

中華民國第 60 屆中小學科學展覽會 作品說明書

高級中等學校組 環境學科

第一名

052609

塑膠微粒對大型蚤生殖的影響

學校名稱：國立中興大學附屬高級中學

| | |
|-----------------------------------------------|-----------------------------|
| 作者： 高二 羅芝瓊 高二 梁筑庭 高二 宮昕儀 | 指導老師： 林士超 孫承矩 |
|-----------------------------------------------|-----------------------------|

關鍵詞：塑膠微粒、大型蚤、生殖影響

得獎感言

塑膠微粒對大型蚤的生殖影響~不要再大量使用塑膠產品

相信不少人都有看過一隻海龜的鼻孔裡被插了吸管，甚至危害到他的生命，不知道你在看這部影片時的省思是什麼，但我也曾經是買手搖杯飲料會順手拿塑膠袋和塑膠吸管的人，在我開始接觸到塑膠污染這個議題時，才真正意識到這些行為對環境造成了多嚴重的破壞。

雖然一個人少用一根吸管看似毫無幫助，但不可忽視的是只要一根吸管就足夠讓海龜死亡。在閱讀許多塑膠微粒文獻和實際參與淨灘以及環境講座後，我也漸漸培養了自備環保餐具的好習慣，甚至是邀請班上同學一起參與這些環保、對環境友善的行動。

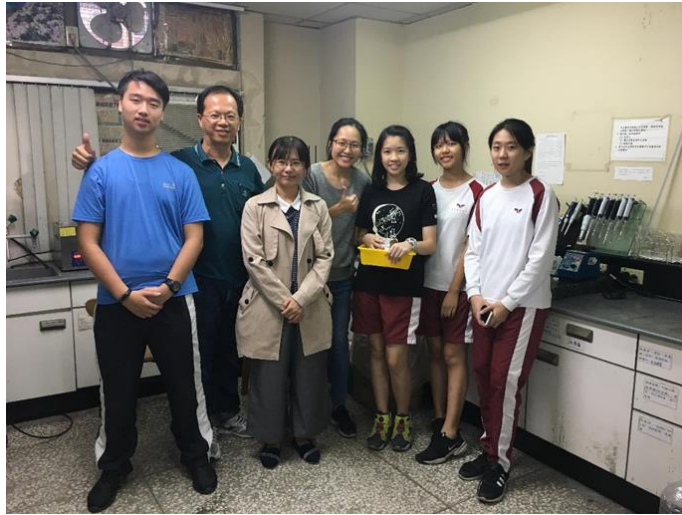
在我們的研究結果中顯示塑膠微粒會對大型蚤的生殖造成影響，雖然目前環境中的塑粒含量還沒達到我們實驗中發現的閾值。但，如果沒有積極處理塑膠污染的話，在研究實驗的結果來看，很有可能直接發生在台灣的淡水生態系中，不過我們也發現到將大型蚤的子代放到乾淨的環境中成長，可以看到它們能有恢復的情形。所以，現在開始改善環境還來得及，透過我們的研究結果也更能說服身邊的人去落實並保護我們生活的環境。

在做科展的過程不只讓我們能更重視環境議題，也培養我們找到問題以及解決問題的能力。而在過程中也當然不會是一帆風順的，很多人都會說科展是辛苦的，會遇到很多挫折，但最後得到結果是甘美的。其實說得也沒有錯，只是我不太認同其中的”但”。我認為那些挫折之處也是美好的甚至是更加甘甜寶貴之處，畢竟一帆風順的科展有什麼樂趣呢？在進行一年半的專題研究後，我認識到了很重要的一點就是最珍貴的其實正是自己突破困境的某時某刻。

科展還有一個很重要的特點，往往我們是從一個點思考、出發，那開拓的學習範圍就非常遼闊了，繞著起點做螺旋式探索、學習，因此科展學到的從來就不只是科學，團隊合作、自我探索、自己學習……這些重要的能力都是我們可以從中獲得的，只要把自己準備好投入其中，必然能從中成長！

在地區科展時，因為是第一次參展，所以我們都很緊張，一直在猜教授會不會很嚴肅或是很兇之類的，結果當教授開始問問題時，發現教授們都很親切，結束時還跟我們說再見，讓我們有了第一次很好的科展體驗！但在全國科展時，第一天總覺得教授對我們的內容沒什麼興趣，讓我們有點失望，老師還一直鼓勵我們。到了第二天，也不知道教授的反應是好？還是不好？讓我們有點擔心，所以當最後被公布得到第一名肯定時，我們都超興奮的！

在這兩次的比賽經驗中，雖然過程中會擔心，但在受到較受青睞時就覺得這些辛苦都是值得的了，相信有這樣地走了一回，以後再做什麼都能戰戰兢兢、攻無不克。



這是我們第一次進入大學實驗室(中興大學分析化學實驗室)，學習操作離心機來分離塑膠微粒溶液。



這是我們做實驗、書報討論的地科教室，是回憶許多的地方，也因常有學長們回來指導我們，是我成長很多的地方。



在高一就有機會接觸了中研院的減塑計劃，感謝陳昭倫教授、陳彥嘉老師，一路走來，我們收穫滿滿。(攝於中研院生物多樣性研究中心)

摘要

塑膠微粒常見於自然環境中，若攝入塑粒是否會對生物生存造成威脅？本研究以塑粒及小球藻餵食大型蚤(*Daphnia magna*)，以螢光顯微鏡觀察大型蚤腸道並監測小球藻濃度以推測大型蚤攝食情形，並監測新生水蚤個體數。

研究發現大型蚤在濾食中會攝入塑膠微粒，在含0.08 mg/L塑粒的培養環境下大型蚤攝食量顯著減少。在含0.01mg/L的塑粒環境下大型蚤開始抱卵天數有延長、第一子代個體數會減少，且平均體長亦減少。若子代出生即放回無塑環境，可恢復生長情形。

在含 0.01mg/L的塑粒環境下，族群大小有顯著減少且在0.08mg/L濃度下的族群在第七天全部死亡，也就是有塑環境對大型蚤生殖及生長確實造成影響。

壹、研究動機

一、前言

近年來有關塑膠的環保議題日漸被重視，在實際參與淨灘和到回收站幫忙分類的活動中，我們親自體會到平時接觸不到的環境中，塑膠垃圾是如何汙染原本乾淨環境。在關心塑膠垃圾及對環境產生污染之虞，我們經由網路搜尋相關議題後了解到這些汙染產生的途徑，包括人們大量使用塑膠產品卻又不妥善回收而是直接丟入垃圾掩埋場或隨地丟棄，進而造成塑膠垃圾經由雨水的沖刷或風的吹送等因素進入海洋中。這些塑膠經長時間的裂解(Pyrolysis)後會變成肉眼無法看見的塑膠微粒 (Microplastic)。因為其非常微小且遍佈於自然環境中，所以很容易被動物攝入。於是我們想知道塑膠微粒是否也會對生物的生存造成威脅？因此本實驗希望探討塑膠微粒是否會對大型蚤之生殖造成影響。

二、文獻探討

(一) 大型蚤 (*Daphnia magna*)

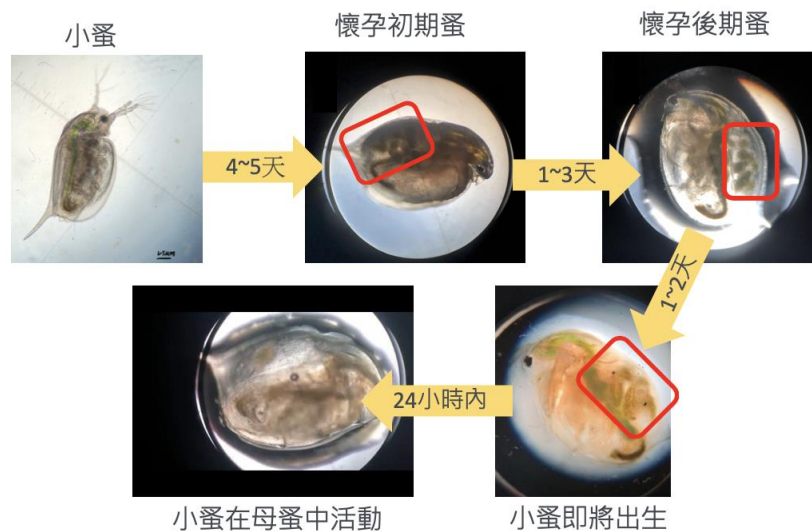
大型蚤分類地位為節肢動物門 (Arthropoda)、鰓足綱 (Branchiopoda)、枝角目 (Cladocera)、溞科 (*Daphniidae*)、溞屬 (*Daphnia*)。橈足類體型微小，是淡水浮游動物的重要份子，所謂浮游動物是指體型微小，具有微弱的游泳能力並無法反抗強大的水流，只能隨著水流載浮載沉^[10]。

大型蚤屬於濾食性動物，主要濾食水中浮游植物 (Phytoplankton)。由於其濾食的方式無法選擇性攝入食物，在受汙染的淡水生態系中也有機會攝入環境中的塑膠微粒，且大型蚤因其體表透明方便進行觀察，故長期被用來作為毒物試驗指標生物。

大型蚤生殖週期短(圖一、二)，約一週內就能產下子代，且每代子代數多。另外，大型蚤是孤雌生殖，在實驗中更能降低因世代間個體差異所造成的誤差，而使實驗變得更加精確。大型蚤為初級消費者，除不易因生物放大效應，而受到攝食對象原先的累積差性影響外，更可有效推估對其上層消費者造成的影響。



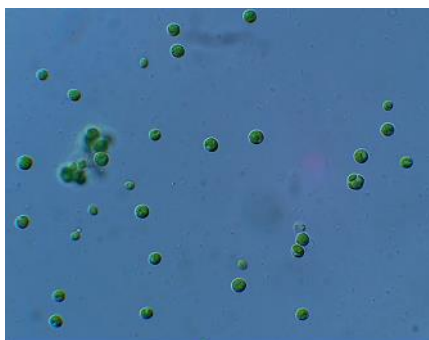
圖一：出生兩日大型蚤 (*Daphnia magna*, 本研究所攝)



圖二：大型蚤生殖週期(紅線圈起處為卵或小蚤，本研究所攝)

(二) 小球藻 (*Chlorella* sp.) (圖三)

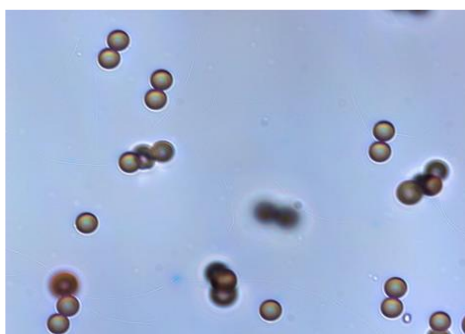
分類地位為綠藻門 (Chlorophyta)、四胞藻綱 (Trebouxiophyceae)、綠球藻目 (Chlorellales)、小球藻科 (*Chlorellaceae*)、小球藻屬 (*Chlorella*)。屬單細胞綠藻的一種，富含高蛋白質(60%)，經常作為水生動物的食物，個體直徑約 2~10 μm ，分裂速度快，在 20 小時內細胞數就能成長 4 倍^[2]。



圖三：小球藻 (*Chlorella* sp.) 直徑 2~10 μm (拍攝倍率 630X，本研究所攝)

(三) 塑膠微粒

根據美國國家海洋暨大氣總署 (The National Oceanic and Atmospheric Administration, NOAA) 規定塑膠微粒定義為直徑小於 5 mm 的塑膠碎片 (圖四)。黑潮基金會在台灣沿海進行塑膠微粒分佈的調查顯示，在台灣沿海 51 個測點中，每個測點皆有發現塑膠微粒，每立方公尺海水中含有 0.016 到 64.12 個不等的塑膠微粒^[1]。



圖四：本研究使用的塑膠微粒 (Polystyrene, PS) 直徑 6~8 μm 、密度 1.04 g/cm^3 、紅色螢光 (拍攝倍率 630X，本研究拍攝)

(四) 塑膠微粒與大型蚤相關研究

Martins & Guilhermino (2018) 將大型蚤暴露於 1~5 μm 0.1 mg/L 的塑膠微粒濃度下，觀察大型蚤親代以及子代所產生的影響。結果顯示，在此環境中大型蚤的生長、生育、族群成長率都有被抑制的趨勢，在兩個世代的時間內就能使該族群滅絕。此外，上述的這項影響於第三子代才完全恢復^[4]。

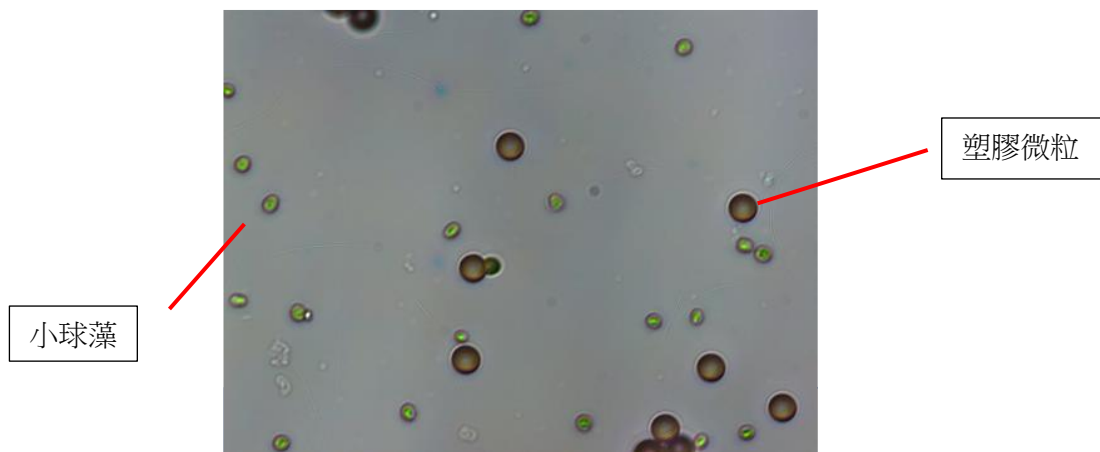
(五) 大型蚤、小球藻以及塑膠微粒間之關係

大型蚤為淡水生態系中的基石生物，主要濾食淡水中生長之富含高營養綠藻的小球藻。因其為濾食生物，故將有機會攝入各種在所生長生態系中的物質。現今，

環境中塑膠並無有效率的分解方式，且數量持續增加中，已成為人類開始重視的議題。塑膠進一步裂解為人類肉眼看不見的塑膠微粒後，也大量地散播出去，近年有研究證實塑膠微粒已遍布在淡水生態系中^[5]。

小球藻的大小約為 2~10 μm ，而本實驗選用的塑膠微粒為直徑 6~8 μm 的圓粒，顆粒大小與小球藻接近，容易被濾食性的大型蚤所攝入(圖五)，因此塑膠微粒會對大型蚤帶來甚麼影響，就成為了一項值得探究的題目了。

其中屬於四大生命現象之一的繁殖對整個族群是很重要的參數，因此我們想了解塑膠微粒會對大型蚤造成什麼影響。












圖五：本研究使用的塑膠微粒 (棕色) 與小球藻 (綠色)，塑膠微粒較大，約為 6 μm 、小球藻約為 2~4 μm (顯微鏡放大 630 倍，本研究所攝)。

貳、研究目的

- 一、暴露於塑膠微粒環境中是否會對大型蚤的生殖造成影響？
- 二、將塑膠微粒環境中的母蚤產下的子代移至乾淨環境中是否會使其子代恢復？
- 三、暴露於塑膠微粒環境中是否會影響大型蚤攝食量？

參、研究設備及器材

| | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
|  |  |  |
| <p>一、塑膠微粒(見備註)</p> | <p>二、小球藻藻液</p> | <p>三、花寶四號 (N : S : P=25 : 5 : 20)</p> |
|  |  |  |
| <p>四、酒精</p> | <p>五、燒杯</p> | <p>六、滴管</p> |
|  |  |  |
| <p>七、抽氣過濾瓶機</p> | <p>八、濾紙孔徑：0.45um\非 塑膠材質</p> | <p>九、量筒</p> |
|  |  |  |
| <p>十、pipette(定量滴管)</p> | <p>十一、滅菌機</p> | <p>十二、載玻片</p> |

| | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
|  |  |  |
| <p>十三、燈管(晝光)</p> | <p>十四、打氣機塑膠管</p> | <p>十五、洗滌瓶</p> |
|  |  |  |
| <p>十六、離心機、離心管</p> | <p>十七、螢光顯微鏡</p> | <p>十八、複式顯微鏡</p> |
|  |  |  |
| <p>十九、手機攝影架</p> | <p>二十、水質測量器 (YSIPRO-3)</p> | <p>二十一、光度計</p> |

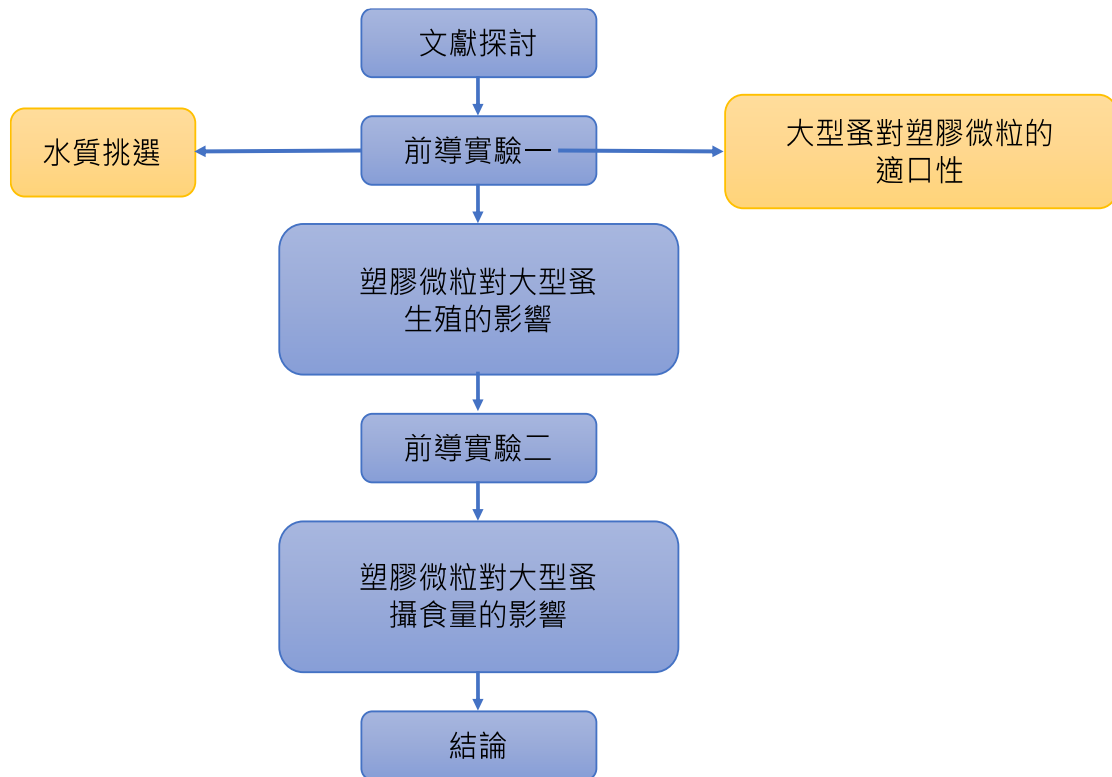
備註：

塑粒生產公司為美國 Spherotech, Inc.，材質：聚苯乙烯，粒徑：6~8 μm ，平均密度：
1.04g/cm³，發螢光。

肆、研究過程或方法

一、研究架構

研究架構流程如下：



二、實驗材料與實驗方法

(一) 大型蚤 (*Daphnia magna*)

實驗中使用的大型蚤取自嘉義大學淡水生物資源中心及行政院農委會農業藥物毒物試驗所應用毒理組，並在 3500 lux 的光照下在光週期 16 hr 光照/ 8 hr 黑暗整日打氣培養。打氣量約每秒十二個氣泡 (60~120 mL/分鐘)，置於實驗室內穩定培養三代後才開始進行實驗，且實驗中皆以出生 24~48 hr 時間內的大型蚤開始進行實驗。

(二) 塑膠微粒 (Polystyrene, PS)

1. 無塑膠微粒環境

為增加實驗的準確度，確保環境中僅有研究過程提供的塑膠微粒，本研究以 0.45 μm 孔徑大小的濾紙過濾，以製備無塑膠微粒的水，實驗中使用的水體皆經過無塑膠微粒處理，且實驗器具皆經過無塑膠微粒水潤洗，以降低實驗誤差。

2. 塑膠微粒：

本實驗使用的塑膠微粒為購買自美國 Spherotech, Inc.，其粒徑為 6~8 μm ，以 580~600 nm 激發呈橘色螢光的聚苯乙烯塑粒。實驗中選擇的環境塑粒濃度參考 Martins & Guilhermino (2018) 中使用的 0.1 mg/L 作為一倍濃度。在實驗一中使用的塑膠微粒濃度分別為 0.01 mg/L、0.1 mg/L 及無塑膠微粒的對照組，實驗二的塑膠微粒濃度分別為 0.01 mg/L、0.02 mg/L、0.04 mg/L、0.08 mg/L 及無塑膠微粒的對照組。

(三) 小球藻 (*Chlorella* sp.)

本次實驗一與實驗二中使用的小球藻取自彰化師範大學藻類研究室，分別以 BG11 培養液及花寶四號培養液 (1 g/L 濃度) 於反應器中進行培養，並控制在 3500 lux 的光照下，光週期為 16 hr 光照/8 hr 黑暗，溫度控制在攝氏 21~25 度中放大其細胞數，作為實驗中所使用的藻液。

三、前導實驗一：挑選培養大型蚤之水質及對塑膠微粒之適口性

(一) 培養大型蚤之水質挑選

為提供較是大型蚤成長之水源，本研究保留了原有的蒸餾水作為對照組，並分別加入經過兩種除氯處理的水體分別為氣曝水（自來水靜置打氣 24 小時去除氯氣）、煮沸水（學校飲水機的熱水並靜置 24 小時以上），以及人工硬水（加入碳酸鈣粉末至飽和）。在上述環境中放入各放入 10 隻大型蚤，2~3 天換水一次，並每日觀察紀錄大型蚤數量變化。

(二) 大型蚤對塑膠微粒適口性挑選檢測

以氣曝後無塑膠微粒水製備出 0.01 mg/L、0.1 mg/L 二種濃度的塑膠微粒環境，使其水體為 40 mL 的氣曝水。加上 10 mL 小球藻 (濃度 $>10^6$ cell/mL) 後，在每個環境中皆放置大型蚤 (24~48 hr) 10 隻，並全天保持打氣。

在大型蚤自由攝食一日後，使用 ZEISS Axio Imager 2 螢光顯微鏡以汞燈激發出 580~600 nm 螢光且在 YFP 濾鏡下 (YFP 500 nm~600 nm) 進行鏡檢 (鏡檢前以氣曝水沖洗大型蚤體表外之塑膠微粒，但還是會有少許塑膠微粒附著在大型蚤身體表面)。

四、實驗一：暴露在不同塑膠微粒環境中對大型蚤生殖影響實驗

(一) 環境設定

分為無塑膠微粒環境的對照組和兩種不同塑膠微粒濃度的塑膠環境組，分別為 0.01 mg/L、0.1 mg/L 塑膠微粒濃度，並置於 200 mL 燒杯中培養，環境中皆含有 185 mL 氣曝水和 15 mL 小球藻，且每日更新水體環境。每一燒杯內放入 10 隻大型蚤，整日保持每秒約十二顆氣泡的打氣量 (60~120 mL/分鐘)、控制光週期為 16 hr 光照/8 hr 黑暗。

(二) 實驗方法：

以 10 隻出生 24~48 hr 的大型蚤為起始，在上述三種環境設定中進行三重覆實驗。實驗進行中每日鏡檢觀察是否有親代大型蚤已經抱卵，若有則移至乾淨無塑膠微粒的水體環境中，確保其產下的子代不會接觸塑膠微粒，直到子代出生再將親代放回原本環境中。第一子代 (以下稱為 F1) 出生後隨機挑選 10 隻並依親代的處理組放置不同環境中；對照組子代將保持在無塑膠微粒環境中，塑膠微粒環境組的子代將分為和親代處理組中相同濃度的塑膠微粒組 (以下稱為 F1 塑膠組，F1-MP) 和回到乾淨無塑膠微粒的環境中 (以下稱為 F1 恢復組，F1-R)。

實驗過程中除了透過鏡檢觀察親代是否抱卵、蒐集親代抱卵天數，同時計算大型蚤每胎產下的子代數、觀察大型蚤子代的體長 (從頂脊柱到尾端的最長連線)、在子代大型蚤出生後七天時蒐集其族群大小計算子代存活率。

五、前導實驗二：換水頻率對大型蚤健康度影響

(一) 環境設定

設定四種環境分別為 500 mL 燒杯且兩天換水一次、500 mL 三天換水一次、500 mL 燒杯實驗終止前都不換水、1L 燒杯實驗終止前都不換水。

每種環境皆 20 隻大型蚤，每兩日餵食 50~75 μ L 的小球藻液 (細胞濃度 2×10^8 cells/mL 以上)。

(二) 實驗方法：每日進行大型蚤活動力觀察及存活率計算。

六、實驗二、暴露於塑膠微粒環境中對大型蚤的攝食量影響

(一) 環境設定

分為無塑膠微粒環境的對照組 (以下稱為對照組 C) 和四種塑粒濃度的塑粒環境組 MP，分別為含 0.01 mg/L、0.02 mg/L、0.04 mg/L 和 0.08 mg/L 塑粒濃度的 1L 水體環境，至實驗終止日前不更新水體，但仍會保持環境中小球藻含量。每一燒杯內放入 20 隻大型蚤，整日保持每秒約 12 顆氣泡的打氣量 (60~120 mL/分鐘)、在 3500 lux 下控制光週期為 16 hr 光照/ 8 hr 黑暗。

(二) 實驗方法：

在上述 5 種環境各放入 20 隻大型蚤 (出生 24~48 hr)，進行三重覆實驗。實驗進行中，每日測量 OD 值 (光學密度值，波長設定為 682 nm) 記錄環境中小球藻的細胞濃度，若發現環境中的小球藻濃度過低 ($OD \leq 0.1$)，則再補充至適當濃度 ($OD=0.35$)，確保環境中有足夠食物。每日觀察大型蚤是否有抱卵現象，依最後抱卵處理組的抱卵日期加上七天作為實驗終止日，並在當日計算燒杯中大型蚤數做為總族群大小。

伍、研究結果

一、前導實驗一：挑選培養大型蚤之水質及對塑膠微粒之適口性

(一)水質挑選

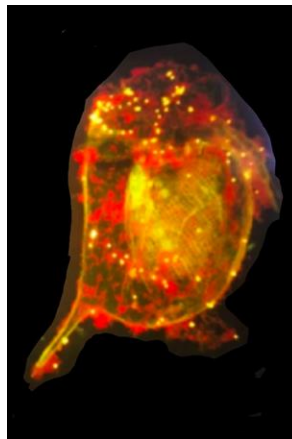
結果發現用氣曝水養殖的大型蚤活動力相較於另外兩種水質更為旺盛(表一)，且水質硬度屬於大型蚤偏好的硬度約 350 mg/L，所以最後使用氣曝水作為養殖大型蚤的環境。

表一、各水質的導電度 SPC、硬度 TDS 及 pH 值

| | 人工硬水 | 氣曝水 | 煮沸水 | 蒸餾水 |
|--------------------|-------|-------|-------|------|
| SPC ($\mu S/cm$) | 1466 | 367.8 | 22.8 | 12.9 |
| TDS (mg/L) | 955.5 | 239.2 | 14.95 | 8.45 |
| pH | 8.27 | 8.13 | 7.76 | 8.11 |

(二)大型蚤對聚苯乙烯塑膠微粒之適口性

透過 ZEISS Axio Imager 2 螢光顯微鏡鏡檢後，發現三種塑粒濃度下的大型蚤皆有攝入塑膠微粒(圖六)。

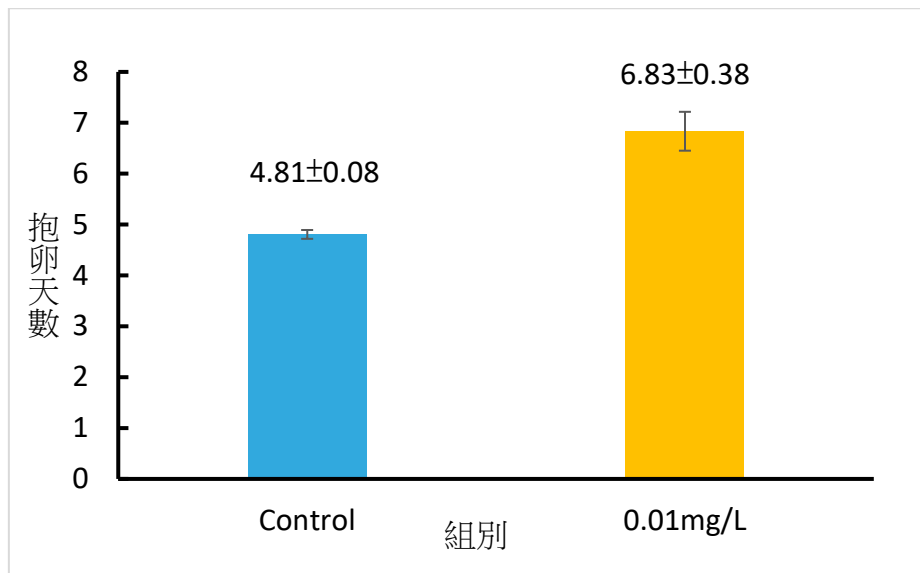


圖六：大型蚤攝入塑膠微粒(黃點為塑膠微粒，紅色為小球藻)

二、實驗一：暴露在不同塑膠微粒環境中對大型蚤生殖影響實驗

(一)暴露在塑膠微粒環境中對大型蚤從出生到抱卵所需的天數的影響

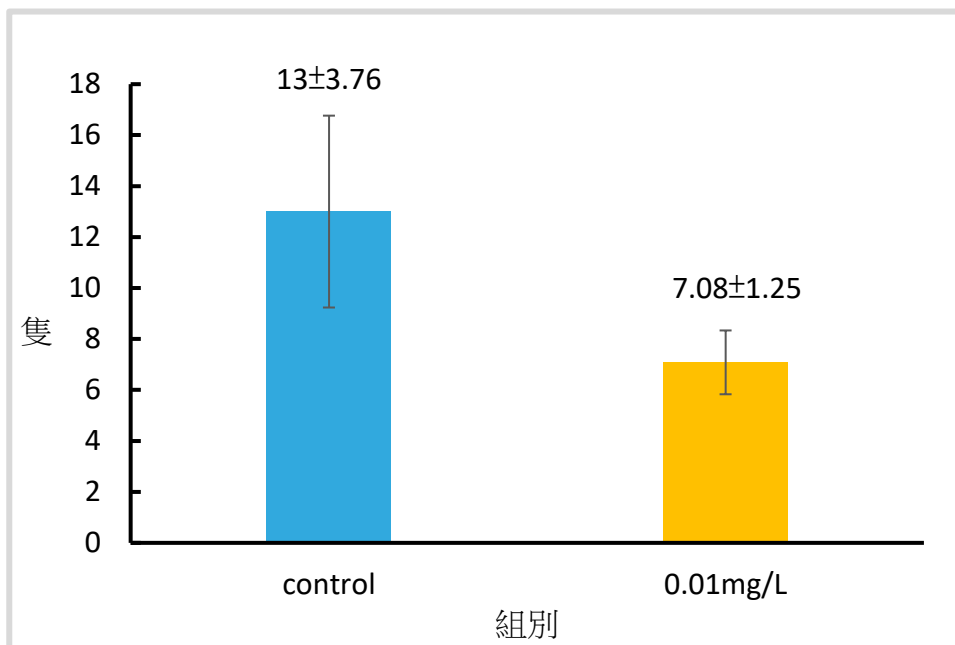
本研究將大型蚤首次抱卵的情形視為其性成熟的指標根據(圖七)，暴露在塑粒環境中的大型蚤產齡相較對照組中晚(約 6.83 天)，從出生到抱卵所需的天數有被延緩的趨勢 ($p < 0.05$)(詳見附錄六)。



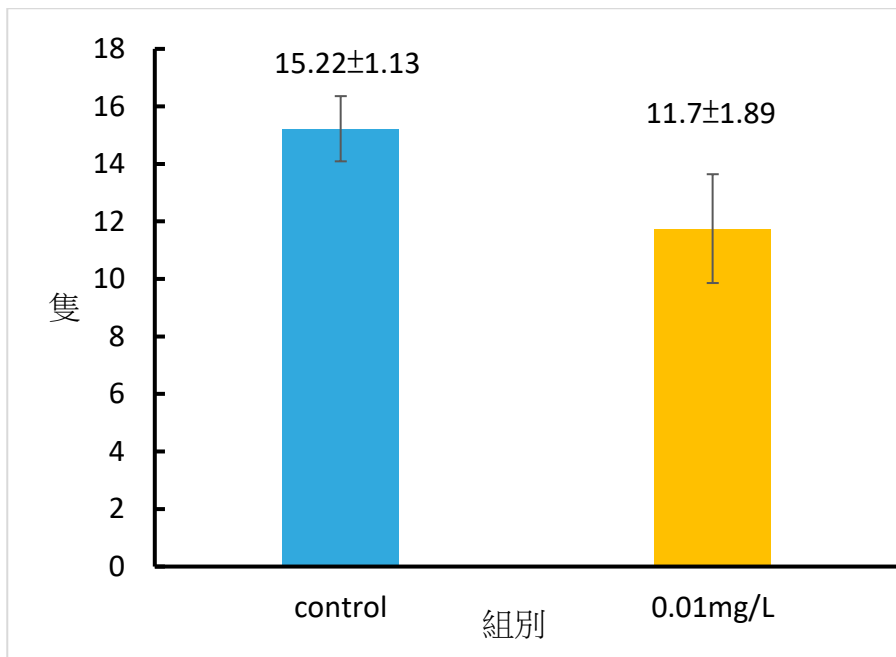
圖七、母蚤第一胎所需的抱卵天數 (Control：對照組)

(二)暴露於塑膠微粒環境中是否會影響大型蚤子代數

根據圖八，暴露在塑粒環境中的母蚤每胎平均生下的幼蚤數 (7 隻) 相較對照組 (13 隻) 中有減少的現象 ($p=0.12$) (詳見附錄六)。而根據圖九塑粒組的平均子代數 (11.8 隻) 還是少於對照組 (15.2 隻) 的平均子代數，但塑粒對母蚤平均子代數的影響在從第一胎至第二胎平均子代數有減緩的趨勢 ($p=0.32$ ，詳見附錄六)。



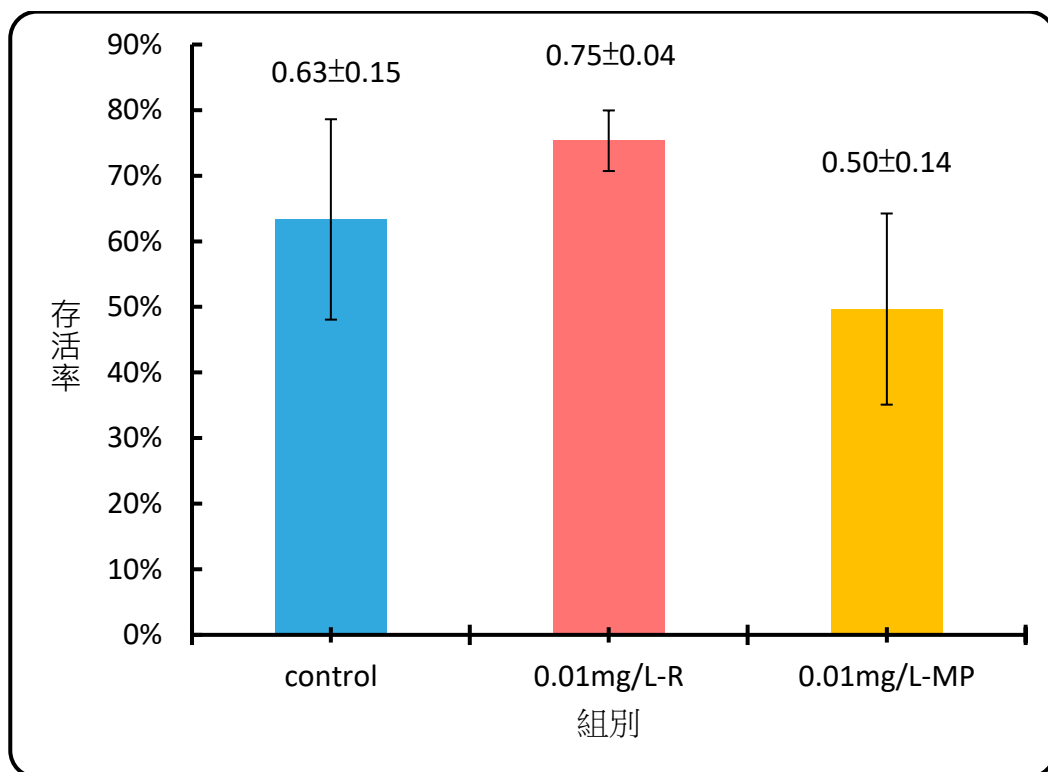
圖八、母蚤第一胎平均子代數 (Control：對照組)



圖九：母蚤第二胎平均子代數 (Control：對照組)

(三)暴露在塑膠微粒環境中是否會影響子代存活率

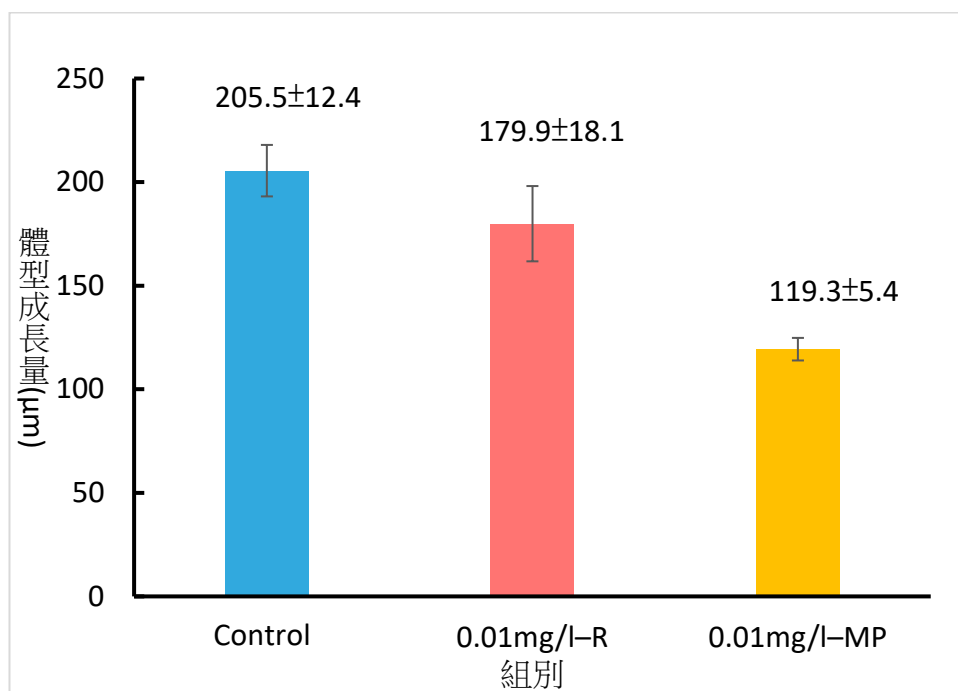
根據圖十結果顯示，塑粒組幼蚤存活率(50%)較對照組(63 %)低，但放置到恢復組的幼蚤存活率(75 %)有恢復的情形，存活率與對照組相近(p=0.97，詳見附錄六)。



圖十：母蚤第一胎子代平均存活率 (Control：對照組 0.01mg/L-R：恢復組，0.01mg/L-MP：塑粒組)

(四) 暴露在塑膠微粒環境中對體型成長量是否有抑制的趨勢

根據圖十一結果顯示，暴露在塑粒環境中的幼蚤的體型成長量($119.3 \mu\text{m}$)較對照組($205.5 \mu\text{m}$)來的低($p=0.08$ ，詳見附錄六)，而恢復組的體型成長量($179.9 \mu\text{m}$)則是高於塑粒組的體型成長量，因此有恢復的趨勢。但較對照組而言，還是能看見母蚤生活在塑粒環境中所留下的影響，體型成長量較對照組低。



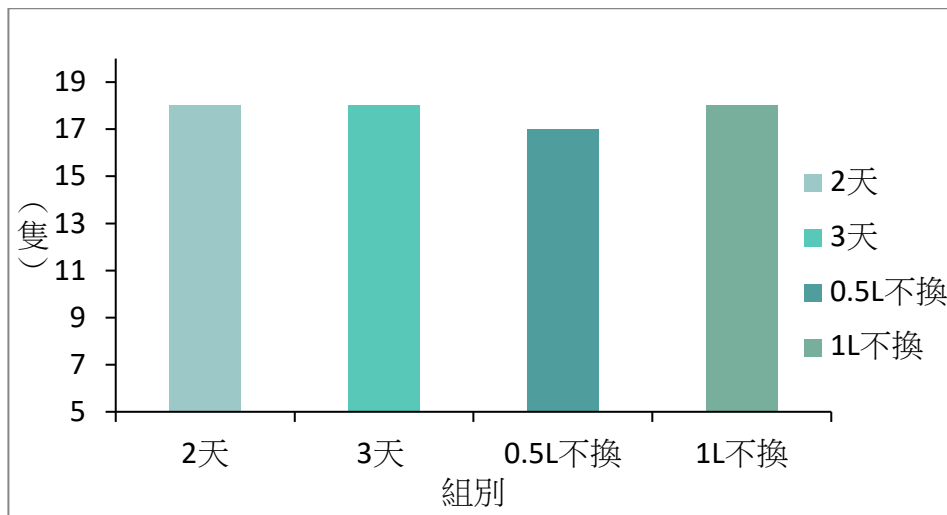
圖十一：大型蚤第一胎子代的體型成長量

(Control：對照組 0.01mg/L-R：恢復組，0.01mg/L-MP：塑粒組)

三、前導實驗二：換水頻率對大型蚤健康度影響

(一) 選擇換水頻率

在實驗進行到第 14 天時，結果顯示 1 L 不換水、500 mL 每兩天換水一次及 500 mL 每三天換水一次中的族群大小最高，在考慮實驗的操作可行性及為了降低實驗誤差我們選擇了 1 L 不換水的實驗配置來進行實驗二。

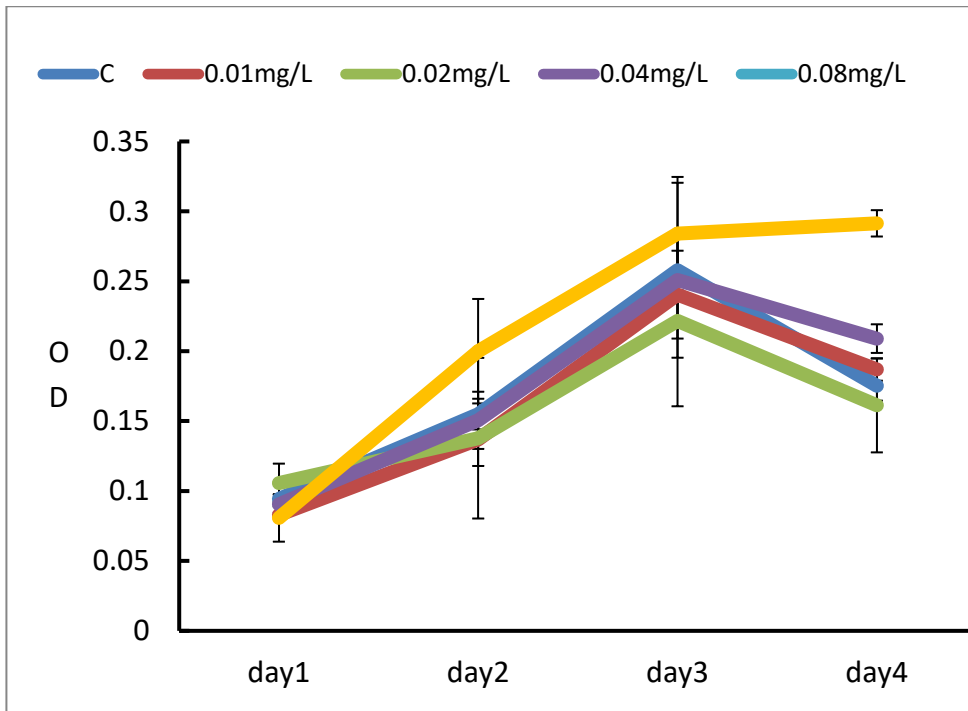


圖十二:不同換水頻率中大型蚤的族群大小

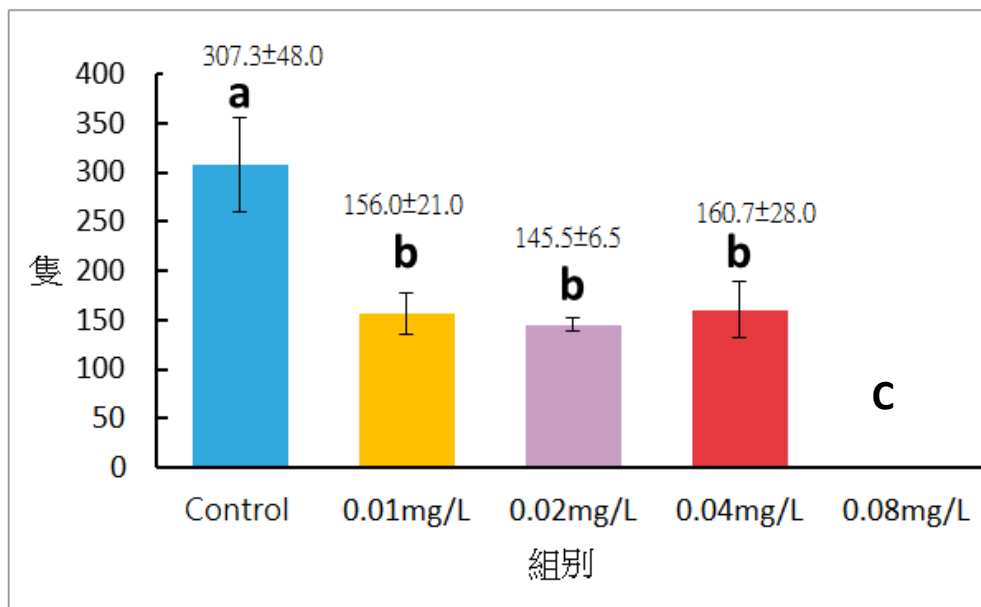
四、實驗二：暴露在不同塑膠微粒環境中對大型蚤攝食量影響

(一)暴露在不同塑膠微粒環境中對大型蚤攝食量影響

根據圖十二結果顯示，依波長 682 nm 下的 OD 值作為環境中小球藻的濃度指標，在第四日時 0.08 mg/L 組環境中的綠藻濃度(OD=0.3)與對照組、0.02 mg/L、0.01 mg/L 皆有顯著差異($p < 0.05$ ，詳見附錄六)。總族群大小根據圖十三結果顯示，在實驗中止日(第 12 天) 0.01 mg/L、0.02 mg/L、0.04 mg/L 三個組別中大型蚤的總族群大小(156、145.5、160.7 隻)皆與對照組(307.3 隻)有明顯差異($p < 0.05$ ，詳見附錄六)，總族群大小已有被抑制的現象，而 0.08 mg/L 組則是在第 7 天大型蚤皆死光(本次實驗是進行三重覆)，和其他組別間皆有明顯差異 ($p < 0.05$ ，詳見附錄六)，也就是 0.08 mg/L 為本實驗中所得塑膠微粒影響濃度閾值。



圖十三：不同塑粒濃度環境下對大型蚤生活環境中小球藻含量的影響 (C：對照組)



圖十四：不同塑粒濃度環境下對大型蚤族群大小的影響 (Control：對照組)

陸、討論

- 一、根據黑潮基金會^[1]對臺灣周遭的塑粒濃度的調查顯示：目前台灣周遭塑粒含量皆低於本研究。但其中標示為嚴重受污染的八掌溪的塑膠含量僅為 0.01mg/L，為本研究所用濃度的 1/10，且八掌溪的塑粒污染物主要為圓形塑粒，與本研究中所使用的形狀相同。又，黑潮基金會調查結果的塑粒尺寸僅含 1~5mm 的塑粒，但環境中可能存在其他大小的塑膠微粒。因此，若台灣海域的塑膠排放量持續增長，環境將愈來愈接近本實驗所設定的環境污染濃度值，並對大型蚤族群持續造成影響且破壞生態平衡。
- 二、Cole 等人(2019)指出大型蚤會避開攝食和塑粒形狀相似的藻類，減少高達 40%的藻類攝取量^[8]。且已知生態中的塑粒不但數量多且形狀也十分多元，因此我們認為此現象會造成大型蚤攝食降低進而對其族群造成影響。
- 三、本研究中暴露於塑粒環境的試驗生物，除了大型蚤外還有作為食物來源的小球藻。小球藻雖然並非本實驗中研究生物，但已有研究顯示有部分藻類生長受塑粒影響，在PVC(聚氯乙烯)跟PP(聚丙烯)的暴露中，都會有藻類葉綠素a被抑制的現象。以及在PVC中，藻類光合作用受到抑制；同時，也有部分藻類在塑粒中成長，有正向的影響(Wu et. al., 2019)^[9]。但，本研究的實驗中皆有提供足量藻液，因此不考慮塑粒對小球藻的影響。
- 四、為了觀察到大型蚤性成熟的時間，本研究將抱卵的第一天視為性成熟的參數。在實驗一數據中發現，0.1 mg/L 塑粒環境組中的大型蚤在未開始抱卵前就全數死亡了。而且，0.01 mg/L 塑粒環境組的開始抱卵天數則是分佈在 6~7 天，相較於對照組中分佈在 4~5 天的開始抱卵天數，有被延緩的趨勢(圖七)，本研究推測暴露在塑粒環境中的大型蚤會有性成熟時間延緩的現象。
- 五、為了觀察暴露在塑粒環境中的母蚤所誕下的子代數是否有減少的現象，選擇將第一胎及第二胎的子代數作為參數，發現在塑粒環境中第一胎(7 隻)及第二胎(11 隻)數量相較於對照組 (13~15 隻)都比較低，而其中第二胎的子代數(11 隻)相較於第一胎的子代數(7 隻)又都有成長的情形 (圖八、九)，其中塑粒組的增加趨勢明顯比對照組大，兩處理組的差異減緩，推測是在母蚤待產期間將其移至乾淨環境中所造成的恢復。
- 六、為了觀察暴露在塑粒環境下的母蚤所誕下的幼蚤存活情形，在子代出生後七天觀察其存活率，發現對照組 (63 %) 及恢復組 (75 %) 的子代存活率相較於塑粒組高 (50 %) (圖十)，本研究推測暴露在塑粒環境中會造成大型水蚤子代數存活率降低。
- 七、在體型成長量這項數據中發現塑粒組的幼蚤體型成長量 (119.3 μm)為最低，恢復組(179.9 μm)次之，對照組最高(205.5 μm) (圖十一)。所以，可以推測暴露在塑粒環境中會抑制

大型蚤的生長情形，而放回到恢復組中，大型蚤雖未完全恢復，但已有成長恢復的現象。也就是說，大型蚤對塑粒低濃度影響下，會有一定的忍受，會有一定的調適。

八、塑粒對於大型蚤的物性、化性方面的成長影響的探討：

- (一) 實驗一中數據顯示暴露在塑粒環境下會延遲大型蚤的抱卵天數並降低其子代的體型成長量及存活率，我們認為除了在塑粒環境下會抑制大型蚤的攝食量，在化性方面的影響，Zhang 等人(2019)^[6]透過蛋白質組分析，發現聚苯乙烯塑膠微粒會增加大型蚤細胞合成的次數並減少能量的儲存，進而導致大型蚤存活率和繁殖力下降，因此塑膠微粒的影響，不只在物性上會抑制大型蚤攝食量，也可能在化性方面對其細胞、基因造成破壞。
- (二) 聚苯乙烯塑粒結構上含有苯環，因此是否會對大型蚤在化性方面造成的影響呢？在自然環境中的塑膠，常會吸附環境賀爾蒙或溶出塑化劑，進而對生物體並造成嚴重的傷害。本研究在結果上僅可以看到塑粒本身的大小，就可能造成大型蚤攝食量降低的情形，而實驗過程中是否有化學成份的溶出，還需進一步的定性與定量分析。
- (三) 透過實驗二，發現在 0.01 mg/L、0.02 mg/L、0.04 mg/L 塑粒濃度下的大型蚤族群數相較於對照組都有減少的現象，但三者之間濃度與族群大小並沒有線性相關；而塑粒濃度到了 0.08 mg/L，則在第七天大型蚤全部死光(圖十三)。所以，本研究認為塑粒會在物性方面對大型蚤造成影響，且在 0.04 mg/L 及 0.08 mg/L 塑粒濃度之間有存在一個閾值(Threshold)，超過閾值會使大型蚤族群全數死亡。
- (四) 在實驗二中，在 0.08 mg/L 塑粒濃度下的環境 OD 值相較於其他塑粒濃度是高出許多的(圖十二)，因此我們認為在 0.08 mg/L 塑粒濃度下的大型蚤的攝食量相較於其他塑粒濃度是偏低的。故可推測是在高塑粒濃度下的大型蚤的攝食量有被抑制的現象，而在 0.04 mg/L 及 0.08 mg/L 塑粒濃度之間存在閾值，此項結果也能解釋實驗一中的 0.1 mg/L 塑粒濃度及實驗二中的 0.08 mg/L 塑粒濃度中大型蚤全數死亡，進而推測實驗一中所觀測到大型蚤性成熟時間被延遲及子代體型成長量降低可能是因為攝食量降低而導致的結果。

九、塑膠微粒相關的研究之探討

- (一) Martins 等人(2018)^[4]所進行實驗的溫度控制是在攝氏 20±1 度，提供直徑 1~5 μm 的塑膠微粒，結果顯示大型蚤在 0.1 mg/L 塑粒環境中可存活三個世代；在本研究則是靜置於開放環境中，模擬野外隨著天氣變動的環境，並提供直徑 6~8 μm 的塑膠

微粒，最終結果顯示在塑粒濃度 0.08 mg/L 中的母蚤在有抱卵能力前就已全數死亡。比較兩者進而推測在溫度波動較大的環境中可能會降低大型蚤存活率。

(二) 在實驗中我們所使用的塑粒會累積在大型蚤的腸道內也有相關文獻針對塑粒的排出做研究(De Felice et al., 2019)^[7]。因此我們推測是這項原因而造成大型蚤的攝食量下降，進而導致大型蚤存活率降低。

十、實驗一中數據顯示暴露在塑粒環境下會延遲大型蚤的抱卵天數並降低其子代的體型成長量及存活率，我們認為除了在塑粒環境下會抑制大型蚤的攝食量。在化性方面的影響，Zhang 等人(2019)^[6]透過蛋白質組分析，發現聚苯乙烯塑膠微粒會增加大型蚤細胞合成的次數並減少能量的儲存，進而導致大型蚤存活率和繁殖力下降，因此塑膠微粒的影響，不只在物性上會抑制大型蚤攝食量，也可能在化性方面對其細胞、基因造成破壞。

柒、結論

- 一、塑膠微粒會造成大型蚤育卵年齡延遲、平均子代數、體長成長量及子代存活率下降。
- 二、暴露在塑粒環境中的親代所產下的子代成長於無塑環境中會有恢復的現象。
- 三、在暴露於聚苯乙烯塑膠微粒環境(0.08 mg/L)中會影響大型蚤的進食效率。

捌、參考資料

1. 黑潮基金會(Kuroshio Ocean Education Foundation, Taiwan) , 2019。島航計畫 塑膠微粒成果分析。
2. 魏印心和胡鴻鈞, 中國淡水藻類——系統、分類及生態, 科學出版 2006
3. Ebert, D., 2005. Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in *Daphnia*. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information.
4. Martins, A., & Guilhermino, L, 2018. Transgenerational effects and recovery of microplastics exposure in model populations of the freshwater cladoceran *Daphnia magna* Straus. *Science of The Total Environment*, 631, 421-428.
5. Richardson, S.D., & Ternes, T.A., 2018. Water analysis: emerging contaminants and current issues, *Anal. Chem.*, 90(1), 398-428.
6. Zhang, C. Jeong, C.B., Lee, J.S., Wang, D.Z. & Wang, M.H., 2019. Transgenerational Proteome Plasticity in Resilience of a Marine Copepod in Response to Environmentally Relevant Concentrations of Microplastics. *Environ. Sci. Technol.* 53(14), 8426-8436.
7. De Felice, B., Valentina Sabatini, S., Antenucci, S., Gattoni, G., Santo, N., Bacchetta, R., Ortenzi, M.A., & Parolini, M. 2019. Polystyrene Microplastics Ingestion Induced Behavioral Effects to the Cladoceran *Daphnia Magna*. *Chemosphere* 231, 423-431.
8. Cole, M., Coppock, R., Lindeque, P.K., Altin, D. Reed, S. Pond, D.W. Sorensen, L. Galloway, T.S. & Booth, A.M. 2019. Effects of Nylon Microplastic on Feeding, Lipid Accumulation, and Moulting in a Coldwater Copepod. *Environ. Sci. Technol.* 53(12), 7075-7082.
9. Wu, Y., Guo, P. Zhang, X. Zhang, Y., Xie, S. & Deng, J., 2019. Effect of microplastics exposure on the photosynthesis system of freshwater algae. *J. Hazardous Materials* 374, 219-227.

玖、附錄

附錄一、大型蚤抱卵天數

| 產齡 | | | | | | |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 產齡 | 第一隻 | 第二隻 | 第三隻 | 第四隻 | 第五隻 | 第六隻 |
| 甲對照組 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | N/A |
| 乙對照組 | 4 | 5 | 5 | 5 | N/A | N/A |
| 丙對照組 | 4 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 甲1X | 7 | 7 | 7 | 7 | 8 | 9 |
| 乙1X | 7 | 7 | 7 | 7 | N/A | N/A |
| 丙1X | 6 | 6 | 6 | N/A | N/A | N/A |
| 甲10X | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A |
| 乙10X | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A |
| 丙10X | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A |

附錄二、大型蚤子代數

| 子代數 | F1-1單隻母蚤平均生產量 | F1-2單隻母蚤平均生產量 | F1+F2 |
|------|---------------|---------------|-------------|
| 對照組甲 | 11.25 | 16 | 27.25 |
| 對照組乙 | 21.25 | 17 | 38.25 |
| 對照組丙 | 6.5 | 12.67 | 19.17 |
| AVE | 13 | 15.22333333 | 28.22333333 |
| 1X甲 | 9.5 | 14.75 | 24.25 |
| 1X乙 | 7.25 | 7.5 | 14.75 |
| 1X丙 | 4.5 | 13 | 17.5 |
| AVE | 7.083333333 | 11.75 | 18.83333333 |
| 10X甲 | N/A | | |
| 10X乙 | N/A | | |
| 10X丙 | N/A | | |

附錄三、大型蚤子代存活率 (MP 塑粒、R 恢復)

| 存活率 | F0存活率/10隻 13 days 後 | F1-1存活率(0609-b1) | | |
|------|------------------------|------------------|------|------|
| | | 6days | | |
| 三重覆 | | | MP | R |
| 對照組甲 | 4 | 5/10 | N/A | N/A |
| 對照組乙 | 4 | 8/10 | N/A | N/A |
| 對照組丙 | 6 | 6/10 | N/A | N/A |
| 1倍甲 | 4 | | 6/10 | 7/10 |
| 1倍乙 | 4 | | 5/9 | 7/9 |
| 1倍丙 | 1 | | 3/9 | 7/9 |

附錄四、大型蚤子代體型成長量

| | | | date | 初1 | 初2 | 初3 | 初4 | 初5 | 初6 | 初7 | 初8 | 初始平均 | 標準差 |
|---|----|----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------|--------|
| 甲 | C | - | 609 | 3.8 | 3 | 3 | 3.5 | 3.5 | 3.5 | 3 | 3.5 | 3.288 | 0.2846 |
| 甲 | 1X | MP | 609 | 4 | 3.5 | 3.5 | 4 | 3.5 | - | - | - | 3.700 | 0.2236 |
| 甲 | 1X | R | 609 | 3.5 | 3.8 | 3 | 3.2 | 3.8 | 3.5 | - | - | 3.300 | 0.2236 |
| 乙 | C | - | 609 | 2.5 | 2.3 | 3.5 | 3 | 3.2 | 2.5 | 3 | - | 2.917 | 0.4031 |
| 乙 | 1X | MP | 609 | 2.8 | 3 | 3.8 | 3.8 | 3.8 | 2.9 | 3.7 | 3.8 | 2.917 | 0.4031 |
| 乙 | 1X | R | 609 | 3.8 | 3.8 | 3 | 3 | 3.6 | 2.9 | 3.8 | 3.3 | 2.917 | 0.4031 |
| 丙 | C | - | 609 | 4 | 2.3 | 3.2 | 3.8 | 3.5 | 4 | 2 | - | 3.133 | 0.7519 |
| 丙 | 1X | MP | 609 | 2.8 | 3.2 | 3.4 | 2.8 | 3 | 3.2 | 3.3 | 3.6 | 3.133 | 0.7519 |
| 丙 | 1X | R | 609 | 2.9 | 3 | 3 | 3.2 | 3 | 3 | 3 | 3.2 | 3.133 | 0.7519 |

(1 unit = 25um)

| | | | date | 結1 | 結2 | 結3 | 結4 | 結5 | 結6 | 結7 | 結8 | 結束平均 | 標準差 |
|---|----|----|------|-----|------|------|-----|----|----|------|----|--------|--------|
| 甲 | C | - | 609 | 12 | 9 | 11 | 13 | 10 | - | - | - | 11.000 | 1.4142 |
| 甲 | 1X | MP | 609 | 11 | 9 | 10 | 7.5 | 9 | 9 | 8 | - | 9.071 | 1.0833 |
| 甲 | 1X | R | 609 | 9 | 12 | 10 | 13 | 12 | 11 | 10 | 11 | 11.000 | 1.2247 |
| 乙 | C | - | 609 | 12 | 10 | 11 | 10 | 10 | 11 | 9 | 11 | 10.500 | 0.8660 |
| 乙 | 1X | MP | 609 | 9.5 | 9 | 9 | 7.5 | - | - | - | - | 8.750 | 0.7500 |
| 乙 | 1X | R | 609 | 9 | 10.5 | 9.5 | 8.5 | 11 | 10 | 10.5 | - | 9.857 | 0.8330 |
| 丙 | C | - | 609 | 16 | 11 | 12 | 11 | - | - | - | - | 12.500 | 2.0616 |
| 丙 | 1X | MP | 609 | 6 | 6.5 | 7 | 5.5 | - | - | - | - | 6.250 | 0.5590 |
| 丙 | 1X | R | 609 | 10 | 9.5 | 10.5 | 9.5 | 11 | 10 | - | - | 10.083 | 0.5336 |

(1 unit = 25um)

附錄五、環境中小球藻含量與大型蚤族群大小

| | c | 1 | 2 | 4 | 8 |
|------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| A | OD AVG | OD AVG | OD AVG | OD AVG | OD AVG |
| 191129 | 0.0933 | 0.0813 | 0.1187 | 0.0913 | 0.0587 |
| 191130 | 0.1530 | 0.1107 | 0.1503 | 0.1247 | 0.2527 |
| 191201 old | 0.2503 | 0.2473 | 0.1027 | 0.2273 | 0.3357 |
| 191201 ne | 0.1697 | 0.1913 | 0.1357 | 0.2227 | 0.2890 |
| 191202 | 0.2240 | 0.2167 | 0.1550 | 0.2550 | 0.3277 |
| 191203 | 0.1773 | 0.1610 | 0.1330 | 0.3103 | 0.2787 |
| 191204 | 0.0260 | 0.0207 | 0.0743 | 0.0317 | 0.3400 |
| 191129 | 0.0983 | 0.0850 | 0.0887 | 0.0920 | 0.1000 |
| 191130 | 0.1693 | 0.1450 | 0.0620 | 0.1523 | 0.1773 |
| 191201 old | 0.3380 | 0.2750 | 0.0837 | 0.2270 | 0.2770 |
| 191201 ne | 0.1903 | 0.1757 | 0.1393 | 0.2063 | 0.2813 |
| 191202 | 0.2957 | 0.1657 | 0.1560 | 0.2220 | 0.2107 |
| 191203 | 0.2007 | 0.1520 | 0.2000 | 0.2347 | 0.1200 |
| 191204 | 0.0263 | 0.0137 | 0.1500 | 0.0190 | 0.0117 |
| 191129 | 0.0913 | 0.0823 | 0.1177 | 0.0880 | 0.0837 |
| 191130 | 0.1427 | 0.1547 | 0.2010 | 0.1747 | 0.1700 |
| 191201 old | 0.1853 | 0.1990 | 0.2217 | 0.2983 | 0.2370 |
| 191201 ne | 0.1660 | 0.1937 | 0.2087 | 0.1980 | 0.3040 |
| 191202 | 0.1917 | 0.1460 | 0.1973 | 0.2363 | 0.2070 |
| 191203 | 0.2123 | 0.2153 | 0.2053 | 0.1743 | 0.1790 |
| 191204 | 0.0713 | 0.0967 | 0.0600 | 0.0170 | 0.0575 |

| | c | | | 1X | | | 2X | | | 4X | | | 8X | | |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| A | od1 | od2 | od3 | od1 | od2 | od3 | od1 | od2 | od3 | od1 | od2 | od3 | od1 | od2 | od3 |
| 191129 | 0.098 | 0.087 | 0.095 | 0.091 | 0.083 | 0.070 | 0.115 | 0.121 | 0.120 | 0.090 | 0.093 | 0.091 | | 0.085 | 0.091 |
| 191130 | 0.153 | 0.157 | 0.149 | 0.099 | 0.117 | 0.116 | 0.156 | 0.148 | 0.147 | 0.133 | 0.122 | 0.119 | 0.231 | 0.218 | 0.309 |
| 191201 ok | 0.257 | 0.252 | 0.242 | 0.242 | 0.249 | 0.251 | 0.153 | | 0.155 | 0.238 | 0.202 | 0.242 | 0.338 | 0.340 | 0.329 |
| 191202 | 0.239 | 0.208 | 0.225 | 0.209 | 0.225 | 0.216 | 0.171 | 0.146 | 0.148 | 0.252 | 0.253 | 0.260 | 0.329 | 0.331 | 0.323 |
| 191203 | 0.155 | 0.169 | 0.208 | 0.161 | 0.165 | 0.157 | 0.141 | 0.137 | 0.121 | 0.341 | 0.318 | 0.272 | 0.279 | 0.256 | 0.301 |
| 191204 | 0.029 | 0.019 | 0.030 | 0.016 | 0.018 | 0.028 | 0.024 | 0.142 | 0.057 | 0.011 | 0.013 | 0.071 | 0.450 | 0.330 | 0.240 |
| B | od1 | od2 | od3 | od1 | od2 | od3 | od1 | od2 | od3 | od1 | od2 | od3 | od1 | od2 | od3 |
| 191129 | 0.085 | 0.100 | 0.110 | 0.090 | 0.080 | 0.085 | 0.090 | 0.097 | 0.079 | 0.092 | 0.086 | 0.098 | 0.110 | 0.090 | 0.100 |
| 191130 | 0.170 | 0.166 | 0.172 | 0.147 | 0.135 | 0.153 | 0.058 | 0.075 | 0.053 | 0.177 | 0.145 | 0.135 | 0.178 | 0.173 | 0.181 |
| 191201 ok | 0.347 | 0.332 | 0.335 | 0.289 | 0.281 | 0.275 | 0.124 | | 0.127 | 0.227 | 0.237 | 0.217 | 0.260 | 0.320 | 0.251 |
| 191202 | 0.293 | 0.312 | 0.282 | 0.163 | 0.171 | 0.163 | 0.168 | 0.158 | 0.142 | 0.217 | 0.209 | 0.240 | 0.224 | 0.211 | 0.197 |
| 191203 | 0.169 | 0.214 | 0.219 | 0.139 | 0.166 | 0.151 | 0.168 | 0.230 | 0.202 | 0.290 | 0.220 | 0.194 | 0.130 | 0.120 | 0.110 |
| 191204 | 0.049 | 0.010 | 0.020 | 0.008 | 0.015 | 0.018 | 0.183 | 0.096 | 0.171 | 0.022 | 0.005 | 0.030 | 0.032 | 0.003 | 0.000 |
| C | od1 | od2 | od3 | od1 | od2 | od3 | od1 | od2 | od3 | od1 | od2 | od3 | od1 | od2 | od3 |
| 191129 | 0.090 | 0.090 | 0.094 | 0.077 | 0.090 | 0.080 | 0.123 | 0.110 | 0.120 | 0.083 | 0.085 | 0.096 | 0.086 | 0.080 | 0.085 |
| 191130 | 0.138 | 0.141 | 0.149 | 0.164 | 0.152 | 0.148 | 0.196 | 0.199 | 0.208 | 0.183 | 0.169 | 0.172 | 0.163 | 0.170 | 0.177 |
| 191201 ok | 0.184 | 0.182 | 0.190 | 0.199 | 0.213 | 0.185 | 0.201 | 0.211 | 0.253 | 0.309 | 0.290 | 0.296 | 0.230 | 0.237 | 0.244 |
| 191202 | 0.221 | 0.190 | 0.164 | 0.127 | 0.156 | 0.155 | 0.212 | 0.187 | 0.193 | 0.206 | 0.263 | 0.240 | 0.221 | 0.198 | 0.202 |
| 191203 | 0.233 | 0.228 | 0.176 | 0.201 | 0.198 | 0.247 | 0.181 | 0.227 | 0.208 | 0.173 | 0.140 | 0.210 | 0.150 | 0.130 | 0.257 |
| 191204 | 0.074 | 0.044 | 0.096 | 0.083 | 0.109 | 0.098 | 0.080 | 0.041 | 0.059 | 0.013 | 0.002 | 0.036 | 0.115 | 0.071 | |

附錄六、ANOVA 分析

附錄六之一

| 第一次育卵天數 * | | | 單因子變異數分析 | | | | | | | | |
|-----------|------|-----|----------|----------|-------|----------|----------|---------|----------|--|--|
| c | 1 | | | | | | | | | | |
| 甲 | 5 | 7.5 | | | | | | | | | |
| 乙 | 4.75 | | 摘要 | | | | | | | | |
| 丙 | 4.67 | 6 | 組 | 個數 | 總和 | 平均 | 變異數 | | | | |
| | | | c | 3 | 14.42 | 4.806667 | 0.029633 | | | | |
| | | | 1 | 2 | 13.5 | 6.75 | 1.125 | | | | |
| | | | ANOVA | | | | | | | | |
| | | | 變源 | SS | 自由度 | MS | F | P-值 | 臨界值 | | |
| | | | 組間 | 4.531853 | 1 | 4.531853 | 11.48015 | 0.04283 | 10.12796 | | |
| | | | 組內 | 1.184267 | 3 | 0.394756 | | | | | |
| | | | 總和 | 5.71612 | 4 | | | | | | |

有顯著差異
P<0.05

附錄六之二

| F1平均子代數 | | | 單因子變異數分析 | | | | | | | | |
|---------|-------|------|----------|----------|-------|----------|----------|----------|----------|--|--|
| 對照組 | 1 | | | | | | | | | | |
| 甲 | 11.25 | 9.5 | | | | | | | | | |
| 乙 | 21.25 | 7.25 | | | | | | | | | |
| 丙 | | 4.5 | 摘要 | | | | | | | | |
| | | | 組 | 個數 | 總和 | 平均 | 變異數 | | | | |
| | | | 對照組 | 2 | 32.5 | 16.25 | 50 | | | | |
| | | | 1 | 3 | 21.25 | 7.083333 | 6.270833 | | | | |
| | | | ANOVA | | | | | | | | |
| | | | 變源 | SS | 自由度 | MS | F | P-值 | 臨界值 | | |
| | | | 組間 | 100.8333 | 1 | 100.8333 | 4.836775 | 0.115251 | 10.12796 | | |
| | | | 組內 | 62.54167 | 3 | 20.84722 | | | | | |
| | | | 總和 | 163.375 | 4 | | | | | | |

無顯著差異

附錄六之三

| F2平均子代數 | | | 單因子變異數分析 | | | | | | |
|---------|-------|-------|----------|----------|-------|----------|----------|----------|----------|
| 對照組 | | 1 | | | | | | | |
| 甲 | 16 | 14.75 | | | | | | | |
| 乙 | 17 | 7.5 | | | | | | | |
| 丙 | 12.67 | 13 | | | | | | | |
| | | | 摘要 | | | | | | |
| | | | 組 | 個數 | 總和 | 平均 | 變異數 | | |
| | | | 16 | 2 | 29.67 | 14.835 | 9.37445 | | |
| | | | 14.75 | 2 | 20.5 | 10.25 | 15.125 | | |
| 無顯著差異 | | | | | | | | | |
| | | | ANOVA | | | | | | |
| | | | 變源 | SS | 自由度 | MS | F | P-值 | 臨界值 |
| | | | 組間 | 21.02223 | 1 | 21.02223 | 1.716139 | 0.320436 | 18.51282 |
| | | | 組內 | 24.49945 | 2 | 12.24973 | | | |
| | | | 總和 | 45.52168 | 3 | | | | |

附錄六之四

| 子代存活率 | | | 單因子變異數分析 | | | | | | |
|-------|-------|-------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 對照組 | F1-恢復 | F1-塑粒 | | | | | | | |
| 0.633 | 0.753 | 0.497 | | | | | | | |
| 0.153 | 0.046 | 0.146 | | | | | | | |
| | | | 摘要 | | | | | | |
| | | | 組 | 個數 | 總和 | 平均 | 變異數 | | |
| | | | 對照組 | 2 | 0.786086 | 0.393043 | 0.115479 | | |
| | | | F1-恢復 | 2 | 0.799521 | 0.399761 | 0.250027 | | |
| 無顯著差異 | | | F1-塑粒 | 2 | 0.642383 | 0.321192 | 0.061583 | | |
| | | | ANOVA | | | | | | |
| | | | 變源 | SS | 自由度 | MS | F | P-值 | 臨界值 |
| | | | 組間 | 0.007587 | 2 | 0.003794 | 0.026647 | 0.973932 | 9.552094 |
| | | | 組內 | 0.427089 | 3 | 0.142363 | | | |
| | | | 總和 | 0.434676 | 5 | | | | |

附錄六之五

| 體長 | | | 單因子變異數分析 | | | | | | |
|-------|---------|---------|----------|----------|---------|----------|----------|----------|----------|
| c | 1 | 2 | | | | | | | |
| 甲 | 192.825 | 134.275 | 193.825 | | | | | | |
| 乙 | 191.05 | 132.5 | 161.425 | | | | | | |
| 丙 | 181.075 | 77.2 | 176.15 | | | | | | |
| | | | 摘要 | | | | | | |
| | | | 組 | 個數 | 總和 | 平均 | 變異數 | | |
| | | | 192.825 | 2 | 372.125 | 186.0625 | 49.75031 | | |
| | | | 134.275 | 2 | 209.7 | 104.85 | 1529.045 | | |
| 無顯著差異 | | | 193.825 | 2 | 337.575 | 168.7875 | 108.4128 | | |
| | | | ANOVA | | | | | | |
| | | | 變源 | SS | 自由度 | MS | F | P-值 | 臨界值 |
| | | | 組間 | 7321.266 | 2 | 3660.633 | 6.508918 | 0.081054 | 9.552094 |
| | | | 組內 | 1687.208 | 3 | 562.4027 | | | |
| | | | 總和 | 9008.475 | 5 | | | | |

附錄六之六

| 總族群數 | C | 1X | 2X | 4X | 8X | |
|----------|-----------|-----|-----------|-----------|-------------|-----------|
| | 260 | 177 | 152 | 129 | | 0 |
| | 306 | 135 | 139 | 182 | | 0 |
| | 356 | | | 171 | | 0 |
| 單因子變異數分析 | | | | | | |
| 摘要 | | | | | | |
| 組 | 個數 | 總和 | 平均 | 變異數 | | |
| C | 3 | 922 | 307.33333 | 2305.3333 | | |
| 1X | 2 | 312 | 156 | 882 | | |
| 2X | 2 | 291 | 145.5 | 84.5 | | |
| 4X | 3 | 482 | 160.66667 | 782.33333 | | |
| 8X | 3 | 0 | 0 | 0 | | |
| ANOVA | | | | | | |
| 變源 | SS | 自由度 | MS | F | P-值 | 臨界值 |
| 組間 | 141965.24 | 4 | 35491.311 | 39.755967 | 2.53074E-05 | 3.8378534 |
| 組內 | 7141.8333 | 8 | 892.72917 | | | |
| 總和 | 149107.08 | 12 | | | | |

附錄六之七

| D4 | b | b | b | b | a | |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|---------|
| | c | 1 | 2 | 4 | 8 | |
| | 0.1697 | 0.1913 | 0.1357 | 0.2227 | 0.2890 | |
| | 0.1903 | 0.1757 | 0.1393 | 0.2063 | 0.2813 | |
| | 0.1660 | 0.1937 | 0.2087 | 0.1980 | 0.3040 | |
| 單因子變異數分析 | | | | | | |
| 摘要 | | | | | | |
| 組 | 個數 | 總和 | 平均 | 變異數 | | |
| c | 3 | 0.526 | 0.175333 | 0.000172 | | |
| 1 | 3 | 0.560667 | 0.186889 | 9.58E-05 | | |
| 2 | 3 | 0.483667 | 0.161222 | 0.001692 | | |
| 4 | 3 | 0.627 | 0.209 | 0.000157 | | |
| 8 | 3 | 0.874333 | 0.291444 | 0.000133 | | |
| ANOVA | | | | | | |
| 變源 | SS | 自由度 | MS | F | P-值 | 臨界值 |
| 組間 | 0.031839 | 4 | 0.00796 | 17.68923 | 0.000157 | 3.47805 |
| 組內 | 0.0045 | 10 | 0.00045 | | | |
| 總和 | 0.036339 | 14 | | | | |

【評語】 052609

本作品以塑粒及小球藻餵食大型蚤(*Daphnia magna*)，以螢光顯微鏡觀察大型蚤腸道並監測小球藻濃度以推測大型蚤攝食情形，並監測新生水蚤個體數。研究結果顯示塑膠微粒會造成大型蚤育卵年齡延遲、平均子代數、體長成長量及子代存活率下降；暴露在塑粒環境中的親代所產下的子代成長於無塑環境中會有恢復的現象；在暴露於聚苯乙烯塑膠微粒環境(0.08 mg/L)中會影響大型蚤的進食效率。本研究架構合理明確，整體研究品質極優，與資源循環概念，有助於提升資源效益與環境保護的目的。

摘要

塑膠微粒遍佈在淡水生態系中^[1]，而生物攝入塑膠微粒是否會對它的生存造成威脅？

本研究以塑膠微粒及小球藻(*Chlorella* sp.) 餵食大型蚤(*Daphnia magna*)，透過螢光顯微鏡及監測培養環境中小球藻細胞濃度來觀察大型蚤攝食情形，並觀察大型蚤個體數以利研究塑膠對大型蚤生殖之影響。

研究發現大型蚤確實會在濾食時攝入塑膠微粒，且在水體含0.08 mg/L塑膠環境下大型蚤親代攝食量顯著減少。在0.01 mg/L的塑膠環境下親代開始抱卵天數有延長，且第一子代個體數減少、存活率降低、體長減少。若子代出生即放回無塑環境，其生長情形有恢復趨勢。

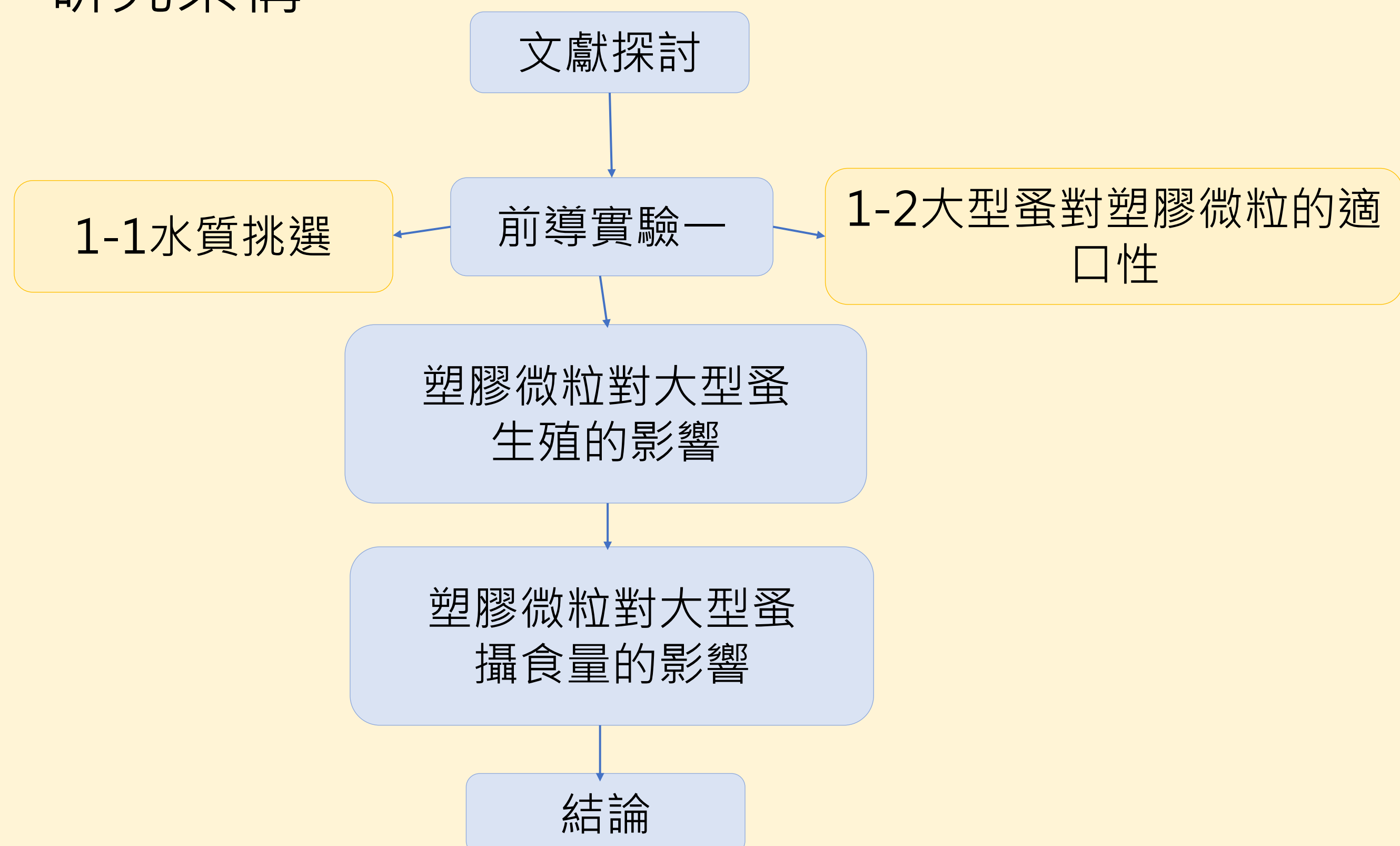
在0.01 mg/L的塑膠濃度下，族群大小有顯著減少，且在0.08 mg/L濃度下的大型蚤在第六天全部死亡。因此，本研究推測塑膠微粒會對大型蚤的生殖及生長確實有影響。

研究目的

- 一、暴露於塑膠微粒環境中是否會對大型蚤的生殖造成影響？
- 二、暴露於塑膠微粒環境中是否會影響大型蚤攝食量？
- 三、將塑膠微粒環境中的母蚤產下的子代移至乾淨環境中是否會使子代恢復？

研究方法/研究結果與討論

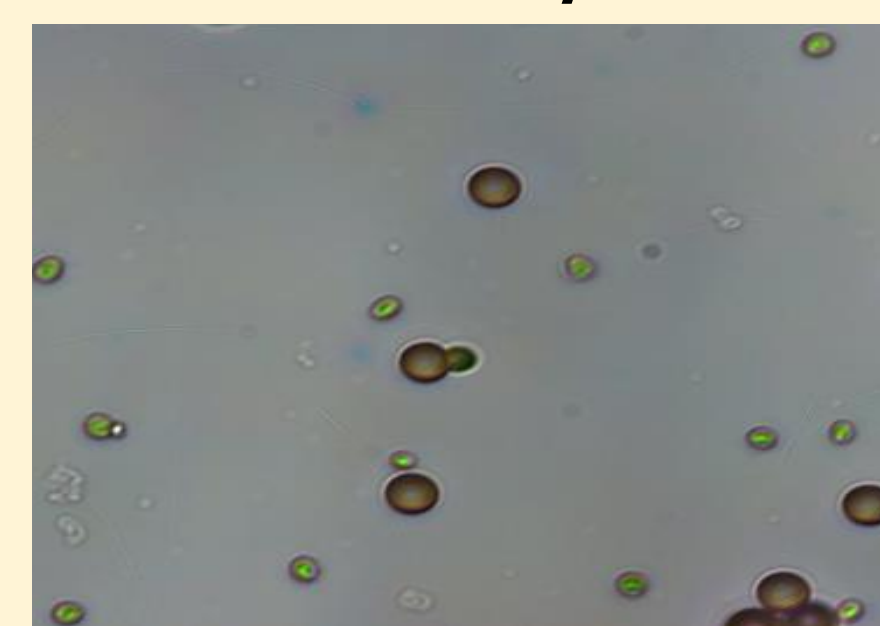
一、研究架構



二、實驗材料



圖一、大型蚤(*Daphnia magna*)



圖二、小球藻(*Chlorella* sp.) 與塑膠微粒(紅色，直徑6~8 μ m)

三、研究方法與結果

(一)前導實驗1-1：
挑選培養大型蚤之水質



(二)前導實驗1-2：大型蚤對塑膠微粒適口性挑選檢測



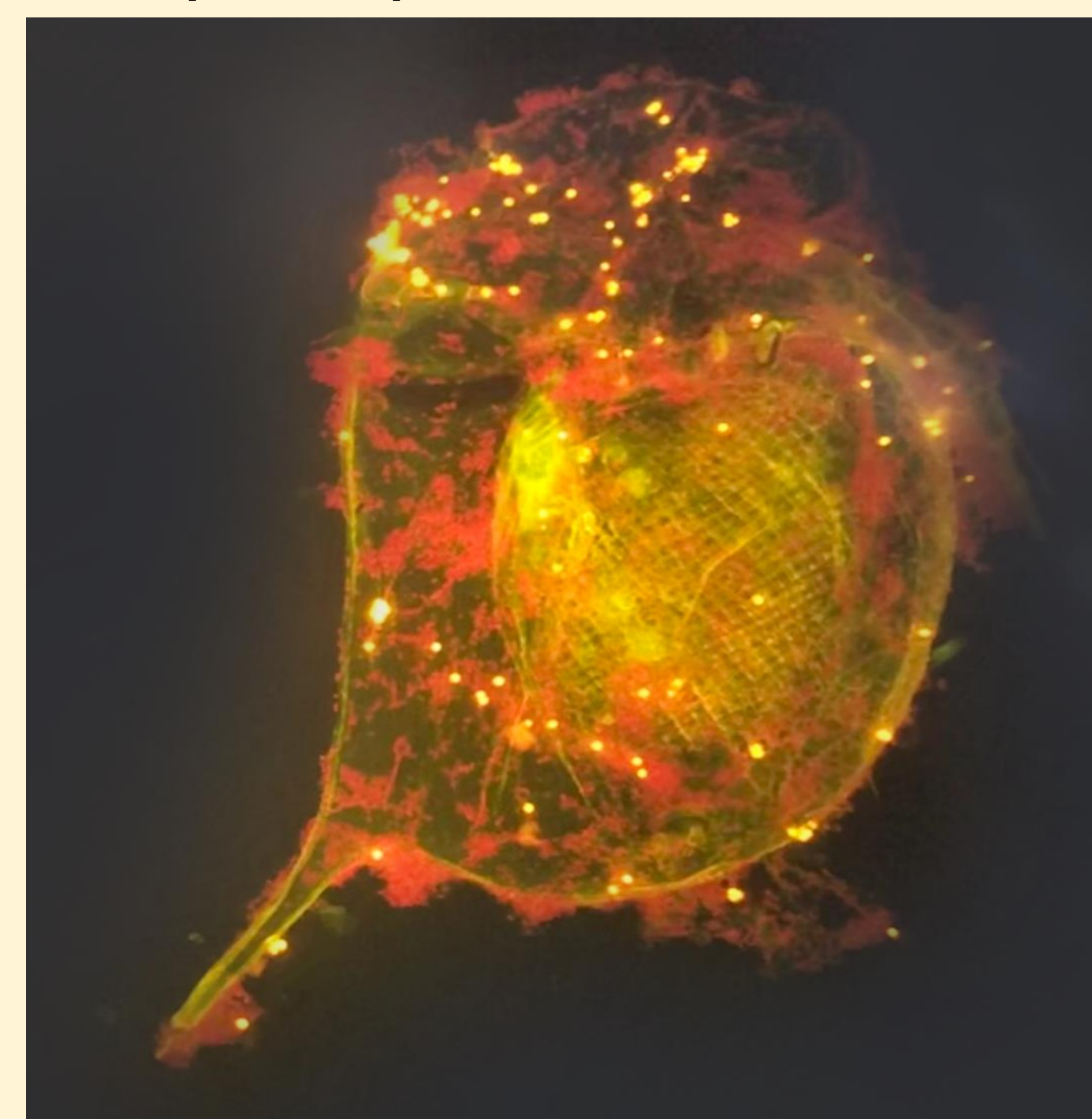
圖三、適口性測試流程

表一、各水質的導電度SPC、硬度TDS及pH值

| | 人工硬水 | 氣曝水 | 煮沸水 | 蒸餾水 |
|-------------------|-------|-------|-------|------|
| SPC (μ S/cm) | 1466 | 367.8 | 22.8 | 12.9 |
| TDS (mg/L) | 955.5 | 239.2 | 14.95 | 8.45 |
| pH | 8.27 | 8.13 | 7.76 | 8.11 |

結果發現：因族群大小選擇氣曝水作為養殖環境，且水質硬度屬於大型蚤偏好的硬度約350 mg/L^[2]。

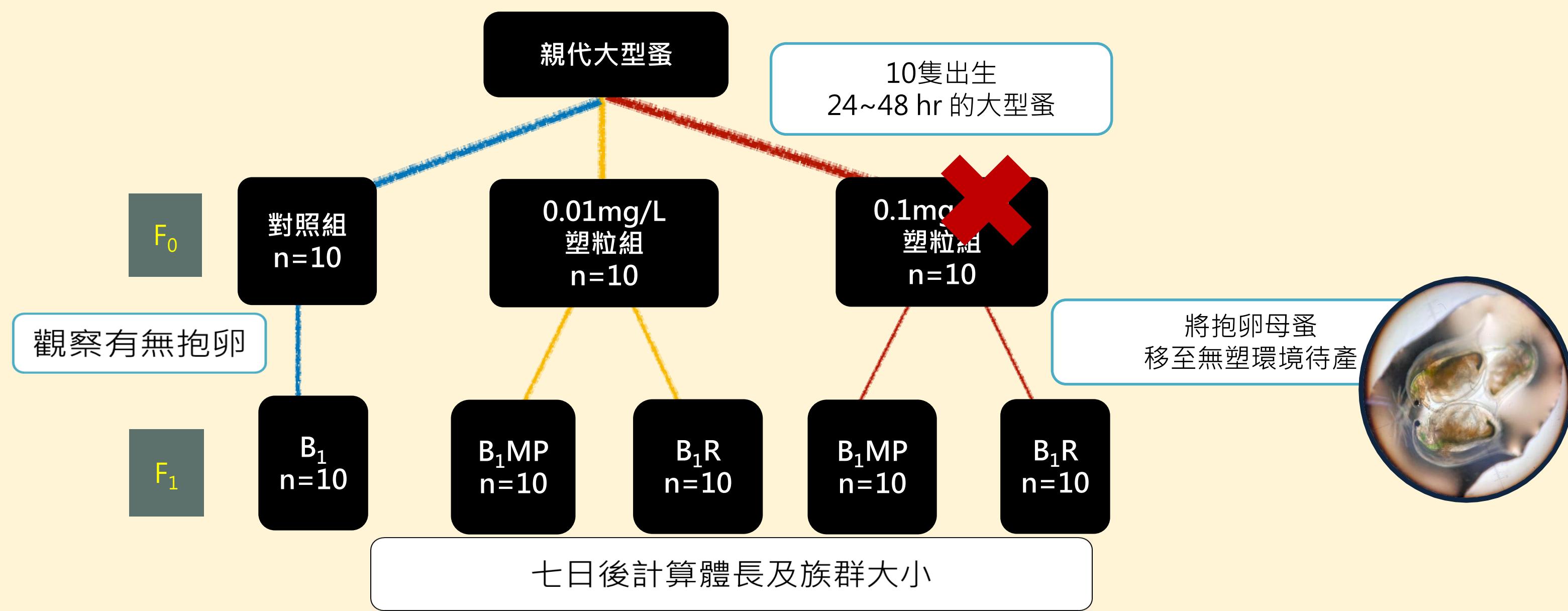
透過ZEISS Axio Imager2螢光顯微鏡鏡檢後發現三種塑膠濃度下的大型蚤皆有確實攝入塑膠微粒(圖四)。



圖四、大型蚤攝入塑膠微粒(黃點為塑膠微粒，紅色為小球藻)

(三)實驗一：

暴露在不同塑膠微粒環境中對大型蚤生殖影響



圖五、大型蚤生殖影響實驗流程圖 (F₀/F₁ 親代/子代, R恢復組, MP塑膠組)

(四)實驗二：

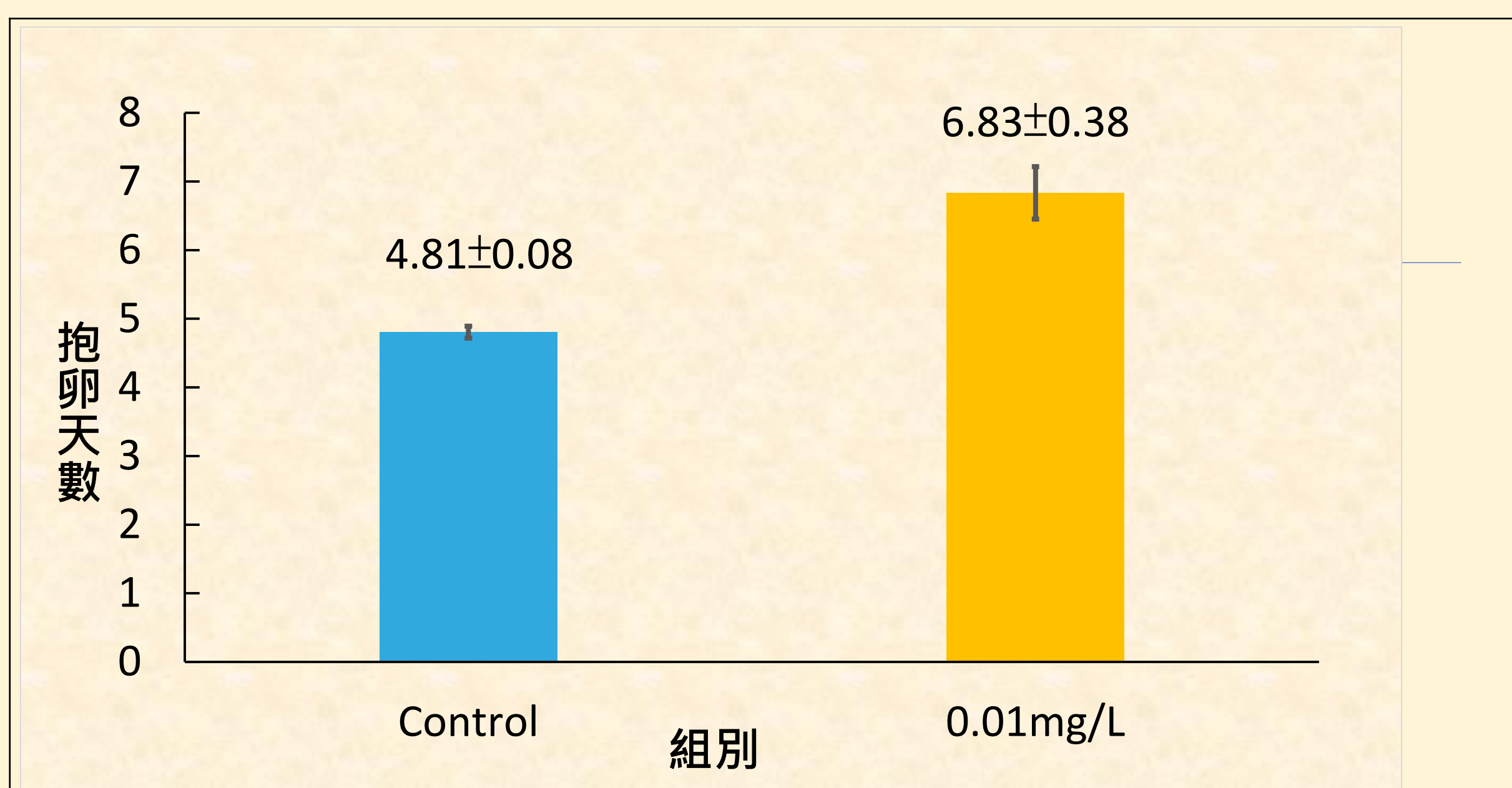
暴露於塑粒環境中對大型蚤的攝食量影響



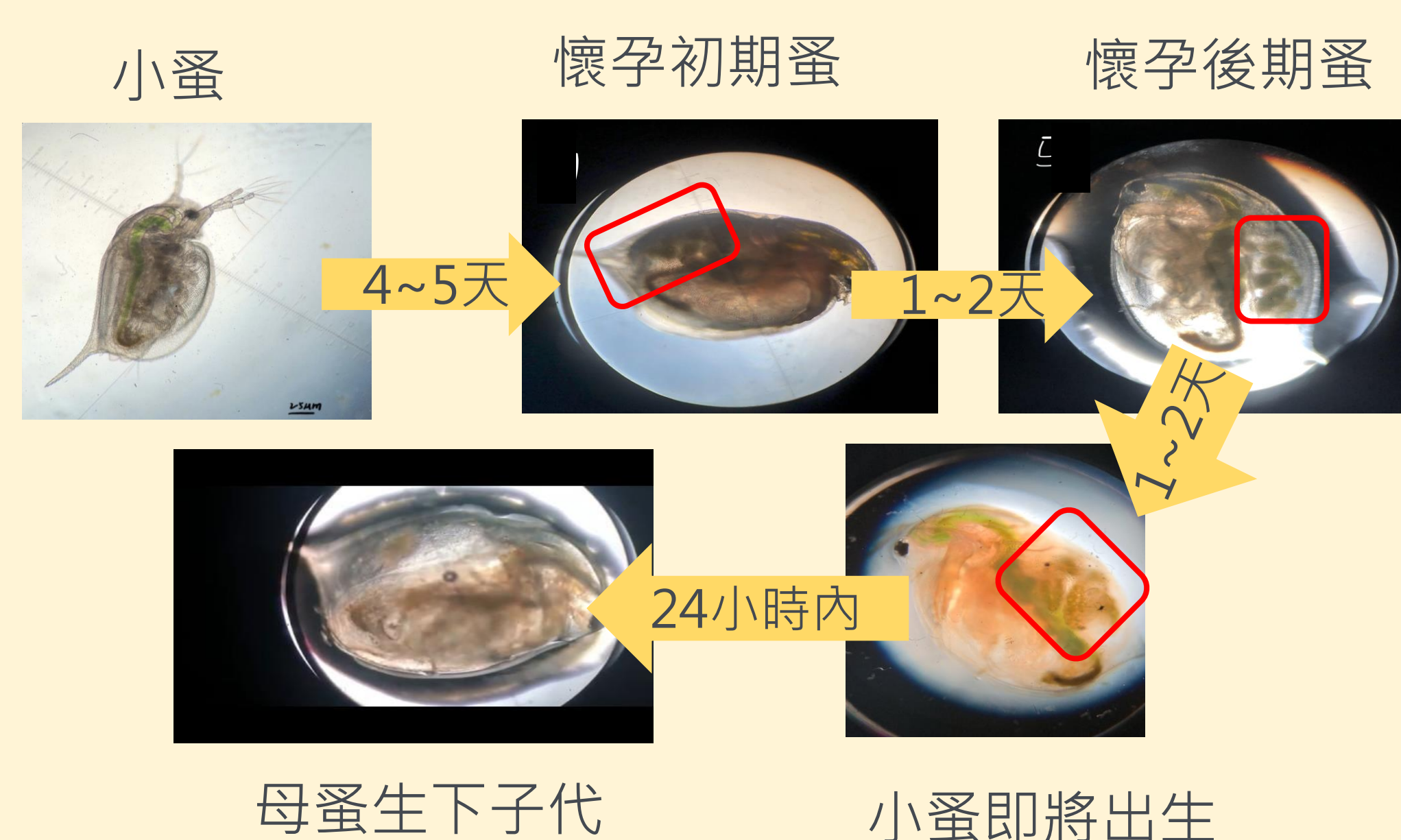
圖六、大型蚤攝食量實驗流程圖

三、結果

(一)實驗一：暴露在不同塑膠微粒環境中對大型蚤生殖影響

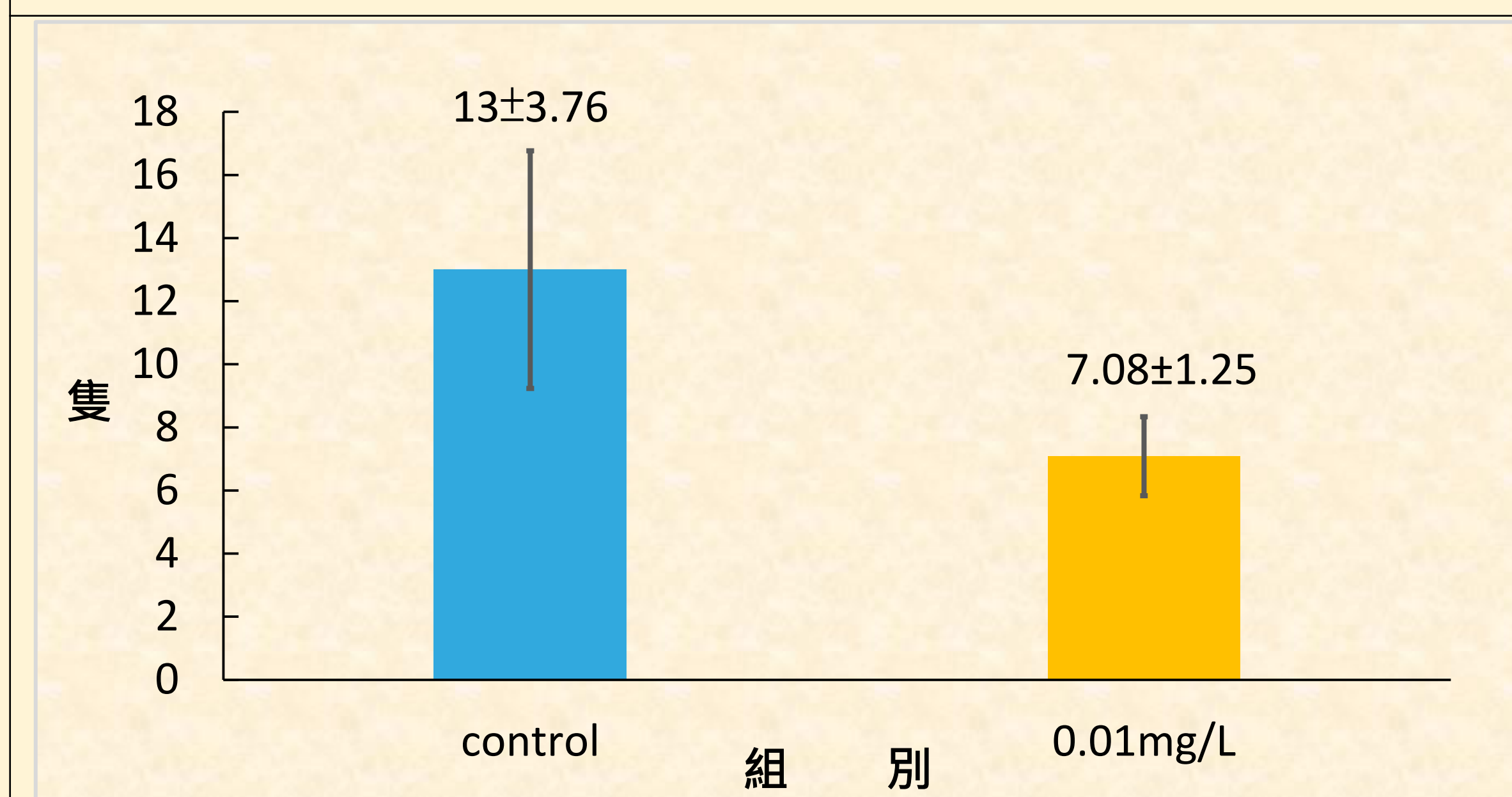


圖七、母蚤第一胎所需的抱卵天數(p<0.05)

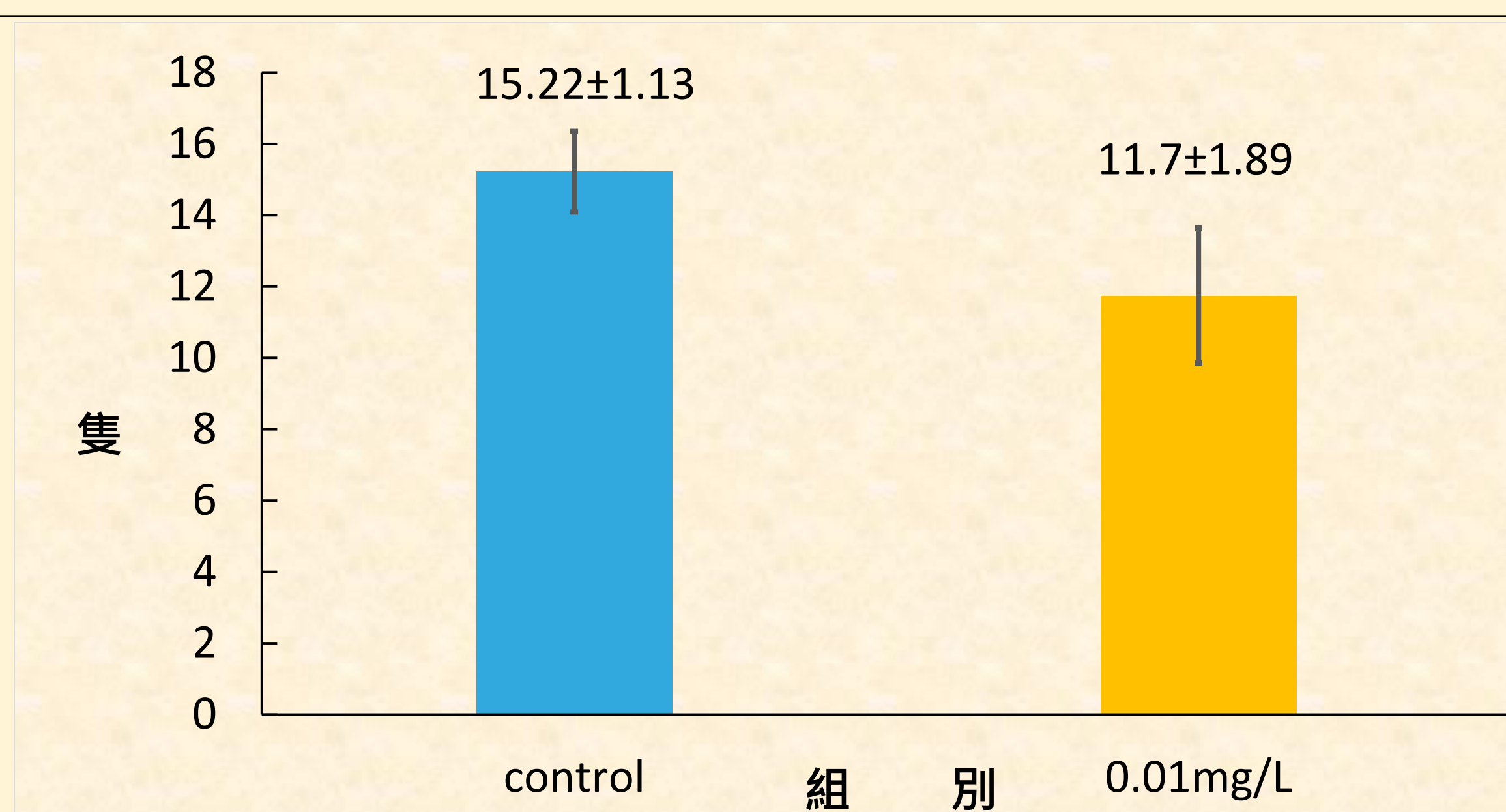


圖八、大型蚤生殖週期

在生殖影響的觀察中我們將母蚤開始抱卵的時間作為性成熟的參數。實驗中，0.1 mg/L 塑粒環境組中的大型蚤在未開始抱卵前就全數死亡了；在塑粒環境組(0.01 mg/L)的始抱卵天數則是分佈在6~7天，相較於對照組中分佈在4~5天的開始抱卵天數有被延緩的趨勢，推測在塑粒環境中會延緩大型蚤的性成熟時間。

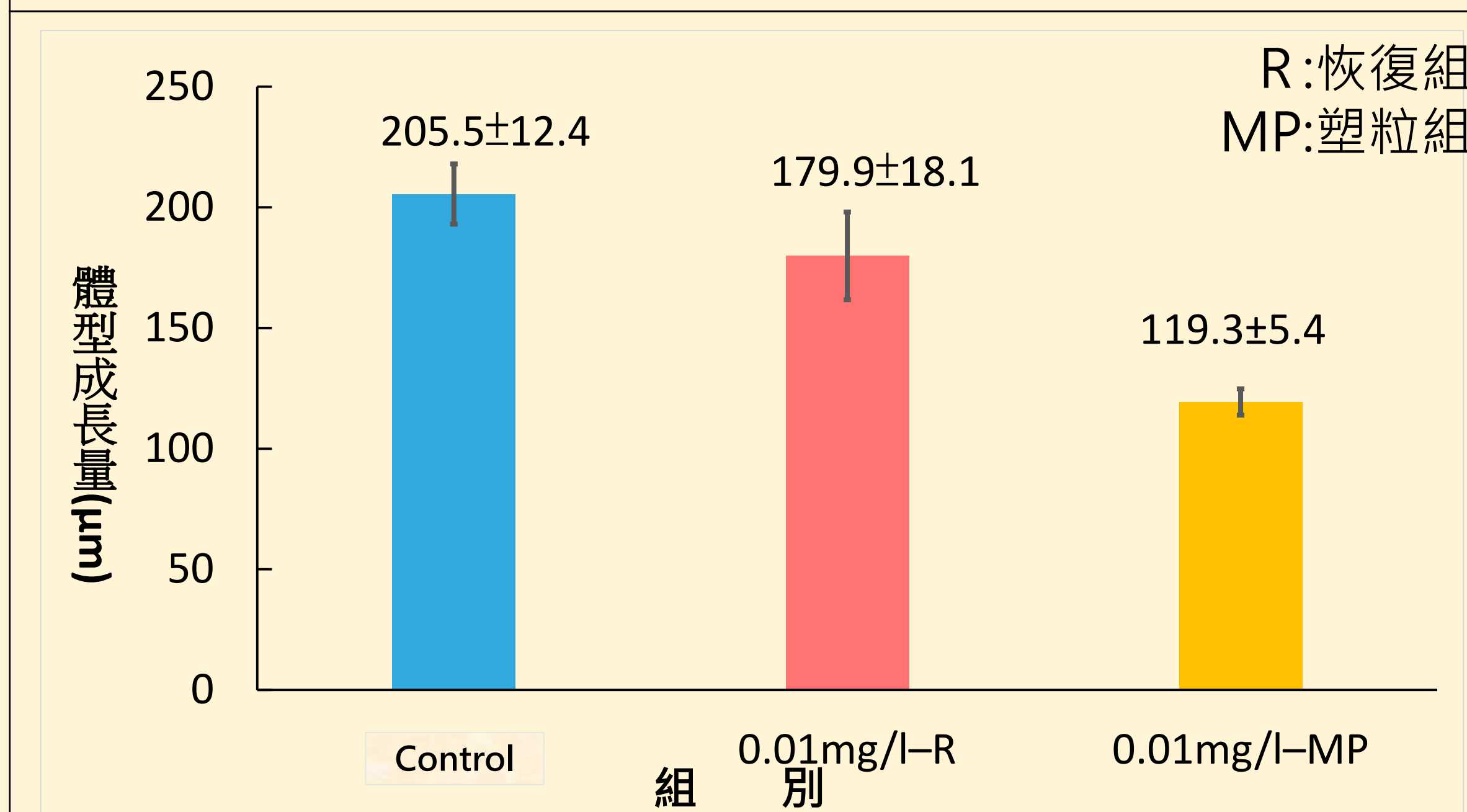


圖九、母蚤第一胎平均子代數

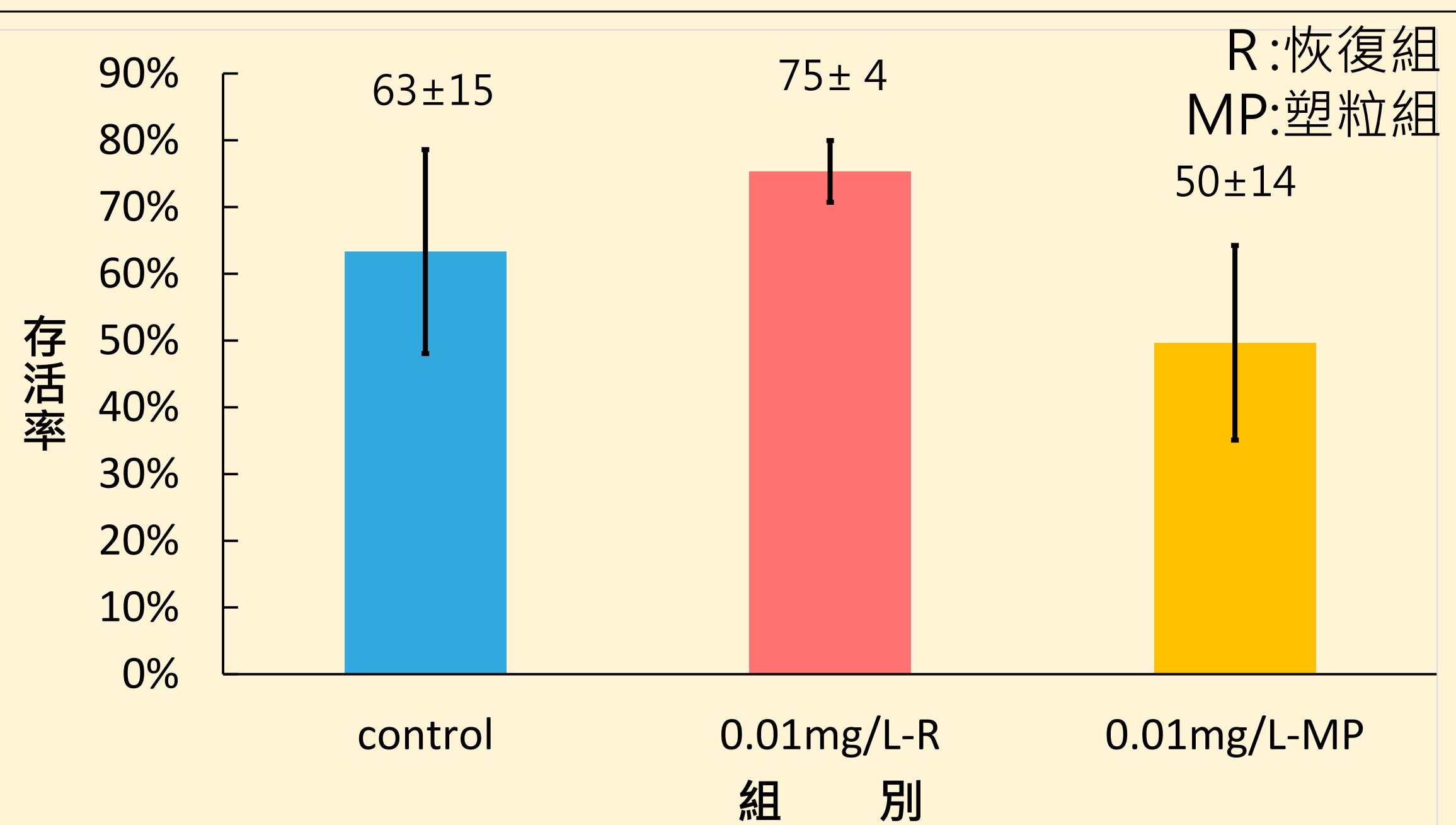


圖十、母蚤第二胎平均子代數

在觀察母蚤的子代數影響時，將第一胎及第二胎的子代數作為參數，並發現在塑粒環境中第一胎(7隻)及第二胎(11隻)數量相較於對照組(13~15隻)都較低，顯示母蚤生殖力受塑粒影響而塑粒組中的第二胎子代數(11隻)相較於第一胎子代數(7隻)有成長的情形，且比較第一、第二胎在兩處理組中的差異有減緩，推測是在母蚤待產期將其移至乾淨環境中所造成的恢復現象。



圖十一、大型蚤第一胎子代體型成長量

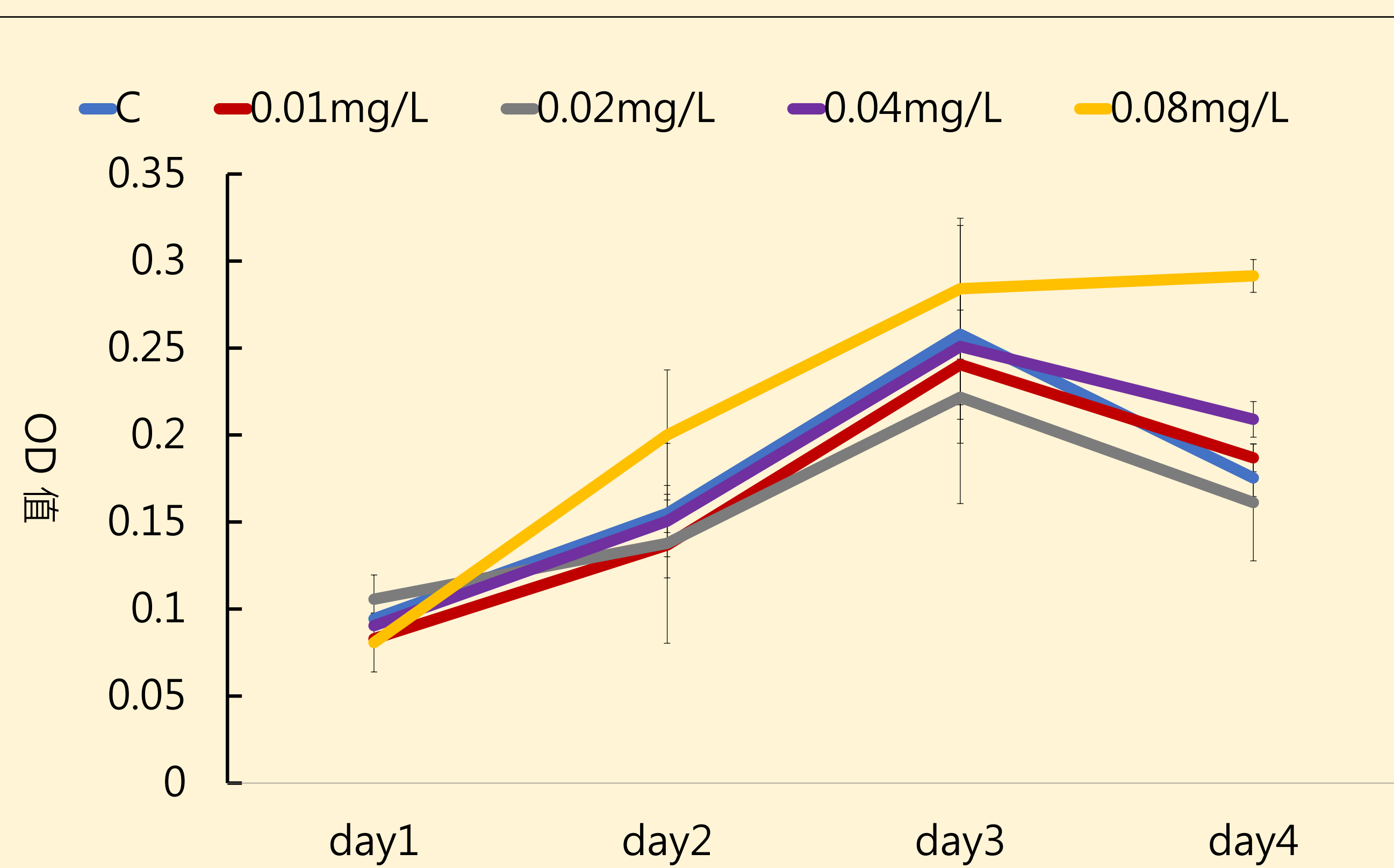


圖十二、大型蚤第一胎子代平均存活率

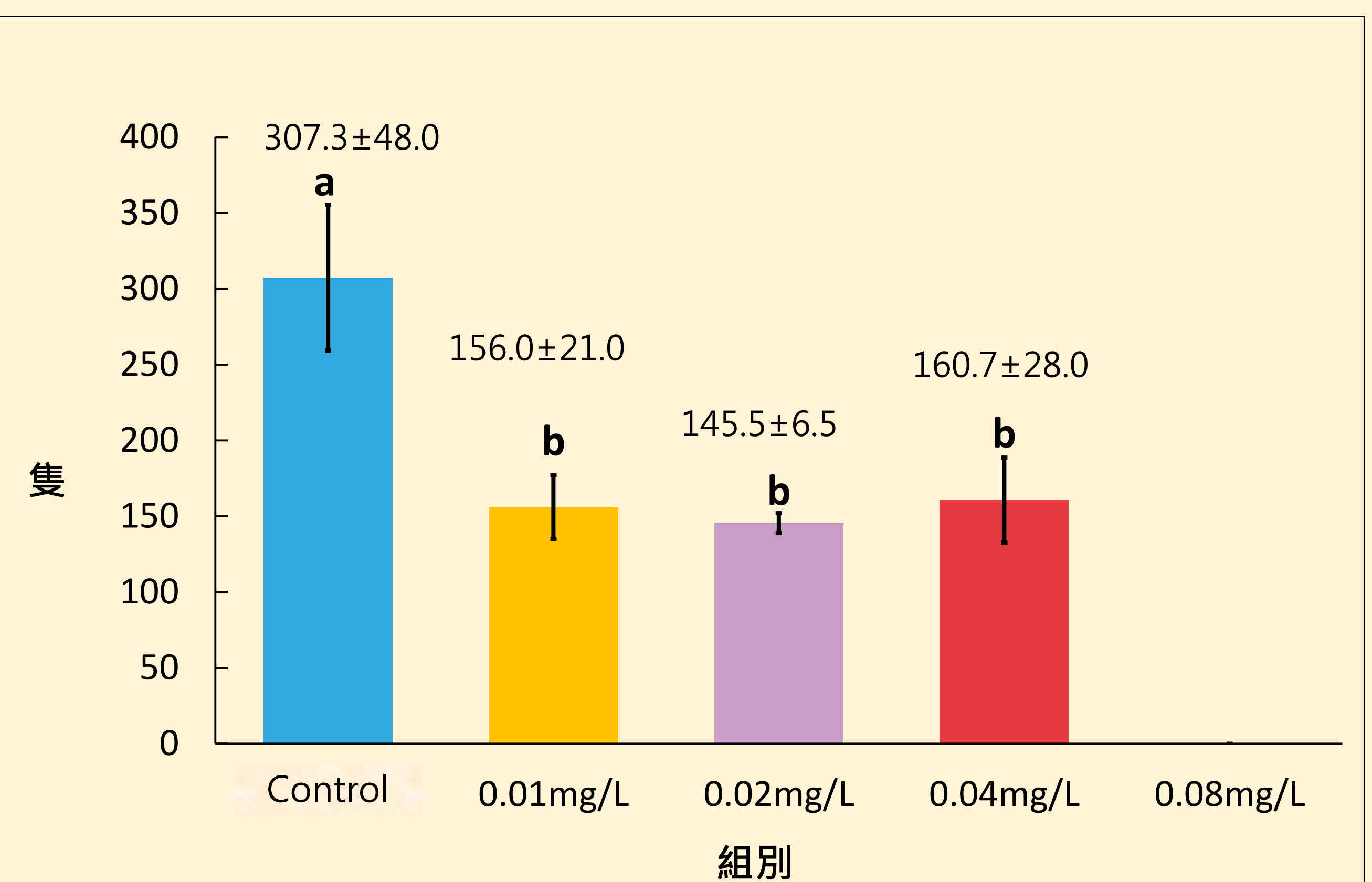
在體型成長量這項數據中，發現塑粒組的幼蚤體型成長量(119.3 μm)為最低，恢復組幼蚤體型成長量(179.9 μm)次之，對照組最高(205.5 μm)。推測暴露在塑粒環境中會抑制大型蚤生長情形，但移至乾淨環境中會使其恢復。

為觀察暴露在塑粒環境下的母蚤所誕生的幼蚤存活情形，在子代出生後七天觀察存活率，發現塑粒組(50%)相較於對照組(63%)及恢復組(75%)的子代存活率較低。推測：暴露在塑粒環境中會造成大型蚤子代數的存活率降低，但移至乾淨的環境中仍會造成子代存活率有恢復情形。

(二)實驗二：暴露於塑膠微粒環境中對大型蚤的攝食量影響



圖十三、不同塑粒濃度環境對大型蚤生活環境中小球藻含量的影響 ($p < 0.05$)



圖十四、不同塑粒濃度環境下對大型蚤族群大小的影響 ($p < 0.05$)

在0.08 mg/L塑粒濃度下的環境OD值相較於其他塑粒濃度是偏高的(圖十三)，因此我們認為在0.08 mg/L塑粒濃度下的大型蚤的攝食量相較於其他塑粒濃度是偏低的，故推測是在高塑粒濃度下的大型蚤的攝食量有被抑制的現象，並且其他組別間沒有顯著差異，因此本研究認為在0.04 mg/L到0.08 mg/L塑粒濃度之間存在閾值。此項結果也能解釋實驗一中0.1 mg/L塑粒濃度及實驗二中的0.08 mg/L塑粒濃度中大型蚤全數死亡，以及推測攝食量降低可能是造成實驗一中所觀測到大型蚤性成熟時間被延遲及子代體型成長量降低的原因之一。

討 論

- 一、根據黑潮基金會^[4]對臺灣周遭的塑粒濃度的調查顯示，目前周遭塑粒含量皆低於本研究。但其中標示為嚴重受污染的八掌溪的塑膠含量僅為0.01mg/L這個組別的1/10；且此地的塑粒污染主要為圓形塑粒，與本研究使用的形狀相同。又黑潮基金會調查的僅含1~5mm的塑粒環境中可能存在其他大小的塑膠微粒。因此，若台灣海域的塑膠排放量持續增長，塑粒濃度將愈來愈接近本實驗所設定的閾值，並對大型蚤族群造成生存危機。
- 二、實驗一數據顯示暴露在塑粒環境會延遲大型蚤抱卵天數並降低其子代的體型成長量及存活率，本研究認為除了在塑粒環境下會抑制大型蚤的攝食量，在化性方面的影響，C. Zhang et. al.^[5]透過蛋白質組(proteome)分析，發現聚苯乙烯塑膠微粒會增加大型蚤細胞合成的次數並減少能量的儲存，進而導致大型蚤存活率和繁殖力下降。因此塑膠微粒的影響，不只在物性上會抑制大型蚤攝食量，也在化性方面對其基因、細胞合成造成干擾。

結 論

- 一、塑膠微粒會造成大型蚤育卵年齡延遲；平均子代數、體型成長量及子代存活率下降。
- 二、在暴露於聚苯乙烯塑膠微粒環境(0.08 mg/L)中會影響大型蚤的進食效率。
- 三、暴露在塑粒環境中的親代所產下的子代成長於無塑環境中會有恢復的現象。

參考資料

1. Richardson, S.D., & Ternes, T.A., 2018. Water analysis: emerging contaminants and current issues, *Anal. Chem.*, 90(1), 398-428.
2. Lewis, M.A., Maki, A.W. Effects of water hardness and diet on productivity of *Daphnia magna* Straus. in laboratory culture. *Hydrobiologia* 85, 175-179 (1981).
3. Martins, A., & Guilhermino, L, 2018. Transgenerational effects and recovery of microplastics exposure in model populations of the freshwater cladoceran *Daphnia magna* Straus. *Science of The Total Environment*, 631, 421-428.
4. 島航計畫 塑膠微粒成果分析2019黑潮基金會Kuroshio Ocean Education Foundation, Taiwan, 2019.
5. C. Zhang et. al., Transgenerational Proteome Plasticity in Resilience of a Marine Copepod in Response to Environmentally Relevant Concentrations of Microplastics, *Environ. Sci. Technol.*, 53, 14, 8426-8436, 2019
6. Lampert, W. and Sommer, U., 2nd edition. Oxford: Oxford University Press, 324 pp. ISBN-13: 9780199213931, 2007
7. Ebert, D., Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in *Daphnia*. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information, 2005
8. 魏印心和胡鴻鈞，中國淡水藻類——系統、分類及生態，科學出版社，北京，2006