嘉義市第 37 屆國民中小學科學展覽會

作品說明書

科　　別：生　物

組　　別：國 中 組

作品名稱：魚半致死濃度在水質毒性檢測上之應用

~~ 以水蚤及米蝦靜水式急毒性檢測為例

關　鍵　詞：水蚤、米蝦、半致死濃度

編　　號：

魚半致死濃度在水質毒性檢測上之應用~~
以水蚤及米蝦靜水式急毒性檢測為例

摘要

水質毒性檢測可提供水體品質現況資訊，達到保障民生用水之安全，有定期或不定期實施檢測之必要。本實驗內容第一部分是以水蚤(*Daphnia magna*)及米蝦(*Neocaridina denticulate*)為試驗生物，使用NaCl為參考毒物，以靜水式生物毒性試驗方法檢測水質，計算48小時之半致死濃度（lethal concentration 50%, LC_{50}）作為水質遭受毒性污染的參考值。第二部分是應用建立半致死率濃度之方法，前往嘉義市下水道、八掌溪及牛稠溪取樣，以水蚤及米蝦做靜水式急毒性檢測，計算48hr.-LC_{50}值藉以判斷水質是否遭到毒性物質汙染。

初步檢測得知：(一)以米蝦雨水蚤對NaCl參考毒物確定試驗，48hr.-LC_{50}值，依序為6%，0.14%，顯示水蚤作為毒性試驗生物對水質的靈敏度比米蝦高。(二)以米蝦為試驗生物，48hr.-LC_{50}值，嘉義市下水道、牛稠溪水及八掌溪水之放流水依序為23%，60%，75%；另以水蚤為試驗魚種，48hr.-LC50值，依序為30%，46%，61%。由此檢測數值可初步判斷，這三種放流水均已遭受毒性物質污染，汙染程度是嘉義市下水道放流水＞牛稠溪水＞八掌溪水。

壹、研究動機

當今水質汙染日益嚴重，許多河川遭受農業廢水、家庭廢水或工業廢水的汙染，造成魚蝦成群的死亡，使大自然的環境受到嚴重的水質汙染；目前環保署對放流水化學毒性物質濃度管制，雖可有效控管各事業單位污染物的排放，卻無法反映水體生物可承受之濃度，因此使用生物毒性試驗確立魚半致死濃度值有其必要性。因此我們開始著手收集資料，並採集八掌溪、牛稠溪與嘉義市下水道的水樣，展開了這次的科展活動。

貳、研究目的

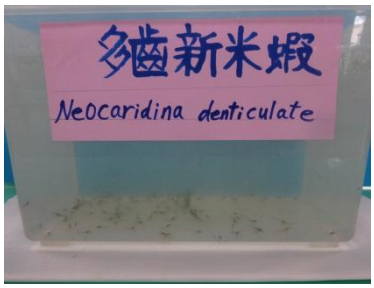
一、以水蚤及米蝦靜水式法做生物急毒性檢測建立LC_{50}指標。

二、以八掌溪、牛稠溪及本市下水道汙水之LC_{50}指標以了解水質汙染情形。

三、喚起民眾對水質汙染問題的關懷與重視。

參、研究設備及器材

巨水蚤(*Daphnia magna*)、多齒新米蝦(*Neocaridina denticulate*)、溫度計、玻璃缸、塑膠桶、水質檢測計(exact micro portable photometer)、pH測定計、自來水、八掌溪水樣、牛稠溪水樣、嘉義市下水道放流水水樣、水蚤飼料、米蝦飼料、碳酸氫鈉（$NaHCO_3$）、硫酸鎂（$MgSO_4 \cdot 7H_2O$）、氯化鉀（KCl）硫酸鈣（$CaSO_4 \cdot 2H_2O$）、試藥級NaCl、程式probit.exe、數位相機、筆電。

 a.試驗魚種(水蚤 *Daphnia magna*)	 b.試驗魚種(多齒新米蝦 *Neocaridina denticulate*)	 c.配製的稀釋水
 d.下水道水樣	 e.八掌溪水	 f. 牛稠溪水樣
 g. pH及導電度計	 h. 水質檢測計	 i.溶氧(DO)檢測計

j.電子天平(小數4位)	k.試驗容器(玻璃杯)	L.水質檢測藥劑

圖 1.儀器設備及實驗藥品

肆、研究過程及方法

第一部份：用 NaCl 為參考毒物，做靜水式生物急毒性檢測，建立水蚤及米蝦之 LC_{50} 數值

一、實驗流程

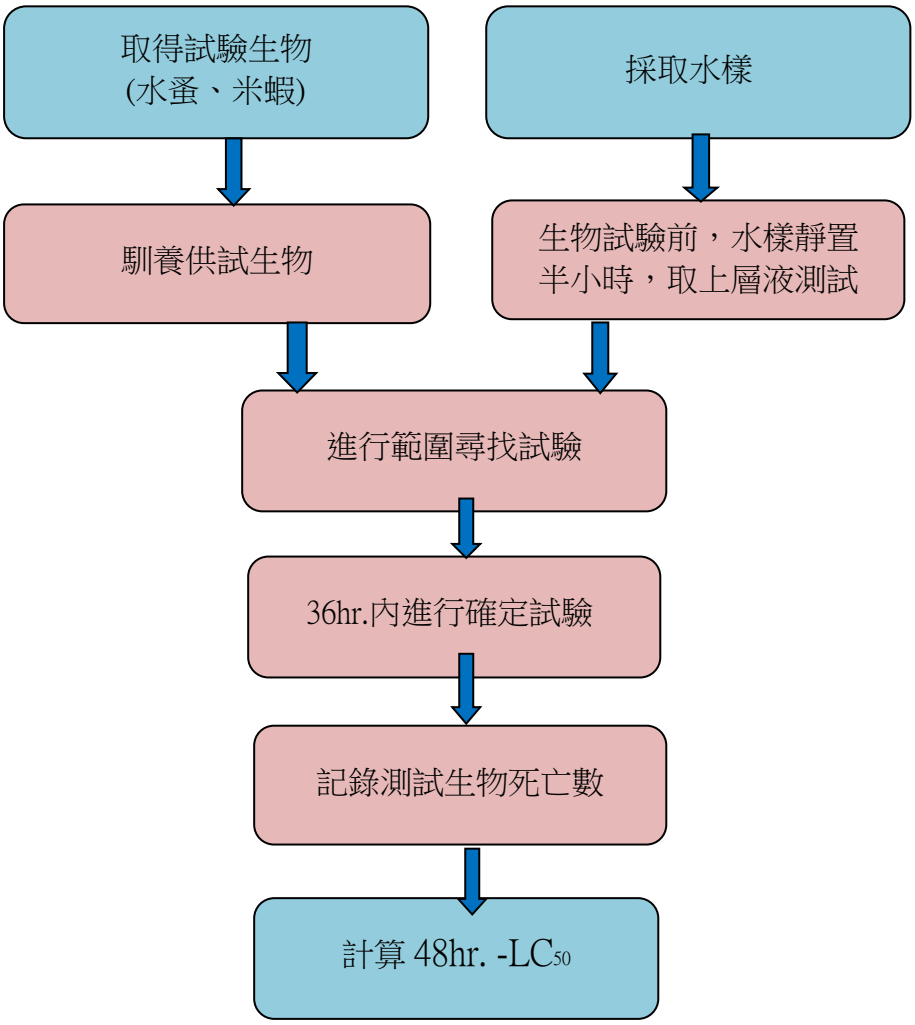


圖 2. 水蚤及米蝦靜水式生物急毒性測試流程

二、方法概要：

使用靜水式生物急毒性試驗方法，以 NaCl 為參考毒物，檢測水蚤及米蝦生物急毒性之半數致死濃度(LC_{50}），計算 48 小時之半數致死濃度（lethal concentration 50%,LC_{50}）。

(一)適用範圍： 適用於地面水體、地下水體、放流水、廢水、污水水源水質及環境用藥之生物急毒性檢測。

(二)試驗魚種：多齒新米蝦(*Neocaridina denticulate*)及巨水蚤(*Daphnia magna*)是由國立嘉義大學淡水生物資源中心提供。

(三)試驗魚種大小：全長 5.0-8.0mm 之多齒新米蝦及時齡不超過 24hr.之水蚤(體長 3.0-5.0mm)。

(四)馴養及毒性試驗室：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。

(五)溫度控制設備：將馴養水溫及試驗水溫控制在 25 ± 2℃ 。

(六)採樣容器：玻璃材質容器。

(七)馴養容器：玻璃或塑膠材質。

(八)試驗容器：2 L 硼矽玻璃燒杯。

(九)馴養水：使用去氯自來水作為馴養水。

(十) 馴養水硬度：應為 80 至 100 mg $CaCO_3$/L，可混合適量之逆滲透水或試劑水進行調整。

三、實驗步驟

(一)試驗準備：

稀釋水 20 L 配製程序如下：

(1) 每 1 L 之試劑水含下列試藥級以上之成分： 碳酸氫鈉（$NaHCO_3$） 96.0 mg，硫酸鎂（$MgSO_4 \cdot 7H_2O$）123.0 mg， 氯化鉀（KCl）4.0 mg，硫酸鈣（$CaSO_4 \cdot 2H_2O$）60.0 mg。

(2)將碳酸氫鈉、硫酸鎂及氯化鉀，依上列配方劑量稱重加入 18 L 試劑水中，曝氣隔夜使試藥充分溶解。稀釋至 20L 劇烈曝氣 12hr，保存勿超過 14 天。

(二)參考毒物 NaCl 之配製：

1. 氯化鈉，試藥級以上。

2. 可根據檢測需求量配製。

(三) 試驗容器及相關器材之清洗：

１.新的塑膠器皿，使用前須用稀釋水潤洗 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。使用前以稀釋水潤洗 1 次。

３.接觸過樣品的玻璃器皿如需重複使用，必須清洗乾淨。

(四) 米蝦及水蚤之馴養：

１.將多齒新米蝦自繁殖場等取回後，放入內盛馴養水之容器中。

２.曝氣，使溶氧維持在 5 mg/L 以上，宜以水循環過濾裝置維護水質，如有死蝦須立即移出；馴養容器內需置放水草或網狀物等供米蝦棲息。

３.馴養之水溫必須與毒性試驗溫度一致，即 25 ± 2℃，光照時間應維持在每天 16 ± 1 小時。

４.馴養時間至少 7 天，毒性試驗開始前 7 天內，期間蝦苗死亡率不得超過 10%，試驗用米蝦全長應為 0.5 至 0.8 公分；水蚤馴養時間至少 3 週。

(五)試驗前之水樣準備：

1.先將水樣靜置半小時，待顆粒沉降後，再取上層液進行試驗。

２.水樣溫度須調整至 25 ± 2℃，米蝦溶氧要高於 3.0 mg/L，水蚤要高於 5.0 mg/L。

(六)待測水質採樣及保存

1.分別至八掌溪嘉義市仁義橋段、牛稠溪嘉義市華興橋段及嘉義市下水道閘門取水樣。

2.採樣時樣品容器須裝至全滿，以減少揮發性物質散失。採樣後立即避光存於 4 ± 2℃ 。

3.水樣必須在採樣後 36 小時內開始進行確定試驗。

(七)範圍尋找試驗（range-finding test）

1.試驗說明: 因不確定樣品之半數致死濃度落在哪一濃度範圍，故先進行範圍尋找試驗。

2. 試驗步驟：

(1)將水樣用藥以稀釋水進行稀釋。每一濃度之試驗水樣體積須 25 mL 以上，以 1 個試驗容器盛裝。

(2)每一濃度之試驗生物總數均為 5 隻。

(3)試驗期間不須餵食，水溫應控制在 25 ± 2℃ ，光照時間應維持每天 16 ± 1 小時。

(4)觀察 8 至 24 小時水蚤與米蝦存活數量並記錄。試驗結果作為確定試驗稀釋濃度之參考。

(八)確定試驗（definitive test）

1.試驗說明：範圍尋找試驗知道 LC_{50} 的落點，可再縮小濃度範圍以確定 LC_{50} 值。

2.試驗步驟：

(1)將水樣或環境用藥以稀釋水稀釋五個濃度(20%、 40%、60%、80% 、100%(原水)，每一濃度之試驗水樣總體積須 100 mL 以上。

(2)稀釋完成後，檢測最高濃度試驗水樣之 pH、溶氧、導電度及餘氯。另須檢測稀釋水之 pH 及導電度。

(3)每一濃度之試驗生物總數均為 20 隻，每一濃度使用 4 個試驗容 器，分別盛裝至少 25 mL 試驗水樣，再各放 5 隻水蚤或米蝦。

(4)空白試驗則取 4 個試驗容器，分別盛裝至少 25 mL 之 100%稀釋水，再放入試驗生物。

(5)試驗期間為 48 小時，開始試驗後，至少於第 2、24 及 48 小時，觀察及移出死亡之米蝦及水蚤並記錄數量。

(6)結束試驗後，須測量並記錄最高濃度試驗水樣之溶氧及 pH，並記錄試驗之最高及最低水溫。

(7)計算 LC_{50} 值。

四、試驗情形(圖 3~5)

a. 巨水蚤*(Daphnia magna)*

b. 巨水蚤之馴養

c. 多齒新米蝦
(Neocaridina denticulate)

d. 多齒新米蝦之馴養

▲圖 3. 多齒新米蝦(*Neocaridina denticulate*)及巨水蚤(*Daphnia magna*)
(由國立嘉義大學淡水生物資源中心提供)

a.配製稀釋水之容器

b.碳酸氫鈉、 硫酸鎂等藥品

c.藥品秤重後加試劑水調配

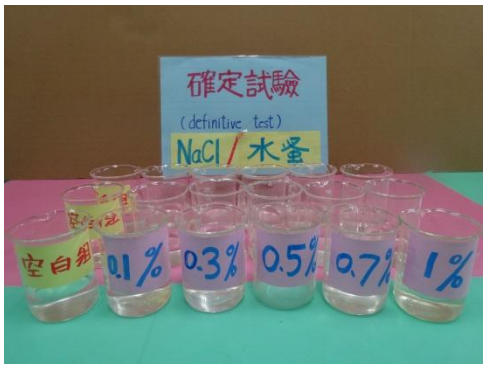
d.稀釋水調配後曝氣曝氣 12hr.

▲圖 4.稀釋水之配製情形

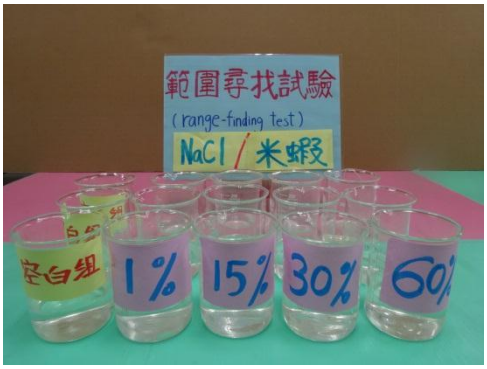
a. 以 NaCl 為參考毒物

b. 以稀釋水調配所需的 NaCl 濃度

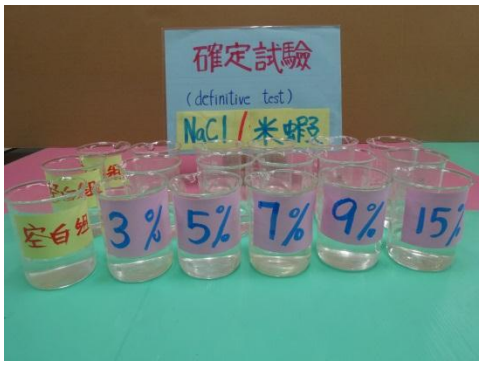
c. 以水蚤與 NaCl 做範圍尋找試驗



d. 以水蚤與 NaCl 做確定試驗



e.以米蝦與 NaCl 做範圍尋找試驗



f.以米蝦與 NaCl 做確定試驗

▲ 圖 5.以 NaCl 為參考毒物做**範圍尋找試驗及確定試驗**情形

第二部份：LC_{50} 測定在水質毒性檢測上之應用~以嘉義市下水道、八掌溪及牛稠溪汙水之檢測為例

一、採樣及保存

(一)放流水採樣方法參照「事業放流水採樣方法（NIEA W109）」之規定，分別至本市世賢路二段與高鐵大道交口附近下水道閘門、牛稠溪華興橋段及八掌溪仁義橋段採水樣。

(二)採樣時樣品容器應裝至全滿，以減少揮發性物質散失。採樣後立即避光保存於 4 ± 2℃。

(三)水樣在採樣後 36 小時內開始於本校科學大樓 3F 進行確定試驗。

二、實驗流程：(圖 6)

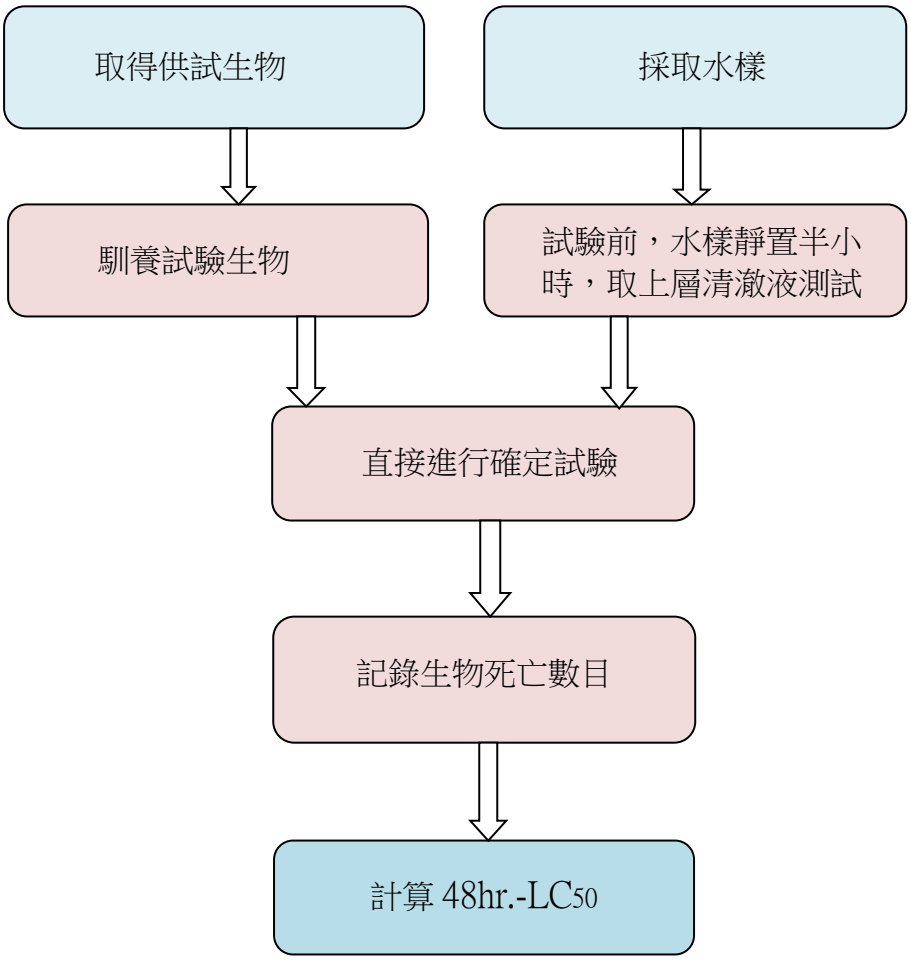


圖 6. 環檢所靜水式生物急毒性測試流程

三、試驗說明

1.依生物急毒性檢測方法內容敘述，地面水體、放流水、廢水及污水等不必進行範圍尋找試驗，可直接做確定試驗，測量 LC_{50} 半數致死濃度。

2.試驗期間水蚤及米蝦不須餵食，水溫應控制在 25 ± 2℃，光照應維持每天 16 ± 1 小時。

四、試驗步驟

1.分別取嘉義市下水道、八掌溪及牛稠溪水樣，以稀釋水進行稀釋，配製 20%、40%、60%、80%及 100%五個濃度。每一濃度之試驗水樣，總體積須 100 mL 以上。

2.稀釋完成後，檢測最高濃度試驗水樣之 pH、溶氧、導電度及餘氯。另須檢測稀釋水之 pH 及導電度。

3 每一濃度之試驗生物總數均為 20 隻，每一濃度使用 4 個試驗容器，分別盛裝至少 25 mL 試驗水樣，再各放 5 隻水蚤或米蝦。

4. 空白試驗則取 4 個試驗容器，分別盛裝至少 25 mL 之 100%稀釋水，再放入試驗生物。

5.試驗期間為 48 小時，開始試驗後，至少於第 2、24 及 48 小時，觀察及移出死亡之米蝦及水蚤並記錄數量。

6.結束試驗後，須測量並記錄最高濃度試驗水樣之 DO 及 pH 值，並記錄試驗期間之最高及最低水溫。

7.計算 48 小時 LC50 半數致死濃度。

五、試驗情形(圖 7~11)

 a.嘉義市下水道放流水閘門	 b. 觀察嘉義市下水道水質惡臭
 c.檢測下水道 DO 值	 d.檢測下水道 pH 值

圖 7.下水道放水閘門採水樣並檢測水質情形。

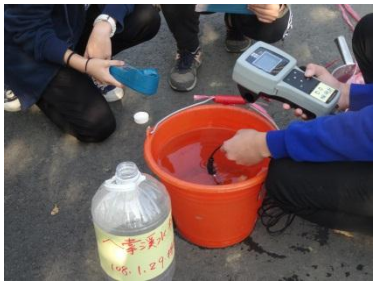
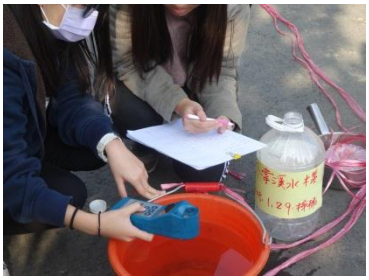
 a.八掌溪仁義橋段放水閘門	 b.八掌溪仁義橋段閘門取樣
 c.檢測八掌溪水樣 DO 值	 d.檢測八掌溪水樣 pH 值

圖 8.八掌溪仁義橋段採水樣並檢測水質情形。

a.牛稠溪水道狹小雜草多

b.牛稠溪華興橋段取水樣

c.檢測牛稠溪水樣 DO 值

d.檢測牛稠溪水樣 pH 值

圖 9.牛稠溪華興橋段採水樣並檢測水質情形。

a.各溪流水樣

b.嘉義市下水道水樣確定試驗

c. 八掌溪水樣做確定試驗

d. 牛稠溪水樣做確定試驗

圖 10. 採回之水樣做範圍尋找試驗及確定試驗情形

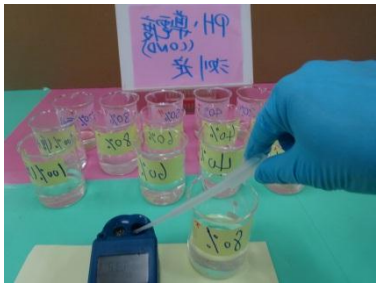
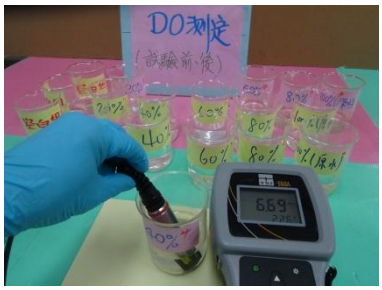
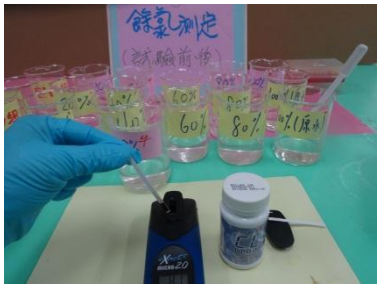
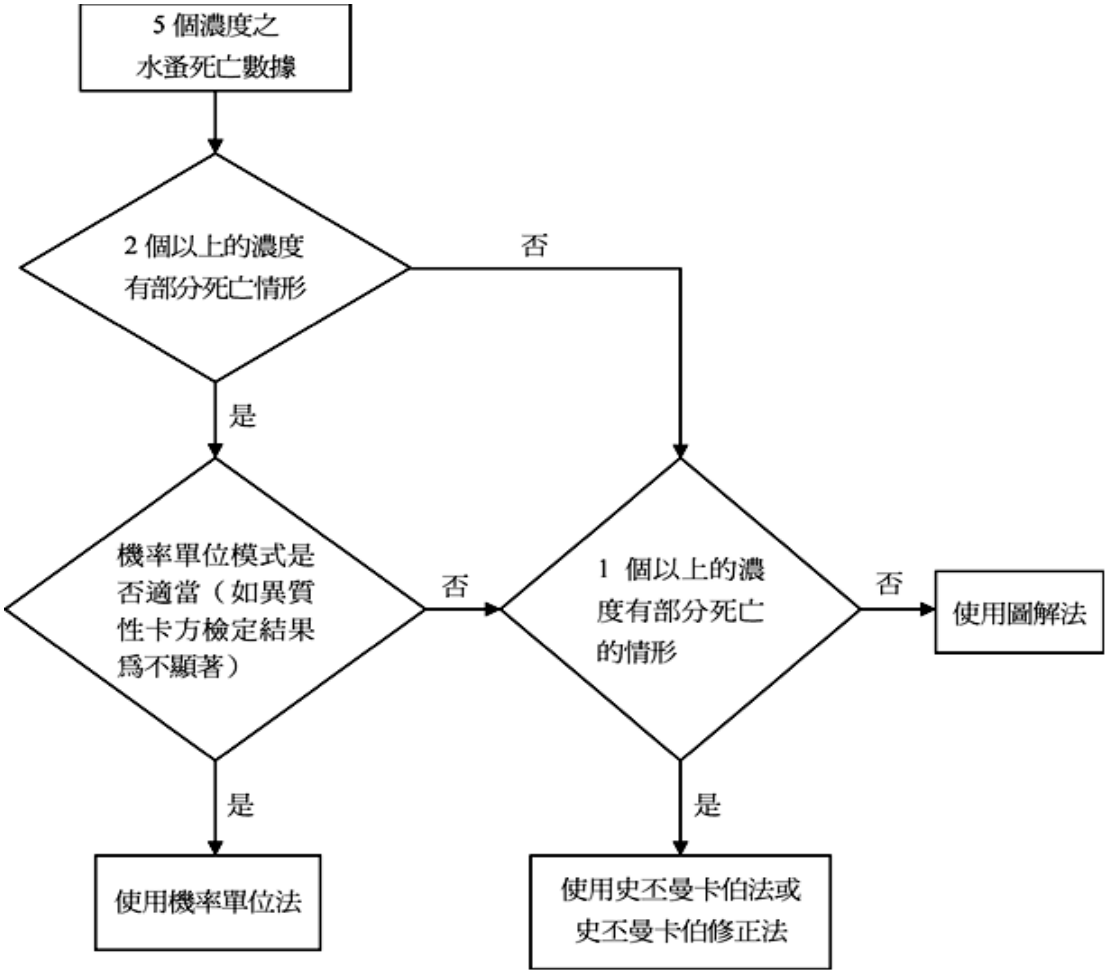
 a.最高濃度試驗水測 pH 值及導電度	 b.最高濃度試驗水測 DO 值
 c.最高濃度試驗水測水溫	 d. 最高濃度試驗水測餘氯值

圖 11. 確定試驗最高濃度試驗水之各項水質項目檢測情形

第三部份：48hr.-LC_{50}之計算方法介紹

一、48 小時 LC_{50}之計算流程：(圖 12)



▲圖 12. 48 小時 LC_{50}之計算流程圖

二、48 小時 LC_{50}之計算方法介紹：

說明：1.參考環保署 102 年 8 月 13 日公告之生物及毒性檢測-水蚤靜水式法，計算 48 小時 LC_{50}值。

2.方法有：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）等四種。方法取捨是由確定實驗之原始數據，依圖 12 之流程作判斷，決定使用的方法。

方法：1.本次研究包含 NaCl 參考毒物確定試驗、嘉義市下水道、八掌溪及牛稠溪水樣確定試驗之實驗原始數據，LC_{50}計算方法取捨，依圖 11 之流程判斷，均可適用機率單位法(probit method)。

2. 將實驗原始資料分別輸入 probit 程式資料，得知查表值＞卡方值，故再確認可選用機率單位法計算 LC_{50}。

三、48 小時 LC_{50}之計算

1. 選用機率單位法計算 LC_{50}。

2.使用 probit 程式輸入各水樣確定實驗之原始數據資料。

3.各溪流水樣計算之 LC_{50}之原始資料呈現於本說明書之附錄(P31~39)。

伍、研究結果

第一部份： NaCl 為參考毒物，以水蚤及米蝦做靜水式生物急毒性檢測，建立 LC_{50} 數值

試驗一、NaCl 為參考毒物之範圍尋找試驗（range-finding test）

(一) 試驗生物：1.多齒新米蝦(*Neocaridina denticulate*)。
2. 水蚤(*Daphnia magna*)

(二) 觀察時間：8~24hr.。

(三) 試驗生物總數：每 一濃度 5 隻。

(四) 試驗濃度：1. 米蝦以 1%、15%、30%及 60%四個濃度。
2. 水蚤以 1%、6%、10%及 20%四個濃度。

(五) 實驗結果：

1. 米蝦對 NaCl **範圍尋找試驗**濃度估計為 15%以下(表 1)。
2. 水蚤對 NaCl **範圍尋找試驗**濃度估計為 1%以下(表 2)。

表 1. NaCl 各濃度範圍尋找試驗米蝦死亡數量之統計

濃度＼時間	3hr.	6hr.	12hr.	24hr
空白實驗	0	0	0	0
1%	0	1	2	2
15%	1	2	3	4
30%	2	3	4	4
60%	2	4	5	5

表 2. NaCl 各濃度範圍尋找試驗水蚤死亡數量之統計

濃度＼時間	3hr.	6hr.	12hr.	24hr
空白實驗	0	0	0	0
1%	0	1	3	4
6%	1	2	4	5
10%	2	3	5	5
20%	2	4	5	5

試驗二、NaCl 為參考毒物之確定試驗（definitive test）

(一) 試驗生物：1.多齒新米蝦(*Neocaridina denticulate*)。
2. 水蚤(*Daphnia magna*)

(二) 觀察時間：48hr.。

(三) 試驗生物總數：每 一濃度 20 隻。

(四) 試驗濃度：1.米蝦以 3%、5%、7%、9%及 15 %五個濃度。
2.水蚤以 0.1%、0.3%、0.5%、0.7%及 1%五個濃度。

(五) 實驗結果：

1. 米蝦與水蚤對 NaCl 參考毒物之檢測之原始數據。(表 3、表 4)
2. 米蝦與水蚤對 NaCl 確定試驗最高濃度試驗水各項水質檢測。(表 5-1、5-2)

表 3. NaCl 各濃度**確定試驗**米蝦**死亡**數量之統計

	2hr.	12hr.	24hr.	48hr
空白實驗	0	0	0	0
3%	0	4	6	6
5%	1	5	8	8
7%	2	5	8	11
9%	3	7	10	13
15%	4	11	13	15
死亡米蝦總數	9	32	44	51

表 4. NaCl 各濃度**確定試驗**水蚤**死亡**數量之統計

	2hr.	12hr.	24hr.	48hr
空白實驗	0	0	0	0
0.1%	0	3	7	9
0.3%	1	5	11	13
0.5%	1	10	12	15
0.7%	1	13	16	18
1%	6	13	15	20
死亡水蚤總數	9	44	61	75

表 5-1 **米蝦** NaCl 確定試驗最高濃度試驗水各項水質檢測

水質檢測項目		pH	導電度	溶氧	餘氯	水溫
稀釋水		7.3	535	5.4	0.1	21℃
試驗水	試驗前	7.1	548	5.3	0.1	21℃
(最高濃度)	試驗後	7.1	550	5.1	0.2	21℃

表 5-2 **水蚤** NaCl 確定試驗最高濃度試驗水各項水質檢測

水質檢測項目		pH	導電度	溶氧	餘氯	水溫
稀釋水		7.3	535	5.4	0.1	20℃
試驗水	試驗前	7.1	548	5.3	0.1	21℃
(最高濃度)	試驗後	7.1	549	5.1	0.2	21℃

第二部份：LC_{50} 測定在水質毒性檢測上之應用~以嘉義市下水道、八掌溪及牛稠溪汙水之檢測為例

確定試驗（definitive test）

試驗一：嘉義市下水道放流水檢測

(一)試驗水樣：嘉義市下水道放流水檢測

(二)試驗生物：1.多齒新米蝦(*Neocaridina denticulate*)。

2. 水蚤(*Daphnia magna*)

(三)觀察時間：48hr.

(四)試驗生物總數：每 一濃度 20 隻。

(五)試驗濃度：20%、40%、60%、80%及 100%五個濃度。

(六)下水道水樣各濃度確定試驗**米蝦**死亡數量之統計(表 6-1)。

下水道水樣各濃度確定試驗**水蚤**死亡數量之統計(表 6-2)。

表 6-1. 下水道水樣各濃度確定試驗米蝦死亡數量之統計

	2hr.	12hr.	24hr.	48hr
空白實驗	0	0	0	0
20%	0	2	9	9
40%	0	3	11	14
60%	2	3	12	15
80%	3	11	13	16
100%(原水)	6	14	16	18
死亡米蝦總數	11	33	61	72

表 6-2. 下水道水樣各濃度確定試驗水蚤死亡數量之統計

	2hr.	12hr.	24hr.	48hr
空白實驗	0	0	0	0
20%	0	0	4	8
40%	0	2	5	10
60%	2	6	11	15
80%	5	7	12	17
100%(原水)	7	11	15	20
死亡水蚤總數	14	26	47	70

試驗二：八掌溪水樣檢測

(一)試驗水樣： 八掌溪仁義橋段水樣

(二)試驗生物：1.多齒新米蝦(*Neocaridina denticulate*)。

2. 水蚤(*Daphnia magna*)

(三)觀察時間：48hr.

(四)試驗生物總數：每 一濃度 20 隻。

(五)試驗濃度：20%、40%、60%、80%及 100%五個濃度。

(六)八掌溪水樣各濃度確定試驗**米蝦**死亡數量之統計(表 7-1)。

八掌溪水樣各濃度確定試驗**水蚤**死亡數量之統計(表 7-2)。

表 7-1.八掌溪水樣各濃度確定試驗米蝦死亡數量之統計

	2hr.	12hr.	24hr.	48hr
空白實驗	0	0	0	0
20%	0	0	1	2
40%	0	1	3	4
60%	0	2	4	6
80%	0	2	6	12
100%(原水)	1	6	11	13
死亡米蝦總數	1	11	25	37

表 7-2.八掌溪水樣各濃度確定試驗水蚤死亡數量之統計

	2hr.	12hr.	24hr.	48hr
空白實驗	0	0	0	0
20%	0	0	3	6
40%	0	2	5	6
60%	1	3	6	8
80%	2	5	7	10
100%(原水)	5	7	11	16
死亡水蚤總數	8	17	32	46

試驗三：牛稠溪水樣檢測

(一)試驗水樣：牛稠溪華興橋段水樣

(二)試驗生物：1.多齒新米蝦(*Neocaridina denticulate*)。

2. 水蚤(*Daphnia magna*)

(三)觀察時間：48hr.

(四)試驗生物總數：每 一濃度 20 隻。

(五)試驗濃度：20%、40%、60%、80%及 100%五個濃度。

(六) 牛稠溪水樣各濃度確定試驗**米蝦**死亡數量之統計(表 8-1)

牛稠溪水樣各濃度確定試驗**水蚤**死亡數量之統計(表 8-2)

表 8-1.牛稠溪水樣各濃度確定試驗米蝦死亡數量之統計

	2hr.	12hr.	24hr.	48hr
空白實驗	0	0	0	0
20%	0	0	0	0
40%	0	0	4	8
60%	4	7	9	11
80%	4	8	12	13
100%(原水)	5	11	12	14
死亡米蝦總數	13	26	37	46

表 8-2.牛稠溪水樣各濃度確定試驗水蚤死亡數量之統計

	2hr.	12hr.	24hr.	48hr
空白實驗	0	0	0	0
20%	0	0	3	6
40%	0	2	5	9
60%	1	4	8	10
80%	3	6	9	12
100%(原水)	5	10	13	17
死亡水蚤總數	9	22	38	54

試驗四：確定試驗最高濃度試驗水各項水質檢測(表 9-1~9-6)

表 9-1.下水道水樣 確定試驗最高濃度試驗水質檢測(米蝦)

水質檢測項目		pH	導電度	溶氧	餘氯	水溫
稀釋水		7.3	535	5.4	0.2	20℃
試驗水	試驗前	6.7	706	3.5	0.2	20℃
(最高濃度)	試驗後	7.2	700	3.0	0.2	20℃

表 9-2.下水道水樣 確定試驗最高濃度試驗水質檢測(水蚤)

水質檢測項目		pH	導電度	溶氧	餘氯	水溫
稀釋水		7.3	535	5.4	0.1	20℃
試驗水	試驗前	6.7	706	3.5	0.2	20℃
(最高濃度)	試驗後	7.4	699	3.1	0.2	20℃

表 9-3.八掌溪水樣 確定試驗最高濃度試驗水質檢測(米蝦)

水質檢測項目		pH	導電度	溶氧	餘氯	水溫
稀釋水		7.3	535	5.4	0.1	19℃
試驗水	試驗前	7.1	663	5.4	0.1	19℃
(最高濃度)	試驗後	7.2	829	5.0	0.1	19℃

表 9-4. 八掌溪水樣 確定試驗最高濃度試驗水質檢測(水蚤)

水質檢測項目		pH	導電度	溶氧	餘氯	水溫
稀釋水		7.3	535	5.4	0.1	19℃
試驗水	試驗前	7.1	663	5.4	0.1	19℃
(最高濃度)	試驗後	7.9	820	5.0	0.1	19℃

表 9-5. 牛稠溪水樣 確定試驗最高濃度試驗水質檢測(米蝦)

水質檢測項目		pH	導電度	溶氧	餘氯	水溫
稀釋水		7.3	535	5.4	0.1	20℃
試驗水	試驗前	6.4	1330	3.7	0.2	20℃
(最高濃度)	試驗後	7.6	1090	3.2	0.2	20℃

表 9-6. 牛稠溪水樣 確定試驗最高濃度試驗水質檢測(水蚤)

水質檢測項目		pH	導電度	溶氧	餘氯	水溫
稀釋水		7.3	535	5.4	0.1	20℃
試驗水	試驗前	6.4	1330	3.7	0.2	20℃
(最高濃度)	試驗後	7.4	1090	3.2	0.2	20℃

第三部份：48hr.-LC_{50}之計算實驗

(輸入 probit 程式之原始資料，詳見附錄 P31-39)

一、米蝦與水蚤對 NaCl 參考毒物確定試驗 48hr.-LC_{50}之計算(表 10)

(一)結果： LC_{50} 如表 10 所示，

米蝦對 NaCl 參考毒物 LC_{50} 約 6%。

水蚤對 NaCl 參考毒物 LC_{50} 約 0.14%。

(二)說明：LC_{50} 水蚤較低，表示水蚤對毒性物質汙染之敏感度較高。

表 10. 米蝦與水蚤對 NaCl 參考毒物確定試驗 48hr.-LC_{50} 之計算結果

試驗生物 / 項目	米蝦	水蚤
分析方法	機率單位法	機率單位法
分析軟體	probit、dosBox0.74-win32-installer.zip	probit、dosBox0.74-win32-installer.zip
查表值	7.815	7.815
卡方值	0.221	3.158
48hr.-LC_{50}	6.102% (約 6%)	0.144% (約 0.14%)
備註	1.查表值＞卡方值，故選用機率單位法計算 LC_{50} 2.probit 程式輸入實驗原始資料，詳見附錄(一、二)。	

二、米蝦對嘉義市下水道、八掌溪及牛稠溪之確定試驗 48hr.-LC50 計算結果

(一)結果：48hr.-LC50 如表 11 所示，原始資料詳見附錄(三~八)。

八掌溪(約 75%)＞牛稠溪(約 60%)＞嘉義市下水道(約 23%)

(二)說明：LC_{50} 數值越高，表示水質遭受毒性物質汙染越低；由此得知水質汙染程度是：嘉義市下水道＞牛稠溪＞八掌溪

表 11. 米蝦對嘉義市下水道、八掌溪及牛稠溪之確定試驗 48hr.-LC50 計算結果

水樣 / 項目	嘉義市下水道	八掌溪	牛稠溪
分析方法	機率單位法	機率單位法	機率單位法
分析軟體	Probit 程式	Probit 程式	Probit 程式
查表值	7.815	7.815	7.815
卡方值	0.45	1.793	3.270
48hr.-LC_{50}	22.966 %(約 23%)	75.170 %(約 75%)	59.61%(約 60%)

三、水蚤對嘉義市下水道、八掌溪及牛稠溪之確定試驗 48hr.-LC50 計算結果

(一)結果：48hr.-LC50 如表 12 所示，原始資料詳見附錄(P34-39)。

八掌溪(約 61%)＞牛稠溪(約 46%)＞嘉義市下水道(約 30%)

(二)說明：1. LC50 數值越高，表示水質遭受毒性物質汙染越低；

由此得知 水質汙染程度是：

嘉義市下水道＞牛稠溪＞八掌溪

2.由實際檢測的 LC50 數據得知：以試驗生物水蚤所得之 LC50 測定值大多低於米蝦之測定值，由此顯示水蚤對水質毒性污染的敏感度高於米蝦。

表 12 水蚤對嘉義市下水道、八掌溪及牛稠溪之確定試驗 48hr.-LC50 計算結果

水樣 項目	嘉義市下水道	八掌溪	牛稠溪
分析方法	機率單位法	機率單位法	機率單位法
分析軟體	Probit 程式	Probit 程式	Probit 程式
查表值	7.815	7.815	7.815
卡方值	4.088	4.927	2.668
48hr.-LC_{50}	30.331%(約 30%)	60.960 %(約 61%)	45.548% (約 46%)

陸、討論

一、米蝦及水蚤靜水式法生物急毒性檢測

本次用以試驗之魚種，多齒新米蝦(*Neocaridina denticulate*)與巨水蚤(*Daphnia magna*)是承蒙國立嘉義大學淡水生物資源中心提供，使實驗得以順利進行。試驗蝦種必須確認為多齒新米蝦，不可混合其他品種；執行毒性試驗後之試驗生物不得重複使用。試驗之米蝦與水蚤須經馴養，米蝦全長 0.5 至 0.8 公分，水蚤全長 0.3 至 0.5 公分。

米蝦移入試驗容器，試驗期間米蝦不得餵食；水蚤於試驗開始之前 2 小時需先餵食。水溫應控制在 25 ± 2℃，光照應維持每天 16 ± 1 小時。取水樣時應先使待測水樣靜置半小時，使粗顆粒沈降後，再取上層澄清溶液進行試驗，以減少實驗誤差。

自來水可使用活性碳過濾或曝氣等方式去氯，但不可使用化學藥劑去氯。水蚤移入時，務必先將廣口滴管伸至液面下再緩緩將水蚤吸入，以避免水蚤受傷或被氣泡留滯於液面而死亡。水蚤族群幾乎都由雌蚤組成，一般為孤雌生殖，夏卵會在育兒室中直接發育為小水蚤。只有當族群感受到壓力，如溫度急遽變化、族群密度過高、食物不足或廢棄物累積，才會造成雄蚤數量上升並產生受精卵（冬卵）。冬卵的特徵為周圍有堅硬的卵鞍（Ephippium）保護，於水蚤蛻殼時排出並沉於水底。

水樣溫度須調整至 25 ± 2℃。若回溫後溶氧低於 3.0 mg/L，應對水樣溫和曝氣，使溶氧升至 3.0 mg/L 以上；另取樣回檢驗室應保存於 5℃的冷藏室，避免照光變質，水樣並應於 36hr.內檢測完畢。

二、範圍尋找試驗（range-finding test）

若不確定樣品之半數致死濃度落於哪一濃度範圍，應先進行範圍尋找試驗。放流水生物急毒性檢測則不須進行範圍尋找試驗。建議可將水樣或環境用藥以稀釋水適度進行 10 倍序列稀釋。每一濃度之試驗水樣體積須 1L 以上，以一個試驗容器盛裝，每一濃度之試驗生物總數均為 5 隻。觀察 8 至 24 小時，記錄米蝦存活數，試驗結果作為確定試驗稀釋濃度之參考。

三、確定試驗（definitive test）

操作確定實驗以計算 LC_{50}，需同時做空白試驗，取 2 個試驗容器，分別盛裝至少 1 L 之 100%稀釋水，各放入 10 隻經馴養且全長 0.5 至 0.8 公分之米蝦，作為空白實驗，實驗期間為 48 小時，水溫應控制在 25 ± 2℃，光照應維持每天 16 ± 1 小時。

將水樣或環境用藥以稀釋水適度稀釋為 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 個固定濃度進行試驗（100%、80%、60%、40%及20%）。每一濃度之試驗水樣，總體積須 2L 以上，以 2 個試驗容器平均盛裝。

另稀釋完成後，應立即檢測最高濃度試驗水樣之 pH、溶氧、導電度及餘氯。另須檢測稀釋水之 pH 及導電度。每一濃度之試驗生物總數均為 20 隻。為易於觀察水蚤活動，每一濃度使用 4 個試驗容器，分別盛裝至少 25 mL 之試驗水樣，再以廣口滴管各放 5 隻時齡不超過 24 小時之水蚤。

以水蚤做空白試驗時，則取 4 個試驗容器，分別盛裝至少 25 mL 之 100%稀釋水，再以廣口滴管各放 5 隻時齡不超過 24 小時水蚤。 試驗期間為 48 小時，觀察 48 小時水蚤存活數量並記錄。存活數量之計算方式係將試驗水樣輕微擾動，觀察水蚤是否仍會活動。

四、魚半致死率濃度在水質毒性檢測上之應用

生物急毒性檢測方法－米蝦靜水式法，本方法主要是以多齒新米蝦（*Neocaridina denticulata*）為試驗生物，以靜水式生物毒性試驗方法，檢測生物急毒性，並計算 48 小時之半數致死濃度（lethal concentration 50%, LC_{50}）。本方法適用於地面水體、地下水體、放流水、廢水、污水、水源水質及環境用藥之生物急毒性檢測；經利用實驗所得到的 LC_{50}，用來檢測本市下水道放流水和八掌溪水質，很迅速的瞭解這兩處，已遭受汙染。

用同一試驗生物檢測不同溪水之水樣時，若 LC_{50} 數值越高，表示水質遭受毒性物質汙染程度越低。

五、其他

生物毒性測試所採用之試驗生物應具備靈敏性高、明確毒性效應指標、良好的毒性反應、普遍性、容易取得與飼養和符合經濟成本等。常見之放流水生物毒性測試，依據測試時間長短可以分 為急毒性和慢毒性兩種，急毒性測試時間一般為 24~96 小時，慢毒性測試時間則可長達數月，甚至數年。以靜水式急毒性測試方法為例，進行測試前，須先馴養受測生物，於採樣後 36 小時內先進行範圍尋找試驗（Range Finding Test），之後再進行確定試驗（ Definitive Test），試驗係將原水樣以稀釋水稀釋為五個濃度，計算不同觀察時間受測生物死亡數量，再計算該水樣之 LC_{50}，若放流水毒性測試 LC_{50} 值越小表示該廢水急毒性愈大，對水生生物將造成越大危害。

使用機率單位法計算 LC_{50} 之條件必須(一) 5 個試驗濃度之死亡百分率，須有至少一個≧50%，及至少一個≦50%。(二) 5 個試驗濃度須有 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%。且 查表值須大於卡方值。

柒、結論

依實驗所測得之 LC_{50} 數值，初步得知本市下水道、八掌溪仁義橋段及牛稠溪華興橋段之水質已遭受污染；而本市下水道水質汙染的程度最嚴重，牛稠溪次之，八掌溪較輕微。這些受汙染的水質它對水中生物造成危害，若能建立完整的 LC_{50} 檢測數據資料，提供工業、養殖業、農業或其他事業用水之參考，則更深具意義與實用。

捌、參考資料

1.國中自然與生活科技，第一冊，2018，康軒出版社。

2.生物急毒性檢測方法－水蚤靜水式法，中華民國 102 年 8 月 13 日環署檢字第 1020069337 號公告 (NIEA B901.14B)。

3.生物急毒性檢測方法—米蝦靜水式法，中華民國 102 年 8 月 13 日環署檢字第 1020069444 號公告(NIEA B905.13B)

4. 陳弘成，1994，魚類毒性試驗標準方法之研究，環境檢驗所委託研究報告 EPA-83-E3S5-09-03-02

5.李俊宏、王漢泉、吳嘉玲、王正雄，2002，新竹縣地區事業廢水生物毒性試驗研究，環境檢驗所環境調查研究年報，57~186。

6.劉貞材，2004 生物指標於水質毒性檢測之相關研究分析，國立成功大學水利及海洋工程研究所碩士論文。

7.事業放流水採樣方法(NIEA W109)，中華民國，98,5,11 環署檢字第 0980040837 號。

8.李俊宏、柳家瑞，1994，魚類急毒性試驗研究，環保署環境檢驗所環境調查研究年報第 2 號。

9. 行政院環保署環境檢驗所，2005，原水水質魚類毒性測試規範。

附錄資料：輸入 probit 程式之 LC_{50} 計算原始資料

附錄一（說明書--表 3）

【米蝦--NaCl 參考毒物確定試驗 48hr.-LC_{50} 之計算結果】

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

Conc.	Number Exposed	Number Resp.	Observed Proportion Responding	Proportion Responding Adjusted for Controls
3.0000	20	6	0.3000	0.3000
5.0000	20	8	0.4000	0.4000
7.0000	20	11	0.5500	0.5500
9.0000	20	13	0.6500	0.6500
15.0000	20	15	0.7500	0.7500

Chi- Square for Heterogeneity (calculated) = 0.221(卡方值)
Chi- Square for Heterogeneity
(tabular value at 0.05 level) = 7.815(查表值)

Estimated LC/EC Values and Confidence Limits

Point	Exposure Conc.	95% Confidence Limits Lower	Upper
LC/EC 1.00	0.321	0.003	1.046
LC/EC 50.00	6.102	3.803	8.762

附錄二（說明書--表 4）

【水蚤--NaCl 參考毒物確定試驗 48hr.-LC_{50}之計算結果】

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

Conc.	Number Exposed	Number Resp.	Observed Proportion Responding	Proportion Responding Adjusted for Controls
0.1000	20	9	0.4500	0.4500
0.3000	20	13	0.6500	0.6500
0.5000	20	15	0.7500	0.7500
0.7000	20	18	0.9000	0.9000
1.0000	20	20	1.0000	1.0000

Chi - Square for Heterogeneity (calculated) = 3.158(卡方值)

Chi - Square for Heterogeneity
(tabular value at 0.05 level) = 7.815(查表值)

Estimated LC/EC Values and Confidence Limits

Point	Exposure Conc.	95% Confidence Limits Lower	Upper
LC/EC 1.00	0.007	0.000	0.025
LC/EC 50.00	0.144	0.061	0.219

附錄三（說明書--表 6-1）

【米蝦--嘉義市下水道水樣各濃度確定試驗 48hr.-LC50 計算結果】

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

Conc.	Number Exposed	Number Resp.	Observed Proportion Responding	Proportion Responding Adjusted for Controls
20.0000	20	9	0.4500	0.4500
40.0000	20	14	0.7000	0.7000
60.0000	20	15	0.7500	0.7500
80.0000	20	16	0.8000	0.8000
100.0000	20	18	0.9000	0.9000

Chi - Square for Heterogeneity (calculated) = 0.450(卡方值)
Chi - Square for Heterogeneity
(tabular value at 0.05 level) = 7.815(查表值)

Estimated LC/EC Values and Confidence Limits

Point	Exposure Conc.	95% Confidence Limits Lower	Upper
LC/EC 1.00	1.135	0.003	4.804
LC/EC 50.00	22.966	6.460	34.377

附錄四（說明書--表 6-2）

【水蚤--嘉義市下水道水樣各濃度確定試驗 48hr.-LC_{50}計算結果】

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

Conc.	Number Exposed	Number Resp.	Observed Proportion Responding	Proportion Responding Adjusted for Controls
20.0000	20	8	0.4000	0.4000
40.0000	20	10	0.5000	0.5000
60.0000	20	15	0.7500	0.7500
80.0000	20	17	0.8500	0.8500
100.0000	20	20	1.0000	1.0000

Chi - Square for Heterogeneity (calculated) = 4.088(卡方值)
Chi - Square for Heterogeneity
(tabular value at 0.05 level) = 7.815(查表值)

Estimated LC/EC Values and Confidence Limits

Point	Exposure Conc.	95% Confidence Limits Lower	Upper
LC/EC 1.00	4.122	0.637	8.795
LC/EC 50.00	30.331	19.380	39.084

附錄五（說明書--表 7-1）

【米蝦—八掌溪水樣各濃度確定試驗 48hr.-LC_{50}計算結果】

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

Conc.	Number Exposed	Number Resp.	Observed Proportion Responding	Proportion Responding Adjusted for Controls
20.0000	20	2	0.1000	0.1000
40.0000	20	4	0.2000	0.2000
60.0000	20	6	0.3000	0.3000
80.0000	20	12	0.6000	0.6000
100.0000	20	13	0.6500	0.6500

Chi - Square for Heterogeneity (calculated) = 1.793(卡方值)
Chi - Square for Heterogeneity
(tabular value at 0.05 level) = 7.815(查表值)

Estimated LC/EC Values and Confidence Limits

Point	Exposure Conc.	95% Confidence Limits Lower	Upper
LC/EC 1.00	9.707	1.654	18.185
LC/EC 50.00	75.170	59.351	110.000

附錄六（說明書--表 7-2）

【水蚤—八掌溪水樣各濃度確定試驗 48hr.-LC50 計算結果】

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

Conc.	Number Exposed	Number Resp.	Observed Proportion Responding	Proportion Responding Adjusted for Controls
20.0000	20	6	0.3000	0.3000
40.0000	20	6	0.3000	0.3000
60.0000	20	8	0.4000	0.4000
80.0000	20	10	0.5000	0.5000
100.0000	20	16	0.8000	0.8000

Chi - Square for Heterogeneity (calculated) = 4.927(卡方值)

Chi - Square for Heterogeneity
(tabular value at 0.05 level) = 7.815(查表值)

Estimated LC/EC Values and Confidence Limits

Point	Exposure Conc.	95% Confidence Limits Lower	Upper
LC/EC 1.00	2.198	0.004	8.117
LC/EC 50.00	60.960	40.522	110.898

附錄七（說明書--表 8-1）

【米蝦—牛稠溪水樣各濃度確定試驗 48hr.-LC50 計算結果】

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

Conc.	Number Exposed	Number Resp.	Observed Proportion Responding	Proportion Responding Adjusted for Controls
20.0000	20	0	0.0000	0.0000
40.0000	20	8	0.4000	0.4000
60.0000	20	11	0.5500	0.5500
80.0000	20	13	0.6500	0.6500
100.0000	20	14	0.7000	0.7000

Chi- Square for Heterogeneity (calculated) = 3.270(卡方值)
Chi- Square for Heterogeneity
(tabular value at 0.05 level) = 7.815(查表值)

Estimated LC/EC Values and Confidence Limits

Point	Exposure Conc.	95% Confidence Limits Lower	Upper
LC/EC 1.00	11.513	3.705	18.906
LC/EC 50.00	59.615	48.459	73.944

附錄八（說明書--表 8-2）

【水蚤—牛稠溪水樣各濃度確定試驗 48hr.-LC_{50}計算結果】

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

Conc.	Number Exposed	Number Resp.	Observed Proportion Responding	Proportion Responding Adjusted for Controls
20.0000	20	6	0.3000	0.3000
40.0000	20	9	0.4500	0.4500
60.0000	20	10	0.5000	0.5000
80.0000	20	12	0.6000	0.6000
100.0000	20	17	0.8500	0.8500

Chi- Square for Heterogeneity (calculated) = 2.668(卡方值)
Chi - Square for Heterogeneity
(tabular value at 0.05 level) = 7.815(查表值)

Estimated LC/EC Values and Confidence Limits

Point	Exposure Conc.	95% Confidence Limits Lower	Upper
LC/EC 1.00	2.337	0.026	7.615
LC/EC 50.00	45.548	27.748	64.516