

# 2022 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 050005

參展科別 動物學

作品名稱 水熊蟲於化學環境壓力耐受機制探討

**Tolerance mechanisms of Tardigrade under  
chemical environmental stresses**

得獎獎項 三等獎

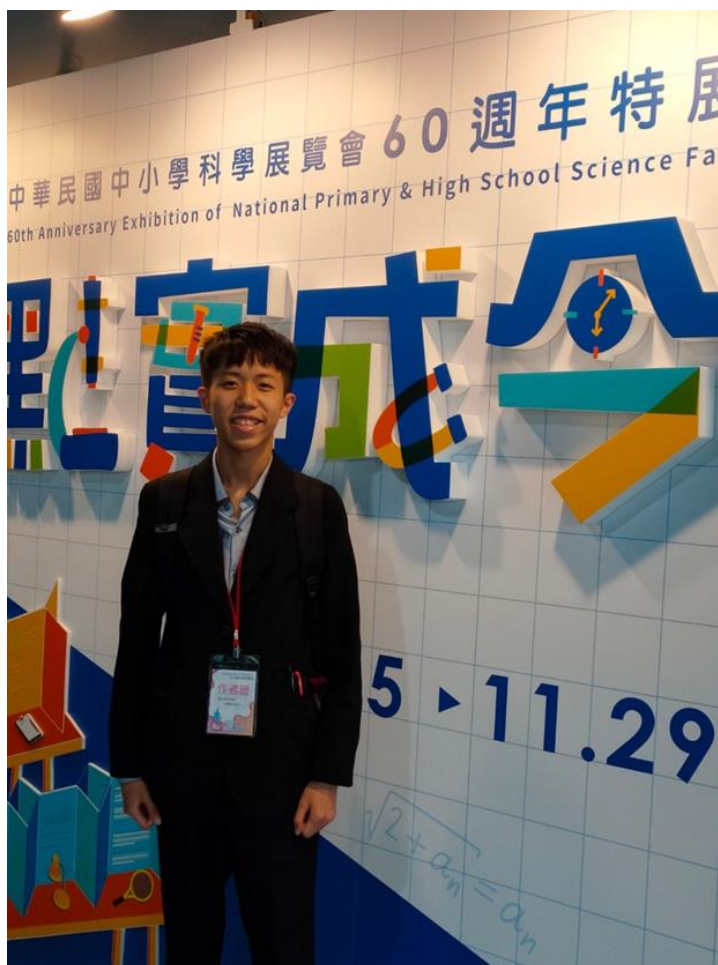
就讀學校 新北市私立竹林高級中學

指導教師 顏嘉怡

作者姓名 顏健弘

關鍵詞 大生熊蟲、化學環境壓力、模式生物

## 作者簡介



我是顏健弘，來自新北市竹林高中。自國三開始進行科展研究，還記得第一次的比賽時在初審就落敗，雖然挫折但我仍持續花時間查找文獻與改良實驗內容，獲得市賽特優並拿到國展佳作，最後踏上國際科展這個高手雲集的殿堂。專題研究這條路雖然不好走，要付出許多時間學習新知，但過程中一定能獲得許多寶貴經驗與能力，也接觸了值得我學習的各界強者。一路上感謝父母的支持讓我能體驗不一樣的高中生活，嘉怡老師和科展學長姐犧牲假日陪伴我挑戰各個比賽，中研院吳漢忠老師、蔡怡陞老師與實驗室學長姐提供實驗資源，新北市教育局提供經費，培訓團書平教授、仁理老師與永達教授給我研究方向和建議，謝謝陪伴我成長的大家！期許自己能持續保有科學熱忱面對未來各項挑戰！

## 摘要

常見模式生物檢測化學環境壓力後無法重複使用。本研究探討對環境變化敏感的大生熊蟲抗化學環境壓力機制，評估其作為重複使用模式生物可行性。得知多數大生熊蟲於硝酸鹽、酸鹼值改變與殺蟲劑環境壓力下仍能活動或隱生。以亞甲藍簡易染色可確認化學環境壓力下大生熊蟲是否受傷害，如體表角質層被破壞會導致完全染色。分析大生熊蟲於常見硝酸鹽環境壓力下體內脂質含量、總蛋白質單體表現量與總抗氧化能力，推測出大生熊蟲對抗硝酸鹽環境壓力機制：1.藉由> 20 kDa 持續性活化蛋白抗硝酸鹽環境壓力。2.活動大生熊蟲增加體內脂質含量隔絕環境硝酸鹽。3.隱生大生熊蟲以抗氧化系統降低硝酸鹽產生的氧化壓力傷害。以上結果得知大生熊蟲具潛能檢測常見化學環境壓力並作為重複檢測之模式生物。未來將持續評估大生熊蟲可檢測的化學環境壓力並為人類健康把關。

## Abstract

Common model organisms can't be reused after testing under environmental stresses. To assess the feasibility of *Macrobiotus* sp. as a model organism for repeated detection under chemical environmental stresses, the present study tried to figure out the tolerance mechanisms of *Macrobiotus* sp. under chemical environmental stresses. Results showed that most of *Macrobiotus* sp. could still active or enter cryptobiosis during exposure to nitrate, pesticides such as Permethrin, and pH value between 5 and 7. Methylene blue staining can determine whether tardigrades were injured under chemical stresses. If the cuticle was damaged, the tardigrade would be colored. Further, the lipid content, polypeptide and Total Antioxidant Capacity (TAC) of *Macrobiotus* sp. under nitrate were analyzed in this study. The following mechanisms of nitrate tolerance were speculated according to the results: 1. *Macrobiotus* sp. resists nitrate stress with >20 kDa constitutive activated proteins. 2. Active *Macrobiotus* sp. increases lipid content in the body in order to isolates the nitrate stress. 3. *Macrobiotus* sp. in the cryptobiotic state use antioxidant system to reduce the oxidative stress produced by nitrates. Based on the above results, *Macrobiotus* sp. had high potential as a model organism for the detection of common chemical stresses. In the future, we will prove whether *Macrobiotus* sp. can be used as a model organism for repeated detection under chemical environmental stresses.

## 壹、研究動機

環境壓力 (environmental stresses) 易導致生態系物種組成與數量改變，生物體暴露於環境壓力下會造成生理損傷、疾病誘發甚至死亡。來源大致分為氣候壓力源 (climatic stressors)、物理壓力源 (physical stressors)、化學壓力源 (chemical stressors) 以及生物壓力源 (biological stressors)。隨著當代工業與農業快速發展，空污氣體、重金屬與殺蟲劑等物質形成的化學壓力在環境中最常見也對人體最具影響。雖然不會立即造成毒性效應，但長時間暴露仍可能引發心血管、腸胃神經等相關疾病 (Freedman, 2015)。模式生物除了用於探討特定的生命現象或機制，近年來，更藉由其對環境壓力敏感特性應用於檢測環境中的化學壓力 (黃, 2015)，預防人體不經意長期接觸化學環境壓力。

評估環境壓力時一般選擇對壓力敏感的生物進行檢測，如：日本沼蝦 (*Macrobrachium nipponense*) 應用於檢測水中常見重金屬 (Yang, 2014)，水蚤 (*Daphnia magna*) 作為檢測農藥與殺蟲劑的模式生物 (Hussain *et al.*, 2020)。模式生物多以 LC<sub>50</sub> (半數致死濃度) 和 EC<sub>50</sub> (半數效應濃度) 評估環境汙染程度，但常因無法存活或受環境壓力傷害而無法重複使用，違反當代生物倫理 4R 準則中的減量 (Reduction) 與精緻化 (Refinement) (秦, 2012)。為了解決此問題，本研究探討對環境變化敏感的大生熊蟲 (*Macrobiotus sp.*) 於常見化學環境壓力下能否持續活動或進入隱生狀態 (cryptobiosis)，藉此特性重複檢測化學環境壓力，作為符合 4R 準則之模式生物。

過去研究主要探討物理環境壓力如：無重力、高劑量輻射與磁場改變環境下 *Paramacrobiotus richtersi*, *Hypsibius exemplaris*, *Echiniscus testudo*, *Milnesium inceptum* 的耐受程度 (Weronika & Łukasz, 2017; Goldstein, 2018; Erdmann *et al.*, 2021)，但尚未有研究評估水熊蟲能否作為檢測化學環境壓力之模式生物，且相較物理環境壓力，人類在日常更容易暴露於化學環境壓力如：蔬菜殘留的氮肥硝酸鹽易致癌 (Ward *et al.*, 2018)，飲用水中過量銅離子導致肝、腎損害 (ATSDR Online, 2004)。因此本研究初期評估了 6 種化學環境壓力 (NaCl、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Sb<sup>3+</sup>、pH 變化與 SO<sub>2</sub>)，發現水熊蟲於 5 種化學環境壓力 (NaCl、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、Sb<sup>3+</sup>、pH 與 SO<sub>2</sub>) 具重複檢測潛能，且實驗後仍可正常活動，與其他生物相比為大生熊蟲作為模式生物的最大優勢 (顏, 2021)。本研究將進一步探討常見化學環境壓力對大生熊蟲更長時間 (2、24

與 48 小時) 的急性毒性效應，以建立大生熊蟲模式生物系統。

確認大生熊蟲可檢測的化學環境壓力後，本研究接續探討其能否重複檢測環境壓力以符合 4R 準則。初期研究藉由大生熊蟲在化學環境壓力下的存活率與 EC<sub>50</sub> 評估重複檢測潛能，但無法確認其是否受傷，因此本研究使用簡易染色（亞甲藍液）初步判別大生熊蟲受化學壓力傷害程度，評估其作為重複檢測模式生物之可行性。

Wright 於 1988 發現 *Macrobiotus hufelandi* & *Hypsibius dujardini* 在物理乾燥環境下隱生時，體表會有脂質堆積，推測能防止體內水分散失並隔絕外在惡劣環境，但尚無研究指出水熊蟲受化學環境壓力影響時，是否也能藉由脂質堆積隔絕壓力傷害，因此本研究利用油紅 O 檢測大生熊蟲於化學環境壓力下體內脂質並分析其含量，確認隱生機制。

除了觀察水熊蟲在隱生時體表組織變化 (Wright, 1988)，亦有文獻探討不同物種水熊蟲正常活動與乾燥隱生時抗逆境蛋白與抗氧化酵素基因表現量 (Boothby *et al.*, 2015; Hashimoto *et al.*, 2016; Kamilari *et al.*, 2019)，但尚無研究探討水熊蟲在化學環境壓力下體內產生的抗逆境蛋白質或抗氧化系統。另外，不同物種水熊蟲對抗環境壓力的基因 (stress related genes) 表現量也會有所差異 (Kamilari *et al.*, 2019)，進而影響其耐受程度。因此本次研究將探討大生熊蟲在化學環境壓力下，不同活動狀態總蛋白質單體表現量與總抗氧化能力，推測是否能藉特定蛋白質抵抗化學環境壓力造成之傷害。未來也將進一步探討水熊蟲作為模式生物之可行性，評估其應用範疇，確認是否符合生物倫理，作為第 1 道防線協助人類評估化學環境壓力劑量或汙染，預防長期暴露而引發疾病。

## 一、文獻探討

### (一) 水熊蟲隱生簡介

水熊蟲面對逆境時進入隱生狀態以降低環境壓力傷害，不同環境壓力下水熊蟲隱生時的抗壓力機制也有所差異，如：乾燥環境下，*Adorybiotus coronifer* 藉由海藻糖 (trehalose) 取代水分保護體內分子結構 (Westh and Ramløv, 1991)，*Richtersius coronifer* 於體表堆積脂質防止水分散失 (Wright, 1988)；*Hypsibius dujardini* 在低溫環境使用 CAHS 蛋白防止水分子結冰破壞細胞膜 (Boothby *et al.*, 2017)。目前對水熊蟲隱生機制的了解多僅限於物理壓力（乾燥與低溫等），而本研究主要探討隱生大生熊蟲在化學硝酸鹽環境壓力下的抗逆境機制。

## (二) 模式生物 (model organism) 用途

研究基於生物倫理考量，不適合以人體或脊椎動物進行實驗，因此多以模式生物的特性：易取得、生命力強以及獨特生理機制進行實驗。隨著環境化學汙染日益嚴重，近年來模式生物常用於探討不同化學物質對其急性毒性效應，並進一步應用於環境毒壓力檢測為人體健康把關（許，2009）。

## (三) 模式生物相關名詞定義 (LC<sub>50</sub> 與 EC<sub>50</sub> 定義參考環保署環保統計名詞定義)

### 1. 半數致死濃度 (Lethal Concentration 50%，簡稱 LC<sub>50</sub>)

施用化學物質濃度導致 50% 實驗生物無法存活，此數據主要應用於水生生物毒理研究。

### 2. 半數效應濃度 (Effective Concentration 50%，簡稱 EC<sub>50</sub>)

施用化學物質濃度導致 50% 實驗生物產生存活率改變、畸形、生長受抑制、酵素活性改變等效應。為了適合本實驗的模式生物，本研究參考 Hygum 於 2017 的研究將 EC<sub>50</sub> 定義為：影響 50% 實驗總隻數的大生熊蟲於實驗後存活率之環境壓力濃度。

### 3. 半數隱生濃度 (Bio-Cryptobiosis Concentration 50%，簡稱 BCC<sub>50</sub>)

BCC<sub>50</sub> 為本研究評估環境壓力是否誘導大生熊蟲進入隱生狀態所定義的新名詞，定義為施用化學物質濃度導致 50% 實驗總隻數的大生熊蟲進入隱生狀態。

## (四) 環境中常見化學環境壓力與污染介紹

下列內容介紹本研究使用的常見化學環境壓力對環境以及人體影響。

### 1. 硝酸鹽 (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)

農業化肥與生活污水等含氮物質經硝化作用後降解成水中常見的鹽汙染：硝酸鹽 (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)。過量硝酸鹽使水體酸化、優養化以及溶氧量降低，對水中生物造成傷害（彭，2009）。蔬菜與飲用水中的硝酸鹽經人體攝取後，於體內還形成亞硝酸鹽與亞硝胺，過量的亞硝酸鹽會導致紅血球運輸氧氣功能降低使細胞組織缺氧，亞硝胺則易造成肝病變與消化系統疾病 (Ward *et al.*, 2018)，因此世界衛生組織建議人體每日硝酸鹽 (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) 攝入量安全參考值為 3.7 mg/kg。一般檢測硝酸鹽含量常以硝酸鹽氮 (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N) 濃度作為依據。硝酸鹽氮 (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N) 是指硝酸根 (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) 離子中的氮含量，通常氮佔硝酸根離子的 22.6 %。

## 2. 銻 ( $\text{Sb}^{3+}$ )

工業領域中，「銻」主要作為 PET 寶特瓶聚合過程的催化劑 ( $\text{C}_6\text{H}_9\text{O}_6\text{Sb}$  與  $\text{Sb}_2\text{O}_3$ )，第 2 代半導體產業使用的銻化銦 ( $\text{InSb}$ )與銻化鎵 ( $\text{GaSb}$ )則應用於紅外線探測儀以及發光二極體的製作。工業銻廢水進入河川或被土壤吸收後，對水中藻類與土壤農作物形成毒害影響其生長，當人體透過食物鏈從農產品攝取過量的銻則易引發腸胃相關疾病，長期接觸則誘發致癌，因此法令規範飲用水中銻濃度須低於 0.01 ppm，若大於 0.1 ppm 則定義為銻汙染，其汙染源多為汙水處理廠與礦區周遭水域等 (何與萬，2004)。

## 3. 銅 ( $\text{Cu}^{2+}$ )

隨著工業發展，銅 ( $\text{Cu}^{2+}$ ) 常用於抑菌劑與電池製造等行業。銅在環境中不易被分解，水中過量的銅會對水生生物造成毒害，土壤中的銅與礦物質和有機物結合後，抑制氮化作用，導致植物無法吸收氮磷養分而影響生長。銅亦是人體所需的微量元素之一，正常人每日建議攝取的銅含量為 0.9 mg，當攝取過量銅汙染之食品則會引發胃抽筋、腹瀉、肝與腎損傷等症狀，慢性銅中毒效應可能導致死亡 (ATSDR Online, 2004)。

## 4. 酸鹼值變化

環境酸鹼值變化壓力多數來自酸雨。雨水正常酸鹼值為 pH 6.5~5，當空污氣體：二氧化氮 ( $\text{NO}_2$ ) 與二氧化硫 ( $\text{SO}_2$ ) 溶於雨水中後會改變雨水酸鹼值，使雨水 pH<5 即定義為酸雨。酸雨滲入農地易使土壤中的有害重金屬如：汞與鎘溶出，並在作物吸收後經由食物鏈進入人體，影響人體健康 (行政院環境保護署)。

## 5. 殺蟲劑

殺蟲劑的農業用途為防治害蟲。農業與園藝業等從業人員長時間暴露於殺蟲劑如：百滅寧 (Permethrin)環境壓力下，易導致麻痺、過敏、頭痛、嘔吐、昏迷及抽筋等症狀，人體每日接觸百滅寧的安全劑量為 0.05 mg/kg (Casida *et al.*, 1983)。本實驗使用的百滅寧為昆蟲的神經軸突興奮毒素，進入昆蟲體內後打開細胞膜上的鈉離子通道增加傳導功能(鄭，2017)，使得神經系統過於興奮、最後麻痺致死。一般農業常以 0.003~0.01 %百滅寧防治鱗翅目昆蟲 (如紋白蝶與小菜蛾) 食用作物。

## (五) 常見檢測環境壓力之模式生物 (表 1)

水中無脊椎生物如：秀麗隱桿線蟲 (*Caenorhabditis elegans*)、虎斑猛水蚤 (*Tigriopus japonicus*)、與日本沼蝦 (*Macrobrachium nipponense*)常用於檢測環境中的重金屬、化學農藥與肥料汙染 (沈, 2012; 黃, 2015) (Chen& Yang, 2007; Sucahyo *et al.*, 2008; Yang, 2014)。相較於上述的模式生物，水熊蟲在過去研究僅用於探討物理環境壓力 (乾燥、無重力、輻射等) 對其影響 (Erdmann *et al.*, 2021; Goldstein, 2018; Jonsson, 2007; Weronika& Łukasz, 2017)。而本研究初步發現，以大生熊蟲 (*Macrobiotus sp.*)作為模式生物不但能檢測工業污染中的銅 ( $\text{Cu}^{2+}$ )環境壓力，更具潛能重複檢測氯化鈉 ( $\text{NaCl}$ )、硝酸鹽 ( $\text{NO}_3^-$ )、銻 ( $\text{Sb}^{3+}$ )、二氧化硫 ( $\text{SO}_2$ ) 以及酸鹼值變化這 5 種環境壓力。

表 1 水熊蟲與當代常見水中無脊椎模式生物

模式生物	主要應用領域	檢測環境壓力種類	特色	參考文獻
水熊蟲	太空環境 極端溫度	輻射、真空、磁場變化、乾燥、低溫、高溫	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 損傷抑制蛋白具潛能應用於人體降低輻射壓力傷害。</li> <li>2. 有助於了解多細胞生物於太空環境生存極限。</li> </ol>	Erdmann <i>et al.</i> , 2021 Goldstein, 2018 Jonsson, 2007 Weronika&Łukasz, 2017
線蟲	細胞凋亡	二水重鉻酸鈉、氯化鉀、pH	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 遺傳背景清楚。</li> <li>2. 生命週期短。</li> <li>3. 蟲體半透明易觀察。</li> </ol>	李等, 2013 Goldstein, 2018
水蚤	農藥汙染 水溫變化	重金屬 氮、氫汙染	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 繁殖週期短。</li> <li>2. 對環境變化敏感 (溫度、光週期和毒物)。</li> <li>3. 海洋水蚤有助於了解重金屬對海洋生物影響。</li> </ol>	沈, 2012 Hussain <i>et al.</i> , 2020
沼蝦	農藥汙染 半導體重金屬	重金屬、類金屬 氮、氫汙染	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 分布廣泛。</li> <li>2. 有助於了解半導體重金屬汙染程度。</li> </ol>	Chen& Yang, 2007 Sucahyo <i>et al.</i> , 2008 Yang, 2014



## (六) 當代生物實驗倫理準則 (4R 準則) (秦, 2012)

**取代 (Replacement)**分為相對取代與絕對取代。相對取代強調使用較低等的生物進行實驗；絕對取代則著重於使用非動物進行研究；**減量 (Reduction)**為盡可能減少實驗動物的使用量；**精緻化 (Refinement)**為將實驗生物置於最適合環境進行實驗，降低其實驗中受到的傷害與痛苦；**負責 (Responsibility)**強調以將心比心態度對待實驗生物，並對實驗生物、科學實驗及社會大眾對實驗生物的期待負責。

## (七) 自由基與生物體抗氧化機制簡介 (圖 1)

自由基易搶奪生物體內其他分子的電子，導致組織以及細胞被氧化造成疾病、老化與細胞組織受損 (王, 2014)。當生物體接觸高溫、輻射、環境污染以及化學物質等環境壓力時容易形成過量自由基，除了誘發疾病也會造成 DNA 突變 (黎與曾, 2007; 王, 2014) (Valko *et al.*, 2004)，如硝酸鹽在體內容易轉變成具強氧化性的自由基一氧化氮。常見的自由基包括：過氧化氫 ( $H_2O_2$ )、超氧化物 (superoxide,  $O_2^-$ )、過氧化物自由基 (peroxy radical,  $ROO\cdot$ ) 與氫氧自由基 (hydroxy radical,  $\cdot OH$ )。

為降低自由基造成危害，生物體內的酵素抗氧化系統 (如：觸酶與超氧化物歧化酶) 與非酵素抗氧化系統 (如：維生素 C、E、 $\beta$  胡蘿蔔素與麩胱甘) 除了減少活性氧與自由基生成，同時也藉由氧化還原的方式將自由基毒性降低。本研究將藉由總抗氧化能力分析實驗，探討大生熊蟲在硝酸鹽環境壓力下，是否能藉抗氧化系統降低氧化壓力傷害。

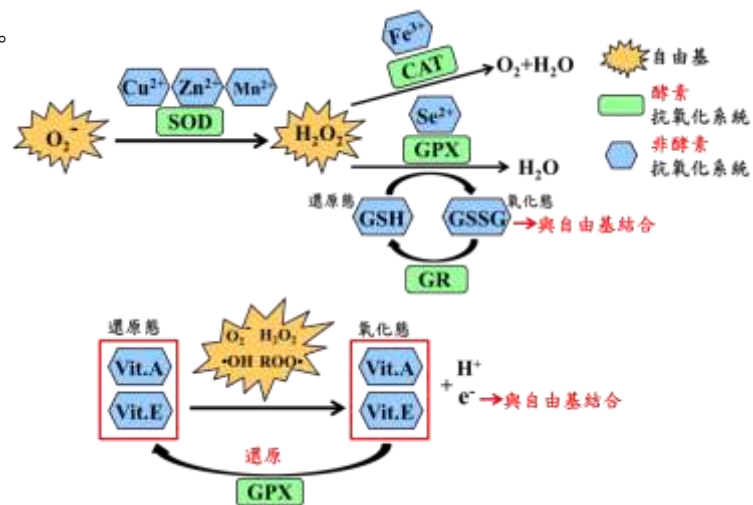


圖 1 抗氧化系統作用機制示意圖 (作者自行繪製)

## (八) 水熊蟲環境壓力耐受基因表現量分析

過去研究對水熊蟲在正常活動 (Hygum, 2017; Kamilari *et al.*, 2019; Hashimoto *et al.*, 2016; Koutsovoulos *et al.*, 2016) 與物理乾燥壓力下隱生 (Hashimoto *et al.*, 2016) 的轉錄組 (transcriptome) 進行測序，統整出不同水熊蟲的耐受相關基因 (stress related genes) 表現量 (表 2)，推測水熊蟲能藉由抗逆境蛋白在環境壓力下穩定細胞的結構，或使用酵素抗氧化系統減

輕自由基傷害。另外推測不同水熊蟲耐受基因表現量不同，導致不同物種在環境壓力下的耐受程度有所差異 (Kamilari *et al.*, 2019)。本研究實際藉由總蛋白質與抗氧化能力分析實驗，初步探討大生熊蟲在硝酸鹽環境壓力下，是否以特定蛋白質或抗氧化酵素降低壓力傷害。

表 2 不同物種水熊蟲耐受基因表現量

基因種類/水熊蟲物種 (活動狀態)	<i>E. sigismundi</i> (正常活動)	<i>R. coronifer</i> (正常活動)	<i>R. varieornatus</i> (乾燥隱生/正常活動)	<i>H. exemplaris</i> (正常活動)
<b>抗逆境蛋白</b>				
LEA 蛋白	—	5	3	9
熱休克蛋白 HSP	—	56	65	59
損傷抑制蛋白 Dsup	—	0	23	32
冷休克蛋白 CSP	—	1	0	0
<b>抗氧化</b>				
超氧化物歧化酶(SOD)	70	8	14	17
觸媒 (CAT)	0	0	4	4
鈣胱甘肽過氧化酶 (GPX)	154	2	1	1
參考文獻	Hygum, 2017 Kamilari <i>et al.</i> , 2019		Hashimoto <i>et al.</i> , 2016 Koutsovoulos <i>et al.</i> , 2016	

Hygum 於 2017 研究中 *Echiniscoides sigismundi* 的基因表現量以 FPKM (Fragments Per Kilobase of transcript per Million) 表示。過往研究中的基因表現量以 TPM (Transcripts per million) 表示 (Kamilari *et al.*, 2019; Hashimoto *et al.*, 2016 & Koutsovoulos *et al.*, 2016)。FPKM = total fragments/mapped reads (millions) × exon length(KB)。TPM = (total exon reads/exon length)/(∑ mapped reads/exon length)

## 貳、研究目的

- 一、評估常見化學環境壓力（硝酸鹽、酸鹼值變化與殺蟲劑）對大生熊蟲的 2、24 與 48 小時的急性毒性效應。
- 二、利用簡易染色（亞甲藍液）評估常見化學環境壓力（硝酸鹽、酸鹼值變化與殺蟲劑）是否對大生熊蟲造成傷害。
- 三、探討大生熊蟲對抗硝酸鹽環境壓力機制
  - （一）以油紅 O 檢測不同活動狀態體內脂質含量。
  - （二）分析不同活動狀態的總蛋白質單體表現量差異。
  - （三）探討不同活動狀態的總抗氧化能力。

## 參、研究設備及器材

### 一、實驗動物簡介—大生熊蟲 (*Macrobiotus* sp.) (圖 2)

#### (一) 水熊蟲簡介

水熊蟲為緩步動物門 (Tardigrada) 的俗稱，現今世界的水熊蟲物種共有 1298 種 (Degma, 2019)，而台灣已知的水熊蟲物種則有 26 種(陰等, 2011)(Ito, 1990; Leong, 2019; Li & Li, 2008; Mathews, 1937; Séméria, 1994)。根據其棲息環境主要分為海生的異緩步綱水熊蟲以及陸生的真緩步綱水熊蟲，不同物種的水熊蟲對於環境壓力耐受程度有所差異，如 *Milnesium*

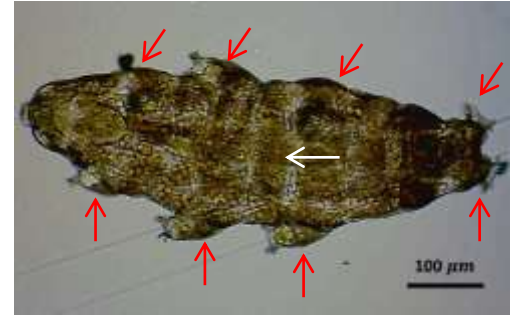


圖 2 大生熊蟲

紅色箭頭處為足，白色箭頭處為體腔。

*tardigradum* 能在高溫壓力下 (100 °C) 持續活動 (Hengherr *et al.*, 2009)。對環境變化敏感的大生熊蟲科 (Macrobiotidae) 在環境壓力下則會進入隱生狀態。本研究自新北市南勢角山的捲葉濕地苔 (*Hyophila involute*) 採集實驗動物，經二叉檢索表、形態特徵矩陣與分子生物定序鑑種後，發現對環境變化敏感的大生熊蟲 (*Macrobiotus* sp.) 為在地生活圈數量最多的物種，因此本研究以大生熊蟲作為實驗動物 (顏, 2021)。

#### (二) 大生熊蟲形態

大生熊蟲具有爪子的 4 對足，頭部可觀察到口器構造。成蟲平均體長 200~700 μm (Altiero *et al.*, 2006)。本研究使用體長 300~500 μm 的大生熊蟲進行實驗。

#### (三) 培養方式

本研究將大生熊蟲置於含有原生環境水樣的 2% 洋菜膠培養基培養。光照週期 12 小時。每日根據其雜食性特性，餵食輪蟲、線蟲、蘚苔植物的假葉與土壤中的藻類，並更換培養基內的食物與原生環境水樣。

## 二、實驗藥品與器材

### (一) 化學壓力影響實驗藥品

名稱	備註
ddH <sub>2</sub> O	-
NaNO <sub>3</sub>	購自 SHIMAKYU CHEMICAL
百滅寧 (Permethrin)殺蟲劑	購自瑞芳植物保護股份有限公司
10X PBS buffer	購自費司生技
Sb <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	—
CH <sub>3</sub> COOH	
NaOH	購自景明化工
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	

### (二) 大生熊蟲組織染色藥品

名稱	備註
ddH <sub>2</sub> O	-
Methylene blue	購自景明化工
Oil Red O	
Isoproponal	
Ethanol	購自 SIGMA
4% Paraformaldehyde in PBS	
Hematoxylin	

### (三) SDS-PAGE 使用器材、藥品及配方

名稱	廠牌
1X Running buffer	
4X Sample Loading Buffer	自行配置
Lysis buffer	
Ethanol	購自 SIGMA
Waver shaker	購自 Major Science
Ultrasonication system	購自 Diagenode
離心機	購自 Beckman
Silver stain protein ladder (10–250 kDa)	
迷你垂直式電泳槽	購自 BIO-RAD
電源供應器	
乾浴槽	購自 Thermo
冷光影像分析系統	購自 UVP
SilverQuest™ Staining kit	購自 invitrogen

#### 1X Running buffer

藥品	使用量
Tris base	3 g
Glycine	14.4 g
SDS	1 g
ddH <sub>2</sub> O	加至 1 L

#### 4X Sample Loading Buffer

藥品	使用量
Laemmli Sample Buffer	1900 μL
2-Mercaptoethanol	100 μL

#### Lysis buffer

藥品
30 mM Tris, pH8.5
8 M Urea
4 % CHAPS
10 mM EDTA
0.1% SDS

#### SilverQuest™ Staining Kit

藥品
Destainer A
Destainer B
Sensitizer
Developer
Developer Enhancer
Stopper

#### (四) T-AOC Assay Kit 使用器材、藥品及配方

名稱	廠牌
Buffer Solution	
TPTZ Solution	
Substrate Solution	購自 Elabscience
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O Standard	
Microplate	
Homogenization medium	自行配置
ELISA reader	購自 Bio Tek

#### Homogenization medium

藥品
0.01 M PBS, pH7.4
5.6 mM sucrose

#### (五) BCA method 使用器材與藥品

名稱	廠牌
Reagent A	購自 Thermo
Reagent B	
ELISA reader	購自 Bio Tek

#### (六) 其他器材

名稱	廠牌
Cat Eye 三眼實體顯微鏡	購自 瑞光儀器
倒立顯微鏡	購自 ZEISS
複式顯微鏡	購自 Motic
Wifi CMOS 彩色相機	
塑膠培養皿	購自 ExtraGene

## 肆、研究過程及方法

### 一、實驗架構圖（圖 3）

本研究目標為評估大生熊蟲能否藉由對化學環境壓力的耐受性，作為重複檢測之模式生物，並探討其在化學環境壓力下的耐受機制。初期研究（顏，2021）發現大生熊蟲為在地生活圈數量最多物種，且其對環境變化敏感，具潛能檢測 5 種化學環境壓力，而銅離子環境壓力對其造成不可逆傷害。本研究進一步以環境中最常見化學壓力：硝酸鹽、酸鹼值變化及殺蟲劑進行 2~48 小時急性毒性效應實驗，以簡易染色實驗觀察其是否受傷，了解大生熊蟲重複利用之可行性。最後以脂質染色、蛋白質與抗氧化分析實驗，了解大生熊蟲對抗常見硝酸鹽壓力耐受機制。

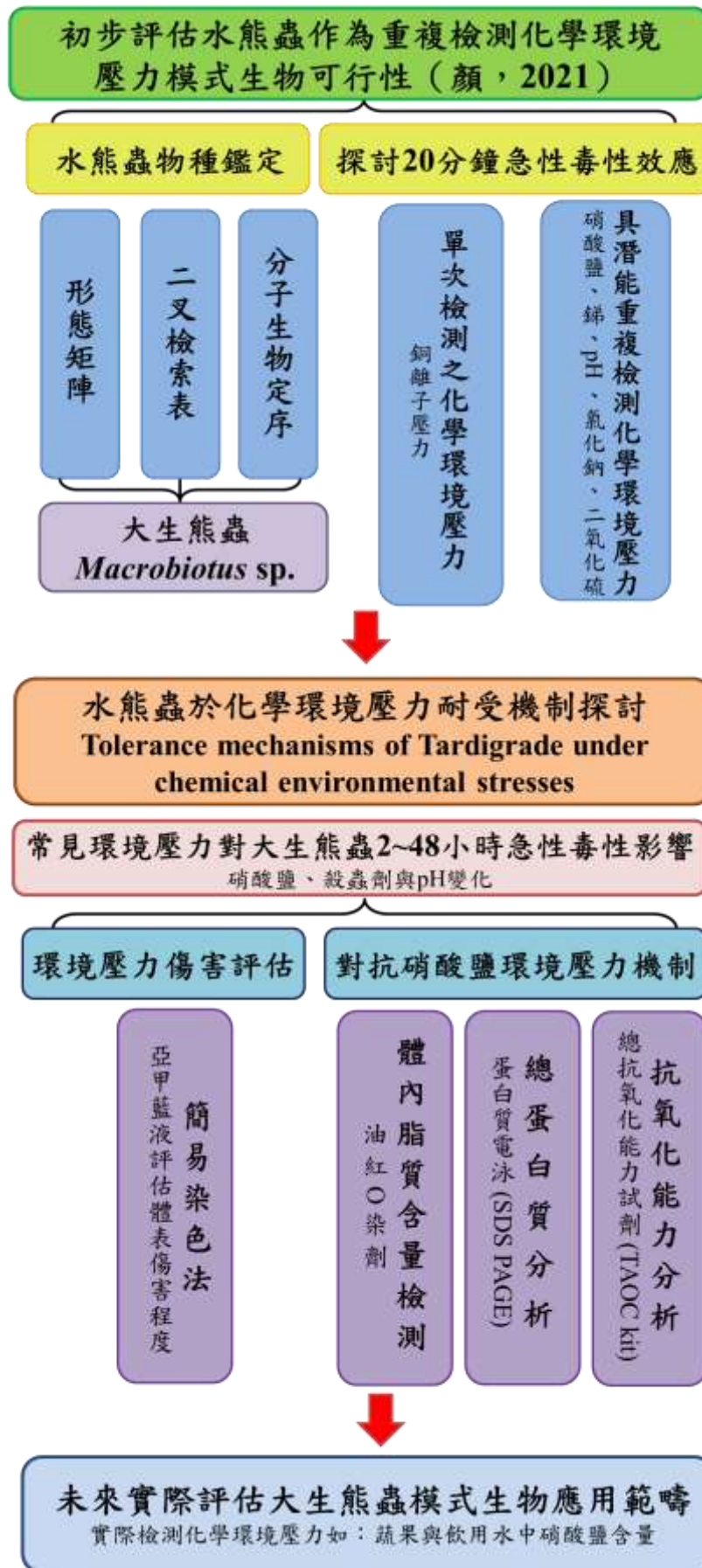


圖 3 研究架構圖



## 二、水熊蟲活動狀態定義

本研究將大生熊蟲在實驗中的各種狀態進行定義（表 3）。實驗結束後將大生熊蟲置於原生水樣，並於 24 小時後再次觀察其活動狀態，若大生熊蟲置於原生水樣超過 24 小時仍無正常活動跡象則定義其為無法存活。

表 3 實驗中水熊蟲活動狀態定義

活動狀態	定義
正常活動（圖 4a）	任一對足運動收縮。
完全隱生（圖 4b）	體腔與 4 對足完全收縮，形態成酒桶狀。
不完全隱生（圖 4c）	體腔收縮，任一對足未向內收縮則定義為不完全隱生。
蛻皮隱生（圖 4d）	體腔與 4 對足向內收縮成隱生狀態，能明顯觀察到皮蛻。
無法存活（圖 4e）	體腔與 4 對足拉長。

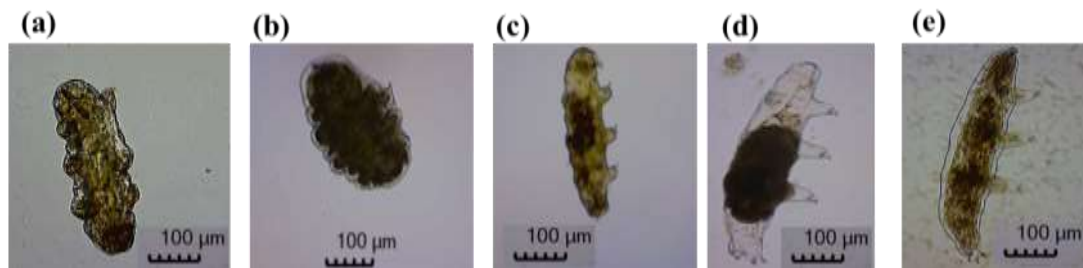


圖 4 水熊蟲活動狀態

(a)為正常活動。(b)為完全隱生。(c)為不完全隱生。(d)為蛻皮隱生。(e)為無法存活。

## 三、評估評估常見化學環境壓力對大生熊蟲的 2~48 小時急性毒性效應（表 4）

先前研究初步發現大生熊蟲於化學環境壓力下具重複檢測之潛能，本研究進一步探討硝酸鹽、酸鹼值變化及殺蟲劑在不同壓力時間點（2、24 及 48 小時）下對大生熊蟲急性毒性效應，評估其作為模式生物檢測常見化學環境壓力的可行性。

表 4 常見化學環境壓力 2~48 小時急性毒性效應實驗條件

環境壓力種類	實驗濃度	使用藥品
硝酸鹽 $\text{NO}_3^-$	100、200、1000 mg/L $\text{NO}_3^-$ -N	$\text{NaNO}_3$
殺蟲劑	0.003、0.005、0.01 %	Permethrin
酸鹼值變化	pH 5 與 pH 4.5	AcOH

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

#### (一) 實驗組

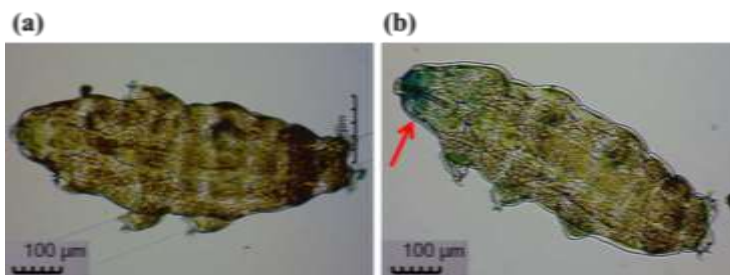
1. 取 10 隻正常活動的大生熊蟲，拍攝其於原生水溶液中活動狀態。
2. 以 dH<sub>2</sub>O 將其清洗 3 次並置於玻片中，根據表 4 緩慢加入 200  $\mu$ L 實驗溶液。
3. 於不同壓力時間點（2、24 及 48 小時）記錄大生熊蟲不同環境壓力下活動狀態。
4. 將大生熊蟲 dH<sub>2</sub>O 清洗 3 次並進行染色，評估其是否受環境壓力傷害（染色步驟見**四、不同環境壓力下的大生熊蟲進行簡易染色**）。
5. 將染色後大生熊蟲再次以 dH<sub>2</sub>O 清洗 3 次，置於含有藻類與食物的原生水樣中 24 小時後記錄存活率。1 天後將玻片上水熊蟲移至培養基，每隔 2 天觀察活動狀態，共 2 週。
6. 藉由死亡率、隱生率以及實驗 1 天後存活率，使用統計軟體 GraphPad Prism 9.1.2 分析其在不同環境壓力下 BCC<sub>50</sub>、EC<sub>50</sub> 以及 LC<sub>50</sub>。

(二) 對照組：將大生熊蟲置於 dH<sub>2</sub>O 持續觀察直至實驗結束。

#### 四、不同環境壓力下的大生熊蟲進行簡易染色

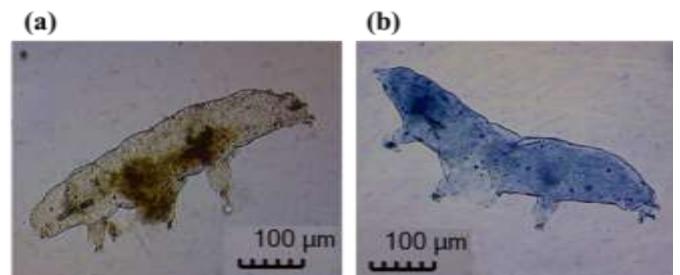
初期研究僅藉由大生熊蟲實驗後與再次實驗後存活率推斷其是能否重複檢測環境壓力，但水熊蟲即使存活，實驗過程中亦可能受到傷害。因此本實驗進一步以亞甲藍液簡易染色，評估不同化學環境壓力是否對大生熊蟲體表造成傷害。

使用未受環境壓力傷害正常活動與體表有傷口並且死亡的大生熊蟲進行預備實驗，發現正常活動大生熊蟲僅有口器被染色（圖 5b），由此推測水熊蟲主要藉由口器將外在物質攝入體內。體表受傷的大生熊蟲接觸亞甲藍液後其身體每個部位皆被染色（圖 6b）。



**圖 5 正常活動大生熊蟲簡易染色結果**

(a)為染色前狀態。(b)為染色後的大生熊蟲，箭頭處為可觀察到染劑呈色的口器。



**圖 6 體表受傷大生熊蟲簡易染色結果**

(a)為染色前狀態。(b)為染色後的大生熊蟲。

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

### (一) 實驗組

1. 當不同環境壓力（硝酸鹽、酸鹼值變化與殺蟲劑）達到化學環境壓力時間點時，將壓力下的大生熊蟲以 dH<sub>2</sub>O 清洗 3 次。
2. 將大生熊蟲置於 200 μL 染劑（亞甲藍液：dH<sub>2</sub>O = 1：1）下 1 分鐘。
3. 染色後以 dH<sub>2</sub>O 清洗大生熊蟲，使用複式顯微鏡和倒立顯微鏡觀察是否染色成功。

### (二) 對照組

#### 1. 體表受傷大生熊蟲

初期研究得知銅離子對大生熊蟲造成不可逆傷害，因此以銅離子環境壓力下無法存活的大生熊蟲作為受傷對照組，同實驗組染色步驟進行簡易染色。

#### 2. 對正常活動大生熊蟲簡易染色。

## 五、大生熊蟲對抗環境壓力機制分析

初期研究（顏，2021）發現大生熊蟲接觸 5 種化學環境壓力 20 分鐘後會隱生，並在實驗後恢復正常活動。目前結果發現硝酸鹽環境壓力下可觀察到大生熊蟲的所有活動狀態(表 3)，且硝酸鹽為最常見化學環境壓力之一，因此接下來實驗將探討大生熊蟲於硝酸鹽壓力下抗逆境機制。

### (一) 檢測脂質含量探討大生熊蟲在硝酸鹽環境壓力下隱生機制是否與乾燥隱生相同

前人探討大生熊蟲屬的 *Macrobiotus hufelandi* 在物理環境壓力—乾燥隱生時的表皮組織變化，發現相較於正常活動，其在乾燥隱生時表皮最外層脂質含量會增加，此機制可能使水熊蟲在乾燥環境隱生時與外界物質隔絕並降低水分散失以達到保護作用 (Baccetti and Rosati, 1971)。因此本研究嘗試以油紅 O 染色檢測乾燥隱生與硝酸鹽環境壓力下的大生熊蟲體內脂質含量，確認大生熊蟲是否增加脂質含量隔絕硝酸鹽傷害。

**步驟** (n = 30 ; Bio = 10 ; Tech = 3)

#### 實驗組

- (1) 實驗達到硝酸鹽環境壓力影響時間點時，將大生熊蟲以 dH<sub>2</sub>O 清洗 3 次。
- (2) 以 4% Paraformaldehyde 固定樣本 1 小時，並使用 60 % 異丙醇浸泡樣本 5 分鐘脫水。

- (3)將大生熊蟲避光置於油紅 O 染劑下染色 15 分鐘，並在染色後重新以 dH<sub>2</sub>O 清洗。
- (4)細胞或組織的脂質經油紅 O 染色後呈現橘紅色，以複式顯微鏡和倒立顯微鏡確認大生熊蟲是否染色成功。
- (5)使用 ImageJ 分析油紅 O 橘紅色呈色面積與範圍，分析時以對照組正常活動水熊蟲的 color threshold 數值為基準進行分析，依下方公式計算出油紅 O 呈色面積占體表總面積百分比。

$$\text{油紅 O 呈色面積占體表總面積百分比 (\%)} : \frac{\text{油紅 O 呈色面積}}{\text{樣本體表總面積}} \times 100 \%$$

### 對照組

同實驗組染色步驟，對正常活動與乾燥隱生的大生熊蟲進行染色。

- (二) 初步分析大生熊蟲於 200 & 1000 mg/L 硝酸鹽氮環境壓力下的總蛋白質單體差異 (n = 30 ; Bio = 10 ; Tech = 3)。

### 1. 樣本配置與處理方式

根據大生熊蟲於硝酸鹽環境壓力下的活動狀態初步分成 5 個組別進行總蛋白質分析 (表 5)。樣本加入 Lysis buffer 後，使用超音波破碎儀 (ultrasonication system) (4 °C，強度設定 High，時間間隔 30 秒，10 次循環共 10 分鐘) 打破樣本抽取總蛋白，最後於 4 °C 以 14000 rpm 離心 10 分鐘。

表 5 實驗樣本配置與描述

樣本名稱	樣本狀態描述
正常活動組 (對照組)	10 隻未經歷硝酸鹽環境壓力的正常活動大生熊蟲。
壓力接觸 1 小時 (實驗組)	10 隻接觸硝酸鹽環境壓力 1 小時的大生熊蟲。
壓力活動組 (實驗組)	達到硝酸鹽環境壓力影響時間點，10 隻處於正常活動的大生熊蟲。
壓力隱生組 (實驗組)	達到硝酸鹽環境壓力影響時間點，10 隻處於隱生狀態的大生熊蟲。
壓力死亡組 (實驗組)	達到硝酸鹽環境壓力影響時間點後無法存活的大生熊蟲 10 隻。

### 2. 以蛋白質電泳分離不同活動狀態的大生熊蟲總蛋白質單體

使用 10 % SDS gel 進行電泳實驗，分離硝酸鹽環境壓力下不同活動狀態大生熊蟲 (表 5) 20~220 kDa 總蛋白質單體，以 BSA 為正對照組，比較不同活動狀態的大生熊蟲蛋白質單體分子量與表現量是否有差異。

### **SDS-PAGE 步驟** (n = 30 ; Bio = 10 ; Tech = 3)

- (1)將樣本（表 5）與 4X Sample Loading Buffer 以 3：1 的比例加入微量離心管，並使用震盪器與微量離心機充分混和。
- (2)混合後的樣本使用乾浴槽以 100 °C 加熱 10 分鐘。
- (3)吸取樣本注入膠體凹洞，並以 90 V 進行電泳 110 分鐘，分離不同分子量的蛋白質單體。
- (4)使用 SilverQuest Staining kit 將膠片進行銀染，並以 ImageJ 分析蛋白質單體色帶面積與亮度，最後使用 Excel 推算蛋白質單體濃度（分析方法參考 徐，2019）。

$$\text{樣本組別蛋白質單體濃度 } (\mu\text{g/mL}) : \text{已知濃度} \times \frac{\text{樣本蛋白質單體面積}}{\text{已知濃度蛋白質單體面積 (BSA)}}$$

### **(三) 探討大生熊蟲於硝酸鹽環境壓力下的總抗氧化能力** (n = 30 ; Bio = 10 ; Tech = 3)

初期研究推測銅離子環境壓力導致大生熊蟲體內產生大量自由基，並藉由抗氧化系統降低自由基引發的氧化壓力，亦有文獻發現海生水熊蟲 *E. sigismundi* 具有抗氧化酶的轉錄本 (transcript)，推測其功能為對抗銅離子產生的氧化壓力傷害 (Hygum, 2017)。因此本實驗將藉由總抗氧化物呈色分析套組 (T-AOC Kit)，以鐵離子還原/抗氧化力 (FRAP)分析法，探討大生熊蟲在硝酸鹽與環境壓力下的總抗氧化能力是否提升以降低氧化壓力傷害。

#### **FRAP method 原理**

酸性環境下，淡藍色的鐵離子螯合物 ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ)可被抗氧化劑還原成深藍色的亞鐵離子螯合物 ( $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ)，藉由測定  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ 的  $\text{OD}_{593}$  可分析酵素抗氧化系統與非酵素抗氧化系統的總抗氧化能力。

#### **T-AOC Assay Kit 分析步驟** (n = 30 ; Bio = 10 ; Tech = 3)

##### **1. 反應試劑配置**

##### **(1)FRAP working solution**

將 T-AOC 分析套組中的試劑以 Buffer Solution: TPTZ Solution: Substrate Solution=10: 1: 1 的比例混和，並靜置於避光條件下反應 2 小時。

##### **(2)Standard solution**

將  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (s)溶於  $\text{dH}_2\text{O}$  中配置成 100 mmol/L  $\text{FeSO}_4$ ，接著將  $\text{FeSO}_4$  溶液以  $\text{dH}_2\text{O}$  稀釋成下列濃度：0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.8, 2.1, 2.5 mmol/L，並使用 ELISA reader 測定  $\text{OD}_{593}$ 。最後以

OD 值為 x 軸，標準品濃度為 y 軸繪製出標準曲線圖。

## 2. 樣本處理方式

- (1)將表 5 中不同活動狀態樣本與 homogenization medium 以 1:1 混和，並使用超音波破碎儀（4 °C，強度設定 Low，時間間隔 3 秒，持續 10 分鐘）打破樣本組織。
- (2)將組織在 4 °C 以 10000 rpm 離心 10 分鐘，接著取上清液以 BCA method 測定其蛋白質濃度。

## 3. 蛋白質濃度測定

### BCA method 步驟

- (1)以牛血清蛋白 (BSA)作為標準品，將 2000  $\mu\text{g/mL}$  BSA 稀釋為 1000, 500, 200, 100, 10, 1  $\mu\text{g/mL}$  BSA。
- (2)將 Reagent A 與 Reagent B 以 50 : 1 混合，製備 working solution。
- (3)將不同濃度 BSA 與 working solution 以 20 : 1 混合，靜置 30 分鐘反應。
- (4)測量混和後溶液的 OD<sub>562</sub>，繪製出蛋白質標準曲線圖。

### 樣本蛋白質濃度測定步驟

- (1)樣本經超音波破碎處理後與 BCA working solution 以 1 : 20 的混和，靜置 30 分鐘反應。
- (2)測量樣本與 BCA working solution 反應後的 OD<sub>562</sub>，以內插法計算蛋白質濃度。

## 3. 總抗氧化能力測定

- (1)於檢測盤的 blank well, standard wells & samples wells 分別加入 5  $\mu\text{L}$  的 ddH<sub>2</sub>O, Standard solution 以及樣本上清液。接著將 180  $\mu\text{L}$  的 FRAP working solution 注入所有的 wells。
- (2)檢測盤置於 37 °C 的環境下 3~5 分鐘，接著測定所有 wells 的 OD<sub>593</sub>，並依據 standard wells OD<sub>562</sub> 繪製標準曲線。

4. 樣本總抗氧化能力計算 依據下方公式可求出樣本的抗氧化能力。

$$\text{公式：總抗氧化能力 T-AOC (mmol/gprot)} = (\Delta A_{593} - b) \div a \times f \div C_{pr}$$

a 為標準曲線斜率。b 為標準曲線截距。 $\Delta A_{593}$  為  $OD_{\text{Sample}} - OD_{\text{Blank}}$ 。

f 為試驗前樣本稀釋係數。 $C_{pr}$  為樣本蛋白質濃度 (gprot/L)。

## 六、數據分析

以 T 檢驗 (T-test)或單因子變異數 (One-way ANOVA)進行分析， $p < 0.05$  為顯著差異 (\*),  $p < 0.01$  為極顯著差異 (\*\*).

## 伍、研究結果與討論

### 一、探討化學環境壓力對大生熊蟲急性毒性效應影響 (表 6)

使用未經環境壓力的大生熊蟲進行初次實驗，並以初次實驗後 7 天的同一組樣本進行重複實驗，初步探討 6 種化學環境壓力 (NaCl、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N、pH、Sb<sup>3+</sup>、SO<sub>2</sub> 與 Cu<sup>2+</sup>) 對其 20 分鐘急性毒性效應，發現大生熊蟲在 NaCl、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N、pH、Sb<sup>3+</sup> 與 SO<sub>2</sub> 環境壓力下無論初次或重複實驗其 BCC<sub>50</sub> 皆無顯著差異 ( $p > 0.05$ )，且實驗後 1 天超過 70 % 的大生熊蟲皆能恢復正常活動。另一個實驗結果發現大生熊蟲在 4 ppm Cu<sup>2+</sup> 20 分鐘環境壓力下無法存活，1~3 ppm Cu<sup>2+</sup> 環境壓力重複實驗後大生熊蟲也皆無法存活 (顏, 2021)。根據 20 分鐘急性毒性效應實驗結果，進一步探討 3 種常見化學環境壓力 (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N、pH 與殺蟲劑) 對大生熊蟲 2、24 與 48 小時急性毒性效應影響，發現其在 pH 4.5 2 小時環境壓力下無法存活，於 1000 mg/L NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 24 小時壓力下存活率為 27 %，其他常見化學環境壓力濃度下 (100~200 mg/L NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N; pH5 & 0.003~0.01 % 殺蟲劑) 大生熊蟲則維持正常活動或進入隱生狀態，並在實驗後持續存活。

表 6 不同化學環境壓力對大生熊蟲急性毒性效應 (n = 30 ; Bio = 10 ; Tech = 3)

化學壓力	20 分鐘 BCC50/LC50 (僅銅離子壓力)	2 小時 BCC50	24 小時 BCC50	48 小時 BCC50	20 分鐘 EC50	24 小時 EC50	48 小時 EC50
NaCl 0.15-0.3-0.6 與 0.9 %	初次實驗 0.64 (0.61-0.67) % 重複實驗 0.62 (0.59-0.66) %	ND	ND	ND	存活率>97 %	ND	ND
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N 100、200、1000、1500 與 2000 mg/L	初次實驗 1126 (1067-1189) mg/L 重複實驗 1143 (1049-1246) mg/L	339.5 mg/L	308.7 mg/L	244.9 mg/L	存活率>85 %	100-200 mg/L 存活率>83 % 1000 mg/L 存活率>80 % 存活率 27 %	100-200 mg/L 存活率>80 %
酸鹼值變化 pH 4.5-7	初次實驗 pH 5.08 重複實驗 pH 5.19	pH 5.23	pH 5.31	ND	存活率>86 %	存活率>70 %	ND
Sb <sup>3+</sup> 400、500 與 600 ppm	初次實驗 416 (405-423) ppm 重複實驗 401 (396-411) ppm	ND	ND	ND	存活率>70 %	ND	ND
SO <sub>2</sub> 5000、10000、12500、 18750 與 25000 ppm	初次實驗 6163 (5902-6355) ppm 重複實驗 5777 (5698-5944) ppm	ND	ND	ND	初次實驗 19554 ppm 重複實驗 18652 ppm	ND	ND
Permethrin 殺蟲劑 0.003、0.005、0.01 %	ND	0.057 %	0.009 %	0.003 %	ND	存活率>87 %	存活率>60 %
Cu <sup>2+</sup> 1, 2, 3, 4 ppm	LC50 初次實驗 3.2 ppm 重複實驗 2.4 (2.2-2.6) ppm	ND	ND	ND	初次實驗 2.4 (1.9-2.9) ppm 重複實驗 ND	ND	ND

BCC50 與 LC50 分別為實驗中半數隱生濃度與半數致死濃度，EC50 (半數效應濃度) 則是根據實驗後 1 天活動率推算得知。表中未進行的實驗以 ND 表示無數據。部分壓力實驗後大生熊蟲活動率 > 50 %，無法推算出 EC50 數據，因此以 EC50 以實驗後 1 天存活率表示。

## 實驗討論

### (一) 初步推測大生熊蟲具潛能重複檢測 5 種化學環境壓力

無論是初次實驗或重複實驗的大生熊蟲，在 NaCl、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N、pH、Sb<sup>3+</sup>與 SO<sub>2</sub> 這些環境壓力 20 分鐘急性毒性效應下皆能活動或進入隱生狀態，且實驗後將其置於原生水樣環境也都能正常活動，初步推測具潛能重複檢測環境壓力。但 EC50 數據無法確認實驗後正常活動的大生熊蟲是否受化學環境壓力傷害，需要進一步藉由簡易染色驗證化學環境壓力是否傷害大生熊蟲，以評估其重複使用潛能。

### (二) Cu<sup>2+</sup>環境壓力對大生熊蟲造成不可逆傷害

與其他化學環境壓力相比，部分大生熊蟲即使在 Cu<sup>2+</sup>環境壓力進入隱生狀態，實驗後仍無法存活。從 EC50 數據可得知，大生熊蟲僅能以傳統的 LC50 單次檢測環境 Cu<sup>2+</sup>壓力，無法重複使用。因此後續將以染色實驗評估大生熊蟲在 Cu<sup>2+</sup>環境壓力下的受傷程度，並在未來藉由蛋白質電泳與抗氧化能力分析實驗，比較 Cu<sup>2+</sup>環境壓力與其他化學環境壓力下大生熊蟲的抗逆境機制是否有差異。

### (三) 隱生水熊蟲受環境壓力傷害

大生熊蟲最初接觸硝酸鹽與酸鹼值變化環境壓力時進入隱生狀態，但持續暴露於 pH4.5 24 小時後卻發現其無法存活，在 1000 mg/L NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 24 小時環境壓力僅有 23 % 低存活率。即便是隱生大生熊蟲，長時間暴露於化學環境壓力仍對其造成其傷害，後續將以亞甲藍液染色大生熊蟲，評估化學環境壓力對其體表傷害程度。

### (四) 大生熊蟲具潛能檢測百滅寧殺蟲劑環境壓力

實驗結果發現大生熊蟲受百滅寧殺蟲劑 24 與 48 小時環境壓力影響後，部分樣本進入隱生狀態，且實驗後置於原生水樣環境下依舊可正常活動，具檢測百滅寧殺蟲劑環境壓力的潛能。

### (五) 持續評估其他化學環境壓力對大生熊蟲影響

目前僅進行硝酸鹽、酸鹼值變化與百滅寧殺蟲劑的化學環境壓力影響實驗，未來將持續探討大生熊蟲暴露於銻 2~48 小時的 BCC50、EC50 與 LC50 的數據。



## 二、簡易染色評估常見化學環境壓力（硝酸鹽、酸鹼值變化與殺蟲劑）是否傷害大生熊蟲

### (一) 硝酸鹽環境壓力

於硝酸鹽環境壓力實驗後存活的大生熊蟲染色結果均為未染色（圖 7b），無法存活的樣本均為完全染色（圖 7c）。

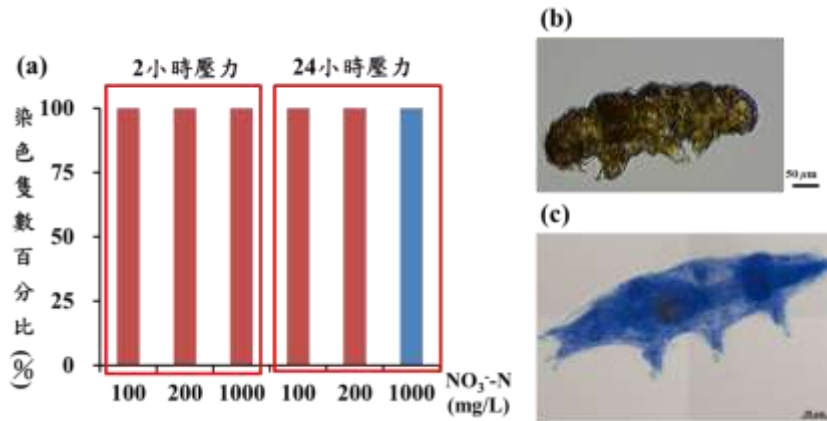


圖 7 大生熊蟲於硝酸鹽環境壓力簡易染色結果 (n = 10 ; Bio = 10 ; Tech = 1)

利用亞甲藍液染色，於倒立顯微鏡下 630X 觀察，並統計不同實驗條件下所有樣本的染色狀態。(a)為不同硝酸鹽濃度壓力下大生熊蟲染色結果百分比。(b)為硝酸鹽環境壓力後未染色活動大生熊蟲。(c)為硝酸鹽環境壓力後完全染色死亡大生熊蟲。

### (二) 酸鹼值變化環境壓力

對 pH 5 在 2 與 24 小時環境壓力實驗中的大生熊蟲進行染色，分別有 93 與 70 % 樣本為未染色（圖 8b）。pH 4.5 在 2 小時環境壓力實驗的染色結果則發現所有樣本為完全染色（圖 8c）。pH 5 2 小時環境壓力下完全染色與未染色樣本百分比具極顯著差異 ( $p < 0.01$ )，pH 5 24 小時環境壓力下完全染色與未染色樣本百分比具顯著差異 ( $p < 0.05$ )。

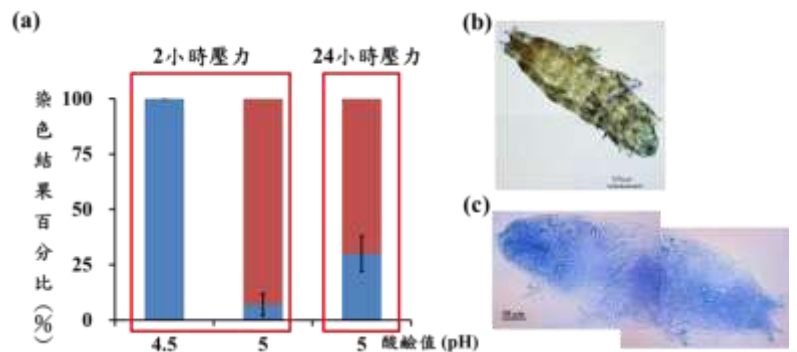


圖 8 大生熊蟲於 pH 環境壓力下簡易染色結果

(n = 30 ; Bio = 10 ; Tech = 3)

利用亞甲藍液染色，於複式顯微鏡下 1000X 觀察，並統計不同實驗條件下所有樣本的染色狀態。(a) 為不同 pH 環境壓力下大生熊蟲染色結果百分比。(b)為 pH 環境壓力後未染色活動大生熊蟲。(c)為 pH 環境壓力後完全染色死亡大生熊蟲。

### (三) 殺蟲劑環境壓力

在不同濃度殺蟲劑 2 小時環境壓力下所有大生熊蟲體表均未被染色，在 0.003、0.005 與 0.01 % 殺蟲劑 24、48 小時環境壓力下，> 70 % 樣本未染色 (圖 9b)，且所有殺蟲劑濃度壓力下，未染色與完全染色樣本百分比具極顯著差異 ( $p < 0.01$ )。

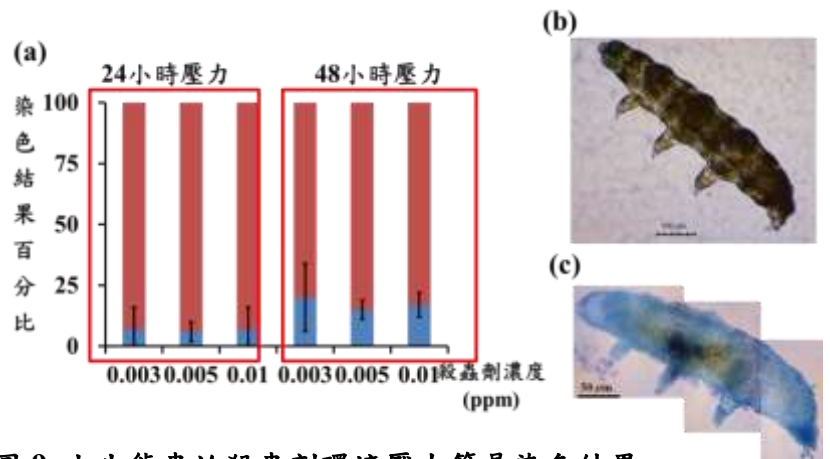


圖 9 大生熊蟲於殺蟲劑環境壓力簡易染色結果

( $n = 30$  ; Bio = 10 ; Tech = 3)

利用亞甲藍液染色，於複式顯微鏡下 1000X 觀察，並統計不同實驗條件下所有樣本的染色狀態。(a) 為不同殺蟲劑濃度壓力下大生熊蟲染色結果百分比。(b) 為殺蟲劑環境壓力後未染色活動大生熊蟲。(c) 為殺蟲劑環境壓力後完全染色死亡大生熊蟲。

### (四) 銅離子環境壓力

1~4 ppm 銅離子 24 小時環境壓力下，所有大生熊蟲皆無法存活，簡易染色後可觀察到未染色、部分染色 (亞甲藍液僅於部份組織呈色) (圖 10c) 與完全染色 (亞甲藍液於樣本所有部位皆呈色) (圖 10d)，隨著銅離子濃度提高，部分染色的百分比逐漸下降，完全染色的百分比則逐漸提升 (圖 10a)。

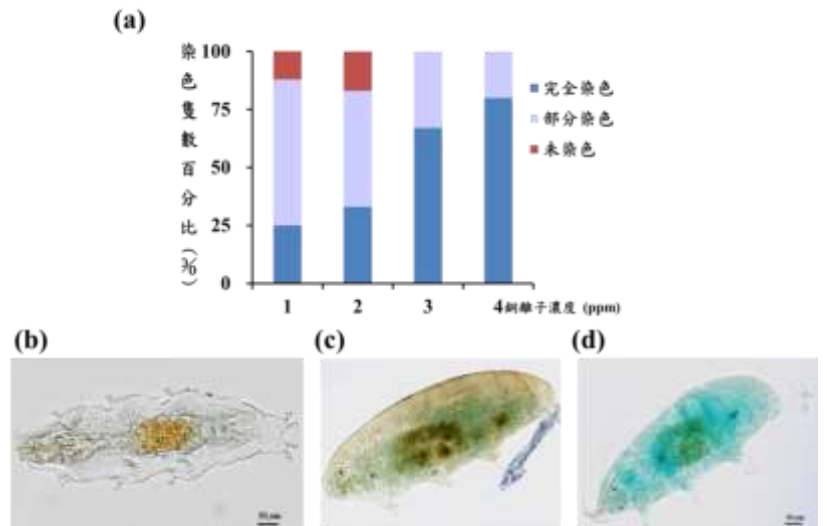


圖 10 大生熊蟲於銅離子環境壓力簡易染色結果

( $n = 10$  ; Bio = 10 ; Tech = 1)

於倒立顯微鏡下 630X 觀察，並統計不同實驗條件下所有樣本的染色狀態。(a) 為樣本經歷 24 小時銅離子環境壓力的染色結果百分比。(b) 為銅離子環境壓力後未染色活動大生熊蟲。(c) 為銅離子環境壓力後部分染色死亡大生熊蟲。(d) 為銅離子環境壓力後完全染色死亡大生熊蟲。

## 實驗討論

### 1. 推測完全染色的水熊蟲如何受到傷害

硝酸鹽、酸鹼值變化與殺蟲劑環境壓力下，無法存活的大生熊蟲皆為完全染色，從圖~的實驗結果可以發現，亞甲藍液在完全染色樣本體內呈色均勻分布，推測化學環境壓力破壞其體表面角質層，導致亞甲藍液完全進入水熊蟲體內均勻染色。為驗證均勻染色是否為體表面角質層破壞所致，本研究將正常活動的水熊蟲浸泡於有機溶劑 100 % 乙醇，使其破壞大生熊蟲體表面角質層，接著以簡易染色進行染色，發現亞甲藍液在大生熊蟲體內均勻呈色（圖 11），推測完全染色的大生熊蟲體表受化學環境壓力破壞。

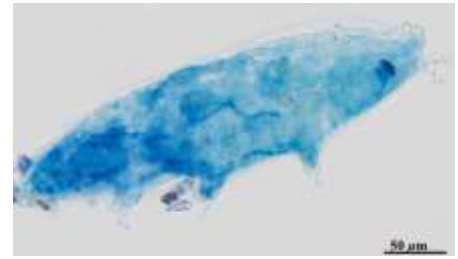


圖 11 對乙醇環境壓力下大生熊蟲進行簡易染色。使用 100 % 乙醇破壞大生熊蟲體表面角質層，並以亞甲藍液對染色，於倒立顯微鏡下 630X 觀察。

### 2. 銅離子濃度影響簡易染色呈色效果

在 1 ppm 銅離子環境壓力下僅有 25 % 大生熊蟲為完全染色，其餘樣本為部分染色或未染色，但隨著銅離子濃度提升至 4 ppm，可觀察到超過 75 % 大生熊蟲完全染色。由此得知不同濃度銅離子對大生熊蟲造成的傷害程度有所不同，推測低濃度壓力下銅離子主要藉由口器部位進入樣本體內造成傷害，高濃度壓力下銅離子則可能改變環境滲透壓使大生熊蟲體表破損，導致 4 ppm 銅離子環境壓力下多數樣本為完全染色。

### 3. 銅離子環境壓力影響大生熊蟲簡易染色呈色效果（圖 12）

相較於硝酸鹽（圖 7）、酸鹼值變化（圖 8）與殺蟲劑環境壓力（圖 9）的深藍色染色結果，銅離子環境壓力下染色的大生熊蟲體表呈色藍綠色（圖 10），並非亞甲藍原液的深藍色。推測此時的亞甲藍液作為還原劑，讓自身氧化後使大生熊蟲體內累積的  $\text{Cu}^{2+}$  還原成綠色的  $\text{Cu}^+$ （圖 12a），因此  $\text{Cu}^{2+}$  還原成  $\text{Cu}^+$  並與氧化的亞甲藍液結合後呈色為藍綠色。

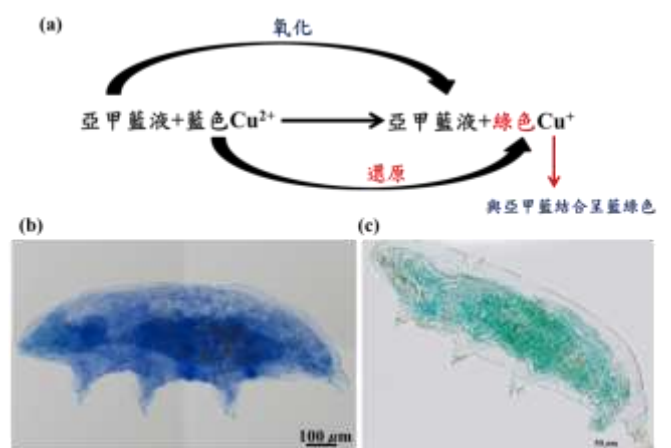


圖 12 常見環境壓力與銅離子環境壓力簡易染色結果。(a) 為銅離子還原過程示意圖。(b) 為 pH5 環境壓力下簡易染色結果。(c) 1 ppm 銅離子環境壓力簡易染色結果。

### 三、大生熊蟲對抗環境壓力機制分析

#### (一) 硝酸鹽環境壓力下體內脂質含量分析

分析油紅 O 於樣本橘紅色呈色面積占體表總面積百分比 (圖 13)，發現 200 mg/L  $\text{NO}_3^-$ -N 24 小時環境壓力下活動的大生熊蟲染色面積百分比則顯著高於 200 mg/L  $\text{NO}_3^-$ -N 1 小時環境壓力下活動的大生熊蟲 ( $p < 0.05$ ) (圖 14c,d)，而同樣為隱生狀態的水熊蟲，乾燥隱生樣本染色面積百分比極顯著高於 200 mg/L  $\text{NO}_3^-$ -N 24 小時環境壓力下隱生的樣本 ( $p < 0.01$ ) (圖 14b,e)。

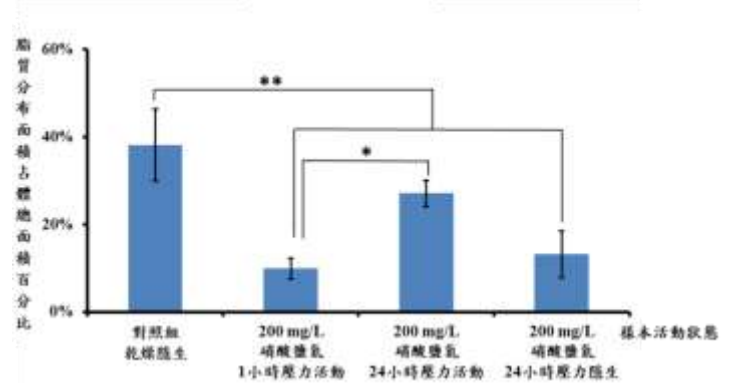


圖 13 大生熊蟲於硝酸鹽環境壓力體內脂質含量。使用 ImageJ 分析不同實驗條件下活動與隱生狀態水熊蟲油紅 O 呈色面積以確認脂質面積占體表總面積百分比 ( $n = 30$ ; Bio = 10; Tech = 3)。以 One-way ANOVA 分析,  $p < 0.05$  (\*) 為顯著差異,  $p < 0.01$  (\*\*) 為極顯著差異。

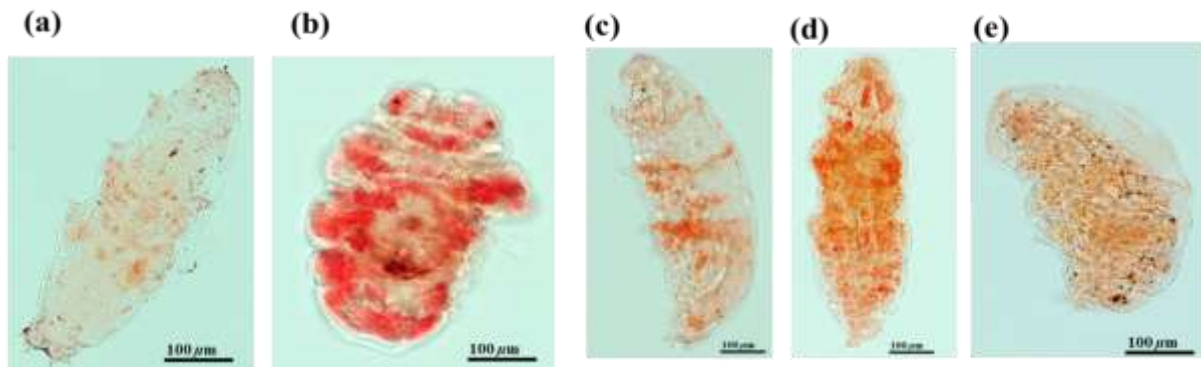


圖 14 大生熊蟲於硝酸鹽環境壓力下體內脂質含量與分布

利用油紅 O 檢測脂質。(a) 為對照組正常活動的大生熊蟲。(b) 為對照組乾燥狀態下隱生的大生熊蟲。(c) 為 200 mg/L  $\text{NO}_3^-$ -N 1 小時環境壓力下活動的大生熊蟲。(d) 為 200 mg/L  $\text{NO}_3^-$ -N 24 小時環境壓力下活動的大生熊蟲。(e) 為 200 mg/L  $\text{NO}_3^-$ -N 24 小時環境壓力下隱生的大生熊蟲。

#### 實驗討論

##### 1. 硝酸鹽環境壓力隱生機制推測

推測活動大生熊蟲在接觸硝酸鹽環境壓力 1~24 小時的過程中，會逐漸增加體內脂質含量，隔絕外在硝酸鹽環境壓力影響。另外發現乾燥環境壓力隱生的樣本呈色面積百分比極顯著高於硝酸鹽壓下隱生的樣本，初步推測大生熊蟲在物理壓力乾燥環境下的隱生機制與化學環境壓力有所差異。後續實驗進一步藉由總蛋白質與抗氧化能力分析探討隱生大生熊蟲對抗硝酸鹽環境壓力機制。

## 2. 嘗試以螢光染劑檢測大生熊蟲脂質分布

一般實驗通常會將組織樣本切片後再進行油紅 O 染色，才能更清楚觀察到染劑於細胞呈色位置。然而對水熊蟲進行組織切片需使用技術較困難的半薄切片 (semi-thin section) 或超薄切片 (ultra-thin section)，因此本研究參考 Hyra *et al.*, 2016 研究使用檢測脂質的 BODIPY493/503 螢光染劑對完整的大生熊蟲個體進行染色，但在預備實驗的過程中發現使用常見螢光物質 (Rhodamine Red, EGFP, DAPI, Cy5 & YFP) 波長照射未染色大生熊蟲體表，皆能激發出其自體螢光 (圖 15)，影響螢光染劑判讀結果。因此未來將嘗試去除樣本自體螢光後以 BODIPY493/503 染色，更準確標定大生熊蟲脂質位置，分析化學環境壓力下不同活動狀態樣本脂質

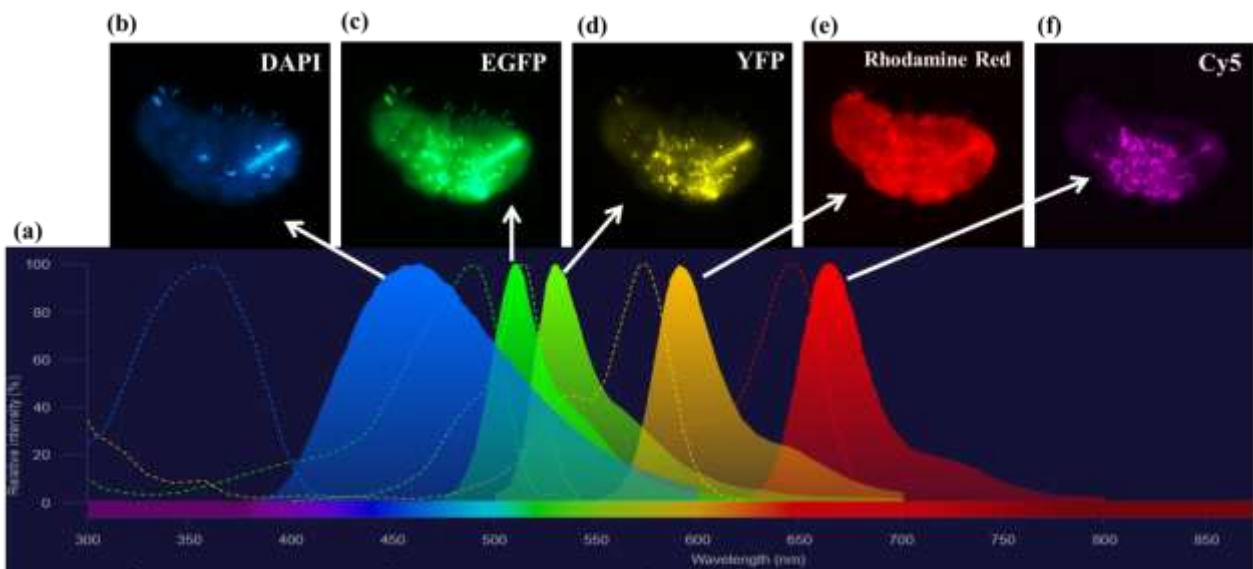


圖 15 大生熊蟲自體螢光

(a) 光譜圖中虛線範圍為激發光 (excitation light) 波長範圍，實線範圍為發散光 (emission light) 波長範圍。  
(b)~(f) 分別使用 DAPI, EGFP, YFP, Rhodamine Red & Cy5 照射正常活動未染色大生熊蟲。

## (二) 初步分析大生熊蟲於 200 mg/L 硝酸鹽環境壓力下的總蛋白質單體差異

以 SDS PAGE 分離大生熊蟲在 200 與 1000 mg/L  $\text{NO}_3^-$ -N 24 小時環境壓力下總蛋白質，銀染呈色後，利用 ImageJ 分析不同蛋白質單體濃度。發現大生熊蟲接觸硝酸鹽環境壓力後，不同活動狀態樣本 20~220 kDa 的蛋白質單體表現量均無顯著差異 ( $p > 0.05$ ) (圖 16)。

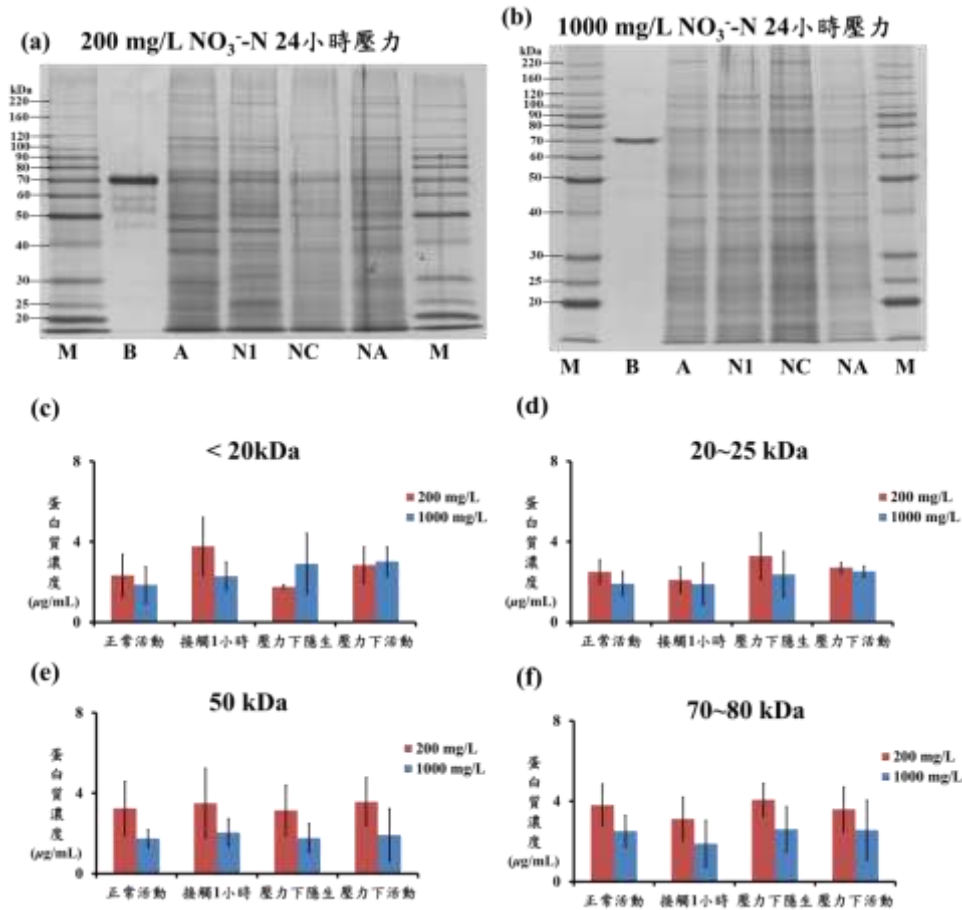


圖 16 以 10 % SDS PAGE 分離大生熊蟲在硝酸鹽環境壓力下總蛋白質單體

(a)與(b)分別為 200 & 1000 mg/L  $\text{NO}_3^-$ -N 24 小時環境壓力銀染分析結果，英文代號為不同樣本組別。M 為分子量 10~220 kDa 蛋白質標準品。B 為對照組 10  $\mu\text{g/mL}$  BSA。A 為活動狀態大生熊蟲。NI 為接觸硝酸鹽環境壓力 1 小時的活動大生熊蟲。NC 為接觸硝酸鹽環境壓力 24 小時的隱生大生熊蟲。NA 為接觸硝酸鹽環境壓力 24 小時的活動大生熊蟲。(c)~(f)使用 ImageJ 分析常見抗氧化酵素分子量的蛋白質單體濃度。

### 實驗討論

實驗初期參考 Ramløv & Westh 於 2001 年的實驗步驟，每一樣本組別使用 60 隻水熊蟲抽取總蛋白質進行分析，發現將 60 隻大生熊蟲的總蛋白質稀釋 10 倍後銀染呈色分析效果最佳，因此後續實驗每一組別樣本改以抽取 10 隻大生熊蟲總蛋白質進行分析。相較於 Ramløv & Westh 於 2001 年的研究使用 Coomassie Blue 染色 SDS-PAGE 膠片分析總蛋白質，本研究使用更靈敏的銀染分析能減少實驗中大生熊蟲的使用量，符合生物倫理強調的減量 (Reduction) 原則。

### (三) 探討大生熊蟲於硝酸鹽環境壓力下的酵素活性測試與總抗氧化能力

對 200 mg/L  $\text{NO}_3^-$ -N 24 小時環境壓力下不同活動狀態的大生熊蟲進行總抗氧化能力分析，發現接觸 200 mg/L  $\text{NO}_3^-$ -N 24 小時隱生的樣本其總抗氧化能力極顯著提升 ( $p < 0.01$ ) (圖 17)。

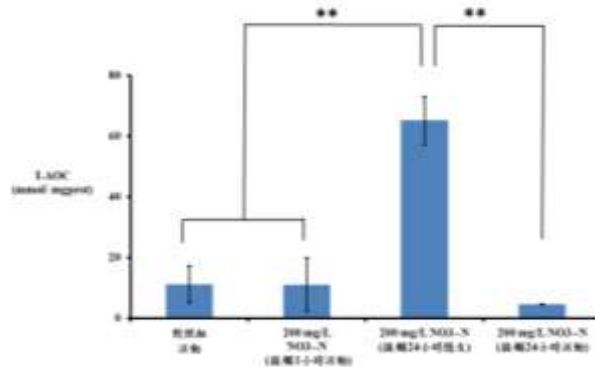


圖 17 大生熊蟲於 200 mg/L  $\text{NO}_3^-$ -N 總抗氧化能力  
使用 TAOC kit 分析樣本於硝酸鹽環境壓力下總抗氧化能力 (TAOC)。以 One-way ANOVA 分析， $p < 0.05$  (\*) 為顯著差異， $p < 0.01$  (\*\*) 為極顯著差異。

### 實驗討論

實驗初期參考 T-AOC Assay Kit 操作手冊將 10 隻大生熊蟲樣本與 homogenization medium 以 1:9 比例混和，並使用水浴式超音波破碎儀以強度 High 打破樣本組織，但 BCA method 結果發現無法測得樣本  $\text{OD}_{562}$  分析蛋白質濃度，推測蛋白質濃度過低導致 FRAP method 無法準確測定樣本總抗氧化能力。因此本研究將樣本與 homogenization medium 改以 1:1 混和和提高蛋白質濃度，並調整超音波破碎儀強度至 Low 避免高功率超音波破壞樣本抗氧化酵素活性，建立大生熊蟲總抗氧化能力分析實驗方法。

## 陸、研究討論

### 一、推測 1000 mg/mL NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 如何傷害大生熊蟲

文獻研究發現陸生水熊蟲 *Halobiotus crispae* 的中腸上表皮細胞具有 SLCO 與 SLC22 這 2 個家族的有機陰離子轉運蛋白 (OAT)，其中 SLCO 主要運輸分子量 > 450 Da 的疏水性有機陰離子，SLC22 負責運輸 < 500 Da 的親水性有機陰離子 (Halberg *et al.*, 2013b)。本研究於初期研究推測大生熊蟲接觸硝酸鹽壓力時，會經由 SLC22 將 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 代謝至體外 (圖 18)，降低硝酸鹽壓力傷害。但 1000 mg/mL NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 24 小時壓力實

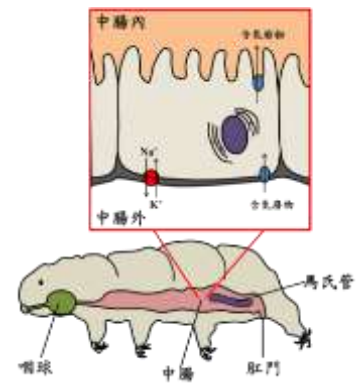


圖 18 水熊蟲代謝硝酸鹽機制 (作者繪製)

驗發現，大生熊蟲雖然在實驗一開始進入皆隱生狀態，但 24 小時後卻有高達 73 % 樣本自隱生轉為無法存活狀態，對其進行亞甲藍簡易染色發現蟲體完全染色。水熊蟲在隱生狀態時體內水分會排出並由海藻糖等物質取代水分保護體內分子結構 (Westh and Ramløv, 1991)。本研究推測大生熊蟲一開始隱生時藉由上述機制使體內滲透壓與硝酸鹽環境滲透壓平衡，但隨時間增加體內可能因海藻糖持續累積轉變為高張環境，再加上大生熊蟲不會以脂質隔絕硝酸鹽環境壓力，導致外在溶液滲入體內使其膨脹與體表破損而無法存活。

### 二、酸鹼值變化壓力對大生熊蟲影響推測

在 pH 值過低的環境下，容易破壞細胞膜內外的質子梯度 (proton gradient)，高濃度氫離子容易驅動過量鈉離子至細胞外，導致水生生物體滲透壓調節失衡 (彭等, 2001)。對 pH4.5 24 小時壓力下死亡大生熊蟲進行簡易染色，結果為完全染色，推測 pH4.5 壓力下大生熊蟲滲透壓調節失衡，導致體表受壓力傷害破損而無法存活。

### 三、大生熊蟲對抗殺蟲劑壓力機制推測

百滅寧 (Permethrin) 殺蟲劑進入昆蟲體內後，藉由打開細胞膜上的鈉離子通道增加傳導功能，使得神經系統過於興奮，最後麻痺昆蟲使其無法存活 (鄭, 2017)。本研究卻發現大生熊蟲於百滅寧殺蟲劑對鱗翅目昆蟲的致死濃度下 (0.003、0.005 與 0.01 %) 有 >80 % 存活率，且存活樣本進行簡易染色結果皆為未染色，推測殺蟲劑壓力下大生熊蟲有隔絕殺蟲劑進入體內的機制，未來將進行油紅 O 染色確認其能否會以脂質隔絕殺蟲劑壓力。



#### 四、銅離子 ( $\text{Cu}^{2+}$ ) 壓力對大生熊蟲造成不可逆傷害

本研究於初期實驗發現，大生熊蟲在 1~3 ppm 銅離子 20 分鐘急性毒性效應下存活率超過 50 %，推測銅離子環境壓力會誘導滲透壓調節酶與抗氧化酵素降低銅離子造成的氧化壓力或滲透壓失衡傷害 (Hygum, 2017)。但本研究進一步實驗發現 1~4 ppm 銅離子 24 小時壓力下大生熊蟲無法存活。從簡易染色結果可發現 1~2 ppm 銅離子下多數為部分染色；3~4 ppm 銅離子下多數為完全染色，推測 1~2 ppm 銅離子壓力主要由口器進入大生熊蟲體內造成氧化壓力傷害，當濃度提升至 3~4 ppm 時除了誘發氧化壓力，亦可能影響滲透壓平衡使樣本體表受損，導致亞甲藍液進入體內均勻染色。另外低濃度銅離子雖然能作為輔因子提升 SOD（超氧化物歧化酶）活性清除自由基傷害（黎與曾，2007；王，2014），但文獻指出長時間接觸高濃度銅離子仍可能使 SOD 超過其正常歧化能力極限，或銅離子與其他金屬離子（如：鋅與錳）競爭抗氧化酵素接合位並抑制其作用（蔣，2009），導致大生熊蟲於無法降低銅離子傷害而無法存活。因此本研究未來將對銅離子壓力下的大生熊蟲進行總蛋白質與抗氧化能力分析，確認其抗逆境機制是否作用，實際確認 1~4 ppm 銅離子如何對大生熊蟲造成不可逆傷害。

#### 五、大生熊蟲對抗 200 mg/L $\text{NO}_3^-$ -N 機制推測

##### （一）增加脂質含量隔絕硝酸鹽壓力

水熊蟲的表皮由外至內的主要構造分別為角質層、上表皮、表皮內層、原表皮與表皮（圖 19）。在水熊蟲正常活動的情況下表皮的脂質貯存於表皮內層，在物理乾燥壓力下隱生時則會由載脂蛋白將脂質運輸至表皮最外層的角質層細胞間隙堆積防止水分散失 (Bjørn, 2006; Litwin, 1985; Wright, 1988)。初期研究推測大生熊蟲可能藉由此機制在化學環境壓力下阻隔外界物質以降低傷害，使用油紅 O 檢測脂質後發現，200 mg/L  $\text{NO}_3^-$ -N 24 小時壓力下活動樣本的脂質含量顯著高於對照組正常活動的大生熊蟲 ( $p < 0.05$ )，推測 200 mg/L  $\text{NO}_3^-$ -N 硝酸鹽壓力下活動的大生熊蟲會產生更多脂質，以隔絕硝酸鹽進入體內影響滲透壓平衡造成傷害。對照組

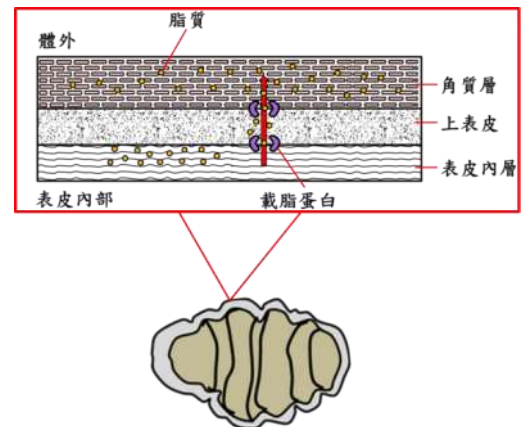


圖 19 隱生水熊蟲表皮構造示意圖  
(作者繪製)

乾燥隱生樣本的脂質含量則是極顯著高於硝酸鹽壓力下隱生的樣本 ( $p < 0.01$ )，推測硝酸鹽壓力下隱生的大生熊蟲藉由其他機制（如抗逆境蛋白或抗氧化系統）對抗此壓力，由此可知同樣為隱生的水熊蟲，仍可能以不同機制降低壓力影響。未來也將比較 200 與 1000 mg/L  $\text{NO}_3^-$ -N 壓力下大生熊蟲體內脂質含量，比較大生熊蟲對抗不同濃度硝酸鹽機制是否相同。

## （二）以持續性活化抗逆境蛋白對抗硝酸鹽壓力

過去研究發現 *Ramazzottius varieornatus* 水熊蟲在正常活動與乾燥隱生時的抗逆境蛋白基因表現量無顯著差異 (Hashimoto *et al.*, 2016)，*Adorybiotus coronifer* 水熊蟲在乾燥壓力隱生時 71 kDa 蛋白質單體表現量顯著增加 (Ramløv & Westh, 2001)，由此可知不同物種水熊蟲仍可能以不同機制對抗相同環境壓力。本研究則發現 200 mg/L  $\text{NO}_3^-$ -N 24 小時壓力下的樣本與正常活動樣本在 20~220 kDa 蛋白質單體表現量無顯著差異 ( $p > 0.05$ )，推測大生熊蟲對抗硝酸鹽壓力的蛋白質為持續性活化蛋白 (constitutively active protein)，而這些蛋白在大生熊蟲正常活動時的功能為何未來可進一步探討。另外推測大生熊蟲亦有可能使用  $< 20$  kDa 的蛋白質對抗硝酸鹽壓力 (表 7)，未來實驗將使用 4~20 % 梯度膠，分離硝酸鹽壓力下大生熊蟲更低分子量的蛋白質比較其表現量是否有顯著差異。

表 7 常見抗逆境蛋白與抗氧化酵素分子

抗逆境蛋白與抗氧化酵素	分子量 (kDa)
觸酶 (CAT)	60 kDa
胱胺甘肽還原酶 (GR)	50 kDa
損傷抑制蛋白 Dsup	42 kDa
熱休克蛋白 HSP (HSP90, HSP70, HSP60, HSP40, HSP20 & HSP10)	10~90 kDa
胱胺甘肽過氧化酶 (GPX)	19 kDa
超氧化物歧化酶 (SOD)	15 kDa
LEA 蛋白	9.1 kDa
冷休克蛋白 CSP	7.2 kDa

分子量  
 $< 20$  kDa

## （三）抗氧化系統對抗硝酸鹽壓力

硝酸鹽進入生物體內後會轉變成亞硝酸鹽，亞硝酸鹽則會使一氧化氮生成，一氧化氮在結構上最外圍的電子軌域不符合八隅體法則，因此具有強烈的氧化性屬於一種自由基 (王與蔡, 2011)。實驗結果發現在 200 mg/L  $\text{NO}_3^-$ -N 24 小時壓力下隱生的大生熊蟲與對照組相比總抗氧化能力極顯著提升 ( $p < 0.01$ )，但在總蛋白質分析時其不同單體表現量則無顯著差異 ( $p > 0.05$ )，因此本研究推測大生熊蟲在硝酸鹽壓力隱生時，可能藉由  $< 20$  kDa 的酵素抗氧化系統 (表 7) 或非酵素抗氧化系統 (如類胡蘿蔔素、維生素 C、E、硫辛酸等物質) 抵抗硝酸鹽壓力傷害，導致 20~220 kDa 蛋白質單體表現量分析結果無顯著差異。未來實驗將提升蛋白質電泳膠片濃度分離  $< 20$  kDa 的蛋白質單體，以及分析樣本隱生時產生的抗氧化系統種類，進一步確認大

生熊蟲在硝酸鹽壓力下隱生機制。

(四) 綜合推測大生熊蟲對抗硝酸鹽壓力機制 (圖 20)

大生熊蟲在 200 mg/L NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 24 小時壓力下，無論活動或隱生皆有可能藉由 > 20 kDa 持續性活化蛋白 (constitutively active protein) 對抗硝酸鹽壓力。推測活動狀態的樣本會增加體內脂質含量隔絕硝酸鹽進入體內，隱生的大生熊蟲則會以 < 20 kDa 的酵素抗氧化系統或非酵素抗氧化系統降低硝酸鹽壓力傷害。

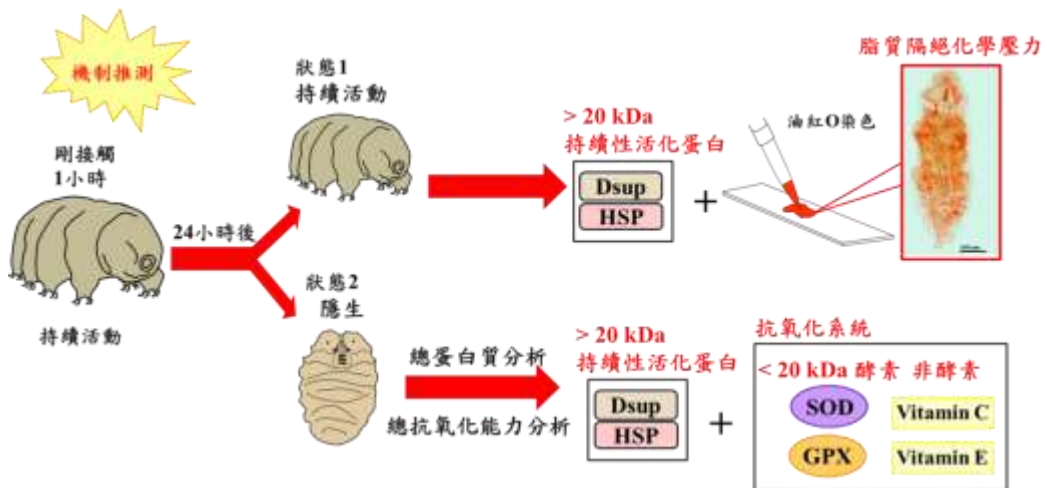


圖 20 大生熊蟲對抗硝酸鹽機制推測示意圖

## 柒、研究結論

- 一、大生熊蟲具潛能檢測  $< 200 \text{ mg/L NO}_3^- \text{-N}$  硝酸鹽、 $0.003\sim 0.01 \%$  殺蟲劑與 pH 5~7 壓力。
- 二、建立簡易染色法確認壓力下水熊蟲體表是否受傷。
- 三、 $200 \text{ mg/L NO}_3^- \text{-N}$  硝酸鹽 24 小時壓力下：
  - (一) 使用  $>20 \text{ kDa}$  持續性活化蛋白對抗硝酸鹽壓力。
  - (二) 活動大生熊蟲提高脂質含量隔絕硝酸鹽壓力。
  - (三) 隱生大生熊蟲以  $< 20 \text{ kDa}$  酵素抗氧化系統或非酵素抗氧化系統對抗硝酸鹽壓力。

## 捌、未來展望

- 一、完成化學物質銻對大生熊蟲 2~48 小時壓力影響實驗。
- 二、持續以簡易染色探討不同化學壓力下，大生熊蟲體表組織是否受傷害。
- 三、藉由油紅 O 染色、API ZYM 酵素分析、總蛋白質單體與抗氧化能力分析，持續探討常見化學壓力下大生熊蟲隱生機制是否作用，評估其作為模式生物重複檢測化學壓力潛能。
- 四、將大生熊蟲實際檢測環境中常見化學壓力，如蔬果與飲用水中的硝酸鹽濃度，並與儀器檢測結果相互比對，實際確認大生熊蟲作為模式生物的應用範疇。

## 玖、參考文獻

### 一、書籍、科展報告、期刊

- (一) 王仁助、蔡淑珍 (2011)。蔬菜中硝酸鹽的思辨。苗粟區農業專訊, 第 62 期, 頁 4-6。
- (二) 何孟常、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) 沈泊聰 (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 Effects of acute and chronic toxicities of copper and zinc on the copepod *Pseudodiaptomus annandalei*。
- (四) 李煜、楊可欣、高珊、敬海明、齊麗娟、寧鈞宇、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。
- (五) 徐亦萱 (2019)。2019 年台灣國際科學展覽會研究報告: 驚爆「膠」點—虎紋三角渦蟲黏液分析及功能推測。
- (六) 彭金良、嚴國安、沈國興、嚴雪、劉永定 (2001)。酸雨對水生生態系統的影響。水生生物學報, 25(3), 282-288。
- (七) 秦咸靜 (2012)。第四章 負責任的研究行為—動物實驗倫理。載於戴正德、李明濱 (主編), 人體試驗—研究倫理的理念與實踐 (頁 39-62)。臺北市: 教育部。
- (八) 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。
- (九) 陰環、李曉晨 (2011)。臺灣緩步動物 (緩步動物門) 新紀錄種記述 (Doctoral dissertation)。
- (十) 黎孝韻、曾國慶 (2007)。自由基及抗氧化物功能的探討。臨床藥學第 24 卷, 第 2 期, 頁 95-103。
- (十一) 顏健弘 (2021)。第 61 屆全國中小學科學展覽會研究報告: 水熊蟲分類與建立模式生物系統評估。
- (十二) Altiero, T., Rebecchi, L., & Bertolani, R. (2006). Phenotypic variations in the life history of two clones of *Macrobiotus richtersi* (Eutardigrada, Macrobiotidae). *Hydrobiologia*, 558(1), 33-40.
- (十三) Baccetti, B., & Rosati, F. (1971). Electron microscopy on tardigrades. III. The integument. *Journal of ultrastructure research*, 34(3-4), 214-243.
- (十四) Bjørn-Mortensen, M. (2006). Osmoregulation and osmobiosis in the eutardigrade *Richtersius coronifer*. *Roskilde Roskilde University Institute for Biology and Chemistry*.
- (十五) Boothby, T. C., Tapia, H., Brozena, A. H., Piszkiwicz, S., Smith, A. E., Giovannini, I., ... & Goldstein, B. (2017). Tardigrades use intrinsically disordered proteins to survive desiccation. *Molecular cell*, 65(6), 975-984.
- (十六) Boothby, T. C., Tenlen, J. R., Smith, F. W., Wang, J. R., Patanella, K. A., Nishimura, E. O., ... & Goldstein, B. (2015). Evidence for extensive horizontal gene transfer from the draft genome of a tardigrade. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(52), 15976-15981.
- (十七) Casida JE, Gammon DW, Glickman AH, Lawrence LJ. Mechanisms of selective action of pyrethroid insecticides. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1983;23:413-38.
- (十八) 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.

- (十九) Degma, P., Bertolani, R., & Guidetti, R. (2019). Actual checklist of Tardigrada species.
- (二十) Erdmann, W., Idzikowski, B., Kowalski, W., Kosicki, J. Z., & Kaczmarek, Ł. (2021). Tolerance of two anhydrobiotic tardigrades *Echiniscus testudo* and *Milnesium inceptum* to hypomagnetic conditions. *PeerJ*, 9, e10630.
- (二十一) Freedman, B. (2015). Ecological effects of environmental stressors. In *Oxford Research Encyclopedia of Environmental Science*.
- (二十二) Goldstein, B., & King, N. (2018). The future of cell biology: emerging model organisms. *Trends in cell biology*, 26(11), 818-824.
- (二十三) Halberg, K. A., Larsen, K. W., Jørgensen, A., Ramløv, H., and 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
- (二十四) Hashimoto, T., Horikawa, D. D., Saito, Y., Kuwahara, H., Kozuka-Hata, H., Shin, T., ... & Kunieda, T. (2016). Extremotolerant tardigrade genome and improved radiotolerance of human cultured cells by tardigrade-unique protein. *Nature communications*, 7(1), 1-14.
- (二十五) 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.
- (二十六) 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.
- (二十七) 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.
- (二十八) Ito, M. (1990). A new species of the genus *Itaquascon* (Eutardigrada: Hypsibiidae) from Taiwan. *Edaphologia (Japan)*.
- (二十九) Jönsson, K. I. (2007). Tardigrades as a potential model organism in space research. *Astrobiology*, 7(5), 757-766.
- (三十) Kamilari, M., Jørgensen, A., Schiøtt, M., & Møbjerg, N. (2019). Comparative transcriptomics suggest unique molecular adaptations within tardigrade lineages. *BMC genomics*, 20(1), 1-19.
- (三十一) Koutsovoulos G, Kumar S, Laetsch DR, Stevens L, Daub J, Conlon C, et al. No evidence for extensive horizontal gene transfer in the genome of the tardigrade *Hypsibius dujardini*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113:5053–8.
- (三十二) Leong Weng I (2019, September). *The diversity of Water bears of Taiwan and Macau*. [Poster presentation]. Summer Internship Poster Competition, Biodiversity Research Center, Academia Sinica, Taipei, Taiwan.
- (三十三) Li, X., & Li, H. (2008). Tardigrades from Taiwan, with the description of a new species of *Doryphoribius* (Tardigrada, Hypsibiidae). *Zoological science*, 25(5), 554-559.
- (三十四) Litwin, J. A. (1985). Light microscopic histochemistry on plastic sections. *Progress in histochemistry and cytochemistry*, 16(2), iii-79.
- (三十五) Mathews GB. Tardigrada from Japan [J] . Peking Natur al History Bulletin, 1936- 1937, 11:

410-412.

- (三十六) Ramløv, H., & Westh, P. (2001). Cryptobiosis in the eutardigrade *Adorybiotus (Richtersius) coronifer*: tolerance to alcohols, temperature and de novo protein synthesis. *Zoologischer Anzeiger-A Journal of Comparative Zoology*, 240(3-4), 517-523.
- (三十七) Séméria, Y. (1994). Une espèce nouvelle de tardigrade de Taiwan: *Echiniscus pseudelegans*, n. sp.(Heterotardigrada Echiniscidae). *Publications de la Société Linnéenne de Lyon*, 63(1), 28-32.
- (三十八) Suchaño, 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.
- (三十九) Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C. J., & Telser, J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and cellular biochemistry*, 266(1), 37-56.
- (四十) Ward, M. H., Jones, R. R., Brender, J. D., De Kok, T. M., Weyer, P. J., Nolan, B. T., ... & Van Breda, S. G. (2018). Drinking water nitrate and human health: an updated review. *International journal of environmental research and public health*, 15(7), 1557.
- (四十一) Weronika, E., & Łukasz, K. (2017). Tardigrades in space research-past and future. *Origins of Life and Evolution of Biospheres*, 47(4), 545-553.
- (四十二) Westh, P., and Ramløv, H. (1991). Trehalose accumulation in the tardigrade *Adorybiotus coronifer* during anhydrobiosis. *J. Exp. Zool.* 258, 303–311. doi: 10.1002/jez.1402580305
- (四十三) Wright, J. C. (1988). The tardigrade cuticle. I. Fine structure and the distribution of lipids. *Tissue and Cell*, 20(5), 745-758.
- (四十四) 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.

## 二、網站

- (一) 王淑卿 (2014 年 05 月 13 日)。自由基與活性氧化物。科學 Online。2021 年 05 月取自：  
<https://highscope.ch.ntu.edu.tw/wordpress/?p=53230>
- (二) 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>
- (三) 蔣永正 (2011 年 09 月)。植物對環境逆境之調控與應用。行政院農業委員會。2022 年 1 月取自：  
<https://www.coa.gov.tw/ws.php?id=24091>
- (四) 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>.
- (五) 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>.
- (六) 鄭旭成 (2017 年 12 月)。環境用藥「殺蟲劑」為什麼能殺蟲？它對人體有害嗎？2021 年 10 月取自：  
<https://pansci.asia/archives/130318>
- (七) 蔡淑珍 (2011 年 7 月)。漫談蔬菜硝酸鹽含量問題。行政院農業委員會農學報導。2022 年 01 月取自：  
[https://kmweb.coa.gov.tw/theme\\_data.php?theme=news&sub\\_theme=agri\\_life&id=53456](https://kmweb.coa.gov.tw/theme_data.php?theme=news&sub_theme=agri_life&id=53456)
- (八) ATSDR Online. "ToxFAQs for Chromium." 27 July 2004. [www.atsdr.cdc.gov/tfacts7.html](http://www.atsdr.cdc.gov/tfacts7.html)

## 【評語】 050005

1. 本研究探討水熊蟲受到環境壓力時，所產生的耐受性機制。

作者從基礎的毒性濃度效應，到機制的探討，包括脂質染色、蛋白質分析、與抗氧化能力的分析。工作完整，並且有層次。

2. 作者從現象分析到分子機制的探討，顯示對於本主題的瞭解，與對科學知識有相當的把握。