

生物急毒性檢測方法—細菌冷光法

中華民國106年6月14日環署檢字第1060043097號公告

自中華民國106年9月15日生效

NIEA B301.10C

一、方法概要

本方法主要係以費氏弧菌 (*Aliivibrio fischeri*) 懸浮液暴露在待測液體樣品或經稀釋樣品中，測定其發光量的抑制度，計算暴露 5、15 及 30 分鐘發光量強度減少的程度。細菌發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、孔隙水及沉澱物溶出液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、或曝氣。
- (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 6.0 以下或 8.5 以上會干擾檢測。
- (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發光刺激效應。
- (六) 測試樣品鹽度不可超過 35 ‰。

四、設備與材料

- (一) 發光偵測設備：偵測冷光裝置設備，包含培養槽(15 ± 1 °C) 及試劑槽(4 ± 2 °C)。如 Microtox® 設備或同級品。
- (二) 冷凍櫃：溫度可維持在 -20 ± 2 °C 之冷凍設備。
- (三) 冰箱：溫度可維持在 4 ± 2 °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 $-20 \pm 2^\circ\text{C}$ 。如 Microtox[®] 生物製劑或同級品。

- (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)」、「底泥採樣方法 (NIEA S104)」。
- (二) 採樣時水樣樣品容器須裝至全滿，以減少揮發性物質散失。
- (三) 樣品於 3 至 5°C 避光貯存，可保存 48 小時，若於 -18°C 則可保存 2 個月。
- (四) 單一化學物質採樣時應採取足夠供給檢測之數量。樣品為已包裝完善且密封完整之成品時，以原包裝在室溫保存。
- (五) 樣品若非液體樣品則須經前處理方式取得水樣。

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 調整至 6.0 至 8.5 範圍。添加量不得超過水樣體積之 5% 。
 - 5. 非溶液樣品先以無菌試劑水溶解。
- (二) 發光偵測設備準備：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. 發光偵測設備操作步驟請依廠商之使用說明執行。
6. 以發光偵測設備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 及 30 分鐘時，以發光偵測設備檢測，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 及 30 分鐘) 時間暴露後發光抑制率

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

f_{kt} ：空白樣品修正係數

I_0 ：樣品初始發光強度

I_{kt} ：空白樣品經 t 時間暴露後發光強度

2. 計算樣品經 t (5、15 及 30 分鐘) 時間暴露後發光抑制率

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

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 及 30 分鐘）時間暴露後發光抑制率（%）

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

I_{ct} ：樣品發光強度乘以空白樣品修正係數

I_t ：經 t 時間暴露後發光強度

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，發光損失量對發光殘餘量之比

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

H_t ：經 t （5、15 及 30 分鐘）時間暴露後發光抑制率（%）

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，即發光損失量等於殘餘發光量，表示發光衰減 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 分鐘）時間暴露後發光抑制率修正值， 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 分鐘）時間暴露後發光抑制率， 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，發光損失量對發光殘餘量之比， 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 $\log C_t$ 的值迴歸求得 $\log C_t = a \log \Gamma_t + b$ 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 $\log C_t = 1.302$ ，再算出 $C_t = 20.06$ ，故 $EC_{50, 5min} = 20.06$ (mg/L)。(可使用發光偵測設備附加運算程式計算)

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、參考資料：

- (一) 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.
- (二) 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)