

行政院環境保護署

105 年度土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案

結合生物毒性測試及環境代謝體學 進行高雄港底泥生態風險評估

期末報告(定 稿)

主 辦 單 位 :  行政院環境保護署
專案執行單位 : 國立高雄海洋科技大學／海洋環境工程系
專案主持人 : 陳秋紋 教授
專案執行期間 : 104 年 11 月 17 日起至
105 年 11 月 16 日止

中 華 民 國 105 年 12 月 印製

「105 年度土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案」

■修正計畫書 □期中報告

□期末報告

審查意見回覆對照表

計畫年度	105	專案類型	■ 研究專案 □ 模場試驗	
計畫主持人	陳秋紋	研究類別	□ 整治 ■ 評估 □ 預防 □ 自訂	
計畫名稱	結合生物毒性測試及環境代謝體學進行高雄港底泥生態風險評估			
專案連絡人	邱國勛	連絡專線	07-361-7141 轉 2315、3708	
政策性審查意見		計畫單位回覆		
1. 請依專案計畫書標準格式撰寫，勿刪除表單及格式，各項次說明或表格勿跨頁。 2. 部份文件（執行同意書、消耗性器材及主要費用）裝訂順序有誤。 3. 「消耗性器材」應將原說明欄位之敘述移至項目名稱欄位，請說明其欄位用途。 4. 「租賃費」說明欄位，請填寫採樣之起訖地點，另租賃車輛請於備註欄 補充說明單價計算方式。 5. 雜項費用：（1）欄位（二）之「保險費」請由行政管理費支出。（2）欄位（三）「郵電費」請更正為「郵資費」，國內外電話費不予以補註。（3）欄位（四）「電腦使用費」之光碟片不予以補助。（4）碳粉匣請依計畫使用覆實編列。 6. 差旅費請依據行政院 103 年 7 月 7 日公告之「國內出差旅費報支要點」編列。 7. 如編列參加成果發表會之相關費用，單據日期需於計畫執行期內，始得核銷。 8. 本計畫經費編列如有浮編不實之虞，期末檢具核銷審查未通過，將扣除該編列款項，不予以補助（或追繳）。		1. 修正計畫書將依據專案計畫書標準格式撰寫。 2. 修正計畫書會修正各項次文件裝訂次序。 3. 修正計畫書會將原說明欄位之敘述移至項目名稱欄位，並敘述其用途。 4. 修正計畫書修正採樣起訖地點及其補充計價方式。 5. 雜項費用將依據審查意見予以修正。 6. 差旅費編列將依據審查意見予以修正。 7. 核銷將依據相關規定辦理。 8. 本計畫經費編列及核銷以據實、合理之原則予以處理。		
技術性審查意見		計畫單位回覆		
委員 1				
1. 高雄港底泥除 PAHs 污染外，重金屬污染也是另一問題，重金屬之毒性也應納入考量。 2. 研究方法及步驟中應納入底泥重金屬		1. 感謝審查委員的意見，修正計畫書中已將重金屬之分析列入。 2&3. 在修正計畫書中將補充納入底泥及生物體重金屬之分析方法。		

「105 年度土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案」

☒修正計畫書 ☐期中報告

☐期末報告

審查意見回覆對照表

計畫年度	105	專案類型	☒ 研究專案 ☐ 模場試驗	
計畫主持人	陳秋紋	研究類別	☐ 整治 ☒ 評估 ☐ 預防 ☐ 自訂	
計畫名稱	結合生物毒性測試及環境代謝體學進行高雄港底泥生態風險評估			
專案連絡人	邱國勛	連絡專線	07-361-7141 轉 2315、3708	
(全量)之分析方法，及其生物有效性之評估。 3. 測試生物海水端足目之成體除代謝物萃取分析外，建議也能進行重金屬分析，以確認測試生物吸收累積重金屬的結果。				
委員 2				
1. 本研究結合傳統生物毒理反應及環境代謝體學，分析高雄港區內不同底泥對底棲生物的毒性生理影響，並同時分析底泥之重金屬及 PAHs，瞭解經由工業或人為活動之污染物對整體生物效應之評估，而提供底泥風險評估指標訂定上之依據。 2. 主持人在底泥及污染物的環境宿命研究及轉換機制之相關領域有不錯的研究成果與表現，研究成果豐碩，研究成果應可應用於底泥的風險評估及污染控制。此外，主持人具相當之底泥處理及研究經驗，可勝任本計畫之執行。 3. 本專案具應用性，對底泥未來政策擬定及污染整治工作之執行應有貢獻。		1-3.感謝委員對本研究計畫的肯定。		
委員 3				
1. 創新研究毒性測試方法。 2. 請說明研究流程與文獻之關聯性。 3. 文獻回顧與研究目的之關聯性多重，經濟效益。		1. 感謝委員對本研究計畫的肯定。 2. 修正計畫書中補充說明研究流程與文獻的關聯性。 3. 謝謝委員的肯定。		

「105 年度土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案」

☒修正計畫書 ☐期中報告

☐期末報告

審查意見回覆對照表

計畫年度	105	專案類型	☒ 研究專案 ☐ 模場試驗	
計畫主持人	陳秋紋	研究類別	☐ 整治 ☒ 評估 ☐ 預防 ☐ 自訂	
計畫名稱	結合生物毒性測試及環境代謝體學進行高雄港底泥生態風險評估			
專案連絡人	邱國勛	連絡專線	07-361-7141 轉 2315、3708	
委員 4				
1. 主持人對高雄港底泥污染物之特性與含量及其毒性測試有多年研究經驗與成果。 2. 本研究計畫為比較不同來源（五處）底泥污染物組成及生物體曝露在此底泥下不同時間之代謝體變化。 3. 建議加強不同底泥之毒性在高雄港之環境生態風險，以說明不同來源（民生、工業）如何影響這些底泥毒性。		1 & 2. 感謝委員的肯定。 3. 感謝委員的建議，將依據結果會依據不同陸地來源之污染源對底泥毒性並對生物體之影響的結果予以加強討論。		
委員 5				
1. 依計畫書所述，本計畫著重採樣分析，對未來分析結果的解讀的說明較少。 2. 研究項目 7 “光譜比對與指認”的擬研究項目與目標可能過廣，建議更具體說明。 3. 本計畫的具體目標與擬說明（或闡述）的標的並不具體。 4. “毒性測試平台”為何？ 5. 耗材費編列過高。		1. 已於修正計畫書中補充說明分析結果的解讀。 2. 已於修正計畫書中補充說明光譜比對與指認。 3. 已於修正計畫書中補充研究的具體目標。 4. 即以端足類為研究物種，除了一般對其活存率等的表觀影響外，並利用代謝體學方法測試底泥對生物體的生理代謝路徑之反應，以毒性測試平台概括統稱。 5. 經過修訂，依據核定金額將耗材費予以修正。		
綜合性審查意見		計畫單位回覆		
原則同意所送計畫，請依審查意見提送修正計畫書。		已依據各委員之意見予以回覆並修正於修正計畫書中。		

行政院環境保護署「土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案」

☐申請計畫書 ☒期中報告

☐修正計畫書 ☐期末報告

審查意見回覆對照表

計畫年度	105 年度	計畫類型	☒ 研究計畫 ☐ 模場試驗
計畫類別	☐ 整治 ☐ 預防 ☒ 評估 ☐ 自訂	主持人：陳秋姣 NO：11	
計畫名稱	結合生物毒性測試及環境代謝體學進行高雄港底泥生態風險評估		
委員審查意見		計畫單位回覆	
委員一 - 已完成預定之工作項目和目標。 - 全底泥生物毒性測試之結果應和底泥污染物之生物有效性有關，而非底泥污染物全量，所以底泥污染物之生物有效性應納入考量。 - 鋁為微量元素，並非重金屬，請修正。 - 代謝組體分析結果顯示測試之五種底泥可分為兩組，其造成之原因(例如:特定污染物)應加以解釋。		Reply to 委員一： - 謝謝委員肯定。 - 謝謝委員指正，因為本研究一開始設定想看底泥污染量與生物代謝體反應，也因為生物樣本取得的季節性，所以沒有針對生物有效性去進行詳細實驗，在本計畫的後續工作將會納入端足類的生物有效性實驗。 - 在修訂後之結果中予以刪除。 - 在修訂之結果討論中予以討論。	
委員二 - 本計畫針對五個樣點進行包括物化分析、重金屬及PAH等分析。顯示底泥的粒徑較大，屬於沙質，而重金屬和PAH等污染物均為較低，其餘樣點並無一致的污染物趨勢。 - 計畫結果表明核磁共振的代謝組學研究方法可用於鑑定被污染物污染的生物體反應的有效方法，且能篩選出可能的代謝物生物標記。 - 後續需說明結論論點之代表性，並針對結論對生態風險程序和政策之影響進行說明。 - 主要成果符合計畫書之內容，目前進度並無落後情形。		Reply to 委員二： 1&2. 謝謝委員的肯定。 - 謝謝委員指導，目前利用分子生物工具在環境的風險評估常會落入不容易直接建立分子層面和環境毒物間的相關性及解釋，所以在後續工作我們預計針對不同重金屬或毒物來一步步釐清毒物和生理反應的生物標記間的表達。 - 謝謝委員肯定。 - 在實驗方法中將補充 QA/QC 的程序。	

行政院環境保護署「土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案」

☐申請計畫書 ☒期中報告

☐修正計畫書 ☐期末報告

審查意見回覆對照表

計畫年度	105 年度	計畫類型	☒ 研究計畫 ☐ 模場試驗
計畫類別	☐ 整治 ☐ 預防 ☒ 評估 ☐ 自訂	主持人：陳秋姣 NO：11	
計畫名稱	結合生物毒性測試及環境代謝體學進行高雄港底泥生態風險評估		
5. 可說明本方法之QA/QC程序。 委員三 1. 底泥中有機污染物的濃度分析呈現一致性的分佈，且濃度也都在顯著範圍，LR點均出現較高濃度，然而以重金屬做為生物毒毒性測試實在難以分別出個別污染物的影響，是否能以一組對照組排除其他污染物來比較其生物毒性，同時也能對環境代謝的影響可有較具體的結果呈現。 2. 後續工作？ 委員四 1. 已依計畫進度及項目確實執行。 2. 已完成初步結論及自評分析，應可達成研究目標。 3. 請補充審查意見回覆對照表及後續工作說明。 委員五 1. 執行現況、流程及方法已說明。 2. 計畫後續執行工作項目未具體說明。		Reply to 委員三： 1&2. 謝謝委員對數據的闡釋，在後續工作中將進行重金屬或有機污染物對生物有效性及代謝體學研究，預期以端足類為模式，朝向建立如蚯蚓當成土壤指標生物的生物標記數據庫為目標。 Reply to 委員四： 1-3. 謝謝委員肯定。將依據意見修訂並在修正計畫書中補充後續工作說明。 Reply to 委員五： 1. 謝謝委員肯定。	

行政院環境保護署「土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案」

☐申請計畫書 ☒期中報告

☐修正計畫書 ☐期末報告

審查意見回覆對照表

計畫年度	105 年度	計畫類型	☒ 研究計畫 ☐ 模場試驗
計畫類別	☐ 整治 ☐ 預防 ☒ 評估 ☐ 自訂	主持人：陳秋姣 NO：11	
計畫名稱	結合生物毒性測試及環境代謝體學進行高雄港底泥生態風險評估		
3. 計畫執行進度與預定進度相符，本計畫至期中報告時執行進度並無落後。	2. 在修訂計畫書中予以補充說明。 3-6. 謝謝委員肯定，於後續工作中的成果將有助於建立環境與分子生物標記的關係，預期以端足類為模式，朝向建立如蚯蚓當成土壤指標生物的生物標記數據庫為目標。 7. 感謝委員指導，有待於後續工作的補足，針對此工具進行更具體的應用與討論。		
4. 已有初步成果，初步成果與原計畫目標符合。			
5. 至期中報告時，整體研究成果符合預期。			
6. 已有初步研究成果，且已有初步討論。但對於成果的實務應用與潛在應用性仍待於期末報告時有更進一步的討論。			
7. 研究內容與計畫目的相符，但研究成果的實務應用性仍待期末時具體討論（例如：“...將...複雜的因子簡化...”等的合理性與適合情境（例如：必要條件...等）（或是所有條件均一體適用...等），建議討論）。			
環保署審查意見		計畫單位回覆	
1. 請檢附審查意見回覆對照表。		1.依據各委員之問題，逐項回覆。	
2. 專案基本資料表請填寫填表日期。		2.修正計畫書中會將日期補正。	
3. 請增加後續工作說明。		3.在修訂計畫書中或增加後續工作說明	

行政院環境保護署「土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案」

☐申請計畫書 ☐期中報告

☐修正計畫書 ☒期末報告

審查意見回覆對照表

計畫年度	105 年度	計畫類型	☒ 研究計畫 ☐ 模場試驗
計畫類別	☐ 整治 ☐ 預防 ☒ 評估 ☐ 自訂	主持人：陳秋姣 NO：11	
計畫名稱	結合生物毒性測試及環境代謝體學進行高雄港底泥生態風險評估		
委員審查意見		計畫單位回覆	
委員一 1. 建議可以補充說明生物標記物種的背景資料，如：目標物種的種名、國內外對於此物種已做過的相關研究內容、以及實驗中物種的來源等。 2. 建議可以補充馴養條件、物種數目，實驗操作背景等，以及其他試驗中可能會影響其目標物種生長之相關參數變化，如：溫度、pH、氨濃度變化等其他潛在會影響受測物種生長的因子。 3. 計畫中有提及底泥中所測得的有機化合物結果，建議可以多闡述其與扁足類之關係，是否確會影響試驗之扁足類的生長狀況。 4. 結果未見生態風險評估之部分。		Reply to 委員一： 1. 謝謝委員建議，詳細生物標記物種的背景資料已補充於第五小節，端足類模式平台一重金屬銅毒性分析結果中。 2. 謝謝委員建議，詳細馴養條件、物種數目，實驗操作背景已於第五小節，端足類模式平台一重金屬銅毒性分析結果中補充。 3. 謝謝委員建議。多環芳香烴(PAHs)污染物普遍存在於底泥中，具潛在的致癌、變異及生物毒性。美國環保署已將十六種 PAHs 列為首要污染物(priority pollutants)，以決定底泥品質，監控底泥污染物之特定濃度對水域生命的急毒性或慢毒性風險。對於端足類生長的影響，文獻上並無著墨太多，大多是後續生物累積上產生的後果，如大型消費者（魚類）身上的病理效應，承蒙委員建議，也許未來可以在試驗中確立有機污染物對於端足類生理生長上的分子毒性反應與病理反應。 4. 謝謝委員指正，已將生態風險評估之部分於結論與建議中討論。	

行政院環境保護署「土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案」

☐申請計畫書 ☐期中報告

☐修正計畫書 ☒期末報告

審查意見回覆對照表

計畫年度	105 年度	計畫類型	研究計畫 模場試驗
計畫類別	整治 預防 評估 自訂	主持人：陳秋姣 NO：11	
計畫名稱	結合生物毒性測試及環境代謝體學進行高雄港底泥生態風險評估		
委員二 1. 本研究針對五個樣點進行包括物化分析、重金屬及 PAH 等分析。應用環境代謝組學的方法，來研究海洋端足類 <i>Hyalella azteca</i> 的暴露在不同環境因素下，其影響的生理和代謝途徑。 2. 請說明如何利用本研究的成果進行底泥的管理以及政策的擬定。 3. 請說明本研究成果的主要貢獻以及成果的外溢性和應用性。 委員三 1. 請補充歷次審查意見及回覆辦理情形，以確認計畫修正或承諾事項之達成度。 2. 請補充相關文獻蒐集及彙整成果於期末報告中，並與試驗分析結果相互探討生物毒性之機理，以供未來生態評估之參考。 3. 本計畫測試完成生物毒性試驗後，有關生態風險評估部分，似未多加著墨，具體而言，高雄港底泥分析之生態評估結果，應有相關闡述。 4. 建議將不同來源底泥之代謝路徑予以推估，以供未來相關環境代謝領域之參考。		Reply to 委員二： 1. 謝謝委員肯定。 2. 謝謝委員指正，已將底泥的管理以及政策的擬定於結論與建議中說明。 3. 謝謝委員指正，已將主要貢獻以及成果的外溢性和應用性之部分於結論與建議中討論。 Reply to 委員三： 1. 謝謝委員提醒，期中審查意見回覆已於報告書中呈現。 2. 謝謝委員指正，已將生態風險評估之部分於結論與建議中討論。 3. 謝謝委員指正，已將生態風險評估之部分於結論與建議中討論。 4. 謝謝委員指正，因為個底泥所造成的代謝物繁多，所以先利用PLS-DA將底泥所影響的代謝物予以看是否能夠分群，再將造成分群的代謝物選擇出來，所以參考點E1有差異之代謝物生物標記進行MetaboAnalyst路徑分析，在JR及SR篩選出的生物標記與aminoacyl-tRNA biosynthesis 和 valine, leucine and isoleucine biosynthesis最有關，而CR則為pantothenate and CoA biosynthesis。已在結果補充。	

行政院環境保護署「土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案」

☐申請計畫書 ☐期中報告

☐修正計畫書 ☒期末報告

審查意見回覆對照表

計畫年度	105 年度	計畫類型	☒ 研究計畫 ☐ 模場試驗
計畫類別	☐ 整治 ☐ 預防 ☒ 評估 ☐ 自訂	主持人：陳秋姣 NO：11	
計畫名稱	結合生物毒性測試及環境代謝體學進行高雄港底泥生態風險評估		
環保署審查意見		計畫單位回覆	
委員四 1. 應提供期中審查意見回覆以符合期末報告之要求。 2. 篩選重金屬銅做生物毒性之確切依據應於報稿中闡述，一般銅的生物毒性並不明顯，且生物毒性宜以有機污染物或其他重金屬如汞鎘鉻為標的物，而本研究分析之底泥中鉻濃度顯著，為何不採用？ 3. 本研究為毒物之代謝研究，以海水端足類代謝分析但文中表4.5以蚯蚓微生物指標的文獻整理與本研究的關聯與應用目的？請說明。		Reply to 委員四： 1. 謝謝委員提醒，期中審查意見回覆已於報告書中呈現。 2. 謝謝的委員建議。的確，依照本研究分析的結果，高雄港底泥中鉻濃度較為顯著，但更顯著且超過法定上限值的重金屬為汞、銅與鋅，三者中又以銅是以生物慢毒性產生為主，具有長期累積效應，不具有立即性的生物毒性，因而在實驗上以銅做為首要監測標的。除此之外，其他包含在法定下限值之上的重金屬，仍舊是列為必要生物指標追蹤範圍，只有優先順序之別。 3. 謝謝委員指正，有關採取銅做為優先分析之理由，已在修正過的期末報告之結論與建議中進一步討論。一般而言，能夠引起存活等急毒性效應的底泥樣品，僅有少部份足以達到，以台灣截至目前為止與本研究中的評估，高雄港的污染程度僅列於中低污染等級，因而當評估中低污染等級底泥生物效應時，較佳評估方式是以生物完整生命周期的慢毒性試驗做為工具。以陸地上為例，採取蚯蚓作為底泥的管理以及政策的擬定之參考依據，其因在於蚯蚓生活於土壤中，進食過程中已知會吸收土壤重金屬、有機污染物或農藥等其他污染，是極佳的土壤環境指標動物。研究也顯示某些蚯蚓對於重金屬的耐受性高，所累積的含量遠遠超過周圍環境的	

行政院環境保護署「土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案」

☐申請計畫書 ☐期中報告

☐修正計畫書 ☒期末報告

審查意見回覆對照表

計畫年度	105 年度	計畫類型	☒ 研究計畫 ☐ 模場試驗
計畫類別	☐ 整治 ☐ 預防 ☒ 評估 ☐ 自訂	主持人：陳秋姣 NO：11	
計畫名稱	結合生物毒性測試及環境代謝體學進行高雄港底泥生態風險評估		
		千百倍，並且能反映其所吸收的重金屬含量，產生相對應的組織或器官病變，非常適合作為田間調查的重金屬濃度監測生物及慢毒性試驗工具，除了降低機器偵測的費用與時間外，更是許多生物的食物來源，在污染物的生物累積效應，有長足的貢獻，對於陸上生態風險評估相當有幫助。然而在海洋或半鹹水水域中，大家採用的生物指標尚未有一統一的方式。目前世界各國通用於在水域中底泥慢毒性檢測之物種中，以完整生命週期作為毒性試驗工具的生物包括端足類動物(Amphipods)、多毛類(Polychaetes)、寡毛類(Oligochaetes)等物種，測試項目主要包括存活、生長發育、繁殖或生物累積效應，但對應污染物造成的生理指標卻不如蚯蚓相對於土壤染污染物的生理指標詳細（如表 4.5 中提及，蚯蚓針對重金屬或有機污染物產生的蛋白質表現之生物指標反應），因而本研究建論與建議中提及蚯蚓微生物指標的文獻整理，目的是藉由本研究分析的結果，進一步導入蚯蚓微生物生理指標反應的概念，期許海水或半鹹水中的端足類也可效法土壤污染環境監控科學，除了監控底泥及端足類的污染物累積量，於未來政策上應鼓勵建立端足類生物於對應不同重金屬或有機物污染之生理反應指標（如蛋白質表現與代謝產物差異），有效監測生物即時生理反應，反映即時的生態危機/風險，從污染物	

行政院環境保護署「土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案」

☐申請計畫書 ☐期中報告

☐修正計畫書 ☒期末報告

審查意見回覆對照表

計畫年度	105 年度	計畫類型	■ 研究計畫 □ 模場試驗
計畫類別	□ 整治 □ 預防 ■ 評估 □ 自訂	主持人：陳秋姣 NO：11	
計畫名稱	結合生物毒性測試及環境代謝體學進行高雄港底泥生態風險評估		
4. 如何排除實驗過程因生物死亡造成之水中氮及其他污染物造成之影響。		濃度的監控，提升至真正生物生理生態的監控。 4. 謝謝委員詢問，詳細排除之建議方法已在修正過的期末報告之結論與建議中進一步討論。的確，水體中氮濃度的減低與控制也需考慮，以降低氮中毒致死的可能性，採用的水中總氮濃度標準為32 mg/L以下，非離子態的氮濃度為1 mg/L 以下，這是根據Hindarti等人所提出的報告所設，在實驗中氮與其他的污染物的移除，最好的方法是直接更換水體即可有效移除。但在底泥測試上較不適當，因此為移除氮與其他的污染物的影響，以氮為例子，可採取(1)增設水中遮蔽躲藏設施供給端足類躲藏，避免殘食行為造成死亡，增加水中氮濃度；(2)在同一水體中，對端族類個體進行隔離飼養與試驗，避免殘食行為造成死亡，增加水中氮濃度；(3)控制飼料餵食量或提供活體海水絲藻作為食物來源降低，食物腐敗產生氮濃度過高；(4)每日監控試驗水體各項水質指標，如pH、鹽度、溫度…等，避免有害非離子態氮濃度的提升；(5)考慮到初步試驗結果顯示，14天試驗處理即可獲得試驗結果，降低試驗天數以減少時間增長可能產生的氮濃度上升之影響，例如Dr. BAT等人的研究成果，重金屬處理時間採用如表4.10所示，依照不同重金屬種類，處理的時間從48h至7天為限。	

行政院環境保護署「土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案」

☐申請計畫書 ☐期中報告

☐修正計畫書 ☒期末報告

審查意見回覆對照表

計畫年度	105 年度	計畫類型	☒ 研究計畫 ☐ 模場試驗
計畫類別	☐ 整治 ☐ 預防 ☒ 評估 ☐ 自訂	主持人：陳秋姣 NO：11	
計畫名稱	結合生物毒性測試及環境代謝體學進行高雄港底泥生態風險評估		
5. 請提出以海洋端足類做微生物指標之具體方法。	5. 謝謝委員指正，已將海洋端足類做微生物指標之具體方法於結論與建議中討論。		
委員五	Reply to 委員五：		
1. 執行現況、流程及方法說明具體。	1. 謝謝委員肯定。		
2. 計畫執行進度與預定進度相符。	2. 謝謝委員肯定。		
3. 整體研究成果符合預期。	3. 謝謝委員肯定。		
4. 根據研究內容所提出之討論與建議合理，但部分成果的解讀與應用條件建議進一步討論(如5.5節的建議(p.63)不易理解)。	4. 謝謝委員肯定，成果的解讀與應用條件已在修正過的期末報告之結論與建議中進一步討論。		
5. 研究內容與計畫目的相符。	5. 謝謝委員肯定。		
6. 研究成果具體：以論文發表為主。	6. 謝謝委員建議，本研究分析尚需完成其他重金屬與有機污染物於生物毒性及生物累積效應的分析，完成後預計未來投稿於國際環境污染領域之高水準期刊。		
7. 研究成果的說明建議具體討論(如p. 58的說明)，實際水體會同時有多重污染物或其他物質干擾(如p.61所示)，此類實際存在的實場現象如何影響本研究結果的解讀？建議討論。	7. 謝謝委員建議，有關實際存在的實場現象如何影響本研究的討論已在修正過的第五節，端足類模式平台－重金屬銅毒性分析結果末段進行論述。		
8. 本技術的應用限制條件(如p.58~61的結果仍待進一步的說明)或是適用條件？建議說明討論。	8. 謝謝委員指正，本研究的應用限制範圍已於修正過後的結論與建議中說明。		
9. 結論與建議一節(p. 63)，宜說明如何應用本研究的成果(本計畫已有具體的研究成果，但是土污基金模場計畫應是以應用性為主，本研究的成果如何應用？應用的條件為何？…等等，建議說明)。	9. 謝謝委員指正，本研究的應用已於修正過後的結論與建議中說明。		

專案基本資料表

專案性質		☒ 實驗性質 ☐ 非實驗性質		專案類別(單選)		☒ 研究專案 ☐ 模場試驗	
研究主題		☐ 整治 ☐ 預防 ☒ 評估 ☐ 自訂					
申請機構系所		國立高雄海洋科技大學 海洋環境工程學系					
機構地址		高雄市楠梓區海專路 142 號					
計畫主持人		陳秋紋		職等／職稱		教授	
協同主持人		邱國勛		職等／職稱		副教授	
專案名稱	中文	結合生物毒性測試及環境代謝體學進行高雄港底泥生態風險評估					
	英文	Integration of Biototoxicity Test and Environmrntal Metabolomics for Ecological Risk Assessment of Kaohsiung Harbor Sediments					
	關鍵字	Biototoxicity; Environmental Metabolomics; Sediment; Kaohsiung harbor					
執行期程		☒ 1 年期 ☐ 2 年期（第____年） ☐ 3 年期（第____年） 自民國 104 年 11 月 17 日起 至民國 105 年 11 月 16 日止					
計畫主持人		姓名：陳秋紋		E-mail：cwchen@mail.nkmu.edu.tw		專線：07-3617141 # 3761 手機：0933301482	
專任助理		姓名：		Email：		專線： 手機：	
經費分析總表		專 案 預 估 經 費		金 額		編列說明	
		1.	人事費用	216,000		(1~5 項相加之 50%為限)	
		2.	貴重儀器使用含維護費	51,000		(與計畫實驗相關)	
		3.	消耗性器材與主要費用	660,000		(與計畫主體相關)	
		4.	其它研究相關費用	69,600		(差旅與租賃費用)	
		5.	雜支費用	39,764		(1~6 項相加之 5%為限)	
		6.	行政管理費	103,636		(1~5 項相加之 10%為限)	
		專案計畫申請總金額		1,140,000		(多年期計畫請列全程經費)	

專案主持人(簽名及蓋章): _____

日期： 105.12.15

行政院環境保護署土壤及地下水污染整治基金管理會
土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案
105 年度專案成果績效自評表

一、專案基本資料

填表日期：105 年 12 月 15 日

專案性質	☒ 實驗性質 ☐ 非實驗性質	專案類別	☒ 研究專案 ☐ 模場試驗
研究主題	☐ 整治 ☒ 評估 ☐ 預防 ☐ 自訂		
申請機構系所	國立高雄海洋科技大學 海洋環境工程學系	計畫主持人	陳秋紋
專案名稱	結合生物毒性測試及環境代謝體學進行高雄港底泥生態風險評估		
專案執行期程	☒ 1 年期 ☐ 2 年期 ☐ 3 年期	查核點	☐ 申請 ☐ 期中 ☒ 期末

二、成果績效自評

「計畫總預估數」應與計畫審查核定值相符，請執行單位依實際達成之量化成果填寫於「結案達成數」欄位中。

(一) 學術面

項目			目標達成程度		申請 預估數	期中 達成數	期末 達成數	結案 達成率	備註 (說明未達成原因或學術 產出發表日期、發表處、發 表名稱、影響指數等)
A 學術產出及活動	1.國內投稿 (篇數)	(1)論文	1		1	100			
		(2)研討會論文	2	2	100	1.2016 臺灣水產年會 2.第九屆地下水資源及水質保護研 討會暨 2016 海峽兩岸地下水與水 文地質應用研討會			
	2.國外投稿 (篇數)	(1)期刊論文	2		2	100	1.Marine Pollution Bulletin special issue (submitted) 2.Environmental Science and Pollution Research (submitted)		
		(2)研討會論文	2	1	1	100	1. 8 th International Conference on Marine Pollution and Ecotoxicology 2. CESE-2016		
	3.報告 (篇數)	(1)技術報告							
		(2)研究報告	1		1	100			
	4.專著 (本數)								
	5.辦理學術 會議(場數)	(1)研討/說明會							
		(2)成果發表會							
		(3)論壇							
6.研發改良 技術(項數)	(1)已開發技術								
	(2)技術平台								
B 人才培育	7.研發人員 (人數)	(1)碩士	2	2		100			
		(2)博士							
	8.研究團隊 (個數)	(1)跨領域團隊							
		(2)跨機構團隊	1	1		100			
		(3)形成研究中心	1	1		100			
		(4)形成實驗室							
9.其他指標 (請自行命名)		(請自填)							

(二) 產業面

項目 \ 目標達成程度				申請 預估數	期中 達成數	期末 達成數	結案 達成率	備註 (說明未達成原因或專利、 技術轉移相關詳細資料)
A 智慧財產權	1.專利 (件數)	已核准	發明					
			新型/設計					
			合計					
		申請中	發明					
			新型/設計					
			合計					
B 研發技術轉移	2.先期技術 成果移轉	件數						
		授權金(仟元)						
		衍生利益金(仟元)						
	3.技術移轉 (專利)	件數						
		授權金(仟元)						
		衍生利益金(仟元)						
	4.技術移轉 (應用技術)	件數						
		授權金(仟元)						
		衍生利益金(仟元)						
	5.可移轉 產業技術	(1)技術(件數)						
		(2)品種/系(件數)						
C 產學研合作	6.促成合作 研究	件數						
		金額(仟元)						
	7.促成投資	件數						
		投資金額(仟元)						
	8.促成取得 業界科專	件數						
		業界投資金額(仟元)						
9.其他指標 (請自行命名)		(請自填)						

(三) 政策面

項目 \ 目標達成程度			申請預估數	期中達成數	期末達成數	結案達成率	備註 (說明未達成原因或其他詳細資料)
A 服務 便民	1.技術服務	次數					
		收入(仟元)					
	2.諮詢服務	次數					
		收入(仟元)					
B 支 援 合 作	3.協助政府制定 (件數)	(1)政策					
		(2)法規					
		(3)規範					
		(4)標準					
D 社 會 效 益	4.獲得認證(件數)						
	5.獲得獎項(件數)						
	6.提升能源效率(%)						
	7.節能減碳效率(%)						
8.其他指標 (請自行命名)		(請自填)					

三、請依學術成就、技術創新、經濟效益、社會影響等方面，評估研究成果對現況或本署之學術或應用價值。（簡述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性，500字為限）

本計畫「結合生物毒性測試及環境代謝體學進行高雄港底泥生態風險評估」期中成果，利用高雄港底泥毒性試驗提供底泥整體對海水底棲端足類的急性毒性衝擊，提供了表觀直接的活存率證據。且利用代謝體學方法和生物標記的篩選，建立一個以代謝體學來篩選生物暴露環境因子的生物標記篩選平台。對未來進行環境毒物的測試和生物標記的建立有一個平台概念可供參考和測試。

中文摘要

陸源性受污染的水源進入到港區，使得水域中的底泥成為污染物長期累積的儲存庫，因此底泥在生態環境中化學物質的水地化循環中扮演重要的角色。而高雄港上游河流的廢水每天大量地將污染物輸進高雄港。為了研究高雄港底泥的生態風險，我們應用環境代謝組學的方法，來研究海洋端足類 *Hyaella azteca* 的暴露在不同環境因素下，其影響的生理和代謝途徑。從不同位置收集到高雄港的底泥，包括愛河(LR)，第五船渠(CR)，前鎮河(JR)，以及鹽水溪(SR)四河的流入口。這些河流流經高度的民生活動和工業區域。另外，高雄港 1 號入港口(E1)作為一個參考測站。我們分別針對五個樣點進行包括物化分析、重金屬及 PAH 等分析。顯示 E1 底泥的粒徑較大，屬於沙質，而重金屬和 PAH 等污染物均為較低，其餘樣點並無一致的污染物趨勢。成熟雌性端足類暴露在不同的底泥 10 日後，以核磁共振光譜學和多變量統計進行其生物體的代謝組學分析。偏最小二乘判別分析(PLS-DA)的結果顯示端足類萃取物顯著地分成 2 組：(HE, LR, CR)和(JR, SR)，再將 VIP>0.9 及 ROC curve 的 AUC>0.9 的代謝物，共有 homocystine, isocaproate, levulinate, methylmalonate, methylsuccinate, N-acetylglutamate, oxalacetate, pimelate, proline, suberate, theophylline, threonine, trimethylamine N-oxide, tryptophan, valerate, valine, valproate 等代謝物為可能的生物標記。結果表明，核磁共振的代謝組學研究方法可用於鑑定被污染物污染的生物體反應的有效方法，且能篩選出可能的代謝物生物標記。本計畫同時亦利用此平台，以銅對端足類測試其毒性，以及尋找其影響的代謝物，發現端足類暴露於高濃度的銅離子環境下，valine 及 isocaproate 很顯著地表現，顯現未來將可陸續依此平台來進行不同單一或多種重金屬影響下的代謝反應，開發可當檢測的生物標記。

Abstract

Aquatic sediment is a long-term sink of all pollutants, therefore it has played an important role in the biogeochemical cycle of chemical species in the ecological environment. Inflow of waste water from upstream rivers bring large flux of pollutants entering the Kaohsiung Harbor daily. In order to reveal the ecological risk of Kaohsiung Harbor sediments, we have applied an ecological metabolomic approach to investigate environmental factors pertinent to physiological and metabolic pathways of a marine amphipod *Hyaella azteca*, at the molecular levels, after exposure to sediments collected from different location in the Kaohsiung Harbor including the stream inlet of four rivers of Love River (LR), Canon River (CR), Jen-Gen River (JR), and Salt River (SR). These rivers are flowing through region of high human and industry activities. Additional, an harbor entrance 1 (E1) was selected as a reference site. We analysed the sediment particle sizes, heavy metals and PAHs. In E1, the particle size was the largest belonging to sand, and the heavy metals and PAHs were the lowest in the sampling sites. In addition, there was no consistent trend of pollutant concentrations in the other sampling sites. Adult female *Hyaella azteca* was exposed to different sediments in seawater. After 10-day exposure, the metabolomic analysis of *Hyaella azteca* was carried out using ^1H NMR spectroscopy and multivariate statistical analyses. Results of partial least square discriminant analysis (PLS-DA) revealed significant separation between extracts of *Hyaella azteca* as 2 groups: (E1, LR, CR), and (JR, SR). Metabolites whose VIP scores and AUC >0.9 were homocystine, isocaproate, levulinate, methylmalonate, methylsuccinate, N-acetylglutamate, oxalacetate, pimelate, proline, suberate, theophylline, threonine, trimethylamine N-oxide, tryptophan, valerate, valine, valproate. Results demonstrated that NMR-based metabolomics can be an efficient method for characterizing metabolic responses related to heavy metal contamination derived from polluted area, for discovery of metabolite biomarkers exposed to whole sediment test. We also used this platform to perform on toxicity test of copper on the amphipod and the effects on metabolites changes. The future work will be continued to discover the metabolite biomarkers related to different single or multiple heavy metal influences.

目次

圖次

表次

一、 前言.....	1
二、 研究目的.....	10
三、 研究方法與過程.....	11
四、 結果與討論.....	20
五、 結論與建議.....	64
六、 參考文獻.....	76

圖次

圖 1.1	高雄港底泥採樣點.....	2
圖 1.2	高雄港 20 個樣點底泥之 m-ERM-q.....	3
圖 1.3	近年來代謝體及環境代謝體學文獻發表數量統計.....	5
圖 1.4	Targeted vs untargeted 代謝體學.....	6
圖 3.1	本研究高雄港底泥採樣點分佈.....	11
圖 3.2	端足類於燒杯中進行底泥毒性測試.....	15
圖 3.3	代謝體學生物標記尋找策略.....	18
圖 4.1	底泥粒徑組成百分比分佈圖.....	23
圖 4.2	底泥含水量分佈圖.....	23
圖 4.3	底泥有機質分佈圖.....	24
圖 4.4	底泥重金屬汞分佈圖.....	24
圖 4.5	底泥重金屬鉛分佈圖.....	25
圖 4.6	底泥重金屬鎘分佈圖.....	25
圖 4.7	底泥重金屬鉻分佈圖.....	26
圖 4.8	底泥重金屬銅分佈圖.....	26
圖 4.9	底泥重金屬鋅分佈圖.....	27
圖 4.10	底泥重金屬鎳分佈圖.....	27
圖 4.11	底泥重金屬錳分佈圖.....	28
圖 4.12	底泥 LPAH 分佈圖.....	31
圖 4.13	底泥 HPAH 分佈圖.....	31
圖 4.14	底泥 Σ PAH 分佈圖.....	32
圖 4.15	底泥 LPAH/HPAH 分佈圖.....	32
圖 4.16	底泥 Σ PAE 分佈圖.....	35

圖 4.17	底泥 Diethyl Phthalate (DEP)分佈圖.....	35
圖 4.18	底泥 Di-n-butyl Phthalate (DnBP)分佈圖.....	36
圖 4.19	底泥 Benzyl Butyl Phthalate (BBP)分佈圖.....	36
圖 4.20	底泥 Di-(2-ethyl hexyl) phthalate (DEHP)分佈圖....	37
圖 4.21	底泥 4-nonylphenol (NP)分佈圖.....	39
圖 4.22	底泥 4-t-octylphenol (OP)分佈圖.....	39
圖 4.23	端足類暴露於不同底泥下 10 天後之存活率.....	40
圖 4.24	端足類代謝物 ^1H NMR 光譜.....	41
圖 4.25	端足類代謝物 PLS-DA 分析.....	42
圖 4.26	生物標記在 E1 vs LR 的 ROC 曲線及 AUC 面積.....	45
圖 4.27	生物標記在 E1 vs CR 的 ROC 曲線及 AUC 面積.....	46
圖 4.28	生物標記在 E1 vs JR 的 ROC 曲線及 AUC 面積.....	47
圖 4.29	生物標記在 E1 vs SR 的 ROC 曲線及 AUC 面積.....	48
圖 4.30	被吸收到 <i>Gammarus locusta</i> 體內中腸腺的重金屬銅...	61
圖 5.1	人造遮蔽物的設計範例.....	69

表次

表 4.1	底泥之物理特性及重金屬分析結果.....	22
表 4.2	底泥 PAH 分析結果.....	30
表 4.3	底泥 PAE 及 AP 分析結果.....	34
表 4.4	代謝物生物標記的 VIP score 及各樣點的 AOU.....	43
表 4.5	其他文獻蚯蚓暴露於化學物質表現的生物標記.....	51
表 4.6	扁跳蝦於不同重金屬銅濃度處理下的總存活率.....	58
表 4.7	扁跳蝦於不同重金屬銅濃度處理下的因殘食造成的死亡率.....	58
表 4.8	扁跳蝦於不同重金屬銅濃度處理下的非因殘食造成的死亡.....	60
表 5.1	端足類暴露於不同氨濃度水體中之 96 小時死亡率.....	70
表 5.2	其他文獻端足類暴露於不同重金屬之毒性試驗.....	71
表 5.3	在不同溫度條件下，端足類對重金屬銅、鋅與鉛的半致死濃度 變化.....	73
表 5.4	端足類暴露於重金屬鎘的 96 小時半致死濃度.....	73
表 5.5	端足類生物指標平台應測定的參考項目表.....	74

一、前言

1. 高雄港底泥的特性

底泥之污染物的含量超過底泥品質標準時，這些化學物質可能會影響生態或生物體，即被視為污染底泥(contaminated sediment)。通常污染物進入水體系統中，大多數被吸附於懸浮顆粒上而後沈降，故底泥可為表水污染物長久累積的儲存庫。因此，當底泥與水體平衡態變動時，沈降於底泥的污染物，會再度被釋回水體，而可能造成污染物重新累積於水域生物體內。為釐清化學物質與生物反應之相關性，以全底泥生物毒性測試的研究，來評估底泥中污染物質對底棲生物的危害，以提供潛在毒性相關資訊，配合底泥污染物之偵測，已成為了解底泥潛在污染物的物質濃度，其所衍生之生態風險評估的必要手段(ASTM 2008)。

高雄港位於台灣西南海岸，扼台灣海峽與巴士海峽交匯要衝，為印度洋和東北亞航運中心重要轉運港，是台灣最大的國際港埠，同時為國際第六大貨運港。高雄港所在灣區是一狹長海灣，總長度 12 公里，寬度為 1 至 1.5 公里之間，水深為 11 至 16 公尺之間，水域面積為 16236 公頃。港區主要有四條流經高雄市之水域注入，分別為愛河、第五船渠、前鎮河及鹽水港溪，此外，港區同時亦承受人口超過 150 萬居民之都市生活污水、都市徑流、工業廢水、船舶用水及上游畜牧廢水等污染。針對高雄港區底泥的污染物分析，申請人已發表了許多相關研究 [1-8]。Chen et al. [5] 以不同底泥品質評估標準(sediment quality guidelines, SQGs) 分析 20 個樣點的底泥污染物(圖 1.1)，包括 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)、重金屬、營養鹽及總有機碳發現大部分的底泥樣本屬於低量及中-低量的毒性污染(圖 1.2)，而工業活動及民生廢水為主要的貢獻。

2. 生物毒性測試

環境毒理化學學會(Society of Environmental Toxicology and Chemistry, SETAC) 認為生物暴露試驗是評估底泥毒性的唯一可靠途徑，故可知對底棲生物的全底泥毒性試驗是底泥生態風險評估過程中最重要的一環。而進行暴露實驗所需之污染底泥一般可以透過兩種方法取得：(1)以添加的方式，在相對無受染或配置的底泥中添加特定的化學污染物質，使生物體暴露在模擬採集全底泥，生物體暴露在野外採集底泥的反應，與暴露在對照組底泥反應做比較。而由全底野外受相當污染源的底泥，可以被用來建立特定污染物的劑量-效應關係。(2)直接從污染水體中泥來評估毒性外，亦可經由懸浮固體，底泥萃取液及孔隙水等不同毒性

測試來評估毒性。因為上述兩者方法各有其優缺點，目前不同國家環保機構 (USEPA、ASTM、OECD) 已公告之底泥毒性試驗方法，針對不同物種均有不同檢測方法。

以添加方式進行生物毒性測試，可以在一個穩定且可以控制的環境下，針對我們想偵測的污染物進行已知濃度的測試，提供一個客觀的污染物對生物體的毒性反應。這樣可以將未知的變因控制在最小的變動底下，所以可以提供在控制的環境下單一或多項污染源的生物毒性。

然而，在野外環境就不是一個沒有變動的環境，常見受試生物可能為微生物、藻類、無脊椎生物及魚類，最佳測試物種的特性應包括對各種污染物敏感性佳、來源方便、個體大小適當、實驗室易飼養、生態代表性高及相關研究資料充足等條件，在文獻中常利用來做底泥毒性測試者包括浮游動物，如 *Daphnia magna*、*Ceriodaphnia dubia* 及底棲無脊椎動物，如 *Tubifex tubifex*、*Hyalella*、*Hexagenia spp.*、*C. riparius* 及 *C. tentano*。而在毒性測試過程中，測試物種的選擇應考量受測物種的生命階段、測試終點、暴露長短、可信度及生態相關性等。

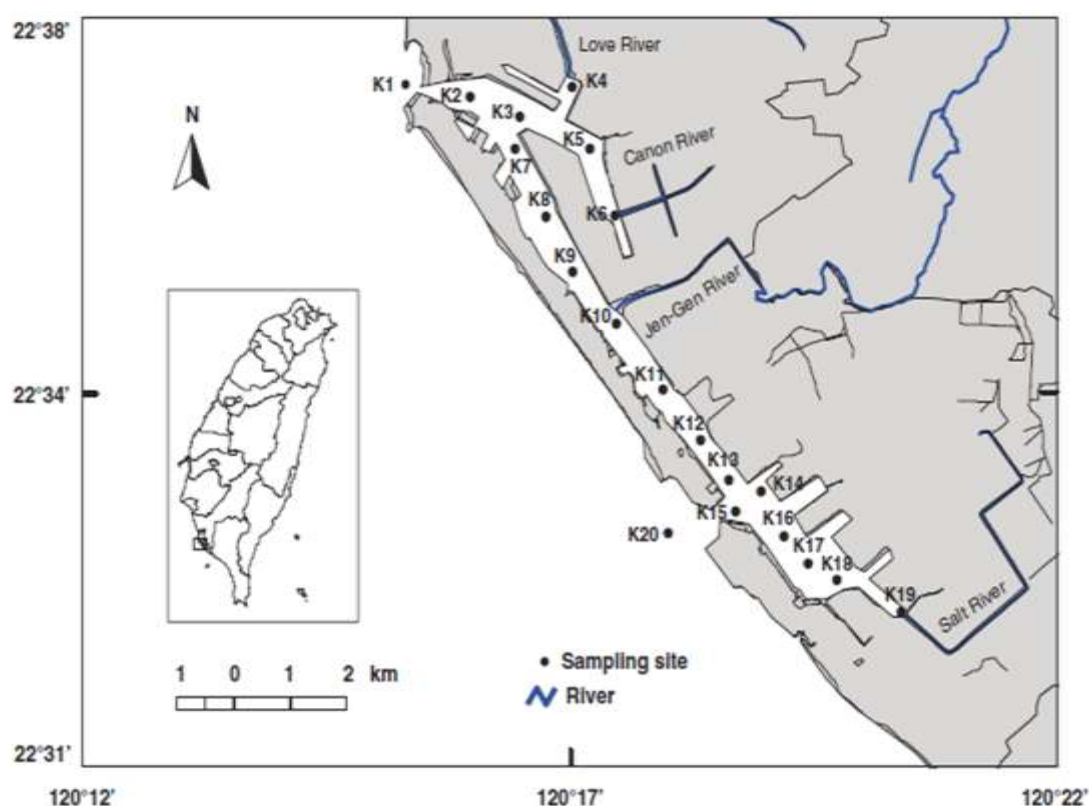


圖 1.1 高雄港底泥採樣點

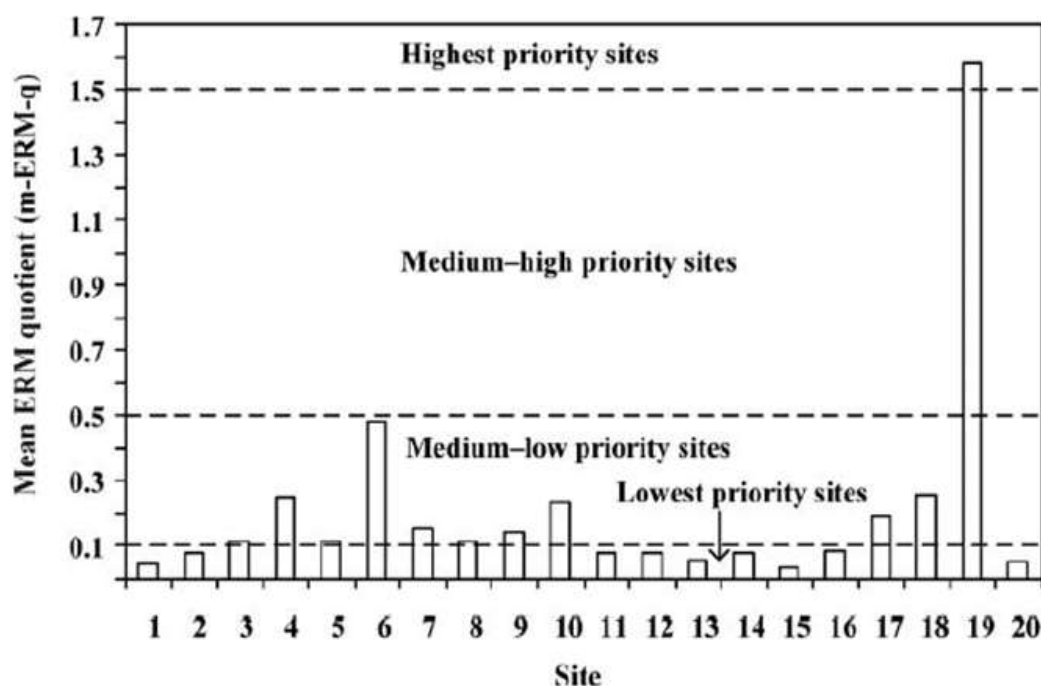


圖 1.2 高雄港 20 個樣點底泥之 m-ERM-q

目前針對測試物種從 USEPA、ASTM 及 OECD 的規範中，可以發現底泥毒性測試大多是針對淡水物種，特別針對海水物種的規範和方法較少。根據 ASTM E 1367-03 (Standard Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment Associated Contaminants with Estuarine and Marine Invertebrates) 及 OPPTS 850.1740(S) (Whole Sediment Chronic Toxicity Testing Using an Estuarine/Marine Invertebrate)，其所設立的方法均以海水端足目為實驗物種，包括 *Ampelisca abdita*、*Eohaustorius estuarius*、*Rhepoxynius abronius* 及 *Leptocheirus plumulosus*。測試時間為 10 天或更久至 28 天，測量的項目包含活存率、成長、行為及生殖。因生物毒性測試約略可分為急毒性、亞毒性與慢毒性 3 種。96 小時內讓生物死亡為急毒性，一個月內使生物死亡為亞毒性，在一個月以上時間使生物死亡、繁殖力下降或導致成長抑制則為慢毒性。透過以上指標，可以用來評估底泥的毒性強度。

這也引起我們想進一步去深入探討這些來自不同區域底泥對生物體的生理反應及其對抗逆境的反應。因此在本計畫欲先採用海水端足類進行測試，從環境污染源連結其生理層面及毒理反應，做一完整的生態風險評估。

3. 環境代謝體學(Environmental Metabolomics)

在後基因體時代，基因組計畫雖然已經確定生物體的全部基因，但是並不能夠表明哪些基因在何時何處表達，表達程度如何，而生命活動的精確機制很大程度上正是依賴于這些基因的精細調控。此外，基因的表達調控是多層次的，如轉錄水準、轉譯水準、轉譯後水準等。近來的研究表明，基因表現(mRNA)與其蛋白質產物下是沒有完全的對應關係，而許多轉錄產物最終都不會被編碼為蛋白質，且大量的蛋白質還要經過複雜的轉譯後修飾(如糖基化、磷酸化等)，這一過程是實施其功能與調節的重要組成部分。如果想對生命做更為深入全面的瞭解，就必須對基因的產物—蛋白質做細緻的調查研究。傳統的對單個蛋白質的研究方式目前已經無法滿足組學時代的要求，生命活動往往是網路式、串聯式的調控，要對複雜的生命活動有全面的認識，必然要在整體水準、動態水準對蛋白質進行研究，因此人們提出了蛋白質體學這一概念，並成為了後基因組時代研究的熱點之一。而在生理反應中最下遊的代謝產物與基因表現及蛋白質的產生關係，又常常是間接的調控。主要是當生物體受到外來刺激後、經過細胞新陳代謝作用後所產生的小分子代謝化合物(分子量小於 1,500 Da)，是一連串複雜反應的終點，可用定性和定量的分析技術來了解生物體的變化相較於蛋白質與基因的表現，生物體內特定的生命現象和許多代謝產物的表現有關，而代謝產物又可視為是基因表現之末端產物。因此，藉由生物體內特定時空內代謝產物表現量的分析，可以推測出該生物體的生理狀況，同時可進一步的瞭解其基因體序列中每一個基因代表的功能，及其所參與之各種生理、生化途徑之調控機制，可進一步推演出整個生物體代謝路徑靜態及動態的變化。因此，代謝質體學也成了繼基因體學、蛋白質體學後的一門重要研究領域。近年來，針對小分子層級作定性與定量的代謝質體學已越來越受到重視。

代謝體分析中除了針對某一代謝物及其相關代謝產物分析(metabolite target analysis)外，另一種為對於生物樣品中的所有代謝物表現作定性定量分析，此為較全面性的代謝質體分析(metabolite profiling)。由於生物體內的代謝物表現量提供了有機體與特定的生化反應中的代謝狀態。因此在尋找不同環境、疾病或是生理反應時的標記物時，代謝質體學成為一個重要的途徑。近年來逐漸受到重視的代謝體學(Metabolomics)是繼基因體學、蛋白質體學後的一門重要研究領域。定量檢測一個生物體系統遭受到病理生理性的刺激或是基因改質後所產生的代謝反應。由蛋白質體學(proteomics)及基因質體學(genomics)的延伸，應用層面很廣，含括疾病診斷、藥物代謝、動植物代謝、毒物反應、藥物開發及功能基因質體學(functional genomics)。代謝體學方法的流程如圖 1.3，即可利用生物體樣本，包括

體液、血液，分析工具包括了質譜或核磁共振儀，而這些數據得經過統計及處理後，能將有造成生理反應後的代謝物指認出後，再以生物資訊學方法得到調控路徑，建立生理反應對環境影響因子的解釋[9-12]。

環境代謝體學((Environmental Metabolomics)是代謝體學的一個分支，乃利用代謝體學工具去分析生物體和環境間的交互作用，如圖 1.3 所示，從文獻發表的數量，可發現這領域在近幾年內快速地成長[13]。

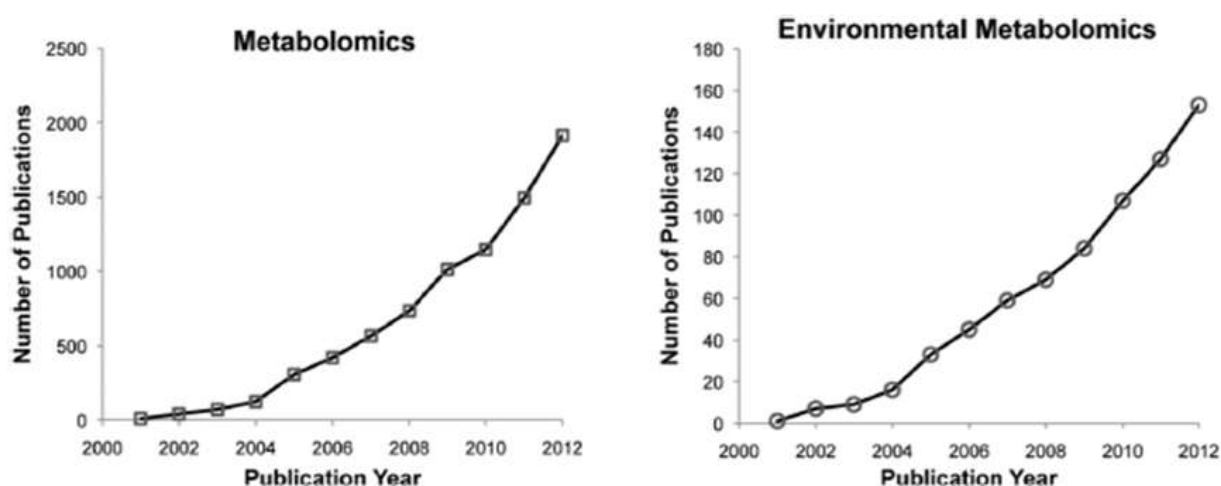


圖 1.3 近年來代謝體及環境代謝體學文獻發表數量統計

因為環境影響因子常為複雜且多樣的，所以可以利用非目標性的代謝體學方法(nontargeted metabolomics)，去分析一個複雜環境下對生物體的整體代謝，換言之，即由bottom-up的實驗設計，由得到的差異去推測造成的原因[13-20]。常利用的工具包括核磁共振(Nuclear magnetic resonance, NMR)及質譜儀(Mass spectrometry, MS)。NMR較質譜的靈敏度為差，但因為對樣本的無選擇性，且樣本製備較為簡單，數據再現性高的特性，並隨著資料庫的越來越完整，近年來已成為環境代謝體學研究的重要工具。而透過環境代謝體學方法，更能評估底泥污染場址中低暴露量之累積性污染物效應，如無法在短時間內觀察到的亞毒性效應，卻可以透過代謝體狀態來推估被影響的生理反應，如影響需要較長時間觀察到的生長發育或繁殖。

其中分析策略大致可以分成兩種：targeted及untargeted代謝體學(圖1.4)。前者為針對特定的代謝物質，觀察針對此代謝物在不同環境或生物生理反應下的定量，所以研究策略為以此代謝物和環境與生物間反應的假設為基礎

(hypothesis-driven) ，以預先的設定假說，探究特定單一類化學物質暴露與環境因子關聯的研究方法。而後者則是與一般體學策略類似，就是不預先設定假說下，以omics方式進行全面性檢測，獲取大量分析資料，接者以後續透過資料探勘(data mining)處理與比對程序，逐漸縮小目標到真正造成生物檢體差異的地方，以期望挑出具實際暴露標誌，乃利用大規模代謝物的比較，比如針對兩個環境因子可能會造成的影響做整體代謝物大規模的比較，透過差異的代謝物，建立環境因子與生物反應的關係。在針對未知的反應，一期尋找新的生物反應標記，這常常是用來讓我開發新的標記方法，因此本計畫也是以此方法來尋找底泥對生物體反應的生物標記。

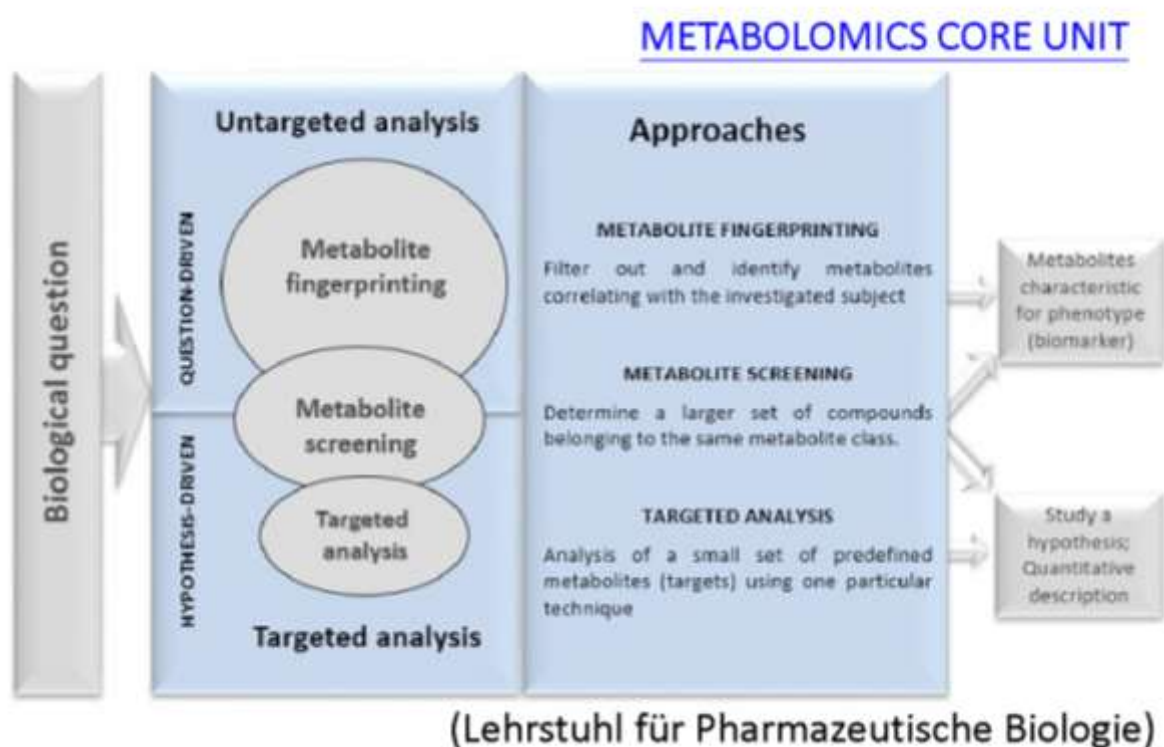


圖 1.4 Targeted vs untargeted 代謝體學

4. 國內外相關執行情形

在高雄港區的污染源報導上，由申請人及其團隊做了一系列的監測及分析[2-8]。其中包括Butyltin、有機碳、氮及磷、Octylphenol、Nonylphenol、PAHs、重金屬等，在目前為止，本團隊應為全球針對高雄港底泥研究上，做過最完整的調查及監測研究，所以累積的經驗與實際數據有能力去進行本計畫之執行。

無論在國內外，海洋底泥的研究及規劃相對於淡水、溪流底泥來得少，以SCIE資料庫查詢，以"ecological risk assessment & sediment"出現於title/keywords/abstract中，共有772篇文獻報導，但若限制於sea出現其中(title/keywords/abstract)，則只剩121篇。因為許多海洋底泥的貢獻都來自於河川，所以以上的研究許多都是針對河川，因而若再限制於harbor出現其中(title/keywords/abstract)，則僅有14篇報導[21-34]，其中也包含了本研究團隊的著作[26]。所以可知海洋底泥毒性的生態風險仍是一個新的領域，更值得開發，而高雄港具有不同污染源的貢獻，又是國際大港，可以展現出應用於臺灣本土研究之特色。

針對底泥毒性測試，環保署環境檢驗所多以雙齒圍沙蠶、多齒新米蝦、端足蟲為主要受試物種，當樣品為不具鹽度之底泥多選擇淡水端足蟲，而具鹽度之河口則以常見河口底棲動物雙齒圍沙蠶占最大宗，再分別搭配多齒新米蝦做為生物毒性試驗污染評估判定之試驗生物。

而在國外，海水底泥測試的生物樣本包括藻類[35-37]、貝類[38, 39]、海膽[40]及端足目[41-45]等，而國內針對海洋底泥的生物毒性測試的報導仍相對地少，由本團隊偕同主持人以底質添加BDE-47及BDE-183對底棲無脊椎底棲線蟲*Monopylephorus limosus*進行毒性測試及探討其蛋白質表現[46]，因此本計畫可以有經驗地處理毒性測試實驗，並予以代謝體學上的研究。

以代謝體學研究生物毒性反應相當多，以SCIE資料庫查詢metabolomic toxicity出現在title/keywords/abstract有296篇報導，而若以environmental metabolomics出現在title者，則有39篇文獻，而應用於底泥上的研究則有5篇[47-51]，且幾乎都是針對出海口的底泥研究，其所探討的議題也與本計畫的目標類似，針對食物鏈對整個環境及人類食物安全導向研究。所以國內外至今約在環境代謝體學應用在底泥的研究，至今仍是新創開始的領域，因此本計畫結合傳統毒理學和新穎環境代謝體學工具，建立此一新的分析研究平台。

所以透過一般的生物毒性測試，從受試物種的存活率、生殖率及成長等，我

們可以從巨觀的角度直接觀察生物體對底泥的耐受性。然而生物體的存活率及成長已經是很後端的生理調控的最終結果，在生物體已經死亡的程度前，其生理內部上的變化已經出現，這些生理反應並無法由活存率等觀察到其可能產生的生理代謝途徑的變化。因此，在許多研究中，無論是單一因子或多因子造成之生理調控的影響，都不僅針對活存率，而希望能更早一步地看到生物體反應[52-56]。而也可以藉由代謝體學瞭解到生物體雖然還不到死亡階段，但可能已經處於那個受污染傷害的生理階段。所以本研究結合了環境科學常利用藉由環境重金屬、污染物建立的生態風險評估指標，並以環境代謝體學方法，由污染物對生物體造成的綜合反應，這將會提高我們在判讀數據時有更靈敏的資料，而非只憑累積性的末端資訊來提供我們解讀，這得藉由分析、環境科學與生物學將關人力跨領域完成。

5.重要性

而本計畫採用海水端足目，因為牠在臺灣海域扮演著食物鏈底層，極容易進入食物鏈再回饋到人類。而高雄港底泥具有不同特質污染源的特質(如具有民生及工業廢水)，展現出的 m-ERM-q 毒性評估也不一(圖 1.2)。以結合生物毒性和代謝體學方法，來進行港區內不同底泥毒性在環境生態風險的評估，提供化學分析外，進一步的對生物體的危害程度相關資訊，以提供未來底泥整治決策及風險評估之參考。

二、研究目的

為充分得到生物體暴露於污染底泥的毒理反應，我們選擇海水端足目之成體為實驗生物，進行28天之毒性測試。計算其活存率、成長及繁殖率。並比較不同底泥之污染物組成和生物體暴露在不同底泥下不同時間的代謝體變化。可分為：

- (一) 分析高雄港底泥PAHs、重金屬等含量；
- (二) 以高雄港底泥對底棲海水無脊椎端足類進行全底泥毒性測試；
- (三) 比較端足目暴露於不同底泥後，其代謝體之差異。

由以上三點得到環境污染物與底棲端足目生物的毒性和生理代謝反應。

三、研究方法與過程（含工作進度甘特圖）

1. 採樣測站與樣品收集

本研究以高雄港為研究區域(圖 3.1)。底泥採樣點包括高雄港外(E1; entrance 1, reference site)、愛河口(LR)、第五船渠口(CR)、前鎮口(JR)及鹽水港溪口(SR)，共 5 測站的底泥，如圖 3.1 所示。採樣點位置是利用全球定位系統(GPS)進行定位。現場採樣作業以漁船號進行各測站沉積物樣本之採集，沉積物係以 6''×6''×6'' Ekman Dredge grab sampler (Jae Sung International Co.)進行表層沉積物之採集，採集之沉積物樣本以玻璃罐盛裝，並暫存於之陰涼處，運回實驗室後，立即進行前處理分析作業。

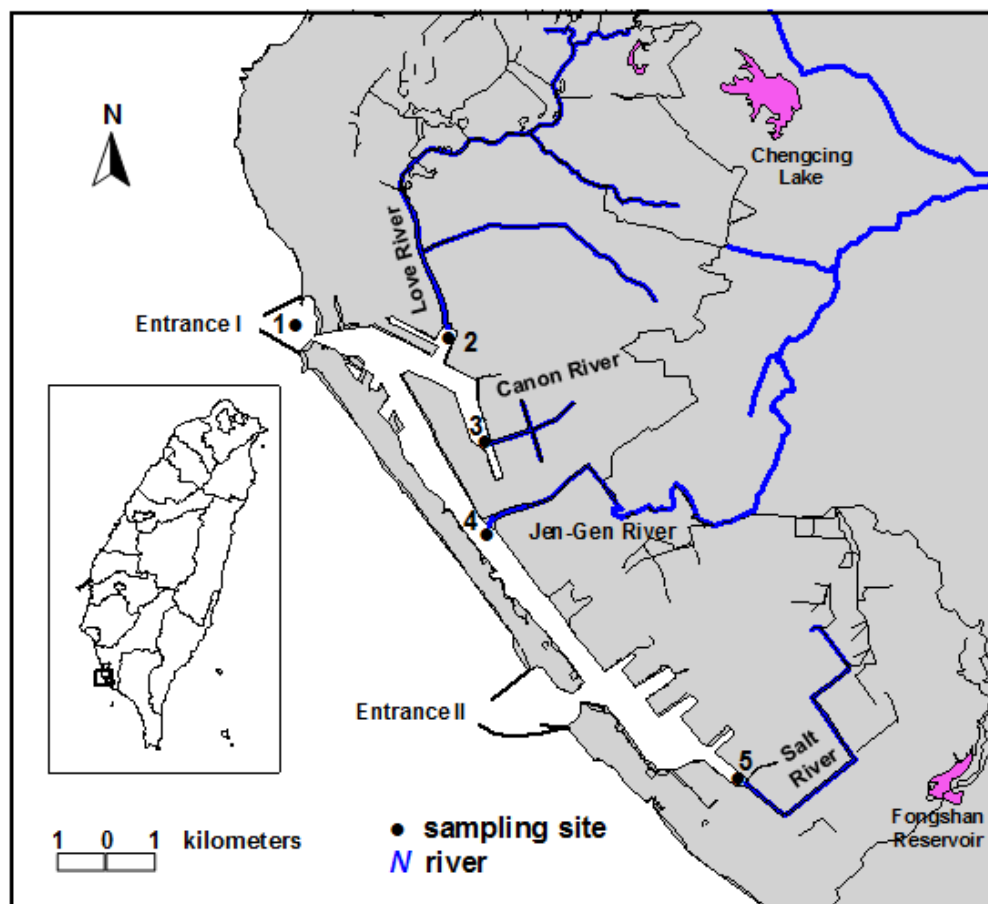


圖 3.1 本研究高雄港底泥採樣點分佈

2. 底泥前處理與分析

底泥樣品運回實驗室後，取一小部分底泥進行含水率分析(在 105°C 乾燥至恆重)。其餘底泥再取一小部分底泥以冷凍乾燥機乾燥(72 小時)，乾燥後的底泥以氧化鋯材質之研鉢及杵研磨至細小顆粒，並以 1000 μm 之篩網過篩，均質後之樣品收集於預先以正己烷潤洗過的褐色玻璃瓶(含鐵氟龍墊片之螺旋蓋)中，儲存於 -20°C 冰庫[6]，待有機化合物之分析。另取一小部份底泥風乾後以以氧化鋯材質之研鉢及杵研磨至細小顆粒，並以 1000 μm 之篩網過篩，均質後之樣品收集於預先以酸洗過的塑膠瓶中，儲存於 -20°C 冰庫[6]，待進行重金屬分析。沉積物的粒徑是以 Beckman Coulter LS230 Laser Diffraction Particle Size Analyzer 分析，分析結果以黏粒(Clay, <2 μm)、粉粒(Silt, 2-63 μm)及砂粒(>63 μm)組成百分比表示。有機質(organic matter, OM)係以燃燒損失法(loss-on-ignition (LOI) method)分析，即 550°C 烘燒 8 小時，後計算燃燒損失百分比。總有機碳(total organic carbon, TOC)係使用 Walkley-Black method 進行分析[6]。

有機化合物之 PAHs 分析方法如下所述：秤取經由乾燥及均質後之樣本 1.0 克，置於 11 ml 之玻璃試管中(附鋁墊片螺旋蓋)，加入 5 ml 正己烷：丙酮(1：1)，再分別加入 0.5 μg 內標準品 (Acenaphthene-d10、Phenanthrene-d10 及 Chrysene-d12) 及 1 μg 擬似標準品(2-Fluorobiphenyl 及 4-Terphenyl-d14)，加蓋後以旋轉振盪器混合均勻，置入超音波裝置(CREST，功率 400W)震盪萃取 30 分鐘，離心 10 分鐘，取出上層液，再加入 5 ml 正己烷：丙酮(1：1)重複萃取 3 次，並將萃取液收集於同一試管中，萃取液經銅粒及矽膠管柱淨化，並以氮氣吹拂濃縮定量，再以氣相層析質譜儀(Agilent 6890N GC/ 5975 MS)分析。氣相層析質譜儀設定條件：注入口溫度為 280°C，注入時不分流，注入後 0.6 分鐘再分流(分流比率：1 比 35)；層析管柱為 HP-5MS，30 m $\times$ 0.25 mmID，1 μm 膜厚塗佈矽酮化合物之熔矽毛細管柱；烘箱升溫條件為 35°C 停留 2 分鐘，以 5°C/min 上升至 140°C，以 10°C/min 上升至 300°C，停留 15 min；載流氣體為超高純度氮氣，流速為 1.5mL/min；樣品注入量為 1 μL ；質譜掃描模式：Selected ion monitoring (SIM mode)；離子化方式為電子撞擊法(EI)。PAHs 之定性係依上述條件，並以 Scan Model (質譜掃描範圍(scan range)：35~500amu；掃描速率(scan rate)：每秒 1.6 次)進行 PAHs 混合標準品 (AccuStandard M-8270-IS-WL-4X)之分析，經由質譜資料庫(National Institute of Standards and Technology, NIST)比對，定義 PAHs 之停留時間及主要離子。樣品中之 PAHs 係以標準品之停留時間及主要定量離子強度進行定性，而定量方式係以各 PAH 感應因子(RF)及各 PAH 與內標準品之波峰強度進行定量。

底泥有機化合物之 PAE、4-NP 及 4-t-OP 分析方法如下所述：稱取經由乾燥

及均質後的樣本 1.000 g，置於 11 mL 之玻璃試管中(附鋁墊片螺旋蓋)，加入 5 mL 二氯甲烷，再加入 50 ng 內標準品 (p-terphenyl)。空白樣品是依照同樣的步驟製備但沒有加入沉積物樣本(without sediment sample)。查核樣品的製備是將 4-NP 及 4-t-OP 混合標準品加入於二氯甲烷溶劑中。所有樣品加蓋後以旋轉振盪器混合均勻，隨後置於超音波裝置(CREST，功率 400W)震盪萃取 30 分鐘，離心 10 分鐘，以 pasteur pipette 取出上層萃取液，殘留的沉積物再加入 5 mL 二氯甲烷重複震盪萃取 3 次，並將萃取液收集於同一試管中。將銅絲加入萃取液中進行除硫(desulphurization)，再以矽膠管柱淨化萃取液，最後以緩慢流量的高純氮氣吹拂濃縮定量至 0.5 mL，並以氣相層析質譜儀(Agilent 6890N GC/ 5975 MS)分析。氣相層析質譜儀設定條件：注入口溫度為 300°C，注入時不分流，注入後 2 分鐘再分流(分流比率：2 比 1)；層析毛細管柱為 HP-5MS，30 m × 0.25 mm，0.25 μm 膜厚；烘箱升溫條件為 70°C 停留 2 分鐘，以 20 °C/min 上升至 220°C，再以 5°C/min 上升至 300°C，停留 5 min；載流氣體為超高純度氮氣，毛細管柱流量為 1.5 mL/min；樣品注入量為 1 μL；質譜掃描模式：Selected ion monitoring (SIM mode)；離子化方式為電子撞擊法(EI)。設定掃描的離子為 107、135、149 (for 4-NP and 4-t-OP) 及 244 (for internal standard, p-terphenyl)。4-NP 及 4-t-OP 之定性係依上述條件，並以 Scan Model (質譜掃描範圍(scan range)：35 – 500 amu；掃描速率(scan rate)：每秒 1.6 次)進行 4-NP 及 4-t-OP 混合標準品之分析，經由質譜資料庫(National Institute of Standards and Technology, NIST)比對，定義 4-NP 及 4-t-OP 之停留時間及主要離子。樣品中之 4-NP 及 4-t-OP 係以標準品之停留時間及主要及次要定量離子強度進行定性，而定量方式係以 4-NP 及 4-t-OP 平均感應因子(RF)及 4-NP (135 m/z)及 4-t-OP (135 m/z)與內標準品(244 m/z)之波峰強度進行定量。

底泥重金屬檢驗方法、樣品保存及品保品管作業主要依據環保署公告之標準方法進行，分析方法簡要說明如下：(1)重金屬(汞、鉛、鎘、鉻、砷、銅、鋅、鎳)：係參照行政院環保署公告之標準檢驗方法(廢棄物及底泥中金屬檢測方法—微波輔助酸消化法 NIEA M301.00C) 測定。(2)汞：依行政院環保署公告之標準檢驗方法(土壤、底泥及廢棄物中總汞檢測方法—冷蒸氣原子吸收光譜法 NIEA M317.03B)測定。(3)砷：依行政院環保署公告之標準檢驗方法(土壤及底泥中砷檢測方法—砷化氫原子吸收光譜法 NIEA S310.64B)測定。

端足類重金屬以酸性消化總則-熱板消化/元素分析(NIEA C303.03C)。汞：土壤、底泥及廢棄物中總汞檢測方法-冷蒸氣原子吸收光譜法(NIEA M317.03B)。砷：土壤及底泥中砷檢測方法—砷化氫原子吸收光譜法(NIEA S310.64B)。

3. 底泥毒性測試

本計畫以全底泥毒性測試(whole sediment toxicity test)，進行 10 天急性及 30 天慢性毒性測試，並建立起代謝體學分析。以實驗室馴化 2 週之端足類進行毒性測試。實驗之端足類於高雄地區養殖池取得後，採其中一受精之個體，以其繁殖之後代為實驗個體得到單一種之族群。

測試底泥放置於 1L 之燒杯中，以體積 200 mL 底泥置於其中，並添加消毒過的海水至 400 mL 處(底泥：覆蓋水=1:1)，並連接打氣管供氧(如圖 3.2)，靜置一天後，待其覆蓋底泥的海水澄清後，再將實驗個體置入實驗燒杯中(圖 3.2)。實驗個體以同樣大小之個體($n = 50/\text{燒杯}$)，雌雄以 1:1 的比例放置，每種底泥以 3 重複，故生物樣本為 $50 \times 3(\text{重複}) \times 5(\text{底泥}) \times 2(10 \text{ day}/30 \text{ day}) = 1500$ 隻。急性實驗組於第 10 天將生物樣本全數收集，並計算其總數。

4. 端足類代謝物萃取

實驗完成後的海水端足類以事先冷凍的 1 mL HPLC 等級甲醇固定後，並即時置入液態氮冷凍而進行代謝物質萃取。以萃取液(甲醇：氯仿：水= 4:4:2.85)萃取後，會形成油水分層相，水相層含有水溶性的低分子代謝物，而油相層含有脂肪分子。水相層收集後，以甲醇及 chloroform 來沉澱蛋白質及其他大分子，而最終之水相層則以冷凍乾燥後，再以含內標物 sodium 3-(trimethylsilyl) propionate-2,2,3,3-d4 (TSP) (Sigma)的 200 μL 0.1 M 以 D2O 配製的磷酸鈉緩衝液(pH 7.4)回溶。回溶後之樣本以 13,600 g 於 4°C 離心 15 分鐘，取其上清液，而後放進 5-mm NMR tube 進行分析或先儲存於-70°C 等待分析。

NMR 分析將對萃取物利用液態 ^1H 和 ^{13}C 之 NMR 光譜做代謝物指認，再利用固態 NMR 對未做處理的整蝦或活體樣品記錄代謝物的變化，同時測量 ^1H 的各種鬆弛速率的變化，最後採用微影像方法比較不同部位的代謝差異。



圖 3.2 端足類於燒杯中進行底泥毒性測試

5. 液態 NMR 光譜

利用標準萃取方法將各發育階段蝦的主要代謝物萃取出來。代謝物之 NMR 光譜以 Varian Inova 500 MHz (INOVA 500; Varian, Inc., Palo Alto, CA) 核磁共振儀中進行，化學位移以 TSP 為標準(0 ppm)。一維 ^1H 譜於 298 K (25°C) 下擷取，水峰訊號利用 presaturation pulse 去抑制。每個樣本以 8 kHz 譜寬來得到 32,000 個數據點，每張光譜採用 128 個 transients 以得到滿意的靈敏度。進一步地我們也利用 2D NMR 來確認代謝物之身份，包含 TOCSY、 ^1H - ^{13}C gHMBC、 ^1H - ^{13}C gHSQC 及 ^1H - ^{13}C gHSQC-TOCSY。NMR 光譜之 QA 及 QC 步驟乃透過樣本溶液中的定量內標物 sodium 3-(trimethylsilyl) propionate-2,2,3,3-d₄ (TSP) 為 0 ppm 來校正化學位移，並同時對所得之光譜進行定量校正，來進行光譜的比對與指認。

6. 光譜比對與指認

^1H NMR 光譜以 Chenomx NMR Suite 5.0 (Chenomx Inc., Alberta Canada) 進行整理，取 0.50–10.00 ppm 的光譜，去除水的光譜(4.7–5.1 ppm)，利用 Chenomx 資料庫(Chenomx library pH4-9)可以將化學位移的訊號予以指認，得到指認的代謝物質訊號以全光譜之訊號強度為標準化(normalization)，並以內含的內標物質(internal standard; TSP)為量化(standardization)的基礎，得到指認代謝物量化數據輸入 Microsoft Excel (Microsoft) 彙整。進一步以 ^1H - ^{13}C 光譜以 Spinworks (University of Manitoba, Canada) 進行對指認光譜進行確認。

7. 統計分析

毒性測試之活存率以 One-way ANOVA 及 post-hoc t test 進行分析。指認到的代謝物以多變量分析軟體 SIMCA-P (Umetrics Inc., Umea, Sweden) 進行偏最小二乘判別分析(Partial Least Squares Discriminant Analysis; PLS-DA)分析。而得到使其分群的代謝物利用 variable importance to the projection plot (VIP plot) 選擇出 VIP score > 1.0 的代謝物，以這些代謝物分別再進行 ANOVA，確定真正在不同組別間有差異者。而將這些有差異的代謝物進一步進行生物指標的篩選，利用：receiver-operating characteristics curve (ROC curve)，在 ROC curve 下的面積(area under the ROC curve, AUC)的數值，以 AUC=0.5, not accurate; 0.5<AUC<0.7, less accurate; 0.7<AUC≤0.9 moderately accurate; 0.9<AUC, highly accurate; AUC=1, exceedingly accurate。我們選出 AUC>0.9 的代謝物為可能的生物標記，篩選策略

流程如圖 3.3。將統計結果(第 10 工作項目)有意義的代謝物以線上代謝體學生物資訊資料庫 Human Metabolome Database 及 BioMagResBank (BMRB-metabolomics) 資料庫來獲得這些代謝物質的背景資料，及受影響後可能調控的代謝路徑。

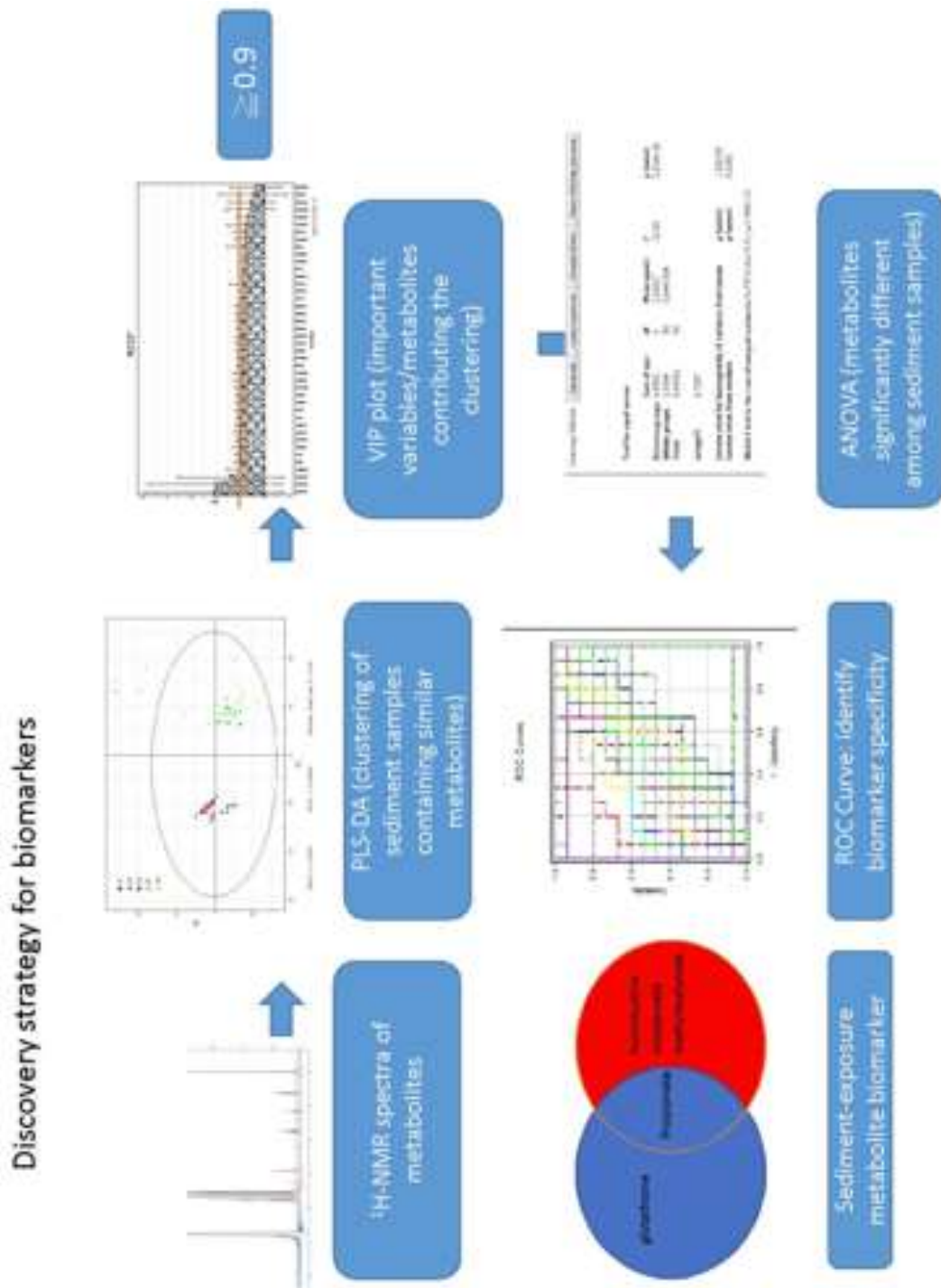


圖 3.3 代謝體學生物標記尋找策略

本研究預期進度甘特圖如下：

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	備 註
文獻資料收集 及整理	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■			
監測五個樣點 中底泥的重金 屬	■	■	■	■	※■	■							
待測生物蓄養		■	■										
生物毒性測試			■	■	※■	■	■	■					
生 物 代 謝 物 NMR 光譜測試							■	■	■	■	※■	■	
期中報告						■							
期末報告												■	
工作進度估計 百分比（ 累 積 數 ）	5%	15%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%	95%	100%	
預定查核點	期 中		1. 底泥污染物之分佈量 2. 生物活存率之表現										
	期 末		3.在不同底泥下代謝路徑之表現										

四、結果與討論

1.底泥物理特質及重金屬含量

以高雄港入港口(E1)為參考點外的四個樣點，其污染的特質分別為愛河(Love river, LR)：河川總長約 12 公里，集水面積約 62 平方公里，以民生廢水為主要污染源。第五船渠(Canon River, CR)：第五船渠的集流面積約 11.3 平方公里，周圍是前鎮工業區，污染源主要為工業廢水。前鎮河(Jen-Gen River, JR)：全長約 20 公里，流域面積計 53.85 平方公里，主要以民生污水為污染源。鹽水港溪(Salt river, SR)：長度為 5 公里，流域面積廣達 1,200 公頃，周圍是小港工業區與中鋼公司，污染源主要為工業廢水。

表 4.1 顯示 5 個採樣點底泥之物理特性及重金屬分析結果。粒徑分析結果顯示(圖 4.1)，除了 E1 以砂粒(sand, $>63\mu\text{m}$)為主要組成外(57.7%)，其餘測站以 $<63\mu\text{m}$ 之黏粒(clay)及粉粒(silt)為主要組成。此細顆粒(fine particles)性質將會導致底泥具有顯著吸附重金屬或有機污染物之效應。由圖 4.2 及圖 4.3 顯示四個河口測站底泥具有較高含水量(56.8-97.2%)及有機質(5.7-9.0%)含量。富含有機特性的底泥將會使溶氧降低而造成不良的厭氧條件。

5個採樣點底泥之各重金屬濃度分析結果(表4.1)如下所述：

- (1) 汞：底泥重金屬汞濃度介於0.10～2.65 mg/kg之間，第五船渠口(CR)及鹽水港溪(SR)之測值明顯較高。四個河口測站的底泥皆高於底泥品質指標之上限值0.87 mg/kg。(圖4.4)
- (2) 鉛：底泥鉛金屬濃度介於17.7～82.6 mg/kg之間，其中LR、CR及SR三個河口的底泥高於底泥品質指標之下限值48 mg/kg。(圖4.5)
- (3) 鎘：重金屬鎘濃度在5個底泥之濃度介於0.85～1.87 mg/kg之間，5個底泥之鎘濃度皆高於底泥品質指標之下限值0.65 mg/kg。(圖4.6)
- (4) 鉻：底泥鉻金屬濃度介於42.2～214 mg/kg之間，四個河口皆高於底泥品質指標值之下限值76 mg/kg。(圖4.7)
- (5) 銅：監測之5個底泥銅濃度介於21.2～516 mg/kg之間，其中SR測站之底泥銅金屬濃度明顯高於其他測站。CR、JR及SR三個底泥皆高於底泥品質指標值之上限157 mg/kg。(圖4.8)
- (6) 鋅：底泥鋅濃度介於207～1491 mg/kg之間，其中CR測站之底泥鋅金屬含量明顯高於其他測站。四個河川口底泥鋅濃度皆高於底泥品質指標值之上限384 mg/kg。(圖4.9)

- (7) 鎳：底泥重金屬鎳濃度介於23.4 ~ 66.3 mg/kg之間，除了E1低於底泥品質指標值下限值(24 mg/kg)外，其餘皆高於底泥品質指標值之下限值24 mg/kg。(圖4.10)
- (8) 錳：底泥重金屬錳濃度介於245 ~ 665 mg/kg之間，其中LR及CR之測值245及294 mg/kg最低。(圖4.11)

綜合上述，四個河口底泥之金屬濃度大致呈現高於底泥品質下限或上限值之情況，顯示對水域生物體有產生危害影響之虞。由其是汞、鎘、鋅及銅金屬。重金屬最高者分別為，汞: CR；鉛: SR；鎘: CR；鉻: JR；銅: SR；鋅: CR；鎳: SR；錳: SR。各檢測的重金屬在不同樣點的排序：汞：CR>SR>LR>JR>E1；鉛：SR>CR>LR>JR>E1；鎘：CR>LR>JR>SR>E1；鉻：JR>SR>CR>LR>E1；銅：SR>CR>JR>LR>E1；鋅：CR>SR>LR>JR>E1；鎳：SR>CR>LR>JR>E1；錳：SR>JR>E1>CR>LR。

表4.1 底泥之物理特性及重金屬分析結果

項目	E1	LR	CR	JR	SR	下限值 ¹	上限值 ¹
Clay (<2μm)	3.4	5.4	3.8	7.4	4.1	-	-
Silt (2-63μm)	38.9	72.4	65.0	75.4	44.6	-	-
Sand (>63μm)	57.7	22.2	31.2	17.2	51.3	-	-
含水量(%)	32.6	97.2	56.8	68.2	65.1	-	-
有機質(%)	3.9	9.0	6.5	5.7	6.0	-	-
汞(mg/kg)	0.10	1.87	2.65	0.88	2.60	0.23	0.87
鉛(mg/kg)	17.7	48.0	65.8	44.8	82.6	48	161
鎘(mg/kg)	0.85	1.86	1.87	1.69	1.15	0.65	2.49
鉻(mg/kg)	42.2	103	137	214	169	76	233
銅(mg/kg)	21.2	105	235	162	516	50	157
鋅(mg/kg)	207	570	1491	424	1122	140	384
鎳(mg/kg)	23.4	42.5	55.5	35.5	66.3	24	80
錳(mg/kg)	414	245	294	472	665	-	-

1. 底泥品質指標之分類管理及用途限制辦法(101.1.4，環署土字第 1000116349 號令訂定)之第四條底泥品質指標項目及其上、下限值。

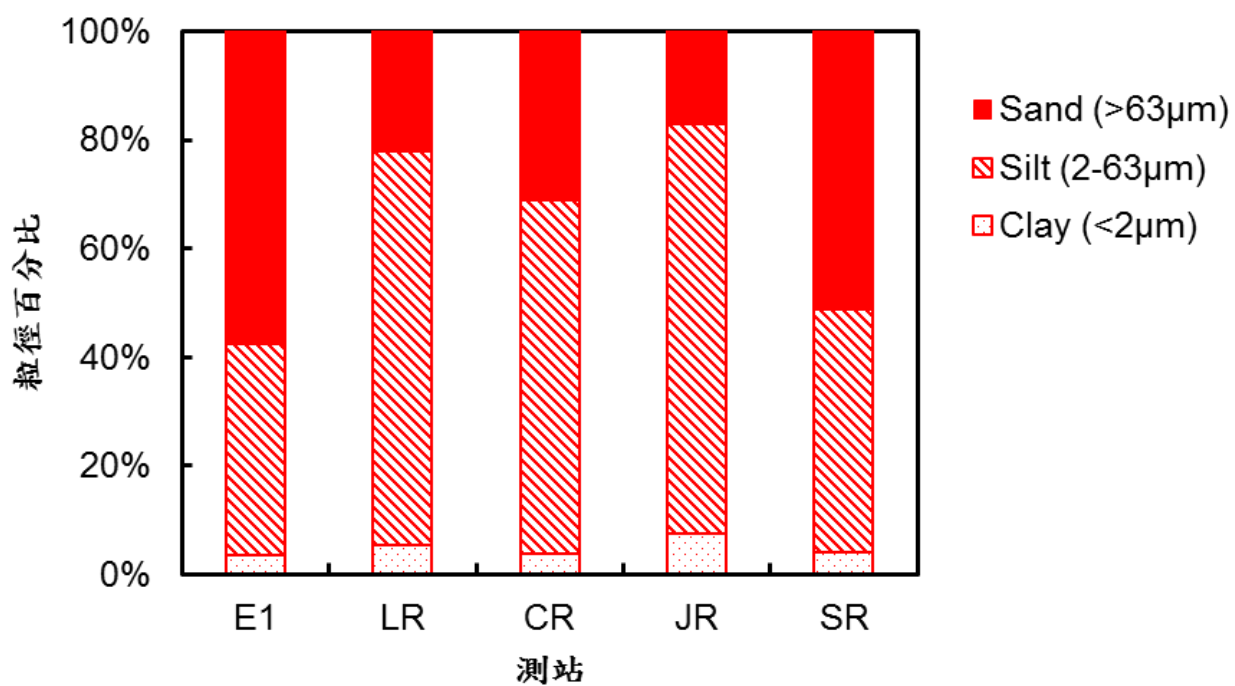


圖4.1 底泥粒徑組成百分比分佈圖

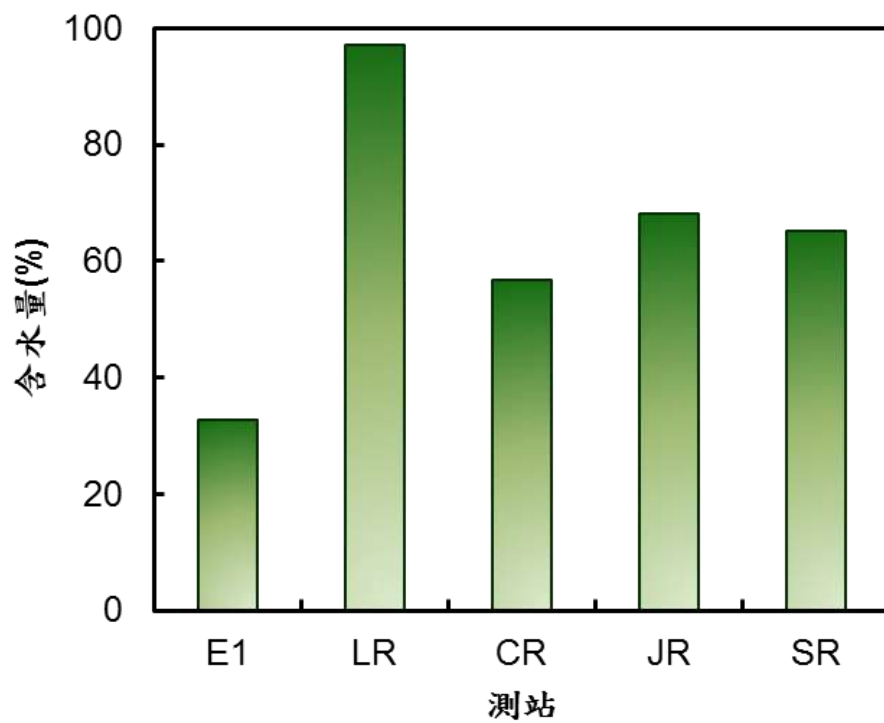


圖4.2 底泥含水量分佈圖

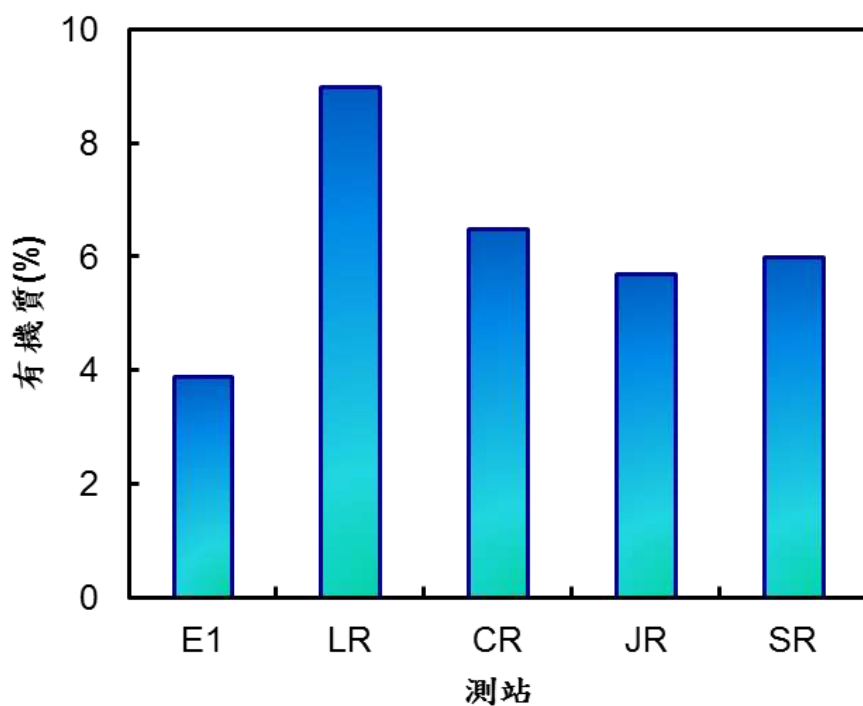


圖4.3 底泥有機質分佈圖

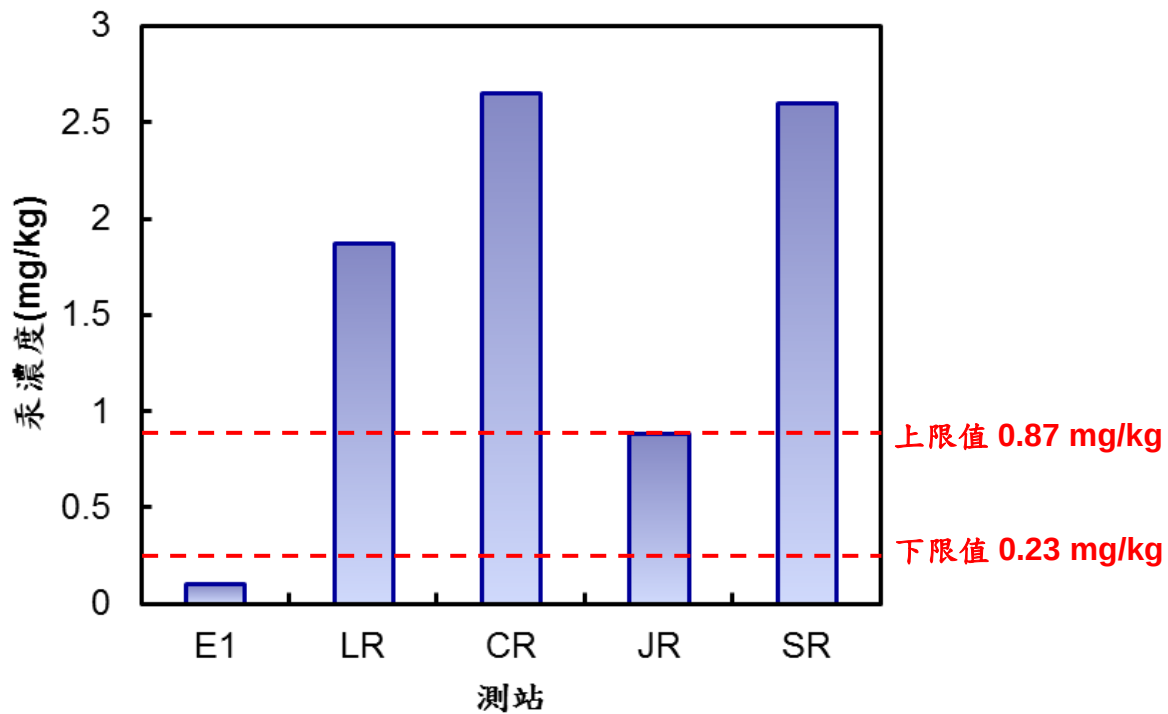


圖4.4 底泥重金屬汞分佈圖

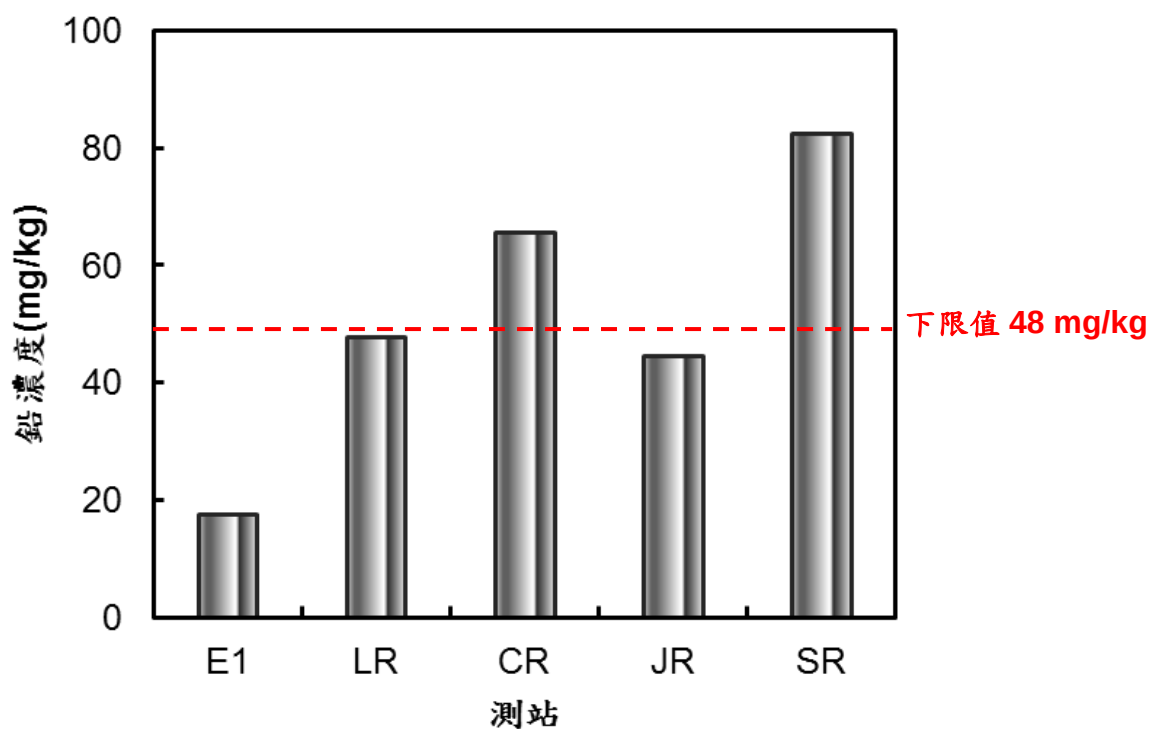


圖4.5 底泥重金屬鉛分佈圖

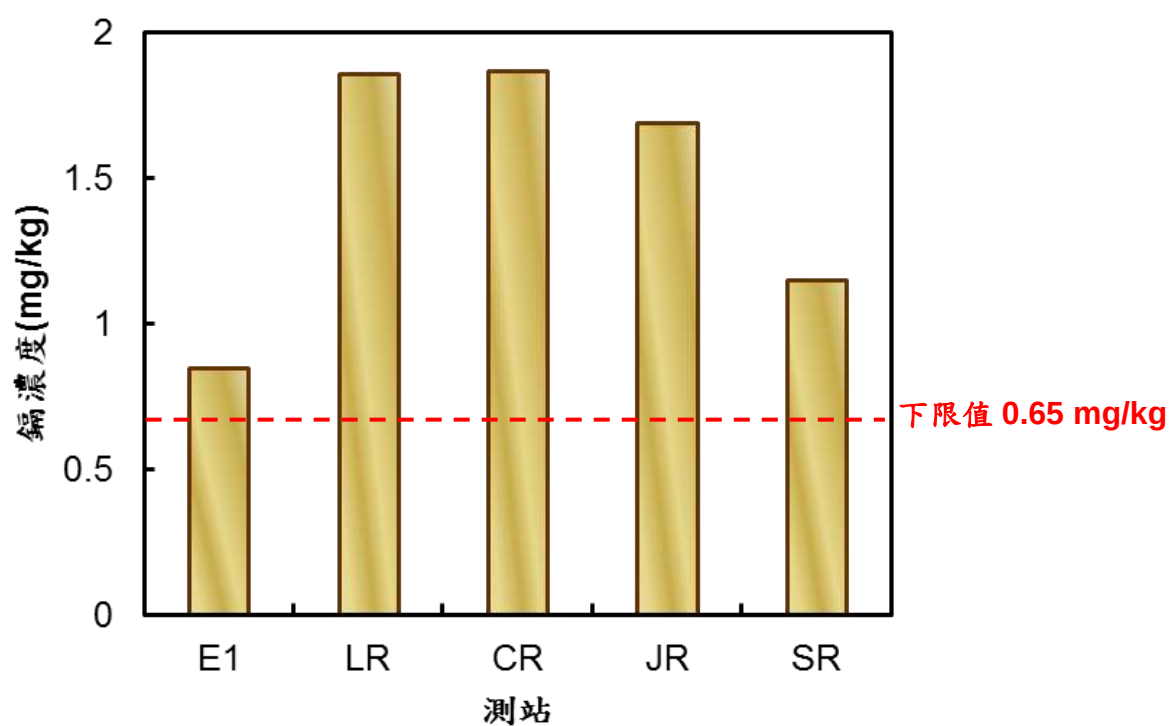


圖4.6 底泥重金屬鎘分佈圖

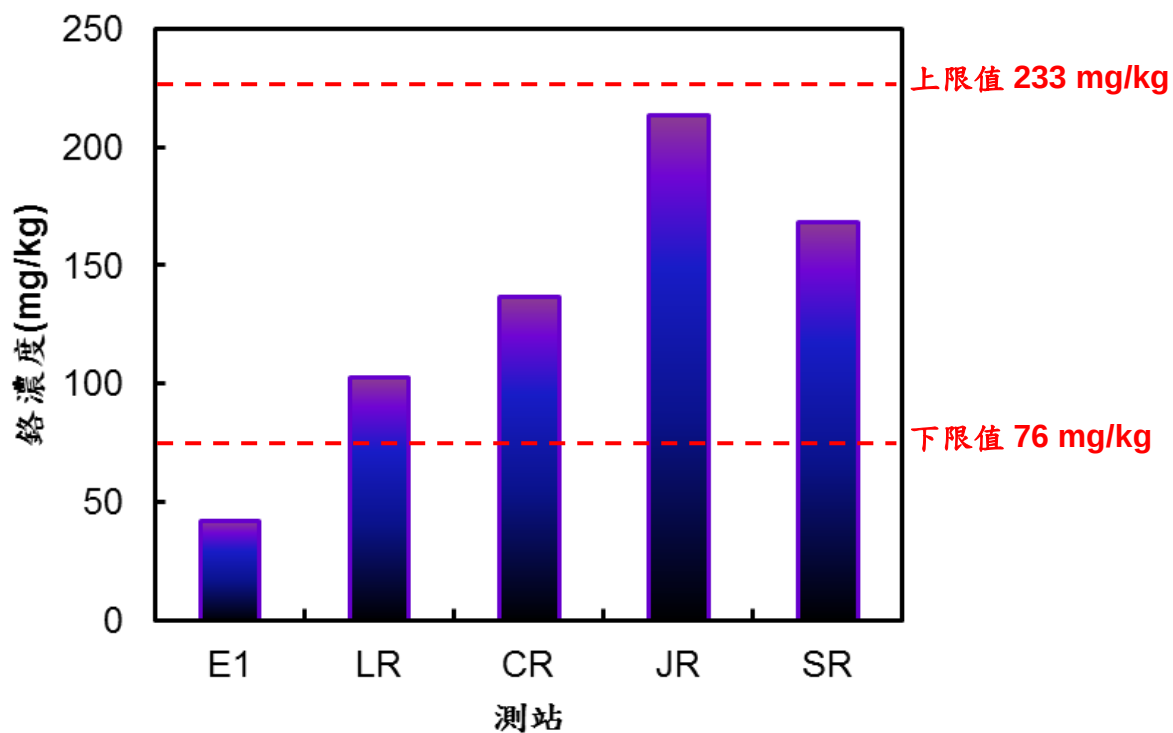


圖4.7 底泥重金屬鉻分佈圖

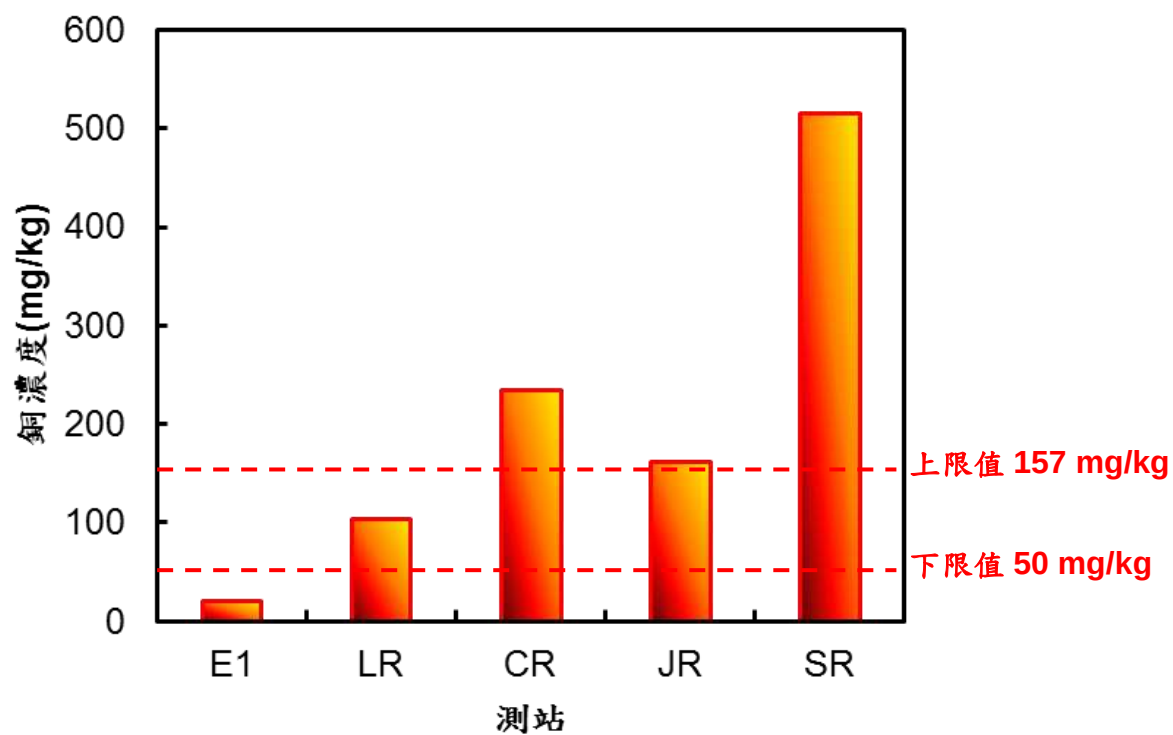


圖4.8 底泥重金屬銅分佈圖

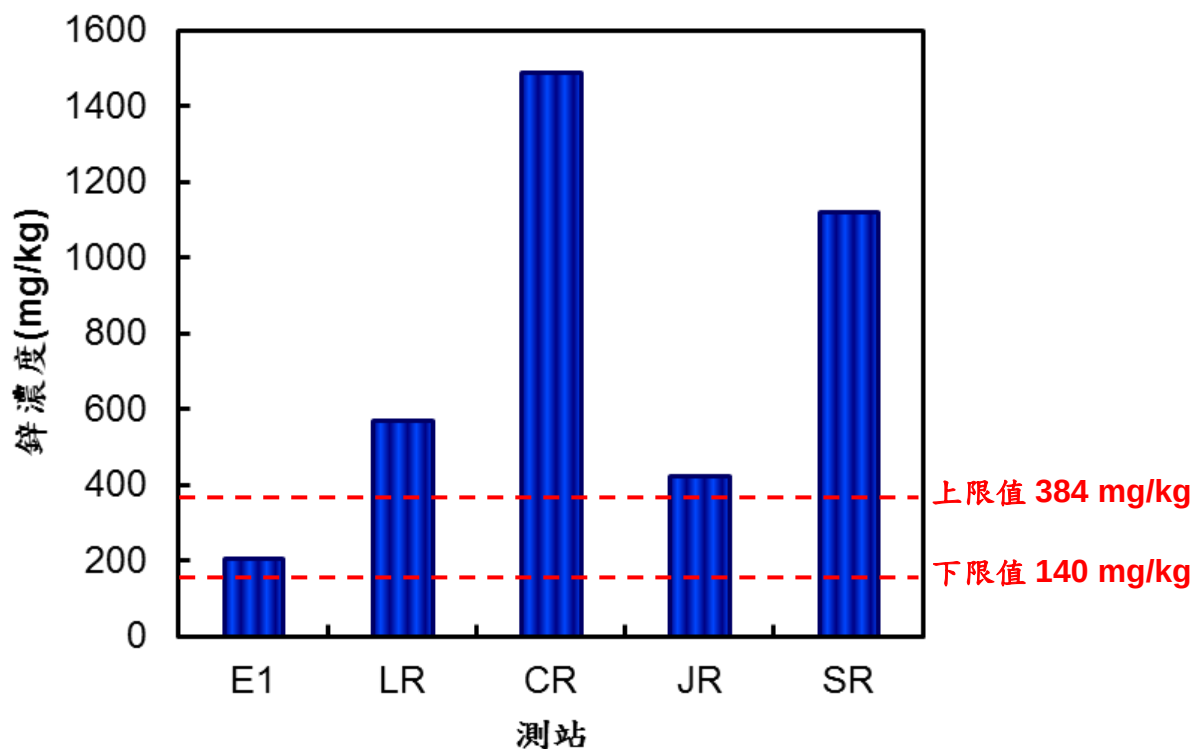


圖4.9 底泥重金屬鋅分佈圖

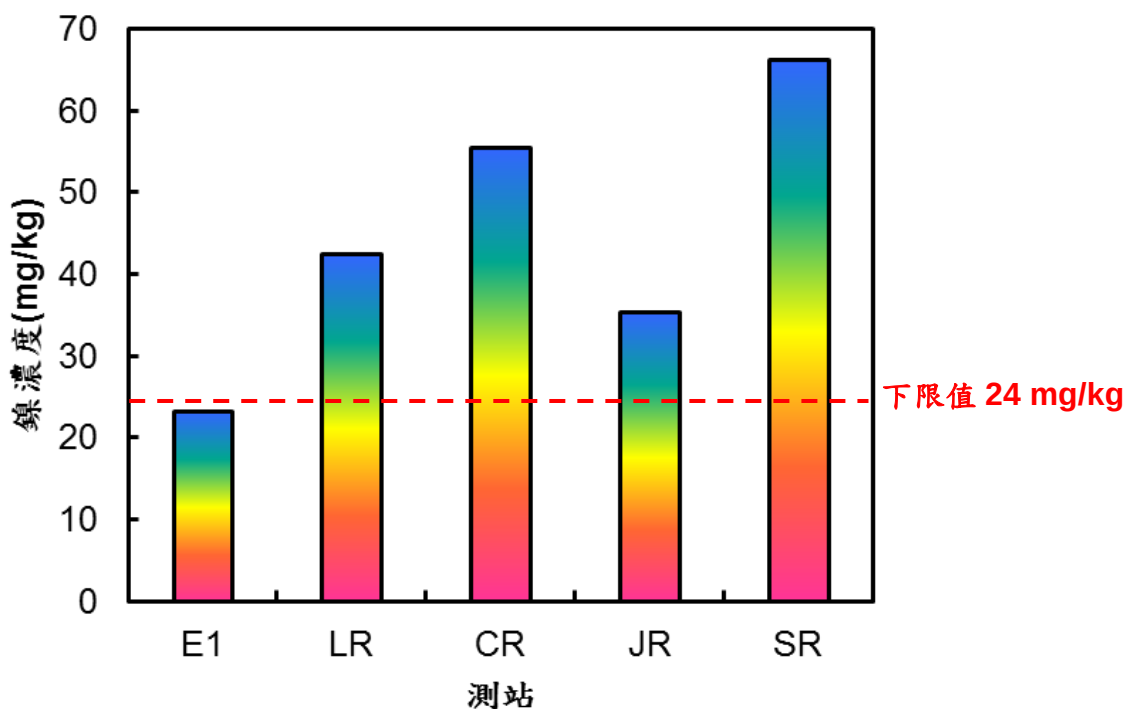


圖4.10 底泥重金屬鎳分佈圖

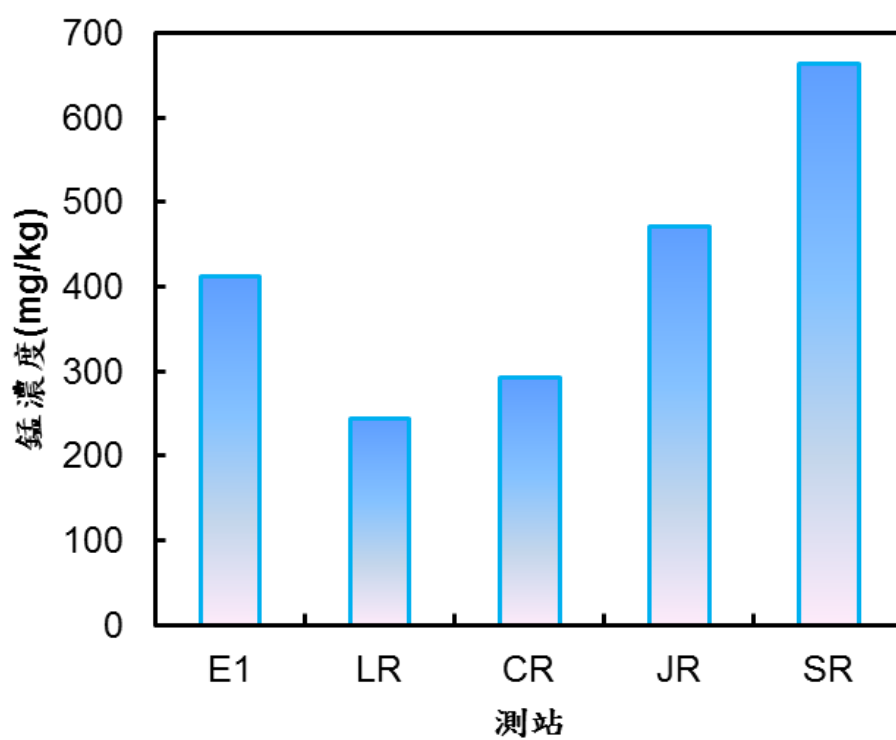


圖4.11 底泥重金屬錳分佈圖

2. 底泥有機化合物分析

(1) PAH

5 個採樣點底泥中 16 種 PAHs 分析結果如表 4.2 所示。底泥中總低環數 2-3 環 PAH (LPAHs)濃度介於 14.6 ~ 11,632 ng/g dry wt. 之間，SR 測站的濃度明顯高於其他測站 2-3 個位數(圖 4.12)。底泥中總高環數 4-6 環 PAH (HPAHs)濃度介於 63.3 ~ 12,731 ng/g dry wt. 之間，與 LPAH 的分佈相似，SR 測站的濃度明顯高於其他測站 2-3 個位數(圖 4.13)。底泥中總 PAH(Σ PAHs)濃度介於 77.9 ~ 24,362 ng/g dry wt. 之間，SR 底泥明顯高於其他測站 4.5~300 倍之間(圖 4.14)。在 16 種檢測之 PAHs 中，Phenanthrene (PH)、Fluoranthene (FLU)、Pyrene (PY)及 Chrysene (CH) 等四種為主要 PAHs 化合物，平均約佔 Σ PAHs 的 9.0%、13.3%、13.4%及 9.7%。各測站底泥 16 種 PAH 之濃度相較於底泥品質指標值顯示，E1、LR、CR 及 JR 底泥之 16 種 PAH 皆低於底泥品質指標值之下限值，惟 SR 底泥之 16 種 PAH 濃度皆明顯高於下限值，其中 Naphthalene (NA)、Acenaphthene (ACE)、Fluorene (FL)、Phenanthrene (PH)、Anthracene (AN)、Fluoranthene (FLU)、Benzo[a]anthracene (BaA)等 7 種 PAH 甚至高於上限值(表 4.2)，顯示 SR 測站底泥知 PAH 對水域生物體有產生危害影響之虞。另外，由總 LPAH 與 HPAH 的含量比值顯示(圖 4.15)，各測站之比值介於 0.1 ~ 0.9 之間，顯示 PAHs 主要可能是來自燃燒來源(pyrolytic)的貢獻，而原油來源(petrogenic)比例較低。

表 4.2 底泥 PAH 分析結果

PAH (ng/g dw)	E1	LR	CR	JR	SR	下限值 ¹	上限值 ¹
Naphthalene (NA)	3.1	17.0	32.7	12.7	1989	70	550
Acenaphthylene (ACY)	0.9	4.6	5.9	6.3	301	40	420
Acenaphthene (ACE)	0.8	5.5	10.2	3.7	2086	40	270
Fluorene (FL)	1.5	8.6	20.7	8.8	2558	40	260
Phenanthrene (PH)	5.9	31.0	39.9	28.1	3609	150	1120
Anthracene (AN)	2.3	11.7	13.1	12.2	1089	80	800
Fluoranthene (FLU)	4.9	108.4	70.7	50.2	2906	290	2860
Pyrene (PY)	8.0	92.6	71.9	55.2	2216	290	2410
Benzo[a]anthracene (BaA)	5.0	43.4	28.8	23.9	1840	140	1210
Chrysene (CH)	9.5	76.6	40.8	29.4	1534	190	1730
Benzo[b]fluoranthene (BbF)	4.5	42.3	39.4	6.5	379	160	1340
Benzo[k]fluoranthene (BkF)	3.5	37.5	9.3	10.4	505	320	3030
Benzo[a]pyrene (BaP)	3.1	40.4	16.9	20.9	1368	160	1400
Indeno[1,2,3-c,d]pyrene (IP)	6.7	43.3	11.1	18.6	1061	160	1230
Dibenz[a,h]anthracene (DA)	12.2	4.9	0.6	2.4	100	40	260
Benzo[g,h,i]perylene (BP)	5.9	120.6	16.5	26.1	822	150	1280
ΣLPAH	14.6	78.4	122.5	71.7	11632		
ΣHPAH	63.3	609.9	306.2	243.6	12731		
ΣPAH	77.9	688.3	428.7	315.3	24363		

1. 底泥品質指標之分類管理及用途限制辦法(101.1.4，環署土字第 1000116349 號令訂定)之第四條底泥品質指標項目及其上、下限值。

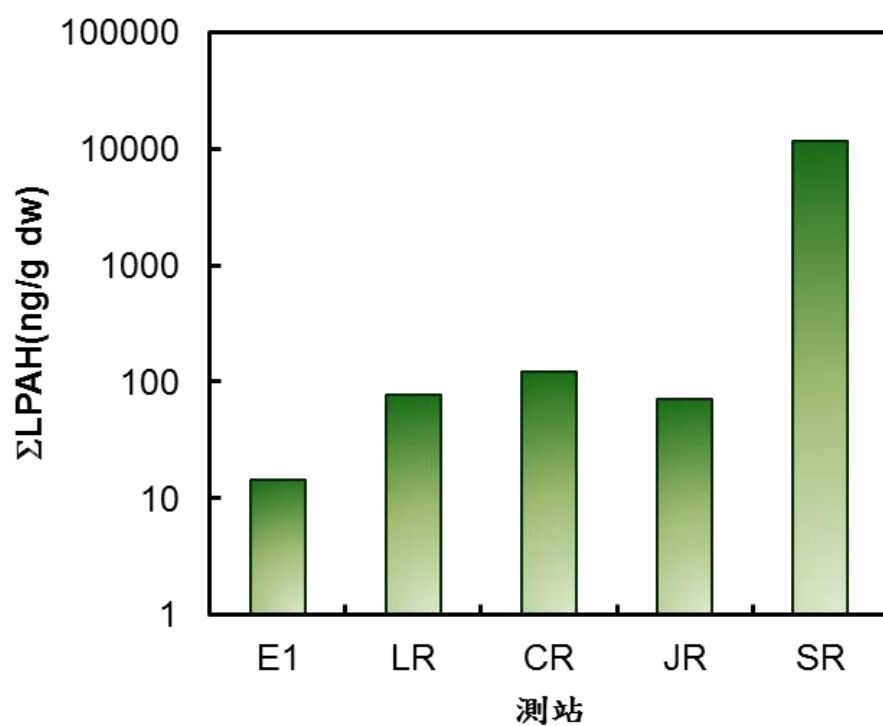


圖4.12 底泥LPAH分佈圖

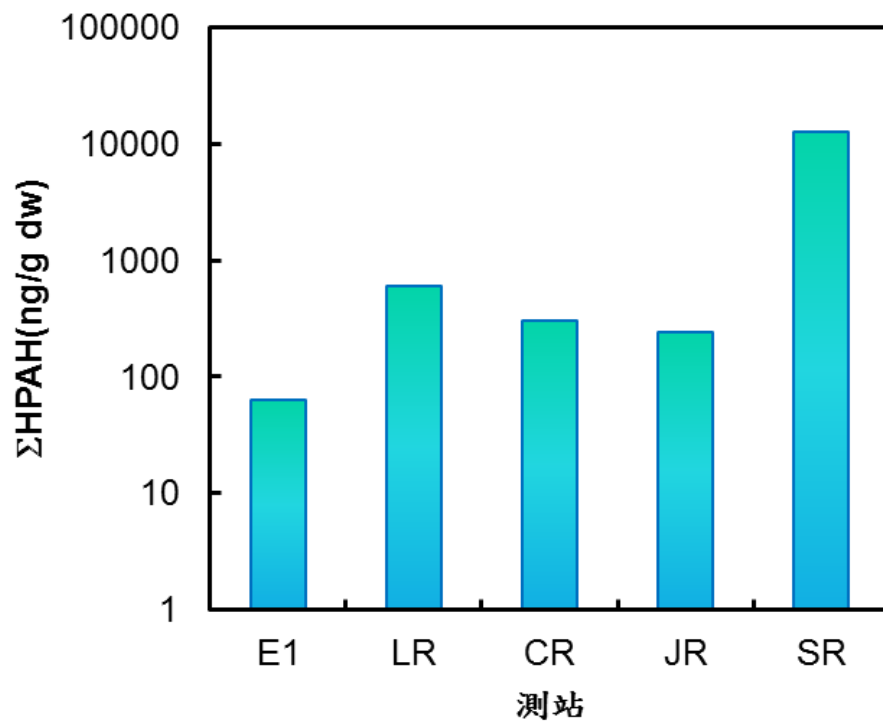


圖4.13 底泥HPAH分佈圖

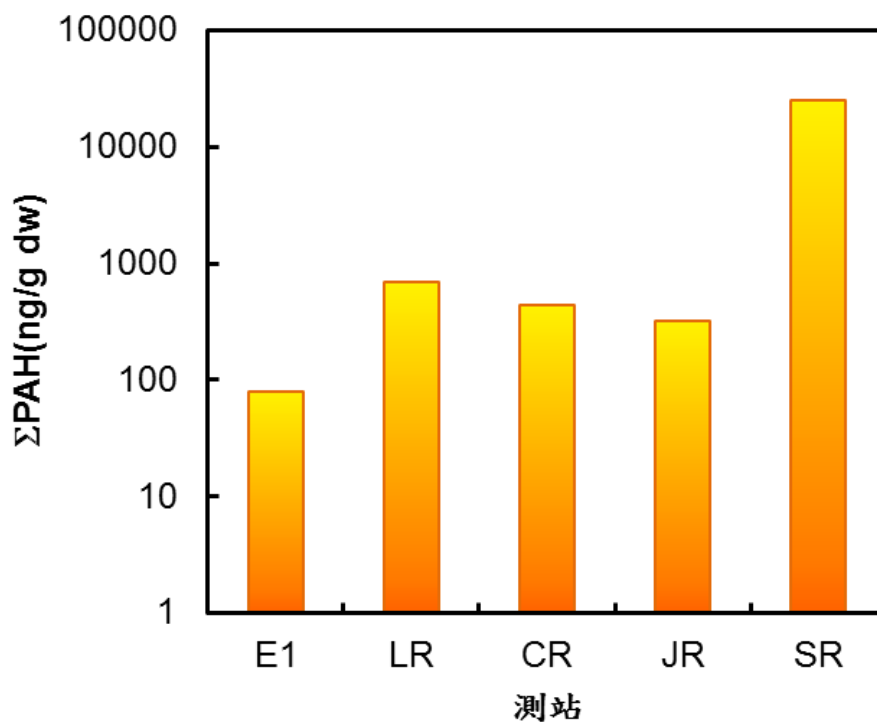


圖4.14 底泥ΣPAH分佈圖

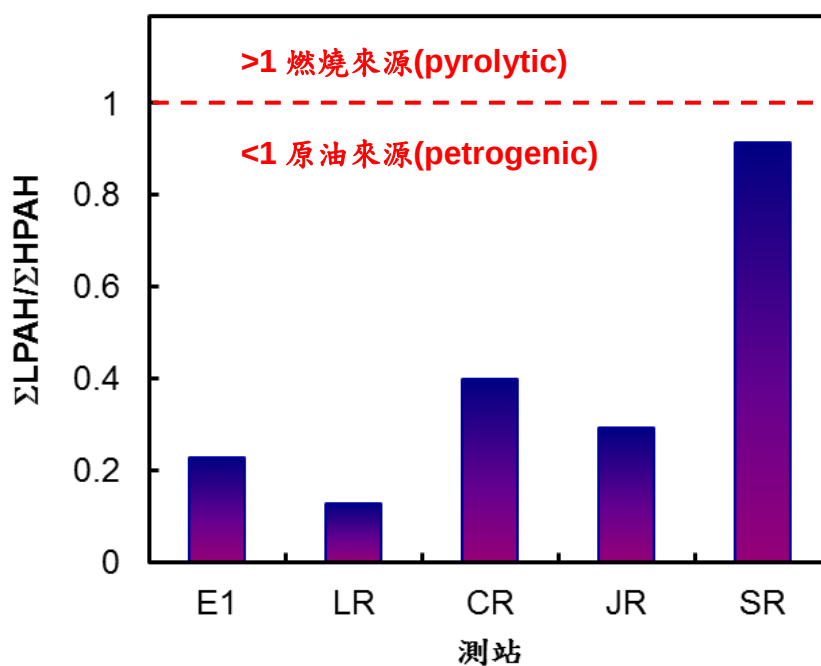


圖 4.15 底泥 LPAH/HPAH 分佈圖 [LPAH/HPAH >1 燃燒來源 (pyrolytic) ;
LPAH/HPAH <1 原油來源 (petrogenic)]

(2) PAE

表4.3顯示5個測站底泥中10種PAEs的濃度分佈。E1測站底泥測得4種PAE濃度值，其中以DEHP的濃度156 ng/g dry wt. 最高。LR及CR測站底泥10種PAE皆有測的濃度值，其中DEHP及DiNP為主要物種，合計約佔 Σ PAE的92.9% (LR)與93.2%。JR測站底泥測得7種PAE濃度，同樣以DEHP及DiNP為主要物種，合計約佔 Σ PAE的98.1%。SR測站底泥除了DiDP外，其於9種PAE皆有測得濃度，同樣以DEHP及DiNP為主要物種，合計約佔 Σ PAE的98.4%。各測站底泥 Σ PAE濃度分佈如圖4.16所示，LR測站的 Σ PAE濃度(118,010 ng/g dry wt.)明顯高出其它測站許多，約為LR、JR及SR的3-4倍。相較於底泥品質指標值，各測站底泥之DEP、DnBP及BBP濃度皆低於底泥品質指標值之下限值(DEP：1260、DnBP：22000及BBP：22000ng/kg dry wt.) (圖4.17~圖4.19)，惟各測站之DEHP濃度除了E1測站外，其餘四個河口測站之底泥DEPH濃度皆高於下限值1970 ng/kg dry wt.，其中LR測站之DEHP濃度42,109 ng/kg dry wt.已超出上限值19700 ng/kg dry wt. (圖4.20)。依據報導，世界各地沉積物的PAEs的濃度範圍約介於0.1 ~ 100,000 ng/g之間，本研究四個河口底泥(36331 ~ 118,010 ng/g) PAEs監測結果相對較高。

PAE是製作PVC等的塑化劑，但亦有被用於製作化妝品、殺蟲劑和阿斯匹靈。這類化學物質會干擾動物體之生理作用如代謝、行為、生殖及性別分化等，因此屬於外因性內分泌干擾物質(endocrine disrupter substance, EDS)也被稱為環境賀爾蒙，長期大量暴露下，可能會影響生物體免疫、神經與內分泌系統正常運作，進而改變生殖或發育現象。DEHP在水中的溶解度不高(2.49×10^{-3} mg/L)，但高溫易溶於非極性溶劑，易吸附在底泥及粒狀污染物(aerosol)並累積在無脊椎動物、魚類及植物體內。人體在48小時內約90%可經尿液或糞便代謝。在富營養的自然環境中數週即會經由好氧生物過程分解，但在厭氧環境下分解極慢，多年不分解。其魚類之LC50為0.16mg/l/96H，水生無脊椎動物之EC50為0.16mg/l/48H。

表4.3 底泥PAE及AP分析結果

PAE (ng/g dw)	E1	LR	CR	JR	SR	下限值 ¹	上限值 ¹
Dimethyl Phthalate (DMP)	28.2	9.7	8.2	27.7	22.1	-	-
Diethyl Phthalate (DEP)	11.5	55.2	19.5	14.8	21.3	1260	22000
Di-isobutyl Phthalate (DiBP)	ND	34.6	13.4	23.7	27.4	-	-
Di-n-butyl Phthalate (DnBP)	ND	96.5	51.5	73.2	164	22000	160000
Dihexyl Phthalate (DHP)	ND	11.0	12.1	ND	5.3	-	-
Benzyl Butyl Phthalate (BBP)	ND	19.2	34.5	ND	9.3	22000	300000
Di-(2-ethyl hexyl) phthalate (DEHP)	153	42109	14647	10604	9616	1970	19700
Di-n-octyl Phthalate (DNOP)	76.3	327	340	377	404	-	-
Di-isononyl Phthalate (DiNP)	ND	67496	19191	16494	30182	-	-
Di-isodecyl Phthalate (DiDP)	ND	7852	1995	ND	ND	-	-
ΣPAE	268	118,010	36,311	27,614	40,451	-	-
AP (ng/g dw)							
4-nonylphenol (NP)	32.6	5490	38275	84319	1722	-	-
4-t-octylphenol (OP)	ND	1417	82.7	119	155	-	-
ΣAP	33	6,907	38,358	84,438	1,877	-	-

1. 底泥品質指標之分類管理及用途限制辦法(101.1.4，環署土字第 1000116349 號令訂定)之第四條底泥品質指標項目及其上、下限值。

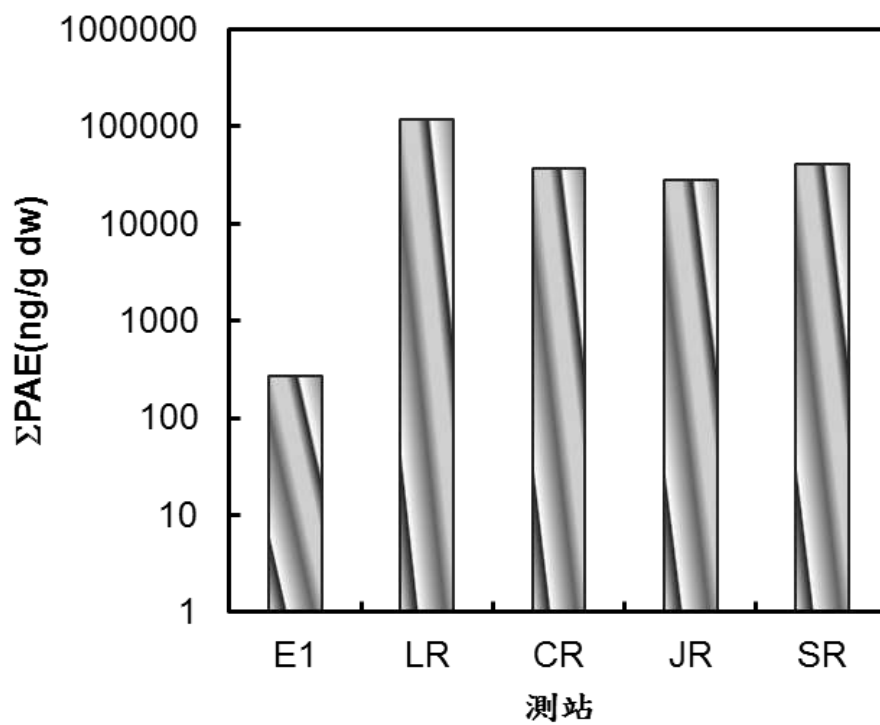
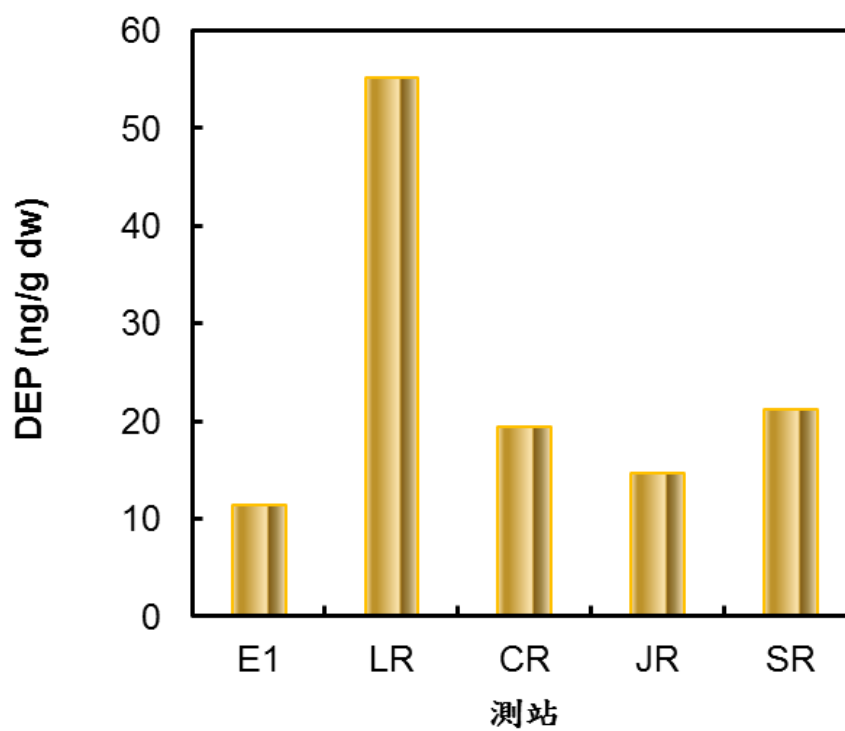
圖4.16 底泥 Σ PAE分佈圖

圖4.17 底泥Diethyl Phthalate (DEP)分佈圖

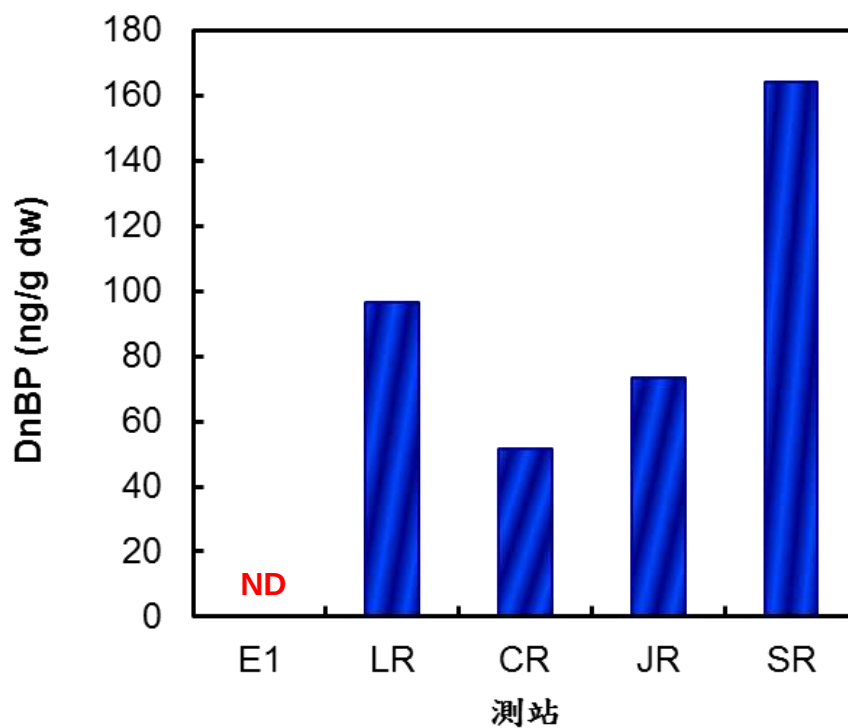


圖4.18 底泥Di-n-butyl Phthalate (DnBP) 分佈圖

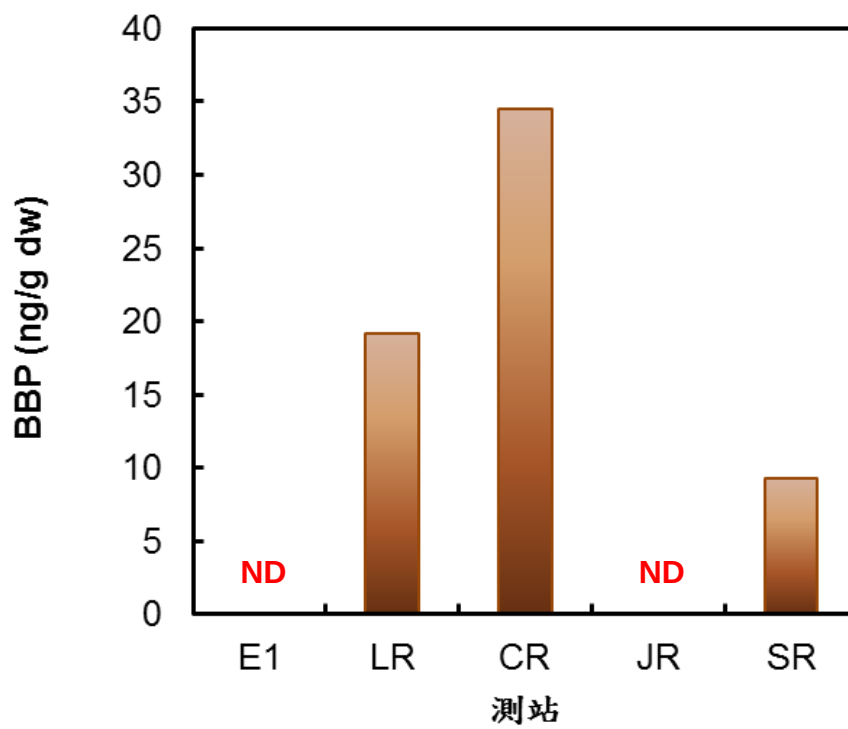


圖4.19 底泥Benzyl Butyl Phthalate (BBP) 分佈圖

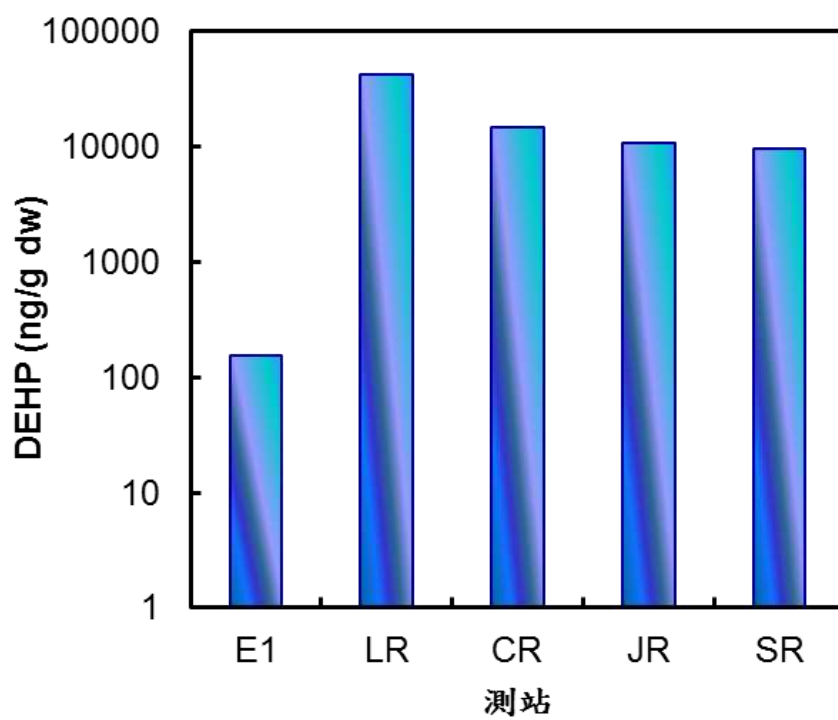


圖4.20 底泥Di-(2-ethyl hexyl) phthalate (DEHP) 分佈圖

(3) AP

表 4.3 列出 5 個測站底泥樣品的 4-NP 及 4-t-OP 濃度分佈。4-NP 及 4-t-OP 濃度分別介於 32.6 ~84,319 ng/g dw 及 ND ~ 1417 ng/g dw 之間。高雄港沉積物 4-NP 及 4-t-OP 平均濃度分佈圖顯示(圖 4.21 及圖 4.22)，河口附近的沉積物 4-NP 及 4-t-OP 濃度明顯較高，尤其是 JR 的 4-NP 及 LR 的 4-t-OP 濃度最高，濃度分別為 84,319 ng/g dw 及 1417 ng/g dw，此結果顯示 JR 及 LR 河川是主要的污染注入源。JR 測站底泥之 4-NP 平均含量約為其他三條河口的 9~17 倍；LR 底泥 4-t-OP 含量約為其他三條河口的 2 ~50 倍。此應是前鎮河及愛河承受沿岸的工業廢水及未經處理的市政廢污水[6-7]。雖然，前鎮河及愛河於流域中上游處有設置一截流閘門，將截流的廢污水輸送至中洲污水處理場處理，而降低河川水中的污染物；然而，在濕季時，河水攔截閘門則被開啟，以使因暴雨所帶來的激增流量通過 (by-passing)。因此，大量 4-NP 經河川沖刷傳輸而累積於河口沉積物。由底泥肆各河口之 4-NP 及 4-t-OP 之分佈顯示，4-NP 及 4-t-OP 由河川注入後逐漸往進出港口方向擴散傳輸，換言之，4-NP 及 4-t-OP 將逐漸被傳送至港外海域，造成影響範圍逐漸擴大。

綜觀底泥特質、重金屬、PAH、PAE 及 AP 等污染物的分析，可發現 E1 普遍來說都是所有樣點最低者，故當參考樣點是適合的。而其它四個河口呈現不同污染物的分佈特性，亦有利於本研究進行謝體分佈特徵的評估與推斷。

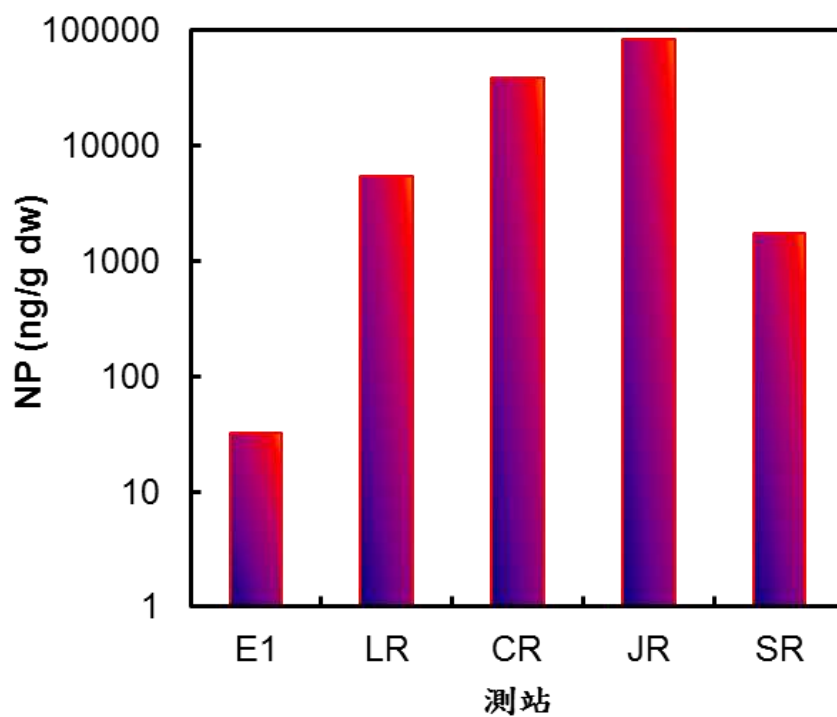


圖4.21 底泥4-nonylphenol (NP)分佈圖

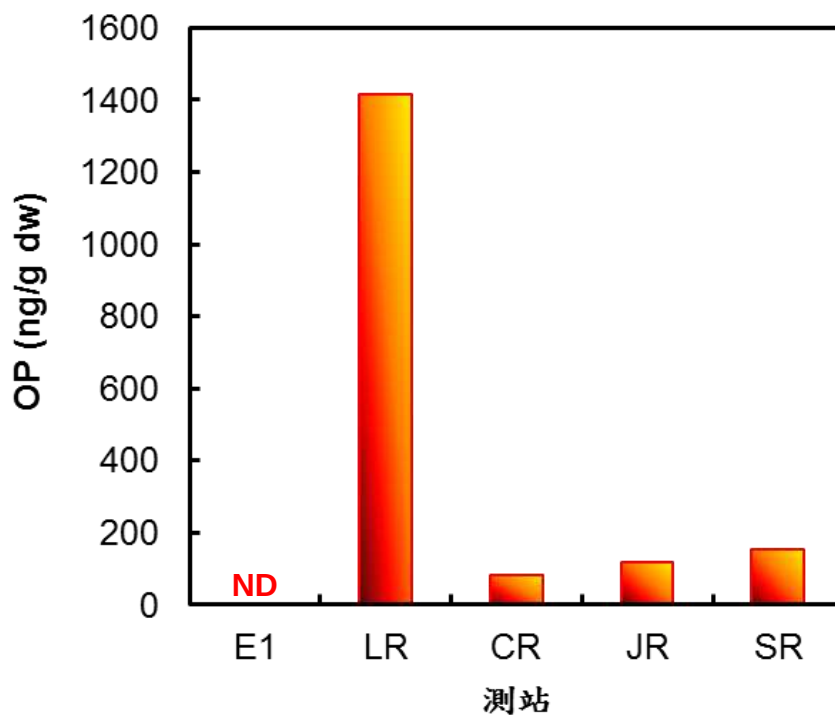


圖4.22 底泥4-t-octylphenol (OP)分佈圖

3. 生物毒性分析

以樣點底泥對實驗室培養的海水端足類進行了毒性測試，結果如圖 4.23。可發現相較於參考樣點 E1，海水端足類暴露於底泥 10 天後，其他各樣點的端族類均有顯著的死亡率。相較初步成果以文蛤實驗，文蛤於 10 天幾乎在所有底泥樣點都呈現全部死亡的現象，所以以海水端足類在 10 天後仍有 70~80%活存率的現象，生物體在 10 天的毒性測試上仍具有相當調適的能力，故也可以進一步用來計算生物在面對底泥慢性毒性測試上的生理調適及反應。

本研究乃以全底泥生物毒性測試的研究，來評估底泥中污染物質對底棲生物的危害，以提供潛在毒性相關資訊，由前述測量的物化特性和重金屬及 PAHs 的在不同底泥的分佈，除了參考樣點 E1 明顯較其他樣點污染源較低外，其餘的各樣點的污染源並無一致性的現象，如汞、鎘和鋅最高出現在 CR；鉛、銅、鎳及錳最高出現在 SR；鉻和鋁出現於 JR。顯示整體污染物對端足類毒性存在，但很難區分哪一類污染物的影響最高。

因此我們試圖以底泥毒物對端足類分子層面上的影響，看能否釐清哪一類的污染物對其生理代謝的影響及衝擊。

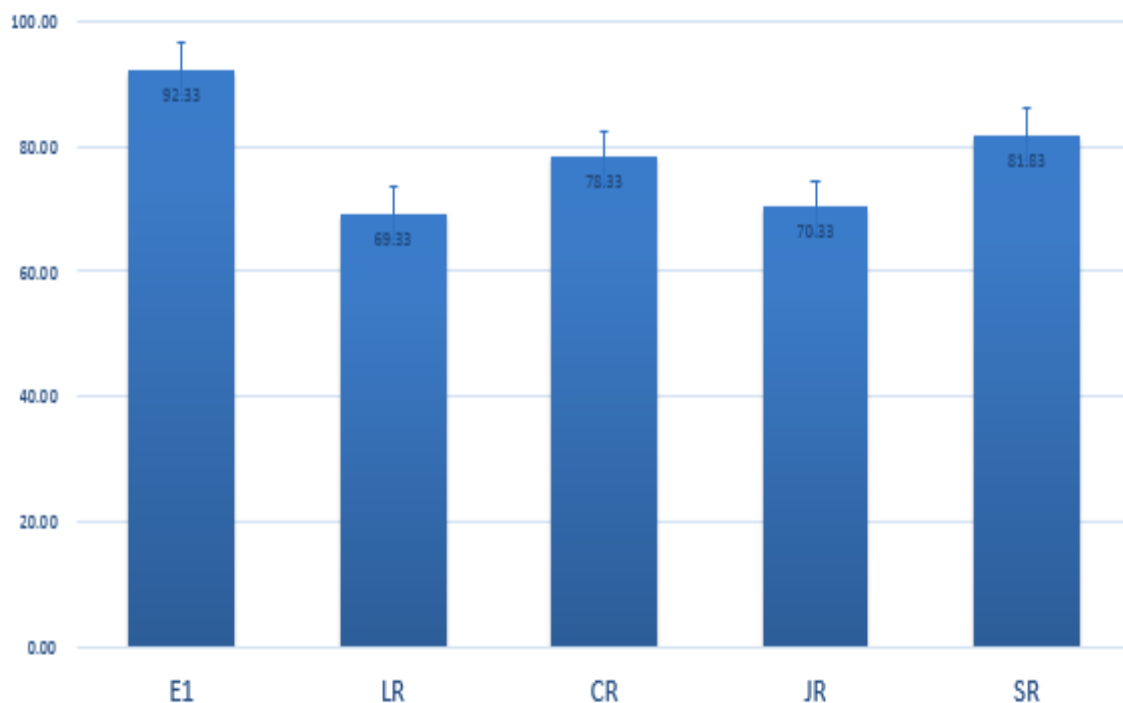


圖 4.23 端足類暴露於不同底泥下 10 天後之存活率

4. 端足類代謝物 NMR 光譜

海水端足類暴露於底泥 10 天後，將活體端足類取出後，以液態氮冷凍，以預冷於-20℃ 的 50% 甲醇研磨翠取其 polar metabolites。以 500MHz 液態 NMR 測試其 ^1H 光譜，由五個樣點代表的樣本堆疊光譜結果顯示(圖 4.24)，由目視指認 (visual inspection)其代謝物光譜在不同樣點間並沒有明顯的差異。我們以資料庫進行代謝物指認，指認出的代謝物共 35 種，以此 35 種代謝物的含量進行 PLS-DA，觀察端足類暴露於在不同樣點的底泥，是否表現出不同的代謝物，而能使其分群。結果發現依據代謝物的種類及其含量，PLS-DA 共分成兩群：(E1, LR, CR)及(JR, SR)(圖 4.25)。利用 VIP plot 來鑑定出對分群有貢獻的代謝物，我們篩選 VIP>0.9 的代謝物，共得到 24 個代謝物(表 4.4)，包括 glutathione, homocystine, isocaproate, isoleucine, leucine, levulinate, lysine, methylmalonate, methylsuccinate, N-acetylglutamate, N-acetyltyrosine, ornithine, oxalacetate, pimelate, proline, propionate, suberate, theophylline, threonine, trimethylamine N-oxide, tryptophan, valerate, valine, valproate。而這些代謝物含量進一步進行 ANOVA 分析，在樣點間均有顯著差異。

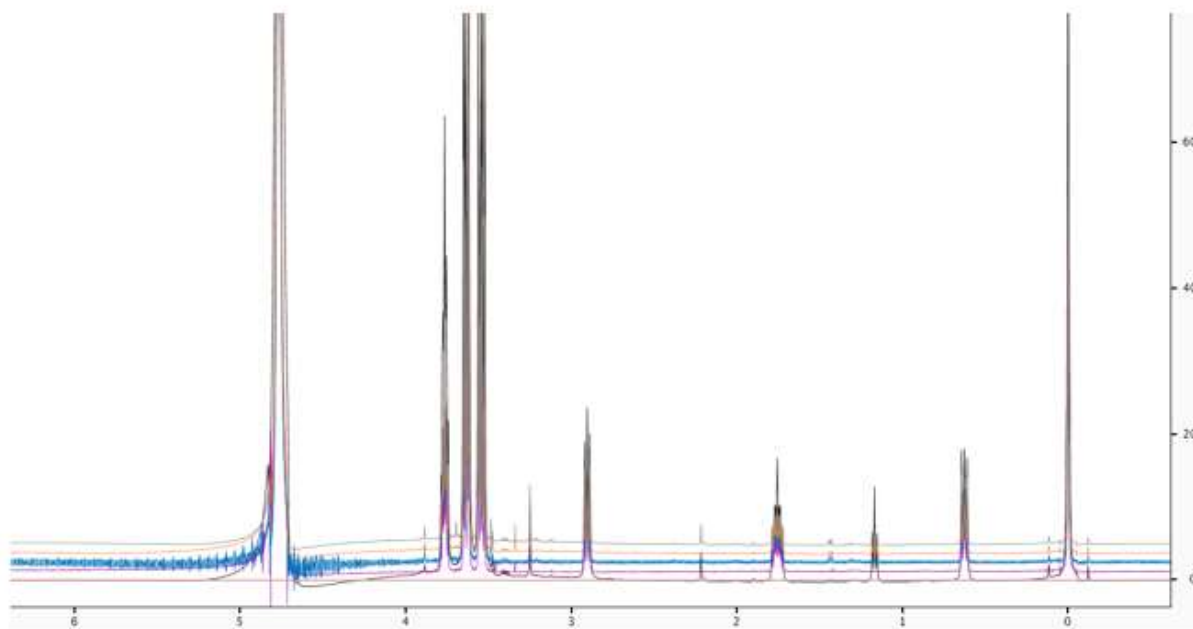


圖 4.24 端足類代謝物 ^1H NMR 光譜

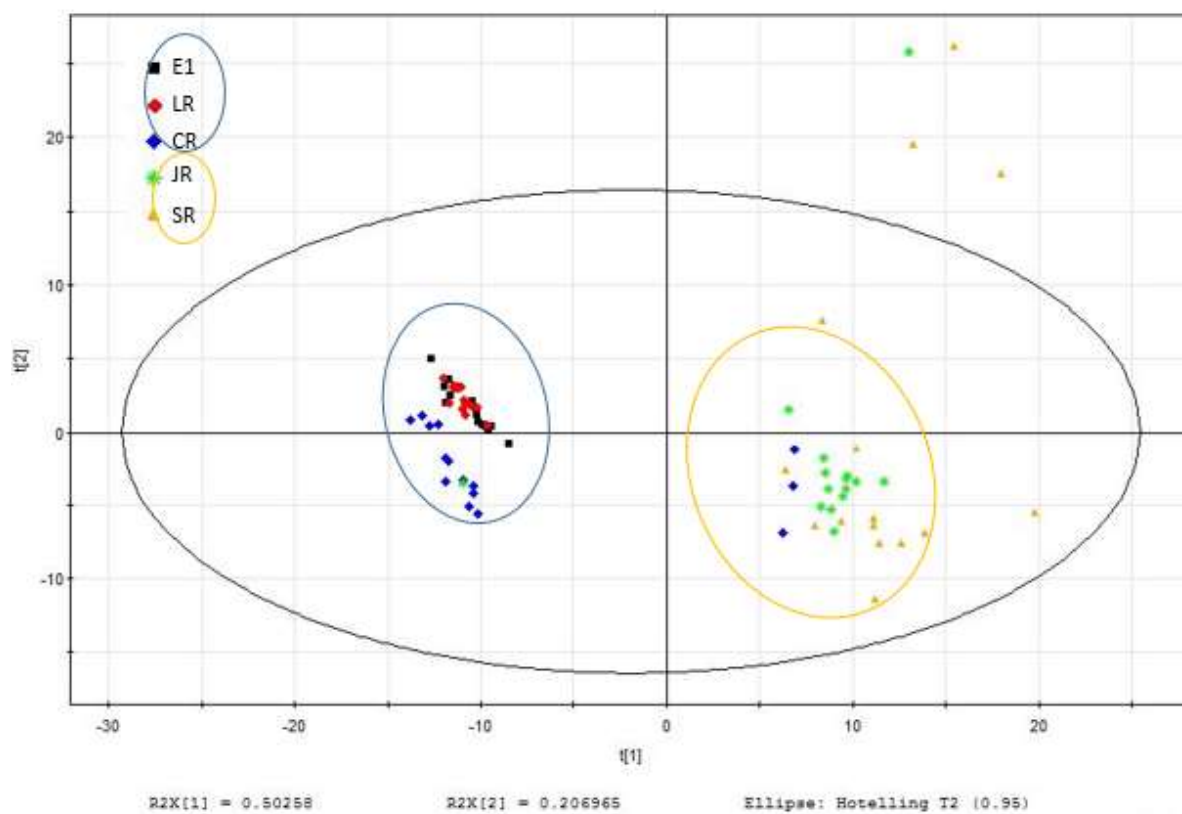


圖 4.25 端足類代謝物 PLS-DA 分析

表 4.4 代謝物生物標記的 VIP score 及各樣點的 AOU

	VIP score	AUC (ROC analysis)			
		LR	CR	JR	SR
Glutathione	0.95	0.72	0.76	0	0.06
Homocystine	0.96	0.53	0.65	1	1
Isocaproate	0.97	0.44	0.51	1	0.97
Isoleucine	0.90	0.35	0.38	0	0.07
Leucine	0.92	0.34	0.41	0	0.07
Levulinate	0.97	0.63	0.67	1	0.97
Lysine	0.97	0.48	0.53	0	0.02
Methylmalonate	1.40	0.49	0.6	0.8	0.93
Methylsuccinate	0.96	0.37	0.7	1	1
N-Acetylglutamate	0.93	0.35	0.58	1	1
N-Acetyltyrosine	0.97	0.62	0.43	0	0
Ornithine	0.96	0.35	0.39	0	0.07
Oxalacetate	2.03	0.49	0.6	1	1
Pimelate	0.96	0.42	0.58	1	0.98
Proline	0.98	0.34	0.58	1	1
Propionate	0.96	0.57	0.9	1	1
Suberate	0.96	0.42	0.6	1	0.98
Theophylline	0.96	0.53	0.4	1	0.94
Threonine	0.96	0.58	0.55	1	0.96
Trimethylamine N-oxide	0.96	0.45	0.63	1	1
Tryptophan	0.96	0.52	0.56	1	0.99
Valerate	0.96	0.44	0.58	1	0.98
Valine	0.98	0.53	0.64	1	1
Valproate	0.98	0.5	0.52	1	0.95

為了測試這些代謝物當成生物標記在這些樣區的專一性及敏感度，利用 ROC curve 建立的曲線(圖 4.26-29)，圖 4.26 為 E1 vs LR 的 ROC 曲線，由我們篩選出的代謝物生物標記，可發現 AUC 都沒有達到 >0.9 的水準，表示在篩選的候選代謝物並無適合區分 E1 和 LR 的生物標記。圖 4.28 的 E1 vs CR 的結果類似於 E1 vs LR 除了代謝物 propionate 外，其餘皆無顯著可以當成生物標記的 sensitivity 及 specificity。而這也解釋為何 PLS-DA 中，E1、LR 及 CR 是沒有顯著分群，表示其整體的代謝物表現無顯著差異。圖 4.29 為 E1 vs JR，可發現相較於 E1，有許多可以當成 JR 特定的生物標記，且部分都高達 $AUC=1$ ，表示專一性和靈敏度相當地高。

由其 ROC 曲線下的面積來判斷其當作生物標記的專一性及敏感度。計算 ROC 曲線時，以 E1 為控制組，其他個樣點為 positive direction，分別將個別的代謝物進行 E1 和各組的比較，也就是上述篩選的候選生物標記，一一進行在 E1 vs LR、E1 vs CR、E1 vs JR、E1 vs SR，由此可以計算每個候選生物標記在 E1 和其他個組間的鑑識度，以 ROC 曲線下的面積(AUC)的數值，高於 0.9 者為高度準確(highly accurate)，共有 homocystine, isocaproate, levulinate, methylmalonate, methylsuccinate, N-acetylglutamate, oxalacetate, pimelate, proline, suberate, theophylline, threonine, trimethylamine N-oxide, tryptophan, valerate, valine, valproate。這些相較於 E1，可以高度鑑別於 JR 和 SR 的生物標記。因為在 PLS-DA 分析上，LR 和 CR 與參考點 E1 是同一分群，所以在生理代謝上除了 propionate 可以區分 E1 vs CR 外，並沒有其他候選的生物指標可以鑑識。將有別於 E1 的生物標記利用 MetaboAnalyst 代謝路徑分析，在 JR 及 SR 篩選出的生物標記與 aminoacyl-tRNA biosynthesis 和 valine, leucine and isoleucine biosynthesis 最有關，而 CR 則為 pantothenate and CoA biosynthesis。

ROC Curves E1 vs LR

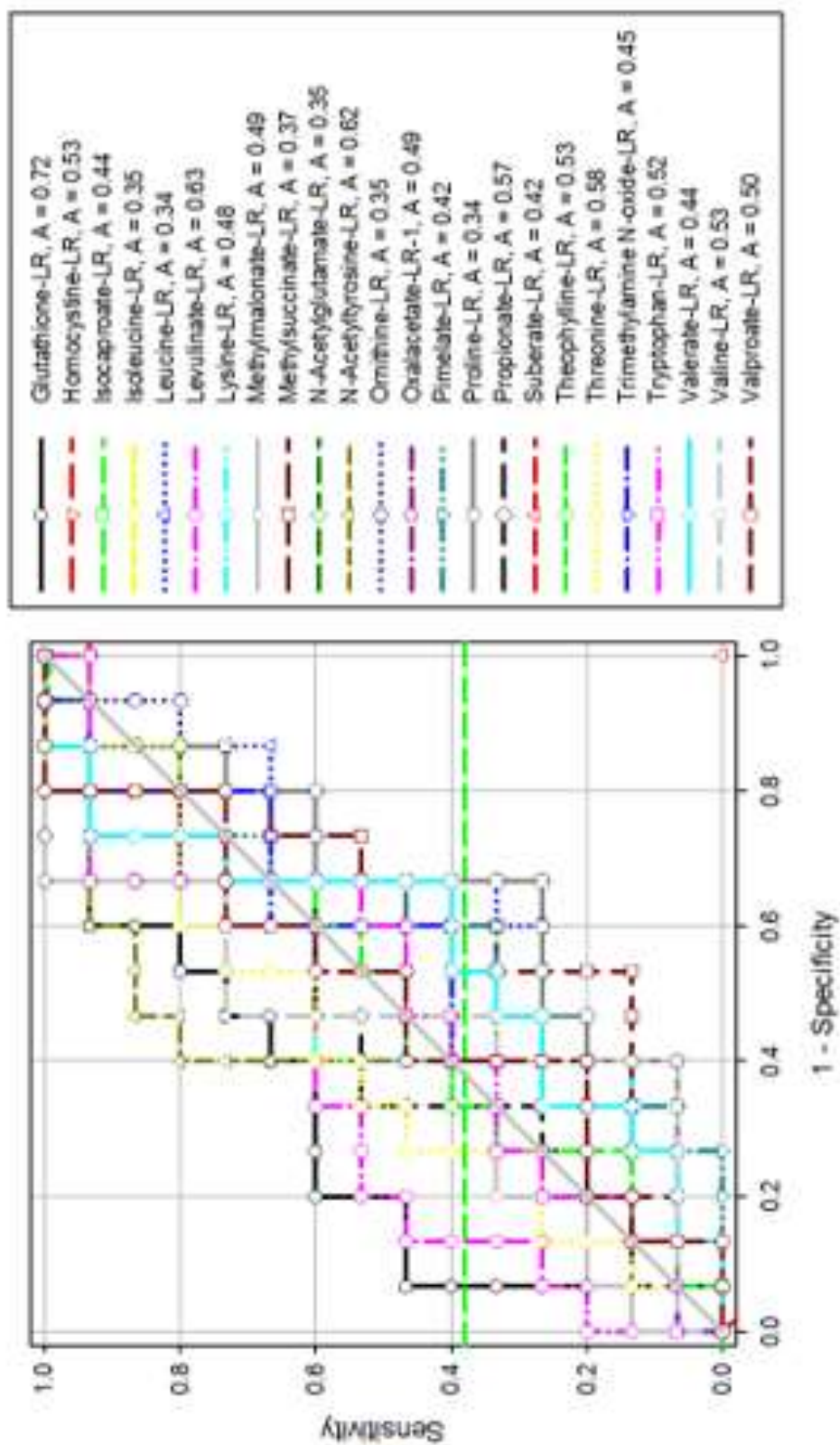


圖 4.26 生物標記在 E1 vs LR 的 ROC 曲線及 AUC 面積

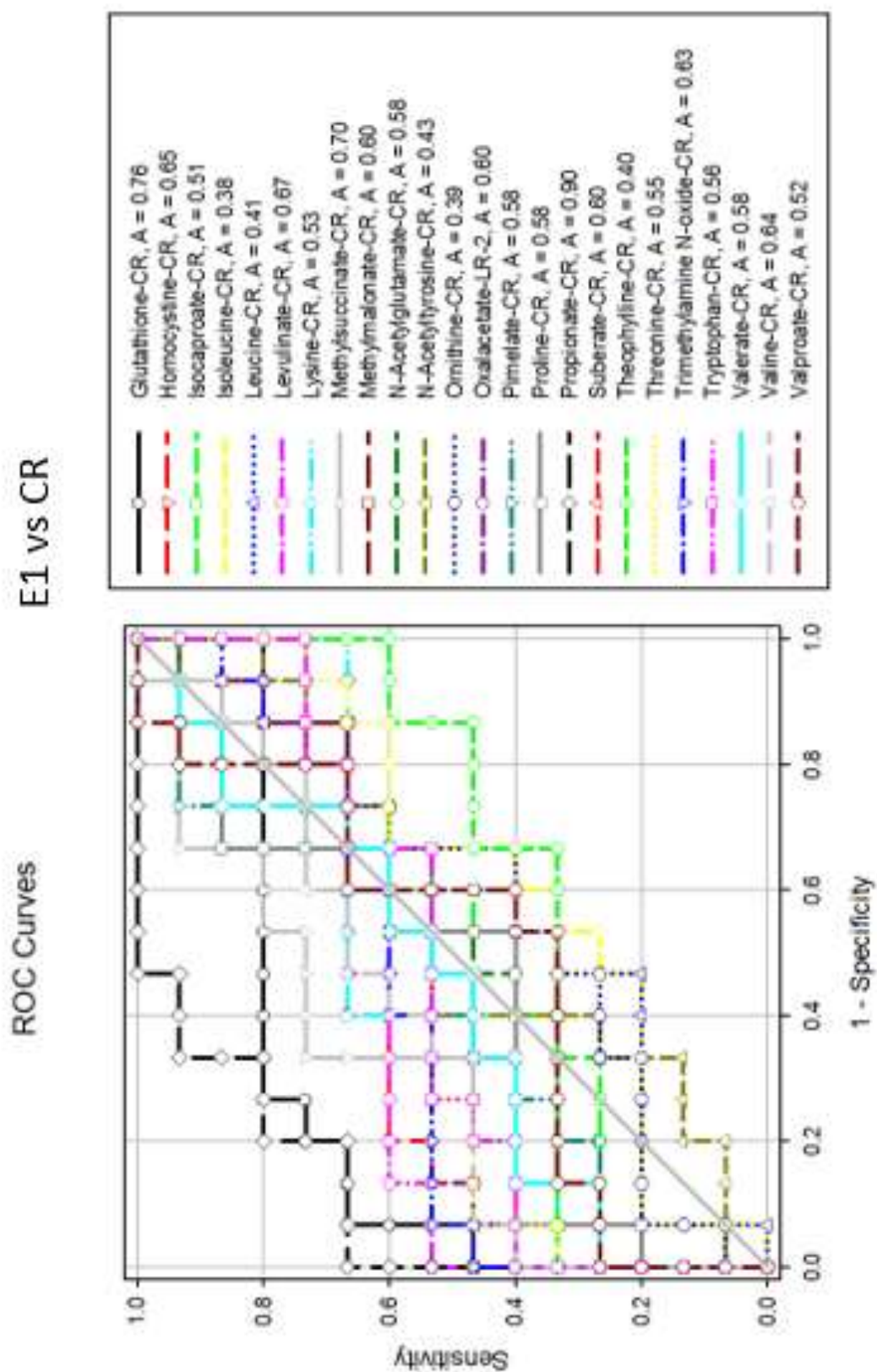


圖 4.27 生物標記在 E1 vs CR 的 ROC 曲線及 AUC 面積

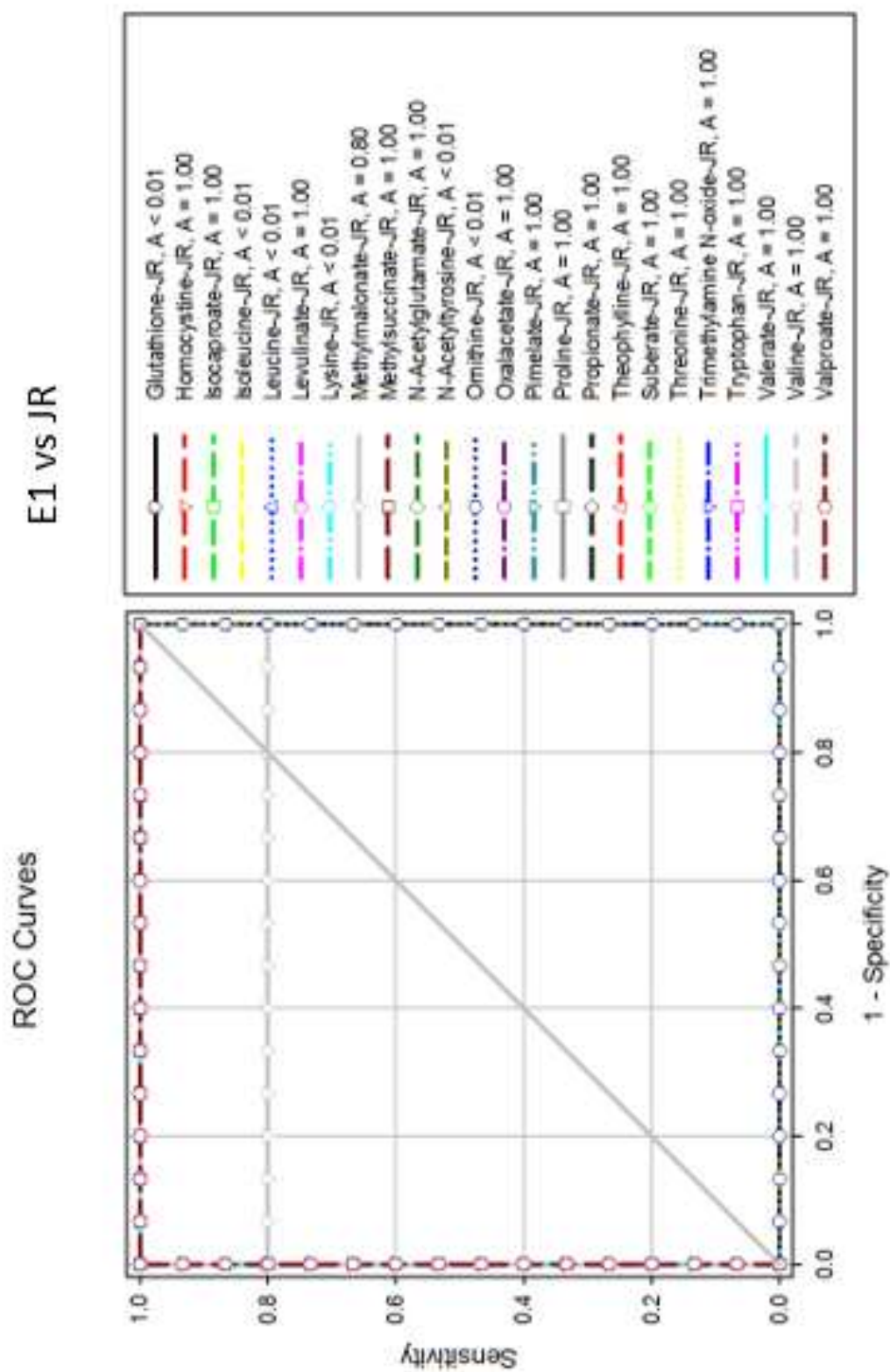


圖 4.28 生物標記在 E1 vs JR 的 ROC 曲線及 AUC 面積

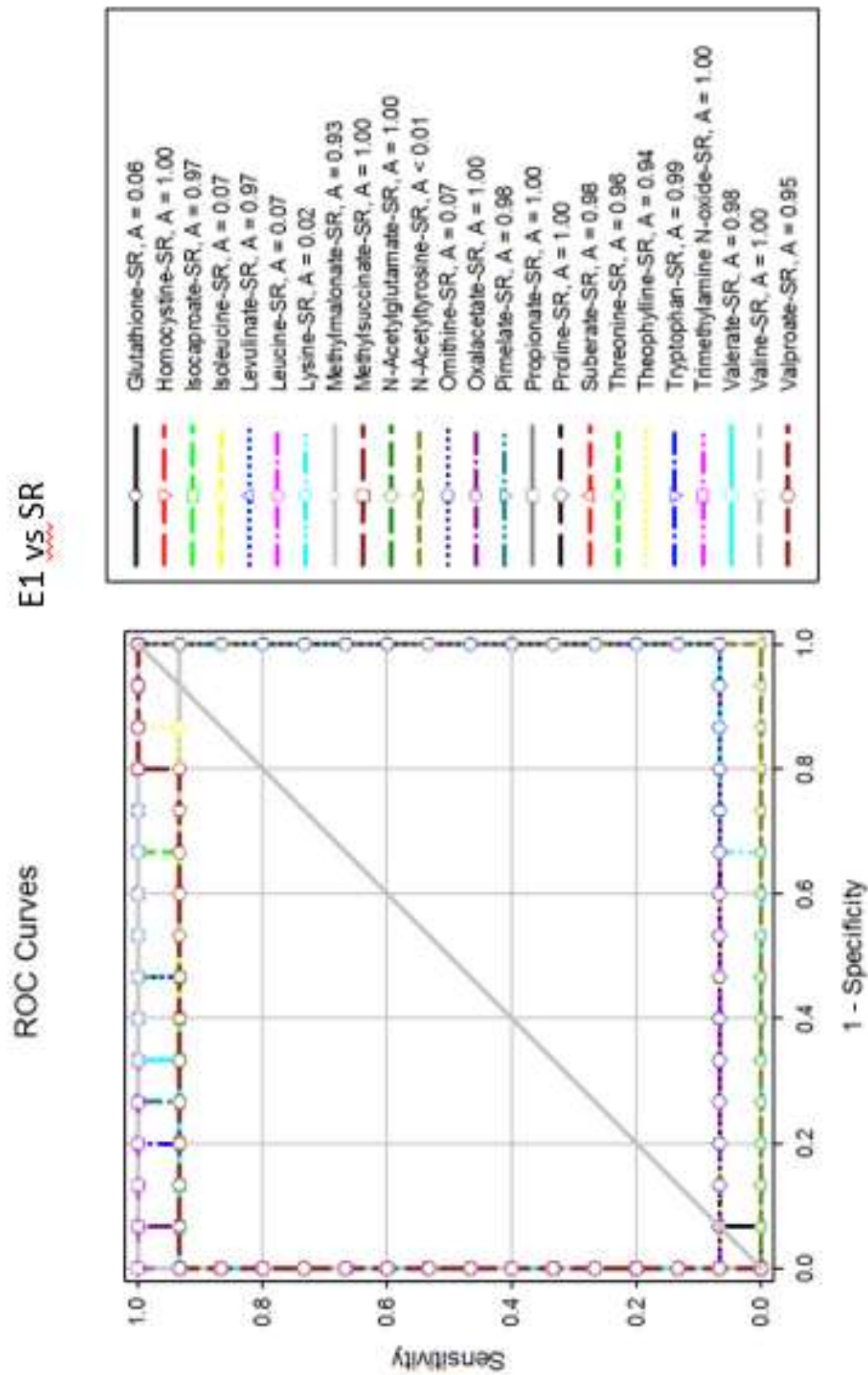


圖 4.29 生物標記在 E1 vs SR 的 ROC 曲線及 AUC 面積

從 PLS-DA 分群的結果，顯示 LR 及 CR 和參考點同屬一群，但汞、鎘和鋅最高出現於 CR，且汞和鎘更是影響生物生理重要的重金屬，這樣的結果可能來自於 JR 及 SR 對海水端足類的影響遠大於 LR 和 CR 對海水端足類的影響。因為底泥污染物是複雜的，且許多污染物對生物造成逆境所影響的生理代謝反應可能有趨同的現象，雖然在污染底泥的污染源並無一致性，很難釐清究竟哪些污染源造成結果顯示的兩群，所以得透過不同污染源的控制實驗，將端足類面對不同污染源的代謝反應予以釐清，瞭解其趨同反應的結果，才能證實以上的推測。

以海洋性端足類當作生物指標的研究已廣泛被利用[57-69]，尤其針對底泥品質(sediment quality)的毒性測試[58,60,62]，無論在急性和慢性毒性試驗上，都被報導是一個可以用來偵測環境的指標生物[63]。Adam et al. (2009)利用混合的多種污染源對淡水端足類 *Gammarus pulex* 進行有機殺蟲劑的毒性測試，發現 propiconazole and tebuconazole (triazoles fungicides)對 *G. pulex* 並無毒性，但 3-iodo-2-propinyl butyl carbamate (IPBC, fungicide) 及 cypermethrin (pyrethroid insecticide)則有毒性。當混合不同比例的上述殺蟲劑，以模擬市售商品來測試時，其毒性結果與 cypermethrin 相當，表示 cypermethrin 在殺蟲劑中對端足類的毒性扮演主要的角色。而僅添加 0.002% cypermethrin 顯示 2.5-18 倍高於以單一殺蟲劑測試的毒性。所以顯示毒性測試當以混合污染物時可能其中有些主要造成毒性的污染物，而利用混合污染源時，可能會加乘毒性作用[61]。

所以本研究以全底泥毒性測試，反映出的為整體底泥毒性，而非單一污染源所造成，由結果顯示，可能在 JR 及 SR 有某些特定污染物，使海水端足類受到的生理代謝反應與其他 LR 和 CR 有明顯的不同。目前針對毒性測試常常因為會了控制污染物變因，所以在實驗室常以特定污染源去測試毒理及生理反應常無法反應真實環境的現象，Watanabe et al. (2015)利用代謝體學在針對五大湖口採集到的斑馬貽貝，也是透過生物體的代謝物表現去瞭解環境的污染情況[70]。採集了四個樣點(含一個參考點)的貽貝 *Dreissena polymorpha*，並以 NMR 分析其組織的代謝物質。而透過 PCA 分析代謝物的表現形態，僅有一個樣點與參考點相異，而單變量分析此樣點與參考點，發現共有 26 個改變的代謝物。而這些代謝物也將可以提供未來環境衝擊及整治時的生物標記。環境代謝體學越來越被廣泛使用於鑑定生物體暴露於某種環境壓力因子下的代謝反應，在尋找代謝生物標記研究上，主要也是跟隨著基因體和蛋白體學的方式，利用刺激物觀察生物的基因或蛋白質表現，而代謝體學則針對代謝物質去著手，除了它代表著生理作用的最下游，同時因為分子量小，在未來發開試劑或偵測技術上也顯得有前瞻的應用性。這方面普遍用於疾病上的研究，更衍生出『Exposome』(暴露體)的概念，乃量測個體自生命早期(受孕開始)到生命最終所接觸的總暴露，然後用以描繪所暴露的

環境因子對人類健康與疾病的相互影響[71,72]，而其中也應用著代謝體學方法來鑑定人類的暴露體[73]。

而從環境因子與生物表現的生物指標上，這被影響的生物指標從個體生物學上，我們可以觀察到包含生物行為，包括避敵(avoidance)、行動(locomotion)、穴居(burrowing)、攝食(feeding)及生殖(reproduction) [74]。而利用分子層面，包括蛋白質或代謝物的表現，許多例子利用蛋白質表現來當作生物暴露於某些環境因子時，即以生物體內的變化，來反應出環境間的毒物，並進一步進行風險評估，陸地上的研究，以蚯蚓(earthworm)常用來當作生物指標，研究其體內的生物標記的表現。如 lysosome 的表現，及當作土壤是否受到燃燒塑膠的污染[75]，而世界上也以蚯蚓進行了一連串的研究，試圖尋找其體內生物標記來當作環境的暴露因子，並當作風險評估的指標[76]，這些生物標記包含了蚯蚓暴露於對重金屬鉛、銅、鋅、鎘及有機污染物 Carbaryl、Diazinon、Benzo(a)pyrene、Chlorpyrifos 等表現的生物標記，這些生物標記包括了 AChE、MROD、NADH Red、NADPH Red、Catalase、GR、GST、LP and LPI、ChE、Total GSH、% GSSG、NRR assay 等如下表 4.5(資料來源：[76])。而近年來以因為代謝體學的進步，Brown et al. (2014) 利用 NMR 代謝體學方法去探討蚯蚓 *Aporrectodea caliginosa* 的代謝反應，在 PLS-DA 亦可以將不同區域蚯蚓予以分群，且透過代謝物的分析，可以了解其代謝路徑的差異，然而仍無法確切瞭解這兩個環境下的哪些環境因子影響了代謝路徑 [77]。

目前針對端足類亦有許多文獻報導其讀毒理學的報導[57-69]，但針對其生物標記開發的報導仍相當稀少，這也是本研究先以此模式建立起先驅平台後，未來可以更進一步地瞭解哪些污染物對端足類的影響，故環境代謝體學的新平台開發對高雄港底泥研究及應用有指標性意義。

表 4.5 其他文獻蚯蚓暴露於化學物質表現的生物標記(1/4) (資料來源：[76])

Species	Test substance: chemical form	Concentration and time of exposure	Test conditions	Biomarkers	Main remarks
<i>E. foetida</i>	Chlorpyrifos	2.96 ± 0.39, and 2.33 ± 0.39 mg ml ⁻¹ 12, 24, 36, and 48 hr	Filter paper contact test (OECD, method 207)	AChE	Significant inhibition (>60%) of AChE activity at the two pesticide concentrations. Morphological abnormalities (necrosis and damage of the structure of muscles, bloody lesions, rectal areas detached).
<i>Drawida wiltsi</i> (juveniles)	Butachlor, Malathion and Carbofuran	1.1, and 2.2 mg kg ⁻¹ (butachlor and carbofuran) 2.2 and 4.4 mg kg ⁻¹ (malathion) Periodically from 1 to 105 d	Natural soil Soil moisture = 20% Temp. = 25° ± 2°C pH = 6.8	AChE	No variations of AChE activity in earthworms exposed to butachlor. Maximum AChE inhibition (41% and 46%) after 9 d of malathion exposure, and after 12 d (54% and 62.9%) of carbofuran exposure. AChE recovered its normal activity after 45 d of malathion exposure, while it needed 75 d to full activity recovery under carbofuran exposure.
<i>Lumbricus rubellus</i> (adults)	Pyrene	10, 40, 160, 640, and 2,560 mg kg ⁻¹ 42 d	Artificial sterilized loam soil Soil moisture = 80% Temp. = 15° ± 1.5°C 16:8 hr, L:D cycle	EROD Catalase	No EROD activity was detected. Catalase activity was lower in earthworms exposed to 160 and 640 mg kg ⁻¹ respect to control group.
<i>Aporrectodea tuberculata</i> (clitellate adults)	Cu: CuCl ₂ ·2H ₂ O Zn: ZnCl ₂	Cu/Zn = 100/175, 200/350, and 400/700 mg kg ⁻¹ 2, 7, and 14 d	Natural soil (collected from Jyväskylä, a nonpolluted area in Finland) Soil moisture = 26% ± 4% pH = 6.7 ± 0.1 Temp. = 15°C Darkness	CYP1A MT GST	Concentration-dependent induction of MT in earthworms exposed to Cu and Zn after 2 and 7 d of exposure. Earthworm populations naturally exposed to metal-contaminated soils showed a higher MT induction than not naturally metal-exposed population after 2 and 7 d of exposure to Cu/Zn-spiked soils. Induction of CYP1A activity after Cu and Zn exposure.

表 4.5 其他文獻蚯蚓暴露於化學物質表現的生物標記(2/4) (資料來源：[76])

Species	Test substance: chemical form	Concentration and time of exposure	Test conditions	Biomarkers	Main remarks
<i>E. fetida</i> (clitellate adults)	Zn and Pb	Reference soil: Zn = $1.75 \pm 0.25 \mu\text{g g}^{-1}$ Pb = $4.30 \pm 0.99 \mu\text{g g}^{-1}$ Metalliferous soil: Zn > $1,500 \mu\text{g g}^{-1}$ Pb > $500 \mu\text{g g}^{-1}$ 20 d	Reference soil: commercial Kettering loam pH = 6.1 Organic matter = 7.0% Metalliferous soil: collected at an abandoned Zn/Pb mine pH = 6.4 Organic matter = 35% Temp. = $15^\circ \pm 1^\circ\text{C}$ Soil moisture = 75% 12:12 hr, L:D cycle	Annetocin	A 20-fold reduction in the annetocin expression was found in earthworms exposed to the metalliferous soil respect to those exposed to the reference soil.
<i>E. andrei</i> (clitellate adults)	Cu: $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Cu = 20, 40, 80, 160, and 320 mg kg^{-1} 28 d	Field soils Soil moisture = 50% pH = 5.6 Organic matter <1% Temp. = 15°C Constant light	NRR assay	Significant dose-related decrease in the NRR time with soil and body Cu concentrations. Suggested toxic threshold for the Cu of $40\text{--}80 \text{ mg kg}^{-1}$. NRR assay becomes a more sensitive indicator than mortality or individual growth.
<i>E. fetida</i> (clitellate adults)	Cu: $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Cu = 50, 100, 300, 700, and 1400 mg kg^{-1} 21 d	Natural soil, pH = $6.5\text{--}7.0$ Temp. = $20^\circ \pm 1^\circ\text{C}$ 12:12 h, L:D cycle	NRR assay	Earthworms exposed to soils spiked with 300 mg kg^{-1} showed a NRR time <4 min, indicating a significant toxic effect. A range of NRR times between 4 and 6 min corresponded to an internal Cu concentration $>50 \text{ mg kg}^{-1}$.

表 4.5 其他文獻蚯蚓暴露於化學物質表現的生物標記(3/4) (資料來源：[76])

Species	Test substance: chemical form	Concentration and time of exposure	Test conditions	Biomarkers	Main remarks
<i>E. fetida</i> (clitellate adults)	Pb: $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	Pb = 20, 40, 80, 160, and 320 mg kg^{-1} 28 d	Sieved cattle manure Soil moisture = 75 % pH = 7.0 Temp. = 25°C	NRR assay	Decrease of NRR time with increasing of Pb body burden.
<i>Aporrectodea caliginosa</i> (adults and juveniles)	Diazinon: Basudin 600EW, 60% a.i. Chlorpyrifos: Lorsban 40EC, 40% a.i. 28 d	Diazinon = 12 and 60 mg kg^{-1} Chlorpyrifos = 4 and 28 mg kg^{-1} 28 d	Natural soil. Soil moisture = 25 % pH = 6.5–7.0 Temp. = 20°C Constant light	NRR assay ChE GST	ChE activity was drastically inhibited in juvenile earthworms exposed to 12 (75 % inhibition) and 60 (90 %) mg kg^{-1} of diazinon. Chlorpyrifos caused a ChE depression of 35 % and 70 % respect to controls in earthworms exposed to 4 and 28 mg kg^{-1} , respectively. GST activity was inhibited by both diazinon treatments. NRR time was significantly decreased in adult earthworms exposed to diazinon (>64 % reduction) and chlorpyrifos (>53 % reduction). ChE activity and NRR assay resulted suitable biomarkers of pesticide suitable exposure, and it was linked to suitable changes in growth or fecundity.
<i>E. fetida</i> (adults)	Pb: lead acetate	Pb = 102, 221, 283, 588, and 1,233 mg kg^{-1} 28 d	Natural soils spiked with Pb Soil moisture = 20 % Organic matter = 5.6 % pH = 7.6 Temp. = 18°C 12: 12 hr L : D cycle	NRR assay	NRR times showed a significant negative relationship with body Pb concentration. All treatments caused a reduction (>50 % reduction) respect to the control group.

表 4.5 其他文獻蚯蚓暴露於化學物質表現的生物標記(4/4) (資料來源：[76])

Species	Test substance: chemical form	Concentration and time of exposure	Test conditions	Biomarkers	Main remarks	Reference ^a
<i>A. caliginosa</i> <i>E. fetida</i> <i>L. terrestris</i> <i>L. rubellus</i> (clitellate adults)	Zn: $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	Zn = 190, 350, 620, 1,200, 2,000, and 3,600 mg kg ⁻¹ 42 d	Natural soil (with 10% sphagnum peat) Soil moisture = 60% Temp. = 15°C Constant light	NRR assay	NRR assay reveals as a good biomarker for predicting adverse effects at life cycle level. NRR assay showed significant species- specific differences.	(14)
<i>L. rubellus</i> (clitellate adults)	Cu: $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ Cd: $CdCl_2 \cdot 2\frac{1}{2}H_2O$	5, 25, 125, and 200 µg g ⁻¹ dry wt, each metal 21 d	Artificial soil (OECD) Soil moisture: 35%–40% pH = 6.0 ± 0.5 Temp. = 17°C 12:12 hr L:D cycle	wMT-1 wMT-2 AOX LYS	Exposure to Cu-spiked soils caused an induction of the biomarkers at the lowest Cu concentrations only. wMT-2 isoform showed a concentration- response relationship with increasing Cd concentrations in the soil. These molecular genetic biomarkers were more sensitive to Cu exposure than mortality, growth, or cocoon production.	(15)

^a AChE, acetylcholinesterase; MROD, methoxyresorufin-O-deethylase; NADH Red, NADH cytochrome reductase; NADPH Red, NADPH cytochrome reductase; GR, glutathione reductase; GST, glutathione-S-transferase; LP, lipid peroxidase; LPT, peroxidizable lipids; total GSH, total glutathione; % GSSG, percentage of oxidized glutathione; EROD, ethoxycorufin-O-deethylase; ChE, cholinesterase; CYP1A, cytochrome P4501A isoenzyme; MT, metallothionein; NRR, neutral red retention; wMT-1, metallothionein isoform 1; wMT-2, metallothionein isoform 2; AOX, amine oxidase; LYS, lysosomal glycoprotein.

5. 端足類模式平台－重金屬銅毒性分析

從期中結果顯示，端足類代謝物質受到底泥的表現，主要可分成兩群，這樣的結果卻又過於簡化，導致原因可能源自於污染源對生理的反應部分有趨同反應的現象。因此在後續工作，我們將陸續展開對端足類對單一污染源的代謝反應，建立如以土壤指標生物蚯蚓暴露不同環境污染物的生物標記資料庫。本研究分析中使用的端足類，*Hyaella* sp. 是一種底棲、攝食碎屑的端足類動物 (Amphipod)，是許多魚類、水禽鳥類及大型無脊椎動物的主要食物來源，雌雄間具顯著差異。大部份 *Hyaella* sp. 端足類都是吃碎屑或是食腐動物[2]，少部分是吃藻類等有機碎屑的雜食性或細小昆蟲及甲殼類的掠食者。在適合的棲地生長密度可高達 10000/m² 以上。這種小型甲殼類為有性生殖，雌體於交配前脫殼，釋放出前一次所交配的後代，並依照雌性尺寸和狀況有別，每次可產生 1 至 50 隻的後代。25℃ 時，*Hyaella* sp. 大約在 28 天性成熟。研究發現水溫超過 10℃ 時，過冬的雌體可生產出高達 30 顆卵的大型窩蛋。

端足類 *Hyaella* sp. 被當作評估底泥毒性的物種已有二十年，其中以 *Hyaella azteca* 最為有名，曾被做為水體毒性之試驗物種。美國環保署與加拿大環境部 (Environment Canada) 都曾 *H. azteca* 進行固相底泥毒性試驗。兩國之間最大區別是測試端足類存活效應的實驗期天數，美國建議 10-28 天進行存活、致死率與生長率的測試，但加拿大則是進行 10-14 天的試驗。但短期暴露只能用來測量高濃度污染，因此本研究採取 28 天試驗，對中低度污染的高雄港底泥較為適合。因此，試驗生物為端足類 *Hyaella* sp.，用以評估中低度污染的高雄港底泥對端足類 *Hyaella* sp. 所造成的存活、生長及繁殖之潛在效應。

前述之全底泥毒性測試試驗，結果確實反映出整體底泥毒性，非單一污染源所造成，並由結果顯示，可能在 JR 及 SR 有某些特定污染物，使海水端足類受到的生理代謝反應與其他 LR 和 CR 有明顯的不同。為釐清屬於哪一種可能的特定污染物，本研究以端足目一扁跳蝦作為模式物種，測試不同濃度之重金屬銅下(在沒有底泥存在，並只提供人造遮蔽物情況下)對其所造成的影響，此種實驗方法有助於了解特定一種重金屬(如銅)所造成的危害。

試驗生物 *Hyaella azteca* 馴養方式依據美國材料試驗學會 ASTM E1706-05 建議進行飼養，其成分及配製方式如下：

分解魚飼料溶液：將 5 g 魚飼料加入 1L RO 水中進行均質，再於室溫下曝氣 7 天分解飼料。7 天後冷藏 1 小時，收集 300 mL 上清液。

草葉粉液：將 5 g 粒狀兔子飼料加入 1L RO 水中均質 5 分鐘，再冷藏至隔夜，

取 300 mL 上清液。

酵母菌液：將 5g 酵母粉加入 1L RO 水均質使酵母菌均勻懸浮後，取 300 mL 與分解魚飼料溶液及草葉粉液混合獲得。

混合液配製完成後即為餵食之混合液，作為馴養 *H. azteca* 之主要食物。飼養與試驗的溫度為 25°C，鹽度為 15 psu，水中 pH 範圍為 7.8-8.2，溶氧為飽和狀態（水體持續打氣），初始氨濃度幾近於零（試紙無法測得）。*Hyaletella azteca* 毒性測試之前於水缸中馴養兩周，每個受試個體之大小相似，*H. azteca* 大小約為 7-8 天大之健康體齡，馴養期間每日餵食 1 次。

試驗生物端足目動物 *Hyaletella azteca* 進行 28 天慢毒性試驗時，依不同測試終點分組進行。實驗結果如表 4.6 顯示，在不同銅濃度的處理中，14、21 與 28 天處理組中，50 隻扁跳蝦皆全部死亡(三重複)。只有在 7 天處理組發現有存活的扁跳蝦個體，以銅濃度為 100 ug/l 此組，存活率最高為 10.6667 %，並在濃度提高到 1000 ug/l 後存活率下降至零。若不考慮銅濃度為 0 ug/l 的控制組，以 7 天處理組結果分析可以推論隨銅濃度提高，扁跳蝦的死亡率會逐漸增加。但有趣的是，銅濃度為 0 ug/l 的控制組之存活率卻相當低，幾近於零(0.6667%)，暗示死亡原因不只受到重金屬影響，可能的死亡原因是扁跳蝦互相殘食的結果(雖然在實驗設計上有提供人造遮蔽物給予扁跳蝦躲藏處，意指人造遮蔽物提供的躲藏效果不佳)，加上有一件值得注意的現象是各組別中並沒有發現扁跳蝦的完整屍體，可能暗喻殘食行為(cannibalism)相當盛行。除了本研究有這樣的發現外，過去文獻中也指出，試驗 *Gammarus locusta* 於有毒河口沉積物中的慢性中毒現象，設定控制組時，也發現實驗室內的操作環境讓殘食幾乎是造成控制組死亡率的大大提高的顯著原因之一[78]。對於 *Gammarus spp.* 這一屬端足類，也的確是殘食行為相當為人所熟知的[79-80]。因此對於 14、21 與 28 天處理組之百分百的死亡率，其造成的原因並不是重金屬銅濃度過高，而是殘食行為造成的機率為大。

在考慮到扁跳蝦的殘食行為後，計算互相殘食造成的死亡率－計算方式為：

$$\text{殘食死亡率 \%} = \frac{\text{死亡的總數目} - \text{屍體數目}}{\text{實驗總個體數}} \times 100\%$$

首先，計算結果如表 4.7 所示，指出 7 天處理組隨著重金屬銅的濃度增加，殘食死亡率從 100 % 下降至 72.6%；14 天處理組從 100% 下降至 73.3%；21 天處理組從 100% 下降至 79 % 以及最後 28 天處理組從 100 % 下降至 78.7%。無論是 7、14、21 或 28 天處理組，趨勢都一致，殘食死亡率都會隨著重金屬銅的濃度增加逐漸降低，暗示重金屬銅對殘食行為造成的死亡有負面影響。但截至目前為止，文獻上雖常指出端足目大多都具有殘食行為[78, 82-83]，卻甚少發現重金屬銅有降低殘食死亡率的效果，可能是病理上造成虛弱而降低殘食行為，雖然最後結果都是死亡，但這仍是這研究額外的發現。

值得討論的是，14、21 與 28 天處理組的死亡率下降幅度，皆比 7 天處理組慢。可能的解釋為 7 天內死亡的扁跳蝦屍體(包含殘食與重金屬中毒的死亡個體)尚未被存活的扁跳蝦完全吃完，因此較能計算到個體數目，隨著處理天數的增加，由於時間較久，提供充分的時間給存活的扁跳蝦進食，扁跳蝦的屍體被完全清除，而無法計算，按照上述方程式的計算就會忽略到可能存在的屍體數目，而高估了殘食所造成的死亡數目。另外一點值得考慮的是，7 天至 28 天各處理組的死亡原因得再將水中氨濃度過高考慮進去，原因是大量的死亡與排泄物，在實驗進行且無法換水的情況下，會累積到致命的濃度，特別是處理時間久的 21 與 28 天處理組，尤其明顯。過往研究也指出當水中氨濃度到達 100 mg/l 時，其端足類 *G. bonnieroides* Stephenson 48 就可高達 83.8 % 的死亡率[81]。因此實驗所獲得死亡數據，不完全是殘食與重金屬銅造成(已透過檢測，發現的確水中氨濃度偏高)，因此簡要總結造成死亡的原因包含殘食行為、重金屬銅與水中氨濃度過高等三個因子。

表 4.6 扁跳蝦於不同重金屬銅濃度處理下的總存活率

Total survival rate (%)					
Copper ($\mu\text{g/l}$)	Time intervals of treatment				
	0-day	7 days	14 days	21 days	28 days
0.0	100	0.6667	0	0	0
100.0	100	10.6667	0	0	0
300.0	100	4.6667	0	0	0
500.0	100	4.0000	0	0	0
1000.0	100	0.0000	0	0	0

表 4.7 扁跳蝦於不同重金屬銅濃度處理下的因殘食造成的死亡率

Cannibalism mortality rate (%)					
Copper ($\mu\text{g/l}$)	Time intervals of treatment				
	0-day	7 days	14 days	21 days	28 days
0.0	0	100	100	100	100
100.0	0	84	100	100	100
300.0	0	86	94	100	98
500.0	0	72	70	79.33333	84.66667
1000.0	0	72.66667	73.33333	79	78.66667

另一方面，計算非互相殘食造成的死亡率—計算方程式為：

$$\text{死亡率 \%} = \frac{\text{屍體數目}}{\text{實驗總個體數}} \times 100\%$$

表 4.8 結果顯示，7 天處理組隨重金屬銅濃度的上升，死亡率從 0 上升到 27.3%；14 天處理組上升至 26.7%；21 天處理組增加到 21%及 28 天處理組提升至 21.3333 %，趨勢都一致，隨著重金屬銅的濃度增加，非殘食造成的死亡率都會逐漸上升。這樣的結果表示扣除掉因殘食所造成的死亡後，因重金屬銅所造成的死隨著銅濃度上升而隨之增加，意即高濃度的重金屬銅的確會造成端足類死亡，而低濃度的影響則有限。符合過去在 *Gammarus pulex pulex* (L., 1758)的研究結果，Dr. BAT 等人的實驗發現，*Gammarus pulex pulex* (L., 1758)的同伴致死濃度為隨溫度 15-25 時，從 0.08 -0.028 mg/l 而變化，他們的實驗中呈現當水中銅濃度為 1 mg/l 時，所有投入的 *Gammarus pulex pulex* 皆在 96 小時後全部死亡[84]。其他文獻也指出重金屬銅的確被吸收到扁跳蝦 *Gammarus locusta* 體內的中腸腺內(圖 4.30)，進而造成生理上的威脅而致命[85]。

另外，觀察結果可發現 7 天與 14 天處理組的非殘食死亡率上升幅度高於 21 天與 28 天組別，這樣的結果應該不是處理時間久造成生理學上的適應，推論原因應是屍體置放這樣長的時間下，可能腐敗甚至是被同類搶食而被清除完畢，而無法計算，導致死亡率的計算會有低估的現象。因此若將此因素考慮進去，結果應該是 21 天與 28 天處理組非因殘食造成的死亡率會高於 7 天與 14 天處理組，就是說重金屬銅濃的增加與時間的加長，增加端足類的死亡率，可能致死的原因是重金屬銅不斷地累積在體內，造成病理現象而致命。

除此之外，尚有另一個因子需考慮，長達 28 天的處理組，同樣地也可能面對水體中氨濃度過高的現象，其所造成的死亡，會包含在表 4.8 數據中。因此數據中呈現的死亡率，也可能是氨中毒所造成，因此會有高估死亡率的結論產生。然而，無論是互相殘食所造成的死亡，還是氨中毒所造成的死亡，在討論中都不應該忽略其可能性。最適當的方法是減低或控制殘食行為的發生及水體中氨濃度的變化，才能更有效評估以端足類作為指標生物的重金屬監控平台。

表 4.8 扁跳蝦於不同重金屬銅濃度處理下的非因殘食造成的死亡率

Non-cannibalism mortality rate (%)					
Copper ($\mu\text{g/l}$)	Time intervals of treatment				
	0-day	7 days	14 days	21 days	28 days
0.0	0	0	0	0	0
100.0	0	5.333333	0	0	0
300.0	0	9.333333	6	0	2
500.0	0	24	30	20.66667	15.33333
1000.0	0	27.33333	26.66667	21	21.33333

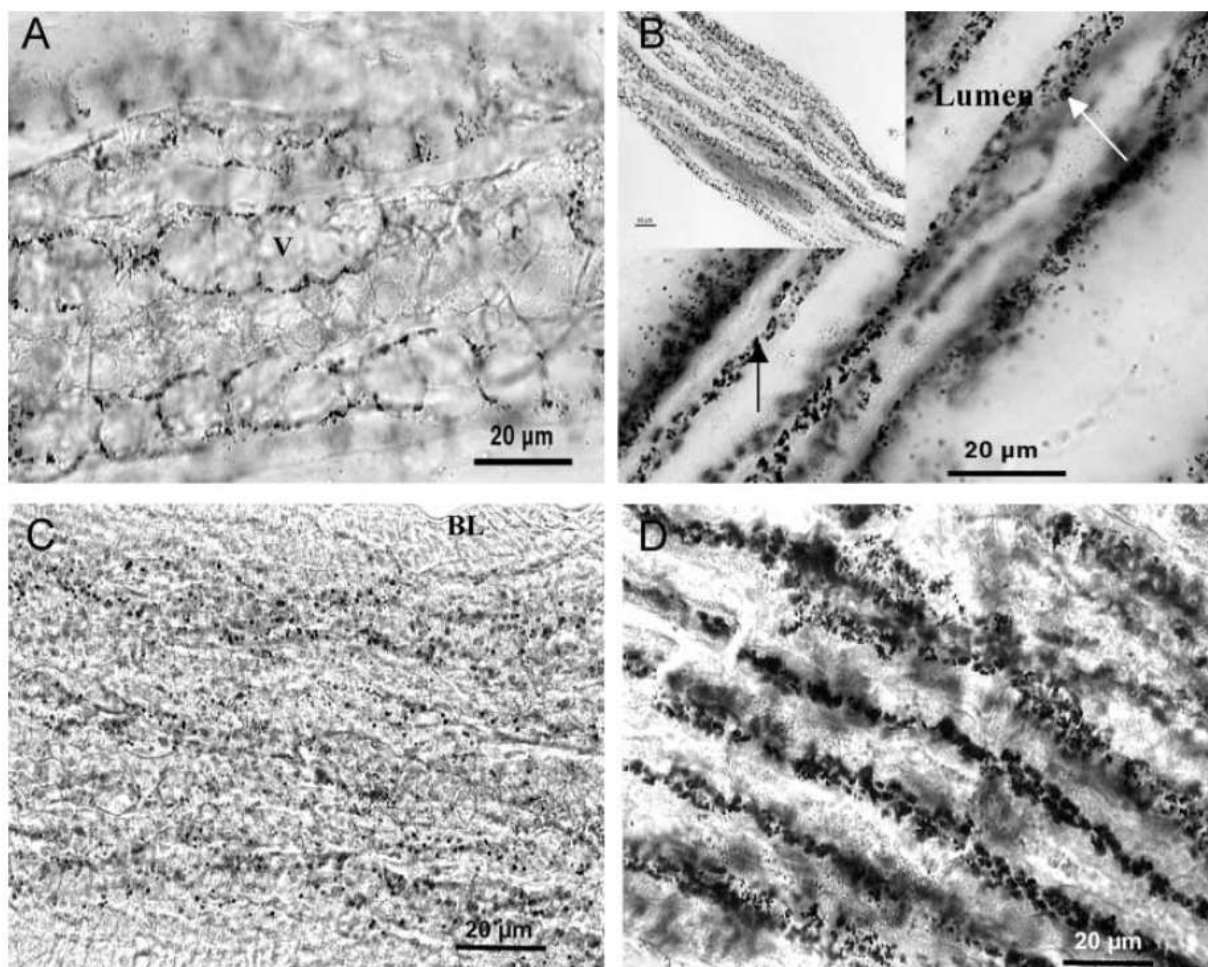


Figure 1. Exposure to water-borne Cu over 96 hours (A and B) and copper-spiked sediments over 28-days (C and D): showing variation of copper content in hepatopancreas whole-mounts from *Gammarus locusta* intermoult males. Copper-containing granules—CuCG (arrow) were stained with dithiooxamide (rubeanic acid). (A) Control—a few small copper granules. (B) Animal exposed to $10 \mu\text{g Cu L}^{-1}$ showing a denser population of granules. Micrograph, in the top left corner, showing an overview of the mid-region of the hepatopancreas displaying CuCG in longitudinal lines. (C) Control—hepatopancreas exhibiting few CuCG. (D) Animal exposed to 3 mg Cu kg^{-1} dry wt. A dense population of CuCG. Arrows, CuCG in the epithelium of the hepatopancreas; V, Vacuoles; BL, Basal lamina.

圖 4.30 被吸收到 *Gammarus locusta* 體內中腸腺的重金屬銅[85]

依照目前結果可做一個總結，重金屬銅濃度的提高，的確能夠降低存活率，意即當底泥沉積物溶解於水體中的銅濃度過高時，必定會對端足類造成影響，特別是濃度高於 $100 \mu\text{g/l}$ 後，就能產生很大的影響。同時，重金屬銅濃度的提高也降低扁跳蝦的殘食率，邏輯上，銅中毒的端足類可能因處在病理狀態而導致其行為能力降低，進而減少本身的殘食行為，因此由殘食行為所造成的死亡率會隨水體中銅濃度增高而下降。這是一個正面的結果，從本研究預計利用暴露不同底泥的海洋性端足類的代謝物，以多變量分析予以分群，證實端足類的代謝物可以當作環境生理代謝反應的指標而言，海洋端足類確實可反映周遭水體中，重金屬的

變化狀況，推論當重金屬高的時候，端足類會大大減少；反之，重金屬濃度減少時，端足類可吸收重金屬，及等於將重金屬攜帶入食物鏈的底層，在整個食物網中循環。因此透過監控端足類可以有效評估任何水域中的重金屬污染風險指數，配合前述代謝體的分析成果，進而發展端足類成為完美的環境指標生物。

然而，本研究成果仍有瑕疵存在，原因在於殘食行為的發生。由於採取的人造遮蔽物(剪裁過的珍珠板)提供的空隙其躲藏效果仍然不佳，使得實驗中的死亡原因，除重金屬銅的影響外，還包含因互相殘食造成的死亡。再加上 21 與 28 天處理組由於不能換水，其端足類死亡原因還需將水中氨濃度過高考慮進去，即便透過每日移除屍體，飼料與排泄物本身也都可能產生大量氨，而引發死亡，因此長時間的 28 天或 21 天處理組是否應該移除，值得討論。以遮蔽物來說，文獻搜尋發現有成年與幼年端足類的差別，幼年端足類喜愛天然的植物作為遮蔽躲藏或覓食的區域，不喜愛人造植物及礦石沙礫；成年端足類則是喜愛有植被覆蓋的礦石沙礫，至於天然與人造植物則沒有差別[86]。遮蔽物的選擇將影響殘食行為發生機率的高低，對於毒物測試上絕對有具足輕重的角色。

因而本研究試著將天然植物—絲藻加入含有銅 500 $\mu\text{g/l}$ 的水體中，測試端足類在高濃度重金屬銅環境下的存活率。初步實驗結果發現 7 天處理組，存活率為 98%；14 天存活率為 80%；21 天存活率為以及 58 天為 46%。不含有重金屬銅的控制組，7、14、21、28 天任一組，其存活率皆大於 94% 以上，並且屍體皆可被發現，不會有遺失的現象。這樣的結果，首先，初步顯示絲藻的投入有助於大大降低端足類的殘食行為，這和 Dr. Jermacz 等人的發現類似[86]，使得殘食所造成的死亡率幾乎可以忽略掉。但此舉可能造成實驗的生物變因變成兩種—絲藻與端足類，由於絲藻植物也能夠吸收重金屬銅，甚至有淨化水體的效果[87]，可能造成端足類面對的銅濃度不一定是原本預設銅濃度的水準，再加上絲藻本身也是端足類的食物來源之一，代表重金屬銅可能由水體吸收或是透過攝食絲藻進入消化道，意即絲藻與端足類兩者之間的交互作用也需要考慮進去，增加了許多變因，因而難以評估重金屬銅單獨對端足類的影響。但這方面卻值得發展，因為考量到野外情況下可能也是有重金屬、絲藻與端足類共同存在下，額外添加絲藻值得考慮做進一步發展，進而更貼近真實在野外採取樣本時，反映出的生物指標反應。

過去，只針對環境中如水體、沉積物的污染物濃度水準去做評估，大多無法真正反映出生物危害的效應，加上絕大部分污染的水環境中大多都是綜合性污染，由單一因子引起的污染之實例鮮少，因此只考慮環境物理化學因子的變化，似乎無法回應真正的問題。甚至可以這樣認為，環境中的污染再多，若生物本身所受影響不高，那麼對生物生態系統本身並不會有太多影響；反之，即使污染含量甚低，但若對生物的影響甚大，那麼絕對會引起生態系統的損害，於是問題就

在於如何判定生物受到的影響。這也是近代急於建立生物指標的意義，無論是單一污染源或多重污染源，最終產生反應的依然是生物本身，鑑定與觀察生物對應污染產生之生理反應（如細胞的特定蛋白質或基因表現），才能了解生物產生的病理症狀真正的致病原因，亦可同時反應可能的生物累積途徑，也就是當受到污染的生物，依照其生態階級，可往上推估上層消費生物可能產生的累積性與毒害，這才是生物指標應當立即建立之因。本實驗中，最後額外添加絲藻，可能代表的含意是環境中實質能夠忍受的污染物濃度水準，在實地野外環境中，絕對不可能只有端足類這一類生物存在，必定有其他生物甚至大量具有 bioremediation 能力的水生生物存在，造成的結果即是實地野外環境能夠忍受的污染濃度向上提升的效果，實驗結果顯示絲藻的投入除有效降低殘蝕的死亡外，似乎造成端足類不會在高濃度銅處理下有立即死亡之虞，暗示絲藻本身也能吸收重金屬銅，而累積到端足類身上的銅似乎是倚賴進食量的多寡來決定銅中毒的速率，接著才產生真正的生理病理反應。這如同生物指標的意義一樣，無論起始的污染物濃度變化為何，真正的生物生理反應才能代表污染的實質意義。也許在未來，如果 eDNA (environmental DNA) 的發展快速，environmental transcriptome 或 environmental metabolomics 更是適合總生物指標建立的最佳依據，也更能反應污染引起生物危害意義。

五、結論與建議

從本研究可以利用暴露不同底泥的海洋性端足類的代謝物，以多變量分析予以分群，證實端足類的代謝物是可以當作環境生理代謝反應的指標，換言之，海洋端足類可以當作環境指標生物。

環境代謝體的應用在此研究上，與其他研究遇到類似的課題，即以 *untargeted* 代謝體學我們無法直接將反應的代謝物指向某個因子，但卻能有效地幫助我們快速地將可能複雜的因子簡化，而篩選出一群可能的生物標記。

因此建議未來工作應可以學習蚯蚓在土壤模式，以端足類當作海洋性暴露生物，進行大規模生物毒性的測試，建立毒物和端足類的生物標記資料庫，供未來使用的平台。一般而言，能夠引起存活等急毒性效應的底泥樣品，僅有少部份足以達到，以台灣截至目前為止與本研究中的評估，高雄港的污染程度僅列於中低污染等級，因而當評估中低污染等級底泥生物效應時，較佳評估方式是以生物完整生命周期的慢毒性試驗做為工具。以陸地上為例，採取蚯蚓作為底泥的管理以及政策的擬定之參考依據，其因在於蚯蚓生活於土壤中，進食過程中已知會吸收土壤重金屬、有機污染物或農藥等其他污染，是極佳的土壤環境指標動物。研究也顯示某些蚯蚓對於重金屬的耐受性高，所累積的含量遠遠超過周圍環境的千百倍，並且能反映其所吸收的重金屬含量，產生相對應的組織或器官病變，非常適合作為田間調查的重金屬濃度監測生物及慢毒性試驗工具，除了降低機器偵測的費用與時間外，更是許多生物的食物來源，在污染物的生物累積效應，有長足的貢獻，對於陸上生態風險評估相當有幫助。然而在海洋或半鹹水水域中，大家採用的生物指標尚未有一統一的方式。目前世界各國通用於在水域中底泥慢毒性檢測之物種中，以完整生命週期作為毒性試驗工具的生物包括端足類動物 (Amphipods)、多毛類 (Polychaetes)、寡毛類 (Oligochaetes) 等物種，測試項目主要包括存活、生長發育、繁殖或生物累積效應，但對應污染物造成的生理指標卻不如蚯蚓相對於土壤污染物的生理指標詳細（如表 4.5 中提及，蚯蚓針對重金屬或有機污染物產生的蛋白質表現之生物指標反應），因而本研究建論與建議中提及蚯蚓微生物指標的文獻整理，目的是藉由本研究分析的結果，進一步導入蚯蚓微生物生理指標反應的概念，期許海水或半鹹水中的端足類也可效法土壤污染環境監控科學，除了監控底泥及端足類的污染物累積量，於未來政策上應鼓勵建立端足類生物於對應不同重金屬或有機物污染之生理反應指標（如蛋白質表現與代謝產物差異），有效監測生物即時生理反應，反映即時的生態危機/風險，從污染物濃度的監控，提升至真正生物生理生態的監控。

水體中氨濃度的減低與控制也需考慮，以降低氨中毒致死的可能性，並削減氨中毒可能在代謝體組學中產生的干擾，減低錯誤推論的可能性，採用的氨濃度標準如表 5.1 所示。的確，水體中氨濃度的減低與控制也需考慮，以降低氨中毒致死的機會，採用的水中總氨濃度標準為 32 mg/L 以下，非離子態的氨濃度為 1 mg/L 以下，這是根據 Hindarti 等人所提出的報告所設，在實驗中氨與其他的污染物的移除，最好的方法是直接更換水體即可有效移除。但在底泥測試上較不適當，因此為移除氨與其他的污染物的影響，以氨為例子，可採取(1)增設水中遮蔽躲藏設施供給端足類躲藏，避免殘食行為造成死亡，增加水中氨濃度，實驗設計上須將下列因素考慮進去，如遮蔽物的選擇，若不選擇天然海藻作為端足類隱匿的場所，可使用人造遮蔽物降低可能的殘食行為發生(圖 5.1)。若選擇天然海藻，則測試的端足類種類建議以幼年的個體為優先，其因乃是相對於成年個體，幼年個體較喜愛天然海藻作為庇護場所[86]；(2)在同一水體中，對端族類個體進行隔離飼養與試驗，避免殘食行為造成死亡，增加水中氨濃度；(3)控制飼料餵食量或提供活體海水絲藻作為食物來源降低，食物腐敗產生氨濃度過高；(4)每日監控試驗水體各項水質指標，如 pH、鹽度、溫度…等，避免有害非離子態氨濃度的提升；(5)考慮到初步試驗結果顯示，14 天試驗處理即可獲得試驗結果，降低試驗天數以減少時間增長可能產生的氨濃度上升之影響，例如 Bat 等人的研究成果，重金屬處理時間採用如表 5.2 所示，依照不同重金屬種類，處理的時間從 48h 至 7 天為限。

為了建立端足類生物指標平台，所使用單一重金屬濃度的標準可參過去已知的研究結果，如表 5.3 與 5.4 所示。生態風險評估建議分成五個階級，依照本研究分析，參考點設定為 E1。沉積物的污染化合物濃度 (heavy metals, PAHs)，依照沉積物品質指標做區分：

- A. ERL (effects range low)：指污染物濃度鮮少引起進一步生物危害的含量。
- B. ERM (effects range median)：污染物濃度水準高過能引起生物危害的含量。

在生態風險評估上，應用的限制條件範圍如本研究五個參考地點所示，以 E1 設點無論是重金屬與 PAH 的含量上皆相對低於其他各組，且不超過 ERM 與法定上限值。因此可根據此研究成果作為模式標準，除高雄港外，其他台灣具有陸緣河口的港灣也可採用此分析進行生態風險評估，其標的生物可以依據該地原生的端足類進行測試，風險係數的評估依照下列項目評量：

高風險

污染物組成：與參考點比較，底泥水體中有一個或多個以上的污染化合物超過法定上限值，且超過 ERM。

毒性測試：端足類暴露於底泥水體中，死亡率大於 20 % 以上。

生物累積效應：對於端足類對污染化合物的吸收，比起參考點，至少有一種或以上污染物的吸收超過顯著標準 ($p < 0.01$)。

生物生理指標因子：與參考點比較，端足類的生理指標反應有顯著增加 ($p < 0.01$)。

存活率：端足類幼體暴露於底泥水體中，存活率比參考點有顯著的降低水準 ($p < 0.01$)。

成長率：端足類幼體暴露於底泥水體中，成長率比參考點有顯著的降低水準 ($p < 0.01$)。

繁殖性徵：與參考點比較，發現端足類至少有兩項以上的生殖性徵受到影響或產生病理症狀。

底棲群落結構：與參考點比較，底棲群落的生物多樣性與豐度皆有顯著下降 ($p < 0.01$)。

中度風險

污染物組成：與參考點比較，底泥水體中有一個或多個以上的污染化合物超過法定上限值，但只超過 ERL。

毒性測試：端足類暴露於底泥水體中，死亡率介於 10 % 至 20 % 之間。

生物累積效應：對於端足類對污染化合物的吸收，比起參考點，至少有一種或以上污染物的吸收，顯著標準介於 $0.01 \leq p < 0.1$ 。

生物生理指標因子：與參考點比較，端足類的生理指標反應有顯著增加，顯著水準介於 $0.01 \leq p < 0.1$ 。

存活率：端足類幼體暴露於底泥水體中，存活率比參考點有顯著的降低水準，顯著水準介於 $0.01 \leq p < 0.1$ 。

成長率：端足類幼體暴露於底泥水體中，成長率比參考點有顯著的降低水準，顯著水準介於 $0.01 \leq p < 0.1$ 。

繁殖性徵：與參考點比較，發現端足類有一項的生殖性徵受到影響或產生病理症狀。

底棲群落結構：與參考點比較，底棲群落的生物多樣性與豐度皆有顯著下降，顯著水準介於 $0.01 \leq p < 0.1$ 。

低風險

污染物組成：與參考點比較，底泥水體中所有污染化合物皆不超過法定上限值與 ERL。

毒性測試：端足類暴露於底泥水體中，死亡率低於 10 % 以上。

生物累積效應：對於端足類對污染化合物的吸收，比起參考點，無顯著提升 ($p \geq 0.1$)。

生物生理指標因子：與參考點比較，端足類的生理指標反應無顯著增加 ($p \geq 0.1$)。

存活率：端足類幼體暴露於底泥水體中，存活率比參考點無顯著的降低水準 ($p \geq 0.1$)。

成長率：端足類幼體暴露於底泥水體中，成長率比參考點無顯著的降低水準 ($p \geq 0.1$)。

繁殖性徵：與參考點比較，發現端足類沒有任何生殖性徵受到影響或產生病理症狀。

底棲群落結構：與參考點比較，底棲群落的生物多樣性與豐度皆無顯著下降 ($p \geq 0.1$)

無風險

污染物組成：與參考點比較，底泥水體中無污染化合物存在。

毒性測試：端足類暴露於底泥水體中，死亡率為零。

生物累積效應：對於端足類對污染化合物的吸收，比起參考點，無污染物的吸收發生。

生物生理指標因子：與參考點比較，端足類對污染物的生理指標反應顯著下降，顯著水準介於 $0.01 \leq p < 0.1$ 。

存活率：端足類幼體暴露於底泥水體中，存活率比參考點有顯著的增加，顯著水準介於 $0.01 \leq p < 0.1$ 。

成長率：端足類幼體暴露於底泥水體中，成長率比參考點有顯著的增加，顯著水準介於 $0.01 \leq p < 0.1$ 。

繁殖性徵：與參考點比較，發現端足類有一個生殖性徵受到的影響有改善的情況。

底棲群落結構：與參考點比較，底棲群落的生物多樣性與豐度不受影響。

風險改善中

污染物組成：與參考點比較，底泥水體中無污染化合物存在。

毒性測試：端足類暴露於底泥水體中，死亡率為零。

生物累積效應：對於端足類對污染化合物的吸收，比起參考點，無污染物的吸收發生。

生物生理指標因子：與參考點比較，端足類對污染物的生理指標反應顯著降低 ($p < 0.01$)。

存活率：端足類幼體暴露於底泥水體中，存活率比參考點有顯著的增加 ($p < 0.01$)。

成長率：端足類幼體暴露於底泥水體中，成長率比參考點有顯著的增加 ($p < 0.01$)。

繁殖性徵：與參考點比較，發現端足類有二個以上的生殖性徵受到的影響有改善的情況。

底棲群落結構：與參考點比較，底棲群落的生物多樣性與豐度不受影響。

本研究的成果可應用各大河口型港灣的環境評量與監控上，其因是此區域大

多是端足類存量相當豐富之處，許多水生生物、甚至鳥類皆主要依賴端足類這類餌料生物維生，透過監控與評量這類端足類對污染的反應，可有效推估人為的污染在生態上造成的生物危害、生物累積性與生態風險。除此之外，還可反過來利用端足類生物平台指標，追蹤環境改善後對生物產生的實質效果，而不再只是環境上的物理化學參數之變化。即政策擬定上，可參閱上述說明的風險評估方式進行評量，劃分出高風險、中度風險、低風險區域，進行監控與生態恢復設施的建立，在零風險與風險改善區設定保護區或環境保護規範，避免外來新污染物的進入，讓原先健康或改善中的生態系統受到危害。法條規範上，生物指標的規範數值範圍，可依照上述風險評估提及的測試項目，建立嚴格的工業、農業及家庭廢水的流放標準之生物指標，供給國內企業及家庭正確的廢水及廢棄物排放準則。

最後，用來評估端足類生物指標的參數也可依照 Neuparth 等人所建議的測定項目(表 5.5)，然後再將代謝體組學、水體與底泥沉積物重金屬分析結果套入，建立端足類對特定污染物或混合型污染物產生的生理指標，如同蚯蚓的研究一樣，指定特定蛋白質或其他生理因子的表現量、活性等，而這也是本研究缺乏的一塊拼圖，在未來需要針對此部分進行開發、研究與共同討論，必能獲得最佳的端足類環境生物指標平台。

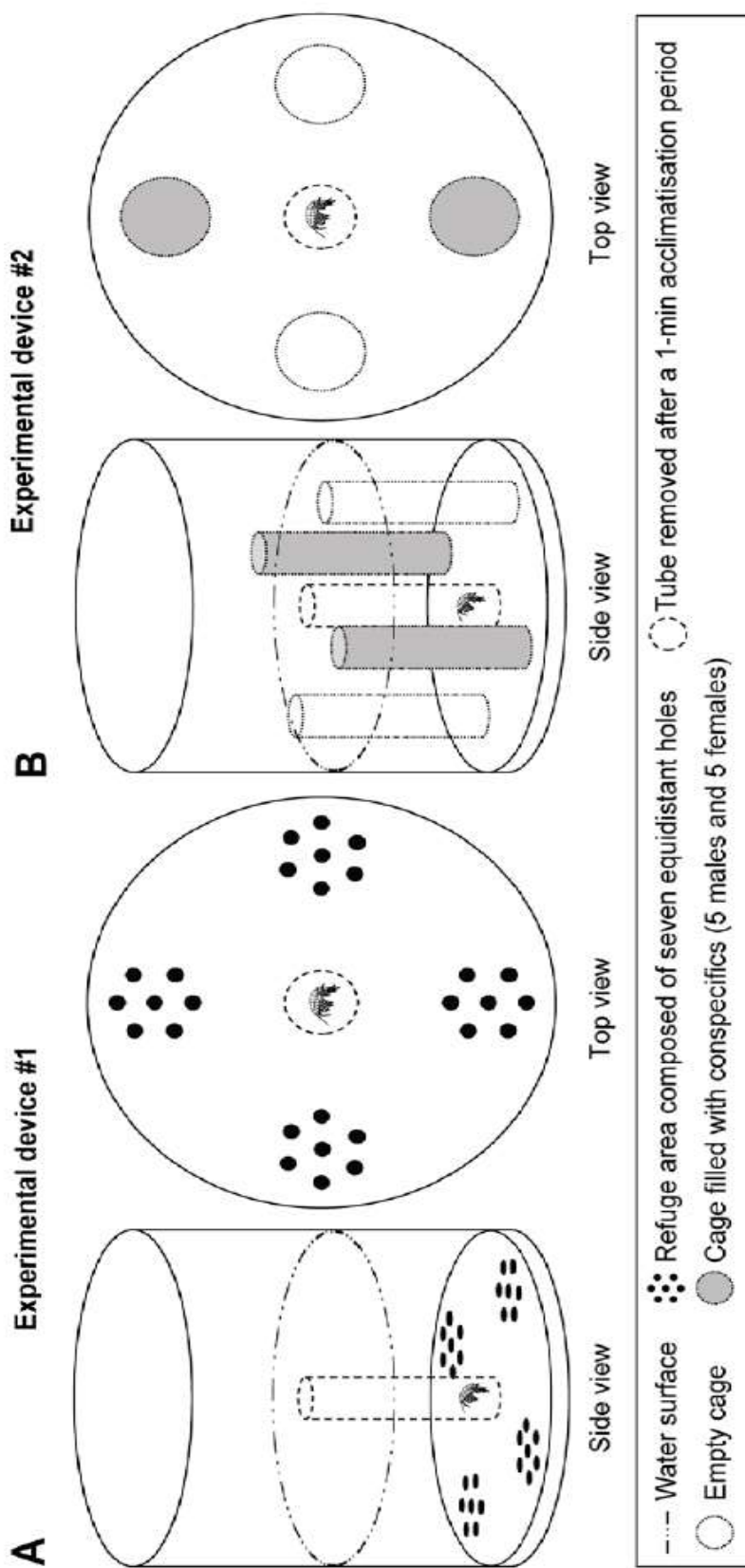


圖 5.1 人造遮蔽物的設計範例 [88]

表 5.1 端足類暴露於不同氨濃度水體中之 96 小時死亡率 [82]

Ammonia conc. (mg.L ⁻¹)	pH	Temperature (°C)	Unionized conc. (mg.L ⁻¹)	Mortality (%)
Control	7.67 (7.33-7.88)	25.06 (24.1-26.2)	0	2.5 (0-10)
18	7.74 (7.61-7.88)	25.36 (24.4-26.6)	0.535	6.3 (0-25)
32	7.72 (7.5-7.87)	25.76 (24.7-26.7)	1.039	10 (5-15)
56	7.70 (7.59-7.83)	25.86 (24.7-27.1)	1.421	31.3 (15-45)
100	7.62 (7.42-7.73)	25.7 (24.4-27.2)	2.542	83.8 (40-100)
180	7.50 (7.32-7.62)	26.18 (25.2-27.1)	3.61	100

表 5.2 其他文獻端足類暴露於不同重金屬之毒性試驗(1/2) [84]

Species	Habitat ^a	Metal	Method ^b	Time	End point ^c	Temp. (°C)	Sal. (‰)	Results	Ref.
<i>Allorchestes compressa</i>	SW	Cd, Zn	WAT, ST	96-120h	S	16.8-20.5	34.5	120h Cd LC ₅₀ = 0.2-4 ppm; 96h Zn LC ₅₀ = 0.58 ppm; this amphipod was more sensitive than crab, shrimp, mollusc and worm.	18
<i>Allorchestes compressa</i>	SW	Se	WAT, CF	96h	S	18	34.8-35.3	LC ₅₀ = 4.77 and 6.17 ppm from two different areas; juveniles were more sensitive than adults.	30
<i>Allorchestes compressa</i>	SW	Cu	WAT, ST	96H	S	20	32±1	LC ₅₀ values for juveniles and adults were 0.11 and 0.50 ppm, respectively.	31
<i>Allorchestes compressa</i>	SW	Zn, Cd, Cu	WAT, CF	96h	S	20.3±0.8	34.1±0.7	Cu was 1.6 times more toxic than Cd and 4 times more toxic than Zn; the toxicity of a combination of two and three metals is different from that of individual metals	32
<i>Allorchestes compressa</i>	SW	Cd, Cr, Cu, Zn	WAT, CF	4wk	S,G	19±1	31±1	Cu was the most toxic metal; the sublethal effects of the four metals appear to be in similar proportion to their lethal effects.	33
<i>Chelura terebrans</i>	SW	Cd	WAT, ST	96h 7 day	S	19.5	35	96h LC ₅₀ = 0.63 ppm; 7day LC ₅₀ = 0.2 ppm.	34
<i>Austrochiltonia subtenuis</i>	FW	Cd	WAT, ST	96h	S	15±1		96h LC ₅₀ = 0.04 ppm.	35
<i>Crangonyx pseudogracilis</i>	FW	Cd, Cu, Cr Pb, Hg, Mo, Ni, Sn, Zn	WAT, ST	48h 720 96h	S	13		48h LC ₅₀ values were 34.6, 2.4, 2.2, 43.8, 0.47, 3618, 252, 72 and 121 ppm; 96h LC ₅₀ s were 1.7, 1.3, 0.42, 27.6, 0.001, 2623, 66 (72h), 50 and 19.8 ppm in order listed.	14
<i>Corophium insidiosum</i>	IN	CD	WAT, ST	96h 7 days	S	19.5	35	96h LC ₅₀ =1.27 ppm; 7day LC ₅₀ = 0.51 ppm.	34
<i>Corophium insidiosum</i>	IN	As,Cd,Cr, Cu,Pb,Hg, Zn	WAT, ST	96h- 20 days	S, A	19±1		96h LC ₅₀ s were 1.1, 0.68, 11, 0.6, >5, 0.02 and 1.9 ppm in order listed.	36
<i>Eohaustorius estuarius</i>	IN	Cd	WAT,	4 days SED	S		30	4-day LC ₅₀ s were 41.9, 36.1 and 14.5 ppm (in water) for animals held in the laboratory for 11, 17 and 121 days, respectively.	37
<i>Elasmopus bampo</i>	C	Cd	WAT, ST	96h 7 days	S	19.5	35	96h LC ₅₀ = 0.57 ppm and 7day LC ₅₀ = 0.2 ppm.	34
<i>Elasmopus bampo</i>	C	As,Cd,Cr, Cu,Pb,Hg, Zn	WAT, ST	96h- 20 days	S, A	19±1		96h LC ₅₀ s were 2.75, 0.9, 3.4, 0.25, >10, 0.02, and 12.5 ppm in order listed.	36

表 5.2 其他文獻端足類暴露於不同重金屬之毒性試驗(2/2) [84]

Species	Habitat ^a	Metal	Method ^b	Time	End point ^c	Temp. (°C)	Sal. (‰)	Results	Ref.
<i>Hyallella azteca</i>	FW	Pb	WAT, ST	12-120h	S			Free Pb concentration reflects Pb's biochemical activity better than total Pb; the highest mortality rates are associated with the highest free Pb concentrations.	38
<i>Gammarus pulex</i>	FW	Cu	WAT, ST	96h	S	15		LC ₅₀ value was 0.02 ppm.	39
<i>Gammarus pulex</i>	FW	Cu	WAT, ST	24-96h	S, A	15		LC ₅₀ values at 24,48,72 and 96h were 0.2,0.17,0.12 and 0.1 ppm.	17
<i>Gammarus pseudolimnaeus</i>	FW	Pb	WAT, CF	96h-28 days	S, A	15		Pb was toxic and caused more than 50% mortality at 136 ppb and above after 96h; 28-day LC ₅₀ = 28.4 ppb and 96h LC ₅₀ = 124 ppb.	40
<i>Grandidierella japonica</i>	IN	Cd	WAT, ST	96h 7 days	S	19.5	35	96h LC ₅₀ = 1.17 ppm and 7day LC ₅₀ = 0.5 ppm.	34
<i>Rhepoxynius abronius</i>	IN	Cd	WAT, ST	96h	S	19.5	35	96h LC ₅₀ = 0.24 ppm.	34

^a IN= infaunal, SW= seawater, FW= freshwater, C= cultured animals

^b WAT= water, SED= sediment, ST= static system, CF= continuous-flow system

^c S= survival, G= growth, A= accumulation

表 5.3 在不同溫度條件下，端足類對重金屬銅、鋅與鉛的半致死濃度變化[84]

Temperatures	Cu LC ₅₀ (95% FL)	Zn LC ₅₀ (95% FL)	Pb LC ₅₀ (95% FL)
15°C	0.080 (0.076-0.087)	12.1 (10.2-15.1)	23.2 (20.3-25.8)
20°C	0.041 (0.035-0.048)	9.3 (8.5-9.7)	16.1 (13.6-18.4)
25°C	0.028 (0.024-0.034)	5.2 (4.8-6.3)	11.2 (9.7-12.8)

表 5.4 端足類暴露於重金屬鎘的 96 小時半致死濃度[82]

Species	96-h LC50 (mg.L ⁻¹)	Reference
<i>Ampelisca abdita</i>	2.9	USEPA (2001a)
<i>Grandidierella japonica</i>	1.17	USEPA (2001b)
	1.47	Lee et al., (2005a)
<i>Eohaustorius estuarius</i>	2.4	ASTM (2006)
<i>Leptocheirus plumolatus</i>	0.36	USEPA (2001a)
	0.53	Kohn et al., (1994)
<i>Reposynius abronius</i>	0.76	DeWitt et al., (1989)
	0.75, 1.1	ASTM (2006)
<i>Monocorophium achersicum</i>	0.7-1.4	Lee et al., (2005b)

表 5.5 端足類生物指標平台應測定的參考項目表 (1/2)[89]

	●●	●	⊕	○	○○
Chemistry (metals-PAHs-PCBs)	One or more contaminants exceed ERM	One or more contaminants exceed ERL	All contaminants are below ERL	-	-
Acute toxicity tests	Mortality higher than 20%	20% ≤ Mortality ≥ 10%	Mortality lower than 10%	-	-
<i>Endpoints from chronic toxicity tests</i>					
Bioaccumulation (Cu-Zn-Cd)	Contaminant uptake higher than control, at least for one of the metals ($p < 0.01$)	Contaminant uptake higher than control, at least for one of the metals ($0.01 \leq p < 0.1$)	No significant increase of contaminants uptake compared to control ($p \geq 0.1$)	-	-
Biomarkers (MT-LP-SB)	Significant induction of biomarker responses compared to control levels ($p < 0.01$)	Significant induction of biomarker responses compared to control levels ($0.01 \leq p < 0.1$)	No significant induction of biomarker responses compared to control levels ($p \geq 0.1$)	Significant reduction of biomarker responses compared to control levels ($0.01 \leq p < 0.1$)	Significant reduction of biomarker responses compared to control levels ($p < 0.01$)
Survival	Significant reduction of survival compared to control ($p < 0.01$)	Significant reduction of survival compared to control ($0.01 \leq p < 0.1$)	No significant difference on survival compared to control ($p \geq 0.1$)	Significant increase of survival compared to control ($0.01 \leq p < 0.1$)	Significant increase of survival compared to control ($p < 0.01$)
Growth	Significant reduction of growth compared to control ($p < 0.01$)	Significant reduction of growth compared to control ($0.01 \leq p < 0.1$)	No significant difference on growth compared to control ($p \geq 0.1$)	Significant increase of growth compared to control ($0.01 \leq p < 0.1$)	Significant increase of growth compared to control ($p < 0.01$)
Reproductive traits	Impairment observed in at least two reproductive traits compared to control	Impairment observed in one reproductive trait compared to control	No symptoms of impairment or improvement in reproductive traits	Improvement observed in one reproductive trait compared to control ($0.01 \leq p < 0.1$)	Improvement observed in at least two reproductive traits compared to control ($p < 0.01$)

(continued on next page)

表 5.5 端足類生物指標平台應測定的參考項目表 (2/2)[89]

	●●	●	⊖	○	○○
Benthic community structure	Diversity and/or abundance are lower than control sediment	Diversity and/or abundance are slightly lower than control sediment	Diversity and/or abundance are not lower than control sediment	-	-
Overall assessment (based on Best Professional Judgment)	Severe adverse effects – detrimental effects with large magnitude predicted to these sediments	Moderate adverse effects – possible detrimental effects, but with small magnitude, predicted to these sediments	Neutral effects – no significant effects predicted to these sediments	Moderate beneficial effects – possible advantageous effects but with small magnitude, predicted to these sediments	High beneficial effects – advantageous effects with large magnitude predicted to these sediments

六、參考文獻

1. Vaezi, A.R., et al., *Ecological risk assessment of metals contamination in the sediment of the Bamdezh wetland, Iran*. International Journal of Environmental Science and Technology, 2015. **12**(3): p. 951-958.
2. Chen, C.-F., et al., *Butyltin contamination in sediments and seawater from Kaohsiung Harbor, Taiwan*. Environmental monitoring and assessment, 2010. **169**(1-4): p. 75-87.
3. Chen, C.W., et al. *Distribution and Origin of Organic Carbon, Nitrogen and Phosphorus in Kaohsiung Harbor Sediments*. in *Advanced Materials Research*. 2014. Trans Tech Publ.
4. Chen, C.W., et al. *Distribution of Octylphenol and Nonylphenol in the Sediment of Kaohsiung Harbor, Taiwan*. in *Advanced Materials Research*. 2014. Trans Tech Publ.
5. Chen, C.-W., C.-F. Chen, and C.-D. Dong, *Distribution of phthalate esters in sediments of Kaohsiung Harbor, Taiwan*. Soil and Sediment Contamination: An International Journal, 2013. **22**(2): p. 119-131.
6. Chen, C.-W., et al., *Composition and source apportionment of PAHs in sediments at river mouths and channel in Kaohsiung Harbor, Taiwan*. Journal of Environmental Monitoring, 2012. **14**(1): p. 105-115.
7. Chen, C.-W., et al., *Distribution and accumulation of heavy metals in the sediments of Kaohsiung Harbor, Taiwan*. Chemosphere, 2007. **66**(8): p. 1431-1440.
8. Dong, C.-D., C.-F. Chen, and C.-W. Chen, *Vertical profile, sources, and equivalent toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediment cores from the river mouths of Kaohsiung Harbor, Taiwan*. Marine pollution bulletin, 2014. **85**(2): p. 665-671.
9. Huang, W.J., et al., *Biological toxicity of groundwater in a seashore area: causal analysis and its spatial pollutant pattern*. Chemosphere, 2014. **100**: p. 8-15.
10. Kasahara, M., et al., *The medaka draft genome and insights into vertebrate genome evolution*. Nature, 2007. **447**(7145): p. 714-9.
11. Chen, W.Y., C.J. Lin, and C.M. Liao, *Assessing exposure risks for aquatic organisms posed by Tamiflu use under seasonal influenza and pandemic*

- conditions. *Environ Pollut*, 2014. **184**: p. 377-84.
12. Yan, Z. and R. Yan, *Increase the accessibility and scale of targeted metabolomics: Construction of a human urinary metabolome-wide multiple reaction monitoring library using directly-coupled reversed-phase and hydrophilic interaction chromatography*. *Anal Chim Acta*, 2015. **894**: p. 65-75.
 13. Giri, S. and A.K. Singh, *Human health risk and ecological risk assessment of metals in fishes, shrimps and sediment from a tropical river*. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 2015. **12**(7): p. 2349-2362.
 14. Chen, C.F., et al., *Butyltin contamination in sediments and seawater from Kaohsiung Harbor, Taiwan*. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2010. **169**(1-4): p. 75-87.
 15. Dong, C.D., C.F. Chen, and C.W. Chen, *Vertical profile, sources, and equivalent toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediment cores from the river mouths of Kaohsiung Harbor, Taiwan*. *Marine Pollution Bulletin*, 2014. **85**(2): p. 665-671.
 16. Dong, C.D., C.W. Chen, and C.F. Chen, *Distribution, enrichment, accumulation and potential ecological risks of mercury in the sediments of Kaohsiung Harbor, Taiwan*. *Chemistry and Ecology*, 2013. **29**(8): p. 693-708.
 17. Chen, C.F., et al., *Assessment of toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments of Kaohsiung Harbor, Taiwan*. *Science of the Total Environment*, 2013. **463**: p. 1174-1181.
 18. Chen, C.W., et al., *Distribution and accumulation of heavy metals in the sediments of Kaohsiung Harbor, Taiwan*. *Chemosphere*, 2007. **66**(8): p. 1431-1440.
 19. Lee, C.L., M.T. Hsieh, and M.D. Fang, *Aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments of Kaohsiung Harbour and adjacent coast, Taiwan*. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2005. **100**(1-3): p. 217-234.
 20. Chang, W.B. and L.S. Fang, *Temporal and spatial variations in the species composition, distribution, and abundance of copepods in Kaohsiung Harbor, Taiwan*. *Zoological Studies*, 2004. **43**(2): p. 454-463.
 21. Hanna, M.H., et al., *Urinary metabolomic markers of aminoglycoside nephrotoxicity in newborn rats*. *Pediatr Res*, 2013. **73**(5): p. 585-91.
 22. Lake, A.D., et al., *Decreased hepatotoxic bile acid composition and altered*

- synthesis in progressive human nonalcoholic fatty liver disease*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013. **268**(2): p. 132-40.
23. Wu, H., et al., *A metabolomic investigation on arsenic-induced toxicological effects in the clam *Ruditapes philippinarum* under different salinities*. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2013. **90**: p. 1-6.
24. Yamazaki, M., et al., *Perturbation of bile acid homeostasis is an early pathogenesis event of drug induced liver injury in rats*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013. **268**(1): p. 79-89.
25. Goncalves, C., et al., *Reconstruction of Historical Trends in Potentially Toxic Elements from Sediment Cores Collected in Bertioga Channel, Southeastern Brazil*. *Brazilian Journal of Oceanography*, 2013. **61**(2): p. 149-160.
26. McKelvie, J.R., et al., *Reduction in the earthworm metabolomic response after phenanthrene exposure in soils with high soil organic carbon content*. *Environ Pollut*, 2013. **175**: p. 75-81.
27. Zhou, W., et al., *A systematic identification of multiple toxin-target interactions based on chemical, genomic and toxicological data*. *Toxicology*, 2013. **304**: p. 173-84.
28. Bhattacharyya, S., et al., *Acylcarnitine profiles in acetaminophen toxicity in the mouse: comparison to toxicity, metabolism and hepatocyte regeneration*. *Metabolites*, 2013. **3**(3): p. 606-22.
29. Ra, K., et al., *Assessment of heavy metal contamination and its ecological risk in the surface sediments along the coast of Korea*. *Journal of Coastal Research*, 2013: p. 105-110.
30. Kosmides, A.K., et al., *Metabolomic fingerprinting: challenges and opportunities*. *Crit Rev Biomed Eng*, 2013. **41**(3): p. 205-21.
31. Eklund, B., et al., *Biological and chemical characterization of harbour sediments from the Stockholm area*. *Journal of Soils and Sediments*, 2010. **10**(1): p. 127-141.
32. Khairy, M.A., et al., *Risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in a Mediterranean semi-enclosed basin affected by human activities (Abu Qir Bay, Egypt)*. *Journal of Hazardous Materials*, 2009. **170**(1): p. 389-397.
33. Martinez-Llado, X., et al., *Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and tributyltin (TBT) in Barcelona harbour sediments and their impact*

- on benthic communities*. Environmental Pollution, 2007. **149**(1): p. 104-113.
34. Kim, G.B., et al., *Application of P450RGS (reporter gene system) as a bioindicator of sediment PAH contamination in the vicinity of Incheon harbor, Korea*. Biomarkers, 1997. **2**(3): p. 181-188.
35. Su, H.M., *Assessment on Pollution Level and Ecological Risk of Heavy Metals in Pond Sediment of Suburban District*. Advances in Manufacturing Science and Engineering, Pts 1-4, 2013. **712-715**: p. 498-501.
36. Rahman, M.S., N. Saha, and A.H. Molla, *Potential ecological risk assessment of heavy metal contamination in sediment and water body around Dhaka export processing zone, Bangladesh*. Environmental Earth Sciences, 2014. **71**(5): p. 2293-2308.
37. Lin, C., et al., *Speciation, distribution, and potential ecological risk assessment of heavy metals in Xiamen Bay surface sediment*. Acta Oceanologica Sinica, 2014. **33**(4): p. 13-21.
38. Gedik, K. and M. Boran, *Assessment of Metal Accumulation and Ecological Risk Around Rize Harbor, Turkey (Southeast Black Sea) Affected by Copper Ore Loading Operations by Using Different Sediment Indexes*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2013. **90**(2): p. 176-181.
39. Caeiro, S., et al., *Ecological risk assessment of sediment management areas: application to Sado Estuary, Portugal*. Ecotoxicology, 2009. **18**(8): p. 1165-1175.
40. Rosen, G., J. Radford, and C. Stransky, *Ecological Risk Assessment Using the Sediment Ecotoxicity Assessment Ring Applications for an Integrative In-Situ Bioassay System*. Sea Technology, 2014. **55**(10): p. 10-13.
41. Yi, Y.J., Z.F. Yang, and S.H. Zhang, *Ecological risk assessment of heavy metals in sediment and human health risk assessment of heavy metals in fishes in the middle and lower reaches of the Yangtze River basin*. Environmental Pollution, 2011. **159**(10): p. 2575-2585.
42. Guo, W., L.T. Zhang, and H.Y. Zhang, *Probabilistic Ecological Risk Assessment of Organochlorine Pesticides (Ocps) in Sediment Porewater from a Shallow Freshwater Lake, China*. Fresenius Environmental Bulletin, 2014. **23**(4): p. 1045-1050.
43. MacDonald, D.D., et al., *Baseline Ecological Risk Assessment of the Calcasieu*

- Estuary, Louisiana: Part 2. An Evaluation of the Predictive Ability of Effects-Based Sediment-Quality Guidelines*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2011. **61**(1): p. 14-28.
44. Rial, D. and R. Beiras, *Prospective ecological risk assessment of sediment resuspension in an estuary*. Journal of Environmental Monitoring, 2012. **14**(8): p. 2137-2144.
45. Ma, W.B., et al., *Study on Potential Ecological Risk Assessment of Sediment from the Yangtze River (Chongqing downtown section) in China*. Contaminated Sites Remediation, 2012. **414**: p. 262-267.
46. Chin, K.H., et al., *Toxic effects of two brominated flame retardants BDE-47 and BDE-183 on the survival and protein expression of the tubificid Monopylephorus limosus*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2012. **84**: p. 46-53.
47. Williams, T.D., et al., *Molecular responses of European flounder (Platichthys flesus) chronically exposed to contaminated estuarine sediments*. Chemosphere, 2014. **108**: p. 152-158.
48. Asakura, T., Y. Date, and J. Kikuchi, *Comparative Analysis of Chemical and Microbial Profiles in Estuarine Sediments Sampled from Kanto and Tohoku Regions in Japan*. Analytical Chemistry, 2014. **86**(11): p. 5425-5432.
49. Spann, N., et al., *Size-dependent effects of low level cadmium and zinc exposure on the metabolome of the Asian clam, Corbicula fluminea*. Aquatic Toxicology, 2011. **105**(3-4): p. 589-599.
50. Liu, X.L., et al., *Metabolic profiling of cadmium-induced effects in one pioneer intertidal halophyte Suaeda salsa by NMR-based metabolomics*. Ecotoxicology, 2011. **20**(6): p. 1422-1431.
51. Alvarez, M.D., et al., *Evaluation of extraction methods for use with NMR-based metabolomics in the marine polychaete ragworm, Hediste diversicolor*. Metabolomics, 2010. **6**(4): p. 541-549.
52. Snape, J.R., et al., *Ecotoxicogenomics: the challenge of integrating genomics into aquatic and terrestrial ecotoxicology*. Aquat Toxicol, 2004. **67**(2): p. 143-54.
53. Iguchi, T., H. Watanabe, and Y. Katsu, *Application of ecotoxicogenomics for studying endocrine disruption in vertebrates and invertebrates*. Environ Health

- Perspect, 2006. **114 Suppl 1**: p. 101-5.
54. Hogstrand, C., S. Balesaria, and C.N. Glover, *Application of genomics and proteomics for study of the integrated response to zinc exposure in a non-model fish species, the rainbow trout*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2002. **133**(4): p. 523-35.
 55. Dowling, V.A. and D. Sheehan, *Proteomics as a route to identification of toxicity targets in environmental toxicology*. Proteomics, 2006. **6**(20): p. 5597-604.
 56. Monsinjon, T., et al., *Data processing and classification analysis of proteomic changes: a case study of oil pollution in the mussel, Mytilus edulis*. Proteome Sci, 2006. **4**(1): p. 17.
 57. Giusto, A., L.A. Somma, and L. Ferrari, *Cadmium toxicity assessment in juveniles of the Austral South America amphipod Hyalella curvispina*. Ecotoxicol Environ Saf, 2012. **79**: p. 163-9.
 58. Mann, R.M., et al., *A rapid amphipod reproduction test for sediment quality assessment: In situ bioassays do not replicate laboratory bioassays*. Environ Toxicol Chem, 2010. **29**(11): p. 2566-74.
 59. Lacaze, E., et al., *Genotoxicity assessment in the amphipod Gammarus fossarum by use of the alkaline Comet assay*. Mutat Res, 2010. **700**(1-2): p. 32-8.
 60. Mann, R.M., et al., *Development and application of a rapid amphipod reproduction test for sediment-quality assessment*. Environ Toxicol Chem, 2009. **28**(6): p. 1244-54.
 61. Adam, O., et al., *Mixture toxicity assessment of wood preservative pesticides in the freshwater amphipod Gammarus pulex (L.)*. Ecotoxicol Environ Saf, 2009. **72**(2): p. 441-9.
 62. Ingersoll, C.G., et al., *A field assessment of long-term laboratory sediment toxicity tests with the amphipod Hyalella azteca*. Environ Toxicol Chem, 2005. **24**(11): p. 2853-70.
 63. Castro, H., et al., *Amphipod acute and chronic sediment toxicity assessment in estuarine environmental monitoring: An example from Ria de Aveiro, NW Portugal*. Mar Pollut Bull, 2006. **53**(1-4): p. 91-9.
 64. Costa, F.O., et al., *Multi-level assessment of chronic toxicity of estuarine*

- sediments with the amphipod Gammarus locusta: II. Organism and population-level endpoints*. Mar Environ Res, 2005. **60**(1): p. 93-110.
65. Neuparth, T., et al., *Multi-level assessment of chronic toxicity of estuarine sediments with the amphipod Gammarus locusta: I. Biochemical endpoints*. Mar Environ Res, 2005. **60**(1): p. 69-91.
66. Clason, B., B. Gulliksen, and G.P. Zauke, *Assessment of two-compartment models as predictive tools for the bioaccumulation of trace metals in the amphipod Gammarus oceanicus Segerstrale, 1947 from Grunnfjord (Northern Norway)*. Sci Total Environ, 2004. **323**(1-3): p. 227-41.
67. Di Marzio, W.D., et al., *Assessment of the toxicity of stabilized sludges using hyalella curvispina (Amphipod) bioassays*. Bull Environ Contam Toxicol, 1999. **63**(5): p. 654-9.
68. Larrain, A., E. Soto, and E. Bay-Schmith, *Assessment of sediment toxicity in San Vicente Bay, central Chile, using the amphipod Ampelisca araucana*. Bull Environ Contam Toxicol, 1998. **61**(3): p. 363-9.
69. Ciarelli, S., et al., *Ecotoxicity Assessment of Contaminated Dredged Material with the Marine Amphipod Corophium volutator*. Arch Environ Contam Toxicol, 1998. **34**(4): p. 350-6.
70. Watanabe, M., et al., *Application of NMR-based metabolomics for environmental assessment in the Great Lakes using zebra mussel ()*. Metabolomics, 2015. **11**(5): p. 1302-1315.
71. Wild, C.P., *The exposome: from concept to utility*. Int J Epidemiol, 2012. **41**(1): p. 24-32.
72. Wild, C.P., *Complementing the genome with an "exposome": the outstanding challenge of environmental exposure measurement in molecular epidemiology*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2005. **14**(8): p. 1847-50.
73. Athersuch, T.J., *The role of metabolomics in characterizing the human exposome*. Bioanalysis, 2012. **4**(18): p. 2207-12.
74. Amiard-Triquet, C., J.-C. Amiard, and P.S. Rainbow, *Ecological biomarkers: indicators of ecotoxicological effects*. 2012: CRC Press.
75. Svendsen, C., et al., *Use of an earthworm lysosomal biomarker for the ecological assessment of pollution from an industrial plastics fire*. Applied Soil Ecology, 1996. **3**(2): p. 99-107.

76. Sanchez-Hernandez, J., *Earthworm biomarkers in ecological risk assessment*, in *Reviews of environmental contamination and toxicology*. 2006, Springer. p. 85-126.
77. Brown, J.N., et al., *Aqueous and lipid Nuclear Magnetic Resonance Metabolomic Profiles of the Earthworm *Aporrectodea Caliginosa* Show Potential as an Indicator Species for Environmental Metabolomics*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2014. **33**(10): p. 2313-2322.
78. Dick, J. T. A., *The cannibalistic behaviour of two *Gammarus* species (Crustacea: Amphipoda)*. The Zoological Society of London, 1995, **236**: p. 697–706.
79. Christie, H., & Kraufvelin, P., *Mechanisms regulating amphipod population density within macroalgal communities with low predator impact*. *Scientia Marina*, 2003, **67**: p. 189–198.
80. Filipe, O. C., et al., *Multi-level assessment of chronic toxicity of estuarine sediments with the amphipod *Gammarus locusta*: II. Organism and population-level endpoints*. *Marine Environmental Research*, 2005, **60**: p. 93-110.
81. Hartvig, C. and Patrik K., *Mechanisms regulating amphipod population density within macroalgal communities with low predator impact*. *Scientia Marina*, 2004, **68**: p. 189-198.
82. Dwi, H., et al., *Toxicity of Ammonia to Benthic Amphipod *Grandidierella bonnieroides*: Potential as Confounding Factor in Sediment Bioassay*. *ILMU Kelautan*, 2015, **20** (4): p.215-222.
83. Lewis, S. E., et al., *Avoidance of filial cannibalism in the amphipod *Gammarus pulex**. *Ethology*, 2010, **116** (2): p.138–146.
84. BAT, L., et al., *Effect of Temperature on the Toxicity of Zinc, Copper and Lead to the Freshwater Amphipod *Gammarus pulex pulex* (L., 1758)*. *Turkish Journal of Zoology*, 2000, **24**: p. 409-415.
85. Correia, A.D., et al., *Studies on biomarkers of copper exposure and toxicity in the marine amphipod *Gammarus locusta* (Crustacea): I. Copper-containing granules within the midgut gland*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 2002, **82**: 827-834.
86. Jermacz, Ł., et al., *Experimental evaluation of preferences of an invasive Ponto-Caspian gammarid *Pontogammarus robustoides* (Amphipoda,*

- Gammaroidea*) for mineral and plant substrata. *Hydrobiologia*, 2015, **746**: p. 209–221.
87. Gupta, R and Mohapatra, H., *Microbial biomass: an economical alternative for removal of heavy metals from waste water*. *Indian journal of experimental biology*, 2003. **41**(9): p. 945-966.
88. Sornom, P., et al., *Effects of Sublethal Cadmium Exposure on Antipredator Behavioural and Antitoxic Responses in the Invasive Amphipod Dikerogammarus villosus*. *Plos one*, 2012. **7** (8): e42435.
89. Neuparth, T., et al., *Multi-level assessment of chronic toxicity of estuarine sediments with the amphipod Gammarus locusta: I. Biochemical endpoints*. 2005, *Marine Environmental Research*, **60**: p. 69–91