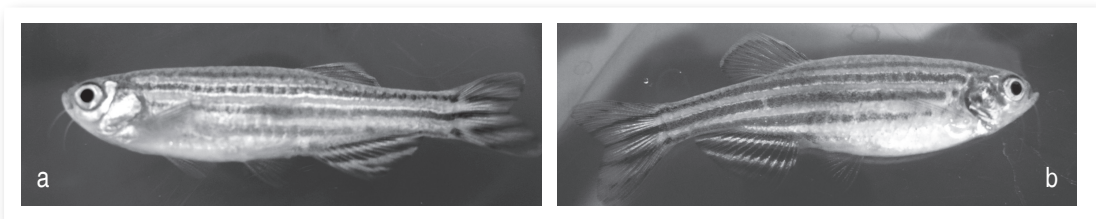


以斑馬魚生理變化偵測 水中毒性物質技術研發



附圖 水生急毒性試驗魚種斑馬魚。(a) 雄魚；(b) 雌魚。

一. 前言

適當的使用農藥，可有效地減少農作物病蟲害及提高產量。目前由於化學農藥具有使用方便、價格便宜及效果顯著等特性，因此被廣泛運用在農林業上。然而當人類普遍使用化學農藥來提高作物產量及品質時，常會忽略過度或不正確地使用農藥時，造成對水域環境污染的影響。水耕作物包括水稻、水芋、茭白筍、菱角等，由於其水田耕作的特性，若農藥使用不當，容易污染附近水域，而受到污染的水匯入河流系統時，長久累積下來不但破壞環境生態及影響水生生物的正常生長，甚至對人類健康產生威脅並增加社會成本的負擔。因此，在進行農藥登記時政府相關單位必須嚴格把關，要求申請廠商提供水生急毒性的試驗報告做為佐證，當農藥具有潛在的水生毒性時，得加註警語或直接禁止其使用於水耕環境，以維護國內的水生環境，降低受農藥污染之疑慮。

目前國際間對於水生脊椎動物的急毒性試驗報告，大多使用魚類做為試驗體。常用的淡水試驗魚種包括斑馬魚（zebrafish）、胖頭鱻（fathead minnow）、青鱗魚（ricefish）、翻車魚（bluegill）、虹鱒（rainbow trout）等魚種。我國將物質依據其水生生物毒性強弱（半致死濃度， LC_{50} ）分成劇毒、中等毒、輕毒及低毒四大類。

本文以斑馬魚（附圖）為例，簡要介紹斑馬魚的特色與應用範圍，並說明水生急毒性試驗流程及常見之魚類對毒性物質的生理變化。希望藉由本篇簡單的介紹，有助於國人對水生急毒性試驗有所認識。

二. 斑馬魚的特色與應用

斑馬魚是經濟合作發展組織（Organization of Economic Cooperation and Development, OECD）所推薦使用於水生急毒性試驗的魚種之一，由於斑馬魚的體型小，成魚長度大約介在1-1.5英吋之間，

因此所需要的飼育空間及飼養花費少，試驗上所需要的化學藥劑量也少，相對地實驗室的費用支出亦少。此外，斑馬魚的生育量高，一對成魚交配後，雌魚可產下100-200顆卵，若環境適宜，雌魚仍可維持該產卵量5-7天。另一方面斑馬魚的受精卵呈現透明無色的外觀，容易和未受精的卵做區別，便於人員繁殖配種及維持一定的數量。

此外，由於生物技術的進步，已建立了完整的斑馬魚基因資料庫供研究人員利用，因此目前斑馬魚除使用在水生急毒性試驗之外，也被廣泛應用在生殖毒性、肌肉毒性、神經毒性、致腫瘤性、環境荷爾蒙、組織器官發育、分子生物學等研究領域，已成為一種水生脊椎模式動物。

三. 斑馬魚急毒性試驗

經濟合作發展組織『魚類急毒性試驗』指引(*OECD Guidelines for Testing of Chemicals. Guideline 203: Fish, Acute Toxicity Test. Adopted*)與美國環保署『淡水和海水魚之急毒性試驗』指引(*USEPA Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.1075: Fish Acute Toxicity Test, Freshwater and Marine*)都推薦的斑馬魚作為供試魚種，來檢測試驗物質對斑馬魚之96小時急性致死毒性，求取半數致死濃度(LC₅₀)，可供評估試驗物質對淡水脊椎動物毒性的影響。試驗液更新法(Static-Renewal)利用1.5-5月齡(約1-3公分)的斑馬魚檢測水中農藥、環衛用藥、或化學品之水生毒性，以供環境安全評估用，方法如下：

1. 試驗流程

(1) 挑選試驗魚隻—供試魚使用1.5-5月齡，體長約2±1公分之健康魚苗。

(2) 試驗物質之配製—依照該物質之使用方法先以有機溶劑(如丙酮、DMSO…等)溶解，再以養殖水配製或直接調配於養殖水中。

(3) 供試魚隻置入含試驗物質之試驗缸中—每個試驗缸中分配10尾斑馬魚，且含藥試驗液之總體積為10公升。

(4) 魚苗暴露於含藥試驗液中96小時—投藥之後每隔24小時更換80%含藥試驗液，直到第96小時試驗結束。

(5) 臨床症狀觀察記錄—在藥劑投予後第3、6、24、48、72和96小時記錄斑馬魚之死亡數與觀察存活魚隻行為是否異常。

(6) 水質檢測—在投藥後第0、24、48、72和96小時取出水樣檢測水質並作記錄，檢測項目包括空氣飽和度、硬度、溫度、電導度與酸鹼值。

(7) 統計死亡率並計算LC₅₀—統計各處理濃度於96小時試驗期間之魚隻死亡總數，再以Probit軟體分析估算LC₅₀值及95%可信賴區間。

表1 我國水生毒性分類

水生生物 毒性分類	淡水魚類*急毒性 LC ₅₀ (96hr) (單位: mg/l)
劇毒	≤ 1
中等毒	1<~ ≤ 10
輕毒	10~ ≤ 100
低毒	> 100

*淡水魚類：以虹鱒(Rainbow trout)、藍鰓(Bluegill)或鯉魚(Carp)為主。

依照我國農藥對水生生物毒性規範，可將物質依據其水生生物毒性強弱分成四大類。(如表1)

2. 常見斑馬魚對毒性物質的生理變化

試驗期間試驗物質對斑馬魚的影響，可在投藥後第3、6、24、48、72和96小時觀察其癥狀。死亡斑馬魚之判定：沉於缸底或漂浮於水面之魚隻，以玻棒輕觸魚體，若不能引發魚體活動者視為死亡，並即刻撈除，放入生物危險標誌專用袋內，以免影響水質。除發現死亡外，其他之癥狀可與對照組比較其外觀、行為與姿勢是否異常。(如表2)

四. 結論

在化學品核准登記前，進行魚類急毒性試驗結果可提供評估化學品對水生環境安全的資訊，具有重要的意義並可供核准登記參考，防患化學物質流入水體累積後對水生環境所造成的影響。此外，水生無脊椎動物毒性試驗(例如水蚤、蝦類)及水生植物毒性試驗(例如藻類)也是國際間進行水生環境安全評估之重要參考依據。本文透過簡要敘述水生急毒性試驗，使大家瞭解水生環境安全評估之重要性，並加深使用合法登記農藥之觀念，避免化學物質污染水體，以維護水生環境。☘

表2 斑馬魚對水中毒性物質之生理變化

項 目	說 明
一切正常	魚的外觀、行為與姿勢皆正常
死亡觀察	
發現死亡	以外物碰觸魚體皆不能引發反應者
瀕死	外物觸碰也不易引起反應
外觀	
變色	魚的軀體顏色深或淡於正常者
立鱗	鱗片豎立，嚴重者宛如松果狀
脫鱗	鱗片脫落
突眼	眼球不正常突出眼窩
出血	肉眼可見皮下明顯之出血點
腹部膨脹	肉眼可見腹部明顯膨脹
消瘦	魚體明顯變瘦
脊柱側彎	脊柱成彎曲狀
魚體或魚鰭有傷口	魚的體表或魚鰭可觀察到傷口或磨損
胸鰭前傾	胸鰭往前打開
鰓蓋往前打開	鰓蓋往前打開
行為與姿勢	
不活潑	自發性活動大幅減少
激動性增加	易受干擾而使活動大幅增加
失去平衡	泳姿失去平衡感
呼吸不正常	持續不斷的張嘴呼吸
厭食	失去食慾
離群	魚隻離群
衝撞魚缸	魚以頭吻部撞擊魚缸壁
沈於魚缸底部	魚大多位於底部，除非外力干預才會上浮，但旋即又沈於底部
浮於魚缸上方	魚大多位於近水面處，除非外力干預才會下沉，但旋即又浮於水面
腹部上翻游動	游泳時腹部朝上
側面向上游動	游泳時側面朝上
翻轉游動	魚體以上下滾翻之泳姿前進
側面朝上平躺於底部	魚體以側面平躺於缸底
腹部上翻平躺於底部	魚體以背面平躺於缸底
頭重尾輕的浮游	魚頭向下魚尾朝上的游動
尾重頭輕的仰游	魚尾向下魚頭朝上的游動
身體或鰭發生抽搐	魚體或魚鰭不自主的抽動
魚受驚後不自主的快速環游	魚受到驚嚇後快速呈環狀游動
不規則且不協調的游動	魚時而仰游、時而翻轉、時而正常的游動
痙攣、抽搐及快速游動	魚快速游動並伴隨著肌肉不自主的收縮
長時間的靜息	魚長時間靜止不動，甚至外界干擾也無動於衷