

國立交通大學  
環境工程研究所  
碩士論文

以密閉式藻類毒性試驗方法評估一級炔丙基醇類之毒性  
與結構-活性關係之研究

The Study of Toxicity Assessment of Primary Propargylic  
Alcohols Using a Closed-System Algal Test and the  
Quantitative Structure-Activity Relationships



研究生：郭冠良  
指導教授：陳重元教授

中華民國九十七年七月

以密閉式藻類毒性試驗方法評估一級炔丙基醇類之毒性

與結構-活性關係之研究

The Study of Toxicity Assessment of Primary Propargylic Alcohols  
Using a Closed-System Algal Test and the Quantitative  
Structure-Activity Relationships

研究生：郭冠良

Student: Kwan-Liang Kuo

指導教授：陳重元

Advisor: Dr.Chung-Yuan Chen



A Thesis

Submitted to Department of Environmental Engineering

College of Engineering

National Chiao Tung University

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master

in

Environmental Engineering

July, 2008

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國九十七年七月

以密閉式藻類毒性試驗方法評估一級炔丙基醇類之毒性

與結構-活性關係之研究

學生：郭冠良

指導教授：陳重元

國立交通大學環境工程研究所

### 摘要

本篇研究係以月芽藻 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) 針對 16 種一級炔丙基醇類(包含 Primary propargylic alcohols and Primary homopropargylic alcohols) 進行 48 小時密閉式藻類毒性試驗。將實驗結果，利用  $\Delta DO$ 、Final yield 及 Growth rate 做為反應後之觀測終點，採用 Probit 模式算出半致死濃度 (50% Effect concentration,  $EC_{50}$ )，由實驗結果顯示，炔基接於 2 的位置毒性較炔基接在 3 的位置高，再將求得毒性試驗以  $\log(1/EC_{50})$  與  $\log K_{ow}$  進行回歸分析，扣除掉機制較為特殊的 2-propyn-1-ol 後得到以 Final yield 為反應終點之最佳回歸方程式 ( $R^2 = 0.9$ )。針對低影響濃度進行敏感性之比較，( $\Delta DO$ 、Final yield 及 Growth rate)，為 NOEC 較  $EC_{10}$  能提供對水體生物更嚴謹的保護標準。而在本研究之三個反應終點當中對於一級炔丙基醇類之敏感性最高者為細胞密度變化量，其次為溶氧產生量，而敏感性最差之反應終點為生長率。與其他水體物種進行敏感度比較可以發現以魚類敏感性最高、其次為月芽藻，敏感性最差者為纖毛蟲。

關鍵字: 月芽藻、一級炔丙基醇、QSAR、半致死濃度( $EC_{50}$ )

The Study of Toxicity Assessment of Primary Propargylic Alcohols  
Using a Closed-System Algal Test and The Quantitative  
Structure-Activity Relationships

Student: Kwan-Liang Kuo

Advisor: Chung-Yuan Chen

Institute of Environmental Engineering

National Chiao Tung University

Abstract

The objective of this study is to study the toxic effect of primary propargylic alcohols on *Pseudokirchneriella subcapitata* using a closed system test. The effects of primary propargylic acids were evaluated by three kinds of response endpoints, i.e., dissolved oxygen production, cell density and algal growth rate. Median effective concentrations ( $EC_{50}$ s) were estimated using the Probit model with a test duration of 48hr. Primary propargylic alcohols with alkene on the second position exhibit higher toxicity than alkene on the third position. The quantitative structure-activity relationships (QSARs) were established based on the 1-octanol/water partition coefficient ( $\log K_{ow}$ ) and using  $\log(1/EC_{50})$ , 2-propyn-1-ol was not included, revealed a good regression relationship ( $R^2=0.9$ , based on final yield).

The results also reveal that the value of the lower effect concentration of the primary propargylic alcohols (cell density, algal growth rate, and the dissolved oxygen production). This demonstrates that the NOEC value can offer a better standard for protecting our aquatic environment than the  $EC_{10}$  value. Hence, comparing with other aquatic organisms the acute toxicity data, The order of the relative sensitivity is then obtained as follows: *Fathead minnows* > *P. subcapitata* > *Tetrahymena pyriformis*.

Keyword: *Pseudokirchneriella subcapitata*, Primary propargylic alcohols, QSAR, Median effective concentration ( $EC_{50}$ )

# 誌 謝

一路從入學到今天能順利完成論文，首先我最感激的是父母親一路上的支持與鼓勵；感謝指導老師陳重元教授，給予了我許多論文上面的指導；承蒙口試委員：交大環工所 林志高教授、清大醫環系 董瑞安教授、中山醫大職安系 趙木榮老師，在論文計畫書及口試期間給予我很多確切的指正及建議，使得此論文能更趨嚴謹及完整。

很榮幸自己能成為交大的一員，在這段日子裡，特別感謝的人包括曾經指導過我的已畢業的定裕及裕勝學長，還有實驗室的同仁們 學姐詔荼， 同學 哲偉、俊竹以及學弟妹 介華、欣好、百珊；另外，也要特別感謝其他研究室的同學們 學詩、精榮、偉志、亮毅、凱迪、楚俊、青洲、立偉等等，這兩年不論是生活上的協助或娛樂，或是學術上的討論，因為有你們，讓我這兩年的研究生生活充滿了無限的回憶與收穫，真的很謝謝你們。

非常感謝在這段時間認識的朋友們，也因為你們的幫助，使我能夠順利完成論文。再次感謝父母親對我辛苦的栽培及支持還有兩位姐姐對我的關心與照顧。

# 目錄

表次	頁次
目錄.....	I
圖目錄.....	V
表目錄.....	VII
第一章 前言.....	1
1.1 研究緣起.....	1
1.2 研究目的.....	5
1.3 研究方法與架構.....	6
第二章 文獻回顧.....	8
2.1 毒性物質—炔丙基醇類.....	8
2.1.1 炔丙基醇之物理特性.....	9
2.1.2 炔丙基醇類之應用.....	13
2.1.3 炔丙基醇之毒理特性.....	13
2.1.4 炔丙基醇類在環境中的分布及使用情況.....	17
2.1 藻類毒性試驗.....	19
2.2.1 試驗物種簡介.....	19
2.2.2 藻類計數方法.....	20

2.2.3 連續性藻類培養方式(Continuous culture technique) .....	22
2.2.4 藻類毒性試驗方式.....	23
2.2.5 試驗中的重要參數.....	26
2.2.6 密閉式試驗方法.....	30
2.2.7 密閉式BOD瓶藻類毒性試驗 .....	32
2.3 SOLVENT CONTROL .....	33
2.4 QSAR的討論 .....	36
2.4.1 QSAR介紹 .....	36
2.4.2 QSAR在環境毒物學上的應用及分類.....	42
2.4.3 QSAR之分類.....	45
2.4.4 炔丙基醇類之QSAR.....	49
2.5 ACUTE AND CHRONIC RATIO ( ACR ).....	51
第三章 基本理論 .....	53
3.1 基本生長動力學 .....	53
3.2 毒性試驗終點種類 .....	55
3.3 毒性物質劑量反應模式 .....	56
3.4 NOEC與CUT-OFF VALUE .....	59
3.4.1 判定NOEC和LOEC .....	59
3.4.2 平均中斷值 (Cut-Off value) .....	60
第四章 實驗設備與方法 .....	61

4.1 實驗設備及材料 .....	61
4.2 實驗前準備 .....	65
4.2.1 培養基質的配製.....	65
4.2.2 玻璃器皿清洗與滅菌 .....	67
4.2.3 盤面光度之調整.....	67
4.2.4 藻類之培養步驟及裝置 .....	68
4.2.5 ISOTON II之配製 .....	70
4.2.6 電子顆粒計數器操作方式與原理 .....	70
4.3 儀器操作原理、步驟與設定條件 .....	72
4.3.1 TOC (總有機碳分析法).....	72
4.3.2 COD-比色法.....	77
4.4 密閉式藻類毒性試驗方法及步驟 .....	79
4.4.1 實驗方法.....	79
4.4.2 實驗步驟.....	79
4.5 實驗之品保及品管(QA/QC).....	85
第五章 實驗結果與討論 .....	87
5.1 藻類毒性試驗數據.....	87
5.2 物種比較表 .....	91
5.3 炔丙基醇類與基線毒性之比較.....	97



5.4 NOEC、EC <sub>10</sub> 之比較.....	100
5.5 急慢毒性比(ACUTE-CHRONIC TOXICITY RATIO ; ACR) .....	105
5.6 QSAR分析.....	108
第六章 結論與建議 .....	113
6.1 結論.....	113
6.2 建議.....	115
第七章、參考文獻 .....	116
附錄一:原始數據 .....	1
附錄二:劑量反應曲線圖 .....	17



## 圖目錄

Fig 1.1 The flow chart of this investigation.....	7
Fig 2.1 Propargylic alcohol ( 2-propyn-1-ol ) .....	8
Fig 2.2 Primary炔丙基醇前親電性之作用機制 .....	14
Fig 2.3 Propargyl alcohol生物代謝活性機制 .....	15
Fig 2.4 Primary homopropargylic alcohol (3-butyn-1-ol)的毒性代謝機制 .....	16
Fig 2.5 炔丙基醇在環境中的分佈比例 .....	18
Fig 2.6 Classification of toxicity mechanism in aquatic toxicity tests.....	47
Fig 3.1 典型的毒性試驗劑量反應曲線 .....	57
Fig 4.1 藻類培養步驟示意圖 .....	69
Fig 4.2 TOC分析儀外觀圖 .....	72
Fig 4.3 TOC主體結構介紹 .....	73
Fig 4.4 Setting and operate step of COD-colorimetry.....	77
Fig 4.5 The flow chart in close-system algal toxicity test.....	80
Fig 4.6 The diffuser system of deion-water.....	81
Fig 5.1 The toxicity response of the algal three end-point.....	88
Fig 5.2 一級炔丙基醇藻類與纖毛蟲毒性數據之比較(based on $\Delta DO$ ) .....	93
Fig 5.3 一級炔丙基醇藻類與纖毛蟲毒性數據之比較(based on Final Yield )..	94
Fig 5.4 一級炔丙基醇藻類與纖毛蟲毒性數據之比較( based on Growth Rate ) .....	94
Fig 5.5 一級炔丙基醇藻類與纖毛蟲毒性數據之比較( based on Final Yield ).	95

Fig 5.6 Correlation between  $\log(1/EC_{50})$  and  $\log p$  based on  $\Delta DO$ .....98

Fig 5.7 Correlation between  $\log(1/EC_{50})$  and  $\log p$  based on Final Yield .....98

Fig 5.8 Correlation between  $\log(1/EC_{50})$  and  $\log p$  based on Growth Rate.....98

Fig 5.9 一級炔丙基醇Log p與Log(1/EC50)之關係圖(based on DO) .....109

Fig 5.10 一級炔丙基醇Log p與Log(1/EC50)之關係圖(based on Final Yield)110

Fig 5.11 一級炔丙基醇Log p與Log(1/EC50)之關係圖(based on Growth Rate)  
.....110

Fig 5.12 一級炔丙基醇去除掉 2-propyn-1-ol Log p與Log(1/EC50)之關係圖  
(based on Final Yield).....111

Fig 5.13  $\log(1/EC_{50})$  calc. V.S.  $\log(1/EC_{50})$ exp. (based on Final Yield).....112



## 表目錄

Table 2.1 化合物之物理化學特性 .....	11
Table 2.2 化合物之物理化學特性(續) .....	12
Table 2.3 批次式與連續式藻類毒性試驗之優缺點比較 .....	24
Table 2.4 The solvent control of DMSO in algal toxicity tests .....	35
Table 2.5 QSAR分析中的outliers毒性機制分類表 .....	48
Table 4.1 The consist of macro-algal medium .....	66
Table 4.2 The consist of micro-algal medium .....	67
Table 4.3 The conditions of Coulter Counter .....	71
Table 5.1 Median effective concentration values ( $EC_{50}$ )based on three end-point .....	90
Table 5.2 藻類各終點之 50%抑制濃度與各物種急毒性數據比較表比較 .....	92
Table 5.3 The relationship of NOEC and $EC_{10}$ .....	103
Table 5.4. The important statistical parameters in three test end-points .....	104
Table 5.5 The ACR values in three test end-points .....	107

# 第一章 前言

## 1.1 研究緣起

隨著工商業的發達及科技不斷的進步，使得人民的生活更加便利，而相對也產生許多負面的影響，由於許許多多的化學加工的合成品不斷的被製造出來，但是卻忽略了它對整個生活環境也相對的造成某種程度的傷害，首當其衝的無非就是我們的水體環境，以往工廠往往將使用完畢的，不管是最常看到的有機廢水或是其他各種來源廢水排至河川水體，造成整個水體環境的惡化，因此就更急需知道這些化學物質對於水體所造成的危害及影響以及造成水體生物的威脅的程度；不過依照現今本國的水質標準若只單純討論化學物質物理及化學上的特性分析時，我們將無法了解這些化合物或毒化物對水體環境及生物體所造成的衝擊，如此生物評估便成為評鑑水中生態污染的首要工具；生物評估可依營養階層分類，諸如魚類、蝦類、無脊椎動物、浮游生物、至最低層的藻類及其他水質標準等等，也由於這些原因，許多國家除了訂定傳統水質標準外，同時也對放流水毒性訂定放流水生物毒性規範，來加強對水體生物的保護及更嚴格的水質標準以達到保護環境的目的。

藻類位於食物鏈的最底層，是極具代表性且重要的生產者，也因為其重要性當藻類的生長情形發生異狀相對地其他水體生物也相對

會發生影響，且藻類的毒性試驗具備了簡單、敏感性、再現性高等等的優點，以及其所具有的高敏感性和實驗的準確性，故以藻類做為指標微生物研究其對毒化物質之涵容能力，在生態保護方面為一個重要指標，本實驗所選用的藻類—月芽藻 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) 為試驗物種，研究其對於毒性物質之涵容能力。

一般而言，毒化物進入水體後，經過河川的稀釋作用，使濃度不至於造成生物急毒性，因此會以慢毒性試驗結果來規範其排入水體的濃度限制，但慢毒性試驗時間長達半年至一年，故在應用上較為不方便；因此在國際上的一些環境組織，如 US EPA (United States Environmental Protection Agency)、ISO (International Organization for Standardization)、ASTM (American Society for Testing and Materials) 及 OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) 皆有規範一系列生物急毒性試驗，讓我們可以在短期時間內瞭解到化合物的對於生物所造成的毒性；在傳統上藻類毒性試驗的標準方法中，大多是開放式的批次 (batch) 培養的系統為實驗方法，由於其為開放式的系統，若待測物質為具揮發性，則有可能因為揮發性的影響而造成低估毒性的影響的低估。也因為如此，本研究使用 BOD 瓶來造成一完整的密閉環境系統，評估具有揮發性的物質並以藻類溶氧變化量 ( $\Delta DO$ )、細胞密度做為試驗

終點，了解其毒性物質對於藻類的影響。

本研究是針對炔丙基醇 (Propargyl alcohol) 及一系列衍生物做藻類毒性試驗。炔丙基醇為一種有著淡天竺葵 (geranium-like odor) 味道的有機化合物，主要用於鋼鐵業中的抗腐蝕劑及電鍍用添加劑，它也是有機物合成的重要中間體，可用於生產丙烯酸、丙烯醛、維生素 A 等，也可用作除鏽劑，能抑制乙酸、磷酸、硫酸、鹽酸等對鐵銅鎳等金屬的腐蝕，還可用作溶劑的穩定劑 (solvent stabilizer)、土壤煙燻劑 (soil fumigant)、除草劑、殺菌劑等，應用十分廣泛。先前主要的研究主要針對哺乳類動物 (Vernot et al., 1977; Archer, 1985)，而對於這類炔丙基醇類水體生物毒理方面的研究相當少，也因此用來作為研究的主題；而針對本研究中的測試物種因為其在商業活動中扮演著重要的角色，對於這類化合物的相關毒性研究也逐漸受到重視，依據台灣環保署 Environmental Protection Administration, R.O.C. (Taiwan) 2006 的統計資料發現其用量達到 1268 公噸，而此化合物本國也在 1999 年將其列入第三類的毒性化學物質；而根據 The Advisory Committee on Existing Chemicals of Environmental Relevance BUA 的報告 (BUA, 1998) 中指出每年約有 500-1000 噸的使用量，而約有 0.75-3 tonnes/yr 排入下水道系統中；根據 Toxics Release Inventory TRI 的資料顯示在美國光是在 Texas city 就有 70000pounds/yr 以上排

放致地下水體，US EPA 在 2003 年 HPV Challenge Program(美國環保署高生產容量計畫書)；其為北美洲包含美國，加拿大，墨西哥所共同簽訂對於工業化學製品的安全製造及用途所成立的協會，此 program 係針對化學製品在美國進口數量在 100 萬磅以上所進行管制的組織部門,也針對此項化合物進行管制及研究另外還有像是 Superfund、RCRA (Resource Conservation and Recovery Act) 以及在歐洲也有像是 ECB(European Chemicals Bureau)、EPCRA (European Pentecostal Charismatic Research Association)在 1986 年也針對此化合物建立 TRI (Toxics Release Inventory) 指標，由上述這些機構組織針對以上這類化合物的關注程度不難發現，這些化合物的排放有很高的可能性造成我們水體環境的破壞甚至更進一步造成人類健康的威脅。

由於化學物質不斷的被合成製造出來，倘若要將每種毒性化合物都作分析研究可能極為費時且不具經濟效益因此在環境毒物學研究中引用了在醫學、製藥工業經常使用的定量-結構-活性反應關係 (Quantitative Structure-Activity Relationships ; QSARs)來預測單一有機化學物質之毒性強弱及可能造成毒性之原因，也由於QSARs模式的建構使我們可以簡單迅速的預先推估出同類有機化合物的毒性，減少資源的浪費。QSAR是一種利用化學物質的物化特性或分子結構



的參數及空間上的參數以及化學物質的生物毒性進行統計回歸分析。在QSARs模式中，大都以辛醇-水係數(The logarithm of 1-octanol/ water partitioncoefficient ;  $\log K_{ow}$  or  $\log p$ )做為參數，而(Wang et al., 2001)指出此 $\log K_{ow}$ 參數說明物質疏水性(hydrophobicity)之特性，由此可之疏水性參數在植物毒性研究中的重要性。

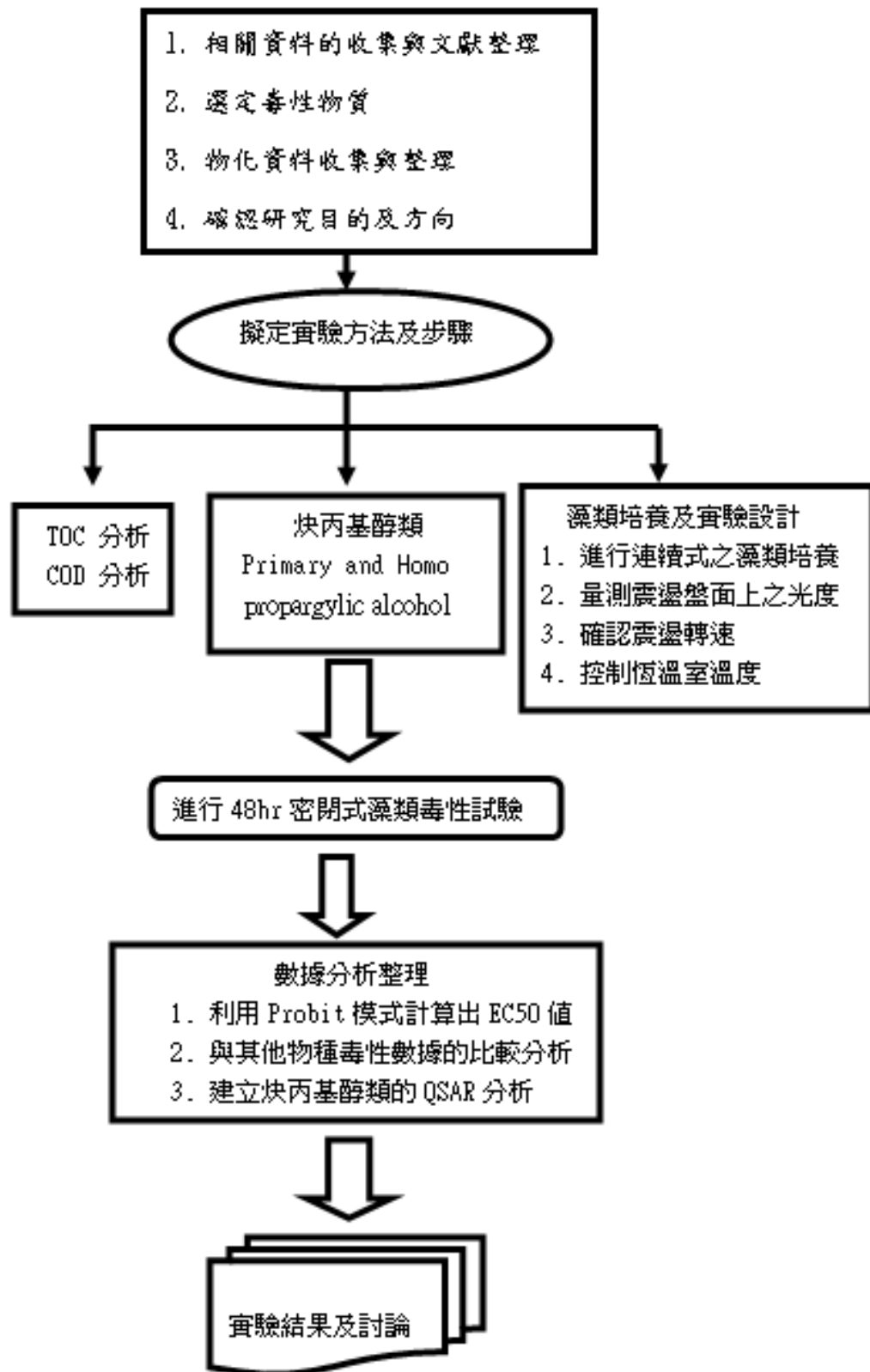
## 1.2 研究目的

1. 利用連續式培養技術，配合BOD瓶進行密閉式藻類毒性試驗，並以溶氧以及細胞密度為試驗終點，探討一系列的炔丙基醇類，利用Probit model計算出 $EC_{50}$  (50%抑制濃度)及 $EC_{10}$  (10%抑制濃度)來評估各一級炔丙基醇在密閉式藻類毒性試驗的結果。
2. 從研究中試驗結果所得到的NOEC以及 $EC_{10}$ 討論一級炔丙基醇於低濃度劑量的影響。
3. 將本研究藻類的數據，和其它學者使用不同方法及物種所做出來的數據做比較，並將實驗結果納入藻類毒性資料庫的參考依據。

### 1.3 研究方法與架構

實驗自參考資料與文獻收集開始，首先確定欲實驗的化合物，進而蒐集化合物之物化資料、文獻回顧、數據收集，做進一步整理與分析，再建立實驗目的、實驗方法及分析方法，最後完成試驗。



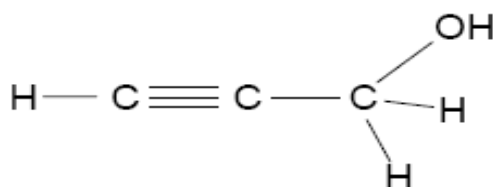


**Fig 1.1 The flow chart of this investigation**

## 第二章 文獻回顧

### 2.1 毒性物質—炔丙基醇類

本篇研究所要討論的是有關炔丙基醇類 (Propargyl alcohol)，它是利用Acetylene(乙炔)在高溫之中所合成出的化學物質(Lewis et al, 2001)以及合成butynediol(丁炔二醇)所產生的副產物(Lington et al., 1994)，而這邊主要針對的是Primary Propargylic alcohol和同分異構物的Primary homopropargylic alcohol一級炔丙醇；homo主要是表示聚合體的組成形式，一般來講聚合體可由同一種單體聚合而成，亦可由數種單體聚合而成，前者稱之為均一聚合體(Homo polymer)後者稱之為共聚合體(Copolymer)，在這裡主要是指CH<sub>3</sub>的單體，本篇研究主要針對碳數由C<sub>3</sub>到C<sub>10</sub>的一級炔丙基醇，依其結構位置上的不同依其分為上述兩類( Primary & Homo propargylic alcohol )，主要較常見的炔丙基醇其結構式如Fig 2.1。



**Fig 2.1 Propargylic alcohol ( 2-propyn-1-ol )**

針對本研究中所檢測的化合物其單體主要由一個炔基(C≡C)和羥基又稱氫氧基(-OH)所組合成的化學物質，依照有機化學對於醇類化合物的命名，是由帶氫氧基開始命名，如同本研究中的炔丙基醇，分

成primary(2-)和homo(3-)兩大類，之中的2,3就是依照炔基和氫氧基的相對位置來做命名，primary propargylic alcohol的化學結構組成單體為 $-C\equiv C-CH_2-OH$ 而其炔基的位置由氫氧基向前推算是在第2個位置，故命名之，同樣地，Primary homopropargylic alcohol則為 $-C\equiv C-CH_2-CH_2-OH$ ，固命名之；其中primary和homo在分子式上為同分異構物，主要的差別是homo propargylic alcohols 在炔基及氫氧基中間多了一個亞甲基(methylene group- $CH_2$ )，造成兩類同分異構物的化合物在毒性機制及造成毒性上的程度是否因此產生差異，也藉此進一步去討論它毒性作用的途徑及分析其造成毒性不同程度的影響。

### 2.1.1 炔丙基醇之物理特性

炔丙基醇類為一含多碳的炔醇類 (acetylenic alcohol)，其主要特色為具有天竺葵 (geranium-like odor) 味道，分子量分佈從 56.06 到 154.25，詳見 Table 2.1；其揮發性蒸氣壓也隨著碳鏈的增加而減少，屬於低揮發性，溶解度水溶性隨碳鏈增加而減少之趨勢；它能與水、乙醇、醛類、苯、吡啶和氯仿等有機溶劑互溶，部分溶於四氯化碳，但不溶於脂肪烴；長期放置，特別在遇光時易泛黃。能與水形成共沸物，共沸點  $97^{\circ}C$ ，炔丙基醇含量 21.2%。能與苯形成共沸物，共沸點  $73^{\circ}C$ ，炔丙基醇含量 13.8%；在炔丙基醇的製備方法方面，炔丙基醇是由 Henry 於 1872 年以  $\beta$ -溴化烯丙醇為原料首

次製備的，目前，主要是從乙炔與甲醛高壓法生產丁炔二醇之副產物中回收。把含量為 80%~90%的乙炔壓縮到 0.4~0.5MPa，預熱至 70~80°C，送入反應器，以丁炔銅為催化劑，和甲醛於 110~120°C 反應，得丁炔二醛初產物。反應產物經濃縮精製得丁炔二醇，同時產生副產物炔丙基醇，丙炔醇量約佔 5%。若選用適當條件，如提高乙炔分壓和降低甲醛濃度，則炔丙基醇收率可進一步提高。

下列的 Table 2.1 及 Table 2.2 為本實驗測試化合物的基本物化特性資料，表中所列有關化合物的物化資料包含分子式(molecular formula)，CAS.number，分子量(molecular weight)，溶解性(solubility)，Log p value (octanol-water partition coefficient)，蒸氣壓 (vapor pressure)，亨利常數 (Henry's constant) 及其結構式(structure formula)。

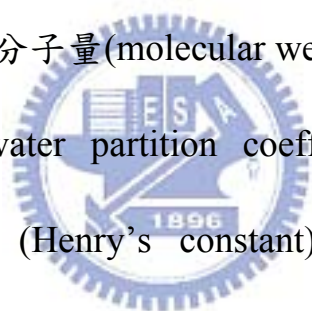


Table 2.1 化合物之物理化學特性

炔丙基醇類 (Primary)	分子式	CAS number	分子量	溶解性	log p*	蒸氣壓	亨利常數	結構式
2-propyn-1-ol 2-丙炔-1-醇	C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> O	107-19-7	56.06	9.35E+005	-0.38	15.6	1.15E-06	
2-butyln-1-ol 2-丁炔-1-醇	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O	764-01-2	70.09	3.42E+005	0.37	1.51	3.93E-07	
2-butyln-1,4-diol 2-丁炔-1,4-二醇	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	110-65-6	86.09	7.96E+005	-0.72	5.56E-04	1.44E-08	
2-pentyn-1-ol 2-戊炔-1-醇	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O	6261-22-9	84.12	1.23E+005	0.89	1.14	5.22E-07	
2-hexyn-1-ol 2-己炔-1-醇	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O	764-60-3	98.14	4.34E+004	1.42	0.33	6.93E-07	
2-heptyn-1-ol 2-庚炔-1-醇	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O	1002-36-4	112.17	1.49E+004	1.95	0.0987	9.2E-07	
2-octyn-1-ol 2-辛炔-1-醇	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O	20739-58-6	126.2	5052	2.48	0.0299	1.22E-06	
2-nonyn-1-ol 2-壬炔-1-醇	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O	5921-73-3	140.23	1689	3.01	0.0059	5.22E-07	
2-decyn-1-ol 2-癸炔-1-醇	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	4117-14-0	154.25	559.3	3.54	0.00155	2.15E-06	

Table 2.2 化合物之物理化學特性(續)

炔丙基醇類 (Homo)	分子式	CAS number	分子量	溶解性	log p*	蒸氣壓	亨利常數	結構式
3-butyn-1-ol 3-丁炔-1-醇	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O	927-74-2	70.09	4.74E+005	-0.18	1.51	7.8E-07	HC≡CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH
3-pentyn-1-ol 3-戊炔-1-醇	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O	10229-10-4	84.12	1.24E+005	0.34	1.14	5.22E-07	
3-hexyn-1-ol 3-己炔-1-醇	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O	1002-28-4	98.14	4.34E+004	0.87	0.33	6.93E-07	
3-heptyn-1-ol 3-庚炔-1-醇	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O	14916-79-1	112.17	1.49E+004	1.4	0.0987	9.2E-07	
3-octyn-1-ol 3-辛炔-1-醇	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O	14916-80-4	126.2	5052	1.93	0.0299	1.22E-06	
3-nonyn-1-ol 3-壬炔-1-醇	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O	31333-13-8	140.22	1689	2.46	0.0059	1.62E-06	HOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> C≡CCH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>
3-decyn-1-ol 3-癸炔-1-醇	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	51721-39-2	154.25	559.3	2.99	0.00155	2.15E-06	

溶解性：mg/L \*(version 1.67 estimate) by USEPA 蒸氣壓：mmHg 亨利常數：atm·m<sup>3</sup>/mole



### 2.1.2 炔丙基醇類之應用

炔丙基醇類的應用也十分廣泛,涵蓋範圍包含了化學、醫藥、石油、農業等等,在化學方面它是有機合成的重要中間體,他可以用來製造丙烯酸、丙烯醛、維生素 A、2-氨基嘧啶,在工業用途方面也可用作除鏽劑,它能抑制強酸物質等對鐵銅鎳等金屬的腐蝕,在石油開採的過程中常被使用;亦可單獨使用作為緩蝕劑,最好能同其產生協同效應的物質復配,以獲得更高的緩蝕效率。如為了增加炔醇在稀硫酸溶液中的緩蝕效果,推薦再加入氯化鈉、氯化鉀、氯化鈣、溴化鉀、碘化鉀或者氯化鋅等;它也可被用來當作溶劑(氯化烴類)的穩定劑,在農業方面,將其做為土壤的煙燻劑,除草劑,殺菌劑等等。

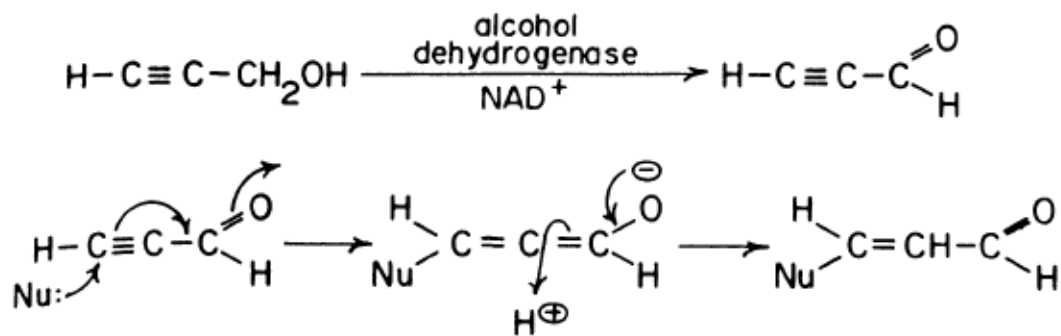


### 2.1.3 炔丙基醇之毒理特性

根據先前學者DeMaster et al.(1994)對老鼠肝臟粒腺體試驗的研究中指出,對於低分子量的醇類大部分都會和醇脫氫酶(alcohol dehydrogenase, ADH)行催化反應,而炔丙基醇為此酵素的抑制因子,在之後的研究才又指出主要的抑制因子為炔丙基醛(Propargyl aldehyde),而Veith et al.(1989)指出,炔丙基醇的作用機制為一個具前親電性(proelectrophile)的機制,而之中包含了醇脫氫酶代謝的轉換成 $\alpha,\beta$ 未飽和的醛或酮類,而經過此代謝反應後產生的未飽和的醛

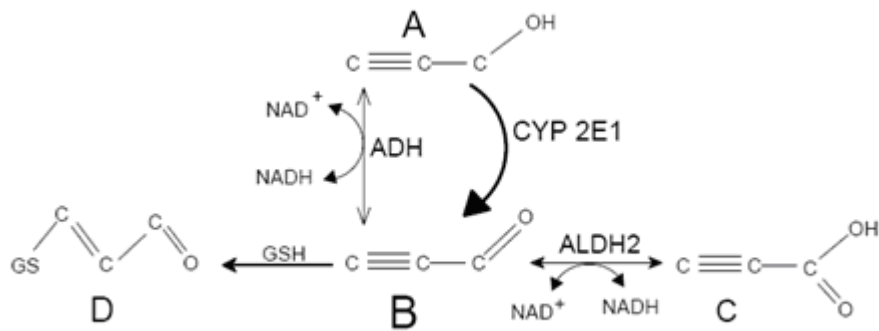
或酮會經由Michael-type reaction 的作用機制再被一些親核性的分子攻擊 (eg Nu = -SH, -NH<sub>2</sub>, -NH, or -OH) 後再經由互變異構化 (tautomerization) 形成不可逆鍵結之穩定結構，詳細的作用情形以

Fig 2.2說明：



**Fig 2.2 Primary 炔丙基醇前親電性之作用機制 (Veith et al., 1989)**

從 Moridani et al. (2001)的研究中也指出在獨立的肝細胞中鈍化的過氧化氫酶只有部分抑制了炔丙基醇的毒性，而他們也進一步證實炔丙基醇引發出細胞毒性 (cytotoxicity)，它會快速的消耗巯基甘肽(GSH)且活性氧化物 (ROS) 的形成造成細胞色素 P450 細胞代謝活性，此細胞色素 P450 為一種氫氧化酶，它負責許多藥物、致癌物、食品添加物、環境污染物的氧化代謝；而它所產生的毒性影響比過氧化氫酶或醇脫氫酶來的更為顯著；除此之外也發現它也負責了炔丙基醇活化成炔丙基醛的過程，詳細的代謝過程詳見 Fig 2.3 所示。



**Fig 2.3 Propargyl alcohol 生物代謝活性機制**

在這圖示中A代表炔丙基醇(2-丙炔-1 醇; 2-propyn-1-ol)，它主要被CYP2E1 酵素氧化以及部分的醇脫氫酶將其氧化成炔丙基醛，此醛類為一具化學活性的化合物，它能夠攻擊重要的細胞裡的大分子但是它會優先和麩胱甘肽形成共價產物D；而另一個對於此醛類的途徑為它會進一步的經細胞氧化經由醛脫氫酶(ALDH<sub>2</sub>)轉變為C，C為炔丙基酸( Propiolic acid )，分子式為C<sub>3</sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，而此化合物被分類為極具毒性之化學物質，但是沒有進一步對於水體生物的無理資料；而此為Propargyl alcohol主要的生物代謝活性機制。

而在 Primary homopropargylic alcohols 的作用機制方面，同樣也是根據 Veith et al. (1989)的研究，有關這類化合物的作用機制以下列的 Fig 2.4 來說明。

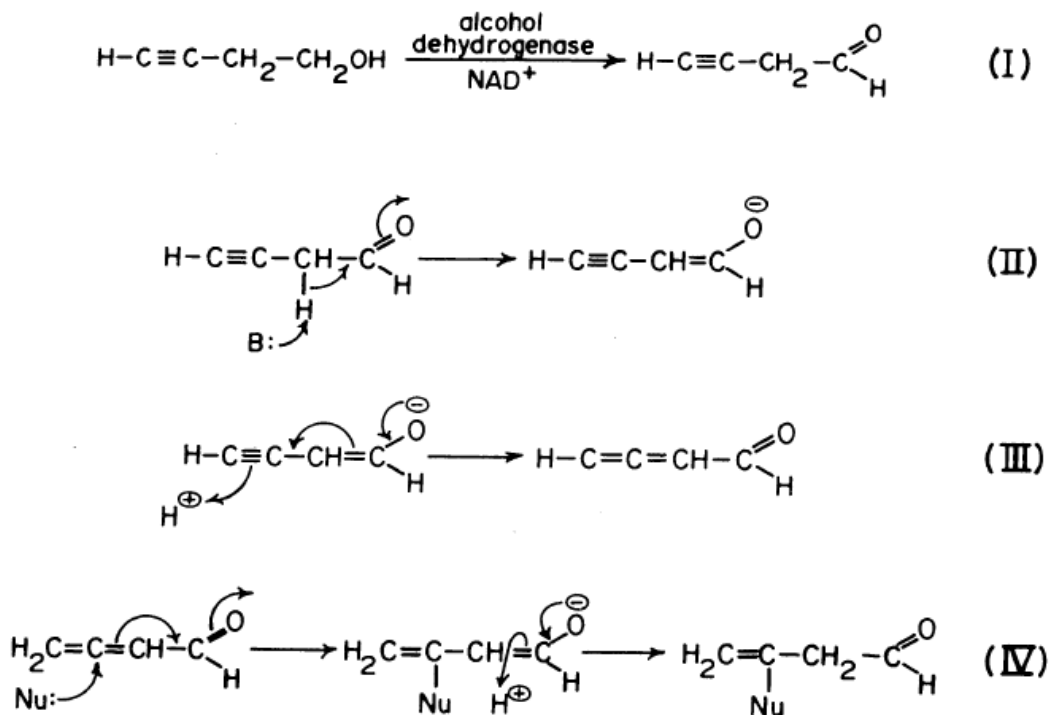


Fig 2.4 Primary homopropargylic alcohol (3-butyn-1-ol)的毒性代謝



在這邊我們以其中最簡單的 3-butyn-1-ol (3-丁炔-1-醇) 為例，他和 Primary propargylic alcohols 相同會再第一個階段 (I) 先經由醇脫氫酶 (ADH) 及輔酶(  $\text{NAD}^+$  ) 形成 3-butyn-1-al ( 3-丁炔-1-醛)，而和 Primary propargylic alcohols 所形成的  $\alpha, \beta$  未飽和的醛類不相同的是，此化合物並不是 Michael acceptor electrophiles，Fig 2.4 中接下來的 (II) 是所形成的 3-butyn-1-al 產生烯醇化作用 (enolization) 與陰離子 (anion) 鍵結 (III) 是結構產生互變異構化作用 (tautomerization) 變成丙二烯 (allene)；(IV) 則是結構會受到親核性分子 ( $\text{Nu} = \text{-NSH}, \text{-NH}, \text{-NH}_2, \text{or -OH}$ ) 攻擊後再經一次的互變異構化作用後形成不可逆的穩定鍵結

構，而此為Primary炔丙基醇主要的生物代謝活性機制。

而在 Bradbury et al. (1991) 針對 fathead minnows 的研究中也指出此類化合物與醇脫氫酶(ADH)的活性高低會直接影響到毒性的高低，在他的研究中 primary propargylic alcohol (2-propyn-1-ol)的 ADH 活性最低，而含有 2 個氫氧基的 2-butyn-1,4-diol (2-丁炔-1,4-二醇)ADH 活性最高，居中的為 2-butyn-1-ol (2-丁炔-1-醇)，而由實驗結果也發現到其毒性高低的比較為 2-propyn-1-ol (1.5ppm) > 2-butyn-1-ol (10.1ppm) > 2-butyn-1,4-diol (53.6ppm)，而與 2-butyn-1-ol 為同分異構物的 Primary homopropargylic alcohol(3-buty-1-ol)在此篇研究中也發現到他與 ADH 的活性較高，相對的所造成的毒性也來的較低(36.1ppm)，毒性相差達 3 倍以上，而這也提供了我在這篇研究中一個重要的依據。

#### 2.1.4 炔丙基醇類在環境中的分布及使用情況

根據本國環保署的公告此炔丙基醇類的使用量為1268公噸(2006; 台灣EPA)，而環保署也早在1999年將此項化合物列為列管毒性物質，並將其列為第三類毒性化學物質(化學物質經暴露，將立即危害人體健康或生物生命者)；而在全球主要有13個製造此類化合物的化學工廠，包含美國(6)、中國(3)、印度(2)、英國(1)、德國(1)，而由U.S EPA HPV Program 中也發現，在美國對於此類化合物具一定規模生

產數量及使用，而包含在德國，由德國的環境機構(BUA , The Advisory Committee on Existing Chemicals of Environmental Relevance) 在1996年的資料顯示，每年也約生產500-1000噸的產量，而每年約有0.75-3噸的數量進入到下水道系統，而針對此類化合物在環境中的分佈情形，從文獻( U.S. EPA HPV Challenge Program Revised Submission, 2003)中也看到利用EPIWIN V3.05這個程式依照其化合物的蒸氣壓及Log *k<sub>ow</sub>*值估算此類化合物在環境中之分佈，其分配比例如Fig 2.5所示。

○ Air	3.1 %
○ Water	53.6 %
○ Soil	43.2 %
○ Sediment	0.09 %

**Fig 2.5 炔丙基醇在環境中的分佈比例**

其中如圖所示，約有一半以上的數量可能進入到水體環境，造成水體環境的汙染及破壞，所以更值得我們去深入的加以研究及探討此類化合物的影響程度。

## 2.1 藻類毒性試驗

### 2.2.1 試驗物種簡介

在本實驗中所使用的月芽藻 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) 屬於單細胞綠藻 (*Chlorophyceae*) 其特徵為成群體但不糾結、不能移動，一般細胞尺寸長×寬為  $8-14 \times 2-3 \mu\text{m}$  體積為  $40-60 \mu\text{m}^3$ ，典型的月芽藻體積約為  $45 \mu\text{m}^3$  且重量介於  $2-3 \times 10^{-8} \text{mg/cell}$  之間，因為體型呈半月型，所以稱為月芽藻，具備有取得容易、培養簡單、容易觀察、生長期短、可以大量生長、具有地區代表性等實驗用的藻種需具有的特點，並較其他微生物試驗來的敏感( U.S.EPA, Ecological Effect Test Guidelines, 1996) 。此外，當生長環境中缺少營養鹽或是溫度、光線、pH等環境條件不佳時，藻體會逐漸呈現很明顯的黃綠色，因此當我們在實驗室培養的過程中，由外觀上可以容易的去判斷。若是以顯微鏡觀察其外型，則可發現其細胞外觀變得較為肥厚，半月型彎曲度也逐漸變小。以顆粒計數器觀察其粒徑的分佈變化也可發現大粒徑的藻類分佈變多，而小顆粒的藻類分佈相對減少則可判斷此藻種的健康情形不佳。

## 2.2.2 藻類計數方法

在進行藻類毒性試驗時，我們必須要有一個能夠正確的反應出藻類生長情況之方法。一般說明藻類生長情況之參數為細胞密度、細胞總體積、乾重、葉綠素、活體內螢光值、營養基濁度、產氣量、ATP及DNA等。目前測量藻類生長質量之方法有下列幾種：(1)顯微鏡計數法(2)電子顆粒計數法(3)直接乾重量測法(4)光學顆粒計數法(5)分光光度計測量葉綠素A法(6)螢光光度計測量葉綠素A法(7)DNA測定法(8)ATP測定法(9) 溶氧測定法Chen et al. (2000) (10)  $^{14}\text{C}$  輻射標定法等。



一般藻類毒性試驗之標準方法，例如 U.S.EPA(United States Environmental Protection Agency)、OECD(Organization for Economic Cooperation and Development)、ISO(International Organization for Standardization)、ASTM(American Society for Testing and Materials)、APHA(American Public Health Association)，上述組織都以測量藻類的生物質量(biomass)為主，而生物質量都以直接稱重(乾重)之方法測得，但由於方法較耗時之因素，因此現今則利用電子或光學顆粒計數器等以間接量測生物質量的方法取代直接稱重法。因為此方法簡單、迅速、所需藻液量少且與生物乾重間有良好之相關性。

溶氧測定法為直接量測水中溶氧之變化，再依此計算出藻類生長之



情形。(Hostetter, H.P., 1976)發展出一套量測水中溶氧之藻類試驗方法，試驗時間縮短至二十四小時，且在 *Raphidocelis subcapitata* 的試驗之中發現，當一或多種之營養鹽呈限制性狀態時，藻類之淨光合反應量會與限制性營養鹽呈現線性關係。(Mingazzini et al., 1997)利用氣泡式呼吸儀連續監測氧氣之變化量，有效的在 1 小時之中量測出 atrazine 及 DCMU 對 *Raphidocelis subcapitata* 之毒性。

$^{14}\text{C}$  輻射標定法是在進行毒性試驗之前，先將水中之碳以同位素  $^{14}\text{C}$  取代。在進行藻類毒性試驗時，因藻類行光合作用會消耗水中之同位素  $^{14}\text{C}$ ，此時再以輻射標定法量測水中同位素  $^{14}\text{C}$  之殘餘量，進而得知藻類生長之情形。Nyholm et al. (2000)認為在相同的試驗狀況之下，試驗時間為六小時之  $^{14}\text{C}$  輻射標定法已足夠作為急毒性試驗之判斷，但其敏感度不及於量測生長抑制之方法。利用  $^{14}\text{C}$  輻射標定法可以縮短試驗時間並可處理大量之樣本，但此方法之缺點為成本高且需要訓練有素之輻射標定專業人員。

### 2.2.3 連續性藻類培養方式(Continuous culture technique)

連續式培養系統包含連續供應新鮮基質至反應槽中，使藻類處於最佳生長狀況，並連續將槽中新陳代謝物質排出。此系統相當類似於自然水體，因低濃度的營養鹽不斷的注入基質中，而所加入的營養鹽與藻類生長產生一動力平衡。

基本上，連續式系統可以分為兩類：The chemostat 及 The turbidostat。於 turbidostat 反應槽中，細胞濃度由光電附著方式維持在一固定常數，當細胞密度超過預先設定位時，光電池將管閥開啟使新基質自儲備槽流入以稀釋反應槽內的細胞密度，同時將等量的細胞及基質自槽中溢流出去。Chemostat 系統包括自培養槽連續加入及移除基質，細胞密度是由營養基的濃度及進流速率控制。新鮮基質加入越快，則細胞成長速率越快。Chemostat 及 turbidostat 的差異在於他們控制生長的方式不一樣。Chemostat 由限制新鮮基質的濃度及進流速率來控制生長，常運用於研究限制性營養源對藻類生長之影響。而 turbidostat 隨時監控槽內生物濃度，基質流入速率由細胞密度所控制。

一般而言，Chemostat 較 turbidostat 受歡迎，因 chemostat 其架設費用較低，器材也較易取得。在本實驗中我們使用 chemostat 來進行藻類連續式的培養方式。

#### 2.2.4 藻類毒性試驗方式

根據藻類培養方式的不同，藻類毒性試驗可分為批次式和連續式這兩種。目前已有的標準藻類毒性試驗方法，大都屬於批次式，如 U.S. EPA 所採用的 "Fresh water algae acute toxicity test"、OECD 所採用的 "Algal growth inhibition test guideline"、ISO 所採用的 "Water quality-algal growth inhibition test"、APHA 所採用的 "Toxicity testing with phyto-plankton" 及 ASTM 所採用 "Standard Guide for Conducting Static 96-h Toxicity Tests with Microalgae" 等。

批次式毒性試驗為起初提供藻類足量的生長基質，但在後續的實驗過程中就不再有任何基質的添加，亦無藻類代謝物的流出。在此條件之下，飽合的基質會降低藻類毒性試驗的敏感度，也很難反應出真實水體中的情況；但由於實驗方法操作容易且成本低廉，可同時處理大量的樣品，因而到目前為止仍被廣為始用。

連續式毒性試驗則是控制基質不斷地流入系統中，符合自然水體的真實情況，代謝物也同時流出，使得藻類保持在良好的生長狀態之下。但是由於整個系統之流量不易控制，所以目前並無一套標準的試驗方法。連續式毒性試驗又可分為 Turbidostat 和 Chemostat 兩種。Turbidostat 是利用光電原理來控制，當槽內細胞密度超過穩定值時，系統將流入新鮮基質以稀釋槽內的細胞密度；而 Chemostat 是

利用穩定的基質進流率，而達到整個系統細胞密度的穩定。Table 2.3 則為批次式及連續式藻類毒性試驗之優缺點比較。

**Table 2.3 批次式與連續式藻類毒性試驗之優缺點比較**

	優點	缺點
批次式	1. 培養技術簡便且成本低 2. 樣品處理量大 3. 實驗數據取得容易	1. 使用高於自然水體的營養鹽濃度 2. 無法反應自然水體之情況 3. 再現性不佳
連續式	1. 符合自然水體情況 2. 實驗敏感度高 3. 代謝物不累積	1. 設備組裝費時 2. 流量控制不易 3. 數據取得困難

在本研究中所使用的方法可分為兩大部份：在藻類培養部份是採用「連續式的培養」，之後則是採用「批次式 BOD 瓶毒性試驗」。其各別內容如下所述：

#### (1) 藻類連續式培養方法

首先將保存在洋菜膠內的月芽藻自冰箱中取出，放置於錐形瓶中活化，待錐形瓶中藻類的數目達最大生長量 80~90% 的時後，再置入連續式培養母槽中。藻類生長所需的營養鹽加入量是由蠕動幫浦

控制；而為了使藻類達到較佳的敏感性，在(Chen and Lin, 1997)所發展出以 Chemostat 為基礎的連續式藻類培養方法當中，使用四公升的母槽以連續式的方式來培養藻類，並控制每日基質的溢流率為一公升，如此便可使得藻類能夠維持在對數生長期及穩定期有較長的時間；在此同時，即可由母槽中取出藻液進行毒性試驗，並非直接將毒物加入母槽內，故母槽將不被污染；而且亦不會有在一般連續式實驗的方法中，需等待系統回復穩定後才能再進行下一批實驗的情況發生，此方法將可使得毒性試驗的頻率大幅增加。

## (2) 批次式毒性試驗：

Huang (2000)發展出一套「四十八小時的批次式BOD瓶毒性試驗」，在整個過程中無任何基質的添加，也無藻類代謝物的流出；其特點為操作簡易，節省了大量的成本與時間的耗費，對於實驗數據也有很高的再現性。Hsu (2000)以此系統進行苯類、甲苯類、氯甲苯類和氯乙烷類等有機物的毒性試驗，與開放式系統的結果相比較後，發現此實驗方法有較佳的敏感度。Kao (2001)則是發現與傳統上批次試的實驗方法相比較後， $EC_{50}$ 值相差了數十倍，也就是說本系統應在揮發性有機物的毒性試驗上有很好的適用性。

## 2.2.5 試驗中的重要參數

生物實驗中其中一個重要的部分就是保持實驗條件的恆定，其實驗結果才會有公信力，不然往往會因為實驗條件的變動造成實驗結果的誤差，以下為本研究室實驗中所考慮的重要參數：

### (1) 光照強度

光照的強度會影響藻類行光合作用之速率，因而造成其產氣率之不同。藻類毒性試驗之中，光照的強度依照不同的試驗標準及不同藻種而有些許的差異。在實驗室培養藻類時必須要考慮「自身遮蔽」效應 (self-shading)，此效應會造成距光源較遠處之光照與較近處之光照強度之差異，良好的混合可以減低自身的遮蔽效應並使光照有更好的利用效率。Nyholm et al. (1989)提到光照強度會影響藻類行光合作用因此在藻類毒性試驗設計中如要使藻類維持在對數生長期，則光照需設為常數。光照強度在良好的培養條件之下，並能使藻類呈現指數生長、縮小培養體積及維持充分的混合有助於達到理想狀態。本研究依(U.S.EPA Ecological Effect Test Guidelines, 1996)標準方法針對*Pseudokirchneriella subcapitata*的規定，於連續式培養和批次試驗中所選擇的光照的強度為  $64.5 \pm 10\% \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  (4300 lux)，且以連續式的光照來排除光暗交替循環式的光照所導致的藻類生物質量變異的缺點。

## (2) pH 值的控制

是否需要控制 pH 一直被廣為討論及研究但是用來預測在某特定的 pH 值狀況下之物種濃度影響困難度很高，因此標準藻類毒性試驗皆傾向其 pH 值維持在固定。

在毒理學的觀念，pH 值若變化一個單位，可能導致毒性改變 10 倍以上； pH 值控制值隨不同的標準方法而有差異，U.S. EPA 規定最終 pH 值需在 8.5 之下(U.S.EPA Ecological Effect Test Guidelines, 1996)，OECD 則要求 pH 值之最大變動不要超過一個單位(OECD,Guideline for testing chemicals, 1984)；ISO 則是要求 pH 值之變動在 1.5 個單位之內(ISO, 1987)。若決定試驗在一固定 pH 值下進行時，就必須小心地確保 pH 值之變化為最少。欲減少 pH 值之改變，大致的方法有下列幾種：(1)使用較低之生物接種量 (2)縮短整個試驗之時間 (3)以空氣或是添加二氧化碳之空氣加以曝氣(4)保持良好通風。

## (3) 溫度

當溫度逐漸增加時，藻類會呈現指數生長，而當達到其最適生長溫度後即迅速下降。本研究採用 U.S. EPA (U.S.EPA Ecological Effect Test Guidelines, 1996)建議的  $24^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  環境下來培養藻類來進行實驗，整個培養及試驗過程中，溫度之變化不可大於  $2^{\circ}\text{C}$ 。

#### (4) 植種數量與時間

對批次式實驗而言，若實驗開始時的植種數量過高，將會造成實驗後期由於藻類細胞大量增加造成代謝物累積及水中碳源耗盡，而導致pH值升高等問題，進而影響毒性試驗結果之精確度。Lin (2001)針對不同試驗時間和不同初始植種密度進行敏感度和變異性的分析，發現生物毒性試驗隨著時間增加，其敏感度提高而C.V.值減少；而隨著初始植種密度減少，其敏感度提高但C.V.值亦提高。而根據Vasseur and Pandard (1988)改變初始生物量進行批次試毒性試驗，結果也證實當提高實驗初始生物量時，EC<sub>50</sub>值也顯著提升。在兼顧兩者的考量下，選定最佳化條件為藻類初始植種密度  $1.5 \times 10^4$  cells/ml。

試驗時間的長短會關係到毒性試驗的敏感性和數據結果。過長的試驗時間，會使得存在於 BOD bottle 內的營養鹽不足，使得藻類有死亡的現象，此外過長的試驗期間，也會使得毒性的反應消失。本實驗選定的時間為四十八小時。

#### (5) 試驗基質

實驗培養基的成份是影響微生物毒性試驗結果的重要因子之一 (Chen, 1994)，其主要之影響培養基其主要之影響培養基因子有 pH、硬度、螯合劑、氮、磷及一些主要陽離子元素，於試驗中會額外加入一定量之螯合劑(EDAT)。此外，氮、磷元素對於藻類生長與毒性



試驗結果影響最大。因此即針對上述之培養基質進行分別探討。

### (1) 氮、磷的影響

在一般的自然水體中，存在這各種不同的生長元素，其中以氮、磷兩種元素為藻類生長的主要限制因子。Lin et al. (2005)針對鋅及酚進行毒性試驗結果後發現，當U.S. EPA營養基質的 $\text{HCO}_3^-$ 加倍時，對毒性試驗敏感度之影響並沒有一定之趨勢，且並不會對其毒性反應造成太大之影響。而影響藻類生長最主要的因素則為氮或磷的濃度，因此該兩種元素即為藻類生長的限制性因子。

在水中只有 $\text{PO}_4^{3-}$ -P形態能夠直接被藻類吸收，因此在各種藻類試驗方法中，磷皆是以正磷酸鹽之型態存在(如ISO和OECD是 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ，U.S.EPA是 $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )，至於氮的形態，由於 $\text{NO}_3^-$ -N及 $\text{NH}_4^+$ -N皆能被藻類吸收，在ISO和OECD用的是 $\text{NH}_4^+$ ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ )形態，U.S.EPA用的則為 $\text{NO}_3^-$ ( $\text{NaNO}_3$ )形態。Millington et al. (1988)發現自營菌無法像異營菌能快速利用 $\text{NH}_4^+$ -N而快速生長，且 $\text{NO}_3^-$ -N不似 $\text{NH}_4^+$ -N那麼容易為異營菌所使用，因此一般自然環境中藻類的氮源大都為硝酸態。

### (2) 螯合劑(EDAT)的影響

一般為使試驗之狀態符合自然環境狀況及讓藻類能有效利用微量元素，在未受污染的水體中螯合物的(EDTA)的濃度不超過 30

$\mu\text{g/L}$ 。 Berger et al. (1994)，於試驗時會在培養基中加入固定量之螯合劑，如ISO於培養基中加入  $78 \mu\text{g/L}$ 的EDTA螯合劑可助於藻類與水中必要元素的螯合，如此可確保毒性試驗期間藻類維持於對數生長期。但是，從文獻上顯示若毒性試驗過程中添加螯合劑會與常見二價金屬( $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 等)形成親水性錯合物，其對微生物的毒性比游離態之金屬來的低，進而影響毒性試驗結果，因此本研究於試驗時亦不加EDTA (Mazidji et al., 1992)。

本實驗參照 1996 年 U.S.EPA 之建議，批次式培養藻類時加入固定量(100%)之螯合劑於培養基中，於連續式培養藻類之營養基質中亦加入固定量之(10%)之螯合劑，而於進行毒性試驗時培養基中則不添加任何螯合劑。



### 2.2.6 密閉式試驗方法

為了要提供足夠的碳源 $\text{CO}_2$ 以避免藻類因為碳源不足生長受到抑制以及能確保毒性物質在試驗時間內能維持穩定的濃度在藻類毒性試驗中扮演很重要的角色；依之前不同的學者研究發現，主要是依照有無headspace兩個系統；和開放式系統相比，含headspace的密閉式系統具有對揮性有機物試驗結果較開放式系統敏感的優點，然而此類設計還需針對碳源及有機物濃度加以控制，以及需要特殊的實驗設備的缺點。

Brack and Rottler (1994)設計了一個間接提供碳源的密閉系統，採用雙層構造的玻璃瓶，將藻液及有機物置放於上方，下方則注入 $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ 緩衝液。(Kuhn and Pattard, 1989)以柵藻(*Scenedesmus subspicatus*)為測試物種來進行毒試驗，使用無機碳與有機碳作為藻類生長所需碳源，並指出密閉的環境於 48 小時之內對藻類不會造成重大的衝擊。(Glaassi and Vighi, 1981)利用一密閉式且恆溫的條件之下滿可保證水中揮發性物質的濃度不變，因此發展出一套AAPBT的系統來測定揮發性物質的毒性。其利用一 2 升之密閉容器，其中試驗溶液僅 100 ml，目的在於利用剩餘大空間提供足夠之 $\text{CO}_2$ ，以避免碳源匱乏而影響藻類敏感度，但實驗中物質濃度僅由亨利定律推算，並無真正測得溶液中實際濃度。Herman et al. (1990)改善此項缺點，其在密封之 125 ml 試管中進行試驗，除了於 50 ml 試驗溶液中添加 0.4%  $\text{NaHCO}_3$  提供充份的碳源，且同時監測試驗溶液與其上空間(head space)之濃度，證明濃度無顯著不同。有關這三種藻類毒性試驗系統（開放式、含headspace之密閉式、不含headspace之完全密閉系統）對揮發性有機物試驗敏感度比較可參閱Mayer et al. (2000)的實驗，結果顯示在相同的實驗條件下，完全密閉式系統中藻類抑制率最多可達 84%，而留有headspace的密閉系統以及開放式系統中藻類抑制率最高僅達到 19%以及 14%，有機物因為揮發而降低對藻

類的敏感度現象極為明顯；實驗結果證明不含headspace之完全密閉式系統是評估揮發性有機物毒性最佳的選擇。

### 2.2.7 密閉式 BOD 瓶藻類毒性試驗

本研究使用了具有完全密閉系統優點之 BOD 瓶進行毒性試驗。過去實驗室發展出連續式培養加上 BOD 瓶密閉試驗系統，利用連續式的培養方法結合了 BOD 瓶發展出試驗方法為「48 小時的批次式 BOD 瓶藻類毒性試驗」其主要為使用體積 300mL 的 BOD 瓶，將藻類、營養鹽和試驗毒物加入其內，再以瓶蓋密封，造成無 headspace 的密閉環境讓藻類暴露於毒性物質一段時間，由觀測終點量測實驗組與無暴露之控制組的抑制情形並進行比較分析。全部實驗過程中沒有新鮮基質的加入，也沒有藻類之代謝物移出，主要優點為操作簡單，時間與成本的耗費也大幅減少，且可處理較大量的樣品數、實驗數據取得容易，所以相對了提高實驗的再現性，利用本實驗方法來評估有機物質對藻類之毒性試驗研究成果也已經在許多期刊中發表 Chen et al. (2005, 2006, 2007)。

## 2.3 Solvent control

在進行生物毒性試驗之前，若實驗之毒性物質具有難溶於水之性質時，一般皆為使用溶劑幫助毒性物質溶解以利後續的定量及毒性試驗之工作。然而溶劑也是屬一種化學物質，也就是溶劑本身也具有一定之毒性能力，因此在選擇溶劑時需注意：1.選擇之溶劑可以使進行生物毒性試驗之毒物達到 100%的溶解，並且在進行毒性試驗時也不會產生再溶出之現象。2.進行生物毒性試驗前需先進行溶劑對照(solvent control)之分析，得知溶劑之毒性大小以評估對生物毒性試驗之影響性。3.應避免所選之溶劑會與毒物進行化學反應，進而造成毒物之毒性有所變化。

一般在生物毒性試驗所選擇之溶劑包含二甲基甲醯胺(Dimethyl Formamide, DMF)、二甲亞砜(Dimethyl Sulfoxide, DMSO)、三乙三醇(Triethylene Glycol, TEG)及丙酮(Acetone)。(Willford,W.A., 1968) 針對魚類(96h-LC<sub>50</sub>)之容許溶劑濃度：丙酮= 9,100 mg/L，DMF= 10,410 mg/L，DMSO=33,500 mg/L，TEG= 92,500 mg/L。而本研究之DMSO進行solvent control之分析結果由Table 2.4 (蔡定裕, 2006)顯示出EC<sub>50</sub>、EC<sub>10</sub>及NOEC值。而在進行毒性試驗前的儲備液的配製方法為將溶解度較低的一級炔丙基醇類(2-nonyl-1-ol，2-decyl-1-ol，3-nonyl-1-ol，3-decyl-1-ol )先溶於 1000mg/L之DMSO中，再將毒化

合物與之混合，而在進行毒性試驗時加入之DMSO最高量皆小  
1mL，由此可得知對於毒性試驗而言溶劑之毒性影響不大。



**Table 2.4 The solvent control of DMSO in algal toxicity tests**

實驗毒物：	DMSO		初始細胞密度(cells/mL)：	15000					
MCV (μm <sup>3</sup> )：	40.67	D (μm)：	4.267	Initial pH：	7.44	EDTA(%)：	0		
T(°C)：	24	Test duration：	48-h						

Conc	Initial DO	Final DO	Final cells	Delta DO			IR	IR	IR
mg/L	mg/L	mg/L	cells/ml	mg/L	μspecific	μrelative	( growth rate)	(Biomass)	(DO)
Control	0.9167	3.736	251900	2.820	1.410	1	0	0	0
21525	1.206	2.096	69600	0.890	0.7668	0.5436	0.4559	0.7695	0.6844
14228	1.096	2.400	103900	1.303	0.9676	0.6862	0.3139	0.6247	0.5378
6931	1.006	2.870	124550	1.863	1.058	0.7505	0.2496	0.5375	0.3392
3283	1.046	3.216	177200	2.170	1.234	0.8754	0.1246	0.3153	0.2305
2189	1.076	3.446	188100	2.370	1.264	0.8967	0.1035	0.2693	0.1595
1094	0.976	4.006	235250	3.030	1.371	0.9720	0.0242	0.0702	-0.0744

ΔDO : EC<sub>10</sub> = 1516.8 mg/L , NOEC = <2189 mg/L

IR : Inhibition rate

Final yield : EC<sub>10</sub> = 816.10 mg/L , NOEC = 1094.5 mg/L

Biomass : Yield f (Final yield based on cell density)

Growth rate : EC<sub>10</sub> = 2369.3 mg/L , NOEC = 1094.5 mg/L

## 2.4 QSAR 的討論

### 2.4.1 QSAR 介紹

最早開始研究討論化學物質的結構及活性之間關係是約在西元 1930~1960 年期間，Miller 和 Ferguson 提出了所謂 formal structure-activity relationship 的理論基礎，之後主要應用於醫藥及農業方面的研究，一直到了西元 1970 年，才有學者提出了 Quantitative Structure-Activity Relationships (QSARs)，並且開始廣泛地應用在環境毒理學上的研究。Hansch et al. (1963)指出，分子對生物體造成的活性，主要與分子本身的物理和化學性質有關。簡單來說，QSAR 就是以化學物質的化學或物理性參數，建立出一個模式用來描述並預測此化學物質與這些參數之間的毒性關係而這也成為之後運用在用來評估工業中麻醉性的有機化合物的毒性關係。

在環境毒理學中，因為化學物質由於各種行業需求的不同而被大量合成製造出來，所以 QSAR 的建立即是為了能夠先去預測不斷產生的新化學物質的毒性，因此具有高預測能力的 QSAR 模式的建立是我們所希望能夠得到的，而為了使 QSAR 讓我們能對預測毒性有所幫助，在 QSAR 所使用的各種參數當中，應在極小的偏差範圍之內必須能夠很準確地預測出毒性，這樣才能夠更真實地去預測化學物質在真實環境中的毒性影響，除此之外，QSAR 的建立只能針



對某些種類的化學物質及其衍生物，去預測它們的毒性，而並非以一種模式就可以包含各種型式的化學物質，另外，無論是從文獻中查閱，或是經由實驗而得到的結果，在 QSAR 當中所使用的一些化學或物理性的參數，都必須能夠容易獲得，這樣對於預測化學物質的毒性方面也比較清楚明白，而這也是之中較為困難的部分，因為畢竟化學物質種類繁多，這方面仍需更多的研究並作更深入的探討。

Hansch et al. (1963)認為化學分子主要會影響生物活性的因素有：(1)疏水性特性(2)電子特性(3)空間特性，他採用了辛醇與水係數 (octanol-water partition coefficient) 當作化學物質進入生物體磷脂雙層的係數，針對這些發生於生物體巨大分子的參數交互影響之下，他以分配性 P (partitioning) 說明這些觀察得到反應關係，另外像是空間性的參數 S (steric properties)和電子性的參數 EI (electronic factors)則需更多較正確毒性反應關係來作為論證，他也假設以下方程式，表示化學分子對生物體所造成的毒性： $\log(C) = x + a(EI) + b(P) + c(S)$ ，C 的單位為莫耳濃度，a、b、c、x 分別為經驗係數用來修正方程式的毒性數據資料。

McFarland (1970)則是認為化學物質的毒性可以表示成下列兩個因素的結合：(1)毒物進入生物相的穿透力 (2)毒物和反應位置的相互作用。用數學式可表示如下：

$$\text{Log (toxicity)}^{-1} = A [ \log (\text{penetration}) ] + B [ \log (\text{interaction}) ] + C$$

Heath (1995)認為許多物化作用機制會影響化學物質穿透細胞膜，例如分子量、分子表面電荷、分子體積、分子在水中的濃度。要建立一個好的 QSAR，必須要同時考慮親油性、電子的和空間的三種作用：

#### (1) 親油性參數 (Hydrophobic parameter)

這方面的參數包括溶解度、辛醇-水分配係數等，其中又以辛醇-水分配係數最常被用到，一般表示成log P或log K<sub>ow</sub>，儘管各類化學物質和不同生物系統的作用未必相同，但是當化學物質要進入細胞體內時，親油性的作用機制將優先考慮於化學物質和反應位置的作用，因為疏水性物質對細胞的作用機制被認為與被動擴散有關，所以穿透細胞膜的能力是與化學物質的疏水性有直接關係。Russom et al. (1997) 指出log P值越高的物質會增加物質在水中與生物相 (Biophases) 的平衡時間，因而增加其LC<sub>50</sub> ratio (24h LC<sub>50</sub> / 96h LC<sub>50</sub>)。現今已有很多方法可以利用電腦軟體幫助我們預測化合物的log P，但由於彼此之間的預測起始點不同，因此導致有不同的結果，尤其是對於一些低溶解度的化學物質，預測的結果常會與實驗所得的結果有偏差(Nirmalakhandan et al., 1998)。

## (2) 電子參數 (Electronic parameter)

這類型的參數包括有原子電荷數 (Atomic charge)、分子軌域能量 ( $E_{\text{homo}}$ 和 $E_{\text{lumo}}$ )、非區域化 (Delocalizability)、Hammett取代基常數 (Hammett sigma substituent constant)和還原位能 (Reduction potential)等。根據Atkins (1994)第五版的物化課本中指出，highest occupied molecular orbital (HOMO) 和 lowest unoccupied molecular orbital (LUMO)這兩個軌域會共同形成分子的「Frontier orbitals」，這個軌域對於一個分子的化學及光學性質具有高度的關聯性。當分子之間以形成電荷轉移方式相互作用時，HOMO可作為分子給予電子能力的量度；而LUMO則可做為分子接受電子能力的量度，亦即電子是從HOMO轉移至LUMO，因此透過HOMO和LUMO來了解分子的電離能力和電子親合力。

## (3) 空間參數 (Steric parameter)

這類型的參數包括總表面積 (Total surface area)、總分子體積 (Total molecular volume)和Taft取代基常數( $E_s$ )等。Di Marizo and Saenz (2004)認為分子體積越大的化學物質，其毒性越高，因為在相同濃度的溶液當中，分子體積較大的化學物質佔有較大的體積分率。

#### (4) 分子連結參數 (Molecular connectivity indices, MCIs)

Randic (1975)所提出，所代表的是化學結構上的鍵結與分支，可將其量化的結果做為化合物的參數，此一參數並非物理或化學性質，所以很容易利用演算法從結構式中取得。

#### (5) 線性溶劑合能關係 (Linear Solvation Energy Relationship , LSER)

利用溶質-溶劑作用力 (Solute-solvent interaction)當作化合物參數，以四個分子的性質表示為：內在分子體積 (Intrinsic molecular volume)、溶劑作用參數 (Solvatochromic parameter)、極性或極性能力量度(Measure of polarity polarizability)，而其缺點為分子特性不易找到，使參數求取有困難。

Ren (2002)利用了四種水溶性參數 (Solute descriptor)，去區分有機物的毒性作用機制，Feng et al. (1996)和Gunatilleka and Poole (1999)亦曾利用這些參數去預測有機物毒性對水中生物的影響，這四種參數分別為：R代表超額莫耳分率 (Excess molar refraction)、 $\pi_H$ 代表溶液的極性 (Solute's dipolarity/dipolarizability)、 $\sum\alpha^H$ 代表溶液的有效氫鍵酸度 (Solute's effective or summation hydrogen-bond acidity)、 $\sum\beta^H$ 代表溶液的有效氫鍵鹼度 (Solute's effective or summation hydrogen-bond basicity)。

Calamari et al. (1983)利用 *Onchorhynchus mykiss* 和 *Danio rerio* 兩種淡水魚類進行氯苯類的毒行試驗，在進行 QSAR 分析時，發現若以氯苯類的 potential nonpolar narcosis power (NP)針對 non-polar narcosis，也就是  $\log MW \times Kow$  去預測毒性，其效果會優於僅利用  $\log p$  去預測。



## 2.4.2 QSAR 在環境毒物學上的應用及分類

QSAR 是用來評估有機化合物毒性的工具之一，早期在 QSAR 的發展是先將化合物進行分類的基礎上而建立的，所以只限制於同類或具類似結構化合物的毒性預測。

Schultz et al. (1998)認為，在毒性分析上要建立有意義的 QSAR 模式，必須將不同毒性機制的化合物加以分類。

由於 QSAR 無法在不同毒性機制下討論，因此在建立 QSAR 模式前需先將毒物進行分類。Verharra et al. (1992)首先根據毒性反應的模式來分類，其依據之標準為毒性比例(Toxic Ratio; TR)。毒性比例 TR 的定義為：


$$TR = EC_{x, \text{baseline}} / EC_{x, \text{experimental}}$$

其中  $EC_{x, \text{baseline}}$  為預測之基線毒性(baseline toxicity)， $EC_{x, \text{experimental}}$  為測量之實驗值。

基線毒性可藉由 QSAR 來預測，而且通常以單一物化參數  $\log p$  來描述，但是  $\log p$  無法完整模擬生物薄膜的情況，所以在基線毒性中又分成非極性(non-polar)和極性(polar)麻醉作用(narcosis)。當某種化合物之毒性大於從 QSAR 預測非極性麻醉作用的 5-10 倍時，也就是  $5 \leq TR \leq 10$ ，則此化合物即被歸類為極性麻醉作用。反之，如某種化合物之  $TR \geq 10$ ，則此化合物即被歸類為反應性(reactive)或是特

別反應(specifically acting)，且當此化合物之  $pK_a \leq 6.5$  時，則該物質即屬於非耦合(uncoupler)之化合物(Schultz, 1987)。

此外，在利用 QSAR 分析極性和非極性的麻醉作用化合物中，如使用  $\log K_{lipw}$ - 薄膜脂質和水的分佈係數(membrane lipid-water partition coefficient)取代  $\log p$ ，則可使某二類之化合物被認為是同一類(Zhao et al., 1998; Escher et al., 2002)。

Di Marizo and Saenz (2004)認為麻醉性物質的作用機制是非特定性的，不會和生物體內特定的受器產生作用；也就是說，某化學物質會誘發麻醉效應的潛能，主要是決定在化學物質的疏水性。若無法得知某有機物的毒性作用機制，則這種有機物的毒性先會被判斷與他的疏水性質有關。Ferguson's principle 則說明了麻醉性物質，作用機制的速率限制步驟，是決定於毒物達到作用位置上所需的時間。

非極性麻醉物質的毒性大小可以和辛醇-水分配係數得到很好的線性關係，因此 Schultz et al. (1998)將非極性麻醉物質所造成的毒性，與  $\log p$  所得的回歸關係定義為基線毒性 (Baseline toxicity)，認為其毒性低於極性麻醉性的物質，而極性麻醉效應一般毒性皆高於基線毒性極性與非極性麻醉效應的差異在於氫鍵鍵結提供酸性之強弱 Schultz et al. (1998)，且主要作用方式為毒物從水相轉移至生物體

特定之反應位置，而與生物體進行相互作用。

Dearden et al. (2000) 則認為若化合物僅有分散力與誘導偶極力，則被定義為非極性麻醉效應，例如酮類、醇類與醚類化合物，這一類的物質會改變細胞膜的功能與結構。

Verharra et al. (1992) 認為極性與非極性麻醉效應的差異在於氫鍵鍵結提供酸性的強弱不同；另一方面，Veith and Broderious (1990) 認為：若化合物屬於極性麻醉效應，則其存在有較強的極化能力與氫鍵結的能力。

Schultz et. al. (1996) 認為 Respiratory uncoupling 會造成粒腺體中電子梯度的短路，因而阻礙了 ATP 的合成，但細胞的呼吸並不受影響；而 Respiratory inhibition 則會毒化細胞中的檸檬酸循環，而阻礙了細胞的呼吸。

Mekenyan and Veith (1994) 將 Electrophilic Uncleophilic 定義為化合物與生物系統形成共價鍵結，而不需與特定的接收者作用，其他反應性的毒物則會和反應中心產生不可逆的鍵結，因而產生抑制作用。



### 2.4.3 QSAR 之分類

一般性也就是麻醉性，主要可分為兩類：非極性、極性。非極性麻醉性通常是較遲鈍的化合物，也可被稱作第一類化合物（class I compound），在 QSAR 分析上，與辛醇與水係數（log p）成良好線性關係，也可定義為基線毒性(baseline toxicity)。極性麻醉性之化合物通常比第一類化合物活潑，包括了酚類與苯胺類等具有氫鍵給體（hydrogen bond donor acidity）特性的化合物。除了這兩種分類，文獻討論上還有另外一種不同的麻醉機制—Ester narcosis，Kamlet et al.(1987)指出酯類的毒性較非極性麻醉性毒性來的高。

化合物的作用包括了極性麻醉效應(polar narcosis)、非極性麻醉效應(nonpolar narcosis)、磷酸呼吸的未耦合(phosphoric acid respiratory uncouplers)與親電性(electrophilic)或親核性(nucleophilic)物質等。所有的有機化合物皆有能產生麻醉效應，但此效應於低濃度中會被許多特異性機制的存在而抵銷(Seward, 2002)。因此常被用於描述難分解化合物與細胞膜間非共價性的交互作用(interaction)，其原因在於擾動了膜層(磷脂雙層)間脂質與蛋白質的比例(Zhao et al., 1998)，改變細胞膜脂質成份，進而產生毒性效應。

極性與非極性麻醉效應通常可以過量毒性(Excess toxicity,  $T_e$ )來辨別，也就是  $T_e$  為預測之毒性大小相對於觀測毒性大小之比值。當

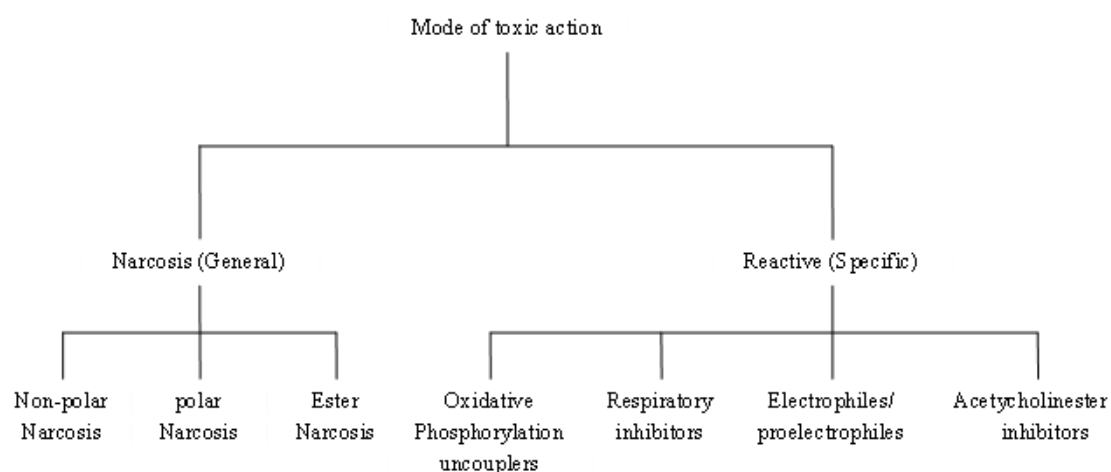
$Te < 2$  時其作用之機制屬於非極性麻醉效應;反之,  $Te > 2$  則其作用機制為極性麻醉效應 Lipnick et al. (1987)。若化合物屬於極性麻醉效應時, 則存在有較強的極化能力與氫鍵結之能力;若化合物僅有分散分與誘導偶極力, 則被定義為非極性麻醉效應, 例如酮類、醇類及醚類化合物(Di Marizo and Saenz, 2004)。(Schultz, 1987)認為酚類的 pKa 大於 8 時, 定義為極性麻醉效應, 而 pKa 小於 6.5 時, 定義為磷酸呼吸的未偶合。

而特異性也可稱為反應性, 這類型有機物除了具有非反應有機物毒性機制即分子之疏水結構具有麻醉效應毒性外, 其官能基和生物體內所產生之化學變化為主要之毒性來源, 通常此類有機物質的毒性超過基線毒性, 比非反應有機物還要毒。反應性有機物其官能基具有親電性 (Electrophile) 能與生物體內之酵素、反應位置之氨基及硫基產生鍵結、取代、錯合等之化學變化, 促使養分吸收、物質傳遞等新陳代謝循環之生化路徑因而受到破壞, 造成生命功能損壞。由於有機物質及生物體內之反應位置皆已產生化學變化, 無法像非反應有機物具有可逆性的效應, 因此反應性有機物質是屬於「不可逆毒性」。

Hermen (1990) 將化學物質廣義分成四大類: Class I inert chemicals、Class II less inert chemicals、Class III reactive chemicals、

Class IV specifically acting chemicals .

Russom et al. (1997) 則將有機物分成 Fig 2.6 的毒性機制，可分為一般的(General)和特異的 (Specific)兩大類型。一般性毒物是指麻醉作用在細胞膜非特定的位置上；而特異性毒物有又可稱為反應性毒物，它會作用在細胞的特定位置上或抑制特定的反應。



**Fig 2.6 Classification of toxicity mechanism in aquatic toxicity tests**

Lipnick (1991)將反應性有機分為四類，分別為反應性親電型毒性(Electrophilie toxicity)、反應性前親電型毒性(Pro-electrophilie toxicity)、反應性具氰基型毒性(Cyanogenic toxicity)和反應性多機制型毒性(Multiple toxicity)。

Lipnick (1991)對於在進行 QSAR 分析時，常會遇到的 outliers，歸納出 Table 2.5 中各種不同的毒性機制。

**Table 2.5 QSAR 分析中的 outliers 毒性機制分類表**

<b>1.Excess toxicity of electrophile nonelectrolytes</b>
Nucleophilic substitution: allylic and propargylic activation
Nucleophilic substitution: benzylic activated
Nucleophilic substitution: $\alpha$ -halo-(C=X, C $\equiv$ X)
Acid anhydrides
Strained three-membered heterocyclic ring
Michael-type addition
Schiff base formation
<b>2.Proelectrophile nonelectrolytes and excess toxicity</b>
Alcohol dehydrogenase activation
Monooxygenase activation
Glutathione transferase activation
<b>3.Cyanogenic nonelectrolytes and excess toxicity</b>
Cyanide release via cyanohydrin-like toxicant
Cyanide release via monooxygenase activation
<b>4.Excess toxicity from multistep or multiple mechanisms</b>

#### 2.4.4 炔丙基醇類之QSAR

文獻中提到有關於炔丙基醇類的QSAR分析主要是(Schultz, 1993; 1994; 2004)針對纖毛蟲(*Tetrahymena pyriformis*)所做的研究，他是以纖毛蟲經過40小時後的50%生長限制濃度 (IGC<sub>50</sub>) 和Log P做QSAR的分析，在primary propargylic alcohols方面，以Eq.1表示。

$$\begin{aligned}\log(\text{IGC}_{50})^{-1} &= 0.65(\log K_{ow}) - 1.22; n = 10; \\ r^2(\text{adj.}) &= 0.969; r^2(\text{pred.}) = 0.964; s = 0.222; \\ F &= 254; Pr > F = 0.0001 \quad (1)\end{aligned}$$

在primary homopropargylic alcohols方面，以Eqn 2表示。

$$\begin{aligned}\log(\text{IGC}_{50})^{-1} &= 0.80(\log K_{ow}) - 1.56; n = 8; \\ r^2(\text{adj.}) &= 0.986; r^2(\text{pred.}) = 0.984; s = 0.176; \\ F &= 413; Pr > F = 0.0001. \quad (2)\end{aligned}$$

本篇研究也是做相同化學物質而以月芽藻為實驗物種來做探討，由上述資料發現，纖毛蟲這種測試物種對於這類化學物種具有很好預測的能力，不過這也可能是測試物種的不同所造成的差異；Roy et al. (2005)也利用電子性參數(Electrophilicity index)  $\omega$  來對這類帶有炔基的醇類以纖毛蟲數據做QSAR的分析，分析結果如下：

$\alpha$ -acetylenic alcohols ( including primary propargylic alcohols)

$$\text{Log}(\text{IGC}_{50}^{-1}) = -60.88 * \omega - 15.03 * \omega_m + 36.15; r^2 = 0.768, \text{SD} = 0.454$$

unsaturated alcohols ( including primary homopropargylic alcohols)

$$\text{Log}(\text{IGC}_{50}^{-1}) = -10.37 * \omega - 3.256 * \omega_m + 4.465; r^2 = 0.751, \text{SD} = 0.32$$

其中 $\omega$ 定義為能量的減少率，而此減少率是由於電子傳遞者及接受者之間產生的最大電流Parr et al. (1999)；依照Veith (1983)的研究

指出要去預測前親電性物質化合物的毒性，在急毒性的研究中它的代謝活性比親電性的反應來的重要，針對此類前親電性化學物質在魚類的研究中也有學者提出只利用辛醇與水參數去做QSAR模式的建立預測的能力不好Mekenyan et al. (1993)，需再加入其他電子性參數及空間性的係數去作分析，而這和以纖毛蟲為測試物種所得到的結果有明顯差異，所以更加值得利用其他測試物種(Ex.藻類)加以研究討論。



## 2.5 Acute and Chronic Ratio ( ACR )

毒性化學物質在環境危害的評估過程當中因為通常進行慢毒性的試驗需時較長且耗費較高的成本，但是對於水體生物的慢毒性影響仍不可忽視。也因為如此根據不同物質而定義的急慢毒性比值 (Acute and Chronic Ratio ，ACR)是必需要存在的。U.S. EPA使用ACR的幾何平均值或一可替代利用的ACR值(a subset of available ACRs)來計算周遭水體慢毒性的標準。ACR值的計算可經由物種的急毒性結果(LC<sub>50</sub>)除以慢毒性結果(NOEC or LOEC)。計算方式如下：


$$ACR = \frac{\text{Acute toxicity}}{\text{Chronic toxicity}}$$

一般而言，ACR 的計算是根據一個實驗結果而得到的。而若缺乏慢毒性實驗結果時，一般會採用 ACR 為 10，利用急毒性的結果推估慢毒性的值。

在過去中，已有許多學者根據不同的數值方法來得到急慢毒性比值。Kenaga (1982)對於不同種的魚類及水中無脊椎動物建立了 LC<sub>50</sub>及慢毒性MATC之間的關係。進而從中發現了，工業有機化學物質的ACR值比一般農藥及重金屬的值要來的低。Mayer et al. (1994)的實驗中發現，使用魚類的急毒性數據可預測其NOEC及MATC的值。Persoone and Janssen (1994)兩位學者則認為ACR的變化隨著物種

和化學物質的不同從1到20000皆有可能，而絕大部份的ACR則是低於1000，一般來說是低於50。

大部分的毒性化學物質在環境中，對於其所作用的目標皆有屬於自己的作用機制。也因為如此，根據不同作用機制的物質訂立合適的ACR ratio才不會造成有高估或低估毒性的情形，方可真正達到保護我們水體環境的目的。





## 第三章 基本理論

### 3.1 基本生長動力學

在批次式藻類培養中，單細胞藻類的生長通常依循簡單的一階動力學：

$$\frac{dX}{dt} = \mu X$$

其中，X 為生物質量（一般以乾重或是細胞數表示之）； $\mu$  為比生長率；t 為時間。影響生長率之因子有光照、溫度、營養鹽及碳源之供應，如果光照、營養鹽或碳源受到限制，則藻類之基本生長模式將由指數型態變成直線型態。

在連續式藻類培養中，當系統達到一平衡（Steady State）時：

一、由反應槽中生物質量之平衡可得下列式子：

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - DX = (\mu - D) X$$

其中，D 為稀釋率（ $\text{day}^{-1}$ ）即入流量與反應槽體積之比值，當系統達到平衡穩定狀態時，

$$\frac{dX}{dt} = 0$$

$$\text{則 } \mu = D$$

此表示當反應槽達到平衡穩定狀態時，反應槽內生物之生長率即為該系統之稀釋率。

二、由反應槽內之基質平衡可得下式：

$$\frac{dS}{dt} = DS_0 - DS - \mu \left( \frac{X}{Y} \right)$$

其中， $S_0$  為入流基質濃度（mg/l）；S 為系統達平衡穩定狀態時，限制性基質之濃度（mg/l）；X 為系統達平衡穩定狀態時，生物質量之密度（cells/ml）；Y 為無因次之生長係數。

當系統達平衡時，

$$\frac{dS}{dt} = 0$$

$$\text{則 } D(S_0 - S) = \mu \left( \frac{X}{Y} \right)$$

$$\text{又 } \mu = D$$

$$\text{所以 } X = Y(S_0 - S)$$

$$\text{再由 Monod's equation, } \mu = \frac{\mu_{\max} S}{(K_S + S)}$$

$$\text{及 } \mu = D$$

$$\text{所以 } S = \frac{K_S D}{(\mu_{\max} - D)}$$

其中， $\mu$ 為比生長率； $\mu_{\max}$ 為最大比生長率； $K_S$ 為飽和常數（比生長率為最大比生長率一半時之基質濃度）。

最後可得

$$X = Y \left[ \frac{S_0 - K_S D}{(\mu_{\max} - D)} \right]$$

由此是可知當反應槽達平衡穩定狀態時，其生物量可由稀釋率及進流基質濃度來控制。

### 3.2 毒性試驗終點種類

一般而言，藻類毒性試驗終點可分為兩種：(一)利用含有藻類溶液的溶氧濃度變化(Delta DO， $\Delta DO$ )，討論有機物毒性對藻類光合作用的影響 (二)利用藻細胞顆粒數的變化，討論有機物毒性對藻類 growth rate 和 final yield 的影響。以下說明各種抑制率的算法：

(1) 以溶氧濃度變化為觀測終點時，毒物對藻類 $\Delta DO$ 的抑制率算法：

$$\text{Inhibition rate on } \Delta DO = 1 - \frac{\Delta DO_t}{\Delta DO_c}$$

$\Delta DO_t$ 表示有添加毒物的處理組藻類於四十八小時後的溶氧變化值

$\Delta DO_c$ 表示無添加毒物的控制組藻類於四十八小時後的溶氧變化值

(2) 本研究進行藻類毒性試驗初期的植種藻細胞數為 15000 cells/ml，因此以藻細胞顆粒數的變化為觀測終點時，毒物對藻類 growth rate 的抑制率算法：

$$\text{Inhibition rate on growth rate} = 1 - \frac{\ln(N_t/15000)}{\ln(N_c/15000)}$$

$N_t$ 表示有添加毒物的處理組藻細胞顆粒數 $N_c$ 表示無添加毒物的控制組藻細胞顆粒數。

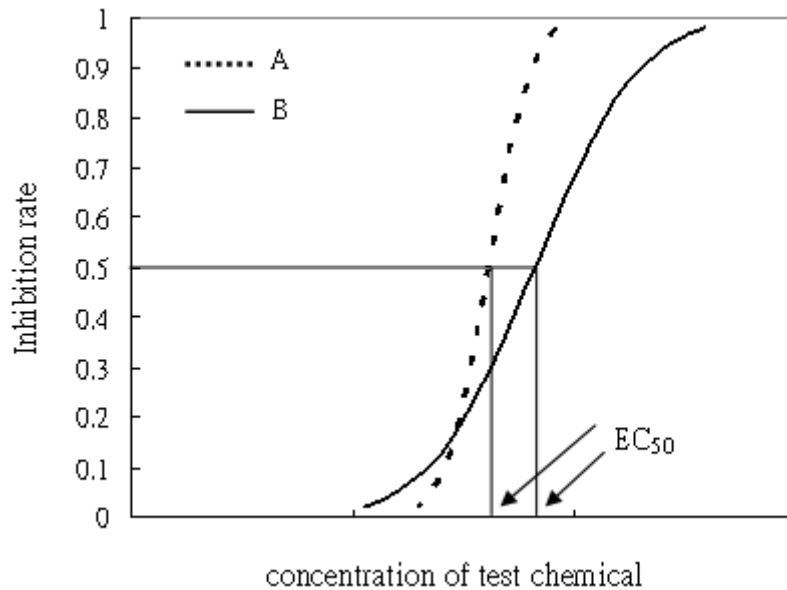
(3) 本研究主要針對有機物毒性對藻類 final yield 的影響，在不同濃度下，有機物對藻類 final yield 的抑制率算法如下：

$$\text{Inhibition rate on final yield} = 1 - \frac{N_t - 15000}{N_c - 15000}$$

$N_t$ 表示有添加毒物的處理組藻細胞顆粒數 $N_c$ 表示無添加毒物的控制組藻細胞顆粒數。

### 3.3 毒性物質劑量反應模式

以毒理學的角度而言，劑量與反應關係 (dose-response relationship) 是探討化學物質對生物體所造成影響之基礎。美國國家科學院將劑量—反應關係定義為：一種物質給予或接受的劑量與在暴露族群中某種健康效應之發生率的關係之特性描述，並且以人類暴露到此物質來估計此效應的發生率之過程；所有的物質皆可能有毒，是否為毒性物質最主要差別在所暴露之劑量。毒性研究主要可以分成模式推估及實驗驗證兩大部分。若從數據分析的部分來看：在毒性試驗過程中，實驗物種受毒性物質作用時，所造成生物體 50% 受抑制（或死亡）時所表現出的毒性物質濃度，即稱做 $EC_{50}$ ；而由受影響或死亡的百分率所迴歸出的S曲線關係，稱為劑量-反應曲線圖（Dose-response curve）；在劑量反應曲線座標中，通常x軸代表毒性物質的濃度，而y軸代表毒性物質對受測生物體的抑制率。在毒性試驗過程中，受測生物受毒性影響造成 50%抑制或死亡，稱為 $EC_{50}$  (50% Effect Concentration) 或 $LC_{50}$  (50% Lethal Concentration)。生物體受毒性物質影響的劑量反應關係如Fig 3.1 所示。虛線與實線分別代表受測生物體A與B的劑量反應曲線，可以看出虛線的斜率大於實線的斜率，表示生物體A對毒性物質的容忍範圍較小，亦說明了生物體A對毒物濃度的變化較敏感：微量的濃度變化即可導致抑制率的明顯改變。而在抑制率為 0.5 處，延伸至兩曲線所對應的毒性物質濃度，即為毒性物對生物體所造成的半致死濃度( $EC_{50}$ )。



**Fig 3.1 典型的毒性試驗劑量反應曲線**

欲從S型曲線求得 $EC_{50}$ 或 $EC_{10}$ 並不容易，因此必須藉由數學關係式將S型轉為直線型以便求取，此種數學轉換模式便稱為劑量反應關係模式，不同的模式根據的理論基礎互有出入，因此同一組數據，經由各種不同模式的分析，其結果可能有所差異；以生物試驗來講，不同生物甚至不同觀測參數（Endpoint）對毒性物質容忍度不盡相同，若以不適當之反應模式計算，實驗點與理論點間變異過大，則所得結果則相當可議，尤其在所求為外插情況下，變異波動更加明顯，因此數據處理程序中往往需要作適合度分析，以判斷最適合之使用模式。

一般常見的毒性物質劑量-反應模式為有三種，包括了：Probit、Weibull 及 Logit 模式，皆是依據不同的假設發展而成，本研究以 Probit 模式為主；Probit 模式為假設毒性物質對於受體生物的容忍度為一常態分布，因此以常態分佈函數來表示毒物對生物抑制率  $P$  對毒物濃度（劑量） $Z$  的濃度（劑量）反應曲線。Probit 模式，為毒性試驗報告中最常見的劑量-反應模式，主要是由實驗經驗，再加上理論基礎所得的一個模式，其係假設生物對毒性物質的容忍度分

布為常態分布 (Log-normal distribution) ，其主要以毒性物質濃度之 log 值與反應率之 NED (Normal equivalent deviation) 具有線性關係為基礎，其中反應率即測試生物對毒性物質之反應比率 (如死亡率等)。此模式將劑量-反應模式之 S 型曲線，轉換成 NED 尺度上的一直線，原來劑量-反應曲線在抑制率於 50% 之處對應到 NEDscale 上為 0，84.1% 反應率之處對應為 1，而 NED scale 之座標值加 5 即為 Probit 的座標，Probit 單位與反應率與毒性物質劑量間之轉換關係如下：

$$Y = A + B \log Z$$
$$P = 0.5 \left[ 1 + \operatorname{erf} \left[ \frac{(Y - 5)}{\sqrt{2}} \right] \right]$$

其中 Y 為 Probit 單位，A、B 為劑量-反應曲線之截距與斜率，Z 為毒性物質劑量濃度 (單位：mg/L)；P 為測試物種對毒性物質之反應率 (如死亡率等，單位：%)，erf 為 error function。

### 3.4 NOEC 與 Cut-Off value

#### 3.4.1 判定 NOEC 和 LOEC

相對於以濃度（劑量）反應模式發展的毒性迴歸分析方法，另一個判斷毒性反應的指標為「未造成生物產生明顯毒性反應的最高濃度」（no observed effect concentration, NOEC）或「達到顯著毒性反應的最低濃度」（lowest observed effect concentration, LOEC）即代表毒性物質對受測物的無影響濃度或最小影響濃度。NOEC 及 LOEC 求法為將各濃度區間下的毒性反應（處理組）與控制組的比較比較在統計上是否達到顯著水準來判斷。舉例來說，假設在某實驗中處理組 A 統計分析發現和控制組沒有差異，而比處理組 A 更高濃度的處理組 B 分析後發現和控制組有統計上差異，則處理組 A 的濃度定義為 NOEC，而處理組 B 的濃度稱為 LOEC。本研究利用統計方法 Dunnett's test (觀察重複組之間的差異以及控制組和處理組的差距以定義 NOEC 值)，藉以分別出各濃度區間下的毒性反應與控制組的比較，在機率上是否達到顯著水準。

### 3.4.2 平均中斷值 (Cut-Off value)

為了了解毒物在低濃度下分析方式結果(模式迴歸分析及統計分析)的差異及找出較適的水體保護指標，本研究中分別比較兩種指標NOEC及EC<sub>10</sub>值，並利用平均中斷值(cut-off value)作為選擇NOEC或EC<sub>10</sub>的客觀參考點。平均中斷值本身與一組試驗的組內變異之平方根成正比，因此組內變異較小的精確試驗有較小的平均中斷值，此中斷值亦指出NOEC所能達到之保護程度的極限，使NOEC之定位更加明顯，其計算公式如下：

$$\text{平均中斷值(\% reduction)} = \frac{T}{X_c} \times S_w \sqrt{\frac{1}{n_c} + \frac{1}{n_i}} \times 100$$

T：查表所得（以 one-tail Dunnett's test 在顯著程度為 5% 之表格）

X<sub>c</sub> 為控制組之平均值，S<sub>w</sub>：組內變異之平方根

n<sub>c</sub>, n<sub>i</sub>：控制組與處理組重複試驗次數。



## 第四章 實驗設備與方法

### 4.1 實驗設備及材料

密閉式 BOD 瓶藻類毒性試驗所需的設備材料：

- ★ 恆溫室：恆溫無塵室大小約為五坪，其溫度控制在  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ，保持恆溫，藻類培養、試驗皆在此溫控室內進行。
- ★ 水質：實驗中清洗容器、器具之清洗及藥品配製用水皆為自來水經過三道陰陽離子混合樹脂，三道活性炭過濾、RO 逆滲透、蒸餾然後再經超過濾 (Milli-Qplus) 處理之去離子水。使用時需確定水質之電阻值  $\geq 18.2 \text{ Mega-ohm (M } \Omega\text{-cm)}$  才可開始使用。
- ★ 培養裝置與迴轉式振盪儀：培養裝置為自行裝配之培養箱，台面可依所需而更改、拆換，以角鋼為架構主體，長  $\times$  寬  $\times$  高為  $135 \times 110 \times 135\text{cm}$ ，頂面履以 120cm 長之白色螢光燈管 8 支。並設有迴轉式振盪儀 (FIRSTEK 公司，型號 S103)，搖動速度可大於 100 rpm，其台面共有 66 個位置。培養設備置於恆溫室內，控制溫度在  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 。作為藻類批次式培養與毒性試驗之用。
- ★ 批次式培養器皿：以批次方式培養液態藻類時所使用之容器為 125ml，Erlmeyer 之三角錐瓶。
- ★ 連續式培養母槽：連續式培養之母槽使用體積 5 公升，直徑為 18cm 之玻璃容器。於體積 4 公升處開口做為溢流口，並且於體積 2 公升處開一口做為取樣之用。母槽上方亦有兩開口，一作為營養基質流入口、另一作為空氣進流用。
- ★ 電磁攪拌器：用於連續式培養母槽，當放置於連續式培養母槽的下方，其作用為使藻液與進流之營養基質、空氣混合均勻，避免藻類之沉澱。
- ★ 蠕動幫浦：蠕動幫浦使用日本 EYELA 公司，型號 MP-1000 之定

量幫浦，作為輸送營養基質到連續式培養母槽之動力，並可控制其流量。

★ **幫浦管**：幫浦管使用 Materflex 公司，型號 H-96400-14。輸送管為矽膠材質，不具毒性，可避免影響母槽之培養及毒性試驗之結果。

★ **曝氣幫浦**：使用之曝氣幫浦為一般常用之曝氣幫浦。

★ **浮子流量計**：其功用在量測曝氣氣體之流量，本實驗母槽之曝器量控制在 400ml/min。需定時以泡沫流量計校正流量。

★ **空氣洗滌器**：洗滌器的功用在去除曝氣氣體中的雜質，並可以藉此濕潤氣體，增加氣體之溶解。

★ **庫德式電子顆粒計數器二代**：功用為計數藻類細胞數。使用 Coulter Electronics 公司之 Coulter Counter，型號為 MULTISIZER II，並以 5.06 $\mu$ m 標準顆粒乳液來校正。配有 50 及 100 $\mu$ m 孔徑之玻璃管。本實驗使用 100 $\mu$ m 孔徑之玻璃管，量測之顆粒直徑範圍為 2 $\mu$ m~60 $\mu$ m

★ **BOD 瓶**：為毒性試驗時使用之玻璃器皿。使用體積 300ml，直徑 8cm 之 BOD 玻璃瓶。上頭開口處有玻璃瓶塞，使其可以利用水封之形式，避免外界氣體、物質等進入，而減少干擾。整個系統為一個封閉式系

★ **光度測定計**：使用 TOPCON 產牌，型號 IM-2D，單位為 lux。

★ **溶氧測定儀**：美國 YSI 公司出品之微電腦溶氧測定儀，Model YSI 5100，附有 Model 5010 溶氧測定探頭 (BOD Probe)，其探頭部分裝有電動攪拌器，可以對樣品進行攪拌。溶氧量測定範圍為 0.0~60.0mg/L，精準度為 $\pm 0.1\%$ 。

- ★ 酸鹼度 (pH) 測定儀：使用 Suntex 公司，Model SP-2200 之 pH 測定儀。其精確度為  $\pm 0.01$ 。
- ★ 曝氣用氣體鋼瓶：使用含 0.5%CO<sub>2</sub> 之高壓氣體鋼瓶，氮氣之純度達 99.5%，總氣體體積為 6m<sup>3</sup>。用於降低營養基質中之溶氧值，並確保能提供足夠之碳源。鋼瓶上備有一流量計，曝氣時之曝器流量控制在 600ml/min。
- ★ 純水曝氣設備：曝氣設備使用體積 10 公升之德國製下口瓶，開口處嵌入一矽膠塞和玻璃管，玻璃管一頭接氣體鋼瓶，一頭接沸石並伸入純水筒底部曝氣，在純水筒開口處附近開一小洞以平衡壓力，曝氣完成後關緊筒蓋以減少外界空氣之進入。
- ★ 無菌操作台：使用造鑫公司製造的 Laminar Flow 操作台，內設有紫外光殺菌，以防止植種過程及配製營養鹽時受到污染。
- ★ 抽器幫浦：使用 SINKU KIKO 公司，型號 ULVACG-5 及 G-50 之幫浦。用於過濾營養基質及 ISOTON II 之用。
- ★ 冰箱：使用 Whirpool 之冰箱，其功用為維持藻種、藥品及營養鹽於 4°C 之下，以保存之。
- ★ 滅菌釜：使用 HIRAYAMA 公司，型號 HA-300M 之滅菌釜，最大壓力可達 1.9 kg/cm<sup>2</sup>，容積為 0.0521m<sup>3</sup>。使用時條件設定為高溫 (121 °C) 高壓 (1.1 kg/cm<sup>2</sup>) 來進行滅菌，每次對實驗器皿進行滅菌的時間設定為 15 分鐘。
- ★ 烘箱：使用 Memmet 公司之烘箱，做為烘乾玻璃器皿用。使用時溫度設為 52 ± 1°C。
- ★ 分析天秤：量測藥品用，產牌 Precisa 205A，精確度至 0.01mg。
- ★ 定量吸管：使用 SOCOREX 公司，可調式移液器，容量為 100~1000μl 及 0.1~5 ml 兩種。

★ 濾膜：使用之濾膜分成兩種，過濾營養基質時使用 Gelman

★ Science 九型號 66191 之 0.45 $\mu$ m 濾膜，過濾 Isoton II 時使用 60301 之 0.2 $\mu$ m 濾膜。

★ 有機物濃度分析儀器：TOC 分析儀及 COD 比色法分析儀

試驗步驟：

本研究主要是利用 BOD 瓶進行 16 種一級炔丙基醇類的藻類毒性試驗，試驗共進行 2 重複以上，每一次實驗為三重複，每一重複為 7 組不同濃度及 1 組控制組，濃度的換算係在實驗前先將配置好的 stock solution 以 TOC 定量，再依濃度比例將名義濃度(nominal concentration)換算為實際濃度，附表一所列出之實驗濃度為換算所得到的進行實驗的實際濃度;實驗結果也分別以溶氧( $\Delta$ DO)、最終生物數量(Final Yield)和細胞生長率(Growth Rate)為試驗終點進行單一毒物之毒性試驗。



## 4.2 實驗前準備

### 4.2.1 培養基質的配製

本研究所使用之培養基質為參考 U.S. EPA 使用之營養基質組成，配製方法如下。

將下列 1 ~ 7 的貯備液 (Stock Solution) 各加 1 ml 至含 900 ml 去離子水中，再稀釋至 1 公升。接著以 0.1 N 當量濃度的 NaOH 或 HCl 將營養基質之 pH 值調至  $7.50 \pm 0.10$ ，用錫箔紙包覆後置於 4°C 冰箱中保存。

1. 硝酸鈉貯備液：溶解 12.750 g  $\text{NaNO}_3$  於 500 ml 去離子水。
2. 氯化鎂貯備液：溶解 6.082 g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  於 500 ml 去離子水。
3. 氯化鈣貯備液：溶解 2.205 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  於 500 ml 去離子水。
4. 微營養鹽貯備液：共配製 stock1 (100% EDTA)、stock2 (10% EDTA) 和 stock3 (0% EDTA) 三瓶不同編號的貯備溶液，100% 是使用於活化藻類時，而在連續式母槽中培養藻類時使用 10%，進行實驗時則使用不含 EDTA 之貯備液。每瓶的配法為先秤取下列七種藥品加入 500 ml 去離子水中，

92.760 mg $\text{H}_3\text{BO}_3$	0.714 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
207.690 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	3.630 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
1.635 mg $\text{ZnCl}_2$	0.006 mg $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
79.880 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	

加完後，再加入整合劑（EDTA），而所需加的量如下：

Na<sub>2</sub>EDTA · 2H<sub>2</sub>O

stock1 :	150 mg Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O
stock2 :	15 mg Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O
stock3 :	不加

5. 硫酸鎂貯備液：溶解 7.350 g MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O於 500 ml去離子水中。

6. 磷酸氫二鉀貯備液：溶解 0.522 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>於 500 ml去離子水中。

7. 碳酸氫鈉貯備液：溶解 7.5 g NaHCO<sub>3</sub> 於 500 ml 去離子水中。

其所含巨量及微量營養素濃度列於 Table 4.1 及 Table 4.2。營養基質的滅菌是以 0.45μm 的濾膜過濾，過濾滅菌後的營養基質須保存在 4 °C 且置於陰暗無光線照射處，以免產生光化學反應。

**Table 4.1 The consist of macro-algal medium**

化合物	濃度(mg/l)	元素	各元素實際濃度(mg/l)
NaNO <sub>3</sub>	25.5	C	2.14
NaHCO <sub>3</sub>	15.0	Na	11.0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.04	P	0.186
		K	0.649
MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	14.7	S	1.91
MgCl <sub>2</sub>	5.7	Mg	2.9
CaCl <sub>2</sub> -2H <sub>2</sub> O	4.41	Ca	1.20

**Table 4. 2 The consist of micro-algal medium**

化合物	濃度 (µg/L)	元素	各元素實際濃度 (µg/L)
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	186	B	32.5
MnCl <sub>2</sub>	264	Mn	115
ZnCl <sub>2</sub>	3.27	Zn	1.57
CoCl <sub>2</sub>	0.78	Co	0.354
CuCl <sub>2</sub>	0.009	Cu	0.04
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	7.26	Mo	2.88
FeCl <sub>3</sub>	96	Fe	30
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	300		

#### 4.2.2 玻璃器皿清洗與滅菌

玻璃器皿使用前需先用不含磷之清潔劑浸泡、清洗，然後以自來水沖洗 5 至 6 次，接下來則用 10% 之鹽酸 (HCl) 浸泡最少一個小時，之後再以碳酸鈉 (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 溶液清洗中和，並用自來水沖洗 5 至 6 次後再以去離子水沖洗 3 至 4 次，置入烘箱中以 52°C 之溫度烘乾。使用前需在其開口處封上鋁箔，置入滅菌釜中，以 1.1Kg/cm<sup>2</sup>、121°C 的條件滅菌 15 分，而定量容器則不可加熱烘乾或放入滅菌釜中，以避免容器因加熱而改變容量，只要於泡酸液清洗完後，置於架上陰乾即可。

#### 4.2.3 盤面光度之調整

使用單面為白色亮面具反射光線效果之木板，組裝於震盪器四周，光度不足處調整木板大小及形狀，並以具反射作用之鋁箔紙覆蓋於木板之上反覆進行微調，使整個震盪器盤面之光度落在 64.5 ±10 µEm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> (4300 ±10% Lux) 之範圍內，以減少實驗之誤差。

#### 4.2.4 藻類之培養步驟及裝置

實驗物種 *Pseudokirchneriella subcapitata* 在進行實驗前必須經過 2-7 天預培養(pre-culture)使之平均細胞體積(mean cell volume)達到  $39-46 \mu\text{m}^3$ ，而藻類細胞數量達到  $1.9\sim 2.0 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ ，在此條件下才取藻類進行實驗。在培養藻類最需注意的步驟為微營養鹽貯備液的加入方法，一開始活化藻類加的是 stock1 (100% EDTA)，而在連續式母槽中培養藻類時使用的是 stock2 (10% EDTA)，且第一瓶硝酸鈉貯備液和第六瓶磷酸氫二鉀貯備液加入體積需為其它五瓶的一半。此外液態營養基質中之藻類可在  $4^\circ\text{C}$  下保存四個星期，於四個星期之後做移植以繼續培養保存菌種。Fig 4.1 為培養步驟且本實驗條件依據(Lin, J.H., 2001)所決定之適當的條件下進行，條件如下：

1. 溫度：藻類之培養及毒性試驗皆在  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  下進行。
2. 光度：藻類之培養及毒性試驗皆在光度為  $64.5 \pm 10\% \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  下進行，所使用之光源為連續白冷光。
3. 氮、磷濃度：培養藻類時使用一半之濃度，毒性試驗時則不變。
4.  $\text{HCO}_3$  濃度：15 mg/L。
5. pH：初始 pH 為  $7.5 \pm 0.1$ 。
6. EDTA 含量：100% 是使用於活化藻類時，而在連續式母槽中培養藻類時使用 10%，進行實驗時則使用不含 EDTA 之貯備液。
7. 試驗時間：四十八小時。
8. 藻類初始植種密度： $1.5 \times 10^4 \text{ cells / ml}$ 。
9. 振盪頻率：100 rpm。



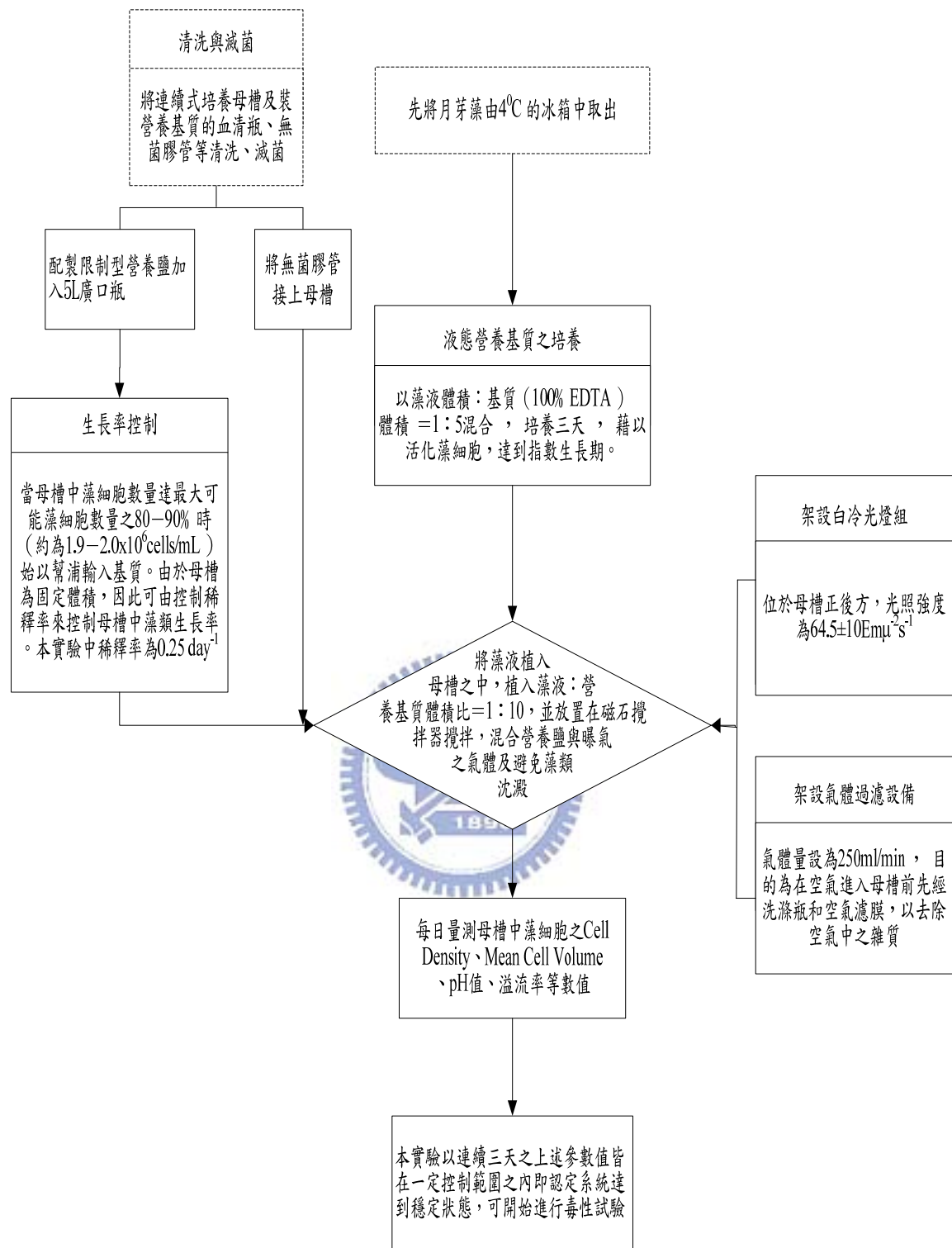


Fig 4.1 藻類培養步驟示意圖

#### 4.2.5 ISOTON II 之配製

ISOTON II 之作用主要是作為電子顆粒計數器之導電溶液，使用電子顆粒計數器量測藻類細胞數時，所使用之溶液皆為 ISOTON II。ISOTON II 的配製是於 20 公升的超純水中加入 200g 氯化鈉(NaCl)，攪拌使其混合均勻，然後以電導計測量其導電度，所需要之導電度為 17mmho。若是導電度低於 17mmho，則再慢慢加入氯化鈉，攪拌均勻，直到導電度為 17mmho；相反的，如果導電度超過了 17mmho，則慢慢加入超純水，攪拌均勻，直到導電度降至 17mmho。待導電度達 17mmho 後再以 0.2 $\mu$ m 之濾膜過濾此溶液，其濾液即是進行計數時所需之 ISOTON II 溶液。

#### 4.2.6 電子顆粒計數器操作方式與原理

在電子顆粒計數器中有一根玻璃管及一攪拌器，將待測之顆粒樣品先與 ISOTON II 稀釋樣品(氯化鈉溶液)混合製成稀釋懸浮液。此懸浮液自玻璃管近底端的側面的一口徑已定之小孔抽引入測試管(Aperture)內，小孔兩側各有一內外電極，當顆粒通過小孔入管內時，每一顆粒均會取代與其相等體積之電解液，導致兩電極之電阻呈現暫時性之改變，由於系統是恒電流設計，故電位差亦暫時性之改變，行程某特定量的電阻。而電阻量化透過示波器的脈衝顯示，其高度正比於顆粒的大小，且脈衝數即是顆粒的數目，直接由電子計數器記錄顯示，然後再將資料輸送至電腦中，以軟體程式(Multisizer Accucomp V. 2.01)進行進一步的分析。電子顆粒計數器主要條件設定如下 Table 4.3。本實驗採用 100 $\mu$ m 孔徑之毛細玻璃管。

計數時，取 1ml 的藻液置入 50ml 之量瓶內，再加入 ISOTON II 至 50ml，然後倒入燒杯中，置入顆粒計數器內計數。以顯示之讀數

值扣除空白顆粒數之數值，即純 ISOTON II 之背景值，所取之值為連續三次值相差在 2% 者之平均值。

**Table 4.3 The conditions of Coulter Counter**

項 目	數 值
滿刻度電流量 (Full scale)	10mA
極性 (Polarity)	+
電流 (Currents , I)	100
粒度下限 (Diameter Lower Threshold , Tl)	2.177 $\mu$ m
粒度上限 (Diameter Lower Threshold , Tu)	6.975 $\mu$ m
脈衝衰減倍率 (Attenuation , A)	1
脈衝放大倍率 (Preset Gain)	1
警戒粒徑限度 (Alarm Threshold)	OFF
孔徑 (Orifice Diameter)	100
孔長 (Orifice Length)	75
分析量	500 $\mu$ L
Setup	Manual
Kd	924
Size	5.00 E
Size unit	$\mu$ m

### 4.3 儀器操作原理、步驟與設定條件

試驗需先進行有機物定量，其中試驗毒物中以 TOC (總有機碳分析儀) 及 COD-比色法定量定量，以下分別就儀器的原理及實驗步驟分別描述。

#### 4.3.1 TOC (總有機碳分析法)

總有機碳(TOC)定義為 Total Organic Carbon，而 TIC 為 Total Inorganic Carbon，TC 則為 Total Carbon；而其簡單的原理為  $TOC=TC-TIC$ ；所使用的機型為 analytikjena 的 multi N/C 3100 TOC Analyzer(如 Fig 4.2)；所利用的分析方式有兩種：第一種為直接分析模式(NPOC Method): $NPOC=TOC$ ，此方法的優點為分析時間快速，適合高濃度的樣品分析，但缺點為樣品需為不具揮發性，由於如此較不適用於本研究；而本研究所使用的為相減法(Differential Method): $TOC=TC-IC$ ，此方法可針對於具揮發性之有機化合物的偵測，為確保於燃燒管中完全氧化，故將溫度設定於  $800-1000^{\circ}\text{C}$ ，在建立背景校正曲線及分析樣品時採用注入不同濃度及相同體積樣品進行，從分析結果也發現其誤差範圍較小(0.2%~5.4%)。



Fig 4.2 TOC 分析儀外觀圖

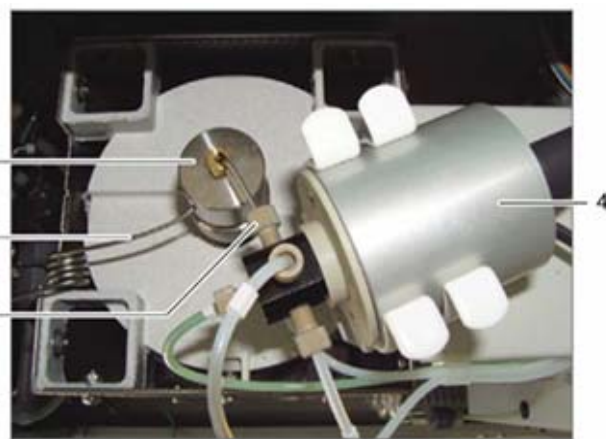
## 主體基本介紹:



- 1.TIC 反應器，2.冷凝器，3.鹵素吸附 U 型管，4.過濾器，  
5.幫浦（磷酸），6.LED 指示燈，7.液體注射針，8.幫浦，  
9.磷酸瓶 10.托盤



- 1 氣體供應系統 2 燃燒系統 3 環狀冷凝管



- 1 燃燒氣體接頭 2 帶動氣體接頭  
3 燃燒頭 4 氣體切換閥

Fig 4.3 TOC 主體結構介紹

#### 4.3.1.1 總有機碳分析之標準液配製流程

A. 總碳(TC)標準儲存液以 1000mg/L 為例：

秤取 2.1254g KHP 鄰苯二甲酸氫鉀 (Potassium Hydrogenphthalate)→以超純水( $>18\Omega$ )溶解並訂量至 1000ml

B. 總無機碳(TIC)標準儲存液以 1000mg/L 為例：

秤取 4.41625g 碳酸鈉(Sodium Carbonate,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )以及 3.5g 碳酸氫鈉(Sodium Hydrogen Carbonate,  $\text{NaHCO}_3$ )混合後→以超純水( $>18\Omega$ )溶解並訂量至 1000ml

C. TC/TIC 混合儲存液，分別取上述已配製好的 TC 及 TIC 標準儲液各 500ml 混合即可。

本實驗進行前，為了確保所配製的化合物 Stock solution 濃度的準確性，會先建立一條校正曲線，濃度分別為 100mg/L，200 mg/L，400 mg/L，600 mg/L，800，1000 mg/L；在進行毒性試驗前後分別測定其濃度，而為了避免高濃度的 stock solution 造成儀器測定的準確性，會採用稀釋的方式再進行樣品的分析，此方法也從分析結果中看到相當準確的結果。

### 4.3.1.2 Multi N/C 3100 總有機碳分析儀 標準操作程序(SOP)

#### 壹、開機步驟：

1. 開啟 multi N/C 3100 主機後方電源開關。
2. 打開氣體鋼瓶總開關，並調整出口調壓閥至 3 kg 刻度。
3. 以超純水沖洗 "Ultrapure Water" 瓶，並至少盛裝一半的超純水，再插入液體管路。
4. 將配置好的磷酸溶液( $H_3PO_4/H_2O$ , 10% v/v)倒入 "H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>" 瓶中，並插入液體管路。
5. 將主機正面的兩組蠕動幫浦管路夾緊。
6. 進入電腦開啟 multi Win 操作軟體。

#### 貳、關機步驟：

1. 跳出 multi Win 操作軟體。
2. 若為常態分析操作，則可以不用關閉 multi N/C 3100 主機電源，以維持 NDIR 偵測器最穩定的狀態；若為長時間停機，則關閉 multi N/C 3100 主機後方電源開關。
3. 鬆開主機正面的兩組蠕動幫浦管路。
4. 關閉氣體鋼瓶總開關，以及出口調壓閥。

#### 參、軟體操作流程

1. 點選桌面軟體 multi Win 進入軟體主畫面。
2. 確認儀器是否正常運作( 溫度、氣體... )。
3. 選擇軟體上方 Instrument，進入 Device control。
4. 點選 Regeneration TIC reactor，並按下 Start 清洗 TIC 反應槽(約 2~3 次)。
5. 選擇所要分析的方法。
6. 進入分析畫面，按下 Start 進行樣品分析，依照軟體說明放入樣

品。

7. 樣品分析完畢，按下軟體上方印表機圖示，列印分析報告。

#### **肆、注意事項**

1. 在使用前務必確認氣體壓力正常方可操作。
2. 若在電腦連線操作模式下，電腦未關機切勿關閉主機電源。
3. 主機電源開啟後，主機散熱出風口須保持良好通風。





### 4.3.2 COD-比色法

本實驗採用 COD-比色法定量濃度，其中藥品及配法參考環保署「水中化學需氧量檢測方法-密閉迴流滴定法」方法，但 COD 濃度決定則採直接比色方式而不採迴流滴定方式。COD 的檢量線是利用 KHP（鄰苯二甲酸氫鉀）濃度對吸光度（600nm）做圖。在此假設苯甲醛類在 150 °C 酸性條件下可被強氧化劑重鉻酸鉀完全氧化成水和二氧化碳，經由比色法求得稀釋後樣品 COD 濃度，再換算儲備液中毒物的濃度。詳細的操作步驟列於 Fig 4.4。



**Fig 4.4 Setting and operate step of COD-colorimetry**

#### 4.3.2.1 COD-比色法藥品配製

配製前需準備 500 mL 的玻璃瓶以 18.2 M  $\Omega$ -cm 的試劑水沖洗乾淨和乾燥。然後包覆鋁箔紙備用。本法所需藥品備製方法如下：(參考環保署「水中化學需氧量檢測方法-密閉迴流滴定法」方法)

1. 重鉻酸鉀消化溶液：將 4.913 g 的重鉻酸鉀（先在 103°C 烘乾 2 小時），加入約 500 mL 試劑水中，依序加入 167 mL 濃硫酸、33.3 g 硫酸汞，混合溶解，冷卻至室溫後定量至 1 L。
2. 硫酸試劑：於 2.5 L 濃硫酸中加入 25 g 硫酸銀，放置 1 至 2 天（或以磁攪拌器攪拌數小時）使硫酸銀完全溶解。
3. COD 標準溶液：稱取 0.425 g 已在 120°C 烘乾至恆重之苯二甲酸氫鉀（KHP），溶解於試劑水中，定量至 1 L。KHP 的理論 COD 值為 1.176 mg / mg，本溶液的理論 COD 值為 500 mg / L。



## 4.4 密閉式藻類毒性試驗方法及步驟

### 4.4.1 實驗方法

在進行藻類毒性實驗前，先查尋過去是否有學者亦是以藻類進行毒性試驗，並參考其實驗結果，接著以文獻中所記載之濃度，於實驗前進行配製。若查無以藻類進行毒性試驗的資料時，則以文獻中的實驗數據與本實驗室過去實驗數據之間的關連性，進行實驗毒物濃度的預測。每次所進行之藻類毒行試驗均包括無添加毒物的控制組，以及添加六種不同濃度的處理組，進行三重覆的分析。最終分別以溶氧、藻類顆粒數、以及生長率，做為觀測終點 (End point)，並利用Probit模式計算出各種毒物對藻類所造成 50%抑制時的濃度( $EC_{50}$ )。

### 4.4.2 實驗步驟

本藻類試驗為屬於四十八小時的急毒性試驗，其 Fig 4.5 為密閉式藻類毒性試驗流程暨裝置示意圖。以下針對實驗進行的第一天及第三天需準備器具和進行順序介紹如下：

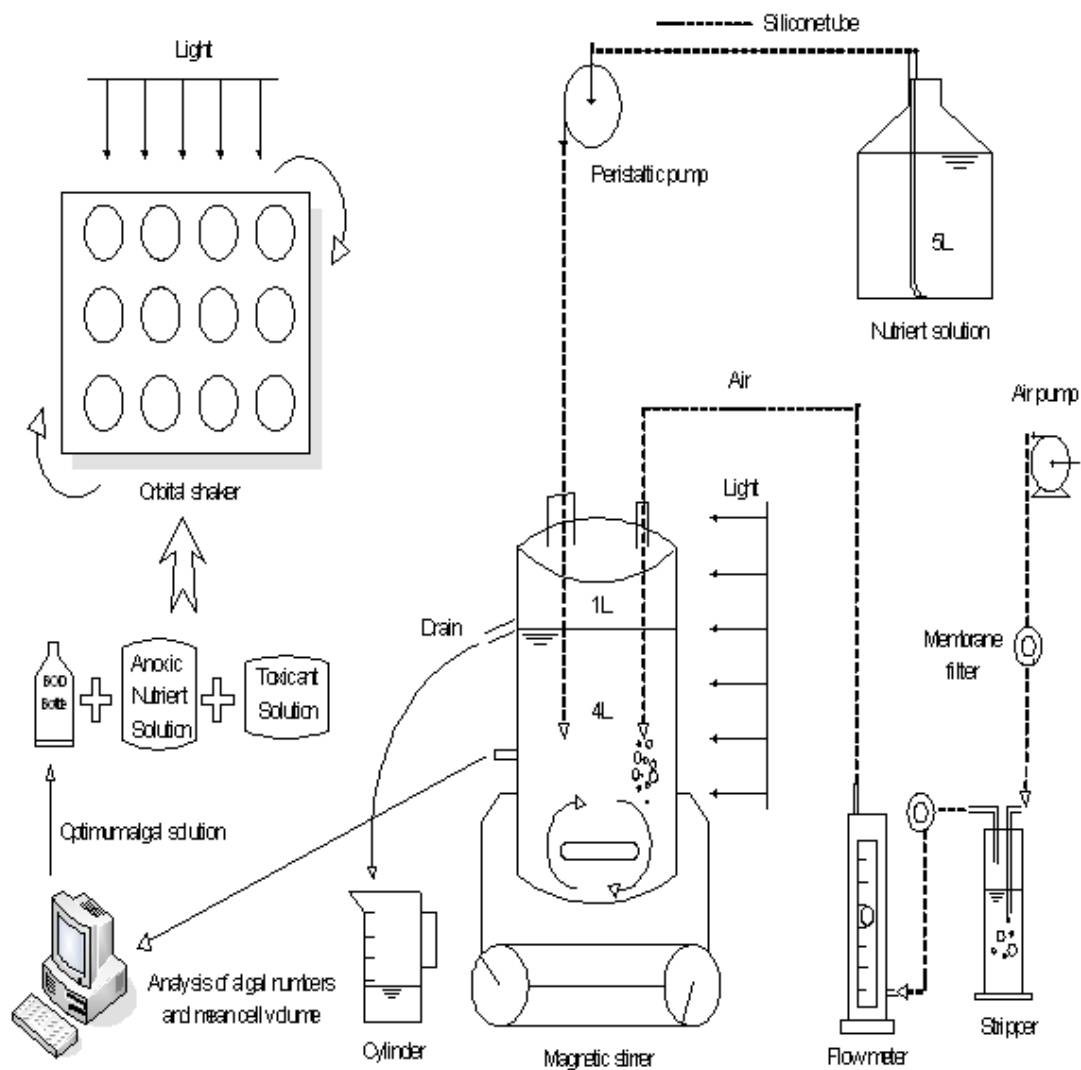
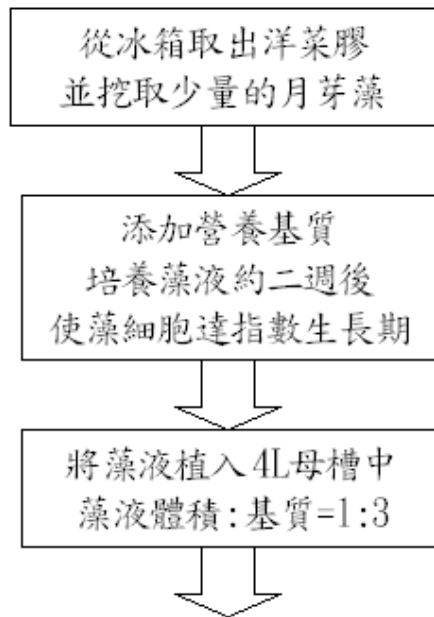
#### 第一天

1. 去離子水曝氣：當確定連續式培養母槽穩定之後，即可以開始藻類毒性試驗。

##### (1) 器具

- 去離子水(DI water)
- pH meter
- 0.1N 氫氧化鈉 (NaOH)

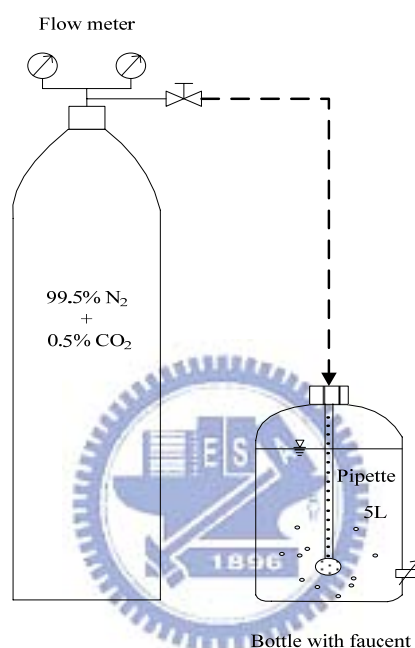
去離子水曝氣設備 (包含德製下口瓶、0.5%  $CO_2 + 99.5\%N_2$ 之高壓氣體鋼瓶、氣體流量計、幫浦管和曝氣小球)



**Fig 4.5 The flow chart in close-system algal toxicity test**

## (2) 進行順序

將自行設計之去離子水曝氣設備裝滿的去離子水，裝完後用 NaOH 調整 pH 值至  $7.5 \pm 0.1$ ，再氣體鋼瓶進行曝氣 15 分鐘 (Fig 4.6)。曝氣的目的是為了降低營養基質中之溶氧值並增加其  $\text{CO}_2$  濃度。曝氣時之氣體流量約為  $600\text{ml}/\text{min}$ ，經過 5 至 6 分鐘的曝氣後，溶氧值可接近  $1.0\text{mg}/\text{l}$ 。迅速將下口瓶之蓋子蓋上。



**Fig 4.6 The diffuser system of deion-water**

1. 營養鹽準備：本步驟只針對一組 24 瓶的 BOD 瓶實驗進行描述。

### (1) 器具

- 經美國環保署 (U.S. EPA) 標準方法修正過後的七瓶的貯備液
- 100mL 燒杯
- 電磁攪拌器 + 磁石

### (2) 進行順序

取一空燒杯各加入的貯備液  $6.3\text{mL}$ ，其中需注意含有 EDTA 微量營養鹽儲備液是取 0% EDTA，取完後再加入磁石覆上鋁箔紙進行攪拌器混和。

2. 藻類選取：目的為判定連續式培養母槽是否已達穩定狀態 (steady

state)，是否可用於用於毒性實驗。

### (1) 器具

- 庫德式電子顆粒計數器(內附有特置鐘型圓口瓶和攪拌器)
- 50mL 定量瓶
- 50mL 燒杯
- ISOTON II
- 1mL 的定量吸管

### (2) 進行順序

先將計數器暖機 30 分鐘後，用 ISOTON II 流洗計數器並設定吸取分析量為 500 $\mu$ L，流洗完畢時，用燒杯從母槽取出藻液，再用定量吸管定量 1mL 從燒杯取出藻液加入定量瓶中並加入 ISOTON II 直至 50mL，再倒入鐘型圓口瓶進行攪拌量測。先量測三次的 ISOTON II 讀值 ( $N_{isoton}$ )，此讀值即為背景值需小於 300，再測量三次的藻類的數目 ( $N_{alga}$ )，最後得淨藻類數目 ( $N$ )，當平均細胞體積 (mean cell volume, MCV) 達到 39-46 $\mu$ m<sup>3</sup>，而  $N$  達到 1.9~2.0 $\times 10^6$  cells/mL，在此條件下才取藻類進行實驗。

$$N \left( \frac{\text{cells}}{\text{mL}} \right) = \left[ \frac{(N_{alga} - N_{isoton}) \text{ cells}}{0.5 \text{ mL}} \right] \times 50$$

3. BOD 瓶試驗：添加藻類、去離子水、營養鹽和毒物加入 BOD 瓶中。

### (1) 器具

- BOD 瓶
- DO meter
- 已曝氣的去離子水曝氣、營養鹽和達 steady state 的藻類
- 培養裝置與迴轉式振盪儀
- 毒物

## (2) 進行順序

分別加入BOD瓶中使試驗時藻類之初始細胞密度為  $1.5 \times 10^4$  cells/ml，之後再迅速加入曝氣好之純水，然後逐瓶加入所需之營養基質和不同體積的毒性物質以達到所需的濃度。當藻液、營養基質及毒性物質皆分別加入BOD瓶中後，測量各瓶之溶氧值，視為初始溶氧值 (Initial DO,  $DO_i$ )，並由各瓶中取出少量之溶液 (約 1ml)，以計數初始藻液細胞密度是否為  $1.5 \times 10^4$  cells/ml。之後將BOD瓶置於培養箱內迴轉式振盪儀上震盪。實驗條件控制在溫度  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ，光照來自於上方平行照射，強度為  $64.5 \pm 10\% \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ 之白冷光燈，震盪頻率為 100rpm。

## 第三天

以下三步驟為毒性試驗四十八小時後的成果驗收。

4. 溶氧值和pH測定：為量測 48 個小時後各個BOD瓶中之溶氧值，視為最終溶氧值 (Final DO,  $DO_f$ )。此步驟可得到本實驗第一個試驗終點 (end point) 溶氧抑制率的原始數據。

## (1) 器具

- DO meter
- 去離子水
- 拭鏡紙
- pH meter

## (2) 進行順序

將DO meter probe用去離子水淋洗再用拭鏡紙吸乾水份置入BOD瓶中量測Final DO ( $DO_f$ )，由Final DO減掉Initial DO可得到一溶氧差 ( $\Delta DO$ )，即  $DO_f - DO_i = \Delta DO$ 。

5. 藻數測定：用顆粒計數器量測每個 BOD 瓶的藻類細胞密度，此步驟可得到本實驗第二個和第三個 end point 即 biomass 和 growth

rate 兩抑制率的 raw data.。

(1) 器具

- 庫德式電子顆粒計數器
- 50mL 定量瓶
- 1L 燒杯
- ISOTON II
- 1mL 的定量吸管

(2) 進行順序

將BOD 瓶中的藻液先倒入約一半於燒杯中，再將BOD 瓶中剩餘的藻液搖晃均勻倒入燒杯中，再用定量吸管定量 1mL從燒杯取出藻液加入定量瓶中並加入ISOTON II量測最終細胞密度。減掉初始植入的細胞密度  $1.5 \times 10^4$  cells/ml可得細胞密度的變化量。

6. 計算 $EC_{50}$ ：使probit模式來計算藻類之抑制率與 $EC_{50}$ 值。





#### 4.5 實驗之品保及品管(QA/QC)

在每次的實驗過程中，可能會因為儀器保養疏失，而導致實驗數據的重覆性不高甚至誤判的情況；因此對於每次實驗過程中，所需要使用的儀器或是藻類的生長狀況，均需要定期檢驗，才可以維持實驗的品質及可信度。以下為本實驗對於藻類及儀器方面所做的檢驗程序介紹：

##### 1. 母槽生長情況紀錄表：

為確保實驗時所使用的藻類在最佳狀態，每天取 1 ml 藻液，量測細胞密度及平均細胞體積 MCV 等參數變動情形並填寫於母槽生長情況紀錄表，並控制母槽的溢流率為 1 L/day(D=0.25)。

##### 2. 儀器定期檢查

實驗儀器誤差會影響實驗結果的好壞，為降低誤差的發生必順定期檢查儀器，下列分別介紹：

- 光度：光度強弱影響藻類之生長狀況，為減少光度所帶來之誤差，所以要將實驗進行之震盪器上之盤面光度調整至一致方可，本次實驗所使用之光度為  $64.5\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ，其誤差皆控制於 10% 以內。
- 顆粒計數器：計數器在量測高濃度處理組（低藻類密度）時也會受到 ISOTON II 背景值、因此本實驗要求 ISOTON II 背景值需小於 300 以下，且實驗前後皆 ISOTON II 用進行取樣管的流洗，清洗取樣管壁結晶。
- DO meter：如果薄膜或電解液受到污染，也會影響到以溶氧指標的敏感度，因此本實驗會每個月定期更換 CLARK-TYPE 薄膜與 3M 氯化鉀電解質和進行校正。
- pH meter: 如電極棒有微粒附著於表面時，因為導致二點校正(pH

= 4 and 7)其誤差比率低於 90%時，則應立即將電極棒泡於 0.1N 之鹽酸之中，以達到去除表面微粒之效果。



## 第五章 實驗結果與討論

### 5.1 藻類毒性試驗數據

本實驗是以一系列不同取代基之炔丙基醇類作為毒性測試化合物，經由密閉式藻類毒性試驗，分別在實驗前後測溶氧量及細胞密度，作為反應終點；利用求得之數據，計算溶氧變化量( $\Delta DO$ )、最終產率(Final Yield or  $\Delta$ Cell density)、生長率 (growth rate) 作為實驗參數，求得毒性物質之 EC50 值及劑量反應曲線。

由於本實驗之化合物具部分揮發性，因此實驗前為了避免造成濃度上的誤差，須以 TOC(總有機碳)測定儀進行濃度上之定量分析。本研究每一組毒物是使用 1 個控制組及 7 組不同高低的濃度，先經由 range finding 以濃度間隔以 5-10 倍數試驗後，取得大致濃度範圍之後，再以 2-3 為倍數做確定試驗，Table 5.1 所顯示的為一級炔丙醇實驗原始數據，為三重複之平均，Initial DO 及 Final DO 為溶氧測定儀所測定出之值，Final cells 為顆粒計數器所測出之細胞顆粒數。 $\mu$ specific、 $\mu$ relative 及抑制率為利用公式所計算出來之值。由此 Table 中可觀測出藻類的生長情況，由此判斷化學物質對於藻類生長情況產生抑制的能力。(其原始數據如附錄一)，由於一級炔丙基醇類也具一定揮發性，而本試驗系統屬於密閉式便可降低這些有機毒物在試驗時間 48 小時內因揮發而導致濃度改變的影響，進而增加藻類毒性試驗之準確性。在 stock solution 的配製係利用 BOD 瓶在無 headspace 之情況下完成，以避免在配製的過程當中減少毒性物質之揮發。

Table 5.1 為以 Probit model 針對 16 種炔丙基醇類( Primary and Primaryhomo propargylic alcohols)分析其三種觀測終點所得到之藻類毒性試驗數據，其數據中包含 EC<sub>50</sub> 值、劑量反應關係曲線之截距( $\alpha$ )

及斜率( $\beta$ )。試驗中以溶氧(Based on  $\Delta$ DO)、最終生物數量(Based on Final yield)及生長率(Based on Growth rate)之變化量為觀測終點以得知藻類受有機物質的影響。原始的實驗數據可由附錄一得知，此外亦可藉由附錄二之曲線以檢查毒性試驗之數據是否為一良好、精確的濃度-反應關係。不同的毒物彼此間毒性的差異級數可由Fig 5.1 比較而得知。

附錄一中各測試化合物的 Initial DO、Final DO 及 Final cells 之測定是藉由溶氧測定儀及顆粒計數器所分析而得，再進一步進行轉換以得知三種 end-point 之抑制率(Inhibition rate; IR)。由毒性試驗結果可以發現，當毒物濃度增加時，毒性物質對於藻類的生長抑制情形亦愈明顯。

由 Fig 5.1 可清楚看出三個反應終點中，以 Final Yield 最敏感，依序為 DO 及 Growth Rate。

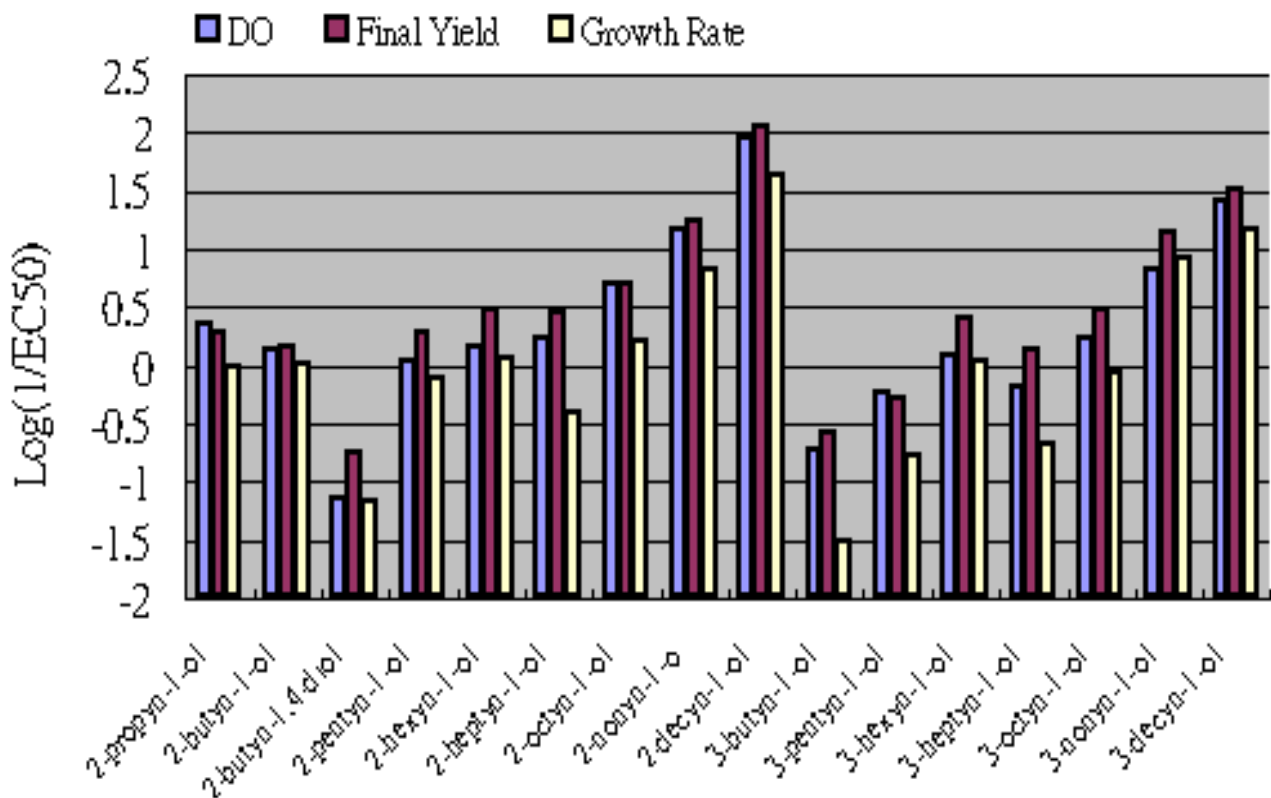


Fig 5.1 The toxicity response of the algal three end-point

Table 5.1 看到以 Final Yield 為反應終點來看毒性的大小依序為 2-decyn-1-ol(1.35)>3-decyn-1-ol(4.84)>2-nonyn-1-ol(7.77)>3-nonyn-1-ol (10.1) >2-octyn-1-ol (24.44) >2-propyn-1-ol (28.88) >2-hexyn-1-ol (32.19) >3-hexyn-1-ol (37.76) >2-heptyn-1-ol (38.37) >3-octyn-1-ol (40.76) >2-pentyn-1-ol (42.47) >2-butyn-1-ol (47.15) >3-heptyn-1-ol (83.62) >3-pentyn-1-ol (158.45) >3-butyn-1-ol (262.33)>2-butyn-1,4-diol (464.21) ; ()內的單位以 mg/L 表示，另兩個實驗終點結果也和 Final Yield 為反應終點的實驗結果相符。

由實驗結果也發現 Primary propargylic alcohols 的毒性大於 Primary homopropargylic alcohols，其毒性大小以同為同分異構物的化合物來看毒性相差約 1.2~3.7 倍毒性最高的為 2-decyn-1-ol，毒性最低的為帶有 2 個氫氧基的 2-butyn-1,4-diol，而毒性的高低分佈由結果來看和其碳數的多寡疏水性的參數(Log kow)及溶解度的高低有關，以毒性最高的 2-decyn-1-ol 來看，無論是在碳數(10 個碳)，疏水性參數(3.54)，溶解度(559.3mg/L)都是本次實驗中具最高碳數，最高的 Log kow 值及最低的溶解度；在本次實驗的化合物中，未按照上述參數排列的為 2-propyn-1-ol，此項化合物在 16 個測試化合物中，其碳數最低(3 個碳)，分子量最低(56.06 g/mole)，Log p 為負值(-0.38)，但是由結果來看其毒性並非為最低的，反而還具有相對高的毒性，由此結果看來也可以發現，此項化合物的代謝過程中經由 ADH 及 NAD<sup>+</sup> 作用產生的炔丙基醛類(propargyl aldehyde)，而此  $\alpha$ -unsaturated aldehyde 為 Michael acceptor electrophiles，而此強親電性物質會使細胞易受親荷性分子(nucleophilic moiety)攻擊(ex. SH<sub>2</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH<sub>2</sub>, -OH<sub>2</sub><sup>+</sup>)，而由實驗結果看來此加成反應特別在低分子量的 primary propargylic alcohols 明顯，造成相對高的毒性效應。(Veith et al., 1989; Bradbury and Christensen, 1991; Schultz and Tichy, 1993)。

**Table 5.1 Median effective concentration values (EC<sub>50</sub>) based on three end-point**

Toxicant	based on ΔDO				based on Final yield				based on Growth rate			
	EC50	95%CI	α	β	EC50	95%CI	α	β	EC50	95%CI	α	β
Primary propargylic												
2-propyn-1-ol	25.15	16.94- 52.25	2.68	1.65	28.88	21.86 - 41.02	1.4	2.47	55.81	48.81- 64.22	0.58	2.53
2-butyln-1-ol	49.84	29.32- 161.27	1.82	1.87	47.15	34.7- 70.27	0.32	3.18	67.48	55.5 -85.67	-2.7	4.23
2-butyln-1,4-diol	1141	579.41- 4421.8	0.94	1.33	464.21	384.22 - 563.7	0.27	1.98	1214.2	1096.3-1348.3	-0.5	1.79
2-pentyln-1-ol	76.2	44.63- 199.35	2.2	1.49	42.47	47.36 - 38.28	1.86	1.93	109.49	95.14-129.42	1.1	1.91
2-hexyn-1-ol	68.12	52.46- 95.14	1.58	1.87	32.19	28.04- 37.21	2.49	1.66	86.52	67.24 - 120.7	1.57	1.77
2-heptyn-1-ol	62.91	48.91 - 82.9	3.16	1.03	38.37	27.4- 51.43	3.39	1.02	285.19	223.26 - 393.34	2.92	0.85
2-octyn-1-ol	25.07	16.36 - 46.13	2.91	1.49	24.44	17.06-37.51	3.2	1.3	78.64	54.56-163.08	2.4	1.37
2-nonyn-1-ol	9.7	7.93-12.31	3.33	1.69	7.77	6.54-9.35	3.39	1.81	21.32	18.62-24.92	2.7	1.73
2-decyn-1-ol	1.7	1.26-2.15	4.38	2.68	1.35	0.9-1.92	4.74	1.96	3.57	2.22-5.47	4.27	1.31
Homopropargylic												
3-butyln-1-ol	367.76	238.41-701.29	3.42	0.62	262.33	222.81 -316.11	2.41	1.07	2262.9	1727.1 -3190.2	2.16	0.85
3-pentyln-1-ol	142.1	101.69-214.37	3.37	0.76	158.45	96.68- 341.64	2.53	1.12	492.12	289.30-1697.8	1.49	1.3
3-hexyn-1-ol	77.78	56.46-107.97	2.83	1.15	37.76	28.03- 48.33	1.49	2.22	89.73	71.68-111.92	1.66	1.71
3-heptyn-1-ol	171.47	158.16- 187.44	1.62	1.51	83.62	66.88 -108.64	2.96	1.06	525.2	372.82 -863.25	2.42	0.95
3-octyn-1-ol	71.66	59.38 -91.61	2.27	1.47	40.76	25.66-87.49	2.91	1.3	140.53	91.09 - 322.5	2.24	1.28
3-nonyn-1-ol	21.42	10.41-32.64	2.38	1.97	10.1	8.54-12.42	2.05	2.94	16.82	14.94-18.99	0.76	3.46
3-decyn-1-ol	5.88	4.21 -8.02	3.43	2.04	4.84	3.88-6.16	3.21	2.62	10.14	8.38-12.15	2.86	2.12

Probit =  $\beta \times \text{Log}(\text{toxicant concentration}) + \alpha$ ;  $\alpha$  = intercept,  $\beta$  = slope

EC<sub>50</sub> unit: mg/L

C.I. = Confidence Interval

## 5.2 物種比較表

下表Table 5.2 中所列是過去針對此類一級炔丙基醇類的文獻中發現利用其他測試物種的與以本實驗 3 個實驗終點 ( $\Delta$ DO、Final Yield 和 Growth Rate) 急毒性數據的比較表，單位皆以mg/L表示；藻類，水蚤 (*Daphnia magna*)，反應終點皆為 $EC_{50}$ (造成 50%抑制濃度)纖毛蟲(Ciliate)反應終點為 $IGC_{50}$  (造成生長抑制 50%濃度)；*Fathead Minnow*、golden orfe、*Leucis idus*皆為魚類，其反應終點為 $LC_{50}$ (造成 50%致死濃度)；最為一個則是為細菌類的急毒性數據。



**Table 5.2 藻類各終點之 50%抑制濃度與各物種急毒性數據比較表**

Toxicant	PSEUDOKIRCHNERIELLA SUBCAPITATA			Ciliate <sup>[a]</sup>	Fathead Minnow <sup>[b]</sup>	Daphnia magna	golden orfe <sup>[e]</sup>	Leucis idus <sup>[f]</sup>	Scenedesmus subspicatus <sup>[g]</sup>	Pseudomonas pudita <sup>[h]</sup>
	DO	FY	GR							
Primary propargylic										
2-propyn-1-ol	25.15	28.88	55.81	658.7	1.53	32[c]	4.6			
2-butyln-1-ol	49.84	47.15	67.48	519	10.1					
2-butyln-1,4-diol	1141	464.21	1214.2	6530	53.6	43.5[d]		100-220	480	3940
2-pentyln-1-ol	76.2	42.47	109.49	314.6						
2-hexyn-1-ol	68.12	32.19	86.52	237.6						
2-heptyn-1-ol	62.91	38.37	285.19	173.53						
2-octyn-1-ol	25.07	24.44	78.64	81.01						
2-nonyn-1-ol	9.7	7.77	21.32	31.39						
2-decyn-1-ol	1.7	1.35	3.57	15.78	1.07					
Homopropargylic										
3-butyln-1-ol	367.76	262.33	2262.9	4849	36.1					
3-pentyln-1-ol	142.1	158.45	492.12	1273.2						
3-hexyn-1-ol	77.78	37.76	89.73	1027.65						
3-heptyn-1-ol	171.47	83.62	525.2	234.26						
3-octyn-1-ol	71.66	40.76	140.53	120.52						
3-nonyn-1-ol	21.42	10.1	16.82	64.1						
3-decyn-1-ol	5.88	4.84	10.14	11.43						



[a]Schultz, et al.(2003); [b]Veith, et al.(1989); [c]Bringmann,G.,Kuehn,R.(1982); [d]BASF AG,Labor Oekologie; unveroeffentlichte Mitteilung vom 30.11.87; [e]BASF AG, Abteilung Toxikologie ; unveroeffentlichte Untersuchung(79/408),06.03.80; [f]BASF AG,Abteilung Toxikologie unveroeffentlichte Untersuchung; [g][h] BASF AG,Labor Oekologie; unveroeffentlichte Untersuchung , (1129/87) (87/755),25.05.1998



由 Table 5.1 可以看到在與纖毛蟲的敏感度比較方面，在與藻類 3 個反應終點的毒性比較方面，DO 及 Final Yield 這兩個反應終點很明顯敏感度要比纖毛蟲高，而在以 Growth rate 為反應終點時大部分也皆優於纖毛蟲，除了 (2-heptyn-1-ol, 3-heptyn-1-ol, 3-octyn-1-ol)，而造成這幾個化合物在敏感度的差異可能在於在這 3 個反應終點中，Growth rate 是屬於較不敏感的(以 Fig 5.1~Fig 5.3 來表示 ; EC50 unit : mmole/L)。

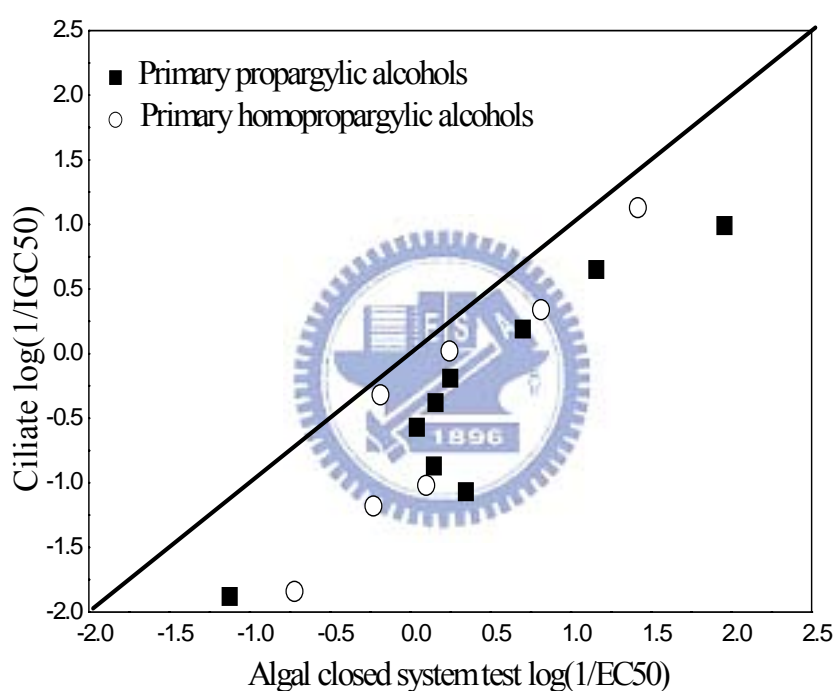


Fig 5.2 一級炔丙基醇藻類與纖毛蟲毒性數據之比較(based on  $\Delta$ DO )

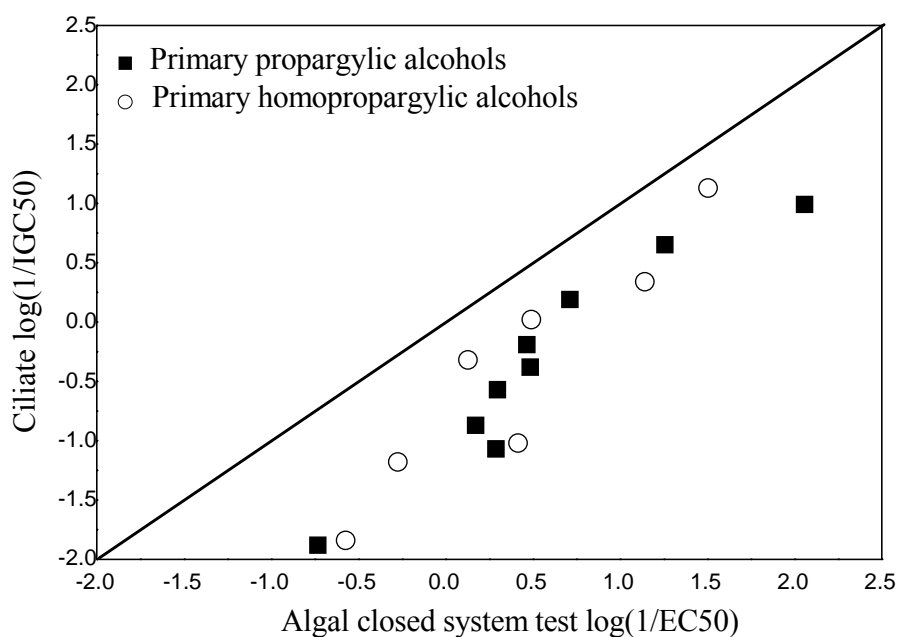


Fig 5.3 一級炔丙基醇藻類與纖毛蟲毒性數據之比較 (based on Final Yield)

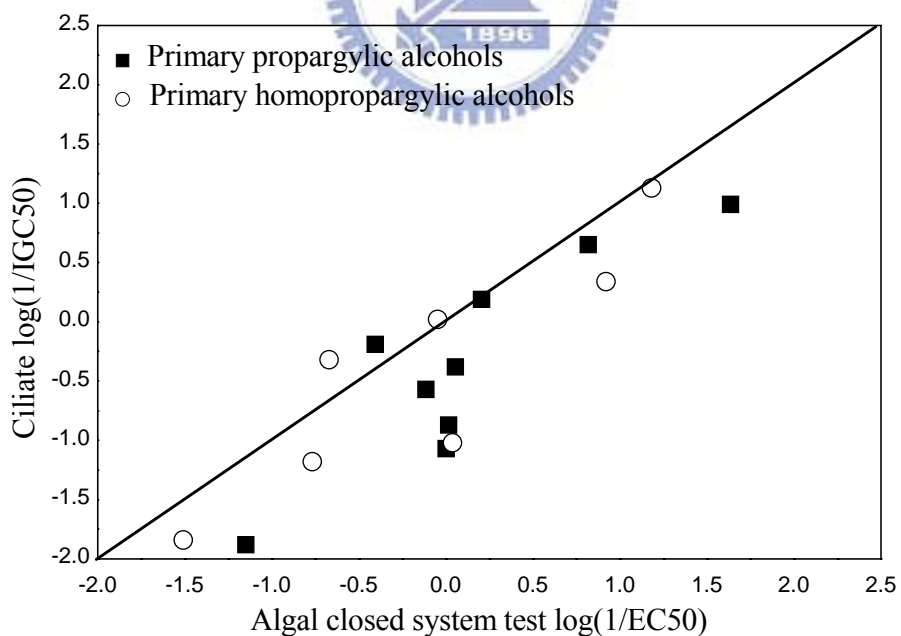
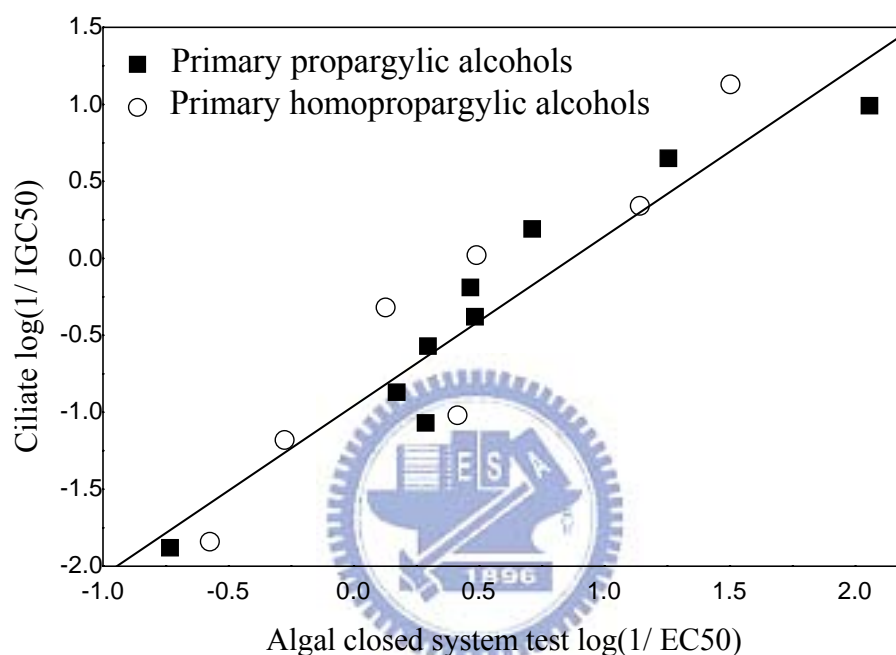


Fig 5.4 一級炔丙基醇藻類與纖毛蟲毒性數據之比較 (based on Growth Rate)

利用月芽藻和纖毛蟲的敏感度做相關性的討論，選用Final Yield為反應終點，結果發現和纖毛蟲有很高的相關性如Fig 5.5 ( $r^2=0.88$ )，而DO及Growth Rate兩個反應終點的相關性也分別達到 0.84 及 0.78，由此也可進一步說明此一級炔丙基醇類的毒性作用機制和纖毛蟲有極高的相似度。



**Fig 5.5 一級炔丙基醇藻類與纖毛蟲毒性數據之比較 (based on Final Yield)**

魚類毒性數據方面，僅有部分文獻提到關於炔丙基醇類，分別是 Veith et al. (1989)，(Mekenyan et al. (1993)，測試物種為 Fathead minnows 對於 Primary propargylic alcohols 之 96 小時的  $LC_{50}$  值分別為 (2-propyn-1-ol 為 1.53ppm，2-butyn-1-ol 為 10.1ppm，2-butyn-1,4-diol 為 53.6，2-decyn-1-ol 為 1.07ppm)；而在 Homo 方面 (3-butyn-1ol 為 36.1ppm)；2-propyn-1-ol 及 2-butyn-1,4-diol 在 *Daphnia magna* 方面其 24hr 的  $EC_{50}$  值分別為 32 及 43.5 ppm；而跟魚類的相關性比較方面，由於實際的數據較為缺乏，故無法作為相關性的觀察及分析。

另外在細菌方面的EC<sub>50</sub>值為 3940ppm ；而在藻類的數據方面則更為缺乏，僅在文獻中看到以Scenedesmus subspicatus為測試物種的 72 小時毒性試驗其 2-propyn-1-ol 的EC<sub>50</sub> 值為 480ppm;而過去也有利用電腦模擬方式針對此類的化合物做預估的毒性，這是利用U.S.EPA所發展的ECOSAR software[Calculated by Toxicology and Regulatory Affairs , December,2002]，它是利用兩條不同的SAR公式去評估 96 小時的藻類抑制情形，第一條公式是利用電腦演算法以train set方式求得化合物之KOW值進而去推估急毒性數據；第二條公式為利用CLOGP的數學模式來推估毒性;兩條公式分別為：

$$\text{Log GA 96-hr EC}_{50} (\text{mmole/L}) = -0.687 - 0.533 \log \text{kow} (\text{using Clogp})$$

$$\text{Where } r^2 = 1.0, \log \text{kow} < 6.4, \text{MW} < 1000 \dots\dots\dots(\text{eqn1})$$

$$\text{Log GA 96-hr EC}_{50} (\text{mmole/L}) = 0.091 - 0.655 \log \text{kow} (\text{using SRC Kowwin})$$

$$\text{Where } r^2 = 1.0, \log \text{kow} < 6.4, \text{MW} < 1000 \dots\dots\dots(\text{eqn2})$$

而由其模擬分析的結果發現，利用 Clogp 的演算方式和我們實際觀測到的藻類急毒性數據較為接近( 2-propyn-1-ol 為 17.7ppm )而以 SRC model 之結果則差距較遠(117ppm)，中間的差異性極高，也因為如此，針對藻類的毒性 U.S.EPA HPV Challenge Program(美國環保署高生產容量協會);此協議書中為了更進一步清楚瞭解炔丙基醇的急毒性影響，依照美國環保署的建議去做藻類毒性的評估，並且根據(OECD 201 guideline, 2006)實行，此為(OECD 201 guideline, 1984)之修訂版本;藉此去更進一步了解此類化學物質對於藻類及水體的毒性影響。

而由實驗所得到的數據發現在三種測試物種中敏感度的高低分別是 *Fathead minnows* > *Pseudokirchneriella subcapitata* > *Tetrahymena pyriformis*，但是魚類的數據也只針對少數幾種所選擇的化學物質，故需要更進一步的研究；由已完成之藻類毒性試驗中看到含氧的取代基愈多，其毒性也相對降低，此結果和魚類及纖毛蟲的實驗結果相符合；藻

類從實驗中發現以 Final Yield 為反應終點其敏感度最佳，依次為  $\Delta$ DO 和 Growth rate；而從實驗結果也發現，除了 2-propyn-1-ol 之外，無論是 Primary 或是 Homo 的部份，其毒性隨著分子量的增加上升，在疏水性上也觀察到類似情況，當 log kow 值越高時，其毒性有增強之趨勢，而此結果也會在 QSAR 的分析上繼續深入討論。

### 5.3 炔丙基醇類與基線毒性之比較

Verhaar et al. (2000)指出利用基線毒性預測毒性的結果與實際觀測毒性之差若介於 log 單位 $\pm 1$  之間則代表此化合物同樣為非極性麻醉毒性機制。

本研究室過去也做了一系列有關非極性麻醉毒性化合物的研究並與 log P 值迴歸同樣依三個不同的反應終點  $\Delta$ DO，Final Yield，Growth rate 建立有關月芽藻的基線毒性(baseline toxicity)關係分別以 Eq(1)、Eq(3) (Hsieh, 2006)、Eq(2) (Tsai and Chen, 2007) 表示：

$$\log (1/ EC_{50,DO}) = 0.978 \log P - 1.83 \quad (1)$$

$$n = 26, R^2 = 0.94, Q^2 = 0.932, S = 0.332, F = 380.2$$

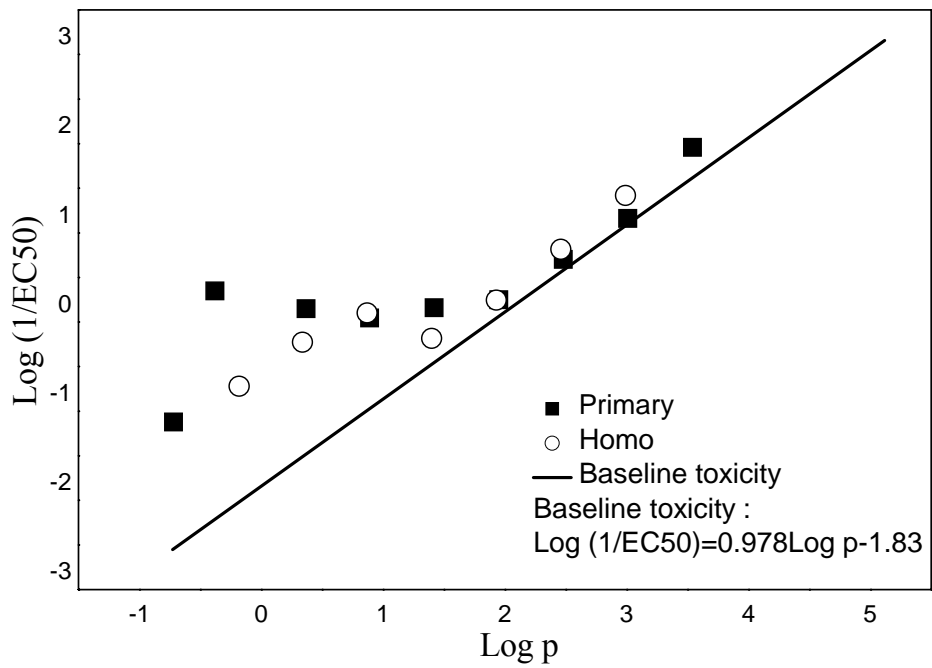
$$\log (1/ EC_{50,Final Yield}) = 0.9 \log P - 1.4 \quad (2)$$

$$n = 48, R^2 = 0.87, Q^2 = 0.866, S = 0.49, F = 303.7$$

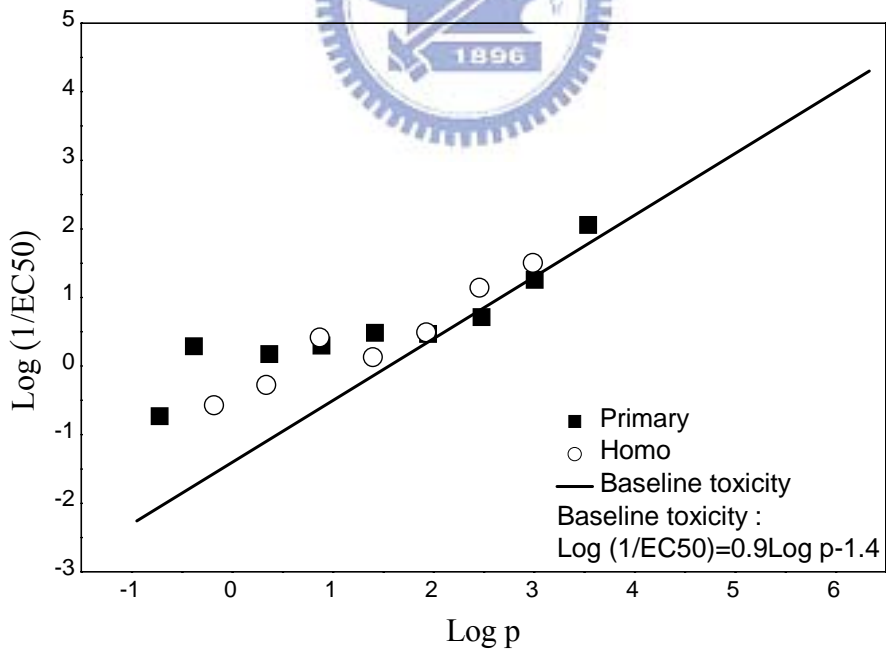
$$\log (1/EC_{50,Growth rate}) = 0.974 \log P - 1.95 \quad (3)$$

$$n = 26, R^2 = 0.943, Q^2 = 0.933, S = 0.325, F = 393.5$$

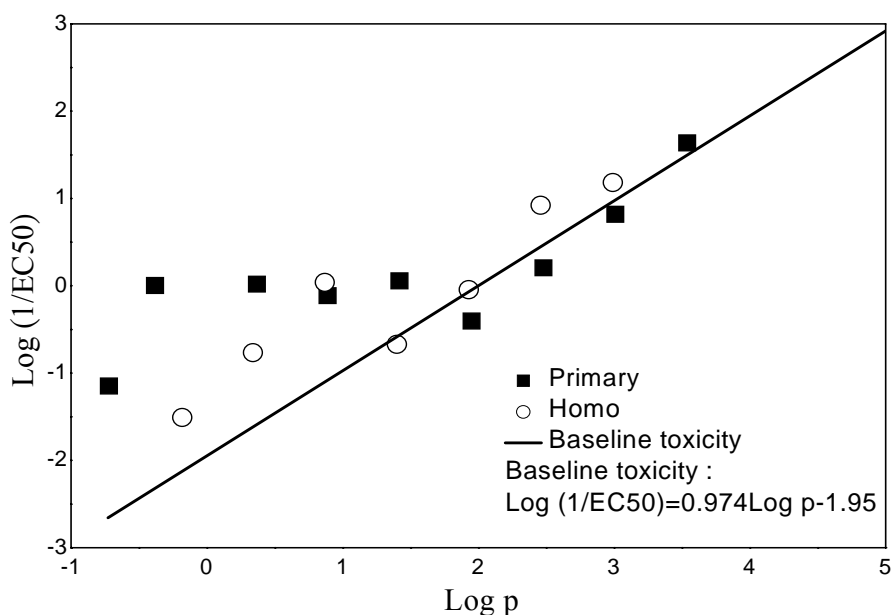
利用上列 3 個公式，希望能進一步的探討一級炔丙基醇類的毒性作用機制為何，下圖 Fig 5.5~Fig 5.7 即為利用三個不同反應終點與基線毒性之比較圖。



**Fig 5.6 Correlation between  $\log(1/\text{EC}_{50})$  and  $\log p$  based on  $\Delta\text{DO}$**



**Fig 5.7 Correlation between  $\log(1/\text{EC}_{50})$  and  $\log p$  based on Final Yield**



**Fig 5.8 Correlation between  $\log(1/EC_{50})$  and  $\log p$  based on Growth Rate**

由以上與過去所建立的有關月芽藻的基線毒性比較途看來大部分的化合物雖然毒性略高於基線毒性，但是其差距大都落在 $\pm 1$ 個 Log 單位，其中以 2-propyn-1-ol，2-butyn-1-ol，2-butyn-1,4-diol 這三個化合物與基線毒性相距較遠，其中最明顯的為 2-propyn-1-ol，由上一小節物種之間的比較和本節中與基線毒性的比較中看來，2-propyn-1-ol 這項化合物的毒性作用機制和其他炔丙基醇類的作用機制有些許不同，而這也可能是因為此項化合物在代謝反應過程中產生具親電性的物質，而此未飽和的醛類在藻類細胞體內形成更強的 Michael-addition 反應；至於 2-butyn-1,4-diol 的部份，此項化合物雖然在較低的疏水性(-0.72)但是造成毒性的原因可能是此項化合物對於月芽藻有較高的選擇性，扣除掉這三個化合物後，可以發現到尤其是 Primary homopropargylic alcohols 的毒性機制是較接近一般的非極性麻醉毒性機制。

由圖形中也發現當 Log *kow* 值小於 1.5，碳數低於 6 個碳，分子量低於 100 的一級炔丙基醇化合物，其毒性和一般行非極性麻醉機制的化合

物有明顯差異，Schultz and Tichy (1993) 利用纖毛蟲對於一級炔丙基醇類的研究中指出，此類化合物特別在低分子量的部份，有較高的毒性效應產生；而和魚類的文獻數據比較方面，分子量最小的 2-propyn-1-ol 同樣發現到具有相對高的毒性 (Veith et al., 1989; Bradbury and Christensen, 1991)；反之，當 Log p 值高於 1.5，碳數高於 6 個碳，分子量高於 100 的一級炔丙基醇化合物其毒性效應則較接近一般較常見的非極性麻醉機制。

#### 5.4 NOEC、EC<sub>10</sub>之比較

在有關低濃度的效應，本研究中同樣地利用三種不同的試驗參數 ( $\Delta$ DO、Final yield 和 Growth rate) 來討論此密閉式BOD瓶藻類毒性試驗之EC<sub>10</sub>值和NOEC值 (No Observed Effect Concentration)。

NOEC 值的判定通常與實驗濃度的取決、重複組的數量和選定之參數有所關聯。本研究中的 NOEC 值是由統計方法中的 Dunnett's test 方法來進行分析，若空白組之重複組間的差異不大時，則與處理組的差距便較為明顯，所求得的 NOEC 值也較為準確，通常較不嚴謹的實驗易出現較高的 NOEC 值。

Table 5.3 列出了EC<sub>10</sub>值及NOEC值之結果，EC<sub>10</sub>也是利用Probit模式求得，NOEC則是利用Dunnett's test所得到的，同時也列出了三種不同參數的EC<sub>10</sub>與NOEC值比例。在NOEC值的比較方面，大多數皆以細胞密度的變化量和比生長速率要來得敏感，而細胞密度的變化量和溶氧變化量兩種參數的敏感度是差不多的，在生長率方面僅有二種毒性物質 (2-decyn-1-ol、3-pentyn-1-ol) 之NOEC值小於實驗濃度的最小值，而溶氧變化量和細胞密度變化則分別有 31%(5/16)及 63%(10/16)的NOEC值較實驗時的最低濃度還要來得低。

和EC<sub>10</sub>的比較方面，以溶氧產生量為參數時的EC<sub>10</sub>/NOEC的比值在



0.22 至 7.8 之間，其中 $>1$ 的組數有 11 組，佔了 69%；再以生長率來討論時可以發現到，則是有 16 組的物質 $EC_{10}/NOEC$ 比值皆 $>1$ ，約由 1.38 到 11.39 之間，若以細胞密度變化量來看的話，卻有 13 組數據的比值 $>1$ ，佔了 81%，值約在 0.42-3.82 之間。當其比值 $>1$ 時則是顯示出 $NOEC$ 會比 $EC_{10}$ 敏感，而造成比值大於 1 的原因可能與毒物濃度設定有關，即較佳的實驗濃度設定可降低分析結果之差異。由此即可看出三種不同參數皆表現出 $NOEC$ 值較 $EC_{10}$ 來得敏感能在毒性評估中提供較好的保護。

為了更深入比較 $EC_{10}$ 與 $NOEC$ 之相關性，進一步地利用ANOVA(analysis of variance) test觀察三項重要參數： $Sw$ 、 $F$  ration及中斷值(cut-off value)。 $Sw$ 代表的是試驗的組內變異，而 $F$  ration為組間變異與組內變異的比值，用以表示組間與組內變異的差異程度。

由 Table 5.4 發現到 $Sw$ 值在三種參數下的差異性皆很大，主要是溶氧產生量的單位是 $mg/L$ ，細胞密度變化量的單位是 $cells/mL$ ，使得 $Sw$ 不能用以直接比較三種反應終點的組內變異，也因此 $F$  ration基於相同理由，同樣無法判斷哪一個觀測參數較為精準。為了能夠比較不同參數的準確度，本研究使用了-判斷參數中斷值，此中斷值與 $Sw$ 成比例關係，且介於 $NOEC$ 與 $LOEC$ 之間，能夠更嚴謹地判斷藻類受到抑制的顯著性，並使之包含單位的複雜參數與控制組的平均值比較並以抑制的百分率作為單位，使其能夠用於不同單位的試驗終點間的比較。

Table 5.4 顯示出溶氧產生量、細胞密度變化量及生長率為反應終點的平均中斷值分別是 3.34、0.75 及 0.6；全部試驗中大部份以生長率為反應終點所得到的中斷值較細胞密度變化量和溶氧產生量小，顯示以這此參數作為反應終點比細胞密度變化量和溶氧的變化量要好許多。

因為中斷值介於 $NOEC$ 與 $LOEC$ 之間，但高於 $NOEC$ ，故當中斷值

小於 10%時，生物受到NOEC的影響濃度會比 10%的抑制濃度要低，也就是說，此時建議選擇NOEC值會比EC<sub>10</sub>提供更加嚴謹的保護標準。Table 5.4 中，針對三種不同反應終點的中斷值而言，三個終點的中斷值皆小於 10，對於本研究的毒性物質而言，NOEC值比EC<sub>10</sub>能提供更佳的保護標準。而整個分析中，實驗條件的維持對於實驗結果的分析變異很大，而一個較小的cut-off value顯示此試驗組內變異相對地較小，因而有一定的精準度。綜合上述的討論可知，NOEC比起EC<sub>10</sub>更能提供對生物較好的保護。



**Table 5.3 The relationship of NOEC and EC<sub>10</sub>**

Chemicals	NOEC			EC <sub>10</sub>			EC <sub>10</sub> /NOEC		
	DO	FY	GR	DO	FY	GR	DO	FY	GR
Primary propargylic alcohols									
2-propyn-1-ol	<2.56	2.56	2.56	4.22	8.74	17.41	>1.65	3.41	6.8
2-butyn-1-ol	5.16	<5.16	5.16	10.33	18.62	33.56	2	>3.61	6.5
2-butyn-1,4-diol	55.67	<55.67	55.67	123.36	104.39	233.43	2.21	>1.88	4.19
2-pentyn-1-ol	2.41	2.41	2.41	10.46	9.2	23.42	4.34	3.82	9.72
2-hexyn-1-ol	<2.43	2.43	2.43	14.03	5.47	16.32	>5.77	2.25	6.72
2-heptyn-1-ol	4.99	<4.99	4.99	3.54	2.1	8.76	0.71	>0.42	1.76
2-octyn-1-ol	2.49	<2.49	2.49	1.7	1.52	9.14	0.68	>0.61	3.67
2-nonyn-1-ol	<0.53	<0.53	0.53	1.85	1.68	3.86	>3.49	>3.17	7.28
2-decyn-1-ol	0.25	<0.25	<0.25	0.57	0.3	0.38	2.28	>1.2	1.52
Primary homopropargylic alcohols									
3-butyn-1-ol	<9.22	9.22	9.22	3.09	16.71	69	>0.34	1.81	7.48
3-pentyn-1-ol	<12.85	<12.85	<12.85	2.88	11.39	51.11	>0.22	>0.89	>3.98
3-hexyn-1-ol	6.17	<6.17	6.17	5.94	10.01	15.94	0.96	>1.62	2.58
3-heptyn-1-ol	3.82	3.82	3.82	24.39	5.16	23.27	6.38	1.35	6.09
3-octyn-1-ol	1.24	1.24	1.24	9.68	4.19	14.12	7.8	3.38	11.39
3-nonyn-1-ol	1.36	<1.36	1.36	4.79	3.7	7.17	3.52	>2.72	5.27
3-decyn-1-ol	0.51	<0.51	0.51	0.95	1.31	2.53	1.86	>2.57	4.96
mean							>2.76	>2.16	>5.62

**Table 5.4. The important statistical parameters in three test end-points**

Sw : Variation between columns F-ration : The ration of variation within columns to variation between columns

Chemicals	DO			Final yield			Growth rate		
	Sw	F-ration	Cut-off value(%)	Sw	F-ration	Cut-off value(%)	Sw	F-ration	Cut-off value(%)
Primary propargylic alcohols									
2-propyn-1-ol	0.01	1.421E+05	0.36	2373.87	7.816E+03	1.53	0.01	1.987E+04	0.81
2-butyne-1-ol	0.2	3.568E+02	6.96	826.64	5.122E+04	0.64	0.01	3.308E+04	0.76
2-butyne-1,4-diol	0.21	2.360E+02	7.34	676.12	6.931E+04	0.5	0	4.104E+04	0.55
2-pentyne-1-ol	0.17	5.272E+02	4.69	692.13	6.713E+04	0.46	0	3.031E+04	0.49
2-hexyne-1-ol	0.05	2.659E+02	2.15	531.84	8.223E+04	0.41	0	6.260E+04	0.39
2-heptyne-1-ol	0.13	1.607E+02	7.08	1508.86	5.994E+03	1.26	0.01	1.687E+03	1.61
2-octyne-1-ol	0.18	1.739E+02	7.91	1031.41	9.543E+03	0.94	0	1.081E+04	0.61
2-nonyne-1-ol	0.03	2.120E+04	0.85	230.94	5.047E+05	0.17	0	1.090E+05	0.27
2-decyne-1-ol	0.01	1.514E+05	0.4	351.87	2.126E+05	0.28	0	1.497E+05	0.29
Primary homopropargylic alcohols									
3-butyne-1-ol	0.06	9.084E+02	1.76	4107.48	7.548E+02	2.88	0.01	4.27E+02	1.95
3-pentyne-1-ol	0.04	1.158E+03	1.8	624.12	2.940E+04	0.51	0	4.174E+04	0.34
3-hexyne-1-ol	0.13	2.176E+02	6.62	727.36	4.375E+04	0.65	0.01	2.220E+04	0.84
3-heptyne-1-ol	0.1	1.008E+03	2.57	1420.43	6.357E+03	1.07	0	9.086E+03	0.51
3-octyne-1-ol	0.05	2.923E+03	1.33	424.26	7.999E+04	0.31	0	6.049E+04	0.21
3-nonyne-1-ol	0.04	1.954E+04	0.96	287.85	1.074E+06	0.15	0	2.452E+05	0.32
3-decyne-1-ol	0.02	5.405E+04	0.59	372.89	4.076E+05	0.23	0	1.118E+05	0.37
mean	0.09	2.492E+04	3.34	1011.75	1.658E+05	0.75	0.003	5.932E+04	0.65

## 5.5 急慢性毒性比(Acute-Chronic Toxicity Ratio ; ACR)

過去的毒性試驗中我們所關注的除了急毒性的結果外，化合物對水體生物長時間所造成的毒害也是值得去關注，然而慢毒性的試驗往往受限於需較長的時間及花費更多的資源。現今大都採用經外插法(extrapolation)得知毒物之毒性影響並更進一步建立環境品質之標準。假設在此求得的結果下，對於現地中的影響及環境來說都是安全的，低於此安全的層級之下，毒性化學物質對於自然環境即有負面之影響。而固定的外插因子通常採用 10、100 或 1000 應用到可獲得的 $EC_{50}$ 或 $LC_{50}$ 以求得最大可接受的危害程級。而急慢性毒性比值 (Acute to chronic toxicity ratio) 即是經由此而發展出來的。因為針對各種不同種類的化學物質卻使用同一固定的因子，在環境風險評估上有時可能會造成低估或高估了毒性化學物質在環境中的慢毒性影響。所使用的公式為  $ACR\ ratio = Acute\ toxicity / Chronic\ toxicity$ ；急慢性毒性所使用的單位為mg/L。

由於本研究的NOEC值有部分(35%)為預測值，也就是在實驗過程中所選之濃度僅可得知LOEC值而無法求得NOEC之實際值。因此藉由使用LOEC進行ACR之分析，並更進一步對 $EC_{10}$ 之ACR做其比較。Table 5.5 為將本研究之實驗結果進行分析所得之LOEC、 $EC_{10}$ 及NEC之ACR值。當ACR較大時即可得知急毒性指標( $EC_{50}$ )高於慢毒性指標(LOEC、 $EC_{10}$ )，亦可說明慢毒性指標有較高之敏感性。

首先討論利用NOEC所計算出來的ACR值，大部分是介於 8~20 之間，除了五個化合物值以Growth rate為終點參數分別為 51.64、65.41、86.03、94.45、130.9，若以 $EC_{10}$ 計算出的結果，ACR值大約都介於3~20之間，其中較大的值為以DO為反應終點的 $EC_{50}/EC_{10}$ ；3-butyn-1-ol (119)，3-pentyn-1-ol (49.3)，以Growth Rate為反應終點的 $EC_{50}/LOEC$ ；3-butyn-1-ol (122.7)，3-heptyn-1-ol (68.7)，3-octyn-1-ol (56.9)；這4個

化學物質造成ACR值會較高的原因可能是在低濃度的效應中，實驗選取的濃度不佳造成模式估算其毒性數據所造成的誤差，但是從其他的數據顯示，針對此一級炔丙基醇類的急慢毒性研究，除上述幾個化合物之外，在本研究利用不同低濃度抑制值所得到三種試驗終點下的ACR平均值約 8.2 ~ 28.6 因為彼此差異不大，為了避免高估或低估毒性，可將此一級炔丙基醇類的ACR ratio訂在 20 以達到安全的標準。



**Table 5.5 The ACR values in three test end-points**

Chemicals	DO(ACR)		Final yield(ACR)		Grwoth rate(ACR)	
	LOEC	EC10	LOEC	EC10	LOEC	EC10
Primary propargylic alcohols						
2-propyn-1-ol	9.8	6	5.6	3.3	10.9	3.2
2-butyn-1-ol	4.8	4.8	9.1	2.5	6.5	2
2-butyn-1,4-diol	10.2	9.2	8.3	4.4	10.9	5.2
2-pentyn-1-ol	15.8	7.3	8.8	4.6	22.7	4.7
2-hexyn-1-ol	28	4.9	6.6	5.9	17.8	5.3
2-heptyn-1-ol	6.3	17.8	7.7	18.3	28.6	32.6
2-octyn-1-ol	5	14.7	10	16.1	15.8	8.6
2-nonyn-1-ol	18.3	5.2	14.7	4.6	20.1	5.5
2-decyn-1-ol	3.3	3	5.4	4.5	14.3	9.4
Primary homopropargylic alcohols						
3-butyn-1-ol	39.9	119	14.2	15.7	122.7	32.8
3-pentyn-1-ol	11.1	49.3	12.3	13.9	38.3	9.6
3-hexyn-1-ol	6.3	13.1	6.1	3.8	7.3	5.6
3-heptyn-1-ol	22.4	7	10.9	16.2	68.7	22.6
3-octyn-1-ol	29	7.4	16.5	10.4	56.9	10
3-nonyn-1-ol	7.9	4.5	7.4	2.7	6.2	2.3
3-decyn-1-ol	5.8	6.2	9.5	3.7	9.9	4
Mean	14	17.5	9.6	8.2	28.6	10.2

## 5.6 QSAR 分析

本實驗將 16 種一級炔丙基醇的 $EC_{50}$ 值與不同參數來進行相關性之探討，過去的文獻資料對於此類化合物的研究較少，也增加本篇研究的重要性。

首先以單純的 $\text{Log } p$ 對於一級炔丙基醇進行QSAR模式的建立,首先先將其分成兩大部分(Primary and homo) ，並以三個實驗終點分別討論，針對模式之適合度，在統計回歸分析中，模式通常採用回歸係數之平方(  $r^2$ ，代表模式所解釋之方差)或自由度校正的 $r^2_{\text{adj}}$ ，標準偏差(Standard error)及檢驗值 $F$ 等來評判。

Primary propargylic alcohols 的 QSAR 回歸方程式:

$$\log(1/EC50) = 0.49 \text{ Log } p - 0.27 ; n=9 ; \\ r^2 = 0.73 ; Q^2 = 0.69 ; S=0.47 ; F = 19 \quad (\text{DO})$$

$$\log(1/EC50) = 0.47 \text{ Log } p - 0.093 ; n=9 ; \\ r^2 = 0.81 ; Q^2 = 0.78 ; S=0.36 ; F = 29.04 \quad (\text{FY})$$

$$\log(1/EC50) = 0.41 \text{ Log } p - 0.46 ; n=9 ; \\ r^2 = 0.63 ; Q^2 = 0.5 ; S=0.36 ; F = 12.14 \quad (\text{GR})$$

Primary homopropargylic alcohols 的 QSAR 回歸方程式:

$$\log(1/EC50) = 0.58 \text{ Log } p - 0.61 ; n=7 ; \\ r^2 = 0.88 ; Q^2 = 0.85 ; S=0.28 ; F = 34.95 \quad (\text{DO})$$

$$\log(1/EC50) = 0.62 \text{ Log } p - 0.46 ; n=7 ; \\ r^2 = 0.92 ; Q^2 = 0.9 ; S=0.23 ; F = 55.26 \quad (\text{FY})$$

$$\log(1/EC50) = 0.77 \text{ Log } p - 1.2 ; n=9 ; \\ r^2 = 0.84 ; Q^2 = 0.81 ; S=0.41 ; F = 27.07 \quad (\text{GR})$$



All primary propargylic alcohols 的 QSAR 回歸方程式:

$$\log(1/EC50) = 0.52 \text{ Log } p - 0.4; n=16 ; \\ r^2 = 0.76 ; Q^2 = 0.74 ; S=0.39 ; F =44.6 \quad (\text{DO})$$

$$\log(1/EC50) = 0.51 \text{ Log } p - 0.23 ; n=16 ; \\ r^2 = 0.83 ; Q^2 = 0.81 ; S=0.32 ; F =66.26 \quad (\text{FY})$$

$$\log(1/EC50) = 0.52 \text{ Log } p - 0.71 ; n=16 ; \\ r^2 = 0.67; Q^2 = 0.64 ; S=0.5 ; F =27.78 \quad (\text{GR})$$

由結果看來，三個終點中以 Final Yield 的效果最佳，Primary homopropargylic alcohols 與 LogP 有不錯的相關性 ( $r^2=0.84\sim0.92$ )，此結果與 (T. Wayne Schultz, 2004) 結果相似，Primary propargylic alcohols 的部份 ( $r^2=0.63\sim0.81$ ) 由以上結果也可發現其作用機制和一般傳統的非極性麻醉機制類似，跟化合物的疏水性有很高的相關性；Fig 5.8~5.10 為 16 個一級炔丙基醇利用三個反應終點對於 Log P 與 Log(1/EC<sub>50</sub>) 回歸的關係圖，EC<sub>50</sub> unit: mmole/L。

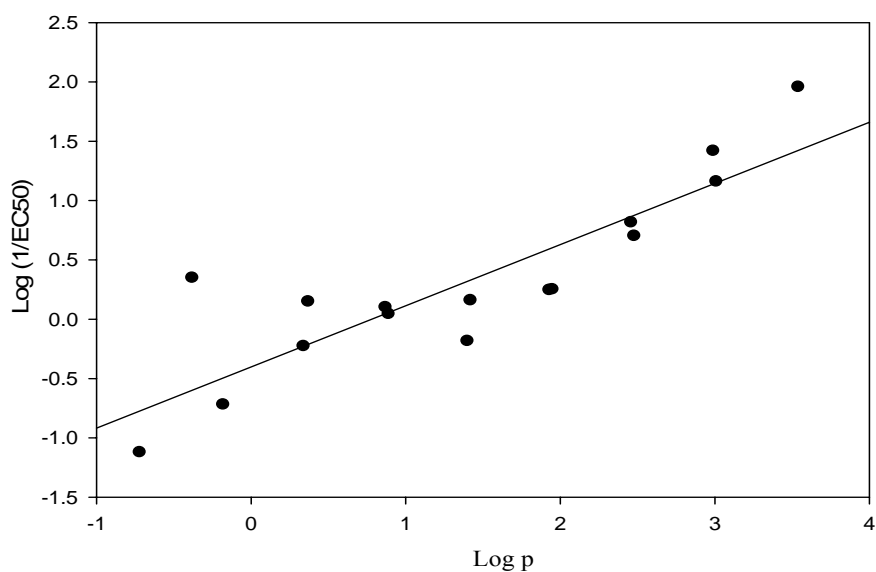
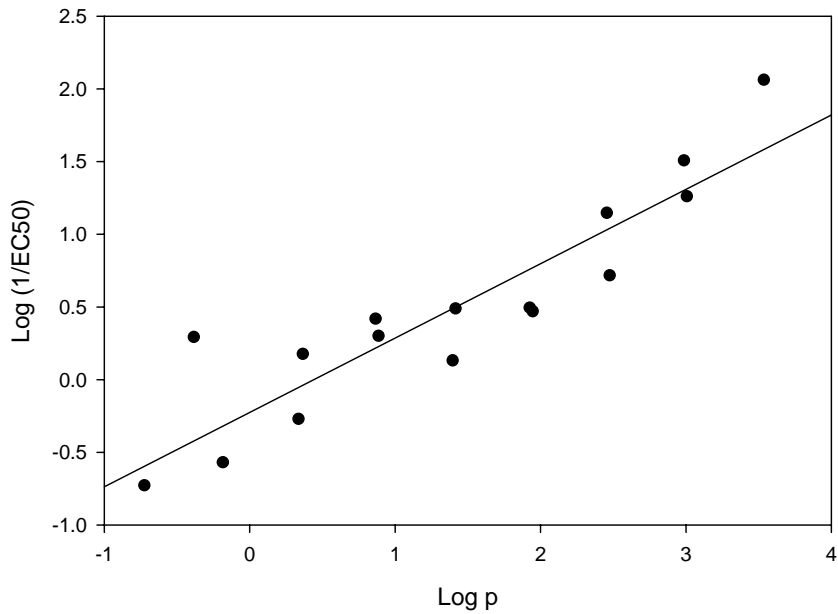
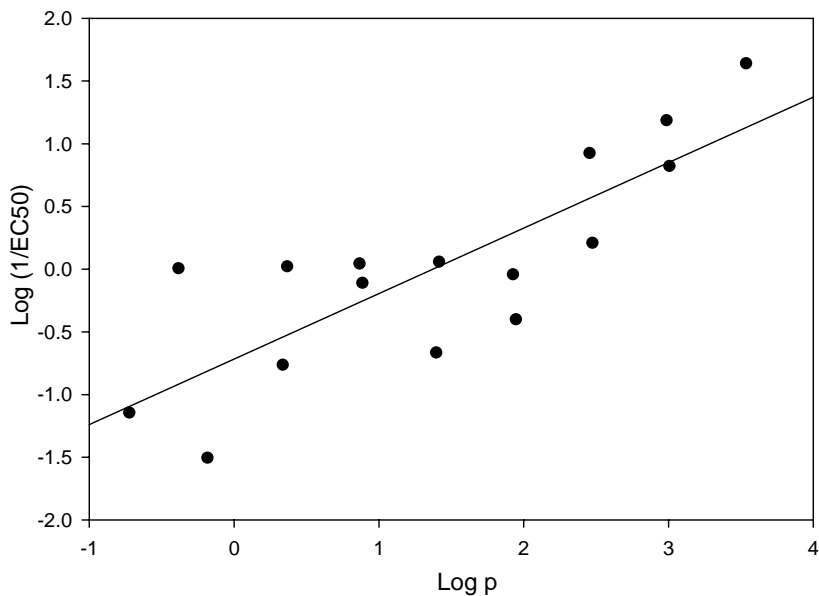


Fig 5.9 一級炔丙基醇 Log p 與 Log(1/EC<sub>50</sub>)之關係圖(based on DO)



**Fig 5.10 一級炔丙基醇 Log p 與 Log(1/EC50)之關係圖(based on Final Yield)**



**Fig 5.11 一級炔丙基醇 Log p 與 Log(1/EC50)之關係圖(based on Growth Rate)**

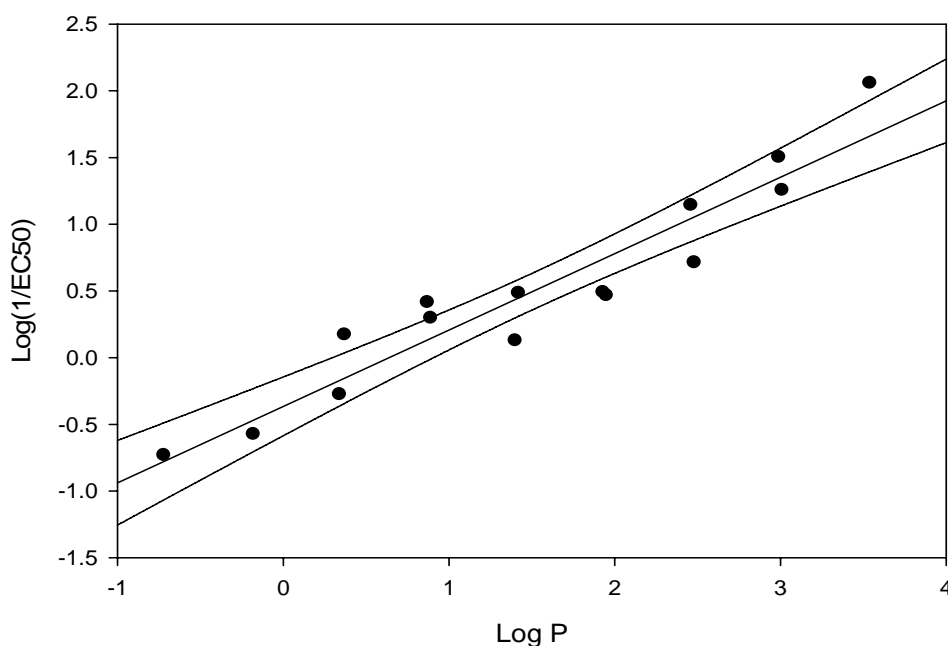
由圖可發現，三個反應終點呈現的趨勢大致相同，其中 2-propyn-1-ol 這項化合物在圖上明顯偏離許多；由結果看來和文獻中 (Veith et al., 1989)比較中發現推斷在代謝活性的過程中，2-propyn-1-ol

產生的未飽和之醛類化合物，而此化合物為 Michael-addition reaction electrophile， 使得其毒性機制更具有反應性，另外以殘差值來看，以回歸最佳的 Final Yield 反應終點來看，其殘差值高達 2.48，若將此化合物當為 outlier 去除時，其回歸效果有明顯增加許多，其回歸公式如下：

$$\log(1/EC50) = 0.57\text{LogP} - 0.37; n=15; \quad (\text{FY})$$

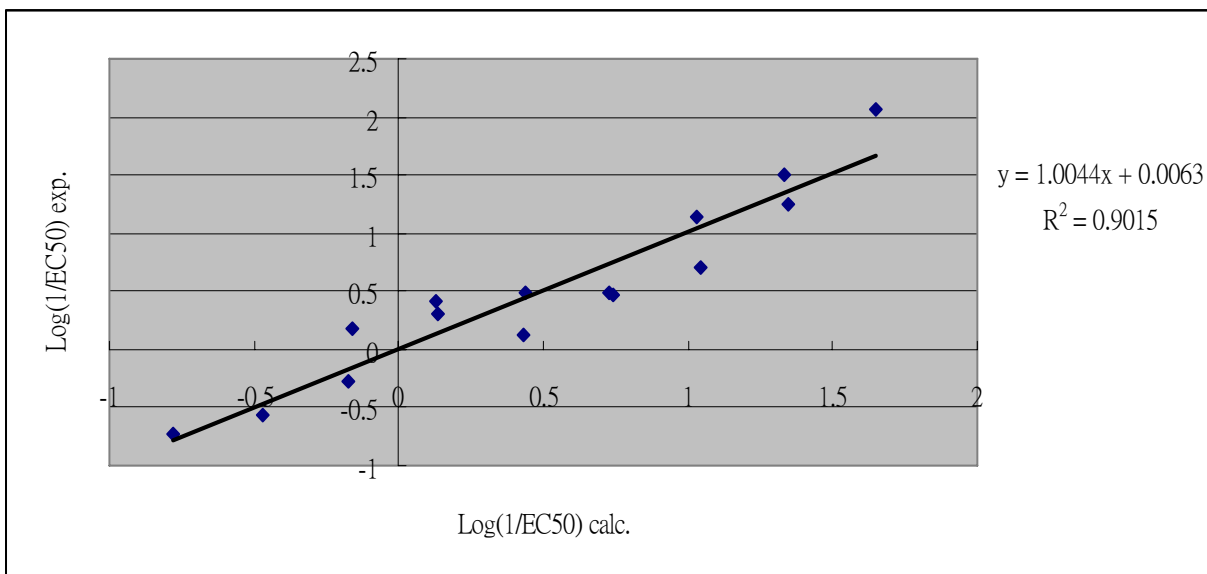
$$r^2 = 0.9; Q^2 = 0.89; S=0.25; F = 118.91$$

而所有回歸的點再去除掉 2-propyn-1-ol 這個 outlier 之後，其回歸的圖形也都落在 95%信賴區間附近(Fig 5.11)，說明了此一級炔丙基醇類和 LogP 有很好的相關性。



**Fig 5.12 一級炔丙基醇去除掉 2-propyn-1-ol Log p 與 Log(1/EC50)之關係圖(based on Final Yield)**

模式回歸分析法亦為判定準確性之一種方法，即將模式之預測值與實驗值進行回歸分析，當回歸公式之斜率愈接近於 1 且截距愈接近於 0 時，其模式之準確性也相對愈高。由 Fig 5.12 可知在本研究中，以三種參數回歸之模式其斜率皆接近於 1，且截距接近 0，由此可知以此反應終點所建立之模式其有極高之準確性。



**Fig 5.13 log(1/EC50) calc. V.S. log (1/EC50)exp. (based on Final Yield)**

在其他QSAR的參數選擇方面，雖然可以參考的數據有限，我們利用疏水性參數Log p加入電子性的參數(Elumo)及分子量(MW)也對於此類一級炔丙基醇有不錯的回歸效果，以敏感度最高的Final Yield為例，加入 $E_{lumo}$ 其回歸的方程式為：

$$\text{Log}(1/\text{EC}50) = 0.51 \text{Log } p + 0.16 E_{lumo} - 0.49 \quad (\text{FY})$$

$$n=16, r^2 = 0.826, Q^2 = 0.799, S = 0.33, F = 30.83$$

而加入分子量(molecular weight)其回歸方程式為：

$$\text{Log}(1/\text{EC}50) = 0.66 \text{Log } p - 0.007 \text{MW} + 0.28 \quad (\text{FY})$$

$$n=16, r^2 = 0.835, Q^2 = 0.809, S = 0.32, F = 32.84$$

由上述的QSAR分析中可以發現，此類一級炔丙基醇的毒性效應和電子軌域的躍遷及分子量也有不錯的相關性；但是和與單純利用疏水性參數Log p比較看來，並無顯著的增加其回歸的效果，這也有可能和化學物質的結構有很大的關係，其 $E_{lumo}$ 值差距不大(大都在1.6~1.7的範圍之間)，分子量的差距也十分有限，故造成此類一級炔丙基醇分析之結果。

## 第六章 結論與建議

### 6.1 結論

本研究為針對 16 種炔丙基醇進行密閉式之藻類毒性試驗，其所得之結論如下：

1. 三個終點參數的敏感度比較，Final yield，依序為 $\Delta$ DO 與 Growth Rate。
2. 炔基接在 2 的位置(Primary propargylic alcohols)毒性比炔基接在 3 的位置(Primary homopropargylic alcohols)毒性要高，大約相差 1.1~7.4 倍左右。
3. 毒性最高的化合物為 2-decyn-1-ol，由結果可顯示隨著碳數越高，取代基分子量越大，毒性會增強。
4. 2-propyn-1-ol 雖然在測試物種中碳數最低(3 個碳)，分子量最小(56.06)，但也具有相對高的毒性，原因可能和其代謝活性過程的機制有關。
5. 利用 ANOVA(analysis of variance)檢定三項重要參數：Sw、F ration 以及中斷值(cut-off value)，發現對於本研究的毒性物質而言，NOEC 值比  $EC_{10}$  能提供最佳的保護標準。
6. 在 cut of value 的比較上，發現 $\Delta$ DO 的變異性在三個參數來說是最高的，而 Final Yield 和 Growth rate 敏感度及變異性，都很低，具有很高的再現性，由於每個參數都有其優點所在，故在本實驗中所選用的反應終點都是很好的參考標準。
7. 以物種比較方面看來，敏感度以魚類較佳，其次為月芽藻，較差的為纖毛蟲，而造成原因可能是此一級炔丙基醇類對於魚類的選擇性較高，其在體內代謝活性酵素與之反應較為激烈所造成的結果。

8. QSAR之研究方面，利用簡單的Log P對 16 個一級炔丙基醇做回歸，以結果看來，以Final Yield的回歸結果最好( $r^2 = 0.83$ )，其次為 $\Delta$ DO ( $r^2 = 0.76$ )和Growth Rate ( $r^2 = 0.67$ )，將殘值較高的 2-propyn-1-ol當作 outlier去除之後，大幅提升回歸的效果 $r^2$  value最高可達 0.9。
9. 過去針對此類化合物機制的研究，將一級炔丙基醇類分類於具前親電性機制(proelectrophile mechanism)的反應性物質，從 QSAR 的分析及與藻類基線毒性的比較結果看來，低分子量的 Primary propargylic alcohols 與 Log p 相關性較不佳，可能的原因和其 Michael-addition 反應的效應較為明顯有關，而其餘的一級炔丙基醇則是與 Log p 有不錯的相關性。
10. 針對此一級炔丙基醇類所建立的QSAR模式， $r^2$  value達 0.9 以上、斜率接近 1 及截距趨近 0，說明此模式有不錯的預測性。
11. 在急慢毒性數據的研究方面，建議ACR ratio為 20 做為保護水體的指標。
12. 針對一級炔丙基醇類，將本研究結果納入藻類毒性資料庫中，以供此類化合物對於水體生物毒性分析的參考依據。

## 6.2 建議

1. 由於對於此類一級炔丙基醇的水體生物的毒性數據很稀少，在未來的研究方面應從其他物種進行試驗，以增加對於替代物種的研究。
2. 增加更多的物化參數及電子性參數進一步提高 QSAR 模式建立的準確性。
3. 針對此類化合物對於藻類特殊的作用機制更加深入的探討。
4. 加強對於一級炔丙基醇類慢毒性的影響之研究。
5. 進一步討論對於此類一級炔丙基醇在作用途徑中產生的中間產物及其造成的毒性影響。
6. 增加對於此類化合物生物降解性的研究。



## 第七章、参考文献

- American Society for Testing and Materials (ASTM)**, 1994. Standard Guide for Conducting Static 96h Toxicity Tests with Microalgae. Annual Book of ASTM Standards. ASTM E1218-90. Philadelphia, PA.
- American Public Health Association (APHA)**, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, 1995. Toxicity testing with phytoplankton, in Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, 19th edn, APHA, Washington, DC.
- Archer, T.E.** (1985): *J. Environ. Sci. Health B* 20, 593 – 59
- Atkins, P.W.**, 1994. Physical chemistry. Oxford University Press. 497.
- BASFAG**, Abteilung Toxikologie; unveroeffentlichte Untersuchung(79/408), 06.03.80
- BASFAG**, Abteilung Toxikologie unveroeffentlichte Untersuchung (87/755), 25.05.1998
- BASF AG**, Labor Oekologie; unveroeffentlichte Mitteilung vom 30.11.87
- BASF AG**, Labor Oekologie; unveroeffentlichte Untersuchung , (1129/87)
- Bergers, P. J.M., Degroot, A.C.**, 1994. The analysis of EDTA in water by HPLC. *Water Research.* : 28 639 – 642
- Brack, W., Rottlern, H.**, 1994. Toxicity testing of highly volatile chemicals with green algae. *ESPR.* 4, 223-228.
- Bradbury SP, Christensen GM.** 1991. Inhibition of alcohol dehydrogenase activity by acetylenic and allylic alcohols: Concordance with in vivo electrophilic reactivity in fish. *Environ Toxicol Chem* 10:1155–1160.
- Calamari, D., Galassi, S., Setti, F., Vighi, M.**, 1983. Toxicity of selected chlorobenzenes to aquatic organisms. *Chemosphere.* 12, 253-262.
- Chen, C.Y.**, 1994. Theoretical evaluation of the inhibitory effects of mercury on algal growth at various orthophosphate levels. *Water Research.* 28, 931-937
- Chen, C.Y., Chao, M.R.**, 2000. No-observed-effect concentrations in batch and continuous algal toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 1589-1596.
- Chen, C.Y., Lin, J. H.**, 2006 Toxicity of chlorophenols to *Pseudokirchneriella*



- subcapitata under air-tight test environment. *Chemosphere*. 62, 503-509.
- Chen, C.Y., Lin, K.C.**, 1997. Optimization and performance evaluation of the continuous algal toxicity test. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 1337-1344.
- Chen, C.Y., Yan Y.K., Yang, C.F.**, 2006. Toxicity assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons using an air-tight algal toxicity test. *Water Science and Technology*. 54,309-315.
- DeMaster, E.G. Dahlseid, T. Redfern, B.** Comparative Oxidation of 2-Propyn-1-ol with Other Low Molecular Weight Unsaturated and Saturated Primary Alcohols by Bovine Liver Catalase in Vitro. *Chem. Res. Toxicol.* 7:414-419 (1994)
- Dearden, J.C., Cronin, M.T.D., Zhao, Y.H.**, 2000. QSAR studies of Compounds Acting by Polar and Nonpolar Narcosis: an Examination of the role of Polarisability and Hydrogen Bonding. *Quant Struct-Act Rel.* 19, 3-9.
- DiMarzio, W., and Saenz, M.E.**, 2004. Quantitative structure-activity relationship for aromatic hydrocarbons on freshwater fish. *Ecotox Environ Safe.* 59, 256-262.
- Environmental Protection Administration, R.O.C. (Taiwan)**  
<http://www.epa.gov.tw/mobile/PDA/statistics05.htm>
- Environmental Protection Administration, R.O.C. (Taiwan)**  
<http://w3.epa.gov.tw/epalaw/docfile/084010a.doc>
- Escher, B.I., Schwarzenbach, R.P.**, 2002. Mechanistic studies on baseline toxicity and uncoupling of organic compounds as a basis for modeling effective membrane concentration in aquatic organisms. *Aquatic Science*. 64, 20-35.
- Feng, L., Han, S., Zhao, Y., Wang, L., Chen, J.**, 1996. Toxicity of organic chemicals to fathead minnow: a united quantitative structure-activity relationship model and its application. *Chem. Res. Toxicol.* 9, 610-613.
- Galassi, S., Vighi, M.**, 1981. Testing toxicity of volatile substances with algae. *Chemosphere*. 10, 1123-1126.
- GDCh-Advisory Committee on Existing Chemicals (BUA) Propargyl Alcohol**  
BUA Report 213(July 1998)

- Gunatilleka, A.D., Poole, C.F.**, 1999. Models for estimating the non-specific aquatic toxicity of organic compounds. *Anyl. Commun.* 36, 235-242
- Hansch, C., Muir, R., Fujita, T., Peyton, P., Maloney, P., Geiger, F., Streich, M.**, 1963. The correlation of biological activity of plant growth regulators and chloromycetin derivatives with Hammett constants and partition coefficients. *Journal of American Chemistry Society.* 85, 2817-2824.
- Heath, A.G.**, 1995. Water pollution and fish physiology. Lewis Publish Boca Raton. 359.
- Herman, D.C., Inniss, W.E., Mayfield, C.I.**, 1990. Impact of volatile aromatic hydrocarbons, alone and in combination, on growth of the freshwater alga *Selenastrum Capricornutum*. *Aquatic Toxicology.* 18, 87-100.
- Hostetter, H.P.**, 1976. A rapid bioassay for algal nutrients and toxins. *J. Phycol.* 12, 10.
- Hsu, C.H.**, 2002. Toxicity assessment of non-polar narcotic chemicals using a close-system algal test. A Thesis of Institute of Environmental Engineering of National Chai Tung University.
- Huang, C.P., Wang, Y.J., Chen, C.Y.**, 2007. Toxicity and quantitative structure–activity relationships of nitriles based on *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Ecotox Environ Safe.* 67,439-446.
- Huang, H.J.**, 2000. Experimental design of the algal toxicity test based on photosynthetic response. A Thesis of Institute of Environmental Engineering of National Chiao Tung University.
- Hsieh, S.H., Hsu, C.H., Tsai, D.Y., Chen, C.Y.**, 2006. Quantitative structure–activity relationships for toxicity of non-polar narcotic chemicals to *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 2920-2926.
- Hsieh, S.H., Tsai, K.P., Chen, C.Y.**, 2006 The combined toxic effects of nonpolar narcotic chemicals to *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Water Res.* 40, 1957-1964.
- International Organization for Standardization (ISO)**, 1987. Water quality- Algal growth inhibition test. Draft International Standard ISO/DIS 8692. Geneva, Switzerland.

- Kamlet, M.J., Doherty, R.M., Taft, R.W., Abraham, M.H., Veith, G.D., Abraham, D.J.** 1987. Solubility properties in polymers and biological media. 8. an analysis of the factors that influence toxicities of organic nonelectrolytes to the golden orfe fish (*Leucidiscus idus melanotus*). *Environ. Sci. Technol.* 21 : 149–155.
- Kao, W.C.**, 2001. A comparison of the results of several freshwater aquatic toxicity testing on synthetic and real wastewaters. A Thesis of Institute of Environmental Engineering of National Chiao Tung University.
- Kenaga, E.E.**, 1982. Predictability of chronic toxicity from acute toxicity of chemicals in fish and aquatic invertebrates. *Environ. Toxicol. Chem.* 1, 347-358.
- Kuhn, R., Pattard, M., Pernak, K., Winter, A.**, 1989. Results of the Harmful Effects of Selected Water Pollutants (Anilines, Phenols, Aliphatic Compounds) to *Daphnia magna*. *Water. Res.* 23, 495-499.
- Lin, J.H.** 2001. Experimental design of the algal toxicity test based on BOD bottle. A Thesis of Institute of Environmental Engineering of National Chiao Tung University.
- Lin, J.H., Kao, W.C., Tsai, K.P., Chen, C.Y.**, 2005. Anovel algal toxicity testing technique for assessing the toxicity of both metallic and organic toxicants. *Water Res.* 39, 1869-1877.
- Lipnick R.L.**, 1991. Outliers : their origin and use in the classification of molecular mechanisms of toxicity. *The Science of the Total Enviroment* 109 : 131-153
- Lipnick, R.L., Watson, K.R., Strausz, K.A.**, 1987. A QSAR study of the acute toxicity of some industrial organic chemicals to goldfish, Narcosis, electrophile and proelectrophilie mechanisms. *Xenobiotica.* 17, 1011-1025.
- Mazidji, C. N., Koopman, B., Bitton, G. and Neita, D.** 1992. Distinction between heavy metal and organic toxicity using EDTA chelation and microbial assays. *Environmental Toxicology and Water Quality.* 7 : 339-353
- Mayer, F.L., Krause, G.F., Buckler, D.R., Ellersieck, M.R.**, 1994. Predicting

- chronic lethality of chemicals to fishes from acute toxicity test data : concepts and linear regression analysis. *Environ. Toxicol. Chem.* 13,671-678.
- Mayer, P., Nyholm, N., Verbruggen, E.M.J., Hermens, J.L.M., Tolls, J., 2000.** Algal growth inhibition test in filled, closed bottles for volatile and sorptive materials. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 2551–2556.
- McFarland, J.W., 1970.** On the parabolic relationship between drug potency and hydrophobicity. *J. Med. Chem.* 13, 1092-1196.
- Mekenyan, O.G., Veith, G.D., 1994.** The electronic factor in QSAR: MO-parameters, competing interactions, reactivity, and toxicity. *SAR QSAR Environ. Res.* 2, 129-143.
- Mekenyan OG, Veith GD, Bradbury SP, Russom CL. 1993.** Structure–toxicity relationships for alpha,beta-unsaturated alcohols in fish. *Quant Struct-Act Rel* .12:132–136.
- Millington, L.A., Goulding, K.H., Adams, N., 1988.** The influence of growth medium composition on the toxicity of chemicals to algae. *Water Research.* 22, 1593-1597
- Mingazzini, M., Saenz, M.E., Albergoni, F.G., Marre, M.T., 1997.** Algal photosynthesis measurements in toxicity testing. *Fresenius Envir Bull.* 6, 308-313.
- Moridani MY, Khan S, Chan T, Teng S, Beard K, O'Brien PJ.** Cytochrome P450 2E1 metabolically activates propargyl alcohol: propionaldehyde-induced hepatocyte cytotoxicity. *Chem Biol Interact.* 30:130-132 (2001)
- Nirmalakhandan, N., Egemen, E., Trevizo, C., Xu, S., 1998.** Structure-and property-activity relationship models for prediction of microbial toxicity of organic chemicals to activated sludge. *Ecotox. Environ. Safe.* 39, 112-119.
- Nyholm, N., Damgaard, B.M., 1990.** A comparison of the algal growth inhibition toxicity test method with the short term <sup>14</sup>C-assimilation test. *Chemosphere.* 21, 671-679.
- Nyholm, N., Källqvist, T., 1989.** Methods for growth inhibition toxicity tests with freshwater algae. *Environ. Toxicol. Chem.* 8 : 689-703.
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), 1984.**

Guideline for testing chemicals. No. 201. Alga growth inhibition test. Paris, France.

**Organization for Economic Cooperation and Development (OECD)**, 2006.

Guideline for testing chemicals. No. 201. Alga growth inhibition test. Paris, France

**Parr, R. G.; Szentpaly, L. V.; Liu, S. J. Am. Chem. Soc.** 1999, 121, 1922.

**Persoone, G., Janssen, C.R.**, 1994. Field validation of predictions based on laboratory toxicity tests. In Hill IR, Heimbach F, Leeuwangh P, Matthiessen P, eds, *Freshwater Field Tests for Hazard Assessment of Chemicals*. Lewis, Boca Raton, FL, USA, pp 379–397.

**Randic, M.**, 1975. On the characterization of molecular branching. *J. Am. Chem. Soc.* 97, 6609-6615.

**Ren, S.**, 2002. Predicting three narcosis mechanisms of aquatic toxicity. *Toxicol. Lett.* 133, 127-139.

**Roy DR, Parthasarathi R, Maiti B, Subramanian V, Chattaraj PK.**

Electrophilicity as a possible descriptor for toxicity prediction. *Bioorg Med Chem* 2005;13(10):3405-12.

**Russom, C.L., Bradbury, S.P., Broderius, S.J., Hammermeister, D.E.,**

**Drummond, R A.**, 1997. Predicting modes of toxic action from chemical structure : acute toxicity in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 5, 948-967.

**Schultz, T.W.**, 1987. The use of ionization constant(pKa) in selecting models of toxicity in phenols. *Ecotox. Environ. Safe.* 14, 178-183

**Schultz, T.W., Bryant, S.E., Kissel, T.S.**, 1996. Toxicological assessment in Tetrahymena of intermediates in aerobic microbial transformation of toluene and p-xylene. *B. Environ. Contam. Tox.* 56, 129–134.

**Schultz, T.W., Sinks, G.D., Bearden, A.P.**, 1998. QSAR in aquatic toxicology : A mechanism of action approach comparing toxic potency to *Pimephales promelas*, *Tetrahymena pyriformis*, and *Vibrio fischeri*. In : Devillers J, editor. *Comparative QSAR*. New York : Taylor & Francis. 51-109.

**Schultz TW, Kissel TS, Tichy M.** 1994. Structure–toxicity relationships for

- unsaturated alcohols to *Tetrahymena pyriformis*: 3-alkyn-1-ol and 2-alken-1-ols. *B. Environ. Contam. Tox.* 53:179–185.
- Schultz TW, Tichy M.** 1993. Structure–toxicity relationships for unsaturated alcohols to *Tetrahymena pyriformis*: C5 and C6 analogs and primary propargylic alcohols. *B. Environ. Contam. Tox.* 51:681–688.
- Seward, J.R., Hamblen, E.L., Schultz, T.W.,** 2002. Regression comparisons of *Tetrahymena pyriformis* and *Poecilia reticulata* toxicity. *Chemosphere.* 47, 93-101.
- T. Wayne Schultz, Julie Seward-Nagel, Karen A. Foster, Vera A. Tucker** 2004. Population Growth Impairment of Aliphatic Alcohols to *Tetrahymena*. *Environ Toxicol* 19: 1–10.
- Tsai, K.P., Chen, C.Y.,** 2007. An algal toxicity database of organic toxicants derived by a closed-system technique. *Environ. Toxicol. Chem.* (In press).
- Vassur, P. and P. Pandard.** 1988. Influence of some experimental factors on metal toxicity to *Selenastrum capricornutum*. *Toxicity Assessment* 3 : 331–343.
- Veith, G.D., Broderius, S.J.,** 1990. Rules for distinguishing toxicants that cause type I and type II narcosis syndrome. *Environ. Health Persp.* 87, 207-211.
- Veith GD, Lipnick RL, Russom CL.** 1989. The toxicity of acetylenic alcohols to the fathead minnow, *Pimephales promelas*—narcosis and proelectrophile activation. *Xenobiotica* 19:555–565.
- Veith, G.D., D.J. Call and L.T. Brooke.** 1983. Structure, toxicity relationships for the fathead minnow, *Pimephales promelas* : Narcotic Industrial chemicals. *Can.J.Fish.Aquat.Sci.* 40 : 743-748
- Verhaar, H.J.M., Solb, J., Speksnijder, J., van Leeuwen, C. J., Hermens, J.L.M.,** 2000. Classifying environmental pollutants: Part 3. External validation of the classification system. *Chemosphere* 40, 875~883.
- Verhaar, H.J.M., Van Leeuwen, C.J., Hermens, J.L.M.,** 1992. Classifying environmental pollutants. 1: Structure-activity relationships for prediction of aquatic toxicity. *Chemosphere* 25, 471-491.

**Willford, W.A.**, 1968. Toxicity of dimethyl sulfoxide (DMSO) to fish. *Bur Sport Fish Wildl Invest Fish Control.* 20, 3-8.

**Yeh, H.J., Chen, C.Y.**, 2006 Toxicity assessment of pesticides to *Pseudokirchneriella subcapitata* under air-tight test environment. *J. Hazard Mater.* 131, pp. 6-12.

**Zhao, Y.T., Cronin, M.T., Dearden, J.C.**, 1998. Quantitative structure- activity relationships of chemicals acting by non-polar narcosis-theoretical considerations. *Quant Struct-Act Rel.* 17, 131-138.

蔡定裕，2006，以密閉式藻類毒性試驗方法評估芳香醛(苯甲醛)之毒性與結構-活性關係之研究，國立交通大學環境工程研究所，碩士論文。



# 附錄一：原始數據

## Primary propargylic alcohols

實驗毒物：		2-propyn-1-ol		初始細胞密度 (cells/mL)：		15000			
MCV (μm <sup>3</sup> )：		47.13		D (μm)：		Initial pH：		7.43	
T(°C)：		23.6		Test duration：		48-h		EDTA(%)：	
								0	
Conc mg/L	Initial DO mg/L	Final DO mg/L	Final cells cells/ml	Delta DO mg/L	μspecific	μrelative	IR ( growth rate)	IR (Biomass)	IR (DO)
Control	1.22	8.94	328600	7.72	1.54340	1	0	0	0
2.56	1.23	8.81	323300	7.58	1.53527	0.99473	0.00527	0.01690	0.01813
5.12	1.25	7.48	297300	6.23	1.49335	0.96757	0.03243	0.09981	0.19301
10.23	1.42	7.2	287300	5.78	1.47624	0.95649	0.04351	0.13170	0.25130
20.46	1.59	6.67	257400	5.08	1.42129	0.92089	0.07911	0.22704	0.34197
30.69	1.56	4.89	158500	3.33	1.17885	0.76380	0.23620	0.54241	0.56865
61.38	1.76	2.19	57200	0.43	0.66925	0.43362	0.56638	0.86543	0.94430
122.76	2.23	2.53	27600	0.3	0.30488	0.19754	0.80246	0.95982	0.96114
Control	1.24	8.91	327900	7.67	1.54233	1	0	0	0
2.56	1.26	8.82	323800	7.56	1.53604	0.99592	0.00408	0.01310	0.01434
5.12	1.18	7.42	301600	6.24	1.50053	0.97290	0.02710	0.08405	0.18644
10.23	1.43	7.19	295000	5.76	1.48946	0.96572	0.03428	0.10515	0.24902
20.46	1.57	6.66	256600	5.09	1.41973	0.92051	0.07949	0.22787	0.33638
30.69	1.63	4.95	160600	3.32	1.18543	0.76860	0.23140	0.53468	0.56714
61.38	1.88	2.28	56600	0.4	0.66398	0.43050	0.56950	0.86705	0.94785
122.76	2.11	2.44	27200	0.33	0.29758	0.19294	0.80706	0.96101	0.95698
Control	1.2	8.88	328100	7.68	1.54263	1	0	0	0
2.56	1.31	8.85	323600	7.54	1.53573	0.99552	0.00448	0.01437	0.01823
5.12	1.23	7.46	297800	6.23	1.49419	0.96859	0.03141	0.09677	0.18880
10.23	1.37	7.14	290700	5.77	1.48212	0.96077	0.03923	0.11945	0.24870
20.46	1.49	6.59	249800	5.1	1.40631	0.91163	0.08837	0.25008	0.33594
30.69	1.55	4.88	159300	3.33	1.18137	0.76581	0.23419	0.53912	0.56641
61.38	1.76	2.19	56900	0.43	0.66662	0.43213	0.56787	0.86618	0.94401
122.76	2.13	2.45	28300	0.32	0.31741	0.20576	0.79424	0.95752	0.95833
Control	1.22000	8.91000	328200.00	7.69000	1.54279	1	0	0	0
2.56	1.26667	8.82667	323566.67	7.56000	1.53568	0.99539	0.00461	0.01479	0.01691
5.12	1.22000	7.45333	298900.00	6.23333	1.49602	0.96969	0.03031	0.09355	0.18942
10.23	1.40667	7.17667	291000.00	5.77000	1.48261	0.96099	0.03899	0.11877	0.24967
20.46	1.55000	6.64000	254600.00	5.09000	1.41578	0.91767	0.08230	0.23499	0.33810
30.69	1.58000	4.90667	159466.67	3.32667	1.18189	0.76607	0.23392	0.53874	0.56740
61.38	1.80000	2.22000	56900.00	0.42000	0.66662	0.43209	0.56791	0.86622	0.94538
122.76	2.15667	2.47333	27700.00	0.31667	0.30662	0.19875	0.80121	0.95945	0.95882

IR : Inhibition rate

Biomass : Yield f (Final yield based on cell density)



實驗毒物： 2-butyn-1-ol 初始細胞密度 (cells/mL)： 15000  
 MCV (μm<sup>3</sup>)： 48.1 D (μm)： Initial pH： 7.49 EDTA(%)： 0  
 T(°C)： 23.5 Test duration： 48-h

Conc mg/L	Initial DO mg/L	Final DO mg/L	Final cells cells/ml	Delta DO mg/L	μspecific	μrelative	IR ( growth rate)	IR (Biomass)	IR (DO)
Control	1.7	7.93	274800	6.23	1.45400	1	0	0	0
5.16	1.71	7.52	269800	5.81	1.44482	0.99369	0.00631	0.01925	0.06742
10.31	1.3	6.61	256200	5.31	1.41895	0.97590	0.02410	0.07159	0.14767
20.63	1.21	6.52	240600	5.31	1.38754	0.95430	0.04570	0.13164	0.14767
41.25	1.49	6.24	201800	4.75	1.29961	0.89382	0.10618	0.28099	0.23756
61.88	1.64	4.52	92200	2.88	0.90795	0.62445	0.37555	0.70285	0.53772
82.51	1.82	2.56	35800	0.74	0.43495	0.29914	0.70086	0.91994	0.88122
103.13	2.48	2.76	16800	0.28	0.05666	0.03897	0.96103	0.99307	0.95506
Control	1.74	7.9	273100	6.16	1.45089	1	0	0	0
5.16	1.73	7.54	270200	5.81	1.44556	0.99632	0.00368	0.01124	0.05682
10.31	1.83	6.69	256900	4.86	1.42032	0.97893	0.02107	0.06277	0.21104
20.63	1.81	6.48	237900	4.67	1.38190	0.95245	0.04755	0.13638	0.24188
41.25	1.86	6.22	202600	4.36	1.30159	0.89710	0.10290	0.27315	0.29221
61.88	1.9	4.56	92600	2.66	0.91012	0.62728	0.37272	0.69934	0.56818
82.51	1.87	2.59	35500	0.72	0.43074	0.29688	0.70312	0.92057	0.88312
103.13	2.51	2.78	16300	0.27	0.04156	0.02864	0.97136	0.99496	0.95617
Control	1.78	7.95	273500	6.17	1.45163	1	0	0	0
5.16	1.68	7.49	269600	5.81	1.44444	0.99505	0.00495	0.01509	0.05835
10.31	1.3	6.71	255600	5.41	1.41778	0.97669	0.02331	0.06925	0.12318
20.63	1.76	6.47	241400	4.71	1.38920	0.95700	0.04300	0.12418	0.23663
41.25	1.91	6.2	201200	4.29	1.29812	0.89426	0.10574	0.27969	0.30470
61.88	1.85	4.51	91900	2.66	0.90633	0.62435	0.37565	0.70251	0.56888
82.51	1.89	2.61	36200	0.72	0.44050	0.30346	0.69654	0.91799	0.88331
103.13	2.53	2.78	17100	0.25	0.06551	0.04513	0.95487	0.99188	0.95948
Control	1.74000	7.92667	273800.00	6.18667	1.45217	1	0	0	0
5.16	1.70667	7.51667	269866.67	5.81000	1.44494	0.99502	0.00498	0.01520	0.06088
10.31	1.47667	6.67000	256233.33	5.19333	1.41902	0.97717	0.02283	0.06788	0.16056
20.63	1.59333	6.49000	239966.67	4.89667	1.38622	0.95458	0.04541	0.13073	0.20851
41.25	1.75333	6.22000	201866.67	4.46667	1.29978	0.89506	0.10494	0.27795	0.27802
61.88	1.79667	4.53000	92233.33	2.73333	0.90813	0.62536	0.37464	0.70157	0.55819
82.51	1.86000	2.58667	35833.33	0.72667	0.43540	0.29983	0.70016	0.91950	0.88254
103.13	2.50667	2.77333	16733.33	0.26667	0.05458	0.03758	0.96235	0.99330	0.95690

IR : Inhibition rate

Biomass : Yield f (Final yield based on cell density)

實驗毒物： 2-butyn-1,4-diol 初始細胞密度 (cells/mL)： 15000  
 MCV (µm3)： 39.2 D (µm)： Initial pH： 7.46 EDTA(%)： 0  
 T(°C)： 24.1 Test duration： 48-h

Conc mg/L	Initial DO mg/L	Final DO mg/L	Final cells cells/ml	Delta DO mg/L	µspecific	µrelative	IR (growth rate)	IR (Biomass)	IR (DO)
Control	1.04	7.12	285700	6.08	1.47345	1	0	0	0
55.67	1.16	6.82	283300	5.66	1.46923	0.99714	0.00286	0.00887	0.06908
111.33	1.17	5.85	243100	4.68	1.39271	0.94521	0.05479	0.15737	0.23026
222.66	1.2	6.17	231200	4.97	1.36762	0.92818	0.07182	0.20133	0.18257
445.32	1.28	6.13	162300	4.85	1.19070	0.80810	0.19190	0.45586	0.20230
890.64	1.66	5.43	83600	3.77	0.85900	0.58298	0.41702	0.74658	0.37993
1781.28	1.91	3.53	44600	1.62	0.54484	0.36977	0.63023	0.89065	0.73355
3562.56	2.34	3.01	27800	0.67	0.30849	0.20937	0.79063	0.95272	0.88980
Control	1.23	7.09	288300	5.86	1.47798	1	0	0	0
55.67	1.15	6.81	283000	5.66	1.46870	0.99372	0.00628	0.01939	0.03413
111.33	1.26	6.3	242300	5.04	1.39106	0.94119	0.05881	0.16831	0.13993
222.66	1.39	6.23	230900	4.84	1.36697	0.92489	0.07511	0.21003	0.17406
445.32	1.22	6.14	163400	4.92	1.19408	0.80791	0.19209	0.45701	0.16041
890.64	1.43	5.89	85900	4.46	0.87257	0.59038	0.40962	0.74058	0.23891
1781.28	1.64	3.81	45100	2.17	0.55042	0.37241	0.62759	0.88986	0.62969
3562.56	2.39	2.94	28300	0.55	0.31741	0.21476	0.78524	0.95134	0.90614
Control	1.31	7.1	289100	5.79	1.47936	1	0	0	0
55.67	1.44	6.79	283700	5.35	1.46993	0.99363	0.00637	0.01970	0.07599
111.33	1.32	6.21	244100	4.89	1.39476	0.94281	0.05719	0.16417	0.15544
222.66	1.21	6.12	232000	4.91	1.36934	0.92563	0.07437	0.20832	0.15199
445.32	1.22	6.07	162900	4.85	1.19254	0.80612	0.19388	0.46042	0.16235
890.64	1.35	5.66	84700	4.31	0.86553	0.58507	0.41493	0.74571	0.25561
1781.28	1.59	3.64	44100	2.05	0.53920	0.36448	0.63552	0.89383	0.64594
3562.56	2.28	3.04	28100	0.76	0.31386	0.21216	0.78784	0.95221	0.86874
Control	1.19333	7.10333	287700.00	5.91000	1.47693	1	0	0	0
55.67	1.25000	6.80667	283333.33	5.55667	1.46929	0.99483	0.00518	0.01601	0.05979
111.33	1.25000	6.12000	243166.67	4.87000	1.39285	0.94307	0.05693	0.16331	0.17597
222.66	1.26667	6.17333	231366.67	4.90667	1.36798	0.92623	0.07377	0.20658	0.16977
445.32	1.24000	6.11333	162866.67	4.87333	1.19244	0.80738	0.19262	0.45777	0.17541
890.64	1.48000	5.66000	84733.33	4.18000	0.86570	0.58615	0.41383	0.74429	0.29272
1781.28	1.71333	3.66000	44600.00	1.94667	0.54482	0.36889	0.63110	0.89146	0.67061
3562.56	2.33667	2.99667	28066.67	0.66000	0.31325	0.21209	0.78789	0.95208	0.88832

IR : Inhibition rate

Biomass : Yield f (Final yield based on cell density)

實驗毒物： 2-pentyn-1-ol 初始細胞密度 (cells/mL)： 15000  
 MCV (μm<sup>3</sup>)： 39.4 D (μm)： Initial pH： 7.42 EDTA(%)： 0  
 T(°C)： 23.7 Test duration： 48-h

Conc mg/L	Initial DO mg/L	Final DO mg/L	Final cells cells/ml	Delta DO mg/L	μspecific	μrelative	IR ( growth rate)	IR (Biomass)	IR (DO)
Control	0.8	8.42	318300	7.62	1.52747	1	0	0	0
2.41	0.98	8.21	316700	7.23	1.52495	0.99835	0.00165	0.00528	0.05118
4.83	0.87	7.55	305300	6.68	1.50662	0.98635	0.01365	0.04286	0.12336
9.66	1.11	8.72	278300	7.61	1.46032	0.95604	0.04396	0.13188	0.00131
19.32	1.02	7.74	242200	6.72	1.39086	0.91056	0.08944	0.25091	0.11811
38.63	1.28	6.64	184700	5.36	1.25534	0.82184	0.17816	0.44049	0.29659
77.27	1.43	5.49	109400	4.06	0.99348	0.65041	0.34959	0.68876	0.46719
154.53	1.94	3.02	43900	1.08	0.53693	0.35152	0.64848	0.90471	0.85827
Control	1.04	8.44	318500	7.4	1.52779	1	0	0	0
2.41	1.13	8.19	316900	7.06	1.52527	0.99835	0.00165	0.00527	0.04595
4.83	1.03	7.86	304200	6.83	1.50482	0.98497	0.01503	0.04712	0.07703
9.66	1.26	8.2	278900	6.94	1.46140	0.95655	0.04345	0.13048	0.06216
19.32	1.12	7.77	241300	6.65	1.38900	0.90916	0.09084	0.25437	0.10135
38.63	1.44	6.79	183900	5.35	1.25317	0.82025	0.17975	0.44349	0.27703
77.27	1.41	5.52	109900	4.11	0.99576	0.65177	0.34823	0.68731	0.44459
154.53	1.95	3.16	45400	1.21	0.55373	0.36244	0.63756	0.89984	0.83649
Control	1.02	8.39	317900	7.37	1.52684	1	0	0	0
2.41	1.11	8.16	316400	7.05	1.52448	0.99845	0.00155	0.00495	0.04342
4.83	1.05	7.79	304800	6.74	1.50580	0.98622	0.01378	0.04325	0.08548
9.66	1.24	8.14	280300	6.9	1.46391	0.95878	0.04122	0.12413	0.06377
19.32	1.18	7.68	242600	6.5	1.39168	0.91148	0.08852	0.24860	0.11805
38.63	1.39	6.76	183200	5.37	1.25126	0.81951	0.18049	0.44470	0.27137
77.27	1.42	5.48	108700	4.06	0.99027	0.64857	0.35143	0.69066	0.44912
154.53	1.92	3.09	44600	1.17	0.54484	0.35684	0.64316	0.90228	0.84125
Control	0.95333	8.41667	318233.33	7.46333	1.52737	1	0	0	0
2.41	1.07333	8.18667	316666.67	7.11333	1.52490	0.99838	0.00162	0.00517	0.04690
4.83	0.98333	7.73333	304766.67	6.75000	1.50575	0.98585	0.01415	0.04441	0.09558
9.66	1.20333	8.35333	279166.67	7.15000	1.46188	0.95712	0.04288	0.12883	0.04198
19.32	1.10667	7.73000	242033.33	6.62333	1.39051	0.91040	0.08960	0.25129	0.11255
38.63	1.37000	6.73000	183933.33	5.36000	1.25326	0.82054	0.17946	0.44289	0.28182
77.27	1.42000	5.49667	109333.33	4.07667	0.99317	0.65025	0.34975	0.68891	0.45377
154.53	1.93667	3.09000	44633.33	1.15333	0.54517	0.35693	0.64304	0.90228	0.84547

IR : Inhibition rate

Biomass : Yield f (Final yield based on cell density)

實驗毒物： 2-hexyn-1-ol 初始細胞密度 (cells/mL)： 15000  
 MCV (µm<sup>3</sup>)： 40.7 D (µm)： Initial pH： 7.54 EDTA(%)： 0  
 T(°C)： 23.7 Test duration： 48-h

Conc mg/L	Initial DO mg/L	Final DO mg/L	Final cells cells/ml	Delta DO mg/L	µspecific	µrelative	IR ( growth rate)	IR (Biomass)	IR (DO)
Control	1.27	6.54	271300	5.27	1.44759	1	0	0	0
2.43	1.23	6.43	270500	5.2	1.44611	0.99898	0.00102	0.00312	0.01328
4.86	1.24	6.34	249000	5.1	1.40470	0.97037	0.02963	0.08701	0.03226
9.72	1.31	6.28	215600	4.97	1.33269	0.92063	0.07937	0.21732	0.05693
19.43	1.33	5.75	186600	4.42	1.26046	0.87073	0.12927	0.33047	0.16129
38.87	1.34	5.15	129500	3.81	1.07782	0.74456	0.25544	0.55326	0.27704
77.73	1.56	4.06	86000	2.5	0.87315	0.60317	0.39683	0.72298	0.52562
155.47	2.41	3.23	31100	0.82	0.36458	0.25185	0.74815	0.93718	0.84440
Control	1.22	6.52	271600	5.3	1.44814	1	0	0	0
2.43	1.24	6.39	270300	5.15	1.44574	0.99834	0.00166	0.00507	0.02830
4.86	1.25	6.32	248600	5.07	1.40390	0.96945	0.03055	0.08963	0.04340
9.72	1.27	6.25	214700	4.98	1.33060	0.91883	0.08117	0.22175	0.06038
19.43	1.32	5.66	187200	4.34	1.26206	0.87151	0.12849	0.32892	0.18113
38.87	1.34	5.22	129800	3.88	1.07897	0.74507	0.25493	0.55261	0.26792
77.73	1.48	4.12	85400	2.64	0.86965	0.60053	0.39947	0.72564	0.50189
155.47	2.39	3.18	31600	0.79	0.37255	0.25726	0.74274	0.93531	0.85094
Control	1.2	6.53	271400	5.33	1.44777	1	0	0	0
2.43	1.24	6.4	270400	5.16	1.44593	0.99873	0.00127	0.00390	0.03189
4.86	1.31	6.34	248100	5.03	1.40289	0.96900	0.03100	0.09087	0.05629
9.72	1.3	6.23	215900	4.93	1.33338	0.92099	0.07901	0.21646	0.07505
19.43	1.27	5.78	185300	4.51	1.25696	0.86821	0.13179	0.33580	0.15385
38.87	1.35	5.19	128900	3.84	1.07549	0.74286	0.25714	0.55577	0.27955
77.73	1.49	4.17	85800	2.68	0.87198	0.60229	0.39771	0.72387	0.49719
155.47	2.38	3.21	30900	0.83	0.36135	0.24959	0.75041	0.93799	0.84428
Control	1.23000	6.53000	271433.33	5.30000	1.44783	1	0	0	0
2.43	1.23667	6.40667	270400.00	5.17000	1.44593	0.99868	0.00132	0.00403	0.02453
4.86	1.26667	6.33333	248566.67	5.06667	1.40383	0.96961	0.03039	0.08917	0.04403
9.72	1.29333	6.25333	215400.00	4.96000	1.33222	0.92015	0.07985	0.21851	0.06415
19.43	1.30667	5.73000	186366.67	4.42333	1.25983	0.87015	0.12985	0.33173	0.16541
38.87	1.34333	5.18667	129400.00	3.84333	1.07743	0.74417	0.25583	0.55388	0.27484
77.73	1.51000	4.11667	85733.33	2.60667	0.87159	0.60200	0.39800	0.72416	0.50818
155.47	2.39333	3.20667	31200.00	0.81333	0.36616	0.25290	0.74708	0.93683	0.84654

IR : Inhibition rate

Biomass : Yield f (Final yield based on cell density)

實驗毒物： 2-heptyn-1-ol 初始細胞密度 (cells/mL)： 15000  
 MCV (μm<sup>3</sup>)： 48.5 D (μm)： Initial pH： 7.52 EDTA(%)： 0  
 T(°C)： 23.6 Test duration： 48-h

Conc	Initial DO	Final DO	Final cells	Delta DO	IR	IR	IR	IR	IR
mg/L	mg/L	mg/L	cells/ml	mg/L	μspecific	μrelative	( growth rate)	(Biomass)	(DO)
Control	1.15	5.23	253400	4.08	1.41346	1	0	0	0
4.99	1.69	5.03	248900	3.34	1.40450	0.99366	0.00634	0.01888	0.18137
9.98	1.38	4.56	197800	3.18	1.28960	0.91237	0.08763	0.23322	0.22059
19.96	1.85	4.29	146200	2.44	1.13846	0.80544	0.19456	0.44966	0.40196
39.92	1.59	4.1	133400	2.51	1.09265	0.77303	0.22697	0.50336	0.38480
79.84	1.6	3.44	108900	1.84	0.99119	0.70125	0.29875	0.60612	0.54902
159.68	1.56	3.05	77600	1.49	0.82176	0.58138	0.41862	0.73742	0.63480
319.36	2.37	3.2	55900	0.83	0.65776	0.46535	0.53465	0.82844	0.79657
Control	1.62	5.31	252600	3.69	1.41188	1	0	0	0
4.99	1.21	5.02	249600	3.81	1.40590	0.99577	0.00423	0.01263	-0.03252
9.98	1.56	4.53	201600	2.97	1.29912	0.92013	0.07987	0.21465	0.19512
19.96	1.56	4.2	145600	2.64	1.13641	0.80489	0.19511	0.45034	0.28455
39.92	1.59	3.87	133200	2.28	1.09190	0.77337	0.22663	0.50253	0.38211
79.84	1.67	3.52	107600	1.85	0.98519	0.69778	0.30222	0.61027	0.49864
159.68	1.6	3.05	75400	1.45	0.80738	0.57185	0.42815	0.74579	0.60705
319.36	2.62	3.28	62100	0.66	0.71035	0.50312	0.49688	0.80177	0.82114
Control	1.23	5.28	253100	4.05	1.41287	1	0	0	0
4.99	1.45	5.01	249900	3.56	1.40651	0.99550	0.00450	0.01344	0.12099
9.98	1.54	4.48	199600	2.94	1.29413	0.91596	0.08404	0.22470	0.27407
19.96	1.55	4.26	146600	2.71	1.13983	0.80675	0.19325	0.44729	0.33086
39.92	1.61	4.13	132900	2.52	1.09077	0.77203	0.22797	0.50483	0.37778
79.84	1.62	3.48	108100	1.86	0.98750	0.69894	0.30106	0.60899	0.54074
159.68	1.66	3.02	76300	1.36	0.81331	0.57565	0.42435	0.74255	0.66420
319.36	2.54	3.24	57800	0.7	0.67447	0.47738	0.52262	0.82024	0.82716
Control	1.33333	5.27333	253033.33	3.94000	1.41274	1	0	0	0
4.99	1.45000	5.02000	249466.67	3.57000	1.40564	0.99498	0.00502	0.01498	0.09391
9.98	1.49333	4.52333	199666.67	3.03000	1.29428	0.91616	0.08383	0.22420	0.23096
19.96	1.65333	4.25000	146133.33	2.59667	1.13823	0.80569	0.19430	0.44910	0.34095
39.92	1.59667	4.03333	133166.67	2.43667	1.09178	0.77281	0.22719	0.50357	0.38156
79.84	1.63000	3.48000	108200.00	1.85000	0.98796	0.69932	0.30067	0.60846	0.53046
159.68	1.60667	3.04000	76433.33	1.43333	0.81415	0.57629	0.42368	0.74191	0.63621
319.36	2.51000	3.24000	58600.00	0.73000	0.68086	0.48195	0.51771	0.81683	0.81472

IR : Inhibition rate

Biomass : Yield f (Final yield based on cell density)

實驗毒物： 2-octyn-1-ol 初始細胞密度 (cells/mL)： 15000  
 MCV (μm<sup>3</sup>)： 45.6 D (μm)： Initial pH： 7.42 EDTA(%)： 0  
 T(°C)： 24.3 Test duration： 48-h

Conc	Initial DO	Final DO	Final cells	Delta DO	IR	IR	IR	IR	IR
mg/L	mg/L	mg/L	cells/ml	mg/L	μspecific	μrelative	( growth rate)	(Biomass)	(DO)
Control	2.21	7.01	232900	4.8	1.37128	1	0	0	0
2.49	1.92	6.58	230200	4.66	1.36545	0.99575	0.00425	0.01239	0.02917
4.99	1.91	5.86	181200	3.95	1.24578	0.90848	0.09152	0.23726	0.17708
9.97	2.06	5.6	163900	3.54	1.19560	0.87189	0.12811	0.31666	0.26250
19.94	2	5.28	156800	3.28	1.17346	0.85574	0.14426	0.34924	0.31667
29.91	1.93	4.86	121100	2.93	1.04428	0.76154	0.23846	0.51308	0.38958
44.87	2.24	3.52	94800	1.28	0.92186	0.67226	0.32774	0.63378	0.73333
67.3	2.59	3.17	55600	0.58	0.65507	0.47770	0.52230	0.81368	0.87917
Control	2.19	6.98	233300	4.79	1.37214	1	0	0	0
2.49	2.21	6.66	230600	4.45	1.36632	0.99576	0.00424	0.01237	0.07098
4.99	2.29	5.8	180300	3.51	1.24329	0.90609	0.09391	0.24279	0.26722
9.97	2.03	5.51	165400	3.48	1.20016	0.87466	0.12534	0.31104	0.27349
19.94	2.54	5.3	153900	2.76	1.16413	0.84840	0.15160	0.36372	0.42380
29.91	2.16	4.68	120400	2.52	1.04138	0.75895	0.24105	0.51718	0.47390
44.87	2.25	3.59	93900	1.34	0.91709	0.66837	0.33163	0.63857	0.72025
67.3	2.56	3.15	54800	0.59	0.64782	0.47212	0.52788	0.81768	0.87683
Control	2.17	6.97	233100	4.8	1.37171	1	0	0	0
2.49	2.19	6.54	230300	4.35	1.36567	0.99560	0.00440	0.01284	0.09375
4.99	2.03	5.84	180900	3.81	1.24495	0.90759	0.09241	0.23934	0.20625
9.97	2.07	5.51	163400	3.44	1.19408	0.87050	0.12950	0.31958	0.28333
19.94	2.14	5.33	152600	3.19	1.15988	0.84558	0.15442	0.36910	0.33542
29.91	2.27	4.72	119600	2.45	1.03805	0.75676	0.24324	0.52040	0.48958
44.87	2.27	3.66	93200	1.39	0.91335	0.66585	0.33415	0.64145	0.71042
67.3	2.57	3.22	54600	0.65	0.64599	0.47094	0.52906	0.81843	0.86458
Control	2.19000	6.98667	233100.00	4.79667	1.37171	1	0	0	0
2.49	2.10667	6.59333	230366.67	4.48667	1.36581	0.99570	0.00430	0.01253	0.06463
4.99	2.07667	5.83333	180800.00	3.75667	1.24467	0.90739	0.09261	0.23980	0.21682
9.97	2.05333	5.54000	164233.33	3.48667	1.19661	0.87235	0.12764	0.31576	0.27311
19.94	2.22667	5.30333	154433.33	3.07667	1.16582	0.84991	0.15007	0.36069	0.35858
29.91	2.12000	4.75333	120366.67	2.63333	1.04124	0.75908	0.24091	0.51689	0.45101
44.87	2.25333	3.59000	93966.67	1.33667	0.91743	0.66883	0.33117	0.63793	0.72133
67.3	2.57333	3.18000	55000.00	0.60667	0.64963	0.47359	0.52640	0.81660	0.87352

IR : Inhibition rate

Biomass : Yield f (Final yield based on cell density)

實驗毒物 :		2-nonyl-1-ol		初始細胞密度 (cells/mL) :		15000			
MCV (μm <sup>3</sup> ) :		46.83		D (μm) :		Initial pH :		7.48	
T(°C) :		24.6		Test duration :		48-h		EDTA(%) :	
								0	
Conc	Initial DO	Final DO	Final cells	Delta DO	IR	IR	IR	IR	IR
mg/L	mg/L	mg/L	cells/ml	mg/L	μspecific	μrelative	( growth rate)	(Biomass)	(DO)
Control	1.09	8.31	290600	7.22	1.48195	1	0	0	0
0.53	1.12	8.29	289400	7.17	1.47988	0.99860	0.00140	0.00435	0.00693
1.06	1.1	7.86	267300	6.76	1.44016	0.97180	0.02820	0.08454	0.06371
2.11	1.13	7.25	249200	6.12	1.40510	0.94815	0.05185	0.15022	0.15235
4.22	1.09	6.58	198300	5.49	1.29087	0.87106	0.12894	0.33491	0.23961
8.45	1.14	5.24	162800	4.1	1.19224	0.80451	0.19549	0.46372	0.43213
16.9	1.26	3.78	79800	2.52	0.83574	0.56394	0.43606	0.76488	0.65097
33.8	1.84	2.26	42900	0.42	0.52541	0.35454	0.64546	0.89877	0.94183
Control	1.08	8.32	290400	7.24	1.48160	1	0	0	0
0.53	1.15	8.3	289500	7.15	1.48005	0.99895	0.00105	0.00327	0.01243
1.06	1.12	7.82	267800	6.7	1.44110	0.97266	0.02734	0.08206	0.07459
2.11	1.12	7.22	249500	6.1	1.40570	0.94877	0.05123	0.14851	0.15746
4.22	1.14	6.55	198500	5.41	1.29137	0.87160	0.12840	0.33370	0.25276
8.45	1.11	5.21	163100	4.1	1.19316	0.80531	0.19469	0.46224	0.43370
16.9	1.29	3.82	79400	2.53	0.83322	0.56238	0.43762	0.76616	0.65055
33.8	1.86	2.29	43300	0.43	0.53005	0.35775	0.64225	0.89724	0.94061
Control	1.11	8.38	290700	7.27	1.48212	1	0	0	0
0.53	1.14	8.33	289300	7.19	1.47971	0.99837	0.00163	0.00508	0.01100
1.06	1.13	7.84	267500	6.71	1.44053	0.97194	0.02806	0.08415	0.07703
2.11	1.12	7.26	249400	6.14	1.40550	0.94831	0.05169	0.14980	0.15543
4.22	1.15	6.54	198700	5.39	1.29187	0.87164	0.12836	0.33370	0.25860
8.45	1.21	5.25	163000	4.04	1.19285	0.80483	0.19517	0.46318	0.44429
16.9	1.27	3.8	79400	2.53	0.83322	0.56218	0.43782	0.76641	0.65199
33.8	1.92	2.33	42500	0.41	0.52073	0.35134	0.64866	0.90025	0.94360
Control	1.09333	8.33667	290566.67	7.24333	1.48189	1	0	0	0
0.53	1.13667	8.30667	289400.00	7.17000	1.47988	0.99864	0.00136	0.00423	0.01012
1.06	1.11667	7.84000	267533.33	6.72333	1.44060	0.97213	0.02787	0.08359	0.07179
2.11	1.12333	7.24333	249366.67	6.12000	1.40544	0.94841	0.05159	0.14951	0.15509
4.22	1.12667	6.55667	198500.00	5.43000	1.29137	0.87143	0.12857	0.33410	0.25035
8.45	1.15333	5.23333	162966.67	4.08000	1.19275	0.80488	0.19512	0.46305	0.43672
16.9	1.27333	3.80000	79533.33	2.52667	0.83406	0.56284	0.43716	0.76582	0.65117
33.8	1.87333	2.29333	42900.00	0.42000	0.52540	0.35454	0.64545	0.89875	0.94202

IR : Inhibition rate

Biomass : Yield f (Final yield based on cell density)

實驗毒物： 2-decyn-ol 初始細胞密度 (cells/mL)： 15000  
 MCV (µm<sup>3</sup>)： 44.3 D (µm)： Initial pH： 7.51 EDTA(%)： 0  
 T(°C)： 23.9 Test duration： 48-h

Conc	Initial DO	Final DO	Final cells	Delta DO	IR	IR	IR	IR	IR
mg/L	mg/L	mg/L	cells/ml	mg/L	µspecific	µrelative	( growth rate)	(Biomass)	(DO)
Control	1.26	8.86	263600	7.6	1.43319	1	0	0	0
0.25	1.19	8.76	256900	7.57	1.42032	0.99102	0.00898	0.02695	0.00395
0.51	1.26	8.55	217800	7.29	1.33776	0.93342	0.06658	0.18423	0.04079
1.01	1.15	7.22	175100	6.07	1.22865	0.85729	0.14271	0.35599	0.20132
2.03	1.17	3.73	67600	2.56	0.75278	0.52525	0.47475	0.78842	0.66316
4.05	1.33	2.36	57100	1.03	0.66838	0.46636	0.53364	0.83065	0.86447
8.1	1.38	1.98	44200	0.6	0.54034	0.37702	0.62298	0.88254	0.92105
16.21	1.71	1.92	25500	0.21	0.26531	0.18512	0.81488	0.95776	0.97237
Control	1.28	8.87	263700	7.59	1.43338	1	0	0	0
0.25	1.23	8.79	256200	7.56	1.41895	0.98994	0.01006	0.03016	0.00395
0.51	1.24	8.54	217600	7.3	1.33730	0.93297	0.06703	0.18536	0.03821
1.01	1.25	7.29	175700	6.04	1.23036	0.85836	0.14164	0.35384	0.20422
2.03	1.25	3.78	67200	2.53	0.74981	0.52311	0.47689	0.79011	0.66667
4.05	1.31	2.36	56600	1.05	0.66398	0.46323	0.53677	0.83273	0.86166
8.1	1.42	2.02	43900	0.6	0.53693	0.37459	0.62541	0.88380	0.92095
16.21	1.66	1.86	25400	0.2	0.26335	0.18373	0.81627	0.95818	0.97365
Control	1.26	8.86	263900	7.6	1.43376	1	0	0	0
0.25	1.18	8.76	255500	7.58	1.41759	0.98872	0.01128	0.03375	0.00263
0.51	1.31	8.59	218100	7.28	1.33845	0.93353	0.06647	0.18401	0.04211
1.01	1.26	7.28	175400	6.02	1.22951	0.85754	0.14246	0.35556	0.20789
2.03	1.28	3.83	67800	2.55	0.75426	0.52607	0.47393	0.78787	0.66447
4.05	1.29	2.34	56900	1.05	0.66662	0.46495	0.53505	0.83166	0.86184
8.1	1.43	2.04	44300	0.61	0.54147	0.37766	0.62234	0.88228	0.91974
16.21	1.69	1.92	25200	0.23	0.25940	0.18092	0.81908	0.95902	0.96974
Control	1.26667	8.86333	263733.33	7.59667	1.43344	1	0	0	0
0.25	1.20000	8.77000	256200.00	7.57000	1.41895	0.98989	0.01011	0.03029	0.00351
0.51	1.27000	8.56000	217833.33	7.29000	1.33784	0.93330	0.06670	0.18453	0.04037
1.01	1.22000	7.26333	175400.00	6.04333	1.22951	0.85773	0.14227	0.35513	0.20448
2.03	1.23333	3.78000	67533.33	2.54667	0.75228	0.52481	0.47519	0.78880	0.66477
4.05	1.31000	2.35333	56866.67	1.04333	0.66633	0.46484	0.53515	0.83168	0.86266
8.1	1.41000	2.01333	44133.33	0.60333	0.53958	0.37642	0.62358	0.88287	0.92058
16.21	1.68667	1.90000	25366.67	0.21333	0.26269	0.18326	0.81674	0.95832	0.97192

IR : Inhibition rate

Biomass : Yield f (Final yield based on cell density)



## Primary homopropargylic alcohols

實驗毒物 :		3-butyn-1-ol		初始細胞密度 (cells/mL) :		15000			
MCV (μm <sup>3</sup> ) :		48.9		D (μm) :		Initial pH :		7.46	
T(°C) :		24.3		Test duration :		48-h		EDTA(%) :	
								0	
Conc	Initial DO	Final DO	Final cells	Delta DO			IR	IR	IR
mg/L	mg/L	mg/L	cells/ml	mg/L	μspecific	μrelative	( growth rate)	(Biomass)	(DO)
Control	1.37	8.72	302600	7.35	1.50218	1	0	0	0
9.22	1.25	7.16	295800	5.91	1.49082	0.99243	0.00757	0.02364	0.19592
18.44	1.29	7.06	270800	5.77	1.44667	0.96304	0.03696	0.11057	0.21497
36.87	1.22	6.72	260200	5.5	1.42670	0.94975	0.05025	0.14743	0.25170
73.75	1.52	6.48	217400	4.96	1.33684	0.88994	0.11006	0.29624	0.32517
147.49	1.6	6.14	180400	4.54	1.24356	0.82784	0.17216	0.42490	0.38231
294.98	1.81	5.9	145900	4.09	1.13744	0.75719	0.24281	0.54485	0.44354
589.96	2.51	5.56	115000	3.05	1.01844	0.67797	0.32203	0.65229	0.58503
Control	1.32	8.66	301900	7.34	1.50102	1	0	0	0
9.22	1.26	7.12	295900	5.86	1.49099	0.99331	0.00669	0.02091	0.20163
18.44	1.25	7.01	271100	5.76	1.44722	0.96416	0.03584	0.10735	0.21526
36.87	1.27	6.69	259900	5.42	1.42612	0.95010	0.04990	0.14639	0.26158
73.75	1.48	6.51	217500	5.03	1.33707	0.89078	0.10922	0.29418	0.31471
147.49	1.57	6.1	184500	4.53	1.25480	0.83596	0.16404	0.40920	0.38283
294.98	1.77	5.84	152500	4.07	1.15956	0.77251	0.22749	0.52074	0.44550
589.96	2.63	5.42	120000	2.79	1.03972	0.69267	0.30733	0.63402	0.61989
Control	1.34	8.65	301600	7.31	1.50053	1	0	0	0
9.22	1.27	7.22	296100	5.95	1.49132	0.99387	0.00613	0.01919	0.18605
18.44	1.31	7.03	269600	5.72	1.44444	0.96263	0.03737	0.11165	0.21751
36.87	1.29	6.74	259600	5.45	1.42555	0.95003	0.04997	0.14655	0.25445
73.75	1.47	6.54	215900	5.07	1.33338	0.88861	0.11139	0.29902	0.30643
147.49	1.54	6.11	182300	4.57	1.24880	0.83224	0.16776	0.41626	0.37483
294.98	1.79	5.85	164800	4.06	1.19834	0.79861	0.20139	0.47732	0.44460
589.96	2.65	5.51	124000	2.86	1.05612	0.70383	0.29617	0.61968	0.60876
Control	1.34333	8.67667	302033.33	7.33333	1.50124	1	0	0	0
9.22	1.26000	7.16667	295933.33	5.90667	1.49104	0.99321	0.00680	0.02125	0.19455
18.44	1.28333	7.03333	270500.00	5.75000	1.44611	0.96327	0.03672	0.10986	0.21591
36.87	1.26000	6.71667	259900.00	5.45667	1.42612	0.94996	0.05004	0.14679	0.25591
73.75	1.49000	6.51000	216933.33	5.02000	1.33577	0.88977	0.11022	0.29648	0.31545
147.49	1.57000	6.11667	182400.00	4.54667	1.24905	0.83201	0.16797	0.41679	0.38000
294.98	1.79000	5.86333	154400.00	4.07333	1.16511	0.77611	0.22348	0.51434	0.44455
589.96	2.59667	5.49667	119666.67	2.90000	1.03809	0.69149	0.30835	0.63535	0.60455

IR : Inhibition rate

Biomass : Yield f (Final yield based on cell density)

實驗毒物： 3-pentyn-1-ol 初始細胞密度 (cells/mL)： 15000  
 MCV (µm3)： 46.35 D (µm)： Initial pH： 7.47 EDTA(%)： 0  
 T(°C)： 23.5 Test duration： 48-h

Conc mg/L	Initial DO mg/L	Final DO mg/L	Final cells cells/ml	Delta DO mg/L	µspecific	µrelative	IR ( growth rate)	IR (Biomass)	IR (DO)
Control	1.65	6.09	257800	4.44	1.42207	1	0	0	0
12.85	1.47	4.8	221800	3.33	1.34686	0.94712	0.05288	0.14827	0.25000
25.71	1.52	4.67	202100	3.15	1.30036	0.91441	0.08559	0.22941	0.29054
51.42	1.56	4.32	192400	2.76	1.27576	0.89712	0.10288	0.26936	0.37838
102.83	1.77	4.21	186200	2.44	1.25939	0.88560	0.11440	0.29489	0.45045
154.25	1.84	4.12	139300	2.28	1.11429	0.78357	0.21643	0.48806	0.48649
308.5	2.13	4.05	108900	1.92	0.99119	0.69701	0.30299	0.61326	0.56757
462.75	2.63	3.78	47900	1.15	0.58053	0.40823	0.59177	0.86450	0.74099
Control	1.6	6.11	260200	4.51	1.42670	1	0	0	0
12.85	1.44	4.83	223100	3.39	1.34978	0.94609	0.05391	0.15131	0.24834
25.71	1.49	4.62	202600	3.13	1.30159	0.91231	0.08769	0.23491	0.30599
51.42	1.54	4.37	193100	2.83	1.27758	0.89548	0.10452	0.27365	0.37251
102.83	1.69	4.25	184400	2.56	1.25453	0.87932	0.12068	0.30914	0.43237
154.25	1.78	4.09	138200	2.31	1.11033	0.77825	0.22175	0.49755	0.48780
308.5	2.07	4.01	109400	1.94	0.99348	0.69635	0.30365	0.61501	0.56984
462.75	2.66	3.88	48100	1.22	0.58262	0.40837	0.59163	0.86501	0.72949
Control	1.63	5.98	258800	4.35	1.42400	1	0	0	0
12.85	1.49	4.87	222900	3.38	1.34934	0.94757	0.05243	0.14725	0.22299
25.71	1.54	4.71	203300	3.17	1.30332	0.91525	0.08475	0.22765	0.27126
51.42	1.58	4.41	192900	2.83	1.27706	0.89681	0.10319	0.27030	0.34943
102.83	1.81	4.29	185500	2.48	1.25750	0.88308	0.11692	0.30066	0.42989
154.25	1.84	4.16	139000	2.32	1.11321	0.78175	0.21825	0.49139	0.46667
308.5	2.19	4.07	110300	1.88	0.99758	0.70054	0.29946	0.60911	0.56782
462.75	2.68	3.91	48500	1.23	0.58676	0.41205	0.58795	0.86259	0.71724
Control	1.62667	6.06000	258933.33	4.43333	1.42426	1	0	0	0
12.85	1.46667	4.83333	222600.00	3.36667	1.34866	0.94692	0.05308	0.14895	0.24060
25.71	1.51667	4.66667	202666.67	3.15000	1.30175	0.91399	0.08601	0.23066	0.28947
51.42	1.56000	4.36667	192800.00	2.80667	1.27680	0.89647	0.10353	0.27111	0.36692
102.83	1.75667	4.25000	185366.67	2.49333	1.25714	0.88267	0.11734	0.30159	0.43759
154.25	1.82000	4.12333	138833.33	2.30333	1.11261	0.78119	0.21881	0.49235	0.48045
308.5	2.13000	4.04333	109533.33	1.91333	0.99408	0.69797	0.30203	0.61246	0.56842
462.75	2.65667	3.85667	48166.67	1.20000	0.58330	0.40955	0.59045	0.86403	0.72932

IR : Inhibition rate

Biomass : Yield f (Final yield based on cell density)

實驗毒物：		3-hexyn-1-ol		初始細胞密度 (cells/mL)：		15000			
MCV (µm <sup>3</sup> )：		45.32		D (µm)：		Initial pH：		7.48	
T(°C)：		24.3		Test duration：		48-h		EDTA(%)：	
								0	
Conc	Initial DO	Final DO	Final cells	Delta DO	IR	IR	IR	IR	IR
mg/L	mg/L	mg/L	cells/ml	mg/L	µspecific	µrelative	( growth rate)	(Biomass)	(DO)
Control	1.43	5.59	235400	4.16	1.37662	1	0	0	0
6.17	1.78	5.61	232000	3.83	1.36934	0.99472	0.00528	0.01543	0.07933
12.34	1.96	5.32	217200	3.36	1.33638	0.97077	0.02923	0.08258	0.19231
24.68	1.44	4.77	166200	3.33	1.20257	0.87357	0.12643	0.31397	0.19952
49.37	1.63	3.66	79600	2.03	0.83448	0.60618	0.39382	0.70690	0.51202
98.73	1.47	3.29	61900	1.82	0.70873	0.51484	0.48516	0.78721	0.56250
197.47	1.56	3.14	33200	1.58	0.39725	0.28857	0.71143	0.91742	0.62019
394.93	2.67	3.46	21100	0.79	0.17061	0.12394	0.87606	0.97232	0.81010
Control	1.47	5.56	234900	4.09	1.37555	1	0	0	0
6.17	1.8	5.64	231700	3.84	1.36870	0.99501	0.00499	0.01455	0.06112
12.34	1.81	5.29	218600	3.48	1.33960	0.97386	0.02614	0.07412	0.14914
24.68	1.84	4.69	165300	2.85	1.19986	0.87227	0.12773	0.31651	0.30318
49.37	1.55	3.67	78500	2.12	0.82752	0.60159	0.39841	0.71123	0.48166
98.73	1.74	3.27	63800	1.53	0.72385	0.52623	0.47377	0.77808	0.62592
197.47	1.5	3.1	32400	1.6	0.38505	0.27993	0.72007	0.92087	0.60880
394.93	2.55	3.48	21000	0.93	0.16824	0.12230	0.87770	0.97271	0.77262
Control	1.51	5.62	235100	4.11	1.37598	1	0	0	0
6.17	1.72	5.56	230800	3.84	1.36675	0.99329	0.00671	0.01954	0.06569
12.34	1.73	5.33	216500	3.6	1.33477	0.97005	0.02995	0.08451	0.12409
24.68	1.64	4.75	164900	3.11	1.19864	0.87112	0.12888	0.31895	0.24331
49.37	1.39	3.6	78700	2.21	0.82880	0.60233	0.39767	0.71059	0.46229
98.73	1.49	3.32	62700	1.83	0.71516	0.51974	0.48026	0.78328	0.55474
197.47	1.68	3.18	31900	1.5	0.37728	0.27419	0.72581	0.92322	0.63504
394.93	2.62	3.51	20700	0.89	0.16104	0.11704	0.88296	0.97410	0.78345
Control	1.47000	5.59000	235133.33	4.12000	1.37605	1	0	0	0
6.17	1.76667	5.60333	231500.00	3.83667	1.36826	0.99434	0.00566	0.01651	0.06877
12.34	1.83333	5.31333	217433.33	3.48000	1.33692	0.97156	0.02844	0.08041	0.15534
24.68	1.64000	4.73667	165466.67	3.09667	1.20036	0.87232	0.12768	0.31647	0.24838
49.37	1.52333	3.64333	78933.33	2.12000	0.83027	0.60337	0.39662	0.70957	0.48544
98.73	1.56667	3.29333	62800.00	1.72667	0.71591	0.52027	0.47971	0.78286	0.58091
197.47	1.58000	3.14000	32500.00	1.56000	0.38653	0.28089	0.71905	0.92050	0.62136
394.93	2.61333	3.48333	20933.33	0.87000	0.16663	0.12109	0.87890	0.97305	0.78883

IR : Inhibition rate

Biomass : Yield f (Final yield based on cell density)

實驗毒物 : 3-heptyn-1-ol				初始細胞密度 (cells/mL) : 15000					
MCV (µm <sup>3</sup> ) : 41.03		D (µm) :		Initial pH : 7.46		EDTA(%) :		0	
T(°C) : 23.6		Test duration : 48-h							
Conc	Initial DO	Final DO	Final cells	Delta DO			IR	IR	IR
mg/L	mg/L	mg/L	cells/ml	mg/L	µspecific	µrelative	( growth rate)	(Biomass)	(DO)
Control	1.58	9.43	281200	7.85	1.46551	1	0	0	0
3.82	1.39	9.23	279900	7.84	1.46319	0.99842	0.00158	0.00488	0.00127
7.65	1.38	9.18	245200	7.8	1.39701	0.95326	0.04674	0.13524	0.00637
15.29	1.29	8.76	214200	7.47	1.32943	0.90715	0.09285	0.25169	0.04841
30.59	1.28	8.32	191300	7.04	1.27290	0.86857	0.13143	0.33772	0.10318
61.17	1.26	7.26	179300	6	1.24051	0.84647	0.15353	0.38279	0.23567
122.34	1.43	6.21	132100	4.78	1.08775	0.74224	0.25776	0.56011	0.39108
244.68	2.27	5.43	88700	3.16	0.88860	0.60635	0.39365	0.72314	0.59745
Control	1.48	9.32	281800	7.84	1.46657	1	0	0	0
3.82	1.34	9.19	279500	7.85	1.46248	0.99721	0.00279	0.00862	-0.00128
7.65	1.41	9.09	245900	7.68	1.39844	0.95354	0.04646	0.13456	0.02041
15.29	1.43	8.71	220300	7.28	1.34347	0.91606	0.08394	0.23051	0.07143
30.59	1.5	8.28	189800	6.78	1.26896	0.86526	0.13474	0.34483	0.13520
61.17	1.52	7.29	176400	5.77	1.23235	0.84029	0.15971	0.39505	0.26403
122.34	1.5	6.26	133100	4.76	1.09153	0.74427	0.25573	0.55735	0.39286
244.68	2.28	5.39	87900	3.11	0.88407	0.60282	0.39718	0.72676	0.60332
Control	1.45	9.32	281300	7.87	1.46569	1	0	0	0
3.82	1.42	9.24	279400	7.82	1.46230	0.99769	0.00231	0.00713	0.00635
7.65	1.43	9.12	244900	7.69	1.39640	0.95273	0.04727	0.13669	0.02287
15.29	1.5	8.73	218400	7.23	1.33914	0.91366	0.08634	0.23620	0.08132
30.59	1.51	8.35	192200	6.84	1.27524	0.87007	0.12993	0.33459	0.13088
61.17	1.49	7.21	177600	5.72	1.23574	0.84312	0.15688	0.38941	0.27319
122.34	1.53	6.3	132800	4.77	1.09040	0.74395	0.25605	0.55764	0.39390
244.68	2.31	5.37	88000	3.06	0.88464	0.60357	0.39643	0.72587	0.61118
Control	1.50333	9.35667	281433.33	7.85333	1.46592	1	0	0	0
3.82	1.38333	9.22000	279600.00	7.83667	1.46265	0.99777	0.00223	0.00688	0.00212
7.65	1.40667	9.13000	245333.33	7.72333	1.39728	0.95318	0.04682	0.13549	0.01655
15.29	1.40667	8.73333	217633.33	7.32667	1.33735	0.91229	0.08769	0.23946	0.06706
30.59	1.43000	8.31667	191100.00	6.88667	1.27237	0.86796	0.13203	0.33905	0.12309
61.17	1.42333	7.25333	177766.67	5.83000	1.23620	0.84329	0.15670	0.38909	0.25764
122.34	1.48667	6.25667	132666.67	4.77000	1.08989	0.74349	0.25651	0.55836	0.39261
244.68	2.28667	5.39667	88200.00	3.11000	0.88577	0.60424	0.39575	0.72526	0.60399

IR : Inhibition rate

Biomass : Yield f (Final yield based on cell density)

實驗毒物： 3-octyn-1-ol 初始細胞密度 (cells/mL)： 15000  
 MCV (μm3)： 43.3 D (μm)： Initial pH： 7.55 EDTA(%)： 0  
 T(°C)： 23.2 Test duration： 48-h

Conc mg/L	Initial DO mg/L	Final DO mg/L	Final cells cells/ml	Delta DO mg/L	μspecific	μrelative	IR ( growth rate)	IR (Biomass)	IR (DO)
Control	1.61	8.96	291700	7.35	1.48384	1	0	0	0
1.24	1.68	8.94	289600	7.26	1.48023	0.99757	0.00243	0.00759	0.01224
2.47	1.71	8.84	266300	7.13	1.43829	0.96930	0.03070	0.09180	0.02993
4.94	1.66	8.72	244300	7.06	1.39517	0.94025	0.05975	0.17130	0.03946
9.88	1.59	7.96	237400	6.37	1.38085	0.93059	0.06941	0.19624	0.13333
19.76	1.59	7.67	231600	6.08	1.36848	0.92226	0.07774	0.21720	0.17279
39.52	1.86	6.83	163100	4.97	1.19316	0.80410	0.19590	0.46476	0.32381
79.04	2.77	6.08	87400	3.31	0.88122	0.59388	0.40612	0.73834	0.54966
Control	1.62	8.94	291300	7.32	1.48315	1	0	0	0
1.24	1.65	8.91	289900	7.26	1.48074	0.99838	0.00162	0.00507	0.00820
2.47	1.68	8.81	267100	7.13	1.43979	0.97076	0.02924	0.08759	0.02596
4.94	1.65	8.7	245000	7.05	1.39660	0.94165	0.05835	0.16757	0.03689
9.88	1.62	7.92	237000	6.3	1.38000	0.93045	0.06955	0.19653	0.13934
19.76	1.67	7.61	232200	5.94	1.36977	0.92356	0.07644	0.21390	0.18852
39.52	1.86	6.81	164400	4.95	1.19713	0.80715	0.19285	0.45928	0.32377
79.04	2.82	6.05	86700	3.23	0.87720	0.59144	0.40856	0.74050	0.55874
Control	1.6	8.89	291400	7.29	1.48332	1	0	0	0
1.24	1.68	8.88	289800	7.2	1.48057	0.99814	0.00186	0.00579	0.01235
2.47	1.64	8.78	266200	7.14	1.43810	0.96951	0.03049	0.09117	0.02058
4.94	1.56	8.68	244700	7.12	1.39599	0.94112	0.05888	0.16896	0.02332
9.88	1.53	7.93	236900	6.4	1.37979	0.93020	0.06980	0.19718	0.12209
19.76	1.61	7.59	231800	5.98	1.36891	0.92287	0.07713	0.21563	0.17970
39.52	1.87	6.84	164000	4.97	1.19591	0.80624	0.19376	0.46093	0.31824
79.04	2.75	6.11	87700	3.36	0.88294	0.59524	0.40476	0.73698	0.53909
Control	1.61000	8.93000	291466.67	7.32000	1.48344	1	0	0	0
1.24	1.67000	8.91000	289766.67	7.24000	1.48051	0.99803	0.00197	0.00615	0.01093
2.47	1.67667	8.81000	266533.33	7.13333	1.43872	0.96986	0.03014	0.09019	0.02550
4.94	1.62333	8.70000	244666.67	7.07667	1.39592	0.94101	0.05899	0.16928	0.03324
9.88	1.58000	7.93667	237100.00	6.35667	1.38022	0.93042	0.06958	0.19665	0.13160
19.76	1.62333	7.62333	231866.67	6.00000	1.36906	0.92289	0.07711	0.21558	0.18033
39.52	1.86333	6.82667	163833.33	4.96333	1.19540	0.80583	0.19417	0.46166	0.32195
79.04	2.78000	6.08000	87266.67	3.30000	0.88045	0.59352	0.40647	0.73861	0.54918

IR : Inhibition rate

Biomass : Yield f (Final yield based on cell density)

實驗毒物： 3-nonyl-1-ol 初始細胞密度 (cells/mL)： 15000  
 MCV (μm<sup>3</sup>)： 44.49 D (μm)： Initial pH： 7.44 EDTA(%)： 0  
 T(°C)： 24.2 Test duration： 48-h

Conc	Initial DO	Final DO	Final cells	Delta DO	IR	IR	IR	IR	IR
mg/L	mg/L	mg/L	cells/ml	mg/L	μspecific	μrelative	( growth rate)	(Biomass)	(DO)
Control	1.09	9.81	403100	8.72	1.64557	1	0	0	0
1.36	1.07	9.76	401900	8.69	1.64408	0.99909	0.00091	0.00309	0.00344
2.71	1.11	9.58	367800	8.47	1.59974	0.97215	0.02785	0.09096	0.02867
5.43	1.13	9.46	334600	8.33	1.55244	0.94341	0.05659	0.17650	0.04472
10.85	1.15	8.84	205400	7.69	1.30845	0.79514	0.20486	0.50940	0.11812
21.7	1.26	4.52	44700	3.26	0.54596	0.33178	0.66822	0.92347	0.62615
43.4	1.28	3.69	18700	2.41	0.11024	0.06699	0.93301	0.99047	0.72362
86.8	1.86	3.44	15600	1.58	0.01961	0.01192	0.98808	0.99845	0.81881
Control	1.08	9.84	403800	8.76	1.64643	1	0	0	0
1.36	1.05	9.74	401600	8.69	1.64370	0.99834	0.00166	0.00566	0.00799
2.71	1.05	9.55	368400	8.5	1.60056	0.97214	0.02786	0.09105	0.02968
5.43	1.09	9.44	334200	8.35	1.55184	0.94255	0.05745	0.17901	0.04680
10.85	1.2	8.86	204700	7.66	1.30675	0.79368	0.20632	0.51209	0.12557
21.7	1.28	4.54	44500	3.26	0.54372	0.33024	0.66976	0.92413	0.62785
43.4	1.39	3.67	18900	2.28	0.11556	0.07019	0.92981	0.98997	0.73973
86.8	1.88	3.45	15900	1.57	0.02913	0.01770	0.98230	0.99769	0.82078
Control	1.05	9.82	404100	8.77	1.64681	1	0	0	0
1.36	1.07	9.71	401300	8.64	1.64333	0.99789	0.00211	0.00720	0.01482
2.71	1.06	9.58	368000	8.52	1.60002	0.97159	0.02841	0.09278	0.02851
5.43	1.07	9.46	335100	8.39	1.55319	0.94315	0.05685	0.17733	0.04333
10.85	1.16	8.82	205100	7.66	1.30772	0.79410	0.20590	0.51144	0.12657
21.7	1.3	4.53	44400	3.23	0.54259	0.32948	0.67052	0.92444	0.63170
43.4	1.41	3.65	18600	2.24	0.10756	0.06531	0.93469	0.99075	0.74458
86.8	1.91	3.46	15700	1.55	0.02281	0.01385	0.98615	0.99820	0.82326
Control	1.07333	9.82333	403666.67	8.75000	1.64627	1	0	0	0
1.36	1.06333	9.73667	401600.00	8.67333	1.64370	0.99844	0.00156	0.00532	0.00876
2.71	1.07333	9.57000	368066.67	8.49667	1.60011	0.97196	0.02804	0.09160	0.02895
5.43	1.09667	9.45333	334633.33	8.35667	1.55249	0.94304	0.05696	0.17762	0.04495
10.85	1.17000	8.84000	205066.67	7.67000	1.30764	0.79431	0.20569	0.51098	0.12343
21.7	1.28000	4.53000	44533.33	3.25000	0.54409	0.33050	0.66950	0.92401	0.62857
43.4	1.36000	3.67000	18733.33	2.31000	0.11112	0.06750	0.93250	0.99039	0.73600
86.8	1.88333	3.45000	15733.33	1.56667	0.02385	0.01449	0.98550	0.99811	0.82095

IR : Inhibition rate

Biomass : Yield f (Final yield based on cell density)

實驗毒物 :		3-decyn-1-ol		初始細胞密度 (cells/mL) :		15000			
MCV (µm <sup>3</sup> ) :		42.62		D (µm) :		Initial pH :		7.44	
T(°C) :		24.3		Test duration :		48-h		EDTA(%) :	
								0	
Conc	Initial DO	Final DO	Final cells	Delta DO	IR	IR	IR	IR	IR
mg/L	mg/L	mg/L	cells/ml	mg/L	µspecific	µrelative	( growth rate)	(Biomass)	(DO)
Control	1.22	9.29	345200	8.07	1.56804	1	0	0	0
0.51	1.15	9.22	342400	8.07	1.56396	0.99740	0.00260	0.00848	0.00000
1.02	1.19	8.81	323200	7.62	1.53511	0.97900	0.02100	0.06663	0.05576
2.04	1.26	8.06	283600	6.8	1.46976	0.93732	0.06268	0.18655	0.15737
4.08	1.26	6.81	233900	5.55	1.37342	0.87589	0.12411	0.33707	0.31227
8.17	1.37	3.5	76900	2.13	0.81723	0.52118	0.47882	0.81254	0.73606
16.34	1.39	2.73	44600	1.34	0.54484	0.34747	0.65253	0.91036	0.83395
32.67	1.66	2.7	24300	1.04	0.24121	0.15383	0.84617	0.97184	0.87113
Control	1.18	9.27	344900	8.09	1.56760	1	0	0	0
0.51	1.16	9.19	342900	8.03	1.56469	0.99815	0.00185	0.00606	0.00742
1.02	1.2	8.85	323100	7.65	1.53496	0.97917	0.02083	0.06608	0.05439
2.04	1.29	8.06	284100	6.77	1.47064	0.93814	0.06186	0.18430	0.16316
4.08	1.24	6.78	233700	5.54	1.37299	0.87586	0.12414	0.33707	0.31520
8.17	1.38	3.53	75900	2.15	0.81068	0.51715	0.48285	0.81540	0.73424
16.34	1.37	2.69	44200	1.32	0.54034	0.34469	0.65531	0.91149	0.83684
32.67	1.69	2.73	24400	1.04	0.24327	0.15518	0.84482	0.97151	0.87145
Control	1.16	9.25	345900	8.09	1.56905	1	0	0	0
0.51	1.22	9.23	343300	8.01	1.56528	0.99760	0.00240	0.00786	0.00989
1.02	1.21	8.83	323600	7.62	1.53573	0.97876	0.02124	0.06739	0.05810
2.04	1.3	8.05	284400	6.75	1.47117	0.93762	0.06238	0.18586	0.16564
4.08	1.22	6.8	233300	5.58	1.37214	0.87450	0.12550	0.34028	0.31026
8.17	1.34	3.52	76100	2.18	0.81200	0.51751	0.48249	0.81535	0.73053
16.34	1.36	2.66	44800	1.3	0.54708	0.34867	0.65133	0.90994	0.83931
32.67	1.71	2.72	24800	1.01	0.25140	0.16022	0.83978	0.97038	0.87515
Control	1.18667	9.27000	345333.33	8.08333	1.56823	1	0	0	0
0.51	1.17667	9.21333	342866.67	8.03667	1.56465	0.99771	0.00229	0.00747	0.00577
1.02	1.20000	8.83000	323300.00	7.63000	1.53527	0.97898	0.02102	0.06670	0.05608
2.04	1.28333	8.05667	284033.33	6.77333	1.47052	0.93769	0.06231	0.18557	0.16206
4.08	1.24000	6.79667	233633.33	5.55667	1.37285	0.87541	0.12459	0.33814	0.31258
8.17	1.36333	3.51667	76300.00	2.15333	0.81330	0.51861	0.48138	0.81443	0.73361
16.34	1.37333	2.69333	44533.33	1.32000	0.54409	0.34694	0.65305	0.91060	0.83670
32.67	1.68667	2.71667	24500.00	1.03000	0.24529	0.15641	0.84357	0.97124	0.87258

IR : Inhibition rate

Biomass : Yield f (Final yield based on cell density)

## 附錄二:劑量反應曲線圖

### Primary propargylic alcohols

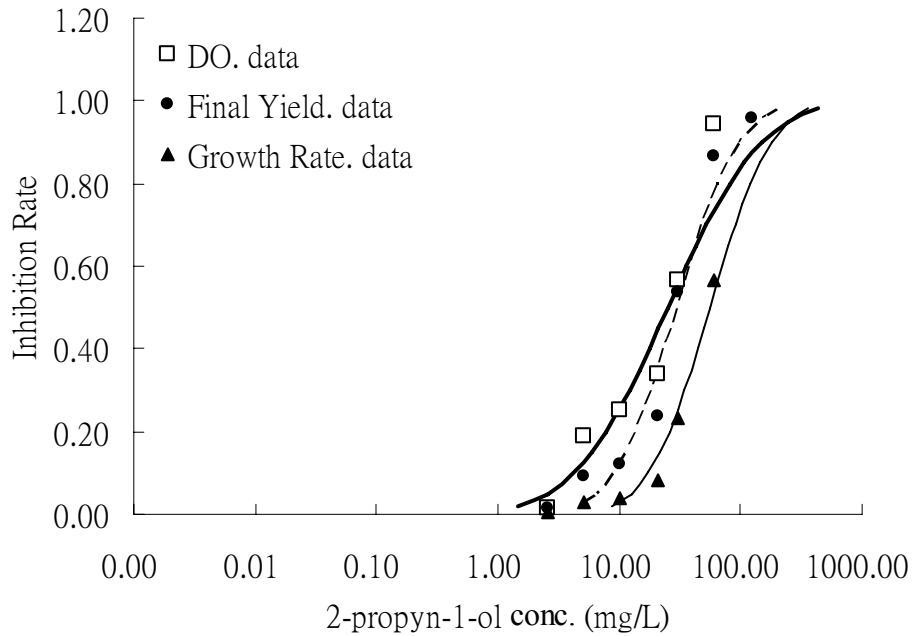


Fig 1 The Dose-response Curve of 2-propyn-1-ol

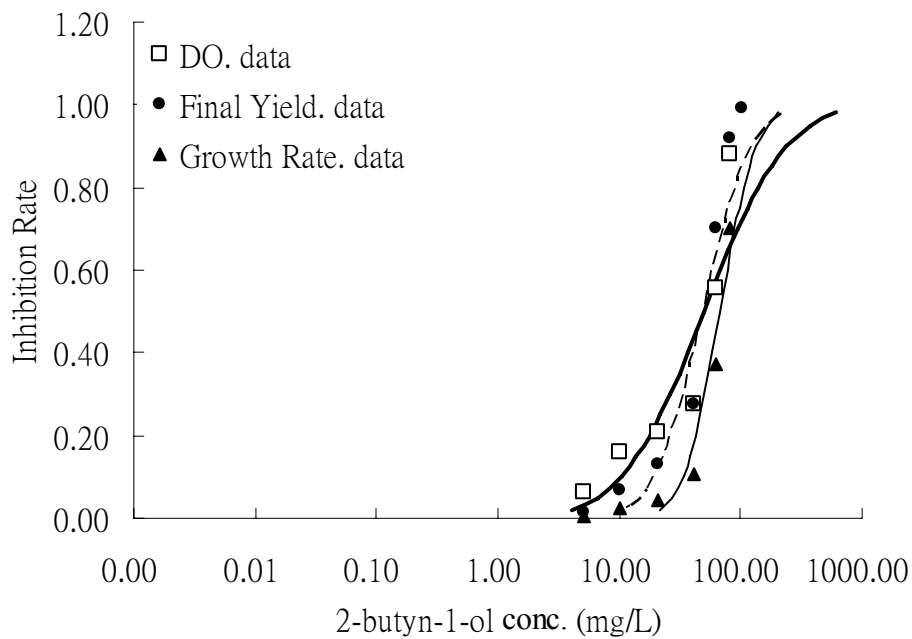
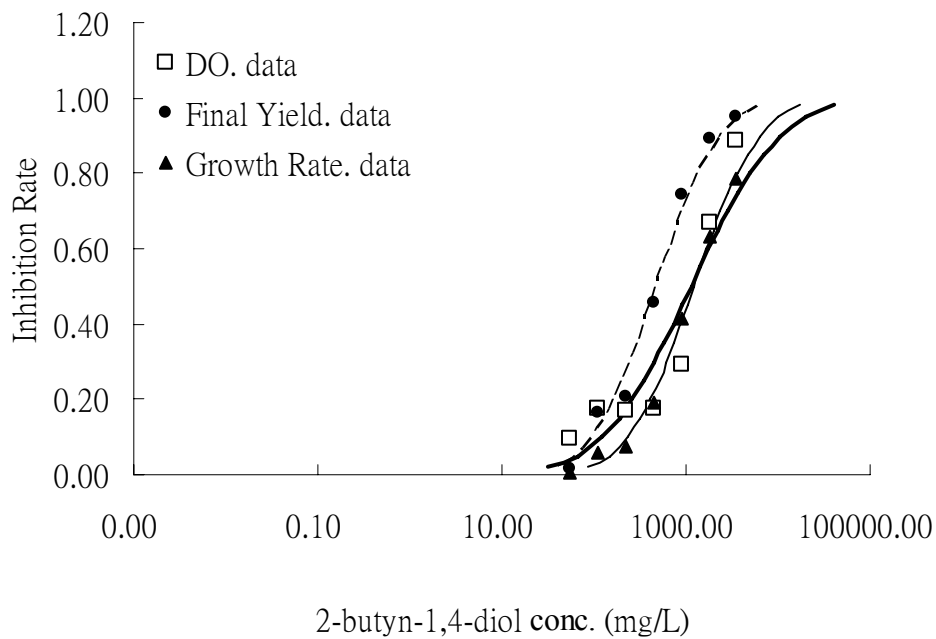
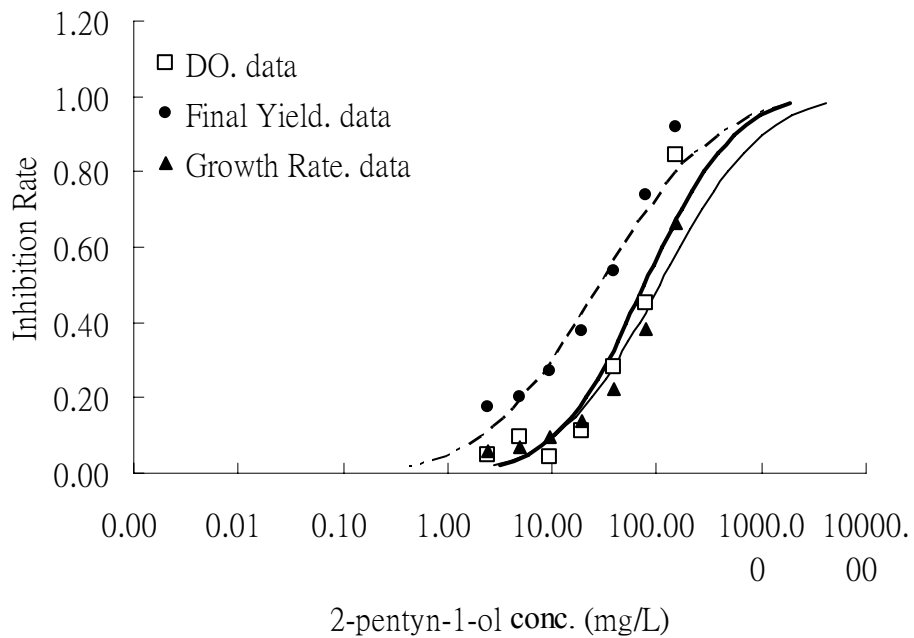


Fig 2 The Dose-response Curve of 2-butyn-1-ol

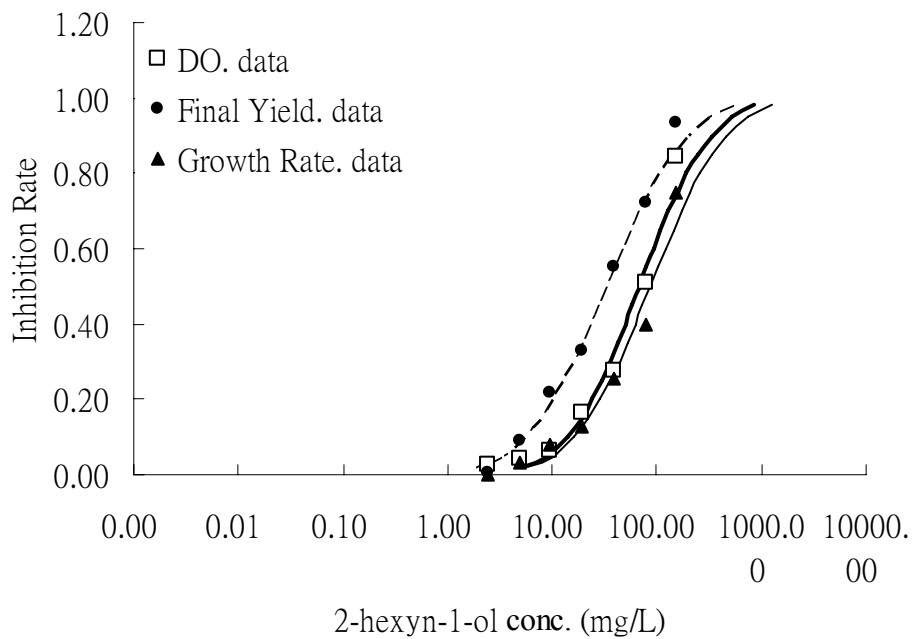




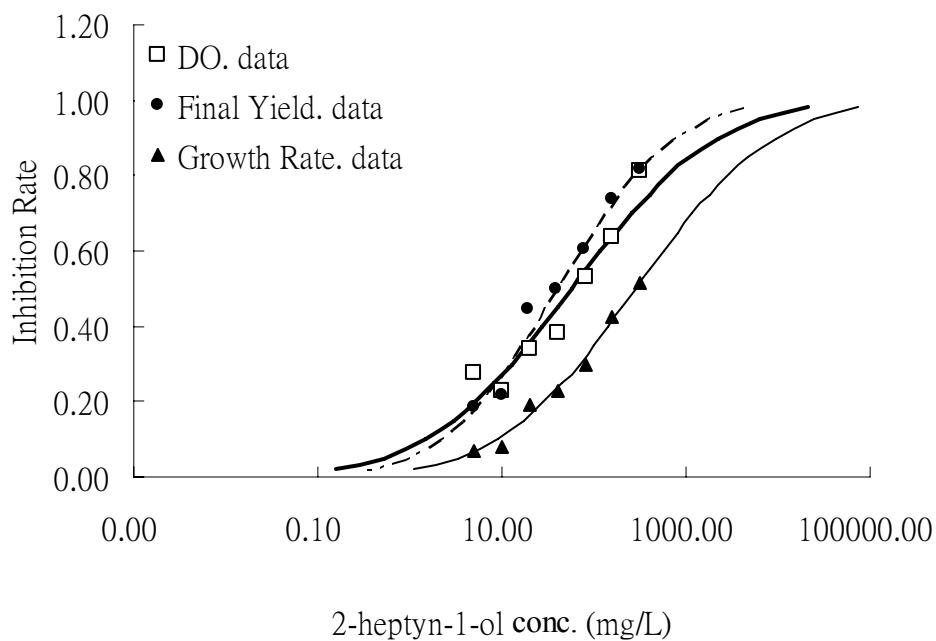
**Fig 3 The Dose-response Curve of 2-butyn-1,4-diol**



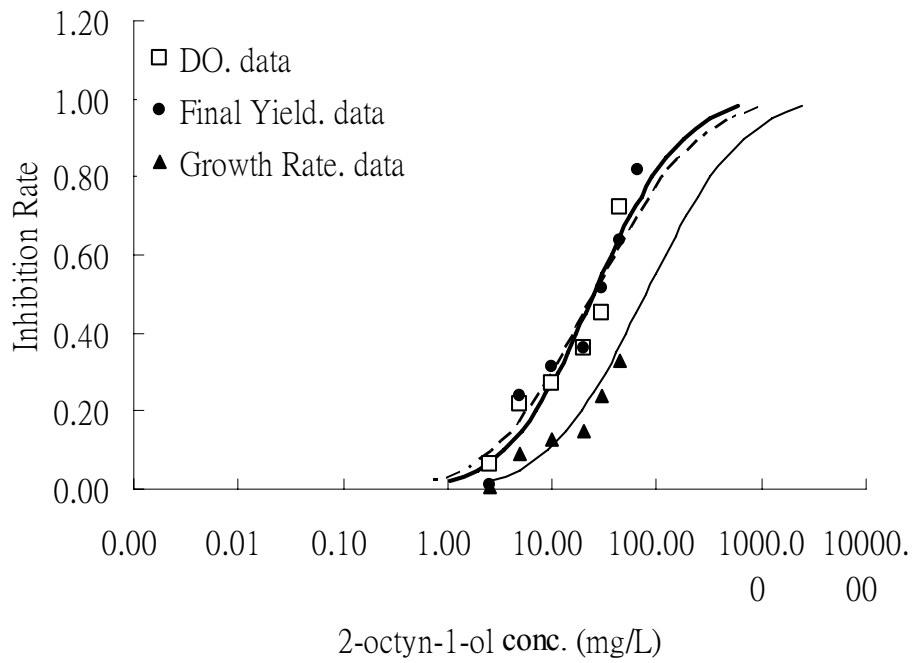
**Fig 4 The Dose-response Curve of 2-pentyn-1-ol**



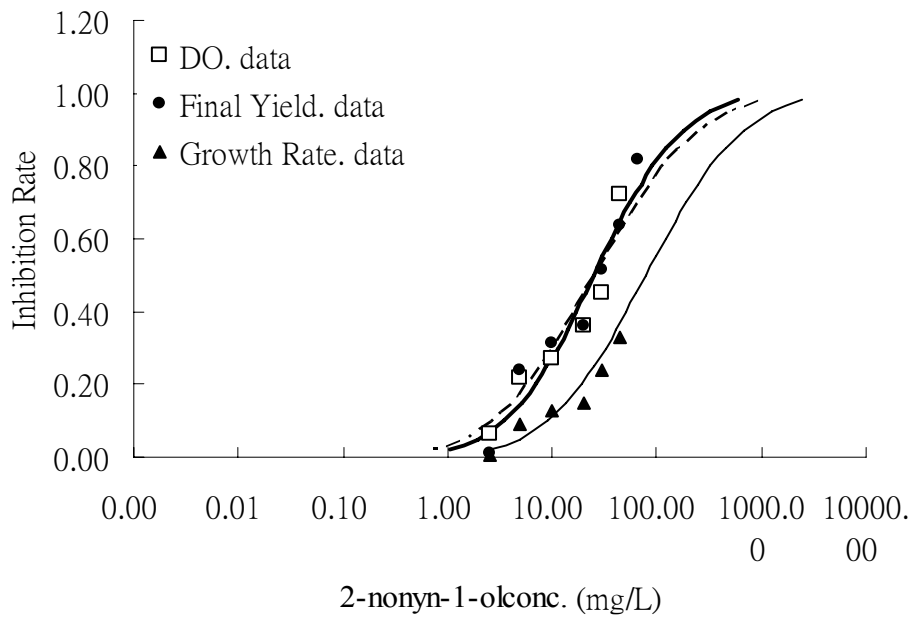
**Fig 5 The Dose-response Curve of 2-hexyn-1-ol**



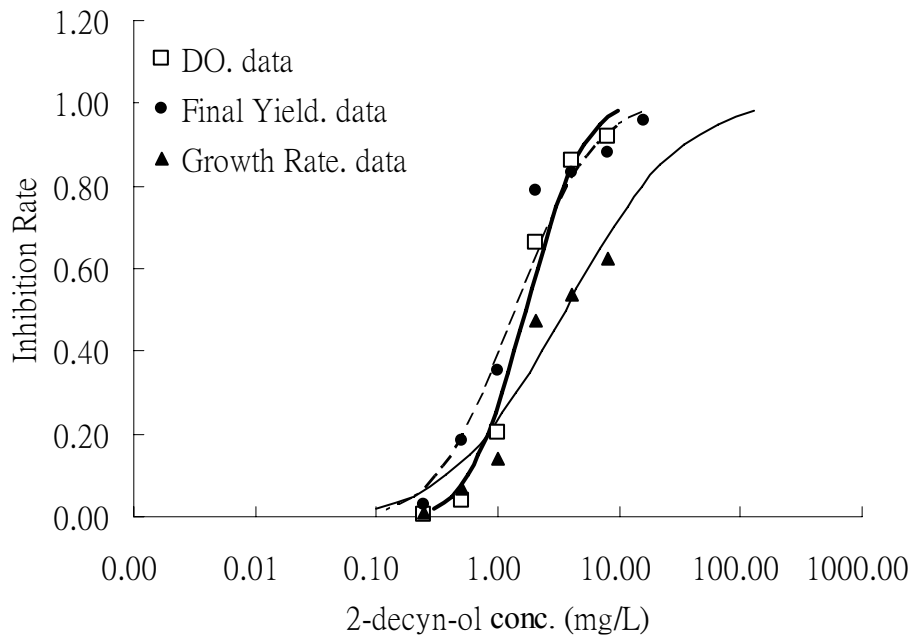
**Fig 6 The Dose-response Curve of 2-heptyn-1-ol**



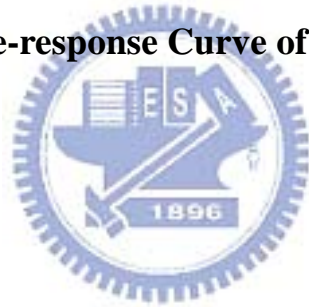
**Fig 7 The Dose-response Curve of 2-octyn-1-ol**



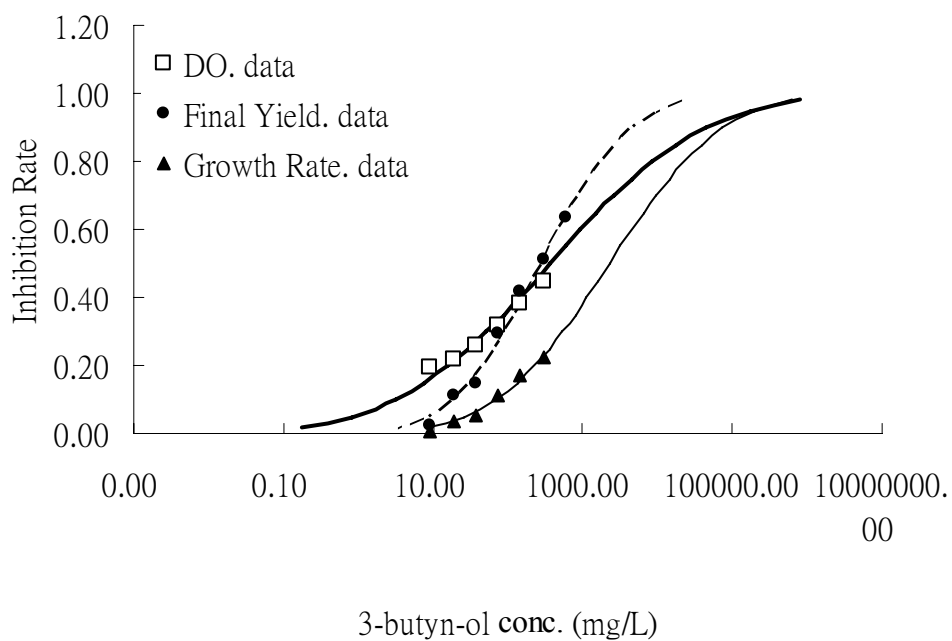
**Fig 8 The Dose-response Curve of 2-nonyl-1-ol**



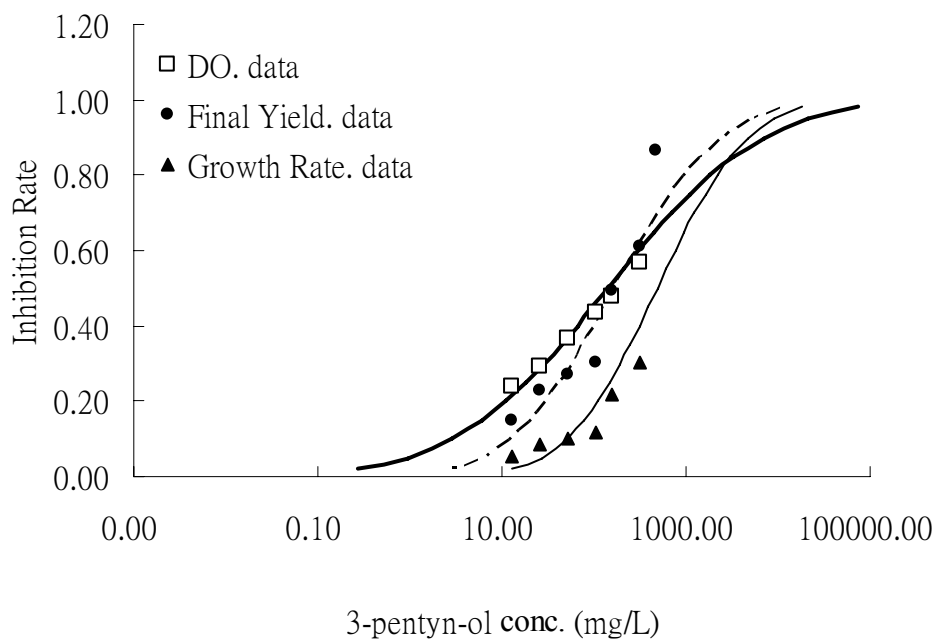
**Fig 9 The Dose-response Curve of 2-decyn-1-ol**



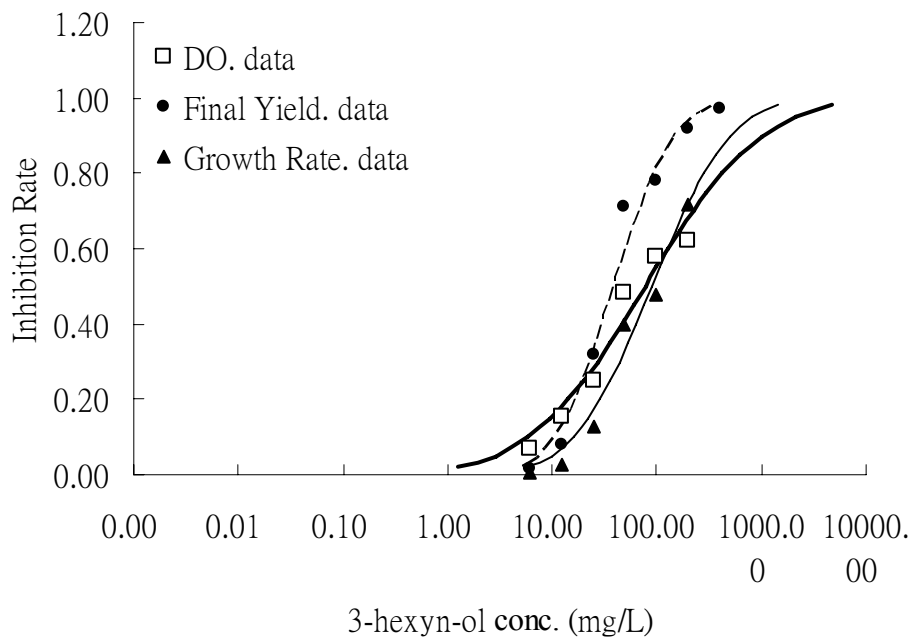
## Primary homopropargylic alcohols



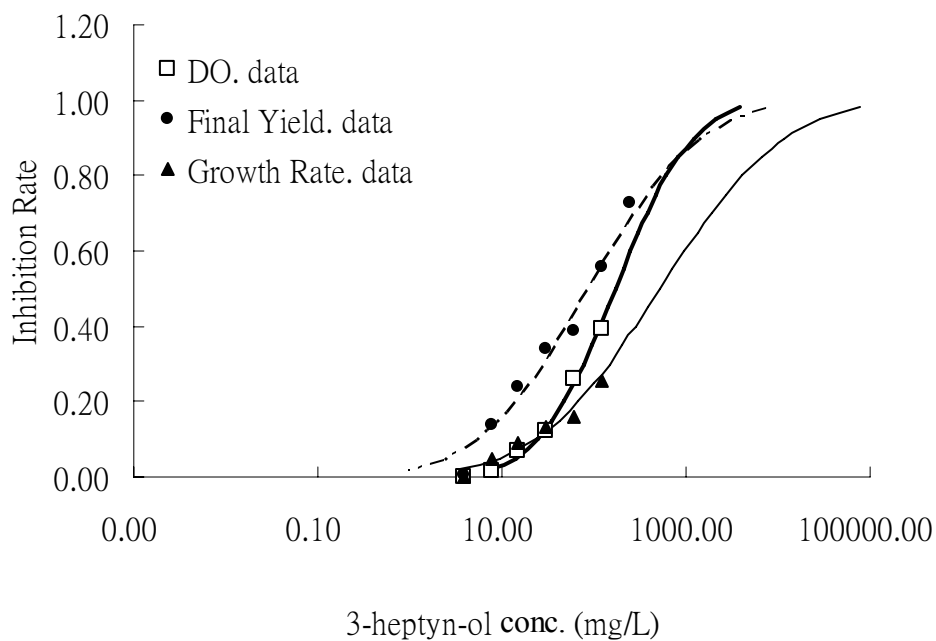
**Fig 10 The Dose-response Curve of 3-butyn-1-ol**



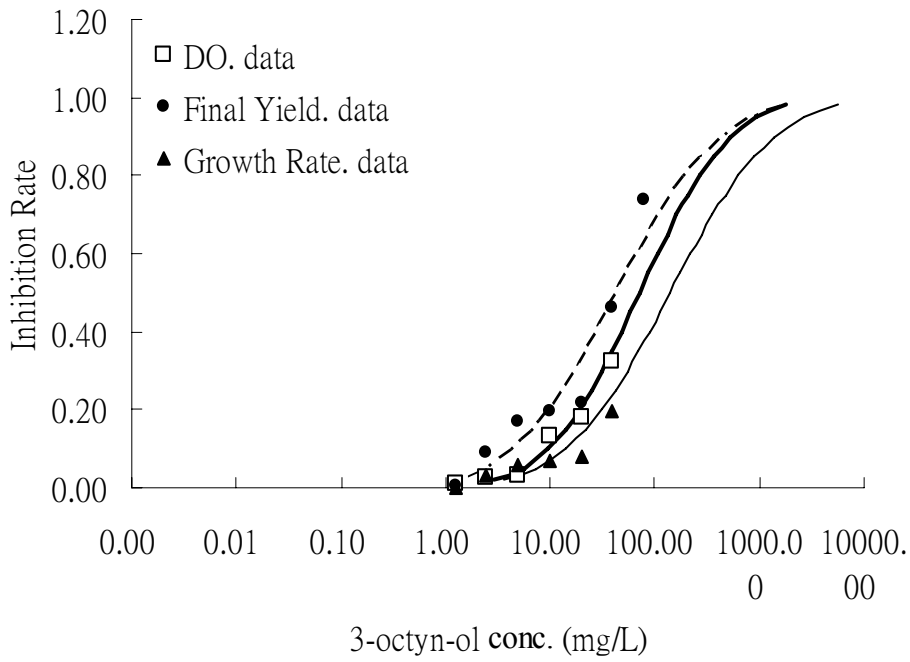
**Fig 11 The Dose-response Curve of 3-pentyn-1-ol**



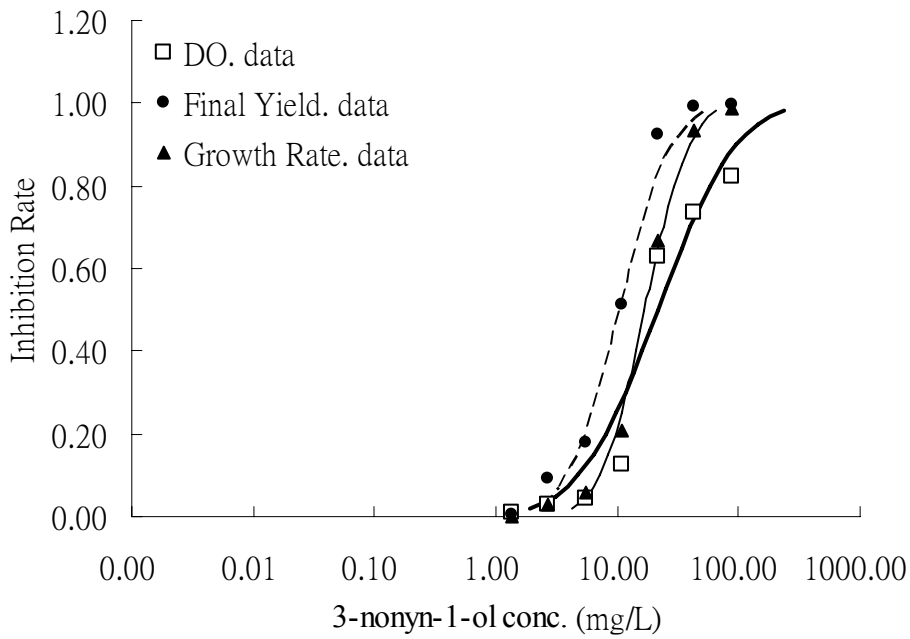
**Fig 12 The Dose-response Curve of 3-hexyn-1-ol**



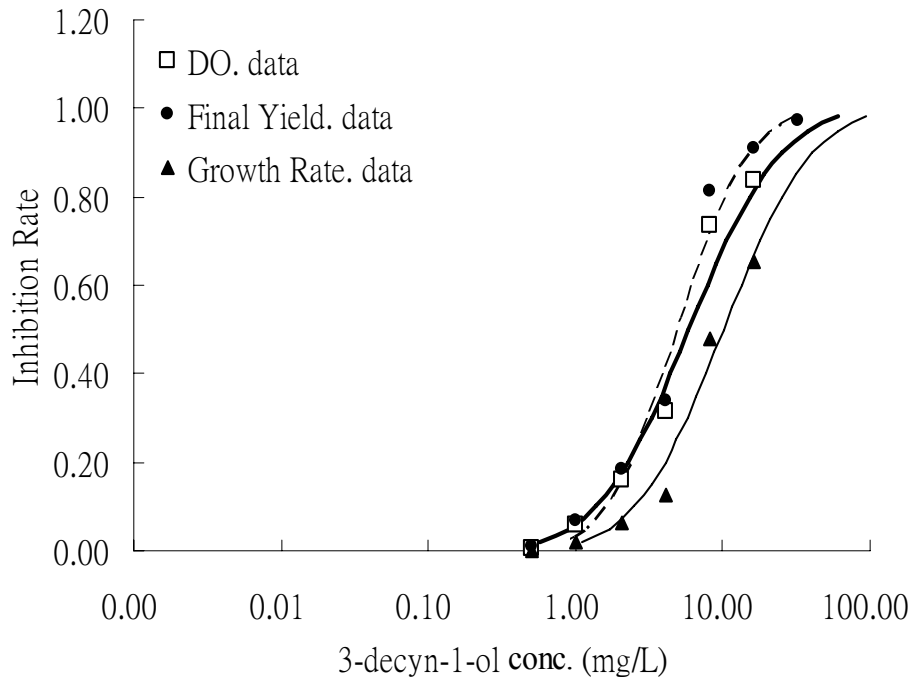
**Fig 13 The Dose-response Curve of 3-heptyn-1-ol**



**Fig 14 The Dose-response Curve of 3-octyn-1-ol**



**Fig 15 The Dose-response Curve of 3-nonyn-1-ol**



**Fig 16 The Dose-response Curve of 3-decyn-1-ol**

