

## 第四章、實驗設計與方法

### 4.1 儀器設備與試劑

#### 4.1.1 儀器設備

✓ 恆溫室：

五坪大的空調控溫室，能夠控制溫度在  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 。

✓ 蠕動幫浦：

培養母槽使用 EYELA 公司，型號 MP-1000 之定量幫浦兩台，用以控制供應母槽之流量。

✓ 幫浦管：

廠牌 Materflex，用於母槽培養液輸送之型號為 H-96400-14。輸送管材質為矽膠材質，不具毒性，可避免影響毒性試驗結果。

✓ 純水設備：

生物試驗用水，包括過濾 ( $0.5 \mu\text{m}$ )，軟水，離子交換，蒸餾設備 (Aquatron A4S, Bibly)，蒸餾水儲水桶 (60L container, Nalgene)；去離子水製造機 (Milli-Q Plus, Millipore, outflow conductivity  $18.2\text{M}\Omega\text{cm}$ )。也用於藥品配製用水及實驗器皿之二次清洗用水。

✓ 抽氣幫浦：



SINKU KIKO 公司，型號 ULVACG-5 及 G-50。用於過濾營養鹽及 Isoton II 時使用。

✓ 基質儲存瓶

容量約為 5 公升，直徑為 25 公分大小的血清瓶。主要用於培養母槽時，連續入流之基質存放所用；每次使用前皆需經過清洗再滅菌才可使用。

✓ 連續式培養母槽：

使用體積 5 公升，直徑 18 公分之掀蓋式玻璃槽。於體積 4 公升處開口做為溢流，再於體積 2 公升處開口做為取樣之用。連續式培養母槽作為連續式藻類培養之用。

✓ 母槽曝氣幫浦與氣體流量計：

幫浦為一般水族箱所使用之曝氣裝備；另外在加上氣體流量計，為氣體流量之量測用，連續培養之母槽的曝氣量大約為：400 mL/min。

✓ 電磁攪拌器：

藻液攪拌用，避免藻類在連續生長母槽中產生沉澱情形，另外可讓進流基質（medium）迅速均勻分佈於母槽中及增加藻液曝氣機會，提供所需 CO<sub>2</sub> 之作用。

✓ 曝氣桶：

曝氣設備使用體積 10 公升之純水桶。開口處嵌入一矽膠塞，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。

✓ pH meter：

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

✓ DO meter :

美國 YSI 公司數字型溶氧測定器 Model 5100；BOD 探頭為 YSI5010，裝有內部電動攪拌器，可以對樣品進行自動攪拌，精準度為  $\pm 0.01$  mg/L。

✓ 毒性試驗瓶：

使用體積 300 毫升，直徑 8 公分之 BOD 玻璃瓶。上頭開口處有玻璃瓶塞，使實驗時可達到水封狀態，讓整個試驗成為一個封閉式系統。

✓ 培養箱：

自行裝配之培養箱二組，台面可拆換，以角鋼為架構主體，長×寬×高為 135×107×90 公分，頂面履以 120 公分超高色溫燈管(40°C,20W)10 支，頂面可依據光面強弱上下調整，內有迴轉式振盪混合器 (WEST 公司，Ferstek Model S103)，搖動速度可超過 100 rpm，機座台面分別可裝 300 mL BOD 瓶 66 座及 105 座。培養箱置於溫控室內，控制溫度在  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 。作為藻類批次式培養與 BOD 瓶密閉式藻類毒性試驗之用。

✓ 電子顆粒計數器：

使用 Coulter Counter，型號 MULTISIZER II (Coulter electronics 公司)，計數細胞數。使用前後需用 ISOTON 潤絲 (rinse) 清理。採用 50  $\mu\text{m}$  孔徑之玻璃管，適用顆粒直徑範圍為 1  $\mu\text{m}$ ~30  $\mu\text{m}$ ，測試時間約在 11~13 秒間。

✓ 電腦：

使用中央處理器為 P-3 之桌上性電腦，視窗 XP (Windows XP) 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。

✓ 光度計：

TOPCON 產牌，型號 IM-2D，單位是 lux。用於每天母槽及震盪培養箱之檯面光度量測。

✓ 氣體鋼瓶：

購於大明行及洽隆，含 0.5% CO<sub>2</sub> 的高壓氮氣鋼瓶，純粹 N<sub>2</sub> 的純度達 99.5%，氣體體積為 6 立方公尺。用於實驗中稀釋水之曝氣，以降低營養基中的 DO 值，且能提供實驗期間足夠量的碳源。

✓ 定量吸管：

使用 SOCOREX 可調式移液器，大小為 100~1000  $\mu$ L 及 1~5mL 兩種。以及 NICHIRO，Nichipet EX，20~200  $\mu$ L、10~100  $\mu$ L 以及 2~20  $\mu$ L 等 3 種。

✓ 分析天平：

產牌 Precisa 205A。

✓ 滅菌釜：

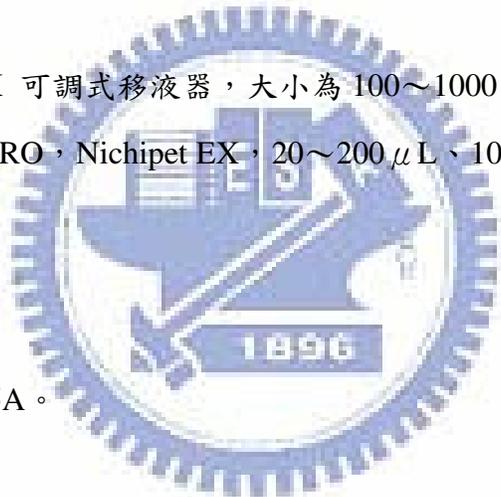
使用 HIRAYAMA 公司，型號 HA-300M 的滅菌釜在 1.1 kg/cm<sup>2</sup>，121°C 下對實驗器皿滅菌 15 分鐘。

✓ 烘箱：

廠牌 Memmet，做為烘乾玻璃器皿用，溫度約在 50°C 上下。

✓ 操作台：

使用造鑫公司製造的 Laminar Flow 操作台，以防止植種過程及配製營養基時受到污染。



✓ 藻種及營養基質之保存：

使用 Whirpool 冰箱將藻、藥品以及營養基質保存於 4°C 以下。

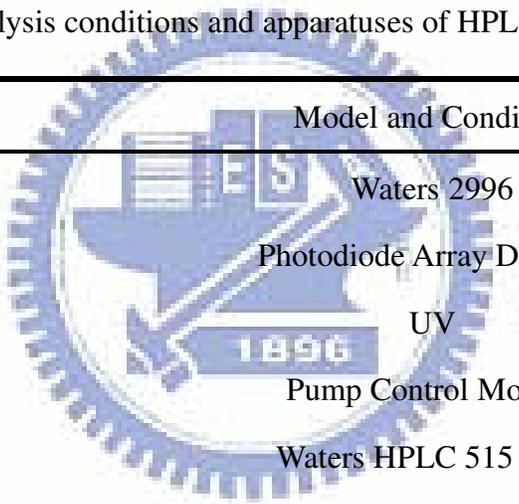
✓ 分析儀器

高效能液相層析儀 (HPLC)，Waters 2996。其裝置的設定於 [Table 4.1.1](#) 所示。

✓ 化學需氧量(COD)分析儀

廠牌 Hach，包含一台加熱板，COD 光度測定儀。

Table 4.1.1 The analysis conditions and apparatuses of HPLC



Item	Model and Condition
HPLC	Waters 2996
Detector	Photodiode Array Detector
Pump	UV Pump Control Module
Column	Waters HPLC 515 × 2 Waters μBondapak, C <sub>18</sub> , 4.6 mm × 150 mm
Injection Volume	10μL
Mobile Phase	Acetonitrile : H <sub>2</sub> O = 90% : 10% Acetonitrile : H <sub>2</sub> O = 100% : 0%
Mobile Phase Flow Rate	1.0 mL/ min

#### 4.1.2 實驗用試劑及耗材

✓ 濾紙：

使用 Gelman Science 九型號 66191 之 0.45 μm (過濾營養基、及水樣

前處理) 及 60301 之  $0.2\ \mu\text{m}$  (過濾 Isoton II) 兩種孔徑之濾紙。

✓ 藥品：

1. HPLC 用藥：Acetonitrile，99.97% HPLC grade。
2. 毒性物質：鄰苯二甲酸酯類 14 種、間苯二甲酸酯類 2 種、對苯二甲酸酯類 4 種，來自 Aldrich、Fluka、Chem 公司。純度如 Table4.1.2。
3. 溶劑：DMSO 二甲亞楓
4. 其他試驗中所需藥品使用 Chem. Service、Merck 或 Riedel-de Haën 公司 G.R.級以上之化學藥品。如藻類營養鹽配置用、酸液配製等。



Table 4.1.2 化合物縮寫、中文名稱及純度

	Toxicants	縮寫	purity	供應商	製造商
	Dimethyl Phthalate	DMP	>95%	友和	chem
	Diethyl Phthalate	DEP	>96%	友和	Fluka
	Diallyl Phthalate	DAP	97%	友和	Aldrich
	Dipropyl phthalate	DPP	99%	友和	Aldrich
	Diisobutyl phthalate	DiBP	99%	友和	Aldrich
	Dibutyl Phthalate	DBP	99%	-	Jassen
	Di-n-amyl Phthalate	DAmP	98%	友和	Chem
鄰苯二甲酸	Diphenyl Phthalate	DPHP	99%	友和	Aldrich
	Dihexyl Phthalate	DHP	98%	友和	Alfa Aesar
	Butylbenzyl phthalate	BBP	98%	友和	Aldrich
	Butyl (2-ethylhexyl) Phthalate	B2EHP	100%	友和	Chem
	Bis(Methoxyethyl) Phthalate	BMOEP	99%	友和	Chem
	Bis(2-Ethoxyethyl) phthalate	BEOEP	98%	友和	Chem
	Bis (2-butoxyethyl) Phthalate	BBOEP	tech.	友和	Aldrich
	Diethyl terephthalate	DEtP	100%	友和	Chem
對苯二甲酸	Diallyl terephthalate	DAtP	>95%	友和	Chem
	Dimethyl Nitroterephthalate	DMNtP	99%	友和	Aldrich
	Dimethyl AminoterePhthalate	DMAtP	97%	友和	Aldrich
間苯二甲酸	Dimethyl 5-Nitroisophthalate	DMNiP	98%	友和	Aldrich
	Dimethyl 5-Aminoisophthalate	DMAiP	98%	友和	Aldrich

## 4.2 實驗方法

### 4.2.1 藻類毒性試驗

整個實驗架構主要以生長率與產氧率為參數之密閉式 BOD 瓶試驗。

#### (一)、 試驗藻種：

本實驗所選用的藻種為 *Pseudokirchneriella subcapitata*，月芽藻，是一種於現今廣用於藻類生物試驗研究之物種。像是 US EPA、ISO、OECD 及 APHA 等單位之藻類毒性試驗法，皆以此物種為標準試驗種之一。實驗藻種購自於 University of Texas, Austin，2003 年 2 月初。

#### (二)、 培養基：

本研究採用 U.S. EPA “The *Selenastrum capricornutum* Printz algal assay bottle test: Experimental design, Application , and Data interpretation protocol. EPA-600/9-78-018.” 所使用的營養鹽組成，再以此營養鹽為基礎，對其組成加以研究而用於連續式母槽與光合抑制藻類毒性試驗中。其中 U.S. EPA 營養鹽的配製方法如下：將下列 (a) ~ (g) 的貯備液 (stock solution) 各加 1 mL 至去離子水中，再稀釋至 1 L。接著以 0.1 N 當量濃度的 NaOH 或 HCl 將營養鹽之 pH 值調至  $7.50 \pm 0.10$  並立即以  $0.45 \mu\text{m}$  的濾膜加以過濾。

以下為營養鹽之配置：

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

(b)、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。

(c)、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。

(d)、微營養鹽貯備液：溶解下列所有藥品於 500 mL 去離子水。

92.760 mg $\text{H}_3\text{BO}_3$	0.714 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
207.690 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	3.630 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
1.635 mg $\text{ZnCl}_2$	0.006 mg $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
79.880 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	150 mg $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

(e)硫酸鎂貯備液：溶解 7.350 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  於 500 mL 去離子水中。

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

(g)碳酸氫鈉貯備液：溶解 7.5 g  $\text{NaHCO}_3$  於 500 ml 去離子水中。

其中微營養鹽貯備液中，EDTA 分別有 100%、10%及 0%三種。100%是使用於活化藻類時，而在連續式母槽中培養藻類時使用 10%，進行實驗時則使用不含 EDTA 之貯備液。最後配成的營養鹽其巨量及微量營養素濃度列於 [Table 4.2.1](#) 及 [Table 4.2.2](#)。而表中之“結果濃度”表示各元素在水溶液中所存在之實際濃度。營養鹽的滅菌是以  $0.45 \mu\text{m}$  的濾膜過濾，過濾滅菌後的營養鹽須保存在  $4^\circ\text{C}$  且置於陰暗無光線照射處，以免產生光化學反應。

(三)、母槽實驗條件的控制：

- ✓ 溫度：利用恆溫室，控制溫度在  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 。
- ✓ 光度：利用白冷光從系統的一方平行連續照射，使培養槽及試驗瓶中間段之光度在  $4300 \pm 10\%$  lux。
- ✓ 曝氣：以 480 mL/min 之空氣流速將培養母槽做曝氣動作。
- ✓ 溢流率控制：母槽溢流率控制在 950-1050 mL/day。

以上各個參數皆要每天量測，來保證實驗的穩定度。

Table 4.2.1 The consist of macro-algal medium

Chemical	concentration (mg/l)	element	Final conc. (mg/l)
NaNO <sub>3</sub>	25.5	N	4.20
NaHCO <sub>3</sub>	15.0	C	2.14
		Na	11.0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.04	P	0.186
		K	0.649
MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	14.7	S	1.91
MgCl <sub>2</sub>	5.70	Mg	2.90
CaCl <sub>2</sub> -2H <sub>2</sub> O	4.41	Ca	1.20

Table 4.2.2 The consist of micro-algal medium

Chemical	concentration (µg/L)	element	Final conc. (µg/L)
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	186	B	32.5
MnCl <sub>2</sub>	264	Mn	115
ZnCl <sub>2</sub>	3.27	Zn	1.57
CoCl <sub>2</sub>	0.780	Co	0.354
CuCl <sub>2</sub>	0.00900	Cu	0.0400
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> -2H <sub>2</sub> O	7.26	Mo	2.88
FeCl <sub>3</sub>	96.0	Fe	30.0
Na <sub>2</sub> EDTA-2H <sub>2</sub> O	300		

#### (四)、實驗前的準備

##### ✓ 玻璃器皿：

先經不含磷的清潔劑清洗後再用自來水沖洗數次，而後泡至 10% HCl 溶液至少 1 小時，取出後以  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液中和。最後再以自來水沖洗約 5-6 次，去離子水沖洗 3、4 次後放入烘箱中加以烘乾（溫度約保持於  $50^\circ\text{C}$  上下）。使用前面通口處封上鋁箔，然後置於設定為  $1.1 \text{ kg/cm}^2$ ， $121^\circ\text{C}$  的滅菌釜中滅菌 15 分鐘。

##### ✓ 母槽：

先用不含磷的清潔劑清洗後再用自來水沖洗數次，直到不見泡沫為止；之後再用去離子水清洗，瀝乾後，在母槽上的各個通口覆上錫箔紙，放入滅菌釜中滅菌 15 分鐘後，取出放至室溫後才使用。

##### ✓ 藻類的保存：

開始時先進行固態培養基的培養，固態培養基組成和液態營養鹽相同；但加 1% 之洋菜膠 (Agar)，通常可保存六個月（在  $4^\circ\text{C}$  下）。藻類每四個星期移植至新的培養皿以保持菌種的健康。另外也做液態營養鹽的培養，通常可保存四個星期（ $4^\circ\text{C}$  下），四個星期後繼續做移植以保存菌種。

#### (五)、ISOTON II 溶液的配製：

加 200g NaCl 於 20 公升的超純水中完全混合，並以電導計測其導電度，其導電度應為 17 mmho。若超過 17 mmho，則以超純水稀釋直到導電度為 17 mmho，若低於 17 mmho，則加入少量 NaCl 直到導電度為 17 mmho。此溶液以  $0.2 \mu\text{m}$  濾紙過濾即得 Isoton II 溶液。其主要作用在於當作電子顆粒計數器之導電溶液用。

(六)、電子顆粒計數法及操作原理：

在電子顆粒計數器內有一根玻璃管，操作中需浸入含有 Isoton II 稀釋樣品的燒杯中，水樣在量測的過程須加以攪拌以使顆粒均勻分佈。而在玻璃管近底端的側面鑲有紅寶石的精準小圓孔，藉以吸取水樣。在玻璃管內外各有一電極片通以直流電，當水樣中所含之顆粒經過圓孔時，會暫時性地干擾到電流，行程某特定量的電阻。而電阻量化透過示波器的波峰顯示，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。電子顆粒計數器主要條件設定如下 Table 4.2.3。本實驗採用 50  $\mu\text{m}$  孔徑之毛細玻璃管，其設定之量測粒徑上下限為 2.622  $\mu\text{m}$  至 60  $\mu\text{m}$ 。量測時，取 1 mL 的藻液置入 50 mL 之定量瓶內，再加入 Isoton II 至 50 mL。將之倒入燒杯，放進顆粒計數器內量測。以顯示之讀數值扣除空白顆粒數之數值（純 Isoton II 之背景值）【\*註 1】，連續三次其值相差在 2% 者之平均值為量測值。

Table 4.2.3 The conditions of Coulter counter

conditions	values
Full scale	10 mA
Polarity	+
Currents , I	100
Diameter Lower Threshold , Tl	2.622 μm
Diameter Lower Threshold , Tu	30 μm
Attenuation , A	1
Preset Gain	1
Alarm Threshold	OFF
Analysis amount	500 μL

\*註 1：藻液每毫升顆粒數 (cells/mL) =

(扣除空白組數值後之三次讀值平均值 / 0.5 mL) × 50

(七)、溶氧測定器的校正：

一般溶氧測定器可使用飽和空氣於水中校正與空氣校正兩種，但因前者須將水曝氣至 100% 相當困難，因此建議採用空氣校正法。茲將空氣校正法介紹於下：將電極置於 2.5 公分左右水量之 BOD 瓶(可視同 100% 溼度)，轉鈕至校正鍵，輸入校正值 (100 %)，確認後轉回一般測定鍵，連續反覆校正三次。每月定期更換 CLARK-TYPE 薄膜與 3M 氯化鉀電解質；若有必要時，需以亞硫酸鈉 30% 將 PROBE 表面清洗乾淨，不要殘留任何化學物質，而得 0% 之 DO 溶液，進行零點校正。

(八)、 實驗步驟：

(a). 藻類培養

先將欲移植的藻類由 4°C 的冰箱中取出，進行批次式培養數天，以活化藻細胞，使其達到對數生長期。接著依比例再將達對數生長期的藻液和培養基植入 4 L 之連續式培養槽中。

將連續式培養槽培養於 24±1°C 之恆溫室中，槽底放置磁石攪拌器，轉動的磁石可讓藻液達均勻混合，避免藻類沉澱及少量供應 CO<sub>2</sub> 之作用，另外經由曝氣裝置之進流氣體則供應 CO<sub>2</sub> 及均勻混合之作用。連續式白冷光從培養槽一邊照射，讓培養槽中段之光照強度介於 4300±10% lux 之間。

而後，當培養槽的藻類數達到相當的數量（約最大可能藻類數之 80~90%），即以蠕動幫浦進流營養液。由於培養槽體積固定（母槽設有溢流口），故可直接由流量控制所需之稀釋率（約為 0.25/d），亦即控制培養槽內藻類之生長率。

經由每天更換新鮮的進流基質，並量測槽中細胞數量、溢流率、及觀察粒徑分析儀中藻類細胞之分佈情形（細胞平均體積；MCV），以判定連續式培養槽是否達到穩定狀態。以連續 3 天之細胞數量、MCV 等參數皆在控制的範圍且粒徑分析儀中藻類細胞之分佈為一常態分佈，即可認定為系統達到穩定狀態。範圍約在：細胞數量（ $1.9 \times 10^6 \sim 2.2 \times 10^6$  cells/mL）及粒徑分析儀中藻類細胞之分佈情形（MCV 在 39~46 $\mu\text{m}^3$  之間）即可。

(b). 稀釋水配置

毒性試驗的營養鹽參考 U.S. EPA 建議配製，適當地修正濃度作為

本試驗的營養鹽；以含 0.5% CO<sub>2</sub> 的 N<sub>2</sub> 氣體（流量為 600 mL/min）對營養鹽進行曝氣，降低水中的溶氧值並提高其 CO<sub>2</sub> 含量，再以 0.1N 的 NaOH 和 HCl 將營養鹽的 pH 值調整至 7.5 ± 0.1，完成營養鹽的配製。

(c). 毒物添加

從培養母槽（steady state 狀態）取出之藻液與上述之營養鹽混合成所需濃度，接下來再加入不同之毒物濃度（含一組控制組及六組處理組）的試驗瓶，一組實驗做三重複組；此時須注意各瓶中的營養鹽濃度與初始細胞密度應該相同，本實驗之初始細胞密度設定在 15,000 cells/mL，進行毒性試驗，且另外再量測初始溶氧值（Initial DO，在此要注意曝氣的時間及狀況，盡量讓初始溶氧降為最低）。

(d). 實驗終點

經過 48 hr 的毒性物質曝露後，量測各加入不同毒物濃度後的試驗瓶之溶氧值（Final DO），扣除起始之溶氧值得淨溶氧值（ $\Delta$ DO），同時利用顆粒計數器測量瓶中細胞密度扣除初始細胞密度 15000 cells/ml，以求得藻類生長率。利用水樣濃度與上述參數，透過 Probit 模式分析，求出毒性物質之 EC<sub>50</sub> 值與劑量曲線圖。整個操作流程圖如 Fig. 4.2.1。

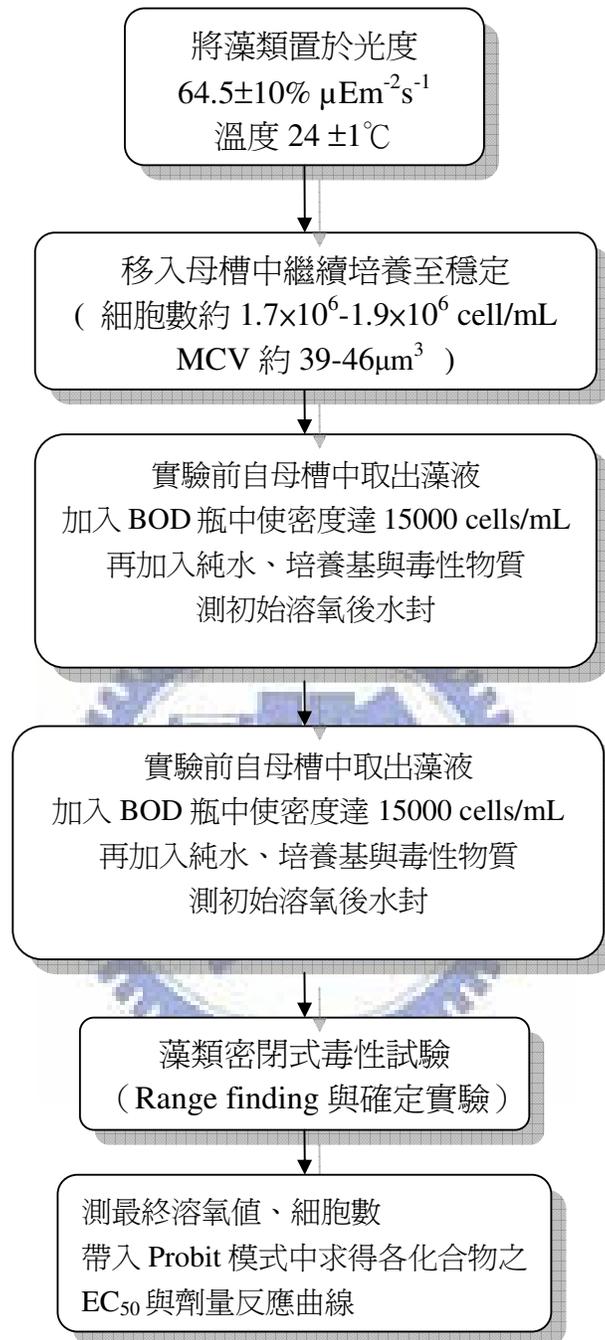


Fig. 4.2.1 The flow chart in algal toxicity test

## 4.2.2 塑化劑藥品之配置與定量

### (1)標準品之配置

以 DMSO(dimethylsulfoxide)作為溶劑，分別對各個化合物配置五個濃度之標準品，以作為 HPLC 定量之檢量線。

### (2)儲備液(stock solution)之配置

實驗前，取適量化合物之原液以 DMSO 作為溶劑，定量至 10ml 後，倒入試管中，迅速蓋上瓶蓋封緊；為確保混合均勻，在配置完儲備液後，利用超音波震盪器使其溶解並混合均勻。

每次實驗前，為確認 stock solution 之濃度，將樣品定量分析，分別以 HPLC 與 COD 化學需氧量分析儀確認此樣品之濃度 (nominal concentration)，確保實驗的準確度。

### (3)HPLC 之操作

#### (a).前處理

在定量前，要先進行 HPLC 的校正程序；去除氣泡，以減少誤差。

#### (b).HPLC 操作步驟

開機後先將偵測器之燈關掉，然後用乙腈 (acetonitrile) 以流速 1mL/min 流洗 30 分鐘。將偵測器 (此為紫外光偵測器) 的燈打開，儀器歸零。設定操作條件：波長、量測時間 (Run time) 約為 5 分鐘 (隨不同的分析物質而改變)，樣品入流量為 10 $\mu$ L，mobile phase 流速為 1 mL/min。

於電腦上輸入所要分析之毒物及日期。用注入針頭取樣品打入注入孔中，開始分析。當分析結束之後，即可在電腦螢幕上觀察脈衝

(peak) 之變化情形，並利用先前所建立之檢量線進一步求得樣本中所含物質之濃度。

儀器關閉前，需再用乙腈以 1mL/min 之流速流洗 30 分鐘始可關閉。待流洗完畢，關掉儀器及電腦。整個操作流程圖如 Fig. 4.2.2。



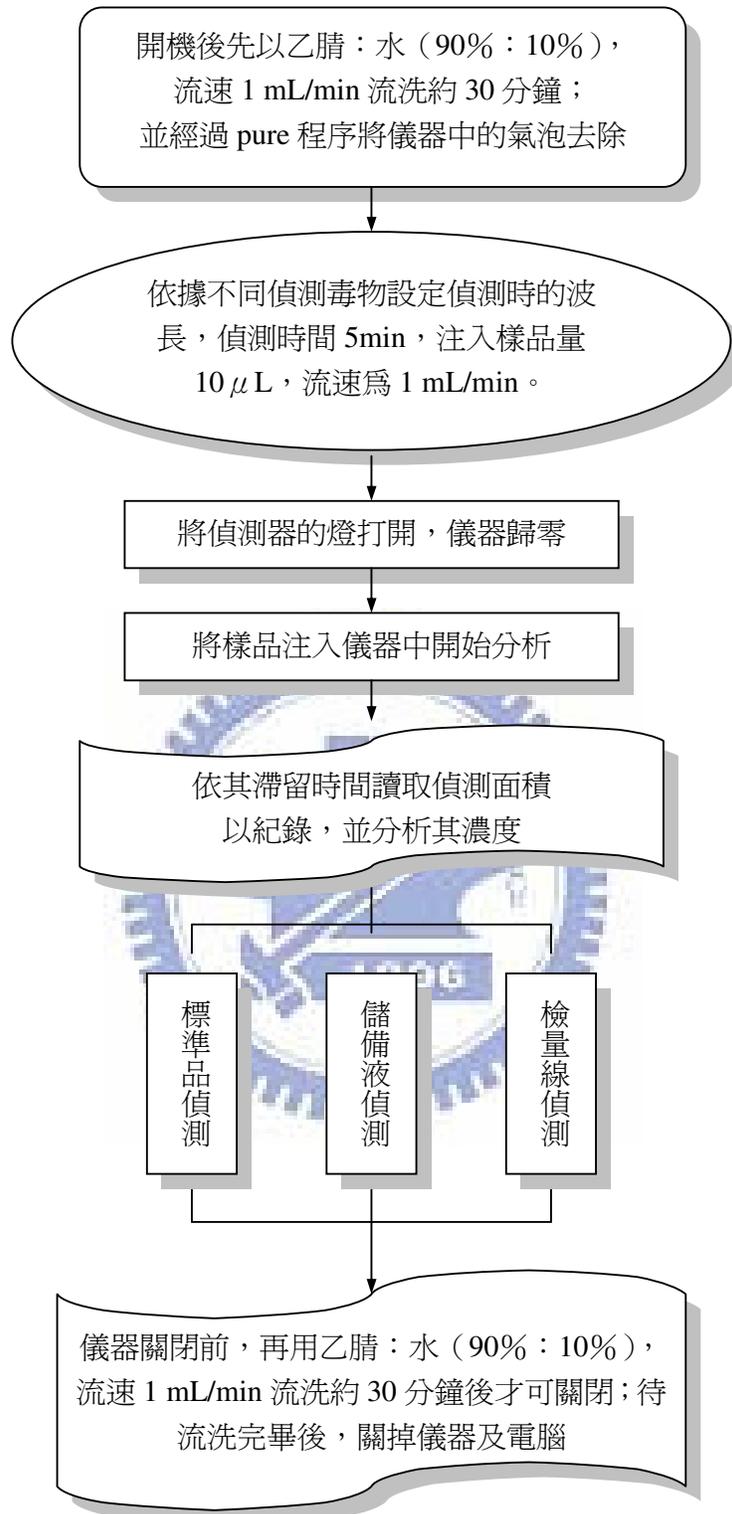


Fig. 4.2.2 The operating steps in HPLC

#### (4)COD 化學需氧量測定儀之操作

##### (a).試劑

- 1.試劑水：電阻值 18.2 之純水
- 2.重鉻酸鉀消化溶液，0.0167M：將 4.913g 的重鉻酸鉀加入約 500ml 試劑水中，依序加入濃硫酸 167ml、33.3g 硫酸汞，混合溶解，冷卻至室溫後定量至 1L。
- 3.硫酸銀試劑：使用市售品

##### (b).COD 操作步驟

首先將 COD 儀器預熱至 150°C，期間將重鉻酸鉀消化液取 1.5ml 加入 COD 消化管中，再加入 3.5ml 之硫酸銀試劑，取配好之 stock solution (樣品)2.5ml 加入消化管中，使樣品留在最上層，倒轉數次使完全混合均勻，同時還需取試劑水 2.5ml 當作空白組。當儀器上升至 150°C 時將消化管放入儀器中加熱 2 小時。

兩小時加熱過程完成後，將之取出放至室溫即可測定其 COD 之值，測定前皆須以拭淨鏡紙將管壁擦拭乾淨；首先以空白組將 COD 光度測定儀歸零，可偵測出樣品之化學需氧量，再利用此值經由化學平衡式換算出樣品濃度。

## 4.3 實驗數據之處理

### 4.3.1 試驗濃度的產生

第一次試驗進行 range finding 的測試，濃度範圍須至少橫跨 3 個 order，得到毒性作用的主要範圍濃度，當範圍確定後，依據 1.5~4 為倍數取得適當濃度，進行確定試驗。

### 4.3.2 模式的運用

將實驗所測出之各參數值（如生長細胞數變化量及溶氧產生量）與對應之有機物濃度帶入模式（probit）中計算，得到各模式的劑量-反應曲線之斜率與截距及 EC50 值；並且由圖中求得生長曲線斜率，作為日後討論。

