

第三章、基本理論

3.1 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，當系統達到一平衡（Steady State）時：

一、由反應槽中生物質量之平衡可得下列式子：

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

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，

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

則 $\mu = D$

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。

二、由反應槽內之基質平衡可得下式：

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

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，

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

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

$$\text{又 } \mu = D$$

$$\text{所以 } X = Y(S_0 - S)$$

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

$$\text{及 } \mu = D$$

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

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。

3.2 毒性物質劑量反應模式

以毒理學的角度而言，劑量與反應關係(dose-response relationship) 是探討化學物質對生物體所造成影響之基礎。美國國家科學院將劑量—反應關係定義為：一種物質給予或接受的劑量與在暴露族群中某種健康效應之發生率的關係之特性描述，並且以人類暴露到此物質來估計此效應的發生率之過程。

所有的物質皆可能有毒，是否為毒性物質最主要差別在所暴露之劑量。毒性研究主要可以分成模式推估及實驗驗證兩大部分。若從數據分析的部分來看：在毒性試驗過程中，實驗物種受測試物質作用時，所造成生物體 50%受抑制（或死亡）時所表現出的測試物質濃度，即稱做 EC_{50} ；而由受影響或死亡的百分率所迴歸出的 S 曲線關係，稱為劑量-反應曲線圖 (Dose-response curve)；這些在於毒性評估方面皆為相當重要。

欲從 S 型曲線求得 EC_{50} 或 EC_{10} 並不容易，因此必須藉由數學關係式將 S 型轉為直線型以便求取，此種數學轉換模式便稱為劑量反應關係模式，不同的模式根據的理論基礎互有出入，因此同一組數據，經由各種不同模式的分析，其結果可能有所差異；以生物試驗來講，不同生物甚至不同觀測參數 (Endpoint) 對毒性物質容忍度不盡相同，若以不適當之反應模式計算，實驗點與理論點間變異過大，則所得結果則相當可議，尤其在所求為外插情況下，變異波動更加明顯，因此數據處理程序中往往需要作適合度分析，以判斷最適合之使用模式。

一般常見的毒性物質劑量-反應模式為有三種，包括了：Probit、Weibull 及 Logit 模式，皆是依據不同的假設發展而成；Probit 模式為假設毒性物質對於受體生物的容忍度為一常態分布，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。Weibull

模式則是符合毒性物質與受體生物間產生化學鍵結的假設，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。至於 Logit 模式則與 Monod Equation 相似，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 3.1.1 為三種劑量反應曲線之數學轉換關係式。

其中，Probit 模式，為毒性試驗報告中最常見的劑量-反應模式，主要是由實驗經驗，再加上理論基礎所得的一個模式，其係假設生物對毒性物質的容忍度分布為常態分布 (Log-normal distribution)，其主要以毒性物質濃度之 log 值與反應率之 NED (Normal equivalent deviation) 具有線性關係為基礎，其中反應率即測試生物對毒性物質之反應比率 (如死亡率等)。此模式將劑量-反應模式之 S 型曲線，轉換成 NED 尺度上的一直線，原來劑量-反應曲線在抑制率於 50% 之處對應到 NED scale 上為 0，84.1% 反應率之處對應為 1，而 NED scale 之座標值加 5 即為 Probit 的座標，Probit 單位與反應率與毒性物質劑量間之轉換關係如下：

$$Y = A + B \log Z$$

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

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。

Table 3.1.1 Weibull、Probit 與 Logit 容忍度分布模式

Type	Transformation	Probability density	Probiblity 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	Probility 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 最佳化模式 G-test

一般毒性試驗為了具體表示實驗系統的敏感度，一般選擇以其 ECx 值來表示，然而在數據的處理上，不同的分析模式用來分析毒性試驗的 ECx 值會造成不同程度的誤差，而一般常用的劑量反應關係模式如 Probit、Weibull 與 Logit 所計算出的 ECx 值又以 EC50 較為接近，故實驗系統的敏感度又多以 EC50 表示之。然而超過或低於 EC50 的 ECx 值，例如 EC90 或 EC10 會因為信賴區間的變大而誤差變會被放大，為了降低往後分析的不確定性，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。本研究主要觀察引起百分之十的藻類致死性效應的化學濃度即求得 EC10 (mg/L)，並進行最佳模式的選擇。

在模式最佳化方面，參考 Caux 及 Moore [57]所提出的方法，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：

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

其中 a 是重複組次數， f_i 是處理組觀察到的實際抑制率，而 \hat{f}_i 是對應模式所求得的理論抑制率。

其計算過程可分為四個步驟

步驟一：將溶氧、細胞數或生長率三個不同參數所觀察到的處理組和控制組比較，處理組和控制組相比轉換成抑制百分比，若最低濃度產生刺激作用，則依使用者決定將此組數據刪除；

即
$$f_{ij} = \frac{x_{ij} - x_{i0}}{x_{i0}} \times 100$$

其中 x_{ij} = 第 i 組重複組，第 j 處理組對應的反應終點。

x_{i0} = 第 i 重複組的控制組對應的反應終點。

步驟二：將已知實驗濃度根據不同的劑量反應關係模式(Weibull、Probit 與 Logit)，分別轉換成其相對應的理論抑制百分比(\hat{f}_{ij})

步驟三：將以上兩步驟所求的結果帶入 G 值之計算公式，所得的數值大小取絕對值後，選擇最小者，即為最佳值。

而在建立處理組觀察到的實際抑制率 f_i 時，在最低濃度會出現刺激作用，使得所求得的结果為負值，此時須對此值做轉換或者直接刪除此點，將其從處理組中去除。



3.4 NEC

無影響濃度(No Effect Concentrations, 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)的方法所求得的。

計算 NEC 主要惟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惟一指數遞減的關係,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 Fig 3.4.1, 3.4.2 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,本研究求得方法是利用將濃度及反應終點的參數取對數轉換後,相互做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。回歸斜率的顯著值($P < 0.05$),及最大的 R^2 。藉由此來判定為線性關係。亦可求出 NEC 之 95%信賴區間的上下極限值(公式如下),如圖 3.4.3 所示。

$$\left. \begin{array}{l} \text{NEC}_{\text{upper}} \\ \text{NEC}_{\text{lower}} \end{array} \right\} = \bar{X} + \frac{b_1(Y_0 - \bar{Y}) \pm ts \left\{ \left[(Y_0 - \bar{Y})^2 / S_{XX} \right] + (b_1^2/n) - (t^2 s^2 / n S_{XX}) \right\}^{1/2}}{b_1 - (t^2 s^2 / S_{XX})}$$

其中, b_1 = 迴歸方程式的斜率。 \bar{X} = 平均濃度, $\bar{Y} = \bar{X}$ 所對應的 Y 值。

t = 自由度為 $(n-1)$ 的 T-value

$$S_{XX} = \sum (X_i - \bar{X})^2$$

$t = t(v, 1 - \alpha/2)$, v 是 s^2 的自由度而 s = 標準偏差, n = 迴歸方程式點的個數。

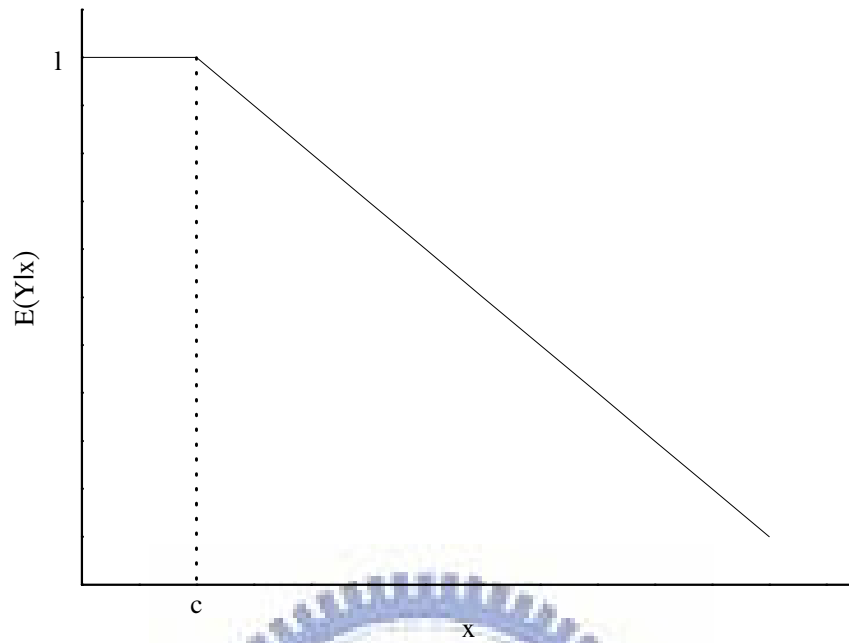


Fig 3.4. 1 Mean response function with a linear decay

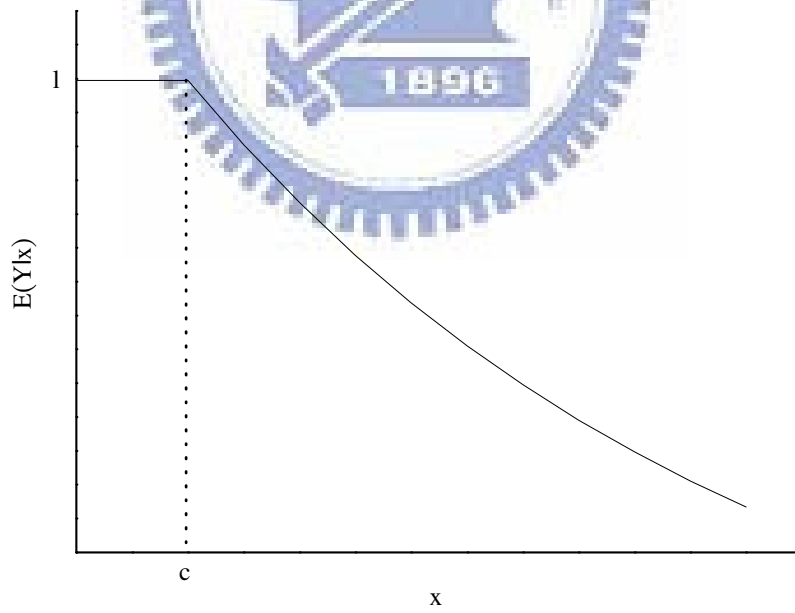


Fig 3.4. 2 Mean response function with an exponential decay

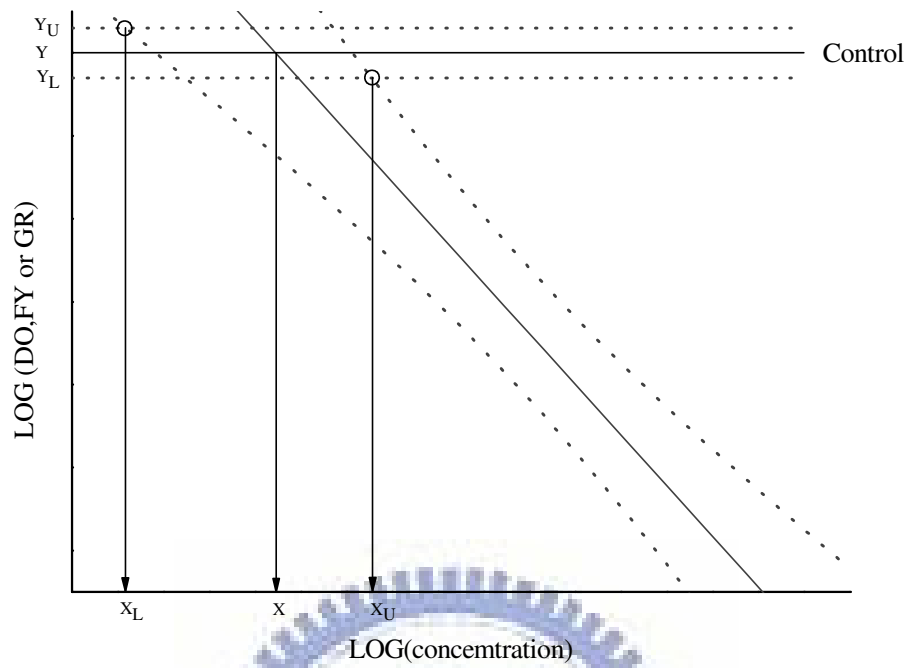


Fig 3.4. 3 Diagrammatic representation of inverse regression analysis procedure for estimating the no-effect concentration (NEC).

