

生物急毒性檢測方法－廣鹽性青鱗魚靜水式法

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鱗魚（*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%, LC_{50} ）或急毒性單位（acute toxic unit, TU_a ）。

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

- （一）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有毒物質，會影響青鱗魚健康且可能造成耐受性改變。
- （二）試驗生物有病或生長狀況不佳，影響耐受性。
- （三）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

- （一）青鱗魚：使用全長（上顎前端至尾鰭後端的長度）1.0 至 1.5 公分之青鱗魚幼魚（圖一），馴養鹽度須為 $30 \pm 3\text{‰}$ ，可購自魚苗繁殖場或自行繁殖。（註）
- （二）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。
- （三）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 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 。
- （四）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。
- （五）馴養容器：玻璃或塑膠材質。

- (六) 試驗容器：1 L 或 2 L 硼矽玻璃燒杯。
- (七) 量瓶及量筒：硼矽玻璃材質。
- (八) 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。
- (九) 溶氧測定儀
- (十) pH 計
- (十一) 鹽度計：曲光折射式或電子式鹽度計，量測範圍 0 至 50‰ 以上。
- (十二) 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。
- (十三) 曝氣設備
- (十四) 水循環過濾裝置：視需要。
- (十五) 磁石攪拌裝置
- (十六) 手操網：大小合適具握柄軟質尼龍網。
- (十七) 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。
- (十八) 幼魚飼料：飼料須考量適口性，大小須適合青鱗魚幼魚，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

- (一) 試劑水：比電阻值須大於 10 MΩ-cm。
- (二) 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 $30 \pm 3\text{‰}$ （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。
- (三) 參考毒物：十二烷基硫酸鈉（Sodium dodecyl sulfate, SDS），試藥級以上。
- (四) 10% (v/v) 鹽酸或硝酸：試藥級以上。
- (五) 丙酮：殘量級。

六、採樣與保存

- (一) 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。
- (二) 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 $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 。
- (三) 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. 試驗用青鱈魚幼魚馴養：

- (1) 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 $30 \pm 3\text{‰}$ 。青鱈魚幼魚適鹽化完成後，須將馴養鹽度維持在 $30 \pm 3\text{‰}$ ，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 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，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) 試驗用青鱈魚幼魚全長應為 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：

- (1) 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。
- (2) 水樣溫度須調整至 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 。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。
- (3) 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 $30 \pm 3\text{‰}$ ，水樣鹽度 27‰ 以上則無須調整。

(二) 生物毒性試驗

1. 以鹽度 $30 \pm 3\text{‰}$ 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 $30 \pm 3\text{‰}$ 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。將試驗用青鱈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 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，光照時間應維持每天 16 ± 1 小時。試驗期間青鱈魚不得餵食。
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鱈魚並記錄死亡數量。
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 LC_{50} 之計算：

1. 計算各試驗濃度之 96 小時青鱈魚死亡總數及青鱈魚死亡百分率：

青鱈魚死亡總數 = 2 個試驗容器之青鱈魚死亡數量加總

青鱈魚死亡百分率 = 青鱈魚死亡總數 $\div$ 20 $\times$ 100%

2. 以下列 4 種方法計算 96 小時 LC_{50} ：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 TU_a 計算

1. TU_a 為 LC_{50} 之倒數，即

$TU_a = 100\% \div (96 \text{ 小時 } LC_{50})$

2. 若放流水水樣 7 個濃度之青鱈魚死亡百分率均小於 50%，則 96 小時之 $LC_{50} > 100\%$ ，換算之 $TU_a < 1.00$ 。
3. 若放流水水樣 7 個濃度之青鱈魚死亡百分率均大於 50%，則 96 小時之 $LC_{50} < 5\%$ ，換算之 $TU_a > 20.00$ 。
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 LC_{50} ，再換算 TU_a 。

九、品質管制

(一) 試驗魚種必須確認為青鱈魚，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：

1. 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，將試驗用青鱈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 $\geq 50\%$ ，及一個 $\leq 50\%$ ，且至少須有 1 個濃度會造成試驗生物部分死亡。

2. 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 LC_{50} 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鱈魚，須進行參考毒物試驗，以確定該批青鱈魚之敏感度。
5. 參考毒物試驗結果 (LC_{50}) 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

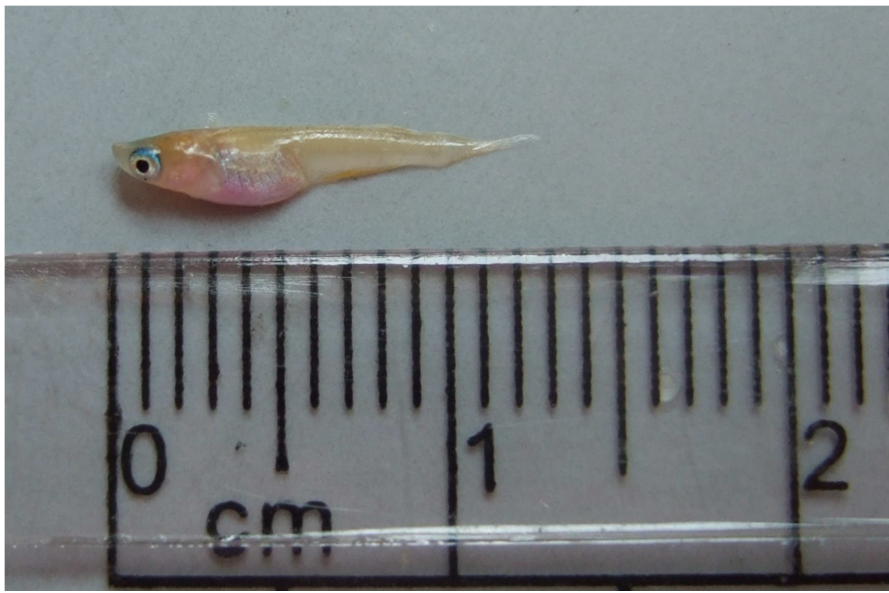
單一實驗室以十二烷基硫酸鈉 (SDS) 進行生物急毒性試驗結果，96 小時 LC_{50} 之平均值為 6.44 mg/L，變異係數為 9.0% ($n=5$)。

十一、參考資料

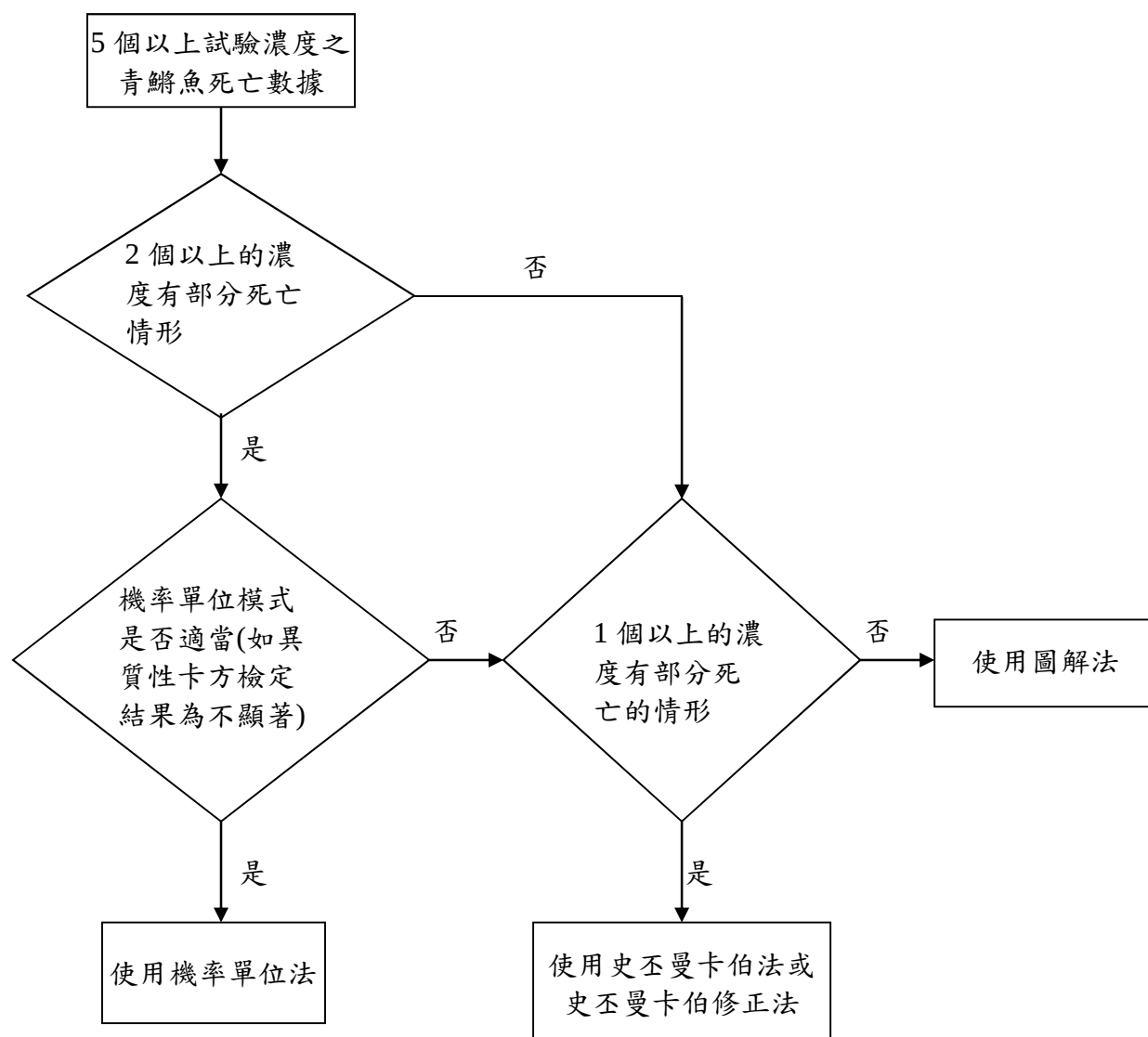
(一) U.S. EPA. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. EPA-821-R-02-012, 2002.

(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、青鱗魚幼魚



圖二、96 小時 LC_{50} 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 $\geq 50\%$ ，及至少一個 $\leq 50\%$ 。
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%，TU_a 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 $\geq 50\%$ ，及至少一組 $\leq 50\%$ 。
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 LC_{50} 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) LC_{50} 為 92%， TU_a 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 $\geq 50\%$ ，及至少一組 $\leq 50\%$ 。

(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 p_0 ，而樣品 7 個濃度之死亡百分率依序為 p_1 、 p_2 、 $\dots$ 、 p_7 （由低濃度至高濃度）。若死亡百分率未依循 $p_0 \leq \dots \leq p_7$ 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 $p_1 = p_2 = p_3 = p_4 = p_5 < p_0 < p_6 = p_7$ ，

則不符順序之數據為 p_0 、 p_1 、 p_2 、 p_3 、 p_4 、 p_5 。此時需進行數據平滑化，將 p_0 至 p_5 加總平均，並以平滑後之死亡百分率取代原有之 p_0 至 p_5 ： $p_0^s = p_1^s = p_2^s = p_3^s = p_4^s = p_5^s = (p_0 + p_1 + p_2 + p_3 + p_4 + p_5) / 6$ 。

2. 死亡百分率調整：完成死亡百分率平滑化後，若 $p_0^s \neq 0$ ，則將樣品各濃度之死亡百分率依據 p_0^s 加以調整。

$$p_i^a = (p_i^s - p_0^s) / (1 - p_0^s)$$

p_i^a ：稀釋樣品 i 之調整死亡百分率

p_i^s ：稀釋樣品 i 之平滑化死亡百分率

p_0^s ：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 LC_{50} 。

（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 p_0 至 p_5 未依循 $p_0 \leq \dots \leq p_7$ 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 $p_0^s \neq 0$ ，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 LC_{50} 為 69%， TU_a 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 PROGRAM
USED FOR CALCULATING LC/EC VALUES
Version 1.5

Do you wish abbreviated (A) or full (F) input/output? a
Output to printer (P) or disk file (D)? d
File name for output? Test1
Title? Test1
Number responding in the control group = ? 0
Number of exposure concentrations, exclusive of controls? 7
Input data starting with the lowest exposure concentration
Concentration = ? 5
Number responding = ? 0
Number exposed = ? 20
Concentration = ? 10
Number responding = ? 0
Number exposed = ? 20
Concentration = ? 20
Number responding = ? 0
Number exposed = ? 20
Concentration = ? 40
Number responding = ? 3
Number exposed = ? 20
Concentration = ? 60
Number responding = ? 9
Number exposed = ? 20
Concentration = ? 80
Number responding = ? 20
Number exposed = ? 20
Concentration = ? 100
Number responding = ? 20
Number exposed = ? 20

Number	Conc.	Number Resp.	Number Exposed
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? n
The control response = 0
Do you wish to modify it? n
Output stored in Test1

圖 1、probit 程式之輸入範例

EPA PROBIT ANALYSIS PROGRAM
USED FOR CALCULATING LC/EC VALUES
Version 1.5

Test1

Conc.	Number Exposed	Number Resp.	Observed Proportion Responding	Proportion Responding Adjusted for 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	1.0000

Chi - Square for Heterogeneity (calculated) = 5.150

Chi - Square for Heterogeneity
(tabular value at 0.05 level) = 11.070

Test1

Estimated LC/EC Values and Confidence Limits

Point	Exposure Conc.	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
LC/EC 1.00	31.620	22.002	37.962
LC/EC 50.00	55.550	49.627	61.121

圖 2、probit 程式之結果範例

```

TRIMMED SPEARMAN-KARBER METHOD.    VERSION 1.5

ENTER DATE OF TEST:

ENTER TEST NUMBER:

WHAT IS TO BE ESTIMATED?
(ENTER "L" FOR LC50 AND "E" FOR EC50)
L
ENTER TEST SPECIES NAME:

ENTER TOXICANT NAME:

ENTER UNITS FOR EXPOSURE CONCENTRATION OF TOXICANT:
%
ENTER THE NUMBER OF INDIVIDUALS IN THE CONTROL:
20
ENTER THE NUMBER OF MORTALITIES IN THE CONTROL
1
ENTER THE NUMBER OF CONCENTRATIONS
(NOT INCLUDING THE CONTROL; MAX = 10)
7
ENTER THE 5 EXPOSURE CONCENTRATIONS (IN INCREASING ORDER):
5 10 20 40 60 80 100
ARE THE NUMBER OF INDIVIDUALS AT EACH EXPOSURE CONCENTRATION EQUAL(Y/N)?
Y
ENTER THE NUMBER OF INDIVIDUALS AT EACH EXPOSURE CONCENTRATION:
20
ENTER UNITS FOR DURATION OF EXPERIMENT
(ENTER "H" FOR HOURS, "D" FOR DAYS, ETC.):
H
ENTER DURATION OF TEST:
96
ENTER THE NUMBER OF MORTALITIES AT EACH EXPOSURE CONCENTRATION:
0 0 0 2 0 0 16
WOULD 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

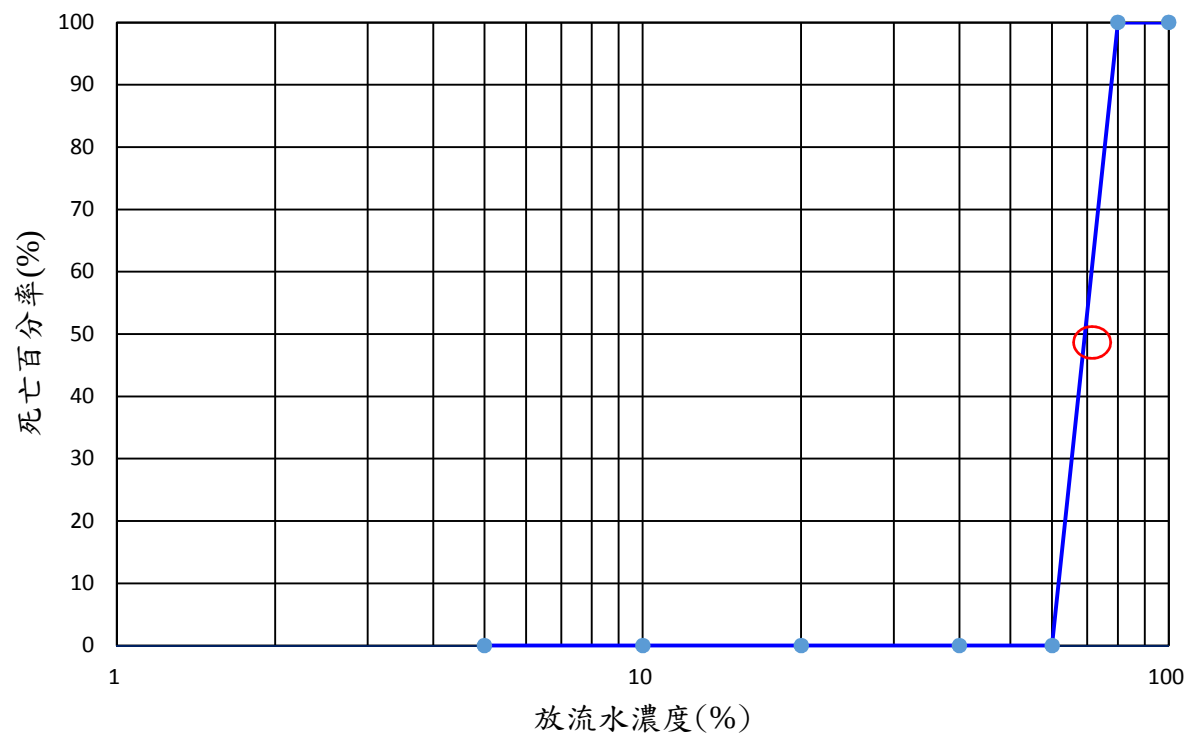


圖 5、圖解法作圖範例