

# 生物急毒性檢測方法—斑馬魚胚胎半靜水式法 (NIEA B909.11C)總說明

為執行放流水、廢（污）水及環境用藥生物急毒性檢測，參考經濟合作暨發展組織檢測方法(OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test)、國際標準化組織檢測方法(ISO 15088, Water quality – Determination of the Acute Toxicity of Waste Water to Zebrafish Eggs (*Danio rerio*))及檢測實務，爰依水污染防治法第六十八條及環境用藥管理法第五十七條，整併現行檢測相關規定，並敘明魚胚胎取得方式、試驗容器前處理步驟等，研訂「生物急毒性檢測方法—斑馬魚胚胎半靜水式法(NIEA B909.11C)」，其要點如下：

- 一、 本方法適用於放流水、廢（污）水及環境用藥對斑馬魚胚胎之生物急毒性檢測。
- 二、 本方法以斑馬魚胚胎進行半靜水式生物毒性試驗，每二十四小時更換試驗溶液一次，觀察魚胚胎發育狀況，計算樣品九十六小時之半致死濃度或急毒性單位。

## 生物急毒性檢測方法－斑馬魚胚胎半靜水式法 (NIEA B909.11C)

| 公告                                                              | 說明         |
|-----------------------------------------------------------------|------------|
| 主旨：訂定「生物急毒性檢測方法－斑馬魚胚胎半靜水式法(NIEA B909.11C)」，並自中華民國一百十五年十一月十五日生效。 | 方法名稱及生效日期。 |
| 依據：水污染防治法第六十八條及環境用藥管理法第五十七條。                                    | 法源依據。      |
| 公告事項：方法內容詳如附件。                                                  | 方法內容。      |

# 生物急毒性檢測方法－斑馬魚胚胎半靜水式法

中華民國 115 年 7 月 24 日環部授研字第 1155108616 號

自中華民國 115 年 11 月 15 日生效

NIEA B909.11C

## 一、方法概要

本方法係以斑馬魚(*Danio rerio*)之胚胎為試驗生物，以半靜水式(Semi-static)生物毒性試驗方法，每 24 小時更換試驗溶液 1 次，檢測生物胚胎急毒性，計算 96 小時之半致死濃度(Lethal concentration 50 %, LC<sub>50</sub>)或急毒性單位(Acute toxic unit, TUa)。

## 二、適用範圍

本方法適用於放流水、廢（污）水及環境用藥對斑馬魚胚胎之生物急毒性檢測。

## 三、干擾

- （一）生物馴養及毒性試驗室內若有化學氣體滲入，或馴養水、稀釋液及器皿中殘留毒性物質，可能影響斑馬魚健康，且可能改變胚胎對毒物的耐受性。
- （二）若馴養個體罹患疾病或健康狀態不穩定，將對其生殖表現及魚卵孵化率造成影響。
- （三）分子量 3 千道爾頓(Kilodalton, kDa)以上的化合物、巨大分子和會引起延遲孵化之物質，可能對胚胎生物可利用性限制，會降低毒性敏感度。

## 四、設備與材料

- （一）斑馬魚胚胎：使用 6 月齡至 24 月齡之性成熟斑馬魚（圖一）所產之受精卵（圖二）進行試驗，可自行產製胚胎或使用市售胚胎。斑馬魚可來自動物供應機構或自行繁殖（註 1），不可混合其他品種。
- （二）生物馴養及毒性試驗室：須與其他化學實驗室區隔之獨立空間，通風良好，無化學氣體影響，且可屏蔽外界干擾（如噪音、振動、強光及人為驚擾等），光照強度為 540 勒克斯(lx)至 1080 lx，光照時間應維持在每天 14 小時±2 小時。
- （三）溫度控制設備：可使用循環式水浴槽、培養箱、空調等方式，將馴養水溫及試驗水溫控制在 26 °C ± 1 °C。
- （四）樣品容器：玻璃或塑膠材質。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，使用於斑馬魚馴養。
- (六) 試驗容器：玻璃或聚苯乙烯(Polystyrene)材質、透明底、附上蓋之 24 孔培養盤，孔格直徑約 16 mm，每孔容量 2.5 mL 以上，進行試驗時須將上蓋蓋上。
- (七) 繁殖容器：玻璃或塑膠材質，中間具可移除之隔板，可將雄魚及雌魚隔開。下方具隔離網（ $2\text{ mm} \pm 0.5\text{ mm}$  網目之不鏽鋼或塑膠等材質），可將親魚及魚卵隔開，可使用市售繁殖箱（示意如圖三）。
- (八) 燒杯、血清瓶、量瓶及量筒：硼矽玻璃材質。
- (九) 移液管：玻璃或塑膠材質。
- (十) 溫度監測裝置：須可顯示斑馬魚馴養期間及毒性試驗期間之最高及最低水溫（註 2），最小刻度須可達  $0.1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- (十一) 溶氧測定儀。
- (十二) pH 計：附有溫度補償裝置，最小刻度須可達 0.1 pH 單位。
- (十三) 導電度計。
- (十四) 餘氯計。
- (十五) 水質硬度計或水質硬度檢測試劑組。
- (十六) 分析天平：待測物重量大於 2 g 時，須能精稱至 0.01 g；待測物重量不大於 2 g 時，須能精稱至 0.001 g。
- (十七) 手操網：大小合適之具握柄軟質尼龍網，使用於斑馬魚馴養。
- (十八) 魚飼料：飼料須考量適口性，建議使用市售超細微粒、半沉浮性魚飼料或豐年蝦等。
- (十九) 光學顯微鏡：放大倍率 30 倍以上之倒立式顯微鏡或解剖顯微鏡（立體顯微鏡）。
- (二十) 培養皿：玻璃或塑膠材質，可使用直徑 9 cm 或其他適當大小之培養皿。
- (二十一) 曝氣設備。
- (二十二) 水循環過濾裝置：使用於斑馬魚馴養。
- (二十三) 塑膠滴管。
- (二十四) 冰箱：溫度能保持在  $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- (二十五) 冷凍櫃：溫度能保持在  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  以下。

(二十六) 電磁攪拌器及攪拌子。

(二十七) 照度計：須可顯示照度值。

## 五、試劑

檢測時使用之試劑除非另有說明，否則至少須為試藥級。使用之溶液或試劑，可依試藥配製比例製備所需使用體積。

(一) 試劑水：電阻率須大於  $10\text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ 。

(二) 碳酸氫鈉(Sodium bicarbonate,  $\text{NaHCO}_3$ )。

(三) 硫酸鎂七水合物(Magnesium sulfate heptahydrate,  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )。

(四) 氯化鉀(Potassium chloride,  $\text{KCl}$ )。

(五) 氯化鈣二水合物(Calcium chloride dihydrate,  $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )。

(六) 丙酮(Acetone,  $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ )：殘量級。

(七) 氫氧化鈉(Sodium hydroxide,  $\text{NaOH}$ )。

(八) 濃鹽酸(Hydrochloric acid,  $\text{HCl}$ )。

(九) 硝酸(Nitric acid,  $\text{HNO}_3$ )。

(十) 0.1 M 鹽酸溶液：取 8.3 mL 濃鹽酸緩緩加入適量試劑水中，定容至 1 L。可使用市售溶液。

(十一) 0.1 M 氫氧化鈉溶液：溶解 4 g 氫氧化鈉於適量試劑水中，再以試劑水定容至 1 L。可使用市售溶液。

(十二) 10 % (v/v) 鹽酸或硝酸溶液：將 100 mL 濃鹽酸或硝酸緩緩加入 900 mL 試劑水中（玻璃器皿酸洗用，須於使用前配製）。

(十三) 3,4-二氯苯胺儲備溶液，100 mg/L：溶解 3,4-二氯苯胺(3,4-Dichloroaniline, 3,4-DCA,  $\text{C}_6\text{H}_3\text{Cl}_2\text{NH}_2$ ) 0.050 g 於稀釋液中，攪拌約 24 小時後，以 0.1 M 氫氧化鈉溶液或 0.1 M 鹽酸溶液調整 pH 值為 6.5 至 8.5，定容至 500 mL，避光保存於  $4\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ ，保存期限 6 個月。

(十四) 正控制(Positive control, PC)試驗溶液(3,4-DCA, 4.0 mg/L)：取 3,4-DCA 儲備溶液 4 mL 加稀釋液定容至 100 mL，pH 值須為 6.5 至 8.5。

(十五) 稀釋液：將 63.0 mg 碳酸氫鈉、123.3 mg 硫酸鎂七水合物、5.5 mg 氯化鉀及 294.0 mg 氯化鈣二水合物，溶解於 1 L 試劑水後，劇烈曝氣至少 8 小時，硬度須為 200 mg  $\text{CaCO}_3/\text{L}$  至 250 mg  $\text{CaCO}_3/\text{L}$ ，pH 值須為 6.5 至 8.5，若需調整 pH 值，

須以 0.1 M 氫氧化鈉溶液或 0.1 M 鹽酸溶液進行。保存不宜超過 14 天。

(十六) 馴養水：可使用稀釋液、去氯自來水（註 3）、無污染之地下水等作為馴養水。馴養水之硬度應為 200 mg CaCO<sub>3</sub>/L 至 250 mg CaCO<sub>3</sub>/L，pH 值須為 6.5 至 8.5，可混合適量試劑水進行調整。

(十七) 甲磺酸三卡因(Tricaine methanesulfonate, C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>5</sub>S)：又稱 MS-222，斑馬魚安樂死使用。

(十八) 漂白水：一般市售消毒用漂白水。

## 六、採樣與保存

(一) 樣品採樣方法參照「事業放流水採樣方法(NIEA W109.5)」(註 4)。每個樣品至少須採 5 瓶，每瓶之樣品量不得少於 0.5 L。

(二) 樣品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大於 0 °C 至 6 °C 以下。

(三) 樣品採樣後若無法在 48 小時內開始進行確定試驗(Definitive test)，樣品在實驗室時須保存於 -18 °C 以下，保存期限 2 個月。

(四) 環境用藥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環境用藥成品時，依其儲存條件以原包裝保存。

## 七、步驟

### (一) 試驗準備

#### 1. 斑馬魚馴養：

(1) 斑馬魚取回後，放入內裝馴養水之馴養容器，馴養時間至少 3 天，觀察魚隻健康情形。

(2) 馴養容器以曝氣設備曝氣，使溶氧飽和度維持在 80 % 以上，以水循環過濾維護水質，如有死魚應立即移出。建議馴養水之 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> < 0.001 mg/L、NO<sub>2</sub><sup>-</sup> < 0.001 mg/L、NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ≤ 48 mg/L，可使用簡易水質測試用試紙或試劑等進行測試，以瞭解馴養水質狀況。

(3) 馴養之水溫為 26 °C ± 1 °C，pH 值為 6.5 至 8.5，且馴養期間 pH 值變化不得超過 1.5，光照時間應維持在每天 14 小時 ± 2 小時。

(4) 視馴養容器中魚隻大小及數量等狀況，調整餵食量及餵食次數。過剩之飼料宜移除以免導致水質惡化。

(5) 選擇正常無畸形之魚隻為產卵之親魚，開始產卵前 2 個月內，不應接受任何藥物（急性或預防）治療。

(6) 雌魚和雄魚的區別：雌魚抱卵時腹部膨脹偏白；雄魚身體較纖細，藍色條紋間帶橙色色調，在臀鰭尤為明顯（圖一）。

## 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。（無菌塑膠器皿使用前無須用試劑水潤洗）。

(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) 接觸過樣品的塑膠器皿，不得重複使用。

(4) 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. 試驗前之樣品準備：

(1) 先將樣品靜置半小時，待粗顆粒沉降後，再取上層液進行試驗。冷凍保存之樣品則以水浴（不超過 26 °C）進行解凍，樣品完全解凍後須立即進行後續檢測步驟。

(2) 試驗前須先測量樣品之溫度、pH 值與溶氧。樣品溫度須調整至 26 °C ± 1 °C。若回溫後溶氧低於 3.0 mg/L，應對樣品溫度和曝氣，使溶氧升至 3.0 mg/L 以上。

(3) 非液態之環境用藥先溶解於稀釋液，難溶解者可使用適當溶劑（例如乙醇或二甲基亞砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)等）助溶（須執行溶劑控制(Solvent control, SC)試驗）。

## 4. 受精卵收集：

(1) 在試驗前一日傍晚，將雌魚與雄魚移至繁殖容器並以隔板隔開（建議雌雄比為 1：2），光照週期及水溫與馴養時相同，

試驗當日早上移除中間隔板，魚兒會急速追逐旋游，身體碰觸時同時排出精卵。產卵的活動可以一直延續到中午，但產卵多在照光開始 30 分鐘內最多；須記錄受精時間。為收集數量足夠之受精卵，建議使用 3 個以上繁殖容器產製受精卵。

- (2) 斑馬魚的卵是沉性卵且不帶黏性，直徑約 0.8 mm 至 1.5 mm，親魚產卵後會吃掉自己的魚卵，所以須在繁殖容器用隔離網將親魚及魚卵隔開（示意如圖三）。
- (3) 收集魚卵並置於培養皿，以塑膠滴管吸取馴養水，輕輕地沖洗魚卵並移除殘存之飼料或魚糞便等。
- (4) 使用光學顯微鏡觀察魚卵是否受精，受精卵會逐漸分化發育為 2 細胞期(Cell stage)、4 細胞期、8 細胞期、16 細胞期等（如圖四），未受精則不會發育。估算每個繁殖容器魚卵之受精率，將受精率 70 % 以上者混合後使用，受精卵數量須能完成檢測（1 次檢測 1 個放流水樣品須使用 168 顆受精卵，1 次檢測 2 個放流水樣品共須使用 288 顆受精卵），且須於受精後 90 分鐘內開始進行毒性試驗（浸泡於試驗溶液中（七、步驟（三）4.））。

##### 5. 試驗容器前處理：

- (1) 進行確定試驗前一天，將樣品以稀釋液至少稀釋為 5 個濃度，相鄰濃度之稀釋倍數不得超過 2 倍。放流水則以 5 個固定濃度（100 %、80 %、60 %、40 % 及 20 %）進行試驗。每一試驗濃度總體積 50 mL 以上。
- (2) 於試驗容器各孔格內分別加入以下溶液 2 mL 以上。（配置示意如圖五）。
  - A. 樣品各稀釋度試驗溶液：以放流水樣品為例，100 %、80 %、60 %、40 % 及 20 % 試驗溶液各 1 盤，於 20 孔格中加入試驗溶液。
  - B. 負控制(Negative control, NC)試驗溶液：1 盤，於 20 孔格中加入稀釋液。
  - C. 正控制(Positive control, PC)試驗溶液：1 盤，於 20 孔格中加入 4.0 mg/L 之 3,4-DCA 溶液。
  - D. 溶劑控制(Solvent control, SC)試驗溶液：1 盤（未使用溶劑助溶則無需執行）。將溶劑添加至稀釋液中混勻，添加量與樣品助溶時之添加量相同。於 20 孔格中加入溶劑

控制試驗溶液。

E. 內部孔盤對照(Internal plate control, IC)試驗溶液：於每個試驗容器剩餘之 4 個孔格中加入稀釋液。

## (二) 範圍尋找試驗(Range - finding test)

1. 放流水不須進行，其他樣品若不確定樣品之半致死濃度落於哪一濃度範圍，可先進行範圍尋找試驗。
2. 可將樣品以稀釋液適度進行 10 倍序列稀釋。每一試驗濃度總體積為 25 mL 以上，分注於試驗容器之 10 個孔格中（每孔至少 2 mL）。
3. 每個孔格置入 1 顆受精卵。
4. 試驗期間水溫應控制在  $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ，光照時間應維持每天 14 小時  $\pm$  2 小時。
5. 觀察 8 小時至 24 小時，記錄胚胎死亡數量，試驗結果供確定試驗稀釋方式參考用。

## (三) 確定試驗(Definitive test)

1. 將樣品以稀釋液至少稀釋為 5 個濃度，相鄰濃度之稀釋倍數不得超過 2 倍。放流水則以 5 個固定濃度（100 %、80 %、60 %、40 % 及 20 %）進行試驗。
2. 稀釋完成後，檢測樣品最高濃度試驗溶液之 pH 值、溶氧、導電度及餘氯。另須檢測稀釋液之 pH 值及導電度。
3. 於培養皿分別加入以下各種溶液約 10 mL（須使魚卵浸泡於溶液中）：
  - (1) 樣品各稀釋度試驗溶液：每一試驗濃度各 1 盤。
  - (2) 稀釋液：1 盤以上，用於負控制(NC)及內部孔盤對照(IC)試驗。
  - (3) 正控制(PC)試驗溶液：1 盤，用於正控制試驗。
  - (4) 溶劑控制試驗(SC)溶液：1 盤（未使用溶劑助溶則無需執行）。
4. 在受精後 90 分鐘內，將七、步驟（一）4. (4) 之受精卵移入前項各培養皿中。使用光學顯微鏡觀察，移除未受精及發育異常（例如不對稱）、卵膜受損等不正常魚卵。正常受精卵數量須足以完成試驗。
5. 將前一天前處理之試驗容器內液體（七、步驟（一）5. (2)）吸

除後，每孔格注入至少 2 mL 相應之試驗溶液，包括樣品各稀釋度試驗溶液（於確定試驗當天配製）、負控制及正控制試驗溶液等。

6. 每個孔格置入 1 顆浸泡於七、步驟（三）4. 相應試驗溶液培養皿中之受精卵。須於受精後 180 分鐘內完成此步驟。

7. 試驗期間為 96 小時，水溫應控制在  $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ，光照時間應維持每天 14 小時  $\pm 2$  小時。

8. 開始試驗後，於第 24 小時、48 小時、72 小時及 96 小時，觀察胚胎並記錄死亡數量。

9. 胚胎出現以下任一種狀況即判定為死亡：

(1) 胚胎凝結 (Coagulation of the embryo)：凝結之胚胎呈乳白色，在顯微鏡下，會出現各種不透明深色的物質（圖六）。

(2) 體節構造發育不全 (Lack of somite formation)：在  $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ，24 小時後，正常斑馬魚胚胎約形成 20 體節，發育正常的胚胎會出現自主性運動（身體收縮），自主性的運動表示體節的形成，若 48 小時仍未發育出體節，則判定胚胎死亡（圖七）。

(3) 尾部從卵黃囊剝離不全 (Non-detachment of the tail from the yolk sac)：正常發育的斑馬魚胚胎，尾巴從卵黃剝離後，會向胚胎後部伸長。須在 24 小時、48 小時、72 小時和 96 小時觀察尾部剝離情形（圖八）。

(4) 心臟無跳動 (Lack of heartbeat)：正常發育的斑馬魚胚胎在  $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ，48 小時後可以觀察到心臟跳動。心跳不規則不應判定為死亡，至少觀察胚胎 1 分鐘心臟無跳動才可判定為死亡（圖九）。

10. 開始試驗後，每隔 24 小時  $\pm 1$  小時須更換試驗溶液（須於觀察胚胎後執行），直到第 96 小時試驗結束。方式如下：

(1) 於更換試驗溶液當天取 1 瓶樣品依七、步驟（一）3. 之規定進行試驗前之樣品準備。

(2) 依七、步驟（三）1. 稀釋樣品。

(3) 將孔格內原有液體吸至近乾，立即加入至少 2 mL 相應之溶液，包括樣品各稀釋度試驗溶液、負控制及正控制試驗溶液等，過程中須避免胚胎暴露於乾燥環境。

11. 計算負控制試驗 96 小時之胚胎孵化率（若進行溶劑控制試驗

時亦須計算其孵化率)：觀察胚胎是否孵化為魚苗狀，計算 20 個試驗孔格之孵化總數。

胚胎孵化總數 = 20 個試驗孔格之孵化數量加總

胚胎孵化率 = 胚胎孵化總數  $\div$  20  $\times$  100 %

12. 結束試驗後，須測量並記錄樣品最高濃度試驗溶液之 pH 值及溶氧，並記錄試驗期間之最高及最低水溫。

13. 斑馬魚及胚胎停用後之處置：

(1) 不再使用之斑馬魚，可於原機構內終養、送回原供應機構、轉送其他單位或進行人道安樂死。安樂死方式為將魚隻以 250 mg/L 至 500 mg/L 之 MS-222 溶液（須以碳酸氫鈉調整 pH 值為 7.0 至 7.5）浸泡至少 20 分鐘。

(2) 魚胚胎則以 6 倍稀釋後之漂白水浸泡至少 5 分鐘。

(3) 須記錄處置方式、數量及日期等。

## 八、結果處理

### (一) 樣品 96 小時 LC<sub>50</sub> 計算

1. 計算各試驗濃度之 96 小時胚胎死亡總數及死亡百分率：

胚胎死亡總數 = 20 個試驗孔格之死亡數量加總

胚胎死亡百分率 = 胚胎死亡總數  $\div$  20  $\times$  100 %

2. 以下列 4 種方法計算 96 小時 LC<sub>50</sub>：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)。依圖十判斷須使用之計算方式，詳細計算方式參見「生物急毒性檢測方法－水蚤靜水式法(NIEA B901.1)」附錄二。

### (二) 樣品 96 小時 TUa 計算

1. TUa 為 LC<sub>50</sub> 之倒數，即

TUa = 100 %  $\div$  (96 小時 LC<sub>50</sub>)

2. 若放流水樣品 5 個濃度之胚胎死亡百分率均小於 50 %，則 96 小時之 LC<sub>50</sub> > 100 %，換算之 TUa < 1.00。

3. 若放流水樣品 5 個濃度之胚胎死亡百分率均大於 50 %，則 96 小時之 LC<sub>50</sub> < 20 %，換算之 TUa > 5.00。

4. 若結果數據不符合前述 2 種狀況，則依八、（一）之方法計算 96 小時  $LC_{50}$ ，再換算 TUa。

## 九、品質管制

- （一）負控制(NC)試驗：每次毒性試驗應至少伴隨一負控制試驗，若胚胎死亡百分率超過 10%，或孵化率低於 80%，則該次毒性試驗之試驗結果不可採用。
- （二）內部孔盤對照(IC)試驗：每個試驗容器皆須執行內部孔盤對照試驗，若 4 個孔格中之胚胎死亡數超過 1 個，則該盤之試驗結果不可採用。
- （三）正控制(PC)試驗：每次毒性試驗應至少伴隨一正控制試驗，若死亡百分率低於 30%，則該次毒性試驗之試驗結果不可採用。
- （四）溶劑控制(SC)試驗：使用溶劑助溶環境用藥樣品時，應至少伴隨一溶劑對照試驗，若胚胎死亡百分率超過 10%，或孵化率低於 80%，則該次毒性試驗之試驗結果不可採用。
- （五）參考毒物試驗
  - 1. 將 3,4-DCA 儲備溶液以稀釋液稀釋為 5 個不同濃度，相鄰濃度之稀釋倍數不得超過 2 倍。5 個試驗濃度之死亡百分率，至少須有 1 個  $\geq 50\%$ ，及 1 個  $\leq 50\%$ ，且至少須有 1 個濃度會造成部分試驗生物死亡。
  - 2. 首次以本方法執行生物毒性試驗之實驗室，應先以參考毒物進行至少 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，每半年至少執行一次參考毒物試驗。
  - 4. 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(Standard deviation, SD)，以平均值  $\pm 2$  SD 為警告上下限值，以平均值  $\pm 3$  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。參考毒物試驗結果若超出  $\pm 3$  SD，或最近 20 次有 2 次以上超出  $\pm 2$  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) OECD. Guideline for the Testing of Chemicals, Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, 2025.
- (二) ISO International Standard. Water quality – Determination of the Acute Toxicity of Waste Water to Zebrafish Eggs (*Danio rerio*). ISO 15088, 2007.
- (三) 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.
- (四) ISO International Standard. Water quality – Sampling Part 16: Guidance on Biotesting of Samples. ISO 5667-16, 2017.
- (五) 國家環境研究院（改制前為行政院環境保護署環境檢驗所），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 1：自行繁殖或馴養斑馬魚，應符合「動物保護法」第 5 條至第 7 條、第 9 條至第 13 條等相關規定。生物屍體之清除及處理，依一般事業廢棄物相關規定辦理。

註 2：將容器盛裝試劑水，置入溫度監測裝置之探頭，可進行毒性試驗期間水溫監測。

註 3：自來水可使用活性碳過濾或曝氣等方式去氯（餘氯須  $< 10 \mu\text{g/L}$ ），但不可使用化學藥劑去氯。

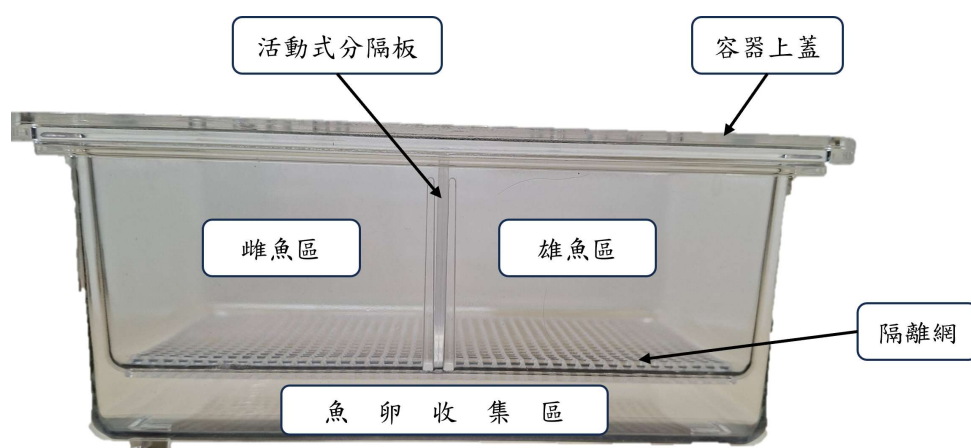
註 4：本文引用之所有公告方法編碼，以環境部最新公告者為準。



圖一 斑馬魚雌雄區別



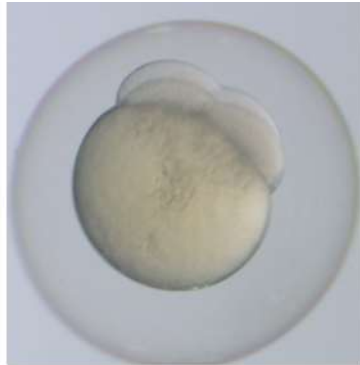
圖二 斑馬魚受精卵



圖三 繁殖容器魚卵收集示意圖



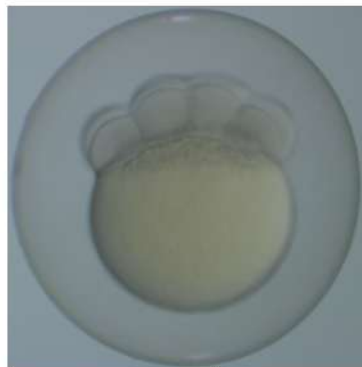
0.75 小時  
2 細胞期



1 小時  
4 細胞期

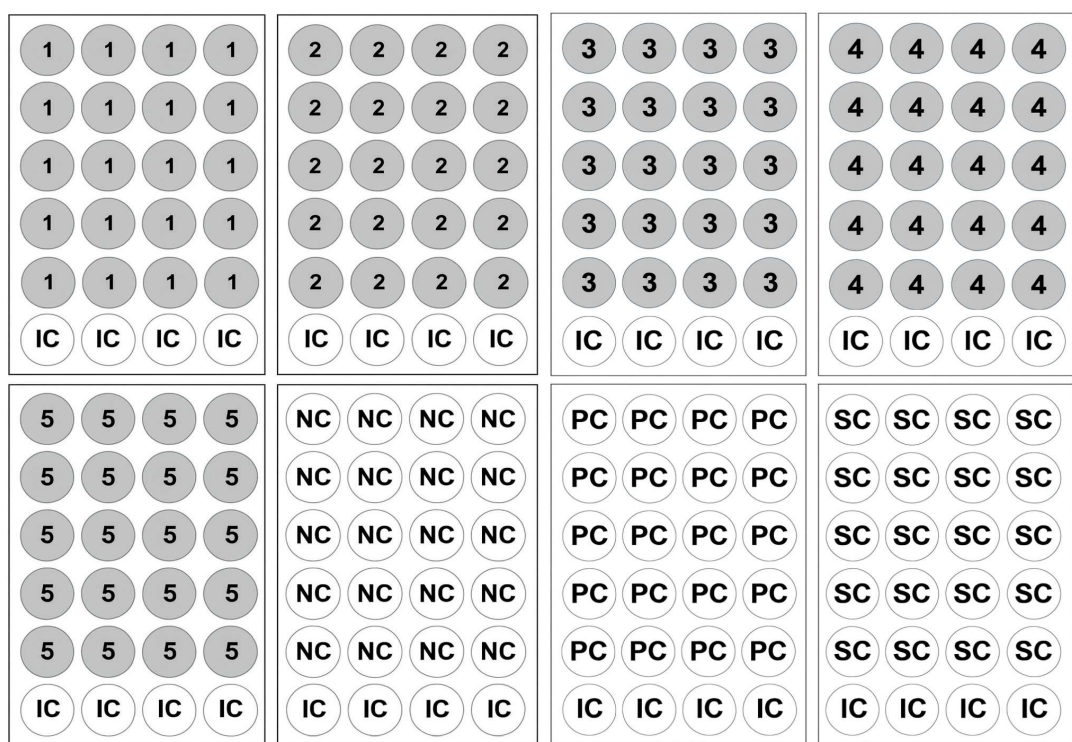


1.2 小時  
8 細胞期



1.5 小時  
16 細胞期

圖四 斑馬魚胚胎發育圖



圖五 試驗容器溶液配置示意圖

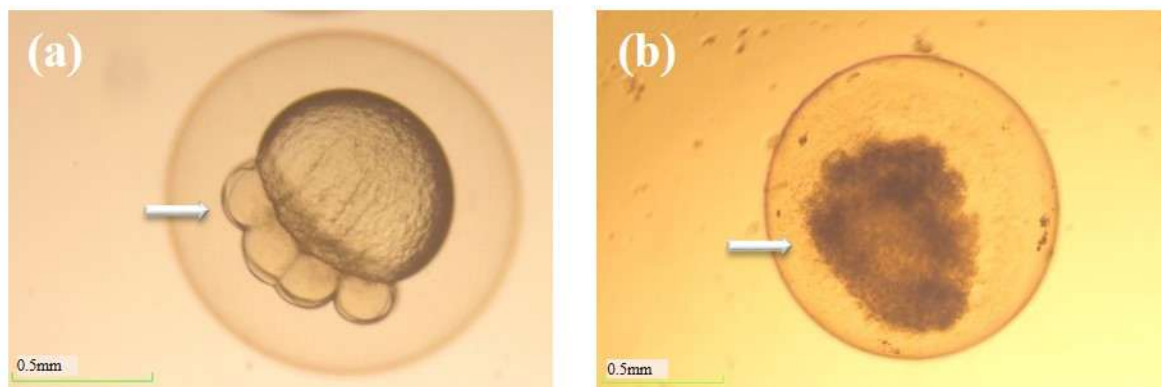
1 至 5：分別為樣品 5 個試驗濃度（各稀釋度試驗溶液）

NC：負控制試驗（稀釋液）

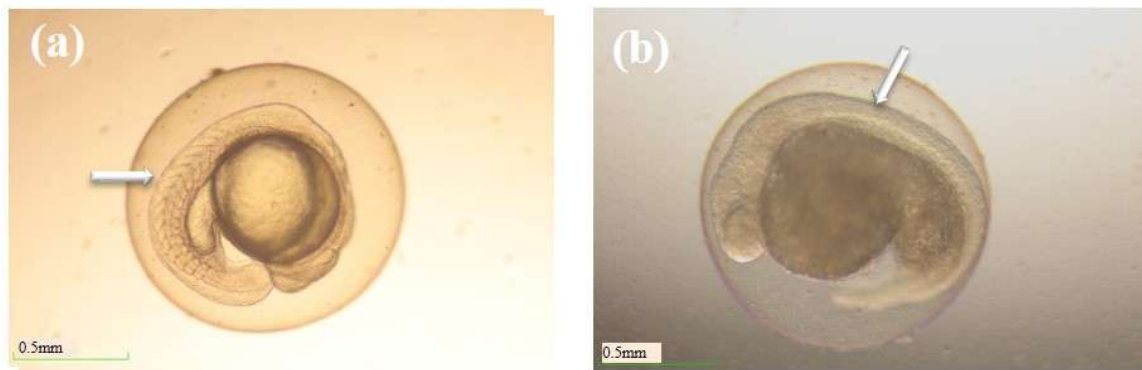
IC：內部孔盤對照試驗（稀釋液）

PC：正控制試驗（4.0 mg/L 3,4-DCA 溶液）

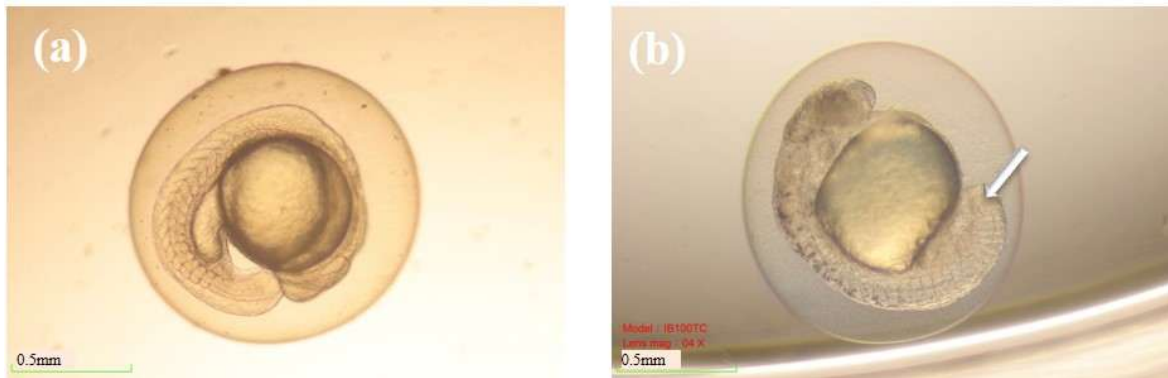
SC：溶劑控制試驗（助溶時使用之溶劑試驗溶液）



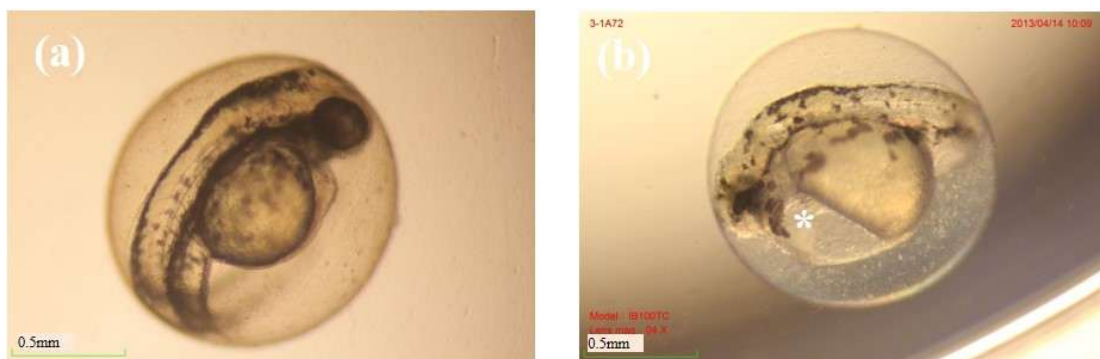
圖六 (a)正常胚胎與 (b)異常凝結之胚胎



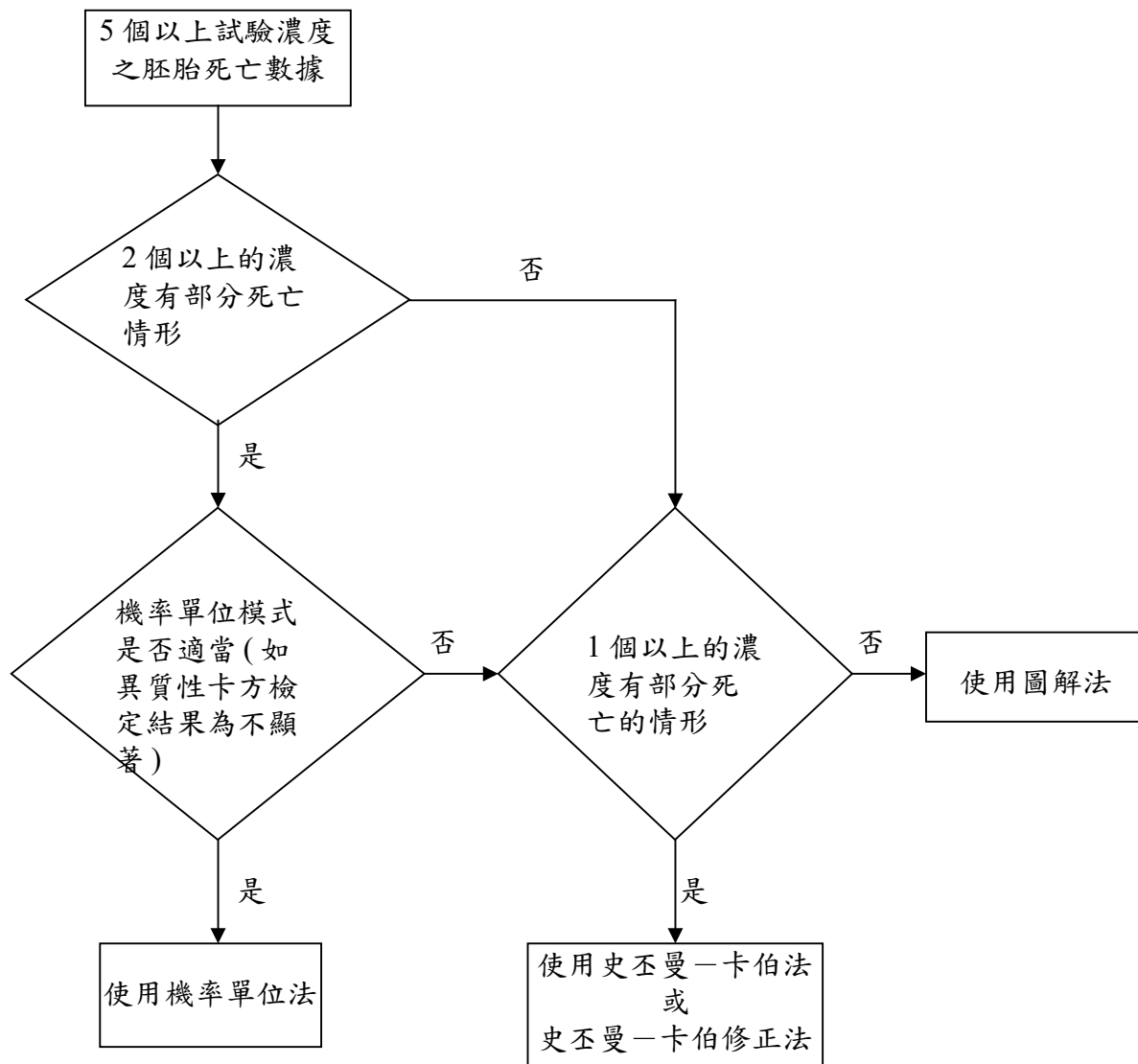
圖七 (a)胚胎發育 24 小時之正常體節發育與 (b)異常之體節發育不全



圖八 (a)正常發育胚胎與 (b)異常發育尾部未剝離之胚胎



圖九 (a)正常發育胚胎與 (b)異常之心臟無跳動（圖中\*標示處）



圖十  $LC_{50}$  計算方式判斷流程圖