

第四章 實驗設備與方法

4.1 實驗設備與材料

密閉式 BOD 瓶藻類毒性試驗的設備材料：

1. 恆溫室：恆溫無塵室大小約為五坪，其溫度控制在 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ，藻類培養、毒性試驗與四十八小時後的分析，皆在此恆溫室內進行。
2. 水質：實驗過程中容器的清洗及藥品的配製用水皆為自來水依次經過四道濾心過濾、離子交換、蒸餾然後再經超過濾 (Milli-Qplus) 處理之去離子水，水質之電阻值控制在 18.2 Mega-ohm ($\text{M } \Omega\text{-cm}$)。
3. 培養裝置與迴轉式振盪儀：培養裝置為自行裝配，長、寬、高為 $135 \times 110 \times 135 \text{ cm}$ ，頂面履以 120 cm 長之白色螢光燈管八支。迴轉式振盪儀 (EIRSTEK, model: S103)，搖動速度可大於 100 rpm，擡面共有六十八個位置。
4. 批次式培養器皿：以批次方式培養液態藻類時所使用之容器為 125 ml 之三角錐瓶。
5. 紗布：藻類培養時，使用消毒紗布覆蓋在三角錐瓶瓶口，以防止異物進入，每次使用前皆經過滅菌斧殺菌。
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。於體積 4 公升處開口做為溢流口，並且於體積 2 公升處開口做為取樣之用。母槽上方亦有兩開口，其中之一作為營養基質流入口，另一作為空氣進流用。
7. 電磁攪拌器：用於連續式培養母槽和四十八小時的毒性試驗，當放置於

連續式培養母槽的下方，其作用為使藻液與進流之營養基質、空氣混合均勻，避免藻類之沉澱。

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，作為輸送營養基質到連續式培養母槽之動力，並可控制其流量。
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，不具毒性，可避免影響母槽之培養及毒性試驗之結果。
10. 曝氣幫浦：使用之曝氣幫浦為一般水族使用之曝氣幫浦。
11. 浮子流量計：其功用在量測曝氣氣體之流量，本實驗母槽之曝器量控制在 250 ml/min。需定時以泡沫流量計校正流量。
12. 空氣洗滌器：洗滌器的功用在去除曝氣氣體中的雜質，並可以藉此濕潤氣體，增加氣體之溶解。
13. 庫德式電子顆粒計數器二代：功用為計數藻類細胞數。使用 Coulter Electronics 公司之 Coulter Counter，型號為 MULTISIZER II，並以 5.06 μm 標準顆粒乳液來校正。配有 50 及 100 μm 孔徑之玻璃管。本實驗使用 100 μm 孔徑之玻璃管，量測之顆粒直徑範圍為 2~60 μm 。
14. 電腦及分析軟體：使用中央處理器為 P-166 之桌上性電腦，視窗 98 (Windows98) 之程式並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。使用時可直接將電子顆粒計數器之數值輸送至電腦中進行分析。
15. BOD 瓶：為毒性試驗時使用之玻璃器皿。使用體積 300 ml，直徑 8 cm，上頭開口處有玻璃瓶塞，使其可以利用水封之形式，避免外界氣體、物

質等進入，而減少干擾，使整個系統為一個封閉式系統。

16. 光度測定計：使用 TOPCON 產牌，型號 IM-2D，單位為 lux。
17. 酸鹼度測定儀 (pH meter)：使用 Suntex 公司，Model SP-2200 之 pH 測定儀。其精確度為 ± 0.01 。
18. 溶氧測定儀：美國 YSI 公司出品之微電腦溶氧測定儀，Model YSI 5100，附有 Model 5010 溶氧測定探頭 (BOD Probe)，其探頭部分裝有電動攪拌器，可以對樣品進行攪拌。溶氧量測定範圍為 0.0~60.0 mg/L，精確度為 $\pm 0.1\%$ 。
19. 曝氣用氣體鋼瓶：使用含 0.5% CO₂、99.9% N₂之高壓氣體鋼瓶，總氣體體積為 6 m³。用於降低營養基質中之溶氧值，並確保能提供足夠之碳源。鋼瓶上備有流量計，曝氣時之曝器流量控制在 600 ml/min。
20. 純水曝氣設備：曝氣設備使用體積 10 公升之德國製下口瓶，。開口處嵌入一矽膠塞和玻璃管，玻璃管一頭接氣體鋼瓶，一頭接沸石並伸入純水筒底部曝氣，在純水筒開口處附近開一小洞以平衡壓力，曝氣完成後關緊筒蓋以減少外界空氣之進入。
21. 無菌操作臺：使用造鑫公司製造的 Laminar Flow 操作臺，內設有紫外光殺菌，以防止植種過程及配製營養鹽時受到污染。
22. 抽器幫浦：使用 SINKU KIKO 公司，型號 ULVACG-5 及 G-50 之幫浦。用於過濾營養基質及 ISOTON II 之用。
23. 冰箱：使用 Whirlpool 之冰箱，其功用為維持藻種、藥品及營養鹽於 4°C 之下，以保存之。
24. 滅菌釜：使用 HIRAYAMA 公司，型號 HA-300M 之滅菌釜，最大壓力可

達 1.9 kg/cm^2 ，容積為 0.0521 m^3 。使用時條件設定為高溫（ 121°C ）高壓（ 1.1 kg/cm^2 ）來進行滅菌，每次對實驗器皿進行滅菌的時間設定為 15 分鐘。

25. 烘箱：使用 Memmet 公司之烘箱，做為烘乾玻璃器皿用。使用時溫度設定為 $52 \pm 1^\circ\text{C}$ 。

26. 分析天秤：量測藥品用，產牌 Precisa 205A，精確度至 0.01 mg 。

27. 定量吸管：使用 SOCOREX 公司，可調式移液器，容量為 $100 \sim 1000 \mu\text{l}$ 及 $0.1 \sim 5 \text{ ml}$ 兩種。

28. 濾膜：使用之濾膜分成兩種，過濾營養基質時使用 Gelman Science 九型號 66191 之 $0.45 \mu\text{m}$ 濾膜，過濾 Isoton II 時使用 60301 之 $0.2 \mu\text{m}$ 濾膜。

29. QSAR 中物化參數計算程式：

(一)辛醇-水係數（ $\log P$ and Clog P ）：由美國環保署提供的 WSKOWWIN V1.41 program 計算求得。

(二) E_{lumo} 、 E_{homo} 、Electronic energy、Core-core Repulsion、Dipole：由 CS Chem3D Pro^R Version 5.0 計算求得。

(三)Solute descriptors： R 、 π^{H} 、 $\sum \alpha^{\text{H}}$ 、 $(\sum \beta^{\text{H}})^2$ ：引用自 (Gunatilleka and Poole, 1999)。

30. 毒物選定：

本研究所包含的有機物共九十一種（表 5.1）；七十一種的有機物毒性試驗已於過去三年內完成，另外二十種有機物主要依據 Blum and Speece, (1991)所列出的環境中主要污染物 (Priority pollutant)所選定，包含十種芳香族 (Aromatics)及十種脂肪族 (Aliphatics)，如表 4.1.1

及 4.1.2 所示。

31. 有機物濃度分析儀器：

(一)總有機碳分析儀

(二)COD 比色法分析儀

(三)液相層析儀：

型號	Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector
	Waters 515 HPLC Pump
分離管柱	c18 4.6 \times 150 mm
迴路容量	20 μ l
沖提相	70% 甲醇+30%去離子水
流速	1.0 ml/min
管柱壓力	650 psi
偵測波長	254 nm
滯留時間	20 min

(四)氣相層析儀：

型號	hp 5890 series II
載流氣體	He 5~7 ml/min
補充氣體	He 20 ml/min
注射埠溫度	250 $^{\circ}$ C
偵測器溫度	280 $^{\circ}$ C
起始溫度	45 $^{\circ}$ C 維持三分鐘
升溫溫度	45 $^{\circ}$ C 以 12 $^{\circ}$ C/min 升溫至 275 $^{\circ}$ C
最終溫度	275 $^{\circ}$ C 維持 12 分鐘

表 4.1.1 Aromatics 毒物列表


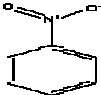

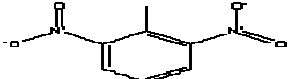
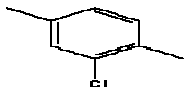
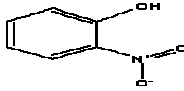

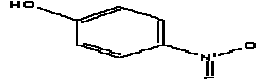
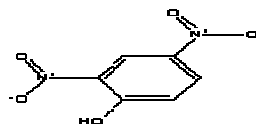

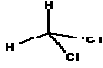
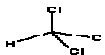






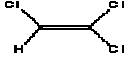

<i>Chemical</i>	<i>Formula</i>	<i>MW.</i>	<i>Structure</i>
<i>Origin & Purity</i>			
<i>Ethylbenzene</i> <i>Lin & 95%</i>	C_8H_{10}	106.167	
<i>Nitrobenzene</i> <i>Merck & 98%</i>	$C_6H_5NO_2$	123.111	
<i>2-chlorotoluene</i> <i>Merck & 98%</i>	C_7H_7Cl	126.5853	
<i>2,6-dinitrotoluene</i> <i>Merck & 98%</i>	$C_7H_6N_2O_4$	182.1354	
<i>2-chloro-p-xylene</i> <i>Merck & 99%</i>	C_8H_9Cl	140.6121	
<i>2-nitrophenol</i> <i>Merck & 99%</i>	$C_6H_5NO_3$	139.1104	
<i>3-nitrophenol</i> <i>Merck & 99%</i>	$C_6H_5NO_3$	139.1104	
<i>4-nitrophenol</i> <i>Merck & 99.5%</i>	$C_6H_5NO_3$	139.1104	
<i>2,4-dinitrophenol</i> <i>Merck & 98%</i>	$C_6H_4N_2O_5$	184.108	
<i>2,4-dimethylphenol</i> <i>Merck & 98%</i>	$C_8H_{10}O$	122.1664	

表 4.1.2 Aliphatics 毒物列表

<i>Chemical</i>	<i>Formula</i>	<i>MW.</i>	<i>Structure</i>
<i>Origin & Purity</i>			
<i>methylene chloride</i> <i>Mallinckrode & 99.91%</i>	CH_2Cl_2	84.933	
<i>chloroform</i> <i>Shimakyu & 99.8%</i>	$CHCl_3$	119.38	
<i>carbon tetrachloride</i> <i>Acros & 99%</i>	CCl_4	153.82	
<i>1,2-dichloropropane</i> <i>Merck & 98%</i>	$C_3H_6Cl_2$	112.99	
<i>1,3-dichloropropane</i> <i>Merck & 99%</i>	$C_3H_6Cl_2$	112.99	
<i>1-chlorobutane</i> <i>Merck & 99%</i>	C_4H_9Cl	92.568	
<i>cis-1,2-dichloroethylene</i> <i>Merck & 100%</i>	$C_2H_2Cl_2$	96.944	
<i>trans-1,2-dichloroethylene</i> <i>Merck & 100%</i>	$C_2H_2Cl_2$	96.944	
<i>trichloroethylene</i> <i>J.T.BAKER & 100%</i>	C_2HCl_3	131.39	
<i>tetrachloroethylene</i> <i>Aldrich & 99.5%</i>	C_2Cl_4	165.83	

4.2 毒性試驗藻種

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

4.3 培養基質的配製

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

將下列 (1)~(7) 的貯備液 (Stock Solution) 各加 1 ml 至含 900 ml 去離子水中，再稀釋 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 。

(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。

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 7.35 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 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% 是適用於活化藻類時，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，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°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 藻類營養基質巨量營養成份

化合物	濃度 (mg/L)	元素	各元素濃度 (mg/L)
NaNO ₃	25.5	N	4.2
NaHCO ₃	15.0	C	2.14
		Na	11.0
K ₂ HPO ₄	1.04	P	0.186
		K	0.649
MgSO ₄ -7H ₂ O	14.7	S	1.91
MgCl ₂	5.7	Mg	2.9
CaCl ₂ -2H ₂ O	4.41	Ca	1.2

表 4.3.2 藻類營養基質微量營養成份

化合物	濃度 (mg/L)	元素	各元素濃度 (mg/L)
H ₃ BO 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
Na ₂ MnO ₄ -2H ₂ O	7.26	Mo	2.88
FeCl ₃	96.0	Fe	30.0
Na ₂ EDTA-2H ₂ O	300		

4.4 實驗前準備工作

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，然後以自來水沖洗五至六次，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，並用自來水沖洗五至六次後再以去離子水沖洗三至四次，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/cm^2 、 121°C 的條件滅菌十五分，而定量容器則不可加熱烘乾或放入滅菌釜中，以避免容器因加熱而改變容量，只要於泡酸液清洗完後，置於架上陰乾即可。

2. 藻類之培養及保存

藻類之培養從最初之固態培養開始，固態培養基質之成分和液態培養基質之成分相同，只是固態培養基質多加入 1% 的洋菜膠 (Agar)，其通常可以在 4°C 下保存約六個月。此外，亦做液態營養基質之培養，在無菌操作臺中，以白金耳刮取固態培養基上之藻類，將其置於液態培養基質中 (含 100% EDTA) 進行培養。通常液態營養基質中之藻類可在 4°C 下保存四個星期，於四個星期之後做移植以繼續培養、保存菌種。

3. ISOTON II 之配製

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

4. 電子顆粒計數器操作

於電子顆粒計數器中有一根玻璃管及一攪拌器，操作時玻璃管需浸入含有 ISOTON II 稀釋樣品的燒杯中，水樣在計數的過程須加以攪拌以使顆粒均勻分佈。而在玻璃管近底端的側面鑲有紅寶石的精準小圓孔，藉以吸取水樣。在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經過圓孔時，會暫時性地干擾到電流，行程某特定量的電阻。而電阻量化透過示波器的脈衝顯示，其高度正比於顆粒的大小，且脈衝數即是顆粒的數目，直接由電子計數器記錄顯示，然後再將資料輸送至電腦中，以軟體程式（Multisizer Accucomp V. 2.01）進行進一步的分析。

於計數時，取 1ml 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。以顯示之讀數值扣除空白顆粒數之數值，即純 ISOTON II 之背景值，所取之值為連續三次值相差在者之平均值。

5. 盤面光度之調整

黏貼鋁箔紙於震盪器四周，使之具有反射光線的效果，經適當調整位置後，可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。



4.5 實驗條件控制

本實驗條件依據 (Lin, 2001) 所決定之最佳化條件下進行，條件如下：

1. 溫度：藻類之培養及毒性試驗皆在 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 下進行。
2. 光度：藻類之培養及毒性試驗皆在光度為 $64.5 \pm 10\% \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ 下進行，所使用之光源為連續白冷光。
3. 氮、磷濃度：培養藻類時使用一半之濃度，毒性試驗時則不變。
4. HCO_3 濃度：15 mg/L。
5. pH：初始 pH 為 7.5 ± 0.1 。
6. EDTA 含量：100% 是使用於活化藻類時，而在連續式母槽中培養藻類時

使用 10%，進行實驗時則使用不含 EDTA 之貯備液。

7. 試驗時間：四十八小時。
8. 藻類初始植種密度： 1.5×10^4 cells / ml。

4.6 實驗方法：

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



4.7 實驗步驟

4.7.1 連續式母槽的培養

1. 將移植的藻類由 4°C 的冰箱中取出，添加含 100% EDTA 的營養基質，培養約兩週後，藉以活化藻細胞，使其達到指數生長期。
2. 將四公升之連續式培養母槽及裝營養基質之廣口瓶、無菌膠管等經過清洗、殺菌之後，置於 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 之溫度控制室中，並將連續式培養母槽放置在磁石攪拌器上連續攪拌，攪拌具有混合和避免藻類沈澱之功能，能使藻液和加入之營養鹽以及曝氣之氣體均勻的混合。連續式培養母槽所需之燈光由一方照射，使用白冷光燈，其光照強度為 $64.5 \pm 10 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ 。本實驗中，連續式培養母槽之曝氣設備所提供之曝氣量為 250 ml/min，且空氣進入母槽之前先經洗滌瓶和空氣濾膜，以去除空氣中之雜質，並藉此濕潤空氣。整個裝置架設好後，即可植入藻液。植入藻液時，以藻

液、營養基質體積比為 1:3 之比例，將藻液植入連續式培養母槽之中。

3. 當連續式培養母槽中藻細胞數量達到約為最大可能藻細胞數量之 80~90% 時 (約為 $1.9 \sim 2.0 \times 10^6$ cells/mL)，則開始以蠕動幫浦輸入營養基質，此處使用之營養基質參考 U.S. EPA 標準方法中之營養基質，但將其中之 EDTA 濃度降為原本之 10%。因為連續式培養母槽有一固定之體積，所以可以藉由流入之營養基質體積直接來計算、控制所需之稀釋率，也就是藉此來控制連續式培養母槽中藻細胞之生長率。本實驗中所稀釋之比率為 0.25 day^{-1} 。
4. 每日量測連續式培養母槽中藻細胞之細胞濃度、平均細胞體積、pH 值、溢流率等數值，以判定連續式培養母槽是否已經達到穩定狀態。本實驗以連續三天之上述參數值皆在一定控制範圍之內，通常以細胞濃度約為 $1.9 \sim 2.0 \times 10^6$ cells/mL，及平均細胞體積約為 $39 \sim 55 \mu\text{m}^3$ ，即判斷系統達到穩定狀態，在此條件下便可取出藻液進行試驗。

4.7.2 藻類毒性試驗

1. 確定連續式培養母槽穩定之後，即可以開始藻類毒性試驗。毒性試驗之營養基質為參考 U.S. EPA 標準方法，而後修改濃度配製。將自純水曝氣設備裝滿純水，並利用含有 0.5% 二氧化碳之氮氣進行曝氣。曝氣前之純水先以 0.1 N 之氫氧化鈉調整至 pH 值為 7.5 ± 0.1 。曝氣步驟可降低營養基質中之溶氧值並增加其二氧化碳的濃度，曝氣時之氣體流量約為 600 ml/min，經過五至六分鐘的曝氣後，溶氧值可接近 1.0 mg/L。
2. 由穩定狀態之連續式培養母槽中取出適量之藻液分別加入 BOD 瓶中，使試驗時藻類之初始細胞密度為 1.5×10^4 cells/ml，再迅速加入已曝氣之純水，最後逐瓶加入所需之營養基質，和不同體積的毒性物質以達到所需的濃度。若毒物無法溶解於水中，則使用丙酮作為溶劑。每次實驗一組七瓶，重複三組。每組之第一瓶為控制組，不加入任何毒性

物質，藉此瞭解在移植過程中是否有其他因素影響到藻類之正常生長。

3. 當藻液、營養基質及毒性物質皆分別加入BOD瓶中後，測量各瓶之溶氧值，視為初始溶氧值 (initial DO, DO_i)。然後將BOD瓶置於迴轉式震盪混合器上進行震盪。實驗條件控制在溫度 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ，光照來自於上方平行照射，強度為 $64.5 \pm 10 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ 之白冷光燈，震盪頻率為 100 rpm。
4. 四十八小時後量測各個BOD瓶中之溶氧值，視為最終溶氧值 (final DO, DO_f)。由最終溶氧值減掉初始溶氧值可得到一溶氧差，為淨溶氧值 (ΔDO)。即 $DO_f - DO_i = \Delta\text{DO}$ 。藉由此溶氧差值，及毒性物質濃度，即可由模式分析求得此毒性物質於試驗終點為溶氧時之 EC_{50} 。
5. 利用顆粒計數器量測BOD瓶的藻類細胞密度，並藉由Probit模式分析，便可求得以藻類細胞密度為試驗終點時之 EC_{50} 值。圖 4.7 為整個實驗流程暨裝置示意圖。



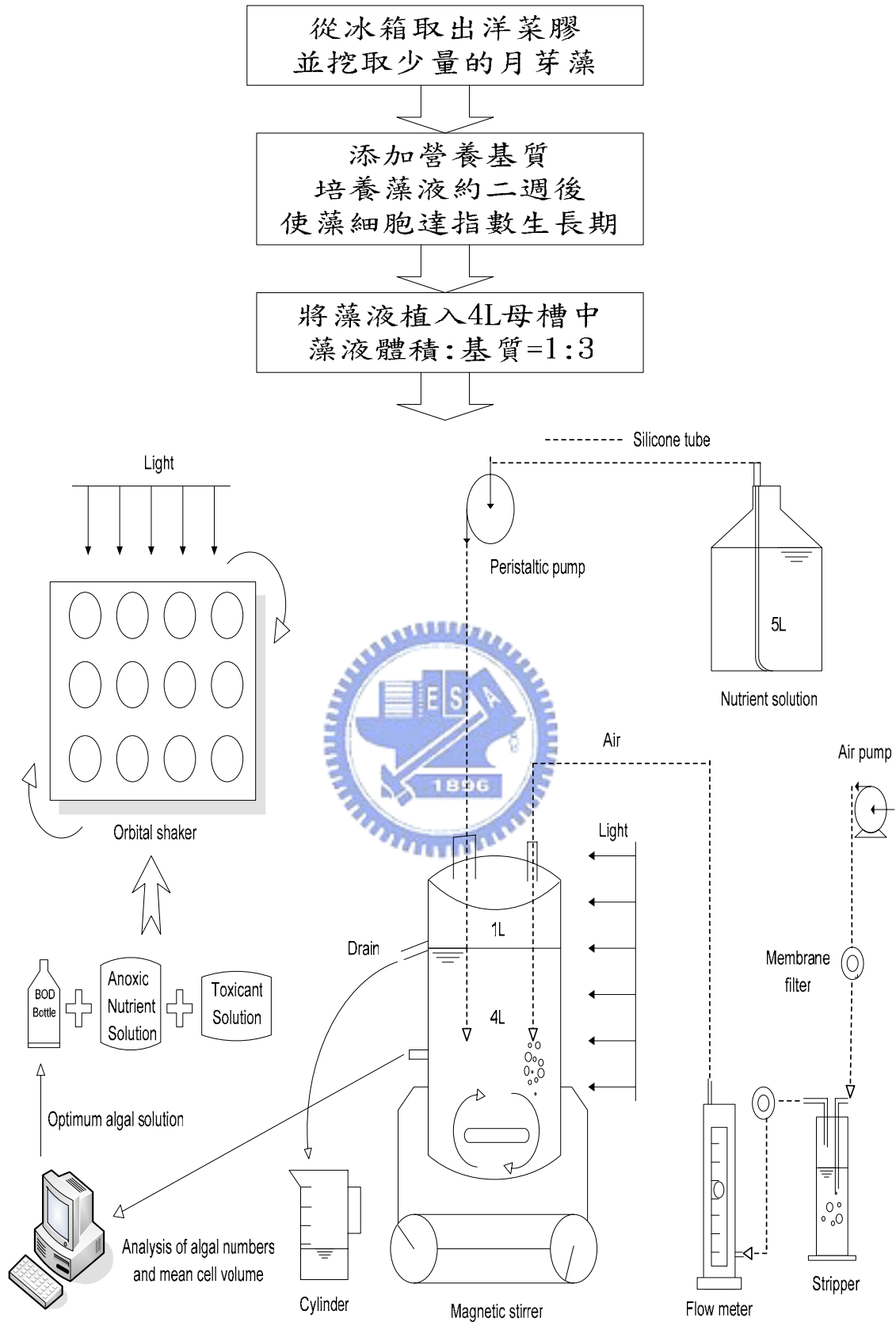


圖 4.7 密閉式藻類毒性試驗流程暨裝置示意圖

4.8 實驗的品保與品管

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

1. 品管圖：

為確保實驗時所使用的藻類在最佳狀態，每天取 1 ml 藻液，量測細胞密度及平均細胞體積 MCV 等參數變動情形並繪製成品管圖，並控制母槽的液流率為 1 L/day。當這些參數落在長期平均值正負三倍標準偏差內才可進行實驗。

2. 光度：

光度的強弱將會影響藻類之生長，為減少光度所帶來之誤差，需要將實驗進行時，震盪器上方之盤面光度調整，使震盪器每個角落的光照強度均相同。本次實驗所使用之光度為 $64.5 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ，其誤差皆控制於 10% 以內。

3. 顆粒計數器：

計數器在量測藻細胞顆粒數時，會受到 ISOTON II 背景值的影響，因此本實驗要求 ISOTON II 背景值需小於 200 以下，且實驗前後皆 ISOTON II 用進行取樣管的流洗，避免取樣管管壁結晶。

4. 溶氧測定儀：

如果薄膜或電解液受到污染，也會影響到以溶氧指標的敏感度，因此本實驗每月定期更換 CLARK-TYPE 薄膜與 3 M 氯化鉀電解質，並在每次實驗前，均進行溶氧的校正。