

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

密閉式藻類毒性試驗偵測有機物毒性及 QSAR 關係之研究

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2211-E-009-016-

執行期間：91 年 08 月 01 日至 92 年 07 月 31 日

執行單位：國立交通大學環境工程研究所

計畫主持人：陳重元

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 10 月 30 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

密閉式藻類毒性試驗偵測有機物毒性及 QSAR 關係之研究

Evaluation of the toxicity of organic chemicals and the QSAR relationship using a closed-system algal toxicity test

計畫編號：NSC 91-2211-E-009-016

執行期限：91 年 8 月 1 日至 92 年 7 月 31 日

主持人：陳重元 執行機構及單位：國立交通大學環境工程研究所

一、中文摘要

本研究以藻類 (*Raphidocelis subcapitata*) 利用 BOD 瓶進行一密閉式藻類毒性試驗, 評估苯胺類極性麻醉有機物之毒性, 以及討論同屬於極性麻醉有機物之酚及氯酚類的毒性機制。

本實驗主要量測兩種反應終點, 包括溶氧變化量 (Based On DO) 以及代表生物質量 (Based On Biomass) 的藻類細胞密度變化量, 而為了提高毒性數據的可信度也以 G test 進行合適度分析, 選擇最佳模式以計算其 EC 值。在本次毒性試驗中可發現取代基對於毒性所造成的影響, 隨者取代基的增加, 毒性有增強的趨勢, 而取代基的位置不同也會造成不同的毒性。在物種之間的敏感度比較上, 藻類毒性試驗與 Microtox 相比敏感度相近, 而與原生動物或次粒腺體的毒性試驗相比則敏感度多數較佳, 顯示藻類毒性試驗具有良好的敏感度。此次研究也對於毒性物質的 QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship) 進行研究, 並成功的建立起包含疏水性及氫鍵鍵結能力兩項物化參數的 QSAR 預估模式, 可用於預測此類有機物對藻類

所造成的毒性。

此外, 本研究以平均中斷值 (cut-off value) 作為選擇 NOEC 或 EC10 的客觀參考點, 結果顯示 NOEC 比 EC10 提供生物更嚴謹的保護標準。

關鍵詞：密閉式藻類毒性試驗、極性麻醉有機物、溶氧變化量、生物質量、QSAR、平均中斷值

Abstract

The effects on algal (*Raphidocelis subcapitata*) inhibition of 13 substituted anilines were recorded by using a close-system algal test, the mechanism of substituted anilines and chlorophenols were discussed which were both considered as polar narcotic chemicals.

The toxic test was ended based on DO and Biomass Methods. The Biomass Method was to calculate the cell density difference between the start and the final points. EC values were calculated using the appropriate model chosen from G-test. In this study, the toxic effects caused by substituted anilines were

found to related to the numbers and positions of substituents. With increasing of the substituents, substances were found more toxic to algal. When compare with other species, BOD bottle test shows a similar sensitivity with Microtox and a good correlation was found in particular with another widely used assays system, the *Tetrahymena* assays. Quantitative structure-activity relationships (QSARs) were established between the EC50 values and various molecular descriptors for hydrophobic and hydrogen-bond interactions, and a highly predictive two-variable QSAR model was obtained.

In addition, a cut-off value approach is proposed to determine whether NOEC or EC10 should be chosen for estimating low toxic effects. The results indicate that NOEC offers better protection to test organisms than EC10.

Keyword: close-system algal test , polar narcotic chemicals, DO, Biomass, QSAR, cut-off value

二、計畫緣由與目的

藻類為自然水體中主要的基層生產者，有毒物質對藻類產生的毒害效應將直接衝擊水體生態環境，許多標準藻類試驗則被用於比較受測物質的相對毒性。但是，大部分之標準試驗方法皆屬於一個開放式系統，因此在偵測揮發性有機物上毒性常有被低估的情形。為解決揮發性化學物質濃度隨著試驗期間拉長及震盪試驗瓶過程中逐漸消失，本實驗室參考先前文獻中的密閉系統試驗[1,2,3]並加以改良，發展成密閉式藻類毒性試驗並進行參數最佳化。用來評估三類非極性麻醉有機物(氯苯、含氯乙烷及含氯甲苯)的毒性，結果顯示試驗敏感性較傳統批次式實驗大幅提高。

大部分有機物之毒性屬於非反應性機制，其毒性主要來自親脂性，藉由毒物覆蓋於細胞膜上造成生化通徑阻塞，或造成細胞膜的非極化而形成毒性，亦稱為麻醉效應。苯胺類有機物被歸類為極性

麻醉有機物 (Narcosis II)，其毒性比非極性麻醉有機物 (Narcosis I) 強，主要除了麻醉效應外，極性以及與氫鍵鍵結能力也是重要的原因[4,5,6]。此類有機物經常被應用於製藥、農藥或是染料製造等工業用途並隨著工業廢棄物一同排出，其毒性可能隨著其取代基的不同或是取代基的數目而有所變化。

本研究目的將利用連續式培養下具高敏感度之藻類，以光合作用產氧量和生物質量為反應參數來探討這些苯胺類極性麻醉性有機毒物對藻類之影響，並對下列問題進行探討。

- (1) 利用 BOD 瓶進行藻類毒性試驗，依照本研究群之前找出之最佳化條件進行實驗，分別以溶氧和細胞密度為試驗終點，比較兩種試驗終點對毒性試驗的影響。
- (2) 探討取代基的位置及數目對毒性的影響。
- (3) 將所得之毒性試驗結果和 QSAR 中之重要參數進行統計分析，討論其相關性。
- (4) 將所得之結果和其他物種之毒性試驗做一比較，討論其相關性和本毒性試驗之可行性。
- (5) 透過 G test (Goodness of fit)，對 Probit、Logit 和 Weibul 三種迴歸模式進行最佳化選擇。
- (6) 分析 EC10 及 NOEC，藉由中斷值(cut-off value)來評估何者能提供生物較佳的保護。

三、研究方法

1、實驗材料

本研究中，採用月芽藻 (*Raphidocelis subcapitata*)。實驗藻種購自於 University of Texas, Austin。所採用的試驗毒物為不同取代基的苯胺類有機毒物計有一氯苯胺、二氯苯胺、三氯苯胺、二甲基本胺以及一溴苯胺，皆為非反應性之極性麻醉有機毒物。

2、實驗步驟

(1) 連續式母槽之培養

藻類於四升的透明連續式母槽培養，其曝氣量 250ml/min，光照強度 $64.5 \pm 10 \% \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ 。溫度 24

± 1 °C。此處使用之營養基質參考 U.S. EPA 標準方法,但將其中之 EDTA 濃度降為原本之 10%,而氮、磷之濃度降為 50%。稀釋之比率為 0.25 day^{-1} 。每日量測連續式培養母槽中藻細胞之細胞濃度 (Cell Density)、平均細胞體積 (Mean Cell Volume)、pH 值、溢流率等數值。本實驗以連續三天之上述參數值皆在一定控制範圍之內,即認為系統達到穩定狀態。

(2) 藻類毒性試驗

當母槽到達穩定狀態後,從母槽中取出藻液進行實驗。毒性試驗進行時,每次為七個 300ml 之 BOD 瓶,一瓶為控制組,即不加入任何毒性物質,另外六瓶則加入不同濃度之毒性物質,並進行三重複。每次進行毒性試驗之前進行 TOC 之量測。營養基質為參考 U.S. EPA,但不含 EDTA。加入 BOD 瓶中之藻類初始細胞密度為 $1.5 \times 10^4 \text{ cells/ml}$ 之後再加入曝氣好之純水,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。測量各瓶之溶氧值,視為初始溶氧值,然後將 BOD 瓶隨機置於震盪器之盤面上震盪。實驗條件控制在溫度 24 ± 1 ,光照強度為 $64.5 \pm 10 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ 之白冷光燈,試驗時間為 48 小時,震盪頻率為 100rpm。於 48 個小時後量測各個 BOD 瓶中之溶氧值,視為最終溶氧值。緊接著用顆粒計數器量測每個 BOD 瓶的藻類細胞密度,藉由試驗前後兩種終點之變化量,進行一系列之統計分析。

(3) 統計分析

本研究使用 Weibul 模式計算 EC50。在模式最佳化方面,利用 G test[7]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)。

在 NOEC 的檢定方面,利用 One sample t-test 及 Dunnett's test 計算 NOEC,並依據 EC10 與 NOEC 的比值來判斷何者能提供生物較佳的保護。One-sample t test 的使用是基於控制圖表,控制圖表是紀錄本研究中控制組之試驗終點參數試驗前後變化量,即為控制組於試驗終了之溶氧增加量和藻類細胞密度之增加量,累積至相當數量後製成一控

制圖。而上下控制範圍 (Control Level) 分別為其參數之平均值加減三倍標準偏差值,而在容忍範圍內之最高濃度即判斷為 NOEC 值。

本研究提出以平均中斷值 (cut-off value) 作為選擇 NOEC 或 EC10 的客觀參考點,中斷值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並且介於 NOEC 與 LOEC 之間,此中斷值亦指出 NOEC 所能達到之保護程度的極限,其計算公式如下:

平均中斷值 (% reduction) =

$$\frac{T}{X_c} \times S_w \sqrt{\frac{1}{nc} + \frac{1}{ni}} \times 100$$

其中 T 為一關鍵值由查表所得 (one-tail Dunnett's test, $P < 0.05$), X_c 為控制組之平均值, S_w 是組內變異之平方根, nc 與 ni 為控制組與處理組重複試驗次數。

四、結果與討論

1. BOD bottle 藻類毒性試驗分析

表 1 為使用 BOD 瓶進行藻類毒性試驗分別以溶氧(DO)增加量以及生物質量(biomass)作為反應終點所得到的 EC50 值。在所有苯胺類有機毒物中,以 2,4,5-trichloroaniline 毒性最強,其 EC50 值不論以溶氧變化量 (EC50=2.15mg/L) 或生物質量 (EC50=2.30mg/L) 為反應終點皆為最小,而 2,3-dimethylaniline 毒性最弱,其 EC50 為 73.54mg/L (base on DO) 和 91.61mg/L (base on biomass)。

本試驗所選用苯胺類有機物以溶氧量為反應終點其 EC50 由 2.15 至 73.54 mg/L,而生物質量則為 2.30 至 91.61 mg/L。比較不同取代基的數目或位置所造成的毒性,首先,隨者取代基的數目增加,毒性也有增加的趨勢,一氯苯胺的 EC50 由 3.55 至 21.96(base on DO) 和 3.74 至 12.96(base on biomass),而二氯苯胺的 EC50 由 3.82 至 26.73 (base on DO) 與 3.56 到 21.13 (base on biomass),三氯苯胺的 EC50 自 2.15 至 4.34 (base on DO) 和 2.30 至 6.63 (base on biomass),三氯苯胺的毒性較二氯苯胺強,而在一氯苯胺和二氯苯胺間的比較則除了

屬於一氯苯胺的 4-chloroaniline 毒性較強而二氯苯胺的 2,6-dichloroaniline 毒性較弱之外，也有此一現象。另外，即使取代基的種類或數目相同，不同的位置也會有不同的毒性，此一現象以一氯苯胺中的 3-chloroaniline、4-chloroaniline 以及二甲基苯胺中的 2,3-dimethylaniline、3,4-dimethylaniline 的 EC50 差異尤為明顯。

在兩種反應終點的敏感度比較上，13 組有機毒物中有 7 組以生物質量較為敏感，6 組以溶氧量較敏感，兩種反應終點敏感度高低在此並不明顯。此外，兩種試驗終點的 EC50 的相關性 R^2 高達 0.94 (圖 1)，顯示此二試驗終點具有相當高的相關性。

2. 最佳化模式之選擇

利用 G test 進行合適度的分析，除了 2,5-dichloroaniline、3,4-dimethylaniline、3,4-dichloroaniline、2-bromoaniline 以藻類溶氧增加量為試驗終點時，以 logit 的回歸模式最佳而 3-chloroaniline 以 probit 回歸模式最佳外，其餘皆是以 weibul 回歸模式最佳。

3. EC10 與 NOEC 的比較

表 2 列出了以 one-sample t test 所利用兩種反應終點的控制圖所求取的 NOEC 與以 weibul model 所計算得到的 EC10 及其兩參數的比值。觀察溶氧量及生物質量的 NOEC 值，僅兩組毒性物質具有相同的 NOEC，而以細胞密度作為反應終點所得到的 NOEC 具有較小或是相等的值，兩種反應終點的 NOEC 值差距更以 3,5-dichloroaniline 達 9.95 倍之多。若是分析 EC10 與 NOEC 的比值，以溶氧增加量為終點的比值全部最小為 0.12 最大至 0.72 全部小於 1，其意義似乎顯示以溶氧量為終點時，EC10 比起 NOEC 要為敏感，能提供較好的保護，而在生物質量的反應上，有六組數據其比值大於 1，將近一半的比例且比值範圍由 0.37 至 2.08，明顯要高於溶氧量的比值。表 3 是利用 Dunnett's test 分析求得 NOEC 與 weibul model 計算之 EC10 及其兩者比值。當以溶氧變化量或細胞密度為反應終點時所得到的 NOEC 值分別有三種和一種毒性物質的濃度

低於實驗設定的最小濃度。當與 EC10 進行比較時發現當以溶氧量為試驗終點時僅有六種毒物的 NOEC 比 EC10 要來的低，而以細胞密度為參數所得之 NOEC 有八種比 EC10 還低，顯示以細胞密度作為反應終點的 NOEC 值比產氧量所得 NOEC 更能提供保護。

由表 4 以溶氧量和細胞密度為反應終點的平均中斷值分別為 9.20 與 8.41，而全部的試驗中以細胞密度為反應終點所得到的中斷值較溶氧小的共有八組，佔了全部的 61.5%，顯示以細胞密度作為反應終點比產氧量要稍好。由於中斷值位於 NOEC 與 LOEC 之間高於 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，換言之，此時以 NOEC 能夠比 EC10 提供更加嚴謹的保護標準。表 5.4.3 中，以溶氧量為反應終點的中斷值大於 10% 的有五組，而以細胞密度為試驗終點的中斷值大於 10% 的僅有三組，由此可知對於本研究的有機毒性物質而言，NOEC 值比 EC10 能提供更好的保護標準。而利用中斷值所得之結果與以控制圖所分析之 NOEC 結果有所差異，可能因各毒性試驗的控制組變異大，拉大了控制圖的上下限控制範圍，而得到較高的 NOEC。導致此高變異性的原因可能來自於所使用的藻類來源未達穩定狀態、試驗過程不夠嚴謹以及毒性物質濃度設定不理想也會導致分析產生偏差。綜合上述討論可知 NOEC 比起 EC10 能提供對生物較好的保護，而比較兩種反應終點可以發現以細胞密度為試驗終點具有較小的組內變異。

4. 與其他物種毒性試驗之比較

由表 5 及表 6 所示，在與 Microtox 試驗所得之敏感度比較上，以溶氧量及生物質量為實驗終點得到比 Microtox 敏感的實驗數據皆為七組，佔所有能比較數據的 43.8%，顯示此一藻類試驗系統對極性麻醉有機物之敏感度與 Microtox 相近。表中所列數據與使用原生動物的 Spirotox 試驗系統比較，藻類毒性試驗較為敏感的部分佔 85.7%，與使用次粒腺體的 SMP assay 相比本試驗系統以溶氧量及生物質量為終點所得較高敏感度分別佔 60%、50%，而和

使用纖毛蟲所進行的試驗相比則 BOD 瓶藻類毒性試驗之兩種試驗終點所得試驗結果皆較為敏感。當與魚類之毒性試驗¹相比，藻類毒性試驗對此類有機物之敏感度與有限的文獻數據比較下，兩者似乎相近。由此顯示藻類毒性試驗對此類極性麻醉有機物具有相當良好之敏感度。

將上述四種毒性試驗物種分別與本試驗的 BOD 瓶藻類毒性試驗系統之兩種反應終點的相關性分析，表 7. 為其回歸方程式與 R^2 值。本試驗與 microtox、Spirotox、SMP assay 相比，相關性最高分別為 R^2 值等於 0.56、0.20、0.43，不具有顯著的相關性。若和纖毛蟲 *Tetrahymena* 比較可發現，溶氧量、生物質量兩種反應終點分別有 R^2 值為 0.90、0.83 的高相關性，由此顯示對於極性麻醉有機物的分析上，藻類毒性試驗相當適合用以預測此類毒物對於纖毛蟲 *Tetrahymena* 所造成的毒性。

5. 極性麻醉有機物之 QSAR

在表 8. 列出本次利用 BOD 瓶藻類試驗系統所求得苯胺類有機物之 EC_{50} 以及本實驗室過去以同一系統進行實驗所得氯酚類有機物之 EC_{50} ，此兩類有機物毒性機制一般被歸類為極性麻醉有機物。兩種試驗終點與 Log P 之相關性以溶氧增加量較為顯著 ($R^2=0.64$)，所得之回歸關係式 model 1 為：

$$\log(1/EC_{50})=0.66\log P + 2.53 \quad , \quad R^2=0.64 \quad n=19 \quad , \\ \text{base on DO}$$

$$\log(1/EC_{50})=0.52\log P + 2.88 \quad , \quad R^2=0.56 \quad n=18 \quad , \\ \text{base on biomass}$$

若去除 4-chloroaniline 此一 outlier 再次進行回歸得關係式 model 2 為：

$$\log(1/EC_{50})=0.75\log P + 2.25 \quad , \quad R^2=0.77 \quad n=18 \quad , \\ \text{base on DO}$$

$$\log(1/EC_{50})=0.60\log P + 2.62 \quad , \quad R^2=0.71 \quad n=17 \quad , \\ \text{base on biomass}$$

再度去除 model 2 中為 outlier 的 3,4-dimethylaniline (DO model) 以及 2,3-dimethylaniline、3,4-dichloroaniline (biomass model) 可得一組相關性較高之回歸關係式 model 3:

$$\log(1/EC_{50})=0.82\log P + 2.02 \quad , \quad R^2=0.84 \quad n=17 \quad , \\ \text{base on DO}$$

$$\log(1/EC_{50})=0.52\log P + 2.87 \quad , \quad R^2=0.79 \quad n=15 \quad , \\ \text{base on biomass}$$

由此顯示在去除明顯的 outlier 之後可發現極性麻醉有機物與 Log P 具有良好的相關性。而 Log P 主要用於描述分子的疏水性，由此知極性麻醉有機物的毒性與其分子的疏水性具有相當程度的相關性。若討論極性麻醉有機物與描述與氫鍵鍵結能力的參數 Elumo 之相關性時可發現兩種反應終點皆與 Elumo 有 $R^2=0.55$ (base on DO)、 $R^2=0.56$ (base on biomass) 的相關性，若去除 4-chloroaniline 以及 3,4-dimethylaniline 兩個明顯的 outlier 後，其相關性更可高達 $R^2=0.82$ (base on DO)、 $R^2=0.80$ (base on biomass)。將 Log P 與 Elumo 同時對兩種反應終點進行回歸，並去除前述之 outlier：4-chloroaniline、3,4-dimethylaniline 以及 3,4-dichloroaniline 則可得到一組同時描述毒性與疏水性和氫鍵鍵結能力之相關式 model 4:

$$\log(1/EC_{50})=0.48\log P - 23.26\text{Elumo} + 2.19 \quad R^2=0.90 \\ n=16 \text{ on DO}$$

$$\log(1/EC_{50})=0.23\log P - 29.91\text{Elumo} + 2.66 \quad R^2=0.87 \\ n=16 \text{ on biomass}$$

由上述討論可明顯看出極性麻醉有機物對於藻類所造成之毒性與其分子的疏水性和氫鍵鍵結能力有顯著的相關。

非極性麻醉有機物的毒性由於相當符合以水及辛醇係數所預估的毒性，因此依據非極性麻醉有機物與 Log P 兩者相關性分析所得到的預估模式被視為基線毒性 (baseline toxicity)，而使用同一試驗系統針對極性麻醉有機物所進行的試驗其毒性應比以基線毒性所預估要高。此一現象在本實驗中也可觀察到。利用本次實驗所得兩種反應終點之 EC_{50} 與 Hsu[8]利用 BOD 瓶藻類毒性試驗對非極性麻醉有機物所求出之 baseline model:

$$\log(1/EC_{50})=0.8014\log P + 1.6827 \quad \text{base on DO}$$

$$\log(1/EC_{50})=0.7782\log P + 1.6684 \quad \text{base on biomass}$$

所預估的極性麻醉有機物之 EC_{50} 值做一比較。由表中可發現 19 種極性麻醉有機物除了

2,4,6-trichloroaniline 以及 2,3-dimethylaniline 符合基線毒性預估之外，其餘毒性物質之毒性均顯示出比基線毒性較強的毒性，而圖 2 也顯示了極性麻醉有機物與非極性麻醉有機物對 Log P 在趨勢上為一接近平行之兩條直線，而其截距代表極性麻醉有機物比起基線要高的毒性，證明苯胺類以及氯酚類有機物對藻類所造成的毒性多屬於極性麻醉機制。

六、計畫成果自評

本研究以密閉式藻類毒性試驗偵測苯胺類極性麻醉有機物的毒性，顯示取代基的位置及數目將造成不同毒性。在物種之間的敏感度比較上，藻類毒性試驗與 Microtox 相比敏感度相近，而比原生動物或次粒腺體的毒性試驗敏感度較佳，顯示本實驗具良好敏感度。對於毒性物質的 QSAR 分析，成功建立起包含疏水性及氫鍵鍵結能力兩項物化參數的 QSAR 預估模式，可用於預測此類有機物對藻類所造成的毒性。本研究之成果基本上完全達成預期目標，研究內容與計畫亦符合，研究成果之應用價值高，將於近期內投稿至國際學術期刊。

七、參考文獻

1. **R. Kuhn and M. Pattard** (1990), In: Water Research, 24:31-38.
2. **S. Galassi and M. Vighi** (1981), In: Chemosphere, 10:1123-1126.
3. **D.C. Herman, W.E. Inniss and C.I. Mayfield** (1990), In: Aquatic Toxicology, 18:87-100.
4. **M.T. Cronin and T.W. Schultz** (1997), In: The Science of the Total Environment, 204:75-88
5. **G.N. Jawecki and J. Sawicki** (2002), In: Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 42:389-395
6. **G.D. Veith and S.J. Broderius** (1987), In: QSAR in Environmental Toxicology II, 385-391.
7. **D.R.J. Moore and P.Y. Caux** (1997), In:

Environmental Toxicology and Chemistry, 16:794-801.

8. **C.H. Hsu** (2002), In: A Thesis Submitted to Institute of Environmental Engineering of National Chiao Tung University

八、圖表

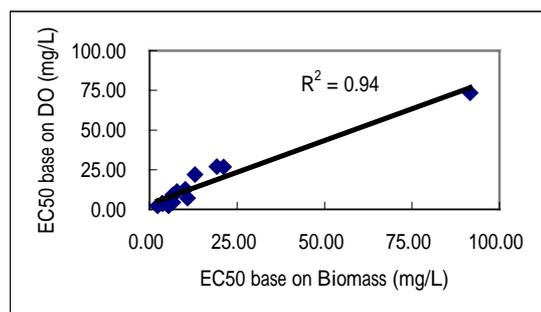


圖 1. 兩種試驗終點之 EC50 相關性分析

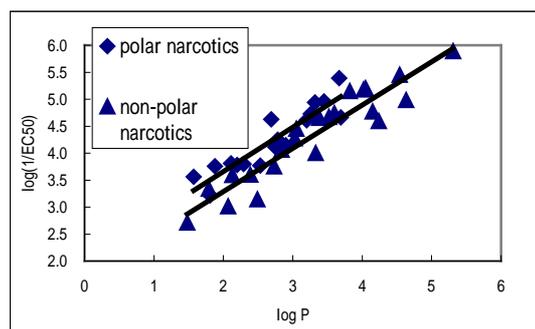


圖 2. 極性麻醉有機物與非極性麻醉有機物對 Log P 之相關性

表 1. 試驗毒物之藻類毒性試驗數據

Chemical	Base on DO				
	EC50	95% Confidence		α	B
	(mg / l)	Limit			
3-Chloroaniline	21.96	17.14	- 27.13	-4.23	1.51
4-Chloroaniline	3.55	2.42	- 4.64	-1.58	0.95
2,4-dichloroaniline	9.1	8.14	- 10.44	-3.15	1.26
2,5-dichloroaniline	12.71	11.34	- 14.02	-4.17	1.50
2,6-dichloroaniline	26.73	23.84	- 29.69	-5.65	1.61
3,4-dichloroaniline	3.82	3.18	- 4.47	-2.00	1.22
3,5-dichloroaniline	11.34	6.82	- 15.99	-3.43	1.26
2,4,5-trichloroaniline	2.15	2.00	- 2.32	-1.37	1.31
2,4,6-trichloroaniline	4.34	3.53	- 5.22	-2.08	1.17
3,4,5-trichloroaniline	2.27	1.62	- 3.15	-1.07	0.85
2-Bromoaniline	26.91	24.02	- 30.07	-5.12	1.45
2,3-Dimethylaniline	73.54	36.41	- 101.44	-5.83	1.27
3,4-Dimethylaniline	7.09	2.00	- 10.53	-2.23	0.95

Chemical	Base on biomass				
	EC50	95% Confidence		α	β
	(mg / l)	Limit			
3-Chloroaniline	12.96	4.42	- 17.29	-4.23	1.51
4-Chloroaniline	3.74	2.28	- 5.21	-2.04	1.27
2,4-dichloroaniline	6.64	6.01	- 7.23	-3.57	1.69
2,5-dichloroaniline	10.23	8.28	- 11.72	-4.12	1.61
2,6-dichloroaniline	21.13	11.54	- 26.71	-4.57	1.38
3,4-dichloroaniline	3.56	3.34	- 3.79	-2.77	1.90
3,5-dichloroaniline	7.86	2.32	- 11.88	-2.28	0.93
2,4,5-trichloroaniline	2.3	1.91	- 2.71	-1.52	1.39
2,4,6-trichloroaniline	6.63	5.2	- 8.04	-1.49	0.74
3,4,5-trichloroaniline	5.44	0.31	- 9.65	-1.66	0.76
2-Bromoaniline	19.23	16.08	- 21.7	-5.36	1.69
2,3-Dimethylaniline	91.61	61.32	- 125.91	-5.49	1.13
3,4-Dimethylaniline	10.87	4.17	- 13.78	-3.81	1.45

α :劑量反應關係曲線之截距

β :劑量反應關係曲線之斜率

表 2. 以 One-sample t test 分析之 NOEC

Chemicals	NOEC (mg/l)		EC10 (mg/l)		EC10 / NOEC	
	base on	base on	base on	base on	base on	base on
	DO	Biomass	DO	Biomass	DO	Biomass
3-chloroaniline	10.02	10.02	3.83	3.71	0.38	0.37
4-chloroaniline	2.68	0.89	0.49	0.84	0.18	0.94
2,4-dichloroaniline	5.09	3.05	2.05	2.18	0.40	0.71
2,5-dichloroaniline	4.99	2.99	3.61	3.18	0.72	1.06
2,6-dichloroaniline	15.99	7.99	8.29	5.39	0.52	0.67
3,4-dichloroaniline	2.49	0.99	0.81	1.32	0.33	1.33
3,5-dichloroaniline	9.75	0.98	2.55	1.03	0.26	1.05
2,4,5-trichloroaniline	1.86	0.56	0.51	0.59	0.27	1.05
2,4,6-trichloroaniline	2.99	0.89	0.86	1.85	0.29	2.08
3,4,5-trichloroaniline	2.02	0.87	0.25	0.46	0.12	0.53
2,3-dimethylaniline	38.92	24.35	16.71	17.37	0.43	0.71
3,4-dimethylaniline	4.76	4.76	0.98	2.95	0.21	0.62
2-bromoaniline	19.89	4.95	7.31	6.31	0.37	1.27

表 3. 以 Dunnett's test 分析之 NOEC 值

Chemicals	NOEC (mg/l)		EC10 (mg/l)		EC10 / NOEC	
	base on	base on	base on	base on	base on	base on
	DO	Biomass	DO	Biomass	DO	Biomass
3-chloroaniline	5.01	<5.01	3.83	3.71	0.76	-
4-chloroaniline	0.89	0.89	0.49	0.84	0.55	0.94
2,4-dichloroaniline	1.02	1.02	2.05	2.18	2.01	2.14
2,5-dichloroaniline	0.99	0.99	3.61	3.18	3.65	3.21
2,6-dichloroaniline	3.997	7.994	8.29	5.39	2.07	0.67
3,4-dichloroaniline	0.995	0.995	0.81	1.32	0.81	1.33
3,5-dichloroaniline	<0.975	0.975	2.55	1.03	>1	1.06
2,4,5-trichloroaniline	0.56	0.93	0.51	0.59	0.91	0.63
2,4,6-trichloroaniline	<0.29	0.89	0.86	1.85	>1	2.08
3,4,5-trichloroaniline	0.202	0.202	0.25	0.46	1.24	2.28
2,3-dimethylaniline	24.35	24.35	16.71	17.37	0.69	0.71
3,4-dimethylaniline	<1.36	1.36	0.98	2.95	-	2.17
2-bromoaniline	9.94	4.95	7.31	6.31	0.74	1.27

表 4. 兩種試驗終點之 cut-off value

Chemicals	data base on DO	data base on biomass
	cut-off	cut-off
3-chloroaniline	10.96	2.21
4-chloroaniline	16.88	17.64
2,4-dichloroaniline	7.89	7.18
2,5-dichloroaniline	5.84	4.34
2,6-dichloroaniline	6.23	9.00
3,4-dichloroaniline	7.45	10.21
3,5-dichloroaniline	7.44	6.98
2,4,5-trichloroaniline	16.71	14.88
2,4,6-trichloroaniline	3.14	7.04
3,4,5-trichloroaniline	6.19	9.44
2,3-dimethylaniline	11.05	7.24
3,4-dimethylaniline	6.39	5.49
2-bromoaniline	13.43	7.63
mean	9.20	8.41

表 5. 本研究之毒性數據與細菌、原生動物之毒性數據

Test Species	BOD Bottle test			
	(Raphidocelis)			
	DO	Biomass	Microtox ^b	Spirotox ^c
Chemicals				
	logEC ₅₀ ⁻¹	logEC ₅₀ ⁻¹	logEC ₅₀ ⁻¹	logEC ₅₀ ⁻¹
3-Chloroaniline	3.76	3.99	3.96	-
4-Chloroaniline	4.56	4.53	4.40	-
2,4-dichloroaniline	4.25	4.39	4.54	3.59
2,5-dichloroaniline	4.11	4.20	4.63	3.56
2,6-dichloroaniline	3.78	3.88	4.98	3.35
3,4-dichloroaniline	4.63	4.66	5.40	3.78
3,5-dichloroaniline	4.15	4.31	4.19	4.48
2,4,5-trichloroaniline	4.96	4.93	5.12	-
2,4,6-trichloroaniline	4.66	4.47	4.63	-
3,4,5-trichloroaniline	4.94	4.56	4.77	-
2-Bromoaniline	3.81	3.95	-	-
2,3-Dimethylaniline	3.22	3.12	-	-
3,4-Dimethylaniline	4.23	4.05	-	-
Phenol	3.56 ^a	3.61 ^a	3.42	-
2-Chlorophenol	3.8 ^a	3.91 ^a	3.58	-
4-Chlorophenol	3.77 ^a	3.92 ^a	4.19	-
2,3-Dichlorophenol	4.73 ^a	4.78 ^a	4.52	3.94
2,4-Dichlorophenol	4.61 ^a	4.63 ^a	4.47	3.98
2,4,6-Trichlorophenol	5.39 ^a	-	7.7	-

EC50 unit : mol/l

表 6. 本研究之毒性數據與次粒腺體、纖毛蟲、魚類之毒性數據

Test Species	BOD Bottle test				
	(Raphidocelis)		Tetrahymena	Pocelia	
	DO	Biomass	SMP assay ^b	Pyriformis ^c	Reticulata ^d
Chemicals					
	logEC ₅₀ ⁻¹	logEC ₅₀ ⁻¹	logEC ₅₀ ⁻¹	logIGC ₅₀ ⁻¹	logLC50 ⁻¹
3-Chloroaniline	3.76	3.99	3.13	3.09	3.98
4-Chloroaniline	4.56	4.53	3.15	4.36	3.69
2,4-dichloroaniline	4.25	4.39	4.00	3.56	4.41
2,5-dichloroaniline	4.11	4.20	4.04	3.58	4.99
2,6-dichloroaniline	3.78	3.88	4.13	3.33	-
3,4-dichloroaniline	4.63	4.66	4.76	4.14	4.41
3,5-dichloroaniline	4.15	4.31	-	-	-
2,4,5-trichloroaniline	4.96	4.93	5.13	4.30	5.00
2,4,6-trichloroaniline	4.66	4.47	4.64	4.01	-
3,4,5-trichloroaniline	4.94	4.56	5.10	4.51	-
2-Bromoaniline	3.81	3.95	-	-	-
2,3-Dimethylaniline	3.22	3.12	-	-	-
3,4-Dimethylaniline	4.23	4.05	2.94	-	-
Phenol	3.56 ^a	3.61 ^a	-	2.79	-
2-Chlorophenol	3.8 ^a	3.91 ^a	-	3.18	-
4-Chlorophenol	3.77 ^a	3.92 ^a	-	3.55	-
2,3-Dichlorophenol	4.73 ^a	4.78 ^a	-	4.27	-
2,4-Dichlorophenol	4.61 ^a	4.63 ^a	-	4.04	-
2,4,6-Trichlorophenol	5.39 ^a	-	-	-	-

EC50、IGC50 unit : mol/l

表 7. BOD bottle 毒性試驗與其他物種毒性試驗之關係

Test Species	Base ON DO		Base On Biomass	
	Regress equation	R ²	Regress equation	R ²
Microtox	Y = 0.41X + 2.43	0.56	Y = 0.49X + 2.13	0.47
Spirotox	Y = 0.36X + 2.93	0.15	Y = 0.38X + 2.95	0.21
SMP assay	Y = 0.35X + 2.96	0.43	Y = 0.27X + 3.28	0.43
T.pyriiformes	Y = 0.86X + 1.06	0.90	Y = 0.67X + 1.78	0.83

Y : BOD bottle test

X : other toxicity test

表 8. 苯胺類與氯酚類之 LogP, Elumo 值與兩種終點之毒性數據

Chemicals	molecular		Elumo (hartree)	Log (1/EC50)	
	weight	logP		Base On DO	Base On Biomass
3-Chloroaniline	127.57	1.88	-0.02161	3.76	3.99
4-Chloroaniline	127.57	1.83	-0.02212	4.56	4.53
2,4-dichloroaniline	162.02	2.78	-0.03511	4.25	4.39
2,5-dichloroaniline	162.02	2.75	-0.03221	4.11	4.20
2,6-dichloroaniline	162.02	2.2	-0.03042	3.78	3.88
3,4-dichloroaniline	162.02	2.69	-0.03148	4.63	4.66
3,5-dichloroaniline	162.02	2.9	-0.03196	4.15	4.31
2,4,5-trichloroaniline	196.46	3.45	-0.04164	4.96	4.93
2,4,6-trichloroaniline	196.46	3.69	-0.04112	4.66	4.47
3,4,5-trichloroaniline	196.46	3.32	-0.03996	4.94	4.56
2-Bromoaniline	172.03	2.11	-0.02275	3.81	3.95
2,3-Dimethylaniline	121.18	1.81	-0.00449	3.22	3.12
3,4-Dimethylaniline	121.18	1.86	-0.00469	4.23	4.05
Phenol	98.96	1.57	-0.01787	3.56	3.61
2-Chlorophenol	128.56	2.29	-0.02897	3.8	3.91
4-Chlorophenol	128.56	2.53	-0.03045	3.77	3.91
2,3-Dichlorophenol	163.01	3.26	-0.03603	4.73	4.78
2,4-Dichlorophenol	163.01	3.20	-0.04065	4.61	4.63
2,4,6-Trichlorophenol	197.45	3.67	-0.05172	5.39	-