

2025年臺灣國際科學展覽會

優勝作品專輯

作品編號	050002
參展科別	動物學
作品名稱	大生熊蟲自體螢光於檢測蔬菜硝酸鹽之應用與 螢光機制探討 Application and Mechanism of Tardigrade Macobiotus Autofluorescence in the Detection of Vegetable Nitrates

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	張恩榮 陳世穎

關鍵詞	<u>大生熊蟲、自體螢光、檢測硝酸鹽模式</u>
-----	--------------------------

作者簡介



我是張恩榮、陳世穎，來自新北市竹林高中。今年是做研究的第二年，從國三開始接受嘉怡老師的培訓，並於隔年開始參加科展，從一開始的懵懂無知能夠踏上國際科展這高手雲集的舞台，經過了許許多多的挫折，但最後也都克服過來了。做科展需要花非常多的時間與心力去學習新知，但從中一定也學到了可以帶走的能力，也遇到了許多值得我學習的強者。一路上感謝我的家人願意相信我的潛能，嘉怡老師與科展團的學長姐們願意花時間犧牲自己幫助我更上一層樓，中研院吳漢忠老師與實驗室學長姐提供資源與實驗設計想法，培訓團的書平教授、仁理老師與永達教授給我研究方向和建議，感謝願意幫助我的所有人，期待未來面對挑戰時都能以冷靜的心態解決問題！！！！

2025 年臺灣國際科學展覽會

研究報告

區別：北區

科別：動物學科

作品名稱：

大生熊蟲自體螢光於檢測蔬菜硝酸鹽之應用與螢光機制探討

Application and Mechanism of Tardigrade *Macobiotus*

Autofluorescence in the Detection of Vegetable Nitrates

關鍵詞：大生熊蟲、自體螢光、檢測硝酸鹽模式

編號：

大生熊蟲自體螢光於檢測蔬菜硝酸鹽之應用與螢光機制探討

摘要

利用鏡檢大生熊蟲形態檢測蔬菜中硝酸鹽壓力，常有形態判別問題，本研究想利用其自體螢光開發新型檢測模式，利用硝酸鹽壓力下其活動與隱生比例差異與自體螢光強度關係，檢測硝酸鹽濃度。顯示其自體螢光最佳激發波長為 488 nm，製作檢量線($R^2=0.99$)與自製裝置使用 470 nm 波長激發以壓克力濾光($R^2=0.97$)可檢測 0~156 mg/L 硝酸鹽，可改善鏡檢缺點，並嘗試應用，發現蔬菜硝酸鹽(小白菜 492mg/L)，超出其自體螢光檢測極限，且蔬菜萃取液會影響大生熊蟲自體螢光，目前能進行定性分析，後續將分析蔬菜中造成干擾物質，繼續評估其應用性。探討其螢光機制，利用組織切片，探討大生熊蟲自體螢光強度與表皮層厚度在隱生和活動狀態下，是否具有相關性，發現脫水樣本自體螢光強度與螢光面積較活動樣本無差異($p>0.05$)，推測自體螢光強度會受到其隱生時體表收縮程度有關。

Application and Mechanism of Tardigrade *Macrobiotus*

Autofluorescence in the Detection of Vegetable Nitrates

Abstract

Using morphological inspection of *Macrobiotus* under a microscope to detect nitrate stress in vegetables often poses issues in morphological identification. This study aims to develop a novel detection model leveraging its autofluorescence. By examining the relationship between nitrate-induced stress, activity, dormancy ratio differences, and autofluorescence intensity, we assess nitrate concentration. Results show the optimal excitation wavelength for autofluorescence is 488 nm, and a calibration curve ($R^2 = 0.99$) was established using a custom device with a 470 nm excitation wavelength and an acrylic filter ($R^2 = 0.97$), enabling nitrate detection between 0–156 mg/L. This approach improves upon the limitations of traditional microscopy.

However, upon testing with vegetable samples, nitrate levels (Brassica 492 mg/L) exceeded the detection limits of autofluorescence-based analysis, and vegetable extracts interfered with *Macrobiotus* autofluorescence, allowing for qualitative analysis only at this stage. Further analysis will focus on identifying interfering substances in vegetables and assessing applicability. Additionally, fluorescence mechanisms were examined by tissue sectioning to explore the relationship between autofluorescence intensity, epidermal thickness, dormancy, and activity states. Findings suggest no significant difference in autofluorescence intensity or area between dehydrated and active samples ($p > 0.05$), indicating autofluorescence intensity may be influenced by the degree of body surface contraction during dormancy.

壹、前言

一、研究動機

硝酸鹽為人類常接觸到的環境壓力之一，過量可能導致心血管疾病風險(吳，2022)，人類主要接觸硝酸鹽的途徑是透過蔬菜，其中葉菜類最容易殘留硝酸鹽(衛福部，2010)，如：小白菜與芥藍菜硝酸鹽濃度普遍偏高(衛福部，2010)，前人利用大生熊蟲檢測小白菜中的硝酸鹽，並驗證了其可行性，因此本研究利用大生熊蟲作為模式生物多種葉菜類蔬菜，使此模式更廣泛地朝實際應用層面發展。

人類為檢測有害物質與環境壓力，使用許多不同的模式生物(例如：線蟲、斑馬魚、小鼠)，但隨者當代生物實驗倫理(4R 原則)發展，以致死率作為標準的模式生物，不符合 4R 原則中減量(Reduction)等原則，前人的研究利用大生熊蟲作為模式生物，以重複利用，同時探討大生熊蟲檢測小白菜可行性；然而前人以鏡檢方式觀察大生熊蟲形態辨別是否進入隱生狀態(圖 1a、b)，可能會有難以判斷的問題(圖 1c、d)，在實際應用層面，消費者並沒有背景知識了解大生熊蟲檢測時的形態變化，易造成判斷誤差。本研究利用其他觀察方式，開發大生熊蟲檢測硝酸鹽模式。

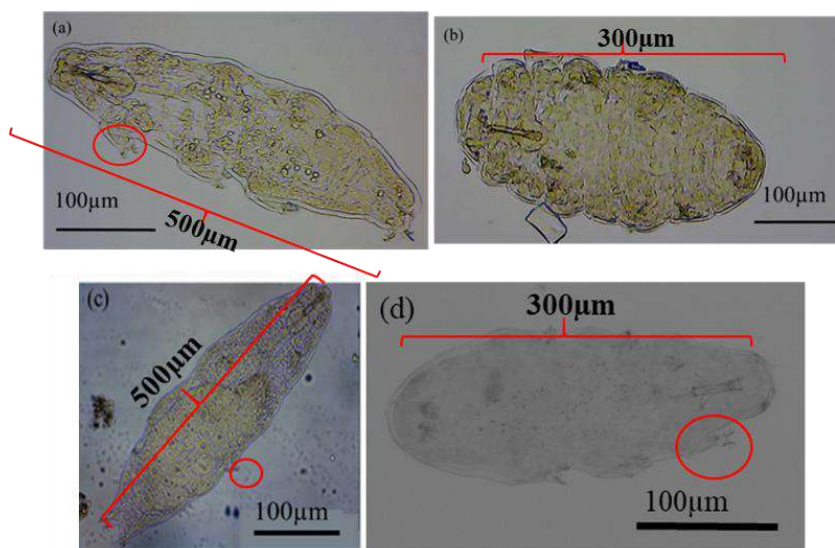


圖 1、大生熊蟲屬(*Macrobiotus* sp.)不同形態(作者拍攝)，(a)為活動、(b)為隱生、(c)為態形難以判斷，圖中大生熊蟲體長伸長，但爪子卻未伸出，故判斷為隱生狀態(d)為態形難以判斷，圖中大生熊蟲爪子伸出，但體長未伸長，故判斷為隱生狀態

水熊蟲在面對外界壓力時會進入隱生狀態(cryptobiosis)(圖 1b)，降低水分散失與抵禦外在壓力傷害，在前人的研究中以對環境敏感的大生熊蟲屬(*Macrobiotus* sp.)作為模式生物，檢測硝酸鹽壓力(圖 2)，發現其並未死亡，反而進入隱生狀態，後續實驗發現並未受傷，最後進行重複使用試驗，確認其可行性(顏，2021~2023)

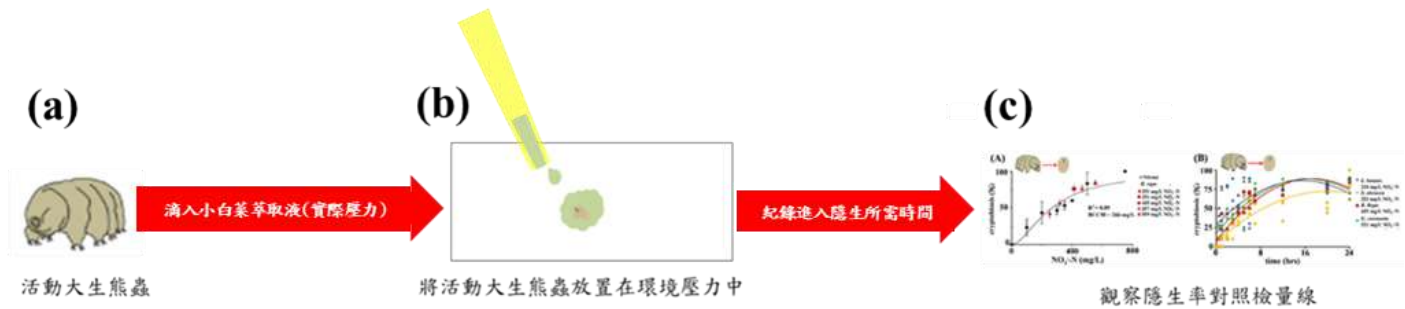


圖 2、大生熊蟲檢測模式示意圖(作者繪製)(圖 c 資料來源：顏、2023)

在前人的研究中發現大生熊蟲隱生與活動狀態下，其相對螢光強度具有差異(顏，2023)，本研究以此結果為基準，開發大生熊蟲自體螢光檢測硝酸鹽壓力模式，本研究假設不同濃度的硝酸鹽可使大生熊蟲活動與隱生相對比例改變，活動與隱生的螢光強度差異，可利用此關係將大生熊蟲螢光檢測法作為定量分析方式檢測硝酸鹽壓力。

為了有效利用螢光建立檢測模式，本研究將同時探討大生熊蟲相關螢光機制，了解其生理意義，由大生熊蟲螢光照片(顏，2023)中，我們發現大生熊蟲螢光可能由於由表皮中螢光物質發射，且隱生狀態時螢光強度較強，但在先前研究中並未對此機制進行探討，文獻中探討水熊蟲(*Paramacrobiotus*.sp)的自螢體光主要激發部分是口器和表皮，其主要螢光物質為幾丁質和膠原蛋白(Bartels *et al.*,2024)(Massa *et al.*,2023)。在前人研究中使用 300~500 μm 大生熊蟲，為充分了解大生熊蟲螢光機制並開發模式，本研究發現水熊蟲的體長可能會影響其在檢測硝酸鹽時的螢光表現，故本研究想要確認大生熊蟲的體長與其自體螢光的關聯性，以達到模式標準化目的，由於在進行螢光分析時會將大生熊蟲封片，故影像並不能完全呈現體長的結果，本研究將以面積取代體長進行分析。

在前人研究中，可利用鏡檢方式觀察 20 分鐘內急性毒性效應 1143mg/L $\text{NO}_3\text{-N}$ ，且存活率>85%(顏，2022)，後續使用大生熊蟲鏡檢方式成功檢測 238mg/L $\text{NO}_3\text{-N}$ 的小白菜壓力，並可重複使用 6 次(顏，2023)，本研究也將記錄大生熊蟲自體螢光檢測硝酸鹽壓力，紀錄能夠檢

測的硝酸鹽濃度。

本次研究想藉由組織切片，探討大生熊蟲在檢測硝酸鹽時體內物質組成，了解其螢光機制，並利用影像探討體長與螢光的關係，以達到標準化模式與更好的檢測效果。利用大生熊蟲自體螢光檢測純硝酸鹽壓力製作檢量線，並以葉菜類蔬菜萃取液模擬實際狀況評估可行性。

二、文獻探討

(一) 團隊歷年研究成果

前人將大生熊蟲做為模式生物，並探討其檢測硝酸鹽可行性，也探討大生熊蟲在檢測硝酸鹽時的隱生與抗氧化機制(顏，2021~2023)，本次研究將延伸前人研究，探討大生熊蟲自體螢光機制，並將螢光投入實際應用，開發檢測硝酸鹽模式

表 1、團隊歷年研究成果(作者繪製)

歷年研究成果	研究內容及成果
水熊蟲分類與建立模式生物系統評估(2021)	得知南勢角區域大生熊蟲分布最多、最廣 製作出南勢角區域用二叉檢索表 發現大生熊蟲能夠檢測常見六種環境壓力
水熊蟲於學環境力耐受機制探討(2022)	可重複檢測硝酸鹽，且未受損
建立檢測化學壓力新型模式生物-大生熊蟲實際應用與耐受機制探討(2023)	於實際化學壓力下檢測可重複使用，且改變檢測方式
大生熊蟲自體螢光於檢測蔬菜硝酸鹽之應用與螢光機制探討(本研究)	探討大生熊蟲檢測硝酸鹽相關螢光機制，並開發螢光檢測模式

(二) 模式生物(model organism)用途

模式生物 (model organism) 是為了解釋特定生命現象，被許多科學家共同採用而詳盡研究的生物，有著一些共同的特性：體積不大、生活史短、成本低廉、方便在實驗室培養和操作、容易繁殖且子代數目多、具有小量且不複雜的基因組等，現今常用於檢測潛在的化學壓力（許，2009）。

(三) 硝酸鹽壓力的毒物分級(環境部化學物質管理署)

根據中央主管機關規定，毒化物分為 4 種類別。硝酸鹽壓力屬於第二類，過量可能會導致心血管疾病或癌症的風險，因此我國規定飲用水中硝酸鹽含量不得大於 45ppm(彭，2009)，且歐盟也規定葉菜類蔬菜硝酸鹽含量不得大於 2000~5000ppm。

第一類：難分解物質，指在環境中不易分解或因生物蓄積、生物濃縮、生物轉化等作用，致

污染環境或危害人體健康者。

第二類：慢毒性物質，有致腫瘤、生育能力受損、產生畸型胎兒、遺傳因子突變或其他慢性疾病等作用者。

第三類：急毒性物質，化學物質經暴露，將立即危害人體健康或生物生命者。

第四類：化學物質具有內分泌干擾素特性或有污染環境、危害人體健康者。

(四) 蔬菜接觸硝酸鹽的方式

氮為保持人類生存機能的必要物質之一，在人體組成的必要元素，現今人類攝取氮的方式主要是透過攝食蔬菜，但是現今人類種植方式強調提升土壤肥力，所以使用氮肥的頻率也大大增加。植物透過氮循環的方式，吸收土壤中的氮，導致植物中硝酸鹽含量增加(大虫農業，2018) (圖 3)，葉菜類是蔬菜硝酸鹽濃度最高的種類，使用網室栽培使得硝酸鹽無法充分透過光合作用散發，因而殘留，土壤排水不良導致硝酸鹽殘留過高，四是趕在颱風天過後採收，因遇連續雨天無法行光合作用，形成殘留(林，2004)。

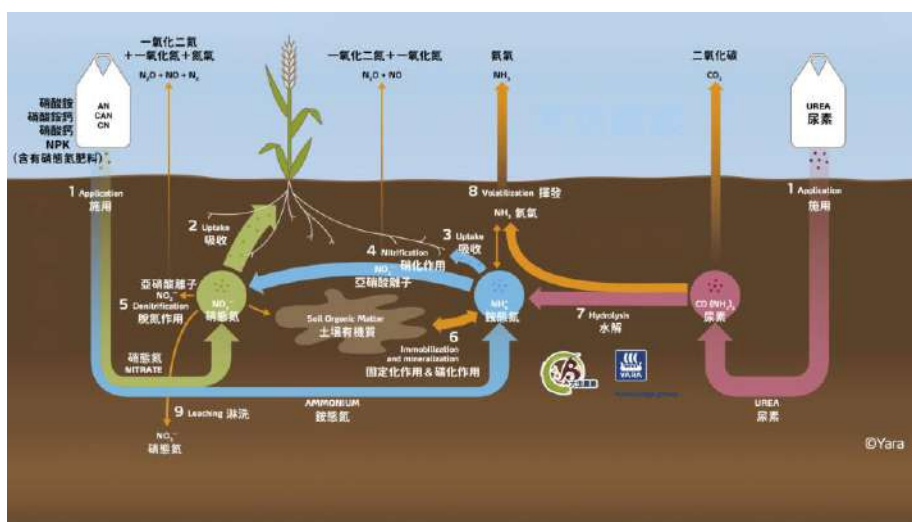


圖 3、使用氮肥後的土壤氮循環(大虫農業，2018)

(五) 水熊蟲體內 α -幾丁質功能與特點

幾丁質根據排列方式不同可分為三種不同型態，依據排列方式分為 α 、 β 和 γ 型，最常見的為 α -幾丁質與 β -幾丁質(宮，2008)(圖 4)， α -幾丁質通常為甲殼動物的甲殼組成成分，而 β -幾丁質常作為昆蟲外骨骼與軟體動物的軟骨的組成成分，且 β -幾丁質的氫鍵較少結構較為鬆散。

目前已知在熊蟲的表皮與口器部分含有 α -幾丁質(Massa *et al.*,2024) (Greven *et al.*,2016) (圖 5)， α -幾丁質具有耐磨且硬度較 β -幾丁質高，可以幫助水熊蟲在捕食時擁有更好的穿透獵物細胞膜的能力(Massa *et al.*,2024)，且水熊蟲時常需要隱生，耐磨的 α -幾丁質外皮也能降低形態變化時受傷的風險。在演化的層面，緩步動物門(水熊蟲)親緣相對於昆蟲，其實更接近蜘蛛，蜘蛛的外表皮就是由 α -幾丁質所組成(Moussian.2013) (Radosavljevic.2019)。

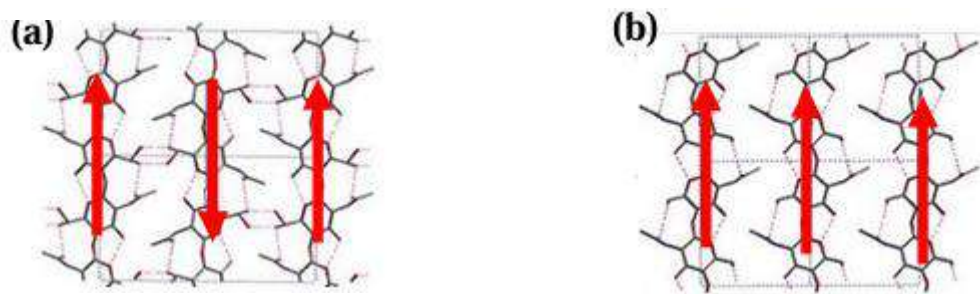


圖 4、 α 和 β chitin 排列 (宮，2008) (a) 為 α -幾丁質；(b) 為 β -幾丁質

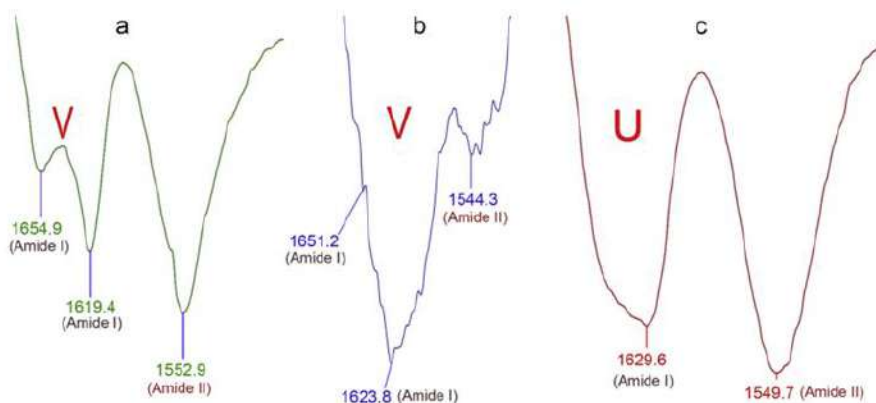


圖 5、不同種類幾丁質的 FT-IR 光譜結果(Greven *et al.*,2016)

a 為 α -幾丁質、b 為水熊蟲表皮幾丁質、c 為 β -幾丁質

(六) 組織切片簡介

1.組織切片的方式

組織切片為病理學常用的診斷，分為石蠟切片(Paraffin Section)、冷凍切片(frozen section)與塑膠切片(Plastic section)，並利用 H&E 染色或 IHC 染色標定物質觀察。

2.應用在水熊蟲上的組織切片方式(表 2) (表 3)

文獻中多利用組織切片方式標定水熊蟲體內物質分布，並探討水熊蟲生理機制(表 3)

表 2、組織切片方式差異(作者繪製)

	優點	缺點	參考資料
冷凍組織切片	快速。細胞抗原性、酵素活性、脂質保存完整	冰晶可能造成組織破損	
石蠟組織切片	組織與細胞結構完整，適用各種染色方式	會造成部分蛋白質變性	源資國際生物科技，2024
塑膠切片	高透明度與較佳組織滲透性	製作困難，部分染色表現不佳	

表 3、應用在水熊蟲上的組織切片(作者繪製)

實驗動物	運用切片方式	運用目的	參考文獻
<i>Hypsibius</i> sp.	冷凍切片	標定中間絲 (IF) 蛋白在細胞內分布，並探討水熊蟲的全新演化起源	Hering <i>et al.</i> ,2016
<i>Richtersius</i> sp.	冷凍切片	以接近「活體」狀態的內部結構和元素分布，進行分析，深入探討生化特性和環境適應機制	Nilsson <i>et al.</i> ,2014
<i>Halobiotus</i> sp.	石蠟切片	觀察中腸結構及相關的運輸蛋白分佈的位置與表現情況，了解其主動運輸機制	Halberg <i>et al.</i> ,2012

(七)自體螢光(Auto Fluorescence)簡介

自體螢光(Auto Fluorescence)簡稱 AF，分為兩種方式，生物發光與生物螢光，生物發光主要是利用生物體內的螢光素酶(luciferase)催化後所產生的螢光。生物體細胞中的分子，在受到合適波長的光線(例如：紫外線)激發後，會發射出能量較低的螢光，這是透過細胞本身內源性螢光團與細胞外基質所發出，在胞內主要藉由粒線體與溶體中的 NADPH 與黃素輔酶(Flavin coenzymes)作為內源性螢光團，膠原蛋白與彈性蛋白因有較高的量子產率，因此做為細胞與組織內的主要螢光團(Monici,2005)，相較於以外源物質所連接的螢光標記物，自體螢光是完全來自於生物體內。生物螢光與生物發光主要可藉由能否在無光環境觀測來區分(吳，2023)，常見生物螢光物質多為蛋白質(例如：水母提取出的 GFP 蛋白)，但是在先前研究的影像中，無法得知大生熊蟲自體螢光是否確實為蛋白所發出，因此本研究嘗試使用切片方式標定幾丁質與膠原蛋白，確認大生熊蟲體內真正螢光物質，並探討其生理意義。

表 4、生物發光與生物螢光差異(作者繪製)

	發光方式	反應類別	物種	無光時能否觀察	參考文獻
生物發光	藉由螢光素酶催化後，生物體本身發光	化學方式	夜光蟲	能	吳，2023
生物螢光	分子接收能量，進入激發態，後以電磁波方式放出能量	物理方式	水母	不能	

(八) 水熊蟲表皮自體螢光物質與可能的演化意義

大生熊蟲的螢光照片中，可以發現其自體螢光相對強度較高部位在口器與表皮，而文獻中探討水熊蟲(*Paramacrobiotus.sp*)口器與表皮組織的螢光物質，口器部分發現是由 α -幾丁質、膠原蛋白組成，在受到 488nm 的激發光後，會有 435~500nm 與 525~540 的雙發射峰，而在表皮部分同時也發現到有 α -幾丁質與膠原蛋白，且可以發出 445nm~577nm 的螢光(Massa *et al.*,2024) (Bartels *et al.*,2024) (圖 6)。

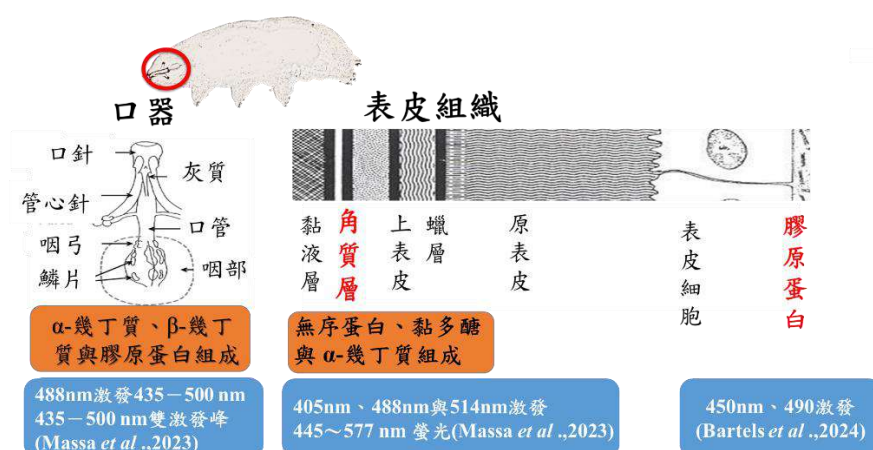


圖 6、大生熊蟲自體螢光發射部位物質(作者繪製)，圖源：口器 (Karin, 2017)、表皮組織 (Bjørn, 2006)

Paramacrobiotus.sp 可藉由表皮的自體螢光抵抗外在紫外線壓力，文獻中將 *Paramacrobiotus.sp* 的表皮萃取物，包覆秀丽隱桿線蟲，並放置於殺菌紫外線燈下 15 分鐘 (253nm)發現其表現出更高的存活率，這種自體螢光會形成一種「屏障」對抗紫外線壓力，這篇文獻推測 *Paramacrobiotus.sp* 藉由此自體螢光方式對抗當地高強度的紫外線壓力(印度邦加羅爾)(Suma *et al.*,2020)。

(九) 現今便攜式螢光設備發展

螢光裝置通常需要 5 個最基本的光學組件，光源、激發光源端分光器、樣本、放光端分光器、螢光偵測器(圖 7)，隨著光學系統與照相設備發展，讓激發螢光的要求進一步降低，基於濾光片所設計的螢光設備陸續出現，現今便攜式螢光設備多靠 LED 作為光源，並利用濾片

阻隔激發光的影響，以電荷耦合元件(CCD)作為訊號偵測器(Shin *et al.*,2021)，這些螢光設備應用範圍廣泛(例如：水質檢測、毒物檢測)，利用 LED 激發綠藻螢光計算水中溶解性有機物質(Dissolved Organic Matter)(DOM)濃度，可以證明利用螢光裝置定量分析(Brandl *et al.*,2020)。以葉綠素為例，現今也有人將葉綠素自體螢光作為一套快速鑑別植物健康程度之方法，由於量測時間僅需幾分鐘，已成為監測植物生長之常見方法，且已經能夠監測苗株是否缺少水分(蕭，2011)，也有文獻利用 LED 與自製暗室成功激發葉綠素螢光(簡，2006)。

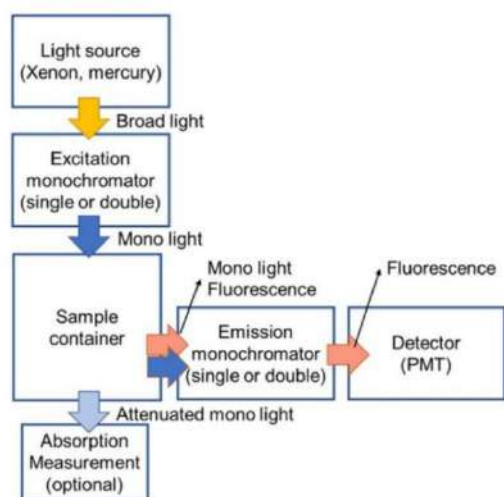


圖 7、基本螢光組件之間交互關係(Shin *et al.*,2021)

(十) 偏振片作用原理

自然中的光源皆為方向不同的圓形偏振光，偏振片就像一個擁有很多細小狹縫的光柵，它只會讓與光柵方向平行的光源通過，擋下所有不平行的光源，形成偏振光，而只要在偏振光後再放置一個垂直方向的偏偏振片，就不會有光源通過(Ento Key.未知) (圖 8)。

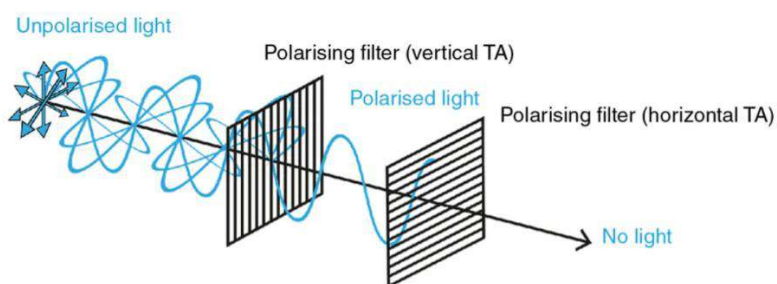


圖 8、偏振片原理(Ento Key)

貳、研究目的與問題

一、探討大生熊蟲檢測硝酸鹽自體螢光機制

- (一) 探討硝酸鹽與實際壓力是否影響大生熊蟲自體螢光表現。
- (二) 利用影像大生熊蟲體長變化與螢光強度關係。
- (三) 利用組織切片標定幾丁質與膠原蛋白，探討大生熊蟲螢光機制
- (四) 1.石蠟切片
2.冷凍切片
- (五) 觀察切片結果，並分析大生熊蟲縱切中段物質並推測其生理意義。

二、將大生熊蟲螢光檢測法投入實際應用，並將其標準化

- (一)拍攝大生熊蟲自體螢光光譜
- (二)以大生熊蟲自體螢光檢測不同濃度硝酸鹽，並繪製檢量線
- (三)以自製裝置激發熊蟲自體螢光，嘗試提升熊蟲螢光檢測法的便利性
- (四)探討大生熊蟲自體螢光檢測實際壓力精準度與可行性。

參、實驗生物與器材

一、實驗動物簡介(圖 9)

(一) 使用大生熊蟲優勢

水熊蟲是緩步動物門(Phylum Tardigrada)的俗稱,現今世界記錄約有 1300 種,且每種對於環境的耐受力不同,本研究使用對環境敏感的大生熊蟲屬(*Macrobiotus* sp.) (圖 9),作為模式生物,隱生的特性,相較於其他模式生物更有優勢,符合當代生物實驗倫理 4R 原則中取代(大生熊蟲為較低等的無脊椎動物)與減量(具有隱生特性,遇硝酸鹽壓力不會受傷害)原則,在先前研究中也發現大生熊蟲螢光檢測法可成為一種新型硝酸鹽檢測法,並具有實際應用潛能,利用大生熊蟲檢測硝酸鹽也能貫徹 SDGs 目標中的永續生產。

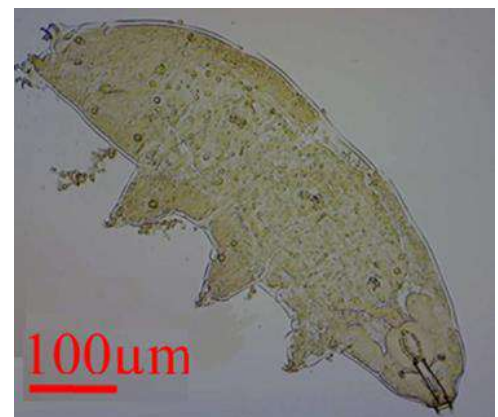


圖 9、大生熊蟲屬(*Macrobiotus* sp.)
(作者拍攝)

(二) 大生熊蟲形態

大生熊蟲平均體長為 200~700 μm ，具有 4 對爪子，嘴巴可觀察到口器 (Altiero *et al.*, 2006)。

本研究使用體長 300~500 μm 的大生熊蟲，成蟲判斷條件取自(顏，2023)。

(三) 培養方式(參考自 Roszkowska *et al.*, 2021)

將大生熊蟲培養於 121mg/L 碳酸氫鹽、5mg/L Mg^{2+} 、37mg/L Ca^{2+} 與 7mg/L Na^{+} 溶液與蒸餾水 1:3 混合培養液中，光照條件完全黑暗，每星期餵食線蟲與苔蘚假葉。

(四) 大生熊蟲生活史

大生熊蟲屬(*Macrobiotus* sp.)壽命為 3~7 個月，食性為雜食，攝食線蟲、輪蟲、苔蘚的假葉，使用孤雌生殖來繁衍後代，使用體外產卵，每隻熊蟲個體可在生命週期內產下約 8~37 顆卵，孵化時間約為 2~3 個月(Altiero *et al.*, 2006)，在生活週期內會隨著年齡蛻皮使體長增長，蛻皮時期在性未分化 (undifferentiated)、性成熟以及前兩次產卵週期時進行，蛻皮次數為 3~4 次(Goldstein . 2022) (圖 10)。

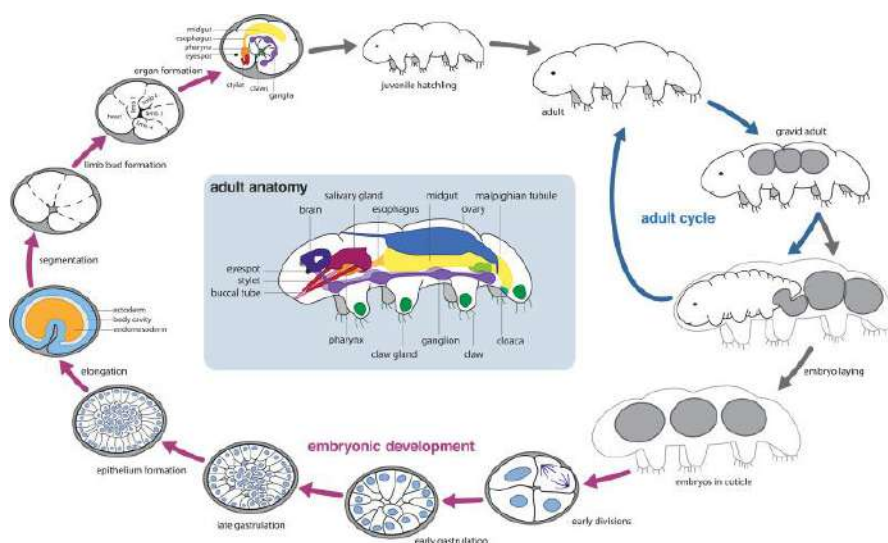


圖 10、大生熊蟲生活史(Goldstein . 2022)

二、實驗器材與藥品

(一) 蔬菜萃取液製作

名稱	備註
小白菜	
花椰菜	
芹菜	產銷履歷認證
馬鈴薯	
蘋果	
果汁機	購自動風

(二) 水楊酸分光光度法

名稱	備註
NaNO ₃	購買SHIMAKYU CHEMICA
Salicylic acid	
Sulfuric acid	購自景明化工
NaOH	

(三) 石蠟切片

名稱	備註
酒精	
甲醛	購自景明化工
二甲苯	
石蠟	
石蠟切片刀片	
幾丁質染色	中研院提供
膠原蛋白染色	
組織包埋盒	
石蠟切片機	

(四) 其他器材

名稱	廠牌
複式顯微鏡	購自Motic
Wifi CMOS 彩色相機	
解剖顯微鏡	購自HOMA
離心機	購自偉吉達
行動顯微二重奏 (µHandy)	億觀生物科技
倒立顯微鏡	購自ZEISS
ELISA reader	購自 Bio Tek
分光光度計	購自 vernier
共軛焦顯微鏡	購自 ZEISS
橘色壓克力板	網路購買
藍色LED燈	購自光華商場

肆、研究設計

一、實驗架構圖(圖 11)

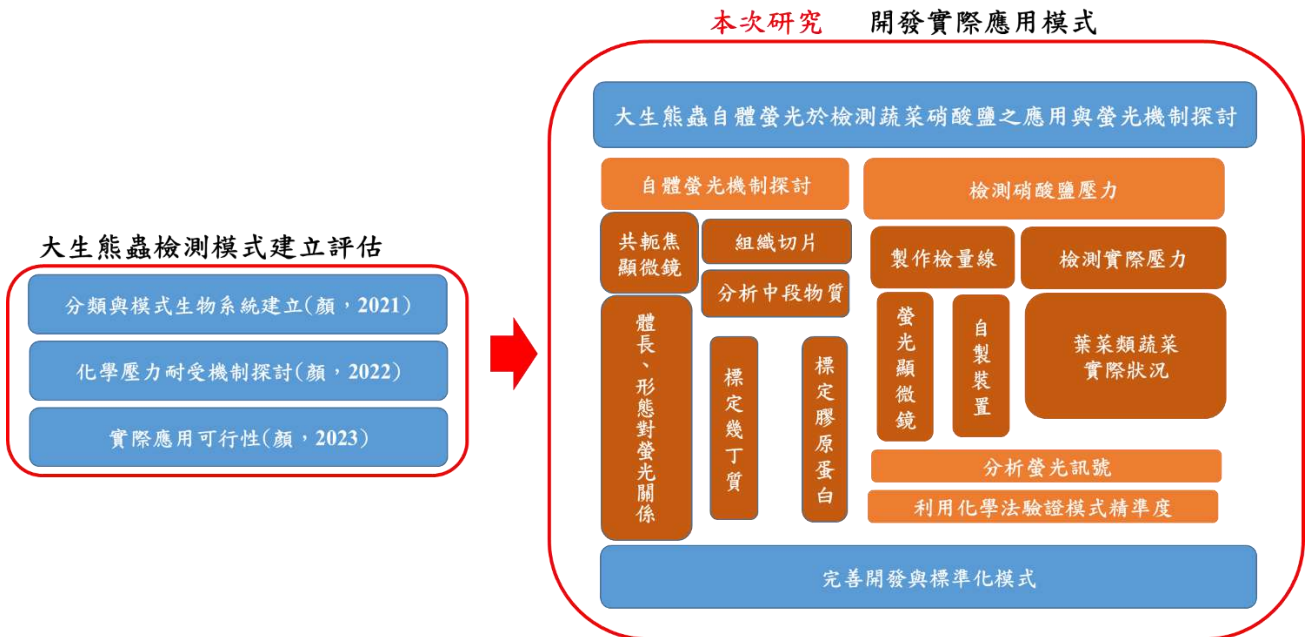


圖 11、實驗架構圖(作者繪製)

二、大生熊蟲活動狀態定義(顏, 2023)(表 5)

顏先前的研究中定義了大生熊蟲實驗中的各種狀態，若在實驗結束後置於原生水樣中 24 小時，仍未恢復正常活動，則定義為死亡，若任一對足可正常活動，定義為活動狀態，若體腔呈現酒桶狀，所有足收入體腔中，定義為死亡。

表 5、水熊蟲活動狀態定義

活動狀態	定義
正常活動(圖12a)	任一對足能夠活動
隱生狀態(圖12b)	體腔與足完全收縮，呈現酒桶狀
死亡(圖12c)	置於原生水樣中24小時，仍未恢復正常活動

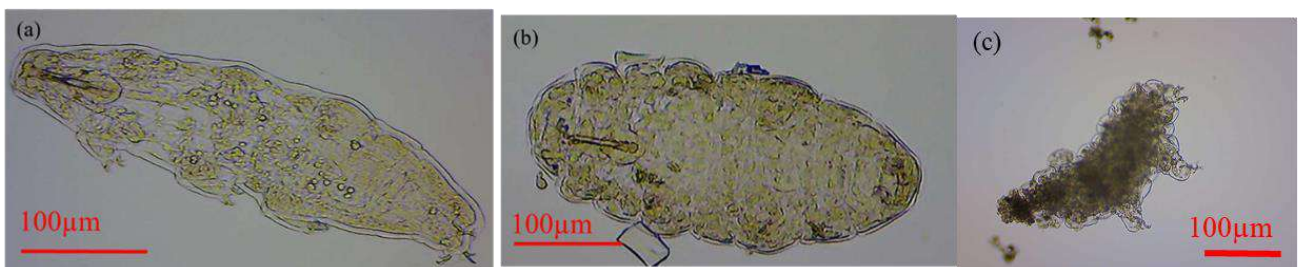


圖 12、大生熊蟲不同狀態(作者拍攝)(a) 正常活動 (b) 隱生狀態(c)死亡，四肢伸長且未活動

三、實驗步驟

(一)利用組織切片探討大生熊蟲自體螢光機制

先前拍攝熊蟲自體螢光，發現其在縱切中段部分有自體螢光波峰，文獻中指出，水熊蟲 (*Paramacrobiotus.sp*)表皮與口器是由 α -幾丁質與膠原蛋白等物質組成並在特定波長激發能發出自體螢光(Massa *et al.*,2024)，並未表明熊蟲縱切中段部分的物質，本研究藉由組織切片方式，將大生熊蟲切片分層後，針對熊蟲縱切中段分析物質，探討自體螢光對其生理意義，利用切片結果、螢光發光面積與螢光強度結果對比，開發最適合檢測硝酸鹽壓力的體長。

1. 利用石蠟切片方式觀察大生熊蟲不同狀態下角質層厚度
2. 大生熊蟲不同體長對自體螢光強度與角質層厚度差異
3. 標定熊蟲幾丁質與膠原蛋白了解其螢光機制

預備實驗：(n=3；Tech=3)

為確認大生熊蟲進行石蠟切片後，自體螢光是否存在，本研究將活動與隱生大生熊蟲置於二甲苯與 100%酒精中，觀察封片自體螢光是否受到影響，並進行後續分析。

實驗組：

- 1.稀釋二甲苯加甘油
- 2.稀釋二甲苯
- 3.100%酒精加甘油
- 4.100%酒精加稀釋二甲苯加甘油
- 5.100%酒精加稀釋二甲苯

對照組：

置於純水中

實驗步驟：

- 1.將活動與隱生狀態大生熊蟲分別置於上述實驗組與對照組溶液中
- 2.等待 30 分鐘，使溶液中成分反應
- 3.封片後置於螢光顯微鏡下，拍攝螢光照片(激發波長：490nm、570nm)
- 4.利用 imagej 分析影像螢光強度

石蠟切片步驟(修改自 Halberg *et al.*,2012)(n=100)

固定：

活動樣本：

- (1)將活動樣本以 20%酒精麻醉
- (2)樣本清洗後吸乾水份。
- (3)固定於 10%福馬林 9 小時

隱生樣本：

- (1)將活動狀態大生熊蟲清洗後放入 37°C培養箱中乾燥 24 小時
- (1)樣本清洗後吸乾水份。
- (2)固定於 10%福馬林 9 小時

脫水：

- (1) 將標本依序置入 50%、60%、70%、80%、90%、100%酒精各 10 分鐘

透明：

- (1)將標本置入 100%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：

將標本置入熔融石蠟 30 分鐘，重複兩次。

包埋：

- (1)將標本置入標本盒中，調整標本平放於盒中。
- (2)將熔融石蠟填滿標本盒，蓋上包埋盒。

切片：

切至 5μm 的厚度切片。

染色：

- (1)利用 H&E 染色觀察組織形態
- (2)以苯胺藍將膠原蛋白染色
- (3)以 Calcofluor White 將幾丁質染色

大生熊蟲不同體長對自體螢光強度與角質層度差異(n=10；Tech=3)

由於在先前研究中是使用 300 μ m 以上的大生熊蟲進行檢測硝酸鹽壓力，但為了建立大生熊蟲螢光檢測法，需要探討不同的體長是否會影響大生熊蟲自體螢光的表現，導致檢測結果出現誤差，本研究將藉由影像分析，探討體長對自體螢光的影響，本研究將記錄熊蟲體長，並分成兩組

實驗組：體長低於 300 μ m 以下

對照組：體長 300 μ m 以上 (先前研究使用)

實驗步驟

拍攝自體螢光觀察

- 1.將熊蟲乾燥後封片
- 2.使用共軛焦顯微鏡將大生熊蟲分層拍攝照片
- 3.使用 imageJ 分析數值，探討其螢光強度關係

(二) 利用大生熊蟲自體螢光檢測硝酸鹽投入實際應用，並將其標準化

顏 2023 的研究成果已經表示大生熊蟲能夠成為模式生物，並深度探討其對硝酸鹽的耐受機制，由於前人將大生熊蟲檢測硝酸鹽時，都是使用鏡檢觀察大生熊蟲活動與隱生變化，本研究想要以自體螢光作為新型觀察方式，達到更好觀察效果，並將大生熊蟲螢光檢測法檢測最容易殘留硝酸鹽的葉菜類蔬菜，達成實際應用的目的，並記錄檢測時間等數據，將此模式標準化。

半數活動時間(Bio-Active Time 50 % , BAT₅₀): BAT₅₀ 為本研究所定義的新名詞，表示施用的化學物質導致 50 % 乾燥隱生大生熊蟲恢復至正常活動狀態所需時間。(在前人的研究結果中以乾燥隱生大生熊蟲檢測化學壓力，並未受到傷害且能夠快速得知檢測結果，並能夠重複利用)

1.記錄大生熊蟲螢光光譜(n=3)

在前人的研究中發現在 490nm 與 570nm 激發下，大生熊蟲均能夠產生自體螢光，本次實驗想要探討大生熊蟲自體螢光激發波長範圍。

實驗步驟

1. 將大生熊蟲以活動與隱生組方式封片
2. 放入共軛焦顯微鏡下
3. 設定激發光源在 405nm、458nm、488nm、514nm、561nm、633nm 波長，共照射 6 次，每張間隔 8.9nm，光源強度為 1 mW，掃描範圍為 $1024\mu\text{m} \times 1024\mu\text{m}$ ，偵測器設定為接收 405nm、440nm、458nm、488nm、514nm、561nm、633nm、695~735nm 等光源
4. 設定拍攝橫截面(圖 13)，每層間隔 $3.21\mu\text{m}$ ，分析影像中螢光強度最強數值
5. 以 imagej 分析數據後，繪製光譜

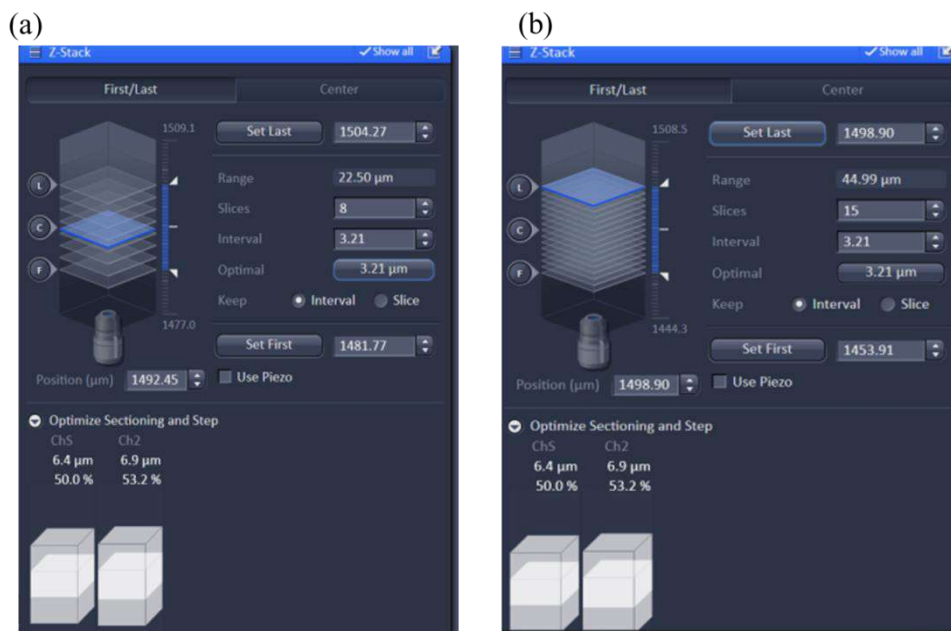


圖 13、共軛焦顯微鏡拍攝大生熊蟲 Z 軸層數(作者拍攝)(a) 活動大生熊蟲 (b) 隱生大生熊蟲

2. 利用螢光顯微鏡探討大生熊蟲自體螢光檢測不同濃度硝酸鹽，並繪製檢量線 (n=10；Tech=3)

根據前言假說，利用大生熊蟲在不同硝酸鹽濃度下，隱生與活動比例的差別，激發自體螢光後相對螢光強度差異，檢測硝酸鹽壓力。

標準曲線製作(方法參考：顏，2023)：

I.硝酸鹽溶液配置：

以硝酸鈉配置 10000mg/L NO_3^- -N 溶液稀釋出 312、156、125、78、62.5、39、0 mg/L NO_3^- -N。

II.將 2.5g 的水楊酸與 50mL 濃硫酸混合成 5%水楊酸。

III.將硝酸鹽溶液與 5%水楊酸以 11：40 混合，等待 15 分鐘，形成二硝基水楊酸。

IV.最後將二硝基水楊酸與 8%氫氧化鈉以 1：20 混合，等待 10 分鐘使其冷卻，測定 OD_{410} 下吸光值。

大生熊蟲檢測不同濃度硝酸鹽(n=10)

I.樣本處理

(1)將每組各 10 隻活動大生熊蟲，乾燥 24 小時後進入隱生狀態

(2)加入 0、78、156、312 mg/L NO_3^- -N 中。

(3)等待 30 分鐘使大生熊蟲進入 BAT_{50} ，以封片膠和指甲油固定。

II.將玻片放入倒立顯微鏡載物臺下

III.利用倒立螢光顯微鏡激發其自體螢光

IV. 以 imagej 分析樣本螢光強度(圖 16)

V. 繪製大生熊蟲在不同濃度下自體螢光強度檢量線

VI. 將繪製完後的檢量線與水楊酸分光光度法(化學法)所繪製出的檢量線做對比，驗證其準確度。

3.利用自製裝置檢測硝酸鹽壓力並繪製檢量線(n=10；Tech=3)

利用特定波長的光可激發大生熊蟲的自體螢光(顏，2022)，但需要在實驗室內使用螢光顯微鏡才可方便觀察，本研究的自製裝置使用濾光片(偏振片、壓克力板)降低激發光數值影響，本研究利用偏振片與橘色壓克力板作為濾光片，嘗試分析其可行性，簡化熊蟲螢光檢測法中激發熊蟲自體螢光的步驟，提升便利性。

光源選用：

使用波長為 470nm(藍光)LED

樣本處理：同上述中 I.樣本處理方式，為求實驗變因控制精準，因此本次研究所設計裝置皆會使用封片後大生熊蟲作為樣本照射。

實驗步驟：

- 1.將實驗 I.封片樣本，放入偏振片與壓克力板下，拍攝螢光
- 2.利用 imagej 分析螢光強度數值

設計概念(圖 14)：

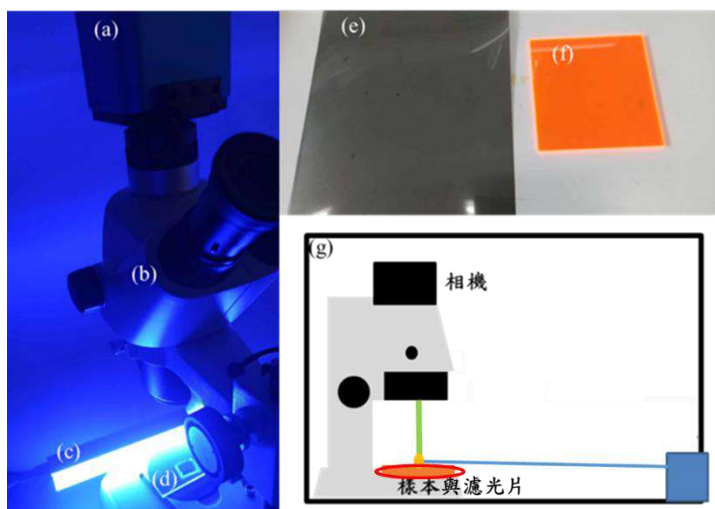


圖 14、LED 激發方法設計示意圖(作者繪製)

(a)為相機(b)為顯微鏡(c)為光源(d)為樣本放置位置(e)偏振片(f)壓克力板(g)裝置設計圖，偏振片與壓克力板將放置在濾光片位置(紅圈位置)

4.使用大生熊蟲檢測蔬菜硝酸鹽壓力(n=10)

為了評估大生熊蟲檢測實際硝酸鹽壓力的可行性與準確度，本研究以大生熊蟲檢測葉菜類蔬菜確認實際運用的可行性。觀察蔬菜中物質是否對大生熊蟲隱生率與螢光強度造成影響，為確認實際檢測精準度，本次研究也將同時探討實際壓力是否會對 10 隻熊蟲的隱生比例產生影響，以及體長是否會對熊蟲的螢光強度產生影響，由於拍攝螢光影像前須要封片，會導致部分大生熊蟲在影像數據中沒有完全伸展，本研究將使用面積取代體長，並嘗試以不封片的形式檢測熊蟲的自體螢光，達到重複利用大生熊蟲進行檢測。

實驗步驟：

- 1.將 10 隻活動大生熊蟲洗淨，並放入 37°C 培養箱 24 小時，乾燥
- 2.將隱生大生熊蟲放入不同種類蔬菜萃取液中，等待 30 分鐘。

使用設備：螢光顯微鏡、自製裝置與手機顯微鏡。

3. 螢光顯微鏡組：將溶液吸出後，以封片膠和指甲油固定封片。

自製裝置組：(1)同上述螢光顯微鏡處理方式。

(2)無須進一步處理(模擬實際狀態)。

2. 激發不同硝酸鹽濃度下大生熊蟲自體螢光，並拍攝照片。

3. 以 imagej 分析影像數據(圖)後，對照實驗 2、3 中所繪製檢量線。

5. 影像分析步驟與分析方法(圖 15~18)

以 imagej 分析，回歸分析，T 檢驗(T-test)分析數據與單因子獨立變異數分析(Analysis of Variance, ANOVA)， $p < 0.05$ 為顯著差異(*)， $p < 0.01$ 為極顯著差異(**)。

I. 螢光光譜分析步驟(圖 15)

1. 開啟 imagej 圖檔

2. 選取欲分析範圍

3. 將數據繪製成折線圖

4. 匯出樣本螢光數值

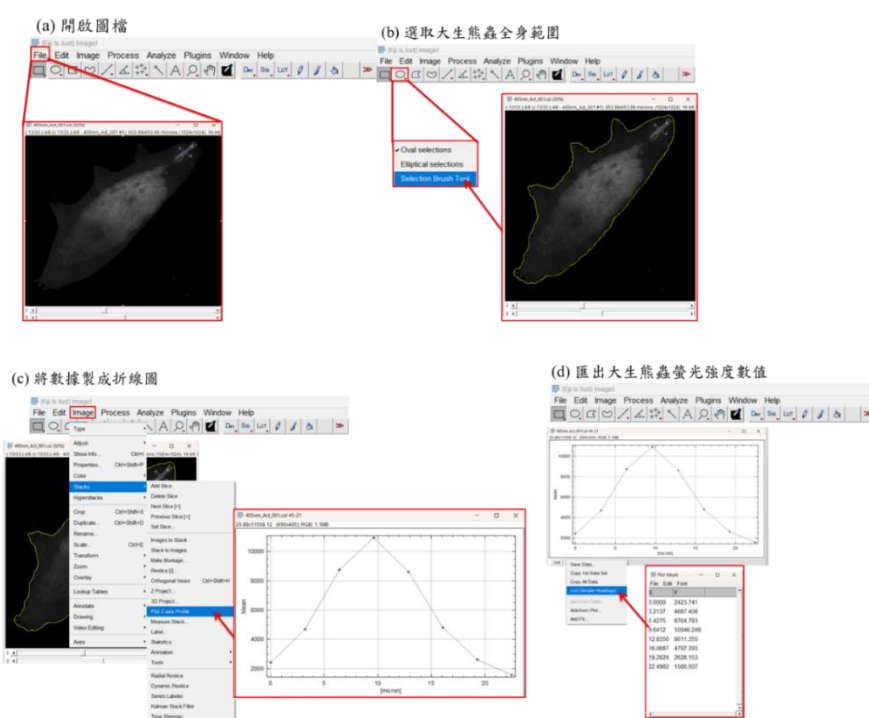


圖 15、螢光光譜分析步驟(作者拍攝)

II. imagej 分析方式(圖 16)

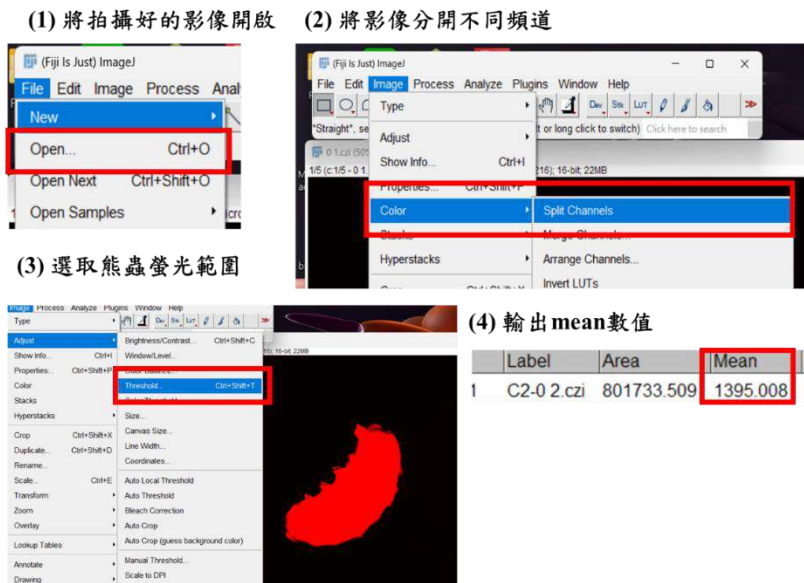


圖 16、imagej 螢光強度操作方式(作者拍攝)

III. 螢光面積分析方式(圖 17)

1. 記錄大生熊蟲檢測實際壓力後活動與隱生隻數與螢光發光面積，確認其隱生比例。
2. 將檢測後大生熊蟲利用 imagej 分析螢光發光面積對照螢光強度，觀察其關聯。



圖 17、imagej 螢光面積操作方式(作者拍攝)

IV. 自製裝置實驗分析步驟：

1. 以 imagej 將照片檔案打開，並選取欲分析範圍
2. 點選 Analyze→Histogram
3. 在藍光介面選取 mean 數值
4. 將數值帶入(3)公式中

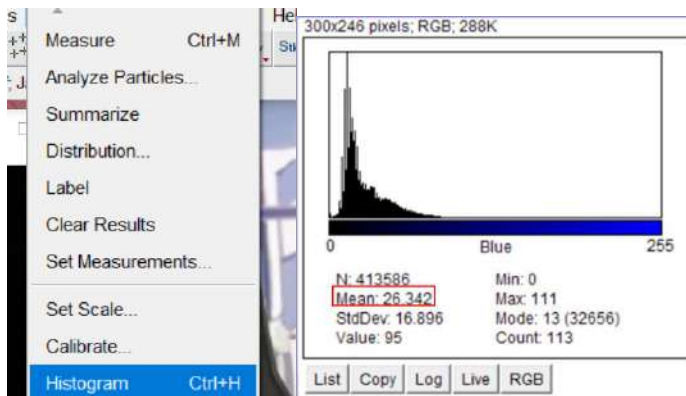


圖 18、濾光片分析步驟(作者拍攝)

V.相對螢光強度(RFI)計算公式：
$$RFI = \frac{Sample}{0mg \text{ Cryptobiosis}_{AVG}}$$

Sample 為樣本螢光數值，0mg Cryptobiosis_{AVG} 為樣本在 0mg/L NO₃⁻-N 下隱生樣本平均螢光數值

VI.自製裝置影像數據分析公式：

$$Sample - background = \text{螢光數值}$$

Sample 為樣本螢光數值，background 為背景值

伍、研究結果

一、利用組織切片探討大生熊蟲自體螢光機制

(一) 大生熊蟲不受切片用溶劑影響其自體螢光

為確認切片後大生熊蟲是否還具有螢光表現，將大生熊蟲置於二甲苯與酒精中，發現其螢光不受影響(圖 19 a、b)，後續分析其螢光強度與面積時發現，受到酒精脫水處理過後的隱生樣本蟲體伸展，其螢光強度與正常活動狀態並無差異($p>0.05$)，並發現其螢光強度與面積成反比(圖 19c、d、e)，未來將持續建立切片技術，觀察並記錄大生熊蟲表皮並標定縱切中段螢光物質。

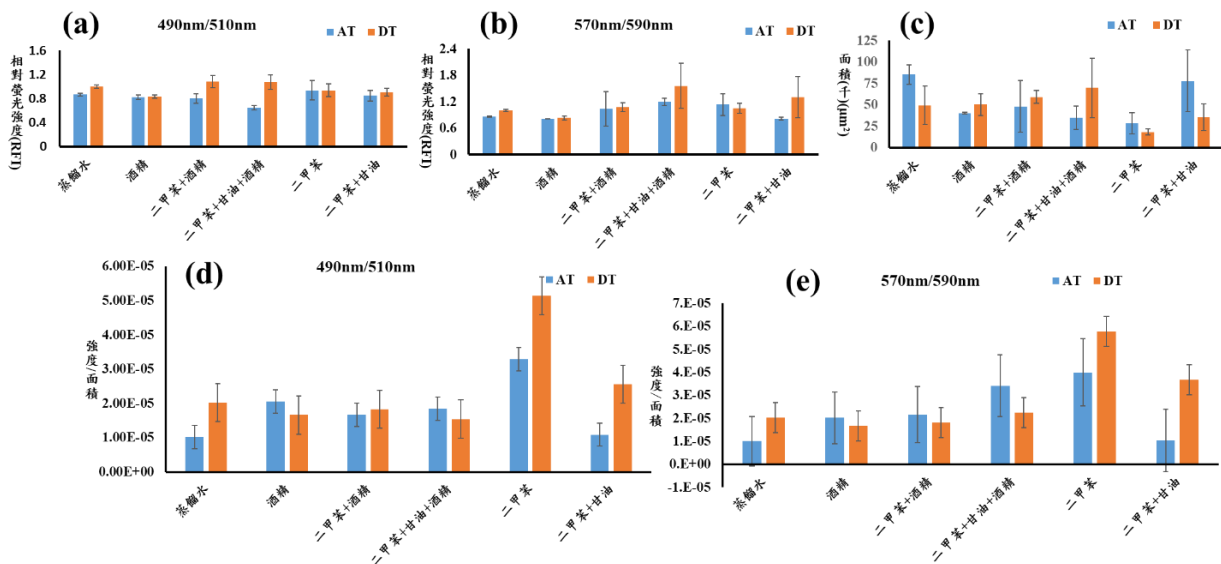


圖 19、大生熊蟲在有機溶劑中螢光強度、面積與比值(作者繪製)(a)為在 490nm/510nm 下螢光強度(b)為在 570nm/590nm 下螢光強度(c)為螢光發光面積(d)為在 490nm/510nm 下螢光強度與面積比值(e)為在 570nm/590nm 下螢光強度與面積比值

二、將大生熊蟲螢光檢測法投入實際應用，並將其標準化 (Bio=10；Tech=3)

(一) 記錄大生熊蟲螢光光譜

利用共軛焦顯微鏡記錄大生熊蟲螢光光譜，確認大生熊蟲在何種波長下能夠激發其自體螢光，結果顯示在 405 nm、458 nm、488 nm、514 nm、561 nm、633 nm 皆能夠激發大生熊蟲字體螢光，488nm 相比其他波長標準差較小且其活動與隱生狀態下螢光強度差異最大(圖 20a)，在 488nm 下能夠發射 507nm~680nm 的螢光(圖 20b)。發現大生熊蟲自體螢光在中段部分最強，隱生狀態螢光強度大於活動狀態(圖 21)(實際圖：圖 22)。

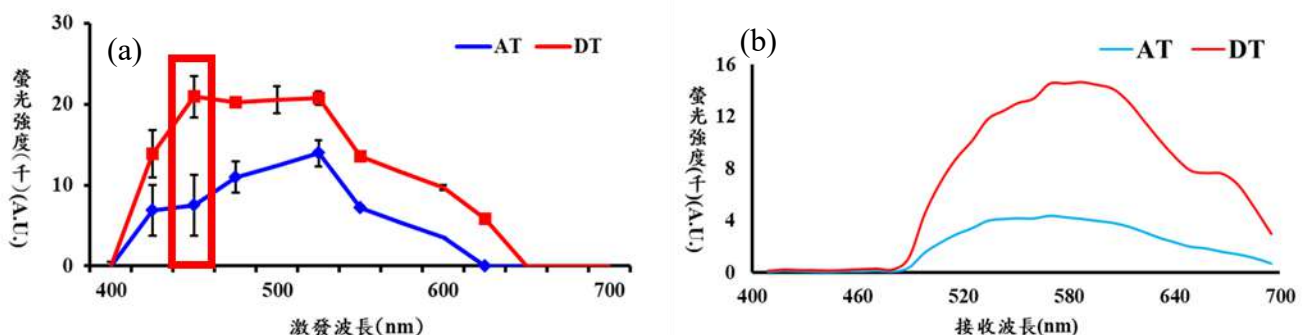


圖 20、大生熊蟲在 488 nm 下發出 569 nm 螢光(作者繪製)，(a)圖為全激發波長，(b)圖為 488nm 激發接收全波長。(作者繪製)，AT 為活動狀態，DT 為隱生狀態

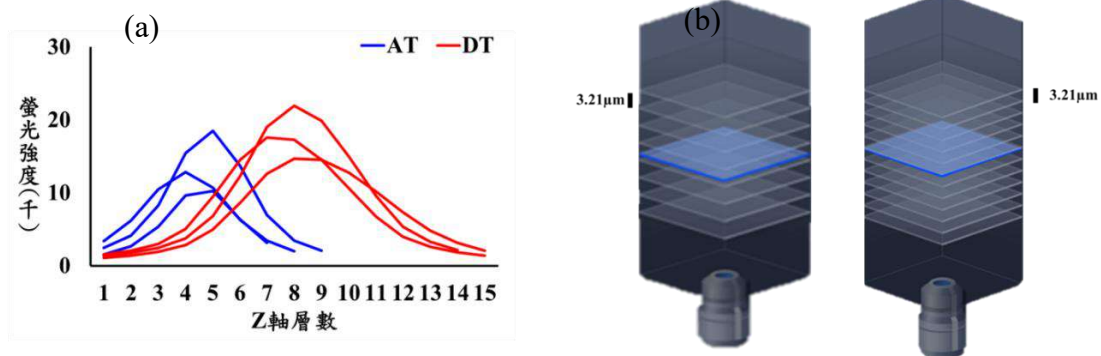


圖 21、大生熊蟲在 488nm 下不同 z 軸螢光強度(作者繪製)

(a)圖中橫軸為 Z 軸聚焦點層數，縱軸為所激發出螢光的訊號強度。(b)大生熊蟲拍攝 Z 軸示意圖 AT 為活動狀態，DT 為隱生狀態，每層 3.21μm

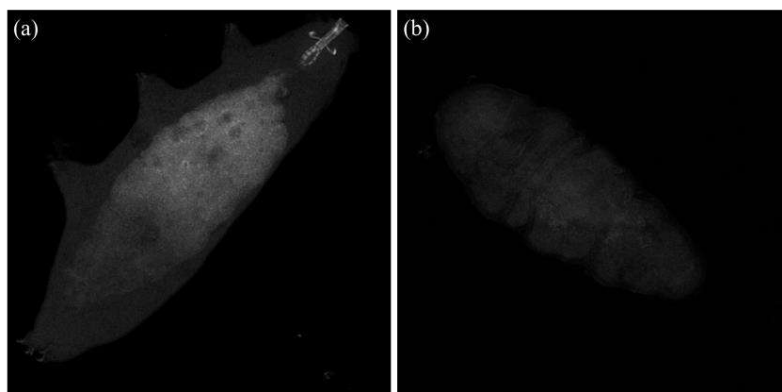


圖 22、共軛焦顯微鏡拍攝大生熊蟲實際圖(作者拍攝) (Z 軸層數 4)(作者拍攝) (a) 活動大生熊蟲 (b) 隱生大生熊蟲

(二) 利用倒立螢光顯微鏡激發大生熊蟲自體螢光

10 隻大生熊蟲利用倒立螢光顯微鏡發現在 490nm、570nm 光線激發下 (570nm/590nm、490nm/510nm) 能夠檢測硝酸鹽，具有相關性，在 312mg/L 硝酸鹽時數值下降。(570nm/590nm $R^2=0.9967$ ；490nm/510nm $R^2=0.7838$) (圖 23a、b)，且螢光強度與大生熊蟲面積有關(圖 23c、d)。

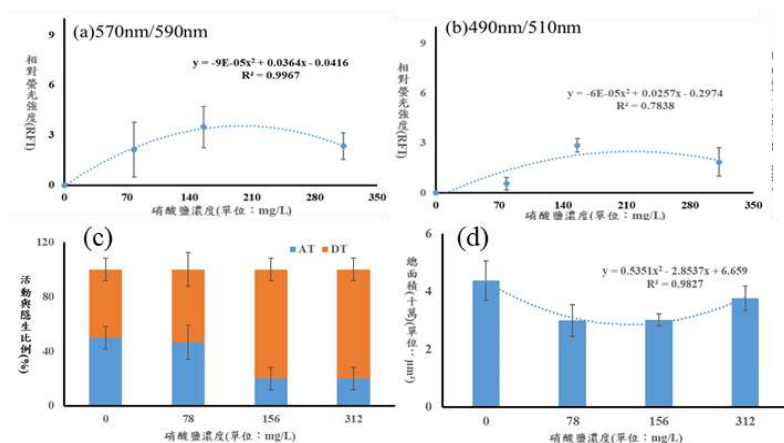


圖 23、大生熊蟲在不同硝酸鹽下的自體螢光對螢光強度(作者繪製) (a)570nm/590nm (b)為 490nm/510nm(c)大生熊蟲檢測不同濃度硝酸鹽時隱生比例(d)為大生熊蟲檢測不同濃度硝酸鹽時各組自體螢光面積

利用螢光顯微鏡分析大生熊蟲在不同硝酸鹽下自體螢光強度，並以內插法取得硝酸鹽濃度發現蔬菜萃取液使大生熊蟲螢光強度與螢光面積呈現浮動狀態，蔬菜萃取液也影響了大生熊蟲的隱生比例，導致檢測結果出線誤差，但依然能夠檢測出蔬菜萃取液是否含有大量硝酸鹽(圖 24)。

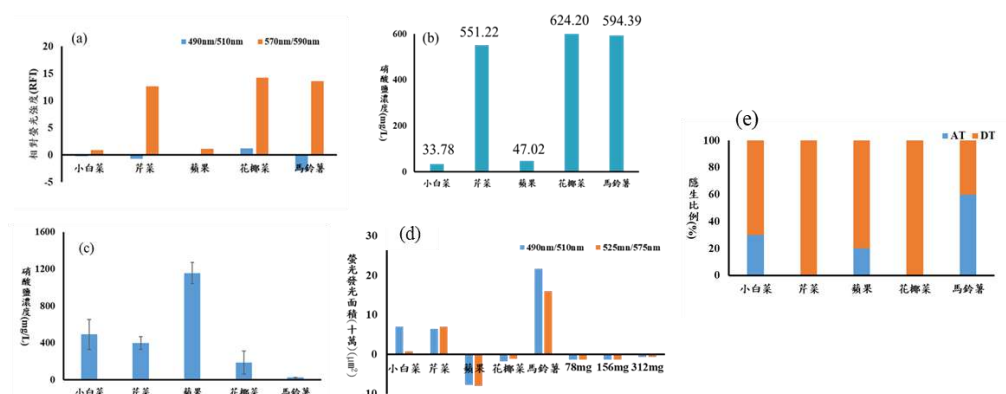


圖 24、大生熊蟲自體螢光檢測硝酸鹽(作者繪製) (a)大生熊蟲檢測蔬菜時螢光強度(b)帶入檢量線攻勢後後取的蔬菜硝酸鹽濃度(c)以化學法檢測蔬菜硝酸鹽濃度(d)為大生熊蟲在蔬菜萃取液中螢光發

光面積，數據分析減去圖 25 d 0mg/L 數據(e)大生熊蟲在不同蔬菜萃取液下隱生比例

(三) 利用自製裝置檢測硝酸鹽壓力並繪製檢量線

嘗試使用不同濾光方式在自製設備下照射大生熊蟲，激發其自體螢光，結果顯示以橘色壓克力板檢測硝酸鹽結果與螢光顯微鏡趨勢符合($R^2=0.9747$)，在檢測蔬菜中硝酸鹽時，大生熊蟲螢光強度依然呈現浮動狀態，與螢光顯微鏡結果吻合，目前也顯示大生熊蟲自體螢光可用於檢測定性檢測蔬菜硝酸鹽壓力(圖 25)。

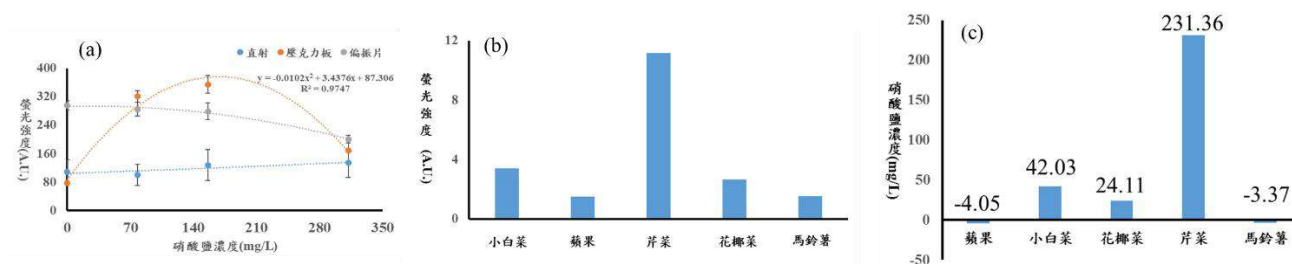


圖 25、自製裝置檢測硝酸鹽壓力(作者繪製)

(a)在純硝酸鹽壓力下檢量線，激發波長:470nm，壓克力板 $R^2=0.9747$ (b)大生熊蟲在蔬菜萃取液下螢光強度(c)將圖(b)結果帶入公式後取得蔬菜硝酸鹽濃度

陸、討論

一、大生熊蟲螢光與體積變化關係

由圖 19 結果可發現在酒精中的大生熊蟲因其體表伸長，造成其螢光強度下降，藉由大生熊蟲螢光照片中可知大生熊蟲的自體螢光是均勻分布全身，故本研究推測其與大生熊蟲的肌肉運動和表皮組織有關，同為大生熊蟲科的無茅熊蟲屬(*Adorybiotus* sp.) 具有對醇類的高度耐受性，且能夠維持細胞的完整性(Ramløv *et al.*,2001)，故可先排除酒精對大生熊蟲的影響，且大生熊蟲表皮組織是由幾丁質與膠原蛋白作為激發螢光的主要物質(Massa *et al.*,2023)(Bartels *et al.*,2024)，在隱生時熊蟲(*Richtersius* sp.)腹側縱向肌肉組織、背縱肌肉組織與腿部肌肉組織收縮並收回體腔內部完成隱生(Halberg *et al.*,2013) (圖 26)，可證明大生熊蟲的螢光強度與形態具關連性，符合前言中假說(圖 27)。

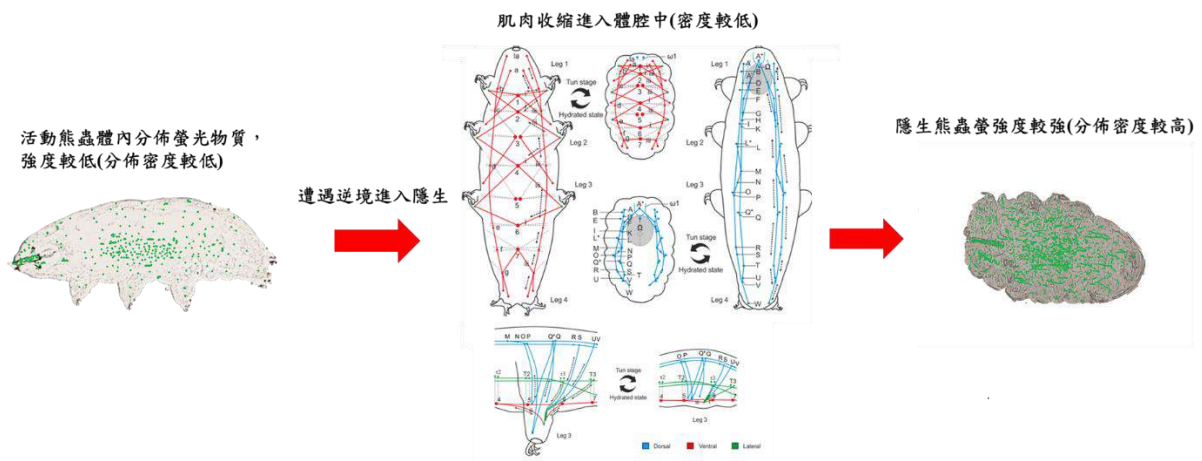


圖 26、大生熊蟲肌肉運動與螢光關係推測圖(來源：Ramløv *et al.*, 2001)，圖中紅線為腹側肌，藍線為背側肌，綠線為側部肌

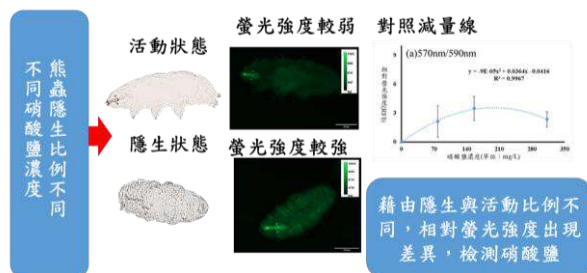


圖 27、大生熊蟲檢測硝酸鹽螢光機制推測圖(作者繪製)

二、緩步動物組織切片固定液比較

本研究目前使用 10%低溫福馬林進行切片，並未有明顯成果，文獻中多以用 3~4%甲醛溶液與緩衝液配合使用(表 6)，本研究後續將參考文獻使用藥品，繼續建立相關切片技術，未來將同時嘗試以冷凍切片方式探討大生熊蟲螢光機制。

表 6、水熊蟲不同固定液效果比較(作者繪製)

實驗動物	固定液	參考文獻
<i>Hypsibius</i> sp.	4%多聚甲醛與0.1 MPBS緩衝	Hering <i>et al.</i> , 2016
<i>Richtersius</i> sp.	至於ddH ₂ O後速凍，無固定液處理	Nilsson <i>et al.</i> , 2014
<i>Halobiotus</i> sp.	3% 甲醛溶液與 0.1 M cacodylate 緩衝液	Halberg <i>et al.</i> , 2012
<i>Macrobiotus</i> sp.	10%低溫福馬林	本研究

三、緩步動物自體螢光應用與硝酸鹽檢測法比較

在其他的研究中，水熊蟲自體螢光，大多用於觀察結構與物種鑑定，而本研究創新利用大生熊蟲自體螢光檢測硝酸鹽壓力。

大生熊蟲具有重複檢測化學壓力的能力，利用檢量線，能夠藉由螢光強度數值，檢測硝酸鹽壓力，相較於其他模式生物而言，使大生熊蟲檢測環境壓力可以減少模式生物死亡，相較於其他化學檢測法，使用大生熊蟲可以降低設備要求且只需將乾燥隱生大生熊蟲置於待測定的溶液中並且分析其自體螢光數值，未來推廣大生熊蟲作為模式生物可利用自體螢光的方式檢測硝酸鹽，此模式相較化學法，可降低化學廢棄物的產生，相對於利用其他模式生物，也能夠重複檢測，實現永續生產的概念。

表 7、不同裝置激發大生熊蟲螢光比較(作者繪製)

使用目的	檢測條件	反應時間	製作	優點	缺點
倒立螢光顯微鏡	不同硝酸鹽度下大生熊蟲隱生與活動狀態比例不同，相對螢光強度差異間接檢測硝酸鹽	30分鐘	玻片標本 (去除硝酸鹽溶液)	量化方便	須封片、需使用imagej分析
共軛焦顯微鏡	觀察光譜與疊層數，推測發光機制		乾燥隱生熊蟲加入檢測物	最精準	須封片、費用高 需使用imagej分析
ELISA Reader	在水溶液中光譜與檢測硝酸鹽		待測液	快速、方便	目前不可使用
自製裝置	利用簡便裝置與大生熊蟲封片檢測硝酸鹽		玻片標本 (去除硝酸鹽溶液)	設備要求低	誤差較大、需使用imagej分析

利用自製裝置觀察大生熊蟲的自體螢光，減少螢光顯微鏡等設備需求，並在未來可嘗試發展出以手機為主體的裝置，並開發專用 APP 以利於數值分析。

表 8、利用水熊蟲自體螢光研究方法比較(作者繪製)

熊蟲物種	觀察方式	使用儀器	用途	參考文獻
<i>Paramacrobiotus</i> sp.	飢餓24小時後，加上水取尚清液	365nm 螢光顯微鏡	探討表皮構造阻擋紫外線	Suma <i>et al.</i> ,2020
<i>Macrobiotus</i> sp.	直接封片	488nm 落射式螢光顯微鏡	物種鑑定	Perry <i>et al.</i> ,2015
	幾丁質染色後封片	330~385nm 雷射掃描顯微鏡		Massa <i>et al.</i> ,2024
<i>Milnesium</i> sp.	幾丁質染色後封片	488nm 雷射掃描顯微鏡	物種鑑定	Massa <i>et al.</i> ,2024
<i>Macrobiotus</i> sp.	活動與隱生比例	490nm、570nm 螢光顯微鏡	檢測硝酸鹽	本研究

表 9、環境壓力檢測方式與水熊蟲檢測法比較 (作者繪製)

檢測方式	觀察方式	反應時間	硝酸鹽檢測極限 (mg/LNO ₃ ⁻ -N)	優點	缺點
水楊酸分光光度法	水溶液吸光值(OD ₄₁₀)	25分鐘	312	準確度高	易受雜質影響
大生熊蟲鏡檢	玻片標本觀察(水埋玻片)	30分鐘	312	可重複使用、零污染	形態觀察不易
大生熊蟲自體螢光	玻片標本觀察(永久玻片)		156	可重複觀察，建立標準	現階段需要封片

利用大生熊蟲進行檢測，可使用較微量(50μL)的待測物進行檢測，在實際應用層面能夠定性檢測，使消費者了解蔬菜中是否含有大量硝酸鹽，使用自體螢光觀察結果，可改善熊蟲形態觀察不易問題。

四、大生熊蟲蛻皮存在自體螢光(圖 28、29) (n=3)

本研究發現大生熊蟲蛻皮口器與爪部分具有螢光，與文獻中一致(Massa *et al.*, 2024)，由此證實大生熊蟲表皮影響自體螢光強度(圖 28)，目前推測口器與爪是由幾丁質與膠原蛋白組成，且由圖 27 可以發現，大生熊蟲除了表皮以外，體內其他部分存在螢光物質，後續將以組織切片標定物質，了解生理意義。

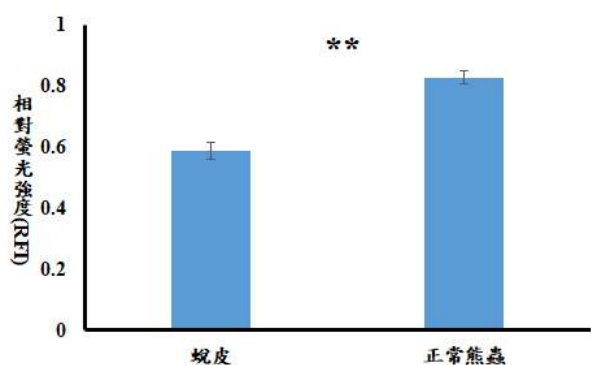


圖 28、大生熊蟲蛻皮與活動狀態自體螢光相對螢光強度比較(n=3) (作者繪製)，**表極顯著差異 $p < 0.01$

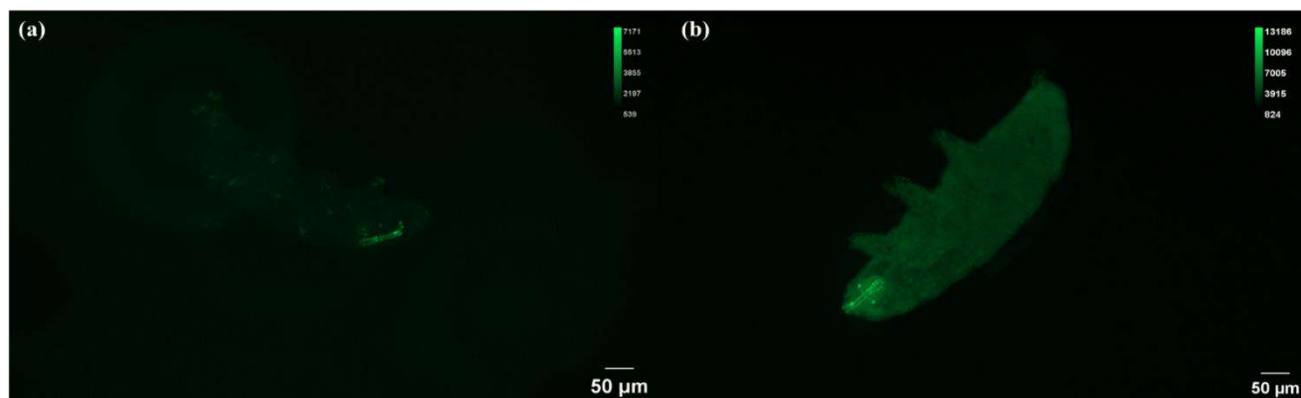


圖 29、大生熊蟲自體螢光實際圖(作者拍攝)

(a) 蛻皮的自體螢光(b)正常活動時的自體螢光

五、大生熊蟲自體螢光被干擾可能原因

目前結果顯示蔬菜萃取液會影響大生熊蟲螢光表現，導致無法進行定量檢測，本研究推測三個原因解釋此現象。

第一：由於萃取液中的背景值干擾大生熊蟲自體螢光結果(圖 30；表 10)，導致分析出現錯誤。

第二：由於萃取液中的複合壓力成分使大生熊蟲進入不完全隱生狀態，造成結果誤差。

第三：萃取液中其他成分接觸大生熊蟲後，抑制其螢光表現。

表 10、蔬菜萃取液背景值紀錄表(作者繪製)

	490nm/510nm	570nm/590nm
蘋果	無	無
小白菜	有	有
花椰菜	有	有
芹菜	無	有
馬鈴薯	無	無

圖 30、葉菜類萃取液實際圖(490nm/510nm)(小白菜萃取液)(作者拍攝繪製)

蔬菜萃取液中複合壓力成分抑制螢光表現導致大生熊蟲進入不完全隱生狀態，文獻中表示植物中的類黃酮(Flavonoids) 能夠調節 GABA(γ -氨基丁酸)受體的活性，讓神經元過極化，從而抑制神經興奮(Johnston1,2015)，另一篇顯示拉氏雄蟲(*Ramazzottius* sp.)在隱生後，GABA 受體會使隱生狀態更加穩定 (Emdee *et al.*,2024)(圖 31)。本研究在實驗結果中，接觸蔬菜萃取液的大生熊蟲，其螢光強度與面積受到部分蔬菜萃取液影響，在芹菜與花椰菜中呈現完全隱生狀態，目前推測是由於芹菜與花椰菜中類黃酮，抑制大生熊蟲神經衝動，使大生熊蟲在芹菜與花椰菜萃取液中呈現隱生狀態(圖 32)，其他萃取液(小白菜、蘋果、馬鈴薯)中成分，也可能影響大生熊蟲螢光表現，導致無法定量檢測硝酸鹽。由馬鈴薯萃取液結果可發現，主要影響大生熊蟲隱生的成分，依然為硝酸鹽。未來將以 LC MS/MS 繼續探討蔬菜萃取液中是否含有類黃酮，以及詳細了解在蔬菜萃取液對大生熊蟲具體影響。

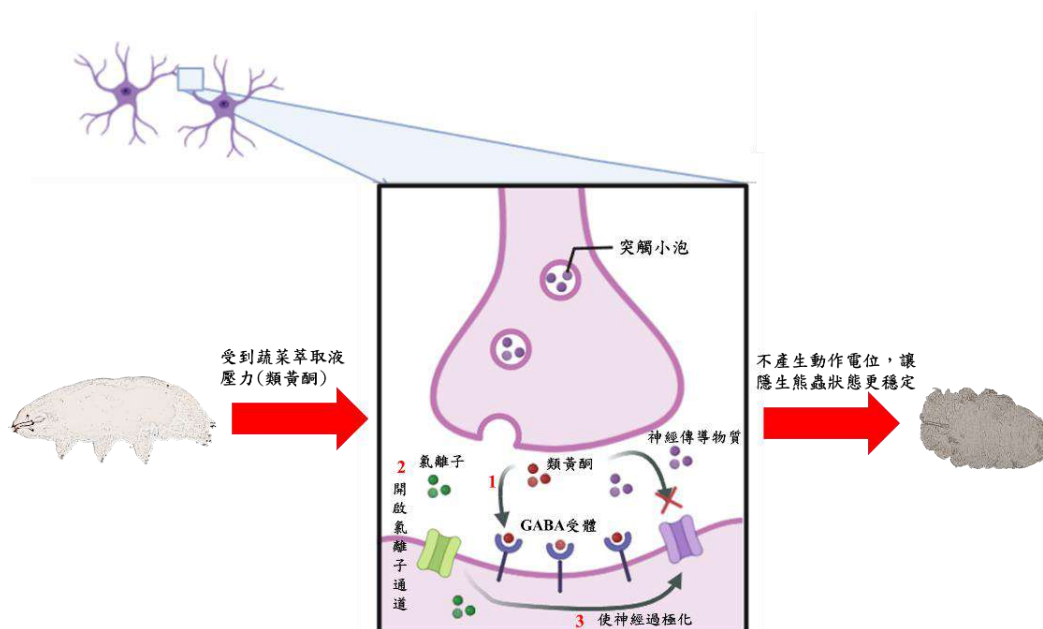


圖 31、大生熊蟲在蔬菜萃取液下，類黃酮影響機制圖。1.類黃酮接觸 GABA 受體 2.開啟氯離子通道 3.使神經過極化，不產生動作電位(作者繪製)

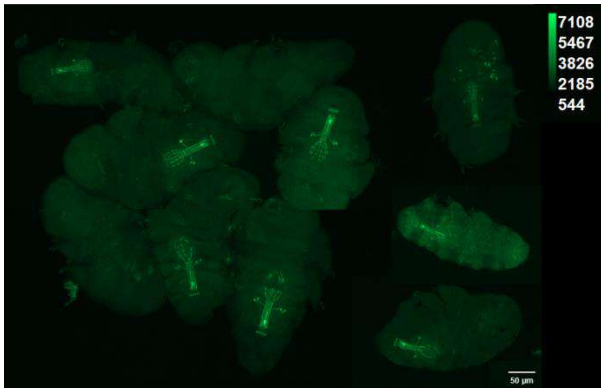


圖 32、大生熊蟲在芹菜萃取液中實際圖(作者拍攝)

六、自製裝置激發大生熊蟲螢光投入實際應用可行性

目前可利用顯微鏡相機與橘色壓克力板，成功檢測不同濃度的硝酸鹽，且已有文獻整理出以手機作為螢光探測器測定螢光的方法(Shin *et al.*, 2021)，未來將探討簡化螢光激發流程與利用智慧裝置分析大生熊蟲自體螢光強度可行性，未來會以市面上以手機為基準的螢光裝置最為範本，加以改良裝置，並且全面發展 APP 檢測硝酸鹽壓力，並且推廣使用，實踐 SDGS 中永續生展的概念。目前利用 APP 可順利輸出在標準溶液下硝酸鹽濃度，但仍然具也誤差，未來可繼續發展 APP，將模式便利化(圖 33、34)，未來也可嘗試探討以 APP 定性檢測蔬菜取液中是否具有硝酸鹽。



圖 33、自製 APP 檢測硝酸鹽流程圖(作者繪製)

```

BUILD SUCCESSFUL (total time: 0 seconds)
選擇的像素的亮度為: 387.29
硝酸鹽的濃度為: 155.16910935738446

```

圖 34、實際 APP 偵測硝酸鹽濃度(作者繪製)

陸、結論

一、本研究以組織切片方式探討大生熊蟲自體螢光相關機制，目前仍在建立大生熊蟲切片技術，在預備實驗中發現大生熊蟲自體螢光不受石蠟切片用有機溶劑(二甲苯、酒精)影響，但受到隱生幅度影響。

二、確認大生熊蟲激發螢光光譜(激發光：488nm，發射光：507nm~680nm)

三、使用大生熊蟲自體螢光檢測硝酸鹽壓力，可檢測 0~156mg/L 的硝酸鹽，並且改善鏡檢的缺點。

四、目前研究成果顯示，大生熊蟲檢測蔬菜硝酸鹽時，螢光強度與螢光面積數值受蔬菜萃取液影響，目前利用自體螢光定性檢測蔬菜中是含有大硝酸鹽。

五、初步建立簡易自製裝置檢測硝酸鹽方法。大生熊蟲自體螢光檢測法可成為新型檢測硝酸鹽模式。

柒、未來展望

一、大生熊蟲使用石蠟切片目前無法切出組織，且未來進行機制探討時，石蠟切片可能影響大生熊蟲體內螢光物質性質，未來將持續建立大生熊蟲組織切片相關技術，並以冷凍切片方式標定大生熊蟲體內幾丁質與膠原蛋白，詳細解析螢光機制。

二、探討大生熊蟲在其他環境壓力下自體螢光表現是否與硝酸鹽一致，繼續探討其螢光機制

三、將大生熊蟲自體螢光檢測硝酸鹽法發展便捷的檢測模型，利用 APP 檢測硝酸鹽並上架應用商店。

四、設計智慧型手機為主體的便攜式檢測方式。

五、由於蔬菜萃取液影響大生熊蟲自體螢光強度表現，後續將利用 LC MS/MS 分析蔬菜中壓力成分，探討萃取液中是否含有類黃酮，探討類黃酮對大生熊蟲隱生形成的影響與對自體螢光關係。

捌、參考文獻

參考文獻：

- (一) 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
- (二) 段建軍，周建斌，王國棟，胡普輝與劉延風(2002)。NO₃-N 的水楊酸比色法快速測定。西北農林科技大學學報(自然科學版)，30(3)。
- (三) 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。
- (四) 顏健弘 (2021)。中華民國第 61 屆中小學科學展覽會作品說明書：水熊蟲分類與建立模式生物系統評估。
- (五) 顏健弘(2022)。2022 年臺灣國際科學展覽會優勝作品專輯：水熊蟲於化學環境壓力耐受機制探討。
- (六) 顏健弘(2023)。2023 年台灣國際國際科學展覽會研究報告：建立檢測化學壓力新型模式生物-大生熊蟲實際應用與耐受機制探討。
- (七) 蕭世傑(2011)。以多通道螢光光譜影像系統與螢光指標探討甘藍苗水份逆境之研究。國立臺灣大學生物資源暨農學院生物產業機電工程學系博士論文
- (八) 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.
- (九) American Publish Health Association.2017. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 23rd Edition. Method 4500 B, pp.4-87~4-88, APHA, Washington, D.C., USA.
- (十) Bartels, P. J., Coffey, D. C., Pineau, M., Kaczmarek, L., & Nelson, D. R. (2024). An exploration of autofluorescence in tardigrades (phylum Tardigrada). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 200(1), 200-217.
- (十一) Brandls, M., Posniecek, T., Preuer, R., & Weigelhofer, G. (2020). A portable sensor system for measurement of fluorescence indices of water samples. *IEEE Sensors Journal*, 20(16), 9132-9139.
- (十二) Bjørn-Mortensen, M. (2006). Osmoregulation and osmobiosis in the eutardigrade *Richtersius coronifer*. Roskilde Roskilde University Institute for Biology and Chemistry.
- (十三) Croce, A. C., & Bottiroli, G. (2014). Autofluorescence spectroscopy and imaging: a tool for biomedical research and diagnosis. *European journal of histochemistry: EJH*, 58(4).
- (十四) Emdee, N., Møbjerg, A., Grollmann, M. M., & Møbjerg, N. (2024). Osmotic stress tolerance

and transcriptomic response of *Ramazzottius varieornatus* (Eutardigrada: Ramazzottiidae) following tun formation. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 200(1), 220-229.

(十五) García-Plazaola, J. I., Fernández-Marín, B., Duke, S. O., Hernández, A., López-Arbeloa, F., & Becerril, J. M. (2015). Autofluorescence: biological functions and technical applications. *Plant Science*, 236, 136-145.

(十六) Goldstein, B. (2022). Tardigrades and their emergence as model organisms. In *Current topics in developmental biology* (Vol. 147, pp. 173-198). Academic Press.

(十七) Halberg, K. A., & Møbjerg, N. (2012). First evidence of epithelial transport in tardigrades: a comparative investigation of organic anion transport. *Journal of Experimental Biology*, 215(3), 497-507.

(十八) Hering, L., Bouameur, J.-E., Reichelt, J., Magin, T. M., & Mayer, G. (2016). Novel origin of lamin-derived cytoplasmic intermediate filaments in tardigrades. *eLife*, 5, e11117

(十九) Irandoust, M., Shariati-Rad, M., & Haghighi, M. (2013). Nitrite determination in water samples based on a modified Griess reaction and central composite design. *Analytical Methods*, 5(21), 5977-5982.

(二十) Johnston, G. A. (2015). Flavonoid nutraceuticals and ionotropic receptors for the inhibitory neurotransmitter GABA. *Neurochemistry international*, 89, 120-125.

(二十一) Moussian, B. (2013). The arthropod cuticle. In *Arthropod biology and evolution: molecules, development, morphology* (pp. 171-196). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg

(二十二) Mapalo, M. A., Robin, N., Boudinot, B. E., Ortega-Hernández, J., & Barden, P. (2021). A tardigrade in Dominican amber. *Proceedings of the Royal Society B*, 288(1960), 20211760.

(二十三) Massa, E., Rebecchi, L., & Guidetti, R. (2024). Composition and structural organization of tardigrades feeding apparatus focusing on chitin and other autofluorescent molecules. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 200(1), 186-199.

(二十四) Monici, M. (2005). Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. *Biotechnology annual review*, 11, 227-256.

(二十五) Nilsson, E. J. C., Pallon, J., Przybylowicz, W. J., Wang, Y. D., & Jönsson, K. I. (2014). Evaluation of cryoanalysis as a tool for analyzing elemental distribution in “live” tardigrades using micro-PIXE. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 332, 181-186.

- (二十六) Radosavljevic, D. (2019). Elemental Characterization of the Whip Spider Cuticle (Arachnida: Amblypygi) (Master's thesis, University of Massachusetts Lowell)
- (二十七) Roszkowska, M., Wojciechowska, D., Kmita, H., Cerbin, S., Dziuba, M. K., Fiałkowska, E., ... & Kaczmarek, Ł. (2021). Tips and tricks how to culture water bears: simple protocols for culturing eutardigrades (Tardigrada) under laboratory conditions. *The European Zoological Journal*, 88(1), 449-465.
- (二十八) 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
- (二十九) Surre, J., Saint-Ruf, C., Collin, V., Orena, S., Ramjeet, M., & Matic, I. (2018). Strong increase in the autofluorescence of cells signals struggle for survival. *Scientific reports*, 8(1), 1-14.
- (三十) Scolari, F., Girella, A., & Croce, A. C. (2022). Imaging and spectral analysis of autofluorescence distribution in larval head structures of mosquito vectors. *European Journal of Histochemistry: EJH*, 66(4).
- (三十一) SCHÖnenbrucher, H. O. L. G. E. R., Adhikary, R., Mukherjee, P., Casey, T. A., Rasmussen, M. A., Maistrovich, F. D., ... & Petrich, J. W. (2008). Fluorescence-based method, exploiting lipofuscin, for real-time detection of : central nervous system tissues on bovine carcasses. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(15), 6220-6226.
- (三十二) Shin, Y. H., Gutierrez-Wing, M. T., & Choi, J. W. (2021). Recent progress in portable fluorescence sensors. *Journal of The Electrochemical Society*, 168(1), 017502.
- (三十三) Suma, H. R., Prakash, S., & Eswarappa, S. M. (2020). Naturally occurring fluorescence protects the eutardigrade *Paramacrobiotus* sp. from ultraviolet radiation. *Biology Letters*, 16(10), 20200391
- (三十四) Uckert, W., Pedersen, L., & Günzburg, W. (2000). Green fluorescent protein retroviral vector: generation of high-titer producer cells and virus supernatant. *Gene Therapy of Cancer: Methods and Protocols*, 275-285.

參考網站：

- (一) 大虫農業(2018 年 11 月 27 日)，植物養分平衡與病害--氮。2024 年 5 月取自：
<https://reurl.cc/lymr09>
- (二) 水中硝酸鹽氮檢測方法-分光光度計法。植根法律網。2023 年 12 月取自：

<https://www.rootlaw.com.tw/LawArticle.aspx?LawID=A040300081044600-0940808>

(三) 主婦聯盟環境保育基金會。葉菜兩片，硝酸鹽就超標。2023 年 12 月取自：

<https://www.huf.org.tw/news/content/1309?fbclid=IwAR1n2FXaSzdkTmhK2QrJRzPOijdUu>
[tdvtvRFw6cdRxaqvnGGNVzVIDc8fxI](https://www.huf.org.tw/news/content/1309?fbclid=IwAR1n2FXaSzdkTmhK2QrJRzPOijdUu)

(四) 阿簡生物筆記(2006 年 11 月 16 日)，看見葉綠素的螢光。2024 年 5 月取自：[https://a-](https://achen.blogspot.com/2006/11/blog-post_16.html?fbclid=IwAR3HGv7czzD8DJF9eJYgcOoNZvMdaoe85JQ2iF94V6b8sbkXV2WBfeI)
[chien.blogspot.com/2006/11/blog-](https://achen.blogspot.com/2006/11/blog-post_16.html?fbclid=IwAR3HGv7czzD8DJF9eJYgcOoNZvMdaoe85JQ2iF94V6b8sbkXV2WBfeI)

[post_16.html?fbclid=IwAR3HGv7czzD8DJF9eJYgcOoNZvMdaoe85JQ2iF94V6b8sbkXV2WBfeI](https://achen.blogspot.com/2006/11/blog-post_16.html?fbclid=IwAR3HGv7czzD8DJF9eJYgcOoNZvMdaoe85JQ2iF94V6b8sbkXV2WBfeI)
[Vofl](https://achen.blogspot.com/2006/11/blog-post_16.html?fbclid=IwAR3HGv7czzD8DJF9eJYgcOoNZvMdaoe85JQ2iF94V6b8sbkXV2WBfeI)

(五) 吳承諦(2022 年 4 月 7 日)。亞硝酸鹽會致癌？當食品添加硝酸鹽遇上「它」才危險。hello 醫生。2023 年 9 月。取自：<https://helloyishi.com.tw/healthy-eating/nutrition/what-is-nitrite/>

(六) 吳曜如(2023 年 12 月 17 日)。海洋裡的點點螢光。2024 年 5 月取自：

[https://oceanomics.blogspot.com/2023/12/blogpost_80.html?fbclid=IwZXh0bgNhZW0CMTAAAR](https://oceanomics.blogspot.com/2023/12/blogpost_80.html?fbclid=IwZXh0bgNhZW0CMTAAAR3sK2sGico_aBZMs84JvzqsKMkMKZ-QnlKiqFZolrZR6U2jujW2Lgv3C4_aem_TH-BenHMuFWSOzF_6T6bQw)
[3sK2sGico_aBZMs84JvzqsKMkMKZ-QnlKiqFZolrZR6U2jujW2Lgv3C4_aem_TH-](https://oceanomics.blogspot.com/2023/12/blogpost_80.html?fbclid=IwZXh0bgNhZW0CMTAAAR3sK2sGico_aBZMs84JvzqsKMkMKZ-QnlKiqFZolrZR6U2jujW2Lgv3C4_aem_TH-BenHMuFWSOzF_6T6bQw)
[BenHMuFWSOzF_6T6bQw](https://oceanomics.blogspot.com/2023/12/blogpost_80.html?fbclid=IwZXh0bgNhZW0CMTAAAR3sK2sGico_aBZMs84JvzqsKMkMKZ-QnlKiqFZolrZR6U2jujW2Lgv3C4_aem_TH-BenHMuFWSOzF_6T6bQw)

(七) 林麗娟(2004 年 5 月 12 日)。吃葉菜應避免硝酸鹽殘留。2024 年 5 月取自：
<https://info.organic.org.tw/3613/>

(八) 協助人類健康的大功臣「模式生物」。PanSci。2023 年 12 月取自：<https://pansci.asia/archives/164662>

(九) 許一懿 (2009 年 08 月 14 日)。模式生物 (Model Organisms)-上。科學 Online。

2023 年 09 月取自：<https://highscope.ch.ntu.edu.tw/wordpress/?p=924>

[-Jmlp2zHUjDCQUcBH3PZtjk-moY4Xz6eIQOYgQ-yE3HpYJho](https://highscope.ch.ntu.edu.tw/wordpress/?p=924)

(十) 源資國際生物科技(2024 年 8 月 30 日)。實驗技術系列-組織切片染色。2024 年 10 月取自：https://www.tri-ibitech.com.tw/knowledge_detail.asp?deid=104

(十一) 廖靜蕙(2012 年 9 月 20 日)。台灣人熱愛葉菜 硝酸鹽殘留沒標準。2023 年 12 月取自：
<https://e-info.org.tw/node/80536>

(十二) 模式生物 (1) 從模式生物外推知識。vocus。2023 年 12 月取自：<https://vocus.cc/article/60e50b2afd897800011d78a9>

(十三) 彭宗仁(2009 年 10 月)水體中硝酸鹽汙染之危害，2024 年 3 月取自：

https://www.spnp.gov.tw/News_Content.aspx?n=14500&s=239293

(十四) Emma Bryce(2023 年 05 月 16 日)被低估的無形污染 化學物質對海洋與人類造成怎樣的危害？<https://e-info.org.tw/node/236747>

(十五) LED 與 LD 的差別 LED inside(2007 年 8 月)，2024 年 4 月取自：

<https://www.ledinside.com.tw/knowledge/20070820-606.html>

(十六) 衛生福利部(2010 年 10 月 28 日)。如何減低蔬果中硝酸鹽含量。衛生福利部:

https://l.messenger.com/l.php?u=https%3A%2F%2Fwww.mohw.gov.tw%2Fcp-3161-26020-1.html&h=AT2iXoPcGJKvrAdWzOtOAPvxPEwxLsBWZbtHbfj8fD35Gmzkl4axAVt_U1roy10BN4OvseqVJ7HTtiaoGPmXcW7faEBqDjqPMdEajaxGHPcU8f-qXubyVw3mJt4zt4T_85fTlA

【評語】 050002

本研究探討以大生熊蟲自體螢光為基礎的硝酸鹽檢測模式，分析隱生狀態與活動狀態間的螢光差異，並提出使用自製便攜裝置進行硝酸鹽壓力檢測的新方法。研究確定最佳激發波長為 488 nm，檢量線的 R^2 高達 0.99，證明該方法在定性檢測中的準確性。然而，蔬菜萃取液的干擾對螢光信號的穩定性造成影響，限制了實際應用中的定量能力。

缺點與改進建議：

1. 測試範圍過窄：

檢測濃度範圍僅 0 - 156 mg/L，無法涵蓋高硝酸鹽樣本（如小白菜 492 mg/L）。建議擴展濃度範圍或改進方法以提高實際應用價值。

2. 干擾效應：

蔬菜萃取液中的成分（如葉綠素與類黃酮）對螢光信號產生顯著干擾，降低檢測準確性。建議引入前處理步驟（如過濾或化學分解）以減少干擾。

3. 數據一致性問題：

螢光譜測試樣本數（ $n=3$ ）與檢量線繪製（ $n=10$ ）數據不一致，需說明原因並標準化測試條件。

4. 實驗室依賴性：

雖然便攜裝置有效，但仍需實驗室設備進行校正（如螢光顯微鏡）。建議開發完全獨立的便攜式檢測系統。

5. 生物化學機制欠缺：

對螢光強度的分子基礎（如隱生相關結構）闡述不足，需補充分子與化學層面分析。