

中華民國第 64 屆中小學科學展覽會

作品說明書

高級中等學校組 動物與醫學學科
探究精神獎

052014

建立大生熊蟲檢測硝酸鹽模式

學校名稱： 新北市私立竹林高級中學

作者： 高一 張恩榮 高一 陳世穎	指導老師： 顏嘉怡
---------------------------------	------------------

關鍵詞： 大生熊蟲、硝酸鹽、檢測模式

摘要

本研究以大生熊蟲(*Macrobiotus* sp.)為對象，建立其自體螢光檢測硝酸鹽模式，可以解決使用大生熊蟲檢測硝酸鹽時活動與隱生狀態難以判斷的問題。在建立此模式的過程中，嘗試利用雷射與 LED 激發大生熊蟲自體螢光，與濾光片阻隔激發樣本後反射光效果，由於雷射與 LED 照射樣本後都是反射光，導致無法成功分析大生熊蟲自體螢光，本研究使用相機濾片、偏振片壓克力板，嘗試解決此問題，濾片結果以壓克力板阻擋激發光照射樣本後反射光效果最佳；目前利用倒立螢光顯微鏡確認大生熊蟲可利用活動與隱生狀態下自體螢光相對強度差異檢測硝酸鹽濃度，檢測範圍可在 0~312 mg/L NO_3^- -N ($R^2=0.9016$)。未來將探討大生熊蟲自體螢光激發機制，並探討哪些物質會影響自體螢光的表現，使檢測模式更加完善。

壹、前言

一、研究動機

在團隊的歷年研究中發現大生熊蟲能夠作為模式生物，並能夠重複檢測蔬菜中硝酸鹽(顏，2023)，生化檢測能夠以低污染方式檢測出蔬果內農藥殘留，化妝品的有害成分等……，大生熊蟲面對環境壓力會隱生的特性，並且能夠重複使用，也符合當代生物實驗倫理 4R 原則中減量(Reduction)與取代(Replacement)原則與 ESG 原則中的 Environment (環境保護)、Social (社會責任)和聯合國 SDGs 原則中的永續生產(Responsible Consumption and Production)和確保健康的生活(Good Health and Well-Being)，大生熊蟲檢測法作為生物檢測法，也有著零污染且能夠重複使用的特性，相對於其他種模式生物(例如：線蟲)大生熊蟲也更有優勢。

歐盟規定葉菜類蔬菜硝酸鹽含量不得超過 2,000~5,000 mg/L，我國環保署訂定飲用水及飲用水水源之標準硝酸鹽濃度應小於 45 mg/L (彭，2009)，然而我國並未明確規定進入市場的蔬果硝酸鹽含量上限，我們認為使用大生熊蟲進行生化檢測(圖 1)，可制定不危害人體的安全標準，能夠有效防止硝酸鹽含量超標的蔬果進入市場。

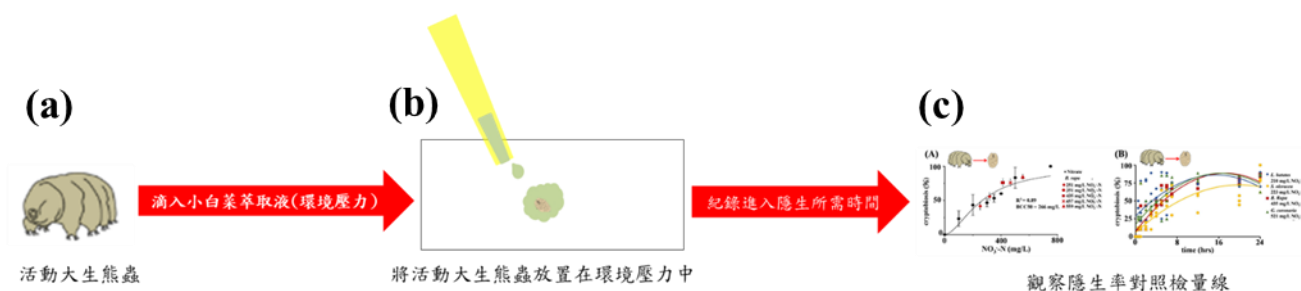


圖 1、大生熊蟲檢測模式示意圖(作者繪製)(資料來源：顏、2023)

(a)、(c) 圖源:顏、2023

在顏的研究中已有將活動大生熊蟲置於蔬菜萃取液中，結由觀察隱生率趨勢檢測硝酸鹽，前人利用此模式檢測硝酸鹽也符合使用化學法的檢測結果，然而，利用鏡檢模式觀察大生熊

蟲，在檢測硝酸鹽時會有形態難以判斷的問題，本研究想建立大生熊蟲檢測硝酸鹽模式，前人發現大生熊蟲活動與隱生狀態在激發波長 490nm 發出 510nm 螢光，其螢光強度具有差異(顏, 2023)，可能夠成為新型觀察方式，檢測不同濃度硝酸鹽，能夠改善鏡檢時大生熊蟲活動與隱生下形態難以判斷的問題(圖 2)，本研究想要使用大生熊蟲半數恢復活動時間(BAT₅₀)，檢測硝酸鹽壓力，並加以探討以螢光顯微鏡、自製雷射與自製 LED 激發大生熊蟲自體螢光，建立大生熊蟲檢測硝酸鹽模式。

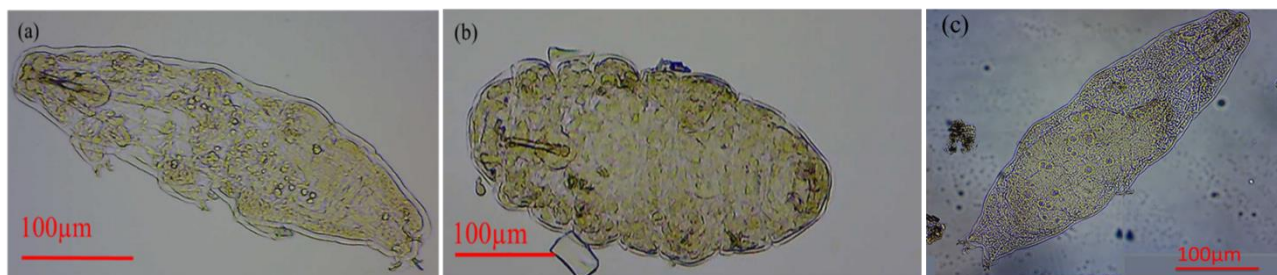


圖 2、大生熊蟲不同形態(作者拍攝)

(a) 正常活動狀態 (b) 隱生狀態 (c) 難以辨別的狀態

二、文獻探討

(一) 團隊歷年研究成果 (表 1)

本團隊進行大生熊蟲的模式生物評估。

為了需要大量水熊蟲進行研究及實驗，且不同水熊蟲對環境壓力的承受度有差異，於 2020 年和 2021 年前期調查校園周圍水熊蟲數量及分布，對環境敏感的大生熊蟲分布最多、最廣，所以最後決定以大生熊蟲進行實驗。

2021 年研究大生熊蟲可進入隱生保護自己在壓力下不受到傷害，希望利用隱生的特性使其作為符合生物倫理準則的模式生物檢測模型，結果得知大生熊蟲可檢測鹽類、硝酸鹽、銻、銅、酸鹼值變化與殺蟲劑六種常見化學壓力，除銅離子壓力外其餘五種都能夠重複檢測。後發現在硝酸鹽壓力、百滅寧殺蟲劑、酸鹼值變化下的大生熊蟲皆具有重複檢測的潛能，農藥已有生化快速檢測法且硝酸鹽是日常生活中較容易接觸到，因此後期研究以蔬菜中的硝酸鹽作為主要檢測物。

2022 年時探討大生熊蟲生理機制，並將大生熊蟲置於硝酸鹽壓力下檢測，以亞甲藍液染色發現其體表未受到硝酸鹽壓力傷害，並確認活動大生熊蟲放置於 1000 mg/L NO₃⁻-N 硝酸鹽壓力下 24 小時全數死亡。

2023 時將乾燥隱生大生熊蟲置於複合物形式的實際化學壓力（小白菜萃取液），比較其在面對單一化學壓力（純硝酸鹽溶液）與複合壓力（小白菜萃取液），所以將小白菜萃取液模擬為複合化學壓力進行實驗，另外實驗中意外發現大生熊蟲在多種波長的光線照射下，能激發其自體螢光，進一步分析則發現隱生大生熊蟲個體由 490 nm 光線激發時，其在 510

nm 發散的相對螢光強度 (RFI) 與活動狀態樣本具顯著差異，在顏的研究中均是使用鏡檢觀察大生熊蟲形態變化，會有形態難以判斷的問題。

本研究將利用大生熊蟲自體螢光建立大生熊蟲檢測硝酸鹽模式。

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
建立大生熊蟲檢測硝酸鹽模式(本研究)	

(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) 模式生物相關名詞定義(LC₅₀、EC₅₀ 參考自環保署；BCC₅₀ 取自顏，2022)

(1)半數致死濃度(Lethal Concentration 50 %，LC₅₀):

單位為每公斤多少毫克 (mg/kg)，為化學物質或農藥讓 50 % 實驗動物死亡的劑量。

(2)半數效應濃度(Effective Concentration 50 %，EC₅₀):

化學物質導致 50 % 實驗動物發生存活率改變、酵素活性改變、生長受抑制等效應。

(3)半數隱生濃度(Bio-Cryptobiosis Concentration 50 %，BCC₅₀):

施用的化學物質導致 50 % 實驗大生熊蟲進入隱生狀態所需濃度。

(4)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 % 實驗的隱生大生熊蟲恢復至正常活動狀態所需時間。

(四) 自體螢光介紹(Autofluorescence，簡稱為 AF)

被特定波長的光照射後進入激發態，就可發射出螢光，而生物細胞內蛋白質也有此螢光特性，稱為自體螢光，每個蛋白質的激發和發散波長均不同，文獻指出所有的真核和原核生物細胞都有自體螢光(Surre J.et al,2018)。自體螢光作為現代常見的定性分析方式，目前已經有實際應用的實例，在植物方面已有利用葉綠體內酵素的自體螢光強度觀察，監測各國二氧化碳排放量，自體螢光也能夠作為植物是否受到壓力危害的檢測標準(García-Plazaola, J. I. .et al,2015)；而生物方面有觀察子頭部的自體螢光，發現節肢彈性蛋白發射出藍色的自體螢光，未來可應用在病媒蚊防治方面，(Scolari F.et al,2022)。顏在 2023 年的研究中，發現大生熊蟲單一硝酸鹽濃度下以 490nm 光線激發，能發射 510nm 自體螢光，並在相同波長

下乾燥隱生和正常活動狀態相對螢光強度有著顯著差異(圖 3)，或許能夠利用其隱生和活動的自體螢光差異，就能夠解決在大生熊蟲從隱生狀態恢復到正常活動時難以判斷是否恢復的問題，目前已確定大生熊蟲自體螢光的激發波長，本研究將嘗試利用大生熊蟲在隱生與活動狀態下自體螢光作為檢測不同濃度硝酸鹽方法，並評估自體螢光標準化的可行性。

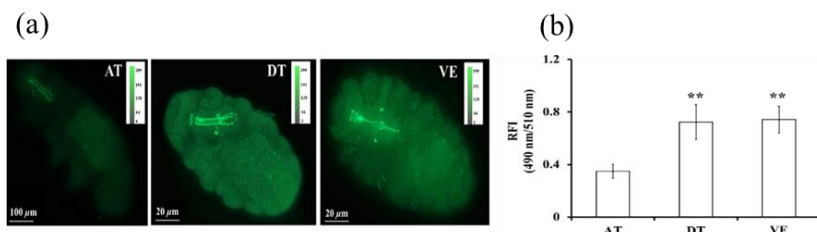


圖 3、大生熊蟲的自體螢光(顏，2023)

(a)大生熊蟲在 490 nm/510 nm 下的螢光拍攝圖，(b)大生熊蟲的相對螢光強度差異 AT 為正常活動、DT 為乾燥隱生、VE 為小白菜壓力下隱生(238 mg/L NO₃⁻-N)

(五) 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 4)，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)。

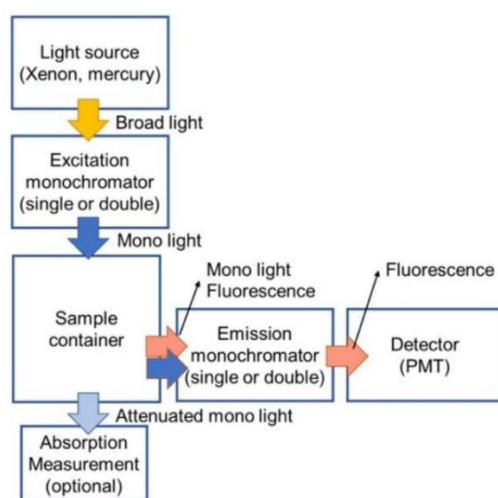


圖 4、基本螢光組件之間交互關係(Shin,et,al.2021)

(六) 雷射作為螢光光源可能性(LED inside,2007)

目前螢光裝置多利用 LED 作為光源，而本次研究除使用 LED 外還利用雷射筆作為激發光源，雷射筆是使用雷射二極體(LD)作為光源，LED 與 LD 的差異在 LD 在 LED 的基礎構造上加入具有光活性的半導體，形成光的反饋迴路(圖 5)，能夠放射出波長和位相等性質完全相同的光(圖 6)，為受激輻射複合光，特點為範圍小、干涉性強。

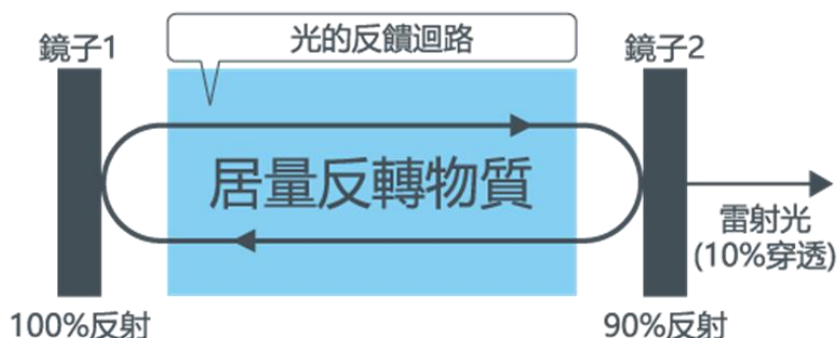


圖 5、LD 發光原理(ROHM)

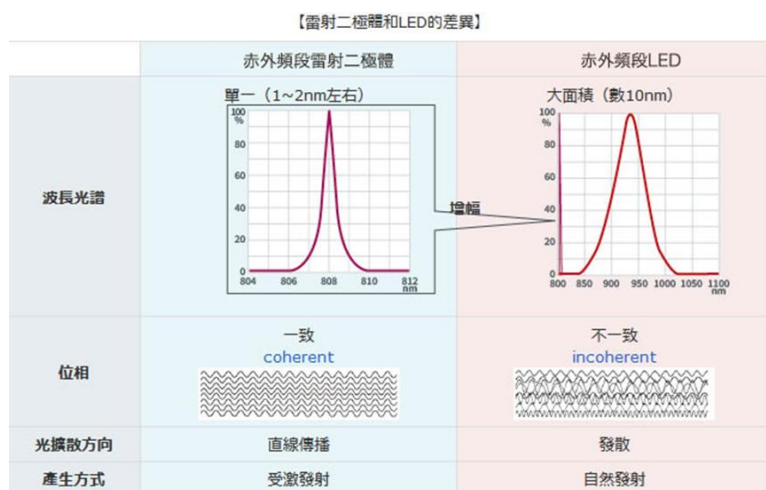


圖 6、LED 與 LD 比較(ROHM)

(七) 硝酸鹽過量對人體的危害

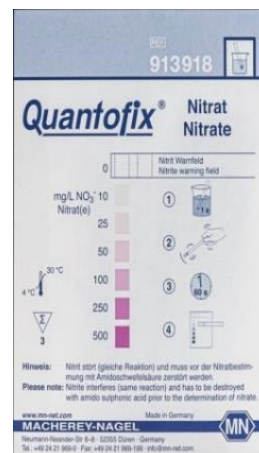
人類攝取過量的硝酸鹽，在經過體內反應後，會形成亞硝酸鹽，若亞硝酸鹽接觸酸性物質、高熱以及胺類物質會發生化學反應產生的亞硝胺，導致心血管疾病或致癌風險（吳，2022），水中硝酸鹽含量過高時可能造成藍嬰症（Blue baby syndrome）（彭，2009）。人類最主要透過攝取蔬菜的方式接觸硝酸鹽，蔬菜中的硝酸鹽來自種植中施用的氮肥，氮肥通過固氮與硝化作用後會轉變成硝酸鹽被植物吸收。目前國家法規規定肉類的硝酸鹽含量小於 70 ppm (mg/kg)，環保署訂定飲用水及飲用水水源之標準，硝酸鹽濃度應小於 45 mg/L，歐盟蔬菜硝酸鹽含量限量為 2000~4500 ppm，然而目前市售的菜葉類硝酸鹽含量遠遠超過 5000 ppm，可以發現我國現有的蔬菜種植方式皆擁有過度依賴氮肥，導致潛在的危險，我們認為檢測蔬菜中硝酸鹽含量是有必要的。

(八) 常見檢測硝酸鹽模式

環境中存在著多種化學壓力，例：歐盟的研究中指出歐洲的主要海域超過 75 % 的面積皆受到重金屬與各種合成物的污染。大多的環境壓力以混合物的形式存在，平時檢測環境壓力的方法大多使用試紙（例如：硝酸鹽試紙），雖然流程快速，但在檢測時容易受到外在環境的影響（溫度、濕度、待測物中的雜質等），導致研究結果出現誤差，且試紙為一次性的消耗品，這樣的檢測方式相對不環保。本團隊先前發現大生熊蟲對環境敏感，具有作為新型模式生物潛力。

1. 試紙檢測法(Irandoust *et al.*, 2013) (圖 7)

亞硝酸鹽與氨基苯磺酸和 α -萘胺的酸性溶液結合產生紅色偶氮染料，每個反應的決定性特徵是它檢測 NO_3^- 的能力。判別硝酸鹽試紙的呈色結果(定性相對濃度)，能夠快速得知硝酸鹽濃度，雖然快速但由於是使用硝酸鹽試紙來檢測，會受到濕度及溫度的影響，固有準確性的問題。



2. 鹽酸分光光度法（植根法律網）(APHA, 2017)

硝酸鹽與水溶性有機物在波長 220nm 吸光值(OD_{220})下會吸光，然而純硝酸鹽在波長 275nm 吸光值 OD_{275} 不會有吸光，利用樣本在 OD_{220} 扣除 OD_{275} 的兩倍吸光度，求硝酸鹽氮的含量，樣本濃度計算公式為 $(\text{NO}_3^- - \text{N mg/L}) = \text{檢量線求得硝酸鹽氮濃度 (mg/L)} \times \text{稀釋倍數}$ 。擁有準確度高的特點。

3. 水楊酸分光光度法（段等，2002）

硝酸根離子與水楊酸反應形成二硝基水楊酸，遇鹼呈黃色，在 OD_{410} 擁有最大吸光度，藉此求得待測物硝酸鹽含量，有著反應時間快、操作簡易、精準度高。

4. 大生熊蟲硝酸鹽檢測法 (圖 8)（顏，2023）

利用大生熊蟲在不同硝酸鹽濃度下所需隱生時間，對照趨勢線檢測待測硝酸鹽濃度，此種檢測方式能夠重複檢測，且有操作簡單的特點，但此種檢測方式會有大生熊蟲形態無法判斷的問題，本次研究想要改善此問題，並建立大生熊蟲檢測硝酸鹽模式。

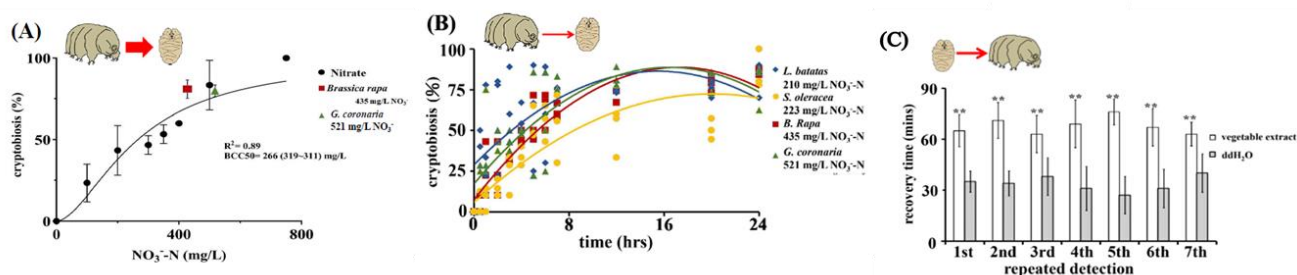


圖 8、大生熊蟲硝酸鹽檢測法。(顏, 2023)

(A) 活動大生熊蟲在不同硝酸鹽濃度下隱生率 (B) 大生熊蟲檢測不同蔬菜萃取液隱生率

(C) 大生熊蟲隱生到活動時間及重複使用次數

貳、研究問題與目的

建立大生熊蟲檢測硝酸鹽模式

- 一、探討雷射與紫外光激發大生熊蟲自體螢光與檢測硝酸鹽可行性
- 二、以相機濾片、偏振片與壓克力板加入自製雷射與 LED 裝置中，並嘗試分析數據
- 三、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

參、研究設備與器材

一、實驗動物簡介

(一)為何使用大生熊蟲(*Macrobiotus* sp.) (圖 9)

現今水熊蟲約有 1300 餘種，水熊蟲在遇到環境變化時（例如：乾燥）會進入隱生 (Cryptobiosis) 降低身體的水分流失和抵抗外在環境壓力傷害，在不同的環境壓力下其隱生機制也會不同，例如：乾燥環境隱生時水熊蟲會在細胞外層形成海藻糖，降低細胞內水分和新陳代謝，並縮小自身體積以減少水分散失 (Hengherr et al., 2009)，顏在 2022 年發現利用大生熊蟲對環境壓力敏感，能快速進入隱生的特性，評估大生熊蟲具潛能成為能重複檢測環境壓力的模式生物相比其他真緩步綱的水熊蟲更適合進行檢測，例：大生熊蟲在 37°C 就能進入隱生，在相對溼度差異 3% 以上就會受到傷害，較適合做為模式生物。



圖 9、大生熊蟲屬 (*Macrobiotus* sp.) (作者拍攝)

(二) 大生熊蟲來源

本次研究的大生熊蟲採集自校園內下操場停車格、教務處前龍柏樹以及校門口人行道前苔蘚中，利用顏自製的南勢角水熊蟲檢索表鑑種後確定為大生熊蟲。

(三) 大生熊蟲形態

大生熊蟲具有 4 對有爪子的足，頭部可以觀察口器，平均體長為 200~700 μm ，本次研究使用的大生熊蟲為體長 300~500 μm ，選此範圍體長能確定大生熊蟲為成蟲。

(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，產卵方式為體外產卵，每隻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。

二、實驗主要器材與藥品

(一) 蔬菜萃取液製作

名稱	備註
小白菜	產銷履歷認證
果汁機	購自動風

(二) 蔬菜硝酸鹽檢測

名稱	備註
NaNO_3	購買 SHIMAKYU CHEMICAL
Salicylic acid	
Sulfuric acid	購自 景明化工
NaOH	

(三) 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
共軛顯微鏡	購自 ZEISS
紅色雷射筆	購自 Norwii
綠色雷射筆	購自 Logitech
紫外驗鈔筆	網路購買
藍色 LED 燈	購自 光華商場

肆、研究過程及方法

一、實驗架構圖（圖 10）

本研究想要建立大生熊蟲檢測硝酸鹽模式，利用先前發現大生熊蟲在活動與隱生狀態下自體螢光其螢光強度具有差異的現象，檢測硝酸鹽壓力(顏，2023)，改善鏡檢時形態難以判斷的問題，先前團隊的研究中發現，將隱生大生熊蟲置於硝酸鹽壓力下(小白菜萃取液)，能夠利用其半數恢復活動時間(BAT₅₀)，檢測硝酸鹽並繪製檢量線。本研究利用不同裝置(自製雷射裝置、自製 LED 裝置與螢光顯微鏡)激發大生熊蟲自體螢光，分析其螢光數值繪製檢量線，並嘗試將此流程標準化，利用雷射與 LED 裝置本使用相機濾片、偏振片與壓克力板設計裝置，嘗試將激發樣本後反射光阻隔，取得更為精準的螢光數值。

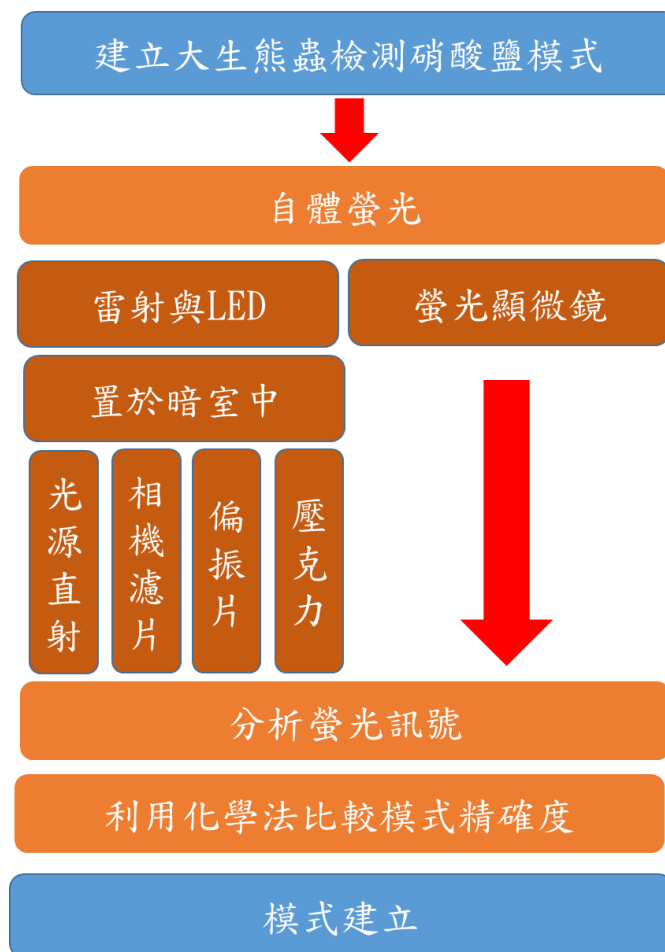


圖 10、實驗架構圖(作者繪製)

二、水熊蟲活動狀態定義（顏，2023）（表 2）（圖 11）

顏先前的研究中定義了大生熊蟲實驗中的各種狀態，在實驗結束後置於原生水樣中 24 小時，若放置於原生水樣中 24 小時後還未活動，則定義為死亡。

表 2、水熊蟲活動狀態定義(作者繪製)

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

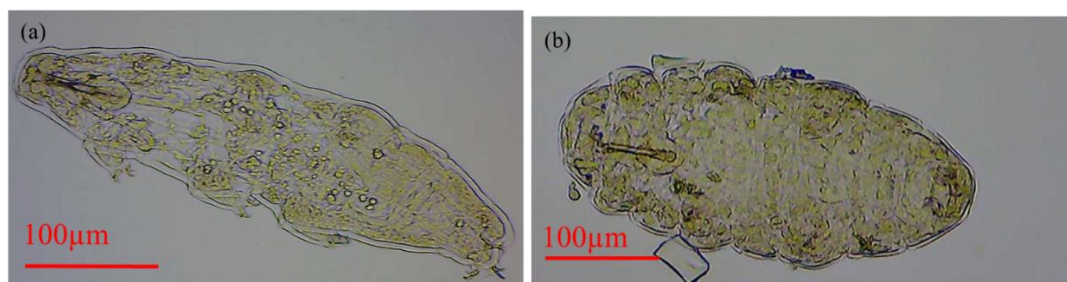


圖 11、大生熊蟲不同狀態(作者拍攝)

(a) 正常活動 (b) 隱生狀態

三、實驗步驟

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 (Bio=10；Tech=3)

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。

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 % 實驗的隱生大生熊蟲恢復至正常活動狀態所需時間。

(一) 水楊酸分光光度法檢測硝酸鹽(對照組)

1. 硝酸鹽溶液製作

以硝酸鈉 (NaNO₃) 利用對半稀釋方式製作 0~312 mg/L NO₃⁻-N 作為檢測溶液。

2. 硝酸鹽濃度標準取線繪製(顏，2023)

- (1) 使用濃硫酸為溶劑配置 5%水楊酸溶液。
- (2) 以硝酸鈉 (NaNO₃) 利用對半稀釋配置 5~312 mg/L NO₃⁻-N 作為標準溶液。
- (3) 將硝酸鹽標準溶液與 5 %水楊酸以 11:40 混和, 靜置反應 20 分鐘，此時水楊酸會轉變為二硝基水楊酸。
- (4) 將二硝基水楊酸與 8 %氫氧化鈉以 1:20 混合，待其冷卻，測定 OD₄₁₀ 繪製標準曲線。

(二) 利用大生熊蟲 BAT₅₀ 檢測硝酸鹽(解剖顯微鏡觀察型態變化)

實驗步驟：

- (1) 將 10 隻乾燥隱生大生熊蟲分別放入 0、75、156、312 mg/L NO₃⁻-N 中。
- (2) 記錄大生熊蟲半數恢復正常活動時間。
- (3) 繪製檢量線，並對比化學法測試其精準度
- (4) 等待樣本恢復活動後，以亞甲藍液染色觀察體表是否受傷

(三) 探討雷射與紫外光激發大生熊蟲自體螢光與檢測硝酸鹽可行性(Bio=10；Tech=3)

利用一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到，利用與螢光顯微鏡發光原理與波長相似，且好取得的雷射激發大生熊蟲的自體螢光，自製雷射與 LED 裝置需要濾光片阻隔其激發光，本研究利用相機濾片、偏振片與琥珀色壓克力板阻隔裝置激發光，降低影響並嘗試分析其可行性。

光源選用：

使用波長為 365nm(紫外光)470nm(藍光)LED 與 532nm(綠光)與 650nm(紅光)雷射

樣本處理：同上述實驗三中樣本處理方式，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

設計理念：

1. 自製雷射裝置激發方法(圖 12)：

將大生熊蟲放置懸滴玻片後，以雷射照射樣本並利用手機顯微鏡觀察與拍照，分析數據。

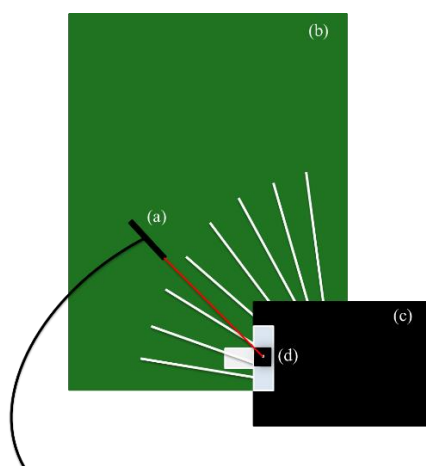


圖 12、雷射激發方法設計示意圖(作者繪製)

(a)為光源(b)為量角器用於確認激發光入射角度(c)為平板電腦用於拍攝激發後照片(d)為自製暗箱，內裝有檔光濾片

2. 自製 LED 裝置(365nm、470nm)激發方法(圖 13)：

將大生熊蟲放置於懸滴玻片中，放置於手機顯微鏡，利用 LED、透鏡反射與擋光濾片(相機濾片、偏振片)照射樣本後，利用手機顯微鏡拍照並分析數據。

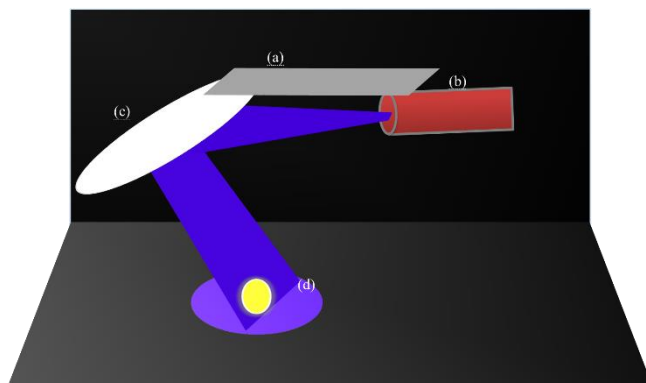


圖 13、LED 激發方法設計示意圖(作者繪製)

(a)為擋光濾片(b)為 LED 光源(c)為透鏡(d)為樣本放置位置

(四) 探討相機濾片、偏振片與壓克力板阻隔激發樣本後反射光的效果

為避免再使用雷射與 LED 激發樣本螢光時，激發光影響導致樣本螢光數據受影響，本實驗將探討相機濾片、偏振片與壓克力板阻隔激發光照射樣本後反射光的效果，尋找何種材質最適合用於裝置中，本實驗使用激發反為較廣且具有高發光效率的 YAG 螢光粉，做為樣本使用，並利用葉子模擬樣本，分析在不同擋光濾片下，自體螢光受影響程度。

實驗步驟

對照組：

使用 LED(470 nm)直接照射 YAG 螢光粉

實驗組：

(1) 使用 LED(470 nm)照射 YAG 螢光粉後，利用相機濾片阻隔激發光

(2) 使用 LED(470 nm)照射 YAG 螢光粉後，利用偏振片阻隔激發光

(3) 使用 LED(470 nm)照射 YAG 螢光粉後，利用壓克力板阻隔激發光

拍照以 imagej 分析照片藍光訊號強度

(1) 使用 LED(470 nm)照射葉子後，利用相機濾片阻隔激發光

(2) 使用 LED(470 nm)照射葉子後，利用偏振片阻隔激發光

(3) 使用 LED(470 nm)照射葉子後，利用壓克力板阻隔激發光

拍照以 imagej 分析照片紅光(因為葉綠素螢光為紅光)訊號強度

(五) 以倒立螢光顯微鏡激發大生熊蟲自體螢光做為檢測硝酸鹽模式

實驗步驟：

活動與隱生大生熊蟲(n=10，Tech=3)

- 1.將每組 10 隻在活動與隱生狀態下大生熊蟲，以封片膠和指甲油固定
- 2.將玻片放入倒立顯微鏡載物臺下
- 3.利用倒立螢光顯微鏡激發其自體螢光數值，並以 imagej 分析

大生熊蟲檢測不同濃度硝酸鹽(n=10)

1. 將大生熊蟲封片
 - (1)將每組各 10 隻大生熊蟲乾燥後加入 0、78、156、312 mg/L NO_3^- -N 中。
 - (2)等待在 0 mg/L NO_3^- -N 中大生熊蟲進入 BAT_{50} 後，以封片膠和指甲油固定。
- 2.將玻片放入倒立顯微鏡載物臺下
- 3.利用倒立螢光顯微鏡激發其自體螢光數值
- 4.繪製大生熊蟲在不同濃度下自體螢光強度檢量線
5. 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。

(六) 記錄大生熊蟲螢光光譜(n=2)

在前人的研究中發現在常見的螢光物質(EGFP、Rhodamine Red)激發波長下，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.將大生熊蟲以上述活動與隱生組方式封片
2. 放入玻片共軛焦顯微鏡下
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 14)，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

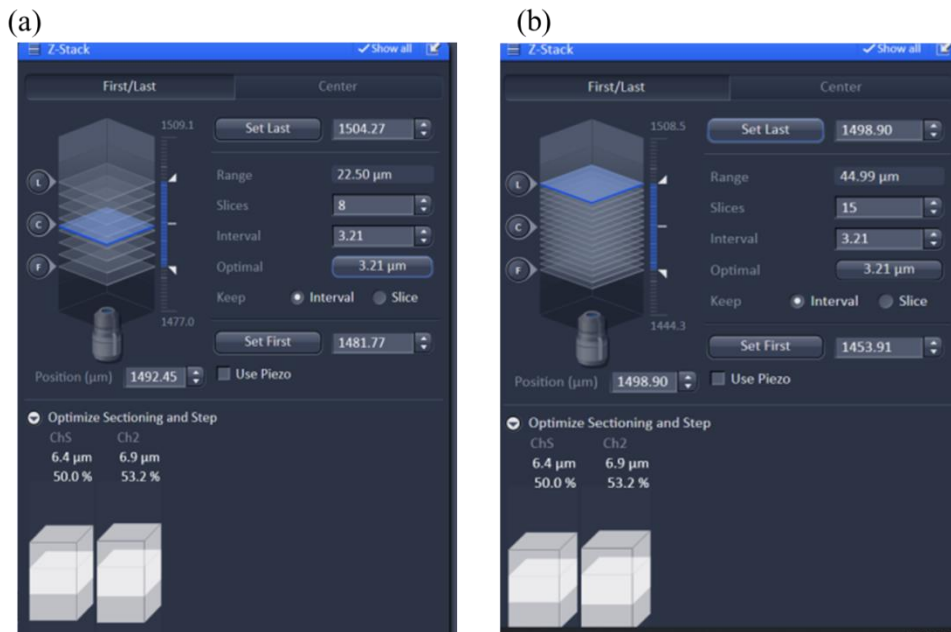


圖 14、共軛焦顯微鏡拍攝大生熊蟲 Z 軸層數(作者拍攝)

(a) 活動大生熊蟲 (b) 隱生大生熊蟲

(七) 數據分析方式：

本研究以回歸分析、T 檢定(t-test)、單因子獨立變異數分析(Analysis of Variance, ANOVA)、ImageJ 分析，分析數據， $p < 0.05$ 為顯著差異(*)， $p < 0.01$ 為極顯著差異(**)。

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

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

嘗試利用不同光源激發大生熊蟲自體螢光分析公式：

$$\text{Sample} - b = \text{螢光數值}$$

Sample 為樣本螢光數值，b 為背景值

濾光片分析步驟(圖 15)

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

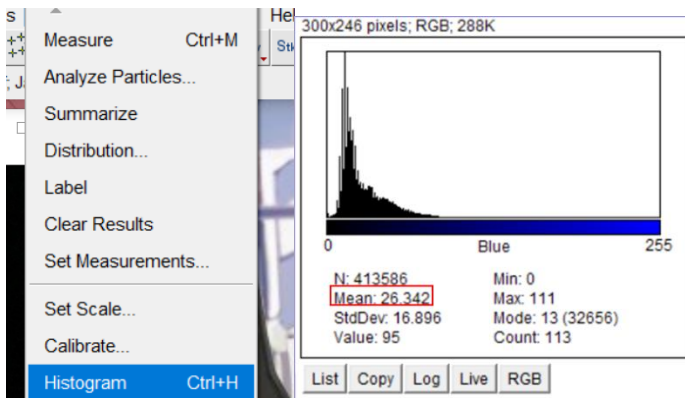


圖 15、濾光片分析步驟(作者拍攝)

螢光光譜分析步驟(圖 16)

1. 開啟 imagej 圖檔
2. 選取欲分析範圍
3. 將數據繪製成摺線圖
4. 匯出樣本螢光數值

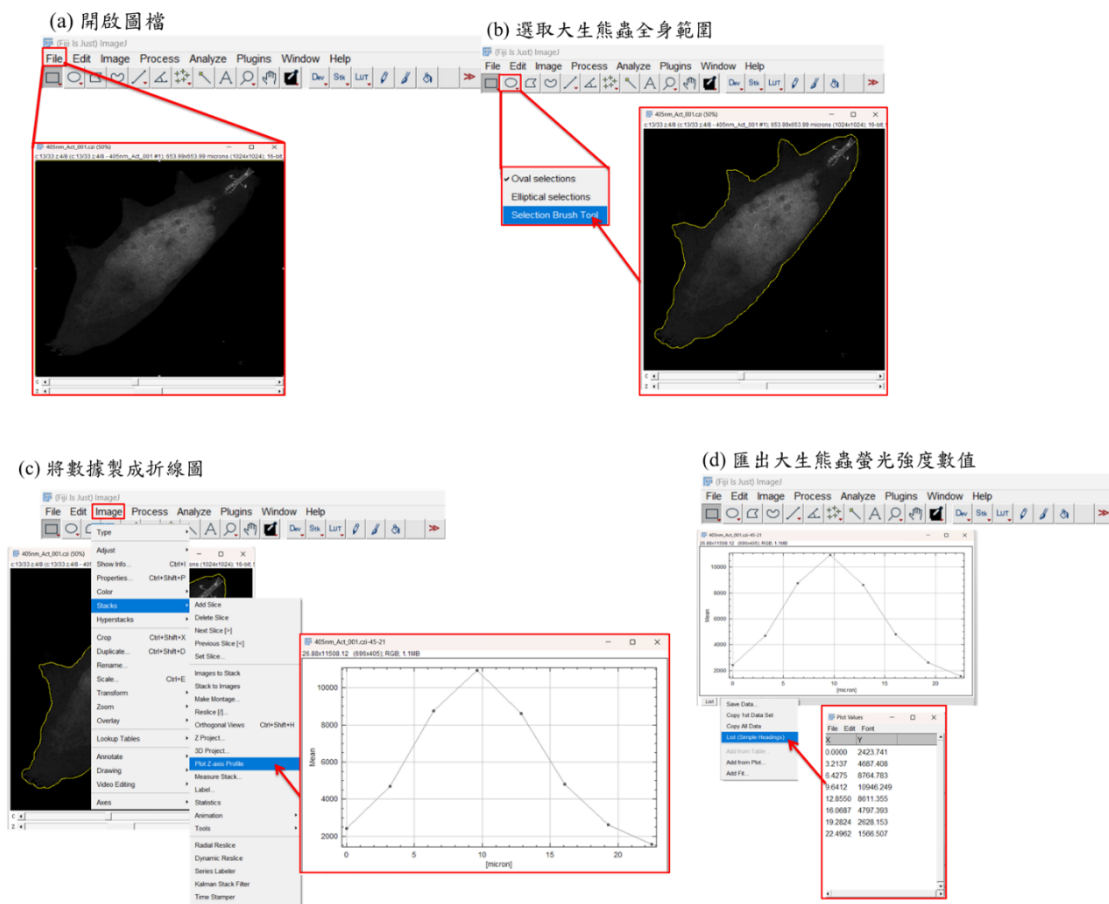


圖 16、螢光光譜分析步驟(作者拍攝)

伍、研究結果

一、利用顯微鏡觀察大生熊蟲 BAT₅₀ 檢測硝酸鹽

利用水楊酸分光光度法檢測硝酸鹽壓力與利用半數大生熊蟲自隱生到活動時間檢測硝酸鹽壓力結果具有相關性($R^2=0.9569$)結果相似，此方法能夠檢測硝酸鹽壓力。

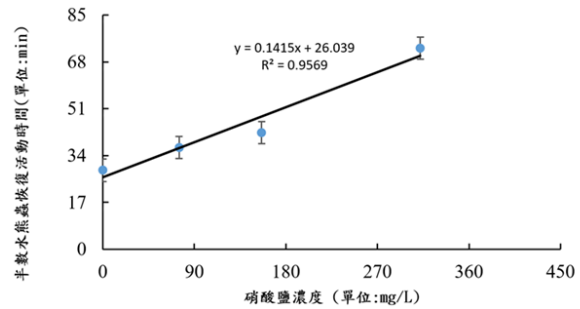
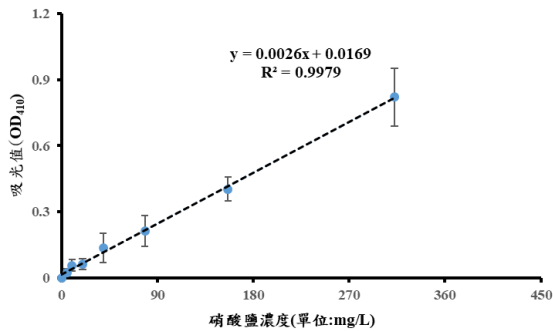


圖 17、水楊酸分光光度法檢測硝酸鹽(作者繪製)

圖 18、大生熊蟲 BAT₅₀ 檢測硝酸鹽結果(作者繪製)

二、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 (Bio=10；Tech=3)

(一) 自製雷射設備激發大生熊蟲自體螢光(n=10)

使用自製雷射激發大生熊蟲自體螢光，結果顯示利用雷射雖分析時有螢光強度，但在嘗試檢測硝酸鹽製作檢量線時，所做的線卻沒有相關性(640nm~660nm 紅雷射 $R^2=0.204$ ；532nm 綠雷射 $R^2=0.2579$)(圖 19)。

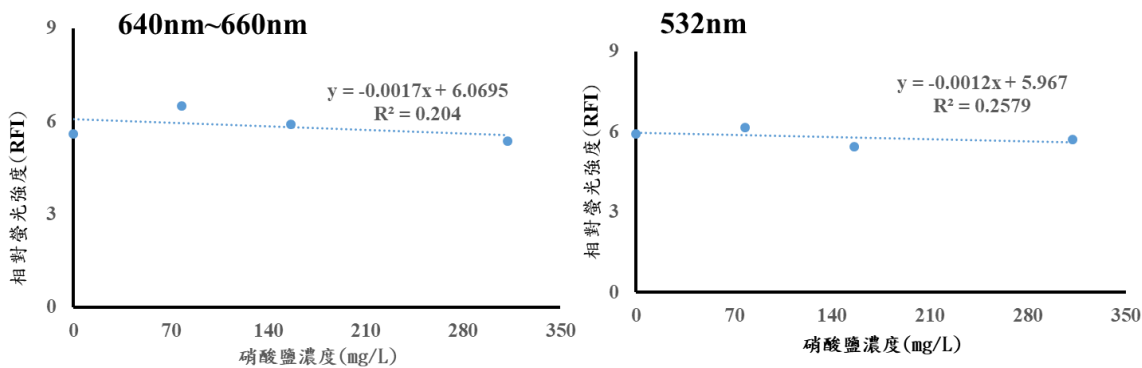


圖 19、10 隻大生熊蟲在 640nm~660nm、532nm 下相對螢光強度數值(作者繪製)

將分析方式改為平均單隻大生熊蟲受雷射激發後，自體螢光相對螢光強度依然無差異(640nm~660nm 紅雷射 $R^2=0.164$ ；532nm 綠雷射 $R^2=0.2299$)(圖 20)

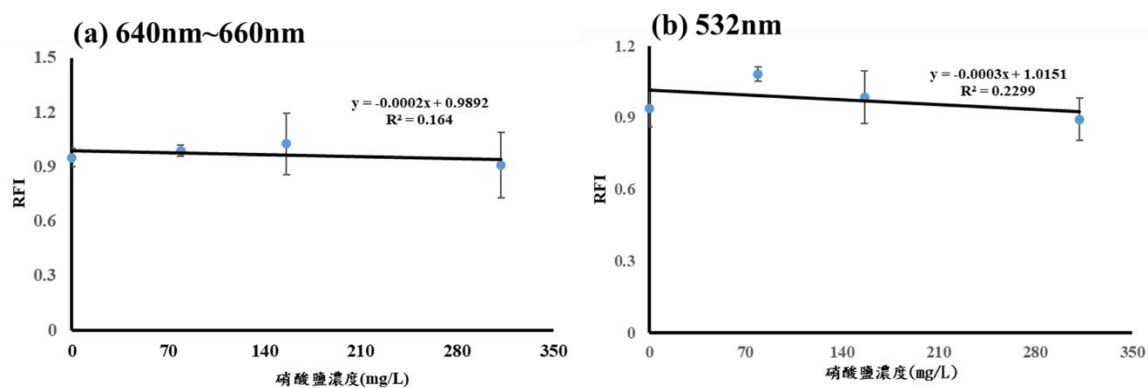


圖 20、平均單隻大生熊蟲在不同硝酸鹽濃度下於雷射的自體螢光(作者繪製)

(a)為在紅雷射下(b)為在綠雷射下

將每種硝酸鹽濃度下活動與隱生大生熊蟲分開製作單隻大生熊蟲螢光強度檢量線，一樣發現所製作出的線並無相關性(640nm~660nm 紅雷射 活動 $R^2=0.6383$ ；640nm~660nm 紅雷射 隱生 $R^2=0.24444$ ；532nm 綠雷射 活動 $R^2=0.1384$ ；532nm 綠雷射 隱生 $R^2=0.07230$)(圖 21)。

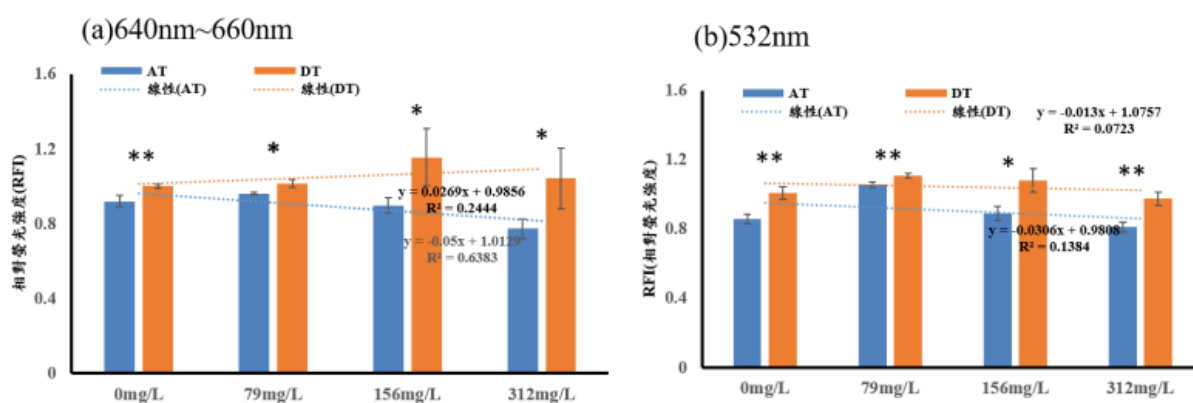


圖 21、平均單隻大生熊蟲雷射激發結果(作者繪製)

(a)為在 640nm~660nm 下(b)為在 532nm 下，AT 為活動狀態，DT 為隱生狀態

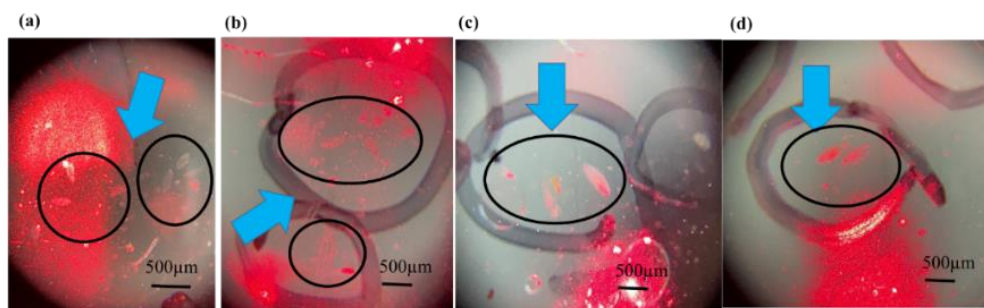


圖 22、大生熊蟲在 640nm~660nm 激發不同濃度硝酸鹽下實際圖(作者拍攝)

(a)為 0 mg/L(b)為 79 mg/L(c)為 156 mg/L(d)為 312 mg/L

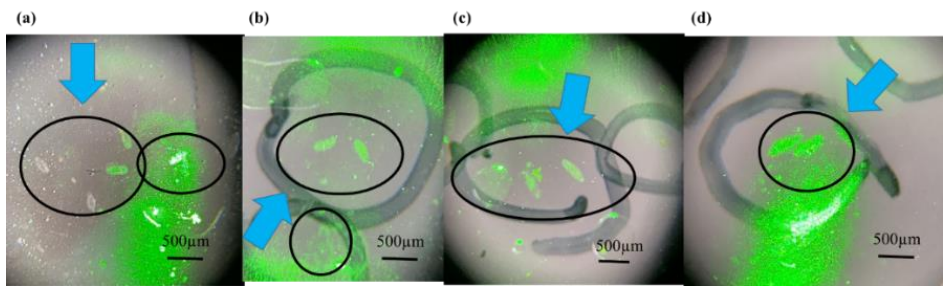


圖 23、大生熊蟲在 532nm 激發不同濃度硝酸鹽下實際圖(作者拍攝)

(a)為 0 mg/L(b)為 79 mg/L(c)為 156 mg/L(d)為 312 mg

(二) 利用不同光源激發在自製設備下活動與隱生大生熊蟲自體螢光

嘗試使用不同光源在自製設備下直接照射活動與隱生狀態下大生熊蟲，激發其自體螢光，結果顯示在不同光源照射下，活動與隱生狀態下大生熊蟲螢光強度，皆無明顯差異。

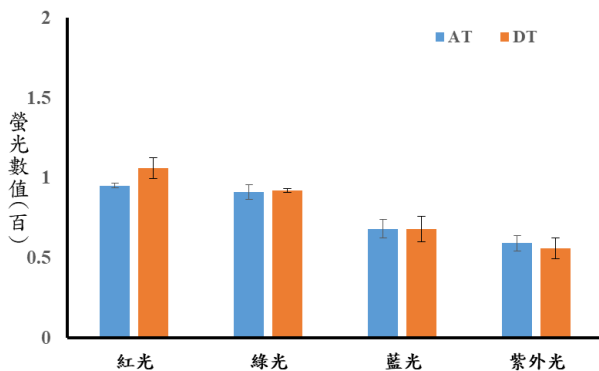


圖 24、自製設備不同光源下大生熊蟲活動與隱生狀態的自體螢光螢光強度(作者繪製)

紅光:640nm~660nm；綠光:532nm；藍光:470nm；紫外光:365nm，AT 為活動狀態，DT 為隱生狀態

(三) 不同濾光片阻隔激發光照射樣本後反射光效果

預備實驗：

由於在使用自製設備與不同光源進行實驗時，結果顯示大生熊蟲活動與隱生狀態下，螢光強度皆無差異，推測是受反射光影響導致無發成功分析數據，目前已設計出自製螢光裝置設計圖，且以利用 365nm 紫外光與 470nm 藍光成功激發出 YAG 螢光粉螢光，並利用透鏡、偏振片、琥珀色壓克力板嘗試減阻隔激發光照射樣本後反射光強度(圖 27)，已知葉綠素在 470nm 下能夠激發螢光，且葉子相對於大生熊蟲而言體積也較大，本研究也初步嘗試了 470nm 激發波長激發葉綠素的螢光，並利用色光分析出其螢光數值(圖 25)。

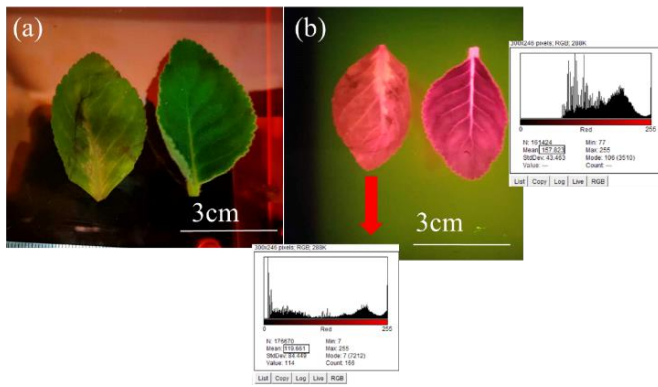


圖 25、葉綠素在 470nm 下激發螢光照片(作者拍攝)

(a)為葉子實際圖左邊為老葉，右邊為新葉(b)為葉子螢光發光情形

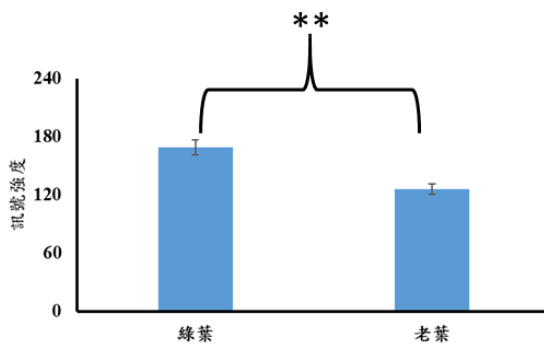


圖 26、葉綠素激發螢光情形(作者繪製)

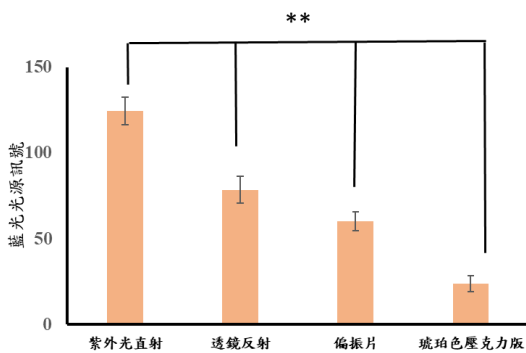
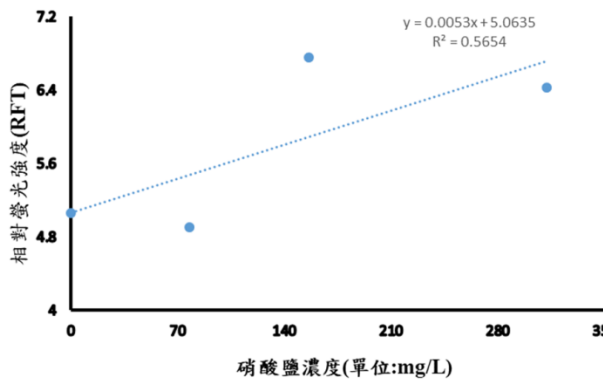


圖 27、利用 365nm 紫外光激發 YAG 螢光粉後，透鏡、偏振片、壓克力板阻擋反射光強度(作者繪製)

(四) 利用倒立螢光顯微鏡激發大生熊蟲自體螢光(n=10)

以乾燥隱生大生蟲在蒸餾水中的 BAT_{50} 做為檢測基準，10 隻大生熊蟲利用倒立螢光顯微鏡發現在常見螢光波長下(570nm/590nm、490nm/510nm)有相關性。(570nm/590nm $R^2=0.5654$ ；490nm/510nm $R^2=0.9016$)(圖 28)。

(a) 570nm/590nm



(b) 490nm/510nm

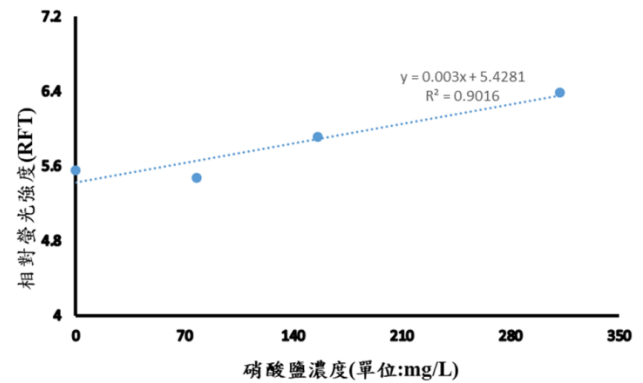
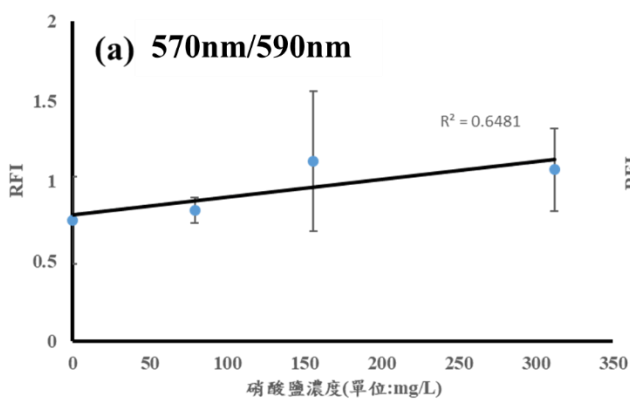


圖 28、大生熊蟲在不同硝酸鹽下的自體螢光對螢光強度(作者繪製)

(a) 為 570nm/590nm (b) 為 490nm/510nm

單隻大生熊蟲平均螢光強度 570nm/590nm 在與 490nm/510nm 下依然具有相關性 (570nm/590nm $R^2=0.6481$; 490nm/510nm $R^2=0.8118$)(圖 29)。

(a) 570nm/590nm



(b) 490nm/510nm

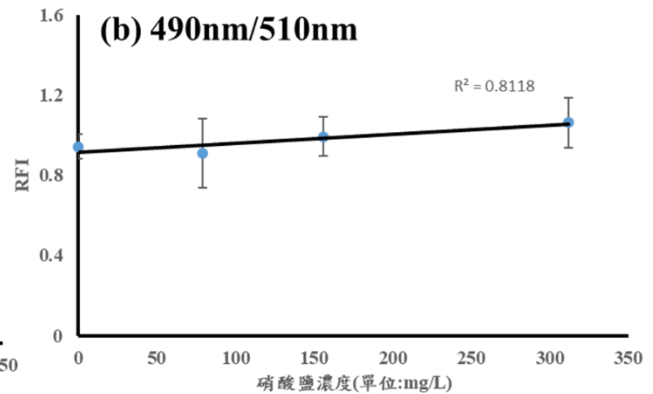


圖 29、平均單隻大生熊蟲在不同硝酸鹽濃度下相對螢光強度數值(作者繪製)

(a) 為 570nm/590nm (b) 為 490nm/510nm

利用倒立螢光顯微鏡激發不同濃度下單隻大生熊蟲分別在活動與隱生狀態在波長 570nm/590nm 、490nm/510nm 下有相關性。(570nm/590nm 活動 $R^2=0.9225$; 570nm/590nm 隱生 $R^2=0.8394$; 490nm/510nm 活動 $R^2=0.7179$; 490nm/510nm 隱生 $R^2=0.9114$)(圖 30)。

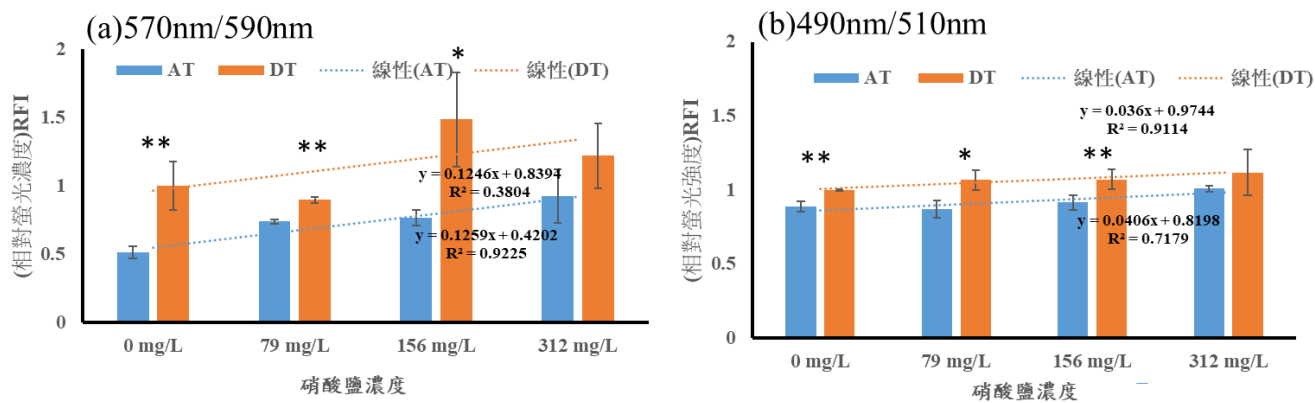


圖 27、平均單隻活動與隱生大生熊蟲在不同硝酸鹽下的自體螢光相對螢光強度(作者繪製)

(a)為 570nm/590nm (b)為 490nm/510nm，AT 為活動狀態，DT 為隱生狀態

在紅、綠螢光下的隱生與活動狀態皆擁有可運用檢測硝酸鹽濃度的相關性

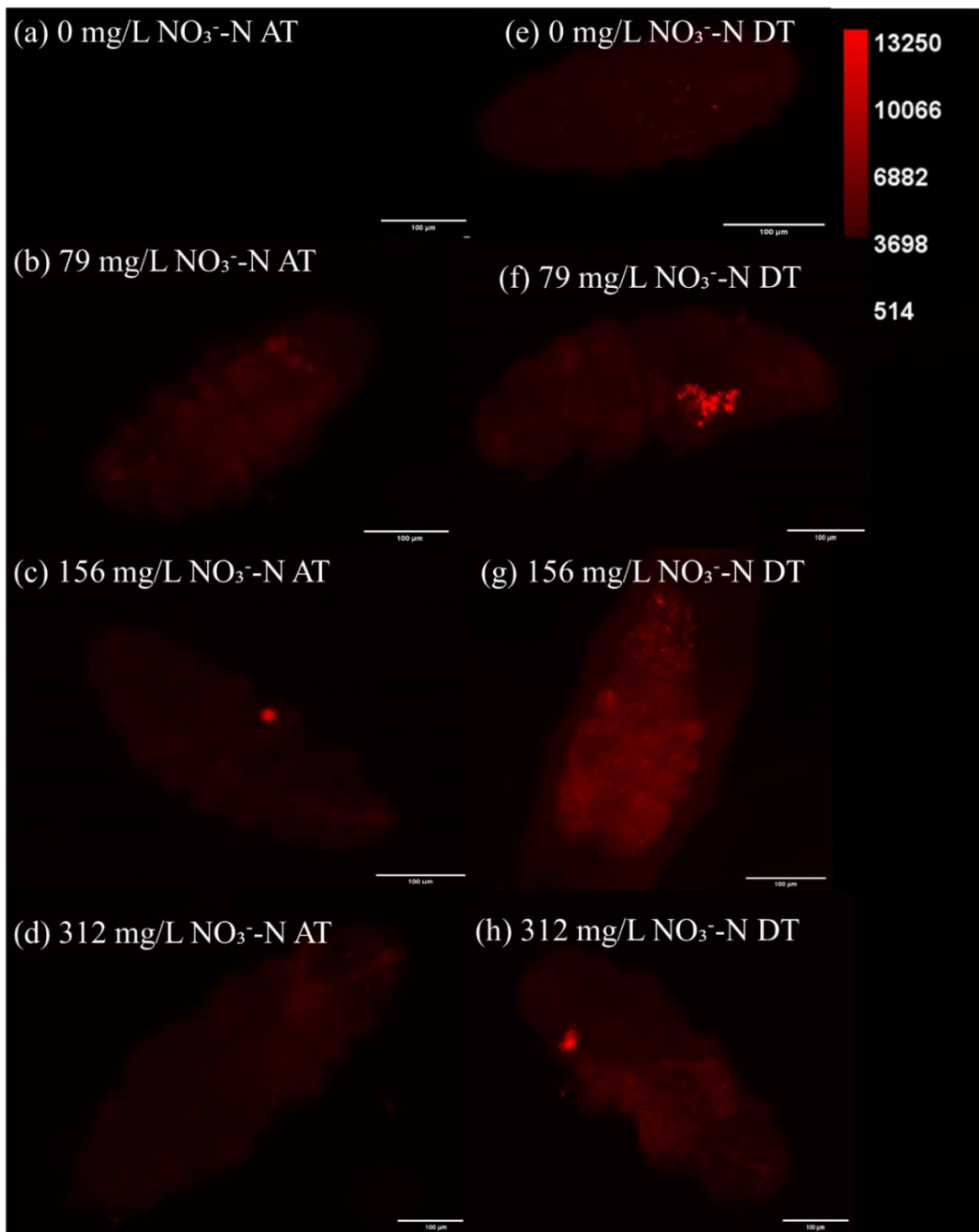


圖 31、大生熊蟲不同硝酸鹽濃度 535 nm / 595 nm 自體螢光實際圖(作者拍攝)

可看在 535nm/595nm 螢光下大生熊蟲隱生螢光的螢光強度比活動螢光高

(a)、(b)、(c)、(d) 為 535nm/595nm 活動熊蟲 0 ~ 312 mg/L 自體螢光，(e)、(f)、(g)、(h) 為 535nm/595nm 隱生熊蟲 0 ~ 312 mg/L 自體螢光，本次實驗並未將大生熊蟲樣本進行飢餓處理，故其體內亮點可能為其攝食物品螢光，分析數據時會圖中亮點手動去除

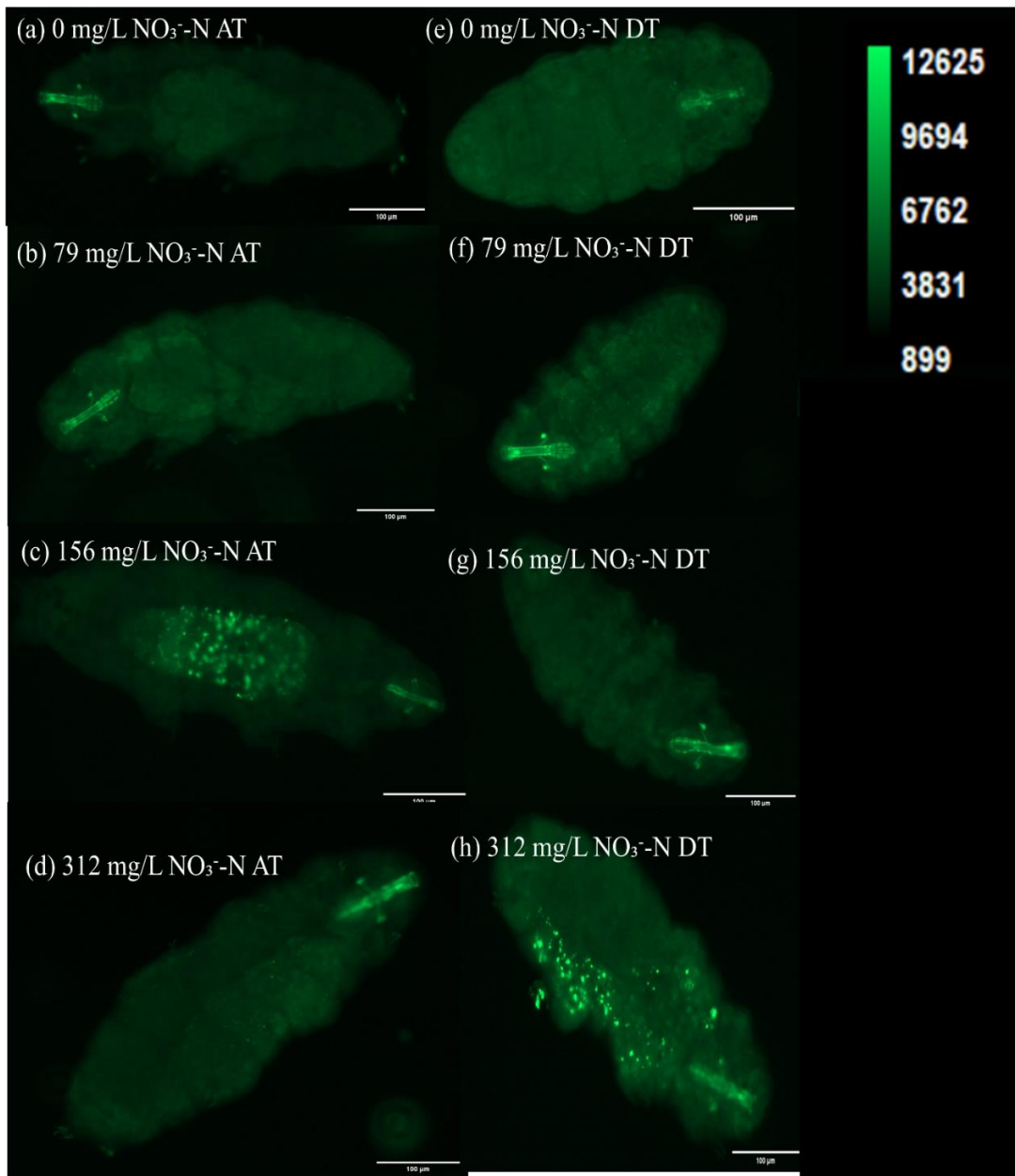


圖 32、大生熊蟲不同硝酸鹽濃度 490nm / 510 nm 自體螢光實際圖(作者拍攝)

可看在 490nm/510nm 螢光下大生熊蟲隱生螢光的螢光強度比活動螢光高

(a)、(b)、(c)、(d) 為 490nm/510nm 活動熊蟲 0 ~ 312 mg/L 自體螢光，(e)、(f)、(g)、(h) 為 490nm/510nm 隱生熊蟲 0 ~ 312 mg/L 自體螢光，本次實驗並未將大生熊蟲樣本進行飢餓處理，故其體內亮點可能為其攝食物品螢光，分析數據時會圖中亮點手動去除

(五) 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，用於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自體螢光，並確認實驗(三)所使用光源能夠激發大生熊蟲自體螢光。

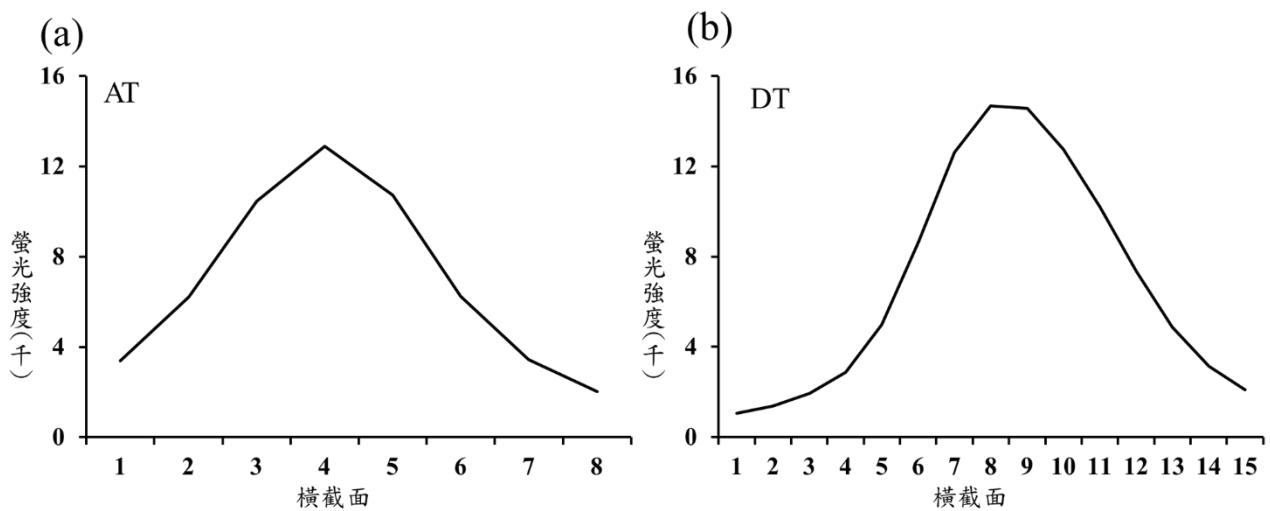


圖 33、大生熊蟲在 488 nm 下發出 569 nm 螢光，圖中橫軸為 Z 軸聚焦點層數，縱軸為所激發出螢光的訊號強度。(作者繪製)

(a)AT 為活動狀態，(b)DT 為隱生狀態

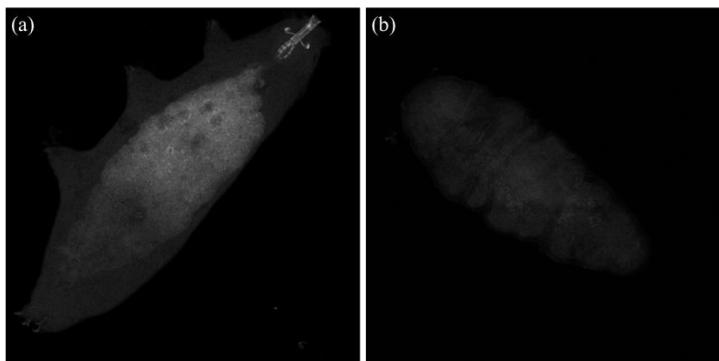


圖 34、共軛焦顯微鏡拍攝大生熊蟲實際圖(作者拍攝)

(a) 活動大生熊蟲 (b) 隱生大生熊蟲

陸、討論

一、利用雷射與 LED 裝置激發大生熊蟲螢光可行性

目前結果顯示使用雷射裝置(532nm 與 650nm)雖然可觀察大生熊蟲隱生和活動狀態的螢光強度差異，但製作硝酸鹽檢量線時，發現其數值無相關性，無法用於觀察濃度差異。自制設備所拍攝到的大生熊蟲自體螢光結果並無線性關係，推測由於照射雷射的過程中，樣本周圍吸光措施不足，導致結果出現誤差，後續將繼續改良雷射裝置激發大生熊蟲自體螢光。

目前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定量分析大生熊蟲自體螢光強度可行性，應用於實際狀況下，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。

二、探討大生熊蟲激發螢光機制

利用大生熊蟲自體螢光作為觀察方式，相對於鏡檢能夠更加快速檢測硝酸鹽，目前已知將大生熊蟲照射在 490nm/510nm、570nm/590nm 下能夠激發其自體螢光，但大生熊蟲並沒有螢光蛋白存在，文獻中發現大生熊蟲屬 (*Macrobiotus* sp.) 螢光可被 450nm~490nm 與 330nm~385nm 光線激發(Bartels,et al.2024)，在 Uckert 的文獻中指出 GFP 螢光蛋白為 27kDa，但在顏 2023 年電泳圖中並沒有 27kDa 的色帶，熊蟲在隱生與活動狀態下螢光強度不同，目前推測大生熊蟲體內抗逆境蛋白可被激發螢光，導致大生熊蟲面對硝酸鹽壓力進入隱生時，抗逆境蛋白堆積與活化，使大生熊蟲隱生狀態時螢光強度大於活動狀態，為來可以在了解大生熊蟲激發自體螢光原因。在結果(四) 圖 31、32 中，使用倒立顯微鏡激發大生熊蟲自體螢光實際圖中，其體拍到的螢光點可能是大生熊蟲你內攝食的苔蘚假葉，故在分析數據時將其去除，由於水熊蟲飢餓實驗需將水熊蟲放入水中等待飢餓，但水熊蟲在面對壓力時就進入隱生，暫停代謝，導致飢餓處理困難。

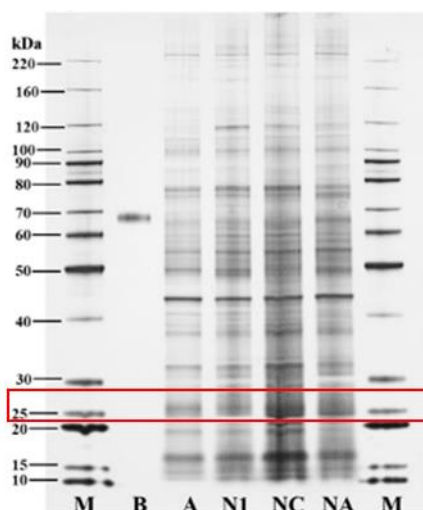


圖 35、大生熊蟲蛋白質單體(顏，2023)

代號 M 為分子量 10~220 kDa protein ladder,B 為 10 μ g/mL BSA,A 為對照組正常活動大生熊蟲,N1 為接觸硝酸鹽 1 小時活動大生熊蟲,NC 為接觸硝酸鹽 24 小時隱生大生熊蟲,NA 為接觸硝酸鹽 24 小時活動大生熊蟲。

三、大生熊蟲與其他環境壓力檢測方式比較

大生熊蟲具有重複檢測複合壓力且能夠重複使用的能力，利用檢量線，能夠藉由大生熊蟲隱生到活動的恢復時間，推測蔬菜萃取液的硝酸鹽濃度，相較於其他模式生物而言，使用大生熊蟲檢測環境壓力可以減少一些必要的模式生物死亡，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蔬菜萃取液中利用其自隱生恢復至正常活動的時間能夠得待測物大概硝酸鹽濃度，若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，有著零污染的優勢，相對於利用其他模式生物，也能夠重複檢測。

表 3、環境壓力檢測方式與水熊蟲檢測法比較 (作者繪製)

	優點	缺點	文獻來源
試紙檢測法	快速得知結果	易受雜質影響	Irandoost et ,al.2013
鹽酸分光光度法	準確度高	耗時、高汙染	APHA，2017
水楊酸分光光度法	準確度高	易受雜質影響	段等，2002
質譜分析	準確度高、可檢測農藥多	價格高、測定時間長	衛福部食藥署
乙醯膽鹼酯酶	快速(約10分鐘)、簡便、價格低(8元/盒)	無法定性定量	周，2017
大生熊蟲(鏡檢)	可重複使用、零汙染	只能在實驗室檢測、形態難以辨別	顏，2023
大生熊蟲(螢光檢)	可重複使用、零汙染	只能在實驗室檢測	本研究

四、大生熊蟲自體螢光降解可能性

文獻中指出水熊蟲化石在 488 nm 下依然能夠激發其螢光，用於分析化石中爪子與口器的形態變化，探討其與現存水熊蟲的親緣關係(Mapalo,et,al.2021)，由此可知在正常狀態下，水熊蟲自體螢光並不會因為時間變化，導致其自體螢光消失，且在他人研究中水熊蟲自體螢光大部分是用來檢定水熊蟲物種，而本研究使用大生熊蟲自體螢光檢測硝酸鹽壓力，但是螢光物質會因為外在因素(例如：去除自體螢光藥劑)，導致螢光淬滅(fluorescent quenching)，故本研究將大生熊蟲自體螢光做為檢測硝酸鹽模式會需要建立樣本前置處理限制，避免後續以此模式檢測硝酸鹽壓力時發生螢光淬滅的情形。

柒、結論

本研究建立了大生熊蟲檢測硝酸鹽模式，以自體螢光做為觀察方法，目前結果顯示以雷射與 LED 激發大生熊蟲自體螢光因反射光問題無發分析其螢光數據，使用螢光顯微鏡能夠激發大生熊蟲自體螢光活動與隱生狀態下相對螢光強度差異，檢測硝酸鹽壓力，並擁有高度相關性，本研究成功建立檢測模式，未來將繼續將此檢測模式標準化

捌、研究貢獻(圖 36)

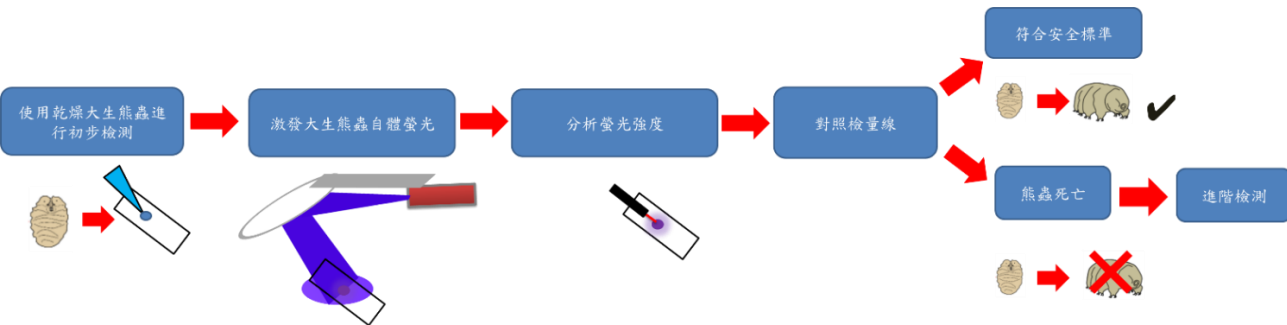


圖 36、研究貢獻圖(作者繪製)

使用大生熊蟲進行蔬菜商品的初步檢測，利用螢光顯微鏡激發大生熊蟲的自體螢光，可快速檢測，對照各自的檢量線得知硝酸鹽濃度，檢測後觀察熊蟲狀態，熊蟲存活就是符合安全標準，如果熊蟲死亡，則需要送往更進階的檢測機構來確認濃度。

玖、未來展望

一、探討大生熊蟲激發自體螢光機制

二、建立基於智慧型手機檢測大生熊蟲自體螢光裝置

三、探討時間、重複使用次數對大生熊蟲檢測硝酸鹽時，自體螢光的影響

拾、參考文獻

參考網站：

- (一) 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>
- (二) 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=IwAR1n2FXaSzdkTmhK2QrJRzPOijdUutdtvtvRFw6cdRxaqvnGGNVzVIDc8fxI>
- (三) 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-chien.blogspot.com/2006/11/blog-post_16.html?fbclid=IwAR3HGv7czzD8DJF9eJYgcOoNZvMdaoe85JQ2iF94V6b8sbkXV2WBfeIVofI
- (四) 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/>
- (五) 周桃美(2017 年 08 月 14 日)。0814-2 蔬果農藥殘留檢驗方法及農藥殘留現況分析。2023 年 12 月取自：<https://www.tc.edu.tw/cms-file/607e97201a3172244b2e5481.pdf>
- (六) 亞硝酸鹽還原試驗原理、程序、結果，2020 年 9 月 11 日。取自：
<https://microbiologynote.com/zh-TW/nitrite-reduction-test/>
- (七) 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(2019 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>
- (十) 農業部(2004 年 8 月)。歐盟蔬菜硝酸鹽限量新規範。2023 年 12 月取自：
<https://www.moa.gov.tw/ws.php?id=7631&fbclid=IwAR0Z8TBxIcQ-Jmlp2zHUjDCQUcBH3PZtjk-moY4Xz6eIQOYgQ-yE3HpYJho>
- (十一) 臺大醫院醫學研究部(2014 年 10 月)。共同研究室電子報。2023 年 12 月取自：
<https://ntuhmc.ntuh.gov.tw/epaper-10th.htm>
- (十二) 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>
- (十三) 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>
- (十四) 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

(十五) 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>

(十六) 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>

參考文獻：

(一) 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)。

(二) 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。

(三) 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。

(四) 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。

(五) 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。

(六) 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

(七) 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.

(八) 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.

(九) 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) Benaroudj, N., & Goldberg, A. L. (2001). Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. *Journal of Biological Chemistry*, 276(26), 24261-24267.

(十一) Brandl, 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.

(十一) Croce, A. C., & Bottiroli, G. (2014). Autofluorescence spectroscopy and imaging: a tool for biomedical research and diagnosis. *European journal of histochemistry: EJH*, 58(4).

(十二) 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.

- (十三) 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.
- (十四) 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.
- (十五) 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).
- (十六) Scho nenbrucher, 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.
- (十七) 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.
- (十八) Surre, J., Saint-Ruf, C., Collin, V., Orenga, S., Ramjeet, M., & Matic, I. (2018). Strong increase in the autofluorescence of cells signals struggle for survival. *Scientific reports*, 8(1), 1-14.
- (十九) 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.

【評語】 052014

前人發現大生熊蟲活動與隱生狀態在激發波長 490 nm 發出 510 nm 螢光，其螢光強度具有差異，可能夠成為新型觀察方式，檢測不同濃度硝酸鹽，因此本研究目的為：

（一）探討雷射與紫外光激發大生熊蟲自體螢光與檢測硝酸鹽可行性。

（二）以相機濾片、偏振片與壓克力板加入自製雷射與 LED 裝置中，並嘗試分析數據。

（三）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。

利用水熊蟲類的大生熊蟲（*Macrobiotus* sp.）為對象，利用簡單的自製雷射激發裝置，建立其自體螢光檢測硝酸鹽模式，是很有趣的想法，也符合生物實驗倫理、ESG 原則與聯合國 SDGs 中多項目標。水熊蟲的相關研究已是該校多年來的科展題材，顯然建立了傳承，也累積了相當多數據與新想法讓後人接續，這是很好的作法。對於本研究有些建議如下：

1. 雖然研究提到將來將探討自體螢光的激發機制，以及哪些物質可能影響其表現，但目前尚未對這些機制進行深入的解析。這限制了對於自體螢光特性的全面理解，以及如何最有效地利用這些特性進行硝酸鹽的檢測。
2. 雖然在採用相機濾片、偏振片和壓克力板後取得了一些進展，但這些改進仍需要進一步的驗證和標準化，以確保檢測模式的準確性和可靠性。

作品簡報

建立大生熊蟲檢測硝酸鹽模式

前言

硝酸鹽作為人類常接觸的環境壓力，過量會導致心血管疾病或是致癌的風險。大生熊蟲(*Macrobiotus* sp.)在面對環境壓力時，會進入隱生狀態自我保護，可作為模式生物並重複檢測蔬菜中的硝酸鹽(顏，2021~2023)，以大生熊蟲作為模式生物，符合當代生物實驗倫理4R原則與SDGS原則中永續生產，但先前研究中在檢測硝酸鹽時是使用顯微鏡觀察大生熊蟲形態變化，會有形態難以判斷的問題(圖1)，本研究想利用大生熊蟲自體螢光解決形態觀察問題，建立檢測硝酸鹽新型模式。

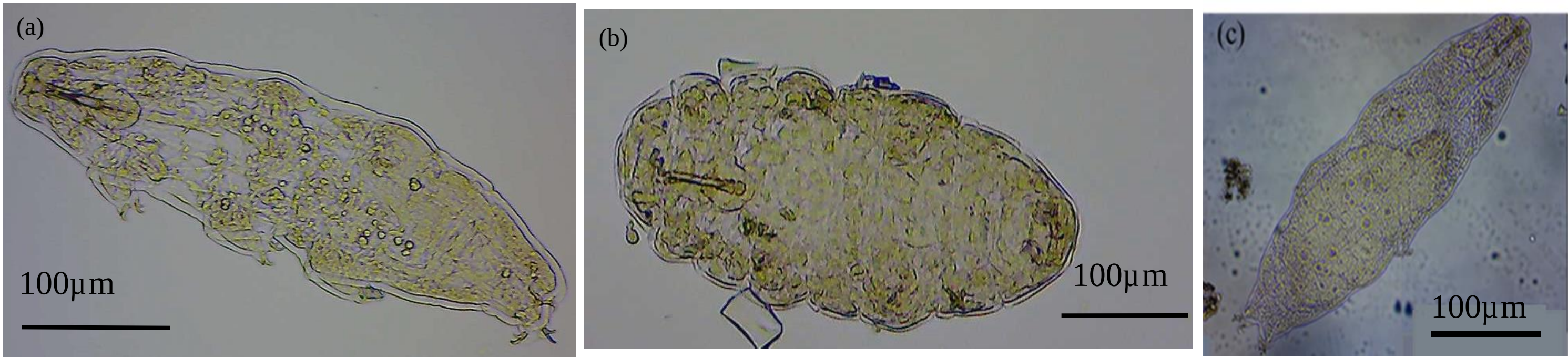


圖1、大生熊蟲不同形態(作者拍攝)

(a) 正常活動狀態 (b) 隱生狀態 (c) 難以辨別的狀態

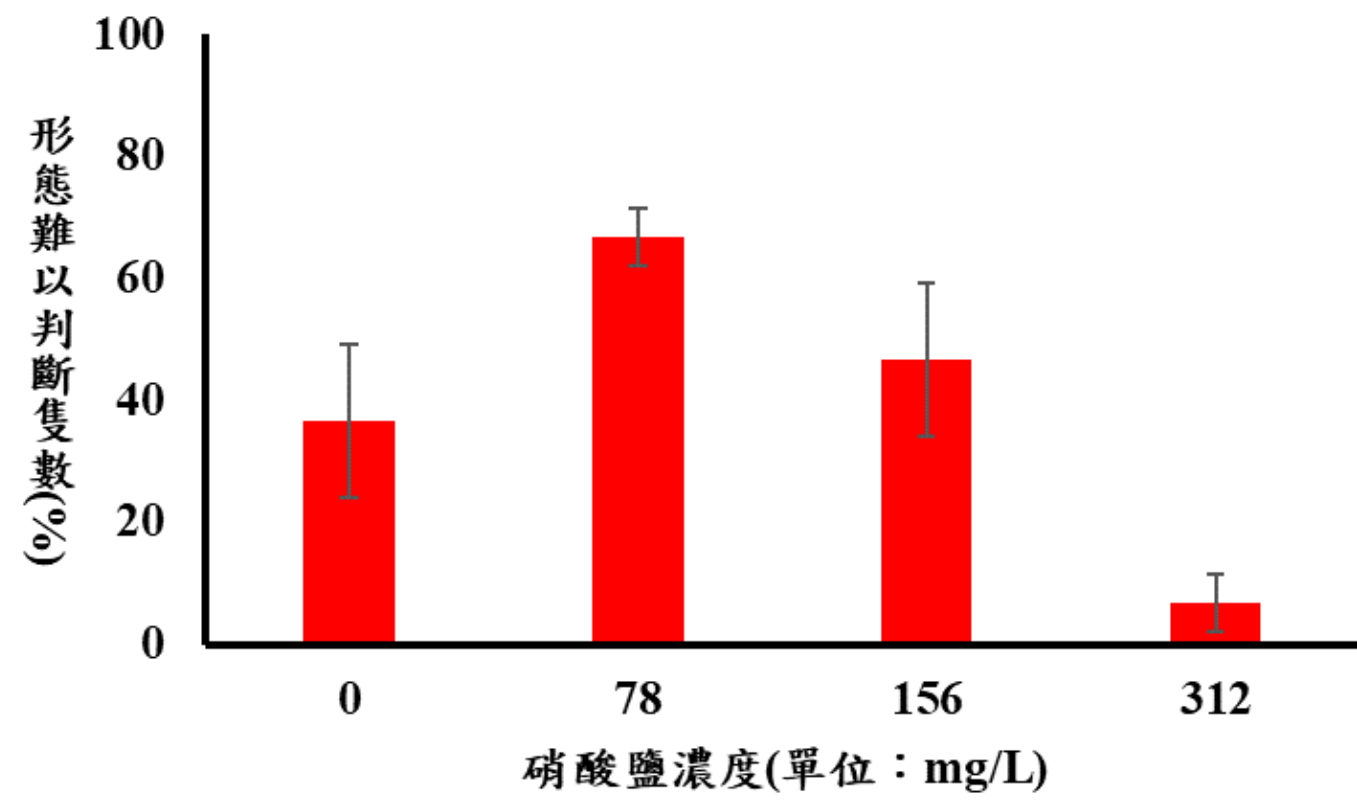


圖2、檢測硝酸鹽時難以判斷形態隻數(作者繪製)

研究方法

一、背景介紹

大生熊蟲(*Macrobiotus* sp.)具內源性自體螢光，受到特定波長激發後(圖4)，進入激發態，讓能量以比激發光波長長光的形式放出(吳，2023)。

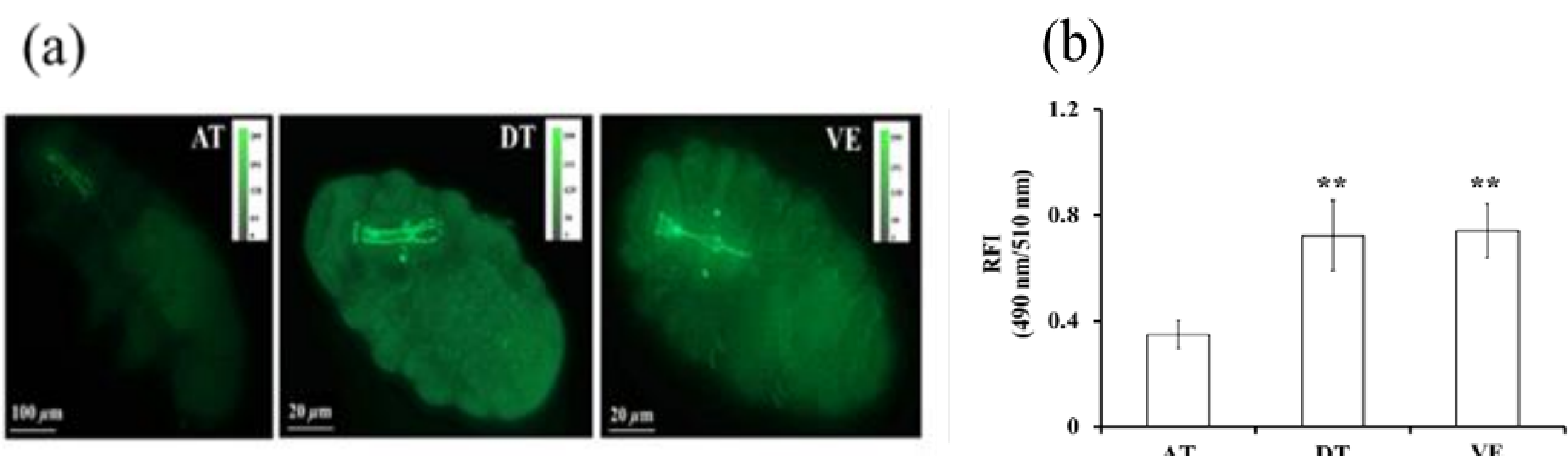


圖3、大生熊蟲的自體螢光(顏，2023)

AT為活動、DT為隱生、VE為在硝酸鹽壓力下隱生(238mg/L NO₃⁻-N)

三、實驗架構圖

大生熊蟲模式生物建立評估

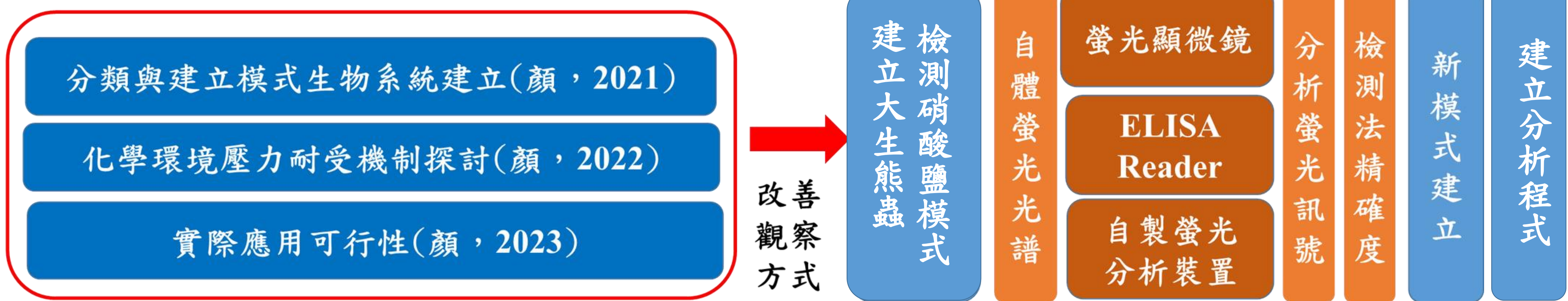


圖5、實驗架構圖(作者繪製)

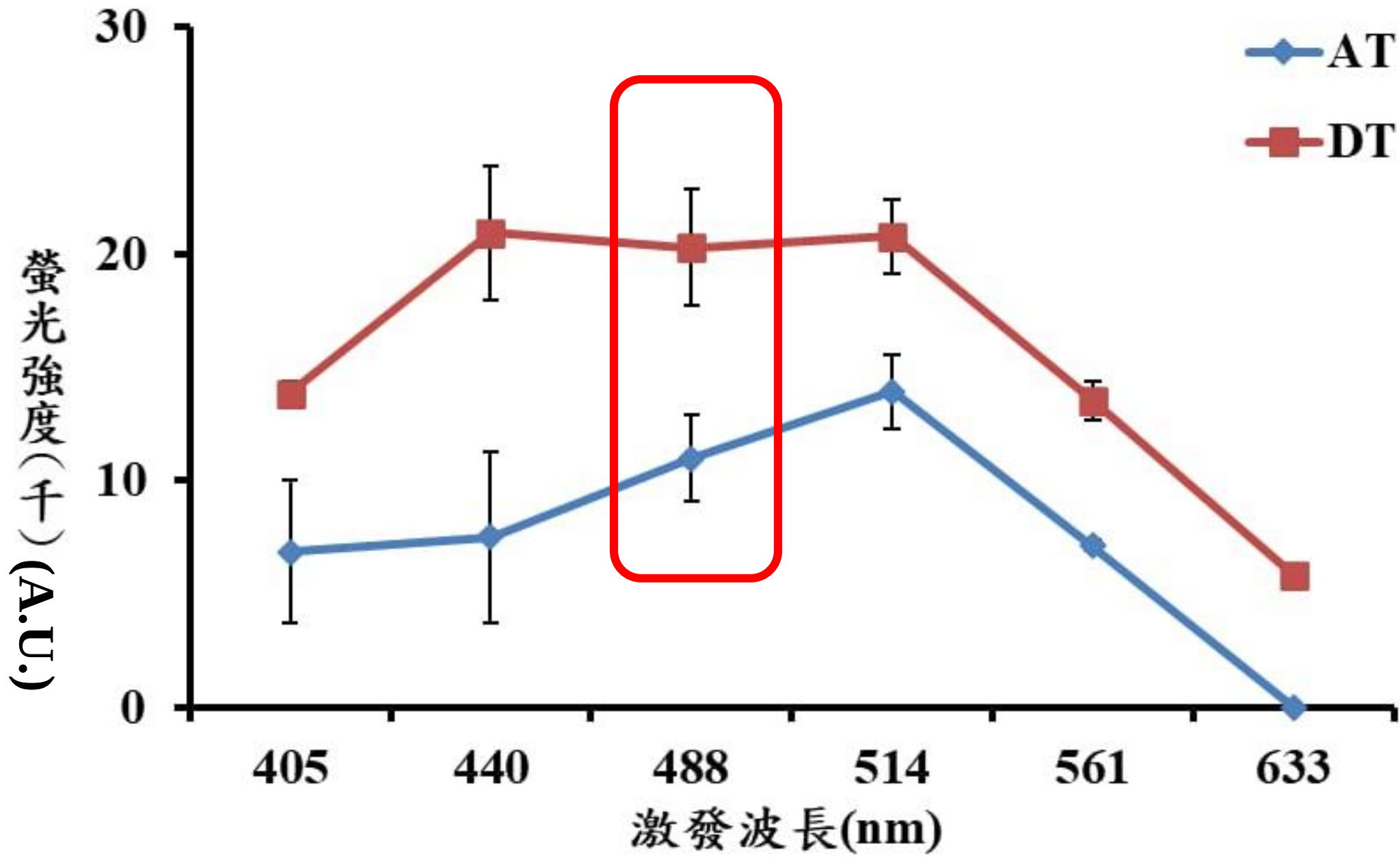


圖6、不同光源激發不同狀態大生熊蟲螢光(作者繪製)
螢光共軛焦倒立顯微鏡；活動狀態(AT)，隱生狀態(DT)

四、數據分析方式

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(**)。

Imagej分析方式：

1.相對螢光強度(RFI)：

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

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

2.螢光數值：

螢光數值分析公式：Sample - background = 螢光數值

Sample為樣本螢光數值，background為背景值

二、研究假說

目前已知

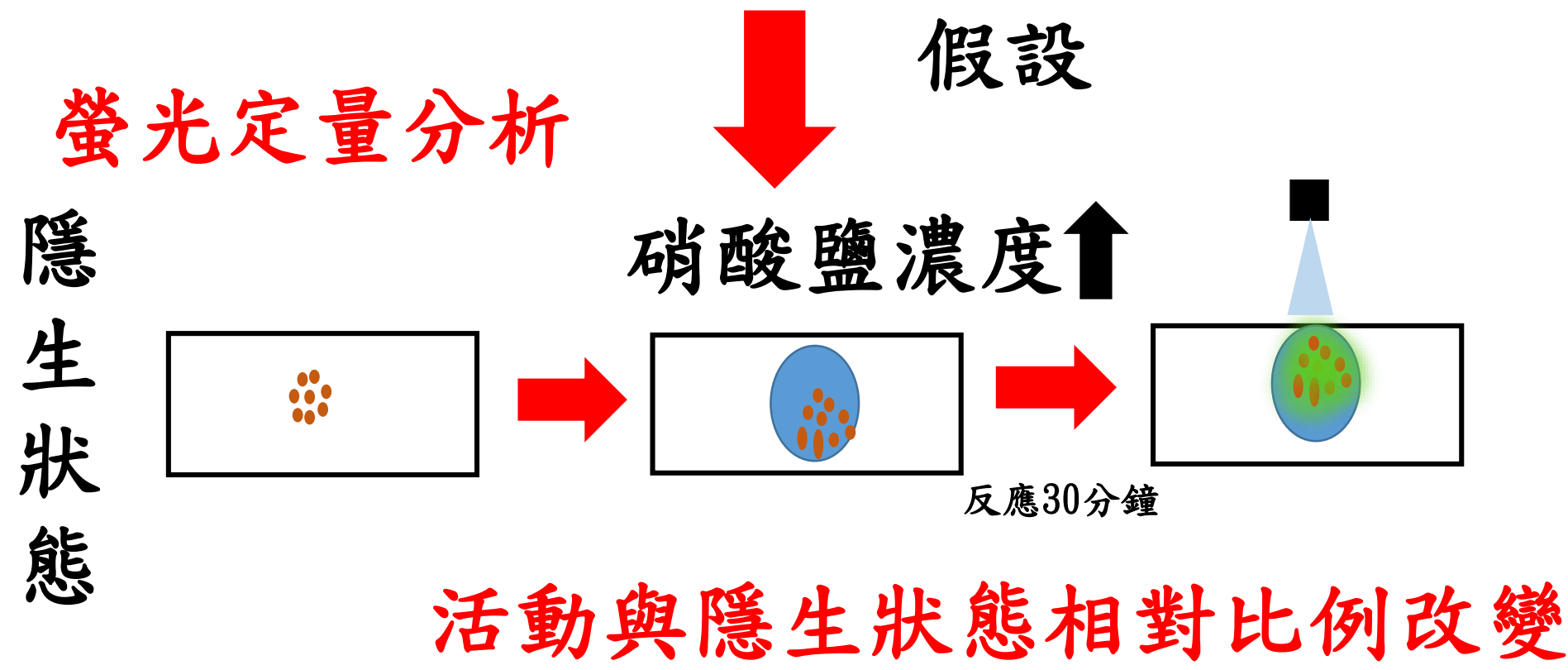
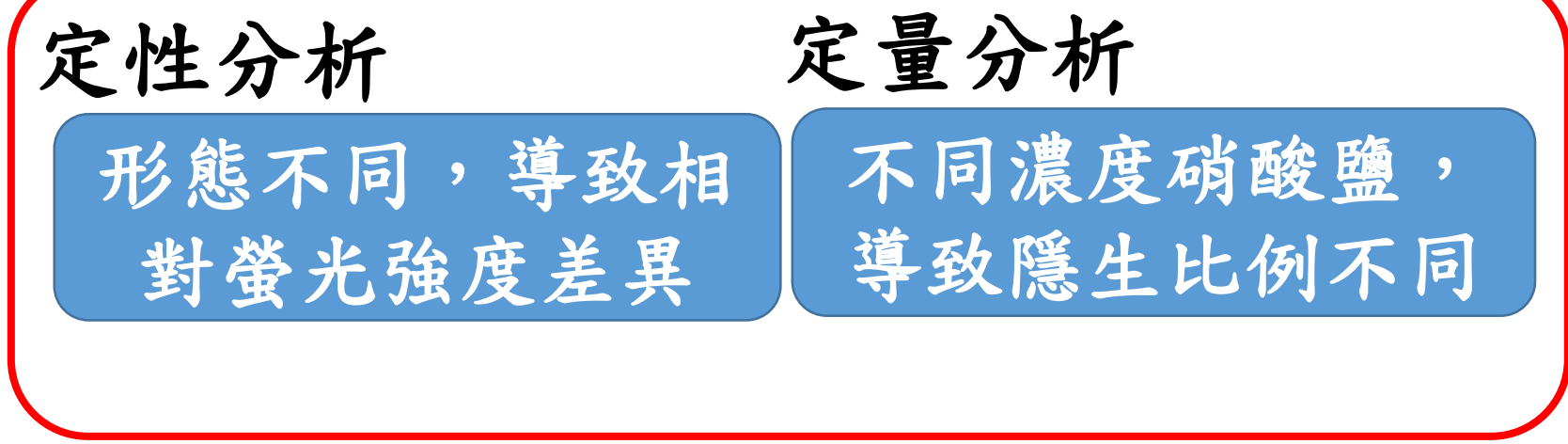


圖4、大生熊蟲隱生比例與硝酸鹽關係假設圖(作者繪製)

(圖6)

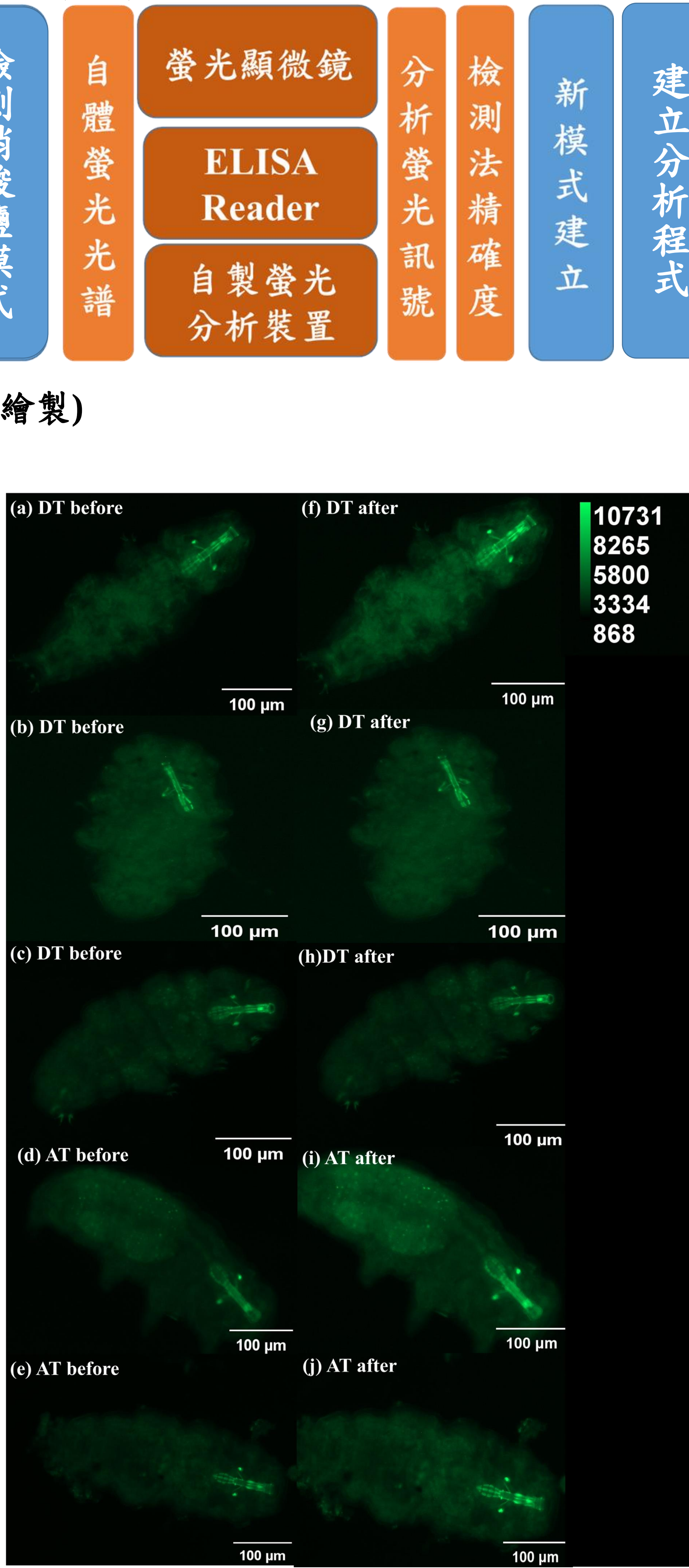


圖7、大生熊蟲自體螢光實際圖(作者拍攝)

圖中熊蟲檢測濃度為156mg/L NO₃⁻-N，AT為活動、DT為隱生
(a)~(e)為一年前拍攝，(f)~(j)為一年後拍攝

研究結果

一、利用共軛焦顯微鏡拍攝不同狀態大生熊蟲自體螢光光譜 n=3

在波長488nm激發大生熊蟲螢光光訊號(波長 507 nm ~ 680 nm) (圖8)，不同狀態螢光強度，大生熊蟲的隱生狀態比活動狀態Z軸層數多且螢光強(圖9~10)。

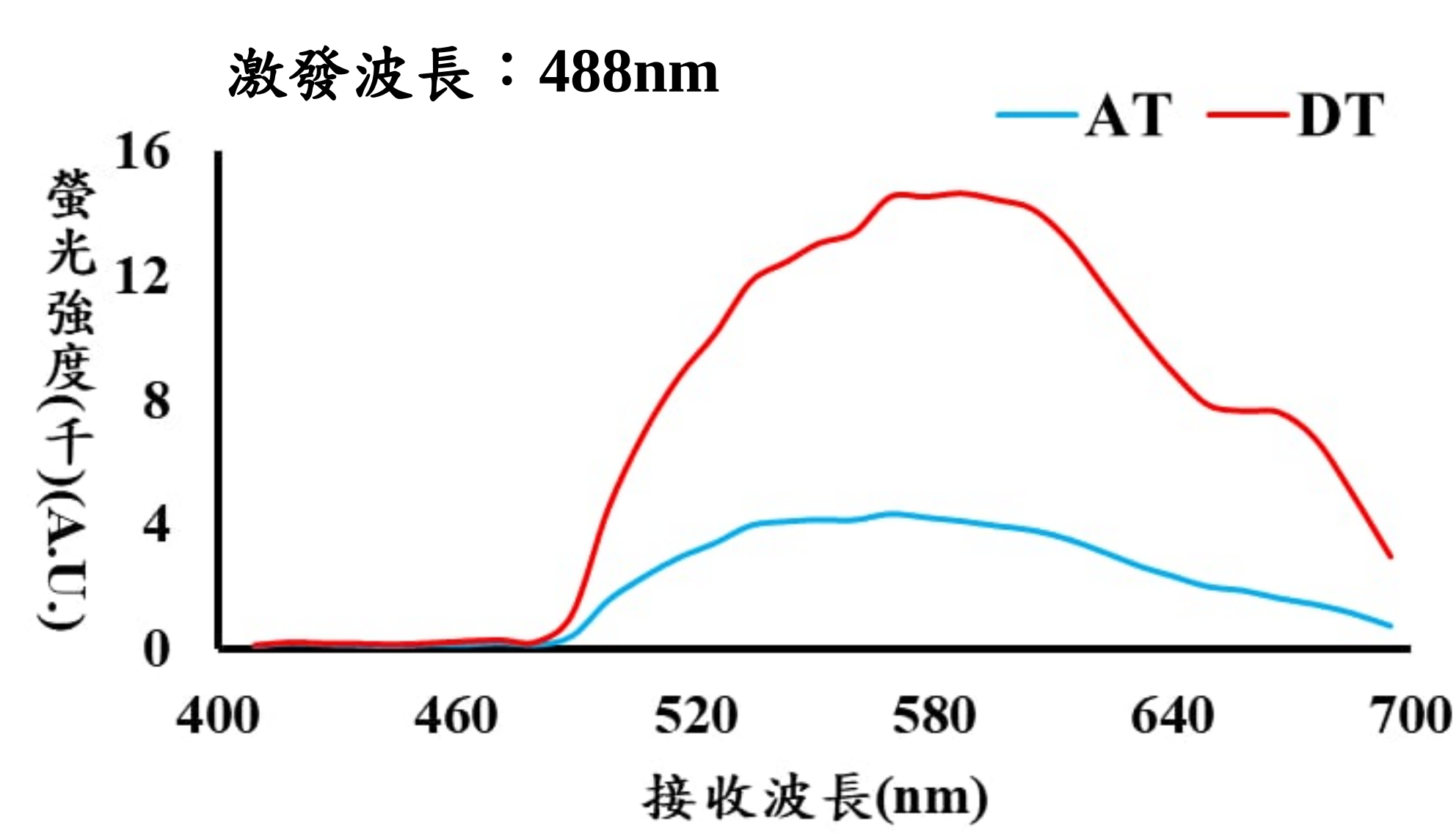


圖8、大生熊蟲自體螢光光譜(作者繪製)

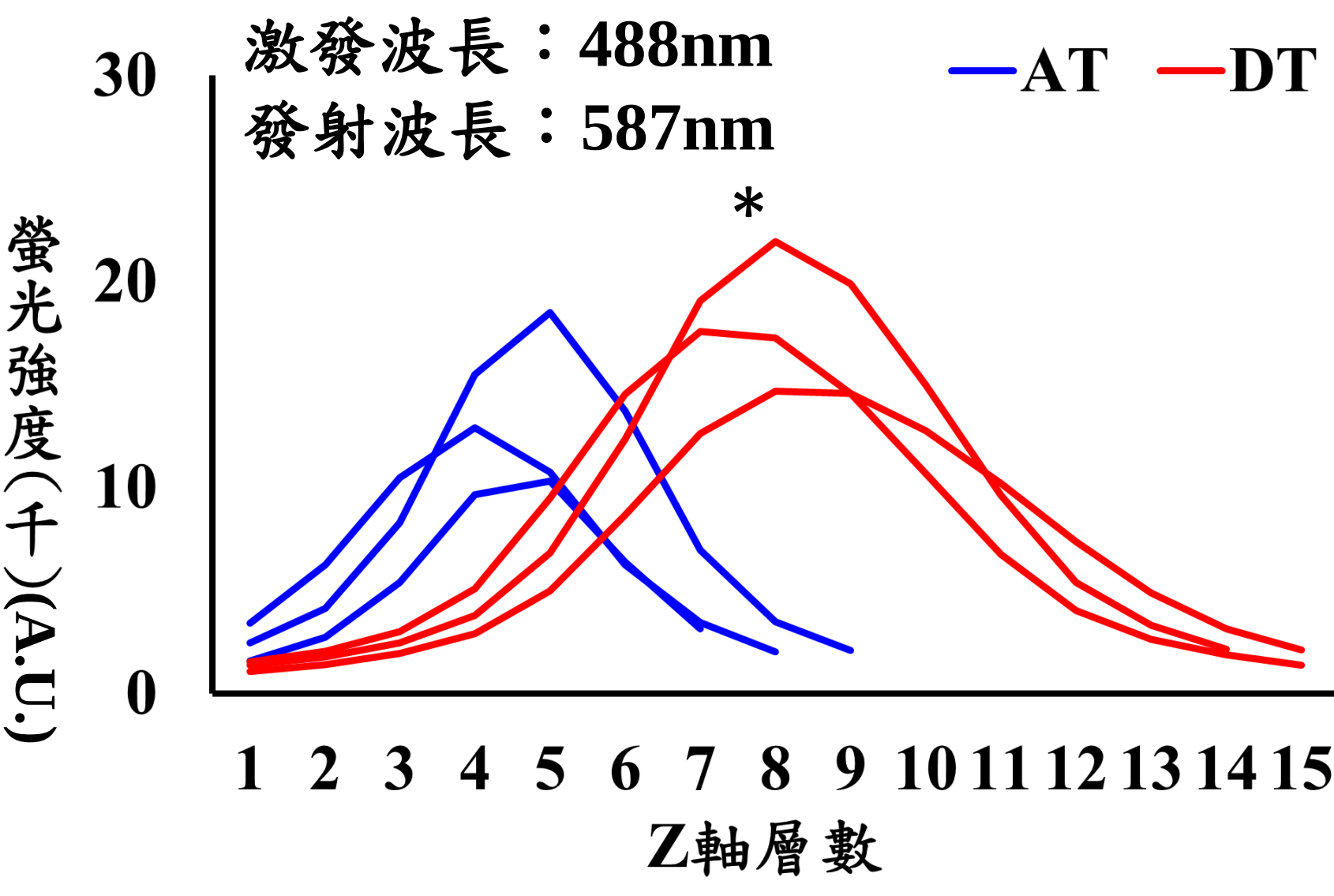


圖9、大生熊蟲Z軸螢光強度(作者繪製)
活動狀態(AT)，隱生狀態(DT)，激發波長488nm

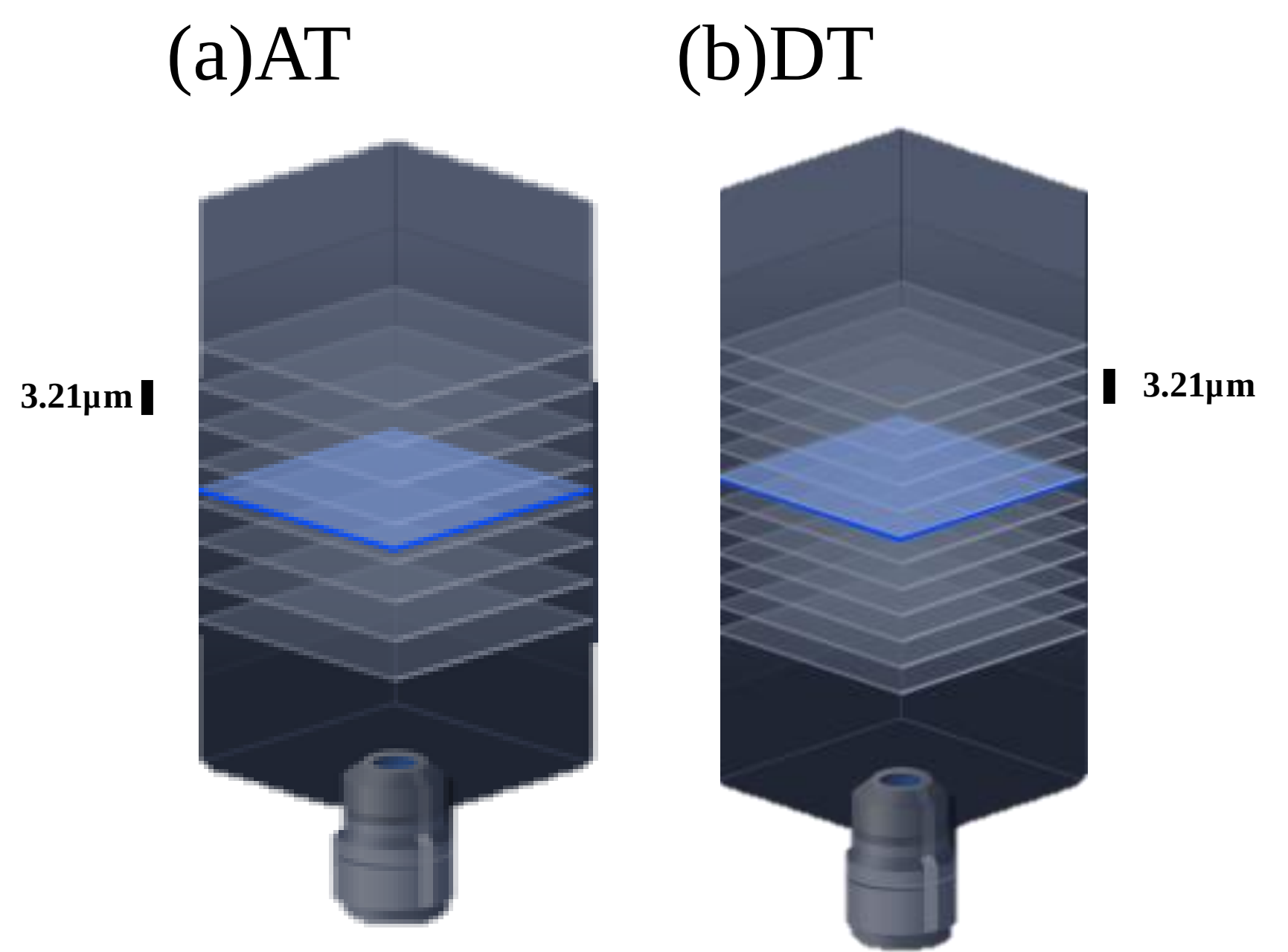


圖10、大生熊蟲拍攝Z軸示意圖(作者拍攝)
(a)為活動狀態，(b)為隱生狀態，每層3.21μm

二、不同硝酸鹽濃度下大生熊蟲自體螢光強度作為新型觀察方式可行性

波長 490 與570 nm分別激發大生熊蟲自體螢光 510 與 590 nm製作檢測硝酸鹽檢量線 ($R^2=0.78$ ； $R^2=0.9967$) (圖11 a ~ c)；不同濃度硝酸鹽下，各組大生熊蟲自體螢光發光面積與相對螢光強度趨勢相反(圖11 d)

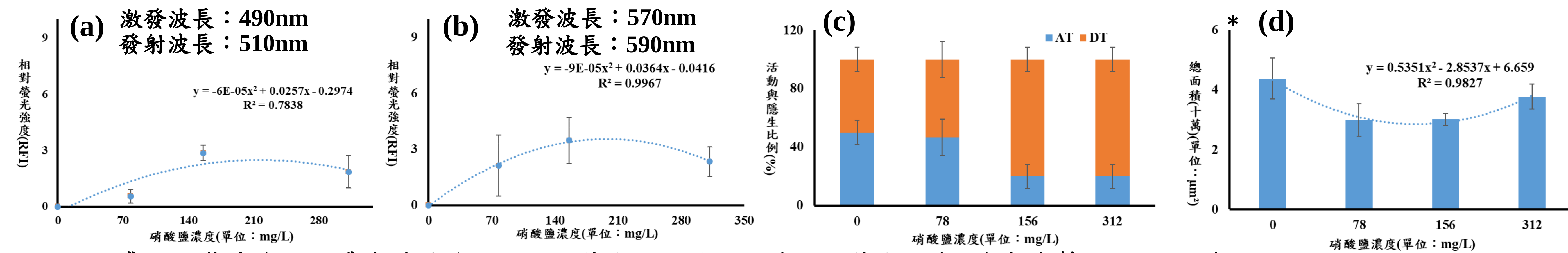


圖11、10隻大生熊蟲在不同濃度硝酸鹽下以倒立螢光顯微鏡照射後相對螢光強度(作者繪製) n=10 ；3重複
(a)在570nm/590nm(b)在490nm/510nm(c)大生熊蟲檢測不同濃度硝酸鹽時隱生比例(d)大生熊蟲檢測不同濃度硝酸鹽時各組自體螢光面積

三、ELISA reader 檢測不同硝酸鹽濃度下大生熊蟲螢光可行性(圖12)

利用 ELISA reader在激發波長 410 nm下螢光比值最佳(圖12 a)且在 410 nm下大生熊蟲活動與隱生狀態具差異(圖12 b)，但在不同硝酸鹽濃度下不同接收波長下自體螢光無相關性(圖12 c)。

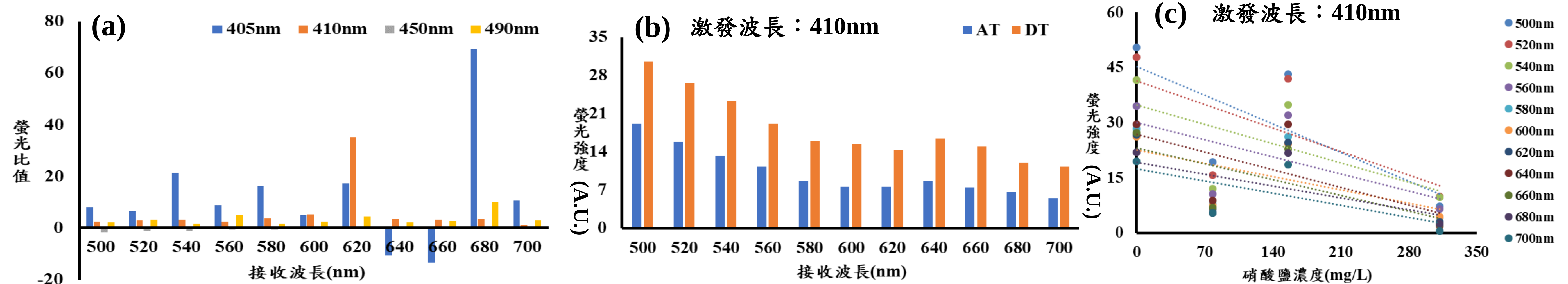


圖12、使用 ELISA reader 檢測活動、隱生與不同硝酸鹽濃度大生熊蟲自體螢光強度(作者繪製) n=10

(a)縱軸公式：螢光比值= $\frac{(DT-blank)}{(AT-blank)}$ ，AT為活動狀態、DT為隱生狀態，blank為水中背景值。(b)為不同接收波長活動與隱生數值(c)為4不同硝酸鹽濃度下不同接收波長螢光數值

四、自製裝置檢測大生熊蟲自體螢光(圖13)

利用壓克力板濾光後，製作硝酸鹽減量線。($R^2=0.9747$)

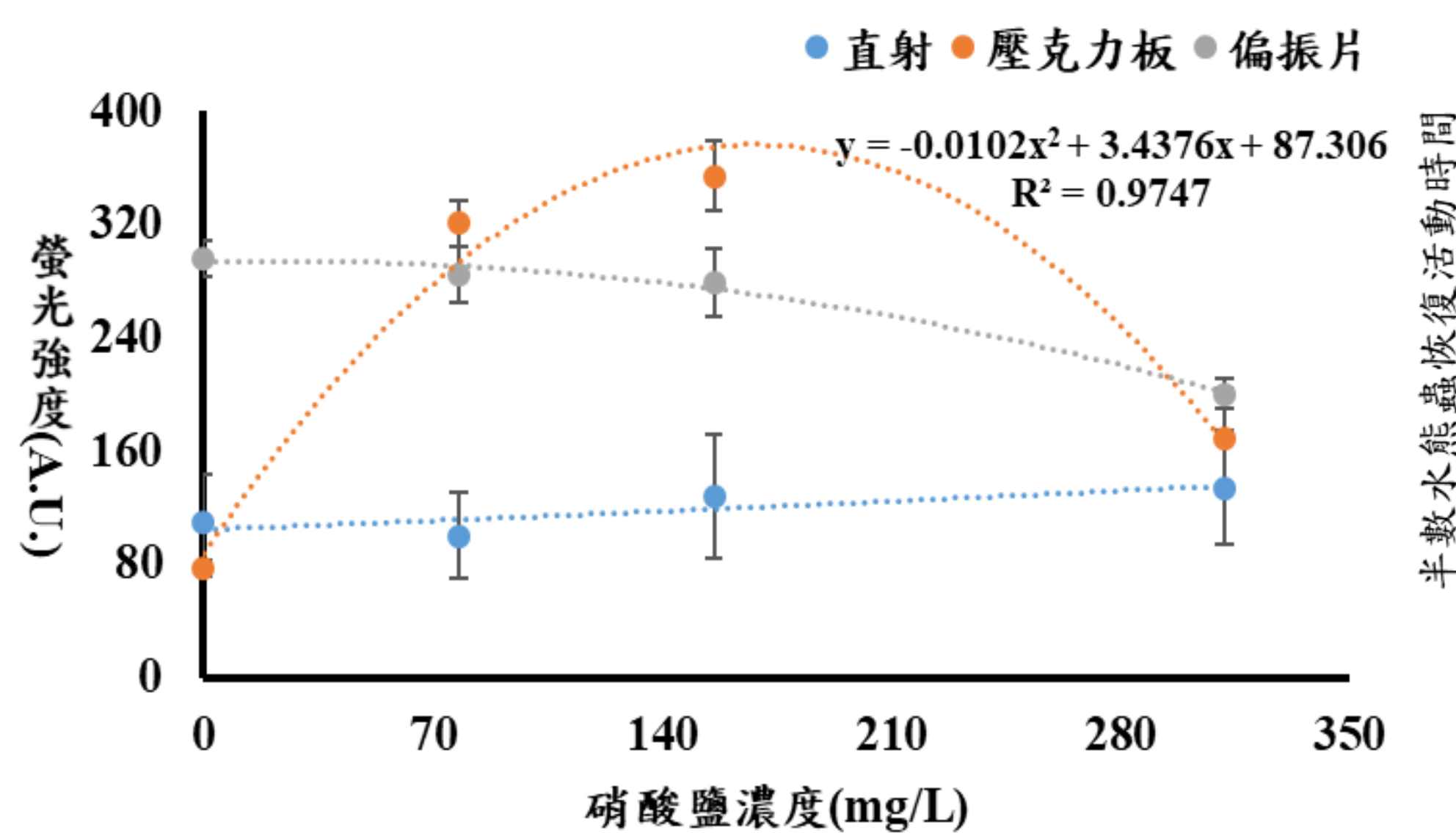


圖13、自製裝置470nm激發不同硝酸鹽濃度下大生熊蟲自體螢光（作者繪製） n=10，3重複

五、對照化學法與鏡檢作為檢測硝酸鹽模式準確度(圖14)

利用大生熊蟲半數恢復活動時間能夠檢測硝酸鹽壓力 ($R^2=0.9569$)，符合化學法($R^2=0.9979$)檢測結果

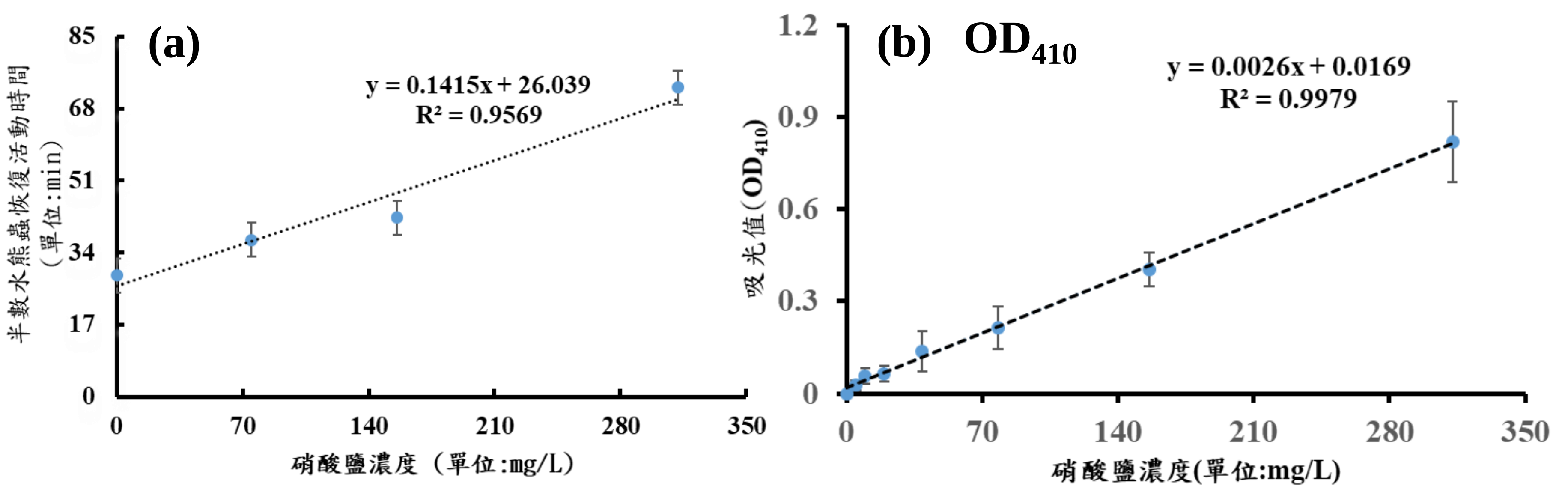


圖14、使用化學法與大生熊蟲鏡檢檢測硝酸鹽(作者繪製)

(a)為使用鏡檢方式檢測硝酸鹽(b)為化學法 n=10，3重複

六、以自製APP檢測硝酸鹽流程圖(圖15)

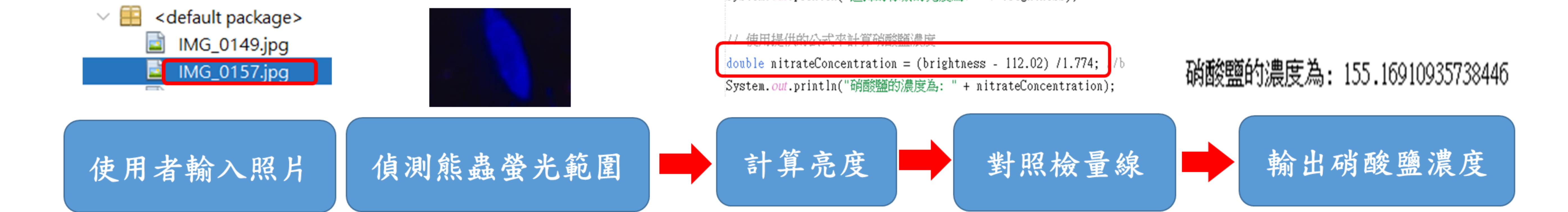


圖15、自製APP檢測硝酸鹽流程圖(作者繪製)

研究討論

一、大生熊蟲螢光檢測法比較

表 1 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	乾燥隱生熊蟲加入檢測物	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				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

表 2 不同研究利用水熊蟲自體螢光方式比較(作者繪製)

熊蟲物種	觀察方式	激發波長	使用儀器	用途	參考文獻
<i>Paramacrobiotus</i> sp.	飢餓24小時後，加水取上清液	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	330nm~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、ELISA Reader	檢測硝酸鹽濃度	本研究

二、大生熊蟲自體螢光降解可能性

水熊蟲化石在 488 nm下依然能夠激發其螢光，用於分析化石中爪子與口器的形態變化，探討其與現存水熊蟲的親緣關係 (Mapalo *et,al.*2021)，本研究將一年前封片的大生熊蟲再次拍攝自體螢光，發現其螢光訊號無顯著差異。

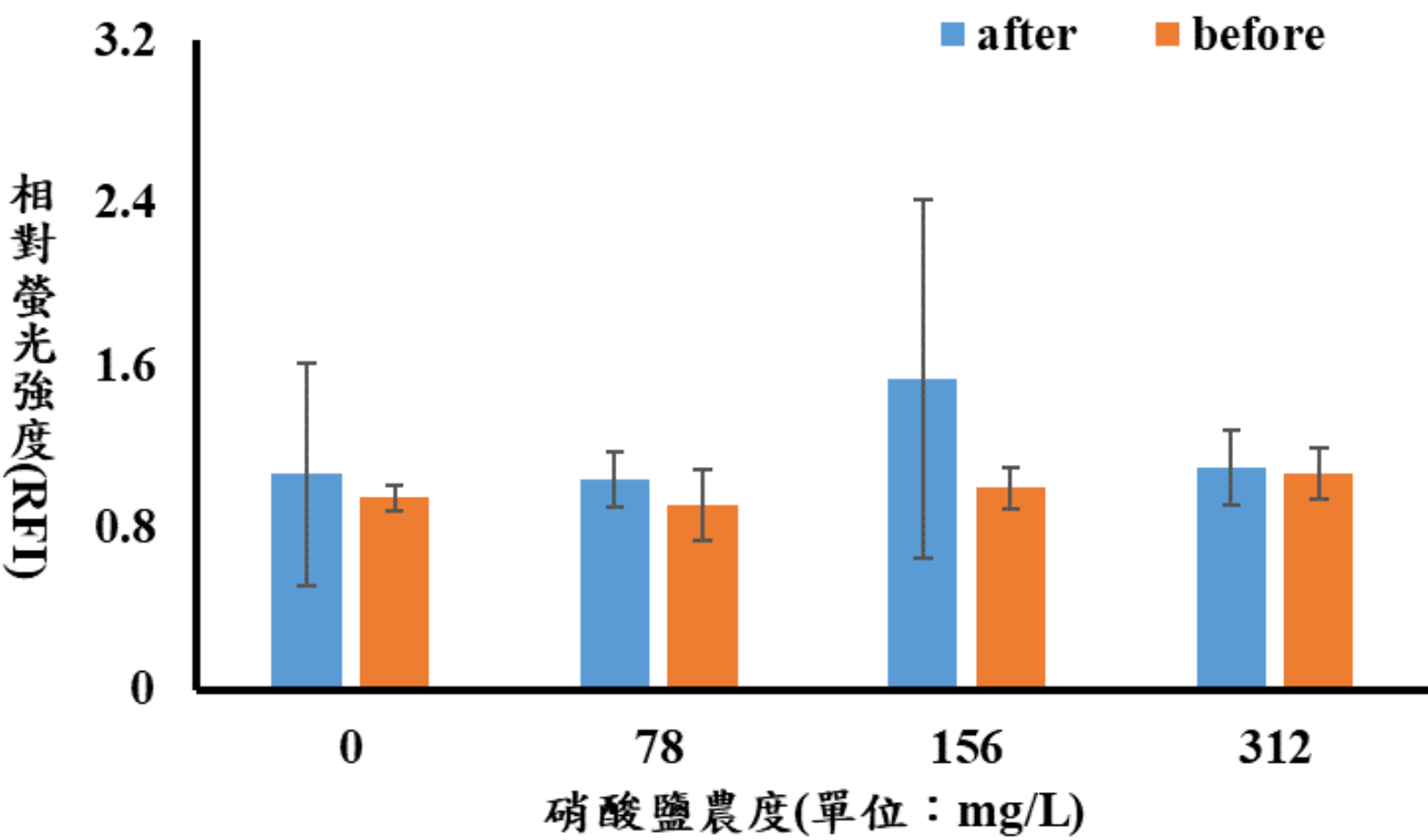


圖16、不同封片時間大生熊蟲螢光強度(作者繪製)

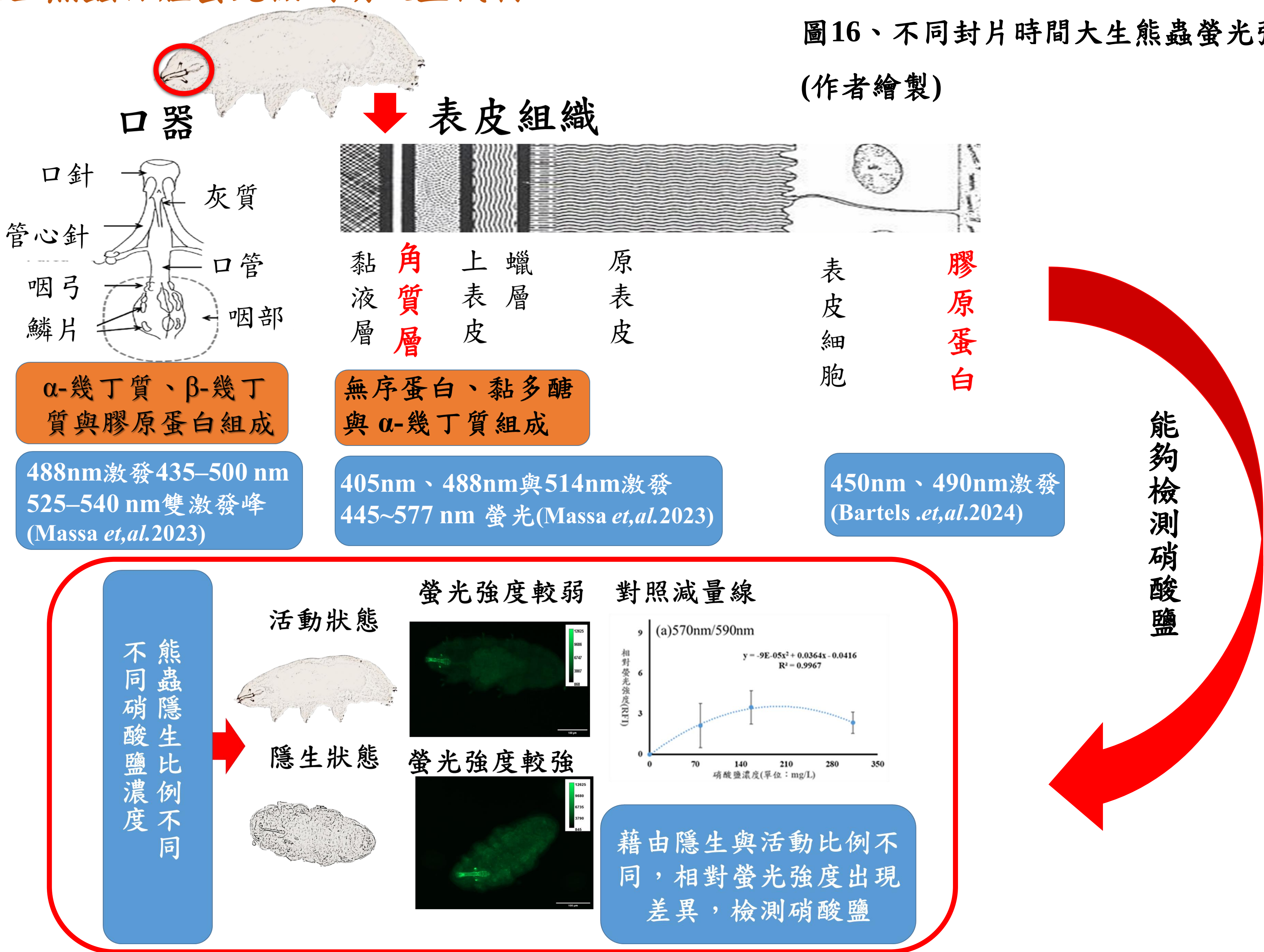


圖17、大生熊蟲螢光機制推測圖(作者繪製)圖源:大生熊蟲(作者繪製)口器 (Karin, 2017)、表皮組織 (Hans, 2006)

表 3 大生熊蟲檢測法比較(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

研究結論

- 一、使用大生熊蟲自體螢光檢測硝酸鹽壓力，可檢測 0~156 mg/L的硝酸鹽，並且改善鏡檢的缺點。
- 二、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。

未來展望

- 一、探討ELISA Reader 以大生熊蟲自體螢光檢測硝酸鹽可行性。
- 二、探討混合物對大生熊蟲自體螢光的影響。
- 三、探討大生熊蟲激發自體螢光機制。
- 四、發展便捷的檢測模型。

參考資料

(一) 顏健弘(2023)。2023 年台灣國際國際科學展覽會研究報告

(二) Mapalo, M. A., Robin, N., Boudinot, B. E., Ortega-Hernández, J., & Barden, P. (2021). Proceedings of the Royal Society B, 288(1960), 20211760.

(三) Massa, E., Rebecchi, L., & Guidetti, R. (2024). Zoological Journal of the Linnean Society, 200(1), 186-199.

(四) Perry, E. S., Miller, W. R., & Lindsay, S. (2015). Journal of Microscopy, 257(2), 117-122.

(五) Suma, H. R., Prakash, S., & Eswarappa, S. M. (2020). Biology Letters, 16(10), 20200391.

(六) Telford, M. J., Bourlat, S. J., Economou, A., Papillon, D., & Rota-Stabelli, O. (2009). Animal Evolution. Genomes, Fossils, and Trees, 71-79. (詳情見作品說明書)