

第二章、文獻回顧

2.1 PAHs 性質之介紹

2.1.1 PAHs 來源與形成機制:

PAHs 為有機毒性物質中多環芳香族碳氫化合物，為兩個或以上的苯環所構成的線狀、角型或一團狀的化學結構物，因具有穩定的化學結構，所以非常穩定，不易在自然界中自行分解，而其中 acenaphthene、anthracene、phenanthrene、fluorene、fluoranthene、pyrene、benzo(a)pyrene 等化合物，為目前美國環保署優先列管之毒性物質。1976 年國際上已確認具致癌性的 PAHs 至少有三十種以上，成為目前世界已知的致癌化學物最龐大的一群。

PAHs 可經由廢水排放至河水，或是由大氣與表水的交換進入河川湖泊水體中，除污染水體本身外，由於疏水性質，使得其極易因沉澱或吸附作用進而污染河川、湖泊、底泥。此外許多研究顯示河底泥及土壤中 PAHs 污染來自大氣沉積作用(Christensen et al,1993)。

多環芳香族碳氫化合物是經由燃燒或熱解的過程中產生，但因其種類複雜繁多，其形成機制至今尚未完全瞭解，根據目前之研究可概分成下列兩類機制：

1. 熱解 (Pyrolysis) 或不完全燃燒(Incomplete Combustion) :

PAHs 的形成為自由基在火焰中之化學反應。自由基起源於碳氫化合物的不完全燃燒，經活性大、反應快之自由基催化及環化等之化學反應機制後，而生成 PAHs。任何含碳有機物的燃燒反應都有可能促使 PAHs 產生，例如：含脂肪的肉類於燒烤時與火焰接觸後即有可能生成 PAHs 附著於肉類上。Frenklach et al.^[4]

也指出，在熱解過程中，若有機分子本身具有苯環結構時，苯環及苯基分子均將大量生成，苯與苯基經聚合反應後則會生成PAHs。產生熱解反應之溫度範圍很廣，但是在高溫及低溫時其所作用又不甚相同。在高溫下的主要反應為高分子量之反應物經由斷鍵及脫氫(Dehydrogenation)，而形成活性大且不穩定之低分子量分子，而在低溫時，則是進行分子聚合反應(Polymerization)(王櫻芳，2002)^[5]。

2. 碳化之過程 (carbonization process)：

PAHs並不是只能由高溫的火燄才能生成。在低溫(200°C以下)和高壓下經過百萬年的時間，PAHs即可由衰變中之生態物質，經由不同程式之碳化過程而產生。此類之轉化過程和熱解相似，但因溫度的關係，反應慢，例如像石油及煤中都具有PAHs及其前驅物(謝永昌，2002)^[6]。PAHs之來源甚多，其主要來源可分成自然產生和人為產生兩種。環境中之PAHs則以人為的貢獻最多。

(1) 自然產生：

陸地和水生生物的合成、森林、草原火災、火山爆發等均可產生PAHs。這些物質都是經由光、熱、燃燒及其他環境中的因素所產生，但是在自然界中所產生的PAHs量極少。

(2) 人為產生：

為燃燒過程中所產生，石油、煤炭等化石燃料及木材、煙草等有機物的不完全燃燒、汽車尾氣等也可產生PAHs，造成大氣中多環芳香烴污染的問題。環境中PAHs的存在形態及分佈受其本身物理化學性質和周圍環境的影響，空氣中PAHs以氣、固兩種形式存在，其中分子量小的2~3環PAHs主要以氣態形式存在，4環PAHs在氣態、顆粒態中的分配基本相同，5~7環的大分子量PAHs則絕大部分以顆粒態形式存在，但在一定條件下兩者間可以相互轉化。

2.1.2 PAHs 之物理性質

PAHs 為多苯環的碳氫化合物，且無其他官能基存在，因此極性相當低，屬非極性物質，故於水中之溶解度不大，一般又稱其為非水相液體(nonaqueous phase liquids, NAPLs) 歸類於疏水性有機物質 (hydrophobic organic compounds, HOCs)^[7]，但其具較高的正辛醇-水分配係數辛烷值(Kow)；PAHs 具有 π 電子共振效應，因此其電子易受可見光及紫外光的激發而轉移，並可因特定UV光之吸收及激發而放出螢光光譜，故可利用UV 與螢光光譜儀測定分析。大多數PAHs 具有高熔點 ($>80^{\circ}\text{C}$) 及高沸點的特性 ($>200^{\circ}\text{C}$)，而直列型的PAHs 之熔點及沸點均較彎曲型者為高；一般而言PAHs 存在於室溫下，其蒸氣壓介於 $10^{-2} \sim 10^{-11}$ atm，屬半揮發性有機化合物，而分子量愈大的PAHs，其蒸氣壓則愈低。但對於非極性或弱極性之溶劑，如正己烷、二氯甲烷、苯及丙酮等，則有較高的溶解度^[1,3]。習慣上通常都將PAHs 分為兩大類，氣相 (Gas Phase)及顆粒相 (Particle Phase)兩部分。

2.1.3 PAHs 之化學性質

PAHs 的共軛環(conjugated rings)結構，使其成為穩定的初級污染物 (primary pollutants)，但其嗜電性(electrophilic)、嗜核子性(nucleophilic)和自由基取代反應的速率一般都大於苯^[8]。環境中PAHs 的 π -bond 易與大氣中的 O_2 進行光化學反應而產生環氧化(endoperoxide)，會和強氧化性化合物(NO_2 、 O_3 和 OH)反應形成硝基多環芳香族(nitro-PAHs)，造成毒性增強的現象。PAHs 極易吸附在土壤的顆粒上。影響PAHs 活性的環境因子包括有陽光、溫度、臭氧、氧及觸媒等物質；PAHs具光學活性，在空氣中PAHs可產生光化學反應而分解或形成具取代基PAHs。；若有臭氧存在則會使PAHs 進行環氧化作用；

在無光解及無臭氧存在的環境中，則PAHs 會與微量的NO₂ 及HNO₃反應，生成含硝基的多環芳香族碳氫化合物（nitro-PAHs）。

PAHs的 π -bond較容易在大氣中進行光化學反應，也容易和其他環境中之氧化劑作用，(例如像臭氧、氮氧化物及硫氧化物等)，而形成其它的化合物。但是當PAHs被吸附在飛灰或土壤中時，其分子則較不容易發生光分解作用，但是當其存在於液態溶液中，則會進行光分解作用。

2.1.4 PAHs 之生物性質

PAHs藉環境擴散和生物累積的特性，對生物圈產生嚴重的污染，底泥中PAHs存在除了危害水中生物以外，並且可能藉食物鏈的累積而危害人體(Malins et al,1985)。另外微生物可進行PAHs生物分解。一些生物如細菌、真菌、藻類被認為對PAHs降解有幫助(Cerniglia et al, 1981)。後來卻發現很多細菌可以利用低分子量的PAHs做唯一碳源及能源，將它們轉換成代謝路徑中的簡單受質。部份PAHs 經證實為直接之致癌物，其引起致癌性與致突變性之機制尚未明瞭。此外，PAHs 與NO_x、SO_x、PCBs 或Dixion 等共存時，會產生毒性加成的作用^[8]。

表 2.1.1 本研究之 PAHs 物化特性

PAHs 名稱	分子式	分子量	熔點 (0C)	沸點 (0C)	蒸氣壓 mmHg	溶解度 (mg/l)	logKow	HOMO-LUMO gap	結構式	適合光照之 紫外光種類
Benzanthrone(Ben)	C ₁₇ H ₁₀ O ₁	230	148	403	2.2×10 ⁻⁷	0.184	4.81	7.427		UVB UVA
Phenathrene(Phe)	C ₁₄ H ₁₀	178	101	340	1.2×10 ⁻⁴	1.29	4.35	8.207		UVA
Fluoranthene(Flu)	C ₁₆ H ₁₀	202	111	375	9.20×10 ⁻⁶	0.26	4.93	7.701		UVA
Anthracene(Ant)	C ₁₄ H ₁₀	178	216	340	1.95×10 ⁻⁴	0.073	4.45	7.284		UVB UVA
Benzo[a]anthracene(B[a]a)	C ₁₈ H ₁₂	228	155	435	2.10×10 ⁻⁷	0.014	5.52	7.392		UVB UVA
Acridine(Acr)	C ₁₃ H ₉ N ₁	179	100	333	2.59×10 ⁻⁵	5.383	3.32	7.531		UVB UVA
Benzo[b]fluorine(B[b]f)	C ₁₇ H ₁₂	216	121	370	5.5×10 ⁻⁸	0.033	5.19	7.986		UVB
Dibenzo[b,i]anthracene (D[b,i]a)	C ₂₂ H ₁₄	278	266	535	10 ⁻¹⁰	0.5	6.32	5.386		UVB UVA
Perylene(Per)	C ₂₀ H ₁₂	252	169	443	1.3×10 ⁻⁹	0.008	6.11	6.7		UVA
Benzo[b]chrysene(B[b]c)	C ₂₂ H ₁₄	278	180	470	1.39× 10 ⁻¹¹	0.0033	6.54	6.606		UVA
Napthalene(Nap)	C ₁₀ H ₈	128	81	218	0.23	31.7	3.32	10.164		UVA

PS. UVA (320~400 nm) , UVB (280~320 nm) , UVC (<280 nm)

2.2 PAHs 之毒理特性及對生物體之危害

PAHs本身並不具備直接致癌性及致突變性，而是需要經過生物組織的代謝轉化後，才能產生致癌性與致突變性。其中以四個苯環以上之 PAHs，如BaA、CHR、BbF、BkF、Bep、BaP、IND、DBA 及Bghip 較具有致癌性，而以BaP 之強致癌性及強突變性引起最多學者探討，Grimmer^[10]經實驗發現PAHs 中所含的致癌物質主要為4~7 環之PAHs，而四環以上的PAHs 多吸附在懸浮微粒上，易經由大氣傳送進入人體。目前已有相當明確的毒理學證據顯示，PAHs進入人體後，會經由細胞色素P450 (Cytochrome P450)代謝作用而轉換成為致癌的先驅物質，進而攻擊DNA，造成遺傳基因的複製缺陷，形成惡性腫瘤。

1990年，Josephson曾指出PAHs導致致癌性與致突變性之機制雖不是相當瞭解，但最有可能之理論為藉由PAHs中碳離子(C⁺)之非定域化能(Delocalization energies)在分子之嗜電活動部分(Electrophilically active portions)所瞭解。根據統計分析結果顯示，這些化學物質皆具有能力引起細胞DNA之互補培基對(Complementary base pair)，接著於DNA雙螺旋部分造成構形轉換之突變(frame shift mutation)，這些都將造成基因在複製上發生錯誤^[20]；若生殖細胞在基因複製時產生錯誤，就會造成後代發生突變；對於器官之細胞，其原有之功能亦將會喪失，甚至有不正常的增殖現象，進而發展成為癌細胞。

Grimmer^[10]研究指出，長期暴露在PAHs之環境下，會造成皮膚病、呼吸道疾病與神經系統上的損傷，並有致突變性及致癌性之風險。Tuominen et al.^[11]研究指出，二到三環之PAHs 無明顯之致突變性，但其硝基衍生物(Nitro-PAHs) 則有強烈之致突變性，不需要酵素活化過程，即對人體健康有嚴重威脅，且造成都市大氣污染物於冬季期間之致突變性比例增大。下表為

PAHs之毒理特性^[48]。

表2.2.1 PAHs之毒理特性

化合物 (簡稱)	Toxicity (毒性)	Carcinogenicity (致癌性)	Genotoxicity (致突變性)
NaP	Algae,24h,50%↓, 33ppm Fish,96hr, Tlm=1~2ppm Rat,LD ₅₀ =306~600ppm, Rabbit,LD ₅₀ =800ppm	-	-
AcPy			
AcP	ND	-,?	+Ames
Flu	ND	-	-
PA	Mouse,LD ₅₀ =700ppm	-,?	-
Ant	Mouse,LD ₅₀ =430ppm	-	-
FL	Rat,LD ₅₀ =2000ppm Rabbit,LD ₅₀ =3180ppm Mouse,LD ₅₀ =500ppm	+,?	+Ames
Pyr	Mouse,LD ₅₀ =517~678ppm	-,?	+?Ames, +UDS, +SCE
CHR	Mouse, LD ₅₀ =320ppm	+	+Ames, +SCE, +CA
BaA	ND	+	+Ames, +SCE, +UDS
BkF		-	
BbF		+	
BaP	Mouse, LD ₅₀ =250ppm Embryotoxic Teratogenic	+	+Ames, +SCE, +UDS, +DA, +CA
IND	ND	+	+Ames
DBA	ND	+	+Ames, +E coli, +DNA-damage, +CA
BghiP			

DA=DNA adducts

SCE=sister chromatid exchange

CA=Chromosomal aberration

Ames=Salmonella typhimurium reversion assay

UDS=unscheduled DNA synthesis

ND=尚未有相關之報告

2.3 特定生物對 PAHs 之分解作用

一些生物如細菌、真菌、藻類被認為對 PAHs 降解有幫助。後來又發現很多細菌可以利用低分子量的 PAHs 做唯一碳源及能源，將它們轉換成代謝路徑中的簡單受質。微生物分解碳氫化合物的效果受到環境中各種物理、化學因素的影響，如溫度、pH 值、微生物族群數量、無機鹽含量、有機物含量、溶氧量等。一般氧氣量與溫度是控制降解速率最重要的因素之一(Bauer and Capone,1985)，而微生物生理狀態亦會影響分解作用。

Dijkman et al.^[12]等學者針對Acridine此PAHs毒物利用七種不同的藻類做生物降解之實驗，發現其中月芽藻可透過其自身之代謝作用對低濃度之Acridine進行生物降解反應，造成Acridine之濃度下降，但對於高濃度之Acridine由於強烈之毒性抑制造成無顯著之生物降解反應。月芽藻也是唯一可以對Acridine產生生物降解反應之藻類物種，其他之藻類並無觀測到此現象。而在另一方面，微生物在土壤中對PAHs的生物分解作用可分為三種型式：

- (一)礦化作用：微生物利用雙氧化酵素將氧分子併入 PAHs 苯環結構中，形成中間產物 *cis*-dihydrodiol，而後再進行後續的開環反應步驟直到形成二氧化碳，微生物在礦化過程中可獲得能量與碳源，而藉此生長。
- (二)共代謝降解作用：微生物並不會利用 PAHs 做為生長碳源與能量來源，通常在共代謝過程中並不進行開環作用，而是將其轉化為酚類、酸類等終產物。
- (三)非專一性自由基氧化作用-微生物利用過氧化酵素非專一性的將 **PAHs** 氧化，通常這些酵素為胞外酵素，作用在難溶於水中的或吸附在土壤上的碳氫污染物，而產生種類非常多的代謝物。

2.4 紫外光線(UV 光)之種類及對 PAHs 之光解效應

紫外線依波長可分為UV-A (320~400 nm)，UV-B (280~320 nm)及UV-C (280 nm以下)三種，本研究 11 種PAHs適合光照之UV光種類請參考表 2.1.1。UV-B會明顯減少浮游生物的數量，進而造成魚蝦數量的減產，或危害魚、蝦、蟹及很多水生動物幼年期的發育。此外，UV-B也會影響共生藻與珊瑚、海葵、水母等的共生關係。有一些化學物質在與紫外線產生光化反應後會造成光毒(phototoxicity)，導致動物致癌，因此太陽輻射的增強，加上環境中日益增加的化學物質對於生物的毒性效應也隨之增強。polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) 包括anthracene, fluoranthene等，對水生生物(Ankley and Collyard^[13])或蚯蚓(Monson et al.^[14])都具有毒性，蚯蚓*Lumbricus variegatus*接觸到fluoranthene的死亡率與光強度有關，在高光度與高fluoranthene下，約 10 小時開始明顯死亡，但在低fluoranthene則可存活；在中光度與高fluoranthene下，18-20 小時開始死亡；在低光度下與高fluoranthene下，24 小時後才有死亡發生，但在低光度低fluoranthene下，96 小時蚯蚓仍都還活著。因此，紫外線對生物的影響中不只有直接對生物的效應，還需考慮到環境中的物質與紫外線的加成反應。

2.5 PAHs 之光誘導毒性

Ahrens and Hickey^[15]針對五種不同的海底生物以Fluoranthene進行UV光照前後毒性試驗，發現光照後之Fluoranthene對五種物種之EC₅₀皆較光照前低，顯示光照後之毒性明顯增強，亦可看出某些種類之PAHs具有光誘導毒性。同樣的Sverdrup et al.^[16]針對Pyrene以土壤中的躍尾蟲進行光照前後的毒性試驗，以躍尾蟲之存活率為試驗終點，其結果亦發現躍尾蟲之存活率對光照後之Pyrene明顯下降，證實Pyrene經光照後之毒性有明顯變強的趨勢。Greenberg et al.^[17]探討在UV光照射下PAHs的毒性，當PAHs吸收有效波長及紫外光線強度後，其毒性將較未照射前增強許多，導致在進行環境影響評估時容易低估PAHs之毒性。而Wiegman

et al.^[68]將含氮取代基之NAPHs對鞭毛藻進行實驗亦發現光照後EC₅₀值下降許多；其他如Djoma et al.^[69]以一系列之PAHs對柵狀藻(*Scenedesmus subspicatus*)進行光照前後毒性試驗亦發現其EC₅₀、EC₁₀及NOEC皆有明顯之下降；而關於脊椎動物的相關研究方面，Monson et al.^[70]以Fluoranthene對青蛙進行光毒試驗亦發現在高強度之UV光照射下其毒性明顯增強而產生光誘導毒性。

Oris and Giesy^[18]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^[19]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。



2.6 QSAR 預測光毒及其機制

2.6.1 QSAR 基本理論

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 模式最早應用於藥物學，以研究發展更有效、副作用小的藥物，其利用化學物質的物理或化學性質來推測描述其生化活性的大小，了解化學物質對生物體生化活動造成干擾程度，於 1970 年代被引入了環境的領域之中，使用的時機為實驗數據缺乏時，用以預測毒性。

環境毒理學家著重在有機物之毒性及其對於生物活動之抑制性；生態學家及環境工程師則是著重在有機物之分解過程及其對環境生態之影響。當QSAR預測的毒性和實驗所得的結果相差在一個order內，則預測模式可達到相當準確性(accuracy)^[21]。本研究實驗所得到的EC₅₀值將會與QSAR模式所得之預測值進行比較分析，觀察所得迴歸式可接受與否。

2.6.2 QSAR 預測 PAHs 光毒

回顧以QSAR預測PAHs光毒性之文獻，首先探討Mekenyan^[22]以水生物種水蚤(*Daphnia magna*)進行毒性試驗，水蚤的ALT(median adjusted lethal time,LT₅₀)半致死時間為試驗終點。利用電腦軟體(MOPAC6)可求出最高佔用分子軌域及最低未佔用分子軌域之能量差(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較域所需的能量。將實驗結果利用Log(1/ALT)及HOMO-LUMO gap(eV)此兩參數進行迴歸，發現兩者呈現鐘型曲線關係，結果並發現PAHs之HOMO-LUMO gap為6.7~7.5ev時PAHs將顯現出光誘導毒性，此具光毒性之範圍稱之為”phototoxicity window”，在此範圍之內之PAHs即可預測其具有光誘導毒性，而此範圍之外則無光誘導毒性。(見圖 2.6.1)

Vieth et al.^[23]分別針對三個不同之HOMO-LUMO gap區間之PAHs毒物選擇Pyrene及Anthracene(6.7~7.5ev具光毒)、phenanthrene and fluorene(>8.2ev不具光毒)、perylene and benzo[b]anthracene(<6.7eV不具光毒)，以methyl, n-butyl, tertiary butyl, ethylene, propylene, nitro....等取代基進行PAHs取代後實驗以分析各種PAHs經不同之取代基取代後其HOMO-LUMO gap之變化以探討該取代基是否影響PAHs之gap差值進而影響其在光毒鐘型曲線中所定義之光毒性。將由不同取代基取代後之PAHs利用MOPAC 6 程式計算其取代後之HOMO-LUMO gap差值，結果發現Alkyl 及 hydroxy這兩種取代基對PAHs之HOMO-LUMO gap 並無顯著的影響，Nitro,alkene以及 chloro此三種取代基對PAHs之HOMO-LUMO gap 有明顯的

影響；單一取代基之PAHs衍生物其HOMO-LUMO gap之最大減少量為 0.42ev，而雙重取代基則為 0.74ev。Vieth [23] 並建議如果照射的光線含有更多的UV-B，則光毒鐘曲線之phototoxicity window範圍應該要增加。

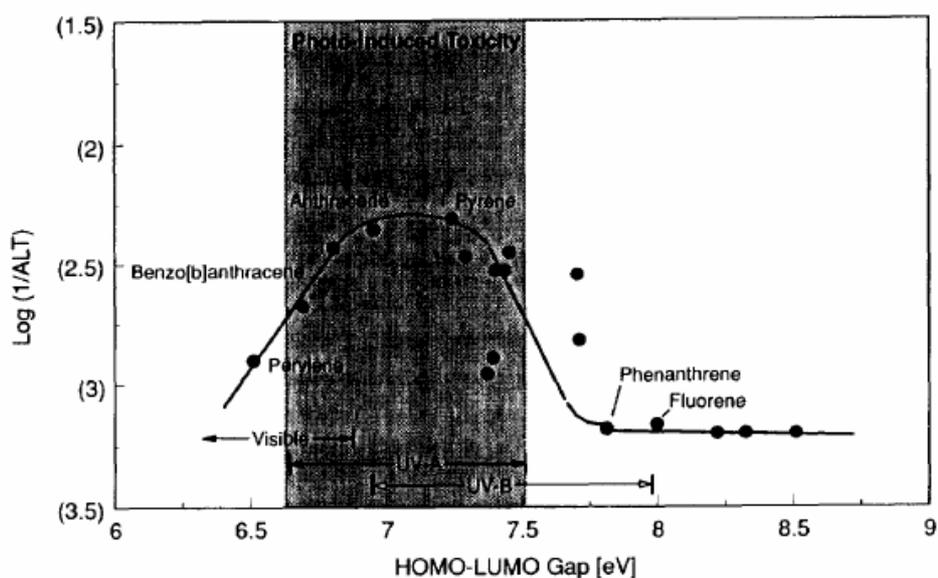


圖 2.6.1 由Mekenyan定義之光毒鐘型曲線

Ankley [24] 針對 α -三硫多環化合物及甲苯的取代基衍生物，以蚊子幼蟲及草蝦為測試物種，分別在有紫外線照射及無光照實驗條件下，得出其光照前和照光後之半致死濃度 (lethal concentration at 50%, LC_{50})。利用 $\text{Log}(\text{黑暗}LC_{50}/\text{照光}LC_{50})$ 及HOMO-LUMO gap此兩參數進行迴歸，結果發現在HOMO-LUMO gap為7.1~7.5eV時具光誘導毒性，其結果與Mekenyan [22]所作之PAHs光毒預測結果相近。除此之外，Fabiana [58]將由Newsted and Giesy [71]研究中所得到之17種PAHs對水蚤(*Daphnia magna*)光毒試驗結果，同樣是以 LT_{50} 半致死時間為試驗終點與 Δ GAP進行迴歸，結果顯示HOMO-LUMO gap在6.5~7.9eV時具光毒性，其範圍涵蓋Mekenyan所定義之光毒預測範圍並較其廣許多。

表 2.6.1 文獻中QSAR預測光毒性之比較

研究者	Mekenyan (1994)	Ankley (1995)	Fabiana (2005)
測試物種	<i>Daphnia magna</i>	蚊子幼蟲及草蝦	<i>Daphnia magna</i>
試驗終點	ALT(半致死時間)	Dark/Light LC ₅₀ Ratio	ALT(半致死時間)
試驗毒物	2~6 環一系列之PAHs 毒物	α -三硫多環化合物 及甲苯取代基衍生物	3-5 環一系列之PAHs 毒物
試驗時間	48hr	96hr	48hr
光照條件	UVA(345-400nm) UVB(235-345nm) Visible(400-700nm)	UVA (345-400nm)	UVA(345-400nm) UVB(235-345nm) Visible(400-700nm)
試驗結果 (HOMO-LUMO GAP)	6.7~7.5ev 具光毒性	7.1~7.5ev 具光毒性	6.5~7.9ev 具光毒性

2.7 藻類毒性試驗

2.7.1 藻類毒性試驗標準方法

藻類毒性試驗方法已發展多年，例如U.S. EPA 所採用的 "Fresh water algae acute toxicity test"^[25]、OECD 所採用的 "Algal growth inhibition test guideline"^[44]、ISO 所採用的 "Water quality-algal growth inhibition test"^[45]、APHA 所採用的 "Toxicity testing with phyto- plankton"^[46]及ASTM 所採用 "Standard Guide for Conducting Static 96-h Toxicity Tests with Microalgae"^[47]等。



2.7.2 連續式、批次式與密閉式藻類毒性試驗

現今的藻類毒性試驗可分以下兩種：

(1)批次式：目前已有的標準藻類毒性試驗方法多為批次式的，批次式藻類毒性試驗是藻類暴露於毒性物質一段時間，再測其試驗終點並與無暴露之控制組進行比較分析。整個實驗過程中沒有新鮮基質的加入，也沒有藻類之代謝物移出，實驗期間藻類經歷了完整的成長週期，遲滯期（lag phase）、指數生長期（exponential phase）、穩定期（stationary phase）及死亡期（death phase）。而其標準試驗方法可採用U.S. EPA所制定之“Fresh Algal Acute Toxicity Test”^[25]。

批次式藻類毒性試驗具有技術簡便、成本低、樣品處理量大、實驗數據取得容易等優點，因此經常被採用。不過以批次式培養方式進行實驗，仍然存在許多缺點。例如在批次式系統中，為了確保藻類生長，大多使用高於自然水體甚多的營養鹽濃度，根據 Chen^[26]的理論，如此將會影響

藻類對毒性物質的容忍度，亦會造成pH的改變，也無法反應自然水體真實狀況。其次，批次式培養因為無新鮮基質的加入而導致營養鹽濃度會隨時間拉長而消耗，以致實驗後期逐漸產生營養鹽匱乏之情形，且代謝物累積無法移出，亦會對後續毒性試驗產生影響。另外，批次式毒性試驗結果具再現性不佳之缺點。

(2)連續式: 連續式藻類毒性試驗則是在培養系統中，連續供應新鮮的營養鹽至反應槽中，並持續的將槽中的新陳代謝物排出，故藻類能保持在最佳的生長狀態。因為低濃度的營養鹽不斷注入系統中，所加入之營養鹽與藻類生長產生一動力平衡，故此系統也較接近自然水體。可是，由於連續式藻類毒性試驗系統欲達平衡(Steady State)時，需要一段相當的時間，且每進行完實驗即需重新培養，相當的耗費人力、物力及時間，所以目前尚未有標準的試驗方法建立。

Chen and Lin ^[27]以Chemostat 系統為基礎，發展出一套兼具實用性、敏感性及簡便性的藻類毒性試驗法。其使用連續式藻類培養之方法，利用四公升的連續式母槽培養藻類，在培養過程中不斷有新鮮基質流入，藻類之代謝物亦可流出，將使母槽內之藻細胞更為健康穩定，待系統達到穩定後，即可由母槽中取出藻液進行毒性試驗而不會污染到母槽，並將毒性試驗時間縮短為 48 小時，大大增加試驗的頻率，也因而改善批次式培養中藻類代謝物之累積，並更能模擬自然水體之環境。

Chen and Huang ^[28]利用連續式的藻類培養方法，配合BOD瓶發展出 48 小時的批次式BOD瓶藻類毒性試驗，將藻類、營養基質和試驗毒物加入 300mL的BOD瓶，然後蓋子密封做密閉式毒性試驗，讓藻類與毒性物質接觸 48 小時後，由觀測終點量測實驗組與控制組(不加毒物)的抑制情形並進行比較分析。整個實驗過程中沒有新鮮基質的加入，也沒有藻類之代謝物移出，屬於批次式毒性試驗，在操作更加簡單，在時間與成本的耗費也大幅減少，且可處理較大量的樣品數、實驗數據取得容易，所以相對了提高

實驗的再現性。因此本研究採用”連續式藻液培養配合批次式^[29,30,31]毒性試驗”之方式。

表 2.7.1 批次式與連續式藻類毒性試驗之優缺點比較^[49]

	優點	缺點
批次式	<ol style="list-style-type: none"> 1. 培養技術簡便且成本低 2. 樣品處理量大 3. 實驗數據取得容易 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 使用高於自然水體的營養鹽濃度 2. 無法反應自然水體之情況 3. 再現性不佳
連續式	<ol style="list-style-type: none"> 1. 符合自然水體情況 2. 實驗敏感度高 3. 代謝物不累積 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 設備組裝費時 2. 流量控制不易 3. 數據取得困難

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，但遇到屬於揮發性的化學物質時，卻有可能因實驗過程中的散失而造成毒物濃度上的誤差進而造成實驗結果之不精確。

為解決此問題，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.^[72]以封口膜覆蓋 250mL 的錐形瓶口，以瓶內空間比 1：4 為實驗設計，使用藻類 *Pseudokirchneriella subcapitata* 為測試物種對 PAHs 進行毒性試驗，在不同試驗時間、碳源、以及開放式系統和密閉式系統下。得到最佳試驗時間為 48hr 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。

Mayer et al.^[77]以 40ml 的玻璃瓶，以螺旋蓋調整實驗之 headspace，實驗設計為瓶內空間存放 10ml 基質及 30ml headspace，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，發現留有 head space 之密閉式系統加入無機碳源 HCO_3^- 相等於瓶中 headspace 的

2% CO₂。以藻類*Pseudokirchneriella 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 的密閉系統抑制率僅達到 19%，而開放式系統抑制率則僅僅為 14%，由此可知以完全密閉式系統可達最高之抑制率及最精準之實驗結果。

因此本實驗以 BOD 瓶進行完全密閉不留任何 head space 之密閉式藻類毒性試驗，以期有效的降低有機物揮發性所產生之實驗誤差，求得更精準之試驗數據。

本研究使用了具有密閉系統優點之 BOD 瓶進行毒性試驗。Lin et al. [78], Chen and Lin [79], and Chen et al. [80] 等以金屬及有機物，如：氯酚、腈類、醛類等利用此密閉式 BOD 瓶藻類毒性試驗系統針對氯酚、腈類、醛類等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，證明了本密閉式系統應用於揮發性有機物的適用性。



2.7.3 毒性試驗物種

標準試驗方法中所使用的毒性試驗物種種類很多，一般常見的試驗物種包含細菌 [32-33]、藻類 [34-36]、魚類 [37,38]、水蚤 [39,40] 等。一般來說，選擇受測物體之條件不外乎容易取得、容易觀察、生長期短、可以大量生長、培養簡單、具有地區代表性等等。

大部分的毒性試驗選擇以藻類為試驗物種的緣由如下：

- (1) 藻類在水生生態系統中是主要的生產者，且其處於食物鏈底部，若其遭到毒害，則會對水生系統之營養層級造成很大的影響 [41]。
- (2) 在毒性試驗過程中，由於藻類繁衍迅速，故試驗時間雖短，卻已歷經數個生命週期，因此試驗較不會受生物處於幼年期或衰老期之影響。

- (3) 相對於魚類及無脊椎動物試驗，藻類試驗有較佳的敏感度及較優的再現性。
- (4) 藻類培養及取得較其他物種容易，具低成本且可快速試驗優點，可以節省更多的時間與成本。

在本研究中，採用植物性浮游生物，月芽藻 (*Pseudokirchneriella subcapitata*)。月芽藻屬於綠藻綱 (Chlorophyceae)，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 $40-60\mu\text{m}^3$ ，其體型呈半月型。*Pseudokirchneriella subcapitata* 生長若有毒性物質侵害、營養鹽缺乏、光線或溫度不適等外在環境因子之影響時，外觀上藻液會由原先的綠色逐漸轉變成微黃色；若以顯微鏡觀察，則發現其細胞變得肥厚且半月型之彎曲度變小。同時體積及粒徑亦會有顯著之變化，小粒徑部份之藻類數量會減少而大粒徑部份則明顯增加。



2.7.4 藻類生長參數

批次式藻類毒性試驗常用的反應參數包括了有細胞密度 (cell density) 產氧量、葉綠素量 (chl-a) 及細胞平均體積 (Mean cell volume, MCV) 或總體積 (Total cell volume, TCV)、碳源攝取量、ATP 及 DNA 等等；。大部分的試驗標準方法，則常以產氧量^[42]及生物量來作為反應參數，由此來定義實驗中所用之藻類的生長情形及毒性效應。溶氧測定法是直接讀取藻液中 DO 值的上升變化量，擁有成本低廉、試驗時間短等優點。Ludyanskiy and Pasichny^[43]設計了一套半連續式的藻類毒性試驗系統，其系統中壓力與外界不斷的平衡，使的藻類行光合作用之速率不會因系統中溶氧值之改變而改變，而其試驗週期為 2 小時，但是因其系統設計複雜，需要操作技術高之研究人員。