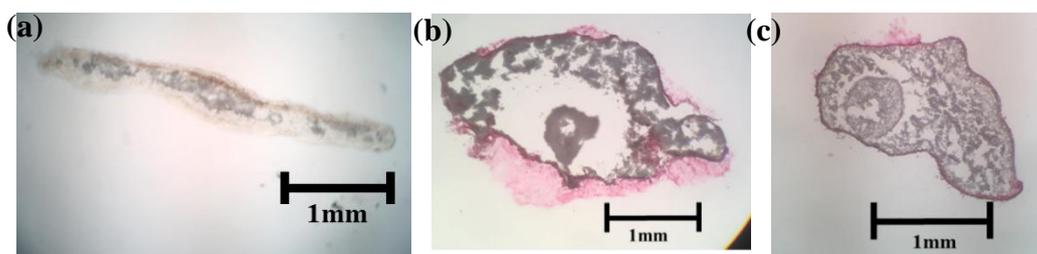


圖 22 不同固定液的渦蟲冷凍組織切片

(a) 固定液是 2.5% glutaraldehyde 配在 0.1M cacodylate buffer 中，外加 10% sucrose；(b) 未加固定液；(c) 10% 福馬林。

三、渦蟲黏液幾丁質酶不適用於 DNS 還原糖測定法

文獻指出 DNS 還原糖測定法需大量的樣本，且 DNS 還原糖測定法敏感度不高 (Ferrari *et al.*, 2014)，而渦蟲分泌黏液量少，需要較敏感的儀器才能測到渦蟲黏液中的幾丁質酶含量。

四、薄層層析實驗方法

渦蟲進行 TLC 實驗主要為了探討渦蟲體內神經傳導物質、個體在水中訊號傳遞物或脂質 (Perkins & Fried, 1982. ; Welsh & King, 1970 ; Fried & Grigo, 1977)，而本研究首次利用渦蟲黏液進行 TLC 實驗，藉此將渦蟲黏液中的醣類進行分離 (表 9)。

表 9 渦蟲萃取物進行 TLC 分離比較

萃取物質	TLC分離物質	參考文獻
渦蟲個體間化學訊號	水中脂質產物	Perkins & Fried, 1982
渦蟲個體	兒茶酚胺 (神經傳導物質)	Welsh & King, 1970
渦蟲個體	脂質	Fried & Grigo, 1977
渦蟲黏液	酵素水解幾丁質產物	本研究

五、渦蟲體外行物理消化大於化學消化

渦蟲黏液需長時間才可水解微量幾丁質，且其捕食完後的蚊幼蟲外殼會有破洞 (表 10)，因此推測渦蟲捕食時，體外物理消化大於化學消化。

表 10 渦蟲消化蚊幼蟲機制證據

	物理消化	化學消化
歷年研究 (王, 2018 ; 徐, 2019)	渦蟲捕食時咽部會進行收縮運動	渦蟲捕食時黏液中含有 8 種酵素
本研究	被捕食完的蚊幼蟲肛部受損	滴黏液反應前後蚊幼蟲外殼透光度無改變
	渦蟲捕食蚊幼蟲僅需 10-15 分鐘	渦蟲黏液水解幾丁質需花 3 天

伍、結論

- 一、渦蟲可在蚊幼蟲羽化成蚊子前快速捕食完畢，有利於未來生物防治。
- 二、渦蟲可在野外有效的抑制蚊幼蟲，且更適合投放於水耕地景中。
- 三、水質並非為渦蟲減少的主因，推測是因食物不足，導致渦蟲死亡，再調整渦蟲數量和水體積，目前發現最佳防治比例為 10 隻渦蟲在 700 mL 中進行蚊媒蚊幼蟲防治。
- 四、石蠟組織切片固定液可用 5 % 福馬林加 30 % 蔗糖固定渦蟲，可切出渦蟲完整咽部。

陸、研究貢獻

衛生局每年投大量資金，協助不同縣市進行登革熱防治，但長期噴灑化學藥劑，蚊子會出現抗藥性，且下雨後，不僅藥劑會被沖刷掉，同時又會出現積水，無法在短期內重新噴灑藥劑。而在生物防治亦有許多限制，如無法在短時間內快速抑制登革熱疫區，對於水質有要求，且須人為管理等（表 11）。往年民眾對於渦蟲的認知皆是害蟲的一種，捕食水族業者販售的蝦子，但在本研究團隊 4 年的研究下發現渦蟲具極高的應用價值，不僅王於 2018 年提出渦蟲黏液未來可能可利用於防水黏著劑，在本研究發現渦蟲有許多優點：**渦蟲具有搶食行為，可增加捕食效率，渦蟲生存環境與蚊幼蟲相似，飼養簡單且低成本，同時可在不可噴灑化學藥劑，或移除積水（物理防治）的水耕地景中，可有效的抑制蚊幼蟲，且不需大量的渦蟲隻數即可進行防治，有利於未來進行野外投放（表 12）；本研究發現渦蟲在體外主要行物理消化，化學消化為協助捕食（表 10）。**

表 11 病媒蚊防治方法比較

	化學防治	生物防治（渦蟲）	物理防治
時效	3 週（疾管局）；1 週（本研究）	56 天（野外完全不餵食）	—
優點	1. 快速抑制帶病毒之成蚊	1. 可阻斷蚊子繁殖循環 2. 環境永續 3. 可用於不可移除地景	1. 一般民眾皆可施行
缺點	1. 蚊子會有抗藥性 2. 無法打斷蚊子繁殖循環 3. 破壞生態及傷害人體 4. 下雨後，藥劑會被沖刷掉	1. 無法在短時間抑制疫情 2. 對外在環境有要求	1. 民眾易遺忘隨時清除積水 2. 不可移除積水或水耕地景無法防治（如樹洞）

表 12 食蚊動物生物防治應用 (部分參考王與郭, 2016)

物種	捕食白線斑蚊幼蟲	優點	缺點
渦蟲	所有齡期	1. 飼養簡單且低成本 2. 生存環境與蚊幼蟲相似 3. 死亡不會影響水質 4. 可完全抑制蚊幼蟲 5. 不適應環境，個體會自解(不會汙染水質)	不適應環境，個體會自解(全數自解會導致無法進行蚊媒防治)
劍水蚤	僅捕食1、2齡	1. 生存環境與蚊子幼蟲相符 2. 低呈本	無法捕食3齡以上的白線斑蚊幼蟲
仰泳春	所有齡期	生存環境與蚊子幼蟲相符	無法確定大量繁殖是否對生態造成危害
食蚊魚	所有齡期	可捕食的蚊子幼蟲數量較高	須定期管理及餵養，否則易造成魚類死亡

柒、未來應用

在本實驗發現渦蟲可在野外有效的抑制蚊幼蟲，但未了解是否有減少成蚊密度，需要設計實驗，比較投放前後成蚊密度是否有減少，來確定渦蟲防治成效所以未來可以嘗試大範圍的投放渦蟲，再參照疾管局登革熱病媒蚊指數，探討渦蟲在大範圍中抑制蚊幼蟲效果：參照衛生福利部疾病管制署

登革熱病媒蚊指數代表登革熱病媒蚊之密度，有住宅指數、容器指數、布氏指數及成蟲指數。前三種指數代表登革熱病媒蚊幼蟲期(含蛹)之多寡，而後一種指數代表登革熱病媒蚊成蚊之密度。此四種指數之定義及計算方法如下：

一、住宅指數：調查 100 戶住宅，發現登革熱病媒蚊幼蟲孳生戶數之百分比。

計算方法： $\text{陽性戶數} / \text{調查戶數} \times 100\%$

二、容器指數：調查 100 個容器，發現登革熱病媒蚊幼蟲孳生容器之百分比。

計算方法： $\text{陽性容器數} / \text{調查容器數} \times 100\%$

三、布氏指數：調查 100 戶住宅，發現登革熱病媒蚊幼蟲孳生陽性容器數。

計算方法： $\text{陽性容器數} / \text{調查戶數} \times 100$

四、成蟲指數：每一戶住宅平均登革熱病媒蚊雌性成蟲數。

計算方法： $\text{雌性成蟲數} / \text{調查戶數}$

本研究建議未來可嘗試將渦蟲投放於不可移除水域中（如水耕地景等），或農田的儲水器進行野外防治，提升民眾配合度，也可以加入未來登革熱和屈公病防治宣導手冊當中。

捌、未來展望

- 一、持續探討渦蟲投放於野外防治可能性。
- 三、確認渦蟲黏液中幾丁質分解酶活性。
- 四、利用冷凍組織切片渦蟲捕食蚊幼蟲組織。
- 五、利用 PAS 染石蠟切片，了解渦蟲捕食蚊幼蟲機制。
- 六、野外防治水質檢測可利用多因子變異數分析。

玖、參考文獻

一、科展、小論文、期刊

- (一) 王琳雅、郭應廷 (2016)。中華民國第 56 屆中小學科學展覽會作品說明書：「孑」地任務－渦蟲捕食白線斑蚊幼蟲之生物防治評估。
- (二) 王琳雅 (2018)。2018 年臺灣國際科展展覽會研究報告：「孑」戰關鍵－台灣淡水渦蟲捕食蚊幼蟲機制及其黏液探討。
- (三) 周少筠、許予昀、鄧子昱 (2016)。中華民國第 56 屆中小學科學展覽會作品說明書：埋伏的殺手——陸生渦蟲掠食與捕蚯蚓行為。
- (四) 徐亦萱 (2019)。2019 年臺灣國際科展展覽會研究報告：驚爆「膠」點－虎紋三角渦蟲黏液分析及功能推測。
- (五) 宮紹凱 (2008)。不同品系金黃色葡萄球菌與大腸桿菌對低分子量幾丁質聚醣敏感差異性及抗菌機制之初步研究 (碩士論文)。取自臺灣博碩士論文系統。
- (六) 陳澤葳 (2019)。中華民國第 59 屆中小學科學展覽會作品說明書：難以「孑」擇－淡水渦蟲對食物記憶與捕食行為
- (七) 唐僑志、李昱甫、劉希哲、廖奕翔 (2005)。中華民國第 45 屆中小學科學展覽會作品說明書：身首異處，記憶猶存！？
- (八) 黃靖博 (2014)。中華民國第 54 屆中小學科學展覽會作品說明書：攔截記憶碼－探討渦蟲的學習與記憶
- (九) 鍾承典 (2018)。2018 年臺灣國際科展展覽會研究報告：Social child labor?－Preliminary study of non-cocooning silk from larvae of Gray-Black Spiny ant, *Polyrhachis dives*(Hymenoptera Formicidae)

- (十) Ali, A. R. S. H. A. D., & Mulla, M. S. (1983). Evaluation of the planarian, *Dugesia dorotocephala*, as a predator of chironomid midges and mosquitoes in experimental ponds. *MOSQ. NEWS.*, 43(1), 46-49.
- (十一) Case, T. J., & Washino, R. K. (1979). Flatworm control of mosquito larvae in rice fields. *Science*, 206(4425), 1412-1414.
- (十二) Dixit, S., Bulnes, V. N., & Raghunathan, C. (2018). Neotype Designation for the Marine Flatworm, *Acanthozoon alderi* (Polycladida: Cotylea: Pseudocerotidae), from India with Comments on the Taxonomical Status of the Genus. *Zoological Studies*, 57(45).
- (十三) Ferrari, A. R., Gaber, Y., & Fraaije, M. W. (2014). A fast, sensitive and easy colorimetric assay for chitinase and cellulase activity detection. *Biotechnology for biofuels*, 7(1), 37.
- (十四) Fried, B., & Grigo, K. L. (1977). Histochemical, thin-layer chromatographic, and histochemical analyses of neutral lipids in the planarian *Dugesia dorotocephala* (Turbellaria). *Transactions of the American Microscopical Society*, 530-532.
- (十五) Fischer, A. H., Jacobson, K. A., Rose, J., & Zeller, R. (2008). Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *Cold spring harbor protocols*, 2008(5), pdb-prot4986.
- (十六) Kotikova, E. A., Raikova, O. I., Reuter, M., & Gustafsson, M. K. S. (2002). The nervous and muscular systems in the free-living flatworm *Castrella truncata* (Rhabdocoela): an immunocytochemical and phalloidin fluorescence study. *Tissue and Cell*, 34(5), 365-374.
- (十七) Melo, A. S., & Andrade, C. F. S. (2001). Differential predation of the planarian *Dugesia tigrina* on two mosquito species under laboratory conditions. *Journal of the American Mosquito Control Association-Mosquito News*, 17(1), 81-83.
- (十八) Morita, N., Inaba, K., & Saito, Y. (2018). Post-Embryonic Development and Genital-Complex Formation in Three Species of Polyclad Flatworms. *Zoological science*, 35(1), 28-39.
- (十九) Perkins, C., & Fried, B. (1982). Intraspecific pairing of planaria, *Dugesia tigrina* and *Dugesia dorotocephala* (Platyhelminthes: Turbellaria), and observations on lipophilic excretory-secretory worm products. *Journal of chemical ecology*, 8(6), 901-909.
- (二十) Tanabe, T., Kawase, T., Watanabe, T., Uchida, Y., & Mitsutomi, M. (2000). Purification and characterization of a 49-kDa chitinase from *Streptomyces griseus* HUT 6037. *Journal of bioscience and bioengineering*, 89(1), 27-32.
- (二十一) Welsh, J. H., & King, E. C. (1970). Catecholamines in planarians. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 36(4), 683-688.
- (二十二) Winsor, L. (1991). Methods for taxonomic and distributional studies of terrestrial flatworms (*Tricladida: Terricola*). *Hydrobiologia*, 227(1), 349-352.

二、網站

(一) 冷凍切片之原理與使用

<http://www2.nsysu.edu.tw/Bio/images/commen/fro-sec-imm-his-ex10409.pdf?fbclid=IwAR1Uad3FJC2xFAKz5igjIqg0ykA4JfHN9WaN6paieXdVeumFtDYV-bKLggg>

(二) 討登革熱經費舊公文複製貼上 高市衛生局坦承忙中有錯。2019 年，9 月，取自

<https://news.ltn.com.tw/news/politics/breakingnews/2840448?fbclid=IwAR3D3hyJiwDJXRKEk9su7DXKbmq6lyBBYgOOdcKCKQ7VkhkQm2aHVMekN00>

(三) 境外移入登革熱病例主要自東南亞，民眾出國旅遊嚴加防範。2019 年，9 月，取自

https://www.cdc.gov.tw/Category/ListContent/z3lni_hN8XQhdqusEuKQA?uaid=7Gjo13LLvzBenW8bsNdurg

(四) 衛生福利部疾病疾病署

<https://nidss.cdc.gov.tw/ch/SingleDisease.aspx?dc=1&dt=2&disease=061>

https://www.cdc.gov.tw/Category/ListContent/0BhRQWTf3QSkAys2TE_qQg?uaid=BGrMYW2LrvhzFjT5xxgrPw

(五) H&E (Haematoxylin and Eosin) Staining for Frozen Tissue Sections

https://pages.jh.edu/~adlerlab/protocols/histo_HE.pdf

(六) TLC Stains

<http://umich.edu/~mssgroup/docs/TLCStains.pdf>

【評語】 050010

1. 此作品以生物防治為目標，探討渦蟲獵食蚊子幼蟲的潛力及其黏液中幾丁質分解酶活性。
2. 實驗設計周延，結果呈現清楚，但研究報告書中圖十八的圖標顏色與數據點的顏色不符。
3. 組織學方面，石蠟切片的結果很清楚，值得鼓勵。除了未來可繼續進行的冷凍組織切片外，應可考慮用 SEM 觀察渦蟲咽部和黏液腺體及蚊子幼蟲受黏液消化後的表皮組織損傷情形。
4. 4 因為此研究為評估渦蟲在蚊子幼蟲防治上的生物防治應用，可增強渦蟲在此應用上的優缺點比較與論述。