生物急毒性檢測方法－廣鹽性青鱂魚靜水式法

中華民國104年1月22日環署檢字第1040006478號公告

自中華民國104年5月15日生效

NIEA B908.10B

# 一、方法概要

本方法係以廣鹽性之青鱂魚（Medaka , *Oryzias latipes*）為試驗生物，以靜水式生物毒性試驗方法檢測生物急毒性，計算 96 小時之半致死濃度（lethal concentration 50%, LC50）或急毒性單位（acute toxic unit, TUa）。

# 二、適用範圍

本方法適用於鹽度 1‰以上放流水之生物急毒性檢測。

# 三、干擾

1. 生物馴養及毒性試驗室內若有化學氣體侵入、人工海水含有有毒物質、器皿或試驗容器未洗淨致殘留有毒物質，會影響青鱂魚健康且可能造成耐受性改變。
2. 試驗生物有病或生長狀況不佳，影響耐受性。
3. 樣品因溶氧或鹽度太低時進行之曝氣或鹽度調整，可能造成揮發性物質散失。

# 四、設備及材料

1. 青鱂魚：使用全長（上顎前端至尾鰭後端的長度）1.0 至 1.5 公分之青鱂魚幼魚（圖一），馴養鹽度須為 30 ± 3‰，可購自魚苗繁殖場或自行繁殖。（註）
2. 生物馴養及毒性試驗室：須為獨立之空間，通風良好，無化學氣體影響，且可屏蔽外界干擾（如噪音、震動、強光、人為驚擾等）。馴養及試驗區宜加以區分，以避免污染。光照強度同一般工作亮度。
3. 溫度控制設備：可使用循環式水浴槽、空調等方式，將馴養水溫及試驗水溫控制在 25 ± 2℃。
4. 採樣容器：玻璃或塑膠材質（如摺疊式水箱）。如使用塑膠材質容器，不可重複使用。
5. 馴養容器：玻璃或塑膠材質。
6. 試驗容器：1 L 或 2 L 硼矽玻璃燒杯。
7. 量瓶及量筒：硼矽玻璃材質。
8. 溫度監測裝置：須可顯示毒性試驗期間試驗水樣之最高及最低溫度。
9. 溶氧測定儀
10. pH 計
11. 鹽度計：曲光折射式或電子式鹽度計，量測範圍0至 50‰ 以 上。
12. 分析天平：待測物重量大於 2 g 時，須能精秤至 0.01 g；待測物重量不大於 2 g 時，須能精秤至 0.001 g。
13. 曝氣設備
14. 水循環過濾裝置：視需要。
15. 磁石攪拌裝置
16. 手操網：大小合適具握柄軟質尼龍網。

## 廣口滴管：開口直徑大小須適合吸取魚苗，亦可將塑膠滴管剪短替代。

1. 幼魚飼料：飼料須考量適口性，大小須適合青鱂魚幼魚，建議使用市售超細微粒、半沉浮性魚飼料或豐年蝦等。

# 五、試劑

1. 試劑水：比電阻值須大於 10 MΩ-cm。
2. 人工海水：溶解適量市售海水素（亦稱人工海鹽）至試劑水使鹽度為 30 ± 3‰（稀釋樣品用）或其他適當濃度（試驗用幼魚馴養用），靜置後取上層液使用，亦可採用過濾方式去除沉澱物。使用前 24 小時須製備完成，溶氧須維持在 5.0 mg/L 以上，室溫下避光保存不宜超過 14 天。
3. 參考毒物：十二烷基硫酸鈉（Sodium dodecyl sulfate，SDS），試藥級以上。
4. 10%（v/v）鹽酸或硝酸：試藥級以上。
5. 丙酮：殘量級。

# 六、採樣與保存

1. 採樣方法參照「事業放流水採樣方法（NIEA W109）」。水樣量須以能做完所需檢測為度，但不得少於 5 L。
2. 採樣時樣品容器須裝至全滿，以減少揮發性物質散失。採樣後立即避光保存於 4 ± 2℃。
3. 水樣必須在採樣後 36 小時內開始進行試驗。

# 七、步驟

（一）試驗準備

### 1. 試驗用青鱂魚幼魚馴養：

#### 適當添加人工海水使馴養水鹽度每 2 日增加幅度不超過 5‰，將馴養水鹽度逐步調高至 30 ± 3‰。青鱂魚幼魚適鹽化完成後，須將馴養鹽度維持在 30 ± 3‰，繼續馴養至少 7 天才可進行試驗。

#### （2）馴養容器以曝氣設備曝氣，使溶氧維持在 5 mg/L 以上，視需要以水循環過濾裝置維護水質，如有死魚應立即移出。

#### （3）馴養之水溫必須與毒性試驗溫度一致，即 25 ± 2℃，光照時間應維持在每天 16 ± 1小時。

#### （4）幼魚成長速度與馴養之密度及餵食狀況有關，須依實際情況調整馴養容器中幼魚數量及餵食次數。過剩之飼料宜移除以免導致水質惡化。

#### （5）毒性試驗開始前 7 天內，期間幼魚死亡率不得超過 10%。

#### （6）毒性試驗開始前 24 小時停止餵食。

#### （7）試驗用青鱂魚幼魚全長應為 1.0 至 1.5 公分。

### 2. 試驗容器及相關器材之清洗：

#### （1）新的塑膠器皿，使用前須用試劑水潤洗 1 次。

#### （2）新的玻璃器皿，須用新鮮配製之 10%（v/v）鹽酸或硝酸浸泡一夜後，再用試劑水沖洗乾淨。使用前以試劑水潤洗 1 次。

#### （3）接觸過樣品的玻璃器皿（如試驗容器、量筒等），如需重複使用，則必須依下列步驟清洗：

#### A.自來水浸泡 15 分鐘後，用清潔劑清洗內壁，再以自來水沖洗 2 次。亦可使用洗瓶機清洗。

#### B.以新鮮配製之 10%（v/v）鹽酸或硝酸潤洗 1 次。

#### C.以試劑水潤洗 2 次。

#### D.以丙酮潤洗 1 次。

#### E.以試劑水沖洗 3 次。

#### F.進行毒性試驗前，再以試劑水潤洗 1 次。

### 3. 試驗前之水樣準備：

#### 先將水樣靜置半小時，待粗顆粒沈降後，再取上層液進行試驗。

1. 水樣溫度須調整至 25 ± 2℃。若回溫後溶氧低於 4.0 mg/L，應對水樣溫和曝氣，使溶氧升至 4.0 mg/L以上。
2. 水樣鹽度低於 27‰ 時，加入適量海水素，以磁石攪拌裝置溫和地攪拌 30 至 60 分鐘，將鹽度調整至 30 ± 3‰，水樣鹽度27‰ 以上則無須調整。

（二）生物毒性試驗

### 1. 以鹽度30 ± 3‰ 之人工海水，將放流水水樣稀釋為 80%、60%、40%、20%、10% 及 5%，試驗濃度包含上述及100%共 7 個濃度，空白試驗則以鹽度30 ± 3‰之人工海水進行。

### 2. 每一濃度之試驗水樣，總體積須 1 L 以上，以 2 個試驗容器平均盛裝。

# 3. 稀釋完成後檢測最高濃度試驗水樣之鹽度、pH及溶氧。另須檢測人工海水之鹽度及 pH。

### 4. 每一濃度之試驗生物總數均為 20 隻。將試驗用青鱂魚幼魚移入試驗容器，每個容器各放 10 隻。

### 5. 試驗期間為 96 小時，水溫應控制在 25 ± 2℃，光照時間應維持每天 16 ± 1 小時。試驗期間青鱂魚不得餵食。

### 6. 開始試驗後，至少於第 2、24、48、72 及 96 小時，觀察及移出死亡之青鱂魚並記錄死亡數量。

### 7. 結束試驗後，須測量並記錄最高濃度試驗水樣之鹽度、pH及溶氧，並記錄試驗期間之最高及最低水溫。

# 八、結果處理

（一）死亡判定：死亡之判定須符合下列二條件：

### 1. 鰭及鰓的活動停止。

### 2. 魚體經輕觸沒反應。

（二）96 小時LC50 之計算：

### 1. 計算各試驗濃度之 96 小時青鱂魚死亡總數及青鱂魚死亡百分率：

青鱂魚死亡總數 = 2 個試驗容器之青鱂魚死亡數量加總

青鱂魚死亡百分率 = 青鱂魚死亡總數 ÷ 20 × 100%

### 2. 以下列 4 種方法計算 96 小時 LC50：圖解法（graphic method）、機率單位法（probit method）、史丕曼－卡伯法（Spearman - Karber method）、史丕曼－卡伯修正法（trimmed Spearman - Karber method）。方法取捨依圖二之流程作判斷，詳細計算方式參見附錄。

（三）放流水之 96 小時TUa計算

### 1. TUa 為LC50之倒數，即

TUa = 100% ÷（96小時 LC50）

### 2. 若放流水水樣 7 個濃度之青鱂魚死亡百分率均小於50%，則 96 小時之LC50 > 100%，換算之 TUa < 1.00。

### 3. 若放流水水樣 7 個濃度之青鱂魚死亡百分率均大於50%，則96小時之LC50 < 5%，換算之 TUa > 20.00。

### 4. 若結果數據不符合前述 2 種狀況，則依八、（二）之方法計算 96 小時 LC50，再換算TUa。

# 九、品質管制

（一）試驗魚種必須確認為青鱂魚，不可混合其他品種。

（二）執行毒性試驗後之試驗生物須廢棄，不得重複使用。

（三）空白試驗：每次毒性試驗應至少伴隨一空白試驗。若空白試驗之死亡率超過 10%，則該次毒性試驗之試驗結果不可採用，必須重做。

（四）參考毒物試驗：

### SDS以人工海水溶解並配製為 5 個不同濃度，相鄰濃度差建議不超過 1 mg/L，每一濃度之試驗水樣總體積須 1 L以上，以 2 個試驗容器平均盛裝，將試驗用青鱂魚幼魚移入試驗容器，每個容器各放 10 隻。5 個試驗濃度之死亡百分率，至少須有一個 ≧ 50%，及一個 ≦ 50%，且至少須有1個濃度會造成試驗生物部分死亡。

### 新設立之實驗室，應先以SDS進行至少 5 次參考毒物試驗，計算 LC50平均值及變異係數（coefficient of variation, CV）。CV值不得超過 50%。

### 3. 執行毒性試驗期間，每個月至少執行一次參考毒物試驗。

### 4. 新購入或自行繁殖之青鱂魚，須進行參考毒物試驗，以確定該批青鱂魚之敏感度。

### 5. 參考毒物試驗結果（LC50）須建立品質管制圖，建立方法為累積至少 15 筆參考毒物試驗結果，計算其平均值及標準偏差（SD），以平均值 ± 2 SD 為警告上下限值，以平均值 ± 3 SD 為管制上下限值。不足 15 筆數據時，可先以 5 筆參考毒物試驗結果建立品質管制圖，再逐漸累積數據。品質管制圖每年應重新製備一次，即使用前一年最後 15 筆參考毒物試驗結果進行計算，若前一年之數據不足 15 筆時，得依序沿用歷年之數據補足 15 筆。

### 6. 參考毒物試驗結果若超出 ± 3 SD，或最近 20 次有 2 次以上超出 ± 2 SD，須檢討誤差來源、執行矯正措施並重新進行參考毒物試驗。

# 十、精密度及準確度

單一實驗室以十二烷基硫酸鈉（SDS）進行生物急毒性試驗結果，96 小時 LC50 之平均值為 6.44 mg/L，變異係數為 9.0%（n = 5）。

# 十一、參考資料

（一）U.S. EPA. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. EPA-821-R-02-012, 2002.

（二）凌永健，高科技產業流水中生物毒性成因之探討（1/4），EPA-102-E3S5-02-01，中華民國102年。

註：動物之科學應用應依行政院農業委員會訂定之「動物保護法」及其相關規定辦理。生物屍體之清除及處理，依一般事業廢棄物相關規定辦理。



圖一、青鱂魚幼魚

5個以上試驗濃度之青鱂魚死亡數據

2個以上的濃度有部分死亡情形

機率單位模式是否適當(如異質性卡方檢定結果為不顯著)

1個以上的濃度有部分死亡的情形

使用圖解法

使用史丕曼卡伯法或
史丕曼卡伯修正法

使用機率單位法

否

是

否

否

是

是

圖二、96 小時 LC50 之計算流程圖

附錄：LC50 計算方法

一、機率單位法

（一）使用條件

1. 5 個以上試驗濃度之死亡百分率，須有至少一個 ≧ 50%，及至少一個 ≦ 50%。

2. 5 個以上試驗濃度須有 2 個以上的濃度有部分死亡的情形，也就是死亡百分率數據須有至少 2 個大於 0 且小於 100%。

（二）計算步驟

1. 可使用程式 probit.exe 進行計算。

2. probit.exe 之輸入範例如圖 1，輸出結果如圖 2。本程式之結果輸出檔為文字檔，內容包含異質性之卡方檢定結果（Chi - square test for heterogeneity）及 LC50 計算結果。計算所得之卡方值（Chi - square for heterogeneity (calculated)）須小於查表值（Tabular value at 0.05 level），LC50 之計算結果才可採用。

3. 若數據輸入後出現Overflow或錯誤訊息、結果輸出檔呈現錯誤訊息、或計算所得之卡方值未小於查表值，則改用史丕曼－卡伯法進行計算。

（三）範例

1. 若結果數據如表 1之結果 1，因試驗濃度 40% 及 60% 出現部分死亡情形，故使用機率單位法進行計算。

2. 執行 probit.exe 檔，數據輸入如圖 1，結果如圖 2。

（1）計算所得之卡方值（5.150）小於查表值（11.070），故機率單位模式適用於此組數據。

（2）LC50 為 56%，TUa 為 1.79。

二、史丕曼－卡伯法及史丕曼－卡伯修正法：

（一）使用條件

1. 5 個以上試驗濃度之死亡百分率數據經過平滑化及調整後，須有至少一組 ≧ 50%，及至少一組 ≦ 50%。

2. 5 個以上試驗濃度之死亡百分率數據經過平滑化及調整後，必須有 1 個以上的濃度有部分死亡的情形。

3. 若最低濃度之平滑調整死亡百分率為 0%，且最高濃度之平滑調整死亡百分率為 100%，則使用史丕曼－卡伯法。若不符合前述條件，則使用史丕曼－卡伯修正法。

（二）計算步驟

1. 可使用程式 tsk.exe 進行計算。

2. tsk.exe 之輸入範例如圖 3，輸出結果如圖 4。本程式會自動進行死亡百分率數據之平滑化及調整，而結果輸出內容包含 SPEARMAN - KARBER TRIM 之數值及 LC50 計算結果。

（1）若SPEARMAN - KARBER TRIM 之數值為 0%，代表計算時使用史丕曼－卡伯法。

（2）若SPEARMAN - KARBER TRIM 之數值非 0%，代表計算時使用史丕曼－卡伯修正法。

（三）範例

1. 若結果數據如表 1 之結果 2，雖然試驗濃度 40% 及 100% 出現部分死亡情形，但機率單位法無法計算，故使用史丕曼－卡伯法及史丕曼－卡伯修正法進行計算。

2. 執行 tsk.exe 檔，數據輸入如圖 3，結果如圖 4。

（1）計算所得之 SPEARMAN - KARBER TRIM 為 20.25%，代表計算時使用史丕曼－卡伯修正法。

（2）LC50 為 92%，TUa 為 1.09。

三、圖解法：適用於各濃度均無部分死亡的情形。

（一）5 個以上試驗濃度之死亡百分率數據經過平滑化及調整後，須有至少一組 ≧ 50%，及至少一組 ≦ 50%。

（二）計算步驟

1. 將死亡百分率數據平滑化：

（1）假設空白試驗之死亡百分率為 p0，而樣品 7 個濃度之死亡百分率依序為 p1、p2、…、p7（由低濃度至高濃度）。若死亡百分率未依循 p0 ≦ … ≦ p7 之順序，則必須進行平滑化。

（2）進行平滑化時，將不符合上述順序之相鄰死亡百分率加總後平均，再以平均值取代原有之死亡百分率。
舉例來說，若 p1 ＝ p2 ＝ p3 ＝ p4＝ p5 ＜ p0 ＜ p6 ＝ p7，則不符順序之數據為 p0、p1、p2、p3、p4、p5。此時需進行數據平滑化，將 p0 至 p5 加總平均，並以平滑後之死亡百分率取代原有之 p0 至 p5：p0s ＝ p1s ＝ p2s ＝ p3s ＝ p4s＝ p5s＝（p0 ＋ p1 ＋ p2 ＋ p3＋ p4＋ p5）/ 6。

2. 死亡百分率調整：完成死亡百分率平滑化後，若 p0s≠0，則將樣品各濃度之死亡百分率依據 p0s 加以調整。

pia ＝ ( pis － p0s ) / ( 1 － p0s )

pia：稀釋樣品 i 之調整死亡百分率
pis：稀釋樣品 i 之平滑化死亡百分率
p0s：空白試驗之平滑化死亡百分率

3. 將樣品濃度（對數座標軸）對調整死亡百分率（線性座標軸）作圖。找出括住 50% 之兩點，畫一直線。找出此一直線上死亡百分率為 50% 時之濃度值，即為 LC50。

（三）範例

1. 若結果數據如表 1 之結果 3 ，死亡百分率計算結果依序為 5%、0%、0%、0%、0%、0%、100%、100%。

2. 因 p0 至 p5 未依循 p0 ≦ … ≦ p7 之順序，故進行死亡百分率平滑化。平滑後之死亡百分率依序為 0.83%、0.83%、0.83%、0.83%、0.83%、0.83%、100%、100%。

3. 因 p0s ≠ 0，故進行死亡百分率調整。調整後之死亡百分率依序為 0%、0%、0%、0%、0%、0%、100%、100%。

4. 將樣品濃度（對數座標軸）對調整死亡百分率（線性座標軸）作圖如圖 5。在濃度 60%及 80% 之資料點之間畫一直線，該直線上死亡百分率為 50% 時，濃度值為 69.28%，故 LC50 為 69%，TUa 為 1.45。

表1、試驗生物死亡數量原始數據（每組之試驗生物均為 20 隻）

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 放流水濃度 | 結果 1 | 結果 2 | 結果 3 |
| 空白試驗 | 0 | 1 | 1 |
| 5% | 0 | 0 | 0 |
| 10% | 0 | 0 | 0 |
| 20% | 0 | 0 | 0 |
| 40% | 3 | 2 | 0 |
| 60% | 9 | 0 | 0 |
| 80% | 20 | 0 | 20 |
| 100% | 20 | 16 | 20 |
| 分析方法 | 機率單位法 | 史丕曼－卡伯修正法 | 圖解法 |

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|

|  |
| --- |
| EPA PROBIT ANALYSIS PROGRAMUSED FOR CALCULATING LC/EC VALUESVersion 1.5 |

Do you wish abbreviated (A) or full (F) input/output? aOutput to printer (P) or disk file (D)? dFile name for output? Test1Title? Test1Number responding in the control group = ? 0Number of exposure concentrations, exclusive of controls? 7Input data starting with the lowest exposure concentrationConcentration = ? 5Number responding = ? 0Number exposed = ? 20Concentration = ? 10Number responding = ? 0Number exposed = ? 20Concentration = ? 20Number responding = ? 0Number exposed = ? 20Concentration = ? 40Number responding = ? 3Number exposed = ? 20Concentration = ? 60Number responding = ? 9Number exposed = ? 20Concentration = ? 80Number responding = ? 20Number exposed = ? 20Concentration = ? 100Number responding = ? 20Number exposed = ? 20

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Number |  | Conc. |  | NumberResp. |  | NumberExposed |
| 1 |  | 5.0000 |  | 0 |  | 20 |
| 2 |  | 10.0000 |  | 0 |  | 20 |
| 3 |  | 20.0000 |  | 0 |  | 20 |
| 4 |  | 40.0000 |  | 3 |  | 20 |
| 5 |  | 60.0000 |  | 9 |  | 20 |
| 6 |  | 80.0000 |  | 20 |  | 20 |
| 7 |  | 100.0000 |  | 20 |  | 20 |

Do you wish to modify your data? nThe control response = 0Do you wish to modify it? nOutput stored in Test1 |

圖1、probit 程式之輸入範例

|  |
| --- |
| EPA PROBIT ANALYSIS PROGRAMUSED FOR CALCULATING LC/EC VALUESVersion 1.5Test1  Proportion  Observed Responding  Number Number Proportion Adjusted for Conc. Exposed Resp. Responding Controls   5.0000 20 0 0.0000 0.0000 10.0000 20 0 0.0000 0.0000 20.0000 20 0 0.0000 0.0000 40.0000 20 3 0.1500 0.1500 60.0000 20 9 0.4500 0.4500 80.0000 20 20 1.0000 1.0000 100.0000 20 20 1.0000 1.0000Chi - Square for Heterogeneity (calculated) = 5.150Chi - Square for Heterogeneity  (tabular value at 0.05 level) = 11.070Test1  Estimated LC/EC Values and Confidence Limits  Exposure 95% Confidence LimitsPoint Conc. Lower Upper LC/EC 1.00 31.620 22.002 37.962LC/EC 50.00 55.550 49.627 61.121 |

圖2、probit 程式之結果範例

|  |
| --- |
| TRIMMED SPEARMAN-KARBER METHOD. VERSION 1.5ENTER DATE OF TEST:ENTER TEST NUMBER:WHAT IS TO BE ESTIMATED? (ENTER “L” FOR LC50 AND “E” FOR EC50)LENTER TEST SPECIES NAME:ENTER TOXICANT NAME:ENTER UNITS FOR EXPOSURE CONCENTRATION OF TOXICANT:%ENTER THE NUMBER OF INDIVIDUALS IN THE CONTROL:20ENTER THE NUMBER OF MORTALITIES IN THE CONTROL1ENTER THE NUMBER OF CONCENTRATIONS(NOT INCLUDING THE CONTROL; MAX = 10)7ENTER THE 5 EXPOSURE CONCENTRATIONS (IN INCREASING ORDER):5 10 20 40 60 80 100ARE THE NUMBER OF INDIVIDUALS AT EACH EXPOSURE CONCENTRATION EQUAL(Y/N)?YENTER THE NUMBER OF INDIVIDUALS AT EACH EXPOSURE CONCENTRATION:20ENTER UNITS FOR DURATION OF EXPERIMENT(ENTER “H” FOR HOURS, “D” FOR DAYS, ETC.):HENTER DURATION OF TEST:96ENTER THE NUMBER OF MORTALITIES AT EACH EXPOSURE CONCENTRATION:0 0 0 2 0 0 16WOULD YOU LIKE THE AUTOMATIC TRIM CALCULATION(Y/N)?Y |

圖3、tsk 程式之輸入範例

|  |
| --- |
|  DATE: TEST NUMBER: DURATION: 96 TOXICANT : SPECIES: RAW DATA: Concentration Number Mortalities - -- ---- (%) Exposed .00 20 1 5.00 20 0 10.00 20 0 20.00 20 0 40.00 20 2 60.00 20 0 80.00 20 0 100.00 20 16 SPEARMAN-KARBER TRIM: 20.25% SPEARMAN-KARBER ESTIMATES: LC50: 91.81 95% LOWER CONFIDENCE: 88.86 95% UPPER CONFIDENCE: 94.85 NOTE: MORTALITY PROPORTIONS WERE NOT MONOTONICALLY INCREASING. ADJUSTMENTS WERE MADE PRIOR TO SPEARMAN-KARBER ESTIMATION.------------------------------------------------------------------------------ WOULD YOU LIKE TO HAVE A COPY SENT TO THE PRINTER(Y/N)? |

圖4、tsk 程式之結果範例

圖5、圖解法作圖範例

