

行政院環境保護署公告

中華民國 105 年 12 月 20 日

環署檢字第 1050104366 號

主 旨：預告訂定「水樣急毒性檢測方法－細菌冷光法（NIEA B301.10C）」草案。

依 據：行政程序法第 154 條第 1 項。

公告事項：

- 一、訂定機關：行政院環境保護署。
- 二、訂定依據：水污染防治法第 68 條。
- 三、草案如附件。本案另詳載於本署環境檢驗所網站（http://www.niea.gov.tw/niea/epa_www.asp）「環境檢測方法草案預告」網頁。
- 四、對於本草案內容有任何意見或修正建議者，請於本預告刊登公報之次日起 60 日內陳述意見或洽詢：
 - (一) 承辦單位：行政院環境保護署環境檢驗所
 - (二) 地址：桃園市中壢區民族路 3 段 260 號
 - (三) 電話：(03)4915818 分機 2112
 - (四) 傳真號碼：(03)4910419
 - (五) 電子郵件：mryang@epa.gov.tw

署 長 李應元

水樣急毒性檢測方法—細菌冷光法（NIEA B301.10C）草案總說明

本署現行之生物急毒性檢驗方法係以魚類成體為測試對象，國際上增列使用細菌測試，為維護實驗動物福祉及與國際檢測方法接軌，研擬公告以細菌檢測生物急毒性之方法。爰依水污染防治法第六十八條規定，擬具「水樣急毒性檢測方法—細菌冷光法（NIEA B301.10C）」草案。

水樣急毒性檢測方法—細菌冷光法（NIEA B301.10C）草案

公 告	說明
主旨：訂定「水樣急毒性檢測方法—細菌冷光法（NIEA B301.10C）」，並自中華民國一百零六年七月十五日生效。	方法名稱及生效日期。
依據：水污染防治法第六十八條。	法源依據。
公告事項：方法內容詳如附件。	方法內容。

水樣急毒性檢測方法－細菌冷光法草案

NIEA B301.10C

一、方法概要

本方法主要係以費氏弧菌 (*Aliivibrio fischeri*) 懸浮液暴露在待測樣品或經稀釋樣品中，測定其放射光的抑制度，計算暴露 5、15、30 min 放射光強度減少的程度。細菌冷光測試生物毒性分析使用之毒性指標為半效應濃度 (Effective Concentration 50%, EC₅₀)，即是當費氏弧菌發光量降至一半時的影響濃度，可藉由測值推算半效應濃度，待測樣品 EC₅₀ 測值與其生物毒性成反比。

二、適用範圍

本方法適用於地面水體、地下水體、放流水、廢水、污水及以水稀釋的單一化學物質之生物急毒性檢測。

三、干擾

- (一) 具有濁度、低溶氧或高色度之水體，會干擾檢測，須經過離心及過濾處理、曝氣。
- (二) 樣品含氯會干擾檢測，可添加硫代硫酸鈉等處理。
- (三) 生物冷光需要氧氣，需氧量高的樣品（或低氧環境）可能造成缺氧和抑制冷光。
- (四) 樣品 pH 值小於 6.0 或大於 8.5 會干擾檢測。
- (五) 試驗生物費氏弧菌是海洋微生物，樣品鹽度超過 30‰ 或有相同滲透壓的其他物質可能造成生物冷光刺激效應。
- (六) 測試樣品鹽度不可超過 35 ‰。

四、設備與材料

- (一) 生物毒性分析儀：設備主要由培養槽 ($15 \pm 1^\circ\text{C}$)、試劑槽 ($4 \pm 2^\circ\text{C}$) 及冷光偵測裝置所組成。
- (二) 冷凍櫃：溫度可維持在 $-20 \pm 2^\circ\text{C}$ 之冷凍設備。
- (三) 冰箱：溫度可維持在 $4 \pm 2^\circ\text{C}$ 。
- (四) 檢測試管：依照儀器規範使用。
- (五) 可調式微量吸管及吸管尖：可吸取 10 μL 、250 μL 、500 μL 、1000 μL 等體積。

- (六) 鹽度計：曲光折射式或電子式鹽度計，量測範圍 0 至 50‰ 以上。
- (七) 溶氧測定儀。

五、試劑

- (一) 生物製劑：市售內含費氏弧菌(*Aliivibrio fischeri* ATCC 49387) 之冷凍乾燥生物製劑，須保存在 $-20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 。
- (二) 試劑水：比電阻值須大於 $10\text{ M}\Omega\text{-cm}$ 。
- (三) 氯化鈉：試藥級以上。
- (四) 酚：試藥級以上。
- (五) 硫酸鋅：試藥級以上。
- (六) 氫氧化鈉：試藥級以上。
- (七) 氯化氫：試藥級以上。
- (八) 硫代硫酸鈉：試藥級以上。

六、採樣與保存

- (一) 採樣方法參照「監測井地下水採樣方法 (NIEA W103)」、「河川、湖泊及水庫水質採樣通則 (NIEA W104)」、「事業放流水採樣方法 (NIEA W109)」。
- (二) 採樣時樣品容器須裝至全滿，以減少揮發性物質散失。
- (三) 樣品於 $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 避光貯存，可保存 48 小時，若於 -20°C 則可保存 2 個月。

七、步驟

- (一) 試驗前之水樣準備
 - 1. 將水樣靜置半小時，待粗顆粒沈降後，再取上層液進行試驗。高濁度樣品可先靜置、離心或過濾處理。
 - 2. 水樣回溫後，溶氧若低於 3.0 mg/L ，應對水樣溫和曝氣，使溶氧升至 3.0 mg/L 以上。
 - 3. 檢測水樣鹽度。
 - 4. 以 1M 氫氧化鈉或氯化氫將水樣之 pH 調整為 6.0 至 8.5。添加量不得超過水樣體積之 5%。
- (二) 生物毒性分析儀準備：儀器之培養槽溫度須達 $15 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ，試劑槽須達 $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 才可使用。
- (三) 生物製劑活化：

1. 依生物製劑配製說明書製備溶解活化生物製劑，將 0.01% 無菌氯化鈉溶液（可購市售商品，使用時溫度應為 $4 \pm 2^\circ\text{C}$ ）加入生物製劑中，輕輕旋轉搖晃，使乾燥粉塊狀的生物試劑完全溶解並混合均勻後，迅速倒於檢測試管中，置入試劑槽 10 至 20 分鐘才可使用。
2. 活化之生物製劑須於 4 小時內完成分析，未使用完應廢棄，不可再次冷凍保存。

（四）樣品檢測：（全程須保持於 $15 \pm 1^\circ\text{C}$ ）

1. 若樣品之鹽度低於 20 ‰，須以 22% 無菌氯化鈉溶液（可購市售商品）調整樣品鹽度，最終鹽度不可超過 35 ‰。例如樣品鹽度為 0，取 2.5 mL 樣品加入 250 μL 之 22% 無菌氯化鈉溶液，該水樣濃度即為 91%。若樣品之鹽度為 20 ‰以上，則無須調整，該水樣濃度即為 100%。
2. 將水樣以 2% 無菌氯化鈉溶液（可購市售商品）至少稀釋成 4 種濃度，相鄰濃度之稀釋倍數不得超過 2 倍。注意測試濃度對生物發光的抑制率必須介於 10 % 和 90 % 之間。
3. 空白試驗則以 2% 無菌氯化鈉溶液進行。
4. 含分析用生物製劑試管製備：於檢測試管中加入 500 μL 之 2% 無菌氯化鈉溶液及 10 μL 活化後之生物製劑，每一試驗水樣皆須製備一份。
5. 生物毒性分析儀操作步驟請依廠商之使用說明執行。
6. 以生物毒性分析儀檢測含分析用生物製劑試管，逐一讀取其初始發光強度(I_0)。
7. 將 500 μL 試驗水樣（空白試驗水樣）加至含分析用生物製劑試管，並開始計時，於反應 5、15、30 min 時，以生物毒性分析儀檢測，逐一讀取其發光強度(I_t)。

八、結果處理

評估濃度 - 效應關係，可使用線性回歸技術計算，步驟如下：

1. 計算空白樣品修正係數：經 t（5,15,30 min）時間暴露後冷光抑制率

$$f_{kt} = \frac{I_{kt}}{I_0}$$

f_{kt} ：空白樣品修正係數

I_0 ：空白樣品經 t 時間暴露後殘餘冷光強度

I_{kt} ：空白樣品經 t 時間暴露後殘餘冷光強度

2. 計算樣品經 t（5,15,30 min）時間暴露後冷光抑制率

$$I_{ct} = I_0 f_{kt}$$

I_{ct} ：樣品發光強度乘以空白樣品修正係數

I_0 ：樣品初始發光強度

f_{kt} ：空白樣品修正係數

3. 計算 H_t ：經 t (5,15,30 min) 時間暴露後冷光抑制率 (%)

$$H_t = \frac{(I_{ct} - I_t)}{I_{ct}} \times 100$$

I_{ct} ：樣品發光強度乘以空白樣品修正係數

I_t ：經 t 時間暴露後殘餘冷光強度

注意測試濃度對生物發光的抑制率必須介於 10 % 和 90 % 之間

4. 計算 Gamma (Γ_t)：經 t 時間暴露後，冷光損失量對冷光殘餘量之比值

$$\Gamma_t = \frac{H_t}{100 - H_t}$$

H_t ：經 t (5,15,30 min) 時間暴露後冷光抑制率 (%)

5. 由樣品濃度 C_t (%) 和測得之 Γ_t 計算濃度—效應關係之線性迴歸方程式

$$\log C_t = a \log \Gamma_t + b$$

C_t ：樣品濃度 (%)

a ：直線斜率

b ：截距

6. 當 $\Gamma = 1$ 時，即冷光損失量等於殘餘冷光量，表示冷光衰減 50%，此時對應濃度即為 EC_{50} 。故將 Γ_t 對數值及其所對應的樣品濃度對數值（或稀釋率），迴歸分析可得一方程式，將 $\Gamma = 1$ 代入求得對應的 C_t 值即為 EC_{50} 值。

7. 計算範例如表 1

(1) $f_{kt} = I_{kt} / I_0$ ，計算空白樣品修正係數 $f_{kt} = 97.24 / 96.35$ ， $f_{kt} = 1.009$

(2) $I_{ct} = I_0 \times f_{kt}$ ，計算樣品經 t (5 min) 時間暴露後冷光抑制率修正值， I_{ct} 依序為 99.06、99.38、96.50、97.44、98.57

(3) $H_t = (I_{ct} - I_t) / I_{ct} \times 100$ ，計算 H_t 經 t (5 min) 時間暴露後冷光抑制率， H_t 依序為 22.85、38.04、49.10、63.41、78.23

(4) $\Gamma_t = H_t / (100 - H_t)$ ，計算 Gamma (Γ_t)：經 t 時間暴露後，冷光損失量對冷光殘餘量之比值， Γ_t 依序為 0.29、0.61、0.96、1.73、3.59

(5) $EC_{50, 5min}$ 計算：將 $\log \Gamma_t$ 及 $\log Ct$ 的值迴歸求得 $\log Ct = a \log \Gamma_t + b$ 方程式之截距及斜率，得 $a = 1.143$ ， $b = 1.302$ 。當 $\Gamma_t = 1$ 即 $\log \Gamma_t = 0$ ，帶入公式求出 $\log Ct = 1.302$ ，再算出 $Ct = 20.06$ ，故 $EC_{50, 5min} = 20.06$ (mg/L)。(可使用生物毒性分析儀附加運算程式計算)

九、品質管制

(一) 空白試驗：空白試劑測試與待測樣品一起分析，以消除微生物試劑本身會隨時間改變而降低發光強度，另外檢測管所放置之培養槽中溫度誤差，微量吸管，吸管尖等等的系統誤差，亦可借空白試驗來消除。

(二) 參考毒物試驗

1. 以酚或硫酸鋅進行參考毒物試驗。酚之 $EC_{50, 5min}$ 值須在 13 至 26 mg/L 之間。硫酸鋅之 $EC_{50, 15min}$ 值為 5 至 12 mg/L。
2. 以酚或硫酸鋅進行至少 15 次參考毒物試驗，並計算 EC_{50} 平均值及變異係數 (coefficient of variation, CV)，CV 值不得超過 50%。
3. 每次檢測樣品時，須併同執行參考毒物試驗，確認菌種有無受干擾而造成數據偏差。
4. 每年應重新建立品質管制圖，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。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。
5. 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、精密度與準確度：

略

十一、參考文獻：

1. ISO 11348-3 (2007). Water quality - Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria) test) -- Part 3: Method using freeze-dried bacteria. Geneva, Switzerland.
2. American Public Health Association, Method 8050 Liquid-phase toxicity Test Using Luminescent Bacteria *Vibrio Fischeri*, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st Edition,

Part 8050, 2005.

表1單一實驗室酚 $EC_{50, 5min}$ 計算範例

	樣品濃度 C_t (mg/L)	I_0	I_t	f_{kt}	I_{ct}	H_t	Γ_t
空白樣品	0	96.35	97.24	1.009			
濃度 1	5.11	98.15	76.42		99.06	22.85	0.29
濃度 2	10.23	98.47	61.57		99.38	38.04	0.61
濃度 3	20.47	95.62	49.12		96.50	49.10	0.96
濃度 4	40.95	96.55	35.65		97.44	63.41	1.73
濃度 5	81.90	97.67	21.45		98.57	78.23	3.59

$EC_{50, 5min} = 20.06$ (mg/L)