

國立交通大學
環境工程研究所
碩士論文

以多變量分析法探討現行發布之生物毒性試驗

Using Multivariate Statistical Analysis to Evaluate
the Present Standard Methods of Aquatic Bioassays

研究生：孟哲賢

指導教授：陳重元 教授

中華民國 一 百 零 一 年 九 月



以多變量分析法探討現行發布之生物毒性試驗

Using Multivariate Statistical Analysis to Evaluate
the Present Standard Methods of Aquatic Bioassays

研究生：孟哲賢

Student：Che- Hsien Meng

指導教授：陳重元

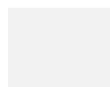
Advisor：Chung-Yuan Chen



September 2012

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國 一百零一年九月



以多變量分析法探討現行發布之生物毒性試驗

學生：孟哲賢

指導教授：陳重元 老師

國立交通大學環境工程研究所

摘要

水生生物毒性評估會因生物敏感性之差異而有低估毒性風險的發生，因此不能只用單一生物試驗來評估毒性。"組生物"試驗方法中包含多種生物試驗方法，能得到較完整的毒性資訊。然而，我國環境檢驗所發布之環境生物毒性檢驗方法中，並未考慮到物種敏感性及食物鏈之概念。因此，本研究目的除了利用實驗及統計結果了解現行發布之生物毒性試驗方法是否足以有效評估污染物的危害性外，並為"組生物"試驗法選擇適當的生物測試方法，作為日後評估環境毒物之參考依據。本實驗主要利用多變量統計法進行研究分析，為避免統計結果缺乏準確性，研究以小樣本(二十種)及大樣本數(九十種)之有機物兩個部份進行，所用到之生物試驗法包含密閉式與批次式月芽藻、水蚤、鯉魚、Fathead minnow及海洋螢光菌六種試驗法，並將兩部份對應生物試驗所得之毒性數據分別進行主成分分析與集群分析，以比較大小樣本數在統計上之差異性。多變量分析結果顯示，密閉式月芽藻為本驗究中最具敏感性的試驗方法，且在主成分分析中與水蚤皆為重要的成分變數；海洋螢光菌、鯉魚與Fathead minnow之間具非常高之相關性，但會因有機物之特殊作用機制使其相關性改變。由於大小樣本數之有機物統計結果相符合，依據主成分分析、群集分析及Pearson相關係數分析之結果選擇的"組生物"包含：密閉式月芽藻、*Daphnia magna*及海洋螢光菌或添加鯉魚試驗法，且根據最終之主成分分析結果顯示，以此"組生物"來評估毒性並不會造成任何毒性評估資訊之損失。因此，密閉式月芽藻、*Daphnia magna*及海洋螢光菌是"組生物"試驗法中合適的試驗生物。

關鍵字：月芽藻、多變量分析、主成分分析、集群分析、組生物

Using Multivariate Statistical Analysis to Evaluate the Present Standard Methods of Aquatic Bioassays

Student : Che- Hsien Meng

Adviser : Chung-Yuan Chen

Institute of Environmental Engineering
National Chiao Tung University

ABSTRACT

In the aquatic toxicity testing, the potential risk of toxicants can be underestimated due to differences in species sensitivity; therefore, it can not only use single-species to assess the toxicity. Test batteries consist of several individual assays which have become more common and receive more complete toxicity information. However, from the testing methods for environmental biological toxicity of the Environmental Protection Administration of Taiwan, it does not consider the concept of species sensitivity and the different trophic levels. The aims of this study not only use experimental and statistical data to investigate whether the existing testing methods for environmental biological toxicity can assess the harmfulness of the pollution effectively, but also select an optimal battery of bioassays as a source references to evaluate ecotoxicity in the future. This study utilize mainly the multivariate analyses, to avoid the insufficient accuracy of the statistical result, the experiment is proceeding from two parts: small sample (Twenty chemicals) and large sample (ninety chemicals). The six bioassays include closed-system and open-system algal(*Pseudokirchneriella subcapitata*), *Daphnia magna*, *Cyprinus carpio*, Fathead minnow and Microtox, then using Principal Component Analysis (PCA) and Cluster Analysis(CA) separately from the toxicity data of the two corresponding biological test. These multivariate analysis clearly showed that closed-system algal is the most sensitive testing method in this study, and is the same as *Daphnia magna* in the PCA that both are the important component variable. The correlation among Microtox, *Cyprinus carpio* and Fathead minnow is high, but it changes according to the special mode of action. PCA, CA and Pearson allowed for the selection of the following test battery : closed-system algal · *Daphnia magna* and Microtox or in addition *Cyprinus carpio* test. And the final PCA shows that the number of bioassay can be reduced without significantly losing information. Thus, closed-system algal, *Daphnia magna* and Microtox are the ideal bioassays in the test battery.

Keywords : *Pseudokirchneriella subcapitata*, Multivariate, Principal Component Analysis, Cluster Analysis, The test battery

致謝

歷經了非常充實的兩年研究生涯，感覺成長了許多，感謝父母的栽培，謝謝你們供養我讀到碩士，使我在求學期間毫無金錢壓力，你們的後半輩子我全包了。感謝陳重元 教授二年來的指導，包容我每一次的上台口頭報告，使我漸漸地對報告不再懼怕且逐漸掌握到訣竅及要點而對口說有大幅的進步。

感謝陳group的所有成員，謝謝大學姐對我在論文上的指導及總是熱心規劃活動讓實驗室充滿歡樂；感謝宏爺、祥哥、萱芳姊的照顧，我超想你們的，謝謝兩位同學阿表及筱涵妳們的關照及相處上的包容；感謝我的好球友們：南維、能俊、脫水、人妖、菸王……，有了你們我的籃球才能如此的精進，才知道我原來還蠻強的!!!!!!；學弟妹們：騏瑋、姜姜、宜君，接著是你們領頭了，盡情去凌虐碩一的毛頭們吧！實驗及論文上多多加油，祝你們一切順順利利；碩一的毛頭們：阿彰、阿法克、阿辰，妳們就是要先被凌虐，皮繃緊點~祝你們有個充實又快樂的碩一生活，加油啦~

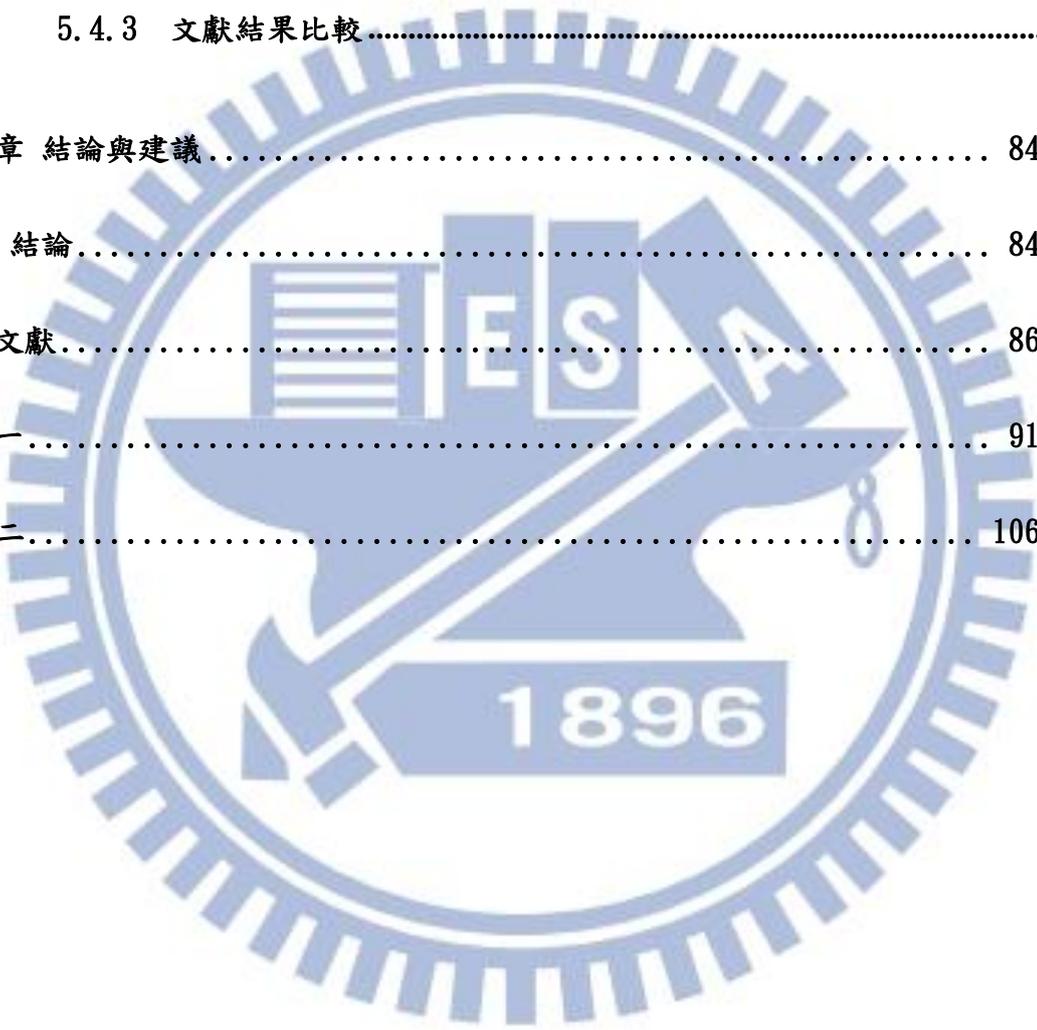
最後，超級感謝我的女友 林育汝，妳是我生命中最最重要的人，與妳在一起的每分每秒真是如此的幸福與美好，感謝妳三不五時來交大陪我克服研究上的萬難，感謝妳讓我能同時兼顧課業與愛情，感情妳那優異的英文能力，感謝妳對我那千奇百怪的情緒與語言上的包容，能與妳在一起我真的是賺到了，我超愛妳的，永遠的那種喔~~~~

中文摘要.....	I
英文摘要.....	II
致謝.....	III
目錄.....	IV
表目錄.....	VIII
圖目錄.....	IX
目錄	
第一章 前言.....	1
1.1 研究緣起.....	1
1.2 研究目的.....	3
第二章 文獻回顧.....	4
2.1 "組生物"試驗法發展趨勢.....	4
2.2 毒性試驗物種.....	7
2.3 月芽藻毒性試驗概述.....	9

2.4	有機物質之毒性機制	12
第三章	基本理論	14
3.1	濃度(劑量)反應模式	14
3.2	多變量分析	17
3.3	主成分分析(Principal component analysis)	18
3.3.1	主成分分析分析架構	19
3.3.2	主成分個數之選取	21
3.3.3	主成分分析結果之解釋與應用	22
3.4	集群分析(Cluster analysis)	25
3.4.1	選擇衡量觀察值相似性(距離)的方式	25
3.4.2	集群的分類方法	27
第四章	實驗材料與方法	29
4.1	儀器設備與試劑	29
4.1.1	Microtox 生物毒性實驗:	29
4.1.2	鯉魚靜水式毒性試驗:	30

4.2	試驗之毒化物	32
4.3	試驗方法	36
4.3.1	藻類毒性試驗	36
4.3.2	Microtox®標準分析程序	43
4.3.3	鯉魚靜水式毒性試驗	44
4.4	文獻數據蒐集與推估	47
4.4.1	生物毒性數據	47
4.4.2	毒性數據推估	47
4.5	毒性數據統計分析	48
第五章	結果與討論	50
5.1	二十種有機物之毒性試驗結果	50
5.2	多變量統計分析	57
5.2.1	群集分析(Cluster analysis)結果	57
5.2.2	主成分分析(Principle analysis)結果	59
5.3	選擇"組生物"物種	67

5.4 九十種有機物毒性分析結果	71
5.4.1 群集分析結果	71
5.4.2 主成分分析結果	72
5.4.3 文獻結果比較	73
第六章 結論與建議	84
6.1 結論	84
參考文獻	86
附錄一	91
附錄二	106



表目錄

表 4.2.1 有機物之結構與物化特性	33
表 4.3.1 微藻營養鹽之組成	38
表 4.3.2 微藻營養鹽之組成 (EDTA 成分).....	38
表 5.1.1 二十種有機物之毒性試驗數據.....	53
表 5.1.2 二十種有機物毒性數據平均值與標準偏差	54
表 5.2.1 主成分分析-共變異矩陣之特徵值及解釋的變異量.....	62
表 5.2.2 主成分分析-共變異矩陣之特徵值及解釋的變異量.....	62
表 5.3 六種試驗生物之 Pearson 兩變數間相關係數比較	69
表 5.4.1 九十種有機物之毒性試驗數據.....	76
表 5.4.1 主成分分析-共變異矩陣之特徵值及解釋的變異量	79
表 5.4.2 主成分分析-共變異矩陣之特徵值及解釋的變異量	79

圖目錄

圖 3.1.1 毒性試驗之劑量-反應關係曲線	16
圖 3.2.1 多變量分析之目的.....	17
圖 3.3.1：陡坡圖	21
圖 3.3.2：主成分分析之成分圖.....	24
圖 4.3.2 去離子水之曝器設備示意圖.....	41
圖 4.3.1：密閉式藻類毒性試驗流程暨裝置示意圖	42
圖 4.3.3：Microtox [®] 螢光快速分析儀的 32 個槽其相關位置圖	43
圖 4.6.1 本研究之實驗流程圖.....	49
圖 5.1.1 密閉式月芽藻與批次式月芽藻試驗法相關性比較錯誤！尚未定義書籤。	
圖 5.1.2 鯉魚與 Fathead minnow 相關性比較.....錯誤！尚未定義書籤。	
圖 5.1.3 生物試驗方法敏感性比較.....	56
圖 5.1.4 有機物毒性大小比較.....	56
圖 5.2.1 試驗生物集群分析樹狀圖	58
圖 5.2.2 敏感性模式：第一及第二主成分之主成分分數圖.....	63
圖 5.2.3 敏感性模式：第一及第二主成分之主成分負荷圖.....	63
圖 5.2.4 敏感性模式：第二及第三主成分之主成分分數圖.....	64
圖 5.2.5 敏感性模式：第二及第三主成分之主成分負荷圖	64

圖 5.2.6 毒性模式:第一及第二主成分之主成分負荷圖	65
圖 5.2.7 毒性模式:第一及第二主成分之主成分分數圖	65
圖 5.2.8 毒性模式:第二及第三主成分之主成分負荷圖	66
圖 5.2.9 毒性模式:第二及第三主成分之主成分分數圖	66
圖 5.3.2 組生物:第一及第二主成分之主成分分數圖	70
圖 5.4.1 五種試驗生物集群分析樹狀圖	80
圖 5.4.2 敏感性模式:第一及第二主成分之主成分分數圖.....	81
圖 5.4.3 敏感性模式:第一及第二主成分之主成分負荷圖.....	81
圖 5.4.4 敏感性模式:第二及第三主成分之主成分分數圖.....	82
圖 5.4.5 敏感性模式:第二及第三主成分之主成分負荷圖.....	82
圖 5.4.6 毒性模式:第一及第二主成分之主成分負荷圖.....	83
圖 5.4.7 毒性模式:第一及第二主成分之主成分分數圖.....	83

第一章 前言

1.1 研究緣起

隨著時代的進步，高科技產業的日新月異，的確為我們的生活帶來許多便利，但同時這些產業在製程中所排放出的廢水也將種種的汙染帶進我們的生活環境。這些高科技產業所排放的廢水中包含了許多複雜的毒性化學物質，這些毒性化學物質不僅對水體環境造成汙染，影響了整個生態環境，更進而影響全體人類的健康與生活品質。因此，對高科技產業之廢水進行毒性評估是極為重要的事情。

以往對放流廢水進行排放控管或污染性評估，只著重在於生物與化學需氧量(BOD、COD)以及固體量(SS)等傳統水質項目，但若只用這些物化參數來進行水質控管，即使放流廢水已達到放流水排放標準，也可能對於環境及生物造成的衝擊與危害性(Hernando *et al.* [1])。其主要原因在於放流廢水中之化學物質過於複雜，且大多都會隨外界因素，如溫度、pH、硬度等使毒性有所改變；有些毒性物質其在水體中之濃度甚小，尚不足以改變原來水體中 BOD、COD、TOC 等參數值，但此濃度卻已嚴重影響水體中之生物；且這些化學物質間之相互作用（協同，拮抗或加成），可能導致毒性的增強或降低，利用傳統水質分析並無法得知毒性改變情形。由於生物的敏感性很高，可以感受到化學物質的劑量遠低於儀器所能偵測的範圍，且直接將生物體曝入於污染物中，將可以更了解污染物之危害程度。與傳統化學分析法進行比較，可發現到以生物試驗來分析廢水，其優點包含簡單、快速、具敏感性且成本較低。為了強化高科技廢水管制，環保署發布於 101 年 1 月起，光電業廢水優先實施「生物急毒性」檢測。環保署表示，生物急毒性屬廢水綜合性指標，代表廢水對水中生物活性影響的程度，如經環保機關查證生物急毒性單位超過 1.43 TUa(Toxicity unit acute)時，將據以判定業者是否開罰，對於整體環境水體生態維護具有正面效益。

生物毒性評估會因生物種類以及對毒性物質敏感度間的不同而造成不同的毒性結果。如果只利用單一的生物試驗法來評估毒性，可能會因生物敏感性之差

異而有低估毒性風險的發生。法國環境保護署有鑑於此，考慮到物種敏感性及生物營養階層(食物鏈)的關係，為避免發生潛在毒性被低估的風險，於 1998 年提出"組生物" (The battery of bioassays)試驗之標準方法，其中所選擇的生物包含植物、甲殼類、無脊椎類、魚類動物等，希望能以這幾種生物來代表整體的生態系統，得到較完整的毒性資訊。而我國環境檢驗所於今年 4 月起發布環境生物毒性檢驗之標準方法(其中包含:水蚤 (*Daphnia magna* ; *Daphnia pulex*)、羅漢魚 (*Pseudorasbora parva*)、鯉魚(*Cyprinus carpio*)、粗首鱨(*Zacco pachycephalus*)、多齒新米蝦 (*Neocaridina denticulata*) 五種生物為試驗生物)其中的生物多為甲殼類及魚類生物，並未故慮到物種敏感性及食物鏈的關係。

藻類為一種被廣泛使用於毒性試驗的物種之一，為水體環境中最主要之生產者，位於食物鏈之最底層，當水中之毒性物質對藻類造成毒性傷害時，經由食物鏈的傳遞，也會對其他更高階之生物物種間接地造成影響。過去，藻類毒性試驗皆為批次式之開放系統，當試驗樣品為具揮發性或半揮發性的有機毒物時，在試驗期間會逸散至空氣中，造成實驗的誤差。而本研究所採用的藻類，月芽藻 (*Pseudokirchneriella subcapitata*)，以連續式母槽系統進行培養，並且以「48 小時密閉式 BOD 瓶藻類毒性試驗」為試驗方法，其優點為簡單、快速、便宜且敏感度皆高於其他試驗物種，此外藻類繁衍迅速，生命週期短暫，於試驗期間幼年或是老年對毒性物質不同忍耐力之影響亦會較小。由上述之各項優點皆可說明以藻類作為毒性測試物種是十分合適的。

從許多相關研究文獻結果得知，將生物毒性試驗之結果進行多變量統計分析能有效評估污染物之危害性。因此本研究將加入藻類(密閉式與開放式)及菌類等生物進行毒性試驗，並將試驗結果之數據進行主成分分析、集群分析和相關係數等統計方法來分析討論，以檢討現行發布之生物毒性試驗標準方法之不足，同時比較密閉式及開放式藻類兩種毒性試驗於主成分分析中之差異，希望藉由本研究之結果能作為評估環境毒物之參考。

1.2 研究目的

據統計，全世界現在至少有超過十萬種以上的化學物質被廣泛使用 (Forget *et al.* [2])。現今工業中所使用的化學物質大多屬於麻醉型 (narcotic mode) 毒性物質，其中又以非極性麻醉型有機物之量為最多，因此本研究選擇二十種有機毒化物，其依據 Russom *et al.* [3] 對毒性機制的分類，可分為有七種非極性麻醉性 (Non-polar narcosis)、四種極性麻醉性 (Polar narcosis) 以及九種反應性 (Reactive) 之有機物，其中麻醉性有機物占所選擇之有機物一半以上，符合當今化學物質使用概況。

除了將這二十種有機毒化物進行鯉魚 (*Cyprinus carpio*) 及海洋螢光菌 (*Photobacterium phosphoreum*) 之生物毒性試驗外，還加入此二十種有機物過去已在本實驗室建立之密閉式月芽藻毒性試驗數據，並且蒐集批次式 (非密閉式) 月芽藻、水蚤 (*Daphnia magna*) 與 Fathead minnow 之文獻毒性數據，將生物試驗與文獻蒐集所得之數據一同進行多變量統計分析。

研究目的除了利用實驗及統計之結果了解現行發布之生物毒性試驗標準方法是否足以有效評估污染物之危害性外，同時也能挑選出 "組生物" 試驗中合適的物種，可作為日後評估環境毒物之參考。除此之外，為避免實驗上所選擇之二十種毒化物樣本數過小造成統計結果缺乏準確性，因此後續於文獻上蒐集近九十種有機物之毒性數據，同樣進行多變量統計分析，比較小樣本與大樣本數之統計結果有無明顯的差異。

第二章 文獻回顧

2.1 "組生物"試驗法發展趨勢

在過去，各種不同型態的放流廢水能否排放至環境中的承受水體，大部分是透過立法制定廢水排放管制項目來加以控管。傳統水質管制項目如BOD、COD、懸浮固體物(SS)、總有機碳(TOC)、重金屬等，主要都是根據物化特性參數及化學方法來制定的。然而，放流廢水中化學物質大多以不同的形式存在且會隨著時間與空間的改變，而以不同的形式存在於環境水體中，這些化學物質與生物體及環境間複雜的交互作用，若僅利用傳統的化學方法是無法評估水質是否對環境具危害性，因此即使放流廢水已達到放流水排放標準，也可能對於環境或生物造成的衝擊與危害性(Hernando *et al.*^[1])。Manusadzianas *et al.*指出利用傳統化學方法來評估廢水之危害性，其最主要的限制性在於無法利用化學方法測得生物對毒化物質之利用度以及毒化物質間交互作用所造成的影響，且要完全鑑定出廢水中之毒化學物質為何，是非常困難的。^[4]

由於生物的敏感性很高，可以感受到化學物質的劑量遠低於儀器所能偵測的範圍，且直接將生物體曝入於污染物中，將可以更了解污染物之危害程度。因此，生物試驗法逐漸備受重視，並於較先進的工業國家中，都已利用生物進行毒性試驗來評估放流廢水之危害性。目前，生物毒性試驗之標準方法不勝枚舉，要如何選擇較適當的生物來評估毒性便成為一大研究課題。從一些相關研究的文獻中顯示，每一種生物試驗之物種對不同的毒化物會有不同的敏感性，且研究指出目前沒有任何一種生物對所有的毒化物都是最具敏感性的(Ren *et al.*^[5]、Fochtman *et al.*^[6])。因此，單單只藉由單一種生物來評估毒性，其試驗結果可能會因生物對毒化物間敏感性的差異而有所不同，且可能在生物物種選擇上之不適當，造成低估毒性之風險發生。

各樣的毒化物可以影響整個水生生物群落，包括初級生產者，初級消費者，食肉動物及細菌分解者，其毒性影響及各種營養階層生物互相影響之關係可能是相當複雜的。法國環境保護署有鑑於此，考慮到物種敏感性及生物營養階層(食物鏈)之關係，為避免發生潛在毒性被低估的風險，於1998年提出利用一組試驗生物來評估毒性之概念，發展出"組生物"試驗(The battery of bioassays)之標準方法，其中所選擇的生物包含植物、甲殼類、無脊椎類、魚類動物等，希望能以這幾種生物來代表整體的生態系統，得到較完整的毒性評估資訊。因此，使用"組生物"試驗已變得越來越普遍。

"組生物"試驗法在挑選試驗之物種上，包含以下幾個重點：

1. 包含各種不同營養階級之生物
2. 挑選之試驗生物足以代表整個生態系統
3. 生物毒性試驗之結果具互補性
4. 試驗成本及效率上之顧慮

"組生物"試驗之試驗生物包括了各種不同營養階級的生物，例如：Blaise *et al.*^[7]提出使用四個營養層級越來越高的試驗生物（如發光細菌，甲殼類動物，藻類和魚類）來評估廢水對生態環境的毒性作用。通常，在"組生物"試驗中的生物體應該要能代表整個(生態)系統，且除了代表性外，另一個重要的考慮因素為，所選擇之生物其進行試驗所得之毒性結果是必須具互補性的(Ren *et al.*^[8])。當然，試驗生物在"組生物"試驗中之數量越多越能了解污染物對環境的危害性，相對的生物試驗所需之花費、試驗時間也會隨著試驗生物的數量增加而提高。因此，為了顧及成本、時間和實驗室空間等因素，經濟及效率層面決定了"組生物"試驗中生物數量上的限制，Vindimian *et al.*指出"組生物"試驗中之物種在選擇上需考慮到容易進行實驗且需要包含最小的生物多樣性^[9]。如果沒有審慎地去選擇"組生物"試驗中的受測生物，將會導致毒性結果具相似或相關性，這樣的"組生物"試驗不僅使毒性結果冗餘無法正確評估污染物之危害性。

雖然文獻資料中有紀載"組生物"試驗之重要性,但要從眾多生物試驗方法中對應不同型態之污染物選擇適合的"組生物"試驗物種,其方法十分有限。然而,統計方法在試驗生物之選擇上卻是個非常有用的工具,除了簡單的迴歸分析及相關係數分析外,較複雜的多變量統計分析,如主成分分析(PCA)、集群分析(CA)等,在許多文獻結果上皆顯示利用"組生物"試驗法配合多變量統計方法能成功有效地評估污染物對於生態環境之危害性。例如,Rojickova-Padrtova *et al.* [10]從九種生物試驗中欲挑選適合於評估五十種廢水毒性之"組生物",作者利用主成分分析法及Spearman相關係數矩陣中發現,海洋螢光菌之試驗結果較其他試驗生物有明顯不同的敏感模式,因此在"組生物"中佔有不可或缺的角色,其次作者在"組生物"物種的挑選上,根據營養層級之概念選擇了三種營養層級及四種不同種類之生物。Fochtman *et al.* [6]從五種不同的*Daphnia magna*試驗方法中挑選適合於評估殺蟲劑毒性之"組生物",從多變量分析法及Spearman相關係數分析中得知五種*Daphnia magna*試驗方法之毒性結果具高度相關性,使作者可選擇敏感性較傳統急毒性試驗法佳且足以取代慢毒性試驗法的*Daphnia magna* Fluotox試驗法。另外Vindimian *et al.* [9]利用急、慢毒性及基因毒性之生物試驗方法進行三十種放流廢水之毒性試驗,主成分分析法之結果顯示,生物急、慢毒性試驗與基因毒性有顯著不同的毒性結果,因此在"組生物"試驗中,急、慢毒性試驗法無法取代基因毒性之試驗方法,並建議將基因毒性之試驗法納入"組生物"試驗法中。而Ren *et al.* [8]則是利用了多元尺度分析法(MDS),選擇"組生物"來評估進入活性污泥中廢水的毒性。以上例子皆說明,只要將統計方法運用得當,並顧及"組生物"試驗法選擇物種上之概念之,便能使用最小數量且富生物多樣性之"組生物"來完整評估各種污染物對於生態環境造成之危害性。

儘管"組生物"試驗法能有效評估污染物之危害性,但仍有其他學者認為不能只用"組生物"來取代傳統的水質分析法,例如:Bernard *et al.* [11]利用七種生物試驗以及十六種水質分析參數來評估垃圾掩埋滲濾液之危害性,並將實驗所得之數據進行主成分分析來選擇適合評估垃圾掩埋滲濾液危害性之"組生物",分析結果得知毒性試驗數據及水質數據間具有相關連性,能藉由所測得的水質數據來解釋

滲濾液中毒性來源之成分為何，因此建議可同時使用化學方法和生物毒性試驗來評估污染物之危害性。Castillo *et al.* 也認為生物測定只能視為一種補充傳統化學分析的方法，並不能替代或取代之。^[12]

2.2 毒性試驗物種

一般來說，選擇受測物體之條件不外乎取得容易、培養簡單且所需養殖空間不大、生命週期短、實驗容易進行、具有地區代表性等。Walsh *et al.*^[13]認為選擇敏感性較佳之物種比選擇具代表性之本土物種來的重要，因為污染物可能會很輕易的傳輸到其他地方，因此以本土生物來進行毒性評估，可能無法保護生態環境。而Nyholm *et al.*^[14]認為標準的生物試驗法，因其需要被廣泛的利用，所以應該選擇容易在實驗室中培養的物種，而不是敏感性佳或在自然中數量豐富的物種。目前用來進行生物毒性試驗的物種很多，以美國環境保護局（U.S. Environmental Protection Agency, U.S. EPA）所訂定的標準方法為例，其列舉的試驗物種就包含有植物及動物性浮游生物、珊瑚、甲殼類、無脊椎動物、水體昆蟲、細菌、藻類、魚類等。以下針對本研究所使用的生物種類進行簡單的描述：

1. 魚類

魚類是最常用來做為水生生態環境急毒性的測試物種，包括 Guppy、Rainbow trout 和 Fathead minnow (*Pimephales promelas*)等，其中以 Fathead minnow 進行的急毒性試驗使用最廣泛，為美國環保署所使用的標準方法之一。而本研究所使用的鯉魚 (*Cyprinus carpio*) 為我國所使用的生物毒性試驗標準方法之一，為本土的魚種。

2. Microtox

Microtox 毒性測試技術的基礎是利用 *Photobacterium phosphoreum* 這種海洋發光細菌，其具有在進行新陳代謝作用時會發出螢光的特性，當毒性物質抑制其正常的代謝作用時，便會使發光的強度減弱，而能用來偵測污染物毒性之大小。早在 15 年前，發光細菌的毒性試驗法已發展用於評估工業排放廢水的毒性上。由於其具操作迅速簡單，試驗期間短，再現性高且使用成本低等優點，因此能快速的篩選大量的汙水水樣，而被廣泛運用在廢水毒性監測及學術研究上。除了上述之特性外，菌類占了營養階層中重要的位子。

3. 水蚤 (*Daphnia magna*)

Daphnia magna 為 OECD 及 US. EPA 等國際組織的水生生物毒性試驗標準物種之一，也是我國生物毒性試驗的標準物種。*Daphnia magna* 是水生生物食物鏈中的重要環節，因為牠們可以是攝食水中細菌，藻類及原生動物的食草動物，也是魚的獵物之一。^[15]此外，水蚤是無脊椎動物中對多種毒性物質具高敏感性的物種(Henegar *et al.*^[16])。

4. 藻類

在所有的生物試驗中，藻類試驗常被廣泛利用於毒性研究，在生物試驗物種中占有一席之地，其優點條列如下：

- (1) 藻類為生態系統的生產者，位於營養階層底層，在食物鏈的過程中將會由於生物濃縮作用(Bioconcentration)，間接地對高營養階層之生物造成傷害。

- (2) 在毒性試驗過程中，其毒性試驗期間雖短，但由於其生命週期短的優點，在試驗期間已歷經數個生命週期，因此試驗中較不會有幼年期或衰老期而影響毒性數據的改變。
- (3) 相對於魚類及甲殼類動物試驗，藻類的毒性試驗十分簡單、快速且培養成本較低。
- (4) 藻類毒性試驗較其他生物試驗敏感性佳，且每組毒性試驗中生物的數量，藻類會比其他生物試驗高很多，較符合常態分布，因此毒性結果可信度高，再現性也較其他生物試驗高^[17,18]。

2.3 月芽藻毒性試驗概述

目前標準試驗方法中建議可使用的藻類種類甚多。Hornstrom *et al.*^[19] 提出試驗之藻種須均勻且穩定的成長，並足以代表某一生態系統。本研究室所採用的試驗藻種為月芽藻 (*Raphidocelis subcapitata*, *Selenastrum capricornutum* or *Pseudokirchneriella subcapitata*) 為單細胞藻類，屬於綠藻綱 (*Chlorophyceae*)。其特徵為成群體但不具移動性，正常培養下不易糾結在玻璃壁上，以顯微鏡觀察其外型呈現半月型。選用 *Pseudokirchneriella subcapitata* 作為毒性試驗藻種之原因除了其符合前述之條件及優點外，其敏感性也較其他藻種佳 (Rojickova-Padrtova *et al.*^[10] 利用七種藻類進行敏感度比較顯示)。此外，當缺少營養鹽或是溫度、光線、pH 等環境條件不適合其生長時，藻類會逐漸呈現出黃綠色，因此可以很容易的發現藻液遭受到污染或是培養狀況不良等情形。

藻類毒性試驗發展至今，已有許多藻類試驗的標準方法。在過去，本研究室探討了這些標準方法之優缺點，利用了「連續式培養」法培養試驗期間所需之月芽藻種，而在試驗方面則採用「批次 BOD 瓶式」藻類毒性試驗法，發展

出一套「48 小時的批次式 BOD 瓶藻類毒性試驗」Chen and Huang^[20]，其內容描述分別如下：

(1) 連續式培養法

Chen and Lin^[21]以連續式藻類母槽系統(Chemostat)為基礎進行藻類的培養，Chemostat 的容量為四公升，培養期間不僅有新鮮基質流入也有藻類代謝物質流出，此狀態與自然水體較為相似，而且營養鹽的供給是由蠕動幫浦來做控制，因此可由控制稀釋率（Dilution rate，即 $D = \text{基質流入量} / \text{反應槽體積}$ 之比值）來調整母槽中月芽藻細胞之密度，使藻種在培養期間維持在最佳的生長狀態，可在試驗時取得長期穩定且生化特性趨近一致的藻種，有利於控制實驗品質。此法改善了「批次式培養(Batch culture)」的缺點，「批次式培養」是將營養鹽加入密閉的空間中，期在培養過程中可能導致營養鹽之匱乏和變質現象以及造成藻類代謝物累積的情形，且「批次式培養」在實驗後仍繼續培養藻類，直到藻類族群恢復正常後方可再進行下一次實驗。

(2) 批次藻類毒性試驗

現有的藻類標準方法，如 U.S.EPA 採用的 "Fresh water algae acute toxicity test"^[22]、OECD 採用的 "Algal growth inhibition test guideline"^[23]及 ISO 採用的 "Water quality-algal growth inhibition test"^[24]等方法大多屬於批次式法，但多屬於「開放式的系統(Open System)」。「開放式系統」是可藉由激烈的搖晃和外界空氣相通來達到氣體交換及提供藻類碳源(CO₂)之目的，但卻使揮發性有機物可能在試驗期間內揮發，造成揮發性有機物濃度下降以至於低估其毒性結果，因此「開放式之系統」並無法有效偵測揮發性有機物之毒性。本研究室針對這項缺失，發展密閉式試驗系統來解決此項問題，使用具有完全密閉系統優點之 BOD 瓶進行毒性試驗。其內容概要為使用體積為 300mL 的 BOD 瓶，將藻類、營養鹽和試驗毒物加入其內，再用蓋子密封，讓藻類暴露於毒性物質中 48 小時，由觀測終點量測實驗組與無暴露控制組的抑制情形並進行比較分析。整個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，在操作更加簡單，在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。同時也發現，以細胞密度及產氧量作為反應參數，對揮發性有機物可得到再現性與敏感度皆較佳的結果。Mayer *et al.*^[25]也指出，在不含 headspace 之完全密閉式批次實驗系統，是評估揮發性有機物的較佳實驗方法。本研究使用了具有密閉系統優點之 BOD 瓶進行毒性試驗。Lin^[26]利用此 BOD 瓶藻類毒性試驗系統針對氯酚類之有機物進行毒性試驗，其實驗結果與一般傳統批次式藻類毒性試驗相比其敏感度較好，Hsu^[27]以此系統針對苯類、氯乙烷類、甲苯和氯甲苯類有機毒物進行毒性試驗，與開放式系統相比不會有毒物濃度隨時間揮發的問題而同樣得到較佳的敏感度。Kao^[28]利用本系統測出揮發性有機之毒性與傳統批次式方法之 EC₅₀ 值相差 3~56 倍，證明了本系統應用於揮發性有機物的適用性。

2.4 有機物質之毒性機制

有機毒物之毒性作用機制在毒理學中可粗略分為兩類，一類為非反應性毒性機制 (Non-reactive)，另一類為反應性毒性機制 (Reactive)，這兩大類毒性機制描述如下：

1. 非反應性毒性機制 (Non-reactive)

一般又稱為麻醉性機制 (Narcotic mechanism)，麻醉性有機物又可細分為非極性麻醉型 (Narcosis I) 和極性麻醉型 (Narcosis II) 兩類，以下對麻醉性有機物進行分類探討：

(1) 非極性麻醉型 (Nonpolar narcotic or Narcosis I)

Konemann *et al.*^[29] 指出此類型之有機物影響生物體時，只會與生物細胞膜上的脂質反應，因此此類型有機物之毒性可以從分配係數來計算。另外 Schultz *et al.*^[30] 從實驗結果中發現，這類型的化學物質所觀察到的毒性與化學物質的辛醇-水係數 ($\log P$)，進行線性迴歸時，其相關係數 (R^2 值) 可高達 0.85 以上，同樣顯示這類型有機物之毒性主要來自親脂性。此外這類型的化學物質毒性符合基線毒性 (基線毒性，Baseline toxicity；所有有機物毒性機制中毒性最低的機制)，毒性較低，通常被用來當作毒性機制毒性的比較基準。

(2) 極性麻醉型 (Polar narcotic or Narcosis II)

Ren *et al.*^[5] 的實驗結果顯示這類型的化學物質毒性會較 Narcosis I 的毒性要高一些，毒性約為 Narcosis I 建立的毒性迴歸式預測值的 2 倍到 10 倍，隨物種而異。Kamlet *et al.*^[31] 指出極性麻醉型有機物其毒性較非極性麻醉型有機物高之原因與有機物其分子上存在強氫鍵鍵結之官能基，也因此使有機物更具「極性」。

也有其他學者認為其毒性較高之原因與有機物所帶之電荷、偶極性等不同因素有關(Verhaar *et al.* [32]、Liao *et al.* [33])。

整體而言，非反應性有機物其毒性主要是來自於有機物質之親脂性(Lipophilic)，親脂性促使有機物分子附著於細胞膜或酵素表面之疏水結構上，並將其生化作用之管道或是反應基給阻擋住了，使得養分吸收、物質傳遞等新陳代謝之功能因而不能正常之進行，造成生命功能受損，造成與麻醉(Narcosis)相似的毒性效應。親脂作用屬於物理性作用，有機物並未在生物體內產生化學變化，因此，在某種程度的曝露劑量內，當毒性物質遭到移除時，毒性抑制效應即消失，屬於可逆性之毒性作用。

2. 反應性毒性機制 (Reactive)

毒性機制屬於反應性機制的毒物，其毒性除具有麻醉效應外，其官能基與生物體內受體結合產生之化學變化為主要之毒性來源，因此這類化學物質的毒性通常超過基線毒性回歸式非常多(差至10倍到1000倍)。這類型的化學物質通常具有受體專一性，可和特殊受體結合，促使原先養分吸收、物質代謝等新陳代謝進行的生化反應位址遭受破壞或抑制而產生毒性，屬不可逆性的反應。

許多學者根據毒性試驗的症狀，有機物的反應機制，生物代謝，和特殊受體結合能力分為許多種不同類型毒性機制。如 Russom *et al.* [3]是將有機物分為一般性(General)和特異性(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，其中包含以下四種特殊的抑制作用：

1. Oxidative phosphorylation uncouples (氧化磷酸非偶合)
2. Respiratory inhibitors (呼吸抑制)
3. Electrophiles/proelectrophiles (親電性/前親電性)
4. Acetylcholinester inhibitors (乙醯膽鹼酶抑制)

第三章 基本理論

3.1 濃度（劑量）反應模式

毒理學上，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。進行生物毒性試驗時，生物體受毒性物質影響或死亡之百分率，會隨著毒性物質濃度的變化，而呈現 S 型曲線狀，此曲線稱為劑量-反應曲線 (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的抑制率。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）時所表現出的測試物質濃度，即稱做 EC_{50} (Effect Concentration 50%) 或 LC_{50} (Lethal Concentration 50%)。生物體受毒性物質影響的劑量反應關係如圖 3.1.1(a)所示，圖中在死亡率 (Mortality)50%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(LC_{50})。但欲從 S 型曲線求得 EC_{50} 或 LC_{50} 值不容易，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。

本研究所使用的 Probit 模式為最常用的劑量-反應模式，其假設生物對毒性物質的容忍度分布為常態分布(Log-normal distribution)，其主要是將毒性物質之濃度取 \log 值，而此值與反應率之 NED (Normal equivalent deviation)具有線性的關係，其中的反應率為測試生物對毒性物質之反應比率（如死亡率等）。Probit 模式是將劑量-反應模式之 S 型曲線，轉換成 NED 尺度上的一直線，原來之劑量-反應曲

線 50% 反應率之處對應到 NED scale 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：

$$Y = NED + 5$$

$$Y = A + B \log(z)$$

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

其中，Y 為 Probit 的概率單位；A，B 分別為反應曲線之截距與斜率；Z 為毒性物質所加之劑量濃度 (mg/L)；P 為受測物種對毒性物質之反應率 (如死亡率 (%) 等)，erf. 為 Error Function。

另外，圖 3.1.1(b) 之數據與圖 3.1.1(a) 相同，差別在於圖 3.1.1(b) 之數據已經由 Probit 模式轉換。由此圖得知，死亡率在 50% 時，信賴區間最窄，也因此，許多毒性試驗之反應終點會選擇半致死濃度 (EC₅₀ 或 LC₅₀) 來表示，原因在於此值於統計中變化較小，較具可信度。

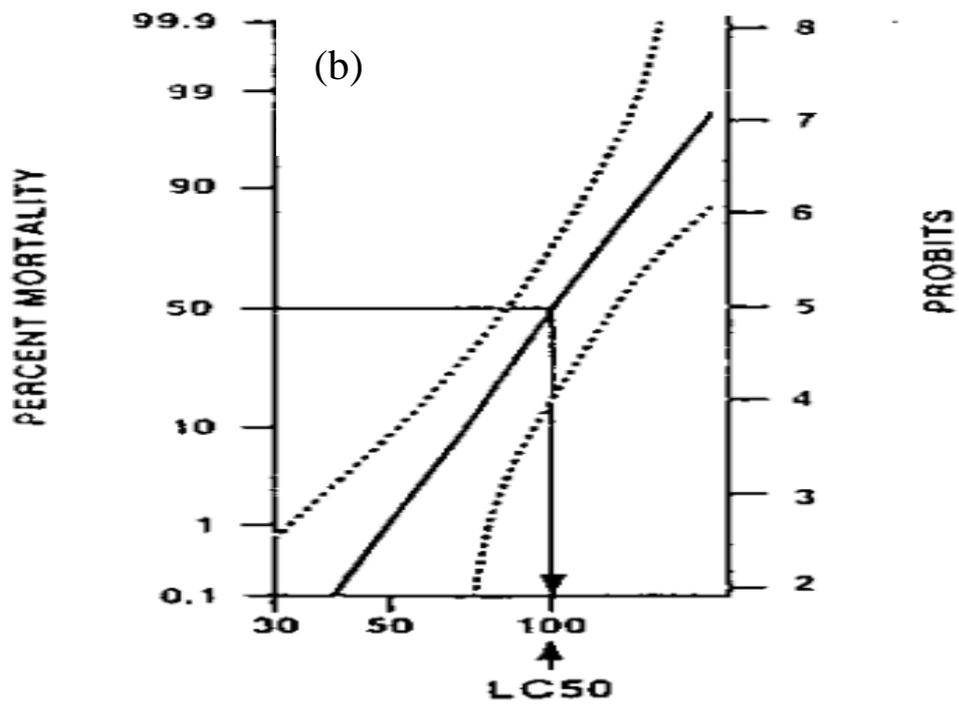
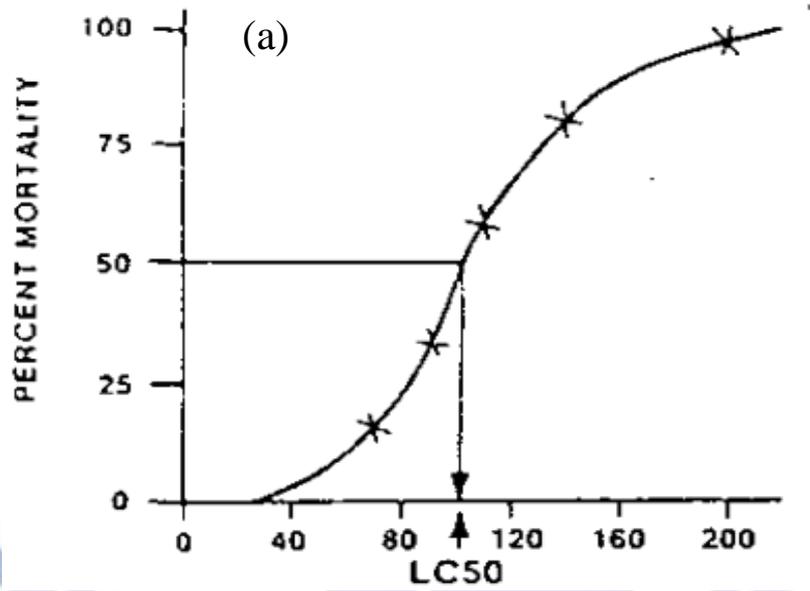


圖 3.1.1 毒性試驗之劑量-反應關係曲線

(a)死亡率(%)對應毒物濃度(mg/L)。(b)右側之y軸為死亡率轉換之Probit座標，對應的x軸為取log之濃度值，兩旁之虛線為95%信賴區間。

3.2 多變量分析

一般在研究後會面臨有大量的數據需要處理，通常會進行統計分析，以從中獲取有用的資訊來了解這些數據背後所代表的意義，以利進行後續的討論與決策。分析的方法很多，從簡單的資料列表、圖表，基本的敘述統計分析再到較複雜的多變量統計分析，可使用的方法不勝枚舉。其中多變量統計分析(Multivariate Statistical Analysis)是一種綜合性分析方法，他能夠在多個研究對象和多個指標相互關聯的情況下分析出他們的統計規律，能讓學術研究者重資料中擷取更多的訊息，正確的解讀分析結果。

多變量統計分析之方法包括多變量變異數分析(Multivariate analysis of variance,MANOVA)、主成分分析(Principal component analysis)、因素分析(Factor analysis)、對應分析(Correspondence analysis)判別分析(Discriminant analysis)、典型相關分析(Canonical correlation analysis)、路徑分析(Path analysis)等，其應用的場合各有不同，如下圖 3.2.1 示，但主要都是要能達到簡化資料且清楚了解變數間的關係。

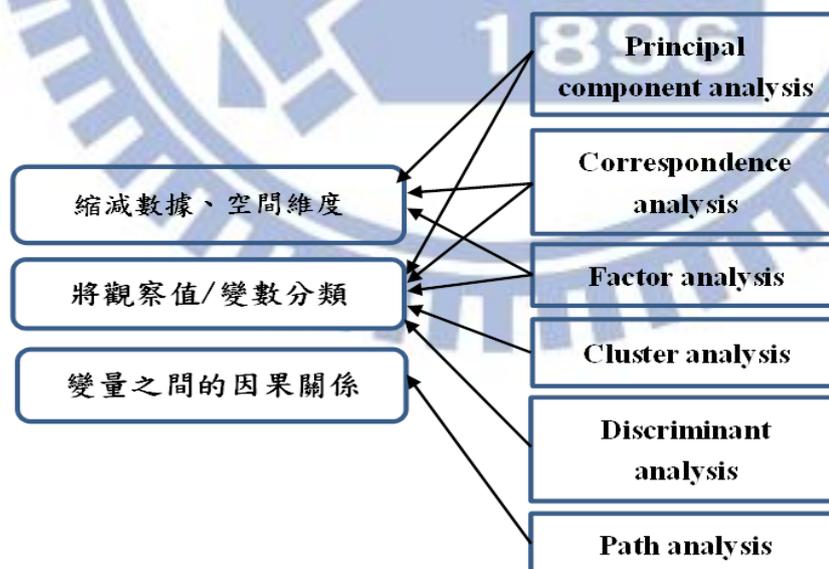


圖 3.2.1 多變量分析之目的

3.3 主成分分析(Principal component analysis)

生活周遭的事物往往受多個指標(變數)的影響，例如環境污染指數、國家競爭力、大學申請入學的成績等。為了能完善的瞭解環境汙染的程度、國家競爭力的強弱、成績的優劣等，我們並不能就單一變數來決定事情的好壞，而是必須同時考量所有的變數，並且使用一個較具有代表性的指標來進行評估。

因而研究學者須找出影響問題變化的相關變因(變數)，進而對每個變因行統計分析，了解它們之間個別的差異。一般就統計而言，變數間的變異數越大，會使得受測者在這些主成份上顯出最大的個別差異，有利於瞭解變數影響問題之輕重程度，給予變數權重做加權平均，產生一個具代表性的指標，便於分析評估。此外，在進行分析評估時，假若變數太過於複雜，會降低評估過程的困難度與複雜性，且當遇到較多的變數時，常會碰到某些變數間存在共線性的問題，使得有些變數在選擇上是多餘的。為了希望所選擇的變數精簡、獨立且具代表性，又能解釋問題中較多的變異，在這兩者之間找到平衡點是十分重要的。

主成分分析法能找出數值加權平均後的最大變異數，能從手中許多相關性較高的變數轉化為彼此獨立的變數，並由其中選取較少且能解釋資料中大部分變異的新變數，也就是所謂的「主成分」，而幾個所選取的主成分能用來解釋分析原始資料的綜合性指標。

3.3.1 主成分分析分析架構

使用主成分分析法之目的是將原始資料中多個具相關性的變數轉換成彼此獨立的新變數(即主成分)，並利用主成分解釋原始資料中大部分的變異，而這些新變數即為原始所有變數的線性組合。當原始資料中含 n 個變數 x ，而經轉換後的新變數為 y ，可用下列數學式來表示：

$$PC_1 = y_1 = w_{11}x_1 + w_{12}x_2 + w_{13}x_3 + \cdots + w_{1n}x_n$$

$$PC_2 = y_2 = w_{21}x_1 + w_{22}x_2 + w_{23}x_3 + \cdots + w_{2n}x_n$$

$$PC_n = y_n = w_{n1}x_1 + w_{n2}x_2 + w_{n3}x_3 + \cdots + w_{nn}x_n$$

上式中， PC_1 即為第一主成分； PC_2 為第二主成分；依此類推。 y_i 是按照解釋總變異比例的大小來排列，即 $Var(y_1) > Var(y_2) > \cdots > Var(y_n)$ ，因此第一主成分能解釋原始資料中最多的變異量；第二主成分次之，且能解釋第一主成分未能解釋之變異；依此類推。所有主成分所能解釋的變異總和會等於原始資料中變異數的總和，即：

$$\sum_{i=1}^n Var(y_i) = \sum_{i=1}^n Var(x_i)$$

另外，轉換式中的 w (weight，亦即權重)為轉換式中極其重要的參數，因此需求得此參數來作變數轉換。一般以電腦軟體進行主成份分析時，原始資料是以的矩陣形式來進行分析，先求出原始資料之共變異矩陣(Variance-covariance matrix；S)或相關係數矩陣(Correlation coefficient matrix；R)，再計算出 S(或 R)之特徵值(λ)，

而每個主成分皆有其對應之特徵值，分別為 $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_n$ ，且 $\lambda_1 > \lambda_2 > \dots > \lambda_n$ ，緊接著會求出其所對應之特徵向量：

$$w_1 = \begin{bmatrix} w_{11} \\ \vdots \\ w_{1n} \end{bmatrix}, w_2 = \begin{bmatrix} w_{21} \\ \vdots \\ w_{2n} \end{bmatrix}, \dots, w_n = \begin{bmatrix} w_{n1} \\ \vdots \\ w_{nn} \end{bmatrix}$$

所謂的特徵向量即為上述提及之權重 w ，其中特徵向量是正交(orthogonal)且獨立的，亦即 $w_i' w_i = 1$ ， $w_i' w_j = 0$ 。

當原始變數共有 n 個，經運算後可得到 n 個主成份個數，但為了達到簡化的目標，只選取最大的 p 個新變數，來代替原來的 n 個變數。每一主成分 (y_i) 解釋變異的比例為：

$$\frac{\text{Var}(y_1)}{\sum_{i=1}^n \text{Var}(y_i)} = \frac{\text{Var}(y_1)}{\sum_{i=1}^n \text{Var}(x_i)} = \frac{\lambda_1}{\sum_{i=1}^n \lambda_i}$$

而前 p 個主成分共同解釋全部變異的比例則為：

$$\frac{\sum_{i=1}^p \text{Var}(y_i)}{\sum_{i=1}^n \text{Var}(y_i)} = \frac{\sum_{i=1}^p \lambda_i}{\sum_{i=1}^n \lambda_i}$$

在從事主成分分析時，另一點值得注意的是，如果分析的問題中變數的單位不一樣時，則應將原始變數的資料標準化，然後再進行分析。主要原因在於，如果單位不一樣時，分析所得的主成分也會跟著改變。此時可使用相關矩陣 R 取代共變異數矩陣 S 再求特徵值及特徵向量。

3.3.2 主成分個數之選取

主成分個數選取的原則在於，所選取的主成分必須能共同解釋大部分原資料中的總變異。某些統計軟體(如 SPSS、Minitab 等)內設值是以特徵值大於 1 來做為保留主成分的依據。另外，也可藉由陡坡考驗(scree plot)來做為選取的依據。陡坡考驗圖的繪製原理是將特徵值依序排列後，繪製出一條由左上往右下走向的曲線圖，如圖 3.3.1 所示。其判斷準則是找出該曲線特徵值突然驟降之轉折處，該轉折處以上的幾個特徵值就是可以保留下來得主成分。

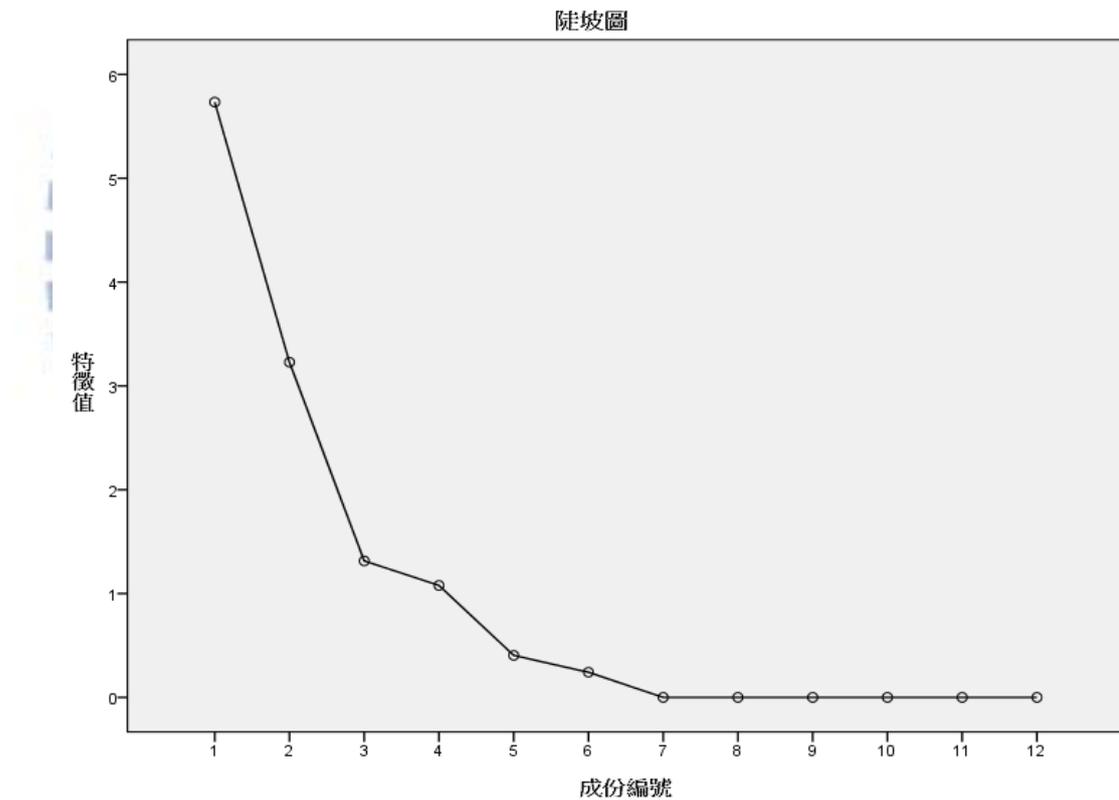


圖 3.3.1：陡坡圖

3.3.3 主成分分析結果之解釋與應用

一般將原始數據進行主成分分析後，主要會以兩張散佈圖來呈現分析結果，此兩張圖分別為成分負荷圖(Loading plot)與成分得點分數圖(Score plot)，其分別是由主成分負荷(Loading)與主成分得分分數(Score)繪製而成，利用成分負荷值及成分得分分數在圖中的相對位置，能瞭解觀測樣本資料與變數之間的相關性。以下分別進行說明：

一. 主成分負荷

主成分負荷值(C_{ji})可利用上述提的特徵向量運算得到，其公式如下：

$$C_{ji} = w_{ji} \sqrt{\lambda_j} \quad (\text{原始資料已標準化})$$

$$C_{ji} = \frac{w_{ji} \sqrt{\lambda_j}}{S_i} \quad (\text{原始資料未標準化})$$

其中 λ_j 為第 j 個主成分的特徵值， S_i 第 i 個變數的標準差， w_{ji} 為權重。

主成份負荷值的大小常用來定義或解釋主成分的意義，當主成分中原始變數所對應的負荷值越大時，表示該變數在解釋主成分變異量上的重要性越高、影響力越大，一般取負荷值在 0.5 以上為取捨標準。由於新變數(主成分)是原始數據中所有變數的線性組合，所以沒有既定的名稱，藉此可利用幾個負荷值較高的原始變數，判斷它們之間的共通性，對新變數(主成分)進行命名的工作。

二. 主成分分數

主成分得分分數(A_m)可用前述之主成分負荷值計算而得到，首先須將原始數據進行標準化處理，使其平均值為 0，變異數為 1，即

$$x'_{ji} = \frac{x_{ji} - \bar{x}_i}{s_i}$$

其中 \bar{x}_i 為原始變數之平均值； s_i 為所有變數之標準偏差

主成分得分分數(A_m)即等於：

$$A_m = \sum_{i=1}^n C_{ji} x'_{ji}$$

其中 C_{ji} 為第 j 個主成分中第 i 個變數對應的負荷值； m 為觀測樣本數

將計算所得之主成分得分分數繪製成主成分分數圖後，圖中的得分點即為觀測樣本經變數之負荷值影響後的散佈位置。當原始的觀測樣本具相關性時，於主成分分數圖中的位置也會較為接近。因此利用主成分分析之結果也可將觀測樣本資料進行分類如下圖 3.3.2 所示，圖中可觀察到 A、B、C 被分為一類；E、F、G 被分為另一類；而 D 自成一類。

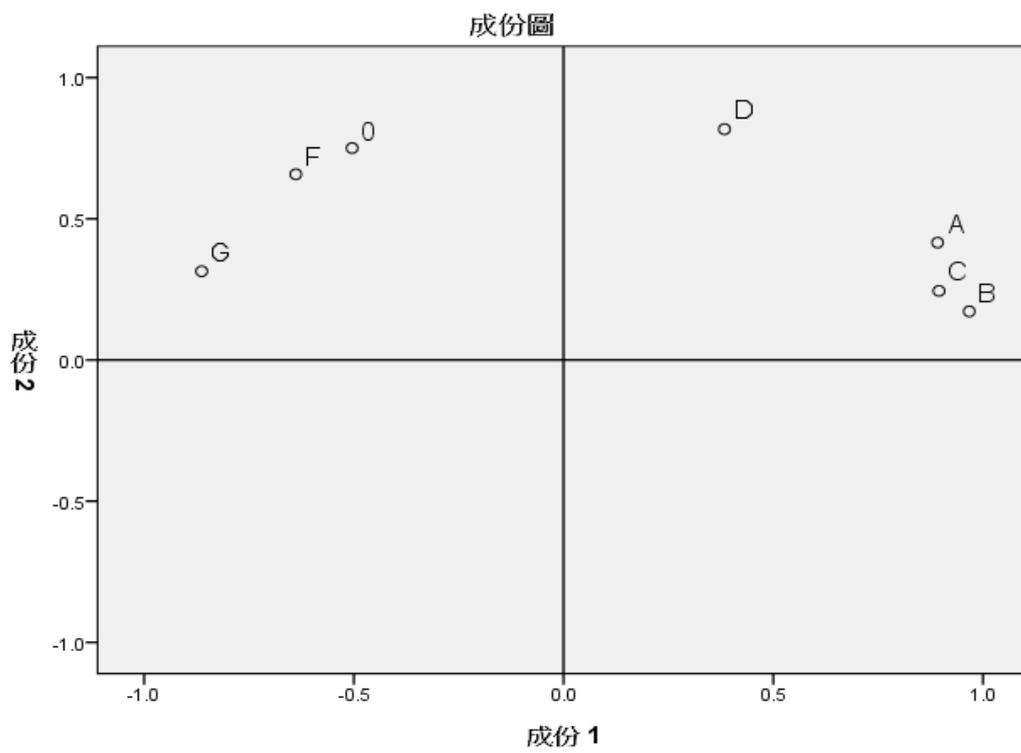


圖 3.3.2：主成分分析之成分圖

3.4 集群分析(Cluster analysis)

群集分析法(Cluster analysis)的目的是將大量的觀測樣本資料，依資料中變數的共通性質進行分群的分析方法。經由集群分析後，在同一集群內的觀察樣本具有高度的同質性；反之，則具高度的異質性。

在前一章介紹主成分分析時，提到可以利用其分析結果，計算其對應各主成分的主成分分數(principal component scores)，可以用來將觀測資料進行分類。作法在本質上有所不同，但其分群結果不一定會有很大的差異，可進行分析結果的比對，確定統計結果之正確性。一般進行集群分析時，會按照以下的步驟來進行：

1. 選擇衡量觀察值間相似性(距離)的方式
2. 選擇集群的分類方法，並決定集群數
3. 繪製集群樹狀圖，解釋分群解果

以下將針對上述步驟做重點式的說明。

3.4.1 選擇衡量觀察值相似性(距離)的方式

集群分析根據變數的測量值將性質相近的觀察值歸為同一類，因此在進行分析時，首先要計算出觀察值之間的相似性，其方法包括：

1. 點間距離

測量兩觀察值間的相似性最常見的方法就是計算二者間的距離，而常用的方法包括：

(1) 歐氏距離(Euclidean distance)

$$d_{xy} = \sqrt{\sum_{i=1}^p (x_i - y_i)^2}$$

(2) 歐氏距離平方(Squared Euclidean Distance)

$$d_{xy} = \sum_{i=1}^p (x_i - y_i)^2$$

由於歐幾里得距離必須計算平方根較麻煩，因此在集群分析上多採用歐氏平方距離(Square Euclidean distance)做為分群之依據。

(3) 馬氏距離(Mahalanhois distance)

當變數間測量單位有差異時會影響統計結果，馬氏距離法是另一種克服此題的方法。其相當於歐氏距離在乘上一權數 Σ^{-1} ，可將變數之變異程度及相關程度納入考慮。 Σ 為變項間之變異數共變數矩陣，如下所示：

$$\Sigma = \begin{bmatrix} \sigma_{11}^2 & \sigma_{12} & \cdots & \sigma_{1p} \\ \sigma_{21} & \sigma_{22}^2 & \cdots & \sigma_{2p} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \sigma_{p1} & \sigma_{p2} & \cdots & \sigma_{pp}^2 \end{bmatrix}$$

將歐氏距離乘上 Σ^{-1} 後，即構成馬氏距離：

$$d_{xy} = \sqrt{(x_i - y_i)' \Sigma^{-1} (x_i - y_i)}$$

2. 相關係數

除了以距離來表示變項之間的相似性外，也可直接利用相關係數來做為集群分析分類的依據。兩觀察值間的相似性越高，代表愈密切。

3.4.2 集群的分類方法

在選擇計算觀察值間相似性的方法後，距離最近的點已被歸為一群，如要進一步分群，則需額外計算以分在一群觀察點全體，與其他尚未分群的每一個觀察點的距離。各種集群分類的方法，依照分類過程的差異，可以分為階層(Hierarchical)與非階層(Non-hierarchical)兩種分群的原則。分別說明如下：

1. 階層式集群法

階層群集分析(Hierarchical Cluster Analysis, HCA)是廣泛被應用的一種方法，基本算法是將每個樣本資料各自成一群集，再根據相似性計算原則，將相似性最高的兩個樣本合併成新的群集，並重複合併作業，直到所有樣本資料都被歸為同一群集為止。合併的過程可用樹狀圖(Dendrogram)的方式加以圖示。其分類的方法包含單一鏈鎖法(Single linkage)、完全鏈鎖法(Complete linkage)、平均鏈鎖法(Average linkage)、中心法(Centroid linkage)及華德最小變異法(Ward's method)，其中群間距離的計算以華德法(Ward's method)之應用較為廣泛。華德法計算A、B兩群距離是以A群中心點 \bar{X}_A 到兩群合併中心點 \bar{X} 距離平方乘A群個體數，與B群中心點 \bar{X}_B 到兩群合併中心點的 \bar{X} 距離平方乘以B群的個體數之和，即：

$$d_{AB} = n_A * \|\bar{X}_A - \bar{X}\|^2 + n_B * \|\bar{X}_B - \bar{X}\|^2$$

2. 非階層式集群法

非階層式集群法以所謂 K 組平均法 (K-means) 為主。其在作法上要先確定欲分群的群數，將所有樣本觀察值隨機各自歸入其中的一群，接著根據各觀察值到各集群中心之距離遠近，重新將觀察值移動到距離最近的集群，再次重新計算各集群的中心及觀察值到各集群之心距離，再次移動觀察值，重複這樣的步驟，直到整個分類結果穩定為止，便完成分群的工作。其主要缺點在於要先主觀的決定所要分群的群數，造成統計的誤差。



第四章 實驗材料與方法

4.1 儀器設備與試劑

4.1.1 Microtox 生物毒性實驗：

1. 微毒測量儀：Microtox Model 500, Microbic's 製。
2. 生物試劑(**Reagent**)：海洋發光菌 *Vibrio fischeri* (費氏弧菌)之商用冷凍乾燥試劑，典試科技總代理
3. 稀釋液(**Dilution water**)：主要成分為濃度2%之NaCl無毒性溶液，功用為稀釋樣品。
4. 活化液(**Reconstitution solution**)：活化液為經過0.2 μ m濾紙三次過濾後之無菌去離子水，功用在於活化冷凍乾燥狀態下的螢光菌。
5. 滲透壓調節液(**MOAS**)：滲透壓調節液主要成分為22%氯化鈉(NaCl)之無毒性溶液，其功能為調整樣品之NaCl濃度達到2%左右，與螢光菌本身之滲透壓相等。其用量多寡與取用樣品體積的關係如下：

$$X \text{ ml sample} * 0.1 = \text{所需的滲透壓調節液體積}$$

4.1.2 鯉魚靜水式毒性試驗：

1. 鯉魚

使用全長（上顎前端至尾鰭後端的長度）2.0 至 3.0 公分之鯉魚幼魚，本實驗之鯉魚苗來源為新屋及彰化淡水魚苗養殖場。

2. 溫度恆溫控制設備

使用臻美公司訂製之循環式水浴槽並配合室內空調恆溫方式，將馴養水溫及試驗水溫控制在 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 。且內含溫度監測裝置，可顯示毒性試驗期間試驗水樣之最高及最低溫度

3. 馴養容器

使用 150L 之普力桶作為馴養的容器，每桶約放置 200 隻鯉魚。

4. 試驗容器

使用 2 L 之硼矽玻璃燒杯。

5. 溶氧測定儀

使用美國 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 ~ 60.0 mg/L，精準度為 $\pm 0.1\%$ 。

6. 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 $\pm 0.01\%$ 。

7. 導電度計

使用 Lutron 公司，Model CD-4306 之比導電度計。

8. 餘氯計

使用 Motortech 之 Micro7⁺ 餘氯計。

9. 分析天平

量測藥品用，產牌 Precisa 205A，精確度至0.01mg。

10. 曝氣機

使用一般水族使用之曝氣設備，使馴養水中之溶氧充足。

11. 水循環過濾裝置

使用上部及外接式過濾器材，內含白棉(過濾用)、生化棉以及陶瓷石英環。

12. 馴養水

本實驗使用稀釋水作為馴養水，其硬度在 80 至 100 mg CaCO₃/L 間。稀釋水之配方如下：

每一 L 之試劑水含下列成分（試藥級以上）：

碳酸氫鈉 (NaHCO ₃)	96.0 mg
七水硫酸鎂 (MgSO ₄ · 7H ₂ O)	123.0 mg
氯化鉀 (KCl)	4.0 mg
二水硫酸鈣 (CaSO ₄ · 2H ₂ O)	60.0 mg

13. 參考毒物

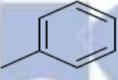
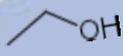
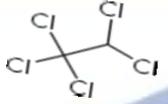
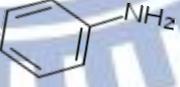
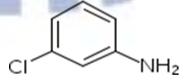
氯化鈉，試藥級以上。

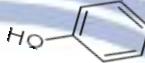
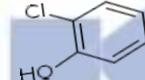
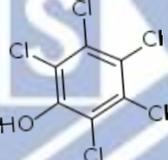
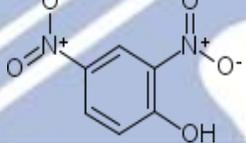
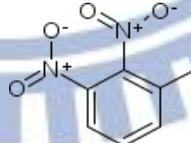
4.2 試驗之毒化物

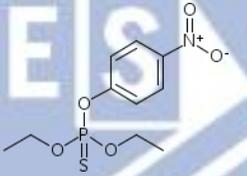
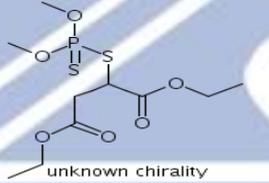
本研究所選用之二十種的有機毒化物，其依據Russom *et al.*^[3]對毒性機制的分類，可分為七種非極性麻醉(Non-polar narcosis)、四種極性麻醉(Polar narcosis)以及九種反應性(Reactive)機制的有機物，其中九種反應性有機物又被Russom *et al.*^[3]分作四種特殊的作用機制(mode of action)，包括兩種氧化磷酸非偶合、兩種呼吸抑制型、三種親電與前親電性和兩種乙醯膽鹼酶抑制之有機物。

通常反應性有機物之毒性會比用疏水性參數所預測的毒性高出甚多，且反應性有機物通常因具有特別的作用模式，會與特殊的受體作結合，使物種間敏感度之變異性提高。從環境保護的角度上來看，這些具特別作用機制的有機物是需要特別關注的。本研究選擇將這二十種有機物視為一種富含各種毒性機制之廢水，主要目的是希望能增加統計分析結果上之準確性，以利選擇適合評估環境毒性危害的"組生物"。表4.2.1為本研究選擇有機物之結構與物化特性。

表 4.2.1 有機物之結構與物化特性

Chemical	CAS No.	Formula	M.W.	Structure	Henry's law constant (atm·m ³ /mole)	Log P	Solubility (mg/L)	MOA
Benzene	71-43-2	C ₆ H ₆	78.11		5.55E-03	2.13	1.79E+003	NP
Toluene	108-88-3	C ₇ H ₈	92.14		6.64E-03	2.73	5.26E+002	NP
Methylene chloride	75-09-2	ClH ₂ Cl	84.93		3.25E-03	1.25	1.3E+004	NP
1,3-dichloropropane	142-28-9	C ₃ H ₆ Cl ₂	112.99		9.76E-04	2.00	2.75E+003	NP
Ethanol	64-17-5	C ₂ H ₆ O	46.07		5E-006	-0.31	1E+006	NP
Propionitrile	107-12-0	C ₃ H ₅ N	55.08		3.70E-05	0.16	1.03E+005	NP
Pentachloroethane	76-01-7	C ₂ HCl ₅	202.29		1.94E-03	3.22	4.8E+002	NP
Aniline	62-53-3	C ₆ H ₇ N	93.13		2.02E-06	0.90	3.6E+004	P
3-chloroaniline	108-42-9	C ₆ H ₆ ClN	127.57		1E-006	1.88	5.4E+003	P

Chemical	CAS No.	Formula	M.W.	Structure	Henry's law constant (atm-m ³ /mole)	Log P	Solubility (mg/L)	MOA
Phenol	108-95-2	C ₆ H ₆ O	94.11		3.3E-007	1.46	8.28 E+004	P
2-chlorophenol	95578	C ₆ H ₅ ClO	128.56		1.12E-05	2.15	2.85E+004	P
Pentachlorophenol	87-86-5	C ₆ HCl ₅ O	266.34		2.45E-008	5.12	14.00	OPU
2,4-dinitrophenol	51-28-5	C ₆ H ₄ N ₂ O ₅	184.11		8.6E-008	1.67	2.79E+003	OPU
Acetaldehyde	75-07-0	C ₂ H ₄ O	44.05		6.67E-05	-0.34	1E+006	EP
Glutaraldehyde	111-30-8	C ₅ H ₈ O ₂	100.12		2.39E-08	-0.18	1.67E+005	EP
2,3-dinitrotoluene	602-01-7	C ₇ H ₆ N ₂ O ₄	182.14		3.97E-07	2.18	270	EP

Chemical	CAS No.	Formula	M.W.	Structure	Henry's law constant (atm-m ³ /mole)	Log P	Solubility (mg/L)	MOA
Chloroacetonitrile	107-14-2	C ₂ H ₂ ClN	75.50		1.08E-005	0.45	1E+005	RI
Malononitrile	109-77-3	C ₃ H ₂ N ₂	66.06		1.31E-007	-0.60	1.33E+005	RI
Parathion	56-38-2	C ₁₀ H ₁₄ NO ₅ PS	291.26		2.98E-007	3.83	11	AI
Malathion	121-75-5	C ₁₀ H ₁₉ O ₆ P ₁ S ₂	330.35		4.89E-09	2.36	143	AI

-Log P、M.W.、Henry's law constant、Solubility data from EPIWEB version 4.0 software

-Structure's picture from chemexper.com

-以上有機物皆為非發性或半揮發性，其區分原理為：

- 揮發性有機物定義為：亨利常數 > 10⁻³ atm-m³/mole
- 半揮發性有機物定義為：亨利常數介於 10⁻³~10⁻⁷ atm-m³/mole
- 非揮發性有機物定義為：亨利常數 < 10⁻⁷ atm-m³/mole

4.3 試驗方法

4.3.1 藻類毒性試驗

在本研究中，密閉式月芽藻之毒性數據取自過去實驗室已建立的毒性資料庫，試驗方法為本研究室發展之「48小時BOD瓶藻類毒性試驗」，其方法介紹如下：

(一) 試驗藻種

本研究中，採用植物性浮游生物，在分類上屬於綠藻綱(*Chlorophyceae*)的月芽藻(*Pseudokirchneriella subcapitata*)，其特徵為單細胞、成群體但不糾結、不能移動，一般細胞體積為 $40-60 \mu\text{m}^3$ ，體型呈半月型。U.S. EPA、ISO、OECD 及 APHA 等單位之藻類毒性試驗，皆使用此藻種做為標準試驗物種之一。本實驗之月芽藻種購自於University of Texas, Austin。

(二) 培養基配製

本研究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 ± 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 12.750g NaNO_3 於 500 ml 去離子水。
2. 氯化鎂貯備液：溶解 6.082g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 於 500 ml 去離子水。
3. 氯化鈣貯備液：溶解 2.205g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 於 500 ml 去離子水。
4. 硫酸鎂貯備液：溶解 7.350g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 於 500 ml 去離子水中。
5. 磷酸氫二鉀貯備液：溶解 0.522g K_2HPO_4 於 500 ml 去離子水中。

6. 碳酸氫鈉貯備液：溶解 7.5g NaHCO_3 於 500 ml 去離子水中。

7. 微營養鹽貯備液：溶解下列所有藥品於 500 ml 去離子水中。

92.760 mg H_3BO_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 ZnCl_2	0.006 mg $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
79.880 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	150 mg $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

其中微營養鹽貯備液中，EDTA 分別有 100%、10%及 0%三種。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。最後配成之營養基質，其所含巨量及微量營養素濃度列於表 4.3.1 及表 4.3.2。營養基質的滅菌是以 $0.45 \mu\text{m}$ 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，以避免產生光化學反應。

表 4.3.1 微藻營養鹽之組成

化合物	濃度 (mg /L)	元素	各元素實際濃度 (mg /L)
NaNO ₃	25.5	N	4.20
MgCl ₂ · 6H ₂ O	5.7	Mg	2.90
CaCl ₂ · 2H ₂ O	4.41	Ca	1.20
MgSO ₄ · 7H ₂ O	14.7	S	1.91
K ₂ HPO ₄	1.04	P	0.186
		K	0.649
NaHCO ₃	15.0	C	2.14
		Na	11.0

表 4.3.2 微藻營養鹽之組成 (EDTA 成分)

化合物	濃度 (µg /L)	元素	各元素實際濃度 (µg /L)
H ₃ BO ₃	186	B	32.5
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	264	Mn	115
ZnCl ₂	3.27	Zn	1.57
FeCl ₃ · 6H ₂ O	96.0	Fe	30.0
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.78	Co	0.354
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	7.26	Mo	2.88
CuCl ₂ · 2H ₂ O	0.00900	Cu	0.0400
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	300		

(三) 實驗前準備工作

連續式藻類培養與保存

實驗物種 *Pseudokirchneriella subcapitata* 在進行實驗前必須經過 2~7 天的預培養，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 $1.9-2.0 \times 10^6$ cells/mL，在此條件下才取藻液進行實驗。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)。此外液態營養基質中之藻類可在 4°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。實驗條件依據 Lin^[21, 34] 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 $4300 \pm 10\%$ Lux 下進行，所使用之光源為連續白冷光。
- (3) HCO_3^- 濃度：15 mg/L。
- (4) pH：初始 pH 為 7.50 ± 0.01 。
- (5) 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。
- (6) 試驗時間：48 hr。
- (7) 藻類初始植種密度： 1.5×10^4 cells / ml。
- (8) 振盪頻率：100 rpm

(四) 密閉式藻類毒性試驗方法及步驟

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，以及添加七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})。

2. 實驗步驟

本藻類試驗屬於四十八小時的急毒性試驗，圖4.3.1為密閉式藻類毒性試驗流程暨裝置示意圖。以下針對實驗進行之步驟1~8即為尋找 EC_{50} 範圍的實驗程序 (range-finding test)，而實驗步驟 9為確定試驗 (definitive test)：

- (1) 當確定連續式培養母槽穩定之後，即可以開始進行藻類毒性試驗。毒性試驗之營養基質為參考 U.S. EPA 標準方法，而後修改濃度配製。
- (2) 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 7.50 ± 0.01 ，氣體鋼瓶進行曝氣 15 分鐘 (如圖 4.3.2)。曝氣的目的是為了降低營養基質中之溶氧值並增加其 CO_2 濃度。經過 5 ~ 6 分鐘的曝氣後，溶氧值可接近 1.0 mg/L。迅速將下口瓶之蓋子蓋上。

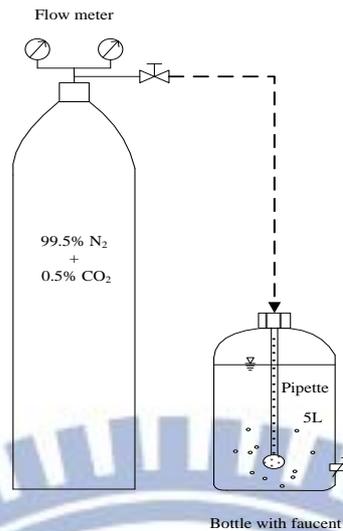


圖 4.3.2 去離子水之曝器設備示意圖

- (3) 由穩定狀態之連續式培養母槽中取出適量之藻液，分別加入 BOD 瓶中使試驗時藻類之初始細胞密度為 1.5×10^4 cells/mL。之後再迅速加入曝氣好之純水，然後逐瓶加入所需之基質混合液 2.1 mL 和不同體積的毒性物質以達到所需的濃度(在進行 Range finding 時，可取較大毒物濃度範圍，如毒物濃度以 5 或 10 的等比數列增加)。每次實驗一組七瓶，重複三組。每組之第一瓶為控制組，即不加入任何毒性物質，藉此了解在移植之過程中是否有其他因素影響到藻類之正常生長。
- (4) 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)，量完 DO 後立即蓋上 BOD 瓶。
- (5) 將 BOD 瓶置於培養箱內迴轉式震盪混合器上震盪。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 $64.5 \pm 10 \text{ } \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ 之白冷光燈，震盪頻率為 100 rpm。
- (6) 在實驗期間內，每 8-12 小時須注意 BOD 瓶上水封是否因蒸發或其他因素而減少，適當的加上去離子水，使水封確實。48 個小時後量測各個 BOD 瓶中之溶氧值，視為最終溶氧值 (Final DO, DO_f)。由最終溶氧值減掉初始溶氧值可得到溶氧差 ($DO_f - DO_i$) 即為淨溶氧值 (ΔDO)

- (7) 在量測完溶氧值後，量測每個 BOD 瓶的 pH 值以了解 pH 的變化。
- (8) 緊接著用顆粒計數器量測每個 BOD 瓶的藻類細胞密度，由此計算藻類之生長率，並使用 Probit model 求得以藻類細胞密度為試驗終點時之 EC_{50} 值。同樣的利用淨溶氧變化值及毒性物質濃度即可由 Probit model 分析求得此毒性物質以溶氧為試驗終點之 EC_{50} 值。
- (9) 重複步驟(1)-(8)，只不過在步驟 3 的毒物濃度範圍隨著之前 Range finding 結果調整毒物濃度，以得到更精確的濃度-反應曲線及 EC_{50} 值。

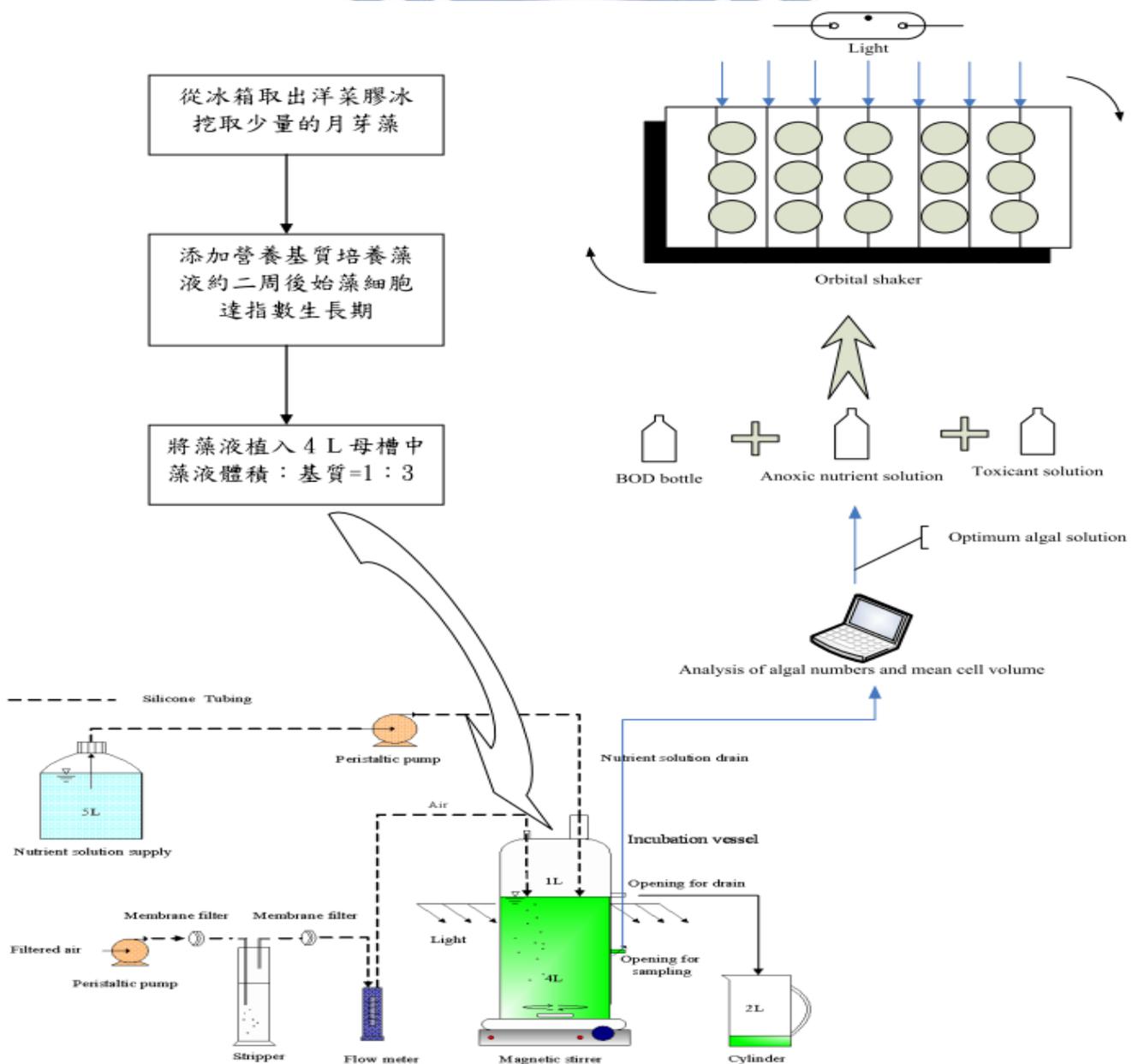


圖 4.3.1：密閉式藻類毒性試驗流程暨裝置示意圖

4.3.2 Microtox®標準分析程序

Microtox®的實驗儀器設備主要由培養槽(incubator)、控溫設備及螢光偵測裝置所組成，實驗時會用到的培養槽相對位置圖如圖 4.3.3 所示。其實驗步驟如下：

1. 加 1000 μ l 的活化液至小試管，放置在 reagent 培養槽，等待 10 分鐘，使之與培養槽溫度達平衡。接著自冷凍庫中取出粉狀的螢光菌並加入 reagent 槽中的活化液，等待 5 分鐘使螢光菌活化。
2. 將小試管放入 A1-A5、B1-B5，以及 E4、E5，F4、F5 的培養槽，隨即加 500 μ l 稀釋液到 B1-B5 和 F4、F5 培養槽，並加 1000 μ l 稀釋液到 A1-A4 和 E4、E5 培養槽。
3. 以 Micropipette 抽取 10 μ l 的螢光菌分別加入 B1-B5 和 F4、F5 培養槽，並以 Micropipette 將之混合均勻。等待 15 分鐘使螢光菌發光達穩定狀態。
4. 加 250 μ l 滲透壓調節液及 2500 μ l 樣品至 A5。以連續 2 倍稀釋方式，由 A5 抽 1000 μ l 至 A4、A4 抽 1000 μ l 至 A3、A3 抽 1000 μ l 至 A2、A2 抽取 1000 μ l 至 A1、A1 抽取 1000 μ l 至 E5。其中 E4 為控制組。
5. 由螢光菌分別加入 B1-B5 和 F4、F5 時，計時 15 分鐘之後，將 B1-B5 和 F4、F5 依序放入 read 槽中讀取其儀器顯示的螢光值，此時即為 0 分鐘之螢光值 (I0)，隨即以 Micropipette 將 A1-A5 和 E4、E5 中各抽取 500 μ l 加入 B1-B5 和 F4、F5，等待 5 分鐘以及 15 分鐘後，分別記錄其螢光值(I5、I15)。

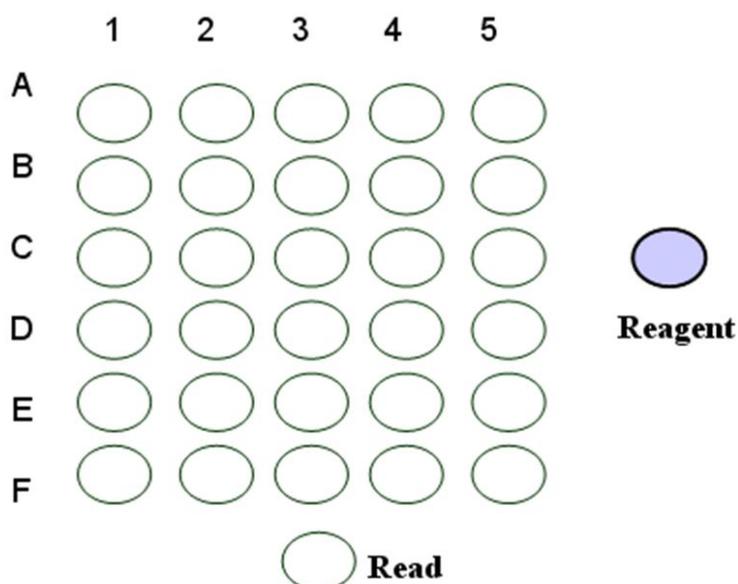


圖 4.3.3：Microtox® 螢光快速分析儀的 32 個槽其相關位置圖

4.3.3 鯉魚靜水式毒性試驗

本研究所使用之鯉魚靜水式毒性試驗的標準方法，主要採用我國環境檢驗環檢所所發布之標準方法，其概略步驟如下：

(一) 鯉魚馴養：

1. 將鯉魚幼魚自魚苗繁殖場取回後，待適應馴養水之水質後，放入內盛馴養水之馴養容器中。
2. 鯉魚馴養時，以曝氣設備進行曝氣，使溶氧維持在 8 mg/L 以上，並以水循環過濾裝置維護水質，如有死魚應立即移出，當水質呈白色混濁及水面上含大量泡泡時，須立即換水，避免因水質惡化造成鯉魚死亡。
3. 馴養之水溫與毒性試驗溫度一致，即 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，光照時間應維持在每天 16 ± 1 小時。
4. 馴養時間至少 7 天，毒性試驗開始前 7 天內，期間幼魚死亡率不得超過 10%。
5. 幼魚成長速度與馴養之密度及餵食狀況有關，須依實際情況調整馴養容器中幼魚數量及餵食次數。過剩之飼料宜移除以免導致水質惡化。
6. 毒性試驗開始前 24 小時停止餵食。
7. 試驗用之鯉魚全長應為 2.0 至 3.0 公分。

(二) 範圍尋找試驗 (range-finding test)

1. 進行試驗時，若不確定樣品之半數致死濃度落於哪一濃度範圍，可先進行範圍找尋試驗。
2. 建議可將水樣或環境用藥以稀釋水適度進行 10 倍序列稀釋。每一濃度之試驗水樣體積至少 1.5 L，以 1 個試驗容器盛裝。
3. 每一濃度之試驗生物總數均為 5 隻。以手操網將經馴養且全長 2.0 至 3.0 公

分之鯉魚移入試驗容器，每個容器各放 5 隻。

4. 試驗期間鯉魚不得餵食，水溫應控制在 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，光照應維持每天 16 ± 1 小時。
5. 觀察 8 至 24 小時，移出死亡之魚並記錄死亡數量。試驗結果作為確定試驗稀釋方式之參考。

(三) 確定試驗 (definitive test)

1. 將水樣或環境用藥以稀釋水稀釋為 5 個濃度，相鄰濃度之稀釋倍數不得超過 2 倍。放流水則以 5 個固定濃度進行試驗 (100%、80%、60%、40% 及 20%)。每一濃度之試驗水樣總體積至少 3 L，以 2 個試驗容器平均盛裝。
2. 稀釋完成後，檢測最高濃度試驗水樣之 pH、溶氧、導電度及餘氯。另須檢測稀釋水之 pH 及導電度。
3. 每一濃度之試驗生物總數均為 20 隻。以手操網將經馴養且全長 2.0 至 3.0 公分之鯉魚移入試驗容器，每個容器各放 10 隻。
4. 空白試驗(Control)則取 2 個試驗容器，分別盛裝至少 1.5 L 之 100% 稀釋水，以手操網各放入 10 隻經馴養且全長 2.0 至 3.0 公分之鯉魚。
5. 試驗期間為 96 小時，水溫應控制在 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，光照應維持每天 16 ± 1 小時。試驗期間鯉魚不得餵食。
6. 開始試驗後，至少於第 2、24、48、72 及 96 小時，觀察及移出死亡之鯉魚並記錄死亡數量。
7. 結束試驗後，須測量並記錄最高濃度試驗水樣之溶氧及 pH，並記錄試驗期間之最高及最低水溫。

(四) 結果處理

1. 死亡判定：死亡之判定須符合下列二條件：

- (1) 鰭及鰓的活動停止。
- (2) 魚體經輕觸沒反應。

2. 96 小時 LC_{50} 之計算：

計算各試驗濃度之 96 小時鯉魚死亡總數及鯉魚死亡百分率：

鯉魚死亡總數 = 2 個試驗容器之鯉魚死亡數量加總

鯉魚死亡百分率 = 鯉魚死亡總數 \div 20 \times 100%

本研究以下列 2 種方法計算 96 小時 LC_{50} ：

- (1) 機率單位法 (probit method)
- (2) 史丕曼—卡伯法 (Spearman-Kärber method)

4.4 文獻數據蒐集與推估

4.4.1 生物毒性數據

除了本研究進行之生物試驗(鯉魚、海洋螢光菌)與本實驗室已建立的密閉式月芽藻數據外，並蒐集 Fathead minnow、*Daphnia magna* 與非密閉式月芽藻之文獻數據，同時進行統計分析。由 OECD 所發展的 QSAR Toolbox 是一個工具性的軟體，其功能在於提供各國政府機關、化學工廠以及其他利益關係者的一個資訊平台，藉以查詢在評估化學物質對生態環境造成危害性的相關毒性數據，此軟體中含各種化學物質分子結構上的相關資訊及生態毒性數據等，其數據來源是由各相關研究實驗結果等管道蒐集而來。因此，本研究主要利用 QSAR Toolbox 2.1 版之軟體來取得本研究所用之有機物對於上述三種試驗生物之毒性數據，而無法從此軟體查得之生物毒性數據則以文獻蒐集的方式取得。其中毒性數據選擇簡要說明如下：Fathead minnow 急毒性試驗 96-h LC₅₀(試驗終點：死亡率(Mortality))；*Daphnia magna* 急毒性試驗 48-h L(E)C₅₀(試驗終點：死亡率)；月芽藻急毒性試驗 48~96h(試驗終點：Biomass、Population、Growth rate)。

4.4.2 毒性數據推估

由於多變量統計法在分析數據的過程中，會將原始數據先轉換為矩陣形式(有機物×試驗生物)進行統計分析，並進行數據間相關性或共變異性的比較。因此，數據矩陣在進行多變量分析時，矩陣中之元素必須都要有數值，才能進行計算，否則統計軟體將會將對應該無數值的變數直接刪除，而無法進行完整的分析。

QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationships)，是以有機物的物理、化學特性及結構之性質與其毒性建立起統計的關係，能藉由少數幾個物化參數與毒性數據來建立可預測有機物毒性的回歸式，當有機毒物具相同毒性機制時，利用

QSAR 來預測毒性之結果具高度準確性。ECOSAR (Ecotoxicological (Quantitative) Structure Activity Relationship)是由 US EPA 發展的一套預測化學品對水生生物毒性的計算程式，其透過蒐集化學品對魚類、水生無脊椎動物(水蚤)及藻類之毒性數據，並進一步依照化學品的分子結構形式進行分類建立各自的 QSAR，廣泛使用來評估化學物質的急性（短期）毒性及慢性（長期）毒性，因此，本研究利用 ECOSAR 來預測無法直接由文獻上取得的毒性數據。另外，無法利用 ECOSAR 來預測之毒性數據，則由相關文獻中找到適合的 QSAR 預測式來推估毒性數據。非密閉式月芽藻對於非極性麻醉型有機物之 72~96h EC₅₀(試驗終點：生長抑制) 毒性數據由公式(1)計算而得，此公式是由 Van Leeuwen *et al.*^[35]所建立；海洋螢光菌對於極性麻醉型有機物之 15-min EC₅₀(試驗終點：發光抑制) 毒性數據由公式(2)計算而得，此公式是由 Marco Vighi *et al.*^[36]所建立。公式(1)(2)如下所示，其中 $\log P$ 為辛醇-水係數。

$$\log(\text{EC}_{50}^{-1}, \text{mM}^{-1}) = 1.00\log P - 1.77 \quad (1)$$

$$\log(\text{EC}_{50}^{-1}, \mu\text{M}^{-1}) = 0.497\log P + 0.304 \quad (2)$$

4.5 毒性數據統計分析

本研究進行生物試驗及文獻蒐集所得之毒性數據，將進行多變量統計分析，其中包括主成分分析法(Principal Component Analysis, PCA)及集群分析(Cluster Analysis, CA)。此兩種分析方法皆是使用統計套裝軟體 Minitab 15 及 Microsoft Excel 2010 來執行。

4.6 實驗流程圖

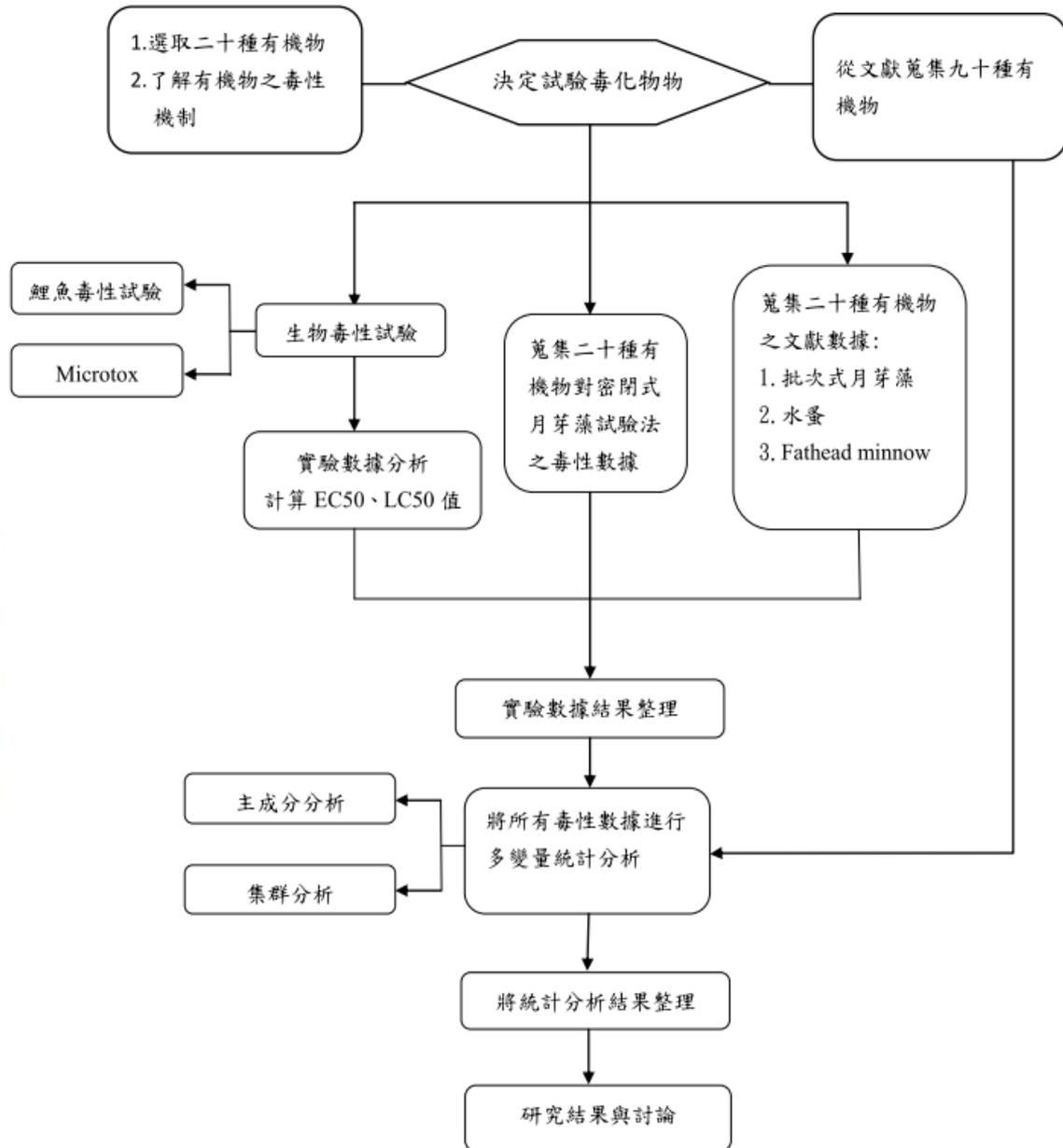


圖 4.6.1 本研究之實驗流程圖

第五章 結果與討論

5.1 二十種有機物之毒性試驗結果

依據 Russom *et al.*^[3]對毒性機制分類，可將本研究中的二十種有機物，分為七種 Non polar narcosis，四種 Polar narcosis，和九種反應性機制之有機物。本研究將這二十種有機物分別進行鯉魚 (*Cyprinus carpio*) 及海洋螢光菌 (*Photobacterium phosphoreum*) 之生物試驗外，另外加入這二十種有機物在本研究室過去已建立的「48 小時密閉式 BOD 瓶藻類毒性試驗」毒性數據，並蒐集非密閉型批次式月芽藻(本文後續將以"批次式月芽藻"代稱)、四十八小時水蚤 (*Daphnia magna*)及九十六小時 Fathead minnow 之急毒性文獻數據，共六種生物的試驗方法，其各毒性數據之結果如表 5.1.1 所示。表中顯示有八個毒性數據無法從文獻中取得，但由於進行多變量分析時需要有數值才能進行完整的統計分析，因此含底線之毒性數據為使用 ECOSAR 來預測之毒性數據。

由於本研究室所進行的月芽藻毒性試驗法是在密閉的 BOD 瓶中與毒化物進行反應，與文獻中所採用的實驗方法不同。為了比較密閉式月芽藻與批次式月芽藻這兩種不同的試驗方法所測得之毒性結果是否具相關性，因此將表 5.1.1 中各生物試驗毒性反應終點 $EC_{50}(mg/L)$ 值在進行單位轉換後，取 $\log(1/EC_{50}(M))$ 值進行 Spearman 相關分析(不包含預測之毒性值)，如圖 5.1.1 分析結果顯示相關係數 (R^2) 值僅有 0.494 ($p=0.007$, $n=13$)，表示雖然此兩種試驗方法同樣是以月芽藻為試驗物種，但兩試驗方法間僅具中度之相關性，且由表 5.1.1 中觀察兩者間之毒性數據可發現，本研究室所發展的藻類試驗方法的確較文獻上所採用之標準方法為敏感，毒性結果最大可差至 40 倍，推測主要原因在於本研究所選擇之二十種有機物多為揮發或半揮發性有機物質，然而在文獻中所採用的標準方法多為開放式的批次試驗法，或是密閉式空間但仍有 headspace，造成有機物在試驗期間

揮發；反之，本實驗室所發展的試驗方法是在密閉式的 BOD 瓶中進行反應，因此可有效降低有機物的揮發，而不至於低估毒性結果。

同樣也進行鯉魚與 Fathead minnow 毒性結果之 Spearman 相關性比較，如圖 5.1.2 分析結果顯示相關係數(R^2)值高達 0.960($p < 0.001$, $n=20$)，表示此兩種魚類試驗法具高度的相關性。Mayer *et al.* [37] 同樣進行物種間相關性之比較，其結果顯示鯉魚與彩虹鱒(Rainbow trout)之相關係數(R^2)值僅有 0.78，但鯉魚與 Fathead minnow 之相關係數(R^2)值卻高達 0.96，顯示這兩種魚類具良好的相關性，此結果與本研究之結果相符合。

為了瞭解這二十種有機物其毒性對於六種生物試驗法間敏感度的大小，本研究參考了 Toussaint *et al.* [38] 所提出的排序方法(The ranking procedure)，並將其方法稍作修改，以進行敏感度大小的分析，方法如下：分別將每一個有機物對應於所有毒性試驗生物測得的毒性結果進行排序，將最不敏感的試驗生物給予最小的數值 1；給予最敏感的生物最高的數值 6 (本研究試驗生物方法有六種)，依此類推；最後將每種試驗生物對應所有有機物得到的排序值(Rank)進行平均，其平均值越大表示生物的敏感性越高。圖 5.1.1 為生物試驗方法敏感性分析結果，由此分析方法可發現本研究室建立的密閉式月芽藻試驗方法，對於這二十種有機物最具敏感性；其次為 *Daphnia magna* 四十八小時的急毒性試驗；Microtox 為敏感性最差的試驗方法；而批次式月芽藻、鯉魚以及 Fathead minnow 這三種試驗法敏感性差不多。

圖 5.1.3 為有機物毒性大小的分析結果，分析的方法與上述方法相同。依據 Russom 對毒性機制的分類，將二十種有機物在圖中分成三個部分，並以不同形式的長條圖做區別：白色長條圖之有機物在分類上屬於 Non polar narcosis 的機制；斜線長條圖為 Polar narcosis 的機制；而黑色的部分屬於反應性的機制。此外，在這三個不同毒性機制區塊中之有機物，分別又以辛醇-水係數值($\log P$)的大小依小到大作排序。由結果可以觀察到，毒性最高之有機物為分類屬於反應性機制的 Pentachlorophenol；而屬於非極性麻醉機制的 Propionitrile 毒性最低，且其趨勢線顯示有機物之毒性有增強的趨勢，其原因與毒性機制之排序方式有關，因而可瞭

解到屬於反應性機制之有機物其毒性會較其他機制之有機物大。此外，可發現到除了非極性麻醉機制中的 Ethanol、極性麻醉機制中的 3-Chloroaniline 以及反應性機制有機物外，毒性會隨著 $\log P$ 值變大而上升，意即非反應性機制有機物的親脂性越大 ($\log P$ 值越大)，對生物體造成之毒性也越強；而反應性有機物也有這樣的趨勢，但較不明顯，其原因在於這些反應性有機物的毒性來源主要是會與生物體產生特殊的作用機制。

在廢水中，除了高毒性的化學物質會特別受到關注外，假若化學物質對試驗生物之毒性差異性較大時，在使用單一生物試驗評估廢水之危害性時，將造成廢水毒性低估的風險存在，因此，本研究針對這二十種有機物進行標準偏差(Standard Deviation)分析。在表 5.1.4 的標準偏差欄(St. dev.)之結果顯示，Ethanol、Aniline、3-chloroaniline、Acetaldehyde、Malononitrile、Parathion、Malathion，這七個有機物對生物造成之毒性結果具有較高的標準偏差，除了 Ethanol、Aniline 及 3-chloroaniline 外，其他四種反應性有機物皆對生物具特殊的作用機制，因而對生物造成的毒性影響本來就會有明顯的不同而使標準偏差值較大；Ethanol、Aniline 及 3-chloroaniline 屬於非反應性有機物，對生物不具特殊的作用機制，但還是可能對某些生物造成特殊的毒性抑制作用，使得標準偏差值也較大；至於剩下的十三個有機物對生物的造成之毒性影響不是都很高就是都很低，使得標準偏差值不會太高。此結果表示廢水中的化學物質種類和機制太複雜時，需要使用多種試驗生物來進行危害性的評估。因此，需進一步使用多變量分析法，來對本研究使用的六種生物試驗法進行分析，選擇能適當評估廢水危害性的"組生物"。

表 5.1.1 二十種有機物之毒性試驗數據

ID	Chemical	MOA	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>		<i>Daphnia</i> ^c	<i>Cyprinus carpio</i>	<i>Fathead minnow</i> ^d	Microtox	Average of Relative Toxicity Ranking
					<i>magna</i>				
			Closed-system ^a	Batch ^b	LC ₅₀ (mg/L)	LC ₅₀ (mg/L)	LC ₅₀ (mg/L)	EC ₅₀ (mg/L)	
	EC ₅₀ (mg/L)	EC ₅₀ (mg/L)							
1	Benzene	NP	15.77/6	29.00/[5](6)	59.60/[2](4)	69.50/[1](8)	33.50/[3](9)	32.88/[4](10)	7.17
2	Toluene	NP	14.19/[5](7)	29.00/[3](6)	22.60/[4](6)	85.52/[1](6)	42.3/[2](7)	13.01/[6](16)	8.00
3	Methylene chloride	NP	33.09/[5](2)	<u>45.41</u>	220.00/[4](3)	530.35/[2](3)	303.00/3	919.00/[1](3)	2.80
4	1,3-dichloropropane	NP	19.93/[6](4)	60.10/[5](3)	280.00/[1](2)	144.10/[2](4)	131.00/[3](4)	94.69/[4](7)	4.00
5	Pentachloroethane	NP	5.61/[6](13)	80.30/1	8.00/[4](9)	9.38/[3](12)	7.53/[5](14)	21.04/[2](11)	10.00
6	Ethanol	NP	16.86/5	<u>209.25</u>	9248/[3](1)	8390/[4](1)	14200/[2](1)	41089/1	1.80
7	Propionitrile	NP	127.72/[4](1)	<u>123.87</u>	<u>535.29</u>	2334/2	1520/[3](2)	8253.8/[1](2)	1.4
8	Aniline	P	26.03/[4](3)	41.00/[3](5)	0.08/[6](17)	74.53/[2](7)	75.50/[1](5)	16.50/[5](14)	8.50
9	3-chloroaniline	P	9.48/[5](11)	26.90 [#] /[1](8)	0.10/[6](16)	22.78/[2](10)	13.40/[3](11)	11.62/[4](17)	12.17
10	Phenol	P	10.90/[6](10)	58.00/[1](4)	12.00/[5](8)	28.08/[3](9)	34.30/[2](8)	17.60/[4](13)	8.67
11	2-chlorophenol	P	8.63/[4](12)	70.00/[1](2)	2.60/[6](12)	7.70/[5](13)	9.41/[3](12)	15.01/[2](15)	11.00
12	Pentachlorophenol	OPU	0.007/[6](20)	0.31/[3](13)	0.68/[1](14)	0.052/[5](20)	0.099/[4](20)	0.54/[2](20)	17.83
13	2,4-dinitrophenol	OPU	0.94/[6](16)	10.90/[2](9)	4.10/[4](11)	3.89/[5](15)	6.58/[3](15)	19.03/[1](12)	13.00
14	Acetaldehyde	EP	0.017/[5](19)	<u>27.92</u>	48.25/[3](5)	95.26/[2](5)	43.1/[4](6)	308.63/[1](4)	7.80
15	Glutaraldehyde	EP	3.04/[5](14)	1.80/[6](11)	14.60/[1](7)	12.94/[2](11)	11.60/[3](12)	4.56/[4](19)	12.33
16	2,3-dinitrotoluene	EP	0.79/[5](18)	1.37/[4](12)	0.66/[6](15)	1.68/[3](17)	1.80/[2](16)	6.44/[1](18)	16.00
17	Chloroacetonitrile	RI	11.45/[2](9)	<u>54.11</u>	5.23/[3](10)	3.01/[4](16)	1.35/[5](18)	142.39/[1](6)	11.80
18	Malononitrile	RI	12.40/[2](8)	<u>5.87</u>	0.93/[4](13)	0.96/[3](19)	0.56/[5](19)	235.00/[1](5)	12.80
19	Parathion	AI	0.93/[4](17)	<u>1.41</u>	0.0014/[5](19)	1.27/[3](18)	1.40/[2](17)	35.57/[1](9)	16.00
20	Malathion	AI	1.73/[5](15)	2.14/[4](10)	0.002/[6](18)	6.95/[3](14)	14.10/[2](10)	67.81/[1](8)	12.50
Average of Relative Sensitivity Ranking			4.80	3.00	3.89	2.85	3.00	2.35	

-MOA= mode of action, [] : Relative sensitivity ranking value, () : Relative toxicity ranking value, __ (underline) : Toxicity value predict from ECOSAR

-^a. Data from lab,

-^b. Data from QSAR Toolbox 2.1, ([#] : Data from Villem Aruoja^[39]),

-^c. 48 hour LC₅₀ Data from QSAR Toolbox 2.1

-^d. 96 hour LC₅₀ Data from QSAR Toolbox 2.1

表 5.1.2 二十種有機物毒性數據平均值與標準偏差

Chemical	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>		<i>Daphnia magna</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	<i>Fathead minnow</i>	Microtox	Average toxicity	St.dev.
	Closed-system Log(1/EC ₅₀)	Batch Log(1/EC ₅₀)	Log(1/EC ₅₀)	Log(1/LC ₅₀)	Log(1/LC ₅₀)	Log(1/EC ₅₀)		
Benzene	0.695	0.430	0.117	0.051	0.368	0.367	0.339	0.232
Toluene	0.812	0.502	0.610	0.032	0.338	0.850	0.524	0.308
Methylene chloride	0.409	<u>0.272</u>	-0.413	-0.796	-0.552	-1.034	-0.309	0.597
1,3-dichloropropane	0.753	0.274	-0.394	-0.106	-0.064	0.077	0.090	0.393
Pentachloroethane	1.557	0.401	1.403	1.334	1.429	0.983	1.185	0.430
Ethanol	0.437	<u>-0.657</u>	-2.303	-2.260	-2.489	-2.950	-1.423	1.629*
Propionitrile	-0.365	<u>-0.352</u>	<u>-0.988</u>	-1.627	-1.441	-2.176	-1.158	0.727
Aniline	0.554	0.356	3.066	0.097	0.091	0.752	0.819	1.130*
3-chloroaniline	1.129	0.676	3.106	0.748	0.979	1.041	1.280	0.911*
Phenol	0.936	0.210	0.894	0.525	0.438	0.728	0.622	0.282
2-chlorophenol	1.173	0.264	1.694	1.223	1.135	0.933	1.055	0.467
Pentachlorophenol	4.580	2.934	2.593	3.709	3.432	2.693	3.324	0.751
2,4-dinitrophenol	2.292	1.228	1.652	1.675	1.447	0.986	1.547	0.449
Acetaldehyde	3.413	<u>0.198</u>	-0.040	-0.335	0.009	-0.845	0.589	1.445*
Glutaraldehyde	1.518	1.745	0.836	0.889	0.936	1.341	1.211	0.379
2,3-dinitrotoluene	2.363	2.124	2.441	2.035	2.005	1.452	2.070	0.350
Chloroacetonitrile	0.819	<u>0.145</u>	1.159	1.399	1.748	-0.276	0.922	0.638
Malononitrile	0.727	<u>1.051</u>	1.851	1.838	2.072	-0.551	1.156	0.905*
Parathion	2.496	<u>2.315</u>	5.318	2.360	2.318	0.913	2.496	1.393*
Malathion	2.281	2.189	5.218	1.677	1.370	0.688	2.237	1.572*

EC₅₀、LC₅₀ Unit : mM

St.dev : Standard Deviation, * : Higher St.dev

__(underline) : Toxicity value predict from ECOSAR

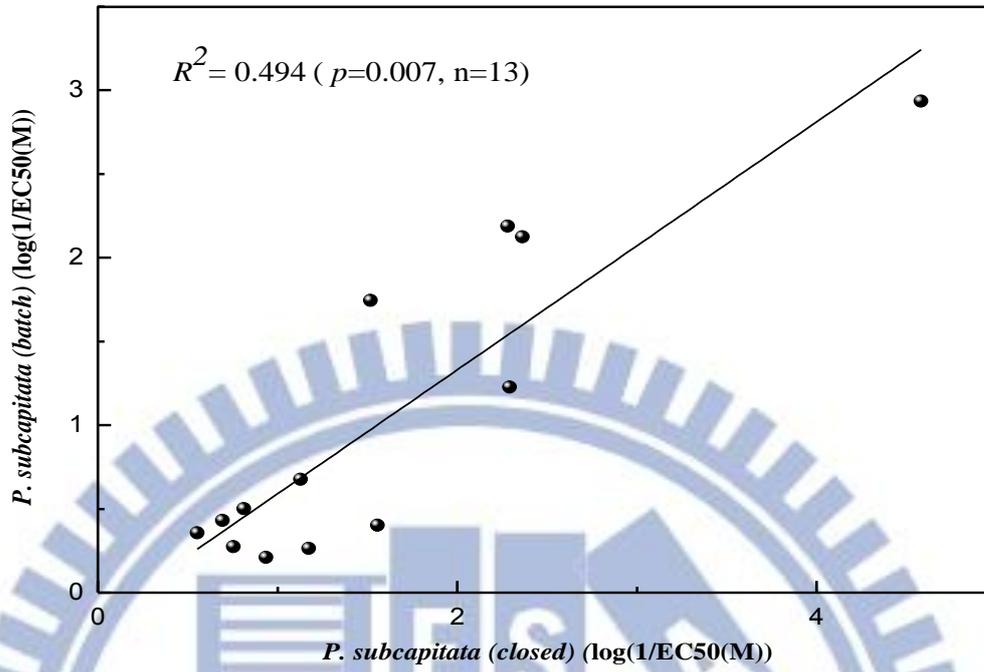


圖 5.1.1 密閉式月芽藻與批次式月芽藻試驗法相關性比較

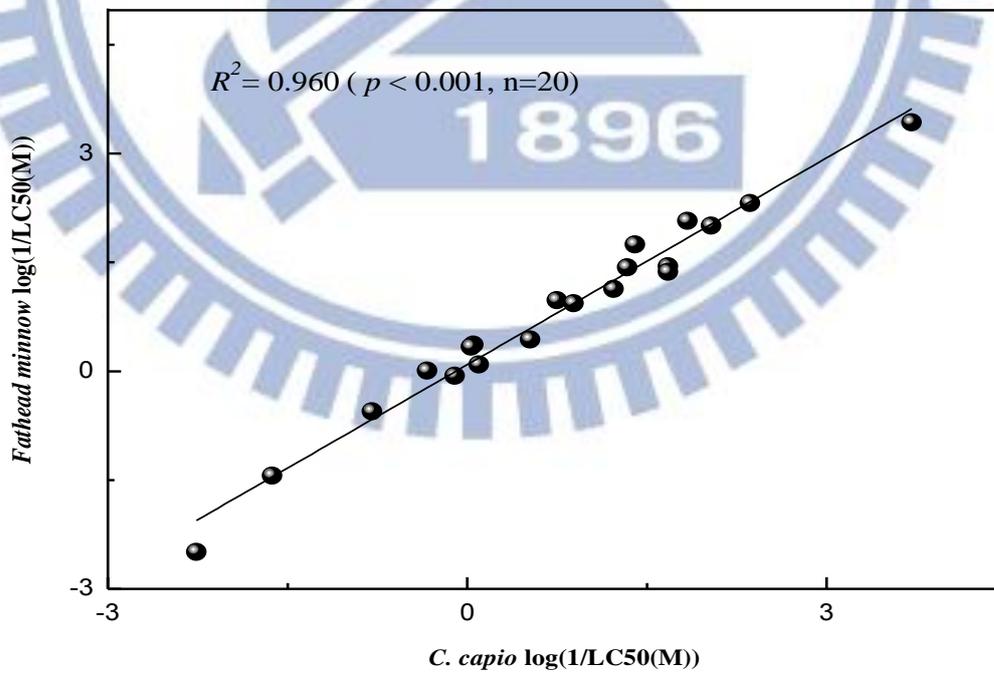


圖 5.1.2 鯉魚與 Fathead minnow 相關性比較

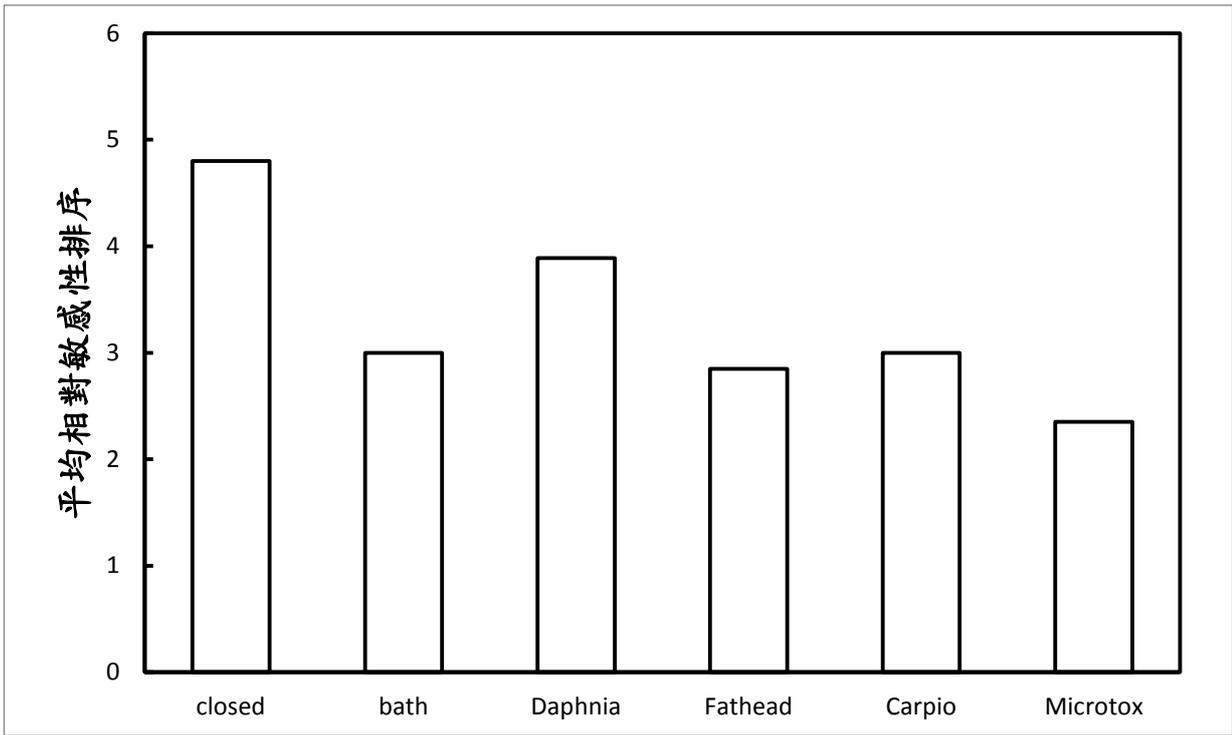


圖 5.1.3 生物試驗方法敏感性比較

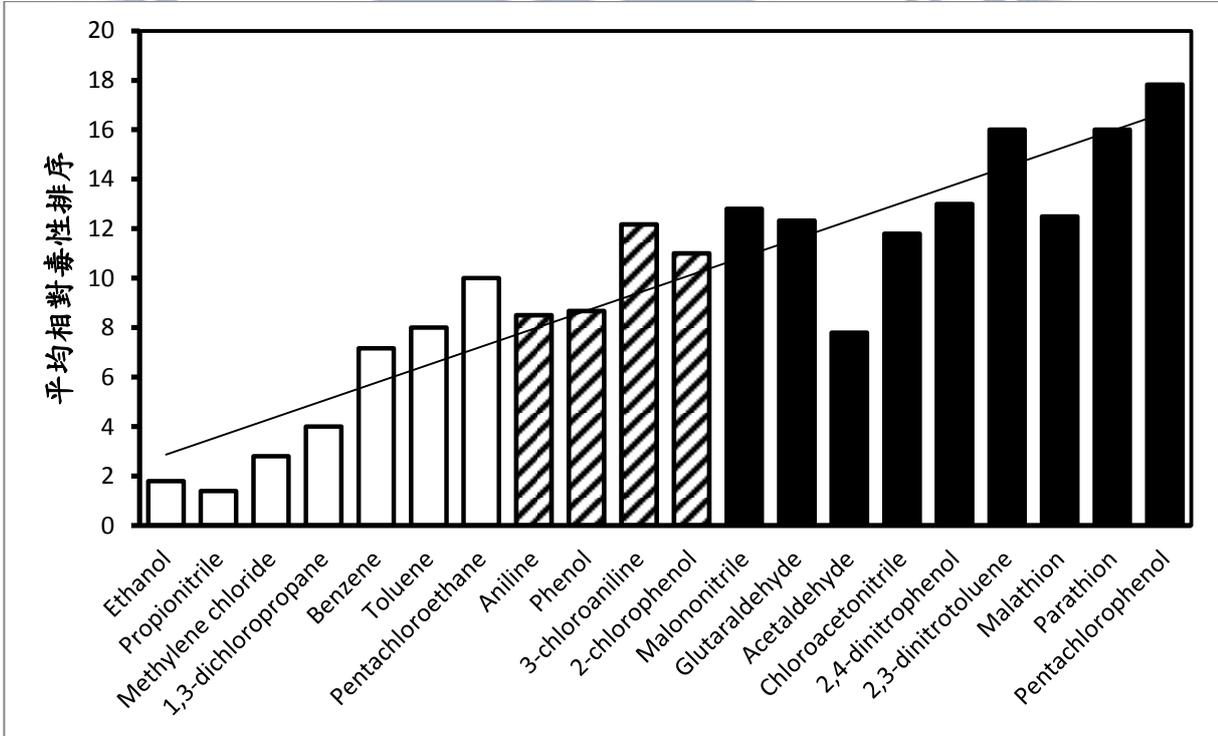


圖 5.1.4 有機物毒性大小比較

5.2 多變量統計分析

由於本研究在二十種有機物(共 120 個數據)之生物毒性數據文獻蒐集上，有八個數據無法取得，因此須利用較合理的手段來填補數據值，否則無法以多變量統計方法進行統計完整的分析。

本研究利用 ECOSAR 來預測無法直接由文獻上取得的毒性數據，並將結果直接呈現於表 5.1.2 中。由於本研究所使用的多變量分析法為主成分分析法和集群分析法，統計結果主要以圖來作呈現；為使統計圖能清楚表達統計結果，表 5.1.2 中的毒性數據之單位為由 $EC_{50}(\text{mg/L})$ 轉換為 $EC_{50}(\text{mM})$ 後，取其倒數 ($1/EC_{50}(\text{mM})$) 使數值與毒性大小呈正相關，並再將數值取 Log 以縮小級距。因此，毒性數據是以 $\log(1/EC_{50}(\text{mM}))$ 的形式來進行多變量統計分析。

5.2.1 群集分析(Cluster analysis)結果

本研究利用階層式(Hierarchical)集群分析將六種生物試驗法進行分類，方法上採用較被大家廣泛使用的華德法歐式距離平方 (Ward's method Squared Euclidean distances) 來進行分析。圖 5.2.1 為群集分析結果之樹狀圖，當華德歐式距離平方在 Linkage distance = 10 取切線(紅色切線)，生物試驗法被分為三個群集，其顯示密閉式月芽藻及 *Daphnia magna* 各自為獨立的一群，而批次式月芽藻、海洋螢光菌、鯉魚及 Fathead minnow 四種試驗方法自成一類。另外當切線取在 Linkage distance = 7.5 時(藍色切線)，則密閉式月芽藻、*Daphnia magna* 及海洋螢光菌獨自成群，而批次式月芽藻、鯉魚及 Fathead minnow 各自為獨立的一類，共四個群集，且可發現鯉魚與 Fathead minnow 之關係最為密切，此結果與鯉魚及 Fathead minnow 進行 Spearman 相關分析時，相關係數(R^2)值高達 0.960 相同顯示出此兩種魚類相關性較佳。兩種月芽藻試驗方法在分群的結果上明顯的不相同，批次式月芽藻反而與兩種魚類的試驗方法關係較為密切。由於群集分析法只能將生物試驗法進行分群而不能解釋分群的原因，因此需藉由主成分分析法來進行進一步的分析。

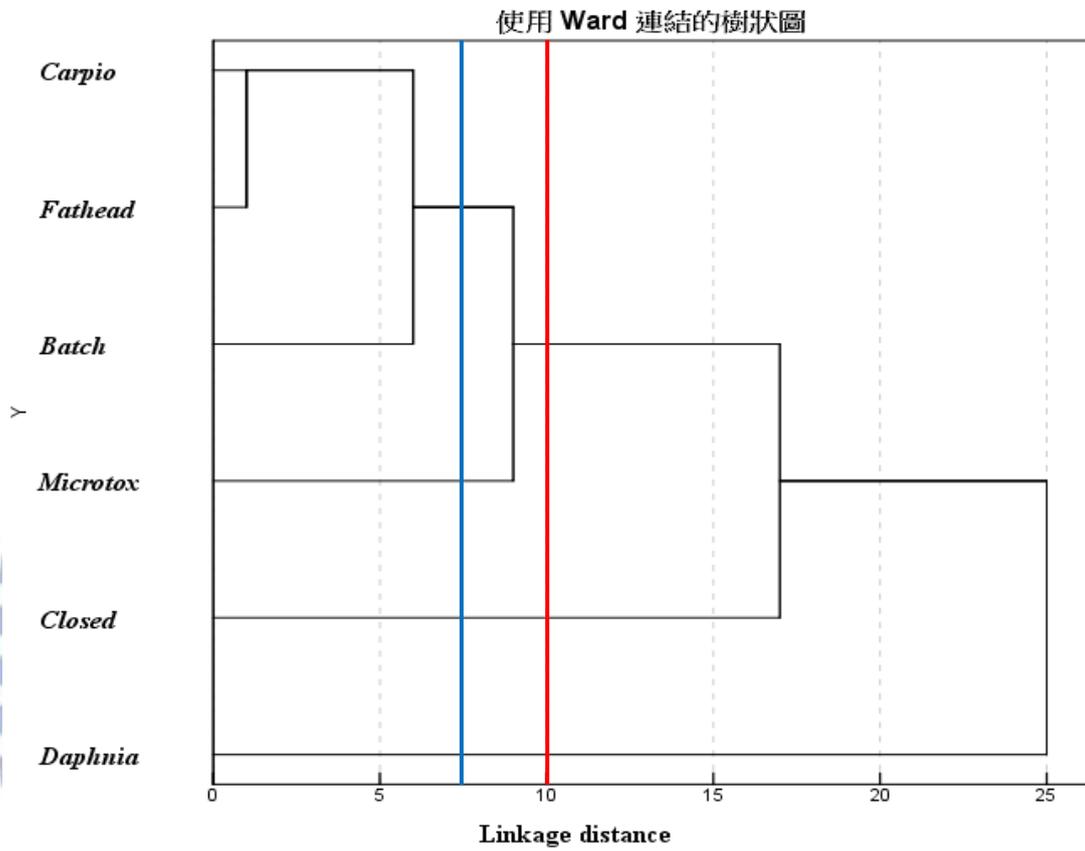


圖 5.2.1 試驗生物集群分析樹狀圖

5.2.2 主成分分析(Principle analysis)結果

各生物試驗之毒性數據在主成分統計分析上，本研究會分別以兩種模式進行分析與討論。第一種模式為選擇以生物試驗法作為觀察樣本(Object)，以有機毒物作為變數(Variable)進行分析，此模式討論的是「試驗物種對有機物之敏感性」，當有機物對試驗物種具特殊的抑制作用而毒性較高時，該生物會受此有機物(Variable)的影響而使得其主成分圖中的位置與其他生物區隔開來，相對的，試驗物種對有機毒物之毒性具相似的敏感性時，分析結果會將具相似敏感性的物種分配在相近的位置上。另外，第二種模式是選擇以有機毒物作為觀察值(Object)，而以生物試驗法作為變數(Variable)來進行主成分分析，此模式主要是探討「有機物對生物之毒性」，利用主成分分析之可用較少的變數去解釋原始資料中的大部分變異的功能，可將相關性高的變數(試驗物種)挑除，選擇具顯著性、成本低且操作方便的生物，因此過去文獻上在選擇合適的"組生物"物種時，大多以此模式進行分析與評估以下分別以兩種模式進行結果分析與討論：

一. 主成分分析- 試驗物種敏感性模式

表 5.2.1 為計算共變異係數矩陣所得之特徵值及解釋的變異量，為達到維度縮減的目的，選取特徵值大於 1 之主成分，共選取了 3 個主成分，總解釋變異量為 93%。圖 5.2.2 與圖 5.2.3 分別為第一主成分與第二主成分分析結果所得之成分分數圖與成分負荷圖。第一主成分以及第二主成分分別累積了 46.6% 以及 34.6% 的變異，兩個主成分所累積加總的解釋變異百分比高達 81.2%，顯示由該兩個主成分因子代表全部因子之情形時，僅有 19.8% 的變異被忽略。由成分分數圖(圖 5.2.2)可觀察到試驗生物的分群情形，第一主成分將 *Daphnia magna* 與其他五種生物試驗法作了明顯的區隔；第二主成分又將密閉式月芽藻個別獨立，因此在分群之結果上 *Daphnia magna* 與密閉式月芽藻自成獨立的一群；而批次式月芽藻、海洋螢光菌、鯉魚及 Fathead minnow 四種試驗方法被分作為一群，彼此間對有機物有較相似的敏感性，此分群結果與群集分析結果相符合。

將成分分數圖的生物試驗法與成分負荷圖(圖 5.2.3)之有機物分布位置相對應，可發現 Parathion、Malathion、Aniline 及 3-Chloroaniline 在第一主成分上具較高的負荷量。查詢文獻得知 Parathion 及 Malathion 皆屬於有機磷類的殺蟲劑，其特殊的作用機制為抑制生物體內的乙醯膽鹼酯酶(Acetylcholinesterase, AChE)，而失去破壞乙醯膽鹼 (acetylcholine, Ach) 的能力，從而造成節肢動物與甲殼類動物神經失常而中毒死亡；Aniline 及 3-Chloroaniline 在過去的文獻中皆指出這兩個苯胺類的有機物對水蚤類之生物有特別的毒性影響，Manon Vaal *et al.* [40] 在其研究中推測苯胺類有機物的毒性來源為經過生物代謝後的產物，而水蚤比其他生物更能代謝苯胺類有機物，使其氧化為更具毒性的產物而具較高的毒性；以上文獻資料顯示出此四種在第一成分軸上具較大負荷量之有機物對 *Daphnia magna* 有明顯的抑制作用，因此第一主成分在意義上是與 *Daphnia magna* 的敏感性有關。另外，第二主成分則顯示出 Ethanol 及 Acetaldehyde 對密閉式月芽藻有明顯的抑制作用。從毒性數據(表 5.1.1)中可觀察到 Ethanol 對密閉式月芽藻所造成的毒性的確比其他生物高出很多，Tsai [18] 指出 Ethanol 會嚴重抑制藻類之光合作用而對藻類具特殊的抑制作用；同時，這也解釋了屬於非極性麻醉的 Ethanol，標準偏差數值很高之原因。而 Acetaldehyde 之毒性試驗結果在過去實驗室的研究中顯示，以密閉式月芽藻進行毒性試驗總是較其他試驗物種具敏感性，其原因可能與 Acetaldehyde 具高揮發性有關(表 4.2.1)，但密閉式月芽藻試驗法較不會受有機物揮發的影響而造成毒性被低估，以上顯示第二主成分在意義上是與密閉式月芽藻之敏感性有關。

圖 5.2.4 與圖 5.2.5 分別為第二主成分與第三主成分分析結果所得之成分分數圖與成分負荷圖。第三主成分個別占了 11.7% 的變異量。由成分分數圖中可發現(圖 5.2.4)原本在分群位置上較接近的鯉魚、Fathead minnow 與海洋螢光菌，於第三主成分座標軸上有了明顯的對立區隔，對應成分負荷圖(圖 5.2.5)後得知，為 Chloroacetonitrile 與 Malononitrile 這兩個有機物造成生物之分群情形改變。Chloroacetonitrile 與 Malononitrile 在毒理機制分類上屬反應性有機物，具呼吸抑

制(respiratory inhibition)之特殊作用機制，因此對魚類造成的毒性影響較藻類及海洋螢光菌高。

此分析模式結果顯示，第一、第二及第三主成分分別是由幾種對 *Daphnia magna*、密閉式月芽藻及魚類具特別抑制的有機物所組成，由於主成分間彼此是正交(Orthogonal)不具相關性的，因此當需要利用生物來評估毒性時，所需要的生物應選擇幾個對上述三個主成分中包含的有機物具特別敏感性的試驗物種。

二. 主成分分析-有機物對生物之毒性模式

此模式為過去研究文獻在選擇"組生物"所使用的主成分分析模式。表 5.2.2 為此模式分析所得之特徵值及解釋的變異量，共選取了 2 個主成分(特徵值大於 1)，分別各解釋了 78.4%以及 10.8%的總變異，總解釋變異量已高達 89.2%。圖 5.2.6 與圖 5.2.7 分別為第一主成分與第二主成分分析結果所得之成分分數圖與成分負荷圖。由成分分數圖(圖 5.2.7)第一主成分軸上，可觀察到位於軸右側的幾個反應性有機物，如 Pentachlorophenol、2,3-Dinitrotoluene、Parathion 及 Malathion 等，在有機物毒性大小排序圖中(圖 5.1.4)顯示對生物具較高的毒性；位於軸左側之非極性麻醉性有機物 Ethanol、Propionitrile 及 Methylene chloride 則顯示具較低的毒性。此結果顯示第一主成分呈現由左而右毒性越來越大之趨勢，在意義上為有機物隨其毒性對生物之大小作分布的情形有關，這也使得在主成分負荷圖中(圖 5.2.6)所有生物占的負荷數值都是正的，表示這二十種有機物對這六種試驗法造成的毒性影響趨勢是相同的。第二主成分則將 *Daphnia magna* 與其他五種生物試驗法分隔開，原因與物種敏感性模式分析之結果相符，Parathion、Malathion、Aniline 及 3-Chloroaniline 四種有機物對 *Daphnia magna* 有明顯的抑制作用；密閉式月芽藻在第二主成分中又比其他四種試驗法有更高的負荷值，此情形可從第二與第三主成分之成分分數圖與成分負荷圖(圖 5.2.8 與圖 5.2.9)中觀察到更明顯的分群情形，其顯示出密閉式月芽藻特別對 Ethanol 及 Acetaldehyde 具敏感性，並可觀察到海洋螢光菌、鯉魚及 Fathead minnow 在分群結果上並不隨

成分改變而變化，與敏感性模式結果不同，而批次式月芽藻則位於第二與第三主成分負荷軸中心位置，對評估這二十種有機物之毒性危害似乎不具明顯的重要性。

此模式之分析結果顯示，有機物於第一主成分軸上之分布情形與其毒性大小有關；具高負荷值的密閉式月芽藻與低負荷值的 *Daphnia magna* 為第二主成分中兩大重要的成分變數；而海洋螢光菌、鯉魚及 Fathead minnow 在分群結果上較為相近，並不隨成分改變而變化。

表 5.2.1 主成分分析-共變異矩陣之特徵值及解釋的變異量

主成分	特徵值	解釋變異量(%)	總解釋變異量(%)
1	6.9633	46.6	46.6
2	5.1754	34.6	81.2
3	1.7549	11.7	93.0
4	0.9534	6.4	99.4
5	0.0930	0.6	100
6	0.0000	0.0	100

表 5.2.2 主成分分析-共變異矩陣之特徵值及解釋的變異量

主成分	特徵值	解釋變異量(%)	總解釋變異量(%)
1	8.9546	78.4	78.4
2	1.2346	10.8	89.2
3	0.6371	5.6	94.8
4	0.4056	3.5	98.3
5	0.1751	1.5	99.8
6	0.0178	0.2	100

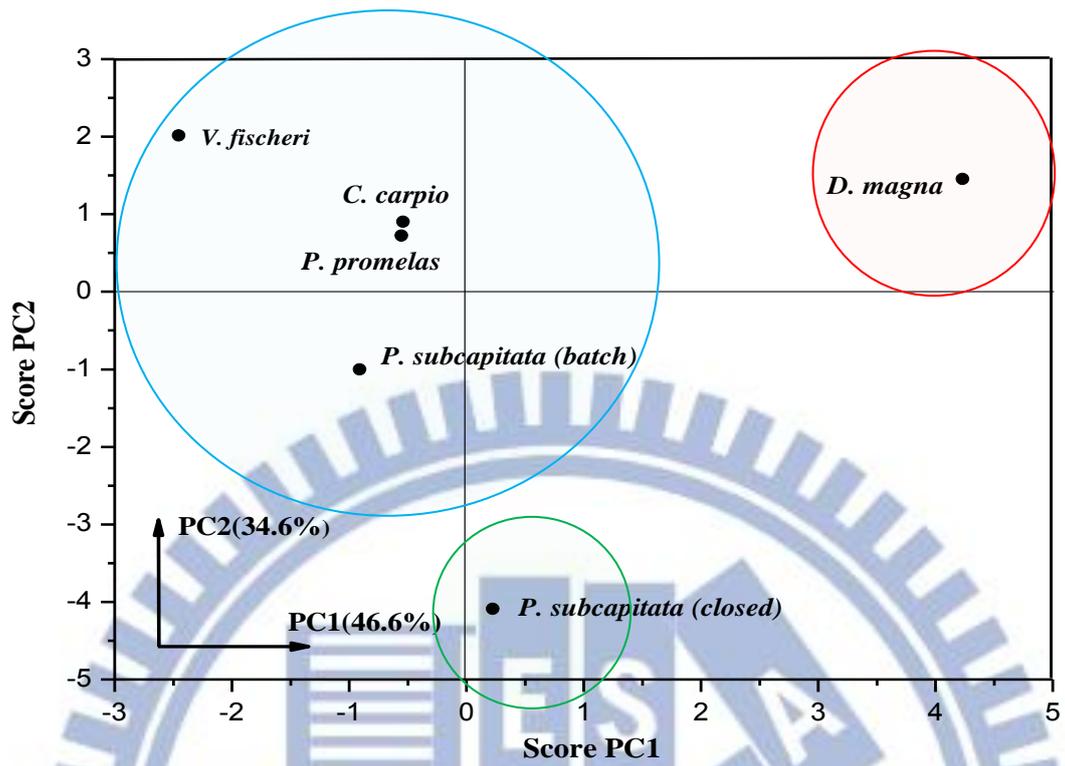


圖 5.2.2 敏感性模式:第一及第二主成分之主成分分數圖(小樣本)

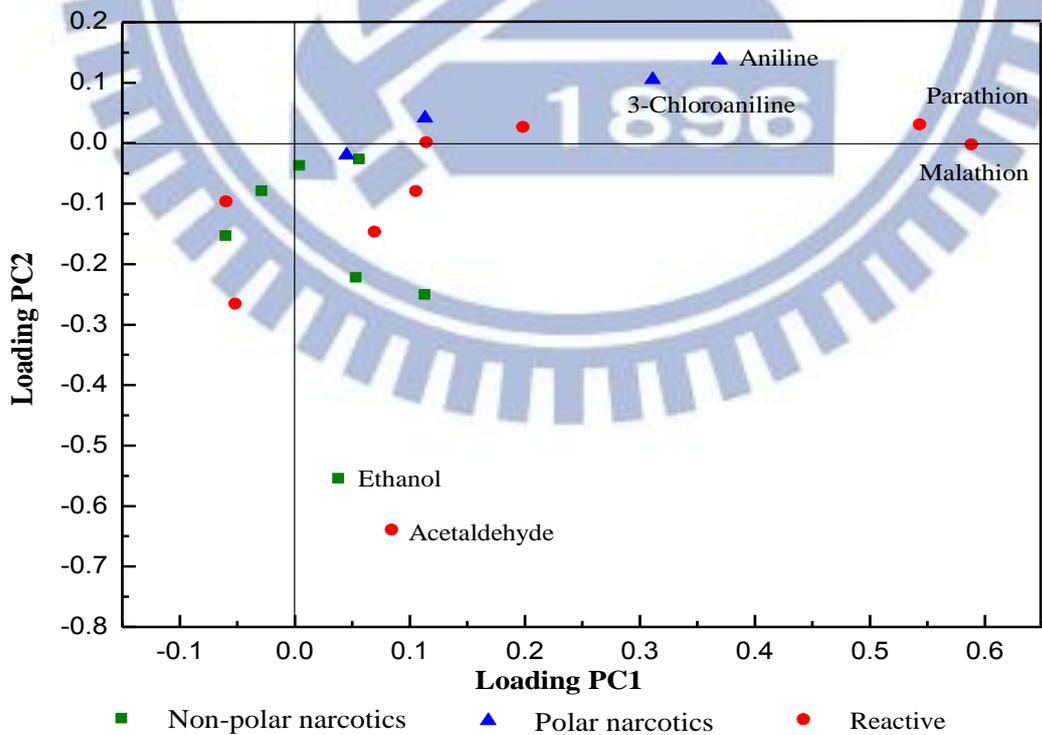


圖 5.2.3 敏感性模式:第一及第二主成分之主成分負荷圖(小樣本)

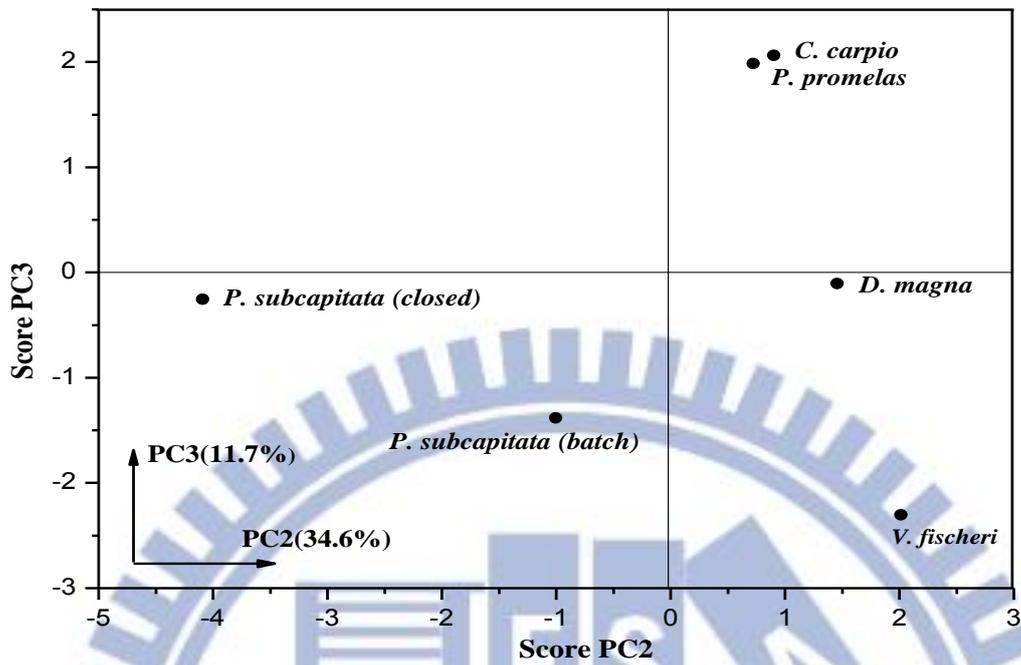


圖 5.2.4 敏感性模式: 第二及第三主成分之主成分分數圖(小樣本)

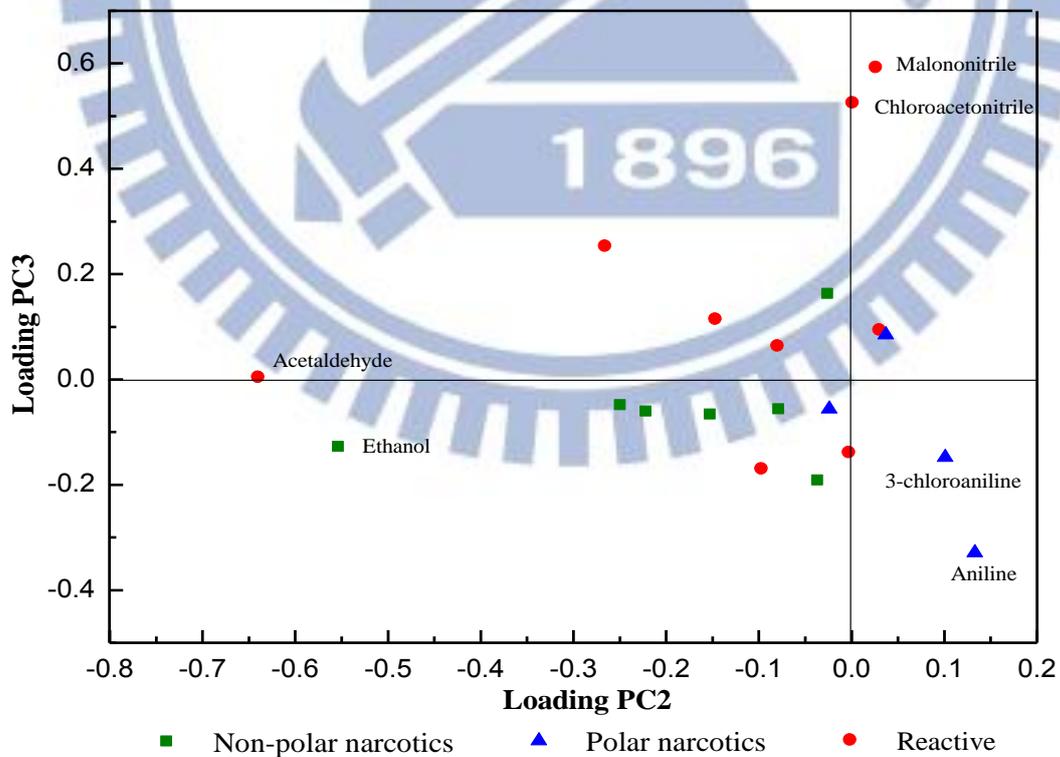


圖 5.2.5 敏感性模式: 第二及第三主成分之主成分負荷圖(小樣本)

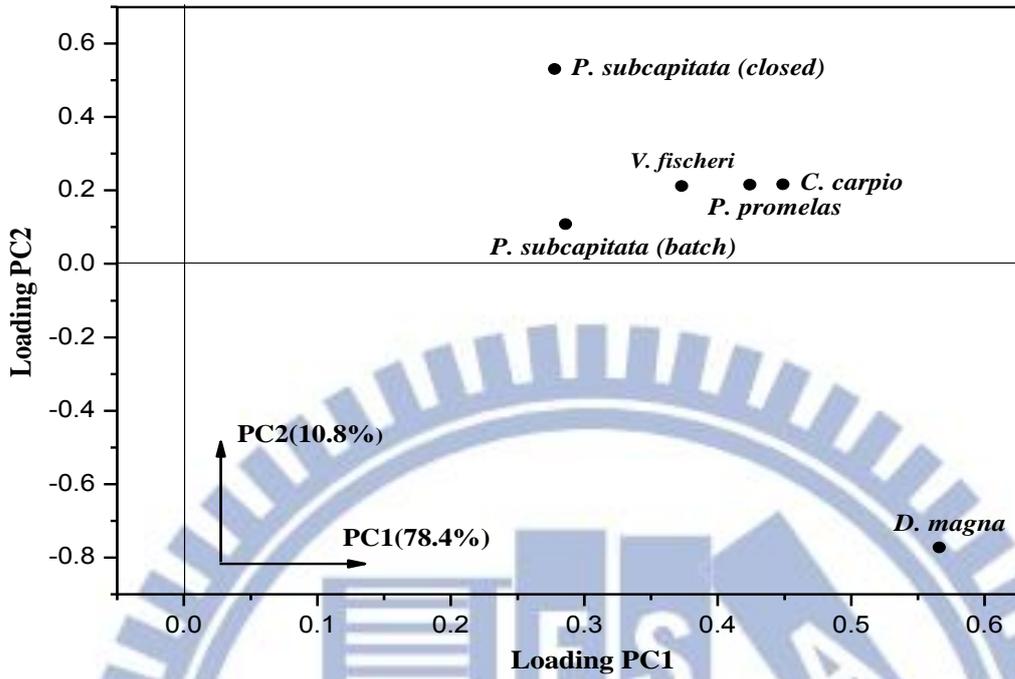


圖 5.2.6 毒性模式:第一及第二主成分之主成分負荷圖(小樣本)

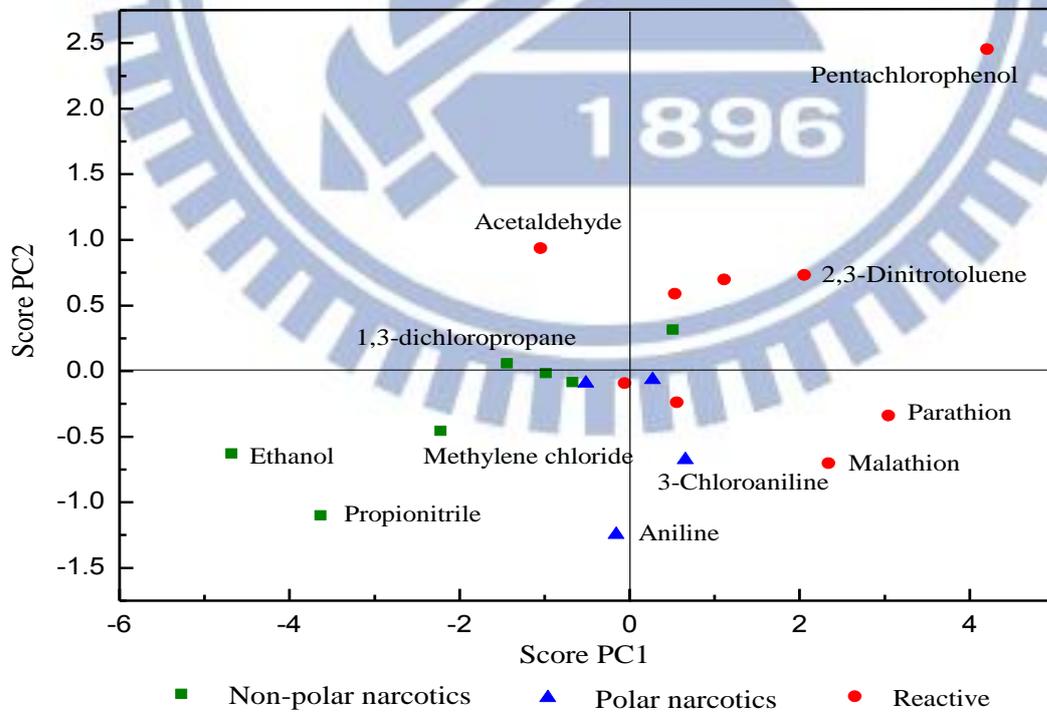


圖 5.2.7 毒性模式:第一及第二主成分之主成分分數圖(小樣本)

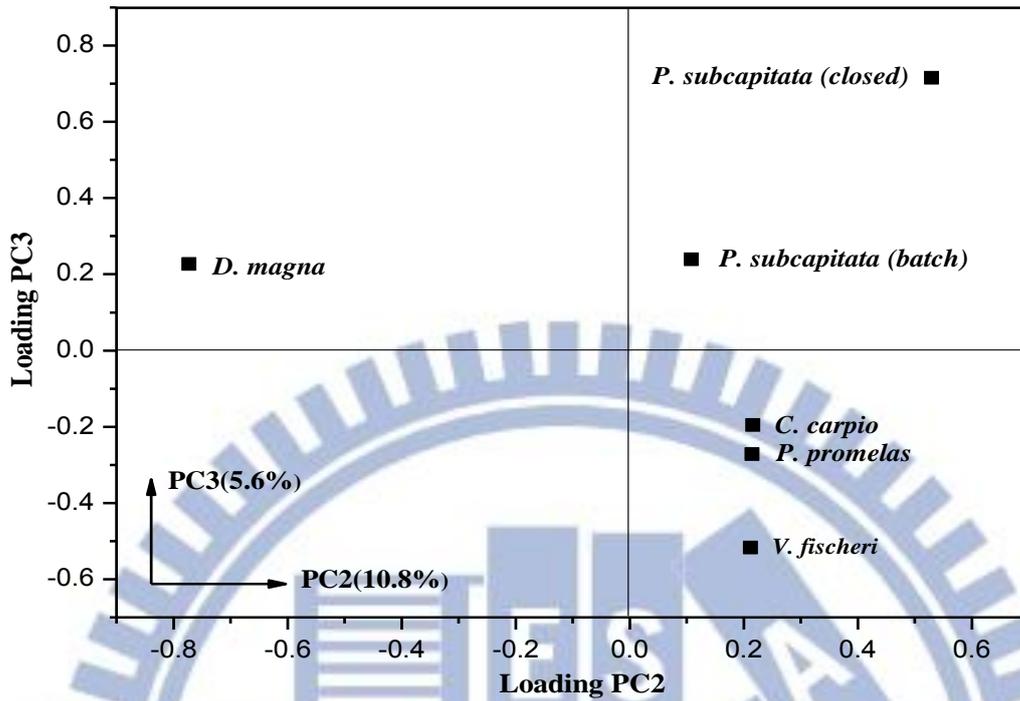


圖 5.2.8 毒性模式：第二及第三主成分之主成分負荷圖(小樣本)

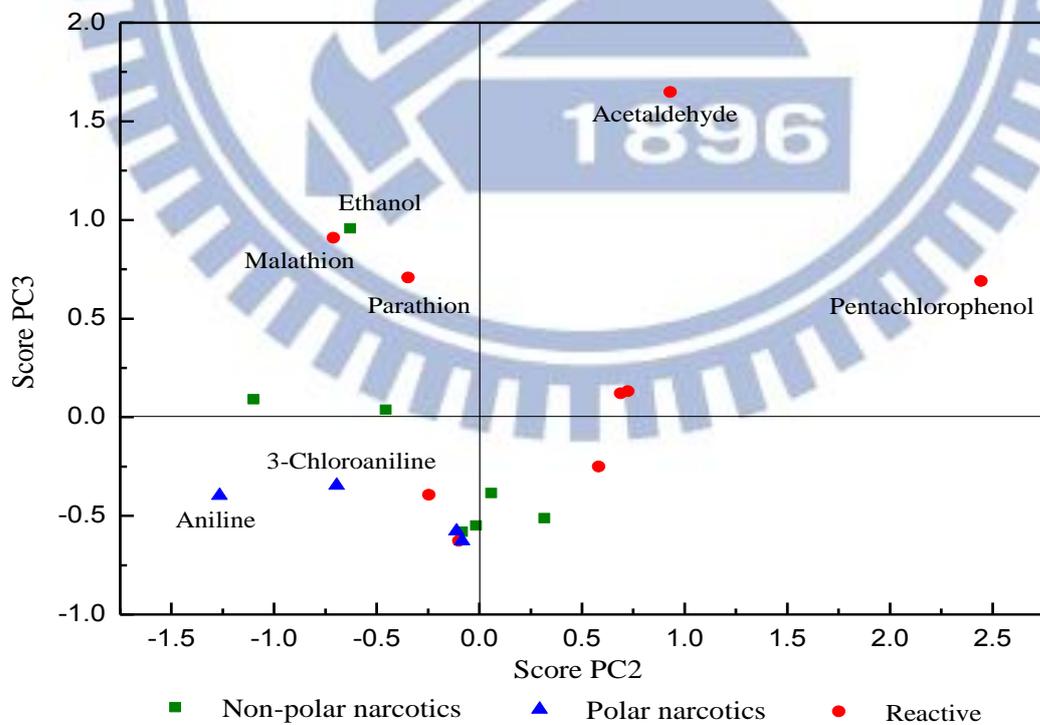


圖 5.2.9 毒性模式：第二及第三主成分之主成分分數圖(小樣本)

5.3 選擇"組生物"物種

由多變量分析結果得知，*Daphnia magna* 與密閉式月芽藻為個別獨立的不同群體，而批次式月芽藻、海洋螢光菌、鯉魚及 Fathead minnow 被分作為較相關的一群，其中鯉魚與 Fathead minnow 在分群結果中相關性非常的高。主成分分析結果顯示 *Daphnia magna* 與密閉式月芽藻分別為主成分一、二之重要的生物變數，由於成分變數間是正交獨立的，顯示出 *Daphnia magna* 與密閉式月芽藻毫無相關性，無法用來取代彼此。表 5.3.1 為 Spearman 兩變數間之相關係數分析，兩種月芽藻試驗方法之相關係數僅有 0.598，僅具中度的相關性；*Daphnia magna* 與密閉式月芽藻相關性甚低($r = 0.458$)，此結果與多變量分析結果相符合，因兩者皆為主成分分析結果中的成分變數而彼此獨立，但 *Daphnia magna* 與另外四種試驗方法尚具相關性 ($r = 0.660\sim 0.757$)；鯉魚、Fathead minnow 兩者間具明顯地相關性($r = 0.980$)；海洋螢光菌則與其他試驗方法相關性上大致相同。

本研究同時考慮到群集分析、主成分分析及相關係數分析之結果，並且參考"組生物"試驗法在試驗物種挑選上的重點，選擇了以下幾種生物試驗法做為評估毒性危害之"組生物"：

- (1) 密閉式月芽藻
- (2) *Daphnia magna*
- (3) 海洋螢光菌 (或添加(4)鯉魚)

所選擇的生物包含了三種營養階層及四種不同種類的生物(植物、無脊椎甲殼類、魚類及菌類)。密閉式月芽藻屬於生產者的角色位於食物鏈之底層，其主成分分析中為重要的成分試驗物種之一，且為本研究六種生物試驗方法中最敏感的方法，敏感性較批次式月芽藻試驗法佳，故選擇其為"組生物"中之一員。*Daphnia magna*為初級消費者，與密閉式月芽藻相比較下，敏感性次之，且兩者同為主成分分析中重要的生物物種，但之間相關性甚低($r = 0.458$)，因此，當同時利用*Daphnia magna*與密閉式月芽藻來評估廢水危害性時，不會造成毒性結果

之冗餘。海洋螢光菌與兩種魚類試驗法在分群結果上較為密切，但將他們與 *Daphnia magna* 及密閉式月芽藻進行相關性比較可發現，海洋螢光菌與密閉式月芽藻和 *Daphnia magna* 之間的相關性，較魚類與密閉式月芽藻和 *Daphnia magna* 之間的相關性為低(前者相關係數(r)值分別為0.665與0.633；後者最高分別為0.687與0.826)，且海洋螢光菌與魚類試驗法比較下具試驗期間短、再現性佳、成本低且無須馴養等優點，故選擇海洋螢光菌取代兩種魚類試驗法為"組生物"之一員。唯獨海洋螢光菌為一商用之生物試驗法，可能在毒性評估上還無法被廣泛地接受。Castillo *et al.*^[12]曾指出在評估急毒性時魚類試驗法是一個很好的指標生物，但試驗所需之魚苗在取得及培養上，可能因魚苗在養殖場時就已受到感染，或魚苗無法適應新的水體環境等因素而無法控制，造成試驗上的困難。

一般而言，過去研究文獻在"組生物"試驗法中物種的選擇上並不會選擇多變量分析分群結果相同且具相關性的試驗生物，但本研究發現鯉魚、Fathead minnow與海洋螢光菌在主成分之「試驗物種之敏感性」模式分析結果顯示，Chloroacetonitrile與Malononitrile會對魚類造成特殊的抑制，使得原分群結果較相近的兩種魚類試驗法與海洋螢光菌於第三主成分上互相獨立。Dearden *et al.*^[41]在其研究中指出當毒性物質為麻醉性機制之有機物時，海洋螢光菌試驗法是一個可取代魚類試驗法的最佳測試方法；然而，對於反應性化學物質，若僅以海洋螢光菌來進行測試評估，將有明顯低估毒性風險之情形產生，因此當廢水含反應性有機物時，魚類試驗法不應被海洋螢光菌試驗法所取代，而是要作為"組生物"測試的一部分。因此，在考慮生物敏感性的差異下，"組生物"試驗法也應包含鯉魚試驗法。因此建議可在評估不同類型之廢水毒性危害時，可先同時進行鯉魚及海洋螢光菌的毒性試驗，如試驗結果顯示兩者之間具相關性時，即可利用海洋螢光菌試驗來代替鯉魚急毒性試驗；反之，則須將鯉魚及海洋螢光菌同時納入"組生物"試驗法中，以評估較完整的毒性危害程度。

圖 5.3.1 與圖 5.3.2 是利用密閉式月芽藻、*Daphnia magna* 及海洋螢光菌三種試驗生物當作變數進行主成分分析，來評估二十種有機物之毒性所得的主成分分數及成分負荷圖，第一與第二主成分總共解釋 91.4%的總變異量，顯示出

即使只用這三種生物來評估有機物之毒性，並不會造成任何毒性評估資訊的損失。因此，密閉式月芽藻、*Daphnia magna* 及海洋螢光菌是"組生物"試驗法合適的試驗生物。

表 5.3 六種試驗生物之 Spearman 兩變數間相關係數比較

Biotest	Closed	Bath	<i>D. magna</i>	Carpio	Fathead	Microtox
Closed	1					
Bath	0.598**	1				
<i>D. magna</i>	0.458*	0.713**	1			
Carpio	0.687**	0.768**	0.826**	1		
Fathead	0.674**	0.704**	0.770**	0.980**	1	
Microtox	0.665**	0.717**	0.633**	0.660**	0.630**	1

** .相關顯著水準 $p < 0.01$ (雙尾)

* .相關顯著水準 $p < 0.05$ (雙尾)

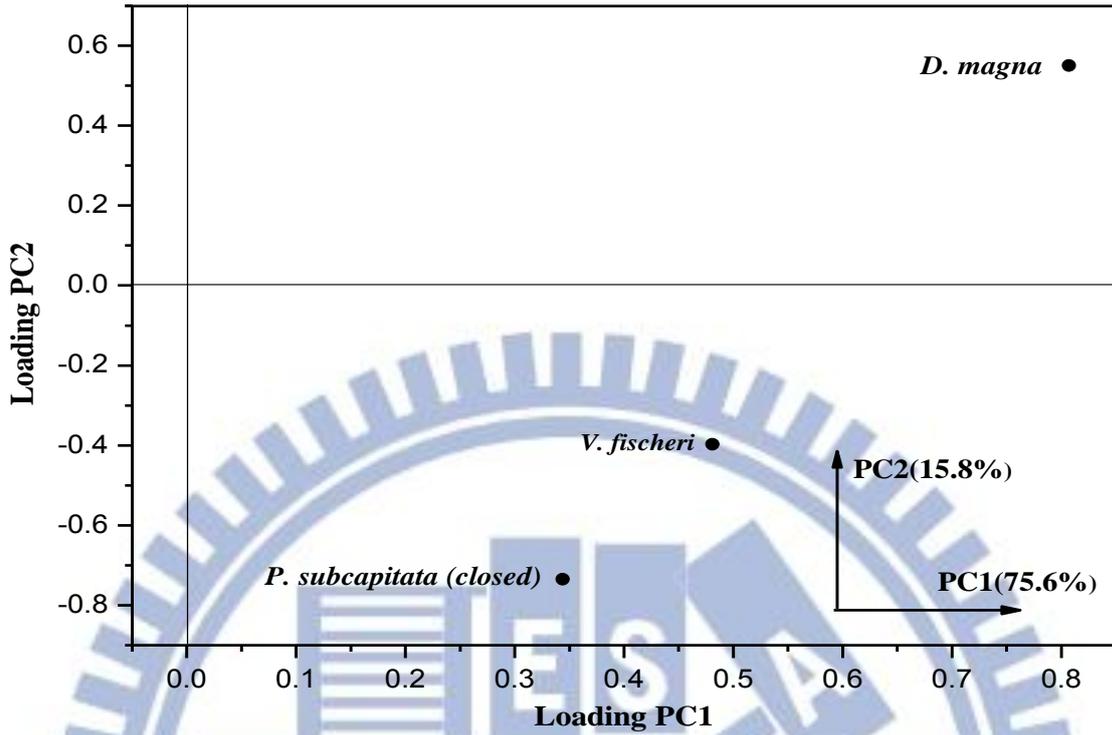


圖 5.3.1 組生物：第一及第二主成分之主成分負荷圖

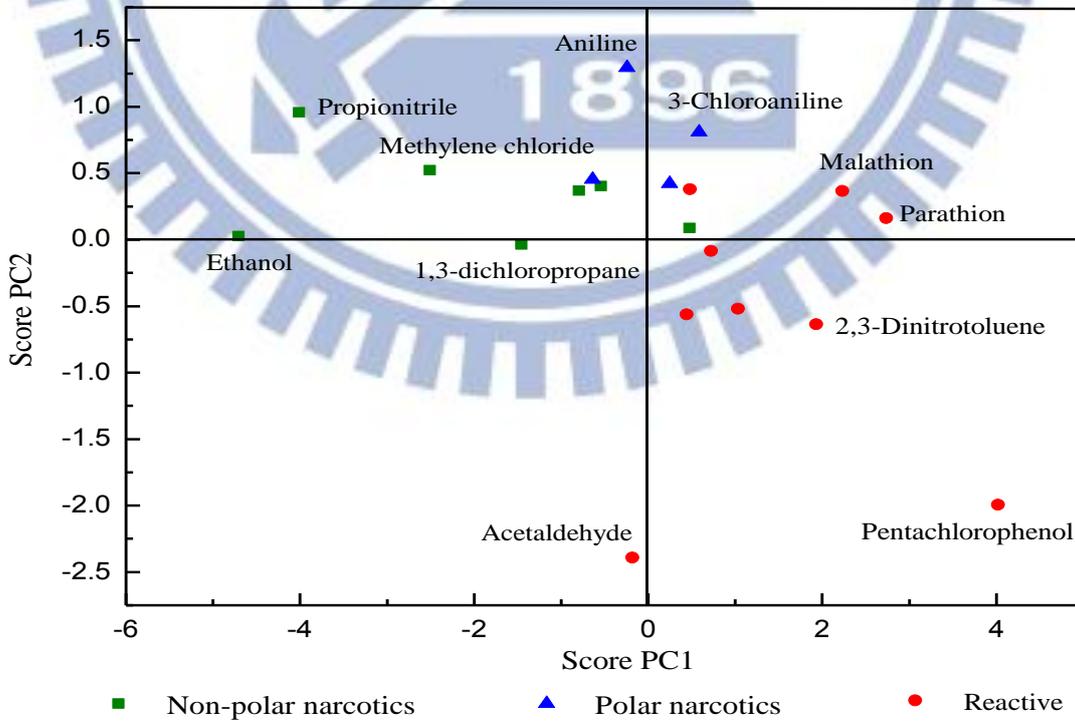


圖 5.3.2 組生物：第一及第二主成分之主成分分數圖

5.4 九十種有機物毒性分析結果

為避免實驗上所選擇之二十種有機物樣本數過小造成統計結果誤差、缺乏準確性，因此本研究於文獻上蒐集密閉式月芽藻、批次式月芽藻、*Daphnia magna*、Fathead minnow及海洋螢光菌五種生物試驗法對九十種有機物所測得之毒性數據，其中有機物包含四十一種非極性麻醉、二十種極性麻醉以及二十九種具四種特殊作用機制的反應性有機物。同樣進行多變量統計分析，比較小樣本與大樣本數之統計結果有無明顯的差異。由於利用鯉魚試驗法測得之毒性數據在文獻上較為缺乏，但從研究結果中發現鯉魚與Fathead minnow間的相關性甚高，因此使用Fathead minnow之文獻數據來取代鯉魚毒性數據的部分。表5.4.1為九十種有機物對五種試驗生物之毒性數據，同樣利用ECOSAR毒性預測程式來預測無法直接由文獻上取得的毒性數據。

5.4.1 群集分析結果

九十種有機物之毒性數據同樣是以階層式群集分析法將五種生物試驗法進行分群的動作，方法採用華德法歐式距離平方(Ward's method Squared Euclidean distances)法進行。圖 5.4.1 為群集分析結果之樹狀圖，分析結果顯示，生物分群的情形與以二十種有機物為觀察樣本下之分群情形相同，圖中顯示當華德歐式距離平方在 Linkage distance = 10 時取切線(紅色切線)，密閉式月芽藻及 *Daphnia magna* 獨自成一群，而批次式月芽藻、Fathead minnow 及海洋螢光菌三種試驗方法自成一類，其中批次式月芽藻與 Fathead minnow 的關係是較為密切的，且分析結果同樣顯示兩種月芽藻試驗方法在分群之結果上仍不相同。

5.4.2 主成分分析結果

九十種有機物之毒性數據同樣會分別以「試驗物種之敏感性」及「有機物對生物之毒性」兩種模式進行主成分分析，分析結果如下：

一. 主成分分析-試驗物種敏感性模式

表 5.4.1 共變異係數矩陣之特徵值及解釋的變異量，共選取了 3 個主成分，總解釋變異量為 87.6%。對應第一主成分與第二主成分之成分分數圖與成分負荷圖(圖 5.4.2 與圖 5.4.3)可發現，密閉式月芽藻獨自位於第一主成分軸之右側，其原因與密閉式月芽藻對 Methanol、Ethanol、Atrazine、Acetaldehyde、2,3,4,6-tetrachlorophenol 及 Pentachlorophenol 等有機物較具敏感性有關，其中 Methanol 與 Ethanol 同樣會抑制藻類之光合作用，因此對藻類具特殊的抑制作用；Atrazine 為一種除草劑，同樣會抑制藻類光合作用反應。另外，*Daphnia magna* 在第二成分軸中具較高的得分分數，其原因與 Parathion、Malathion 及 Fenthion 幾個具乙醯膽鹼酯酶抑制以及 Aniline、3-Chloroaniline 與 4-Chloroaniline 等苯胺類有機物對甲殼類動物較具特殊抑制作用有關。此外，海洋螢光菌位於第二成分軸之下方，對於 Benzoic acid、3-Chlorobenzoic acid 及 4-Bromobenzoic acid 三個有機酸物質較具敏感性，此結果可由第二主成分與三主成分之成分圖與負荷圖(圖 5.4.4 與圖 5.4.5)觀察到更明顯的情形。

二. 主成分分析-有機物對生物之毒性模式

表 5.4.2 為此模式分析所得之特徵值及解釋的變異量，共選取了 2 個主成分，總解釋變異量已達 88.4%。圖 5.4.6 與圖 5.4.7 為第一主成分與第二主成分之成分分數圖與成分負荷圖。生物在分群上之結果與群集分析結果相符，密閉式月芽藻與 *Daphnia magna* 分別位於第二成分軸之上、下兩方，獨自成群並彼此呈現負相關情形；而其他三種試驗方法位於軸之中間位置，自成一類。有機物的部分，

由成分分數圖(圖 5.4.7)可觀察到第一成分軸上是以有機物毒性大小來作排序的，位於第一主成分軸右側的 Hexachlorobenzene、Atrazine、Pentachlorophenol、2,3,4,6-tetrachlorophenol、Parathion、Malathion 及 Fenthion 等有機物對生物具較高的毒性；軸左側之 Ethanol、Methanol、Acetone、1-propanol、2-propanol、Acetonitrile 及 Propionitrile 等非極性麻醉有機物則毒性較弱。另外，第二成分軸則解釋了生物在分群上不同的原因，其原因與前面研究分析結果大致相同。

以九十種有機物進行主成分分析結果顯示，密閉式月芽藻與 *Daphnia magna* 為主成分中重要的兩個變數，且彼此互無相關性，此結果與本研究選擇的二十種有機物進行主成分分析時結果相同。

5.4.3 文獻結果比較

對於本研究所選擇出的"組生物"結果，與文獻結果進行比較與討論。Pandard *et al.* [42] 利用月芽藻、萵苣、兩種蚤類(*D. magna* 及 *C. dubia*)，蚯蚓和海洋螢光菌六種生物，對四十種不同類型之廢棄物進行毒性評估，並利用多變量統計分析選擇適合於有效評估這四十種廢棄物毒性之"組生物"。在"組生物"的選擇中包含了 *C. dubia*、萵苣及海洋螢光菌三種試驗生物，其中 *C. dubia* 為該研究中最具敏感性的物種，月芽藻次之；但作者並未選擇月芽藻為"組生物"的成員之一，原因在於月芽藻與 *D. magna* 及海洋螢光菌對四十種廢棄物之毒性具較相似的敏感性，並於主成分分析結果中顯示出三者分配於相近的位置上，此結果與本研究所進行之主成分分析結果皆相同顯示，批次式月芽藻與海洋螢光菌對毒性具有較相似之敏感性，因此作者也從中挑選了海洋螢光菌試驗法來取代月芽藻的生物試驗方法，其原因不外乎為海洋螢光菌試驗法較其他試驗法便利。然而，本研究結果卻顯示出月芽藻會因試驗方法(密閉式與非密閉式)的不同而對有機物之毒性及敏感性結果造成差異，使毒性有被低估的可能發生。

Renata *et al.* [10] 為了能有效評估環境中污染物之危害性，採集了市政廢水、工

業廢水等 15 種樣本，利用六種替代性生物試驗法 (包含商用的月芽藻、扇尾仙女蝦、輪蟲、*C.dubia*、纖毛蟲及海洋螢光菌)及三種標準毒性試驗方法(ISO：月芽藻、*D. magna* 及學名為 *Poecilia reticulata* 的魚種)進行毒性評估，並從中選取"組生物"試驗物種做為日後篩選毒性樣本之目的。其研究結果顯示月芽藻(ISO 標準方法)具較高的相對敏感性，而魚類(*Poecilia reticulata*)的相對敏感性最低，且主成分分析與試驗物種之相關係數比較結果顯示，月芽藻與 *D. magna* 於第一主成分中位置相互對立且相關係數極低，皆顯示出月芽藻與 *D. magna* 間不具任何相關性，以上二點皆與本研究相符合；該研究分析結果並無顯示出海洋螢光菌與月芽藻間具相似的敏感性，但卻發現海洋螢光菌具與其他試驗生物有不同的敏感性模式，在污染物的毒性試驗上有不同的分析結果，且於第三主成分中與其他試驗生物有明顯的區隔，為重要的試驗生物之一，在毒性分析上為不可忽略的生物試驗方法，故作者在"組生物"的選擇上挑選了月芽藻、扇尾仙女蝦及海洋螢光菌，其中扇尾仙女蝦與標準試驗方法中的 *D. magna* 同為甲殼類動物，並且在該研究中與 *D. magna* 具高度的相似性，乃因扇尾仙女蝦在實驗操作上較具便利性，故取代 *D. magna* 為組生物成員之一，此外"組生物"中並不包含較高等的魚類生物，主因為魚類試驗方法較不具敏感性外，現今的趨勢通常都用較低營養階層的生物來推估污染物對魚類所造成的毒性。

Fochtman *at el.* [6] 為了評估農藥對水生生態環境所造成的危害影響，將十三個被廣泛使用的農藥(殺蟲劑、殺菌劑、除草劑)作為樣本，並使用兩種藻類(月芽藻、柵藻)、*D. magna*(標準急毒性試驗、商用急毒性試驗、慢毒性、螢光試驗及餵食抑制)、扇尾仙女蝦、四膜蟲及兩種魚類(鯉魚及 rainbow trout)來進行生物試驗，並選出適合的"組生物"來有效評估農藥對環境造成的危害。月芽藻與 *D. magna* 間的極低相關性在該研究中也可以觀察的到，並且可以發現到五種不同技術的 *D. magna* 毒性試驗法與同為甲殼類動物的扇尾仙女蝦，在主成分分析及 Pearson 相關係數分析所得到的結果皆顯示具極高的相似性，也說明了利用多變量分析法來選擇"組生物"的適切性。作者所選擇的"組生物"包含了月芽藻、*D. magna* (螢光試驗法)、四膜蟲以及 rainbow trout，其中雖然柵藻與月芽藻在分析上具高相關性，

但柵藻與其他試驗生物間的相關性較月來藻與其他試驗生物間為高，故作者選擇月芽藻作為兩者間的代表；利用 *D. magna* 的螢光試驗法能成功地預測 *D. magna* 慢毒性試驗，因此選擇螢光試驗法來取代試驗期間較長的 *D. magna* 慢毒性試驗；而四膜蟲為原核生物的代表，因此也為"組生物"成員之一；rainbow trout 也為此篇研究的"組生物"之一，然而該研究並未使用海洋螢光菌試驗進行毒性評估，因而無法得知其與月芽藻及兩種魚類間的相關性，但由本研究及其他文獻結果得知，魚類試驗法較為不敏感且能用海洋螢光菌或營養階層較低階的生物來進行取代。

以上幾篇研究文獻皆是利用試驗生物作為變數，污染物為觀察值來進行主成分分析，相當於本研究主成分分析中的"毒性模式"，而本研究在主成分分析中還增加了"敏感性模式" 進行分析，利用生物間的相對敏感性進行分類，並且取得有用的統計資訊，更能適切的選擇"組生物"。



表. 5.4.1 九十種有機物之毒性試驗數據

ID	Chemical	MOA	MW	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>		<i>Daphnia</i> ^c	Fathead ^d	Microtox ^e	logP	Henry's law
				Closed-system ^a EC ₅₀ (mg/L)	Batch ^b EC ₅₀ (mg/L)	<i>magana</i> EC ₅₀ (mg/L)	minnow LC ₅₀ (mg/	EC ₅₀ (mg/L)		constant (atm-m ³ /mo
1	2-Nitrotoluene	NP	137.14	11.57	16.87*	5.40	37.10	16.90	2.30	1.25E-05
2	Benzene	NP	78.11	15.77	29.00	59.60	33.50	32.88 [#]	2.13	5.55E-03
3	Chlorobenzene	NP	112.56	7.82	12.50	8.60	29.10	13.50	2.84	3.11E-03
4	1,2-dichlorobenzene	NP	147.00	2.84	6.90	2.40	9.47	6.13	3.43	1.92E-03
5	1,3-dichlorobenzene	NP	147.00	1.86	6.70	28.00	8.03	8.46	3.53	2.63E-03
6	1,4-dichlorobenzene	NP	147.00	2.07	7.10	11.00	4.20	5.99	3.44	2.41E-03
7	1,2,3-trichlorobenzene	NP	181.45	0.84	1.60	1.45	2.34	3.70	4.05	1.25E-03
8	1,2,4-trichlorobenzene	NP	181.45	0.63	5.60	1.40	2.99	5.74	4.02	1.42E-03
9	1,3,5-trichlorobenzene	NP	181.45	1.67	3.00	2.90	3.30	14.10	4.19	1.89E-03
10	1,2,3,4-tetrachlorobenzene	NP	215.89	0.57	1.09*	0.54	1.10	3.34	4.60	7.60E-04
11	1,2,4,5-tetrachlorobenzene	NP	215.89	1.26	46.80	0.75*	0.32	0.67	4.64	1.00E-03
12	Hexachlorobenzene	NP	284.78	0.22	0.22*	0.09*	10.00	0.14	5.73	1.70E-03
13	Toluene	NP	92.14	14.19	29.00	22.60	42.30	13.01 [#]	2.73	6.64E-03
14	2-chlorotoluene	NP	126.59	10.65	9.20	5.94*	7.45	6.06	3.42	3.57E-03
15	4-chlorotoluene	NP	126.59	10.53	6.10	3.57	5.92	16.70	3.33	4.38E-03
16	Ethylbenzene	NP	106.17	1.34	3.60	4.63	12.10	7.69	3.15	7.88E-03
17	Nitrobenzene	NP	123.11	13.89	23.80	27.00	119.00	18.60	1.85	2.40E-05
18	Methylene chloride	NP	84.93	33.09	45.41*	220.00	303.00	919.00 [#]	1.25	3.25E-03
19	Chloroform	NP	119.38	22.86	49.18*	29.00	70.70	336.00	1.97	3.67E-03
20	Carbon tetrachloride	NP	153.82	23.59	0.89	35.00	41.40	33.70	2.83	2.76E-02
21	1,2-dichloroethane	NP	98.96	154.93	230.00	220.00	136.00	531.00	1.48	1.18E-03
22	1,1,1-trichloroethane	NP	133.41	47.43	10.32*	11.20	52.90	45.60	2.49	1.72E-02
23	1,1,2,2-tetrachloroethane	NP	167.85	13.72	92.30	9.30	20.30	33.49	2.39	3.67E-04
24	Pentachloroethane	NP	202.29	5.61	80.30	8.00	7.53	21.04 [#]	3.22	1.94E-03
25	Hexachloroethane	NP	236.74	0.46	93.20	8.10	1.53	0.72	4.14	3.89E-03
26	1,3-dichloropropane	NP	112.99	19.93	60.10	280.00	131.00	94.69 [#]	2.00	9.76E-04
27	Trichloroethene	NP	131.39	26.24	77.00	18.00	44.10	190.00	2.42	9.85E-03
28	Tetrachloroethene	NP	165.83	10.54	27.00	18.00	23.80	19.00	3.40	1.77E-02
29	1-propanol	NP	60.10	4947.90	1990.10 [@]	3640.00	4630.00	8102.00 [#]	0.25	7.41E-06
30	2-propanol	NP	60.10	8468.50	3154.09 [@]	4558.70	10400	22800.00	0.05	8.10E-06
31	1-octanol	NP	130.23	1.85	8.40*	20.20	13.10	1.64	3.00	2.45E-05
32	Acetone	NP	58.08	5276.10	5943.29 [@]	6100.00	8120.00	7310.00	-0.24	3.50E-05
33	Ethanol	NP	46.07	16.86	209.25*	9248.00	14200	41089.00 [#]	-0.31	5.00E-06
34	Methanol	NP	32.04	6.50	295.76*	3290.00	28200	58300.00	-0.77	4.55E-06
35	2,4,6-Trichlorophenol	NP	197.45	0.80	3.50	6.00	4.55	8.23	3.69	2.60E-06
36	2,4-dichlorophenol	NP	163.00	2.42	14.00	2.60	7.75	3.73	3.06	4.29E-06
37	Acetonitrile	NP	41.05	5509.10	5288.00 [@]	3600.00	1640.00	17521.5 [#]	-0.34	3.45E-05
38	propionitrile	NP	55.08	127.72	123.87*	535.29*	1520.00	8253.8 [#]	0.16	3.70E-05

ID	Chemical	MOA	MW	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>		<i>Daphnia</i> ^c	Fathead ^d	Microtox ^e EC ₅₀ (mg/L)	logP	Henry's law constant (atm-m ³ /mo)
				Closed-system ^a EC ₅₀ (mg/L)	Batch ^b EC ₅₀ (mg/L)	<i>magana</i> EC ₅₀ (mg/L)	minnow LC ₅₀ (mg/			
39	Diethyl Phthalate	NP	222.24	55.46	69.50	52.00	31.80	114.00	2.42	6.10E-07
40	3-Ethoxy-4-hydroxybenzaldehyde	NP	166.18	11.72	44.94*	41.46 ^h	87.60	40.05 ⁿ	1.58	3.79E-09
41	4-(Dimethylamino)benzaldehyde	NP	149.19	18.96	25.60*	16.99*	46.10	1.98 ⁿ	1.81	2.14E-07
42	Aniline	P	93.13	26.03	41.00	0.08	75.50	16.50 [#]	0.90	2.02E-06
43	3-Nitroaniline	P	138.13	42.03	15.00	0.98	37.63*	23.50	1.37	7.91E-09
44	3-chloroaniline	P	127.57	9.48	26.90 ^{&}	0.10	13.40	11.62 [#]	1.88	1.00E-06
45	4-chloroaniline	P	127.57	1.54	2.31 ^{&}	0.05	12.00	5.08 [#]	1.83	1.16E-06
46	2,4-dichloroaniline	P	162.02	3.38	3.96 ^{&}	0.50	6.30	4.94 [#]	2.78	1.58E-06
47	2,5-dichloroaniline	P	162.02	5.94	16.50 ^{&}	2.92	1.66	5.51 [#]	2.75	1.58E-06
48	2,6-dichloroaniline	P	162.02	16.30	23.20 ^{&}	1.40	15.12*	1.89 [#]	2.76	1.58E-06
49	3,4-dichloroaniline	P	162.02	2.02	2.50 ^{&}	0.10	7.00	0.83 [#]	2.69	1.46E-05
50	3,5-dichloroaniline	P	162.02	3.98	4.39 ^{&}	1.12	3.89	13.65 [#]	2.90	1.58E-06
51	2,4,5-trichloroaniline	P	196.46	1.17	3.14 ^{&}	3.40	1.96	7.92 ^j	3.45	1.34E-06
52	2,4,6-trichloroaniline	P	196.46	3.47	4.94 ^{&}	2.30 ^g	10.00	6.07	3.52	1.34E-06
53	2,3-dimethylaniline	P	121.18	45.40	30.80 ^{&}	8.90	14.28*	5.02 ^k	2.17	2.50E-06
54	3,4-dimethylaniline	P	121.18	6.93	7.34 ^{&}	1.10	14.28*	7.33 ^k	1.84	1.86E-06
55	Phenol	P	94.11	10.90	58.00	12.00	34.30	17.60 [#]	1.46	3.33E-07
56	2-chlorophenol	P	128.56	8.63	70.00	2.60	11.60	15.01 [#]	2.15	1.12E-05
57	4-chlorophenol	P	128.56	8.80	38.00	4.10	6.11	1.12 [#]	2.39	6.27E-07
58	2,3-dichlorophenol	P	163	1.23	5.00	4.09	6.29*	4.33 [#]	2.84	4.77E-07
59	2-nitrophenol	P	139.11	1.08	38.06*	13.20	160.00	21.00	1.79	1.28E-05
60	4-nitrophenol	P	139.11	0.25	4.89	20.00	37.30	12.40	1.91	4.15E-10
61	2,4-dimethylphenol	P	122.17	13.50	12.54*	2.10	16.60	2.61	2.30	9.51E-07
62	2,3-Dinitrotoluene	EP	182.14	0.79	1.37	0.66	1.80	6.44 [#]	2.18	3.97E-07
63	2,4-Dinitrotoluene	EP	182.14	2.54	1.60	26.20	32.80	9.83 [#]	1.98	5.40E-08
64	2,6-dinitrotoluene	EP	182.14	2.19	7.70	21.70	18.50	2.99 ⁿ	2.10	7.47E-07
65	Formaldehyde	EP	30.03	2.55	39.90*	29.00	26.30	5.96 [#]	0.35	3.37E-07
66	Acetaldehyde	EP	44.05	0.02	116.33*	48.25	43.10	308.63 [#]	-0.34	6.67E-05
67	Glutaraldehyde	EP	100.12	3.04	1.80 ^c	14.60	11.60	4.56 [#]	-0.18	2.39E-08
68	Propionaldehyde	EP	58.08	12.92	79.77*	86.87*	130.00	192.43 [#]	0.59	7.34E-05
69	Butyraldehyde	EP	72.11	11.95	51.51*	48.01*	16.00	140.82 [#]	0.88	0.000115
70	2-Hydroxybenzaldehyde	EP	122.12	3.12	17.88*	5.80	2.30	14.30	1.81	5.61E-06
71	4-Hydroxybenzaldehyde	EP	122.12	2.53	50.30*	39.79 ^h	18.09*	7.53	1.35	5.11E-10
72	4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyde	EP	152.15	38.83	79.11*	48.22 ^h	123.00	100.56 ⁿ	1.21	2.15E-09
73	Benzaldehyde	EP	106.13	60.20	23.07*	48.06 ^h	12.80	9.79 ⁿ	1.48	2.67E-05
74	5-Bromo-2-hydroxybenzaldehyde	EP	201.02	1.21	1.21	3.62 ^h	1.30	5.76 ⁿ	2.9	7.01E-07
75	4-Chlorobenzaldehyde	EP	140.57	11.69	12.96*	7.42*	2.20	23.33 ⁿ	2.1	2.39E-05
76	4-Ethoxybenzaldehyde	EP	150.18	11.88	15.24*	8.93*	27.60	10.18 ⁿ	2.28	3.08E-05

ID	Chemical	MOA	MW	Pseudokirchneriella subcapitata		Daphnia ^c	Fathead ^d	Microtox ^e EC ₅₀ (mg/L)	logP	Henry's law constant (atm-m ³ /mo)
				Closed-svstem ^a EC ₅₀ (mg/L)	Batch ^b EC ₅₀ (mg/L)	<i>magana</i> EC ₅₀ (mg/L)	minnow LC ₅₀ (mg/			
77	Benzoic acid	EP	122.12	36.39	195.30	703.00 ⁱ	500.00 ⁱ	9.93i	1.87	3.81E-08
78	3-Chlorobenzoic acid	EP	156.57	7.03	152.69*	278.00 ⁱ	250.00 ⁱ	7.49i	2.68	3.88E-08
79	4-Bromobenzoic acid	EP	201.02	4.57	137.53*	567.00 ⁱ	250.00 ⁱ	2.97i	2.86	1.90E-08
80	Atrazine	EP	215.69	0.08	0.38	6.90	15.00	20.00	2.61	2.36E-09
81	2,4-Dinitroaniline	OPU	183.12	3.41	23.66 ^{&}	9.60	14.20	12.70	1.84	6.48E-10
82	3,5-Dinitroaniline	OPU	183.12	0.45	21.40 ^{&}	3.76	21.40	35.70	1.89	1.51E-10
83	2,3,4,6-tetrachlorophenol	OPU	231.89	0.01	1.30	0.29	1.03	1.46	4.45	8.84E-06
84	Pentachlorophenol	OPU	266.34	0.01	0.31	0.68	0.10	0.54	5.12	2.45E-08
85	2,4-dinitrophenol	OPU	184.11	0.94	10.90	4.10	6.58	19.00 [#]	1.67	8.60E-08
86	Chloroacetonitrile	RI	75.50	11.45	54.11*	5.23 [#]	1.35	142.39 [#]	0.45	1.08E-05
87	Malononitrile	RI	66.06	12.40	5.87*	0.93 [#]	0.56	235.00 [#]	-0.6	1.31E-07
88	Parathion	AI	291.26	0.93	1.41*	0.00	1.40	35.57 [#]	3.83	2.98E-07
89	Malathion	AI	330.35	1.73	2.14 ^f	0.00	14.10	67.81 [#]	2.36	4.89E-09
90	Fenthion	AI	278.32	1.05	1.10	0.01	3.20	0.89	4.09	1.46E-06

-Log P、M.W.、Henry's law constant data from EPIWEB version 4.0 software

-MOA= mode of action ; NP=Non polar narcosis ; P= Polar narcosis ; EP = electrophilic/proelectrophilic; OPU= oxidative phosphorylation uncoupling ;
RI = respiratory inhibition ; AI= Acetylcholinesterase inhibition.

- a. Data from laboratory,

- b. Data from QSAR Toolbox 2.1, (e : Data from Larissa L. Sano^[43], f : Data from Mads Munkegaard^[44], & : Data from Villem Aruoja^[39],

* : Data Predict from ECOSAR, @ : Data Predict from OSAR $\log(1/EC_{50}(mM)) = 1.00 * \log P - 1.77$, publish from Villem Aruoja^[39])

- c. 48 hour EC₅₀ Data from QSAR Toolbox 2.1, (g : Data from Tatsuo Abe^[45], h : Data from Lijun Jin^[46], i : Data from Y.H. Zhao^[47], # : Data from laboratory,

* : Data Predict from ECOSAR,)

- d. 96 hour LC₅₀ Data from QSAR Toolbox 2.1, (i : Data from Y.H. Zhao^[47], * : Data Predict from ECOSAR,)

- e. 15min EC₅₀ Data from QSAR Toolbox 2.1, (# : Data from lab., j : Data from Mark T. D. Cronin^[48], n : Data from Lijun jin^[46], i : Data from Y.H. Zhao^[47],

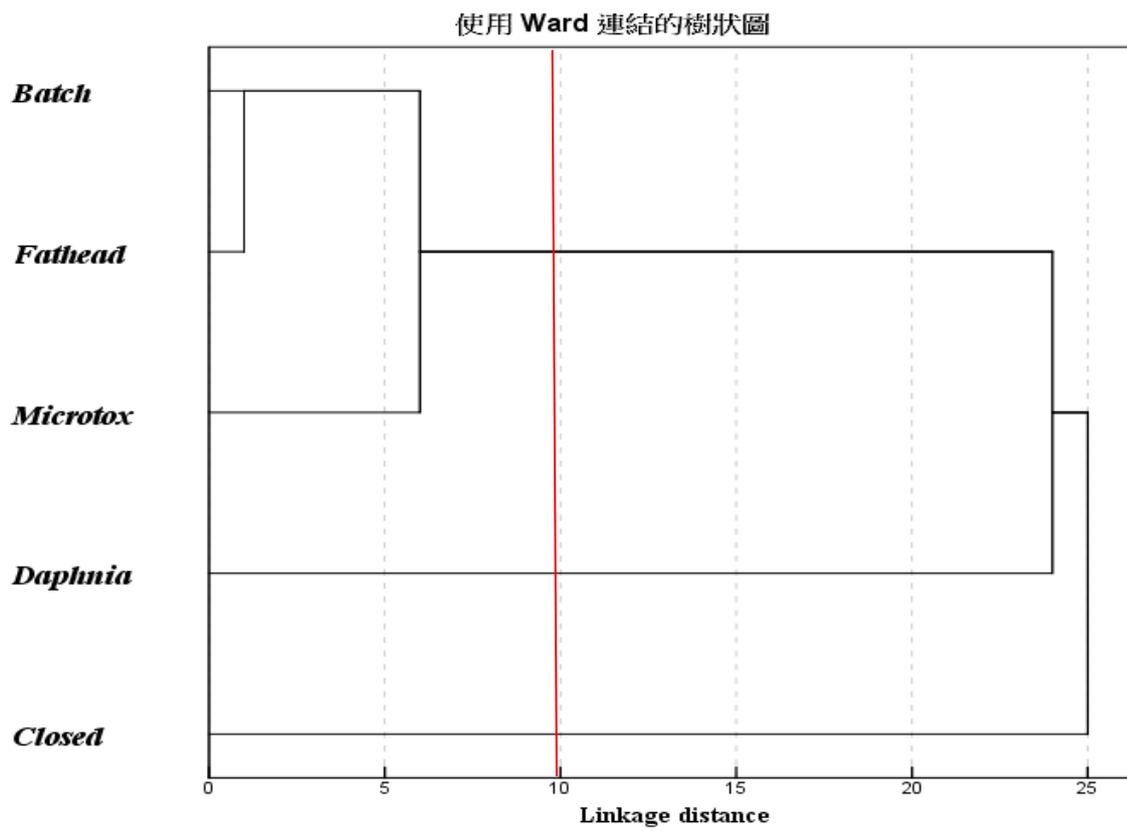
k : Data Predict from OSAR $\log(1/EC_{50}(uM)) = 0.497 * \log P + 0.304$ publish from Marco Vighi^[36])

表 5.4.1 主成分分析-共變異矩陣之特徵值及解釋的變異量

主成分	特徵值	解釋變異量(%)	總解釋變異量(%)
1	14.555	36.8	36.8
2	13.941	35.3	72.1
3	6.128	15.5	87.6
4	4.884	12.4	100
5	0.000	0.0	100

表 5.4.2 主成分分析-共變異矩陣之特徵值及解釋的變異量

主成分	特徵值	解釋變異量(%)	總解釋變異量(%)
1	5.8429	80.3	80.3
2	0.5894	8.1	88.4
3	0.4340	6.0	94.4
4	0.2256	3.1	97.5
5	0.1822	2.5	100



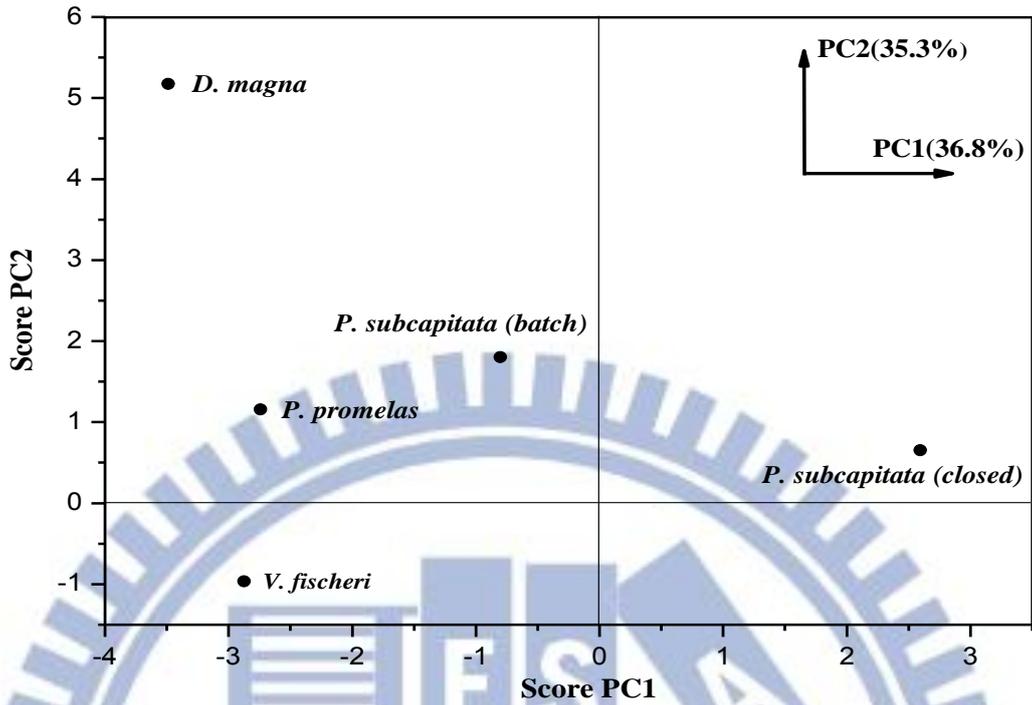


圖 5.4.2 敏感性模式:第一及第二主成分之主成分分數圖(大樣本)

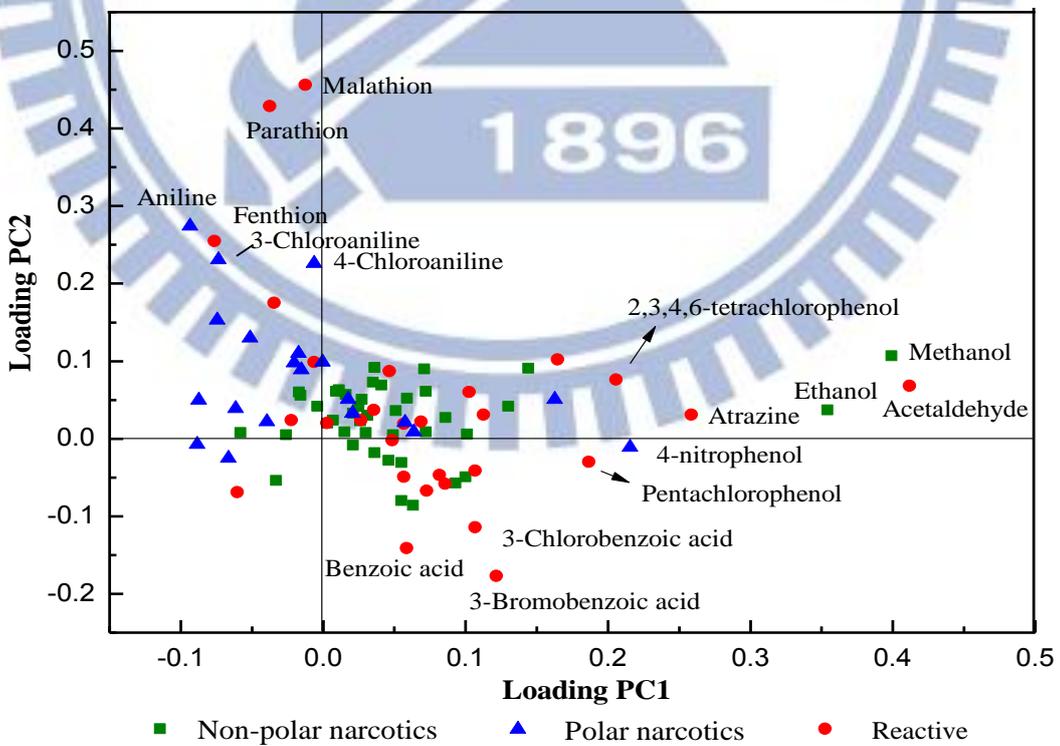


圖 5.4.3 敏感性模式:第一及第二主成分之主成分負荷圖(大樣本)

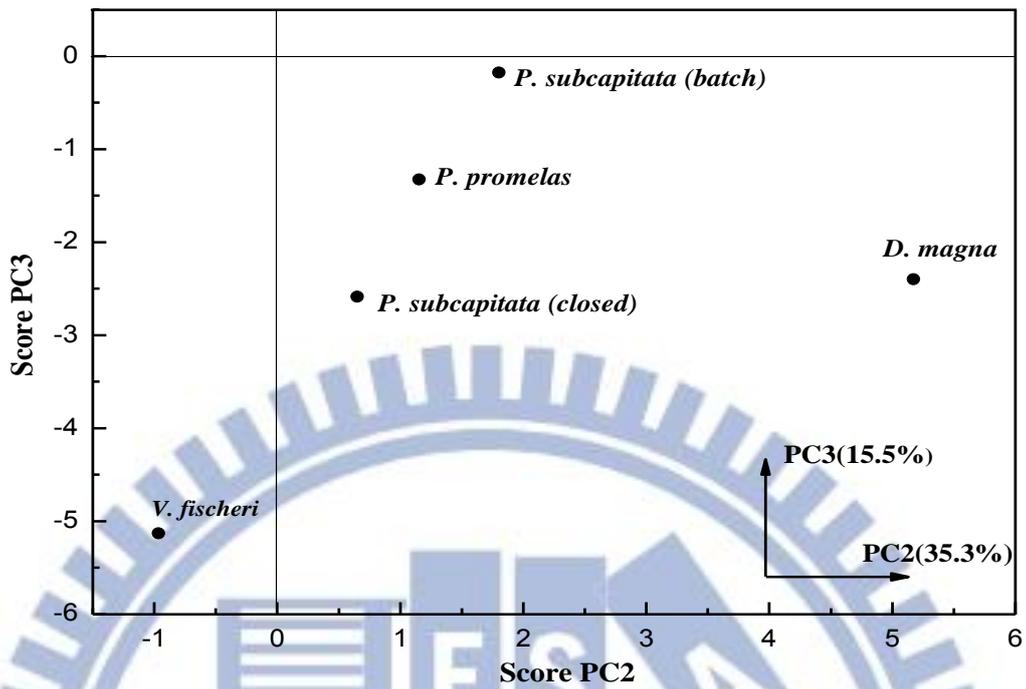


圖 5.4.4 敏感性模式：第二及第三主成分之主成分分數圖(大樣本)

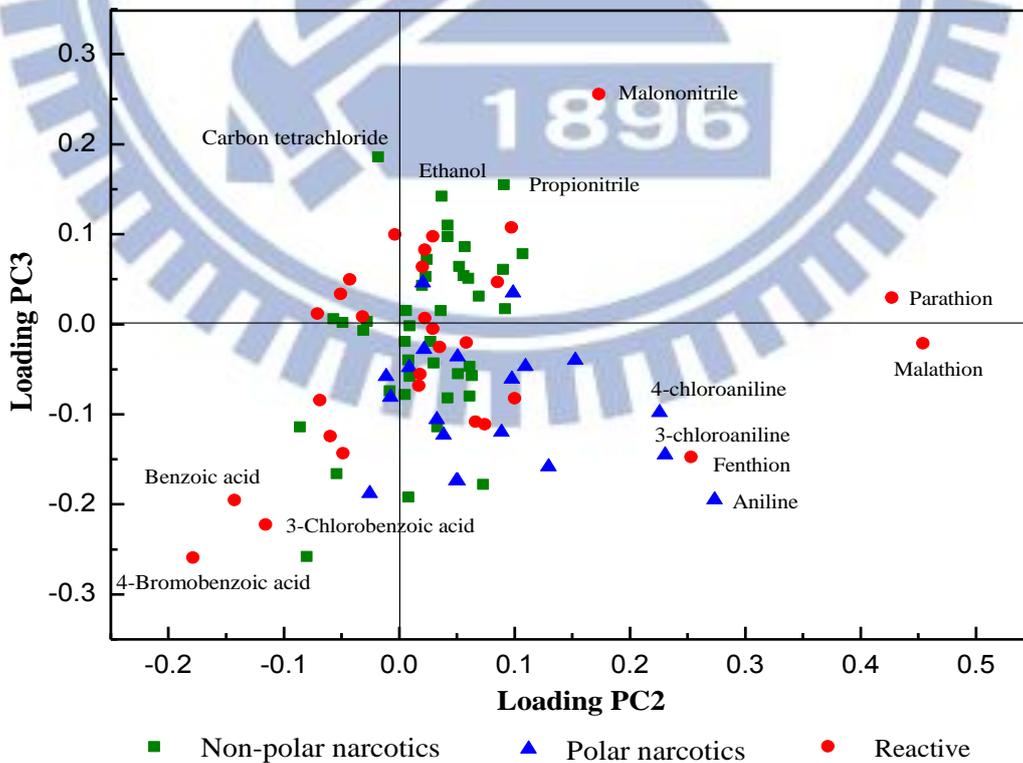


圖 5.4.5 敏感性模式：第二及第三主成分之主成分負荷圖(大樣本)

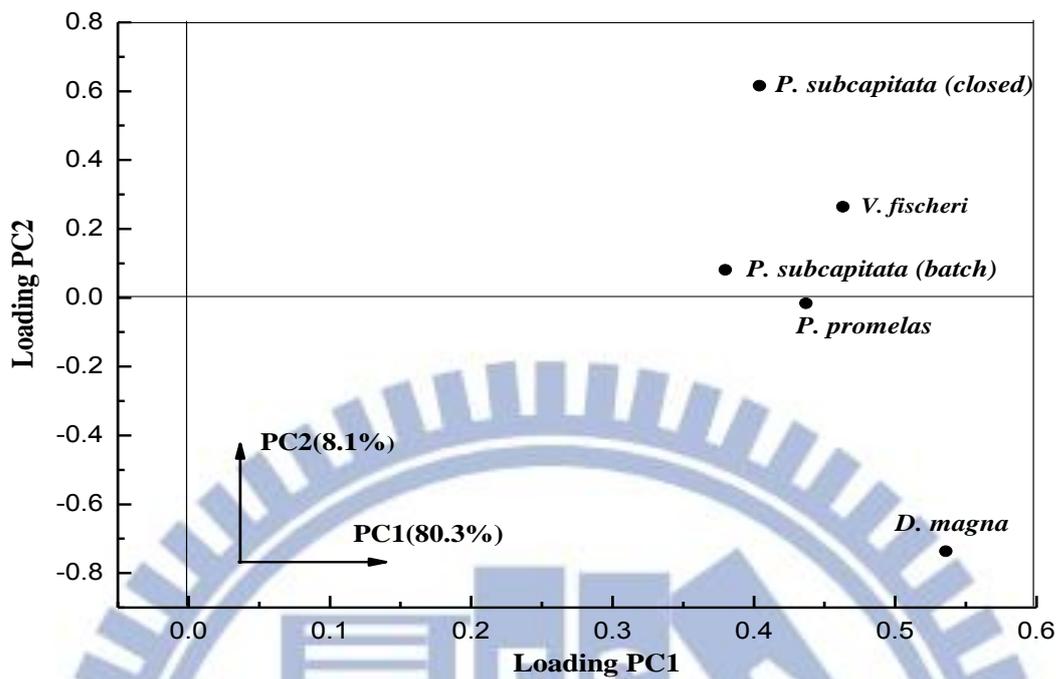


圖 5.4.6 毒性模式:第一及第二主成分之主成分負荷圖(大樣本)

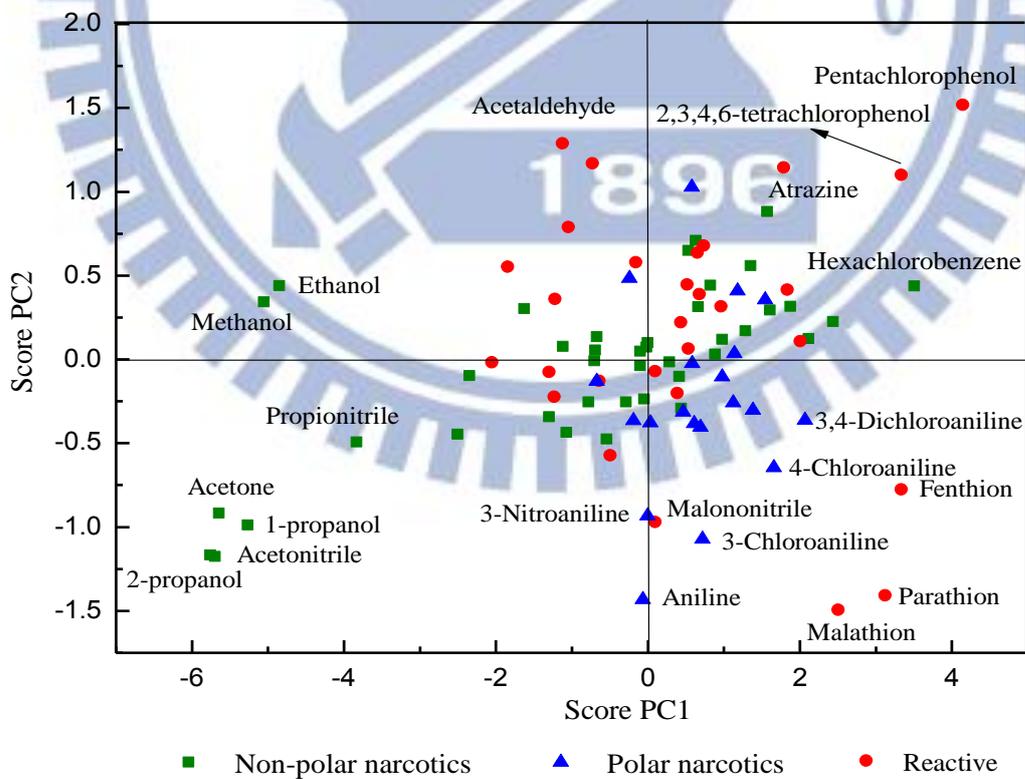


圖 5.4.7 毒性模式:第一及第二主成分之主成分分數圖(大樣本)

第六章 結論與建議

6.1 結論

綜合以上實驗及統計所得之結果，可得到以下之結論：

1. 密閉式月芽藻為六種生物試驗法中最具敏感性的方法，其在多變量統計分析結果中皆顯示為獨立的一群，為重要的成分變數。此外，藻類為水生生物食物鏈中重要的生產者角色，因此為“組生物”法中不可或缺的物種之一；然而在我國現行發布之生物毒性試驗標準方法僅包含甲殼類生物及魚類試驗方法，即使廢水經由這些標準方法進行毒性試驗評估後已達合格標準，但因藻類較具敏感性，可能對藻類造成嚴重毒性影響，進而因營養階層底層之生產者的破壞，間接地影響次級及高級消費者(甲殼類生物及魚類生物)。因此，本研究結果顯示我國現行發布之生物毒性試驗標準方法並無考慮到生物營養階層及生物敏感性的概念，而無法有效評估汙染物之危害性，尚須納入密閉式月芽藻及海洋螢光菌生物試驗方法。
2. 本研究室所發展之密閉式月芽藻試驗方法較其他藻類標準試驗方法為敏感，且可有效降低有機物的揮發而不至於低估了所造成的毒性。因此建議選擇此方法。
3. 海洋螢光菌具實驗操作容易、試驗期間短、再現性佳與成本低等優點，且研究發現，海洋螢光菌與鯉魚及 Fathead minnow 試驗法間分群結果相同，具相關性，因此可取代鯉魚或 Fathead minnow 的毒性試驗；但需考慮到具特殊作用機制的有機物可能造成分群狀況改變。

4. 多變量統計分析結果顯示，當以九十種有機物為觀察樣本時，其分析結果與以本研究進行試驗所選擇之二十有機物為觀察樣本時相符合。
5. 研究指出沒有任何一種生物試驗方法對所有毒化物皆具有高敏感性，因此無法使用單一生物進行廢水毒性評估。
6. 本研究所選擇之組生物包含：生產者-密閉式月芽藻；初級消費者-*Daphnia magna*；分解者-海洋螢光菌，且主成分分析結果顯示，以此"組生物"進行毒性評估時，並不會減少解釋的變異量($PC1$ 、 $PC2$ 共同解釋 91.4%的原始變異量)，因此密閉式月芽藻、*Daphnia magna* 及海洋螢光菌是"組生物"試驗法中合適的試驗生物。
7. 使用多變量統計法能有效的選擇"組生物"來評估廢水之危害性，因此，不同類型之廢水能利用此方法來選擇較合適的"組生物"。

參考文獻

- [1] Hernando MD, Fernandez-Alba AR, Tauler R, Barcelona D. 2005. Toxicity assays applied to wastewater treatment. *Talanta* 65:358-366.
- [2] Forget G, Gagnon P, Sanchez WA, Dutka BJ. 2000. Overview of methods and results of the eight country International Development Research Centre (IDRC) WaterTox project. *Environmental Toxicology* 15:264-276.
- [3] Russom CL, Bradbury SP, Broderius SJ, Hammermeister DE, Drummond RA. 1997. Predicting modes of toxic action from chemical structure: Acute toxicity in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 16:948-967.
- [4] Manusadzianas L, Balkelyt L, Sadauskas K, Blinova I, Pollumaa L, Kahru A. 2003. Ecotoxicological study of Lithuanian and Estonian wastewaters: selection of the biotests, and correspondence between toxicity and chemical-based indices. *Aquatic Toxicology* 63:27-41.
- [5] Ren S, Frymier PD. 2002. Modeling the toxicity of polar and nonpolar narcotic compounds to luminescent bacterium Shk1. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21:2649-2653.
- [6] Fochtman P, Raszka A, Nierzedzka E. 2000. The use of conventional bioassays, microbiotests, and some “rapid” methods in the selection of an optimal test battery for the assessment of pesticides toxicity. *Environmental Toxicology* 15:376-384.
- [7] Blaise CB, N; Coillie, R. van. 1985. Integrated ecotoxicological approach to assessment of ecotoxicity. *Water quality bulletin*;10(1):3-10, 60-61.
- [8] Ren S, Frymier PD. 2003. Use of multidimensional scaling in the selection of wastewater toxicity test battery components. *Water Research* 37:1655-1661.
- [9] Vindimian É, Garric J, Flammarion P, Thybaud É, Babut M. 1999. An index of effluent aquatic toxicity designed by partial least squares regression, using acute and chronic tests and expert judgements. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18:2386-2391.

- [10] Rojickova-Padrtova R, Marsalek B, Holoubek I. 1998. Evaluation of alternative and standard toxicity assays for screening of environmental samples: Selection of an optimal test battery. *Chemosphere* 37:495-507.
- [11] Bernard C, Colin JR, Anne LD-D. 1997. Estimation of the hazard of landfills through toxicity testing of leachates: 2. Comparison of physico-chemical characteristics of landfill leachates with their toxicity determined with a battery of tests. *Chemosphere* 35:2783-2796.
- [12] Castillo GC, Vila IC, Neild E. 2000. Ecotoxicity assessment of metals and wastewater using multitrophic assays. *Environmental Toxicology* 15:370-375.
- [13] Walsh GE, Merrill RG. 1984. Algal bioassays of industrial and energy process effluents. *Algae as Ecological Indicators, Academic Press, New York*:329-360.
- [14] Nyholm N, Källqvist T. 1989. Methods for growth inhibition toxicity tests with freshwater algae. *Environmental Toxicology and Chemistry* 8:689-703.
- [15] Wang Y-S, Tai K-T, Yen J-H. 2004. Separation, bioactivity, and dissipation of enantiomers of the organophosphorus insecticide fenamiphos. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 57:346-353.
- [16] Henegar A, Mombelli E, Pandard P, P 矇 ry ARR. What can be learnt from an ecotoxicity database in the framework of the REACH regulation? *Science of The Total Environment* 409:489-494.
- [17] Lin J-H, Kao W-C, Tsai K-P, Chen C-Y. 2005. A novel algal toxicity testing technique for assessing the toxicity of both metallic and organic toxicants. *Water Research* 39:1869-1877.
- [18] Tsai K-P, Chen C-Y. 2007. An algal toxicity database of organic toxicants derived by a closed-system technique. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26:1931-1939.
- [19] Hornstrom E. 1990. Toxicity test with algae—a discussion on the batch method. *Ecotoxicol Environ Saf.* 20(3):343-53.
- [20] Huang HJ. 2000. Experimental design of the algal toxicity test based on photosynthetic responses. National Chiao Tung University.
- [21] Chen C-Y, Lin K-C. 1997. Optimization and performance evaluation of the continuous algal toxicity test. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16:1337-1344.

- [22] United States Environmental Protection Agency(U.S. EPA). 1996. Ecological Effect Test Guidelines. OPPTS 850.5400. Algal Toxicity, Tiers I and II.
- [23] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 1984. Guideline for testing chemicals. No. 201. Alga growth inhibition test. Paris, France.
- [24] International Organization for Standardization (ISO). 1987. Water quality- Algal growth inhibition test. Draft International Standard ISO/DIS 8692. Geneva, Switzerland.
- [25] Mayer P, Nyholm N, Verbruggen EMJ, Hermens JLM, Tolls J. 2000. Algal growth inhibition test in filled, closed bottles for volatile and sorptive materials. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19:2551-2556.
- [26] Lin JH. 2001. Experimental design of the algal toxicity test based on BOD bottle. A Thesis Submitted to Institute of Environmental Engineering of National Chiao Tung University.
- [27] Hsu CH. 2002. Experimental design of the algal toxicity test based on photosynthetic response. A Thesis of Institute of Environmental Engineering of National Chiao Tung University.
- [28] Kao WC. 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.
- [29] Konemann H. 1981. Quantitative structure-activity relationships in fish toxicity studies Part 1: Relationship for 50 industrial pollutants. *Toxicology* 19:209-221.
- [30] Schultz TW SG, Bearden AP. 1998. QSAR in aquatic toxicology: a mechanism of action approach comparing toxic potency to *Pimephales promelas*, *Tetrahymena pyriformis*, and *Vibrio fischeri*. Taylor & Francis, New York, NY, USA:pp 51-109.
- [31] Kamlet MJ, Doherty RM, Veith GD, Taft RW, Abraham MH. 1986. Solubility properties in polymers and biological media. 7. An analysis of toxicant properties that influence inhibition of bioluminescence in *Photobacterium phosphoreum* (the Microtox test). *Environmental Science & Technology* 20:690-695.
- [32] Verhaar HJM, van Leeuwen CJ, Hermens JLM. 1992. Classifying environmental pollutants. *Chemosphere* 25:471-491.

- [33] Liao YY, Wang LS, He YB, Yang H. 1996. Toxicity QSAR of Substituted Benzenes to Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 56:460-466.
- [34] Lin JH. 2001. Experimental design of the algal toxicity test based on BOD bottle. National Chiao Tung University.
- [35] Van Leeuwen CJ, Van Der Zandt PTJ, Aldenberg T, Verhaar HJM, Hermens JLM. 1992. Application of QSARs, extrapolation and equilibrium partitioning in aquatic effects assessment. I. Narcotic industrial pollutants. *Environmental Toxicology and Chemistry* 11:267-282.
- [36] Vighi M, Migliorati S, Monti GS. 2009. Toxicity on the luminescent bacterium *Vibrio fischeri* (Beijerinck). I: QSAR equation for narcotics and polar narcotics. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72:154-161.
- [37] Mayer FL, Ellersieck MR. 1986. Manual of acute toxicity: Interpretation and data base for 410 chemicals and 66 species of freshwater animals. Volume 160 iii, 439 p.
- [38] Toussaint MW, Shedd TR, van der Schalie WH, Leather GR. 1995. A comparison of standard acute toxicity tests with rapid-screening toxicity tests. *Environmental Toxicology and Chemistry* 14:907-915.
- [39] Aruoja V, Sihtmae M, Dubourguier H-C, Kahru A. 2011. Toxicity of 58 substituted anilines and phenols to algae *Pseudokirchneriella subcapitata* and bacteria *Vibrio fischeri*: Comparison with published data and QSARs. *Chemosphere* 84:1310-1320.
- [40] Vaal M, van der Wal JT, Hermens J, Hoekstra J. 1997. Pattern analysis of the variation in the sensitivity of aquatic species to toxicants. *Chemosphere* 35:1291-1309.
- [41] Dearden JC, Cronin MTD, Dobbs AJ. 1995. Quantitative structure-activity relationships as a tool to assess the comparative toxicity of organic chemicals. *Chemosphere* 31:2521-2528.
- [42] Pandard P, Devillers J, Charissou A-M, Poulsen V, Jourdain M-J, Ferard J-F, Grand C, Bispo A. 2006. Selecting a battery of bioassays for ecotoxicological characterization of wastes. *Science of The Total Environment* 363:114-125.
- [43] Sano LL, Krueger AM, Landrum PF. 2005. Chronic toxicity of glutaraldehyde: differential sensitivity of three freshwater organisms. *Aquatic Toxicology* 71:283-296.

[44] Munkegaard M, Abbaspoor M, Cedergreen N. 2008. Organophosphorous insecticides as herbicide synergists on the green algae <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> and the aquatic plant <i>Lemna minor</i>. *Ecotoxicology* 17:29-35.

[45] Tatsuo Abe, Saito H, Niikura Y, Shigeoka T, Nakano Y. 2001. Embryonic development assay with *Daphnia magna*: application to toxicity of aniline derivatives. *Chemosphere* 45:487-495.

[46] Jin L, Dai J, Guo P, Wang L, Wei Z, Zhang Z. 1998. Quantitative structure-toxicity relationships for benzaldehydes to *Daphnia magna*. *Chemosphere* 37:79-85.

[47] Zhao YH, Cronin MTD, Dearden JC. 1998. Quantitative Structure-Activity Relationships of Chemicals Acting by Non-polar Narcosis—Theoretical Considerations. *Quantitative Structure-Activity Relationships* 17:131-138.

[48] Cronina MTD. GSB, G. D. Sinksb & T. W. Schultzb 2000. Structure-Toxicity Relationships for Aliphatic Compounds Encompassing a Variety of Mechanisms of Toxic Action to *Vibrio fischeri* SAR and QSAR in *Environmental Research* 11:301-312.





附錄一

二十種有機物毒性試驗

鯉魚急毒性試驗

原始數據

Benzene		
Conc. (mg/L)	Initial Number	Final Number
Control	20	18
122.2	20	0
106.17	20	0
89.8	20	1
73.5	20	5
65.3	20	13
49	20	19

Toluene		
Conc. (mg/L)	Initial Number	Final Number
Control	20	20
115.47	20	0
95.26	20	8
86.6	20	11
80.83	20	13
72.17	20	15
60.62	20	19

Methylene chloride		
Conc. (mg/L)	Initial Number	Final Number
Control	20	19
688.13	20	0
635.2	20	0
582.27	20	7
529.33	20	9
476.4	20	13
423.47	20	19

1,3-dichloropropane		
Conc. (mg/L)	Initial Number	Final Number
Control	20	20
174.8	20	0
167.2	20	0
152	20	4
144.4	20	9
136.8	20	17
114	20	20

Pentachloroethane		
Conc. (mg/L)	Initial Number	Final Number
Control	20	19
15.93	20	0
12.752	20	3
9.564	20	8
7.44	20	17
5.84	20	18
4.25	20	20

Ethanol		
Conc. (mg/L)	Initial Number	Final Number
Control	20	20
16406.5	20	0
13125.2	20	0
9843.9	20	6
7656.4	20	13
5468.8	20	17
4375.1	20	19

Propionitrile

Conc. (mg/L)	Initial Number	Final Number
Control	20	19
3057.12	20	0
2802.36	20	0
2547.6	20	8
2292.8	20	9
1783.32	20	16
1401.18	20	19

Aniline

Conc. (mg/L)	Initial Number	Final Number
Control	20	20
148.28	20	0
121.32	20	3
94.36	20	5
80.88	20	8
60.66	20	20
47.18	20	19

3-chloroaniline

Conc. (mg/L)	Initial Number	Final Number
Control	20	20
63.3	20	0
44.3	20	0
31.67	20	3
19	20	16
12.67	20	17
6.3	20	20

Phenol

Conc. (mg/L)	Initial Number	Final Number
Control	20	20
57.05	20	0
39.93	20	3
28.52	20	9
19.97	20	19
14.26	20	20
8.56	20	20

2-chlorophenol

Conc. (mg/L)	Initial Number	Final Number
Control	20	19
26.64	20	0
16.65	20	2
9.99	20	5
6.67	20	14
3.33	20	16
1.332	20	19

Pentachlorophenol

Conc. (mg/L)	Initial Number	Final Number
Control	20	19
0.693	20	0
0.396	20	0
0.198	20	0
0.099	20	3
0.0495	20	11
0.0198	20	16

2,4-dinitrophenol		
Conc. (mg/L)	Initial Number	Final Number
Control	20	20
18.53	20	0
12.97	20	0
7.41	20	2
3.71	20	11
1.85	20	18
0.741	20	20

Acetaldehyde		
Conc. (mg/L)	Initial Number	Final Number
Control	20	20
205.87	20	0
154.4	20	0
123.52	20	3
102.93	20	7
72.05	20	18
51.47	20	20

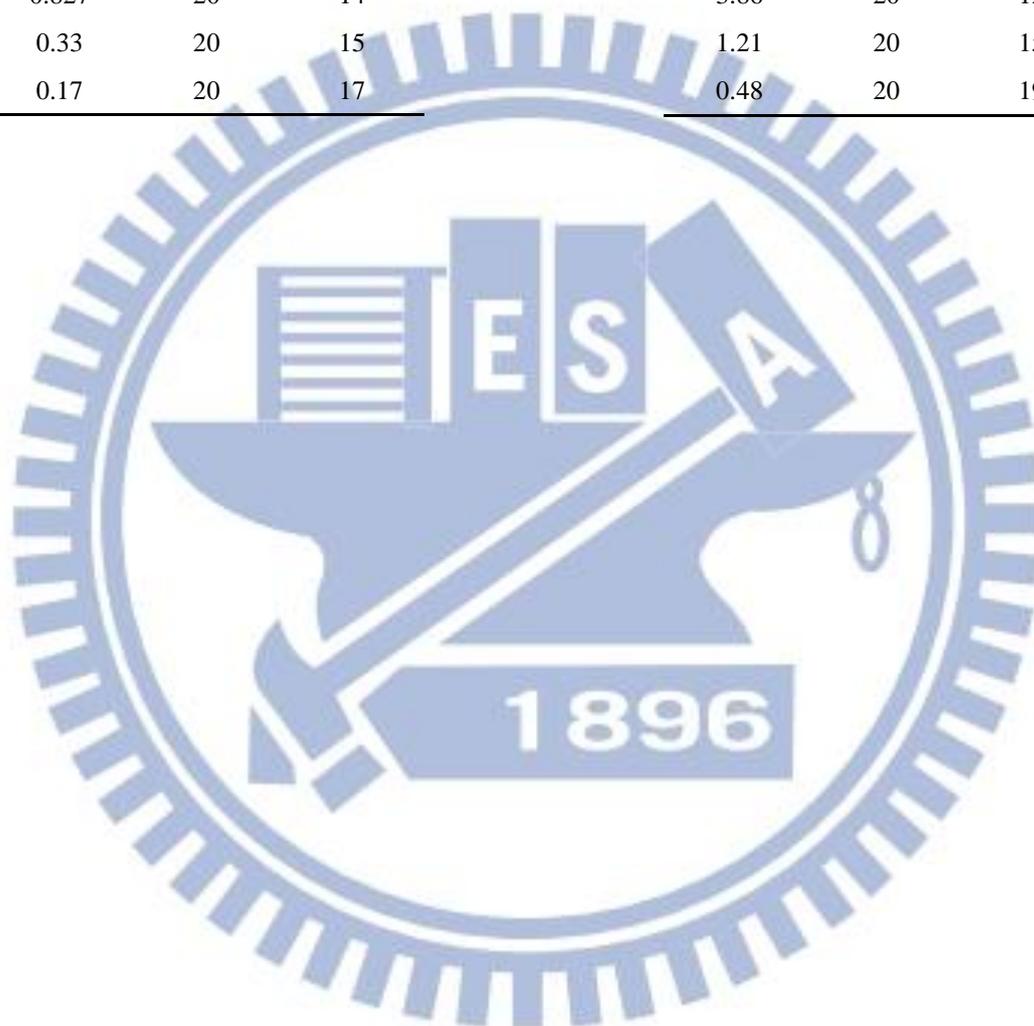
Glutaraldehyde		
Conc. (mg/L)	Initial Number	Final Number
Control	20	20
24.44	20	0
16.92	20	1
11.28	20	15
7.52	20	19
5.64	20	20
3.76	20	20

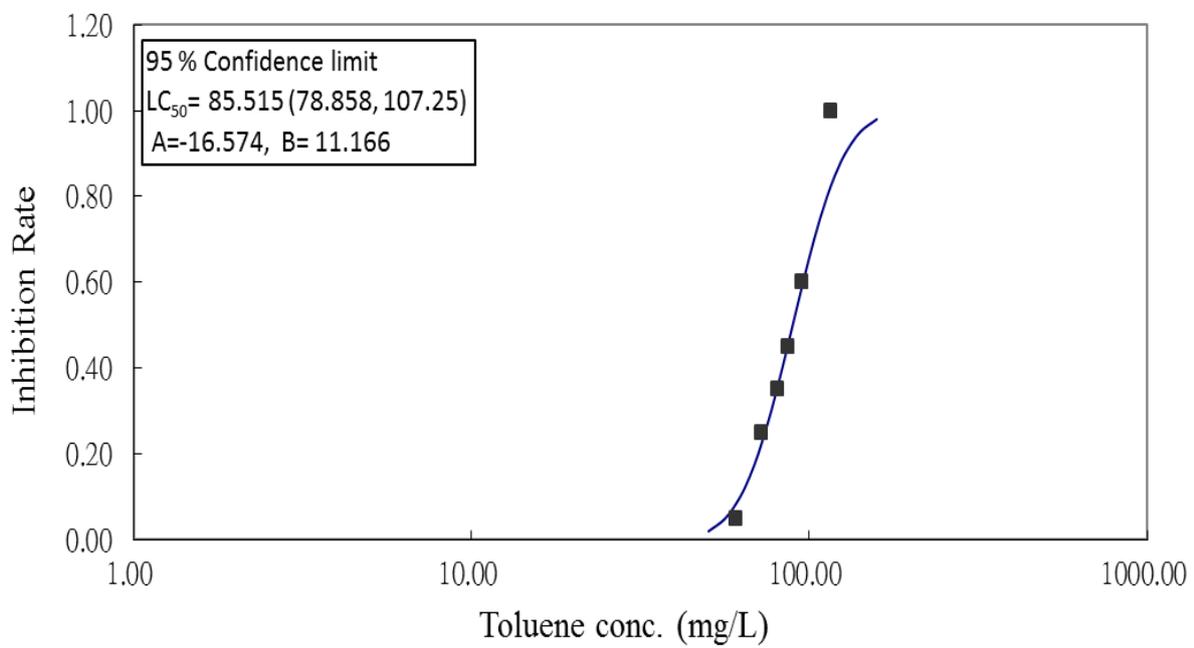
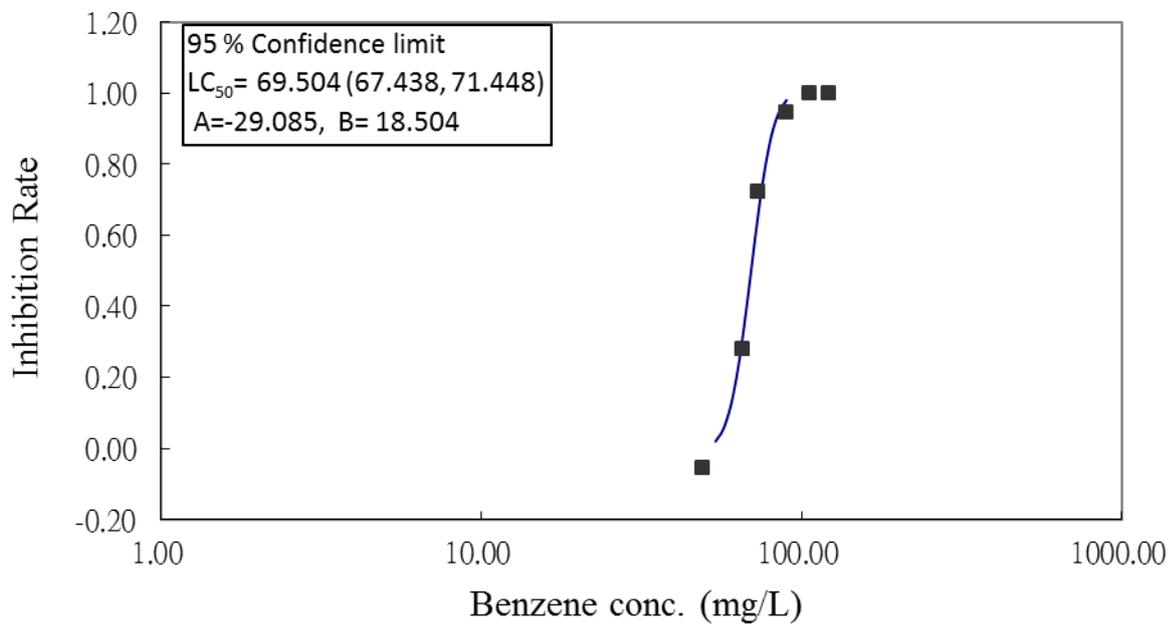
2,3-dinitrotoluene		
Conc. (mg/L)	Initial Number	Final Number
Control	20	19
7.27	20	0
5.45	20	0
3.63	20	0
1.816	20	8
0.9075	20	18
0.363	20	19

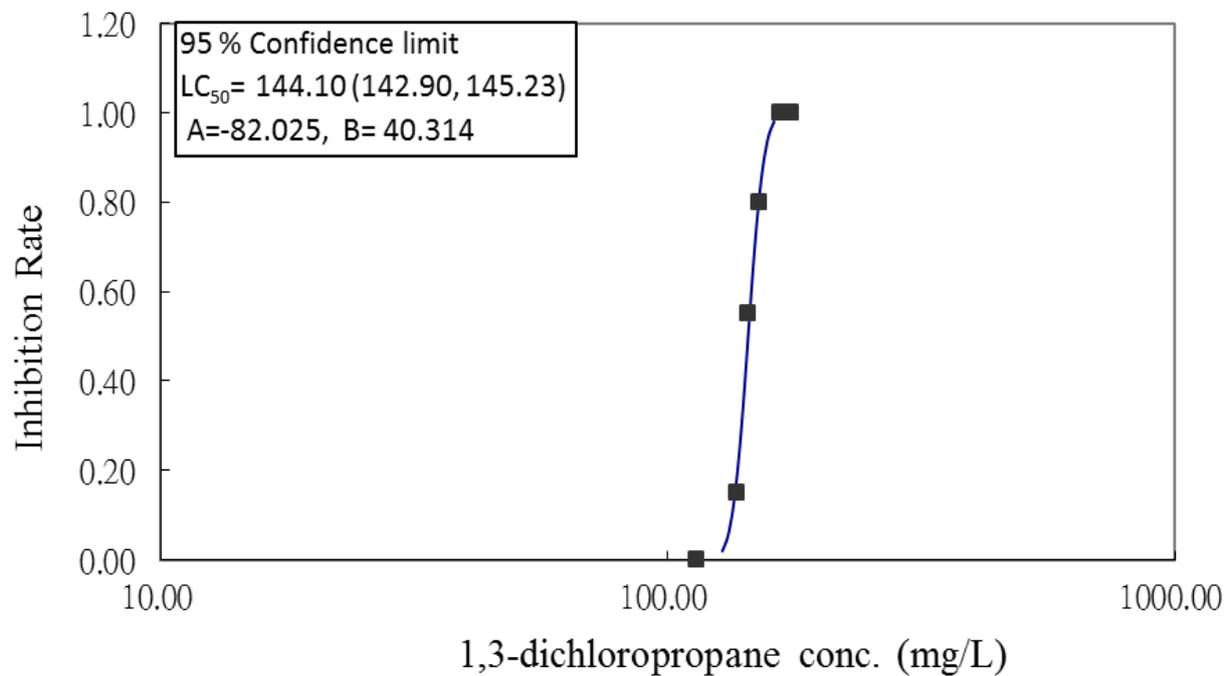
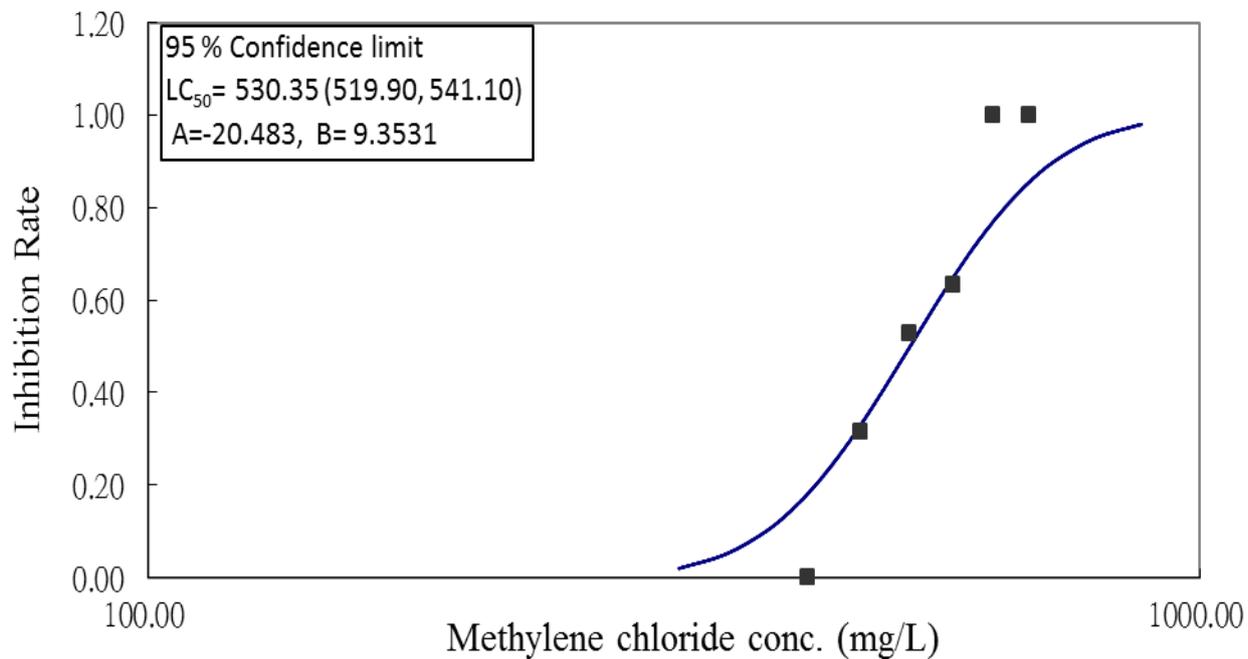
Chloroacetonitrile		
Conc. (mg/L)	Initial Number	Final Number
Control	20	19
7.77	20	0
5.44	20	0
3.88	20	6
2.33	20	13
1.55	20	20
0.78	20	20

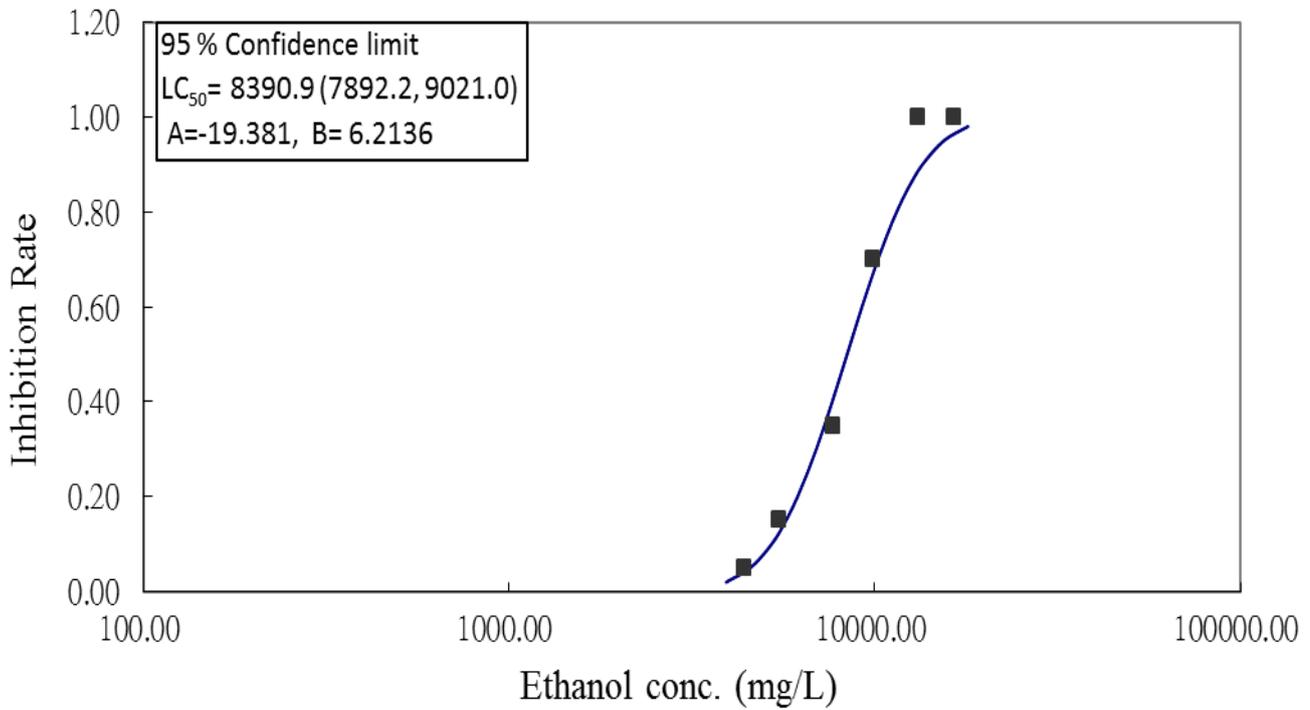
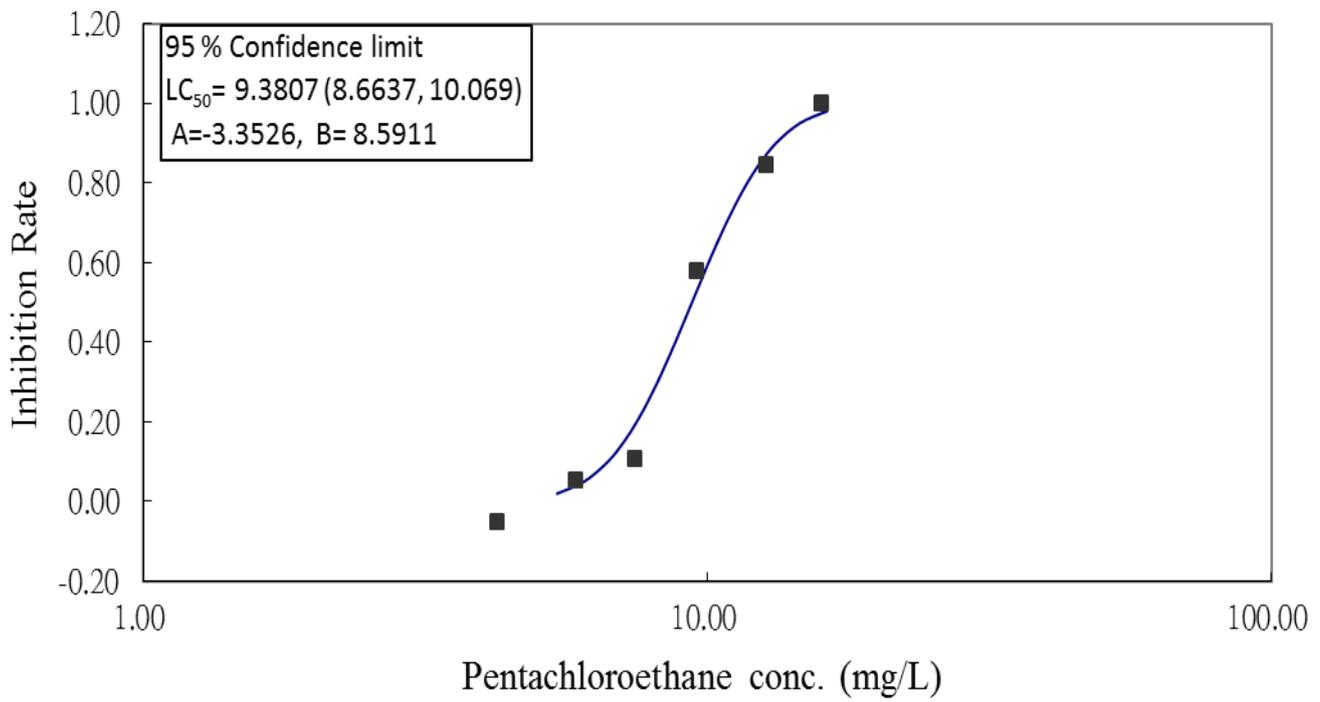
Malononitrile		
Conc. (mg/L)	Initial Number	Final Number
Control	20	20
4.752	20	0
1.584	20	3
0.792	20	14
0.158	20	19
0.079	20	20

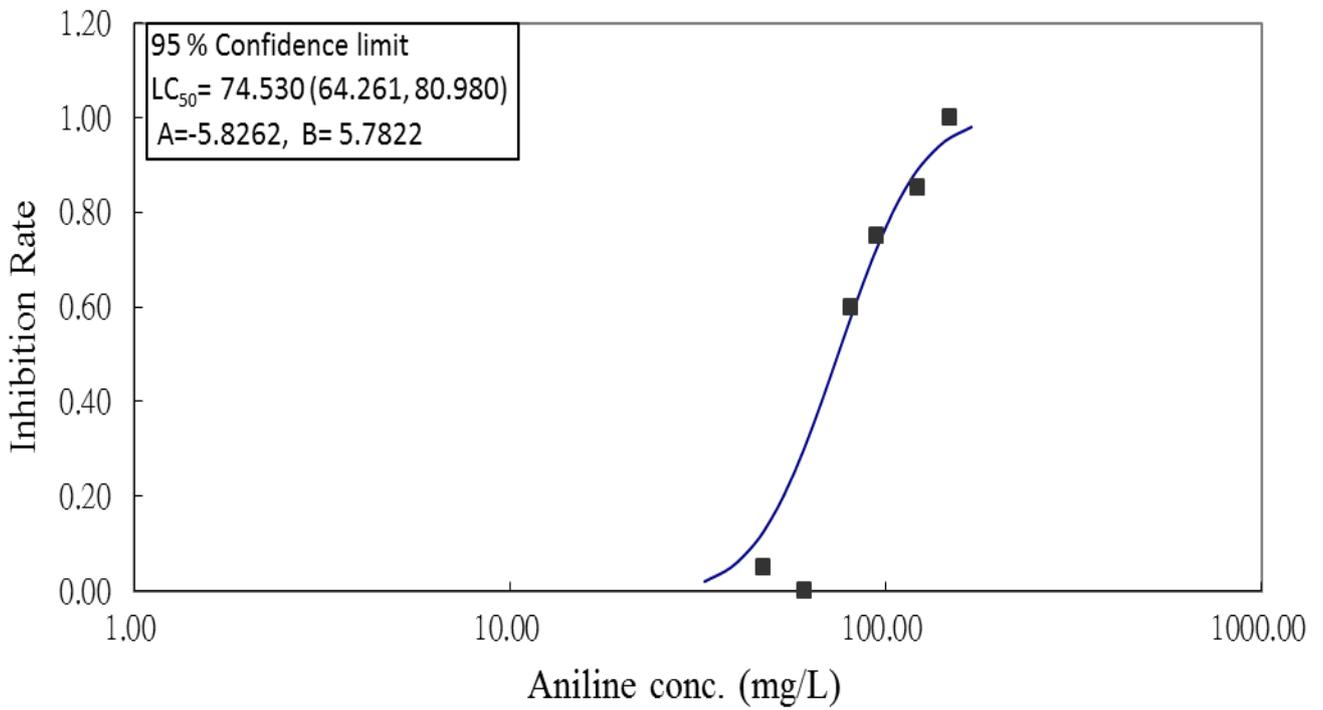
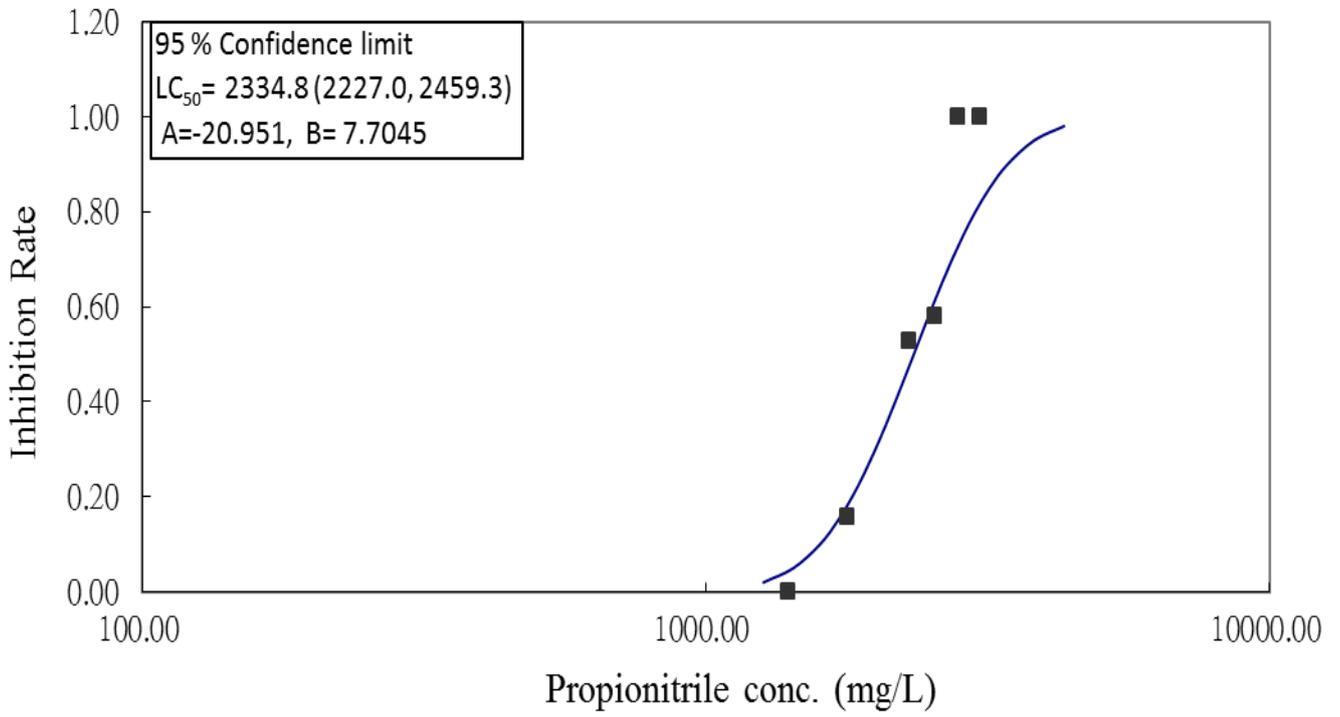
Parathion			Malathion		
Conc. (mg/L)	Initial Number	Final Number	Conc. (mg/L)	Initial Number	Final Number
Control	20	19	Control	20	20
6.61	20	0	38.57	20	0
3.31	20	0	19.29	20	0
1.653	20	7	9.64	20	9
0.827	20	14	3.86	20	12
0.33	20	15	1.21	20	15
0.17	20	17	0.48	20	19

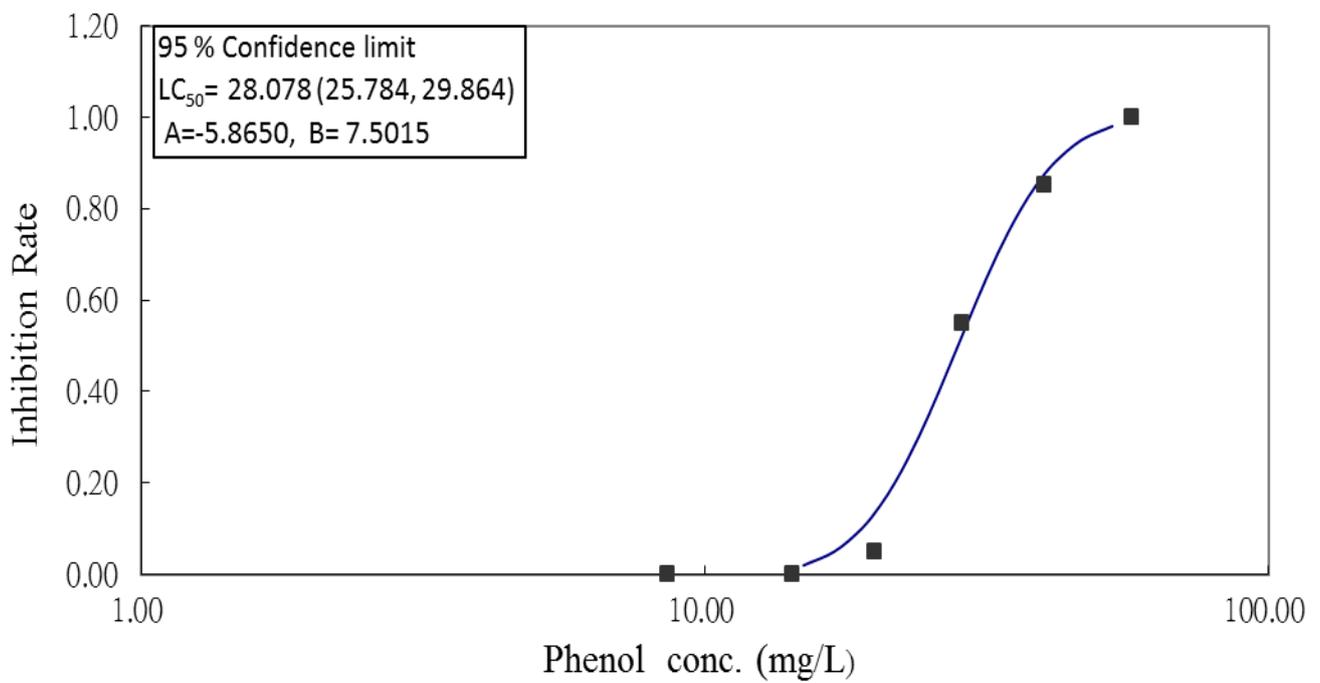
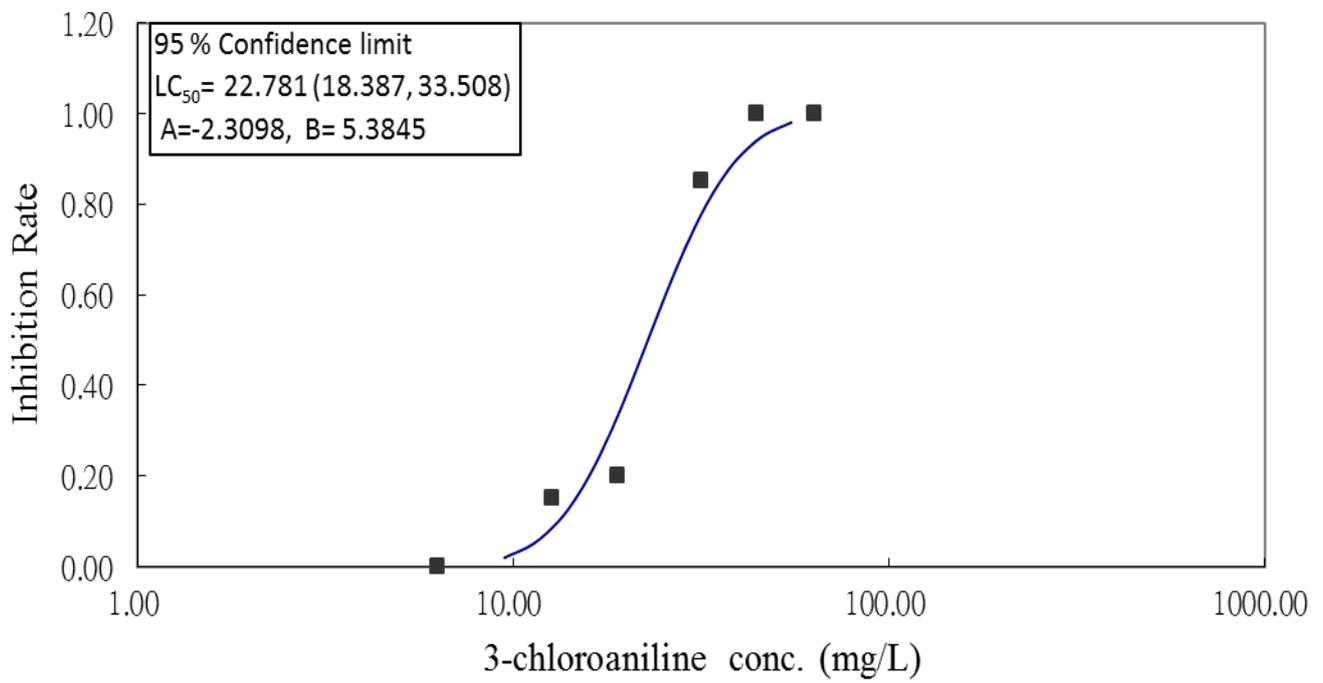


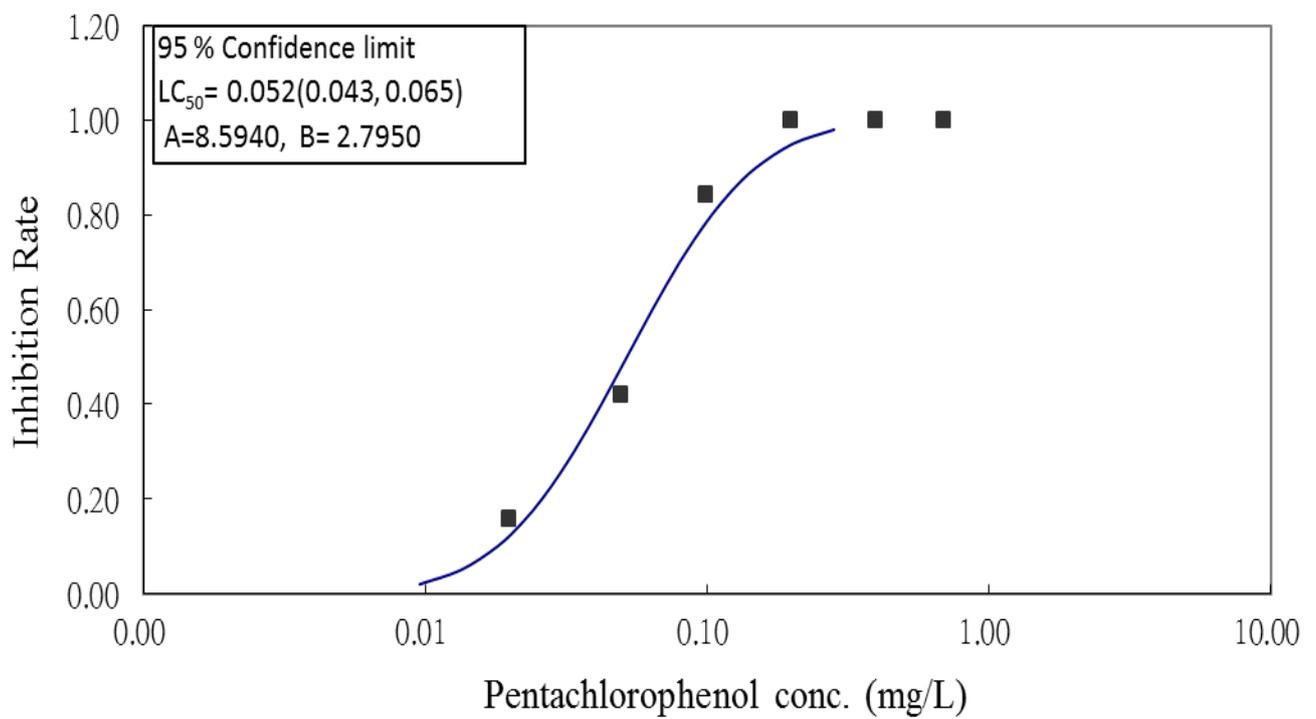
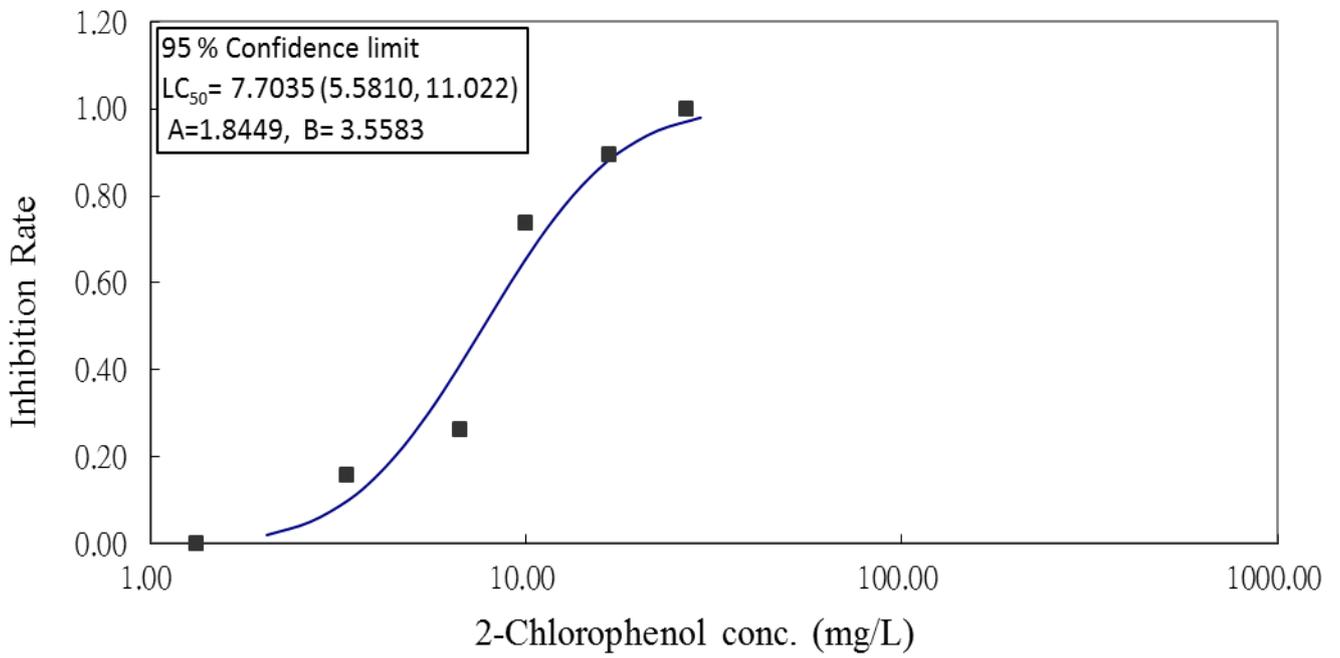


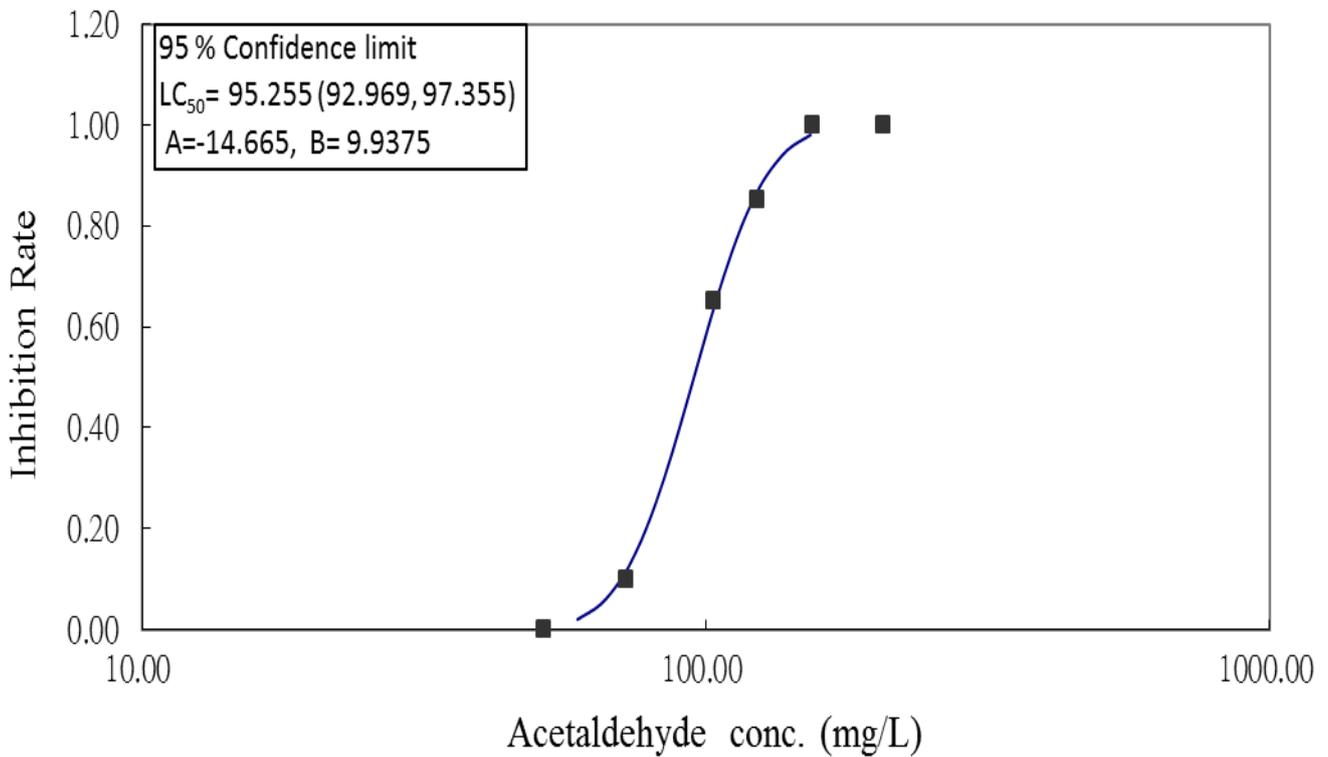
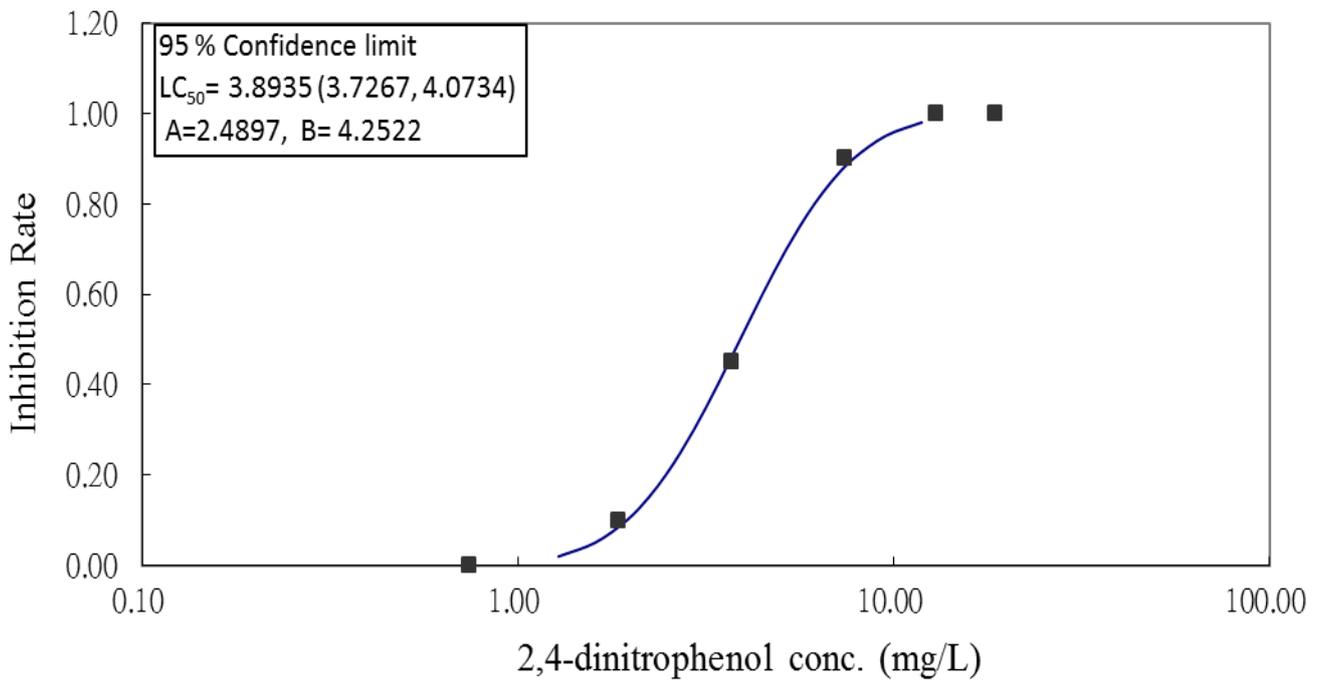


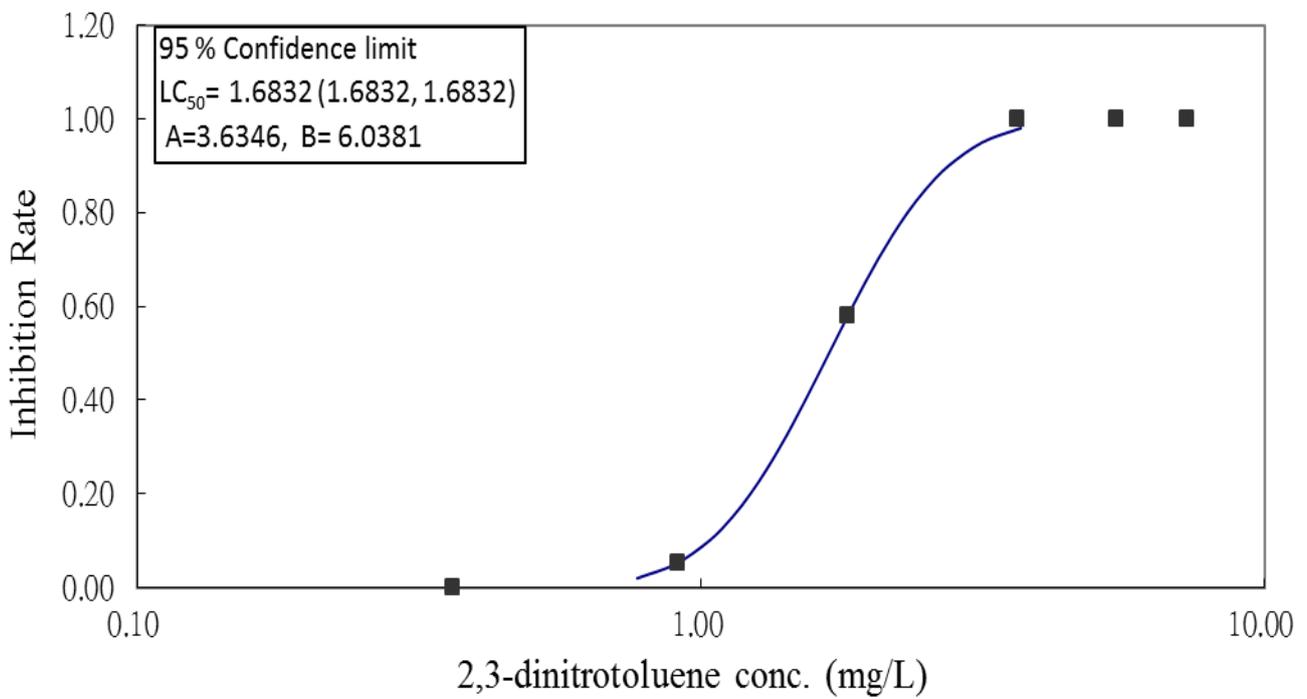
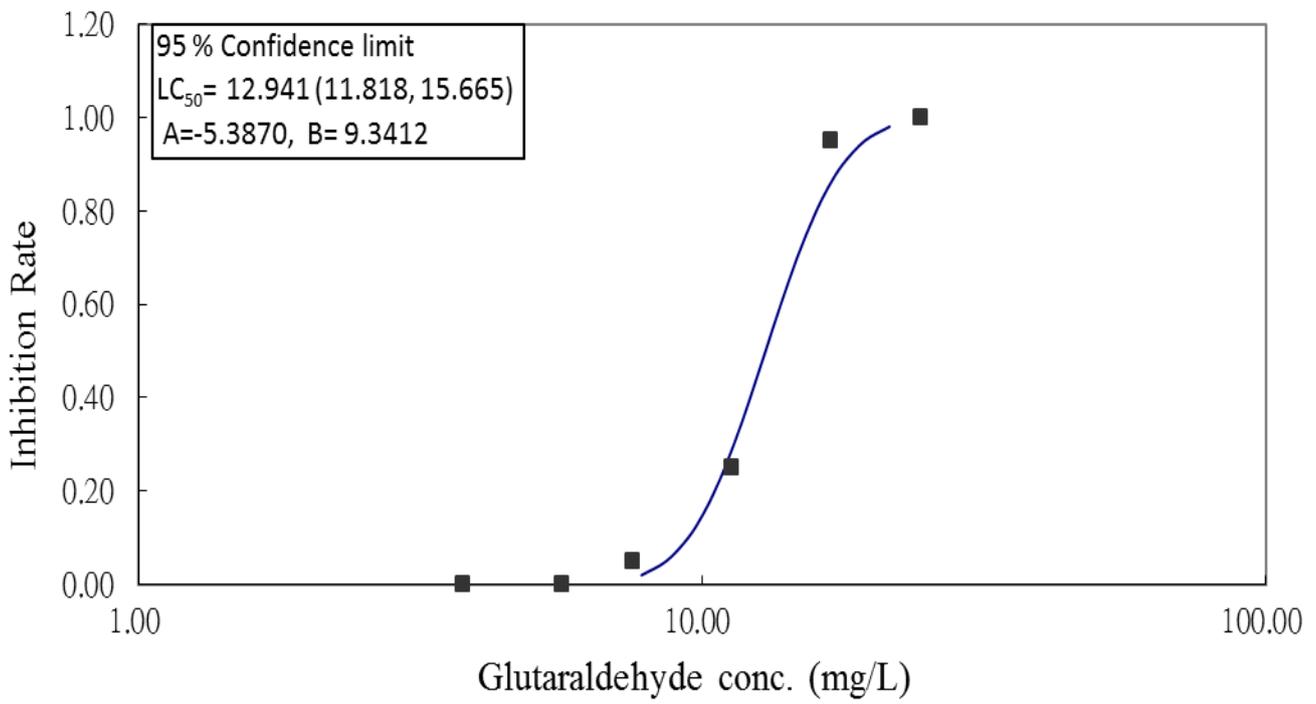


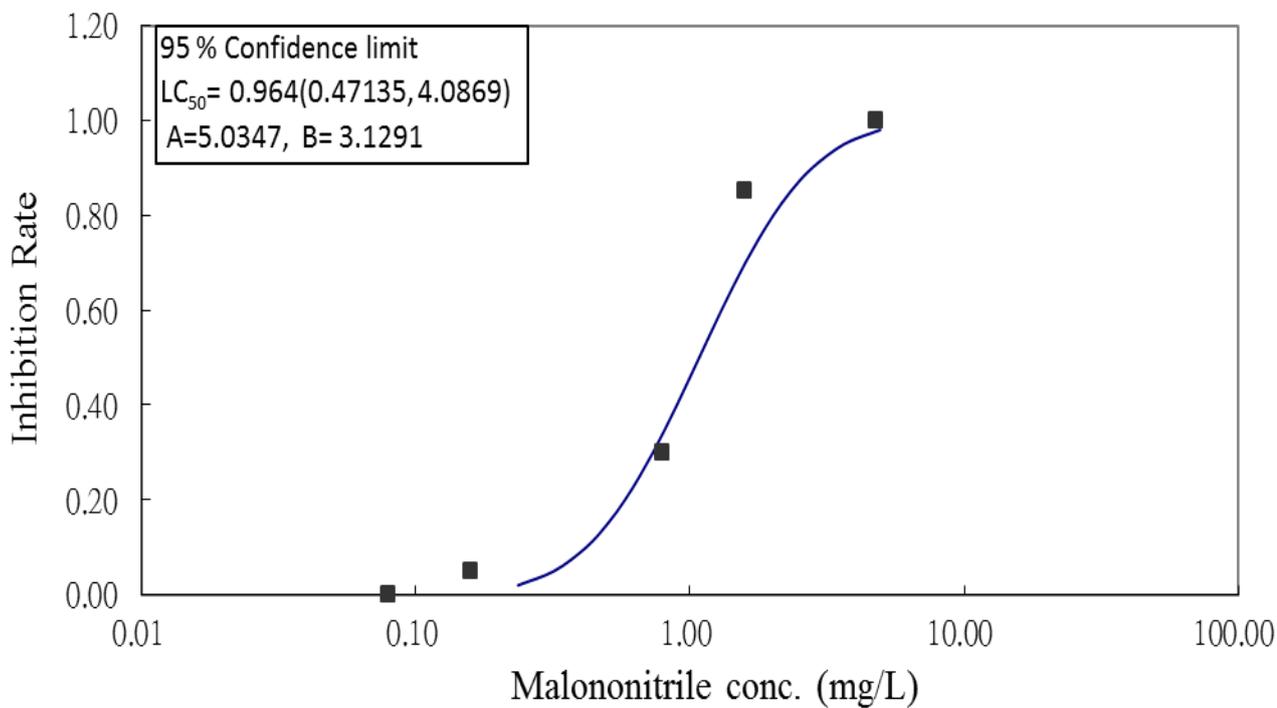
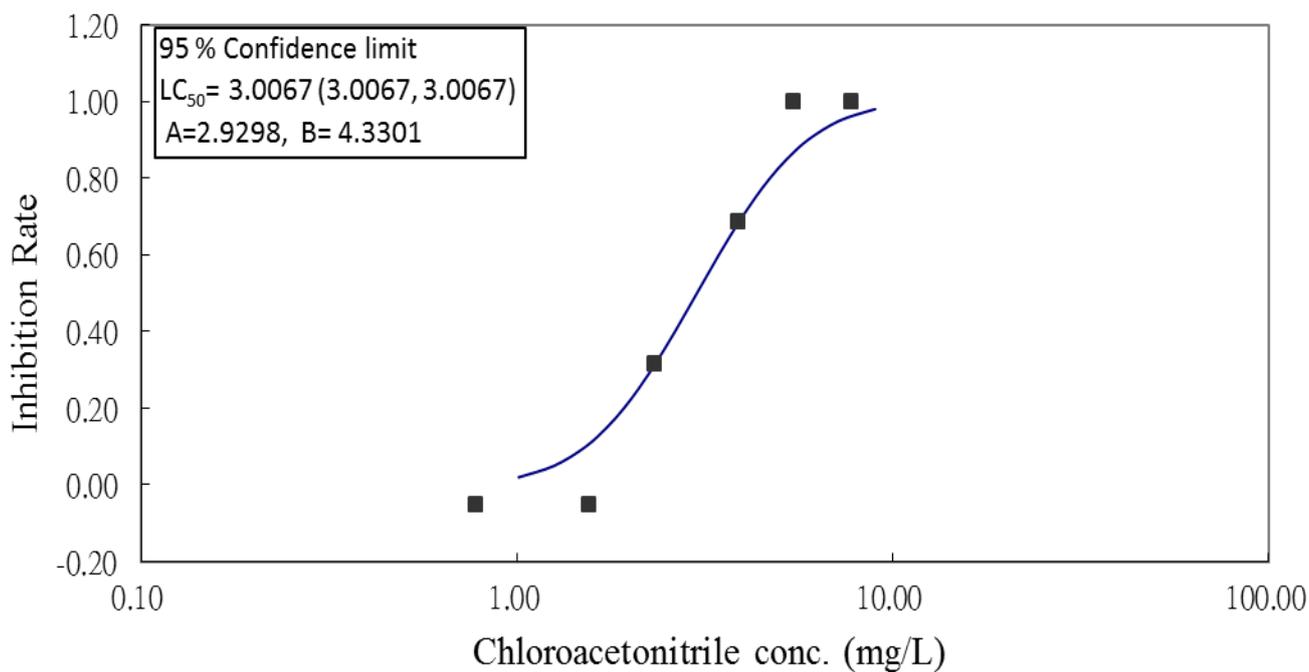


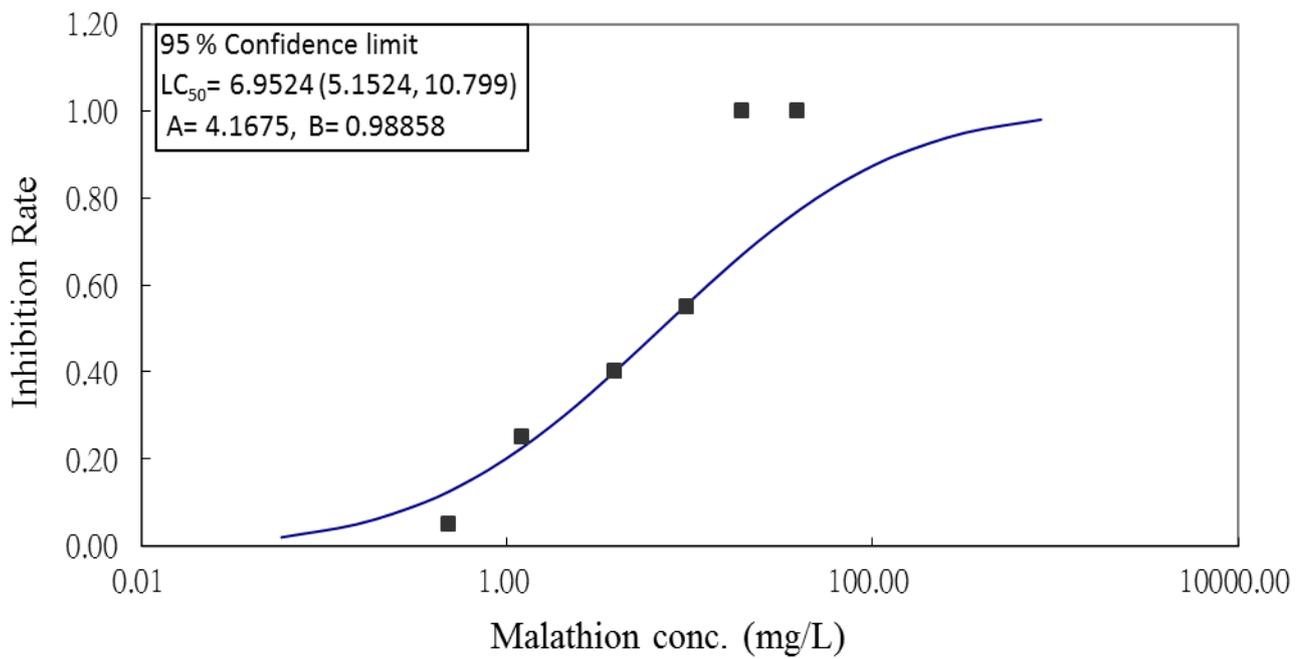
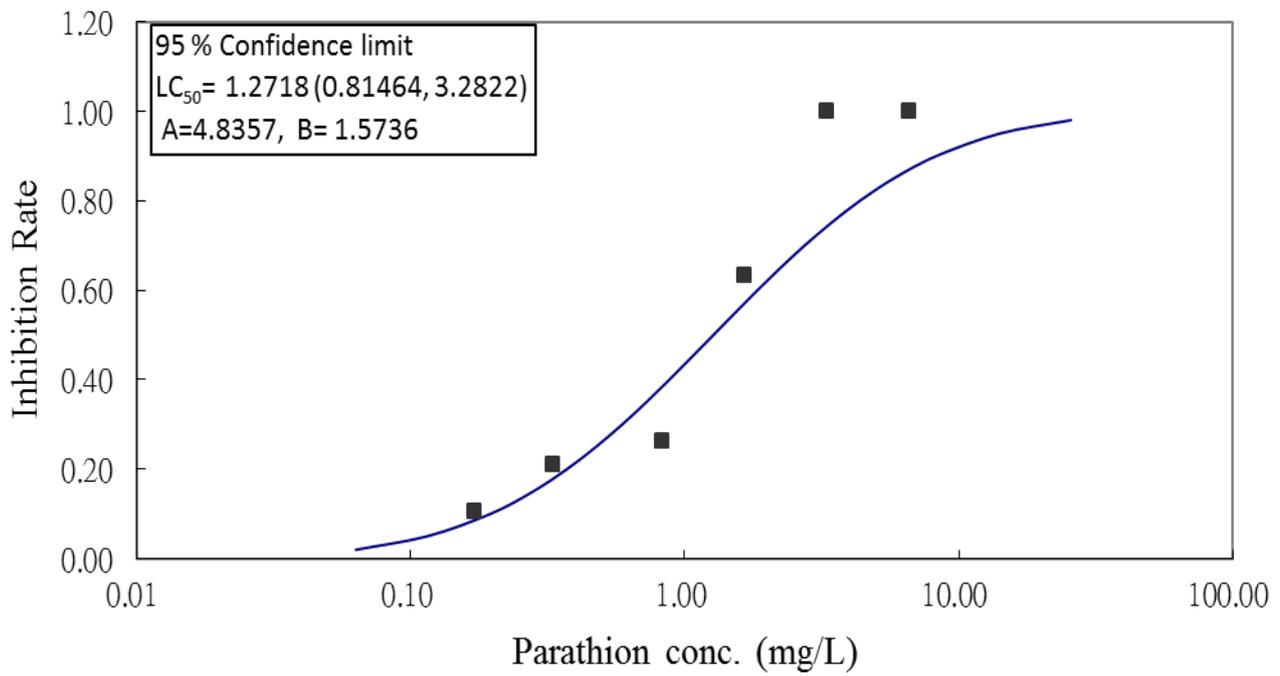














附錄二

二十種有機物毒性試驗

Microtox 急毒性試驗

原始數據

Benzene			Toluene		
Conc. (mg/L)	Initial light	Final light	Conc. (mg/L)	Initial light	Final light
Control	88	76	Control	109	84
315	96	14	77.85	98	11
157.5	90	20	38.925	105	16
78.75	91	24	19.46	94	28
39.38	95	37	9.73	102	44
19.69	86	46	4.87	100	60

Methylene chloride			1,3-dichloropropane		
Conc. (mg/L)	Initial light	Final light	Conc. (mg/L)	Initial light	Final light
Control	90	80	Control	95	76
5956.2	88	0	513	91	5
2978.1	88	0	256.5	90	11
1489.05	93	14	128.25	93	29
744.53	92	54	64.125	97	51
372.26	87	76	32.06	93	71

Pentachloroethane			Ethanol		
Conc. (mg/L)	Initial light	Final light	Conc. (mg/L)	Initial light	Final light
Control	92	103	Control	94	83
71.73	88	0	134919	101	0
35.865	96	7	67459.5	95	9
17.9325	90	68	33729.75	92	56
8.96625	93	120	16864.875	97	93
4.483125	95	121	8432.4375	101	107

Propionitrile		
Conc. (mg/L)	Initial light	Final light
Control	94	97
17196.3	91	8
8598.15	85	42
4299.075	88	79
2149.5375	89	99
1074.76875	97	113

Aniline		
Conc. (mg/L)	Initial light	Final light
Control	93	105
50.82084	86	25
25.41042	83	36
12.70521	80	46
6.352605	88	76
3.1763025	90	93

3-chloroaniline		
Conc. (mg/L)	Initial light	Final light
Control	94	114
74.25	91	25
37.125	92	31
18.5625	93	46
9.28125	94	74
4.640625	93	93

Phenol		
Conc. (mg/L)	Initial light	Final light
Control	92	100
43.875	84	29
21.9375	81	41
10.96875	89	59
5.484375	86	74
2.7421875	83	86

2-chlorophenol		
Conc. (mg/L)	Initial light	Final light
Control	99	113
84.33	94	16
42.165	87	25
21.0825	88	39
10.54125	86	56
5.270625	96	87

Pentachlorophenol		
Conc. (mg/L)	Initial light	Final light
Control	96	71
1.34	94	19
0.67	96	27
0.335	98	46
0.1675	90	59
0.08375	91	70

2,4-dinitrophenol		
Conc. (mg/L)	Initial light	Final light
Control	97	96
97.02	86	0
48.51	97	0
24.255	92	35
12.1275	99	71
6.06375	98	79

Acetaldehyde		
Conc. (mg/L)	Initial light	Final light
Control	94	98
694.98	86	23
347.49	82	40
173.745	83	60
86.8725	91	77
43.43625	93	90

Glutaraldehyde		
Conc. (mg/L)	Initial light	Final light
Control	97	109
25.38	84	13
12.69	88	27
6.345	92	44
3.1725	95	62
1.58625	97	78

2,3-dinitrotoluene		
Conc. (mg/L)	Initial light	Final light
Control	94	105
26.73	82	15
13.365	88	30
6.6825	83	48
3.34125	87	65
1.670625	88	78

Chloroacetonitrile		
Conc. (mg/L)	Initial light	Final light
Control	91	102
314.61	84	25
157.305	75	43
78.6525	83	61
39.32625	90	79
19.663125	86	90

Malononitrile		
Conc. (mg/L)	Initial light	Final light
Control	95	87
801.9	87	14
400.95	97	30
200.475	96	48
100.2375	95	66
50.11875	94	75

Parathion			Malathion		
Conc. (mg/L)	Initial light	Final light	Conc. (mg/L)	Initial light	Final light
Control	96	107	Control	93	102
334.757	91	0	542.43	90	0
167.3785	87	9	271.215	87	3
83.68925	95	26	135.6075	86	26
41.844625	93	43	67.80375	87	51
20.9223125	97	75	33.901875	97	74

