

第一章、緒論

1.1 研究緣起：

多環芳香烴化合物(Polycyclic aromatic hydrocarbon, PAHs)具致癌性及致突變性^[1]，因此引起大眾關切之議題。PAHs在環境中分布廣泛，其主要是經由碳氫化合物在不完全燃燒之情形下所產生^[2,3]，天然來源如森林大火，人為來源如石化工業及汽機車排放之廢氣，其廢氣吸附於大氣中微粒，經重力沈降至水體中。而PAHs具低反應性，在環境中的停留時間久，使其可存在於環境之各介質。

一般而言，PAHs為疏水性化合物，然而其結構上具二及三環者則水溶性較高^[3]，當溶於水之PAHs經太陽光之照射後行光降解，近年來有研究發現，PAHs在光解後產生光誘導毒性，其毒性較未光解強，水體中之生態環境因毒性影響而改變^[3]。

近年來工業科技發展迅速，環境資源被開發利用，人類活動所產生之污染已嚴重破壞自然生態，使環境受衝擊而日漸惡化。PAHs 對水體生物之毒性，可藉生物毒性試驗之方法，監測水體生物受 PAHs 之影響，評估水體生態環境變化，因此生物毒性試驗方法已謂為趨勢。

生物毒性試驗之受測生物，例如魚類、水蚤、藻類、水生生物及浮游生物等，在水體生態系統中，藻類屬於食物鏈的底部，為重要的生產者，若受毒性物質之危害時，會由食物鏈致使其他物種也產生理變化。基於上述本實驗使用浮游植物—月芽藻 (*Raphidocelis subcapitata*) 為試驗物種；另一方面，藻類之生活史較短，在試驗時毒性物質對幼年或老年期藻類之容忍性差異性較小。

利用標準方法測試揮發性有機物之毒性時，由於試驗條件為開放式系統，因此常造成毒性低估情形，本研究改善上述之缺點而以完全密閉式的 BOD 瓶作為試驗容器，並以藻類的光合作用產氧量及抑制藻類細胞繁殖為反應參數進行試驗；另外，針對 PAHs 中的 Anthracene 及 Naphthalene 光變化途徑作分析，且比較光變化產物對藻類毒性影響，進一步以 QSAR (Quantitative Structure Activity Relationship) 對其毒性結果作迴歸分析，可預測水體環境中 PAHs 光毒之結果，作為保護水體生物之參考。



1.2 研究目的：

由上述所遇問題，本研究進行下列之方向探討：

- 一、於 BOD 瓶藻類毒性試驗下，研究藻類以細胞密度、最終產量與溶氧為試驗終點時，對 PAHs 進行毒性試驗，比較兩種試驗終點對毒性試驗之影響。
- 二、研究 PAHs 在不同光波長和試驗時間下，光分解產物之種類及其藻類的毒性變化為何。
- 三、以 QSAR 進行分析與毒性試驗之結果作一比較，討論兩者間相關性為何。
- 四、比較藻類毒性試驗和其他物種毒性試驗之結果，探討其差異性。
- 五、分析 EC₁₀、NOEC 及 LOEC 之變化，進一步探討 PAHs 濃度及光毒對環境水體生態之危害性。

1.3 研究架構



為探討毒性物質 Anthracene 及 Naphthalene 在不同波長的人工紫外線照射後，其光分解產物對藻類毒性影響，並針對不同照射時間進行研究與討論，以完整瞭解 Anthracene 及 Naphthalene 在水體中光變化情形。

將配製的毒性物質稀釋進行 HPLC 定量分析，添加定量的藻類初始細胞及毒物於 BOD 內，然後置於恆溫室內的迴轉式振盪混合器進行毒性試驗。利用已定量的毒性物質置於照光實驗箱進行照光實驗，人工紫外線燈有短波長及長波長紫外線燈，照光時間分為 0 至 48 小時，每小時由照光實驗箱取出樣品進行定性分析。

透過不同照光時間後定性分析之毒性物質，依時間長短進行藻類毒性試驗，比較人工紫外線光燈及日光燈下藻類影響，並可獲知照光時間對藻類毒性變化。研究架構見圖 1.3.1。

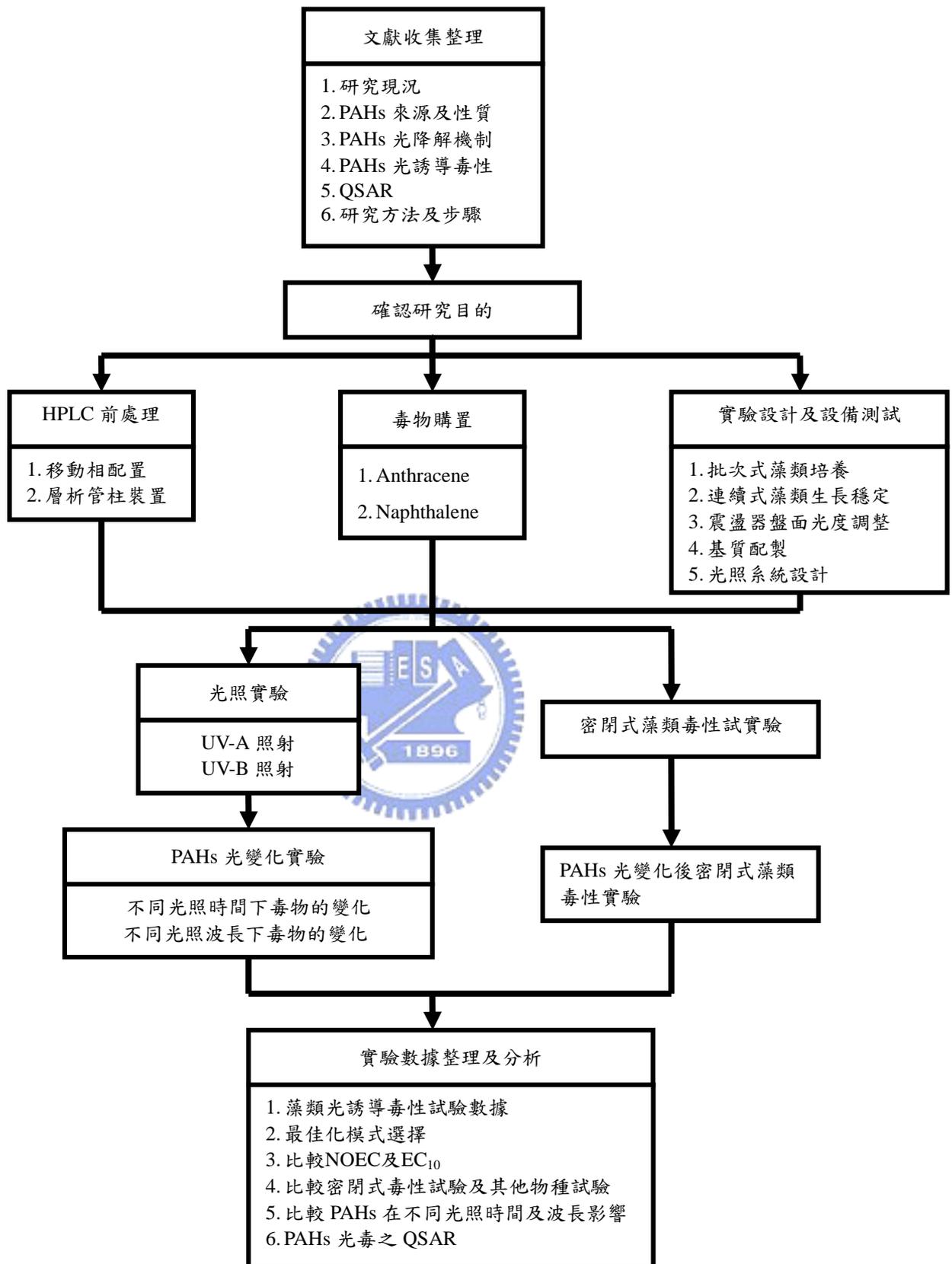


圖 1.3.1 研究流程圖

第二章 文獻回顧

2.1 多環芳香族(PAHs)之特性

2.1.1 PAHs 之來源及種類

多環芳香烴化合物 (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs) 是由碳及氫原子所組成的苯環，由兩個或兩個以上苯環鍵結形成之化合物。PAHs 種類有數千種形式，同分子式 PAHs 可能有數個同分異構物，故 PAHs 為一族群總稱。在環境中約有三百多種 PAHs，而美國環保署在 129 種優先列管污染物(priority pollutants)和 189 種有害空氣污染物(hazardous air pollutants)中選取 16 種 PAHs 進行管制。

多環芳香烴化合物來源可分為自然及人為兩種^[21]：

1. 自然來源：

植物或生物合成、天然森林火災及火山爆發是大氣中 PAHs 主要來源。

2. 人為來源：

主要為人為活動產生的高溫燃燒過程所排放，其來源如住宅加熱設施、工業製程排放、海陸空交通工具排放、電力及加熱設備使用、焚化及露天燃燒等。

水體環境中PAHs主要來自於工業區排放廢水、湖泊或出海口地表污染物(Mueller et al., 1989)。由於PAHs難溶於水之特性，因此其環境流佈大部份吸附在固體微粒，再沈降至水體底部或沈積在河川底質(sediment)，進而累積在水棲生物體內造成影響^[22]。

2.1.2 PAHs 之物理性質

PAHs大多具高熔點及高沸點，熔點皆高於 80°C，沸點皆高於 200°C，常溫下是以氣固相共存在環境中。PAHs在 25°C 飽和蒸氣壓分小於 0.1mmHg，飽和蒸氣壓分布在 $10^{-1} \sim 10^{-7}$ mmHg，屬於半揮發有機化合物 (Semi-volatile organic compounds, SOCs)，常溫下為氣固共存。PAHs以碳氫苯環鍵結而成，極性低且無取代基，在水中溶解度低，若在有機溶劑中(非極性或弱極性)，如丙酮、苯、正己烷等，則有較高溶解度^[1,3]。

PAHs具高能量 π 鍵結軌域(π -bonding orbital)及低能量 π^* 反鍵結軌域(π -antibonding orbital)，使PAHs經電子轉移形成可吸收紫外光和可見光，因而含有吸收光譜及螢光光譜特性^[1]。

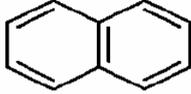
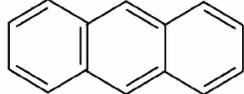
2.1.3 PAHs 之化學性質



因PAHs的結構有共軛環，故其反應性較低，在環境中為穩定的原生性污染物(primary pollutants)。然而，空氣中PAHs具光化學活性，吸收紫外光和可見光而形成激發態，會和強氧化性化合物(NO_3 和 O_3)反應形成硝基多環芳香族(nitro-PAHs)，此衍生物之毒性較PAHs毒性高。

PAHs主要為親電子反應(Electrophilic reaction)，在空氣中PAHs可產生光化學反應而分解或形成具取代基PAHs。在空氣中飄浮之PAHs受光氧化(Photooxidized)形成各種化合物，如Anthracene在大氣中經光氧化形成9,10-endoperoxide及各種quinones^[23]；在水體中Anthracene受光氧化及模擬日光照射，形成許多由氧及氫氧取代基化合物，最終產生穩態的取代基化合物及單環化合物^[4]。

表 2.1.1 Naphthalene 及 Anthracene 特性

PAHs 名稱	Naphthalene (Nap)	Anthracene (Ant)
結構式		
化學式	$C_{10}H_8$	$C_{14}H_{10}$
分子量	128	178
性質	白色結晶，揮發性薄片，強煤焦油氣味，難溶於水，溶於苯、乙醚。	黃色晶體帶有藍色螢光，難溶於水，溶於酒精、乙醚。
熔點(°C)	80.55	216.2-216.4
沸點(°C)	217.9	339.9
比重	1.145 (20°C)	1.25 (27°C)
蒸氣壓(mmHg)	0.23 (25°C) 1 (52.6°C)	1 (145°C)
溶解度(µg/L)	31700	73
logK _{ow}	3.32	4.45
閃火點(°C)	80	121
用途	染料、茜素、菲、蔥醌、印花、煙幕成份、閃爍計數器之晶體、有機半導體研究。	逐蟲劑、殺蟲劑、潤滑劑、合成樹脂、防腐劑、閃爍偵檢器、防霉劑。

2.1.4 PAHs 之光降解機制

在光化學中說明分子吸收光子時，低能階電子得到外加能量使其激發至高能階軌道，當化合物鍵結也在此電子激發之軌道，由於電子轉移而使化學鍵結斷鍵^[24]。光化學分解可分為直接光解(direct photolysis)及間接光解(indirect photolysis)：

1. 直接光解：物質吸收光能後至激發態，自行化學反應而分解。
2. 間接光解：在化學反應中加入光敏感物質(photosensitizer)，它可吸收光能後至激發態產生氫氧自由基(OH·)，自由基和有機物作用使得有機物斷鍵造成光降解反應^[25]。

PAHs 在紫外線照射下，化合物吸收紫外線光子能量後打斷分子共價鍵，使得分子由低能量的單重電子基態(Ground-state singlet)轉換至高能量的單重電子激發態(Excited-state singlet)，而單重電子激發態為一短暫形式，它接著會以三種途徑失去電子能量：

1. 以放出熱能使它降至基態。
2. 釋放光子使其降至單重電子基態。
3. 分子系統內轉換效應(intersystem crossing) —單重電子激發態經由分子轉換至較低能未成對三重電子激發態(excited-state triplet)。

高振動能的三重電子激發態再經放出熱能及發出熐光方式，使其變為單重電子基態^[26]。

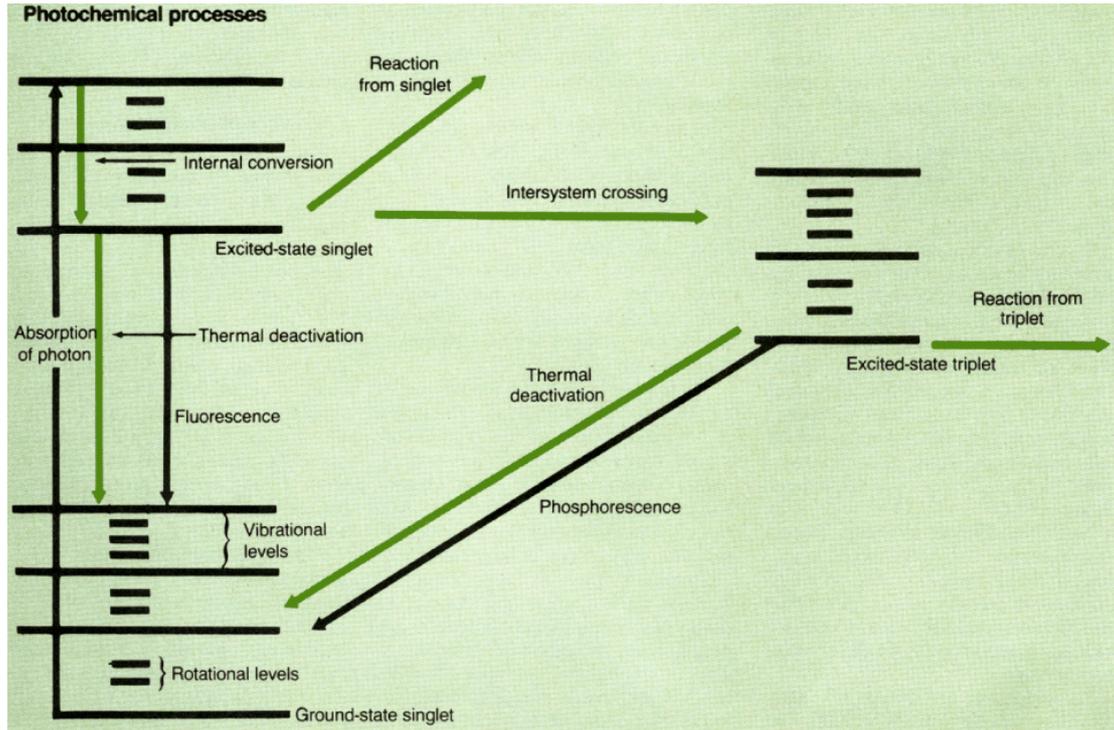


圖 2.1.1 光化學過程 (Larson and Berenbaum, 1988)

PAHs 所誘導的光毒機制，可由上述光化學及光動力學反應 (photodynamic reactions) 解釋，在光動力學機制中又可分為 type I 及 type II 兩種反應。在 type I 中是由三重電子激發態降低原子價，產生可和生物基質結合的高反應性自由基 (free radicals)；type II 則由發色團 (chromophore) 吸收紫外線後，將其能量傳送至氧分子形成單重態氧分子 (singlet-oxygen, $^1\text{O}_2$)，此 $^1\text{O}_2$ 會破壞細胞膜及破壞 DNA，另外也產生二級自由基 (secondary radicals) 會影響細胞結構與功能致傷害生物體^[27]。

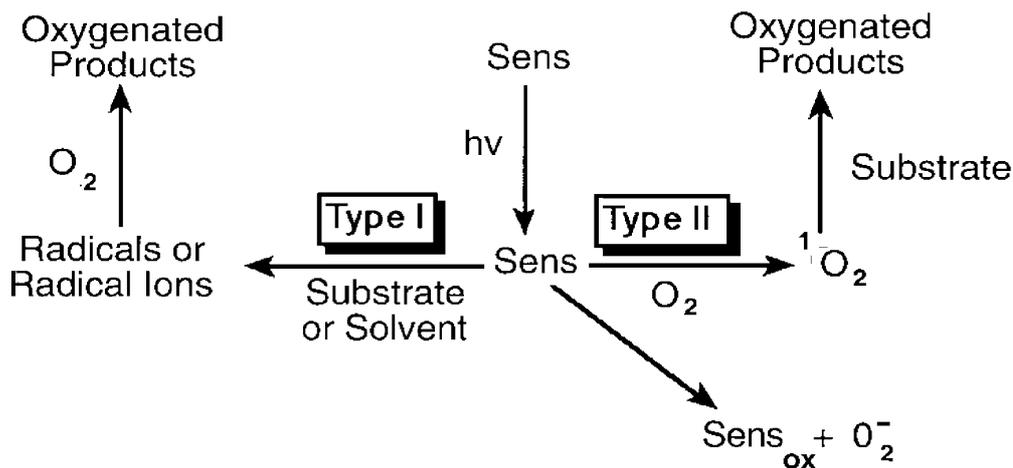


圖2.1.2 定義 Type I and Type II 光敏氧化反應 (Foote, 1991)

2.1.5 PAHs 之光變化

PAHs 溶解度極低，在水體環境中為穩定之有機化合物，但經太陽光照射後，化合物本身吸收光能導致不穩定，最後產生氧化作用。PAHs 中的二環 Naphthalene 及三環 Anthracene 由太陽光提供足夠光能致化合物鍵結被破壞後較易溶於水，並且光氧化產物其潛在毒性對水體生物造成莫大影響，基於上述情況進一步探討 Naphthalene 及 Anthracene 光氧化途徑及其光變化產物。

Anthracene 受單重態氧的加入反應，由於取代基 9 及 10 處的位置上電子密度較低，因而迅速地光氧化反應產生 Anthraquinone，此化合物極不穩定會再反應成其他化合物，氧分子及氫氧自由基對 Anthraquinone 上取代基位置反應，生成穩定及不穩定二類化合物，而不穩定化合物即為反應中間產物，再進一步地反應產生具單環及二環的最終產物，其光變化途徑如圖 2.1.3^[40]。Naphthalene 受太陽光照射後，進行光氧化反應產生光降解，然而 Naphthalene 並不屬於光敏化物質，因此其光變化情形和 Anthracene 不同，另外光變化後產物的毒性較原化合物低，其光變化途徑如圖 2.1.4^[41]。

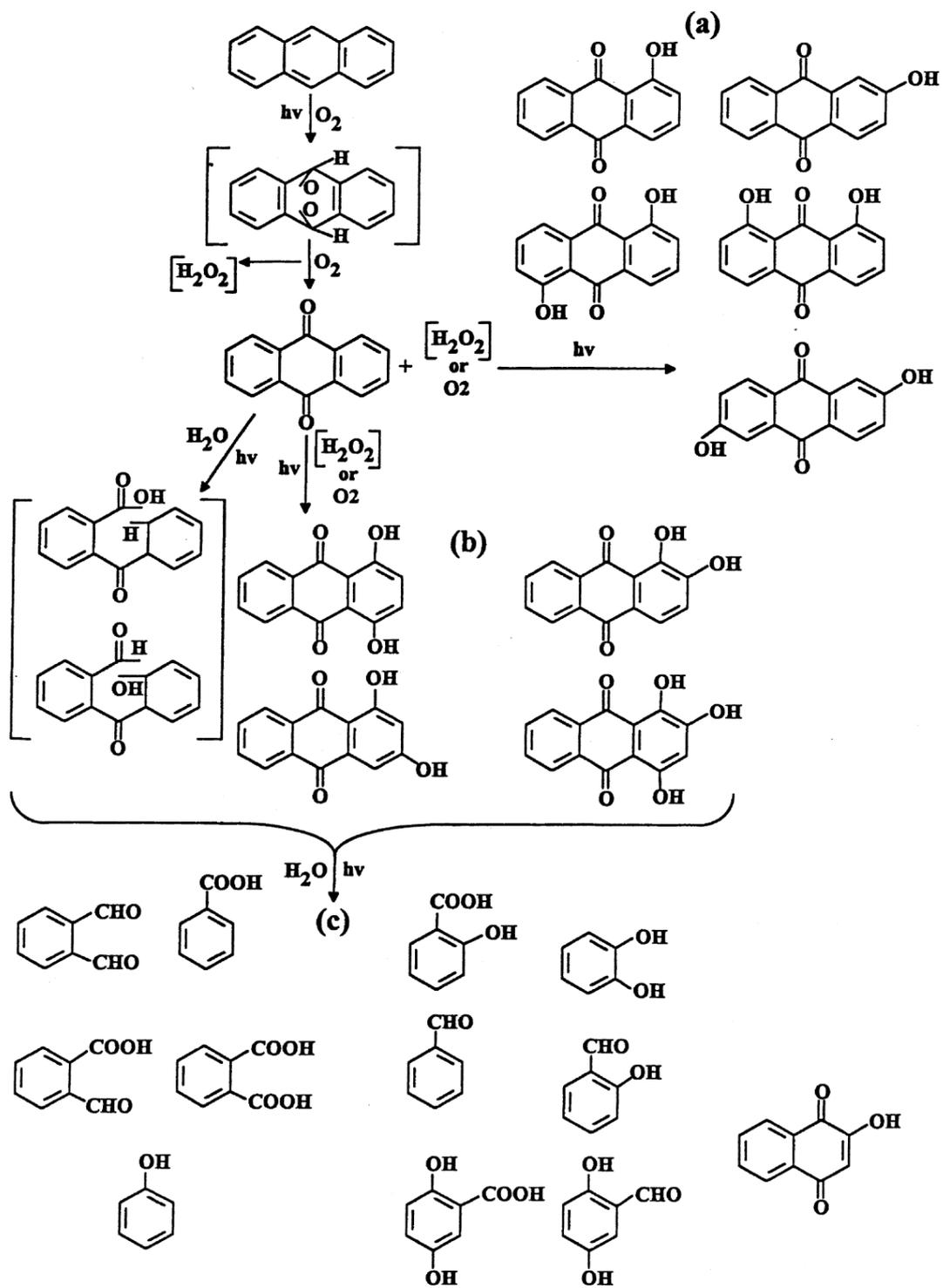


圖 2.1.3 在模擬太陽光下 Anthracene 光氧化途徑及光變化產物(Mallakin et al.,2000)

2.2 PAHs 毒理特性及光誘導毒性

2.2.1 PAHs 毒理特性

PAHs 受重視及關注是因為在四環以上時具致癌性(carcinogenicity)及致突變性(mutagenicity)，此外也會引發皮膚病、神經系統損害、呼吸疾病等。PAHs 是經由代謝系統的間接作用而致癌及致突變性。PAHs 和細胞大分子作用經代謝而產生致癌，cytochrome P450 和 PAHs 鍵結行單電子氧化(one-electron oxidation)形成自由基，再與 DNA 作用引起癌症。

2.2.2 PAHs 光誘導毒性



Greenberg et al., 1997^[28] 探討在陽光照射下PAHs的毒性，當PAHs吸收有效波長及紫外線強度後，造成毒性較未照射增強許多，致評估PAHs毒性產生低估情況，此外也研究水生植物浮萍(*Lemna gibba*)實驗，發現經光變化的PAHs未知混合較原PAHs未受光刺激的毒性高出許多。Ren et al., 1996^[29] 對螢光菌 (*Photobacterium phosphoreum*) 做實驗也得出相同結果。Mallakin et al.1999^[30] 以浮萍為物種對Anthracene光變化的中間產物 Anthraquinone及 11 個hydroxyanthraquinone毒物試驗，其EC₅₀由 50ppb至幾 ppm。Marwood et al., 1999^[31] 以伊利湖(Lake Erie)中的浮游植物作物種，對Anthracene光變化中的 1,2-dihydroxyanthraquinone為毒性物質作試驗，發現此毒物會對浮游植物的光合作用產生抑制效應。

Gala and Giesy^[42] 以淡水綠藻 (*Raphidocelis subcapitata*)為測試物種，Anthracene為其測試毒物，對藻類的試驗參數為比生長率及¹⁴C輻射標定測定法，此為批次式開放系統的毒性試驗，為避免Anthracene溶液揮發造成毒性

低估，試驗期間每 8 小時再加入Anthracene溶液以維持固定濃度，然而Anthracene經UV-A照射後已光降解為其他化合物，並且定時再加入新的Anthracene溶液，在多種光變化產物的反應下反而造成毒性高估之情況。Brack et al., 2003^[16] 以單細胞綠藻(*Scenedesmus vacuolatus*) 及螢光菌(*Vibrio fischeri*) 對Anthracene光變化產物作試驗，此為批次式密閉式系統的毒性試驗，發現Anthracene在藻類實驗中其未照光和光變化後毒性比較時，難顯現出光變化後毒性較強情況；螢光菌則有明顯光照後毒性變強情形。



表 2.2.1 Anthracene 光誘導毒性之相關研究

研究者	研究物種	試驗終點	試驗毒物	試驗時間	光照條件	試驗結果
Gala and Giesy ^[42]	Algae (<i>Raphidocelis subcapitata</i>)	比生長率 ¹⁴ C 輻射標定 測定	Anthracene	22 hr 及 24 hr	日光燈及 UV-A 燈	比生長EC ₅₀ =3.9~37.4μg/L ¹⁴ C 輻射標定測定 EC ₅₀ =3.3~24μg/L
Gala and Giesy ^[43]	Algae (<i>Raphidocelis subcapitata</i>)	細胞大小 葉綠素濃度 細胞生存力	Anthracene	4 hr 及 28 hr	6 支日光燈及 UV-A 燈	EC ₅₀ =16.1 ppb
Brack et al. ^[16]	Algae (<i>Scenedesmus vacuolatus</i>)	抑制細胞繁殖	Anthracene 及光變化產物	24 hr	模擬太陽光 燈管	Anthraquinone 及 10-hydroxyanthraquinone 抑 制率超過 50%。
Greenberg et al. ^[28]	Duckweed (<i>Lemna gibba</i>)	抑制生長	Anthracene 及光變化產物	7 days	模擬太陽光 燈管	2-hydroxyanthraquinone 毒性 最高(EC ₅₀ =0.05 mg/L)
Greenberg et al. ^[30]	Duckweed (<i>Lemna gibba</i>)	抑制光系統 I 或細胞色 素 b6/f 光氧化傷害 光系統 II	Anthracene 及光變化產物	6 hr	模擬太陽光 燈管	2-hydroxyanthraquinone 毒性 最高(EC ₅₀ =0.1 mg/L)
Choi and Oris ^[44]	Topminnow (<i>Poeciliopsis lucida</i>)	肝細胞線的 細胞死亡率	Anthracene Anthraquinone 1,2-dihydroxyanthraquinone Phenathrene	5 hr	UV-A 燈 UV-B 燈 日光燈	光變化產物(Anthraquinon 及 1,2-dihydroxyanthraquinone) 低毒性



Larson and Berenbaum. 1988^[26] 說明PAHs在受紫外光激發後由單重基態至三重態激發態，接著光化學中還原反應未完全，致使其促進電子轉移(光氧化及光還原)，形成具反應性和潛在毒性的中間產物，然而在生成物中超氧陰離子自由基(superoxide anion radicals, $O_2^- \cdot$)，它是強親核試劑(Nucleophile)可取代脂膜上的脂類，在生物體的細胞中反應產生過氧化氫及氧氣，過氧化氫再和金屬離子如：銅、鐵等，反應形成具高反應性氫氧自由基($OH \cdot$)，它可和DNA結合後發生致癌及突變。

Oris and Giesy 1987^[32] 解釋PAHs在水體生物的光毒機制是由具反應性氧物種(reactive oxygen species, ROS)引起氧化壓力(oxidative stress)。ROS藉由其高反應性和生物體中大分子作用，造成生物體受傷害此現象為氧化壓力。Halliwell and Gutteridge 1984^[33] 對氧化壓力做研究指出脂質過氧化(lipid hydroperoxide) 反應，讓生物體細胞膜通透性受影響，其作用機制為ROS先攻擊在生物體中含多元不飽和脂肪酸膜，再形成具毒性之醛類、烷類等，在上述作用時的中間產物如過氧自由基(peroxy radicals) 也同時產生，而這些中間產物可自行攻擊更多不飽和脂肪酸，使得許多脂質過氧化反應。Diplock et al 1991^[34] 指出藉由ROS使胺基酸變化造成蛋白質受損產生形態改變，Dizdaroglu and Bergtold 1986^[35] 也發現ROS引起DNA破碎及產生DNA adduct，adducts會使DNA複製時改變而導致癌症，Parchment 1991^[36] 說明DNA分離導致ROS產生進而引起DNA破碎，此過程為主要讓細胞死亡因子。

2.3 QSARs 及毒性機制

2.3.1 基本介紹

QSAR (quantitative structure-activity relationship) 是以有機物的物性、化性及結構間的性質與毒性建立起之統計關係，毒物學學者可由化學物之物化性質預測其毒性，在環境影響評估方面，QSAR是很重要的預測工具。QSAR最早是應用於醫藥學上，1970年後逐漸引進環工領域。在環工領域上QSAR的應用為推估當化學物質進入環境中對環境生物的影響及其環境宿命。另一應用則是利用QSAR對於新的未知化學物質毒性進行推估^[37]。此類物化參數包括電子效應 (σ_x)、位阻參數、辛醇－水係數 (n-octanol/water partition coefficient, logP)、分子折射率 (molar refractivity, MR)等。

基於化合物反應能力QSAR參數如親電性參數低分子佔用軌域能量 (the Lowest Unoccupied Molecular Orbital energy, E_{LUMO})，高分子佔用軌域能量 (the Highest Occupied Molecular Orbital energy, E_{HOMO})， E_{LUMO} 及 E_{HOMO} 本身和反應前後分子能量有關。

2.3.2 QSAR 分析 PAHs 光毒

在UV光下照射PAHs所導致之光誘導毒性之研究。Mekenyan et al.1994^[38] 研究學者以水蚤(Daphnia magna)進行試驗，水蚤的ALT(median adjusted lethal time, LT_{50})半調節致死時間為試驗終點。使用QSAR預估光誘導毒性時是依據兩個分析因子，分別為光毒性之內在因子(Internal factors)

及外在因子(External factors)，內在因子為對光的吸收程度和化合物的穩定性，外在因子為光照射能量和照光強度。由分析因子利用電腦軟體(MOPAC6)可求出高佔用分子軌域及低佔用分子軌域之間隔(Highest Occupied Molecular and Lowest Unoccupied Molecular Orbital gap, HOMO-LUMO gap)，HOMO-LUMO gap是指電子由低分子軌域提升至高分子軌域所需的能量。Log(1/ALT)及HOMO-LUMO gap(eV)兩者呈現鐘型曲線關係，在HOMO-LUMO gap為 7.1 ± 0.4 eV時具光誘導毒性稱為 phototoxicity window，此範圍之外則無光誘導毒性。而在無光誘導毒性之中，有些化合物因為它具防止吸收日光波長及可提高本身穩定性的特性，導致它吸收短光波長，獲得較大能量使得HOMO-LUMO gap較大，例如：Anthracene、Pyrene及 Benzo[a]pyrene；但化合物受限於能量及穩定性之因素，使得HOMO-LUMO gap較小，例如：Dibenzo[b,i]anthracene。Chen et al., 1996 指出HOMO-LUMO gap愈大，PAHs吸收短波長紫外線其光降解速率愈快。

Gilman et al., 1995^[39] 針對 α -三硫多環化合物及甲苯的取代基衍生物為毒物，以蚊子幼蟲及草蝦為測試物種，在有紫外線照射及無光實驗條件下，分別得出其黑暗和照光之半致死濃度 (lethal concentration at 50%, LC₅₀)。利用Log(黑暗LC₅₀/照光LC₅₀)及HOMO-LUMO gap進行迴歸，在HOMO-LUMO gap為 7.1—7.5eV時具光誘導毒性，其結果似前述水蚤之能量分佈。

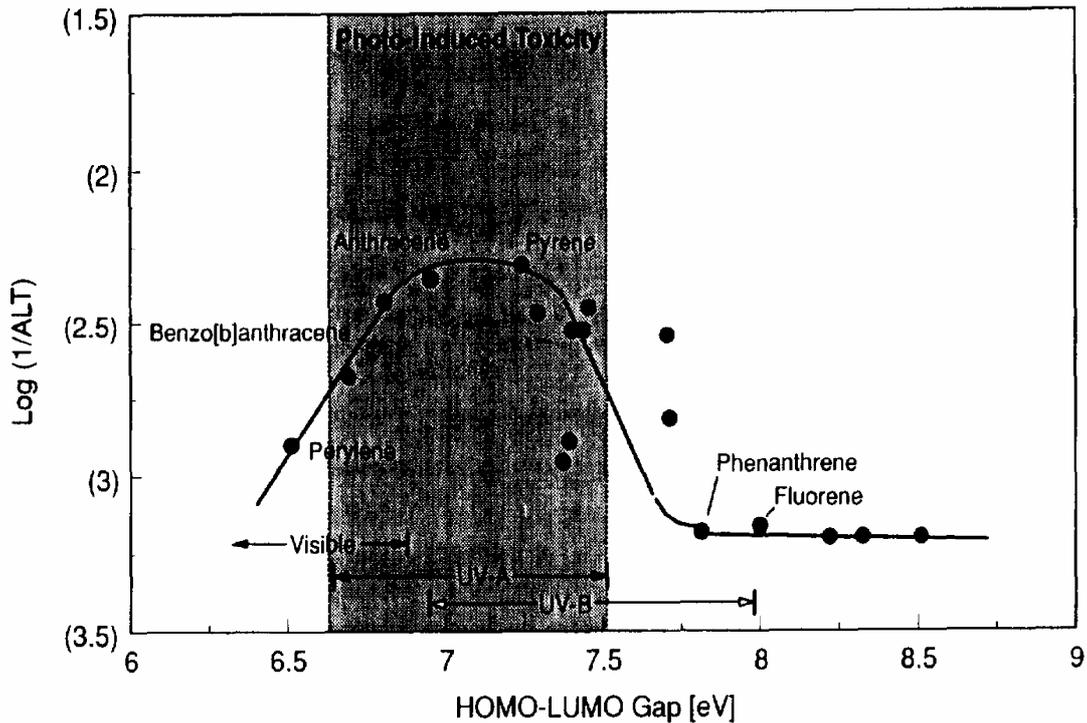


圖 2.3.1 由基態分子的 HOMO-LUMO gap 定義光毒鐘型曲線(Mekenyan et al.1994)



2.4 藻類毒性試驗

藻類毒性試驗方法主要為批次式，大部份藻類毒性試驗以及標準方法大多為批次式，批次式試驗方法是試驗期間提供足夠的基質使藻類生長，藻類生長週期可分為四個階段，分別為遲滯期 (Lag Phase)、指數生長期 (Exponential Phase)、穩定期 (Stationary Phase) 以及死亡期 (Death Phase)。標準方法使用批次實驗，在開始時加入飽和基質，其試驗瓶與外界呈開放狀況，雖然可由空氣中攝取 CO_2 為生長所需碳源，但進行高揮發性有機物毒性試驗，揮發性有機物易逸散導致濃度降低，對藻類的毒性效應產生低估現象^[15]，本研究針對此試驗進行研究並改良試驗的方法，以完全密閉式的BOD瓶作為試驗容器，並以藻類的光合作用產氧量及抑制藻類

細胞繁殖為反應參數，其結果明顯地較批次式敏感。

藻類培養是使用連續式培養方法，新鮮基質不斷流入而代謝物流出。Chen and Huang^[7]利用Chemostat連續式藻類培養，Chemostat是以流入母槽中的新鮮基質濃度調整細胞密度，讓藻類維持在最佳生長狀態。連續式的培養方法結合了BOD瓶發展出的藻類行光和作用的毒性試驗方法，試驗時藻液是取自於母槽中，而進行密閉式試驗時BOD瓶中，故母槽不會被毒物污染而受影響；此外，密閉式試驗僅取母槽中少量藻液，對整個母槽中藻類影響可被忽略，使得實驗頻率大幅增加；另外在操作更簡單且方便，時間與成本上耗費大幅減少，同時也提高實驗再現性。

由於在自然水體中的藻類有相當多的種類，但在毒性試驗物種的選擇上須考量物種是否容易取得、容易觀察、容易培養、生長期短、具有地區代表性等因素^[10]。在本研究中所使用的試驗物種月芽藻 (*Raphidocelis subcapitata*) 屬於綠藻綱 (*Chlorophyceae*) 其特徵為單細胞、呈群體但不糾結、不能移動，一般細胞體積為 $40-60\mu\text{m}^3$ ，其體型成半月型。此類物種及具有上述優點，而其敏感度與其他藻類相比也大多較佳^[11]。藻種在培養的過程時，生長若受到污染或營養鹽缺少、溫度改變、光線不足、pH值變化等培養環境不良時，藻液逐漸呈現淡黃色，以顯微鏡觀察其外型，發現藻類細胞變得較肥厚，半月型彎曲度也逐漸變小，以顆粒技術器觀察會發現其粒徑分佈的變化，大粒徑的藻類分佈增加，由此可知月芽藻相當適用電子顆粒計數器計數觀察。

2.5 毒性試驗參數

影響試驗之情況皆需關注，所以可能影響實驗的參數列入討論，另外在試驗數據分析時為解釋依據。試驗方法經標準化後可去除許多物理或化

學的變異參數，也幫助無經驗的研究人員迅速建立實驗操作環境。

藻類毒性試驗設計參數考量的主要包括：生長的量測、試驗時間、光照、pH、溫度、植種藻液的初始密度、培養基、營養鹽，以下將分別討論這些實驗參數。

表 2.5.1 藻類毒性試驗參數

試驗參數	試驗條件	參數影響
藻類生長的量測	電子顆粒計數器	較穩定且敏感的方法。利用電子顆粒計數器來量測，既簡單迅速且與生物乾重有良好的相關性。
	溶氧測定法	測定毒性物質對藻類行光和作用的影響，直接量測水中溶氧的變化。
試驗時間	48 小時	試驗時間增加則提高敏感度，變異係數降低 ^[12] ，若試驗過長毒性可能因不同的反應而消失。
光照	4.3klux	光照強度影響藻類光和作用的速率。U.S. EPA ^[13] 於月芽藻採用 4.3klux 光照強度，在此強度可模擬生態水體的環境。
二氧化碳和 pH	pH 小於 8.5 ^[13]	pH 變動可能會降低試驗的再現性。試驗室裡易缺少碳源，而導致 pH 值大幅度變動；另外，藻類光和作用也使得 pH 值很大的變化。

溫度	24±2°C ^[13]	藻類的生長會隨溫度的增加而成指數增加。
植種藻液初始密度	1.5×10 ⁴ cells/ml	不同的藻液初始細胞密度會影響實驗結果。過高初始細胞密度進行試驗所得EC ₅₀ 會偏高，過低初始細胞密度會增加試驗變異性。
試驗用培養基	包含N、C、Na、P、K、S、Mg、Ca、B、Mn、Zn、Co、Cu、Mo、Fe、EDTA元素 ^[13] 。	培養培對藻類影響極大，為使藻類有效利用微量元素，試驗時加入定量螯合劑。

2.6 密閉式系統藻類毒性試驗



藻類毒性試驗的標準方法為開放式系統，其碳源是以激烈的搖晃震盪使得氣體交換，但此法應用在揮發性有機物時，易使揮發而降低了濃度，因而低估實際毒性。

為解決有機物揮發使得毒性實驗結果低估情況，以縮短試驗時間、連續入流或定時加入固定毒物濃度溶液的方法以減低有機物揮發性，然而毒性物質的揮發速率各有不同，造成實驗結果再現性降低且無精確數據以說明其毒性影響，基於上述原因，有學者採用以密閉式的系統來進行揮發性物質的毒性試驗。

Halling-Sorensen et al.^[14]以封口膜覆蓋 250mL 的錐形瓶口，以瓶內空間比 1 : 4 (50ml 基質 : 200ml headspace) 為實驗設計，加入無機碳源 HCO₃⁻ 為

0.19mmole 相等於瓶中 headspace 的 1% CO₂，使用藻類 *Raphidocelis subcapitata* 為測試物種，試驗毒性物質為 PAH，分別比較不同試驗時間、碳源、開放式系統和密閉式系統下情況。在最佳試驗時間為兩天時，密閉式系統對 PAH 進行實驗所得的敏感度遠高過開放式系統甚至能達到 10 倍之多。

Brack and Rottler^[15] 利用一密閉式的雙層瓶構造玻璃瓶，上方置入藻液與有機物，碳源為下方 HCO₃⁻ / CO₃²⁻ 的二氧化碳緩衝液，以 *Chlamydomonas reinhardtii* 作為試驗物種，試驗毒物具不揮發、低揮發性或是揮發性物質。此系統在揮發性有機物的敏感度性遠高過文獻中開放式系統的毒性試驗數據。Brack et al., 2003^[16] 針對密閉式再進一步研究，使用玻璃瓶上方附有一不漏氣 10ml 試驗管，以藻類 *Scenedesmus vacuolatus* 為測試物種，毒性物質為 PAHs 中具有三環的 Anthracene 光變化產物，加入無機碳源 HCO₃⁻ 並以藻類的細胞數及細胞體積為試驗終點。

Mayer et al.^[17] 以 40ml 的玻璃瓶，上方附有螺旋蓋以調整實驗 headspace，以瓶內空間比 1：3 (10ml 基質：30ml headspace) 為實驗設計，比較三種不同實驗條件：開放式系統、留有 head space 之密閉式系統以及完全密閉系統，其中留有 head space 之密閉式系統加入無機碳源 HCO₃⁻ 相等於瓶中 headspace 的 2% CO₂。以藻類 *Raphidocelis subcapitata* 為測試物種，玻璃瓶裝滿不同濃度的試驗溶液並以 3x10³ cells/mL 藻類細胞密度進行植種，實驗顯示完全密閉式系統藻類抑制率可達 84%，留有 head space 的密閉系統以及開放式系統抑制率最高僅達到 19% 以及 14%，由此可比較密閉式系統對藻類毒性試驗之影響。

Glassi and Vighi^[18] 引用 U.S.EPA 所提出的 Algal Assay Procedure Bottle Test (AAPBT) 做修改，以一 2 升之密閉容器內裝試驗溶液僅 100 ml，利用剩餘的大空間提供足夠之碳源，以 *Raphidocelis subcapitata* 為試驗物種進行試驗，針對五種氯苯類有機物，此系統為密閉式系統但過大的空間(head

space)仍使得有機物揮發；在揮發有機物質濃度方面，無實際量測有機物真正濃度，而是利用有機物的物理參數以計算溶液中與上方空間（head space）平衡後的濃度。

本實驗將以 BOD 瓶為實驗容器，BOD 瓶內將置滿測試溶液並且不留任何 head space 屬於密閉式系統，能有效的降低因為有機物揮發所產生的不利因素，而能夠求得更有效的毒性試驗數據。

本研究使用了具有密閉系統優點之 BOD 瓶進行毒性試驗。Lin^[12]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^[19]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^[20]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。



第三章 基本理論

3.1 基本生長動力學

在批次式藻類培養中，單細胞藻類的生長通常依循簡單的一階動力學：

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

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

在連續式藻類培養中，當系統達到一平衡（Steady State）時：

一、由反應槽中生物質量之平衡可得下列式子：

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

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

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

則 $\mu = D$

此表示當反應槽達到平衡穩定狀態時，反應槽內生物之比生長率等於該系統之稀釋率。

二、由反應槽內之基質平衡可得下式：

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

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

當系統達平衡時，

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

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

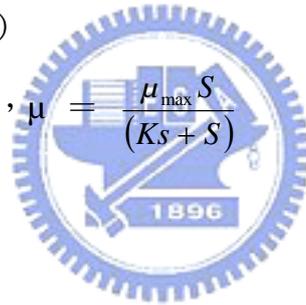
$$\text{又 } \mu = D$$

$$\text{所以 } X = Y(S_0 - S)$$

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

$$\text{及 } \mu = D$$

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



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

最後可得

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

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

3.2 毒性物質之劑量反應關係模式

當試驗物種受到毒性物質的抑制而造成 50% 抑制或死亡，稱為 EC50 (Effect Concentration) 或 LC50 (Lethal Concentration)。而試驗物種受到毒性物質的抑制所造成的抑制或死亡之百分率，隨著毒性物質濃度成 S 型劑量反應關係曲線利用數學轉換模式將 S 型曲線轉為直線以方便求得 EC50 或 EC10 便稱為劑量反應關係模式。

不同的劑量反應關係模式是根據不同的理論基礎所發展，即使是同一組數據，以不同模式進行分析，其結果可能有所差異。以生物試驗來講，使用不同生物甚至不同試驗終點 (Endpoint) 來觀察毒性物質所造成的抑制，其結果都不盡相同，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。常見的劑量反應關係模式分別為 Probit、Weibull 與 Logit 三種。Probit 是最常用的劑量反應關係模式，是假設受生物對毒性物質容忍度成對數常態分布 (log-normal distribution)。Logit 則是由人口成長研究所發展而出的另一種模式，適用於自催化 (autocatalysis) 之化學反應，而 Weibull 模式假設毒性物質在受測生物體內產生某種化學鍵結，對於參與生化反應的有機物或重金屬具有重要涵義。表 3.2.1 為三種劑量反應曲線之數學轉換關係。

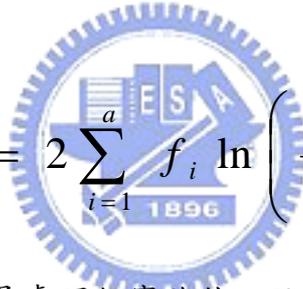
表 3.2.1 Weibull、Probit 與 Logit 容忍度分布模式

Type	Transformation	Probability density	Probibility of response P
Weibull	$u = \ln(k) + \eta \ln(z)$	$\exp(t - e^t)$	$1 - \exp(-kz^\eta) = 1 - \exp(-e^u)$
Probit	$Y = \alpha + \beta \log(z)$	$\frac{1}{\sqrt{2\pi}} \exp(-\frac{t^2}{2})$	$\int_{-\infty}^{Y-5} \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \exp(-\frac{t^2}{2}) dt = \frac{1}{2} (1 + \text{erf}(\frac{Y-5}{\sqrt{2}}))$
Logit	$1 = \theta + \phi \ln(z)$	$\frac{1}{4 \cosh^2(\frac{t}{2})}$	$\frac{1}{1 + e^{-\theta} z^{-\phi}} = \frac{1}{1 + e^{-t}}$

Type	Probility of no-response Q	Transform vs P	Transform vs Q
Weibull	$\exp(-kz^\eta) = \exp(-e^u)$	$u = \ln(-\ln(1 - P))$	$u = \ln(-\ln Q)$
Probit	$\int_{Y-5}^{\infty} \exp(-\frac{t^2}{2}) dt = \frac{1}{2} (1 - \text{erf}(\frac{Y-5}{\sqrt{2}}))$	$Y = 5 + \sqrt{2} \text{erf}^{-1}(2p - 1)$	$Y = 5 + \sqrt{2} \text{erf}^{-1}(1 - 2Q)$
Logit	$\frac{1}{1 + e^{\theta} z^{\phi}} = \frac{1}{1 + e^t}$	$1 = \ln(\frac{P}{1 - P})$	$1 = \ln(\frac{1 - Q}{Q})$

3.3 數據分析

一般毒性試驗為了具體表示實驗系統的敏感度，一般選擇以其 EC 值來表示，然而在數據的處理上，即使相同的數據選用不同的劑量反應關係模式計算也會得到不同的 EC 值，而一般常用的劑量反應關係模式如 Probit、Weibull 與 Logit 所計算出的 EC 值又以 EC50 較為接近，故實驗系統的敏感度又多以 EC50 表示之。然而超過或低於 EC50 的 EC 值例如 EC90 或 EC10 會因為信賴區間的變大而影響可信度，為了降低往後分析的不確定性，進行 G test (goodness of fit)，經由對重複試驗的每一處理組與期望值的誤差比較，所得絕對值最小之 G 值可為適合的最佳模式。G 值的計算公式如下：


$$G = 2 \sum_{i=1}^a f_i \ln \left(\frac{f_i}{\hat{f}_i} \right)$$

其中 a 是重複組次數， f_i 是處理組實驗值，而 \hat{f}_i 是對應模式之期望值。

為了能夠對生態環境提供更好的保護，NOEC (no observed effect concentration) 以及 EC10 也是常用來比較的參數。NOEC 代表毒性物質對於生物不具影響的最高濃度，而 EC10 為根據劑量反應關係模式所求取的毒性物質對生物造成 10% 抑制的濃度。為了計算 NOEC 值，One-sample t test 以及 Dunnett's test 是常用以跟控制組比較的統計方法。本實驗所進行的 One-sample t test 主要根據所有實驗控制組的溶氧變化量和細胞密度增加量的平均值加減三倍標準偏差值定義出上下控制範圍決定 NOEC 值，而 Dunnett's test 則觀察重複組之間的差異以及控制組和處理組的差距以定義 NOEC。然而 NOEC 值常受到試驗濃度的設定以及實驗的變異而有所影響，而被認為比起 EC10 未能明確表示毒性物質對生物的實際效應，儘管

如此，NOEC 在風險評估上仍然佔有相當的重要性。本研究將針對 EC10 以及 NOEC 進行討論，並提出平均中斷值（cut-of value）作為選擇 NOEC 或是 EC10 之參考點。中斷值與一組試驗的組內變異之平方根成正比，因此組內變異較小的精確試驗有較小的平均中斷值，由於中斷值的濃度大於 NOEC 而小於 LOEC，故中斷值亦指出 NOEC 所能達到之保護程度的極限，其計算公式如下：

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

其中 T 為查表所得（以 one-tail Dunnett's test 在顯著程度為 5% 之表）， X_c 為控制組之平均值， S_w 是組內變異之平方根， nc 與 ni 為控制組與處理組重複試驗。

3.4 QSAR 分析方法



生物體和毒物反應項（interaction）的 QSAR 參數，早期研究以取代基電子效應、立體效應以及其他參數如水解常數來表示化學物質的相對反應趨勢或能力，然而此種方式不易真正達到定量 QSAR 參數的目標。Schultz^[45] 使用量子化學參數如 E_{LUMO} 、 E_{HOMO} 等參數進行 QSAR 分析，而兩者的能量差異 ΔE 值（ $E_{LUMO} - E_{HOMO}$ ）為分子從基態到激發態所需能量，通常分子在激發態時進行化學反應，因此 ΔE 值愈小則化合物進行化學反應之機率較高。本研究使用的 E_{LUMO} 及 E_{HOMO} 值是以 Gaussian 98 for windows 版的 MOPAC 運算所得。

第四章 實驗設備與實驗方法

4.1 實驗設備及方法

1. 恆溫無塵室

恆溫無塵室大小約為五坪，其溫度控制在 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 。

2. 水質

自來水依次經過過濾、離子交換、蒸餾然後再經超過濾 (Milli-Qplus) 處理之去離子水，其水質之比電阻 ≥ 18.2 Megaohm。

3. 批次式培養器皿

125 ml，Erlmeyer 之三角錐瓶。



4. 試驗裝置

角鋼為架構主體，長 \times 寬 \times 高為 $135 \times 110 \times 135$ cm，頂面履以 120 cm 長之白色螢光燈管 8 支。設備下方設有迴轉式振盪混合器 (EIRSTEK 公司，型號 S103)。

5. 瓶塞

脫脂棉加上消毒紗布。

6. 連續式培養母槽

連續式培養之母槽使用體積 5 公升，直徑為 18 cm 之玻璃容器。

7. 電磁攪拌器

8. 蠕動幫浦

蠕動幫浦使用 Masterflex 公司，型號 7533-70 pump drive 及 7518-10

pump head 之定量幫浦。

9.幫浦管

幫浦管使用 Materflex 公司，型號 H-96400-14。輸送管為矽膠材質。

10.曝氣幫浦

11.浮子流量計

12.電子顆粒計數器

使用 Coulter Electronics 公司之 Coulter Counter，型號為 MULTISIZER II，並以 5.06 μm 標準顆粒乳液來校正。

13.電腦及分析軟體

配合電子顆粒計數器所需之軟體 (Multisizer Accucomp V. 2.01) 來進行顆粒計數之分析。



14.BOD 瓶

使用體積 300 ml，直徑 8 cm 之 BOD 玻璃瓶。

15.光度測定計

使用 TOPCON 產牌，型號 IM-2D。

16.pH 值測定儀

使用 Suntex 公司，型號 SP-7 之 pH 測定儀。

17.溶氧測定儀

使用美國 YSI 公司出產之數字型溶氧測定器，型號 Model 59，BOD 探頭型號為 YSI5730。

18.曝氣用氣體鋼瓶

使用含 0.5% CO_2 之高壓氮氣鋼瓶，氮氣之純度達 99.9%，總氣體體積

為 6 m^3 。

19. 純水曝氣設備

曝氣設備使用體積 10 公升之純水筒。

20. 無菌操作台

使用造鑫公司製造的 Laminar Flow 操作台。

21. 抽氣幫浦

使用 SINKU KIKO 公司，型號 ULVACG-5 及 G-50 之幫浦。

22. 冰箱

使用 Whirpool 之冰箱。

23. 滅菌釜

使用 HIRAYAMA 公司，型號 HA-300 M 之滅菌釜，最大壓力可達 1.9 kg/cm^2 ，容積為 0.0521 m^3 。



24. 烘箱

使用 Memmet 公司之烘箱，做為烘乾玻璃器皿用。

25. 分析天秤

產牌 Precisa 205 A。

26. 定量吸管

使用 SOCOREX 公司，容量為 $100 \sim 1000 \mu\text{l}$ 及 $1 \sim 5 \text{ ml}$ 兩種。

27. 濾膜

使用 Gelman Science 九型號 66191 之 $0.45 \mu\text{m}$ 濾膜，60301 之 $0.2 \mu\text{m}$ 濾膜。

28. 藥品

使用 Merck 及 ACROS 公司生產的化學品，樣品純度大於 98%。

29. QSAR 中物化參數計算程式

使用的 E_{LUMO} 及 E_{HOMO} 值是以 Gaussian 98 for windows 中的 MOPAC method 而得。

30. 超音波洗淨器

31. 紫外線燈

使用 4 watt 可切換 UV-A 及 UV-B 波長，型號 UVGL-25，115V/60Hz。

32. 紫外線強度測定儀

使用 UVP 公司生產的 UVX Radiometer，測定強度範圍 0~20 Mw/cm²，有三種切換 sensor，分別 UVX-25、UVX-31 及 UVX-36。

33. 高效能液相層析儀 (High-Performance Liquid Chromatography, HPLC)

表 4.1.1 HPLC 設備與分析條件

Item	型號與條件
HPLC	Waters 2487
Detector	Dual λ Absorbance Detector UV ($\lambda = 254$ nm)
Pump	Waters 515
Column	(1) Waters PAH, 4.6 mm \times 250 mm (2) Waters μ Bondapak, C ₁₈ , 4.6 mm \times 150 mm
Injection Volume	20 μ l
Mobile Phase	(1) Acetonitrile : Water = 50 : 50 (2) Methonal : Water = 95 : 5
Mobil Phase Flow Rate	1 ml / min

4.2 試驗藻種

本研究中，採用植物性浮游生物，月芽藻 (*Raphidocelis subcapitata*)。*Raphidocelis subcapitata* 屬於綠藻綱 (Chlorophyceae) 其特徵為單細胞、成群體但不糾結、不能移動，培養達穩定時藻類平均細胞體積在 $40\text{-}60\ \mu\text{m}^3$ 之間，其體型呈半月型。此藻種之使用極為廣泛，例如 U.S. EPA、ISO、OECD 及 APHA 等單位之藻類毒性試驗法，皆使用此藻種為標準試驗物種之一。實驗藻種購自於 University of Texas, Austin。

4.3 培養基質配製

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 。儲備液的配法如下：

- (1) 硝酸鈉貯備液：溶解 12.750 g NaNO_3 於 500 ml 去離子水。
- (2) 氯化鎂貯備液：溶解 6.082 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 於 500 ml 去離子水。
- (3) 氯化鈣貯備液：溶解 2.205 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 於 500 ml 去離子水。
- (4) 微營養鹽貯備液：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 $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

(5)硫酸鎂貯備液：溶解 7.350 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 於 500 ml 去離子水中。

(6)磷酸氫二鉀貯備液：溶解 0.522 g K_2HPO_4 於 500 ml 去離子水中。

(7)碳酸氫鈉貯備液：溶解 7.5 g $NaHCO_3$ 於 500 ml 去離子水中。

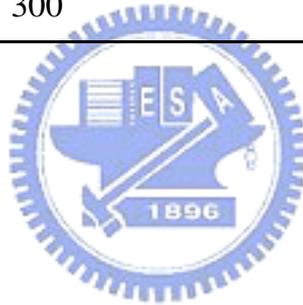
其中微營養鹽貯備液中，EDTA 分別有 100%、10% 及 0% 三種。100% 是使用於活化藻類時，而在連續式母槽中培養藻類時使用 10%，進行實驗時則使用不含 EDTA 之貯備液。最後配成之營養基質，其所含巨量及微量營養素濃度列於表 4.3.1 及表 4.3.2。營養基質的滅菌是以 0.45 μm 的濾膜過濾，過濾滅菌後的營養基質須保存在 4 $^{\circ}C$ 且置於陰暗無光線照射處，以免產生光化學反應。

表 4.3.1 藻類營養基質之巨量營養組成份

化合物	濃度 (mg /L)	元素	各元素實際濃度 (mg /L)
$NaNO_3$	25.5	N	4.2
$NaHCO_3$	15.0	C	2.14
		Na	11.0
K_2HPO_4	1.04	P	0.186
		K	0.649
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	14.7	S	1.91
$MgCl_2$	5.7	Mg	2.9
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	4.41	Ca	1.20

表 4.3.2 藻類營養基質之微量營養組成份

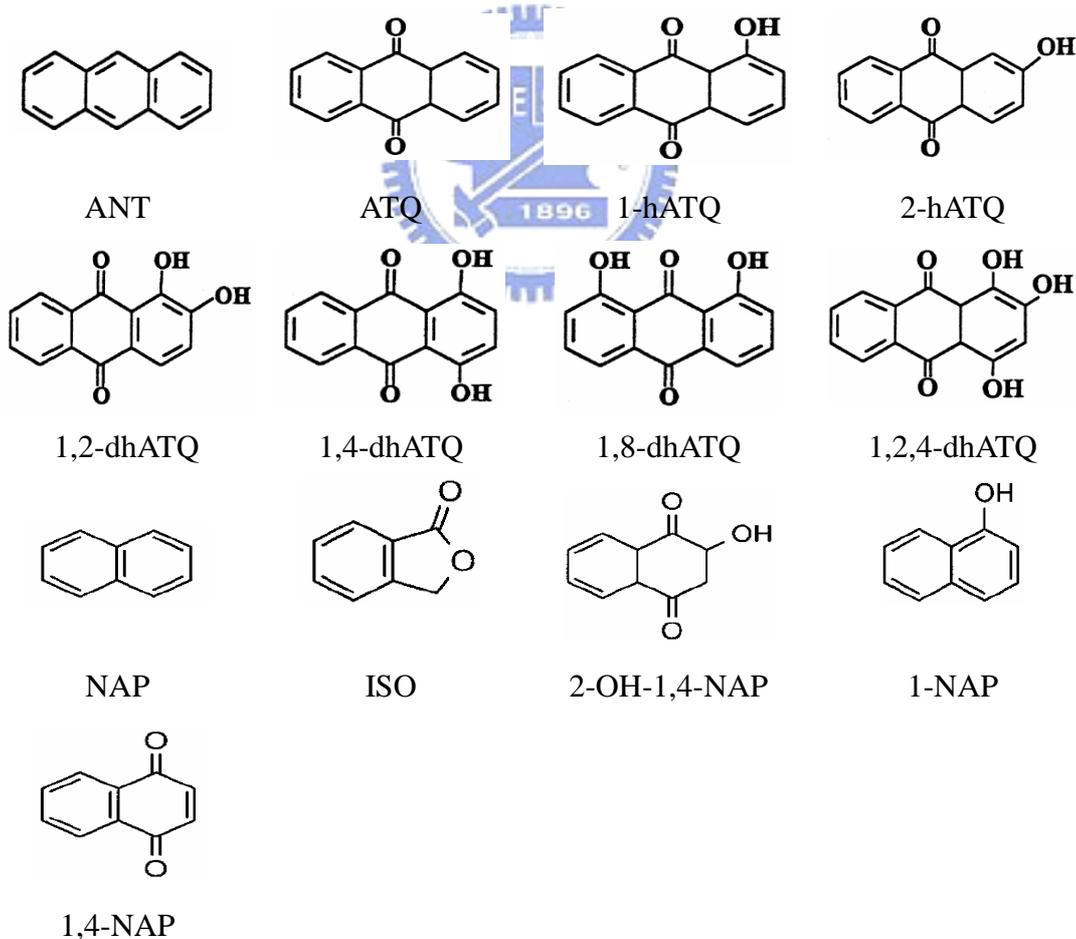
化合物	濃度 ($\mu\text{g/L}$)	元素	各元素實際濃度 ($\mu\text{g/L}$)
H_3BO_3	186	B	32.5
MnCl_2	264	Mn	115
ZnCl_2	3.27	Zn	1.57
CoCl_2	0.780	Co	0.354
CuCl_2	0.009	Cu	0.04
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7.26	Mo	2.88
FeCl_3	96.0	Fe	30.0
$\text{Na}_2\text{EDTA}2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	300		



4.4 試驗毒物

本實驗所使用的試驗毒物為 Anthracene (ANT)、Anthraquinone (ATQ)、1-hydroxyanthrquinone (1-hATQ)、2-hydroxyanthrquinone (2-dhATQ)、1,2-dihydroxyanthrquinone (1,2-dhATQ)、1,4-dihydroxyanthrquinone (1,4-dhATQ)、1,8-dihydroxyanthrquinone (1,8-dhATQ)、1,2,4-trihydroxyanthrquinone (1,2,4-thATQ)、Naphthalene (NAP)、Isobenzofuranone (ISO)、2-OH-2,3H-1,4-Naphthalenedione (2-OH-1,4-NAP)、1-naphthol (1NAP) 與 1,4-naphthaquinone (1,4-NAP)，其結構式如圖：

圖 4.4.1 試驗毒物之結構式



4.5 實驗前準備

1. 玻璃器皿

玻璃器皿使用前需先用不含磷之清潔劑浸泡、清洗，然後以自來水沖洗 5 至 6 次，接下來則用 10% 之鹽酸 (HCl) 浸泡最少一個小時，之後再以碳酸鈉 (Na_2CO_3) 溶液清洗中和，並用自來水沖洗 5 至 6 次後再以去離子水沖洗 3 至 4 次，至入烘箱中以 52 °C 之溫度烘乾。使用前需在其開口處封上鋁箔，置入滅菌釜中，以 1.1 kg/cm²、121 °C 的條件滅菌，而定量容器則不可加熱烘乾或放入滅菌釜中，以避免容器因加熱而改變容量，只要於泡酸液清洗完後，置於架上陰乾即可。

2. 藻類之培養及保存

首先，在無菌操作台中，以接種環刮取固態培養基上之藻類，將其置入約含 100 ml 液態培養基質中 (含 100% EDTA) 250 ml 錐形瓶中，錐形瓶上方綁上滅菌紗布再放到震盪器上培養活化藻類，培養時至少需要三個錐形瓶。數日後當再將數瓶藻液倒入約含 200 ml 液態培養基質的 1000 ml 錐形瓶中培養。最後培養成功的藻液體積比上培養基質 (含 10% EDTA) 體積比為 1:5 的比例將藻液倒入 4 公升之連續式培養母槽培養，通常數日後天後達到約為最大可能藻細胞數量之 80—90% 時 (約為 $1.9-2.0 \times 10^6$ cells/mL) 即可入流新鮮基質。多餘的藻液可在 4 °C 的冰箱保存四個星期，於四個星期之後做移植以繼續培養以保存藻類。之後母槽當掉後可以以冰箱保存的藻類以下列步驟進行活化培養藻類，不須經過重新刮取固態培養基上藻類培養的步驟。

3. ISOTON I I 之配製

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

4. 電子顆粒計數器之操作原理

電子顆粒計數器量測設備為玻璃管及攪拌器，操作時玻璃管需浸入含有 ISOTON II 稀釋樣品的燒杯中，水樣在計數的過程攪拌以使顆粒均勻分佈。其特殊原理為玻璃管近底端的側面鑲有紅寶石的精準小圓孔，玻璃管利用虹吸原理從小圓孔吸入水樣，而玻璃管內外各有一電極片通以直流電，當水樣中所含之顆粒被帶經圓孔時，會暫時性地干擾到電流，形成某特定的電阻。而電阻量化後其高度正比於顆粒的大小，脈衝數為顆粒的數目，如此即可得到水中顆粒粒徑分佈及數量。最終資料可輸送到電腦，以軟體程式 (Multisizer Accucomp V. 2.01) 進行分析。電子顆粒計數器主要條件設定如下表 4.5.1。本實驗採用 100 μm 孔徑之毛細玻璃管。

進行藻類計數時，僅需取 1 ml 的藻液置入 50 ml 之量瓶內，再加入 ISOTON II 至 50 ml，然後倒入燒杯中，置入顆粒計數器內計數。顯示之數值需扣除 ISOTON II 之背景值後再乘以 100 倍才是真正的水中藻類細胞數目。

表 4.5.1 電子計數器設定之條件

項 目	數 值
滿刻度電流量 (Full scale)	10 mA
極性 (Polarity)	+
電流 (Currents I)	100
粒度下限 (Diameter Lower Threshold , Tl)	2.177 μm
粒度上限 (Diameter Lower Threshold , Tu)	6.975 μm
脈衝衰減倍率 (Attenuation , A)	1
脈衝放大倍率 (Preset Gain)	1
警戒粒徑限度 (Alarm Threshold)	OFF
分析量	500 μL

5. 溶氧測定儀之校正



一般溶氧測定儀可使用飽和空氣於水中校正與空氣校正兩種，但前者須將水曝氣至 100%，操作上相當困難，因此在此採用空氣校正法。空氣校正之方法是將電極置於盛有 2.5 公分左右水量之 BOD 瓶上，將此可視為 100% 之溼度，轉鈕至校正鍵 (calibrate)，輸入校正值 (100%)，確認後轉回測定鍵，連續重覆校正三次。每個月定期更換 CLARK-TYPE 薄膜與 3 M 氯化鉀電解質。必要時，需以 30% 之亞硫酸鈉將 PROBE 表面清洗乾淨，使其不殘留任何化學物質，而得 0% 之 DO 溶液，進行零點校正。

6. 盤面光度之調整

使用單面為白色亮面具反射光線效果之木板，組裝於震盪器四周，調整木板大小及形狀，使整個震盪器盤面之光度落在 $64.5 \pm 10\% \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ 之範圍內，以減少實驗之誤差。

7. 實驗條件之控制

本實驗條件是依據Chen and Lin^[6]所決定之最佳化條件下進行，其條件如下：

- 1.溫度：藻類之培養及毒性試驗皆在 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 下進行。
- 2.光度：藻類之培養及毒性試驗皆在光度為 $64.5 \pm 10\% \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ 下進行，所使用之光源為連續白冷光。
- 3.氮、磷濃度：培養藻類時使用 USEPA 規定濃度的一半濃度進行培養，毒性試驗時則不變。
4. HCO_3 濃度：原濃度不變。
- 5.pH：基質的初始 pH 值需控制在 7.5 ± 0.1 下實驗。
- 6.EDTA 含量：在批次培養活化藻類時使用 USEPA 規定的 EDTA 濃度 (100%)，而在連續式母槽中培養藻類時使用 USEPA 規定 EDTA 濃度的 10%，進行實驗時則使用不含 EDTA 之貯備液。
- 7.試驗時間：48 小時。
- 8.藻類初始植種密度： 1.5×10^4 cells /ml。

8. 儲備溶液

本研究中所使用的毒性物質 PAHs 為難溶於水，其溶解度隨著環數增多而降低，需藉加入有機溶劑助其溶解，配製完成儲備溶液以錫箔紙包圍置於室溫下保存。圖為配製 PAHs 流程圖。

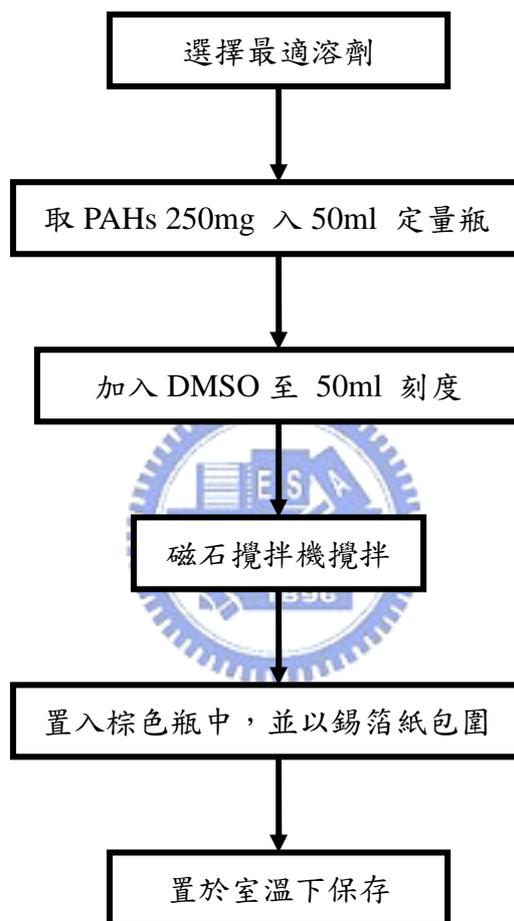


圖 4.5.1 配製儲備溶液流程

在選擇最適溶劑時，需考量低揮發性且對藻類產生較小影響，基於上述條件 DMSO(dimethyl sulphoxide) 為實驗溶劑。秤取 PAHs 250 mg 倒入 50ml 定量瓶中，加入 DMSO 至定量瓶並置於磁石攪拌機攪拌，使其充分溶解後，將配製完成的儲備溶液裝於棕色瓶中，外層以錫箔紙包圍避免受光照射，置於室溫下保存以備使用。

9. 移動相配製

本研究進行 HPLC 分析時的移動相溶液，使用乙腈及純水定比例方式配製，若進行 HPLC 光變化的定性實驗時，其水相部份需以磷酸控制 pH 值約為 3。將乙腈及純水裝入 1 L 容量瓶中，以超音波震盪震盪 45 分鐘，以去除移動相溶液中氣泡，震盪後於室溫下保存以備分析使用。

10. 高效能液相層析儀 (High-Performance Liquid Chromatography, HPLC) 之操作原理

HPLC 是利用樣品與流動相(mobile phase)、固定相(stationary phase)介面相間大小不同的作用力所造之速度差導致樣品中物質之分離。有此物質較易和動相介面結合，其通過層析管柱速度較其他物質快，利用兩物質在管柱中滯留時間(retention time)之差異，最後由偵測器(detector)偵測以區別物質。偵測器依所測到物質，以脈衝(peak shape)形式呈現，並可由脈衝出現時間和標準品比較可得此物質種類，脈衝面積大小可推算物質濃度。

4.6 藻類與毒性物質之品質保證

1. 藻類生長控制圖

藻類生長情形是否適合進行毒性實驗，此問題可影響實驗 EC_{50} 值結果及可信度，本研究利用藻類的生長參數如細胞密度、平均細胞體積及pH值畫品管控制圖(control chart)，由生長參數之數據呈現於圖中趨勢了解藻類生長，而其數據需在平均值的正負兩個標準偏差下才可進行實驗。

2. 溶劑空白試驗

由於試驗毒物溶解度甚低，因此使用 DMSO 為溶劑以助溶，然而溶劑也可能對藻類產生毒性造成實驗時溶劑干擾情況，進而影響分析可信度。為排除溶劑影響，在試驗時多做僅含溶劑而無毒物試驗，比較此結果和控制組差異值可視為忽略。

3. 檢量線之製作

配製一系列不同濃度的 PAHs 標準溶液及內標溶液，經電腦軟體積分得其波峰面積，將 PAHs 波峰面及內標波峰面積相除可得其面積比，再和 PAHs 標準品濃度進行線性迴歸，可得 PAHs 檢量線及迴歸方程式。

4.7 照光實驗

本研究以錫箔紙包圍紙箱內部作為照光實驗箱，其內部放置可切換光後譜的人工紫外線光燈。利用紫外線強度測定儀量測照光強度，再將定量已知的 Anthracene 及 Naphthalene 倒入 1 升燒杯中，放置於所需照光強度處進行照光實驗，並依不同照光時間分別取出燒杯，進行 HPLC 定性分析及毒性試驗。



4.8 實驗步驟

4.8.1 連續式母槽之培養

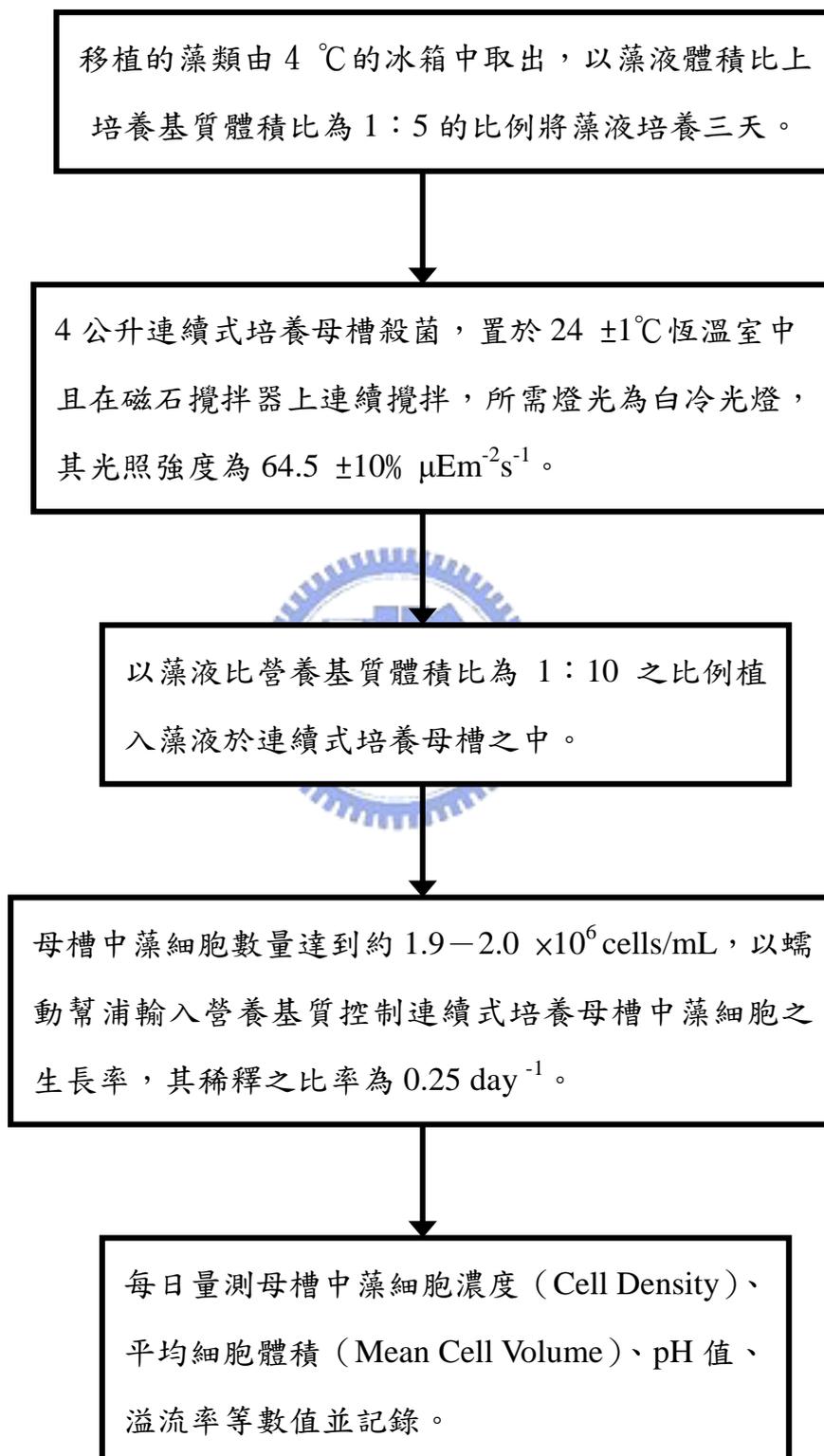


圖 4.8.1 連續式母槽之培養

4.8.2 毒性試驗

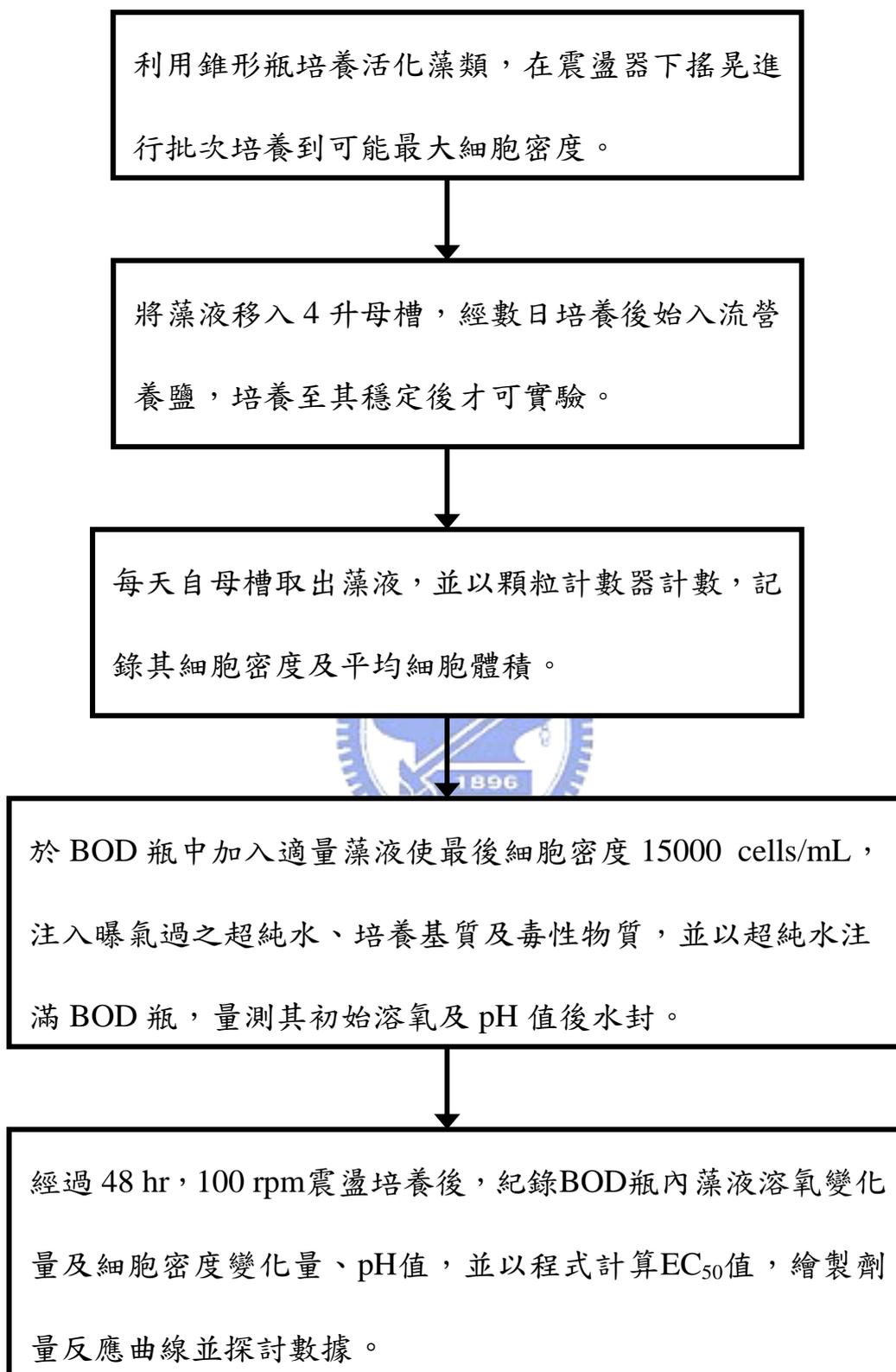


圖 4.8.2 藻類毒性試驗流程圖

4.8.3 HPLC 之分析流程

本研究主要探討 Anthracene 及 Naphthalene 在陽光下照射光變化產物及其毒性。利用 HPLC 分別進行定量及定性分析(如圖)，在定量分析方面，先配置個別光變化產物溶液，求其實際濃度後再進行藻類毒性試驗；在定性分析方面則可分為照人工紫線燈後及日光燈下兩項討論：

1. 由人工紫外線燈照射後的儲備溶液，每小時取出溶液稀釋至低濃度，再比較波峰面積變化。另外將未照光儲備溶液加入光變化後溶液，經由固定停留時間但不同波峰面積以確認光變化產物。
2. 在日光燈照射 BOD 瓶中低濃度儲備溶液，經 48 小時後再以 HPLC 分析比較其波峰變化情形，探討 Anthracene 及 Naphthalene 在日光燈下是否會進行光變化。



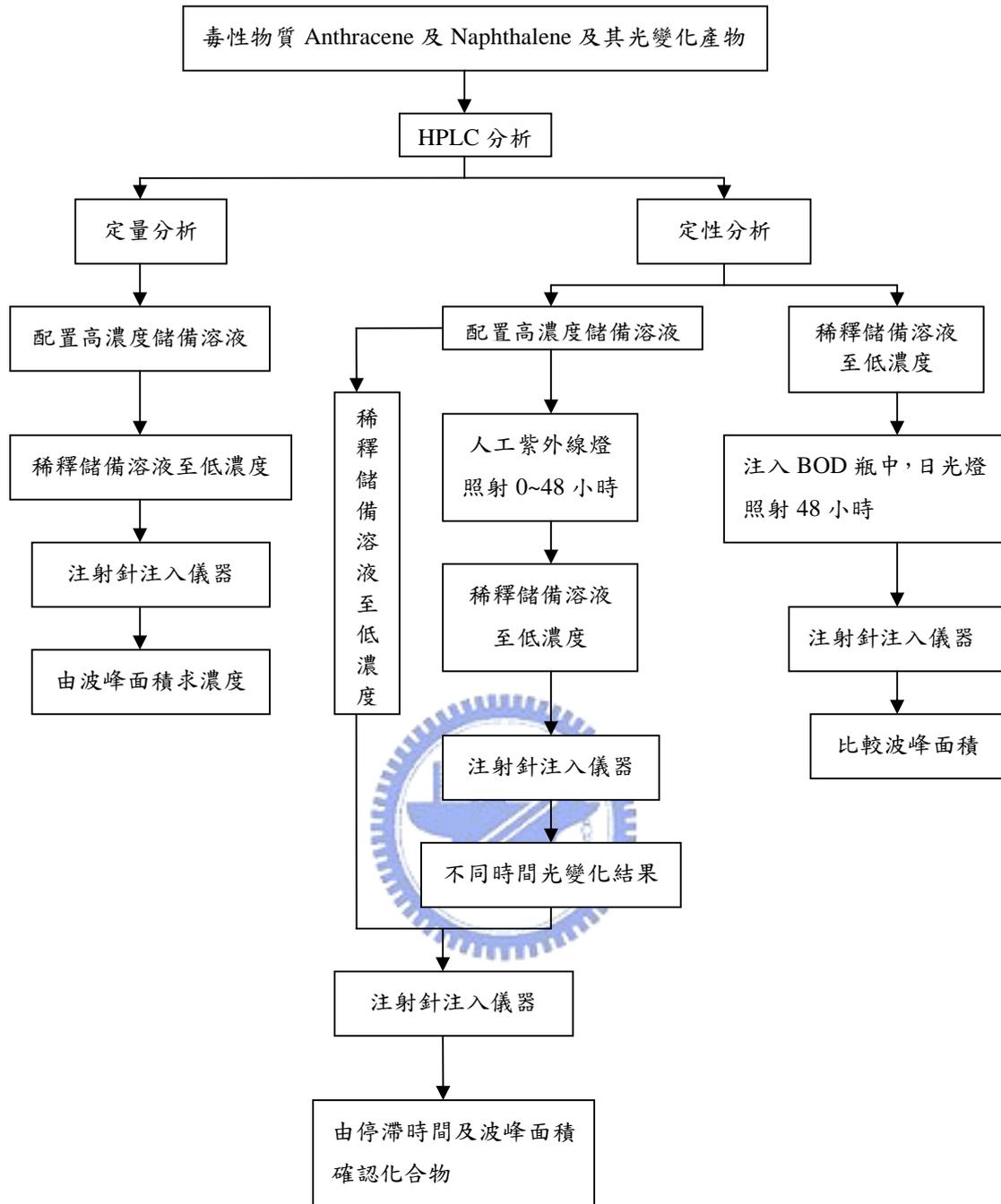


圖 4.8.3 HPLC 分析流程圖

4.8.4 HPLC 之分析步驟

分析使用的層析管柱為逆相分離管柱(reverse-phase column)，直徑 4.6mm，長度為 250mm。移動相沖提為乙腈和水的混合比例為固定，流率為 0.5 ml/min。偵測器為紫外線可見光偵測器(UV-visible detector)，選擇物質的激發(excitation)波長及發散(emission)波長進行試驗，樣本利用自動射器(autosampler)注射，注射量為 20 μ L，定量分析時間為 20 分鐘。

HPLC 操作流程如下：

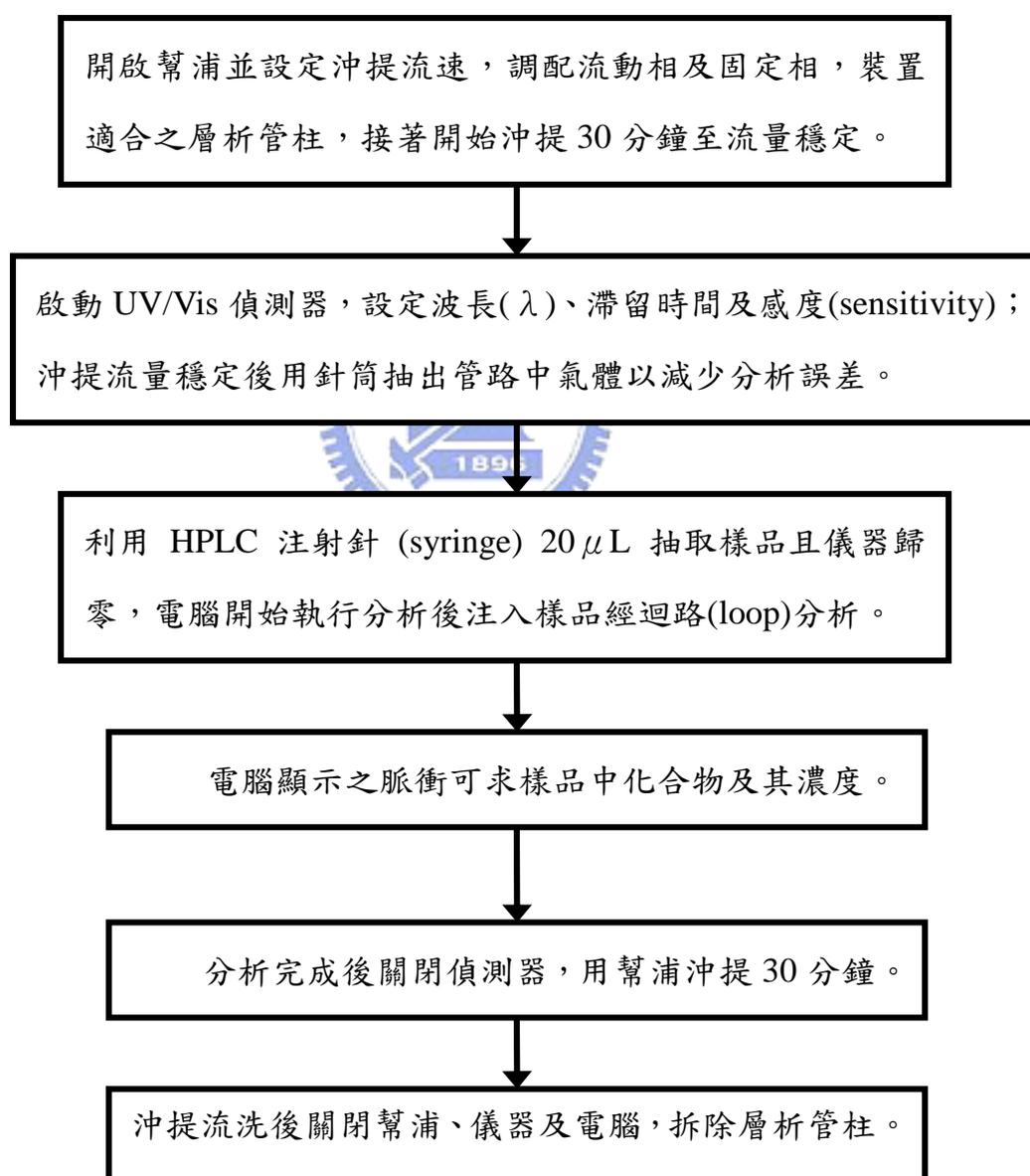


圖 4.8.4 HPLC 操作流程圖

第五章、結果與討論

5.1 藻類毒性數據

本研究將利用 PAHs 中三環 ANT 與二環 NAP 之光變化有機毒物，進行一系列之 BOD 瓶藻類毒性試驗，測量藻類溶氧增加量(DO)、最終產量(FY)及生長率(GR)為試驗終點，由於試驗毒物為半揮發性之有機物，在實驗時為避免揮發產生試驗之誤差，毒性試驗前以 HPLC 進行濃度定量分析。試驗時使用之毒物恩(Anthracene)、蔥昆(Anthraquinone)、羧恩昆(hydroxyanthraquinone)、二羥基蔥昆(dihydroxyanthraquinone)、三昆萘(trihydroxyanthraquinone)、奈(Naphthalene)、奈醌(naphthoquinone)，其水及辛醇係數最小為 1.2，最大為 4.5。

表 5.1.1 1,8-二萘萘為實驗數據，表中之數據皆為三重複試驗之平均值。設定 1 個控制組及 6 個不同濃度處理組，隨著濃度增加毒物對藻類的抑制也越大，以溶氧增加量為試驗終點而言，毒物濃度由 0.049 mg/l 上升至 0.786 mg/l，DO 抑制率也由 0.13 增加到 0.93，FY 抑制率 0.19 增加至 0.95，GR 抑制率由 0.07 增加到 0.8。在相同的濃度下，以 FY 為試驗終點所造成的抑制率皆大於以 DO 及 GR 為試驗終點所造成的抑制率，由此可知以 FY 為試驗終點較敏感。依據各個不同毒物濃度所造成的抑制率，透過 probit 模式可畫出如圖 5.1.1 以毒物濃度為橫軸，抑制率為縱軸的劑量反應曲線，藉由此曲線可知毒物之劑量反應關係和 EC_{50} 。

Mallakin et al., (2000) ^[4] 與 Mcconkey et al., (2002) ^[41] 分別對 ANT 及 NAP 的光變化過程做化學分析，但此並非本研究的目的，故在此不多加討論，然而本研究藉由上述分析之鑑定結果做為實驗毒物，進一步探討 ANT

及NAP光變化前後抑制藻類生長之情況做比較。

表 5.1.2 顯示以藻類溶氧增加量、最終產量及生長率作為試驗終點時，對ANT、Nap 及其光變化產物之毒性結果，而圖 5.1.1 至 5.1.13 為三種試驗終點的劑量反應曲線圖。本研究共試驗 13 種有機物，其中有 8 組ANT 及其光變化產物，而NAP部份有 5 組。從各參數之敏感度討論，8 組ANT 中有 4 組以DO較敏感，3 組以FY較敏感，1 組DO與FY敏感度相當，5 組NAP中皆以FY較敏感，由此可知ANT及其光變化產物對於DO及FY敏感性相當，而 GR在所有毒物中皆較DO與FY不敏感。Lin^[12]在重金屬毒性試驗以GR為參數時，具有較高的敏感度，並且在有機物酚類的毒性結果也具相同趨勢。然而Kao^[20]以甲苯為毒物的藻類毒性試驗中發現以DO為參數較敏感，Hsu^[19]對苯類、氯苯類、甲苯、氯甲苯類等非極性麻醉有機物實驗，也得到相同結果。Chen^[56]研究醛類的毒性實驗，發現醛類以DO為參數時較敏感，Huang^[57]在腈類毒性試驗也以DO較敏感，Lee^[58]以苯胺類進行實驗時DO與GR此兩參數敏感性差異小。

對於光變化的產物毒性，可發現到ANT的部份除了 2-hATQ 及 1,2-dhATQ例外，其餘毒性皆較ANT毒性高，此呈現之趨勢與預期結果相符。至於 5 組NAP的結果則較不一致，各有二組毒性較NAP毒性高及低，本研究對此結果推測可能為光變化過程不同，造成抑制藻類情況有所不同，而敏感度之差異可分為二方面討論。第一為NAP光變化後毒性增加有 1,4-NAP 與 2-OH-1,4-NAP，根據 Mekenyan et al., 1994^[38]以水蚤的 ALT(median adjusted lethal time,LT₅₀)半調節致死時間為試驗終點，利用 Log(1/ALT)及 HOMO-LUMO gap (eV)兩者呈現鐘型曲線關係預測在 HOMO-LUMO gap為 7.1±0.4 eV 時具光誘導毒性，而NAP在此範圍之外被判定為不具光毒，但本實驗結果卻呈現毒性較NAP高，甚至與ANT光變化後毒性相當。值得注意的是文獻^[41]上提及NAP經光氧化產生中間產物 1,4-NAP，再進行光變化為最終產物 2-OH-1,4-NAP，由表 5.1.1 可發現

2-OH-1,4-NAP毒性較 1,4-NAP強，此外文獻^[4]亦提及 2-OH-1,4-NAP 也是ANT光變化後的最終產物之一，綜上所述可知 2-OH-1,4-NAP為須注意的光毒產物。由光變化過程解釋毒性的變化，ANT經光變化降解為較低環化合物，其毒性也較低，依據表 5.1.1 可知光變化過程的中間產物毒性會較高，但NAP光變化中間產物 1,4-NAP毒性卻低於 2-OH-1,4-NAP，此為光毒之特殊現象。

Gressel et al., 1985^[46] 指出naphthoquinone 會抑制光合作用光系統II 電子傳送，而 1,4-NAP與 2-OH-1,4-NAP結構式中含naphthoquinone，因此推論是naphthoquinone導致較大的藻類抑制反應。第二點為NAP光變化後毒性減少為ISO與 1-NAP，由上述HOMO-LUMO gap所預測之結果與本研究預期相符合，光變化產物毒性較NAP低。

由表 5.1.1 ANT光變化產物之毒性做進一步探討。當以DO為試驗終點時其敏感度順序為：1,8-dhATQ > 1,4-dhATQ與 1,2,4-trihATQ > 1-hATQ > ATQ > ANT > 1,2-dhATQ > 2-hATQ；而以FY為試驗終點時其敏感度順序為：1,8-dhATQ > 1,4-dhATQ > 1,2,4-trihATQ > 1-hATQ > ATQ > 2-hATQ > ANT > 1,2-dhATQ。由DO與FY兩者敏感度排序差異性小，藻類對 1,8-dhATQ 最敏感，而 2-hATQ及 1,2-dhATQ則呈現低敏感之情況。Greenberg et al., 1997^[28] 解釋Anthracene經光變化後，其光變化產物對植物之細胞毒性 (cytotoxic) 機制，Plastoquinone功能是在葉綠體中，由光系統II傳遞高能量電子至光系統I，當Anthracene光產物quinone在光系統中和Plastoquinone競爭傳遞電子，使得電子在此兩個光系統中流向轉變或阻塞，因而減少光合成產生導致生長率降低。Mallakin et al., 2002^[47] 研究ANT光變化產物抑制浮萍光合作用的情形，結果顯示 2-hATQ及 1,8-dhATQ致毒原因是上述致毒現象，Babu et al., 2001^[48] 指出 1,2-ATQ 阻礙葉綠體中的電子傳送至Cyt b6/f complex，導致PSII受到抑制。

對於不同試驗終點之間彼此相關性而言，雖然毒性物質對試驗終點敏

感度有所差異，本研究依據表 5.1.1 之EC₅₀ 值做相關性分析，由圖 5.1.14 至圖 5.1.16 發現，各試驗終點相關係數皆可達 0.98，顯示各試驗終點之間有極高的相關性。

表 5.1.1 1,8-二昆苗之實驗數據

Conc. (mg/l)	Initial DO (mg/l)	Final DO (mg/l)	Delta DO (mg/l)	Inhibition rate On DO	Final (cells/ml)	Delta (cells/ml)	Inhibition rate On FY	Inhibition rate On GR
Control	0.47	7.39	6.93	0.00	260200	245200	0.00	0.00
0.786	0.49	0.95	0.46	0.93	26800	11800	0.95	0.80
0.393	0.46	1.40	0.94	0.86	41267	26267	0.89	0.65
0.295	0.44	1.82	1.37	0.80	45933	30933	0.87	0.61
0.196	0.47	3.03	2.56	0.63	78333	63333	0.74	0.42
0.098	0.51	5.93	5.41	0.22	172900	157900	0.36	0.14
0.049	0.55	6.57	6.03	0.13	212567	197567	0.19	0.07

Initial cell density = 1.5×10^4 cells/ml



表 5.1.2 試驗毒物之藻類毒性試驗數據

Chemical	DO		Final yield (FY)		Growth rate (GR)	
	95%		95%		95%	
	EC50 (mg / l)	Confidence Limit	EC50 (mg / l)	Confidence Limit	EC50 (mg / l)	Confidence Limit
Anthracene	0.46	0.34 - 0.59	0.56	0.40 - 0.76	1.11	0.94 - 1.55
Anthraquinone	0.30	0.17 - 0.40	0.38	0.27 - 0.47	1.23	0.98 - 1.97
1-hydroxyanthraquinone	0.28	0.25 - 0.32	0.33	0.3 - 0.37	0.59	0.49 - 0.77
2-hydroxyanthraquinone	0.55	0.50 - 0.59	0.49	0.45 - 0.52	0.88	0.84 - 0.92
1,2-dihydroxyanthraquinone	0.54	0.47 - 0.61	0.96	0.86 - 1.24	1.18	1.00 - 1.40
1,4-dihydroxyanthraquinone	0.25	0.087 - 0.40	0.21	0.13 - 0.30	0.45	0.13 - 0.73
1,8-dihydroxyanthraquinone	0.15	0.12 - 0.19	0.12	0.10 - 0.14	0.28	0.20 - 0.31
1,2,4-trihydroxyanthraquinone	0.25	0.23 - 0.27	0.25	0.23 - 0.28	0.34	0.32 - 0.38
Naphthalene	4.05	2.72 - 5.27	3.11	2.46 - 3.67	4.94	3.79 - 6.10
Isobenzofuranone	151.62	138.96 - 167.48	141.60	127.07 - 159.76	219.77	204.71 - 240.23
2-OH-2,3H-1,4-Naphthalenedione	0.31	0.28 - 0.35	0.21	0.18 - 0.24	0.48	0.41 - 0.55
1-naphthol	5.93	5.95 - 6.11	5.85	5.33 - 6.53	9.58	8.46 - 10.69
1,4-naphthaquinone	0.38	0.26 - 0.59	0.26	0.19 - 0.45	0.56	0.40 - 0.80

Initial cell density = 1.5×10^4 cells/ml

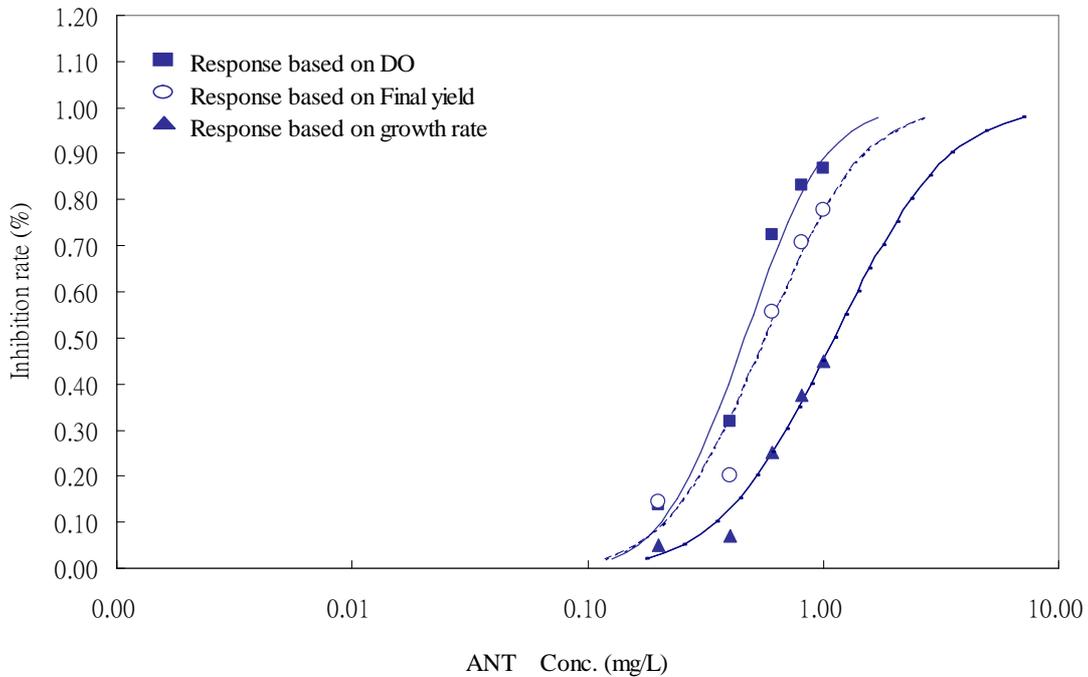


圖 5.1.1 三種試驗終點下 ANT 之劑量反應曲線

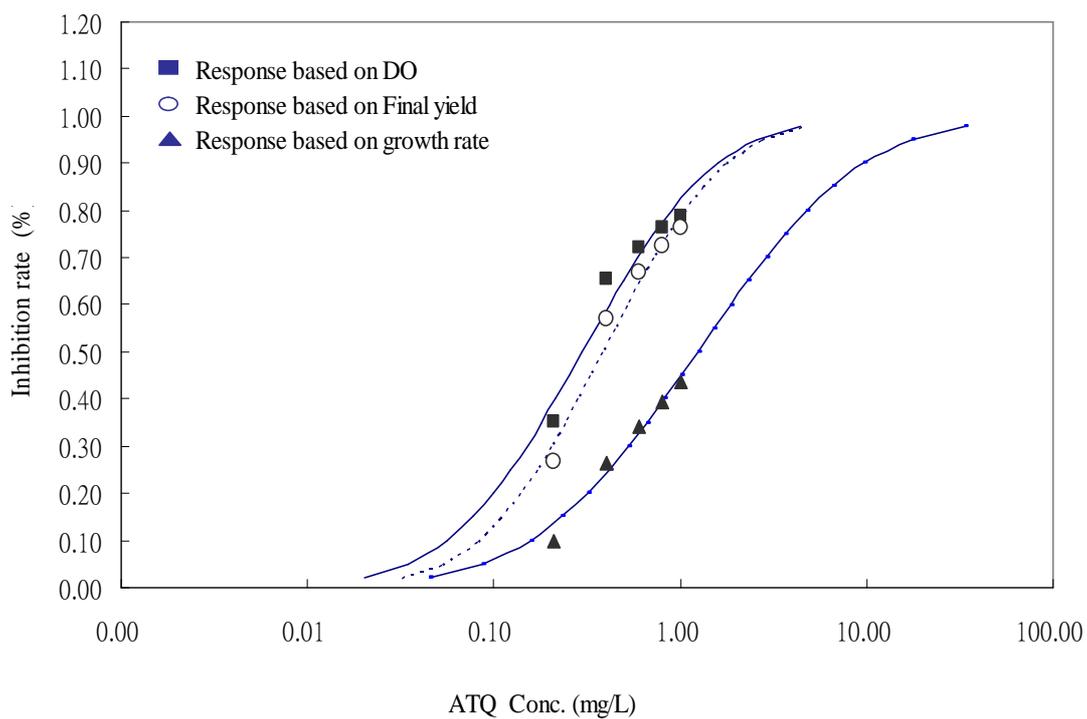


圖 5.1.2 三種試驗終點下 ATQ 之劑量反應曲線

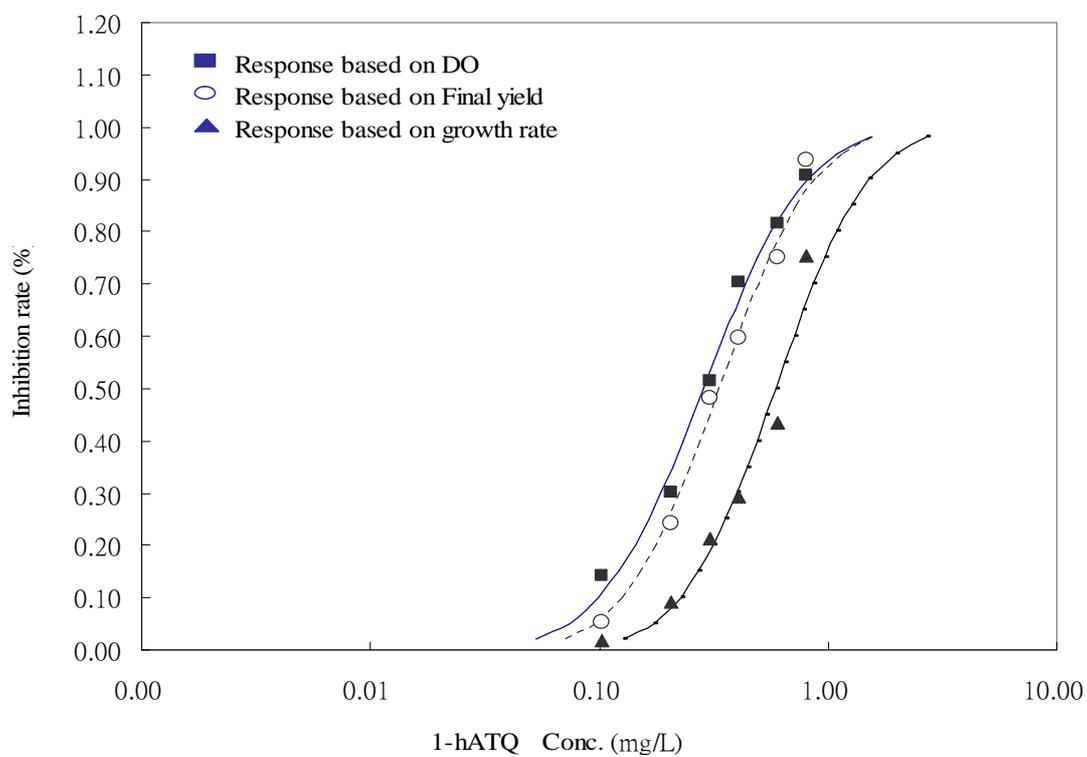


圖 5.1.3 三種試驗終點下 1-hANT 之劑量反應曲線

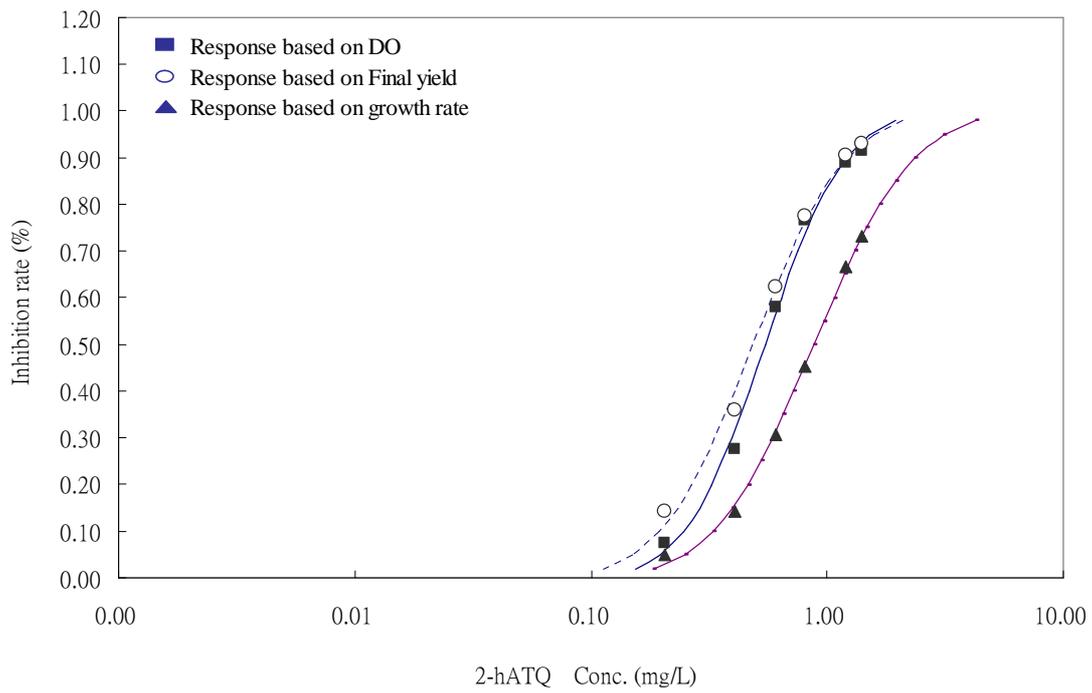


圖 5.1.4 三種試驗終點下 2-hATQ 之劑量反應曲線

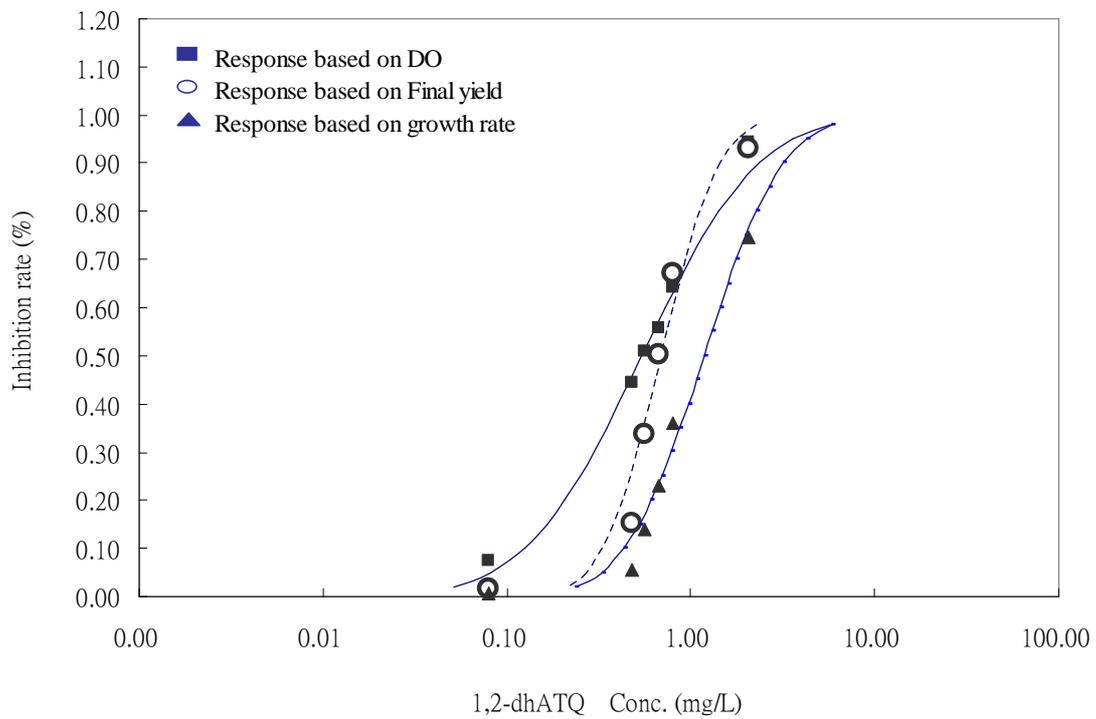


圖 5.1.5 三種試驗終點下 1,2-dhATQ 之劑量反應曲線

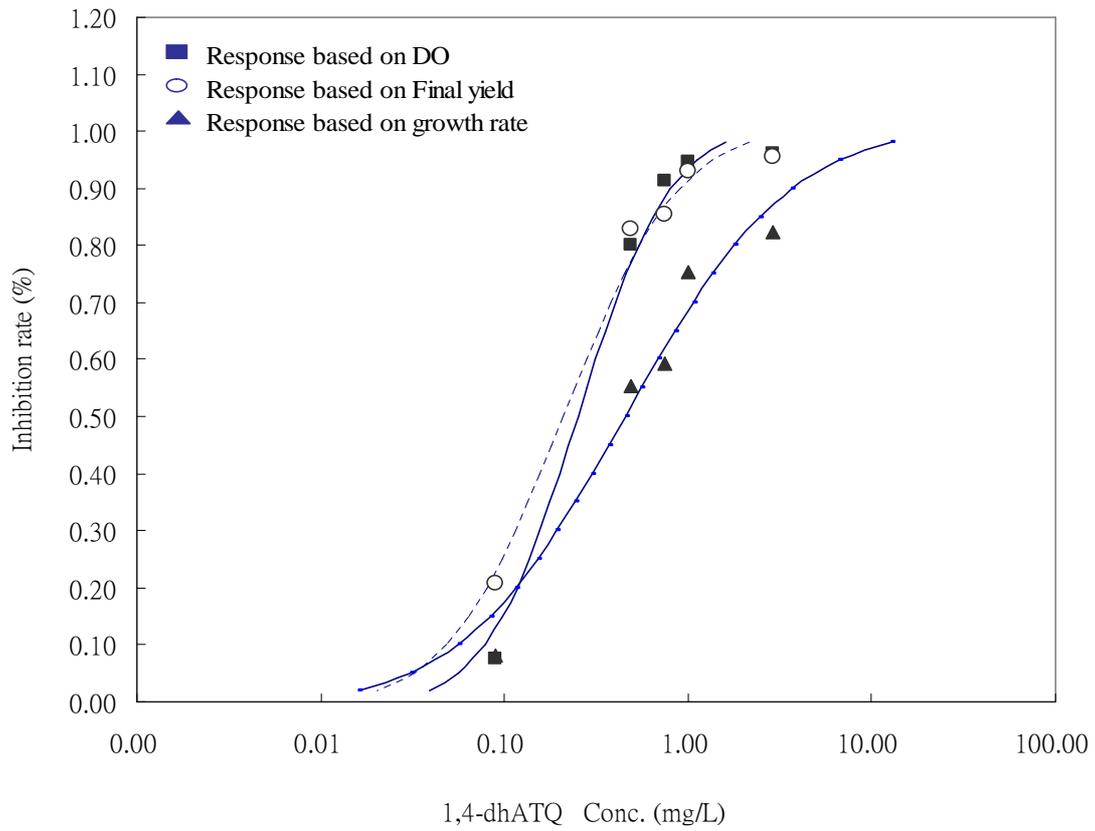


圖 5.1.6 三種試驗終點下 1,4-dhATQ 之劑量反應曲線

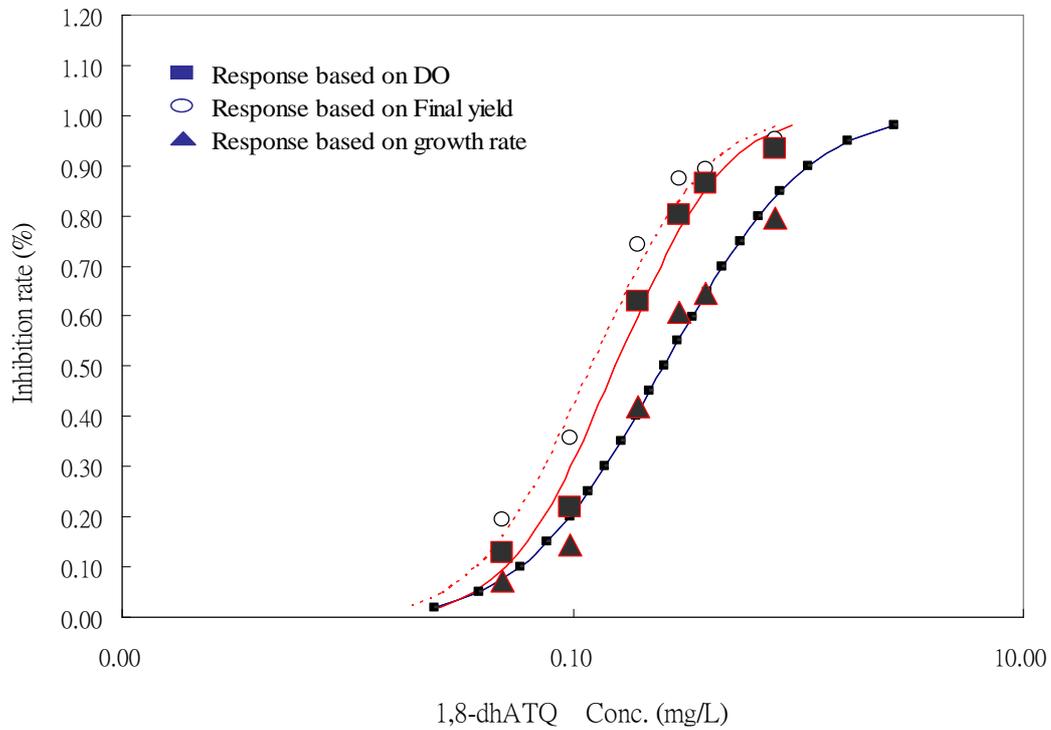


圖 5.1.7 三種試驗終點下 1,8-dhATQ 之劑量反應曲線

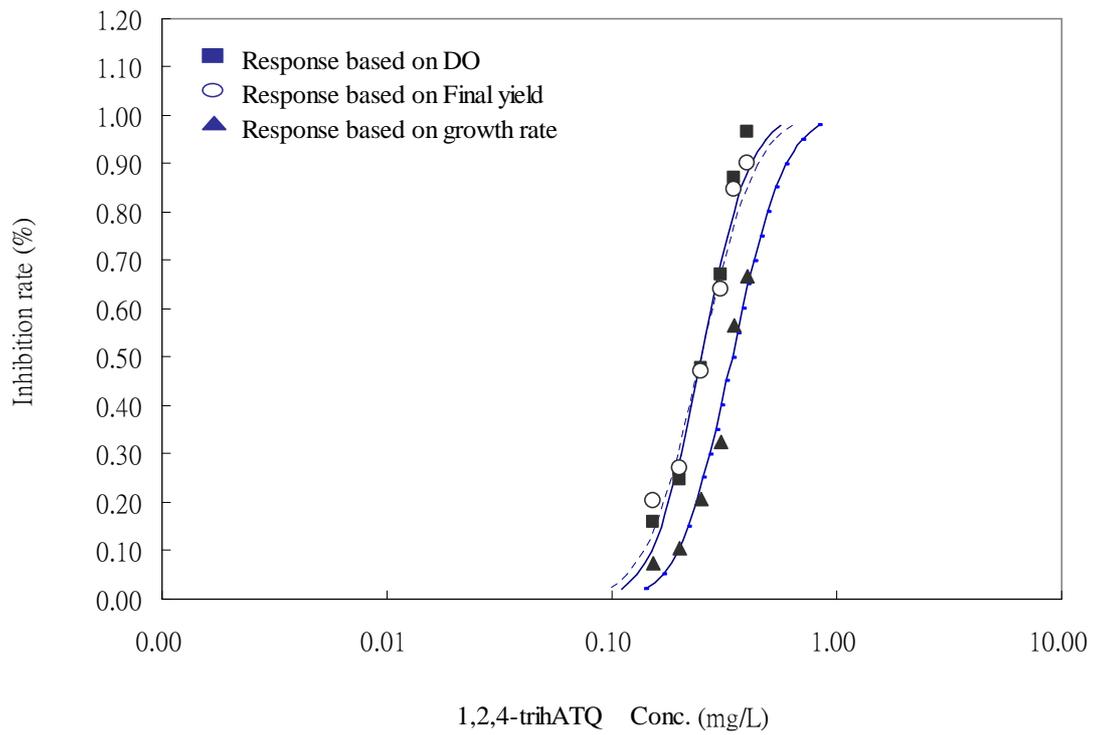


圖 5.1.8 三種試驗終點下 1,2,4-trihATQ 之劑量反應曲線

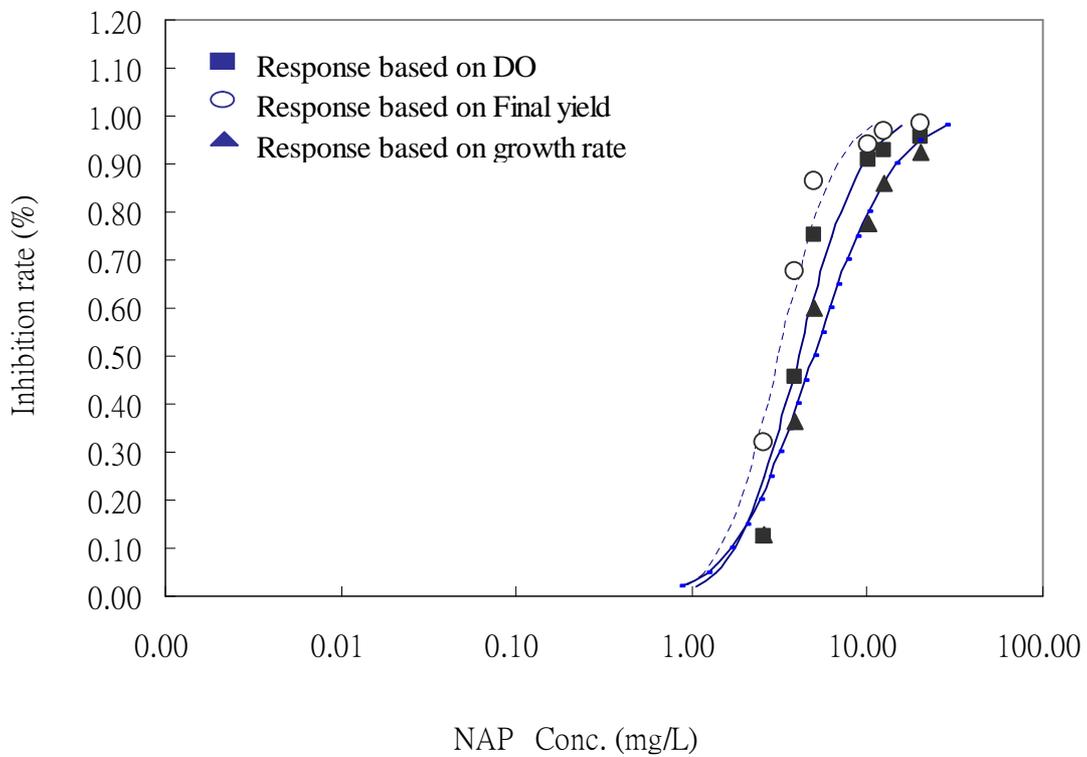


圖 5.1.9 三種試驗終點下 NAP 之劑量反應曲線

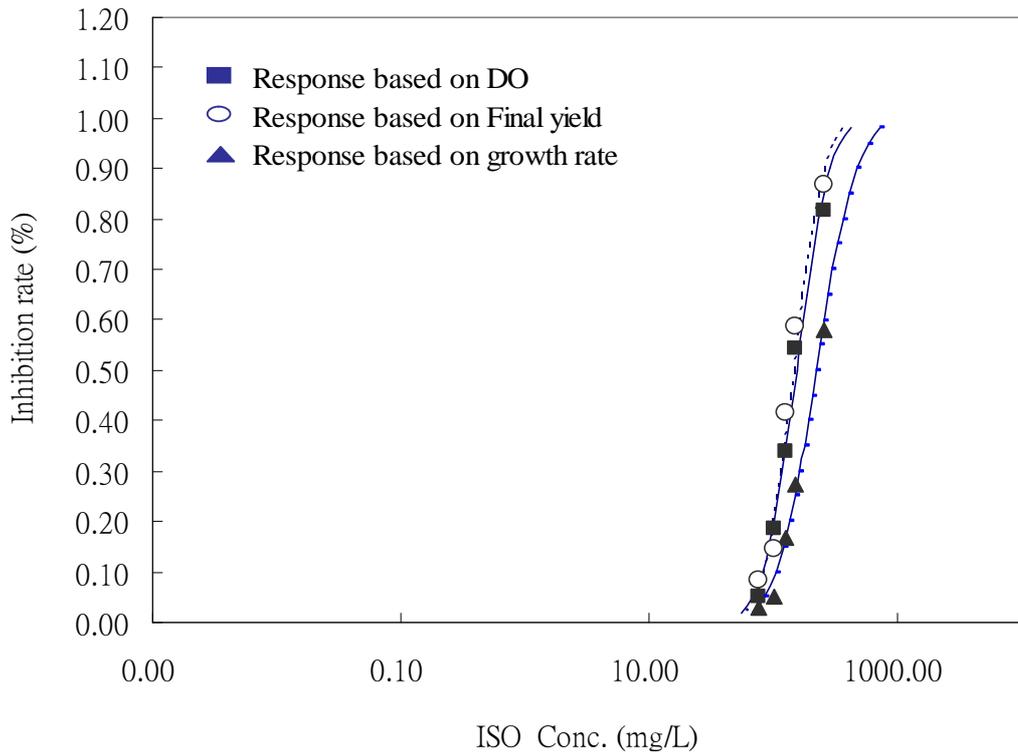


圖 5.1.10 三種試驗終點下 ISO 之劑量反應曲線

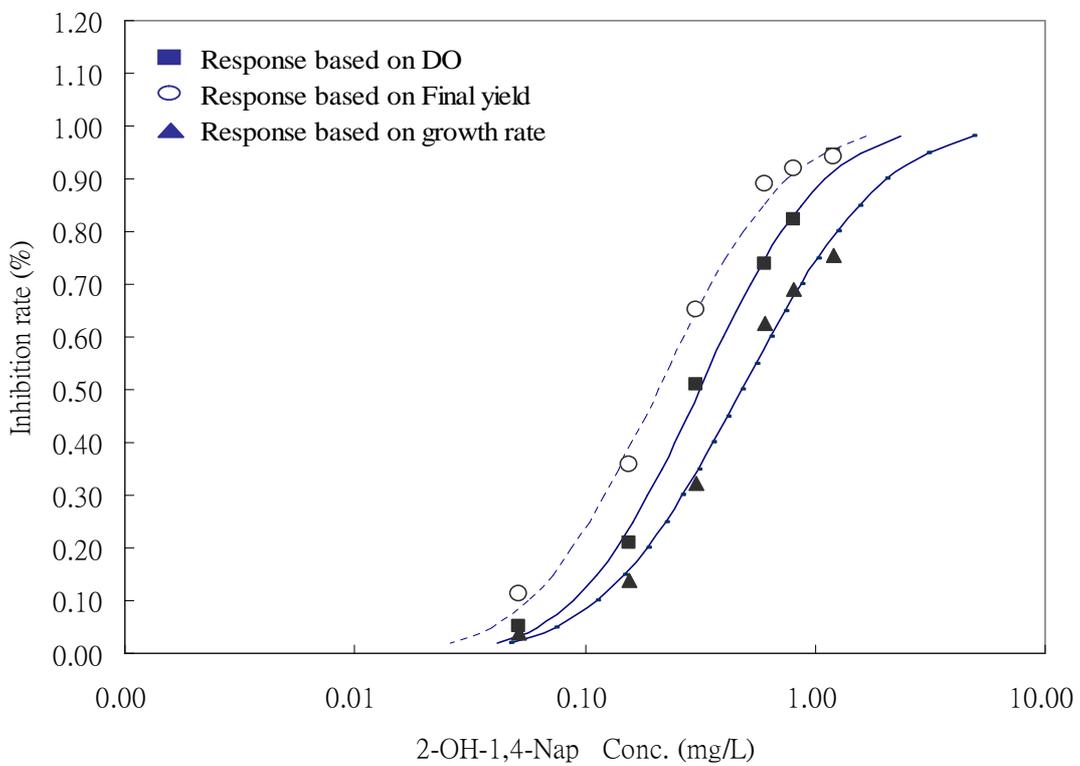


圖 5.1.11 三種試驗終點下 2-OH-1,4-Nap 之劑量反應曲線

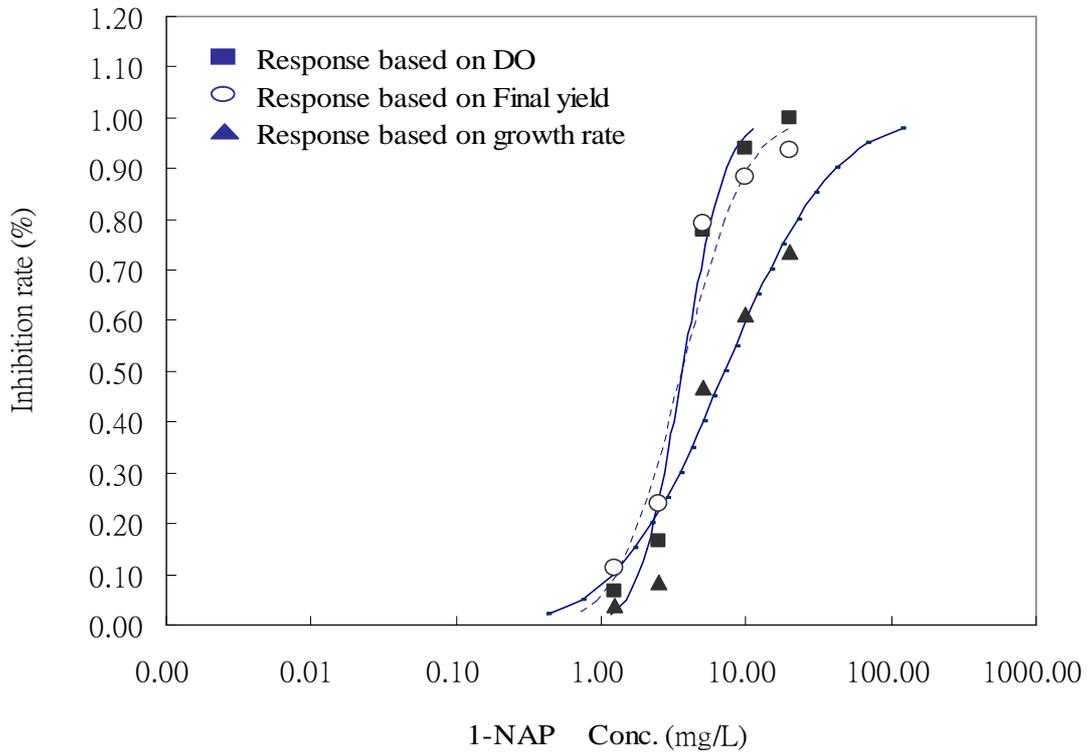


圖 5.1.12 三種試驗終點下 1-NAP 之劑量反應曲線

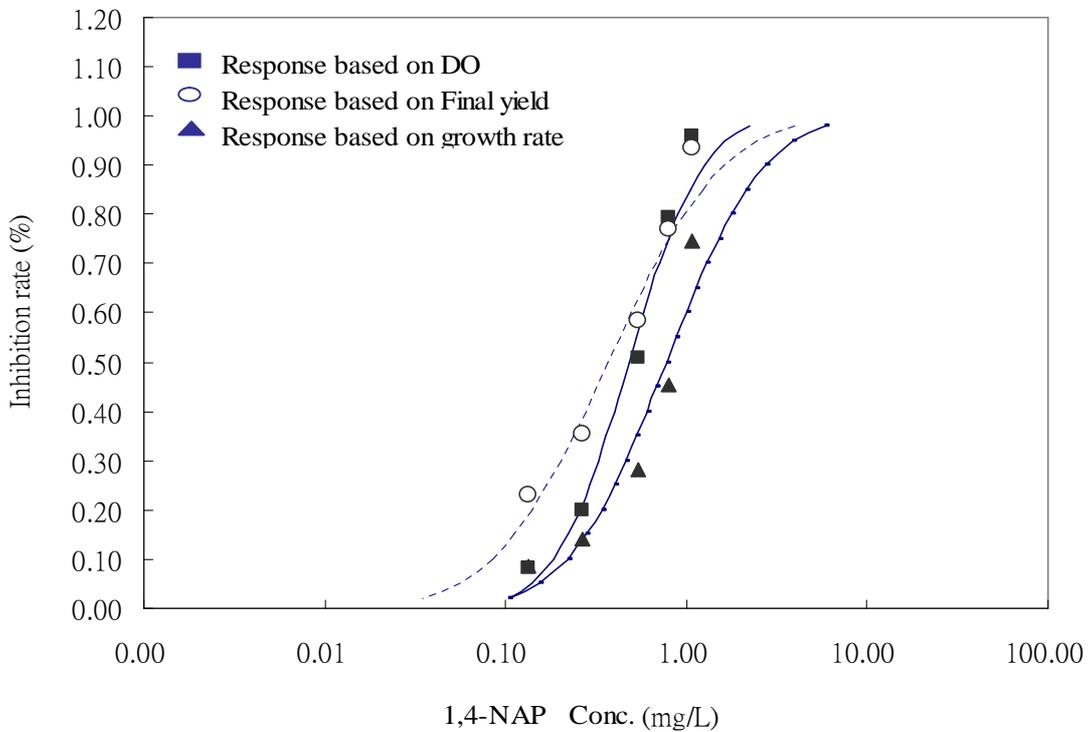


圖 5.1.13 三種試驗終點下 1,4-NAP 之劑量反應曲線

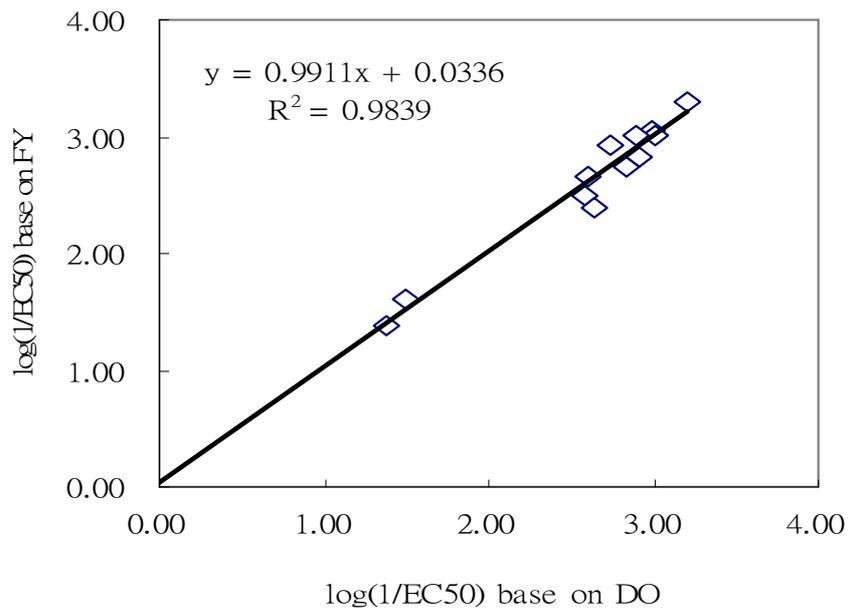


圖 5.1.14 DO 與 FY 試驗終點之 EC50 相關性分析

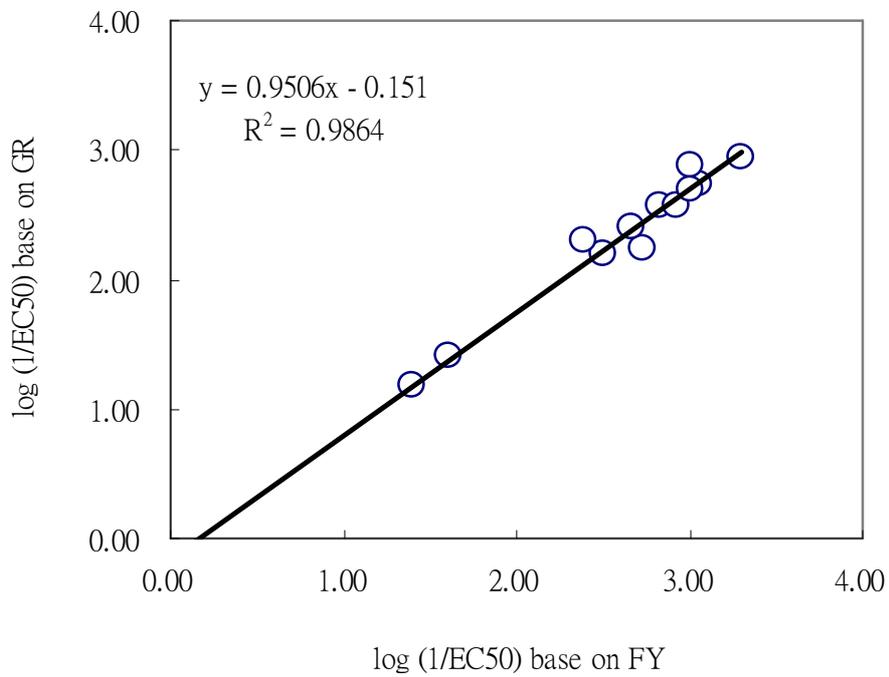


圖 5.1.15 FY 與 GR 試驗終點之 EC50 相關性分析

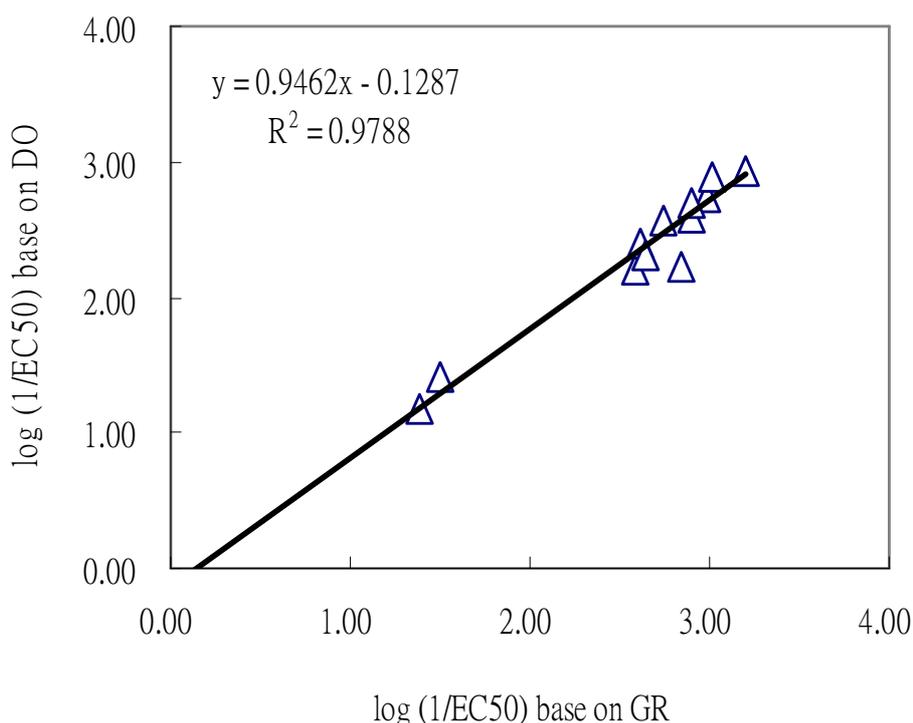


圖 5.1.16 GR 與 DO 試驗終點之 EC50 相關性分析

5.2 PAHs 光誘導毒性

5.2.1 Anthracene 光誘導毒性

本研究配置之 ANT 標準品溶液，以 HPLC 分析在不同 UV-A 光照時間下，ANT 光變化產物之層析圖譜如圖 5.2.1。另外，本研究分別針對單一純化合物所出現之波峰 (peak) 滯留時間 (Retention time) 進行光降解之化合物之比對，其分析結果示於表 5.2.1。依圖 5.2.1 可知 ANT 未照光之滯留時間為 54.6 分鐘，6 小時 UV-A 光照後主要產生 ATQ 及 1ATQ，其滯留時間分別為 19.3 分鐘與 25.8 分鐘，而 ANT 則衰減為其他化合物，經光照時間 24 小時及 48 小時後，此時主要光變化產物為 18ATQ 及

14ATQ，其滯留時間分別為 29.7 分鐘與 42.8 分鐘，比較層析圖譜發現 1,4-dhATQ 比例在增加中。本實驗 ANT 光變化之情況，可分為三方面討論：(1) ANT 先受到光敏化作用，將光能量傳遞給氧分子，使 ANT 光氧化形成 ATQ，ATQ 即為光變化第一產物。(2) 在 ATQ 分子中的共軛鍵，由於 UV-A 之光能量使其斷鍵，此外 OH 自由基為強氧化劑，進而取代 ATQ 環上 H 鍵，因此 ATQ 上被 OH 自由基取代形成 1-hATQ。(3) 光變化產物中含穩定及不穩定化合物，本實驗分析中並未偵測到 2-hATQ、1,2-dhATQ 及 1,2,4-trihATQ，有兩種可能之因素造成，分別為 ANT 光降解速率與光變化產物所佔比例。對於 ANT 光降解速率而言，有研究指出 ANT 光降解速率與濃度呈擬一階反應，ANT 低濃度時光變化速率較高濃度快，因此可能為本研究低濃度條件下，其光降解速率迅速而未偵測到；另一方面，由於光變化所形成之比例不同，也可能為此化合物在 ANT 光變化溶液中所佔比例過低致被忽略。

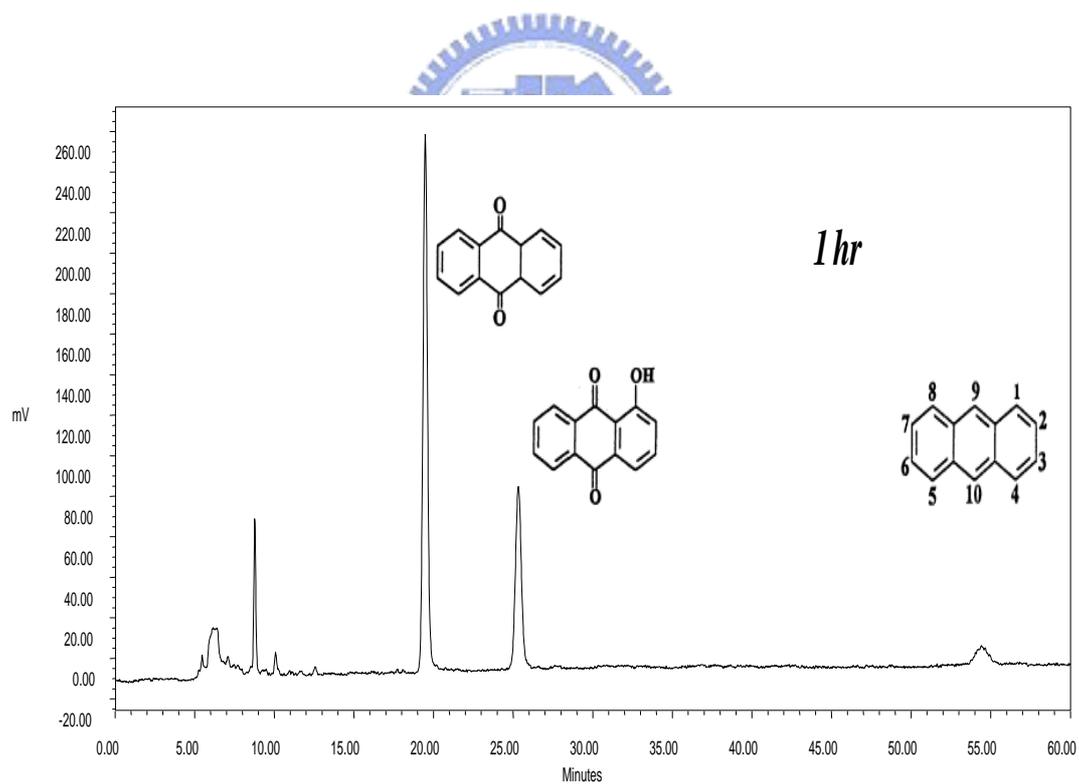
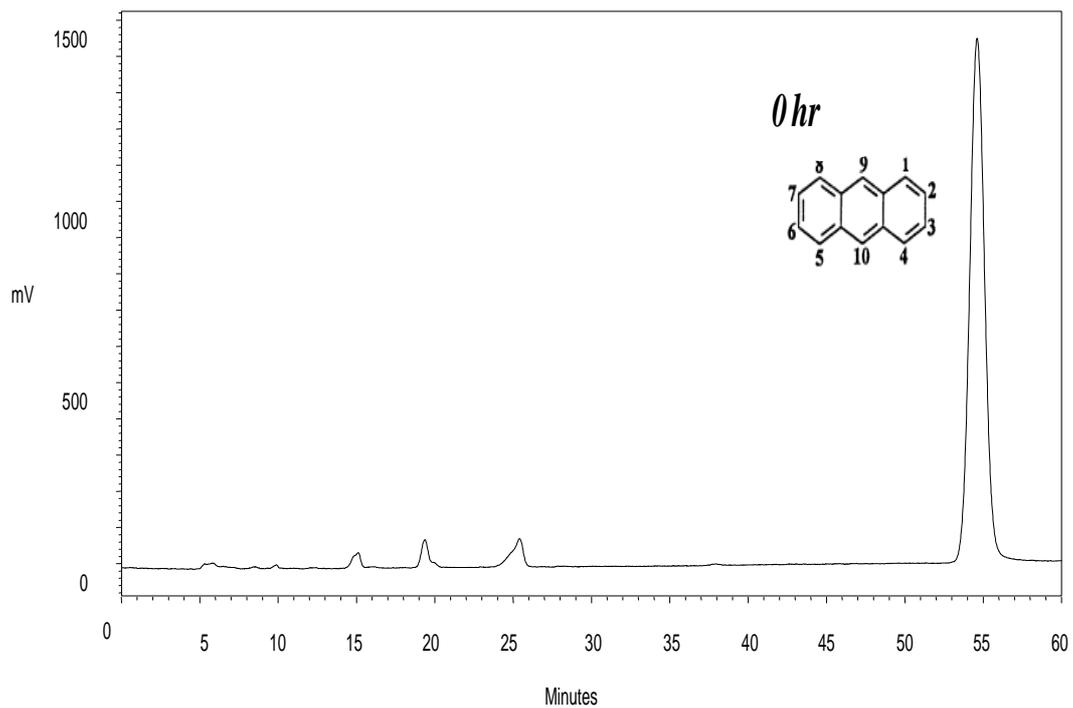
Mallakin *et al.* (2000)^[4] 分析 ANT 光變化中的 1-hATQ 是屬於穩定性化合物，然而本實驗發現 1-hATQ 會經光照時間增長而變化為不穩定化合物，這與本研究結果不相符，可能造成此差異之因素為實驗條件不同。

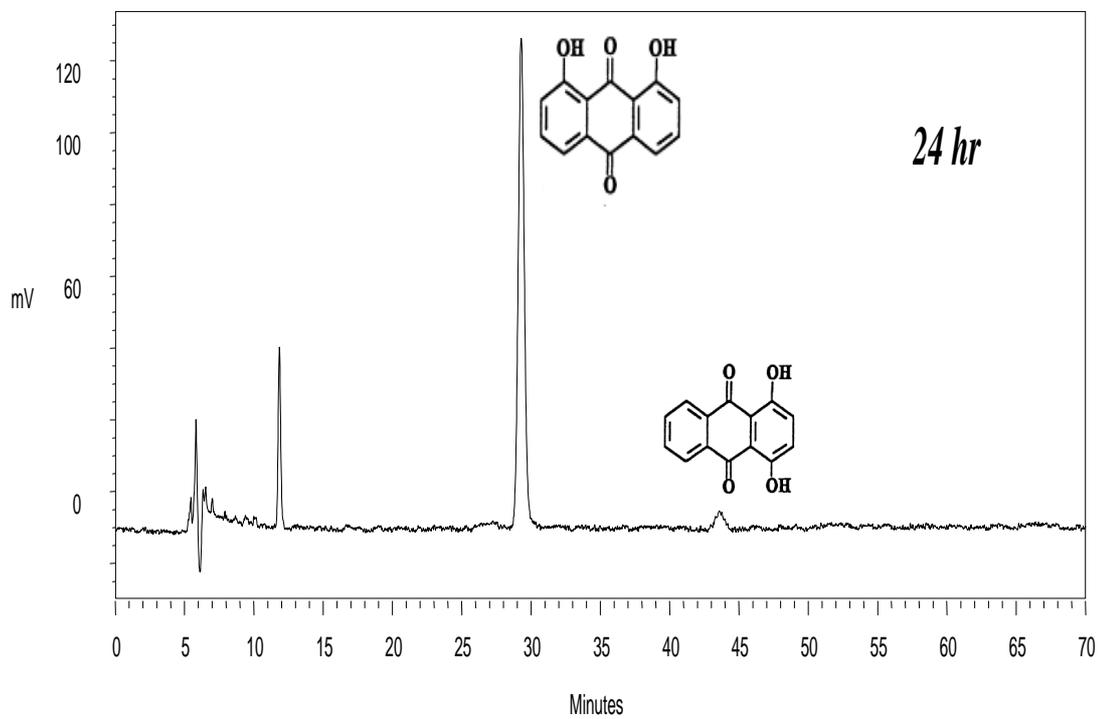
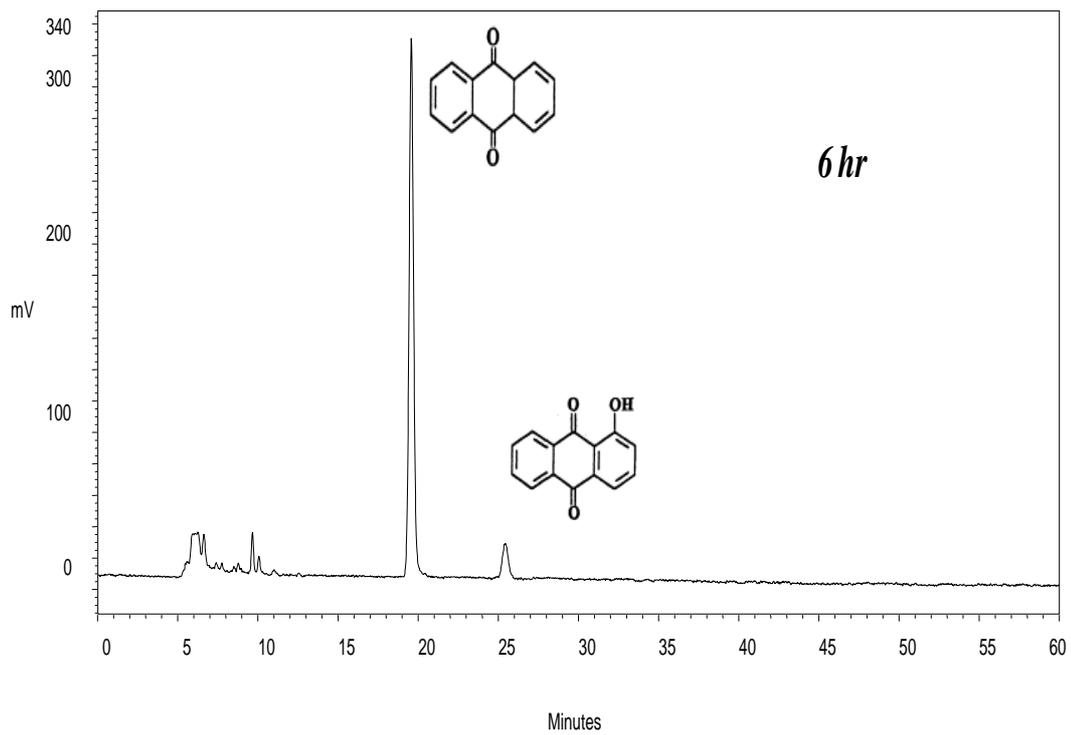
表 5.2.1 為本研究針對 ANT 在固定 UV-A 強度下，不同光照時間所得之試驗結果，而圖 5.2.2 至 5.2.4 是以三種試驗終點經不同光照時間下之劑量反應曲線。由表中可發現在 UV-A 燈下 ANT 毒性皆明顯高於日光燈之結果，從各參數之敏感度而言，日光燈下以 DO 最敏感，但於 UV-A 燈時皆以最終產量最敏感。值得注意的是在 GR 此參數，經 UV-A 燈照射後對藻類抑制有大幅度增加，甚至在 24 小時此時段，其 EC_{50} 幾近於 DO 值；另一方面，由不同 UV-A 燈之光照時間探討 EC_{50} 值，由圖 5.2.1 知最初光照 6 小時 ANT 已完全光降解為 ATQ，此時 EC_{50} 值已較日光燈下敏感 2 至 4 倍，當光照至 24 小時主要為 1,8-dhATQ，此時毒性較原 ANT 增強約 3 至 7 倍，然而持續光照至 48 小時之毒性與 24 小時比較，卻未有增強趨勢反而毒性降低，推

測可能為三環的光變化產物進一步光降解產生毒性較低的單環或二環化合物。

Huang et al., 1997^[49] 針對浮萍受ANT光變化後毒性研究，利用螢光度計測浮萍之葉綠素，進一步得知抑制光合作用之情況，其結果指出在無UV-A燈時僅抑制葉綠體中的PSI，而在UV-A燈下可抑制PSI及PSII，並指出當PSI為最初毒性反應位置，不能完全阻止葉綠體運作機制，但抑制PSII則對葉綠體造成永久氧化傷害。綜上所述，針對日光燈及UV-A燈下毒性差異，本研究推論可能為日光燈下抑制光合作用的PSI，經UV-A燈光照後則再抑制PSII，使得試驗終點GR的EC₅₀值有如此大的改變。







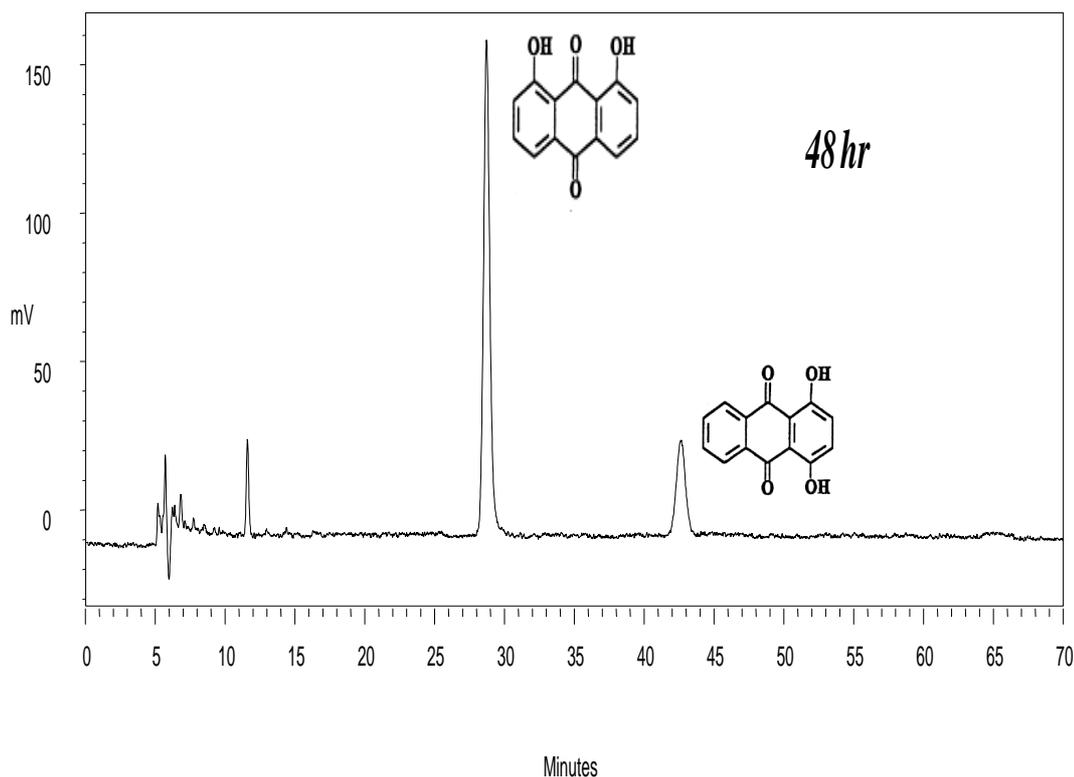


圖 5.2.1 ANT 於不同 UV 光照時間下化合物之波峰變化



表 5.2.1 ANT 在不同 UV 光照時間下對藻類之毒性比較

UV-A exposure time (hr)	DO		Final yield		Growth rate	
	EC50 (mg / l)	EC10 (mg / l)	EC50 (mg / l)	EC10 (mg / l)	EC50 (mg / l)	EC10 (mg / l)
0	0.46	0.21	0.56	0.22	1.11	0.35
6	0.22	0.06	0.17	0.08	0.27	0.10
24	0.14	0.07	0.12	0.06	0.15	0.09
48	0.15	0.07	0.15	0.07	0.24	0.07

Initial cell density = 1.5×10^4 cells/ml

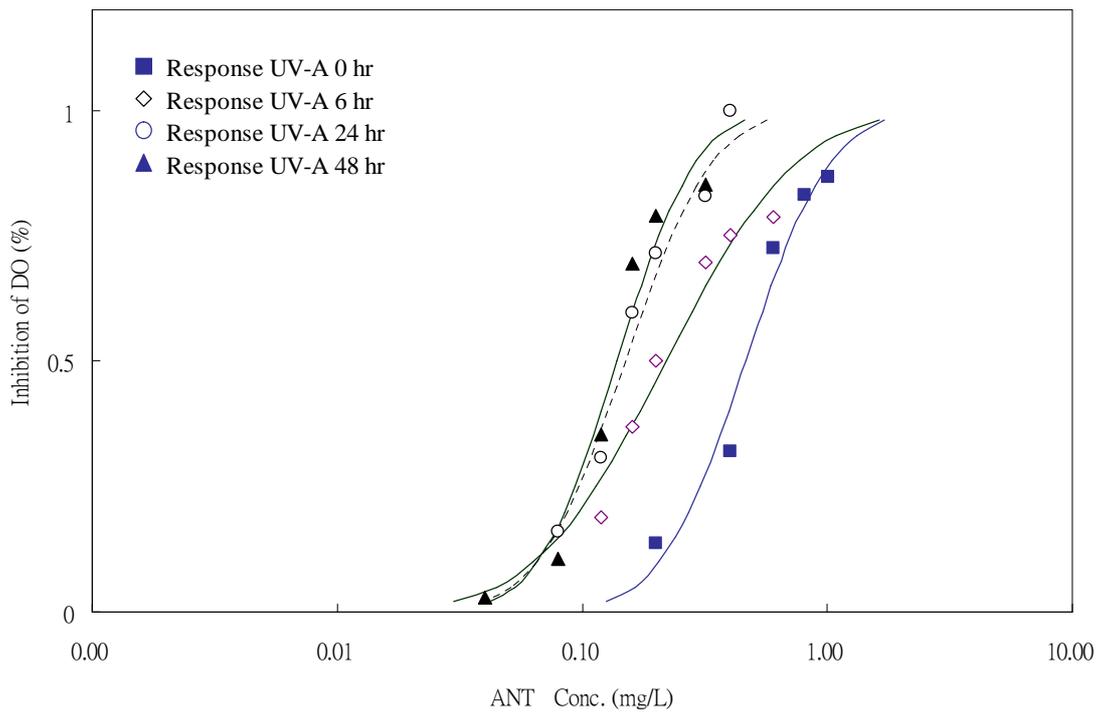


圖 5.2.2 ANT 在不同 UV 光照時間下對藻類氧氣增加量的劑量反應曲線

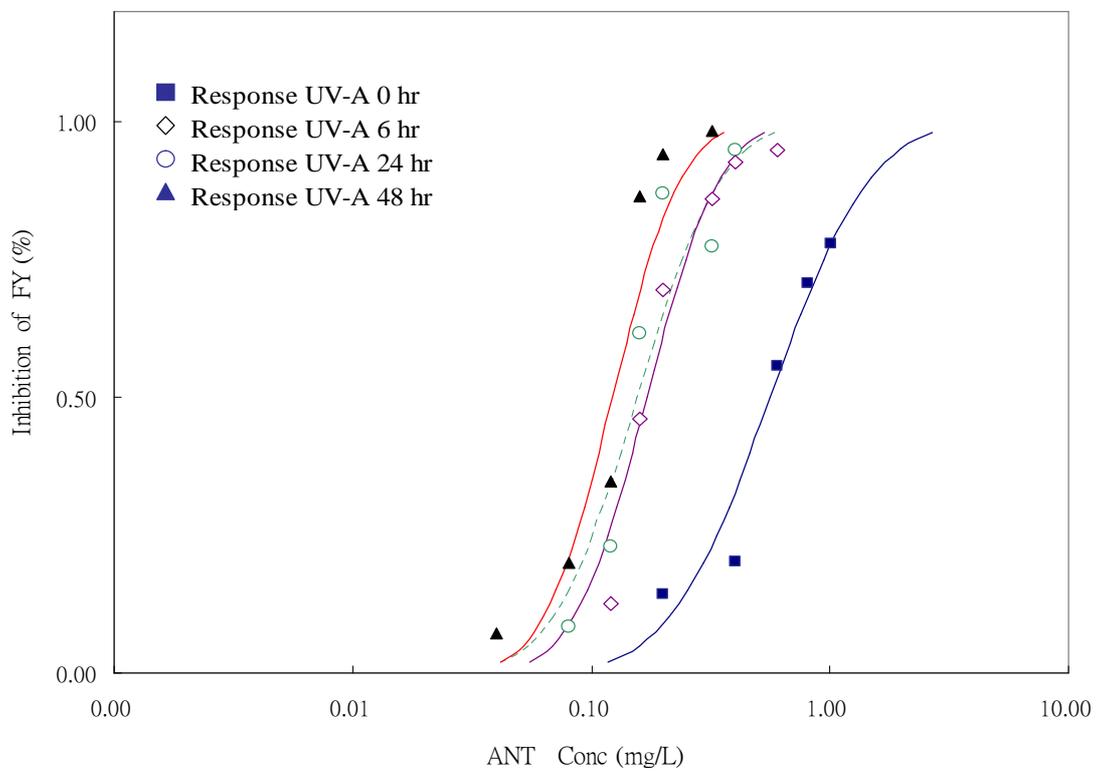


圖 5.2.3 ANT 在不同 UV 光照時間下對藻類最終產量的劑量反應曲線

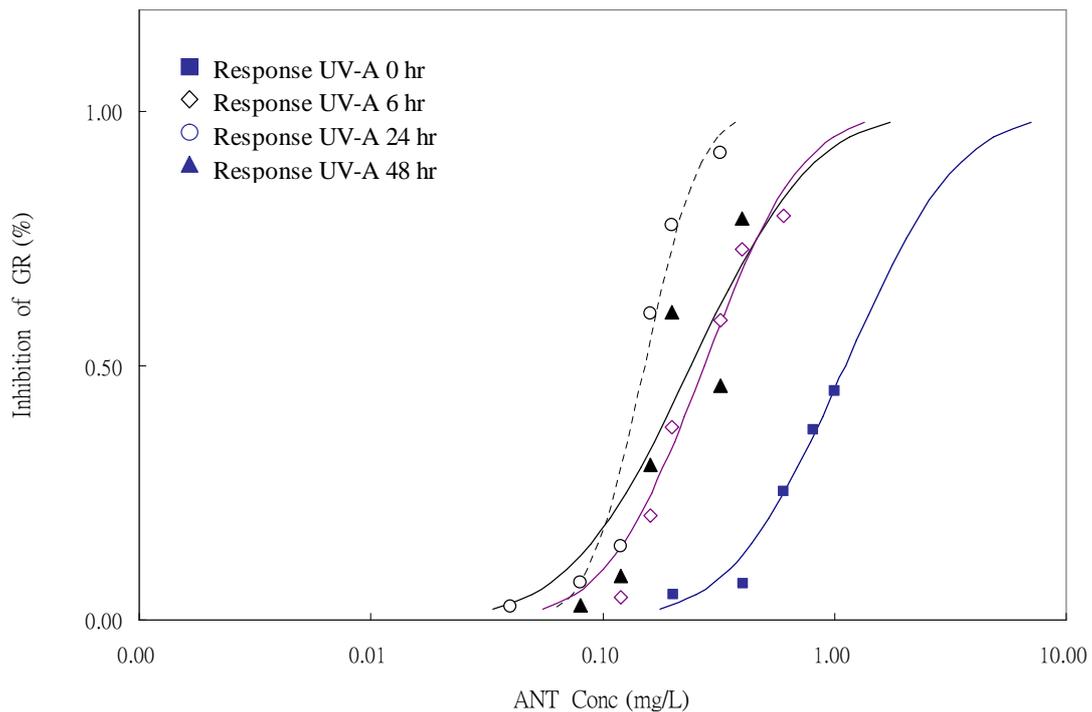


圖 5.2.4 ANT 在不同 UV 光照時間下對藻類生長率的劑量反應曲線

5.2.2 Naphthalene 光誘導毒性

表 5.2.2 顯示於日光燈下及 UV-B 光照 24 小時後毒性試驗的比較，圖 5.2.5 至圖 5.2.7 為三種試驗終點下不同光照時間之劑量反應曲線。在經 UV-B 光照後之結果，發現毒性皆較日光燈下為弱，此表示無顯現光誘導毒性之現象，由 Mcconkey et al., (2002)^[41] 化學分析流程得知，NAP 行光降解變為其他化合物，大部份光變化產物之結構皆受高能量之光能影響，使得共軛鍵斷裂造成毒性變化。本研究針對光變化產物毒性較原 NAP 毒性高做一探討，由前述單一毒性試驗結果知光降解後 2-OH-1,4-NAP 與 1,4-NAP 兩化合物毒性較原 NAP 高，因此假設 NAP 經 UV-B 光照後毒性會增加，但經進一步試驗結果卻顯示毒性減低，造成此差異之原因本研究推論為單一光降解產物所佔 NAP 光照後混合液中之比例不同所致，

2-OH-1,4-NAP與 1,4-NAP此兩化合物毒性雖高，卻可能由於光照後混合液中所佔有比例低，未能達到明顯抑制濃度，因此產生NAP光變化產物之毒性高而NAP 光照後毒性低之結果。

另一方面，依據 Mekenyan et al., 1994^[38] 推估 PAHs 光誘導毒性模式中，HOMO-LUMO gap 為 6.7 至 7.5 具光毒，而 NAP 則在此範圍之外，屬於不具光毒之化合物，由本研究所得之實驗結果與文獻預測模式結果相符，也顯示此模式可更廣泛作為 PAHs 對藻類光誘導毒性試驗之參考預測模式。

表 5.2.2 NAP 在不同 UV 光照時間下對藻類之毒性比較

UV-B Exposure time (hr)	DO EC ₅₀ (mg / l)	Final yield EC ₅₀ (mg / l)	Growth rate EC ₅₀ (mg / l)
0	4.05	3.11	4.94
24	7.45	4.39	11.11

Initial cell density = 1.5×10^4 cells/ml

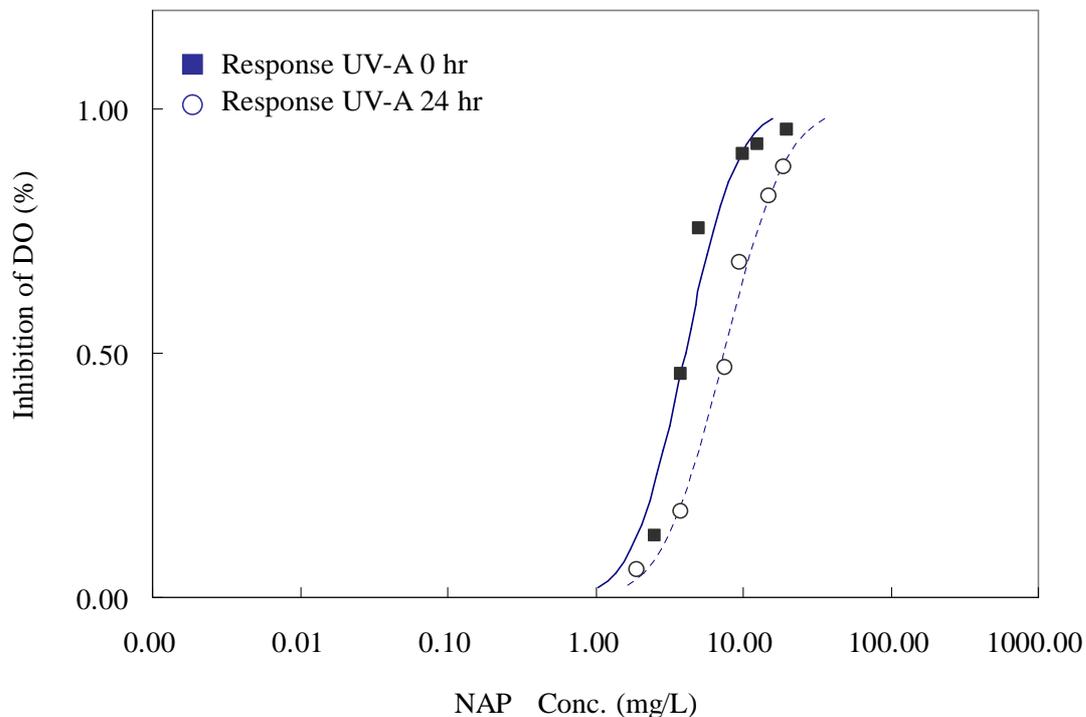


圖 5.2.5 NAP 在不同 UV 光照時間下對藻類氧氣增加量的劑量反應曲線

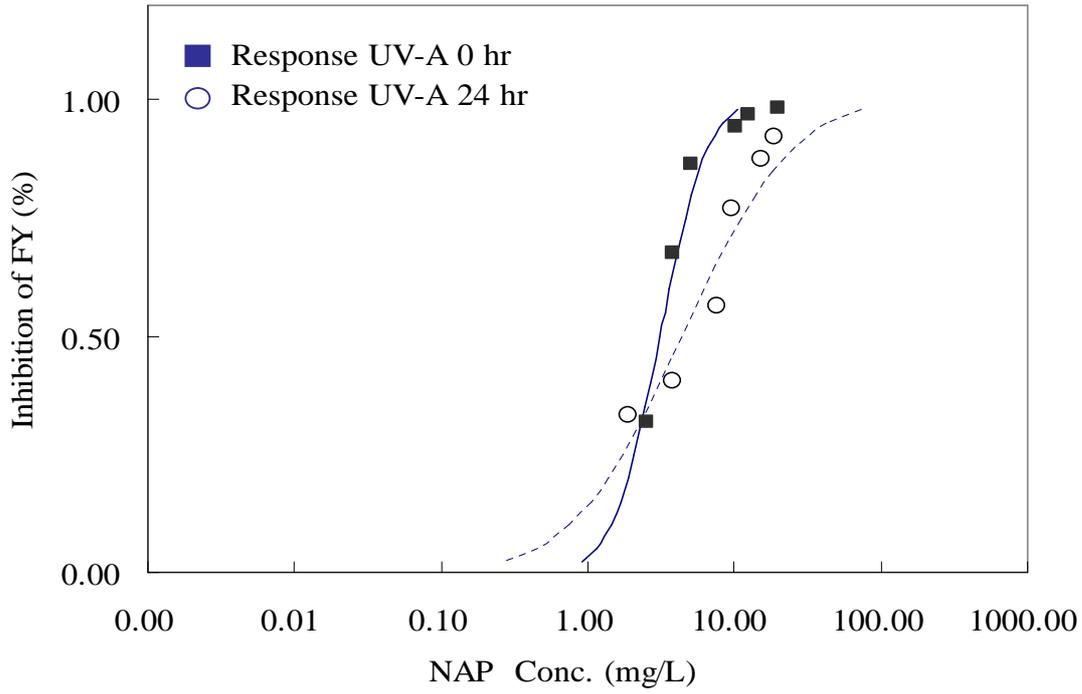


圖 5.2.6 NAP 在不同 UV 光照時間下對藻類最終產量的劑量反應曲線

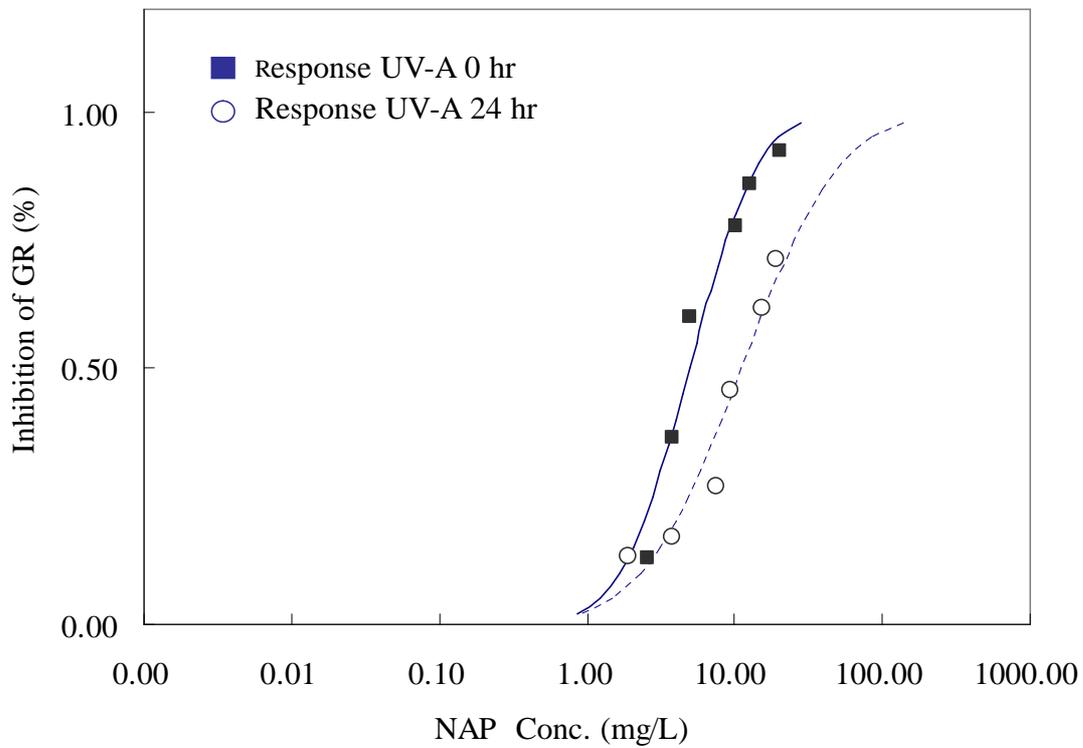


圖 5.2.7 NAP 在不同 UV 光照時間下對藻類生長率的劑量反應曲線

5.3 最佳化模式之選擇

根據第三章所述，可知毒性試驗常用數學模式求取EC值，利用的數學模式分別為probit、logit與weibul，不同模式所計算EC值也會有所差異。然而，EC值在信賴區間較小時，會有較高的可信度，因此計算EC₅₀時三種模式差異小，可信度高；若計算EC₁₀或EC₉₀，由於信賴區間大導致低可信度，此結果可能為選用不適模式計算所造成。本研究利用G test 分析以求得最適之計算模式，G test 分析是比較對重複試驗的每一處理組與期望值誤差，而所得絕對值最小G值即為適合的最佳模式。

表 5.3.1 至 5.3.3 分別以溶氧增加量 (DO)、最終產量 (FY) 與生長率 (GR) 為試驗終點之G值。在DO優選模式中，除了 1,2,4-trihATQ、2-OH-1,4-NAP、1,4-NAP是以Weibull迴歸模式最佳外，其餘以Logit迴歸模式最佳；當以FY為試驗終點時，ANT、ATQ、1-hATQ與ISO是以Probit迴歸模式最佳外，其餘也是以Logit迴歸模式為最佳，然而GR的優選模式結果則全以Weibull迴歸模式為最佳。在Chao^[9]的研究中顯示連續式實驗以Probit最適合，而批次式實驗則以Logit最適合，其批次實驗結果與本研究的DO與FY優選模式結果一致。Hsu^[19]與Lee^[54]在本研究相同的試驗方法下，針對非極性麻醉毒物及極性麻醉性機制毒物進行實驗，經數據分析結果是以Weibull模式較佳，Prakash et al.^[55]用Polytox研究一些非極性麻醉性毒物的實驗，所得迴歸結果認為weibull模式最佳，而Huang以腈類為毒物經模式最佳化分析結果也同樣以Weibull模式較佳，綜合上述之結果與本研究的GR分析一致。

表 5.3.1 以 DO 為試驗終點之三種模式 G value

Chemicals	G of Probit	G of Logit	G of Weibul
ANT	2.093	0.447 *	3.880
ATQ	6.396	5.392 *	9.986
1-hATQ	8.955	1.116 *	9.844
2-hATQ	11.695	10.267*	17.883
1,2-dhATQ	22.428	0.694 *	11.488
1,4-dhATQ	1643.116	27.322*	131.711
1,8-dhATQ	0.016	0.015 *	0.149
1,2,4-trihATQ	1.936	1.849	0.344 *
NAP	0.722	0.291 *	1.203
ISO	6.168	3.541 *	12.592
2-OH-1,4-NAP	1102.175	1043.337	908.157 *
1-NAP	7.483	5.356 *	29.712
1,4-NAP	11.915	14.312	4.051 *

* : the lowest absolute value of G among three models

表 5.3.2 以 FY 為試驗終點之三種模式 G value

Chemicals	G of Probit	G of Logit	G of Weibul
ANT	60.845 *	60.850	60.890
ATQ	74.935 *	75.399	78.068
1-hATQ	102.700*	107.466	143.908
2-hATQ	121.365	117.845 *	125.800
1,2-dhATQ	69.621	62.734 *	88.064
1,4-dhATQ	64.175	63.147 *	65.525
1,8-dhATQ	45.384	45.147 *	46.694
1,2,4-trihATQ	46.812	46.802 *	47.560
NAP	69.282	67.914 *	72.811
ISO	74.871 *	82.228	110.335
2-OH-1,4-NAP	109.268	108.405 *	113.225
1-NAP	64.771	63.531 *	102.424
1,4-NAP	53.534	52.273 *	55.651

* : the lowest absolute value of G among three models

表 5.3.3 以 GR 為試驗終點之三種模式 G value

Chemicals	G of Probit	G of Logit	G of Weibul
ANT	781.014	773.176	763.828 *
ATQ	815.940	809.509	801.832 *
1-hATQ	776.188	720.651	692.696 *
2-hATQ	823.610	836.625	819.312 *
1,2-dhATQ	665.282	652.817	619.745 *
1,4-dhATQ	681.436	682.139	176.500 *
1,8-dhATQ	688.209	687.269	682.917 *
1,2,4-trihATQ	635.137	631.727	617.171 *
NAP	304.025	304.716	302.492 *
ISO	651.182	636.365	623.940 *
2-OH-1,4-NAP	729.736	708.650	663.615 *
1-NAP	630.793	649.972	613.575 *
1,4-NAP	602.972	603.224	602.202 *

* : the lowest absolute value of G among three models

5.4 EC10 與 NOEC 值之比較

本研究利用BOD瓶藻類毒性試驗，根據溶氧量增加量、最終產量及生長率為反應終點所得到的EC10 與NOEC (No Observed Effect Concentration) 值。然而，NOEC值的判定與實驗所設計情況、選取加入毒性物質濃度、試驗重複組之數量與觀測參數相互影響，若實驗條件未能掌控常造成NOEC 值誤判情況。另一方面，由統計方法中的Dunnett's test計算求得NOEC 值，對於重複組之間的差異縮小，處理組之間的差距則較為明顯，相對的由Dunnett's test所得到之NOEC值也較準確。Chao^[9]利用藻類的連續式培養母槽的生長控制圖 (Control Chart) 所定義的NOEC值與利用Dunnett's test分析得到的NOEC相互比較而得到了相同的結果。綜合以上的

兩個分析方法，Chao^[9] 對NOEC定義方法與利用Dunnett's test所得之NOEC進一步與EC10 進行比較。

由圖 5.4.1 與 5.4.2 為本研究中針對實驗控制組的溶氧與細胞密度之增加量所記錄而繪製的控制圖。依數據平均值加減取三倍標準偏差值定義出上下控制範圍 (Control Level)，當實驗處理組的溶氧或細胞密度增加量在此控制範圍之外時，稱此毒性物質對藻類有明顯的抑制，而NOEC值是指在控制範圍內，毒性物質最高濃度的處理組，將此結果與適合模式分析之EC10 比較，討論兩者所能提供的保護水體程度。以溶氧增加量為試驗終點時，其控制範圍上限為 8.13 mg/L，下限為 6.03 mg/L，平均為 7.08 mg/L；而以最終產量為試驗終點時，控制範圍上限為 3.56×10^5 cells/ml，下限為 1.78×10^5 cells/ml，平均為 2.67×10^5 cells/ml。

本研究以兩種反應終點的控制圖所求取的 NOEC 值，另外用最適模式計算得到的 EC10，以及此兩參數的比值如表 5.4.1。由表中可發現溶氧量及最終產量的 NOEC 值，有七組毒性物質具有相同的結果，得知此兩參數用控制圖所得之敏感度其差異性小。在最適保護水體的參數選擇中，本研究分析 EC10 與 NOEC 的比值以求得最佳參數。以溶氧增加量與最終產量為終點的比值時，除了 1-hATQ 與 1,8-dhATQ 在溶氧增加量比值等於 1 外，其餘數據比值皆小於 1，其意義顯示以溶氧量或最終產量為終點時，EC10 較 NOEC 為敏感而能提供較佳保護。

表 5.4.2 是利用 Dunnett's test 分析之 NOEC，此兩種試驗終點各有二種毒物之 NOEC 低於實驗所設的最小濃度，並與最適模式分析所獲得之 EC10 與 NOEC 的比值在溶氧增加量與最終產量結果呈現大於 1 趨勢，因此可得知 NOEC 較 EC10 更能提供保護。

由上述兩種方法分析無法說明 NOEC 與 EC10 何者可提供較佳保護，因此需再深入探討的比較 EC10 與 NOEC，本研究進一步利用 ANOVA (analysis of variance) 檢定中兩項重要參數，Sw、F ration 以及中斷值

(cut-off value)。Sw 代表試驗的組內變異，而 F ration 為組間變異與組內變異的比值，用以表示組間變異與組內變異的差異程度。由表 5.4.3 之結果，可發現此兩種試驗終點之 Sw 值差異性大，其原因是以溶氧量的單位是 mg/L 而細胞密度的單位是 cells/ml，由於使用不同的單位，使得 Sw 不能用以直接比較兩反應終點的組內變異，根據以上之結果 F ration 同樣也無法判斷哪一觀測參數較為精確。為了能夠比較參數的準確度，本研究利用判斷參數中斷值，此中斷值與 Sw 成比例關係且介於 NOEC 與 LOEC 之間，可更嚴謹的判斷藻類受到抑制的顯著性。

由表 5.4.3 以溶氧量和細胞密度為反應終點的平均中斷值分別為 4.27 與 3.99，顯示以細胞密度作為反應終點較溶氧量要稍佳。在Hsu^[19]針對非極性麻醉有機物的此兩種反應終點之中斷值比較上顯示以溶氧增加量為試驗種點的組內變異較低，此一結果與本研究並不相符。因為中斷值位於 NOEC與LOEC之間高於NOEC，故當中斷值小於 10%時，生物受到NOEC的影響濃度會比 10%的抑制濃度要低，換言之，此時以NOEC能夠比EC10提供更加嚴謹的保護標準。對於本研究的有機毒性物質而言，NOEC比EC10 值能提供更好的保護標準。利用中斷值所之結果與以控制圖所分析之NOEC結果有所差異，可能為各毒性試驗的控制組變異大，導致較高的標準偏差值，並增加控制圖的上下限控制範圍，因此得到較高的NOEC。導致此差異的原因可能來自於所使用的藻類未達穩定狀態、試驗過程不夠嚴謹以及設定不佳的毒性物質濃度皆會導致分析產生偏差。

綜合上述討論可知 NOEC 比起 EC10 值更能提供對生物較好的保護，而比較兩種反應終點可以發現以細胞密度為試驗終點具有較小的組內變異。

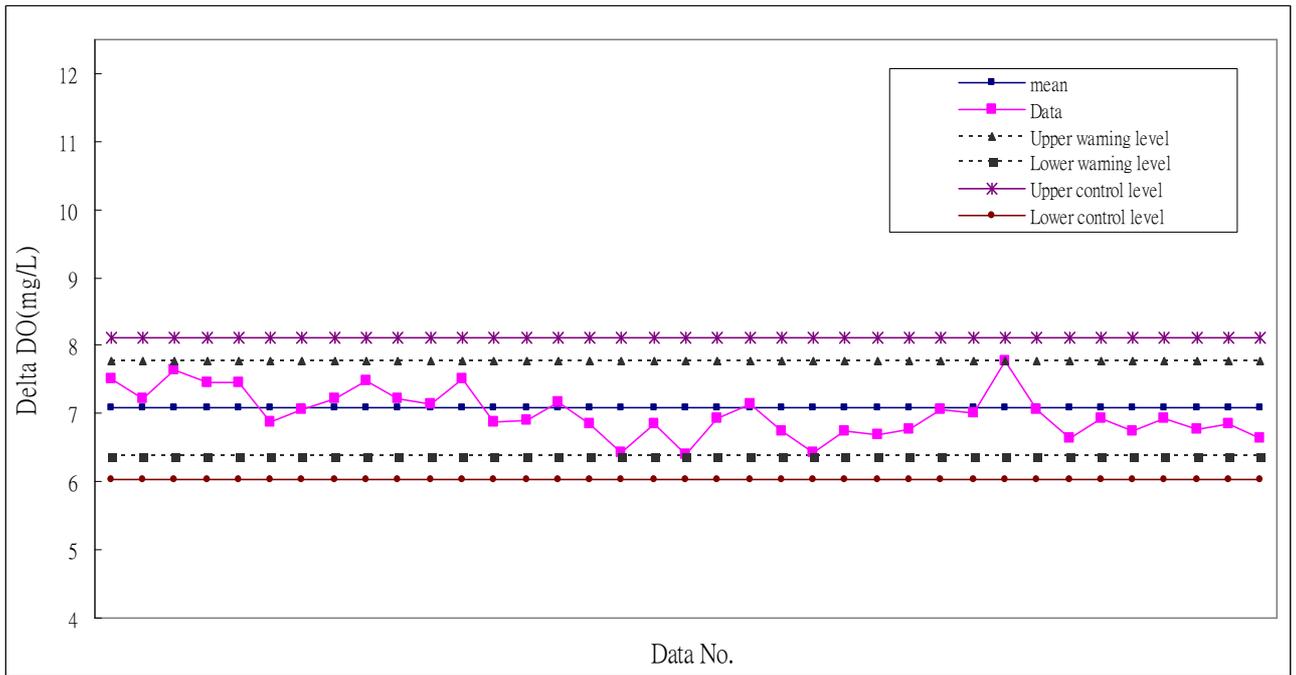


圖 5.4.1 控制組溶氧增加量之控制圖

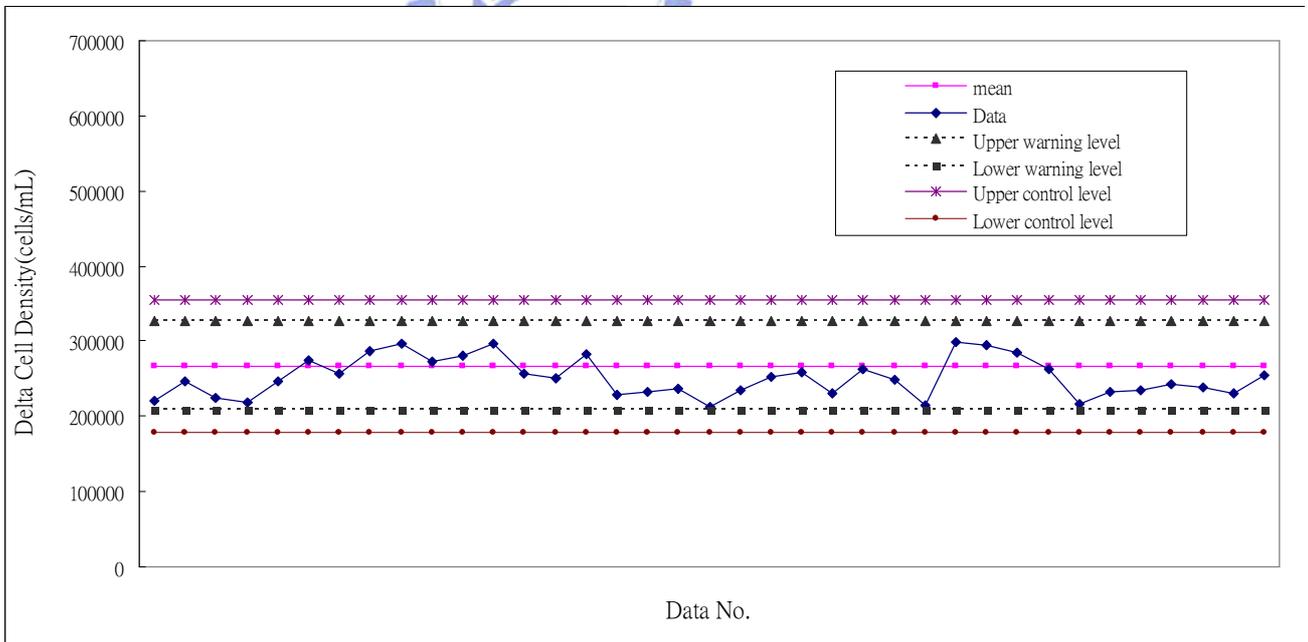


圖 5.4.2 控制組藻類細胞密度增加量之控制圖

表 5.4.1 以 One-sample t test 分析兩種試驗終點之 NOEC 與 EC10 及其比值

Chemicals	NOEC (mg/l)		EC10 (mg/l)		EC10 / NOEC	
	base on	base on	base on	base on	base on	base on
	DO	FY	DO	FY	DO	FY
Anthracene	0.25	0.3	0.21	0.21	0.84	0.70
Anthraquinone	<0.21	<0.21	0.05	0.08	>0.24	>0.38
1-hydroxyanthraquinone	0.1	0.21	0.10	0.13	1.00	0.62
2-hydroxyanthraquinone	0.4	0.4	0.25	0.19	0.63	0.48
1,2-dihydroxyanthraquinone	0.48	0.48	0.13	0.34	0.27	0.71
1,4-dihydroxyanthraquinone	0.09	0.09	0.08	0.05	0.89	0.56
1,8-dihydroxyanthraquinone	0.05	0.1	0.05	0.03	1.00	0.30
1,2,4-trihydroxyanthraquinone	0.15	0.2	0.14	0.13	0.93	0.65
Naphthalene	<2.56	<2.56	1.79	1.53	<0.70	<0.60
Isobenzofuranone	100.62	100.62	78.66	80.14	0.78	0.80
2-OH-2,3H-1,4-Naphthalenedione	0.16	0.16	0.06	0.07	0.38	0.44
1-naphthol	3.81	3.81	3.43	2.62	0.90	0.69
1,4-naphthaquinone	0.27	0.27	0.18	0.08	0.67	0.30

表 5.4.2 以 Dunnett's test 分析之 NOEC 值

Chemicals	NOEC (mg/l)		EC10 (mg/l)		EC10 / NOEC	
	base on	base on	base on	base on	base on	base on
	DO	FY	DO	FY	DO	FY
Anthracene	<0.20	<0.20	0.21	0.21	>1.05	>1.05
Anthraquinone	<0.21	<0.21	0.05	0.08	>0.24	>0.38
1-hydroxyanthraquinone	0.10	0.10	0.10	0.13	1.00	1.30
2-hydroxyanthraquinone	<0.21	<0.21	0.25	0.19	>1.19	>0.90
1,2-dihydroxyanthraquinone	<0.08	0.08	0.13	0.34	>1.63	4.25
1,4-dihydroxyanthraquinone	<0.09	<0.09	0.08	0.05	>0.89	>0.56
1,8-dihydroxyanthraquinone	<0.05	<0.05	0.05	0.03	>1.00	>0.60
1,2,4-trihydroxyanthraquinone	<0.15	<0.15	0.14	0.13	>0.93	>0.87
Naphthalene	<2.56	<2.56	1.79	1.53	>0.70	>0.60
Isobenzofuranone	75.68	<75.68	78.66	80.14	1.04	>1.06
2-OH-2,3H-1,4-Naphthalenedione	0.05	0.05	0.06	0.07	1.20	1.40
1-naphthol	2.50	2.50	3.43	2.62	1.37	1.05
1,4-naphthaquinone	0.05	<0.05	0.18	0.08	3.60	>1.60

表 5.4.3 兩種試驗終點之重要統計參數

Chemicals	data base on DO			data base on FY		
	Sw	F-ration	cut-off	Sw	F-ration	cut-off
			value(%)			value(%)
Anthracene	0.14	876.48	4.01	6592.02	462.01	4.65
Anthraquinone	0.21	106.92	6.22	7586	149.32	5.57
1-hydroxyanthraquinone	0.15	637.52	4.33	3583.61	1386.85	2.99
2-hydroxyanthraquinone	0.09	2407.88	2.56	3306.73	1858.65	2.53
1,2-dihydroxyanthraquinone	0.13	468.44	4.78	4944.19	675.93	4.44
1,4-dihydroxyanthraquinone	0.22	646.36	5.36	1670.13	4288.55	1.6
1,8-dihydroxyanthraquinone	0.08	2980.06	2.29	3900.71	1187.1	3.16
1,2,4-trihydroxyanthraquinone	0.24	270.14	7.29	5273.73	540.41	4.31
Naphthalene	0.09	1798.99	2.86	1488.29	4220.53	1.35
Isobenzofuranone	0.21	351.85	5.82	9372.44	281.81	6.61
2-OH-2,3H-1,4-Naphthalenedione	0.12	1354.13	3.58	11983.79	203.42	8.70
1-naphthol	0.08	4213.66	2.5	3928.44	2338.6	2.75
1,4-naphthaquinone	0.13	1658.53	3.97	3845.63	1450.03	3.27
mean	0.15	1367.00	4.27	5190.44	1464.86	3.99

5.5 Anthracene 與 Naphthalene 之 QSAR

本研究針對 ANT 與 NAP 光變化產物做一預測分析，本研究利用水及辛醇係數 (n-Octanol / Water Partition Coefficient, LogP) 此參數做為預測化合物之毒性，藻類毒性試驗進行相關性分析，表 5.4.1 為藻類三種試驗終點相關性分析之毒性數據，在比較三種試驗終點與 Log P 之相關性，發現所得結果無法有效預測光毒毒性，所得之迴歸關係式為：

$$\log(1/EC50)=0.44\log P + 1.08 \quad , \quad R^2=0.24 \quad n=13, \text{ base on DO}$$

$$\log(1/EC50)=0.4\log P + 1.23 \quad , \quad R^2=0.19 \quad n=13, \text{ base on FY}$$

$$\log(1/EC50)=0.39\log P + 0.99 \quad , \quad R^2=0.2 \quad n=13, \text{ base on GR}$$

由圖 5.5.1 至 5.5.3 可發現此迴歸曲線皆存在偏離之 outlier 化合物 2-OH-1,4-NAP、1,4-NAP 與 ANT，經去除後得較高相關性之關係式：

$$\log(1/EC50)=1.14 \log P - 1.28 \quad , \quad R^2=0.78 \quad n=10, \text{ base on DO}$$

$$\log(1/EC50)=1.41 \log P - 1.3 \quad , \quad R^2=0.81 \quad n=10, \text{ base on FY}$$

$$\log(1/EC50)=1.09 \log P - 1.39 \quad , \quad R^2=0.80 \quad n=10, \text{ base on GR}$$

經去除明顯 outlier 後可發現 PAHs 光毒產物與 Log P 具有不錯的相關性，因 Log P 是用於表示分子疏水性參數，故由上述迴歸結果得知 PAHs 光毒產物毒性與其分子疏水性兩者有一定程度相關性。

本研究利用 PAHs 與氫鍵鍵結能力的參數 Elumo 探討，在試驗毒物中 ISO 為迴歸分析之 outlier，經去除後其毒性迴歸式為：

$$\log(1/EC50)=-1.12 E_{LUMO} + 1.32 \quad , \quad R^2=0.85 \quad n=12, \text{ base on DO}$$

$$\log(1/EC50)=-1.09 E_{LUMO} + 1.36 \quad , \quad R^2=0.79 \quad n=12, \text{ base on FY}$$

$$\log(1/EC50)=-1.02 E_{LUMO} + 1.17 \quad , \quad R^2=0.79 \quad n=12, \text{ base on GR}$$

三種試驗終點與 E_{LUMO} 之相關性以溶氧增加量較為顯著，其相關性分別可達 $R^2=0.85$ (base on DO)、 $R^2=0.79$ (base on FY) 與 $R^2=0.79$ (base on GR)

如圖 5.5.4 至圖 5.5.6，由結果顯示 E_{LUMO} 與PAHs光毒有較佳的相關性，說明PAHs光毒與化合物反應前後能量之機制有關，因此得知在QSAR分析PAHs光毒時， E_{LUMO} 可做為預測毒性之參數。

本研究再將上述之 Log P 與 Elumo 此兩種反應終點進行迴歸，去除上述 outlier：2-OH-1,4-NAP、1,4-NAP、ANT 與 ISO 後可得到較佳描述毒性與疏水性和氫鍵鍵結能力之複迴歸式：

$$\log(1/EC50)=0.3 \log P -1.09Elumo + 0.27 \quad , \quad R^2=0.95 \quad n=9, \text{base on DO}$$

$$\log(1/EC50)=0.47 \log P -0.97Elumo -0.17 \quad , \quad R^2=0.93 \quad n=9, \text{base on FY}$$

$$\log(1/EC50)=0.37 \log P -0.93Elumo -0.03 \quad , \quad R^2=0.88 \quad n=9, \text{base on GR}$$

由上述結果可得知PAHs光毒產物對於藻類之毒性與其分子的疏水性和氫鍵鍵結能力有明顯的相關性。

表 5.5.1 QSAR 分析參數

Chemicals	Molecular weight	Log P	E_{LUMO}			
			(hartree)	Base on DO	Base on FY	Base on GR
ANT	178.24	4.5	-0.84	2.59	2.50	2.21
ATQ	208.22	3.4	-1.393	2.84	2.74	2.23
1-hATQ	224.22	3.5	-1.359	2.90	2.83	2.58
2-hATQ	224.22	2.9	-1.404	2.61	2.66	2.41
1,2-dhATQ	240.22	3.2	-1.393	2.65	2.40	2.31
1,4-dhATQ	240.22	3.9	-1.594	2.98	3.06	2.73
1,8-dhATQ	240.22	3.9	-1.555	3.20	3.30	2.93
1,2,4-trihATQ	256.22	3.5	-1.244	3.01	3.01	2.88
NAP	128.18	3.3	-0.265	1.50	1.61	1.41
ISO	147.13	1.2	-0.655	-0.01	0.02	-0.17
2-OH-1,4-NAP	174.16	1.4	-1.01	2.75	2.93	2.56
1-NAP	144.17	2.9	-0.247	1.39	1.39	1.18
1,4-NAP	158.16	1.7	-1.546	2.90	3.01	2.70

EC50 unit : mmol/l

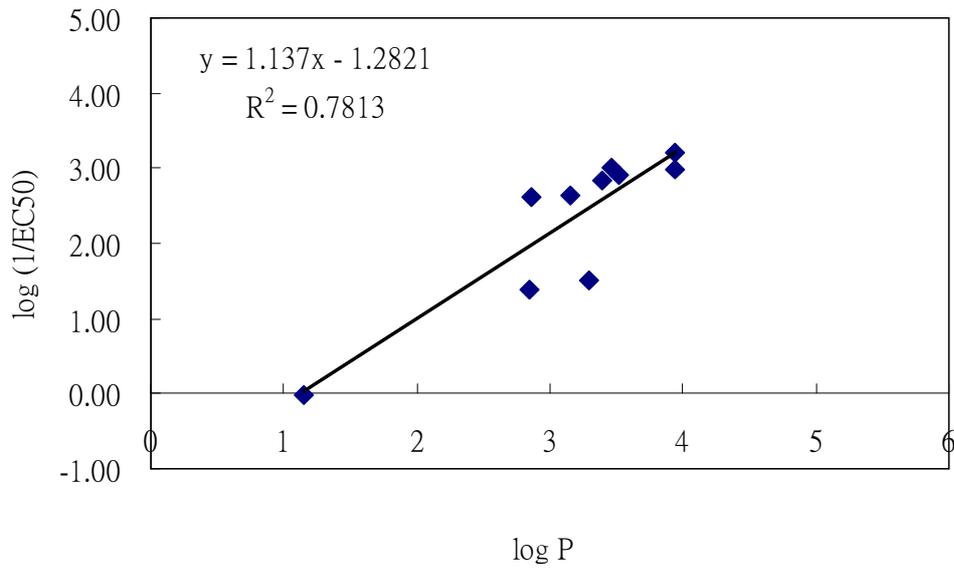


圖 5.5.1 去除outlier後Log P值對Log (1/EC₅₀) on DO 關係圖

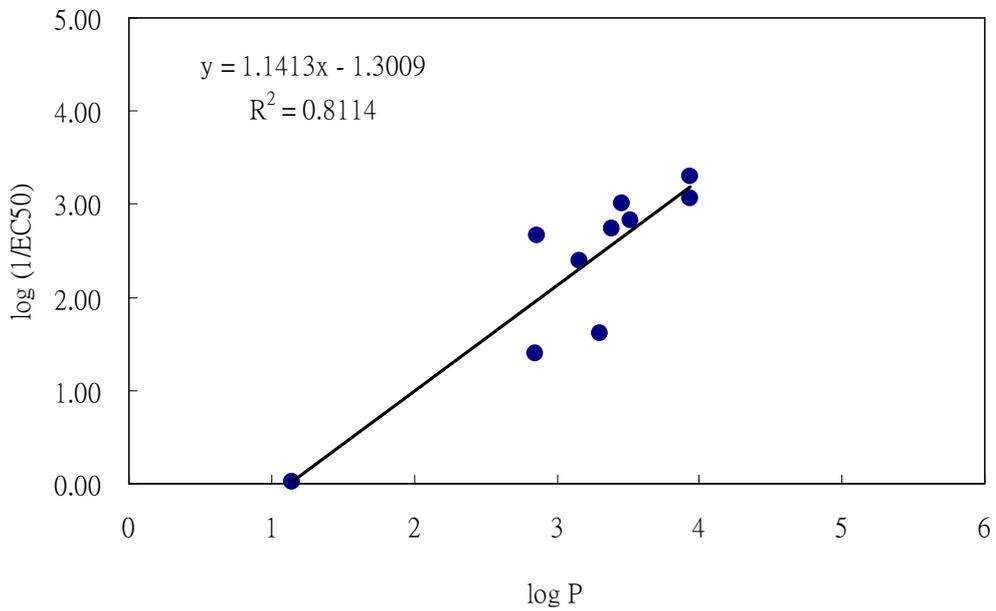


圖 5.5.2 去除outlier後Log P值對Log (1/EC₅₀) on FY 關係圖

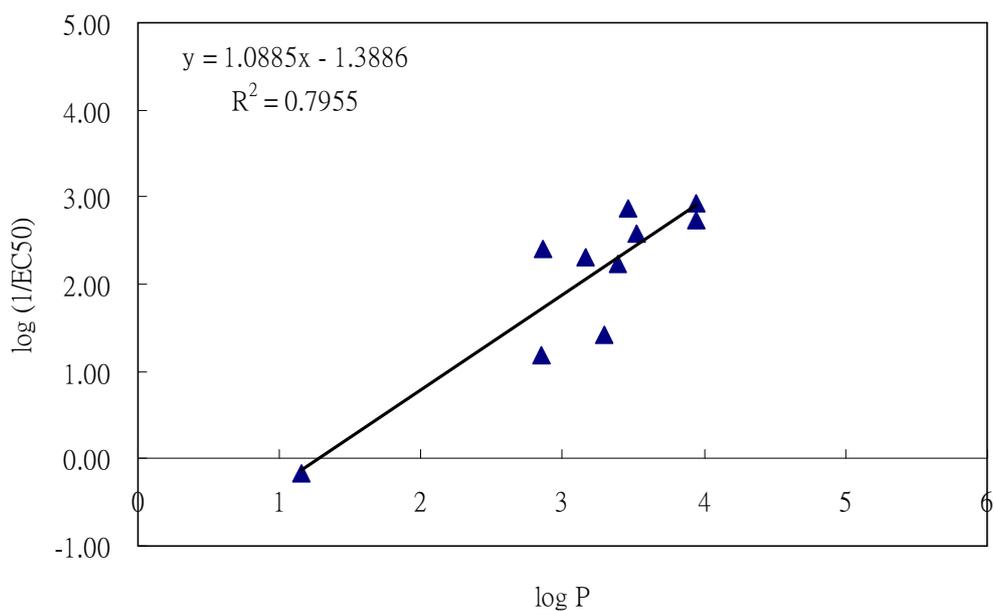


圖 5.5.3 去除outlier後Log P值對Log (1/EC₅₀) on GR 關係圖

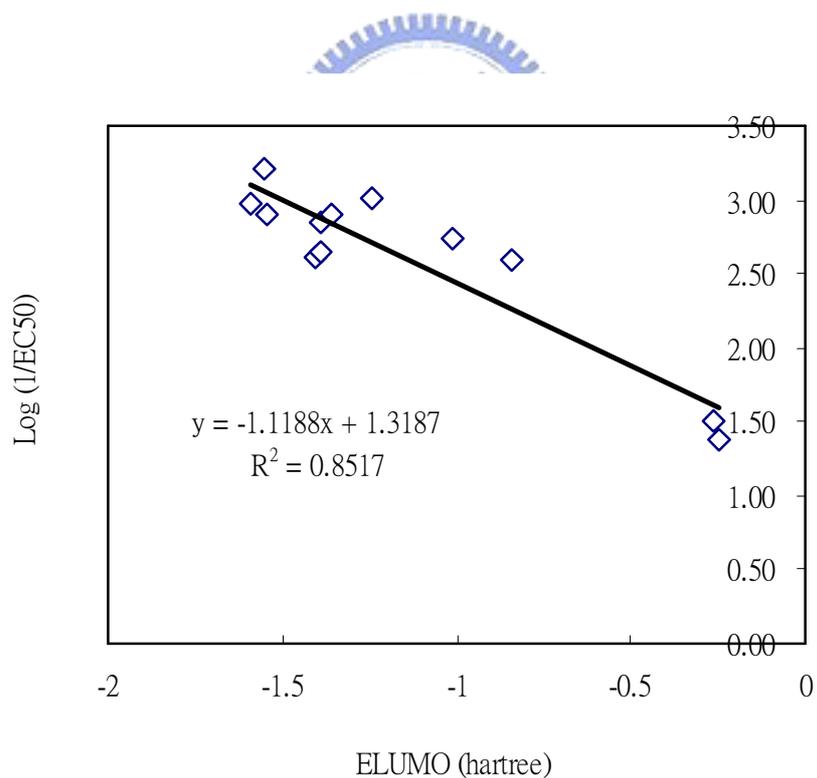


圖 5.5.4 多環芳香烴化合物 E_{LUMO} 值對 Log (1/EC₅₀) on DO 關係圖

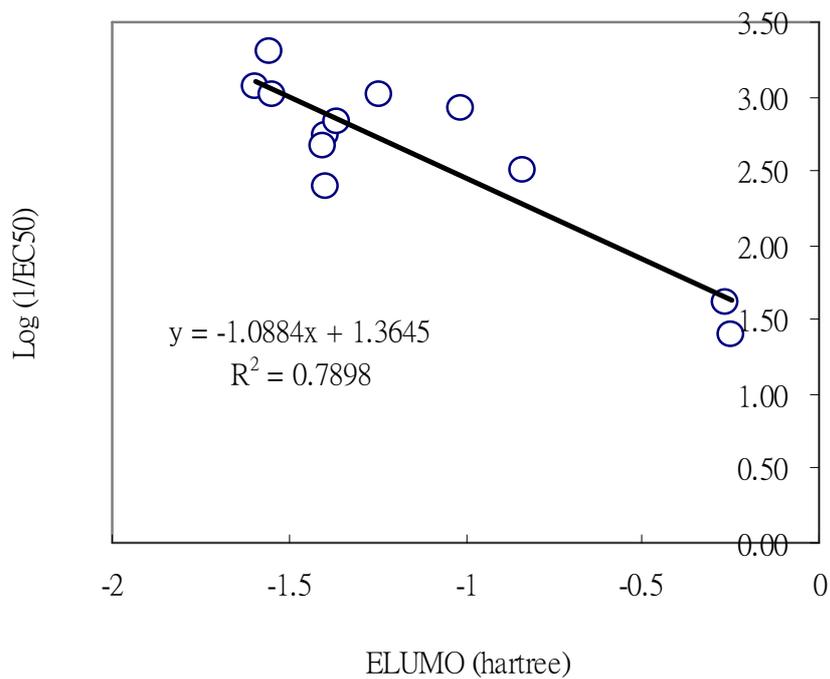


圖 5.5.5 多環芳香烴化合物 E_{LUMO} 值對 $\text{Log}(1/EC_{50})$ on FY 關係圖

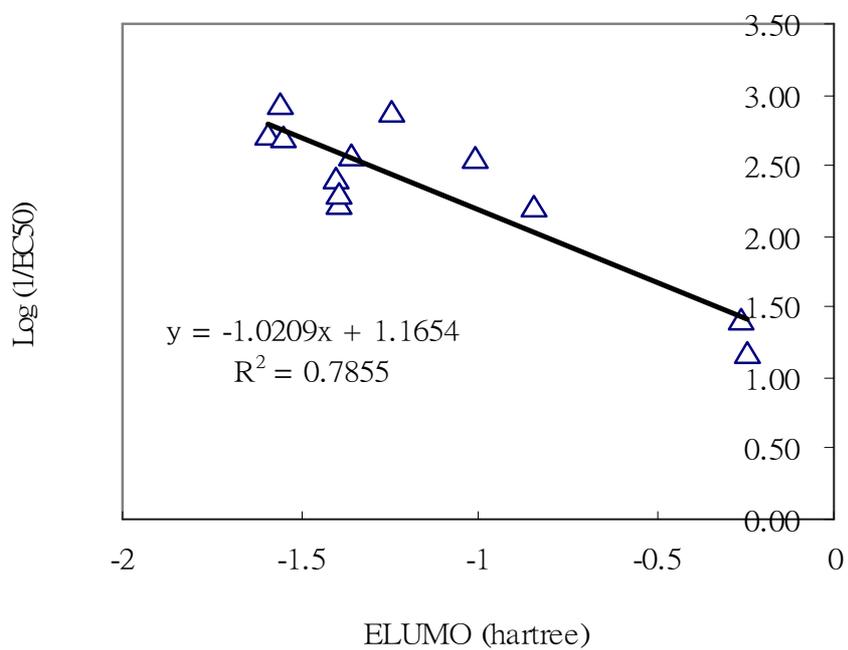


圖 5.5.6 多環芳香烴化合物 E_{LUMO} 值對 $\text{Log}(1/EC_{50})$ on GR 關係圖

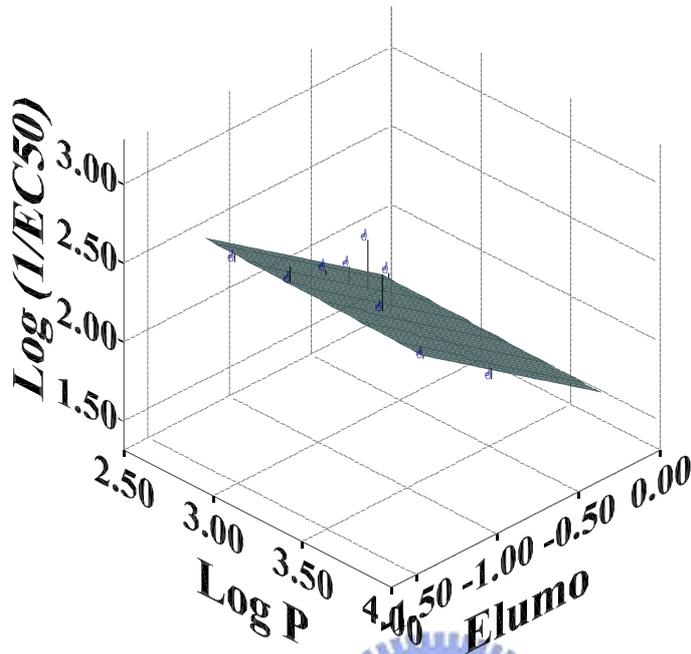


圖 5.5.7 多環芳香烴化合物log P值和 E_{LUMO} 值對 $\log(1/EC_{50})$ on DO迴歸關係圖

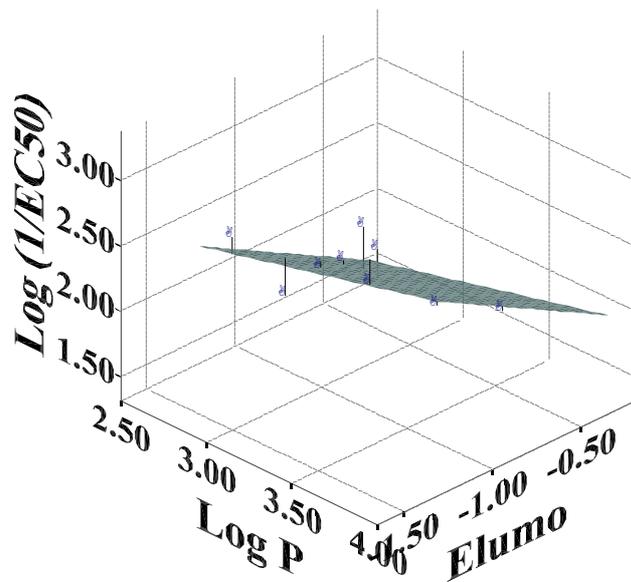


圖 5.5.8 多環芳香烴化合物log P值和 E_{LUMO} 值對 $\log(1/EC_{50})$ on FY迴歸關係圖

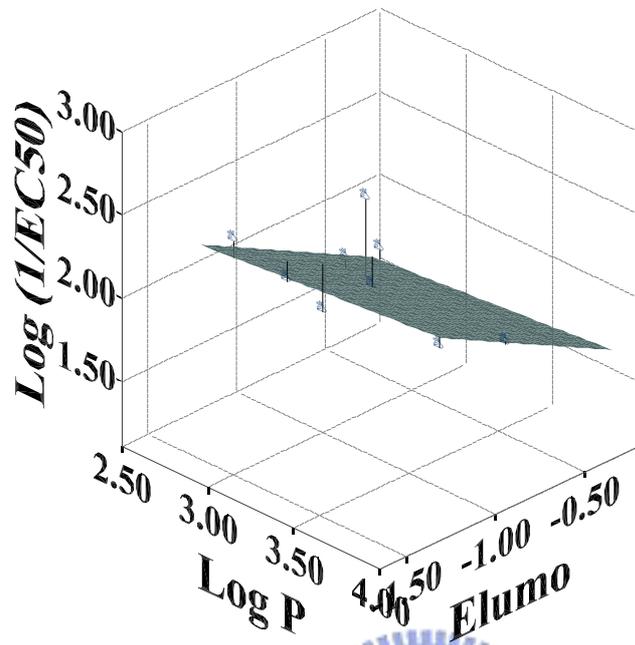


圖 5.5.9 多環芳香烴化合物log P值和 E_{LUMO} 值對 $\log(1/EC_{50})$ on GR迴歸關係圖



5.6 藻類與其他毒性試驗之敏感度比較

5.6.1 未照 UV 藻類毒性數據與其他試驗物種毒性數據之比較

將藻類與其他物種在未照UV光處理的毒性試驗做一比較，結果顯示在表 5.6.1。探討毒性試驗之敏感度，藻類明顯皆較其他物種敏感，其中差距最大為ATQ，本研究結果竟然比Microtox敏感有 319 倍，而造成此差異二個可能原因，第一點為毒性試驗之環境不同，因ATQ為半揮發之有機物，Microtox實驗為開放式環境下，使得試驗期間隨毒物揮發而測試濃度降低，導致試驗之毒性敏感度低，毒性數據可信度降低。第二點為試驗物種不同，各物種的致毒機制不同且試驗終點不同，皆可能產生敏感度之差異。然而Microtox在 1,2-dhATQ卻螢光菌產生極強的抑制，El-Alawi et al. (2001)^[29]說明因 1,2-dhATQ經光變化後其溶解性較ANT高，使得螢光菌生物可利用提高所致。

針對試驗物種不同之敏感度差異探討，若物種相同且試驗終點一致時，其敏感度預期差異會減小。因此本實驗與柵狀藻 (*S. subspicatus*) 在ANT的敏感度相差 2 倍，由此得知不同物種間的差異性對毒性結果有相當大的影響；另一方面，在 NAP 的敏感度卻相差近 22 倍，此原因為 NAP 揮發性較 ANT 高且毒性測試時處於開放系統下，毒性顯然有低估之情況，然而本實驗條件為密閉系統，兩者比較之下證明本研究之方法適合用於揮發性毒性試驗。

對於ANT光變化產物之毒性方面，本研究與浮萍毒性試驗之比較結果，除了 2-hATQ得到結果與預期不一致外，其餘可明顯的發現到本實驗比浮萍毒性試驗敏感，尤其是 1,4-dhATQ甚至相差有 95 倍，Mallakin et al., 2002^[47] 研究指出 1,4-dhATQ僅造成光合作用些微抑制，這與本研究結果不

相符，可能的原因為不同物種致毒機制不同，另外實驗條件不同也可能產生此差異。對於實驗條件與毒性性質探討，1,4-dhATQ為一不穩定之化合物，會因光能量及氧氣繼續光變化為其他的化合物，又因浮萍毒性試驗為開放式，因此毒性試驗結果有所偏差，相較於本實驗為密閉式系統，不會有上述之實驗誤差，再次的說明本研究實驗條件上較為嚴謹。

表 5.6.1 未照 UV 之藻類毒性數據與其他試驗物種毒性數據

Test species	BOD bottle test (<i>Raphidocelis subcapitata</i>)			Algae ^a (<i>S. subspicatus</i>)	Duckweed (<i>L. gibba</i>)	Microtox ^d (<i>V. fischeri</i>)	
	DO EC ₅₀ (mg/l)	FY EC ₅₀ (mg/l)	GR EC ₅₀ (mg/l)	EC ₅₀ (mg/l)	EC ₅₀ ^b (mg/l)	IC ₅₀ ^c (mg/l)	EC ₅₀ (mg/l)
ANT	0.46	0.56	1.11	1.04	1.3	1.8	85.78
ATQ	0.3	0.38	1.23	-	1.5	1.6	95.85
1-hATQ	0.28	0.33	0.59	-	2.5	3.4	-
2-hATQ	0.55	0.49	0.88	-	0.2	0.4	-
1,2-dhATQ	0.54	0.96	1.18	-	5.5	1.7	1.81
1,4-dhATQ	0.25	0.21	0.45	-	>10	>20	-
1,8-dhATQ	0.15	0.12	0.28	-	3	16	-
1,2,4-trihATQ	0.25	0.25	0.34	-	>10	>15	-
NAP	4.05	3.11	4.94	68.21	-	-	99.85

a : Djomo et al. (2004) ^[51]

b : Mallakin et al. (1999) ^[30]

c : Mallakin et al. (2002) ^[47]

d : El-Alawi et al. (2001) ^[29]

5.6.2 照 UV 後藻類毒性數據與其他試驗物種毒性數據之比較

由於ANT 經UV光照後會變化為其他化合物，而光變化產物的各別毒性與不同UV光照時間毒性已在之前探討，但本研究進一步將試驗結果與其他物種做一比較，瞭解ANT光變化後毒性變化是否與本研究結果有相似的情形。**表 5.6.2** 顯示藻類毒性試驗與其他物種在UV光照後之毒性結果，值得注意的是同樣為月芽藻 (*R. subcapitata*) 且毒性物質相同，但敏感度卻相差了 33 倍，為何會造成如此大差距，由其實驗方法探究可推論其原因，發現文獻採用重新加入毒物 (renewal) 之方法以避免毒性物質揮發，卻不知ANT會經光變化產生毒性更高的產物，故光誘導毒性效應較揮發性影響更大。在螢光菌 (*V. fischeri*)方面之光誘導毒性與本實驗結果相近，比較UV光照前後螢光菌毒性差異竟有 600 倍之多，本研究毒性差異有 7 倍，螢光菌與本研究試驗之敏感性相當，而魚類(*L. macrochirus*)與水蚤(*D. magna*)方面，其試驗結果則較本研究敏感。Brack et al. ^[16]以柵狀藻與螢光菌為試驗物種，結果顯示藻類在光照前後毒性差異，此結果與本研究一致，而螢光菌方面與El-Alawi et al. (2001) ^[29]結論相同，螢光菌在比較光毒時為較適物種，對於藻類為不適合原因其解釋為ANT已對藻類具強抑制性，光照後雖有毒性增加趨勢，但此差距對螢光菌之結果而言甚小。

針對藻類敏感偏低此結果Marwood et al., (2001) ^[58]指出藻類對葉綠體的氧化還原反應具良好的管理，可抵抗PAHs光敏化所產生的單重態氧 (1O_2)。Gala and Giesy 1994 ^[43]解釋藻類具有類胡蘿蔔素(carotenoids)，它可破壞單重態氧(1O_2) 的攻擊而保護藻類，Foote et al.,1970 ^[52]也指出由於類胡蘿蔔素具有 9 個或更多碳與碳形成之共軛鍵，可破壞由PAHs激發所產生的單重態氧 (1O_2)對藻類傷害。

表 5.6.2 照 UV 之藻類毒性數據與其他試驗物種毒性數據

Test species	BOD bottle test (<i>Raphidocelis subcapitata</i>)			Algae ^a (<i>R. subcapitata</i>)	Duckweed (<i>L. gibba</i>)	Microtox ^d (<i>V. fischeri</i>)	Fish ^e (<i>L. macrochirus</i>)	Cladoceran ^f (<i>D. magna</i>)	
Toxicant	DO EC ₅₀ (mg/l)	FY EC ₅₀ (mg/l)	GR EC ₅₀ (mg/l)	EC ₅₀ (mg/l)	EC ₅₀ ^b (mg/l)	IC ₅₀ ^c (mg/l)	EC ₅₀ (mg/l)	LC ₅₀ (mg/l)	EC ₅₀ (mg/l)
ANT	0.14	0.12	0.15	0.0036	0.8	1	0.13	0.0045	0.0042

a : Gala and Giesy 1994^[43]

b : Mallakin et al. (1999)^[30]

c : Mallakin et al. (2002)^[47]

d : El-Alawi et al. (2001)^[29]

e : Oris and Giesy. (1986)^[53]

f : Holst and Giesy. (1989)^[54]



第六章、結論與建議

6.1 結論

根據以上實驗結果及分析，本研究整理出以下幾點結論：

1. 在 ANT 光變化產物中，1,8-dhATQ 為毒性最低的，2-hATQ 與 1,2-dhATQ 毒性相當，NAP 光變化產物毒性差則較大，ISO 與 2-OH-1,4-NAP 毒性差異最為顯著。由溶氧增加量與最終產量試驗終點討論，可發現兩者毒性順序大致相同，得知兩種試驗終點有很好的相關性。兩種試驗終點中，NAP 以最終產量較為敏感，ANT 則兩者敏感度差異不大，此結果和過去不同。由於 ANT 與 NAP 光變後會產生 Quinone，此化合物會使得葉綠體中電子傳遞受阻礙，光合作用與生長率皆受到抑制，由此可證明本實驗中 ANT 和 NAP 之光變化抑制結果。
2. 以 One-sample t test 分析 NOEC 的結果，兩種參數結果發現 EC10 比 NOEC 較能提供生物較好的保護，然而此結果無法明確判別 NOEC 與 EC₁₀ 何者較為嚴謹，因此進一步以 Dunnett's test 與中斷值的分析結果來看，以溶氧增加量為試驗終點的中斷值平均為 4.27 %，以最終產量為試驗終點的中斷值平均為 3.99 %，可發現兩者值皆小於 10%，顯示以最終產量為試驗終點比溶氧增加量稍佳，並得知 NOEC 值比 EC10 更能提供生物較佳保護的結果。
3. 在敏感度的探討方面，未照 UV 光時其結果為 ANT 此毒物與批次式的 *R. subcapitat* 的毒性試驗與本試驗敏感度的表現差異不大，但在 NAP 則有顯著差異。本實驗與 Microtox 在 ANT 與 NAP 敏感度上差距最大，其差距竟高達 300 倍以上。本研究為一密閉式毒性試驗，因此不會有

毒物在試驗期間隨時間揮發的問題，可大大的提高敏感性，由此可知本試驗非常適合應用在揮發性毒物的毒性試驗上。

4. 由於 ANT 經 UV 光照後會變化為其他化合物，本研究進一步將試驗結果與其他物種做一比較，本實驗與同一物種 (*R. subcapitat*) 毒性結果比較發現毒性皆較未照 UV 光增加，此為 ANT 會經光變化產生毒性更高的產物所致。在魚類(*L. macrochirus*)與水蚤(*D. magna*)方面，其試驗結果較本研究敏感。因為藻類具有類胡蘿蔔素(carotenoids)，具有 9 個或更多碳與碳形成之共軛鍵，可破壞單重態氧的攻擊而保護藻類，此為藻類保護作用之特別機制。
5. 在QSAR的分析中，ANT與NAP光變化產物的毒性與其Log P值具良好相關性，與 E_{LUMO} 值迴歸分析也有相當好的相關性，此結果顯示ANT與NAP光變化產物對藻類抑制和藻類體內的生化反應能力有關。
6. 經上述討論與比較，得知利用 BOD 瓶之試驗配合連續式藻類培養，可得到敏感性、再現性及可信度佳之毒性數值，此外整個試驗方法之量測簡單，對於試驗時間過長及複雜之生物毒性試驗方法，本研究方法為可替代之試驗方法。

6.2 建議

1. UV-A 光照強弱會影響 ANT 光變化之速率，對毒性試驗結果產生影響，本研究建議未來可以此參數進行實驗，比較光照強弱會讓毒性增加或減少。
2. 預測 PAHs 光毒可分為模式及實驗兩方面說明，首先於 Elumo-Ehomo 之間能量差為 6.7-7.5 eV 進行 UV 光照實驗，另由實驗結果判別光照前後毒性差異，比較實驗及模式所得結果是否一致。
3. 在 NOEC 與 EC10 的比較時，NOEC 所得之分析結果不如預期，試驗之控制組所產生變異性影響到分析導致結果有偏高之趨勢。造成此變異性的原因推論可能是試驗藻類來源未達穩定狀態。因此建議對於試驗藻類的狀況一定要嚴格控制。
4. 在試驗毒性物質上，本研究僅對 ANT 與 NAP 光變化產物進行試驗，並未對混合毒性做探討，未來可加以研究以了解其交互作用之毒性影響。
5. 本研究之毒性試驗主要是應用在分析、量測實際廢水對環境所造成之光毒傷害，利用本研究方法對於實際廢水之毒性試驗需要再進一步的分析討論之。
6. 在藻類培養過程中，曝氣量會直接影響其生長狀況，因此對試驗藻類的來源有直接影響，本研究群過去並未探討此參數，應該對此參數最佳化。

參考文獻

1. **Lee, ML, Novotny, M, Bartle, KD** 1981, Analytical chemistry of polycyclic aromatic compounds. Academic Press, New York.
2. **Petry T., Schmid P. and Schlatter C.** 1996. The use of toxic equivalency factors in assessing occupation and environmental health risk associated with exposure to airborne mixture of polycyclic aromatic hydrocarbons(PAHs), *Chemosphere* **32** : 639-648
3. **Josephson J.** 1984. Polynuclear aromatic hydrocarbons, *Environmental science & technology* **18**:93A-95A.
4. **Mallakin A, Dixon DG, Greenberg BM.** 2000. Pathway of anthracene modification under simulated solar radiation. *Chemosphere.* **40** : 1435-1441.
5. **Mallakin A, McConkey BJ, Miao G, McKibben B, Snieckus V, Dixon DG, Greenberg BM,** 1999. Impacts of Structural Photomodification on the Toxicity of Environmental Contaminants: Anthracene Photooxidation Products. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **43** : 204-212.
6. **Chen C.Y. and Lin K.C.** 1997. Optimization and performance evaluation of the continuous algal toxicity test. *Environmental Toxicology Chemistry.* **16**:1337-1344.
7. **Huang, H.J.** 2000. Experimental design of the algal toxicity test based on photosynthetic response. A Thesis Submitted to Institute of Environmental Engineering of National Chiao Tung University.
8. **Chen C.Y.** 1994. Theoretical evaluation of the inhibitory effects of mercury on algal growth at various orthophosphate levels. *Water Research.*

- 28:931-937.
9. **Chen C.Y. and Chao M.R.** 2000. No-observed-effect concentrations in batch and continuous algal toxicity test. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **19**:1589-1596.
 10. **Gregorio FL, Novillo A.** 1996. Toxicity and bioaccumulation of cadmium in *Olisthodiscus luteus*(Raphidophyceae). *Water Research*. **30**:57-62
 11. **Rojickova-Padrtova R and Marsalek B.** 1999. Selection and sensitivity comparisons of algal species for toxicity testing. *Chemosphere*. **38**:3329-3338.
 12. **Lin J.H.** 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.
 13. **United States Environmental Protection Agency.** 1996. Ecological Effect Test Guidelines. OPPTS 850.5400. Algal Toxicity, Tiers I and II.
 14. **Halling-Sorensen B, Nyholm N and Baun A.** 1996. Algal toxicity tests with volatile and hazardous compounds in air-tight test flasks with CO₂ enriched headspace. *Chemosphere*. **32**:1513-1526.
 15. **Brack W, Rottler H.** 1994. Toxicity testing of volatile chemicals with green algae. *ESPR*. **4**:23-28.
 16. **Brack W, Altenburger R, Kuster E, Meissner B, Wenzel KD, Schuurmann G** 2003. Identification of toxic products of anthracene photomodification **in simulated sunlight**. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. **22**, No. 10, pp. 2228–2237
 17. **Mayer P, Nyholm N, Verbruggen EMJ, Hermens JLM and Tolls J.** 2000. Algal growth inhibition test in filled, closed bottles for volatile and sorptive materials. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **20**:826-832.

18. **Glassi S, Vighi M.** 1981. Testing toxicity of volatile substances with algae. *Chemosphere*. **10**:1123-1126.
19. **Hsu C.H.** 2002. Toxicity assessment of non-polar narcotic chemicals using a close-system algal test. A Thesis Submitted to Institute of Environmental Engineering of National Chiao Tung University.
20. **Kao W.C.** 2001. A comparison of the results of several freshwater aquatic toxicity testing on synthetic and real wastewaters. A Thesis Submitted to Institute of Environmental Engineering of National Chiao Tung University.
21. **Beak S.O.** 1991. A review of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons sources, fate , and behavior. *Water, Air, Soil Pollution*. **60** : 279-300
22. **Meador JP, Stein JE, Reichert WL, and Varanasi.U.** 1995. A review of bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine organisms. *Reviews of Environmental Contamination & Toxicology*. **143** : 79-165.
23. **Fox M.A., Olive S.** 1979. Photooxidation of anthracene on atmospheric particulate matter. *Science*. **205** : 582-583.
24. **Maron SH, Lando JB.** 1974. Fundamentals of physical chemistry. Macmillan Publishing Co. Inc. New York.
25. **Zepp R.G.** 1988. Factors affecting the photochemical treatment of hazardous waste. *Environmental Science & Technology*. **22(3)** : 256
26. **Larson RA, Berenbaum MR.** 1988. Environmental phototoxicity. *Environmental Science & Technology*. **22(4)** : 354-360
27. **Foote C.S.** 1991. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem. Photobiol.* **54** : 659.
28. **Huang X-D, Krylov SN, Ren L, McConkey BJ, Dixon DG, Greenberg**

- BM. 1997.** Mechanistic quantitative structure-activity relationship model for the photoinduced toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons: II. An empirical model for the toxicity of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons to the duckweed *Lemna gibba* L. G-3. *Environ Toxicol Chem* **16**:2296–2303.
29. **El-Alawi YS, Dixon DG, Greenberg BM. 2001.** Effects of a preincubated period on the photoinduced toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to the luminescent bacterium *Vibrio fischeri*. *Environ Toxicol* **16**:277–286.
30. **Mallakin A, McConkey BJ, Miao G, McKibben B, Snieckus V, Dixon DG, Greenberg BM. 1999.** Impacts of structural photomodification on the toxicity of environmental contaminants: Anthracene photooxidation products. *Ecotoxicol Environ Saf* **43**: 204–212.
31. **Marwood CA, Smith REH, Solomon KR, Charlton MN, Greenberg BM. 1999.** Intact and photomodified polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit photosynthesis in natural assemblages of Lake Erie phytoplankton exposed to solar radiation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **44** : 322–327.
32. **Oris JT, Giesy JP. 1987.** The photo-induced toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to larvae of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Chemosphere* **16**:1395–1404.
33. **Halliwell B, Gutteridge JMC. 1984.** Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press, New York, NY, USA.
34. **Rice-Evans C, Diplock AT, Symons MCR. 1991.** *Techniques in Free Radical Research*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
35. **Dizdaroglu M, Bergtold DS. 1986.** Characterization of free radical-induced base damage in DNA at biologically relevant levels. *Anal Biochem* **156**:182–188.

36. **Parchment RE.** 1991. Programmed cell death (apoptosis) in murine blastocysts: Extracellular free-radicals, polyamines, and other cytotoxic agents. *In Vitro* **5**:493–500.
37. **Nirmalakhandan N, Speece RE.** 1998. Structure-activity relationships. *Environmental Science & Technology*. **22** : 606-615.
38. **Mekenyan OG, Ankley GT, Veith GD, Call DJ.** 1994. QSARs for photo-induced toxicity : 1. acute lethality of PAHs to *Daphnia magna*. *Chemosphere*. **28** : 567-582.
39. **Veith GD, Mekenyan OG, Ankley GT, Call DJ.** 1995. QSAR evaluation of α -terthienyl phototoxicity. *Environmental Science & Technology*. **29** : 1267-1272.
40. **Mcconkey BJ, Hewitt LM, Dixon DG, Greenberg BM.** 2002. Natural sunlight induced photooxidation of naphthalene in aqueous solution. *Water, Air, and Soil Pollution*. **136** : 347-359.
41. **Gala W.R., Giesy J.P.** 1992 Photo-induced toxicity of anthracene to the green alga, *Selenastrum capricornutum*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **23** : 316-323
42. **Gala WR, Giesy JP.** 1994 Flow cytometric determination of the photoinduced toxicity of anthracene of the green alga *Selenastrum capricornutum*. *Environ Toxicol Chem* **13**:831-840
43. **Choi J, Oris JT.** 2003. Assessment of the toxicity of anthracene photo-modification products using the topminnow (*Poeciliopsis lucida*) hepatoma cell line (PLHC-1). *Aquatic Toxicology*. **65 (3)**: 243-251
44. **Akers KS, Sinks GD, Schultz TW.** 1999. Structure-toxicity relationships for selected halogenated aliphatic chemicals. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. **7**:33-39

45. **Gressel J.** 1985. Herbicide tolerance and resistance : Alteration of site of activity. In S.O. Duke, ed., Weed Physiology, Vol. 2.CRC, Boca Raton, FL, USA pp.159-189.
46. **Mallakin A, Babu TS, Dixon DG, Greenberg BM.** 2002. Sites of toxicity of specific photooxidation products of anthracene to higher plants : inhibiont of photosynthetic activity and electron transport in *Lemma gibba L. G-3* (Duckweed). *Environ Toxicol* pp. 462-471.
47. **Babu TS, Marder JB, Tripuranthakam S, Dixon DG, Greenberg BM,** 2001. Synergistic effects of a photooxidized polycyclic aromatic hydrocarbon and copper on photosynthesis and plant growth : evidence that in vivo formation of reactive oxygen species is a mechanism of copper toxicity. Vol. 20 : 1351-1358.
48. **Huang XD, McConkey BJ, Babu TS, Greenberg BM,** 1997. Mechanism of photoinduced toxicity of photomodified anthracene to plants : inhibition of photosynthesis in the aquatic higher plant *Lemma gibba* (Duckweed). *Environ Toxicol Chem* Vol. 16 : 1707-1715.
49. **Djomo JE, Dauta A, Ferrier V, Narbonne JF, Monkiedje A, Njine T, Garrigues P,** 2004. Toxic effects of some major polyarmatic hydrocarbons found in curde oil and aquatic sediments on scenedesmus subspicatus. *Water research.* Vol. 38 : 1817-1821.
50. **Foote, CS, Chang YC, Denny RW,** 1970. Chemistry of singlet oxygen. X. Carotenoid quenching parallels biological protection. *J.Am. Chem. Soc.* 5216-5218.
51. **Oris, JT, Giesy JP,** 1986. Photoinduced toxicity of anthracene to juvenile bluegell sunfish (*Lepomis macrochirus Rafinesque*) : Photoperiod effects and predictive hazard evaluation. *Environ Toxicol Chem.* Vol. 5 : 761-768.

52. **Holst LL, Giesy JP, 1989.** Chronic effects of the photoenhanced toxicity of anthracene on *Daphnia magna* reproduction. *Environ Toxicol Chem.* Vol. **8** : 933-942.
53. **Lee P.L. 2003.** Toxicity assessment of polar narcotic chemicals using a close-system algal test. A Thesis Submitted to Institute of Environmental Engineering of National Chiao Tung University.
54. **Prakash J, Nirmalakhandan N, Sun B, Peace J. 1996.** Toxicity of binary mixtures of organic chemicals to microorganisms. *Water Research.* **30**:1459-1463.
55. **Chen S.L. 2003.** Toxicity assessment of aldehyde chemicals. A Thesis Submitted to Institute of Environmental Engineering of National Chiao Tung University.
56. **Huang C.P. 2003.** Toxicity assessment of nitriles using a close-system algal test. A Thesis Submitted to Institute of Environmental Engineering of National Chiao Tung University.
57. **Lee P.L. 2003.** Toxicity assessment of polar narcotic chemicals using a close-system algal test. A Thesis Submitted to Institute of Environmental Engineering of National Chiao Tung University.
58. **Marwood CA, Solomon KR, Greenberg BM. 2001.** Chlorophyll fluorescence as a bioindicator of effects on growth in aquatic macrophytes from mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ Toxicol Chem.* Vol. **20** : 890-898.

附錄一 毒性試驗原始數據

實驗毒物：Anthracene

初始細胞密度： 1.5×10^4 cells/ml

MCV：40.86 μm^3

重複一

Conc mg/L	Initial DO mg/L	Final DO mg/L	Final cells cells/ml	Delta DO mg/L	specific growth rate	比抑制率 On growth rate	比抑制率 On Biomass	比抑制率 On DO
Control	0.43	8.06	280300	7.63	1.46	0.00	0.00	0.00
1.007	0.45	1.42	73300	0.97	0.79	0.46	0.78	0.87
0.806	0.48	1.82	100400	1.34	0.95	0.35	0.68	0.82
0.604	0.49	2.39	146400	1.90	1.14	0.22	0.50	0.75
0.403	0.56	5.85	244600	5.29	1.40	0.05	0.13	0.31
0.201	0.61	7.03	251900	6.42	1.41	0.04	0.11	0.16

重複二

Control	0.44	7.91	310200	7.47	1.51	0.00	0.00	0.00
1.007	0.55	1.45	73700	0.90	0.80	0.47	0.80	0.88
0.806	0.41	1.59	91700	1.18	0.91	0.40	0.74	0.84
0.604	0.44	2.73	137600	2.29	1.11	0.27	0.58	0.69
0.403	0.47	5.6	240700	5.13	1.39	0.08	0.24	0.31
0.201	0.44	7.03	249800	6.59	1.41	0.07	0.20	0.12

重複三

Control	0.4	7.84	298600	7.44	1.50	0.00	0.00	0.00
1.007	0.36	1.48	85100	1.12	0.87	0.42	0.75	0.85
0.806	0.42	1.69	99400	1.27	0.95	0.37	0.70	0.83
0.604	0.4	2.41	135900	2.01	1.10	0.26	0.57	0.73
0.403	0.45	5.36	233800	4.91	1.37	0.08	0.23	0.34
0.201	0.44	6.89	267000	6.45	1.44	0.04	0.11	0.13

平均

Control	0.42	7.94	296367	7.51	1.49	0.00	0.00	0.00
0.402	0.45	1.45	77367	1.00	0.82	0.45	0.78	0.87
0.353	0.44	1.70	97167	1.26	0.93	0.37	0.71	0.83
0.304	0.44	2.51	139967	2.07	1.12	0.25	0.56	0.72
0.25	0.49	5.60	239700	5.11	1.39	0.07	0.20	0.32
0.201	0.50	6.98	256233	6.49	1.42	0.05	0.14	0.14

實驗毒物：Anthraquinone

初始細胞密度： 1.5×10^4 cells/ml

MCV： $38.8\mu\text{m}^3$

重複一

Conc mg/L	Initial DO mg/L	Final DO mg/L	Final cells cells/ml	Delta DO mg/L	specific growth rate	比抑制率 On growth rate	比抑制率 On Biomass	比抑制率 On DO
Control	0.44	7.42	270400	6.98	1.00	0.00	0.00	0.00
1.003	0.53	1.99	74100	1.46	0.55	0.45	0.77	0.79
0.804	0.49	2.01	85700	1.52	0.60	0.40	0.72	0.78
0.601	0.44	2.47	97200	2.03	0.65	0.35	0.68	0.71
0.402	0.55	3.09	135200	2.54	0.76	0.24	0.53	0.64
0.208	0.42	4.57	198300	4.15	0.89	0.11	0.28	0.41

重複二

Control	0.27	7.52	283900	7.25	1.00	0.00	0.00	0.00
1.003	0.36	1.8	75900	1.44	0.55	0.45	0.77	0.80
0.804	0.4	2.17	90400	1.77	0.61	0.39	0.72	0.76
0.601	0.42	2.28	107400	1.86	0.67	0.33	0.66	0.74
0.402	0.38	2.82	132600	2.44	0.74	0.26	0.56	0.66
0.208	0.47	5.44	221400	4.97	0.92	0.08	0.23	0.31

重複三

Control	0.3	7.46	300200	7.16	1.00	0.00	0.00	0.00
1.003	0.39	1.99	87200	1.60	0.59	0.41	0.75	0.78
0.804	0.31	2.08	92700	1.77	0.61	0.39	0.73	0.75
0.601	0.29	2.35	109100	2.06	0.66	0.34	0.67	0.71
0.402	0.32	2.72	124900	2.40	0.71	0.29	0.61	0.66
0.208	0.32	5.07	217800	4.75	0.89	0.11	0.29	0.34

平均

Control	0.34	7.47	284833	7.13	1.00	0.00	0.00	0.00
1.003	0.43	1.93	79067	1.50	0.56	0.44	0.76	0.79
0.804	0.40	2.09	89600	1.69	0.61	0.39	0.72	0.76
0.601	0.38	2.37	104567	1.98	0.66	0.34	0.67	0.72
0.402	0.42	2.88	130900	2.46	0.74	0.26	0.57	0.65
0.208	0.40	5.03	212500	4.62	0.90	0.10	0.27	0.35

實驗毒物：1-hATQ

初始細胞密度： 1.5×10^4 cells/ml

MCV：43.19 μm^3

重複一

Conc mg/L	Initial DO mg/L	Final DO mg/L	Final cells cells/ml	Delta DO mg/L	specific growth rate	比抑制率 On growth rate	比抑制率 On Biomass	比抑制率 On DO
Control	0.42	7.51	250300	7.09	1.41	0.00	0.00	0.00
0.806	0.47	1.22	30100	0.75	0.35	0.75	0.94	0.89
0.606	0.63	1.8	69200	1.17	0.76	0.46	0.77	0.83
0.406	0.45	2.6	112900	2.15	1.01	0.28	0.58	0.70
0.303	0.38	3.94	132800	3.56	1.09	0.23	0.50	0.50
0.206	0.33	5.31	191300	4.98	1.27	0.10	0.25	0.30
0.103	0.49	7.43	246000	6.94	1.40	0.01	0.02	0.02

重複二

Control	0.37	7.49	255400	7.12	1.42	0.00	0.00	0.00
0.806	0.64	1.36	29100	0.72	0.33	0.77	0.94	0.90
0.606	0.44	1.84	74500	1.4	0.80	0.43	0.75	0.80
0.406	0.47	2.45	108600	1.98	0.99	0.30	0.61	0.72
0.303	0.44	3.89	142000	3.45	1.12	0.21	0.47	0.52
0.206	0.39	5.46	198600	5.07	1.29	0.09	0.24	0.29
0.103	0.35	7.34	249400	6.99	1.41	0.01	0.02	0.02

重複三

Control	0.34	7.61	250900	7.27	1.41	0.00	0.00	0.00
0.806	0.61	1.14	31200	0.53	0.37	0.74	0.93	0.93
0.606	0.5	1.88	78900	1.38	0.83	0.41	0.73	0.81
0.406	0.5	2.72	109200	2.22	0.99	0.30	0.60	0.69
0.303	0.4	3.85	138500	3.45	1.11	0.21	0.48	0.53
0.206	0.35	5.28	193300	4.93	1.28	0.09	0.24	0.32
0.103	0.4	7.41	237300	7.01	1.38	0.02	0.06	0.04

平均

Control	0.38	7.54	252200.0	7.16	1.41	0.00	0.00	0.00
0.806	0.57	1.24	30133.3	0.67	0.35	0.75	0.94	0.91
0.606	0.52	1.84	74200.0	1.32	0.80	0.43	0.75	0.82
0.406	0.47	2.59	110233.3	2.12	1.00	0.29	0.60	0.70
0.303	0.41	3.89	137766.7	3.49	1.11	0.21	0.48	0.51
0.206	0.36	5.35	194400.0	4.99	1.28	0.09	0.24	0.30
0.103	0.41	7.39	244233.3	6.98	1.39	0.01	0.03	0.03

實驗毒物：2-hATQ

初始細胞密度：1.5 × 10⁴ cells/ml

MCV：41.37μm³

重複一

Conc mg/L	Initial DO mg/L	Final DO mg/L	Final cells cells/ml	Delta DO mg/L	specific growth rate	比抑制率 On growth rate	比抑制率 On Biomass	比抑制率 On DO
Control	0.59	7.35	251700	6.76	1.00	0.00	0.00	0.00
1.404	0.44	1.06	36100	0.62	0.31	0.69	0.91	0.91
1.204	0.37	1.17	40100	0.80	0.35	0.65	0.89	0.88
0.804	0.36	2.08	75700	1.72	0.57	0.43	0.74	0.75
0.604	0.44	3.59	110000	3.15	0.71	0.29	0.60	0.53
0.404	0.43	5.54	183700	5.11	0.89	0.11	0.29	0.24
0.205	0.39	6.89	237100	6.50	0.98	0.02	0.06	0.04

重複二

Control	0.3	7.42	286000	7.12	1.00	0.00	0.00	0.00
1.404	0.44	0.98	30400	0.54	0.24	0.76	0.94	0.92
1.204	0.35	1.14	37700	0.79	0.31	0.69	0.92	0.89
0.804	0.39	1.97	66300	1.58	0.50	0.50	0.81	0.78
0.604	0.38	3.25	114700	2.87	0.69	0.31	0.63	0.60
0.404	0.46	5.52	181200	5.06	0.85	0.15	0.39	0.29
0.205	0.4	6.89	237900	6.49	0.94	0.06	0.18	0.09

重複三

Control	0.43	7.62	289200	7.19	1.00	0.00	0.00	0.00
1.404	0.92	1.54	32000	0.62	0.26	0.74	0.94	0.91
1.204	0.53	1.28	40700	0.75	0.34	0.66	0.91	0.90
0.804	0.47	2.08	78900	1.61	0.56	0.44	0.77	0.78
0.604	0.45	3.25	113800	2.80	0.68	0.32	0.64	0.61
0.404	0.38	5.46	180900	5.08	0.84	0.16	0.39	0.29
0.205	0.42	6.95	240400	6.53	0.94	0.06	0.18	0.09

平均

Control	0.44	7.46	275633	7.02	1.00	0.00	0.00	0.00
1.404	0.60	1.19	32833	0.59	0.27	0.73	0.93	0.92
1.204	0.42	1.20	39500	0.78	0.33	0.67	0.91	0.89
0.804	0.41	2.04	73633	1.64	0.55	0.45	0.78	0.77
0.604	0.42	3.36	112833	2.94	0.69	0.31	0.62	0.58
0.404	0.42	5.51	181933	5.08	0.86	0.14	0.36	0.28
0.205	0.40	6.91	238467	6.51	0.95	0.05	0.14	0.07

毒物：1,2-dihydroxyanthraquinone

初始細胞密度： 1.5×10^4 cells/ml

MCV：41.27 μ m³

重複一

Conc. (mg/l)	Initial DO (mg/l)	Final DO (mg/l)	Delta DO (mg/l)	抑制率 On DO	Final (cells/ml)	Delta (cells/ml)	抑制率 On Cells
Control	0.43	6.28	5.85	0	234400	219400	0
2.05	0.54	0.86	0.32	0.945	30300	15300	0.744
0.8	0.58	2.8	2.22	0.621	84200	69200	0.372
0.67	0.7	3.35	2.65	0.547	121700	106700	0.238
0.56	0.64	3.52	2.88	0.508	156500	141500	0.147
0.48	0.69	4.06	3.37	0.424	206200	191200	0.047
0.08	0.66	5.85	5.19	0.113	228700	213700	0.009

重複二

Conc. (mg/l)	Initial DO (mg/l)	Final DO (mg/l)	Delta DO (mg/l)	抑制率 On DO	Final (cells/ml)	Delta (cells/ml)	抑制率 On Cells
Control	0.53	6.32	5.79	0.000	233500	218500	0
2.05	0.69	1.09	0.4	0.931	31700	16700	0.727
0.8	0.65	2.73	2.08	0.641	86200	71200	0.363
0.67	0.6	3.24	2.64	0.544	134300	119300	0.201
0.56	0.62	3.6	2.98	0.485	163300	148300	0.130
0.48	0.65	4.03	3.38	0.416	200300	185300	0.056
0.08	0.73	6.35	5.62	0.029	230500	215500	0.005

重複三

Conc. (mg/l)	Initial DO (mg/l)	Final DO (mg/l)	Delta DO (mg/l)	抑制率 On DO	Final (cells/ml)	Delta (cells/ml)	抑制率 On Cells
Control	0.57	6.73	6.16	0.000	235700	220700	0
2.05	0.75	1.03	0.28	0.955	28600	13600	0.766
0.8	0.61	2.68	2.07	0.664	91700	76700	0.343
0.67	0.73	3.3	2.57	0.583	116300	101300	0.256
0.56	0.67	3.53	2.86	0.536	161100	146100	0.138
0.48	0.66	3.8	3.14	0.490	196700	181700	0.066
0.08	0.65	6.34	5.69	0.076	234500	219500	0.002

平均

Conc. (mg/l)	Initial DO (mg/l)	Final DO (mg/l)	Delta DO (mg/l)	抑制率 On DO	Final (cells/ml)	Delta (cells/ml)	抑制率 On Cells
Control	0.51	6.44	5.93	0	234533.33	219533.33	0
2.05	0.66	0.99	0.33	0.944	30200.00	15200.00	0.745
0.8	0.61	2.74	2.12	0.642	87366.67	72366.67	0.359
0.67	0.68	3.30	2.62	0.558	124100.00	109100.00	0.231
0.56	0.64	3.55	2.91	0.510	160300.00	145300.00	0.138
0.48	0.67	3.96	3.30	0.444	201066.67	186066.67	0.056
0.08	0.68	6.18	5.50	0.073	231233.33	216233.33	0.005

毒物：1,4-dihydroxyanthraquinone 初始細胞密度： 1.5×10^4 cells/ml

MCV： $46.51 \mu\text{m}^3$

重複一

Conc. (mg/l)	Initial DO (mg/l)	Final DO (mg/l)	Delta DO (mg/l)	抑制率 On DO	Final (cells/ml)	Delta (cells/ml)	抑制率 On Cells
Control	1.72	10.14	8.42	0	219700	204700	0
2.91	1.57	1.89	0.32	0.962	24700	9700	0.814
1	1.52	1.94	0.42	0.950	27800	12800	0.770
0.75	1.57	2.22	0.65	0.923	44300	29300	0.597
0.49	1.75	3.54	1.79	0.787	50900	35900	0.545
0.09	1.75	9.58	7.83	0.070	176100	161100	0.082

重複二

Conc. (mg/l)	Initial DO (mg/l)	Final DO (mg/l)	Delta DO (mg/l)	抑制率 On DO	Final (cells/ml)	Delta (cells/ml)	抑制率 On Cells
Control	1.67	10.08	8.41	0.000	222000	207000	0.000
2.91	1.58	1.83	0.25	0.970	23300	8300	0.837
1	1.54	1.89	0.35	0.958	26800	11800	0.785
0.75	1.36	1.95	0.59	0.930	43200	28200	0.607
0.49	1.45	3.1	1.65	0.804	49800	34800	0.555
0.09	1.62	9.03	7.41	0.119	175500	160500	0.087

重複三

Conc. (mg/l)	Initial DO (mg/l)	Final DO (mg/l)	Delta DO (mg/l)	抑制率 On DO	Final (cells/ml)	Delta (cells/ml)	抑制率 On Cells
Control	1.64	10.17	8.53	0.000	213100	198100	0.000
2.91	1.63	2.08	0.45	0.947	24100	9100	0.821
1	1.63	2.19	0.56	0.934	32500	17500	0.709
0.75	1.63	2.6	0.97	0.886	46000	31000	0.578
0.49	1.46	3.04	1.58	0.815	48100	33100	0.561
0.09	1.56	9.77	8.21	0.038	176400	161400	0.071

平均

Conc. (mg/l)	Initial DO (mg/l)	Final DO (mg/l)	Delta DO (mg/l)	抑制率 On DO	Final (cells/ml)	Delta (cells/ml)	抑制率 On Cells
Control	1.68	10.13	8.45	0.000	218267	203267	0
2.91	1.59	1.93	0.34	0.960	24033	9033	0.824
1	1.56	2.01	0.44	0.948	29033	14033	0.753
0.75	1.52	2.26	0.74	0.913	44500	29500	0.594
0.49	1.55	3.23	1.67	0.802	49600	34600	0.553
0.09	1.64	9.46	6.82	0.075	176000	161000	0.080

實驗毒物：

1,8-dihydroxyanthraquinone

初始細胞密度： 1.5×10^4 cells/ml

MCV： $39.85 \mu\text{m}^3$

重複一

Conc mg/L	Initial DO mg/L	Final DO mg/L	Final cells cells/ml	Delta DO mg/L	specific growth rate	比抑制率 On growth rate	比抑制率 On Biomass	比抑制率 On DO
Control	0.5	7.45	256800	6.95	1.00	0.00	0.00	0.00
0.786	0.42	0.92	28000	0.50	0.22	0.78	0.95	0.93
0.393	0.47	1.45	46200	0.98	0.40	0.60	0.87	0.86
0.295	0.47	1.79	51900	1.32	0.44	0.56	0.85	0.81
0.196	0.46	3.11	79200	2.65	0.59	0.41	0.73	0.62
0.098	0.55	5.97	179000	5.42	0.87	0.13	0.32	0.22
0.049	0.6	6.64	212000	6.04	0.93	0.07	0.19	0.13

重複二

Control	0.46	7.3	255400	6.84	1.00	0.00	0.00	0.00
0.786	0.43	0.82	25200	0.39	0.18	0.82	0.96	0.94
0.393	0.45	1.37	38700	0.92	0.33	0.67	0.90	0.87
0.295	0.44	1.98	44600	1.54	0.38	0.62	0.88	0.77
0.196	0.47	2.95	75200	2.48	0.57	0.43	0.75	0.64
0.098	0.52	5.91	168900	5.39	0.85	0.15	0.36	0.21
0.049	0.56	6.58	215000	6.02	0.94	0.06	0.17	0.12

重複三

Control	0.44	7.43	268400	6.99	1.00	0.00	0.00	0.00
0.786	0.63	1.11	27200	0.48	0.21	0.79	0.95	0.93
0.393	0.46	1.38	38900	0.92	0.33	0.67	0.91	0.87
0.295	0.42	1.68	41300	1.26	0.35	0.65	0.90	0.82
0.196	0.47	3.03	80600	2.56	0.58	0.42	0.74	0.63
0.098	0.47	5.9	170800	5.43	0.84	0.16	0.39	0.22
0.049	0.48	6.5	210700	6.02	0.92	0.08	0.23	0.14

平均

Control	0.47	7.39	260200	6.93	1.00	0.00	0.00	0.00
0.786	0.49	0.95	26800	0.46	0.20	0.80	0.95	0.93
0.393	0.46	1.40	41267	0.94	0.35	0.65	0.89	0.86
0.295	0.44	1.82	45933	1.37	0.39	0.61	0.87	0.80
0.196	0.47	3.03	78333	2.56	0.58	0.42	0.74	0.63
0.098	0.51	5.93	172900	5.41	0.86	0.14	0.36	0.22
0.049	0.55	6.57	212567	6.03	0.93	0.07	0.19	0.13

實驗毒物：

1,8-dihydroxyanthraquinone

初始細胞密度：1.5 × 10⁴ cells/ml

MCV：42.79 μm³

重複一

Conc mg/L	Initial DO mg/L	Final DO mg/L	Final cells cells/ml	Delta DO mg/L	specific growth rate	比抑制率 On growth rate	比抑制率 On Biomass	比抑制率 On DO
Control	0.38	6.96	230700	6.580	1.000	0.000	0.000	0.000
0.786	0.36	0.86	32200	0.500	0.280	0.720	0.920	0.924
0.393	0.43	1.3	42700	0.870	0.383	0.617	0.872	0.868
0.295	0.38	1.52	53000	1.140	0.462	0.538	0.824	0.827
0.196	0.38	2.5	91600	2.120	0.662	0.338	0.645	0.678
0.098	0.41	5.53	144800	5.120	0.830	0.170	0.398	0.222
0.049	0.44	6.14	177300	5.700	0.904	0.096	0.248	0.134

重複二

Control	0.39	7.05	237200	6.660	1.000	0.000	0.000	0.000
0.786	0.33	0.88	34300	0.550	0.300	0.700	0.913	0.917
0.393	0.4	1.26	42900	0.860	0.381	0.619	0.874	0.871
0.295	0.43	1.6	59300	1.170	0.498	0.502	0.801	0.824
0.196	0.37	2.52	96500	2.150	0.674	0.326	0.633	0.677
0.098	0.37	5.49	145500	5.120	0.823	0.177	0.413	0.231
0.049	0.39	6.25	183100	5.860	0.906	0.094	0.243	0.120

重複三

Control	0.47	7.11	229600	6.640	1.000	0.000	0.000	0.000
0.786	0.47	0.94	30800	0.470	0.264	0.736	0.926	0.929
0.393	0.39	1.22	41300	0.830	0.371	0.629	0.877	0.875
0.295	0.39	1.47	56900	1.080	0.489	0.511	0.805	0.837
0.196	0.36	2.32	85600	1.960	0.638	0.362	0.671	0.705
0.098	0.4	5.56	146100	5.160	0.834	0.166	0.389	0.223
0.049	0.36	6.16	186700	5.800	0.924	0.076	0.200	0.127

平均

Control	0.41	7.04	232500	6.627	1.000	0.000	0.000	0.000
0.786	0.39	0.89	32433	0.507	0.281	0.719	0.920	0.924
0.393	0.41	1.26	42300	0.853	0.378	0.622	0.874	0.871
0.295	0.40	1.53	56400	1.130	0.483	0.517	0.810	0.829
0.196	0.37	2.45	91233	2.077	0.658	0.341	0.650	0.687
0.098	0.39	5.53	145467	5.133	0.829	0.171	0.400	0.225
0.049	0.40	6.18	182367	5.787	0.911	0.089	0.230	0.127

實驗毒物：

1,2,4-trihydroxyantraquinone

初始細胞密度： 1.5×10^4 cells/ml

MCV： $44.01 \mu\text{m}^3$

重複一

Conc mg/L	Initial DO mg/L	Final DO mg/L	Final cells cells/ml	Delta DO mg/L	specific growth rate	比抑制率 On growth rate	比抑制率 On Biomass	比抑制率 On DO
Control	0.37	7.23	258900	6.86	1.00	0.00	0.00	0.00
0.402	0.41	0.67	38700	0.26	0.33	0.67	0.90	0.96
0.353	0.48	1.37	53100	0.89	0.44	0.56	0.84	0.87
0.304	0.46	2.89	100200	2.43	0.67	0.33	0.65	0.65
0.25	0.39	4.41	144600	4.02	0.80	0.20	0.47	0.41
0.201	0.45	5.85	198100	5.40	0.91	0.09	0.25	0.21
0.152	0.49	6.08	213100	5.59	0.93	0.07	0.19	0.19

重複二

Control	0.32	7.19	254100	6.87	1.00	0.00	0.00	0.00
0.402	0.36	0.44	37900	0.08	0.33	0.67	0.90	0.99
0.353	0.37	1.04	45400	0.67	0.39	0.61	0.87	0.90
0.304	0.38	2.64	109100	2.26	0.70	0.30	0.61	0.67
0.25	0.35	3.92	142600	3.57	0.80	0.20	0.47	0.48
0.201	0.37	5.5	190300	5.13	0.90	0.10	0.27	0.25
0.152	0.39	6.32	199900	5.93	0.92	0.08	0.23	0.14

重複三

Control	0.23	7.13	259400	6.90	1.00	0.00	0.00	0.00
0.402	0.75	1.1	39500	0.35	0.34	0.66	0.90	0.95
0.353	0.63	1.71	56400	1.08	0.46	0.54	0.83	0.84
0.304	0.52	2.63	96300	2.11	0.65	0.35	0.67	0.69
0.25	0.44	3.63	141900	3.19	0.79	0.21	0.48	0.54
0.201	0.37	5.33	186500	4.96	0.88	0.12	0.30	0.28
0.152	0.33	6.18	212200	5.85	0.93	0.07	0.19	0.15

平均

Control	0.31	7.18	257467	6.88	1.00	0.00	0.00	0.00
0.402	0.51	0.74	38700	0.23	0.33	0.67	0.90	0.97
0.353	0.49	1.37	51633	0.88	0.43	0.57	0.85	0.87
0.304	0.45	2.72	101867	2.27	0.67	0.33	0.64	0.67
0.25	0.39	3.99	143033	3.59	0.79	0.21	0.47	0.48
0.201	0.40	5.56	191633	5.16	0.90	0.10	0.27	0.25
0.152	0.40	6.19	208400	5.79	0.93	0.07	0.20	0.16

實驗毒物：NAP

初始細胞密度： 1.5×10^4 cells/ml

MCV：40.71 μm^3

重複一

Conc mg/L	Initial DO mg/L	Final DO mg/L	Final cells cells/ml	Delta DO mg/L	specific growth rate	比抑制率 On growth rate	比抑制率 On Biomass	比抑制率 On DO
Control	0.37	7.19	232700	6.82	1.37	0.00	0.00	0.00
20.006	0.37	0.78	18400	0.41	0.10	0.93	0.98	0.94
12.515	0.41	0.84	22400	0.43	0.20	0.85	0.97	0.94
10.049	0.37	1.02	28000	0.65	0.31	0.77	0.94	0.90
5.024	0.45	2.32	43800	1.87	0.54	0.61	0.87	0.73
3.837	0.37	4.06	87100	3.69	0.88	0.36	0.67	0.46
2.558	0.4	6.46	163500	6.06	1.19	0.13	0.32	0.11

重複二

Control	0.31	7.22	233500	6.91	1.37	0.00	0.00	0.00
20.006	0.45	0.71	18900	0.26	0.12	0.92	0.98	0.96
12.515	0.35	0.92	21700	0.57	0.18	0.87	0.97	0.92
10.049	0.37	1.01	29700	0.64	0.34	0.75	0.93	0.91
5.024	0.38	1.92	43100	1.54	0.53	0.62	0.87	0.78
3.837	0.38	4.19	84300	3.81	0.86	0.37	0.68	0.45
2.558	0.36	6.37	162200	6.01	1.19	0.13	0.33	0.13

重複三

Control	0.34	7.17	228700	6.83	1.36	0.00	0.00	0.00
20.006	0.57	0.8	18200	0.23	0.10	0.93	0.99	0.97
12.515	0.37	0.88	22200	0.51	0.20	0.86	0.97	0.93
10.049	0.38	1.01	25200	0.63	0.26	0.81	0.95	0.91
5.024	0.34	1.99	47100	1.65	0.57	0.58	0.85	0.76
3.837	0.37	4.04	84500	3.67	0.86	0.37	0.67	0.46
2.558	0.37	6.31	161700	5.94	1.19	0.13	0.31	0.13

平均

Control	0.34	7.19	231633	6.85	1.37	0.00	0.00	0.00
20.006	0.46	0.76	18500	0.30	0.10	0.92	0.98	0.96
12.515	0.38	0.88	22100	0.50	0.19	0.86	0.97	0.93
10.049	0.37	1.01	27633	0.64	0.30	0.78	0.94	0.91
5.024	0.39	2.08	44667	1.69	0.55	0.60	0.86	0.75
3.837	0.37	4.10	85300	3.72	0.87	0.36	0.68	0.46
2.558	0.38	6.38	162467	6.00	1.19	0.13	0.32	0.12

重複一

Conc mg/L	Initial DO mg/L	Final DO mg/L	Final cells cells/ml	Delta DO mg/L	specific growth rate	比抑制率 On growth rate	比抑制率 On Biomass	比抑制率 On DO
Control	0.36	7.88	290000	7.52	1.00	0.00	0.00	0.00
250.256	0.58	1.98	62800	1.40	0.48	0.52	0.83	0.81
150.497	0.51	4.03	143100	3.52	0.76	0.24	0.53	0.53
125.558	0.56	5.81	186500	5.25	0.85	0.15	0.38	0.30
100.618	0.38	6.26	255600	5.88	0.96	0.04	0.13	0.22
75.679	0.49	7.55	268000	7.06	0.97	0.03	0.08	0.06

重複二

Control	0.39	7.87	305200	7.48	1.00	0.00	0.00	0.00
250.256	0.38	1.75	53600	1.37	0.42	0.58	0.87	0.82
150.497	0.36	3.63	122200	3.27	0.70	0.30	0.63	0.56
125.558	0.5	5.39	164600	4.89	0.80	0.20	0.48	0.35
100.618	0.38	6.87	253600	6.49	0.94	0.06	0.18	0.13
75.679	0.44	7.58	272600	7.14	0.96	0.04	0.11	0.05

重複三

Control	0.34	7.8	294500	7.46	1.00	0.00	0.00	0.00
250.256	0.46	1.8	40400	1.34	0.33	0.67	0.91	0.82
150.497	0.37	3.87	127800	3.50	0.72	0.28	0.60	0.53
125.558	0.41	5.12	187100	4.71	0.85	0.15	0.38	0.37
100.618	0.36	6.26	256000	5.90	0.95	0.05	0.14	0.21
75.679	0.31	7.42	278800	7.11	0.98	0.02	0.06	0.05

平均

Control	0.36	7.85	296567	7.49	1.00	0.00	0.00	0.00
250.256	0.47	1.84	52267	1.37	0.41	0.58	0.87	0.82
150.497	0.41	3.84	131033	3.43	0.73	0.27	0.59	0.54
125.558	0.49	5.44	179400	4.95	0.83	0.17	0.42	0.34
100.618	0.37	6.46	255067	6.09	0.95	0.05	0.15	0.19
75.679	0.41	7.52	273133	7.10	0.97	0.03	0.08	0.05

重複一

Conc mg/L	Initial DO mg/L	Final DO mg/L	Final cells cells/ml	Delta DO mg/L	specific growth rate	比抑制率 On growth rate	比抑制率 On Biomass	比抑制率 On DO
Control	0.41	7.59	287200	7.18	1.00	0.00	0.00	0.00
1.208	0.49	0.93	27400	0.44	0.20	0.80	0.95	0.94
0.802	0.33	1.49	35900	1.16	0.30	0.70	0.92	0.84
0.604	0.44	2.27	41000	1.83	0.34	0.66	0.90	0.75
0.302	0.48	4.09	93900	3.61	0.62	0.38	0.71	0.50
0.156	0.44	5.92	167000	5.48	0.82	0.18	0.44	0.24
0.052	0.53	7.37	255800	6.84	0.96	0.04	0.12	0.05

重複二

Control	0.32	7.61	289900	7.29	1.00	0.00	0.00	0.00
1.208	0.53	1.05	31700	0.52	0.25	0.75	0.94	0.93
0.802	0.4	1.72	37000	1.32	0.30	0.70	0.92	0.82
0.604	0.41	2.31	46600	1.90	0.38	0.62	0.89	0.74
0.302	0.37	3.97	122100	3.60	0.71	0.29	0.61	0.51
0.156	0.4	6.17	194100	5.77	0.86	0.14	0.35	0.21
0.052	0.42	7.23	256100	6.81	0.96	0.04	0.12	0.07

重複三

Control	0.4	7.57	293800	7.17	1.00	0.00	0.00	0.00
1.208	0.46	0.69	33500	0.23	0.27	0.73	0.93	0.97
0.802	0.49	1.87	39400	1.38	0.32	0.68	0.91	0.81
0.604	0.49	2.44	48900	1.95	0.40	0.60	0.88	0.73
0.302	0.43	3.86	118000	3.43	0.69	0.31	0.63	0.52
0.156	0.4	6.26	214800	5.86	0.89	0.11	0.28	0.18
0.052	0.47	7.32	264800	6.85	0.97	0.03	0.10	0.04

平均

Control	0.38	7.59	290300	7.21	1.00	0.00	0.00	0.00
1.208	0.49	0.89	30867	0.40	0.24	0.76	0.94	0.95
0.802	0.41	1.69	37433	1.29	0.31	0.69	0.92	0.82
0.604	0.45	2.34	45500	1.89	0.37	0.63	0.89	0.74
0.302	0.43	3.97	111333	3.55	0.67	0.32	0.65	0.51
0.156	0.41	6.12	191967	5.70	0.86	0.14	0.36	0.21
0.052	0.47	7.31	258900	6.83	0.96	0.04	0.11	0.05

實驗毒物：1-naphthol

初始細胞密度： 1.5×10^4 cells/ml

MCV：38.24 μm^3

重複一

Conc mg/L	Initial DO mg/L	Final DO mg/L	Final cells cells/ml	Delta DO mg/L	specific growth rate	比抑制率 On growth rate	比抑制率 On Biomass	比抑制率 On DO
Control	0.62	7.48	302600	6.86	1.00	0.00	0.00	0.00
20.017	0.73	0.54	35200	-0.19	0.28	0.72	0.93	1.03
10.008	0.76	1.08	51300	0.32	0.41	0.59	0.87	0.95
5.004	0.7	2.17	72900	1.47	0.53	0.47	0.80	0.79
2.502	0.68	6.37	231800	5.69	0.91	0.09	0.25	0.17
1.251	0.71	7.03	263300	6.32	0.95	0.05	0.14	0.08

重複二

Control	0.64	7.42	298000	6.78	1.00	0.00	0.00	0.00
20.017	0.72	0.54	31500	-0.18	0.25	0.75	0.94	1.03
10.008	0.66	1.19	45600	0.53	0.37	0.63	0.89	0.92
5.004	0.68	2.16	70600	1.48	0.52	0.48	0.80	0.78
2.502	0.59	6.25	224100	5.66	0.90	0.10	0.26	0.17
1.251	0.69	7.11	267800	6.42	0.96	0.04	0.11	0.05

重複三

Control	0.58	7.47	295200	6.89	1.00	0.00	0.00	0.00
20.017	0.65	0.55	32500	-0.10	0.26	0.74	0.94	1.01
10.008	0.67	1.09	46200	0.42	0.38	0.62	0.89	0.94
5.004	0.66	2.29	78100	1.63	0.55	0.45	0.77	0.76
2.502	0.57	6.39	236900	5.82	0.93	0.07	0.21	0.16
1.251	0.61	7.06	268200	6.45	0.97	0.03	0.10	0.06

平均

Control	0.61	7.46	298600	6.84	1.00	0.00	0.00	0.00
20.017	0.70	0.54	33067	-0.16	0.26	0.74	0.94	1.02
10.008	0.70	1.12	47700	0.42	0.39	0.61	0.88	0.94
5.004	0.68	2.21	73867	1.53	0.53	0.47	0.79	0.78
2.502	0.61	6.34	230933	5.72	0.91	0.09	0.24	0.16
1.251	0.67	7.07	266433	6.40	0.96	0.04	0.11	0.07

實驗毒物：1-NAP

初始細胞密度： 1.5×10^4 cells/ml

MCV :41.29 μm^3

重複一

Conc mg/L	Initial DO mg/L	Final DO mg/L	Final cells cells/ml	Delta DO mg/L	specific growth rate	比抑制率 On growth rate	比抑制率 On Biomass	比抑制率 On DO
Control	0.4	7.33	241100	6.86	1.39	0.00	0.00	0.00
20.017	0.47	0.37	22800	0.03	0.21	0.85	0.97	1.00
12.51	0.34	0.64	32400	0.35	0.39	0.72	0.92	0.95
10.008	0.29	1.15	52000	0.83	0.62	0.55	0.84	0.88
5.004	0.32	4.75	159700	4.39	1.18	0.15	0.36	0.36
3.807	0.36	6.23	175100	5.86	1.23	0.12	0.29	0.15
2.502	0.37	7.1	219600	6.75	1.34	0.03	0.10	0.02

重複二

Control	0.35	7.32	252400	6.97	1.41	0.00	0.00	0.00
20.017	0.31	0.36	28500	0.05	0.32	0.77	0.94	0.99
12.51	0.5	0.77	37800	0.27	0.46	0.67	0.90	0.96
10.008	0.43	1.25	58600	0.82	0.68	0.52	0.82	0.88
5.004	0.56	5.15	168100	4.59	1.21	0.14	0.36	0.34
3.807	0.47	6.39	188000	5.92	1.26	0.10	0.27	0.15
2.502	0.33	7.19	229700	6.86	1.36	0.03	0.10	0.02

重複三

Control	0.36	7.35	242800	6.99	1.39	0.00	0.00	0.00
20.017	0.5	0.58	25500	0.08	0.27	0.81	0.95	0.99
12.51	0.41	0.7	34800	0.29	0.42	0.70	0.91	0.96
10.008	0.36	1.17	54800	0.81	0.65	0.53	0.83	0.88
5.004	0.33	5.29	166700	4.96	1.20	0.14	0.33	0.29
3.807	0.31	6.31	185000	6	1.26	0.10	0.25	0.14
2.502	0.33	7.01	228600	6.68	1.36	0.02	0.06	0.04

平均

Control	0.39	7.33	245433	6.94	1.40	0.00	0.00	0.00
20.017	0.38	0.44	25600	0.05	0.27	0.81	0.95	0.99
12.51	0.40	0.70	35000	0.30	0.42	0.70	0.91	0.96
10.008	0.37	1.19	55133	0.82	0.65	0.53	0.83	0.88
5.004	0.42	5.06	164833	4.65	1.20	0.14	0.35	0.33
3.807	0.38	6.31	182700	5.93	1.25	0.11	0.27	0.15
2.502	0.34	7.10	225967	6.76	1.36	0.03	0.08	0.03

實驗毒物：1-nap

初始細胞密度：1.5 × 10⁴ cells/ml

MCV：42.96 μm³

重複一

Conc mg/L	Initial DO mg/L	Final DO mg/L	Final cells cells/ml	Delta DO mg/L	specific growth rate	比抑制率 On growth rate	比抑制率 On Biomass	比抑制率 On DO
Control	0.44	7.29	244000	6.85	1.39	0.00	0.00	0.00
20.017	0.46	0.59	26000	0.13	0.28	0.80	0.95	0.98
12.51	0.49	0.76	37700	0.27	0.46	0.67	0.90	0.96
10.008	0.46	1.16	55000	0.70	0.65	0.53	0.83	0.90
5.004	0.48	4.82	150900	4.34	1.15	0.17	0.41	0.37
3.807	0.47	6.18	171700	5.71	1.22	0.13	0.32	0.17
2.502	0.53	7.05	222800	6.52	1.35	0.03	0.09	0.05

重複二

Control	0.49	7.25	236500	6.76	1.38	0.00	0.00	0.00
20.017	0.45	0.55	27600	0.10	0.30	0.78	0.94	0.99
12.51	0.46	0.71	33700	0.25	0.40	0.71	0.92	0.96
10.008	0.48	1.06	52100	0.58	0.62	0.55	0.83	0.91
5.004	0.6	4.88	154200	4.28	1.17	0.16	0.37	0.37
3.807	0.48	6.32	182000	5.84	1.25	0.09	0.25	0.14
2.502	0.61	6.94	214600	6.33	1.33	0.04	0.10	0.06

重複三

Control	0.45	7.13	234400	6.68	1.37	0.00	0.00	0.00
20.017	0.58	0.63	29100	0.05	0.33	0.76	0.94	0.99
12.51	0.47	0.75	37900	0.28	0.46	0.66	0.90	0.96
10.008	0.45	1.14	49800	0.69	0.60	0.56	0.84	0.90
5.004	0.48	4.73	152100	4.25	1.16	0.16	0.38	0.36
3.807	0.48	6.27	182400	5.79	1.25	0.09	0.24	0.13
2.502	0.49	6.99	228700	6.50	1.36	0.01	0.03	0.03

平均

Control	0.46	7.22	238300	6.76	1.38	0.00	0.00	0.00
20.017	0.50	0.59	27567	0.09	0.30	0.78	0.94	0.99
12.51	0.47	0.74	36433	0.27	0.44	0.68	0.90	0.96
10.008	0.46	1.12	52300	0.66	0.62	0.55	0.83	0.90
5.004	0.52	4.81	152400	4.29	1.16	0.16	0.38	0.37
3.807	0.48	6.26	178700	5.78	1.24	0.10	0.27	0.15
2.502	0.54	6.99	222033	6.45	1.35	0.03	0.07	0.05

實驗毒物：1,4-naphthoquinone

初始細胞密度： 1.5×10^4 cells/mlMCV： $42.4 \mu\text{m}^3$

重複一

Conc mg/L	Initial DO mg/L	Final DO mg/L	Final cells cells/ml	Delta DO mg/L	specific growth rate	比抑制率 On growth rate	比抑制率 On Biomass	比抑制率 On DO
Control	0.47	7.17	249000	6.70	1.00	0.00	0.00	0.00
1.464	0.44	0.06	26400	-0.38	0.20	0.80	0.95	1.06
0.732	0.47	1.19	43900	0.72	0.38	0.62	0.88	0.89
0.407	0.44	3.73	107600	3.29	0.70	0.30	0.60	0.51
0.179	0.53	5.98	182400	5.45	0.89	0.11	0.28	0.19
0.089	0.47	6.49	196600	6.02	0.92	0.08	0.22	0.10
0.049	0.53	6.75	214400	6.22	0.95	0.05	0.15	0.07

重複二

Control	0.59	7.23	251900	6.64	1.00	0.00	0.00	0.00
1.464	0.38	0.1	27300	-0.28	0.21	0.79	0.95	1.04
0.732	0.51	0.83	32100	0.32	0.27	0.73	0.93	0.95
0.407	0.53	3.5	103800	2.97	0.69	0.31	0.63	0.55
0.179	0.52	6	182100	5.48	0.88	0.12	0.29	0.17
0.089	0.44	6.46	205000	6.02	0.93	0.07	0.20	0.09
0.049	0.41	6.78	218800	6.37	0.95	0.05	0.14	0.04

重複三

Control	0.44	7.13	242800	6.69	1.00	0.00	0.00	0.00
1.464	0.6	0.1	23800	-0.50	0.17	0.83	0.96	1.07
0.732	0.56	0.98	35700	0.42	0.31	0.69	0.91	0.94
0.407	0.52	3.67	107800	3.15	0.71	0.29	0.59	0.53
0.179	0.52	6.12	185200	5.60	0.90	0.10	0.25	0.16
0.089	0.4	6.55	208200	6.15	0.94	0.06	0.15	0.08
0.049	0.46	6.71	217200	6.25	0.96	0.04	0.11	0.07

平均

Control	0.50	7.18	247900	6.68	1.00	0.00	0.00	0.00
1.464	0.47	0.09	25833	-0.39	0.19	0.81	0.95	1.06
0.732	0.51	1.00	37233	0.49	0.32	0.68	0.90	0.93
0.407	0.50	3.63	106400	3.14	0.70	0.30	0.61	0.53
0.179	0.52	6.03	183233	5.51	0.89	0.11	0.28	0.17
0.089	0.44	6.50	203267	6.06	0.93	0.07	0.19	0.09
0.049	0.47	6.75	216800	6.28	0.95	0.05	0.13	0.06

實驗毒物：1,4-naphthoquinone

初始細胞密度： 1.5×10^4 cells/ml

MCV： $40.01 \mu\text{m}^3$

重複一

Conc mg/L	Initial DO mg/L	Final DO mg/L	Final cells cells/ml	Delta DO mg/L	specific growth rate	比抑制率 On growth rate	比抑制率 On Biomass	比抑制率 On DO
Control	0.34	7.1	263000	6.76	1.00	0.00	0.00	0.00
1.073	0.41	0.65	17900	0.24	0.06	0.94	0.99	0.96
0.805	0.43	1.26	36500	0.83	0.31	0.69	0.91	0.88
0.537	0.36	3.1	91500	2.74	0.63	0.37	0.69	0.59
0.268	0.47	5.37	123200	4.90	0.74	0.26	0.56	0.28
0.134	0.49	6.05	175000	5.56	0.86	0.14	0.35	0.18

重複二

Control	0.44	7.27	267800	6.83	1.00	0.00	0.00	0.00
1.073	0.43	0.69	22900	0.26	0.15	0.85	0.97	0.96
0.805	0.39	1.35	41100	0.96	0.35	0.65	0.90	0.86
0.537	0.39	3.03	93000	2.64	0.63	0.37	0.69	0.61
0.268	0.45	5.44	132300	4.99	0.76	0.24	0.54	0.27
0.134	0.41	6.03	188500	5.62	0.88	0.12	0.31	0.18

重複三

Control	0.33	7.06	252400	6.73	1.00	0.00	0.00	0.00
1.073	0.46	0.78	23500	0.32	0.16	0.84	0.96	0.95
0.805	0.53	1.51	42600	0.98	0.37	0.63	0.88	0.85
0.537	0.39	3.25	101700	2.86	0.68	0.32	0.63	0.58
0.268	0.46	5.57	142200	5.11	0.80	0.20	0.46	0.24
0.134	0.46	6.12	182300	5.66	0.88	0.12	0.30	0.16

平均

Control	0.37	7.14	261067	6.77	1.00	0.00	0.00	0.00
1.073	0.43	0.71	21433	0.27	0.12	0.88	0.97	0.96
0.805	0.45	1.37	40067	0.92	0.34	0.66	0.90	0.86
0.537	0.38	3.13	95400	2.75	0.65	0.35	0.67	0.59
0.268	0.46	5.46	132567	5.00	0.76	0.24	0.52	0.26
0.134	0.45	6.07	181933	5.61	0.87	0.13	0.32	0.17

實驗毒物：1,4-naphthoquinone

初始細胞密度： 1.5×10^4 cells/ml

MCV：39.85 μm^3

重複一

Conc mg/L	Initial DO mg/L	Final DO mg/L	Final cells cells/ml	Delta DO mg/L	specific growth rate	比抑制率 On growth rate	比抑制率 On Biomass	比抑制率 On DO
Control	0.34	7.23	260800	6.89	1.00	0.00	0.00	0.00
1.073	0.34	0.62	30300	0.28	0.25	0.75	0.94	0.96
0.805	0.33	1.66	72800	1.33	0.55	0.45	0.76	0.81
0.537	0.33	3.81	119300	3.48	0.73	0.27	0.58	0.49
0.268	0.36	5.89	174500	5.53	0.86	0.14	0.35	0.20
0.134	0.36	6.68	206000	6.32	0.92	0.08	0.22	0.08

重複二

Control	0.35	7.15	258900	6.8	1.00	0.00	0.00	0.00
1.073	0.28	0.54	32800	0.26	0.27	0.73	0.93	0.96
0.805	0.33	1.89	69600	1.56	0.54	0.46	0.78	0.77
0.537	0.38	3.72	115200	3.34	0.72	0.28	0.59	0.51
0.268	0.38	5.92	176000	5.54	0.86	0.14	0.34	0.19
0.134	0.32	6.61	204300	6.29	0.92	0.08	0.22	0.08

重複三

Control	0.36	7.25	262600	6.89	1.00	0.00	0.00	0.00
1.073	0.38	0.68	29400	0.3	0.24	0.76	0.94	0.96
0.805	0.34	1.66	71000	1.32	0.54	0.46	0.77	0.81
0.537	0.33	3.64	115700	3.31	0.71	0.29	0.59	0.52
0.268	0.38	5.79	170400	5.41	0.85	0.15	0.37	0.21
0.134	0.32	6.57	203200	6.25	0.91	0.09	0.24	0.09

平均

Control	0.35	7.21	260767	6.86	1.00	0.00	0.00	0.00
1.073	0.33	0.61	30833	0.28	0.25	0.75	0.94	0.96
0.805	0.33	1.74	71133	1.40	0.55	0.45	0.77	0.80
0.537	0.35	3.72	116733	3.38	0.72	0.28	0.59	0.51
0.268	0.37	5.87	173633	5.49	0.86	0.14	0.35	0.20
0.134	0.33	6.62	204500	6.29	0.91	0.09	0.23	0.08

實驗毒物： Anthracene

初始細胞密度： 1.5×10^4 cells/ml

MCV： $42.35 \mu\text{m}^3$

UV-A 6 hr

重複一

Conc mg/L	Initial DO mg/L	Final DO mg/L	Final cells cells/ml	Delta DO mg/L	specific growth rate	比抑制率 On growth rate	比抑制率 On Biomass	比抑制率 On DO
Control	0.56	7.21	242300	6.65	1.39	0.00	0.00	0.00
0.6	0.43	1.78	22000	1.35	0.19	0.86	0.97	0.80
0.4	0.48	2.17	32500	1.69	0.39	0.72	0.92	0.75
0.32	0.45	2.57	47700	2.12	0.58	0.58	0.86	0.68
0.2	0.51	3.83	82400	3.32	0.85	0.39	0.70	0.50
0.16	0.6	4.8	136600	4.2	1.10	0.21	0.47	0.37
0.12	0.52	6.09	216700	5.57	1.34	0.04	0.11	0.16

重複二

Control	0.47	7.27	241400	6.8	1.39	0.00	0.00	0.00
0.6	0.38	1.91	28400	1.53	0.32	0.77	0.94	0.78
0.4	0.56	2.21	30000	1.65	0.35	0.75	0.93	0.76
0.32	0.47	2.43	45800	1.96	0.56	0.60	0.86	0.71
0.2	0.54	3.9	88100	3.36	0.89	0.36	0.68	0.51
0.16	0.5	4.73	133900	4.23	1.09	0.21	0.47	0.38
0.12	0.53	5.93	210400	5.4	1.32	0.05	0.14	0.21

重複三

Control	0.37	7.09	242400	6.72	1.39	0.00	0.00	0.00
0.6	0.52	1.94	29400	1.42	0.34	0.76	0.94	0.79
0.4	0.52	2.19	33200	1.67	0.40	0.71	0.92	0.75
0.32	0.49	2.52	47300	2.03	0.57	0.59	0.86	0.70
0.2	0.5	3.88	83000	3.38	0.86	0.39	0.70	0.50
0.16	0.53	4.82	141100	4.29	1.12	0.19	0.45	0.36
0.12	0.64	6.02	213800	5.38	1.33	0.05	0.13	0.20

平均

Control	0.47	7.19	242033	6.72	1.39	0.00	0.00	0.00
0.6	0.44	1.88	26600	1.43	0.28	0.79	0.95	0.79
0.4	0.52	2.19	31900	1.67	0.38	0.73	0.93	0.75
0.32	0.47	2.51	46933	2.04	0.57	0.59	0.86	0.70
0.2	0.52	3.87	84500	3.35	0.86	0.38	0.69	0.50
0.16	0.54	4.78	137200	4.24	1.11	0.20	0.46	0.37
0.12	0.56	6.01	213633	5.45	1.33	0.04	0.13	0.19

實驗毒物：Anthracene

初始細胞密度： 1.5×10^4 cells/ml

MCV： $43.4\mu\text{m}^3$

UV-A 24 hr

重複一

Conc mg/L	Initial DO mg/L	Final DO mg/L	Final cells cells/ml	Delta DO mg/L	specific growth rate	比抑制率 On growth rate	比抑制率 On Biomass	比抑制率 On DO
Control	0.38	7.12	231000	6.74	1.37	0.00	0.00	0.00
0.32	1.4	2.41	18800	1.01	0.11	0.92	0.98	0.85
0.2	0.95	2.55	27700	1.6	0.31	0.78	0.94	0.76
0.16	0.9	3.17	49500	2.27	0.60	0.56	0.84	0.66
0.12	0.81	5.66	170000	4.85	1.21	0.11	0.28	0.28
0.08	0.69	6.84	196000	6.15	1.29	0.06	0.16	0.09
0.04	0.62	7.27	228200	6.65	1.36	0.00	0.01	0.01

重複二

Control	0.32	7.11	241600	6.79	1.39	0.00	0.00	0.00
0.32	1.39	2.43	19300	1.04	0.13	0.91	0.98	0.85
0.2	1.04	2.44	29300	1.4	0.33	0.76	0.94	0.79
0.16	0.82	2.92	45200	2.1	0.55	0.60	0.87	0.69
0.12	0.69	4.92	158600	4.23	1.18	0.15	0.37	0.38
0.08	0.6	6.63	191700	6.03	1.27	0.08	0.22	0.11
0.04	0.54	7.09	218700	6.55	1.34	0.04	0.10	0.04

重複三

Control	0.31	7.01	231100	6.7	1.37	0.00	0.00	0.00
0.32	1.55	2.48	18400	0.93	0.10	0.93	0.98	0.86
0.2	1.1	2.37	26100	1.27	0.28	0.80	0.95	0.81
0.16	0.88	2.69	39900	1.81	0.49	0.64	0.88	0.73
0.12	0.71	4.73	145500	4.02	1.14	0.17	0.40	0.40
0.08	0.52	6.44	185300	5.92	1.26	0.08	0.21	0.12
0.04	0.46	6.94	209800	6.48	1.32	0.04	0.10	0.03

平均

Control	0.34	7.08	234567	6.74	1.37	0.00	0.00	0.00
0.32	1.45	2.44	18833	0.99	0.11	0.92	0.98	0.85
0.2	1.03	2.45	27700	1.42	0.31	0.78	0.94	0.79
0.16	0.87	2.93	44867	2.06	0.55	0.60	0.86	0.69
0.12	0.74	5.10	158033	4.37	1.18	0.14	0.35	0.35
0.08	0.60	6.64	191000	6.03	1.27	0.07	0.20	0.11
0.04	0.54	7.10	218900	6.56	1.34	0.03	0.07	0.03

實驗毒物：Anthracene

初始細胞密度： 1.5×10^4 cells/ml

MCV：45.76 μm^3

UV-A 48 hr

重複一

Conc mg/L	Initial DO mg/L	Final DO mg/L	Final cells cells/ml	Delta DO mg/L	specific growth rate	比抑制率 On growth rate	比抑制率 On Biomass	比抑制率 On DO
Control	0.49	7.19	259400	6.7	1.43	0.00	0.00	0.00
0.4	0.9	0.51	25600	-0.39	0.27	0.81	0.96	1.06
0.32	0.6	1.73	43900	1.13	0.54	0.62	0.88	0.83
0.2	0.6	2.44	72100	1.84	0.79	0.45	0.77	0.73
0.16	0.47	2.97	109400	2.5	0.99	0.30	0.61	0.63
0.12	0.87	5.45	196100	4.58	1.29	0.10	0.26	0.32
0.08	0.83	6.68	240400	5.85	1.39	0.03	0.08	0.13

重複二

Control	0.54	7.13	255500	6.59	1.42	0.00	0.00	0.00
0.4	0.81	0.47	28200	-0.34	0.32	0.78	0.95	1.05
0.32	0.54	1.71	47800	1.17	0.58	0.59	0.86	0.82
0.2	0.67	2.59	68100	1.92	0.76	0.47	0.78	0.71
0.16	0.8	3.73	105200	2.93	0.97	0.31	0.62	0.56
0.12	0.92	5.5	205100	4.58	1.31	0.08	0.21	0.31
0.08	0.69	6.18	229000	5.49	1.36	0.04	0.11	0.17

重複三

Control	0.59	7.22	246900	6.63	1.40	0.00	0.00	0.00
0.4	0.88	0.59	27600	-0.29	0.30	0.78	0.95	1.04
0.32	0.71	1.82	46100	1.11	0.56	0.60	0.87	0.83
0.2	0.61	2.55	67300	1.94	0.75	0.46	0.77	0.71
0.16	0.75	3.38	105900	2.63	0.98	0.30	0.61	0.60
0.12	0.91	5.53	195800	4.62	1.28	0.08	0.22	0.30
0.08	0.73	6.12	232900	5.39	1.37	0.02	0.06	0.19

平均

Control	0.54	7.18	253933	6.64	1.41	0.00	0.00	0.00
0.4	0.86	0.52	27133	-0.34	0.30	0.79	0.95	1.05
0.2	0.62	1.75	45933	1.14	0.56	0.60	0.87	0.83
0.32	0.63	2.53	69167	1.90	0.76	0.46	0.77	0.71
0.16	0.67	3.36	106833	2.69	0.98	0.31	0.62	0.60
0.12	0.90	5.49	199000	4.59	1.29	0.09	0.23	0.31
0.08	0.75	6.33	234100	5.58	1.37	0.03	0.08	0.16

實驗毒物：NAP

UV-B 24hr

初始細胞密度： 1.5×10^4 cells/ml

MCV：39.34 μm^3

重複一

Conc mg/L	Initial DO mg/L	Final DO mg/L	Final cells cells/ml	Delta DO mg/L	specific growth rate	比抑制率 On growth rate	比抑制率 On Biomass	比抑制率 On DO
Control	0.52	7.36	249000	6.84	1.40	0.00	0.00	0.00
19	0.7	1.54	31100	0.84	0.36	0.74	0.93	0.88
15.2	0.36	1.57	40700	1.21	0.50	0.64	0.89	0.82
9.5	0.54	2.74	70100	2.2	0.77	0.45	0.76	0.68
7.6	0.85	4.52	126700	3.67	1.07	0.24	0.52	0.46
3.8	0.57	6.14	152700	5.57	1.16	0.17	0.41	0.19
1.9	0.47	7.1	171300	6.63	1.22	0.13	0.33	0.03

重複二

Control	0.36	7.41	258800	7.05	1.42	0.00	0.00	0.00
19	0.67	1.54	34900	0.87	0.42	0.70	0.92	0.88
15.2	0.46	1.81	45000	1.35	0.55	0.61	0.88	0.81
9.5	0.61	2.71	64400	2.1	0.73	0.49	0.80	0.70
7.6	0.9	4.59	115700	3.69	1.02	0.28	0.59	0.48
3.8	0.57	6.38	159900	5.81	1.18	0.17	0.41	0.18
1.9	0.47	6.89	170500	6.42	1.22	0.15	0.36	0.09

重複三

Control	0.23	7.13	242400	6.9	1.39	0.00	0.00	0.00
19	0.75	1.57	35300	0.82	0.43	0.69	0.91	0.88
15.2	0.63	1.82	47100	1.19	0.57	0.59	0.86	0.83
9.5	0.52	2.79	72000	2.27	0.78	0.44	0.75	0.67
7.6	0.44	4.1	110400	3.66	1.00	0.28	0.58	0.47
3.8	0.37	6.13	152100	5.76	1.16	0.17	0.40	0.17
1.9	0.33	6.88	174900	6.55	1.23	0.12	0.30	0.05

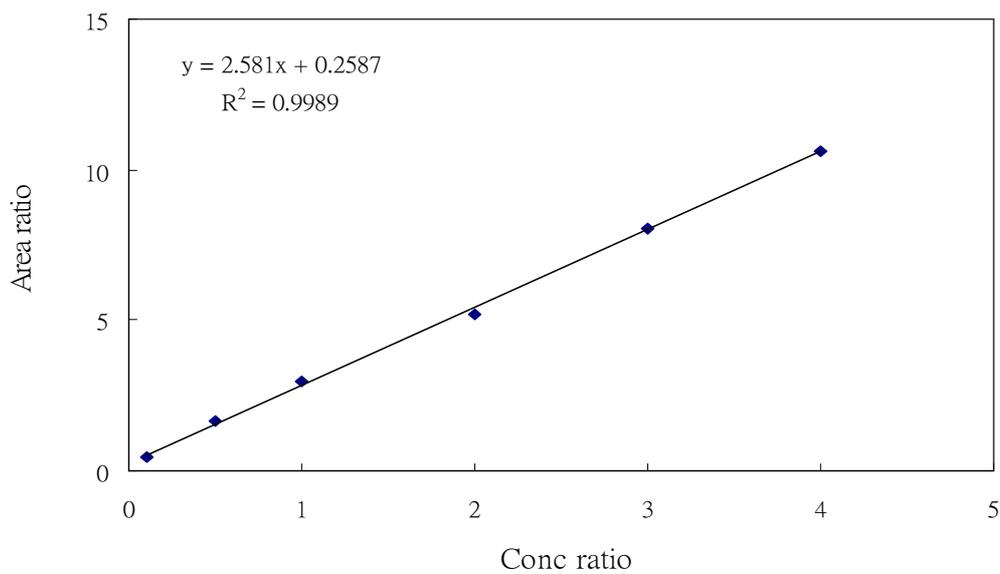
平均

Control	0.37	7.30	250067	6.93	1.41	0.00	0.00	0.00
19	0.71	1.55	33767	0.84	0.40	0.71	0.92	0.88
15.2	0.48	1.73	44267	1.25	0.54	0.62	0.88	0.82
9.5	0.56	2.75	68833	2.19	0.76	0.46	0.77	0.68
7.6	0.73	4.40	117600	3.67	1.03	0.27	0.56	0.47
3.8	0.50	6.22	154900	5.71	1.17	0.17	0.40	0.18
1.9	0.42	6.96	172233	6.53	1.22	0.13	0.33	0.06

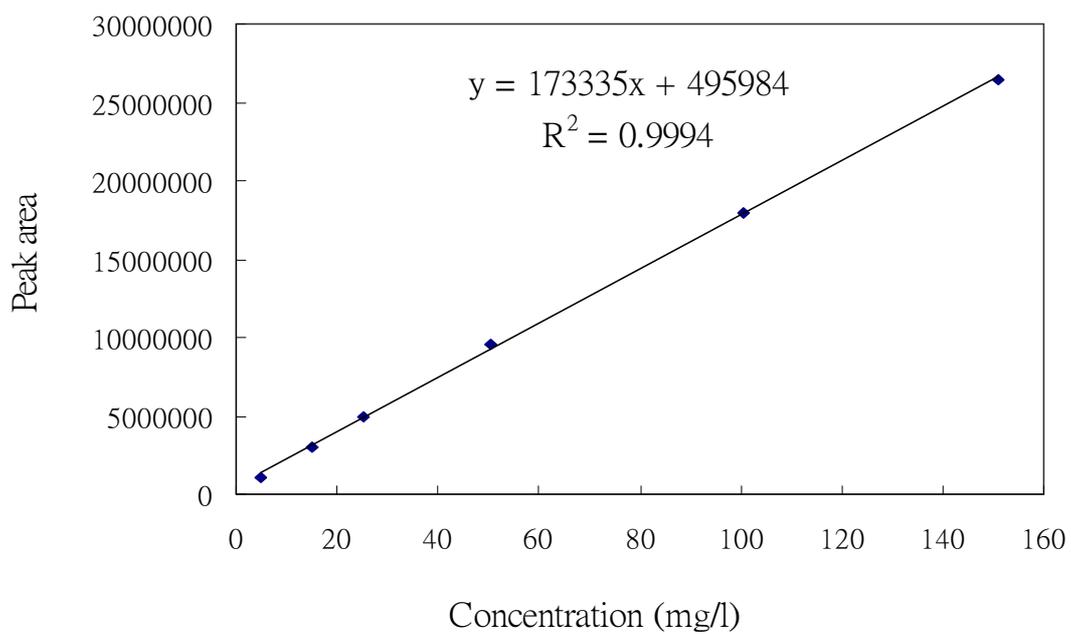
附錄二 儀器分析

HPLC 檢量線：

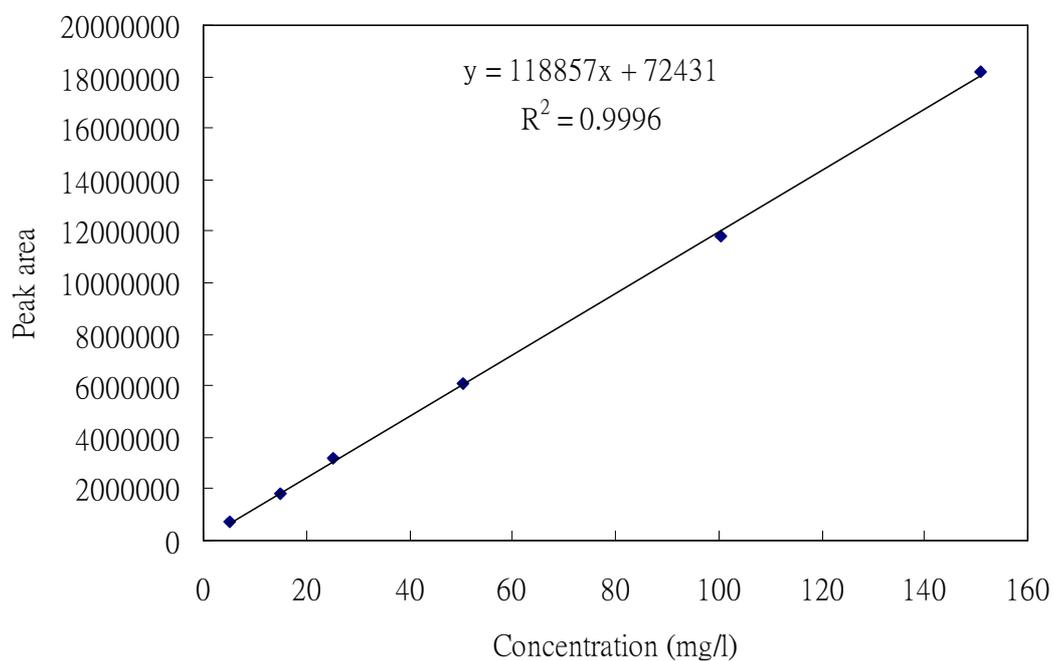
Toxic : Anthracene & 1,2-dhATQ



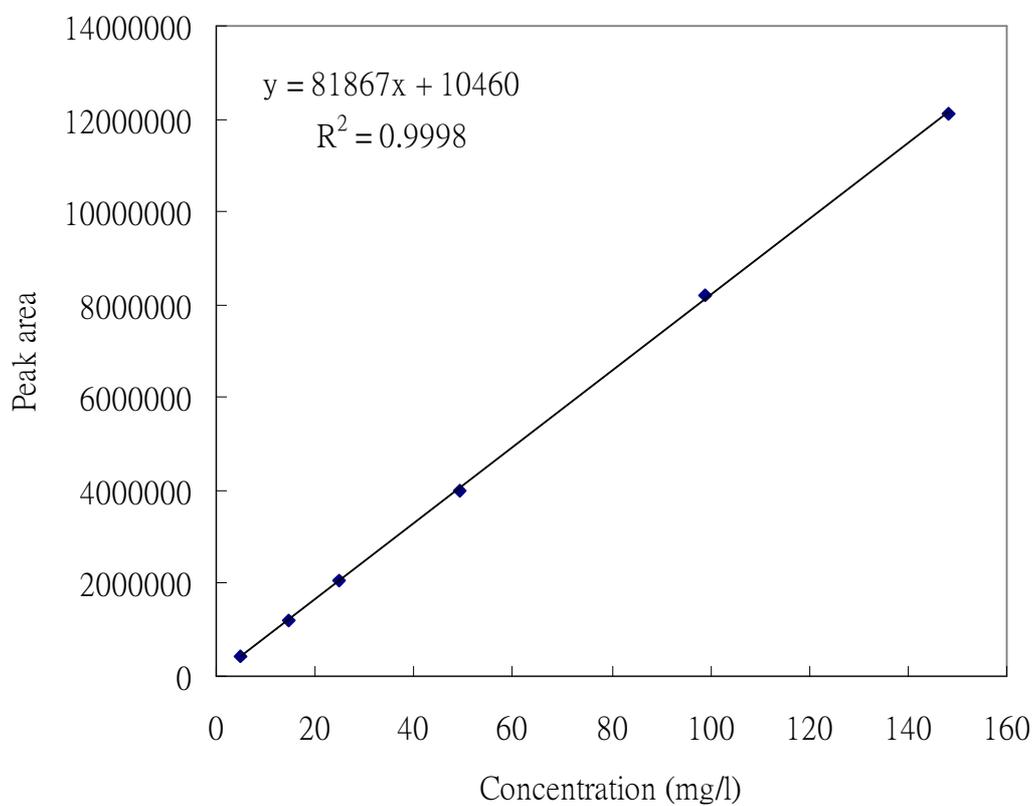
ATQ



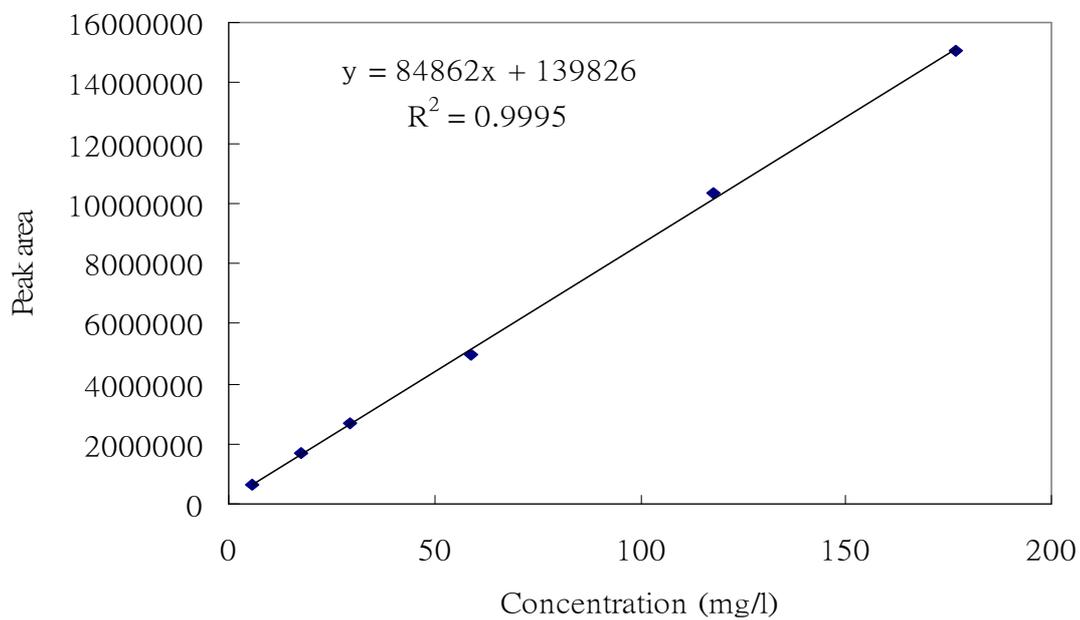
1-hATQ



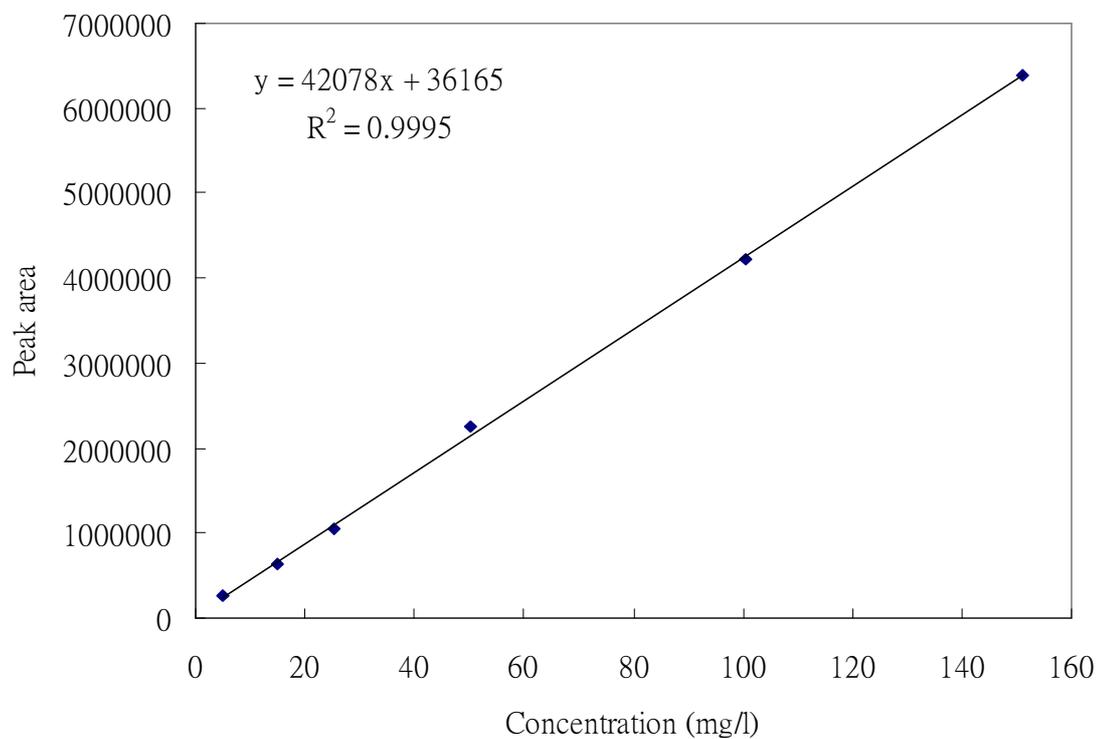
1,4-dhATQ



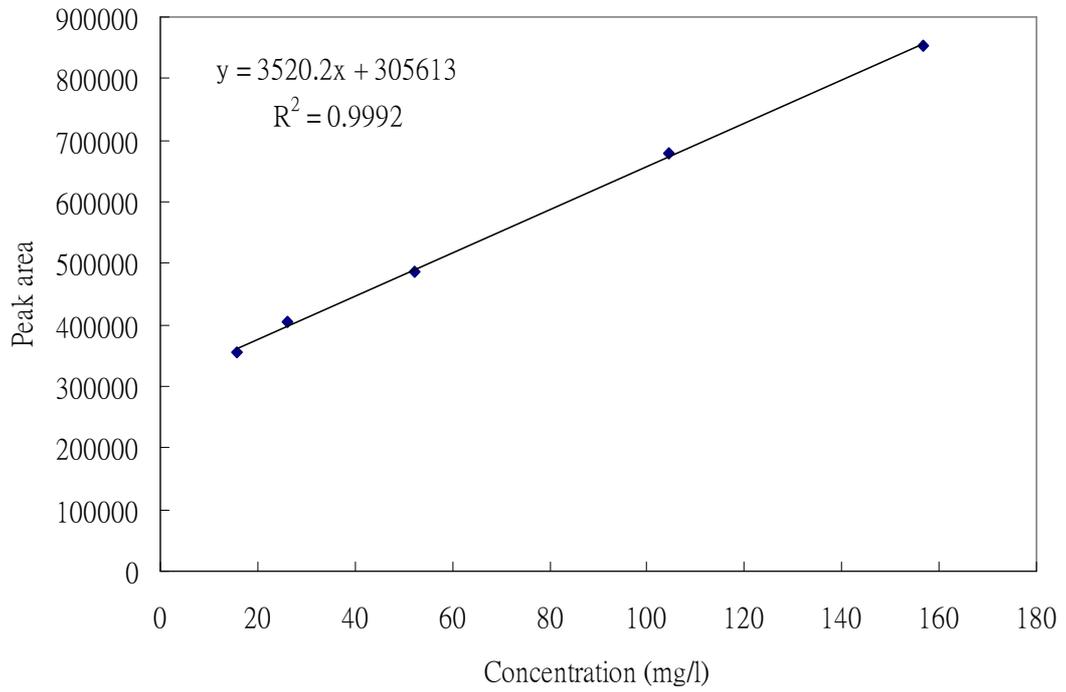
1,8-dhATQ



2-OH-1,4-NAP



1-NAP



1,4-NAP

