

## 第四章、實驗設備與實驗方法

### 4.1 實驗設備及藥品

#### 1. 恆溫無塵室

恆溫無塵室大小約為五坪，其溫度控制在  $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ，保持恆溫，藻類培養、試驗皆在此溫控室內進行。

#### 2. 水質

實驗中清洗容器、器具之二次清洗水及藥品配製用水皆為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。使用時需確定水質之比電阻  $\geq 18.2 \text{ Megaohm}$  才可開始使用。

#### 3. 批次式培養器皿

以批次方式培養液態藻類時所使用之容器為 125ml, Erlenmeyer 之三角錐瓶。

#### 4. 培養裝置

培養裝置為自行裝配之培養箱，台面可依所需而更改、拆換，以角鋼為架構主體，長  $\times$  寬  $\times$  高為 135  $\times$  110  $\times$  135cm，頂面履以 120cm 長之白色螢光燈管 8 支，並設有迴轉式振盪混合器 (EIRSTEK 公司，型號 S103)，搖動速度可大於 100 rpm，其台面共有 112 個位置。培養設備置於恆溫室內，控制溫度在  $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 。作為藻類批次式培養與毒性試驗之用。

## 5. 瓶塞

使用脫脂棉加上消毒紗布，每次使用前需先經過滅菌斧殺菌。

## 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 18cm 之玻璃容器。於體積 4 公升處開口做為溢流口，並且於體積 2 公升處開一口做為取樣之用。母槽上方亦有兩開口，一作為營養基質流入口、另一作為空氣進流用。

## 7. 電磁攪拌器

其作用為使藻液與進流之營養基質、空氣混合均勻，並且避免藻類之沉澱。



## 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

所使用之曝氣幫浦為一般水族使用之曝氣幫浦。

## 11. 氣體流量計

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 250ml/min。

## 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 $\mu$ m 標準顆粒乳液來校正。配有 50 及 100 $\mu$ m 孔徑之玻璃管。本實驗使用 100 $\mu$ m 孔徑之玻璃管，量測之顆粒直徑範圍為 2 $\mu$ m~60 $\mu$ m

## 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 Se) 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

呼吸毒性試驗時使用之玻璃器皿。使用體積 300ml，直徑 8cm 之 BOD 玻璃瓶。上頭開口處有玻璃瓶塞，使其可以利用水封之形式，避免外

界氣體、物質等進入，而減少干擾。整個系統為一個封閉式系統。

## 16. 光度測定計

使用 TOPCON 產牌，型號 IM-2D，單位為 lux。

## 17. pH 測定儀

使用 Suntex 公司，型號 SP-7 之 pH 測定儀。其精確度為  $\pm 0.01$ 。

## 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 0.0~60.0mg/L，精準度為  $\pm 0.1\%$ 。



## 19. 曝氣用氣體鋼瓶

使用含 0.5%CO<sub>2</sub> 之高壓氮氣鋼瓶，氮氣之純度達 99.9%，總氣體體積為 6m<sup>3</sup>。用於降低營養基質中之溶氧值，並確保能提供足夠之碳源。鋼瓶上備有一流量計，曝氣時之曝器流量控制在 600ml/min。

## 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. 無菌操作台

使用造鑫公司製造的 Laminar Flow 操作台，內設有紫外光殺菌，以防止植種過程及配製營養鹽時受到污染。

## 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 Whirpool 之冰箱，其功用為維持藻種、藥品及營養鹽於 4°C 之下，以保存之。



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

## 25. 烘箱

使用 Memmet 公司之烘箱，做為烘乾玻璃器皿用。使用時溫度設為 52 ± 1°C，每次操作時間為 2 小時。

## 26. 分析天秤

量測藥品用，產牌 Precisa 205A，精確度至 0.01mg。

## 27. 定量吸管

使用 SOCOREX 公司，可調式移液器，容量為 100~1000 $\mu$ l 及 0.1~5 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 $\mu$ m 濾膜，過濾 Isoton II 時使用 60301 之 0.2 $\mu$ m 濾膜。

## 29. UV 紫外光燈

使用 8 watt 長型紫外線燈 with J138 Stand，可切換 365/302/254 三段波長，以便針對不同之 PAHs 光解所需之特定 UV-A 或 UV-B 波長進行照射，型號 UVLMS-38，115V/60Hz。

## 30. 紫外線強度測定儀

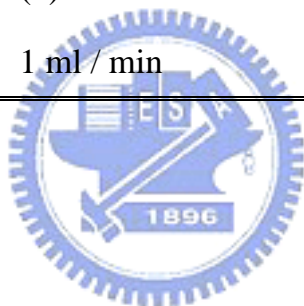
使用UVP公司生產的UVX Radiometer，測定強度範圍 0~20 Mw/cm<sup>2</sup>，有三種切換sensor，分別UVX-25、UVX-31 及UVX-36。

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

表 4.4.1 為 HPLC 設備與分析條件

表 4.1.1 HPLC 設備與分析條件

Item	型號與條件
HPLC	Waters 2487
Detector	Dual $\lambda$ Absorbance Detector 全波段偵測掃描
Pump	Waters 515
Column	(1) Waters PAH , 4.6 mm $\times$ 250 mm (2) Waters $\mu$ Bondapak , C <sub>18</sub> , 4.6 mm $\times$ 150 mm
Injection Volume	20 $\mu$ l
Mobile Phase	(1) Acetonitrile : Water = 50 : 50 (2) Methonal : Water = 70 : 30
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（*Pseudokirchneriella subcapitata*）。*Pseudokirchneriella 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，一般細胞體積為 40-60 $\mu\text{m}^3$ ，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。

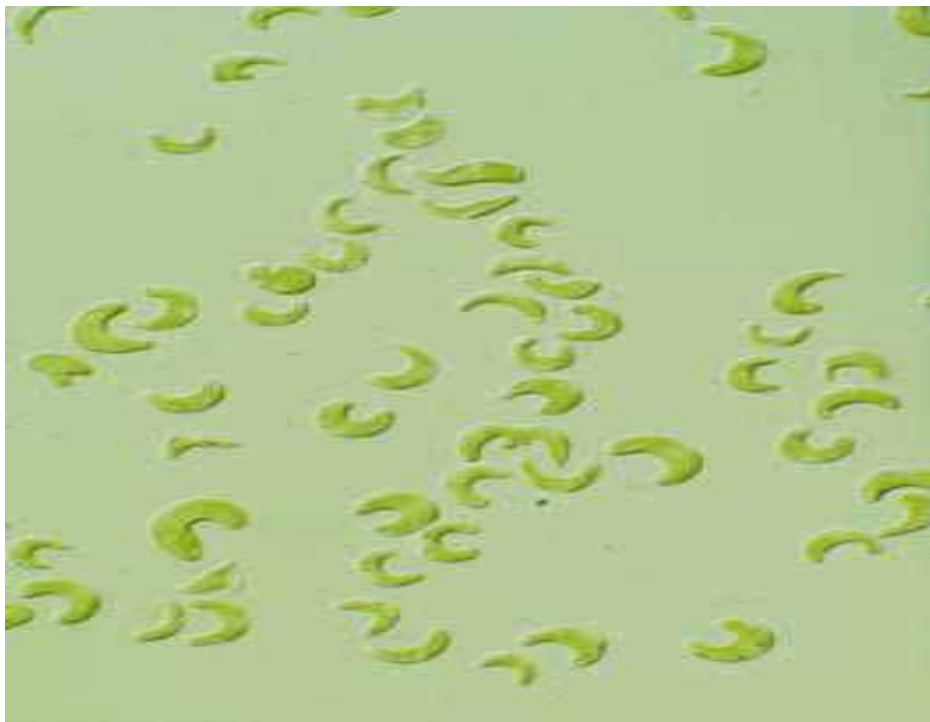


圖 4.2.1 月芽藻圖鑑



### 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<sup>[25]</sup> 使用之營養基質組成，配製方法如下：

將下列 (1) ~ (7) 的貯備液 (Stock Solution) 各加 1 ml 至含 900 ml 去離子水中，再稀釋至 1 公升。接著以 0.1 N 當量濃度的 NaOH 或 HCl 將營養基質之 pH 值調至  $7.50 \pm 0.10$ 。

(1) 硝酸鈉貯備液：溶解 12.750 g  $\text{NaNO}_3$  於 500 ml 去離子水。

(2) 氯化鎂貯備液：溶解 6.082 g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  於 500 ml 去離子水。

(3) 氯化鈣貯備液：溶解 2.205 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  於 500 ml 去離子水。

(4) 微營養鹽貯備液：溶解下列所有藥品於 500 ml 去離子水。

92.760 mg  $\text{H}_3\text{BO}_3$

0.714 mg  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

207.690 mg  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

3.630 mg  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

1.635 mg  $\text{ZnCl}_2$

0.006 mg  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

79.880 mg  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

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  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  於 500 ml 去離子水中。

(6) 磷酸氫二鉀貯備液：溶解 0.522 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  於 500 ml 去離子水中。

(7) 碳酸氫鈉貯備液：溶解 7.5 g  $\text{NaHCO}_3$  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  $0.45 \mu\text{m}$  的濾膜過濾，過濾滅菌後的營養基質須保存在  $4^\circ\text{C}$  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 <sub>3</sub>	25.5	N	4.2
NaHCO <sub>3</sub>	15.0	C	2.14
		Na	11.0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.04	P	0.186
		K	0.649
MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	14.7	S	1.91
MgCl <sub>2</sub>	5.7	Mg	2.9
CaCl <sub>2</sub> -2H <sub>2</sub> O	4.41	Ca	1.20

表 4.3.2 藻類營養基質之微量營養組成份

化合物	濃度 (µg/L)	元素	各元素實際濃度 (µg/L)
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	186	B	32.5
MnCl <sub>2</sub>	264	Mn	115
ZnCl <sub>2</sub>	3.27	Zn	1.57
CoCl <sub>2</sub>	0.780	Co	0.354
CuCl <sub>2</sub>	0.009	Cu	0.04
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> -2H <sub>2</sub> O	7.26	Mo	2.88
FeCl <sub>3</sub>	96.0	Fe	30.0
Na <sub>2</sub> EDTA-2H <sub>2</sub> O	300		

## 4.4 試驗毒物

本研究選擇了一系列 2~5 環之 PAHs 毒物，分別對其在 UV 燈光照前及光照後進行密閉式藻類毒性試驗，分析其光照前後之毒性差異進而判斷其光毒性，由於 PAHs 在水中的溶解度極低，所以本研究選用有機溶劑 DMSO(Dimethyl Sulfoxide)二甲亞砜作為 PAHs 之溶劑。所選定的 PAHs 藥品包含二環之 Naphthalene，三環之 Phenanthrene、Anthracene，四環之 Fluoranthene、Benzo[a]anthracene、Benzo[b]fluorine，五環之 Dibenzo[b,i]anthracene、Perylene、Benzo[b]chrysene，以及兩種 PAHs 取代基衍生物 Benzanthrone、Acridine.其物化特性參見表 2.1.1

## 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 ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 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  $52^\circ\text{C}$  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  $1.1\text{Kg}/\text{cm}^2$ 、 $121^\circ\text{C}$  的條件滅菌 15 分鐘 (定量瓶於泡酸液清洗完後，置於架上陰乾即可)。

### 2. 藻類之培養及保存


開始時先進行固態培養基的培養，固態培養基組成和液態培養基相同但加 1% 之洋菜膠(Agar)，通常可保存約 6 個月(在  $4^\circ\text{C}$  下)。藻類每四個星期移植至新的培養皿以保持菌種的健康。另外也做液態培養基的培養，

通常可保存 4 個星期(4 °C 下)，四個星期後繼續做移植以保存菌種。

### 3. ISOTON II 之配製及電子顆粒計數器之操作

ISOTON II 之作用主要是作為電子顆粒計數器之導電溶液，也就是說，電子顆粒計數器中所用之溶液皆為 ISOTON II。ISOTON II 的配製比例為 1 公升的超純水中加入 10g 氯化鈉 (NaCl)，攪拌使其混合均勻，然後以電導計測量其導電度，所需要之導電度為 17mmho。若是導電度低於 17mmho，則再慢慢加入氯化鈉，攪拌均勻，直到導電度為 17mmho；相反的，如果導電度超過了 17mmho，則慢慢加入超純水，攪拌均勻，直到導電度降至 17mmho。待導電度達 17mmho 後再以 0.2 $\mu$ m 之濾膜過濾此溶液，其濾液即是我們所要之 ISOTON II 溶液，以顆粒計數器量測到之食鹽顆粒數空白值須小於 200。

#### 電子顆粒計數法及操作原理:



電子顆粒計數器在使用前須先暖機約半小時以使機器內之管路可抽至真空狀態，使用前後皆須流洗管路，並補充上方之 300ml ISOTON 抽取溶液。在電子顆粒計數器內有一根玻璃管，操作中需浸入含有 Isoton 稀釋樣品的燒杯中。而在玻璃管近底端的側面具有半透膜的精密小圓孔，用以吸取水樣。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，其干擾正比於每個顆粒的大小。所產生的電阻則由示波器的波峰顯示，其高度正比於顆粒的多少，個別的脈衝數由電子數位器直接記錄顯示。而水樣在量測的過程須加以攪拌以使顆粒均勻分佈。電子顆粒計數法適用於單顆粒藻類之計數，如 *Raphidocelis subcapitata*。電子顆粒計數器主要條件設定如下表 4.4。本實驗採用 50  $\mu$ m 孔徑之毛細玻璃管，其設定之量測粒徑上下限為 2.622  $\mu$ m 至 30  $\mu$ m。量測時，所取之藻液量依生長情形而定，若藻液色澤較深時則取 1 ml，若藻液色澤較淺則取 5 ml，放入 50 ml 之量瓶內，再加入 Isoton 至 50 ml。將

之倒入燒杯，放進顆粒計數器內量測。以顯示之讀數值扣除空白顆粒數之數值(純 Isoton 之背景值)，連續三次其值相差在 2 % 者之平均值為量測值。

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)	10mA
極性 (Polarity)	+
電流 (Currents , I)	100
粒度下限 (Diameter Lower Threshold , Tl)	2.622 $\mu$ m
粒度上限 (Diameter Lower Threshold , Tu)	30 $\mu$ m
脈衝衰減倍率 (Attenuation , A)	1
脈衝放大倍率 (Preset Gain)	1
警戒粒徑限度 (Alarm Threshold)	OFF
分析量	500 $\mu$ L

#### 4. 盤面光度之調整

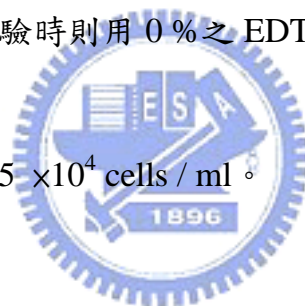
使用單面為白色亮面具反射光線效果之木板和錫箔紙，組裝於震盪器四周，調整木板大小及形狀，使整個震盪器盤面之光度落在  $64.5 \pm 10\% \mu \text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  之範圍內，以減少實驗之誤差。

## 4.6 實驗條件之控制與處理組濃度之訂定

### 1. 實驗條件之控制

本實驗條件是依據Lin<sup>[13]</sup>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  $24 \pm 1$  °C下進行。
2. 光度：藻類之培養及毒性試驗皆在光度為  $64.5 \pm 10\% \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ 下進行，所使用之光源為連續白冷光。
3. 氮、磷濃度：培養藻類時使用一半之濃度，毒性試驗時則不變。
4.  $\text{HCO}_3$ 濃度：原濃度不變。
5. pH：初始 pH 為  $7.5 \pm 0.1$ 。
6. EDTA 含量：100% 是使用於活化藻類時，而在連續式母槽中培養藻類時使用 10 %，進行實驗時則用 0 %之 EDTA 貯備液。
7. 試驗時間：48 小時。
8. 藻類初始植種密度： $1.5 \times 10^4$  cells / ml。



### 2. 處理組濃度之訂定

毒性試驗進行前須先訂定處理組之濃度，即進行range finding實驗。以文獻上所查得之不同PAHs 藻類毒性試驗 $\text{EC}_{50}$ 值為基準，由此參考之 $\text{EC}_{50}$ 濃度往上及往下各取 4~5 個濃度，一開始所取之各濃度間隔可以較大以利求出整個抑制範圍，待毒性試驗結束得到實驗結果後，根據各濃度之抑制率與劑量反應曲線圖再調整並縮小所取之處理組濃度範圍，若所取之濃度範圍仍未達所要求之抑制範圍則需繼續進行range finding試驗直至所取之處理組濃度在三種試驗終點下對藻類之抑制率均勻分布在 0~100%抑制範圍為止。如此即可求得最終之處理組濃度並根據其結果帶入模式中計算出 $\text{EC}_{50}$ 與其他相關數值。



## 4.7 實驗步驟

### 4.7.1 連續式母槽之培養

本實驗選擇以連續式母槽培養方法配合批次式藻類毒性試驗，以下將介紹連續式母槽培養之方法與步驟。

#### 1.連續式藻類培養之步驟如下：

- (1) 接種環以酒精燈滅菌後，刮取固態培養基上之藻種些許，將其放入 250 ml 錐形瓶中加入基質（含 100% EDTA）至 100ml，錐形瓶瓶口封上滅菌紗布後放到震盪器上震盪以活化藻類。
- (2) 當 250 ml 錐形瓶中之瓶藻類生長至一定大小(顏色明顯變綠)時，將之倒入 1000 ml 錐形瓶中加入 900ml 基質培養。
- (3) 當 1000 ml 錐形瓶中之藻類生長至一定數目時即可將之到入 5 公升之連續式培養母槽中，並加入 3 公升之基質。通常 2~3 天後藻細胞數目達到一定數目後即可開始入流新鮮基質。
- (4) 每日皆需配製約 1~2 公升新鮮之基質（含 10% EDTA）以提供藻類充足之養份，確實測量溢流率以調整 pump 進流速度至液流率為 1000ml/day 為準，並每日量測連續式培養母槽中藻細胞之細胞密度（Cell Density）、平均細胞體積（Mean Cell Volume）以了解藻類之生長情況。
- (5) 當母槽之 Cell Density 達到  $1.7\sim 2.2 \times 10^6$  cells/ml，MCV 值達到 39~46 時即可自母槽取出藻液開始進行毒性試驗。

## 2. 藻類培養環境設計如下：

5 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  $250 \text{ ml/min}$ ，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。

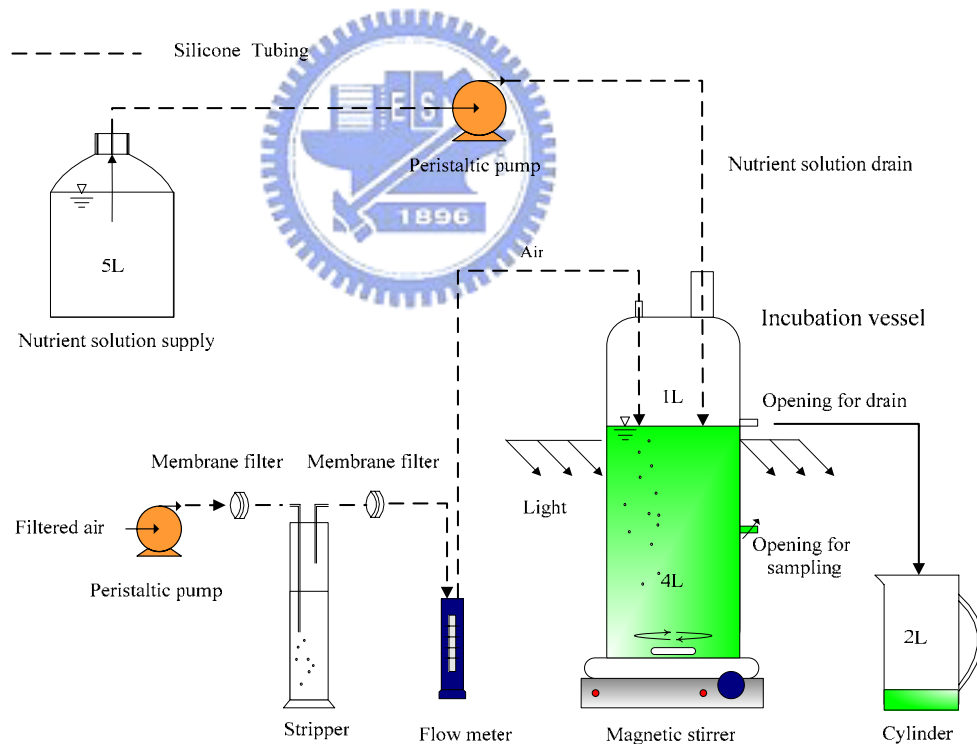


圖 4.7.1 連續式藻類培養裝置圖



## 4.7.2 藻類毒性試驗

當母槽之顆粒數達到  $1.7\sim 2.2 \times 10^6$  cells/ml，MCV(平均細胞體積)約 39~46 之間，即處於對數生長期時，即可自母槽取出藻液來進行毒性試驗。毒性試驗所加入之營養基質參考U.S. EPA<sup>[25]</sup> 之標準方法。試驗步驟如下：

- (1) 將自行設計之 10L純水曝氣設備內裝一定量之純水，接下來以二氧化碳 (CO<sub>2</sub>) 及氮氣 (N<sub>2</sub>) 之混合氣進行曝氣約十五分鐘，曝氣步驟可以降低營養基質中之溶氧值使初始溶氧降低至 1.0 mg/l上下並增加其CO<sub>2</sub> 濃度。
- (2) 由母槽所測得之藻細胞數換算得到欲使每個BOD瓶初始細胞密度為  $1.5 \times 10^4$  cells/ml所需加之藻液量，隨後自培養母槽中取出適量之藻液，分別加入各個BOD瓶內。隨後加入曝氣好之純水，然後逐瓶加入所需之營養基質和不同體積的毒性物質以達到所需的濃度。之後一一測量每個BOD瓶之初始溶氧值並紀錄之，BOD瓶測完溶氧後以瓶蓋進密封以達到水封之目的，然後將BOD瓶置於震盪器上震盪 48 小時。實驗條件控制在溫度  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ，光照來自於上方平行照射，強度為  $64.5 \pm 10\% \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ 之白冷光燈，震盪頻率為 100rpm。
- (3) 於 48 個小時後BOD瓶自震盪器上取下，隨後量測各個BOD瓶中之最終溶氧值 (Final DO, DO<sub>f</sub>)。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 ( $\Delta\text{DO}$ )
- (4) 測完溶氧後接著利用顆粒計數器測量每個 BOD 瓶的藻類細胞密度。
- (5) 透過劑量反應關係模式之分析可以得到以淨溶氧差值 ( $\Delta\text{DO}$ ) 以及藻細胞密度為試驗終點之EC<sub>50</sub>值，並可以得到毒性物質與藻類之劑量反應關係圖。
- (6) 每次實驗一組八瓶，進行三重複實驗。每組之第一瓶為控制組，不加

入任何毒性物質。

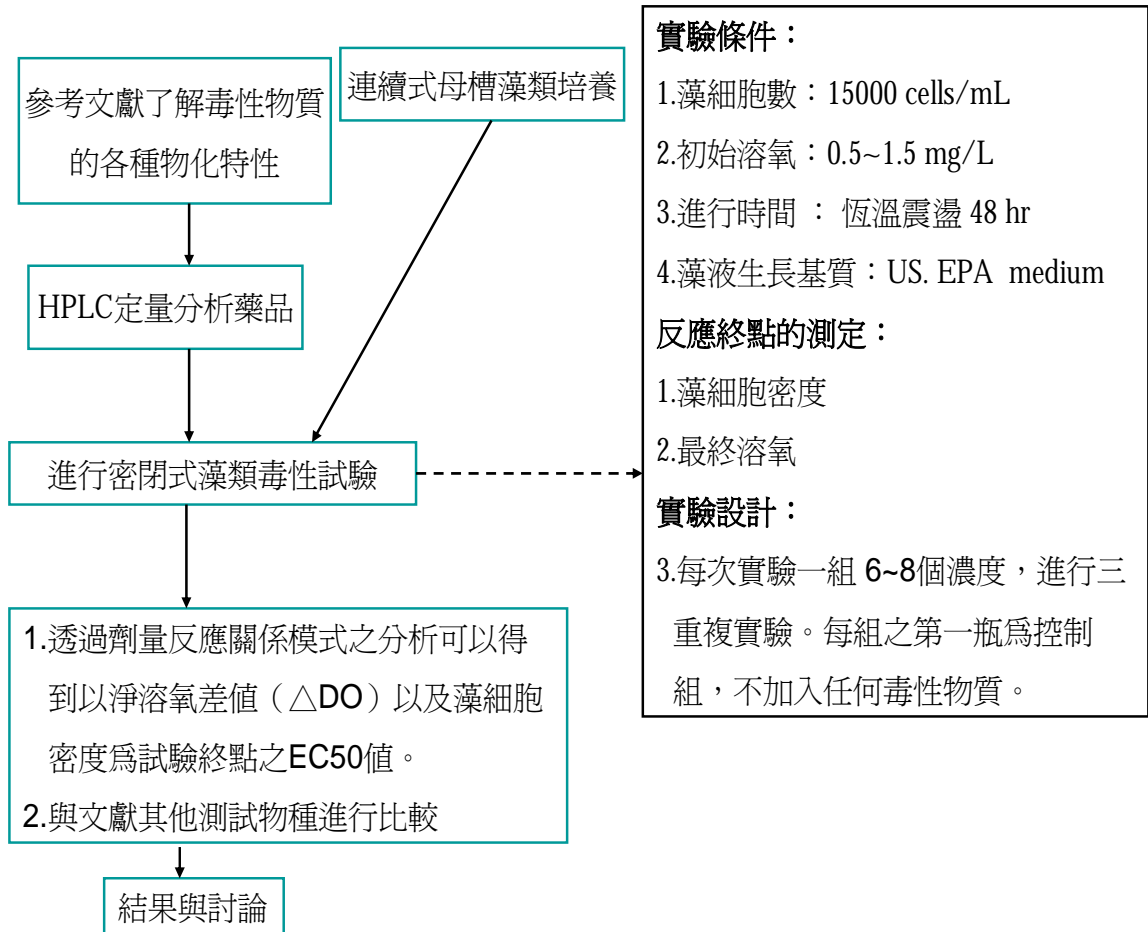


圖 4.7.2 藻類毒性試驗流程圖

### 4.7.3 HPLC 分析方法

HPLC進行分析前後都須以流洗液流洗管線約 30 分鐘，不同的分析物質需調配不同成分的移動相；本研究選擇甲醇及水進行調配，流洗液為甲醇和水以 50/50 比例混合，移動相為甲醇和水以 70/30 比例混合，利用電腦可自動控制溶液抽取比例及流速，進行樣品定量分析時流率為 1 ml/min。分析使用的層析管柱為C<sub>18</sub>逆相分離管柱(reverse-phase column)，

直徑 4.6mm，長度為 150mm。偵測器為紫外線可見光全波段偵測器 (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 $\mu$ L，定量分析時間為 10-60 分鐘。HPLC分析流程圖 4.7.3。

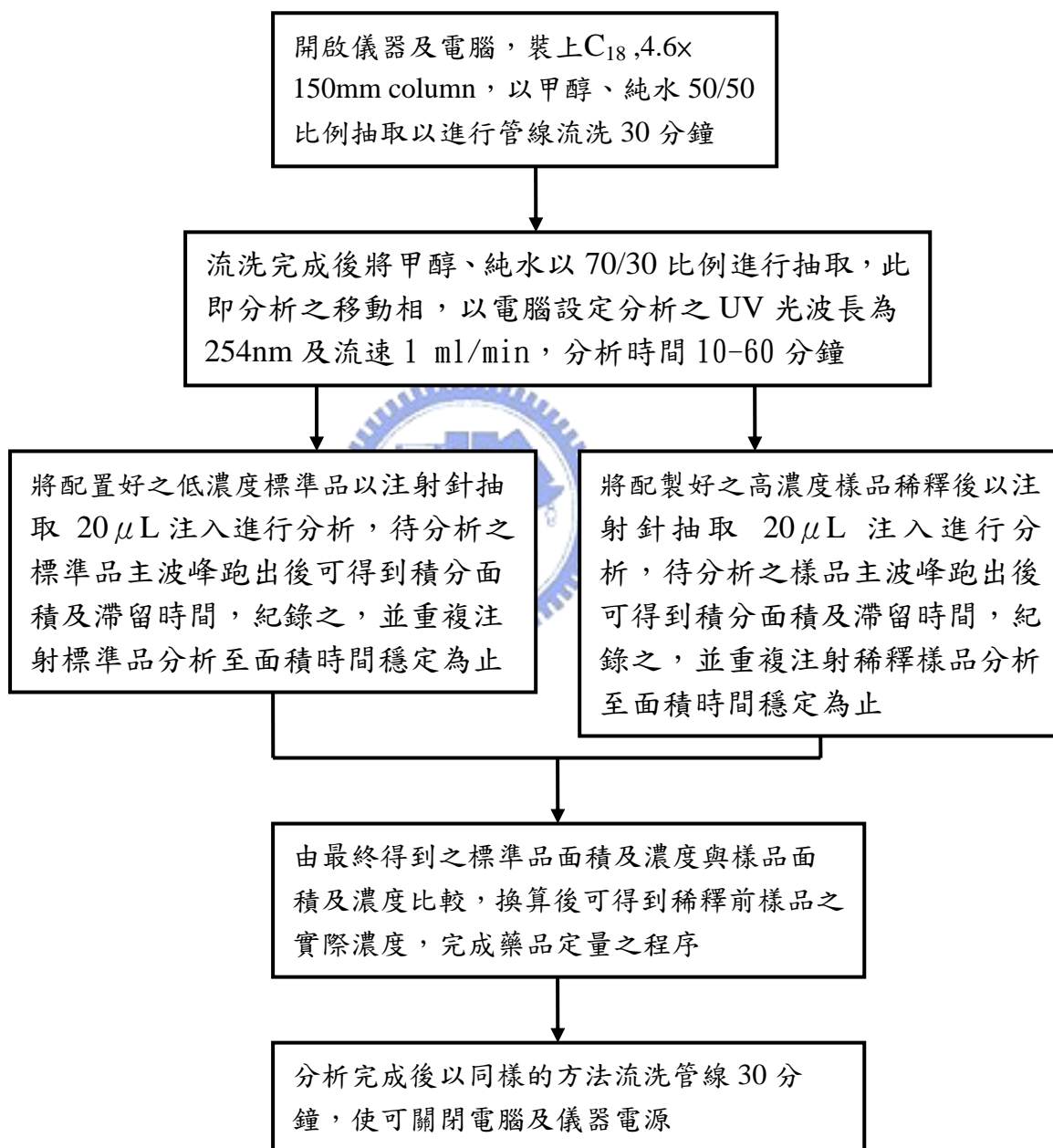


圖 4.7.3 HPLC 分析流程

## 4.8 光照條件設計

本研究是將 11 種 PAHs 進行光照前後藻類毒性試驗，而 UV 光種類及光照時間則是由文獻上查得不同化合物適合之光照條件進行光照，本研究 11 種 PAHs 適合之 UV 光種類請參考表 2.1.1；一般而言環數越高之 PAHs 由於結構較穩定因此其光降解所需之光照時間較長，本研究參考文獻上之光照實驗設計條件是以兩環 1~2 天，三環 2~3 天，四環 3~4 天、五環 4~5 天進行光照時間設計。

Hsu<sup>[55]</sup>的研究中指出低濃度之 PAHs 光降解速率較快，經過本研究測試後得到 PAHs 化合物濃度為 5ppm 時光解速率較快且接近 HPLC 之偵測極限，因此本研究訂定 5ppm 為光照濃度。光照前先將定量好之化合物濃度以 20ml 試管稀釋至 5ppm，再以 HPLC 分析光照前波峰分佈情形並記錄其面積與滯留時間，隨後將試管放到 UV 紫外光燈下並以鋁薄紙箱罩住以保持穩定之光照強度。而光照之強度經過紫外線強度測定儀分析後，UVA 光照強度為  $1060 \mu W/cm^2$ ；UVB 為  $2000 \mu W/cm^2$ 。光照完成後同樣以 HPLC 分析光照後化合物及光解產物波峰分佈情形並記錄其面積與滯留時間，隨後比較光照前後分析圖譜之差異性進而討論其光解程度。

## 4.9 溶氧測定儀之使用與校正

本研究以溶氧為試驗終點時需記錄實驗之初始溶氧與 48 小時恆溫震盪實驗後之最終溶氧，進而將溶氧增加量與控制組比較計算出不同處理濃度之抑制率。而在水中的溶氧量主要是以溶氧測定儀(DO Meter)進行測定，其可偵測溶氧範圍為 0.0~60.0mg/L，使用之前須先將其偵測頭以去離子水沖洗充分濕潤後，放置一段時間觀測其在空氣中之飽和溶氧量是否為 8.5 mg/L 上下，若其值相去甚遠則需進行校正，校正方法為設定儀器之相對溼度為 100%、大氣壓 760 mm-Hg 後待其值穩定則可開始偵測溶氧，若仍然不穩定則需添加 3M 氯化鉀電解質溶液至偵測頭薄膜中，或進行 CLARK-TYPE 薄膜之更換。進行實驗時由濃度低之處理組依序測到濃度高之處理組，以免偵測頭吸附高濃度之毒物而影響低濃度之處理組造成實驗誤差；而測定 48 小時之最終溶氧量時則須由高濃度處理組測至低濃度處理組以提高儀器之敏感度。當實驗結束後須以去離子水沖洗偵測頭以去除吸附其上之毒性物質並將之輕輕甩乾。

