

第一章、緒論

1.1 研究緣起

在二十一世紀的今日，人類於科技上的研發逐漸日新月異，因此於生活品質或是工商發展能力也是相對的大大的提昇，所造成之污染物及污染量也更為之驚人，也由於此一因素使得造成生態環境的衝擊更勝於以往。現今一般家庭污水、事業廢水、地面水和地下水等一般水體大多含有毒性有機或無機之物質，而所含之毒性物質其種類更為之複雜，其中亦包含有高毒性之化合物，即使暴露於相當低濃度之環境中也都會對生物造成明顯的毒性危害。

醛類化合物能對人體造成傷害，如為氣體時會對眼睛、皮膚產生刺激性的傷害。若為水體中之化學物質時，則會對身體組織產生致毒性及致突變性，更進一步會使體內組織產生病變，如腫瘤、癌症^{[1][2]}。此外，由於醛類化合物為生物親電性 (bioreactive electrophiles) 物質，此一親電性反應機制會使的該物質毒性皆比極性(polar)與非極性(non-polar)物質擁有更高之毒性^[3]，因此對環境生態的危害也更為之明顯。

苯甲醛及其衍生物(benzaldehyde derivatives),被廣泛用於合成農藥之藥劑或是合成中所產生之中間物。此外，水處理程序中之消毒處理或含苯類之物質經不當燃燒和氧化不完全時皆有可能會產生苯甲醛及其衍生物^{[4][5][6]}，因此當其排放於自然水體時即會造成水系生態之危害。由鑑於此，對於該類毒物之環境行為及生態影響必須進行生物毒性試驗，以了解造成毒性之方式進而加以控制，使其減低對生態所產生之危害。

生物毒性試驗中，美國使用之毒性試驗生物以水蚤(*Daphnia*)為最普

遍，約佔48%；其次為小鱸魚(*Fathead minnow*)，約佔26%，其中藻類也是一種被廣泛用於毒性試驗之物種之一。藻類屬於食物鏈的最底層，當水中之毒性物質對藻類造成毒性傷害時，經由食物鏈的傳遞，同時也會對其他物種造成影響。本次實驗採用的則是浮游植物-月芽藻(*Pseudokirchneriella subcapitata*; previously named *Raphidocelis subcapitata* and *Selenastrum capricornutum*)，其優點為簡單、快速、便宜且敏感皆高於其他試驗物種之外，藻類繁衍迅速，生命週期短暫，於試驗期間幼年或是老年對毒性物質不同忍耐力之影響亦會較小。由上述之各項優點皆可說明以藻類作為毒性測試物種是十分適合的。

對於許多複雜及不同結構之化學物質，由於種類繁多且數量龐大之因素，我們可能無法針對所有化學物質進行完整之毒性分析。因此環境毒物學則引用醫學、製藥工業經常使用的定量-結構反應關係(Quantitative Structure-Activity Relationships; QSARs)預測單一有機化學物質之毒性大小及可能造成毒性之原因。此外，由於 QSARs 可以簡單而迅速的推估出同類有機物質之毒性，不僅節省許多經費，亦省下許多的時間以及人力。

在 QSARs 模式中，大都以辛醇-水係數(The logarithm of 1-octanol/water partition coefficient; $\log K_{ow}$ or $\log P$)做為參數，而 Xiaodong *et al.*^[7] 指出 $\log K_{ow}$ 為說明物質疏水性(hydrophobicity)之特性，而疏水性即是植物毒性研究中最重要之參數之一。

本研究利用藻類毒性試驗方法，利用實驗結果及相關參數所建構之 QSARs 進行生物反應性有機毒物(苯甲醛及其衍生物)之毒性分析，探討不同結構及作用機制下所可能發生之毒性效應及特性。

1.2 研究目的

1. 台灣地區由於山坡陡峻，以及颱風豪雨雨勢急促，大部分的降雨量皆迅速流入海洋。此外，由於降雨量在地域、季節分佈極不平均，所以也容易造成乾旱之現象，因此更可得知水資源之重要性。在此微量的可用水資源中如又受到污染物之排放而造成污染的話，其對人類及生態皆會產生莫大的危害及衝擊。有鑒於此，藉由藻類毒性實驗可反應出水體污染之程度，也可做為毒性資料庫之數據以利建構更完善之毒性評估。
2. 由於苯甲醛為醛類化合物，因此毒性反應機制與醛類化合物相同皆為生物親電性，其毒性皆比基線毒性(baseline toxicity)高，此外，藉由各種物理化學參數與藻類毒性實驗所得之 $\log(1/EC_{50})$ 進行回歸分析，以得知不同參數與毒性之回歸結果，進而可預測在不同毒性機制下，受測有機物之毒性。
3. 由於有機苯甲醛類大多具有揮發或半揮發之性質，因此本研究是以連續培養，批次實驗之密閉式藻類毒性實驗方式，此方式由於可減少毒物揮發進而可提高毒性實驗之準確性。再以月芽藻的細胞密度及溶氧變化作為反應終點，觀察有機苯甲醛類對月芽藻所造成之毒性影響，最終再藉由 Probit 模式求出苯甲醛類所造成之 EC_{50} 。
4. 利用毒性實驗結果與以 $\log K_{ow}$ 等物化參數所建構之 QSAR 進行回歸，進而觀察相似結構之苯甲醛類，所產生之毒性效應與其彼此之間之關連性，並參考文獻中以其他物種所得之毒性結果進行比較，討論彼此之間的敏感性。

1.3 研究方法及架構

實驗首先是由參考文獻中收集相關資料及數據，經確定實驗毒物之後，將所選定之毒性物質之物化資料及研究文獻進行更進一步之整理，再建構實驗目的、實驗方法及實驗結果分析以完成毒性實驗。

本研究是以密閉式藻類毒性實驗，採連續培養、批次實驗之方式進行，再將實驗結果之數據以 Probit 模式分析求得 EC_{50} 值及劑量反應曲線 (dose-response curve)。最終再將實驗所得之結果進行更進一步之討論並提出本研究之結論。

整體實驗過程之架構由圖 1.3.1 表示。



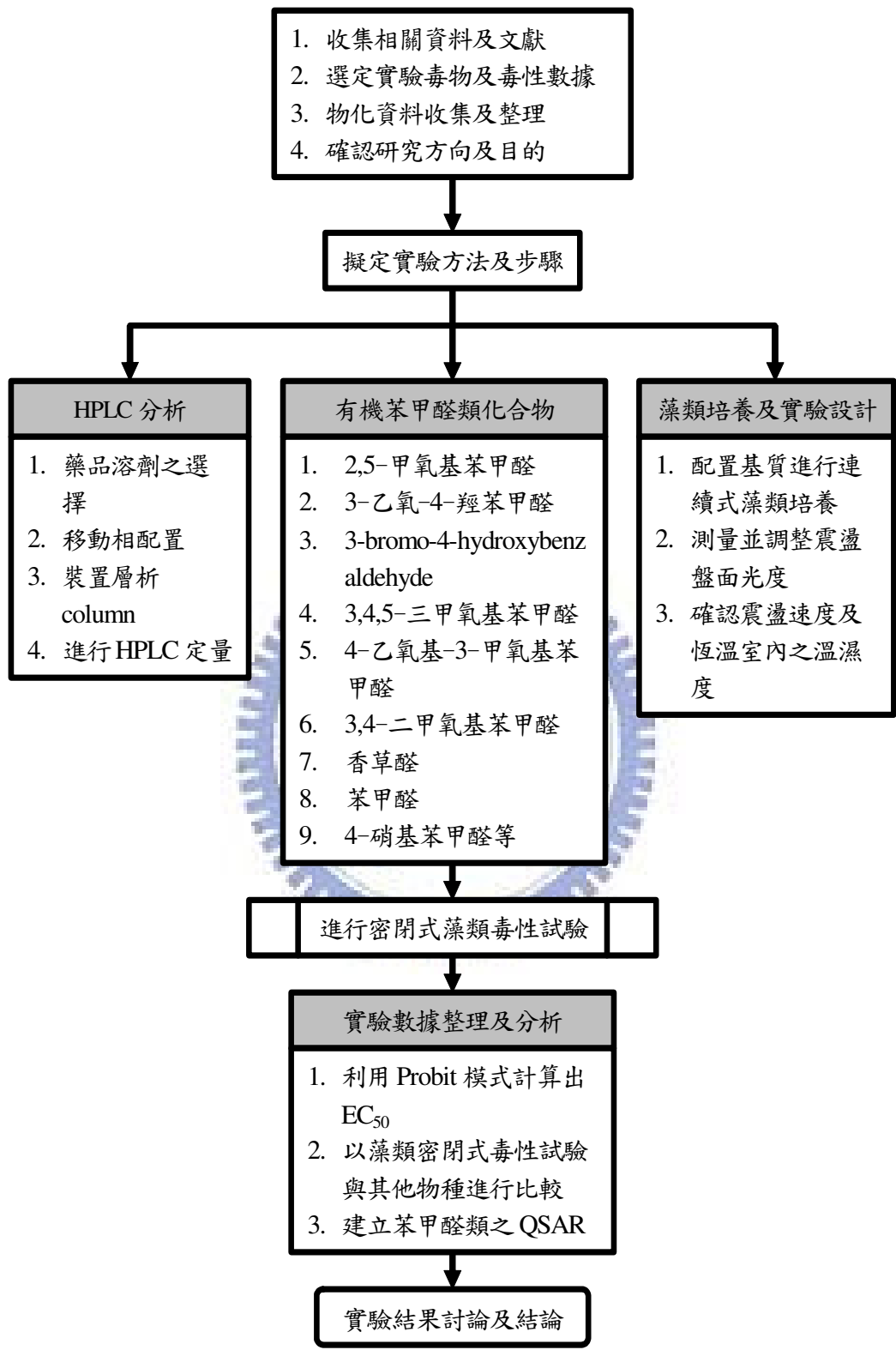


Fig 1.3.1 、 The flow chart of this investigation

第二章、文獻回顧

2.1 毒性物質-醛及苯甲醛之介紹

2.1.1 醛的定義

醛(aldehyde)：有機化合物的一類，是醛基(-CHO)和烴基(或氫原子)連接而成的化合物。

通式：RCHO

命名：碳的編號由醛基開始

2.1.2 醛的來源

全球中有極大多數的化學製造廠擁有醛類化合物，根據 Toxic Substances Control Act(TSCA)之資料，其中大約有 40,000 至 50,000 種被歸類為有機醛。醛的來源有很多種，例如為製造乙醇(alconols)之添加劑、藥劑合成的中間物、農業用化學藥劑，消毒之副產物及清潔劑等^[8]。

水體中的有機污染物有許多種，其中醛類包括以下這些種類：甲醛、丙烯醛、三氯乙醛及苯甲醛等等。其具體的化學形態、分佈、毒性皆會對人體健康及生態環境造成相當程度的影響與衝擊，因此也可藉由污染來源的控制以達到一定程度的防制效果。其中苯甲醛及其衍生物，通常被廣泛用於合成農藥之藥劑或是合成中所產生之中間物。此外，水處理程序中之消毒處理或含苯類之物質經不當燃燒和氧化不完全時皆有可能會產生苯甲醛及其衍生物^{[4][5][6]}。

2.1.3 醛類化合物之物化性質

醛類化合物大都具有揮發之性質，也原屬於揮發性有機化合物(Volatile Organic Compounds, 簡稱 VOCs)之一類，醛類化合物的組成十分簡單，僅有碳、氫、氧三個元素，但由於醛類化合物具有羰基(Carbonyl Group)的官能基，使此類化合物比其他類似組成的化合物擁有較高的化學活性。

醛類化合物從外觀上很難區別，通常醛類化合物具有刺鼻的味道。若以原子鍵結的方式來說明醛類化合物的物化特性，醛類化合物的羰基是由 σ 鍵結及 π 鍵結所形成的碳原子 sp^2 混成軌域加入氧原子所組成；羰基碳原子的 σ 鍵位於同一平面上，其餘鍵結之角度接近 120° ， π 鍵所結合之碳原子與氧原子則不位於同一平面上，因而使羰基具有極性，再者羰基上的氧原子擁有二對自由價電子，更增加了醛類化合物與其他化合物發生反應的能力。由於所有的醛類化合物均具有 π 鍵結，使其具有極性與具有未鍵結的自由電子對，能展現醛類化合物的特性及反應活性^{[9][10]}。

醛類化合物與其他分子量相近之非極性化合物比較時，醛類化合物的沸點較高；但如果是與醇類(ROH)或羧酸(RCOOH)比較時，醛類化合物的沸點則偏低，主要是醛類化合物僅有偶極-偶極分子間反應，彼此之間並沒有氫鍵。醛類化合物的羰基與水分子反應時當為氫鍵的接受者，因此低分子量的醛類化合物比分子量相近的非極性化合物更易溶於水中^[10]。

2.1.4 醛類化合物之毒性作用機制

對於毒理學家而言，醛類是一項受到重視的有機物質。原因為有機醛類物質於低濃度時，其毒性比以具疏水性質(hydrophobicity)之非反應性毒

物有著更高的毒性。造成較高毒性之因素為醛類有機物在蛋白質及核酸中含有親核基因(Nucleophilic groups)，因此即使毒性作用位置相同，所產生之毒性大小依然比非反應性物質還要高。也就是說在醛類有機物之生物巨分子(biological macromolecules)結構中，其構造為共價鍵結(covalent bind)。因此將會提高醛類有機物之毒性進而造成人體的致突變性及致癌性[8][11][12][13]。

此外，由於醛類有機物為具反應性之毒物的原因為毒性反應經由共價鍵結之結構，會與氨基類(amino groups)化學性質形成 schiff bases，由此一反應即會提高醛類有機物之毒性。而該毒性反應機制也已經由 Karabunarliev S *et. al.*^[14]以醛類與 *Fathead minnow* 之毒性試驗所証實。

2.2 常用的毒性試驗物種

目前已有 100,000 種化學物質被排放於環境之中，其中大約只有 1-5% 的化學物質有毒性資料，對於具高生產量之化學物質，也僅有少數化合物擁有毒性資料。據統計，每年在美國高生產量的化學物質有 2863 項，而擁有完整毒性資料的只有 7%，沒有毒性資料的就佔 43%^[15]。

現今排放於水體中的化學物質大多以不同的形式存在，若僅以化學分析法是無法完全表達污染物對環境及生態所產生之衝擊及危害。由於生物具有高敏感之特性，因此當化學物質於低濃度時，生物實驗分析可較低於儀器分析之檢測範圍，進而了解污染物對生物所造成之危害並能得知污染物的危害程度。為了評估化學物質對環境所造成的危害，許多不同的測試方法已經被發展出來，表 2.2.1 列舉了一些常用的毒性測試方法。

Table 2.2.1、Toxicity experiment methods^[15]

測試方法	實驗物種	測試時間	測試終點	花費(美元)
Microtox	<i>Photobacterium phosphoreum</i>	5 min	EC ₅₀	62
Polytox	Blend of bacteria	21min	EC ₅₀	407
輪蟲(Rotifer)	<i>Branchionus calyciflorus</i>	24 hr	LC ₅₀	333
水蚤	<i>Daphnia magna</i>	48 hr	LC ₅₀	703
鱒魚	<i>Fathead minnow</i>	96 hr	LC ₅₀	1036
纖毛蟲	<i>Tetrahymena pyriformis</i>	48 hr	IGC ₅₀	---
鹽水豐年蟲 (Brine shrimp)	<i>Artemia salina</i>	24 hr	LC ₅₀	333
萵苣(Lettuce)	<i>Lactuca sativa</i>	96 hr	LC ₅₀	296

2.2.1 Microtox 測試

大約在 1965 年第一次利用發光菌(luminescent bacteria)測試空氣污染物開始，利用會放出光的有機體去發展一個快速而靈敏的水中毒性測試法已成為研究環境污染的重要課題。而 Microtox 是由 Beckman 公司於 1980 年時所發展出的測試方法，主要是利用螢光菌 (*Photobacterium phosphoreum*)於生長時會發出光芒，而且具有高敏感性。因此當此菌種曝露於含有毒物之環境中，其發光能力會與毒物濃度成反比且於特定時間內發光程度減半時之抑制濃度作為判斷毒物毒性之指標^[16]。

2.2.2 Polytox 測試^[17]

Polytox(Polybac Corporation, Bethlehem, PA, USA)是一種由所分離出含有 12 種微生物混和的物質，而且在冷凍乾燥情況下可被保存使用。美國 EPA 已經認為 Polytox 是一種有效且不貴的測試方法。

Polytox 毒性測試程序:

1. 先將 Polytox 培養菌放置於 300mL 之 BOD 瓶中，每瓶加入 8 克後使其成為水溶液(加入預先讓空氣進入的二次去離子水)，此為標準基底線(baseline standard run)，然後再測量化學溶液。
2. 蓋上瓶蓋，置放於磁性攪拌器(magnetic mixers)上，於 19 分鐘及 21 分鐘時測量溶氧值並換算出氧氣消耗率。
3. 相對於控制組(control sample)，即可求得細菌呼吸減小百分比程度。

為了容易比較，可把實驗時間從 20 分鐘提高至 30 分鐘。

2.2.3 水蚤(*Daphnia*)測試

水蚤(*Daphnia*)通常被做為靜水式生物毒性試驗方法的物種之一，以四十八小時之半致死濃度(LC₅₀)檢測水樣之急毒性。其實驗方法為將水蚤置於容器中，並加入不同濃度之毒物後進行試驗(通常 24 小時)，測試終點的判定為水蚤的死亡-水蚤不再游動為主。

Ramos *et. al.*^[18]發現，水蚤對於苯胺類的敏感性皆高於其他測試物種(藻類、兩棲類及環節動物)。Kaliser *et. al.*^[19]的實驗結果亦認為水蚤為敏感性很高的物種。

2.2.4 纖毛蟲(*Tetrahymena pyriformis*)測試

此方法是由 Schultz 及其他工作群所發展出來的毒性測試方法，並經過十多年的努力而建立一個毒性資料庫-TETRATOX。纖毛蟲是一種單細

胞原生動物，在毒性試驗中以 IGC_{50} (50% Inhibition Growth Concentration) 來表示毒性效應。

2.2.5 植物及藻類測試

由於植物生長速度及物種分佈的侷限，觀測時間較長，大多應用於長期性的毒性檢測；而藻類對於水中毒性則相當敏感，較常用於急毒性之生物指標。而在水體生物毒性試驗中，藻類由於下列優點而被廣泛用於進行毒性之研究：

1. 藻類為生態系統中最低階的生產者之一，在食物鏈的過程中由於生物濃縮作用(Bioconcentration)而造成其他高階消費者體內含有高濃度之毒性物質。
2. 在毒性試驗過程中，藻類生長過程可分成四個階段：遲滯期(Lag phase)、對數生長期(Exponential phase)、穩定期(Stationary phase)及死亡期(Death phase)。在良好的培養環境下，可以迅速讓藻類到達對數生長期和穩定期，並且持續一段較長的時間，如此便有利於實驗之進行。其他某些生物實驗則必須受到長期的幼年期或生命週期之限制。
3. 藻類毒性試驗與其他生物種之毒性實驗進行比較後，可發現藻類具有較高之再現性。尤其於密閉式之藻類毒性試驗^[41]中，當反應終點為 ΔDO 及Growth rate時，兩者之變異係數(coefficients of variation ; CV)約為10%，而傳統之藻類毒性試驗其CV為20至32%左右，由此即可發現密閉式藻類毒性試驗法具更高之再現性。

2.3 藻類毒性試驗

2.3.1 試驗物種簡介

本實驗所採用的試驗藻種為月芽藻(*Raphidocelis subcapitata*, *Selenastrum capricornutum* or *Pseudokirchneriella subcapitata*) Strains UTEX 1648, 為 2005 年 1 月份向 The Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin (<http://www.bio.utexas.edu/research/utex/>)所購得。月芽藻是屬於綠藻綱(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 μm^3 。典型月芽藻的體積約為 45 μm^3 且重量介於 10 至 20 pg/cell 之間^[20], 因為體型呈半月型, 所以稱為月芽藻。月芽藻具備有取得容易、培養簡單、容易觀察、生長期短、可以大量生長、具有地區代表性等實驗用的藻種需具有的特點, 並較其它微生物試驗來的敏感^[21]。

2.3.2 藻類計數方法

在進行藻類毒性試驗時, 我們必須要有一個能夠正確的反應出藻類生長情況之方法。一般說明藻類生長情況之參數為細胞密度、細胞總體積、乾重、葉綠素、活體內螢光值、營養基濁度、產氣量、ATP 及 DNA 等。目前測量藻類生長質量之方法有下列幾種: (1)顯微鏡計數法(2)電子顆粒計數法(3)直接乾重量測法(4)光學顆粒計數法(5)分光光度計測量葉綠素 A 法(6)螢光光度計測量葉綠素 A 法(7)DNA 測定法(8)ATP 測定法(9) ^{14}C 輻射標定法及溶氧測定法^[22]。

現今各標準進行生物毒性試驗方法中, 以 U.S. EPA 所訂定的標準方法為例, 其列舉的試驗物種就包含有植物性浮游生物、動物性浮游生物、珊瑚、甲殼類、無脊椎動物、水體昆蟲及軟體動物等。而在經濟合作暨發展組織 (Organization for Economic Cooperation and Development, OECD)、美國測試暨材料學會 (American Society for Testing and Materials, ASTM)、美國環保署 (U.S. Environmental Protection Agency, U.S. EPA)、美國公共健康協會 (American Public Health Association, APHA)、美國自來水工程協會 (American Water Works Association, AWWA) 和水環境聯盟 (Water Environment Federation, WEF) 等六組織中所提的標準方法中仍建議以微

小藻類作為試驗物種為最佳^[23]。上述組織大都以測量藻類的生物質量 (biomass) 為主，而生物質量都以直接稱重(乾重)之方法測得，但由於方法較耗時之因素，因此現今則利用電子或光學顆粒計數器等以間接量測生物質量的方法取代直接稱重法。因為此方法簡單、迅速、所需藻液量少且與生物乾重間有良好之相關性。

¹⁴C 輻射標定法是在進行毒性試驗之前，先將水中之碳以同位素 ¹⁴C 取代。在進行藻類毒性試驗時，因藻類行光合作用會消耗水中之同位素 ¹⁴C，此時再以輻射標定法量測水中同位素 ¹⁴C 之殘餘量，進而得知藻類生長之情形。Nyholm and Damgaard^[24]認為在相同的試驗狀況之下，試驗時間為六小時之 ¹⁴C 輻射標定法已足夠作為急毒性試驗之判斷，但其敏感度不及於量測生長抑制之方法。利用 ¹⁴C 輻射標定法可以縮短試驗時間並可處理大量之樣本，但此方法之缺點為成本高且需要訓練有素之輻射標定專業人員。

2.3.3 藻類毒性試驗

藻類毒性試驗可分為批次式和連續式兩種。而目前已有的標準藻類毒性試驗，大都屬於批次式的試驗方法，如 U.S.EPA 所採用的「Fresh water algae acute toxicity test」、OECD 所採用的「Algal growth inhibition test guideline」、ISO 所採用的「Water quality-algal growth inhibition test」、APHA 所採用的「Toxicity testing with phyto-plankton」及 ASTM 所採用的「Standard Guide for Conducting Static 96h toxicity tests with Microalgae」等。

批次式毒性試驗為起初提供藻類足量的生長基質，但是在後續的實驗過程中則不再添加任何基質，亦無藻類之代謝物質流出。在此條件之下，基質的消耗及代謝物的累積皆會降低藻類毒性試驗之敏感性，同時也難反應出真實水體中的情況。但由於此方法的優點為操作容易、成本低廉且可同時處理大量之樣本，因而到目前為止仍被廣為使用。若再依據試驗中與外界氣體是否有接觸而進行分類，可分成開放式批次實驗與密閉式批次實

驗兩種。開放式批次實驗系統雖然可以藉由震盪與外界空氣接觸，而達到提供碳源之目的，但若考慮揮發性有機物於實驗期間的揮發行爲，則在濃度上的控制將是一大難題。相反地，密閉式批次實驗並無毒物揮發之問題存在，但其藻類生長所需之碳源則必須提高(基質或 headspace)。

Brack and Rottler^[25]設計了一個間接提供碳源的密閉系統，採用雙層構造的玻璃瓶，將藻液及有機物置放於上方，下方則注入 $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ 緩衝液。Kuhn and Pattard^{[26][44]}以柵藻(*Scenedesmus subspicatus*)為測試物種來進行毒試驗，使用無機碳與有機碳作為藻類生長所需碳源，並指出密閉的環境於 48 小時之內對藻類不會造成重大的衝擊。Glaassi and Vighi^[27]利用一密閉式且恆溫的條件之下滿可保證水中揮發性物質的濃度不變，因此發展出一套 AAPBT 的系統來測定揮發性物質的毒性。其利用一 2 升之密閉容器，其中試驗溶液僅 100 ml，目的在於利用剩餘大空間提供足夠之 CO_2 ，以避免碳源匱乏而影響藻類敏感度，但實驗中物質濃度僅由亨利定律推算，並無真正測得溶液中實際濃度。Herman *et al.*^[28]改善此項缺點，其在密封之 125 ml 試管中進行試驗，除了於 50 ml 試驗溶液中添加 0.4% NaHCO_3 提供充份的碳源，且同時監測試驗溶液與其上空間(head space)之濃度，證明濃度無顯著不同。Mayer *et. al.*^[20]指出在不含 head space 之完全密閉式批次實驗系統，是評估揮發性有機物較佳的實驗方法。

連續式毒性試驗為控制基質以連續方式加入系統中，較符合自然水體的真實情況且代謝物亦同時流出，因此使得藻類保持於良好的生長環境之中。但是由於整體系統之流量不易控制，所以目前並無一套標準的試驗方法。連續式毒性試驗又可分為恆濁器(Turbidostat)和恆化器(Chemostat)兩種。恆濁器是利用光電原理來控制，當槽內細胞密度超過穩定值時，系統將流入新鮮基質以稀釋槽內的細胞密度。恆化器是利用穩定的基質進流率，而達到系統細胞密度的穩定。

本研究使用兼具實用性、敏感性及簡便性的藻類毒性試驗法進行實驗，試驗期間所需的藻類由「連續式培養方法」建立的藻液培養母槽取得，

在試驗方面則採「批次 BOD 瓶式的藻類毒性試驗」進行，內容描述分別如下：

1. 連續式培養方法(Continuous culture technique)

培養步驟可分為三，第一為藻類活化，即將保存於冰箱中含洋菜膠的 *Pseudokirchneriella subcapitata* 活化，第二為批次培養，即經過數天活化後，將藻類加入定量的營養鹽基質的錐形瓶進行批次培養，第三為連續式培養，即待錐形瓶中藻類的數目已達最大生長量的 80%~90% (藻數約 $1.9\sim 2.0 \times 10^6$ cells / mL) 時，置入於連續式培養母槽中，而營養鹽的供給主要由蠕動幫浦控制，也就是可由控制稀釋率 (dilution rate, 即 $D = \text{基質流入量} / \text{反應槽體積}$ 之比值) 來決定槽中細胞密度之多寡。當在低稀釋率時，會使營養鹽濃度降低，接著細胞的毒性容忍度也跟著降低，如此會導致細胞有較高的敏感性。當改變 dilution rate 則母槽約需 2~4 天即可達到新的 steady state。為了讓藻類達到較佳的敏感性，本實驗將稀釋率設為 0.25 day^{-1} (水力停留時間為 4 day) 來提供適量基質使藻類的生長與營養鹽的供給達成一動態的平衡，讓藻類在 exponential phase 和 stationary phase 可停留較久，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。

根據 Chen and Lin^[29] 以連續式藻類母槽系統(chemostat)為基礎進行培養藻類，chemostat 的容量為四公升，培養期間不僅有新鮮基質流入也有代謝物的流出，此狀態與自然水體較相似，可改善了「批次式培養(batch culture)」的缺點，即可避免加入的營養鹽完全拘限在一密閉空間，而導致的匱乏和變質的現象和代謝物累積情形。

2. 批次藻類毒性試驗 (Batch of toxicity tests with microalgae)

Chen and Huang^[30] 利用連續式的培養方法結合了 BOD 瓶(BOD bottle) 發展出試驗方法為「48 小時的批次式 BOD 瓶藻類毒性試驗」其主要為使用體積 300mL 的 BOD 瓶，將藻類、營養鹽和試驗毒物加入其內，再用蓋子密封，讓藻類暴露於毒性物質一段時間，由觀測終點量測實驗組與無暴

露控制組的抑制情形並進行比較分析。整個實驗過程中沒有新鮮基質的加入，也沒有藻類之代謝物移出，在其優點操作簡單，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。

2.3.4 試驗之重要參數

在進行任何的毒性試驗之中，其結果皆可能不盡相同，而不同的操作參數皆可能是導致實驗結果差異的主要因素之一，因此對於各參數必須進行嚴格的控制並了解各參數對於藻類生長與毒性之間是否有其相關性。

下列為本研究中所考慮之參數：

1. pH 控制及碳源供給

由於藻類因進行光合作用而導致 pH 產生明顯的變化，因此於實驗系統中若不對 pH 加以控制的話，則重復性的試驗將難以進行。此外，在碳源方面，由於藻類生長時首先會消耗水中之溶解性二氧化碳(本實驗設備之曝氣幫浦和氣體鋼瓶所提供)，次者為培養基(medium)中的碳酸氫鈉(NaHCO_3)，當碳源不足時則會造成藻類死亡。在 pH 控制方面，由於預測某特定 pH 值情況之物種濃度較有其困難性，且 pH 亦會改變毒性物質於水中的型態及濃度，進而影響毒性的大小。如 HCN 於 pH 7.8 降至 7.5 時，毒性會提高十倍左右。因此標準藻類毒性試驗皆傾向於固定 pH 值。Nyholm^[31]提出固定藻類 pH 的方式，如圖 2.3.1 所示：

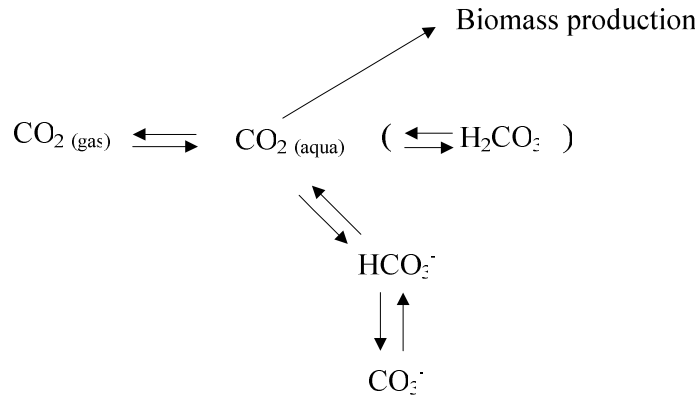


Fig 2.3.1、Carbonate system and photosynthesis method for pH balance

不同的標準方法對於 pH 的變化皆有則不同之規定，如 U.S.EPA 要求最終之 pH 需在 8.5 之下，OECD 則規定 pH 的變化不可超過一個單位；ISO 則要求 pH 的變化不可超過 1.5 的單位。因此，在控制 pH 變化的方法大致上有下列幾種：

1. 減少生物接種量
2. 系統加入空氣或氣態二氧化碳
3. 維持均勻振盪
4. 保持空氣的流通
5. 縮短整體的實驗時間

Arenberg *et. al.* ^[32] 利用月芽藻為試驗物種進行藻類毒性試驗，為防止 pH 值的變化而將試驗時間由三天縮短為二天。而 Lin *et. al.* ^[33] 於密閉式藻類毒性試驗中並未控制整體系統之 pH，發現當水中溶解性金屬對於藻類的抑制率高於 20% 時，系統中的 pH 變化大多皆在 1.5 單位以下，因此認為藻類毒性試驗是不需針對 pH 變化而加以控制。本研究依據早期之藻類毒性研究方法 ^[91] 於進行毒性試驗前，將 pH 控制於 7.5 左右，使其減少 pH 變化所造成之可能誤差性。

2. 光照強度

Nyholm and Kälqvist ^[34] 提到光照強度會影響藻類行光合作用，因此在

藻類毒性試驗的設計中如要使藻類維持在對數生長期，則光照需設為常數。而要保持光照強度為一穩定值之方法有兩種：(1)保持較低的生物質量、縮小培養體積及提供充份之混合，此一方法的主要目的為可減少「自身遮蔽(self-shading)」所產生之影響，即排除光源的遠近距離使光照強度之差異。(2)提供充足的光照強度使藻類能吸到一定量的光度而不影響生長。因此，如光照強度為一常數時，能使藻類呈現對數生長，縮小培養體積等優點以利藻類處於理想的環境中。

本研究依照 U.S. EPA^[35] 標準方法針對 *Pseudokirchneriella subcapitata* 的規定，於連續式培養和批次試驗中所選擇的光照的強度為 $64.5 \pm 10\% \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ (4300 lux)，且以連續式的光照來排除光暗交替循環式的光照所導致的藻類生物質量變異的缺點。

3. 溫度

溫度的變化皆會影響藻類生長的情況，如藻類會隨溫度提昇而呈對數生長，而當達到最適生長溫度後即會快速下降。本研究採 U.S. EPA 建議於 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 之環境下進行藻類的培養及毒性試驗。

4. 植種藻液初始密度與試驗時間

在批次式實驗中，若植入 BOD bottle 的藻液初始密度過低（藻類細胞數目過少）時，由於藻類細胞量為微量之因素，相對的增加了生長率的變化，因此以 Probit model 所求得之 EC_{50} 值也會產生較大之變化。反之，植種數量過高時，將會使得於實驗後期時，由於藻類細胞數量增加而代謝物過量累積及水中碳源耗盡，使得 pH 產生變化且 EC_{50} 值亦相對增加。

毒性試驗的敏感性及數據結果皆易受試驗時間之長短而有所影響，當試驗時間過長時，會導致 BOD bottle 內之營養鹽不足進而影響控制組之生長，使得處理組與控制組於最終產量的差距漸漸縮小，另一方面，過長的試驗時間亦會使得毒性的反應消失。Lin^[33] 發現當試驗時間增加時，毒性

試驗的敏感度隨之提高且 C.V.值減少，當初始植種密度減少時，則敏感度提高且 C.V.值亦提高。在兼顧兩者的考量下，本試驗依據早期之密閉式藻類毒性試驗方法^[91]，選定最適當之生長條件為控制 BOD bottle 內藻類初始植種密度在 1.5×10^4 cells/ml，試驗時間為 48 小時。

5. 實驗培養基

實驗培養基的成份是影響微生物毒性試驗結果的重要因子之一^[36]，其主要之影響培養基因子有 pH、硬度、螯合劑、氮、磷及一些主要陽離子。一般為了使試驗之環境符合自然環境之情況及讓藻類能有效的利用微量元素，於試驗中會額外加入一定量之螯合劑(EDAT)。此外，氮、磷元素對於藻類生長與毒性試驗結果影響最大。因此即針對上述之培養基質進行分別探討：

1. 氮、磷的影響

在一般的自然水體中，存在這各種不同的生長元素，其中以氮、磷兩種元素為藻類生長的主要限制因子。Lin^[33]針對鋅(zinc)及酚(phenols)進行毒性試驗結果後發現，當 U.S. EPA 營養基質的 HCO_3^- 加倍時，對毒性試驗敏感度之影響並沒有一定之趨勢，且並不會對其毒性反應造成太大之影響。而影響藻類生長最主要的因素則為氮或磷的濃度，因此該兩種元素即為藻類生長的限制性因子。

在水中只有 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 形態能夠直接被藻類吸收，因此在各種藻類試驗方法中，磷皆是以正磷酸鹽之型態存在(如 ISO 和 OECD 是 KH_2PO_4 ，U.S.EPA 是 K_2HPO_4)，至於氮的形態，由於 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 及 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 皆能被藻類吸收，在 ISO 和 OECD 用的是 $\text{NH}_4^+(\text{NH}_4\text{Cl})$ 形態，U.S.EPA 用的則為 $\text{NO}_3^-(\text{NaNO}_3)$ 形態。Millington *et. al.*^[37]發現自營菌無法像異營菌能快速利用 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 而快速生長，且 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 不似 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 那麼容易為異營菌所使用，因此一般自然環境中藻類的氮源大都為硝酸態。

2. 螯合劑(EDAT)的影響

一般為了使試驗之環境符合自然環境之情況及讓藻類能有效的利用微量元素，於試驗中會額外加入一定量之螯合劑(EDAT)。如 ISO 於培養基中加入 78 $\mu\text{g/L}$ 的螯合劑。但在文獻^{[38][39][40]}中指出 EDTA、NTA 等會與二價金屬(Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Zn^{2+})進行螯合作用，進而影響重金屬對藻類之毒性試驗結果。因此，1996 年 U.S.EPA^[35]建議在培養藻類時可加入固定量之螯合劑於培養基中，而於進行毒性試驗時培養基中則不添加任何螯合劑。

Lin^[33]於藻類毒性試驗中，以重金屬鋅為毒性物質，植種之藻細胞數為 10^5 cells/mL，毒性實驗為 12 小時，分別加入 EDTA(0 and 300 $\mu\text{g/L}$)於基質中進行毒性試驗。結果顯示，EDTA 的確會和其重金屬進行螯合作用而改變重金屬之濃度，因而影響藻類毒性試驗之結果。此外，Lin *et al.*^[41]以酚為毒性物質進行密閉式藻類毒性試驗中，當基質中之碳源(NaHCO_3)由 15mg/L 提高為 300mg/L 後進行實驗，結果發現藻類對毒性物質之敏感性大為降低。

為了得知 HCO_3^- 對於毒性試驗之影響性，Lin^[33]分別進行兩組藻類密閉式毒性試驗：一組初始細胞密度為 10^5 cells/mL，毒性試驗時間為十二小時，毒性物質為重金屬鋅及鎘之條件下，分別採用 U.S.EPA 基質(HCO_3^- 濃度為 10mg/L)及加入兩倍之營養基質進行藻類毒性試驗，反應終點為溶氧變化量；另一組初始細胞密度為 1.5×10^5 cells/mL，毒性試驗時間為四十八小時，毒性物質為重金屬鋅及有機物質酚進行毒性試驗。結果發現當 HCO_3^- 加倍後對藻類毒性試驗之敏感度的影響性並無一定之趨勢，且與其毒性反應亦不會太大之影響。

本研究參照 1996 年 U.S.EPA^[35]之建議，批次式培養藻類時加入固定量(100%)之螯合劑於培養基中，於連續式培養藻類之營養基質中亦加入固定量之(10%)之螯合劑，而於進行毒性試驗時培養基中則不添加任何螯合劑。

2.3.5 觀測終點(End point)之量測

在藻類毒性試驗中，若能正確的應用試驗結果之觀測終點，即可得知藻類受到毒物影響之生長抑制情況。一般應用的藻類生長參數為:1.細胞密度 2.乾重 3.葉綠素 4.產氧量、ATP 及 DNA 等等。此外，藻類生長抑制的情形也易受儀器的精密度、敏感性、偵測極限及測量時間的影響，因此研究人員應先考慮實驗之器材及設備的可用性及性質，以減少毒性試驗結果所產生之誤差。

目前針對批次式培養之藻類毒性試驗中，大多以測量生物質量(bio-mass)為量測終點。所謂的生物質量即是測量生物乾重及數目。Christensen *et. al.* [42]認為以生物質量求得的抑制率做為觀測終點較其它參數(總細胞數目、細胞體積)為佳。但直接量測生物乾重十分費時且程序繁瑣，因此目前皆利用電子顆粒計數器、光學顆粒計數器等量測生物乾重，而這些方法不僅簡單、快速，所需的藻液量亦少，且與生物乾重間有良好的相關性。此外溶氧測定也擁有成本低廉、試驗時間短等優點。

因此，本研究將以觀測藻類的細胞密度(Final yield and Growth rate)及溶氧變化(ΔDO)，以電子顆粒計數器測量細胞密度，溶氧測定儀測量藻液中溶氧量之變化量，並藉由 probit 模式將實驗結果轉變成藻類生長抑制率及斜率。

2.3.6 揮發性有機物實驗

早期的標準生物試驗方法皆以評估「水溶性」及「非揮發性」的化學物質，尚無方法可偵測揮發性有機物的毒性 [43]。其主要因素為傳統的批次式毒性試驗方法皆為開放式系統(Open-system)，此一系統會提供激烈的振盪以利藻類進行氣體交換並得到無機碳源(CO_2)。但揮發性化學物質濃度會伴隨著試驗期間拉長及震盪試驗瓶之過程中逐漸消失因而低估其毒性，相對地亦造成各個實驗室測試得的毒性結果會有所差異。

一般藻類毒性試驗之密閉式系統，需考慮下列兩項重要的因素，一為提供足夠的碳源，以避免藻類會因為碳源不足而生長受到抑制，二為確保試驗毒性物質於試驗期間因揮發作用而改變毒物濃度。

本試驗方法為密閉式 BOD 瓶藻類毒性試驗，為了不讓揮發性物質的濃度會因為試驗容器的上方留有未裝滿液體的空間(head space)而有揮發、濃度減少的情形，因此在本試驗的容器 BOD 瓶會將液體(毒物+基質)加滿以達到不留空間為主，讓 Head Space 減至最低；在提供足夠的碳源的部分，事先將去離子水以 $\text{CO}_2\text{-N}_2$ 混合氣體曝氣，一方面除去水中溶氧，另一方面便是增加碳源，讓營養液能有足夠的碳源使藻類生長不受抑制。

2.4 有機物結構與毒性之關係

一般碳原子為四條共價鍵(四對共用電子對)，使得化學物質可以產生直鏈狀、支鏈狀及環狀之形式。此外，由於共價鍵會與其他的分子連接在一起，進而形成各種化合物；若這些化合物有相同的分子式，則稱為異構物(Isomers)。雖然異構物有相同的分子式，但鍵結的位置的不同(鄰位、間位及對位；*ortho*-、*meta*-、*para*-)對於毒性亦會造成很大的影響。

Ramos *et. al.*^[18]發現取代基若位於苯胺類(Anilines)的 *ortho* 位置時，對水蚤而言，其毒性低於取代基於其他位置上。Ensley *et. al.*^[45]發現氯酚類(chlorophenols)對浮萍進行毒性試驗時，氯酚類的毒性正比於苯環上所接氯原子的數目。Kim H.K *et. al.*^[46]則發現肉桂醛(cinnamaldehyde)之異構物當中，若氫氧根(hydroxyl)位於 *ortho* 之位置時，其對於纖毛蟲的毒性影響最大。Yen *et. al.*^[47]以鹵烷類對水蚤進行毒性試驗時，發現三種現象：(1)支鏈狀分子的毒性高於直鏈狀分子的毒性。(2)分子量與毒性成正比。(3)鹵烷類的碳原子數目若小於五個時，則帶有溴原子取代基的鹵烷類毒性會高於帶有氯取代基的酚；若碳原子數目大於五個時，則情況相反。

Dearden *et. al.*^[48]發現取代基若位於 2-和 3-位置時之硝基苯，影響對纖

毛蟲毒性的主要因素為疏水性及電子參數。McKarns *et. al.*^[49]發現烷醇類的毒性與所含的碳原子數目有關，其碳原子的數目和毒性為正比之關係。

2.5 定量結構-反應關係(QSAR)

2.5.1 QSAR 之簡介

雖然傳統的生物分析法可得知有機化合物對生態環境所造成之衝擊，但其缺點為所需的時間較長，且由於大量新的化合物不斷的推陳出新，因此即必須建構出一套可快速預測化合物毒性的方法，以減少時間及金錢上的浪費。

在西元 1930-1960 年期間，就有專家為了研究物質的化學結構與其活性之關係，而提出了 formal structure-activity relationship 的理論，接著並陸續應用於藥物及殺蟲劑的研究方面。直到西元 1970 年間，才有學者提出了 Quantitative Structure-Activity Relationships(QSARs)，並開始廣泛地應用在環境毒理學上的研究。在 1930 年代，Hammett 提出著名的 Hammett equation，是最早將結構與活性之間的關係以量化的方式呈現。在 1993 年，Hammett 以甲基脂類(methyl esters)與三甲基胺(trimethyl amine)之反應結果中發現此類反應速率與酸解離常數有關。

$$\text{Log}(k_X/k_H) = \rho \log(k_X/k_H) = \rho \sigma$$

此即為 Hammett equation，其中 σ 為取代基常數(substituent constant)，代表的物理意義及反應物整體的極性效應。

在 1950 年間，Taft 引用 Hammett 的概念，加入了關於立體效應的參數^[50]：

$$\delta E_s = \log(K_X/K_O)$$

K_X 和 K_O 分別代表 x 取代基時的水解速率常數和沒有取代時的化合物；其中， E_s 為立體參數(steric substituent parameter)，表示取代基立體效應大小，

δ 則為相當於 ρ 的反應參數。Corwin 和 Hansch 於 1962 年發表第一個 QSAR 論文-「The correlation of the biological activity of phenoxyacetic acids with Hammett substituent constants and partition coefficients」^[51]，首次使用親脂性參數-log P，此參數與生物活性(biological activities)關係更為密切。簡單而言，QSAR 就是應用物質的物化參數而建立之一種模式，可用來預測某生物種與這些參數之間的毒性關係。

在環境毒理學中，建立 QSAR 之目的為預測每日不斷產生的新化學物質之毒性，因此為了能建構有效的 QSAR 模式則必須注意下列因素：

- 應用於 QSAR 模式之參數，必須在極小的偏差範圍之內，所建立之模式才能有效並準確的預測毒性大小及毒性反應機制。
- 目前為止，QSAR 模式的發展僅應用於預測單一毒性物質之毒性，對於混合毒性之分析尚未有完整之研究。
- QSAR 模式並非以一種模式就可以包含各種型式的化學物質。簡單而言，針對某一種毒性物質之研究，最好能配合該毒性物質之衍生物同時進行分析，其所建立之模式才有最佳之效果。
- QSAR 模式所應用之毒性數據及參數，需有容易取得之便利性。此外，需針對實驗毒物之特性篩選所使用之參數；例如，該毒物為低水溶解性，則不應將溶解度當為建立 QSAR 模式之參數。

McFarland^[52]認為化學物質的毒性主要有下列兩種因素所造成：(1)毒物進入生物相的穿透力。(2)毒物和反應位置的相互作用。以數學模式表示法如下：

$$\text{Log(toxicity)}^{-1} = A[\text{log(penetration)}] + B[\text{log(interaction)}] + C$$

Jin^[53]以水蚤(*Daphnia magna*)對苯甲醛及其衍生物進行毒性試驗，以 Linear Solvation Energy Relationship(LSER)和 Theoretical Linear Solvation Energy Relationship(TLSER)做為參數所建立之 QSAR，其相關性為不良 ($R^2=0.35-0.37$)。當應用之參數變為 Hammett values(σ^*)及 second most negative net atomic charge on an atom(sq-)時，相關性則大為提高($R^2=0.91$)，

由此可證明苯甲醛為親電性之化合物(electrophile)。

2.5.2 常用之 QSAR 參數

參數含喻一些結構上的特性及性質，因此在定量方法上可利用生物活性進行迴歸；一些特定物理化學性質參數值，可代表毒性物質與受測物種之間的作用力。一般使用的 QSAR 參數大至可分為下列幾種類型：

1. 親脂性參數(hydrophobic or lipophilicity parameter)

建立 QSAR 模式最常使用的參數即為親脂性參數，這方面的參數包括溶解度、辛醇-水分配係數(log P or log Kow)等。因為此參數與毒性的水溶性、薄膜的滲透性及提供配位基(ligand)與接受器(receptor)的鍵結有直接的關係。簡單而言，各類化學物質和不同生物系統的作用未必相同，但是當化學物質要進入細胞體內時，親油性的作用機制將優先考慮於化學物質和反應位置的作用，因為疏水性物質對細胞的作用機制被認為與被動擴散(Pssive diffusion)有關，所以穿透細胞膜的動力是與化學物質的疏水性有直接關係。

親脂性參數定義為一個化合物在水溶液相和非水溶液相分佈的情況；早期對於分佈係數(partition coefficient ; P)的定義為與「輕」和「重」相有關。現今對於P的定義為物質濃度在有機相和水溶液相平衡時分佈的比例。

$$P = C_{\text{org}} / C_{\text{aq}}$$

在較早時期的 QSAR 模式中會使用不同的有機相和水相系統所得到的分佈係數，但自從 Hansch 使用有取代基的苯甲酸正辛醇和水的分佈係數後，正辛醇即變成分佈係數中所使用的有機相。Russom *et. al.*^[54] 指出擁有越高 log P 的物質會增加物質在水中與生物相 (Biophases) 的平衡時間，因而增加其 LC₅₀ ratio (24h LC₅₀ / 96h LC₅₀)。現今已有很多方法可以利用電腦軟體幫助我們預測化合物的 log P，但由於彼此之間的預測起始點不同，因此導

致有不同的結果，由其是對於一些溶解度低的化學物質，預測的結果常會與實驗所得的結果有偏差^[55]。

2. 電子參數(Electronic parameter)

分子的電子性質可以用許多不同類型的參數來描述。一般這類型的參數包括有原子電荷數 (Atomic charge)、分子軌域能量 (E_{homo} 和 E_{lumo})、未定域化 (Delocalizability)、偶極矩(Dipole moment)、Hammett 取代基常 (Hammett sigma substituent constant; σ)和還原位能 (Reduction potential) 等。上述之所有參數都是描述一些基團(group)或取代基對電子分佈的影響，因此在 QSAR 的建立上都有應用過這些參數。相對於描述整個分子性質的參數(親脂性參數和莫耳折射率)，電子參數主要著重於一些原子或基團(除了偶極矩)。例如，選擇 σ_p 來描述對位(*p*-)取代基對於 phenolic 酸性的影響，此模式可以表示 phenolic 基團在與鍵結位置作用時當作一個氫鍵的提供者或接受者。

根據 (Atkins, 1994)^[56]第五版的物化課本中指出，highest occupied molecular orbital (HOMO)和 lowest unoccupied molecular orbital (LUMO)這兩個軌域會共同形成分子的「Frontier orbitals」，這個軌域對於一個分子的化學及光學性質具有高度的關聯性。當分子之間以形成電荷轉移方式相互作用時，HOMO 可作為分子給予電子能力的量度；而 LUMO 則可做為分子接受電子能力的量度，亦即電子是從 HOMO 轉移至 LUMO，因此透過 HOMO 和 LUMO 來了解分子的電離能力和電子親合力。

3. 立體(空間)參數(Steric parameter)

立體效應很難去描述，因為在鍵結位置時的 3D 結構通常很難取得。立體效應常數 E_s 是在 QSAR 的研究中第一個被使用來描述立體效應的參數，而其他相關參數包括總表面積(Total surface area)、總分子體積(Total molecular volume)及莫耳折射率(molar refractivity)等。Di Marizo and Saenz

[57]發現化學物質之分子體積與其毒性成正比，因為在相同濃度的溶液當中，分子體積較大的化學物質佔有較大的體積分率。

4. 分子連結參數(molecule connectivity indices; MCIs)

最早是由 Randic^[58]所提出，所代表的是化學結構上的鍵結與分支，可將其量化的結果做為化合物的參數，此一參數並非物理或化學性質，所以很容易利用演算法從結構式中取得。

5. 線性溶劑合能關係 (Linear Solvation Energy Relationship , LSER)

利用溶質-溶劑作用力 (Solute-solvent interaction)當作化合物參數，以四個分子的性質表示為：內在分子體積 (Intrinsic molecular volume)、溶劑作用參數 (Solvatochromic parameter)、極性或極性能力量度(Measure of polarity polarizability)，而其缺點為分子特性不易找到，使參數求取有困難。

6. 極性參數(polarizability)

莫耳體積(MV)、莫耳折射率(MR)及等張比容(parachor; PA)都為相關性之參數。

$$MV = MW / \rho \quad MW: \text{分子量}, \rho: \text{密度}$$

$$MR = MV \times [n^2 - 1/n^2 + 2] \quad n: \text{折射係數}$$

$$PA = MV \times \gamma^{1/4} \quad \gamma: \text{表面張力}$$

其中 MR 被廣泛應用於 QSAR，且與凡得瓦體積(van der waals volume)、等張比容有很好的相關性(R=0.92 and 0.97)。MR 的計算是經由極化性(polarizability)和一些基團的極性而來的，分子中極性的部分愈大者，MR 值就愈大。早期 Kubinyi^[59]認為在 QSAR 的迴歸方程式中如果 MR 之係數為正，則表示取代基鍵結在極性表面;反之，如為負值或是非線性關係則表

示此鍵結的位置受到立體障礙或是一個限制區域(limit area)。

2.5.3 QSAR 在環境毒物學上的應用

QSAR 是評估有機化合物急毒性的工具之一，早期在 QSAR 的發展是先將化合物進行分類的基礎上而建立的，也就是一個 QSAR 的模型只能建立一系列相同或相類似化合物的毒性。Schultz *et. al.*^[60]認為，在毒性分析上要建立有意義的 QSAR 模式，必須將不同毒性機制的化合物加以分類。

由於 QSAR 無法在不同毒性機制下討論，因此在建立 QSAR 模式前需先將毒物進行分類。Verharra *et. al.*^[61]首先根據毒性反應的模式來分類，其依據之標準為毒性比例(Toxic Ratio; TR)。毒性比例 TR 的定義為：

$$TR = EC_{x, \text{baseline}} / EC_{x, \text{experimental}}$$

其中 $EC_{x, \text{baseline}}$ 為預測之基線毒性(baseline toxicity)， $EC_{x, \text{experimental}}$ 為測量之實驗值。

基線毒性可藉由 QSAR 來預測，而且通常以單一物化參數-logKow 來描述，但是 logKow 無法完整模擬生物薄膜的情況，所以在基線毒性中又分成非極性(non-polar)和極性(polar)麻醉作用(narcosis)。當某種化合物之毒性大於從 QSAR 預測非極性麻醉作用的 5-10 倍時，也就是 $5 \leq TR \leq 10$ ，則此化合物即被歸類為極性麻醉作用。反之，如某種化合物之 $TR \geq 10$ ，則此化合物即被歸類為反應性(reactive)或是特別反應(specifically acting)，且當此化合物之 $pK_a \leq 6.5$ 時，則該物質即屬於非耦合(uncoupler)之化合物^[62]。

Russom *et. al.*^[54]則將有機物分成圖 2.5.1 的毒性機制，可分為一般的(General)和特異的(Specific)兩大類型。一般性毒物是指麻醉作用在細胞膜非特定的位置上；而特異性毒物有又可稱為反應性毒物，它會作用在細胞的特定位置上或抑制特定的反應。Hermens^[28](in OECD, 1995)將化學物質廣義分成四大類：Class I inert chemicals、Class II less inert chemicals、Class

III reactive chemicals 、Class IV specifically acting chemicals 。

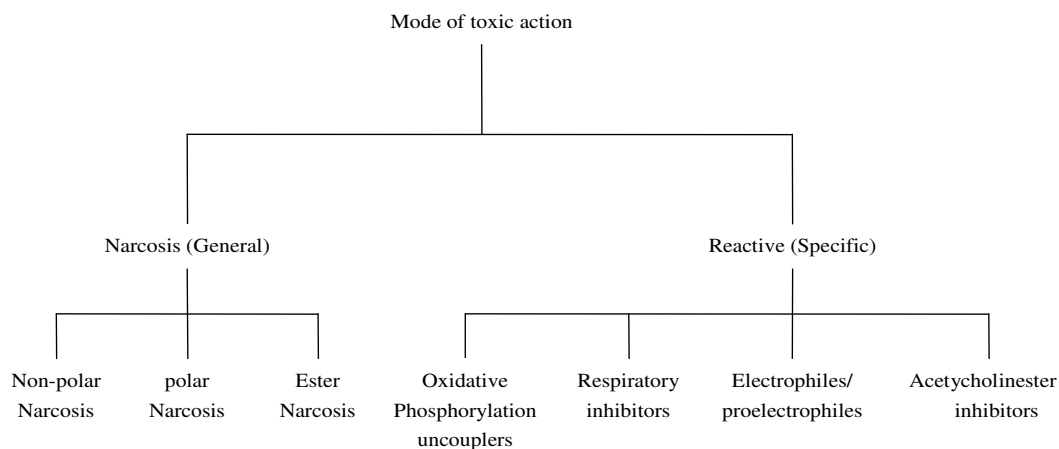


Fig 2.5.1 、Classification of toxicity mechanism in aquatic toxicity tests

此外，在利用 QSAR 分析極性和非極性的麻醉作用化合物中，如使用 logKlipw-薄膜脂質和水的分佈係數(membrane lipid-water partition coefficient)取代 logKow，則可使某二類之化合物被認為是同一類^{[63] [64]}。Lipnick^[65]對於在進行 QSAR 分析時，常會遇到的 outliers，歸納出圖 2.5.1 中各種不同的毒性機制。

Schultz *et. al.*^[66]認為 Respiratory uncoupling 會造成粒腺體中電子梯度的短路，因而阻礙了 ATP 的合成，但細胞的呼吸並不受影響；而 Respiratory inhibition 則會毒化細胞中的檸檬酸循環，而阻礙了細胞的呼吸。

Table 2.5.1、QSAR 分析中的 outliers 毒性機制分類表

1.Excess toxicity of electrophile nonelectrolytes
Nucleophilic substitution: allylic and propargylic activation
Nucleophilic substitution: benzylic activated
Nucleophilic substitution: α -halo-(C=X, C \equiv X)
Acid anhydrides
Strained three-membered heterocyclic ring
Michael-type addition
Schiff base formation
2.Proelectrophile nonelectrolytes and excess toxicity
Alcohol dehydrogenase activation
Monooxygenase activation
Glutathione transferase activation
3.Cyanogenic nonelectrolytes and excess toxicity
Cyanide release via cyanohydrin-like toxicant
Cyanide release via monooxygenase activation
4.Excess toxicity from multistep or multiple mechanisms

2.6 化合物作用的毒性機制

化合物的作用包括了極性麻醉效應(polar narcosis)、非極性麻醉效應(nonpolar narcosis)、磷酸呼吸的未耦合(phosphoric acid respiratory uncouplers)與親電性(electrophilic)或親核性(nucleophilic)物質等。所有的有機化合物皆有能力產生麻醉效應，但此效應於低濃度中會被許多特異性機制的存在而抵銷^[67]。因此常被用於描述難分解化合物與細胞膜間非共價性的交互作用(interaction)，其原因在於擾動了膜層(磷脂雙層)間脂質與蛋白質的比例^{[63][68]}，改變細胞膜脂質成份，進而產生毒性效應。

極性與非極性麻醉效應的差異在於氫鍵鍵結提供酸性之強弱^[69]，非極性麻醉效應被定義為基線毒性(baseline toxicity)^[63]，而極性麻醉效應一般毒性皆高於基線毒性且主要作用方式為毒物從水相轉移至生物體特定之反應位置，而與生物體進行相互作用。極性與非極性麻醉效應通常可以過量毒性(Excess toxicity, Te)來辨別，也就是 Te 為預測之毒性大小相對於觀測毒性大小之比值。當 $Te < 2$ 時其作用之機制屬於非極性麻醉效應;反之，

$Te > 2$ 則其作用機制為極性麻醉效應^[70]。若化合物屬於極性麻醉效應時，則存在有較強的極化能力與氫鍵結之能力；若化合物僅有分散分與誘導偶極力，則被定義為非極性麻醉效應，例如酮類、醇類及醚類化合物^[71]。

2.7 Surrogate 於環境毒理學上的應用

由於現今工業快速發展，使得社會上亦大量使用新式之化合物。由鑑於此，若僅以一種生物毒性評估方法評估其危害，即會與現實之情況產生落差。因此，現今皆以提出另一種替代性之生物評估法以減少其落差之程度，也就是以某一種毒性物質對 A 生物體所產生之毒性影響，是否於 B 生物體上也可同樣觀察得知。因此我們會選擇其他的生物體，來進行同樣的毒性測試，進而觀察生物體之間的毒性劑量反應及敏感性是否接近。而這種所選擇的生物體，即稱為替代實驗物種(Surrogate)，這種觀念很早就被用來預測藥物對人體的劑量反應影響。

一般具代表性的 surrogate 應該符合以下條件^[72]：

(1) 不管在人造或是天然的環境當中，它的反應終點應該是會被保護 (2) 反應終點必須要很清楚 (3) 此種生物必須容易培養 (4) 它對相類似的毒性物質的反應，都應該在我們所預料當中 (5) 需具經濟性、快速性及代表性。舉例而言，若已知待測的毒物難溶於水，則應該選擇生活環境不是在水中的生物來進行實驗，如此才能準確地觀察出毒性物質之濃度與其所造成的毒性關係，在此種情形之下，就不可用生存於水中的魚類來進行毒性實驗，因為將無法準確得知此毒物在水體中真正的濃度。

選擇了適當的 surrogates 進行實驗之後，我們將可以從結果中發現彼此之間的相關性，Blum and Speece^[72]認為應該有以下兩點要求：

- 此相關性必須建立在兩種的實驗物種上。
- 對於實驗物種所接觸到的毒性物質範圍必須要明確的說明。

Julie R *et. al.*^[67]以氯苯、甲苯及醛類等 127 化合物針對纖毛蟲與孔雀

魚(*Poecilia reticulata*)進行 QSAR 之研究，得到不錯之迴歸模式($R^2=0.85$)，其中針對非極性麻醉物、酚及醛類亦有良好之結果，因此認為纖毛蟲對孔雀魚而言是種良好之替代實驗物種。Glendon D *et. al.*^[73]則以 100 種化合物針對纖毛蟲與鱒魚(Fathead minnow)進行 QSAR 之研究，發現兩者對麻醉性之物質(包括極性與非極性)之相關性較高($R^2=0.93$)，而對親電性化合物之相關性則較為低($R^2=0.78$)，因此認為針對麻醉性物質而言纖毛蟲對鱒魚而言是種良好之替代實驗物種。Dimitrov *et. al.*^[8]以醛類對魚類及纖毛蟲進行毒性試驗，除了五點 outliers 之外，其他的醛類在兩物種之間具有很好的相關性。Di Marizo and Saenz^[57]認為以麻醉性有機物所得到的毒性試驗結果，在不同測試物種之間的差異，會隨著有機物 $\log K_{ow}$ 的升高，而使得差異消失，藉著這種概念，在進行環境影響評估的時後，我們便可允許一些外來的不確定性因子存在，並使得標準毒性試驗方法亦變得可行。Di Marizo *et. al.*^[74]的研究結果發現，*B. iberingii* 和 *P. promelas* 這兩種魚類對一系列苯衍生物的毒性反應，當苯衍生物的 $\log Kow$ 小於 4 的時後，*B. iberingii* 的敏感性是高於 *P. promelas*。

2.8 Acute and Chronic Ratio (ACR)

毒性化學物質在環境危害的評估過程當中，缺乏長時間暴露的毒性試驗研究數據。經常必須使用急毒性試驗來預測環境中慢毒性的影響。因此，根據不同物質而定義的急慢毒性比值(Acute and Chronic Ratio ，ACR)是必需要存在的。U.S. EPA 使用 ACR 的幾何平均值或一可替代利用的 ACR 值(a subset of available ACRs)來計算周遭水體慢毒性的標準。ACR 值的計算可經由物種的急毒性結果(LC₅₀)除以慢毒性結果(NOEC or LOEC)。計算方式如下：

$$ACR = \frac{\text{Acute toxicity}}{\text{Chronic toxicity}}$$

一般而言，ACR 的計算是基於一個實驗結果而得到的。而若缺乏慢毒性實驗結果時，一般會採用 ACR 為 10，利用急毒性的結果推估慢毒性的值。

在過去中，已有許多學者根據不同的數值方法來得到急慢毒性比值。在 1982 年，Kenaga^[75]對於不同種的魚類及水中無脊椎動物建立了 LC₅₀ 及慢毒性 MATC 之間的關係。進而從中發現了，工業有機化學物質的 ACR 值比一般農藥及重金屬的值要來的低。而此相似的結果也於 1994 年，Mayer *et. al.*^[76]的實驗中發現，使用魚類的急毒性數據可預測其 NOEC 及 MATC 的值。而在 European Center for Ecotoxicology and Toxicology of Chemical (ECETOC) 中，他們對於大部分的物質(包含:無機物、有機金屬以及殺蟲劑)和多數的物種所做的結果，其認為百分之九十的 ACR 值是介於 27 至 40 之間的，而平均 ACR 值則介於 4.2 至 22 之間。Persoone 及 Janssen^[77]兩位學者則認為 ACR 的變化隨著物種和化學物質的不同從 1 到 20000 皆有可能，而絕大部份的 ACR 則是低於 1000，一般來說是低於 50。Länge *et. al.*^[78]收集不同物種及化學物質的數據所做出的結果認為對於所有的物種和化學物質來說急慢毒性比值採用 73 就足以安全的預測 90% 物質的慢毒性 NOEC 值了，而一般工業有機化學物質則建議採用 12-25 亦足以預測其慢毒性 NOEC 值了。

然而，大部分的毒性化學物質在環境中，對於其所作用的目標皆有屬於自己的作用機制。因此，若將全部的毒性化學物質皆使用同一個 ACR 定值來表示急慢毒性之間的關係，而不考慮物種的生活史及慢毒性對其生活史的影響，如此一來，將會產生高估或低估了現地中，毒性化學物質的毒性。

Roex *et al.*^[79]在 2000 年時，根據不同作用機制的毒性化學物質分類做比較，其發現極性麻醉性的化學物質，其擁有較高急慢毒性比值，約為 9.8±11.8，而非極性麻醉性的化學物質則較低，約為 2.58±1.57。在其它文獻中，有對於兩種不同水蚤的 thee-brood test 極性麻醉性及非極性麻醉性化

學物質的急慢毒性比值分別為 7.66 ± 2.74 及 2.37 ± 0.69 。即代表了在不同的作用機之分類下，ACR 的值應會有差異性。除此之外，物種的不同也有可能會影響急慢毒性的比值。

2.9 Solvent control

在進行生物毒性試驗之前，若實驗之毒性物質具有難溶於水之性質時，一般皆為使用溶劑幫助毒性物質溶解以利後續的定量及毒性試驗之工作。然而溶劑也是屬一種化學物質，也就是溶劑本身也具有一定之毒性能力，因此在選擇溶劑時需注意：

1. 選擇之溶劑可以使進行生物毒性試驗之毒物達到 100% 的溶解，並且在進行毒性試驗時也不會產生再溶出之現象。
2. 進行生物毒性試驗前需先進行溶劑對照(solvent control)之分析，得知溶劑之毒性大小以評估對生物毒性試驗之影響性。
3. 應避免所選之溶劑會與毒物進行化學反應，進而造成毒物之毒性有所變化。

一般在生物毒性試驗所選擇之溶劑包含二甲基甲醯胺(Dimethyl Formamide, DMF)、二甲亞砜(Dimethyl Sulfoxide, DMSO)、三乙三醇(Triethylene Glycol, TEG)及丙酮(Acetone)。針對魚類(96h-LC₅₀)^[80]之容許溶劑濃度：丙酮= 9,100 mg/L，DMF= 10,410 mg/L，DMSO=33,500 mg/L，TEG= 92,500 mg/L。而本研究之 DMSO 進行 solvent control 之分析結果由表 2.5.2 顯示出 EC₅₀、EC₁₀ 及 NOEC 值。而在進行毒性試驗前的儲備液的配製方法為將苯甲醛類溶於 30ml 之 DMSO(濃度= 1.0945×10^6 mg/L)中，再將 30ml 之 DMSO 放入 BOD 瓶內加去離子水稀釋。此時之 DMSO 濃度為 109450mg/L，而在進行毒性試驗時加入之 DMSO 最高量為 1mL，因此在毒性試驗之 BOD 瓶內之 DMSO 濃度最高為 364.83mg/L，皆低於 EC₅₀、EC₁₀ 及 NOEC 值。由此可得知對於毒性試驗而言溶劑之毒性影響不大。

Table 2.5.2、The solvent control of DMSO in algal toxicity tests

實驗毒物： DMSO 初始細胞密度(cells/mL)： 15000
 MCV (μm³)： 40.67 D (μm)： 4.267 Initial pH： 7.44 EDTA(%)： 0
 T(°C)： 24 Test duration： 48-h

Conc mg/L	Initial DO mg/L	Final DO mg/L	Final cells cells/ml	Delta DO mg/L	μspecific	μrelative	IR (growth rate)	IR (Biomass)	IR (DO)
Control	0.9167	3.736	251900	2.820	1.410	1	0	0	0
21525	1.206	2.096	69600	0.890	0.7668	0.5436	0.4559	0.7695	0.6844
14228	1.096	2.400	103900	1.303	0.9676	0.6862	0.3139	0.6247	0.5378
6931	1.006	2.870	124550	1.863	1.058	0.7505	0.2496	0.5375	0.3392
3283	1.046	3.216	177200	2.170	1.234	0.8754	0.1246	0.3153	0.2305
2189	1.076	3.446	188100	2.370	1.264	0.8967	0.1035	0.2693	0.1595
1094	0.976	4.006	235250	3.030	1.371	0.9720	0.0242	0.0702	-0.0744

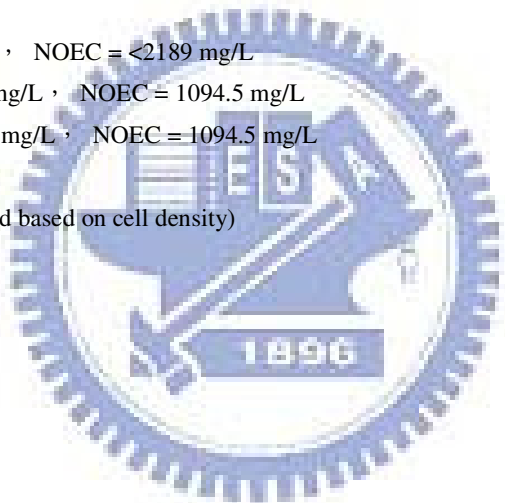
△DO : EC₁₀ = 1516.8 mg/L , NOEC = <2189 mg/L

Final yield : EC₁₀ = 816.10 mg/L , NOEC = 1094.5 mg/L

Growth rate : EC₁₀ = 2369.3 mg/L , NOEC = 1094.5 mg/L

IR : Inhibition rate

Biomass : Yield f (Final yield based on cell density)



第三章、基本理論

3.1 毒性試驗終點種類

藻類毒性試驗終點可分為兩種：(一)利用含有藻類溶液的溶氧濃度變化(Delta DO, ΔDO)，討論有機物毒性對藻類光合作用的影響 (二)利用藻細胞顆粒數的變化，討論有機物毒性對藻類 growth rate 和 final yield 的影響。以下說明各種抑制率的算法：

(1)以溶氧濃度變化為觀測終點時，毒物對藻類 ΔDO 的抑制率算法：

$$\text{Inhibition rate on } \Delta DO = 1 - \frac{\Delta DO_t}{\Delta DO_c}$$

ΔDO_t :表示有添加毒物的處理組藻類於四十八小時後的溶氧變化值

ΔDO_c :表示無添加毒物的控制組藻類於四十八小時後的溶氧變化值

(2) 本研究進行藻類毒性試驗初期的植種藻細胞數為 15000 cells/ml，因此以藻細胞顆粒數的變化為觀測終點時，毒物對藻類 growth rate 的抑制率算法：

$$\text{Inhibition rate on growth rate} = 1 - \frac{\ln(N_t/15000)}{\ln(N_c/15000)}$$

N_t :表示有添加毒物的處理組藻細胞顆粒數

N_c :表示無添加毒物的控制組藻細胞顆粒數

(3)本研究主要針對有機物毒性對藻類 final yield 的影響，在不同濃度下，有機物對藻類 final yield 的抑制率算法如下：

$$\text{Inhibition rate on final yield} = 1 - \frac{N_t - 15000}{N_c - 15000}$$

N_t :表示有添加毒物的處理組藻細胞顆粒數

N_c :表示無添加毒物的控制組藻細胞顆粒數

3.2 常用的單一毒性模式

受測試生物受到毒性物質作用時，所受影響或死亡之百分率，會隨著毒性物質濃度成 S 型曲線關係，稱為濃度反應關係，若已知毒物進入生物體內的量，則可稱為劑量反應關係(Dose-response curve)，其中 x 軸為有機物濃度，而 y 軸為反應百分比。在毒性試驗過程中，受測生物受毒性影響造成 50% 抑制或死亡，則稱為 EC_{50} (Effect Concentration 50%) 或 LC_{50} (Lethal Concentration 50%)。

生物體受毒性物質影響的劑量反應關係如圖 3.2.1 所示。虛線與實線分別代表受測生物體 A 與 B 的劑量反應曲線，可以看出虛線的斜率大於實線的斜率，表示生物體 A 對毒性物質的容忍範圍較小，亦說明了生物體 A 對毒物濃度的變化較敏感：微量的濃度變化即可導致抑制率的明顯改變。而在抑制率為 0.5 處，延伸至兩曲線所對應的毒性物質濃度，即為毒性物對生物體所造成的半至死濃度(EC_{50})。

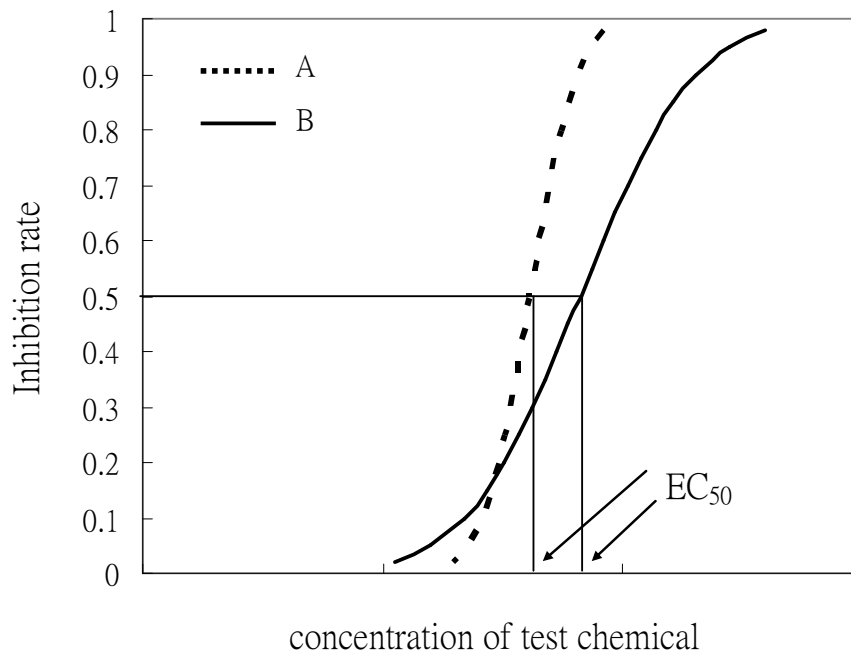


Fig 3.2.1、Dose-response curve of common toxicity test

由於欲從原來數據直接求得 EC_{50} 並不容易，通常必須藉由數學關係式將 S 型轉為以便求取，這也必須藉由數學轉換模式以便求取，此種數學轉換模式便稱為劑量反應關係模式，一般常用的劑量反應關係模式分為 Probit、Weibull 與 Logit 三種，而表 3.2.1 針對 Weibull、Probit 與 Logit 三種模式的容忍度分布公式。下列為常用模式之解釋：

1. Probit：為最常用的劑量-反應(dose-response)模式，其假設生物對毒性物質的容忍度分布為常態分布(Log-normal distribution)，因此以常態分佈函數來表示毒物對生物抑制率 P 對毒物濃度(劑量)Z 的濃度(劑量)反應曲線。在 Probit 轉換式中，毒性物質之 S 型濃度反應曲線先轉換成 NED(Normal Equivalent Deviation) scale 之直線，其中 50 % 抑制率(P) 對應至 NED scale 上時為 0，而 84.1% 則對應為 1，而 NED scale 的座標值加上 5 即為 Probit 座標之概率單位 Y 值 ($Y=NED+5$)，當 $Y=5$ 時表示一半的測試生物受到毒性物質抑制，此時對應的毒物濃度就是 EC_{50} 。Probit 單位與反應率與毒性物質劑量間之轉換關係如下：

$$Y=A+B\log Z \quad (1)$$

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

其中 Y 為 Probit 單位，A、B 為劑量-反應曲線之截距與斜率，Z 為毒性物質劑量濃度 (單位：mg/l)，P 為測試物種對毒性物質之反應率 (如死亡率等，單位：%)，erf 為 error function。

2. Weibull：為機率-反應機制基礎 (Mechanistic-Probability basis) 模式，發展根據毒性物質分子與受測試生物之受體分子間化學鍵關係所推演而來，logit 模式相同皆假設毒性物質會在生物體內受體產生化反應。
3. Logit：由人口成長研究所發展而出的另一種模式，描述毒性反應中的某種酵素反應 (Enzyme Reaction)，適用於自催化 (autocatalysis) 之化學反應

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

Type	Transformation	Probability density	Probability of response P
Weibull	$u = \ln(k) + \eta \ln(z)$	$\exp(t - e^t)$	$1 - \exp(-kz^\eta) = 1 - \exp(-e^u)$
Probit	$Y = \alpha + \beta \log(z)$	$\frac{1}{\sqrt{2\pi}} \exp(-\frac{t^2}{2})$	$\int_{-\infty}^{Y-5} \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \exp(-\frac{t^2}{2}) dt = \frac{1}{2} (1 + \operatorname{erf}(\frac{Y-5}{\sqrt{2}}))$
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	Probability 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	$\int_{Y-5}^{\infty} \exp(-\frac{t^2}{2}) dt = \frac{1}{2} (1 - \operatorname{erf}(\frac{Y-5}{\sqrt{2}}))$	$Y = 5 + \sqrt{2} \operatorname{erf}^{-1}(2p - 1)$	$Y = 5 + \sqrt{2} \operatorname{erf}^{-1}(1 - 2Q)$
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 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，當系統達到平衡（Steady State）時：

(1)由反應槽中生物質量之平衡可得下列式子：

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

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，則 $\mu = D$ 。

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

此表示當反應槽達到平衡穩定狀態時，反應槽內生物之生長率即為該系統之稀釋率。

(2)由反應槽內之基質平衡可得下式：

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

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，

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

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

$$\text{又 } \mu = D$$

$$\text{所以 } X = Y(S_0 - S)$$

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

$$\text{及 } \mu = D$$

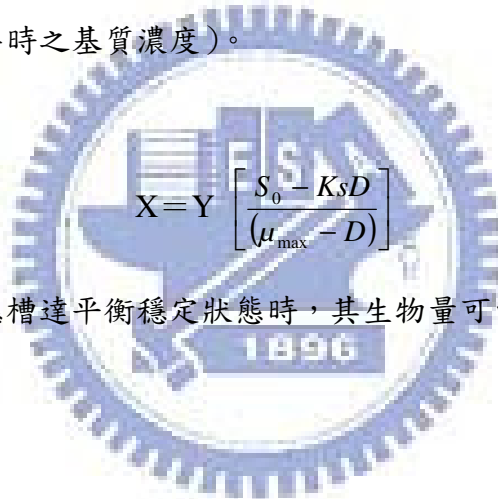
$$\text{所以 } S = \frac{K_s D}{(\mu_{\max} - D)}$$

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。



3.4 模式最佳化選擇

不同的分析模式用來分析毒性試驗的 EC 值會造成不同程度的誤差，在傳統毒物學上常以 EC₅₀ 值表示化學物質的相對毒性，當我們將 EC₅₀ 值探討轉向更低濃度毒物(如 EC₁₀)對生物的影響，這類的誤差變會被放大，因此為了改善這種情況，毒性數據處理程序中往往需要對模式本身作適合度分析，以找出最適合之分析模式。本試驗主要觀察引起 50% 的藻類致死性效應的化學濃度即求得 EC₅₀ (mg/L)，並進行最佳模式的選擇。

在模式最佳化方面，利用 G test 來作最佳化選擇(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(best fit)。G 值之計算公式如下：

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

a：重複組次數， f_i ：處理組實驗值， \hat{f}_i ：對應模式之期望值

3.5 NOEC 與 Cut-Off value

3.5.1 判定 NOEC 和 LOEC

此外另一個判斷毒性反應的指標為「未造成生物產生明顯毒性反應的最高濃度」(no observed effect concentration, NOEC)或「達到顯著毒性反應的最低濃度」(lowest observed effect concentration, LOEC)即代表毒性

物質對受測物的無影響濃度或最小影響濃度。NOEC 及 LOEC 求法為將各濃度區間下的毒性反應（處理組）與控制組的比較，比較在統計上是否達到顯著水準來判斷。舉例來說，假設在某實驗中處理組 A（統計）分析發現和控制組沒有差異，而比處理組 A 更高濃度的處理組 B 分析後發現和控制組有統計上差異，則處理組 A 的濃度定義為 NOEC，而處理組 B 的濃度稱為 LOEC。本研究利用統計方法 Dunnett's test，藉以分別出各濃度區間下的毒性反應與控制組的比較，在機率上是否達到顯著水準。

3.5.2 平均中斷值 (Cut-Off value)

為了了解毒物在低濃度下分析方式結果（模式迴歸分析及統計分析）的差異及找出較適的水體保護指標，本研究中分別比較兩種指標 NOEC 及 EC₁₀ 值，並利用平均中斷值 (cut-off value) 作為選擇 NOEC 或 EC₁₀ 的客觀參考點。平均中斷值本身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，此中斷值亦指出 NOEC 所能達到之保護程度的極限，使 NOEC 之定位更加明顯，其計算公式如下：

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

T：查表所得（以 one-tail Dunnett's test 在顯著程度為 5% 之表格）

X_c 為控制組之平均值，S_w：組內變異之平方根

n_c, n_i：控制組與處理組重複試驗次數。

3.5.3 NEC

毒性反應的判斷指標，除了前面提到的 NOEC 及 EC₁₀ 外，還有無影

響濃度(No Effect Concentrations, NEC)。NEC 主要和 NOEC 不同的地方是在於計算的方法不同,之前已提到 NOEC 是利用變數分析(ANOVA)的方法求得的,而 NEC 則是利用回歸分析(Regression analysis)之方法所求得的。

計算 NEC 主要為一非線性模式的假設,其主要是假設所觀測到的反應終點參數和濃度呈現一個簡單的線性遞減關係或者是為一指數遞減的關係,但在接近濃度為零(及控制組)時,會呈現一定值接著即開始遞減,如圖 3.5.1, 3.5.2 所示,c 即表示為 NEC。而這些模式在統計學上的文獻中已存在很久並且有相當多的命名,例如:segmented regression, multiphase regression, regression with changepoint 以及 regression with breakpoint 等等。而使用這樣的方式求的 NEC,計算方法複雜且須有良好的統計背景基礎才會運用。因此,本研究求得方法是參 Karsten and Narindwr 所提出的方法,利用將濃度及反應終點的參數取對數轉換後,相互作圖比較取其線性關係式後,將反應終點參數控制組的值代入,推出 NEC 的值。而此線性關係的判斷則是參考 Paulsson *et al.*,其根據兩項參考值

- (1) 回歸斜率的顯著值($P < 0.05$)。
- (2) 最大的 r^2 。藉由此來判定為線性關係。

即可判定此迴歸回一線性關係。在本研究中,超過百分之九十五的數據其 P 值皆小於 0.05,而平均 P 值約為 0.016。

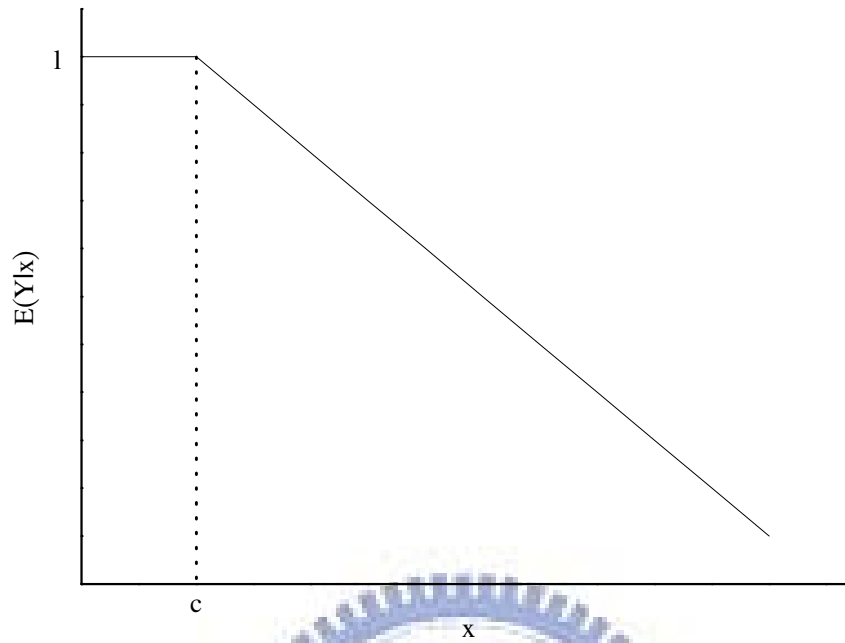


Fig 3.5.1 、 Mean function of linear decay

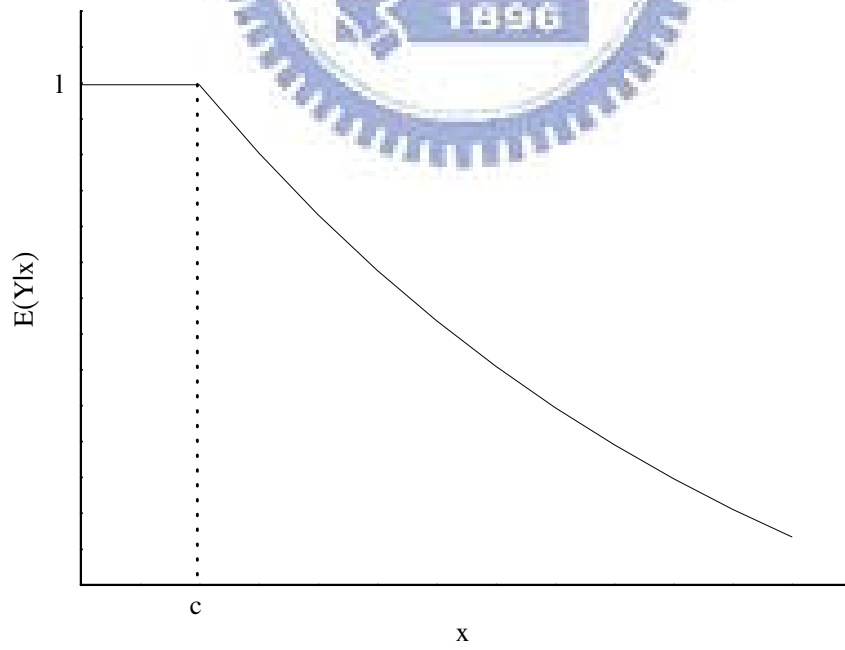


Fig 3.5.2 、 Mean function of exponential decay

第四章、實驗設備與方法

4.1 實驗設備及材料

密閉式 BOD 瓶藻類毒性試驗所需的設備材料：

1. **恆溫室**：恆溫無塵室大小約為五坪，其溫度控制在 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ，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。使用時需確定水質之電阻值 $\geq 18.2 \text{ Mega-ohm}$ ($\text{M}\Omega\text{-cm}$) 才可開始使用。
3. **培養裝置與迴轉式振盪儀**：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 $135 \times 110 \times 135\text{cm}$ ，頂面履以 120cm 長之白色螢光燈管 8 支。並設有迴轉式振盪儀 (EIRSTEK 公司，型號 S103)，搖動速度可大於 100 rpm ，其台面共有 66 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。
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 125ml ，Erlnmeyer 之三角錐瓶。
5. **紗布**：藻類於批次培養時，使用消毒紗布覆蓋在三角錐瓶瓶口，其用意為防止異物進入並便利空氣中之 CO_2 流通而提供藻類生長所需之碳源。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 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**：用於連續式培養母槽，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**：蠕動幫浦使用日本 EYELA 公司，型號 MP-1000 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 400ml/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 μ m 標準顆粒乳液來校正。配有 50 及 100 μ m 孔徑之玻璃管。本實驗使用 100 μ m 孔徑之玻璃管，量測之顆粒直徑範圍為 2 μ m~60 μ m
14. **電腦及分析軟體**：使用中央處理器為 PIII -650 之桌上性電腦，視窗 XP (WindowsXP) 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 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. **酸鹼度 (pH) 測定儀**：使用 Suntex 公司，Model SP-2200 之 pH 測定儀。其精確度為 ± 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±0.1%。
19. **曝氣用氣體鋼瓶：** 使用含 0.5%CO₂ 之高壓氣體鋼瓶，氮氣之純度達 99.9%，總氣體體積為 6m³。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℃ 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/cm²，容積為 0.0521m³。使用時條件設定為高溫 (121 °C) 高壓 (1.1 kg/cm²) 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 。
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 100~1000μl

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 μ m 濾膜，過濾 Isoton II 時使用 60301 之 0.2 μ m 濾膜。

29. QSAR 中物化參數計算程式：

- 辛醇水係數 ($\log K_{ow}$) 由美國環保署提供的 WSKOWWIN V1.41 program 計算求得
- E_{LUMO} 及 E_{HOMO} 值以 Gaussian 98 for windows 中的 ab initio method (全初始量子化學計算法) 而得。計算流程為先利用 ChemOffice 建立所需要的輸出檔，再將其輸入 Gaussian 98 for windows 計算而得。為了節省之後的計算時間，化學物結構先利用 ChemOffice 在 B3LYP/6-31G 的 level 下將化學物結構最佳化，再存成輸入檔。輸入檔以 Gaussian 98 開啟進行疊代運算求解，運算後所得的結果中最大的 Alpha occ. eigenvalues 值即為該化學物的 E_{HOMO} 值，而最小的 Alpha virt. Eigenvalues 值即為化學物的 E_{LUMO} 值。

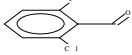
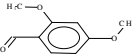
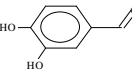
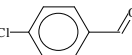
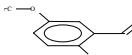
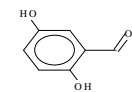
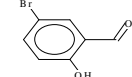
試驗步驟：

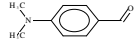

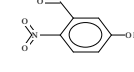
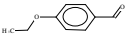
本研究主要是利用 BOD 瓶進行 20 種為生物反應性之有機醛類(苯甲醛)的藻類毒性試驗，試驗共進行 2 run 以上，每一 run 為三重複，每一重複為 7 瓶。分別以溶氧、最終生物數量和生長率為觀測終點(end point)進行單一毒物之毒性試驗。實驗毒物之物化特性如表 4.1.1。

(): purity
 manufacturer: Riedel-de Haen

Table 4.1.1 、Physical and chemical characteristics of benzaldehydes

Chemical	CAS No.	Formula	M.W.	Structure	E _{HOMO}	E _{LUMO}	Log P	Solubility (mg/L)	Vapor pressure(Kpa)	Henry's Law Constants (atm·m ³ /mole)
3-ethoxy-4-hydroxybenzaldehyde (99%)	121-32-4	C ₉ H ₁₀ O ₃	166.17		-9.402	-0.498	1.58	2820	1.38717E-06	1.10E-10
3-bromo-4-hydroxybenzaldehyde (97%)	2973-78-6	C ₇ H ₅ BrO ₂	201.02		-9.636	-0.691	1.83	1330	7.16259E-05	5.57E-10
3,4,5-trimethoxybenzaldehyde (98%)	86-81-7	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	196.21		-9.297	-0.563	1.39	1490	0.000150721	2.78E-09
4-ethoxy-3-methoxybenzaldehyde (98%)	120-25-2	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	180.2		-9.217	-0.420	1.63	1160	0.000493512	6.24E-08
3,4-dimethoxybenzaldehyde (99%)	120-14-9	C ₉ H ₁₀ O ₃	166.17		-9.263	-0.456	1.22	6320	0.001467197	4.70E-08
4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde (99%)	121-33-5	C ₈ H ₈ O ₃	152.15		-9.367	-0.509	1.21	1.1E+004	1.5739E-05	2.15E-09
Benzaldehyde (99%)	100-52-7	C ₇ H ₆ O	106.12		-10.003	-0.435	1.48	6570	0.016939461	2.67E-05
4-Nitrobenzaldehyde (98%)	555-16-8	C ₇ H ₅ NO ₃	151.12		-10.834	-1.674	1.56	2340	0.000472171	5.30E-08
2,4-Dihydroxybenzaldehyde (98%)	95-01-2	C ₇ H ₆ O ₃	138.12		-9.459	-0.565	1.53	7640	4.94E-06	1.83E-10

Chemical	CAS No.	Formula	M.W.	Structure	E _{HOMO}	E _{LUMO}	Log P	Solubility (mg/L)	Vapor pressure(Kpa)	Henry's Law Constants (atm-m ³ /mole)
2-Chloro-6-fluorobenzaldehyde (95%)	387-45-1	C ₇ H ₄ ClFO	158.55		-9.94	-0.876	2.56	-	-	-
2,4-Dimethoxybenzaldehyde (98%)	613-45-6	C ₉ H ₁₀ O ₃	166.17		-9.425	-0.482	1.87	1450	0.000158724	4.70E-08
3,4-dihydroxybenzaldehyde (99%)	139-85-5	C ₇ H ₆ O ₃	138.12		-9.24	-0.55	1.09	6310	1.54723E-05	1.45E-13
4-Chlorobenzaldehyde (97%)	104-88-1	C ₇ H ₅ ClO	140.57		-9.907	-0.736	2.1	1340	0.024408829	9.95E-06
2,5-dimethoxybenzaldehyde (99%)	93-02-7	C ₉ H ₁₀ O ₃	166.18		-8.878	-0.419	1.91	765	0.001467197	4.70E-08
2,5-dihydroxybenzaldehyde (98%)	1194-98-5	C ₇ H ₆ O ₃	138.12		-9.058	-0.686	0.54	1.38E+04	1.55E-05	1.83E-010
5-bromo-2-hydroxybenzaldehyde (98%)	1761-61-1	C ₇ H ₅ BrO ₂	201.02		-9.506	-0.818	2.9	100	7.16E-05	7.01E-007

Chemical	CAS No.	Formula	M.W.	Structure	E _{HOMO}	E _{LUMO}	Log P	Solubility (mg/L)	Vapor pressure(Kpa)	Henry's Law Constants (atm-m ³ /mole)
4-(dimethylamino)benzaldehyde (99%)	100-10-7	C ₉ H ₁₁ NO	149.19		-8.541	-0.178	1.81	2180	0.000491	2.14E-007
4-bromobenzaldehyde (99%)	1122-91-4	C ₇ H ₅ BrO	185.02		-9.934	-0.813	2.6	314	0.003415	5.35E-006
5-hydroxy-2-nitrobenzaldehyde (98%)	42454-06-8	C ₇ H ₅ NO ₄	167.12		-10.294	-1.459	1.63	9870	5.07E-06	5.51E-012
4-ethoxybenzaldehyde (99%)	10031-82-0	C ₉ H ₁₀ O ₂	150.18		-9.312	-0.341	2.28	1610	0.003828	1.05E-006

- 以上之化學物質皆為揮發性或半揮發性，其區分之原理為：

VOCs 之定義為：蒸氣壓 > 10⁻⁵ Kpa；亨利常數(H) > 10⁻³ atm-m³/mole

半揮發性有機物定義為：蒸氣壓介於 10⁻²~10⁻⁸ Kpa；10⁻³ > H > 10⁻⁷

不揮發性有機物定義為：蒸氣壓小於 10⁻⁸ Kpa；H < 10⁻⁷

- 760 mm-Hg = 1 atm = 101.37 Kpa
- E_{HOMO}、E_{LUMO} data from Chemoffice version 5.0 software (MOPAC program, AM1 Hamiltonian)

試驗毒物配製

本實驗採用的試驗毒物為工業中常見的有機苯甲醛及衍生物，毒性物質濃度單位皆為 mg/l。由於苯甲醛類大多為難溶於水之有機物，因此在貯備溶液之準備過程中，會以二甲亞砜(DMSO)當為溶劑，將一定量之苯甲醛加入其中以配製所需之貯備溶液。Willford W.A.^[80]於報告中指出，以 DMSO 對魚進行毒性實驗時，其 96hr-LC₅₀ 值約為 33,500mg/L，由此可得知此毒物之毒性很低，也因此常以此物質當為進行毒性實驗之溶劑。本實驗參照 Douglas W.Kononen *et. al.*^[81]和 Pia Arenberg *et. al.*的方法進行，於進行試驗時於培養基質及藻液中加入適量體積由下圖 4.1.1 方法配製的儲備液(stock solution)，以達到所需的毒物濃度。此外當實驗進行完畢時，所配製的有機物的貯備溶液便不再重複使用，避免貯備溶液所受的干擾影響到下次實驗。

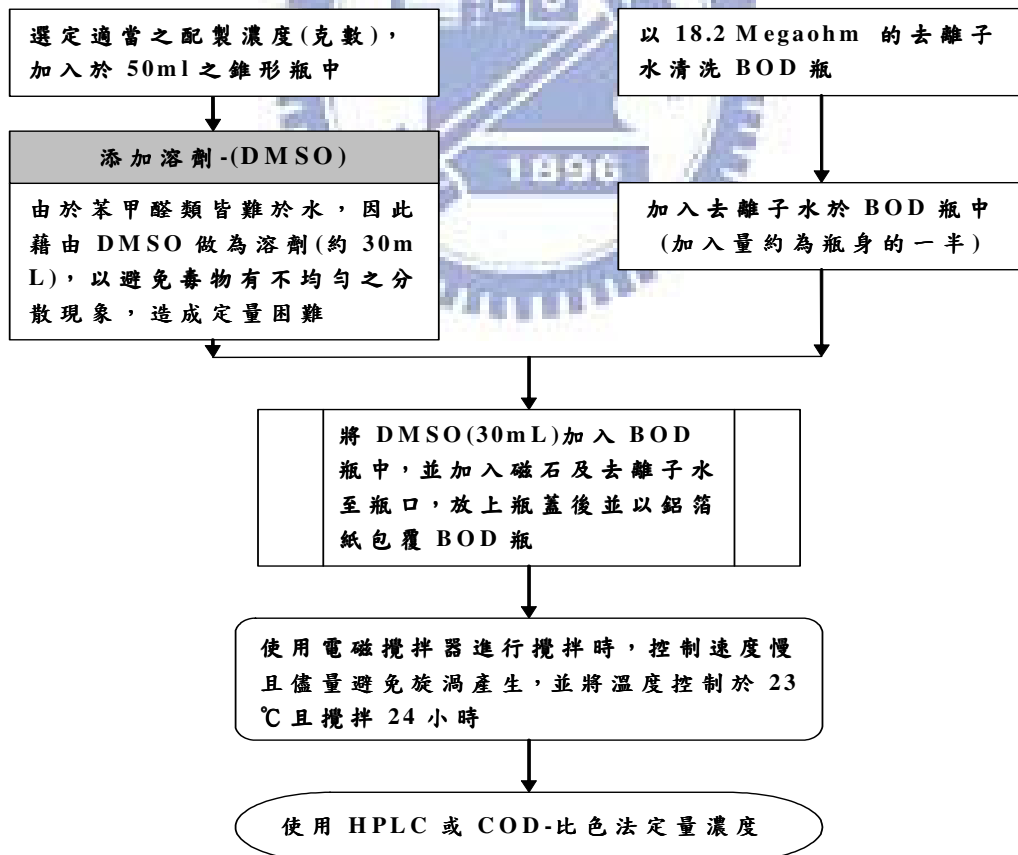


Fig 4.1.1、The flow chart of stock solution manufacture

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 實驗前準備

4.3.1 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，再稀釋至 1 公升。接著以 0.1N 當量濃度的 NaOH 或 HCl 將營養基質之 pH 值調至 7.50 ± 0.10 ，用錫箔紙包覆後置於 4°C 冰箱中保存。

1. 硝酸鈉貯備液：溶解 12.750 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：共配製 stock1 (100% EDTA)、stock2 (10% EDTA) 和 stock3 (0% EDTA) 三瓶不同編號的貯備溶液，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。每瓶的配法為先秤取下列七種藥品加入 500 ml 去離子水中，

- 92.760 mg H₃BO₃
- 207.690 mg MnCl₂ · 4H₂O
- 1.635 mg ZnCl₂
- 79.880 mg FeCl₃ · 6H₂O
- 0.714 mg CoCl₂ · 6H₂O
- 3.630 mg Na₂MoO₄ · 2H₂O
- 0.006 mg CuCl₂ · 2H₂O

加完後，再加入螯合劑 (EDTA)，而所需加的量如下：

- Na₂EDTA · 2H₂O

stock1 : 150 mg Na₂EDTA · 2H₂O

stock2 : 15 mg Na₂EDTA · 2H₂O

stock3 : 不加

5. 硫酸鎂貯備液：溶解 7.350 g MgSO₄ · 7H₂O 於 500 ml 去離子水中。
6. 磷酸氫二鉀貯備液：溶解 0.522 g K₂HPO₄ 於 500 ml 去離子水中。
7. 碳酸氫鈉貯備液：溶解 7.5 g NaHCO₃ 於 500 ml 去離子水中。

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 0.45μm 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。

Table 4.3.1、The consist of macro-algal medium

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 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	1.20

Table 4.3.2、The consist of micro-algal medium

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
$\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	300		

4.3.2 玻璃器皿清洗與滅菌

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，置入烘箱中以 52°C 之溫度烘乾。使用前需在其開口處封上鋁箔，置入滅菌斧中，以 1.1Kg/cm^2 、 121°C 的條件滅菌 15 分，而定量容器則不可加熱烘乾或放入滅菌斧中，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。

4.3.3 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，光度不足處調整木板大小及形狀，並以具反射作用之鋁箔紙覆蓋於木板之上反覆進行微調，使整個震盪器盤面之光度落在 $64.5 \pm 10 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ($4300 \pm 10\%$ Lux) 之範圍內，以減少實驗之誤差。表 4.3.3 則列出所有盤面光度之調整結果，其中最大值為 $67.50 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ，最小值則為 $60.75 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ，而平均值則為

64.79 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ，其誤差皆控制於 10% 以內，而 C.V. 值為 1.92%。

Table 4.3.3、The display of luminosity upper the shaker($\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$)

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
63.25	63.00	63.75	64.50	63.75	65.25	66.75	66.00	66.75	65.25	65.25	66.00	66.00
63.51	63.75	64.50	63.00	63.00	65.25	66.75	65.25	66.00	65.25	64.50	64.50	66.75
63.7	64.50	66.00	64.50	65.25	65.25	66.00	65.25	65.25	64.50	65.25	66.00	66.00
64.50	64.50	66.00	64.50	65.25	64.50	65.25	65.25	63.75	64.50	64.50	66.00	67.50
64.95	66.25	65.25	64.50	65.25	66.00	66.75	65.25	64.50	64.50	64.50	65.25	66.75
66.00	64.50	64.50	63.75	64.50	65.25	65.25	66.75	64.50	64.50	64.50	66.00	66.75
64.5	63.75	64.50	62.25	63.00	64.50	64.50	65.25	63.75	64.50	64.50	65.25	66.00
63.00	63.00	62.25	60.75	61.50	63.00	63.75	63.75	62.25	63.00	63.00	64.50	66.00

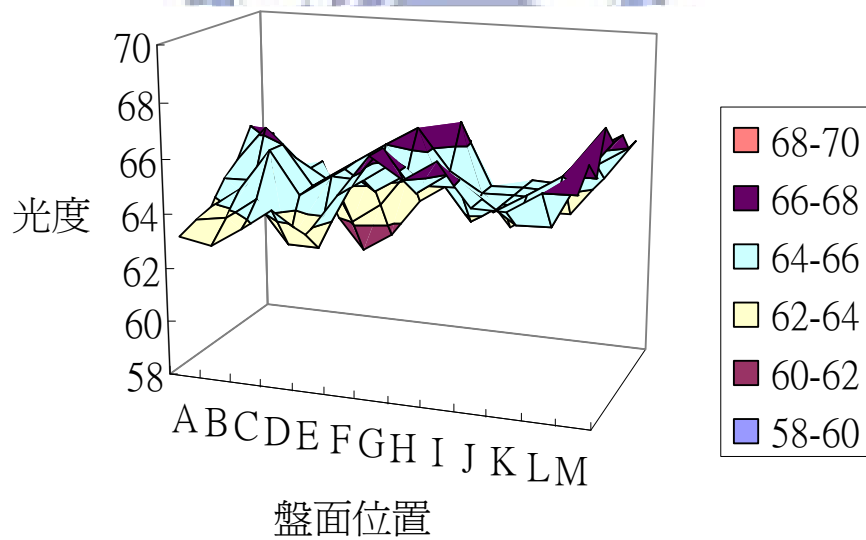


Fig 4.3.1、調整後之盤面光度區面圖(單位: $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$)

4.3.4 藻類之培養步驟及裝置

實驗物種 *Pseudokirchneriella subcapitata* 在進行實驗前必須經過 2-7 天預培養(pre-culture)使之平均細胞體積(mean cell volume)達到 $39\text{-}46\ \mu\text{m}^3$ ，而藻類細胞數量達到 $1.9\text{-}2.0\times 10^6\ \text{cells/mL}$ ，在此條件下才取藻類進行實驗。在培養藻類最需注意的步驟為微營養鹽貯備液的加入方法，一開始活化藻類加的是 stock1 (100% EDTA)，而在連續式母槽中培養藻類時使用的是 stock2 (10% EDTA)，且第一瓶硝酸鈉貯備液和第六瓶磷酸氫二鉀貯備液加入體積需為其它五瓶的一半。此外液態營養基質中之藻類可在 4°C 下保存四個星期，於四個星期之後做移植以繼續培養保存菌種。圖 4.3.2 為培養步驟且本實驗條件依據 Lin^[33] 所決定之適當的條件下進行，條件如下：

1. 溫度：藻類之培養及毒性試驗皆在 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 下進行。
2. 光度：藻類之培養及毒性試驗皆在光度為 $64.5 \pm 10\% \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ 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： $1.5 \times 10^4\ \text{cells / ml}$ 。
9. 振盪頻率：100 rpm。

4.3.5 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 200g 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 μ 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。

4.3.6 COD-比色法藥品配製

配製前需準備 500 mL 的玻璃瓶以 18.2 M Ω -cm 的試劑水沖洗乾淨和乾燥。然後包覆鋁箔紙備用。本法所需藥品備製方法如下：(參考環保署「水中化學需氧量檢測方法-密閉迴流滴定法」方法)

1. 重鉻酸鉀消化溶液：將 4.913 g 的重鉻酸鉀 (先在 103 $^{\circ}$ C 烘乾 2 小時)，加入約 500 mL 試劑水中，依序加入 167 mL 濃硫酸、33.3 g 硫酸汞，混合溶解，冷卻至室溫後定量至 1 L。
2. 硫酸試劑：於 2.5 L 濃硫酸中加入 25 g 硫酸銀，放置 1 至 2 天 (或以磁攪拌器攪拌數小時) 使硫酸銀完全溶解。
3. COD 標準溶液：稱取 0.425 g 已在 120 $^{\circ}$ C 烘乾至恆重之苯二甲酸氫鉀 (KHP)，溶解於試劑水中，定量至 1 L。KHP 的理論 COD 值為 1.176 mg / mg，本溶液的理論 COD 值為 500 mg / L。

4.3.7 電子顆粒計數器操作方式與原理

在電子顆粒計數器中有一根玻璃管及一攪拌器，將待測之顆粒樣品先與 ISOTON II 稀釋樣品 (氯化鈉溶液) 混合製成稀釋懸浮液。此懸浮液自玻

玻璃管近底端的側面的一口徑已定之小孔抽引入測試管(Aperture)內，小孔兩側各有一內外電極，當顆粒通過小孔入管內時，每一顆粒均會取代與其相等體積之電解液，導致兩電極之電阻呈現暫時性之改變，由於系統是恒電流設計，故電位差亦暫時性之改變，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，直接由電子記數器記錄顯示，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。電子顆粒計數器主要條件設定如下表 4.3.4。本實驗採用 100 μ m 孔徑之毛細玻璃管。

計數時，取 1ml 的藻液置入 50ml 之量瓶內，再加入 ISOTON II 至 50ml，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 2% 者之平均值。

Table 4.3.4、The conditions of Coulter Counter

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)	2.177 μ m
粒度上限 (Diameter Lower Threshold , Tu)	6.975 μ 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
孔徑 (Orifice Diameter)	100
孔長 (Orifice Length)	75.00
分析量	500 μ L
Setup	Manual
Kd	924
Size	5.00 E
Size unit	μ m

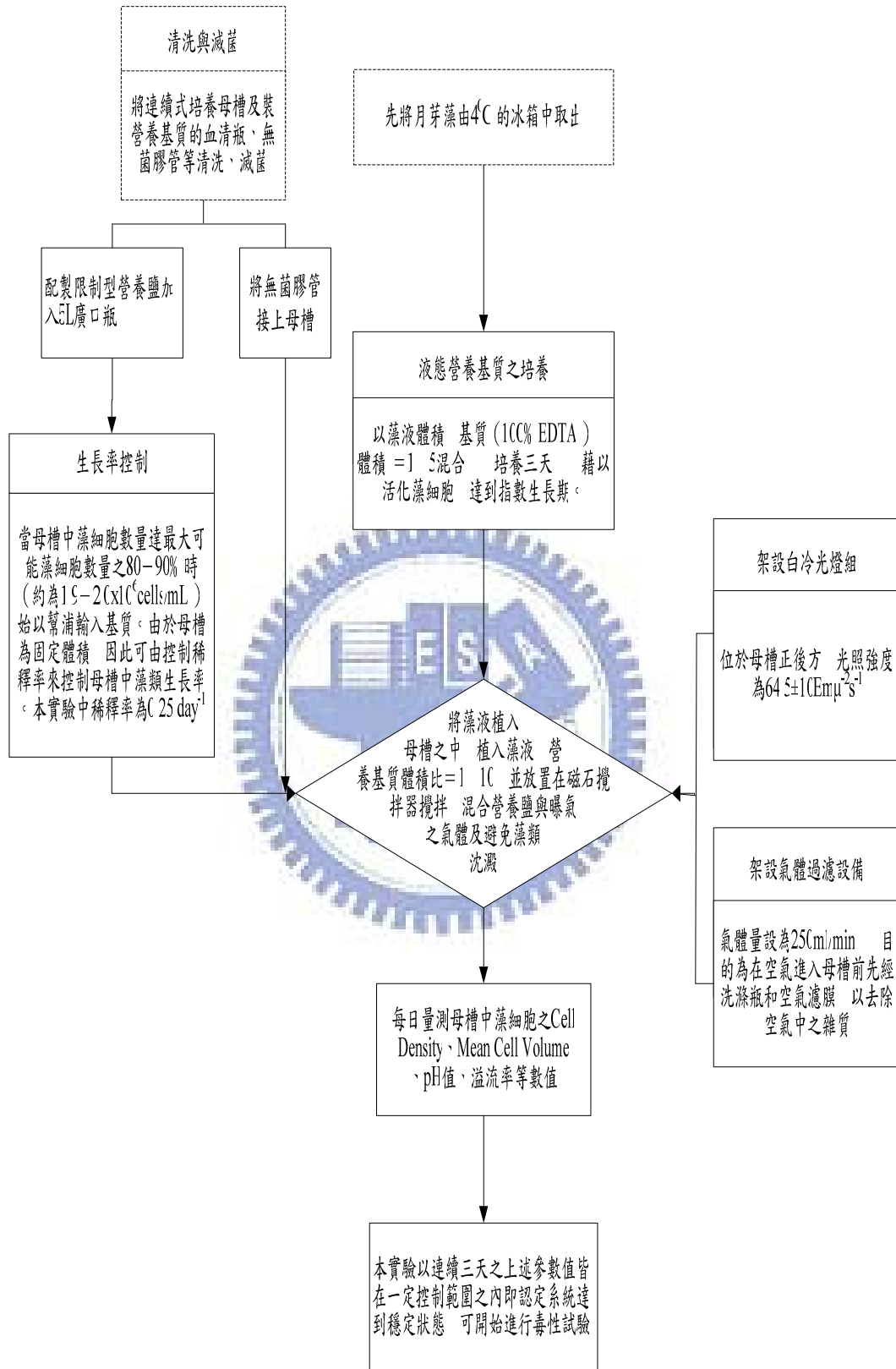


Fig 4.3.2、The culteur steps of algal

4.4 儀器操作原理、步驟與設定條件

試驗需先進行有機物定量，其中試驗毒物中以 COD-比色法定量及 HPLC 定量，以下分別就儀器的原理及實驗步驟分別描述。

4.4.1 COD-比色法

本實驗採用 COD-比色法定量濃度，其中藥品及配法參考環保署「水中化學需氧量檢測方法-密閉迴流滴定法」方法，但 COD 濃度決定則採直接比色方式而不採迴流滴定方式。COD 的檢量線是利用 KHP（鄰苯二甲酸氫鉀）濃度對吸光度（600nm）做圖。在此假設苯甲醛類在 150 °C 酸性條件下可被強氧化劑重鉻酸鉀完全氧化成水和二氧化碳，經由比色法求得稀釋後樣品 COD 濃度，再換算儲備液中毒物的濃度。詳細的操作步驟列於圖 4.4.1。



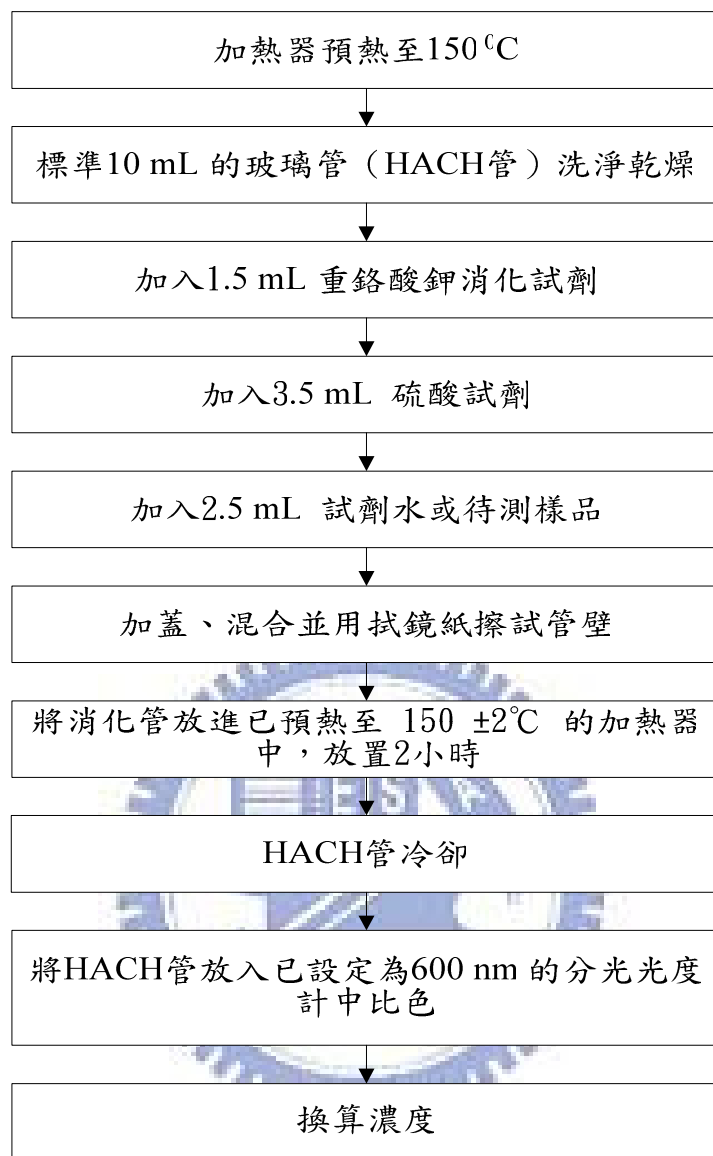


Fig 4.4.1、Setting and operate step of COD-colorimetry

4.4.2 高效能液相層析儀 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

1. 原理：

HPLC 是利用樣品與動相、靜相介面間大小不同之作用力所造成之速度差導致於樣品中物質之分離。不同的分析物質及 Column 種類會不同的移動相，有的物質較易和動相介面結合，其通過 Column 時速度較其他物

質快，因此由於此時間差，使其較先被偵測器偵測到，隨後其他的物質再一一被偵測到；反之較容易和靜相介面結合的物質，則較慢出現在偵測器上。當偵測器偵測到物質時，觀測螢幕上會出現一個脈衝 (Peak Shape)，依造脈衝出現的時間點和標準品比較則可以得知此物質之種類，並可以計算脈衝面積之大小以得之其濃度等數據。理想中的脈衝為高斯曲線 (Gaussian Curve)。本實驗相關規格及設定的內容如表 4.4.1。

Table 4.4.1、The analysis conditions and apparatuses of HPLC

項 目	規 格 與 設 定 條 件
型號 (type)	Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector Waters 515 HPLC Pump
分離管柱 (column)	C18 - 4.6 \times 150 mm (Type :T91971L)
迴路容量 (loop volume)	20 μ l
沖提相 (mobile phase)	組成：60%乙晴 + 40%去離子水 前處理：超音波震盪將氣泡趕走 流速：1.5 ml/min
管柱壓力 (pressure)	約 650 psi
偵測波長 (λ)	300 nm
滯留時間(run time)	20 min

2. 樣品前處理

- 將欲分析樣品置於保存容器之中，置於冰箱內 4°C 冷藏。
- 將塑膠針筒及濾膜置入冰箱，等待使用。
- 待分析時，於冰箱內 (低溫狀態之下)，將樣品搖晃均勻，以針抽取足量樣品置於 HPLC 分析容器中，等待分析。

3. HPLC 操作步驟

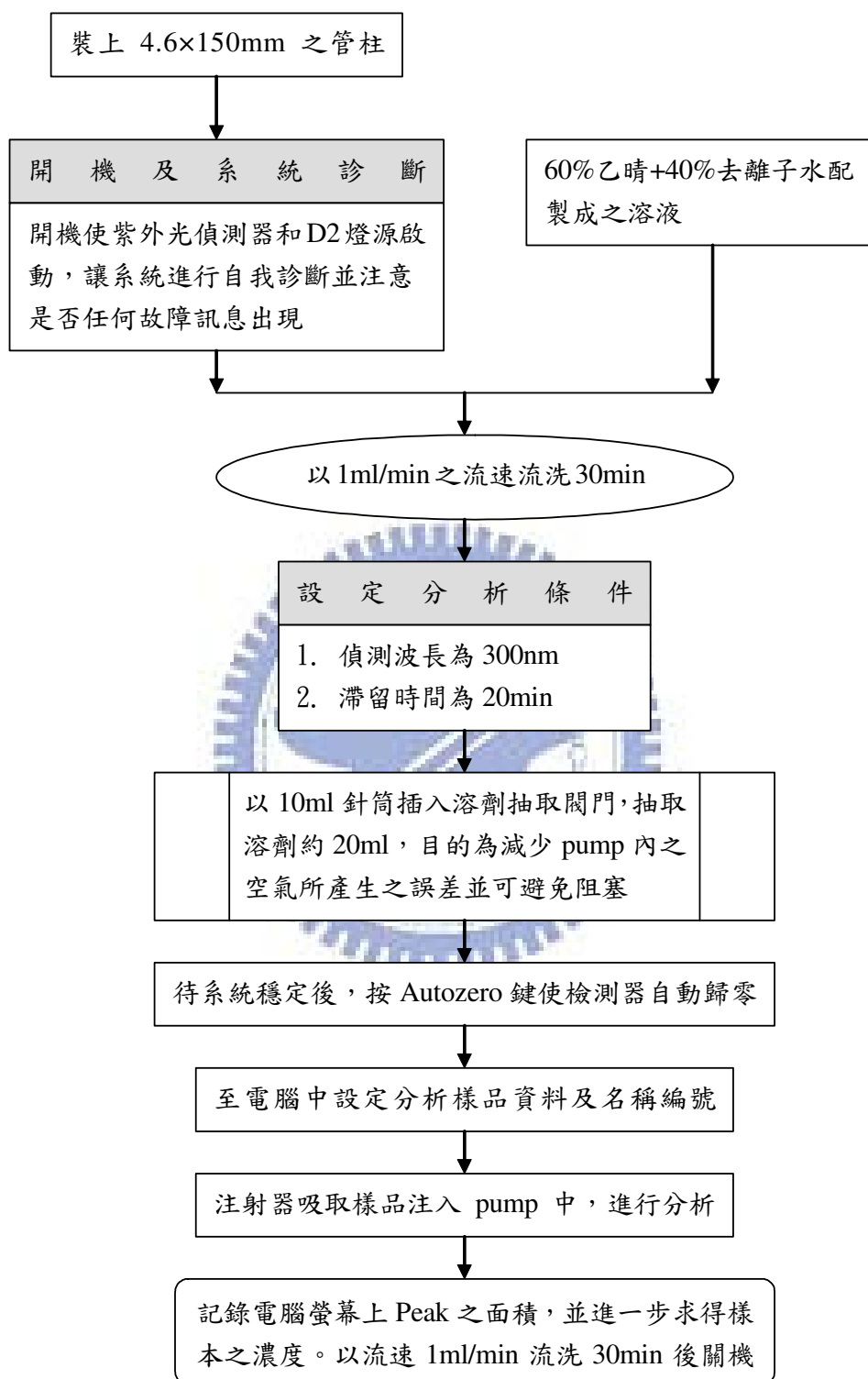


Fig 4.4.2、Setting and operate step of HPLC

4.5 密閉式藻類毒性試驗方法及步驟

4.5.1 實驗方法

於進行藻類毒性實驗前，先查尋過去是否有學者亦是以藻類進行毒性試驗，並參考其實驗結果，接著以文獻中所記載之濃度，於實驗前進行配製。若查無以藻類進行毒性試驗的資料時，則以文獻中的實驗數據與本實驗室過去實驗數據之間的關連性，進行實驗毒物濃度的預測。每次所進行之藻類毒行試驗均包括無添加毒物的控制組，以及添加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(EC_{50})。

4.5.2 實驗步驟

本藻類試驗為屬於四十八小時的急毒性試驗，其圖 4.5.1 為密閉式藻類毒性試驗流程暨裝置示意圖。以下針對實驗進行的第一天及第三天需準備器具和進行順序介紹如下：

第一天

1. 去離子水曝氣：當確定連續式培養母槽穩定之後，即可以開始藻類毒性試驗。

(1) 器具

- 18.2 Megaohm 的去離子水
- pH meter
- 0.1N 氫氧化鈉 (NaOH)
- 去離子水曝氣設備 (包含德製下口瓶、0.5% CO_2 + 99.5% N_2 之高壓氣體鋼瓶、氣體流量計、幫浦管和曝氣小球)

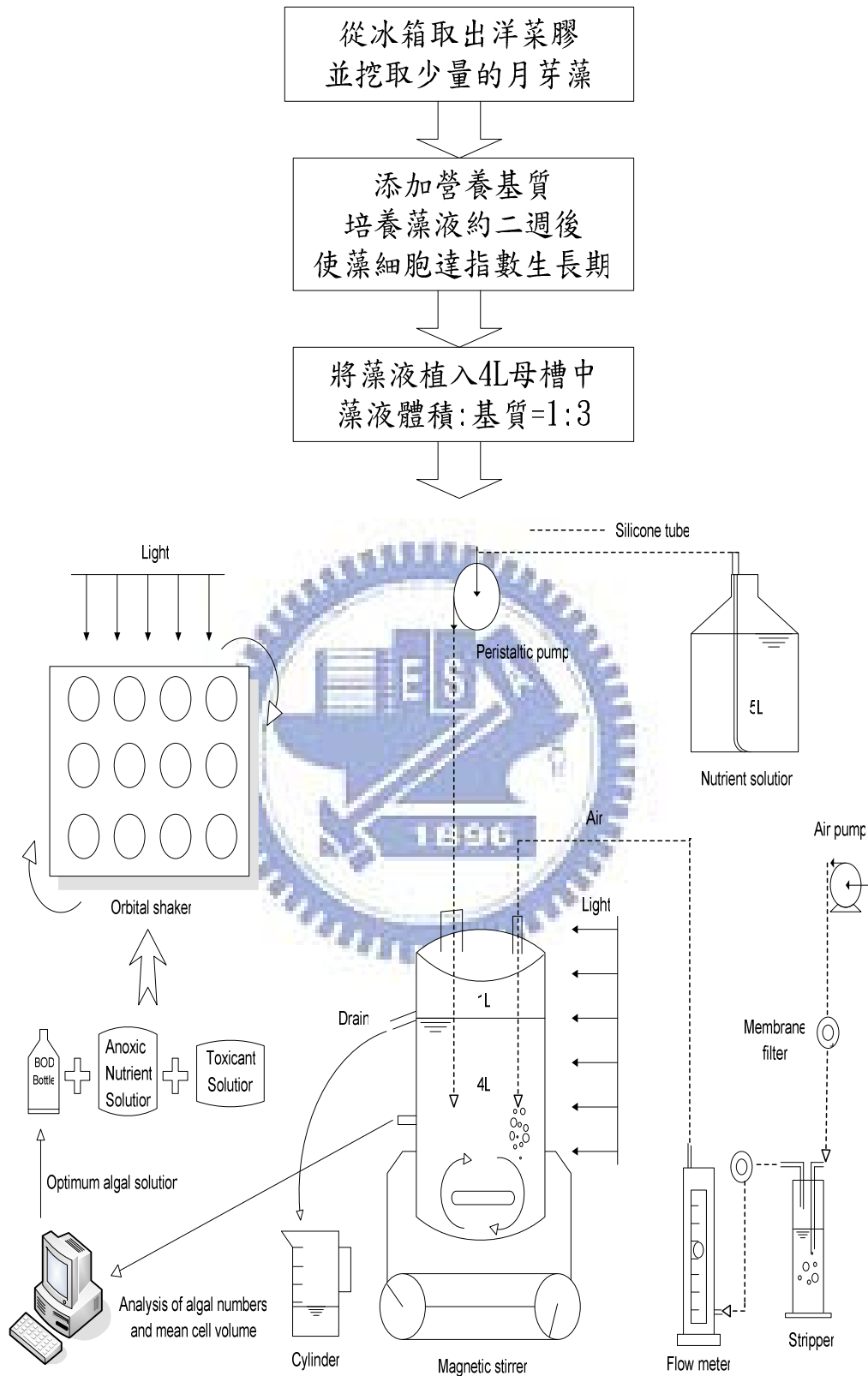


Fig 4.5.1 、 The flow chart in close-system algal toxicity test

(2) 進行順序

將自行設計之去離子水曝氣設備裝滿的去離子水，裝完後用 NaOH 調整 pH 值至 7.5 ± 0.1 ，再氣體鋼瓶進行曝氣 15 分鐘(如圖 4.5.2)。曝氣的目的是為了降低營養基質中之溶氧值並增加其 CO_2 濃度。曝氣時之氣體流量約為 $600\text{ml}/\text{min}$ ，經過 5 至 6 分鐘的曝氣後，溶氧值可接近 $1.0\text{mg}/\text{l}$ 。迅速將下口瓶之蓋子蓋上。

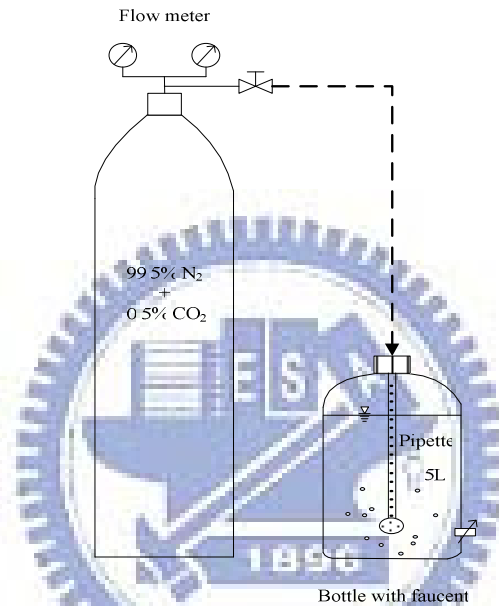


Fig 4.5.2、The diffuser system of deion-water

2. 營養鹽準備：本步驟只針對一組 21 瓶的 BOD 瓶實驗進行描述。

(1) 器具

- 經美國環保署 (U.S. EPA) 標準方法修正過後的七瓶的貯備液
- 100mL 燒杯
- 電磁攪拌器+磁石

(2) 進行順序

取一空燒杯各加入的貯備液 6.3mL ，其中需注意含有 EDTA 微量營養鹽儲備液是取 0% EDTA，取完後再加入磁石覆上鋁箔紙進行攪拌器混和。

3. 藻類選取：目的為判定連續式培養母槽是否已達穩定狀態 (steady

state)，是否可用於用於毒性實驗。

(1) 器具

- 庫德式電子顆粒計數器(內附有特置鐘型圓口瓶和攪拌器)
- 50mL 定量瓶
- 50mL 燒杯
- ISOTON II
- 1mL 的定量吸管

(2) 進行順序

先將計數器暖機 30 分鐘後，用 ISOTON II 流洗計數器並設定吸取分析量為 500 μ L，流洗完畢時，用燒杯從母槽取出藻液，再用定量吸管定量 1mL 從燒杯取出藻液加入定量瓶中並加入 ISOTON II 直至 50mL，再倒入鐘型圓口瓶進行攪拌量測。先量測三次的 ISOTON II 讀值 (N_{isoton})，此讀值即為背景值需小於 300，再測量三次的藻類的數目 (N_{alga})，最後得淨藻類數目 (N)，當平均細胞體積 (mean cell volume, MCV) 達到 39-46 μ m³，而 N 達到 1.9~2.0 $\times 10^6$ cells/mL，在此條件下才取藻類進行實驗。

$$N \left(\frac{\text{cells}}{\text{mL}} \right) = \left[\frac{(N_{alga} - N_{isoton}) \text{ cells}}{0.5 \text{ mL}} \right] \times 50$$

4. BOD 瓶試驗：添加藻類、去離子水、營養鹽和毒物加入 BOD 瓶中。

(1) 器具

- BOD 瓶
- DO meter
- 已曝氣的去離子水曝氣、營養鹽和達 steady state 的藻類
- 培養裝置與迴轉式振盪儀
- 毒物

(2) 進行順序

分別加入 BOD 瓶中使試驗時藻類之初始細胞密度為 1.5×10^4 cells/ml，之後再迅速加入曝氣好之純水，然後逐瓶加入所需之營養基質和不同體積的毒性物質以達到所需的濃度。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)，並由各瓶中取出少量之溶液 (約 1ml)，以計數初始藻液細胞密度是否為 1.5×10^4 cells/ml。之後將 BOD 瓶置於培養箱內迴轉式振盪儀上震盪。實驗條件控制在溫度 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ，光照來自於上方平行照射，強度為 $64.5 \pm 10\% \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ 之白冷光燈，震盪頻率為 100rpm。

第三天

以下三步驟為毒性試驗四十八小時後的成果驗收

5. 溶氧值和 pH 測定：為量測 48 個小時後各個 BOD 瓶中之溶氧值，視為最終溶氧值 (Final DO, DO_f)。此步驟可得到本實驗第一個試驗終點 (end point) 溶氧抑制率的 raw data。

(1) 器具

- DO meter
- 18.2 Megaohm 的去離子水
- 拭鏡紙
- pH meter

(2) 進行順序

將 DO meter probe 用去離子水淋洗再用拭鏡紙吸乾水份置入 BOD 瓶中量測 Final DO (DO_f)，由 Final DO 減掉 Initial DO 可得到一溶氧差 (ΔDO)，即 $\text{DO}_f - \text{DO}_i = \Delta\text{DO}$ 。

6. 藻數測定：用顆粒計數器量測每個 BOD 瓶的藻類細胞密度，此步驟可得到本實驗第二個和第三個 end point 即 biomass 和 growth rate 兩抑制率的 raw data。

(1) 器具

- 庫德式電子顆粒計數器
- 50mL 定量瓶
- 1L 燒杯
- ISOTON II
- 1mL 的定量吸管

(2) 進行順序

將 BOD 瓶中的藻液先倒入約一半於燒杯中，再將 BOD 瓶中剩餘的藻液搖晃均勻倒入燒杯中，再用定量吸管定量 1mL 從燒杯取出藻液加入定量瓶中並加入 ISOTON II 量測最終細胞密度。減掉初始植入的的細胞密度 1.5×10^4 cells/ml 可得細胞密度的變化量。

7. 計算 EC_{50} ：使 probit 模式來計算藻類之抑制率與 EC_{50} 值。

4.6 實驗之品保及品管(QA/QC)

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，並控制母槽的溢流率為 1 L/day($D=0.25$)。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。圖 4.6.1、圖 4.6.2 為 algae cells density 及 mean cells volume 之品管圖。

2. 儀器定期檢查

實驗儀器誤差會影響實驗結果的好壞，為降低誤差的發生必順定期檢查儀器，下列分別介紹：

- 光度：光度強弱影響藻類之生長狀況，為減少光度所帶來之誤差，所以要將實驗進行之震盪器上之盤面光度調整至一致方可，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。
- 顆粒計數器：計數器在量測高濃度處理組（低藻類密度）時也會受到 ISOTON II 背景值、因此本實驗要求 ISOTON II 背景值需小於 300 以下，且實驗前後皆 ISOTON II 用進行取樣管的流洗，清洗取樣管壁結晶。
- DO meter：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，因此本實驗會每個月定期更換 CLARK-TYPE 薄膜與 3M 氯化鉀電解質和進行校正。
- pH meter: 如電極棒有微粒附著於表面時，因為導致二點校正(pH = 4 and 7)其斜率低於 90 時，則應立即將電極棒泡於 0.1N 之鹽酸之中，以達到去除表面微粒之效果。

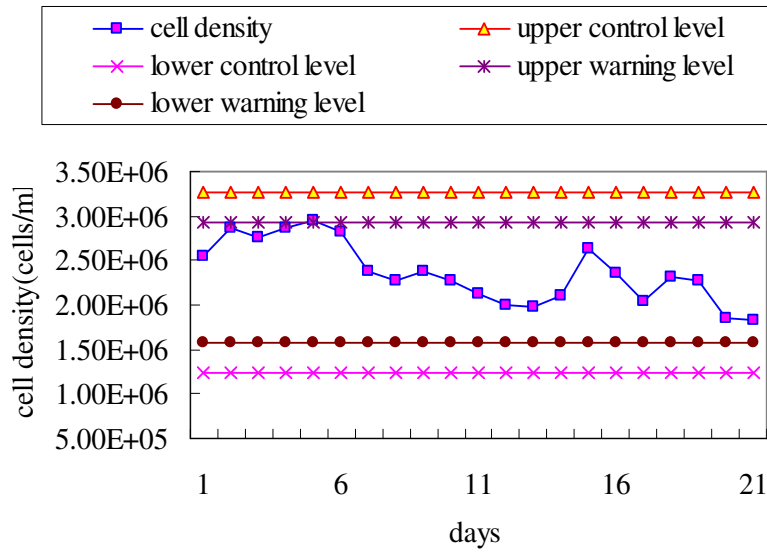


Fig 4.6.1 、 The quality control of algae cells density

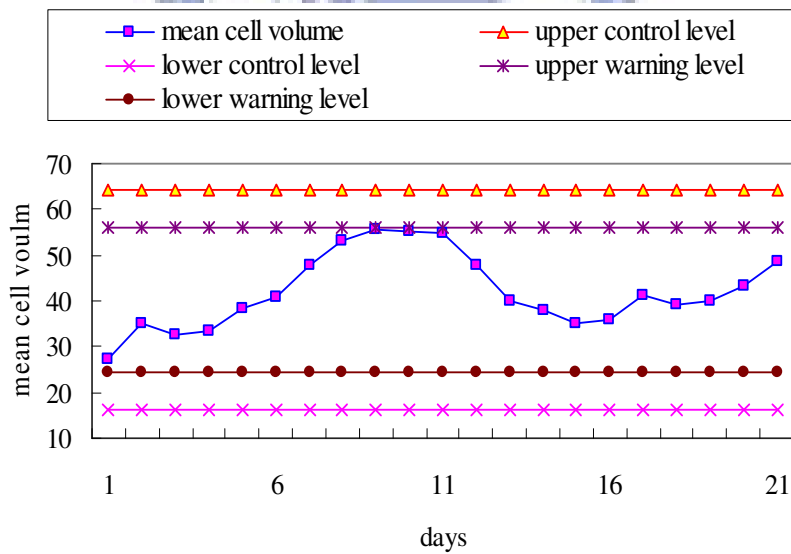


Fig 4.6.2 、 The quality control of mean cells volume

第五章、結果與討論

5.1 藻類毒性試驗數據

本研究為利用 48 小時之批次式 BOD 瓶藻類毒性試驗方法針對 20 種工業及製藥業所添加之中間物-苯甲醛及其衍生物。由於苯甲醛類屬於揮發或半揮發性，而本試驗系統屬於密閉式便可克服這些有機毒物在試驗時間 48 小時內因揮發而導致濃度改變，進而降低藻類毒性試驗之敏感性。此外，stock solution 也應利用 BOD 瓶在無 headspace 之情況下配製，以避免在配製的過程當中減少毒性物質之揮發。

表 5.1.1 為以 2,5-二氫基苯甲醛為測試毒物之毒性試驗原始數據，所呈現的為試驗三重複下的平均值，Initial DO、Final DO 及 Final cells 之測定是藉由溶氧測定儀及顆粒計數器所分析而得，再進一步進行轉換以得知三種 end-point 之抑制率(Inhibition rate; IR)。由毒性試驗結果可以發現，當毒物濃度增加時，毒性物質對於藻類的生長抑制情形亦愈明顯；以溶氧變化量而言，當毒性物質濃度由 0.970mg/L 至 11.66mg/L 時，其抑制率由 9% 至 93%，而生質量及生長率之抑制率亦由 8%及 3%提高至 85%及 56%。

此外，由表 5.1.1 之中亦可發現到當 2,5-二氫基苯甲醛之濃度為 0.490mg/L 時，三種反應終點之抑制率為其負值。其主要因素為藻類對其毒性呈現毒物興奮效應(Hormesis)，即毒物激活了體內細胞的修復和維護系統，使得當毒物若為低劑量時，則會幫助藻細胞的生長。

Table 5.1.1、The raw data of algal toxicity test about 2,5-dihydroxybenzaldehyde

Conc mg/L	Initial DO mg/L	Final DO mg/L	Final cells cells/ml	Delta DO mg/L	μ_{specific}	μ_{relative}	IR (growth rate)	IR (Biomass)	IR (DO)
Control	0.710	5.810	2.873E+05	5.100	1.470	1.000	0.000	0.000	0.000
11.66	1.210	1.550	5.470E+04	0.340	0.650	0.440	0.560	0.850	0.930
8.750	1.030	1.940	9.890E+04	0.910	0.940	0.640	0.360	0.690	0.820
5.830	0.960	2.450	1.489E+05	1.490	1.150	0.780	0.220	0.510	0.710
2.920	0.880	3.710	2.175E+05	2.840	1.340	0.910	0.090	0.260	0.440
0.970	0.910	5.520	2.662E+05	4.620	1.440	0.980	0.030	0.080	0.090
0.490	0.850	6.130	3.022E+05	5.280	1.500	1.020	-0.020	-0.050	-0.040

EC₅₀=16.47 mg/L (DO)

IR: Inhibition rate

EC₅₀=14.26 mg/L (Final yield)

Biomass: Final yield based on cell density

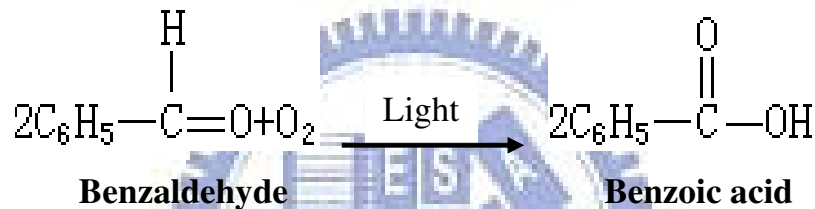
EC₅₀=19.97 mg/L (Growth rate)

EC₅₀ value is conducted by Probit model

表 5.1.2 為以 probit model 針對 20 種苯甲醛類分析其三種觀測終點所得到之藻類毒性試驗數據，其數據中包含 EC₅₀ 值、劑量反應關係曲線之截距(α)及斜率(β)。試驗中以溶氧(Based on Δ DO)、最終生物數量(Based on Final yield)及生長率(Based on Growth rate)之變化量為觀測終點以得知藻類受有機物質的影響。不同的毒物彼此間毒性的差異級數可由圖 5.1.1 比較而得知，此外亦可藉由圖 5.1.3 至圖 5.1.22 之曲線以檢查毒性試驗之數據是否為一良好、精確的濃度-反應關係。

針對藻類對不同苯甲醛類之敏感度而言，可發現到當苯甲醛之取代基及鍵結位置不同時，其毒性之相關性亦有非常明顯之變化。以溶氧為觀測終點時，其 EC₅₀ 值由 1.457mg/L(5-bromo-2-hydroxybenzaldehyde)至 157.3 mg/L (3,4-dimethoxybenzaldehyde)，最終生物量之 EC₅₀ 值變化為 1.209 mg/L (5-bromo-2-hydroxybenzaldehyde)至 64.56mg/L(3,4-dimethoxybenzaldehyde)，而生長率則為 1.654mg/L(5-bromo-2-hydroxybenzaldehyde)至 162.1mg/L (3,4-dimethoxybenzaldehyde)。由上述之關係可以看出，5-溴-2-烴基苯甲醛對於藻類之毒性最高，而 3,4-二甲氧基苯甲醛對於藻類之毒性則為最低。

此外，本研究之結果發現於三種苯甲醛類(苯甲醛、香草醛及 3,4-二烴基苯甲醛)之 Δ DO 為觀測終點時，其敏感性皆明顯比觀測終點為 Final yield 及 Growth rate 具有較高之特性，其中苯甲醛之情況最為明顯(圖 5.1.2)。此情形在早期之密閉式藻類毒性研究中^[83]，針對甲醇進行毒性試驗時亦有相同之情況發生。根據 Fan *et. al.*^[84]利用小綠藻(*Chlorella pyrenoidosa*)針對苯甲醛進行毒性試驗，其結果發現苯甲醛在進行毒性試驗之過程中會行歧化作用(dismutation)。此外，由於醛因在其羰基碳原子上含有一個氫原子，比酮容易被氧化。因此當苯甲醛在有光的照射下容易被氧化成苯甲酸：



由上述之反應式可以發現到苯甲醛會與氧反應而形成苯甲酸，也因此使得在密閉式藻類毒性試驗中其溶氧產生量無法提高之主要因素。Zhao *et. al.*^[85]在利用水蚤(*Daphnia*)對苯甲酸進行毒性試驗，其結果發現苯甲酸之毒性作用機制應為非極性麻醉性(non-polar narcosis)，因此當苯甲醛經反應形成苯甲酸後，其毒性也因而降低，使得藻類細胞之生長較不受到苯甲醛毒性之影響。

圖 5.1.3 至圖 5.1.22 為本研究針對苯甲醛類所求得之濃度-反應曲線圖，由圖形中所得之曲線斜率值約為 1.576 至 9.678，由此可看出斜率值相差約為 9 倍左右。當濃度-反應曲線圖之斜率值較高時，表示生物體所能忍受的最高濃度到完全抑制濃度只存在狹窄之區域內。因此，當濃度上若有少許變化時，生物受體的反應抑制率即會有大幅增加之情形，此情況使得在進行毒性試驗之毒物濃度處理時需多加留意。

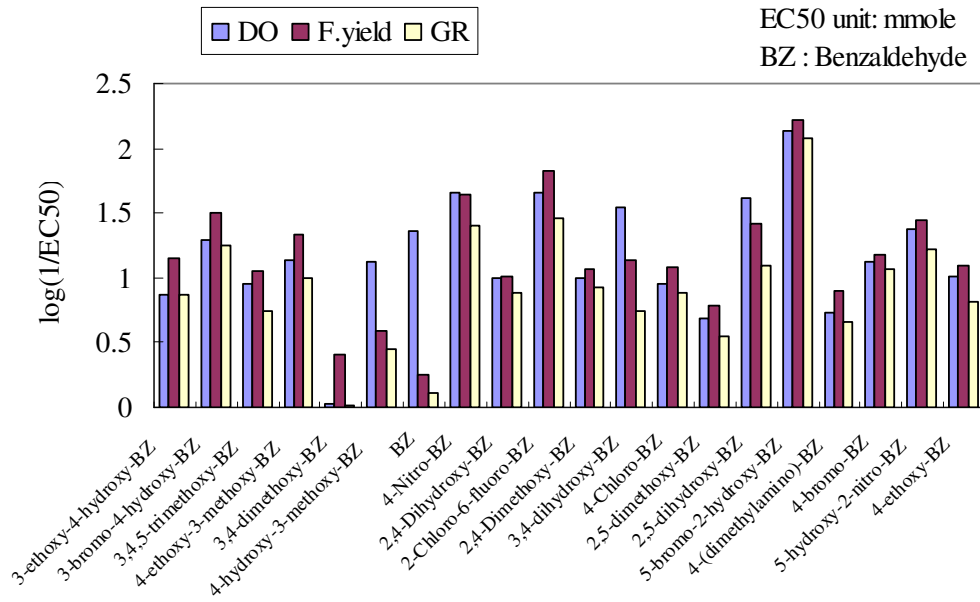


Fig 5.1.1 、 The toxicity response of the algal three end-point

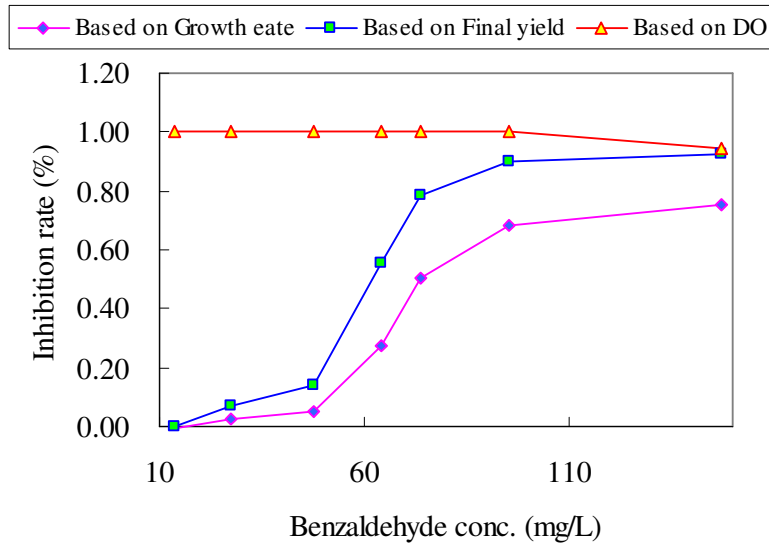


Fig 5.1.2 、 The special toxicity reation of benzaldehyde in algal test

Table 5.1.2 、 Median effective concentration values(EC_{50})based on three end-point EC_{50} unit: mg/L

Toxicant	based on ΔDO				based on Final yield				based on Growth rate			
	EC_{50}	95%C.I.	α	β	EC_{50}	95%C.I.	α	β	EC_{50}	95%C.I.	α	β
3-ethoxy-4-hydroxybenzaldehyde	22.34	19.31-22.34	0.024	3.775	11.72	10.70-12.75	2.025	2.782	22.68	21.07-24.50	1.809	2.353
3-bromo-4-hydroxybenzaldehyde	10.40	9.686-11.49	0.679	4.248	6.391	5.911-6.833	2.106	3.591	11.30	10.37-12.78	1.768	3.068
3,4,5-trimethoxybenzaldehyde	21.79	19.75-24.22	1.277	2.782	17.59	15.86-19.55	1.180	3.067	35.00	32.82-37.74	1.094	2.529
4-ethoxy-3-methoxybenzaldehyde	13.09	12.31-13.78	0.1451	4.351	8.453	7.074-9.830	2.371	2.835	17.98	16.52-19.62	1.790	2.557
3,4-dimethoxybenzaldehyde	157.3	126.7-201.0	-1.183	2.815	64.56	49.80-81.44	1.796	1.770	162.0	116.7-258.5	1.518	1.575
4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde	11.46	11.30-11.61	-5.250	9.678	38.83	37.20-40.36	-4.497	5.975	53.84	51.10-56.65	-3.550	4.939
Benzaldehyde	4.563	4.359-4.781	2.222	4.214	60.20	48.67-70.43	-4.433	5.301	81.76	64.41-99.54	-1.848	3.580
4-Nitrobenzaldehyde	3.308	3.269-3.345	0.036	9.556	3.413	2.743-3.979	3.182	3.410	6.017	5.226-6.908	3.037	2.518
2,4-Dihydroxybenzaldehyde	14.13	13.65-14.60	-5.271	8.930	13.65	11.85-14.92	-4.210	8.112	18.05	16.68-20.73	-1.393	5.088
2-Chloro-6-fluorobenzaldehyde	3.497	3.280-3.708	3.214	3.286	2.346	2.002-2.676	3.878	3.028	5.562	5.100-6.056	3.380	2.173
2,4-Dimethoxybenzaldehyde	16.47	16.09-16.88	-4.220	7.577	14.26	13.33-15.16	-1.286	5.446	19.97	18.56-22.57	-1.450	4.959
3,4-dihydroxybenzaldehyde	3.966	3.561-4.395	1.860	5.248	10.02	7.896-12.23	2.891	2.106	24.87	21.55-29.89	2.526	1.772
4-Chlorobenzaldehyde	15.47	14.34-16.44	-1.971	5.861	11.69	11.25-12.11	0.1189	4.570	18.26	17.61-18.99	-0.0955	4.039
2,5-dimethoxybenzaldehyde	34.48	32.75-36.13	-3.216	5.344	26.87	25.44-28.24	-0.3494	3.742	46.60	45.02-48.45	-0.1074	3.061
2,5-dihydroxybenzaldehyde	3.394	3.130-3.656	3.731	2.392	5.283	4.449-6.225	3.299	2.351	11.14	9.484-14.31	2.467	2.419
5-bromo-2-hydroxybenzaldehyde	1.457	1.695-1.255	4.324	4.131	1.208	1.009-1.413	4.539	5.600	1.653	1.267-2.317	4.190	3.706
4-(dimethylamino)benzaldehyde	27.71	27.29-28.17	-4.104	6.311	18.96	17.28-20.61	0.4055	3.595	32.45	30.02-36.27	0.1008	3.241
4-bromobenzaldehyde	13.93	13.11-14.63	-4.144	7.995	12.17	11.49-12.82	-3.453	7.788	15.75	14.78-17.09	-2.140	5.963
5-hydroxy-2-nitrobenzaldehyde	7.009	6.839-7.185	0.5269	5.290	6.025	5.677-6.379	1.5133	4.470	9.900	9.684-10.12	1.316	3.699
4-ethoxybenzaldehyde	14.72	11.31-17.27	0.1759	4.131	11.88	10.00-13.84	1.6141	3.149	22.85	19.75-27.26	1.933	2.256

Probit = $\beta \times \text{Log}(\text{toxicant concentration}) + \alpha$; α = intercept, β = slope

C.I. = Confidence Interval

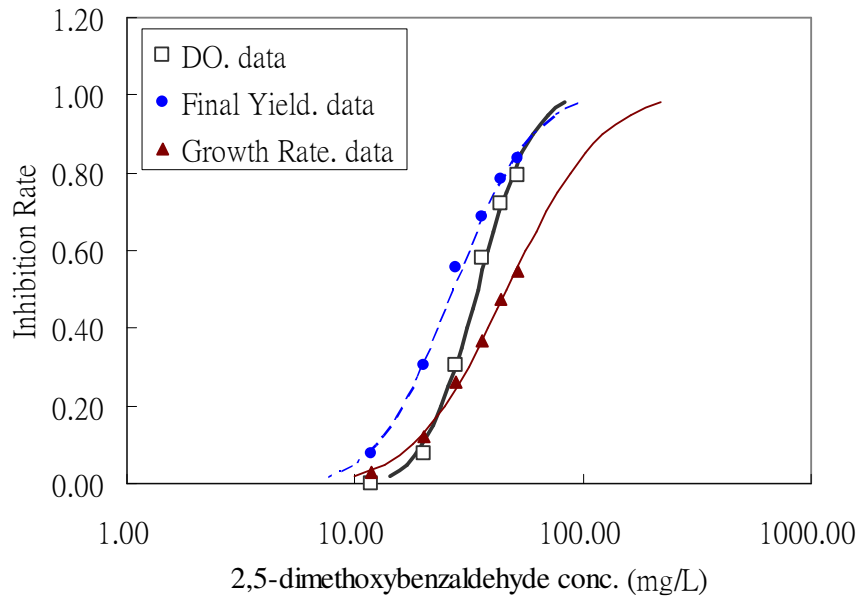


Fig 5.1.3 、 The Dose-response Curve of 2,5-dimethoxybenzaldehyde

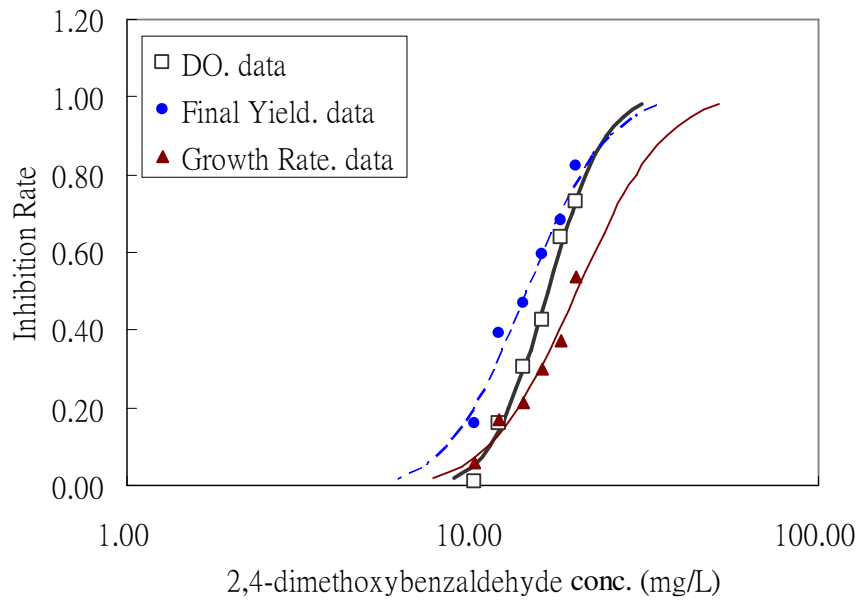
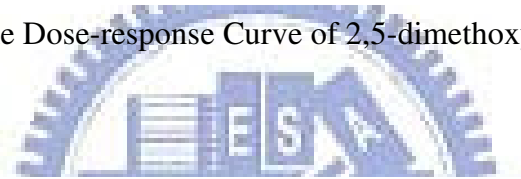


Fig 5.1.4 、 The Dose-response Curve of 2,4-dimethoxybenzaldehyde

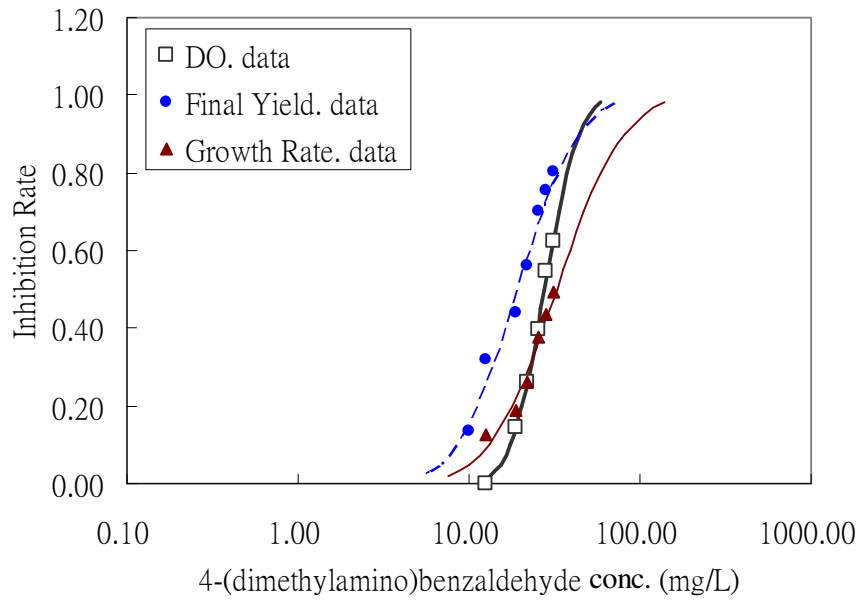


Fig 5.1.5 、 The Dose-response Curve of 4-(dimethylamino)benzaldehyde

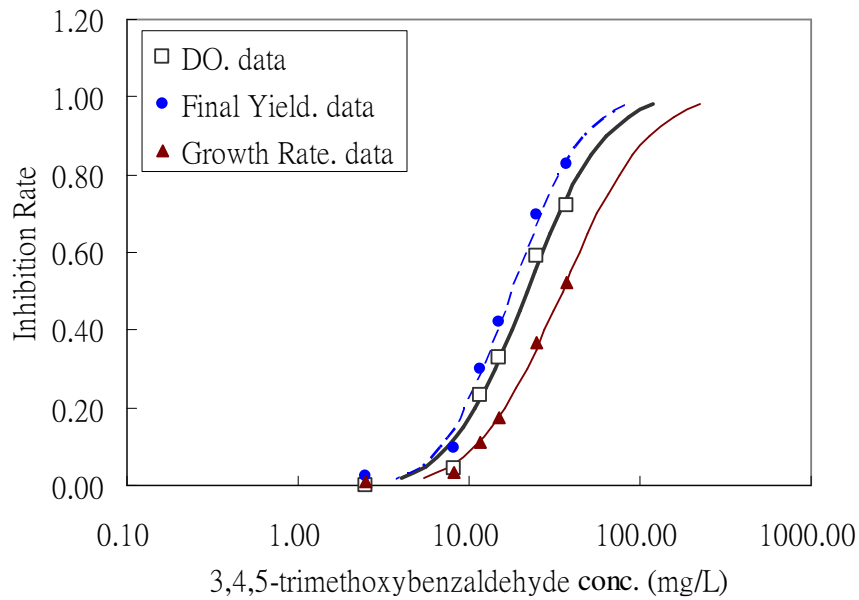
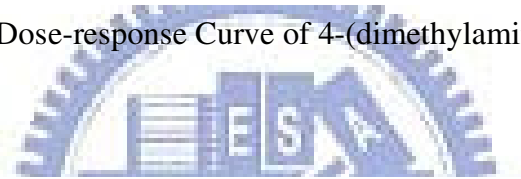


Fig 5.1.6 、 The Dose-response Curve of 3,4,5-trimethoxybenzaldehyde

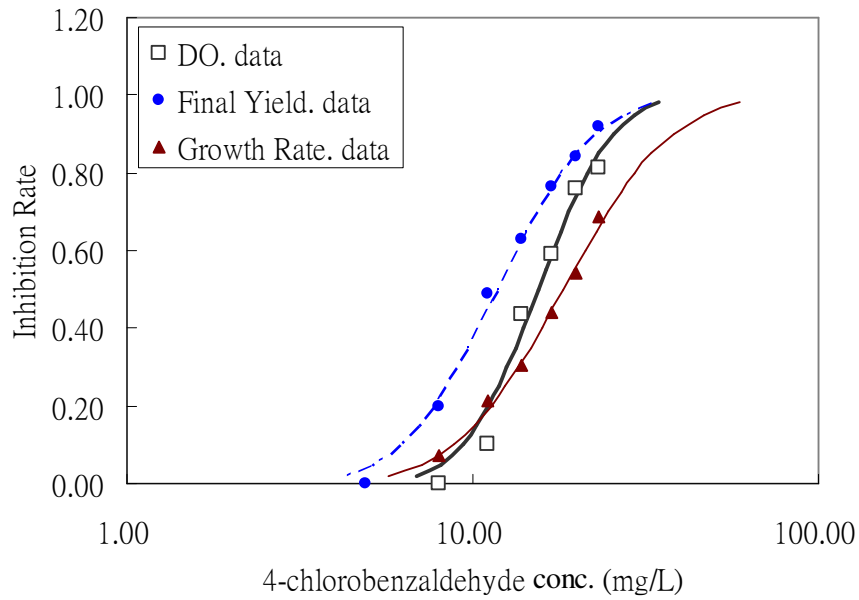


Fig 5.1.7 、 The Dose-response Curve of 4-chlorobenzaldehyde

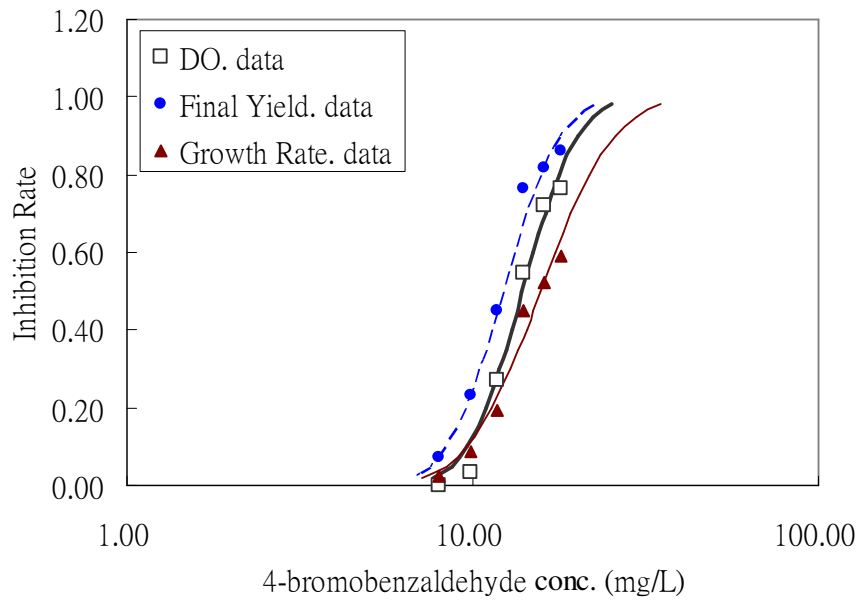
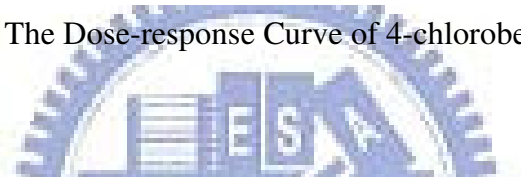


Fig 5.1.8 、 The Dose-response Curve of 4-bromobenzaldehyde

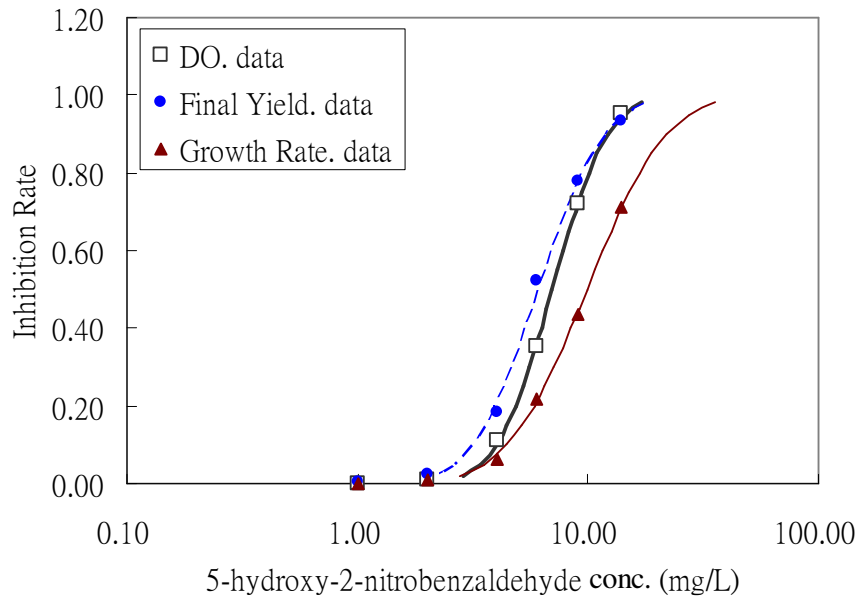


Fig 5.1.9 、 The Dose-response Curve of 5-hydroxy-2-nitrobenzaldehyde

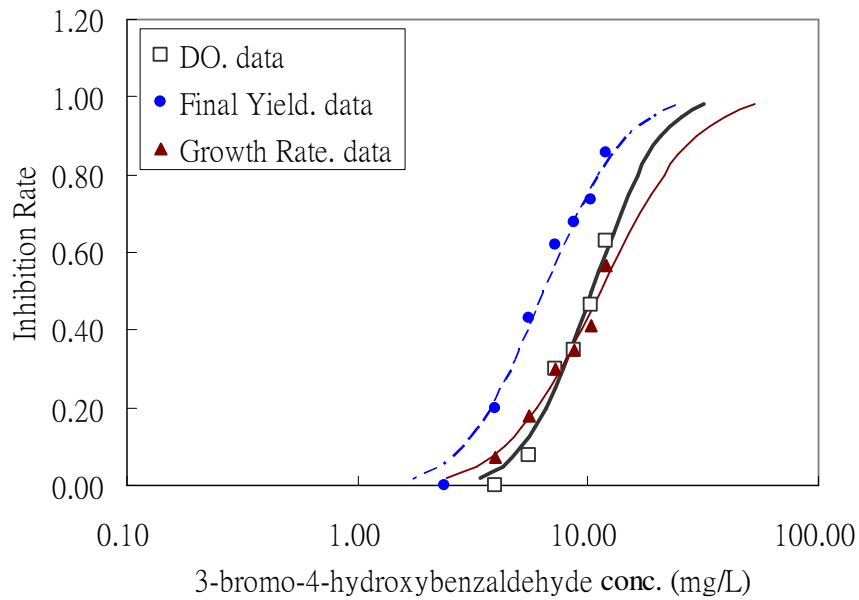
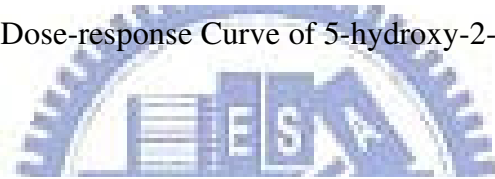


Fig 5.1.10 、 The Dose-response Curve of 3-bromo-4-hydroxybenzaldehyde

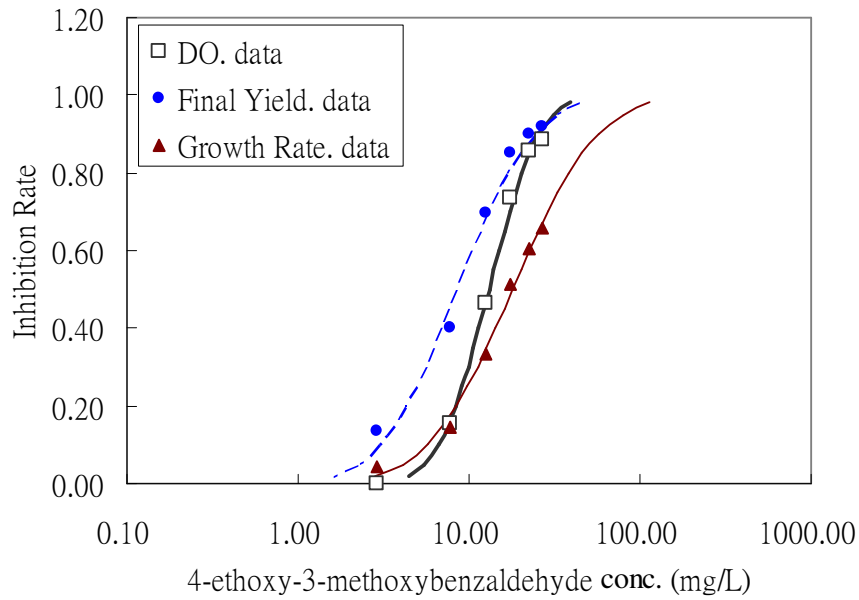


Fig 5.1.11 、 The Dose-response Curve of 4-ethoxy-3-methoxybenzaldehyde

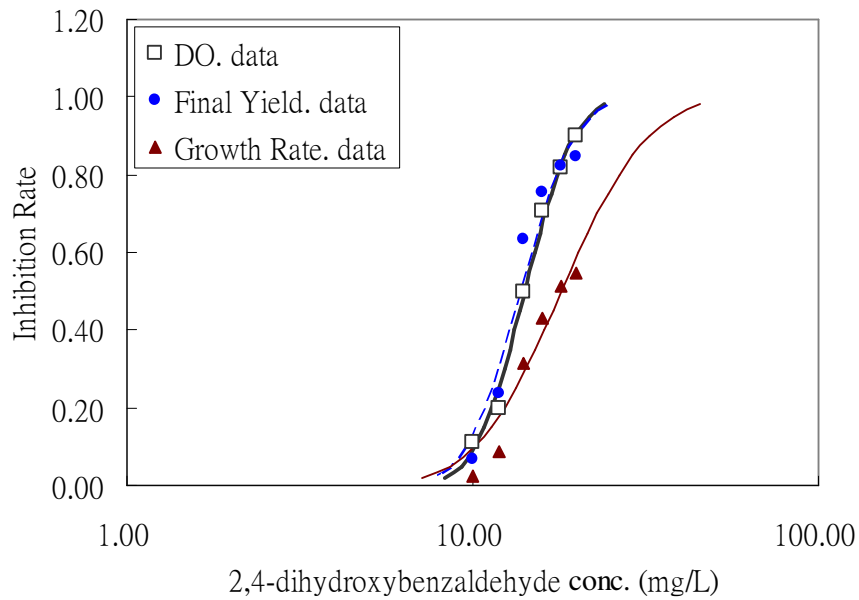
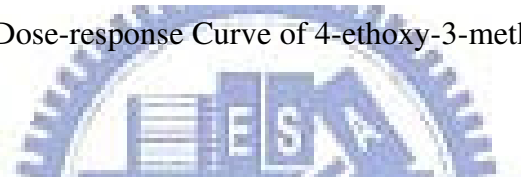


Fig 5.1.12 、 The Dose-response Curve of 2,4-dihydroxybenzaldehyde

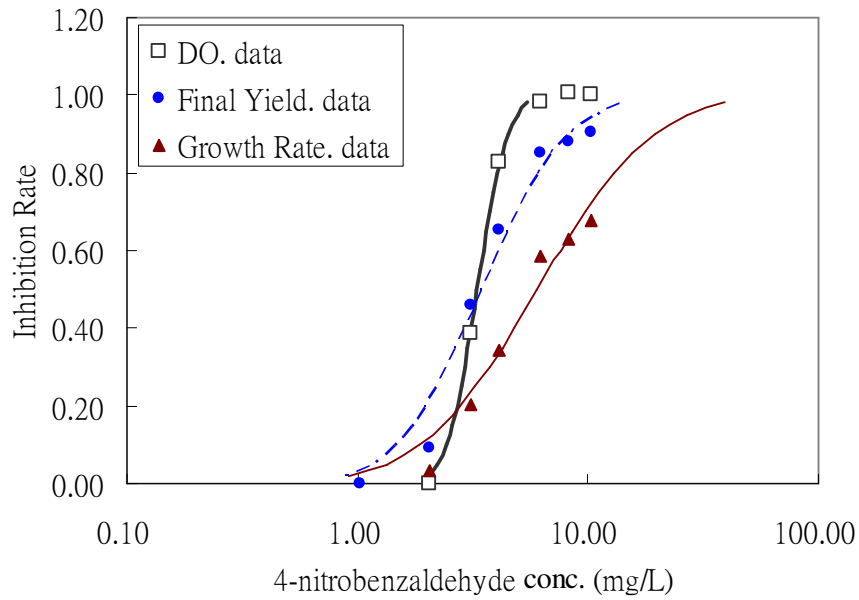


Fig 5.1.13 、 The Dose-response Curve of 4-nitrobenzaldehyde

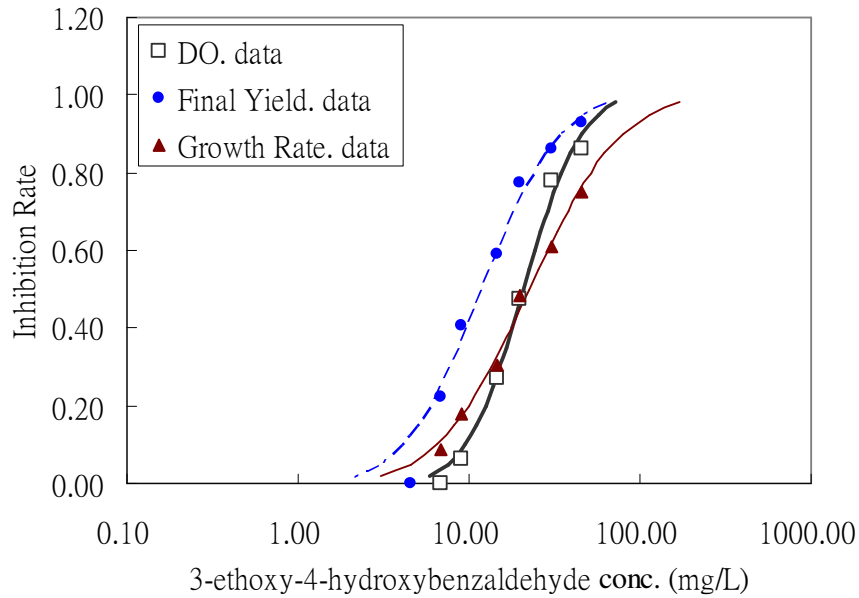
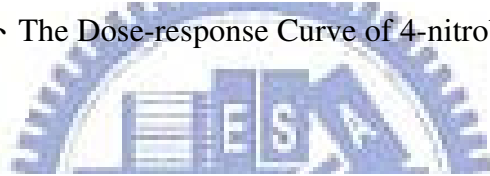


Fig 5.1.14 、 The Dose-response Curve of 3-ethoxy-4-hydroxybenzaldehyde

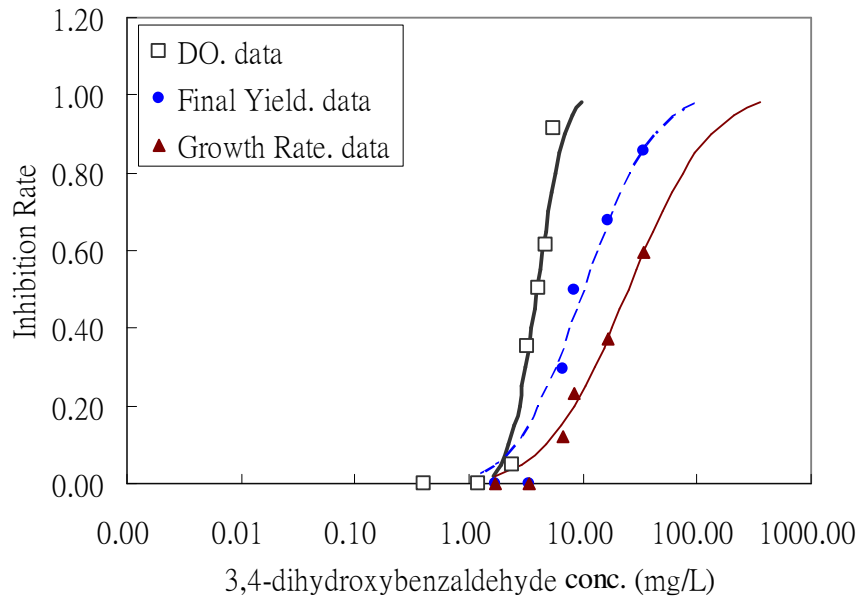


Fig 5.1.15 、 The Dose-response Curve of 3,4-dihydroxybenzaldehyde

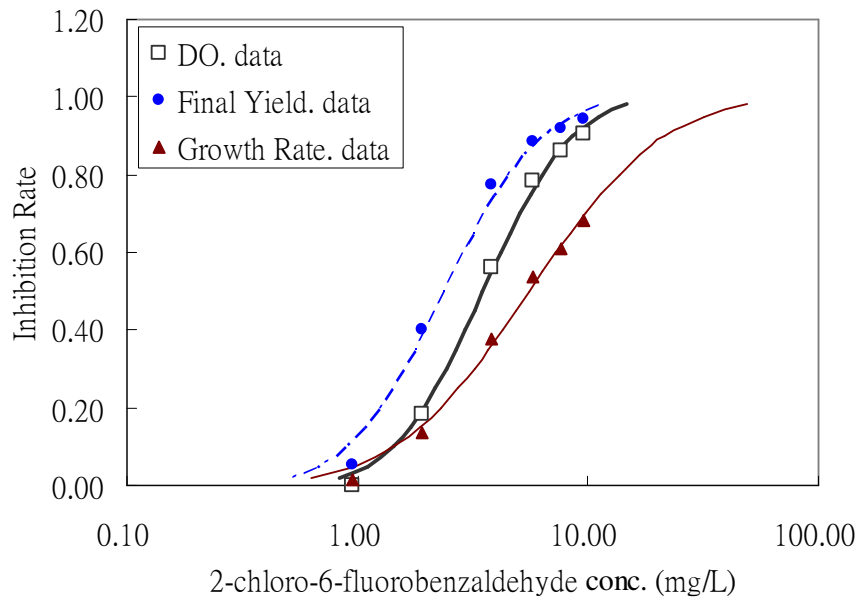
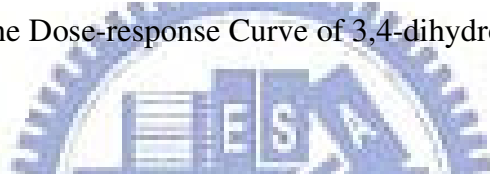


Fig 5.1.16 、 The Dose-response Curve of 2-chloro-6-fluorobenzaldehyde

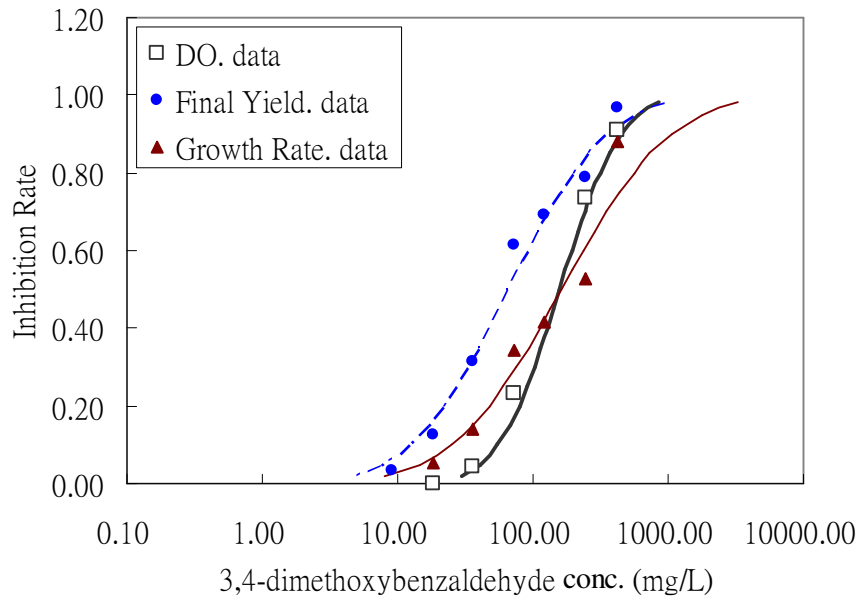


Fig 5.1.17 、 The Dose-response Curve of 3,4-dimethoxybenzaldehyde

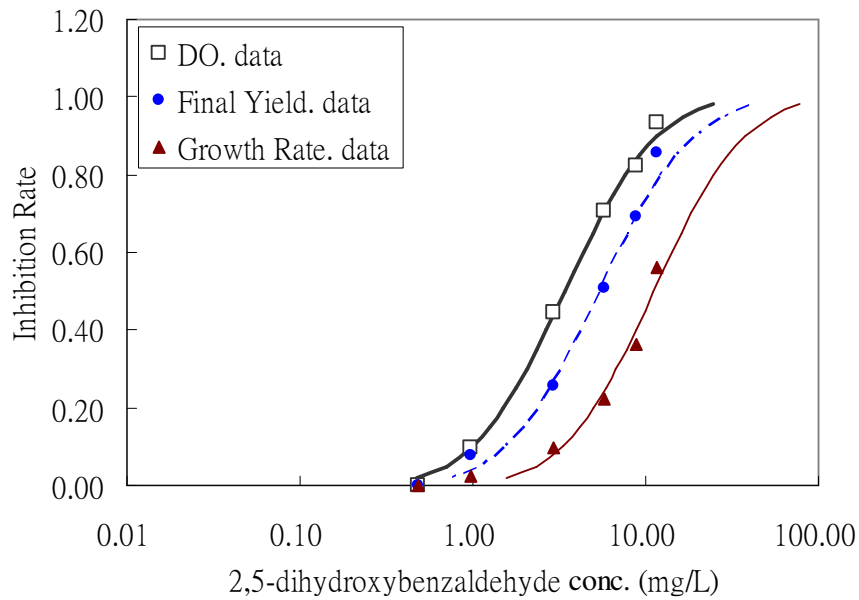
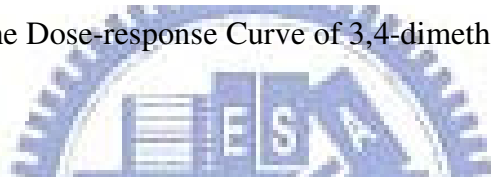


Fig 5.1.18 、 The Dose-response Curve of 2,5-dihydroxybenzaldehyde

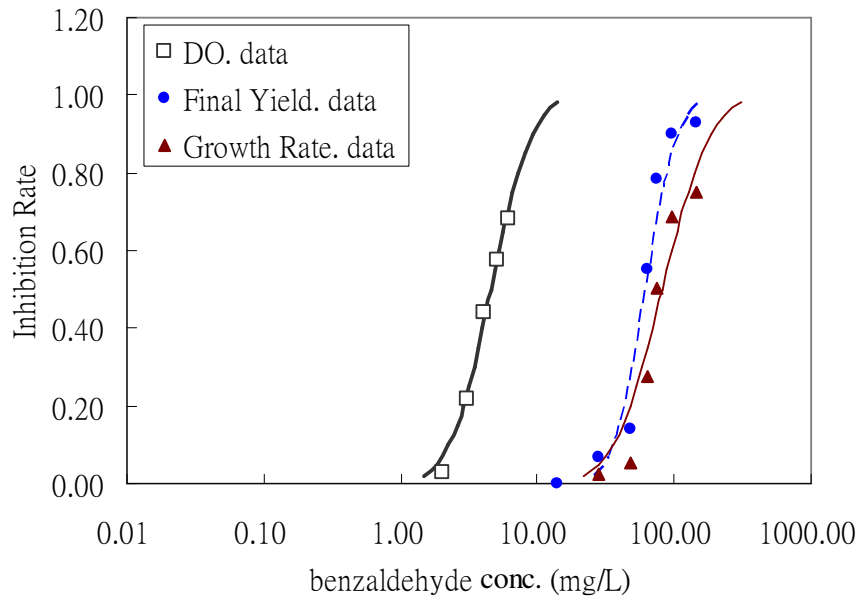


Fig 5.1.19 、 The Dose-response Curve of benzaldehyde

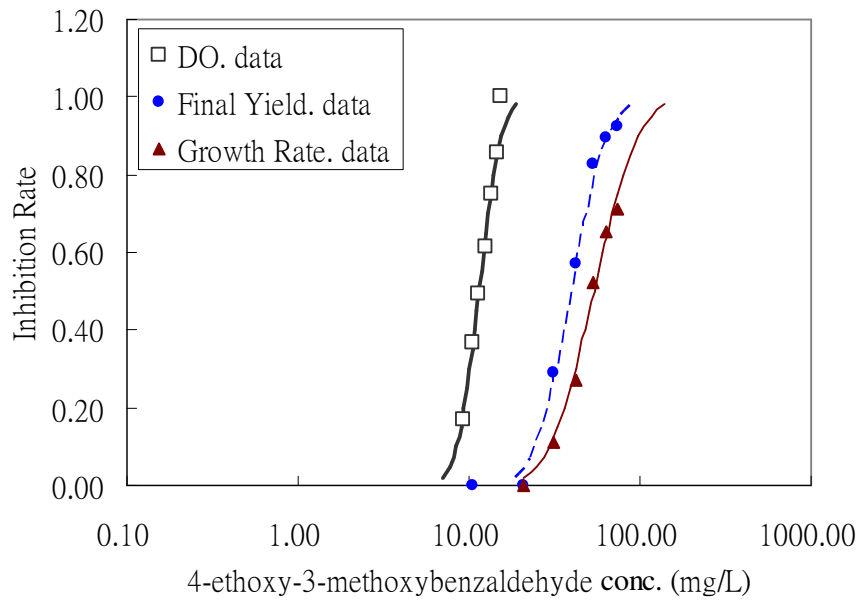
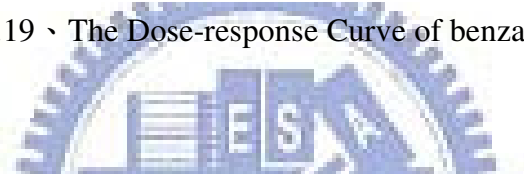


Fig 5.1.20 、 The Dose-response Curve of 4-ethoxy-3-methoxybenzaldehyde

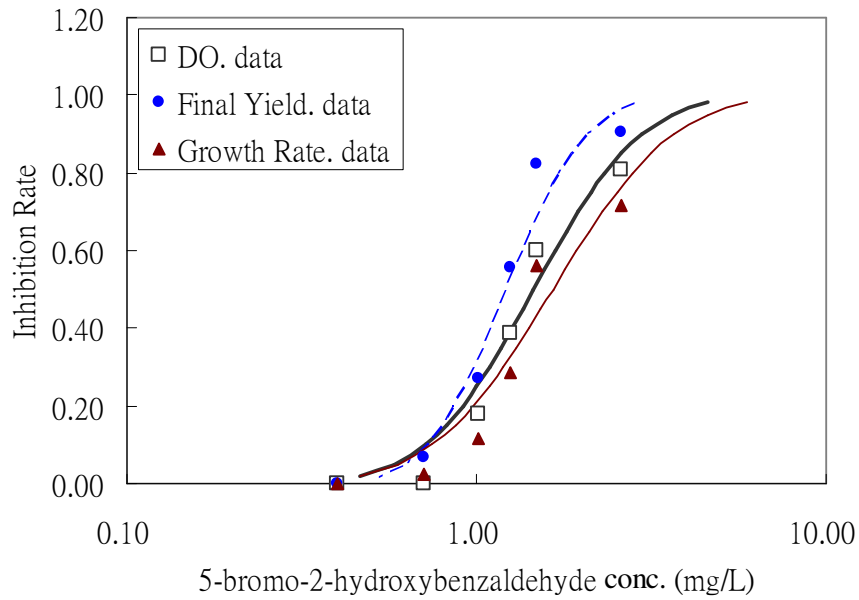


Fig 5.1.21 、 The Dose-response Curve of 5-bromo-2-hydroxybenzaldehyde

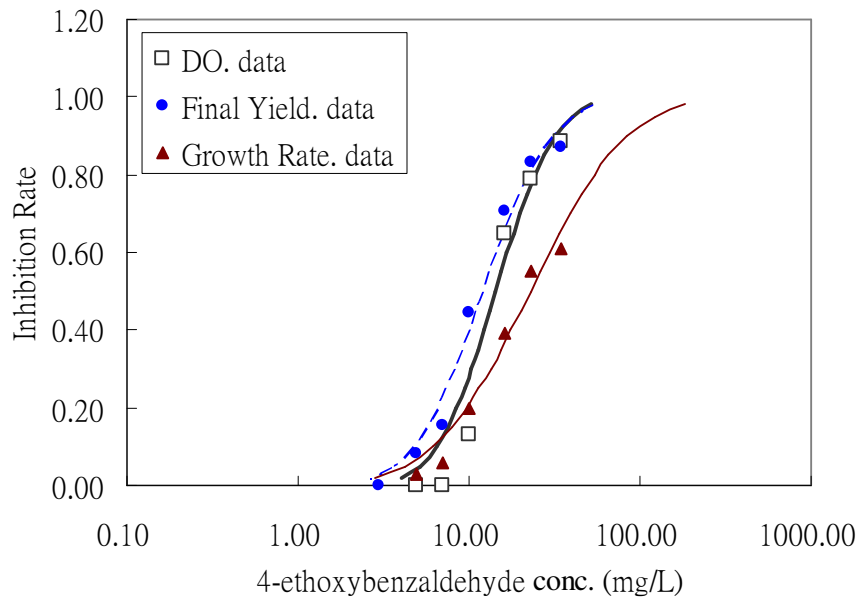
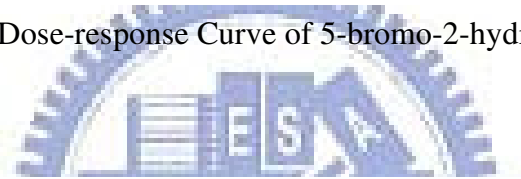


Fig 5.1.22 、 The Dose-response Curve of 4-ethoxybenzaldehyde

5.2 苯甲醛類結構與毒性

一般而言，所有的化學物質皆有其同分異構物(isomer)，也就是不同的化合物具有相同之分子式稱之。而早期的毒理學研究中即指出當化學物質之取代基或取代位置不同時，其毒性之差異亦有相當大之變化。Walker *et al.* [86] 利用鱒魚(*Fathead minnow*)針對苯甲醛類進行毒性試驗，其結果發現苯甲醛若於鄰位(*ortho*-)接有氫氧基(hydroxy)時，該物質之毒性遠高於苯甲醛、對位(*para*-)氫氧基苯甲醛及烷基類苯甲醛(alkoxybenzaldehyes)。而使得鄰位氫氧基苯甲醛之毒性較高之因素可能為於鄰位氫氧基之氫原子(hydrogen)與苯甲醛之羰基(carbonyl)中之氧產生氫結鍵(hydrogen bonding)。

Netzeva *et al.* [87] 則利用纖毛蟲(*Tetrahymena*)針對苯甲醛類進行毒性試驗，其結果也發現到 *ortho*-苯甲醛之毒性皆高於 *meta*-、*para*-苯甲醛。而造成鄰位苯甲醛類其毒性較高之因素，主要為此毒物會經由生物轉化作用(biotransformation)形成相似醌(quinone)之結構物，而此結構物由於有著比苯甲醛更高之生物親電性反應，也因此使其毒性比其他同分異構物有著較高之毒性。

表 5.2.1 為本研究之不同烴基苯甲醛之毒性值，由表中可以看出 5-溴-2-烴基其毒性最毒，以反應終點為最終產率(F.yield)及生長率(G.R)而言，其毒性與苯甲醛大約相差 50 及 80 倍左右。此外，除了 3-溴-4-烴基苯甲醛之外，其他位於對位(*para*-)之烴基苯甲醛其毒性皆比鄰位(*ortho*-)低。針對鄰位之烴基苯甲醛而言，也可發現到毒性最高之物質為 5-溴-2-烴基苯甲醛，由此即可得知取代基若含有溴(*bromo*-)時，其烴基苯甲醛之毒性也會因而提高。

對位之烴基苯甲醛(No.5, 6, 7)其毒性也因其取代基之不同也有不同之變化，當其取代位置為間位且取代基為溴(*bromo*-)時，毒性最高，其次則為取代基為乙氧基(*ethoxy*-)，毒性最低的則為取代基為甲氧基(*methoxy*-)。

Table 5.2.1、The relationships between toxicity and structure of hydroxybenzaldehydes

NO.	Toxicant	F.yield	G.R
		log(1/EC ₅₀)	log(1/EC ₅₀)
2-hydroxybenzaldehyde			
1	2,4-dihydroxybenzaldehyde	1.005	0.884
2	2,5-dihydroxybenzaldehyde	1.417	1.093
3	5-bromo-2-hydroxybenzaldehyde	2.221	2.085
4	5-hydroxy-2-nitrobenzaldehyde	1.443	1.227
4-hydroxybenzaldehyde			
5	3-ethoxy-4-hydroxybenzaldehyde	1.152	0.865
6	3-bromo-4-hydroxybenzaldehyde	1.498	1.25
7	3-methoxy-4-hydroxybenzaldehyde	0.593	0.451
8	3,4-dihydroxybenzaldehyde	1.139	0.745
9	Benzaldehyde	0.246	0.113

圖 5.2.1 為苯甲醛及烴基苯甲醛於不同取代基、取代位置與毒性之相關分佈圖，由此圖可更易看出苯甲醛結構與毒性之相關性。



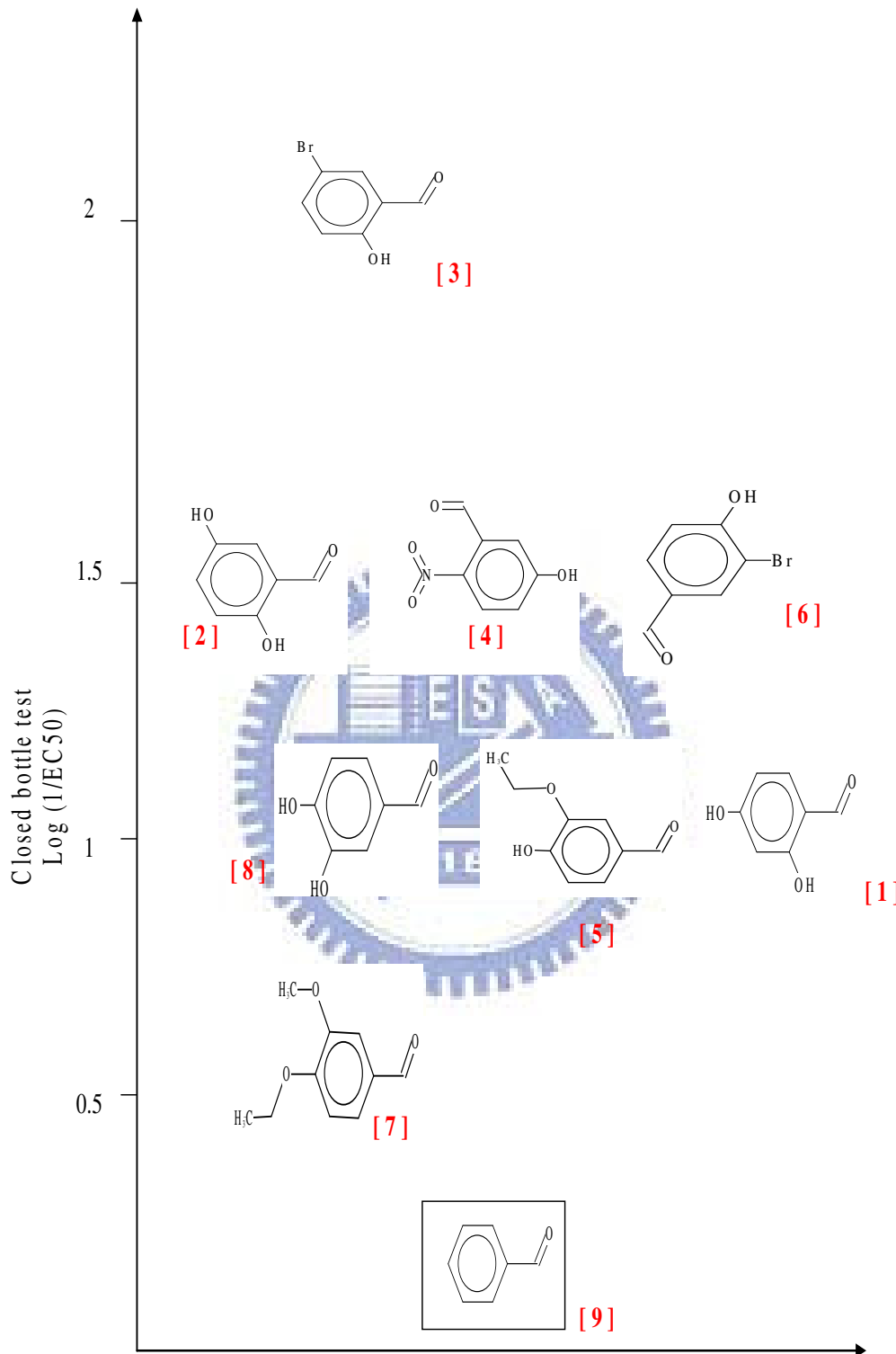


Fig 5.2.1 、 The relationships between toxicity and structure of hydroxybenzaldehydes

5.3 最佳化模式

為了得知在進行不同生物毒性試驗於不同毒性物質敏感度之相對差異性，通常皆是利用不同的數學模式經由轉換實驗數據以得知 EC_x 值或 LC_x 值，以便於比較或判定於不同條件(試驗物種、試驗期間、反應終點)下之敏感性。

由於分析模式理論的不同，同一組數據經由不同的模式所計算出的結果也會不盡相同，也因此選擇較佳的模式更顯為重要。在毒性學中常用之數學模式有 Probit、Logit 與 Weibull，其主要之優點為此三種模式所計算之 EC₅₀ 值較為穩定，分析之差異性小且較具代表性。

在應用濃度關係模式於計算低影響濃度時(例: EC₁₀)，不同模式之間的信賴區間及差異性也會提高因而造成分析上之誤差。為了避免上述情況發生，因此表 5.3.1、5.3.2、及 5.3.3 即為本研究之毒性試驗結果經由三種模式之分析所得之 EC₅₀ 值進行 G-test 最佳化優選(Goodness-of-fit)，藉由選定最佳計算模式之後即可進一步計算出低影響濃度(EC₁₀)。最佳化模式之選定法為經由對重覆試驗的每一處理組與期望值的誤差比較。所得絕對值最小的 G 值。

回顧最佳模式之研究中，Christensen^[88]和 Nyholm 認為 Weibull 為較適合描述機制-反應(mechanistic-probabilistic)曲線之 EC₅₀，也說明 Weibull 模式的參數可能和化學毒性上特殊作用位置的有關。Prakash *et. al.*^[89]以 Polytox 針對 non-polar narcosis 進行實驗，毒性數據分析結果也認為 Weibull 模式較佳，但在 Chen and Chao^[22]的研究中連續式藻類毒性試驗則顯示 Probit 模式最適合，而批次式毒性試驗則以 logit 模式最適合。

由表 5.3.1、5.3.2 及 5.3.3 所得之結果可以發現在密閉式藻類毒性試驗中，三種反應終點(Δ DO、Final yield and Growth rate)皆是以 Probit 計算模式於絕對值最小 G 值中佔有最多之比例。因此，在本研究中可明顯發現到 Probit 為最適合之迴歸模式(Δ DO: 45%、Final yield: 50% and Growth rate: 55%)，而此結果也與連續式藻類毒性試驗法所得之結果一樣。但是如果針

對次等之最佳模式而言，可以發現到在 Δ DO 參數中是以 Weibull 模式為屬第二之最佳模式，而在 Final yield 和 Growth rate 之參數中則是以 logit 模式為第二之最佳模式。

圖 5.3.1 為分別在不同反應參數下進行兩種模式之比較，發現到兩種模式的差異性並不大，而且 G-test 是經由處理組與預測值之誤差所相比而求得。由圖中即可看此在 EC_{50} 值之分析其兩種模式相似性高，主要之差異區域為低影響濃度區(EC_{10})。

由於上一節之 EC_{50} 值是由 Probit 模式所計算而求得，直接符合本節所選擇之最佳模式，因此在下一節之 EC_{10} 值之計算法亦使用 Probit 模式進行分析而得知。



Table 5.3.1、G values of dissolved oxygen production in three models

Toxicants	G of Probit	G of Logit	G of Weibull	Best fit
3-ethoxy-4-hydroxybenzaldehyde	-3.329*	-7.961	-24.82	
3-bromo-4-hydroxybenzaldehyde	-5.615*	-10.24	-17.80	
3,4,5-trimethoxybenzaldehyde	9.391	6.542	4.030*	
4-ethoxy-3-methoxybenzaldehyde	16.27	15.51	1.122*	
3,4-dimethoxybenzaldehyde	38.94	34.31	-2.013*	
4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde	134.3	142.4	97.91*	
Benzaldehyde	187.2	189.1	162.7*	
4-Nitrobenzaldehyde	-1.387	2.260	-0.193*	
2,4-Dihydroxybenzaldehyde	6.238	4.285*	-24.97	
2-Chloro-6-fluorobenzaldehyde	-6.367	-5.773*	-20.51	
2,4-Dimethoxybenzaldehyde	0.282*	2.181	6.188	Probit (45%)
3,4-dihydroxybenzaldehyde	72.91	86.23	45.06*	
4-Chlorobenzaldehyde	12.80	9.177*	11.70	
2,5-dimethoxybenzaldehyde	-9.525*	-14.62	-28.06	
2,5-dihydroxybenzaldehyde	17.07	19.14	-10.73*	
5-bromo-2-hydroxybenzaldehyde	-6.706*	-11.76	-25.77	
4-(dimethylamino)benzaldehyde	0.689*	-0.808	-5.193	
4-bromobenzaldehyde	-13.96*	-19.02	-30.58	
5-hydroxy-2-nitrobenzaldehyde	11.28*	15.47	-13.04	
4-ethoxybenzaldehyde	-20.08*	-28.63	-50.24	

*：最佳值(絕對值下之 G 值最小值)

Table 5.3.2、G values of Final yield in three models

Toxicants	G of Probit	G of Logit	G of Weibull	Best fit
3-ethoxy-4-hydroxybenzaldehyde	-156.8	-155.9*	-168.6	
3-bromo-4-hydroxybenzaldehyde	-107.9	-107.8*	-120.5	
3,4,5-trimethoxybenzaldehyde	-59.01	-60.14	-57.06*	
4-ethoxy-3-methoxybenzaldehyde	-25.64	-20.29*	-59.60	
3,4-dimethoxybenzaldehyde	-141.7	-139.2*	-172.5	
4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde	-86.88	-85.14*	-93.53	
Benzaldehyde	-113.0*	-121.7	-126.8	
4-Nitrobenzaldehyde	-163.8*	-172.1	-181.7	
2,4-Dihydroxybenzaldehyde	-109.5*	-118.9	-145.0	
2-Chloro-6-fluorobenzaldehyde	-83.81*	-87.10	-99.87	
2,4-Dimethoxybenzaldehyde	-113.8*	-114.5	-128.4	Probit (50%)
3,4-dihydroxybenzaldehyde	-94.45*	-95.71	-103.1	
4-Chlorobenzaldehyde	-122.8	-120.7*	-137.6	
2,5-dimethoxybenzaldehyde	-105.8*	-109.7	-125.6	
2,5-dihydroxybenzaldehyde	-57.33	-50.85*	-63.58	
5-bromo-2-hydroxybenzaldehyde	-92.01*	-98.10	-103.1	
4-(dimethylamino)benzaldehyde	-93.72	-92.98*	-111.7	
4-bromobenzaldehyde	-102.6*	-102.7	-105.6	
5-hydroxy-2-nitrobenzaldehyde	-68.07	-66.37*	-79.12	
4-ethoxybenzaldehyde	-114.8*	-122.3	-125.8	

*：最佳值(絕對值下之 G 值最小值)

Table 5.3.3、G values of Growth rate in three models

Toxicants	G of Probit	G of Logit	G of Weibull	Best fit
3-ethoxy-4-hydroxybenzaldehyde	6.769	1.970*	-12.94	
3-bromo-4-hydroxybenzaldehyde	3.168	-0.081*	-6.544	
3,4,5-trimethoxybenzaldehyde	9.366	8.738	7.128*	
4-ethoxy-3-methoxybenzaldehyde	19.00	10.47	-3.059*	
3,4-dimethoxybenzaldehyde	124.5*	128.5	76.59	
4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde	58.67	54.69	41.03*	
Benzaldehyde	12.85	3.787*	-21.01	
4-Nitrobenzaldehyde	-14.18*	-20.49	-33.82	
2,4-Dihydroxybenzaldehyde	-28.30*	-39.37	-48.55	
2-Chloro-6-fluorobenzaldehyde	-13.52*	-19.34	-29.12	
2,4-Dimethoxybenzaldehyde	5.160	2.465*	-2.544	Probit (55%)
3,4-dihydroxybenzaldehyde	-3.270*	-5.962	-9.117	
4-Chlorobenzaldehyde	5.473	2.661*	-6.390	
2,5-dimethoxybenzaldehyde	1.923*	-4.341	-10.53	
2,5-dihydroxybenzaldehyde	3.770*	8.032	5.822	
5-bromo-2-hydroxybenzaldehyde	-6.627*	-17.41	-42.25	
4-(dimethylamino)benzaldehyde	18.19	14.45	9.587*	
4-bromobenzaldehyde	-4.966*	-10.99	-23.22	
5-hydroxy-2-nitrobenzaldehyde	0.558*	-3.035	-11.41	
4-ethoxybenzaldehyde	-7.410*	-14.00	-25.69	

*：最佳值(絕對值下之 G 值最小值)

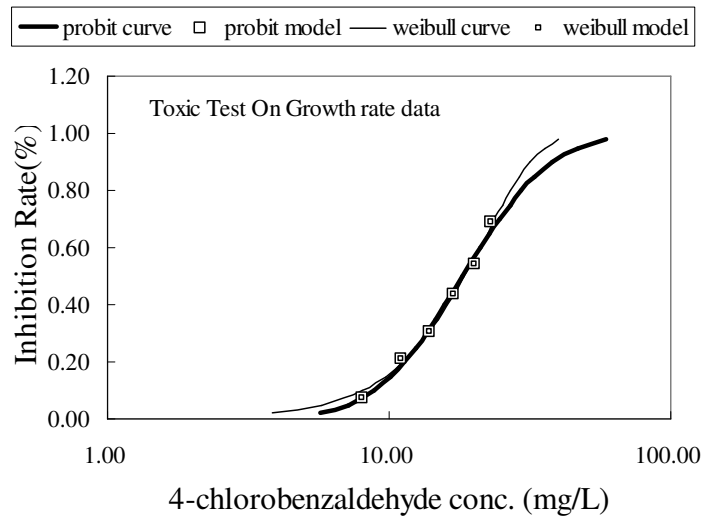
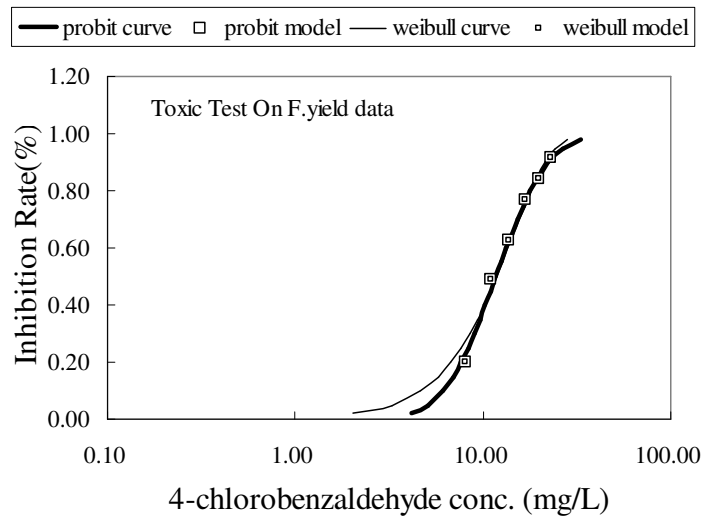
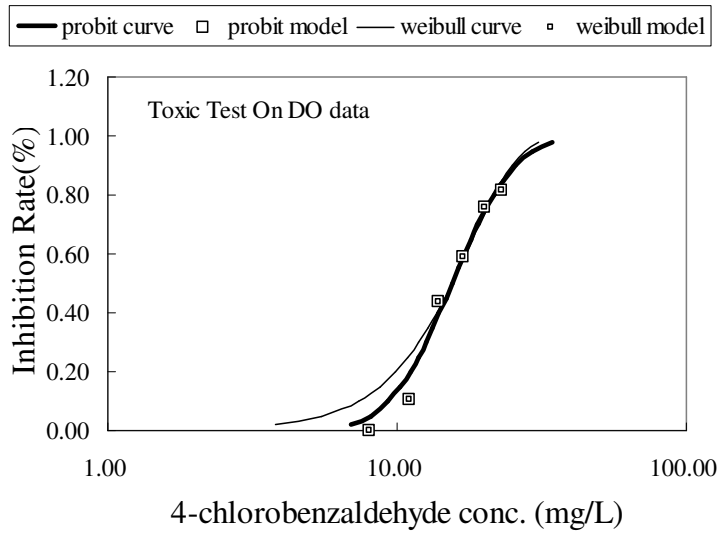


Fig 5.3.1 、 The Dose-response Curve between Weibull and Probit model

5.4 EC₁₀ 值與 NOEC、LOEC、NEC 值之比較

首先在本研究中分別利用三種不同的試驗參數 (Δ DO、Final yield and Growth rate) 來討論密閉式 BOD 瓶藻類毒性試驗之 EC₁₀ 值和 NOEC 值 (No Observed Effect Concentration)。

NOEC 值的判定通常與實驗濃度的取決、重複組的數量和選定之參數有所關聯。一般 NOEC 值是由統計方法中的 Dunnett's test 方法來進行分析，若空白組之重複組間的差異不大時，則與處理組的差距便較為明顯，所求得的 NOEC 值也較為準確，通常較不嚴謹的實驗易出現較高的 NOEC 值。

表 5.4.2 列出了利用 Dunnett's test 所得到的 NOEC 值，而 EC₁₀ 則是根據前節所決定的最佳化模式所計算求得，並列出了三種不同參數的 EC₁₀ 與 NOEC 值比例。在 NOEC 值的比較方面，三種不同參數有著相同 NOEC 值的毒性物質僅有二種(5-氫-2-硝基苯甲醛、3,4,5-三甲氧基苯甲醛)，其它數據不是無法比較就是大多數皆以生長率和細胞密度的變化量較溶氧產生量要來得敏感，而生長率和細胞密度變化量兩種參數的敏感度是差不多的，在生長率方面僅有四種毒性物質(3-溴-4-氫基苯甲醛、2,4-二氫基苯甲醛、2,4-二甲氧基苯甲醛及 3,4-二氫基苯甲醛)之 NOEC 值小於實驗濃度的最小值，而溶氧產生量和細胞密度變化則為 30% 及 45% 的 NOEC 值較實驗時的最低濃度還要來得低。接著在與 EC₁₀ 的比較之下，以溶氧產生量為參數時的 EC₁₀/NOEC 的比值在 0.6370 至 2.235 之間，其中 >1 的組數有 13 組，佔了 65%；再以生長率來討論時可以發現到，也是有 14 組的物質 EC₁₀/NOEC 比值 >1，約由 0.6970 到 3.385 之間，佔了 70%；但是，若以細胞密度變化量來看的話，卻有 10 組數據的比值 >1，佔了 50%，值約在 0.3660-1.555 之間。當其比值 >1 時則是顯示出 NOEC 會比 EC₁₀ 敏感，而造成比值大於 1 的原因可能與毒物濃度設定有關，即較佳的實驗濃度設定可

降低分析結果之差異。由此即可看出三種不同參數皆表現出 NOEC 值較 EC_{10} 來得敏感能在毒性評估中提供較好的保護。

然而由上述的分析方法無法描述 NOEC 值與 EC_{10} 何者較為嚴謹，由其是當分析結果間互相抵觸時。為了更深入比較 EC_{10} 與 NOEC 之相關性，本實驗將更進一步地利用 ANOVA(analysis of variance)檢定三項重要參數：Sw、F ration 以及中斷值(cut-off value)。Sw 代表的是試驗的組內變異，而 F ration 為組間變異與組內變異的比值，用以表示組間與組內變異的差異程度。

由表 5.4.3 發現到 Sw 值在三種參數下的差異性皆很大，主要是溶氧產生量的單位是 mg/L，細胞密度變化量的單位是 cells/mL，使得 Sw 不能用以直接比較三種反應終點的組內變異，也因此 F ration 基於相同理由，同樣無法判斷哪一個觀測參數較為精準。為了能夠比較不同參數的準確度，本研究使用了-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，能夠更嚴謹地判斷藻類受到抑制的顯著性，並使之包含單位的複雜參數與控制組的平均值比較並以抑制的百分率作為單位，使其能夠用於不同單位的試驗終點間的比較。

表 5.4.3 顯示出溶氧產生量、細胞密度變化量及生長率為反應終點的平均中斷值分別是 9.730、9.740 及 7.000，而全部試驗中以生長率為反應終點所得到的中斷值較細胞密度變化量和溶氧產生量小的分別各佔了全部的 70%，顯示以這此項參數作為反應終點比細胞密度變化量和溶氧的變化量要好許多。

因為中斷值介於 NOEC 與 LOEC 之間，但高於 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，也就是說，此時建議選擇 NOEC 值會比 EC_{10} 提供更加嚴謹的保護標準。表 5.4.3 中，針對三種不同反應終點的中斷值而言，除了香草醛及苯甲醛之中斷值

是大於 10% 之外，其他毒性物質的中斷值於三種反應終點中並非完全大於 10%。如果分別針對單一反應終點進行討論時，在溶氧產生量方面，<10% 之中斷值佔 65%；在細胞密度變化量方面，<10% 之中斷值佔 55%；而生長率方面，<10% 之中斷值佔 85%。由此可知，以對於本研究的毒性物質而言，NOEC 值比 EC₁₀ 能提供更佳的保護標準。而整個分析中，可能會導致高變異性的原因可能來自於所使用的藻類未達穩定狀態、或試驗過程不夠嚴謹以及毒性物質濃度設定不理想，都會產生分析上的偏差。而一個較小的 cut-off value 顯示此試驗組內變異相對地較小，因而有一定的精準度。綜合上述的討論可知，NOEC 比起 EC₁₀ 更能提供對生物較好的保護。

表 5.4.1 為針對苯甲醛利用本研究所得之低影響濃度(NOEC、EC₁₀)與鞭毛蟲(*Tetrahymena thermophila*)及鱒魚(*Fathead minnow*)之低影響濃度進行敏感性之比較。其結果顯示出本研究之 10% 影響濃度(EC₁₀)低於鞭毛蟲之測值，由此即說明本研究於低影響濃度之敏感性高於鞭毛蟲。但是本研究於兩種反應終點(endpoint : Final yield and Growth rate)之低影響濃度值皆比魚類還要高，而造成魚類具有較高敏感性之因素可能為魚類之實驗期間較長，可與毒性進行充份之反應。此外，由於苯甲醛在本研究中會進行歧化作用(dismutation)造成其毒性降低，因此使其本研究之敏感性低於鱒魚。

Table 5.4.1、Comparison relative sensitivity of different toxicity tests based on benzaldehyde toxicity

							Unit:mg/L	
Close BOD Bottle algal test (48hr)						<i>T.thermophila</i> (48hr)* <i>F.minnow</i> (7d)*		
DO		Final yield		Grwoth rate				
NOEC	EC ₁₀	NOEC	EC ₁₀	NOEC	EC ₁₀	EC ₁₀	NOEC	
2.022	2.266	47.69	34.50	47.69	35.87	60.00	3.600	

T. thermophila: *Tetrahymena thermophila* *F. minnow* :*Fathead minnow*

*: data from U.S.EPA Ecotox database

為了更進一步了解在低影響濃度間敏感性之差異性，進而將本研究之各低影響濃度進行敏感性之比較。表 5.4.4 為以 LOEC、 EC_{10} 及 NEC 之敏感性比較結果，由表中可以發現到在三種反應終點當中以 EC_{10} 為低影響濃度中最具敏感性之參數，其次之敏感性參數為 NEC，而最不具敏感性之參數為 LOEC。

由於 NOEC 之敏感性比 EC_{10} 要來的高，因為對於整體的低影響濃度敏感性比較結果可以得知： $NOEC > EC_{10} > NEC > LOEC$ 。而在密閉式藻類毒性試驗針對其他種類之毒物，在四種低影響濃度之敏感性進行分析所得之結果： $NOEC \approx EC_{10} > NEC \approx LOEC$ 。由此結果可以發現到針對苯甲醛所得到的低影響濃度之敏感性，和其他種類之毒物於低影響濃度之結果相似。由於其他種類之毒物包括有非極性、極性及反應性之毒性作用機制。因此，在密閉式藻類毒性試驗當中，對於大多數之毒性化學物質於四種低影響濃度之敏感性比較，所得之結果為 NOEC 為最具敏感性之反應終點。



Table 5.4.2 、 The relationship of NOEC and EC₁₀

Chemical	NOEC			EC ₁₀			EC ₁₀ /NOEC		
	DO	F.yield	G.R	DO	F.yield	G.R	DO	F.yield	G.R
3-ethoxy-4-hydroxybenzaldehyde	9.140	4.570	4.570	10.95 ^P	3.939 ^L	6.107 ^L	1.550	0.8880	1.417
3-bromo-4-hydroxybenzaldehyde	<5.590	<3.990	<3.990	5.194 ^P	2.684 ^L	4.173 ^L	>0.9290	>0.6730	>1.046
3,4,5-trimethoxybenzaldehyde	8.240	8.240	8.240	5.716 ^W	5.109 ^W	9.982 ^W	1.954	0.8160	1.323
4-ethoxy-3-methoxybenzaldehyde	<7.851	<2.908	2.908	5.002 ^W	3.001 ^L	4.721 ^W	>0.6370	>1.032	1.950
3,4-dimethoxybenzaldehyde	36.35	18.17	35.35	45.19 ^W	11.14 ^L	24.90 ^P	2.235	0.6710	0.7040
4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde	9.299	21.04	31.56	7.695 ^W	23.53 ^L	25.13 ^W	1.068	1.126	0.9390
benzaldehyde	2.022	47.69	47.69	1.890 ^W	34.50 ^P	33.42 ^L	0.9690	0.7230	0.7520
4-Nitrobenzaldehyde	2.061	<1.031	2.061	2.083 ^W	1.436 ^P	1.864 ^P	1.298	>1.393	0.9040
2,4-Dihydroxybenzaldehyde	<9.980	<9.980	<9.980	10.10 ^L	9.491 ^P	10.11 ^P	>1.012	>0.9510	>1.013
2-Chloro-6-fluorobenzaldehyde	0.959	<0.9590	0.9590	1.400 ^L	0.8860 ^P	1.431 ^P	1.615	>0.9240	1.492
2,4-Dimethoxybenzaldehyde	11.94	<10.10	<10.10	11.16 ^P	14.26 ^P	10.87 ^L	0.7620	>1.412	>1.076
3,4-dihydroxybenzaldehyde	2.404	<6.750	<6.750	1.982 ^W	2.469 ^P	4.706 ^P	1.906	>0.3660	>0.6970
4-Chlorobenzaldehyde	11.09	4.930	4.930	9.001 ^L	5.978 ^L	8.557 ^L	1.431	1.244	1.784
2,5-dimethoxybenzaldehyde	<20.16	<11.89	11.89	19.85 ^P	12.21 ^P	17.77 ^P	>0.9850	>1.027	1.495
2,5-dihydroxybenzaldehyde	0.4860	0.9720	0.9720	0.6670 ^W	1.500 ^L	3.290 ^P	2.193	1.550	3.385
5-bromo-2-hydroxybenzaldehyde	<1.010	0.7100	0.7100	0.7130 ^P	0.7140 ^P	0.7460 ^P	>0.7060	1.006	1.051
4-(dimethylamino) benzaldehyde	12.62	<10.09	10.09	17.36 ^P	7.987 ^L	12.60 ^W	1.578	>0.7920	1.294
4-bromobenzaldehyde	9.923	8.002	8.002	9.627 ^P	8.335 ^P	9.605 ^P	1.152	1.042	1.200
5-hydroxy-2-nitrobenzaldehyde	2.003	2.003	2.003	4.012 ^P	3.104 ^L	4.459 ^P	1.437	1.555	2.226
4-ethoxybenzaldehyde	<9.920	6.950	6.950	7.204 ^P	4.658 ^P	6.181 ^P	>0.7260	0.6700	0.8890
mean							>1.307	>0.9930	>1.332

NOEC is conducted by Dunnett's test, EC₁₀ is conducted by three models; P for Probit, L for Logit and W for Weibull

Table 5.4.3 、 The important statistical parameters in three test end-points

Toxicants	DO			Final yield			Growth rate		
	Sw	F-ration	Cut-off value(%)	Sw	F-ration	Cut-off value(%)	Sw	F-ration	Cut-off value(%)
3-ethoxy-4-hydroxybenzaldehyde	0.3700	115.5	15.39	1.374E+04	76.60	14.12	0.0600	118.7	9.540
3-bromo-4-hydroxybenzaldehyde	0.1500	377.3	7.470	4.818E+03	1247	3.670	0.0200	836.3	2.700
3,4,5-trimethoxybenzaldehyde	0.4300	58.40	14.26	1.386E+04	113.7	10.39	0.0500	99.70	7.430
4-ethoxy-3-methoxybenzaldehyde	0.5000	170.4	11.70	1.489E+04	222.8	7.480	0.0400	385.5	4.670
3,4-dimethoxybenzaldehyde	0.2000	244.5	9.200	9.696E+03	85.00	12.67	0.1200	31.90	20.56
4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde	0.4000	28.40	20.55	3.058E+04	49.10	24.34	0.1300	38.00	19.39
benzaldehyde	0.3500	135.3	11.26	2.034E+04	40.90	21.59	0.0900	62.20	14.83
4-Nitrobenzaldehyde	0.1800	961.2	6.520	6.086E+03	758.5	5.490	0.0400	318.2	6.160
2,4-Dihydroxybenzaldehyde	0.1100	708.9	4.480	1.710E+03	7908	1.280	0.0100	7663	0.9200
2-Chloro-6-fluorobenzaldehyde	0.2300	895.8	4.760	8.397E+03	1962	2.880	0.0300	1075	2.990
2,4-Dimethoxybenzaldehyde	0.4100	21.50	21.85	5.397E+03	252.2	5.000	0.0200	365.0	3.200
3,4-dihydroxybenzaldehyde	0.1600	538.9	5.490	3.415E+03	2497	3.270	0.0200	1585	2.440
4-Chlorobenzaldehyde	0.2100	465.6	10.00	1.599E+04	111.3	11.72	0.0300	354.7	4.910
2,5-dimethoxybenzaldehyde	0.0800	1337	3.720	7.557E+03	265.5	6.240	0.0300	332.5	4.040
2,5-dihydroxybenzaldehyde	0.2300	227.8	9.610	7.531E+03	497.1	5.520	0.0300	478.5	3.700
5-bromo-2-hydroxybenzaldehyde	0.1300	549.7	6.330	1.197E+04	128.1	13.76	0.0400	246.2	7.360
4-(dimethylamino) benzaldehyde	0.1200	490.2	5.400	1.473E+04	52.20	11.75	0.0500	63.50	7.570
4-bromobenzaldehyde	0.1900	227.4	8.400	9.958E+03	181.3	8.470	0.0400	211.3	6.040
5-hydroxy-2-nitrobenzaldehyde	0.2500	268.2	9.080	1.649E+04	197.7	9.860	0.0300	505.5	4.620
4-ethoxybenzaldehyde	0.2200	448.3	9.090	1.708E+04	68.90	15.34	0.0500	177.8	7.000
mean	0.2500	413.5	9.730	1.171E+04	835.7	9.740	0.0500	747.4	7.000

Sw : Variation between columns F-ration : The ration of variation within columns to variation between columns

Table 5.4.4 、 The relationship of LOEC 、 EC₁₀ and NEC

Chemical	DO				Final yield				Growth rate			
	LOEC	EC ₁₀	NEC	p	LOEC	EC ₁₀	NEC	p	LOEC	EC ₁₀	NEC	p
3-ethoxy-4-hydroxybenzaldehyde	14.47	10.95	10.08	4.000E-03	6.860	3.940	5.230	1.720E-06	6.860	6.110	6.960	6.570E-04
3-bromo-4-hydroxybenzaldehyde	5.590	5.190	5.370	1.030E-02	3.990	2.680	3.530	7.160E-04	3.990	4.170	3.900	4.170E-03
3,4,5-trimethoxybenzaldehyde	11.74	5.720	8.410	5.140E-04	11.74	5.110	8.080	5.530E-04	11.74	9.980	8.750	2.850E-03
4-ethoxy-3-methoxybenzaldehyde	7.850	5.000	7.670	1.900E-03	2.910	3.000	3.250	2.410E-03	7.850	4.720	6.690	4.780E-04
3,4-dimethoxybenzaldehyde	72.70	45.19	73.78	2.610E-02	36.35	11.14	23.19	1.720E-03	72.70	24.90	12.42	9.330E-04
4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde	10.39	7.700	10.33	1.470E-02	31.56	23.53	27.62	6.100E-04	42.01	25.13	30.38	1.420E-03
Benzaldehyde	3.040	1.890	2.160	1.300E-02	64.10	34.50	39.08	6.110E-03	64.10	33.42	44.56	5.670E-03
4-Nitrobenzaldehyde	3.090	2.080	2.590	6.810E-03	2.060	1.440	1.840	2.070E-04	3.090	1.860	2.100	1.380E-04
2,4-Dihydroxybenzaldehyde	9.980	10.10	10.49	1.450E-03	9.980	9.490	9.930	3.290E-04	9.980	10.11	10.26	2.060E-04
2-Chloro-6-fluorobenzaldehyde	1.920	1.400	1.810	1.280E-03	0.960	0.890	1.040	6.950E-05	1.920	1.430	1.610	5.050E-04
2,4-Dimethoxybenzaldehyde	14.08	11.16	11.63	6.110E-03	10.10	14.26	9.480	1.590E-03	10.10	10.87	10.02	6.140E-03
3,4-dihydroxybenzaldehyde	3.210	1.980	2.310	2.470E-02	6.750	2.470	4.100	7.860E-03	6.750	4.710	5.130	1.400E-02
4-Chlorobenzaldehyde	13.86	9.000	10.66	4.240E-04	8.010	5.980	7.520	2.450E-04	8.010	8.560	8.390	3.980E-03
2,5-dimethoxybenzaldehyde	20.16	19.85	20.56	1.880E-03	11.89	12.21	12.58	3.830E-05	20.16	17.77	17.58	1.040E-03
2,5-dihydroxybenzaldehyde	0.970	0.670	2.150	2.520E-02	2.920	1.500	2.440	4.470E-02	2.920	3.290	2.780	2.700E-02
5-bromo-2-hydroxybenzaldehyde	1.010	0.710	0.880	5.520E-03	1.010	0.710	0.710	1.060E-02	1.010	0.750	0.880	3.060E-02
4-(dimethylamino)benzaldehyde	18.93	17.36	17.83	2.010E-03	10.09	7.990	9.560	4.360E-04	12.62	12.60	10.23	1.210E-03
4-bromobenzaldehyde	11.84	9.630	10.06	1.140E-03	9.820	8.340	8.340	8.630E-04	9.920	9.610	8.640	1.520E-03
5-hydroxy-2-nitrobenzaldehyde	4.010	4.010	4.410	4.730E-02	4.010	3.100	3.750	5.060E-03	4.010	4.460	4.200	3.310E-02
4-ethoxybenzaldehyde	9.920	7.200	8.830	2.060E-03	9.920	4.660	5.690	2.160E-04	9.920	6.180	6.480	3.760E-04
mean	11.94[3]	8.84[1]	11.10[2]		12.25[3]	7.850[1]	9.350[2]		15.48[3]	10.03[1]	10.10[2]	

LOEC 、 EC₁₀ 、 NEC Unit : mg/L [] : ranking value

P : Significance level of NEC

5.5 急慢毒性比(Acute-Chronic Toxicity Ratio ; ACR)

在毒性試驗中，由於慢毒性試驗比急毒性試驗需更多之時間、物資及人力。因此，現今大都利用經外插法(extrapolation)得知毒物之毒性影響並更進一步得知達到環境品質之標準。假設在此求得的結果下，對於現地中的影響及環境來說都是安全的，低於此安全的層級之下，毒性化學物質對於自然環境即有負面之影響。而固定的外插因子通常採用 10、100 或 1000 應用到可獲得的 EC_{50} 或 LC_{50} 以求得最大可接受的危害程級。而急慢毒性比值 (Acute to chronic toxicity ratio) 即是經由此而發展出來的。因為使用一固定的因子有時可能會低估或高估了毒性化學物質在環境中的慢毒性影響。

由於本研究的 NOEC 值有大部分(55%)為預測值，也就是在實驗過程中所選之濃度僅可得知 LOEC 值而無法求得 NOEC 之實際值。因此藉由使用 LOEC 進行 ACR 之分析，並更進一步對 EC_{10} 與 NEC 之 ACR 做其比較。表 5.5.1 為將本研究之實驗結果進行分析所得之 LOEC、 EC_{10} 及 NEC 之 ACR 值。當 ACR 較大時即可得知急毒性指標(EC_{50})高於慢毒性指標(LOEC、 EC_{10} 、NEC)，亦可說明慢毒性指標有較高之敏感性。

由表 5.5.1 顯示出本研究之 ACR 其平均值約為 1~3 左右，由此可以發現本研究之急性及慢毒性結果變異性不大，而造成較低差異性的主要因素為藻類之世代時間較短，因此對於急性及慢毒性之影響亦相對降低。在於 Roex^[79] 的結果進行比較「極性麻醉性 (9.8 ± 11.8)，反應性 (17.31 ± 26.6)」，可發現本研究的 ACR 值是較低的。造成此結果的原因可能為由於大部分的對於求的 ACR 值的急毒性以及慢毒性的反應結果，其實驗之物種和本研究不同，以及對於急慢毒性分別實驗的天數可能是不相同的，再加上最後觀察的反應終點也不同，而本研究對於藻類的急慢毒性試驗的實驗時間

是相同為 48 小時，且皆是以 Final yield 為觀測終點，所以可能導致和過去文獻的結果有所差異。

在反應終點 Growth rate 之 ACR 值中，可以發現到 3,4-二甲氧基苯甲醛有較高之 ACR 值，由於該物質於反應終點 Growth rate 亦有較高之 Cut-off value，由此即說明此實驗是一較不嚴謹之實驗，因而會導致其實驗結果的可信度下降，也就可能會造成如此的差異性。由於本研究於三種反應終點之 ACR 差異性不大，因此於密閉式藻類急毒性試驗中對於苯甲醛類即可使用其 ACR 預測其慢毒性之影響性，並且在環境危害的評估當中，由於本研究之 ACR 係數(1~3)與早期所採用之係數(10)相近，因而採用 10 為一外插因子用以評估 EC_{50} 和 NOEC 之間的比例是合理的。



Table 5.5.1 、 The ACR values in three test end-points

Chemical	DO(ACR)			Final yield(ACR)			Grrowth rate(ACR)		
	LOEC	EC ₁₀	NEC	LOEC	EC ₁₀	NEC	LOEC	EC ₁₀	NEC
3-ethoxy-4-hydroxybenzaldehyde	1.544	2.041	2.217	1.709	2.887	2.242	3.306	3.503	3.257
3-bromo-4-hydroxybenzaldehyde	1.861	2.003	1.938	1.602	2.274	1.812	2.832	2.616	2.895
3,4,5-trimethoxybenzaldehyde	1.856	2.888	2.592	1.499	2.617	2.177	2.982	3.211	4.001
4-ethoxy-3-methoxybenzaldehyde	1.663	1.970	1.702	2.907	2.832	2.598	2.290	3.170	2.687
3,4-dimethoxybenzaldehyde	2.164	2.853	2.133	1.776	5.297	2.784	2.229	6.508	13.049
4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde	1.103	1.357	1.109	1.230	1.639	1.406	1.282	1.817	1.772
benzaldehyde	1.501	2.014	2.117	0.939	1.745	1.541	1.276	2.279	1.835
4-Nitrobenzaldehyde	1.070	1.362	1.278	1.656	2.377	1.855	1.946	3.228	2.860
2,4-Dihydroxybenzaldehyde	1.416	1.392	1.347	1.368	1.439	1.374	1.809	1.786	1.761
2-Chloro-6-fluorobenzaldehyde	1.822	2.454	1.937	2.447	2.649	2.262	2.899	3.887	3.451
2,4-Dimethoxybenzaldehyde	1.170	1.476	1.416	1.412	1.000	1.505	1.978	1.813	1.994
3,4-dihydroxybenzaldehyde	1.237	1.755	1.719	1.485	4.060	2.445	3.685	5.286	4.853
4-Chlorobenzaldehyde	1.116	1.654	1.451	1.460	1.907	1.556	2.280	2.076	2.178
2,5-dimethoxybenzaldehyde	1.710	1.737	1.677	2.260	2.200	2.137	2.312	2.622	2.651
2,5-dihydroxybenzaldehyde	3.491	3.435	1.578	1.809	3.506	2.167	3.815	3.386	4.010
5-bromo-2-hydroxybenzaldehyde	1.443	2.044	1.659	1.197	1.693	1.693	1.637	2.217	1.875
4-(dimethylamino) benzaldehyde	1.464	1.596	1.554	1.880	2.272	1.984	2.572	2.485	3.174
4-bromobenzaldehyde	1.176	1.447	1.384	1.239	1.461	1.460	1.588	1.640	1.824
5-hydroxy-2-nitrobenzaldehyde	1.748	1.747	1.589	1.503	1.935	1.607	2.469	2.220	2.355
4-ethoxybenzaldehyde	1.484	2.043	1.667	1.198	2.552	2.091	2.304	3.697	3.529
mean	1.602	1.963	1.703	1.629	2.417	1.935	2.375	2.973	3.301

ACR = EC₅₀/(LOEC or EC₁₀ or NEC)

EC₅₀、LOEC、EC₁₀、NEC unit : mg/L

5.6 密閉式 BOD 瓶藻類毒性試驗與其他物種試驗之比較

毒性試驗所選用的生物種會隨著基質(media)、試驗期間之長短與敏感性的因素而有所不同。也就是同一毒性物質以不同的生物種試驗時會呈現不同的敏感度，即使同一生物種試驗也會因試驗方法而導致敏感度變異。Cronin *et al.*^[48]認為當毒物屬於相同的毒性機制可利用物種間迴歸結果來了解彼此的相關性，並可由迴歸的結果推估其他物種的敏感度，也因此基於以上論點本節將討論本密閉式藻類試驗法與其他方法的相關性。

表 5.6.1 為以密閉式藻類毒性試驗(Δ DO、Final yield 及 Growth rate)與水蚤(*Daphnia magna*)、海洋性發光菌(*Microtox*)、纖毛蟲(*Tetrahymena pyriformis*)及鱒魚(*Fathead minnow*)所得之實驗結果。針對密閉式藻類毒性試驗而言，可以發現到三種反應終點當中對於苯甲醛類之敏感性最高者為細胞密度變化量，其次為溶氧產生量，而敏感性最差之反應終點為生長率。進一步探討藻類與其他生物種之敏感性比較可以發現本研究(藻類)其敏感性最高、依序為鱒魚、水蚤、海洋性發光菌，敏感性最差者為纖毛蟲。而本研究之藻類其敏感性為最高之主要因素為避免了苯甲醛類之揮發，因而提高了其敏感性。

為了進行建立較佳的迴歸分析結果，必須先去除離群值(outlier)，由於本試驗用的藻類在香草醛、苯甲醛及 3,4-二氫基苯甲醛，其 DO 觀測終點得到的敏感度會遠小於其他試驗物種，而其主要原因為藻類使該醛類進行歧化作用(dismutation)，因而使得溶氧產生量受到影響，並非是醛類之毒性所造成之抑制作用。因此本實驗將香草醛、苯甲醛及 3,4-二氫基苯甲醛判定為 outlier，不納入迴歸。

本實驗共有 DO (z)、Final yield (x) 與 growth rate (y) 三種觀測終點，此三種參數呈現出高度相關性：

$$z = 0.603x + 0.487y - 0.103, \quad R^2 = 0.950$$

由於三參數相關性高，因此僅選定 DO 觀測終點所求得的毒性數據與其他物種進行迴歸分析。圖 5.6.1 為本研究以溶氧產生量與其他生物種之毒性

數據分佈圖，經由畫出 45 度的對角線來判別物種敏感性的差別性，即當分佈點落於對角線之下半部時，表示是 X 軸的數據比 Y 軸要來的大，即本研究方法所得到之實驗結果其敏感性較高。圖中之分佈點可以看出其主要之分佈位置較接近於溶氧產生量，即可進一步証實本研究方法之敏感性高於其他生物種。其中有兩種毒物之敏感性高於密閉式藻類毒性試驗法，一種為 4-氯苯甲醛對於鱒魚有較高之毒性，另一種為 4-二甲氨基苯甲醛對於海洋性發光菌有較高之毒性。

Kishino and Kobayashi^[90] 指出在魚類的毒性試驗中，有機物質之毒性會與鍵結氯原子之數目成正比，其主要之因素為當鍵結之氯原子之數目愈多時，會使得 OH group 的電子密度降低，因而造成毒性上昇。而 4-二甲氨基苯甲醛對於 Microtox 具有較高之毒性為該物質有較高的偶極矩(dipole moment)，即當有機物質之作用機制為生物反應性時，則會對於 Microtox 有著較高之極性與較高之毒性^[82]。

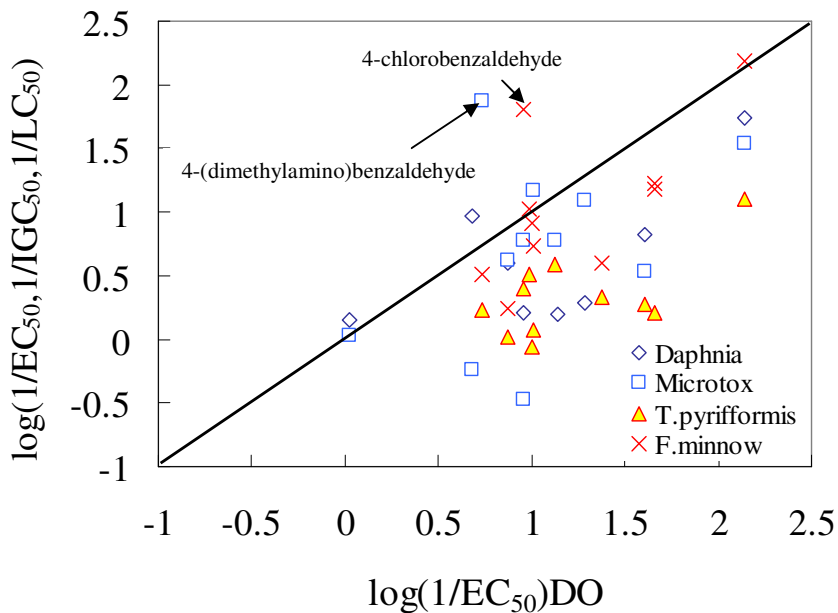


Fig 5.6.1、Comparison of relative sensitivity of *P.subcapitata* and other species

Table 5.6.1 、 Comparison of algal toxicity test results with other species

Unit : mmol/L

Chemicals	Algae (BOD bottle)(48hr)		Daphnia *	Microtox [@]	T.pyrififormis [#]	F.minnow ^{&}	
	Δ DO	F.yield	G.R	48hr	15min	40hr	96hr
	Log(1/EC ₅₀)	Log(1/EC ₅₀)	Log(1/EC ₅₀)	Log(1/EC ₅₀)	Log(1/EC ₅₀)	Log(1/IGC ₅₀)	Log(1/LC ₅₀)
3-ethoxy-4-hydroxybenzaldehyde	0.8710[3]	1.152[1]	0.8650[2]	0.6030[5]	0.6180[4]	0.0150[7]	0.2420[6]
3-bromo-4-hydroxybenzaldehyde	1.286[2]	1.498[1]	1.250[3]	0.2820[5]	1.096[4]	-	-
3,4,5-trimethoxybenzaldehyde	0.9540[2]	1.047[1]	0.749[3]	0.2110[4]	-0.478[5]	-	-
4-ethoxy-3-methoxybenzaldehyde	1.140[2]	1.329[1]	1.001[3]	0.1950[4]	-	-	-
3,4-dimethoxybenzaldehyde	0.0240[4]	0.4110[1]	0.0110[5]	0.1510[2]	0.0300[3]	-	-
4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde	1.123	0.5930[2]	0.4510[4]	0.4990[3]	0.1800[6]	-0.030[7]	0.4260[5]
Benzaldehyde	1.367	0.2460[6]	0.1130[5]	0.3440[4]	1.035[3]	-0.1960[7]	1.145[2]
4-Nitrobenzaldehyde	1.660[1]	1.646[2]	1.400[3]	-	-	0.2030[5]	1.180[4]
2,4-Dihydroxybenzaldehyde	0.990[2]	1.005[2]	0.8840[4]	-	-	0.5150[5]	1.023[1]
2-Chloro-6-fluorobenzaldehyde	1.656[2]	1.830[1]	1.455[3]	-	-	-	1.227[4]
2,4-Dimethoxybenzaldehyde	1.004[2]	1.066[1]	0.9200[3]	-	-	-0.0560[5]	0.9170[4]
3,4-dihydroxybenzaldehyde	1.542	1.139[2]	0.7450[3]	0.6680[4]	0.6000[5]	0.1070[6]	-
4-Chlorobenzaldehyde	0.9590[3]	1.080[2]	0.8860[4]	-	0.7800[5]	0.4000[6]	1.810[1]
2,5-dimethoxybenzaldehyde	0.6830[3]	0.7910[2]	0.5520[4]	0.9720[1]	-0.2370[5]	-	-
2,5-dihydroxybenzaldehyde	1.610[1]	1.417[2]	1.093[3]	0.8210[4]	0.5350[5]	0.2770[6]	-
5-bromo-2-hydroxybenzaldehyde	2.13[3]	2.221[1]	2.085[4]	1.745[5]	1.5436[6]	1.107[7]	2.189[2]
4-(dimethylamino)benzaldehyde	0.7310[3]	0.8960[2]	0.6630[4]	-	1.876[1]	0.2310[6]	0.5100[5]
4-bromobenzaldehyde	1.123[2]	1.182[1]	1.070[3]	-	0.7780[4]	0.5870[5]	-
5-hydroxy-2-nitrobenzaldehyde	1.377[2]	1.443[1]	1.227[3]	-	-	0.3290[5]	0.600[4]
4-ethoxybenzaldehyde	1.009[3]	1.102[2]	0.8180[4]	-	1.169[1]	0.0730[6]	0.7280[5]
Ave.Ranking	2.353[2]	1.700[1]	3.500[3]	3.730[5]	4.070[6]	5.930[7]	3.580[4]

*: Data from Lijum Jin^[53], @: Data from Lijum Jin^[83], #: Data from Schultz T.W^[88], &: Data from Russom C.L^[54]

[]: ranking value F.yield: Final yield G.R: Growth Rate

5.7 QSAR 分析

QSAR(Quantitative Structure-Activity Relationship)早期用於製藥及醫藥之研究。在 70 年代以後，QSAR 才被引入環境工程學中加以應用。所謂 QSAR，是以有機物的物理特性，化學特性及結構間的性質與毒性建立起高質量之統計關係。所謂高質量，即指模式具有對內部樣本的良好估計能力和對外部樣本的良好預測能力。而環境學者可以由化學物質的物理特性，預測其毒性，以運用在環境影響評估的範疇。儘管製藥及醫學工業早已經使用 QSAR 於許多特殊生化機制，而在環工領域，QSAR 的應用尚侷限在非反應性有機物麻醉作用上，少數反應性有機物實驗結果亦不佳。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。

本實驗將 20 種苯甲醛的 EC_{50} 值與不同參數來進行相關性之探討，因為這部份過去的文獻資料並不多，故這類毒性物質的 QSAR 建立之必要性也相對地提高。因此本實驗的數據也以不同參數來建立 QSAR。表 5.7.1 與表 5.7.2 為三種試驗終點之毒性數據、所用到的參數值與迴歸結果的相關性。

由表 5.7.2 顯示出毒性數據與其他參數值之間的相關性並不佳， R^2 大多小於 0.3，除了無法建立良好的 QSAR 之外，也不足應用於其他相同毒性機制的毒物上。這可能是因本實驗所選擇的毒性物質並非為同類型之物質，因此在化學結構上的分類卻跨越了其他毒性作用機制，使其毒性差異性太大，因而造成無法找出良好的相關性。

Schultz *et.al*^[88] 利用 logKow 針對 77 種芳香醛類進行 QSAR 之分析，其結果 $R^2=0.733$ ，造成較好之回歸效果可能之原因如下：

1. 毒物一般具選擇性，也就是同一種毒性對於不同生物種所產生之毒性作用機制也可能不同。

2. 不同生物之毒性試驗，由於基質之影響、試驗期間之長短等皆可能影響毒性試驗結果，因而進一步產生不佳之回歸效果。
3. 回歸數量(樣本數)之多寡亦會影響 QSAR 迴歸之品質。即本研究之數量為 20 種苯甲醛，遠小於 Schultz 所進行迴歸之樣本數。

Walker J.D *et.al*^[87] 亦在針對烴基苯甲醛類(hydroxybenzaldehydes)進行鱒魚之毒性試驗中，指出此類之物質對於 logKow 較有其相關性。Eq(1)即針對烴基苯甲醛利用鱒魚進行毒性試驗所建立之 QSAR 模式：

$$\text{Log}(1/\text{EC}_{50}) = -10.26(\pm 3.159) + 0.603(\pm 0.078)\text{logKow} + 54.63(\pm 12.516)$$

$$O_{\text{Donor_dlc}} \quad (1)$$

$$N=8, R^2=0.933, S^2=0.022, F=35.081, Q^2=0.871$$

$O_{\text{Donor_dlc}}$ 為鄰位烴基苯甲醛提供 OH group 鍵結之能力。

本研究嘗試針對 8 種烴基苯甲醛利用 logKow 進行 QSAR 之回歸分析，由於溶氧產生量受歧化作用(dismutation)之影響，因此採用細胞密度變化量及生長率進行 QSAR 之回歸，其結果為 Eq(2)、Eq(3)。可以發現有一個 outlier(2,5-dihydroxybenzaldehyde)，若將此點去除後再進行迴歸即可得到較好之 QSAR 模式。其結果如圖 5.7.3 所示。

$$\text{Log}(1/\text{EC}_{50})\text{F.yield} = 0.970\text{logKow} + 0.2702 \quad (2)$$

$$N=8, R^2=0.449, S=0.379, F=4.893$$

$$\text{Log}(1/\text{EC}_{50})\text{G.R} = 1.069\text{logKow} + 0.389 \quad (3)$$

$$N=8, R^2=0.581, S=0.34, F=8.308$$

由圖 5.7.3 與 Eq(4)、Eq(5)即可說明烴基苯甲醛對於 logK_{ow} 是具有其相關性，而本研究所選定之 20 種苯甲醛並非為同類型之物質。

$$\text{Log}(1/\text{EC}_{50})\text{F.yield} = 0.817\text{logKow} + 0.2365 \quad (4)$$

$$N=7, R^2=0.817, S=0.215, F=22.3, Q^2=0.673$$

$$\text{Log}(1/\text{EC}_{50})\text{G.R} = 0.9152\log\text{K}_{ow} + 0.091 \quad (5)$$

$$N=7, R^2 = 0.9152, S=0.16, F=54.03, Q^2=0.851$$

因此以 20 種苯甲醛利用 $\log\text{K}_{ow}$ 無法得到良好之關係。目前對於 2,5-dihydroxybenzaldehyde 成為 outlier 之因素還不得而知，因此在未來還需做進一步之研究。

為了進一步了解所建立之 QSAR 模式有其良好之準確性，本研究將 $\log\text{K}_{ow}$ 代入 Eq(2)、Eq(3) 中以求得其模式之預測值，並將其值與實驗值進行迴歸分析，藉由迴歸之結果以得知所建立之 QSAR 模式預測之準確性。

Table 5.7.1、The experiment values and predict values in hydroxybenzaldehydes

Chemicals	F.yield	G.R	$\log\text{K}_{ow}$	F.yield-calc.	G.R-calc.
	$\text{Log}(1/\text{EC}_{50})$	$\text{Log}(1/\text{EC}_{50})$		$\text{Log}(1/\text{EC}_{50})$	$\text{Log}(1/\text{EC}_{50})$
3-ethoxy-4-hydroxybenzaldehyde	1.152	0.8650	1.580	1.215	0.9870
3-bromo-4-hydroxybenzaldehyde	1.498	1.250	1.830	1.407	1.198
4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde	0.5930	0.4510	1.210	0.9290	0.6740
2,4-dihydroxybenzaldehyde	1.005	0.8840	1.530	1.176	0.9440
3,4-dihydroxybenzaldehyde	1.139	0.7440	1.090	0.8360	0.5720
5-bromo-2-hydroxybenzaldehyde	2.221	2.085	2.900	2.233	2.103
5-hydroxy-2-nitrobenzaldehyde	1.443	1.227	1.630	1.253	1.029

$\log(1/\text{EC}_{50})$ unit : mM

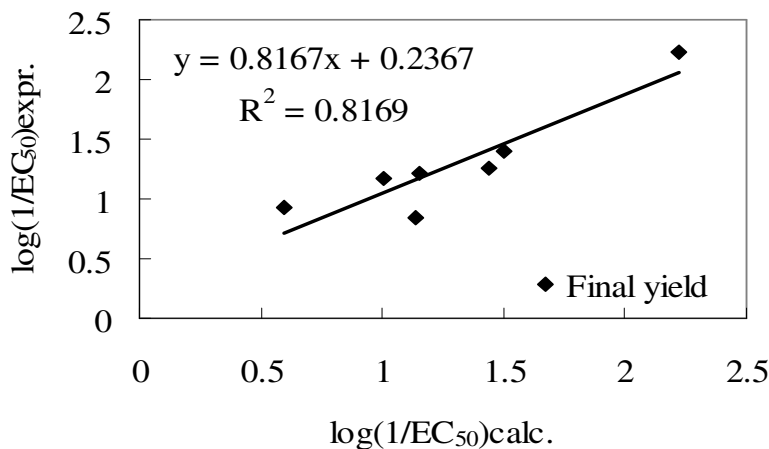


Fig 5.7.1、Plot of experiment values versus predict values in hydroxybenzaldehydes based on Final yield

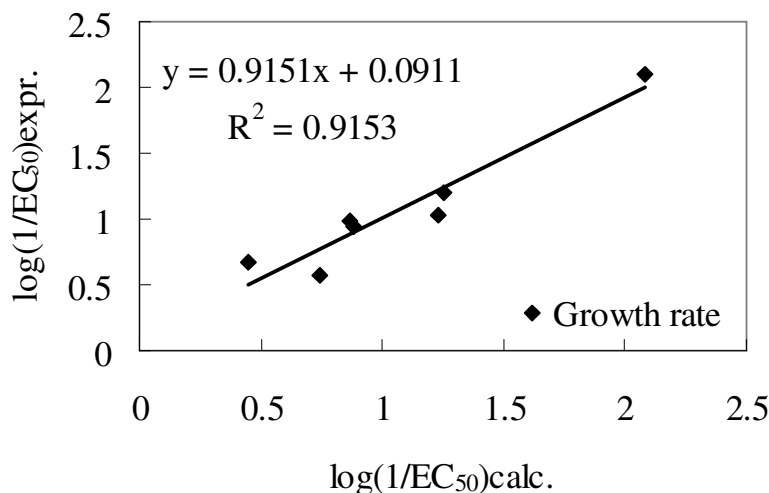


Fig 5.7.2、Plot of experiment values versus predict values in hydroxybenzaldehydes based on Growth rate

由圖 5.7.1 及圖 5.7.2 顯示出本研究以反應終點 Growth rate 所建立之 QSAR 模式除了有較高之適合度(fitting)之外，其模式之預測能力也是比反應終點為 Final yield 還要好。一般而言，模式預測能力之判定方法除了藉由統計方法求得之外，另一種方法即是將其模式之預測值與實驗值進行迴歸分析。

針對模式之適合度而言，在統計迴歸分析中，模式通常採用回歸係數之平方(r^2 ，代表模式所解釋之方差)或自由度校正的 r^2_{adj} ，標準偏差及檢驗值 F 等來評判。而模式之穩健性(準確性)一般採用交叉驗證法(cross-validation)來進行檢驗。而此方法通常包含兩種方式：一種逐一剔除法(Leave-one-out)，即一般所說的 Jackknife 檢驗，其做法是從訓練集中每次刪除一個化合物，用其餘的化合物建立模式並用來預測刪除化合物的性質/活性；另一種方式為分組剔除法(Leave-more-out)，即每次剔除 N 個化合物，用其餘化合物集來建立模式並預測 N 個化合物的性質。本研究利用逐一剔除法所得之結果顯示(Final yield $Q^2=0.673$; Growth rate $Q^2=0.851$)以生長率所建立之模式，其準確性高於 Final yield 所建立之模式。

模式迴歸分析法亦為判定準確性之一種方法，即將模式之預測值與實

驗值進行迴歸分析，當迴歸公式之斜率愈接近於 1 且截矩愈接近於 0 時，其模式之準確性也相對愈高。在本研究中，以 Growth rate 回歸之模式其斜率為 0.915 且截矩為 0.091，由此可知以此反應終點所建立之模式其有著較高之準確性。



Table 5.7.2 、 Physical and chemical parameters of benzaldehydes

Chemical	E_{HOMO}	E_{LUMO}	Log P	M.W	V.P	Henry's law constants
	(EV)	(EV)			(Kpa)	(atm·m ³ /mole)
3-ethoxy-4-hydroxybenzaldehyde	-9.430	-0.5100	1.580	166.2	1.387E-06	1.100E-10
3-bromo-4-hydroxybenzaldehyde	-8.800	-1.690	1.830	201.0	7.163E-05	5.570E-10
3,4,5-trimethoxybenzaldehyde	-9.310	-0.6300	1.390	196.2	1.507E-04	2.780E-09
4-ethoxy-3-methoxybenzaldehyde	-9.220	-0.4200	1.630	180.2	4.935E-04	6.240E-08
3,4-dimethoxybenzaldehyde	-9.010	-0.4400	1.220	166.2	1.467E-03	4.700E-08
4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde	-9.040	-0.4900	1.210	152.2	1.574E-05	2.150E-09
Benzaldehyde	-10.00	-0.4400	1.480	106.1	1.694E-02	2.670E-05
4-Nitrobenzaldehyde	-10.830	-1.670	1.560	151.1	4.722E-04	5.300E-08
2,4-Dihydroxybenzaldehyde	-9.460	-0.5700	1.530	138.1	4.940E-06	1.830E-10
2-Chloro-6-fluorobenzaldehyde	-9.940	-0.9100	2.560	158.6	-	-
2,4-Dimethoxybenzaldehyde	-9.150	-0.3000	1.870	166.2	1.587E-04	4.700E-08
3,4-dihydroxybenzaldehyde	-9.240	-0.5500	1.090	138.1	1.547E-05	1.450E-13
4-Chlorobenzaldehyde	-9.910	-0.7400	2.100	140.6	2.441E-02	9.950E-06
2,5-dimethoxybenzaldehyde	-8.880	-0.4200	1.910	166.2	1.467E-03	4.700E-08
2,5-dihydroxybenzaldehyde	-9.000	-0.5500	0.5400	138.1	1.550E-05	1.830E-10
5-bromo-2-hydroxybenzaldehyde	-9.440	-0.6600	2.900	201.0	7.160E-05	7.010E-07
4-(dimethylamino)benzaldehyde	-8.540	-0.1800	1.810	149.2	4.910E-04	2.140E-07
4-bromobenzaldehyde	-9.930	-0.8100	2.600	185.0	3.415E-03	5.350E-06
5-hydroxy-2-nitrobenzaldehyde	-10.290	-1.460	1.630	167.1	5.070E-06	5.510E-12
4-ethoxybenzaldehyde	-9.320	-0.3400	2.280	150.2	3.828E-03	1.050E-06

M.W : Molecule Weight V.P : Vapour Pressure

Table 5.7.3 Relationships between the toxicity data and other parameters

Parameters	DO		Final yield		Growth rate	
$E_{HOMO}(EV)$	$y = -0.525x - 8.828$	$R^2 = 0.178$	$y = -0.340x - 9.045$	$R^2 = 0.079$	$y = -0.384x - 9.090$	$R^2 = 0.101$
$E_{LUMO}(EV)$	$y = -0.394x - 0.231$	$R^2 = 0.168$	$y = -0.470x - 0.146$	$R^2 = 0.253$	$y = -0.469x - 0.260$	$R^2 = 0.254$
Log Kow	$y = 0.272x + 1.420$	$R^2 = 0.048$	$y = 0.550x + 1.101$	$R^2 = 0.207$	$y = 0.629x + 1.163$	$R^2 = 0.272$
Molecule Weight	$y = 1.284x + 159.4$	$R^2 = 0.001$	$y = 25.36x + 131.6$	$R^2 = 0.239$	$y = 24.82x + 138.2$	$R^2 = 0.231$
Log(M.W)	$y = -0.678x - 2.949$	$R^2 = 0.061$	$y = -0.89x - 2.713$	$R^2 = 0.108$	$y = -0.795x - 3.017$	$R^2 = 0.089$
Log(H.L.C)	$y = 0.400x - 7.971$	$R^2 = 0.004$	$y = 0.562x - 8.155$	$R^2 = 0.009$	$y = 0.674x - 8.120$	$R^2 = 0.013$

V.P : Vapour Pressure(Kpa) H.L.C : Henry's law constants(atm-m³/mole)

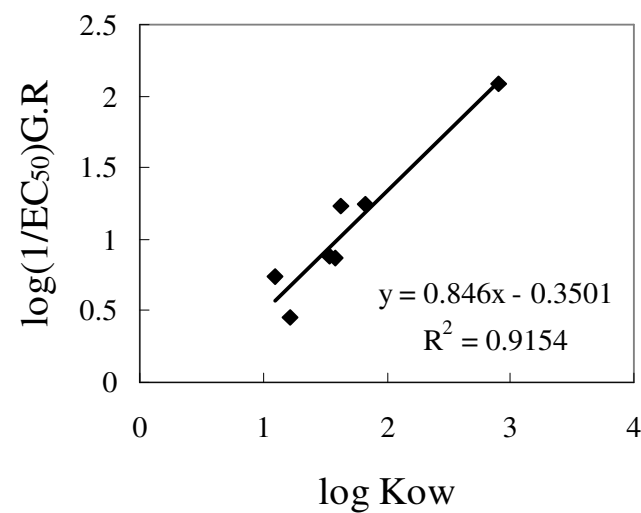
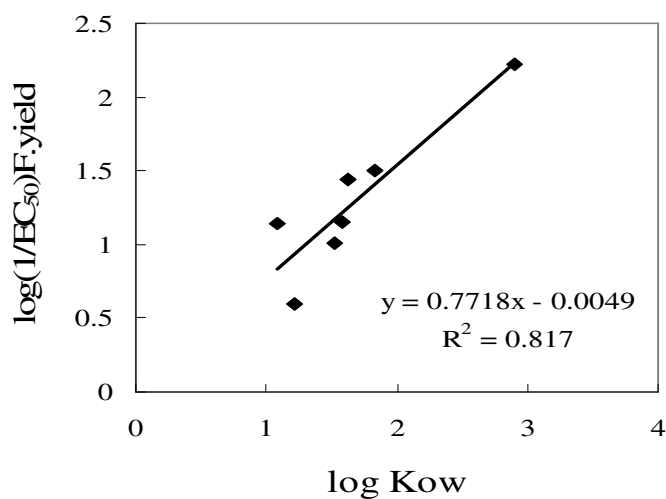


Fig 5.7.3 QSAR analysis of the seven hydroxybenzaldehydes

第六章、結論與建議

6.1 結論

本研究為針對 20 種苯甲醛進行密閉式之藻類毒性試驗，其所得之結果如下：

1. 三種苯甲醛(苯甲醛、香草醛及 3,4-二氫基苯甲醛)之 ΔDO 為觀測終點時，其敏感性皆明顯比觀測終點為 Final yield 及 Growth rate 具有較高之特性，其中苯甲醛之情況最為明顯[$\text{Log}(1/EC_{50})_{DO} = 1.367$, $\text{Log}(1/EC_{50})_{F.yield} = 0.2460$, $\text{Log}(1/EC_{50})_{GR} = 0.1130$]。而造成此情形之因素為藻種會與苯甲醛行歧化作用(dismutation)。此作用會造成苯甲醛轉化為苯甲酸之過程中行耗氧作用，因而減少溶氧產生量並降低其毒性。
2. 在不同氫基苯甲醛之毒性中，以 5-溴-2-氫基其毒性最毒，以反應終點為最終產率($\text{Log}(1/EC_{50})_{F.yield} = 2.221$)及生長率($\text{Log}(1/EC_{50})_{GR} = 2.085$)而言，其毒性與苯甲醛[$\text{Log}(1/EC_{50})_{F.yield} = 0.2460$, $\text{Log}(1/EC_{50})_{GR} = 0.1130$]大約相差 50 及 80 倍左右。除了 3-溴-4-氫基苯甲醛之外，其他位於對位(*para*-)之氫基苯甲醛其毒性皆比鄰位(*ortho*-)低。而 3-溴-4-氫基苯甲醛有較高之毒性為取代基若含有溴(*bromo*-)時，其氫基苯甲醛之毒性也會因而提高。
3. 經由 G-test 最佳化優選(Goodness-of-fit)分析後，其最佳計算模式為 Probit 模式[$\Delta DO = 45\%$, $F.yield = 50\%$, $G.R = 55\%$]。再更進一步地利用 ANOVA(analysis of variance)檢定三項重要參數：Sw、F ration 以及中斷值(cut-off value)，發現對於本研究的毒性物質而言，NOEC 值比 EC_{10} 能提供更佳之保護標準。對整體之低影響濃度而言，其敏感性之比較結果： $NOEC > EC_{10} > NEC > LOEC$ 。此外，不同參數間所計算之中斷值，以生長率為反應終點時的值是最小的(cut-off

value = 7.000), 即表示在苯甲醛之毒性試驗中以此一參數能提供生物較為嚴謹的保護。

4. 在本研究之三種反應終點當中(去除 Δ DO之3種 outliers)對於苯甲醛類之敏感性最高者為細胞密度變化量[Ave.ranking = 1.700], 其次為溶氧產生量[Ave.ranking = 2.353], 而敏感性最差之反應終點為生長率[Ave.ranking = 3.500]。與其他生物種進行比較可以發現本研究(藻類)其敏感性最高、依序為鱒魚[Ave.ranking = 3.580]、水蚤[Ave.ranking = 3.730]、海洋性發光菌[Ave.ranking = 4.070], 敏感性最差者為纖毛蟲[Ave.ranking = 5.930]。
5. 毒性數據與其他參數值之間的 QSAR 相關性並不佳, R^2 大多小於 0.3。這可能是因本實驗所選擇的毒性物質並非為同類型之物質, 因此在化學結構上的分類卻跨越了其他毒性作用機制, 使其毒性差異性太大, 因而造成無法找出良好的相關性。
6. 針對 8 種烴基苯甲醛利用 logKow 進行 QSAR 之回歸分析, 可以發現有一個 outlier (2,5-dihydroxybenzaldehyde), 若將此點去除後再進行迴歸即可得到較好之 QSAR 模式。
[Log(1/EC₅₀)F.yield= 0.817logKow + 0.2365 ; N=7, R²= 0.817]
[Log(1/EC₅₀)G.R= 0.9152logKow + 0.091 ; N=7, R²= 0.9152]
7. 以反應終點為 Grwoth rate 所建立之 QSAR 模式, 其模式比反應終點為 Final yield 之模式有其較高之準確性(QSAR_{GR}; Q²=0.851)。

6.2 建議

1. 由於藻種會與部份醛類(苯甲醛、香草醛及 3,4-二烴基苯甲醛)行歧化作用(dismutation)而形成酸類, 一般有機酸類皆會產生解離之現象。因此在未來之研究當中應考慮解離與毒性之相關性。
2. 本研究所選定之苯甲醛類為非同類型之物質, 如需建構更完善之

QSAR 模式，除了增加更多之物化參數之外(如 pKa 值等)，應更進一步找尋同類型之物質進行毒性試驗及建構 QSAR 模式。

3. 由於現今對於苯甲醛於其他生物種之毒性數據並不充足，因此在未來之研究當中應收集更多生物種之毒性數據，以更進一步研究替代實驗物種之可行性。



第七章、参考文献

1. **Bailey, R.A., Clark, H.M., Krause, S., Strong, R.L.,** 1978. "Atmospheric chemistry" Chemistry of the Environment. Academic Press. New York.
2. **Sitting, M.,** 1974. "Aldehydes" Pollution Detection and Monitoring Handbook. Noyes Data Corp. Park Ridge. New Jersey.
3. **J.L.M, Hermens.,** 1990. Electrophiles and acute toxicity to fish. *Environ. Health. Persp.* 87, 219-225.
4. **Koga, M., Akiyama, T., Glaze, W.H.,** 1991. Analysis of ozonation by-products produced in drinking water treatment. *Toxicol. and Health.* 7, 423-432.
5. **Manaha, S.E.,** 1990. Environmental Chemistry (4th Edn). Lewis. Boca Ration. FL. 414-416.
6. **Que-Hee, S.S.,** 1993. Biological Monitoring: An introduction (Edn). Van Nostrand Reinhold. New York .
7. **Wang, X., Cheng, S., Wang, L., Han, S.,** 2001. Quantitative Structure-Activity Relationships: Comparative inhibition of nitrogen-containing aromatics on germination of *Cucumis Sativus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 913-916.
8. **Dimitrov, S., Koleva, Y., Schultz, T.W., Walker, J.D., Mekenyan, O.,** 2004. Interspecies quantitative structure-activity relationship model for aldehydes: aquatic toxicity. *Environ. Toxicol. Chem.* 23 (2), 463-470.
9. **Fessenden, R.J., Fessenden, J.S., Logue, M.W.,** 1998. Organic Chemistry. 6th edition Brooks/Cole Publishing Company. A Division of International Thomson Publishing Inc. ISBN 0-534-35199-9. CA. USA.
10. **Brown, W.H.,** 1997. Introduction to Organic Chemistry, Saunders College Publishing. Harcourt Brace & company. FL. USA.
11. **Henschler, D., Schlede, E.,** 1986. Structure-activity relationships of α,β -unsaturated carbonylic compounds. IARC. 70, 197-205.
12. **Sterner, O., Carter, R.E., Nilsson, L.M.,** 1987. Structure-activity

- relationships for unsaturated dialdehydes. 1. the mutagenic activity of 18 compounds in the *Salmonella/microsome* assay. *Mutat. Res.* 188, 169-74.
13. **Morales, P., Andersson, M., Lewan, L., Sterner, O.,** 1992. Structure-activity relationships for unsaturated dialdehydes. 6. The mutagenic activity of 11 compounds in the V78/HGPRT assay. *Mutat. Res.* 268, 315-21.
14. **Karabunarliev, S., Mekenyan, O.G., Karcher, W., Russom, C.L., Bradbury, S.P.,** 1996. Quantum-chemical descriptors for estimating the acute toxicity of electrophiles to the fathead minnow (*Pimephales promelas*). An analysis based on molecular mechanisms. *Quant. Struct-Act Relat.* 15, 302-310.
15. **Dearden J.C.,** 2002. Prediction of environmental toxicity and fate using quantitative structure-activity relationships(QSARs). *J. Braz. Chem. Soc.* 13, 754-762.
16. **Sixt, S., Altschuh, J., Bruggemann, R.,** 1995. Quantitative structure-toxicity relationship for 80 chlorinated compounds using quantum chemical descriptors. *Chemosphere.* 60, 2397-2414.
17. **Nirmalakhandan, N., Peace, J., Egemen, E., M.Mohsin, S.B., Hall, E.,** 1996. Estimating toxicity of mixtures of organic chemicals to activated sludge using surrogate test cultures. *Wat. Sci. Tech.* 34, 87-92.
18. **Ramos, E.U., Vaal, M.A., Hermens, J.L.M.,** 2002. Interspecies sensitivity in the aquatic toxicity of aromatic amines. *Environ. Toxicol. Pharm.* 11, 149-158.
19. **Kaiser, K.L.E., Esterby, S.R.,** 1991. Regression and cluster analysis of the acute toxicity of 267 chemicals to six species of biota and octanol/water partition coefficient. *Sci. Total. Environ.* 109 (110), 499-514.
20. **Mayer, P., Nyholm, N., Verbruggen, E.M.J., Hermens, J.L.M., Tolls, J.,** 2000. Algal growth inhibition test in filled, closed bottles for volatile and sorptive materials. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 2551–2556.
21. **Padrtova, R.R., Marsalek, B., Holoubek, I.,** 1998. Evaluation of alternative and standard toxicity assays for screening of environmental

- samples: selection of an optimal test battery. *Chemosphere*. 37, 495-507.
22. **Chen, C.Y., Chao, M.R.**, 2000. No-observed-effect concentrations in batch and continuous algal toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 1589-1596.
 23. **Okumura, Y., Koyama, J., Takaku, H., Satoh, H.**, 2001. Influence of Organic Solvents on the Growth of Marine Microalgae. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 41, 123–128.
 24. **Nyholm, N., Damgaard, B.M.**, 1990. A comparison of the algal growth inhibition toxicity test method with the short term ¹⁴C-assimilation test. *Chemosphere*. 21, 671-679.
 25. **Brack, W., Rottlern, H.**, 1994. Toxicity testing of highly volatile chemicals with green algae. *ESPR*. 4, 223-228.
 26. **Kuhn, R., Pattard, M., Pernak, K., Winter, A.**, 1989. Results of the Harmful Effects of Selected Water Pollutants (Anilines, Phenols, Aliphatic Compounds) to *Daphnia magna*. *Water. Res.* 23, 495-499.
 27. **Galassi, S., Vighi, M.**, 1981. Testing toxicity of volatile substances with algae. *Chemosphere*. 10, 1123-1126.
 28. **Herman, D.C., Inness, W.E., Mayfield, C.I.**, 1990. Impact of volatile aromatic hydrocarbons, alone and in combination, on growth of the freshwater alga *Selenastrum Capricornutum*. *Aquatic. Toxicology*. 18, 87-100.
 29. **Chen, C.Y., Lin, K.C.**, 1997. Optimization and performance evaluation of the continuous algal toxicity test. *Environmental Toxicology Chemistry*. 16, 1337-1344.
 30. **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.
 31. **Halling-Sørensen, B., Nyholm, N., Baun, A.**, 1996. Algal toxicity tests with volatile and hazardous compounds in air-tight test flasks with CO₂ enriched headspace. *Chemosphere*. 32, 1513 – 1526.
 32. **Arensberg, P., Hemmingsen, V.H., Nyholm, N.**, 1995. A miniscale algal

- toxicity test. *Chemosphere*. 30, 2103-2115.
33. **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.
 34. **Nyholm, N., Kälqvist, T.**, 1989. Methods for growth inhibition toxicity tests with freshwater algae. *Environ. Toxicol. Chem.* 8, 689-703.
 35. **United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA)** . 1996. Ecological Effect Test Guidelines. OPPTS 850.5400. Algal Toxicity, Tiers I and II.
 36. **Chen, C.Y.**, 1994. Theoretical evaluation of the inhibitory effects of mercury on algal growth at various orthophosphate levels. *Water Research*. 28, 931-937.
 37. **Millington, L.A., Goulding, K.H., Adams, N.**, 1988. The influence of growth medium composition on the toxicity of chemicals to algae. *Water Research*. 22, 1593-1597.
 38. **Newman, M.C., McIntosh, A.W.**, 1991. *Metal Ecotoxicology*. pp.1-26. Lewis, Michigan.
 39. **Mazidji, C.N., Koopman, B., Bitton, G., Neita, D.**, 1992. Distinction between heavy metal and organic toxicity using EDTA chelation and microbial assays. *Environ. Toxicol. Water. Qual.* 7, 339-353.
 40. **Sorvari, J., Sillanpaa, M.**, 1996. Influence of metal complex formation on heavy metal and free EDTA and DTPA acute toxicity determined by *Daphnia magna*. *Chemosphere*. 33, 1119-1127.
 41. **Lin, J.H., Kao, W.C., Tsai, K.P., Chen, C.Y.**, 2005. Anovel algal toxicity testing technique for assessing the toxicity of both metallic and organic toxicants. *Water Res.* 39, 1869-1877.
 42. **Christensen, E.R., Chen, D., Nyholm, N., Kusk, O.**, 2001. Joint action of chemicals in algal toxicity tests: influence of response level and dose – response regression model. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 2361-2369.
 43. **Jawecki, G.N., Sawicki, J.**, 1999. Spirotox-A new tool for testing the toxicity of volatile compounds. *Chemosphere*. 38, 3211-3218.

44. **Kuhn, R., Pattard, M.,** 1990. Results of the harmful effects of water pollutants to green algae (*Scenedesmus subspicatus*) in the cell multiplication inhibition test. *Wat. Res.* 24, 31-38.
45. **Ensley, H.E., Sharma, H.A., Barber, J.T., Polito, M.A.,** 1997. *Metabolism of chlorinated phenols by Lemna gibba, Duckweed.* In E.L. Kruger, T.A. Anderson, and J.R. Coats (eds.), *Phytoremediation of Soil and Water Contaminants, American Chemical Society. Washington. DC.*238-253.
46. **Kim, H.K., Kim, J.R., Ahn, Y.J.,** 2004. Acaricidal activity of cinnamaldehyde and its congeners against *Tyrophagus Putrescentiae*. *Journal of Stored Products Research* 40, 56-63.
47. **Yen, J.H., Lin, K.H., Wang, Y.S.,** 2002. Acute Lethal Toxicity of Environmental Pollutants to Aquatic Organisms. *Ecotox. Safe.* 52, 113-116.
48. **Dearden, J.C., Cronin, M.T.D., Schultz, T.M.,** 1995. QSAR study of the toxicity of nitrobenzenes of *Tetrahymena pyriformis*. *Quant. Struct-Act Relat.* 14, 427-432.
49. **Mckarns, J.W., Hansch, C., Caldwell, W.S., Morgan, W.T., Moore, S.K., Doolittle, D.J.,** 1997. Correlation between hydrophobicity of Short-chain aliphatic alcohols and their ability to alter plasma membrane integrity. *Fund. Appl. Toxicol.* 36, 62-70.
50. **Speece, R.E.,** 1988. Structure-activity relationships : Quantitative techniques for predicting the behavior of chemicals in the ecosystem. *Environ. Sci. Technol.* 22, 606-615.
51. **Hansch, C., Maloney, P.P., Fujita, T., Muir, R.M.,** 1962. Correlation of the biological activity of phenoxyacetic acids with Hammett substituent constants and partition coefficients. *Nature.* 194, 178-180.
52. **McFarland, J.W.,** 1970. On the parabolic relationship between drug potency and hydrophobicity. *J. Med. Chem.* 13, 1092-1196.
53. **Lijun, J., Jiayin, D., Pan, G., Liansheng, W., Zhongbo, W.,** 1998. Quantitative structure-toxicity relationships for benzaldehydes to *Daphnia magna*. *Chemosphere.* 37(1), 79-85.

54. **Russon, C.L., Bradbury, S.P., Broderius, S.J., Hammermeister, D.E., Drummond, R.A.,** 1997. Predicting modes of toxic action from chemical structure : acute toxicity in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ. Toxicol. Chem.* 16 (5), 948-967.
55. **Nirmalakhandan, N., Egemen, E., Trevizo, C., Xu, S.,** 1998. Structure and property-activity relationship models for prediction of microbial toxicity of organic chemicals to activated sludge. *Ecotox. Environ. Safe.* 39, 112-119.
56. **Atkins, P.W.,** 1994. Physical chemistry. Oxford University Press. 497.
57. **Di, M.W., Saenz, M.E.,** 2004. Quantitative structure-activity relationship for aromatic hydrocarbons on freshwater fish. *Ecotox. Environ. Safe.* 59, 256-262.
58. **Randic, M.,** 1975. On characterization of molecular branching. *J. Am. Chem. Soc.* 97, 6609-6615.
59. **Kubinyi, H.,** 1993. QSAR: Hansch Analysis and Related Approaches. VCH Publishers. New York. NY(USA). pp.4-49.
60. **Schultz, T.W., Sinks, G.D., Bearden, A.P.,** 1998. QSAR in aquatic toxicology : A mechanism of action approach comparing toxic potency to *Pimephales promelas*, *Tetrahymena pyriformis*, and *Vibrio fischeri*. In : Devillers J, editor. Comparative QSAR. New York : Taylor & Francis. 51-109.
61. **Verhaar, H.J.M., Van Leeuwen, C.J., Hermens, J.L.M.,** 1992. Classifying environmental pollutants. 1: Structure-activity relationships for prediction of aquatic toxicity. *Chemosphere* 25, 471-491.
62. **Schultz, T.W.,** 1987. The use of ionization constant(pKa) in selecting models of toxicity in phenols. *Ecotox. Environ. Safety.* 14, 178-183.
63. **Zhao, Y.T., Cronin, M.T., Dearden, J.C.,** 1998. Quantitative structure-activity relationships of chemicals acting by non-polar narcosis-theoretical considerations. *Quant. Struct. Act. Relat.* 17, 131-138.
64. **Escher, B.I., Schwarzenbach, R.P.,** 2002. Mechanistic studies on baseline toxicity and uncoupling of organic compounds as a basis for modeling

- effective membrane concentration in aquatic organisms. *Aquatic Science*. 64, 20-35.
65. **Lipick, R.L.**, 1991. Outliers: their origin and use in the classification of molecular mechanisms of toxicity. *Sci. Total. Environ.* 109 (110), 131-153.
66. **Schultz, T.W., Bearden, A.P., Jaworska, J.S.**, 1996. A novel QSAR approach for estimating toxicity of phenols. *SAR QSAR Environ. Res.* 5, 99-112.
67. **Seward, J.R., Hamblen, E.L., Schultz, T.W.**, 2002. Regression comparisons of *Tetrahymena pyriformis* and *Poecilia reticulata* toxicity. *Chemosphere*. 47, 93-101.
68. **Franks, N.B., Lieb W.R.**, 1990. Mechanisms of general anesthesia. *Environ. Health Perspectives*. 87, 199-205.
69. **Verhaar, H.J.M., Van leeuwen C.J., Hermens J.L.M.**, 1992. Classifying Environmental Pollutants 1: Structure-activity relationships for predication of aquatic toxicity. *Chemosphere*. 25, 471-491.
70. **Lipnick, R.L., Watson, K.R., Strausz, K.A.**, 1987. A QSAR study of the acute toxicity of some industrial organic chemicals to goldfish, Narcosis, electrophile and proelectrophile mechanisms. *Xenobiotica*. 17, 1011-1025.
71. **Dearden, J.C., Cronin, M.T.D., Zhao, Y.H.**, 2000. QSAR Studies of Compounds Acting by Polar and Non-polar Narcosis: an Examination of the Role of Polarisability and Hydrogen Bonding. *Quant. Struct. Act. Relat.* 19, 3-9.
72. **Blum, D.J.W., Speece, R.E.**, 1991. A database of chemical toxicity to environmental bacteria and its use in interspecies comparisons and correlations. *J. WPCF*. 63, 198-207.
73. **Glendon, D., Sinks., Schultz T.W.**, 2001. Correlation of *Tetrahymena* and *Pimephales* toxicity: evaluation of 100 additional compounds. *Environ. Toxicol. Chem.* 20 (4), 917-921.
74. **Di Marizo W.D., Galassi, S., Todeschini, R., Consolaro, S.**, 2001. Traditional versus WHIM molecular descriptors in QSAR approaches applied to fish toxicity studies. *Chemosphere*. 44, 401-406.

75. **Kenaga, E.E.**, 1982. Predictability of chronic toxicity from acute toxicity of chemicals in fish and aquatic invertebrates. *Environ. Toxicol. Chem.* 1, 347-358.
76. **Mayer, F.L., Krause, G.F., Buckler, D.R., Ellersieck, M.R.**, 1994. Predicting chronic lethality of chemicals to fishes from acute toxicity test data : concepts and linear regression analysis. *Environ. Toxicol. Chem.* 13,671-678.
77. **Persoone, G., Janssen, C.R.**, 1994. Field validation of predictions based on laboratory toxicity tests. In Hill IR, Heimbach F, Leeuwangh P, Matthiessen P, eds, *Freshwater Field Tests for Hazard Assessment of Chemicals*. Lewis, Boca Raton, FL, USA, pp 379–397.
78. **Länge, R., Hutchinson, T.H., Scholz, N., Solbé, J.**, 1998, Analysis of the ECETOC aquatic toxicity(EAT) database II – Comparison of acute to chronic ratios for various aquatic organism and chemical substances. 36,115-127
79. **Roex, EWM., Van Gestel CAM., Van Wezel AP., Van Straalen NM.**, 2000. Ratios between acute aquatic toxicity and effects on population growth rate in relation to toxicant mode of action. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 685-693.
80. **Willford, W.A.**, 1968. Toxicity of dimethyl sulfoxide (DMSO) to fish. *Bur Sport Fish Wildl Invest Fish Control.* 20, 3-8.
81. **Kononen, D.W., Gorski, R.A.**, 1997. A method for evaluating the toxicity of industrial solvent mixture. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 968–976.
82. **Lijun, J., Yan, G., Jiayin, D., Linansheng, W., Zhongbo, W., Zheng, Z.**, 1999. Toxicity of substituted benzaldehydes to *Photobacterium Phosphoreum* and quantitative structure-activity relationship. *Toxicological and Environmental Chemistry.* 69, 149-156.
83. **謝適鴻**，2005，以密閉式藻類毒性試驗評估工業常用非極性麻醉有機物之混合毒性，國立交通大學環境工程研究所，碩士論文。

84. **Fan, C.S., Stauffer J.F., Umbreit W.W.**, 2006. An experimental separation of oxygen liberation from carbon dioxide fixation in photosynthesis by chlorella. *The Journal of General Physiology*. 27, 15-28.
85. **Zhao, Y.H., Ji, G.D., Cronin, M.T.D., Dearden, J.C.**, 1998. QSAR study of the toxicity of benzoic acids to *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* and carp. *The Science of the Total Environment*. 216, 205-215.
86. **Walker, J.D., Jaworska, J., Comber, M.H.I., Schultz, T.W., Dearden, J.C.**, 2003. Guidelines for developing and using quantitative structure-activity relationships. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 22, 1653-1665.
87. **Netzeva, T.I., Schultz, T.W.**, 2005. QSARs for the aquatic toxicity of aromatic aldehydes from *Tetrahymena* data. *Chemosphere*. 61, 1632-1643.
88. **Christensen, E.R., Chen, C.Y.**, 1985. A general noninteractive multiple toxicity model including Probit, Logit, and Weibull transformations. *Biometrics*. 41, 711-725.
89. **Prakash, J., Nirmalakhandan, N., Sun, B., Peace, J.**, 1996. Toxicity of binary mixtures of organic chemicals to microorganisms. *Wat. Res.* 30, 1459-1463.
90. **Kishino, T., Kobayashi, K.**, 1996. Acute toxicity and structure-activity relationships of chlorophenols in fish. *Wat. Res.* 30, 387-392.
91. **林國清**，1997，連續式藻類毒性試驗之實驗設計及效能評估，國立交通大學土木工程研究所，博士論文。

