

水樣急毒性檢測方法—藻類靜水式法

中華民國88年7月12日（88）環署檢字第46420號公告

自中華民國88年10月12日起實施

NIEA B906.10B

一、方法概要

本方法係以本地綠藻類之小球藻(*Chlorella vulgaris* Beij. 品系 #3001) 為測試生物，以批次培養方式，測量水樣毒性對藻細胞生長造成之抑制程度，並以 24 小時半抑制之有效濃度 (EC₅₀) 和最低無抑制濃度 (NOEC) 表示，藉以檢測水樣之毒性。

二、適用範圍

本方法適用於事業、都市放流水或其他廢污水之急毒性試驗。

三、干擾

(一) 水樣中含大量微生物或懸浮顆粒較多時，會造成干擾，須先予過濾去除。

(二) 測試使用之器皿有不潔淨時，會造成結果誤差。

四、設備

(一) 溫度計 (0~50°C)

(二) pH 計

(三) 迴旋搖盪培養器

(四) 恆溫培養箱或培養室，可控制在 27 ± 1 °C。

(五) 螢光光度計 (須具有 436 nm 之激光濾片 (excitation filter) 和

680 nm 之發射濾片 (emission filter)，或功能相同之濾片)。

(六) 天平：可精秤至 0.1 mg。

(七) 照明設備：可達 $100\sim 200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。

(八) 三角錐瓶：125 或 150 mL。

(九) 無菌過濾裝置。

(十) 光學顯微鏡。

五、試劑及供試生物

(一) 基礎培養液

用於藻類培養急毒性測試之基礎培養液，其酸鹼度須控制

在 $\text{pH}=7.00\sim 7.40$ ，其組成如下：

藥品名稱	每公升含量 (L^{-1})
NaNO_3	25.50 mg
KH_2PO_4	1.04 mg
$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	14.70 mg
MgCl_2	12.16 mg
$\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4.41 mg
NaHCO_3	15.00 mg
Fe-EDTA 溶液 (註 1)	0.05 mL
H_3BO_3	0.0093 mg
MnCl_2	0.21 mg
CoCl_2	0.00071 mg

CuCl ₂ (註 2)	0.000006 mg
Na ₂ MoO ₄	0.0036 mg
ZnCl ₂	0.00163 mg

(二) 試劑

1. 葉綠素 a 標準品
2. 稀釋水：二次去離子水或蒸餾水
3. 10% 硝酸溶液
4. 丙酮
5. 參考毒物 (試藥級或農藥殘量級)
 - (1) 硫酸銅 (CuSO₄·5H₂O)
 - (2) 氯化鎘 (CdCl₂·H₂O)
 - (3) 十二烷基硫酸鈉 (Dodecyl sodium sulfate, SDS)
 - (4) 五氯酚鈉 (Sodium pentachlorophenate, PCP)
 - (5) 加保伏 (Carbofuran)

(三) 供試生物

採用自本地分離之綠藻類單細胞小球藻 (*Chlorella vulgaris* Beij.)，品系編號 #3001，供試生物之維持如下：

- (1) 將藻細胞移植於基礎培養液中，然後在與毒性測試相同之培養條件下培養三天以上，進行馴養活化，至其生長速率能維持在 0.03 h⁻¹ 以上，才能進行毒性試驗。馴化時間之光照採光暗比為 14:10

小時。

- (2) 未進行試驗之種藻培養液須每日進行稀釋，使種藻培養液之葉綠素 a 濃度維持於 1.00~10.0 ppb 之間，以保持藻細胞於對數生長期（生長速率大於 0.03 h^{-1} ）。

六、採樣與保存

- (一) 水樣必須在指定之放流口採樣，樣品瓶需裝滿無氣泡，採集及運送過程中不可曝氣，以減少揮發性物質流失，因而使水樣毒性改變。
- (二) 水樣原則上，至少應採取代表性水樣一次，進行毒性試驗。
- (三) 所採水樣量約為一公升，採樣後立即保存於暗處及 4°C 冷藏裝置內，送回實驗室。水樣必須在採樣後 24 小時內進行毒性試驗。
- (四) 在進行毒性試驗前，應先將水樣靜置半小時待粗顆粒沉降後，再取上清液測試。

七、毒性測試步驟

(一) 器皿清洗

1. 新的玻璃器皿必須先以 10% 硝酸溶液浸泡一夜，再以自來水沖洗，最後以去離子水潤洗一次。
2. 已做過毒性測試器皿必須照下列方法清洗：
 - (1) 自來水浸泡十五分鐘，並以清潔劑清洗內壁。

- (2) 以自來水沖洗二次。
- (3) 以 10% 硝酸溶液清洗器皿一次。
- (4) 以去離子水沖洗二次。
- (5) 以丙酮沖洗一次。
- (6) 以去離子水沖洗三次。

3. 做毒性試驗前，器皿須再以前述去離子水沖洗一次。

(二) 藻類培養

測試初始之藻液葉綠素 a 應維持在 0.15~0.30 ppb 之間
(每毫升藻細胞數 $(1.2\sim 2.4)\times 10^4$)。測試培養時間為 24 小時。

培養條件為：

1. 光照強度： $100\sim 200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。
2. 光照週期：在測試期間採用全光照。
3. 培養溫度： $27 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 。
4. 搖盪： $70\pm 10 \text{ rpm/min}$ 之迴旋搖盪器上培養。

無法於預定之時間內進行分析時，可將待測藻培養液暫時置於冰箱內暗藏，但須於五小時內完成分析。

(三) 藻細胞生長速率 (μ') 之計算：

以藻液之葉綠素 a 濃度在 24 小時內增加之數量作為生長速率之計算依據，其計算公式如下：
$$\mu' = \ln(A_i/A_0) / 24$$

A_0 ：初始之藻液葉綠素 a 濃度（單位為 ppb ($=\mu\text{g/L}$))； A_i ：測試終止時之藻液葉綠素 a 濃度。

（四）葉綠素 a 含量測定

以螢光光度計測定待測液之葉綠素 a 濃度，過程如下：

1. 取稀釋水，倒入玻璃測定管中，讀取螢光測值，此數值為背景值。
2. 取待測液，倒入玻璃測定管中，讀取葉綠素 a 之測值，扣除背景值後，即得待測液之實際葉綠素 a 含量測值。葉綠素 a 之測值若高於 20ppb 時，應以稀釋水稀釋之，再重測。
3. 每一待測液須至少測量三次，求其平均值，單位以 ppb 表示之。

（五）毒性試驗

1. 以 0.2 μm 孔徑之濾膜，將水樣中之微生物和顆粒物質去除。並以稀釋水稀釋成適當濃度，再進行毒性試驗。對照組為 100% 稀釋水。
2. 對照組和各稀釋濃度之待測水樣分別各取 48 mL，置於三角錐瓶中，分別添加 1 mL 50 倍濃度之基礎培養液，混合均勻。

3. 植藻：於前項之待測液各添加 1 mL 之藻原液（藻原液為含 10.0 ± 2.5 ppb 葉綠素 a 之種藻培養液），混勻後，分別測定植藻後之各培養液之初始葉綠素 a 含量，然後進行 24 小時之培養測試。
4. 先進行濃度範圍試驗，找出可能造成藻細胞長抑制之大致濃度範圍，然後再進行確定試驗。
 - （1） 濃度範圍試驗：每次測試濃度以五種稀釋濃度為原則，藉以找出可能導致藻細胞生長有明顯抑制之粗略濃度範圍。
 - （2） 確定試驗：在前項有明顯抑制之粗略濃度範圍內，以較密集之稀釋濃度範圍，測試出稀釋濃度與藻細胞生長反應間之關係，以求出造成藻細胞生長速率受抑制之確實濃度。每個濃度稀釋比例不得低於較高濃度之 50% 為原則。

八、結果處理

- （一） 根據測試之稀釋水樣濃度與藻細胞生長速率關係，求出藻細胞在 24 小時培養後其生長速率受 50% 抑制之濃度（Median inhibition effect concentration, EC_{50} ）及最高無抑制濃度（No observed effect concentration, NOEC）。 EC_{50}

之求法以圖解法(Graphic method)或是移動平均法(Moving average method)為之, NOEC 則以統計或圖解內插法求之, 以生長速率達對照組之 95% 為基準。一般水樣之 EC₅₀ 和 NOEC 以百分率(%) 稀釋濃度表示之。

- (二) 重複: 每組測試之稀釋水樣濃度應各有三個重複試驗組。確定試驗須至少重複三次, 以平均值表示之。

九、品質管制

- (一) 藻細胞進行測試前, 須先以參考毒物做確定試驗, 以確定藻種之敏感度。
- (二) 藻細胞進行測試前, 須測定其是否在對數成長期, 對數成長期以種藻細胞之生長速率大於 0.03 h⁻¹ 以上為認定基準。
- (三) 在毒性試驗時, 對照組之藻細胞生長速率須大於 0.03 h⁻¹, 否則試驗須重做。

十、精密度及準確度

單一實驗室對參考毒物之 EC₅₀ 及 NOEC 參見表一。

表一、單一實驗室所做小球藻 (*Chlorella vulgaris* 3001) 對硫酸銅 (CuSO₄)、氯化鎘 (CdCl₂)、五氯酚 (PCP)、十二烷基硫酸鈉 (SDS) 加保伏 (Carbofuran) 毒性試驗之 EC₅₀、

NOEC 及變異係數值。

參考毒物	重複數 (n)	EC ₅₀ (mg/L)		NOEC (mg/L)	
		平均值	變異係數	平均值	變異係數
CuSO ₄	13	0.020	6.3	0.003	23.6
CdCl ₂	4	0.090	5.7	0.010	13.5
PCP	3	4.61	20.6	1.53	60.7
SDS	4	15.10	3.4	6.99	19.4
Carbofuran	8	3.13	8.8	0.44	21.0

十一、參考資料

- (一) 吳俊宗、陳秀如、陳瑾禎，1998，本土藻類毒性試驗標準方法之研究，EPA-154870116，96 頁。
- (二) American Public Health Association (APHA)，American Water Works Association and Water Pollution Control Federation，1992，Standard Methods for Examination of Water，18th ed.，APHA，Washington，DC。
- (三) American Society for Testing and Materials (ASTM)，1992，Standard practice for conducting static chronic 96-h toxicity tests on hazardous chemical wastes using the freshwater green alga，*Selenastrum capricornutum*.Draft。
- (四) US Environmental Protection Agency(USEPA)，1971，Algae assay procedure bottle test，National Eutrophication Research Program，Pacific Northwest Environmental Research Laboratory，

Corvallis, OR。

註 1：Fe-EDTA 溶液組成：FeSO₄·7H₂O，3.48 g/L；Titriplex III
(EDTA)，4.66 g/L。此溶液應與基礎培養液分開滅菌，使
用前添加於基礎培養液，混勻後使用。

註 2：微量元素須做二次稀釋，以減少誤差。