

第二章 文獻回顧

2.1 毒性物質－鄰苯二甲酸酯類

本研究主要討論的鄰苯二甲酸酯類(Phthalate esters；PE)是由鄰苯二甲酸(Phthalic acid)與不同碳數的醇類(alcohol)所組成的雙酯類^[1]，如 Fig 2.1.1^[2]，詳細結構式見 Table 2.1.1。此類化合物可再細分成兩大類：低分子類($C < 6$)與高分子類($C \geq 6$)。

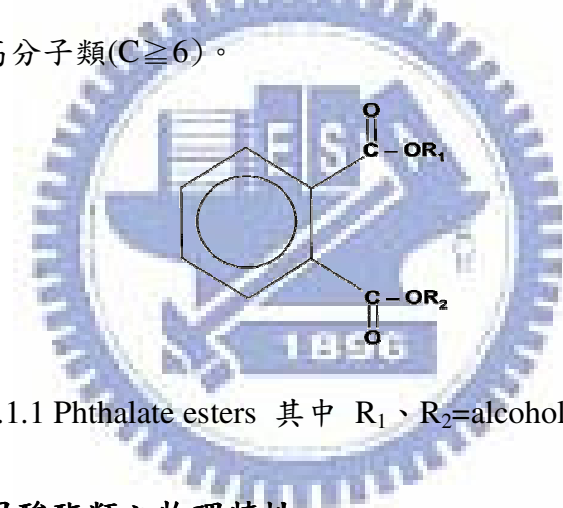






















Fig. 2.1.1 Phthalate esters 其中 R_1 、 R_2 =alcohol ($C_1 - C_6$)

2.1.1 鄰苯二甲酸酯類之物理特性

鄰苯二甲酸酯類為具有芳香氣味的無色液體，中等黏度、高穩定性，分子量自 194 ~ 366，詳見 Table 2.1.1；水溶解性隨著碳鏈增加而減少，最高值為鄰苯二甲酸二甲酯(Dimethyl Phthalate；DMP) 4200mg/L，極溶於水，至幾乎不溶於水的鄰苯二甲酸丁基(2-乙基己基)酯(Butyl (2-ethylhexyl) Phthalate；B2EHP) 0.0216 mg/L，但皆溶於多數有機溶劑中，如：DMSO；蒸氣壓也隨著碳鏈的增加而減少，分佈範圍在 $10^{-4} - 10^{-7}$ kpa，屬於低揮發性。由於此類化合物又分為低分子與高分子，物理特性分布的範圍較為廣泛，在環境危害評估上有很大的影響^[1]。

Table 2.1.1 Physical and chemical characteristics of phthalate

化合物名稱	縮寫	化學式	CAS NO.	分子量	溶解性 ^a	log P ^b	蒸氣壓 ^c	亨利常數 ^d	結構式
Dimethyl Phthalate	DMP	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	131-11-3	194	4.20E+03	1.66	4.11E-04	1.97E-07	
Diethyl Phthalate	DEP	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	84-66-2	222	1.10E+03	2.65	2.80E-04	6.10E-07	
Diallyl Phthalate	DAP	C ₁₄ H ₁₄ O ₄	131-17-9	246	1.82E+02	3.36	1.55E-04	3.86E-07	
Dipropyl Phthalate	DPP	C ₁₄ H ₁₈ O ₄	131-16-8	250	1.08E+02	3.63	1.76E-05	4.03E-07	
Diisobutyl Phthalate	DiBP	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	84-69-5	278	2.00E+01	4.46	8.87E-04	1.22E-06	
Dibutyl Phthalate	DBP	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	84-74-2	278	1.12E+01	4.61	2.68E-06	1.81E-06	
Di-n-amyl Phthalate	DAMP	C ₁₈ H ₂₆ O ₄	131-18-0	306	1.00E+02	5.59	2.61E-05	8.88E-07	
Diphenyl Phthalate	DPHP	C ₂₀ H ₁₄ O ₄	84-62-8	318	8.20E-02	4.10	1.00E-07	3.06E-08	
Dihexyl Phthalate	DHP	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	84-75-3	335	2.40E-01	6.57	1.87E-06	2.57E-05	
Butylbenzyl phthalate	BBP	C ₁₉ H ₂₀ O ₄	85-68-7	312	2.69E+00	4.84	1.10E-06	1.26E-06	
Butyl (2-ethylhexyl) Phthalate	B2EHP	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	85-69-8	335	2.16E-02	6.50	3.15E-06	2.13E-06	
Bis(Methoxyethyl) Phthalate	BMOEP	C ₁₄ H ₁₈ O ₆	117-82-8	282	8.50E+03	1.11	3.04E-05	2.81E-13	
Bis(2-Ethoxyethyl) phthalate	BEOEP	C ₁₆ H ₂₂ O ₆	605-54-9	310	1.30E+03	2.10	1.92E-05	9.52E-11	
Bis (2-butoxyethyl) Phthalate	BBOEP	C ₂₀ H ₃₀ O ₆	117-83-9	367	3.00E+02	4.06	2.89E-04	2.03E-12	
Diethyl Terephthalate	DEtP	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	636-09-9	222	7.20E+02	2.65	-	1.87E-06	
Diallyl Terephthalate	DAtP	C ₁₄ H ₁₄ O ₄	1026-92-2	246	3.38E+01	3.36	-	1.11E-05	
Dimethyl Nitroterephthalate	DMNtP	C ₁₀ H ₉ NO ₆	5292-45-5	239	6.01E+02	1.48	-	9.80E-08	
Dimethyl AminoterePhthalate	DMAtP	C ₁₀ H ₁₁ NO ₄	5376-81-6	209	6.31E+02	2.10	-	5.19E-07	
Dimethyl Nitroisophthalate	DMNiP	C ₁₀ H ₉ N ₁ O ₆	13290-96-5	239	6.01E+02	1.48	-	9.80E-08	
Dimethyl Aminoisophthalate	DMAiP	C ₁₀ H ₁₁ N ₁ O ₄	99-27-4	209	4.16E+03	1.14	-	7.88E-08	

a. 溶解度: mg/L b.log P used EPI suite version 1.67 estimate c. 亨利常數: atm-m³/mole d. 蒸氣壓: kpa

2.1.2 鄰苯二甲酸酯類之應用

鄰苯二甲酸酯類的應用依據分子的高低有所區別，低分子如：DMP、DEP、DAP 主要添加於密封劑、黏合劑、墨水...等用途；而高分子如：DEHP 主要功用為塑化劑^[2]，其作用為減少聚合體分子間的摩擦力，使分子可以在輕輕攪拌下分開，增加高分子聚合物的柔韌性、加工性、延展性與可用性^[3]。

塑膠是一種高分子聚合物，最常見的材質包括了聚氯乙烯 (PVC)、聚苯乙烯 (PS)、聚乙烯 (PE)、聚丙烯 (PP) 等，例如一般所見硬梆梆的水管即為 PVC 材質，若加入鄰苯二甲酸酯類，則可增加塑膠的柔軟度及可塑性^[3]；因此可大量的使用在建築材料、家具設備、食物包裝、塑膠管子、地板、玩具...等。

鄰苯二甲酸酯類除了以上功用，除蟲劑、香水、化妝品..等產品也會添加^[1]；如 DMP 具有增透性，因此可添加在驅蟲劑中；BBP 或 DEHP 添加在香水中可增加香味的持久性^[4]。甚至醫院的血袋、靜脈注射液、洗腎透析用的 PVC 管、兒童玩具、咬牙器、安撫奶嘴皆會添加入此類化合物^[3]。

而鄰苯二甲酸酯類的添加量會依產品用途而改變，一般添加量約佔產品的小部分，但有些產品甚至會加入超過產品的 50%^[5]；若是半硬質 PVC 添加量約為 10~30%，軟質 PVC 則需達到 30~70%，由此我們可以知道塑化劑添加的量是不容小覷的。

2.1.3 鄰苯二甲酸於環境之流佈

鄰苯二甲酸酯類在各國的研究報導中顯示，環境中污染濃度最高的地方有：塑膠產品工廠、工業及民生污水處理場、垃圾場、受污染之河川底泥及下水道污泥。而鄰苯二甲酸酯類在海水和淡水表層的濃度為 0.1-300 $\mu\text{g/L}$ ，在底泥的濃度為 0.1ng-100 $\mu\text{g/g}$ ^[6]。

目前國內研究結果顯示在淡水河之四個採樣點包括關渡橋、台北橋、忠孝橋及中興橋之河底泥中含有鄰苯二甲酸酯類化合物。其中包括鄰苯二甲酸二乙酯、鄰苯二甲酸丁酯苯甲酯、鄰苯二甲酸二辛酯、鄰苯二甲酸二丁酯、鄰苯二甲酸二(2-乙基己基)酯，其濃度範圍分別為 ND~0.007 mg/g，ND~0.16 mg/g，ND~1.04 mg/g，0.17~0.93 mg/g，5.61~90.9 mg/g^[7]。此外，在中港溪、客雅溪、淡水河、二仁溪之河底泥中，鄰苯二甲酸酯類包括鄰苯二甲酸二己酯、鄰苯二甲酸丁酯苯甲酯、鄰苯二甲酸二環己酯、鄰苯二甲酸二(2-乙基己基)酯、鄰苯二甲酸二丁酯，其濃度範圍分別為 ND~Trace，ND~2.36 mg/g，ND~6.17 mg/g，Trace~13.9 mg/g，13.1~37.34 mg/g^[8]。此結果初步證實鄰苯二甲酸酯類化合物已流入河體環境中。

綜合各國的研究結果發現，鄰苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(DEHP)和鄰苯二甲酸二丁酯(DBP)在河水與河底泥中的含量是各種鄰苯二甲酸酯類中最高的，而鄰苯二甲酸二(2-乙基己基)酯與鄰苯二甲酸二丁酯也是工業上最常使用的鄰苯二甲酸酯類。

2.1.4 鄰苯二甲酸之毒理特性

鄰苯二甲酸酯類並非以化學鍵結於聚合物中，而是以氫鍵結力與凡德瓦力(Van der waals)與聚合物相容，因此在使用過程或是與水體接觸時流出造成環境的破壞^{[3][9]}。由於此類化合物所使用的範圍過於廣泛，因此我們可以說此類化合物在環境中是無所不在的，無論是製造、使用、丟棄的過程都有可能釋放出來。

而鄰苯二甲酸酯類多次被討論為疑似干擾內分泌失調之化學物質，包括了鄰苯二甲酸丁酯苯甲酯、鄰苯二甲酸二辛酯、鄰苯二甲酸二丁酯、鄰苯二甲酸二(2-乙基己基)酯、鄰苯二甲酸二異葵酯、鄰苯二甲酸二異壬酯(、鄰苯二甲酸二己酯等。所謂內分泌干擾物質也是俗稱的「環境荷爾蒙」，雖然不明顯危害生物體，但微量的殘跡卻可干擾生物體內分泌系統。此類化學物質透過食物鏈進入人體，形成假性荷爾蒙，傳遞假性的化學訊號，也影響本來身體內荷爾蒙的量，進而干擾內分泌原來的機制，形成內分泌失調(endocrine disruption)，特別是生殖機能方面^[10]。

在文獻中對於急毒性的討論，此類化合物有分為低分子與高分子，因此毒理特性也有所不同；當 log P 值偏大時，在飽和水溶解度不具有急毒性，如 Adams *et al.*(1995)^[5]利用許多不同物種如四種魚類、水蚤、搖蚊、綠藻及小蝦對於一系列鄰苯二甲酸酯類進行急毒性試驗，發現在 BBP 這個化合物(log P=4.84)，除了流水式試驗的魚類及綠藻類具有急毒性外，其餘物種在飽和水溶解度之下都不具有急毒性，而當 log P \geq 6.57(DHP)時發現在所有物種之下都不具有急毒性；Jonsson *et al.*(2003)^[11]利用海洋發光菌、綠藻及水蚤作測試物種，除了低分子化合物還增加了 DEHP(log P= 8.39) 高分子的化合物，結果顯示在海洋發光菌當中，當 log P \geq 4.61 在飽和水溶解度下不具急毒性，而所有物種在 DEHP 此高分子化合物皆不具急毒性；

Call *et al.*(2001)^[12]以底生生物作為實驗物種，測試低分子化合物及 DHP、DEHP，同樣發現 DHP 及 DEHP 皆不具急毒性；Staples *et al.*(1997)^[11]整理過去文獻中對於 PE 所做的急毒性試驗之結果，發現分子量小於 DHP 之 PE 在飽和水溶解度下皆不具有毒性。Parkerton *et al.*(2000)^[2]認為造成高分子 PE 在飽和水溶解度下之濃度不足以在水體生物中累積造成毒性，因此會顯示不具急毒性；過去文獻大部分以探討低分子化合物(DMP、DEP、DBP、BBP)為主，因此本研究以分子量小於 DHP 之具有急毒性之化合物為主，除此之外增加了相關的對苯二甲酸酯類、或接上其他取代基如硝基(-NO₂)及胺基(-NH₂)之間、對苯二甲酸二甲酯對於藻類之急毒性，希望能更深入瞭解此結構化合物之毒理特性。

在生物體內的影響部份，Ghorpade *et al.*(2002)^[13]指出若連續三天以含有 25ppm 的 DEP 養殖印度鯉魚科 *Cirrhina mrigala*，分析其組織中的變化，可發現在肝臟與肌肉中的 ACP 與 ALP、肌肉中的 SDH、肝臟中的 ALT 皆明顯增加，而腦中的 AchE 明顯的減少，由此結果可發現此類化合物對於動物體組織的酵素具有傷害，對於生物體長期有不良的影響；而 Sung *et al.*(2003)^[14]也針對一系列鄰苯二甲酸酯類對於蝦類酵素上的影響，利用 annexin assay 發現曝露在 DHP 及 DPP 濃度 100µg/mL 10 分鐘之下，蝦類會因為細胞自毀而死亡，且隨時間增長而死亡數目增加；若是曝露在 DEP、DHP、BBP 之下則會因為麻醉作用造成蝦類死亡。

2.1.5 鄰苯二甲酸酯類之降解

鄰苯二甲酸酯類會被微生物降解成鄰苯二甲酸單酯與相關的醇類或是再進一步合成為相關的酸類，如 Fig 2.1.2^[15]。

全球各地皆廣泛的使用鄰苯二甲酸酯類在各種產品用途上，因此風險評估是很重要的，比起水解、光解、氧化作用，生物上的降解對於鄰苯二甲酸酯類是更重要的影響^[1]。文獻上指出在實驗室測試下，無論是好氧或厭氧的情形皆會產生生物降解作用^[9]；且現在除了鄰苯二甲酸酯在環境中無所不在，甚至其新陳代謝之單酯類在掩埋場滲出液、河水水體、河川底泥中皆有被偵測到^{[16][17][18]}。

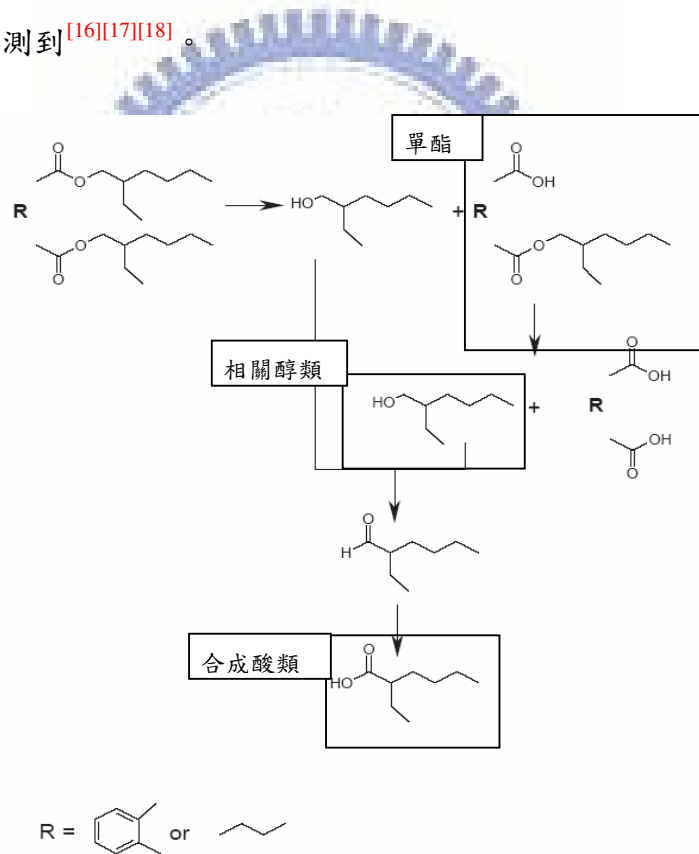


Fig 2.1.2 鄰苯二甲酸酯類生物降解圖示^[15]

2.2 QSAR 的討論

2.2.1 QSAR 簡介

QSAR(Quantitative Structure-Activity Relationship)定量結構－活性關係，最早以前是使用於藥物學，以研究發展更有效、副作用小的藥物，其利用化學物質的物理或化學性質來推測描述其生化活性的大小，了解化學物質對生物體生化活動造成干擾程度^[19]，於 1970 年代被引入了環境的領域之中，應用於預測某有機化合物之急毒性^[20]。

原先建立 QSAR 是依據化合物的分類，例如同一系列或同一種類的化合物，但後期發現利用化合物毒性作用機制所建立的 QSAR 模式是較適當的^{[21][22][23]}。由於同一類化合物所產生的不同的毒性機制，會破壞一個 QSAR 模式之品質。而對於毒性作用機制可大致分為兩大類：一般性 (general) 及特異性 (specific)^[24]。一般性主要指化合物並非以特定位置對生物體造成攻擊，而是與生物體之細胞膜進行反應^[25]；特異性則是針對生物體內標的蛋白進行攻擊，造成毒性^[24]。若要對這兩大類細分，則可見 Fig 2.2.1 之圖示^[19]。

2.2.2 QSAR 之分類

一般性也就是麻醉性，主要可分為兩類：非極性、極性。非極性麻醉性通常是較遲鈍的化合物，也可被稱作第一類化合物 (class I compound)，在 QSAR 分析上，與辛醇與水係數 ($\log K_{ow}$) 成良好線性關係，也可定義為基線毒性 (baseline toxicity)。極性麻醉性之化合物通常比第一類化合物活潑，包括了酚類與苯胺類等具有氫鍵給體 (hydrogen bond donor acidity) 特性的化合物。除了這兩種分類，文獻討論上還有另外一種不同的麻醉機制—Ester narcosis，Kamlet *et al.* (1987)^[26] 指出酯類的毒性較非極性麻醉性毒性來的高；Schultz *et al.* (1998)^[27] 認為酯類對於 fathead minnow (*Pimephales promelas*) 之毒性比較接近於極性麻醉性毒性。

而特异性也可稱為反應性，這類型有機物除了具有非反應有機物毒性機制即分子之疏水結構具有麻醉效應毒性外，其官能基和生物體內所產生之化學變化為主要之毒性來源，通常此類有機物質的毒性超過基線毒性，比非反應有機物還要毒。

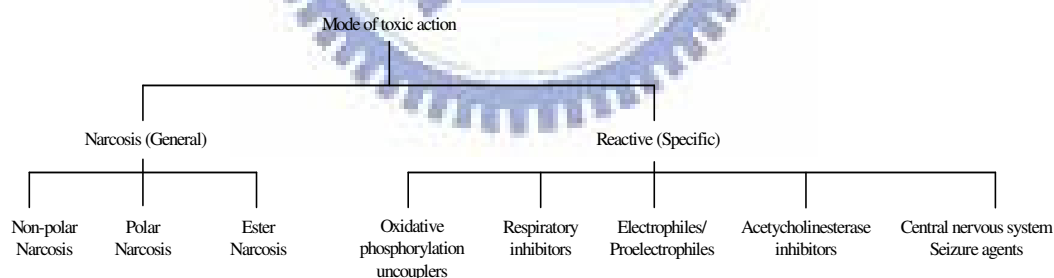


Fig 2.1.1 QSAR 分類^[19]

2.2.3 鄰苯二甲酸酯類之 QSAR

Jaworska *et al.*(1995)^[28] 認為 PE 在魚體內會因為水解產生酸類及相關醇類，此水解速率會依據分子體積越小越快，因此在較低分子之 PE 在魚類中會顯示較高的超過毒性，因此過去學者認為這類化合物與極性麻醉所顯示的毒性相符合；在單細胞生物如纖毛蟲體內雖然也會有水解作用，但其活性不強，因此水解作用可忽略，並發現其毒性作用機制與非極性麻醉毒性相符合，與 log P 會有很好的相關性。Adams *et al.*(1995)^[5]、Staples *et al.*(1997)^[1]、Jonsson *et al.*(1997)^[9]、Call *et al.*(2001)^[12]認為此類之低分子化合物與水溶解度具有相關性，其毒性隨水溶解度降低而增強，而以綠藻所呈現之相關性最為良好。而 Parkerton *et al.*(2000)^[2]發現這類化合物之 log P 與水溶解性呈現良好相關性($R^2=0.99$)，因此也可以瞭解和水溶解性有良好相關性間接表示與 log P 具有良好相關性。

Adams *et al.*(1995)^[5]認為 PE 不屬於特殊毒性作用機制，最初是被定義為非極性麻醉機制，但在低分子部分卻顯示超過毒性且被定義為極性麻醉機制或第三類麻醉機制；Jaworska *et al.*(1995)^[28]認為不同物種間對於 PE 水解作用有所不同，而水解產物又分為兩個非極性的酸及醇類或一個非極性的酸類及一個極性的醇類，甚至不完全水解造成一個單酯及一個醇，因此毒性作用機制會依據不同物種之水解能力而改變，Parkerton *et al.*(2000)^[2]對此下一個結論，PE 會依據物種間不同之生物濃縮作用，造成不同的麻醉機制。

2.3 藻類毒性試驗

在本實驗中所使用的月芽藻 (*Pseudokirchneriella subcapitata*)屬於綠藻 (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 $40\text{-}60\ \mu\text{m}^3$ ，見 Fig 2.3.1。

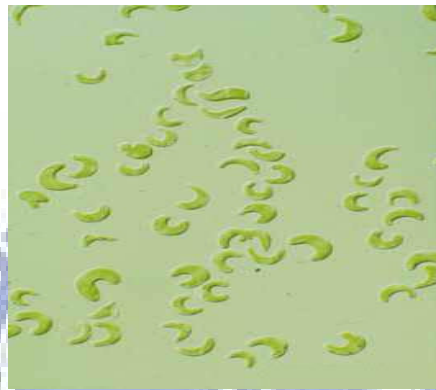


Fig 2.3.1 月芽藻圖示

典型的月芽藻體積約為 $45\ \mu\text{m}^3$ 且重量介於 $10\text{-}20\ \text{pg/cell}$ 之間，為淡水類單細胞藻類，因為體型呈半月型，所以稱為月芽藻，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，並較大部分生物試驗來的敏感^[29]。此外，當培養中缺少營養鹽或是溫度、光線、pH、有毒物質侵害、細菌滋生等環境條件不佳時，母槽會逐漸呈現很明顯的黃綠色，因此當我們在實驗室培養的過程中，由外觀上可以容易的去判斷母槽的生長情形。除了外觀上的判斷，更可利用顆粒計數器觀察其粒徑的分佈變化，若發現顆粒數變少、大粒徑的藻類分佈變多時，則可判斷此藻種的健康情形不佳。

2.3.1 連續性藻類培養方式(Continuous culture technique)

連續式培養系統包含連續供應新鮮基質至反應槽中，使藻類處於最佳生長狀況，並連續將槽中新陳代謝物質排出。此系統相當類似於自然水體，因低濃度的營養鹽不斷的注入基質中，而所加入的營養鹽與藻類生長產生一動力平衡。

基本上，連續式系統可以分為兩類：The chemostat 及 The turbidostat。於 turbidostat 反應槽中，細胞濃度由光電附著方式維持在一固定常數，當細胞密度超過預先設定位時，光電池將管閥開啟使新基質自儲備槽流入以稀釋反應槽內的細胞密度，同時將等量的細胞及基質自槽中溢流出去。Chemostat 系統包括自培養槽連續加入及移除基質，細胞密度是由營養基的濃度及進流速率控制。新鮮基質加入越快，則細胞成長速率越快。Chemostat 及 turbidostat 的差異在於他們控制生長的方式不一樣。Chemostat 由限制新鮮基質的濃度及進流速率來控制生長，常運用於研究限制性營養源對藻類生長之影響。而 turbidostat 隨時監控槽內生物濃度，基質流入速率由細胞密度所控制。

一般而言，Chemostat 較 turbidostat 受歡迎，因 chemostat 其架設費用較低，器材也較易取得。在本實驗中我們使用 chemostat 來進行藻類連續式的培養方式。

2.3.2 藻類生長測定方法

進行藻類毒性試驗前後，需要一個能夠正確的反應出藻類生長情況之方法，以便判定藻類之生長情形。一般藻類生長情況之參數有下列幾種：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、產氧量、碳源攝取量、ATP 及 DNA 等等之參數。一個理想的測定方法應為迅速、精確、高敏感度、低偵測極限最好可以低成本，適合這些條件之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)分光光度計測葉綠素 A 法 (6)螢光光度計測葉綠素 A 法 (7)DNA 測定法 (8)ATP 測定法 (9)¹⁴C 輻射標定法 (10)溶氧測定法^[30]等。

一般藻類毒性試驗之標準方法，例如 United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA)^[31]、Organization for Economic Cooperation and Development (OECD)^[32]、International Organization for Standardization (ISO)^[33]、American Society for Testing and Materials (ASTM)^[34]、American Public Health Association (APHA)^[35]皆於試驗終點時，測量藻類的生物質量。而量測生物質量最直接的方法就是量測生物之乾重，但是直接稱重的方法，需要花費較久的時間，所以利用電子顆粒計數器、光學顆粒計數器等之間接量測生物質量的方法逐漸將直接稱重法取代，因為這些方法簡單、快速，所需藻液量亦少，且與生物乾重之間有良好的相關性。

溶氧測定法為直接量測水中溶氧之變化，再依此計算出藻類生長之情形，擁有成本低廉，試驗時間短的優點。Hostetter(1976)^[36]發展出一套量測水中溶氧之藻類試驗方法，試驗時間縮短至二十四小時，且在 *Raphidocelis subcapitata* 的試驗之中發現，當一或多種之營養鹽呈限制性狀態時，藻類之淨光合反應量會與限制性營養鹽呈現線性關係。

2.3.3 藻類毒性試驗優點

目前標準試驗方法用來進行生物毒性試驗所使用的物種包括有魚類、無脊椎動物、浮游植物和細菌等，在所有生物試驗中，藻類生物試驗被廣泛使用做為環境影響的研究，其理由如下：

- (1) 藻類為主要的生產者且處於食物鏈底部，任何對此類生物之衝擊，將會間接地對較高營養階層之生物造成傷害，故藻類生物在生態上具有相當重要性。
- (2) 與魚類及無脊椎動物試驗比較，藻類試驗是相當簡單、快速且便宜的生物試驗。
- (3) 與細菌試驗比較，藻類試驗較不易因生物體內基因多樣性而產生變異。
- (4) 藻類生物試驗一般來講比其他微生物實驗來得敏感。
- (5) 藻類毒性試驗過程中，由於藻類繁衍迅速，故試驗時間雖短但已歷經數個生命週期，試驗較不會受到幼年期或衰老期之影響。

2.3.4 藻類毒性試驗方法

根據藻類培養方式的不同，藻類毒性試驗可分為批次式和連續式這兩種。目前已有的標準藻類毒性試驗方法，大都屬於批次式，如 U.S. EPA 所採用的 "Fresh water algae acute toxicity test"^[31]、OECD 所採用的 "Algal growth inhibition test guideline"^[32]、ISO 所採用的 "Water quality-algal growth inhibition test"^[33]、APHA 所採用的 "Toxicity testing with phyto-plankton"^[34]及 ASTM 所採用 "Standard Guide for Conducting Static 96-h Toxicity Tests with Microalgae"^[35]等。

(1) 批次式：

目前已有的標準藻類毒性試驗方法多為批次式的，批次式藻類毒性試驗是藻類暴露於毒性物質一段時間，再測其試驗終點並與無暴露之控制組進行比較分析。整個實驗過程中沒有新鮮基質的加入，也沒有藻類之代謝物移出，實驗期間藻類經歷了完整的成長週期，遲滯期 (lag phase)、指數生長期 (exponential phase)、穩定期 (stationary phase) 及死亡期 (death phase)。而其標準試驗方法可採用 U.S. EPA^[31]所制定之“Fresh Algal Acute Toxicity Test”。

批次式藻類毒性試驗具有技術簡便、成本低、樣品處理量大、實驗數據取得容易等優點，因此經常被採用。不過以批次式培養方式進行實驗，仍然存在許多缺點：

1. 在批次式系統中，為了確保藻類生長，大多使用高於自然水體甚多的營養鹽濃度，根據 Chen(1989)^[37]的理論，如此將會影響藻類對毒性物質的容忍度，亦會造成 pH 的改變，也無法反應自然水體真實狀況。
2. 批次式培養因為無新鮮基質的加入而導致營養鹽濃度會隨時間拉長而消耗，以致實驗後期逐漸產生營養鹽匱乏之情形，且代謝物累積無法移出，亦會對後續毒性試驗產生影響。
3. 批次式培養所作出毒性試驗結果具文獻上指出，在同一實驗室的試驗結果會有 20%到 32%的變化量；且在不同實驗室中 EC₅₀ 值甚至會有更大的變動，顯示批次式實驗結果的差異性大^[38]。

(2) 連續式配合批次式試驗：

連續式藻類毒性試驗則是在培養系統中，連續供應新鮮的營養鹽至反

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

由於在批次式及連續式藻類毒性試驗都各有其缺點存在，因此Chen *et al.*(1997)^[39]利用Chemostat系統為基礎，使用連續式培養、批次式實驗，發展出一套兼具實用性、敏感性及簡便性的藻類毒性試驗法。其利用四公升的連續式母槽培養藻類，在培養過程中不斷有低濃度之新鮮基質流入，藻類之代謝物亦可流出，如此就更接近自然水體環境，且使母槽內之藻細胞更為健康。待系統達到穩定後，即可由母槽中取出藻液進行批次式毒性試驗而不會污染到母槽，並將毒性試驗時間縮短為48小時，大大增加試驗的頻率，也因而改善批次式培養中藻類代謝物之累積；Lin *et al.*(2005)^[40]對於再現性的研究，發現以DO及Growth rate為終點參數之下，兩組不同試驗之變異係數是接近10%的，因此也改善了過去批次式實驗再現度不佳的結果。

Chen *et al.*(2000)^[41]利用連續式的藻類培養方法，配合BOD瓶發展出48小時的批次式BOD瓶藻類毒性試驗，將藻類、營養基質和試驗毒物加入300mL的BOD瓶，然後蓋子密封做密閉式毒性試驗，讓藻類與毒性物質接觸48小時後，由觀測終點量測實驗組與控制組(不加毒物)的抑制情形並進行比較分析。整個實驗過程中沒有新鮮基質的加入，也沒有藻類之代謝物移出，屬於批次式毒性試驗，在操作更加簡單，在時間與成本的耗費也大幅減少，且可處理較大量的樣品數、實驗數據取得容易，所以相對了提高實驗的再現性。因此本研究採用”連續式藻液培養配合批次式毒性試

驗”之方式。

2.3.5 試驗中的重要參數

比較實驗室彼此之間之毒性試驗結果，發現差異很大，潛在的變異數為各間實驗室之物理化學的實驗參數控制不一；因此文獻中之藻類毒性試驗資料，只有對其試驗方法加以評估的才有價值，某些實驗室可能會因為高生物量或不良氣體交換導致 pH 值升的太高，則此類批次式試驗結果是令人懷疑的。以下為本研究室實驗中所考慮的重要參數：

(1) pH 值的控制

在自然界中因為光合作用的關係導致 pH 值於一天中會有很大的變化因此有人主張 pH 值可以不需要控制，讓藻類在合理的 pH 值範圍內暴露於毒性物質。然而如此將很難進行重複性試驗，而且用來預測在某特定的 pH 值狀況下之物種濃度影響也有困難。因此標準藻類毒性試驗皆傾向其 pH 值維持在固定。

在毒理學的觀念，pH 值若變化一個單位，可能導致毒性改變 10 倍以上； pH 值控制值隨不同的標準方法而有差異，U.S. EPA 規定最終 pH 值需在 8.5 之下^[31]，OECD 則要求 pH 值之最大變動不要超過一個單位^[32]；ISO 則是要求 pH 值之變動在 1.5 個單位之內^[33]。若決定試驗在一固定 pH 值下進行時，就必須小心地確保 pH 值之變化為最少。欲減少 pH 值之改變，大致的方法有下列幾種：(1)使用較低之生物接種量 (2)縮短整個試驗之時間 (3)以空氣或是添加二氧化碳之空氣加以曝氣。

雖然各個國際環境組織對於 pH 值變化皆有控制再依個範圍之內，但 Lin *et al.*(2005)^[40]在密閉式藻類毒性試驗中，並未刻意對整個系統的 pH 加以限制，發現在水中溶解性金屬對於藻類的抑制率若高於 20%時，系統中

pH 的濃度變化大部份皆在 1.5 個單位以下，因此本研究依據藻類最適生長之 pH 值，將初始值控制為 7.5，並不刻意限制系統中 pH 的變化。

(2)光照強度

光照的強度會影響藻類行光合作用之速率，因而造成其產氧率之不同^[38]。藻類毒性試驗之中，光照的強度依照不同的試驗標準及不同藻種而有些許的差異。在實驗室培養藻類時必須要考慮「自身遮蔽」效應 (self-shading)，此效應會造成距光源較遠處之光照與較近處之光照強度之差異，良好的混合可以減低自身的遮蔽效應並使光照有更好的利用效率。光照強度在良好的培養條件之下，應為一常數並能使藻類呈現指數生長、縮小培養體積及維持充分的混合有助於達到理想狀態。

本研究實驗過程會將培養箱所有位置之光度調整至 $4300 \pm 5\%$ ，且將 BOD 瓶置於轉速 100rpm 之振盪混合器，一方面減低自身遮蔽效應，另一方面也確保實驗過程中化學物質混合均勻。

(3)溫度

當溫度逐漸增加時，藻類會呈現指數生長，而當達到其最適生長溫度後即迅速下降。本研究採用 U.S. EPA 建議的 24°C 環境下來培養藻類及進行實驗，整個培養及試驗過程中，溫度之變化不可大於 2°C ，本研究即是在恆溫室控制 24°C 下進行所有藻類培養與實驗。

(4)植種數量與時間

對批次式實驗而言，若實驗開始時的植種數量過高，將會造成實驗後期由於藻類細胞大量增加造成代謝物累積及水中碳源耗盡，而導致 pH 值升高等問題，進而影響毒性試驗結果之精確度。Lin *et al.*(2001)^[42]針對不同試驗時間和不同初始植種密度進行敏感度和變異性的分析，發現生物毒性

試驗隨著時間增加，其敏感度提高而 C.V.值減少；而隨著初始植種密度減少，其敏感度提高但 C.V.值亦提高。而根據 Vasseur *et al.*(1988)^[43] 改變初始生物量進行批次試毒性試驗，結果也證實當提高實驗初始生物量時，EC₅₀ 值也顯著提升。在兼顧兩者的考量下，選定最佳化條件為藻類初始植種密度 1.5×10^4 cells/ml。

試驗時間的長短會關係到毒性試驗的敏感性和數據結果。過長的試驗時間，會使得存在於 BOD bottle 內的營養鹽不足，使得藻類有死亡的現象，此外過長的試驗期間，也會使得毒性的反應消失。一般標準的藻類毒性試驗為 96 小時，但有鑑於前述之缺點，因此本研究所選定的時間縮短為 48 小時。

(5) 試驗基質

本研究所使用的營養基質是依循 U.S. EPA 之規範，而一般為使試驗之狀態符合自然環境狀況及讓藻類能有效利用微量元素，在未受污染的水體中螯合物的(EDTA)的濃度不超過 30 $\mu\text{g/L}$ ^[44]，於試驗時會在培養基中加入固定量之螯合劑，如 ISO 於培養基中加入 78 $\mu\text{g/L}$ 的 EDTA 螯合劑可助於藻類與水中必要元素的螯合，如此可確保毒性試驗期間藻類維持於對數生長期。但是，從文獻上顯示若毒性試驗過程中添加螯合劑會與常見二價金屬(Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 等)形成親水性錯合物，其對微生物的毒性比游離態之金屬來的低，進而影響毒性試驗結果^[45]，因此本研究於試驗時亦不加 EDTA。

Lin *et al.*(2000)^[41] 在密閉式藻類毒性試驗中，若將提供藻類生長所需碳源的 NaHCO_3 由 15 mg/L 增為 300 mg/L，對於酚的毒性試驗結果而言，敏感度將降低。因此本實驗將 NaHCO_3 定為 15mg/L。