

中華民國第 59 屆中小學科學展覽會  
作品說明書

---

國中組 生物科

探究精神獎

030312

魚記猶存-觀賞用斑馬魚空間記憶的探討

學校名稱：苗栗縣私立君毅高級中學(附設國中)

作者：  國一 溫舜如  國一 張祐瑋  國一 邱詩茹	指導老師：  宋威德  簡含祠
---	-----------------------------

關鍵詞：學習環境、斑馬魚、空間記憶

## 摘要

本研究旨在探討環境對觀賞用斑馬魚(*Danio rerio*)空間記憶形成的影響。前人研究建構在斑馬魚空間記憶的腦區，或聲音、顏色等刺激對空間記憶的影響；本研究則證實了斑馬魚的記憶學習與環境具關聯性。本研究的原理是利用斑馬魚偏好深水區的天擇特性，加上改良自T字型迷宮的十字型迷宮，觀察訓練兩天後，斑馬魚進入深水區的耗時減少量，以推估空間記憶形成。從迷宮水體溫度及成分兩個向度進行探討，發現：低溫環境有助斑馬魚形成空間記憶。咖啡、酒精及茶有助形成空間記憶；人參、黃耆及菸草則無助於形成空間記憶。此外，本研究更運用自製的制約訓練器，發現空間記憶學習的最佳環境也能促進斑馬魚的制約行為學習，或許能進一步推廣到更多類別的長期記憶。

## 壹、研究動機

魚是生活中常見的生物，我們卻從來沒有去仔細了解牠們。老師在上動物行為及神經系統的單元時，提到，學習行為是經由後天學習才表現出來的，是否能夠有效學習除了和神經系統的發達程度有關外，也和我們所處的環境有很大的關係……。我突然想到，我們都會調侃記憶力不好的同學是「金魚腦」，但，魚的記憶力跟人類真的差這麼多？如果給魚去走迷宮，魚會不會像遇到雙心石滬一樣，走不出來？後來看了一些文獻資料，發現魚的記憶模式原來和人類很相像，於是我們好奇，若找出魚兒學習與環境的關聯，是否能提供人類的學習一些建議？或許，找到適合的學習環境，讀書就能夠更有效率一些。

## 貳、研究目的

本研究先找出斑馬魚形成空間記憶的最佳溫度，再找出最佳水體成分，並進一步確認成分濃度與形成空間記憶的關聯。最後，檢測最佳化環境是否影響操作制約的學習，如圖 1。

研究一、探討水體溫度對觀賞用斑馬魚空間記憶形成的影響

(一) 探討觀賞用斑馬魚在 23°C 水體溫度的空間記憶形成

(二) 探討觀賞用斑馬魚在 29°C 水體溫度的空間記憶形成

研究二、探討水體成分對觀賞用斑馬魚空間記憶形成的影響

(一) 探討觀賞用斑馬魚在咖啡水溶液中的空間記憶形成

(二) 探討觀賞用斑馬魚在酒精水溶液中的空間記憶形成

(三) 探討觀賞用斑馬魚在人參水溶液中的空間記憶形成

(四) 探討觀賞用斑馬魚在黃耆水溶液中的空間記憶形成

(五) 探討觀賞用斑馬魚在抹茶水溶液中的空間記憶形成

(六) 探討觀賞用斑馬魚在菸草水溶液中的空間記憶形成

研究三、探討不同濃度的水體環境(酒精、抹茶)對觀賞用斑馬魚空間記憶形成的影響

(一) 探討觀賞用斑馬魚在不同濃度酒精水溶液中的空間記憶形成

(二) 探討觀賞用斑馬魚在不同濃度抹茶水溶液中的空間記憶形成

研究四、分析最佳水體環境是否對觀賞用斑馬魚學習制約行為有影響

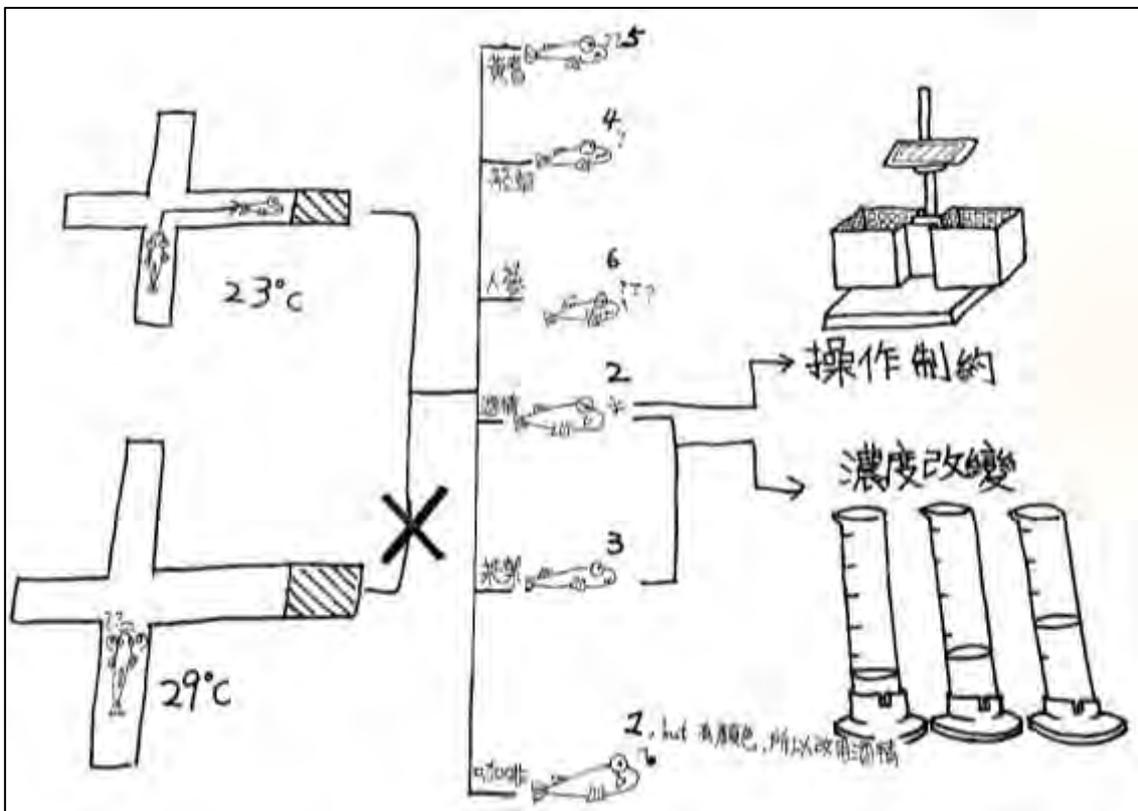


圖 1、觀賞用斑馬魚空間記憶的探討研究流程圖

## 參、研究設備及器材

### 一、飼養用器材 (如圖 2)

1. 魚缸(大 x1 中 x2 小 x2)
2. 水妖精+空氣幫浦+風管
3. 撈魚魚網
4. 觀賞魚飼料
5. 斑馬魚(萊姆仙子)共 51 隻：研究一 6 隻、研究二 21 隻、研究三 18 隻、研究四 6 隻

### 二、實驗用器材(6~11.以缸水配置) (如圖 3、圖 4)

1. 自製十字形迷宮
2. 自製 PP 材質擋板
3. 溫度計
4. 手機水平儀 app
5. 手機相機 app
6. 咖啡水溶液(重量百分濃度 0.05%)
7. 茶葉水溶液(重量百分濃度 0.05%、0.01%、0.005%)
8. 人參水溶液(重量百分濃度 0.043%)
9. 黃耆水溶液(重量百分濃度 0.05%)
10. 酒精水溶液(重量百分濃度 0.05%、0.01%、0.005%)
11. 菸草水溶液(重量百分濃度 0.05%)

### 三、迷宮架設與修理設備

1. 壓克力板
2. 熱熔膠槍&熱熔膠條
3. 膠帶
4. 氣仿及注射用針筒附針頭
5. 自製錄影腳架



圖 2、飼養用器材

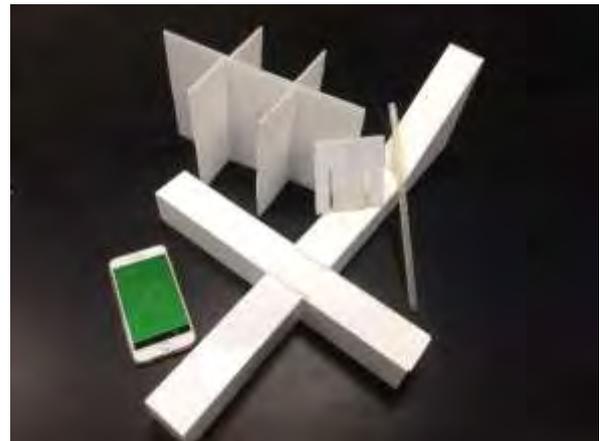


圖 3、實驗用器材



圖 4、配置水溶液之粉末或萃取液

(由左而右依序為：人參萃取液、咖啡粉、抹茶粉、黃耆粉及菸草粉)

## 肆、研究過程或方法

一、**研究原理**：本研究利用斑馬魚偏好深水區的特性，將斑馬魚置於有一處深水區的十字型迷宮，觀察斑馬魚在迷宮中訓練兩天後，進入深水區的耗時減少量，以推估空間記憶形成。

二、文獻探討：魚類記憶的形成原理與常用的研究方法

1. 選用斑馬魚作為模式生物，是因為**斑馬魚基因和人類相似度高達 87%**，且哺乳類的海馬迴同源於硬骨魚的端腦，所以我們能藉由斑馬魚的反應回推人類(吳世郁，2008)。
2. 空間記憶為記錄該生物生存環境與空間定位的一種記憶型態。動物能夠記憶空間定位並往返於特定位置間。反應性策略是以迷宮或路線中出現的視覺等相關線索做為導航依據以抵達目的地；位置性策略則是因地因時習得目的地與獎賞之間的關聯性(吳世郁，2008)。我們將兩策略應用在我們的研究設計，希望斑馬魚記憶的，有迷宮中深水區的位置，及特定視覺環境與食物的關聯。
3. T 字型迷宮結構，有分成淺水區和深水區。深水區內會布置人工水草和石頭，打造斑馬魚比較偏好的環境，並以此做為學習誘因，訓練斑馬魚的空間記憶(吳世郁，2008)。
4. **Novel tank 的實驗指出，當斑馬魚進到一個新環境時，會習慣性潛到深水區，減少天擇壓力造成的恐懼**；當魚適應新環境後，感受到較輕的天擇壓力，便往淺水區探索，但魚還是傾向待在深水區 (Jonathan M Cachat, et al,2010)。
5. T 字型迷宮實驗有兩個階段。首先是馴化階段，會將斑馬魚放進 T 型迷宮的中間水道，但是會關閉左右的橫向水道，因為要避免斑馬魚提前發現深水區影響實驗結果，這個流程的目的是要讓斑馬魚先熟悉環境，以免因為不熟悉這個環境而害怕，影響實驗結果。

馴化階段之後就是訓練階段。這時候會開放右側的深水區，讓斑馬魚可以學習從等待區到深水區的路線，實驗時會記錄從等待區開放後第一次進入深水區超過 20 秒的耗時，一次會訓練 5 分鐘，如果 5 分鐘內沒有到達深水區，就會將他趕到深水區待 2 分鐘，然後再把魚移動回魚缸。訓練階段會重複 3 次，3 次訓練間各間隔 1 天(吳世郁，2008)。

**我們的研究方法也是以隔板隔開，讓斑馬魚在迷宮岔路處一邊適應環境，但訓練的部分有做改變**，和吳世郁於 2008 年碩士論文(斑馬魚端腦在空間記憶上所扮演的角色)不同的有：

**a. 將 T 字型迷宮改為十字型迷宮，訓練時間由 5 分鐘增長為 10 分鐘**

文獻中的實驗是訓練 5 分鐘，我們則是 10 分鐘，因為我們的迷宮是十字形迷宮，較為複雜，因此我們給斑馬魚更多的時間去熟悉並記憶通往深水區的路徑。

**b. 我們為避免被驅趕的負面記憶與深水區產生記憶連結，故沒驅趕斑馬魚**

文獻中若斑馬魚沒找到深水區，最後會把魚趕到深水區，但我們沒有，因為如果把魚趕到深水區，魚可能會將深水區與被驅趕產生連結，進而發生恐懼，影響實驗結果。

**c. 將進入深水區所需耗時定義為「第一次進入深水區達 30 秒的所需耗時」**

文獻的實驗記錄採用第一次進入深水區達 20 秒的所需耗時，我們改成第一次進入深水區達 30 秒的所需耗時，是為了更加確保斑馬魚注意到深水區的存在。

### 三、斑馬魚基本飼養及實驗前準備

#### (一)架缸

1. 將取得之地下水倒入魚缸
2. 架設循環設備(空氣幫浦驅動的水妖精)
3. 加入替代底沙的石頭(用以培養缸內的硝化菌等菌種)
4. 每次更換三分之一的水，一天兩次，持續兩周；並記錄於換水輪班表。

#### (二)新魚入缸

1. 將新魚連袋放入大缸(適應水溫，約一小時)，如下圖 5
2. 剪開袋子，將魚倒入內含大缸水的小缸(適應水質，約半小時)
3. 將魚連同小缸置入大缸，以使魚慢慢游出至大缸，如下圖 6
4. 每三天換三分之一的水，並進行記錄
5. 每天餵食一次，並進行記錄。



圖 5、新魚到貨時，將魚連袋置入大缸



圖 6、將新魚連同小缸置入大缸

#### (三)迷宮製作

1. 改良文獻資料的 T 字型迷宮，設計十字型迷宮：
  - a. 文獻中的迷宮是 T 字形結構，有分成淺水區和深水區。深水區內會布置人工水草和石頭，打造斑馬魚比較偏好的環境，並以此做為學習誘因，訓練斑馬魚的空間記憶(吳世郁，2008)。
  - b. 另一文獻介紹 Novel tank，提到當斑馬魚進到一個新環境時，會習慣性潛到深水區，減少天擇壓力造成的恐懼；當魚適應新環境後，感受到較輕的天擇壓力，便往淺水區探索，但魚還是傾向待在深水區 (Jonathan M Cachat, et al,2010)。(如下圖 7)
  - c. 我們將 T 字型迷宮改良成十字形迷宮，是希望能增加往前游的空間給斑馬魚，避免斑馬魚在前游到碰壁後，被強迫左右轉，如此便能減少斑馬魚逢機進入深水區的可能，降低本研究的誤差。此外，我們也沒有佈置深水區，而是直接引用 2010 年 Novel tank 文獻提到的，斑馬魚傾向待在深水區的天性觀察空間學習。
2. 設計十字形迷宮基本外型(有一處深水區)並繪製構造圖。迷宮基本構造包含：中心走廊底板、岔路底板、深水區底板、迷宮牆壁，如下圖 8。
3. 委由廠商按設計圖裁切壓克力板
4. 裁切好的壓克力板用氯仿連接，過程如下圖 9。
  - 使用氯仿時，須在開放空間，並於一旁架設電風扇，戴手套使用針頭組吸取。
5. 壓克力板尚有未能完全密封處，用熱熔膠把隙縫封住，以防止漏水。如下圖 10。
6. 隨著使用，迷宮會開始產生縫隙，此使再次用氯仿或熱熔膠進行補強。

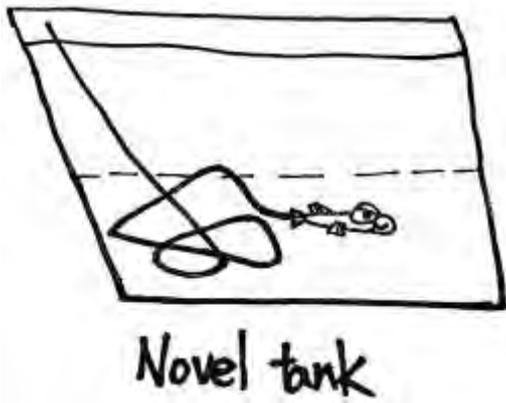


圖 7：文獻中的 Novel tank 路徑示意圖

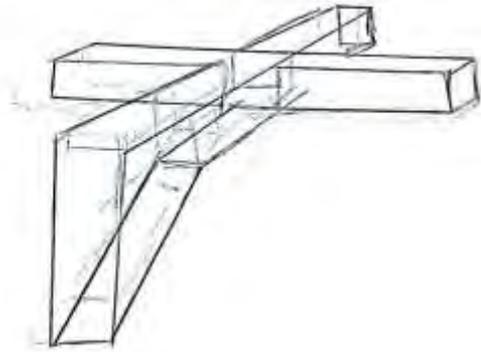


圖 8、迷宮基本構造設計圖



圖 9、使用氰仿連接壓克力板



圖 10、測試迷宮漏水，若漏水以熱熔膠補強

#### (四) 設計觀賞用斑馬魚的個別套房

斑馬魚在兩次訓練間，力求生活環境能相似。透過文獻，我們看到利用水槽連通所建置的飼養箱(陳瑾寧等，56 屆全國科展)。但此建置方法，需消耗大量經費，我們保留了多個小空間水質須相同的原理，改以 pp 板設計斑馬魚在每兩次訓練間待的「個別套房」。

1. 測量魚缸內壁的長寬高，並設計隔板規格
2. 依設計的隔板規格切割 pp 板
3. 將 pp 板接合在一起，並置入魚缸中，完成個別套房之設計，如圖 11 及圖 12。



圖 11、將 pp 板接合在一起



圖 12、在個別套房悠游的魚兒

四、 規劃研究一、研究二及研究三的實驗基本步驟

(一) 為十字形迷宫編區為深水區、淺水區，十字形迷宫俯瞰圖與編制如下圖 13：

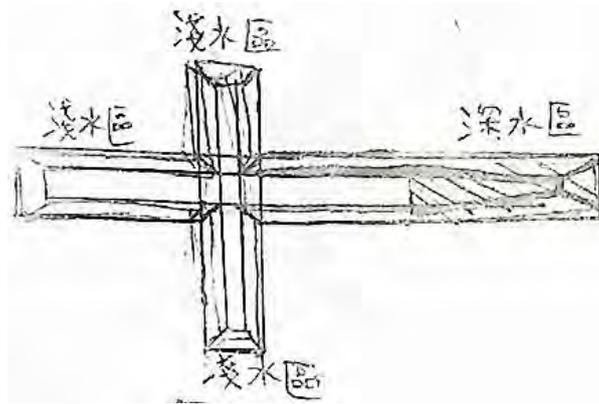
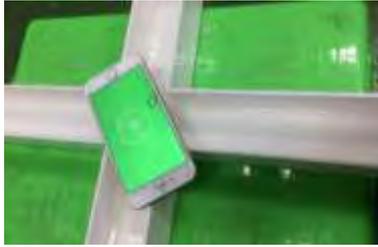


圖 13、十字形迷宫俯瞰示意圖與各區編制

(二) 本研究以十字形迷宫進行觀賞用斑馬魚的空間記憶訓練，並分析斑馬魚在第一天與第三天進入深水區所需耗時的差異來判定習得空間記憶的程度。**研究一、研究二、研究三共同制定了統一操作流程，在接下來的說明書篇幅中，我們將簡稱為「基本步驟」**，如下表 1：

表 1、研究一、研究二及研究三的統一操作流程，以下簡稱為「基本步驟」

<p>1、設置迷宫</p> 	<p>2、加水體至淺水區 2 公分線</p> 	<p>3、測量水溫與水平度</p> 
<p>4、關上閘門</p> 	<p>5、放入魚，讓牠適應 5 分鐘</p> 	<p>6、以釣魚線拉開閘門</p> 
<p>7、讓魚在迷宮內待十分鐘</p> 	<p>8、停止記錄魚回個別套房</p> 	<p>9、場復</p> 

註 1：為降低斑馬魚的焦慮，在放入迷宫適應 5 分鐘前，即先在過渡的杯子適應 10 分鐘。

註 2：為減少拉開閘門時，光影或其他因素的干擾，我們使用釣魚線，在遠方將閘門拉開。

## 五、 研究一：探討水體溫度對觀賞用斑馬魚空間記憶形成的影響

(一)觀察及背景知識：日常經驗中，我們覺得自己熱的時候難集中注意力，冷的時候比較清醒，記憶力佳。但水中悠遊的魚兒好像不會受溫度高低影響活動力，記憶力則有待測試。

(二)提出問題：斑馬魚和哺乳類的記憶形成機制非常相似。魚的記憶力會不會受到溫度影響？我們如果能夠知道，或許能夠推論適合我們的學習環境。

(三)研究假設：斑馬魚在溫度較低的水中，空間記憶的形成效果較好。

(四)實驗設計：預計比較低溫及高溫環境中，斑馬魚的空間記憶形成能力，以驗證研究假設(如下圖 14)

1. 據萊姆仙子供應商提供的資料，**萊姆仙子最適溫度在 22°C~30°C 之間**
2. 低溫環境：實驗須在冷氣房進行，且斑馬魚在實驗外的時間也須待在冷氣房，冷氣定溫 23°C。在實驗前 2 小時，就要把實驗水體(缸水)放進冷氣房調整水溫。基本步驟共執行三次，並攝影實驗過程。且每兩次操作之間，需間隔 22 小時以上。
3. 高溫環境：實驗須在空調環境進行，且斑馬魚在實驗外的時間也須待在此環境，空調定溫 29°C。在實驗前 2 小時，就要把實驗水體(缸水)放進此環境調整水溫。基本步驟共執行三次，並攝影實驗過程。且每兩次操作之間，需間隔 22 小時以上。
4. 事後觀察攝影檔案，紀錄魚的路徑，並依此分析，第一次進入深水區達 30 秒所需耗時及斑馬魚在 10 分鐘記錄時間內待在深水區的總時間。



圖 14、研究一實驗設計示意圖：運用空調房調整溫度，將斑馬魚分別置於 23°C 與 29°C 的環境中，以觀察斑馬魚在溫度較低的水中，空間記憶形成效果是否較好

## 六、 研究二：探討水體成分對觀賞用斑馬魚空間記憶形成的影響

(一)觀察及背景知識：日常經驗中，喝咖啡能讓精神變好、茶能夠提神、人參及黃耆有補氣效果，喝酒會讓人記憶片斷、菸草有害身體健康。其中，茶、中藥等更是我們漫漫長夜讀書的好陪伴，魚的記憶力會不會也受到這些物質影響呢？

(二)提出問題：斑馬魚和哺乳類的記憶形成機制非常相似。那，魚的記憶力會不會也受到咖啡、抹茶、人參、黃耆、酒精及菸草等物質影響？我們如果能夠知道，或許可以推論適合我們的學習環境。

(三)研究假設：共分六個子實驗，這六個子實驗共用一組對照組。有六項研究假設待檢驗：

1. 斑馬魚在**咖啡**水溶液中，能有效形成空間記憶。
2. 斑馬魚在**抹茶**水溶液中，能有效形成空間記憶。
3. 斑馬魚在**人參**水溶液中，能有效形成空間記憶。

4. 斑馬魚在**黃耆**水溶液中，能有效形成空間記憶。
5. 斑馬魚在**酒精**水溶液中，無法有效形成空間記憶。
6. 斑馬魚在**菸草**水溶液中，無法有效形成空間記憶。

#### (四)實驗設計

本研究共分六個子實驗，這六個子實驗共用一組對照組。六個子實驗分別套用上述基本步驟，在迷宮中分別放入使用缸水配置的：咖啡水溶液、抹茶水溶液、人參水溶液、黃耆水溶液、酒精水溶液及菸草水溶液，對照組的水體環境則使用平時飼養萊姆仙子的缸水。魚類的生活環境是直接浸泡在水中，且魚類的呼吸器官，鰓，是透過水的流入，使其完成物質交換，水質有些許變動，即可能對魚造成巨大影響。**為了避免在實驗過程中，傷害到模式生物，我們很仔細地配置水溶液，六種水溶液，皆配置在小於或等於 0.05%的濃度。**(如圖 15)

1. 咖啡水溶液：使用市售咖啡粉及缸水，在迷宮中調配出 0.05%的咖啡水溶液，操作上述基本步驟。共執行三次基本步驟流程，並攝影實驗過程。且，每兩次操作之間，需間隔 22 小時以上。
2. 抹茶水溶液：使用市售抹茶粉及缸水，在迷宮中調配出 0.05%的抹茶水溶液，操作上述基本步驟。共執行三次基本步驟流程，並攝影實驗過程。且，每兩次操作之間，需間隔 22 小時以上。
3. 人參水溶液：使用市售人參萃取液及缸水，在迷宮中調配出約 0.043%的人參水溶液，操作上述基本步驟。共執行三次基本步驟流程，並攝影實驗過程。且，每兩次操作之間，需間隔 22 小時以上。
4. 黃耆水溶液：使用市售黃耆磨粉及缸水，在迷宮中調配出 0.05%的黃耆水溶液，操作上述基本步驟。共執行三次基本步驟流程，並攝影實驗過程。且，每兩次操作之間，需間隔 22 小時以上。
5. 酒精水溶液：使用市售酒精及缸水，在迷宮中調配出 0.05%的酒精水溶液，操作上述基本步驟。共執行三次基本步驟流程，並攝影實驗過程。且，每兩次操作之間，需間隔 22 小時以上。
6. 菸草水溶液：使用市售菸草粉及缸水，在迷宮中調配出 0.05%的菸草水溶液，操作上述基本步驟。共執行三次基本步驟流程，並攝影實驗過程。且，每兩次操作之間，需間隔 22 小時以上。
7. 對照組：在迷宮中置入缸水，操作上述基本步驟。共執行三次基本步驟流程，並攝影實驗過程。且，每兩次操作之間，需間隔 22 小時以上。
8. 事後觀察攝影檔案，紀錄魚的路徑，並依此分析，第一次進入深水區達 30 秒需耗費的時間及魚在 10 分鐘記錄時間內待在深水區的總時間。

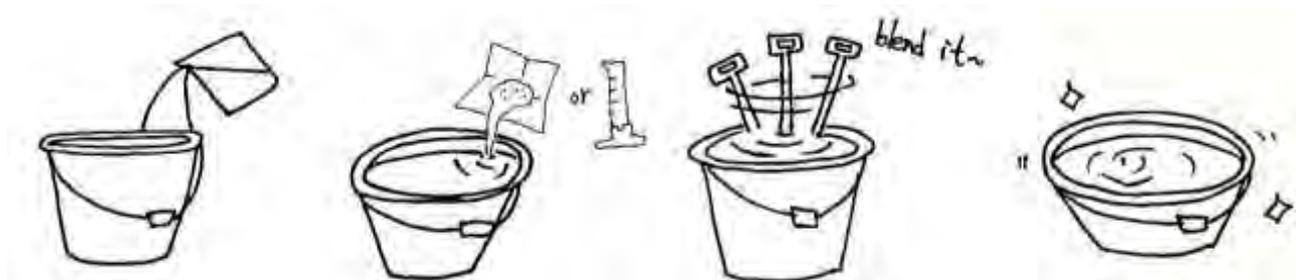


圖 15、研究二配置水溶液的流程示意圖：先將缸水倒入水桶中，之後分別加入粉末或液體，經過充分攪拌，調配出我們所需濃度的實驗用水溶液。

## 七、研究三、探討不同濃度的水體環境(酒精、抹茶)對觀賞用斑馬魚空間記憶形成的影響

(一)觀察及背景知識：研究二中，我們發現酒精和抹茶環境中的空間記憶形成相較對照組為佳。因此好奇，較 0.05% 更低濃度的酒精與抹茶是否對斑馬魚空間記憶的形成有影響？

(二)提出問題：不斷降低水體環境的濃度，是否會減少斑馬魚空間記憶的形成？

(三)研究假設：

1. 斑馬魚在低濃度的酒精水溶液中，空間記憶形成效果會較不明顯。
2. 斑馬魚在低濃度的抹茶水溶液中，空間記憶形成效果會較不明顯。

(四)實驗設計：

本研究共分兩個子實驗，分別套用基本步驟，在迷宮中分別放入使用缸水配置的：酒精水溶液(0.05%、0.01%、0.005%)與抹茶水溶液(0.05%、0.01%、0.005%)。(如下圖 16)

1. 酒精水溶液：使用市售酒精及缸水，在迷宮中分別調配出 0.05%、0.01% 及 0.005% 的酒精水溶液，操作上述基本步驟。共執行三次基本步驟流程，並攝影實驗過程。且，每兩次操作之間，需間隔 22 小時以上。
2. 抹茶水溶液：使用市售抹茶粉及缸水，在迷宮中分別調配出 0.05%、0.01% 及 0.005% 的抹茶水溶液，操作上述基本步驟。共執行三次基本步驟流程，並攝影實驗過程。且，每兩次操作之間，需間隔 22 小時以上。

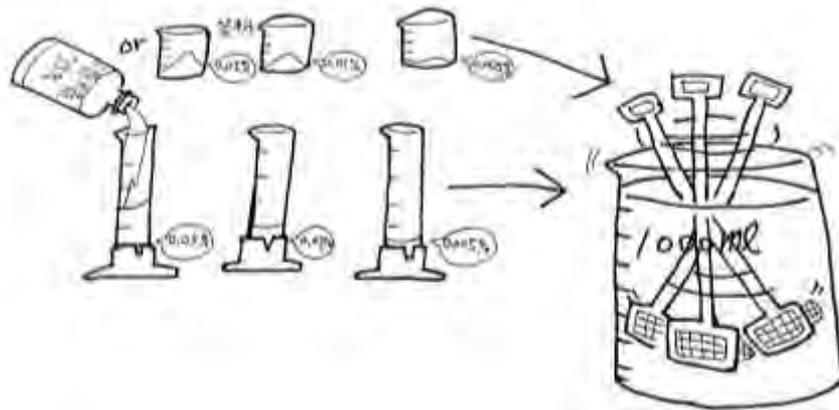


圖 16、研究三實驗設計示意圖：將不同量的 75%酒精與抹茶粉加入放有定量缸水的水桶中，經過充分攪拌，調配出我們所需濃度的酒精水溶液與抹茶水溶液。

## 八、研究四：分析最佳水體環境是否對觀賞用斑馬魚學習制約行為有影響。

(一)觀察與背景知識：

能提升空間記憶的水體環境，是否也有助於提升其他長期記憶呢？如果能解答這個問題，或許我們就可以回推到人類，一個好的環境，可以提升不同種類學習的效果。於是我們以操作制約為例，要進一步去探討空間記憶的最佳水體環境對斑馬魚操作制約形成之影響。

(二)提出問題：斑馬魚在不同水體環境，記住圖案與食物獎勵關聯的能力有沒有差別？

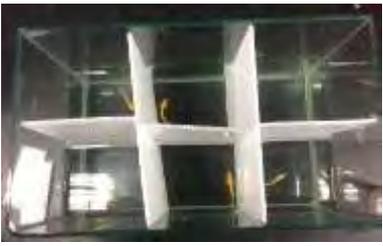
(三)研究假設：斑馬魚在酒精環境中，較能記住圖案與食物獎勵的關聯。

(四)實驗設計

研究二發現，魚在咖啡、酒精及抹茶水溶液中，形成空間記憶的效果較對照組好。我們選擇其中顏色為透明的酒精水溶液當實驗組，池水當對照組進行研究四。研究四設計了一個自製的制約訓練器，用不透明壓克力板製作。一邊貼滿已護貝的方形圖案紙，另一邊貼滿已護貝的圓形圖案紙，並將實驗區分為兩階段：

1. 第一階段：訓練(共計兩次，如下表 2)
  - a. 設置自製制約訓練器，將水溶液加至 6 公分線
  - b. 用隔板擋住自製制約訓練器的中間廊道
  - c. 將魚從中間廊道放入，適應環境 5 分鐘
  - d. 訓練部分 first：開始錄影並打開隔板，5 分鐘內，斑馬魚游進方形區 1 次，便在**方形區和圓形區同時做出相同的餵食動作，但只有方形區的鑷子夾有飼料**。若斑馬魚沒吃，則僅利用鑷子做出餵食動作，但鑷子不夾飼料。
  - e. 訓練部分 second：5 分鐘後，停止餵食，不再把鑷子放入魚缸。僅攝影觀察斑馬魚在制約訓練器內的游動狀況，計時 5 分鐘。
  - f. 停止錄影，把斑馬魚放回套房並充分餵食後，剝奪食物 22 小時以上。
  - g. 事後觀察錄影，分別記錄斑馬魚在訓練部分 first 進入方形區次數與待在方形區的總時間；訓練部分 second 斑馬魚進入方形區次數與待在方形區的總時間。
2. 第二階段：測試(共計一次，如下表 2)
  - a. 設置自製制約訓練器，將水溶液加至 6 公分線
  - b. 用隔板擋住自製制約訓練器的中間廊道
  - c. 將魚從中間廊道放入，適應環境 5 分鐘
  - d. 開始錄影並打開隔板，計時 5 分鐘(與訓練階段不同的是，不以任何方式餵食)
  - e. 停止錄影，把斑馬魚放回套房並充分餵食
  - f. 事後觀察錄影，紀錄 5 分鐘內斑馬魚進入方形區次數與待在方形區的總時間

表 2、研究四的操作制約實驗流程步驟表

<p>1.設置實驗器材</p> 	<p>2.水體加至 6 公分線</p> 	<p>3. 隔板擋住中間廊道兩端</p> 
<p>4. 將魚從中間廊道放入，讓牠適應環境 5 分鐘</p> 	<p>5. 打開閘門並開始錄影(訓練階段還需餵食)</p> 	<p>6. 結束攝影，將斑馬魚放回個別套房後，充分餵食</p> 

## 伍、研究結果

研究一、探討水體溫度對觀賞用斑馬魚空間記憶形成的影響

(一) 探討觀賞用斑馬魚在 23°C 水體溫度的空間記憶形成

本實驗共取 3 隻萊姆仙子做為樣本。在 23°C 的缸水環境中，第一天進入深水區達 30 秒所需時間平均為 100 秒，第二天進入深水區達 30 秒所需時間平均僅為 6 秒，進入深水區所需耗時有隨著訓練而減少。(如下表 3 及下圖 17)。並且，我們將第一天的耗時與第二天的耗時進行 t 檢定比較，得到 p 值為 0.18，雖然未嚴格達到統計上的顯著差異，但就行為實驗來說，已經足以說明 **23°C 環境中的斑馬魚能夠有效建立起空間記憶**：

表 3、萊姆仙子在 23°C 環境，進入深水區所需耗時表

	低溫 1	低溫 2	低溫 3	平均	標準差	p 值
第一天	10	171	119	100	82.16	
第二天	8	92	130	77	62.43	
第三天	1	13	3	6	6.43	0.18

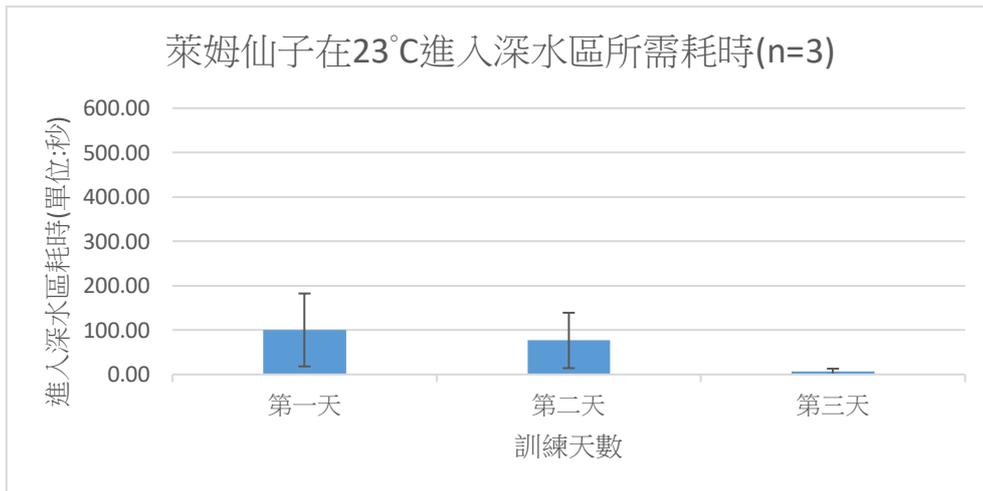


圖 17、萊姆仙子在 23°C 環境，進入深水區所需耗時圖

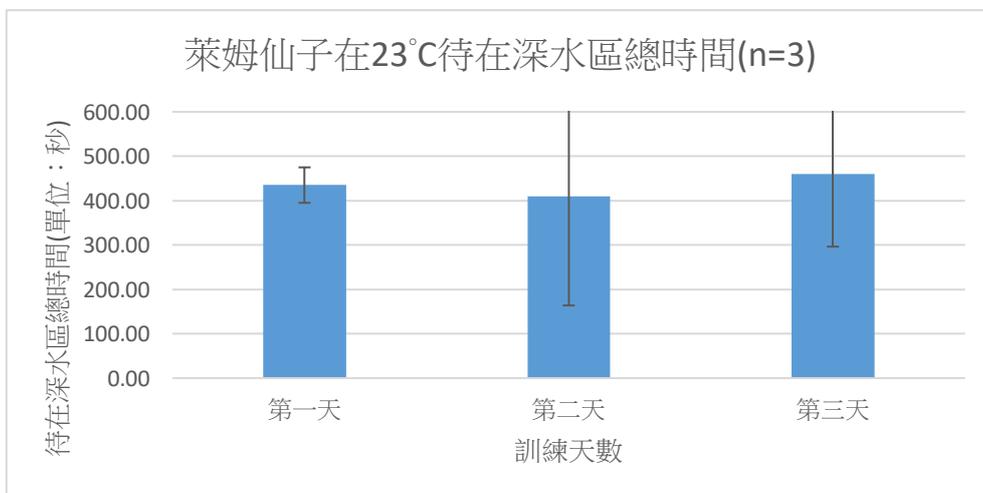


圖 18、萊姆仙子在 23°C 環境，待在深水區總時間圖

## (二) 探討觀賞用斑馬魚在 29°C 水體溫度的空間記憶形成

本實驗共取 3 隻萊姆仙子做為樣本。在 29°C 的缸水環境中，第一天進入深水區達 30 秒所需時間平均為 137 秒，第三天進入深水區達 30 秒所需時間平均僅為 46 秒，進入深水區所需耗時有隨著訓練而減少。(如下表 4 及下圖 19)。並且，我們將第一天的耗時與第三天的耗時進行 t 檢定比較，得到 p 值為 0.46，第一天與第三天的進入深水區耗時，常態分佈圖的重疊機率幾乎接近一半，**難以說明 29°C 環境中的斑馬魚能夠有效建立起空間記憶**：

表 4、萊姆仙子在 29°C 環境，進入深水區所需耗時表

	高溫 1	高溫 2	高溫 3	平均	標準差	p 值
第一天	335	32	43	137	171.85	
第二天	224	58	58	113	95.84	
第三天	20	2	116	46	61.29	0.46

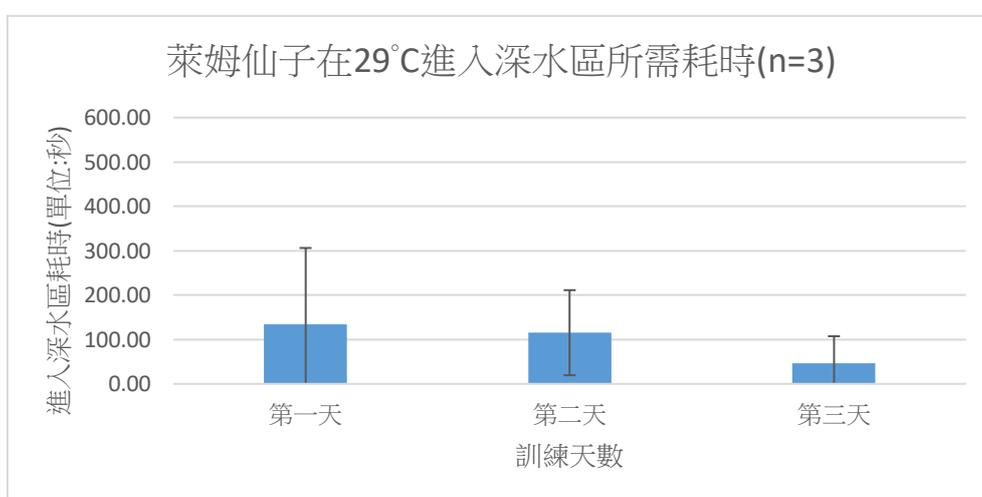


圖 19、萊姆仙子在 29°C 環境，進入深水區所需耗時圖

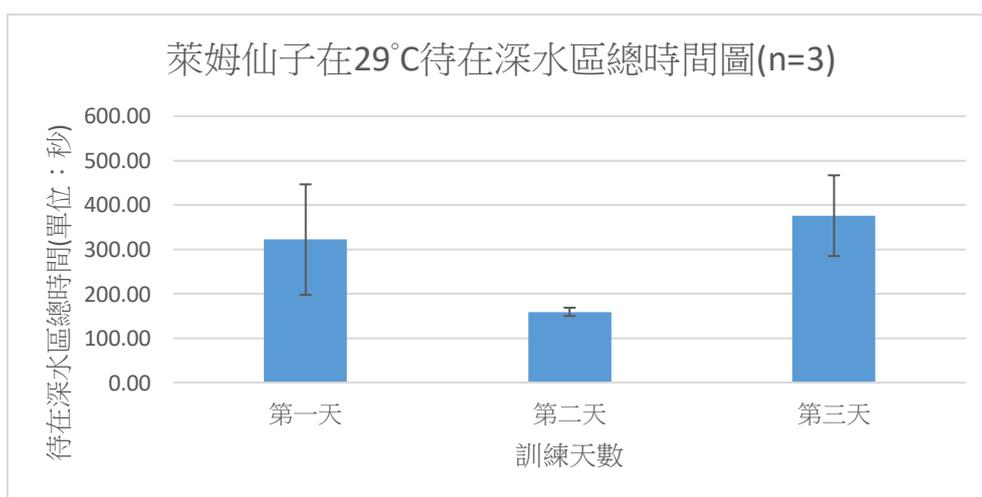


圖 20、萊姆仙子在 29°C 環境，待在深水區總時間圖

比較斑馬魚在 23°C(低溫環境) 與 29°C(高溫環境)的空間記憶形成效果，發現斑馬魚在 23°C 環境，第一天與第三天進入深水區的耗時統計 p 值較小，代表具有較大的差別，推論**斑馬魚在 23°C 環境的空間記憶形成效果較 29°C 環境佳**。考量萊姆仙子的最適溫度(22°C~30°C 之間)及操作可行性後，我們決定後續的研究將採用 23°C~24°C 的水溶液進行實驗。

研究二、探討水體組成對觀賞用斑馬魚空間記憶形成的影響

●對照組：本研究六個實驗共用一組對照組

對照組共取 3 隻萊姆仙子做為樣本。在約 23.5°C 的缸水環境中，第一天進入深水區達 30 秒所需時間平均為 187 秒，第三天進入深水區達 30 秒所需時間平均僅為 50 秒，進入深水區所需耗時有隨著訓練而減少。(如下表 5 及下圖 21)。並且，我們將第一天的耗時與第三天的耗時進行 t 檢定比較，得到 p 值為 0.26：

表 5、對照組萊姆仙子(約 23.5°C 的缸水環境)，進入深水區所需耗時表

	對照 1	對照 2	對照 3	平均	標準差	p 值
第一天	227	319	15	187	155.90	
第二天	106	35	50	64	37.42	
第三天	21	90	38	50	35.95	0.26

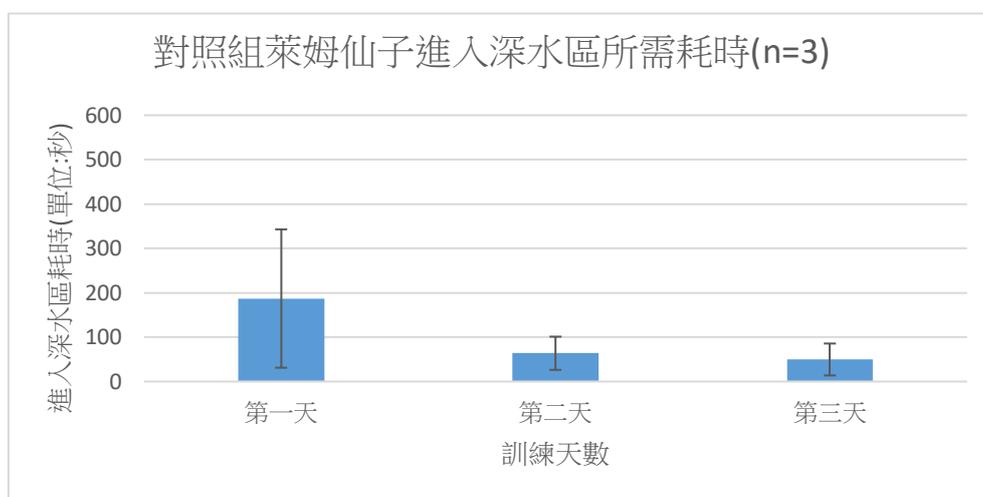


圖 21、對照組萊姆仙子(約 24°C 的缸水環境)，進入深水區所需耗時圖

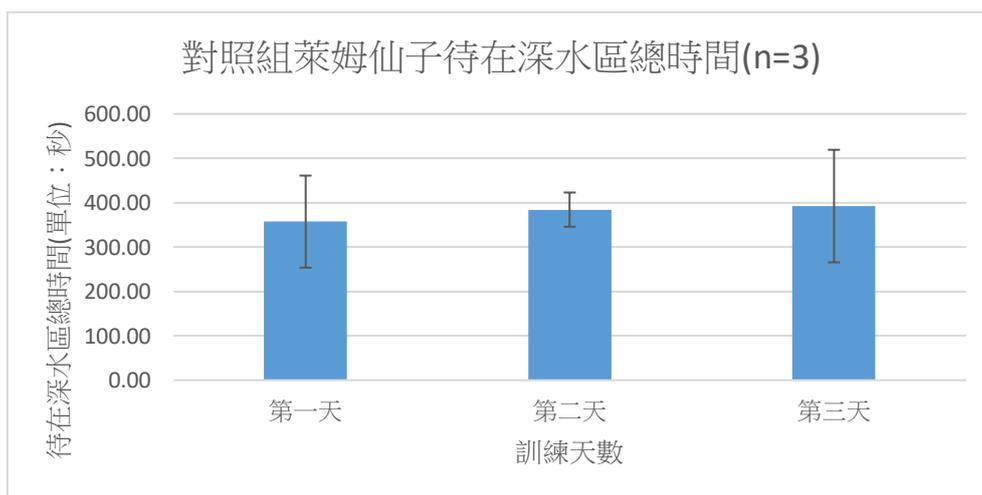


圖 22、對照組萊姆仙子(約 24°C 的缸水環境)，待在深水區總時間圖

### (一)探討觀賞用斑馬魚在咖啡水溶液中的空間記憶形成

本實驗共取 3 隻萊姆仙子做為樣本。在約 23.5°C 的咖啡水溶液(0.05%)環境中，第一天進入深水區達 30 秒所需時間平均為 116 秒，第三天進入深水區達 30 秒所需時間平均僅為 37 秒，進入深水區所需耗時有隨著訓練而減少。(如下表 6 及下圖 23)。並且，我們將第一天的耗時與第三天的耗時進行 t 檢定比較，得到 p 值為 0.13，雖然未嚴格達到統計上的顯著差異標準，但就行為實驗來說，已經**足以說明在約 23.5°C 咖啡水溶液環境中，斑馬魚能夠有效建立起空間記憶**：

表 6、萊姆仙子在約 23.5°C 的咖啡水溶液環境，進入深水區所需耗時表

	咖啡 1	咖啡 2	咖啡 3	平均	標準差	p 值
第一天	69	182	96	116	59.01	
第二天	5	46	209	87	107.91	
第三天	61	34	15	37	23.12	0.13

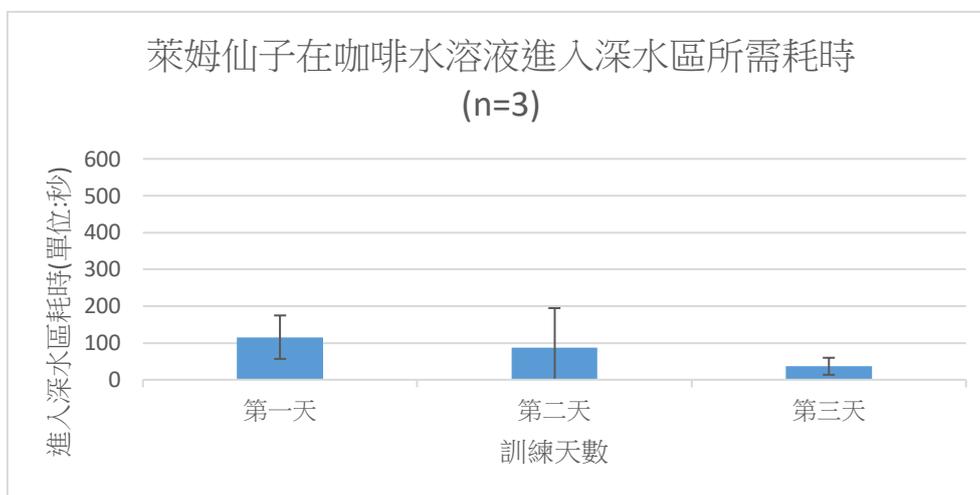


圖 23、萊姆仙子在約 23.5°C 的咖啡水溶液環境，進入深水區所需耗時圖

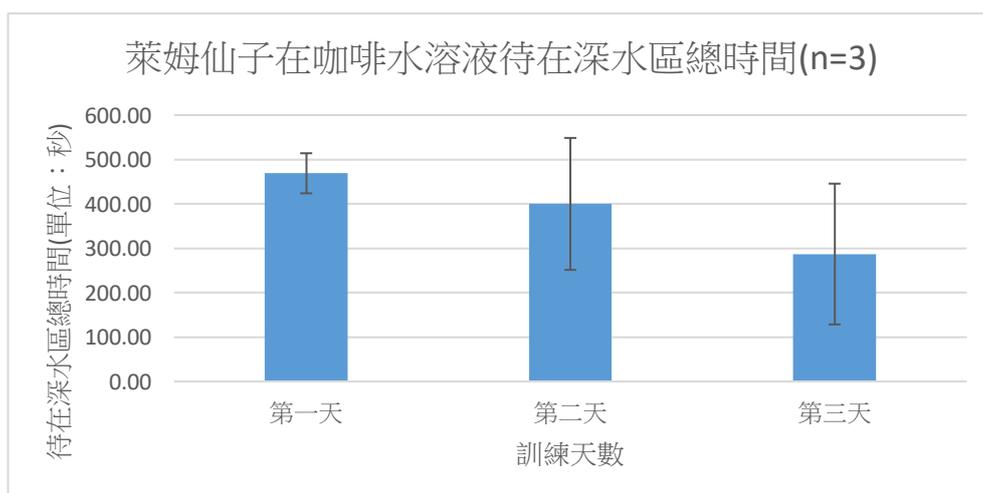


圖 24、萊姆仙子在約 23.5°C 的咖啡水溶液環境，待在深水區的總時間圖

咖啡因是一種生物鹼，會抑制睡眠的訊息傳遞，達到提神效果；此外，咖啡因也能促進肝醣分解為葡萄糖。因此，咖啡因不但能提高腦部活性，也能增加血糖，提供給大腦執行記憶功能。推論本實驗結果，**咖啡水溶液中，斑馬魚能建立空間記憶，且效果較對照組為佳**。

## (二)探討觀賞用斑馬魚在抹茶水溶液中的空間記憶形成

本實驗共取 3 隻萊姆仙子做為樣本。在約 23.5°C 的抹茶水溶液(0.05%)環境中，第一天進入深水區達 30 秒所需時間平均為 579 秒，第三天進入深水區達 30 秒所需時間平均為 265 秒，進入深水區所需耗時有隨著訓練而減少。(如下表 7 及下圖 25)。並且，我們將第一天的耗時與第三天的耗時進行 t 檢定比較，得到 p 值為 0.20，雖然未嚴格達到統計上的顯著差異標準，但就行為實驗來說，**已經足以說明在約 23.5°C 的抹茶水溶液環境中，斑馬魚能夠有效建立起空間記憶**：

表 7、萊姆仙子在約 23.5°C 的抹茶水溶液環境，進入深水區所需耗時表。

	0.05%茶 1	0.05%茶 2	0.05%茶 3	平均	標準差	p 值
第一天	600	600	536	579	36.95	
第二天	128	289	159	192	85.42	
第三天	600	89	106	265	290.24	0.20

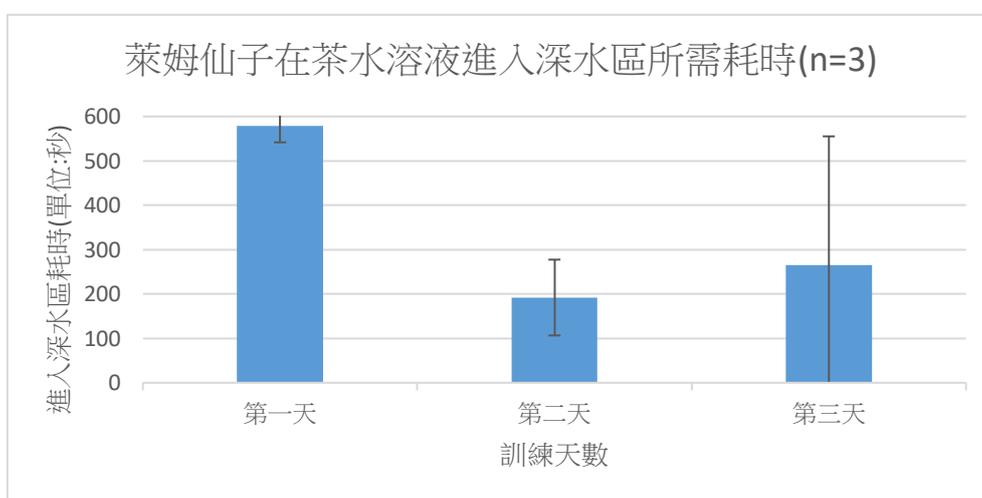


圖 25、萊姆仙子在約 23.5°C 的抹茶水溶液環境，進入深水區所需耗時圖

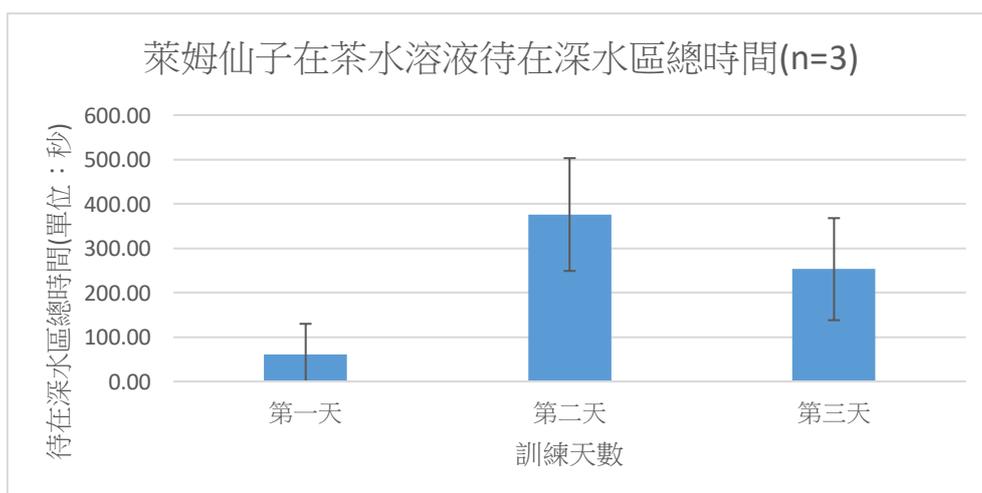


圖 26、萊姆仙子在約 23.5°C 的抹茶水溶液環境，待在深水區的總時間圖

抹茶中有茶氨酸能增強人的記憶力並活絡副交感神經，使魚的探索行為因此減少，以本實驗第一天進入深水區所需耗時平均 579 秒為例，就明顯相較其他實驗為多。依本實驗結果推論，**抹茶水溶液中，斑馬魚能建立起空間記憶，且效果較對照組(缸水)為佳**。

(三)探討觀賞用斑馬魚在人參水溶液中的空間記憶形成

本實驗共取 3 隻萊姆仙子做為樣本。在約 23.5°C 的人蔘水溶液(0.043%)環境中，第一天進入深水區達 30 秒所需時間平均為 133 秒，第二天進入深水區達 30 秒所需時間平均為 141 秒，進入深水區所需耗時並沒有隨著訓練而減少。(如下表 8 及下圖 27)。因此，**並不能說斑馬魚在人蔘水溶液環境中，能有效建立起空間記憶**：

表 8、萊姆仙子在約 23.5°C 的人蔘水溶液環境，進入深水區所需耗時表

	人參 1	人參 2	人參 3	平均	標準差	p 值
第一天	38	201	160	133	84.79	
第二天	418	22	64	168	217.52	
第三天	166	107	150	141	30.51	0.89

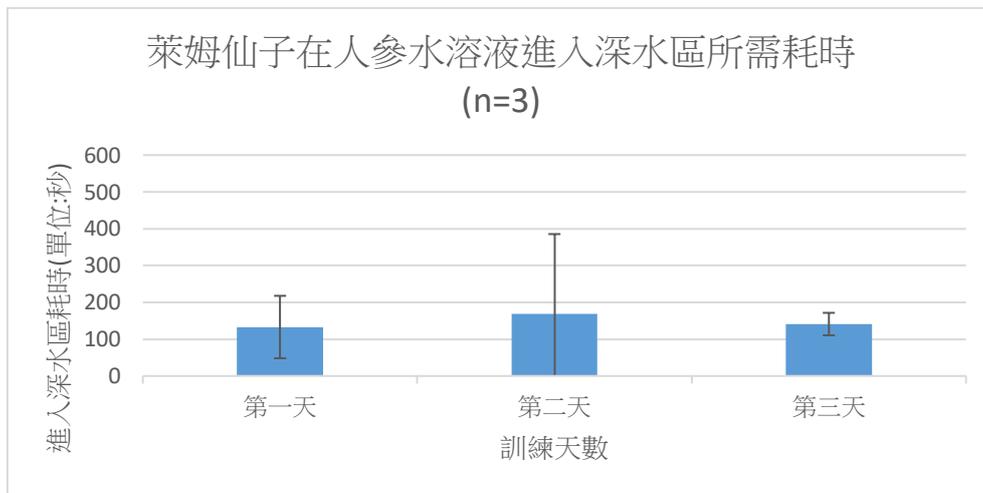


圖 27、萊姆仙子在約 23.5°C 的人蔘水溶液環境，進入深水區所需耗時圖

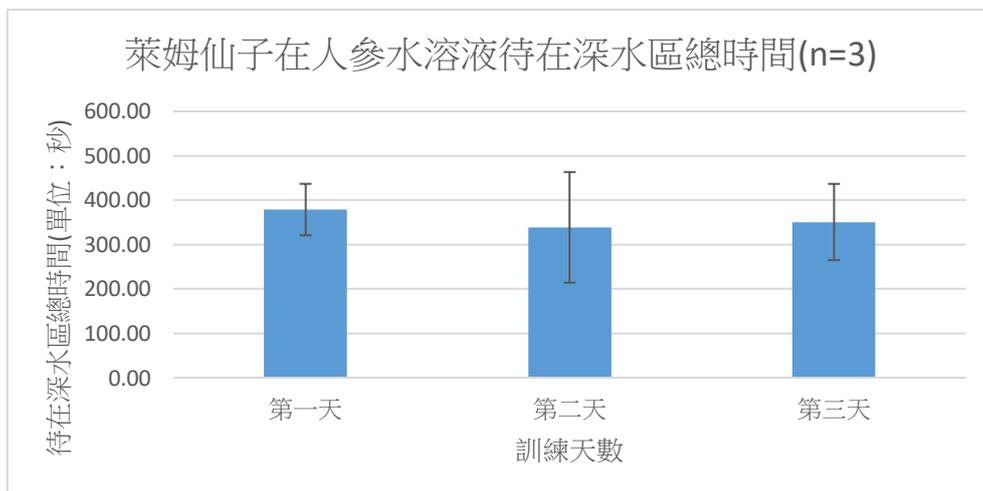


圖 28、萊姆仙子在約 23.5°C 的人蔘水溶液環境，待在深水區總時間圖

人蔘富含十八種單體皂甙。主要能改善神經衰弱、疲勞過度、身體虛弱等症狀；也能增強體表細胞的活力，達到抑制衰老等作用。但，比較本實驗結果與對照組，**人蔘水溶液中，斑馬魚建立空間記憶的效果，較對照組(缸水)為差。**

(四)探討觀賞用斑馬魚在黃耆水溶液中的空間記憶形成

本實驗共取 3 隻萊姆仙子做為樣本。在約 23.5°C 的黃耆水溶液(0.05%)環境中，第一天進入深水區達 30 秒所需時間平均為 348 秒，第三天進入深水區達 30 秒所需時間平均為 249 秒，進入深水區所需耗時有隨著訓練而減少(如下表 9 及下圖 29)。但是，我們將第一天與第三天的進入深水區耗時進行 t 檢定比較，得到 p 值為 0.68，第一天與第三天的耗時，常態分佈圖的重疊機率超過一半，**並不能說斑馬魚在黃耆水溶液環境中，能有效建立起空間記憶：**

表 9、萊姆仙子在約 23.5°C 的黃耆水溶液環境，進入深水區所需耗時表。

	黃耆 1	黃耆 2	黃耆 3	平均	標準差	p 值
第一天	102	342	600	348	249.05	
第二天	146	253	30	143	111.53	
第三天	62	103	582	249	289.11	0.68

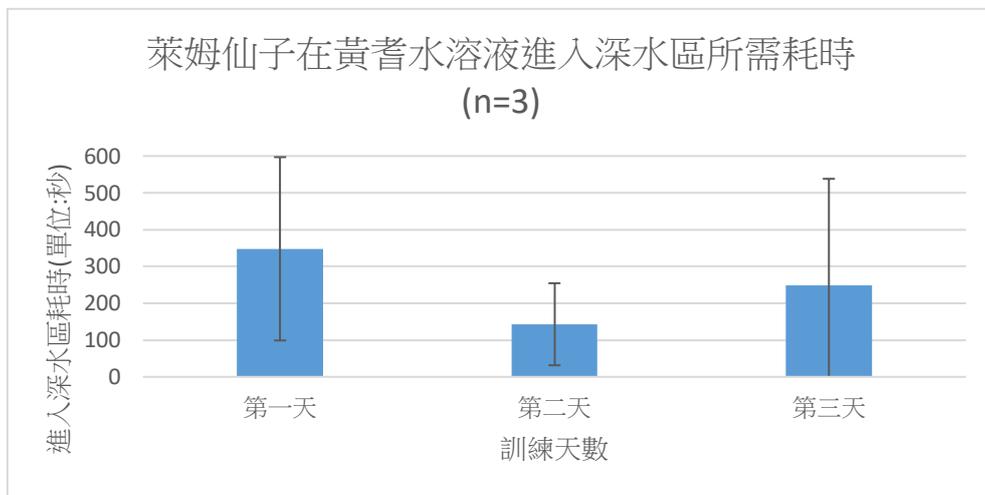


圖 29、萊姆仙子在約 23.5°C 的黃耆水溶液環境，進入深水區所需耗時圖

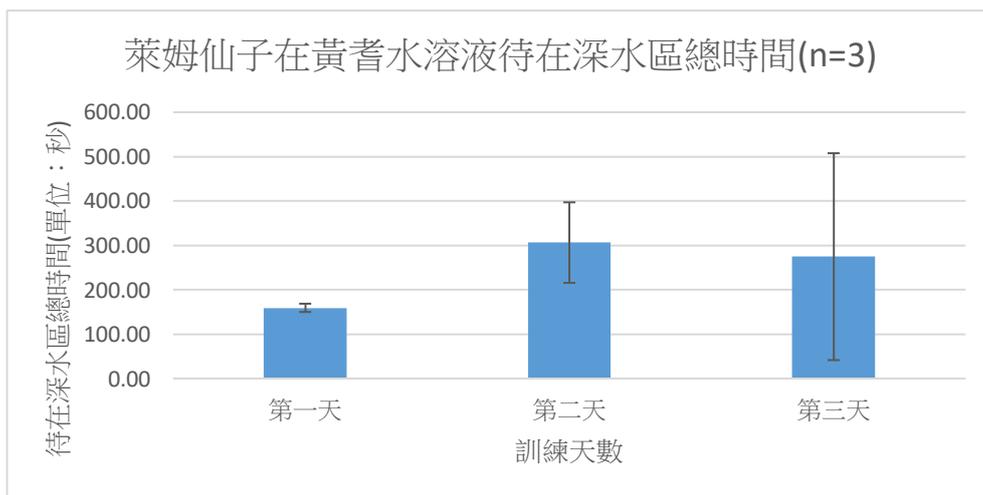


圖 30、萊姆仙子在約 23.5°C 的黃耆水溶液環境，待在深水區的總時間圖

黃耆的功效有：提高免疫功能、預防感冒等；且是預防阿茲海默症跟失智症的常用藥材之一。不過，比較本實驗結果與對照組，**黃耆水溶液中，斑馬魚建立空間記憶的效果，較對照組(缸水)為差。**

(五)探討觀賞用斑馬魚在酒精水溶液中的空間記憶形成

本實驗共取 3 隻萊姆仙子做為樣本。在約 23.5°C 的酒精水溶液(0.05%)環境中，第一天進入深水區達 30 秒所需時間平均為 204 秒，第二天進入深水區達 30 秒所需時間平均僅為 81 秒，進入深水區所需耗時有隨著訓練而減少。(如下表 10 及下圖 31)。並且，我們將第一天的耗時與第三天的耗時進行 t 檢定比較，得到 p 值為 0.18，雖然未嚴格達到統計上的顯著差異標準，但就行為實驗來說，已經**足以說明在約 23.5°C 的酒精水溶液環境中，斑馬魚能夠有效建立起空間記憶**：

表 10、萊姆仙子在約 23.5°C 的酒精水溶液環境，進入深水區所需耗時表

	0.05%酒精 1	0.05%酒精 2	0.05%酒精 3	平均	標準差	p 值
第一天	151	328	132	204	108.09	
第二天	14	544	55	204	63.52	
第三天	63	29	152	81	294.87	0.18

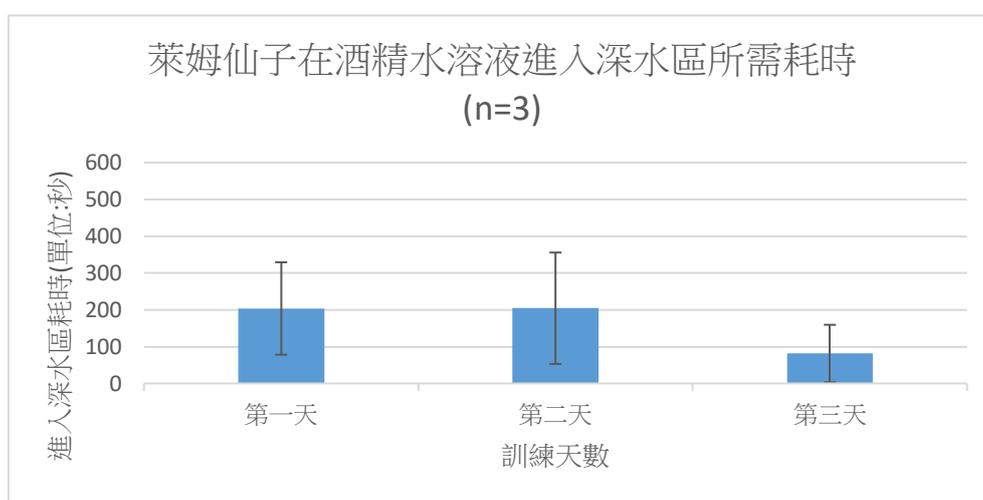


圖 31、萊姆仙子在約 23.5°C 的 0.05%酒精水溶液環境，進入深水區所需耗時圖

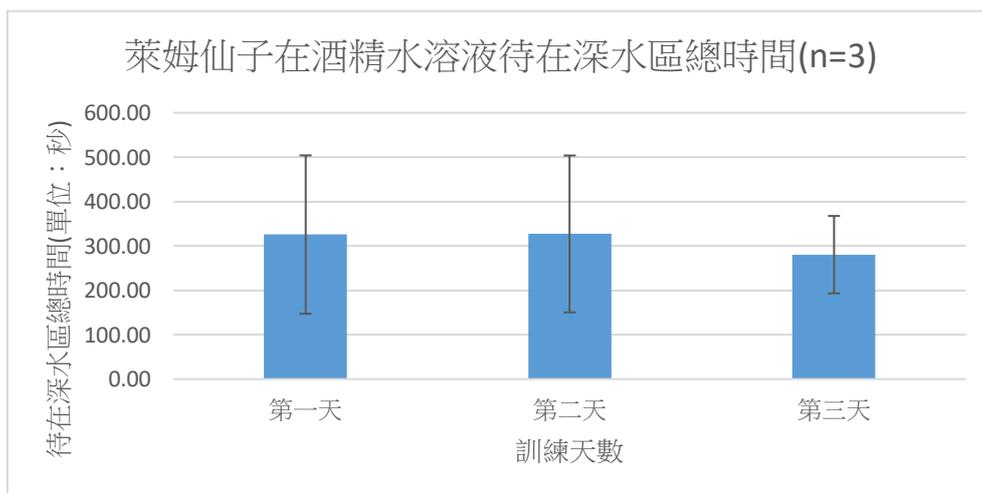


圖 32、萊姆仙子在約 23.5°C 的 0.05%酒精水溶液環境，待在深水區的總時間圖

酒精水溶液是乙醇與水的混合物。乙醇對人類的影響，是減少前額葉對行為的抑制效果，但斑馬魚並沒有分化完整的前額葉，且酒精對魚腦影響的探討，超出我們的能力範圍。依本實驗結果推論，**酒精水溶液中，斑馬魚能建立起空間記憶，且效果較對照組(缸水)為佳**。

## (六)探討觀賞用斑馬魚在菸草水溶液中的空間記憶形成

本實驗共取 3 隻萊姆仙子做為樣本。在約 23.5°C 的菸草水溶液(0.05%)環境中，第一天進入深水區達 30 秒所需時間平均為 511 秒，第三天進入深水區達 30 秒所需時間平均為 366 秒，進入深水區所需耗時有隨著訓練而減少(如下表 11 及下圖 33)。但是，我們將第一天與第三天進入深水區耗時進行 t 檢定比較，得到 p 值為 0.50，第一天與第三天的耗時，常態分佈圖的重疊機率為一半，**並不能說斑馬魚在菸草水溶液環境中，能有效建立起空間記憶：**

表 11、萊姆仙子在約 23.5°C 的菸草水溶液環境，進入深水區所需耗時表

	菸草 1	菸草 2	菸草 3	平均	標準差	p 值
第一天	600	332	600	511	154.73	
第二天	310	566	462	446	128.75	
第三天	461	600	36	366	293.84	0.50

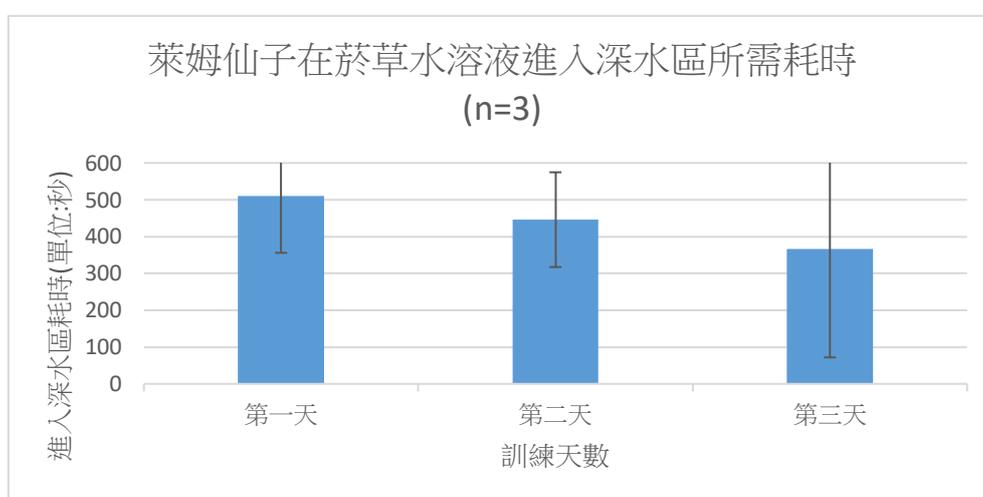


圖 33、萊姆仙子在約 23.5°C 的菸草水溶液環境，進入深水區所需耗時圖

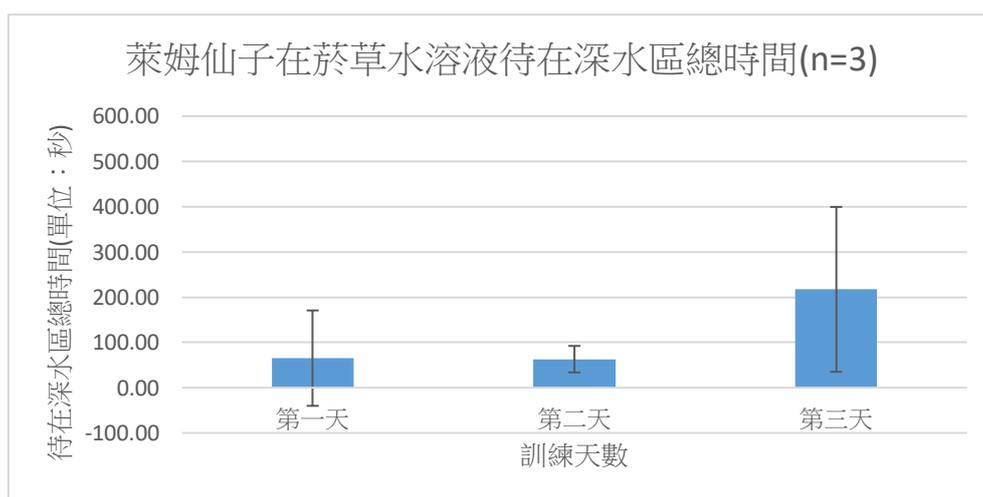


圖 34、萊姆仙子在約 23.5°C 的菸草水溶液環境，待在深水區總時間圖

菸草中的尼古丁成分是一種副交感神經生物鹼，能活絡副交感神經，使魚的探索行為因此減少，以本實驗第一天進入深水區所需耗時平均 511 秒為例，就明顯相較其他實驗的 100~348 秒為多。依本實驗結果推論，**菸草水溶液中，斑馬魚建立空間記憶的效果，較對照組(缸水)為差。**

(七)將六組實驗組水溶液及缸水對照組的斑馬魚在第一天與第三天進入深水區所需的耗時，進行變異數不同的獨立雙樣本 t 檢定，所得結果如下表 12：

表 12、斑馬魚在第一天與第三天進入深水區所需耗時的 t 檢定 p 值表

	對照組	咖啡	茶	人參	黃耆	酒精	菸草
p 值	0.26	0.13	0.20	0.89	0.68	0.18	0.50

### 1. 我們以對照組的獨立雙樣本 t 檢定 p 值作為判斷空間記憶學習效果是否達顯著的依據

表 12 的獨立雙樣本 t 檢定是在  $n=3$  的情況下，比較斑馬魚第一天與第三天進入深水區所需的耗時。在常態分佈的假設下，p 值越小，代表拒絕兩組數據相同的傾向越強，所以能用 p 值來判斷兩筆數據在統計上的差異是大是小。一般會以  $p<0.05$  或  $p<0.01$  來作為判斷是否達到顯著差異，但也並非一定要以此作為標準。若我們將對照組的 p 值 0.26 設為達到顯著差異的標準，則實驗組中若 p 值小於 0.26，我們便可宣稱空間記憶的學習效果達到顯著差異；實驗組中若 p 值大於 0.26，我們便無法證明空間記憶的學習效果達到顯著差異。

### 2. 咖啡、酒精及抹茶水溶液中，斑馬魚的空間記憶形成效果較對照組好

對照表 12，咖啡、酒精及抹茶水溶液 p 值皆小於對照組，空間記憶形成效果較對照組好。咖啡有咖啡因能提升大腦活性並增加血糖，抹茶中則有茶胺酸能增加記憶力，本研究發現，斑馬魚在咖啡與抹茶的環境，空間記憶形成效果確實勝過對照組。酒精主要的影響在減少前額葉的抑制效果，但魚類腦部並沒有那麼複雜的分化，乙醇對魚類腦部的影響也超出我們的能力範圍，不過，依實驗結果，斑馬魚在酒精環境中，空間記憶形成效果勝過對照組。

### 3. 人參、黃耆及菸草水溶液中，斑馬魚的空間記憶形成效果較對照組差

再對照表 12，人參、黃耆及菸草水溶液 p 值皆大於對照組，空間記憶形成效果較對照組差。人參富含十八種單體皂甙，能改善神經衰弱症狀，黃耆更是預防阿茲海默症與失智症的常用藥材，但，本研究發現，斑馬魚在人參與黃耆的環境中，空間記憶形成效果差於對照組。菸草的尼古丁能活絡副交感神經，減少斑馬魚的探索行為，並且降低心跳，使斑馬魚進入放鬆狀態，依實驗結果，斑馬魚在菸草環境中，空間記憶形成效果差於對照組。

### 研究三、探討不同濃度的水體環境(酒精、抹茶)對觀賞用斑馬魚空間記憶形成的影響

#### (一)探討觀賞用斑馬魚在不同濃度酒精水溶液中的空間記憶形成

我們依據研究二的結果，選出了空間記憶形成效果較對照組佳的酒精水溶液和抹茶水溶液，分別調配出 0.05%、0.01%和 0.005%濃度的水溶液進行實驗，希望能在安全前提下，找到最有利斑馬魚空間記憶的水溶液濃度。

0.05%的酒精中，我們將第一天與第三天進入深水區的耗時進行 t 檢定比較，得到 p 值為 0.18；而 0.01%的酒精中，為 0.44；在 0.005%的酒精中，則為 0.30。(如下表 13、14、15)

表 13、萊姆仙子在約 23.5°C 的 0.05%酒精水溶液環境，進入深水區所需耗時表

	0.05%酒精 1	0.05%酒精 2	0.05%酒精 3	平均	標準差	p 值
第一天	151	328	132	204	108.09	
第二天	14	544	55	204	63.52	
第三天	63	29	152	81	294.87	0.18

表 14、萊姆仙子在約 23.5°C 的 0.01%酒精水溶液環境，進入深水區所需耗時表

	0.01%酒精 1	0.01%酒精 2	0.01%酒精 3	平均	標準差	p 值
第一天	99	20	600	240	314.55	
第二天	85	57	2	48	42.23	
第三天	15	171	2	63	94.04	0.44

表 15、萊姆仙子在約 23.5°C 的 0.005%酒精水溶液環境，進入深水區所需耗時表

	0.005%酒精 1	0.005%酒精 2	0.005%酒精 3	平均	標準差	p 值
第一天	409	600	13	341	299.41	
第二天	378	178	153	236	123.32	
第三天	5	193	116	105	94.51	0.30

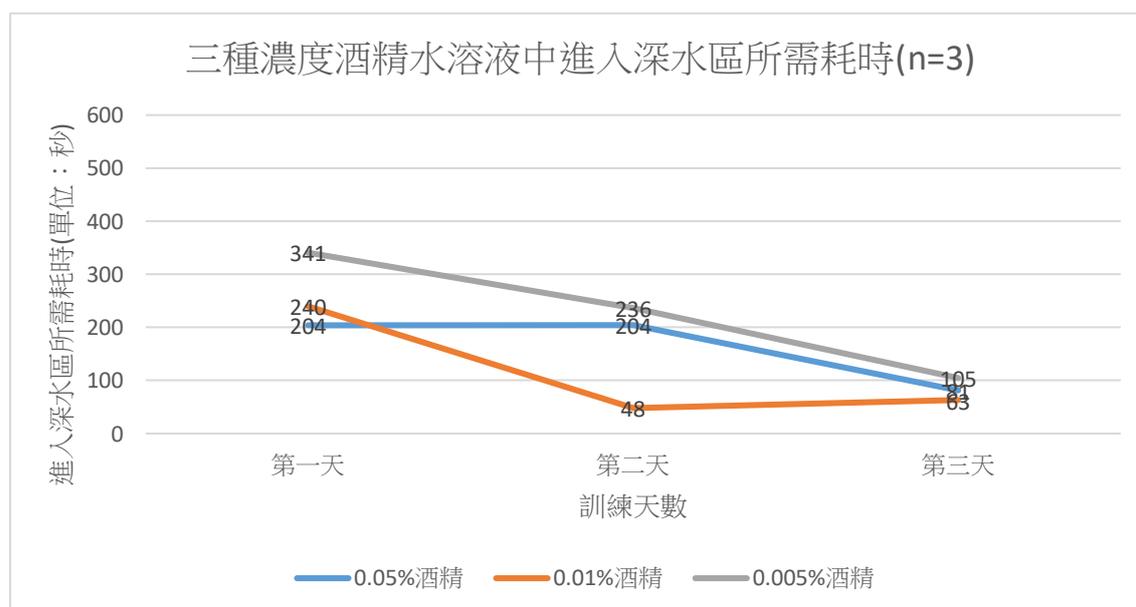


圖 35、萊姆仙子在約 23.5°C 的三種濃度酒精水溶液環境，進入深水區平均所需耗時圖

由圖 35 發現，斑馬魚在酒精水溶液環境，進入深水區的耗時有隨著訓練天數減少的趨勢。但若進一步比較三種濃度的 p 值(0.05%，p 值 0.18； 0.01%，p 值 0.44； 0.005%，p 值 0.30)，會發現空間記憶形成效果並非與濃度變化有絕對相關。

(二)探討觀賞用斑馬魚在不同濃度**抹茶**水溶液中的空間記憶形成

0.05%的抹茶中，我們將第一天與第三天進入深水區的耗時進行 t 檢定比較，得到 p 值為 0.20；而 0.01%的抹茶中，為 0.30；在 0.005%的抹茶中，則為 0.25。(如下表 16、17、18)

表 16、萊姆仙子在約 23.5°C 的 0.05%茶水溶液環境，進入深水區所需耗時表

	0.05%茶 1	0.05%茶 2	0.05%茶 3	平均	標準差	p 值
第一天	600	600	536	579	36.95	
第二天	128	289	159	192	85.42	
第三天	600	89	106	265	290.24	0.20

表 17、萊姆仙子在約 23.5°C 的 0.01%茶水溶液環境，進入深水區所需耗時表

	0.01%茶 1	0.01%茶 2	0.01%茶 3	平均	標準差	p 值
第一天	57	518	501	359	261.39	
第二天	159	242	5	135	120.26	
第三天	291	64	80	145	126.69	0.30

表 18、萊姆仙子在約 23.5°C 的 0.005%茶水溶液環境，進入深水區所需耗時表

	0.005%茶 1	0.005%茶 2	0.005%茶 3	平均	標準差	p 值
第一天	600	600	114	438	164.41	
第二天	451	600	27	359	297.30	
第三天	6	334	190	177	280.59	0.25

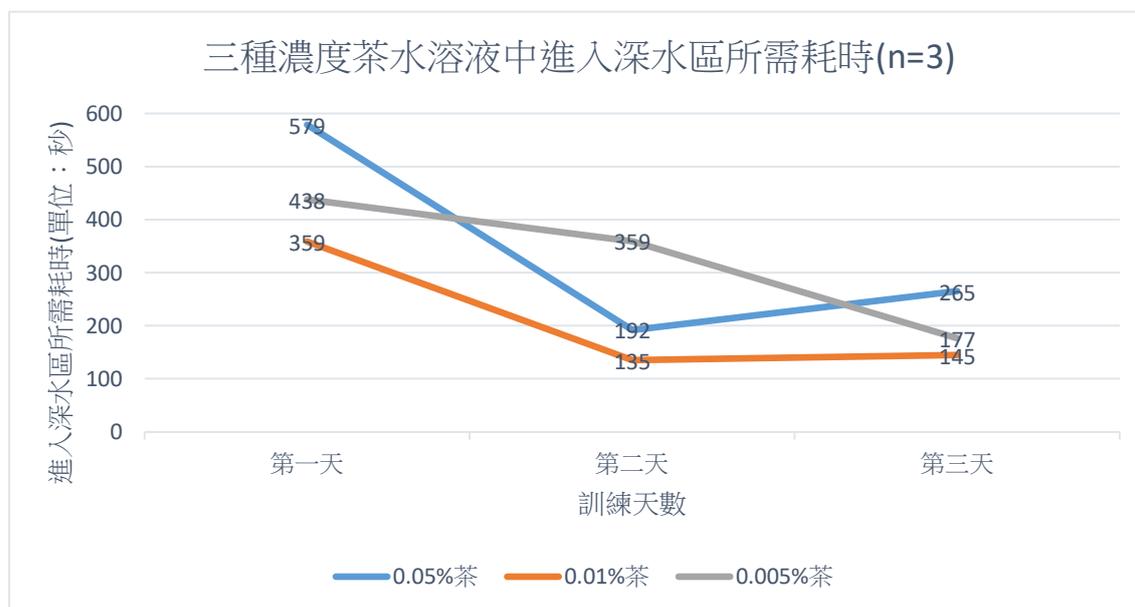


圖 36、萊姆仙子在約 23.5°C 的三種濃度茶水溶液環境，進入深水區平均所需耗時圖

由圖 36 發現，斑馬魚在抹茶水溶液環境，進入深水區的耗時有隨著訓練天數減少的趨勢。但若進一步比較三種濃度的 p 值(0.05%，p 值 0.20； 0.01%，p 值 0.30； 0.005%，p 值 0.25)，會發現**空間記憶形成效果並非與濃度變化有絕對相關**。

綜合本研究兩項實驗，斑馬魚分別在 0.05%的酒精環境及 0.05%的抹茶環境中，空間記憶形成效果最佳，故**我們仍認為「水體濃度會影響空間記憶形成」的假設應找得到絕對關聯性，只是需要在濃度更高的情況**。但是，礙於再高濃度的酒精或抹茶可能影響斑馬魚的健康或生存，我們沒有做更高濃度的實驗來驗證。

#### 研究四、分析最佳水體環境是否對觀賞用斑馬魚的操作制約效果有影響

##### (一)進入方形區次數的分析

研究二發現，魚在咖啡、酒精及抹茶水溶液中，空間記憶的形成效果較對照組好。因此，我們選擇顏色與缸水同為透明的酒精水溶液當實驗組，池水當對照組，運用自製的制約訓練器進行研究四。

由表 19 可以發現，斑馬魚在缸水中，進入方形區的次數有隨著訓練天數逐漸下降的趨勢，這可能表示我們制約訓練的次數或天數不足以使斑馬魚建立起制約行為，因此，斑馬魚沒辦法學到進入方形區與獲得飼料的關聯。不過，由表 20 可以發現，斑馬魚在酒精環境中，進入方形區的次數有隨著訓練天數逐漸上升的趨勢，這可能表示，兩次各相隔一天的訓練足以讓斑馬魚在酒精環境中順利建立起制約行為。

**如果酒精環境中的斑馬魚能在三天內，建立起制約行為，缸水環境中的斑馬魚應該也能建立起制約行為。因此，或許我們需要更多的證據加入，以做綜合性的結果判斷。**

表 19、斑馬魚在缸水環境中進入方形區次數表

	缸水 1	缸水 2	缸水 3	平均	標準差
第一天	40	20	21	27	15.72
第二天	19	15	44	26	11.27
第三天	24	25	21	23	2.08

表 20、斑馬魚在 0.05%酒精環境中進入方形區次數表

	酒精 1	酒精 2	酒精 3	平均	標準差
第一天	22	48	13	28	18.18
第二天	35	35	10	27	14.43
第三天	39	37	21	32	9.87

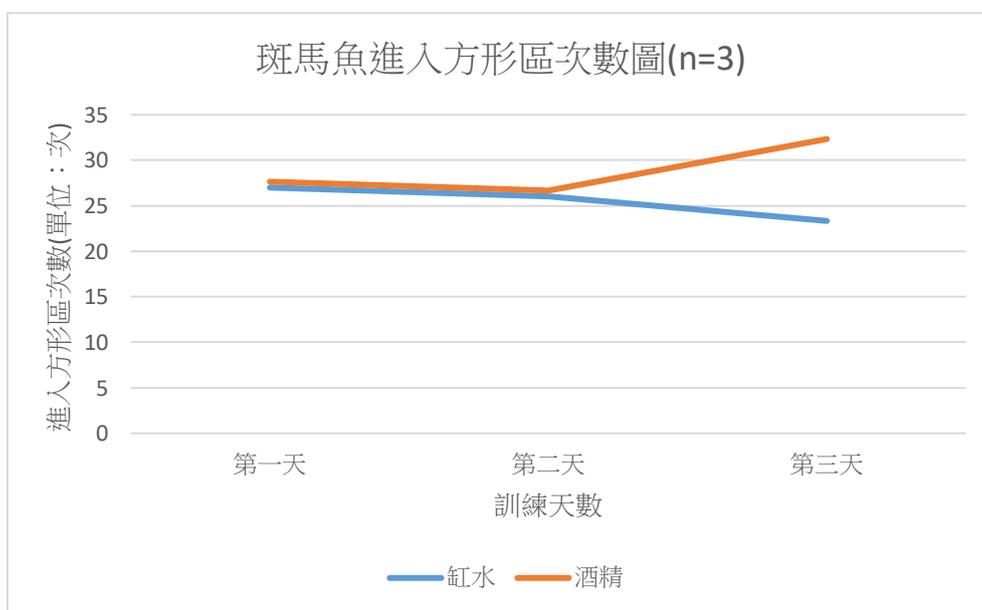


圖 37、斑馬魚在缸水及酒精環境中，進入方形區次數圖

由圖 37 可知，斑馬魚第一天、第二天在兩種水體中，進入方形區的次數是差不多的，到第三天才產生明顯的的差距。斑馬魚在常溫環境，進入方形區次數有減少的趨勢；而在酒精環境，進入方形區次數則有增加的趨勢。**如果我們要有更精確的結果判斷，或許需要加入更多證據輔助說明**，而我們除了記錄進入方形區的次數，也記錄了待在方形區的總時間。

## (二) 待在方形區總時間的分析

由表 21 可以發現，斑馬魚在缸水中，待在方形區的總時間有隨著訓練天數增加的趨勢，這可能表示，兩次各相隔一天的訓練足以讓**斑馬魚在缸水環境中順利建立起制約行為**。而且，由表 22 可以發現，斑馬魚在酒精環境中，待在方形區的總時間有隨著訓練天數逐漸上升的趨勢，這或許也表示，**斑馬魚在酒精環境中能順利建立起制約行為**。

綜合進入方形區次數的分析與待在方形區總時間的分析，彷彿可見斑馬魚是能夠建立起制約行為的，**但斑馬魚學習到的是「待在方形區與獲得食物」的關聯性，而非「進入方形區與獲得食物」的關聯性**。

表 21、斑馬魚在缸水環境中待在方形區總時間表

	缸水 1	缸水 2	缸水 3	平均	標準差
第一天	87	101	121	103	7.64
第二天	132	142	147	140	17.09
第三天	140	119	120	126	11.85

表 22、斑馬魚在酒精環境中待在方形區總時間表

	酒精 1	酒精 2	酒精 3	平均	標準差
第一天	100	107	59	89	25.93
第二天	128	117	118	121	6.08
第三天	217	131	122	157	52.44

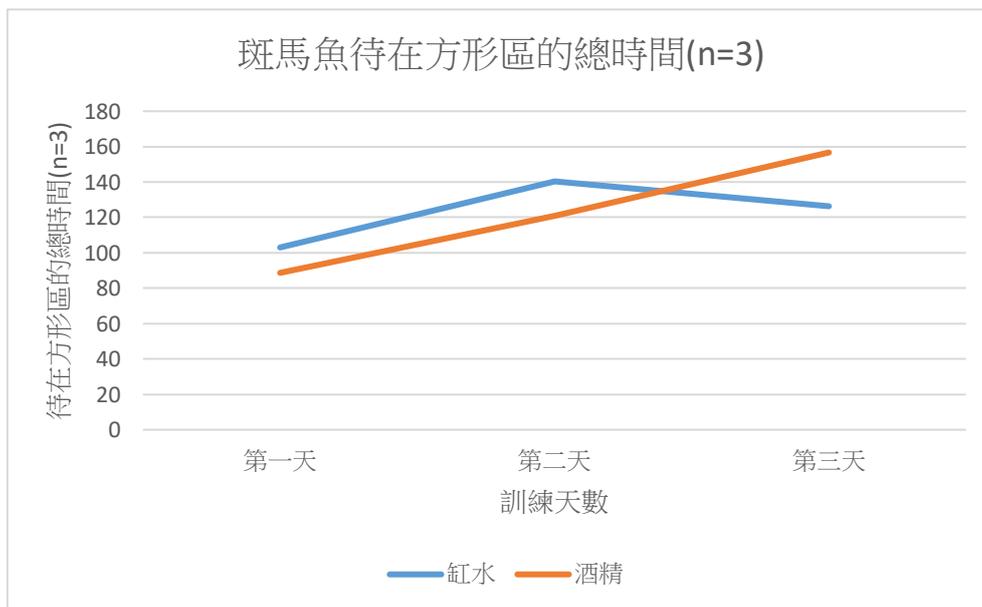


圖 38、斑馬魚在缸水及酒精環境中，待在方形區總時間圖

由圖 38 可知，在缸水或酒精環境中，斑馬魚測試階段(第三天)待在方形區的總時間，都較訓練階段第一天來得長。斑馬魚第一天、第二天待在方形區的總時間，缸水環境都較酒精環境來得多，但第三天(亦即不予餵食的測試階段)，酒精環境的斑馬魚會較長時間待在方形區，缸水環境的斑馬魚待在方形區的現象則比較不明顯。

綜合進入方形區次數的分析與待在方形區總時間的分析，我們確認**斑馬魚能夠建立起「待在方形區與獲得食物」的關聯性**，若訓練階段天數能夠增加，趨勢或許會更加明顯。且，**斑馬魚在酒精環境中，建立制約行為的效果，確實較在缸水環境中為佳**；對於斑馬魚而言，空間記憶學習的最佳水體環境，或許也能推廣到更多類別的長期記憶學習。

## 陸、討論

### 一、我們自實驗影片整理出斑馬魚在迷宮中的行為模式

#### (一)我們歸納出三類斑馬魚進出深水區的模式

觀看和記錄實驗影片後，發現了一些斑馬魚的路徑和行為規律。我們發現**斑馬魚進入深水區後，會以深水區為中心，不停向外探索**，出現短時間內多次進出深水區的行為。將斑馬魚進出深水區的方式，歸納出主要三種模式：

##### 1. 以 Z 字型游法進出深水區

Z 字型游法是最常見的進出深水區模式。我們很好奇斑馬魚為什麼不要以直線前進，但卻找不到說明的文獻資料。後來我們想到，釣魚時常以小魚為誘餌，故意 Z 字形晃動釣竿，創造出小魚游動的假象，讓大魚難以察覺這是誘餌，進而上鉤；釣魚的人會刻意如此晃動釣竿，可能是魚本身就會以 Z 字型的游法來躲避天敵。

##### 2. 以繞圈方式進出深水區

繞圈方式進出深水區也是常見的模式。斑馬魚會以順時針或逆時針的方式，從深水區出發，在深水區與淺水區交界處附近規律繞行。通常斑馬魚在進入淺水區後，會快速繞回深水區的底部，**我們在十字型迷宮見證了 Novel tank 的研究**(Jonathan M Cachat, et al,2010)。淺水區環境讓斑馬魚有較大天擇壓力，因此，稍微探索後便躲回深水區。

##### 3. 身體橫向左右搖擺方式進出深水區

身體橫向左右搖擺是最罕見的進出深水區模式。十字型迷宮的廊道並不寬敞，只有 5 公分，比斑馬魚體長多一些而已。少數斑馬魚會讓身體橫向，在深水區與淺水區交界處附近搖擺。

以上三種進出深水區的主要模式，說明了**斑馬魚有不只一種的探索模式**。

#### (二)我們觀察到斑馬魚在離開深水區時的游速會影響它接下來的路徑

斑馬魚離開深水區時的游速和斑馬魚接下來的路徑有關聯。**若斑馬魚以直線前進快速離開深水區，通常會直接到達對面的廊道。當斑馬魚以慢速 Z 字型離開深水區，則常會轉入左右兩邊的廊道**。不過，無論進入什麼廊道，斑馬魚都會不停來回，我們推測重覆探索的行為是為了熟悉環境，達到躲避天敵的效果。

### 二、斑馬魚基本飼養

#### (一)我們選擇使用水妖精作為循環系統的動力

外掛過濾器是獨立的馬達運作，但是，產生的水流衝力小，無法為魚缸提供足夠氧氣，而使環境負載力較低(如圖 39)；**水妖精則需搭配打氣幫浦，是直接將空氣打進水中，能為魚缸提供足夠氧氣，創造較高的環境負載力**(如圖 40)。



圖 39、外掛過濾器提供的水流衝力較小



圖 40、水妖精直接將空氣打進水中

## (二)斑馬魚會群游，且遭遇危險時會有躲避行為

文獻談到，斑馬魚喜歡待在深水區，更喜歡在有遮蔽物的深水區。(吳世郁，2008)飼養斑馬魚的過程也發現，遭遇危險時(例如：魚網進入擾動)，斑馬魚通常會躲到海綿或石頭等遮蔽物附近，保護自己；但若沒有遭遇危險，斑馬魚有時也會待在淺水區。有一次還觀察到，有隻小蟲停在魚缸壁，斑馬魚還跳出水面想吃小蟲子呢!除此之外，我們還發現，**斑馬魚大部分的時間都是一群游在一起，喜歡群體行動。**

## 三、我們的研究從多個面向掌管控制變因，企圖減少實驗誤差

### (一)我們透過隨機撈取降低取樣誤差

我們在學校學習，深刻體會到，大家學科學習的天賦有差別，斑馬魚也可能有學習上的個別差異。因此，我們在**撈取斑馬魚時，是隨意撈取，而非挑選我們偏好的特定斑馬魚，希望透過這個方法來降低斑馬魚的取樣誤差。**

### (二)水質震盪容易干擾實驗結果，故我們極力避免水質震盪

換水只能換整缸水約三分之一左右，若要將魚進行移缸或轉換環境，也要使魚能處在類似的水質環境下。例如：**我們在大缸、個別套房及迷宮之間移動魚時，就需特別留意水質環境是否震盪太大**，若沒多加留意，可能增加斑馬魚的焦慮，干擾實驗結果。

### (三)斑馬魚轉換環境易增加焦慮感，我們設置過渡區，降低魚的焦慮

為減少轉換環境造成斑馬魚焦慮，實驗過程，都相當小心地將魚從個別套房撈出；放入迷宮前，也讓魚先在過渡的杯子適應約十分鐘。迷宮的水體，使用缸水或缸水配製的水溶液。我們請教臺師大生物所的研究生，了解到，缸水是斑馬魚長期適應的水體，**用來填充迷宮，魚在過渡杯子的十分鐘適應及迷宮的五分鐘適應，即足夠降低焦慮。**

### (四)我們將 T 字型迷宮改良為十字型迷宮，降低斑馬魚逢機進入深水區造成的誤差影響

2008 年，吳世郁研究生使用 T 字型迷宮觀察斑馬魚的空間記憶，但，T 字型迷宮很可能使斑馬魚在前游到碰壁後，被強迫左右轉。因此，**我們將 T 字型迷宮改良為十字形迷宮，希望能增加往前游的空間給斑馬魚，減少斑馬魚逢機進入深水區的可能性，以降低本研究的實驗誤差，提高可信度。**

### (五)我們以第一次進入深水區達 30 秒的耗時作為判斷斑馬魚辨認且停留於深水區的標準

文獻的實驗記錄採用第一次進入深水區達 20 秒的所需耗時(吳世郁，2008)。我們改成第一次進入深水區達 30 秒的所需耗時，是為了更加確保斑馬魚注意到深水區的存在。**如果斑馬魚停留在深水區的時間太短，魚可能只是在探索環境的過程恰巧路過，並沒注意到那是深水區**；但若斑馬魚停留在深水區的時間超過 30 秒，是純粹進行環境探索，而沒注意到是深水區的機率就更小了。

### (六)魚的活動力與探索行為具有個別差異，故使用 p 值判斷空間記憶學習狀況

在隨機取樣前提下，同一組的三隻斑馬魚，探索能力與學習能力都不相同。一開始，斑馬魚並不知道迷宮中深水區的位置，因此**斑馬魚第一天進入深水區的時間，不能直接推論成學習狀況的表現，只能當作是對於環境的探索行為**等因素導致。因此，本研究評估斑馬魚的空間記憶學習，是將斑馬魚第一天與第三天進入深水區所需耗時進行變異數不同的獨立雙樣本 t 檢定，以統計方法確認空間記憶的學習。

#### 四、研究一、探討水體溫度對觀賞用斑馬魚空間記憶形成的影響

##### (一)斑馬魚是外溫動物，故水體的溫度改變應控制在斑馬魚的最適溫度範圍

七上恆定性單元提到，斑馬魚是外溫動物，不會自發性地調節體溫。因此，實驗過程應謹慎控制水溫在斑馬魚的最適溫度範圍(22°C~30°C 之間)。我們的實驗設計，為避免傷害模式生物，因此預留邊際，使用 23°C 與 29°C 作為低溫組與高溫組。

另外，我們觀察到另一個七上恆定性單元有關的現象：體溫恆定單元提到，人類是內溫動物，在較熱的環境中會減少活動以減少體熱產生；但，斑馬魚是外溫動物，不會有自發性的體溫調節行為。在我們實驗過程中，雖然沒有記錄數據加以量化，但也確實觀察到 29°C 水體中，魚的活動力並不比在 23°C 水體中來得差。

##### (二)研究一符合研究假設：斑馬魚在溫度較低的水中，空間記憶的形成效果較好

使用變異數不同的獨立雙樣本 t 檢定，分析斑馬魚第一天與第三天進入深水區所需耗時：在 23°C 環境中，p 值為 0.18；在 29°C 環境中，p 值為 0.46。推論斑馬魚在 23°C 的低溫環境，空間記憶形成效果較 29°C 的高溫環境佳。考量操作上，若要將水溫嚴格控制在 23°C，將耗費大量時間，故我們決定之後的研究採用 23°C~24°C 的水體進行實驗。

#### 五、研究二、探討水體成分對觀賞用斑馬魚空間記憶形成的影響

##### (一)水體成分是利用擴散作用，藉由鰓進入斑馬魚體內

七上提到「擴散作用」和「滲透作用」。其中，擴散作用是指物質從高濃度區域往低濃度區域移動的情形；水溶液中的物質透過鰓進入斑馬魚體內，也是一個擴散作用物質交換的過程，斑馬魚待在某物質的水溶液環境中，水中物質便會透過擴散作用物質交換進入斑馬魚體內。例如斑馬魚在咖啡水溶液中，水中的咖啡因濃度較高，斑馬魚血液中的咖啡因濃度較低，因此，咖啡因會藉由擴散作用透過鰓進入斑馬魚體內，再藉由血液循環系統使咖啡因在全身循環，當然，也會流過斑馬魚的記憶腦區。

##### (二)調配出的水溶液應控制在不危害斑馬魚安全的濃度範圍

魚類生活環境是直接浸泡在水中，呼吸器官鰓能藉由水的流入，完成物質交換，因此，水質有些許變動，即可能對魚造成巨大影響。我們參考了「觀賞魚類用藥介紹」的文章，知道觀賞魚在一小時內的短期藥浴，能接受 0.3%~3%的粗鹽水溶液(王渭賢，民 100)。為了避免在實驗過程中，傷害到模式生物，因此將水溶液濃度再往下調一個數量級，所有的實驗水體皆使用 0.05%以下的濃度。

##### (三)研究二共有六個子實驗，三項符合研究假設，三項不符合研究假設

使用變異數不同的獨立雙樣本 t 檢定，分析斑馬魚第一天與第三天進入深水區所需耗時：對照組 p 值為 0.26；咖啡環境 p 值為 0.13；茶環境 p 值為 0.20；人參環境 p 值為 0.89；黃耆環境 p 值為 0.68；酒精環境 p 值為 0.18；菸草環境 p 值為 0.50。若將對照組的 p 值 0.26 設為達到顯著差異的標準，則斑馬魚在咖啡、茶及酒精三項水溶液中，空間記憶的學習效果達到顯著差異，其中，咖啡與茶符合研究假設，酒精則不符合研究假設；斑馬魚在人參、黃耆及菸草三項水溶液中，無法證明空間記憶的學習效果達到顯著差異，其中，菸草符合研究假設，人參與黃耆不符合研究假設。

#### (四)斑馬魚在具有活絡副交感神經化合物的水體環境中，探索行為會減少

抹茶水溶液(具茶胺酸分子)、菸草水溶液(具尼古丁分子)中，斑馬魚並不會積極地探索空間，而是傾向在淺水區定點不動。我們認為這恰巧可以說明，**斑馬魚在具有可活絡副交感神經化合物的水體環境中，感受到較輕微的天擇壓力，而減少探索行為。**

### 六、研究三、探討不同濃度的水體環境(酒精、抹茶)對觀賞用斑馬魚空間記憶形成的影響

#### (一)研究三共有兩個子實驗，皆符合研究假設：

斑馬魚在酒精與抹茶水溶液中，進入深水區的耗時皆有隨著訓練天數減少的趨勢。若進一步比較三種濃度的 p 值，則發現空間記憶形成效果並非與濃度變化有絕對相關。但無論是酒精水溶液或抹茶水溶液，斑馬魚皆在 0.05%的環境中，空間記憶形成效果最佳。因此，**斑馬魚在低濃度的酒精或抹茶水溶液中，空間記憶形成效果較不明顯。**

#### (二)我們不再往上調整水溶液濃度來證明水體濃度與空間記憶效果的絕對相關

我們發現，將酒精及抹茶水溶液濃度降低，並無法證明空間記憶形成效果與濃度變化有絕對相關。但，兩種水溶液濃度在 0.05%時，空間記憶形成效果確實較 0.01%、0.005%時為佳。於是我們好奇，提高酒精及抹茶水溶液濃度，是不是對斑馬魚的空間記憶形成更有幫助呢？但，**研究使用的水溶液濃度，是為了避免在實驗過程中，傷害到模式生物，若再調高水溶液濃度，可能會傷害到斑馬魚。**因此，我們決定不再調高水溶液濃度來進行更深入的實驗驗證。

### 七、研究四、分析最佳水體環境是否對觀賞用斑馬魚學習制約行為有影響

#### (一)關於我們探索魚類的制約行為學習

我們只在書中看過制約訓練，那是一個老鼠壓桿子食物就掉下來的故事，但我們不太相信。於是，我們嘗試在魚缸中操作簡易的制約訓練--**統一在魚缸的右邊餵食，大約 2 周後，斑馬魚竟看到人影靠近，就自動游到魚缸右側等待餵食！**

#### (二)研究四符合研究假設：斑馬魚在酒精環境中，較能記住圖案與食物獎勵的關聯

斑馬魚能在我們自製的制約訓練器中，建立起「待在方形區能獲得食物」的制約行為。且，**斑馬魚在酒精環境中，比在缸水環境中建立更明顯的制約效果**；可以推論，對於斑馬魚而言，**空間記憶學習的最佳水體環境，或許也能推廣到其他類別的長期記憶學習**。如果將這個概念進一步猜測到人類，某項學習的最佳環境，可能也能類推到其他項目的學習，那麼，找到最佳學習環境就會是很重要的事情了。

#### (三)增加訓練階段的天數，可能更明確觀察出不同水體環境下，斑馬魚制約行為的差距

斑馬魚能在我們自製的制約訓練器中，順利建立制約行為，且酒精環境中具有較好的效果。但，我們認為，斑馬魚在酒精與缸水環境的學習差異可以有更明顯的差距。**我們推測，若增加訓練階段的天數，將更能觀察出不同水體環境下，斑馬魚待在方形區時間的差距。**這是因為，增加訓練階段的天數，斑馬魚將能更熟悉制約訓練器的環境，且，增加訓練次數與時間，也能讓斑馬魚建立更根深蒂固且自動化的制約行為。

## 柒、結論

到底我們所處的環境是否會影響學習呢？在完成觀賞用斑馬魚空間記憶影響的研究後，我們體會到，在分別間隔 22 小時的兩次訓練前提下，低溫環境較有利於斑馬魚的空間記憶學習。而環境物質也對斑馬魚的空間記憶習得有影響，但部分與我們的日常生活經驗有所不同，因此，很難直接定論什麼物質好，什麼物質壞。例如：在分別間隔 22 小時的兩次訓練前提下，咖啡、酒精及抹茶有助空間記憶；而人參、黃耆及菸草則反而無助於空間記憶。斑馬魚空間記憶學習的最佳水體環境，也同時是學習制約行為的好環境，或許能推廣到更多類別的長期記憶學習。但本研究都僅只觀察兩天學習後的影響，我們很難藉由為期三天的行為觀察，直接斷定長期的利弊。綜合以上，本實驗在分別間隔 22 小時的兩次訓練前提下，證實了**斑馬魚的空間記憶學習受環境影響，甚至，環境的影響效果也可能推廣到更多長期記憶的學習**。回觀人類，或許這就是為何我們喜歡待在冷氣房內讀書的原因吧！畢竟，所處環境對我們的學習效果是很重要的。

## 捌、參考資料及其他

- 一、吳世郁（民 96）。斑馬魚端腦在空間記憶上所扮演的角色（碩士論文）。
- 二、Jonathan M. Cachat, et.al (2010). Zebrafish Models in Neurobehavioral Research, pp 73-88. Retrieved from [https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-60761-922-2\\_3](https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-60761-922-2_3)。
- 三、陳博淵等(2018)・魚「藥」龍門-探討百合對斑馬魚各個階段的影響・中華民國第五十八屆中小學科學展覽會作品說明書。
- 四、陳瑾寧等（2016）・沉魚落「顏」，「魚」云「憶」云・中華民國第五十六屆中小學科學展覽會作品說明書。
- 五、Cait Newport, Guy Wallis, Yarema Reshitnyk & Ulrike E. Siebeck (2016). Discrimination of human faces by archerfish (*Toxotes chatareus*). Scientific Report.
- 六、曾彥翔（2008）・魚也可以很聰明-探討孔雀魚的學習能力・中華民國第四十八屆中小學科學展覽會作品說明書。
- 七、蔡旻臻等(2005)・酒精和尼古丁對斑馬魚胚胎發育的影響・中華民國第四十五屆中小學科學展覽會作品說明書。
- 八、謝昕穎等（2018）・酸溜溜的滋味-探討酸鹼度對封閉水域莫氏樹蛙蝌蚪的影響・中華民國第五十八屆中小學科學展覽會作品說明書。
- 九、王渭賢（民 100 年 02 月 23 日）。觀賞魚類用藥介紹。取自 <http://web.nchu.edu.tw/pweb/users/wtsay/lesson/11680.pdf>。
- 十、郭東穎（2014）・生物的群聚行為與生存優勢-大肚魚的群體決策行為研究及電腦模擬・中華民國第五十四屆中小學科學展覽會作品說明書。
- 十一、許竣博（民 97）。探討斑馬魚恐懼記憶之神經機制（碩士論文）。

## 【評語】 030312

1. 此研究的目的是在於探討環境因子對斑馬魚空間記憶形成的影響，變因包含水溫和六種物質的水溶液進行處理後之斑馬魚的空間記憶變化。
2. 這是一個很有創意與生活化的題目，研究結果相當有趣，實驗的基礎設置也有巧妙之處。惟實驗操作上，樣本數不足(N=3)，數據落差較大，難以排除個體差異的影響，應可再更詳盡的操作，才能做較有效的討論與推論，值得繼續深入！
3. 對於使用六種水溶液進行測試，此部分在議題選擇與假說建立部分薄弱，例如為何選取人蔘，則須重新思考其所代表意義。

## 摘要

本研究旨在探討環境對觀賞用斑馬魚(*Danio rerio*)空間記憶形成的影響。前人研究建構在斑馬魚空間記憶的腦區，或聲音、顏色等刺激對空間記憶的影響；本研究則證實了斑馬魚的記憶學習與環境具關聯性。本研究的原理是利用斑馬魚偏好深水區的天擇特性，加上改良自T字型迷宮的十字型迷宮，觀察訓練兩天後，斑馬魚進入深水區的耗時減少量，以推估空間記憶形成。從迷宮水體溫度及成分兩個向度進行探討，發現：低溫環境有助斑馬魚形成空間記憶。咖啡、酒精及茶有助形成空間記憶；人參、黃耆及菸草則無助於形成空間記憶。此外，本研究更運用自製的制約訓練器，發現空間記憶學習的最佳環境也能促進斑馬魚的制約行為學習，或許能進一步推廣到更多類別的長期記憶。

## 研究動機

魚是生活中常見的生物，我們卻從來沒有去仔細了解牠們。老師在上動物行為及神經系統的單元時，提到，學習行為是經由後天學習才表現出來的，是否能夠有效學習除了和神經系統的發達程度有關外，也和我們所處的環境有很大的關係……。我突然想到，我們都會調侃記憶力不好的同學是「金魚腦」，但，魚的記憶力跟人類真的差這麼多？如果給魚去走迷宮，魚會不會像遇到雙心石滬一樣，走不出來？後來看了一些文獻資料，發現魚的記憶模式原來和人類很相像，於是我們好奇，若找出魚兒學習與環境的關聯，是否能提供人類的學習一些建議？或許，找到適合的學習環境，讀書就能夠更有效率一些。

## 研究目的

本研究先找出斑馬魚形成空間記憶的最佳溫度，再找出最佳水體成分，並進一步確認成分濃度與形成空間記憶的關聯。最後，檢測最佳化環境是否影響操作制約的學習，如圖1。

### 研究一、探討水體溫度對觀賞用斑馬魚空間記憶形成的影響

(一)探討觀賞用斑馬魚在23°C水體溫度的空間記憶形成

(二)探討觀賞用斑馬魚在29°C水體溫度的空間記憶形成

### 研究二、探討水體成分對觀賞用斑馬魚空間記憶形成的影響

(一)探討觀賞用斑馬魚在咖啡水溶液中的空間記憶形成

(二)探討觀賞用斑馬魚在酒精水溶液中的空間記憶形成

(三)探討觀賞用斑馬魚在人參水溶液中的空間記憶形成

(四)探討觀賞用斑馬魚在黃耆水溶液中的空間記憶形成

(五)探討觀賞用斑馬魚在抹茶水溶液中的空間記憶形成

(六)探討觀賞用斑馬魚在菸草水溶液中的空間記憶形成

### 研究三、探討不同濃度的水體環境(酒精、抹茶)對觀賞用斑馬魚空間記憶形成的影響

(一)探討觀賞用斑馬魚在不同濃度酒精水溶液中的空間記憶形成

(二)探討觀賞用斑馬魚在不同濃度抹茶水溶液中的空間記憶形成

### 研究四、分析最佳水體環境是否對觀賞用斑馬魚學習制約行為有影響

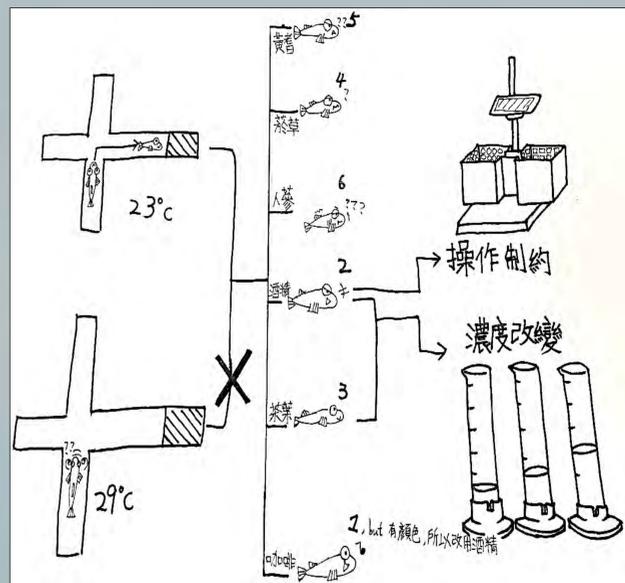


圖1、魚記憶研究流程圖

## 研究原理

本研究利用斑馬魚偏好深水區的特性，將斑馬魚置於有一處深水區的十字型迷宮，觀察斑馬魚在迷宮中訓練兩天後，進入深水區的耗時減少量，以推估空間記憶形成。

## 文獻探討與改良：魚類記憶的形成原理與常用的研究方法

- 選用斑馬魚作為模式生物，是因為斑馬魚基因和人類相似度高達87%，且哺乳類的海馬迴同源於硬骨魚的端腦，所以我們能藉由斑馬魚的反應回推人類(吳世郁，2008)。
- 空間記憶為記錄該生物生存環境與空間定位的一種記憶型態。動物能夠記憶空間定位並往返於特定位置間。反應性策略是以迷宮或路線中出現的視覺等相關線索做為導航依據以抵達目的地；位置性策略則是因地因時習得目的地與獎賞之間的關聯性(吳世郁，2008)。我們將兩策略應用在我們的研究設計，希望斑馬魚記憶的，有迷宮中深水區的位置，及特定視覺環境與食物的關聯。
- T字型迷宮結構，有分成淺水區和深水區。深水區內會布置人工水草和石頭，打造斑馬魚比較偏好的環境，並以此做為學習誘因，訓練斑馬魚的空間記憶(吳世郁，2008)。
- Novel tank的實驗指出，當斑馬魚進到一個新環境時，會習慣性潛到深水區，減少天擇壓力造成的恐懼；當魚適應新環境後，感受到較輕的天擇壓力，便往淺水區探索，但魚還是傾向待在深水區 (Jonathan M Cachat, et al, 2010)。
- T字型迷宮實驗有兩個階段。首先是馴化階段，會將斑馬魚放進T型迷宮的中間水道，但是關閉左右橫向水道，因為要避免斑馬魚提前發現深水區影響實驗結果，這個流程的目的是要讓斑馬魚先熟悉環境，以免因為不熟悉這個環境而害怕，影響實驗結果。馴化階段之後就是訓練階段。這時候會開放右側的深水區，讓斑馬魚可以學習從等待區到深水區的路線，實驗時會記錄從等待區開放後第一次進入深水區超過20秒的耗時，一次會訓練5分鐘，如果5分鐘內沒有到達深水區，就會將他趕到深水區待2分鐘，然後再把魚移動回魚缸。訓練階段會重複3次，3次訓練間各間隔1天(吳世郁，2008)。

我們的研究方法也是以隔板隔開，讓斑馬魚在迷宮岔路處一邊適應環境，但訓練的部分有做改變，和吳世郁於2008年碩士論文(斑馬魚端腦在空間記憶上所扮演的角色)不同的有：

- 將T字型迷宮改為十字型迷宮，訓練時間由5分鐘增長為10分鐘
- 我們為避免被驅趕的負面記憶與深水區產生記憶連結，故沒驅趕斑馬魚
- 將進入深水區所需耗時定義為「第一次進入深水區達30秒的所需耗時」

## 製作實驗器材與擬定研究基本步驟

### ●改良文獻資料的T字型迷宮，設計十字型迷宮

- 文獻中的迷宮是T字形，分成淺水區和深水區。深水區內會布置人工水草和石頭，打造斑馬魚比較偏好的環境(吳世郁，2008)。
- Novel tank提到，斑馬魚進到新環境時，為減少天擇恐懼，會習慣性潛到深水區；當適應新環境後便往淺水區探索，但仍傾向待深水區 (Jonathan M Cachat, et al, 2010)。
- 我們將T字型迷宮改良成十字形迷宮，是希望能增加往前游的空間給斑馬魚，避免斑馬魚在前游到碰壁後，被強迫左右轉，如此能減少斑馬魚逢機進入深水區的可能，降低本研究的誤差。設計圖與黏接過程如圖2、3。
- 我們也沒有佈置深水區，而是直接引用2010年Novel tank文獻提到的，斑馬魚傾向待在深水區的天性觀察空間學習。



圖2、黏接壓克力



圖3、十字型迷宮設計圖

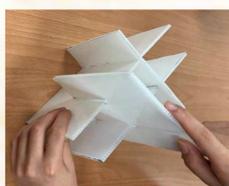


圖4、接合個別套房

### ●設計觀賞用斑馬魚的個別套房

斑馬魚在兩次訓練間，力求生活環境能相似。透過文獻，我們看到利用水槽連通所建置的飼養箱(陳瑾寧等，56屆全國科展)，但此建置方法，需消耗大量經費。我們保留了多個小空間水質須相同的原理，改以pp板設計斑馬魚在每兩次訓練間待的「個別套房」。(圖4、5)



圖5、魚兒悠游於個別套房

本研究以十字形迷宮進行觀賞用斑馬魚的空間記憶訓練，並分析斑馬魚在第一天與第三天進入深水區所需耗時的差異來判定習得空間記憶的程度。研究一、研究二、研究三共同制定了統一操作流程，在接下來的說明書篇幅中，我們將簡稱為「基本步驟」，如表1：

表1、研究一、研究二及研究三的统一操作流程，以下簡稱為「基本步驟」

1、設置迷宮	2、加水體至淺水區2公分線	3、測量水溫與水平度
4、關上閘門	5、放入魚，讓牠適應5分鐘	6、以釣魚線拉開閘門
7、讓魚在迷宮內待十分鐘	8、停止記錄魚回個別套房	9、場復

註1：為降低斑馬魚的焦慮，在放入迷宮適應前，即先在過渡的杯子適應10分鐘。  
註2：為減少光影或其他因素的干擾，我們使用釣魚線，在遠方將閘門拉開。

# 我們的研究從多個面向掌管控制變因，企圖減少實驗誤差

- 我們透過隨機撈取降低取樣誤差
- 水質震盪容易干擾實驗結果，故我們極力避免水質震盪
- 斑馬魚轉換環境易增加焦慮感，我們設置過渡區，降低魚的焦慮
- 我們將T字型迷宮改良為十字型迷宮，降低斑馬魚逢機進入深水區造成的誤差影響
- 我們以第一次進入深水區達30秒的耗時作為判斷斑馬魚辨認且停留於深水區的標準
- 魚的活動力與探索行為具有個別差異，故使用p值判斷空間記憶學習狀況

## 研究一：探討水體溫度對觀賞用斑馬魚空間記憶形成的影響

- (一)觀察及背景知識：我們覺得熱的時候難集中注意力，冷的時候比較清醒，記憶力佳。但水中悠遊的魚兒記憶力是否會受溫度高低影響，則有待測試。
- (二)提出問題：斑馬魚和哺乳類的記憶形成機制非常相似。魚的記憶力會不會受到溫度影響？我們如果能夠知道，或許能夠推論適合我們的學習環境。
- (三)研究假設：斑馬魚在溫度較低的水中，空間記憶的形成效果較好。
- (四)實驗設計：比較低溫及高溫環境中，斑馬魚的空間記憶形成能力，如圖6。
- (五)研究結果與討論：

●斑馬魚是外溫動物，故水體的溫度改變應控制在斑馬魚的最適溫度範圍

七上恆定性單元提到，斑馬魚是外溫動物，不會自發性地調節體溫。因此，實驗過程應謹慎控制水溫在斑馬魚的最適溫度範圍(22°C~30°C之間)。我們的實驗設計，為避免傷害模式生物，因此預留邊際，使用23°C與29°C作為低溫組與高溫組。

●23°C環境中，斑馬魚能夠有效建立空間記憶(如表2、圖7)

●難以說明29°C環境中的斑馬魚能夠有效建立起空間記憶(如表3、圖8)

●研究一符合研究假設：斑馬魚在溫度較低的水中，空間記憶的形成效果較好

使用變異數不同的獨立雙樣本t檢定，分析斑馬魚第一天與第三天進入深水區所需耗時：在23°C環境中，p值為0.18；在29°C環境中，p值為0.46。推論斑馬魚在23°C的低溫環境，空間記憶形成效果較29°C的高溫環境佳。考量操作，若要將水溫嚴格控制在23°C，將耗費大量時間，故我們決定之後的研究採用23°C~24°C的水體進行實驗。

表2、萊姆仙子在23°C環境，進入深水區所需耗時表

	低溫1	低溫2	低溫3	平均	標準差	p值
第一天	10	171	119	100	82.16	
第二天	8	92	130	77	62.43	
第三天	1	13	3	6	6.43	0.18

表3、萊姆仙子在29°C環境，進入深水區所需耗時表

	高溫1	高溫2	高溫3	平均	標準差	p值
第一天	335	32	43	137	171.85	
第二天	224	58	58	113	95.84	
第三天	20	2	116	46	61.29	0.46

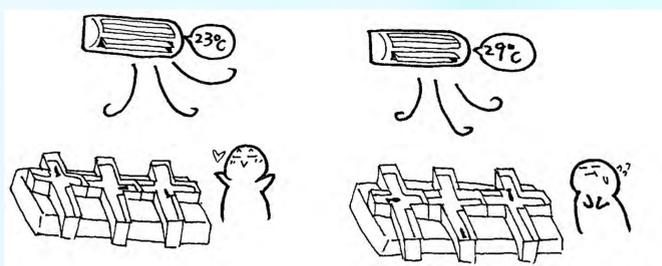


圖6、研究一實驗設計示意圖

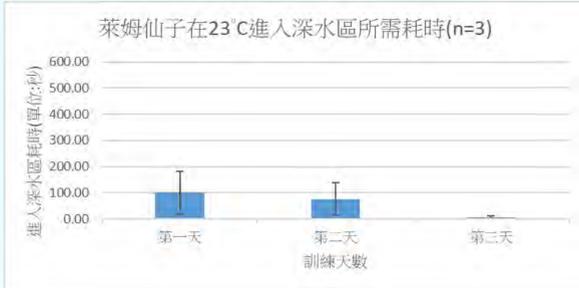


圖7、萊姆仙子在23°C環境，進入深水區所需耗時圖

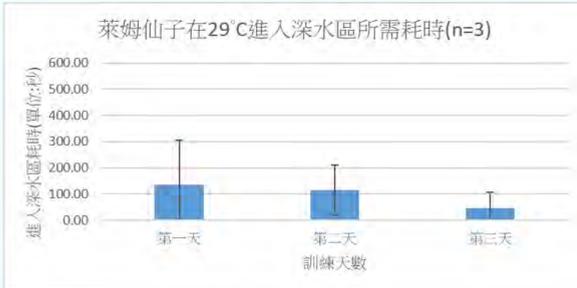


圖8、萊姆仙子在29°C環境，進入深水區所需耗時圖

## 研究二：探討水體成分對觀賞用斑馬魚空間記憶形成的影響

- (一)觀察及背景知識：日常經驗中，喝咖啡能讓精神變好、茶能夠提神、人參及黃耆有補氣效果，喝酒會讓人記憶片斷、菸草有害身體健康。其中，茶、中藥等更是我們漫漫長夜讀書的好陪伴，魚的記憶力會不會也受到這些物質影響呢？
- (二)提出問題：斑馬魚和哺乳類的記憶形成機制非常相似。那，魚的記憶力會不會也受到咖啡、抹茶、人參、黃耆、酒精及菸草等物質影響？我們如果能夠知道，或許可以推論適合我們的學習環境。
- (三)研究假設：共分六個子實驗，這六個子實驗共用一組對照組。有六項研究假設待檢驗：

1. 斑馬魚在咖啡水溶液中，能有效形成空間記憶。
2. 斑馬魚在抹茶水溶液中，能有效形成空間記憶。
3. 斑馬魚在人參水溶液中，能有效形成空間記憶。
4. 斑馬魚在黃耆水溶液中，能有效形成空間記憶。
5. 斑馬魚在酒精水溶液中，無法有效形成空間記憶。
6. 斑馬魚在菸草水溶液中，無法有效形成空間記憶。

### (四)實驗設計

本研究共分六個子實驗，這六個子實驗共用一組對照組。六個子實驗分別套用上述基本步驟，在迷宮中分別放入使用缸水配置的：咖啡水溶液、抹茶水溶液、人參水溶液、黃耆水溶液、酒精水溶液及菸草水溶液，對照組的水體環境則使用平時飼養萊姆仙子的缸水。魚類的生活環境是直接浸泡在水中，且魚類的呼吸器官，鰓，是透過水的流入，使其完成物質交換，水質有些許變動，即可能對魚造成巨大影響。為了避免在實驗過程中，傷害到模式生物，我們很謹慎地配置水溶液，六種水溶液，皆配置在小於或等於0.05%的濃度。(如上圖9)

1. 實驗組水溶液：使用市售咖啡粉 / 抹茶粉 / 人參萃取液 / 黃耆磨粉 / 酒精 / 菸草粉 及缸水，在迷宮中調配出0.05%咖啡水溶液 / 0.05%抹茶水溶液 / 約0.043%人參水溶液 / 0.05%黃耆水溶液 / 0.05%酒精水溶液 / 0.05%的菸草水溶液，操作上述基本步驟。共執行三次基本步驟流程，並攝影實驗過程。且，每兩次操作之間，需間隔22小時以上。
2. 對照組水溶液：在迷宮中置入缸水，操作上述基本步驟。共執行三次基本步驟流程，並攝影實驗過程。且，每兩次操作之間，需間隔22小時以上。

### (五)研究結果與討論：

●水體成分是利用擴散作用，藉由鰓進入斑馬魚體內

七上提到「擴散作用」和「滲透作用」。其中，擴散作用是指物質從高濃度區域往低濃度區域移動的情形；水溶液中的物質透過鰓進入斑馬魚體內，也是一個擴散作用物質交換的過程，斑馬魚待在某物質的水溶液環境中，水中物質便會透過擴散作用物質交換進入斑馬魚體內。

●調配出的水溶液應控制在不危害斑馬魚安全的濃度範圍

水質有些許變動，即可能對魚造成巨大影響。我們參考了「觀賞魚類用藥介紹」的文章，知道觀賞魚在一小時內的短期藥浴，能接受0.3%~3%的粗鹽水溶液(王渭賢，民100)。為了避免在實驗過程中，傷害到模式生物，因此將水溶液濃度再往下調一個數量級，所有的實驗水體皆使用0.05%以下的濃度。

●我們以對照組的獨立雙樣本t檢定p值作為判斷空間記憶學習效果是否達顯著的依據

咖啡、酒精及抹茶水溶液中，斑馬魚的空間記憶形成效果較對照組好；人參、黃耆及菸草水溶液中，斑馬魚的空間記憶形成效果較對照組差。如右表4。

●研究二共有六個子實驗，三項符合研究假設，三項不符合研究假設

使用變異數不同的獨立雙樣本t檢定，分析斑馬魚第一天與第三天進入深水區所需耗時：對照組p值為0.26；咖啡環境p值為0.13；茶環境p值為0.20；人參環境p值為0.89；黃耆環境p值為0.68；酒精環境p值為0.18；菸草環境p值為0.50。若將對照組的p值0.26設為達到顯著差異的標準，則斑馬魚在咖啡、茶及酒精三項水溶液中，空間記憶的學習效果達到顯著差異，其中，咖啡與茶符合研究假設，酒精則不符合研究假設；斑馬魚在人參、黃耆及菸草三項水溶液中，無法證明空間記憶的學習效果達到顯著差異，其中，菸草符合研究假設，人參與黃耆不符合研究假設。(如表5~11；如圖10~16)

●斑馬魚在具有活絡副交感神經化合物的水體環境中，探索行為會減少

抹茶水溶液(具茶胺酸分子)、菸草水溶液(具尼古丁分子)中，斑馬魚並不會積極地探索空間，而是傾向在淺水區定點不動。我們認為這恰巧可以說明，斑馬魚在具有可活絡副交感神經化合物的水體環境中，感受到較輕微的天擇壓力，而減少探索行為。

表5、對照組中，進入深水區所需耗時表

	對照1	對照2	對照3	平均	標準差	p值
第一天	227	319	15	187	155.90	
第二天	106	35	50	64	37.42	
第三天	21	90	38	50	35.95	0.26

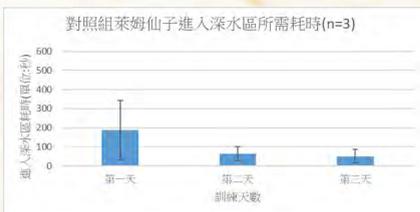


圖10、對照組中，進入深水區所需耗時圖

表6、咖啡水溶液中，進入深水區所需耗時表

	咖啡1	咖啡2	咖啡3	平均	標準差	p值
第一天	69	182	96	116	59.01	
第二天	5	46	209	87	107.91	
第三天	61	34	15	37	23.12	0.13

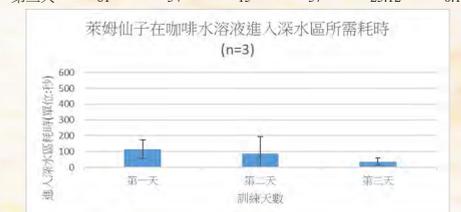


圖11、咖啡水溶液中，進入深水區所需耗時圖

表7、茶水溶液中，進入深水區所需耗時表

	0.05%茶1	0.05%茶2	0.05%茶3	平均	標準差	p值
第一天	600	600	536	579	36.95	
第二天	128	289	159	192	85.42	
第三天	600	89	106	265	290.24	0.20

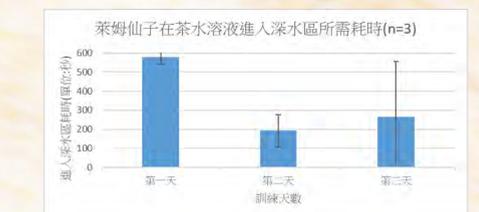


圖12、茶水溶液中，進入深水區所需耗時圖

表8、人參水溶液中，進入深水區所需耗時表

	人參1	人參2	人參3	平均	標準差	p值
第一天	38	201	160	133	84.79	
第二天	418	22	64	168	217.52	
第三天	166	107	150	141	30.51	0.89

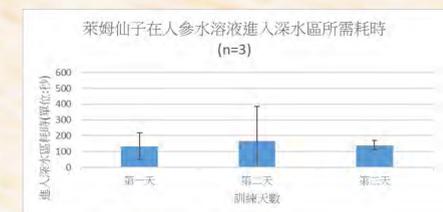


圖13、人參水溶液中，進入深水區所需耗時圖

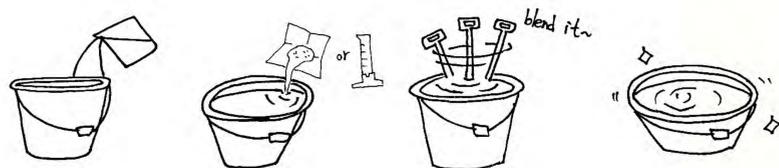


圖9、研究二配置水溶液的流程示意圖

表9、黃耆水溶液中，進入深水區所需耗時表

	黃耆1	黃耆2	黃耆3	平均	標準差	p 值
第一天	102	342	600	348	249.05	
第二天	146	253	30	143	111.53	
第三天	62	103	582	249	289.11	0.68

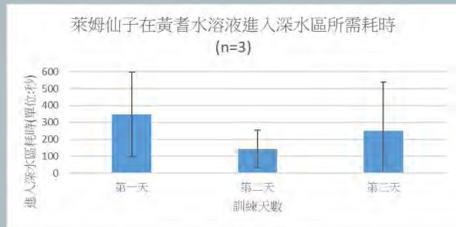


圖14、黃耆水溶液中，進入深水區所需耗時圖

表10、酒精水溶液中，進入深水區所需耗時表

	0.05%酒精1	0.05%酒精2	0.05%酒精3	平均	標準差	p 值
第一天	151	328	132	204	108.09	
第二天	14	544	55	204	63.52	
第三天	63	29	152	81	294.87	0.18

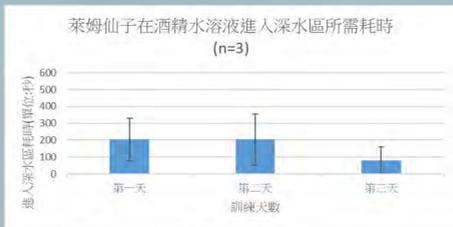


圖15、酒精水溶液中，進入深水區所需耗時圖

表11、菸草水溶液中，進入深水區所需耗時表

	菸草1	菸草2	菸草3	平均	標準差	p 值
第一天	600	332	600	511	154.73	
第二天	310	566	462	446	128.75	
第三天	461	600	36	366	293.84	0.50

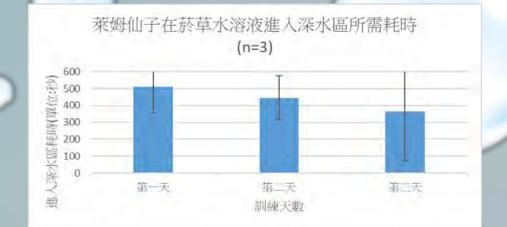


圖16、菸草水溶液中，進入深水區所需耗時圖

### 研究三、探討不同濃度的水體環境(酒精、抹茶)對觀賞用斑馬魚空間記憶形成的影響

(一)觀察及背景知識：研究二中，我們發現酒精和抹茶環境中的空間記憶形成相較對照組為佳。因此好奇，較0.05%更低濃度的酒精與抹茶是否對斑馬魚空間記憶的形成有影響？

(二)提出問題：不斷降低水體環境的濃度，是否會減少斑馬魚空間記憶的形成？

(三)研究假設：

1. 斑馬魚在低濃度的酒精水溶液中，空間記憶形成效果會較不明顯。
2. 斑馬魚在低濃度的抹茶水溶液中，空間記憶形成效果會較不明顯。

(四)實驗設計：本研究共分兩個子實驗，分別套用基本步驟。

在迷宮中分別放入使用缸水配置的三種濃度酒精水溶液與抹茶水溶液。如圖17。

(五)研究結果與討論：

●水體濃度會影響空間記憶形成的假設應該可以在濃度更高的情況找到關聯性

不過，礙於再高濃度的酒精或抹茶可能影響斑馬魚的健康或生存，我們沒有做更高濃度的實驗來驗證。

●研究三共有兩個子實驗，皆符合研究假設：

斑馬魚在酒精與抹茶的水溶液中，進入深水區的耗時皆有隨著訓練天數減少的趨勢。若進一步比較三種濃度的p值，則發現空間記憶形成效果並非與濃度變化有絕對相關。但無論是酒精水溶液或抹茶水溶液，斑馬魚皆在0.05%的環境中，空間記憶形成效果最佳。因此，**斑馬魚在低濃度的酒精或抹茶水溶液中，空間記憶形成效果較不明顯。**

●我們不再往上調整水溶液濃度來證明水體濃度與空間記憶效果的絕對相關

我們發現，將酒精及抹茶水溶液濃度降低，並無法證明空間記憶形成效果與濃度變化有絕對相關。但，兩種水溶液濃度在0.05%時，空間記憶形成效果確實較0.01%、0.005%時為佳。於是我們好奇，提高酒精及抹茶的水溶液濃度，是不是對斑馬魚的空間記憶形成更有幫助呢？但，**研究使用的水溶液濃度，是為了避免在實驗過程中，傷害到模式生物，若再調高水溶液濃度，可能會傷害到斑馬魚。**因此，我們決定不再調高水溶液濃度來進行更深入的實驗驗證。

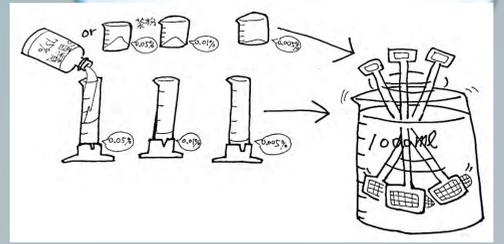


圖17、研究三實驗設計示意圖

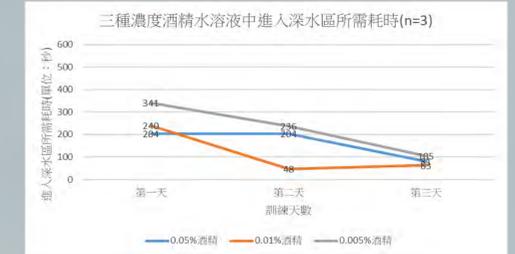


圖18、三種濃度酒精水溶液環境，進入深水區所需耗時圖

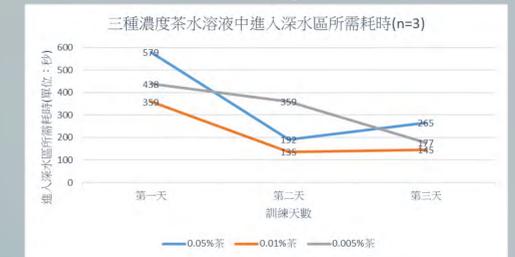


圖19、三種濃度茶水溶液環境，進入深水區所需耗時圖

### 我們自實驗影片整理出斑馬魚有不只一種進出深水區的探索模式

(一)我們歸納出三類斑馬魚進出深水區的模式

我們發現**斑馬魚進入深水區後，會以深水區為中心，不停向外探索**，進出深水區的方式，主要有三種模式：

- 以Z字型游法進出深水區
- 以繞圈方式進出深水區
- 身體橫向左右搖擺方式進出深水區

(二)我們觀察到斑馬魚在離開深水區時的游速會影響它接下來的路徑

**若斑馬魚以直線前進快速離開深水區，通常會直接到達對面的廊道。當斑馬魚以慢速Z字型離開深水區，則常轉入左右兩邊的廊道。**

### 研究四：分析最佳水體環境是否對觀賞用斑馬魚學習制約行為有影響

(一)觀察與背景知識：

能提升空間記憶的水體環境，是否也有助於提升其他長期記憶呢？如果能解答這個問題，或許我們就可以回推到人類，一個好的環境，可以提升不同種類學習的效果。於是我們以操作制約為例，進一步去探討空間記憶的最佳水體對斑馬魚操作制約形成之影響。

(二)提出問題：斑馬魚在不同水體環境，記住圖案與食物獎勵關聯的能力有沒有差別？

(三)研究假設：斑馬魚在酒精環境中，較能記住圖案與食物獎勵的關聯。

(四)實驗設計

研究二發現，魚在咖啡、酒精及抹茶水溶液中，形成空間記憶的效果較對照組好。**我們選擇其中顏色為透明的酒精水溶液當實驗組，池水當對照組進行研究四。研究四設計了一個自製的制約訓練器，用不透明壓克力板製作。**一邊貼滿已護貝的方形圖案紙，另一邊貼滿已護貝的圓形圖案紙，並將實驗區分為訓練與測試兩階段，皆使用表12的實驗流程步驟：

(五)研究結果與討論：

●研究四符合研究假設：斑馬魚在酒精環境中，較能記住圖案與食物獎勵的關聯(如圖20、圖21)

斑馬魚能在自製的制約訓練器中，建立起「待在方形區能獲得食物」的制約行為。且，**斑馬魚在酒精環境中，比在缸水環境中建立更明顯的制約效果**；可以推論，對斑馬魚而言，**空間記憶學習的最佳水體環境，或許也能推廣到其他類別的長期記憶學習。**若將這個概念進一步猜測到人類，某項學習的最佳環境，可能也能類推到其他項目的學習，那麼，找到最佳學習環境就會是很重要的事情了。

●增加訓練階段的天數，可能更明確觀察出不同水體環境下，斑馬魚制約行為的差距

斑馬魚能在我們自製的制約訓練器中，順利建立制約行為，且酒精環境中具有較好的效果。但，我們認為，斑馬魚在酒精與缸水環境的學習差異可以有更明顯的差距。我們推測，若增加訓練階段的天數，**斑馬魚將能更熟悉制約訓練器的環境，且增加訓練次數與時間，也能讓斑馬魚建立更根深蒂固且自動化的制約行為**，將更能觀察出不同水體環境下，斑馬魚待在方形區時間的差距。

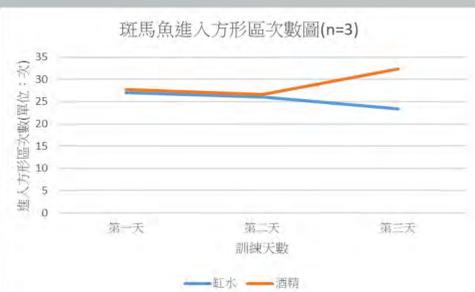


圖20、缸水及酒精環境，進入方形區次數圖

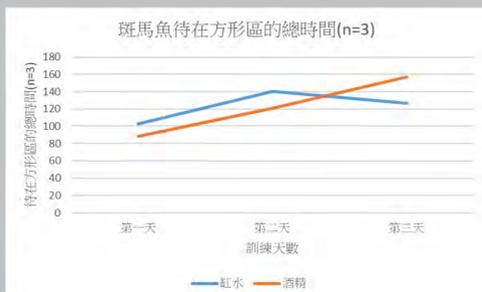


圖21、缸水及酒精環境，待在方形區總時間圖

表12、研究四的操作制約實驗流程步驟表→

1. 設置實驗器材 	2. 水體加至6公分線 	3. 隔板擋住中間廊道兩端 
4. 將魚從中間廊道放入，讓牠適應環境5分鐘 	5. 打開閘門並開始錄影(訓練階段還需餵食) 	6. 結束攝影，將斑馬魚放回個別套房後，充分餵食 

### 結論：斑馬魚空間記憶與其他長期記憶會受環境影響其學習效果

到底我們所處的環境是否會影響學習呢？在完成觀賞用斑馬魚空間記憶影響的研究後，我們體會到，在分別間隔22小時的兩次訓練前提下，低溫環境較有利於斑馬魚的空間記憶學習。而環境物質也對斑馬魚的空間記憶習得有影響，但部分與我們的日常生活經驗有所不同，因此，很難直接定論什麼物質好，什麼物質壞。例如：在分別間隔22小時的兩次訓練前提下，咖啡、酒精及抹茶有助空間記憶；而人參、黃耆及菸草則反而無助於空間記憶。斑馬魚空間記憶學習的最佳水體環境，也同時是學習制約行為的好環境，或許能推廣到更多類別的長期記憶學習。但本研究僅只觀察兩天學習後的影響，我們很難藉由為期三天的行為觀察，直接斷定長期的利弊。綜合以上，本實驗在分別間隔22小時的兩次訓練前提下，證實了**斑馬魚的空間記憶學習受環境影響，甚至，環境的影響效果也可能推廣到更多長期記憶的學習**。回觀人類，或許這就是為何我們喜歡待在冷氣房內讀書的原因吧！畢竟，所處環境對我們的學習效果是很重要的。

### 參考資料

一、吳世郁 (民 96)。斑馬魚端腦在空間記憶上所扮演的角色 (碩士論文)。  
 二、Jonathan M. Cachat, et al (2010). Zebrafish Models in Neurobehavioral Research, pp 73-88. Retrieved from https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-60761-922-2\_3  
 三、陳博淵等(2018)。魚「腦」探討百合對斑馬魚各個階段的影響-中華民國第五十八屆中小學科學展覽會作品說明書。  
 四、曹彥蓉 (2008)。魚也可以很聰明-探討孔雀魚的學習能力。中華民國第四十八屆中小學科學展覽會作品說明書。  
 五、Can Newport, Guy Wallis, Yarena Reshtnyk & Ulrike E. Siebeck (2016). Discrimination of human faces by zebrafish (Tetraodon lineatus). Scientific Report.  
 六、曹彥蓉 (2008)。魚也可以很聰明-探討孔雀魚的學習能力。中華民國第四十八屆中小學科學展覽會作品說明書。  
 七、蔡瑩瑩等(2005)。酒精和尼古丁對斑馬魚胎兒發育的影響。中華民國第四十五屆中小學科學展覽會作品說明書。  
 八、謝昕穎等 (2018)。藍藻菌的滋味-探討藍藻菌對斑馬魚幼魚生長及樹蛙轉錄的影響。中華民國第五十八屆中小學科學展覽會作品說明書。  
 九、王潤賢 (民 100 年 02 月 23 日)。觀賞魚類用藥介紹。取自http://web.nchu.edu.tw/~pweb/users/wtsay/lesson/11680.pdf。  
 十、郭東穎 (2014)。生物的群聚行為與生存優勢-大肚魚的群聚決策行為研究及電腦模擬。中華民國第五十四屆中小學科學展覽會作品說明書。